

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

**“Tamizaje antibacteriano *in vitro* de los extractos etanólicos de las hojas y raíces de especímenes de *Valeriana prionophylla* Standl. procedentes de tres regiones del altiplano guatemalteco”.**

EDWIN MOISES CAN MACÚ

MAESTRÍA MULTIDISCIPLINARIA, EN PRODUCCIÓN Y USO DE PLANTAS  
MEDICINALES

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2007

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

**“Tamizaje antibacteriano *in vitro* de los extractos etanólicos de las hojas y raíces de especímenes de *Valeriana prionophylla* Standl. procedentes de tres regiones del altiplano guatemalteco”.**

INFORME DE TESIS PRESENTADO POR

EDWIN MOISES CAN MACÚ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE LA  
MAESTRÍA MULTIDISCIPLINARIA, EN PRODUCCIÓN Y USO DE PLANTAS  
MEDICINALES

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2007

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

**JUNTA DIRECTIVA**

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

**CONSEJO ACADÉMICO  
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.**

## ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Definición del problema	4
4. Justificación	6
5. Marco teórico	7
5.1. Situación general y tendencias de la salud en Guatemala	7
5.2. El género <i>valeriana</i>	9
5.3. <i>Valeriana</i> en Guatemala	18
5.4. Elaboración de extractos	21
5.5. Actividad antimicrobiana	26
5.6. Microorganismos patógenos.	31
6. Objetivos	34
6.1. Objetivo General	34
6.2. Objetivos Específicos	34
7. Hipótesis	35
8. Metodología	36
8.1. Universo	36
8.2. Muestra	36
8.3. Recursos	36
8.4. Procedimientos	39
9. Resultados	42
10. Discusión de resultados	44
11. Conclusiones	46
12. Referencias bibliográficas	47



## 1. RESUMEN

Debido a que diversas especies de valeriana, sobre todo *Valeriana officinalis* L., han mostrado actividad antimicrobiana, se decidió investigar la presencia equivalente de actividad antimicrobiana en la especie nativa *Valeriana prionophylla* Standl., de cuya actividad antimicótica ya existen reportes en Guatemala.

Se utilizó una técnica de difusión en agar para evaluar la inhibición del crecimiento de 6 diferentes bacterias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27843, *Micobacterium smegmatis* ATCC 607 y *Bacillus subtilis*) por 6 extractos de hojas y raíces de especímenes de *V. prionophylla* procedentes de 3 diferentes regiones del altiplano de Guatemala (Nebaj, en Quiché, Concepción Tutupa en San Marcos y Cerro Raxquin en Totonicapán).

Todos los extractos mostraron actividad inhibitoria, en diversos grados, del crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Micobacterium smegmatis*. *M. smegmatis* tuvo los mayores halos de inhibición. No hubo ninguna actividad inhibitoria para las restantes bacterias.

Entre los extractos de raíz, los procedentes de Concepción Tutuapa fueron los más activos. Entre los de hoja, los más activos fueron los de Nebaj (región 1). En términos generales, los extractos de rizoma fueron más activos que los de hojas. Es la primera vez que se demuestra actividad antimicrobiana en hojas de *V. prionophylla*.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas se encuentran entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad en nuestro país (1). La multicausalidad de estas enfermedades es compleja y, sobre la base de tradiciones milenarias, con frecuencia se recurre al uso de plantas medicinales como una alternativa para su tratamiento.

En consecuencia con esta realidad, se considera conveniente fomentar el estudio de las propiedades antimicrobianas de las plantas medicinales del país, dando prioridad, por razones obvias, a las nativas. Entre estas plantas se incluye a *V. prionophylla*, especie nativa poco estudiada, sin tradición de uso antimicrobiano pero que, según los informes de Gaitán y colaboradores y Cruz y colaboradores, tiene cierta actividad antifúngica, que podría ser similar a la de *V. officinalis* (2, 3).

En el presente trabajo se hizo un tamizaje de la actividad antibacteriana de *V. prionophylla*, utilizando un procedimiento de difusión en agar para medir la presencia cuali-cuantitativa de actividad inhibitoria contra diversas cepas de bacterias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27843, *Micobacterium smegmatis* ATCC 607 y *Bacillus subtilis*). Se utilizaron extractos etanólicos de la raíz y las hojas de *V. prionophylla* procedente de tres áreas del altiplano guatemalteco (Nebaj, en Quiché, Concepción Tutupa en San Marcos y Cerro Raxquin en Totonicapán). Una característica especial de este estudio es que se incluyeron extractos etanólicos de la hoja, que no se ha considerado de uso medicinal.

Los extractos de *V. prionophylla* fueron proporcionados por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC). Los cultivos se hicieron en el laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC.

En este estudio se encontró actividad antibacteriana en los extractos de hojas y raíces contra *Micobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis*. *M. smegmatis* tuvo los mayores halos de inhibición. No hubo ninguna actividad inhibitoria para las restantes bacterias.

Entre los extractos de raíz, los procedentes de Concepción Tutuapa fueron los más activos. Entre los de hoja, los procedentes de Nebaj (región 1) fueron los más activos. En términos generales, los extractos de rizoma fueron más activos que los de hojas.

Sobre todo, es de resaltar que por primera vez se encuentra actividad antimicrobiana en los extractos de raíz y hojas de *V. prionophylla*. No se puede descartar que, en estudios futuros, dependiendo del genotipo y cultivar, así como de la edad fenológica y de la época de cosecha, pudiera variar el espectro de actividad antimicrobiana.

### 3. DEFINICION DEL PROBLEMA

Las enfermedades infecciosas se encuentran entre las causas más frecuentes de la morbilidad y la mortalidad de Guatemala. Predominan las infecciones gastrointestinales, las infecciones respiratorias y las infecciones superficiales de la piel. De hecho, las infecciones respiratorias y gastrointestinales ocupan los primeros dos lugares como causa de morbilidad (1).

Los agentes etiológicos más frecuentes de estas infecciones incluyen, en el caso de la piel, a bacterias como *Staphylococcus aureus* y en el caso de las infecciones entéricas a bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y Shigellas de diversas especies y serotipos. Bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* son causa frecuente de infecciones respiratorias superiores e inferiores. Como agente etiológico menos frecuente, *Pseudomonas aeruginosa*, puede producir infecciones crónicas de la piel y el tejido óseo en ciertas circunstancias, así como enfermedades pulmonares y de otros tejidos en ciertos subgrupos de pacientes. Otros agentes, comparativamente menos frecuentes, pero no por ello menos importantes, y con grados de patogenicidad variables, completan el cuadro de la morbimortalidad por procesos infecciosos en Guatemala (por ejemplo, *Micobacterium tuberculosis* y *Clostridium tetani*).

Aunque generalmente las infecciones bacterianas más comunes son leves a moderadas, en ciertos casos, principalmente en los de infecciones entéricas y respiratorias en niños, se trata de cuadros severos que pueden complicarse y provocar inclusive la muerte.

Estas enfermedades reconocen una multicausalidad compleja. Baste como ejemplo (por demás está mencionar el incuestionable papel del agente etiológico o de los determinantes económicos) indicar la dificultad de acceso geográfico de algunas regiones del país que imposibilita el acceso a multitud de servicios.

Las comunidades de estas regiones, por esto mismo y por otras razones, se caracterizan por la falta de conocimiento sobre las causas de las infecciones y sobre las medidas de higiene básicas para su prevención. Así mismo, cuando los necesitan, no tienen acceso a medicamentos de síntesis.

Además, el tratamiento de los procesos infecciosos con antibióticos, sobre todo en las áreas rurales, aunque esté disponible y sea posible comprarlo, no siempre es aceptado como primera opción y, siguiendo los usos tradicionales, se aplican preparaciones obtenidas de plantas. Entre estas plantas se pueden mencionar *Byrsonima crassifolia* (L) HBK (nance), *Hamelia patens* Jacq (chichipin), *Senna alata* (L) Roxb (barajillo) y otras cuyas propiedades antimicrobianas, en muchos casos, ya han sido convenientemente validadas (4).

Tomado en cuenta esta situación, se considera pertinente continuar buscando o validando propiedades antimicrobianas en diversas plantas. Entre éstas se debe mencionar a *V. prionophylla*, valeriana nativa de nuestro país, cuya raíz primariamente se usa por sus propiedades ansiolíticas e inductoras del sueño; pero que además, Gaitán y Cruz, en 2005, en forma independiente, reportaron que presentan cierta actividad antifúngica (2, 3).

Actualmente, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC, se lleva a cabo un estudio extenso de *V. prionophylla*. Como parte dicho estudio, en forma complementaria, y en consecuencia con los argumentos enunciados, se plantea la investigación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de sus hojas y raíces.

#### 4. JUSTIFICACION

Anteriormente se han estudiado las propiedades ansiolíticas y sedantes de los extractos de la raíz de *V. prionophylla* (propiedades medicinales primarias de las valerianas) que son análogas a las de otras valerianas (como *V. officinalis*); pero se han investigado poco otras de sus posibles propiedades, entre ellas las antimicrobianas, que también podrían ser análogas a las de *V. officinalis* y otras valerianas. Aunque *V. prionophylla* no tiene tradición de uso como antimicrobiana, contamos con algunos estudios hechos en Guatemala que han demostrado que posee cierta actividad antimicótica (2 - 6).

Particularmente, sería interesante encontrarle alguna actividad a las hojas, porque a la fecha, en contraste con la raíz (pasa lo mismo con otras valerianas), no parecieran tenerla y se consideran un producto de desecho.

Para Guatemala es importante continuar la investigación de las propiedades antimicrobianas de *V. prionophylla* porque las enfermedades infecciosas se incluyen entre sus principales causas de morbimortalidad (1).

Además, si se demuestra actividad antimicrobiana en las hojas o raíces de *V. prionophylla*, en el futuro se podría agregar un nuevo uso a esta planta y, por lo tanto, se volvería mas valiosa (económicamente, por ejemplo) para los habitantes de los lugares donde crece, lo cual, tratándose de una especie nativa, es muy conveniente porque sería un estímulo más para su conservación mediante un uso racional y sostenible.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. SITUACIÓN GENERAL Y TENDENCIAS DE LA SALUD EN GUATEMALA

#### 5.1.1. Mortalidad

En 1,999, se registraron 53,486 defunciones, correspondiendo a una tasa de mortalidad de 4.8 por 1,000 hab. Las primeras causas de mortalidad general, para ambos sexos, correspondieron a neumonías y diarreas. En 1,999 estas causas representaron 22.3% y 6% del total de defunciones, respectivamente. En 1,997, según datos de Instituto Nacional de Estadística (INE), la mortalidad proporcional por los 6 grandes grupos de causas fue: enfermedades transmisibles 13%; tumores 7%; enfermedades del aparato circulatorio 12%; ciertas afecciones originadas en el período perinatal 8%, causas externas 13% y todas las demás causas 47%. Los médicos certificaron 59.8% de las defunciones. El subregistro de mortalidad se estimó en 56% (1).

A continuación se hace una descripción de la mortalidad por grupos de población.

##### 5.1.1.1. Niños (0-4 años)

Para 1,997 y 1,999, la tasa registrada de mortalidad infantil fue 37.7 y 40.5 por 1,000 nacidos vivos (nv). Las tasas de mortalidad neonatal y posneonatal fueron de 15.4 y 22.3 por 1,000 nv, respectivamente. La Encuesta Nacional de Salud Materno Infantil de 1,998-1,999 (ENSMI-98/99), estimó la tasa de mortalidad infantil (TMI) en 45 por mil nv. Para 1,999, las infecciones respiratorias agudas (IRA), la enfermedad diarreica aguda (EDA) y las causas perinatales representaron 40%, 12% y 11 % respectivamente, de las muertes de menores de un año. La tasa de mortalidad de niños de 1 a 4 años fue 14 por mil; 9 por 1,000 en el área urbana y 20 por 1,000 en el área rural (1).

##### 5.1.1.2. Escolares (5 a 9 años)

Para 1,999, se registraron 1,027 defunciones para una tasa de 0.6 por 1,000. Los casos de EDA incrementaron de 16,015 casos en 1,997 a 43,119 en 1,998 y 50,799 casos para 1,999 (1).

#### 5.1.1.3. Adolescentes (10 a 19 años)

En el 2,000, la población de 10 a 19 años se estimó en 2,752,924 personas, 24% de la población total. El 51% de esta población vivía en el área rural. La tasa de fecundidad en las adolescentes (15 a 19 años) fue de 123 por cada 1,000 mujeres. Para 1,998, según datos del INE, las principales causas de muerte en el grupo de 15 a 19 años fueron: muertes por arma de fuego, neumonía e influenza, y las infecciones intestinales (1).

#### 5.1.1.4. Adultos (20 a 59 años)

Para 1,999, la población entre los 20 a 59 años fue 4,116,147 habitantes (39.3% del total). Según la Encuesta Nacional de Salud Materno Infantil de 1,995 (ENSMI'95), la tasa estimada de mortalidad materna para 1,990-1,995 fue de 190 por 100,000 nv. Datos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) de 1,997 a 1,999, indicaron tasas de mortalidad materna de 98, 100,2 y 94,9 por 100.000 nv, respectivamente. La tendencia en la utilización de métodos de planificación aumentó de 31.4% en 1,995 a 38.2% en 1,998 y 1,999 (1).

#### 5.1.1.5. Adultos mayores (60 años y más)

Para 1,999 se estimó en 5.3% la proporción de habitantes de 60 años y más. Las 10 primeras causas de consulta en adultos mayores en servicios del MSPAS, fueron por enfermedades prevenibles, transmisibles e infecciosas (1).

### **5.1.2. Morbilidad**

Se enfatiza en las enfermedades diarreicas y respiratorias por ser las primeras causas de morbilidad en el país.

#### 5.1.2.1. Enfermedades infecciosas intestinales

En 1,999 se registraron 385,633 casos de EDA (tasa de 3,470 por 100,000 hab), además de 3,244 muertes (29.2 por 100.000) por dicha causa. En el 2000, la morbilidad presentó un incremento de 21.6% con relación a 1,999, registrándose 468,981 casos (4,220 por 100,000). En 1,999, los menores de 5 años fueron el grupo más afectado con 61.8% de los casos. Se observó un incremento en los casos de cólera entre 1,997 y 1,999, donde se registraron 1,008 y 2,077 casos, respectivamente. En el 2,000 se registraron 790 casos. En 1,999 y 2,000 se presentaron 18 y 6 defunciones por cólera (letalidad de 0.9 y 0.8 respectivamente) (1).

#### 5.1.2.2. Infecciones respiratorias agudas

En 1,999 las infecciones respiratorias agudas (IRA) eran la primera causa de morbilidad y mortalidad en el país. Se registraron 1,019,247 casos de IRA y 228,762 casos de neumonía que causaron 11,082 defunciones. La neumonía fue la primera causa de mortalidad entre los niños menores de 1 año (10.6 por 1,000 menores de un año); 63% de los casos y 50% de las defunciones ocurrieron en los menores de cinco años (1).

## 5.2. EL GÉNERO *VALERIANA*

Las especies de valeriana han sido usadas por muchos años y cada vez se encuentran más pruebas científicas para demostrar su efectividad. Luego de 20 siglos podemos apreciar en su justa dimensión las apreciaciones de Galeno acerca de las propiedades sedantes de valeriana (5, 6).

### 5.2.1. Descripción de familia *Valerianaceae*

*Valeriana* es el género mayor de *Valerianaceae*, una familia representada en todas las temperaturas y áreas subtropicales del mundo.

*Valerianaceae* fue descrita por Bentham y Hooker en el año 1954 (6). Es una hierba con hojas opuestas y sin estípulas. Las flores se disponen en corimbos o panículas terminales y son, usualmente, pequeñas y numerosas. El cáliz se encuentra por debajo del ovario y forma un pequeño, a veces dentado, borde que es poco notable en el momento de la floración. La corola es usualmente monopétala, tubular en la base, con cinco lóbulos extendidos. Siempre hay menos estambres que lóbulos en la corola. El fruto es pequeño, seco y de aspecto de semilla, con una única semilla suspendida del extremo (6).

## **5.2.2. Química de la familia *Valerianaceae***

### 5.2.2.1. Terpenoides

Son derivados de la vía del mevalonato y consisten en unidades de 5 carbonos con múltiples ramificaciones. Los monoterpenos y los sesquiterpenos, con comparativamente poca oxigenación y cadenas substituidas, se encuentran frecuentemente en plantas como mezclas complejas conocidas como aceites volátiles. Se almacenan en órganos especializados y juegan un papel importante en su estrategia de supervivencia (6).

Los aceites volátiles de Valeriana consisten en una mezcla de mono y sesquiterpenoides, o casi completamente sesquiterpenoides, siendo estos de gran interés e importancia en lo que concierne a su quimotaxonomía y para la definición de su actividad biológica. La cantidad total, el tipo específico de terpenoides y la proporción de los mismos, presentes en un aceite volátil específico derivado de una particular especie variará considerablemente de acuerdo con factores ambientales tales como el clima y el suelo. Evidentemente, también habrá variaciones según la parte de la planta que se destile (6).

Los monoterpenoides incluyen principalmente al borneol y sus esteres isovaléricos y acetílicos (6).

Los sesquiterpenos pueden constituir casi la totalidad de los aceites volátiles. Estos están constituidos principalmente por dos anillos básicos: el de tipo valerano y el de tipo kesano. También se encuentran otros anillos relativamente menos importantes. Todos los derivados kesil tiene cierta actividad sedante. Dentro de los sesquiterpenos del aceite esencial merece especial mención el ácido valerénico y otros varios compuestos con la misma estructura básica de este. El ácido valerénico sobre todo, ha mostrado contribuir substancialmente a la actividad sedante y espasmolítica del aceite esencial. El ácido valerénico fue aislado en 1957 en conjunto con el valeranal. Otros derivados del ácido valerénico incluyen al ácido hidroxivalerénico y al ácido acetoxivalerénico. Existen otros compuestos sesquiterpenoides que forman parte del aceite esencial, pero tienen una importancia relativamente menor (6).

#### 5.2.3.2. Terpenoides no volátiles: Valepotriatos

Fueron aislados por primera vez en 1,966 de *Valeriana wallichii* DC, y atrajeron la atención como posibles responsables de la actividad sedante de la planta (dada la frecuente observación de la discrepancia entre la cantidad de aceites volátiles presentes en un extracto y su efecto sedante). El esqueleto terpénico de los valepotriatos es esencialmente el mismo que el de los monoterpenos glucósidos conocidos como iridooides, los cuales son muy comunes en las dicotiledóneas, pero que, en los valepotriatos en particular, presenta la característica de carecer de residuos de azúcar y de presentar cadenas laterales de esteres. Los tres primeros valepotriatos aislados fueron el valtrato, el isoaltrato y el didroaltrato. Muchos otros valepotriatos se conocen en la actualidad (6).

#### 5.2.3.3. Alcaloides y fenilpropanoides

Otros compuestos presentes en la valeriana incluyen compuestos nitrogenados (alcaloides y aminoácidos) y fenilpropanoides (constituyentes del aceite esencial, lignanos, flavonoides y compuestos relacionados) (6).

*Alcaloides.* Diversos alcaloides se encuentran presentes en pequeñas cantidades en *Valeriana*. Estos se encuentran biogenéticamente relacionados con los terpenoides y las similitudes en el esqueleto de carbón son evidentes. Se mencionan valeclorine, valtroxal, valerianina, actinidina y otros (56).

*Fenilpropanoides.* Constituyen importantes metabolitos secundarios de las plantas con flores. En *Valeriana*, se habían encontrado 4 clases de fenilpropanoides como constituyentes relativamente menores y, hasta hace algunos años, no se había demostrado que jugaran un papel significativo en alguno de los efectos farmacológicos de extracto (6).

*Glucósidos flavonoides.* En 2,003, Marder y colaboradores reportaron la presencia de la 6-metilapigenina y la hesperidina -glucósidos flavonoides-, en valeriana; estos compuestos tendrían actividad depresora sobre el SNC (7).

En 2,004, Fernández reportó haber encontrado linarina en los rizomas de ciertas especies de valeriana (8). Esta molécula, al igual que la 2S-hesperidina, tendría actividad hipnótico-sedante y, ambas, una importante interacción sinérgica cuando fueron combinadas con otros componentes de los extractos de que fueron obtenidas. (8).

Así, los glucósidos flavonoides de valeriana forman un nuevo grupo dentro de la creciente familia de flavonoides con actividad sobre el SNC.

*Lignanos.* En 2,004, Piccinelli aisló dos nuevos lignanos de la raíz de *V. prionophylla*. Estos son 7,9':7,9'diepoxilignano glucósidos. Su estructura se dilucidó por medio de RMN 1D y 2D. Ya anteriormente se habían aislado otros lignanos de *V. officinalis*. De ellos el 8-hidroxi-pinresinol exhibió afinidad por los receptores de 5-HT<sub>1A</sub> a bajas concentraciones micromolares y, el 4'-O-β-D-glucopiranosil-9-O-(6''-deoxisacarosil) olivil mostró ser un potencial antagonista parcial de los receptores A<sub>1</sub> de adenosina (9).

#### 5.2.4. Farmacología y Terapéutica de la familia *Valerianaceae*

Valeriana y sus extractos primariamente se usan como ansiolíticos e inductores del sueño. Se han hecho estudios electrofisiológicos, de unión a receptor y otros, para demostrar esta actividad. Se ha demostrado que el extracto acuoso de *V. officinalis* disminuye la recaptación del ácido gamma amino butírico (GABA, por sus siglas en inglés) en sinaptosomas aislados (usando un GABA radiomarcado) (5).

Como ya se indicó, la actividad farmacológica de tipo ansiolítica y sedante de valeriana se ha atribuido tanto a los valepotriatos como a los componentes del aceite esencia (5). Mas recientemente se han descrito una serie de flavonoides que pudieran también tener una participación en la actividad farmacológica de Valeriana.

Marder en 2003, encontró que muchos derivados flavonoides pueden ser ligandos para el receptor GABA<sub>A</sub>, sitio de unión benzodiazepínica, con sus resultantes acciones depresoras en los ratones. No obstante la acción depresora no dependería, por lo menos en forma directa, de la unión a los clásicos receptores GABA<sub>A</sub>, según lo evidencia la imposibilidad de la picrotoxina para bloquear la acción de los glucósidos flavonoides (7).

Fernández en 2,004, describió propiedades hipnótico-sedantes para la linarina, un flavonoide aislado de *V. officinalis* (8). También Fernández, en 2,006, reportó una posible acción depresora sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) de un numero de glucósidos flavonoides (2S-nehoesperidina, 2S-naringina, disemina, rutina y gospina), en comparación con 2S-hesperidina y linarina. Estos glucósidos flavonoides incrementaron, en diversos grados, el tiempo de sueño, redujeron los parámetros exploratorios en la prueba de la mesa agujereada y redujeron la actividad locomotora espontánea, en un grupo de ratas a las que se les indujo un estado de sueño con tiopental. Pero la mayor actividad se encontró en las dos últimas moléculas mencionadas, presentes en *V. officinalis*. (10).

Houghton en 1,988, hizo una extensa revisión de los constituyentes de valeriana con énfasis en su actividad sedante. Se centró sobre todo en los sesquiterpenoides (constituyentes del aceite esencial) y los iridoides (valepotriatos, monoterpenos bicíclicos). Indicó varios modelos animales para probar la actividad farmacológica de valeriana. Acerca de la actividad farmacológica sedante del extracto indicó que solo un tercio de ella se debe a los constituyentes del aceite esencial y pareciera haber una mejor correlación entre la presencia de valepotriatos y dicha actividad. También indicó que no siempre se puede demostrar una correlación perfecta entre actividad sedante y concentración de valepotriatos. También hizo un análisis de la actividad farmacológica de los diferentes constituyentes de valeriana. Por último indicó que los valepotriatos podrían tener cierta actividad citotóxica (11).

Stevinson en 2,000, en una revisión de 9 estudios aleatorizados, doble ciego, placebo controlados, acerca de la utilidad de valeriana en el tratamiento del insomnio, concluye que la evidencia sobre la utilidad de valeriana para esta indicación es promisorio pero no conclusiva. Indica que los resultados de algunos estudios sugieren que valeriana puede tener efectos agudos y acumulativos sobre el sueño, pero no todos los estudios han producido hallazgos positivos. Argumenta que esta discrepancia puede deberse a ciertas inconsistencias entre estudios en cuanto al diseño experimental. Finalmente aboga por el desarrollo de estudios rigurosos que puedan determinar la eficacia de valeriana como un tratamiento para el insomnio. Aparentemente el principal problema radica en el pequeño tamaño de las muestras utilizadas (12).

Herrera-Arellano en 2,001, Hizo una evaluación polisomnográfica de los efectos hipnóticos de un extracto estandarizado de la especie mexicana *Valeriana edulis* en pacientes que padecían de insomnio. Este estudio es interesante porque hizo uso de una medición polisomnográfica, la cual es considerada el estándar de oro para la evaluación de los trastornos del sueño. Según este estudio, *V. edulis* mostró ser útil en disminuir los episodios de despertar (produjo un sueño más estable y con menos interrupciones) e incrementó, en la misma forma que *V. officinalis*, el tiempo de sueño REM. En cuanto a seguridad, se concluyó que *V. edulis* puede ser segura para un uso de corta duración (13).

Francis en 2,002, investigó el efecto de *V. edulis* sobre los trastornos del sueño en niños con deficiencias intelectuales. Este estudio arrojó datos indicadores de que *V. edulis* podría ser útil y segura en el largo plazo en niños con trastornos del sueño que padecen de deficiencias intelectuales. Se midieron parámetros como la latencia del sueño, el tiempo que tardó en despertar cada niño, el tiempo total de sueño y la calidad del sueño. No se hizo ninguna consideración en cuanto a toxicidad a largo plazo. El estudio incluyó solamente 5 pacientes (14).

Carlini en 2,003, mencionó a *V. officinalis* como una planta con propiedades ansiolíticas. Carlini indicó que, como se sabe, las sustancias con propiedades ansiolíticas, sobre todo las de la familia de las benzodiazepinas, ocupan un lugar prominente en la clasificación de las más utilizadas por el hombre para minimizar el estrés, la tensión y la ansiedad. Pero las drogas ansiolíticas tienen una relación riesgo/beneficio que es desfavorable, sobre todo porque producen tolerancia y dependencia. No ocurre así con valeriana (15).

Carlini señaló que esta planta ha mostrado beneficios en diversos estudios en relación con el tratamiento de los trastornos de sueño. Indicó reportes de la interacción de diversos constituyentes de valeriana con el sistema GABA en el cerebro: la inhibición de la transaminasa-GABA específica, la interacción con los receptores de GABA/benzodiazepina y la interferencia con la recaptación y liberación de GABA en sinaptosomas (15).

Gutiérrez en 2,004, hizo un estudio para determinar si el extracto de *V. officinalis* afecta las funciones cognitivas y psicomotoras. Para ello examinó el efecto del extracto de valeriana (600, 1,200 y 1,800 mg) en comparación con 10 mg de diazepam (control positivo) y placebo (control negativo) en 10 voluntarios jóvenes y sanos. Según sus resultados, valeriana no tendría efectos sobre el estado de humor o sobre las funciones psicomotoras y cognitivas (16).

Shinomiya en 2,005 hizo un estudio para investigar el efecto del extracto de valeriana (*V. officinalis*) sobre el ciclo de sueño-vigilia usando un modelo de ratas. Se observó un significativo acortamiento en la latencia del sueño a dosis de 1,000 a 3,000 mg/Kg. Por otro lado el extracto de valeriana no tuvo un efecto significativo sobre el tiempo total de vigilia, el tiempo de sueño no REM (ciclo del sueño sin movimiento rápido de los ojos) o el sueño REM. El extracto de valeriana a dosis de 1,000 a 3,000 mg/Kg mostró un incremento significativo en la actividad delta durante el sueño no REM. Shinomiya concluye que el extracto de valeriana puede ser útil como una medicina herbal con efectos inductores del sueño y de mejoría en la calidad del mismo (17).

#### **5.2.5. Actividad Antimicrobiana**

Diez valepotriatos han mostrado actividad contra el hongo patógeno de las plantas *Cladosporium cucumerinum*. El valtrato 3 fue activo a 1 µg y también mostró inhibición significativa a bajas dosis sobre otros hongos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Trichopyton mentagrophytes*. El valtrato 3 y el dihidrovaltrato 5 también fueron activos contra otros patógenos de las plantas y los valepotriatos se mostraron promisorios como un nuevo grupo de compuestos fungicidas (5).

En un estudio del Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad de Nueva Jersey, se encontraron diferentes perfiles de actividad antimicrobiana en diversos cultivares de *V. officinalis*. El aceite esencial del cultivar “Select” de *Valeriana officinalis*, demostró actividad contra *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Mientras tanto el cultivar “Anthose” tuvo baja o ninguna actividad contra estos gérmenes incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. Los autores del estudio indican que probablemente estas diferencias radican en el tipo de cultivar y el estado de desarrollo de las plantas utilizadas.

Al analizar el perfil de componentes del aceite esencial en las variedades antedichas, se pudo demostrar diferencias en relación al cultivar, edad de la planta y tiempo de cosecha. Los componentes encontrados en el cultivar “Select” fueron valeranal, bornil acetato, 15-acetoxi valeranona, ácido valerénico y camfeno. En el cultivar “Anthose” se encontraron valeranal, (-)-bornil acetato, alfa-humuleno, camfeno, 15-acetoxi valeranona y ácido valerénico. El perfil de aceite esencial de estos cultivares no coincidía con los perfiles de los quimiotipos propuestos en la literatura (18).

### 5.2.6. Toxicidad

El uso por siglos, respalda la seguridad de valeriana. Numerosos estudios han indicado que los extractos acuosos y alcohólicos de *V. officinalis* tienen un alto valor de DL<sub>50</sub>. Los principales síntomas de una sobredosis incluirían fatiga, dolor abdominal y temblor, pero todos ellos desaparecen dentro de 24 horas (6).

Se ha descrito la presencia de citotoxicidad en los valepotriatos. Esto ha causado preocupación acerca de la seguridad de las preparaciones de *Valeriana*, particularmente en el uso a largo plazo (6).

Gurley, en 2005 utilizó las proporciones metabólicas fenotípicas de un único punto para determinar si la administración a largo plazo del extracto de valeriana (*V. officinalis*) y otras plantas podrían afectar la actividad del citocromo (específicamente CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 O CYP3A4/5). El punto de partida de esta investigación yace en el hecho de que las interacciones de muchas drogas vegetales se relacionan directamente con la modulación, por medios fotoquímicos, del citocromo P450 (CYP). Los resultados del estudio indican que no se producen cambios estadísticamente significativos en las proporciones fenotípicas, es decir no se altera el citocromo P450. Por lo tanto, valeriana parecería ser menos probable que produzca interacciones hierba-droga mediadas por la inhibición del CYP (19).

Markowitz en 2,004, informó sobre los resultados de una investigación en que estudió la influencia del extracto de *V. officinalis* sobre las enzimas del citocromo P450 2D6 (CYP2D6), conocidas por ser enzimas metabolizantes de drogas. Markowitz administró, como drogas de prueba, dextrometorfano (actividad sobre el citocromo CYP2D6) y alprazolam (actividad sobre el citocromo CYP3A4). Estas drogas fueron administradas en la línea base y luego otra vez después de la exposición a dos tabletas de 500 mg de valeriana. El experimento duró 14 días. Al final se midieron las concentraciones séricas de los medicamentos de prueba. Markowitz concluyó que es improbable que las dosis típicas de valeriana puedan producir un efecto clínicamente significativo sobre el metabolismo de medicamentos dependientes de las vías CYP2D6 o CYP3A4 del citocromo (20).

Yao en 2007, evaluó la toxicidad de *V. officinalis* en ratas embarazadas y embriones de 10.5 días de gestación. En este estudio no se observaron signos de toxicidad materna y los resultados indican que no produce efectos sobre la fertilidad ni sobre el crecimiento fetal. Los resultados de este estudio mostraron que el consumo de 65 veces la dosis humana usual (de la forma farmacéutica de valeriana utilizada en el estudio) no tienen resultados reproductivos adversos en ratas. Se indica que esta falta de toxicidad podría estar relacionada con que el bajo pH del extracto removió las potencialmente citotóxicas moléculas de epóxido (21).

### **5.3. VALERIANA EN GUATEMALA**

#### **5.3.1. Géneros de *Valeriana* en Guatemala**

La familia de las valerianas consta de alrededor de 11 géneros, con más de 300 especies que crecen principalmente en climas templados y regiones tropicales; en los trópicos americanos se encuentran sobre todo en las altas montañas, excepto por algunas especies herbáceas (22).

De esta familia solo un género se ha descrito en Guatemala: *Valeriana* Linnaeus. Se trata de un género con quizá 200 especies, que se encuentra en todos los continentes, excepto en Australia. De este género 12 especies se han descrito en Guatemala: *Valeriana clematitidis* HBK, *Valeriana cucurbitifolia* Standl, *Valeriana deltoidea* F. G. Meyer, *Valeriana densiflora* Benth, *Valeriana palmatiloba* F.G. Meyer, *Valeriana palmeri* Gray, *Valeriana prionophylla* Standl, *Valeriana pulchella* Mart. & Gal., *Valeriana robertianifolia* Briq., *Valeriana scandens* L., *Valeriana sorbifolia* HBK, *Valeriana urticaefolia* HBK (22).

Otras especies de plantas que no pertenecen a esta familia también se conocen en Guatemala como valerianas, entre ellas *Perezia nudicaulis* Gray. (Asteraceae), *Vetiveria zizanioides* L. (Poaceae) y *chaptalia nutans* (L.) Polak (Asteraceae). Su contenido de valepotriatos y su actividad antimicrobiana fueron evaluados recientemente por Cruz (3).

### **5.3.2. *Valeriana prionophylla* Standl.**

#### 5.3.2.1. Ubicación geográfica

También se registra con el nombre común de pericón de monte en la flora de Guatemala. Es propia de bosques de pinos, húmedos, abiertos o prados húmedos alpinos o antes bien de hendiduras de acantilados rocosos en alturas que van de los 2,100 a los 4,200 m. Crece en Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá y Totonicapán. También crece en México y Costa Rica (22).

#### 5.3.2.2. Filogenia

Las especies de Valerianaceae son componentes comunes de la flora alpina a través del hemisferio norte así como también en los Andes de Sur América. Bell en 2,004 publicó una clasificación de Valerianaceae utilizando la muestra de valerianas más grande reportada hasta la fecha.

Haciendo un análisis en conjunto con los resultados de otros estudios obtuvo las siguientes conclusiones: 1) La dos principales divergencias basales en Valerianaceae las conforman *Patrnia* y *Nardostacys*. 2) *Valerianilla* y *Fedia* forman una bien fundamentada clase. 3) Valeriana no es monofilética. 4) Valerianaceae se originó en Asia y colonizó el Nuevo Mundo en varias ocasiones. 5) Un gran grupo de valerianas exclusivas del Nuevo Mundo son una clase muy bien fundamentada. Dentro de esta clase se encuentra *V. prionophylla* (23).

No se cuenta a la fecha con estudios de cariotipo acerca de *V. prionophylla*, pero serían de gran interés dada la considerable complejidad genética y taxonómica de Valerianaceae, como lo demuestran los estudios de Corsi publicados en 1,984 acerca de los aspectos fotoquímicos y biológicos de *V. officinalis* (24).

#### 5.3.2.3. Descripción

Se trata de una planta erecta, perenne. **Raíz.** Principal larga, a menudo ramificada. **Tallo.** De 10 a 80 centímetros, dispersamente piloso o casi glabroso con los nodos pilosos. **Hojas.** Predominantemente basales, usualmente numerosas y de aspecto algo cespitoso; los bordes no divididos, oblongolineares a espatulados, principalmente de 3 a 30 cm de largo y de 0.5 a 3 cm de ancho, obtusas, atenuadas en la base subpeciolar, los márgenes son serrados, serrado-dentados, undulado-dentados, crenados o raramente enteros, usualmente ciliados, glabrosos a pilosos; hojas caulinares, en pares de 2 o 3, principalmente de 2 a 20 cm de largo, usualmente sesiles, algunas veces corto-peciolas. **Inflorescencias.** Largo-pedunculadas; las numerosas flores se disponen en un agregado dicasio, denso o difuso, brácteas lineares, cáliz limbo con 9 a 11 segmentos, corola rotada, de 1.5 a 3 mm de largo. Blanco, rosado, o violeta pálido, glabroso. Los estambres dirigidos hacia afuera, las anteras apareciendo 4 lobadas, la teca sulcada, el estilo dirigido hacia afuera, aquenios de 2 – 3 cm de largo, lisos o transversalmente rugosos, glabrosos o pilosos, las costillas adaxiales usualmente son conspicuas (22).

### 5.3.3. Estudio de *V. prionophylla* en Guatemala

Cruz y colaboradores en 2005, indica que el extracto de *V. prionophylla* presenta una concentración inhibitoria mínima de 0.25 mg/dL contra *Cryptococcus neoformans* (3). Gaitán, también en 2005, indica que *V. prionophylla* tiene actividad contra *Sporothrix schenckii*, habiendo tenido una actividad inhibitoria contra la fase levaduriforme a una concentración de 0.5 mg/mL y contra la fase micelial a una concentración de 0.025 mg/dL.(2).

En 2,005, Cruz publicó un ensayo clínico en el que evaluó la efectividad de *V. prionophylla* como inductora del sueño. Entre sus conclusiones indica que *V. prionophylla* disminuyó significativamente la latencia del sueño, disminuyó el número de veces que los pacientes despertaron durante la noche y mejoró significativamente la calidad del sueño (5).

Por otro lado, Piccinelli y colaboradores, en 2,004 publicaron sus hallazgos acerca de la presencia de ciertos lignanos con actividad antioxidante y relajante vascular en *V. prionophylla* de Guatemala (9).

Finalmente, en 2006 Calderón estudió la actividad citotóxica de extractos de *V. prionophylla* de Quiché en cultivos de líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y sistema nervioso central (25).

## 5.4. ELABORACIÓN DE EXTRACTOS

### 5.4.1. Generalidades

Para la utilización de las plantas medicinales, la población hace uso de técnicas sencillas, pero para la validación y ampliación de sus indicaciones terapéutica, se deben elaborar extractos que cumplan con criterio de reproducibilidad, eficiencia, estabilidad y cuantificación (26).

Con un buen extracto se pueden hacer el tamizaje fotoquímico, la investigación de la actividad biocida o los ensayos *in vitro*, *in vivo* o de índole propiamente clínica (ensayos en humanos) que permitan hacer la investigación y validación de la actividad (26). De aquí que “antes de empezar un proceso extractivo. . . se debe definir la selectividad del disolvente a ser usado en el proceso...” (27). Un extracto elaborado con los disolventes adecuados, y procesado en la forma conveniente, es un punto crítico para la investigación de las plantas medicinales.

Los disolventes mas utilizados en la industria de productos fitoterapéuticos son el agua, en alcohol etílico, la glicerina, el propilenglicol y mezclas de estos líquidos (27). Igualmente ocurre en la investigación de laboratorio de las plantas medicinales.

En general, antes de ser usados, los extractos se procesan para obtener consistencias que van desde líquidas hasta sólidas (27).

#### **5.4.2. Extractos**

La materia prima vegetal en la industria de fitofármacos esta representada, en la mayoría de la ocasiones, por la droga seca (26). La extracción de los principios activos es el paso inicial en la preparación del material vegetal. Al material resultante del proceso de extracción se le conoce como un extracto. El extracto se obtiene por agotamiento con disolventes (27).

Los extractos se pueden utilizar como productos intermedios que posteriormente se utilizaran en diversas formas (27, 28). En la industria fitofarmacéutica darán origen a diversas formas farmacéuticas terminadas. En el campo de la investigación, que es el que nos interesa en este documento, serán la base para los estudios de diversa índole que se lleven a cabo.

### 5.4.3. Métodos de extracción

#### 5.4.3.1. Clasificación

En general, se pueden clasificar así: expresión, destilación o extracción con disolventes. En diversas farmacopeas se podrán encontrar diversos métodos para la elaboración de extractos, en la Farmacopea Brasileña, por ejemplo, se describen cuatro métodos generales para la preparación de extractos. Cada método de extracción sirve a un propósito en particular, la expresión, por ejemplo, es el método ideal para la obtención de aceites esenciales a partir de cítricos. Por destilación se obtienen aguas aromáticas, alcoholados (o espíritus) y aceites esenciales (26 - 28).

#### 5.4.3.2. Extracción con disolventes y sus fundamentos

Es un proceso que incorpora las sustancias activas de una droga cruda a un determinado disolvente o menstruo en forma de disolución. Puede desarrollarse en frío o en caliente, pero a menos que la extracción mejore sustancialmente con la elevación de la temperatura, siempre se hace a la temperatura ambiente, para disminuir los costos y la peligrosidad en el proceso productivo (28).

La extracción puede desarrollarse con una gran variedad de disolventes, empezando por el agua (disolvente polar) hasta los disolventes orgánicos de naturaleza altamente no polar como el hexano. La selección del disolvente está determinada por los siguientes factores: Naturaleza de los componentes a ser extraídos, precio y disponibilidad del disolvente, operaciones unitarias del proceso, toxicidad del disolvente, aspectos ambientales. El proceso extractivo es un proceso complejo donde se distinguen fundamentalmente dos fases: la de lavado y la de difusión (28).

En la fase de lavado, las células rotas por las operaciones de trituración, entran en contacto directo con el menstruo. Los componentes celulares existentes podrán ser fácilmente disueltos o arrastrados por el disolvente, por lo que parte de las sustancias activas pasan casi instantáneamente al disolvente en esta primer fase del proceso extractivo. Cuanto mas fino es el polvo de la droga cruda, tanto mas importante es este proceso de lavado celular (28).

La fase de difusión celular, también llamada de extracción, transcurre en forma más compleja. Las membranas celulares arrugadas y secas de la droga cruda deben pasar a un estado tal que permita el paso del menstruo al interior de las células. Esto se consigue por esponjamiento de la estructura celulósica de la membrana mediante la incorporación de moléculas del disolvente que provoca un aumento de volumen, lo cual permite el paso del menstruo al interior de la célula. Este fenómeno es favorecido por el agua, no así por alcoholes de alta graduación. El proceso que sigue combina fenómenos de disolución, difusión, ósmosis, diálisis, desorción (28).

En la disolución se distribuyen uniformemente uno o varios solutos en las moléculas del disolvente. Este se va concentrando mediante el mecanismo de difusión, que es el flujo de soluto desde donde hay más concentración hacia donde hay menos. Con el transcurso del tiempo este gradiente se equilibra impidiendo una mayor extracción del principio. Mediante la ósmosis el disolvente puede viajar a través de la membrana, no así el soluto disuelto, por lo cual podemos hablar de la difusión libre del disolvente en este caso; es decir el paso del disolvente de la solución menos concentrada a la más concentrada (28).

En el fenómeno de la diálisis ocurre lo contrario, las moléculas de soluto viajan de la solución más concentrada a la menos concentrada o al disolvente puro a través de una membrana. Cabe señalar que en este proceso pasan sólo las sustancias disueltas molecularmente y aun así solo aquellas menores que los poros del tabique representado por la membrana celular. Ya establecido el equilibrio se establece el mecanismo de adsorción-desorción sobre la superficie del tejido celular (28).

#### 5.4.3.3. Percolación

Consiste en hacer pasar el menstruo a través de la droga cruda hasta su extracción exhaustiva. La percolación se lleva a cabo en un percolador, aparato de cuerpo cilíndrico o cónico provisto de una llave de salida en la parte inferior, donde se coloca la droga cruda previamente humedecida con el disolvente. La percolación simple consiste en la extracción completa de la droga con el disolvente simple o renovado. Tiene como desventaja el alto consumo de disolvente. La repercolación consiste en hacer recircular el disolvente a través de distintas fracciones de la droga, utilizando una batería de percoladores (28).

Para mejorar el flujo del disolvente a través de materiales vegetales que tienden a la compactación se recurre a la adición de cascarilla de granos de arroz hasta un 10% del peso de la materia prima vegetal (28).

#### 5.4.4. Métodos de Concentración

Los extractos se concentran evaporando el disolvente (sobre todo si es tóxico) a presión reducida y temperatura controlada, por medio de un rotavapor, hasta alcanzar un estado de miel. Los extractos acuosos se suelen concentrar por medio de liofilización. En esta forma los extractos son más estables y fáciles de almacenar y dosificar (26, 27, 28).

El proceso de concentración busca aumentar el contenido de sólidos totales en el extracto con la finalidad de alcanzar un determinado contenido del residuo seco, producir extractos blandos o como etapa preliminar en la producción de extractos duros. Los extractos también pueden ser concentrados para la extracción en contracorriente con disolventes no miscibles, con miras a la fabricación de extractos purificados o al aislamiento de sustancias puras (27, 28).

Los principios de funcionamiento de un evaporador rotatorio (rotavapor) son los siguientes: 1) Un balón de evaporación, a 40°C, rota a una velocidad constante produciendo una película que aumenta la superficie de evaporación. 2) Con la ayuda de una bomba se genera un vacío entre 30 y 300 mbar que facilita la evaporación sin necesidad de aumentar la temperatura. 3) El vapor del disolvente es condensado en el refrigerante que esta conectado a un sistema de enfriamiento que luego se colecta en un balón colector (27).

## **5.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

### **5.5.1 Cultivos microbianos**

Los cultivos microbianos se hacen con diversos propósitos, por ejemplo para la identificación microbiana o para medir la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos (29).

En lo que toca a las plantas medicinales, los cultivos para medir la susceptibilidad microbiana forman parte de la etapa inicial del proceso de investigación. Permiten definir:

- la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados,
- la potencia de un compuesto (fitocomplejo, por ejemplo),
- la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal,
- el espectro de microorganismos inhibidos y
- la concentración de la droga en el organismo humano.

Es preciso conocer el modelo microbiano y tenerlo controlado en condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de esta actividad puede hacerse por métodos de difusión o dilución (28).

Otros métodos se basan en la evaluación del crecimiento de bacterias inoculadas en la superficie de medios conteniendo moléculas bioactivas (en el caso de plantas medicinales, del extracto) (3, 29). Los resultados son reportados como crecimiento positivo (no inhibido) o negativo (inhibido) (3). Inversamente otros métodos consisten en la inoculación de los microorganismos en el medio de cultivo y la perforación de pozos que son llenados con el extracto para luego de la incubación medir los halos de inhibición de crecimiento (30).

#### 5.5.1.1. Método de difusión

El método de difusión en agar, utilizando discos impregnados con los extractos de las plantas, ha sido ampliamente validado y se utiliza con mucha frecuencia para la evaluación de la actividad antimicrobiana en plantas y antibióticos de síntesis (29, 31, 32, 33, 34, 35). Se ha utilizado en forma comparativa en conjunto con otros métodos de medición de actividad antimicrobiana y en diferentes investigaciones de actividad antimicrobiana en medicamentos de síntesis (33, 36). También se han hecho investigaciones acerca del rendimiento de este tipo de pruebas de susceptibilidad microbiana en diferentes circunstancias (por ejemplo la prevalencia de susceptibilidad) (37).

Las técnicas de difusión en agar proveen resultados razonablemente exactos y precisos. Se usan como un procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo. Generalmente los microorganismos son categorizados como resistentes, intermedios o susceptibles para cada agente antimicrobiano. Los antimicrobianos son aplicados en forma de discos de papel filtro (método de Bauer-Kirby). El crecimiento exponencial de bacterias en el medio de cultivo adecuado es inhibido por las moléculas bioactivas que difunden del papel al agar (32).

Cuando los discos son aplicados a la superficie inoculada, varios eventos suceden simultáneamente. Primero, el disco seco absorbe agua del agar y de esta forma se disuelve la droga. El agente antimicrobiano se encuentra de este modo libre para difundir por el agar adyacente. El resultado es un gradiente cambiante en forma gradual de concentración en el agar que rodea a cada disco. Conforme progresa la difusión del antimicrobiano, también ocurre la multiplicación microbiana. Luego de una fase de demora, se inicia una fase de crecimiento logarítmico. Finalmente se formará una capa de crecimiento bacteriano en derredor del disco. Esta capa de crecimiento en derredor del disco se continuará con una zona de inhibición que será mayor tanto cuanto mayor sea la concentración inhibitoria que se alcance del antibiótico (32).

#### 5.5.1.2. Método de dilución

Se utiliza para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo. Está basado principalmente en la técnica desarrollada por Mitscher y colaboradores en 1972. Se recomienda para el tamizaje de productos naturales, es reproducible, sensible y relativamente fácil de estandarizar y procesar gran cantidad de muestras. La CIM es la concentración mas baja en la que no hay crecimiento visible, esta prueba puede ser en caldo (tubo) y en agar (placa). En el caso de hongos, existen técnicas similares (Brancato & Golding) que han sido estandarizadas en Guatemala y han permitido evaluar la actividad de una cantidad de especies vegetales usadas medicinalmente (29).

La prueba de microdilución en caldo de CIM se realiza en una placa de poli-estireno que contiene aproximadamente 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antimicrobianos. Una celdilla sirve como control positivo (caldo más inóculo), y otro sirve como control negativo (sólo caldo). La mayoría de los sistemas tienen un volumen de 0.1 mL en cada celdilla. Para facilitar el uso de agentes antimicrobianos apropiados contra cepas específicas, un laboratorio por lo general tiene un tipo de placa para bacterias gram positivas y otro para bacterias gram-negativas.

Para probar cepas aisladas de orina, algunos laboratorios tienen un tipo diferente de placa que contiene medicamentos apropiados para tratar infecciones de las vías urinarias bajas. Para probar bacterias fastidiosas se requieren paneles con medios especiales (32).

### **5.5.2. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo deben ser elegidos según los requerimientos de crecimiento del organismo en cuestión. Cada medio de cultivo debe ser preparado según las instrucciones específicas del fabricante. Las especificaciones sobre los cuidados en la preparación y conservación de los medios de cultivo se detallan en la literatura consultada (32).

### **5.5.3. Sensidiscos**

La potencia de los discos debe ser estandarizada. Evidentemente los cambios en el contenido de los discos producirán cambios en los diámetros de las zonas de inhibición (32).

Los discos para probar medicamentos de síntesis deben ser almacenados como sigue:

- Refrigerar los viales a 8°C o menos, o congelar a -14°C o más bajo, en un congelador no formador de escarcha.
- Viales de discos sellados que contienen drogas de la clase  $\beta$ -lactámicos deben ser almacenados congelados, excepto pequeñas cantidades para trabajo inmediato, las que pueden ser refrigeradas sólo para una semana. Algunos agentes como por ejemplo, combinaciones de imipenem, cefaclor, clavulanato pueden conservar mayor estabilidad si se almacenan congelados hasta el día de uso.
- Los viales de discos que no han sido abiertos deben ser sacados del refrigerador o congelador, 1 o 2 horas antes de usar para que igualen su temperatura a la del ambiente antes de abrir. Este procedimiento minimiza la cantidad de condensado que se forma cuando aire caliente toca los discos fríos.

-Una vez que un vial de discos se ha sacado de su paquete sellado, debe ser puesto en un desecador bien sellado. Cuando se usa un dispensador de discos, éste debe ser puesto con una cubierta ajustada y con un adecuado agente desecante. El dispensador debe alcanzar la temperatura ambiente antes de abrir. La excesiva humedad se debe evitar reemplazando el desecante cuando el indicador cambia de color.

Sólo aquellos discos con fecha de expiración del fabricante dentro del plazo pueden ser usados (32).

#### **5.5.4. Lectura de las placas e interpretación de los resultados**

(1) Cada placa es examinada después de 18 a 24 horas de incubación. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Si aparecen colonias individuales, el inóculo estaba muy diluido y la prueba debe ser repetida. Los diámetros de la zona de inhibición completa, a ojo desnudo, son medidos en mm pasando por el centro del disco. La caja de Petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada.

(2) El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas. Sin embargo, colonias discretas creciendo dentro de la zona clara de inhibición deben ser identificadas y probadas nuevamente.

(3) Los tamaños de las zonas de inhibición, cuando se trata de medicamentos de síntesis, son interpretados en las Tablas NCCLS para ser informado como susceptible, intermedio, o resistente a los antimicrobianos que se han probado (32).

## 5.6. MICROORGANISMOS PATÓGENOS

### 5.6.1. *Staphylococcus aureus*

Coco Gram positivo, positivo a la coagulasa, crece con facilidad en muchos medios y es activo desde el punto de vista metabólico. Forma colonias de color gris a amarillo dorado intenso y suele estar distribuido en grupos irregulares a manera de racimos de uva. Es un patógeno de gran importancia para el ser humano (38). Produce infecciones de la piel como la erisipela y el impétigo, pero tiene el potencial de producir infecciones en otros tejidos las cuales pueden ser mortales (neumonía y meningitis por ejemplo). El tratamiento generalmente consiste en penicilinas o cefalosporinas a las cuales sea sensible. Una variedad de estafilococo metilcilina resistente puede ser en realidad multirresistente e inclusive se han aislado algunas cepas resistentes a vancomicina (36).

### 5.6.2. *Escherichia coli*

Bacilo Gram negativo, entérico. Produce de manera típica pruebas positivas a indol, descarboxilasa de la lisina y glucosa. Aislado de la orina se puede identificar con rapidez porque produce hemólisis en agar sangre, morfología típica de las colonias con un “resplandor” iridiscente en los medios diferenciales como agar EAM y prueba de marca del indol positiva (35). Diferentes serotipos de *E coli* producen, por mecanismos específicos, cuadros de diarrea aguda. Es agente causal importante de infecciones de las vías urinarias. Algunas cepas (por ejemplo O157:H7, productor de verotoxinas), pueden producir cuadros severos de sepsis con fallo renal agudo asociado. El tratamiento generalmente incluye el uso de sulfas, fluoroquinolonas o cefalosporinas de tercera generación. (39)

### 5.6.3. *Salmonella typhi*

Bacilo Gram negativo, motil, entérico. De manera característica fermenta la glucosa y la manosa sin producir gas, pero no fermenta la lactosa ni la sacarosa (38).

Agente causal de la fiebre tifoidea, produce alta mortalidad cuando no se trata. Se distinguen varias etapas en la evolución del cuadro clínico y cursa con fiebres altas características asociadas a bradicardia relativa. Anteriormente el tratamiento se hacia con cloramfenicol pero, actualmente, con el surgimiento de las quinolonas el tratamiento con ciprofloxacina ha pasado a ser de primera elección (39).

#### **5.6.4. *Pseudomonas aeruginosa***

Bacilo Gram negativo, no propiamente entérico, motil, Puede permanecer aislada o formar parejas e inclusive cadenas cortas. En cultivo produce colonias fácilmente reconocibles por su olor y color característicos. Pueden producir pigmentos fluorescentes. Se encuentra distribuida con amplitud en la naturaleza, y es frecuente descubrirla en los ambientes húmedos de los hospitales. Puede colonizar al ser humano normal, en el cual es un microorganismo saprófito (38). Produce enfermedad en la persona que tiene defensas anormales. Infecta con frecuencia ulceras y heridas operatorias en pacientes hospitalizados. Causa frecuente de sepsis en pacientes de cuidado intensivo (con catéteres subclavios, por ejemplo). El tratamiento debe administrarse sobre la base de la sensibilidad reportada debido a que desarrolla resistencia con gran facilidad. En general se recomienda el uso de doble droga. (39).

#### **5.6.5. *Mycobacterium smegmatis***

Fue la primera especie de micobacteria reconocida después de *Mycobacterium tuberculosis*. Aunque *M. smegmatis* fue aislada inicialmente de exudados de chancros luéticos en 1884, y de secreciones genitales en 1885, posteriormente no ha sido nunca recuperada a partir de esas mismas fuentes. Se ha aislado del suelo y del agua, considerándose un microorganismo ambiental, por lo que, durante muchos años, ha sido considerada como una micobacteria no patógena. Para algunos autores es un organismo saprófito y ambiental de escaso potencial patógeno. Está clasificada en el grupo IV de la clasificación de Runyon, como micobacteria de rápido crecimiento, aunque Casal la incluye en el Grupo V de micobacterias escotocromógenas de crecimiento rápido (40).

Brown en 1999, tras estudiar 71 aislamientos clínicos establece tres grupos con idénticas características bioquímicas y de crecimiento, pero con distintos perfiles de ácidos micólicos mediante HPLC, diferentes patrones de restricción del gen *hsp-65* y diferentes patrones de sensibilidad antimicrobiana; proponiendo la separación en tres especies. El grupo 1, con 35 cepas idénticas a las cepas de referencia, que corresponden a *M. smegmatis* sensu strictu, *M. goodii* para el grupo 2 y *M. wolinsky* para el grupo 3 (40).

Su importancia radica en que puede utilizarse como un predictor de actividad contra micobacterias patógenas (30).

#### **5.6.6. *Bacillus subtilis***

Bacilo Gram positivo, aerobio, formador de esporas, grande, tiende a agruparse formando cadenas. Microorganismo saprófito. Generalmente no patógena, pero importante por su estrecha relación con *Bacillus anthracis* y *Bacillu. cereus*, patógenos importantes para el ser humano. Causantes de cuadros dermatológicos y pulmonares (conocidos con el nombre de Anatrax) en el caso de *B. anthracis* y gastrointestinales en el caso de *B. cereus* (40).

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. GENERAL

6.1.1. Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la raíz y hojas de *V. prionophylla*.

### 6.2. ESPECIFICOS

6.2.1. Tamizar mediante el método de difusión en disco, la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz y hojas de *V. prionophylla*.

6.2.2. Cuantificar la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico de la raíz y hoja de *V. prionophylla*.

6.2.3. Comparar la actividad antibacteriana de diferentes poblaciones de *V. prionophylla* del altiplano de Guatemala.

## 7. HIPÓTESIS

*V. prionophylla* presenta actividad antimicrobiana *in vitro* al menos contra una de las cepas de bacterias investigadas.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 UNIVERSO

Especies de *Valeriana prionophylla* colectados en el altiplano de Guatemala.

### 8.2 MUESTRA

5 especímenes de *V. prionophylla* procedentes de los siguientes departamentos: El Quiché, San Marcos, Totonicapán.

### 8.3 RECURSOS

#### 8.3.1 Humanos

Dr. Edwin Can M.

Asesor: Lic. Armando Cáceres

Revisores: Lic M.A. Margarita Paz, Lic M.A. Maria Eugenia Paredes, Ing. M.Sc. Vicente Martínez.

Colaboradores: Br. Vinicio García. Laboratorio de Bioensayos, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC

#### 8.3.2 Institucionales

- Laboratorio de Bioensayos, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC
- Centro de documentación y Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC.
- Centro de documentación y Biblioteca del Laboratorio Fitofarmacéutico Farmaya S.A.

### **8.3.3. Equipo**

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cajas de Petri de 9 cm de diámetro
- Campana bacteriológica
- Campana de Flujo Laminar
- Centrífuga
- Incubadora a 36 y 42 grados centígrados
- Mechero Bunsen
- Microscopio de Luz Blanca
- Refrigerador a 4 grados centígrados
- Sonificador
- Viales
- Vortex
- Beakers
- Erlenmeyers
- Percolador de vidrio o acero inoxidable

### **8.3.4. Materiales y Reactivos**

- Algodón
- Agua desionizada
- Solución salina al 0.85%
- Alcohol etílico al 50%
- Alcohol etílico a 35%
- Caldo Trypticase Soya
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Sabouraud
- Estándar de MacFarland 0.5

- Gentamicina, ampolla de 2 ml.
- Discos estériles
- Cinta adhesiva
- Cinta testigo
- Asas de Nicromo
- Bata
- Espátulas
- Gradilla
- Guantes
- Hisopos
- Marcador indeleble
- Pinzas
- Pipetas automáticas de 10 a 100 $\mu$ L y de 100 a 1000  $\mu$ L
- Tubos pequeños con tapón de rosca estériles
- Papel filtro

#### **8.3.5. Cepas**

- *Staphylococcus aureus* 25923
- *Salmonella typhi* ATCC 14028
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27843
- *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
- *Bacillus subtilis*

#### **8.3.6. Material vegetal**

Se trabajó con material vegetal recolectado de Nebaj en Quiché, Concepción Tutuapa en San Marcos y Cerro Raxquin en Totonicapán.

## **8.4. PROCEDIMIENTOS**

Se trabajó con extractos preparados con material vegetal recolectado y preparado por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC. Los numerales 8.4.1. a 8.4.3. se describen según las técnicas descritas en el Manual de Operaciones de dicho laboratorio.

### **8.4.1. Recolección y preparación del material vegetal**

Se seleccionaron los especímenes con mejores características de crecimiento y desarrollo. Luego de extraer las raíces se introdujeron en una bolsa plástica gruesa, atándolas a nivel de tallo, formando un empaque hermético; acondicionadas en esta forma se trasladaron hacia el lugar en que se procesaron.

Se seleccionaron las hojas de mejor aspecto y constitución, se lavaron tres veces con agua destilada y una vez más con agua conteniendo hipoclorito de sodio (10 gotas de hipoclorito por litro de agua). Se colocaron en bandejas plásticas de secado, una hoja contigua a la otra sin apilarlas.

El procesamiento de las raíces fue similar. Se seleccionaron y cortaron las raíces de mejor aspecto. Se lavaron vigorosamente con agua destilada y un cepillo fino, eliminando tierra, impurezas y materiales extraños. Se lavarón una vez más con agua conteniendo hipoclorito de sodio (10 gotas por litro de agua). Con un cuchillo grueso se contaron las raíces en hojuelas lo mas delgadas posibles. Se colocaron las hojuelas en bandejas plásticas de secado una contigua a la otra, sin apilar.

### **8.4.2. Extracción por percolación**

- En un percolador previamente limpio y seco, se colocó un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.
- Se pesó la cantidad de material vegetal a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador.

- Se Humedeció el material vegetal con el disolvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- Se transfirió el material al percolador; Se agregó disolvente hasta cubrir el material Vegetal.
- Se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción (18 – 24 horas).
- Se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- Se Recogió el líquido en un erlenmeyer, se añadió suficiente disolvente extra, según fuera necesario, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- El material sólido que quedó, se presionó fuertemente y el líquido obtenido se añadió al percolado obtenido anteriormente.

#### **8.4.3. Concentración usando un rotavapor**

- Se verifico que estuvieran conectadas todas las conexiones eléctricas.
- Se colocó el balón colector, fijándolo con la llave respectiva.
- Se revisó el nivel de agua del baño de calentamiento.
- Se encendió el baño (temperatura entre 50 y 60°C).
- Se Revisó que la llave de alimentación del refrigerante estuviera cerrada.
- Se colocó el balón con la muestra y se sujetó al vástago con la llave correspondiente.
- Se encendió el botón que permite girar el balón que contiene la muestra a una revolución adecuada.
- Se conectó un sistema de enfriamiento o por lo menos de circulación de agua del chorro.
- Se encendió la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.
- Cuando se inició la destilación, se apagó la bomba de vacío.
- Se encendió la bomba de vacío cuantas veces fue necesario hasta que se agotó el disolvente del balón de evaporación o ya no destilaba ningún líquido.
- Cuando el extracto tenía aspecto de miel, se pasó a una cristalizadora y se colocó en una desecadora hasta que estuviera completamente seco.

#### 8.4.4. Método de difusión aplicado al cultivo de bacterias

- Se pesaron 200 mg del extracto seco (5:1) de cada muestra y se diluyeron con 2 mL de alcohol al 50%, dando una concentración final de 100 mg/ml.
- Cada extracto fue disuelto utilizando un sonicador.
- Los extractos así preparados fueron esterilizados en autoclave.
- Se impregnaron discos de papel secante de 6 mm de diámetro y 0.6 mm de grosor con 50  $\mu$ L de extracto (aplicando 10  $\mu$ L por 5 veces, y secando después de cada aplicación en una campana de flujo laminar).
- Se efectuó un cultivo de 24 h en agar Muller-Hinton (AMH) de cada una de las bacterias a estudio.
- Para prepara un inóculo estandarizado se tomaron las asadas necesarias de cada cultivo, disolviéndolas sucesivamente en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de agua desionizada estéril, hasta alcanza la misma turbidez que la del tubo No. 5 del nefelómetro de MacFarland.
- Este inóculo estandarizado se aplicó con un asa previamente esterilizada en la superficie de cajas de AMH, siguiendo 4 direcciones y se dejó reposar por 3 a 5 min.
- A continuación, se aplicaron los discos impregnados en triplicado.
- Se incubó a 35°C por 24 h y se midieron los halos de inhibición en mm.

La actividad se determinó por el diámetro del halo de inhibición: menos de 6 mm se tomo como negativo, 6-9 mm como intermedio y >9 mm como positivo. Se compararon con discos impregnados con alcohol al 50% (control negativo) y con antibiótico de referencia (control positivo: gentamicina).

## 9. RESULTADOS

Los resultados de los halos de inhibición se presentan en el cuadro siguiente.

Tabla 1. Halos de inhibición en mm presentados por cada Extracto de *V. prionophylla*, según la parte utilizada y procedencia, para cada una de las bacterias probadas (\*)

<i>Espécimen</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. thypi</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. smegmatis</i>
Rizoma/Tutuapa	0.0	0.0	0.0	0.0	13.3	13.3
Rizoma/C. Raxquin	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0	13.0
Rizoma/Nebaj1	0.0	0.0	0.0	0.0	10.7	11.0
Hoja/Tutuapa	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	8.3
Hoja/Nebaj2	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	7.7
Hoja/Nebaj1	0.0	0.0	0.0	0.0	9.7	11.3
Gentamicina	35.	35.0	34.7	36.7	35.3	37.7
Alcohol al 50%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(\*) Cada prueba para cada bacteria se hizo por triplicado y cada valor presentado corresponde al promedio aritmético de los tres resultados obtenidos.

Se puede observar que no hubo actividad inhibitoria de ningún de los extracto para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* o *S. typhi*.

Todos los extractos de rizoma, sin distinción de procedencia, tuvieron un halo de inhibición superior a 9 mm tanto para *B. subtilis* como para *M. smegmatis*, lo cual se interpreta como una inhibición positiva. El rizoma procedente de Concepción Tutuapa fue más activo que el de Cerro Raxquin y éste a su vez más activo que el de Nebaj 1.

El extracto de las hojas procedentes de Nebaj 1 tuvo un halo de inhibición superior a 9 mm tanto para *B. subtilis* como para *M. smegmatis*, es decir, inhibición positiva. Los extractos de las hojas procedentes de de Nebaj 2 y Concepción Tutuapa tuvieron halos de inhibición entre 6 y 9 mm para estas mismas bacterias, lo que se debe interpretar como una actividad intermedia.

En términos generales, el extracto preparado a partir del rizoma procedente de Concepción Tutuapa fue el más activo contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*, pero los extractos de las hojas procedentes de esta misma región solo tuvieron una actividad intermedia. Por otro lado, solo la valeriana de Nebaj 1 tuvo actividad, aunque baja, tanto en rizoma como en hojas, contra estos mismos gérmenes.

*M. smegmatis* fue el microorganismo más sensible a todos los extractos.

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se encontró actividad de los extractos de las hojas y la raíz contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*. Debe resaltarse que, aunque la actividad no fue muy superior a los 9 mm en ninguno de los cultivos, anteriormente no se había demostrado (3).

También debe resaltarse que es la primera vez que se hace el estudio de la actividad antimicrobiana de las hojas que son una parte de la planta considerada como no útil hasta la fecha, pero que según los resultados de este estudio por lo menos tienen actividad contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*.

La actividad antimicrobiana de las hojas y raíz, en forma independiente de la conocida actividad ansiolítica del rizoma, agrega una nueva potencial utilidad a esta planta. Esta potencial utilidad le agregaría interés económico a esta especie y, en consecuencia, estimularía el interés por su conservación, lo cual es importante dado que es una planta nativa.

Merece especial atención el hecho de que, en contraste con los resultados del presente estudio, Cruz no demostró actividad contra *B. subtilis* o *M. smegmatis* en 2005 (3). Para hacer dicho estudio se utilizaron un método de dilución y extractos de raíz.

Las diferencias entre dicho estudio y el presente podrían radicar, además de las relacionadas con el método y los materiales, en las variaciones de los metabolitos secundarios de las plantas relacionadas con las condiciones de colecta del material vegetal (época del año, estado fenológico de los especímenes, tiempo transcurrido antes del procesamiento) y, posiblemente, con alguna variación genotípica. Estos mismos aspectos parecieran tener suma importancia en la variación de la actividad de *V. officinalis* (18, 23, 24).

No se pudo demostrar actividad antibacteriana de los extractos de hojas y raíz de *V. prionophylla* contra *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* o contra *P. aeruginosa*. Esto difiere del hallazgo reportado sobre la actividad de ciertas variedades de *V. officinalis* sobre *S. aureus* y *E. coli*. Pero, igualmente, se considera que para descartar en forma concluyente la falta de actividad de la *V. prionophylla*, de las regiones que se incluyeron en este estudio, contra dichas bacterias, en futuros estudios se deben tomar en cuenta los cambios que pudieran presentarse en la actividad de las plantas investigadas en función de posibles variaciones en los metabolitos secundarios relacionadas con los aspectos ya mencionados (18).

También se debe indicar que resulta interesante que la mayor actividad demostrada haya sido contra *M. smegmatis*, microorganismo de fácil cultivo y predictor de actividad contra otras micobacterias (como *Mycobacterium tuberculosis*) patógenas para el hombre. Esto es importante, sobre todo en nuestro país, porque la tuberculosis es una enfermedad reemergente, de alta prevalencia y, con mayor frecuencia de la que se quisiera, farmacorresistente.

En cuanto a *B. subtilis*, bacteria formadora de spora, sabemos que es un saprofito muy cercano a bacterias tan letales como *Clostridium tetani*, agente causal del tétanos y *B. anthracis*, agente causal del ántrax y que actualmente se considera como un arma biológica. No se puede descartar que dichos microorganismos puedan ser sensibles a los extractos de hojas o raíces de *V. prionophylla*.

## 11. CONCLUSIONES

1. Se demostró actividad de los extractos de rizoma de *V. prionophylla* contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*.
2. Se pudo demostrar actividad de los extractos de hoja de *V. prionophylla* contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*.
3. *V. prionophylla* podría tener actividad contra micobacterias patógenas para el hombre, causantes de enfermedades de suma importancia en nuestro país.
4. *V. prionophylla* podría tener actividad contra bacterias tales como *B. antracis* y *C. tetani*.
5. No se demostró actividad contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, o *S. typhi*.
6. Es necesario hacer estudios en los que se tome en cuenta la época de cosecha, el estado fenológico, el tiempo transcurrido entre la cosecha y el procesamiento y, la posible presencia de variaciones fenotípicas, puesto que son variables que pudieran influir sobre la actividad antibacteriana de *V. prionophylla*.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OPS. "Guatemala: *Base de Datos de Indicadores Básicos en Salud de la OPS*". 7 Oct. 2007. <[http://www.paho.org/Spanish/DD/AIS/cp\\_320.htm](http://www.paho.org/Spanish/DD/AIS/cp_320.htm)>
2. Gaitán I. *et al.* Actividad contra hongos causantes de micosis subcutáneas (*Sporotrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*) de 12 especies vegetales de uso medicinal en Guatemala. Rev. Científica Fac CCQQ y Farm Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005;3:19-24.
3. Cruz A. *et al.* Evaluación de la actividad biocida e identificación química de valepotriatos en cuatro especies reconocidas popularmente en Guatemala como valeriana. Rev. Científica FAc. CCQQ y Farm. USAC. 2005;3:43-48.
4. Camporese, A. *et al.* Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). J Ethnopharm 2003;87:103-107.
5. Cruz E. Evaluación clínica de la efectividad de *Valeriana prionophylla* como inductora del sueño. Tikalia, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005;23:85-99.
6. Houghton PJ. Ed. *Valerian*, The Genus Valerian. Singapore: Harwood academic publishers, 1997. 142p.
7. Marder M. *et al.* 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. Pharmacol Biochem Behav 2003;75:537-545.
8. Fernández S. *et al.* Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. Pharmacol Biochem Be 2004;77:399-404.
9. Piccinelli A. *et al.* New lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with antioxidative and vasorelaxant activities. J Nat Prod 2004;67:1135-1140.
10. Fernández S. *et al.* Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. Eur J Pharmacol. 2006;539:168-176.
11. Houghton PJ. The biological activity of valerian and related plants. J Ethnopharm. 1988;22:121-142.

12. Stevinson C., Ernst E. Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. *Sleep Med* 2000;1:91-99.
13. Herrera-Arellano A. *et al.* Polysomnographic Evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* Standardized Extract in patients Suffering from insomnia. *Planta Med* 2001;67:695-699.
14. Francis AJP., Dempster RJW. Effect of valerian, *Valeriana edulis*, on sleep difficulties in children with intellectual deficits: randomised trial. *Phytomedicine* 2002;9:272-279.
15. Carlini E. Plants and the central nervous system. *Pharmacol Biochem Bhe* 2003;75:501-512.
16. Gutierrez S. *et al.* Assesing subjective and psychomotor effects of the herbal medication valerian in healthy volunteers. *Pharmacol Biochem Be* 2004;78:57-64.
17. Shinomiya K. *et al.* Effects of Valerian extract on the sleep-wake cycle in sleep-disturbed rats. *Acta Med Okayama.* 2005;59:89-92
18. Letchamo W. Ward W. Heard B. Heard D. Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *J Agric Food Chem.* 2004;16:52(12):3915-3919.
19. Gurley B. *et al.* In vivo effects of goldenseal, kava kava, black cohosh y valeriana on human citochrome P450 1A2, 2D6, 2E1 y 3A4/5 phenoypes. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77(5):405-426.
20. Markowitz J. et al. Multiple night-time doses o valerian (*Valeriana officinalis*) had minimal effects on CYP3A4 activity y no effect on CYP2d6 activity in healty volunteers. *Drug metab dispo* 2004;32:1333-1336.
21. Yao M., *et al.* A developmental toxicity-screening test of valerian. *J Ethpharm* 2007;113:204-209.
22. Standley, PC., Steyermark J. *Flora of Guatemala.* Botany 1977;24:297-306.
23. Bell D., Donoghue M. Phitogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Organ Diver Evol* 2005;5:147-159.
24. Corsi G., Lokar L., Pagni A. Biological and phytochemical aspectos of *Valeriana officinalis*. *Biochem Sist Ecol* 1984;12:57-62.

25. Calderón I., *et al.* Screening of Latin American plants for citotoxic activity. *Pharmaceut. Biol.* 2006;44:130-140.
26. Cáceres A. *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala.* Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999, pg 28.
27. Sharapin N, Pinzón RS, *et al.* *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos,* Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello (CAB) – Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). 2000, 248 Pg.
28. Cáceres A. ed. *Vademcum Nacional de Plantas Medicinales.* Guatemala: 2006, pg 10-12
29. Cruz SM. *Caracterización de Aceites Esenciales y Evaluación de la Actividad Biocida de Cinco Especies Nativas de Piperaceae.* Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesina. Maestría Multidisciplinaria en Producción y uso de Plantas Medicinales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 55p
30. Cáceres A. *et al.* Actividad biocida de plantas detectadas por etnobotánica y bioprospección en la reserva de biosfera Sierra de las Minas. *Ciencia y Tecnología Universidad de San Carlos de Guatemala.* 2001;2:23-45.
31. Rojas R. *et al.* Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Jethpharm* 2003;88:199-204.
32. Lennette E., *et al.* *Manual of Clinical Microbiolgy.* 4ta. Ed. Washington: American Society for Microabiology. 1985. 1149p
33. Biedenbach D., Jones R. In vitro activity of linezolid (U-100766) against *Haemophilus influenzae* measured by three diferent susceptibility testing methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:49-53.
34. Cáceres A. *et al.* Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *J Ethpharm* 1995;48:85-88.
35. Kamatou G., *et al.* The in vitro parmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J Ethpharm* 1995;102:382-390.
36. Doming, K., *et al.* Antibiotic susceptibility testing of *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium pseudolongum* straisn: Broth microdilution vs. Agar disc diffusion assay. *Int J Food Microbiol* 2007;In Press.

37. Lamy B., *et al.* How does susceptibility prevalence impact on the performance of disk diffusion susceptibility testing? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;49:131-139.
38. Jawetz E. *et al.* *Microbiología Médica.* México: El Manual Moderno. 1992. 700p.
39. Fauci A. *et al.* *Harrison's Principles of Internal Medicine.* USA: McGraw-Hill. 1998. 2570 p.
40. Azar J. *Mycobacterium smegmatis.* 8 Oct. 2007.  
<[http://www.seimc.org/control/revi\\_Micobac/msmeg.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Micobac/msmeg.htm)>

ANEXO

Patrones de inhibición de *B. subtilis* y *M. Smegmatis*



*B. subtilis.*



*M. smegmatis*