

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA E IDENTIFICACIÓN QUÍMICA DE VALEPOTRIATOS EN CUATRO ESPECIES RECONOCIDAS POPULARMENTE EN GUATEMALA COMO VALERIANA

Ada Cruz¹, Sully M. Cruz¹, Isabel Gaitán² y Armando Cáceres²

¹ Escuela de Química Farmacéutica y ² Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

RESUMEN

Se reporta el estudio de cuatro plantas, tres de ellas son llamadas popularmente en Guatemala como valeriana, por la propiedad sedante que supuestamente poseen, estas plantas son *Vetiveria zizanioides* L., *Chaptalia nutans* L., *Perezia nudicaulis* Gray. La cuarta planta es *Valeriana prionophylla* Standl., perteneciente al género *Valeriana* y usada con el mismo fin.

El objetivo principal de la investigación fue la identificación química del ácido valerénico y ácido hidroxivalerénico, en las plantas llamadas popularmente Valeriana, pues estos metabolitos son específicos para el género *Valeriana* y son los que le confieren su efecto sedante. Adicionalmente se identificaron otros valepotriatos como valtrato, didrovaltrato y acevaltrato. Se utilizó la raíz de *Valeriana officinalis* L. como estándar, a la vez se incluyó en el estudio a *V. prionophylla*, planta de Guatemala sin estudios realizados hasta el momento. La identificación química se realizó por medio de cromatografía en capa fina, dando como resultado la presencia de dichas moléculas en la raíz de las plantas llamadas popularmente Valeriana, siendo más abundante en la raíz de *C. nutans*, seguido por *V. zizanioides* y por último *P. nudicaulis*. La raíz de *V. prionophylla* mostró la presencia de bandas características de los valepotriatos como se esperaba, pero fue aún mayor que *V. officinalis*.

Otro de los objetivos fue la evaluación de la actividad antibacteriana, antifúngica e insecticida de las plantas en estudio. Estos análisis se realizaron en dos fases. La primera fue el tamizaje con microorganismos cultivados, expuestos ante el extracto de las raíces de las plantas a concentración de 1 mg/mL. La segunda (se realiza si el extracto inhibe el crecimiento de los microorganismos a 1 mg/mL) consistió en determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) a concentraciones de 1, 0.5 y 0.25 mg/mL. Siendo cuatro las plantas inactivas excepto *P. nudicaulis* y *V. prionophylla* activas contra *Cryptococcus neoformans* a 0.5 y 0.25 mg/mL respectivamente.

INTRODUCCIÓN

En Guatemala (Zacapa, Izabal y Suchitepéquez) las especies de *Vetiveria zizanioides*, *Chaptalia nutans* y *Perezia nudicaulis* son empleadas como sedantes en casos de nerviosismo, intranquilidad y dolor de muela, por lo que son llamadas Valeriana. Estas especies popularmente llamadas Valeriana son de diferentes familias y géneros. Los géneros *Perezia* y *Chaptalia* pertenecen a la familia Asteraceae, el género *Vetiveria* a la familia Poaceae y el género *Valeriana* a la familia Valerianaceae (1) (Figura 1) Por las diferencias de familias y géneros se consideró importante realizar la identificación de los ácidos valerénico y ácido hidroxivalerénico de estas plantas. Para la identificación de estos valepotriatos se utilizó *Valeriana officinalis* como estándar, como comparación con las demás plantas del estudio.

La raíz de *V. officinalis* desecada a 40°C contiene 0.5-2.0% de valepotriatos. Los valepotriatos son pertenecientes al grupo de sesquiterpenos. La composición de la mezcla de valepotriatos es variable, predominan el ácido valerénico y el ácido hidroxivalerénico. Se encuentran pequeñas cantidades de didrovaltrato e IVDH-valtrato (isovalerohidroxididrovaltrato),

además el valerósido. La actividad farmacológica del ácido valerénico es espasmolítica y miorelajante, asimismo junto a otros sesquiterpenos tienen un efecto sedante ligado a la inhibición del catabolismo del ácido γ -aminobutírico (GABA), que también es un importante inhibidor del sistema nervioso central (2-4).

Además del uso como sedante a estas plantas se les atribuye popularmente actividad para el tratamiento del mal de orín, bronquitis y dermatitis, por lo que se evaluó la actividad antifúngica, antibacteriana e insecticida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

C. nutans se recolectó en Samayac del departamento de Suchitepéquez, *P. nudicaulis* se recolectó de la Sierra de las Minas del departamento de Zacapa, *V. prionophylla* se colectó en Nebaj, departamento de Quiché, *V. officinalis* fue proveída amablemente por Astrid van Ginzel de Barcelona, España y *V. zizanioides* por el Ing. César Vektorazzi (Extract., Guatemala).

Extracto de la planta

El material vegetal seco y molido y fue extraído con etanol al 95% por precolación durante 24 horas, produciendo una solución etanólica de las raíces de las plantas. Posteriormente fue evaporado el etanol a 45°C bajo presión reducida en Rotavapor Büchi. Se pesaron 100 mg del extracto y se disolvieron en 10 mL de etanol al 50%, dando una concentración final de 10 mg/mL para el tamizaje antifúngico y antibacteriano.

Microorganismos utilizados

Los microorganismos utilizados fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* C13, *Trichophyton rubrum* T4, *Trichophyton mentagrophytes* T3, *Aspergillus flavus* A3, *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

Métodos para identificación de valepotriatos

Acido valerénico e hidroxivalerénico

Se extrajeron 0.2 g del vegetal pulverizado con 5 mL de metanol durante 5 minutos, se filtró y concentró a residuo seco, luego se disolvió con 0.2 mL de metanol. En la cromatopla se colocó 5 µL de extracto y 2 µL de solución de referencia (rojo de Sudan G), en bandas de 10 x 2 mm. Luego se colocó la placa en cámara saturada de n-hexano-etilmetilcetona proporción 70:30, tiempo de recorrido de 10 minutos con 8 cm de recorrido. Luego de secar la placa, se asperjó con aldehído anísico y se calentó durante 2 minutos a 105-110°C.

En el cromatograma desarrollado se observó la mancha de referencia con rojo (Rf=0.39), color violeta intenso, correspondiente al ácido valerénico (Rf=0.26) y una zona azul violeta debida al ácido hidroxivalerénico (Rf=0.10), ambas con fluorescencia de color rojo ladrillo intenso a la luz UV de 365 nm (4).

Valtrato, acevaltrato y didrovaltrato

Se extrajeron 0.2 g de material pulverizado con 5 mL de diclorometano durante 5 minutos a 60°C, luego se filtró y desecó, disolviéndolo con 0.2 mL de acetato de etilo. En la cromatopla se aplicó 10 µL. Luego se colocó en una cámara saturada con tolueno-acetato de etilo proporción 75:25, en 15 cm de recorrido; secado la placa y asperjado con ácido clorhídrico-ácido acético. En estas condiciones se detectaron valtrato y acevaltrato con zonas de color azul y didrovaltrato con zonas color café (5).

Bioensayos

Actividad antimicrobiana y antilevadura

Preparación de agar-extracto: Se prepararon tubos con 9 mL de agar Mueller Hinton, se esterilizó en autoclave de vapor, se dejó enfriar a 50°C y se agregó 1 mL de la solución del extracto disuelto. La concentración final del extracto fue de 1 mg/mL. Ambos se agitan y vierten en cajas de petri estériles, dejando solidificar e incubándolo a 36°C por 24 horas para comprobar esterilidad.

Preparación del inóculo: El microorganismo en estudio se inoculó en un tubo con 8 mL de agar Mueller Hinton en declive durante 24 horas a 36°C. Luego se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 mL de caldo Tripticasa soya, incubándolo a 36°C durante 24 horas. Se diluyeron 5 mL de la suspensión anterior en un tubo con 4.95 mL de solución salina y se inoculó en las cajas con agar extracto una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Las cajas se incubaron a 36°C durante 24 horas. Se utilizó como control negativo una caja con agar Mueller Hinton y etanol al 50%. Se realizaron un total de cuatro repeticiones para cada microorganismo.

Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: Actividad negativa presencia de crecimiento homogéneo del microorganismo; actividad positiva ausencia de crecimiento.

No se determinó la CIM por que todos los extractos fueron negativos.

Actividad antifúngica

Preparación del agar-extracto: Se prepararon tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud y 1.5 mL del extracto, siguiendo el mismo procedimiento de preparación del agar-extracto de la actividad antimicrobiana, quedando una concentración final de 1 mg/mL.

Preparación del inóculo de hongos filamentosos: Se preparó medio Takashio (Sabouraud modificado para la producción de esporas) con 0.6 g de dextrosa, 0.3 g de Na₂SO₄, 0.3 g de KH₂PO₄, 0.3 g de peptona y 6 g de agar-agar. Se agregó 300 mL de agua y se vertió 6 mL en tubos de tapón de rosca, se esterilizó en autoclave y dejó solidificar en declive. En este medio se sembraron los hongos a ensayar por 21 días a 27°C. A cada tubo se le agregó 2 mL de agua destilada estéril y se desprendió el hongo, trasvasando el material obtenido a viales. A esta solución se le hizo conteo de esporas en cámara de Neubauer, obteniendo 100 esporas/mL = 1 x 10⁵ esporas/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante).

A las cajas con agar-extracto de raíz se le abrieron cuatro agujeros con campanillas de Durham en forma equidistante. Luego se colocaron 30 µL de la suspensión de esporas en los agujeros. Se incubó a 27°C durante 14 días, haciendo cuatro repeticiones del procedimiento. Se utilizó como control negativo una caja con agar Sabouraud y etanol al 50%.

Interpretación de los resultados: Actividad positiva ausencia de crecimiento, actividad negativa presencia de crecimiento microbiano homogéneo.

RESULTADOS

En las pruebas de tamizaje de la inhibición del crecimiento bacteriano se demostró moderada actividad (Tabla 1), mientras que no se demostró actividad antifúngica (Tabla 2). La Tabla 3 muestra los resultados del MIC contra las levaduras. No se encontró actividad contra ninguna de las larvas ensayadas (Tabla 4).

Tabla 1. Tamizaje antibacteriano y antilevadadura

Especie	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>V. prionophylla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. zizanioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. nudicaulis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. nutans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-

Bacterias Gram positivo (D: *B. subtilis* y A: *S. aureus*), bacterias Gram negativo (H: *E. coli*, E: *P. aeruginosa* y B: *S. typhi*), hongos levaduriformes (F: *C. albicans* y G: *C. neoformans*) y micobacterias (C: *M. smegmatis*).

(+) No hay crecimiento o actividad positiva

(-) Si hay crecimiento o actividad negativa

Tabla 2. Tamizaje antifúngico

Especie	A	B	C
<i>V. prionophylla</i>	-	-	-
<i>V. zizanioides</i>	-	-	-
<i>P. nudicaulis</i>	-	-	-
<i>C. nutans</i>	-	-	-

A: *A. flavus* B: *T. rubrum*, C: *T. mentagrophytes*

(+) No hay crecimiento o actividad positiva

(-) Si hay crecimiento o actividad negativa

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima de los extractos con actividad antifúngica (mg/mL)

Especie	<i>C. neoformans</i>
<i>V. prionophylla</i>	0.25
<i>V. zizanioides</i>	0.5

Tabla 4. Tamizaje antilarvario

Especie	<i>A. aegypti</i>				<i>A. albimanus</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>V. prionophylla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. zizanioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. nudicaulis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. nutans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Actividad positiva (12 larvas vivas)

(-) Actividad negativa (12 larvas muertas)

Todas las especies mostraron un patrón diverso al tamizaje fitoquímico (Tabla 5), demostrándose ciertas homogeneidad en los Rf de los metabolitos ensayados (Tabla 6).

Tabla 5. Tamizaje fitoquímico

Especie	A	B	C	D
<i>V. prionophylla</i>	+++	+++	++	+
<i>V. zizanioides</i>	+	+++	+++	+
<i>P. nudicaulis</i>	+	+	+	+++
<i>C. nutans</i>	++	+++	+	+++
<i>V. officinalis</i>	++	++	+	-

A: Ácido valerénico B: Ácido hidroxivalerénico,

C: Acevaltrato y valtrato, D: dihidrovaltrato

Abundante ++++; Moderado ++; Escaso +; No detectable

Tabla 6. Determinación de Rf de Valepotriatos

Especie	A	B	C	D
<i>V. prionophylla</i>	0.6	0.2	0.4	0.8
<i>V. zizanioides</i>	0.5, 0.6	0.1, 0.4	0.3	0.7
<i>P. nudicaulis</i>	0.7	0.6	0.7	0.9
<i>C. nutans</i>	0.6	0.2	0.3	0.8
<i>V. officinalis</i>	0.5	0.4	0.5	-

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La determinación química de los velepotriatos de las cuatro especies mostraron resultados interesantes. Los metabolitos ácido valerénico e hidroxivalerénico presentes en el género *Valeriana*, fueron encontrados en las tres especie llamadas popularmente Valeriana. El ácido hidroxivalerénico fue abundante para *V. zizanioides* y *C. nutans*. En cuanto al ácido valerénico se encontró moderadamente presente en *C. nutans* y escaso en *P. nudicaulis* y *V. zizanioides*. A diferencia de las dos plantas que pertenecen al género *Valeriana* se encontraron abundantes estos metabolitos como se esperaba, pero más notable en *V. prionophylla* que en *V. officinalis*. Estos metabolitos contribuyen a explicar el efecto sedante de las plantas popularmente llamadas Valeriana, siendo más abundante en *C. nutans*, seguido de *V. zizanioides* y *P. nudicaulis*. Adicionalmente se identificó la presencia de otros

valepatriatos como el valtrato, acevaltrato y didovaltrato; siendo abundante didovaltrato en *P. nudicaulis* y *C. nutans*; y el valtrato y acevaltrato abundante en *V. zizanioides*.

Es importante notar que *V. prionophylla* es más abundante en valepatriatos que *V. officinalis*, pues los metabolitos presentes en las plantas son afectados por factores como genotipo, clima, cosecha, lugar de procedencia y procesos de preparación (23). La raíz de *V. officinalis* utilizada en el estudio provenía de España, a diferencia que *V. prionophylla* que provenía de Nebaj, Quiché, donde se cuenta con condiciones ambientales adecuadas para su crecimiento

En cuanto a los valores de Rf obtenidos de los valepatriatos fueron mayores que los teóricos. Aunque estos valores según la revisión bibliográfica son aproximados, por lo que son variables, siendo identificados por los colores característicos de éstos. Una de las razones de las variaciones de los Rfs es mantener la igualdad de condiciones metodológicas.

El análisis de la actividad antibacteriana, antifúngica e insecticida de las cuatro especies demostraron inactividad contra los organismos expuestos, exceptuando *V. prionophylla* y *P.*

nudicaulis en concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/mL respectivamente, que fueron activas contra *C. neoformans*. Con estos resultados podemos decir que ambas especies tienen actividad para el tratamiento de criptococosis, enfermedad que se adquiere por la inhalación de la levadura encapsulada de *C. neoformans*, causando enfermedad pulmonar autolimitada o diseminarse principalmente a las meninges, pero en ciertas ocasiones a la piel, huesos y órganos internos (24).

Estudios recientes de la planta entera de *C. nutans* mostraron efecto inhibitorio contra *B. subtilis*, a una concentración de 50 mg/mL (25).

Se sabe que los sesquiterpenos, flavonoides, cumarinas, colchicina poseen actividad antimalárica, amebicida, insecticida, antifúngica e inhiben el crecimiento de bacterias. Estos metabolitos se encuentran en todas las partes de la planta, siendo abundante en hojas, flores y frutos (26-28). Por lo que se concluye, que la raíz de las cuatro plantas en estudio poseen leve concentración de dichos metabolitos a concentración de 1 mg/mL, exceptuando a las dos plantas que fueron activas contra *C. neoformans*.



Chaptalia nutans



Perezia nudicaulis



Vetiveria zizanioides



Valeriana prionophylla

Figura 1. Fotografía de las plantas estudiadas.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de la raíz de *V. prionophylla*, *V. zizanioides*, *P. nudicaulis* y *C. nutans* no presentan actividad contra las siguientes bacterias: *S. aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* a una concentración de 1 mg/mL.

El extracto etanólico de la raíz de *V. prionophylla*, *V. zizanioides*, *P. nudicaulis* y *C. nutans* no son activos contra los hongos filamentosos: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *A. flavus* a una concentración de 1 mg/mL.

El extracto etanólico de la raíz de *V. prionophylla*, *V. zizanioides*, *P. nudicaulis* y *C. nutans* no poseen actividad insecticida contra las larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus* a una concentración de 1 mg/mL.

El extracto etanólico de la raíz de *V. prionophylla* y *P. nudicaulis* presentan actividad a una concentración inhibitoria mínima de 0.25 y 0.5 mg/mL respectivamente contra *C. neoformans*.

Los metabolitos ácido valerénico y ácido hidroxivalerénico están presentes en el extracto etanólico de la raíz de *V. zizanioides*, *P. nudicaulis* y *C. nutans* plantas llamadas popularmente Valeriana en Guatemala.

Los metabolitos ácido valerénico y ácido hidroxivalerénico son más abundantes en *V. prionophylla* que en *V. officinalis*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto Flora Regional OEA y a proyectos del IIQB por su apoyo financiero; a los Laboratorios LIPRONAT y de Bioensayos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por su colaboración y apoyo material en la realización de la parte experimental, y al Laboratorio Farmaya por el acceso a material bibliográfico y botánico.

REFERENCIAS

1. Standley PC & Williams LD. 1976. Flora de Guatemala. Fieldiana: Botany. 24(12):436-437.
2. Hobbs CH. 1995. Valerian, The Rezaxing and Sep Herb. Capitola, C.A. Botanica. 6p.
3. Houghton RJ. 1988. The Biological activity of Valerian and related plants. J. Ethnopharmacol. 22:121-142.
4. Cañigüeral S. et al. 1998. Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y Tisana. Un manual de base científica para Farmacéuticos y Médicos. Milán OEMF International. 542-545.
5. Wagner H. et al. 1984. Plants drug analysis. Berlin, Springer-Verlag. 263-267.
6. CYTED. 1993. Manual de Técnicas de investigación. Bogotá, Proyecto X-1.
7. Cáceres A et al. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. 1. Screening of activity to bacteria, fungi and American tripanozomes of 13 natives plants. J. Ethnopharmacol. 62:195-202.
8. España SM. et al. 1994. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 5. Vibriocidal activity of the American Plants used to treat diarrhea. Fitoterapia 65: 273-274.
9. Mitscher L. et al. 1987. A modern look at folkloric use antiinfective agents. J. Nat. Prod. 5: 1025-1041.
10. Mitscher L. et al. 1972. Antimicrobial agents higher plants. Introduction, rationale and methodology. Lloydia 35:157-166.
11. Brancato FP, Golding NS. The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. J. Mycol. 1953 45:848-863.
12. Burlingame EM & Reddish GP. 1973. Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. J. Lab. Clin. Med. 14: 649-653.
13. Cáceres A. et al. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophyc infections. 3. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. J. Ethnopharmacol. 40: 207-213.
14. MacRae WD. et al. Studies of the pharma-cological activity of Amazonian euphorbiaceae. J. Ethnopharmacol. 1988; 22:147-172.
15. MacCarthy P. et al. 1992. Antifungal activity of meridine. A natural product from the marine sponge. J. Nat. Prod. 55: 1644-1668.
16. Vanbrenseghem R. et al. 1970. Production of macroconidia by *Microsporum ferrugineum* OTA 1992. Sabouraudia. 7: 252-256.
17. Chariandy CM. et al. 1999. Screening of medical plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. J. Ethnopharmacol. 62:265-270.
18. Kagan J. et al. 1983. The Phototoxicity of some 1,3-butadienes and relate thiophenes against larva of the mosquito *Aedes aegypti* and the fruti fly *Drosophyla melanogaster*. Insecta. Sci. Appl. 4: 377-387.

19. Maradufu A. *et al.* 1978. Isolation of (5-E)-ocinonea mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. *Lloydia* 41 :181-183.
20. Mischra SK *et al.* 1987. Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *J. Indust. Microbiol.* 2:267-276.
21. Thangam T *et al.* 1997. Mosquito larvicidal activity of mangrove plant extract and synergistic activity of *Rhizophora apiculata* with pyrethrum against *Culex quinquefasciatus*. *Int. J. Pharmacog.* 35 : 69-71.
22. Zarroug IMA 1988. Evaluation of Sudanese plant extracts as mosquito larvicides. *Int. J. Crude Drug Res.* 26 : 77-80.
23. Gao QX & Björk L. 2000. Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. *Fitoterapia.* 71:19-24.
24. Index Merk. 1998. 10 ed.
25. Coelho de Souza G *et al.* 2004. Ethno-pharmacological studies of antimicrobial remedies in south of Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 90:135-143.
26. Weber S. *et al.* 1999. *Natural Products from Plants.* CRC Press LLC. Washington, DC. 10, 81-84. 89 p.
27. Cutler SJ & Cutler HG. 2000. *Biologically active natural Products.* Pharmaceutical. CRC Press LLC. Washington, DC. 37p.
28. Medinilla BE. 1999. *Manual de Laboratorio de Fitoquímica.* Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 13-18p.