

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

**ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE  
ISOVALTRATO EN EXTRACTO DE HOJA Y RAÍZ  
DE VALERIANA (*Valeriana prionophylla* Standl.) DE  
DOS LOCALIDADES DIFERENTES DE  
GUATEMALA**

**DAVINSON JAVIER RIQUETT ROBLES**

**MAESTRÍA MULTIDISCIPLINARIA EN  
PRODUCCIÓN Y USO DE PLANTAS MEDICINALES**

**Guatemala, noviembre de 2,007**

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

**ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE  
ISOVALTRATO EN EXTRACTO DE HOJA Y RAÍZ  
DE VALERIANA (*Valeriana prionophylla* Standl.) DE  
DOS LOCALIDADES DIFERENTES DE  
GUATEMALA**

Informe de tesis  
Presentado por

**DAVINSON JAVIER RIQUETT ROBLES**

**Para optar al título de  
MAESTRÍA EN ARTES MULTIDISCIPLINARIA, EN  
PRODUCCIÓN  
Y USO DE PLANTAS MEDICINALES**

**Guatemala, noviembre de 2,007**

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

**JUNTA DIRECTIVA**

Oscar 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 ACADÉMICO**

**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D., DECANO  
Licda. Anne Liere de Godoy, M.sc.  
Dr. Jorge Luis De León Arana  
Dr. Jorge Erwin López Gutiérrez  
Félix Ricardo Veliz Fuentes, M.Sc.



## AGRADECIMIENTOS

- A MI ASESORA Licda. M.A. Sully Cruz, por compartir conmigo sus conocimientos científicos y ayudarme en la culminación de esta Maestría.
- A MI ASESOR Lic. Armando Cáceres, por compartir conmigo sus conocimientos científicos y ayudarme en la culminación de esta Maestría.
- A MIS PROFESORES Ing. Alvaro Orellana, Lic. Benito Soler, Licda. Sully Cruz, Lic. Armando Cáceres, Ing. Vicente Martínez, Lic. Linneo, Licda. Maria Eugenia Paredes, Dr. Oscar Cobar, Lic. Rodolfo Orozco.
- A MIS COMPAÑEROS Ing. Benjamín Piedra Santa, Ing. Francisco Aldana, Dr. Edwin Cann, Dr. Angel Quiñónez y Lic. Juan Carlos Garrido, por apoyarme en el transcurso de este proyecto y brindarme su apoyo.
- A LA UNIVERSIDAD  
SAN CARLOS DE  
GUATEMALA Por brindarme la oportunidad de pertenecer a ella.

## INDICE

<b>TEMA</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Definición del problema	3
4. Justificación	4
5. Marco teórico	5
6. Objetivos	23
7. Hipótesis	24
8. Materiales y métodos	25
9. Resultados	30
10. Discusión de resultados	35
11. Conclusiones	37
12. Recomendaciones	38
13. Referencias	39
Anexos	42

## INDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Monoterpenos encontrados en <i>V. officinalis</i>	10
Figura 2. Sesquiterpenos encontrados en <i>V. officinalis</i>	11
Figura 3. Derivados valerénicos encontrados en <i>V. officinalis</i>	12
Figura 4. Iridioides presentes en <i>V. officinalis</i>	14
Figura 5. Productos de descomposición y metabolitos en <i>V. officinalis</i>	15
Figura 6. Alcaloides presentes en <i>V. officinalis</i>	16
Figura 7. Aminoácidos presentes en <i>V. officinalis</i>	17

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de humedad de las muestras de <i>V. prionophylla</i>	30
Tabla 2. Valores de Rf obtenidos en la cromatoplaque de <i>V. prionophylla</i>	31
Tabla 3. Relación peso volumen obtenidos en los extractos de <i>V. prionophylla</i>	32
Tabla 4. Relación de fracciones obtenidas de los extractos de <i>V. prionophylla</i>	33
Tabla 5. Longitudes de onda de mayor absorción en <i>V. prionophylla</i>	33
Tabla 6. Relaciones de absorbancia de los extractos de <i>V. prionophylla</i>	34

## 1. RESUMEN

La *Valeriana prionophylla* Standl., es una planta nativa de Guatemala utilizada medicinalmente para tratar el insomnio, esta planta presenta en su composición metabolitos activos con propiedades inductoras del sueño similares a *Valeriana officinalis*, especie ampliamente estudiada y que aparece en varias farmacopeas del mundo.

Con este estudio se contribuye con el estudio de *V. prionophylla* en cuanto a la determinación de isovaltrato por cromatografía en capa fina y espectrofotometría ultravioleta visible.

El presente trabajo comprendió la cosecha de hojas y raíces de *V. prionophylla* de dos localidades de Guatemala. A las muestras desecadas se les realizó una extracción con diclorometano y una posterior separación por cromatografía tipo empaque en columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil una mezcla de tolueno-acetato de etilo 75:25. A las fracciones colectadas, se les corrió un barrido en un espectrofotómetro ultravioleta visible contra un estándar de isovaltrato, con el fin de detectar la presencia del mismo.

En este estudio se comprobó la presencia de isovaltrato en hojas y raíces de *V. prionophylla*, notándose que hay un mayor contenido en la raíz.

Se comprobó la hipótesis de que *Valeriana prionophylla* contiene isovaltrato en su composición química, semejante a *Valeriana officinalis*, no hay diferencia en el perfil de isovaltrato detectado por cromatografía de capa fina y espectrofotometría ultravioleta visible, entre muestras de *V. prionophylla* de dos localidades.

## 2. INTRODUCCIÓN

Este proyecto de investigación tiene como propósito contribuir al conocimiento, con base científica, sobre la composición química de la especie, en cuanto a la identificación de isovaltrato presente en raíces y hojas de la especie *Valeriana prionophylla*, por la técnicas de cromatografía en capa fina y espectrofotometría de absorción ultravioleta visible.

*Valeriana prionophylla* es utilizada en Guatemala para tratar el insomnio, este trabajo demuestra que esta especie contiene isovaltrato, el cual es un compuesto químico que forma parte del grupo de los valepotriatos a quienes se les atribuye parte de la responsabilidad farmacológica en la especie *Valeriana officinalis*, quien es ampliamente utilizada en el mercado para tratar el insomnio.

En las muestras analizadas de hojas y raíces de *V. prionophylla* de ambas localidades (San Marcos y Totonicapán) se encontró presente Isovaltrato, al igual que la muestra en polvo de *V. officinallis* y además se demostró que el isovaltrato esta presente en mayor cantidad en las raíces que en las hojas.

### 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

*Valeriana prionophylla* es una especie nativa de Mesoamérica, utilizada en Guatemala para tratar el insomnio al igual que *Valeriana officinalis* la cual es una especie que se encuentra en varias farmacopeas del mundo y que cuenta con muchos estudios sobre su composición química, en especial de los compuestos químicos llamados Valepotriatos a quienes se le atribuye gran responsabilidad en la actividad farmacológica. En la actualidad, se desea equipar el uso *V. prionophylla* con relación a *V. officinalis*, pero se tiene pocos estudios dedicados a su composición química por lo que se hace necesario realizar estudios fitoquímicos de la especie, entre los cuales podemos incluir la determinación de isovaltrato por espectrofotometría de absorción ultravioleta visible; a la vez compararlos entre materiales cultivado y silvestre de dos localidades diferentes de Guatemala.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Para poder equiparar *V. prionophylla* con *V. officinalis*, es necesario detectar e identificar los valepotriatos presentes con el fin de establecer una relación cualitativa de los mismos entre ambas especies; además al generar esta información de *V. prionophylla* se estará aportando datos para la elaboración de una monografía completa de la especie, ya que en la actualidad se están realizando estudios sobre su composición química, actividades farmacológicas y actividad biocida. para en el futuro comercializarla en el mercado garantizando la calidad de dichos productos.

En la actualidad no se encuentran reportadas metodologías analíticas estandarizadas por espectrofotometría de absorción tendientes a la identificación y valoración de valepotriatos (isovaltrato) en *V. prionophylla*, por lo que resulta importante el desarrollo del presente trabajo. Esto será de utilidad para analizar la calidad material vegetal destinado a la elaboración de productos fitoterapéuticos a base de *V. prionophylla*.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Familia Valerianaceae

La familia Valerianaceae contiene cerca de 350 especies distribuidas alrededor del mundo (excepto Nueva Zelanda y Australia). Se caracterizan por tener flores simpetalas, ovario inferior tricarpelar, fruto en aquenio y ausencia de endospermo. La familia exhibe considerable diversidad morfológica en sus frutos y flores, la variación más perceptible en la morfología de las flores es concerniente al número de estambres, con rango de 1 a 4. Esta familia parece ser originaria de Asia, probablemente de los Himalayas y subsecuentemente se dispersó por Europa y todo el nuevo mundo. La presencia en muchas especies de iridioides del tipo valepotriatos, caracterizan el grupo (1).

El género representativo agrupa hierbas y arbustos perennes nativos sobre todo de las regiones templadas del hemisferio norte. Las valerianas alcanzan una altura comprendida entre 50 cm. y 1.5 m y forman raíces gruesas de olor acre y hojas simples o lobadas. Las flores pequeñas, rosas o blancas, se agrupan en inflorescencias apretadas y suelen ser muy fragantes. La valeriana o hierba de gatos, recibe este nombre porque el olor de sus flores atrae a los gatos. Es nativa de Europa y el norte de Asia y se cultiva como ornamental; de las raíces se extrae un medicamento sedante. Es uno de los remedios naturales más utilizados en el tratamiento de las afecciones nerviosas. El nombre científico de la familia es Valerianaceae y el género representativo es *Valeriana*. La valeriana o hierba de gatos es la especie *Valeriana officinalis* (2).

### 5.2 *Valeriana prionophylla*

*Valeriana prionophylla* es una especie nativa de Mesoamérica, utilizada en Guatemala para tratar el insomnio al igual que *Valeriana officinalis* la cual es una especie que se encuentra en varias farmacopeas del mundo y que cuenta con muchos estudios sobre su

composición química, en especial de los compuestos químicos llamados Valepotriatos a quienes se le atribuye gran responsabilidad en la actividad farmacológica.

En la actualidad, se desea equiparar el uso *V. prionophylla* con relación a *V. officinalis*, pero se tiene pocos estudios dedicados a su composición química por lo que se hace necesario realizar estudios fitoquímicos de la especie, entre los cuales se pueden incluir la detección de Isovaltrato por cromatografía en capa fina y espectrofotometría de absorción ultravioleta visible; a la vez compararlos entre materiales cultivados en dos localidades diferentes de Guatemala.

#### Descripción Botánica:

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	MAGNOLIOPHYTA
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Dipsacales
Familia:	Valerianaceae
Genero:	<i>Valeriana</i>
Especie:	<i>prionophylla</i>

Nombre Científico: *Valeriana prionophylla* Standl.

Nombres Comunes: Valeriana, Pericón de monte o Ceiba

Hierba perenne erecta, a menudo bifurcada, raíces olorosas, los tallos de 10-80 cm. de alto, esparcidamente pilosos o casi glabros, los núcleos pilosulosos; hojas predominantemente basal, usualmente numerosas y aprisionadas, algunas cespitosas, las hojas in divididas, oblongo-linear a espaluladas, de mayoría de 3-30 cm. de largo, 0.5-3 cm. de ancho, obtusas, atenuadas hacia la base subpeciolar, los márgenes serrados, serrado-dentado, crenada o raramente entero, usualmente ciliado, glabra o pilosulada, hojas caulinares 2-3 pares principalmente 2-20 cm de largo, usualmente sésiles y

envuelta en la base, algunas veces corto-peciolada; inflorescencia largamente redunculada, las flores numerosas dispuestas en un dicasio agregado, densa o difusa; brácteas lineares, limbo del cáliz con 9-11 segmentos exserta, anteras aprisionadas 4-lobadas, la teca surcada: estilo exserto aquenios 2-3 cm de longitud, lisos o transversalmente rugulosos, glabros o piloso, el adaxial con costillas usualmente conspicuas (3).

Distribución: Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá, Totonicapán, México (Chiapas) y Costa Rica.

Hábitat: En campos abiertos, frío, bosque de pino, en prados montañosos fríos y húmedos o preferiblemente en lugares desérticos en riscos rocosos, algunas veces sobre calizas (4).

Usos Populares: Sedante y antiespasmódico (4).

### **5.2.1 Estudios publicados.**

*Valeriana prionophylla* es una especie a la que se le ha atribuido actividad sedante e hipnótica, aunque los estudios realizados son pocos tanto en relación con su actividad farmacológica como con su composición química, su uso popular es externo.

Entre los estudios realizados se encuentra la “Evaluación de la actividad biocida e identificación química de valepotriatos en tres plantas reconocidas popularmente en Guatemala como valeriana”, reportó que la raíz pulverizada de *V. prionophylla* originaria de Nebaj, Quiché, contiene mayor cantidad de valepotriatos, de ácidos hidroxivalerénico y valerénico que *V. officinalis* proveniente de España; estos compuestos forman parte del complejo químico responsable de la actividad farmacológica de *V. officinalis*, por lo que se deduce que son los que harían parte también de la actividad farmacológica de *V. prionophylla* (4).

Otro estudio, muestra que *V. prionophylla* contiene prinsepiol, 8-hidroxipinoresinol-4'-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y 8-hidroxipinoresinol, moléculas que han sido aisladas de las raíces de *V. officinalis* a las cuales se les ha atribuido parte del efecto farmacológico; los ensayos farmacológicos realizados muestran que el extracto alcohólico ejerce mejor efecto que cada uno de los componentes administrados por separado. Este estudio indica que el extracto etanólico ejerce actividad vaso relajante y antioxidante (5).

Otro estudio realizados confirma la presencia de diversos Valtratos (acevaltrato, didrovaltrato, valtrato, isovaltrato) en las raíces, constituyentes igualmente aislados de *V. officinalis* y que forman parte del conjunto de moléculas responsables de la acción farmacológica (6).

Un estudio de caracterización de *V. prionophylla*, nos describe que en el análisis fitoquímico realizado se encontró ácido valerénico y un producto de degradación de baldrinal (7)

### **5.3 *Valeriana officinalis***

Las raíces de *V. officinalis* contienen algunos compuestos con actividad farmacológica demostrada, estos incluyen el aceite esencial y sus sesquiterpenoides (ácido valerénico), iridoides (valepotriatos) y sus productos de descomposición como el baldrinal y homobaldrinal, aminoácidos (arginina, GABA, glutamina, tirosina), y alcaloides. *V. officinalis* también contiene pequeñas cantidades de ácidos fenólicos y flavonoides, ácido clorogénico, ácido cafeico, colina,  $\beta$ -sitosterol, ácidos grasos y varios minerales (2).

#### **5.3.1 Terpenoides**

##### **5.3.1.1 Aceite volátil de *V. officinalis* y sus constituyentes**

El aceite volátil producido por esta especie consiste en una mezcla de mono y sesquiterpenoides. Los sesquiterpenoides son los componentes de mayor interés e importancia por su quimiotaxonomía y actividad biológica que presentan. El aceite

esencial se encuentra entre 0.1 a 0.6% y su composición varía significativamente; contiene mono y sesquiterpenos carbonados, dentro de los constituyentes encontramos acetato de bornilo, valerianol, valeranona, criptofauronol y valeranal.

Los sesquiterpenos tienen tres tipos de estructuras basadas en los esqueletos de kesano, valeranona y ácido valerénico. El ácido valerénico y sus derivados (ácido acetoxivalerénico y ácido hidroxivalerénico) han sido reportados como característicos de esta especie y de sus subespecies. Sin embargo, estos compuestos han sido encontrados en otras especies.

Más de 150 compuestos han sido reportados en el aceite esencial. El acetato de bornilo y el isovalerato han sido reportados como los componentes primarios del aceite esencial, otros componentes primarios incluyen valeraniol, valeranona y valeranal; otros compuestos secundarios incluyen isoborneol, borneol, acetato de isobornilo, terpinoleno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, kanfeno,  $\beta$ -cariofileno y limoneno.

Las fórmulas químicas de algunos de los componentes más frecuentemente encontrados se describen en las Figuras 1, 2 y 3 (2).

#### 5.3.1.2 Valepotriatos

Entre otros terpenoides no presentes en el aceite volátil de *V. officinalis* están los Valepotriatos que son triésteres de un terpenoide, el alcohol trihídrico; este alcohol tiene la estructura de un iridioide ciclopentapirano con un anillo epóxido unido. Las concentraciones de valepotriatos están entre 0.5 y 2%, sin embargo en la raíz este porcentaje puede llegar hasta 14% dependiendo de la especie.

Los valepotriatos se degradan rápidamente, especialmente en soluciones ácidas. Secada cuidadosamente, *V. officinalis* puede llegar a contener 0.8% de valepotriatos (8).

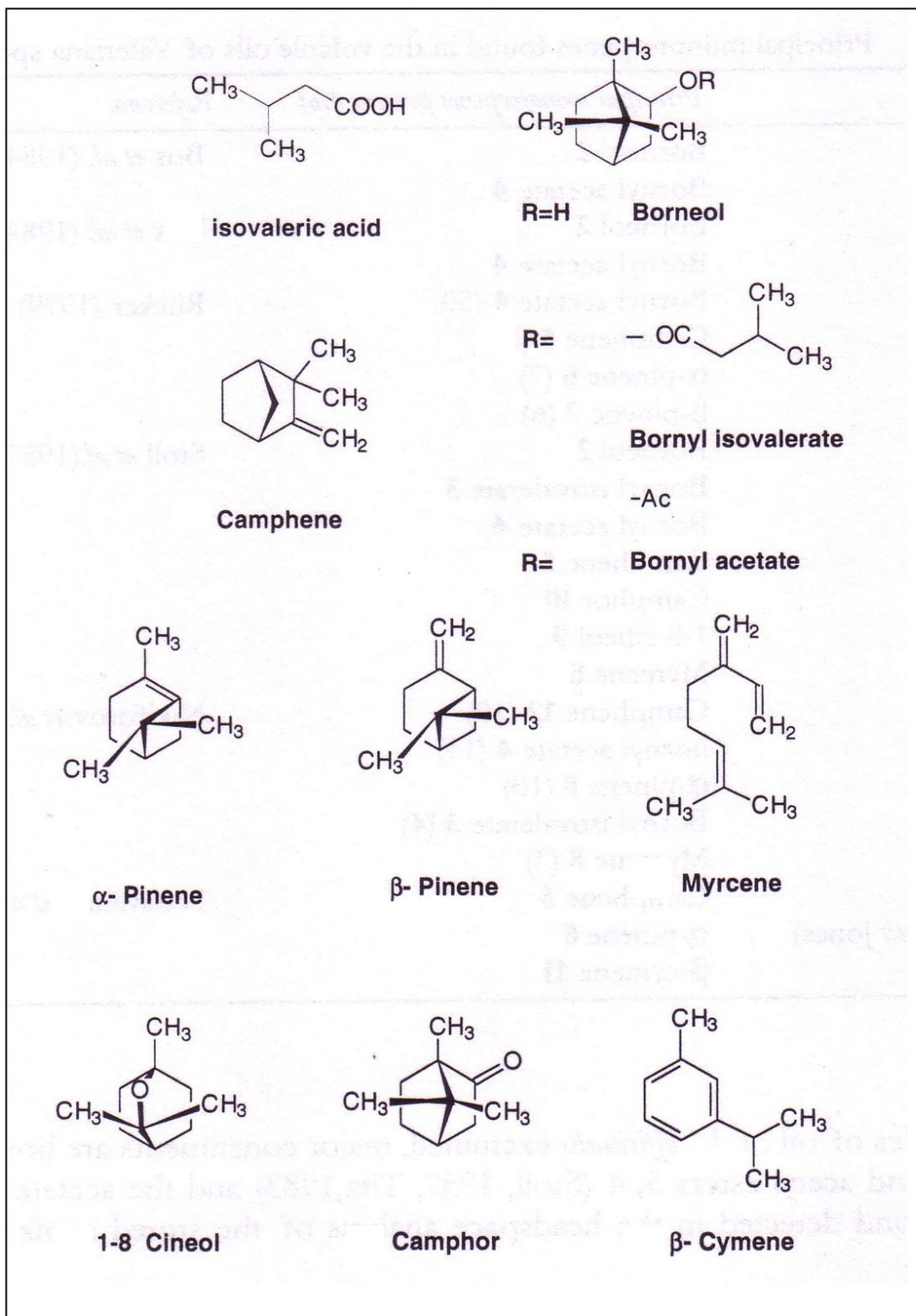


Figura 1. Monoterpenos encontrados en *Valeriana officinalis*

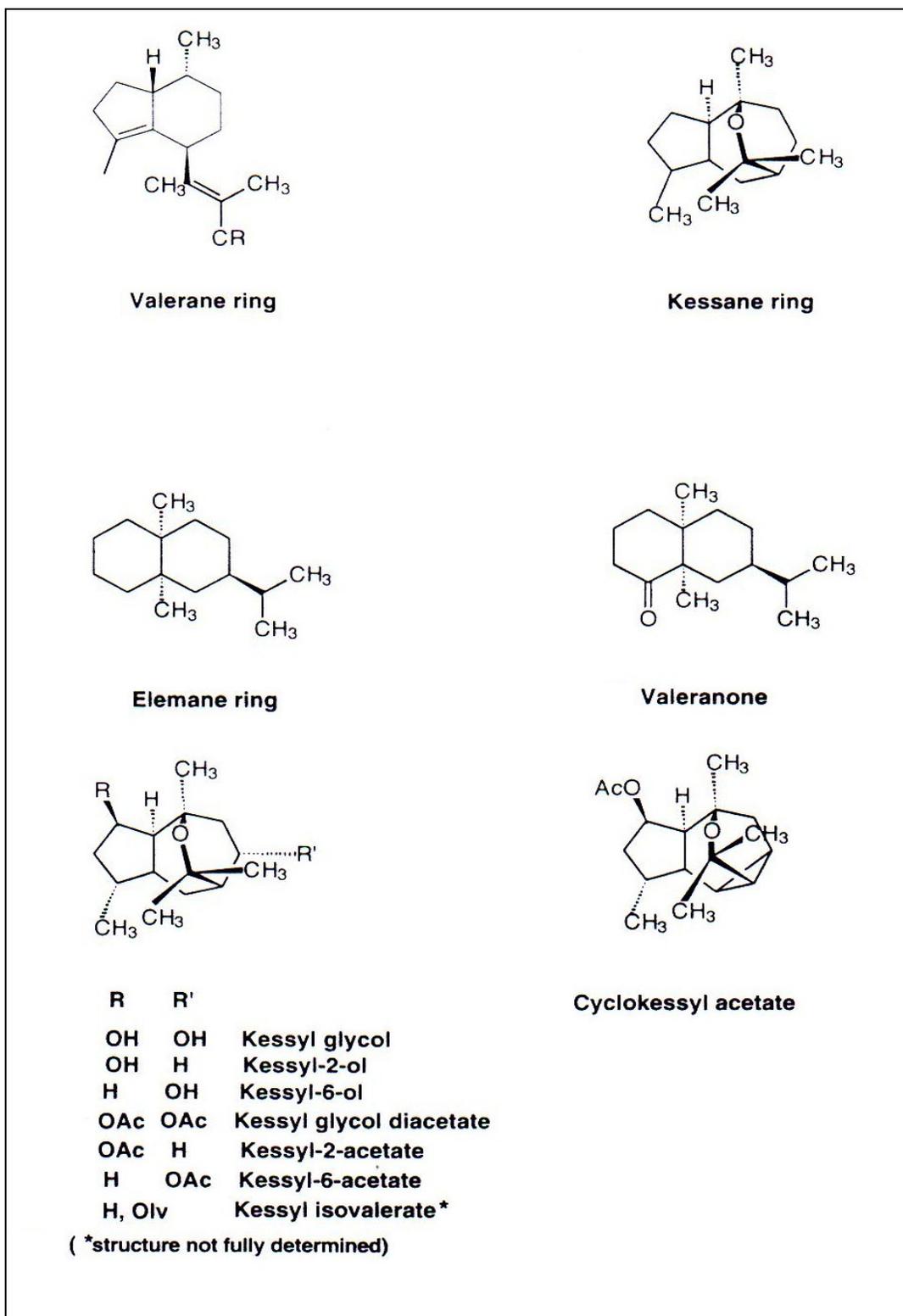
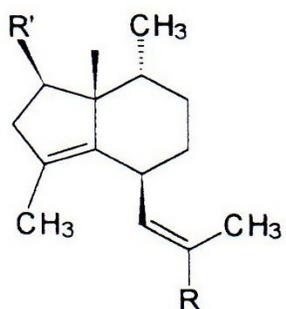


Figura 2. Sesquiterpenos encontrados en *Valeriana officinalis*



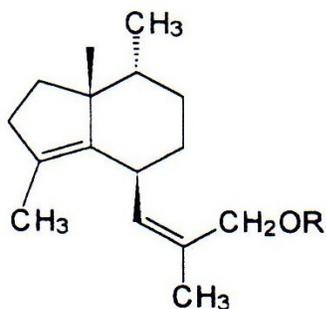
R	R'	
CHO	H	Valerenal ( <i>Stoll et al., 1957</i> )
COOH	H	Valerenic acid ( <i>Stoll et al., 1957</i> )
COOH	OH	Hydroxyvalerenic acid ( <i>Buechi et al., 1960</i> )
COOH	OAc	Acetoxyvalerenic acid ( <i>Buechi et al., 1960</i> )
CH <sub>2</sub> OH	H	Valerenol ( <i>Bos et al., 1986</i> )
CH <sub>2</sub> OAc	H	<i>E</i> -Valerenyl acetate ( <i>Bos et al., 1986</i> )
CH <sub>2</sub> Oiv	H	<i>E</i> -Valerenyl isovalerate ( <i>Bos et al., 1986</i> )

R = CH<sub>2</sub>OOCC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>

R' = H                      Valerenyl *n*-valerate (*Bos et al., 1986*)

R = CH<sub>2</sub>OOCC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>

R' = H                      Valerenyl hexanoate (*Bos et al., 1986*)



R = Ac                      **Z-Valerenyl acetate** (*Bos et al., 1986*)

R = Iv                      **Z-Valerenyl isovalerate** (*Bos et al., 1986*)

Figura 3. Derivados valerénicos encontrados en *Valeriana officinalis*

Los valepotriatos fueron aislados por primera vez en 1996 de *V. wallichii*. El aislamiento de estas sustancias fue de gran interés ya que ello proveyó algunas respuestas en torno al efecto sedativo tranquilizante de los extractos de valeriana, los cuales no podían ser explicados únicamente con base en la cantidad de aceite volátil presente (2).

El esqueleto monoterpénico de los valepotriatos es esencialmente el mismo que el del grupo de glicósidos monoterpénicos conocidos como iridioides, sin embargo los valepotriatos usualmente no tienen un azúcar residual en su estructura (2).

Los primeros tres valepotriatos aislados de *V. wallichii* fueron nombrados como valtrato, acevaltrato y didrovaltrato (2). La Figura 4 muestra un listado general de las estructuras químicas de los iridioides.

Basados en su estructura química, los valepotriatos pueden ser divididos en cuatro grupos: tipo dieno, tipo monoeno, tipo hidrino-valtrato y tipo dexosi monoeno de valepotriatos (9). Los valepotriatos son compuestos inestables: ellos son termolábiles y se descomponen rápidamente bajo condiciones ácidas ó básicas, en soluciones acuosas y también en soluciones alcohólicas. En metanol anhidro y a 20 °C, los valepotriatos dieno muestran una estabilidad relativa. Disolviendo en metanol o etanol, con únicamente una pequeña cantidad de agua y almacenando a temperatura ambiente, tenemos alrededor de un 90% de descomposición en pocas semanas (10).

### 5.3.1.3 Productos de descomposición y metabolitos

Los valepotriatos se hidrolizan rápidamente y no se encuentran presentes cantidades significantes de los mismos en soluciones acuosas o alcohólicas diluidas, después de pocos días. Ellos también son metabolizados en el tracto gastrointestinal y se obtienen productos como baldrinal, homobaldrinal, deacibaldrinal y valtroxal (11). En la Figura 5 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

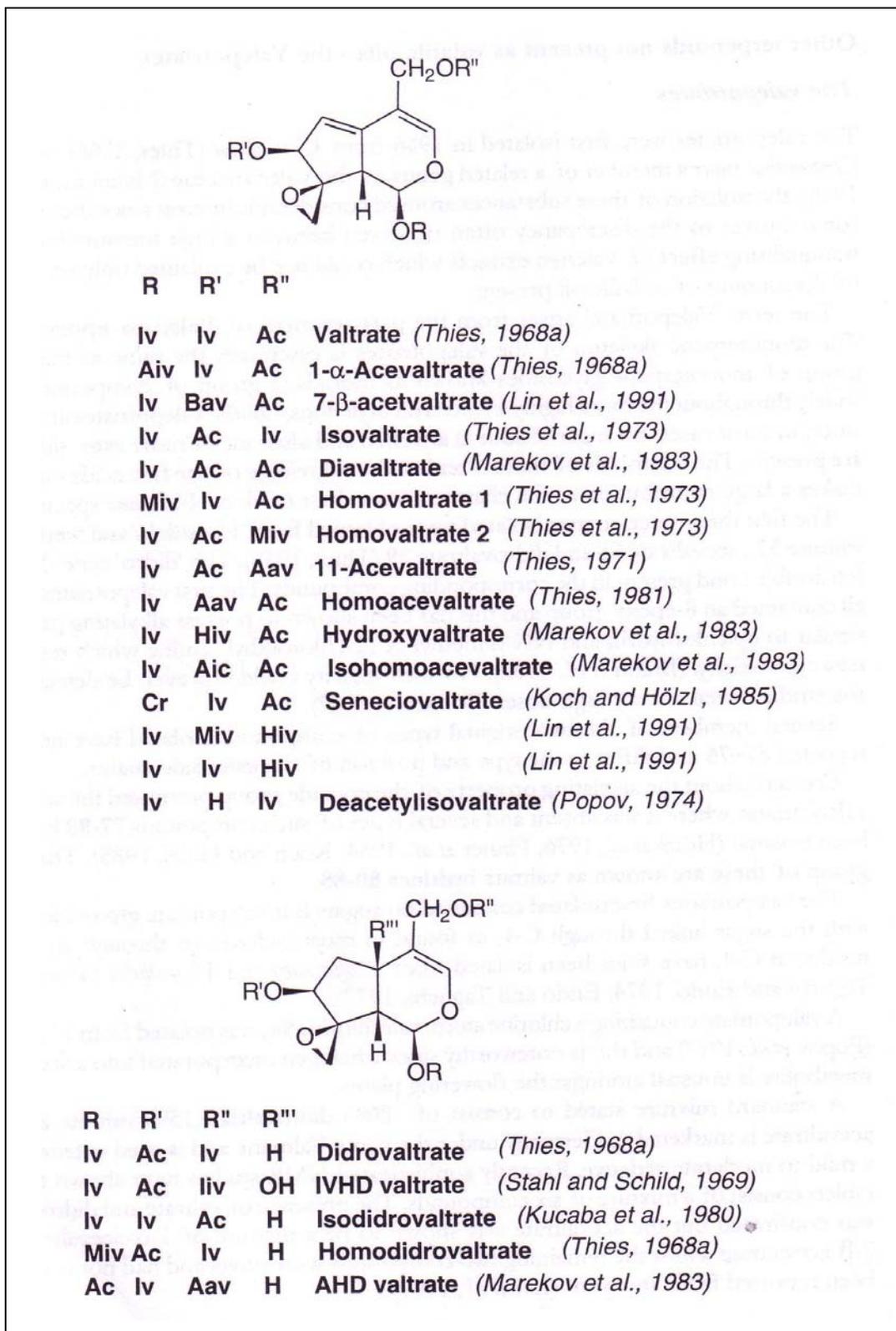


Figura 4. Iridioides presentes en *Valeriana officinalis*

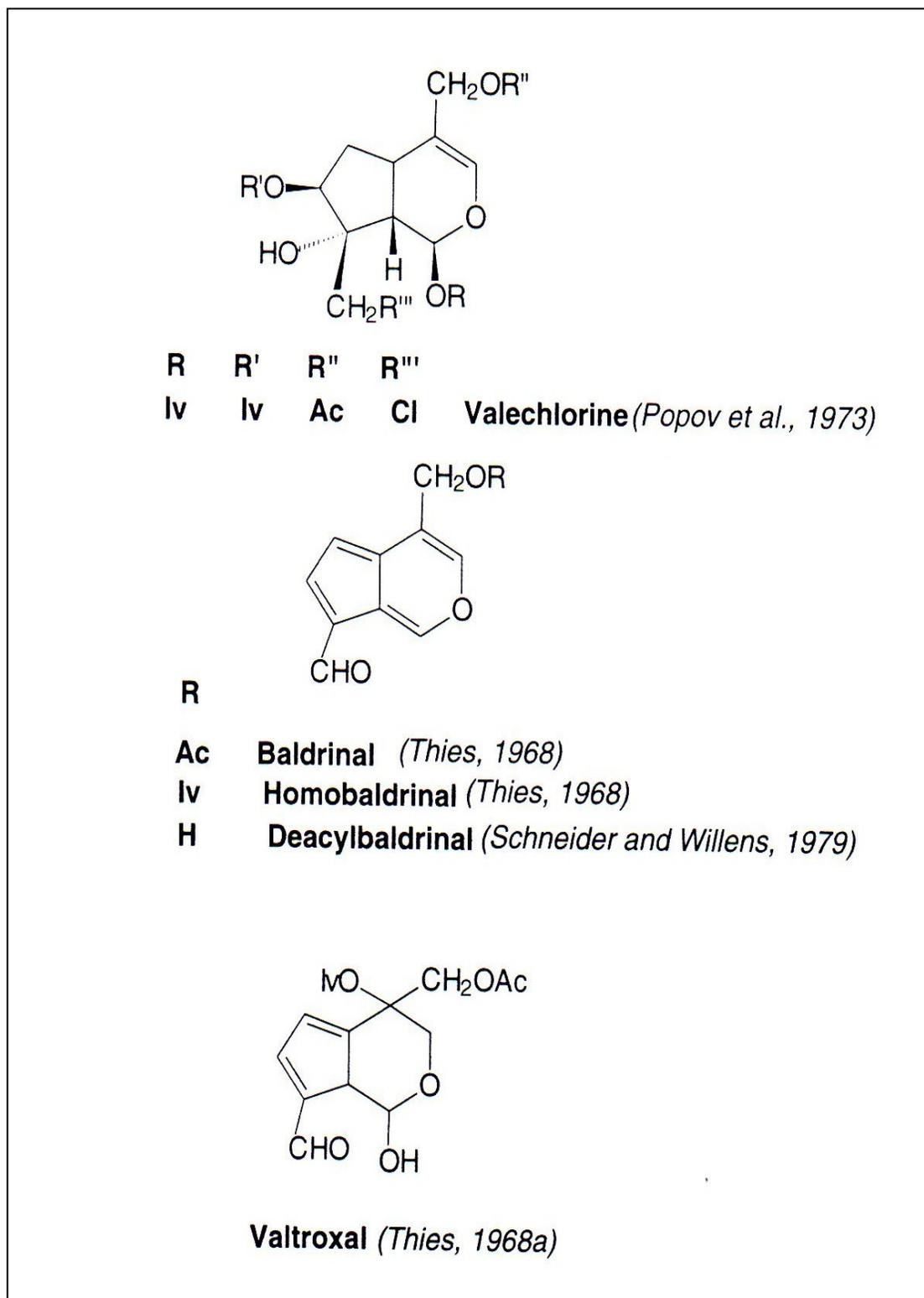


Figura 5. Productos de descomposición y metabolitos presentes en *V. officinalis*

### 5.3.2 Compuestos nitrogenados

#### 5.3.2.1 Alcaloides

En algunas plantas medicinales los alcaloides son los metabolitos secundarios más importantes pero este no es el caso de Valeriana, donde los alcaloides presentes se encuentran en pocas cantidades. La presencia de alcaloides en este género se conoce desde finales del siglo XIX, pero no fue sino hasta 1967 que se aislaron los alcaloides valerianina y actinidina de *V. officinalis* (12). En la Figura 6 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

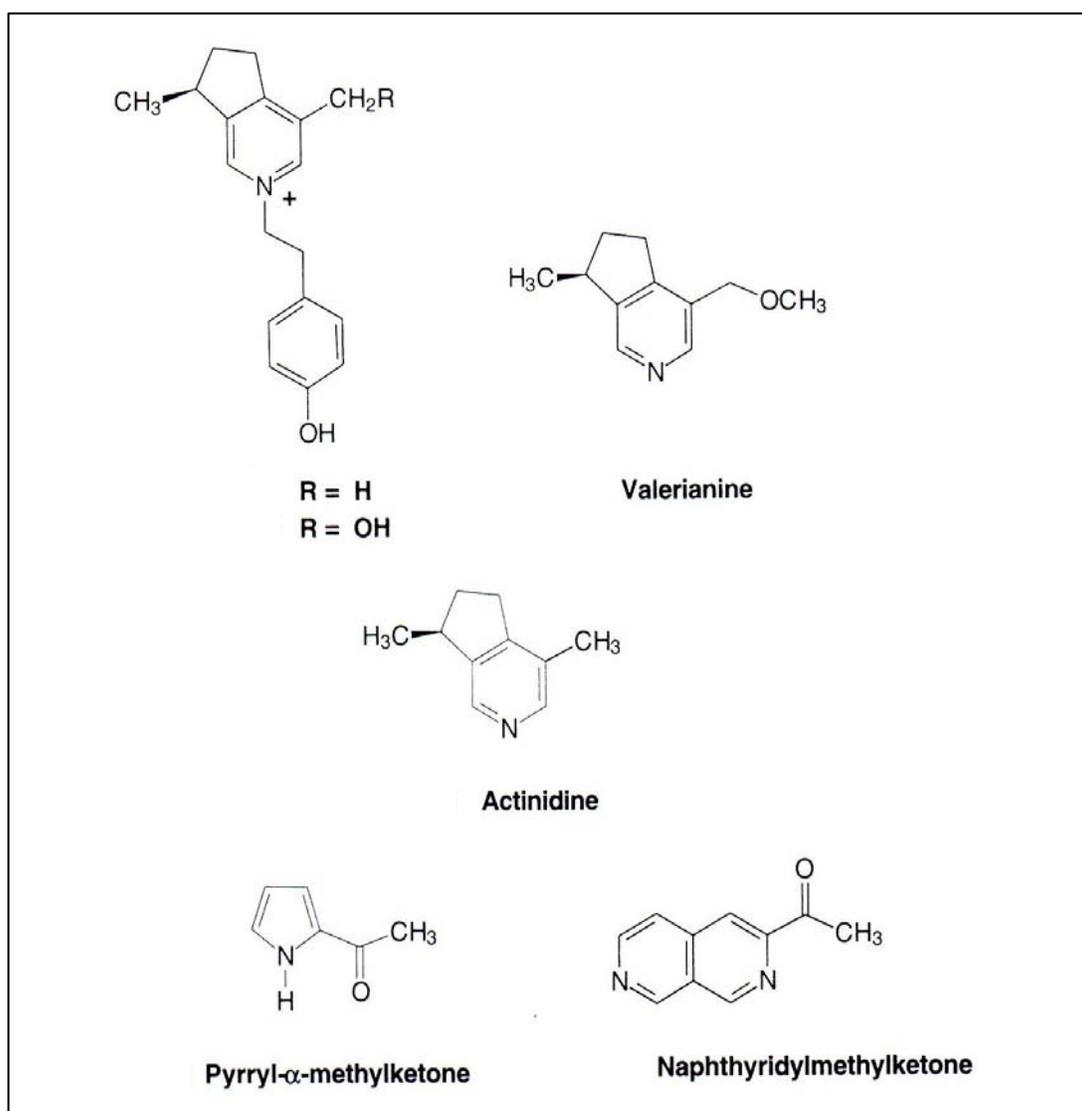


Figura 6. Alcaloides presentes en *Valeriana officinalis*

## 5.3.2.2 Aminoácidos

*V. officinalis* contiene una cantidad apreciable de aminoácidos. En un estudio realizado se encontró la presencia de tirosina, glutamina y GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico) (13). En la Figura 7 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

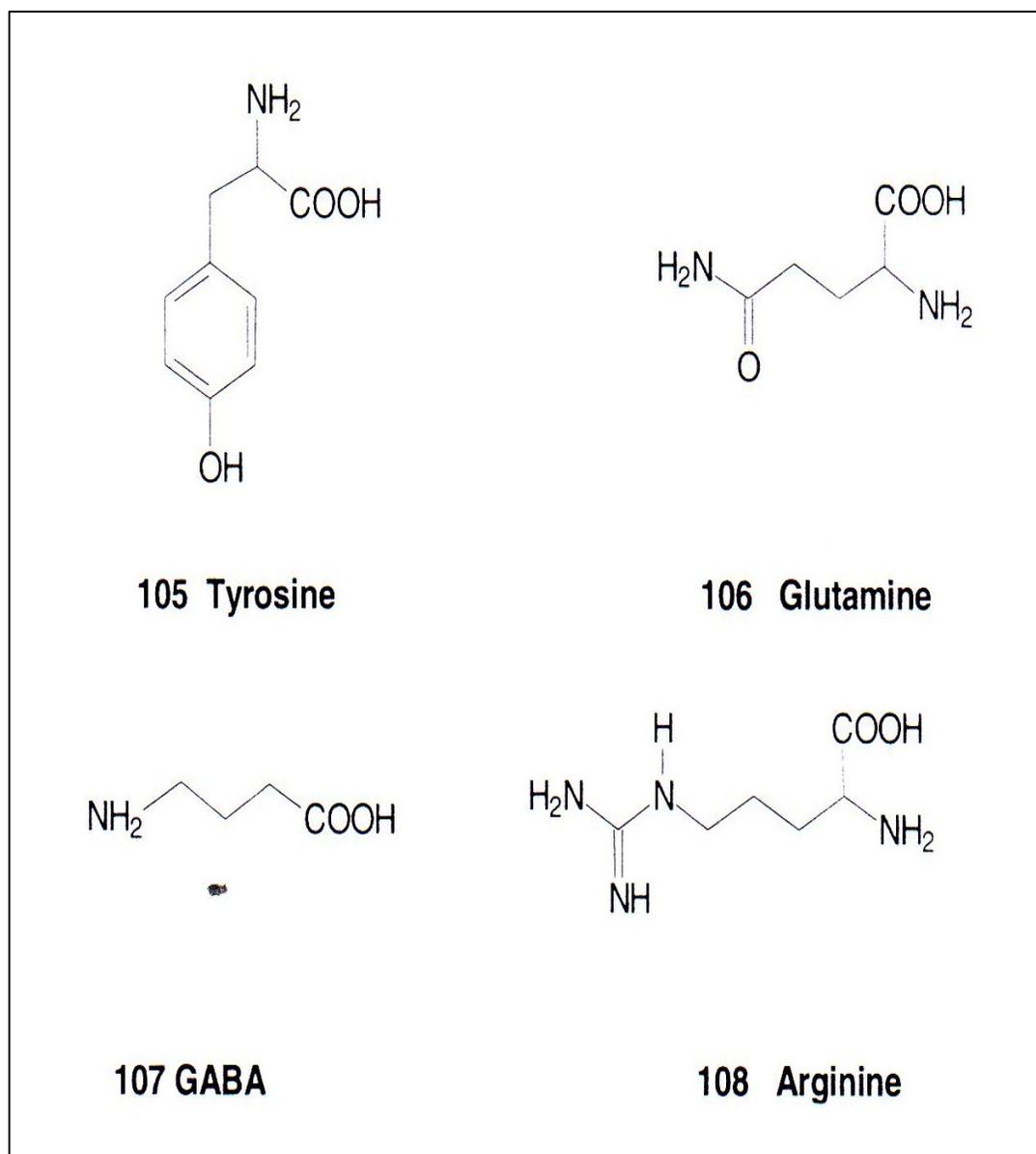


Figura 7. Aminoácidos presentes en *Valeriana officinalis*

#### **5.4 Técnica cromatográfica**

La cromatografía es una de las técnicas más efectivas para separar e identificar los componentes químicos. El método fue desarrollado por el botánico ruso Mikhail Tswett, en 1906, que utilizó una columna de carbonato cálcico para la separación de pigmentos vegetales, llegando a la conclusión de que la clorofila no era un simple compuesto químico. Las técnicas cromatográficas actuales tienen multitud de formas, la mayoría de las cuales pueden ser automatizadas y están adaptadas para el reparto de gran o pequeña cantidad de sustancias, siendo separadas y purificadas. La separación consiste en un proceso de competición donde las moléculas tendrán que elegir en que fase residen (estacionaria, no se mueve a lo largo del proceso de separación, o móvil, líquida o gaseosa). Estas diferencias a la hora de elegir son las que aprovechamos para su separación (14). En base a la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria, se puede clasificar en:

##### A. Cromatografía plana:

1. Cromatografía en papel
2. Cromatografía en capa fina (TLC)

##### B. Cromatografía en columna

1. Cromatografía de gases (GC)
2. Cromatografía líquida (LC)
  - a. Cromatografía líquido - líquido
  - b. Cromatografía sólido - Líquido

#### **5.5 Cromatografía en Capa Fina**

La cromatografía en capa fina, o más comúnmente TLC (thin layer chromatography, en inglés), es una técnica cromatográfica utilizada, entre otros posibles usos, para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla. Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente, un disolvente) y a una fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel o gel de sílice). Esta diferencia se traduce en

un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación (14).

La cromatografía de capa fina es una forma de cromatografía en columna en la cual el material adsorbente reposa en un cristal o en una película de plástico. Se basa en la distribución en dos fases, la estacionaria, compuesta por una capa de hidratación y la móvil, que se trata de un solvente orgánico. El soporte es una capa de 0,1 a 1 mm de óxido de silícico o celulosa, apoyada en un subsoporte de cristal. La capa se aplica manualmente mediante un aparato que deja una ranura regable por la que sale la pasta denominada Silicagen, este aparato se desliza por la placa a velocidad constante para conseguir la textura deseada. La cromatografía en capa fina aguanta tratamientos de visualización muy potentes debido al subsoporte y que es más rápida, pudiendo terminar la corrida en una media hora.

Una vez realizada la cromatografía, hay que identificar el compuesto. Escogemos la distancia recorrida desde el origen, pero esta distancia depende del tiempo, además de otros factores y, por lo tanto está muy en función de las condiciones experimentales. Si la relacionamos con otra, todas las variables se anularían, diferenciándose sólo en la en la distancia recorrida en la cromatografía y, por tanto, en la diferente naturaleza de los componentes. Una vez caracterizado el parámetro, medimos con una regla y se efectúa la relación con otro dato, hay que seguir unos pasos para poder identificar el componente separado, los cuales son:

- Formar tablas: donde hay que tener en cuenta la naturaleza de las fases para una correcta tabulación.
- Patrones conocidos: comparar con otras muestras patrón ya conocidas.
- Reacciones específicas o colorantes: Podemos identificar compuestos mediante reacciones específicas de los mismos.

## 5.6 Cromatografía en Columna

Todas las cromatografías denominadas en columna se caracterizan por tener una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna de vidrio de 5 a 30 mm de diámetro por la que se hace pasar una fase móvil líquida o gaseosa que estará en permanente movimiento. Según la afinidad de las moléculas por la fase móvil o la estacionaria, éstas se separarán. Después de cada cromatografía podremos sacar información del cromatograma tanto cualitativa (para identificar los distintos compuestos de la mezcla) como cuantitativa (para poder obtener la cantidad y composición de las sustancias separadas). Las fases estacionarias pueden ser de materiales muy distintos, existen derivados de dextranos (sefadex), derivados de agarosa, poliacrilamida, esferas de vidrio, sílice, etc. (15)

Existen distintos tipos de cromatografía en columna:

Cromatografía de intercambio iónica: se basa en la afinidad de los iones en solución por los sitios de polaridad opuesta que se encuentran en la fase estacionaria.

Cromatografía de exclusión: Se basa en la habilidad de materiales de porosidad controlada para separar los componentes de una mezcla de acuerdo al tamaño y forma de las moléculas.

Cromatografía de afinidad: se basa en la especificidad de algunas macromoléculas biológicas. Éstas se unen específicamente a la fase estacionaria y para separar dicha macromolécula, bastará con variar el pH una vez que la columna este limpia y sólo se encuentre la que nos interesa.

Cromatografía de adsorción: se basa principalmente en las diferencias en la afinidad relativa de los compuestos por el sólido utilizado como fase estacionaria. Las separaciones obtenidas se determinan casi exclusivamente por interacciones polares, siendo la fase estacionaria más polar que la fase móvil.

Cromatografía de alta resolución (HPLC) y Cromatografía de gases.

### **5.7 Espectrofotometría de Absorción Ultravioleta Visible**

Los métodos espectroscópicos de análisis se basan en la medición de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia. Los de emisión utilizan la radiación emitida por una sustancia que ha sido excitada por una energía térmica, eléctrica o electromagnética, al pasar al estado fundamental. Esta radiación es característica del material o compuesto emisor. Los de absorción se basan en la disminución de potencia de una radiación electromagnética que ha interactuado con la materia. Miden la relación entre intensidad final - inicial mediante un parámetro denominado Transmitancia. Para que haya interacción entre la radiación electromagnética y la materia es necesario: que la energía asociada a esa radiación electromagnética satisfaga a la necesidad de energía de ese salto y que exista una probabilidad de transmisión entre niveles. También hay que tener en cuenta el orden de adición de los reactivos, porque puede influir en la obtención de la absorbancia (16).

En la espectrofotometría molecular ultravioleta visible vemos transiciones moleculares utilizando ultravioleta visible. El rango espectral para ultravioleta va de 200 - 400nm, y para el visible va de 400 - 700 nm. El rango de energía que abarca es de 6 e-V (electrón voltio). En los espectros de absorción influye el estado físico del absorbente (analito) y el tipo de disolvente empleado. Los compuestos que absorben en ultravioleta visible se denominan Cromóforos, dentro hay inorgánicos, orgánicos y complejos de transferencia de carga.

Orgánicos: Los que tienen enlaces insaturados (dobles y triples enlaces) porque los electrones no están tan fuertemente unidos con en los enlaces sencillos. Los compuestos orgánicos con oxígeno, azufre, nitrógeno o halógenos presentan absorción en ultravioleta porque los electrones no compartidos no están tan fuertemente unidos, y son lo que provocan la transición.

Inorgánicos: Tienen transición en ultravioleta visible, los complejos formados con compuestos de las primeras series de transición van a dar transición en al menos algún estado de oxidación.

Complejos de transferencia de carga: Son los grupos donadores de electrones enlazados, los donan a un compuesto receptor de electrones con orbitales vacíos, cuando este compuesto donador absorbe la energía uno de estos electrones se transfiere al orbital vacío del receptor y se produce un estado de oxidación - reducción interno, estos compuestos tienen absorptividades molares altísima, por lo que permiten un elevada sensibilidad, la mayoría implican un ión metálico, pueden ser tanto compuestos inorgánicos como orgánicos.

Este es uno de los métodos más utilizados en laboratorios químicos y clínicos, y se caracteriza por la amplia aplicación a compuestos orgánicos e inorgánicos. Tiene una sensibilidad (límite de Detección) de entre  $10^{-4}M$  y  $10^{-7}M$ , posee una selectividad moderada – alta, es rápido y de fácil automatización, tiene una exactitud y precisión razonables, con un error de entre el 1 - 3%.

Muchos de los compuestos no absorbentes orgánicos e inorgánicos se pueden analizar (determinar) haciéndolos reaccionar con reactivos cromóforos que absorben fuertemente en la región ultravioleta visible. Para que esto de buen resultado es necesario que la reacción sea forzada hasta que se complete.

El procedimiento para el análisis cuantitativo conlleva determinar las condiciones que permitan una relación reproducible entre absorbancia - concentración del compuesto (ha de ser lineal), para ellos hay que seguir una serie de pasos: Selección de la Longitud de Onda, determinación de Variables que puedan influir en la absorbancia (pH, temperatura, presencia de sustancias interferentes, concentración de los reactivos) y determinación de la relación entre Absorbancia – Concentración (17).

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir con el estudio de *V. prionophylla* raíz y hojas en cuanto a la determinación de isovaltrato por cromatografía en capa fina y espectrofotometría de absorción ultravioleta visible.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6.2.1 Evaluar la presencia de isovaltrato en las hojas de *V. prionophylla* cultivada y silvestre de dos localidades de Guatemala.

6.2.2 Evaluar la presencia de isovaltrato en las raíces de *V. prionophylla* cultivada de dos localidades de Guatemala.

6.2.3 Comparar cualitativamente los contenidos de isovaltrato presentes en las muestras de las dos localidades analizadas.

6.2.4 Comparar cualitativamente los perfiles de isovaltrato obtenidos contra los reportados en la literatura para *V. officinalis*.

## 7. HIPOTESIS

*Valeriana prionophylla* contiene isovaltrato en su composición química, semejante a *Valeriana officinalis*, no hay diferencia en el perfil de isovaltrato detectado por cromatografía de capa fina y espectrofotometría ultravioleta visible, entre muestras de *V. prionophylla* de dos localidades.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Universo de trabajo

*Valeriana prionophylla* cultivada y silvestre de Guatemala.

### 8.2 Muestra

Material silvestre de la localidad de Cerro Raxquim en Totonicapán (3,221 msnm.; 14°49'59'', 91°23'31'') y material cultivado del Municipio de Tacaná, Aldea Vista hermosa en San Marcos.

### 8.3 Medios

#### 8.3.1 Recursos humanos:

Autor: Lic. Davinson Javier Riquett Robles.

Asesora: Licda. M.A. Sully Cruz.

Revisores: Lic. M.A. Rodolfo Orozco

Ing. M.Sc. José Vicente Martínez

#### 8.3.2 Recursos institucionales:

8.3.2.1 Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

8.3.2.2 Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT.

### 8.4 Materiales

8.4.1 Cámara para cromatografía de capa fina

8.4.2 Beakers

8.4.3 Tubos de ensayo

8.4.4 Probetas

8.4.5 Pipetas

8.4.6 Erlenmeyers

8.4.7 Espátulas

8.4.8 Columna de vidrio para cromatografía

8.4.9 Placa cromatográfica de sílica gel

8.4.10 Tijeras de jardín

8.4.11 Asperjador

8.4.12 Matraces volumétricos

8.4.13 Pipeteadora

8.4.14 Macerador de vidrio

8.4.15 Papel filtro

8.4.16 Tamiz

### **8.5 Equipos**

8.5.1 Balanza analítica

8.5.2 Espectrofotómetro ultravioleta visible

8.5.3 Horno de desecación

8.5.4 Medidor de humedad

8.5.5 Campana de extracción de gases

8.5.6 Baño de María

### **8.6 Reactivos**

8.6.1 Diclorometano

8.6.2 Ácido clorhídrico

8.6.3 Ácido acético glacial

8.6.4 Tolueno

8.6.5 Acetato de etilo

8.6.6 Estándar de Isovaltrato

### **8.7 Métodos**

8.7.1 Recopilación bibliográfica: Se realizó una revisión bibliográfica en las diferentes fuentes y bases de datos acerca de *Valeriana prionophylla*. La información recolectada se describió en los incisos 5.2 y 5.2.1 del presente trabajo.

8.7.2 Obtención de la muestra: Se obtuvo material silvestre de la localidad de Cerro Raxquim en Totonicapán (3,221 msnm.; 14°49'59'', 91°23'31'') y material cultivado del Municipio de Tacaná, Aldea Vista hermosa en San Marcos.

8.7.2.1 Identificación: Se realizó comparando las muestras con un patrón de la planta herborizada del herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

8.7.2.2 Cosecha: Se cosechó material sano tanto de la raíz como de la hoja. Las partes cosechadas se depositaron en una bolsa limpia e identificada. Ver Figura 1 del Anexo 1.

8.7.2.3 Poscosecha: Se lavaron las partes cosechadas por separado con agua potable y se dejó escurrir el material para eliminar el exceso de agua. Se cortó el material para su posterior desecación.

8.7.2.4 Secado y almacenamiento: Se colocó el material en bandejas, en lugar ventilado, sin exposición directa a los rayos del sol. Tanto las hojas como las raíces se almacenaron enteras en bolsas plásticas, limpias e identificadas.

8.7.2.5 Tamizado y molienda: Las hojas fueron pasadas por tamiz, obteniéndose un tamaño entre 0.5 – 2.0 cm, ver Figura 2 del Anexo 1. Las raíces se cortaron en trozos de entre 0.5 – 2.5 cm utilizando tijeras de jardín. Una vez realizado este procedimiento se procedió a la determinación de la humedad de las muestras.

8.7.2.6 Determinación del contenido de humedad: En una balanza de humedad marca Alogen MB35, se determinó un valor inicial del contenido de humedad de las muestras, luego de tener este valor inicial se procedió a secar nuevamente la muestra a 35 °C por 30 minutos en un horno de desecación, como se muestra en las Figuras 3 y 4 del Anexo 1.

Después de este secado, se procedió a determinar la humedad final de las muestras, para proceder de inmediato a la extracción.

8.7.3 Técnica de separación por Cromatografía en Capa Fina: Para asegurar que el disolvente a utilizar en el proceso de extracción por maceración fuese el correcto, se preparó un micro extracto y se corrió una Cromatografía en Capa Fina de cada una de las muestras a analizar, igualmente se corrió una muestra de polvo de *Valeriana officinalis* y de estándar de isovaltrato. Inicialmente se trataron 0.5 g de cada una de las muestras con 5 mL de diclorometano calentando a 40 °C por 5 minutos. Luego del calentamiento se filtró y el residuo se lavó con 2 mL de diclorometano. Los extractos obtenidos se combinaron y se evaporaron hasta sequedad. Al residuo obtenido en la evaporación, se le agregó 0.2 mL de acetato de etilo. De esta solución se aplicaron 10 µmL en una placa cromatográfica de silica gel; la fase móvil utilizada fue una mezcla de tolueno-acetato de etilo (75:25). Para el revelado del cromatograma se utilizó una mezcla de ácido clorhídrico-ácido acético glacial (8:2) asperjado sobre la placa y calentado posteriormente a 110 °C por 10 minutos, luego del calentamiento se revisó la placa cromatográfica tanto a la luz visible como a la luz ultravioleta para detectar todos los puntos que aparecieron.

8.7.4 Técnica de extracción por maceración: En un macerador previamente lavado, se colocó la planta fraccionada, en el caso de las hojas tamizadas y en el caso de las raíces troceadas. Al recipiente se le agregó el disolvente extractor el cual consistió en una mezcla de Tolueno-Acetato de etilo 75:25. El proceso de maceración se dejó por 48 horas. Al final del proceso, se filtro el extracto obtenido por papel filtro y se colecto en erlenmeyers limpios e identificados.

8.7.5 Técnica de Separación por cromatografía en columna: Los extractos obtenidos de la maceración, fueron sometidos a una separación por cromatografía en columna. 5 mL de cada uno de los extractos se hicieron pasar por una columna de vidrio empacada con silica gel, utilizando como fase móvil una mezcla de Tolueno-Acetato de etilo (75:25).

De cada una de las corridas cromatográficas en columna realizadas a los extractos se obtuvieron una serie de fracciones, las cuales se colectaron por la diferenciación en el color. A cada una de las fracciones se les realizó una corrida cromatográfica en capa fina, con el fin de visualizar semejanzas entre algunas fracciones y combinarlas según las mismas; para la cromatografía en capa fina se utilizó como fase móvil una mezcla de tolueno-acetato de etilo (75:25), para el revelado del cromatograma se utilizó una mezcla de ácido clorhídrico-ácido acético glacial (8:2) asperjado sobre la placa y calentado posteriormente a 110 °C por 10 minutos, luego del calentamiento se revisó la placa cromatográfica tanto a la luz visible como a la luz ultravioleta para detectar todos los puntos que aparecieron.

8.7.6 Determinación de Isovaltrato por espectrofotometría de absorción ultravioleta visible: Cada una de las fracciones finales se sometieron a un análisis espectrofotométrico con el fin de determinar la presencia de isovaltrato y en lo posible hacer una aproximación semicuantitativa del contenido de los mismos.

8.7.7 Análisis y presentación de resultados: Se hizo de forma descriptiva. El análisis de los datos cromatográficos se realizó en base a los Rf obtenidos, los cuales se compararon con el Rf del estándar. Igualmente para los datos obtenidos por espectrofotometría, se analizaron los valores de las absorbancias de cada una de las fracciones determinado los mayores contenidos por la medida más alta de absorbancia. Los resultados de los Rf y de las absorbancias obtenidas se presentan en forma de tablas.

## 9. RESULTADOS

### 8.1 Determinación del contenido de humedad

Los resultados de humedad obtenidos en las muestras a evaluar de *V. prionophylla* fueron, para la muestra de hojas de la localidad de San Marcos 14.21 % inicial y 10.12% después de la desecación; para la muestra de raíces de la localidad de San Marcos 13.69 % inicial y 11.54% después de la desecación; para la muestra de hojas de la localidad de Totoncapán 12.40 % inicial y 9.83% después de la desecación y para la muestra de raíces de la localidad de Totoncapán 11.84 % inicial y 9.40% después de la desecación. En la Tabla 1 se muestran los resultados de los contenidos de humedad de las muestras antes y después de ser sometidas a secado en horno de desecación.

Tabla 1. Valores de humedad de las muestras *Valeriana prionophylla*

<b>Muestra Inicial</b>	<b>Peso inicial de muestra (g)</b>	<b>Peso final de muestra (g)</b>	<b>Porcentaje de humedad (%)</b>
Hojas (San Marcos)	1.006	0.863	14.21
Raíz (San Marcos)	1.002	0.864	13.69
Hojas (Totoncapán)	1.001	0.876	12.40
Raíz (Totoncapán)	1.005	0.886	11.84
<b>Muestra Final (después del secado a 35°C por 30 minutos)</b>	<b>Peso inicial de muestra (g)</b>	<b>Peso final de muestra (g)</b>	<b>Porcentaje de humedad (%)</b>
Hojas (San Marcos)	1.008	0.906	10.12
Raíz (San Marcos)	1.031	0.912	11.54
Hojas (Totoncapán)	1.007	0.908	9.83
Raíz (Totoncapán)	1.032	0.935	9.40

## 8.2 Técnica de separación por Cromatografía en Capa Fina

En la cromatoplaque los resultados obtenidos en las muestras a evaluar de *V. prionophylla* fueron, para la muestra de hojas de la localidad de San marcos 8 bandas; para la muestra de raíces de la localidad de San marcos 6 bandas; para la muestra de hojas de la localidad de Totonicapán 8 bandas y para la muestra de raíces de la localidad de Totonicapán 6 bandas. En la Tabla 2 se muestran los Rf obtenidos.

Tabla 2. Valores de Rf obtenidos en la cromatoplaque de *V. prionophylla*

Muestra	No. De Manchas	Rf's
Hojas (San Marcos)	+++++++	0.13, 0.24, 0.33, 0.44, 0.53, 0.66, 0.80 y 0.93
Raíz (San Marcos)	+++++	0.24, 0.33, 0.44, 0.53, 0.66 y 0.93
Hojas (Totonicapán)	+++++++	0.13, 0.24, 0.33, 0.44, 0.53, 0.66, 0.80 y 0.93
Raíz (Totonicapán)	+++++	0.24, 0.33, 0.44, 0.53, 0.66 y 0.93
Polvo <i>V. officinalis</i>	++++	0.44, 0.53, 0.80 y 0.93
Estándar de Isovaltrato	+	0.53

En el revelado se pudo apreciar que el punto o la mancha y el Rf correspondiente al estándar de isovaltrato con Rf de 0.53, correspondió a todas las muestras corridas incluida *V. officinalis*.

En la Figura 1 del Anexo 2 se puede observar el revelado de la placa cromatográfica, en la Figura 2 del Anexo 2 la interpretación del cromatograma obtenido y en la Figura 3 del Anexo 2 se aprecia un cromatograma reportado en la literatura para *V. officinalis*.

## 8.3 Técnica de extracción por maceración

En la Tabla 3 se muestran los detalles de pesos de muestras y cantidad de disolvente utilizado para la extracción.

Tabla 3. Relación peso de muestra volumen de disolvente en la obtención de los extractos de *Valeriana prionophylla*

Muestra	Cantidad de muestra (g)	Relación	Cantidad de disolvente (mL)	Cantidad de extracto obtenido (mL)
Hojas (San Marcos)	10.066	1:10	100	52
Raíz (San Marcos)	10.0206	1:5	50	25
Hojas (Totonicapán)	10.0068	1:10	100	45
Raíz (Totonicapán)	10.0562	1:5	50	25

Las Figuras 4 y 5 del Anexo 2 muestran los diferentes extractos obtenidos.

### 8.3 Técnica de Separación por cromatografía en columna

Los extractos obtenidos de la maceración, fueron sometidos a una separación por cromatografía en columna, como se ilustra en la Figura 6 del Anexo 2.

De cada una de las corridas cromatográficas en columna realizadas a los extractos se obtuvieron una serie de fracciones, las cuales fueron colectadas por la diferenciación en el color, la que fue muy evidente. Las fracciones colectadas se muestran en la Figura 7 del Anexo 2.

A cada una de las fracciones se le hizo una corrida cromatográfica en capa fina, con el fin de visualizar semejanzas entre algunas fracciones y combinarlas según las mismas. En las Figuras 8, 9, 10 y 11 del Anexo 2, se muestran las placas cromatográficas obtenidas para cada una de las fracciones de los cuatro extractos.

De las corridas cromatográficas realizadas a las fracciones obtenidas por separación en columna de los extractos diclorometánicos, se buscó la semejanza en el perfil de separación para mezclar las fracciones comunes, los resultados obtenidos de este trabajo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Relación de fracciones obtenidas de los extractos de *V. prionophylla*

Extracto	Fracciones obtenidas	Fracciones útiles	Fracciones combinadas	Muestras analizadas
Hojas San Marcos	18	11	2+3 ; 4+5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 : 10+11	7
Raíces San Marcos	4	3	1+2 ; 3	2
Hojas Tonicapán	10	6	1+2+3+4 ; 5+6	2
Raíces Tonicapán	4	3	1 ; 2 ; 3	3

#### 8.4 Técnica de determinación cualitativa por Espectrofotometría de absorción ultravioleta/visible.

Luego de correr las muestras, se compararon los espectros obtenidos y los resultados de este análisis se describen en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Longitudes de onda de mayor absorción de los extractos de *V. prionophylla*

Muestra	Longitudes de onda de mayor absorción $\pm 2$ (nm)
Hojas San Marcos	282 , 414 , 670
Raíces San Marcos	285
Hojas Tonicapán	282 , 415 , 670
Raíces Tonicapán	283

Los espectros obtenidos se muestran en las Figuras 12, 13, 14, 15, 16 y 17 del Anexo 2.

Las muestras de las fracciones de los extractos de las raíces de ambas localidades, presentaron un máximo de absorción a  $284 \pm 2$  nm y las muestras de las fracciones de los extractos de las hojas a  $284 \pm 2$  nm,  $414 \pm 2$  nm y  $670 \pm 2$  nm.

Tabla 6. Relación de valores de absorbancia por fracciones de los extractos de *V. prionophylla*

Muestra	Fracción	284 ±2 nm	414 ±2 nm	670 ±2 nm
Hojas San Marcos	1	---	0.15466	---
	2	0.11917	0.41998	0.18361
	3	---	1.03210	0.43257
	4	0.15265	0.23374	---
	5	7.2183E-2	4.0841E-2	---
	6	4.1270E-2	9.1691E-3	---
	7	6.1987E-2	---	1.3738E-3
Raíces San Marcos	1	2.60970	---	---
	2	0.54518	---	---
Hojas Totonicapán	1	0.10666	0.14433	6.2674E-2
	2	8.7773E-2	2.3424E-2	---
Raíces Totonicapán	1	1.16130	---	---
	2	2.38810	---	2.8248e-3
	3	0.56457	---	---

Las absorbancias obtenidas de las fracciones de los extractos de raíces, presentan valores mayores (entre 2.3 y 2.6 AU) a 284 ±2 nm; en cambio las absorbancias obtenidas para las fracciones de los extractos de las hojas exhiben máximos de 0.10 a 0.15 AU.

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo realizado sobre muestras de *V. prionophylla* muestra diversos aspectos en cuanto a la detección de isovaltrato en cromatografía en capa fina y por espectrofotometría de absorción ultravioleta visible, los cuales permiten establecer relaciones comparativas cualitativas con respecto a la especie de referencia que es *V. officinalis*. En la fase previa, donde se realizó una micro extracción de las muestras vegetales con diclorometano y una corrida por cromatografía en capa fina de los residuos obtenidos, se comprobó que este es un disolvente que logra extraer los valepotriatos de forma eficiente. Al efectuar el proceso de obtención de los extractos por maceración, se observó que los extractos de las hojas presentaban una coloración azul verdosa oscura, en cambio los extractos de las raíces eran amarillo pálido. Con respecto a la separación por cromatografía en columna aplicada a cada uno de los extractos obtenidos, es adecuado señalar que hubo una verdadera separación perceptible por capas de colores que se notaban a simple vista, las cuales fueron el punto de medida en la obtención de las diversas fracciones obtenidas. Estas fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina, con el objeto de detectar en cuales de ellas se encontraba presente el compuesto isovaltrato, y además para poder mezclar algunas fracciones entre si por semejanza en los perfiles cromatográficos obtenidos. Al realizar un análisis detallado de las placas cromatográficas en capa fina, se observa que se encuentran presentes otros componentes, que aunque como no se corrió ningún otro estándar además de isovaltrato, al comparar con el cromatograma reportado en la literatura para *V. officinalis* (Figura 3 del Anexo 2), se evidencia la presencia de ácidos valerénicos, valtrato y acevaltrato. Al efectuar las corridas espectrofotométricas, se detectó la presencia de isovaltrato en todas las muestras a una longitud de onda de  $284 \pm 2$  nm, sin embargo esta resultó más notoria en las muestras de raíces, donde la absorción marcó un valor alto en la escala del espectro. Se corrió un estándar de isovaltrato para corroborar la identidad del mismo en las muestras. También en todas las corridas por cromatografía en capa fina se aplicó el estándar de isovaltrato, y en todas ellas como se

puede observar en las figuras de las placas cromatográficas (Figuras 2, 8, 9, 10 y 11 del Anexo 2), se evidenció la presencia de este componente. Al analizar los resultados de las lecturas espectrofotométricas (Tablas 5 y 6), se observa que los valores de absorbancia de las raíces son aproximadamente 10 veces mayores que los valores obtenidos para las hojas, lo que comprueba que las raíces contienen mayor cantidad de isoaltrato que las hojas. El esquema propuesto para la extracción y separación de isoaltrato en las muestras vegetales brindó resultados satisfactorios, ya que se obtuvieron fracciones muy simples en las cuales se pudo detectar la presencia de isoaltrato tanto como por cromatografía en capa fina como por espectrofotometría de absorción ultravioleta visible.

## 11. CONCLUSIONES

- 10.1** Las muestras analizadas de hojas y raíces de *V. prionophylla* de ambas localidades (San Marcos y Totonicapán) tienen presente Isovaltrato, al igual que la muestra en polvo de *V. officinalis*.
- 10.2** Las raíces contienen mayor cantidad de Isovaltrato que las hojas, según los datos obtenidos por espectrofotometría de absorción ultravioleta visible.
- 10.3** Además de Isovaltrato, podemos evidenciar la presencia de valtrato, acevaltrato y ácidos valerénicos en las muestras vegetales.
- 10.4** El solvente extractor utilizado (diclorometano), logró extraer el compuesto de interés de este trabajo, que fue el isovaltrato.
- 10.5** Utilizando la técnica de espectrofotometría de absorción ultravioleta visible, se logra la identificación de Isovaltrato a una longitud de onda de  $284 \pm 2$  nm.
- 10.6** La presencia de isovaltrato y de otros valepotriatos, justifican el uso equiparable de *V. prionophylla* como planta medicinal al igual que los usos reportados en las Farmacopeas para *V. officinalis*.

## 12. RECOMENDACIONES

- 11.1** Realizar un análisis cuantitativo de las muestras objeto del estudio, utilizando la técnica espectrofotométrica.
- 11.2** Realizar la validación de la técnica espectrofotométrica, para poder crear estándares de calidad para la elaboración de productos fitofarmacéuticos.
- 11.3** Realizar ensayos sobre otros solventes extractivos, con el objeto de estandarizar cual es el solvente que extrae mejor y en mayor cantidad los valepotriatos y en especial el Isovaltrato.
- 11.4** Incluir en el estudio muestras de otras localidades, para realizar un análisis comparativo general entre las mismas.
- 11.5** Realizar un análisis comparativo, utilizando diversas técnicas (Espectrofotometría ultravioleta visible, Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC), entre diferentes muestras de diferentes órganos de *V. prionophylla* y los de *V. officinalis*.
- 11.6** Incluir en la metodología la detección y cuantificación de otros valepotriatos, para obtener un perfil fitoquímico más amplio de la especie.
- 11.7** Reducir el barrido espectrofotométrico a un rango entre 220 y 300 nm, con el fin de obtener mejores espectros que evidencien la presencia y cuantificación de isovaltrato.

### 13. REFERENCIAS

**12.1** Bell ChD., Donoghue MJ. Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special referente to the South American valerians. *Organisms, Diversity & Evolution* 2005; 5: 147-159.

**12.2** Houghton PJ. The Chemistry of valeriana. *Valerian; The Genus Valeriana*. Harwood Academic Publishers, 1997. p. 21-54.

**12.3** Nash DL. Flora de Guatemala, Valerianaceae. *Field. Bot.* 24 (11): 296–306.

**12.4** Cruz A. Evaluación de la actividad biocida e Identificación Química de Valepotriatos en tres plantas reconocidas popularmente en Guatemala como Valeriana. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 46 pp.

**12.5** Piccinelli A. et al. New Lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with Antioxidative and Vasorelaxant Activities. *Journal of Natural Products* 2004; 67, (7): 1135-1140.

**12.6** Chavadej S. Further investigations of valepotriates in the valerianaceae. *Pharm Weekbl* 1985; 74: 167 – 168.

**12.7** De la Cruz B. Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas científicamente. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005: 42-44.

**12.8** El-Nagger LJ., Bed JL, Iridoids from the Bark of *Anthocephalus chinensis* (*A. cadamba*) *Journal Natural Products* 1980; 43: 649.

**12.9** Bos R., Woerdenbag HJ., Niesko Pras. Determination de Valepotriates. Journal of Chromatography A 2002; 967: 131-146.

**12.10** Bos R. et al. Aspectos analíticos de las preparaciones fitoterapéuticas de la valeriana; Análisis fitoquímico Phytochem. Anal. 1996; 7: 143.

**12.11** Scheneider G., Willens M. Neue Abbauprodukte der Valepotriate aus Kentranthus rubber. 1979; Archiv der Pharmazie; 315: 555-556.

**12.12** Torsell K., and Wahlberg, K. Isolation, structure and synthesis of alkaloids from Valeriana officinalis. Acta Chemica Scandinavica 1967; 21: 53-60.

**12.13** Hânsel R., Schultz J. Valerensäuren und Valerenal als Leitstoffe des offizinellen Baldrians. 1982; Deutsche Apotheker Zeitung 122: 215-219.

**12.14** Wagner H., Bladt, S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2 ed. Germany: Editorial Springer. 2001; p. 341-361.

**12.15** Roca C. Evaluación comparativa de la acción sedante e hipnótica de un elixir fitoterapéutico y la combinación de las plantas originales. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 77 pp.

**12.16** Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria 1999. pp 365-368.

**12.17** Cruz E. Evaluación clínica de la efectividad de *Valeriana prionophylla* como inductora del sueño. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Trabajo de graduación Maestría en Uso y Producción de Plantas Medicinales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y Facultad de Agronomía) 2005. 50 pp.

**12.18** Gattuso M., Gattuso S. Manual de Procedimientos para el Análisis de Drogas en Polvo. Argentina: UNR Editora. 1999. pp 7-18.

**12.19** Pecsok RL., Shields LD. Métodos modernos de análisis químico. México: Limusa 1983; pp 104-110.

**12.20** Rubinson KA., Rubinson JF. Análisis instrumental. España: Pearson 2001; pp 173-189.

**12.21** Luna R. Fundamentos de Química Analítica. 2 ed. México: Limusa 1984; p. 29-48.

**12.22** Skoog DA., West DM. Análisis instrumental. México: Interamericana 1997; p 157-213.

**12.23** Solís P., Guerrero N., Gattuso S., Cáceres A. Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Guatemala: OEA/AICD/AE 2003; p 43-84.

**ANEXO 1.**  
**OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**



Figura 1. Cosecha del material vegetal de *V. prionophylla* de Tonicapán



Figura 2. Tamizado de las hojas de *V. prionophylla*



Figura 3. Balanza de humedad marca Halogen



Figura 4. Horno de desecación conteniendo muestra de *V. prionophylla*

**ANEXO 2.**  
**EXTRACTOS, CROMATOGRAFIAS TLC Y ESPECTROS DE ABSORCIÓN**

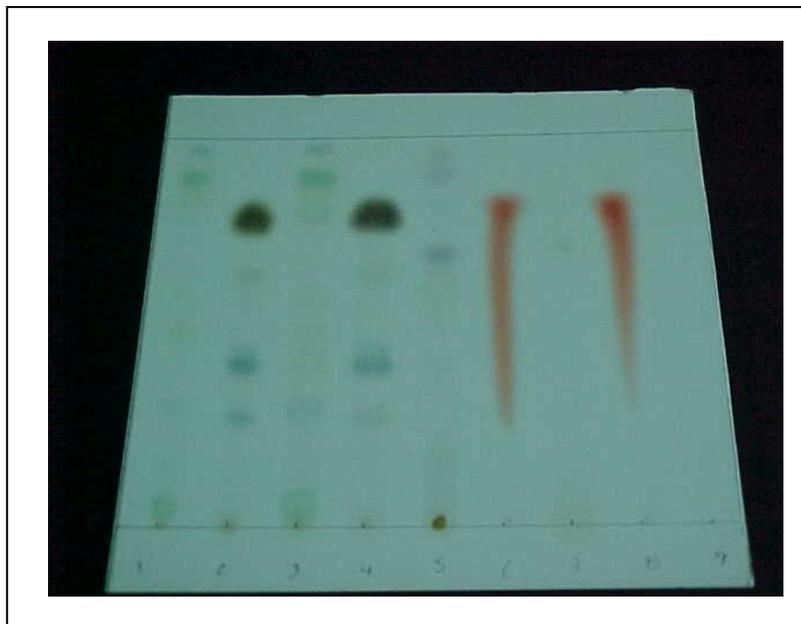


Figura 1. Revelado de placa cromatográfica de *V. prionophylla*

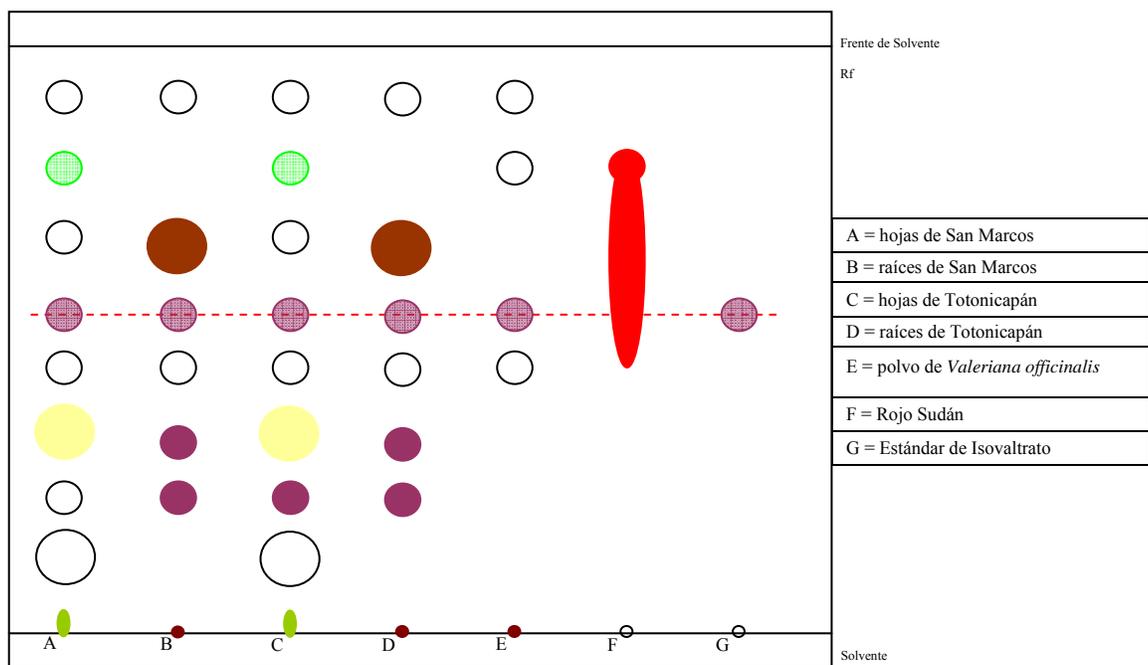


Figura 2. Interpretación del cromatograma revelado de *V. prionophylla*

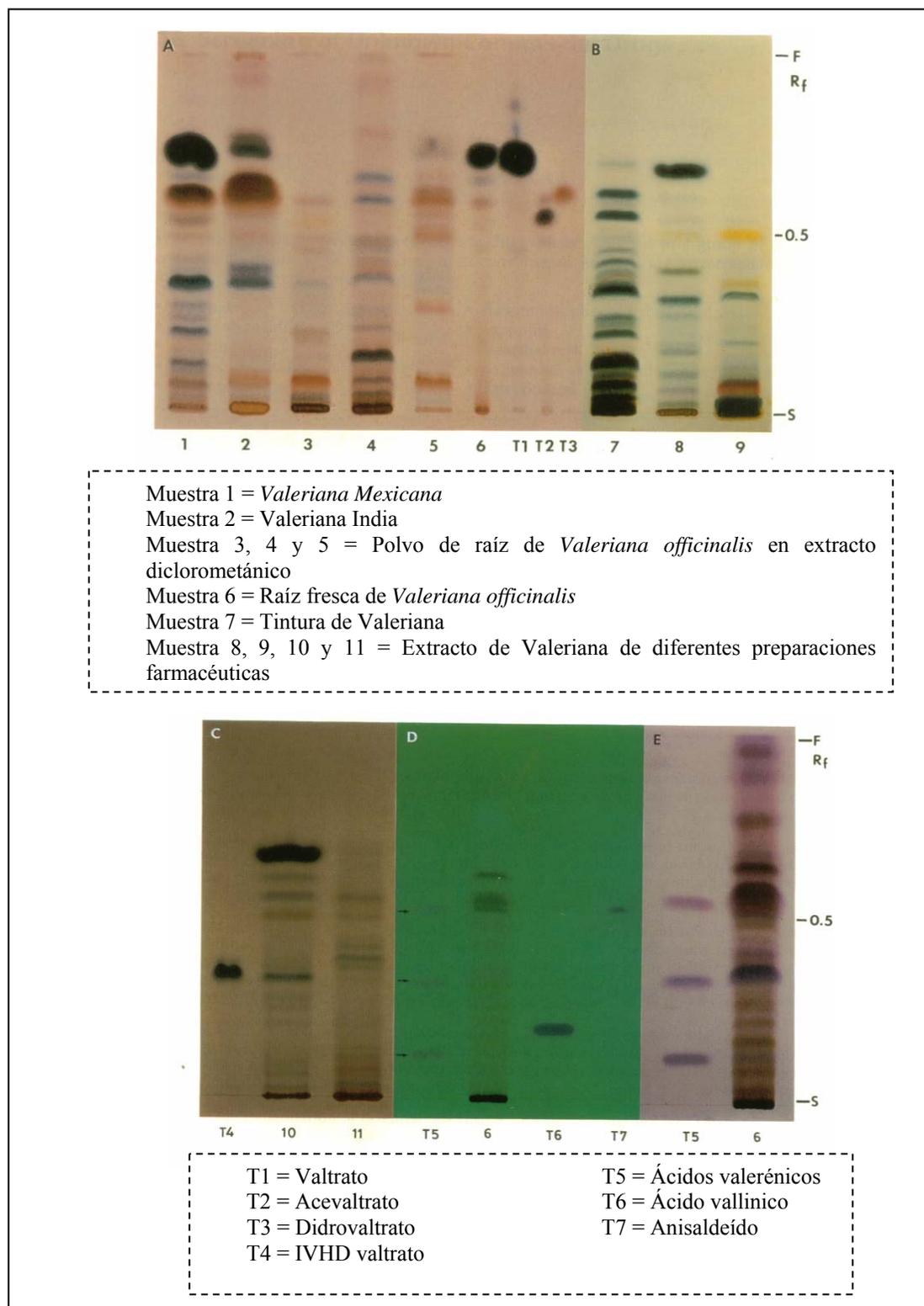


Figura 3. Cromatograma reportado en literatura para *V. officinalis*

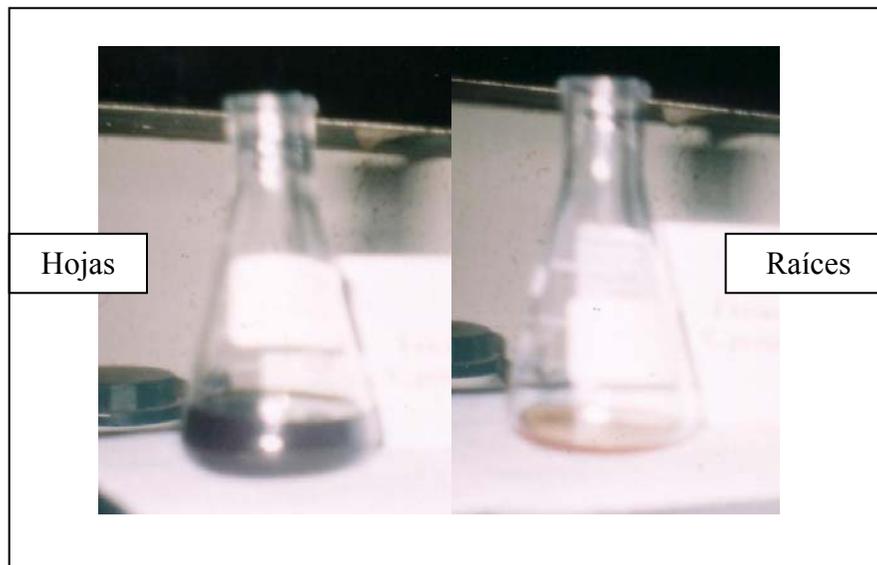


Figura 4. Extractos de *V. prionophylla* obtenidos por maceración de muestra de San Marcos



Figura 5. Extractos de *V. prionophylla* obtenidos por maceración de muestra de Tonicapán

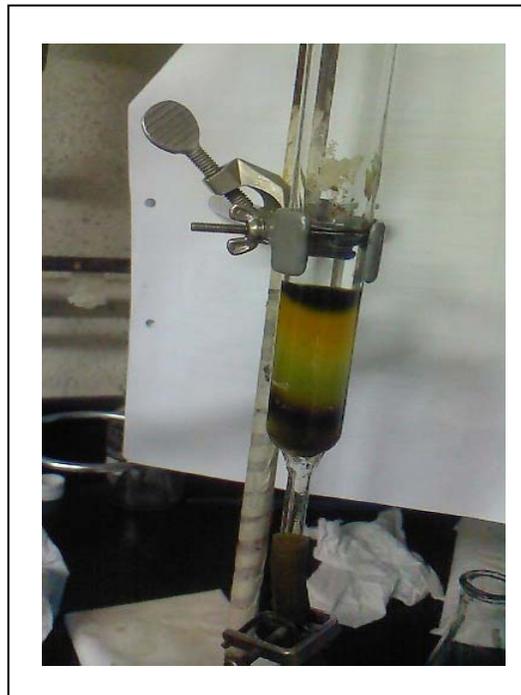


Figura 6. Separación por cromatografía en columna de extractos de *V. prionophylla* obtenido de muestra de hojas de San Marcos



Figura 7. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de *V. prionophylla*

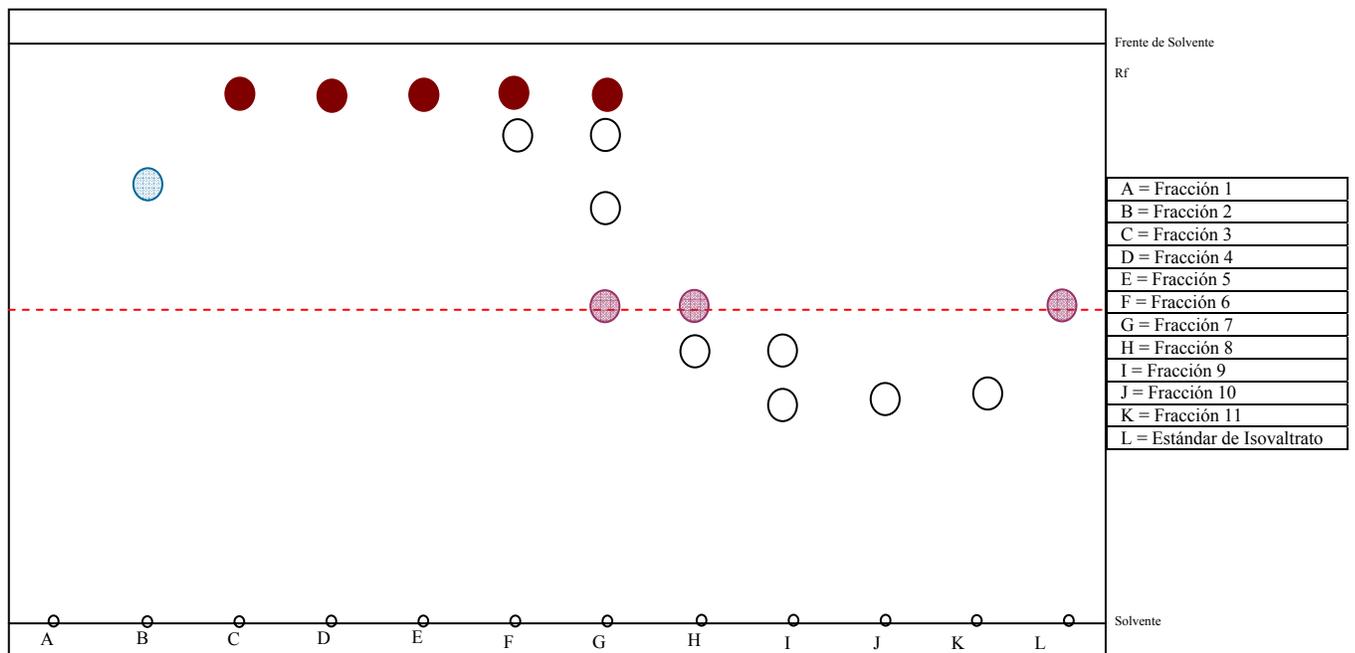


Figura 8. TLC de las fracciones de cromatografía en columna del extracto de *V. prionophylla* de hojas de San Marcos

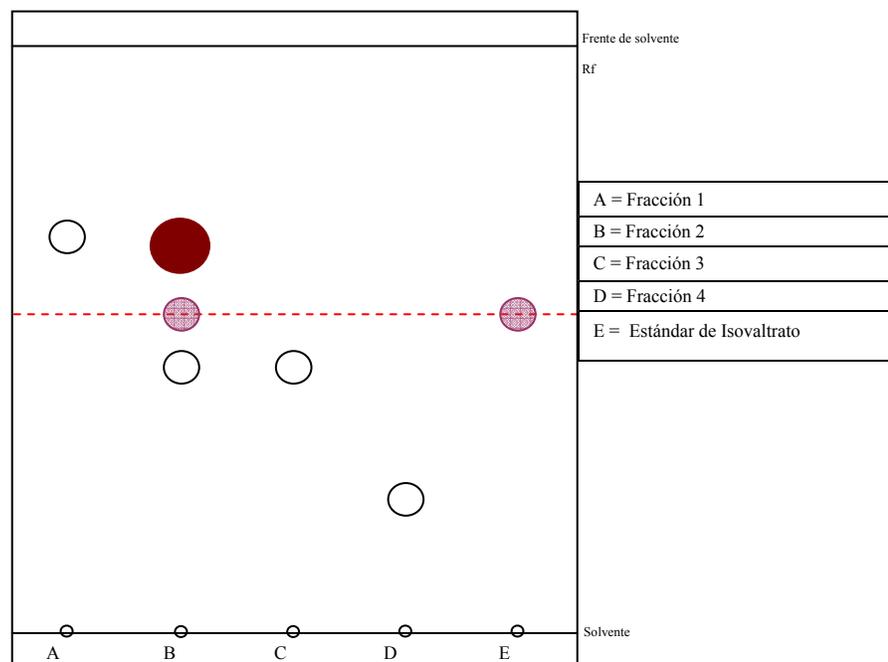


Figura 9. TLC de las fracciones de cromatografía en columna del extracto de *V. prionophylla* de raíces de San Marcos

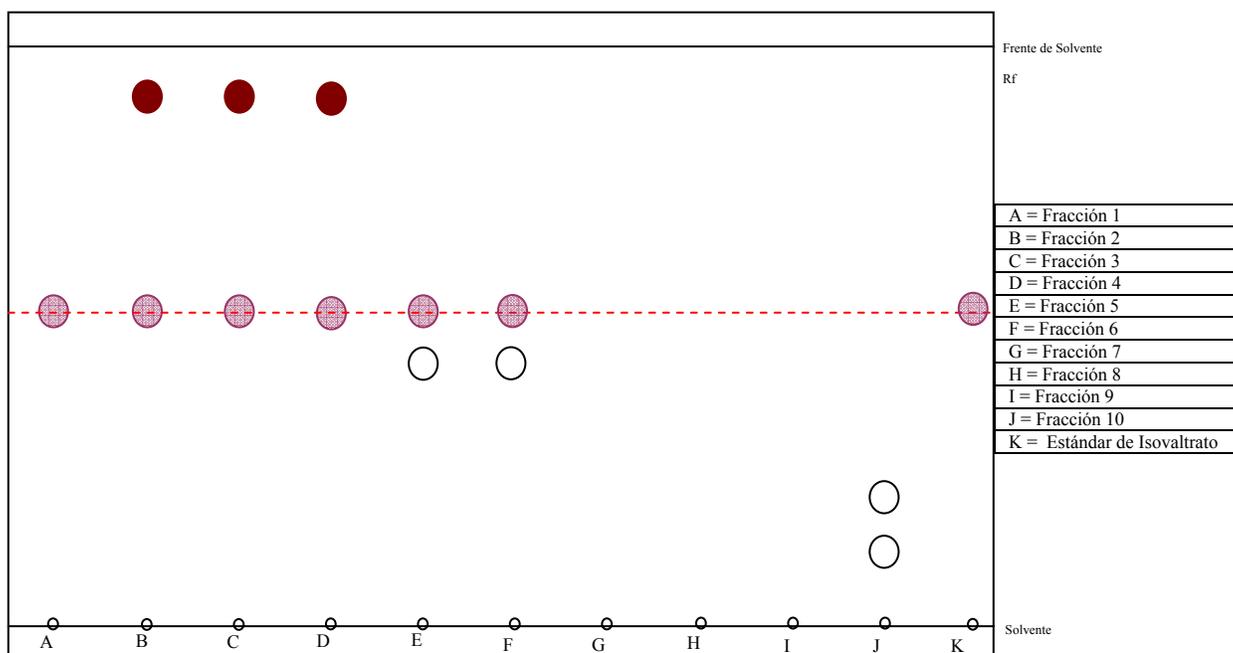


Figura 10. TLC de las fracciones de cromatografía en columna del extracto de *V. priono-phylla* de hojas de Tonicapán

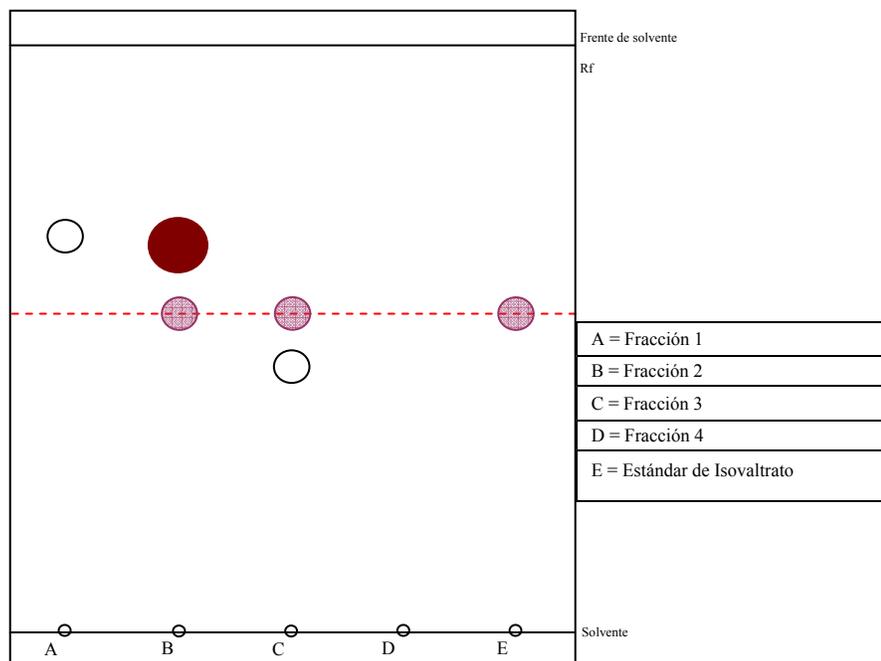
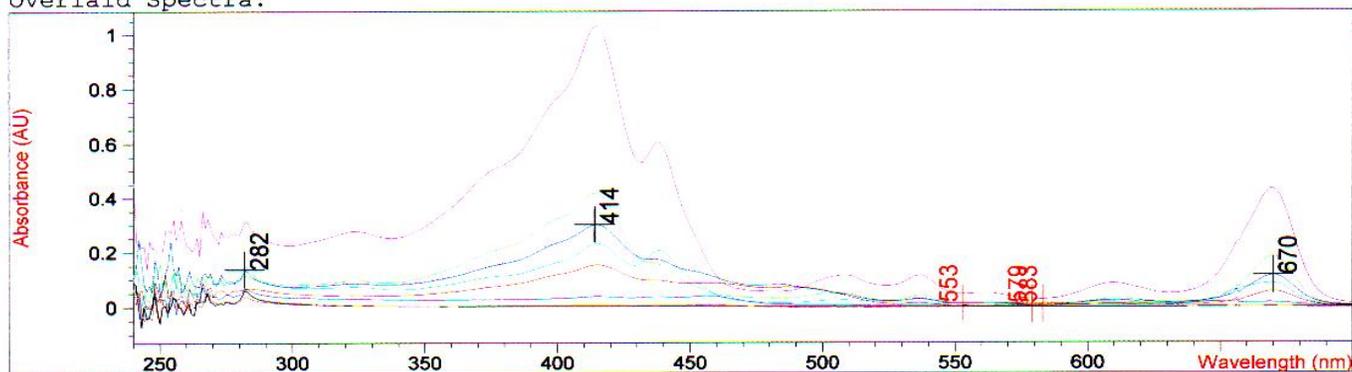


Figura 11. TLC de las fracciones de cromatografía en columna del extracto de *V. priono-phylla* de raíces de Tonicapán

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\VALE1H.SD Created : 9/25/07 11:14:43

## Overlaid Spectra:



#	Name	Peaks (nm)	Abs (AU)	Valleys (nm)	Abs (AU)
1	Muestra 1 Fracc	282.0	6.1987E-2	657.0	5.4932E-4
1		670.0	1.3738E-3	***	***
1		***	***	***	***
2	Muestra 1 Fracc	282.0	4.1270E-2	658.0	6.5565E-4
2		414.0	9.1691E-3	446.0	6.9013E-3
2		456.0	9.0461E-3	432.0	7.1630E-3
3	Muestra 1 Fracc	282.0	7.2183E-2	551.0	5.9314E-3
3		456.0	4.1631E-2	525.0	6.1541E-3
3		415.0	4.0841E-2	617.0	7.1030E-3
4	Muestra 1 Fracc	415.0	0.23374	582.0	6.9847E-3
4		438.0	0.20750	629.0	1.1655E-2
4		282.0	0.15265	553.0	1.3430E-2
5	Muestra 1 Fracc	415.0	1.03210	583.0	2.8122E-2
5		438.0	0.60741	552.0	4.6776E-2
5		669.0	0.43257	631.0	4.8469E-2
6	Muestra 1 Fracc	414.0	0.41998	583.0	6.9003E-3
6		670.0	0.18361	553.0	1.3000E-2
6		282.0	0.11917	632.0	1.6120E-2
7	Muestra 1 Fracc	415.0	0.15466	583.0	4.7402E-3
7		456.0	8.7524E-2	579.0	4.7464E-3
7		487.0	7.2444E-2	588.0	4.8742E-3
8	Extracto madre d	414.0	0.30173	583.0	9.7814E-3
8		282.0	0.13715	579.0	9.9936E-3
8		670.0	0.11425	553.0	1.2944E-2

Report generated by : dmtm

Signature: .....

\*\*\* End Spectrum/Peak Report \*\*\*

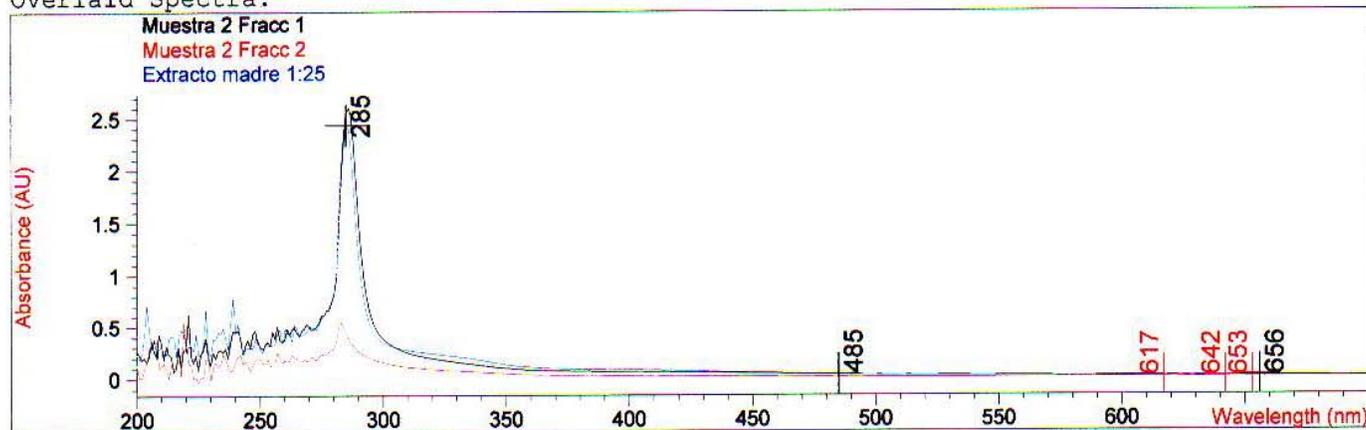
Figura 12. Espectro de Absorción de las fracciones obtenidas del Extracto diclorometánico de las hojas de *V. prionoophylla* de San Marcos

Spectrum/Peak Report

Date 9/25/2007 Time 15:15:43 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\VALE1R.SD Created : 9/25/07 13:15:14

## Overlaid Spectra:



#	Name	Peaks (nm)	Abs (AU)	Valleys (nm)	Abs (AU)
1	Muestra 2 Fracc	286.0	2.60970	642.0	1.9237E-2
1		620.0	2.0713E-2	618.0	2.0436E-2
1		656.0	1.9661E-2	***	***
2	Muestra 2 Fracc	283.0	0.54518	641.0	9.4986E-3
2		656.0	1.7756E-2	617.0	9.5201E-3
2		487.0	1.6198E-2	626.0	1.0270E-2
3	Extracto madre 1	285.0	2.43550	642.0	1.5235E-2
3		485.0	4.1249E-2	653.0	1.6262E-2
3		656.0	2.3525E-2	617.0	1.6806E-2

Report generated by : dmtm

Signature: .....

\*\*\* End Spectrum/Peak Report \*\*\*

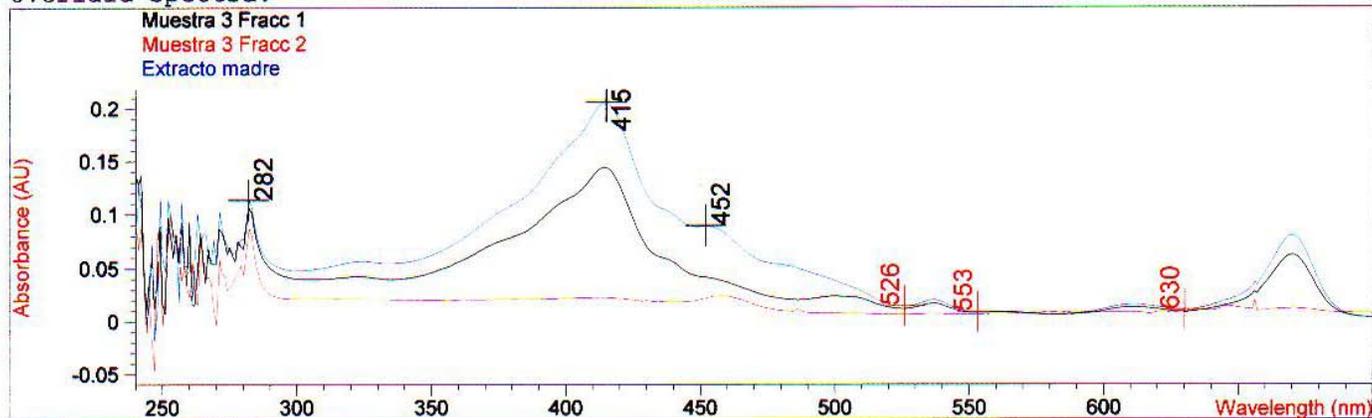
Figura 13. Espectro de Absorción de las fracciones obtenidas del Extracto diclorometánico de las raíces de *V. prionophylla* de San Marcos

Spectrum/Peak Report

Date 9/25/2007 Time 15:30:22 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\VALE2H.SD Created : 9/25/07 13:39:32

## Overlaid Spectra:



#	Name	Peaks (nm)	Abs (AU)	Valleys (nm)	Abs (AU)
1	Muestra 3 Fracc	414.0	0.14433	553.0	8.3270E-3
1		282.0	0.10666	630.0	9.3145E-3
1		670.0	6.2674E-2	525.0	1.2006E-2
2	Muestra 3 Fracc	282.0	8.7773E-2	523.0	6.6218E-3
2		458.0	2.4633E-2	550.0	6.8221E-3
2		413.0	2.3424E-2	617.0	7.6113E-3
3	Extracto madre	415.0	0.20656	553.0	9.4013E-3
3		282.0	0.11352	630.0	1.1336E-2
3		452.0	8.9517E-2	526.0	1.4416E-2

Report generated by : dmtm

Signature: .....

\*\*\* End Spectrum/Peak Report \*\*\*

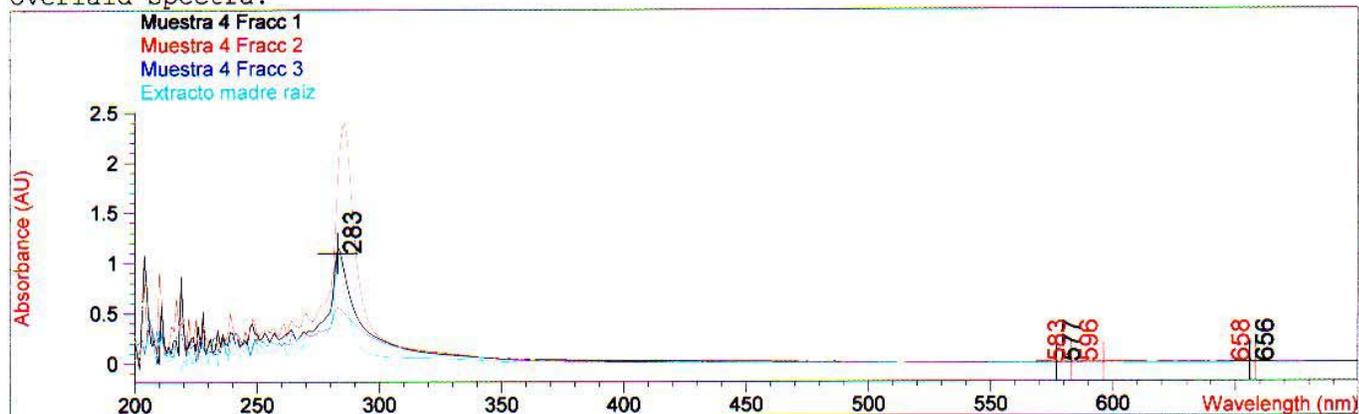
Figura 14. Espectro de Absorción de las fracciones obtenidas del Extracto diclorometánico de las hojas de *V. prionophylla* de Totonicapán

Spectrum/Peak Report

Date 9/25/2007 Time 15:32:59 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\VALE2R.SD Created : 9/25/07 13:54:34

Overlaid Spectra:



#	Name	Peaks (nm)	Abs (AU)	Valleys (nm)	Abs (AU)
1	Muestra 4 Fracc	283.0	1.16130	642.0	4.8475E-3
1		656.0	1.5796E-2	617.0	4.9424E-3
1		486.0	1.3328E-2	626.0	5.3358E-3
2	Muestra 4 Fracc	286.0	2.38810	658.0	1.5550E-3
2		656.0	4.2672E-3	583.0	2.0690E-3
2		671.0	2.8248E-3	579.0	2.2020E-3
3	Muestra 4 Fracc	283.0	0.56457	617.0	6.2051E-3
3		656.0	1.7021E-2	641.0	6.3591E-3
3		486.0	1.1611E-2	626.0	6.9675E-3
4	Extracto madre r	283.0	1.09620	658.0	2.3093E-3
4		656.0	5.9695E-3	583.0	3.0332E-3
4		577.0	3.8171E-3	596.0	3.0990E-3

Report generated by : dmtm

Signature: .....

\*\*\* End Spectrum/Peak Report \*\*\*

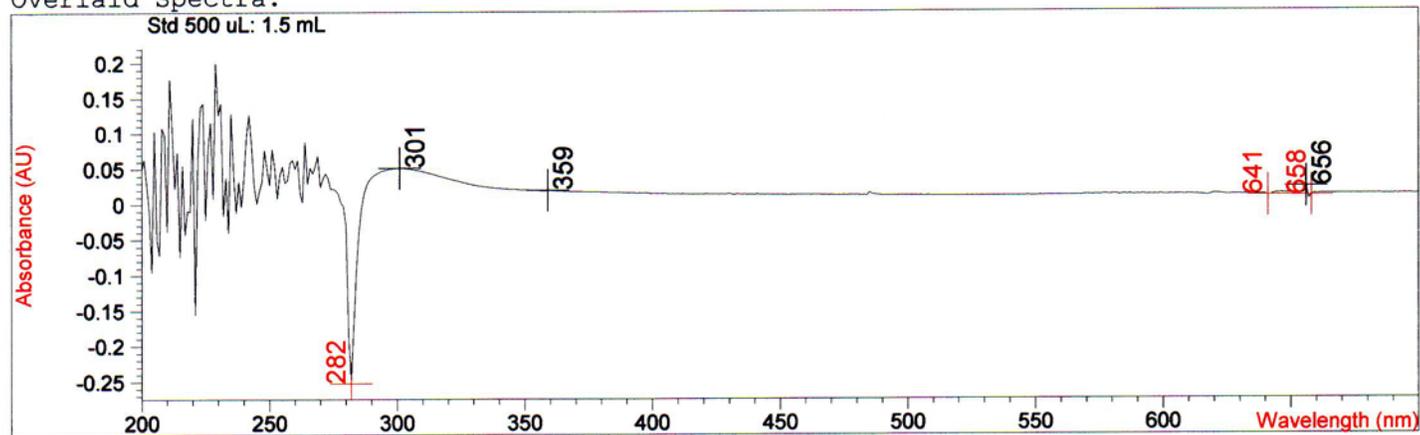
Figura 15. Espectro de Absorción de las fracciones obtenidas del Extracto diclorometánico de las raíces de *V. prionophylla* de Tonicapán

Spectrum/Peak Report

Date 9/25/2007 Time 16:07:08 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\VALE1STA.SD Created : 9/25/07 12:37:36

Overlaid Spectra:



#	Name	Peaks (nm)	Abs (AU)	Valleys (nm)	Abs (AU)
1	Std 500 uL: 1.5	301.0	5.0951E-2	282.0	-0.25160
1		656.0	2.2360E-2	658.0	9.8033E-3
1		359.0	1.9475E-2	641.0	1.0373E-2

Report generated by : dmtm

Signature: .....

\*\*\* End Spectrum/Peak Report \*\*\*

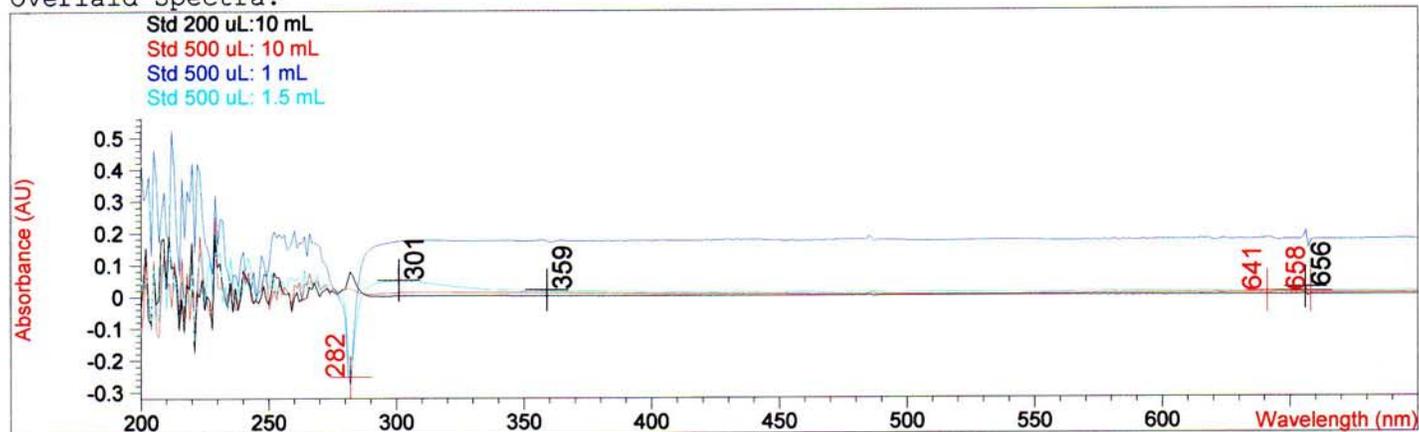
Figura 16. Espectro de Absorción del estándar de Isovaltrato

Spectrum/Peak Report

Date 9/25/2007 Time 16:05:34 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\VALE1STA.SD Created : 9/25/07 12:09:44

## Overlaid Spectra:



#	Name	Peaks (nm)	Abs (AU)	Valleys (nm)	Abs (AU)
1	Std 200 uL: 10 mL	282.0	7.8104E-2	658.0	-1.2412E-3
1		656.0	4.3035E-3	583.0	-6.7425E-4
1		485.0	3.5272E-3	579.0	-3.7527E-4
2	Std 500 uL: 10 m	656.0	1.6623E-2	658.0	2.9922E-3
2		315.0	1.4670E-2	617.0	4.4460E-3
2		360.0	1.2355E-2	641.0	4.6520E-3
3	Std 500 uL: 1 mL	656.0	0.20046	282.0	-0.27839
3		485.0	0.18725	658.0	0.16965
3		430.0	0.17876	583.0	0.16968
4	Std 500 uL: 1.5	301.0	5.0951E-2	282.0	-0.25160
4		656.0	2.2360E-2	658.0	9.8033E-3
4		359.0	1.9475E-2	641.0	1.0373E-2

Report generated by : dmtm

Signature: .....

\*\*\* End Spectrum/Peak Report \*\*\*

Figura 17. Espectro de Absorción del estándar de Isovaltrato