

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Departamento de Farmacología**

**Cátedra de Farmacobotánica**

**Estudio anatómico, fitoquímico y actividad antioxidante de  
dos especies del género valeriana conocidas con el  
nombre de “ñancolahuen”**

**Ing. Agr. Hernán Gerónimo Bach**

**Director: Prof. Dr. Marcelo L. Wagner**

**Directora Adjunto: Dra. Renée H. Fortunato**

**Año: 2014**

*A mis viejos, Félix y Cita*

*y a mis dos nortes Tomás y Anita*

## **Agradecimientos**

Primeramente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por otorgarme la beca que permitió que realizara el trabajo de investigación aquí presentado.

A la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por permitir que realice mi trabajo de investigación en esta Casa de estudios.

A mi directora de Beca Dra. Renée H. Fortunato por abrirme las puertas del Herbario (BAB).

A mi Director Prof. Dr. Marcelo L. Wagner por haberme aceptado como doctorando.

A la Dra. Beatriz G. Varela por la formación y el acompañamiento en todo lo referido a la anatomía.

Al Prof. Dr. Rafael A. Ricco por haberme sumergido en el mundo de los polifenoles y por su invaluable ayuda en el laboratorio.

A la Prof. Dra. Catalina van Baren y al Prof. Dr. Arnaldo Bandoni, de la Cátedra de Farmacognosia, por permitirme realizar con ellos los estudios sobre las esencias.

Al Dr. Gustavo Giberti, por su ayuda en la búsqueda de bibliografía y ejemplares de herbario en el museo de Farmacobotánica (BAF).

A todo el personal de la cátedra de Farmacobotánica, especialmente al Dr. Alberto Gurni (ex profesor de la Cátedra), Sra. Ana María, Graciela, Cecilia, Ana, Nicolás, Leo; Ignacio, Mario, Karina, Laura, Victoria, Judith y Ezequiel.

A todos mis compañeros del INTA por haberme ayudado en el día a día: Dr. Matías Morales, Ing. Agr. Martín Arteaga. Sr. Eduardo Ruiz, Sr. Pedro Calieres, Sra. Dora Gonzalez, Sra. Graciela Arias, Sra. Angélica Marino.

A la Dra. Julieta von Thungen y al Ing. Agr. Ms .Sc Donaldo Bran, de la Experimental Bariloche por su apoyo en los viajes realizados a la Patagonia.

Al Lic. Federico Robbiatti por su ayuda en los viajes de colección y en el análisis estadístico.

Al Dr. Nicolás Nagahama por su hospitalidad en mi último viaje realizado a Esquel.

A mis padres (Felix y Cita), a mis hermanos (Huyus, Omar, Miguel, Sergio y Jose) por acompañarme y alentarme en todos los momentos y a mis hijos (Tomás y Anita) por iluminar mi vida.

***Especialmente agradezco a Dios haber conocido a dos nuevos Amigos  
Marcelo y Rafa quienes hicieron amena mi estadía en la Facultad y además  
permitieron que esta investigación de sus frutos***

## Publicaciones y premios que dio lugar esta tesis

### Trabajos presentados en congresos

X Simposio Argentino XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica.

**Estudio anatómico y fitoquímico de Valerianas comercializadas en la Patagonia Argentina.**

H. G. Bach, B. Varela, R. H. Fortunato, A. Gurni & M. L. Wagner.

XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica. Posadas Misiones 7-10 Octubre de 2011

**Compuestos polifenólicos en dos poblaciones de *Valeriana carnososa* SM. (Valerianaceae) de la Patagonia.**

H. G. Bach, R. A. Ricco. A. A. Gurni, R. H. Fortunato y M. L. Wagner.

Bol. Soc. Arg. Bot. Vol 46 Supl ISSN 0373-580X.

XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica. 2-6 Septiembre La Plata, Argentina.

**Estudio de la dinámica de polifenoles en *Valeriana clarionifolia* Phil. (Valerianaceae).**

Bach H. G., Ricco R. A., Fortunato R. H. y Wagner M. L.

Bol. Soc. Arg. Bot. Vol 48 Supl. ISSN 0373-580X

XI Simposio Argentino de Farmacobotánica. XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. I Congreso Latinoamericano de plantas medicinales.

20-22 Noviembre. 2013. Rosario Argentina.

**Actividad antioxidante in vitro de *Valeriana carnososa*.**

Bach H. G., Ricco R. A., Fortunato R. H. y Wagner M. L.

Dominguezia Vol 29 (s) Nov. 2013 ISSN 1669-6859

**Composición química de los aceites esenciales de *Valeriana carnososa* Sm. y *V. clarionifolia* Phil. (Valerianaceae) de la Patagonia.**

Bach H. G. Wagner M. L, Fortunato R. H, van Baren C. M. y Bandoni A. L.

Dominguezia Vol 29 (s) Nov. 2013 ISSN 1669-6859.

## **Trabajos publicados en revistas científicas con referato**

**'Pharmacobotany of Two *Valeriana* Species (Valerianaceae) of Argentinian Patagonia Known as "Ñancolahuen"'**.

Hernán G. Bach, Beatriz G. Varela, Renée H. Fortunato and Marcelo L. Wagner.  
2014. Lat. Am. J. Pharm. 33 (6): 891-6.

## **Premios recibidos**

Mención de Honor en mérito a la calidad científica, a la originalidad del tema, y a la exposición realizada al trabajo presentado en forma de póster. Estudio anatómico y fitoquímico de Valerianas comercializadas en la Patagonia Argentina.

H. G. Bach, B. Varela, R. H. Fortunato, A. Gurni & M. L. Wagner.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>Introducción</b> .....                      | 1  |
| Generalidades.....                             | 2  |
| Morfología y Anatomía .....                    | 12 |
| Usos en medicina tradicional.....              | 13 |
| Fitoquímica.....                               | 15 |
| Terpenos.....                                  | 15 |
| Polifenoles.....                               | 17 |
| Acción farmacológica.....                      | 18 |
| <b>Objetivos</b> .....                         | 20 |
| <b>Capítulo I: Morfología y Anatomía</b> ..... | 21 |
| Materiales y métodos.....                      | 22 |
| Material vegetal.....                          | 22 |
| Metodología.....                               | 23 |
| Resultados.....                                | 24 |
| <i>Valeriana carnososa</i> .....               | 24 |
| <i>Valeriana clarionifolia</i> .....           | 28 |
| <i>Valeriana officinalis</i> .....             | 33 |
| Discusión.....                                 | 35 |
| Conclusión.....                                | 37 |
| <b>Capítulo II: Fitoquímica</b> .....          | 39 |
| Sección I: Polifenoles.....                    | 40 |
| Materiales y métodos.....                      | 40 |
| Resultados.....                                | 46 |
| Discusión.....                                 | 70 |
| Conclusión.....                                | 74 |
| Sección II: Aceites esenciales.....            | 75 |
| Materiales y métodos.....                      | 76 |
| Resultados.....                                | 83 |
| Discusión.....                                 | 90 |
| Conclusión.....                                | 94 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Capítulo III: Acción Farmacológica</b> ..... | 96  |
| Materiales y métodos.....                       | 97  |
| Resultados.....                                 | 103 |
| Discusión.....                                  | 138 |
| Conclusión.....                                 | 142 |
| <br>  |     |
| <b>Conclusión Final</b> .....                   | 143 |
| <b>Referencias Bibliográficas</b> .....         | 144 |
| <b>Resumen</b> .....                            | 153 |

# INTRODUCCIÓN



Paisaje patagónico donde se puede ver la estepa con la pre-cordillera y la cordillera.

# INTRODUCCIÓN

## GENERALIDADES

El género *Valeriana* (Valerianaceae) está constituido por aproximadamente 250 especies, que se encuentran distribuidas en todas las regiones del mundo a excepción de Oceanía. En el presente estudio se adoptará la nomenclatura tradicional, que reconoce al género *Valeriana* como perteneciente a la familia Valerianaceae (Weberling, 1970; Larsen, 1986; Eriksen, 1989), en la actualidad Valerianaceae se la considera como una subfamilia (Valerianoideae) perteneciente a la familia Caprifoliaceae APG III (2009) y por consiguiente el género *Valeriana* pertenecería a dicha familia. Por lo tanto se adopta el criterio conservador debido a que muchas especies del género *Valeriana* que tienen referencias químicas y farmacológicas figuran como pertenecientes a la familia Valerianaceae. En el sur de Sudamérica crecen 81 especies, de las cuales 48 han sido registradas en el territorio argentino (Borsini 1999; Kutschker 2009; 2011), principalmente a lo largo de la cordillera de los Andes, desde la provincia de Jujuy hasta Tierra del Fuego. De acuerdo con la clasificación fitogeográfica de Cabrera (1976) y Morello *et al.* (2012) (Figura1) crecen en las provincias:

### a.- Subantártica

*Valeriana hebecarpa* DC., *V. laphatifolia* Vahl., *V. laxiflora* DC., *V. samolifolia* (DC.) Colla, *V. sedifolia* d' Urb.;

Figura 1. Provincias fitogeográficas de la Argentina



Según Morello *et al.* (2012)

#### **b.- Patagónica**

*Valeriana borsini* Rossow, *V. carnososa* Sm., *V. clarionifolia* Phil., *V. crispa* Ruiz et Pav., *V. leucocarpa* DC., *V. polemoniifolia* Phil., *V. stricta* Clos, *V. tunuyanense* E. Mendez, *V. virescens* Clos;

#### **c.- Altoandina**

*Valeriana altoandina* Cabrera, *V. boelckeii* Rossow, *V. calvescens* Briq., *V. castellanosi* Borsini, *V. chilensis* Borsini, *V. clematitidis* Kunth, *V. condamoana* Graebn., *V. corymbulosa* (Wedd.) Cabrera, *V. corynodes* Borsini, *V. descolei* Borsini, *V. dinorhiza* (Griseb.) Hook., *V. fonckii* Phil, *V. hornsouchiana* Walp., *V. humahuacensis* Borsini, *V. hunzikeri* Borsini, *V. lasiocarpa* Griseb., *V. macrorrhiza* DC., *V. moyanoi* Speg., *V. munzonii* Borsini, *V. philippiana* Briq., *V. picnantha* A. Gray., *V. pyricarpa* Borsini, *V. ruizlealii* Borsini, *V. urbani* Phil.; Puneña: *V. tafiensis* Borsini; Chaqueña: *V. effusa* Griseb., *V. ferax* (Griseb.) Hook., *V. polybotrya* (Griseb.) Hock., *V. stuckerti* Briq., *V. tucumana* Borsini;

#### **d.- Pampeana y Epinal del dominio chaqueño**

*Valeriana polystachya* Sm., *V. salicarifolia* Vahl., *V. scandens* Loefl. ex L.

#### **e.- Paranaense**

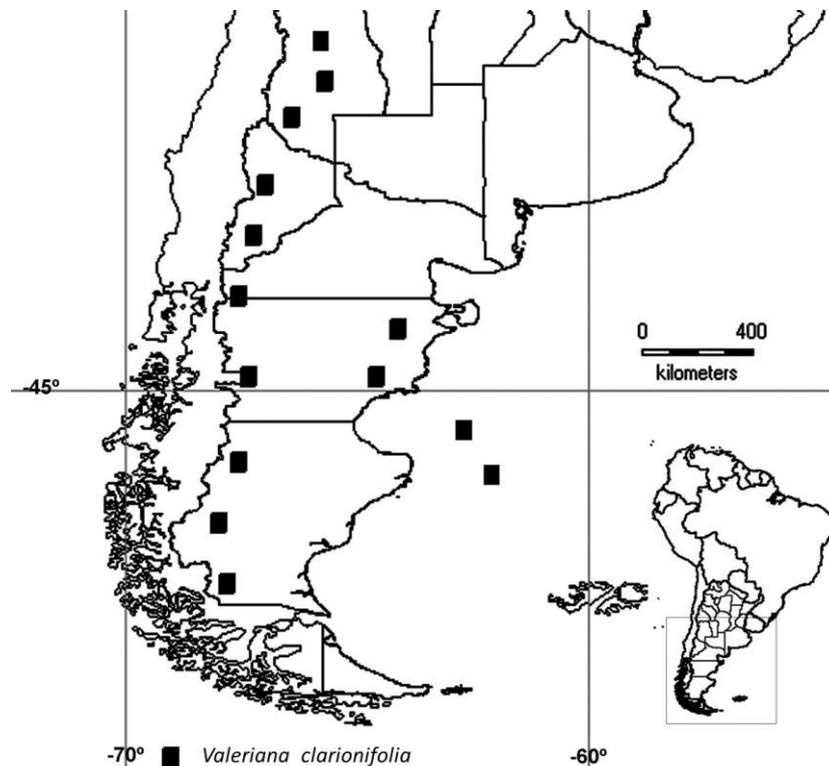
*Valeriana kurtziana* Borsini.

**Figura 2-** Distribución geográfica de *Valeriana carnosa* en la Argentina



De todas las especies que habitan el territorio argentino, *V. carnosa* es la que presenta mayor área de distribución porque crece desde el centro de la provincia de Mendoza hasta la provincia de Tierra del Fuego, en el extremo sur. Con respecto a la dispersión latitudinal, las que presentan mayor dispersión son *V. clarionifolia* (centro de Mendoza hasta Santa Cruz) y *V. macrorrhiza* (Sur de Mendoza hasta Tierra del Fuego). Con respecto al ordenamiento longitudinal y altitudinal *V. carnosa* y *V. clarionifolia* son las que poseen mayor dispersión: desde los 70° a los 63° aproximadamente y desde el nivel del mar hasta los 2000 m.s.m. Es de señalar que ambas especies son conocidas con el nombre vulgar de “ñancolahuen” y son las que tienen la mayor área de distribución dentro del territorio nacional (Figura 2 y 3.).

**Figura 3-** Distribución de *Valeriana clarionifolia* en la Argentina



Las características distintivas de las especies del género *Valeriana* son las siguientes:

a.- **Raíces.** Axiales, ramificadas y fibrosas, a veces cónicas, o con engrosamientos piriformes, napiformes, entre otros. La corteza suele ser parda y delgada. En las especies perennes pueden alcanzar hasta 50 cm de longitud y 3 cm de diámetro.

b.- **Tallos.** Herbáceos, suculentos o subleñosos, simples o múltiples, ramificados y bifurcados en ramas opuestas. Pueden tener internodios comprimidos con formación de roseta basal de hojas. Otras veces, trepadores (*V. scandens*). En muchas especies suelen diferenciarse en rizomas o

estolones, o también puede tener ambas adaptaciones. Los primeros se caracterizan por ser subterráneos, horizontales o más o menos verticales dependiendo de las características edáficas de donde se desarrollan, los estolones a diferencia de los rizomas se desarrollan sobre la superficie; ambos tipos de tallos presentan yemas que emitirán vástagos. En la mayoría de las especies del género, las yemas de renuevo se encuentran por debajo de la superficie, por lo tanto, constituyen verdaderos hemicriptófitos.

c.- **Hojas.** Las hojas pueden ser opuestas o verticiladas, generalmente las inferiores, y poseen prefoliación decusada con entrenudos muy cortos formando una roseta basal. El tamaño varía desde pequeñas, de 7 mm longitud (*V. sedifolia*) hasta 35 cm (*V. ruiz-lealii*). En algunas especies, las hojas pueden ser sésiles o pecioladas, en este último caso, el peciolo es ligeramente aplanado con la cara superior cóncava, glabra a pubescente y sin estipulas. Por otro lado, un mismo individuo puede presentar un amplio polimorfismo entre las hojas basales y las apicales (*V. effusa* y *V. scandens*) y en otras, las hojas son siempre simples (*V. carnososa* y *V. macrorrhiza*) o compuestas y pinnadas (*V. ferax* y *V. polybotrya*). El ápice puede ser agudo, obtuso o acuminado y la base simétrica o asimétrica atenuada hacia el peciolo, los bordes pueden ser enteros (*V. castellanosi*), tenues o notablemente dentados (*V. carnososa*), aserrados, crenados, sinuados o partidos (*V. clarionifolia*); la consistencia varía desde membranosa, carnososa a suculenta, observándose especies con hojas concoloras o discoloras y, por lo general, glabras (Figura 4).

**Figura 4.** Distintos tipos de hojas en las valerianas



**A-** Hojas compuestas de *Valeriana officinalis*. **B-** Hojas enteras de *V. carnososa*. **C-** Hojas enteras de *V. wallichii*. **D-** Hojas enteras de margen partido en *V. clarionifolia*.

d.- **Inflorescencias.** Son panículas de dicasios, laxos o compactos, formando cabezuelas, espigas, pseudo-corimbos, glomérulos, entre otras, terminales o axilares (Figura 5).

**Figura 5.** Detalle de las flores y de las inflorescencias



**A.** *V. officinalis*. **B.** *V. clarionifolia*. **C.** *V. carnosa*.

e.- **Flores.** Las flores son hermafroditas o polígamos-dioicas y varían desde 2 - 3 mm hasta 10 mm de longitud. El cáliz se encuentra soldado en su base al ovario, es entero, dentado o laciniado, involuto a la antesis o desarrollado en vilano plumoso con 6 a 20 setas; estas setas forman un anillo alrededor de la base de la corola y durante la fructificación, se desarrollan y expanden formando el vilano plumoso. La corola es pequeña de 1 a 10 mm de longitud, gamopétala y pentámera, membranosa, glabra o pubescente, blanca, blanco-

azulada o blanco-amarillenta; en las flores hermafroditas o masculinas la corola es infundibuliforme o hipocraterimorfos y, en las femeninas la corola es siempre más pequeña y campanulado o rotáceo. El androceo posee 3 (4 - 5) estambres, epipétalos, que se insertan a distintas alturas. El gineceo se inserta en la axila de dos bractéolas concrecentes, presenta ovario ínfero, sésil, tricarpelar con 1 lóculo fértil; la forma y el tamaño es variable según las especies, llevando siempre en su parte superior al cáliz. El estilo es simple y filiforme, de tamaño variable, siendo a veces engrosado hacia el ápice e insertándose sobre un hipanto carnoso; el estigma es trífido o trilobado, papiloso con lóbulos cortos o muy desarrollados (Figura 5).

f.- **Frutos.** Son aquenios, su tamaño varía entre 1 y 7 mm de largo. La forma que adquieren es variable desde oblonga elíptica, piriforme, ovada entre otras. El pericarpio es liso o rugoso, siendo glabro o densamente pubescente de pelos cortos y rígidos o largos y filamentosos.

g.- **Semillas.** Suelen ser piriformes y alcanzar en su desarrollo hasta un tercio de la cavidad ovárica o cubrirla totalmente, son péndulas y exalbuminadas con los cotiledones aplanados, carnosos y más largos que la radícula.

Las estructuras subterráneas (Figura 6 y 7) están compuestas por raíces engrosadas o rizomas y son las encargadas de la propagación de la especie, además de almacenar las reservas, éstas reservas están constituidas por almidón, aceites fijos y/o aceites esenciales. Por lo general, las valerianas habitan en climas que durante el invierno tienen que soportar condiciones extremas de temperatura (temperaturas bajo cero) y durante la estación más

cálida altos niveles de irradiación, por lo tanto, las estructuras subterráneas son las que le permiten a estas especies perpetuarse en estos tipos de ambientes.

**Figura 6.** Órganos subterráneos de las valerianas



**A.** *V. ferax* raíz engrosada; **B.** *V. carnosa* rizoma y raíces; **C-** *V. macrorhiza*, raíz engrosada; **D-** *V. clarionifolia*, engrosada; **E-** *V. ferax*, raíz.

La especie tipo del género es *Valeriana officinalis* L., es una planta nativa de Europa y Asia, se la utiliza desde la antigüedad por sus propiedades medicinales. El nombre genérico deriva del latín *valere*, que significa estar saludable, fuerte, sano, aludiendo a las propiedades medicinales de las valerianas y *officinalis* es el término que se asignaba a las especies utilizadas

en la oficina de las farmacias del siglo XVI, por lo tanto, es una especie utilizada desde hace siglos en la medicina tradicional.

### **Morfología y anatomía**

El naturalista Francés Joannes Chatin (1872) fue quien se interesó en las valerianas y a fines del siglo XIX publica la obra titulada "*Études Botaniques, Chimiques et Médicales sur les Valérianées*" en donde describe la morfología y la estructura anatómica de *V. officinalis* L., *V. phu* L., *V. montana* L., *V. celtica* L., *V. salunca* All, *Valeriana saxatilis* L. y *V. tuberosa* L.. En el siglo XX fueron descritos los órganos subterráneos de *Valeriana wallichii* DC. "valeriana de la India", *V. faurlei* Briq." "valeriana japonesa" y *V. edulis* Nutt, y Jones "valeriana mexicana". Lörcher y Weberling (1985) dan a conocer la estructura de los rizomas de *V. micropterina* Wedd y de *V. thalictroides* Graebn de los Andes Peruanos. De las especies de la Argentina, Borsini (1944) describe la exomorfología de los órganos subterráneos de las 23 especies conocidas hasta ese momento. Pilberg y Rossow (1992) hacen un estudio preliminar en donde muestran la disposición de los tejidos de los órganos subterráneos de *V. carnosa* y *V. boelckeii* ambas de la Patagonia. Petenatti *et al.* (2001) describen la morfología y la anatomía de dos especies nativas del centro y norte de la Argentina *V. ferax* (Griseb) Höck. y *V. polybotrya* (Griseb.) Höck. utilizadas en la medicina tradicional. Asimismo, en la Farmacopea Nacional Argentina VI edición se describe la anatomía y los caracteres micrográficos de *V. officinalis*, aclarando que la misma puede ser remplazada por *V. effusa* o *V. ferax* previa aclaración del origen de estas especies. Recientemente en la publicación de la

VIII edición de la farmacopea Argentina se vuelve a incluir a *V. officinalis* describiendo la anatomía del rizoma y de la raíz.

### **Usos en la medicina tradicional**

Los primeros registros escritos sobre los usos populares de *V. officinalis* datan del siglo XVI y fueron dados a conocer por Fabio Colonna en su *Phytobasanos* en 1592 (citado por Font Quer, 1962). Este sabio, dice Marchant en las “*Memoires de L’ Academie des Sciences*” (Paris, 1706 II páginas 172 - 173) “...que la raíz de la Valeriana es específico y excelente contra la epilepsia y que además de ver a epilépticos sanarse con Valeriana el mismo lo ha hecho...”. A su vez, desde la época de Dioscórides se le atribuyen numerosas acciones a las valerianas tales como: acción antiepiléptica, antihistérica, sudorífica, diurética, antihelmíntica y emenagoga, así como contra las convulsiones y las caídas y las exulceraciones de la boca y encías, en la hemicránea y debilidad de la vista (Font Quer, 1962). Los usos más destacados hasta nuestros días de los órganos subterráneos de *V. officinalis* son para el tratamiento sintomático de los estados neuróticos, especialmente en trastornos menores del sueño y dolores de la región gástrica (Bruneton, 2001). Otras especies del género que poseen usos medicinales son *V. walichii* DC (valeriana de la India); *V. fauriei* Briq. y *V. edulis* Nutt subesp *procera* F.G. Meyer (valeriana mexicana) (Bruneton, 2001). Entre las especies nativas de la Argentina que se utilizan en la medicina tradicional Domínguez (1928) menciona a *V. carnososa*, *V. effusa* y *V. ferax* (bajo el nombre de *Phyllactis ferax* Griseb) en donde dice: “...los rizomas de estas y otras especies de *Valeriana* y *Phyllactis* Pers. tienen propiedades sedantes y antiespasmódicas como la valeriana oficial”. Barbosa y col. (2009) menciona, entre las especies

medicinales argentinas, a *V. carnos*; *V. clarionifolia*, ambas especies son conocidas con el nombre vulgar de “ñancolahuen”, *V. laphatifolia* Vahl. (“hualhuinke”), *V. macrorhiza* DC.; *V. effusa* Griseb., *V. ferax* (Griseb.) Hock (“dorado”) y *V. polibotrya* (Griseb.) Hock.

De las especies argentinas de *Valeriana* se destacan los “ñancolahuen” (*V. carnos* y *V. clarionifolia*), por ser las especies a las que se les atribuyen la mayor cantidad de usos populares, tales como: sedante, antiespasmódico, diurético, digestivo y antirreumática (Domínguez, 1928). A los “ñancolahuen” se los consideran como las plantas que protegen los siguientes órganos: hígado, pulmón, corazón, estomago, vejiga y sangre (Dominguez, 1928; Saggese 1959 Ratera E., 1980; Conticello *et al.*, 1997; Barbosa *et al.*, 2009; Estomba *et al.*, 2009; Ochoa, 2010). Asimismo, a los “ñancolahuen” se les atribuyen propiedades mágicas utilizándose, con estos fines, en diferentes prácticas rituales por los nativos de la Patagonia. Cabe destacar que en las farmacias y herboristerías de la Argentina se comercializan los órganos subterráneos de “ñancolahuen”, *V. carnos* y *V. clarionifolia* (relevamiento personal).

**Figura 7.** Medicamentos herbarios de “ñancolahuen”



Envases en los que se expende “Ñancolahuen” en herboristerías y farmacias

## **Fitoquímica**

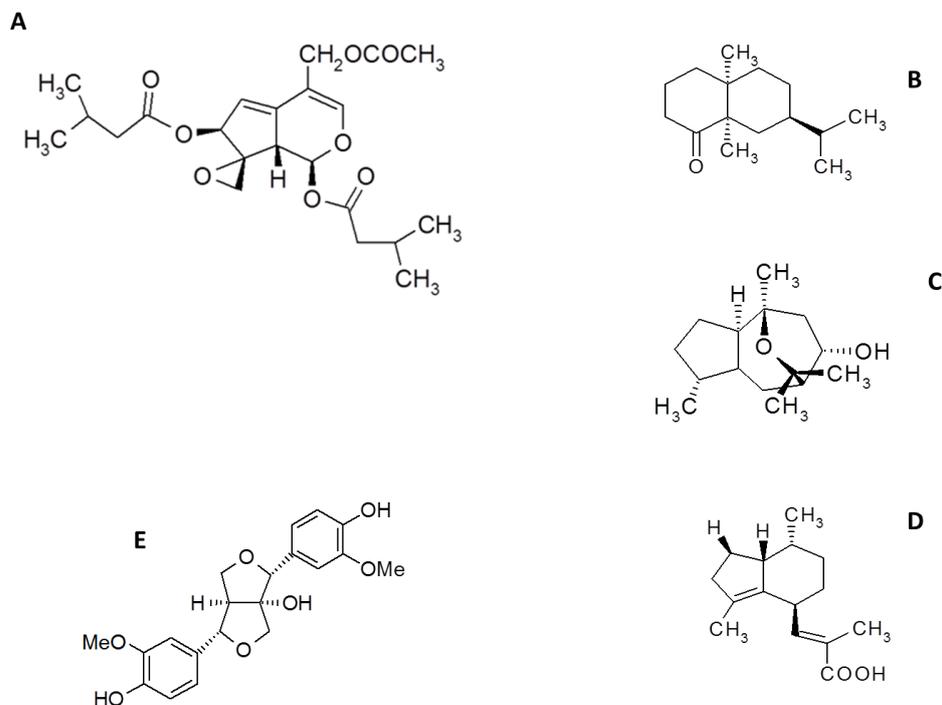
La especie más estudiada fitoquímicamente es *Valeriana officinalis*, de la cual se han aislado numerosos compuestos pertenecientes a diferentes grupos fitoquímicos.

## **Terpenos**

**Sesquiterpenos e iridoides.** Entre los sesquiterpenos no volátiles se destacan el ácido valerénico, el ácido acetoxivalerénico y el ácido hidroxivalerénico. Los sesquiterpenos volátiles, que se encuentran en cantidades de 2 - 20 ml/Kg de droga seca, son valerenal, valerianol, valeranol y sus ésteres (acetato, valerato), valeranona, alcohol kesílico, eudesmatrieno entre otros hidrocarburos (Bruneton, 2001; Houghton, 1997). Los iridoides que se aislaron son muy específicos, derivados del iridano 8,10 epoxidados, 3(4)-5(6)-diénicos (valtrato, isovaltrato, acevaltrato) o 3(4)-monoénicos (dihidrovaltrato, isovaleroxihidroxi-dihidrovaltrato) (Bruneton 2001) (Figura 8).

De las especies argentinas, Di Giusto y Mandrile (1976) realizaron un estudio para detectar la presencia de valepotriatos en valerianas de la Argentina. Pudieron detectar este tipo de compuestos en *V. carnososa* y *V. clarionifolia*, “ñancolahuen”, así como en *V. fonckii*, *V. laphatifolia*, *V. moyanoi*, *V. magellanica* y *V. polystachya*.

**Figura 8- Terpenos en las valerianas**



**A-**Valtrato (Valepotriato). **B-** Valeranona (sesquiterpeno). **C-** Alcohol kesilico (sesquiterpeno). **D-** Ácido valerénico (sesquiterpeno). **E-** Hidroxi-pinorresinol.

### **Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son compuestos de naturaleza química compleja, son volátiles y muy difundidos en el reino vegetal. Por lo general, son mezclas líquidas de varios compuestos.

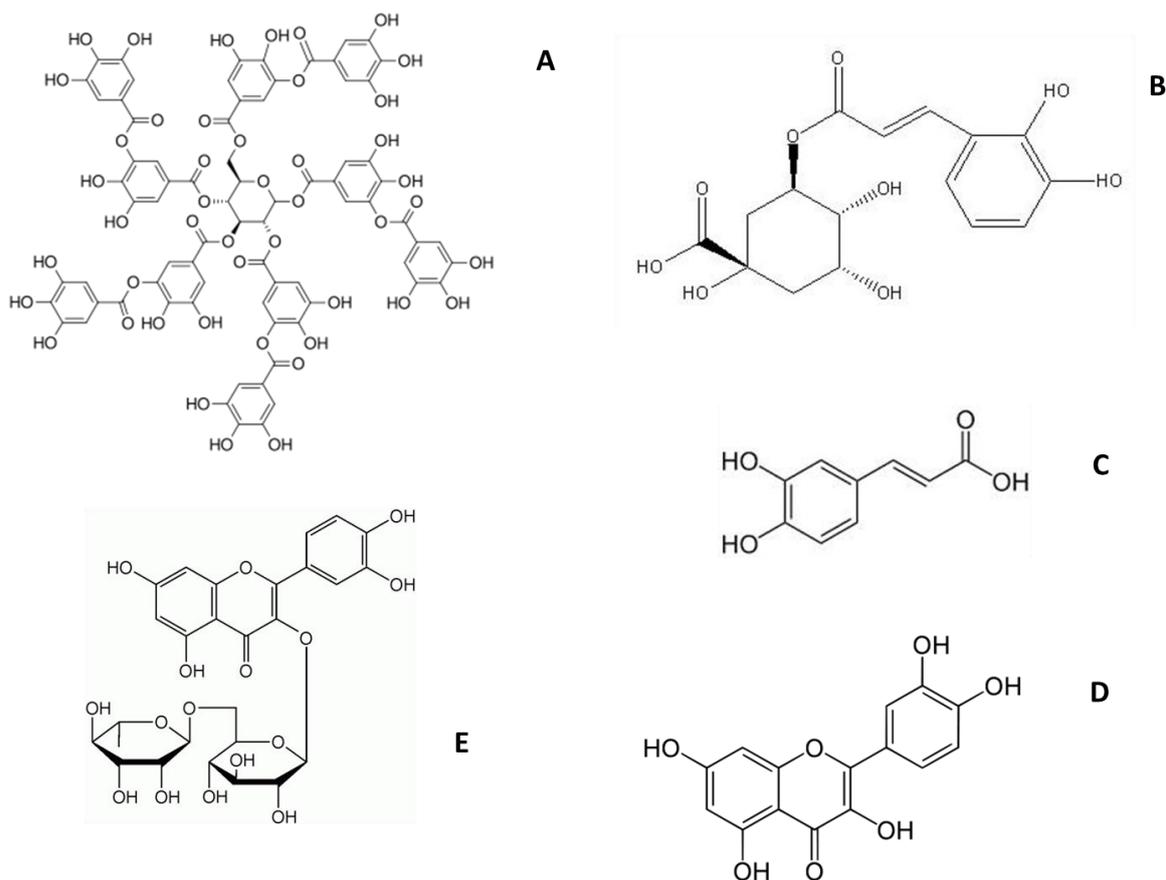
La fracción volátil de la droga seca de *V. officinalis* representa entre 2 y 20 ml/Kg (Bruneton, 2001). Esta amplia variación se debe al estado fenológico de los individuos en la cosecha, a las condiciones del cultivo y al método de

extracción. Los sesquiterpenos volátiles que principalmente se han aislado de *V. officinalis* son valerenal, valerianol, valeranol y sus ésteres (acetato, valerato), valeranona y el alcohol kesílico (Bruneton, 2001). Domínguez (1928) ya hace mención al contenido de los aceites esenciales en *V. polystachya* y *V. carnosa* atribuyéndole a esta última la presencia de borneol.

## **Fenoles**

Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo libres o sustituidos, el compuesto básico es el fenol pero la mayoría de los compuestos son polifenoles (Figura 9). Existen fenoles simples ( $C_6$ ) como el fenol, catecol y el floroglucinol. También hay derivados con cadenas laterales de uno, dos o tres carbonos representados por el ácido salicílico ( $C_6-C_1$ ), el ácido p-hidroxifenilacético ( $C_6-C_2$ ) y el grupo de los ácidos hidroxicinámicos ( $C_6-C_3$ ), por ejemplo, el ácido cafeico. De los compuestos polifenólicos los más abundantes en las plantas son las ligninas, los taninos y los flavonoides. Este último grupo se destaca por su constante presencia en las plantas y por ser compuestos que tienen actividad farmacológica. Se han aislado en *V. officinalis* la 6-metilapigenina (Wasowski *et al.*, 2002) y los glucósidos linarina y hesperidina, este último fue hallado también en *V. wallichii* (Marder *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2004). De las especies nativas de la Argentina solo se han aislado dos fenil-propanos de la planta entera de *V. carnosa* (ácido fenil-propiónico; 3-4 dihidroxi fenil-propanoide) (Barbosa *et al.*, 2009).

**Figura 9- Principales tipos de polifenoles.**



**A.-** Ácido tánico. **B.-** Ácido clorogénico. **C.-** Ácido cafeico. **D.-** Quercetina. **E.-** Rutina.

### **Acción farmacológica**

Dos actividades farmacológicas de *V. officinalis* han recibido la mayor atención por parte de los farmacólogos, uno es el efecto sedante y la otra acción es el

efecto espasmolítico. La acción sedante es la más estudiada (Alonso, 1998), a pesar de ello, algunos estudios son contradictorios y no se ha podido determinar de manera clara la naturaleza química de los compuestos responsables de dicha actividad (Bruneton, 2001). Sin embargo, en los últimos años se han aislado de *V. officinalis* los compuestos que estarían involucrados en la actividad sedante, como los flavonoides 6-metilapigenina (Wasowski *et al.*, 2002) y los glucósidos linarina y hesperidina, este último también fue hallado en *V. wallichii* (Marder *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2004).

De las especies nativas de la Argentina se han realizado estudios farmacológicos en dos especies, una de ellas es *V. carnososa*, en esta especie se describieron leves efectos ansiolíticos (Wasowski *et al.*, 1996), y la otra es *V. macrorrhiza*, a la que se le atribuyeron efectos hipnóticos (Wasowski *et al.*, 1996).

En los últimos años se han reportado estudios sobre la actividad antioxidante principalmente en *V. officinalis* (Dugaheh, *et al.*, 2013; Sudati, 2009). Los compuestos antioxidantes actúan previniendo el estrés oxidativo causado por los radicales libres, principalmente las especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas especies reactivas se forman en condiciones fisiológicas normales, pero cuando ocurre un desbalance entre ellas a favor de las especies oxidantes pueden producirse daños que conduzcan a distintos desordenes fisiológicos y enfermedades tales como, por ejemplo, insomnio (Sudati J.H., 2009), cáncer (Kinnula y Crapo, 2004), enfermedades cardiovasculares (Singh y Jialal, 2006), enfermedades neurodegenerativas (Smith *et al.*, 2000; Bolton *et al.*, 2000),

artritis (Badarinath, *et al.*, 2010) y trastornos del sistema digestivo (Dryden *et al.*, 2005).

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este trabajo de investigación son:

- 1.- Describir la estructura anatómica de las raíces y los rizomas de *Valeriana carnososa* y *Valeriana clarionifolia* para poder obtener los caracteres diagnósticos que permitan caracterizar, identificar y diferenciar los órganos de ambas especies que son utilizados en la medicina popular y tradicional y comercializadas en las herboristerías y farmacias.
- 2.- Estudiar la dinámica de los polifenoles de *V. carnososa* y *V. clarionifolia*, en distintas poblaciones y en diferentes estados fenológicos, para estudiar la variabilidad interpoblacional y determinar el momento propicio de la cosecha para su uso en la medicina tradicional y popular.
- 3.- Analizar cuali-cuantitativamente el aceite esencial de *V. carnososa* y de *V. clarionifolia*, para conocer su producción, composición y poder establecer la época adecuada de cosecha.
- 4.- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos y acuosos de *V. carnososa* y *V. clarionifolia*, para relacionar la actividad biológica evaluada con los usos tradicionales y populares registrados.

# CAPITULO I: MORFOLOGÍA Y ANATOMÍA



*Valeriana carnosa*

## **Materiales y métodos**

### Material vegetal

Los estudios se realizaron sobre los siguientes materiales: a) raíces y rizomas de ejemplares colectados en viajes a la región patagónica; b) ejemplares de herbario. Los materiales de referencia citados a continuación, así como los preparados histológicos permanentes obtenidos se encuentran depositados en el Herbario del Instituto de Recursos Biológicos (BAB) y en la Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, respectivamente.

El material se identificó mediante claves según Borsini (1999), y la nomenclatura de las especies se consignó de acuerdo con Kutschker (2009).

***Valeriana carnosa***: Argentina. - *Río Negro*. Dpto. Bariloche: cerro Otto, ladera de rocas del lado NW de la aerosilla del cerro. Elev. 1100 m. 9-12-2008. Leg. R.H. Fortunato *et al.* 9447 (BAB); El Bolsón: alrededores del mirador del cerro Piltriquitron. Elev. 1200 m. 18-III-2010. Leg. H. G. Bach 415 (BAB); - *Santa Cruz*. Dpto. Lago Buenos Aires: orilla del Río Ceballos. 29-XI-1990. M.N. Correa *et al.* 10343 (BAB); - *Tierra Del Fuego*. Dpto. Río Grande. San Sebastián: borde de playa sobre la Bahía San Sebastián. 29-I-1995. Leg. R.H. Fortunato & M. Elechosa 4895 (BAB).

***Valeriana clarionifolia***: Argentina. *Chubut*. - Dpto. Futaleufú: frente al lago Futalauquen. 2-12-1990. Leg. M.N. Correa *et al.* 10441(BAB); *Neuquén*. - Dpto. Los Lagos: Ruta 23, 5 Km al E. del cruce con RN 231 en dirección a Pilcaniyeu. Elev. 900 m. 8-12-2008. Leg. R.H. Fortunato *et al.* 9433 (BAB); *Río Negro*. -

Dpto. Pilcaniyeu: 2-3 Km. al NW de la pista del aeropuerto, frente a la torre de aviación. Elev. 700 m. 6-12-2008. Leg. R.H. Fortunato *et al.* 9381 (BAB); *Santa Cruz*.- Dpto. Lago Buenos Aires: camino al río Jeinemen RP 250. 28-12-1990. Leg. M.N. Correa *et al.* 10322 (BAB).

***Valeriana officinalis***: Argentina. San Juan. - Dpto: Calingasta. Barreal cosecha 2009 M. Ferres sin número (BAB 92505). Buenos Aires. Muestra comercial col H. G. Bach (BAB 92506).

## Metodología

Sobre las raíces y los rizomas se realizaron técnicas de corte y coloración, de disociación y de micrometría de almidón. Se obtuvieron secciones transversales a mano alzada y con micrótomo de deslizamiento Reichert. Las secciones obtenidas se colorearon con safranina - fast green según las técnicas estándar (D' Ambrogio de Argüeso, 1986; IRAM, 1994), y se montaron con bálsamo de Canadá.

El disociado de los órganos consistió en tomar pequeñas porciones del material a examinar, agregar NaOH 5 %, dejar en ebullición por 10 min, y luego lavar con agua y conservar en etanol 70° (WHO, 1998; IRAM, 1993). La observación macroscópica y las características organolépticas se examinaron siguiendo la propuesta de la Organización Mundial de Salud (WHO, 1998), la observación con luz ultravioleta se realizó con un equipo "Camag" a la longitud de 366 nm. Para la observación de los granos de almidón se redujeron porciones de raíces y rizomas a polvo y se observaron bajo luz polarizada. Las mediciones de los

granos de almidón se llevaron a cabo con un ocular micrométrico calibrado Carl Zeiss PL 10x. Las observaciones microscópicas y las fotomicrografías se realizaron con un foto microscopio Zeiss Axiolab MC 80 DX. Las ilustraciones de los ejemplares fueron realizados por una ilustradora científica y en el esquema de los cortes transversales se utilizó la simbología de Metcalfe y Chalk (1983).

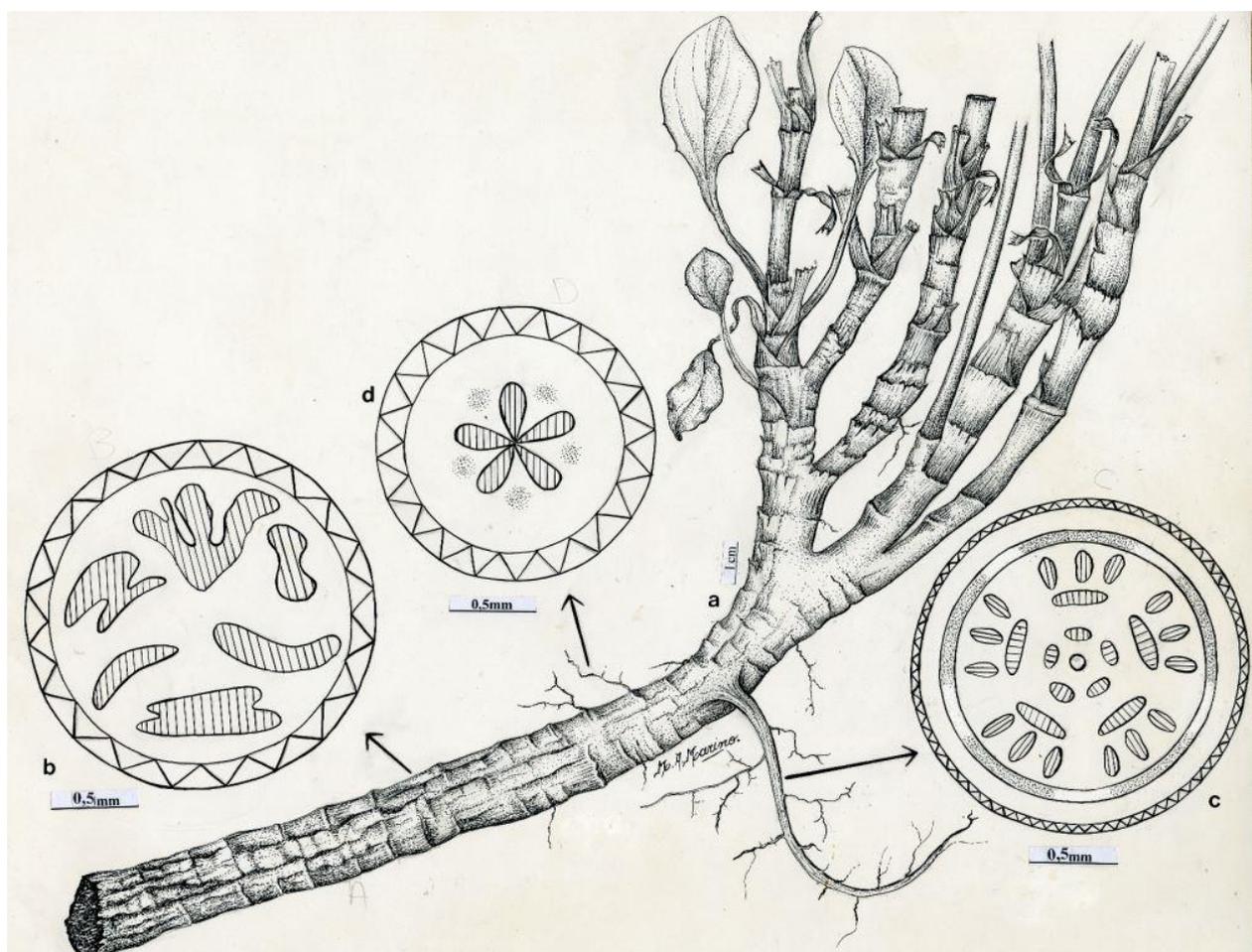
## **Resultados**

### ***Valeriana carnososa***

**Morfología.** El rizoma es de gran desarrollo mide entre 2 - 6 cm de diámetro y puede alcanzar hasta 60 cm de longitud; presenta yemas y su crecimiento es determinado, monopodial (Figura 9). Las raíces secundarias, de 0,3 – 0,6 cm de diámetro, son de color castaño, estriadas, sin surcos y no presentan yemas (Figura 2 - 3, A).

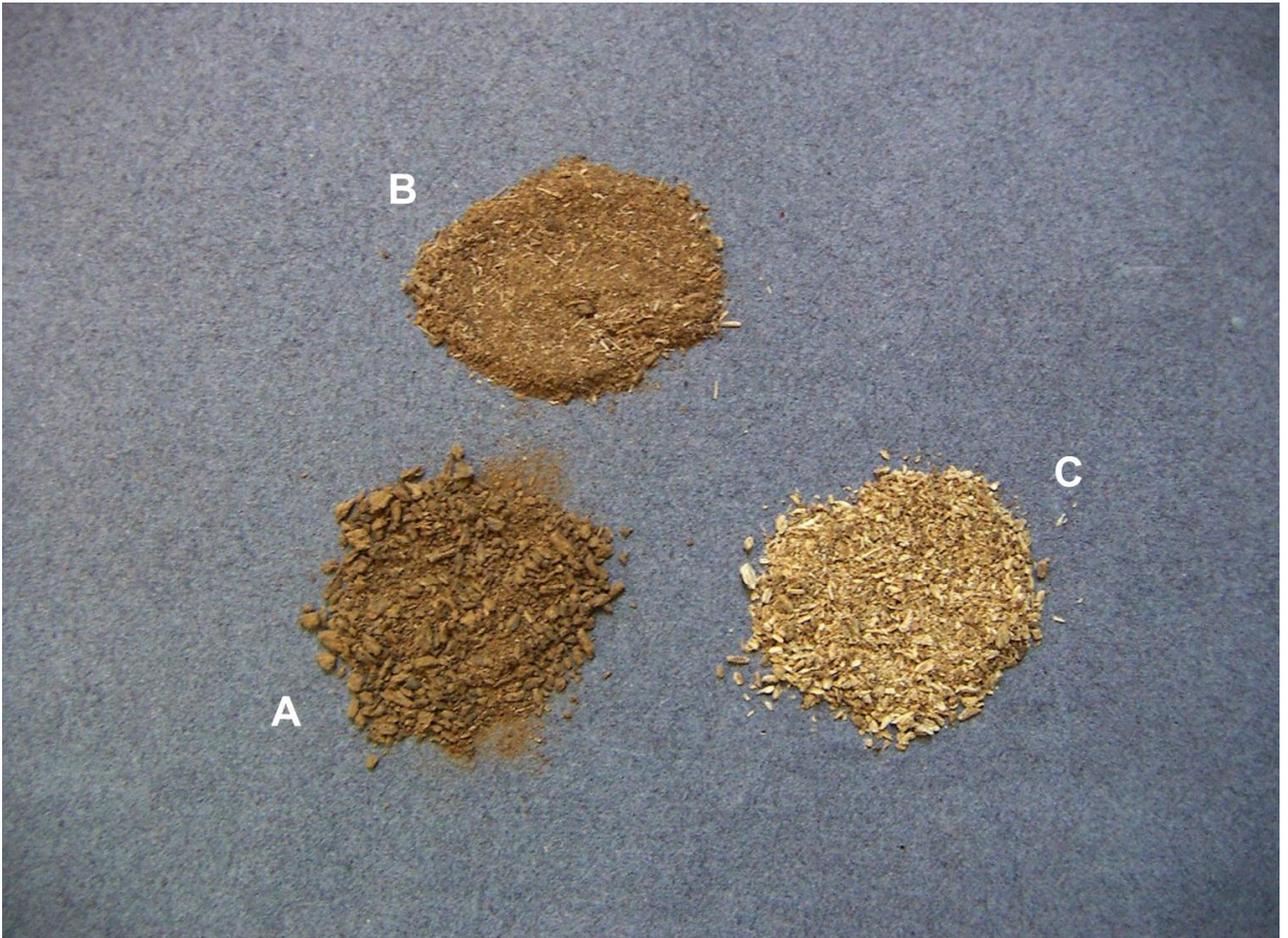
**Macroscopía y caracteres organolépticos.** La superficie es de color castaño oscuro y posee estriaciones lineales y/o helicoidales, profundamente surcadas. El tipo de fractura es plana. El olor que presenta es el típico de las valerianas pero suave. El material molido observado a la luz natural presenta coloración castaño oscuro o marrón (Figura 10). Pero al ser observado a la luz ultravioleta de longitud de onda de 366 nm el color es castaño claro (Figura 11).

**Figura 9. *Valeriana carnosa***



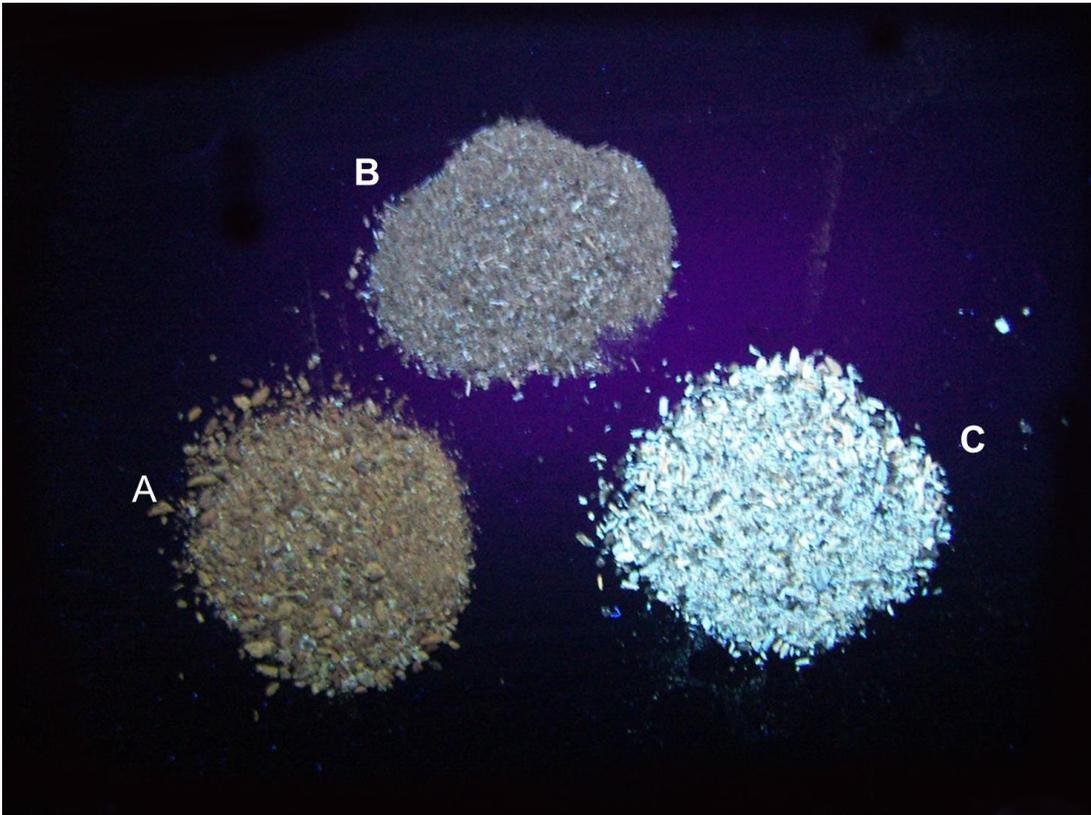
**a-** *Valeriana carnosa* vista macroscópica de rizoma y raíces. **b-** Diagrama en corte transversal con la simbología de Metcalfe del rizoma. **c-** Diagrama en corte transversal con la simbología de Metcalfe de la raíz secundaria. **d-** Diagrama en corte transversal con la simbología de Metcalfe de la raíz primaria.

**Figura 10.** Observación del polvo con luz natural



**A-** *Valeriana carnosa*. **B-** *Valeriana officinalis*. **C-** *Valeriana clarionifolia*.

**Figura 11.** Observación del polvo bajo luz ultravioleta (366 nm)



**A-** *Valeriana carnososa*. **B-** *Valeriana officinalis*. **C-** *Valeriana clarionifolia*.

**Microscopía.** Las secciones transversales de las raíces primarias presentaron una estructura típica en actinostela tetrarca o pentarca, con temprano desarrollo de peridermis (Figura 12-B). En el estado de crecimiento secundario se observa la médula (Figura 12-C). Las estelas presentaron xilema homogéneo y radios xilemáticos de escaso desarrollo (Figura 12-D y E). La

relación cilindro central/ corteza es baja, presentando el parénquima cortical y la peridermis el mismo desarrollo (Figura 12-D).

Las secciones transversales del rizoma mostraron una estructura con crecimiento secundario anómalo, donde el tejido de conducción xilemático se encuentra disperso en el parénquima formando grupos irregulares libres de floema y con una disposición fisurada. La peridermis presentó escaso desarrollo (Figura 12-F).

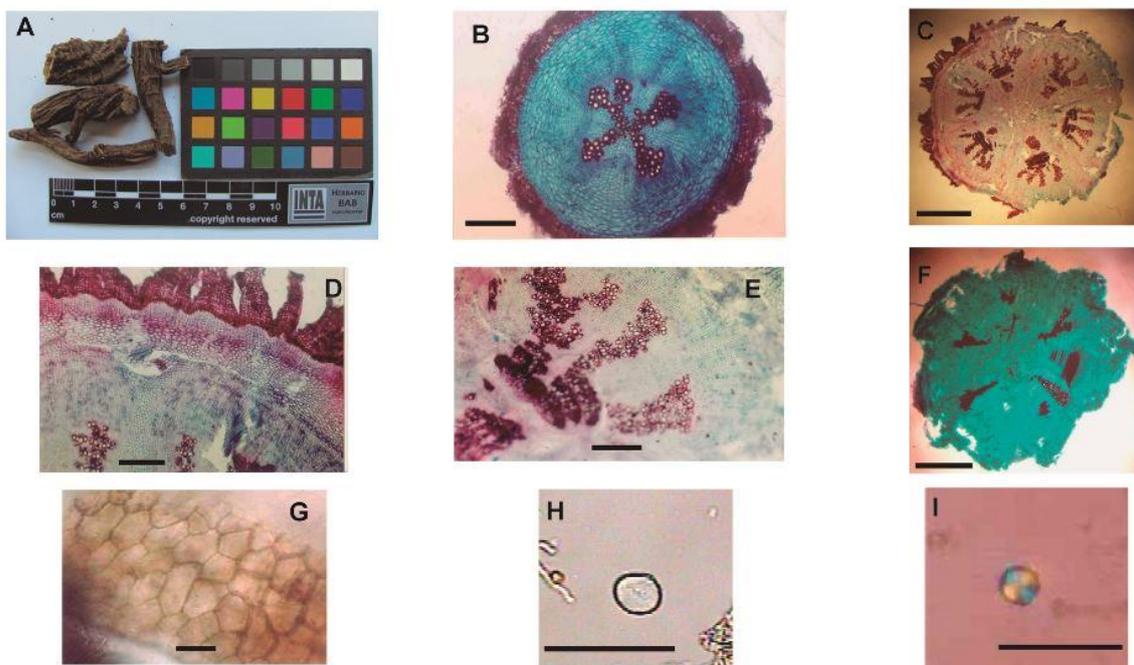
En el disociado del rizoma, el súber presentó células de forma poligonal irregular con ángulos agudos y obtusos (Figura 12-G).

En el examen del polvo de los órganos subterráneos se observaron células suberosas, tráqueas, fibras y granos de almidón simples, de forma esférica, con hilio central. El diámetro promedio de los granos fue de 10 - 20  $\mu\text{m}$ . Observados bajo luz polarizada exhibieron típica cruz de malta (Figura 12-H, I).

### ***Valeriana clarionifolia***

**Morfología.** El sistema subterráneo consiste en una raíz pivotante de hasta 4 cm de diámetro y puede presentar ramificaciones. No presenta rizoma sino que es la misma raíz la encargada de almacenar las sustancias de reserva como los carbohidratos (almidón y aceites) y el agua. (Figura 13-a).

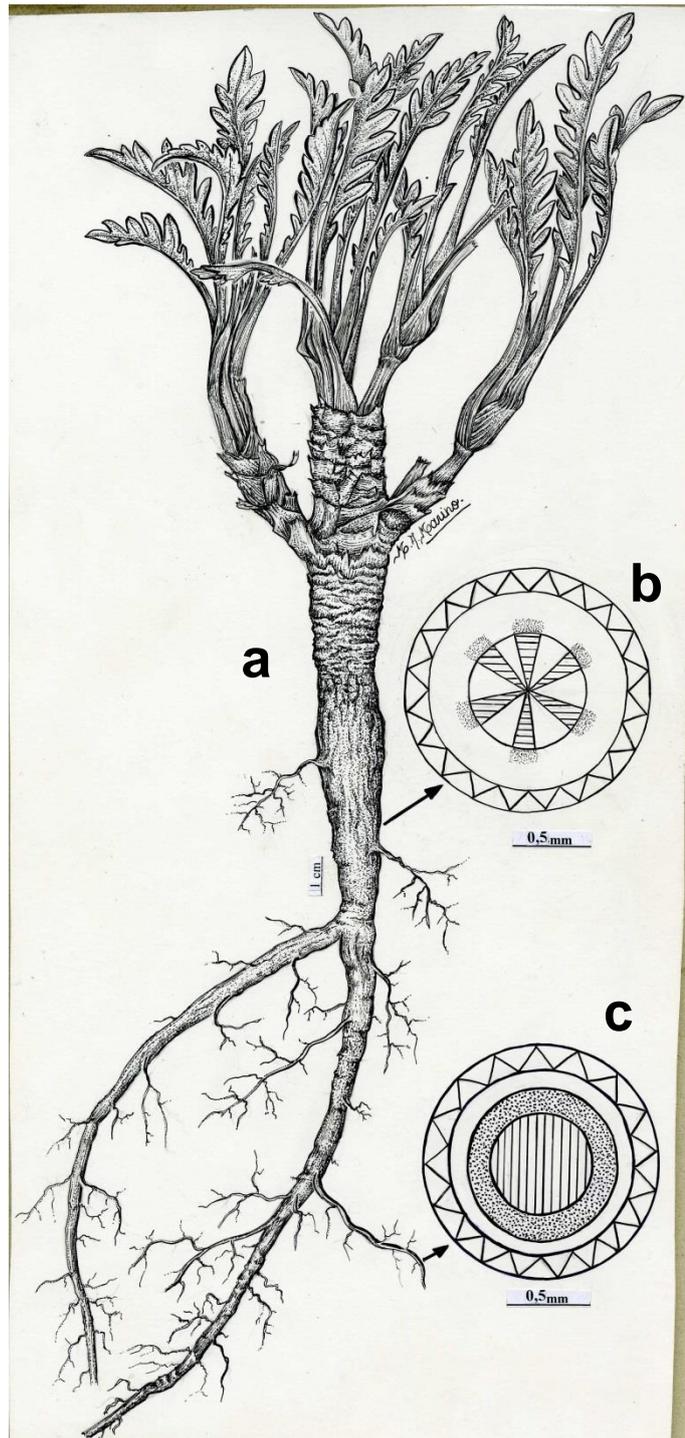
**Figura 12.** *Valeriana carnososa*, vista macroscópica y microscópica



**A-** Vista macroscópica. **B-** Corte transversal de la raíz primaria. **C-** Corte transversal de la raíz secundaria. **D-** Corte transversal de la raíz, detalle de la corteza comercial. **E-** Corte transversal de la raíz secundaria, detalle del haz vascular. **F-** Vista general del rizoma. **G-** Detalle del súber del rizoma. **H-** Grano de almidón. **I-** Grano de almidón visto con luz polarizada.

Escala de las barras. B: 354  $\mu\text{m}$ ; C, D: 2,5 mm; E, F: 354  $\mu\text{m}$ ; G, H, I: 50  $\mu\text{m}$ .

**Figura 13.** *Valeriana clarionifolia*

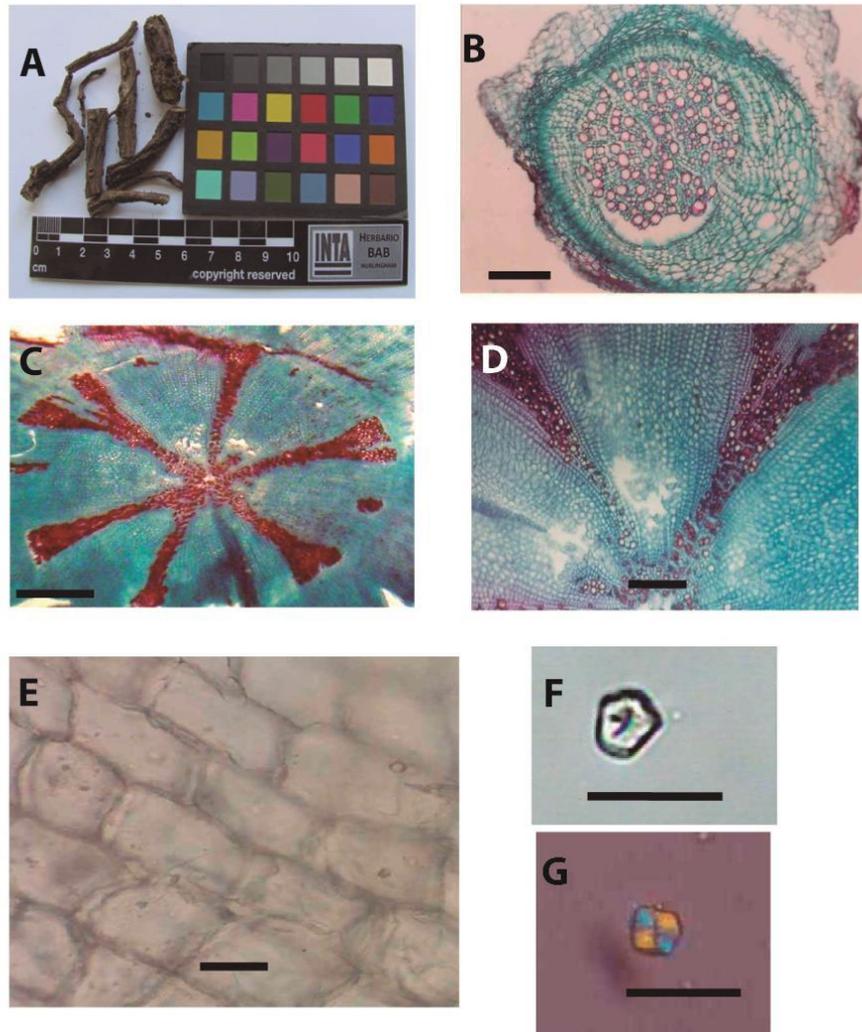


**a-** Vista macroscópica de la raíz engrosada. **b-** Diagrama del corte transversal de la raíz secundaria con la simbología de Metcalfe. **c-** Diagrama del corte transversal de la raíz primaria con la simbología de Metcalfe.

**Macroscopía y caracteres organolépticos.** El color es castaño claro, la superficie es rugosa, y no presenta estriaciones surcadas. El tipo de fractura es plano y levemente fibroso. En el material molido, el polvo es de color castaño claro (Figura 10-C), adquiriendo una coloración blanca al ser iluminado con luz UV de 366 nm (Figura 11-C).

**Microscopía.** En la sección transversal de la raíz, el crecimiento secundario se inicia tempranamente ya que se hace visible en las raíces de aproximadamente 1 mm de diámetro. El haz vascular en la estructura primaria de la raíz forman una protóstela ectofloica, por lo tanto, no hay médula presente. No se observa endodermis. El espesor del floema y del parénquima es variable, con 5 - 6 estratos celulares. El súber también presenta espesor variable con estratos de 6 - 7 células, estas son de mayor tamaño que las células del parénquima (Figura 14-B). En el estado de crecimiento secundario, que son las raíces utilizadas en medicina tradicional, el haz vascular desarrolla una actinostela hexarca con amplios radios xilemáticos. La relación cilindro central/corteza es de 1:1. El floema se mezcla con las células parenquimáticas y el límite no se visualiza debido a la ausencia de fibras floemáticas. La peridermis se encuentra bien desarrollada y la relación corteza/peridermis es de 2:1 (Figura 13-b; Figura 14-C).

**Figura 14.** *Valeriana clarionifolia*



**A-** Vista macroscópica. **B-** Corte transversal de la raíz primaria. **C-** Corte transversal de la raíz secundaria. **D-** Radios xilemáticos. **E-**Detalle del súber. **F-** Grano de almidón. **G-** Grano de almidón visto con luz polarizada.

Escala de las barras. B, D: 354  $\mu\text{m}$ ; C: 1,5 mm; E, F, G: 50  $\mu\text{m}$ .

En el disociado se observaron células suberosas de forma rectangular, con ángulos rectos (Figura 14-E).

En el examen del polvo se observó la presencia de granos de almidón simples, de 15 - 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, de forma hexagonal y con hilo central. Observados bajo luz polarizada exhibieron la típica cruz de malta (Figura 14-F, G).

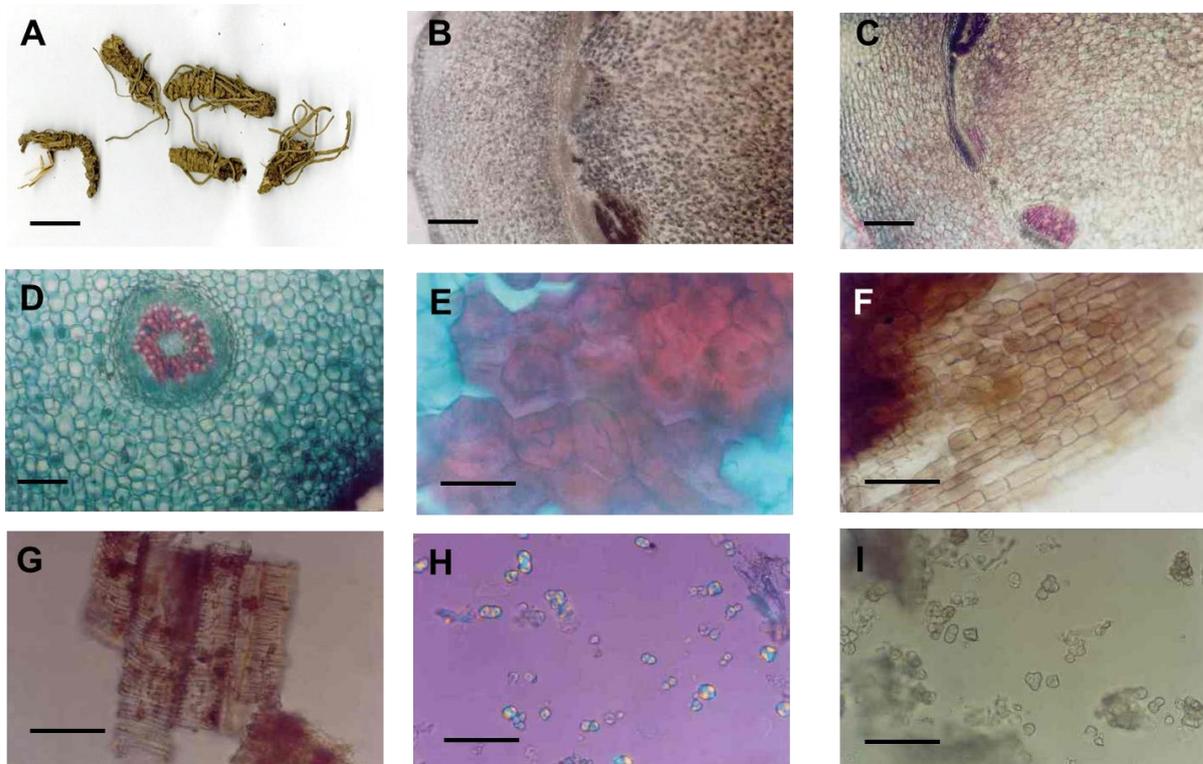
### ***Valeriana officinalis***

**Morfología.** Los órganos subterráneos de *V. officinalis* están formados por raíces y rizomas, estos últimos son horizontales de aproximadamente 1 cm de diámetro. De este rizoma crecen las raíces y en conjunto conforman la parte usada de esta droga vegetal (Figura 15-A).

**Macroscopía y caracteres organolépticos.** El rizoma es ovoide, de 3 - 6 cm de longitud y hasta 2 cm de diámetro. La superficie es de color pardo-amarilla a pardo-oscuro. La fractura es corta y cornea. Tiene el olor particular de las valerianas, penetrante y desagradable para algunas personas y de sabor algo amargo (Figura 15).

**Microscopia.** El rizoma presenta una estructura vascular en eustela. Con una peridermis de escaso desarrollo, un parénquima cortical amilífero, con haces fibrovasculares dispersos, colaterales y una médula grande y amilífera. Mientras que la raíz posee una sifonostela ectofloica, un parénquima cortical de varias hileras de células amilíferas y las células de la hipodermis a veces poseen glóbulos oleosos. Al examinar el polvo se observan granos de almidón simples o compuestos de 3 - 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, (Figura 15) (FNA 1978; Williamson, 1999).

**Figura 15-** Macroscopía y microscopía de los órganos subterráneos de *Valeriana officinalis*



**A.-** Vista macroscópica de los rizomas y raíces. **B-** Rizoma sin coloración. **C-** Rizoma coloreado. **D-** Corte transversal de la raíz primaria. **E-** Esclereidas en el disgregado del rizoma. **F-** Suber. **G-** Elementos de conducción. **H-** Granos de almidón vistos con la luz polarizada. **I-** Granos de almidón observados sin luz polarizada.

Escala de las barras. A: 2 cm; B,C,D: 354  $\mu$ m; E,F,G: 150  $\mu$ m; H,I: 50  $\mu$ m.

## Discusión

De las especies que posee el género *Valeriana* y que se utilizan en medicina tradicional, *V. officinalis* fue la primera en la cual se conoció la anatomía de sus órganos subterráneos. Se caracteriza por poseer un rizoma del cual emergen numerosas raíces. El rizoma presenta una estructura vascular en eustela, mientras que la raíz primaria posee una sifonostela ectofloica (Figura 15 B, C y D) (Youngken, 1958). *V. carnososa* está incluida en el grupo de las especies que poseen rizoma, pero a diferencia de *V. officinalis*, el rizoma de *V. carnososa* presenta una estructura secundaria anómala vista en el transcorte (Figura 12-F).

El crecimiento anómalo se da en varios grupos, sobre todo en dicotiledóneas, y es común hablar de ellos como estructuras atípicas. Metcalfe y Chalk, (1983) describen varios tipos de crecimiento anómalo, aunque no para la familia Valerianaceae. La disposición del xilema de *Schnella microstachya* Raddi (sub. nom. *Bauhinia langsdorfiana* Bong.) (Leguminosae) descrita por Metcalfe y Chalk (1983) se asemeja a la que presenta *V. carnososa*. En el género *Valeriana*, Lörcher y Weberling (1985) reportaron un tipo de crecimiento secundario anómalo en los rizomas de *V. micropterina* Wedd y de *V. thalictroides* Graebn especies procedentes de los Andes peruanos, en el cual se forman zonas de cambium medular que producen xilema interno que se fractura en porciones pequeñas y pueden unirse unas con otras en anillos elipsoidales. De esta

manera, se forman complejos de tejido conductor sin floema. Este tipo de crecimiento, que hace que el xilema se encuentre disperso por todo el órgano sin seguir un orden, es el que presenta *V. carnos*.

Por otro lado, *V. clarionifolia* carece de rizoma y sólo posee raíces. Dado la exomorfoloía que presentan las dos especies de “ñancohuen”, en una muestra comercial habrá que comparar el rizoma con estructura anómala de *V. carnos* con las raíces secundarias de *V. clarionifolia*, ya que estas estructuras representan más del 90 % de los órganos subterráneos de dichas especies.

El disociado del material aporta un carácter diagnóstico muy distintivo. Mientras que en *V. clarionifolia* el súber presenta células cuadrangulares, de ángulos rectos, las células del súber de *V. carnos* son poligonales, con ángulos agudos y obtusos. Asimismo, en *V. officinalis* las células del súber son irregulares según Schneider (1921), por lo tanto, este carácter sirve para diferenciar a las dos especies de “ñancohuen” entre sí y a *V. clarionifolia* de *V. officinalis*.

Los granos de almidón son sustancias ergásticas de reserva que se pueden detectar muy fácilmente sin usar sustancias químicas y, por lo tanto, no afecta irreversiblemente la muestra, para lograrlo se utiliza la luz polarizada para la observación. Los granos de almidón pueden ser detectados inclusive cuando las drogas vegetales se presentan en polvo. En *V. carnos* y *V. clarionifolia* los granos de almidón se diferencian por el tamaño y la morfología, 10 - 20 µm de diámetro y esféricos en *V. carnos*, mientras que en *V. clarionifolia* miden 15 -

25  $\mu\text{m}$  de diámetro y son de forma hexagonal. Estas dos especies se diferencian de *V. officinalis* ya que en esta última los gránulos son numerosos, de diámetro muy variable (3 - 20  $\mu\text{m}$ ), y suelen agruparse como granos compuestos (Schneider, 1921; Youngken, 1958; FNA, 1978; Jackson y Snowdon, 1990). También se pueden diferenciar de *V. jatamansi* Jones, ya que esta especie presenta gránulos simples o compuestos de 10 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, así como de *V. procera* Kunth y *V. edulis* Nutt. que no presentan granos de almidón (Joshi *et al.*, 2005). En las especies nativas de la Argentina, *V. ferax* (Griseb) Höck. y *V. polybotrya* (Griseb.) Höck., a las que se les realizaron estudios farmacognósticos, no se hallaron gránulos de almidón (Petenatti *et al.*, 2001). Dado que en las especies patagónicas el contenido de almidón es escaso hay que realizar un examen minucioso para poder detectarlo ya que de lo contrario puede no ser informado (Molares & Ladio, 2012). Asimismo, se recomienda analizar más de una población en este tipo de estudios.

## **CONCLUSIÓN**

Se describe por primera vez la anatomía de los órganos subterráneos de *V. carnosa* y de *V. clarionifolia*. Por medio de los cortes transversales de las raíces de ambas especies es posible diferenciarlas. En caso que el material se encuentre en porciones muy pequeñas que no permitan realizar un corte histológico para ver la disposición de todos los tejidos, se podrán autenticar mediante la observación de las células suberosas o de los granos de almidón. El súber se podrá estudiar en un disociado de órganos (disgregado) o en el

polvo de la droga vegetal y los granos de almidón solo se los podrá identificar en el polvo.

## **CAPITULO II: FITOQUÍMICA**

### ***SECCIÓN I: POLIFENOLES***



**Nevada de verano en el cerro Piltriquitron**

## **Sección I: Estudio de polifenoles**

### **Materiales y métodos**

#### ***1.- Material Vegetal***

El material vegetal con el cual se realizaron los estudios de polifenoles fueron recolectados en la región patagónica (Tabla 1). Se colectaron las plantas enteras y posteriormente se separaron los órganos aéreos de los subterráneos. Fueron secados al abrigo de la luz y a temperatura ambiente. La molienda del material se realizó con un molinillo marca IKA, modelo A11 basic. Las determinaciones se realizaron de acuerdo con los trabajos de Borsini (1999) y de Kutschker (2011). Los ejemplares de referencia se encuentran depositados en el herbario del Instituto de Recursos Biológicos (BAB), del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias INTA - Castelar y en el Museo de Farmacobotánica “Juan Aníbal Domínguez” (BAF) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

**Tabla 1-** Material vegetal

| <b>Especie</b>                 | <b>Localidad</b>   | <b>Ambiente</b>                       | <b>Fecha y colector</b>                            | <b>Herbario</b> |
|--------------------------------|--|---------------------------------------|--|-----------------|
| <b><i>V. carnosa</i></b>       | Pcia Río Negro<br>Bariloche<br>cerro Otto  | Precordillera<br>Elevación<br>1000 m  | 09-XI-2008<br>R.H. Fortunato<br><i>et al.</i> 9447 | BAB             |
| <b><i>V. carnosa</i></b>       | Pcia. Río Negro<br>Bariloche<br>cerro Otto   | Precordillera<br>Elevación<br>1050 m  | 12-III-2010<br>H.G. Bach 403                       | BAB<br>BAF      |
| <b><i>V. carnosa</i></b>       | Pcia. Río Negro<br>El Bolsón<br>cerro Piltriquitron  | Precordillera<br>Elevación<br>1200 m  | 09-XI-2010<br>R.H. Fortunato<br><i>et al.</i> 9789 | BAB             |
| <b><i>V. carnosa</i></b>       | Pcia. Río Negro<br>El Bolsón<br>cerro Piltriquitron  | Precordillera<br>Elevación<br>1200 m. | 18-III-2010.<br>Leg. H. G.<br>Bach 415.            | BAB<br>BAF      |
| <b><i>V. clarionifolia</i></b> | Pcia. Neuquén<br>Dpto. Los Lagos:<br>Ruta 23, 5 Km al E<br>del cruce con RN<br>231 en dirección a<br>Pilcaniyeu. | Estepa<br>Elevación<br>900 m.         | 8-XI-2008<br>R.H. Fortunato<br><i>et al.</i> 9433  | BAB             |
| <b><i>V. clarionifolia</i></b> | Pcia. Río Negro<br>Dpto. Pilcaniyeu: 2-3<br>Km. al NO de la pista<br>del aeropuerto                              | Estepa<br>Elevación<br>700 m          | 6-XI-2008<br>R.H. Fortunato<br><i>et al.</i> 9381  | BAB             |
| <b><i>V. clarionifolia</i></b> | Pcia. Neuquén<br>Dpto. Los Lagos:<br>Ruta 23, 5 Km al E.<br>del cruce con RN<br>231 en dirección a<br>Pilcaniyeu | Estepa<br>Elevación<br>900 m.         | 15-III-2012<br>H.G. Bach y F.<br>Robbiati 568      | BAB             |
| <b><i>V. clarionifolia</i></b> | Pcia. Río Negro<br>Dpto. Pilcaniyeu: 2-3<br>Km. al NW de la<br>pista del aeropuerto                              | Estepa<br>Elevación<br>700 m          | 15-III-2012<br>H.G. Bach y F.<br>Robbiati 561      | BAB             |
| <b><i>V. officinalis</i></b>   | Pcia. San Juan<br>Barrial. Cultivo   | Precordillera                         | III-2007<br>M. Ferres s/n                          | BAB<br>23452    |

Descripción de la localidad, ambiente y fecha de recolección de los especímenes utilizados para el estudio de la dinámica de polifenoles

## **2.- Obtención de los extractos**

### *Extractos metanólicos 80 %*

Los extractos para el estudio de los polifenoles y de la actividad antioxidante fueron realizados con metanol 80 %, por maceración durante 48 horas, a partir de 1 g de material vegetal molido en 10 ml del solvente. Luego de las 48 horas se filtraron y de esta manera se obtuvieron los extractos metanólicos.

### *Cocimientos*

El cocimiento es una forma farmacéutica líquida, de preparación extemporánea, constituida por una solución extractiva, preparada por la acción del agua mantenida en ebullición, sobre la droga más o menos dividida o también entera cuando está formada por piezas pequeñas. La proporción que se utiliza es de 50 g de material vegetal en 1000 ml de agua destilada. El proceso consistió en colocar la droga en un recipiente tipo vaso de precipitados, se vertió el agua, se tapó imperfectamente, se calentó hasta que comenzó a hervir dejando en ebullición por 20 minutos. Se dejó enfriar hasta alcanzar los 50 - 40 °C, se filtró y se lavó el residuo hasta completar los 1000 ml.

### *Tinturas*

La tintura es una forma farmacéutica líquida, generalmente constituida por una solución extractiva, preparada con drogas complejas vegetales o animales y alcohol solo o asociado con agua, éter, glicerina u otras sustancias convenientes. La proporción de la droga o las drogas, así como la calidad y la cantidad del menstruo y el procedimiento de obtención, variarán de acuerdo con la naturaleza de los principios a disolver. Las tinturas de drogas heroicas, en general, se preparan de acuerdo con las prescripciones de la Convención

Internacional de Bruselas, de manera tal que para cada 100 g de droga se obtengan 1000 ml de tintura, se utiliza alcohol 70° como menstruo y se procede por lixiviación. Las tinturas de drogas no heroicas (como es el caso de la valeriana), en general, se preparan de manera que cada 200 g de droga vegetal se obtengan 1000 ml de tintura, variando el menstruo y el procedimiento de preparación. En el procedimiento tipo maceración (procedimiento tipo M), que es el que se utilizó, consiste en colocar la droga y unos 850 ml del menstruo prescripto (alcohol 70°) en un frasco con tapa adecuada. Se mantiene la mezcla a temperatura ambiente durante 7 días. Luego se filtra, se prensa el residuo y se lava con el solvente del menstruo hasta obtener los 1000 ml.

Se aclara que primeramente se realiza un *screening* tanto de los órganos subterráneos como de los aéreos con extractos metanólicos. Como los órganos utilizados en la medicina tradicional y comercializados en las farmacias y herboristerías son los subterráneos, se realizan con estos órganos infusiones y cocimientos que son las formas farmacéuticas más utilizadas para administrar valeriana.

### **3- Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos totales**

#### **3.1. *Modificación del método de Dao y Friedman* (1992)**

Se tomó una alícuota de 50 µl del extracto y se llevó a volumen (2 ml) con etanol absoluto. Se determinó la absorbancia a 328 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico. Los valores se expresaron como equivalentes de ácido clorogénico (mg de ácido clorogénico / g material seco).

### **3.2 Cuantificación de flavonoides**

El método aquí descrito se basa en la formación de complejos coloreados entre los hidroxilos fenólicos y el grupo ceto de los flavonoides con el tricloruro de aluminio y el acetato de sodio.

#### ***Modificación de la técnica de Maksimovic et al. (2005)***

Se tomaron 0,1 ml del extracto y se le adicionaron 1,4 ml de agua desionizada y 0,50 ml del reactivo de flavonoides (133 mg tricloruro de aluminio, 400 mg acetato de sodio en 100 ml de solvente constituido por 140 ml metanol, 50 ml agua, 10 ml ácido acético). Luego de 5 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 360 nm.

Se realizó una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides se expresó como equivalentes de rutina (mg rutina / g material seco).

### **3-3. Cuantificación de fenoles totales**

Entre las mediciones realizadas en los estudios de química ecológica, la determinación del contenido total de compuestos fenólicos ocupa un lugar preponderante. Las técnicas empleadas permiten cuantificar el contenido de hidroxilos fenólicos presentes en el material a analizar (extractos), independientemente de la naturaleza de cada componente presente.

En la actualidad, la cuantificación de los fenoles totales es llevada a cabo mediante dos técnicas: el método de Folin-Ciocalteu (el más empleado) y el

método de Price y Butler. Ambos métodos se fundamentan en reacciones de óxido reducción.

En el método de Folin-Ciocalteu, el ión fenolato es oxidado (en medio alcalino) mientras que el reactivo fosfotúngstico-molíbdeno es reducido, formando un complejo color azul (cromóforo).

#### ***Método de Folin–Ciocalteu*** (Makkar et al., 1993)

Se tomó una alícuota (50 - 100  $\mu$ l) del extracto y fue transferida a un tubo de ensayos y el volumen se llevó a 500  $\mu$ l con agua desionizada. Se adicionaron a continuación 250  $\mu$ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 ml de solución acuosa de carbonato de sodio al 20 %. Luego de 40 minutos se midió la absorbancia a 725 nm. El contenido de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido tánico (mg ácido tánico / g material seco) o equivalentes de ácido gálico (mg ácido gálico / g material seco).

#### **Análisis Estadístico**

Se analizaron 3 individuos por población, para cada población se calculó la media aritmética y el desvío estándar. Para contrastar la hipótesis nula de que las medias de las distintas poblaciones coinciden se realizó un ANOVA, y para las comparaciones entre pares de medias se utilizó el test de Tukey con un nivel de significación de 0,05.

#### **Resultados**

Primeramente se exponen los resultados de las cuantificaciones realizadas con los extractos metanólicos al 80 %.

#### Fenoles totales

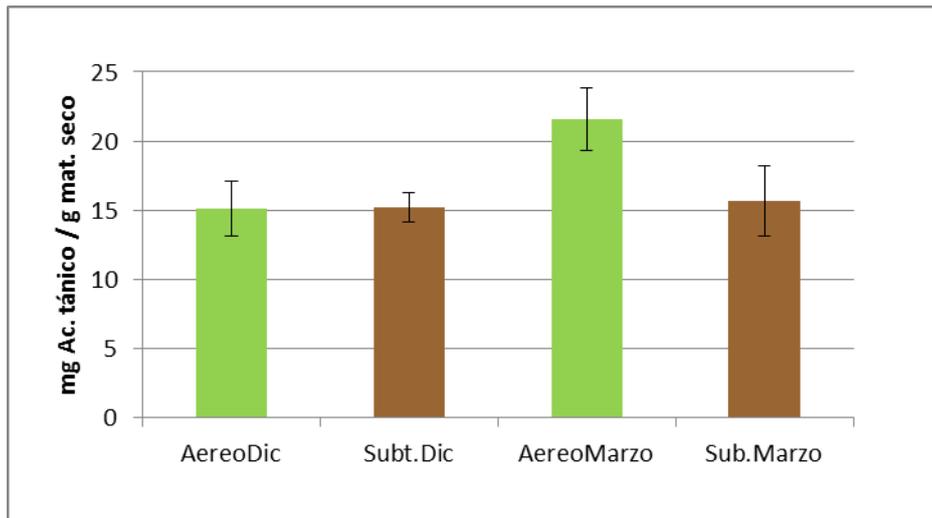
##### *V. carnos*a partes aéreas

Los valores de fenoles totales, en las partes aéreas, expresados como mg de ácido tánico / g de material seco fueron mayores en el estado fenológico de finales del periodo de crecimiento, esta diferencia fue significativa para las dos poblaciones analizadas.

##### *V. carnos*a partes subterráneas

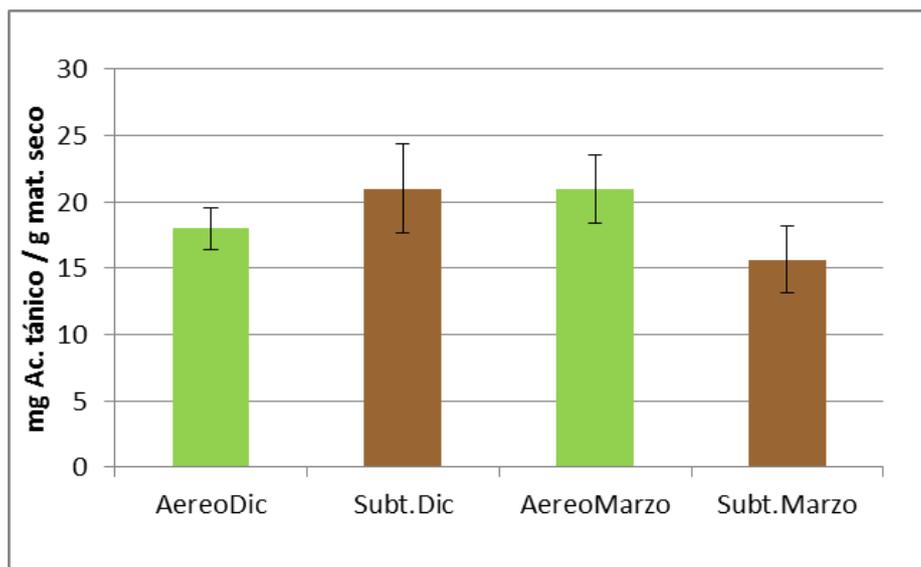
En los órganos subterráneas hubo leves diferencias entre los estadios fenológicos en la población del cerro Piltriquitron, los valores fueron levemente inferiores en el estado fenológico de postfructificación. No se detectaron diferencias entre los diferentes estadios fenológicos en la población del cerro Otto (Figura 16 y 17).

**Figura 16-** Fenoles totales de *V. carnos*a



Fenoles totales de *V. carnosa* de la población del cerro Otto.

**Figura 17-** Fenoles totales de *V. carnosa*



Fenoles totales de *V. carnosa* de la población del cerro Piltriquitron.

#### *V. clarionifolia* partes aéreas

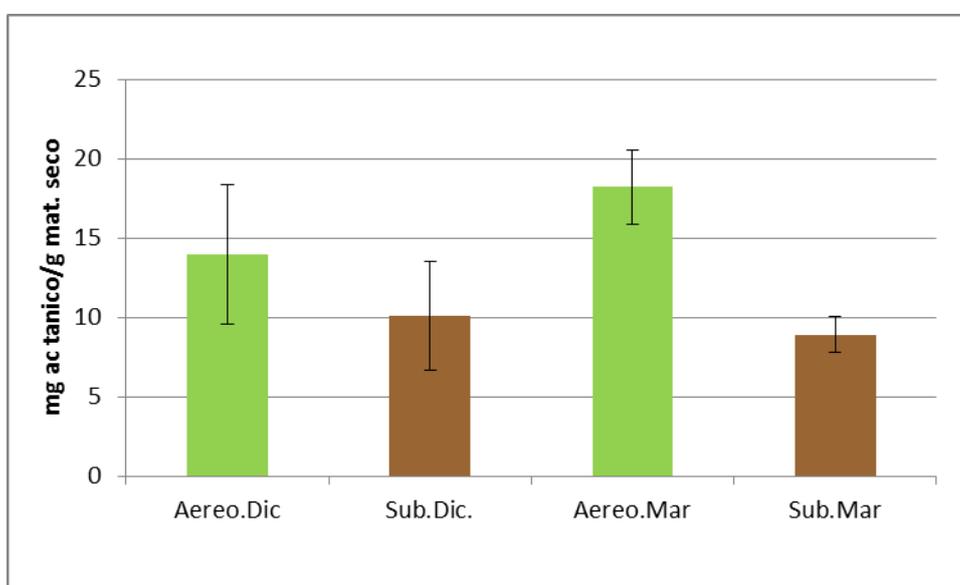
En los ejemplares estudiados de las dos poblaciones los valores de fenoles totales, expresados como mg de ácido tánico / g material seco, fueron mayores en las partes aéreas para el estado fenológico de finales de la estación de crecimiento (mes de marzo). Los valores de la población del aeropuerto fueron

de 14 mg ácido tánico / g material seco en la etapa de floración y de 17 mg ácido tánico / g material seco en el estado fenológico de finales de la estación de crecimiento.

#### *V. clarionifolia* partes subterráneas

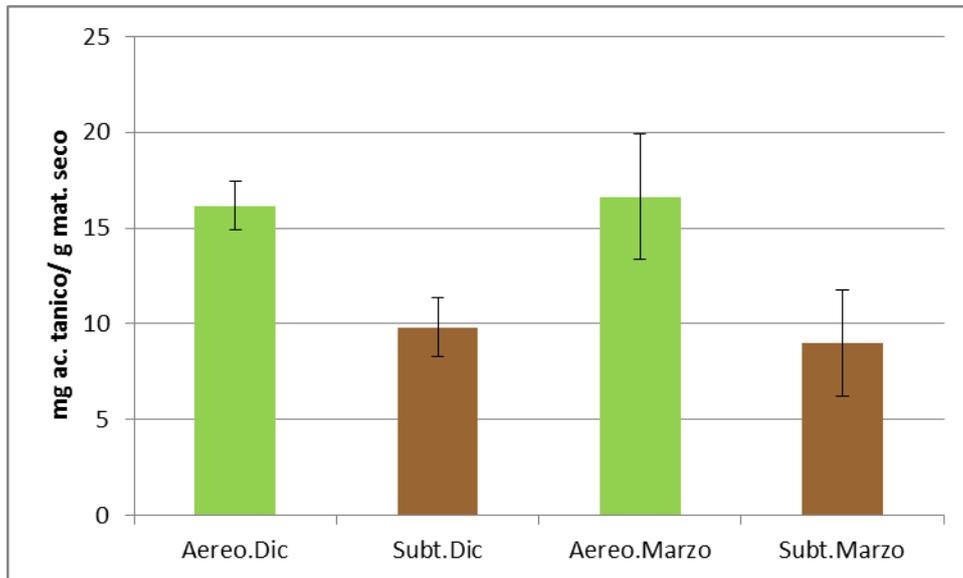
En las partes subterráneas de la población del aeropuerto los valores fueron más elevados en el estado fenológico de floración, con valores de 10 mg ácido tánico / g material seco contra 8,9 mg ácido tánico / g material seco en la posfructificación. Mientras que para los ejemplares de la población de la estancia San Ramón los valores fueron de 9,8 mg ácido tánico / g material seco contra 8,9 mg ácido tánico / g material seco en la posfructificación, pero dichas diferencias no son significativas (Figura 18 y 19).

**Figura 18-** Fenoles totales de *V. clarionifolia*



Fenoles totales *V. clarionifolia* para la población del aeropuerto.

**Figura 19-** Fenoles totales de *V. clarionifolia*



Fenoles totales *V. clarionifolia* para la población de la estancia San Ramón.

### Ácidos hidroxicinámicos

#### *V. carnos*a partes aéreas

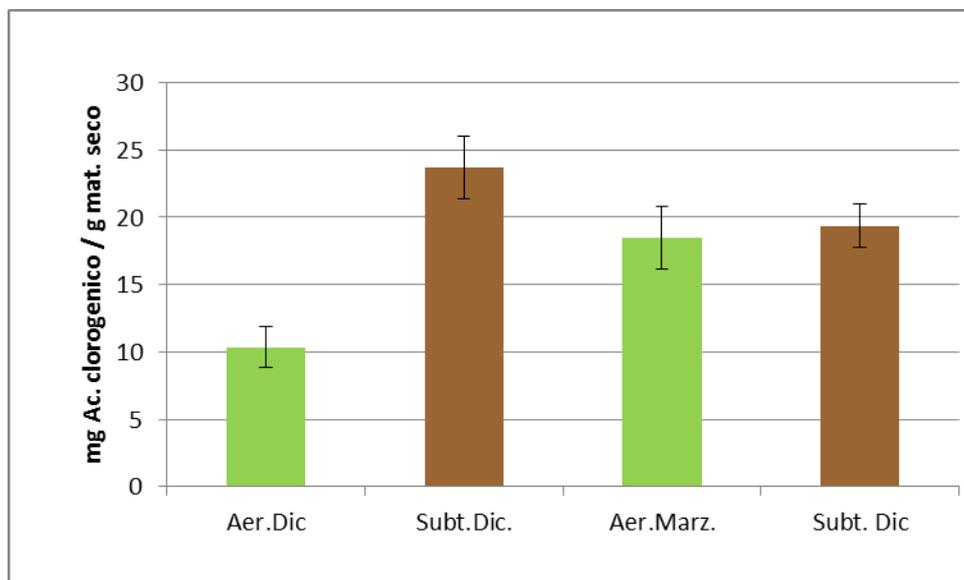
En los ejemplares del cerro Otto, los valores de ácidos hidroxicinámicos totales, expresados como mg de ácido clorogénico / g material seco, fueron mayores al final de la estación de crecimiento (18 mg ácido clorogénico / g material seco) con respecto a la floración (10 mg ácido clorogénico / g material seco). En la población de El Bolsón (cerro Piltriquitron) los resultados fueron como los de la población del cerro Otto pero con valores mayores para el estado de posfructificación (18 mg ácido clorogénico / g material seco) con relación a la floración (14 mg ácido clorogénico / g material seco) (Figura 20 y 21).

#### *V. carnos*a partes subterráneas

En las partes subterráneas, los ácidos hidroxicinámicos totales fueron mayores en el estado fenológico de la floración, en los ejemplares de la población del

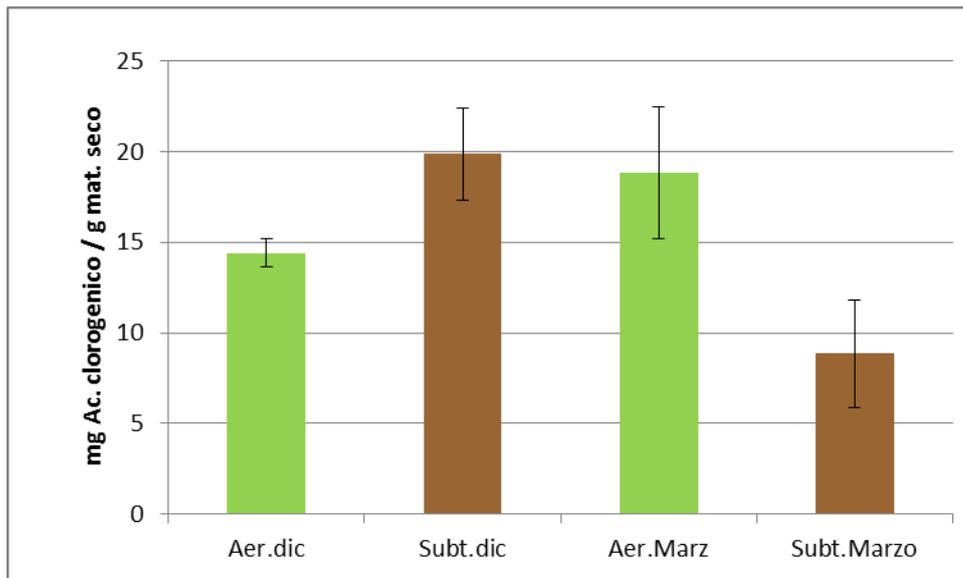
cerro Otto (23,6 mg ácido clorogénico / g material seco) con respecto a la posfructificación (19,3 mg ácido clorogénico / g material seco). Mientras que para la población del cerro Piltriquitron la tendencia fue la misma que en el cerro Otto pero con valores menores, 20 mg ácido clorogénico / g material seco en la floración y 9 mg ácido clorogénico / g material seco en la posfructificación (Figura 20 y 21).

**Figura 20-** Ácidos hidroxicinámicos en *V. carnososa*



Ácidos hidroxicinámicos totales en *V. carnososa* en la población del cerro Otto.

**Figura 21-** Ácidos hidroxicinámicos en *V. carnosa*



Ácidos hidroxicinámicos totales en *V. carnosa* en la población del cerro Piltriquitron.

#### *V. clarionifolia* partes aéreas

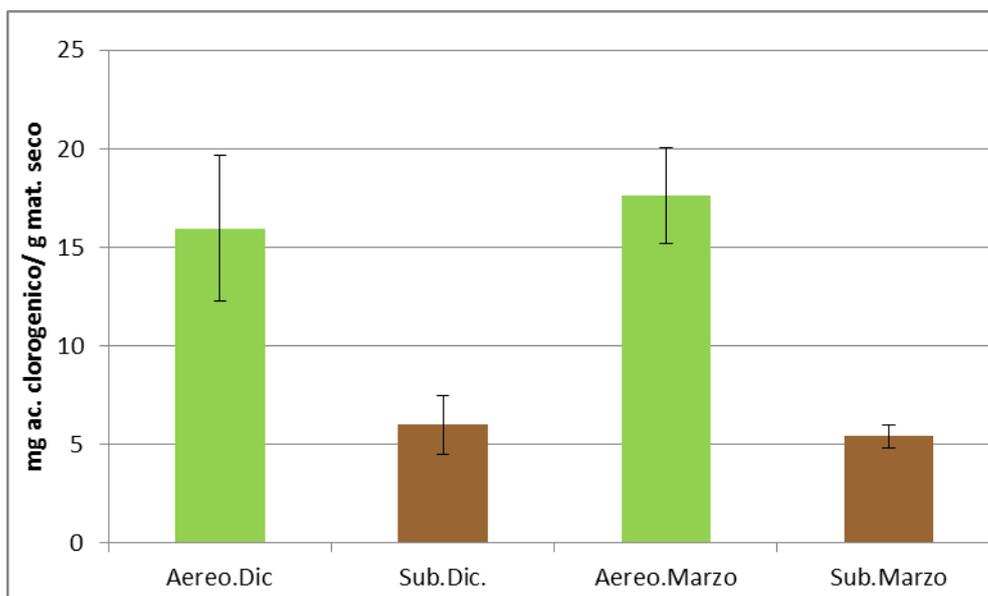
En las partes aéreas las cantidades de ácidos hidroxicinámicos totales fueron levemente superiores en el estadio de finales de la estación de crecimiento para la población del aeropuerto. Los valores fueron de 16 mg ácido clorogénico / g material seco en la floración y 17 mg ácido clorogénico / g material seco en el estadio de finales de la estación crecimiento. Esta tendencia se invierte para la otra población en estudio (estancia San Ramón), los valores fueron 22 mg ácido clorogénico / g material seco en floración y 18 mg ácido clorogénico / g material seco (Figura 22 y 23).

#### *V. clarionifolia* partes subterráneas

Para la población del aeropuerto los valores de ácidos hidroxicinámicos totales fueron mayores en el estadio de floración con valores de 6 mg ácido clorogénico / g material seco y en el estado fenológico de finales de crecimiento

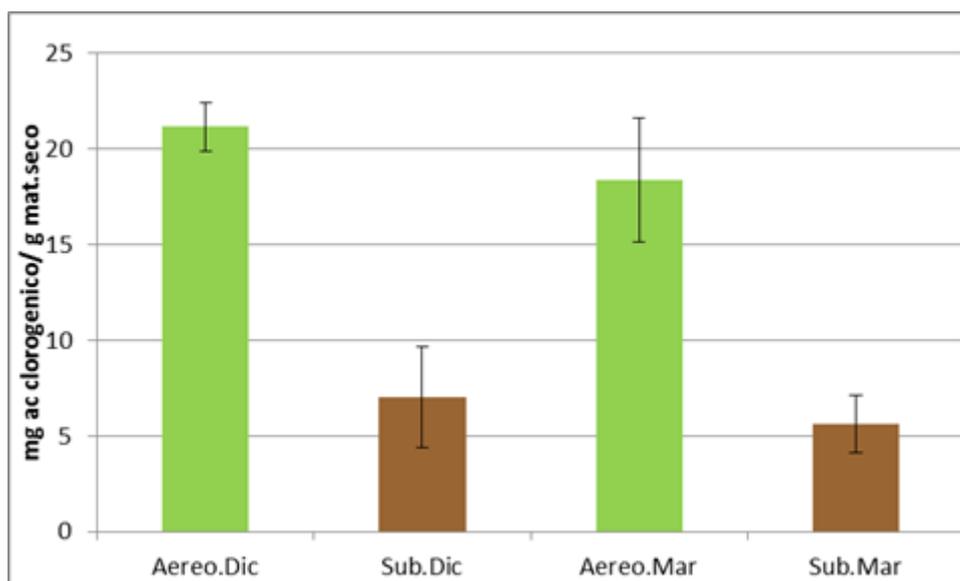
fueron de 5 mg ácido clorogénico / g material seco. Dicha tendencia se repitió en la segunda población estudiada con valores que promediaron los 8 mg ácido clorogénico / g material seco en la floración y 5,5 mg ácido clorogénico / g material seco en el estadio de finales de la estación de crecimiento (Figura 22 y 23).

**Figura 22-** Ácidos hidroxicinámicos en *V. clarionifolia*



Ácidos hidroxicinámicos totales en *V. clarionifolia* de la población del aeropuerto

**Figura 23-** Ácidos hidroxicinámicos en *V. clarionifolia*



Ácidos hidroxicinámicos totales en *V. clarionifolia* de la población de la estancia San Ramón

### Flavonoides totales

#### *V. carnos*a partes aéreas

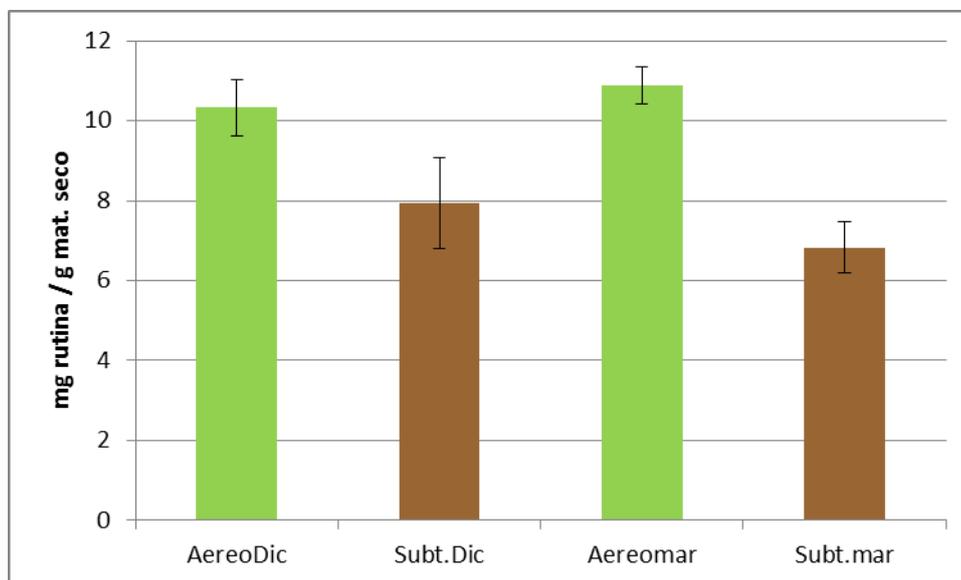
En los ejemplares de la población del cerro Otto los valores de los flavonoides totales son mayores en el estado fenológico postfructificación; los valores son 10,0 mg rutina / g material seco en la floración y 10,5 mg rutina / g material seco en el estado de postfructificación. Esta diferencia se hace más notoria en la población del cerro Piltriquitron, en esta zona los valores de los flavonoides totales son de 8,5 mg rutina / g material seco en la floración y 14 mg rutina / g material seco en la postfructificación (Figura 24 y 25).

#### *V. carnos*a partes subterráneas

Las partes subterráneas de *V. carnos*a está compuesta por raíces y rizomas, los valores de flavonoides totales fueron mayores en ambas poblaciones

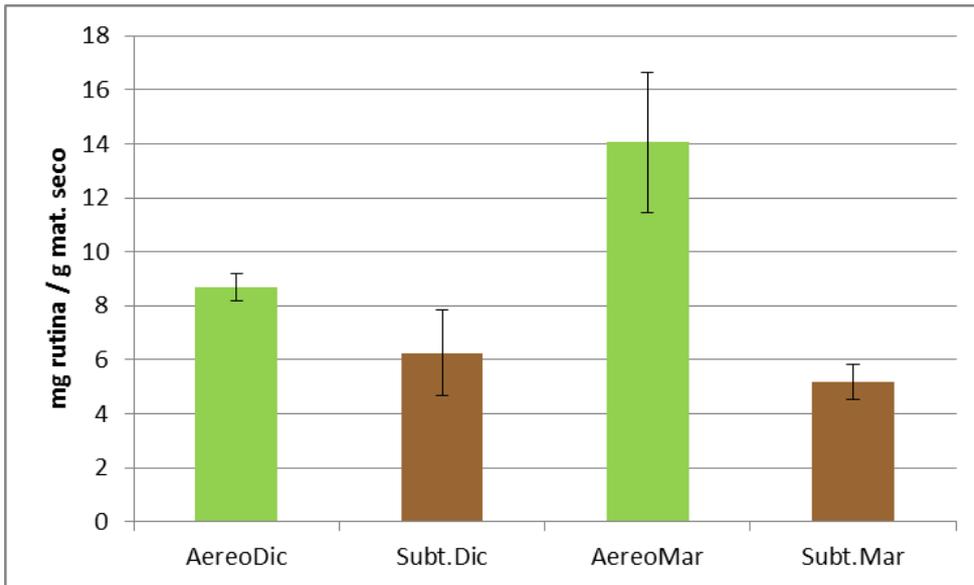
estudiadas en el estado fenológico de la floración. En el cerro Otto los valores fueron 8,0 mg rutina / g material seco en la floración y 6,5 mg rutina / g material seco en postfructificación. En la población del cerro Piltriquitron la tendencia fue idéntica pero con valores absolutos menores 6,0 mg rutina / g material seco en floración y 5,5 mg rutina / g material seco en la postfructificación (Figura 24 y 25).

**Figura 24-** Flavonoides totales en *V. carnos*



Flavonoides totales en *V. carnos* en la población del cerro Otto.

**Figura 25-** Flavonoides totales en *V. carnososa*

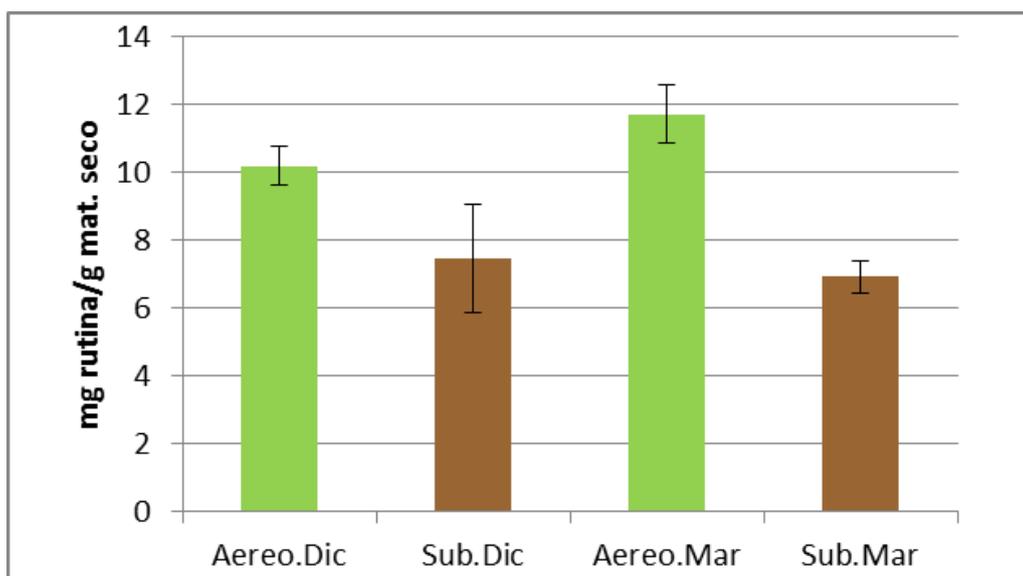


Flavonoides totales en *V. carnososa* en la población del cerro Piltriquitron.

#### *V. clarionifolia* partes aéreas

Los valores medidos en *V. clarionifolia* son mayores en la estación de finales de periodo de crecimiento por sobre los medidos en la floración. Los valores son 10,0 mg rutinina / g material seco en la floración y 11,7 mg rutinina / g material seco en la etapa de finales de la estación de crecimiento, estos valores corresponden a los ejemplares de la población del aeropuerto (Figura 26). Por otro lado, en la población de la estancia San Ramón se repite el mismo valor en la floración, 10,0 mg rutinina / g material seco y es levemente superior la medición en la pos-fructificación 12 mg rutinina / g material seco (Figura 27).

**Figura 26-** Flavonoides totales en *V. clarionifolia*

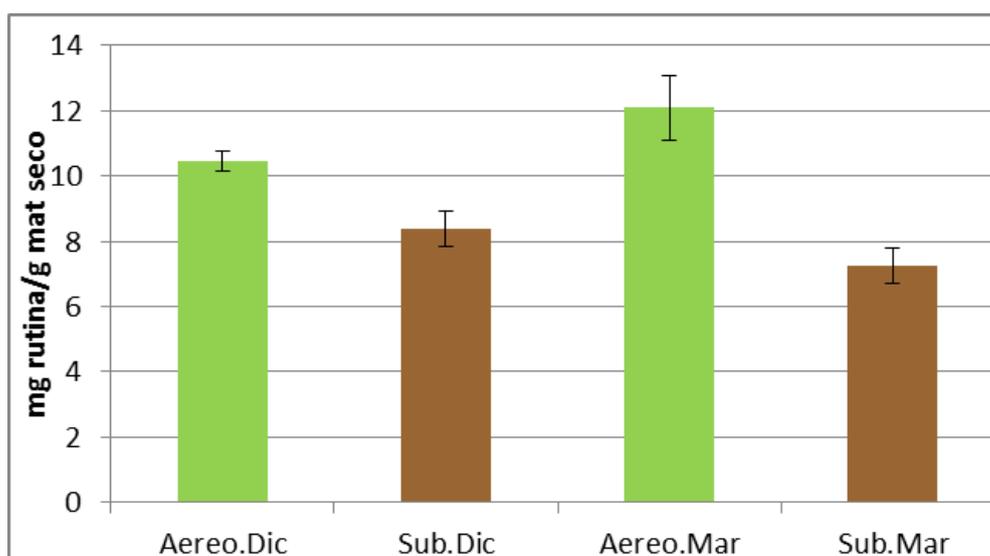


Flavonoides totales en *V. clarionifolia* de la población del aeropuerto.

#### *V. clarionifolia* partes subterráneas

En las raíces de *V. clarionifolia* los valores de los flavonoides totales son mayores en el estado fenológico de la floración en las dos poblaciones estudiadas. Los valores para los ejemplares de la población del aeropuerto son 7,4 mg de rutina / g material seco en la floración y 7,0 mg de rutina / g material seco en los finales de la estación de crecimiento. Para los ejemplares de la estancia San Ramón los valores son 8,2 mg de rutina / g material seco para el estadio de la floración y 7,3 mg de rutina / g material seco para el estadio de la postfructificación (Figura 26 y 27).

**Figura 27-** Flavonoides totales en *V. clarionifolia*



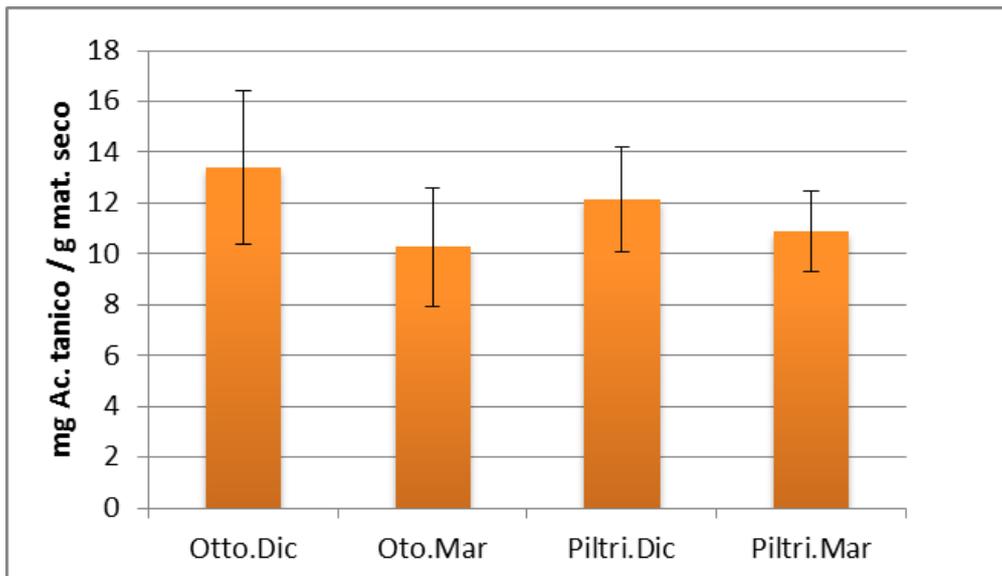
Flavonoides totales en *V. clarionifolia* población estancia San Ramón.

### **Cuantificaciones realizadas a los cocimientos y a las tinturas**

Polifenoles en los cocimientos de *V. carnososa*

Los valores de los fenoles totales de los cocimientos arrojaron mayores concentraciones para el estado fenológico de la floración en las dos poblaciones estudiadas. En la población del cerro Otto se midieron valores de 13,4 mg de ácido tánico / g de material seco para la floración y de 10,3 mg de ácido tánico / g de material seco en la postfructificación. Mientras que en la población del Bolsón los valores fueron de 12,0 mg de ácido tánico / g de material seco en la floración y de 10,8 mg de ácido tánico/g de material seco en la postfructificación (Figura 28).

**Figura 28-** Fenoles totales en *V. carnosa*

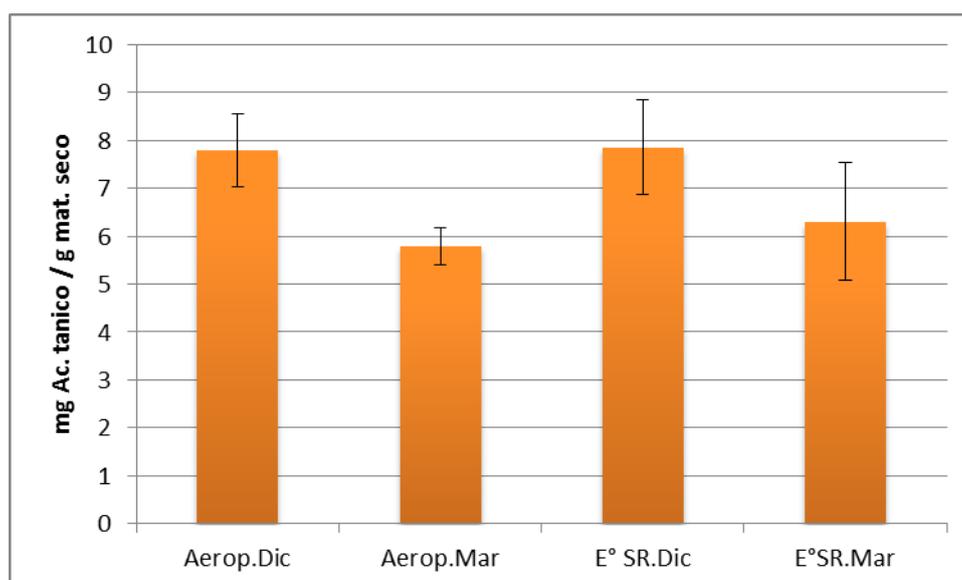


Fenoles totales de los cocimientos de las partes subterráneas en dos poblaciones de *V. carnosa*, en dos épocas contrastantes diciembre y marzo.

#### Polifenoles en los cocimientos de *V. clarionifolia*

Los valores de los fenoles totales en la población del aeropuerto fueron de 7,8 mg de ácido tánico / g de material seco en la floración y de 5,8 mg de ácido tánico / g de material seco en la postfructificación. A su vez, en la población de la estancia San Ramón los valores fueron de 7,8 mg de ácido tánico / g de material seco en la floración y de 6,3 mg de ácido tánico / g de material seco en el estadio fenológico de finales de la estación de crecimiento (Figura 29).

**Figura 29-** Fenoles totales en *V. clarionifolia*

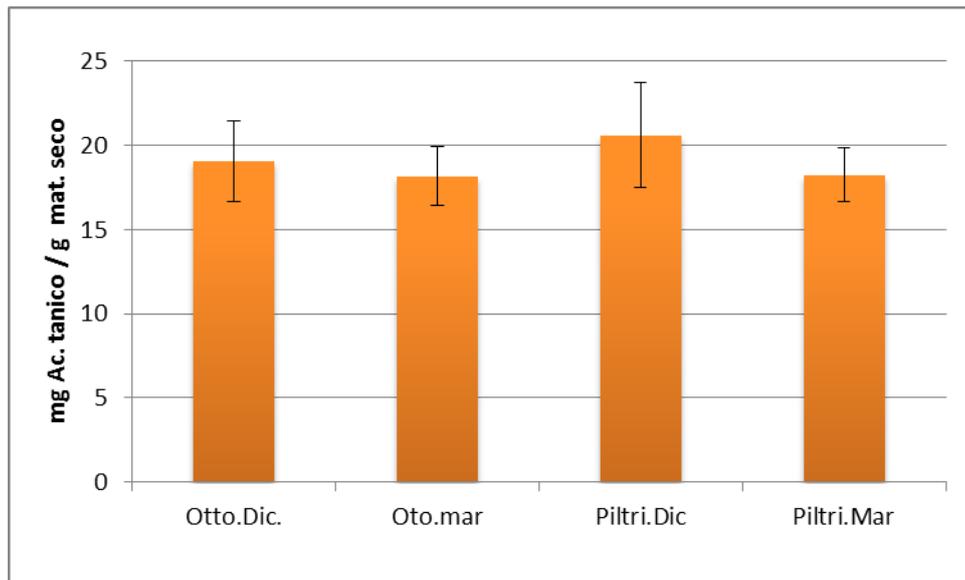


Fenoles totales de los cocimientos de las partes subterráneas en dos poblaciones de *V. clarionifolia* en dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Polifenoles de las tinturas de *V. carnososa*

Las cuantificaciones de las tinturas arrojaron valores de 19,0 mg de ácido tánico / g de material seco en la floración y de 18,0 mg de ácido tánico / g de material seco en la postfructificación para la población del cerro Otto. Mientras que en la población de El Bolsón (cerro Piltriquitron), los valores medidos fueron de 20,0 mg de ácido tánico / g de material seco en la floración y de 1,0 mg de ácido tánico / g de material seco en el estado fenológico de finales de la estación de crecimiento (Figura 30).

**Figura 30-** Fenoles totales en *V. carnosa*

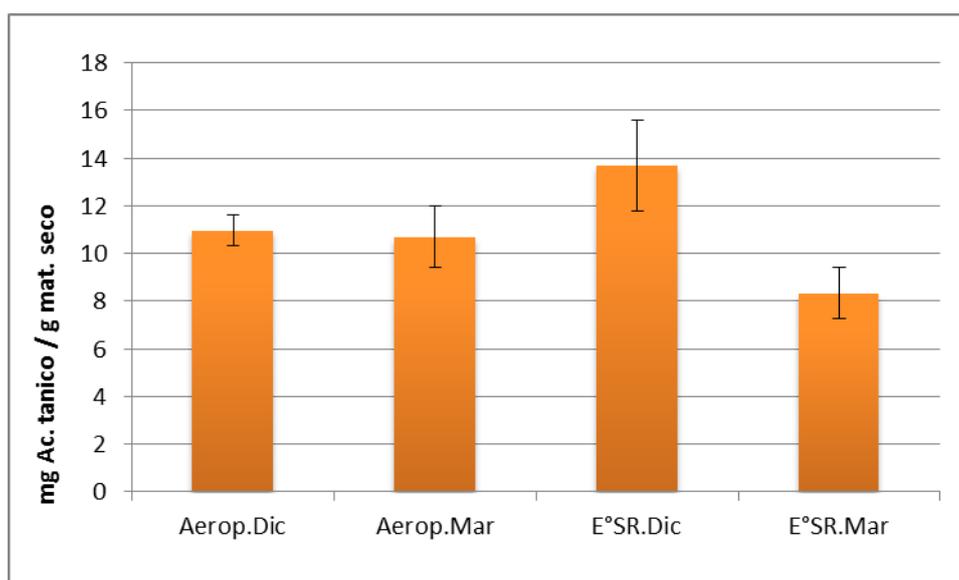


Fenoles totales de las tinturas de la parte subterránea en dos poblaciones de *V. carnosa* en dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

Fenoles totales de las tinturas de *V. clarionifolia*

En *V. clarionifolia* los valores de los fenoles totales de las tinturas arrojaron los siguientes valores para la población del aeropuerto: 10,9 mg de ácido tánico / g de material seco en la floración y 10,7 mg de ácido tánico / g de material seco en la postfructificación. En la población de la estancia San Ramón los valores medidos fueron de 13,7 mg de ácido tánico / g de material seco en la floración y de 8,3 mg de ácido tánico / g de material seco al finalizar el periodo de crecimiento (Figura 31).

**Figura 31-** Fenoles totales en *V. clarionifolia*

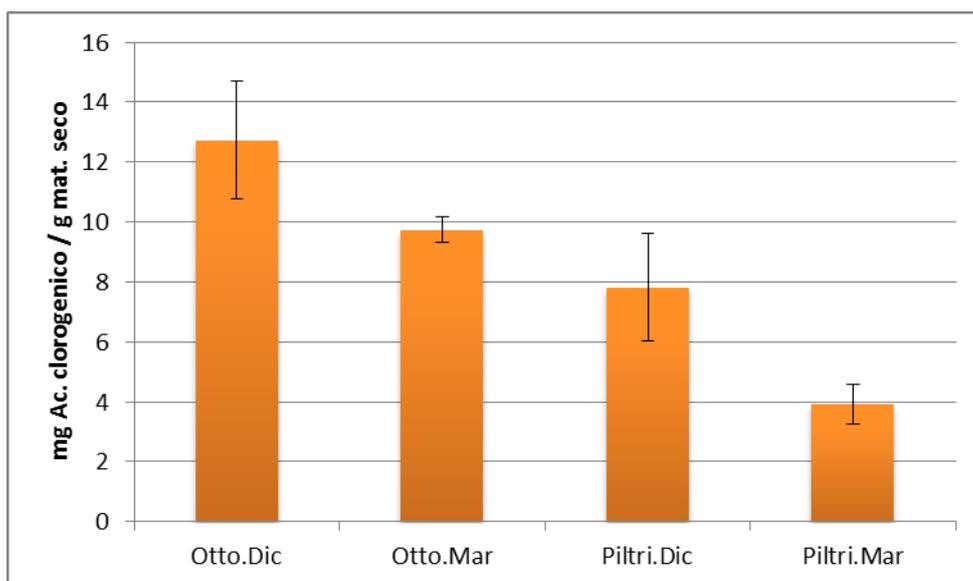


Fenoles totales de las tinturas de las partes subterráneas de dos poblaciones de *V. clarionifolia* en dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Ácidos hidroxicinámicos en los cocimientos de *V. carnososa*

Los valores de los ácidos hidroxicinámicos totales expresados como mg de ácido clorogénico / g de material seco en la población del cerro Otto fueron de 12,7 mg de ácido clorogénico / g de material seco en el periodo de la floración, mientras que en el estadio de finales de la estación de crecimiento fue de 9,7 mg de ácido clorogénico / g de material seco, a su vez, en la población del cerro Piltriquitron los valores fueron menores en ambos estadios pero con mayor diferencia entre los periodos, el mayor valor lo alcanzó en la floración (7,8 mg de ácido clorogénico / g de material seco) que en la época de post-fructificación (3,9 mg de ácido clorogénico / g de material seco (Figura 32).

**Figura 32-** Ácidos hidroxicinámicos totales en *V. carnos*

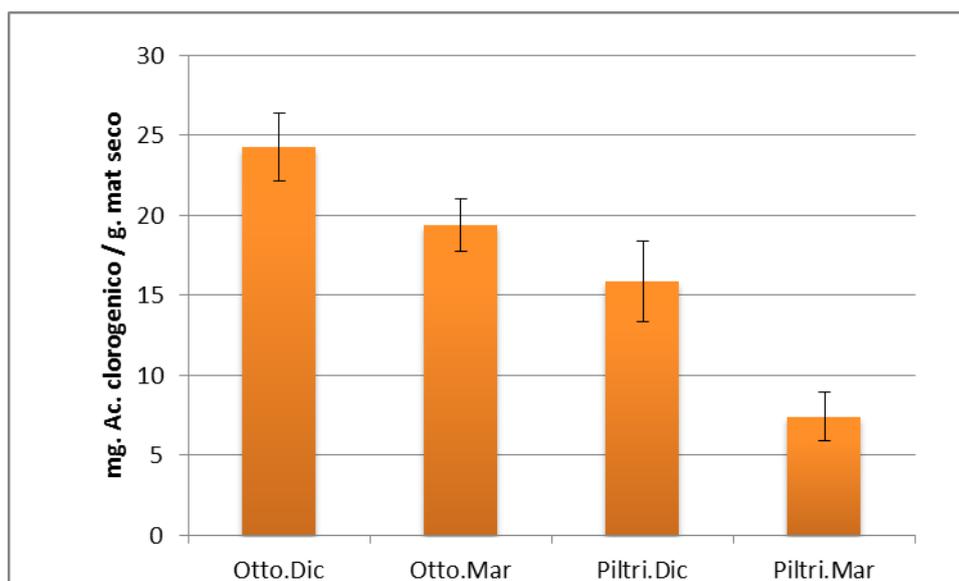


Ácidos hidroxicinámicos totales de los cocimientos de la parte subterránea en dos poblaciones de *V. carnos* para dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Ácidos hidroxicinámicos de las tinturas de *V. carnos*

En las tinturas las tendencias fueron las mismas que en los cocimientos, pero con valores que doblan los medidos en los cocimientos. Para la población del cerro Otto los valores fueron de 24,3 mg de ácido clorogénico / g de material seco en la floración, mientras que al final del periodo de crecimiento los valores fueron de 19,4 mg de ácido clorogénico / g de material seco. Los valores medidos en la población de la localidad de El Bolsón (cerro Piltriquitron) fue de 15,8 mg de ácido clorogénico / g de material seco en la floración y 7,5 mg de ácido clorogénico / g de material seco en la posfructificación (Figura 33).

**Figura 33-** Ácidos hidroxicinámicos totales en *V. carnososa*

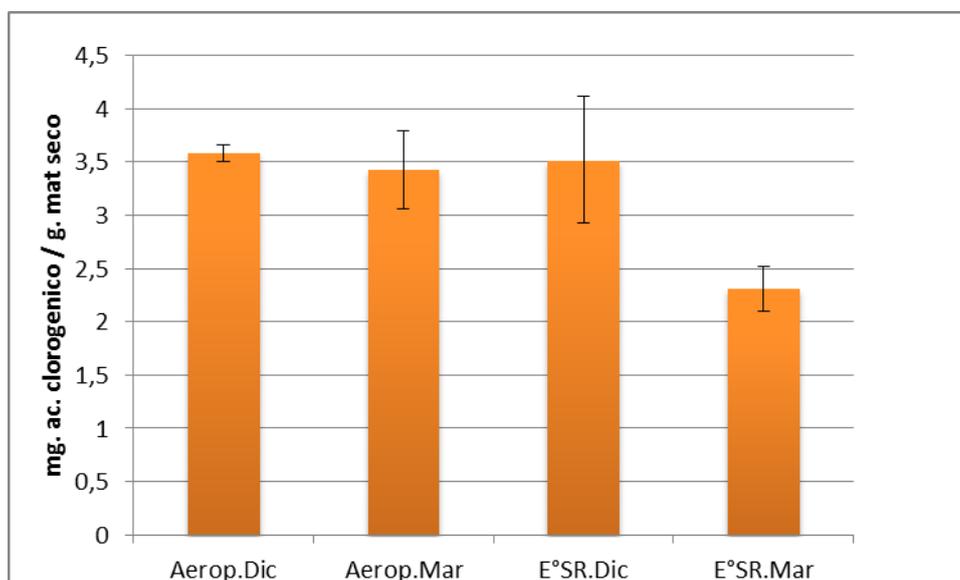


Ácidos hidroxicinámicos totales en las tinturas de la parte subterránea en dos poblaciones de *V. carnososa*, para dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Ácidos hidroxicinámicos en los cocimientos de *V. clarionifolia*

Los valores de los ácidos hidroxicinámicos totales, expresados como mg de ácido clorogénico / g de material seco, fueron para la población del aeropuerto de 4,0 mg de ácido clorogénico / g de material seco en la etapa de la floración mientras que en el estadio de finales de la estación de crecimiento fue de 3,4 mg de ácido clorogénico / g de material seco. En la población de la estancia San Ramón los valores fueron menores, 3,5 mg de ácido clorogénico / g de material seco en la floración y 2,3 mg de ácido clorogénico / g de material seco en la posfructificación (Figura 34).

**Figura 34-** Ácidos hidroxicinámicos de *V. clarionifolia*

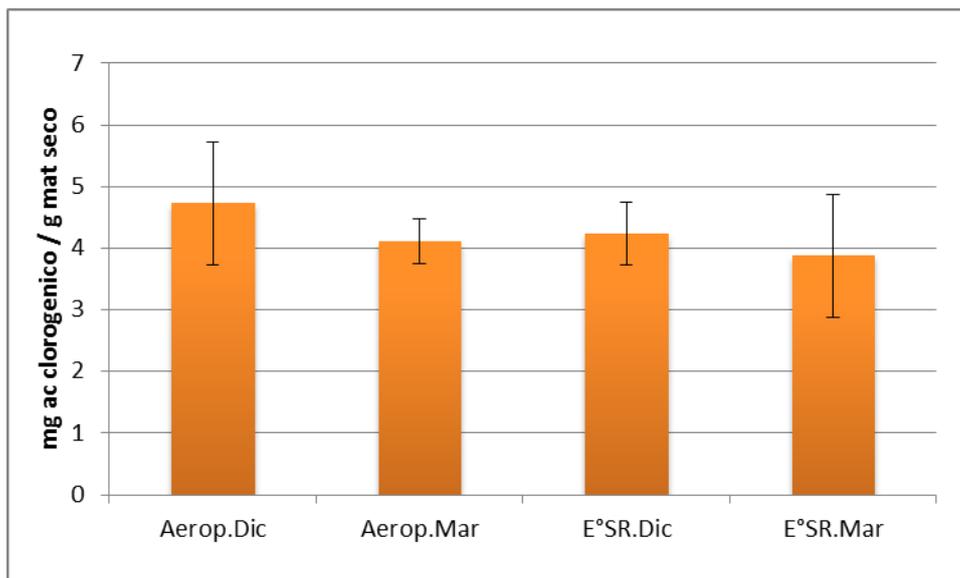


Ácidos hidroxicinámicos totales de los cocimientos de la parte subterránea en las dos poblaciones de *V. clarionifolia* para dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Ácidos hidroxicinámicos en las tinturas de *V. clarionifolia*

Los valores de los ácidos hidroxicinámicos totales expresados como mg de ácido clorogénico / g de material seco, fueron para la población del aeropuerto de 4,7 mg de ácido clorogénico / g de material seco en el estadio de floración mientras que, en el estadio de finales de la estación de crecimiento, fue de 3,1 mg de ácido clorogénico / g de material seco. Por otro lado, en la población de la estancia San Ramón los valores fueron menores en ambos estadios 4,2 mg de ácido clorogénico / g de material seco y 3,8 mg de ácido clorogénico / g de material seco para los estadios de floración y posfructificación respectivamente (Figura 35).

**Figura 35-** Ácidos hidroxicinámicos totales para *V. clarionifolia*

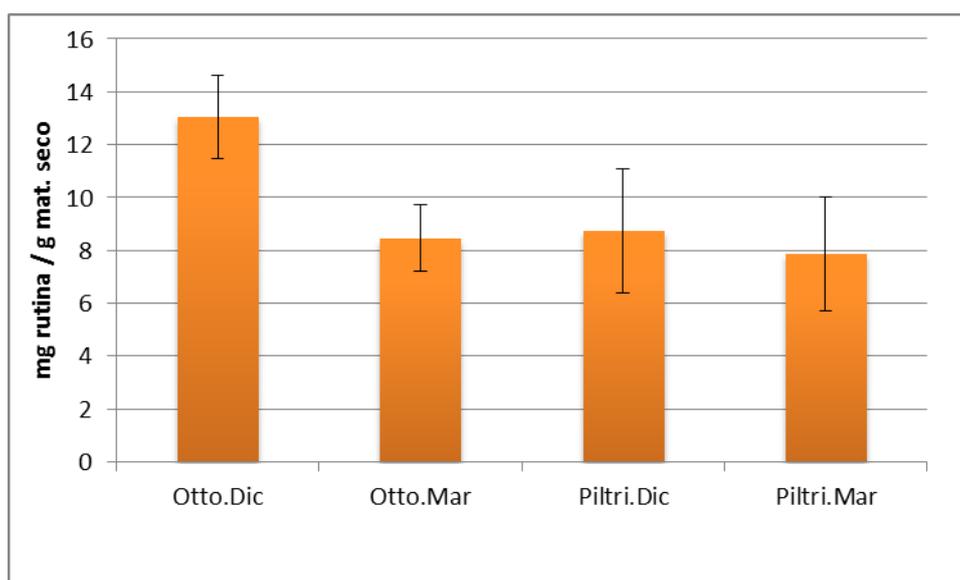


Ácidos hidroxicinámicos totales de las tinturas de las partes subterráneas en dos poblaciones de *V. clarionifolia* para dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Flavonoides totales de cocimientos de *V. carnososa*

Las cantidades medidas de los flavonoides totales, expresados como mg rutina / g de material seco, fueron para la población del cerro Otto 13,0 mg de rutina / g de material seco en la época de la floración y de 8,5 mg de rutina / g de material seco en la etapa final de la estación de crecimiento. Para los individuos colectados en El Bolsón los valores fueron de 8,7 mg de rutina / g de material seco para la floración y de 7,8 mg de rutina / g de material seco para la posfructificación (Figura 36).

**Figura 36-** Flavonoides totales para *V. carnosa*

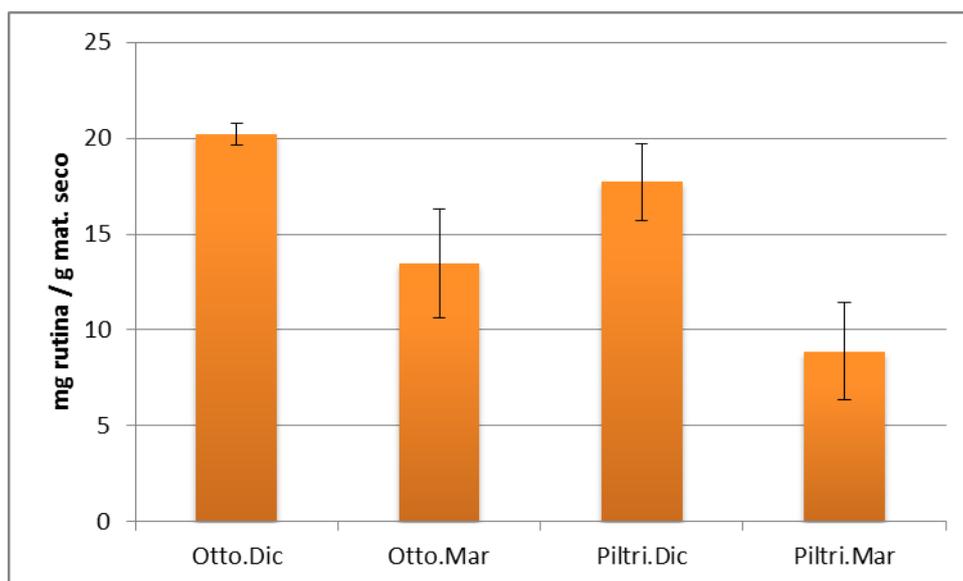


Flavonoides totales de los cocimientos de las partes subterráneas en las dos poblaciones de *V. carnosa* para dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Flavonoides totales de las tinturas de *V. carnosa*

En las tinturas las cantidades medidas de flavonoides totales expresados como rutina fueron para la población del cerro Otto, 20,0 mg de rutina / g de material seco para la floración y de 13,5 mg de rutina / g de material seco en el estadio fenológico de finales de la estación de crecimiento. Por el otro lado, la población coleccionada en El Bolsón los valores fueron de 18,0 mg de rutina / g de material seco para la floración y de 8 mg de rutina / g de material seco para el estadio fenológico de la posfructificación (Figura 37).

**Figura 37-** Flavonoides totales en *V. carnosa*

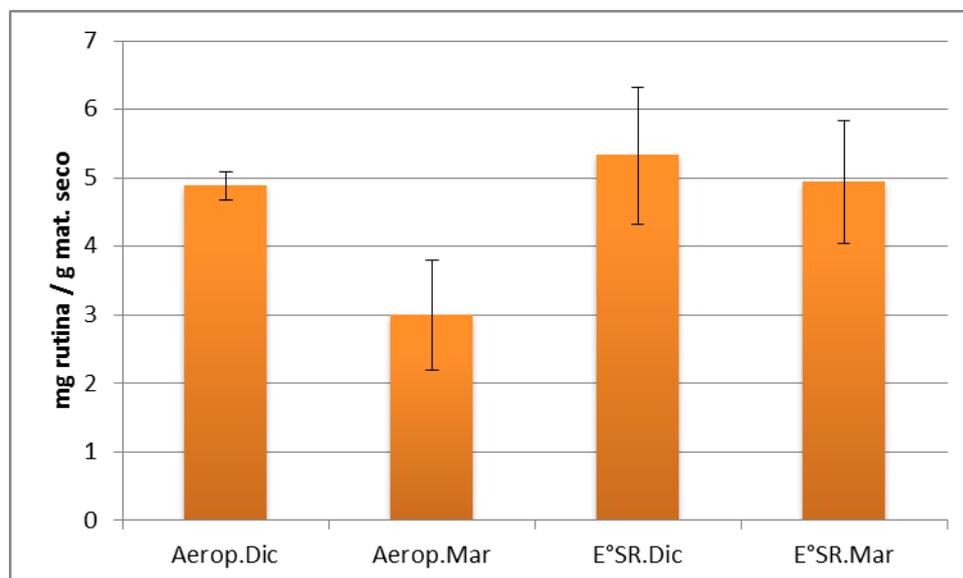


Flavonoides totales de las tinturas de las partes subterráneas en dos poblaciones de *V. carnosa* para dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Flavonoides totales de los cocimientos de *V. clarionifolia*

Las cantidades medidas de flavonoides totales fueron, para la población del aeropuerto, 4,8 mg de rutina / g de material seco para la floración y de 3,0 mg de rutina / g de material seco en el estadio fenológico de finales de la estación de crecimiento. Por el otro lado, en la población coleccionada en la estancia San Ramón los valores fueron de 5,0 mg de rutina / g de material seco para la floración y de 4,9 mg de rutina / g de material seco para el estadio fenológico de la posfructificación (Figura 38).

**Figura 38-** Flavonoides totales en *V. clarionifolia*

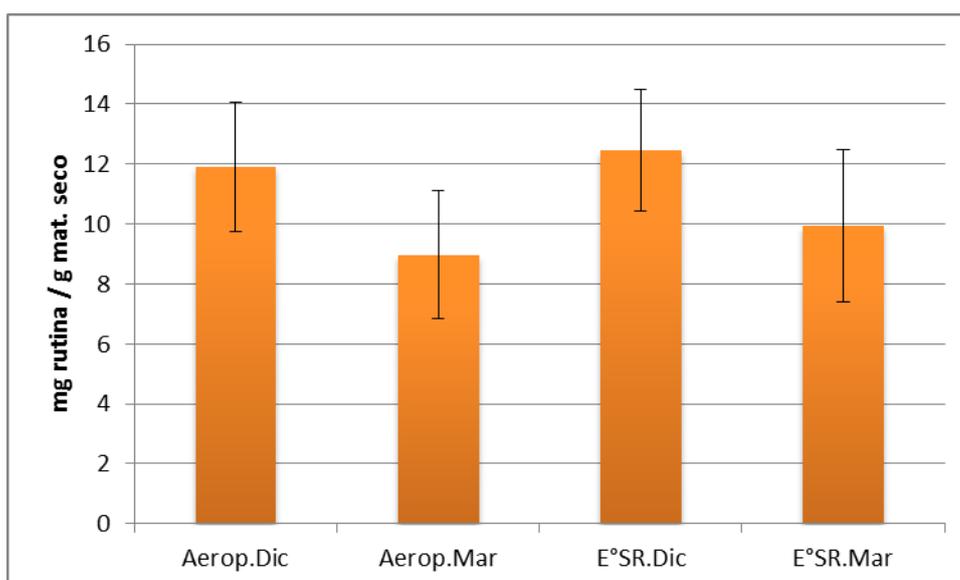


Flavonoides totales de los cocimientos de la parte subterránea en dos poblaciones de *V. clarionifolia* para dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

#### Flavonoides totales de tinturas de *V. clarionifolia*

En las tinturas las cantidades medidas de los flavonoides totales, en la población del aeropuerto, fueron 12,0 mg de rutina / g de material seco para la floración y de 9,0 mg de rutina / g de material seco en el estadio fenológico de finales de la estación de crecimiento. Por el otro lado, la población coleccionada en la estancia San Ramón los valores fueron de 12,5 mg de rutina / g de material seco para la floración y de 10 mg de rutina / g de material seco para el estadio fenológico de la posfructificación (Figura 39).

**Figura 39-** Flavonoides totales en *V. clarionifolia*



Flavonoides totales de las tinturas de las partes subterráneas en dos poblaciones de *V. clarionifolia* para dos épocas contrastantes, diciembre y marzo.

Fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoides totales en *V. officinalis*

En los cocimientos y las tinturas los valores de los fenoles totales fueron respectivamente 7,5 y 12,0 mg de ácido tánico / g material seco. Mayor diferencia se observa en la cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos en donde los valores de las tinturas cuadruplican al de los cocimientos 1,5 mg de ácido clorogénico / g material seco para los cocimientos y 8,2 mg de ácido clorogénico / g material para las tinturas. También los flavonoides presentan valores muy superiores en las tinturas, 4,18 mg rutina / g material seco en los cocimientos y 19,46 mg de rutina / g material seco en las tinturas (Tabla 2). En todos los casos las diferencias son significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2-** Cuantificación de los polifenoles en *V. officinalis*

| <i>V.officinalis</i> | Fenoles totales<br>(mg ac. tánico/ g<br>mat. seco) | Ácidos hidroxicinámicos<br>totales<br>(mg de ácido clorogenico/ g<br>mat. seco) | Flavonoides<br>totales<br>(mg rutina / g mat.<br>seco) |
|----------------------|--|---|--|
| <b>Cocimiento</b>    | 7,5 ± 1,12   | 1,5 ± 0,98  | 4,18 ± 0,87  |
| <b>Tintura</b>       | 12 ± 0,91  | 8,2 ± 0,43  | 19,46 ± 2,12   |

Valores de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoides totales en *V. officinalis* cultivada en la provincia de San Juan.

## Discusión

Se realizó un *screening* general de la cantidad de polifenoles en los extractos metanólicos 80 % de las partes aéreas (PA) y las partes subterráneas (PS). Para el estudio se utilizó metanol, debido a que es el solvente clásico utilizado para la cuantificación de los polifenoles, por lo tanto, se obtuvo extractos con altas concentraciones de estos metabolitos. Luego, como *V. carnososa* y *V. clarionifolia* son plantas en las que se utilizan sus órganos subterráneos en la medicina tradicional, se realizaron cocimientos y tinturas para tener una primera aproximación en los tipos de compuestos que pueden ser ingeridos por las personas que utilizan estas preparaciones. Por otro lado, como *Valeriana officinalis* es una planta cuyas raíces se emplean en la medicina tradicional desde antes de la era cristiana y es una planta que se encuentra incluida en las principales farmacopeas del mundo (por ejemplo, Farmacopea Argentina, Farmacopea Británica, Farmacopea de Estados Unidos), además, en los últimos años se le han validado los usos que se le atribuían desde antiguo. Por lo tanto se utiliza a *V. officinalis* como referente para comparar las dos especies nativas de la Patagonia utilizadas en la medicina tradicional.

En los extractos metanólicos, al analizar la concentración de los fenoles totales en las partes aéreas, tanto en *V. carnososa* como en *V. clarionifolia*, siempre fueron mayores los valores en el estado fenológico de finales de la estación de crecimiento, pero esta diferencia fue significativa ( $p < 0,05$ ) solo para la población del cerro Otto. Contrariamente en las partes subterráneas estos resultados se invierten, los valores de los fenoles totales son mayores en el estado fenológico de la floración, pero la diferencia no es significativa ( $p < 0,05$ ). Al realizar las cuantificaciones en los cocimientos, los valores tienen la misma tendencia que en el extracto metanólico 80 %, pero con menores valores absolutos para ambos estadios. Esto puede deberse al tipo de solvente utilizado para la extracción, ya que el cocimiento al realizarse con agua tiene menor poder de extracción que solventes menos polares como, por ejemplo, el metanol, el cual es considerado el solvente ideal para la extracción de los fenoles. Por otro lado, si se compara a *V. carnososa* con los valores de los fenoles totales medidos en *V. clarionifolia* se observa que, los extractos metanólicos 80 % tienen valores más altos de polifenoles en las partes aéreas de *V. carnososa*. Igual situación se repite en las partes subterráneas, que son los órganos que interesan por ser los utilizados en la medicina tradicional, además, son comercializados en las farmacias y herboristerías del país.

Por otra parte, tanto *V. carnososa* como *V. clarionifolia* no presentan diferencias significativas en la cantidad de los polifenoles entre las dos poblaciones estudiadas, ni entre los dos estadios fenológicos. Esta situación se repite para las cuantificaciones hechas con las formas farmacéuticas de los cocimientos y las infusiones. Es interesante mostrar que los valores de los polifenoles totales

más altos fueron en las tinturas para las tres especies (*V. carnos*a, *V. clarionifolia* y *V. officinalis*), con valores para *V. carnos*a de 20,0 mg de ácido tánico / g material seco; para *V. officinalis* de 12,2 mg de ácido tánico / g material seco y para *V. clarionifolia* de 13,0 mg de ácido tánico / g material seco. Al indagar en la bibliografía sobre otros reportes de polifenoles hechos en las valerianas se pudo observar que no hay muchos reportes, esto se debe a que hasta la década de 1990 los estudios fueron centrados en los terpenos como el ácido valeriánico, los valepotriatos y las esencias, ya que a estos compuestos y, en especial, a los valepotriatos se les atribuía ser los responsables de las acciones farmacológicas. Sin embargo, en los últimos años empezó a cobrar importancia los polifenoles, de ahí que se le atribuyen a los fenoles y en parte al ácido valeriánico las acciones farmacológicas. Si bien hay reportes como el trabajo de Bhatt *et al.* (2012) en donde comparan la cantidad de polifenoles en las plantas espontaneas y cultivadas de *Valeriana jatamansi* Jones, en donde los valores de fenoles totales alcanzan hasta los 13,0 mg de ácido gálico / g material seco.

Al analizar los valores de las cuantificaciones de los ácidos hidroxicinámicos totales, estos fueron dispares o no concordantes con la tendencia entre las dos especies estudiadas. Por un lado, los valores de *V. carnos*a de ácidos hidroxicinámicos totales fueron superiores en las partes subterráneas con respecto a las partes aéreas. En cambio en *V. clarionifolia* los valores de los ácidos hidroxicinámicos son opuestos, mayor concentración en la parte aérea y significativamente menores en las partes subterráneas. La tintura fue la forma farmacéutica con mayor cantidad de hidroxicinámicos, luego le sigue los

extractos metanolicos 80 % y finalmente el cocimiento fue la forma farmacéutica con los valores más bajos. En la cuantificación de los flavonoides totales de los extractos metanolicos 80 %, los valores expresados como mg de rutina / g material seco siempre fueron mayores en los órganos subterráneos. En los órganos aéreos los valores de los flavonoides totales fueron superiores en la etapa de finales de la estación de crecimiento o posfructificación (mes de marzo), mientras que en las partes subterráneas los valores de los flavonoides totales fue superior en el estado fenológico de floración, estos resultados se observaron en ambas poblaciones de las dos especies estudiadas. Por lo tanto, hay variaciones interpoblacionales y entre estadios fenológicos. Al analizar los resultados de FT en las diferentes formas farmacéuticas se observa que hay variaciones entre las especies, los valores son superiores en *V. carnososa*. Además, hay variaciones entre las poblaciones analizadas, los valores son mayores en la población del cerro Otto que en la del cerro Piltriquitron para *V. carnososa* (en los cocimientos y en las tinturas). En *V. clarionifolia* la población con valores promedios más elevados fue la de la estancia San Ramón pero dichas diferencias no son significativas. Lo que es de notar es que en ambas especies y en las cuatro poblaciones los valores de FT resultaron siempre mayores en el estadio de floración, esta información es importante ya que como en los últimos años ha sido demostrado que diversos flavonoides como hesperidina y rutina intervienen en la actividad farmacológica atribuida a las valerianas (Wasowski *et al.*, 2002; Marder *et al.*, 2003) sería recomendable realizar la extracción o cosecha en este estadio fenológico. Al comparar los valores de flavonoides totales de *V. officinalis* con los de *V. carnososa* y *V. clarionifolia* los resultados muestran que *V. carnososa* se aproxima más a *V.*

*officinalis*. Al comparar los valores de *V. carnososa* y *V. clarionifolia* con los de la bibliografía previa (Dugaheh *et al.*, 2013) se observa que los extractos metanólicos de las especies patagónicas estudiadas tienen mayor valor que *V. jatamansi*.

## **Conclusión**

Se realizan por primera vez en *Valeriana carnososa* y *V. clarionifolia* cuantificaciones para conocer los valores de polifenoles que contienen. Las cuantificaciones de polifenoles arrojaron que son mayores en las partes aéreas. De las dos especies estudiadas, la que arrojó mayores valores de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoides totales fue *V. carnososa*. Para obtener extractos de “ñancohuen” ricos en polifenoles habría que realizar tinturas, que son las formas farmacéuticas que extraen mayor cantidad de este grupo fitoquímico. Debido a la gran variabilidad intrapoblacional (entre individuos) observada se recomienda utilizar un número grande de individuos por población (mayor a tres). Asimismo se establece que la época favorable para la colecta sería diciembre ya que es el mes en donde se producen las mayores cantidades de polifenoles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides.

## Capítulo II: Fitoquímica

### *Sección II: Aceites esenciales*



Vista desde el cerro Piltriquitron (El Bolsón, Río Negro)

## **SECCIÓN II: Análisis del aceite esencial**

### **Solventes, reactivos, equipamiento y metodología utilizadas**

Para el análisis cuali-cuantitativo de los aceites esenciales por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama acoplado a un detector de masa (las siglas en inglés son GC-FID-MS) se utilizó un equipo Perkin Elmer GC modelo Clarus 500, provisto de un único inyector tipo *split/splitless* conectado con un divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido: a) polietilenglicol de PM aprox. 20.000 (DB-Wax, J&W Scientific) y b) 5 % fenil-95% dimetilpolisiloxano (DB-5, J&W Scientific), ambas de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 0,25 µm de espesor de la fase estacionaria. La columna polar está conectada a un detector FID mientras que la columna no polar está conectada a un detector FID y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV), a través de un sistema de venteo (MSVent™) (Figura 40).

### **Material vegetal**

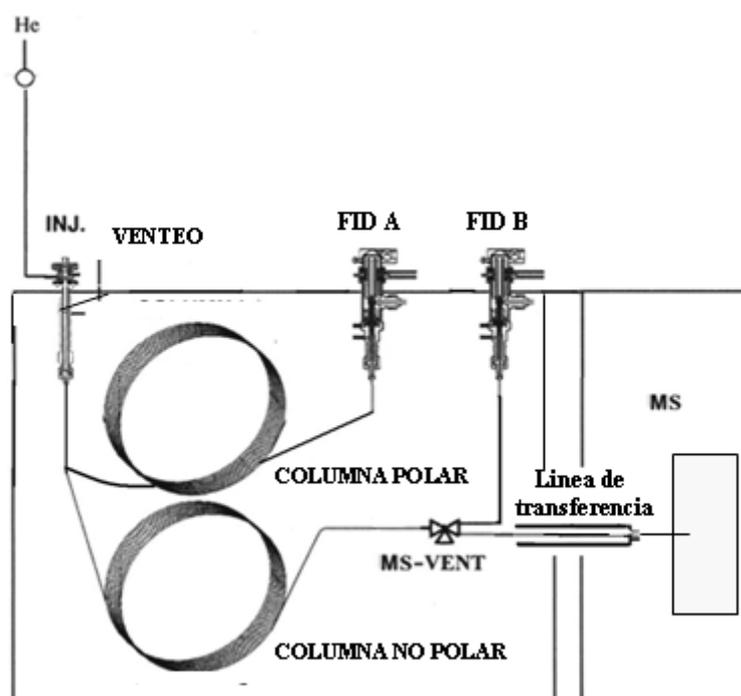
Para la recolección del material se realizaron viajes a la región patagónica relevándose tres poblaciones por especie. Fueron utilizados 5 especímenes por población, los que fueron secados a temperatura ambiente y conservados al abrigo de la luz hasta la molienda previa a la destilación. Los datos de la recolección se muestran en la tabla 3. Asimismo de la especie euroasiática *V. officinalis* se trabajó con material procedente de la provincia de San Juan provisto por el señor Mauricio Ferres s/n (BAB 23452).

**Tabla 3-** Material vegetal

| <b>Especie</b>                 | <b>Localidad</b>                               | <b>Ambiente</b>                   | <b>Fecha y colector</b>                                |
|--------------------------------|--|-----------------------------------|--|
| <b><i>V. carnososa</i></b>     | Cerro Otto<br>Depto. Bariloche<br>Río Negro    | Precordillera<br>elevación 1100m  | 09-XII-2008<br>R.H. Fortunato <i>et al.</i> 9447 (BAB) |
| <b><i>V. carnososa</i></b>     | Cerro Piltriquitrón<br>El Bolsón<br>Río Negro  | Precordillera<br>elevación 1200   | 16-XII-2009.<br>H. G. Bach y E.<br>Ruiz 359 (BAB)      |
| <b><i>V. carnososa</i></b>     | Cerro la Z<br>Esquel<br>Chubut                 | Precordillera<br>elevación 800 m  | 10-X-2013<br>N. Nagahama s/n<br>(BAB 23215)            |
| <b><i>V. clarionifolia</i></b> | Aeropuerto<br>Depto. Bariloche<br>Río Negro    | Estepa<br>elevación 400 m         | 14-XII-2009<br>H. G. Bach y E.<br>Ruiz 333             |
| <b><i>V. clarionifolia</i></b> | E° San Ramón<br>Depto. Pilcaniyeu<br>Río Negro | Estepa<br>elevación 600 m         | 8-XI-2008<br>R.H. Fortunato <i>et al.</i> 9433         |
| <b><i>V. clarionifolia</i></b> | Cañadon de<br>los Bandidos<br>Esquel<br>Chubut | Precordillera<br>elevación 1000 m | 10-X-2013<br>N. Nagahama s/n<br>(BAB 23216)            |

Datos generales de recolección de las especies estudiadas.

**Figura 40-** Cromatógrafo gaseosos



Esquema del cromatógrafo gaseoso con detector de ionización de llama acoplado a un detector de masa (GC-FID-MS)

## Desarrollo experimental

### 2.a. Obtención de los extractos

#### 2.a.1. *Fracción volátil (aceite esencial)*

Las esencias de *V. carnososa* y *V. clarionifolia* se obtuvieron a partir de las partes subterráneas, rizomas y/o raíces, desecadas mediante el método de extracción por arrastre con vapor de agua utilizando un equipo Clevenger (Figura 41). El procedimiento consiste en sumergir el material vegetal en el agua, calentar a

ebullición de forma que el agua caliente penetre en los tejidos de la planta, ablandando o rompiendo las estructuras celulares que contienen al aceite esencial. Los compuestos volátiles pasan del agua a la fase gaseosa y son arrastrados por el vapor de agua. Al pasar por el refrigerante a bolas de la trampa Clevenger, condensa el aceite esencial y el agua, el aceite se deposita en la parte superior, en caso de que sea más liviano que el agua, como en este caso, o en la parte inferior si es que es más pesado.

**Figura 41-** Trampa Clevenger



## **Metodología empleada**

Calibración y puesta a punto del extractor Clevenger: se armó el equipo extractor de esencias con un balón conteniendo solamente agua y unos trozos de plato poroso. Se comenzó con el calentamiento y se esperó hasta que el agua comenzara a ebullición. Se midió la velocidad de goteo y se reguló en 2 ml / min mediante el control del calentamiento, subiendo la temperatura si era necesario aumentar la velocidad de goteo, o bien disminuyendo la temperatura en caso contrario.

Determinación del tiempo de destilación: una vez regulada la velocidad de extracción en el equipo extractor se procedió a colocar 200 g del material vegetal molido (ESQ\_Rx) de *V. carnososa* en el balón con agua destilada y plato poroso. Se comenzó el calentamiento hasta ebullición y se comenzó la extracción. A la hora de haber comenzado la destilación se midió la cantidad de aceite extraído hasta ese momento en el tubo graduado y se procedió a recogerlo, denominando esta fracción como destilado F1. Se prosiguió con la extracción en las mismas condiciones iniciales. A la hora de haber proseguido con la extracción (2 horas del tiempo inicial) se midió nuevamente la cantidad de aceite esencial extraído en el tubo graduado y se recogió, este último se denominó destilado F2. El destilado F2 se juntó con el destilado F1 conformando el integrado 1. Se prosiguió con este esquema midiendo y recogiendo el aceite esencial extraído cada hora, hasta no obtener más aceite esencial, designándose a ese tiempo como el tiempo de extracción más conveniente. Idéntica metodología se utilizó para *V. clarionifolia*.

Extracción de compuestos volátiles del material vegetal: una vez regulada la velocidad de extracción en el equipo extractor y determinado el tiempo de extracción, se procedió a colocar unos 200 g del material vegetal molido (raíces y/o rizomas, según el caso) de *V. carnososa* o de *V. clarionifolia* en el balón con agua destilada y plato poroso. Se comenzó el calentamiento hasta ebullición y se extrajo durante 5 horas. Finalizado el tiempo, se dejó enfriar el sistema, se midió el volumen del aceite esencial obtenido y se recogió la esencia, localizada en la parte superior del tubo graduado. El aceite esencial obtenido se desecó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se almacenó a 2 °C, al abrigo de la luz, hasta su utilización.

### **Estudio de la composición química del extracto volátil (aceite esencial)**

Análisis cuali-cuantitativo del aceite esencial

El análisis de los aceites esenciales obtenidos según lo descrito en el punto *Obtención de extractos* (Parte Experimental), fue realizado por cromatografía de gases con detector de ionización de llama, acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolar (GC/FID/MS).

La identificación de los componentes del aceite esencial fue realizada por comparación de sus espectros de masa con los que figuran en las bases de datos computarizadas (Adams, 2007; Wiley/NIST Mass Spectral Library, 2005; estándares propios), y por comparación de sus índices de retención, obtenidos en las dos columnas empleadas respecto de una serie homóloga de alcanos (C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>), con los valores obtenidos de los estándares propios y con los que

figuran en la bibliografía. La configuración del sistema de trabajo del equipo GC-FID-MS es a presión constante.

La composición porcentual fue determinada por el método de porcentaje de las áreas, considerando que el factor de respuesta para todos los componentes es igual a 1. Para cada componente fue tomada la menor respuesta obtenida entre las correspondientes a cada columna usada.

#### *Condiciones analíticas*

Las condiciones analíticas empleadas para el análisis cuali-cuantitativo de los aceites esenciales por CG-FID-MS fueron:

Fase móvil: Helio a 1,87 ml / min.

Inyector tipo split/splitless (relación de split 1:100) conectado con un divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido (una polar y otra no polar).

Programación de la temperatura: 50 °C, luego se eleva la temperatura a 3 °C / min hasta los 225 °C (15 min).

Temperaturas de inyector y detectores FID: 255 °C y 275 °C, respectivamente.

Temperatura de la línea de transferencia: 180 °C.

Temperatura de la fuente de iones: 150 °C.

Tiempo final de corrida: 70 min

Rango de masas escaneado: 40 - 400 m/z.

Cantidad inyectada: 0,2 µl de una dilución al 10 % en etanol

## Resultados

Se obtuvieron los aceites esenciales de los órganos subterráneos de *V. clarionifolia* y *V. carnososa* de diferentes orígenes geográficos. *V. carnososa*: San Carlos de Bariloche (cerro Otto); El Bolsón (cerro Piltriquitron) y Esquel (cerro la Z). *V. clarionifolia*: San Carlos de Bariloche (aeropuerto); Neuquén (estancia San Ramón) y Esquel (Cañadón de los Bandidos).

Los rendimientos de los aceites esenciales para *V. clarionifolia* fueron de 0,21 ml / g (v / m); para *V. carnososa* 0,18 g / ml y para *V. officinalis* 0,25 ml / g (v / m). *V. clarionifolia* como *V. officinalis* no presentaron inconvenientes para extraer el aceite esencial. Fue en *V. carnososa* que se dificultó la extracción y recolección de la esencia, esto se debió a la probable presencia de ceras, que se adherían a las paredes de la trampa Clevenger y no permitían que el aceite se deposite normalmente por la acción de la gravedad. Por lo tanto se colocó una “trampa” de hexano la cual disolvía los compuestos que solidificaban y de este modo se podía extraer la esencia.

El aceite esencial se encuentra en las raíces de *V. clarionifolia* y en los rizomas y raíces de *V. carnososa*, y dentro de estos órganos en la peridermis y parénquima cortical (Molares & Ladio, 2010), en lo que se denomina corteza comercial.

Para su comparación se obtuvo el aceite esencial de una muestra de *V. officinalis* cultivada en la provincia de San Juan, Argentina. El análisis por GC-FID-MS mostró que la composición química de los aceites esenciales de *V. clarionifolia* y *V. carnososa* presenta perfiles cualitativos totalmente diferentes a

los de *V. officinalis* (Figura 42 y 43). A su vez los perfiles de *V. clarionifolia* (Bariloche, Pilcaniyeu) y *V. carnososa* (Bariloche, El Bolsón) difieren de las poblaciones recolectadas en Esquel (Figura 42 y 43) y (Tabla 4).

Se identificaron un total de 107 compuestos en las muestras analizadas alcanzando un total del 63,4 al 82,0 % del total de los aceites. Las composiciones químicas de las valerianas nativas se caracterizaron por la presencia de una mayor proporción de sesquiterpenos, entre un 32,8 a un 49,1%, con preponderancia de sesquiterpenos hidrocarburos. Mientras que los monoterpenos están presentes en menor cantidad, entre un 16,7 a un 29,7%, con iguales proporciones de hidrocarburos y de especies oxigenadas.

*V. officinalis* presenta una composición típica de la especie (Houghton, 1999; Bruneton, 2001) caracterizada por la presencia de acetato de bornilo (11,1 %), valerenal, valerianol, valeranol y ácido isovaleriánico (Tabla 4 y 5). Este último es el que le otorga el típico aroma a las valerianas. En las especies nativas colectadas en Esquel, *V. carnososa* y *V. clarionifolia*, el contenido de este compuesto tiene la mitad del contenido que en las restantes poblaciones. Esto concuerda con las características organolépticas de la muestra recogidas debido a que los individuos recolectados en Esquel presentaban menor aroma típico a la valeriana.

**Tabla 4-** Compuestos identificados en el aceite esencial de las diferentes especies de *Valeriana*

|    | IR<br>no<br>polar | IR<br>polar | Compuestos                    | V.<br><i>officinalis</i> | V.<br><i>clarionifolia</i><br>Bariloche | V.<br><i>clarionifolia</i><br>Pilcaniyeu | V.<br><i>carcosa</i><br>Bariloche | V.<br><i>carcosa</i><br>Bolsón | V.<br><i>carcosa</i><br>Esquel | V.<br><i>clarionifolia</i><br>Esquel | Compuestos |
|----|-------------------|-------------|-------------------------------|--------------------------|---|--|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------|
| 1  | <900              | 1670        | ÁCIDO<br>ISOVALERÁNICO        | 1,9                      | 1,8                                     | 1,8                                      | 1,9                               | 1,8                            | 1,0                            | 1,1                                  | ACIDO ORG  |
| 2  | 916               |             | 3-METIL VALERICO,<br>ACIDO    | tr                       | tr                                      | tr                                       | tr                                | tr                             | tr                             | tr                                   | ACIDO ORG  |
| 3  | 926               | 1036        | ALFA TUYENO                   | tr                       | tr                                      | tr                                       | tr                                | tr                             | tr                             | tr                                   | MHC        |
| 4  | 929               | 1037        | TRICICLENO                    | tr                       | 0,1                                     | tr                                       | tr                                | tr                             | tr                             | tr                                   | MHC        |
| 5  | 935               | 1043        | ALFA PINENO                   | 2,2                      | 9,7                                     | 9,9                                      | 10,1                              | 10,5                           | 4,3                            | 4,7                                  | MHC        |
| 6  | 950               | 1089        | ALFA FENCHENO                 | 3,1                      |   |  |                                   |                                |                                |                                      | MHC        |
| 7  | 951               | 1100        | CANFENO                       | 3,0                      | 2,6                                     | 2,6                                      | 2,8                               | 2,5                            | 0,6                            | 0,7                                  | MHC        |
| 8  | 968               | 1138        | SABINENO                      | tr                       | tr                                      | 0,1                                      | 0,1                               | 0,1                            | tr                             | tr                                   | MHC        |
| 9  | 979               | 1133        | BETA PINENO                   | 0,7                      | 2,7                                     | 2,6                                      | 2,7                               | 2,7                            | 0,8                            | 0,9                                  | MHC        |
| 10 | 1012              | 1206        | ALFA TERPINENO                | 0,1                      | tr                                      | tr                                       | tr                                | tr                             |                                |                                      | MHC        |
| 11 | 1018              | 1286        | p-CIMENO                      | 0,1                      | 0,1                                     | 0,3                                      | 0,3                               | 0,3                            | tr                             | tr                                   | MHC        |
| 12 | 1022              | 1234        | 1,8-CINEOL                    |                          | 0,3                                     | 0,2                                      | 0,2                               | 0,2                            | tr                             | tr                                   | MOX        |
| 13 | 1024              | 1221        | LIMONENO                      | 0,4                      | 0,7                                     | 0,8                                      | 0,6                               | 0,5                            | 0,2                            | 0,3                                  | MHC        |
| 14 | 1047              | 1264        | BETA FELANDRENO               | 0,2                      | tr                                      | tr                                       | tr                                | tr                             | 0,2                            | 0,2                                  | MHC        |
| 15 | 1047              | 1264        | GAMMA TERPINENO               | 0,1                      | 0,1                                     | tr                                       | tr                                | tr                             | tr                             | tr                                   | MHC        |
| 16 | 1082              | 1305        | TERPINOLENO                   | 0,1                      | tr                                      | tr                                       | tr                                | tr                             | tr                             | tr                                   | MHC        |
| 17 | 1087              | 1303        | ISOVALERIANATO DE<br>ISOAMILO |                          | 0,3                                     | 0,2                                      | 0,3                               | 0,3                            | tr                             | tr                                   | MHC        |
| 18 | 1110              | 1507        | ALFA CANFOLENAL               |                          | 0,2                                     | 0,2                                      | 0,1                               | 0,1                            |                                |                                      | MOX        |
| 19 | 1128              | 1687        | TRANS VERBENOL                |                          | tr                                      | tr                                       | tr                                | tr                             |                                |                                      | MOX        |
| 20 | 1141              | 1591        | PINOCARVONA                   |                          | tr                                      | tr                                       | tr                                | tr                             |                                |                                      | MOX        |

|    |      |      |                                |      |     |     |     |     |     |     |                   |
|----|------|------|--------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|
| 21 | 1150 | 1711 | BORNEOL                        | 2,0  | 0,2 | 0,2 | 0,1 | tr  | tr  | 0,1 | MOX               |
| 22 | 1164 | 1614 | TERPINENOL-4                   | 0,2  | 0,2 | 0,2 | 0,1 | tr  |     |     | MOX               |
| 23 | 1172 | 1705 | ALFA TERPINEOL                 | 0,1  | 0,1 | 0,2 | 0,1 | tr  |     |     | MOX               |
| 24 | 1181 | 1796 | MIRTENOL                       | 0,4  |     |     |     |     |     |     | MOX               |
| 25 | 1203 |      | beta ciclocitral               |      |     |     |     |     | tr  | tr  | MOX               |
| 26 | 1214 | 1604 | TIMOL METIL ETER               | 0,2  |     |     |     |     |     |     | MOX               |
| 27 | 1223 | 1448 | ISOVALERIANATO<br>HEXILO       |      | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | tr  | tr  | ESTER<br>ORGÁNICO |
| 28 | 1225 | 1619 | CARVACROL METIL<br>ETER        | 0,1  |     |     |     |     |     |     | MOX               |
| 29 | 1260 | 1944 | dolichodial                    |      | 4,6 | 4,8 | 5,1 | 4,9 | 7,7 | 8,0 | MOX               |
| 30 | 1270 | 1595 | ACETATO BORNILLO               | 11,1 | 4,4 | 4,0 | 4,2 | 4,2 | 3,9 | 4,1 | MOX               |
| 31 | 1276 | 1977 | epidolichodial                 |      | 1,7 | 2,2 | 2,0 | 2,1 | 1,6 | 1,0 | MOX               |
| 32 | 1304 |      | nepetalactol                   |      |     |     |     |     | 0,2 | 0,5 | MOX               |
| 33 | 1309 | 1680 | ACETATO MIRTENILO              | 0,2  |     |     |     |     |     |     | MOX               |
| 34 | 1326 | 2178 | EUGENOL                        |      | 1,5 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 0,2 | 0,3 | MOX               |
| 35 | 1331 | 1704 | ACETATO DE<br>TERPINILO        | 1,4  | tr  | tr  | tr  | tr  |     |     | MOX               |
| 36 | 1335 | 1485 | DELTA ELEMENO                  | 0,5  |     |     |     |     |     |     | SHC               |
| 37 | 1350 | 1470 | ALFA CUBEENO                   |      | 0,8 | 1,0 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | SHC               |
| 38 | 1369 | 1897 | ISOVALERIANATO<br>BENCILLO     |      | 0,1 | 0,1 | tr  | tr  | 0,1 | 0,1 | FP                |
| 39 | 1370 | 1504 | CICLOSATIVENO                  | 0,1  | tr  | tr  | tr  | tr  |     |     | SHC               |
| 40 | 1376 | 1511 | ALFA COPAENO                   | 0,1  | 0,6 | 0,5 | tr  | tr  | tr  | tr  | SHC               |
| 41 | 1382 |      | PACIFIGORGIA-<br>1(9),10-DIENO | tr   |     |     |     |     |     |     | SHC               |
| 42 | 1384 | 1535 | ALFA FUNEBRENO                 |      | 0,4 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | tr  | tr  | SHC               |
| 43 | 1385 | 1507 | BETA PATCHULENO                |      | tr  | tr  | tr  | tr  |     |     | SHC               |
| 44 | 1387 | 1603 | BETA ELEMENO                   | tr   |     |     |     |     |     |     | SHC               |
| 45 | 1388 |      | SESQUITUYENO                   |      | 0,6 | 0,3 | tr  | tr  | 0,6 | 0,1 | SHC               |
| 46 | 1390 |      | epi nepetalactona              |      |     |     |     |     | 0,1 | 0,1 | SOX               |
| 47 | 1394 |      | 2,6-DIMETOXI-p-                | tr   |     |     |     |     |     |     | SOX               |

|             |      |      |                             |     |     |     |     |     |      |      |     |
|-------------|------|------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|
| CIMENO      |      |      |                             |     |     |     |     |     |      |      |     |
| 48          | 1402 | 1867 | 2,5-DIMETOXI-p-CIMENO       | 0,4 |     |     |     |     |      |      | SOX |
| 49          | 1404 |      | 7-EPI-ALFA-CEDRENO          | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,7  | 0,6  | SHC |
| 50          | 1412 | 1576 | CIS ALFA                    |     | 0,3 | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 2,8  | 1,3  | SHC |
| BERGAMOTENO |      |      |                             |     |     |     |     |     |      |      |     |
| 51          | 1412 |      | PACIFIGORGIA-1(6),10-DIENO  | 0,6 |     |     |     |     |      |      | SHC |
| 52          | 1417 | 1614 | BETA CARIOFILENO            | 1,8 | 0,1 | 0,1 | tr  | tr  | tr   | tr   | SHC |
| 53          | 1420 | 1584 | alfa santaleno              |     |     |     |     |     | 6,9  | 7,5  | SHC |
| 54          | 1431 | 1596 | TRANS ALFA BERGAMOTENO      |     | 0,5 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 1,9  | 1,0  | SHC |
| 55          | 1431 | 1608 | BETA GURJUNENO              | 1,2 |     |     |     |     |      |      | SHC |
| 56          | 1437 | 1622 | AROMADENDRENO               | tr  |     |     |     |     |      |      | SHC |
| 57          | 1437 | 1646 | SESQUISABINENO A            |     | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | tr   | 0,1  | SHC |
| 58          | 1439 | 1659 | SEYCHELENO                  |     | 0,1 | tr  | tr  | tr  |      |      | SHC |
| 59          | 1447 | 1629 | epi beta santaleno          |     | tr  | tr  | tr  | tr  | 14,8 | 13,8 | SHC |
| 60          | 1448 | 1668 | CIS BETA FARNESENO          |     | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 1,7  | 1,8  | SHC |
| 61          | 1449 | 1665 | SESQUISABINENO B            |     | tr  | tr  | tr  | tr  | tr   | tr   | SHC |
| 62          | 1449 | 1683 | ALFA HUMULENO               | 0,1 | 0,1 | tr  | tr  | tr  | tr   | tr   | SHC |
| 63          | 1477 | 1671 | TRANS BETA FARNESENO        |     | tr  | tr  | tr  | tr  | 8,7  | 9,0  | SHC |
| 64          | 1451 |      | PACIFIGORGIA-2(10),11-DIENO | 0,8 |     |     |     |     |      |      | SHC |
| 65          | 1452 |      | VALERA-4,7(11)-DIENO        | 1,2 |     |     |     |     |      |      | SHC |
| 66          | 1454 | 1653 | ALFA PATCHULENO             |     | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,3 |      |      | SHC |
| 67          | 1456 | 1658 | ALLO AROMADENDRENO          | 1,4 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |      |      | SHC |
| 68          | 1460 |      | ALFA ACORADIENO             |     | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |      |      | SHC |
| 69          | 1462 | 1943 | BETA IONONA                 | 0,4 |     |     |     |     |      |      | SOX |
| 70          | 1462 |      | EUDESMA-1,4(15),11-TRIENO   |     |     |     |     |     | 3,0  |      | SHC |

|    |      |      |                              |     |      |      |      |      |     |     |       |
|----|------|------|------------------------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|-------|
| 71 | 1465 | 1994 | ISOVALERIANATO<br>FENILETILO |     | 0,5  | 0,5  | 0,3  | 0,4  | tr  | tr  | FP    |
| 72 | 1468 | 1669 | GAMMA GURJUNENO              | 0,4 |      |      |      |      |     |     | SHC   |
| 73 | 1470 | 1783 | AR CURCUMENO                 | t r | 0,3  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,3 | 0,3 | SHC   |
| 74 | 1472 | 1696 | GAMMA<br>CURCUMENO           | 0,4 | 0,5  | 0,5  | 0,2  | 0,2  | 0,3 | 0,2 | SHC   |
| 75 | 1474 | 1721 | GERMACRENO D                 | 0,3 | 0,2  | 0,3  | 0,2  | 0,1  |     |     | SHC   |
| 76 | 1480 | 1732 | BETA SELINENO                | 0,6 |      |      |      |      |     |     | SHC   |
| 77 | 1486 | 1726 | ALFA ZINGIBERENO             | 0,4 | 0,7  | 0,8  | 0,5  | 0,6  | 0,1 | 0,1 | SHC   |
| 78 | 1489 | 1742 | BICICLOGERMACRENO            | 0,7 |      |      |      |      |     |     | SHC   |
| 79 | 1491 | 1736 | ALFA CIS BISABOLENO          | 0,1 |      |      |      |      |     |     | SHC   |
| 80 | 1492 | 1730 | ALFA MUUROLENO               |     | tr   | tr   | tr   | tr   |     |     | SHC   |
| 81 | 1500 | 1733 | BETA BISABOLENO              | 0,2 | 0,2  | 0,1  | 0,1  | 0,1  |     |     | SHC   |
| 82 | 1503 | 1744 | CURCUMENO BETA               |     |      |      |      |      | 0,3 | 0,4 | SHC   |
| 83 | 1504 |      | ISOVALERIANATO DE<br>BORNILO | 0,1 |      |      |      |      |     |     | ESTER |
| 84 | 1508 | 1841 | CIS CALAMENENO               |     | 0,2  | 0,3  | 0,3  | 0,3  |     |     | SHC   |
| 85 | 1510 | 1770 | 7-EPI-BETA-SELINENO          |     | 0,1  | 0,1  | tr   | tr   |     |     | SHC   |
| 86 | 1512 | 1763 | DELTA CADINENO               | 0,4 | 2,0  | 1,8  | 1,7  | 1,9  |     |     | SHC   |
| 87 | 1515 | 1779 | BETA<br>SESQUIFELANDRENO     |     | 36,0 | 38,1 | 40,4 | 40,0 | 6,9 | 5,4 | SHC   |
| 88 | 1521 | 1804 | KESSANO                      | 0,1 |      |      |      |      |     |     | SHC   |
| 89 | 1524 | 1787 | CADINA-1,4-DIENO<br>TRANS    |     | 0,2  | 0,1  | tr   | tr   |     |     | SHC   |
| 90 | 1525 | 1922 | ALFA CALACORENO              |     | tr   | tr   | tr   | tr   |     |     | SHC   |
| 91 | 1533 | 2093 | VALENCENE KETONE             | 0,7 |      |      |      |      |     |     | SOX   |
| 92 | 1543 | 1859 | ISOVALERIANATO<br>MIRTE NILO | 0,5 |      |      |      |      |     |     | ESTER |
| 93 | 1550 | 1836 | GERMACRENO B                 | 0,3 |      |      |      |      |     |     | SHC   |
| 94 | 1557 | 1993 | MAALIOL                      | 4,5 |      |      |      |      |     |     | SOX   |
| 95 | 1565 | 1989 | OXICARIOFILENO               | 0,3 |      |      |      |      |     |     | SOX   |
| 96 | 1605 | 2106 | 10-EPI-EUDESMOL              | 0,4 |      |      |      |      |     |     | SOX   |

|     |      |      |   |      |      |      |      |      |      |      |           |
|-----|------|------|---|------|------|------|------|------|------|------|-----------|
| 97  | 1611 | 2136 | ACORENOL ALFA                                     |      |      |      |      |      | tr   | tr   | SOX       |
| 98  | 1614 | 2167 | ACORENOL BETA                                     |      | 0,3  | 0,2  | 0,1  | 0,1  | 0,6  | 0,5  | SOX       |
| 99  | 1628 | 2192 | EREMOLIGENOL<br>(ESTEREOISOMERO<br>DE VALERIANOL) | 2,6  |      |      |      |      |      |      | SOX       |
| 100 | 1634 | 2214 | VALERIANOL  | 7,2  |      |      |      |      |      |      | SOX       |
| 101 | 1639 | 2181 | PATCHULOL   |      | 0,2  | 0,1  | 0,1  | 0,1  |      |      | SOX       |
| 102 | 1666 | 2218 | ALFA BISABOLOL                                    | 0,5  | tr   | tr   | tr   | tr   | 0,2  | 0,2  | SOX       |
| 103 | 1699 | 2212 | VALERENAL   | 5,3  |      |      |      |      |      |      | SOX       |
| 104 | 1709 |      | VALERENOL   | 0,3  |      |      |      |      |      |      | SOX       |
| 105 | 1736 | 2505 | DRIMENOL  |      | 1,3  | 1,6  | 1,1  | 1,0  | 0,4  | 0,4  | SOX       |
| 106 | 1850 | 2900 | ACIDO VALERENICO                                  | 1,5  |      |      |      |      |      |      | ACIDO ORG |
| 107 | 1947 | 2908 | ÁCIDO<br>HEXADECANOICO                            | 1,0  |      |      |      |      |      |      | ACIDO ORG |
|     |      |      | total   | 63,4 | 78,0 | 82,0 | 79,7 | 79,1 | 68,2 | 67,9 |           |

**Tabla 5-** Grupos de terpenos aislados de las esencias de las especies de *Valeriana*

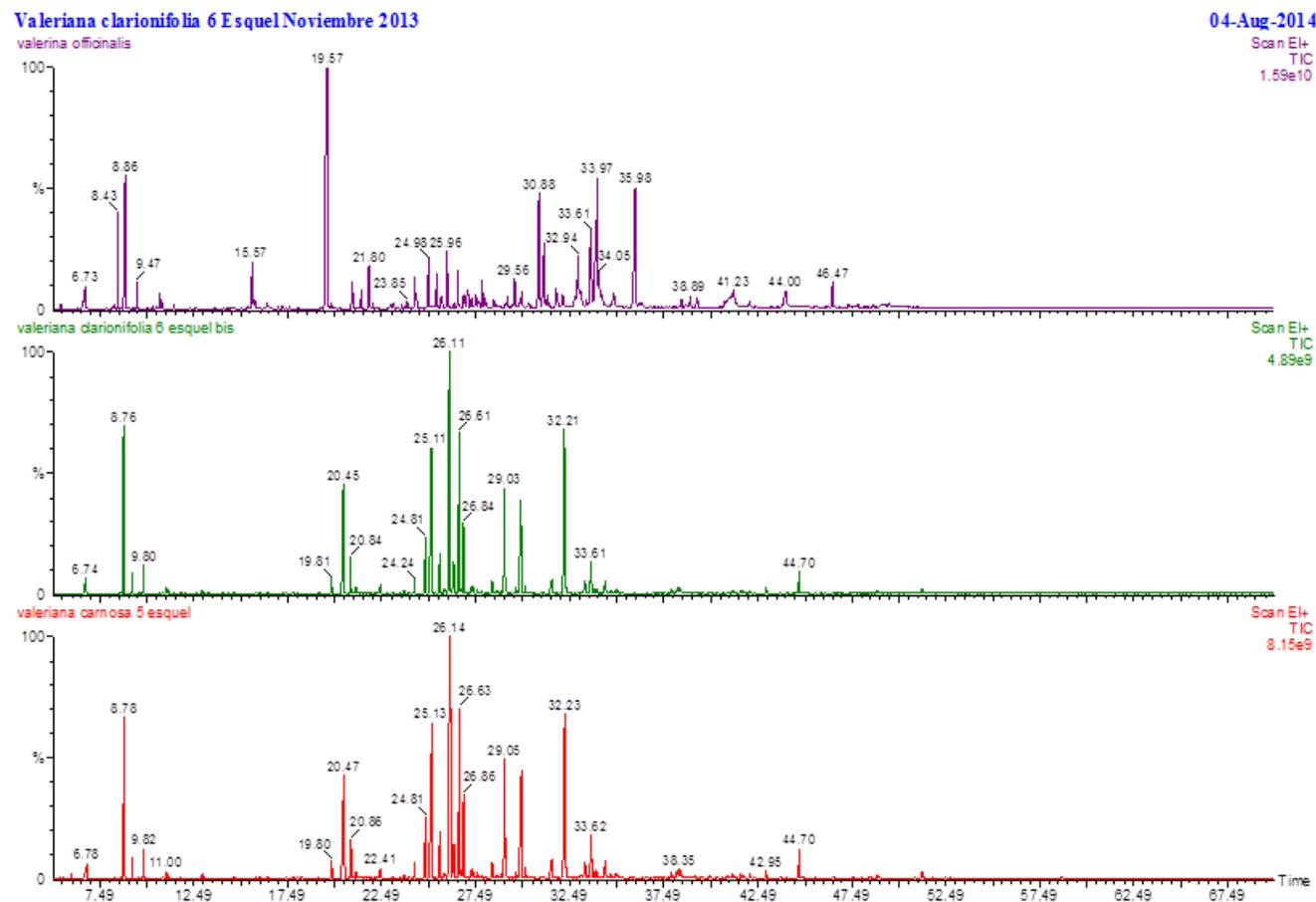
| <i>V. officinalis</i> | <i>V. clarionifolia</i><br>Bariloche | <i>V. clarionifolia</i><br>Pilcaniyeu | <i>V. carnososa</i><br>Bariloche | <i>V. carnososa</i><br>Bolsón | <i>V. carnososa</i><br>Esquel | <i>V. clarionifolia</i><br>Esquel | Compuestos                          |
|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 10,3                  | 16,6                                 | 16,5                                  | 16,5                             | 16,9                          | 6,1                           | 6,8                               | Monoterpenos hidrocarburos (MHC)    |
| 15,5                  | 12,9                                 | 13,2                                  | 12,8                             | 12,5                          | 13,6                          | 15,1                              | Monoterpenos oxigenados (MOX)       |
| 25,8                  | 29,5                                 | 29,7                                  | 29,3                             | 29,4                          | 19,7                          | 21,9                              | Monoterpenos totales (MT)           |
| 11,7                  | 45,9                                 | 47,2                                  | 46,3                             | 45,3                          | 46,2                          | 44,6                              | Sesquiterpenos hidrocarburos (SHC)  |
| 21,1                  | 1,8                                  | 1,9                                   | 1,3                              | 1,2                           | 0,12                          | 1,2                               | Sesquiterpenos oxigenados (SOX)     |
| 32,8                  | 47,7                                 | 49,1                                  | 47,6                             | 46,5                          | 46,32                         | 45,8                              | Sesquiterpenos totales (ST)         |
| 4,8                   | 0,8                                  | 3,2                                   | 2,8                              | 3,2                           | 2,18                          | 0,2                               | Ácidos, esteres fenilpropanoides FP |
| 63,4                  | 78,0                                 | 82,0                                  | 19,7                             | 79,1                          | 68,2                          | 67,9                              | Total                               |

## Discusión

De los compuestos presentes en la esencia de valeriana, el acetato de bornilo es el que más aporta un efecto sedante a la especie (Matsubara *et al.*, 2011). Esta actividad se sumaría al efecto sedante reconocido en otros compuestos no volátiles (derivados iridoides) (Bruneton, 2001; Houghton, 1999). El contenido de este terpeno oxigenado en las composiciones de las poblaciones de Bariloche y las de Esquel (3,9 - 4,4 %) es menor que la presenta en *V. officinalis* (11,1 %) (Tabla 4). Las composiciones de *V. carnososa* (Bariloche y El Bolsón) y de *V. clarionifolia* (Bariloche y estancia San Ramón) son

cuantitativamente muy similares y tienen como compuesto mayoritario a beta-sesquifelandreno. Mientras que en las poblaciones de Esquel solo tiene entre un 5,4 - 6,9 % de beta-sesquifelandreno, además, aparecen varios compuestos principales como el alfa-santaleno (6,9 - 7,5 %), el epi-beta-santaleno (13,8 - 14,8%) y el trans-beta-farneseno (7,0 - 8,0 %). Asimismo, si comparamos a *V. carnos*a y *V. clarionifolia* con otras especies del género, estas no comparten ningún compuesto con *V. wallichii* (Mathela *et al.*, 2005), esta especie es nativa de la India y presenta altos contenidos de patchoulol (> 40%) y muchas veces suele encontrarse como adulterante de *V. officinalis*. Sin embargo, con otras especies comparte compuestos como por ejemplo con *V. alliarifolia*, tienen en común el ácido isovalerenico y el ácido valerianico (Bardekci *et al.*, 2012) o con *V. amurensis* con la que comparte el acetato de bornilo (Cui *et al.*, 2010). Por otra parte, en las valerianas nativas, se ha detectado la presencia de dolichodial (4,6 - 8,0 %) y epidolichodial (1,0 - 2,2 %), algunos de ellos sugeridos como precursores de las nepetalactonas. Estos compuestos han sido descritos previamente como involucrados en la señalización con insectos, particularmente la hormiga argentina (*Linepithema humile* Mayr) (Cavill *et al.*, 1976).

**Figura 42-** Espectro de masa donde se pueden ver los picos principales con sus respectivos tiempos de retención de *V. officinalis*,(San Juan), *V. carnosa* y *V. clarionifolia* (Esquel).



**Figura 43-** Espectro de masa donde se pueden ver los picos principales con sus respectivos tiempos de retención, *V. carnososa* (Bariloche); *V. clarionifolia* (aeropuerto); *V. officinalis* (San Juan).

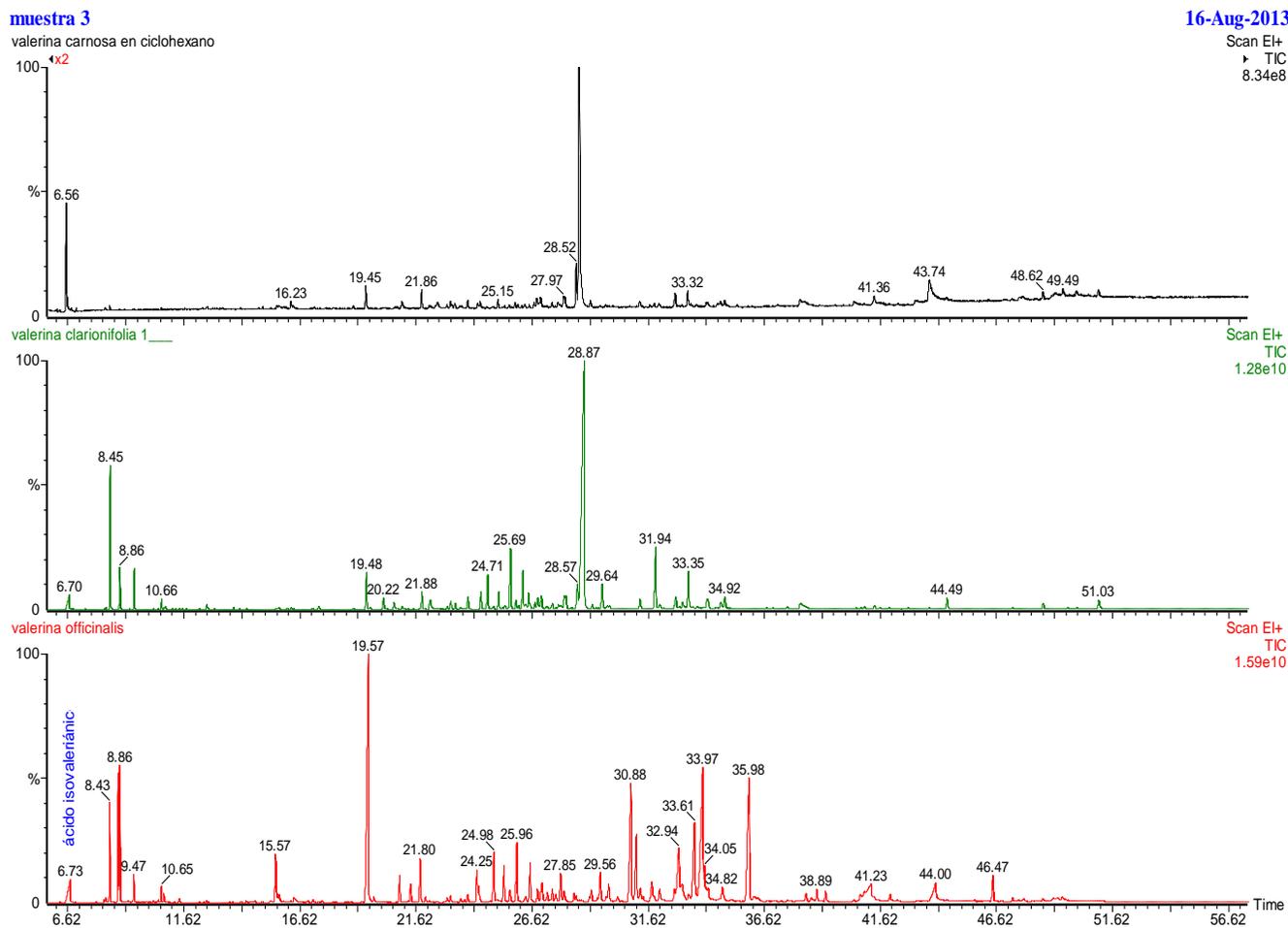
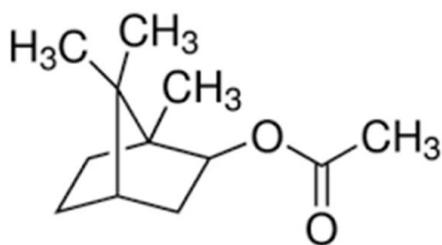
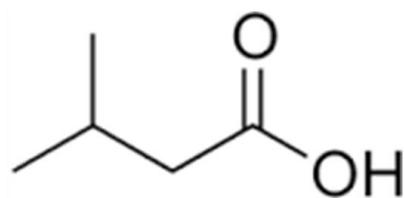


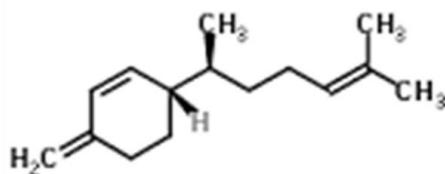
Figura 44



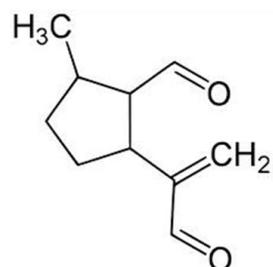
Acetato de Bornilo



Ácido - isovalerianico



Beta - sesquifelandreno



Dolichodial

Estructuras de los compuestos más importantes identificados

## Conclusión

Se describe por primera vez la composición de las esencias de *V. carnos* y *V. clarionifolia*, ambas especies nativas de la Patagonia y utilizadas en la medicina tradicional. Se confirma la presencia de ácido isovalerianico, el cual da el olor “típico de las valerianas” y de acetato de bornilo compuesto con actividad sedante. Asimismo, se informa por primera vez para el género la presencia de dolichodial y epidolichodial, compuestos presentes en los insectos, particularmente en la hormiga argentina (*Linepithema humilis* Mayr) y precursores de la nepeta-lactona.

Por otro lado, el conocimiento de la composición química de las esencias de *V. carnos* y *V. clarionifolia* podría ser de utilidad para realizar controles de calidad de los medicamentos herbarios que contengan “ñancolahuen”.

# CAPITULO III: FARMACOLOGÍA

## Actividad Antioxidante *in vitro*



Caviahue, Neuquen.

## Actividad antioxidante

### Materiales y métodos (DPPH)

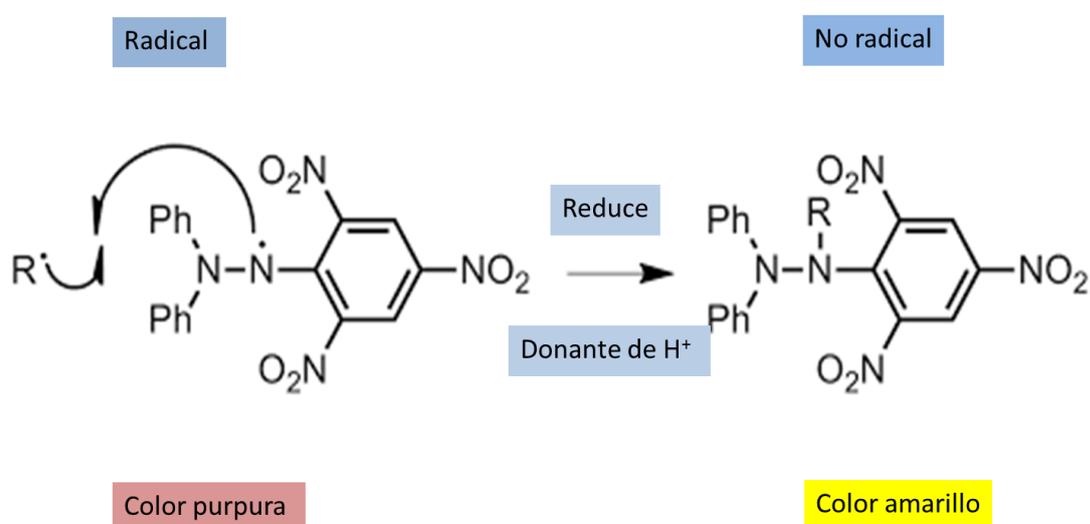
Se estudió la actividad antioxidante *in vitro* de las dos especies conocidas como “ñancolahuen” *V. carnosus* y *V. clarionifolia*. La actividad se midió por las siguientes metodologías:

Capacidad atrapadora de radicales libres

1.- Ensayo de neutralización del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).

Este método se basa en la reducción del radical DPPH, el cual se encuentra en medio metanólico, al compuesto no radical DPPH-H en presencia de un donante de hidrógeno que proviene de la sustancia antioxidante (Blois, 1958). Esta reacción produce un cambio de color en la solución y se monitorea espectrofotométricamente a 517 nm (Figura 45 y 46).

**Figura 45-** Esquema donde se visualiza la reacción producida entre el DPPH y el extracto donante de H<sup>+</sup>



Equipamiento:

espectrofotometro HP de arreglo de diodos.

cubetas de vidrio

micropipetas de 20 µl, 100 µl y 2000 µl

tubos Eppendorf

tubos de vidrio

gradillas

Primeramente se preparó la solución de DPPH a una concentración de 20 mg /

L. Esta solución de DPPH se prepara con metanol, calidad HPLC.

Seguidamente se diluyen los extractos originales MeOH 80 % a razón de 1/10.

Se procede a realizar las mediciones espectrofotométricas de acuerdo con el esquema presentado en la tabla 3.

**Tabla 3-** Esquema de trabajo para la medición de la actividad antioxidante de los extractos

|                | <b>MeOH</b> | <b>Muestra</b> | <b>DPPH (20 mg/L)</b> |
|----------------|-------------|----------------|-----------------------|
| <b>Control</b> | 1000 µl     | ---            | 2000 µl               |
| <b>1</b>       | 980 µl      | 20 µl          | 2000 µl               |
| <b>2</b>       | 960 µl      | 40 µl          | 2000 µl               |
| <b>3</b>       | 940 µl      | 60 µl          | 2000 µl               |
| <b>Total</b>   | ---         | ---            | 3000 µl               |

Una vez realizadas la mezcla del reactivo y la muestra a las concentraciones óptimas (Tabla 3), se deja en oscuridad por el termino de 20 minutos y se procede a realizar la lectura a 517 nm (Figura 43). En primer lugar se realiza la

lectura del blanco. El cálculo del porcentaje de inhibición se realiza por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left( \frac{\text{Abs. blanco} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. blanco}} \right) * 100$$

Luego con los porcentajes de inhibición calculados se procede a graficar la curva del porcentaje de inhibición con cada concentración de extracto, para extrapolar y poder calcular la  $CI_{50\%}$  (concentración necesaria para neutralizar el 50 % del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil). Asimismo, se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición de una sustancia que tiene la actividad antioxidante conocida para poder compararla con la actividad antioxidante de los extractos, en este caso se utilizó el flavonoide rutina como sustancia de referencia.

**Figura 46-** Ensayo de neutralización del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)



Visualización del pasaje del color purpura (menor actividad) al color amarillo (mayor actividad antioxidante).

**A-** Menor concentración de extracto.

**B-** Concentración media.

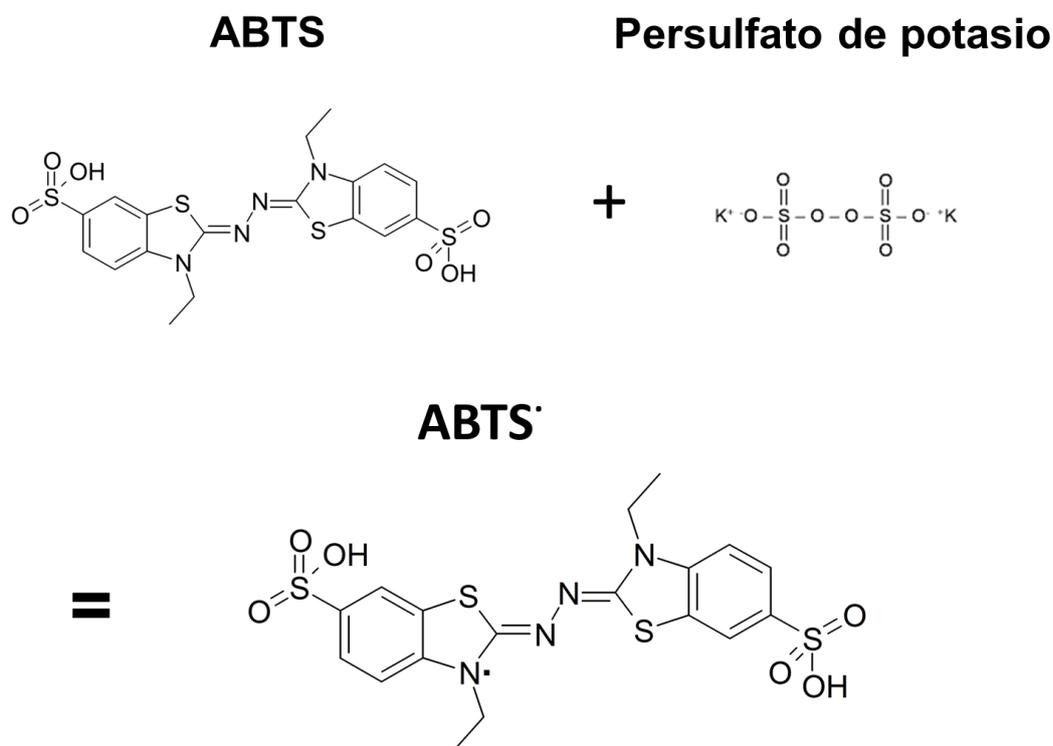
**C-** Mayor concentración.

## 2.- Decoloración del radical catión ABTS

Se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Campos *et al.* (1997) y Re *et al.* (1999). El ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzothiazolina-6-sulfónico) (ABTS) reacciona con el persulfato de potasio para generar el radical catión ABTS<sup>+</sup>. Este radical libre es neutralizado en presencia de una sustancia antioxidante, que en este caso es el extracto vegetal a ensayar.

En primer lugar se prepara la solución acuosa del reactivo el ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzothiazolina-6-sulfónico) (ABTS) 7 mMolar cuya concentración es de 3,84 g / l. Hasta este momento el ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzothiazolina-6-sulfónico) no se encuentra como radical, para que esto suceda se lo mezcla con una solución 4,95 mMolar de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). Estas sustancias reaccionan estequiométricamente 1 - 1, por lo tanto, se mezclan en partes iguales los volúmenes de acuerdo con el trabajo programado. Para que reaccione la totalidad de la molécula de ABTS al radical ABTS• (Figura 47 y 48) se debe preparar la solución mezcla 12 horas antes de su empleo y, al ser el ABTS una sustancia que se degrada con la luz, se debe preservar en la oscuridad.

Figura 47- Reacción del ABTS



Esquema en donde se representa la generación del radical ABTS<sup>•+</sup> por el desapareamiento que genera el persulfato de potasio en los electrones del átomo de nitrógeno.

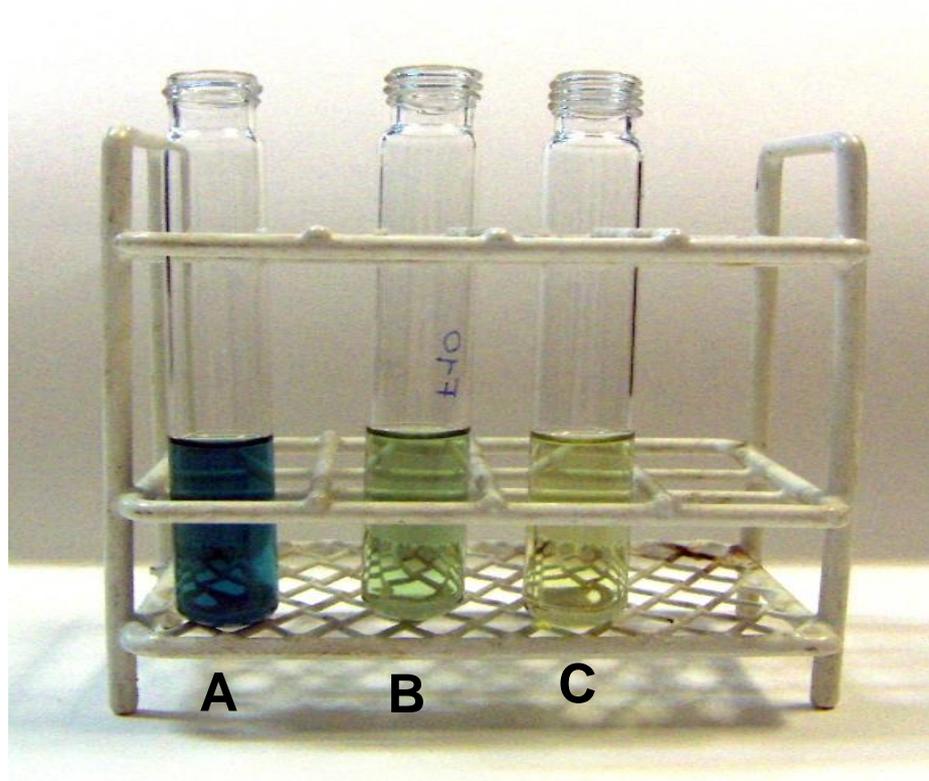
Luego, una vez que la solución mezcla se encuentra estable (no antes de las 12 horas), se procede a preparar la dilución de la solución de ABTS, la cual consiste en tomar 1 ml de solución mezcla y diluirla con 10 ml de etanol anhidro. En la figura 45 se observa cómo se produce el viraje de color de solución del radical ABTS en presencia de un extracto con capacidad antioxidante. El cálculo del porcentaje de inhibición se realiza por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left( \frac{\text{Abs. blanco} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. blanco}} \right) * 100$$

**Tabla 4-** Esquema de trabajo para la medición de la actividad antioxidante de los extractos

|                | <b>Etanol 100°</b> | <b>Muestra</b> | <b>ABTS</b>  |
|----------------|--------------------|----------------|--------------|
| <b>Control</b> | 200 $\mu$ l        | ---            | 2800 $\mu$ l |
| <b>1</b>       | 180 $\mu$ l        | 20 $\mu$ l     | 2800 $\mu$ l |
| <b>2</b>       | 160 $\mu$ l        | 40 $\mu$ l     | 2800 $\mu$ l |
| <b>3</b>       | 140 $\mu$ l        | 60 $\mu$ l     | 2800 $\mu$ l |
| <b>Total</b>   | ---                | ---            | 3000 $\mu$ l |

**Figura 48-** Decoloración del radical catión ABTS



Visualización del pasaje de color azul (menor actividad antioxidante) al amarillo (mayor actividad antioxidante. **A-** menor concentración de extracto; **B-** concentración media; **C-** mayor concentración

## RESULTADOS

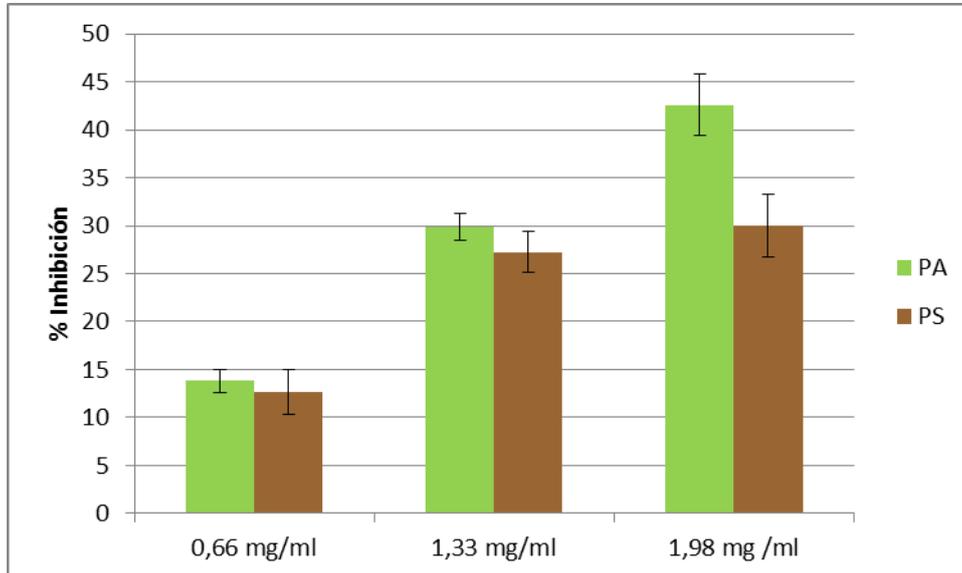
Capacidad atrapadora de radicales libres

a) Ensayo de neutralización del radical difenil-picril-hidrazil (DPPH)

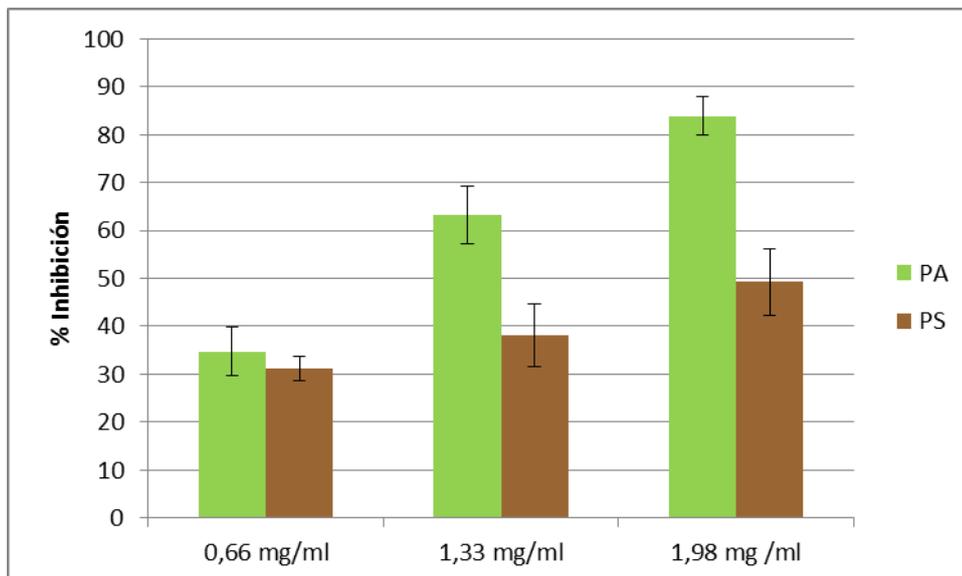
*V. carnos*: Se presentan los porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos en las poblaciones del cerro Otto y del cerro Piltriquitron en los dos estados fenológicos.

En la población del cerro Otto, para ambos estados fenológicos, los porcentajes de inhibición resultaron mayores en las partes aéreas sobre las subterráneas (Figura 49 y 50). La  $CI_{50\%}$  en las partes aéreas fue de 3,46 mg / ml en la floración y 1,5 mg / ml al final de la estación de crecimiento. Mientras que en las partes subterráneas los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 5,8 mg /ml, en la floración y de 3,16 mg / ml en la posfructificación (Tabla 5).

**Figura 49-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. carnososa*, de la población del cerro Otto, en el estado fenológico de la floración



**Figura 50-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. carnososa*, de la población del cerro Otto, en el estado fenológico de la posfructificación



**Tabla 5-** Ensayo de neutralización del radical difenil-picril-hidrazil (DPPH)

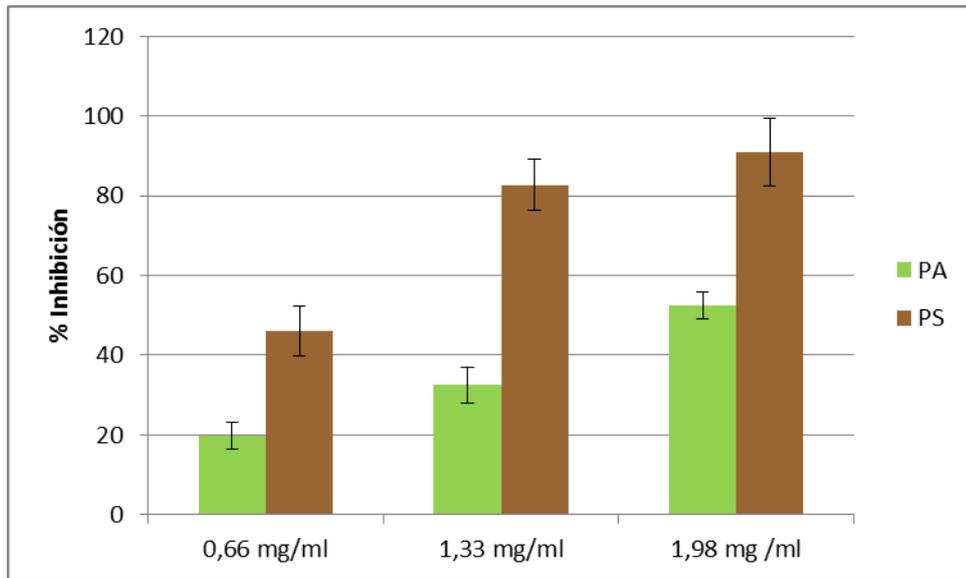
| <b>Extracto metanólico</b>   | <b>Fórmula lineal</b> | <b>Valor R<sup>2</sup></b> | <b>CI<sub>50</sub> %</b> |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>PA, Otto, diciembre</b>   | $y = 14,4 x - 0,03$   | 0,98                       | 3,5mg / ml               |
| <b>PS, Otto, diciembre</b>   | $y = 8,65 x + 5,9$    | 0,99                       | 5,8 mg / ml              |
| <b>PA, Otto, marzo</b>       | $y = 24,55 x + 11,48$ | 0,99                       | 1,5 mg / ml              |
| <b>PS, Otto, marzo</b>       | $y = 9,43 x + 21,53$  | 0,98                       | 3,2 mg / ml              |
| <b>PA, Piltri, diciembre</b> | $y = 16,45 x + 2,43$  | 0,98                       | 2,5 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri, diciembre</b> | $y = 22,53 x + 28,30$ | 0,88                       | 2,7 mg / ml              |
| <b>PA, Piltri, marzo</b>     | $y = 6,35 x + 35,73$  | 0,97                       | 2,3 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri, marzo</b>     | $y = 13,5 x + 13,44$  | 0,98                       | 2,8 mg / ml              |
| <b>Cocimientos</b>           |                       |                            |                          |
| <b>PS, Otto diciembre</b>    | $y = 15,75 x + 23,52$ | 0,99                       | 1,7 mg / ml              |
| <b>PS, Otto marzo</b>        | $y = 24,63 x + 2,28$  | 0,97                       | 1,9 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri diciembre</b>  | $y = 25,73 x + 3,35$  | 0,99                       | 1,8 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri marzo</b>      | $y = 33,57 x - 9,4$   | 0,98                       | 1,7 mg / ml              |
| <b>Tinturas</b>              |                       |                            |                          |
| <b>PS, Otto diciembre</b>    | $y = 19,53 x + 27,55$ | 0,97                       | 1,8 mg / ml              |
| <b>PS, Otto marzo</b>        | $y = 17,5 x + 33,5$   | 0,96                       | 0,94 mg / ml             |
| <b>PS, Piltri diciembre</b>  | $y = 21,5 x + 24,57$  | 0,94                       | 1,2 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri marzo</b>      | $y = 20,8 x + 29,2$   | 0,90                       | 1,0 mg / ml              |

Ecuación de la recta, valor R<sup>2</sup> y CI<sub>50</sub>% de *V. carnosus* sobre el radical DPPH

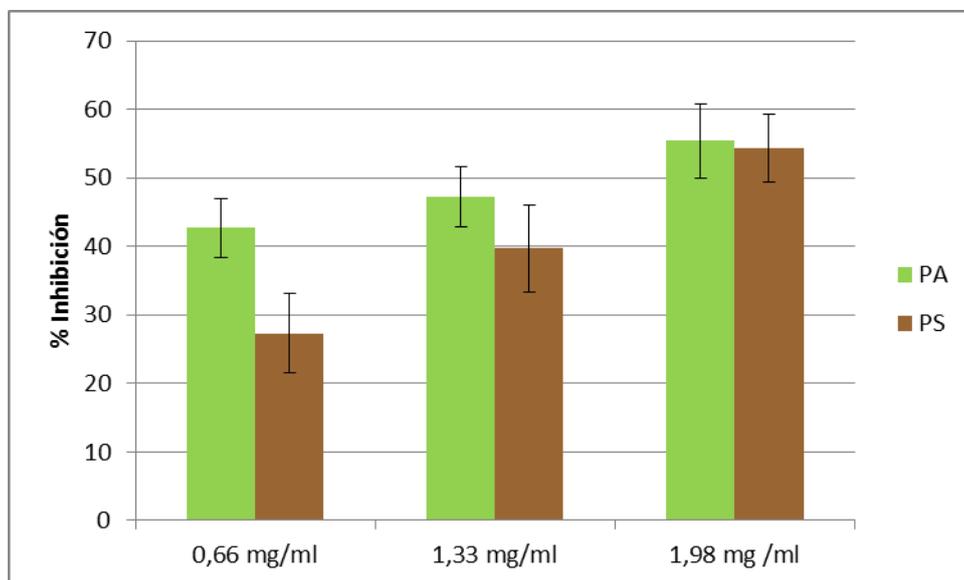
Piltri = cerro Pitriquitron

La población del cerro Piltriquitron, en la localidad de El Bolsón, los porcentajes de inhibición, resultaron mayores en las partes subterráneas con respecto a las partes aéreas, en el estado fenológico de floración (Figura 51 y 52). Para este estadio las  $CI_{50\%}$  fueron de 2,9 mg / ml en las partes aéreas y 0,96 mg / ml en las partes subterráneas. Mientras que en la estación de finales del periodo de crecimiento, en las partes subterráneas los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 2,7 mg / ml, y de 2,2 mg / ml en las partes aéreas (Tabla 5).

**Figura 51-** Porcentaje de inhibición de los extracto metanólico de *V. carnos*, de la población del cerro Piltriquitron, en el estado fenológico de floración



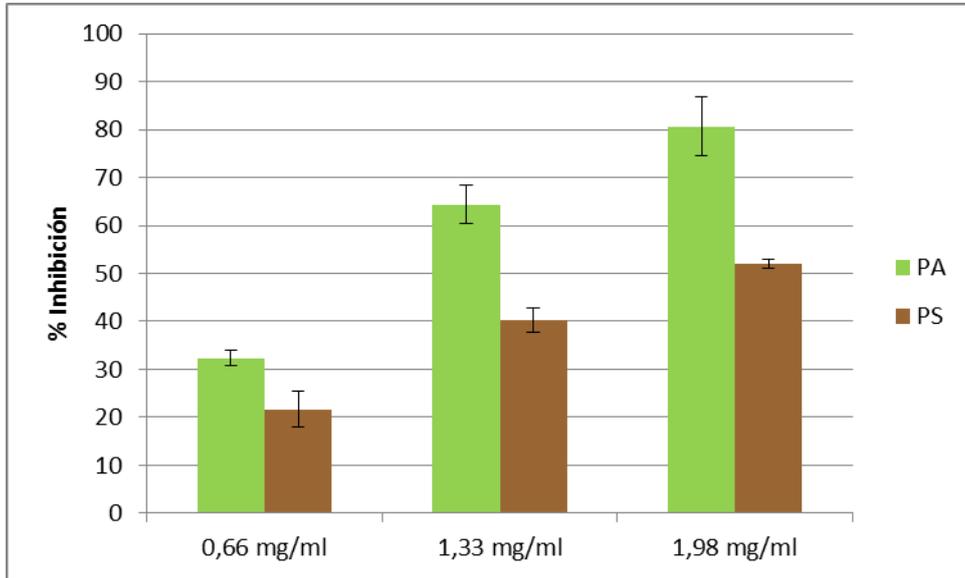
**Figura 52-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. carnososa*, de la población del cerro Piltriquitron, en el estado fenológico de posfructificación



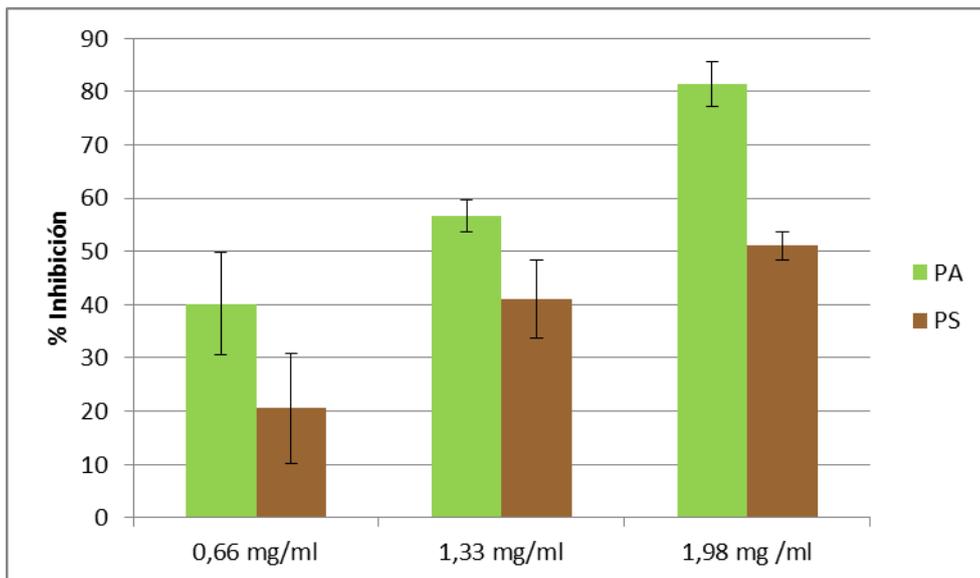
*V. clarionifolia*: Se presentan los porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos, en las poblaciones del aeropuerto y de la estancia San Ramón estudiadas en dos estados fenológicos.

En la población del aeropuerto, para ambos estados fenológicos, los porcentajes de inhibición resultaron mayores en los órganos aéreos sobre los subterráneos (Figura 53 y 54). La  $CI_{50\%}$  en los órganos aéreos fue de 1,6 mg / ml en la floración y 1,5 mg / ml en el estadio de finales de la estación de crecimiento. Mientras que en las partes subterráneas los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 2,7 mg / ml, en la floración y de 2,8 mg / ml en la posfructificación (Tabla 5).

**Figura 53-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. clarionifolia*, en la población del aeropuerto, en el estado fenológico de floración

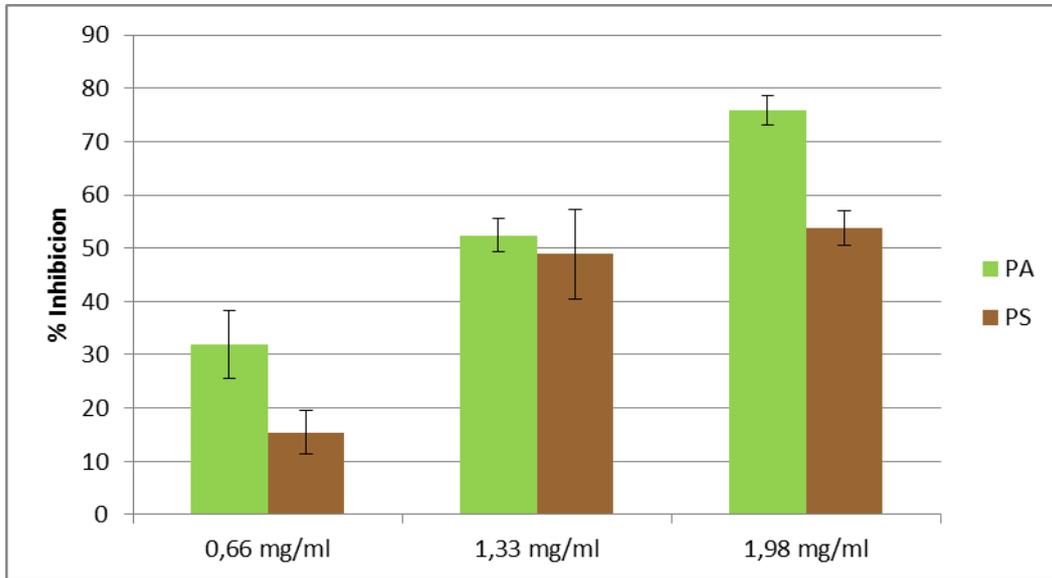


**Figura 54-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. clarionifolia*, en la población del aeropuerto, en el estado fenológico de posfructificación

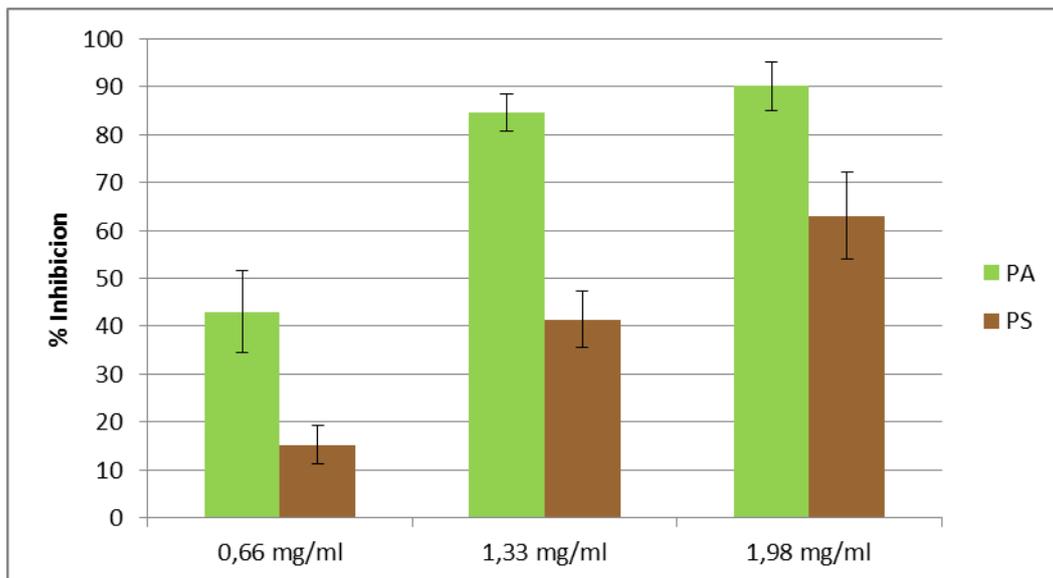


En la población de la estancia San Ramón, para ambos estados fenológicos, los porcentajes de inhibición resultaron mayores en las partes aéreas sobre las subterráneas (Figura 55 y 56). Los valores de  $CI_{50\%}$  fueron, en las partes aéreas, de 1,8 mg / ml en la floración y 1,0 mg / ml al final de la estación de crecimiento. Mientras que en las partes subterráneas los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 2,5 mg / ml, en la floración y de 1,7 mg / ml en la posfructificación (Tabla 6).

**Figura 55-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. clarionifolia*, en la población de la estancia San Ramón, en el estado fenológico de floración



**Figura 56-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. clarionifolia*, en la población de la estancia San Ramón, en el estado fenológico de posfructificación



**Tabla 6-** Ensayo de neutralización del radical difenil-picril-hidrazil (DPPH)

| <b>Extracto metanólico</b>               | <b>Fórmula lineal</b> | <b>Valor R<sup>2</sup></b> | <b>C I<sub>50</sub> %</b> |
|--|-----------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>PA, Aeropuerto, diciembre</b>         | $y = 24,67 x + 10,78$ | 0,96                       | 1,6 mg / ml               |
| <b>PS, Aeropuerto, diciembre</b>         | $y = 15,22 x + 7,56$  | 0,98                       | 2,7 mg / ml               |
| <b>PA, aeropuerto, marzo</b>             | $y = 20,59 x + 18,12$ | 0,99                       | 1,5 mg / ml               |
| <b>PS, aeropuerto, marzo</b>             | $y = 15,25 x + 7,0$   | 0,96                       | 2,8 mg / ml               |
| <b>PA, estancia San Ramón, diciembre</b> | $y = 21 x + 9,46$     | 0,99                       | 1,8 mg / ml               |
| <b>PS, estancia San Ramón, diciembre</b> | $y = 19,21 x + 0,96$  | 0,96                       | 2,5 mg / ml               |
| <b>PA, estancia San Ramón, marzo</b>     | $y = 23,55 x + 25,34$ | 0,97                       | 1,0 mg / ml               |
| <b>PS, estancia San Ramón, marzo</b>     | $y = 23,89 x + 7,88$  | 0,99                       | 1,7 mg / ml               |
| <b>Cocimientos</b>                       |                       |                            |                           |
| <b>PS, aeropuerto diciembre</b>          | $y = 31,84 x - 13,56$ | 0,99                       | 1,9 mg / ml               |
| <b>PS, aeropuerto marzo</b>              | $y = 29,31 x - 11,89$ | 0,98                       | 2,1 mg / ml               |
| <b>PS, estancia San Ramón diciembre</b>  | $y = 24,23 x + 8,67$  | 0,96                       | 1,7 mg / ml               |
| <b>PS, estancia San Ramón marzo</b>      | $y = 21,30 x - 0,36$  | 0,97                       | 2,3 mg / ml               |
| <b>Tinturas</b>                          |                       |                            |                           |
| <b>PS, aeropuerto diciembre</b>          | $y = 18,9 x + 26,36$  | 0,95                       | 1,3 mg / ml               |
| <b>PS, aeropuerto marzo</b>              | $y = 19,8 x + 3,85$   | 0,90                       | 0,9 mg / ml               |
| <b>PS, estancia San Ramón diciembre</b>  | $y = 23,9 x + 21,57$  | 0,99                       | 1,2 mg / ml               |
| <b>PS, estancia San Ramón marzo</b>      | $y = 23,5 x + 25,2$   | 0,96                       | 1,0 mg / ml               |

Ecuación de la recta, valor R<sup>2</sup> y CI<sub>50%</sub> de *V. clarionifolia* sobre el radical DPPH.

### ***Ensayo de neutralización del radical difenil-picril-hidrazil (DPPH) en los cocimientos***

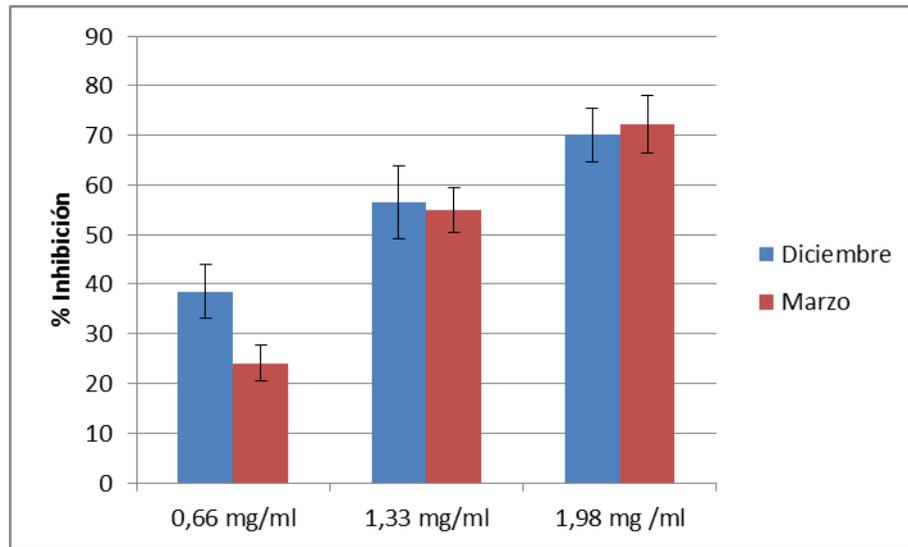
#### *V. carnososa*

Los porcentajes de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas en las dos poblaciones estudiadas fueron más elevados en el estado fenológico de la floración (Figura 57 y 58). Por otra parte, en la floración las  $CI_{50\%}$  fueron de 1,6 mg / ml y 1,8 mg / ml para las poblaciones del cerro Otto y Piltriquitron respectivamente y en el estadio de posfructificación fueron de 1,9 mg / ml y 1,7 mg / ml en las poblaciones del cerro Otto y Piltriquitron respectivamente (Tabla 5).

#### *V. clarionifolia*

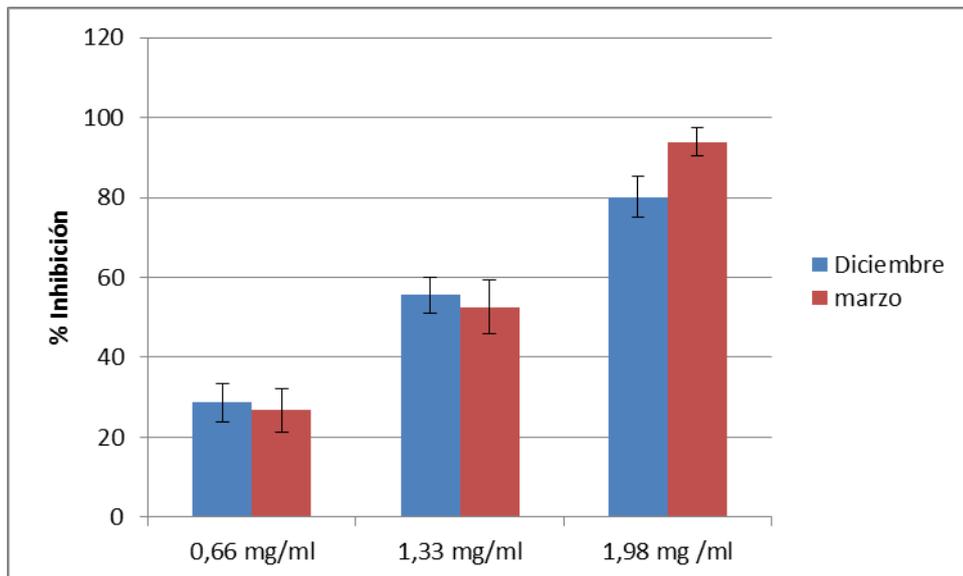
Los porcentajes de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas, en las dos poblaciones analizadas, fueron más elevados en el estado fenológico de la floración (Figura 59 y 60). Los valores de las  $CI_{50\%}$  fueron de 1,9 mg / ml en la floración y 2,1 mg / ml en la pos fructificación para la población del aeropuerto. En la población de la estancia San Ramón los valores de  $CI_{50\%}$  fueron en la floración 1,7 mg / ml y 2,3 mg / ml en la pos fructificación (Tabla 6).

**FIGURA 57-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. carnosa*



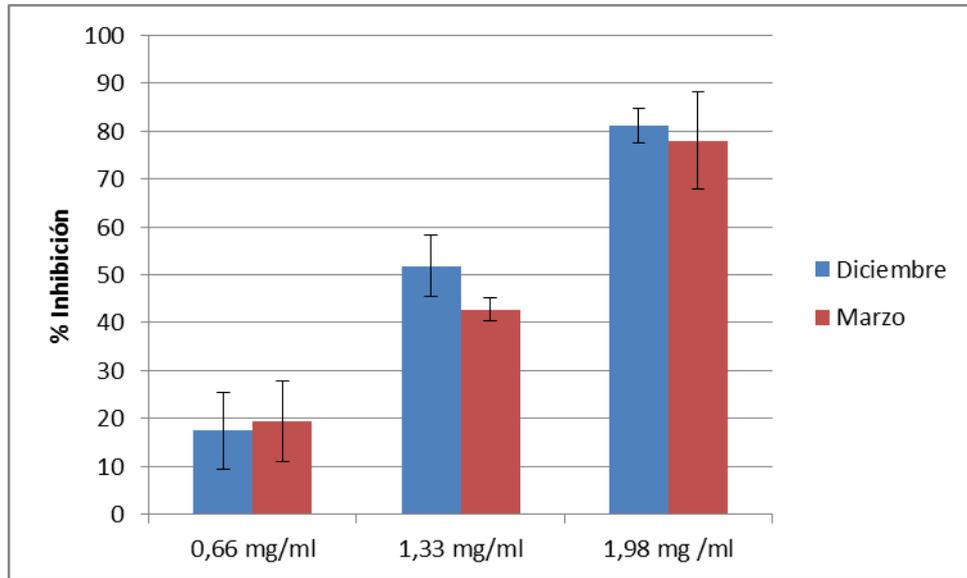
La población es la del cerro Otto. Los estados fenológicos estudiados son: floración (diciembre) y posfructificación (marzo).

**Figura 58-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. carnosa*



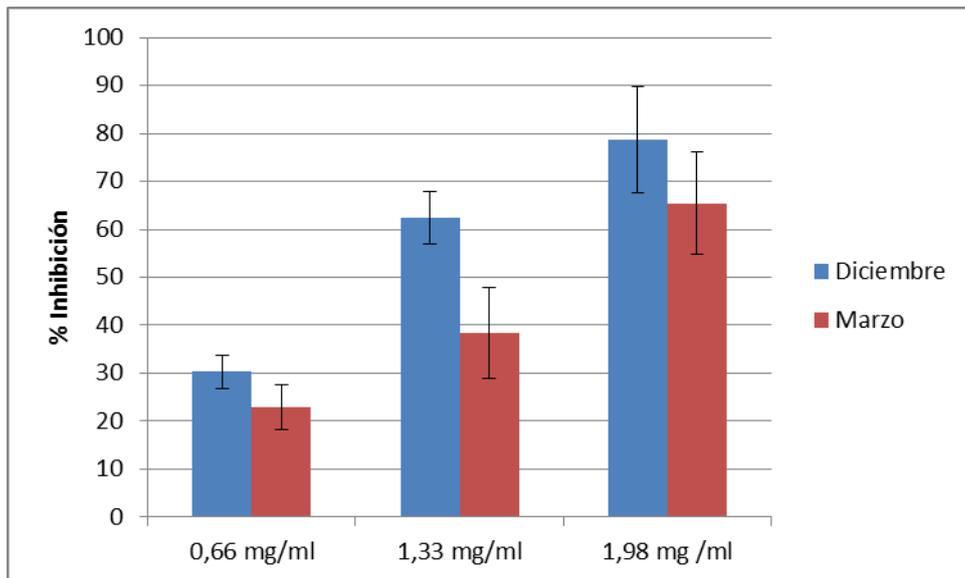
La población es la del cerro Piltriquitron. Los estados fenológicos estudiados son de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

**Figura 59-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. clarionifolia*



La población corresponde a la del aeropuerto para los estados fenológicos de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

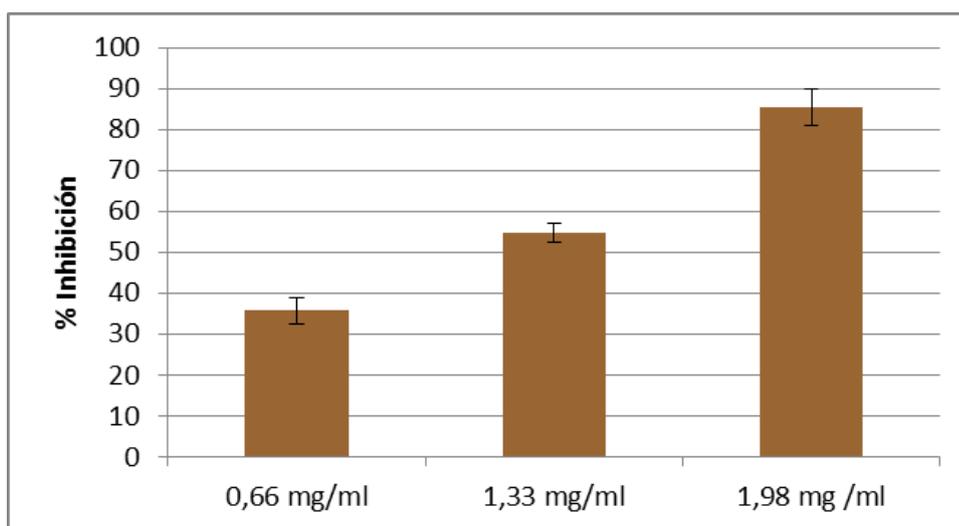
**FIGURA 60-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. clarionifolia*



La población de la estancia San Ramón y se realizaron en los estados fenológicos de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

En *V. officinalis* los porcentajes de inhibición de los órganos subterráneos (rizomas + raíces) en los cocimientos fueron de 35 %, 54% y 85 % para las tres concentraciones (Figura 61), y la  $CI_{50\%}$  fue de 1,65 mg / ml ( $R^2= 0,98$ ).

**Figura 61-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. officinalis*



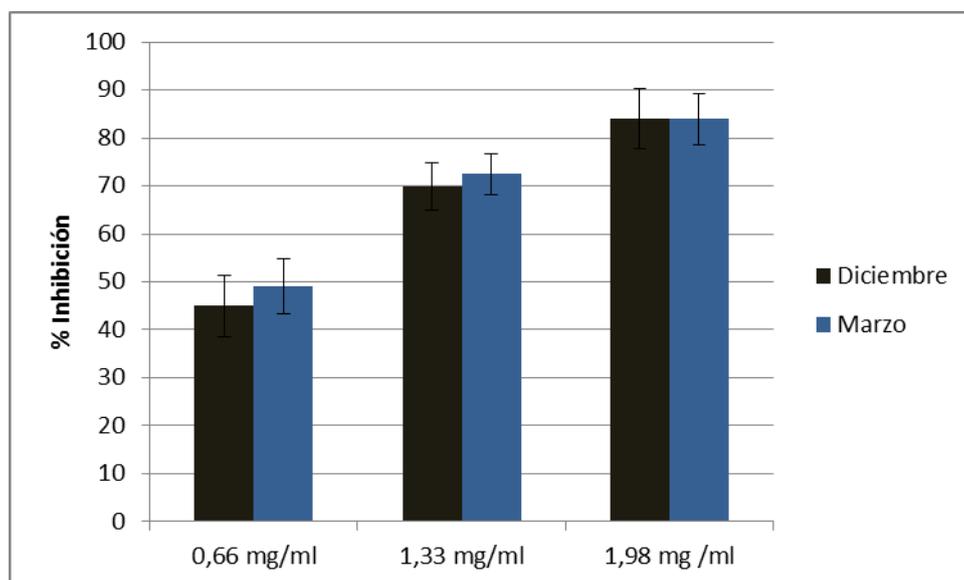
Ejemplares cultivados en la provincia de San Juan.

### ***Ensayo de neutralización del radical difenil-picril-hidrazil (DPPH) en tinturas***

#### *V. carnosa*

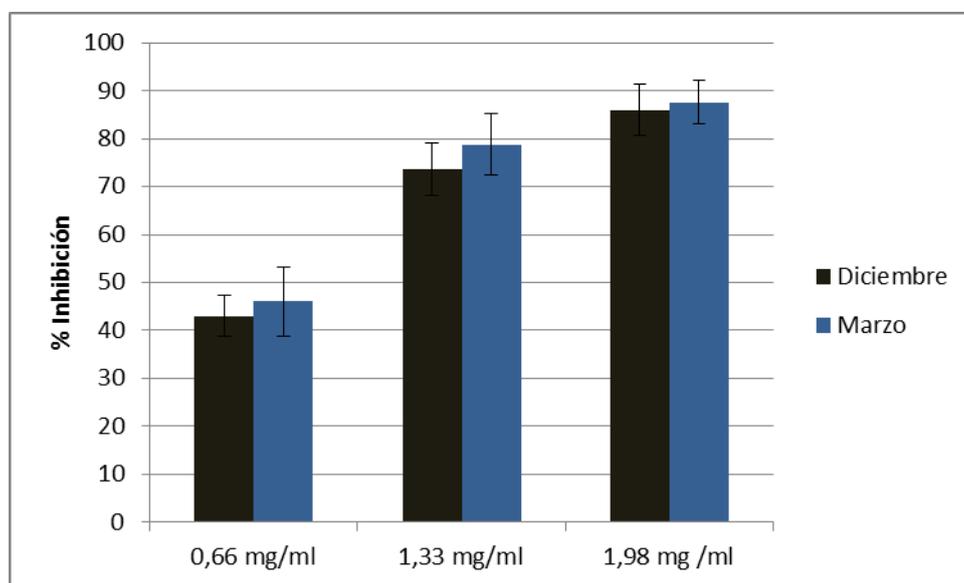
En las tinturas, los porcentajes de inhibición de las partes subterráneas, fueron mayores en el estado fenológico de la posfructificación en las dos poblaciones estudiadas, cerro Otto y cerro Piltriquitron (Figura 62 y 63). Asimismo, las  $CI_{50\%}$  fueron de 0,94 mg / ml y de 1,0 mg / ml para el cerro Otto y Piltriquitron respectivamente. En floración la población con menor valor de  $CI_{50\%}$  fue la población del cerro Piltriquitron (1,2 mg / ml), mientras que en la población del cerro Otto, el valor de  $CI_{50\%}$  fue de 1,8 mg / ml (Tabla 5)

**Figura 62-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las partes subterráneas de *V. carnosa*



La población estudiada es la del cerro Otto, para los estados fenológicos de la floración (diciembre) y de la posfructificación (marzo).

**Figura 63-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las partes subterráneas de *V. carnosa*

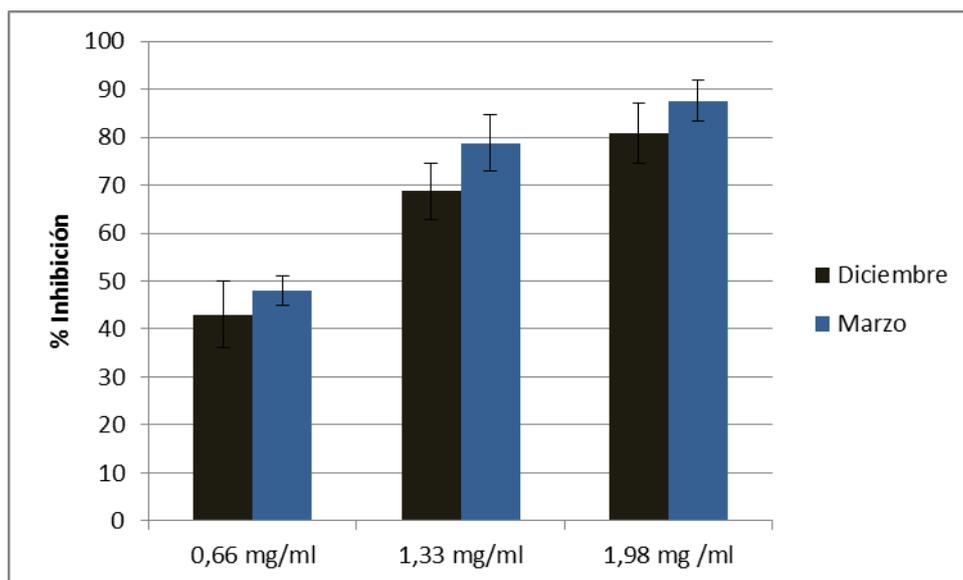


La población corresponde a la del cerro Piltriquitron, para los estados fenológicos de la floración (diciembre) y de la posfructificación (marzo).

*V. clarionifolia*:

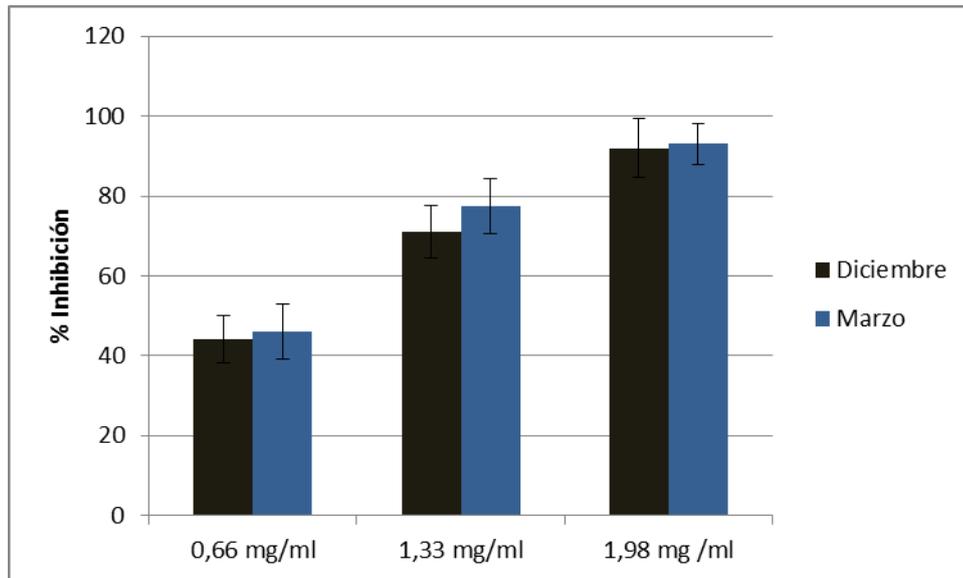
En las tinturas, los porcentajes de inhibición de las partes subterráneas, en las dos poblaciones estudiadas, fueron mayores en el estado fenológico de la posfructificación (mes de marzo) (Figura 64 y 65). Se registraron pequeñas variaciones en los valores de  $CI_{50\%}$ , los menores valores se registraron en el estado fenológico de la posfructificación y fue para la población del aeropuerto (0,90 mg / ml). En la floración, la población con menor valor de  $CI_{50\%}$  fue para la que crece en la estancia San Ramón (1,21 mg / ml) (Tabla 6).

**FIGURA 64-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las partes subterráneas de *V. clarionifolia*



La población corresponde a la del aeropuerto, los estados fenológicos estudiados son la floración (diciembre) y la posfructificación (marzo).

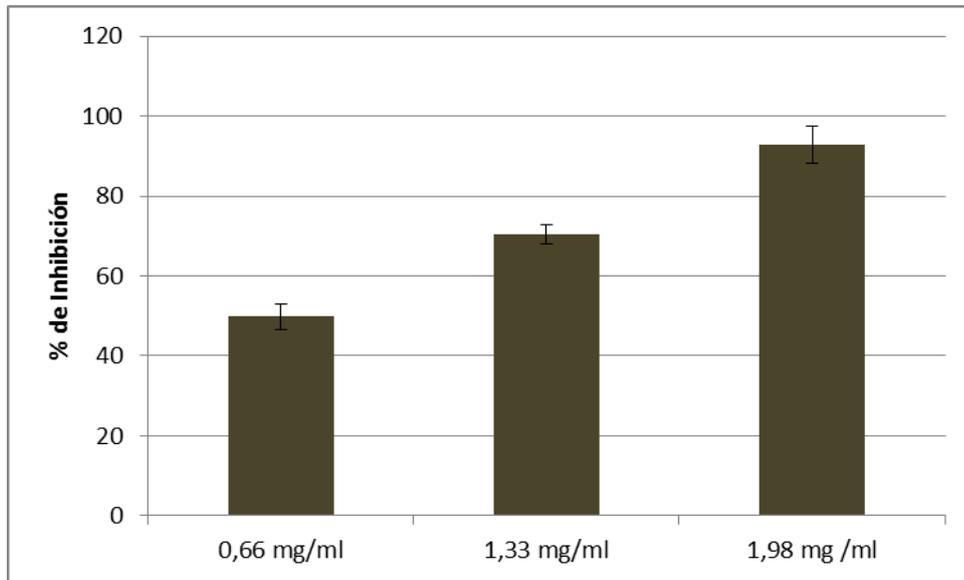
**Figura 65-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las parte subterráneas de *V. clarionifolia*



La población corresponde a la de la estancia San Ramón, los estados fenológicos estudiados son la floración (diciembre) y la posfructificación (marzo).

En las tinturas hechas con los rizomas y las raíces de *V. officinalis*, los porcentajes de inhibición fueron de 49 %, 70 % y 92 % en las tres concentraciones ensayadas (Figura 66). La  $CI_{50\%}$  fue de 1,0 mg / ml ( $R^2 = 0,99$ ).

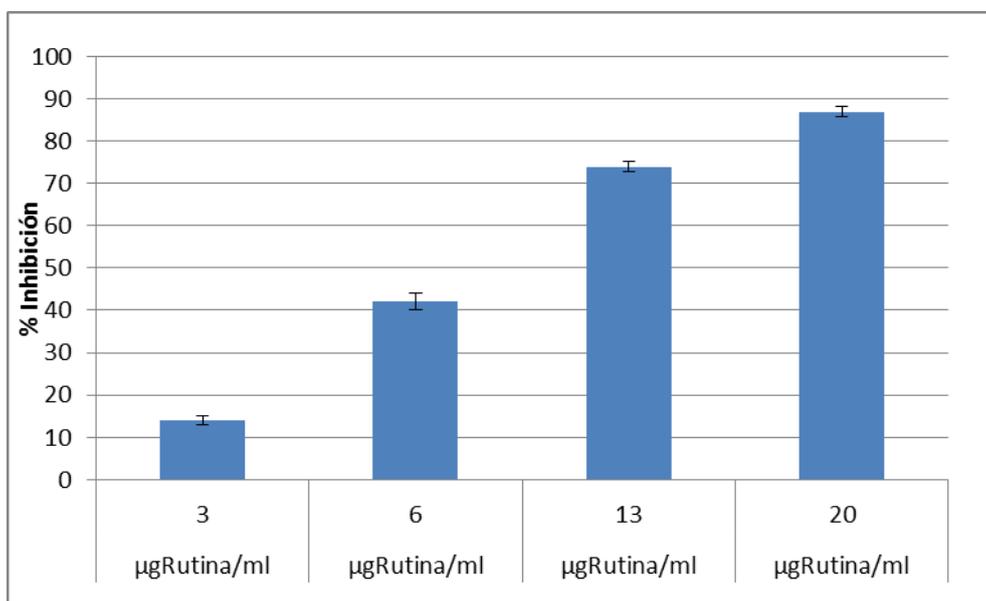
**FIGURA 66-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las partes subterráneas de *V. officinalis*



Los ejemplares fueron cultivados en la provincia de San Juan

Se realizó una curva con una sustancia con capacidad atrapadora de radicales libres conocida, en este caso se escogió rutina, se ensayaron cuatro concentraciones de la sustancia pura que arrojaron los siguientes resultados: a la concentración de 3 µg / ml corresponde 14 % de inhibición, con 6 µg / ml corresponde 42 %, con 13 µg / ml corresponde 74 % y con 20 µg / ml corresponde 87 % (Figura 67). La ecuación de la recta ( $y = 25,1 x - 8,5$ ) arrojó un valor de  $CI_{50\%}$  de 2,34 µg / ml, con  $R^2$  de 0,97.

**FIGURA 67-** Porcentajes de inhibición de rutina sobre el radical DPPH



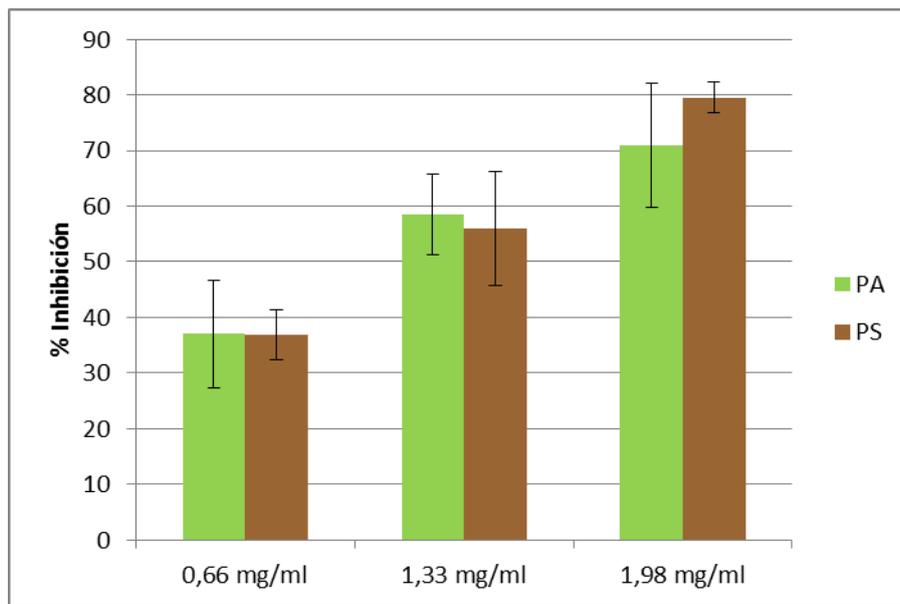
#### Decoloración del radical catión ABTS

##### *V. carnosus*

Primeramente se presentan los porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos 80 %, de las poblaciones del cerro Otto y del cerro Piltriquitron estudiadas en dos estados fenológicos.

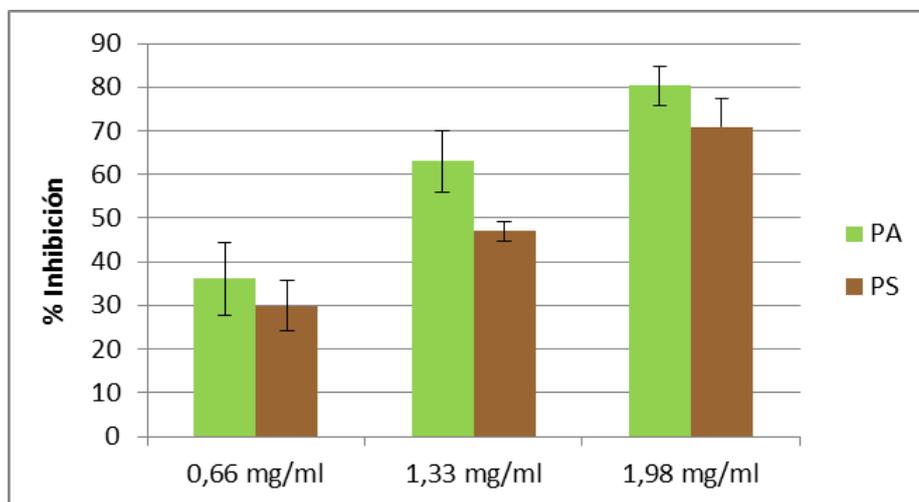
En los ejemplares de la población del cerro Otto, para ambos estados fenológicos, los porcentajes de inhibición resultaron mayores en las partes aéreas (Figura 68 y 69). La  $CI_{50\%}$  fue de 3,46 mg / ml en la época de floración y 1,5 mg / ml en finales de la estación de crecimiento. Mientras que en los órganos subterráneos los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 5,8 mg / ml en la floración y de 3,16 mg / ml en la posfructificación (Tabla 7).

**Figura 68-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. carnososa*



La población en estudio corresponde a la del cerro Otto, en el estado fenológico de la floración.

**Figura 69-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. carnososa*



La población corresponde a la del cerro Otto, en el estado fenológico de la posfructificación.

**Tabla 7-** Decoloración del radical catión ABTS

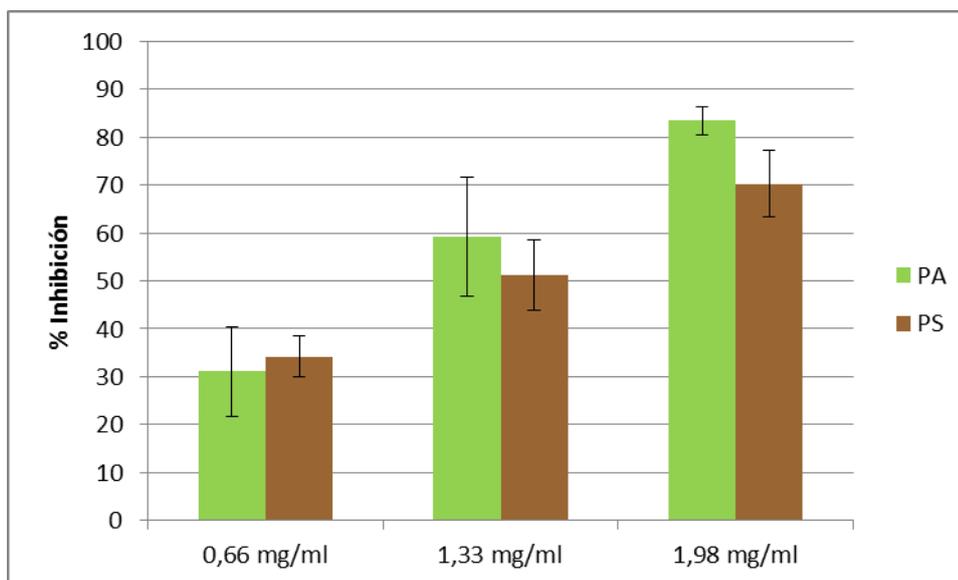
| <b>Extracto metanólico</b>   | <b>Fórmula lineal</b> | <b>Valor R<sup>2</sup></b> | <b>CI<sub>50</sub> %</b> |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>PA, Otto, diciembre</b>   | $y = 16,96 x + 21,5$  | 0,98                       | 1,7mg / ml               |
| <b>PS, Otto, diciembre</b>   | $y = 21,29 x + 14,93$ | 0,99                       | 1,6 mg / ml              |
| <b>PA, Otto, marzo</b>       | $y = 22,12 x + 15,57$ | 0,98                       | 1,5 mg / ml              |
| <b>PS, Otto, marzo</b>       | $y = 20,49 x + 8,34$  | 0,99                       | 2,0 mg / ml              |
| <b>PA, Piltri, diciembre</b> | $y = 26,13 x + 5,7$   | 0,99                       | 1,7 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri, diciembre</b> | $y = 18,03 x + 15,84$ | 0,99                       | 1,9 mg / ml              |
| <b>PA, Piltri, marzo</b>     | $y = 17,94 x + 26,86$ | 0,98                       | 1,3 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri, marzo</b>     | $y = 18,23 x + 15,84$ | 0,99                       | 1,9 mg / ml              |
| <b>Cocimientos</b>           |                       |                            |                          |
| <b>PS, Otto diciembre</b>    | $y = 15,66 x + 6,36$  | 0,98                       | 2,7 mg / ml              |
| <b>PS, Otto marzo</b>        | $y = 17,13 x + 6,72$  | 0,99                       | 2,5 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri diciembre</b>  | $y = 17,67 x + 12,63$ | 0,91                       | 2,1 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri marzo</b>      | $y = 14,63 x + 12,5$  | 0,99                       | 2,5 mg / ml              |
| <b>Tinturas</b>              |                       |                            |                          |
| <b>PS, Otto diciembre</b>    | $y = 17,19 x + 31,05$ | 0,98                       | 1,1 mg / ml              |
| <b>PS, Otto marzo</b>        | $y = 18,12 x + 19,47$ | 0,95                       | 1,7 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri diciembre</b>  | $y = 19,84 x + 20,04$ | 0,84                       | 1,5 mg / ml              |
| <b>PS, Piltri marzo</b>      | $y = 19,35 x + 21,23$ | 0,99                       | 1,5 mg / ml              |

Ecuación de la recta, valor R<sup>2</sup> y CI<sub>50</sub>% de *V. carnososa* sobre el radical ABTS.

Piltri = cerro Pitriquitron

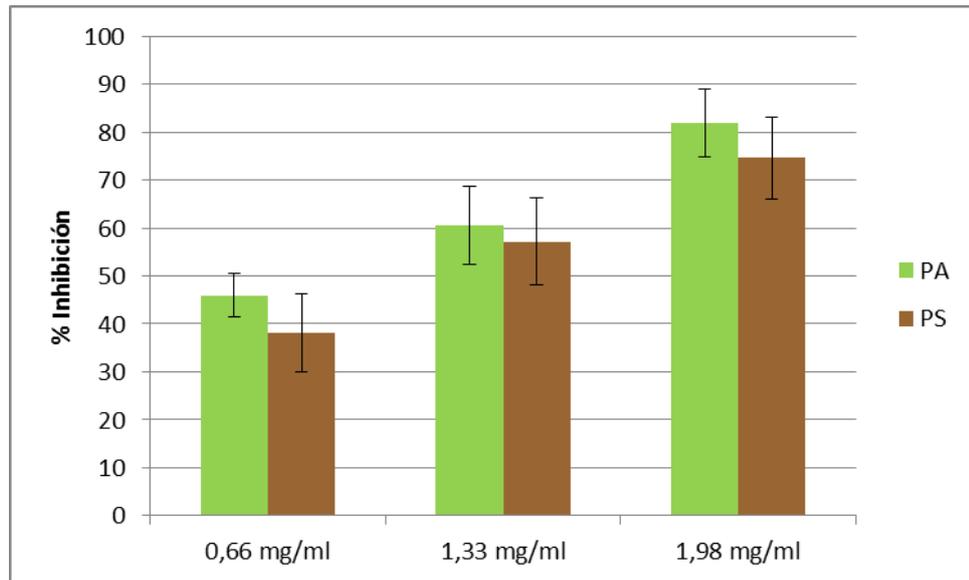
En los ejemplares de la población del cerro Piltriquitron los porcentajes de inhibición resultaron mayores en las partes aéreas por sobre las subterráneas, en los dos estadios fenológicos cuantificados, floración y posfructificación, pero las diferencias no fueron significativas (Figura 70 y 71). Por otro lado, las  $CI_{50\%}$  de las partes aéreas fueron de 1,7 mg / ml y de 1,3 mg / ml para la floración y para el final de la estación de crecimiento respectivamente. En los órganos subterráneos no hubo diferencias entre estadios fenológicos, la  $CI_{50\%}$  de ambas estaciones arrojaron valores de 1,9 mg / ml (Tabla 7).

**Figura 70-** Porcentaje de inhibición de los extracto metanólicos de *V. carnosus*



La población es la del cerro Piltriquitron, en el estado fenológico de floración.

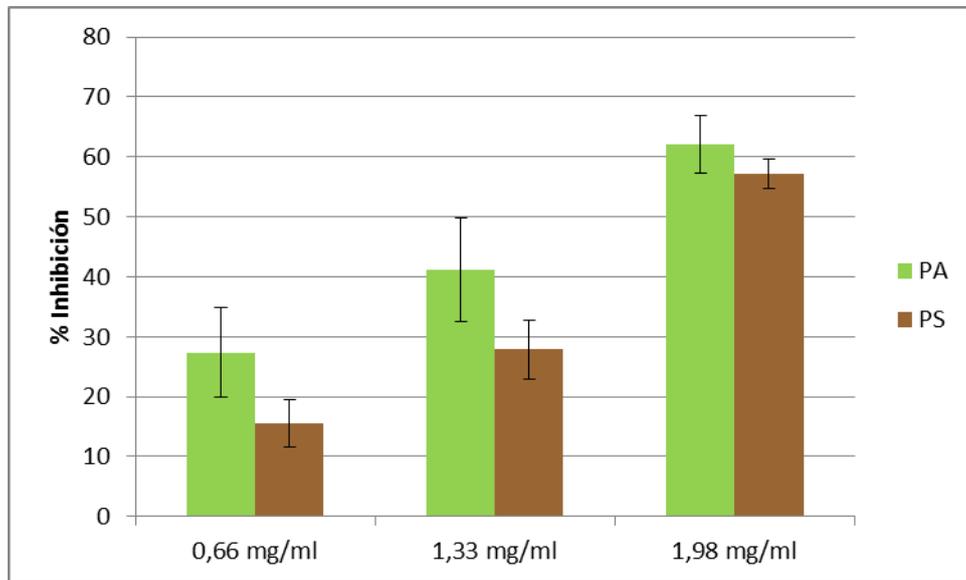
**Figura 71-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. carnosa*



La población en estudio corresponde a la del cerro Piltriquitron, el estado fenológico es de posfructificación.

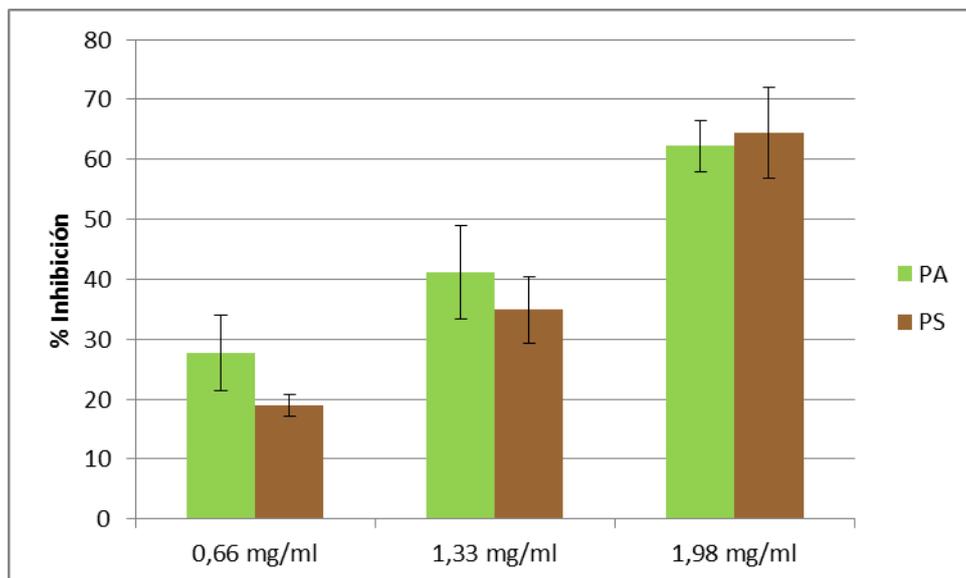
En los ejemplares de *V. clarionifolia* de la población del aeropuerto los porcentajes de inhibición, calculados por el método de decoloración del radical ABTS, fueron mayores en las partes aéreas en los dos estadios cuantificados, floración y posfructificación (Figura 72 y 73). Los valores de  $CI_{50\%}$  fueron, para las partes aéreas de los ejemplares de la población del aeropuerto, de 2,3 mg / ml en los dos estadios fenológicos estudiados, mientras que en los órganos subterráneos los valores fueron de 2,7 mg / ml en la floración y de 2,4 mg / ml en la posfructificación (Tabla 8).

**Figura 72-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. clarionifolia*



Corresponde a la población del aeropuerto, en el estado fenológico de floración.

**Figura 73-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. clarionifolia*



La población es estudio es la del aeropuerto, en el estado fenológico de la posfructificación.

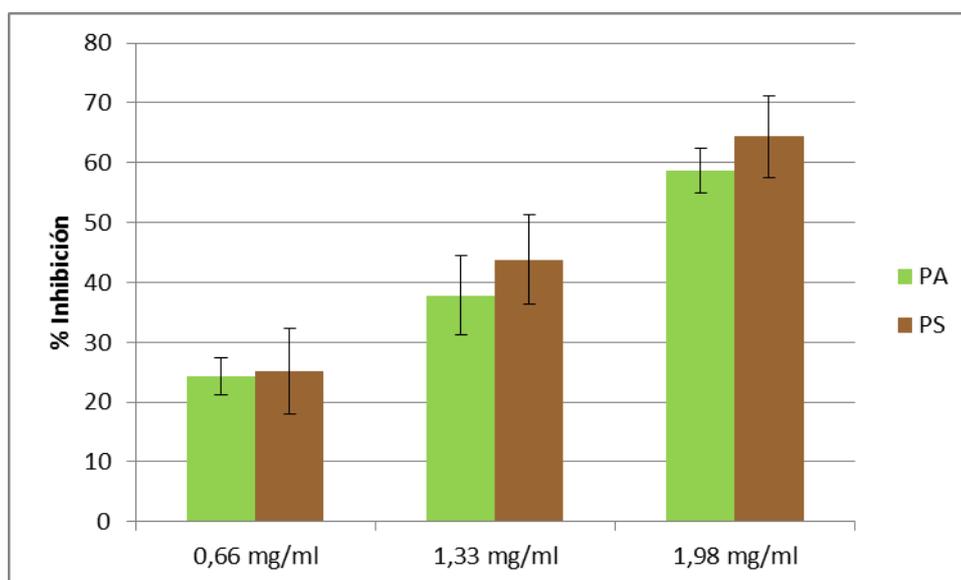
**Tabla 8-** Decoloración del radical catión ABTS

| <b>Extracto metanólico</b>         | <b>Fórmula lineal</b> | <b>Valor R<sup>2</sup></b> | <b>CI<sub>50</sub> %</b> |
|------------------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>PA, Aeropuerto, diciembre</b>   | $y = 17,36 x + 8,77$  | 0,98                       | 2,3 mg / ml              |
| <b>PS, Aeropuerto, diciembre</b>   | $y = 20,80 x - 8,07$  | 0,94                       | 2,7 mg / ml              |
| <b>PA, Aeropuerto, marzo</b>       | $y = 17,25 x + 9,18$  | 0,98                       | 2,3 mg / ml              |
| <b>PS, Aeropuerto, marzo</b>       | $y = 22,74 x + 6,03$  | 0,97                       | 2,4 mg / ml              |
| <b>PA, E° San Ramón, diciembre</b> | $y = 17,19 x + 5,84$  | 0,98                       | 2,6 mg / ml              |
| <b>PS, E° San Ramón, diciembre</b> | $y = 19,65 x + 5,09$  | 0,99                       | 2,3 mg / ml              |
| <b>PA, E° San Ramón, marzo</b>     | $y = 16,95 x + 14,07$ | 0,99                       | 2,1 mg / ml              |
| <b>PS, E° San Ramón, marzo</b>     | $y = 19,66 x + 5,23$  | 0,99                       | 2,3 mg / ml              |
| <b>Cocimientos</b>                 |                       |                            |                          |
| <b>PS, Aeropuerto diciembre</b>    | $y = 10,64 x + 7,40$  | 0,99                       | 4,0 mg / ml              |
| <b>PS, Aeropuerto marzo</b>        | $y = 11,37 x - 0,11$  | 0,9                        | 4,0 mg / ml              |
| <b>PS, E° San Ramón diciembre</b>  | $y = 12,83 x + 6,72$  | 0,99                       | 3,4 mg / ml              |
| <b>PS, E° San Ramón marzo</b>      | $y = 12,11 x + 5,00$  | 0,9                        | 3,7 mg / ml              |
| <b>Tinturas</b>                    |                       |                            |                          |
| <b>PS, Aeropuerto diciembre</b>    | $y = 11,84 x + 8,47$  | 0,99                       | 3,4 mg / ml              |
| <b>PS, Aeropuerto marzo</b>        | $y = 11,35 x + 14,63$ | 0,98                       | 3,3 mg / ml              |
| <b>PS, E° San Ramón diciembre</b>  | $y = 12,87 x + 15,33$ | 0,99                       | 2,7 mg / ml              |
| <b>PS, E° San Ramón marzo</b>      | $y = 18,9 x + 5,0$    | 0,98                       | 2,3 mg / ml              |

Ecuación de la recta, valor R<sup>2</sup> y CI<sub>50</sub>% de *V. clarionifolia* sobre el radical ABTS.

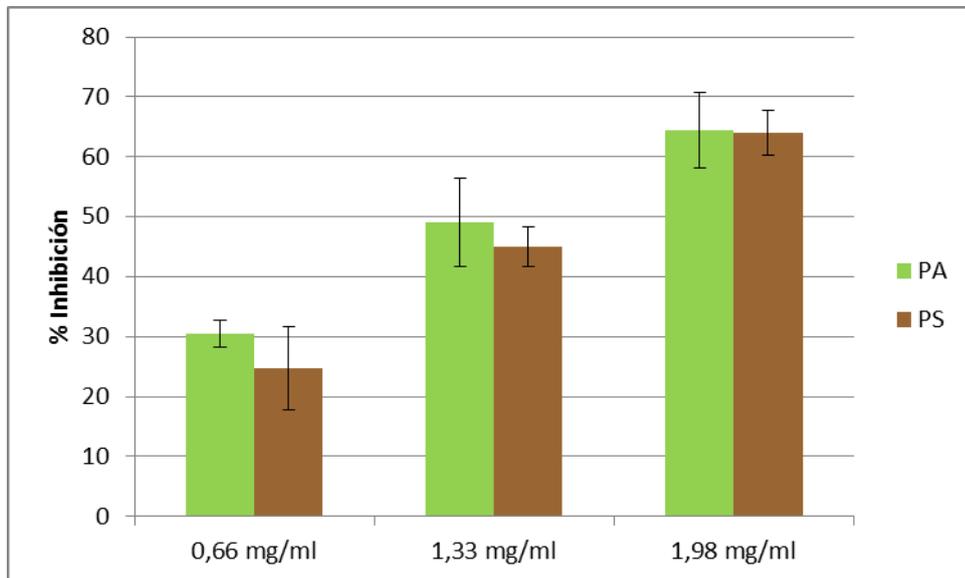
En los ejemplares de *V. clarionifolia* de la estancia San Ramón los porcentajes de inhibición en las partes subterráneas fueron mayores en el estado fenológico de floración (Figura 74). Las  $CI_{50\%}$  fueron de 2,3 mg / ml en las partes subterráneas y de 2,7 mg / ml en las partes aéreas (Tabla 8). En el estado fenológico de posfructificación los valores de porcentaje de inhibición fueron mayores en las partes aéreas (Figura 75). Los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 2,1 mg / ml en las partes aéreas y de 2,3 mg / ml en las partes subterráneas (Tabla 8).

**Figura 74-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. clarionifolia*



La población es de la estancia San Ramón en el estado fenológico de floración.

**Figura 75-** Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *V. clarionifolia*



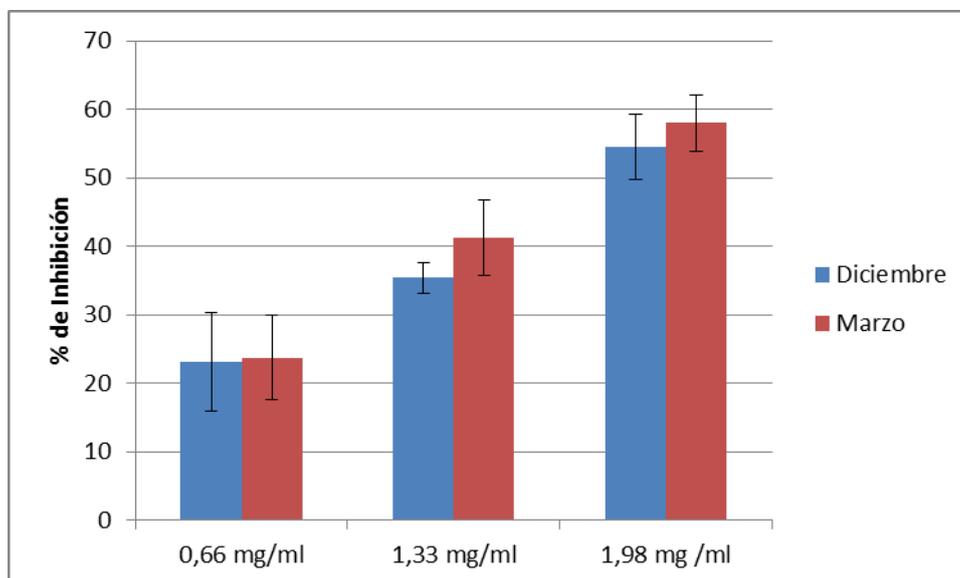
Corresponde a la población de la estancia San Ramón, en el estado fenológico de posfructificación.

#### ***Porcentajes de inhibición del catión ABTS en los cocimientos***

El cálculo de los porcentajes de inhibición de los cocimientos se realizaron en los órganos subterráneos, por ser estos los empleados en la medicina tradicional y popular.

En los ejemplares de *V. carnosa* de la población del cerro Otto, los porcentajes de inhibición fueron superiores en el estado fenológico de posfructificación, los valores en el mes de diciembre (floración) fue de 23 %, 35 % y 54 % y la  $CI_{50\%}$  de 2,7 mg / ml. En el mes de marzo (posfructificación), los valores de los porcentaje de inhibición fueron de 23 %, 41 % y 58 % y la  $CI_{50\%}$  fue de 2,5 mg / ml (Figura 76) (Tabla 7).

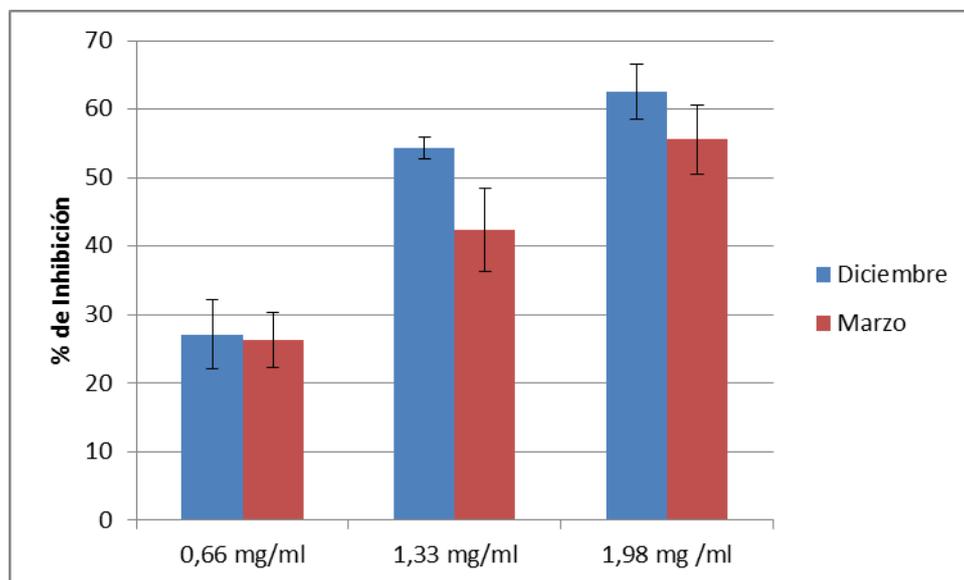
**Figura 76-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. carnosa*



Corresponde a la población del cerro Otto, para los estados fenológicos de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

En los ejemplares de *V. carnosa* de la población del cerro Piltriquitron, los porcentajes de inhibición resultaron mayores en el estado fenológico de la floración (diciembre) con valores de 27 %, 54 % y 62 % de menor a mayor concentración respectivamente; en la posfructificación (marzo) los valores fueron de 26 %, 42 % y 55 % respectivamente (Figura 77). Los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 2,1 mg / ml en la floración y de 2,5 mg / ml en la posfructificación (Tabla 7).

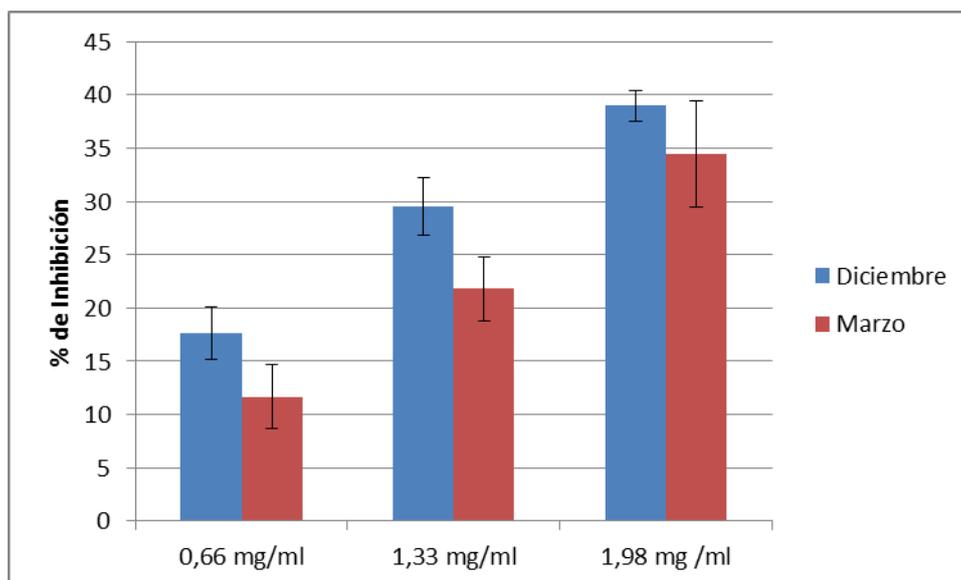
**Figura 77-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. carnosa*



La población en estudio corresponde a la del cerro Piltriquitron, para los estados fenológicos de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

En *V. clarionifolia* los valores del porcentaje de inhibición de los ejemplares de la población del aeropuerto en floración fueron de 17 %, 29 % y 38 % para la menor y la mayor concentración del extracto, mientras que en la posfructificación los valores fueron de 11 %, 21 % y 34 % (Figura 78). Los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 4 mg / ml para los dos estadios fenológicos (Tabla 8).

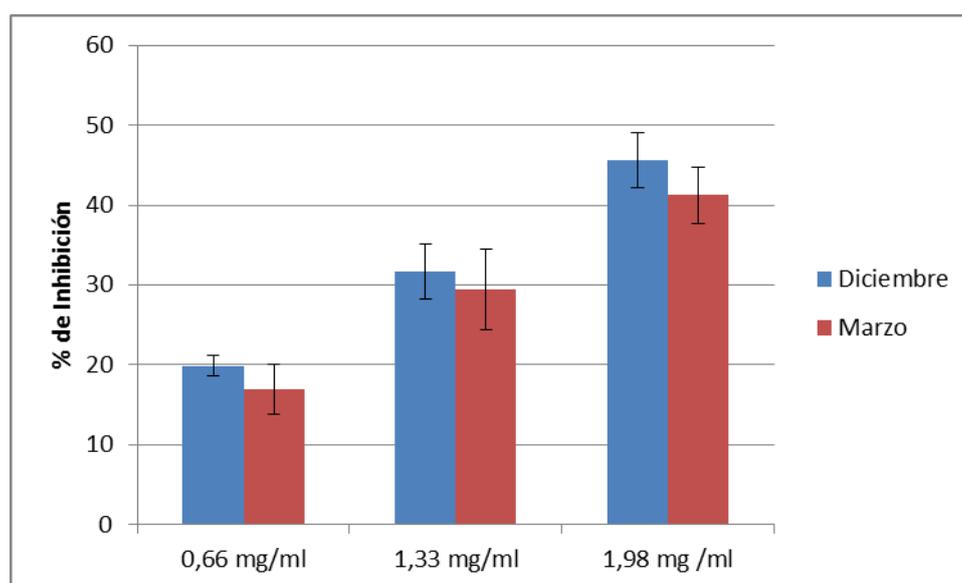
**FIGURA 78-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. clarionifolia*



La población en estudio corresponde a la del aeropuerto para los estados fenológicos de la floración (diciembre) y de la posfructificación (marzo).

En los ejemplares de la estancia San Ramón los valores del porcentaje de inhibición en la floración fueron de 19 %, 31 % y 45 % para la menor y la mayor concentración respectivamente. Mientras que en el estado fenológico de la posfructificación los valores fueron de 16 %, 39 % y de 42 % (Figura 79). Los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 3,4 mg / ml en la floración y de 3,7 mg / ml en la posfructificación (Tabla 8).

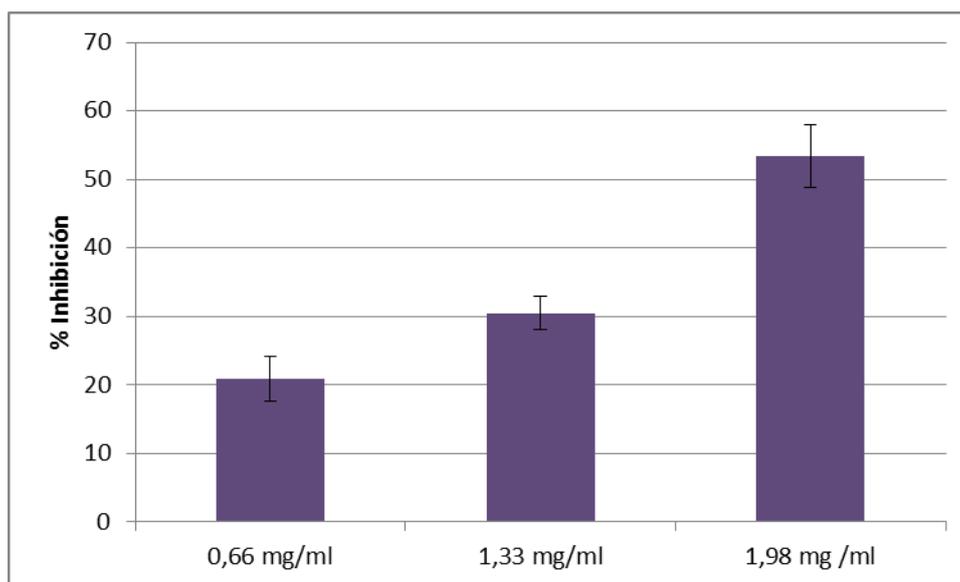
**FIGURA 79-** Porcentaje de inhibición de los cocimientos de las partes subterráneas de *V. clarionifolia*



La población de la estancia San Ramón para los estados fenológicos de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

En *V. officinalis* los valores del porcentaje de inhibición fueron de 20 %, 30 % y 54 %, para las menores y mayores concentraciones respectivamente (Figura 80). Asimismo, la  $CI_{50\%}$  fue de 2,9 mg / ml.

**Figura 80-** Porcentaje de inhibición de cocimientos de las partes subterráneas de *V. officinalis*

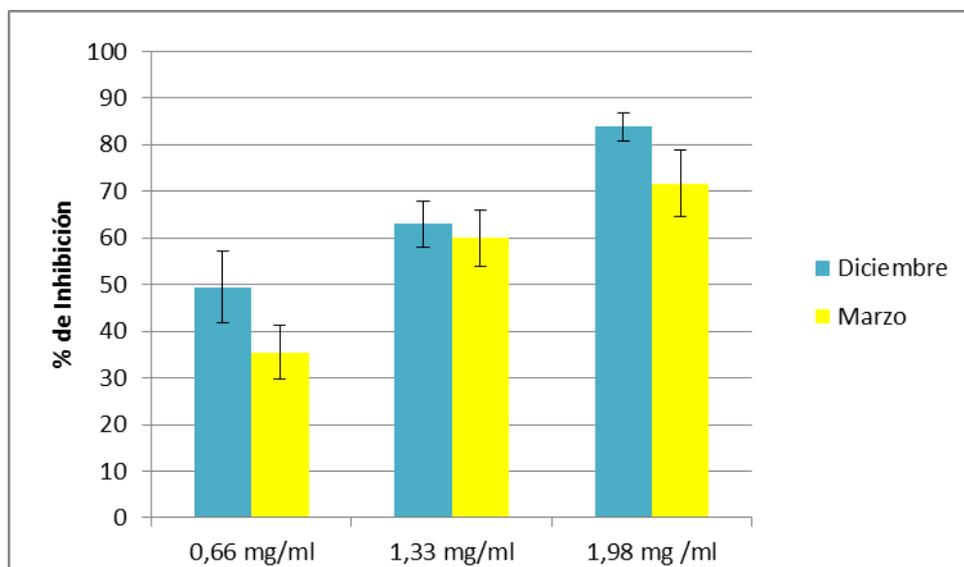


Los ejemplares provienen de cultivos en la provincia de San Juan.

### **Porcentajes de inhibición del catión ABTS en tinturas**

Los porcentajes de inhibición, de las tinturas realizadas con los ejemplares de *V. carnosus* del cerro Otto, presentaron valores de 49 %, 63 % y 83 % para el estado fenológico de la floración. En el estado fenológico de la posfructificación los porcentajes de inhibición fueron de 36 %, 60 % y 71 % para las menores y mayores concentraciones respectivamente (Figura 81). Los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 1,1 mg / ml para diciembre (floración) y de 1,7 mg / ml para marzo (posfructificación).

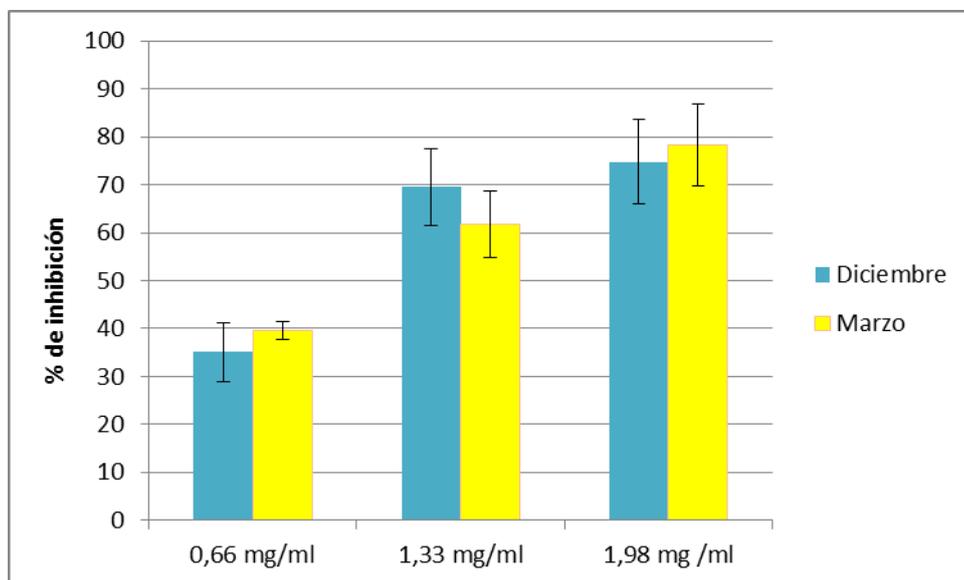
**Figura 81-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las partes subterráneas de *V. carnosa*



Población del cerro Otto, para los estados fenológicos de floración (diciembre) y de pos-fructificación (marzo).

Las tinturas de *V. carnosa* del cerro Piltriquitron presentan porcentajes de inhibición de 36 %, 70 % y 75 % en la floración y valores de 40 % 60 % y 79 % en la posfructificación (Figura 82). Los valores de  $CI_{50\%}$  fueron de 1,5 mg / ml para los dos estados fenológicos.

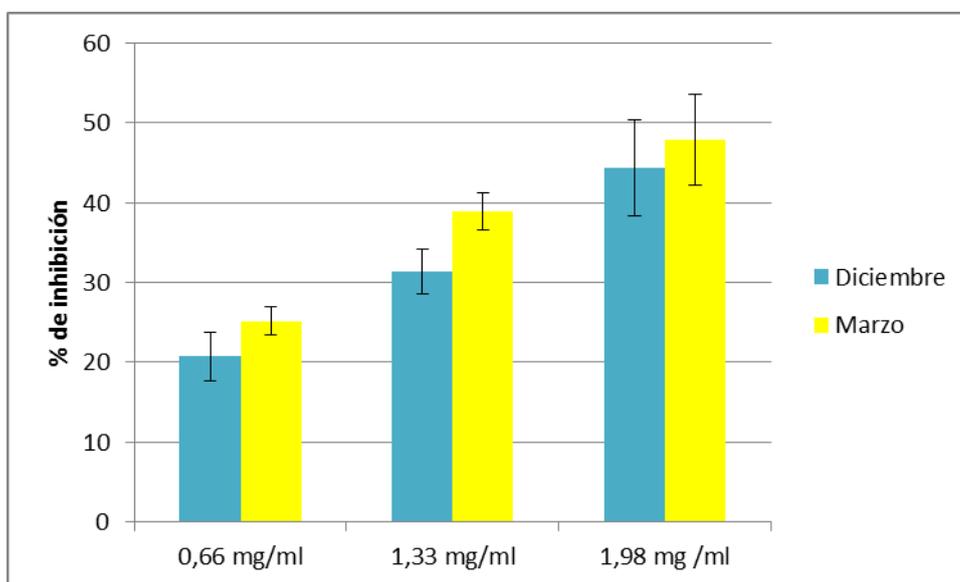
**Figura 82-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las partes subterráneas de *V. carnosa*



Población del cerro Piltriquitron, para los estados fenológicos de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

En las tinturas hechas con los órganos subterráneos de *V. clarionifolia* de la población del aeropuerto los porcentajes de inhibición fueron de 20 %, 31 % y 45 % para el estado fenológico de la floración y de 25 %, 38 % y 48 % para el estado fenológico de la posfructificación (Figura 83). La  $CI_{50\%}$  fue de 3,4mg / ml y 3,3 mg / ml.

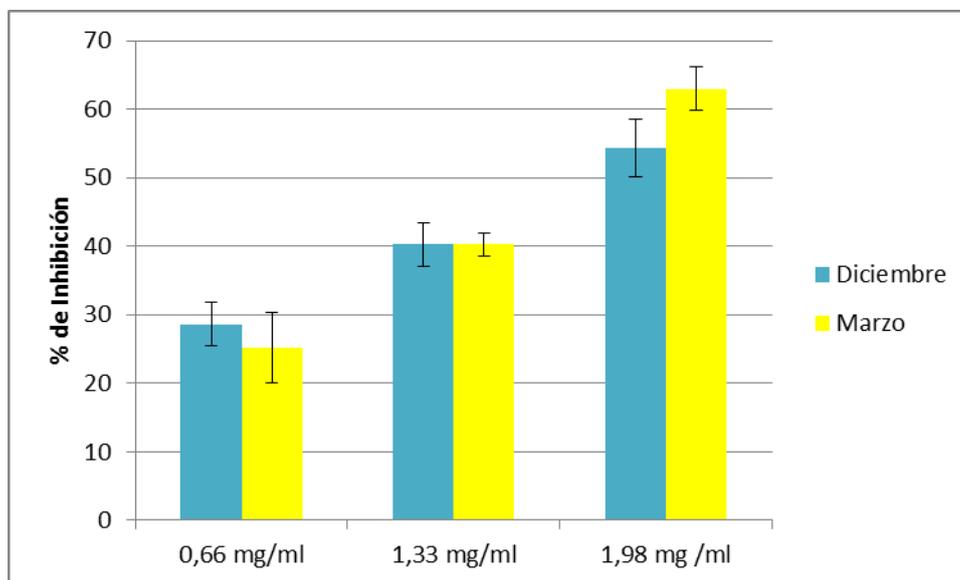
**Figura 83-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las partes subterráneas de *V. clarionifolia*



Población del aeropuerto para los estados fenológicos de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

En los ejemplares de la población de la estancia San Ramón los valores de porcentaje de inhibición fueron de 29 %, 40 % y 54 % en el mes de diciembre (floración) mientras que en el mes de marzo (posfructificación) los valores de porcentaje inhibición fueron de 26 %, 40 % y 62 % (Figura 84). Los valores de  $Cl_{50\%}$  fueron de 2,7 mg / ml y de 2,3 mg / ml para la floración y la posfructificación respectivamente.

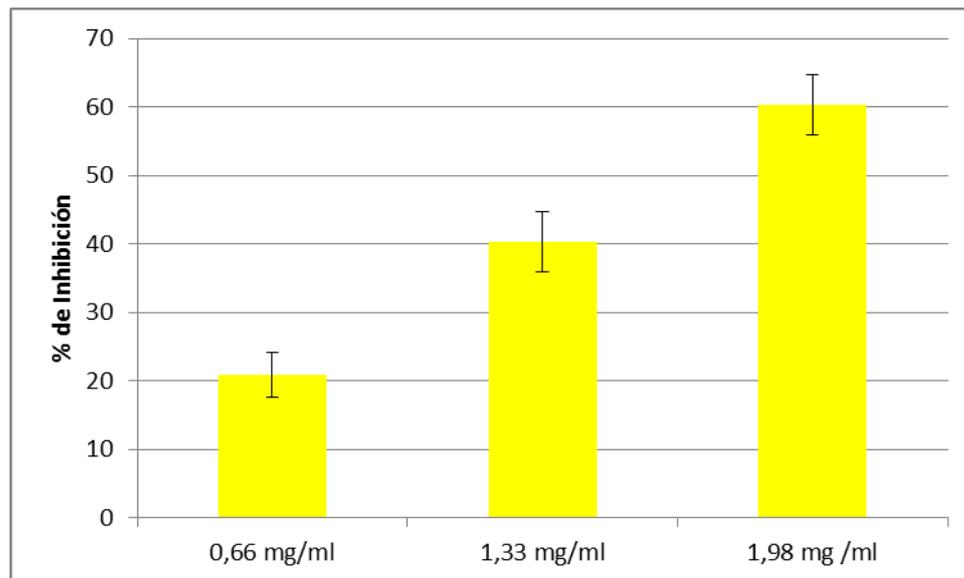
**Figura 84-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las parte subterráneas de *V. clarionifolia*



Población de la estancia San Ramón para los estados fenológicos de floración (diciembre) y de posfructificación (marzo).

En los rizomas y las raíces de *V. officinalis*, cultivados en la provincia de San Juan, los porcentajes de inhibición fueron de 21 %, 40 % y 60 % para las menores a mayores concentraciones respectivamente (Figura 85). La  $CI_{50\%}$  fue de 2,5 mg / ml (ecuación de la recta  $y = 1,706 x + 1,1063$ ;  $R^2 = 0,99$ ).

**Figura 85-** Porcentaje de inhibición de las tinturas de las partes subterráneas de *V. officinalis*



Los ejemplares provienen de cultivares de la provincia de San Juan.

## DISCUSIÓN

Cuando se evalúa la actividad antioxidante *in vitro* es importante el cálculo de la  $CI_{50\%}$ , para poder comparar entre distintas sustancias y/o extractos. Al analizar los porcentajes de inhibición, registrados por el método de DPPH con sus respectivas  $CI_{50\%}$ , se observa que en los extractos metanólicos siempre las  $CI_{50\%}$  fueron menores en las partes aéreas, tanto en *V. carnososa* como en *V. clarionifolia*. Existió una excepción en una población de *V. carnososa* (cerro Piltriquitron) que se encontraba en el estadio de floración, en donde esta tendencia se invirtió. Esta mayor actividad antioxidante de las partes aéreas se

puede explicar debido al alto contenido de fenoles totales en los órganos aéreos, ya que los polifenoles tienen la estructura adecuada para neutralizar al electrón desapareado de la sustancia oxidante. Al evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos, por la metodología de decoloración del radical ABTS, se observa la misma tendencia que por la metodología DPPH, en donde las  $CI_{50\%}$  fueron menores en los órganos aéreos.

Como los órganos subterráneos de *V. carnososa* y *V. clarionifolia* son utilizados en la medicina tradicional, se evaluó la actividad antioxidante de dos formas farmacéuticas utilizadas por las comunidades. Las preparaciones farmacéuticas fueron el cocimiento, que utilizan agua como solvente de extracción, y la tintura, que utiliza etanol 50° a 70 ° como solvente. Al analizar los valores de  $CI_{50\%}$  de los cocimientos por el método de DPPH se observa que en *V. clarionifolia* los valores de  $CI_{50\%}$  son menores en el estado fenológico de la floración (diciembre) que en el estado de finales de la estación de crecimiento (marzo). Mientras que en *V. carnososa* no se mantiene esta tendencia, y las diferencias son mínimas, del orden de 0,1 - 0,2 unidades. Al analizar por el método de ABTS, se observa que los valores de  $CI_{50\%}$  son mayores en ambas especies al comparar con el método DPPH igualmente, según la bibliografía (Badarinath et al. 2010), es difícil comparar los distintos métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*, por lo tanto, no se hará énfasis en comparar los métodos aquí evaluados. Al analizar los valores de  $CI_{50\%}$  de los cocimientos de *V. clarionifolia* y *V. carnososa*, se observa que los valores más bajos son los cuantificados en el estadio fenológico de la floración, por lo tanto sería recomendable cosechar en diciembre antes que en marzo.

Estos valores más bajos de  $CI_{50\%}$  en el estado fenológico de la floración coinciden con los valores más alto en la concentración de los fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoides totales, cuantificados en el estadio de la floración (diciembre).

Al analizar los valores de  $CI_{50\%}$  de las tinturas se observa que se invierte la situación que se da en los cocimientos en ambas especies de “ñancolahuen” y, además, en las dos poblaciones estudiadas de ambas especies se observa que los porcentajes de inhibición son mayores en el estado fenológico de la posfructificación (marzo) y, por lo tanto, los valores de  $CI_{50\%}$  son menores, en este estadio.

De acuerdo con los resultados descritos surge una incongruencia, porque estos menores valores de  $CI_{50\%}$  de las tinturas de los materiales cosechados en la posfloración no se pueden relacionar con los valores de los polifenoles cuantificados ya que, en todos los casos, las cuantificaciones de los polifenoles son mayores en floración.

Al analizar los valores de  $CI_{50\%}$  por el método de ABTS se observa que los mismos son menores en *V. clarionifolia* en el estadio de la posfructificación. En cambio, en *V. carnososa* para la población del cerro Otto los valores de  $CI_{50\%}$  son menores en la floración (1,1 mg / ml) y en la posfructificación es de (1,7 mg / ml). Cuando se observan los valores obtenidos en la población del cerro Piltriquitron, en ambos estadios fenológicos, el valor de  $CI_{50\%}$  fue de 1,5 mg / ml.

Asimismo, al comparar los valores de  $CI_{50\%}$  de los “ñancohuen” con *V. officinalis* se observa que los cocimientos de *V. officinalis* tienen mayor actividad antioxidante que los de *V. carnososa* y *V. clarionifolia*. Pero esta situación mejora para las especies nativas al analizar la capacidad antioxidante en la forma farmacéutica de tinturas. En la población de *V. carnososa* del cerro Otto la  $CI_{50\%}$  es levemente menor (0,94 mg / ml) al valor obtenido en *V. officinalis* (1,0 mg / ml), asimismo, en la población de El Bolsón (cerro Piltriquitron) las  $CI_{50\%}$  son iguales, ambas con 1,0 mg / ml. La misma situación se repite en *V. clarionifolia*. Si comparamos con otras especies del género, por ejemplo, *V. jatamansi* (Bhatt *et al.*, 2012) le reportan valores de  $CI_{50\%}$  de 3,28 mg / ml en los extractos metanólicos por el método DPPH.

Estos resultados justifican el nombre de “*valere*” = estar saludable, sano atribuido a la *V. officinalis* y por analogía a sus parientas de la Patagonia Argentina.

Debido a que los procesos de estrés oxidativos están asociados a las enfermedades que afectan al sistema nervioso central, causando daño celular irreversible, y se generan enfermedades como el mal de Alzheimer, el Parkinson o enfermedades crónicas como insomnio (Sudati *et al.*, 2009), con lo cual la actividad antioxidante reportada en los órganos subterráneos estaría validando las acciones a nivel central de las “valerianas”. Asimismo, como los procesos inflamatorios pueden ser iniciados por el estrés oxidativo y este proceso ser prevenido por sustancias capaces de neutralizar a los radicales libres (Meli y Raso, 2013), por lo tanto, se justifica el uso como antirreumático

que se le atribuye al “ñancohuen” en la región patagónica. Con esta base sería deseable que estas pruebas sean realizadas en cultivos celulares o *in vivo* para poder tener una confirmación y de esta manera validar los usos etnofarmacológicos.

### **Conclusión**

La actividad antioxidante fue mayor en los extractos realizados con las partes aéreas. Los valores más bajos de  $CI_{50\%}$  para *V. carnososa* y *V. clarionifolia* se registraron en el estadio de la floración.

La forma farmacéutica que posee mayor porcentaje de inhibición de radicales libres es la tintura, por lo tanto, sería la forma farmacéutica recomendada para su empleo en medicina tradicional.

## CONCLUSIÓN FINAL

Se describen por primera vez la anatomía de *V. carnososa* y *V. clarionifolia*, aportando caracteres diagnósticos en el polvo, disociado y en los transcortes que permiten su autenticación. Asimismo se establece la ausencia del rizoma en *V. clarionifolia* cuyo órgano de reserva es la raíz engrosada.

En lo concerniente a la fitoquímica, se realizaron cuantificaciones de polifenoles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides para establecer el momento apropiado de la cosecha, recomendándose el mes de diciembre, el cual coincide con la floración en las dos especies estudiadas, como el mes apropiado debido a que fue la época en la que se encuentran las mayores concentraciones de estos grupos fitoquímicos. Por otro lado, en cuanto a las esencias se confirma la presencia de ácido iso-valerénico, compuesto que le otorga el olor característico a las “valerianas” y el acetato de bornilo que tiene reconocida actividad sedante. También se informa la presencia de posibles quimiotipos, los cuales requieren mayor estudio para su confirmación.

Cuando se analiza la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y de las dos formas farmacéuticas (cocimientos e infusiones) los ejemplares colectados en la época de floración (diciembre) presentan menores valores de la  $CI_{50\%}$ , por lo tanto más activos. La actividad antioxidante que poseen *V. carnososa* y *V. clarionifolia* estarían validando los usos atribuidos al “ñancolahuen” como planta sedante y paliativa de procesos inflamatorios.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams R.P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4<sup>th</sup> Ed., Allured: Carol Stream, IL.
- Alonso J.R. 1998. Tratado de fitomedicina. Edit. ISIS, Buenos Aires. 948-956 pp.
- APG III 2009. Bremer B., Bremer K., Chase M. W., Fay M. F., Reveal J. L., Soltis D. E., Soltis P. S. y Stevens P. F. (Compiladores). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: Botanical Journal of the Linnean Society. 161 (2): 105: 121
- Baby E. E., Cabezas, M., Kutschker., A., Messina V. y Walsöe de Reza N. E. 2005. Discrimination of different valerian types with an electronic nose. J. Argent. Chem. Soc. 93 (1-3) 43-50.
- Badarinath A. V., Rao K. M., Chetty C. M. S., Ramkanth S., Rajan T. V. S. y Gnanaprakash K. 2010. A Review on in vitro Antioxidant Methods: Comparasions, Correlations and Considerations. Int. J. pharm. Tech. Res. 2:2 1276-1285.
- Barbosa G.E., Cantero J. J., Núñez C., Pacciaroni, A. y Ariza Espinar L. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34 (1-2): 7-365.
- Bardekci H., Demirci B., Yesilada E., Kirmizibekmez H. y Can baser K. H. 2012. Chemical composition of the Essential Oil of the subterranean parts of *Valeriana allariifolia*. Rec. Nat. Prod. 6: 1 89-92.

- Bhatt I. D., Dauthal P., Rawat S., Gaira K. S., Jugran A., Rawal R. S. y Dhar U. 2012. Characterization of essential oil composition, phenolic content, and antioxidant properties in wild and planted individuals of *Valeriana jatamansi* Jones. *Scientia Horticulturae* 136 61-68.
- Blois M.S.1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1150.
- Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G. y Monks T. J. 2000. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 135-160.
- Borsini O. E.1944. Valerianaceae. En H. Descole (Dir.), Gen. Sp. Pl. Argent. Vol II 275-372. San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Borsini O.E. 1999. Valerianaceae. En: M.N. Correa (dir.), Flora Patagónica. Colección Científica INTA 8 (6): 448-471.
- Bruneton J. 2001. *Farmacognosia. Fitoquímica de plantas medicinales*. Ed. Acribia 2° ed.pp 588.
- Cabrera A. L. 1976. Regiones Fitogeograficas Argentinas. Fasciculo 1, Tomo II. Ed. Acme. Bs. As. Arg. 85 pp.
- Campos A. M. y Lissi E. 1997. Kinetics of reaction between 2,2' azinobis (3-ethylbenzono thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)). Derived Radical Cations and Phenols. *Int. J. Chem. Kinet.* 29: 219-224.
- Cavill G. W. K, Houghton E., Mc Donald F. J. y Williams P. J. 1976. *Insect Biochem.* 6, 483-490.
- Chatin J. 1872. *Études Botaniques, chimiques et Médicales sur les Valérianées*. Paris.

- Conticello L., Gandullo, R. Bustamante, A. y Tartaglia, C. 1997. El uso de plantas medicinales por la comunidad mapuche de San Martín de los Andes, Pcia. de Neuquén (Argentina). *Parodiana* 10 (1-2): 165-180.
- Cuassolo F., Ladio A.H. & Ezcurra C. 2009. Aspectos de la comercialización y control de calidad de las plantas medicinales más vendidas en una comunidad urbana del NO de la Patagonia Argentina. *Bol Latinoam Caribe Plan Med Aromát*, 9 (3), 166-176.
- Cui L., Zhen-Yu Wang y Xiu-Hua Zheuc. 2010. Volatile Constituents in the Roots and Rhizomes Oils of *Valeriana amurensis*. *J. of Essential oil Bearing plants*. 13: 1 130-134.
- Domínguez J. A. 1928. Contribuciones a la Materia Médica Argentina. Primera contribución. Buenos Aires, Argentina. pp.433
- Dao L. and Friedman M. 1992. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem*. 40: 2152-2160.
- D'Ambrogio de Argüeso A. 1986. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 1-83.
- Di Giusto, M. y Mandrile E. 1976. Presencia de Valepotriatos en Valerianas Argentinas. *Rev. Farmacéutica Argentina* 118: 7-9.
- Dryden G.W., Deaciuc, I, Arteel, G y Mc Clain C.L., 2005. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Curr. Gastroenterol. Rep*. 7: 308-316.
- Dugaheh M.A., Meisami F., Torabiani Z. y Sharififar F. 2013. Antioxidant effect and study of components of *Valeriana sisymbriifolia* and *Nardostachys*

- jatamansii* in comparison to *Valeriana officinalis*. Pak. J. Pharm. Sci. 26 : 1 53-58.
- Estomba D. y Ladio A.H. 2009. Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia. J. Ethnopharmacology 103 (1) 109-119.
- Eriksen B. 1989. Notes on generic and infrageneric delimitation in the Valerianaceae. Nordic journal of Botany 9: 179-187.
- FNA. *Farmacopea Nacional Argentina*. 1978. Codex medicamentarius Argentino. Sexta edición. Buenos Aires, Argentina: Codex S.A.
- FNA. *Farmacopea Nacional Argentina*. 2003. Vol. I Séptima edición. Buenos Aires, Argentina
- Fernández S., Wasowski C., Paladini A.C. y Marder M. 2004. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. Pharmacol. Biochem. Behav. 77 (2): 399-404.
- Font Quer P. 1962. Plantas medicinales. El Dioscórides Renovado. Ed. Labor. Barcelona España. Pp758-760.
- Houghton P.J. 1997. The chemistry of Valeriana, Valerian: thr Genus Valeriana. CRC Press, USA.
- Houghton P.J. 1999. The cientific basis for the reputed activity of Valerian. Journal of Pharmacy and Pharmacology 51 (5): 505-512.
- IRAM. *Instituto Argentino de Racionalización de Materiales*. 1993. Norma 37500.
- RAM. *Instituto Argentino de Racionalización de Materiales*. 1994. Norma 37507.

- IRAM. *Instituto Argentino de Racionalización de materiales*. 1985. Norma 18729
- Jackson B.P. y Snowdon D.W. 1990. *Atlas of microscopy of medicinal plants culinary herbs and spices*. London, UK: Belhaven Press
- Joshi V.C., Navarrete A. y Khan I. 2005. Authentication of *Valerian procera* Kunth and comparative account of five *Valeriana* species. *Journal of AOAC International*, 88 (6), 1621-1625.
- Kinnula V.L. y Crapo J. D. 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 718-744.
- Kutschker A. 2008. Morfología del fruto en especies de *Valeriana* (Valerianaceae) de los Andes australes. *Darwiniana* 46 (1): 17-35.
- Kutschker A. 2009. En: ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. J. BELGRANO (ed.), Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107 (2): 3091-3101.
- Kutschker A. 2009. *Valeriana* L. (Valerianaceae) en Sudamérica austral: taxonomía, aspectos biogeográficos y fitoquímicos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia S.J.B. Chubut, Argentina. 246 pp.
- Kutschker A. 2011. Revisión del género *Valeriana* (Valerianaceae) en Sudamérica austral. *Gayana Bot.* 68(2): 244-296.
- Larsen B.B. 1986. A taxonomic revision of *Phyllactis* and *valeriana* sect *Bracteata* (valerianaceae). *Nordic Journal of Botany* 6: 427-446.
- Lörcher H. y Weberling F. 1985. Axial anatomy of high Andean *Valeriana* species: *Valeriana micropterina* and *Valeriana thalictroides*. *Flora* 176: 197-212

- Makkar H.P.S., Bluemmel M., Borowy N.K. y Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61: 161-165.
- Maksimovic Z., Malecic D. y Covacevis N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Mayadis stigma* extracts. *Biores. Tech.* 96: 873-877.
- Marder M., Viola H., Wasowski C., Fernández S., Medina J. H. y Paladini A. C. 2003. 6-Methylapigenin and hesperidin: new Valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol. Biochem Beha.* 75: 537-545.
- Mathela C.S., Tiwari M., Sammal S.S. y Chanotiya C.S. 2005. Valeriana wallichii DC, a new Chemotype from Northwestern Himalaya. *J. Essent. Oil Res.* 17 672-675.
- Matsubara E., Fukagawa M., Okamoto T., Ohnuki K., Shimisu K. y Ryuichiro K. 2011. (-) Bornyl acetate induces autonomic relaxation and reduces arousal level after visual display terminal work without any influences of task performance in low-dose condition. *Biomedical Research* 32 (2) 151-158.
- Meli R. y Raso G. M. 2013. Natural antioxidant in the pharmacological treatment of rheumatic immune and inflammatory diseases. In Alcaras, M. J., Guallino A. y Sanchez-Pernaute O. editors. Pp. 251-273. Springer NY. USA.
- Méndez E. 2010. Una nueva especie de *Valeriana* (Valerianaceae) para la Argentina. *Dawiniana*, 48(1), 201-203.
- Metcalf C.R. y Chalk L. 1983. "Anatomy of the Dicotyledons" II. Clarendon Press, Oxford, pp. 52-62.

- Molares S. y Ladio A.H. 2010. Plantas aromáticas con órganos subterráneos de importancia cultural en la Patagonia Argentina: Una aproximación a sus usos desde la etnobotánica, la percepción sensorial y la anatomía. *Darwiniana* 50(1): 7-24.
- Morello J, Matteucci, S.D., Rodriguez A.F y M.E.Silva 2012. Ecorregiones y complejos ecosistemicos Argentinos. Editorial Orientación Gráfica Argentina.
- Ochoa J.J., Ladio A.H. y Lozada M. 2010. Uso de recursos herbolarios entre mapuches y criollos de la comunidad campesina de Arroyo Las Minas (Río Negro, Patagonia Argentina). *Bol. Latinoam. Caribe Plan. Med. Aromat.* 9 (4), 269-276.
- Petenatti, M. F., Petenatti F. M. y Del Vitto L. A. 2001. Estudios Farmacognósticos de dos especies Argentinas de Valeriana (Valerianaceae): *V. ferax* y *V. polybotrya*. *Acta Farm. Bonaerense* 20 (1) 17-24.
- Ratera E. y Ratera M. 1980. Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. Edit. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radic Biol. Med.* 26 (9-10): 1231-7
- Retta D. Gattuso S., Gattuso M., Di Leo Lira P., van Baren C. y Bandoni A. (2009). "Volatile constituents of five *Baccharis* species from the Northeastern Argentina". *J. Braz. Chem. Soc.* 20(7):1379-1384.

- Pilberg C. y Rossow R. 1992. Estudio anatómico del rizoma de *Valeriana boelckeii* Rossow y de *V. carnososa* Sm. IV Simposio Argentino de Farmacobotanica, FFyB-UBA. Buenos Aires, Argentina.
- Ruch R.J., Cheng S. J. y Klauning J. E. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen* 10: 1003-1008.
- Saggese, D. 1959. *Yerbas medicinales Argentinas*. 10 Ed. Rosario Argentina. Pp 126.
- Schneider A. 1921. "*The microanalysis of powdered Vegetable Drugs*". 2ª ed. Blakiston's Son & Co., Philadelphia, pp. 527-529.
- Singh U. y Jialal I. 2006. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 13: 124-142.
- Smith M. A., Rottkamp C. A., Nunomura A., Raina A. K. y Perry G. 2000. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1502: 139-144.
- Sudati J. H., Fachineto R., Pereira R. P., Boligon A. A., Atheyde M. L., Soares F. A., de Vargas Barbosa N. B. y Texeira Rocha J. B. 2009. In vitro Antioxidant Activity of *Valeriana officinalis* Against Different Neurotoxic Agents. *Neurochem Res.* 34: 1372-1379.
- Thusoo S., Gupta S., Sudan R., Kour., Bhagat S., Hussin R. y Bhagat M. 2014. Antioxidant Activity of Essential Oil and Extracts of *Valeriana jatamansi* Roots. *Biomed. Reserch International*. Article ID 614187 4pages.
- Wasowski C., Wolfma C., Viola H., Marder M., Paladini A. y Medina J. 1996. Ligandos para el receptor *benzodiazepínico central en valerianas*

- nativas de Argentina*. VII Simposio Latioamericano de Farmacobotánica. II Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. Uruguay.
- Wasowski C, Marder M, Viola H., Medina J. H. y Paladini A.C. 2002. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA<sub>A</sub> receptors, from *Valeriana wallichii* DC. *Planta Med.* 68: 934-936.
- Weberling F. 1970. Valerianaceae. In: Hegi, G. *Flora von Mitteleuropa*. Parey-Verlag, Berlin.
- WHO (World Health Organization). 1998. Quality control methods for medicinal plant material. Geneva. [on line] [Accesed: 04/2012] <http://who.int/medicindocs/pdf/h1791e.pdf>
- Wiley/NIST 2008. *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. 8<sup>th</sup> Ed. J. Wiley & Sons, Inc., New York/NIST/EPA/NIH (2005) *Mass Spectral Library*, vers. 2.0.
- Williamson, E. 1999. Valerian Root. En Roy Upton editors: *American Herbal Pharmacopoeia and therapeutic compendium*. Santa Cruz CA. USA. Pp25.
- Youngken H.W. 1958. "*Tratado de Farmacognosia*". Atlante, Mexico, pp. 1100-1105.

## RESUMEN

El género *Valeriana* (Valerianaceae) está constituido por aproximadamente 250 especies que se encuentran distribuidas en todas las regiones del mundo a excepción de Oceanía. En el sur de Sudamérica crecen 81 especies de las cuales 48 han sido registradas en el territorio argentino, principalmente a lo largo de la cordillera de los Andes, desde la provincia de Jujuy hasta Tierra del Fuego. En la región patagónica crecen 19 especies.

Desde antiguo es conocido el uso medicinal atribuido a *Valeriana officinalis* L., en la región patagónica también hay especies nativas de valeriana que se utilizan en medicina tradicional, las que se destacan son *V. carnososa* y *V. clarionifolia* (“ñancolahuen”) ya que además de tener registros de uso como remedios herbarios son comercializadas en las herboristerías y farmacias. Los usos populares más difundidos de las valerianas son: tratamiento sintomático de los estados neuróticos, especialmente en trastornos menores del sueño y dolores de la región gástrica. Asimismo, los “ñancolahuen” se comercializan como sustitutos de *V. officinalis* y para combatir el reumatismo.

Los objetivos de este proyecto de investigación son: a) describir la estructura anatómica de las raíces y los rizomas de *Valeriana carnososa* y *Valeriana clarionifolia*, para poder obtener caracteres diagnósticos que permitan identificar y diferenciar los órganos subterráneos de ambas especies que son utilizados por la medicina popular; b) estudiar la dinámica de los polifenoles de *V. carnososa* y *V. clarionifolia* en distintas poblaciones y en diferentes estados fenológicos, para conocer la variabilidad y determinar el momento propicio de la cosecha para su uso en la medicina tradicional y popular; c) analizar cuali-

cuantitativamente el aceite esencial de *V. carnososa* y de *V. clarionifolia* para conocer su composición y poder establecer la época adecuada de cosecha; d) evaluar la capacidad antioxidante in vitro de los extractos metanólicos y acuosos de *V. carnososa* y *V. clarionifolia*, para relacionar la actividad biológica evaluada con los usos tradicionales y populares registrados.

Para cumplir con los objetivos se realizaron viajes de recolección a la región patagónica, se adicionó material de herbario para los estudios anatómicos. Estos estudios se realizaron con las técnicas estándares de corte y coloración, se realizaron disgregados de órganos y se analizó la droga en polvo. El estudio fitoquímico de los polifenoles se realizó por la metodología propuesta por Folin-Ciocalte, los ácidos hidroxicinámicos se cuantificaron según Dao y Friedman y los flavonoides por la metodología de Maksimovic et al. Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación de las raíces de *V. clarionifolia* y de los rizomas y las raíces de *V. carnososa* se utilizó una trampa Clevenger. Posteriormente los aceites se analizaron por GC-FID-MS. En forma adicional se extrajo una muestra de *V. officinalis* para su comparación. Para el estudio de la actividad antioxidante in vitro se utilizaron los mismos extractos que para el estudio de polifenoles. Las técnicas empleadas fueron la del ensayo de neutralización del radical 1,1-difenil- 2 - picril-hidrazil (DPPH) y la técnica de decoloración del radical catión ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

Los estudios morfo-anatómicos revelaron que *V. clarionifolia* carece de rizoma. La estructura primaria de la raíz forma una protóstela ectofloica. Cuando se analiza la estructura secundaria de las raíces, considerada la droga vegetal

utilizada en la medicina tradicional, el haz vascular desarrolla una actinostela hexarca con amplios radios xilemáticos. *V. carnos*a se caracteriza por poseer rizoma, cuya anatomía posee estructura anómala. Ambas especies presentan escasos granos de almidón, que se pueden diferenciar por su forma.

El estudio de la dinámica de polifenoles muestra que en los órganos subterráneos las mayores concentraciones de polifenoles se cuantificaron en el estadio fenológico de la floración. Asimismo, se registró una gran variabilidad intrapoblacional. Los aceites esenciales mostraron una composición química muy compleja, lográndose la identificación del 71,3 al 73,4 % del total de los componentes de los aceites. *V. clarionifolia* y *V. carnos*a presentaron perfiles cualitativos semejantes pero a su vez muy diferentes al de *V. officinalis*. Los compuestos mayoritarios identificados fueron beta-sesquifelandreno (36,0 %), alfa-pineno (9,7 %), acetato de bornilo (4,4 %) y ácido isovaleriánico (1,8 %). El contenido de ácido isovaleriánico fue semejante al presente en *V. officinalis*. Asimismo se reporta por primera vez en el género la presencia de dolichodial y epidolichodial, precursores de las nepeta-lactonas.

La actividad antioxidante de los cocimientos es mayor en las dos especies, en el estadio de la floración. Mientras que esta situación se invierte en las tinturas.

Por lo tanto el presente estudio realizado sobre *V. carnos*a y *V. clarionifolia* aporta información novedosa sobre la anatomía y la química de los aceites esenciales, que sirve para caracterizar y utilizar dicha información en control de calidad de posibles medicamentos herbarios.