

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“Separación e identificación de flavonoides a partir de extractos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala mediante Cromatografía Contracorriente (CCC)”**



BELTER ISAÍ TRINIDAD REYES

Químico

Guatemala, noviembre de 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“Separación e identificación de flavonoides a partir de extractos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala mediante Cromatografía Contracorriente (CCC)”**

Proyecto de Investigación

Presentado por

BELTER ISAÍ TRINIDAD REYES

Para optar al título de

Químico

Guatemala, noviembre de 2020

## MIEMBROS DE LA JUNTA DIRECTIVA

M. A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabido	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovani Rafael Fuentes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merari Caceros Castañeda	Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios Padre, Hijo y Espíritu Santo, por haberme dado la sabiduría, paciencia y fortaleza para culminar mi carrera.

A mis padres por haberme apoyado económicamente a la conclusión de mis actividades académicas, y a ti padre Oscar Rolando Trinidad Linares por haberme enseñado los valores necesarios para afrontar la vida. Un abrazo al cielo papito.

A mi abuelita Julia Alonzo Ramírez por haberme aconsejado y regañado cuando era necesario e incluso apoyado económicamente a finalizar mi ciclo escolar, que está en el cielo cuidándome y sé que estaría orgullosa de mi por este logro.

A la Magnífica Universidad de San Carlos de Guatemala y al pueblo de Guatemala por permitirme estudiar en esta hermosa casa de estudios, mi Alma Mater.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por haberme enseñado los fundamentos de química y de las ciencias naturales.

Al Departamento de Análisis Inorgánico por haberme abierto sus puertas para impartir los laboratorios de Análisis Inorgánico 1 y 2, durante más de dos años.

Al Dr. Francisco Pérez del laboratorio de la Unidad de Análisis Instrumental (UAI) por la asesoría y revisión del proyecto de investigación, a la Licda. Carolina Guzmán por el laboratorio del Centro de Información y Asesoría Toxicológica (CIAT) por el apoyo con el uso de HPLC-DAD y a la Licda. Isabel Gaitán de Citohistología, Química Biológica, por su apoyo en los análisis microbiológicos.

A mis profesores que me brindaron el apoyo y que me tuvieron paciencia durante todo el período que estuve recibiendo cada curso, en especial al Lic. Rodolfo Orozco por haber estado atento y apoyándome con sus conocimientos de Análisis Instrumental. A mis amigos, Máx Mérida, don Luis, Panchito Barrios, Álvaro García (jefecito). Y a todos los que fueron mis alumnos de los cursos de análisis inorgánico, análisis instrumental y fisicoquímica.

## ÍNDICE

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN.....	21
II. RESUMEN.....	22
III. ANTECEDENTES.....	23
A. Productos naturales.....	23
B. Productos naturales de origen vegetal .....	23
C. Plantas Medicinales.....	25
D. Experiencias en Guatemala .....	25
E. Descripción de las plantas de estudio .....	26
1. <i>Tagetes lucida</i> Cav. (pericón) .....	26
a) Nombres comunes.....	27
b) Descripción botánica.....	27
c) Composición química.....	27
d) Localización geográfica en Guatemala. ....	29
2. <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. (valeriana).....	30
a) Nombres comunes.....	31
b) Descripción botánica.....	31
c) Composición química.....	32
d) Localización geográfica de la <i>V. prionophylla</i> en Guatemala.....	33
3. Estudios de composición química y actividad antioxidante de otras plantas del género <i>Valeriana</i> .....	34
F. Metabolitos secundarios de <i>T. lucida</i> y <i>V. prionophylla</i> .....	36
G. Flavonoides .....	36
1. Estructuras químicas de los flavonoides .....	36
2. Actividad antioxidante de los flavonoides.....	40
3. Actividad biológica de los flavonoides .....	41
H. Cumarinas .....	42
I. Cromatografía Contracorriente (CCC).....	42
1. Perspectiva general.....	42

2. Fundamento .....	43
3. Desarrollo de la Cromatografía Contracorriente de Alta Velocidad .....	45
4. Separación de Flavonoides mediante CCC .....	46
IV. JUSTIFICACIONES .....	48
V. OBJETIVOS .....	49
A. Objetivo General .....	49
B. Objetivos Específicos .....	49
VI. HIPÓTESIS .....	50
VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
A. Universo y Muestra .....	51
B. Materiales .....	51
1. Estándares .....	51
2. Reactivos .....	52
3. Cristalería .....	52
4. Equipo de laboratorio .....	53
5. Instrumentos de medición .....	54
6. Material de muestreo .....	54
7. Material de laboratorio .....	54
8. Material vegetal .....	55
C. Métodos .....	55
1. Estructuras químicas de los compuestos .....	55
2. Recolección de los especímenes .....	55
3. Determinación del porcentaje de humedad .....	56
4. Preparación de la muestra .....	56
5. Extracción del material vegetal .....	57
6. Análisis de cumarinas mediante cromatografía en capa fina .....	57
7. Análisis de flavonoides mediante cromatografía en capa fina .....	58
8. Fraccionamiento de extractos por Cromatografía Contracorriente (CCC) .....	58
9. Análisis de flavonoides por cromatografía líquida en alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) .....	61
10. Determinación de actividad antioxidante por técnica micrométrica de DPPH (1,1-Diphenil-2-picrilhidrazilo) (Marroquín, 2011) .....	63

11. Cuantificación de fenoles totales por técnica micrométrica (Marroquín, 2011) .....	64
12. Análisis de actividad antimicrobiológica .....	64
VIII. AVAL DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN.....	68
IX. RESULTADOS .....	69
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	82
A. Colectas de las muestras de <i>Tagetes lucida Cav.</i> y <i>Valeriana prionophylla Standl.</i> .....	82
B. Porcentajes de humedad.....	83
C. Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos.....	83
D. Análisis de cumarinas por cromatografía en capa fina. ....	84
E. Análisis de flavonoides por cromatografía en capa fina. ....	85
F. Análisis de flavonoides mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia	86
G. Análisis de fenoles totales y actividad antioxidante en las plantas de estudio.	88
H. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>T. lucida</i> y <i>V. prionophylla</i> . ....	89
I. Importancia de los resultados obtenidos en este proyecto de investigación	89
XI. CONCLUSIONES .....	91
XII. RECOMENDACIONES.....	93
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94
XIV. ANEXOS .....	104
Anexo 1. Estructuras químicas de los flavonoides que se han reportado en <i>Tagetes lucida Cav.</i> y <i>Valeriana prionophylla Standl.</i> .....	104
Anexo 2. Otras estructuras que se mencionan en este estudio. ....	107
Anexo 3. Fotografías de campo de las distintas colectas realizadas. ....	109
Anexo 4. Herborización de cada colecta coleccionada en el Herbario BIGU, tres puntos de colecta de <i>Tagetes lucida Cav.</i> y de <i>Valeriana prionophylla Standl.</i>	114
Anexo 5. Cromatoplasmas de cromatografía en capa fina (CCF).....	120
Anexo 6. Cromatogramas de los estándares de flavonoides y de las fracciones de extracto de las muestras vegetales de <i>Tagetes lucida Cav.</i> y <i>Valeriana prionophylla Standl.</i> obtenidos en HPLC-DAD de los extractos fraccionados mediante cromatografía contracorriente (CCC). ....	121

Anexo 7. Fotografías de análisis microbiológico y antioxidante. ....	168
Anexo 8. Certificados de determinación botánica extendidas por BIGU. ....	169
Anexo 9. Gráficos del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante. ...	171

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Solventes para las separaciones de flavonoides por CCC.....	47
Cuadro 2. Gradiente de las corridas cromatográficas HPLC-DAD.....	62
Cuadro 3. Diluciones y concentraciones de los extractos crudos de las muestras de <i>T. lucida</i> y <i>V. prionophylla</i> , para la preparación del Agar-Planta.....	65
Cuadro 4. Puntos de colecta de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl.	69
Cuadro 5. Porcentaje de humedad de las colectas de <i>T. lucida</i> y <i>V. prionophylla</i> .....	70
Cuadro 6. Rendimiento de los Extractos etanólicos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl.....	71
Cuadro 7. Estándares de cumarinas corridos en cromatografía capa fina.....	72
Cuadro 8. Análisis de cumarinas de extractos crudos y material vegetal de <i>V. prionophylla</i> mediante cromatografía en capa fina.....	72
Cuadro 9. Análisis de cumarinas de extracto crudo y material vegetal de <i>T. lucida</i> mediante cromatografía en capa fina.....	73
Cuadro 10. Estándares de flavonoides corridos en cromatografía capa fina.....	74
Cuadro 11. Determinación de flavonoides de extracto crudo y material vegetal de <i>V. prionophylla</i> mediante cromatografía en capa fina.....	74
Cuadro 12. Determinación de flavonoides de extractos crudos y material vegetal de <i>T. lucida</i> mediante cromatografía en capa fina.....	75
Cuadro 13. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad	

antimicrobiana de los extractos etanólicos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl.....	76
Cuadro 14. Tamizaje de la actividad antimicrobiana contra microorganismos de los extractos etanólicos en estudio a una concentración 1 mg/mL.....	77
Cuadro 15. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la actividad antimicrobiana contra microorganismos de los extractos etanólicos en estudio con actividad positiva a una concentración 1 mg/mL.....	77
Tabla 16. Actividad antioxidante y fenoles totales de tres extractos etanólicos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y tres de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. de diferente procedencia.....	78
Cuadro 17. Estándares de flavonoides analizados en HPLC con DAD (detector de arreglo de diodos).....	79
Cuadro 18. Preparación de los extractos crudos alcohólicos secos de las muestras vegetales para la obtención de extractos fraccionados mediante cromatografía contracorriente (CCC), para ser evaluadas posteriormente en HPLC-DAD.....	80
Cuadro 19. Flavonoides identificados en las fracciones de extracto de las muestras de <i>Tagetes lucida</i> Cav., obtenidas en cromatografía contracorriente y analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).....	81
Cuadro 20. Flavonoides identificados en las fracciones de extracto de las muestras de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl., obtenidas en cromatografía contracorriente y analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC -DAD).....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obtención de metabolitos secundarios a partir de metabolitos primarios en los organismos vivos (Dewick, 2002, pág. 9). .....	24
Figura 2. Pericón ( <i>Tagetes lucida</i> Cav.) (Nicolas, 2013, pág. 251). .....	26
Figura 3. Localización geográfica aproximada de las poblaciones de pericón ( <i>T. lucida</i> ) identificadas en Guatemala, incluyendo las poblaciones muestreadas en este estudio: 1) Sipacapa, San Marcos; 2) Cabricán, Quetzaltenango; y 3) Joyabaj, Quiché (tomado y modificado de: Flora Mesoamericana, 2018). .....	29
Figura 4. En la literatura consultada no se encuentra una imagen para <i>V. prionophylla</i> , en este caso se hace referencia al tallo de <i>V. officinalis</i> por sus similitudes (Nicolas, 2013, pág. 256). .....	31
Figura 5. Localización geográfica aproximada de las poblaciones de valeriana ( <i>V. prionophylla</i> ) identificadas en Guatemala, incluyendo las poblaciones muestreadas en este estudio: 1) Patzún, Chimaltenango; 2) San José Ojetenam, San Marcos; y 3) Santa Lucía Utatlán, Sololá (tomado y modificado de: Flora Mesoamericana, 2018). .....	33
Figura 6. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración (Pérez Trueba, 2003, pág. 48). .....	38
Figura 7. Estructuras más abundantes en las plantas: flavonas, flavonoles y flavanonas (Stefova, Stafilov, & Kulevanova, 2010, pág. 883). .....	38
Figura 8. Estructuras de los distintos tipos de flavonoides encontrados en las plantas (Bruneton, 2001, pág. 307). .....	39
Figura 9. Otros tipos de flavonoides que están presenten en las plantas (Pérez Trueba, 2003, pág. 49). .....	40
Figura 10. Los dos sistemas básicos en CCC (Suma, 2018). .....	43
Figura 11. Los dos sistemas básicos de CCC (otro ejemplo): Equilibrio hidrostático (izquierda) y Equilibrio hidrodinámico (derecha) (Ito, 2010, pág. 328). .....	44

Figura 12. Orientación de la bobina coaxial en el soporte de la centrífuga planetaria de la bobina tipo J (principio y mecanismo de CCC de alta velocidad) (Ito, 2010, pág. 332).	45
Figura 13. Cromatógrafo contracorriente (CCC) utilizado para el fraccionamiento de extractos alcohólicos crudos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. Fotografía tomada por Belter Trinidad en el laboratorio de Fisicoquímica.	60
Figura 14. Espectrómetro UV utilizado para comparar los espectros de fracciones obtenidas por CCC. Fotografía tomada por Belter Trinidad en el laboratorio de Fisicoquímica.	60
Figura 15. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (DAD) utilizado para la identificación de flavonoides en extractos alcohólicos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Toxicología (CIAT).	62
Figura 16. Catequina (PerkinElmer, 2011).	104
Figura 17. Rutina (CAS 153-18-4) (PerkinElmer, 2011).	104
Figura 18. Fórmula química de la quercetina (un flavonoide: flavonol) (CAS 117-39-5) presente en la valeriana (referente a <i>V. officinalis</i> L.) (PerkinElmer, 2011).	104
Figura 19. Apigenina (flavona) (ref. <i>V. officinalis</i> ) (CAS 520-36-5) (PerkinElmer, 2011).	105
Figura 20. Kaempferol (flavonol) (ref. <i>V. officinalis</i> ) (CAS 520-18-3) (PerkinElmer, 2011).	105
Figura 21. 2S(-)-hesperidina (glucósido de flavanona) (ref. <i>V. whallichii</i> ) (CAS 520-26-3) (PerkinElmer, 2011).	105
Figura 22. Genisteína (PerkinElmer, 2011).	106
Figura 23. Hidroxiflavona (PerkinElmer, 2011).	106
Figura 24. Naringenina (PerkinElmer, 2011).	106
Figura 25. Naringina (PerkinElmer, 2011).	106
Figura 26. Estructura química de: valeranona (izquierda) y ácido valerénico (derecha, si R=H) (PerkinElmer, 2011).	107

Figura 27. Fórmula química del baldrinal, el principio activo más importante de la valeriana (proveniente de los valtratos) (PerkinElmer, 2011). .....	107
Figura 28. Estructura del pachulol, componente mayoritario en el aceite esencial de <i>V. jatamansi</i> Jones, y se le han atribuido propiedades insecticidas (PerkinElmer, 2011). .....	107
Figura 29. Estructura general de las cumarinas (arriba) y ácido p-cumárico (abajo) (PerkinElmer, 2011). .....	108
Figura 30. <i>Tagetes lucida</i> Cav. - Aldea Poj, Sipacapa, San Marcos. Fotografía tomada por Max Mérida.....	109
Figura 31. <i>Tagetes lucida</i> Cav. - Caceríos Ranchería y Ranchería Chiquita, Cabricán, Quetzaltenango. Fotografía tomada por Belter Trinidad. ....	110
Figura 32. <i>Tagetes lucida</i> Cav. - Aldea Estanzuela, Joyabaj, Quiché. Fotografía tomada por Max Mérida.....	111
Figura 33. <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. - Aldea Chuchucá Alto, Patzún, Chimaltenango. Fotografía tomada por Belter Trinidad.....	112
Figura 34. <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. - San José Ojetenam, San Marcos. Fotografía tomada por Max Mérida. ....	112
Figura 35. <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. - San José Ojetenam, San Marcos. - Preparación de la muestra para su herborización. Fotografía tomada por Belter Trinidad. ....	113
Figura 36. <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. - Aldea Ciénaga Grande, Santa Lucía Utatlán, Sololá. Fotografía tomada por Max Mérida. ....	113
Figura 37. Espécimen herborizado de <i>T. lucida</i> , colectado en Sipacapa, San Marcos. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU.....	114
Figura 38. Espécimen herborizado de <i>T. lucida</i> , colectado en Cabricán, Quetzaltenango. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU. ....	115
Figura 39. Espécimen herborizado de <i>T. lucida</i> , colectado en Joyabaj, Quiché. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU. ....	116
Figura 40. Espécimen herborizado de <i>V. prionophylla</i> colectado en Patzún, Chimaltenango. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU. ....	117

Figura 41. Espécimen herborizado de <i>V. prionophylla</i> colectado en San José Ojetenam, San Marcos. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU. ....	118
Figura 42. Espécimen herborizado de <i>V. prionophylla</i> colectado en Santa Lucía Utatlán, Sololá. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU. ....	119
Figura 43. Cromatoplaça del análisis de cumarinas de los extractos secos alcohólicos y material vegetal de <i>T. lucida</i> y <i>V. prionophylla</i> . Fotografía tomada por Belter Trinidad. ....	120
Figura 44. Cromatoplaça del análisis de flavonoides de los extractos secos alcohólicos y material vegetal de <i>T. lucida</i> y <i>V. prionophylla</i> . Fotografía tomada por Belter Trinidad. ....	120
Figura 45. Cromatograma del estándar de naringenina (TR: 21.54) en la longitud de onda de 230 nm obtenido en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	121
Figura 46. Cromatogramas del estándar de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (TR: 9.24) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	122
Figura 47. Cromatogramas del estándar de apigenina (TR: 18.89) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.15 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	123
Figura 48. Cromatogramas del estándar de catequina (TR: 8.47) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	124
Figura 49. Cromatogramas del estándar de daidzeína (TR: 20.48) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	125
Figura 50. Cromatogramas del estándar de genisteína (TR: 21.71) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	126

Figura 51. Cromatogramas del estándar de Hidroxiflavona (TR: 22.62) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	127
Figura 52. Cromatogramas del estándar de Kaempferol (TR: 21.86) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.98 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	128
Figura 53. Cromatogramas del estándar de Naringina (TR: 17.38) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.....	129
Figura 54. Cromatogramas del estándar de Quercetina (TR: 18.91) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales. ....	130
Figura 55. Cromatogramas del estándar de Rutina (TR: 15.26) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.0904 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.....	131
Figura 56. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 01 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	132
Figura 57. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 03 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	133
Figura 58. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 04 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	134
Figura 59. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 07 obtenido por cromatografía	

contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	135
Figura 60. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 08 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	136
Figura 61. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales. ....	137
Figura 62. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 02 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	138
Figura 63. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 03 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	139
Figura 64. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 04 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	140
Figura 65. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 05 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimental. ....	141
Figura 66. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 06 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	142

Figura 67. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 07 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	143
Figura 68. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 08 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	144
Figura 69. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales. ....	145
Figura 70. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 02 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	146
Figura 71. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 03 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	147
Figura 72. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 04 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	148
Figura 73. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 05 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	149
Figura 74. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 06 obtenido por cromatografía	

contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	150
Figura 75. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 07 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	151
Figura 76. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 08 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	152
Figura 77. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 09 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	153
Figura 78. Cromatogramas de la muestra de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 10 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	154
Figura 79. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de <i>Tagetes lucida</i> Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuentes: Datos experimentales.....	155
Figura 80. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. procedente de Patzún, Chimaltenango. Fracción de extracto 01 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	156
Figura 81. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. procedente de Patzún, Chimaltenango. Fracción de extracto 03 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	157

Figura 82. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. procedente de Patzún, Chimaltenango. Fracción de extracto 05 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	158
Figura 83. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. procedente de Patzún, Chimaltenango. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	159
Figura 84. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. proveniente de San José Ojetenam, San Marcos. Fracción de extracto 01 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales. ....	160
Figura 85. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. proveniente de San José Ojetenam, San Marcos. Fracción de extracto 02 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales. ....	161
Figura 86. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. proveniente de San José Ojetenam, San Marcos. Fracción de extracto 03 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales. ....	162
Figura 87. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. proveniente de San José Ojetenam, San Marcos. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	163
Figura 88. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. procedente de Santa Lucía Utatlán, Sololá. Fracción de extracto 01 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.....	164
Figura 89. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. procedente de Santa Lucía Utatlán, Sololá. Fracción de extracto 03 obtenido por	

cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales. ....	165
Figura 90. Cromatogramas de la muestra de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. procedente de Santa Lucía Utatlán, Sololá. Fracción de extracto 05 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales. ....	166
Figura 91. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. procedente de Santa Lucía Utatlán, Sololá. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales. ....	167
Figura 92. Análisis microbiológico de muestras de extractos crudos alcohólicos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. Fuente: Fotografía tomada por Belter Trinidad. ....	168
Figura 93. Análisis de actividad antioxidante de extractos alcohólicos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. Fuente: Fotografía tomada por Belter Trinidad. ....	168
Figura 94. Certificado de la determinación botánica de las muestras recolectadas de <i>Tagetes lucida</i> Cav. (pericón) extendida por la Unidad de Investigación Herbario BIGU. Fuente: Herbario BIGU. ....	169
Figura 95. Certificado de la determinación botánica de las muestras recolectadas de <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. (valeriana) extendida por la Unidad de Investigación Herbario BIGU. Fuente: Herbario BIGU. ....	170
Figura 96. Contenido de fenoles totales en las muestras de <i>Tagetes lucida</i> Cav. (en azul) y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. (en rojo). Fuente: Datos experimentales. ....	171
Figura 97. Gráfico que representa los valores de CI50 del ensayo DPPH para las muestras de <i>Tagetes lucida</i> Cav. (en azul) y <i>Valeriana prionophylla</i> Standl. (en rojo). Fuente: Datos experimentales. ....	171

## I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente estudio se enmarca en el área de la química de productos naturales, la cual es una rama de la química orgánica.

El ámbito es el de la química de productos naturales de plantas nativas de Guatemala, enfocándose en dos plantas que tienen muchas aplicaciones en la medicina tradicional, como son *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl., las cuales son nativas del occidente de Guatemala. La investigación se enfocó en la determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos alcohólicos de ambas especies y en la separación y aislamiento de flavonoides, por medio de cromatografía contracorriente, de las cuales se analizaron flavonoides haciendo uso de la técnica de separación de Cromatografía Contracorriente (CCC), para establecer si la misma es una técnica adecuada para la separación de compuestos, aislamiento e incluso purificación de flavonoides, usando como método de identificación cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y también el análisis de cumarinas mediante cromatografía en capa fina (CCF) como método de identificación para este estudio.

## II. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de flavonoides, cumarinas, la actividad antioxidante y biológica de las fracciones de seis extractos alcohólicos de las especies *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala mediante cromatografía contracorriente (CCC). Las colectas fueron realizadas en los siguientes lugares, para *Tagetes lucida* Cav.: Sipacapa, San Marcos; Cabricán, Quetzaltenango y Joyabaj, Quiché; y para *Valeriana prionophylla* Standl.: Patzún, Chimaltenango; San José Ojetenam, San Marcos y Santa Lucía Utatlán, Sololá.

Los flavonoides se identificaron en las hojas o partes aéreas de pericón y en las raíces de valeriana por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con detector de arreglo de diodos. Los valores obtenidos de las capacidades antioxidantes *in vitro* de estos extractos crudos y del material vegetal seco de las seis colectas de los especímenes vegetales, se obtuvieron usando el método de DPPH; encontrándose mayor actividad antioxidante para las muestras de *T. lucida* que para las de *V. prionophylla*.

Los extractos de *T. lucida* presentaron actividad biológica contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. tiphymurium* y *C. albicans*, mientras que los extractos de *V. prionophylla* solo presentaron actividad biológica contra *C. albicans*. Finalmente, se encontró mayor presencia de flavonoides en la muestra de *T. lucida* procedente de Joyabaj, Quiché.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Productos naturales

Dentro del estudio de los compuestos orgánicos se encuentra una gama de compuestos con estructuras diversas, y encontramos este tipo de compuestos en los seres vivos como “animales, plantas, hongos, algas, incluso las bacterias” (Pomilio, 2012, pág. 74). “Un producto natural puede ser considerado todo compuesto orgánico proveniente de cualquier organismo vivo<sup>1</sup> y de bajo peso molecular (<1500 uma) sintetizado por organismos biológicos” (Jiménez, 2013, pág. 134).

Una gran variedad de organismos superiores son capaces de sintetizar y transformar sus compuestos químicos, por ejemplo “las plantas son muy eficientes sintetizando compuestos orgánicos vía fotosíntesis utilizando todos los materiales inorgánicos necesarios que encuentran en su ambiente” (Dewick, 2002, pág. 7), ver figura 1.

#### B. Productos naturales de origen vegetal

En la naturaleza hay una inmensa variedad de especies de plantas. Aunque no se puede observar a simple vista, las plantas mantienen un movimiento constante de macronutrientes y se “encuentran dentro de un estado dinámico estacionario desde el punto de vista químico, es decir, una constante síntesis y degradación de biomoléculas (...) manteniendo las concentraciones de estos, constantes” (Ringuelet & Viña, 2013, pág. 7).

---

<sup>1</sup> Sin embargo, Cooper & Nicola (2015) indican que la arena también es un producto natural y no es un organismo vivo.

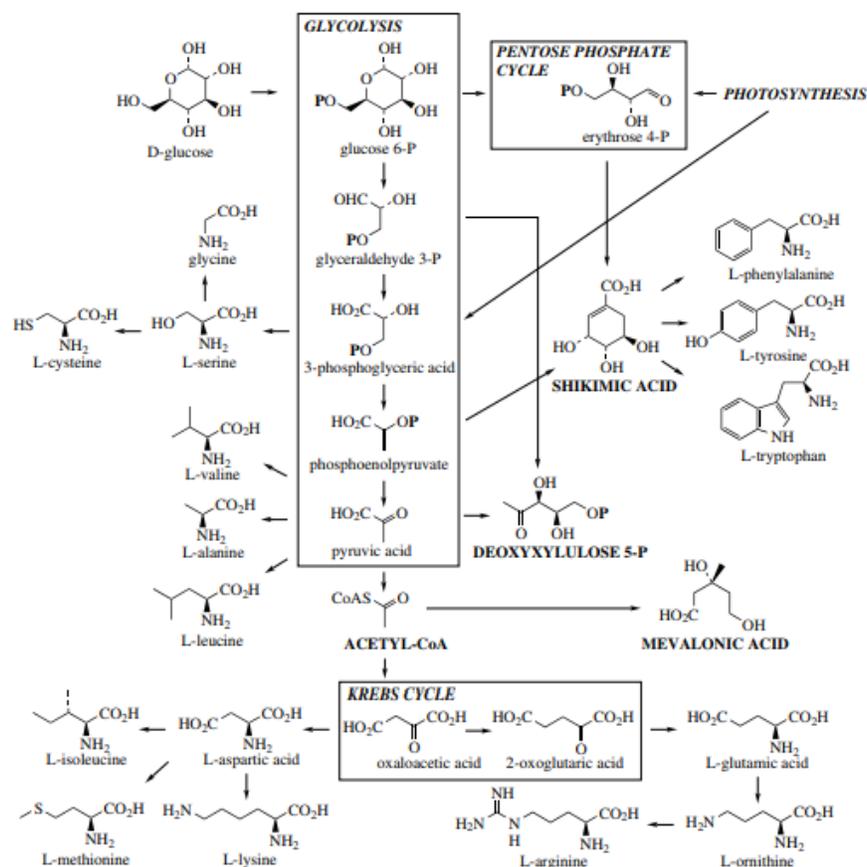


Figura 1. Obtención de metabolitos secundarios a partir de metabolitos primarios en los organismos vivos (Dewick, 2002, pág. 9).

El uso de los componentes de origen vegetal es más pronunciado en el tratamiento de enfermedades (terapéutica), ya que “se fundamentan los recursos terapéuticos en elementos disponibles en la naturaleza, y es una de las tradiciones milenarias mejor estudiadas” (Cáceres, 2009). La gran riqueza del mundo vegetal se pone de manifiesto en los múltiples principios medicinales que sintetizan las plantas: desde antibióticos (...); hasta cardiotónicos, (...); pasando por sedantes, como los de la amapola<sup>2</sup> y la valeriana (Pamplona, 2007, pág. 27).

<sup>2</sup> El alcaloide mayoritario es una tetrahidrobencazequina, la rhouadina (Bruneton, 2001, pág. 909).

### **C. Plantas Medicinales**

Las plantas medicinales son de gran utilidad para el hombre, de toda la vegetación que existe, en cuanto a uso terapéutico se refiere.

Las plantas medicinales se utilizan para curar las enfermedades más comunes o tras el diagnóstico de un médico, dando con el diagnóstico el nombre a la enfermedad; si la salud no mejora tras el uso de la planta medicinal, el especialista indicará cuales son los medicamentos químicos (Nicolas, 2013, pág. 24). Para la OMS (Organización Mundial de la Salud) planta medicinal es todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas, farmacológicas o que son precursoras en la semisíntesis químico farmacéutica (Pamplona, 2007; Kuklinski, 2000). “Por lo tanto miles de personas a nivel mundial tienen dificultad al acceder a la medicina moderna y utilizan la medicina tradicional como un tratamiento alternativo o convencional, y el valor medicinal de las plantas yace en la certeza de las sustancias químicas que producen una buena acción fisiológica en el cuerpo humano” (Bonilla, Guadarrama, Alarcón, Limón, & Vazquez, 2015, pág. 463).

### **D. Experiencias en Guatemala**

Guatemala es un país con una riqueza vegetativa muy alta a pesar de ser un país de poca extensión territorial. En ella hay muchas especies vegetales que no se han estudiado e incluso que aún no han sido descubiertas. “Por ser un territorio muy montañoso ha sido inaccesible el estudio de toda la vegetación por su terreno escarpado y empinado” (de MacVean & Monzón, s. f., pág. 84). “La flora de Guatemala es de alta riqueza por su gran biodiversidad (...) por lo cual la Fundación Defensores de la Naturaleza y expertos en botánica buscan estudiar a fondo la flora nativa de Guatemala” (González Escobar, 2010, pág. 2).

## E. Descripción de las plantas de estudio

### 1. *Tagetes lucida* Cav. (pericón)

En Guatemala el uso de esta planta es muy popular, “se describe en Chimaltenango, El Quiché, Jalapa, Guatemala, Huehuetenango, Petén, Quetzaltenango, Sacatepéquez y San Marcos, aunque es nativa desde México hasta Honduras, desde 1,000 a 2,000 msnm aproximadamente” (Cáceres, 1996, pág. 305). Ver Figura 3. El género *Tagetes* tiene 35 especies y según Rydberg todas americanas (Cáceres, 1996, pág. 305) solo en México se han descrito 24 especies y las propiedades biológicas de varias de estas especies afectan a diversos organismos desde bacterias, virus, hongos, nemátodos, ácaros e insectos, incluso otras especies de plantas (Barajas, Montes, Castrejón, Flores, & Serrato, 2011, pág. 85). Y en el caso de *T. lucida* inhibe el desarrollo de 5 especies fitopatógenas de hongos y una dermatofita (Barajas, Montes, Castrejón, Flores, & Serrato, 2011, pág. 86). Ver Figura 2.



Figura 2. Pericón (*Tagetes lucida* Cav.) (Nicolas, 2013, pág. 251).

a) Nombres comunes

*Tagetes florida* Sweet, *T. schiedeana* Less., l'yá, Jolomocox, Ucá (Cáceres, 1996, pág. 305; Jean-Pierre, 2013, pág. 183). Mantzania wamal, pericón, pimente wamal, (Chile); hierba de San Juan, hipericón, liya, pericón, ucá (Guatemala); hipericón, pericón (España) (Flora Mesoamericana, 2018).

b) Descripción botánica

La especie *Tagetes lucida* Cav., pertenece al género *Tagetes* y a la familia *Asteraceae* (Database, 2018). Hierba perenne aromática, glabra, erecta de 30-95 cm de alto, se levanta de una base corta, gruesa y leñosa; cimosamente ramificada; ramas escasas. Hojas opuestas o subyacentes, sésiles, oblongo-lanceoladas, 5-10 cm de largo, puntiagudas, finamente dentadas, con numerosas glándulas oleosas. Flores amarillas en pequeñas cabezuelas terminales; receptáculo cilíndrico, 9-10 cm diámetro; 5-7 filarios subulados en el ápice (Cáceres, 1996, pág. 305; Flora Mesoamericana, 2018). Se utiliza el tallo, semilla, hoja y flor (Nicolas, 2013, pág. 251). Esta planta tiene un olor dulce, semejante al anís (Hernández, y otros, 2006, pág. 19) (Figura 2).

c) Composición química

Contiene aceite esencial (limoneno, cariofileno, ocimeno, anetol...), resinas, ácido gálico, taninos, cumarinas, flavonas, alcaloides (Nicolas, 2013, pág. 251). El aceite esencial de *T. lucida* presenta los siguientes compuestos: limoneno (16.5%),  $\beta$ -ocimeno (14%),  $\beta$ -cariofileno (28%), mirceno (4-5%), anetol, alilanol, esdragol, eter metílico de eugenol, tagetona, dihidrotagetona, tetrahidrotagetona, linalool, presenta también; alcaloides cuaternarios, flavonoides, quercetagetina y patuletina, saponinas, taninos, leucoantocianinas, ácido gálico,

poliacetilenos, glicósidos cianogénicos, cumarinas (Cáceres, 1996, pág. 306) también presenta 4',5,7-trimetoxiflavona como compuesto bioactivo (Hernández et al., 2006, pág. 19) o también llamado apigenina trimetiléter (Pubchem, 2018), quercetina<sup>3</sup> y posiblemente rutina, este último no detectado en el extracto acuoso (Bonilla, Guadarrama, Alarcón, Limón, & Vazquez, 2015, pág. 464). Rutina y kaempferol, y sus glucósidos; Quercetina-7-O-glucósido y 6-hidroxi-kaempferol-7-O-glucósido, en extractos metanólicos, utilizando <sup>13</sup>C-RMN y <sup>1</sup>H-RMN (Aquino, Cáceres, Morelli, & Rastrelli, 2002, pág. 1773). Ver mapa (Figura 3).

---

<sup>3</sup> Figura 19, Anexo 1.

d) Localización geográfica en Guatemala.

En la Figura 3 se presenta un mapa de localización geográfica de las poblaciones de *T. lucida* en las cuales se colectaron las muestras analizadas en este estudio.

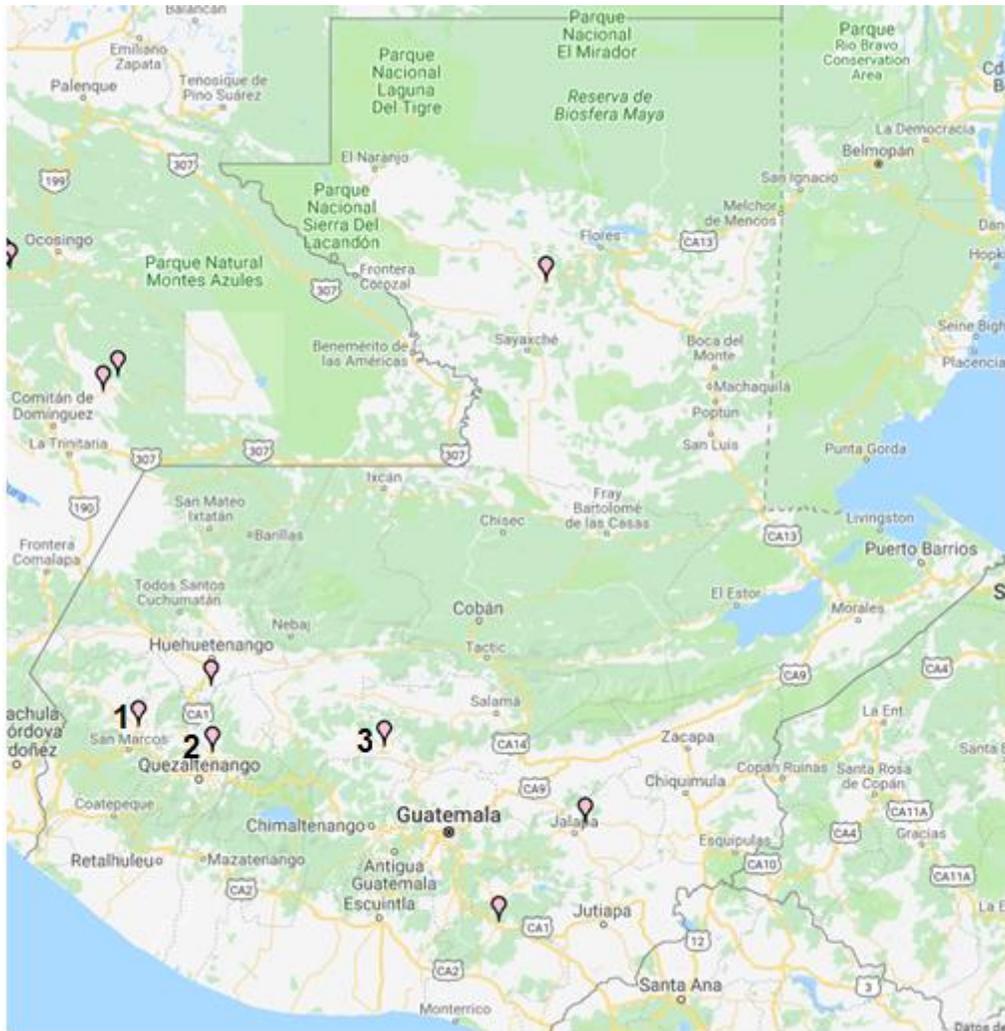


Figura 3. Localización geográfica aproximada de las poblaciones de pericón (*T. lucida*) identificadas en Guatemala, incluyendo las poblaciones muestreadas en este estudio: 1) Sipacapa, San Marcos; 2) Cabricán, Quetzaltenango; y 3) Joyabaj, Quiché (tomado y modificado de: Flora Mesoamericana, 2018).

## **2. *Valeriana prionophylla* Standl. (valeriana)**

Se cree que el nombre valeriana podría derivar del latín *valere*, que significa “estar bien” o “estar feliz” (Botanical-Online SL, 2018). El género *Valeriana* (Valerianaceae) está constituido por más de 250 especies alrededor del mundo, utilizadas por muchas culturas como plantas medicinales; la parte más importante es la raíz y se aplica como sedante desde los inicios de la civilización de los antiguos griegos y romanos (Wang, y otros, 2010, pág. 161). En Guatemala se han descrito alrededor de 12 especies del género *Valeriana*. La misma habita desde los 2,800 a 3,700 msnm de altitud<sup>4</sup> (Cáceres, 2009, pág. 1; Contreras & Méndez, 2014, pág. 223) o por ejemplo la *Valeriana jatamansi* habita de 1220 a 3000 msnm, originaria de la India) (Thusoo, y otros, 2014, pág. 1) en lugares fríos, márgenes de los ríos, bosques y herbazales húmedos (Botanical-Online SL, 2018), incluso a la orilla de las carreteras. La especie de *V. prionophylla* crece en los departamentos de San Marcos, Huehuetenango, Quetzaltenango, Quiché, Sololá y Chimaltenango, principalmente (ver Figuras 4 y 5).

---

<sup>4</sup> La planta puede encontrarse a una altitud ligeramente superior a la indicada en esta descripción.



Figura 4. En la literatura consultada no se encuentra una imagen para *V. prionophylla*, en este caso se hace referencia al tallo de *V. officinalis* por sus similitudes (Nicolas, 2013, pág. 256).

a) Nombres comunes

Valeriana, raíz de gato, pericón de monte. *Valeriana pumilio* Standl, *Valerina skutchii* Standl. (Flora Mesoamericana, 2018, pág. 9). Uxe ulew, valeriana del altiplano (Nicolas, 2013, pág. 183). “Raíz de catacata, raíz de los gatos<sup>5</sup> (referente a *Valeriana officinalis* L.)” (Botanical-Online SL, 2018).

b) Descripción botánica

La especie *Valeriana prionophylla* Standl., pertenece al género *Valeriana* y a la familia *Valerianaceae*. Es una planta erecta, perenne, 0.2-1.5 m de tallo, raíz cilíndrica y pivotante bifurcada, 1.5 a 5 cm de ancho de raíz, coronada por un caudex simple o de ramificación múltiple, tiene 1 tallo por caudex, de un color verde a morado o morado maculado, escasamente pubescente en los nódulos, los pelos 0.2-0.5 mm. Hojas basales o con 1 a 4 pares de caulinas. Cuchillas obovadas,

<sup>5</sup> Se dice que a los gatos les gusta refrescarse en valeriana, es un estimulante y sustitutivo de la hierba gatera, les provoca efectos similares a la embriaguez (*Valeriana prionophylla* L.) (Botanical-Online SL, 2018).

la base atenuada, el ápice agudo o redondeado. Glándulas ciliadas acolchadas distribuidas a menudo cada 2-15 mm a lo largo del margen de hojas enteras y en las axilas de los dientes sobre hojas serruladas, las superficies glabras, serosas o con pelos dispersos de 0.3 a 0.6 mm, el nervio central carinado o blanco. Ampliamente peciolado, de 5-12 cm, la base libre, márgenes ciliados, los pelos de 0.2 a 0.5 mm. Paniculoide de la inflorescencia, de 2.5-13 x 2-10 cm en la flor temprana, 40-65 x 15-20 en la flor y las frutas tardías; ramas ascendentes, ramificación terminal dicotómica. Glabra a pubescente en todo, los pelos de 0.3-0.5 mm. Florece y fructifica de julio a enero en Chiapas y Guatemala. Número cromosómico  $2n=32$  (Flora Mesoamericana, 2018, pág. 9).

c) Composición química

Aceite esencial (0.5 a 1.5%), valepotriatos<sup>6</sup> (0.5 a 2%), alcaloides (0.1%), enzimas, colina (Nicolas, 2013, pág. 256). Baldrinal, principio activo más importante (Pamplona, 2007, pág. 173). Valeranona, borneol y sus ésteres, kesano (*Valeriana* sp.) (Kuklinski, 2000, pág. 142). Quercetina<sup>7</sup> (un flavonol) (referente a *V. officinalis* L.) (Botanical-Online SL, 2018).

---

<sup>6</sup> O iridoides (1-5%) (valeclorina, valtrato de isovaleróxihidrina, didrovaltratos e isovaltratos), durante el secado los valtratos se descomponen en baldrinal. Dado que los valtratos se descomponen fácilmente, es difícil que se encuentren en productos estandarizados acabados (tinturas, cápsulas, etc.) y solo se encuentra en el aceite esencial de la valeriana (Botanical-Online SL, 2018).

<sup>7</sup> Es un flavonol presente como O-glicósido en altas concentraciones, tanto en frutas como verduras, uvas verdes, cítricos, tomate, brócoli, cebolla y otros vegetales verdes, es el flavonoides más abundante y más habitual en la dieta humana (Pubchem, 2018).

d) Localización geográfica de la *V. prionoophylla* en Guatemala.

En la Figura 5 se presenta un mapa de localización geográfica de las poblaciones de *V. prionoophylla* en las cuales se colectaron las muestras analizadas en este estudio.

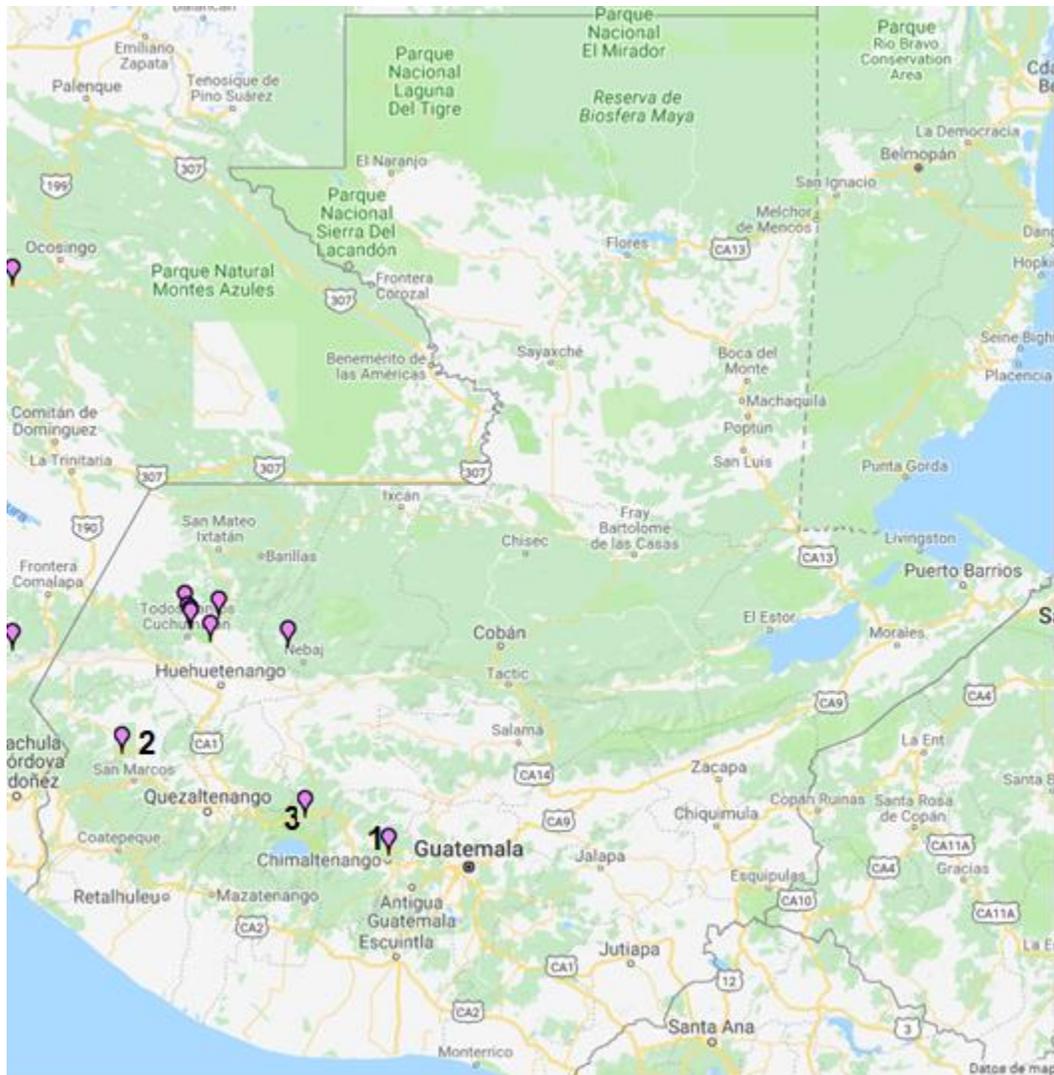


Figura 5. Localización geográfica aproximada de las poblaciones de valeriana (*V. prionoophylla*) identificadas en Guatemala, incluyendo las poblaciones muestreadas en este estudio: 1) Patzún, Chimaltenango; 2) San José Ojetenam, San Marcos; y 3) Santa Lucía Utatlán, Sololá (tomado y modificado de: Flora Mesoamericana, 2018).

### **3. Estudios de composición química y actividad antioxidante de otras plantas del género *Valeriana***

Ambas plantas, *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl., tienen sus características distintivas, y en varias partes de Latinoamérica se han hecho diversos estudios y se han encontrado que ejercen papeles importantes en la naturaleza como “en México se evaluó la actividad antifúngica de extractos acuosos y aceite esenciales de cinco especies de *Tagetes*, entre ellas *T. lucida*, en especies de hongos, *Sclerotium rolfsii* y *Monilinia fructicola*” (Barajas, Montes, Castrejón, Flores, & Serrato, 2011, pág. 86). Así las especies del género *Valeriana*, se pueden comparar y en sí tienen sus similitudes, por ejemplo, en su artículo Liu, Zhou, & Liu (2013) hacen comparación entre la *Valeriana jatamansi* Jones y la *V. officinalis*, que el primero ejerce una toxicidad para los insectos por sus componentes químicos (patchulol<sup>8</sup>, 24.3%, el mayoritario, ver Anexo 2, Figura 33) y por el empleo de la *V. officinalis* en el tratamiento del desorden del sueño y nervioso, obesidad, entre otros. Por lo cual, el objetivo fue la identificación de los componentes en la *V. jatamansi* que tienen potencial insecticida, además de la composición química del aceite esencial de las raíces de esta especie.

Bonilla, Guadarrama, Alarcón, Limón, & Vazquez (2015) demostraron la actividad antidepresiva en *Tagetes lucida* Cav., y solo se determinó dicha actividad biológica en extractos acuosos de dicha planta, haciendo las pruebas en ratas Wistar macho (más de 5 individuos), por los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>2A</sub>.

---

<sup>8</sup> Un alcohol terciario sesquiterpenoide, también llamado alcohol pachulí (Pubchem, 2018). Componente mayoritario de *V. jatamansi* y tiene el potencial como insecticida o fumigante natural (Liu, Zhou, & Liu, 2013, pág. 3), ver la estructura química en Anexo 2, Figura 35.

Aquino, Cáceres, Morelli, & Rastrelli (2002) trabajaron con extractos metanólicos de *T. lucida*, encontrando flavonoides como quercetina-7-O-glucósido-6-hidroxikaempferol-7-O-glucósido, quercetina, rutina y kaempferol. Piccinelli et al. (2004) presentaron su estudio encontrando dos nuevos lignanos en las raíces de *V. prionophylla* identificados como 7,9':7',9-diepoxilignano glicósidos.

Contreras (2009), trabajó con tinturas de *V. prionophylla* como sedante y ansiolítico, indicando que es factible realizar un producto medicinal a partir de la tintura 1:5 de la raíz de *V. prionophylla* pero el contenido de flavonoides es mayor en la tintura 1:10 que en la 1:5 (etanol 70%).

García (2013) estudió la actividad antifúngica de extractos etanólicos de hoja y rizoma de *V. prionophylla*, colectadas en dos regiones de Guatemala, evaluó la actividad antifúngica de *V. prionophylla* procedente de San Marcos y Quiché, contra agentes causales de micosis superficiales y oportunistas (*Trichophyton rubrum*, *Micosporum gypseum*, *Aspergillus flavus*, entre otros.)<sup>9</sup> y determinó su eficacia para inhibir el crecimiento del hongo. Encontró que el extracto de hoja y rizoma de *V. prionophylla* no presentó actividad antifúngica significativa ante hongos filamentosos y levaduriformes.

Scull, Guitiérrez, Sánchez, Montes (2016) estudiaron el perfil químico de dos extractos hidroalcohólicos de *T. lucida* (30% y 50%) mediante cromatografía en capa fina, HPLC y fenoles totales; observando una similitud entre ambos extractos, excepto en el contenido de fenoles totales, pero ambos manifestaron propiedades antioxidantes, siendo mayor para el extracto hidroalcohólico al 30% y superiores a la vitamina C, utilizada como

---

<sup>9</sup> Los dos primeros acá mencionados son micosis superficiales y el tercero es micosis oportunista.

sustancia de referencia. Los resultados obtenidos permitirán validar a *T. lucida* como una alternativa terapéutica a tener en cuenta dentro de nuestra medicina natural y tradicional.

#### **F. Metabolitos secundarios de *T. lucida* y *V. prionophylla***

Los principios activos se distribuyen de forma desigual por las diferentes partes u órganos de la planta, debido a la especialización de sus células; no basta con saber que la valeriana es un buen sedante; hay que saber que parte de la planta se debe utilizar (Pamplona, 2007, pág. 27). Los principios activos son sustancias químicas responsables de la actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga, y puede contener varios principios activos (Kuklinski, 2000, pág. 4). En algunos casos, todas las partes de la planta contienen los mismos principios activos, de forma que es indiferente utilizar unas u otras (Pamplona, 2007, pág. 27). Para *V. prionophylla*, la raíz es donde se encuentra la mayor cantidad de metabolitos y por lo tanto es la parte más utilizada de esta planta y para *T. lucida* se utilizan tallos, flores, hojas y raíz.

#### **G. Flavonoides**

##### **1. Estructuras químicas de los flavonoides**

El descubrimiento de los flavonoides se remonta a los inicios de los años 1930, cuando el ganador del Premio Nobel de Medicina (1937), Albert Szent-Györgyi (1893-1986), fue el primero en identificar flavonoides en cítricos, y aseguró que también tenían un rol positivo importante en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, sin embargo, debido al desconocimiento de estas sustancias naturales, en el pasado se les conocía en su conjunto como vitamina P (Skorek, Jurczyk, Sajewicz, & Kowalska, 2016, pág. 286). Y hoy en día se han descubierto más de 4,000 flavonoides y están omnipresentes en frutas, semillas, hojas y flores de todo tipo de plantas. Presentan un amplio espectro de color, como el amarillo en los cítricos (debido a la presencia de flavonoles,

flavonas, chalconas y auronas) y hasta un color azul marino en los arándanos, ciruelas, fresas, etc., (por la presencia de antocianinas) y también son de los compuestos polifenólicos con un rango amplio de polaridad (Skorek, Jurczyk, Sajewicz, & Kowalska, 2016, pág. 286; Yuan, 2010, pág. 878).

Siendo sustancias que se producen regularmente en las plantas, los flavonoides “son pigmentos casi universales en los vegetales y casi siempre hidrosolubles, que son responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas” (Bruneton, 2001, pág. 306) y también son sustancias captadoras de radicales (antirradicales) (Kuklinski, 2000, pág. 234). También son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas, todos presentando un esqueleto hidrocarbonado de 15 carbonos del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (difeníl-propano) (Stefova, Stafilov, & Kulevanova, 2010, pág. 882; Pubchem, 2018). Derivados del ácido shiquímico y de tres restos de acetato (Pérez Trueba, 2003, pág. 48). O también caracterizados por una estructura benzo- $\gamma$ -pirano (Cartaya & Reynaldo, 2001, pág. 5). Este tipo de sustancias naturales protegen a las plantas de daños producidos por agentes oxidantes, como rayos UV, contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. (Martínez, Gonzáles, Culebras, & Tuñón, 2002, pág. 271). Si bien los flavonoides (>4,000) son los encargados de proveer la coloración a las plantas, otros no son visibles directamente, como las flavonas y flavonoles incoloros que copigmentan y protegen a los antocianósidos (Bruneton, 2001, pág. 306). En la Figura 8 se presentan las estructuras de algunos tipos de flavonoides. Los flavonoides son una clase específica de polifenoles. En general, se cree que los flavonoides incluyen una amplia variedad de compuestos fenólicos, tales como las flavonas, flavonoles, flavononas, flavanonoles, antocianidinas, flavan-3,4-dioles, xantonas, flavan-3-oles, isoflavonas, isoflavanonas,

chalconas, dihidrochalconas, auronas, y homoisoflavonas (Yuan, 2010) y otros tipos (Figuras 6 a 9).

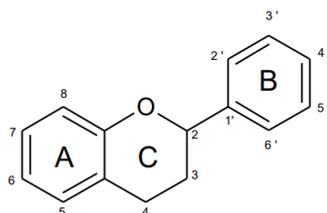


Figura 6. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración (Pérez Trueba, 2003, pág. 48).

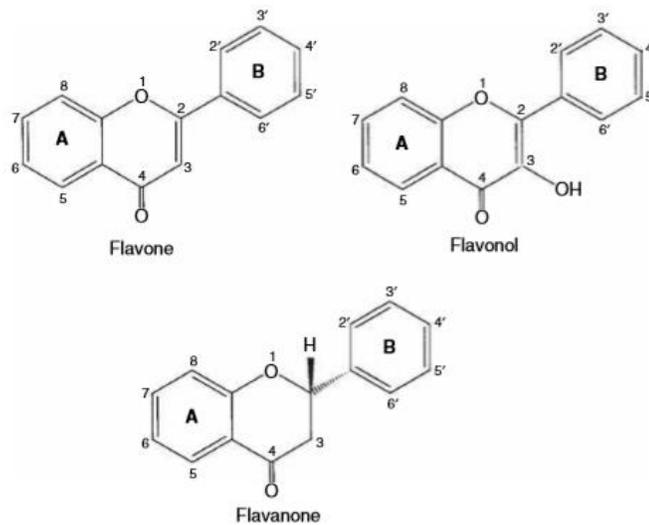


Figura 7. Estructuras más abundantes en las plantas: flavonas, flavonoles y flavanonas (Stefova, Stafilov, & Kulevanova, 2010, pág. 883).

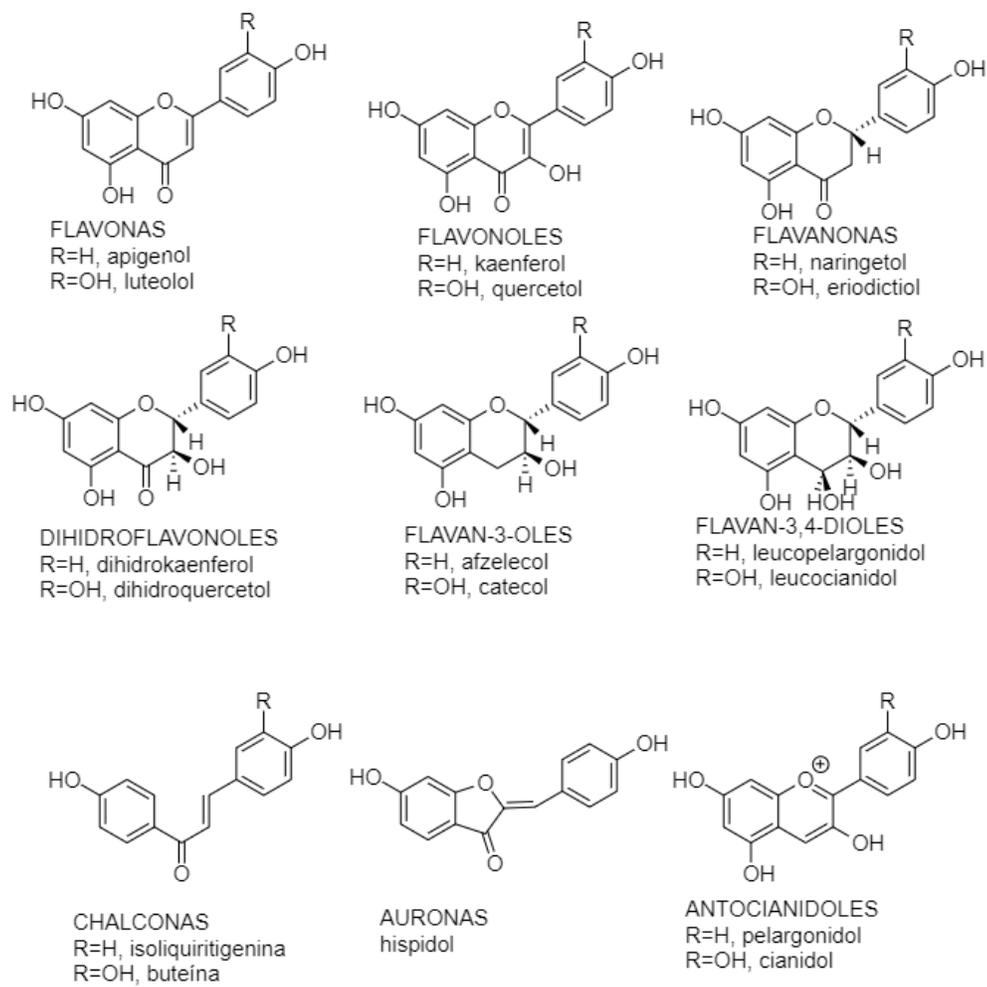


Figura 8. Estructuras de los distintos tipos de flavonoides encontrados en las plantas (Bruneton, 2001, pág. 307).

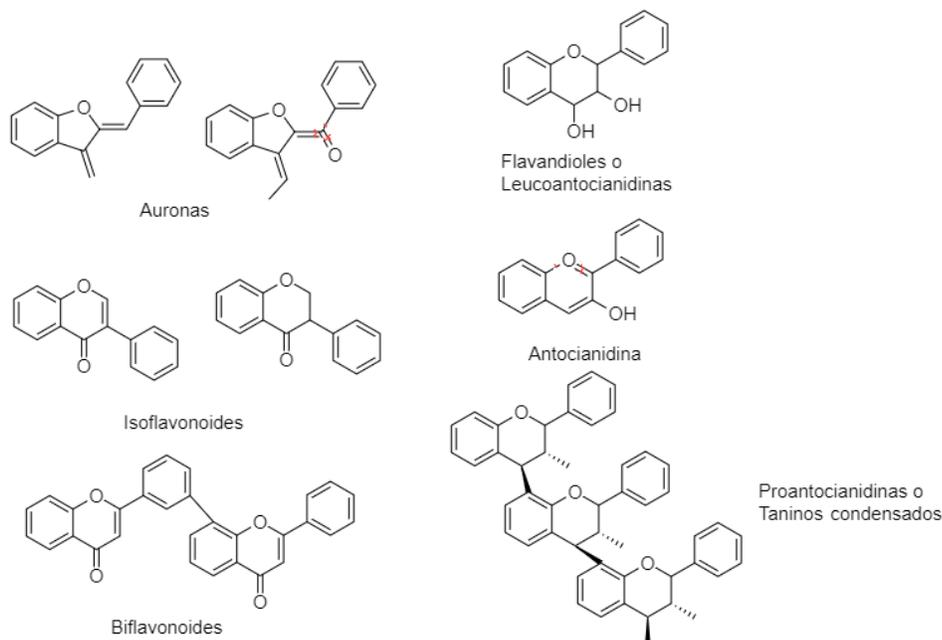


Figura 9. Otros tipos de flavonoides que están presentes en las plantas (Pérez Trueba, 2003, pág. 49).

## 2. Actividad antioxidante de los flavonoides

Los polifenoles, ampliamente extendidos en el reino vegetal, son objeto de estudio en los campos de la química, química clínica y bioquímica, y los flavonoides son un grupo interesante de los polifenoles debido a sus diversas actividades biológicas (Skorek, Jurczyk, Sajewicz, & Kowalska, 2016, pág. 286).

En un estudio realizado por Pérez (2003) de flavonoides: antioxidantes o prooxidantes, quedó demostrado que los flavonoides desempeñan un doble papel como antioxidantes y prooxidantes<sup>10</sup>, indicando también que si bien una dieta rica en flavonoides es beneficiosa para la salud, un exceso puede ser

<sup>10</sup> Rasgo probablemente responsable de los efectos mutagénicos y genotóxicos también encontrados para algunos de estos metabolitos en diversos sistemas experimentales, y este efecto lo ejercen en reducción temporal del Cu(II) a Cu(I), generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y afecta las funciones del glutatión y glutatión-S transferasa (Pérez Trueba, 2003, pág. 48).

muy perjudicial debido a sus diversas propiedades farmacológicas, propiedades quelatantes de los metales de transición y secuestradores de los radicales libres. Así para este estudio los flavonoides ocupan un lugar destacado, ya que los mecanismos antioxidantes que ejercen son resultado de la combinación de sus propiedades. Cuando los flavonoides tienen sustituciones en la posición orto en el anillo A o B, son estructuras que tienen una buena acción inhibitoria de la formación del radical hidroxilo (Aguilar & Bonilla, 2009, pág. 21).

Los flavonoides tienen una amplia aplicación en la industria cosmética ya que afectan<sup>11</sup> directamente la piel de los humanos, y como antioxidantes extienden la vida útil de los productos cosméticos (Skorek, Jurczyk, Sajewicz, & Kowalska, 2016, pág. 286). De ahí que su principal rol es causado por las propiedades antioxidantes. Y por lo cual, impiden la oxidación de la vitamina C, que es la responsable de proteger las paredes de los vasos sanguíneos (Skorek, Jurczyk, Sajewicz, & Kowalska, 2016, pág. 286).

### **3. Actividad biológica de los flavonoides**

Ha quedado demostrado en estudios *in vivo* e *in vitro*, que los flavonoides son fuertemente antioxidantes, anti-inflamatorios, anticancerígenos y de actividades de anti-acumulación y se ha conocido que los flavonoides protegen los vasos sanguíneos capilares, cerrándolos herméticamente (Skorek, Jurczyk, Sajewicz, & Kowalska, 2016, pág. 286). Varias plantas y especies que contienen derivados de los flavonoides han encontrado aplicación como agentes preventivos de enfermedades y terapéuticos en la medicina tradicional en Asia durante miles de años. El riesgo mucho menor de cáncer de colon, próstata y mama en los asiáticos, que consumen más verduras, frutas y té que las poblaciones del hemisferio occidental, plantea la cuestión si los flavonoides

---

<sup>11</sup> Los flavonoides rejuvenecen la piel de los humanos, tienen una acción antimicrobiana, etc.

median los efectos protectores de las dietas ricas en esos alimentos actuando como agentes quimiopreventivos y anticancerígenos (Pubchem, 2018). Especies como la *V. jatamansi*, son consideradas como afrodisiacas, antiespasmódicas, antisépticas, expectorantes, oftálmicas y tónicas; usadas en enfermedades como el cólera, histeria, asma y para combatir mordedura de serpiente y picadura de escorpión (Thusoo, y otros, 2014, pág. 1). La ingesta media de flavonoides por los seres humanos es mayor a 1 g por día, aunque los flavonoides carecen de valor nutricional clásico, cada vez más se les ve como componentes dietéticos beneficiosos (Pubchem, 2018).

## **H. Cumarinas**

Las cumarinas son 2H-1-benzopiran-2-onas que se pueden considerar, en primera aproximación, como las lactonas de los ácidos 2-hidroxi-Z-cinámicos, y se encuentran comúnmente en la familia Asteraceae y en variedad (Bruneton, 2001, págs. 261-262). La gran mayoría de las cumarinas tienen sustitución en C-7 por un hidroxilo, a partir de esta estructura básica surgen muchas otras cumarinas (Ver Figura 35 en Anexo 2), el interés farmacológico de las drogas con cumarinas es limitado (Bruneton, 2001).

## **I. Cromatografía Contracorriente (CCC)**

### **1. Perspectiva general**

El origen en la composición y separación de los productos naturales o materia en general ha sido un gran reto para la ciencia a lo largo de los años, un método común es el uso de agua para la extracción de componentes en alimentos, suelos y plantas (AlphaCrom, 2018).

El desarrollo de la CCC comenzó a mediados de los años sesenta. Entre los diversos tipos de modos CCC para la separación de flavonoides, las técnicas principales son la cromatografía en contracorriente de gotas (DCCC), la cromatografía en contracorriente locular rotativa (RLCCC) y la cromatografía de

partición en centrífuga (CPC). Hoy en día, los métodos de CPC con cartucho y bobina multicapa son las técnicas principales (Yuan, 2010, pág. 878).

## 2. Fundamento

La cromatografía es una metodología de separación de mezclas de múltiples componentes en una muestra determinada (Markowski, 2004). La cromatografía contracorriente (CCC) es un sistema de partición líquido-líquido sin soporte sólido donde los solutos son divididos entre la fase líquida móvil y la fase líquida estacionaria en un espacio de columna abierta (Ito, 2010). También se puede decir que la CCC es un método cromatográfico que se usa para separar solutos que son más o menos retenidos en la columna por una fase estacionaria (líquida en este caso) y son eluidos en la salida de la columna por una fase móvil (Rolet-Menet, 2010). La instrumentación, por lo tanto, requiere una técnica de enfoque para alcanzar ambas retenciones de la fase estacionaria y la alta eficiencia de partición en la ausencia de un soporte sólido. La variedad de los sistemas CCC existentes pueden dividirse en dos clases: sistemas de equilibrio hidrostático e hidrodinámico (Figura 10).

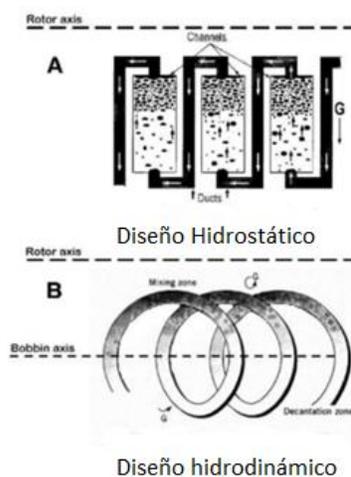


Figura 10. Los dos sistemas básicos en CCC (Suma, 2018).

El sistema de equilibrio básico hidrodinámico (Figura 10, B y Figura 11 derecha) utiliza una bobina giratoria, el cual genera un efecto de tornillo

arquimediano, por lo cual todos los objetos de diferentes densidades en la bobina son manejados hacia una terminal, convencionalmente llamada “cabeza”, la otra terminal comienza en la cola.

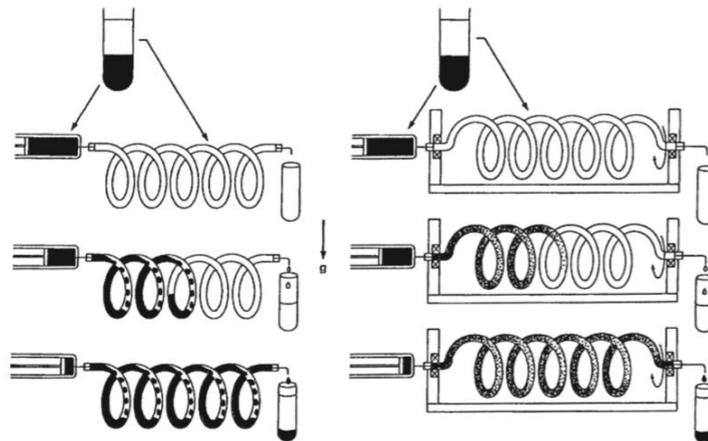


Figura 11. Los dos sistemas básicos de CCC (otro ejemplo): Equilibrio hidrostático (izquierda) y Equilibrio hidrodinámico (derecha) (Ito, 2010, pág. 328).

La fase móvil introducida mediante la cabeza de la bobina es mezclada con la fase estacionaria para establecer el equilibrio hidrodinámico, con un parte de la fase estacionaria, retenida en cada cambio de la bobina. Este proceso continúa hasta que la fase móvil eluye de la cola de la bobina. Después el equilibrio hidrodinámico es establecido mediante la bobina, la fase móvil únicamente desplaza la fase similar mientras deja la fase estacionaria en la bobina. Consecuentemente, los solutos introducidos localmente en la cabeza de la bobina son sometidos a un proceso de separación eficiente entre las dos fases y separadas acorde a su coeficiente de partición.

El sistema hidrodinámico tiene una alta eficiencia de partición en un tiempo de elución corto, pero la retención de la fase estacionaria tiende a favorecer la inestabilidad debido a la mezcla vigorosa.

### 3. Desarrollo de la Cromatografía Contracorriente de Alta Velocidad

El desarrollo de la Cromatografía Contracorriente de Alta Velocidad (HSCCC)<sup>12</sup> se inició con el descubrimiento que al aplicar un movimiento planetario de tipo J a una bobina de extremo cerrado montada de manera coaxial en un soporte (Figura 12 y Figura 33 Anexo 3), las dos fases del disolvente están completamente separadas de tal manera que una fase ocupa el lado de la cabeza y la otra fase el lado de la cola de la bobina (Ito, 2010).

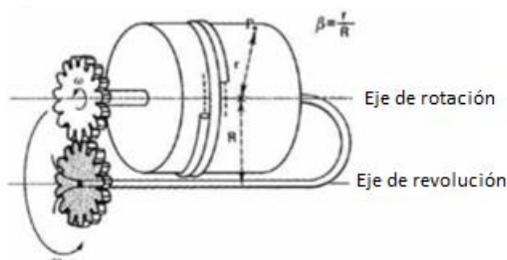


Figura 12. Orientación de la bobina coaxial en el soporte de la centrifuga planetaria de la bobina tipo J (principio y mecanismo de CCC de alta velocidad) (Ito, 2010, pág. 332).

La cromatografía contracorriente ha sido desarrollada y usada para separaciones preparativas y analíticas de sustancias orgánicas y bio-orgánicas. Estudios en años anteriores han demostrado que las técnicas pueden ser aplicadas a separaciones analíticas y radioquímicas, preconcentración y purificación de sustancias inorgánicas en soluciones a escala de laboratorio por el uso de varios sistemas de líquidos en dos fases (Maryutina & Spivakov, 2010, pág. 336). El éxito de la separación en CCC depende de elegir un sistema de solventes de dos fases que proporcione los coeficientes de partición adecuados para los compuestos que se separarán y la retención satisfactoria de la fase estacionaria.

Ito (2010) clasifica algunos sistemas de solventes, como hidrofóbicos (heptano-agua o cloroformo-agua), intermedios (como cloroformo-ácido acético-agua y n-

<sup>12</sup> High-Speed Countercurrent Chromatography, por sus siglas en inglés.

butanol-agua) e hidrofílico (como n-butanol-ácido acético-agua) acorde a la hidrofobicidad de las fases no acuosas.

La división de los solutos entre dos fases de solvente inmiscibles es un método ideal para la separación de los flavonoides porque se evita el fenómeno de la adsorción irreversible, la cola, la pérdida de la muestra y la desnaturalización, que evitan a los analistas que usan otras formas de cromatografía líquida (LC) (Yuan, 2010, pág. 878). Ver Anexo 3, Figura 33.

#### **4. Separación de Flavonoides mediante CCC**

Varios métodos de Cromatografía Contracorriente (CCC) emplean sistemas de solventes de dos fases para la separación de flavonoides. Que son  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (4:x:2, x=puede estar entre 2.5 y 4 para muestras diferentes) puede ser utilizada para su prefraccionamiento. Los solventes en dos fases pueden ser divididos en cuatro tipos:  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{n-BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{EtOAc}:\text{PrOH}:\text{H}_2\text{O}$  ó  $\text{BuOH}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O}$ , y  $\text{n-C}_6\text{H}_{14}:\text{EtOAc}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente (Yuan, 2010).

El fraccionamiento en CCC permite el uso ya sea paso a paso de la elución o por gradiente de elución, y la escala analítica de CCC puede ser utilizada para la separación de flavonoides. El éxito de CCC es tener una buena elección del sistema de solventes (Yuan, 2010).

Las Figuras 34 y 35 en el Anexo 4, muestran cromatogramas que representan tres flavonoides, hesperidina (1), kaempferol (2), y quercetina (3), haciendo uso de varios métodos cromatográficos: a) DCCC; b) RLCC; c) sistema CPC de bobina multicapa; y d) Sistema CPC de cartucho. Utilizando el mismo sistema de solventes: cloroformo-metanol-agua (33:40:27). Las eluciones de los tres picos fueron similares y de acuerdo con el orden de polaridad creciente: hesperetina, kaempferol, quercetina (Figura 35, Anexo 4).

Para el prefraccionamiento de flavonoides por CCC se ha utilizado un sistema versátil de disolventes en dos fases. Los flavonoides abarcan una amplia gama de frecuencias y exhiben una buena solubilidad en metanol. Se puede usar de referencia el Cuadro 1 para encontrar el sistema de disolventes adecuado para separar flavonoides. Los diversos sistemas de disolventes de dos fases se dividen en cuatro tipos. Se ha demostrado que el sistema de disolventes cloroformo-metanol-agua se ha utilizado para la mayor cantidad de aplicaciones, por su gran versatilidad (Yuan, 2010).

**Cuadro 1.** Solventes para las separaciones de flavonoides por CCC.

<b>Muestra</b>	<b>Sistema de solventes</b>
Flavonoides	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O, 4:3:2 CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O, 7:13:8 CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O, 33:40:27 CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O, 5:6:4
Flavonol glicosídico	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O, 7:13:8
Isoflavonol glicosídico	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O, 7:13:8
Flavonoides	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:5%HCl, 5:5:3
Flavonoides glicosídicos	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH: <i>n</i> -BuOH:H <sub>2</sub> O, 10:10:1:6
Flavonol glicosídicos	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH: <i>n</i> -BuOH:H <sub>2</sub> O, 7:6:3:4
Flavonol glicosídicos	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH: <i>i</i> -PrOH:H <sub>2</sub> O, 5:6:1:4
Flavonoides glicosídicos	EtOA:PrOH:H <sub>2</sub> O, 4:2:7
Antocianidinas	EtOA:PrOH:H <sub>2</sub> O, 140:8:80
Flavonoides glicosídicos	EtOA:PrOH:H <sub>2</sub> O, 2:1:2
Flavonoides glicosídicos	BuOH:HOAc:H <sub>2</sub> O, 4:1:5
Antocianidinas glicosídicas	BuOH:HOAc:H <sub>2</sub> O, 4:1:5
Biflavonoides	<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :EtOAc:CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O, 2:8:5:5

Fuente: Yuan, 2010, pág. 879.

#### IV. JUSTIFICACIONES

En Guatemala existen plantas medicinales que podrían aprovecharse mejor económicamente, por medio de la generación de valor agregado a través del aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos, como es el caso de las plantas *T. lucida* y *V. prionophylla*, que se ha demostrado que presentan propiedades medicinales. Por esta razón, es necesario desarrollar metodología para el aislamiento de metabolitos secundarios como los flavonoides, utilizando técnicas modernas que permitan obtener sustancias puras a escala preparativa, lo cual puede lograrse a través de la cromatografía contracorriente (CCC).

Por lo anterior se estudiaron dos plantas medicinales nativas de Guatemala, las cuales son *Valeriana prionophylla* Standl. (valeriana) y *Tagetes lucida* Cav. (pericón), evaluando el potencial de sus extractos etanólicos, mediante una metodología nueva en Guatemala, la cromatografía contracorriente (CCC), con la cual se obtuvieron las fracciones en las que se determinaron los flavonoides.

Se hizo el fraccionamiento de los extractos a manera de aislar e identificar los principales flavonoides para evaluar la factibilidad de su utilización como nutraceuticos. Para lo anterior se implementó una metodología para la separación de flavonoides en extractos de las dos plantas de estudio por medio de cromatografía contracorriente como una herramienta moderna en el aislamiento y separación de metabolitos secundarios. La cromatografía contracorriente es una técnica que puede escalarse a nivel industrial, obteniéndose fracciones de extractos vegetales, que pueden ser utilizados en diversas industrias tales como: alimenticia, cosmética, farmacéutica, en la producción de nutraceuticos, aromas, preservantes y saborizantes, de ahí la importancia de evaluar la producción de extractos a escala preparativa por medio de la técnica en cromatografía contracorriente (CCC).

## V. OBJETIVOS

### A. Objetivo General

Determinar la presencia de flavonoides y otros metabolitos secundarios específicos, la actividad antioxidante y biológica de las fracciones de extractos alcohólicos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala mediante Cromatografía Contracorriente (CCC).

### B. Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones de separación por Cromatografía Contracorriente para la obtención de fracciones de extractos alcohólicos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala.
2. Determinar las diferencias de composición de fracciones de extractos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala, obtenidas mediante Cromatografía Contracorriente.
3. Determinar la actividad antioxidante de los extractos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala, obtenidas por Cromatografía Contracorriente.
4. Determinar la actividad biológica de los extractos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala, obtenidas por Cromatografía Contracorriente.

## VI. HIPÓTESIS

Las fracciones de extractos alcohólicos de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav. y raíces de *Valeriana prionophylla* Standl. de diferentes localidades, obtenidas por cromatografía contracorriente (CCC) presentan diferentes composiciones químicas, y en consecuencia diferentes actividades antioxidantes y biológicas.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo y Muestra

El universo está constituido por las dos plantas medicinales, nativas de Guatemala: *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl., dichas plantas por ser de regiones frías, fueron colectadas en el altiplano occidente de Guatemala.

Las muestras corresponden al material vegetal que se colectaron en las poblaciones de las plantas correspondientes a los departamentos de: San Marcos, El Quiché, Quetzaltenango, Chimaltenango y Sololá. Las plantas fueron colectadas en tres diferentes puntos geográficos del occidente de Guatemala para cada planta, haciendo un total de 6 colectas distintas.

Se colectó 1 kg de material vegetal por colecta. Del pericón se colectaron hojas, tallos y flores; y para la valeriana solo la raíz (rizomas).

### B. Materiales

#### 1. Estándares

- Quercetina (estándar de flavonoide).
- Catequina (estándar de flavonoide).
- Rutina (estándar de flavonoide).
- Naringina (estándar de flavonoide).
- Apigenina (estándar de flavonoide).
- Daidzeína (estándar de flavonoide).
- Naringenina (estándar de flavonoide).
- Genisteína (estándar de flavonoide).
- Kaempferol (estándar de flavonoide).
- Hidroxiflavona (estándar de flavonoide).
- Ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

- 7-hidroxycumarina (umbeliferona), estándar al 1% en metanol, CCF.
- Ácido p-cumárico, estándar al 1% en metanol, CCF.
- Extracto de canela en metanol, CCF (para control).

## **2. Reactivos**

- Alcohol etílico al 70% grado reactivo marca RGH.
- Metanol grado reactivo marca Merck.
- Cloroformo grado reactivo marca Merck.
- Acetato de etilo grado reactivo marca Merck.
- n-hexano grado reactivo marca Merck.
- Acetonitrilo grado HPLC marca Merck.
- Ácido fórmico grado reactivo marca Merck.
- Agua ultrapura o Agua HPLC marca Merck.
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato).
- Tolueno grado reactivo marca Merck.
- Acetato de sodio y ácido acético glacial, ambos marca Merck.
- Reactivo Folin-Ciocalteu.
- Carbonato de sodio marca Merck.
- Agar Müller-Hinton.
- Agar tripticasa soya y Caldo tripticasa soya.

## **3. Cristalería**

- Vasos de precipitados 100 mL, 250 mL, 500 mL.
- Varillas de agitación.
- Embudos de vidrio, acanalados.
- Vidrios de reloj de aprox. 20 cm de radio.
- Probeta Pyrex de 500 mL, 1000 mL.
- Cajas de petrí de vidrio de 20 cm diámetro.

- Cajas de petrí de plástico.
- Cámara de cromatografía Pyrex con tapadera.
- Erlenmeyer (varios).
- Tubos de ensayo PIREX (más de 20 aproximadamente).

#### **4. Equipo de laboratorio**

- Rotavapor marca BÜCHI Switzerland R-210.
- Cromatógrafo Contracorriente (CCC), marca IntroPrep. Con una columna de teflón enrollada en una de las bobinas del rotor anodizado de aluminio. Con capacidad de ~148 mL de muestra y 2.1 mm de grosor.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC), EliteLaChrom, con detector de arreglo de diodos, equipado con columna LiChrospher 60 RP-Select B (5 µm) 10 cm marca Merck.
- Accesorios para enfriamiento de recirculación de agua en el rotavapor: bomba de vacío, agua de chorro, hielo (botellas con agua congelada del refrigerador), mangueras y hielera suficientemente grande.
- Campana de flujo laminar.
- Autoclave.
- Incubadora.
- Refrigeradora.
- Sonicador marca SHARPERTEK.
- Lámpara UV de 254nm.
- Equipo de filtración, Kitasato, bomba de vacío, etc., marca Merck.

## **5. Instrumentos de medición**

- Balanza analítica digital de humedades, marca OHAUS MB35 halogen de 3 decimales.
- Balanza semi-analítica de tres decimales.
- Balanza analítica de cuatro decimales RADWAG WAS220/C/2.
- Cronómetro.

## **6. Material de muestreo**

- Aparato GPS.
- Vehículo Hylux modelo 2006, de doble cabina. Propiedad de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Tijeras especiales para corte en jardinería.
- Costales.
- Cuaderno de notas.
- Cámara digital o celular con potente cámara de 16 MP.
- Lápiz.
- Lapicero.
- Prensa de madera para colocar muestras para herborizar.
- Piocha.
- Lazos cortos.

## **7. Material de laboratorio**

- Viales de 1.5 mL de vidrio ó plástico de color ámbar con tapadera.
- Micropipetas pasteur de vidrio.
- Bulbos para micropipetas pasteur.
- Espátulas.
- Pinzas.

- Capilares sin heparina (para sembrar en CCF).
- Mechero bunsen.
- Fósforos.
- Agua desmineralizada.
- Asas de nicromo en argolla e incinerador eléctrico para asas.
- Recipientes ámbar de vidrio de 1 litro para guardar extractos.
- Placas de sílica gel F<sub>254</sub> TLC, 20x20 cm, Cat. No. 105747, Merck.
- Baño de maría.
- Equipo para revelar (asperjador).

#### 8. Material vegetal

- *Valeriana prionophylla* Standl. (nombre común: valeriana). 3 puntos.
- *Tagetes lucida* Cav. (nombre común: pericón). 3 puntos.

### C. Métodos

#### 1. Estructuras químicas de los compuestos

Para el diseño de las estructuras químicas en este trabajo, se utilizó un programa en línea, llamado ChemDraw (PerkinElmer, 2011).

#### 2. Recolección de los especímenes

Para *Tagetes lucida* Cav. se colectó todo el tallo, las hojas, las flores y frutos, y para la *Valeriana prionophylla* Standl. se colectó solamente la raíz. En el mes de septiembre del 2017 fueron colectadas las muestras de *T. lucida* en San Marcos, Quetzaltenango y Quiché, luego para febrero del 2018 se realizó la primera colecta de *V. prionophylla* en Chimaltenango, en agosto de ese mismo año se colectó la segunda muestra de *V. prionophylla* en San Marcos, y la última colecta de esta especie se realizó en marzo del 2019 en el departamento de Sololá.

Especímenes herborizados de *T. lucida* se depositaron en el herbario BIGU bajo los números de registro BIGU 78468 (Sipacapa, San Marcos), 78469 (Cabricán, Quetzaltenango) y 78470 (Joyabaj, Quiché) (Figura 94, Anexo 8). Igualmente para *V. prionophylla* se depositaron en el herbario BIGU bajo los números de registro BIGU 80766 (Patzún, Chimaltenango), 80769 (San José Ojetenam, San Marcos) y 80770 (Santa Lucía Utatlán, Sololá) (Figura 95, Anexo 8).

### **3. Determinación del porcentaje de humedad**

Se pesaron por triplicado 0.5 g de material vegetal de cada muestra en balanza de humedades a 100°C durante 10 minutos, se tomó nota de la medición final en porcentaje, y se anotó el peso final obtenido. Se hizo este procedimiento tanto para el material fresco, como para el material seco.

### **4. Preparación de la muestra**

- *Tagetes lucida* Cav.

Se separaron las hojas, flores y los tallos suaves del material vegetal y se descartó el resto, luego todo completo se sometió a sequedad en el horno. Se sacudió suavemente el material vegetal para remover residuos de tierra y otras impurezas.

- *Valeriana prionophylla* Standl.

Se examinó el material si no estaba en mal estado, y se limpió de partes podridas y se lavó la suciedad con agua de chorro. Se cortaron posteriormente con tijeras de jardinero. Generalmente por ser raíces trajeron consigo restos de suelo.

## **5. Extracción del material vegetal**

Los extractos fueron preparados en etanol al 70%, con 50 g de cada material colectado seco en 500 mL de solvente, guardados durante 3 días en recipientes ámbar de 1 litro. Se realizaron dos extracciones de 500 mL por cada pesada las cuales fueron unidas posteriormente para obtener 1 litro en total. Luego se evaporó el disolvente en un evaporador rotatorio con recuperación del etanol 70% hasta llegar a la consistencia semisólida en el balón a una temperatura de 45°C y una velocidad de 40-50 RPM. Se activó el vacío eventualmente hasta que se evaporó la mayor parte de solvente. Se vertió el extracto concentrado en una caja Petri de vidrio de 10 cm de diámetro debidamente tarada y rotulado. Una vez evaporado el solvente se trasladó a viales debidamente tarados, rotulados y se calculó el rendimiento del extracto y se guardó a 4°C.

## **6. Análisis de cumarinas mediante cromatografía en capa fina**

A 1 g de material vegetal se le adicionó 10 mL de metanol y se calentó por 30 minutos en baño maría. Se filtró y evaporó hasta 1 mL y 0.1 g de extracto crudo se disolvieron en 5 mL de metanol. Se aplicó 15 µL de cada extracto seco y material vegetal en una cromatoplaaca de sílica gel 60F<sub>254</sub>. Como fase móvil se utilizó tolueno:acetato de etilo (93:7), estándares de: extracto de canela, umbeliferona, ácido p-cumárico y cumarina. Se corrió la placa y se marcó el frente del solvente, resultando de 7.0 cm. (Figura 43).

Detección: Se trató químicamente la placa con una solución de hidróxido de potasio al 5% como revelador, luego se leyó a 365 nm en una cámara especial.

## **7. Análisis de flavonoides mediante cromatografía en capa fina**

Se realizó la identificación de flavonoides por medio de cromatografía en capa fina (CCF) (Figura 52) para tres muestras de material vegetal y extractos de *Tagetes lucida* Cav. y tres muestras de material vegetal y extractos de *Valeriana prionophylla* Standl., empleando las siguientes condiciones:

- Fase móvil: acetato de etilo: ácido acético glacial: ácido fórmico: agua; (100:11:11:27).
- Frente de solvente: 7.1 cm
- Estándares:
  - ✓ Rutina: Rf: 0.41, anaranjado.
  - ✓ Quercetina: Rf: 0.99, anaranjado.
  - ✓ Hiperósido: Rf: 0.66, anaranjado.
  - ✓ Ácido clorogénico: 0.55, verde.

Los resultados se presentan en los Cuadros 10, 11 y 12 evidenciando que todas las muestras presentan flavonoides (Figura 53 en Anexo 6).

## **8. Fraccionamiento de extractos por Cromatografía Contracorriente (CCC)**

El solvente se bombeó desde los reservorios y el eluyente se recolectó en tubos de ensayo de 12 mL de capacidad.

- a) Se preparó inicialmente la fase estacionaria/fase móvil. Como las dos fases son líquidas se hizo la mezcla de 4 solventes: agua HPLC ó ultrapura, metanol HPLC, acetato de etilo HPLC y n-hexano. Cada uno en partes iguales (1:1:1:1) se midieron 200 mL por solvente, y se mezclaron en el orden indicado.
- b) Se mezcló vigorosamente para estabilizar el solvente y observar la división de ambas fases. La fase superior estuvo conformada por

hexano y una parte de acetato de etilo, la fase inferior por agua, metanol y parte de acetato de etilo.

- c) Se procedió a bombear la fase estacionaria, para este caso fue la fase inferior (agua, metanol y parte de acetato de etilo). Esta fase desplazó al metanol que ya estaba en el sistema, 155 mL.
- d) Una vez llena la columna con la fase estacionaria se encendió el cromatógrafo contracorriente y se bombeó la fase móvil (fase superior), con un flujo de 3 mL/min a una velocidad de la columna de 860 RPM.
- e) Luego se inyectó 7 mL de la muestra del extracto vegetal disuelta en metanol al 70% y filtrada por 0.45  $\mu\text{m}$ . Para este sistema (aprox. 250 mL de capacidad), la bomba entregó 3 mL/min y no debe producir pulsos grandes. El cromatógrafo se cargó completamente con la muestra (inyección) (Figura 13).
- f) Las fracciones de extracto con espectros similares, obtenidos del análisis de espectroscopía UV de cada fracción, fueron mezcladas sabiendo que contenían composición química similar (se usó el rango: 200 a 400 nm).



Figura 13. Cromatógrafo contracorriente (CCC) utilizado para el fraccionamiento de extractos alcohólicos crudos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. Fotografía tomada por Belter Trinidad en el laboratorio de Fisicoquímica.



Figura 14. Espectrómetro UV utilizado para comparar los espectros de fracciones obtenidas por CCC. Fotografía tomada por Belter Trinidad en el laboratorio de Fisicoquímica.

**9. Análisis de flavonoides por cromatografía líquida en alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)**

Se prepararon soluciones estándar de los flavonoides: naringenina, naringina, quercetina, arginina, kaempferol, rutina, daidzeína, apigenina, catequina, genisteína, hidroxiflavona y ácido 2,5-dihidroxibenzoico; cada uno fue preparado en acetonitrilo:agua, 1:1, pensando aproximadamente 2 mg de cada estándar en 2 a 3 mL de solvente (acetonitrilo:agua, 1:1), Se hicieron los cálculos para tomar un volumen determinado en  $\mu\text{L}$  de esta solución, para obtener finalmente una concentración de inyección de 0.1 mg/mL para cada estándar, siempre diluyendo con el mismo solvente, acetonitrilo:agua, 1:1.

Luego se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de las muestras y soluciones de estándares en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución utilizando las siguientes condiciones: Columna de 10 cm, LiChrospher® 60 RP-Select B, 5 $\mu\text{m}$ , marca Merck. Detección: arreglo de diodos (DAD); caudal: 1 mL/min; temperatura: 30 °C; Volumen de inyección: 10 $\mu\text{L}$ ; fase móvil: ácido fórmico al 0.1% en agua (A); acetonitrilo (B); longitudes de onda programadas en DAD: 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm (Figura 15). El gradiente se puede ver en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Gradiente de las corridas cromatográficas HPLC-DAD.

t (minutos)	*A (%)	*B (%)
0	98	2
3	87	13
8	87	13
11	80	20
15	80	20
18	55	45
24	20	80
25	0	100
28	0	100
29	98	2
35	98	2

Fuente: Datos experimentales. \*A: ácido fórmico en agua al 0.1%; B: Acetonitrilo HPLC.



Figura 15. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (DAD) utilizado para la identificación de flavonoides en extractos alcohólicos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Toxicología (CIAT).

Para encontrar la concentración de los flavonoides se utilizó la ecuación:

%p/p Flavonoide obtenido =  $\left[ \frac{((\text{Abs. Muestra} / \text{Abs. Estándar}) * \text{Concentración estándar} * \text{volumen inyectado en CCC}) / 1000}{(\text{Vol. Extracto preparado} / \text{Vol. Inyectado CCC})} \right] / \text{Peso del extracto seco} * (\text{Extracto seco en g} / 50 \text{ g muestra vegetal}) * 100 = \text{g} / 100\text{g}.$

#### **10. Determinación de actividad antioxidante por técnica micrométrica de DPPH (1,1-Diphenil-2-picrilhidrazilo) (Marroquín, 2011)**

Esta técnica utilizó el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH, este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Para la solución madre se pesaron 20 mg de extracto seco y se agregó 1 ml de metanol. Se prepararon una serie de diluciones de 1 mL. Se tomaron 20 µL de cada una de las diluciones y se les agregó 200 µL de DPPH (2.2 mg/25 mL = 0.88% p/v en metanol, color púrpura en solución) en una microplaca de 96 pozos, luego se incubó a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos y se leyó por triplicado en lector de microplacas de 96 pozos a una longitud de onda de 490 nm. Para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los pozos de reacción se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ Inhibición}$$

Absorbancia del control = Absorbancia del Control – Absorbancia del Blanco Control

Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo – Absorbancia del Blanco respectivo

Luego con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de cada dilución se elaboró una gráfica lineal. Con una buena ecuación de regresión lineal se determinó la concentración inhibitoria media, según la siguiente fórmula:

$$\text{IC50: } \frac{50 \% - \text{pendiente}}{\text{Intercepto}}$$

### **11. Cuantificación de fenoles totales por técnica micrométrica (Marroquín, 2011)**

La cuantificación se basa en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para la prueba se tomó la dilución que tuvo un porcentaje de inhibición entre el 60% en la prueba de DPPH. Para el análisis se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra y se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu y 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Luego se incubó a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 2 horas. Finalmente se leyó por triplicado en lector de microplacas de 96 pozos a una longitud de onda de 630 nm.

Cálculo de fenoles totales:

$$\begin{aligned} \text{Concentración base curva (CBC)} &= \text{Abs} - \text{Intercepto/pendiente.} \\ \mu\text{g equivalentes Ác. Gálico/g de extracto} &= \\ &= \frac{[(\text{CBC}/0.025) * (\text{Peso alícuota}/\text{Vol. Reconstitución}) * 1000]}{\text{Dilución}} \end{aligned}$$

### **12. Análisis de actividad antimicrobiológica**

Se evaluó la actividad biológica de los extractos, previo a su fraccionamiento y de las principales fracciones que se obtuvieron a partir de su separación por cromatografía contracorriente (CCC). La actividad biológica se evaluó frente a los microorganismos purificados: *Candida albicans* (levadura) ATCC™ 10231, *Escherichia coli* ATCC™ 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC™ 14028, *Bacillus subtilis* ATCC™ 6633 y

*Staphylococcus aureus* ATCC™ 25923. Estos microorganismos fueron purificados en cajas de agar Trypticase Soja (16 g/400 mL agua desmineralizada), luego que se comprobó su pureza incubándolos.

Tamizaje de la actividad antimicrobiológica *in vitro*:

- a) Se pesaron 50 mg de cada uno de los seis extractos secos.
- b) Se disolvieron con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), agitándose en vortex hasta completa disolución.
- c) Se hicieron los cálculos respectivos para obtener una concentración final de extracto de 10 mg/mL (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Diluciones y concentraciones de los extractos crudos de las muestras de *T. lucida* y *V. prionophylla*, para la preparación del Agar-Planta.

Extracto	Peso (mg)	Volumen medido (µL)	Dilución EtOH 50% (µL)	Total Extracto diluido (µL)	Concentración final de extracto (mg/mL)	Concentración Agar-Planta (mg/mL)
EP1	51.4	973	4027	5000	10	1
EP2	55.6	899	4101	5000	10	1
EP3	61.1	818	4182	5000	10	1
EV1	61.0	820	4180	5000	10	1
EV2	59.7	838	4162	5000	10	1
EV3	60.7	824	4176	5000	10	1

Fuente: Datos experimentales. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj; EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana Santa Lucía Utatlán.

- d) Se diluyó cada extracto con Etanol al 50%, y obtener un volumen final de 5 mL (obteniendo: 10 mg/mL).
- e) Se preparó el agar Mueller Hilton, 4.94 g en 130 mL de agua desmineralizada, se calentó hasta disolución completa y se llenaron los tubos de ensayo, tomando dos tubos por extracto y dos controles (14

tubos en total), llenándolos con 9 mL de agar caliente preparado (este se solidificó).

- f) Se preparó caldo tripticasa soja con 1.5 g de este en 50 mL de agua desmineralizada al tiempo, se disolvió y se agregó 5 mL a cada uno de 10 tubos, igualmente se preparó una solución salina 0.85%, en agua desmineralizada, se tomaron 5 mL y se agregaron a cada uno de 10 tubos (se quitaron 50  $\mu$ L de cada tubo de la solución salina antes de autoclavar para obtener 4.95 mL finales).
- g) Después de autoclavar las preparaciones anteriores, se prepararon los agares-planta, tomando 1 mL por extracto y control, se les agregaron 9 mL de agar Mueller Hilton (se hizo por duplicado). Se agitó homogéneamente.
- h) Se incubó por 24 h y luego fueron refrigerados los agares-planta para su uso posterior.
- i) Se tomó una asada de cada una de las bacterias purificadas y se inoculó en 5 mL de caldo tripticasa soya, se incubó por 24h a 36°C, se tomó 50  $\mu$ L de este caldo y se agregó en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% para una concentración de 1 mg/mL.
- j) Se tomó con un asa en argolla una porción de cada uno de los microorganismos y se inoculó en las cajas con extracto crudo, se siguió el patrón de 10 partes iguales con una zona clara en el centro de la caja, se dejó reposar durante 5 - 10 min. y se incubó a 36°C por 24 h. Se inocularon cuatro estrías del mismo microorganismo por extracto, y se prepararon dos cajas por cada extracto crudo (agar-planta). Se utilizó etanol al 50% como control negativo.
- k) Se hicieron las revisiones adecuadas para observar el crecimiento de microorganismos, y en las que no hubo crecimiento se hizo un análisis de concentración inhibitoria mínima (CIM).

- l) Para la determinación de la CIM se utilizó el mismo procedimiento con diluciones de extracto 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL y se hizo por triplicado; la interpretación de los resultados fue la misma que se aplicó en el procedimiento de tamizaje.

### VIII. AVAL DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

En cumplimiento al INSTRUCTIVO PARA EVALUACIÓN TERMINAL DE LOS ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA EN SU MODALIDAD DE “PROYECTO DE INVESTIGACIÓN”.

Se extiende el siguiente aval a BELTER ISAÍ TRINIDAD REYES, para la publicación de los resultados obtenidos en la investigación denominada “Separación e identificación de flavonoides a partir de extractos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. de varias localidades del occidente de Guatemala mediante Cromatografía Contracorriente (CCC)”, los cuales constituyen resultados parciales del proyecto de investigación Macro denominado FINDECYT/FODECYT 15-2017, “Producción de Extractos Fraccionados de Alto Valor Agregado de seis plantas medicinales nativas de Guatemala por Extracción con Fluidos Supercríticos y Cromatografía Contracorriente”.



Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Investigador Principal

## IX. RESULTADOS

Se detalla la información de la colecta de las partes aéreas del individuo *T. lucida* y raíz de *V. prionophylla* de localidades diferentes del occidente de Guatemala (Cuadro 4). Todos los individuos se encontraron en estado silvestre en potreros de comunidades rurales o a orillas de carreteras en sitios abiertos y soleados. La mayoría de las muestras fueron colectadas en localidades con alturas superiores a los 2,000 msnm.

**Cuadro 4.** Puntos de colecta de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl.

Colecta No.	Espécimen (No. Herbario BIGU)*	Lugar de colecta	Fecha	Coordenadas	Altura (msnm)
1	EP1 (78468)	Aldea Poj, Sipacapa, San Marcos.	09/09/2017	N 15°12'15.4" W 091°40'17.7"	2,211
2	EP2 (78469)	Caceríos Ranchería y Ranchería Chiquita, Cabricán, Quetzaltenango.	10/09/2017	N 15°04'58.7" W 091°38'36.6"	2,626
3	EP3 (78470)	Aldea Estanzuela, Joyabaj, Quiché.	10/09/2017	N 14°59'10.0" W 090°51'39.7"	1,531
4	EV1 (80769)	Aldea Chuchucá Alto, Patzún, Chimaltenango	01/02/2018	N 14°39'04.9" W 091°02'48.4"	2,476
5	EV2 (80766)	San José Ojetenam San Marcos.	20/08/2018	N 15°13'06.0" W 091°57'35.2"	3,352
6	EV3 (80770)	Aldea Ciénaga Grande, Santa Lucía Utatlán, Sololá.	21/03/2019	N 14°47'13.5" W 091°15'20.6"	2,347

Fuente: Datos experimentales. \*Herbario BIGU. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj; EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana de Santa Lucía Utatlán.

En el Cuadro 5 se detallan los valores de humedad para el material seco y fresco; para las tres muestras de *T. lucida* se observaron valores superiores a 70%, igualmente para el porcentaje de humedad del material seco, superando el 8%.

**Cuadro 5.** Porcentaje de humedad de las colectas de *T. lucida* (pericón) y *V. prionophylla* (valeriana).

Colecta No.	Espécimen	Humedad del material fresco (%)	Humedad del material seco (%)
1	EP1	71.17 ± 1.02	9.48 ± 0.08
2	EP2	71.19 ± 1.09	8.66 ± 0.04
3	EP3	73.24 ± 0.99	8.63 ± 0.06
4	EV1	53.52 ± 2.39	7.84 ± 0.01
5	EV2	60.70 ± 1.48	7.06 ± 0.04
6	EV3	63.43 ± 3.30	7.23 ± 0.03
Condiciones: a 100 °C por 10 minutos en balanza de humedades OHAUS MB35 Halogen de 3 decimales.			

Fuente: Datos experimentales. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj; EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana Santa Lucía Utatlán.

En el Cuadro 6 se presentan los porcentajes de rendimiento de extracción, donde se observa que el porcentaje de rendimiento de extracción fue superior para las tres muestras de *V. prionophylla*, superando el 30%, excepto para la muestra procedente de San José Ojetenam, San Marcos. Mientras tanto las muestras de *T. lucida* presentaron rendimientos de extracción entre el 22% al 24% de rendimiento.

**Cuadro 6.** Rendimiento de los extractos etanólicos de *Tagetes lucida* Cav. (pericón) y *Valeriana prionophylla* Standl. (valeriana).

Nombre científico/Nombre común/ Familia	Órgano vegetal utilizado	Peso seco utilizado (g)	Peso extracto seco obtenido (g)	Rendimiento de extracción (%)
EP1	Partes aéreas	50.0	12.0	24.0
EP2	Partes aéreas	50.0	9.9	22.8
EP3	Partes aéreas	50.0	12.1	24.2
EV1	Raíz	50.0	18.2	36.4
EV2	Raíz	50.0	12.5	24.9
EV3	Raíz	50.0	19.7	39.3

Fuente: Datos experimentales. (%) rendimiento de extracción = (Cantidad de extracto obtenido/peso de la planta en seco)x100. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj; EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana de Santa Lucía Utatlán.

En los Cuadros 7 (estándares de referencia de cumarinas), 8 y 9, se presentan los Rf de las cumarinas identificadas mediante cromatografía en capa fina, en el material vegetal y del extracto seco de *T. lucida* y *V. prionophylla*, para las muestras de *T. lucida* se encontró cumarina base (Rf = 0.43) y muchas otras no identificadas. Para la *V. prionophylla* no se encontraron muchas cumarinas, aunque algo parecida con los datos del extracto de referencia de canela, presentado en el Cuadro 7.

En los Cuadros 10 (estándares de referencia de flavonoides), 11 y 12, se presentan los Rf de los flavonoides identificados mediante cromatografía en capa fina, en el material vegetal y del extracto seco de *T. lucida* y *V. prionophylla*.

**Cuadro 7.** Estándares de cumarinas corridos en cromatografía capa fina.

Estándar	Banda	Rf	Color
Extracto de canela (Extracto de referencia)	1	0.34	Verde
	2	0.43	Verde
	3	0.54	Verde
Umbeliferona ó 7-hidroxicumarina	1	0.07	Azul
Ácido p-cumárico	1	0.07	Azul
Cumarina	1	0.43	Verde

Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 8.** Análisis de cumarinas de extractos crudos y material vegetal de *V. prionophylla* mediante cromatografía en capa fina.

Especimen	Banda	Material Vegetal			Extracto crudo		
		Cm	Color	Rf	Cm	Color	Rf
EV1	1	2.3	Azul	0.33	2.3	Verde	0.33
	2	-	-	-	2.8	Verde	0.40
	3	-	-	-	4.6	Azul	0.66
EV2	1	No presentó bandas			2.3	Verde	0.33
	2				2.9	Verde	0.41
	3				4.1	Azul	0.59
	4				4.6	Azul	0.66
EV3	1	No presentó bandas			2.4	Verde	0.34
	2				4.7	Azul	0.67

Fuente: Datos experimentales. \*EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana de Santa Lucía Utatlán.

**Cuadro 9.** Análisis de cumarinas de extracto crudo y material vegetal de *T. lucida* mediante cromatografía en capa fina.

Espécimen	Banda	Material Vegetal			Extracto crudo		
		Cm	Color	Rf	Cm	Color	Rf
EP1	1	0.5	Azul	0.07	0.5	Azul	0.07
	2	1.0	Verde	0.14	-	-	-
	3	2.4	Azul	0.34	2.4	Azul	0.34
	4	3.0	Azul	0.43	2.9	Azul	0.41
	5	3.3	Verde	0.47	3.3	Verde	0.47
	6	4.0	Verde	0.57	3.9	Verde	0.56
	7	4.5	Azul	0.64	4.4	Azul	0.63
	8	6.7	Azul	0.96	6.5	Azul	0.93
EP2	1	0.5	Azul	0.07	0.5	Azul	0.07
	2	-	-	-	0.8	Azul	0.11
	3	2.4	Azul	0.34	2.4	Azul	0.34
	4	3.0	Azul	0.43	3.0	Azul	0.43
	5	3.3	Verde	0.47	3.3	Verde	0.47
	6	4.1	Verde	0.59	4.0	Verde	0.57
	7	4.5	Azul	0.64	4.5	Azul	0.64
	8	6.7	Azul	0.96	6.8	Azul	0.97
EP3	1	0.5	Azul	0.07	0.5	Azul	0.07
	2	0.8	Azul	0.11	0.8	Azul	0.11
	3	1.0	Verde	0.14	1.0	Verde	0.14
	4	1.3	Verde	0.19	1.4	Verde	0.20
	5	1.9	Azul	0.27	1.9	Azul	0.27
	6	2.4	Azul	0.34	2.4	Azul	0.34
	7	3.0	Azul	0.43	3.0	Azul	0.43
	8	3.3	Verde	0.47	3.4	Verde	0.49
	9	4.1	Verde	0.59	4.1	Verde	0.59
	10	4.5	Azul	0.64	4.6	Azul	0.66
	11	6.7	Azul	0.97	6.7	Azul	0.96

Fuente: Datos experimentales. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj.

**Cuadro 10.** Estándares de flavonoides corridos en cromatografía capa fina.

Estándar	Banda	Rf	Color
Rutina	1	0.41	Anaranjado
Quercetina	1	0.99	Anaranjado
Hiperósido	1	0.07	Anaranjado
Ácido clorogénico	1	0.55	Verde

Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 11.** Determinación de flavonoides de extracto crudo y material vegetal de *V. prionophylla* mediante cromatografía en capa fina.

Especimen	Banda	Material Vegetal			Extracto crudo		
		Cm	Color	Rf	Cm	Color	Rf
EV1	1	0.3	Azul	0.04	0.4	Anaranjado	0.06
	2	-	-	-	2.1	Azul	0.29
	3	3.3	Verde	0.46	3.5	Verde	0.49
	4	-	-	-	4.9	Azul	0.69
	5	5.4	Verde	0.76	5.5	Verde	0.77
	6	6.3	Verde	0.89	6.3	Verde	0.89
	7	-	-	-	6.7	Verde	0.94
EV2	1	0.3	Azul	0.04	0.5	Anaranjado	0.07
	2	-	-	-	2.1	Azul	0.3
	3	3.5	Verde	0.49	3.4	Verde	0.48
	4	-	-	-	4.9	Azul	0.69
	5	5.5	Verde	0.77	5.5	Verde	0.77
	6	6.5	Azul	0.91	6.7	Amarillo	0.94
EV3	1	0.3	Azul	0.04	0.4	Anaranjado	0.06
	2	-	-	-	2.3	Azul	0.32
	3	3.3	Verde	0.46	3.5	Verde	0.49
	4	5.3	Verde	0.75	5.6	Verde	0.79
	5	6.5	Verde	0.91	6.6	Verde	0.93

Fuente: Datos experimentales. \*EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana de Santa Lucía Utatlán.

**Cuadro 12.** Determinación de flavonoides de extractos crudos y material vegetal de *T. lucida* mediante cromatografía en capa fina.

Especimen	Banda	Material Vegetal			Extracto crudo		
		Cm	Color	Rf	Cm	Color	Rf
EP1	1	2.6	Anaranjado	0.37	2.6	Anaranjado	0.37
	2	3.6	Verde	0.51	3.6	Verde	0.51
	3	4.4	Anaranjado	0.62	4.2	Anaranjado	0.59
	4	5.3	Verde	0.75	5.2	Verde	0.73
	5	6.4	Verde	0.90	6.3	Verde	0.89
	6	6.8	Azul	0.96	6.6	Azul	0.93
EP2	1	2.3	Anaranjado	0.32	2.5	Anaranjado	0.35
	2	3.5	Verde	0.49	3.7	Verde	0.52
	3	4.2	Anaranjado	0.59	4.4	Anaranjado	0.62
	4	5.2	Verde	0.73	5.2	Verde	0.73
	5	6.2	Verde	0.87	6.3	Verde	0.89
	6	6.6	Azul	0.93	6.6	Azul	0.93
EP3	1	2.2	Anaranjado	0.31	2.5	Anaranjado	0.35
	2	3.2	Verde	0.45	3.4	Verde	0.51
	3	4.2	Anaranjado	0.59	4.4	Anaranjado	0.62
	4	5.2	Verde	0.73	5.2	Verde	0.73
	5	6.2	Verde	0.87	6.3	Verde	0.89
	6	6.6	Azul	0.93	6.7	Azul	0.94

Fuente: Datos experimentales. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj.

En el Cuadro 13 se presentan las preparaciones de los extractos alcohólicos y en los Cuadros 14 (estándares de referencia), 15 y 16, se presentan los tiempos de retención y las concentraciones de los flavonoides de las fracciones de extracto extraídas de las partes aéreas de individuos de *T. lucida* y *V. prionophylla* de diferentes localidades del occidente de Guatemala. La naringenina fue encontrada en las tres muestras de *T. lucida*, siendo la muestra de Sipacapa, San Marcos, la que presentó la mayor concentración (0.32 g/100g) y también el flavonoide más

abundante. Y para la *V. prionophylla* el más abundante fue kaempferol, con una concentración de 0.40 g/100g.

**Cuadro 13.** Preparación de los extractos crudos alcohólicos secos de las muestras vegetales para la obtención de extractos fraccionados mediante cromatografía contracorriente (CCC), para ser evaluadas posteriormente en HPLC-DAD a 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm.

Muestra No.	Nombre de la muestra vegetal del extracto crudo alcohólico inyectado en cromatografía contracorriente	Peso extracto seco (g)	Volumen (mL)	Solvente	Peso en la muestra inyectada en CCC (g)	*Cantidad de fracciones de extracto obtenidas mediante CCC
1	EP1	2.0522	30	Metanol 70%	0.4788	8 (12 mL c/u)
2	EP2	2.0376	20	Metanol 70%	0.7132	8 (12 mL c/u)
3	EP3	2.1519	20	Metanol 70%	0.7532	10 (12 mL c/u)
1	EV1	2.0879	20	Metanol 70%	0.7308	5 (12 mL c/u)
2	EV2	2.0061	20	Metanol 70%	0.7021	5 (12 mL c/u)
3	EV3	2.0101	20	Metanol 70%	0.7035	5 (12 mL c/u)

Fuente: Datos experimentales. \*Se inyectaron 7 mL de extracto alcohólico filtrado al CCC. HPLC-DAD: Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj; EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana de Santa Lucía Utatlán.

**Cuadro 14.** Tiempos de retención de estándares<sup>13</sup> de flavonoides analizados por HPLC-DAD.

Nombre del estándar	Tiempo de retención (TR)	Concentración (mg/mL)	Volumen de inyección	Cromatograma (Anexo 6)
Catequina	8.47	0.10	10 µL	Figura 48
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	9.24	0.10	10 µL	Figura 46
Rutina	15.26	0.09	10 µL	Figura 55
Naringina	17.38	0.10	10 µL	Figura 53
Apigenina	18.89	0.15	10 µL	Figura 47
Quercetina	18.91	0.10	10 µL	Figura 54
Daidzeína	20.48	0.10	10 µL	Figura 49
Naringenina	21.54	0.10	10 µL	Figura 45
Genisteína	21.71	0.10	10 µL	Figura 50
Kaempferol	21.86	0.98	10 µL	Figura 52
Hidroxiflavona	22.62	0.10	10 µL	Figura 51

Fuente: Datos experimentales. T<sub>R</sub>: Tiempo de retención. HPLC-DAD: Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos.

**Cuadro 15.** Flavonoides identificados en las fracciones de extracto de las muestras de *Tagetes lucida* Cav. (en base seca), obtenidas en cromatografía contracorriente y analizadas por HPLC-DAD.

Compuesto	T <sub>R</sub>	EP1 (% g/100g)	EP2 (% g/100g)	EP3 (% g/100g)
Catequina	8.78	0.03	0.06	ND
Naringina	18.01	ND	0.05	0.20
Apigenina	18.96	ND	0.005	0.02
Quercetina	19.25	ND	ND	0.006
Naringenina	21.31	0.32	0.15	0.04
Genisteína	21.74	ND	ND	0.0008
Kaempferol	21.82	ND	ND	0.10
Hidroxiflavona	22.76	ND	0.05	ND

Fuente: Datos experimentales. ND = No Detectado. HPLC-DAD: Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj.

<sup>13</sup> Los estándares fueron preparados disolviéndolos en acetonitrilo:agua 1:1, ambos solventes grado HPLC, se hizo una sonicación para cada uno y disolverse de forma eficiente.

**Cuadro 16.** Flavonoides identificados en las fracciones de extracto de las muestras de *Valeriana prionophylla* Standl. (en base seca), obtenidas en cromatografía contracorriente y analizadas por HPLC-DAD.

Compuesto	T <sub>R</sub>	EV1 (% g/100g)	EV2 (% g/100g)	EV3 (% g/100g)
Apigenina	18.66	0.003	ND	ND
Naringenina	21.74	0.007	ND	ND
Kaempferol	22.11	ND	0.40	0.03

Fuente: Datos experimentales. ND = No Detectado. HPLC-DAD: Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos. \*EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana de Santa Lucía Utatlán.

Los valores de actividad antioxidante y fenoles totales para las muestras de *T. lucida* y *V. prionophylla*, procedentes de diferentes localidades del occidente de Guatemala se presentan en el Cuadro 17. Se encontró una mayor cantidad de fenoles totales para las muestras de *T. lucida*, siendo mayor para la procedente de Cabricán, Quetzaltenango ( $394.05 \pm 13.09 \mu\text{g EAG/g}$ ) (Cuadro 17, Figura 96). Las muestras de *T. lucida* presentaron mayor actividad antioxidante que las de *V. prionophylla* con  $0.37 \pm 0.02 \text{ mg/mL}$  para la muestra de *T. lucida* procedente de Joyabaj, Quiché (Cuadro 17, Figura 97).

**Cuadro 17.** Actividad antioxidante y fenoles totales de tres extractos etanólicos de *Tagetes lucida* Cav. y tres de *Valeriana prionophylla* Standl. de diferente procedencia.

Planta	Espécimen	DPPH CI50 (mg/mL) hecho por triplicado (promedio)	Fenoles totales µg EAG/g de extracto hecho por triplicado (promedio)
Tagetes lucida Cav.	EP1	0.44 ± 0.00	240.24 ± 7.44
	EP2	0.40 ± 0.01	394.05 ± 13.09
	EP3	0.37 ± 0.02	248.39 ± 7.74
Valeriana prionophylla Standl.	EV1	6.28 ± 0.11	10.60 ± 0.30
	EV2	8.05 ± 0.06	7.54 ± 0.21
	EV3	11.72 ± 0.04	4.95 ± 0.14
Quercetina	Estándar	0.075 ± 0.0004	---
Trolox	Estándar	0.115 ± 0.0008	---
TBHQ	Estándar	0.115 ± 0.0007	---
Vitamina C	Estándar	0.088 ± 0.0105	---

Fuente: Datos experimentales. DPPH = 1,1-difenil-2picrihidrazilo; ABTS = 2,2'-azinobis-(ácido-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico); FT = Fenoles Totales; FRAP = Reducción de hierro, CI50 = Concentración inhibitoria media, EAG = Equivalentes de ácido gálico. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj; EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana Santa Lucía Uatlán. Ver el Anexo 9, Figuras 96 y 97, ahí se encuentran los gráficos comparativos tanto para el análisis antioxidante como para el análisis de fenoles totales, lo cual se esquematiza de una manera más sencilla y visual.

En el Cuadro 18 se observan los microorganismos utilizados para este estudio y en los Cuadros 19 y 20 se presentan los resultados del tamizaje de actividad antibacteriana y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), respectivamente, de las muestras de *T. lucida* y *V. prionophylla*, procedentes del occidente de Guatemala. Los extractos de las tres muestras de *T. lucida* tienen mayor actividad biológica contra los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (CIM>0.25 mg/mL), al contrario que las tres muestras de *V. prionophylla*,

únicamente hubo actividad biológica contra *Candida albicans* (CIM>0.50 mg/mL), de la muestra procedente de Patzún, Chimaltenango.

**Cuadro 18.** Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl.

Microorganismo	Cepa ATCC™	Tipo de Microorganismo
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	Bacillo Gram positivo
<i>Salmonella tiphymurium</i>	14028	Bacillo Gram negativo
<i>Escherichia coli</i>	8739	Bacillo Gram negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Coco Gram positivo
<i>Candida albicans</i>	10231	Levadura

Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 19.** Tamizaje de la actividad antimicrobiana contra microorganismos de los extractos etanólicos en estudio a una concentración 1 mg/mL.

Microorganismo	Extractos de cada una de las colectas						
	Etanol 50% (control negativo)	EP1	EP2	EP3	EV1	EV2	EV3
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Salmonella tiphymurium</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	-	-

Fuente: Datos experimentales. Donde: (-): actividad negativa del extracto; (+): actividad positiva del extracto. A una concentración de 1mg/mL. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj; EV1: Extracto de valeriana de Patzún; EV2: Extracto de valeriana de San José Ojetenam; y EV3: Extracto de Valeriana de Santa Lucía Utatlán.

**Cuadro 20.** Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la actividad antimicrobiana contra microorganismos de los extractos etanólicos en estudio con actividad positiva a una concentración 1 mg/mL.

Microorganismo	Extractos de cada una de las colectas				
	Etanol 50 % (control negativo)	*EP1	*EP2	*EP3	*EV1
<i>Bacillus subtilis</i>	-	>1	>1	0.25	>1
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	0.25	0.25	0.25	>1
<i>Candida albicans</i>	-	1	1	0.5	1

Fuente: Datos experimentales. \*EP1: Extracto de pericón de Sipacapa; EP2: Extracto de pericón de Cabricán; EP3: Extracto de pericón de Joyabaj; EV1: Extracto de valeriana de Patzún.

## X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### A. Colectas de las muestras de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl.

La colecta de las dos especies vegetales, *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl., colectadas en varios departamentos del occidente de Guatemala (Cuadro 4) se realizaron en lugares muy fríos, especialmente la *V. prionophylla*, de la colecta realizada en San José Ojetenam, San Marcos ubicada a 3,352 msnm, cercana al volcán Tajumulco. Estas especies son abundantes en el altiplano del país, por sus climas fríos y lluviosos, como se observa en los mapas de la Figura 3 y Figura 5, cada número indica la ubicación aproximada donde fue colectado el material vegetal de las plantas de estudio. En época de lluvia la floración de estas dos especies fue abundante, en el caso de *V. prionophylla* los tallos son largos y con una gran abundancia de flores (Figura 34).

En el Cuadro 4 se observan las fechas en que se realizaron todas las colectas; la floración de la *V. prionophylla* fue favorecida en época de lluvia a diferencia que en época seca, que no presentó floración (Figura 33 y Figura 36 en el Anexo 3) es decir, en los meses de febrero y marzo. Aunque para *T. lucida* la floración, aunque escasa, se mantuvo presente en los últimos meses del año (Figuras 30, 31 y 32 en Anexo 3) en la colecta hecha en Joyabaj, Quiché, la planta presentaba una floración abundante, incluso llovió ese día de colecta, 09 de septiembre 2017.

Especímenes herborizados de *T. lucida* y *V. prionophylla* se depositaron para su registro en el herbario BIGU de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (Cuadro 3 y Figura 35), como se puede observar en las Figuras 37 a la 42 del Anexo 4 (en orden de colectas realizadas) y en los certificados extendidos por el herbario BIGU correspondientes (Figuras 94 y 95, Anexo 8).

### **B. Porcentajes de humedad.**

En el Cuadro 5 se presenta el porcentaje de humedad del material fresco y seco para cada uno de los especímenes recolectados, encontrándose valores superiores a 70% de humedad para *T. lucida* y en el caso de la *V. prionophylla* se obtuvo una humedad relativamente baja, superando apenas el 50%, en especial para la muestra procedente de Patzún, Chimaltenango. Y en el caso de la humedad del material seco no superó el 10% para ninguna de las colectas, sabiendo esto se prepararon los extractos alcohólicos, ya que según lo recomendado por la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) el material seco no debe superar el 12.0 % (Secretaría Nacional de México, 2013, pág. 265).

### **C. Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos.**

La obtención de los extractos etanólicos de las dos plantas de estudio colectadas en tres localidades de muestreo cada una, se realizó por medio del método de maceración en frío y concentración en rotavapor, obteniéndose un buen rendimiento para cada una como se observa en el Cuadro 6. Para *T. lucida* se obtuvo un menor rendimiento de extracto en la muestra procedente de Cabricán, Quetzaltenango (22.8%), que para las muestras procedentes de Sipacapa, San Marcos (24.0%) y Joyabaj, Quiché (24.2%). Y para las muestras de *V. prionophylla*, el porcentaje de rendimiento de extracto fue mayor para la muestra procedente de Santa Lucía Utatlán, Sololá (39.3%) que para las muestras procedentes de Patzún, Chimaltenango (36.4%) y San José Ojetenam, San Marcos (24.9%).

Es importante destacar que, al momento de la colecta, la muestra de *Tagetes lucida* Cav. de Sipacapa, San Marcos presentaba una floración escasa (Figura 30, Anexo 3), al igual que la muestra procedente de Cabricán, Quetzaltenango (Figura 31, Anexo 3), no así la de Joyabaj, Quiché (Figura 32, Anexo 3) con una floración

abundante; esta última colecta se realizó bajo una intensa precipitación pluvial (fecha: 10 septiembre 2017). En el caso de la *Valeriana prionophylla* Standl. la muestra colectada en San José Ojetenam, presentó abundancia de flores y tallos (Figura 33, Anexo 3), no así las otras dos muestras colectadas en Patzún, Chimaltenango y Santa Lucía Utatlán, Sololá, que no presentaron floración (Figuras 33 y 36, Anexo 3).

#### **D. Análisis de cumarinas por cromatografía en capa fina.**

Las cumarinas se analizaron por cromatografía en capa fina en todas las muestras de las dos especies de estudio, tanto en el extracto crudo como en el material vegetal, encontrándose en todos los extractos presencia de cumarinas, no siendo así para el material vegetal seco (Cuadros 7, 8 y 9). En el Cuadro 7 se muestran los estándares que se corrieron en conjunto con las muestras, los cuales fueron de compuestos puros y un estándar vegetal de canela para tener una mejor comparación frente a las muestras *T. lucida* y *V. prionophylla*. Como se puede observar en el Cuadro 7, el estándar de canela desplegó tres bandas con Rf diferentes y de color verde; una de ellas (Rf=0.43) correspondió al estándar de cumarina base, y las otras dos a derivados de cumarina.

Para las muestras de *V. prionophylla*, se observaron cumarinas similares a las del estándar de canela y al estándar de cumarina base (Cuadro 8), también se resalta que las muestras como material vegetal no presentaron cumarinas, a excepción de la muestra procedente de Patzún, Chimaltenango. La única banda observada corresponde a una que se observó con el mismo valor de Rf que para el estándar de canela (Rf=0.33) que corresponde a un derivado de cumarina no identificado.

Para las muestras de *T. lucida* se encontró umbeliferona y cumarina base en todas las colectas, extracto y material vegetal (Cuadro 9), pero en este caso para esta última se observó de color azul, ya que se observó verde para su estándar respectivo, según el Cuadro 7. *T. lucida* presenta más de 7 cumarinas, entre ellas

7,8-dihidroxicumarina, umbeliferona (7-hidroxicumarina), escoparona (6,7-dimetoxicumarina), esculetina (6,7-dihidroxicumarina), 6-hidroxi-7-metoxicumarina, herniarina (7-metoxicumarina) y escopoletina (6-metoxi-7-hidroxicumarina) (Céspedes et al., 2006) (Figura 43, Anexo 5). Hasta el momento no se encuentran tablas de Rf para cumarinas con las mismas condiciones trabajadas en este estudio, en especial para la misma fase móvil trabajada (tolueno:acetato de etilo, 93:7), por lo cual no se cuenta con una base para comparar e identificar a qué cumarinas corresponden los otros valores de Rf.

#### **E. Análisis de flavonoides por cromatografía en capa fina.**

Los Cuadros 10, 11 y 12, presentan los resultados del análisis de flavonoides efectuados para todas las muestras de extractos y material vegetal de *V. prionophylla* (Cuadro 11) y *T. lucida* (Cuadro 12). Se encontró la presencia de hiperósido al comparar el valor de Rf obtenido (0.07) con el del estándar de dicho compuesto (Cuadro 10), sin embargo, este compuesto no se identificó por HPLC-DAD porque no se contaba con estándar para obtener el tiempo de retención. Esta banda de color anaranjado fue observada únicamente para los extractos, ya que para el material vegetal se observó otro compuesto con Rf 0.04 y de color azul, lo cual supone la presencia de un flavonoide diferente desconocido. Las tres muestras de *T. lucida* presentaron diversos flavonoides, entre ellos la rutina, al encontrarse los valores de Rf (de 0.35 a 0.37) cercanos a los del estándar de rutina (Rf = 0.41), sin embargo, no se encontró por HPLC-DAD, cuyos análisis se describen en la sección correspondiente. Como se puede observar los estándares de flavonoides aparecieron como una banda anaranjada (Cuadro 10), y hay varias bandas con ese color en las muestras de *T. lucida* para las cuales no se conoce su identidad. En un estudio realizado por Tenorio Domínguez (2016) se encontraron en *T. lucida* los siguientes flavonoides con sus respectivos valores de Rf entre paréntesis: quercetina (0.92), naringina (0.64), rutina (0.55), hesperidina

(0.62), neoesperidina (0.62), luteolina (0.95) y kaempferol (0.90), los cuales fueron obtenidos utilizando como fase móvil butanol:ácido acético:agua 40:10:50 v/v/v (Figura 44).

#### **F. Análisis de flavonoides mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia**

Las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía contracorriente de los extractos crudos de *T. lucida* y *V. prionophylla* fueron analizadas por HPLC-DAD. Las fracciones que eluyeron consecutivamente y que presentaron espectros UV similares fueron combinadas para el análisis posterior de flavonoides por HPLC-DAD (Cuadro 13). Para *T. lucida* se obtuvieron más fracciones que para *V. prionophylla*, ya que hay más flavonoides presentes en *T. lucida* (Database, 2018), así se corroboró en este estudio que *T. lucida* presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos (flavonoides) que *V. prionophylla*.

En los Cuadros 15 y 16 se presentan los resultados de la identificación de flavonoides en las fracciones de extracto por medio de HPLC-DAD. Las fracciones de extracto obtenidas mediante el método de cromatografía contracorriente, fueron analizadas en cuatro longitudes de onda, 230, 260, 285 y 310 nm. Para el análisis se corrieron estándares de flavonoides preparados previamente en acetonitrilo:agua (1:1) tales como naringenina, kaempferol, arginina, naringina, daídzeina, entre otros (Cuadro 14), a una concentración conocida de 0.1 mg/mL. Se evidenció que en las fracciones de extracto hubo una separación eficiente de flavonoides y por lo tanto se logró aislar varios flavonoides por cromatografía contracorriente.

Para la muestra de *T. lucida*, procedente de Joyabaj, Quiché, se identificaron flavonoides como apigenina (0.02 g/100g), naringina (0.20 g/100g), naringenina (0.04 g/100g), quercetina (0.006 g/100g), genisteína (0.0008 g/100g) y kaempferol (0.10 g/100g); para las muestras de Cabricán, Quetzaltenango y de Sipacapa, San

Marcos, se encontró naringenina en concentraciones de 0.15 g/100g y 0.32 g/100g, respectivamente. La presencia de estos flavonoides puede contribuir a las propiedades medicinales que se han atribuido a esta especie (Nicolas, 2013). Los flavonoides naringina, naringenina y genisteína no habían sido reportados en *T. lucida* en trabajos previos (Bonilla, Guadarrama, Alarcón, Limón, & Vazquez, 2015; Aquino, Cáceres, Morelli, & Rastrelli, 2002) y en otro estudio se encontró rutina (Cáceres, 1996), la cual no se identificó en este estudio en los análisis por HPLC-DAD aunque sí por cromatografía en capa fina. El flavonoide más abundante encontrado en *T. lucida* fue la naringenina (0.32 g/100g), procedente de Sipacapa, San Marcos (Cuadro 15). Las Figuras 56 a 79, del Anexo 6, muestran los cromatogramas del análisis de HPLC-DAD de las fracciones de extracto de *T. lucida*.

El flavonoide kaempferol fue identificado en la muestra de *V. prionophylla* procedente de San José Ojetenam, San Marcos, en concentración de 0.40 g/100g (base seca). Los extractos de *V. prionophylla* presentaron coloración amarilla intensa probablemente por la presencia del kaempferol en las concentraciones encontradas (Nicolas, 2013). Sin embargo, hay estudios previos donde no se encontraron los flavonoides naringina, apigenina y kaempferol para *V. prionophylla*, pero sí el flavonoide quercetina, que no fue encontrado en este estudio (Cáceres, 2009; Contreras & Méndez, 2014) (Cuadro 16). Las Figuras 80 a 91, del Anexo 6, muestran los cromatogramas del análisis de HPLC-DAD de las fracciones de extracto de *V. prionophylla*.

En el Anexo 6, en las Figuras 61, 69, 79, 83, 87 y 91, se presentan los cromatogramas de los extractos etanólicos de las muestras *T. lucida* y *V. prionophylla*, que no fueron separadas por cromatografía contracorriente, observándose picos de compuestos que no fueron identificados por HPLC. En los cromatogramas obtenidos (Anexo 6), hay picos que no se identificaron por falta de

estándares y que no necesariamente corresponden a flavonoides, que quedan pendientes de identificar en estudios posteriores.

### **G. Análisis de fenoles totales y actividad antioxidante en las plantas de estudio.**

El Cuadro 17 muestra los valores de fenoles totales para cada una de las muestras vegetales evaluadas como extractos secos. La muestra de *T. lucida* colectada en el municipio de Cabricán, Quetzaltenango, presentó el mayor contenido de fenoles totales representado como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) por cada g de extracto seco ( $394.05 \pm 13.09$ ). Para las muestras de *V. prionophylla*, la muestra proveniente de Patzún del departamento de Chimaltenango, presentó la mayor cantidad total de compuestos fenólicos ( $10.60 \pm 0.30$ ), aunque en realidad las tres colectas resultaron con contenidos escasos de fenoles totales. Estos resultados reflejan que el pericón es una fuente rica en compuestos fenólicos, lo cual puede verificarse en la Figura 96 del Anexo 9 (barras en color azul). En el gráfico las otras dos muestras (San Marcos y Quiché) muestran un mayor contenido de fenoles totales, aunque un tercio menores en comparación con la muestra colectada en Quetzaltenango, lo cual puede deberse a las diferentes condiciones ambientales entre las localidades donde se realizaron las colectas.

Generalmente el contenido de compuestos fenólicos, está relacionado con la actividad antioxidante, lo cual significa que cuanto mayor sea la concentración de compuestos fenólicos mayor será la actividad antioxidante de una muestra vegetal (Cartaya & Reynaldo, 2001), lo cual se observó en las muestras analizadas en el presente estudio (Cuadro 17 y Figura 97 del Anexo 9), que presentaron  $\text{CI}_{50}$  de 0.44, 0.40 y 0.37 mg/mL para el pericón y 6.28, 8.05 y 11.72 mg/mL para la valeriana. En la presente investigación, *Tagetes lucida* Cav. presentó valores de

CI<sub>50</sub> menores a los de *V. prionophylla*. Como se observa en el Cuadro 17, las tres muestras de *T. lucida* presentan un valor muy similar, con una ligera diferencia con la muestra proveniente de Joyabaj, Quiché, que presentó mayor actividad antioxidante que las muestras colectadas en San Marcos y Quetzaltenango.

#### **H. Actividad antimicrobiana de los extractos de *T. lucida* y *V. prionophylla*.**

En el Cuadro 20 se observa que los extractos de *T. lucida* de las tres procedencias presentaron actividad contra *B. subtilis* (CIM: >0.25 mg/mL), *S. aureus* (CIM: >0.25 mg/mL) y *C. albicans* (CIM: >0.50 mg/mL). Sin embargo, para las muestras de *V. prionophylla*, solamente la muestra procedente de Patzún, Chimaltenango, presentó actividad positiva (CIM = 1 mg/mL) contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *C. albicans*; y las muestras de las otras dos procedencias no presentaron actividad biológica cuantificable contra dichos microorganismos (Cuadros 18 y 19); dada la mayor cantidad de fenoles totales presentes en la muestra de Patzún ( $10.60 \pm 0.30$  µg EAG/g de extracto seco), comparada con las otras procedencias, San José Ojetenam, San Marcos y Santa Lucía Utatlán, Sololá (Cuadro 17). Entre los compuestos responsables de la actividad antifúngica y antibacteriana en *T. lucida*, pueden estar las cumarinas (Céspedes et al., 2006) (Figura 92 y 93, Anexo 7).

#### **I. Importancia de los resultados obtenidos en este proyecto de investigación**

Se determinó en esta investigación que por medio de la técnica de cromatografía contracorriente, es posible separar y aislar flavonoides de las plantas de estudio, para los que se observaron picos únicos en los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD. Tanto los extractos etanólicos de *T. lucida* como los de *V. prionophylla* presentaron diferencias de composición de fenoles totales así como de actividad biológica. Los resultados de la actividad antimicrobiana para *T. lucida* obtenidos en la presente investigación son promisorios para el tratamiento de

infecciones que involucren a los microorganismos utilizados en este estudio. En el caso de *V. prionophylla* solo se identificaron tres flavonoides, siendo el kaempferol el más abundante, por lo que podría considerarse el aprovechamiento de esta planta como fuente de dicho flavonoide, el cual fue encontrado en concentraciones de hasta 0.40 g/100g para la muestra de San José Ojetenam, San Marcos (Cuadro 17).

A partir de los resultados de esta investigación se puede investigar el desarrollo de aplicaciones de cromatografía contracorriente, para el aislamiento de los flavonoides y de otros metabolitos secundarios de otras plantas a las plantas de estudio *T. lucida* y *V. prionophylla*, para profundizar en la investigación de sus propiedades medicinales.

## XI. CONCLUSIONES

1. Se logró la separación de flavonoides de extractos etanólicos de las plantas *T. lucida* y *V. prionophylla* de diferentes procedencias del occidente de Guatemala, por medio de cromatografía contracorriente utilizando la mezcla de n-hexano, acetato de etilo, metanol y agua como solventes en proporciones de 1:1:1:1, a un flujo de 3 mL/min.
2. El flavonoide que se logró separar e identificar que presentó la mayor concentración en *T. lucida* fue la naringenina, en la muestra colectada en Sipacapa, San Marcos, con una concentración de 0.32 g por cada 100 g de muestra vegetal fresca.
3. El flavonoide que se logró separar e identificar que presentó la mayor concentración en *V. prionophylla* fue el kaempferol en, la muestra colectada en San José Ojetenam, San Marcos, con una concentración de 0.40 g por cada 100 g de muestra vegetal fresca.
4. La muestra de *V. prionophylla*, procedente del departamento de Sololá, municipio de Santa Lucía Utatlán, presentó el mayor rendimiento de extracción por maceración en etanol, 39.3%.
5. Se identificaron cuatro cumarinas en *T. lucida*, por cromatografía en capa fina.
6. Se identificaron dos cumarinas en *V. prionophylla*, por cromatografía en capa fina.
7. Las muestras de *T. lucida* y *V. prionophylla*, presentaron flavonoides según el análisis por cromatografía en capa fina, presentando *T. lucida* mayor abundancia de dichos compuestos.
8. Los extractos de las muestras de *T. lucida*, originarias de Sipacapa, San Marcos y Cabricán, Quetzaltenango, presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (CIM de 0.25 mg/mL) y *C. albicans* (CIM entre 0.5 a 1 mg/L). Por otra parte, la muestra colectada en Joyabaj, Quiché, presentó actividad

contra *B. subtilis* (CIM de 0.25 mg/mL), *S. aureus* (CIM 0.25) y *C. albicans* (CIM 0.5 mg/mL).

9. Los extractos de las colectas de *V. prionophylla*, no presentaron actividad antimicrobiana contra *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, excepto la muestra originaria de Patzún, Chimaltenango, que presentó actividad contra *C. albicans* (CIM de 1 mg/mL).
10. Las muestras de *T. lucida* y *V. prionophylla* presentaron mayor actividad antioxidante que los estándares de compuestos antioxidantes utilizados en la industria como trolox, TBHQ, quercetina y vitamina C; presentando el valor más alto la muestra de *V. prionophylla* procedente de Santa Lucía, Utatlán, Sololá.
11. Los extractos de las muestras de *T. lucida* presentaron mayor contenido de fenoles totales que los extractos de las muestras de *V. prionophylla*.

## XII. RECOMENDACIONES

1. Experimentar con diferentes fases móviles y estacionarias para optimizar la separación de flavonoides de extractos alcohólicos de *T. lucida* y *V. prionophylla* por cromatografía contracorriente, para separar compuestos que no se han logrado separar con las condiciones utilizadas. Se podría sustituir la mezcla utilizada agua:metanol:acetato de etilo:hexano (1:1:1:1) por mezclas como: cloroformo:metanol:agua (4:3:2) y cloroformo:metanol:HCl 5% (5:5:3).
2. Se recomienda inyectar otros estándares de flavonoides no utilizados en este trabajo, para ampliar la base de tiempos de retención para el método analítico empleado, con el fin de identificar un mayor número de flavonoides presentes en *T. lucida* y *V. prionophylla*.

### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, E., & Bonilla, P. (2009). Actividad antioxidante e inmunológica de flavonoides aislados de hojas de *Smallantus sonchifolius* (yacón). *Ciencia e investigación*, 12(1), 15-23.
- AlphaCrom. (12 de octubre de 2018). *History of Countercurrent (CCC)*. Obtenido de [contact@alphacrom.com](mailto:contact@alphacrom.com): <http://countercurrent.ch/files/history.pdf>
- Aquino, R., Cáceres, A., Morelli, S., & Rastrelli, L. (2002). An Extract of *Tagetes lucida* and Its Phenolic Constituents as Antioxidants. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy*, 65, 1773-1776. doi:10.1021/np020018i
- Barajas, J. S., Montes, R., Castrejón, F., Flores, H. E., & Serrato, M. A. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 85-91. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v34/v34a10.pdf>
- Barrios, A. C. (2007). *Validación farmacológica de la acción sedante e hipnótica de rizoma de Valeriana prionophylla (valeriana) en combinación con hojas de Passiflora edulis (flor de la pasión), flor con bráctea de Tilia platyphyllos (tilo) o pericarpio de Citrus aurantium...* Ciudad de Guatemala: Editorial Universitaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado el 2018
- Berthod, A. (2002). *Countercurrent Chromatography* (Vol. 38). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science.

- Bhatt, I. D., Dauthal, P., Rawat, S., Gaira, K. S., Jugran, A., Rawal, R. S., & Dhar, U. (2012). Characterization of essential oil composition, phenolic content, and antioxidant properties in wild and planted individuals of *Valeriana Jatamansi* Jones. *ELSEVIER*, 136, 61-68. doi:10.1016/j.scienta.2011.12.032
- Bonilla, H., Guadarrama, G., Alarcón, F. J., Limón, O., & Vazquez, G. (2015). Antidepressant-like activity of *Tagetes lucida* Cav. is mediated by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer*, 69, 463–470. doi:10.1007/s11418-015-0909-5
- Botanical-Online SL. (12 de Octubre de 2018). *Propiedades de la Valeriana (Valeriana Officinalis L.)*. Obtenido de 1999-2018 Derechos reservados: <https://www.botanical-online.com/medicinalsvalerianacastella.htm>
- Brewster, R. Q., Vanderwerf, C. A., & McEwen, W. E. (1970). *Curso práctico de química orgánica*. Madrid: Editorial Alhambra, S.A.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica plantas medicinales* (Segunda ed.). España: Acribia, S.A.
- Bueno, M. (2000). *Diccionario Enciclopédico*. Ciudad de México D. F.: Larousse.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Ciudad de Guatemala: Editorial Universitaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cáceres, A. (2009). *Vademécun Nacional de Plantas*. Ciudad de Guatemala: Editorial Universitaria - Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cáceres, A. (2009). *Variabilidad genética, desarrollo de tecnología agrícola y caracterización fitofarmacéutica de una especie de valeriana (Valeriana*

*prionophylla*) nativa de Guatemala con potencial como sedante natural. Ciudad de Guatemala: Editorial Universitaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Cambridge Dictionary. (2018). *Diccionario Inglés-Español*. Obtenido de Cambridge University Press: <https://dictionary.cambridge.org/es/diccionario/ingles-espanol/>

Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5-14. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215009001.pdf>

Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Iberoamericana de Patología Clínica*, 61(1), 28-40. Recuperado el 18 de octubre de 2018, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

Céspedes, C. L., Avila, J., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J., & Salgado-Garciglia, R. (2006). Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3521-3527. doi:<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf053071w#>

Contreras, A., & Méndez, V. H. (2014). Fenología de la planta medicinal *Valeriana prionophylla* (Valerianaceae) en páramos de Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED*, 6(2), 223-231. Obtenido de <https://investiga.uned.ac.cr/revistas/index.php/cuadernos/article/viewFile/628/525>

- Contreras, J. P. (2009). *Propuesta de dos formulaciones a partir de tinturas de Valeriana prionoophylla Standl. como sedante y ansiolítico*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Ciudad de Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cooper, R., & Nicola, G. (2015). *Natural Products Chemistry*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Database, P. (24 de 09 de 2018). *Classification for Kingdom Plantae*. Obtenido de USA: National Resources Conservation Service: <https://plants.usda.gov/classification.html>
- de MacVean, A., & Monzón, J. (s. f.). Estudio preliminar de la flora de la estación científica "Refugio del Quetzal", Volcán Atitlán, Guatemala. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*, 84-92. Obtenido de [http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-19/Art9\\_flora\\_de\\_la\\_estacion.pdf](http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-19/Art9_flora_de_la_estacion.pdf)
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach* (2 ed.). West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. Obtenido de <https://nadjeeb.files.wordpress.com/2009/10/dewick-natural-prod.pdf>
- Flora Mesoamericana. (26 de Septiembre de 2018). *Missouri Botanical Garden*. Obtenido de Tropicos: [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)
- García, J. D. (2013). *Actividad antifúngica de extractos etanólicos de hoja y rizoma de Valeriana prionoophylla, colectadas en dos regiones de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Ciudad de Guatemala: Editorial Universitaria.
- Garrido, J. C. (2007). *Análisis por cromatografía líquida de alta resolución de ácido valerénico o sus derivados en extractos de hojas y raíz de valeriana (Valeriana prionoophylla Standl.)*. Ciudad de Guatemala: Editorial

Universitaria - Universidad de San Carlos de Guatemala. Obtenido de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2611.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2611.pdf)

González Escobar, O. G. (2010). *Caracterización de la flora del Jardín Botánico Nacional, Finca San Luis Buenavista, Palín, Escuintla, Guatemala*. Ciudad de Guatemala: Editorial Universitaria USAC. Obtenido de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202009.19.pdf>

Hernández, T., Canales, M., Flores, C., García, A. M., Durán, A., & Avila, J. C. (2006). Antimicrobial Activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical Biology*, 44(1), 19-22. doi:10.1080/13880200500509157

Ito, Y. (2010). CCC: Instrumentation. En J. Cazes, *Encyclopedia of Chromatography* (3 ed., Vol. 1, págs. 327-338). Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press.

Jiménez, C. (2013). El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *Divulgación de la química*, 2(192), 134-141.

Jurado, R., Arenas, C., Doblaz, A., Rivero, A., & Torres, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Enfermedades infecciosas (IV)*, 52(10), 3497-3501. Recuperado el 18 de octubre de 2018, de [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Tifoidea\\_otras\\_salmonellas\\_Medicine20100.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Tifoidea_otras_salmonellas_Medicine20100.pdf)

Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia*. Barcelona: Ediciones Omega, S. A.

Liu, X. C., Zhou, L., & Liu, Z. L. (2013). Identification of Insecticidal Constituents from the Essential Oil of *Valeriana jatamansi* Jones against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. *Journal of Chemistry*, s. v.(s. num.), 1-6. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2013/853912>

- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J. H., & Paladini, A. C. (2003). 6-methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav.*, 75(3), 537-545. doi:[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(03\)00121-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(03)00121-7)
- Markowski, W. (2004). Efficiency of a Thin-Layer Chromatography Plate. En J. Cazes, *Encyclopedia of Chromatography* (págs. 79-85). Boca Raton, Florida, United States of America: Marcel Dekker.
- Martínez, S., Gonzáles, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6(17), 271-278. Obtenido de <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
- Maryutina, T., & Spivakov, B. Y. (2010). CCC: Solvent Systems. En J. Cazes, *Encyclopedia of Chromatography* (3rd. ed., Vol. 1, págs. 336-338). Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press.
- McMurry, J. (2017). *Química Orgánica*. Ciudad de México: Edamsa Impresiones, S.A.
- Nicolas, J.-P. (2013). *Manual de plantas medicinales del altiplano de Guatemala para el uso familiar*. Chinique, El Quiché, Guatemala: Ediciones Médicos Delcalzos. Obtenido de <http://www.jardinsdumonde.org/wp-content/uploads/2016/03/MANUAL-DE-PLANTAS-MEDICINALES-GUATEMALA-JDM.pdf>
- Pamplona, J. D. (2007). *Enciclopedia de las plantas medicinales*. Madrid, España: Editorial Safeliz.
- Pérez Sabino, J. F., Farfán Barrera, C., Oliva Hernández, B. E., & Jayes Reyes, P. G. (2012). *Determinación de los flavonoides en seis plantas del género Lippia (Verbenaceae) nativas de Guatemala como posibles fuentes de*

*nutracéuticos*. Ciudad de Guatemala: Editorial Universitaria USAC. Obtenido de <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/rapidos2011/INF-2011-36.pdf>

Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana Investigación Biomédica*, 1(22), 48-57. Recuperado el 15 de octubre de 2018, de <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v22n1/ibi07103.pdf>

PerkinElmer. (2011). *ChemDraw*. Obtenido de <https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html>

Piccinelli, A. L., Arana, S., Cáceres, A., di Villa Bianca, R. d., Sorrentino, R., & Rastrelli, L. (2004). New Lignans from the Roots of *Valeriana prionophylla* with Antioxidative and Vasorelaxant Activities. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy*, 67, 1135-1140. doi:10.1021/np049879c

Pomilio, A. B. (2012). Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica*, 46(1), 73-82. Recuperado el 20 de Julio de 2017, de Vinculación con la Bioquímica: <http://www.redalyc.org/pdf/535/53522610011.pdf>

Pubchem. (27 de September de 2018). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de U.S. National Library of Medicine: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>

Real Academia Española (RAE) - WEB. (19 de octubre de 2018). *Diccionario de la Lengua Española*. Obtenido de Felipe IV-2018: <http://www.rae.es/>

Real Academia Española (REA). (1956). *Diccionario de la Lengua Española*. Madrid: s. e.

- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). Introducción a los productos naturales vegetales. En J. Ringuelet, & S. Viña, *Productos Naturales Vegetales* (págs. 4-17). Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475. Recuperado el 18 de octubre de 2018, de [http://www.adiveter.com/ftp\\_public/E.coli.pdf](http://www.adiveter.com/ftp_public/E.coli.pdf)
- Rolet-Menet, M. C. (2010). Detection in CCC. En J. Cazes, *Encyclopedia of Chromatography* (3rd. ed., Vol. 1, págs. 567-569). Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press.
- Sánchez, A., & Gonzáles, M. (s. f.). Técnicas de recolecta de plantas y herborización. En s. a., s. t. (págs. 123-133). s. l.: s. e. Recuperado el 18 de octubre de 2018, de <https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/6082/Capitulo12.pdf>
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Scientific Food Agriculture*, 76(2), 270-276.
- Scull, R., Gutiérrez, Y., Sánchez, A., & Montes, A. (2016). ANÁLISIS FARMACOGNÓSTICO DE *Tagetes lucida* Cav. Y SUS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 1-13. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/324606052\\_ANALISIS\\_FARMACOGNOSTICO\\_DE\\_Tagetes\\_lucida\\_Cav\\_Y\\_SUS\\_EXTRACTOS\\_HIDROALCOHOLICOS](https://www.researchgate.net/publication/324606052_ANALISIS_FARMACOGNOSTICO_DE_Tagetes_lucida_Cav_Y_SUS_EXTRACTOS_HIDROALCOHOLICOS)

- Secretaría Nacional de México. (2013). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* (2 ed.). Ciudad de México: S. Ed.
- Sigma-Aldrich (Merck). (19 de octubre de 2018). *Product Information*. Obtenido de Merck- Sigma Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/47641dat.pdf>
- Skorek, M., Jurczyk, K., Sajewicz, M., & Kowalska, T. (2016). Thin-layer chromatographic identification of flavonoids and phenolic acids contained in cosmetic raw materials. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*, 39(5-6), 286-291. doi:<http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2016.1163467>
- Stefova, M., Stafilov, T., & Kulevanova, S. (2010). Flavonoids: HPLC Analysis. En J. Cazes, *Encyclopedia of Chromatography* (3rd. ed., Vol. 2, págs. 882-889). Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press.
- Suma, S. (5 de octubre de 2018). Counter Current Chromatography. s. l., s. l., s. l. Obtenido de <https://www.slideshare.net/SumaSam1/counter-current-chromatography-71947193>
- Tenorio Domínguez, M. (2016). Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). *Scientia Agropecuaria*, 7(4), 419-431. Recuperado el 16 de marzo de 2020, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v7n4/a07v7n4.pdf>
- Thusoo, S., Gupta, S., Sudan, R., Kour, J., Bhagat, S., Hussain, R., & Bhagat, M. (2014). Antioxidant Activity of Essential Oil and Extracts of *Valeriana jatamansi* Roots. *BioMed Research International*, s. vol.(s. num.), 1-4. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2014/614187>

- Universidad Complutense de Madrid (Dirección). (2010). *Prácticas de Química Orgánica I: Manejo del rotavapor* [Película].
- Volák, J., Stodola, J., & Severa, F. (1989). *Plantas Medicinales*. Checoslovaquia: Susaeta, S.A. TSNP Martin.
- Wang, W., Xu, H., Chen, H., Tai, K., Liu, F., & Gao, Y. (2016). In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagenin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2614-2624. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-016-2228-6>
- Wang, Y., Yin, L., Yu, S., Shi, Q., Gu, Y., & Kiyota, H. (2010). Chemical Constituents of Plants from the Genus *Valeriana*. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*(7), 161-172.
- Word Reference. (2018). *Online Language Dictionaries*. Obtenido de Diccionario de la Lengua Española: <http://www.wordreference.com/definicion/>
- Yuan, L. M. (2010). Flavonoids: CCC Separation. En J. Cazes, *Encyclopedia of Chromatography* (3 ed., Vol. 2, págs. 878-881). Boca Raton, Florida, United States: CRC Press.

#### XIV. ANEXOS

**Anexo 1.** Estructuras químicas de los flavonoides que se han reportado en *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl.

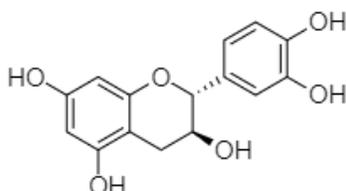


Figura 16. Catequina (PerkinElmer, 2011).

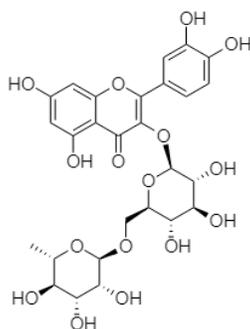


Figura 17. Rutina<sup>14</sup> (CAS 153-18-4) (PerkinElmer, 2011).

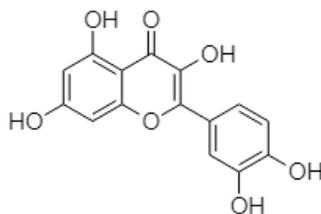


Figura 18. Fórmula química de la quercetina<sup>15</sup> (un flavonoide: flavonol) (CAS 117-39-5) presente en la valeriana (referente a *V. officinalis* L.) (PerkinElmer, 2011).

<sup>14</sup> Es un flavonol O-glicosídico, encontrado en muchas plantas y vegetales, ejerce muchas actividades biológicas, incluyendo propiedades antialérgicas, antiinflamatorias, antiproliferativas y anticarcinogénicas. La rutina actúa como un liberador de quercetina en el intestino grueso (Pubchem, 2018).

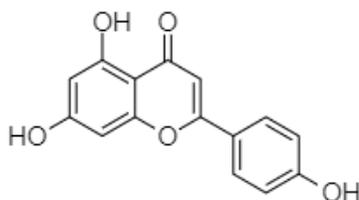


Figura 19. Apigenina<sup>16</sup> (flavona) (ref. *V. officinalis*) (CAS 520-36-5) (PerkinElmer, 2011).

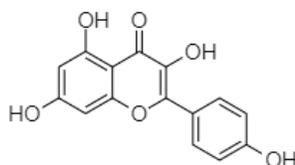


Figura 20. Kaempferol (flavonol) (ref. *V. officinalis*) (CAS 520-18-3) (PerkinElmer, 2011).

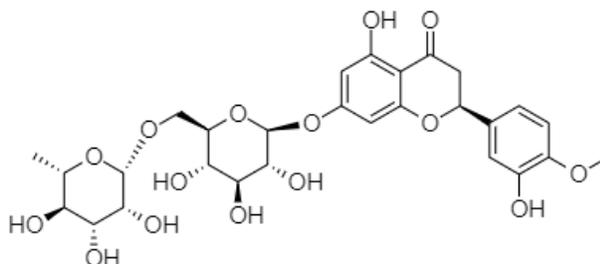


Figura 21. 2S(-)-hesperidina<sup>17</sup> (glucósido de flavanona) (ref. *V. whallichii*) (CAS 520-26-3) (PerkinElmer, 2011).

<sup>15</sup> Impide la actividad de la histamina descarboxilasa, los niveles más bajos de histamina en el organismo, y en efecto, ejerce actividades antiinflamatorias y reduce el dolor (Skorek, Jurczyk, Sajewicz, & Kowalska, 2016, pág. 287).

<sup>16</sup> Agente quimiopreventivo para el cáncer de la piel (Pubchem, 2018).

<sup>17</sup> Es un derivado de disacárido que consiste en hesperetina, su papel es actuar como mutágeno (Pubchem, 2018).

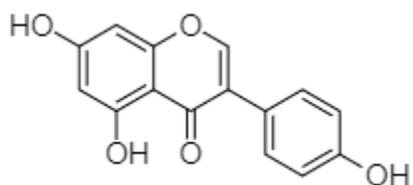


Figura 22. Genisteína (PerkinElmer, 2011).

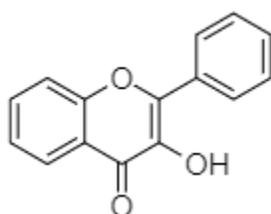


Figura 23. Hidroxiflavona (PerkinElmer, 2011).

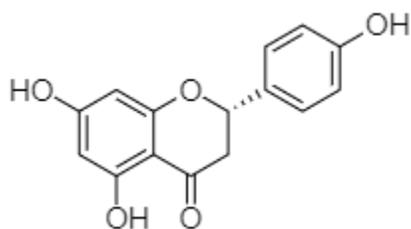


Figura 24. Naringenina (PerkinElmer, 2011).

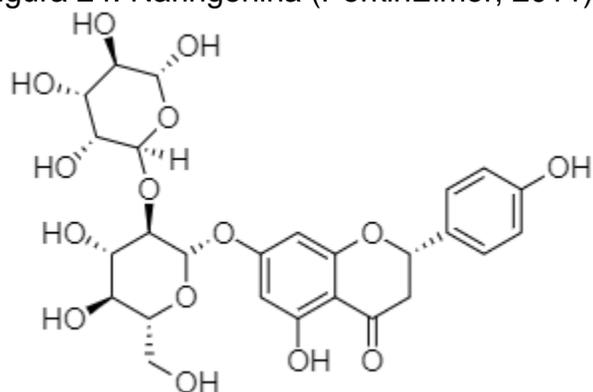


Figura 25. Naringina (PerkinElmer, 2011).

**Anexo 2.** Otras estructuras que se mencionan en este estudio.

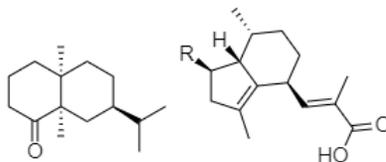


Figura 26. Estructura química de: valeranona (izquierda) y ácido valerénico (derecha, si R=H) (PerkinElmer, 2011).

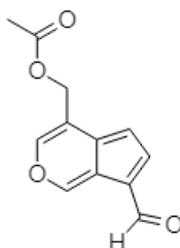


Figura 27. Fórmula química del baldrinal, el principio activo más importante de la valeriana (proveniente de los valtratos) (PerkinElmer, 2011).

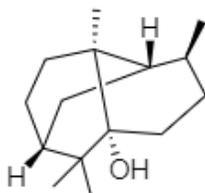


Figura 28. Estructura del pachulol, componente mayoritario en el aceite esencial de *V. jatamansi* Jones, y se le han atribuido propiedades insecticidas (PerkinElmer, 2011).

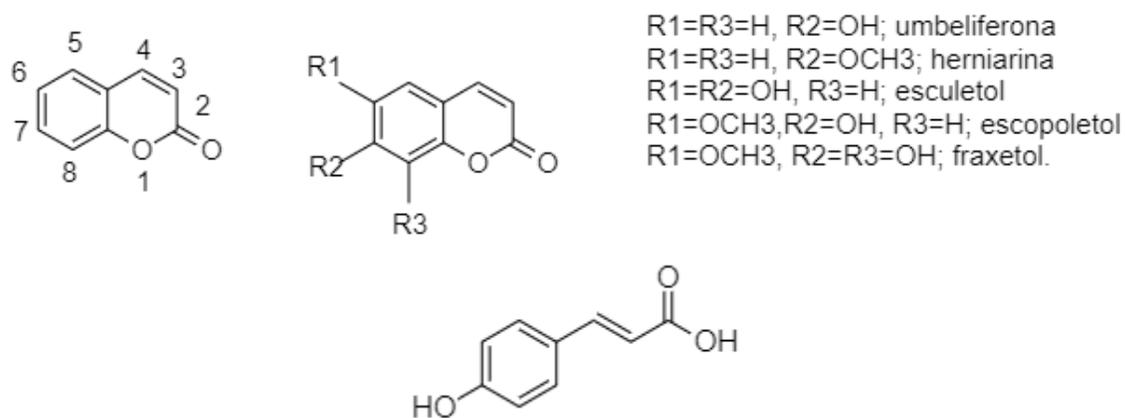


Figura 29. Estructura general de las cumarinas (arriba) y ácido p-cumárico (abajo) (PerkinElmer, 2011).

**Anexo 3. Fotografías de campo de las distintas colectas realizadas.**



Figura 30. *Tagetes lucida* Cav. - Aldea Poj, Sipacapa, San Marcos. Fotografía tomada por Max Mérida.



Figura 31. *Tagetes lucida* Cav. - Caceríos Ranchería y Ranchería Chiquita, Cabricán, Quetzaltenango. Fotografía tomada por Belter Trinidad.



Figura 32. *Tagetes lucida* Cav. - Aldea Estanzuela, Joyabaj, Quiché. Fotografía tomada por Max Mérida.



Figura 33. *Valeriana prionophylla* Standl. - Aldea Chuchucá Alto, Patzún, Chimaltenango. Fotografía tomada por Belter Trinidad.



Figura 34. *Valeriana prionophylla* Standl. - San José Ojetenam, San Marcos. Fotografía tomada por Max Mérida.



Figura 35. *Valeriana prionophylla* Standl. - San José Ojetenam, San Marcos. - Preparación de la muestra para su herborización. Fotografía tomada por Belter Trinidad.



Figura 36. *Valeriana prionophylla* Standl. - Aldea Ciénaga Grande, Santa Lucía Utatlán, Sololá. Fotografía tomada por Max Mérida.

Anexo 4. Herborización de cada colecta coleccionada en el Herbario BIGU, tres puntos de colecta de *Tagetes lucida* Cav. y de *Valeriana prionophylla* Standl.

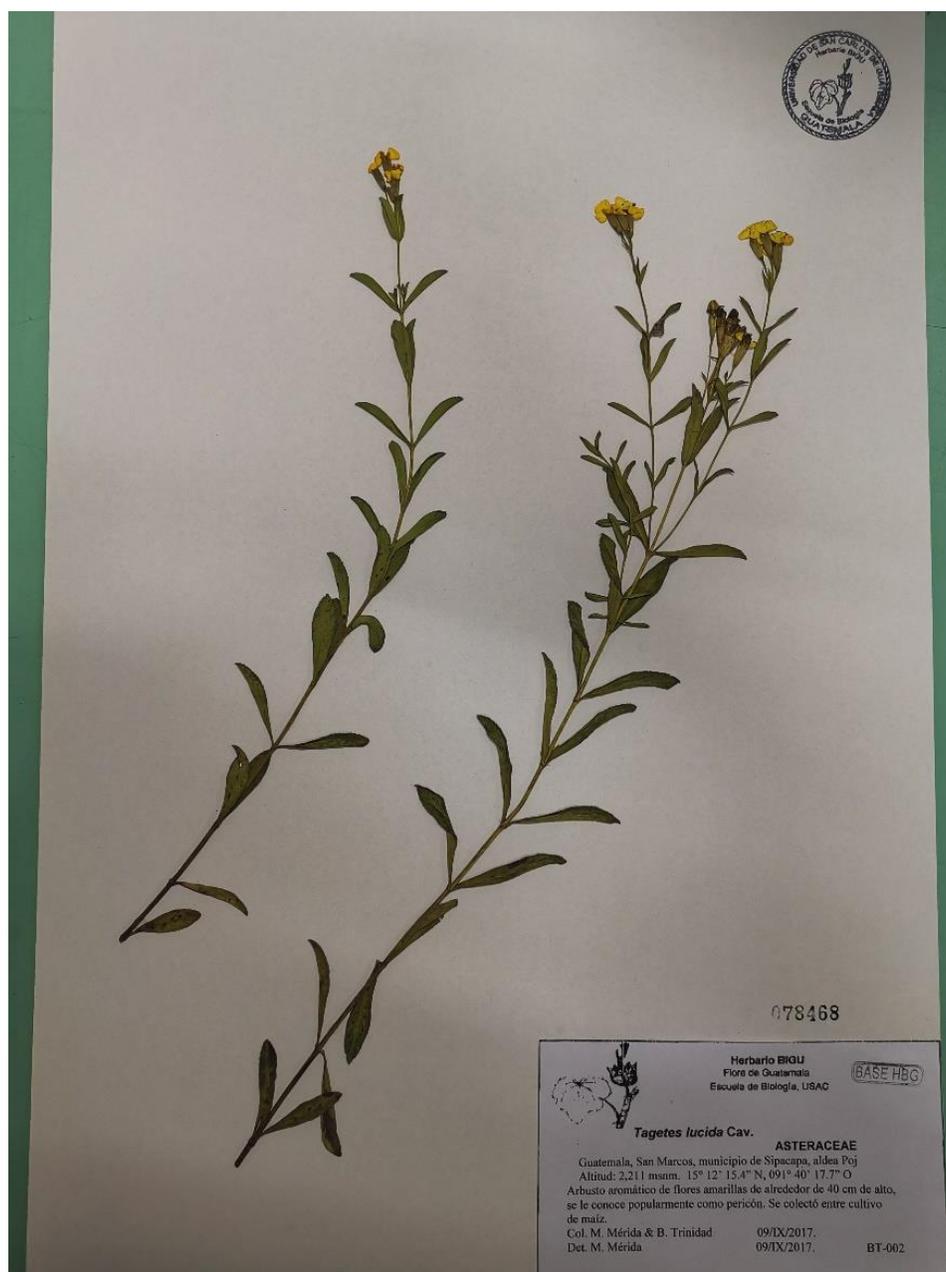


Figura 37. Espécimen herborizado de *T. lucida*, colectado en Sipacapa, San Marcos. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU.



Figura 38. Espécimen herborizado de *T. lucida*, colectado en Cabricán, Quetzaltenango. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU.



Figura 39. Espécimen herborizado de *T. lucida*, colectado en Joyabaj, Quiché. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU.

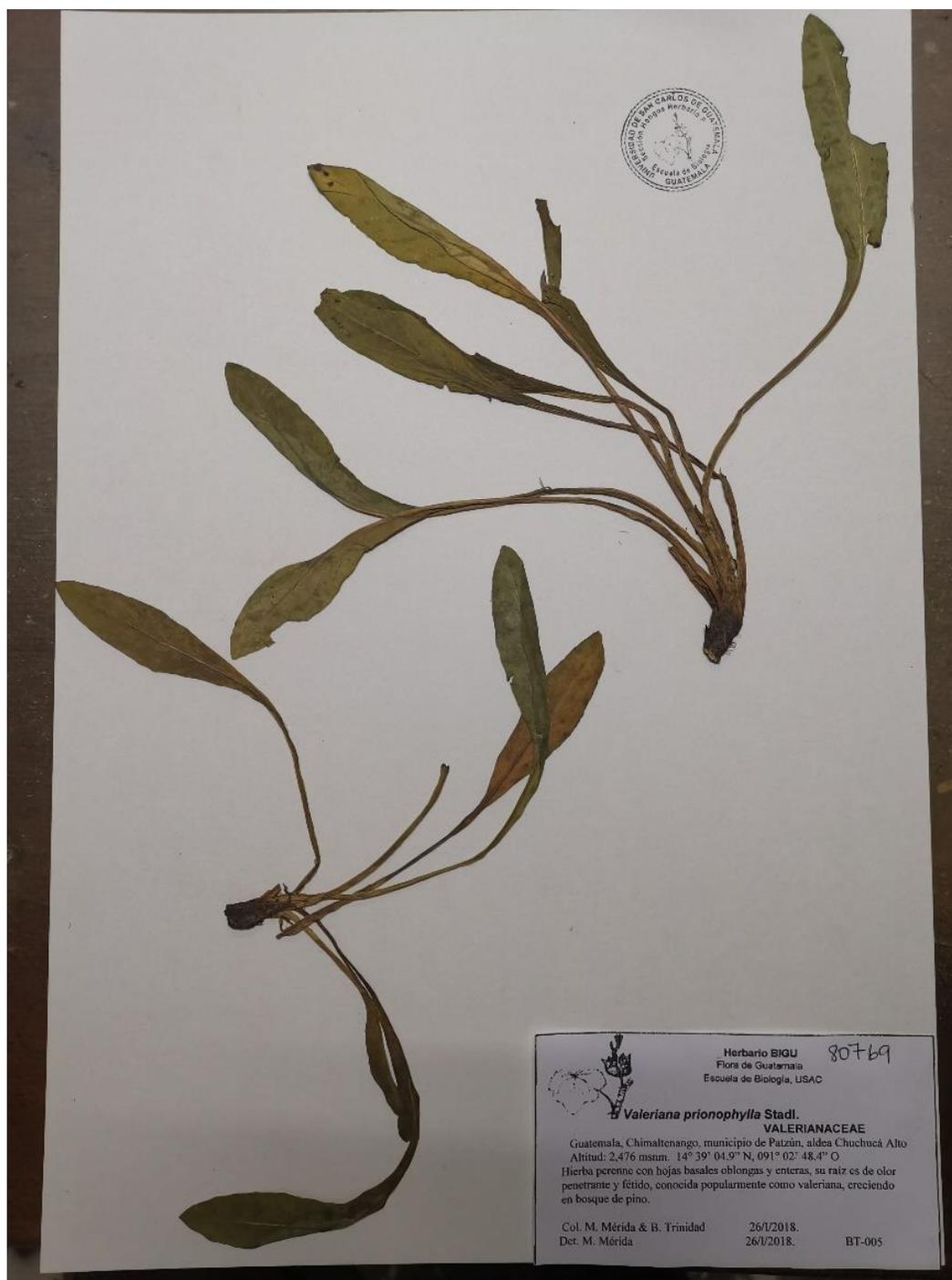


Figura 40. Espécimen herborizado de *V. prionophylla* colectado en Patzún, Chimaltenango. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU.

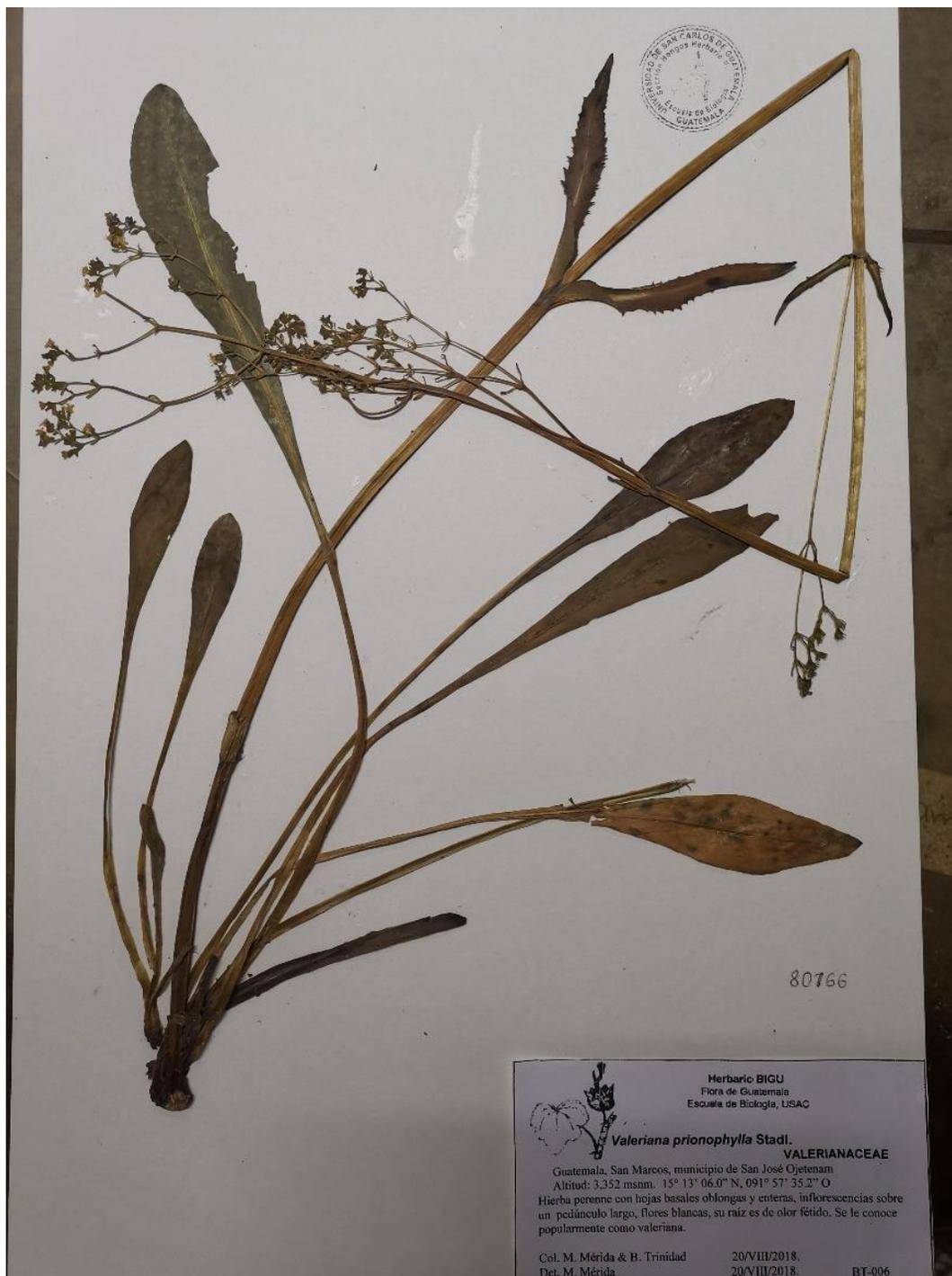


Figura 41. Espécimen herborizado de *V. prionophylla* colectado en San José Ojetenam, San Marcos. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU.

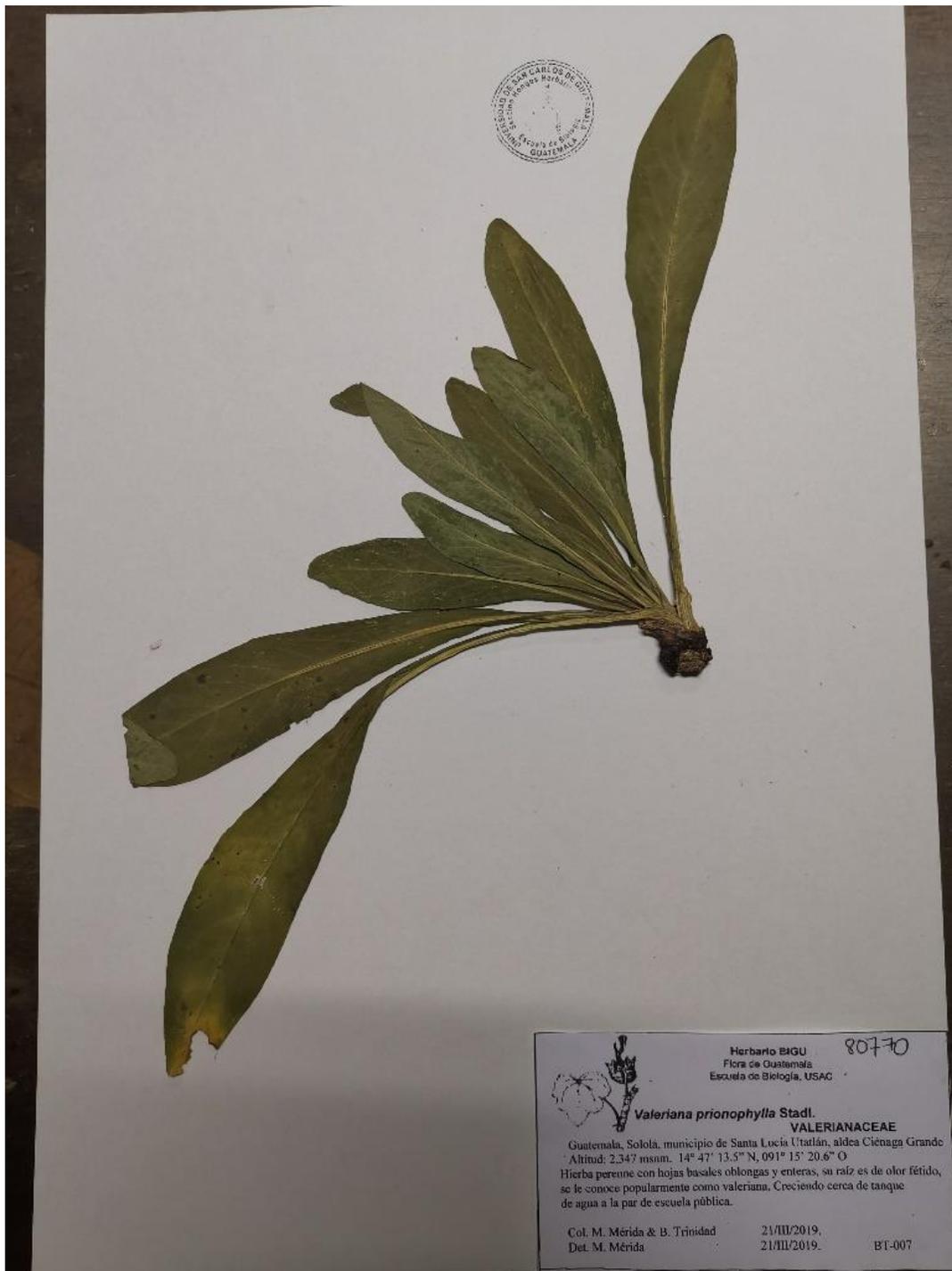


Figura 42. Especimen herborizado de *V. prionophylla* colectado en Santa Lucía Utatlán, Sololá. Fotografía tomada por Belter Trinidad en Herbario BIGU.

### Anexo 5. Cromatoplasmas de cromatografía en capa fina (CCF).

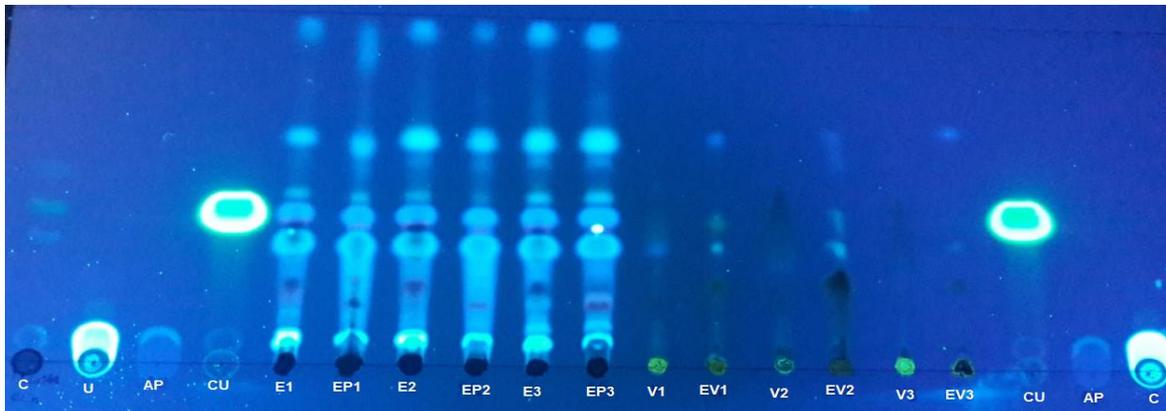


Figura 43. Cromatoplasma del análisis de cumarinas de los extractos secos alcohólicos y material vegetal de *T. lucida* y *V. prionophylla*. Fotografía tomada por Belter Trinidad.

**C:** Extracto de cumarina; **U:** umbeliferona; **AP:** Ácido p-cumarínico; **CU:** cumarina; **P1:** Pericón (Sipacapa, San Marcos); **EP1:** Extracto 1 de pericón (Sipacapa, San Marcos); **P2:** Pericón (Cabricán, Quetzaltenango); **EP2:** Extracto 2 de pericón (Cabricán, Quetzaltenango); **P3:** Pericón (Joyabaj, Quiché); **EP3:** Extracto 3 de pericón (Joyabaj, Quiché); **V1:** Valeriana (Patzún, Chimaltenango); **EV1:** Extracto 1 de valeriana (Patzún, Chimaltenango); **V2:** Valeriana (San José Ojetenam, San Marcos); **EV2:** Extracto 2 de valeriana (San José Ojetenam, San Marcos); **V3:** Valeriana (Santa Lucía Utatlán, Sololá); **EV3:** Extracto 3 de valeriana (Santa Lucía Utatlán, Sololá).

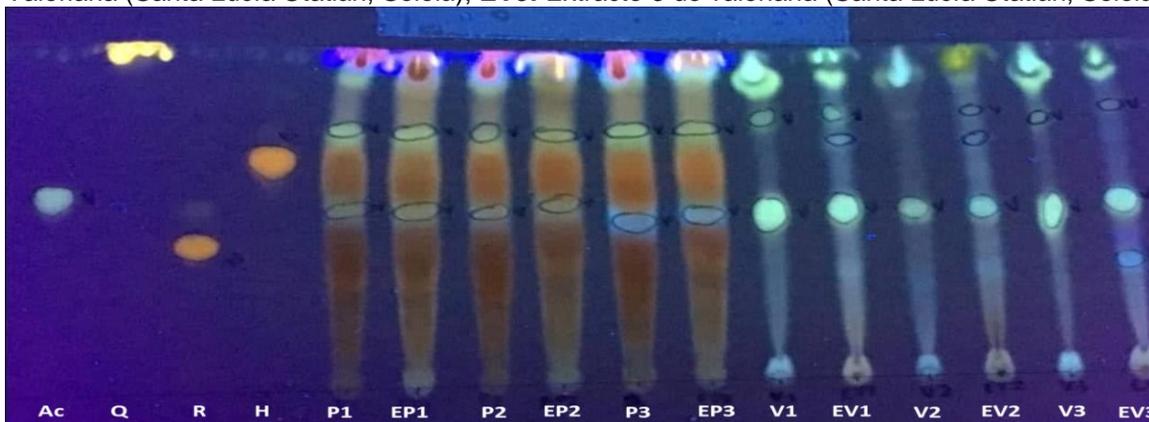


Figura 44. Cromatoplasma del análisis de flavonoides de los extractos secos alcohólicos y material vegetal de *T. lucida* y *V. prionophylla*. Fotografía tomada por Belter Trinidad.

**Ac:** Ácido clorogénico; **Q:** Quercetina; **R:** Rutina; **H:** Hiperósido; **P1:** Pericón (Sipacapa, San Marcos); **EP1:** Extracto 1 de pericón (Sipacapa, San Marcos); **P2:** Pericón (Cabricán, Quetzaltenango); **EP2:** Extracto 2 de pericón (Cabricán, Quetzaltenango); **P3:** Pericón (Joyabaj, Quiché); **EP3:** Extracto 3 de pericón (Joyabaj, Quiché); **V1:** Valeriana (Patzún, Chimaltenango); **EV1:** Extracto 1 de valeriana (Patzún, Chimaltenango); **V2:** Valeriana (San José Ojetenam, San Marcos); **EV2:** Extracto 2 de valeriana (San José Ojetenam, San Marcos); **V3:** Valeriana (Santa Lucía Utatlán, Sololá); **EV3:** Valeriana 3 de valeriana (Santa Lucía Utatlán, Sololá).

**Anexo 6. Cromatogramas de los estándares de flavonoides y de las fracciones de extracto de las muestras vegetales de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. obtenidos en HPLC-DAD de los extractos fraccionados mediante cromatografía contracorriente (CCC).**

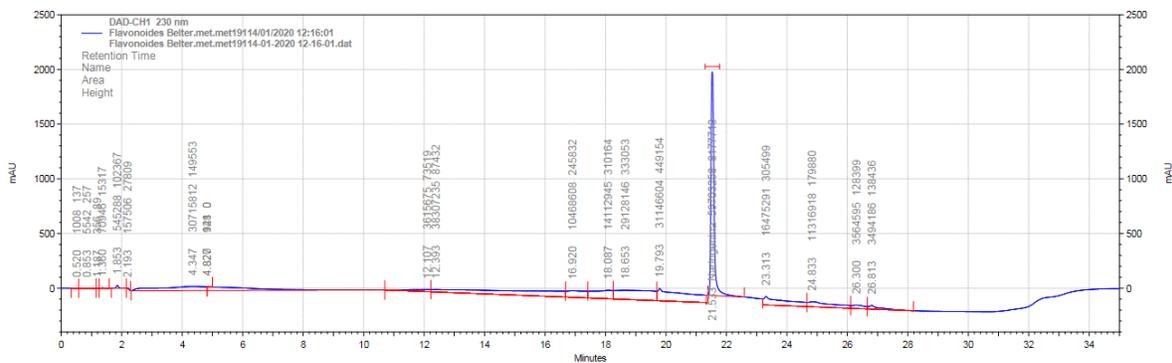


Figura 45. Cromatograma del estándar de naringenina (TR: 21.54) en la longitud de onda de 230 nm obtenido en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

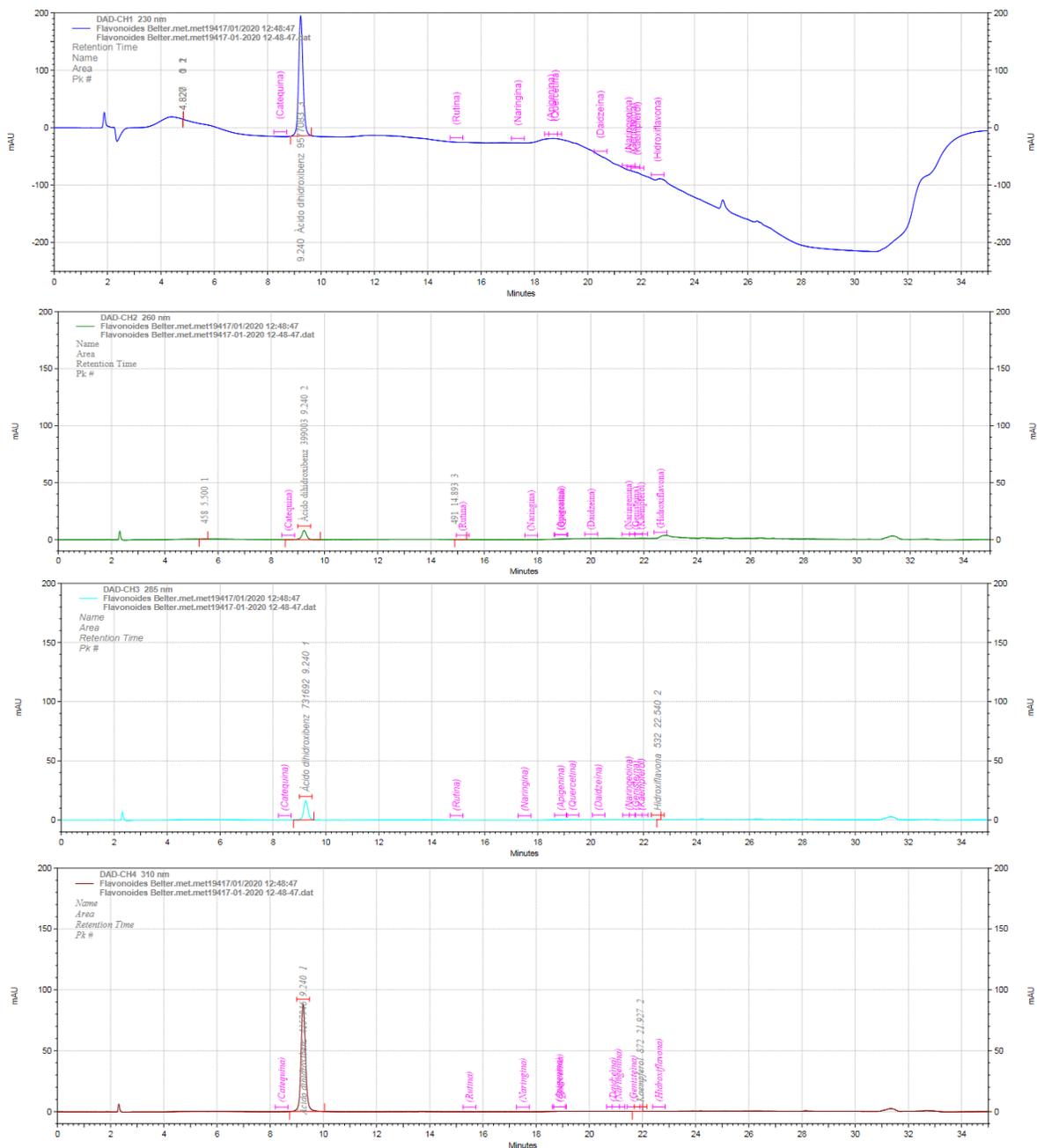


Figura 46. Cromatogramas del estándar de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (TR: 9.24) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

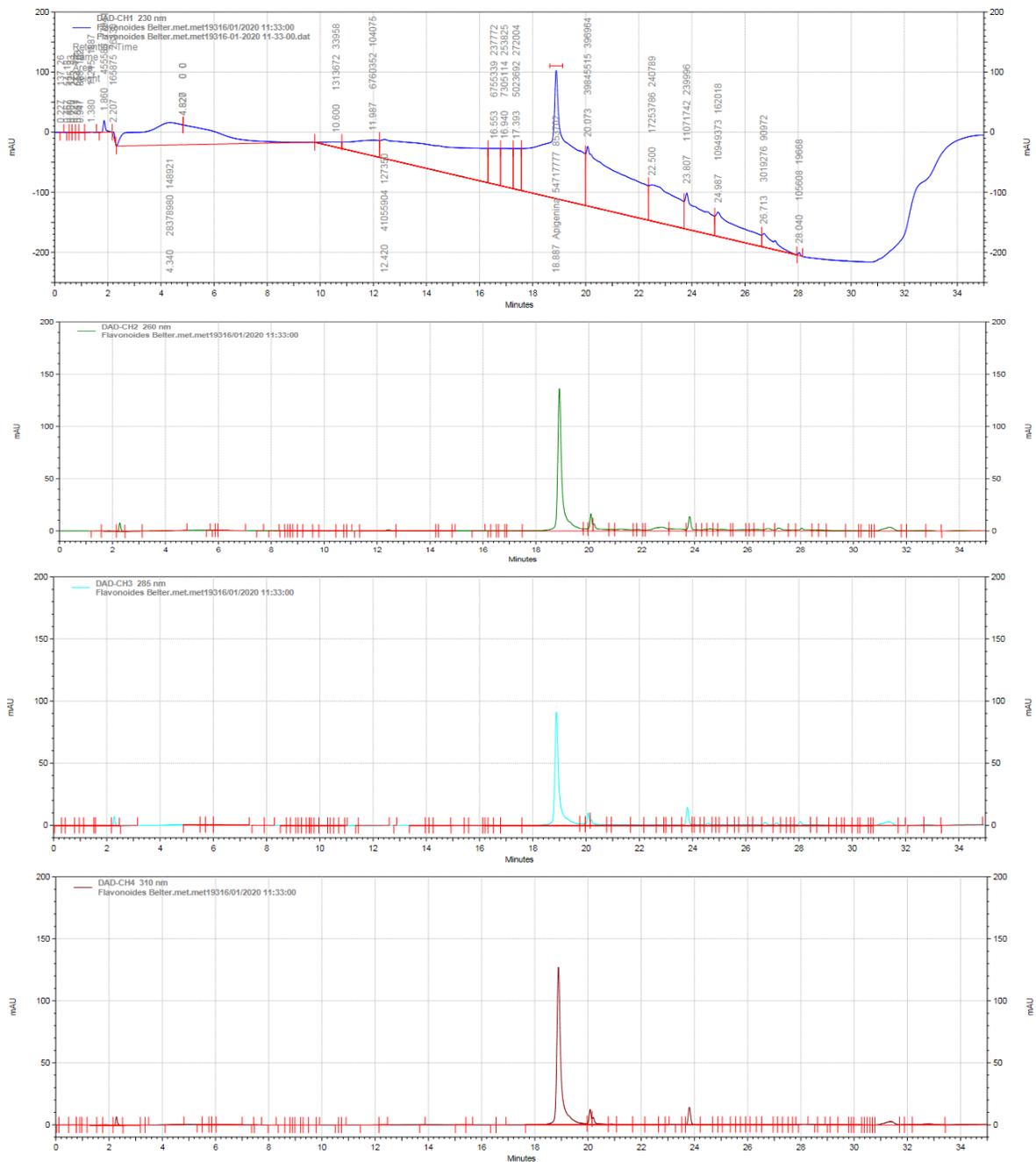


Figura 47. Cromatogramas del estándar de apigenina (TR: 18.89) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.15 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

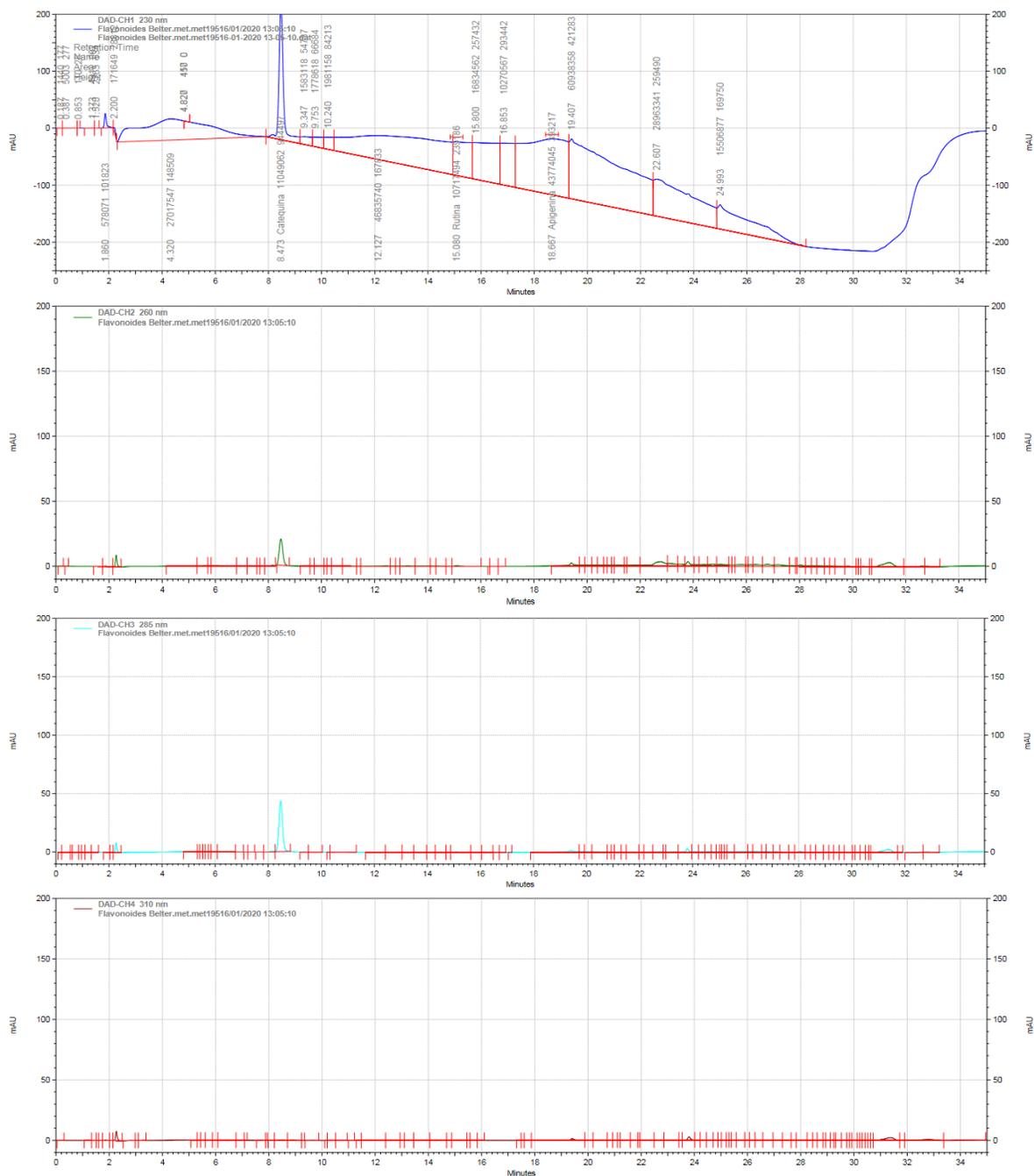


Figura 48. Cromatogramas del estándar de catequina (TR: 8.47) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

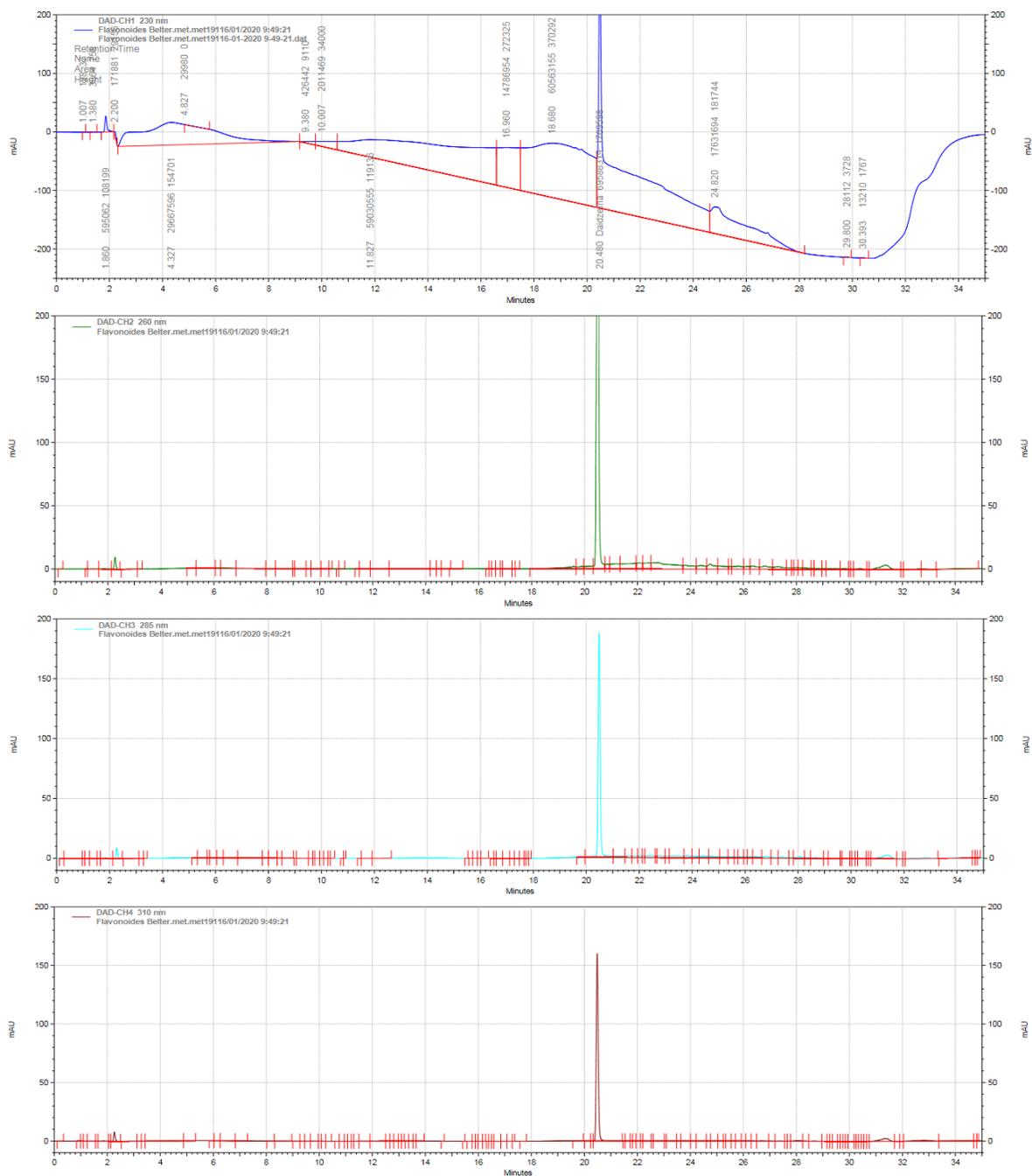


Figura 49. Cromatogramas del estándar de daidzeína (TR: 20.48) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

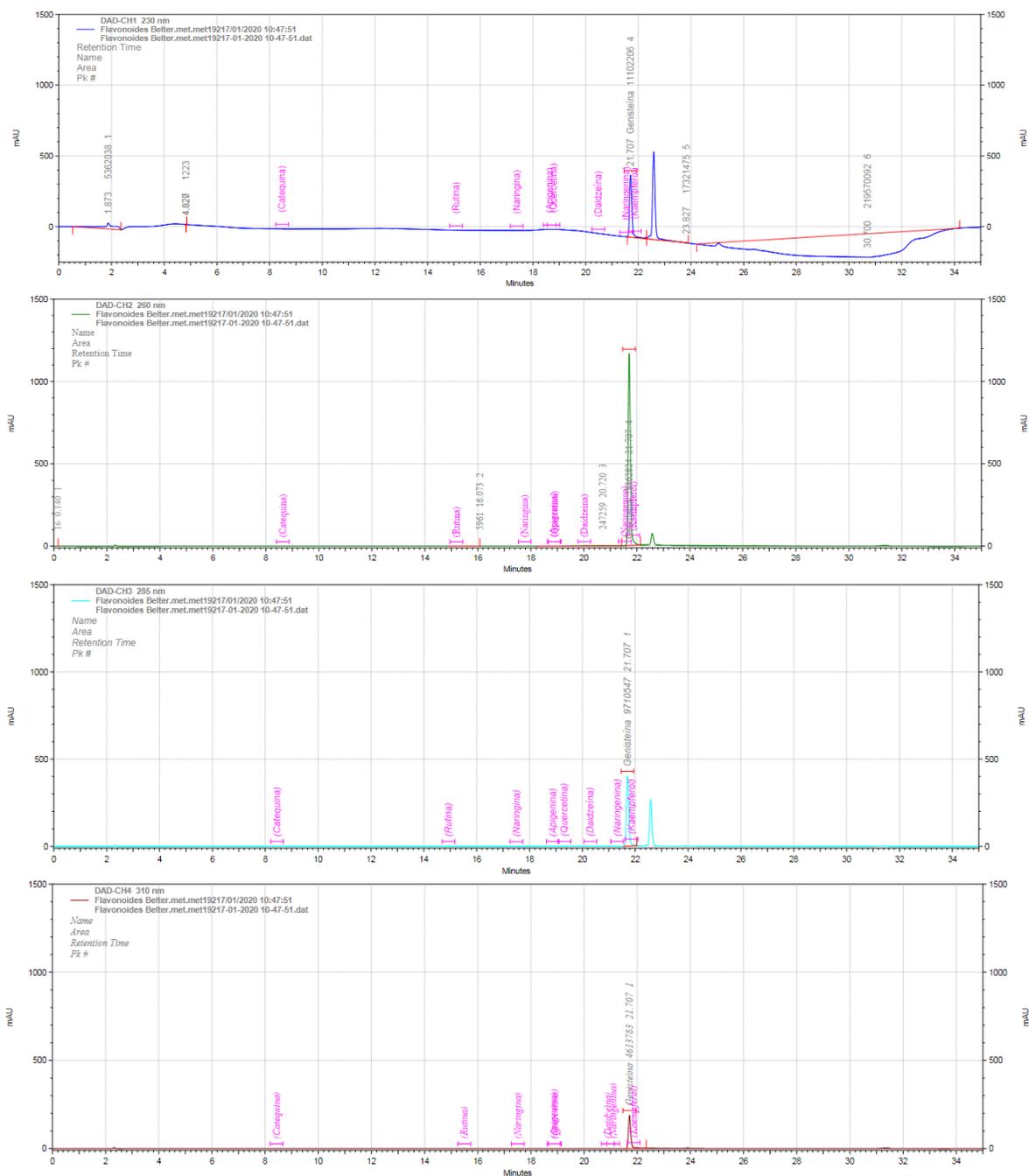


Figura 50. Cromatogramas del estándar de genisteína (TR: 21.71) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

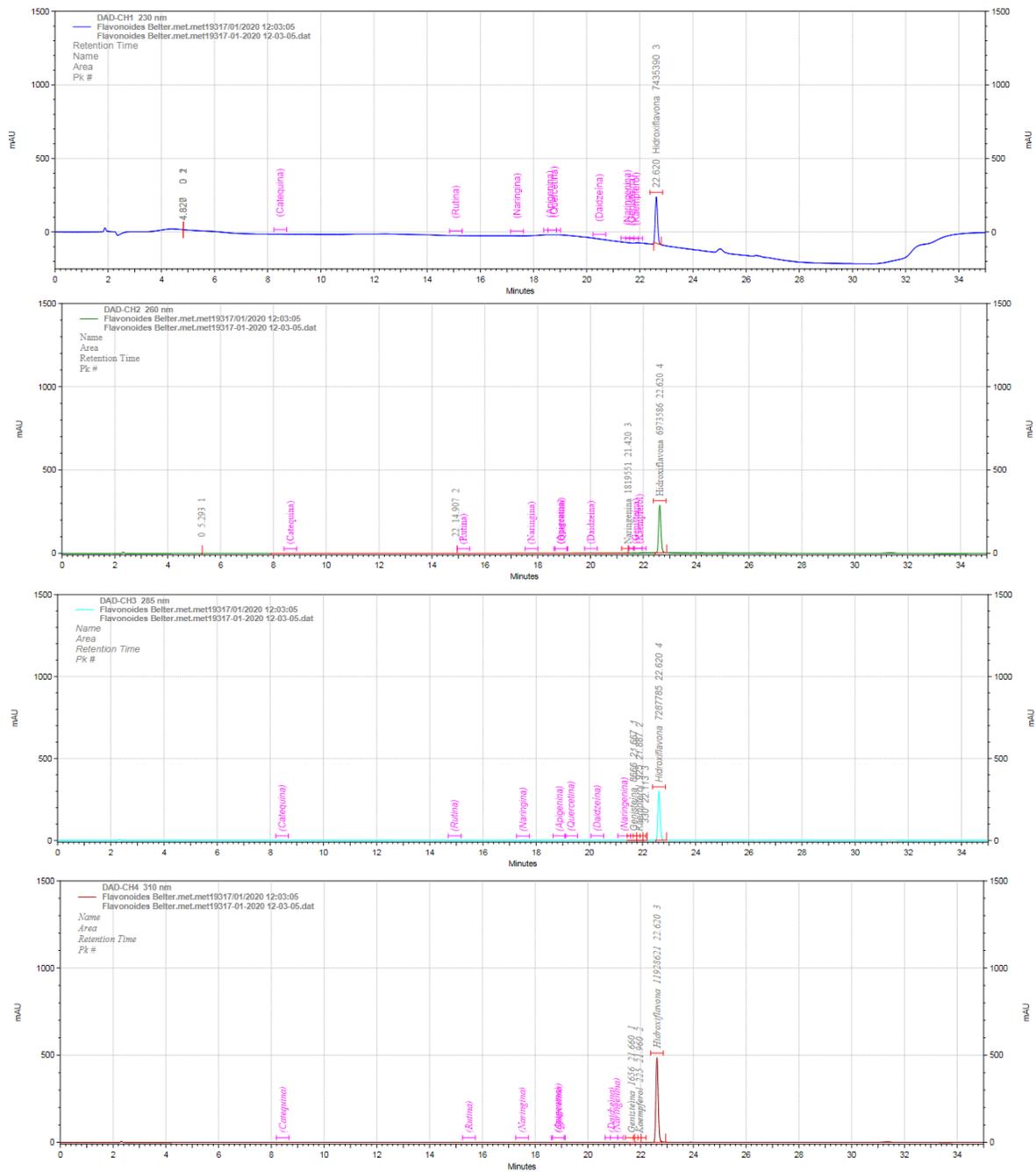


Figura 51. Cromatogramas del estándar de Hidroxiflavona (TR: 22.62) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

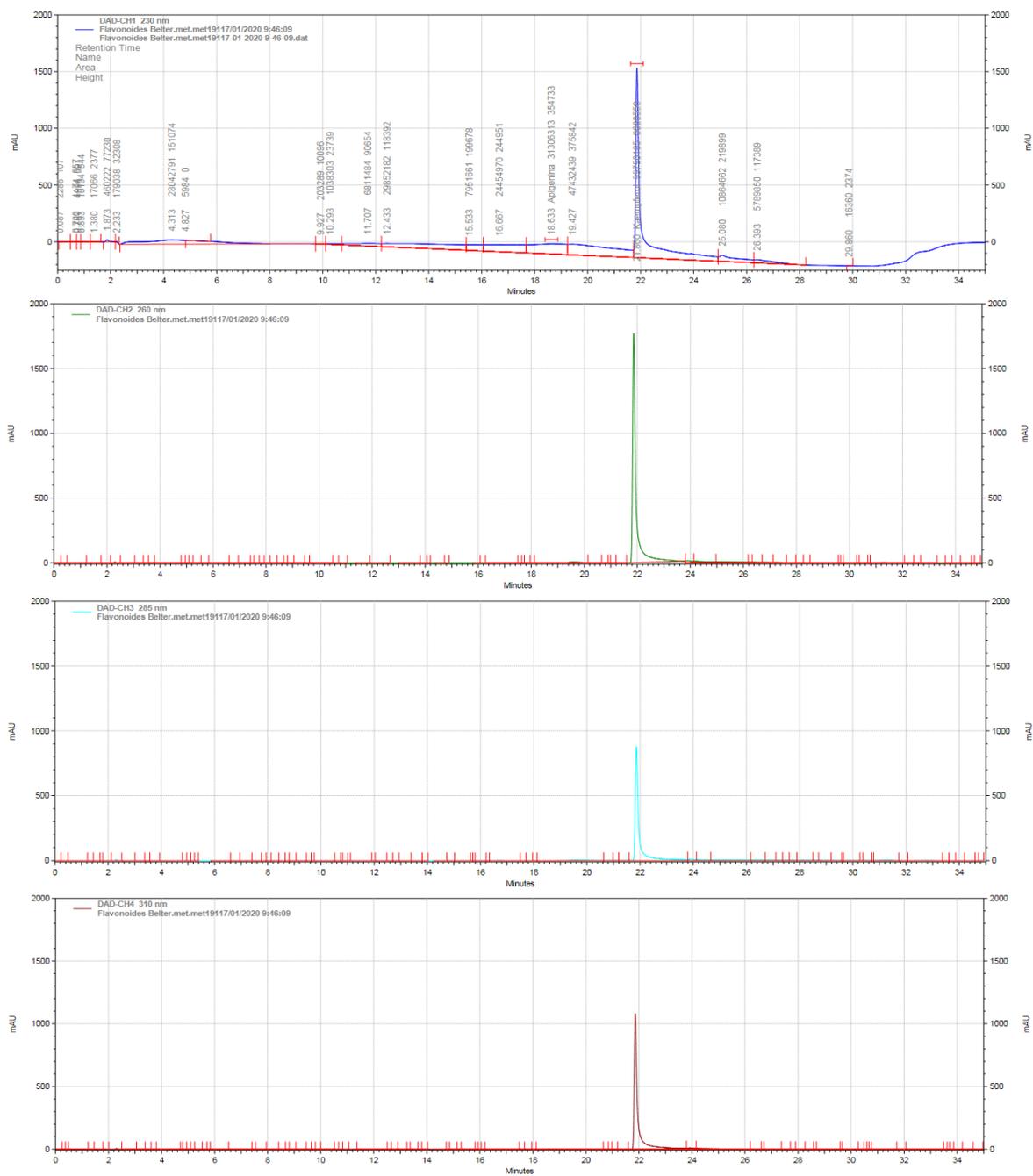


Figura 52. Cromatogramas del estándar de Kaempferol (TR: 21.86) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.98 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

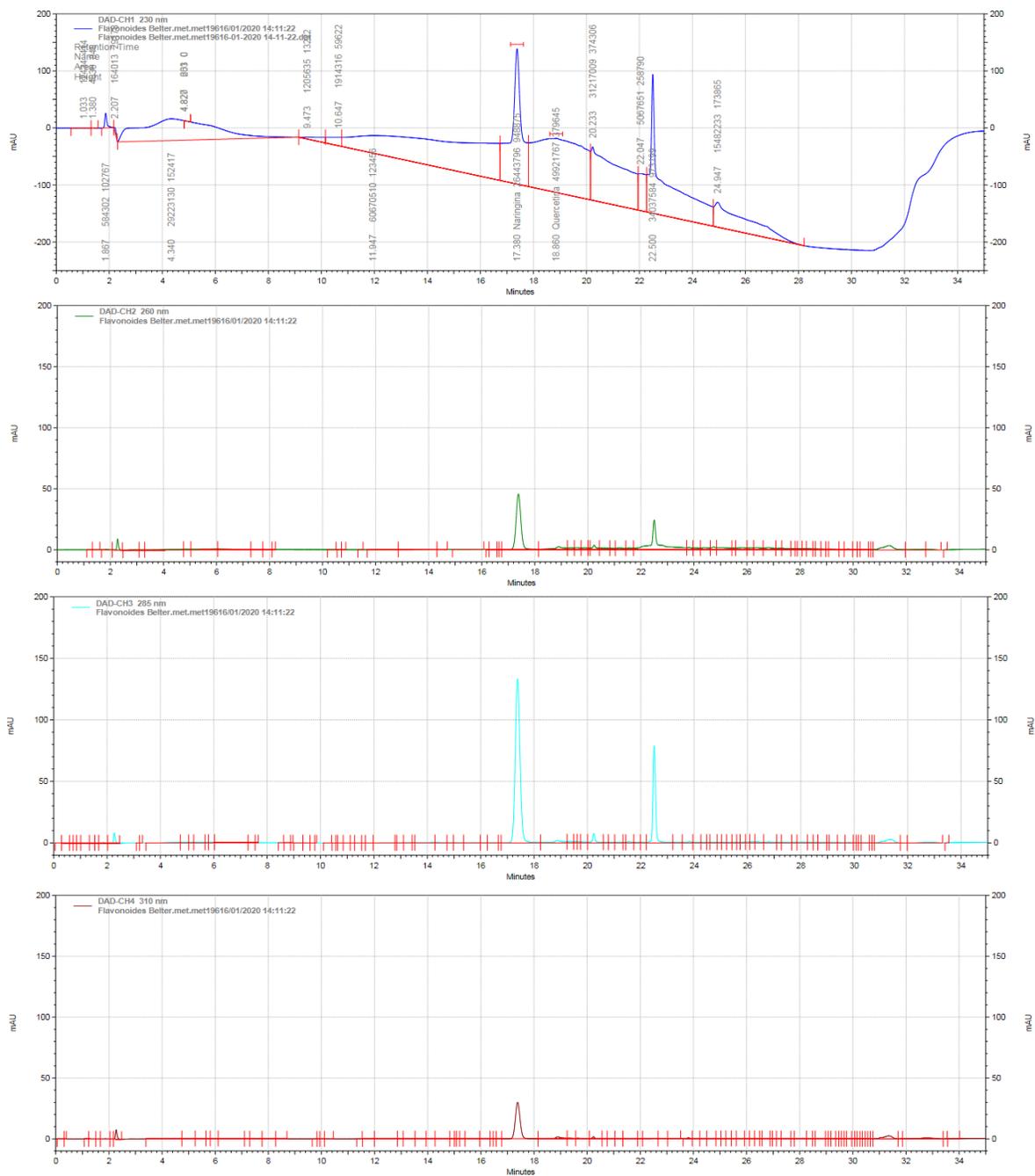


Figura 53. Cromatogramas del estándar de Naringina (TR: 17.38) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

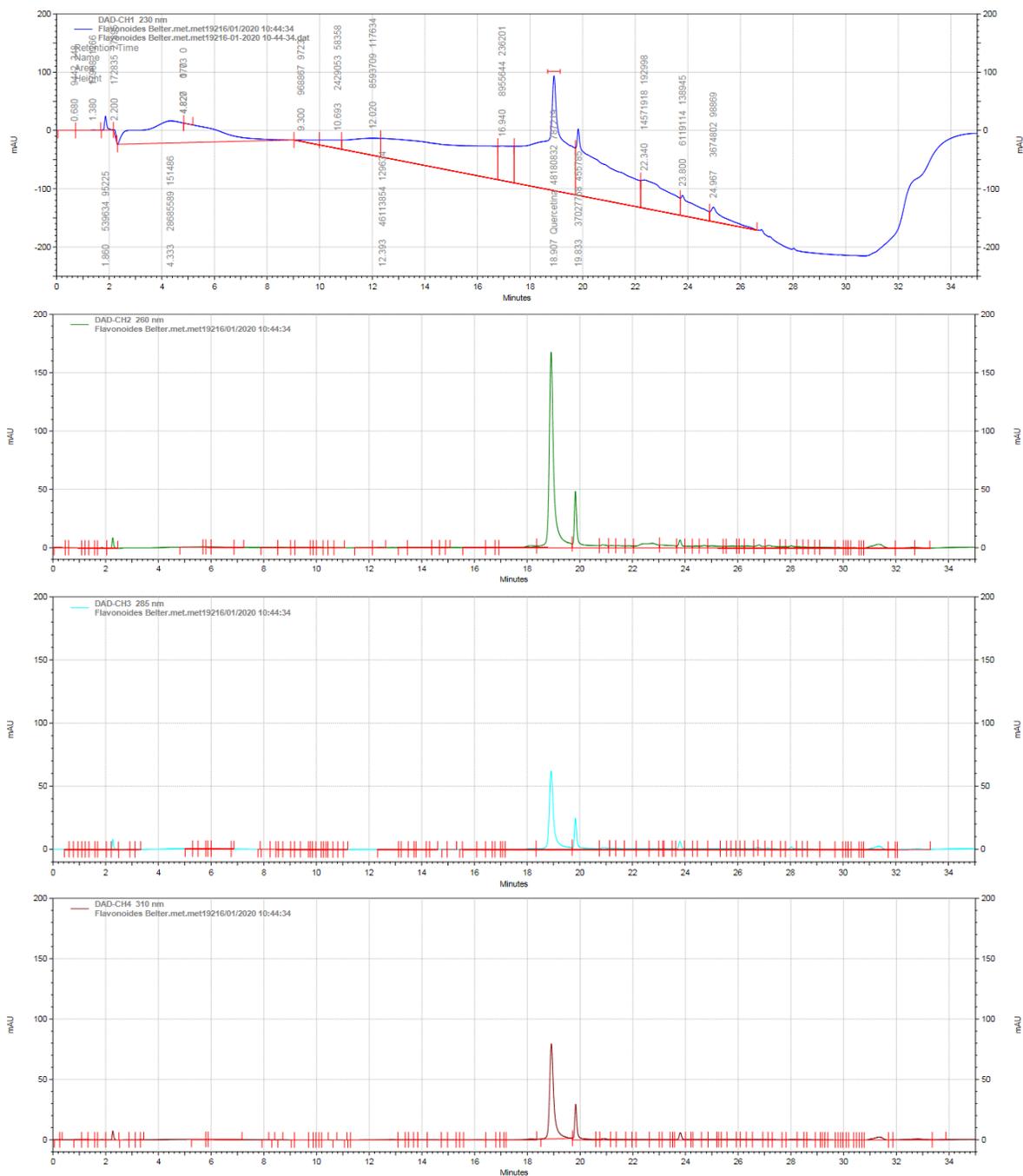


Figura 54. Cromatogramas del estándar de Quercetina (TR: 18.91) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.1 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

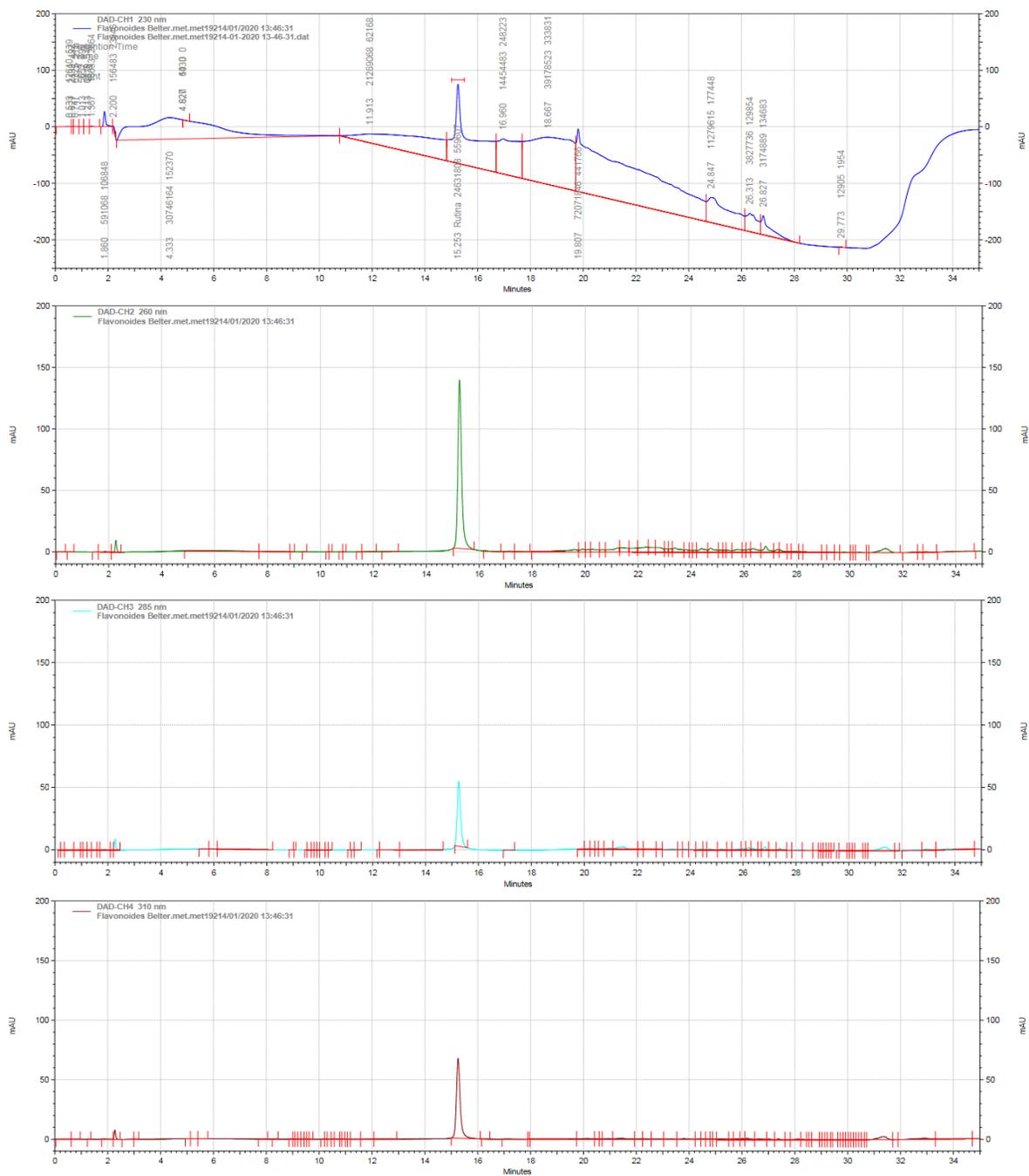


Figura 55. Cromatogramas del estándar de Rutina (TR: 15.26) en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm obtenidos en HPLC-DAD a una concentración de 0.0904 mg/mL. Fuente: Datos experimentales.

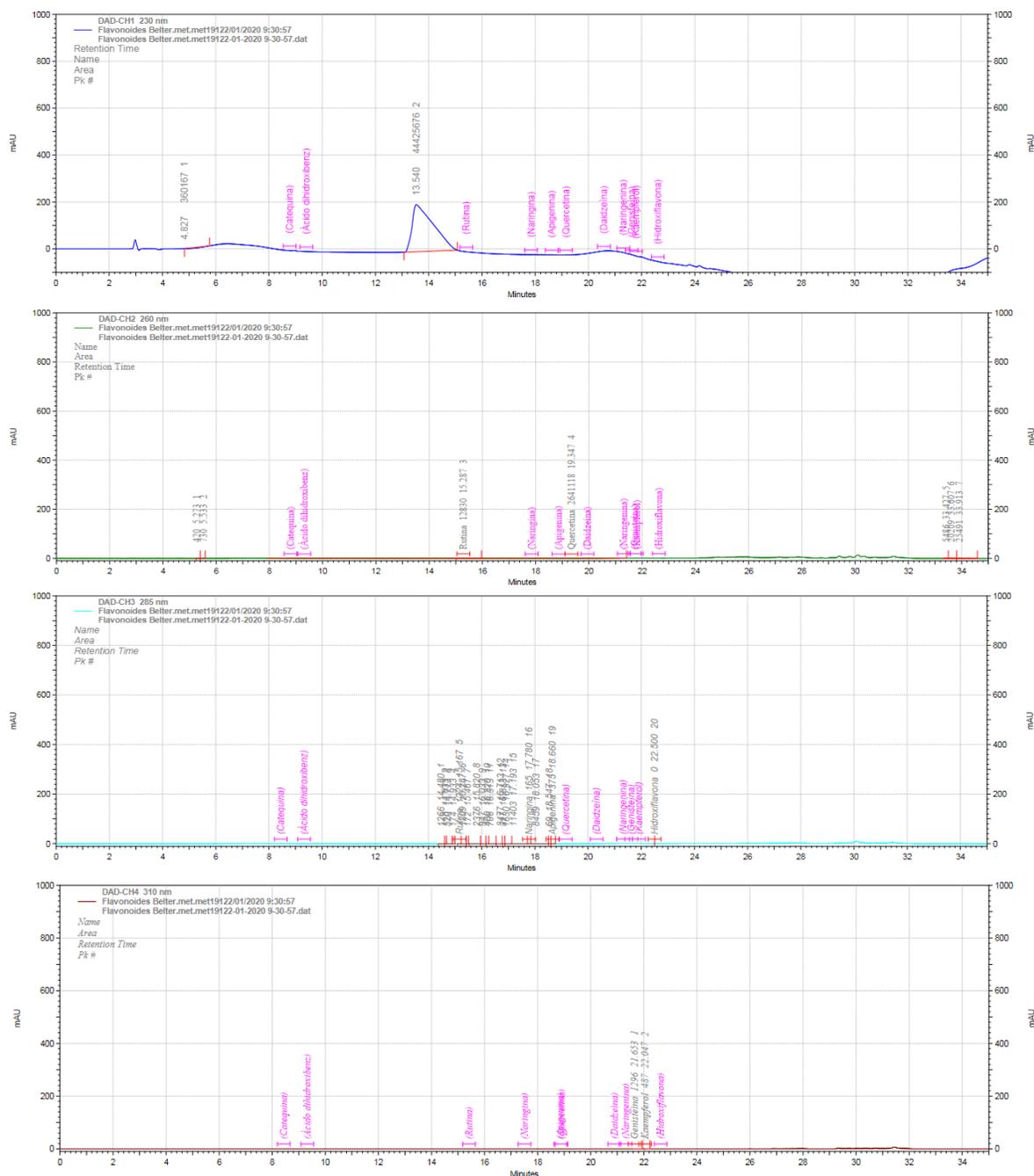


Figura 56. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 01 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

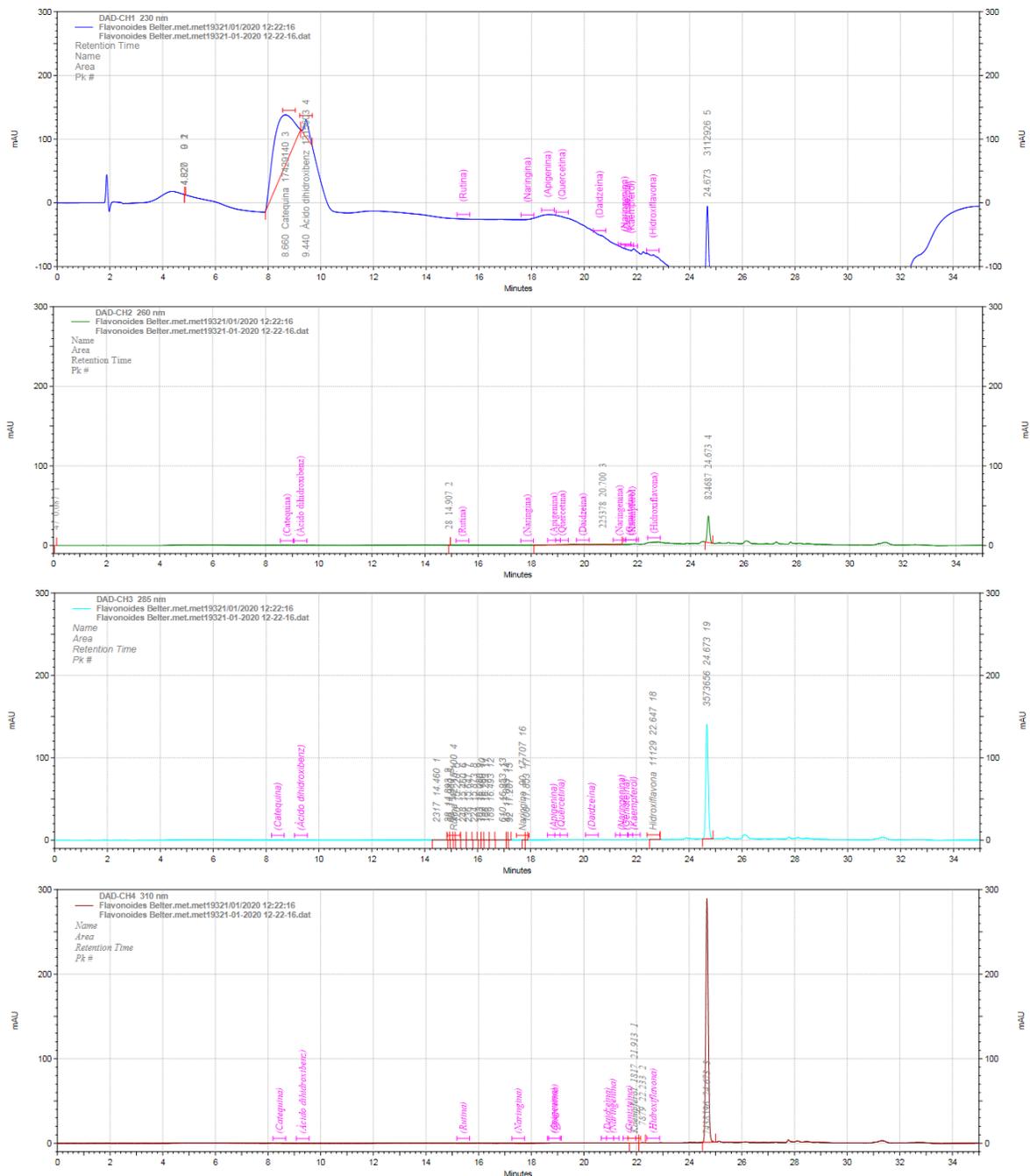


Figura 57. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 03 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

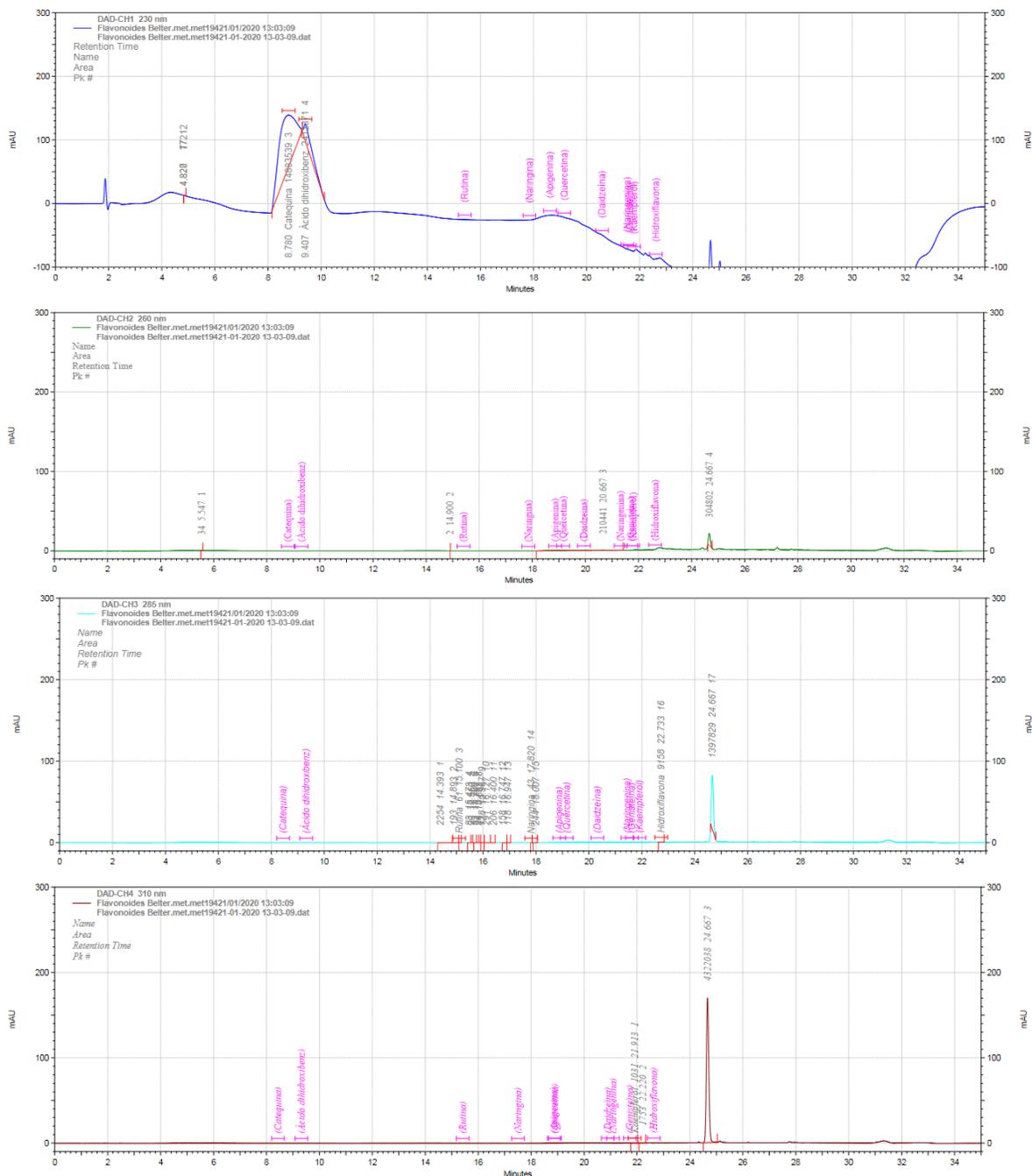


Figura 58. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 04 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

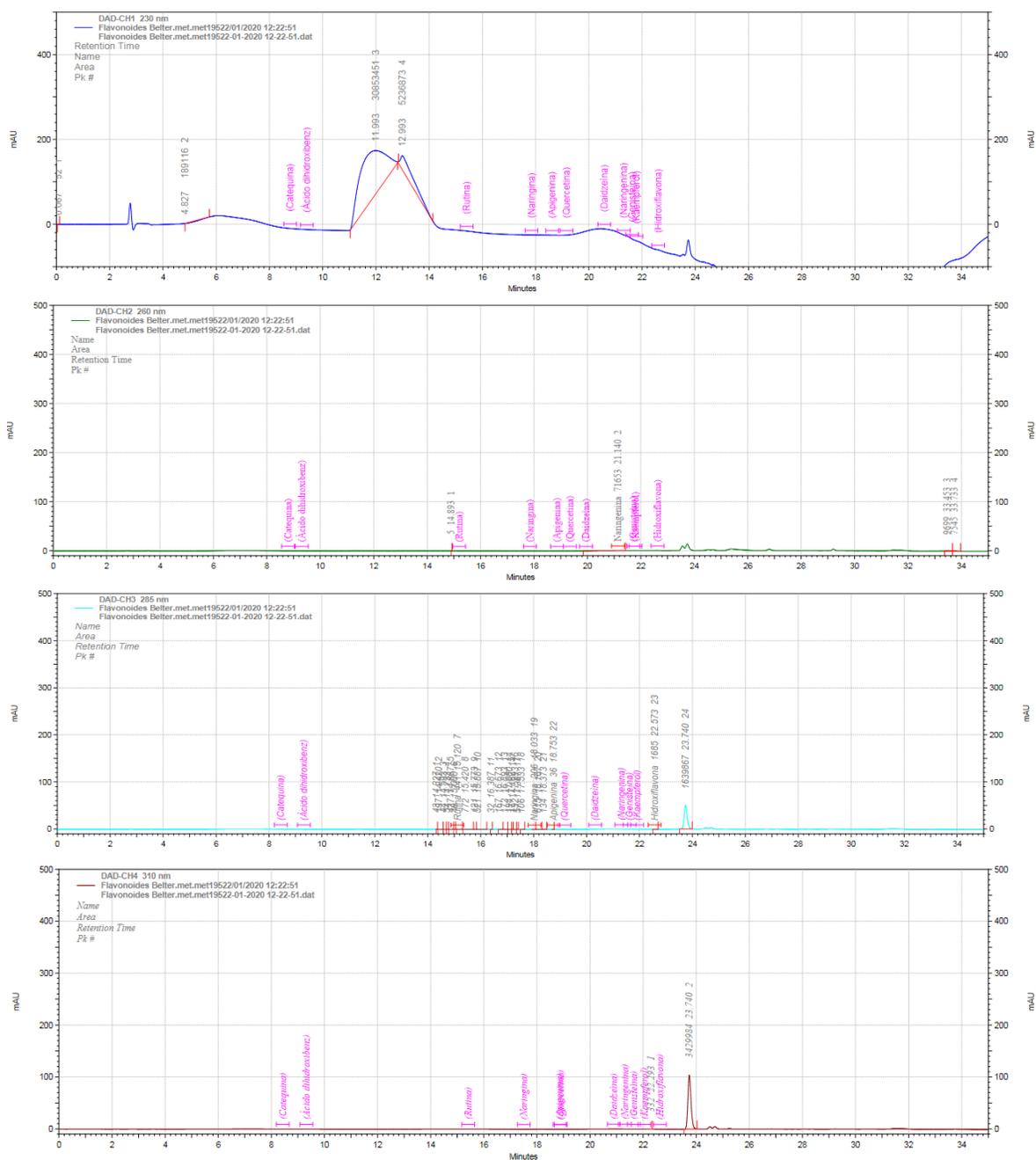


Figura 59. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 07 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

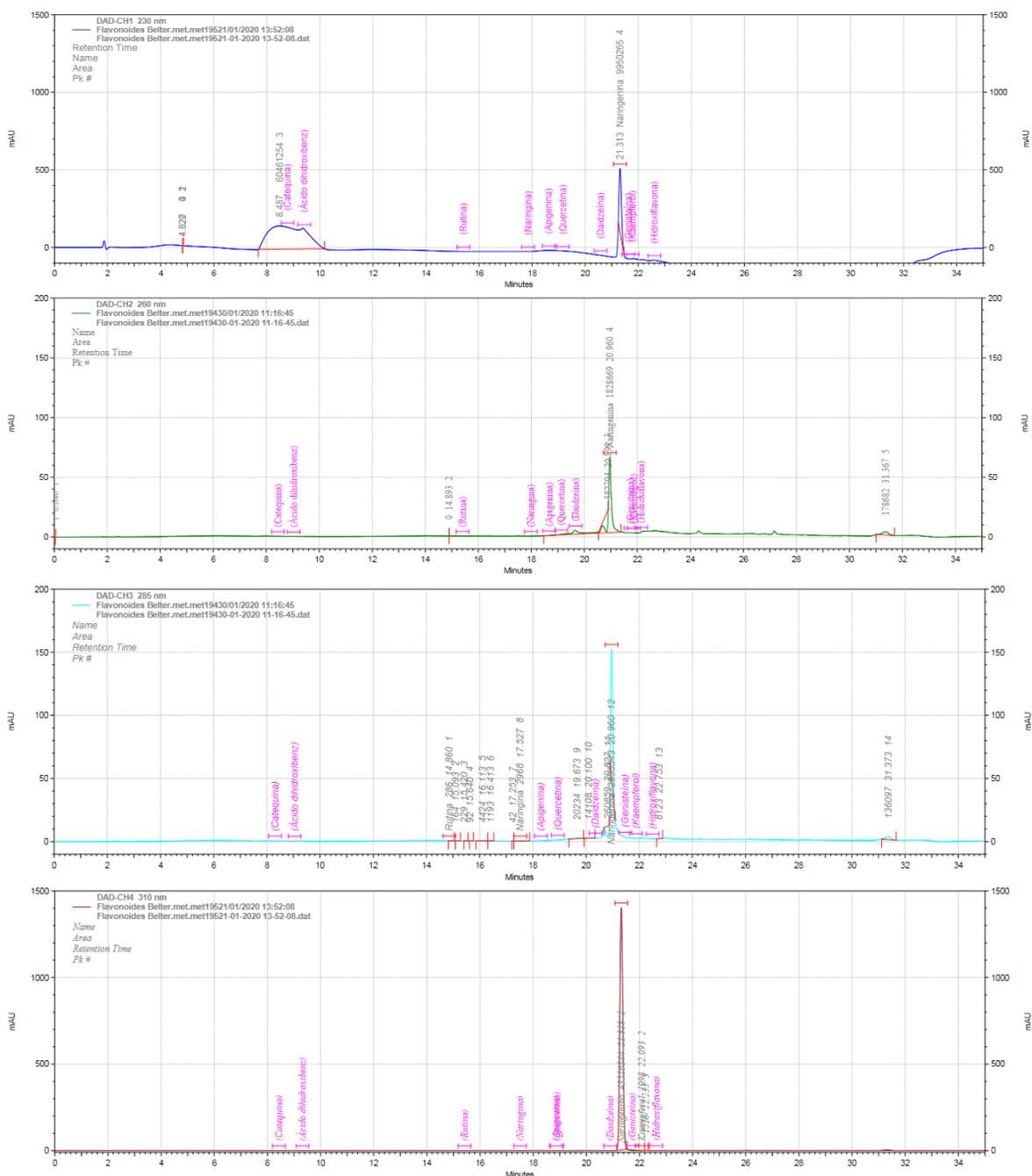


Figura 60. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. Fracción de extracto 08 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

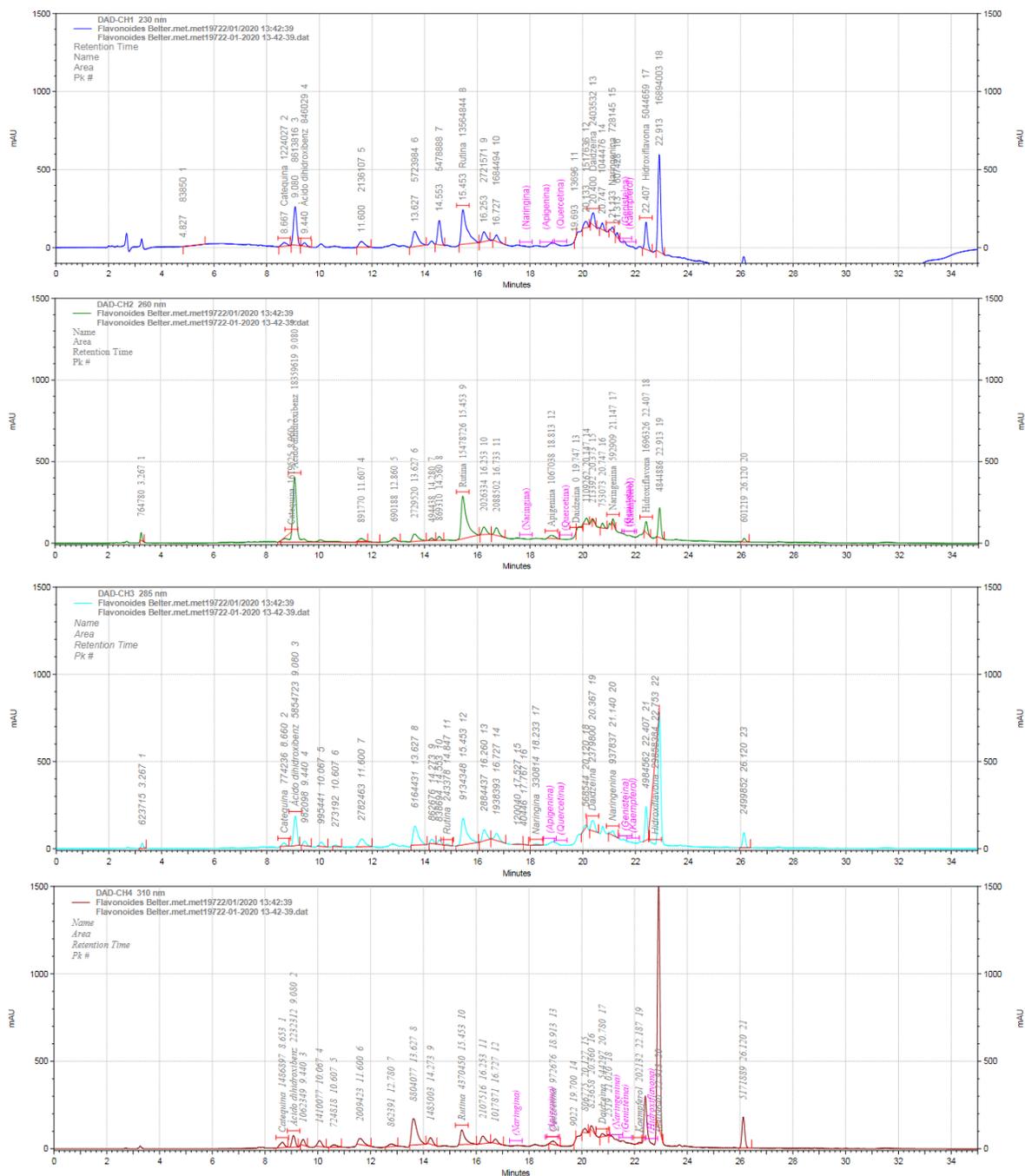


Figura 61. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Sipacapa, San Marcos. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.







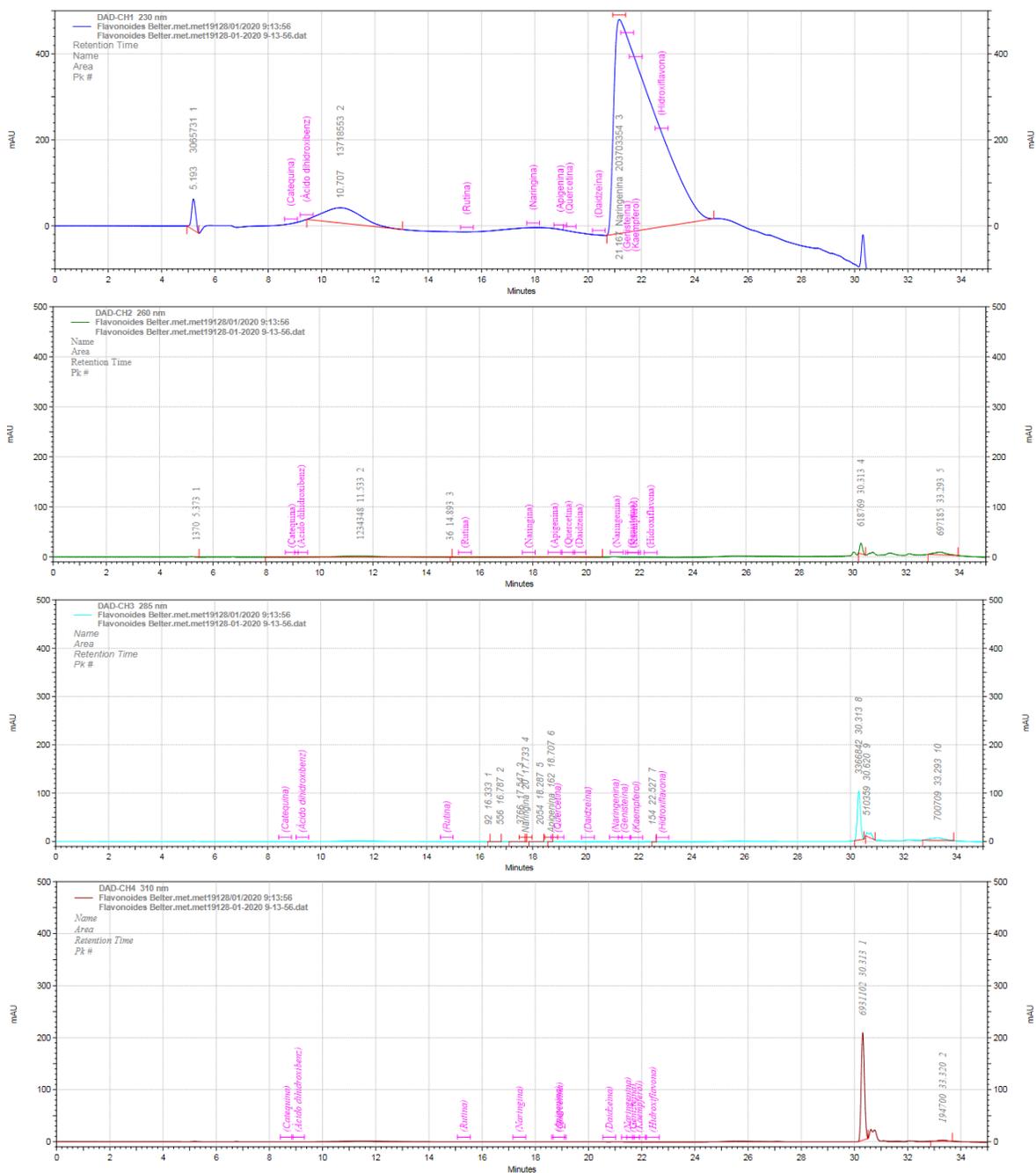


Figura 65. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 05 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimental.



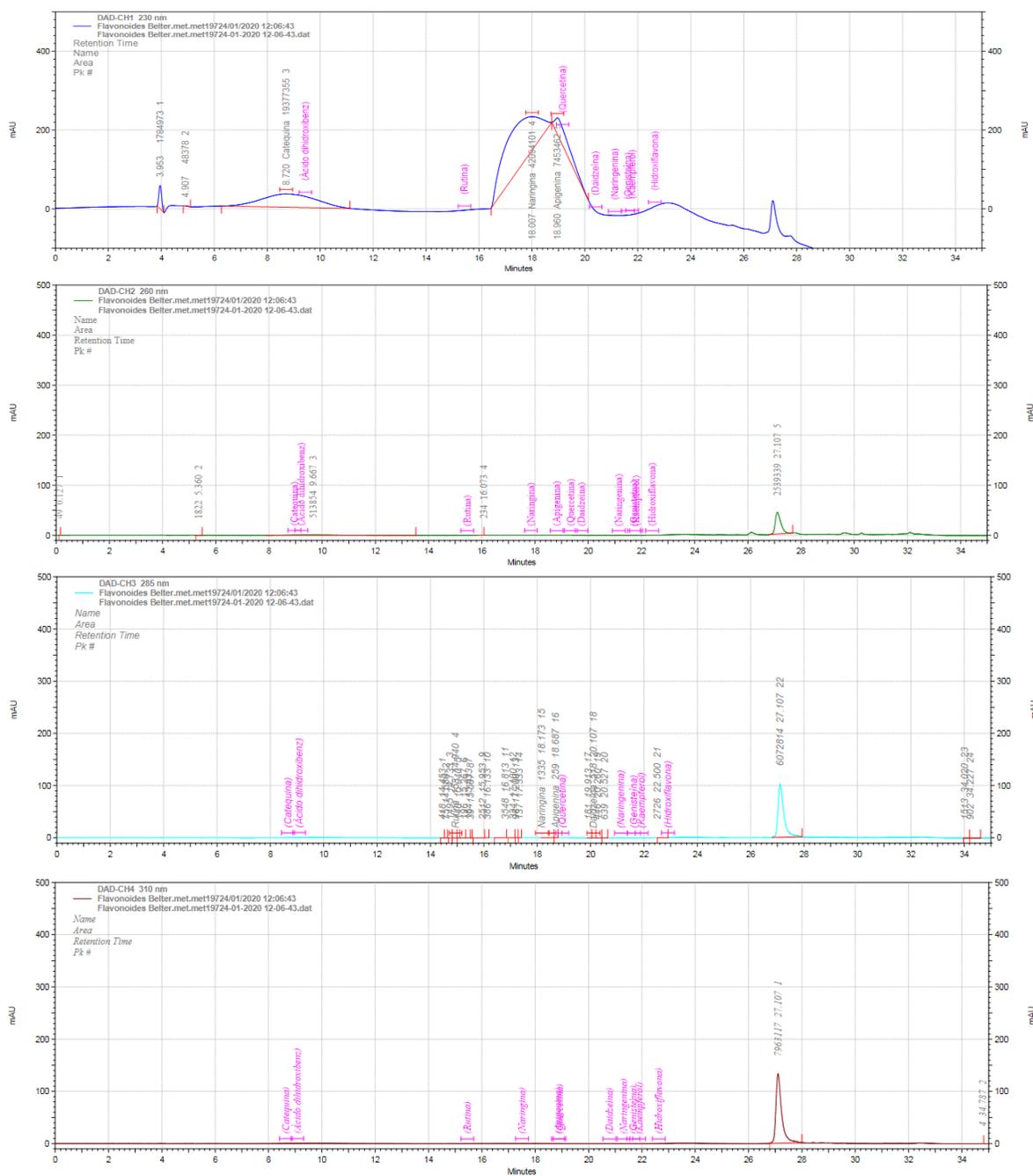


Figura 67. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. Fracción de extracto 07 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.



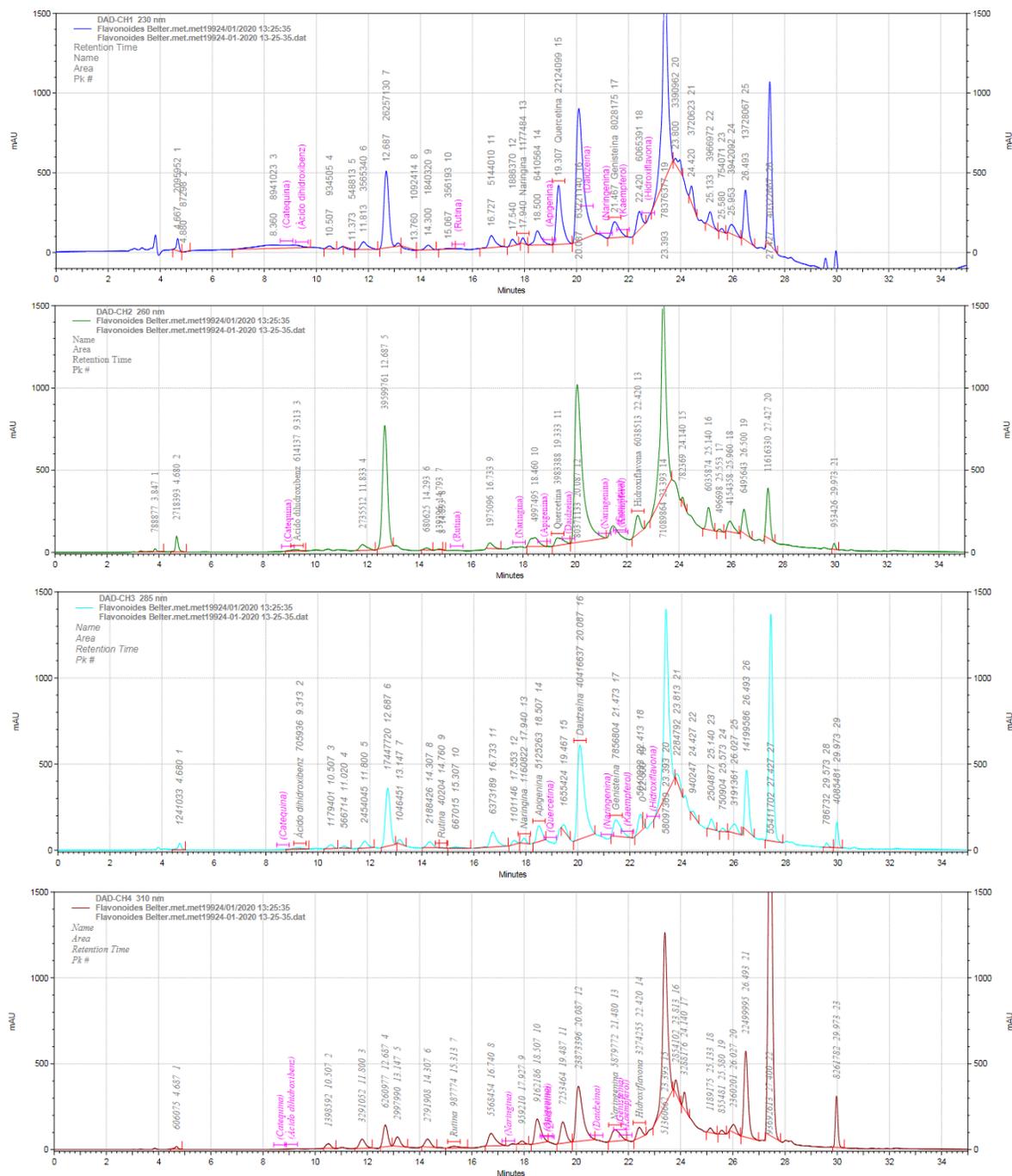


Figura 69. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Cabricán, Quetzaltenango. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

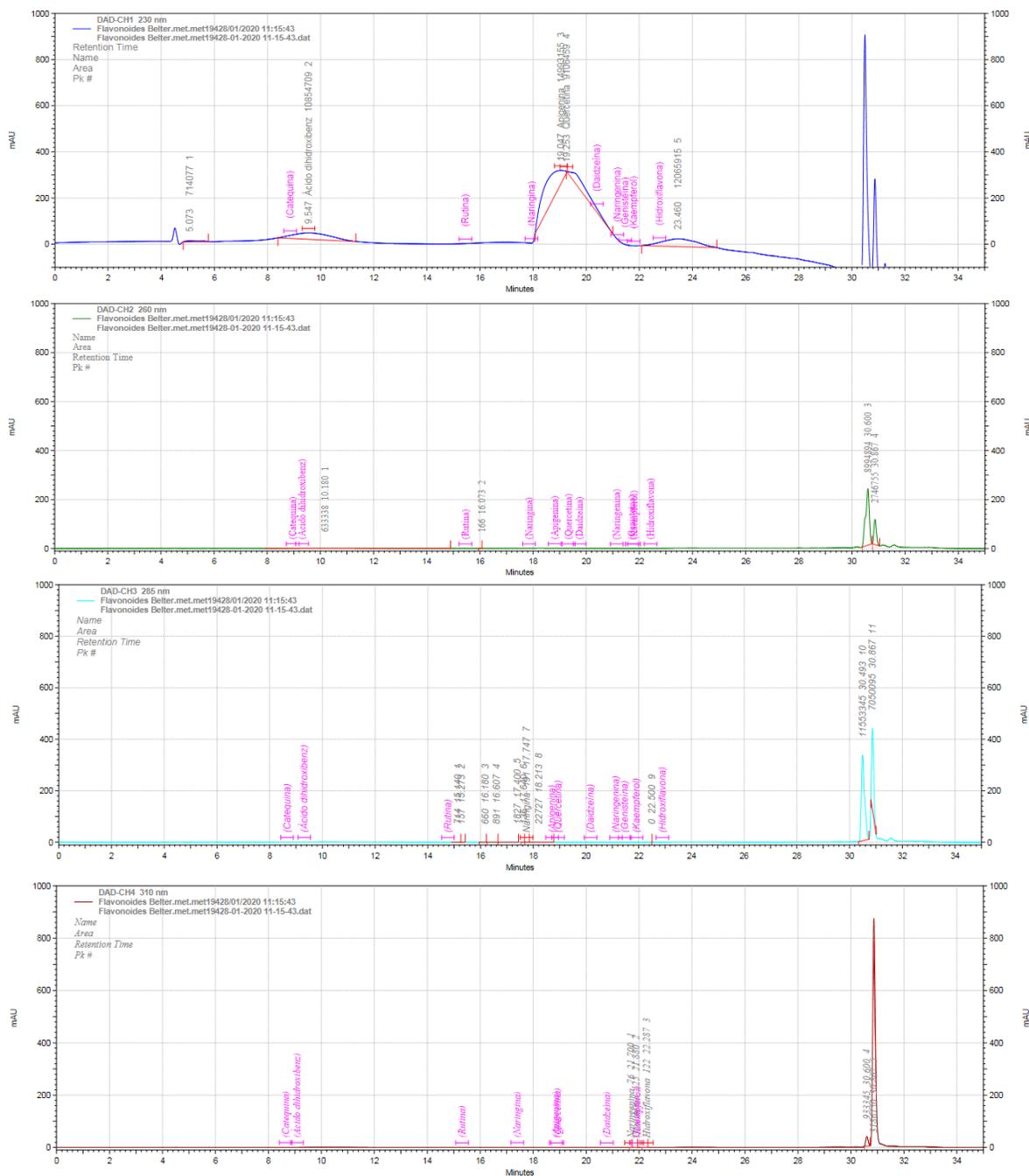


Figura 70. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 02 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

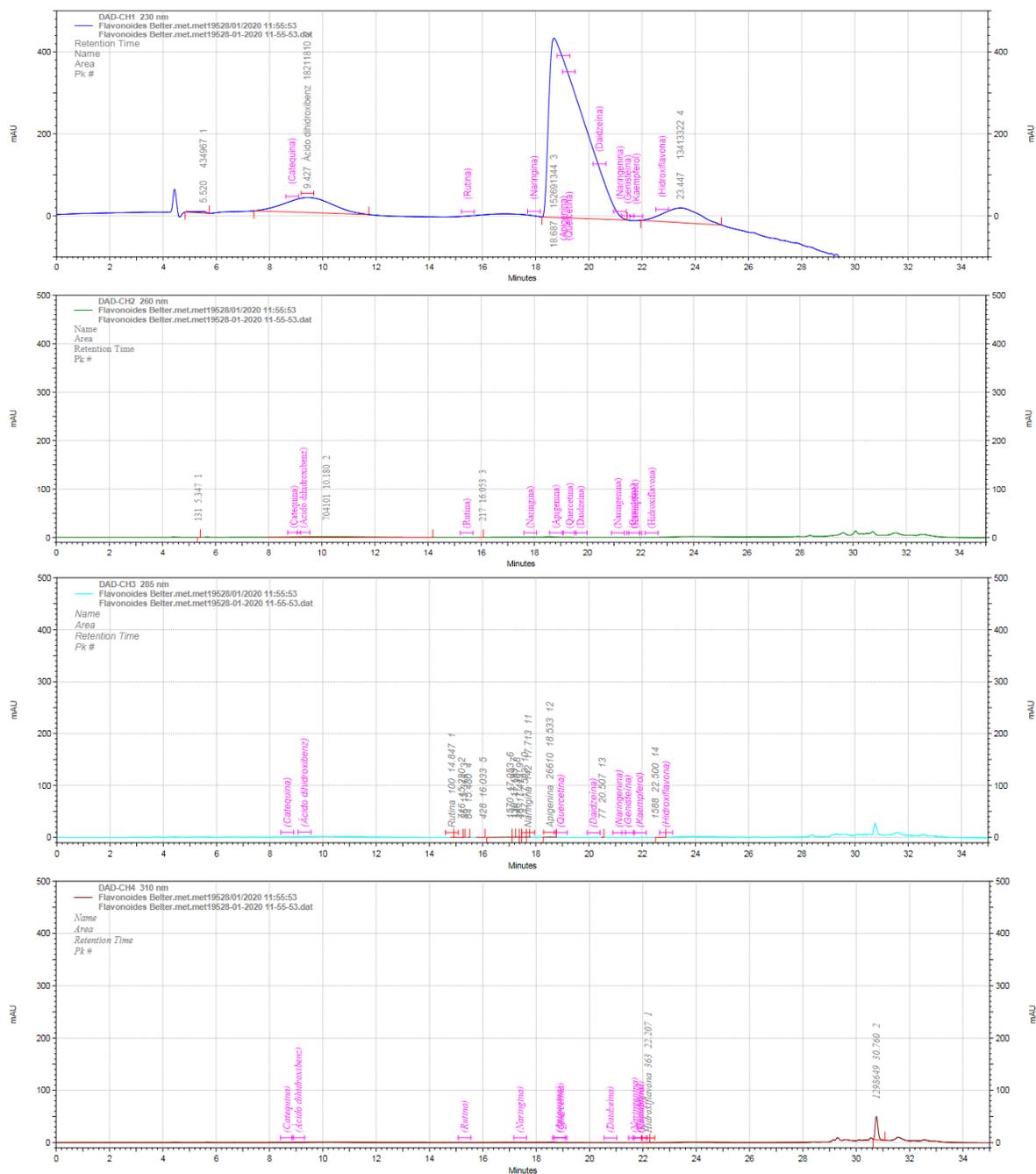


Figura 71. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 03 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

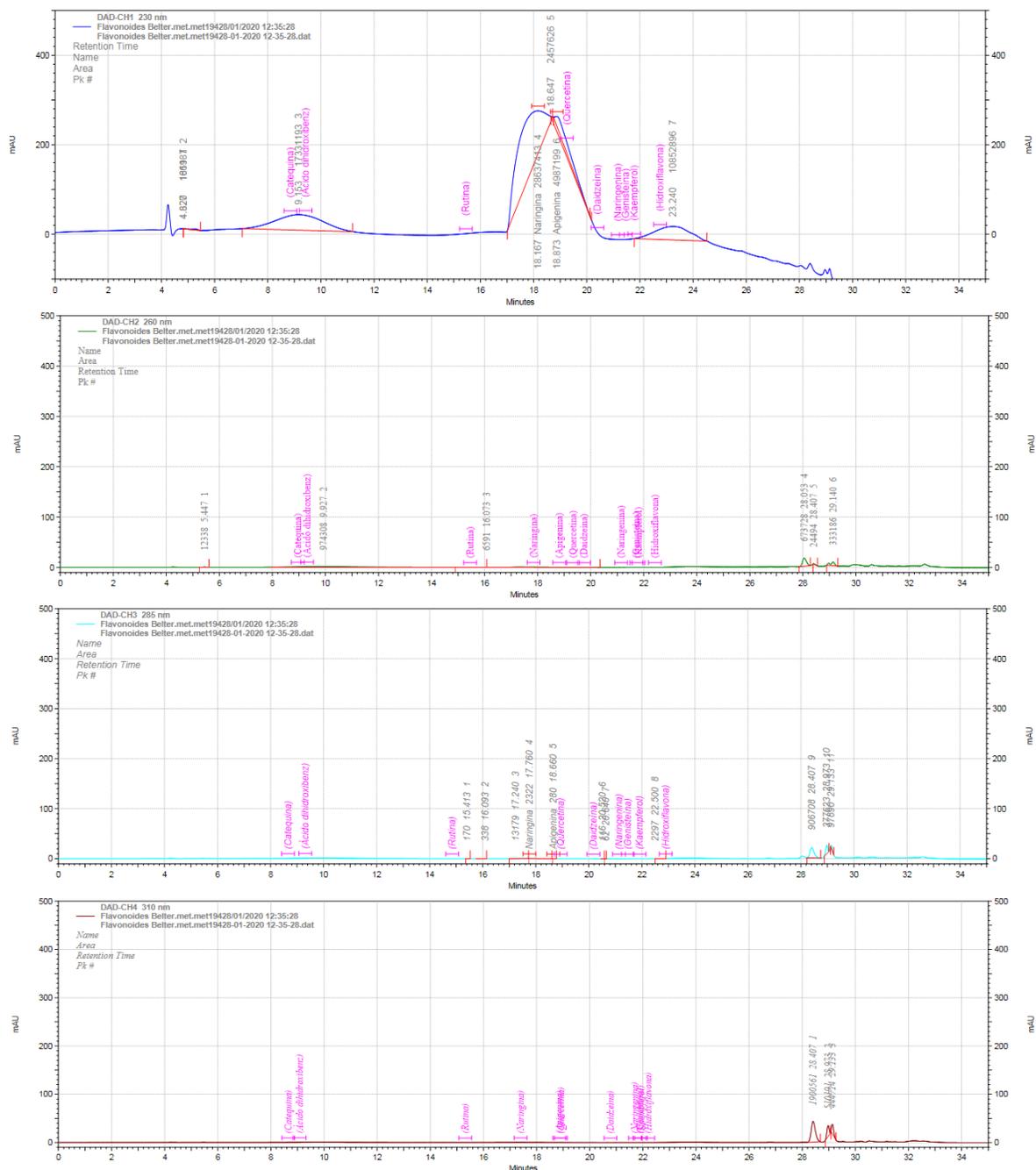


Figura 72. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 04 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

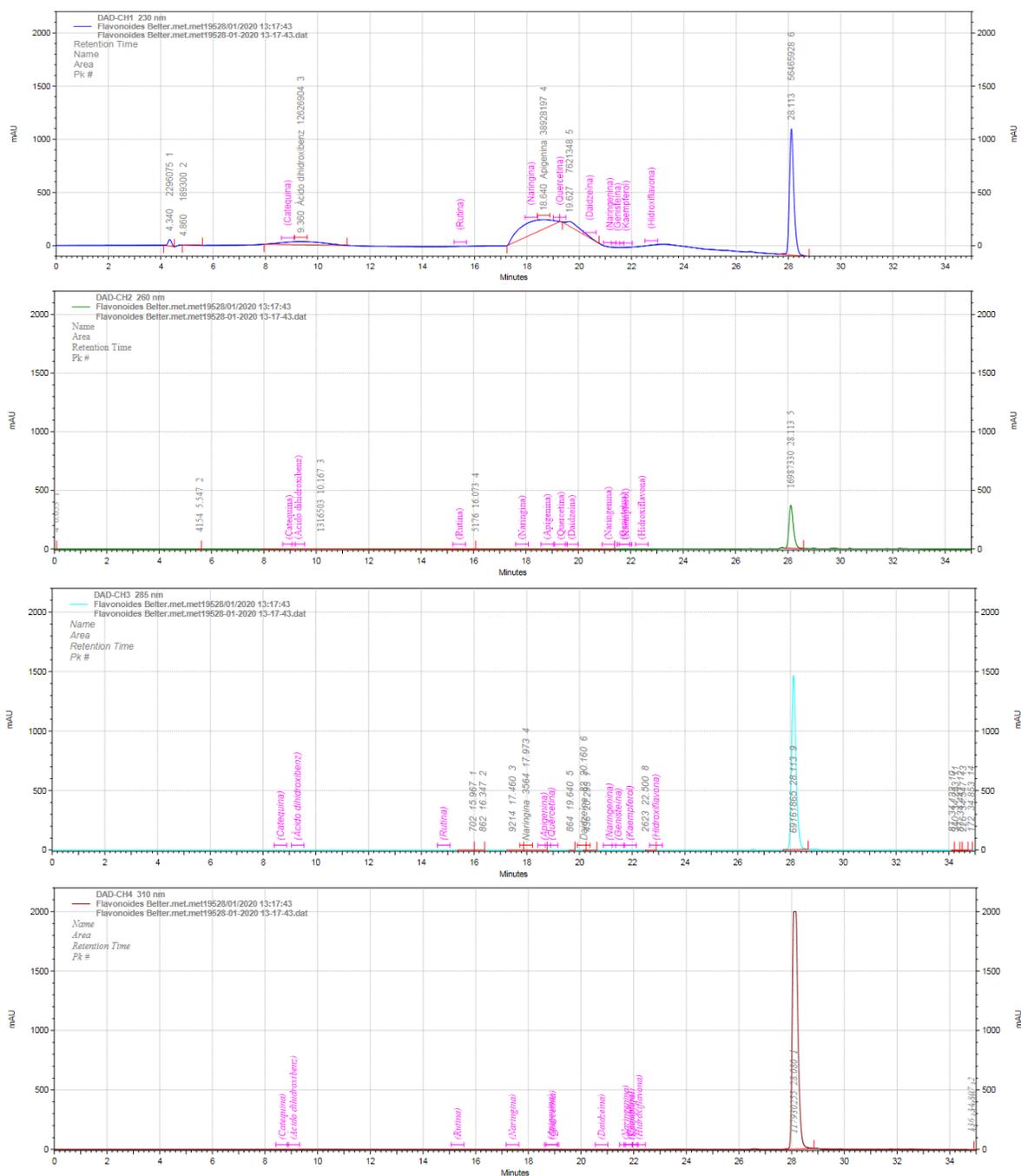


Figura 73. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 05 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

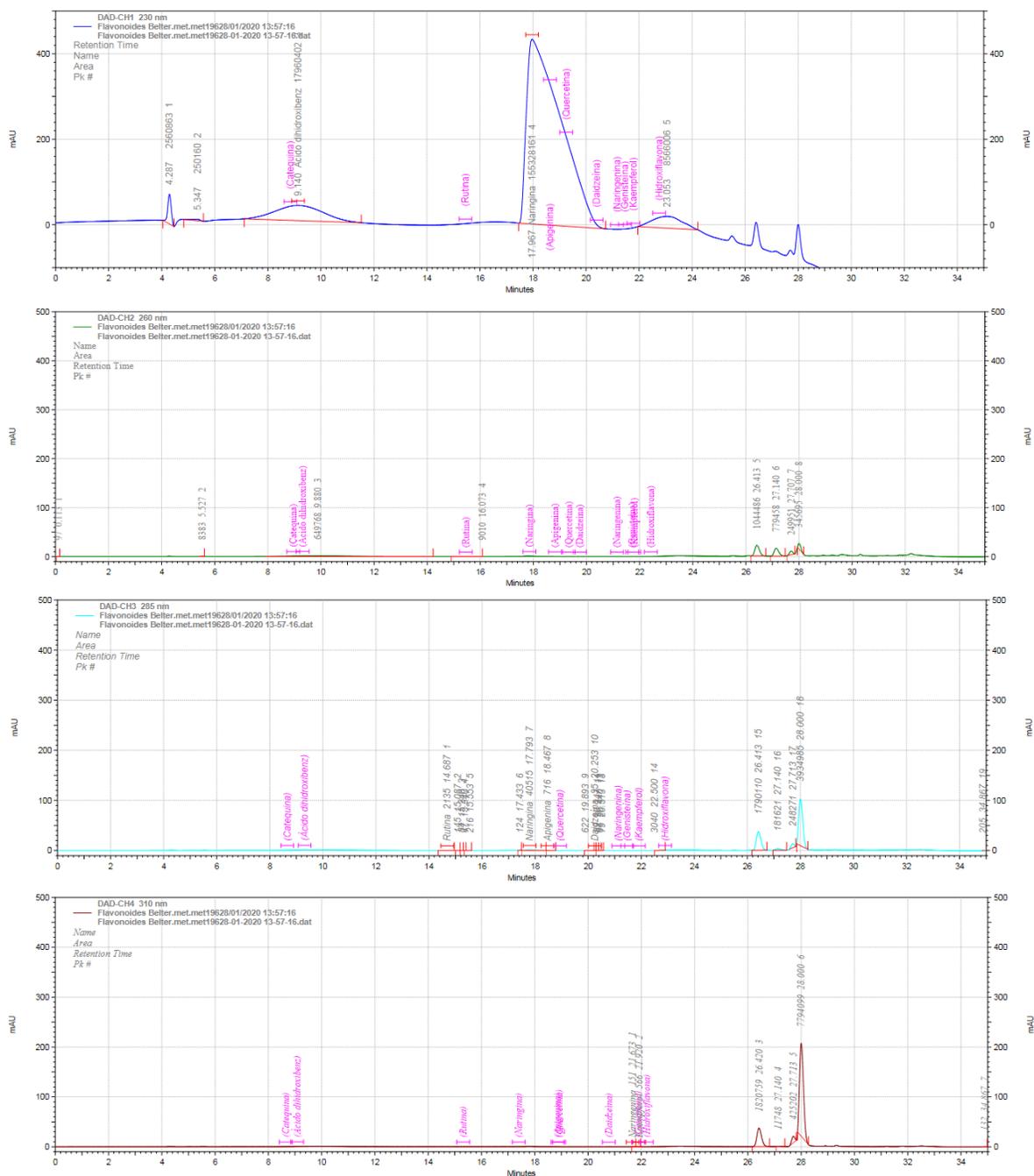


Figura 74. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 06 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

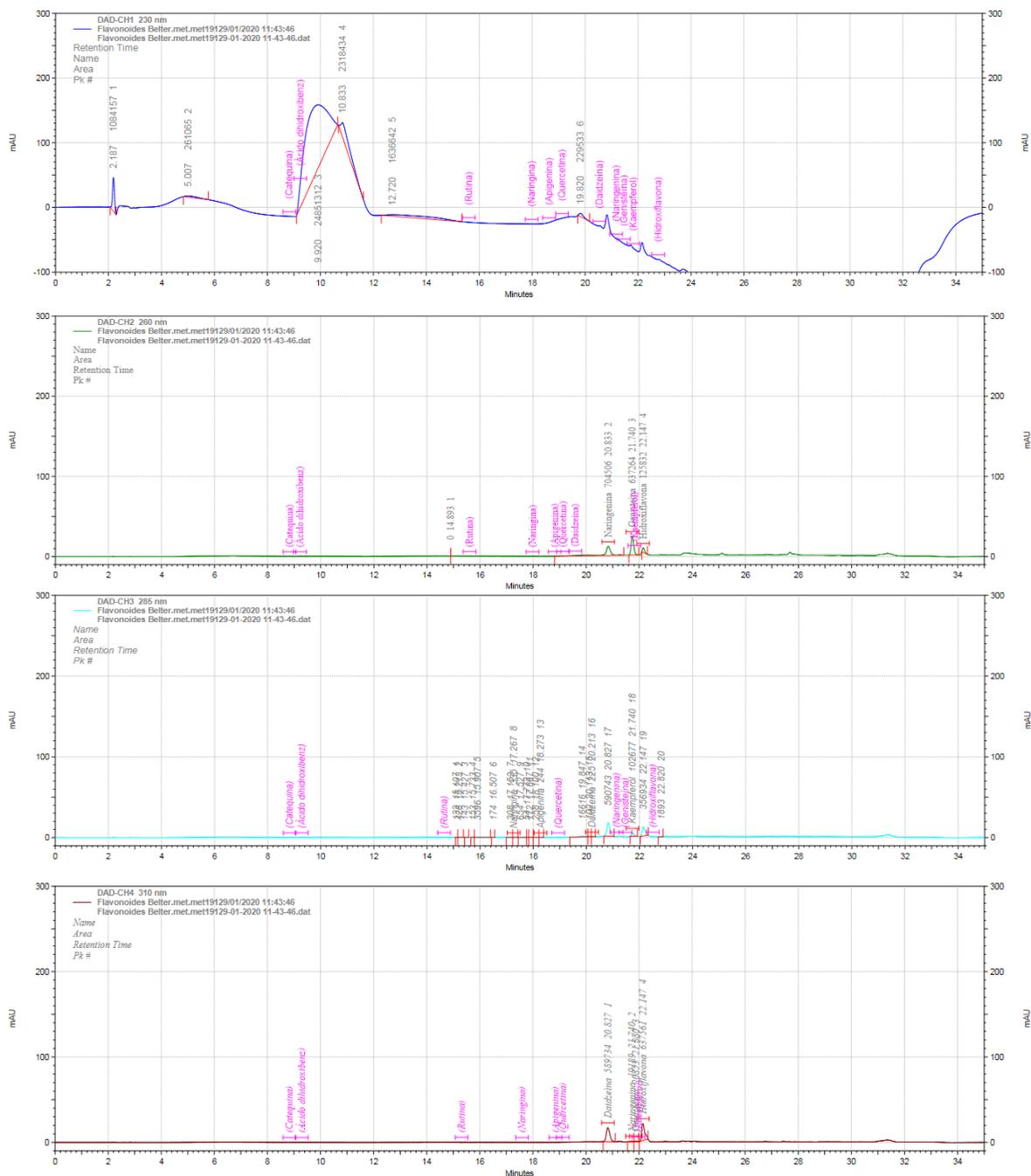


Figura 75. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 07 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

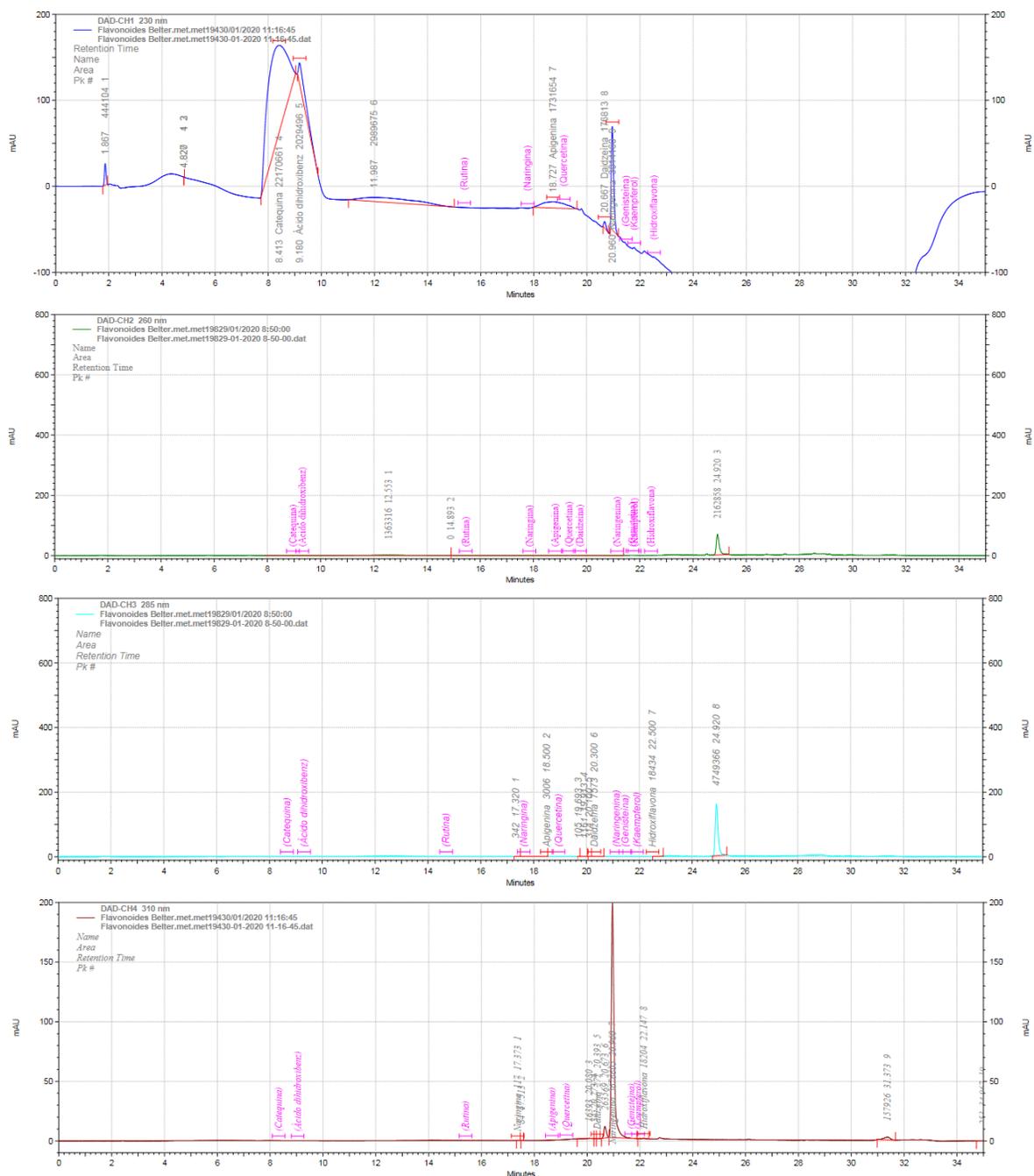


Figura 76. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 08 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

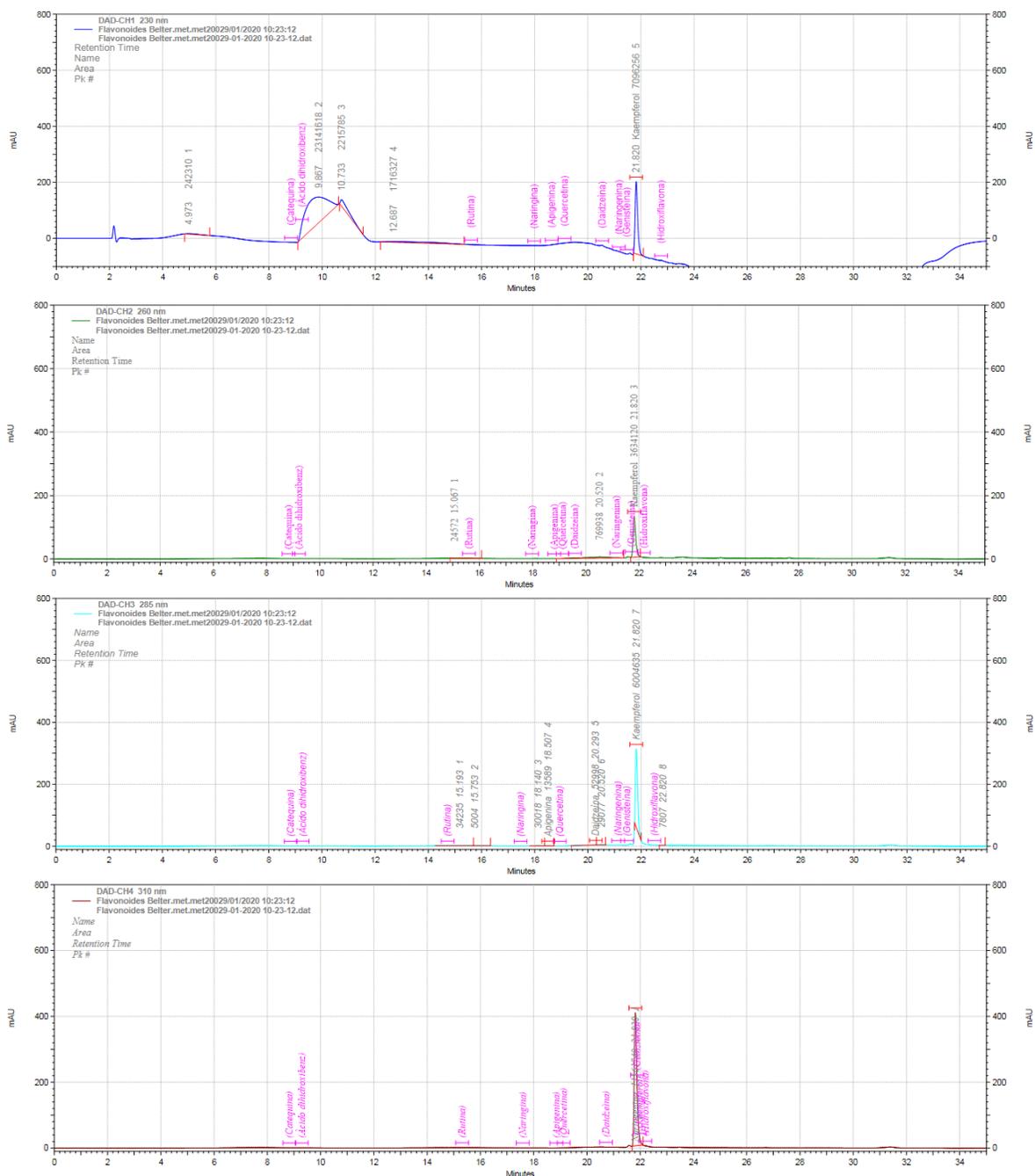


Figura 77. Cromatogramas de la muestra de *Tagetes lucida* Cav. proveniente de Joyabaj, Quiché. Fracción de extracto 09 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.





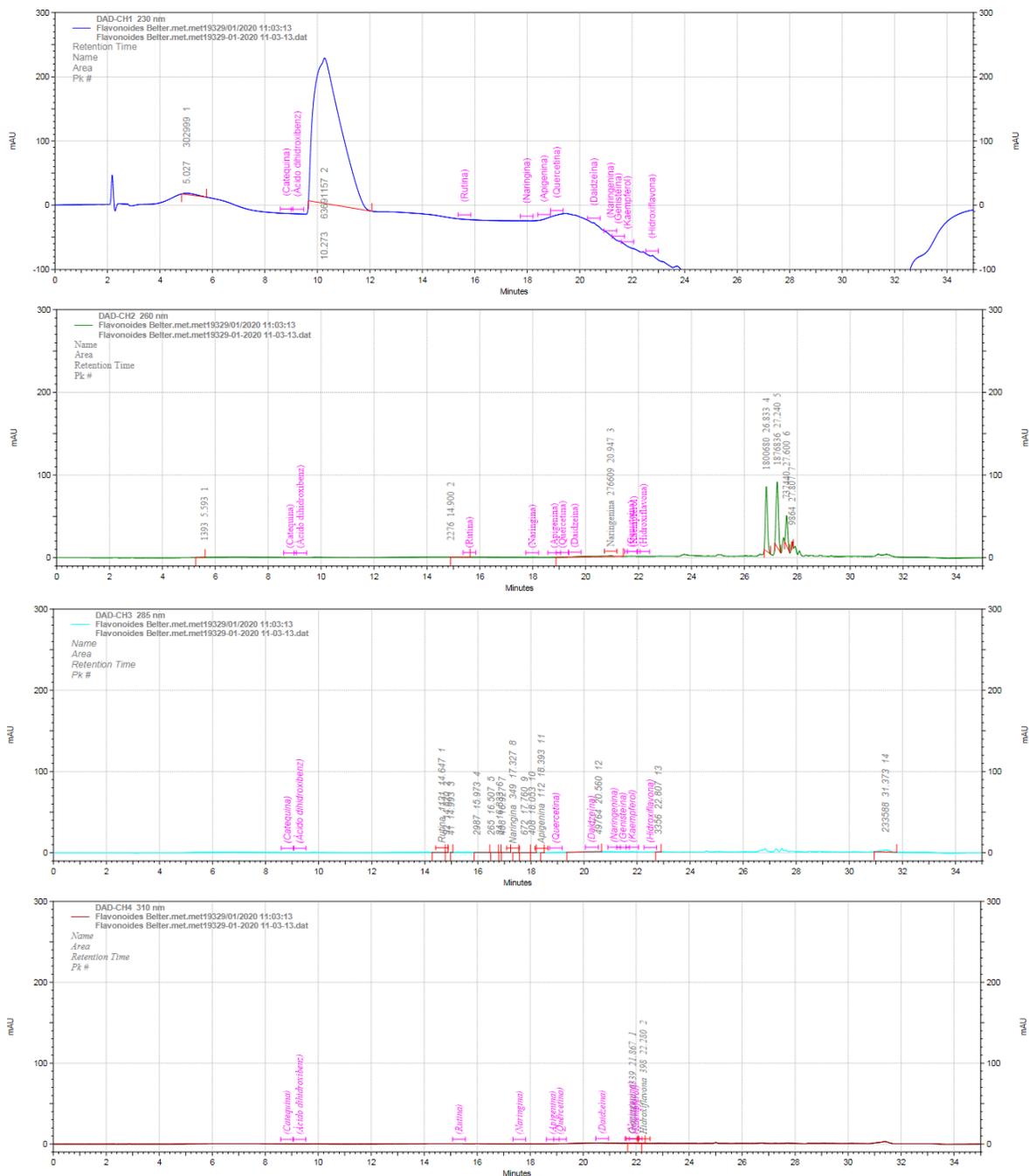


Figura 80. Cromatogramas de la muestra de *Valeriana prionophylla* Standl. procedente de Patzún, Chimaltenango. Fracción de extracto 01 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.





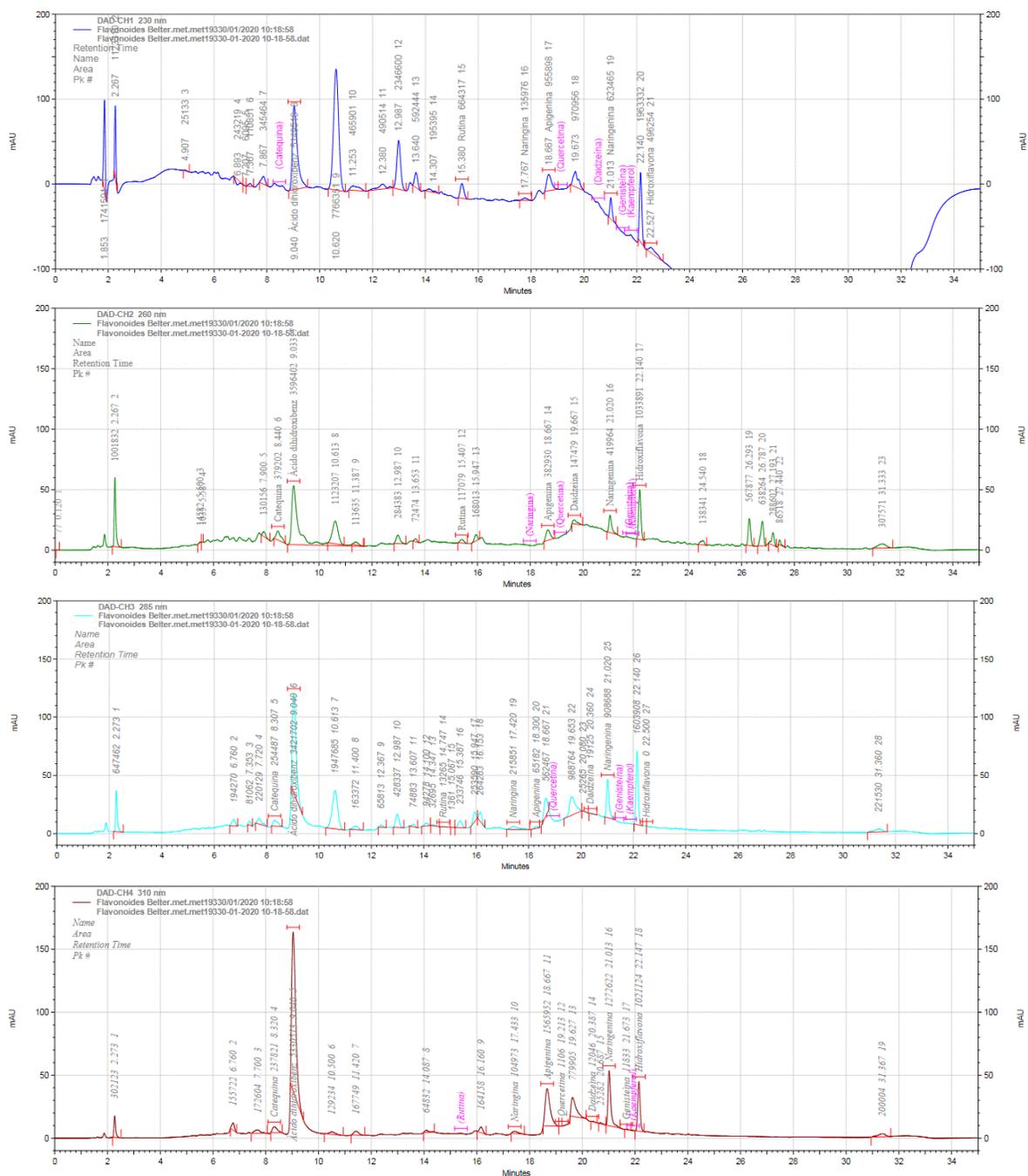


Figura 83. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de *Valeriana prionophylla* Standl. procedente de Patzún, Chimaltenango. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.



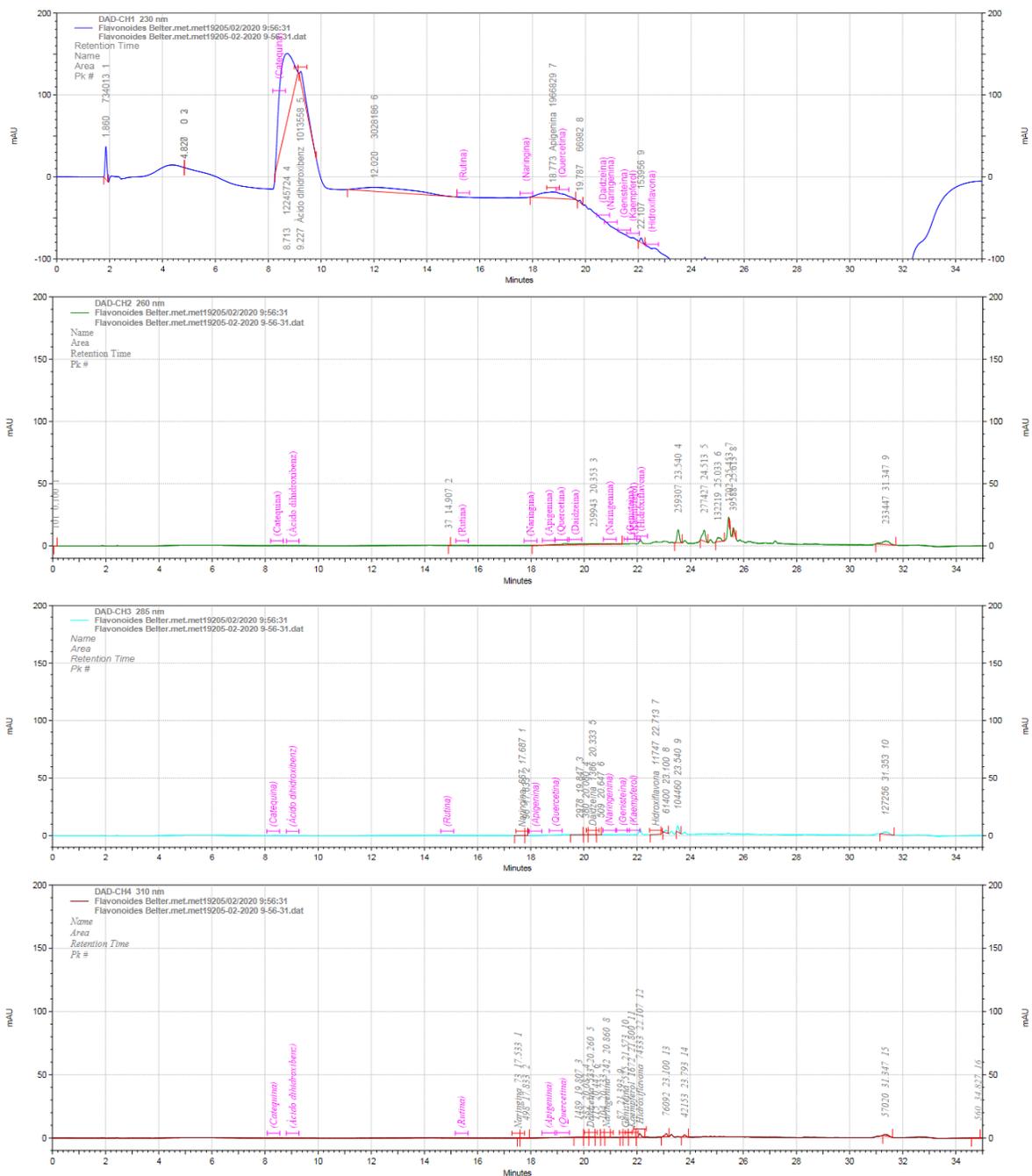


Figura 85. Cromatogramas de la muestra de *Valeriana prionophylla* Standl. proveniente de San José Ojetenam, San Marcos. Fracción de extracto 02 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.





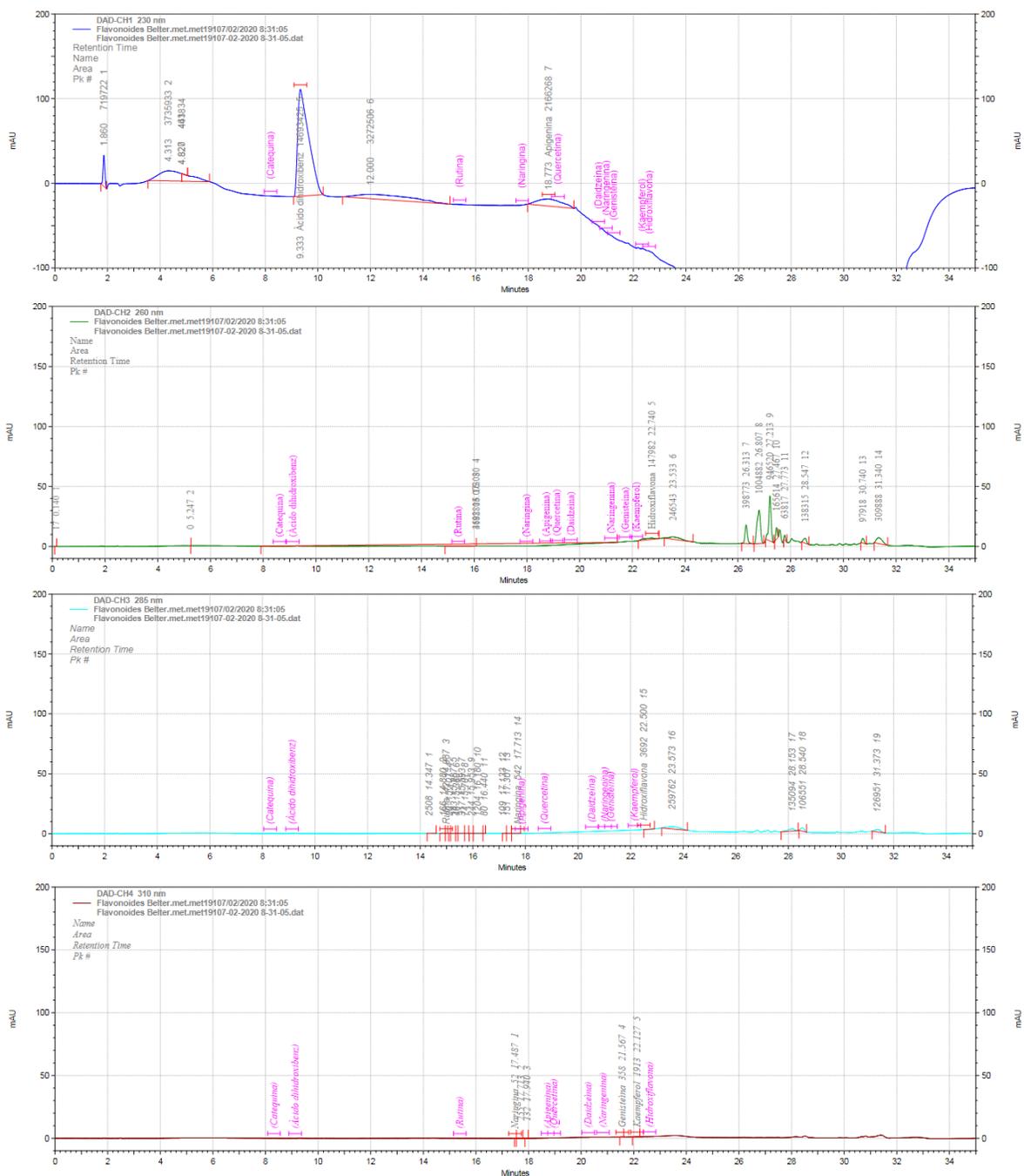


Figura 88. Cromatogramas de la muestra de *Valeriana prionophylla* Standl. procedente de Santa Lucía Utatlán, Sololá. Fracción de extracto 01 obtenido por cromatografía contracorriente, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.





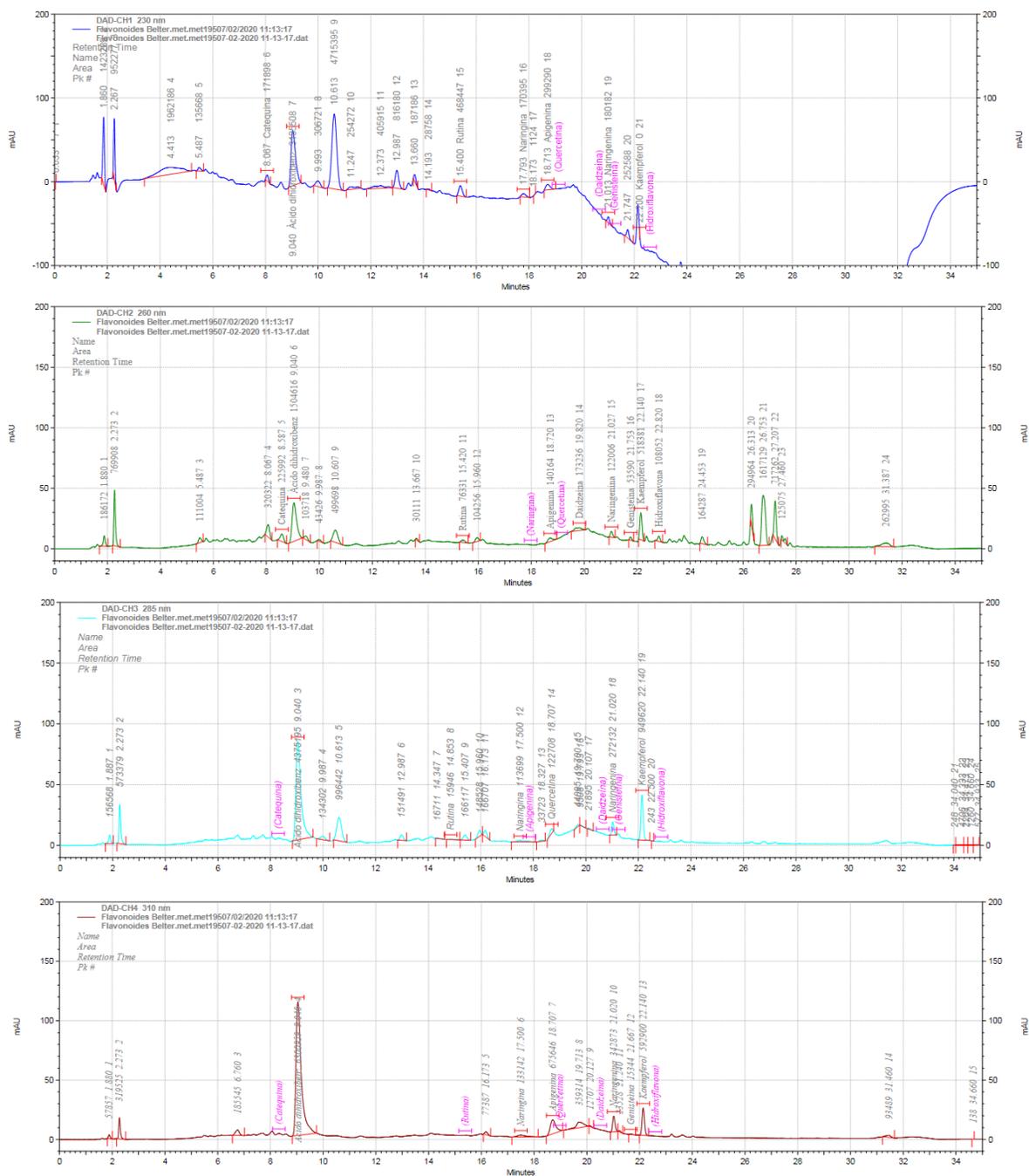


Figura 91. Cromatogramas de la muestra de extracto etanólico de *Valeriana prionophylla* Standl. procedente de Santa Lucía Utatlán, Sololá. No Fraccionada, en las longitudes de onda 230 nm, 260 nm, 285 nm y 310 nm, mediante HPLC-DAD. Fuente: Datos experimentales.

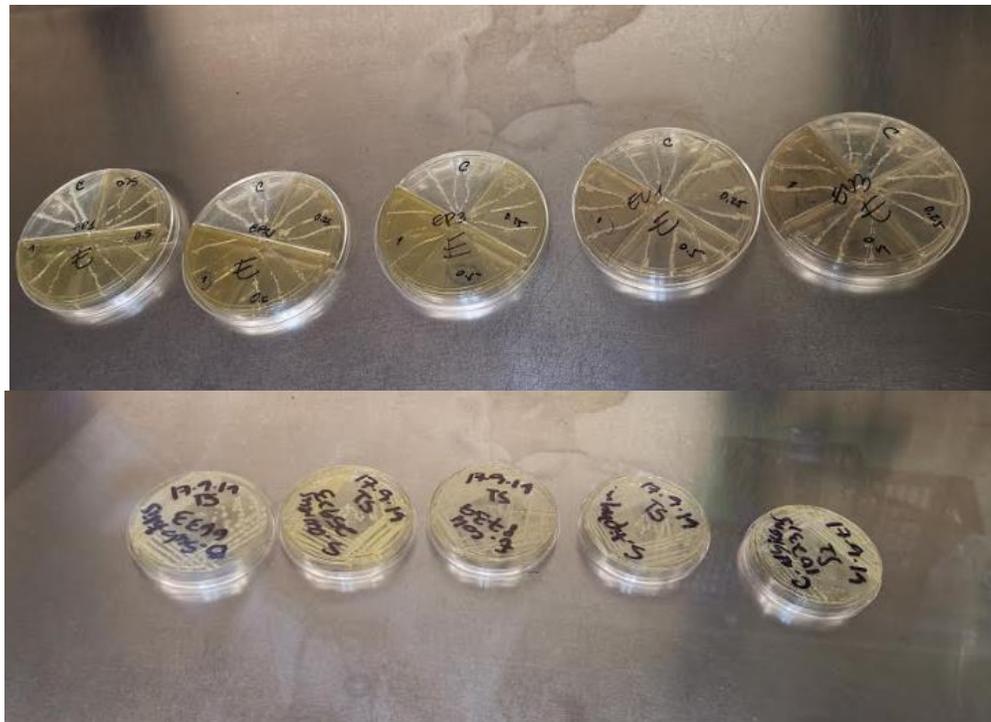
**Anexo 7. Fotografías de análisis microbiológico y antioxidante.**

Figura 92. Análisis microbiológico de muestras de extractos crudos alcohólicos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. Fuente: Fotografía tomada por Belter Trinidad.

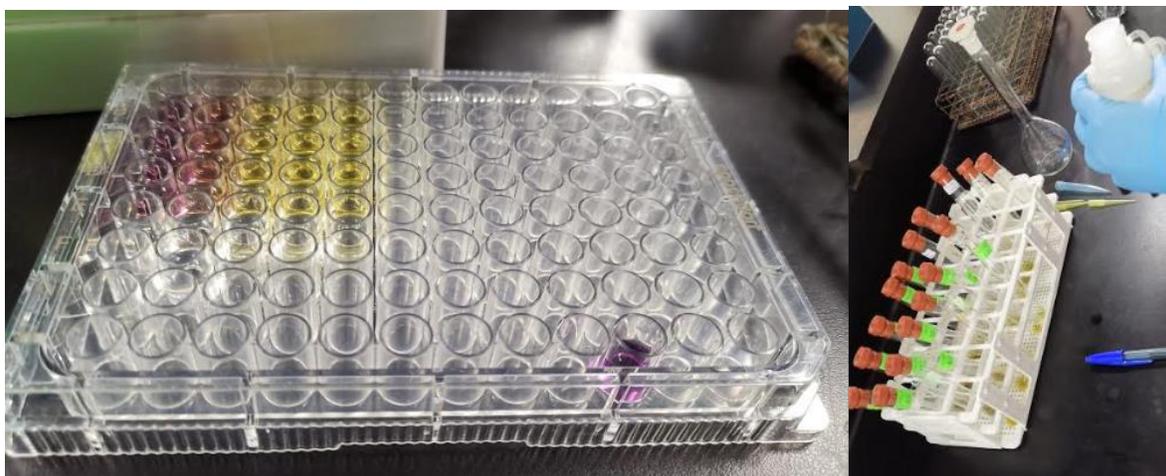


Figura 93. Análisis de actividad antioxidante de extractos alcohólicos de *Tagetes lucida* Cav. y *Valeriana prionophylla* Standl. Fuente: Fotografía tomada por Belter Trinidad.

### Anexo 8. Certificados de determinación botánica extendidas por BIGU.



Figura 94. Certificado de la determinación botánica de las muestras recolectadas de *Tagetes lucida* Cav. (pericón) extendida por la Unidad de Investigación Herbario BIGU. Fuente: Herbario BIGU.





**Of.No.Ref.DBRNRyC.09.090.2019**  
17 de septiembre de 2019

**A QUIEN CORRESPONDA:**

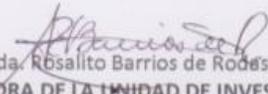
Por este medio hago constar que esta Unidad de Investigación Herbario BIGU, recibió del Br. Belter Isai Trinidad Reyes, identificado con carné 200817091 y CUI No. 2252428690101, estudiante de la carrera de Química de esta casa de estudios y solicitó la determinación botánica de las muestras recolectadas de:

***Valeriana prionophylla* Stadl. (Valerianaceae) Registro BIGU 80766 (localidad San Marcos)**  
***Valeriana prionophylla* Stadl. (Valerianaceae) Registro BIGU 80769 (localidad Chimaltenango)**  
***Valeriana prionophylla* Stadl. (Valerianaceae) Registro BIGU 80770 (localidad Sololá)**

las cuales fueron identificadas, ingresadas al inventario de esta unidad y utilizadas para la fase práctica-experimental de la elaboración de su tesis.

Sin otro particular, me suscribo de usted, atentamente,

**"Id y enseñad a todos"**

  
Licda. Rosalito Barrios de Rodas  
COORDINADORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION  
HERBARIO BIGU



c.c. Archivo  
Correlativo

Figura 95. Certificado de la determinación botánica de las muestras recolectadas de *Valeriana prionophylla* Standl. (valeriana) extendida por la Unidad de Investigación Herbario BIGU. Fuente: Herbario BIGU.

### Anexo 9. Gráficos del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.

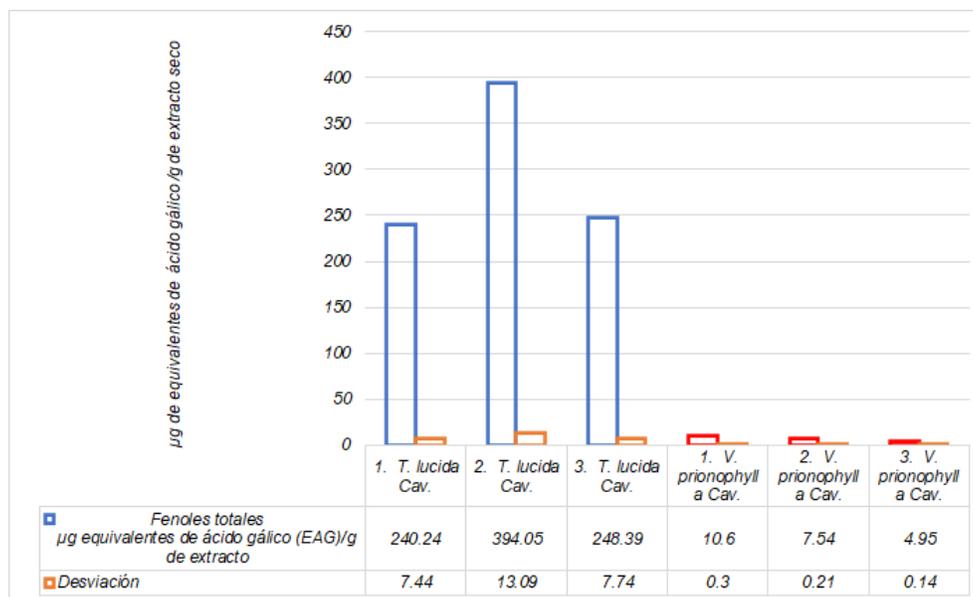


Figura 96. Contenido de fenoles totales en las muestras de *Tagetes lucida* Cav. (en azul) y *Valeriana prionoophylla* Standl. (en rojo). Fuente: Datos experimentales.

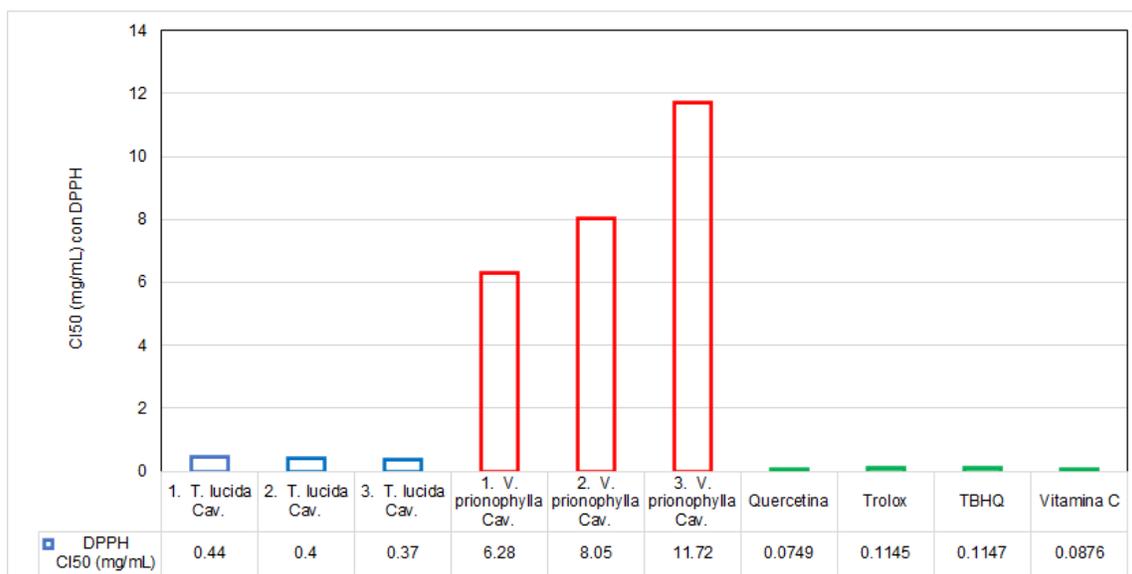


Figura 97. Gráfico que representa los valores de CI50 del ensayo DPPH para las muestras de *Tagetes lucida* Cav. (en azul) y *Valeriana prionoophylla* Standl. (en rojo). Fuente: Datos experimentales.



Firma \_\_\_\_\_

Br. Belter Isaí Trinidad Reyes

Autor



Firma \_\_\_\_\_

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Asesor e Investigador Principal



Firma \_\_\_\_\_

Licda. Bessie Evelyn Oliva Hernández

Directora

Escuela de Química



Firma \_\_\_\_\_

M. A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano