

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

CÀTEDRA DE FARMACOGNÒSIA I FARMACODINÀMIA

ESTUDI DEL CONTINGUT EN VALEPOTRIATS
DE DIFERENTS CULTIUS DE
Valeriana wallichii D.C.

Tesina presentada per
Roser Vila i Casanovas
i dirigida pel Dr. Josep
Iglesià i Anglès, per a
la col·lació del Grau de
Llicenciatura.

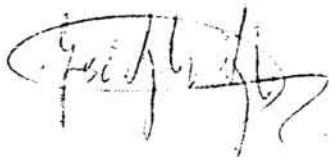
Barcelona, Febrer 1983

Roser Vila

EL DR. JOSEP IGLESIAS I ANGLÈS, PROFESSOR AGREGAT DE
FARMACOGNÒSIA I FARMACODINÀMIA DE LA FACULTAT DE FARMÀCIA DE
LA UNIVERSITAT DE BARCELONA,

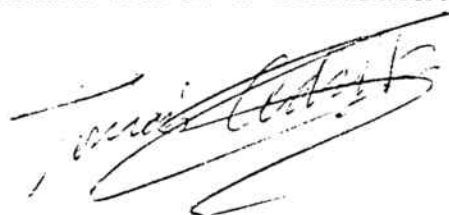
CERTIFICA: Que la Tesina de Llicenciatura titulada : "ESTU-
DI DE DIFERENTS CULTIUS DE Valeriana wallichii D.C." ,pre-
sentada per Roser Vila i Casanovas per a la col·lació del
Grau de Llicenciat en Farmàcia, ha estat realitzada al Labo-
ratori del Departament de Farmacognòsia i Farmacodinàmia
sota la seva direcció i autoritza la seva presentació per
a ésser jutjada pel Tribunal corresponent.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes
que corresponguin, signa aquesta certificació a Barcelona,
el 2 de Març del 1.983.



Prof. Dr. Josep Iglesias i Anglès

V.P., el Director del
Departament, Prof. Dr.
Tomàs Adzet i Porredon.



La realització d'aquest treball ha estat possible gràcies a l'esperit d'equip i a l'acolliment que, en tot moment, he trobat en el Departament de Farmacognòsia i Farmacodinàmia. De manera particular haig d'agrair:

-Al Dr. Josep Iglesias, Professor Agregat de Farmacognòsia i Farmacodinàmia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, que m'ha dirigit aquest treball, per les idees i els consells tan valuosos que contínuament m'ha anat donant al llarg de tota la investigació.

-Al Dr. Tomàs Adzet, Catedràtic i Cap del Departament de Farmacognòsia i Farmacodinàmia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, les possibilitats de treball, els suggeriments i les orientacions que, en tot moment, m'ha proporcionat.

-A la Dra. M^a Carmen de la Torre, Catedràtica de Bromatologia, Toxicologia i Anàlisi Química de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, per la generositat que ha tingut en posar a la meva disposició l'instrumental necessari per portar a terme les valoracions quantitatives, i al Dr. Josep Boatella, Professor Agregat del mateix Departament, per l'especial dedicació i els assessoraments proporcionats en tot moment.

-Als Professors Dr. Guinea i Dr. Loren del Departament de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universi-

tat de Barcelona per la realització de l'anàlisi de fongs.

-Al Dr.Nadal,Cap del Laboratori de Diagnòstic del Servei de Protecció dels Vegetals del Departament d'Agricultura,Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya,per la identificació de fongs.

-Al Dr.Lasala,de la Unitat d'Edafologia i Agrobiologia de l'Institut de Biologia de Barcelona del C.S.I.C.,per la realització de les anàlisis del sòls cultivats.

Finalment,la inestimable ajuda dels meus amics i companys del Departament,que no m'ha faltat mai,mereix tot el meu agraïment.

INDEX

INTRODUCCIÓ

1.- INTRODUCCIÓ	2
-----------------------	---

RECOPILACIÓ DE DADES

2.- CARACTERÍSTIQUES BOTÀNIQUES	6
---------------------------------------	---

3.- BREU SINOPSI HISTÒRICA	11
----------------------------------	----

4.- FARMACOERGÀSIA	13
--------------------------	----

4.1.- Cultiu	13
--------------------	----

4.2.- Factors extrínsecs que influeixen en la producció de principis actius	16
---	----

4.2.1.- Multiplicació	16
-----------------------------	----

4.2.2.- Factors climàtics	18
---------------------------------	----

4.2.2.1.- Elements climàtics principals	19
---	----

4.2.2.2.- Climatologia i vegetació de l'entorn original de <u>V.wallichii</u> D.C.	20
---	----

4.2.2.3.- Influència del clima en el cultiu de <u>V.officinalis</u> L. i en la producció de principis actius	23
--	----

4.2.3.- Factors edàfics	26
-------------------------------	----

4.2.3.1.- Característiques del sòl..	26
--------------------------------------	----

4.2.3.2.- Aplicació al cultiu de <u>Valeriana</u>	30
---	----

4.2.4.- Factors fitosanitaris	30
-------------------------------------	----

4.3.-	Cultius de teixits i de cèl.lules.....	31
4.4.-	Recol.lecció.Dessecació.Conservació de la droga	32
5.-	CARACTERÍSTIQUES DE LA DROGA	35
5.1.-	Característiques farmacobotàniques	35
5.2.-	Característiques fitoquímiques	37
5.2.1.-	Valepotriats	37
5.2.2.-	Altres components	55
5.3.-	Característiques farmacodinàmiques	57
6.-	TÈCNIQUES ANALÍTIQUES DELS VALEPOTRIATS	64
6.1.-	Extracció i anàlisi qualitativa	64
6.2.-	Anàlisi quantitativa	68
6.3.-	Cromatografia líquida d'alta resolució	71
6.3.1.-	Fonaments	71
6.3.2.-	Elements del cromatògraf	73
6.3.3.-	Mètodes i avantatges	74

PART EXPERIMENTAL

7.-	FARMACOERGÀSIA	79
7.1.-	Cultius realitzats	79
7.1.1.-	Al delta de l'Ebre	79
7.1.1.1.-	Situació geogràfica	79
7.1.1.2.-	Climatologia i edafologia..	81
7.1.1.3.-	Evolució del cultiu	84
7.1.2.-	A Barcelona	87
7.1.2.1.-	Situació geogràfica	87
7.1.2.2.-	Climatologia i edafologia..	87
7.1.2.3.-	Evolució del cultiu	91

7.1.3.- A Sant Privat d'En Bas	91
7.1.3.1.- Situació geogràfica	91
7.1.3.2.- Climatologia i edafologia..	91
7.1.3.3.- Evolució del cultiu	95
7.2.- Malalties fitoparasitàries	95
7.2.1.- Anàlisis de les plantes parasitades..	95
7.2.2.- Fongs	99
7.2.3.- Pugons	100
7.2.4.- Nemàtodes.....	102
7.2.4.1.- Espècies detectades	102
7.2.4.2.- Tractament de les plantes infestades	105
8.- ESTUDI DELS VALEPOTRIATS DELS DIFERENTS CULTIUS DE <u>V.wallichii</u> D.C.	109
8.1.- Extracció	109
8.2.- Identificació	110
8.3.- Cromatografia en capa fina	111
8.4.- Cromatografia en columna	117
8.5.- Cromatografia líquida d'alta resolució	119
9.- DISCUSSIÓ DELS RESULTATS ,... ,.....	161
<u>CONCLUSIONS</u>	
10.- CONCLUSIONS	166
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	
BIBLIOGRAFIA	169

INTRODUCCIÓ

1.- INTRODUCCIÓ

Les plantes de la família de les Valerianàcies tenen un interès especial en les investigacions que es fan per tal de trobar compostos d'origen vegetal que presentin un efecte sedant i tranquil·litzant.

Ja des de l'antiguitat, l'arrel de Valeriana ha estat àmpliament utilitzada; però no és fins al segle XVIII que es posen de manifest les seves propietats sedatives. Actualment, i degut a la progressiva intensificació del seu ús, s'ha fet necessari el cultiu d'aquesta planta.

Per determinar quins són els principis actius de la droga s'han portat a terme nombroses investigacions: En un principi s'atribuí l'acció a l'oli essencial, però el posterior descobriment dels valepotriats (valtrat, acevaltrat i didrovaltrat) per THIES i col. (112, 113), i les investigacions farmacològiques realitzades han demostrat que aquests són els principals responsables de la seva acció sedant i tranquil·litzant. Posteriorment, s'ha trobat que, dels tres valepotriats anteriors, el que sembla més actiu és el didrovaltrat (o dihidrovaltrat) (133, 135).

En determinar el contingut de valepotriats de diverses espècies del gènere Valeriana L., es posà de manifest que V.wallichii DC, originària de l'Himàlaia (2000-3000 m.), presentava un contingut superior al de V.officinalis L., i en particular de didrovaltrat. Per aquest motiu, s'ha intentat cultivar V.wallichii DC en diversos països europeus. L'èxit ha estat més aviat escàs, principalment pel fet que

les condicions ambientals en què creix en el seu hàbitat natural són molt diferents de les que es poden trobar a Europa.

En no tenir notícia de l'existència de cultius d'aquesta espècie al nostre país, hem cregut interessant realitzar-ne en diverses zones i fer-ne la consegüent investigació.

Aquesta comporta tant un estudi edàfic i climàtic de les zones on es troben els conreus, com la pràctica de nombroses anàlisis qualitatives i quantitatives de les plantes cultivades, ja que és interessant conèixer el seu contingut en principis actius per a determinar quina és la millor època de recol·lecció i tenir, al mateix temps, una orientació respecte a la seva activitat.

Essent els valepotriats productes termolàbils i fàcilment degradables en presència d'àcids o d'àlcalis, la seva investigació és problemàtica.

La cromatografia líquida d'alta resolució fa possible l'anàlisi de compostos làbils a la calor i d'elevat pes molecular mitjançant separacions ràpides i eficients en condicions moderades. A més, permet injectar directament l'extracte acabat d'obtenir, sense necessitat de purificacions prèvies; així, es redueix el temps de manipulació i el risc de degradació de la mostra.

Altrament, l'estudi dels valepotriats per cromatografia líquida en fase inversa permet tant la determinació del contingut total com la identificació i quantificació de cada un d'ells.

És per això que hem emprat aquesta tècnica a l'hora de fer un estudi comparatiu del contingut en valepotriats de plantes de V.wallichii DC procedents dels nostres cultius.

RECOPILACIÓ DE DADES

2.- CARACTERÍSTIQUES BOTÀNIQUES

Valeriana wallichii De Candolle és una planta originària de l'Himàlaia inclosa a la Farmacopea de l'Índia junt amb la Valeriana officinalis L.; ha figurat també a la Farmacopea Britànica. (82)

Taxonòmicament es classifica de la següent manera (30, 107, 38) :

Subregne	-----	Cormobionta
Divisió	-----	Spermatophyta
Subdivisió	-----	Magnoliophytina (o Angiospermae)
Classe	-----	Magnoliatae (o Dicotyledonae)
Subclasse	-----	Asteridae (o Sympetalae tetracycliae)
Ordre	-----	Rubiales
Família	-----	Valerianaceae
Tribu	-----	Valerianeae
Subtribu	-----	Valerianinae
Gènere	-----	Valeriana L.
Secció	-----	Euvaleriana Höck
Sèrie	-----	Montana
Espècie	-----	<u>Valeriana wallichii</u> DC

La família de les Valerianàcies agrupa unes 350 espècies de plantes que formen mates o arbustos, anuals o perennes, gairebé sempre herbàcies. Les fulles són oposades, sense estípules, simples o més o menys dividides. Les flors, agrupades en raïms densos o cimes terminals, solen ésser petites i asimètriques, generalment hermafrodites. El calze i la corol·la són pentàmers. La corol·la és infundibilifor-

me, de vegades gibosa o esperonada a la base (per exemple: G. Centranthus DC) de 5 lòbuls més o menys desiguals i de color variable : blanc, rosa o vermellós. El nombre d'estams és variable i pot anar des d'un fins a cinc. L'ovari és tricarpelar. El fruit és un aqueni, que al gènere Valeriana L. és unilocular, i coronat per un plomall o per les dents del calze que actuen com a òrgans de dispersió. La llavor no té albumen. (92, 106, 127, 14, 19).

Les característiques histològiques més importants de les plantes d'aquesta família són: Absència d'oxalat càlcic; presència de sacs de secreció, els quals solen estar a la capa subepidèrmica de les arrels, contenen oli essencial i tenen parets suberinitzades; i traqueïdes escaliformes o amb porus simples (136).

Es tracta de plantes que, principalment, es troben en estat salvatge en regions asiàtiques, encara que també creixen a la conca mediterrània i a Amèrica del Sud. (128).

En els gèneres de la família Valerianàcies s'observa una evolució progressiva que es manifesta tant per una reducció del gineceu i del nombre d'estams, com per les característiques dels grans de pol·len que difereixen d'unes espècies a les altres. S'han fet estudis de la morfologia de diverses espècies de diferents gèneres de la família Valerianàcies i s'han trobat quatre tipus de pol·len i quatre formes intermèdies tenint en compte la superfície de l'epiderm. Tots els gèneres, excepte Valeriana L., són bastant uniformes respecte al tipus de pol·len; només al gènere Valeriana L. es troben tots els tipus i formes in-

termèdies.No s'ha trobat cap relació directe entre el tipus de pol.len i les formes de vida de les Valerianàcies(8).

El gènere Valeriana L. agrupa més de 200 espècies de plantes herbàcies,perennes, amb rizoma subterrani i amb tiges florals erectes i normalment no ramificades.Les fulles són oposades,enteres o més o menys dividides.Moltes vegades,les fulles d'una mateixa planta varien de forma i mida,de tal manera que les fulles basals són simples,amples,senceres i peciolades,mentre que les fulles superiors són dividides,estretes,dentades i sèssils.

Algunes espècies són estrictament dioiques,d'altres són polígames o ocasionalment dioiques,i d'altres són hermafrodites.En les espècies estrictament dioiques,les corol.les de les plantes femenines són menors que les de les plantes masculines.Per exemple : Valeriana dioica L. té flors unisexuals.

Les flors poden ésser de color rosat,blanc o groguenc i estan en cimes o fascicles tricotòmics terminals;el calze és de limbe envolt que es transforma en plomall plomós a la fructificació i té de cinc a quinze dents.La corol.la és quasi regular,infundibiliforme,poc o gens gibosa a la base,no esperonada;té cinc lòbuls desiguals.Hi ha tres estams.El fruit és un aqueni ovoïdo-oblong,plano-convex i unilocular.(14,19,39,106,127).

Sir W.JONES (1790),un dels primers homes en dedicar-se a investigar la civilització oriental,donà una primera descripció de Valeriana wallichii DC,que ell anomenà "Valeriana jatamansi",pensant que es tractava del nard indú (Nardosta-

9

chys jatamansi DC) àmpliament utilitzat en l'antiguitat, per les seves propietats oloroses, en ungüents. Posteriorment, DE CANDOLLE (1830) fa una descripció d'aquesta Valeriana que ell anomenà V.wallichii DC.(19,39,138).

Valeriana wallichii DC s'inclou en el grup de la V.mon-
tana L. que agrupa les espècies següents (8,107) :

V.alliarifolia Vahl.

V.asarifolia Dufresne

V.bertiscea Panciç

V.capitata Pall.

V.capitata Pall.ex Link ssp.acutiloba (Rydb.)

V.capitata Pall.ex Link ssp pubicarpa (Rydb.)

V.daphniflora Hand.-Mz.

V.jatamansi Jones

V.lancifolia Hand.-Mz.

V.montana L.

V.pauciflora Michx.

V.pyrenaica L.

V.sitchensis Bong.ssp.scouleri (Rydb.)

V.sitchensis Bong.

V.suendermannii Melch.

V.tiliifolia Troitzky

V.tripteris L.

Creix a l'Afganistan a l'Himàlaia temperat, desde Caixmir fins a Butan (3000 m.), i a les muntanyes de Khasia (1200-1800 m.). En aquestes zones també s'hi poden trobar altres Valerianes com : V.dioica L., V.pyrolaefolia Dcne., V.hardwickii Wall., V.elegans C.B.Clarke, V.Stracheyi C.B.Clarke i V.offi-

cinalis L. (9,136,139).

És una planta herbàcia, perenne, lleugerament peluda, que té un gruixut rizoma horitzontal. La tija té de 15-46 cm. d'altura.

Les fulles basals tenen el pecíol llarg i són de 2,5-7,5 cm. de diàmetre; tenen forma de cor, el marge dentat o sinuós i són acabades en punxa; no són senceres. A la tija hi ha poques fulles, més petites que les basals i són senceres o pinnades.

Floreix el mes de Maig. Les flors són blanques o lleugerament rosades, disposades en un corimb terminal de 2,5-7,5 cm. d'ample. Generalment són unisexuals amb les flors masculines i femenines en diferents plantes. Les bracteoles són oblongo-lineals i tan llargues com el fruit. El fruit és pelut o gairebé sense pèl. (9,52).

El gra de pol·len és del tipus forma de transició C.(8).



3.- BREU SINOPSI HISTÒRICA

Els metges grecs i romans receptaven la Valeriana com a diurètic, anàlgesic i contra la tos i l'asma. No és fins a mitjan segle XVIII que un metge anglès, HILL, assenyala els seus efectes sedants nerviosos, que posteriorment van ésser confirmats.(82).

Etimològicament la paraula Valeriana vé del llatí "VALERE" que vol dir estar bé, estar sa, i fa al·lusió a les seves propietats medicinals.(7).

DIOSCÓRIDES va fer una de les primeres descripcions botàniques de la droga, que ell anomenava Phu. El mot Valeriana no es troba en els autors clàssics; el trobem per primera vegada els segles IX i X en els escrits d'ISAAC JUDEUS (metge egipci que va morir l'any 932) i de CONSTANTINUS AFRICANUS (1087).

A Anglaterra l'arrel de Valeriana era molt apreciada, fins i tot per la seva olor, avui dia considerada insuportable, ja que al segle XVI era costum utilitzar-la com a perfum en els vestits. En l'actualitat encara s'empren de la mateixa manera les arrels de V.celtica L. i les de Valeriana de l'Himàlaia a l'Orient(29).

Les primeres recerques farmacològiques i terapèutiques sobre la Valeriana fetes en animals d'experimentació i en l'home es vean iniciar a finals del segle XIX amb els treballs de GRISARD, BOCK i BINZ, i a primers del segle XX amb els de KIONKA (1904), POUCHET i CHEVALIER (1905), PARANT (1905), LEGRAS (1906) i KOCHMANN (1904).

Tant aquestes primeres investigacions com les dels nombrosos investigadors que posteriorment s'han ocupat d'aquest tema han estat dirigides, entre altres coses, a precisar l'acció farmacològica i terapèutica, així com a trobar el principi o principis actius responsables d'aquesta acció; però, donat l'elevat nombre de substàncies que hi ha al complex continuït fitoquímic de la droga, les dificultats per aïllar-les, identificar-les i per fer el seu estudi farmacològic, s'ha tardat bastants anys a obtenir els resultats definitius (7).

4.- FARMACOERGÀSIA

4.1.- Cultiu

Degut a l'acció terapèutica de les arrels de Valerianes i a la difusió del seu ús, s'ha fet necessari el cultiu d'aquestes plantes, ja que les espontànies no són suficients per cobrir les necessitats farmacèutiques i comercials dels països. D'aquesta manera trobem cultius de V. officinalis L. a gran part dels països europeus (França, Alemanya, Anglaterra, Holanda, Bèlgica, Polònia, Romania, etc...) i també a Rússia i Estats Units. (82, 136).

El descobriment de THIES (1966) dels principals responsables de l'acció terapèutica de la Valeriana, va permetre d'estudiar el contingut en valepotriats de plantes que havien crescut en diferents llocs i, per tant, en condicions climàtiques i edafològiques diferents. D'aquesta manera es pogueren determinar les millors condicions per al cultiu de Valeriana officinalis L., amb el fi d'obtenir un rendiment elevat. Cal tenir en compte que, a més dels valepotriats, hi ha, a la droga l'oli essencial que sembla que també intervé en l'acció farmacològica i del que també s'han fet estudis per veure la producció segons les condicions de cultiu. (132).

El rendiment d'oli essencial de la Valeriana depèn de diversos factors, especialment de la varietat de la planta, salvatge o cultivada, de la naturalesa del sòl, dels adobs, de les condicions meteorològiques en què ha crescut la planta, etc... (48).

Segons alguns autors, el tipus de sòl no té cap influència en la composició química de l'oli essencial, mentre que

les condicions meteorològiques influeixen notablement en el contingut porcentual d'oli.(7)

Interessa fer determinacions dels principis actius en la planta segons els períodes de vegetació i els factors ambientals, la qual cosa ens pot donar una idea de quin és el temps més adequat de recol·lecció.

El grup de les Valerianes oficinals presenta ecotipus dins de cada espècie : és a dir, la mateixa espècie presenta individus acomodats al pla i a la muntanya. Sembla també que hi ha variants geogràfiques encara mal conegudes; així les Valerianes oficinals de les Illes Britàniques no s'assemblen a les de l'europa continental. El nombre cromosòmic de base és 7, i es coneixen espècies diploides (V.exaltata Mikan), tetraploides (V.collina Wallr.) i octaploides (V.procurrens Wallr., V.sambucifolia Mikan). Dins de cada espècie sembla que hi ha nombrosos genotipus. En conclusió, el polimorfisme del grup resulta a la vegada de diferències genotípiques i fenotípiques induïdes per les circumstàncies ecològiques o geogràfiques.(66)

En el curs dels últims anys s'ha intensificat el cultiu de V.wallichii DC per tal com té un contingut en valepòtrits superior a V.officinalis L. i sobretot en didrovaltrat que sembla que és el més actiu.(133,135)

Aquesta planta, però, és originària de l'Himàlaia on creix en estat salvatge sota unes condicions edàfiques i climàtiques diferents de les que, en principi, es puguin trobar a Europa.

Cal doncs buscar unes condicions de cultiu que perme-

tin obtenir un elevat rendiment de la planta. Valeriana wallichii DC s'ha intentat cultivar a diverses parts d'Europa i no s'han obtingut els resultats desitjats; per això s'ha provat de cultivar a Espanya en diferents punts de la nostra geografia. Això ha permès fer un estudi comparatiu del contingut en valepotriats de V. wallichii DC de diferents procedències i deduir quines són les condicions ambientals que sembla que van millor pel seu cultiu i quines són aquelles que l'afecten més i que en el futur s'hauran de tenir en compte.

Per fer aquest estudi hem considerat les característiques generals del clima de la regió escollida i les del sòl en què s'ha cultivat, per determinar si es pot establir una relació entre el contingut en valepotriats i aquests factors de manera que estudis posteriors es realitzin en aquelles condicions que siguin millors.

En l'estudi del clima hi intervé tant el macroclima com el clima local o microclima que pot modificar bastant les característiques generals del macroclima.

Quant a l'estudi del sòl, hem fet anàlisis de les terres fins a 30 cm. de profunditat aproximadament, que és la zona on es troben les arrels de la planta i de la que, per tant, pendrà els nutrients que precisa per créixer i desenvolupar-se.

Hi ha dues races químiques de Valeriana wallichii DC (56):

- a) Raça didrovaltrat : diploide ($2n=16$)
- b) Raça acevaltrat : tetraploide ($2n=32$)

La que és objecte d'aquest treball és la Valeriana

wallichii DC de la raça didrovaltrat.

4.2.- Factors extrínsecs que influeixen en la producció de principis actius.

4.2.1.- Multiplicació.

La multiplicació de Valeriana wallichii DC pot tenir lloc per via sexuada o per via vegetativa, és a dir per llavors o per estolons.

Les llavors han d'ésser madures i conservar el seu poder germinatiu. Algunes només germinen espontàniament després de l'hivern, necessiten un període de fred. En la pràctica s'associa l'acció del fred i l'estratificació, o sigui : es posen les llavors en capes fines en la sorra humida a una temperatura de 0-10°C. Generalment s'afavoreix la germinació per l'acció de la llum. Hi han poques espècies que es sembrin directament a terra, en general es posen en planters i més tard es trasplanten a la terra.

En el cas de les llavors de Valeriana, la sembra es fa a la tardor per estratificació i a baixes temperatures, i es trasplanten les plantes petites al camp a l'Abril o tan aviat com desapareguin les gelades (136). Altres autors (82) consideren millor sembrar les llavors a la primavera després d'estratificació, trasplantar en planters i passar-les a terra a la tardor o a la primavera següent. En el Dioscòrides renovat de FONT I QUER (30) s'indica que la llavor de Valeriana es planta a la tardor o al principi de la primavera, i es trasplanta quan ja és una mica gran.

La reproducció per via vegetativa permet obtenir individus amb el mateix genotipus que l'individu inicial, i és interessant quan es volen conservar els caràcters en la descendència. Es poden emprar els òrgans subterranis (rizomes, estolons, bulbs, ...). En la Valeriana s'utilitzen arrels velles dividides, que s'haurien de plantar al camp a primers de tardor, i estolons. (82, 136).

Anteriorment al descobriment dels valepotriats, en el curs d'estudis fets sobre el cultiu de Valeriana es revelà el fet que el contingut d'oli eteri no semblava ésser influenciat pel període de sembra. Tampoc no es pogué confirmar amb seguretat si la distància entre les plantes influïa o no en el rendiment d'oli essencial, encara que semblava que la distància òptima era de 30x30 cm. (23).

Experiments realitzats per CZABAJSKA i col. (18), els anys 1971-1974, amb Valeriana officinalis L., demostren que seria millor sembrar directament les llavors al camp, que no pas fer planters i després trasplantar les plantes petites al camp de cultiu, a causa d'un millor rendiment de la collita i que no hi ha tanta pèrdua de temps com plantant. La millor època per sembrar sembla que és a mitjan Agost, sempre que les condicions climàtiques siguin favorables, ja que si no ho són es pot sembrar en una altra època; els resultats obtinguts depenen de les condicions climàtiques durant la primera etapa de desenvolupament, ja que és decisiu que hi hagi humitat suficient durant la germinació i el primer període de desenvolupament de les plantes.

Si es fan planters, no té cap importància l'època en què

es trasplanten, sempre que el temps sigui favorable. També s'observà que un augment de l'espai entre les plantes contribuïa a una disminució de la collita. Sembrant les llavors directament al camp, no té cap efecte un aclariment de les plantes.

Aquests dos mètodes de cultiu i les diferents èpoques en què es poden fer no influeixen en el contingut en oli essencial i en valepotriats de la droga.

4.2.2.- Factors climàtics.

El clima actua sobre la vegetació tant d'una manera directa com indirecta a través de la seva influència sobre el sol (82, 137).

Els elements del clima són les seves variables meteorològiques: precipitacions, temperatura, insolació, humitat del terra i de l'atmosfera, vent, pressió atmosfèrica, ... Els més importants són la temperatura i l'humitat.

Els factors del clima són les propietats geofísiques que el condicionen: orientació, continentalitat, latitud i altitud sobre el nivell del mar. Aquesta última és important però no és un factor absolut, ja que hi ha plantes que poden créixer a altituds molt diferents de les del país d'origen. Per exemple: el ruibarbre oficial es troba a la Xina a 2000-3000 m., i s'ha pogut cultivar a Holanda. Aquest és també el cas de Valeriana wallichii DC (82, 35).

4.2.2.1.- Elements climàtics principals.

A) Temperatura : Les plantes tenen una temperatura òptima de creixement, i uns límits superior i inferior a partir dels quals no creixen. Els ecotipus d'espècies àmpliament distribuïdes tenen, de vegades, diferents òptims de temperatura, que segurament s'han establert per selecció natural per afrontar les condicions dominants. (109)

La temperatura de la superfície del sòl segueix estretament les variacions de temperatura de l'aire, però la cobertura vegetal les atenua. A partir d'uns 20 cm. de profunditat la variació diurna de temperatura és molt dèbil i la variació estacional és molt més petita que vora la superfície del sòl.

Les temperatures del sòl fluctuen menys en sòls argilosos i sòls humits que en sòls arenosos o secs. (59)

B) Precipitacions : La pluja és un dels elements climàtics que més influeix en el rendiment dels cultius. En general, són millors les pluges fines i de llarga duració que les curtes però molt intenses. (35)

C) Humitat : A la primavera, la rosada pot resultar un perillós brou de cultiu en el qual poden proliferar gèrmens productors de malalties, sobretot quan la temperatura augmenta bruscament.

La humitat ajuda a fixar els tractaments d'herbicides i d'adobs sobre plantes i sòls. (35)

D) Vent : El vent influeix de forma decisiva en el tipus de cultiu d'una determinada comarca. Té efectes avantatjosos,

però també en té de perjudicials. Condiciona la pluja i la temperatura. (35)

D'acord amb aquestes consideracions és poden distingir en la terra diverses zones climàtiques que poden tenir excepcions particulars com són, per exemple, els vents planetaris (al·lisis i monsons) i la presència d'altres muntanyes. Tot això influeix en el tipus de vegetació que hi ha en una determinada zona. (137)

En el cas de les plantes medicinals el clima pot influir en el contingut en principis actius de manera positiva o negativa. (82)

4.2.2.2.- Climatologia i vegetació de l'entorn original de Valeriana wallichii DC.

Com ja hem vist, V. wallichii DC és originària de l'Himàlaia on creix espontàniament a altituds de 2100-3000 m., és a dir a l'Himàlaia temperat, des de Caixmir fins a Butan, i als turons de Khasia a 1200-1800 m. d'altitud. O sigui, es troba al Nord d'Afganistan, Pakistan i Índia, i al Nepal i Butan.

La serralada de l'Himàlaia és situada a l'Àsia meridional. S'estén en sentit longitudinal, de la vall de l'Indus, al Nord-oest, a la del Brahmaputra, al Sud-est, i en sentit transversal, del Tibet, al Nord, a la plana indogangètica, al Sud.

Valeriana wallichii DC es troba al vessant Sud de l'Himàlaia.

Aquest sistema muntanyós presenta una clara dissimetria entre el vessant Sud(més pronunciat) i el vessant Nord(on hi ha el Tibet);això fa que gran part dels rius himalaïans es dirigeixin cap al Sud.

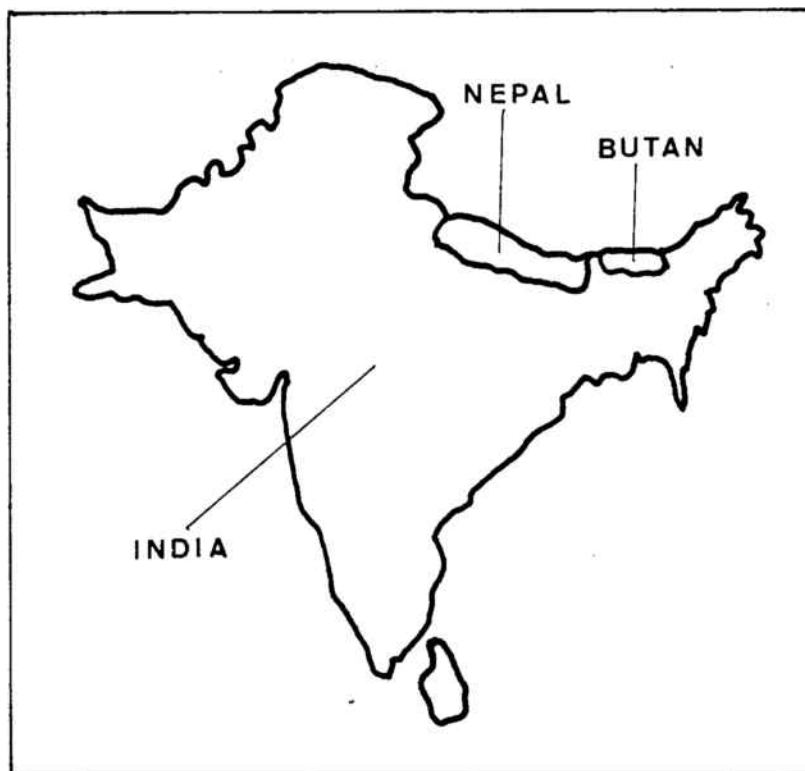
Des del punt de vista climàtic,que és el que ens interessa,es pot considerar que,en general,es tracta d'un clima temperat humit,però cal distingir entre una part oriental més humida (Butan,Nepal i Índia) i una altra d'occidental més seca pel fet que el monsó plujós de l'estiu perd humitat en el seu pas des del mar cap a l'interior (Afganistan i Pakistan).

La serralada de l'Himàlaia ,a causa de l'altura i l'extensió,exerceix una considerable influència en el clima, ja que atura els corrents d'aire fred de l'hivern que bufen del Nord,i els monsons estivals carregats d'humitat,procedents de l'Oceà Índic.És per això que en el vessant Sud les precipitacions poden arribar fins a 3000 mm. anuals i donar lloc a una vegetació rica,mentre que al vessant tibetà són molt escasses i contribueixen a una vegetació pobra.Al Nord, el clima és sec i rigorós,mentre que al Sud és més suau i amb pluges abundants.En la zona Sud de l'Himàlaia,el 85-90% de pluges té lloc de Juny a Octubre.Es distingeixen les estacions següents:

- Freda : de Novembre a Febrer.
- Calorosa : de Març a Maig.
- Plujosa : de Juny a Octubre.

Dels 2 monsons anuals,el d'hivern és preferentment sec i el d'estiu plujós.En els vessants de l'Himàlaia les

pluges són abundants amb una mitjana anual de 2000-3000mm.



A Katmandú (1326 m. d'altitud) les precipitacions són d'uns 1300 mm. anuals i les temperatures mitjanes de Gener i Juliol són de 10°C i 23°C respectivament.

L'arribada del monsó d'estiu fa que augmenti molt la humitat i que baixin les temperatures.

En quant a la vegetació, trobem, que a la part oriental hi ha :

- selva tropical:fins a 2000m.
- bosc caducifoli:des de 2000m.fins a 3000m.
- coníferes:entre 3000m.i 4000m.
- vegetació propiament alpina:a partir dels 4500m.
- neus perpètues:per sobre dels 6500m.

A la part occidental, la vegetació s'adapta a les condicions climàtiques menys humides.

És a dir, es pot distingir en general : el baix Himàlaia amb un bosc caducifoli monsonic (o selva tropical), i l'àrea himalaiana on es troben espècies del gènere Acer, castanyers, arbres de fulla perenne com alzines, magnòlies i rododèndrons, seguits de coníferes i de vegetació alpina amb prats permanents a les zones més altes. (36, 137)

Referent al tipus de sòl, l'arc himalaia no és homogeni. La zona compresa entre 2000-3000 m. esta formada per roques que probablement són de l'era terciària, roques poc consistents, esquists i saulons en les zones més altes. Aquesta zona esta formada per sediments del plistocè (gresos) i rocam metamòrfic. (36)

Valeriana wallichii DC necessita ,per tant, un clima temperat i humit.

4.2.2.3.- Influència del clima en el cultiu de V.officinalis L. i en la producció de principis actius.

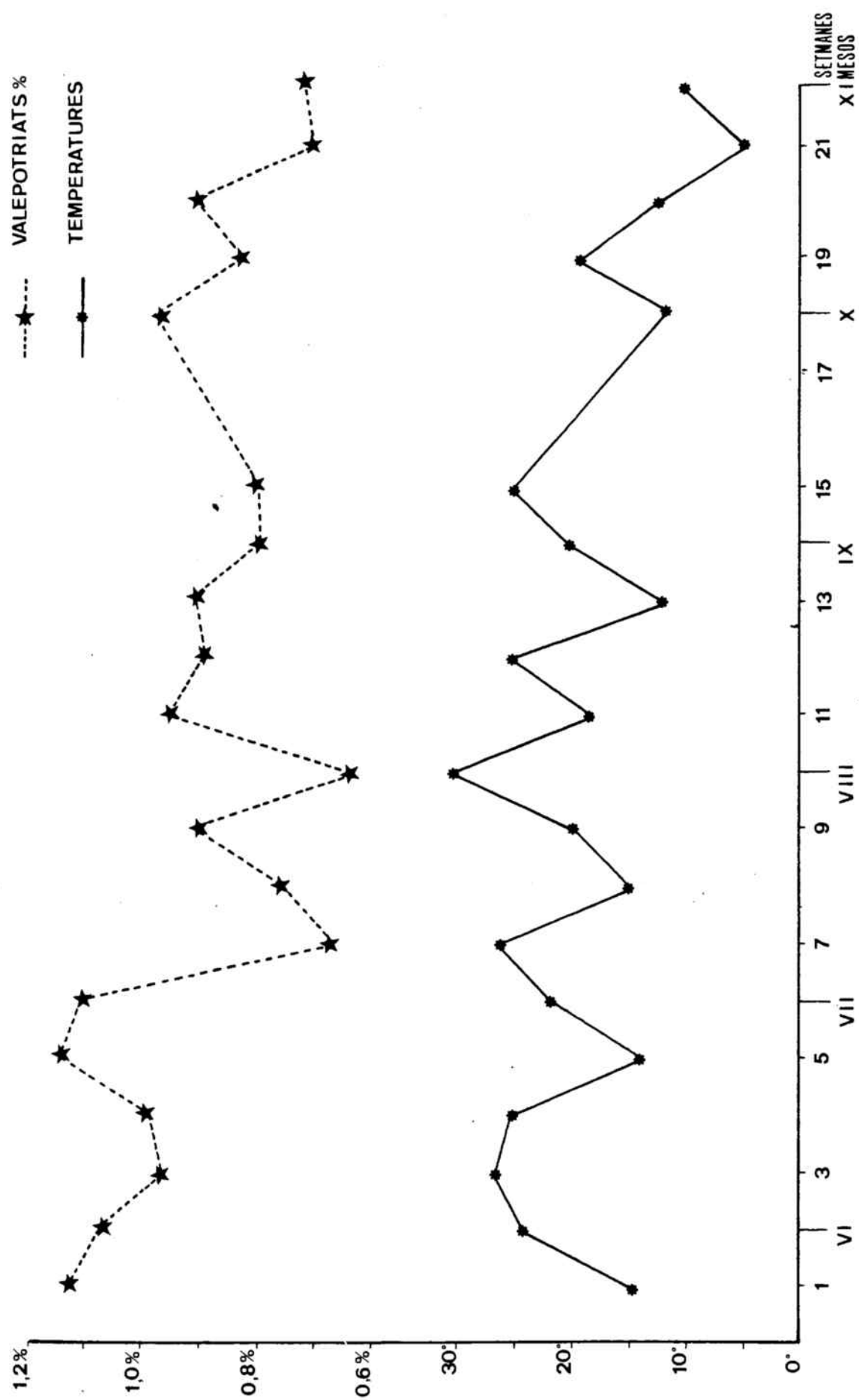
En el cas de V.officinalis L. nombrosos autors coincideixen en el fet de que el seu cultiu precisa d'un alt grau d'humitat; així: FONT I QUER (30), PARIS (82) i WALLIS (136); per contra, NYLANDER (81) trobà que la Valeriana que creix en llocs secs és relativament més rica en oli eteri que la que viu en llocs humits. El cultiu de V.officinalis L. precisa d'un clima temperat suau.

Se sap que el contingut en valepotriats varia en les plantes amb la remperatura, de tal manera que quan augmenta

la temperatura disminueix el contingut, que augmenta clarament amb temperatures cada vegada més fredes mentre les plantes tinguin fulles. També varia durant el dia, ja que a primera hora del matí o al vespre el contingut és més alt que al migdia.(132).(Veure pàg.)

El contingut d'oli essencial depèn més de les variacions climàtiques i no tant del microclima. Eisenhut(24) en extenses investigacions sobre el cultiu de Valeriana trobà una dependència de l'oli eteri amb l'altura del cultiu i que un augment de l'altura de 100 a 400 m. produïa un augment del contingut d'aproximadament un 13%.

(Veure pàg.25.)



4.2.3.- Factors edàfics.

En termes generals es pot dir que el sòl és tant el material que serveix de suport per al creixement de les plantes, com una reserva d'aigua i d'elements nutritius; és a dir, intervé tant per les seves propietats físiques com químiques. (82, 76)

La interpretació de les anàlisis del sòl no és fàcil, s'ha de fer considerant el conjunt dels resultats obtinguts i no els resultats aïllats. L'objectiu de les anàlisis realitzades ha sigut determinar el grau de fertilitat i les característiques principals dels sòls cultivats.

4.2.3.1.- Característiques del sòl.

A) Textura : Les textures molt fines, riques en argila, corresponen a sòls pesats, difícils de treballar, mentre que les textures més gruixudes, és a dir sorrenques, són les que caracteritzen els sòls lleugers més fàcils de treballar. Al mig hi ha els llims argilo-sorrencs i alguns sòls que no tinguin més d'un 30-35% de llims, els quals presenten una estructura equilibrada i corresponen a allò que habitualment s'anomena "terra franca". Les terres molt llimoses són desfavorables per als cultius. (82, 22)

B) Porositat : La porositat representa el volum d'espais buits del sòl, expressat en tant per cent del volum total. (22)
En els sòls de cultiu la porositat no arriba al 50%. (59)

La importància de l'orejament dels sòls és considerable per a la circulació d'oxigen, tant per a la respiració de

les arrels com per a la dels microorganismes.

C) Edafoclima : Les variacions de temperatura del sòl són, junt amb les variacions del grau d'humitat, un element essencial del microclima.

D) pH : S'ha de diferenciar entre l'acidesa "actual" i l'acidesa total o "potencial". La primera expressa la concentració d'ions H⁺, actualment dissociats, de les solucions del sòl, i permet distingir entre sòls alcalins, neutres i àcids.

Els sòls àcids són silicis, mentre que els alcalins són calcaris.

L'acidesa "potencial" o total correspon a la quantitat d'ions H⁺ de canvi que no estan actualment dissociats però que a mida que es produeix la neutralització es van dissociant de manera progressiva. (22)

El pH pot influir en l'absorció dels nutrients dels vegetals. (110)

La diferència de valors entre el pH actual i el pH potencial pot arribar a ésser de l'ordre d'una unitat; això és funció del grau de saturació del sòl.

pH actual - pH potencial ≥ 1 Tendència a l'acidificació.

pH actual - pH potencial $\leq 0,5$ Tendència a la salinització.

E) Matèria mineral : La descomposició física i química de la roca mare produeix el substrat mineral. (59)

D'entre els cations que les plantes absorbeixen, el calci, magnesi, potassi i amoni tenen una especial importància.

cia, per això en les anàlisis del sòls s'han determinat aquests cations, excepte l'amoni, ja que en el cas del nitrogen s'ha fet la determinació del nitrogen total.

Quan l'acidesa del sòl augmenta, la disponibilitat dels ions calci potassi i magnesi té tendència a disminuir. (110)

El calci té un paper antitòxic enfront del potassi, sodi i magnesi; l'ió magnesi es troba, en general, en menor proporció que l'ió calci. (22)

El calci exerceix una important acció en la fixació i mobilització del potassi en el sòl. En la planta aquests dos ions varien en sentit invers. (20)

La barreja d'ions pot modificar bastant la permeabilitat de les membranes cel·lulars per cada un d'ells. Una concentració elevada d'algun element pot portar a la deficiència d'un altre en interferir-se l'absorció; en aquest cas els símptomes de toxicitat d'un element poden semblar els de deficiència d'un altre. (110)

F) Matèria orgànica : La destrucció i incorporació de restes de plantes que descomponen els microorganismes del sòl donen lloc a la matèria orgànica. Es produeix una mineralització i una humificació posterior. (59)

L'humus és biològicament més actiu com més ric en nitrogen es.

Com que no es disposa de cap mètode prou precís per valorar globalment la matèria orgànica, es fa la determinació del carboni total i la del nitrogen total, la qual cosa permet trobar la relació C/N que representa l'índex d'activitat global de l'humus i del grau d'humificació de la matèria

orgànica; com més pròxima a 10 sigui aquesta relació, millor és la qualitat de la matèria orgànica.

Multiplicant el valor del C total per un coeficient, que en el cas dels sòls de cultiu és 1,72, s'obté el contingut aproximat de matèria orgànica del sòl. (22)

G) Adobs : Els adobs estan destinats a completar l'aportació de nutrients al sòl per conseguir les condicions alimentícies més favorables per un bon desenvolupament de les plantes. (20)

En general, com a fertilitzants, s'utilitzen productes químics, que poden ésser nitrogenats, fosfatats o potàssics.

Quan s'afegeixen fertilitzants fosfatats al sòl, com per exemple superfosfat, part d'aquest fòsfor es pot convertir ràpidament en compostos inorgànics inaprofitables per un procés anomenat de fixació química. Molts bacteris i fongs poden reconvertir aquest fòsfor en ortofosfat mitjançant àcids orgànics que produeixen, o per altres mecanismes; aquesta acció és particularment activa prop de les arrels. (59)

Per obtenir bons rendiments, és molt important que la relació entre nitrogen, fòsfor i potassi sigui equilibrada.

En sòls alcalins, sembla millor utilitzar N nítric, mentre que en els àcids és més apropiat el N amoniacal si no hi ha perill de sequedat; en climes humits també sembla millor l'amoniacal i en secs el nítric. (20)

El nitrosulfat amònic al 26% té una quarta part del N en forma nítrica i la resta en forma amoniacal, cosa que permet que hi hagi una reserva de N no eliminable pel rentat de l'aigua de pluja.

4.2.3.2. Aplicació al cultiu de Valeriana.

En el cas de V.officinalis L. sembla que el tipus de sòl més apropiat per al seu cultiu és un terreny ric, franc, sorrenc i sec (49, 94, 136), ja que les plantes hi són més riques en essència que les que creixen en terrenys pantanosos i humits. Segons PARIS (82) és convenient un sòl fresc, argilo-calcari, però no pantanós.

Els adobs i sobretot el superfosfat, augmenten tant la producció de rizomes i arrels com la de principis actius. (23, 30)

4.2.4.-Factors fitosanitaris.

A) Microflora : Els bacteris del sòl permeten la mineralització de substàncies orgàniques a nivell de les arrels petites; poden ésser beneficioses, o produir malalties a les plantes.

Els fongs també influeixen en la nutrició vegetal en sòls neutres o alcalins. Solen tolerar millor que els bacteris els sòls àcids. Poden produir també malures. (59, 82)

A més de fongs i bacteris, la majoria dels sòls tenen un elevat nombre de nemàtodes, els quals tenen un gran interès científic, ja que estan molt disseminats i inclouen espècies que van des de vida lliure, a ectoparàsits polífags i a endoparàsits d'hoste específic que s'adapten per això morfològicament i fisiològicament, com per exemple amb pèrdua de mobilitat de les femelles i desenvolupament d'estats de repòs que poden resistir la dessecació i ésser dispersats pel sòl i les plantes. (59)

Altres malalties són produïdes per virus i pugons.

En general, les malures fitoparasitàries produeixen una disminució del rendiment dels cultius i pèrdues considerables.

B) Productes fitosanitaris : La lluita contra les males herbes i contra els paràsits es realitza amb herbicides, insecticides i fungicides adequats.

4.3.- Cultius de teixits i de cèl.lules.

Els cultius de cèl.lules vegetals in vitro, han permès en els últims anys estudiar els factors físics i químics que intervenen en la producció de principis actius de plantes medicinals i arribar a conseguir continguts més elevats.

En aquest sentit, BECKER i col. (4, 5, 6) han realitzat cultius de teixits i de cèl.lules d'arrels i rizomes de Valeriana wallichii DC, així com d'altres plantes de la família de les Valerianàcies.

Els teixits de V.wallichii DC són capaços de produir valepotriats fins i tot en cultius de tres anys i mig de duració. En cultius de cèl.lules de V.officinalis L. no s'obtenen valepotriats.

<u>Valtrat/Isovaltrat</u>		<u>Didrovaltat</u>		<u>Acevaltrat</u>	
<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
0,66	0,6	0,10	1,4	0,34	0,4

a.- Valors expressats en % de matèria seca, corresponents als cultius de teixits de V.wallichii DC.

b.- Valors corresponents a les arrels de les plantes intactes.

En la taula anterior s'observa que, mentre que els continguts de valtrat/isovaltrat i acevaltrat són similars en els cultius i en les arrels de la planta sencera, el didrovaltrat es troba en quantitat inferior en els cultius de teixits.(6)

Per això, i considerant que els cultius de teixits resulten cars, no ens ha semblat un mètode rentable, sinó que trobem millor fer cultius de les plantes senceres.

4.4.- Recol.lecció, dessecació i conservació de la droga.

Les arrels i els rizomes de Valeriana es recullen a la primavera, si es tracta de plantes de l'any anterior, o a la tardor si les plantes són del mateix any.(82)

Diverses investigacions realitzades en aquest sentit assenyalen que el millor temps per collir les plantes és la tardor (Setembre-Octubre) (132), quan ja han caigut els fruits.(30)

El contingut en valepotriats varia durant el dia, per la qual cosa és millor collir les plantes a primera hora del matí o al vespre.

Un cop recollides, les arrels i els rizomes es renten bé amb aigua per eliminar la terra retinguda per la cabellera d'arrels, amb cura de no trencar l'epidermis, ja que l'essència de Valeriana es troba immediatament per sota d'ella.(30, 82)

Després s'assequen en llocs ben ventilats i a temperatures no gaire elevades, perquè els valepotriats són esters termolàbils; generalment s'assequen en corrent d'aire a 40°C.

El contingut d'oli essencial depèn, en elevat grau, de

la influència de les condicions de dessecació (especialment de la temperatura). La dessecació dels rizomes i les arrels amb diversos procediments ha posat en evidència que, en condicions naturals a l'ombra, així com en ambients secs a temperatures fins a 45°C, s'obtenen resultats millors que a temperatures superiors. L'ús dels raigs infrarrojos produeix una disminució del contingut d'oli essencial i de l'activitat biològica. (7)

L'acció degradant dels enzims sobre l'acció farmacològica dels principis actius de les arrels i rizomes de la Valeriana ha estat estudiada per diversos autors. S'ha demostrat que la droga no fermentada, en la que s'ha bloquejat l'acció dels enzims, té un contingut més alt d'oli essencial que la droga fermentada.

L'olor característica s'atribueix, principalment, als esters isovaleriànics, els quals durant l'envelliment de l'arrel s'hidrolitzen i alliberen àcid isovaleriànic que és precisament la causa de l'olor. Com que aquesta olor es produeix només durant la dessecació de les arrels s'ha plantejat la hipòtesi que la droga fresca conté enzims oxidants responsables del desenvolupament del típic olor. Per evitar l'acció d'aquests enzims, s'han elaborat procediments d'estabilització.

També s'ha suposat que en les arrels fresques hi ha glucòsids que en escindir-se produeixen les substàncies oloroses. (7)

En la majoria dels casos, les arrels i els rizomes de Valeriana que es troben al comerç presenten continguts bai-

xos en valepotriats. Aquest fet es pot atribuir a una mala conservació de la droga.

Per aconseguir la màxima integritat dels valepotriats, les arrels ja dessecades de Valeriana s'haurien de conservar a baixa temperatura, en recipients hermètics i protegides de la humitat però no de la llum. La temperatura és un factor important ja que augmenta la velocitat de la reacció d'hidròlisi dels valepotriats. (16)

El contingut en valepotriats disminueix de forma gradual durant l'emmagatzematge; en tres mesos el valtrat pot arribar a disminuir un 20%. Aquesta pèrdua s'incrementa si la droga es guarda polvoritzada. (84)

Per això, és interessant disposar d'un mètode ràpid i senzill que permeti determinar en un moment donat el contingut en valepotriats. Els mètodes emprats anteriorment (colorimètrics, espectrofotomètrics, ...) no permetien fer una determinació exacta de cada un dels valepotriats i tenien un cert error. La cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR) aconsegueix separar tots i cada un dels valepotriats i permet fer una anàlisi qualitativa i quantitativa en un curt període de temps.

5.- CARACTERÍSTIQUES DE LA DROGA

5.1.- Característiques farmacobotàniques.

La Valeriana de l'Índia consisteix en el rizoma i les arrels de Valeriana wallichii DC.

La droga és en realitat el rizoma, però, generalment va acompanyat de les arrels que també contenen principis actius.

El rizoma és de color marró groguenc, cilíndric amb estries circulars, lleugerament aplanat dorsiventralment i sovint una mica corb. Normalment és presenta en petits fragments de 2-8 cm. de llarg per 5-12 mm. de diàmetre. Les arrels són primes, però fortes, de 3-7 cm. de llarg i 1-2 mm. de diàmetre.

La superfície superior del rizoma té nombroses cicatrius d'inserció envelopants de les fulles, mentre que als costats i a la superfície inferior hi ha les arrels, trossos d'arrels i cicatrius d'inserció de les arrels. A la part superior del rizoma ha ha restes de pecíols secs.

La fractura és curta i còrnia. A l'interior hi ha una escorça prima i fosca d'un mil·límetre d'ample aproximadament, un càmrium ben marcat i una medul·la ample de color marró verdós i de vegades llacunar que ocupa aproximadament $\frac{2}{3}$ del diàmetre, rodejada per 12-20 petits feixos de xilema de color pàl·lid. De vegades hi ha indicis d'arrels que surten dels feixos i atravessen l'escorça.

Freqüentment, trossos del rizoma estan units per estolons, més estrets, que tenen arrugues longitudinals i són de 2,5-4,0 cm. de llarg i 3-6 mm. de diàmetre.

Quan la droga és fresca, i un cop neta de terra, és de color groguenc blanquinós; en assecar-se, s'enfosqueix.

La droga fresca no fa olor. Amb el temps, un cop recol·lectada, a causa de la degradació dels esters i de l'alliberament de l'àcid valeriànic la olor es fa forta i desagradable. El gust és canforaci i amarg. Tant l'olor com el gust són, si més no, tant forts com els de V. officinalis.
(82, 126, 136, 139)



5.2.- Característiques fitoquímiques.

5.2.1.- Valepotriats.

L'activitat farmacològica de l'arrel de Valeriana i dels seus preparats depèn fonamentalment del contingut en valepotriats, els quals va ésser aïllats d'arrels i rizomes de Valeriana wallichii DC i identificats per THIES i col. l'any 1966 (112, 113), i gràcies a posteriors investigacions farmacològiques (26) i clíniques (13) es pogué demostrar que són els principals responsables de l'efecte sedant i tranquilitzant.

Durant molt de temps, anteriorment al descobriment dels valepotriats, s'atribuí l'acció sedant de la Valeriana a l'oli essencial sense precisar quin o quins eren els principis actius de la droga. En un principi es pensà que els responsables de l'acció podrien ésser esters de l'àcid isovaleriànic. Així STOLL i col. (1957) (104) aïllaren l'acetat de bornil, l'isovalerianat d'l-mirtenil, així com dos esters més de l'àcid isovaleriànic que no van poder identificar; alguns d'aquests esters tenien propietats espamolítiques.

KREPINSKY i col. (1959) (63) aïllaren l'isovalerianat de bornil, narcòtic feble, que es considerà el veritable principi actiu de la Valeriana, perquè disminueix l'insomni en individus nerviosos i l'excitabilitat de la mèdula espinal.

SCHULTZ i ECKSTEIN (1962) (96) aïllaren de V. wallichii DC una substància activa, bastant tòxica, que identificaren com un diester de l'àcid isovaleriànic i de l'àcid caproic, d'estructura indeterminada.

En estudis posteriors, SCHAETTE (1971) (95) i WAGNER i col.(135) han trobat que l'oli essencial presenta un efecte sedant molt lleuger.

PARIS i col.(1967)(83) demostraren també la presència d'esters de marcada acció sedant en les arrels de Centranthus ruber DC, planta pròxima a la Valeriana que pertany també a la família de les Valerianàcies, que resultaren ésser valepotriats, els quals han sigut ja estudiats en el nostre Departament per ADZET i col.(1975)(1,2).

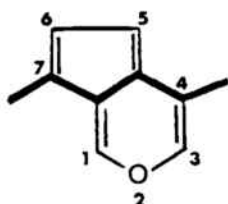
MANNETSTÄTTER, GERLACH i POETHKE, l'any 1966 (70), obtingueren una substància A anàloga al baldrinal (producte resultant de la degradació del valtrat) i un ester B idèntic al valepotriat.

.Estructura i propietats cromògenes:

Els valepotriats són esters iridoides que es troben en diverses espècies de la família de les Valerianàcies.

La paraula valepotriat està formada per tres radicals (16):

- VAL : Per recordar que aquestes substàncies han estat descobertes en la Valeriana.
- EPO : Perquè tenen una funció epoxi.
- TRIAT : Per assenyalar que es tracta de triesters d'un alcohol derivat d'un terpè, el 4,7-dimetilciclopenta [c]pirane, que no s'ha pogut aïllar.



4,7- dimetilciclopenta [c] pirane

Són polihidroxiciclopenta(c)piranes, inestables, esterificats amb els àcids isovalèric, acètic, isocaproic, β -acetoxiisovalèric i β -acetoxiisocaproic; alguns d'ells són d'estructura encara no ben definida.

En V.wallichii DC s'hi troben els valepotriats següents : valtrat, didrovaltrat i acevaltrat, aïllats per THIES i col.(112,113); homodidrovaltrat, 8,11-desoxidodidrovaltrat i isovaleroxihidrina del valtrat aïllats per THIES (116); i isovaleroxihidroxididrovaltrat (IVDH-valtrat) aïllat per primera vegada per STAHL i SCHILD (102).

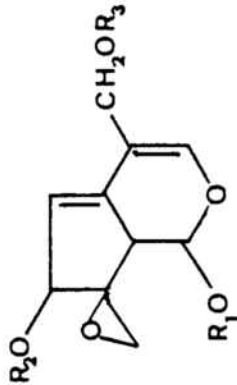
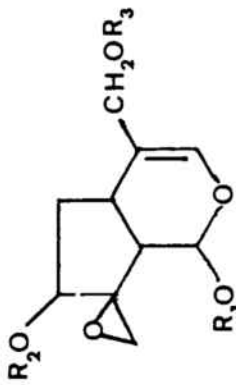
Aquests compostos es van poder separar per cromatografia en capa fina i cromatografia en columna a partir de l'extracte purificat de la droga. En els últims anys, l'evolució de noves tècniques més sensibles ha permès separar nous valepotriats i així s'ha trobat que a més dels que ja es coneixien hi ha altres homòlegs i isòmers; d'aquesta manera per cromatografia líquida d'alta resolució s'han separat de V.wallichii DC l'homovaltrat, l'isovaltrat, l'homoacevaltrat i l' α -acevaltrat (45,78,80,124). Veure pàg.40.

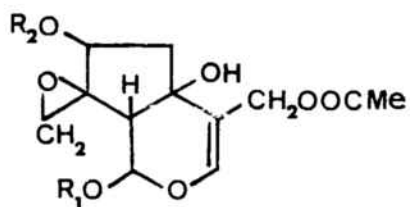
Posteriorment, s'han aïllat d'altres espècies de Valerianàcies valepotriats diferents :

- DIA-valtrat (Desisovalerilacetilvaltrat) de Centranthus ruber DC (42).
- AHD-valtrat (Acetoxihidroxididrovaltrat) de Centranthus ruber DC (87).
- 7-epi-deacetilisovaltrat de Valeriana officinalis L. (86).
- Isodidrovaltrat de Valeriana vaginata HBK.(64).

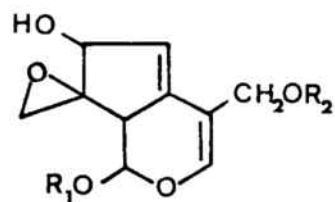
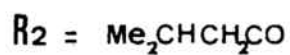
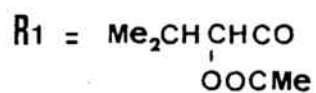
(Veure pàg. 41).

VALEPOTRIATS

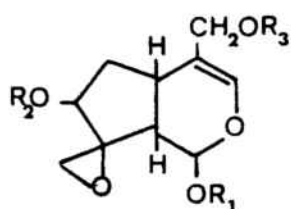
	<table><tr><th></th><th>R₁</th><th>R₂</th><th>R₃</th></tr><tr><td>Valtrat</td><td>COCH₂CHMe₂</td><td>COCH₂CHMe₂</td><td>COCH₃</td></tr><tr><td>Isovaltrat</td><td>COCH₂CHMe₂</td><td>COCH₃</td><td>COCH₂CHMe₂</td></tr><tr><td>Homovaltrat</td><td>COCH₂CHMe₂</td><td>CO(CH₂)₂CHMe₂</td><td>COCH₃</td></tr><tr><td>Acevaltrat</td><td>COCH₂CHMe₂OCOCH₃(or R₂)</td><td>COCH₂CHMe₂(or R₁)</td><td>COCH₃</td></tr><tr><td>Homoacevaltrat</td><td>CO(CH₂)₂CHMe₂OCOCH₃(or R₂)</td><td>COCH₂CHMe₂(or R₁)</td><td>COCH₃</td></tr></table>		R ₁	R ₂	R ₃	Valtrat	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₃	Isovaltrat	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₃	COCH ₂ CHMe ₂	Homovaltrat	COCH ₂ CHMe ₂	CO(CH ₂) ₂ CHMe ₂	COCH ₃	Acevaltrat	COCH ₂ CHMe ₂ OCOCH ₃ (or R ₂)	COCH ₂ CHMe ₂ (or R ₁)	COCH ₃	Homoacevaltrat	CO(CH ₂) ₂ CHMe ₂ OCOCH ₃ (or R ₂)	COCH ₂ CHMe ₂ (or R ₁)	COCH ₃
	R ₁	R ₂	R ₃																						
Valtrat	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₃																						
Isovaltrat	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₃	COCH ₂ CHMe ₂																						
Homovaltrat	COCH ₂ CHMe ₂	CO(CH ₂) ₂ CHMe ₂	COCH ₃																						
Acevaltrat	COCH ₂ CHMe ₂ OCOCH ₃ (or R ₂)	COCH ₂ CHMe ₂ (or R ₁)	COCH ₃																						
Homoacevaltrat	CO(CH ₂) ₂ CHMe ₂ OCOCH ₃ (or R ₂)	COCH ₂ CHMe ₂ (or R ₁)	COCH ₃																						
	<table><tr><th></th><th>R₁</th><th>R₂</th><th>R₃</th></tr><tr><td>Didrovaltrat</td><td>COCH₂CHMe₂</td><td>COCH₃</td><td>COCH₂CHMe₂</td></tr><tr><td>Homodidrovaltrat</td><td>CO(CH₂)₂CHMe₂</td><td>COCH₃</td><td>COCH₂CHMe₂</td></tr><tr><td>IVDH - valtrat</td><td>COCH₂CHMe₂(or R₂) OCOCH₂CHMe₂</td><td>COCH₂CHMe₂(or R₂)</td><td>COCH₃</td></tr><tr><td>Isodidrovaltrat</td><td>COCH₂CHMe₂</td><td>COCH₂CHMe₂</td><td>COCH₃</td></tr></table>		R ₁	R ₂	R ₃	Didrovaltrat	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₃	COCH ₂ CHMe ₂	Homodidrovaltrat	CO(CH ₂) ₂ CHMe ₂	COCH ₃	COCH ₂ CHMe ₂	IVDH - valtrat	COCH ₂ CHMe ₂ (or R ₂) OCOCH ₂ CHMe ₂	COCH ₂ CHMe ₂ (or R ₂)	COCH ₃	Isodidrovaltrat	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₃				
	R ₁	R ₂	R ₃																						
Didrovaltrat	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₃	COCH ₂ CHMe ₂																						
Homodidrovaltrat	CO(CH ₂) ₂ CHMe ₂	COCH ₃	COCH ₂ CHMe ₂																						
IVDH - valtrat	COCH ₂ CHMe ₂ (or R ₂) OCOCH ₂ CHMe ₂	COCH ₂ CHMe ₂ (or R ₂)	COCH ₃																						
Isodidrovaltrat	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₂ CHMe ₂	COCH ₃																						



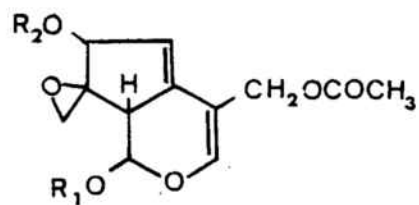
AHD- Valtrat



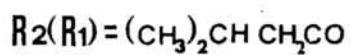
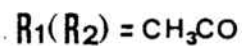
7 - epi - deacetylisovaltrat



Isodidrovaltrat



DIA - valtrat



Les característiques estructurals, estereoquímica i configuració, dels valepotriats i productes intermedis han estat determinats, principalment, gràcies als nombrosos treballs realitzats per THIES (116, 120, 119) i per THIES i col. (124, 123, 122). L'estereoquímica dels valepotriats ha estat estudiada, principalment, per espectroscòpia RMN i en alguns casos per transformacions químiques. Es poden dividir en dos grups estèrics :

- Valtrat : que inclou el valtrat, l'acevaltrat, l'isovalerohidrina del valtrat i la valeclorina, amb un protó en α en C_1 i un protó en β en C_7 .

- Didrovaltrat : que inclou el didrovaltrat, l'homodidrovaltrat, el desoxidodidrovaltrat i l'homodesoxidodidrovaltrat, amb un protó en β en C_1 i un protó en α en C_7 .

Els dos grups tenen la mateixa estereoquímica en C_8 i en C_9 .

L'anell de l'epòxid té la mateixa estereoquímica en el valtrat i en el didrovaltrat. Els dos compostos donen hidrines que tenen un grup β -hidroxil i un grup $-CH_2$ en α (123).

El valtrat és un oli viscos i espès de color marró groguenc de fórmula $C_{22}H_{30}O_8$, que es caracteritza pels espectres de masses, IR i UV que presenta dos màxims : $\lambda_{m\grave{a}x_1} = 204 \text{ nm.}$ i $\lambda_{m\grave{a}x_2} = 256 \text{ nm.}$ $n_D^{20} = 1,4906$; $[\alpha]_D^{21} = 172,7^\circ$ (en MeOH).

El didrovaltrat cristal·litza en forma d'agulles blanques de punt de fusió $64-65^\circ C$, $[\alpha]_D^{21} = -80,8^\circ$ (en MeOH). La seva fórmula és $C_{22}H_{32}O_8$. Es caracteritza també pels espectres

de masses, IR i UV on s'observa només un màxim a 206 nm.

L'acevaltrat ($C_{23}H_{32}O_{10}$) cristal·litza també en forma d'agulles blanques de punt de fusió $82-84^{\circ}C$ i $[\alpha]_D^{24} = 163,7^{\circ}$ (en MeOH). Es caracteritza pels espectres de masses, IR i UV que presenta dos màxims d'absorció : $\lambda_{m\grave{a}x_1} = 204$ nm. i $\lambda_{m\grave{a}x_2} = 256$ nm. i un mínim a 208 nm. (123)

L'homodidrovaltrat ($C_{23}H_{34}O_8$), el 8,11-desoxidodidrovaltrat ($C_{22}H_{32}O_7$) i l'isovalerohidrina del valtrat ($C_{27}H_{40}O_{10}$) cristal·litzen també en forma d'agulles blanques, de punt de fusió $50-51^{\circ}C$, $68-70^{\circ}C$ i $105-107^{\circ}C$ respectivament. (114).

Segons THIES (117) els valepotriats es divideixen en grups segons les seves reaccions de coloració :

Grup A	Diens conjugats : tenen dos dobles enllaços conjugats ; reaccionen amb els àcids i donen sals blaves solubles en l'aigua.
Grup B	

Grup C	Diens no conjugats i monoens : reaccionen amb els àcids no oxigenats i donen un color marró clar no específic.
Grup D	
Grup E	

Precisament, l'identificació dels valepotriats en l'arrel i rizoma de Valeriana es basa en aquestes reaccions de coloració.

.Estabilitat i degradació dels valepotriats :

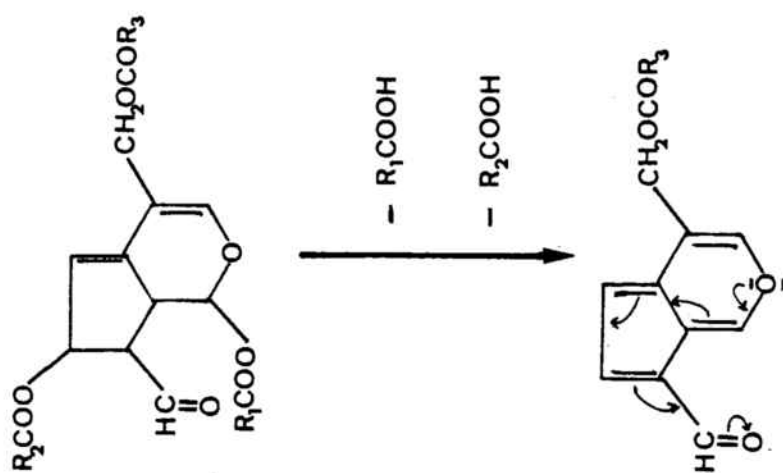
Els valepotriats són compostos inestables. Es degraden a temperatures superiors a 40°C, i són destruïts pels àcids minerals (pH inferior a 3) i pels àlcalis (pH superior a 11) (16).

Els productes de degradació dels valepotriats es poden formar durant el procés d'elució en cromatografia en columna emprant sílica i alúmina com a fase estacionària.

El producte de degradació del valtrat i de l'acevaltrat per l'acció dels àcids i del calor és el baldrinal, que també es troba en V.wallichii DC (123).

Per degradació de l'isovaltrat ($C_{22}H_{30}O_8$) s'obté l'homobaldrinal (114).

(Veure pàg.45)



VALTRAT $R_1=R_2=-\text{CH}_2\text{CHMe}_2$
 $R_3=-\text{CH}_3$
 ISOVALTRAT $R_1=R_3=-\text{CH}_2\text{CHMe}_2$
 $R_2=-\text{CH}_3$

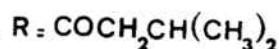
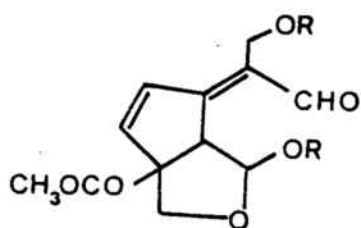
BALDRINAL $R_3=-\text{CH}_3$
 HOMOBLDRINAL $R_3=-\text{CH}_2\text{CHMe}_2$

DEGRADACIÓ DELS VALEPOTRIATS

El baldrinal cristal.litza en forma de prismes grocs de punt de fusió 112-113°C.

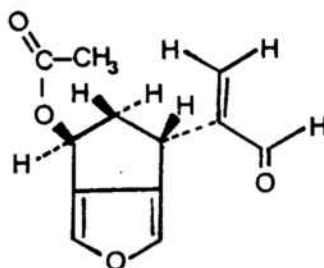
L'homobaldrinal cristal.litza en forma d'agulles grogues de punt de fusió 36-37°C.

Més recenment, s'ha trobat un nou producte de descomposició de l'isovaltrat : l'isovaltral, que s'ha aïllat de V.edulis ssp. procera Meyer, i que cristal.litza en forma d'agulles blanques de punt de fusió 80-81°C (21).



Isovaltral

D'altra banda, s'ha comprovat que la degradació del didrovaltrat in vitro per l'acció d'una esterasa seguida d'un tractament amb $\text{Cl}_3\text{CCOOH}/\text{Cl}_3\text{CH}$, dona lloc a un ciclopenta-[c]-furane (117,120) :



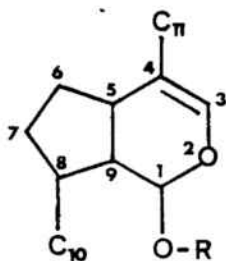
Investigacions autorradiogràfiques i químiques de diferents òrgans de ratolí (fetge, ronyó, pulmó, cervell,...) després d'administració per via oral, intravenosa i intra-

duodenal de didrovaltrat marcat amb C^{14} , han mostrat que es reabsorbeix en una petita proporció en forma intacta. La major part de la radiactivitat incorporada es troba en forma de producte de degradació polimeritzat(134). El didrovaltrat, in vivo, és degradat i metabolitzat ràpidament.

.Compostos iridoides : Característiques.

Els compostos iridoides formen un grup químicament ben definit. Es tracta de monoterpens ciclopentanoides. El seu esquelet presenta un anell de ciclopentà unit a un anell α -pirona. Es troben repartits en diverses famílies de dicotiledònies. Tenen algunes analogies estructurals amb els alcaloides monoterpènics.

Els compostos iridoides poden tenir substituents molt diversos. En el cas dels valepotriats, que són els que ens interessin, hi ha :



.L'hidroxil de la posició 1 esterificat amb l'àcid isovalèric.

.Un grup $-CH_2OH$ en la posició 4 esterificat per l'àcid acètic o l'isovalèric.

.Un hidroxil esterificat en la posició 7.

Els iridoides es poden classificar tenint en compte si estan o no substituïts en la posició 4 i segons la posició dels dobles enllaços de l'anell de ciclopentà.

Els valepotriats tenen la posició 4 substituïda i poden o no tenir un doble enllaç en 5-6. Excepte el baldrinal,

tenen un, dos o tres grups isovaleril (un isocapril en els derivats "homo").

Els compostos iridoides són sòlids cristal·litzats o amorfs, a excepció del valtrat que és un oli; els seus derivats, però, són sòlids de baix punt de fusió.

Solen donar reaccions colorades, que s'utilitzen per identificar-los, en determinades condicions (85).

.Biosíntesi dels valpotriats :

La biosíntesi dels iridoides s'efectua per la via de l'àcid mevalònic(73). Molts autors han proposat esquemes de biosíntesi però sovint es tracta d'hipòtesis no comprovades, ja que la major part dels mecanismes encara s'han d'elucidar.

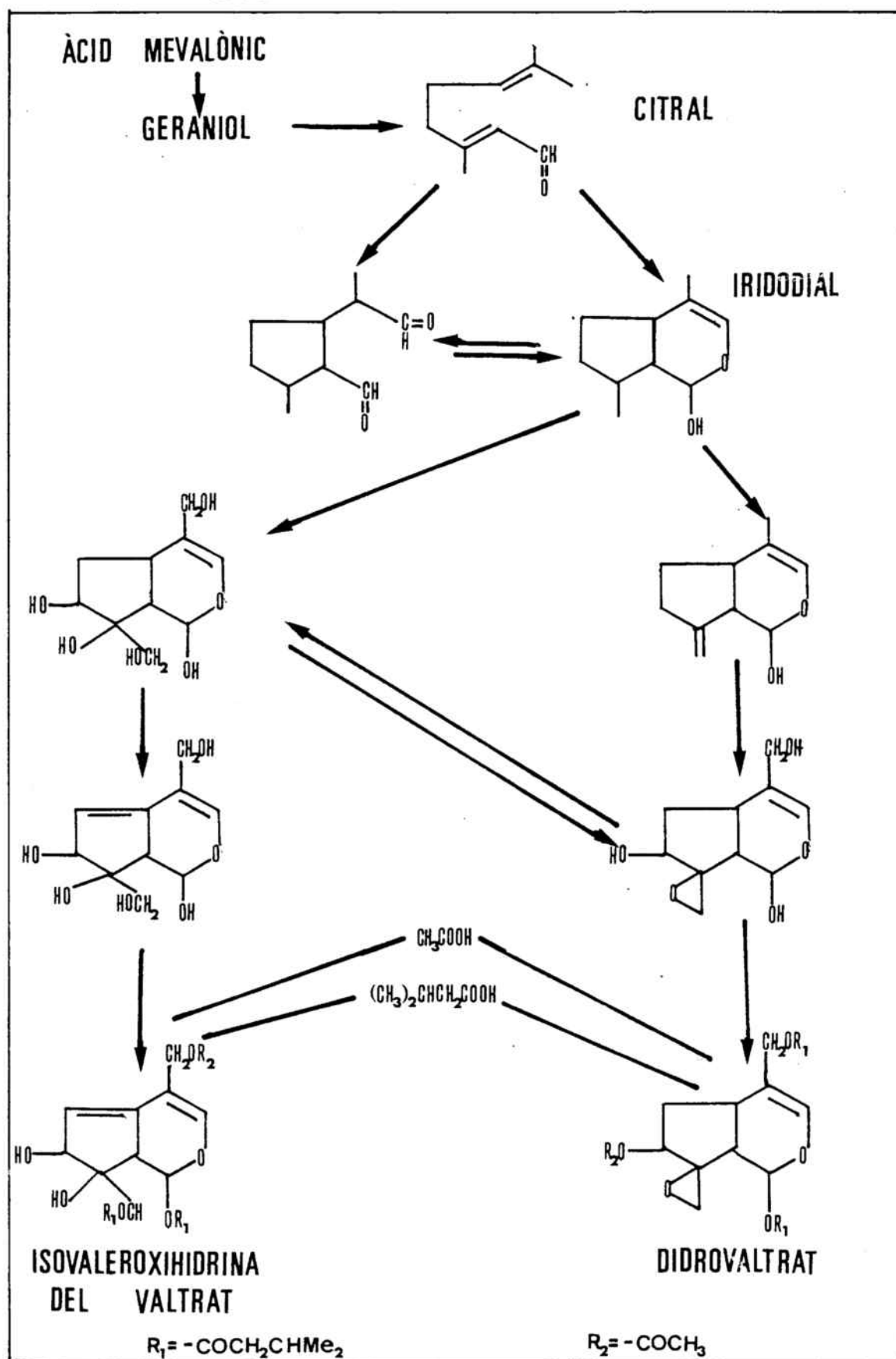
En investigacions realitzades amb acetat marcat radioactivament amb C^{14} i incorporat a la part subterrània de V. wallichii DC, HÖLZ i col.(55) arribaren a la conclusió de que, segurament, el lloc de biosíntesi dels valepotriats era la hipodermis dels òrgans subterrànies. En les fulles de V. wallichii DC hi ha, també, valepotriats; com que els valepotriats són substàncies extremadament hidròfobes, es podria excloure un transport des de l'arrel fins a les fulles, i considerar que es forma directament en les fulles (54, 55).

FUNKE i FRIEDRICH (33) consideren, en canvi, que és possible que hi hagi un transport del valerosidat, aïllat per THIES (118), des de l'arrel a la part aèria.

Però la biosíntesi dels valepotriats no està encara elucidada. Es pot establir un esquema biosintètic que es basa en investigacions del metabolisme de la planta, segons el qual, a partir de l'àcid mevalònic (MVA) s'arriba al

BIOSÍNTESI

VALEPOTRIATS



citral pel camí ja conegut. A partir del citral es forma l'esquelet iridoide a través d'un dialdehid el qual per ciclació es transforma en iridodial que és un dimetilciclopentapirane.

Les passes següents són desconegudes i només es poden establir hipotèticament; consisteixen en els següents processos (5 5) :

- 1.- Hidroxilació
- 2.- Esterificació dels grups hidroxil
- 3.- Formació de l'anell epòxid
- 4.- Aparició dels dobles enllaços conjugats.

Veure figura

.Localització i contingut en parts aèries i subterrànies :

En V.wallichii DC, els valepotriats es troben principalment en les arrels i rizomes, els quals poden tenir fins a un 3,5% de valepotriats (54). En les plantes de la raça didrovaltrat, aquest pot arribar fins a un 2% (60-80% dels valepotriats totals).

g. valepotriats totals	
per 100g. de droga	3,5
Valtrat	14%
Didrovaltrat	60%
Acevaltrat	12%
IVDH-valtrat	3%

En un principi, els valepotriats es detectaren només en les arrels i rizomes de plantes de la família de les Valerianàcies. HÖLZ i JURCIC (55) per cromatografia en capa fina trobaren que també eren a la part aèria de V.wallichii DC. La concentració màxima de valepotriats en les fulles és aproximadament d'un 1% al Maig-Juny del primer any de la planta i després disminueix de manera que al segon any arriba només a un valor de 0,1-0,3%. Els resultats obtinguts per HÖLZ i JURCIC s'exposen en la taula següent:

Valepotriat	% Fulles	% Arrels i Rizomes
Valtrat	18	24
Didrovaltrat	20	50
Acevaltrat	20	15
Valepotriat B _x	20	—
Valepotriat B _y	10	—
IVDH-valtrat	3	5
Valepotriats totals (g/100 g.droga)	1,3	2,8

D'aquesta taula es dedueix que tant la composició qualitativa com quantitativa de les fulles i òrgans subterrànics de V.wallichii DC difereixen. En les fulles, a més dels 4 valepotriats principals, hi ha 2 valepotriats que no es troben a les arrels i que, com s'ha comprovat per reaccions de fluorescència, pertanyen al grup B de THIES (117). D'altra

banda, el percentatge de valepotriats en les fulles és inferior al dels òrgans subterranis. S'observa també, que mentre que en la part subterrània el valepotriat majoritari és el didrovaltrat, seguit del valtrat, acevaltrat IVDH-valtrat, en les fulles el didrovaltrat, acevaltrat, valtrat i valepotriat B_x es troben aproximadament en un 20%, el valepotriat B_y i el IVDH-valtrat es troben en un 10 i un 3%, respectivament.

Les fulles de V.wallichii DC tenen també una petita quantitat d'oli volàtil. En canvi, la part aèria de V.officinalis L. no té ni oli volàtil ni valepotriats.

Estudis posteriors, relitzats per. FUNKE i FRIEDRICH (33) també per cromatografia en capa fina i reaccions colorades demostraren que hi ha diferències en la composició qualitativa dels valepotriats de les fulles i dels òrgans subterranis de V.wallichii DC.

V.wallichii DC ocupa un lloc privilegiat entre les altres Valerianàcies pel seu contingut en valepotriats. Mentre que en les altres espècies hi ha diferències graduals entre el percentatge i composició de valepotriats d'arrels i rizomes, en V.wallichii DC arriba a produir-se fins i tot un canvi del component principal. És a dir, les arrels tenen principalment valtrat i els rizomes didrovaltrat(56).

g.valepotriats per 100g. de droga.		%		
		V	D	A
Arrels fins a 1mm.de diàmetre	2,2	40	20	25
Rizomes i arrels més velles	3,5	10	70	15

D - Didrovaltrat, V - Valtrat, A - Acevaltrat

VALEPOTRIATS EN V.wallichii DC.

.Comparació amb altres espècies :

L'estudi dels valepotriats ha tingut també un interès taxonòmic.

La investigació microanalítica de les arrels i els rizomes de diverses espècies de diferents gèneres de la família Valerianàcies, mostra que els valepotriats són característics d'aquesta família. En general, el valtrat és el component majoritari. En els gèneres Patrinia Juss. i Nardostachys DC no s'ha pogut identificar cap valepotriat (102).

Els òrgans subterranis de V.officinalis L. tenen un 0,5% de valepotriats (82), V.alliariaefolia Vahl. té fins a un 2,5% i V.edulis ssp. procera Meyer fins a un 5%. Aquesta última s'anomena també V.mexicana; el seu component principal és la fracció valtrat/isovaltrat, no tan activa com el didrovaltrat.

GENERES	% Valepotriats en arrels i rizoma			
	V	D	A	IVDH-valtrat
<u>VALERIANA</u> L.				
<u>V.officinalis</u> L. var. <u>exaltata</u>	0,8-1,0	0,01	0,01	0,1-0,2
<u>V.officinalis</u> L. var. <u>procurrens</u>	0,8-1,0	0,01	0,01	0,1-0,2
<u>V.officinalis</u> L. var. <u>sambucifolia</u>	0,5-0,8	0,01	0,01	0,1-0,2
<u>V.dioica</u> L.	0,2-0,4	indicis	indicis	0,05
<u>V.montana</u> L.	0,2-0,5	indicis	0,01	0,05
<u>V.phu</u> L.	0,4	indicis	0,01	0,05
<u>CENTRANTHUS</u> DC:				
<u>C.angustifolius</u> DC	0,6	0,05	0,05	0,1
<u>FEDIA</u> Gaertn.				
<u>F.cornucopiae</u> Gaertn.	0,6	0,01	0,01-0,02	0,06

V - Valtrat, D - Didrovaltrat, A - Acevaltrat

No s'han trobat valepotriats en les parts aèries de Valeriana officinalis L., V.palustris Gars., V.excelsa Poir., V.sambucifolia Mik., i V.phu L. (102), en canvi sí que n'hi ha a les fulles de V.dioica L., V.tripteris L., V.simplicifolia (Rchb.) Kabath, i Fedia cornucopiae (L.) Gaertner

En els gèneres Centranthus DC i Fedia Gaertn. els valepotriats es troben a la part aèria i a la subterrània.

En el gènere Valeriana L. algunes espècies no tenen valepotriats a la part aèria (32,102).

Gèneres	Espècies	Arrels i rizomes	Brots
<u>Centranthus</u> DC	<u>C.ruber</u> (L.)DC.	+	+
	<u>C.angustifolius</u> DC.	+	+
<u>Fedia</u> Gaertn.	<u>F.cornucopiae</u> Gaertn.	+	+
<u>Valeriana</u> L.	<u>V.alliariifolia</u> Vahl.	+	+
	<u>V.tripteris</u> L.	+	+
	<u>V.dioica</u> L.	+	+
	<u>V.wallichii</u> DC.	+	+
	<u>V.officinalis</u> L.	+	-
	<u>V.excelsa</u> Poir.	+	-
	<u>V.phu</u> L.	+	-

. VALEPOTRIATS EN DIVERSES ESPÈCIES DE
VALERIANÀCIES

5.2.2.- Altres components.

La composició química de Valeriana wallichii DC s'assembla bastant a la de V.officinalis L., més que la d'altres Valerianes, com per exemple: V.edulis ssp. procera Meyer, V.phu L., V.officinalis var. angustifolia Miq., etc...

Entre les substàncies banals hi ha sals minerals, midó, tanins, mucíl·lags, Els àcids orgànics que hi ha provenen de l'alteració de l'essència, on es troben en forma d'esters,

(94, 100).

La droga conté aproximadament un 1% d'oli volàtil que, entre altres productes té esters d'àcids isovaleriànic i fòrmic (126, 136, 139).

Investigacions recents de l'essència de l'arrel i tintura de diferents espècies de Valeriana per cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR), han demostrat que l'essència de V.wallichii DC no té àcid valerènic, ni àcid acetoxivalerènic, ni valerenal, així com tampoc la de V.edulis ssp. procera Meyer. En canvi, estan presents a l'essència de V.officinalis L. (41).

S'ha aïllat també de rizomes de V.wallichii DC un flavonoide i un glicòsid d'un ester iridoide.

El flavonoide és l'isovalerianat de linarina (115); la linarina és el ramnoglucòsid de l'acacetina.

El glicòsid és el valerosidat (58, 118) que es troba en un 5%, mentre que a V.officinalis L. hi és en un 1,5%.

5.3.- Característiques farmacodinàmiques. Acció i utilització.

Les investigacions realitzades sobre l'acció dels principis actius i preparats totals de la Valeriana han estat molt nombroses així com els resultats obtinguts, moltes vegades discordants.

El descobriment dels valepotriats per THIES i col. (112) (1966) va obrir un nou camí en l'estudi de les propietats farmacològiques de la Valeriana resultant ésser els principals responsables de l'acció sedant com ho demostren els experiments realitzats per EICKSTEDT i RAHMAN (1969) (26), WAGNER i col. (1980) (135), i WAGNER i JURCIC (1979) (133).

Altres investigacions amb extractes de Valeriana i valepotriats han estat fetes per SCHAEETTE (1971) (95), BORKOWSKI (1972) (10), JURCIC (62) i HAZELHOFF (43).

Sembla però, que l'acció total de la droga necessita de la sinèrgia de diverses substàncies, ja que si l'essència obtinguda per arrossegament amb vapor d'aigua és poc activa, alguns compostos de l'extracte eteri (valenol, àcid valerènic) són antiespasmòdics enèrgics (82).

Per això hi ha hagut investigadors que paral·lelament als estudis dels valepotriats, han treballat també amb l'oli essencial estudiant els seus components i la seva possible acció fisiològica.

En aquest sentit són importants la valeranona, un sesquiterpè de l'oli essencial de Valeriana officinalis L.s.l.

(95) que també esta en Nardostachys jatamansi DC (91), i compostos aïllats de Valerianes japoneses, que tenen activitat farmacològica i poden tenir un efecte additiu. La valeranona, en ratolins, allarga el temps de son després de l'administració d'hexobarbital, augmenta la coordinació motora i té un efecte anticonvulsiu després de l'electro-xoc (92). ARORA i ARORA (3) troben una disminució de la serotonina en el cervell de conill després de l'administració de valeranona, probablement deguda a un augment de l'efecte de la 5-HT-decarboxilassa, però no troben canvis en l'activitat de la MAO.

S'ha aïllat de Valeriana faurei Briqu. var. faurei un compost que allarga també el temps de son produït per l'hexobarbital i disminueix la deambulació (111).

Altres investigacions sobre l'oli essencial han estat portats a terme per STOLL i col. (105) i HAZELHOFF (44,45); aquest últim estudia la composició de l'oli essencial de diverses races de V. officinalis L. per cromatografia de gasos, distingeix tres tipus d'essències : A, B i C, i arriba a la conclusió que l'acció de l'oli essencial depèn de la seva composició i que hi ha una interacció entre els diferents components dels preparats de Valeriana, de tal manera que mentre per una banda n'hi ha que tenen activitat farmacològica, per una altra l'oli essencial o alguns dels seus components poden tenir també un important paper a la biodisponibilitat, alliberament i estabilitat dels valepotriats.

Posteriorment, HENDRIKS i col. (1981) (51) han fet un "screening" farmacològic de valerenal, àcid valeriànic (105),

valeranona i isovalerat d'isoeugenil (50), tots ells components de l'oli essencial que tenen activitat, resultant ésser el valerenal i l'àcid valerènic, que tenen alguna semblança estructural amb els valepotriats, els més actius farmacològicament a dosis més baixes, i l'isovalerat d'isoeugenil el menys actiu. L'acció d'aquests compostos i de l'oli essencial és més de tipus depressor central i no tant relaxant muscular.

Així i tot queden encara molts interrogants respecte al paper que juga l'oli essencial en l'activitat farmacològica de la Valeriana. Pot ésser que també altres substàncies presents en la droga intervinguin d'alguna manera en l'acció com per exemple : alcaloides (actinidina, valerina, catinina, α -naftiridilmetilcetona (60)) o bé aminoàcids com és l'àcid -aminobutíric (GABA) que s'ha trobat junt amb glutamina, alanina, tirosina i asparragina, a l'arrel de Valeriana (40).

WAGNER i col. (1980) (135) han estudiat l'acció de diferents extractes de V.wallichii DC i fraccions amb contingut definit de valepotriats, valepotriats purs i els seus productes de degradació sobre la motilitat espontània dels ratolins; els resultats confirmen que l'oli eteri té efectes més dèbils que els valepotriats mentre que aquests últims i extractes de Valeriana amb contingut elevat de valepotriats tenen l'acció sedant més alta, així com l'homobaldri-
nal, producte de degradació de l'isovaltrat, la qual cosa fa pensar que els valepotriats originals no siguin les formes actives dels preparats de Valeriana. Cal destacar també el

fet que un augment de la dosi no sempre porta a un augment de l'efecte, sinó més aviat a una disminució, és a dir que la droga actua preferentment a dosis més baixes que altres.

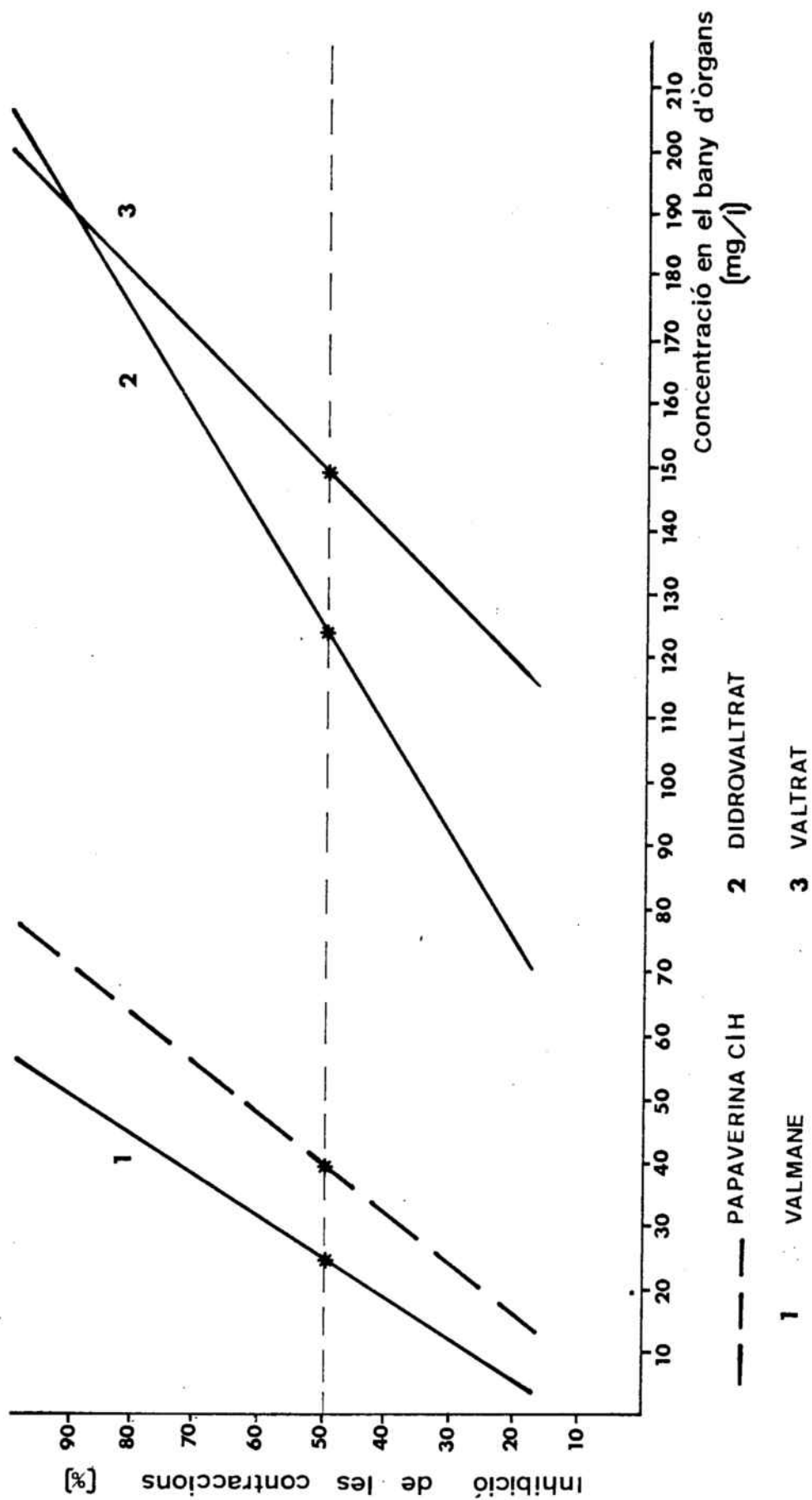
La Valeriana disminueix l'excitabilitat reflexe de granotes i peixos.

En els animals de sang calenta, gairebé tots els experiments, realitzats en ratolins, han demostrat que aquesta droga disminueix notablement la motilitat espontània de l'animal, reforça l'acció dels hipnòtics (barbitúrics) i actua com a antagonista de la cafeïna o amfetamines. Disminueix l'agressivitat i la motilitat dels gats i té un efecte tranquil·litzant en els ratolins (26). Té una acció antiespasmòdica sobre l'intestí aïllat de conill (104). S'han fet també investigacions neurofisiològiques en gats amb valepotriats i extractes de Valeriana (53).

Experiments realitzats en íleum de cobai arriben a la conclusió que la barreja de valepotriats de V.wallichii DC (Valmane^R) té més acció espasmolítica que no pas la papaverina, i aquesta més que el didrovaltrat i valtrat purs (133) . (Veure pàg.61).

ACCIÓ ESPASMOLÍTICA DESPRÉS DE L'ADMINISTRACIÓ DE 0,5 mg/l

D'HISTAMINA



En l'home actua com a tranquil·litzant, disminuint l'ansietat, de manera similar a la reserpina o les fenotiazines, però en menor grau (82). Té una acció hipnòtica dèbil, sedant suau del sistema nerviós central i antiespasmòdica. És molt poc tòxica.

Segons STAHL (100) la Valeriana té una acció equilibrant, és a dir, actua com a calmant en cas d'agitació i com a excitant en cas de fatiga.

Com en nombroses altres drogues, s'ha trobat que l'oli essencial de V.wallichii DC té una potent activitat antibacteriana tant contra bacteris Gram positius com Gram negatius (108), així com una certa acció fungicida efectiva, entre altres contra Candida albicans. Per això, es pot utilitzar com antisèptic en menjars i cosmètics i també en la profilaxi i tractament de candidomicosis (88)

ROSSENFELD i CHAZANOWITSCH han estudiat la conservació de l'activitat bacteriostàtica en les drogues dessecades i han pogut constatar que mentre en algunes drogues es conserva integralment i en altres només parcialment, n'hi ha d'altres en les que aquesta activitat es perd totalment (90).

Més recentment BOUNTAH i col. (1981) (11), basant-se en investigacions anteriors que posaven de manifest la possible activitat citotòxica i antitumoral d'algunes estructures terpeniques (65, 97), han trobat que valtrat, didrovaltrat i baldrinal tenen activitat citotòxica i que didrovaltrat té, també, activitat antitumoral.

Valtrat, isovaltrat i didrovaltrat podrien actuar com agents alquilants, a causa de l'estructura d'epòxid, de mane-

ra semblant a les mostasses nitrogenades (12). Inhibeixen la incorporació de timidina, marcada amb C^{14} , al DNA de cèl·lules de carcinoma d'Ehrlich ; aquest efecte no desapareix si es renta, la qual cosa significa que hi ha un enllaç covalent amb l'estructura biològica del carcinoma d'Ehrlich.

.Utilització :

La Valeriana de l'Índia s'utilitza en terapèutica de manera similar a la Valeriana officinalis L.

També s'utilitza en perfumeria i com a repel·lent d'insectes i arnes (139).

S'empra en forma d'extracte, infusió o tintura (27), sovint combinada amb bromurs, hidrat de cloral i fenobarbital en el tractament de la histèria i altres estats nerviosos. També s'ha utilitzat com a carminatiu (74).

6.- TÈCNiques ANALÍTIQUES DELS VALEPOTRIATS

6.1.- Extracció i anàlisi qualitativa.

S'han proposat diversos mètodes d'extracció de valepotriats que, en general, difereixen en el tipus de solvent emprat i en la tècnica escollida.

En tota extracció, s'ha de tenir en compte la influència del temps d'extracció en el rendiment.

La separació dels valepotriats es pot fer tant per cromatografia en columna com per cromatografia en capa fina.

En primer lloc, hi ha el mètode utilitzat per THIES (116) que consisteix en una extracció i separació dels valepotriats, i que es basa en una percolació de la droga amb acetat d'etil seguida d'una purificació i cromatografia en columna de l'extracte obtingut.

En un percolador de 200 l. es posen 60,0 Kg. d'arrels de Valeriana de l'Índia triturades, junt amb 90 l. d'acetat d'etil amb un 1% d'àcid acètic glacial. Passades 24 hores s'inicia la percolació i durant 2 dies es van afegint, en fraccions, 100 l. de líquid de percolació. Al final s'obtenen 190 l. de percolat total. Aquest percolat es renta, en fraccions, en una solució de NaHCO_3 al 3% i en NaCl al 5%, s'aclareix amb carbó vegetal i s'asseca sobre Na_2SO_4 anhidre. Després es concentra en un rotavapor a 30°C fins a pes constant. S'obté un producte grogós, molt viscos (3,15 Kg. = 5,25%).

Per la purificació de l'extracte obtingut i per separar els esters de l'àcid isovaleriànic dels olis essen-

cials, β -citosterina, esters d'àcids grassos inespecífics i altres substàncies acompanyants, es dilueix el producte obtingut en 18 l. d'àcid acètic al 90% a 10°C i la solució s'extreu tres vegades amb 5 l. d'èter de petroli saturat d'àcid acètic al 90%. Les fases etèries es menyspreen. Finalment, la fase acètica es dilueix en 1,5 volums d'aigua i s'extreu 6 vegades amb, aproximadament, 15 l. d'èter de petroli. Les fases etèries reunides, que contenen els esters, es renten amb una solució de NaOH al 0,25%, s'assequen sobre Na_2SO_4 anhidre, s'aclareixen amb carbó vegetal i es concentren al buit, a 30°C, fins a pes constant. El producte obtingut és un oli purificat de color groc clar (0,7726 Kg.=1,29% referit a la droga dessecada).

En una barreja de 4 l. d'acetona, 1 l. de monoacetat de glicerina i 0,2 l. d'àcid propiònic se sedimenten 5 Kg. d'òxid d'alumini de grau d'activitat I segons BROKMANN. Després de la disminució de la temperatura, s'omple una columna amb aquesta sedimentació i es renten amb 4 l. d'hexà lliure d'acetona.

Seguidament, 0,25 Kg. de l'oli purificat obtingut es dilueixen en 50 ml. d'hexà i s'afageixen a la columna. L'elució es fa amb 20 l. d'hexà. La velocitat de goteig és de 10 ml/min i la temperatura 15°C. Es recullen 40 fraccions de 5 l. cada una.

El valtrat s'elueix de la fracció 5 a la 24; el didrovaltrat de la 27 a la 29. Per l'elució de l'acevaltrat s'ha d'afegir un 10% d'acetona a l'hexà a partir de la fracció 30. Des de la fracció 30 a la 40 s'elueix l'acevaltrat.

Posteriorment, aquest mètode d'extracció ha estat modificat per HAZELHOFF i col. (45) que utilitzen diclorometà en lloc d'acetat d'etil amb un 1% d'àcid acètic glacial i passen per alt la posterior dissolució de l'extracte en àcid acètic al 90% ja que aquest pas produeix una considerable descomposició dels valepotriats.

Un altre mètode proposat per HAZELHOFF i col. (45) consisteix en extreure, durant 5 hores, 10,0-20,0 g. de droga polvoritzada amb diclorometà en un Soxhlet, a temperatura de 40-50°C. Passat el temps prescrit, s'evapora el diclorometà al buit a 30°C fins a pes constant.

El procediment amb Soxhlet és menys laboriós i proporciona una extracció dels valepotriats similar a la percolació (46, 45). Per últim, STAHL i SCHÜTZ (103), fan una extracció dels valepotriats amb gasos supercrítics utilitzant CO_2 i CHF_3 , comprovant que resulta millor el CHF_3 a pressió de 70 bar. i 30°C, que el CO_2 a 100 bar. i 40°C.

Condicions d'extracció	D	V	nº de proves
Soxhlet, Cl_2CH_2 (40°C)	2,95%	0,34%	2
Maceració, Cl_2CH_2 (20°C)	3,03%	0,31%	3
CO_2 (40°C)	3,00%	0,32%	4
CHF_3 (30-40°C)	2,93%	0,33%	3

D - Didrovaltrat , V - Valtrat

EXTRACCIÓ DELS VALEPOTRIATS PER DIFERENTS
PROCEDIMENTS.

En la taula anterior, s'observa que la maceració a temperatura ambient també resulta efectiva. En aquest cas, és important rentar el residu amb el solvent extractor i afegir-lo al macerat, perquè part dels valepotriats queden retinguts en la droga i es produeixen pèrdues que poden arribar a un 30%.

Els valepotriats es poden separar també per cromatografia en capa fina de l'extracte pur, lo que permet una posterior identificació i valoració quantitativa de cada un d'ells.

El suport més utilitzat és el Silicagel F₂₅₄ (Merck).

Es poden emprar diversos sistemes d'eluents, com són:
hexà : acetat d'etil (8:2) (7 8); hexà : etilmetilcetona (8:2) (102, 103); benzè : etanol absolut (9,5:0,5) (84); toluè : acetat d'etil : etilmetilcetona (80:15:5) (4 5), entre altres.

Un cop finalitzada la cromatografia, i ja seques les plaques, s'observen a la llum UV a 254 nm.; d'aquesta manera només es veuen els valepotriats cromògens, mentre que el diidrovaltrat i altres que no tenen dobles enllaços conjugats s'han de revelar per visualitzar-los.

S'han descrit diversos sistemes de reveladors que s'exposen en la taula següent.

Reveladors	Valtrat i Acevaltrat	Didrovaltrat
a) HCl 6N (71)	blau	-
b) SbCl_3 al 22% en CHCl_3 (112)	gris-marró	taronja
c) 2,4-dinitrofenilhidra- zina clorhídrica(101)	blau	taronja
d) HCl 25% : Ac.acètic gla- cial (1:1) (112)	gris-vert	marró clar
e) Benzidina clorhídrica (101)	gris-vert	marró-taronja
f) Reactiu hidroxàmic (131)	vermell-marró	vermell-marró

6.2.- Anàlisi quantitativa.

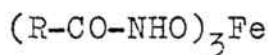
Fins fa pocs anys, els mètodes clàssics de valoració quantitativa dels valepotriats han consistit principalment en una espectrofotometria directa, o bé en una colorimatria o densitometria; alguns d'ells encara s'utilitzen en l'actualitat.

En l'espectrofotometria directa a 256 nm. (102), els valepotriats que absorbeixen al UV es poden valorar prèvia separació cromatogràfica i elució de les taques. Aquest mètode només permet valorar els valepotriats cromògens.

WAGNER i col.(131) utilitzen un mèt de colorimètric basat en la formació de derivats hidroxàmics dels valepotriats, prèvia cromatografia en capa fina dels extractes, que es posen en evidència per reacció amb el clorur fèrric. El principi de la reacció consisteix en la formació d'un àcid hidroxàmic per mitjà de la hidroxilamina en medi molt alcalí, per ruptura de la funció ester segons la reacció següent:



El derivat hidroxàmic format dóna, seguidament, en medi àcid, amb el clorur fèrric, un complex fèrric de color vermell fosc de fórmula :



en el que la intensitat de color és proporcional a la quantitat d'hidroxamat format, que a la vegada depèn de la quantitat d'ester inicial. Aquest complex té el màxim d'absorció a 512 nm.

El mètode colorimètric requereix fer una elució de les taques de la placa cromatogràfica amb el consegüent risc de pèrdues que això comporta. Per aquest motiu, és més adequada la densitometria en què es suprimeix aquest pas i es perd menys temps. El mètode densitomètric permet valorar un taca aïllada sense risc d'interferència, mentre que el colorimètric no és tan precís, ja que requereix separar la sílice d'una zona important del cromatograma en què hi poden haver altres derivats, amb funció carboxílica, capaços de raccionar positivament i donar lloc a resultats falsos.

Tant en l'espectrofotometria directa, com en la colorimè-

metria o densitometria, s'ha de fer una escala de referència cromatografiant testimonis en la mateixa placa que el problema, cada vegada, perquè les condicions cromatogràfiques varien d'una placa a l'altra.

MANNETSTÄTTER i col. (71,72) aïllaren de Centranthus ruber DC uns derivats que anomenaren "halazucroms" perquè en presència d'àcid clorhídric donaven una coloració blava. Es tractava de compostos semblants als valepotriats. La valoració dels "halazucroms" la realitzen pel mètode de la iodhidrina que, a més de valorar només els valepotriats cromògens, té l'inconvenient que no permet fer una valoració individual de cada un d'ells.

El mètode densitomètric utilitzat per HAZELHOFF i col. (45,46) presenta l'inconvenient que no valora el didrovaltrat sinó que només valora els valepotriats que absorbeixen a 254-256 nm. (valtrat, acevaltrat i els isòmers i homòlegs respectivament).

RÜCKER i col. (93) aconseguixen determinar el didrovaltrat per densitometria utilitzant vapors d'amoníac com a reactiu de detecció després de la separació cromatogràfica dels valepotriats; la detecció del valtrat i de l'isovaltrat es fa a 255 nm., la del baldrinal i homobaldrinal a 425 nm., i la del didrovaltrat a 279 nm.

Un altre mètode proposat per LIPTAK i col. (67), consisteix a fer la valoració obrint l'anell de l'epòxid amb una solució 0,05N d'àcid acètic i aigua de brom, valorant després l'excés d'àcid amb acetat sòdic 0,01N, utilitzant violeta cristall com a indicador.

Aquests mètodes presenten diversos inconvenients, com per exemple :

- . Alguns d'ells només valoren els valepotriats totals i no els individuals.

- . Per cromatografia en capa fina, la densitometria és adequada per fer una valoració individual de cada valepotriat si s'aconsegueix una bona separació de tots els components de l'extracte, cosa que és difícil ja que hi ha diversos isòmers i homòlegs que interfereixen en la valoració individual de valtrat, acevaltrat i didrovaltrat. Per tant, és necessari buscar un sistema d'eluent adequat.

- . Uns altres mètodes només valoren els valepotriats cromògens, que absorbeixen a 256 nm.

6.3.- Cromatografia líquida d'alta resolució.

6.3.1.- Fonaments.

Els objectius de tota investigació amb cromatografia líquida, vénen determinats per la química de la separació i la física dels fluids en moviment. Aquest concepte s'ha d'afegir al d'aconseguir una resolució dels components individuals de la mostra i retenir aquesta resolució fins que aquests components siguin detectats i possiblement recollits.

La cromatografia de partició líquid-líquid es basa en la diferent solubilitat de les molècules de la mostra en la fase mòbil i en la fase estacionària(75).

Segons la polaritat relativa de les fases estacionàries es distingeixen dos tipus de cromatografia líquida(140):

A) En fase normal : La fase estacionària és fortament polar i la mòbil apolar. Les mostres polars queden retingudes en la columna durant temps superiors a les menys polars o apolars.

B) En fase inversa : La fase estacionària es de naturalesa apolar, mentre que la fase mòbil és un líquid polar, normalment aigua o alcohol. Com més apolar sigui la mostra, més retinguda serà.

De vegades la fase mòbil es pot modificar per ajustar la seva polaritat afegint-hi una substància més polar (en fase normal) o menys polar (en fase inversa), segons la naturalesa del problema.

En qualsevol separació es pot escollir entre una elució per gradient (si es canvia la composició de la fase mòbil durant l'anàlisi) o una operació isocràtica (si es manté constant). La primera s'utilitza en el cas de mostres que tenen substàncies de polaritat molt diferent.

La selecció dels líquids utilitzats com a fase mòbil depèn de diversos paràmetres; un dels més importants és la polaritat, però també intervenen la viscositat, l'absorció UV i l'índex de refracció, entre altres (28, 140).

La cromatografia líquida en fase inversa és una cromatografia de partició que utilitza fases estacionàries líquides apolars químicament lligades a un suport sòlid i dissolvents polars. Com a dissolvent utilitza l'aigua, ja que és el més polar i transparent a l'UV i al visible; per modificar la polaritat s'hi afegeixen dissolvents orgànics polars miscibles en l'aigua com per exemple : metanol o acetonitril.

En el cas de substàncies neutres, no iòniques, s'haurien d'obtenir pics simètrics. La màxima resolució s'obté amb l'eluent més polar (100%) mentre que l'addició d'un dissolvent miscible orgànic disminueix el temps de retenció i, per tant, la separació (28).

6.3.2.- Elements del cromatògraf.

En tot cromatògraf líquid hi ha :

- una bomba o bombes impulsores de la fase mòbil, amb circuits de control digitals, que proporcionen un flux constant del solvent, necessari per la identificació dels components de la mostra segons el temps de retenció.
- un injector per dipositar la mostra en la columna.
- una columna amb la fase estacionària.
- un detector per visualitzar els components eluïts que requereix tant una alta sensibilitat com un cert grau d'estabilitat, la qual cosa determina l'exactitud de la quantificació.
- un registrador de la resposta del detector.

A més a més, hi pot haver també un equip de tractament de dades i un col·lector de fraccions.

El material que omple la columna és molt compacte i de partícules petites, i proporciona una alta resistència al flux de líquids al seu través (140).

La columna amb octadecilsilà de 18 carbonis (ODS) és un dels tipus més àmpliament utilitzats, ja que aquestes columnes, ideals per a mostres no polars, també poden ésser

utilitzades per a mostres moderadament polars i polars.

Els detectors més usuals són els que detecten canvis en l'absorció UV. Com més gran és la concentració del compost absorbent, més ample és el senyal. A més, com que el grau d'absorció depèn de l'estructura específica o dels grups funcionals presents (absorbibilitat molar), la intensitat del senyal també és una funció del tipus de compost que s'està detectant(75).

Un altre factor important és la temperatura de la columna. Un augment de temperatura millora la separació (pics punxeguts i més simètrics) i disminueix el temps de retenció de cada component de la mostra. Per tant, és necessari un control de la temperatura a fi d'obtenir separacions dignes de confiança i reproduïbles.

6.3.3.- Mètodes i avantatges.

La introducció de la cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR) en l'anàlisi qualitativa i quantitativa dels extractes vegetals ha permès el desenvolupament de noves tècniques encaminades a aconseguir resultats més pròxims a la realitat.

En primer lloc, en l'anàlisi qualitativa, presenta avantatges tant enfront de la cromatografia en capa fina com enfront de la cromatografia en columna clàssica.

En segon lloc, també presenta avantatges en l'anàlisi quantitativa enfront dels mètodes emprats fins ara.

D'altra banda l'anàlisi per CLAR requereix unes despeses d'instrumental elevades i personal especialitzat. Per-

En l'anàlisi d'extractes vegetals de composició complexa per cromatografia en capa fina, una part considerable de temps s'ha de dedicar a la preparació de la mostra per eliminar impureses i concentrar-la; en canvi, en la CLAR, això no és necessari, a més permet caracteritzar i avaluar els components d'un extracte encara que tinguin diferent polaritat en una sola anàlisi (31).

La diferència bàsica entre la cromatografia en columna i la CLAR és, principalment, instrumental, de capacitat de treball i a nivell de resultats obtinguts (28). Els avantatges que presenta la CLAR són (140):

- Columnes reutilitzables de petit diàmetre (2-5 mm.)
- Rebliments de columna de partícules molt petites, lo qual fa que hi hagi un elevat nombre de plats teòrics (eficàcia elevada).
- Pressió d'entrada relativament alta i flux controlat de la fase mòbil.
- Introducció precisa de la mostra, sense necessitar grans quantitats.
- Detectors continus especials que poden operar a cabals molt baixos i detectar quantitats molt petites.
- Instruments normalitzats i automatitzats.
- Anàlisis ràpides, tant qualitatives com quantitatives.
- Alta resolució.

La CLAR permet una separació ràpida i completa dels valepotriats.

El mètode intrduït per STAHL i SCHILD (101) per a la separació dels valepotriats majoritaris per cromatografia

en capa fina, ha estat àmpliament utilitzat.

Fa pocs anys WAGNER i col. (125) van descriure un mètode per la separació d'aquests valepotriats, millor que el mètode de l'àcid hidroxàmic (131). Es tracta d'una CLAR en fase normal utilitzant una columna plena de silicagel i com a sistema d'eluent una barreja d'hexà : acetat d'etil (20:3). La detecció dels valepotriats la realitzen amb dos detectors: un refractòmetre (IR) i un fotòmetre UV a 280 nm.; amb el primer aconseguen valorar els valepotriats totals de l'extracte i amb el segon valoren els valepotriats de la fracció valtrat. Per diferència poden conèixer la quantitat de valepotriats de la fracció didrovaltrat.

Per mitjà de la CLAR, VAN MEER i LABADIE han aconseguit una bona separació dels valepotriats (7 7, 7 8, 7 9), en particular la dels cromògens, emprant com eluent barreges d'hexà i acetat d'etil entre altres i fent la detecció a 254 nm. A aquesta longitud d'ona no es poden detectar els components de la fracció didrovaltrat, sinó que per això calen longituds d'ona més baixes, cosa que limita els dissolvents que es poden usar com a fase mòbil. Ha estat possible, però, analitzar aquests components mitjançant barreges d'hexà : etanol i detecció a 200 nm. Això va permetre demostrar que, en Valeriana wallichii DC, junt amb el valtrat hi ha l'isovaltrat i l'homovaltrat, així com altres components que no s'identificaren i que, junt amb el didrovaltrat, hi havia també l'homodidrovaltrat (7 8).

Posteriorment, per CLAR en fase inversa, s'ha aconseguit separar molt millor els isòmers i homòlegs dels valepotriats

utilitzant barreges d'aigua : metanol i d'aigua : acetoni-tril com a fase mòbil(80).

HAZELHOFF i col. han estudiat també l'anàlisi qualitativa i quantitativa de valepotriats per CLAR (44,45), així com l'aplicació a escala preparativa (47).

El problema que es planteja en l'anàlisi quantitativa per CLAR és que s'ha de fer una detecció a 254 o 256 nm. i una altra a 200-208 nm. per poder quantificar tots els valepotriats de l'extracte. Això, per una banda fa que hi hagi interferències per causa de la baixa longitud d'ona, i per una altra que es disposi d'un estàndard intern apropiat, ja que es necessita un estàndard per cada una d'aquestes longituds d'ona.

La CLAR, per tant, permet determinar cada un dels valepotriats. En diverses anàlisis quantitatives de valepotriats cromògens, HAZELHOFF i col. (45,46) han comprovat que la desviació estàndard en el mètode de CLAR és significativament més petita que la desviació estàndard en la cromatografia en capa fina.

PART

EXPERIMENTAL

7.- FARMACOERGASIA.

7.1.- Cultius realitzats.

Per determinar la variació del contingut en valepotriats amb el temps en funció del cultiu, del clima i de les possibles diferències edafològiques dels sòls cultivats, és necessari fer un estudi previ d'aquests factors.

Les plantes estudiades provenen, principalment, de La Cava (delta de l'Ebre) i de Barcelona. Al final de l'assaig hem pogut disposar, també, de plantes cultivades a Sant Privat d'En Bas (Olot, Girona) que poden ajudar a donar una orientació per tenir-les en compte en futurs estudis. (Veure pàg. 80).

D'entre les plantes estudiades, unes provenen de llavors i les altres d'esqueixos.

7.1.1.- Al delta de l'Ebre.

7.1.1.1.- Situació geogràfica.

El delta de l'Ebre s'estén aproximadament per uns 320 Km²; inclou aiguamolls i petites basses interiors. Les terres més altes es troben al centre, als dos costats del riu, a on hi ha l'illa de Gràcia. Cap al litoral augmenten els aiguamolls i s'hi formen grans basses (98). Els lòbuls deltaics han experimentat en els últims anys una notable evolució i han condicionat el desenvolupament de la plana deltaica.

El delta de l'Ebre es pot considerar un cas intermedi entre els "deltas dominats pel riu" (per exemple : Mississipi) i els "deltas dominats per les ones" (per exemple:



Senegal), ja que en ell es manifesta tant la influència fluvial com els processos costers (69).

7.1.1.2.- Climatologia i edagologia.

El clima del delta de l'Ebre és de tipus mediterrani litoral, amb hiverns suaus i estius llargs i calorosos. La temperatura mitjana varia entre 26°C, els mesos de Juliol i Agost, i 10°C, el més de Gener. Les temperatures màximes i mínimes durant l'any poden oscil·lar entre 39°C i -6°C; arriben a ésser inferiors a 0°C menys d'un 8% de l'any.

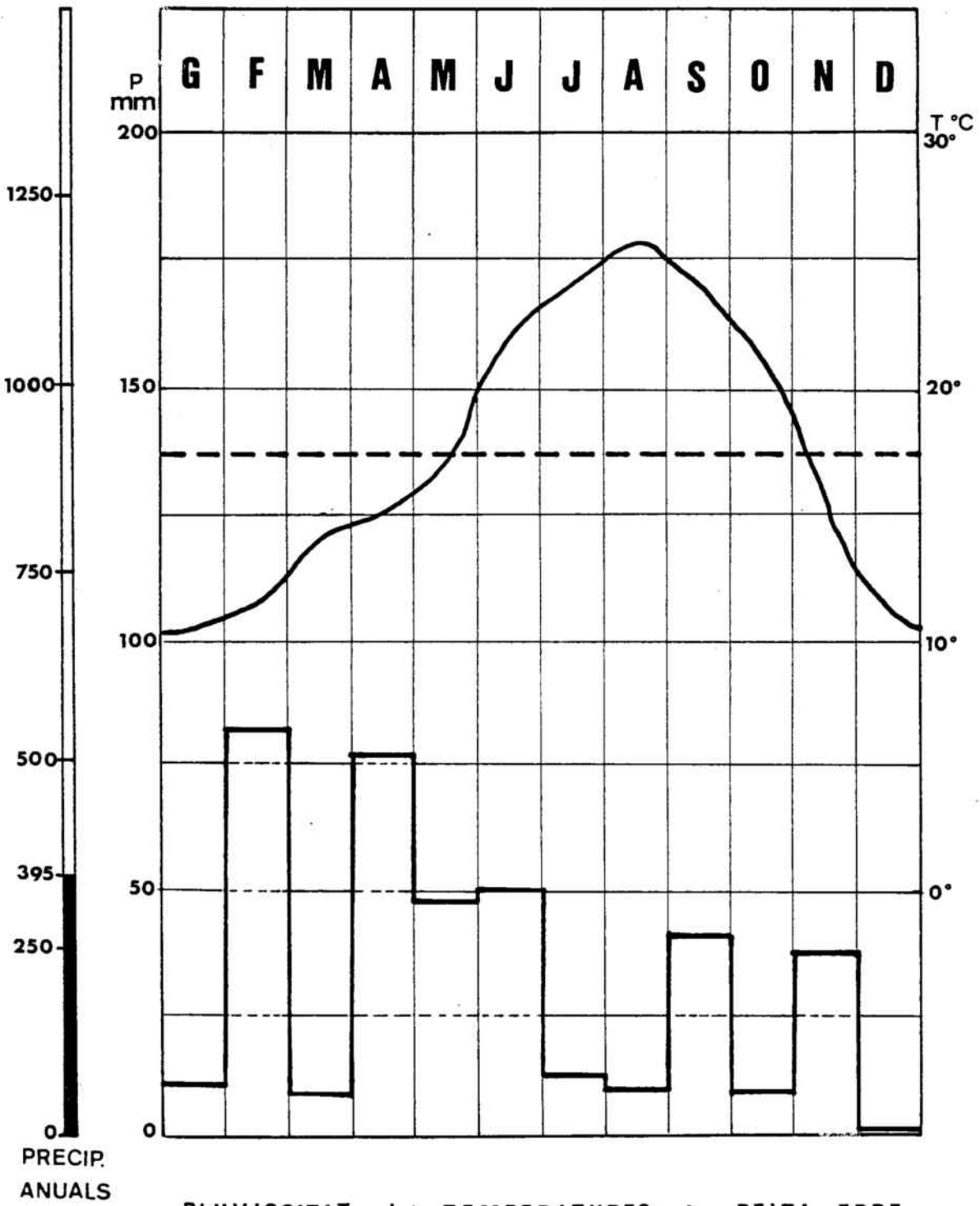
La precipitació mitjana és de 530 mm. l'any (129).

Els mesos de Gener, Juliol i Agost són, en general, secs, mentre que la tardor és plujosa, sobretot el més de Setembre.

El més característic per assenyalar és el règim de vents, els quals són molt variables i sovint arriben a velocitats de 50-100 Km/h. Els vents dominants són del Nord (tramuntana), Nord-oest ("vent de dalt") i Sud-est ("vent de mar"). El "vent de dalt", sec i calent, domina de l'Octubre a l'Abril, amb una petita calma al Febrer. La primavera és seca i amb molt de vent. L'estiu s'ha d'ésser humit i amb un suau vent de baix. Al Setembre hi ha el mínim de vent i el màxim d'humitat i de pluja. La tardor és ventosa i plujosa i a mida que passa l'hivern el vent augmenta. (Veure pàg. 82).

En el delta de l'Ebre es distingeixen sòls francs, adequats als cultius, i sòls salats, marjalencs i sorrencs, que presenten inconvenients per a l'agricultura (15).

El paisatge es caracteritza per l'amplada de l'horitzó, trencada per rengleres de xops que hi ha vora els canals i camins.



PLUVIOSITAT I TEMPERATURES : DELTA EBRE

L'anàlisi del sòl cultivat ha estat facilitat per l'Institució Nacional d'Investigacions Agronòmiques de Cabrils i ha donat els següents resultats:

pH -----	7,96
Salinitat -----	0,16 mmho/cm
Humitat -----	1,99%
Matèria orgànica -----	2,96%
Nitrògen -----	0,18%
Fòsfor -----	23 p.p.m.
Potassi -----	322 p.p.m.
Relació carboni/nitrogen -	9,25
Carboni -----	1,72%
Carbonats -----	35,86%
Calci -----	44,2 mEq./100 g.
Magnesi -----	3 mEq./100 g.

A la vista d'aquests resultats, es pot deduir que es tracta d'un sòl lleugerament alcalí (pH 7,9) en el que la salinitat no és elevada. Tots els valors són acceptables excepte els corresponents al fòsfor i al magnesi, elements indispensables per un bon desenvolupament del vegetal, que estan disminuïts i això pot provocar debilitat en les plantes i clorosis. Per corregir aquest dèficit s'han d'afegir adobs als cultius.

En el nostre cas els adobs que s'han considerat més adequats han estat :

a) Adobs a base de sulfat amònic, superfosfat de calci i sulfat de potassi.

b) Nitrosulfat amònic en cobertera.

c) adob foliar per corregir la falta de magnesi.

7.1.1.3.- Evolució del cultiu.

De les plantes cultivades al delta de l'Ebre hem de distingir entre les que provenen d'esqueixos i les que provenen de llavors.

A) Una part del material és constituït per esqueixos de plantes cultivades l'any 1981 a La Cava i plantats la primera quinzena de Gener del 1982. La distància entre les plantes era de 30x25 cm. Prèviament, el mes de Novembre, s'havia adobat la terra amb :

- . Superfosfat de calci ----- 675 Kg/ha.
- . Sulfat amònic (al 26%) ----- 450 Kg/ha.
- . Sulfat potàssic ----- 225 Kg/ha.

Durant el cultiu, i a partir del mes de Febrer, s'havien fet successius tractaments amb l'herbicida leucalín al 100% de puresa a dosis elevades d'1-1,5 Kg/ha. a causa de la repetida aparició de males herbes que podrien perjudicar el cultiu entre les que hi havien: Portulaca oleracea, Digitaria sanguinalis, Amaranthus retroflexus i Chenopodium album.

El mes de Maig s'adobà amb nitrosulfat amònic al 26% a la dosi de 225 Kg/ha.

El desenvolupament inicial de les plantes era favorable, fins que, al Maig, es detectà la presència de pugons, nemàtodes i fongs que van rebre el següent tractament:

- . Fongs----- TMTD (Thiram) 1,5Kg/ha.
- . Pugons----- Rogor 650 cm³/ha.
- . Nemàtodes----- Nema-cur 0,5-1,5 l/ha.

Els dos primers s'aplicaren per polvorització.

Degut a que els efectes de la calor repercuteixen bastant en el cultiu de Valeriana wallichii DC. a finals de Juny es procedí a tallar la part aèria de les plantes per disminuir les pèrdues per respiració que es produeixen amb les temperatures elevades els mesos d'estiu, i per impedir nous atacs de fongs i pugons. Moltes d'aquestes plantes, però, no tornaren a brotar, es produïren clarianes en la població, les arrels experimentaren un desenvolupament molt lent i la base de la tija d'algunes plantes es podria.

Aquests fets poden ésser conseqüència de diversos factors: en primer lloc, les plantes que surten dels esqueixos no són tan vigorosos com les que provenen de llavors; en segon lloc, pot ésser que el cultiu s'hagi regat massa i com que el sòl no és molt sorrenc l'aigua es queda massa temps en el terra i produeix un microclima tropical; i per últim, la planta no es troba en el clima apropiat i qualsevol plaga l'ataca fàcilment, per exemple: els nemàtodes.

Per això, i com que la protecció i manteniment del cultiu resulten cars, el mes d'Agost s'obtà per recol·lectar totes les arrels.

B) L'altra part del material procedent de La Cava prové de llavors de plantes cultivades l'any 1981. Aquestes llavors es van sembrar en un planter el Desembre de 1981 fins a mitjan Abril del 1982 en què es van trasplantar al camp. La distància entre les plantes era de 25x30 cm.

Un mes abans, igual que en el cas dels esqueixos, s'havia adobat la terra amb:

- . Superfosfat de calci----- 675 Kg/ha.
- . Sulfat amònic (al 26%)----- 450 Kg/ha.
- . Sulfat potàssic----- 225 Kg/ha.

A mitjan Maig es va fer un tractament contra les males herbes polvoritzant amb leucalín a una dosi de 1,5 Kg/ha., i també contra fongs i pugons. Més tard s'inicià el tractament contra nemàtodes amb Nema-cur^R.

El mes de Juny es van corregir les deficiències de magnesi amb adob foliar.

- Desenvolupament de les plantes:

Aparentment, les plantes seguien un bon desenvolupament inicial en el camp i començaren a florir a mitjan Maig. Fins a finals del mateix mes no s'observaren signes indicadors de malaltia. Primerament, aparegueren pugons en les males herbes (Chenopodium album i Capsella bursa-pastoris) les quals creixien malgrat les elevades dosis d'herbicida; els pugons passaren després a les Valerianes. Posteriorment, es detectà la presència de fongs en les fulles de Valeriana wallichii DC, i la de nemàtodes en les arrels, que augmentaren bastant sobretot amb la calor.

Per les raons abans exposades, també en aquest cas es tallà la part aèria de les plantes, les quals tornaren a brotar ràpidament i presentaven un bon aspecte encara que tenien nemàtodes.

Les fulles tenien un color groguenc, per la qual cosa es pensà que podia ésser conseqüència d'una falta de magnesi i de nitrogen; per això, s'adobà amb 40Kg/ha. de MgO

i amb 60 Kg/ha. de nitrogen; després de fer-ho, les plantes experimentaren una millora.

Malgrat tot, el cultiu d'aquestes plantes, encara que relativament millor que el dels esqueixos, presentava bastantes clarianes.

L'herbicida emprat no resultà eficaç en cap dels dos casos, ja que el cultiu de V.wallichii DC presentava una gran quantitat de mala herba, perquè el tractament es va iniciar massa tard (30 dies després de la plantació en comptes de 8-15 dies després).

S'observà, a més, un possible efecte selectiu del leucalín, ja que la població de mala herba després de repetits tractaments era sempre la mateixa (Amaranthus retroflexus, Portulaca oleracea i Gramineae).

Per altra banda, les temperatures elevades en els mesos de Juliol i Agost fan que les plantes es desenvolupin lentament o que morin; per això, seria convenient efectuar la sembra de les llavors el mes de Setembre i recol·lectar les arrels avans de l'estiu.

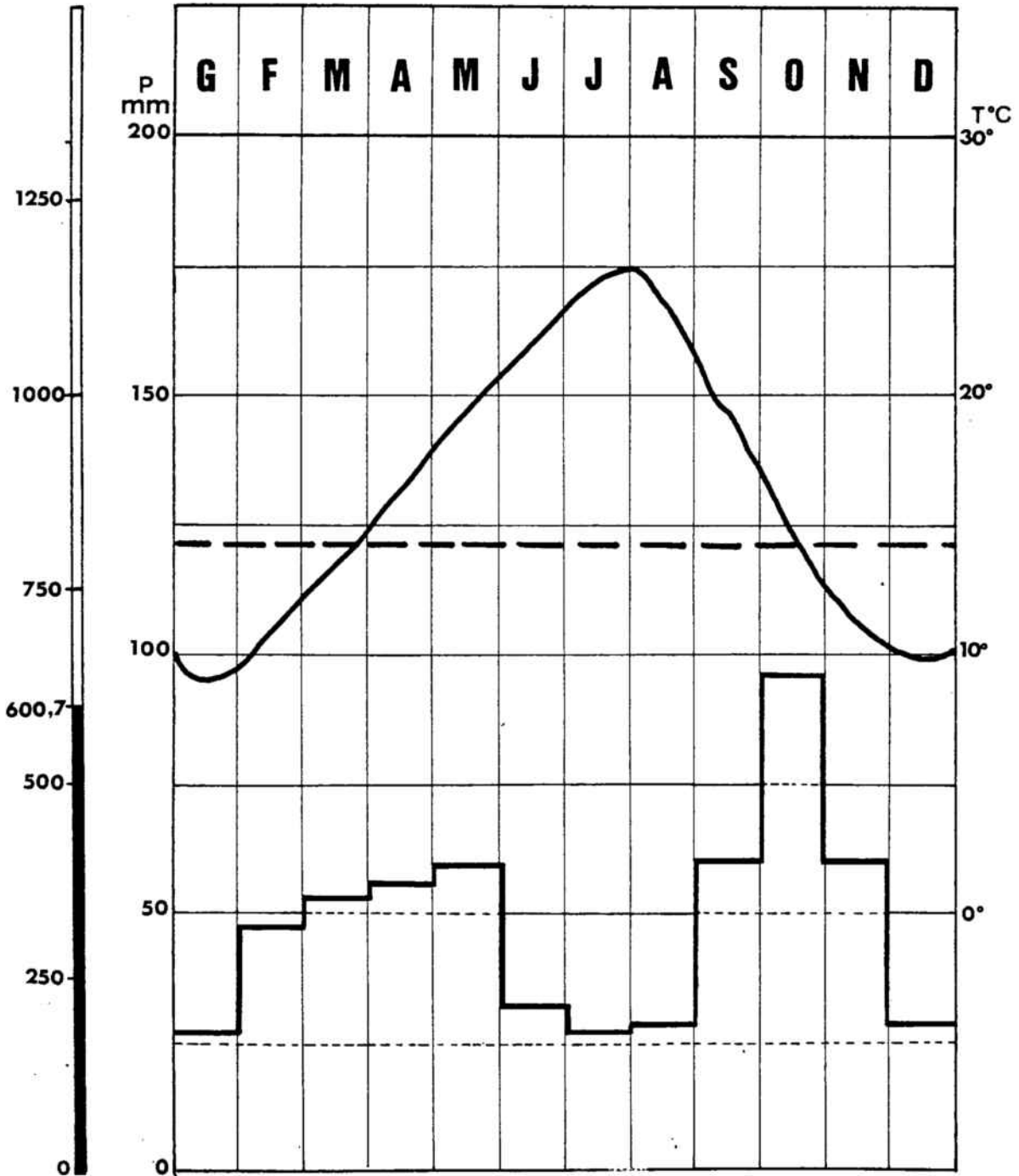
7.1.2.- A Barcelona.

7.1.2.1.- Situació geogràfica.

El sòl cultivat està situat als camps de cultiu de la Universitat de Barcelona, a la zona de Pedralbes.

7.1.2.2.- Climatologia i edafologia.

El clima de Barcelona és de tipus mediterrani litoral amb hiverns suaus i estius calorosos i secs. Les tempera-



PREGIP.
ANUALS

PLUVIOSITAT I TEMPERATURES : BARCELONA

tures mitjanes varien des de 5°C el mes de Gener a 28°C a l'Agost. La humitat mitjana és del 67-80% (98).

Les precipitacions oscil·len entre 400 i 700 mm. anuals, amb un màxim acusat al Setembre-Octubre i un màxim secundari de Març a Maig. Són característiques les precipitacions de gran intensitat momentànea. (Veure pàg.88).

Hi ha un règim regular de vents en el qual alternen els vents del Sud-Sud-oest(marinades) que són importants sobretot a l'estiu, i els del Nord, suaus i més importants a l'hivern. A més a més, hi ha vents esporàdics de llevant i de ponent que provoquen temporals (99).

Quant al tipus de sòl, està situat al replà superior del pla de Barcelona que està format per terrenys terciaris constituïts per argiles grogues pliocèniques que contenen alguns nivells de sorra en els que s'inclouen bons aqüífers. Sobre aquest sòl s'hi superposen dipòsits cíclics formats per argiles roges a la base, seguides de llims grocs i d'una crosta calcària a la part superior, que corresponen a les oscil·lacions climàtiques del quaternari (98, 99).

L'anàlisi del sòl cultivat ha estat realitzat a l'Institut de Biologia de Barcelona del C.S.I.C., en la Unitat d'Edafologia i Agrobiologia, i ha donat els següents resultats:

Grava -----	12,42%
pH actual(H ₂ O) -----	7,67
pH potencial(ClK)-----	6,69
Carboni -----	0,96%

Nitrogen -----	3755
Matèria orgànica -----	1,65%
Relació C/N -----	7,67
Carbonats(CO_3CA) -----	11,43%
P assimilable(P_2O_5) -----	842 p.p.m.
K assimilable(K_2O) -----	437 p.p.m.
Ca assimilable(CaO) -----	6100 p.p.m.
Mg assimilable(MgO) -----	380 p.p.m.
Salinitat R(1:2) -----	0,21 mmhos/cm.

El pH actual és de 7,67, per tant es tracta d'un sòl sensiblement bàsic.

No hi ha salinització ni acidificació, com ho indiquen les diferències de pH.

El valor ideal de la relació C/N és 10-11; en aquest cas és de 7,67 per la qual cosa convindria afegir C en forma de matèria orgànica, ja que no interessa disminuir la quantitat de nitrogen.

La matèria orgànica té un valor acceptable perquè passa d'1,5%. Es consideren valors molt baixos els inferiors a 1%, valors mitjans els compresos entre 1-2% i valors molt bons els superiors a un 3%.

Els carbonats tenen un valor d'11,43%, que no és elevat i per tant no es tracta d'un terreny calcari.

El valor normal del P assimilable oscil·la entre 200 i 300 p.p.m.; 842 p.p.m. és un valor massa elevat.

Els altres elements (K, Ca, i Mg) tenen valors mitjans acceptables.

Aquests resultats permeten arribar a la conclusió que es tracta d'un terreny no calcari, ric en N i P per causa d'adobs que s'havien aplicat anteriorment al cultiu de V. wallichii DC; per tant no és necessària l'addició de nous adobs.

7.1.2.3.- Evolució del cultiu.

Les plantes de Barcelona provenen d'esqueixos de plantes cultivades al delta de l'Ebre que es van plantar als camps de cultiu de la Universitat de Barcelona el mes de Maig de 1980 i dels que s'han anat fent successius esqueixos.

No s'ha aplicat cap adob ni tractament especial. En cap moment no s'ha observat la presència de nemàtodes, fongs i pugons causants de malalties.

Les plantes han presentat un bon aspecte fins després de l'estiu i també un bon desenvolupament de les arrels. No s'ha tallat la part aèria.

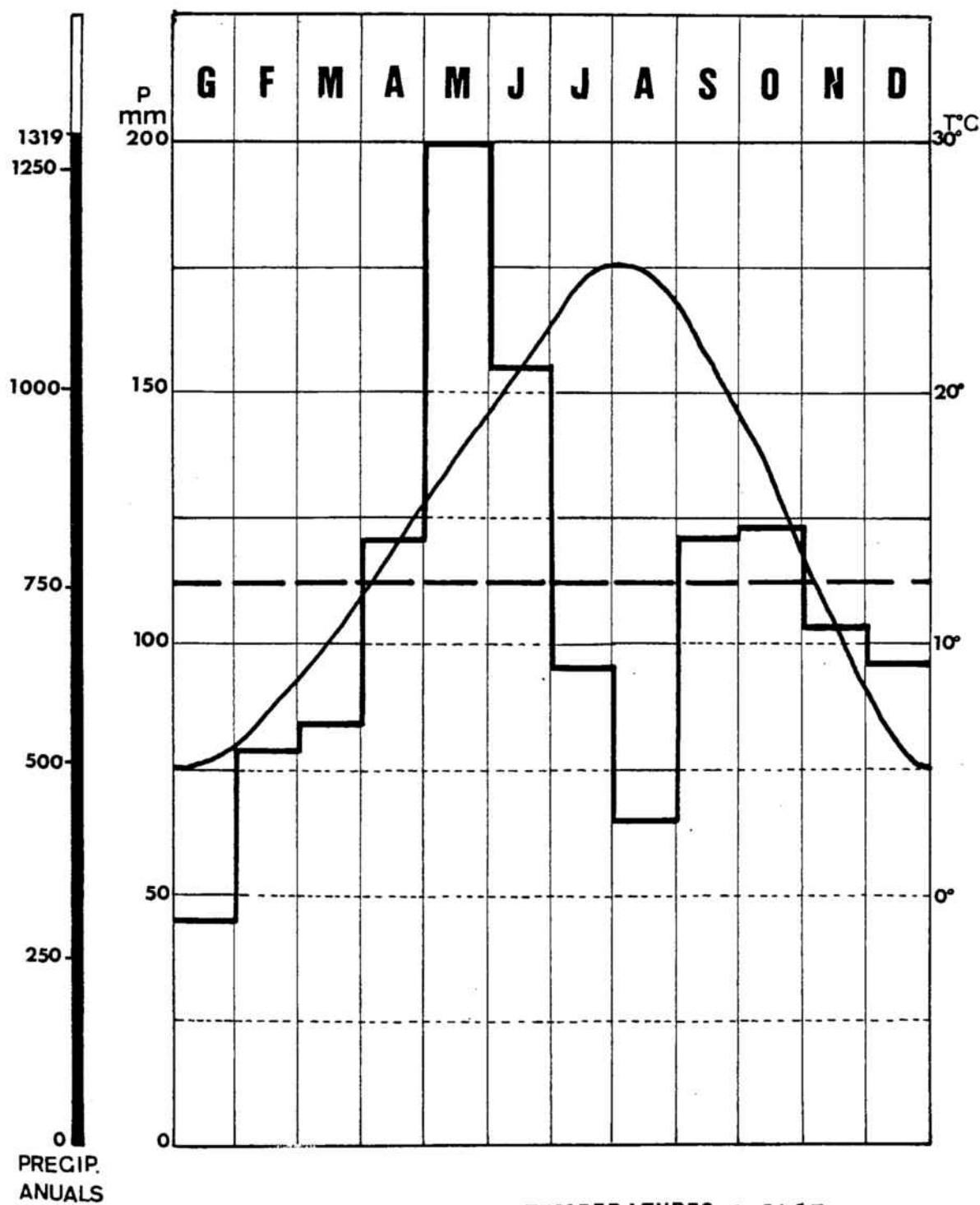
7.1.3.- A Sant Privat d'En Bas.

7.1.3.1.- Situació geogràfica.

Sant Privat d'En Bas es troba situat a la comarca gironina de la Garrotxa, a la plana d'En Bas, al Sud d'Olot. Aquesta plana és travessada en direcció Sud-Nord pel riu Fluvià; l'altitud mitjana és de 450 m. (68)

7.1.3.2.- Climatologia i edafologia.

El clima d'aquesta regió és temperat, de tipus mediterrani d'alta muntanya o submediterrani. Es caracteritza per l'ele-



vada humitat, ja que els relleus de les serralades condensen les humitats generalment d'origen mediterrani de tal manera que en aquesta regió arriben a caure més de 1000 mm. a l'any.

El màxim de pluja es produeix a la primavera i el mínim a l'hivern.

La plana d'Olot és un dels centres de màxima pluviositat i humitat atmosfèrica de Catalunya.

Les temperatures mitjanes oscil·len entre 4°C al Gener i 20°C al Juliol. Es registren temperatures inferiors a 0°C uns 59 dies a l'any. A l'estiu el clima és relativament fresc (98). (Veure pàg. 92).

La vegetació és de tipus submediterrani i en alguns llocs fins i tot atlàntic, amb predomini del bos caducifoli (rouredes i fagedes); a les zones volcàniques i de sòl més sec hi ha bosquets d'alzines. També hi ha pastoratges.

Els materials d'aquest sector (margues, gresos i conglomerats que es disposen en un sistema de "horsts" i fosses tectòniques) poc permeables, permeten una circulació superficial normal d'acord amb la pluviositat de la regió i la constitució de planes prou extenses per a l'establiment de conreus d'una certa importància fertilitzats pels productes dels volcans extingits (98).

L'anàlisi del sòl realitzada a l'Institut de Biologia de Barcelona del C.S.I.C., a la Unitat d'Edafologia i Agrobiologia ens ha proporcionat els resultats següents:

Grava -----	2,57%
pH actual (H_2O) -----	7,48
pH potencial (ClK) -----	6,74
Carboni -----	0,68%
Nitrogen -----	2437
Matèria orgànica -----	1,17%
Relació C/N -----	8,37
Carbonats (CO_3Ca) -----	11,02%
P assimilable (P_2O_5) -----	324 p.p.m.
K assimilable (K_2O) -----	151 p.p.m.
Ca assimilable (CaO) -----	5800 p.p.m.
Mg assimilable (MgO) -----	150 p.p.m.
Salinitat R (1:2) -----	0,20 mmhos/cm.

El pH actual té un valor de 7,48, que indica que es tracta d'un sòl sensiblement alcalí i amb tendència a mantenir aquesta característica, per tal com la diferència entre el pH actual i el pH potencial només és de 0,64. No hi ha salinització ni acidificació, com ho indiquen les diferències de pH.

La relació C/N és de 8,37; interessaria augmentar-la per la qual cosa s'hauria d'afegir C en forma de matèria orgànica. La matèria orgànica té un valor mitjà tirant a baix.

Els carbonats es troben en un 11,02% cosa que ens indica que no es tracta d'un terreny calcari.

El fòsfor té un valor normal. El potassi presenta un valor mitjà tirant a baix. El magnesi es troba en baixa proporció.

7.1.3.3.- Evolució del cultiu.

Les plantes cultivades a Sant Privat d'En Bas han estat esqueixos de Valeriana wallichii DC, procedents del delta de l'Ebre, plantats el mes d'Octubre de 1981

En aquest cultiu no s'ha aplicat cap adob ni tractament especial. Tampoc no s'ha observat en cap moment la presència de pugons o nemàtodes. Aquestes plantes han sigut les que han presentat un aspecte millor tant de la part aèria com de la subterrània. L'evolució del cultiu ha estat bona.

7.2.- Malalties fitoparasitàries.

Les malalties que es produeixen en els vegetals poden ésser degudes en part a les condicions climàtiques, en part als paràsits animals i en part a les males herbes.

La creixent intensificació de l'agricultura i la tendència cada cop més gran a monocultius afavoreixen l'aparició de malalties vegetals i plagues. Per això, s'apliquen mides fitosanitàries adequades destinades a protegir els cultius, evitant-se d'aquesta manera considerables pèrdues en la collita. Això suposa que s'han de conèixer les biologies dels paràsits causants de les malalties.

7.2.1.- Anàlisi de les plantes parasitades.

En el cas de la Valeriana wallichii DC cultivada al delta de l'Ebre, es va observar la presència de pugons (Doralis fabae i Myzodes persicae) en les flors i tiges de les flors; a més, es produïren una sèrie de símptomes externs com

per exemple:desenvolupament retardat de les plantes,fulles amb petits punts negres i algunes plantes mortes,que ens feren pensar en la possible presència d'un altre tipus de paràsit com podien ésser fongs,nemàtodes o virus.

En arrencar unes quantes plantes es podia observar que les arrels eren més petites del compte,no presentaven la típica cabellera sinó que estaven poc ramificades i moltes d'elles tenien uns engruiximents,en alguns cassos més grans i en altres no tant,que ,com vàrem poder comprovar en analitzar les arrels,eren quists de nemàtodes.

Per aquest motiu,en un capítol a part,hem fet un petit estudi dels principals paràsits que han afectat a V.walli-
chii DC,per conèixer millor de quina manera ataquen a la planta,en quines condicions i què es pot fer per a prevenir-los o combatre'ls si és possible.

Les anàlisis de les fulles (realitzades en la Càtedra de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i en el Laboratori de Diagnòstic del Servei de Protecció dels Vegetals del Departament d'Agricultura,Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya) i de les arrels i part aèria (realitzades en la Divisió Fitosanitària de Bayer Hispània Comercial S.A.) de V.wallichii DC del delta de l'Ebre proporcionaren els resultats següents:

- Identificació de fongs en les fulles :

. Flora majoritària : G.Alternaria

G.Fusarium

. Altres gèneres detectats : G.Meliola

G.Phyllosticta

G.Cladosporium

G.Aspergillus

- Identificació de nemàtodes en les arrels i en la terra cultivada :

Quantitat de mostra analitzada : 50 g. de planta
100 g. de terra

Resultats:

<u>Gènere</u>	<u>Quantitat</u>
<u>Meloidogyne</u> -----	75
<u>Tylenchus</u> -----	60
<u>Ditylenchus</u> -----	14
<u>Aphelenchus</u> -----	90

Són de remarcar pel perill que comporten, el G.Meloidogyne i el G.Ditylenchus, encara que no es coneixen els llinars màxim i mínim pel cultiu de Valeriana.

A la vista dels resultats obtinguts i per evitar possibles plagues de nemàtodes es feren, també, anàlisis de les plantes cultivades a Barcelona i a Sant Privat d'En Bas que donaren els resultats següents :

A) Mostra : V.wallichii DC cultivada a Barcelona.

Quantitat analitzada : 80 g. d'arrels, 80 g. de fulles i 100 c.c. de terra.

Resultats :

<u>Gènere</u>	<u>Quantitat</u>
<u>Paratylenchus</u> -----	2040
<u>Helicotylenchus</u> -----	180
<u>Tylenchus</u> -----	60
<u>Aphelenchus</u> -----	90

La població de Paratylenchus podria ésser important si es tractés d'una planta de la família de les Umbel.lí-feres o de les Crucíferes. Les altres poblacions són baixes i no tenen importància. En l'anàlisi de les fulles no s'ha trobat cap nemàtode. No s'han trobat nemàtodes dels gèneres Meloidogyne ni Ditylenchus que són dels més perillosos.

B) Mostra : V.wallichii DC cultivada a Sant Privat d'En Bas.

Quantitat analitzada : 17 g. d'arrels i 27 g. de fulles.

Resultats :

<u>Gènere</u>	<u>Quantitat</u>
<u>Pratylenchus</u> -----	30

Pratylenchus pot resultar perillós per a diverses plantes; no sabem si ataca o no la Valeriana, però en aquest cas el dany seria molt petit perquè està en nombre molt baix. En l'anàlisi de les fulles no s'ha trobat cap nemàtode.

Com a conseqüència dels resultats de les tres anàlisis i per l'aspecte i evolució dels cultius, es pot deduir que les plantes més sanes i vigoroses són les de Barcelona i

Sant Privat d'En Bas.

7.2.2.- Fongs.

Secundàriament a l'atac de nemàtodes i pugons es poden produir en els cultius malalties degudes a fongs, els quals es classifiquen com a vegetals inferiors pel seu petit tamany i per no tenir clorofil·la; això els impedeix d'assimilar els hidrats de carboni de tal manera que s'han de nodrir a partir de les substàncies elaborades per la planta hoste.

En el moment de plantejar-se la lluita contra els fongs cal considerar si són endoparàsits o ectoparàsits, ja que segons es tracti d'uns o altres s'aplicaran productes criptogàmicides o fungicides. Els primers només prevenen invasions per fongs endoparàsits, mentre que els segons permeten tant prevenir com combatre els fongs ectoparàsits en qualsevol fase del seu desenvolupament.

D'entre els fongs que s'han trobat en V.wallichii DC del delta de l'Ebre, el G.Fusarium és el més perillós. Els fongs d'aquest gènere pertanyen a la classe dels Ascomicets i es caracteritzen per tenir un esporodoqui o tubercle constituït per hifes entrecreuades al final de les quals hi ha els conidis que són fusiformes.

Algunes espècies són molt perilloses per a plantes herbàcies cultivades. En general, penetren des del sòl a l'arrel a través de ferides (produïdes sobretot per nemàtodes, picades d'insectes, etc...) i passen ràpidament a la part llenyosa; parasiten els vasos de la base de la tija, els conidis penetren als teixits intercel·lulars del coll de l'arrel i

això fa que s'assequi i es podreixi aquesta part de la planta, que es deturi el seu desenvolupament i fins i tot que es mori.

Si es tallen les tiges o les arrels es pot observar que la part llenyosa s'ha tornat fosca; això s'ha pogut comprovar en les Valerianes del delta de l'Ebre.

La fusariosis es produeix amb freqüència quan el temps és humit i en terrenys semipesats o pesats amb un contingut relativament elevat en nitrogen. La temperatura òptima és de 30°C. Pot arribar a produir pèrdues superiors al 5% de la collita total.

La lluita contra aquests fongs és difícil si no s'ha desinfectat el sòl prèviament o no s'ha alternat el cultiu durant un cert temps. Es pot aconseguir una certa eficàcia polvoritzant criptogamicides per la superfície del sòl o afegint-los a l'aigua de regar. Convé arrancar ràpidament les plantes malaltes, cremar-les i desinfectar els esqueixos.

Es pot disminuir l'atac per Fusarium adobant el terreny amb sals potàssiques (17,61).

Els gèneres Alternaria, Phyllosticta i Cladosporium produeixen l'aparició de taques de diferent morfologia en les fulles. En general, les temperatures elevades i una humitat suficient afavoreixen l'aparició dels fongs.

7.2.3.- Pugons.

Els pugons s'inclouen dins dels enemics més perillosos de la part aèria dels vegetals per tal com constitueixen una plaga directa per la seva activitat xucladora i són

transmissors de virus.

A causa de l'activitat xucladora, els pugons treuen a les plantes les principals matèries d'assimilació i els injecten al mateix temps una substància tòxica que provoca deformacions dels òrgans vegetals. Les plantes afectades queden poblades secundàriament per fongs que formen cobertes negres (fumagina negra).

En els cultius de V. wallichii DC del delta de l'Ebre es trobaren les espècies Myzodes persicae (pugó verd del presseguer) i Doralis fabae (pugó negre de les fabes) en les flors i tiges florals. El clima sec i càlid intensifica molt la multiplicació i disseminació d'aquests animals i les plantes no poden compensar l'enorme pèrdua de saba.

La lluita contra els pugons s'ha d'iniciar al detectar les primeres colònies als marges dels camps i cal repetir el tractament quan es produeixin noves invasions. Es pot fer un tractament durant l'hivern i un altre a l'estiu:

- Tractament d'hivern : Consisteix a destruir els ous dels pugons. Hi ha productes que permeten tant la destrucció dels ous com la de larves ja nascudes i la d'adults.

- Tractament d'estiu : Va dirigit contra els pugons que més tard immigren volant (17).

Tant Myzodes persicae com Doralis fabae constitueixen importants vehicles de propagació de malalties produïdes per virus, les quals originen l'aparició de zones cloròtiques en el limbe i fan difícil la fotosíntesi i l'assimilació de substàncies nutritives i produeixen la consegüent necrosi de tiges i fulles, la detenció del desenvolupament,

taques, etc... Per a prevenir les infeccions per virus s'hauria d'alternar els cultius amb altres espècies més resistents, cremar les plantes malaltes i, sobretot, combatre els pugons vectors en la primera aparició amb insecticides adequats (17).

7.2.4.- Nemàtodes.

7.2.4.1.- Espècies detectades.

En els últims anys s'ha produït un augment de les plagues de nemàtodes en els cultius degut, principalment, a :

- una millora en les condicions de creixement de les plantes cultivades que millora també les dels nemàtodes.
- una intensificació de l'agricultura : la mecanització i racionalització de l'agricultura moderna han exigít una rotació dels cultius cada vegada més estreta i moltes vegades fins passar al cultiu repetit d'una mateixa espècie.

Com a conseqüència, es fa cada vegada més necessària la desinfecció del sòl contra nemàtodes per a obtenir bons rendiments dels cultius, de tal manera que moltes vegades no se'n pot prescindir.

L'atac de nemàtodes a les arrels del blat de moro pot arribar a produir pèrdues en la collita de l'ordre del 40%.

Els nemàtodes fitoparasitaris es caracteritzen perquè tenen un estilet bucal amb el qual perforen les parets de les cèl·lules vegetals. Són molt resistents, poden viure en condicions adverses i són capaços d'enquistar-se fins i

tot durant 20 anys.

Els components de la secreció salival de moltes espècies de nemàtodes fitoparasitaris permeten la digestió extra-oral del contigut de la cèl.lula vegetal perforada amb l'estilet. A més, mitjançant auxines, obliguen la planta a formar cèl.lules gegants (agalles) o vertaders teixits que després utilitzen per a alimentar-se (8 9).

Els nemàtodes més perillosos que hem trobat en el cultiu de V.wallichii DC pertanyen al gènere Ditylenchus i al gènere Meloidogyne.

Els nemàtodes del gènere Ditylenchus s'inclouen en el grup d'endoparàsits de fulla i tija. Solen afectar a plantes amb bulb i al blat de moro. El seu cicle dura d'uns 25 a 30 dies. No formen quists però es poden mantenir en forma de larva durant diversos anys en el terra. Ataquen, principalment, els teixits primaris de la tija i produeixen deformació de les fulles i fan que els bulbs es tornin esponjosos i es podreixin (8 9).

El gènere Meloidogyne inclou nemàtodes que són endoparàsits sedentaris de les arrels. Es caracteritza per a produir engruiximents nous en les arrels de les plantes. Les larves penetren en l'arrel i s'alimenten de saba cel.lular dificultant l'absorció d'aliment i aigua a les plantes, les quals reaccionen formant les agalles en les que té lloc el desenvolupament i la multiplicació dels nemàtodes. En condicions normals el seu cicle dura 25 dies. Per cada femella maduren centenars de petits ous dels que surten al cap de poc temps els nemàtodes joves, els quals ataquen, en la ma-

teixa planta, les arrels que encara estan sanes, o bé segueixen alimentant-se de l'agalla ja existent que, llavors, es fa més gran.

La reacció és diferent segons la planta atacada, per exemple : en mongetes, tomàquet i cucurbitàcies pot ésser molt gran, mentre que a la vinya sòl ésser quasi nul·la. Com a conseqüència de l'atac, les plantes creixen poc i les fulles presenten de vegades un color groguenc i poden caure prematurament, com ha succeït en V.wallichii DC del delta de l'Ebre.

La formació de les agalles només té lloc quan hi ha temperatures superiors als 25°C durant un temps prolongat (17,89).

Els danys que s'han observat en el cultiu de V.wallichii DC produïts pels nemàtodes han estat:

- a) Part aèria : Necrosi i debilitament, deformacions, nanisme, taques a les fulles i lesions.
- b) Part subterrània : Agalles en les arrels, podriment, necrosis epidèrmiques i altres lesions, arrels poc desenvolupades, deformacions.

Però, a més a més, també produeixen danys fisiològics, com per exemple Meloidogyne que dificulta l'absorció d'aigua i de potassi.

És important, també, el fet que aquests nemàtodes poden transportar malalties; així :

<u>Fusarium</u>	-----	<u>Meloidogyne</u>
<u>Verticillium</u>	-----	<u>Pratylenchus</u>
<u>Phytophthora</u>	-----	<u>Meloidogyne</u>

<u>Pythium</u> -----	<u>Meloidogyne</u>
<u>Bacteris</u>	<u>Aphelenchoides</u>
	<u>Ditylenchus</u>

entre altres (8 9).

En la taula següent s'exposen els principals factors ambientals que influeixen en el desenvolupament dels nemàtodes, als que s'ha d'afegir l'humitat del terra.

<u>Nemàtode</u>	<u>T òptima del sòl</u>	<u>T inhibi- dora baixa</u>	<u>T inhibi- dora alta</u>
<u>Meloidogyne</u>	28°C	16°C	40°C
<u>Ditylenchus</u>	12°C	1°C	-

	<u>pH òptim</u>
<u>Meloidogyne</u>	4(6,5)8,5
<u>Ditylenchus</u>	-

7.2.4.2.- Tractament de les plantes infestades.

Els millors preparats de què es disposa avui dia per lluitar contra els nemàtodes són els nematicides hidrosolubles de propietats sistèmiques i de contacte, d'ampli espectre d'acció, ja que tenen un millor grau d'eficàcia i controlen tant els nemàtodes del sòl com els que ja han penetrat a les arrels.

En els cultius del delta de l'Ebre hem utilitzat el producte Nemacur^R de Bayer A.G. que té les característiques exposades.

Nemacur^R és un nematicida fosforat efectiu en el control de nemàtodes que formen agalles i quists en les arrels, endoparàsits i ectoparàsits, actuant secundàriament sobre insectes xupadors (per exemple : *Doralis fabae*) i àcars.

Té una bona fitocompatibilitat ja que es pot aplicar tant en el moment de la sembra com abans, o durant el trasplant, o en cultius ja existents.

Penetra en el sòl més lentament que la majoria de nematicides fumigants; això, però, no és cap inconvenient per a l'eficàcia sinó tot el contrari, ja que així els nemàtodes estan més temps en contacte amb la matèria activa i segons el principi :

$$\text{Concentració} \times \text{Temps d'exposició} = \text{Constant}$$

resulta que la concentració de substància activa per a obtenir un bon efecte pot ésser molt insignificant; això, suposa una despesa menor. La seva acció dura diversos mesos.

Ha estat utilitzat amb anterioritat en la remolatxa, plantes ornamentals, cereals i verdures i ha produït augments notables en les collites (57).

Per tot això hem considerat que podria ésser efectiu en el cas de V. wallichii DC. S'ha fet un assaig per a trobar la dosi més efectiva, per la qual cosa s'han considerat quatre parcel·les del cultiu de 50 m² cada una : una de testimoni, i tres més en les que s'ha aplicat el Nemacur^R a les dosis de 0,5 l/ha., 1,0 l/ha. i 1,5 l/ha. respectivament. Els resultats obtinguts han estat els següents :

DOSI	Quantitat inicial de plantes 4-8-82		Quantitat primer 17-8-82		Quantitat després del tractament 26-8-82	
	nº de plantes	%	nº de plantes	%	nº de plantes	%
0 l/ha	126	100	51	41	32	25
0,5 l/ha.	162	100	71	44	35	22
1,0 l/ha.	93	100	47	51	31	33
1,5 l/ha.	169	100	75	44	46	27

Sembla, per tant, que el millor resultat s'obté amb la dosi d'1,0 l/ha., tractament amb el que encara viuen $\frac{1}{3}$ de les plantes. A les altres dosis viuen, aproximadament, $\frac{1}{4}$ de les plantes inicials.



.ARRELS AMB QUISTS
DE NEMATODES

8.- ESTUDI DELS VALEPOTRIATS DELS DIFERENTS CULTIUS DE V.wallichii DC.

8.1.- Extracció.

En primer lloc, hem fet una extracció dels valepotriats de V.wallichii DC segons THIES (116) :

En un percolador de 250 ml. es posen 60,0 g. d'arrels i rizomes, dessecats i triturats, junt amb 90 ml. d'acetat d'etil amb un 1% d'àcid acètic glacial. Es deixa en maceració 24 hores i després s'inicia la percolació afegint durant dos dies líquid de percolació fins arribar a obtenir 190 ml. de percolat total. La velocitat de goteig és de 30 gotes/min. El líquid obtingut és de color marró-grogós i transparent. Aquest líquid es renta, en un embut de decantació, 2-3 vegades amb una solució de NaHCO_3 al 3% i després amb NaCl al 5%, per a eliminar l'àcid que hi ha en el líquid de percolació. S'asseca amb Na_2SO_4 anhidre i s'eliminen les impureses amb carbó vegetal. Després es concentra fins a pes constant al rotavapor a 30°C ; amb això, s'obté una substància viscosa de color marró. Aquest producte es dissol en 18 ml. d'àcid acètic al 90% a 10°C , i s'extrau 3 vegades amb 5 ml., cada vegada, d'èter de petroli saturat amb àcid acètic al 90%; es menyspreen les fases etèries.

La fase acètica es dilueix en 45 volums d'aigua i s'extrau 6 vegades amb 15 ml. d'èter de petroli, cada vegada. Les fases etèries reunides es renten 2-3 vegades amb una solució de NaOH al 0,25%, s'assequen sobre SO_4Na_2 anhidre i s'aclaren amb carbó vegetal. Finalment, es concentra fins

a pes constant al rotavapor a 30°C. D'aquesta manera s'obté un oli purificat de color groc clar que té els esters de l'àcid isovaleriànic, com ho demostrà la corresponent cromatografia en capa fina en el sistema hexà : etilmetilcetona (8:2) i revelant amb 2,4-dinitrofenilhidrazina clorhídrica. De totes les solucions que es llencen en aquest mètode hem fet cromatografies en capa fina per a comprovar que no es perden valepotriats en algun pas. No s'ha trobat que hi hagués pèrdues en cap d'ells.

A causa de la descomposició dels valepotriats en medi àcid, que ha donat lloc a l'obtenció d'una quantitat d'extracte molt petita, i que és un procés llarg que necessita gran quantitat de droga, no és adequat per a fer una valoració quantitativa i rutinària de diferents mostres.

Com que la percolació i l'extracció per Soxhlet donen un rendiment similar i tampoc no s'observen grans diferències entre aquesta última i la maceració, hem utilitzat en les nostres anàlisis una extracció per maceració amb acetat d'etil.

8.2.- Identificació.

Hi ha mètodes que consisteixen en microextraccions per a fer proves d'identificació dels valepotriats.

Per a fer un test ràpid dels valepotriats cromògens de les diverses Valerianes de diferent procedència, hem seguit la tècnica d'STAHL (102) :

0,4 g. d'arrels i rizomes dessecats i polvoritzats de V.wallichii DC de Barcelona, Sant Privat d'En Bas i delta

de l'Ebre, es posen en tres tubs diferents. A cada un s'afegeixen 10 ml. de diclorometà i durant 5 min. s'agiten amb freqüència. Després es filtren i el filtrat es concentra al buit, aproximadament a uns 50°C, fins a un volum de 0,4 ml.

Per l'examen dels valepotriats cromògens, s'agafen 0,1 ml. de la solució anterior i s'hi afegeixen 3 ml. d'una barreja a parts iguals d'àcid acètic i àcid clorhídric al 25%. Passats 5 min., aproximadament, la solució es colora de blau, cosa que demostra la presència de valepotriats en aquestes plantes.

8.3.- Cromatografia en capa fina.

S'ha utilitzat com a suport Silicagel F₂₅₄ (Merck) i diversos sistemes d'eluent:

- I.- Hexà : Etilmetilcetona (8:2) (101,102).
- II.- Hexà : Acetat d'etil (8:2) (78).
- III.- Toluè : Acetat d'etil : Etilmetilcetona (80:15:5) (45).

Quan el front d'elució ha arribat a l'altura precisa les plaques es treuen de la cubeta, es deixen assecat i després s'observen a la llum UV a 254 nm. Es veuen taques blaves sobre fons verd corresponents als valepotriats amb dobles enllaços conjugats, és a dir, cromògens (valtrat, acevaltrat, isovaltrat, homovaltrat, ...), mentre que el diidrovaltrat i altres que no tenen propietats cromògenes no es veuen si no es revelen.

El revelador que hem utilitzat per la bona visualitza-

ció aconseguida dels valepotriats és la 2,4-dinitrofenilhidrazina clorhídrica que es prepara de la següent manera:

0,2 g. de 2,4-dinitrofenilhidrazina es dissolen en 20 ml. de metanol i s'afegeixen 40 ml. d'àcid acètic glacial i 40 ml. d'àcid clorhídric al 25%. És de preparació extemporània.

Per tant, un cop observades les plaques a la llum UV a 254 nm. es polvoritzen amb el reactiu citat i es posen a l'estufa a 110°C durant 5-10 min. Amb això, el valtrat i l'acevaltrat apareixen de color blau-gris, l'IVDH-valtrat blau i el didrovaltrat de color ocre. L'aparició de color blau indica la presència d'un -OH en C₅ o d'un anell d'epòxid(117).

Com que no hem disposat de patró de valtrat pur hem fet també cromatografia en capa fina de l'extracte de Valmane^R (barreja de valepotriats purs de V.wallichii DC que té un 80% de didrovaltrat, 15% de valtrat i 5% d'acevaltrat). L'extracció es fa de la següent manera (78) :

Una pastilla de Valmane^R finament polvoritzada es dissol en 10 ml. de diclorometà agitant durant 5 min. Després es filtra i s'aclareix dos vegades el filtre amb 5 ml. de diclorometà. Les solucions obtingudes es concentren a temperatura ambient fins a 5 ml. D'aquesta manera ja es pot emprar per a fer cromatografia en capa fina.

. Preparació de la solució de referència (101):

Es dissolen 10 mg. de vainillina en 10 microlitres (0,01 ml.) d'anisaldehid i s'afegeixen 10 ml. de metanol.

L'extracte obtingut per percolació segons THIES (116) es dissol en metanol i es fan cromatografies en capa fina en els diferents sistemes d'eluent, junt amb els patrons dels valepotriats i amb la solució de referència.

Sistema I : desenvolupament de 10 cm.

Sistema II : desenvolupament de 13 cm.

Sistema III : desenvolupament de 15 cm.

Dels tres sistemes sembla que el que va millor és el toluè : acetat d'etil : etilmetilcetona (80:15:5), amb el qual s'aconsegueix una bona separació dels valepotriats.

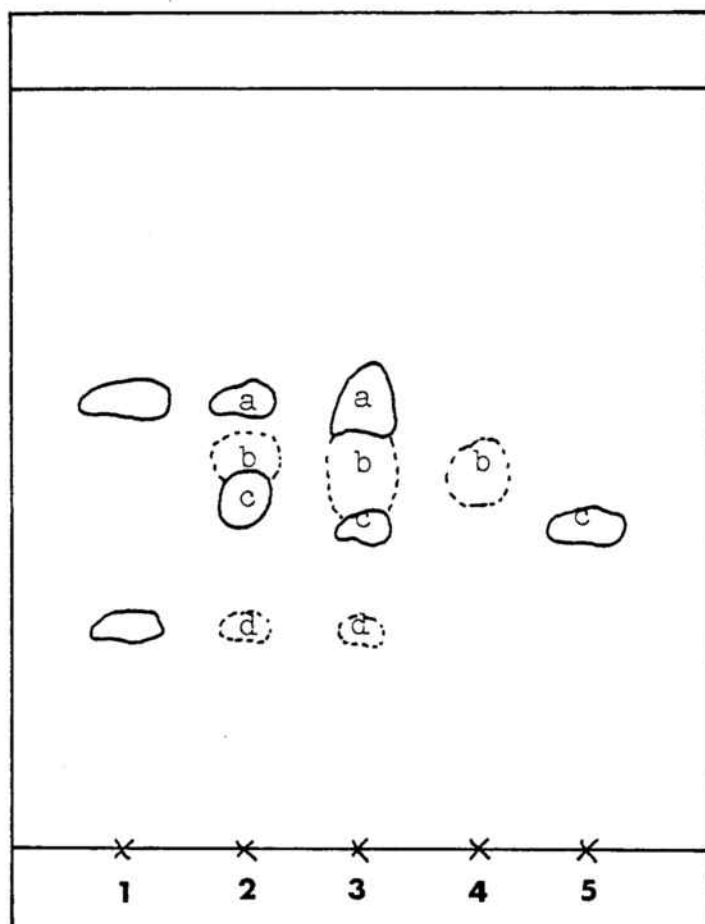
La solució de referència dóna lloc a dos taques : la corresponent a la vainillina, que en el sistema I té $0,2 < R_f < 0,3$ i la corresponent a l'anisaldehid, que té $0,5 < R_f < 0,6$ en el sistema I.

Amb el sistema I s'aconsegueix una bona separació de la fracció valtrat, didrovaltrat i acevaltrat però no dels isòmers i homòlegs, cosa que si que s'aconsegueix amb els sistemes II i III, sobretot dels de la fracció valtrat. També s'observa que la fracció valtrat es separa millor de la fracció didrovaltrat en el sistema II que a l'I. A II i III la fracció valtrat apareix dividida en dos o més taques mentre que en I només n'hi ha una.

A continuació s'exposen els resultats obtinguts en cada un dels sistemes.

SISTEMA I : Hexà:Etilmetilcetona (8:2).

- 1.- Solució de referència.
- 2.- Extracte de V.wallichii DC.
- 3.- Extracte de Valmane^R.
- 4.- Didrovaltrat patró.
- 5.- Acevaltrat patró.



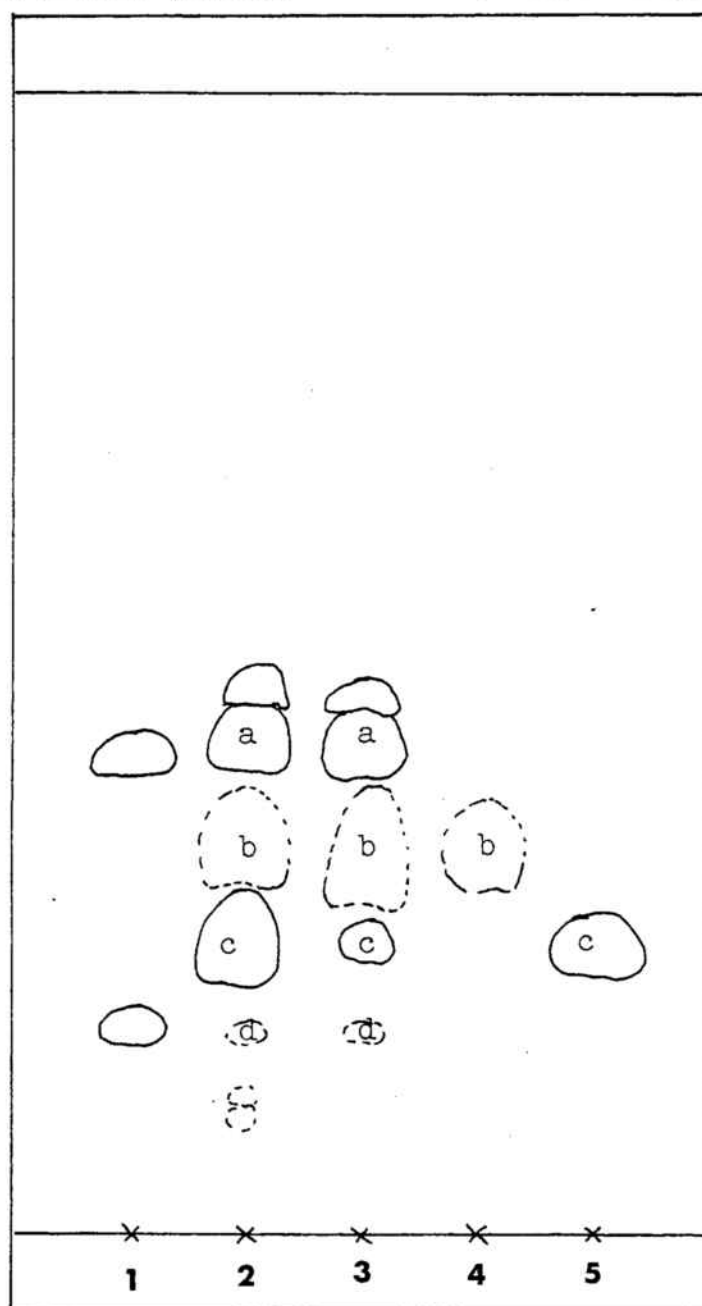
- a - Valtrat $R_f=0,50$
 b - Didrovaltrat $R_f=0,46$
 c - Acevaltrat $R_f=0,38$
 d - IVDH-valtrat $R_f=0,22$

—— taques visibles a la llum UV a 254 nm. sense revelar.

----- taques visibles després de revelar.

SISTEMA II : Hexà:Acetat d'etil (8:2)

- 1.- Solució de referència.
- 2.- Extracte de V.wallichii DC.
- 3.- Extracte de Valmane^R.
- 4.- Didrovaltrat patró.
- 5.- Acevaltrat patró.



a - Valtrat $R_f=0,43$

c - Acevaltrat $R_f=0,25$

b - Didrovaltrat $R_f=0,33$

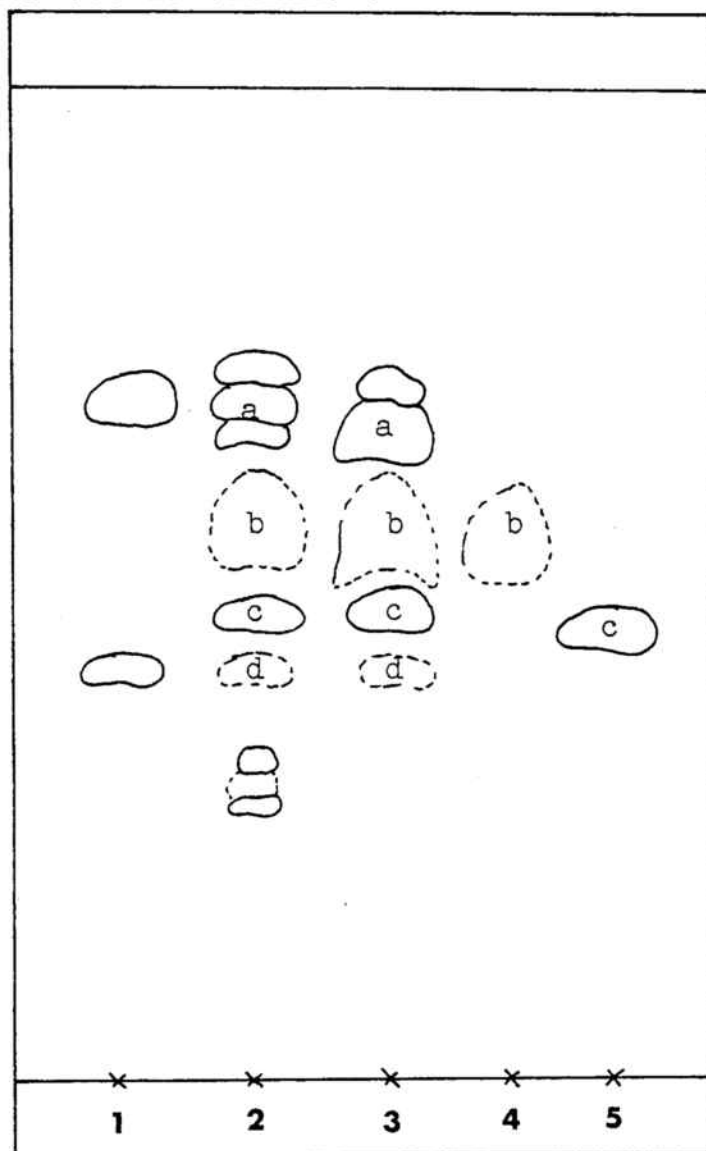
d - IVDH-valtrat $R_f=0,10$

— taques visibles a la llum UV a 254 nm. sense revelar.

----- taques visibles després de revelar.

SISTEMA III : Toluè:Acetat d'etil:Etilmetilcetona
(80:15:5)

- | | |
|--|-------------------------|
| 1.- Solució de referència. | 4.- Didrovaltrat patró. |
| 2.- Extracte de <u>V.wallichii</u> DC. | 5.- Acevaltrat patró. |
| 3.- Extracte de Valmane ^R . | |



a - Valtrat $R_f=0,69$

c - Acevaltrat $R_f=0,53$

b - Didrovaltrat $R_f=0,60$

d IVDH-valtrat $R_f=0,42$

—— taques visibles a la llum UV a 254 nm. sense revelar.

----- taques visibles després de revelar.

8.4.- Cromatografia en columna.

Quant a la cromatografia en columna, s'ha seguit la tècnica de THIES (116) amb petites modificacions:

En un vas de precipitats es posen 5 g. d'òxid d'alumini d'activitat I segons BROCKMANN i es sedimenten en una barreja de 4 ml. d'acetona i 0,2 ml. d'àcid propiònic. Es produeix un augment de temperatura.

Quan ja ha disminuït la temperatura, es llença el sobrenedant, es dissol l'òxid d'alumini sedimentat en la mínima quantitat d'hexà necessària i es posa en una columna de 25 mm. de diàmetre; s'obre la clau i es deixa passar l'hexà per a rentar.

L'oli purificat, obtingut en l'extracció, es dissol en 5 ml. d'hexà i es posa en la columna. L'elució del valtrat i del didrovaltrat es fa amb hexà. Per a l'elució de l'acevaltrat s'afegeix un 10% d'acetona a l'hexà.

El control de l'elució es fa per cromatografia en capa fina de cada una de les fraccions recollides, en el sistema hexà : acetat d'etil : etilmetilcetona (80:15:5) i revelant amb 2,4-dinitrofenilhidrazina clorhídrica.

Per aquest mètode i recollint fraccions de 2 ml., hem aconseguit separar valtrat pur en les fraccions 4, 5, 6, 7, 8 i 9. En les següents fraccions hem obtingut una barreja de tots els valepotriats (valtrat, acevaltrat, didrovaltrat i IVDH-valtrat).

Donada la petita altura del rebliment de la columna, vam pensar que potser era aquesta la causa que no s'aconsegüís una bona separació dels valepotriats. Per això, es repe-

tí la cromatografia en columna però posant-hi 25 g. d'òxid d'alumini sedimentats en 24 ml. d'acetona i 1,2 ml. d'àcid propiònic. Les fraccions recollides, en aquest cas, eren d'1 ml. No s'obtingué res fins a la fracció 71, a partir de la qual aparegué una barreja tant de valepotriats com de compostos no identificats, probablement productes de la degradació dels valepotriats.

Un altre extracte, obtingut pel mateix mètode, es cromatografià en una columna de 16 mm. de diàmetre que contenia 15 g. d'òxid d'alumini prèviament sedimentats en 18 ml. d'acetona i 0,9 ml. d'àcid propiònic i rentats amb hexà. Tampoc no s'obtingueren els resultats esperats.

La conclusió que podríem treure d'això és que l'extracte que conté la barreja de valepotriats purs, sofreix una degradació durant la cromatografia si aquesta dura dos o més dies; per tant, per evitar-ho, s'hauria d'escurçar el temps de l'anàlisi qualitativa reduint l'altura de la columna, sempre que això no interfereixi en una bona separació dels valepotriats.

Per aquest motiu, sembla que la cromatografia en columna és adequada en el cas de disposar d'una gran quantitat d'extracte, de manera que, encara que una part es degradi durant el procés d'elució, al final s'obtenen fraccions que contenen els valepotriats purs i separats.

Com que un dels objectius d'aquest treball és trobar un mètode senzill i ràpid d'anàlisi dels valepotriats, la cromatografia en columna no ens serveix.

8.5.- Cromatografia líquida d'alta resolució.

Com que els monoens (didrovaltrats) i els diens (valtrats i acevaltrats) presenten màxims d'absorció a l'UV a diferents longituds d'ona (aproximadament a 206 ò 256 nm.), l'anàlisi ha d'efectuar-se en dues parts. (Veure pag. 121 i 122).

L'ordre d'elució dels valepotriats és el següent:

- 206 nm. :

Didrovaltrats

Didrovaltrat

IVDH-valtrat

Homodidrovaltrat

-256 nm. :

Acevaltrats

Acevaltrat

Homoacevaltrat

1 α -acevaltrat

Valtrats

Isovaltrat

Valtrat

Homovaltrat

Com que no hem pogut disposar de patrons de tots aquests valepotriats, només s'han determinat els valepotriats principals : didrovaltrat, valtrat i acevaltrat, però no altres isòmers ni homòlegs, encara que, com es pot apreciar en els cromatogra es representa també una fracció important del conjunt de tots els valepotriats, sobretot els que es

determinen a 256 nm.

Els patrons que hem emprat, proporcionats per Kali-Chemie Pharma (Hannover), són :

.Didrovaltrat

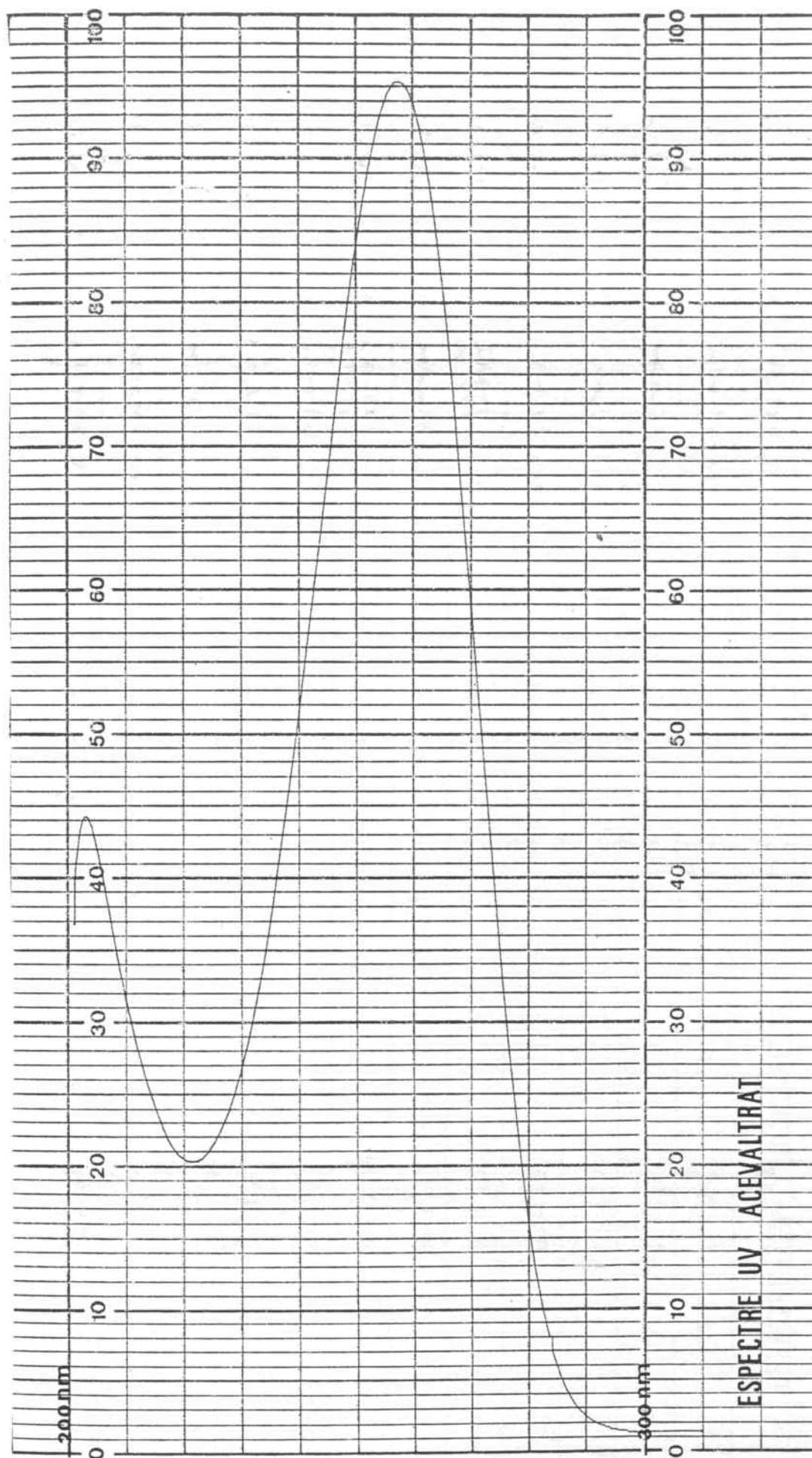
.Acevaltrat

.Barreja de valepotriats, d'un 88,1% de puresa amb la següent composició ,determinada per cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR) :

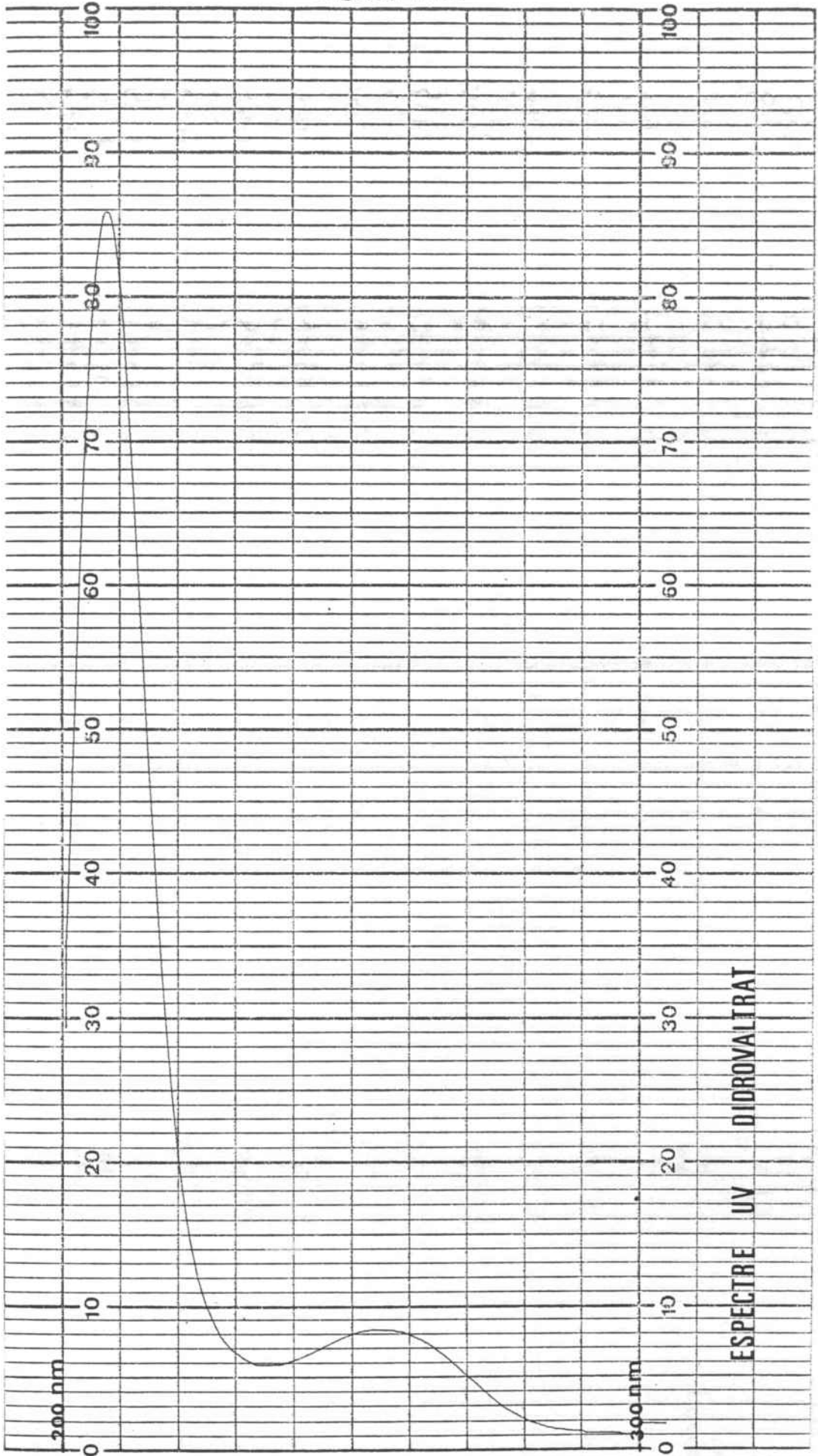
Didrovaltrat -----	54,7%
Homodidrovaltrat -----	18,6%
Acevaltrat -----	4,00%
1 α -acevaltrat -----	0,45%
Isovaltrat -----	1,53%
Valtrat -----	5,75%
Homovaltrat -----	3,13%

Aquest darrer patró, com que els principals components que té, d'entre els que es detecten a 256 nm., són l'acevaltrat i el valtrat, l'hem utilitzat per a fer les solucions patró i les rectes de regressió d'aquests dos valepotriats, de manera que analitzant una solució d'aquest producte, primer sense afegir-hi acevaltrat i després afegint-ne, hem pogut identificar el pic corresponent a l'acevaltrat i, per deducció, el corresponent al valtrat.

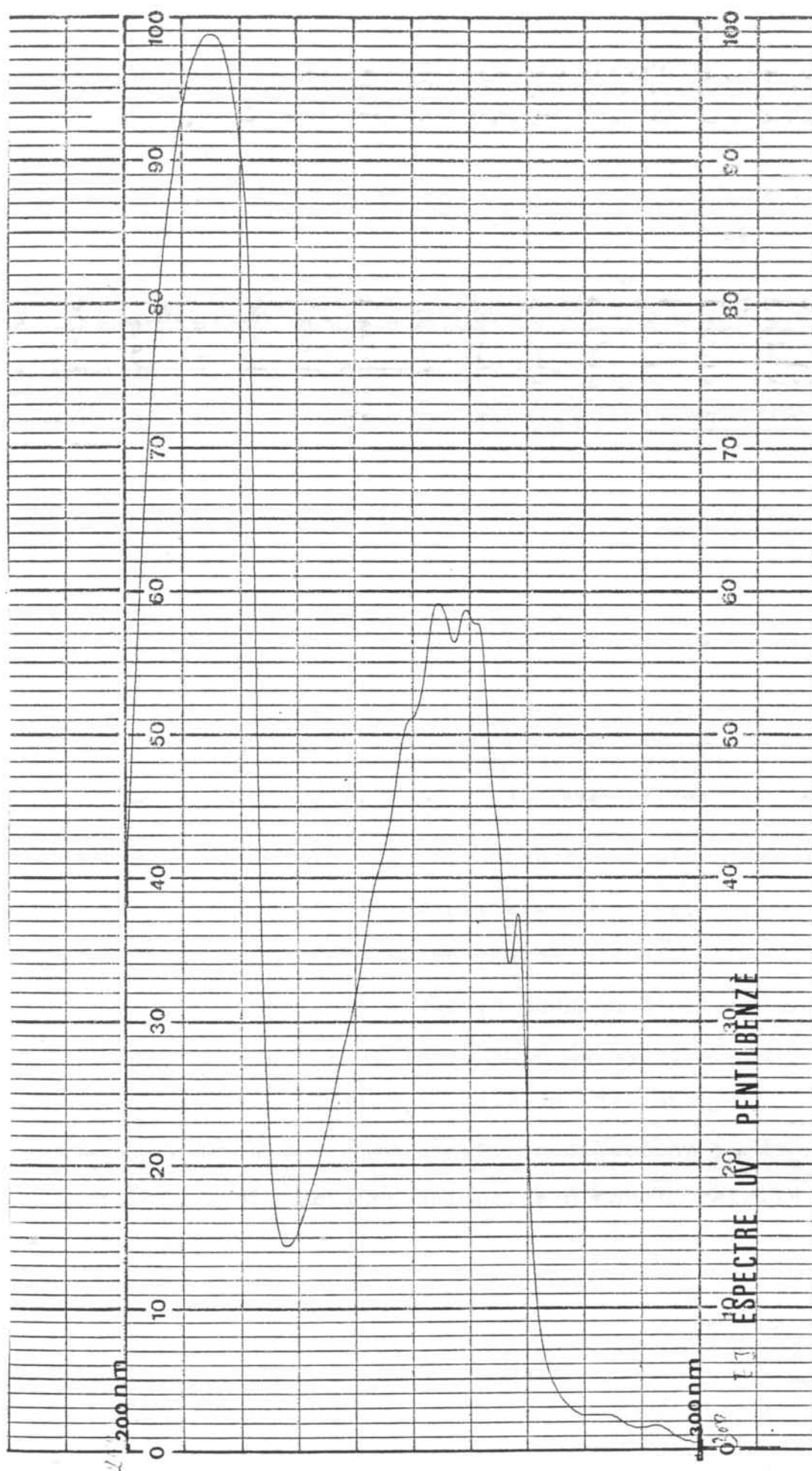
Per la determinació quantitativa s'ha emprat el mètode de l'estàndard intern, que en aquest cas ha estat el pentilbencè el qual presenta els avantatges que absorbeix tant a 256 nm. com a 220 nm. i és eluït bastant més tard que els valepotriats. (Veure pag. 123).



NQ.153-1003



ESPECTRE UV DIDROVALIRAC



La identificació dels valepotriats de l'extracte de Valeriana wallichii DC s'ha fet mitjançant els temps de retenció relatius.

.Preparació de la solució de l'estàndard intern :

0,25 ml. de pentilbencè es dissolen en quantitat suficient d'acetat d'etil per a 1000 ml.

.Preparació de les mostres :

1,00 g. de droga dessecada i triturada es barreja amb 25 ml. de solució de l'estàndard intern i es deixa macerar 14 hores. A continuació s'agita durant 1 hora 30 min. Es centrifuga 15 min., es filtra i s'enrasa a 25 ml. amb acetat d'etil en un matràs aforat.

.Preparació de les solucions patró:

Es preparen solucions patró de diferents concentracions, d'acord amb el possible contingut de l'extracte.

Solucions patró de didrovaltrat :

Es pesa una determinada quantitat de didrovaltrat patró amb precisió (101,5 mg.) i es porta a 10 ml. amb la solució de l'estàndard intern en un matràs aforat.

Es preparen 5 tubs i es retolen; a cada un d'ells s'hi posa una quantitat diferent de la solució de didrovaltrat i després s'afegeix, a tots ells, solució de l'estàndard intern fins a 25 ml. ; amb això, s'obtenen solucions de didrovaltrat de diferents concentracions, però amb la mateixa quantitat d'estàndard intern.

<u>Tub</u>	<u>ml.solució</u> <u>estàndard</u> <u>intern</u>	<u>ml.solució</u> <u>didrovaltrat</u>	<u>concentració</u> <u>didrovaltrat</u> (mg/25 ml)
1	22	3	30,45
2	23	2	20,30
3	23,5	1,5	15,225
4	24	1	10,150
5	24,5	0,5	5,075

Solucions patró de valtrat i acevaltrat :

S'opera de manera anàloga. 200,7 mg. de barreja de valepotriats es porten a 10 ml. amb solució de l'estàndard intern en un matràs aforat. Aquesta solució tindrà: 8,028 mg. d'acevaltrat i 11,540 mg. de valtrat.

Es preparen 5 tubs retolats i, a cada un d'ells, s'hi posa una quantitat diferent d'aquesta solució; es completa després fins a 25 ml. amb la solució de l'estàndard intern. S'obtenen solucions patró de diferents concentracions de valtrat i d'acevaltrat, però amb la mateixa quantitat d'estàndard intern.

<u>Tub</u>	<u>ml.solució</u> <u>estàndard</u> <u>intern</u>	<u>ml.solució</u> <u>valepotriats</u>	<u>V</u> (mg/25ml)	<u>A</u> (mg/25ml)
6	23	2	2,3080	1,6056
7	24	1	1,1540	0,8028
8	24,5	0,5	0,5770	0,4014
9	24,7	0,3	0,3462	0,2408
10	24,8	0,2	0,2308	0,1605

V - Valtrat , A - Acevaltrat

Les concentracions de les solucions de didrovaltrat, acevaltrat i valtrat corresponen a mg/g de droga.

L'aparell utilitzat en l'anàlisi és un cromatògraf Perkin-Elmer, model Series 3 Liquid-Chromatograph. El detector és un Perkin-Elmer LC-55 B Spectrophotometric Detector i el registrador Perkin-Elmer 561 Recorder. El forn de la columna és un LC-100 Column Oven de la mateixa marca.

Les característiques de la columna són :

- .tipus de columna : Hibar pre-packed column RT 250-4.
- .material de rebliment de la columna : Lichrosorb RP-18 (10UM).

.longitud : 250 mm.

.diàmetre intern : 4 mm.

Condicions de treball:

.manera de treballar : isocràtica.

.eluent : 70% Metanol

30% Aigua

.flux : 1 ml/min.

.temperatura de la columna : 40°C.

.detecció UV : valtrat i acevaltrat a 256 nm.

didrovaltrat a 220 nm.

.quantitat de mostra injectada : a 256 nm. --- 20 μ l.

a 220 nm. --- 10 μ l.

.sensibilitat del detector: 0,05 ABS.

.temps de l'anàlisi : 30 min.

.velocitat del paper : 5 mm/min.

L'anàlisi directa d'extractes de drogues vegetals en brut sembla problemàtica si es fan deteccions a baixa longitud d'ona (200-208 nm.), donades les múltiples possibilitats d'interferències produïdes per matèries naturals addicionals dels extractes. Per això, encara que el màxim d'absorció del didrovaltrat sigui a 206 nm. nosaltres hem fet la detecció a 220 nm., longitud d'ona en la que també presenta absorció.

Els valors dels temps de retenció són els següents:

	<u>Temps de retenció</u>	<u>Retenció relativa</u>
<u>Acevaltrat</u>	8 min.(aprox.)	0,29
<u>Didrovaltrat</u>	9 min.(aprox.)	0,33
<u>Valtrat</u>	14 min.(aprox.)	0,51
<u>Pentilbenzè</u>	27 min.(aprox.)	1

Veure pàgines 129 i 130.

El càlcul de les rectes de regressió ha donat els següents resultats:

1) VALTRAT :

$x = \text{mg.valtrat/g.droga}$

$y = \text{relació entre l'àrea del pic del valtrat i l'àrea del pic del pentilbenzè.}$

<u>x</u>	<u>y</u>	
2,3080	14,7727	
1,1540	6,1875	$y = mx + b;$
0,5770	4,1666	$y = 6,3987x - 0,2851;$
0,3460	1,7272	Coeficient de correla-
0,2308	1,2535	ció "r": $r = 0,9936$

Veure pàg. 132.

2) ACEVALTRAT :

$x = \text{mg.acevaltrat/g. droga}$

$y = \text{relació entre l'àrea del pic de l'acevaltrat i l'àrea del pic del pentilbenzè.}$

<u>x</u>	<u>y</u>	
1,6056	9,8636	
0,8028	4,5937	$y = mx + b;$
0,4014	2,6833	$y = 6,2381x - 0,1963;$
0,2408	1,1111	Coeficient de correla-
0,1605	0,7977	ció "r": $r = 0,9979$

3) DIDROVALTRAT:

$x = \text{mg.didrovaltrat/g.droga}$

$y = \text{relació entre l'àrea del pic del didrovaltrat i l'àrea del pic del pentilbenzè.}$

<u>x</u>	<u>y</u>	
30,4500	0,7078	
20,3000	0,5381	$y = mx + b;$
15,2250	0,4479	$y = 0,0200x + 0,1187;$
10,1500	0,3521	Coeficient de correla-
5,0750	0,1782	ció "r" : $r = 0,9842$

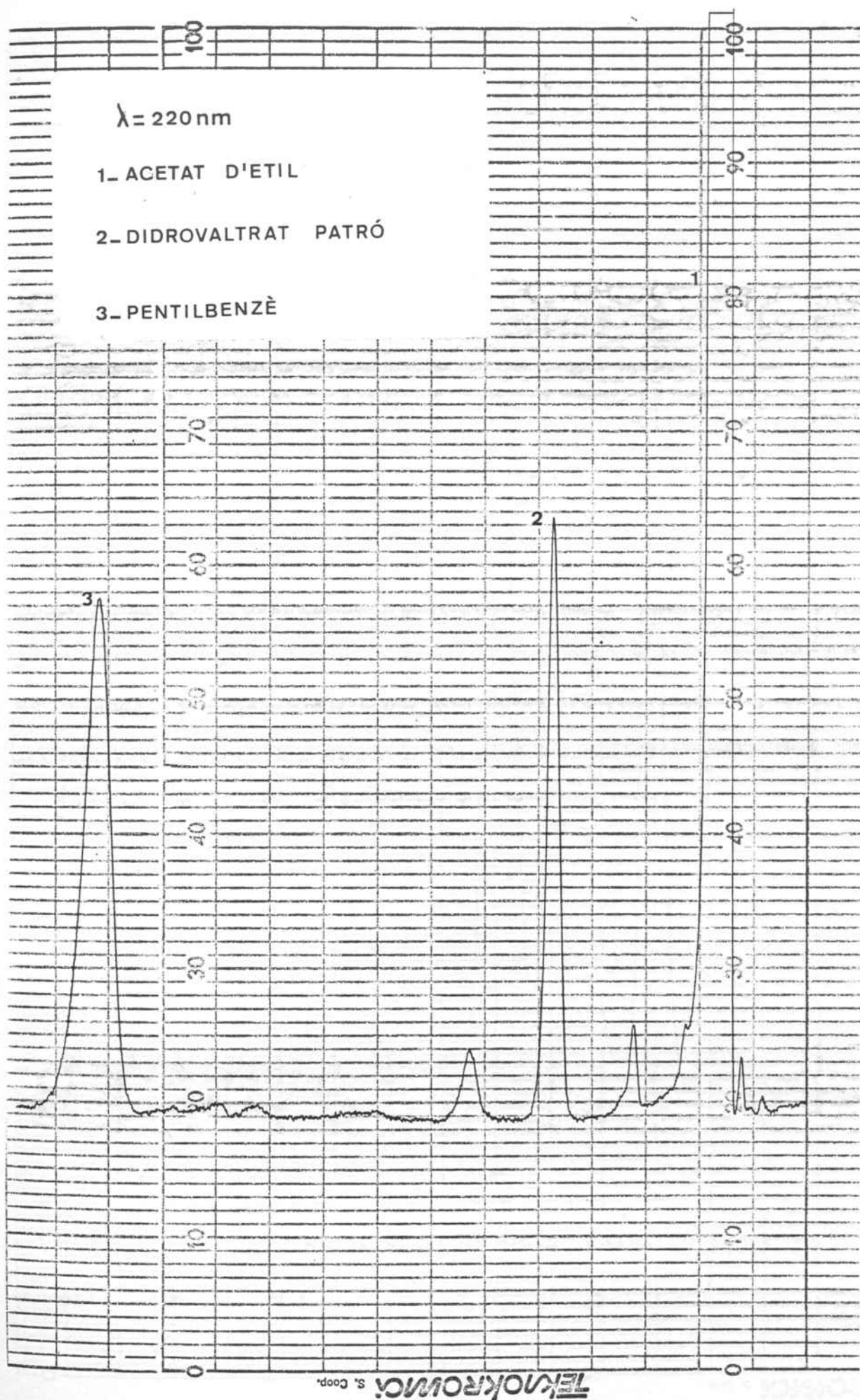
Veure pàg. 131 i 133.

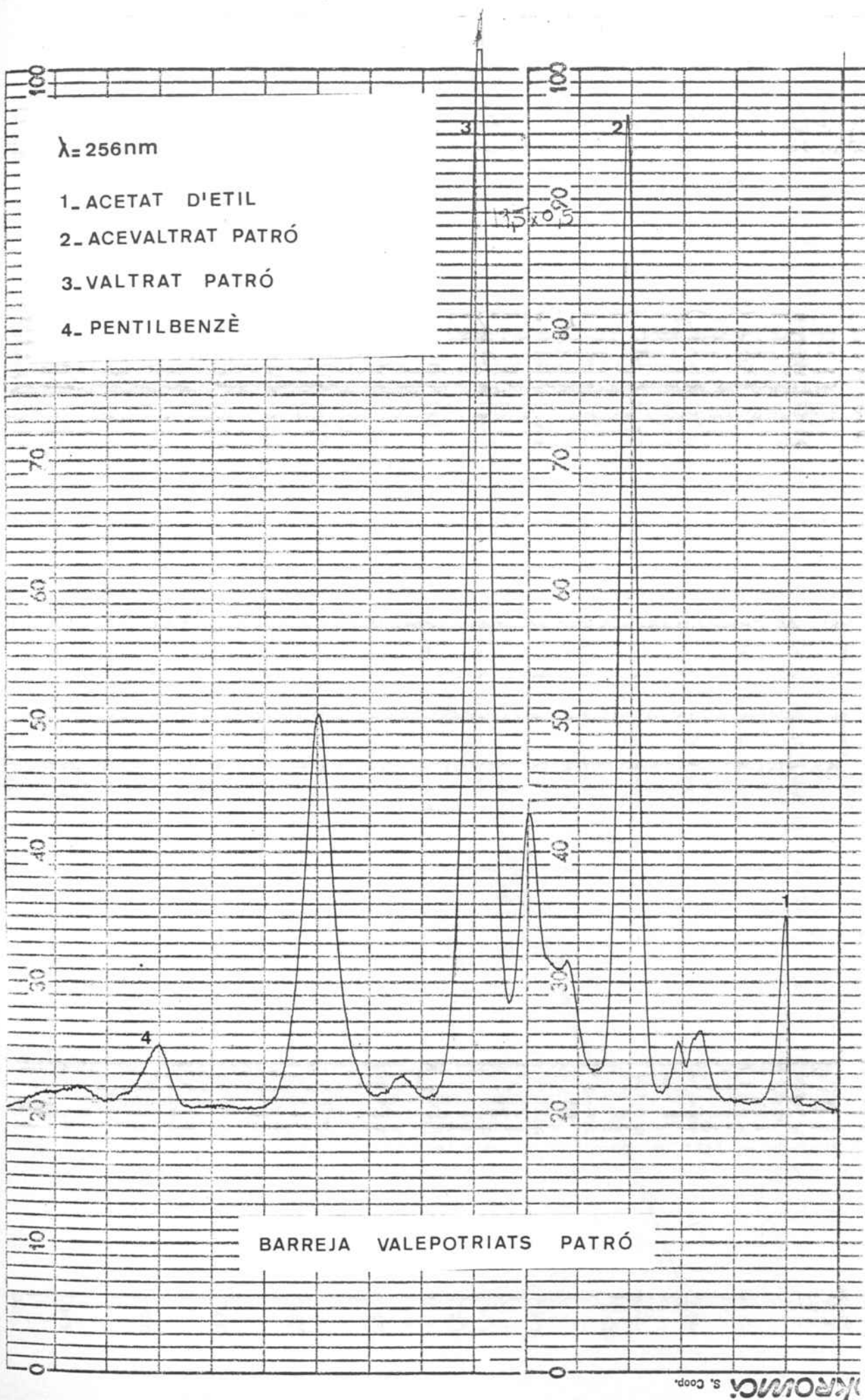
$\lambda = 220 \text{ nm}$

1- ACETAT D'ETIL

2- DIDROVALTRAT PATRÓ

3- PENTILBENZÈ





RECTA DE REGRESSIÓ DEL DIDROVALTRAT

àrea didrovaltrat
àrea pentilbenzé

0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

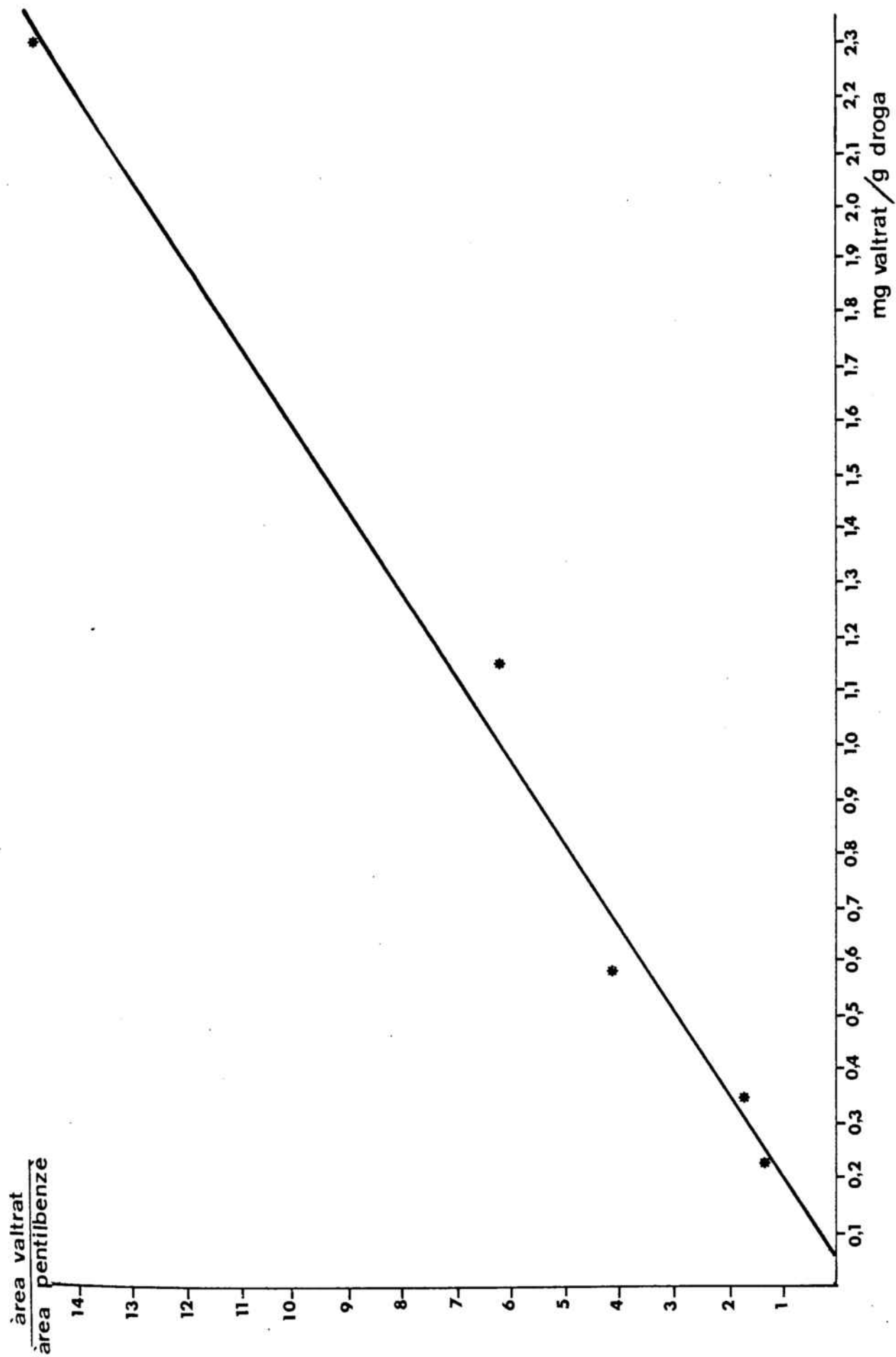
29

30

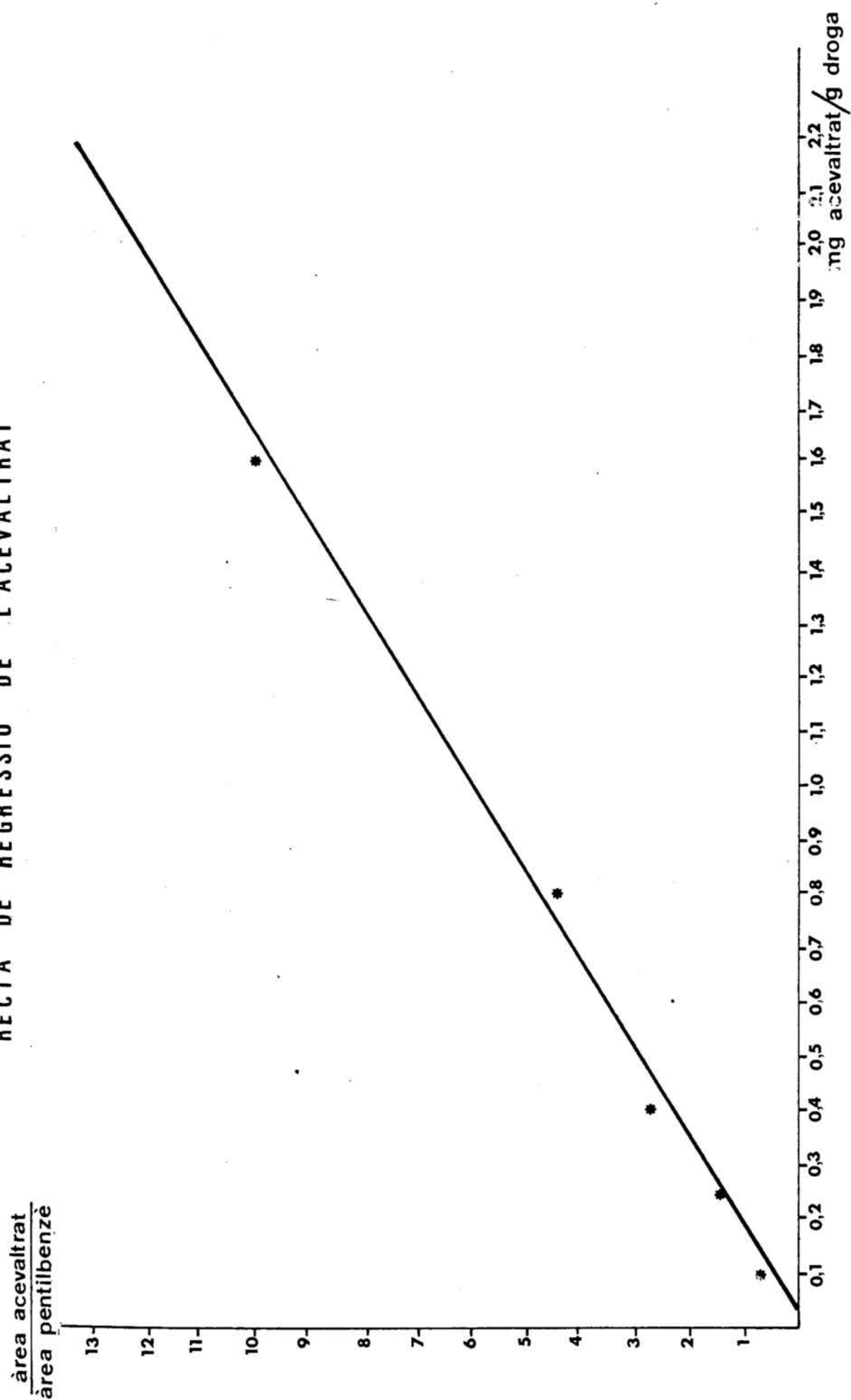
31

mg didrovaltrat/g droga

RECTA DE REGRESSIÓ DEL VALTRAT



RECTA DE REGRESSIÓ DE L'ACEVALTRAT



S'han analitzat per separat les arrels i els rizomes de plantes collides a finals de cada mes. De cada mostra s'han fet tres determinacions i després s'ha calculat la mitjana, que és el valor final.

Els resultats obtinguts es troben en les taules de les pàgines 135, 136, 137 i 138. A continuació hi ha alguns dels cromatogrames realitzats i les gràfiques representatives dels resultats des del punt de vista del valepotriat que es determina i des del punt de vista de la procedència del cultiu.

BARCELONA (esqueixos)

RECOL.LECCIO	DIDROVALTRAT	VALTRAT	ACEVALTRAT	
JULIOL	Arrels	6,5422	4,8236	0,3829
	Rizoma	10,1078	4,6155	0,1926
AGOST	Arrels	1,7053	1,7005	0,5528
	Rizoma	15,8540	1,6472	0,2304
SETEMBRE	Arrels	1,9328	4,5021	0,5942
	Rizoma	24,3254	2,6340	0,2317
OCTUBRE	Arrels	2,1840	5,0011	0,6076
	Rizoma	18,3028	2,4530	0,2325
NOVEMBRE	Arrels	3,9253	3,1582	1,2353
	Rizoma	18,7326	2,3609	0,2434

Quantitats expressades en mg/g de droga.

DELTA DE L'EBRE (llavors)

RECOL.LECCIO	DIDROVALTRAT	VALTRAT	ACEVALTRAT
JULIOL	Arrels	7,0608	0,9564
	Rizoma	8,7820	0,5381
AGOST	Arrels	12,6975	2,4789
	Rizoma	15,1788	1,5788
SETEMBRE	Arrels	15,0046	2,4856
	Rizoma	27,2883	1,6291
OCTUBRE	Arrels	1,8707	1,2390
	Rizoma	3,0159	0,9221
NOVEMBRE	Arrels	2,1227	1,8461
	Rizoma	2,8070	0,9450

Quantitats expressades en mg/g de droga.

DELTA DE L'EBRE (esqueixos)

RECOL.LECCIÓ	DIDROVALTRAT	VALTRAT	ACEVALTRAT	
JUNY	Arrels	0,6064	1,6353	0,4033
	Rizoma	1,0352	0,9418	0,1459
JULIOL	Arrels	3,0844	0,9746	0,4686
	Rizoma	3,7620	0,9218	0,1236
AGOST	Arrels	7,9991	3,1650	0,6963
	Rizoma	13,3128	3,0211	0,3254

Quantitats expressades en mg/g de droga.

SANT PRIVAT D'EN BAS (esqueixos)

RECOL.LECCIÓ	DIDROVALTRAT	VALTRAT	ACEVALTRAT
Arrels	4,8826	0,9545	0,4115
OCTUBRE			
Rizoma	13,2110	0,9448	0,1431
Arrels	8,1532	2,5286	0,6030
NOVEMBRE			
Rizoma	12,9495	1,3207	0,1555

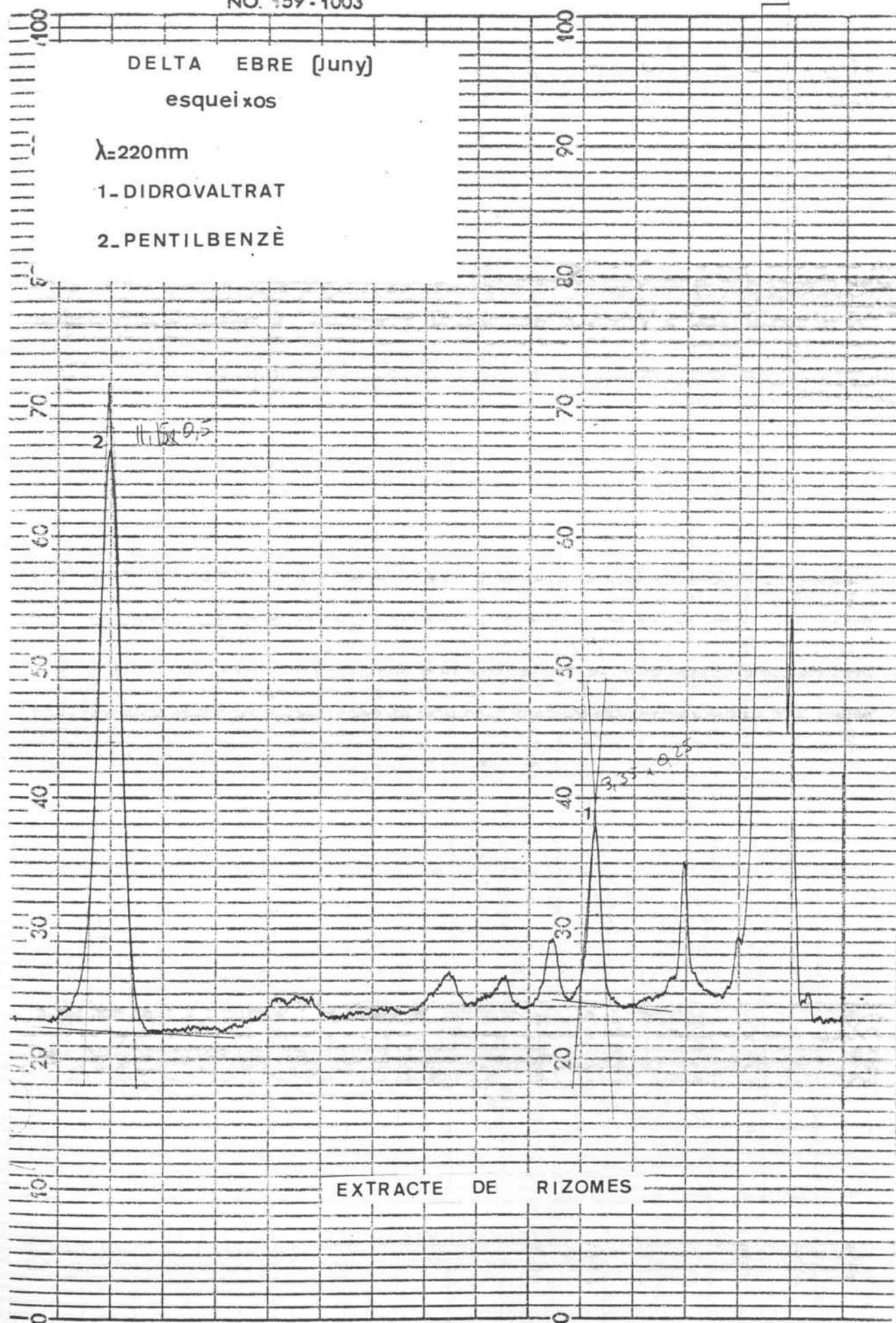
Quantitats expressades en mg/g de droga.

NO. 159-1003

DELTA EBRE (juny)
esqueixos $\lambda=220\text{nm}$

1-DIDROVALTRAT

2-PENTILBENZÈ



NO. 159-1003

DELTA EBRE (μ ny)

esqueixos

 $\lambda = 220 \text{ nm}$

1. DIDROVALTRAT

2. PENTILBENZÈ

2
12 x 0,61
3,3 x 0,3

EXTRACTE D'ARRELS

NO. 159-1003

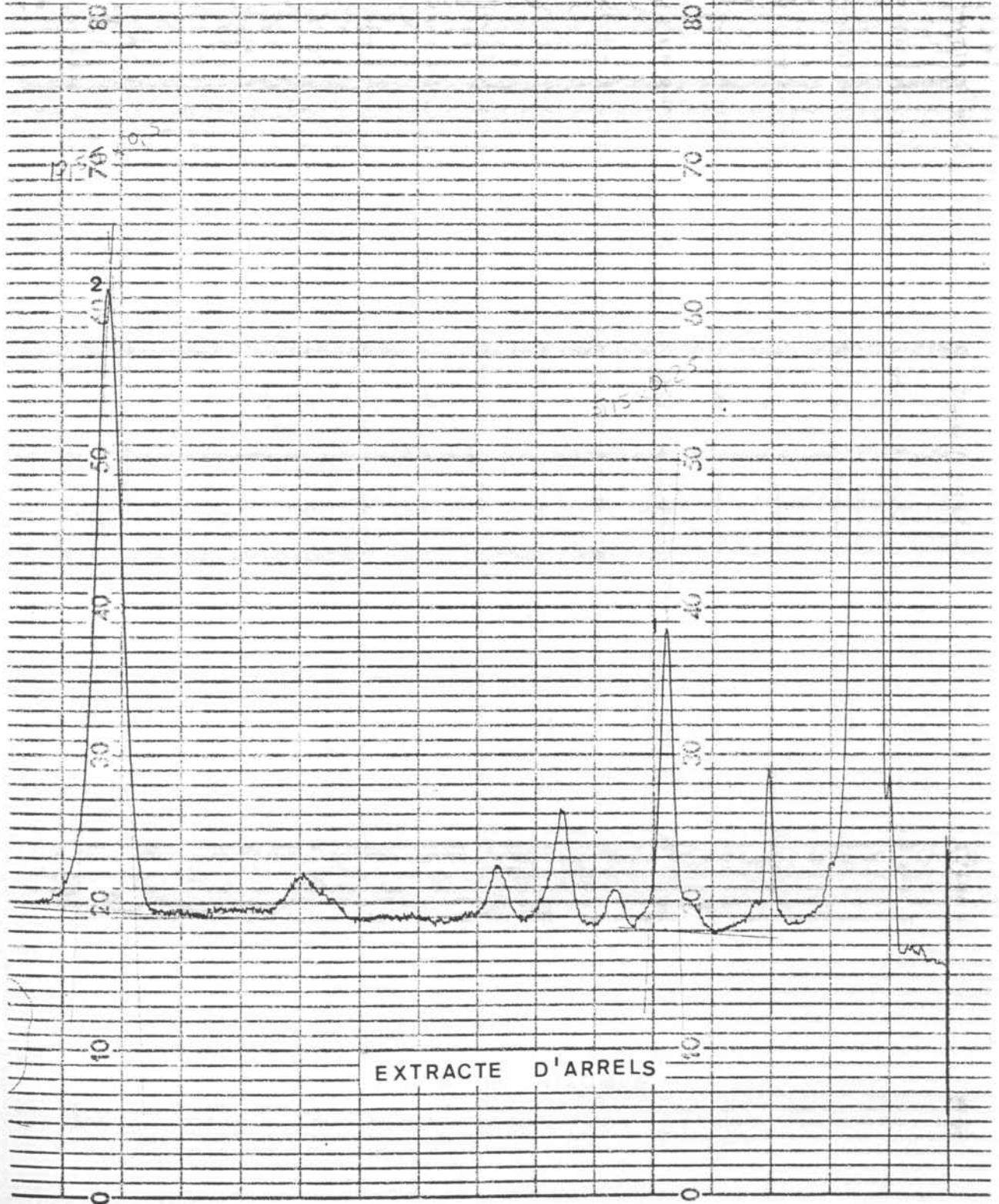
DELTA EBRE (Setembre)

llavors

 $\lambda=220\text{nm}$

1. DIDROVALTRAT

2. PENTILBENZÈ



NO. 159-1003

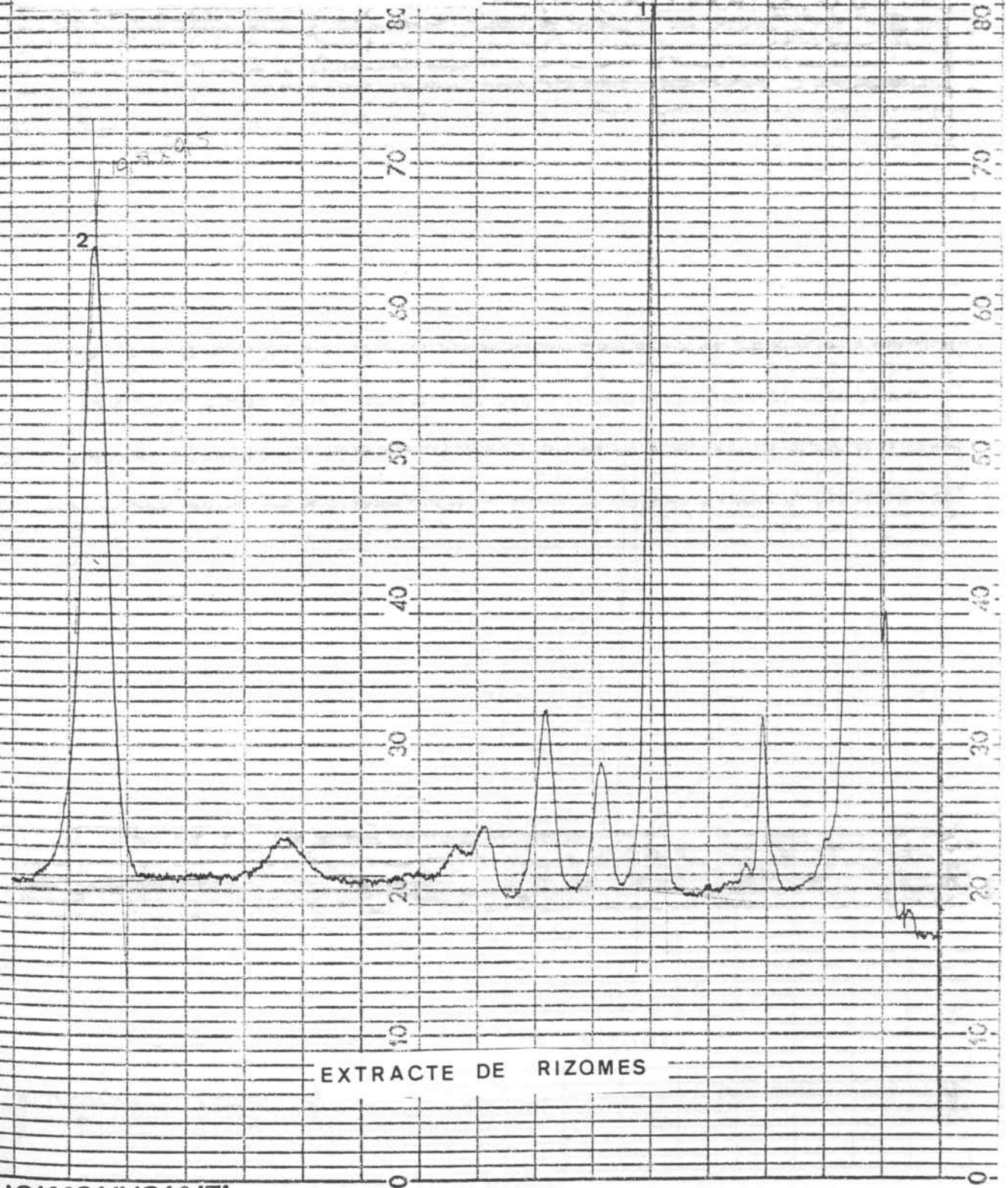
DELTA EBRE (Setembre)

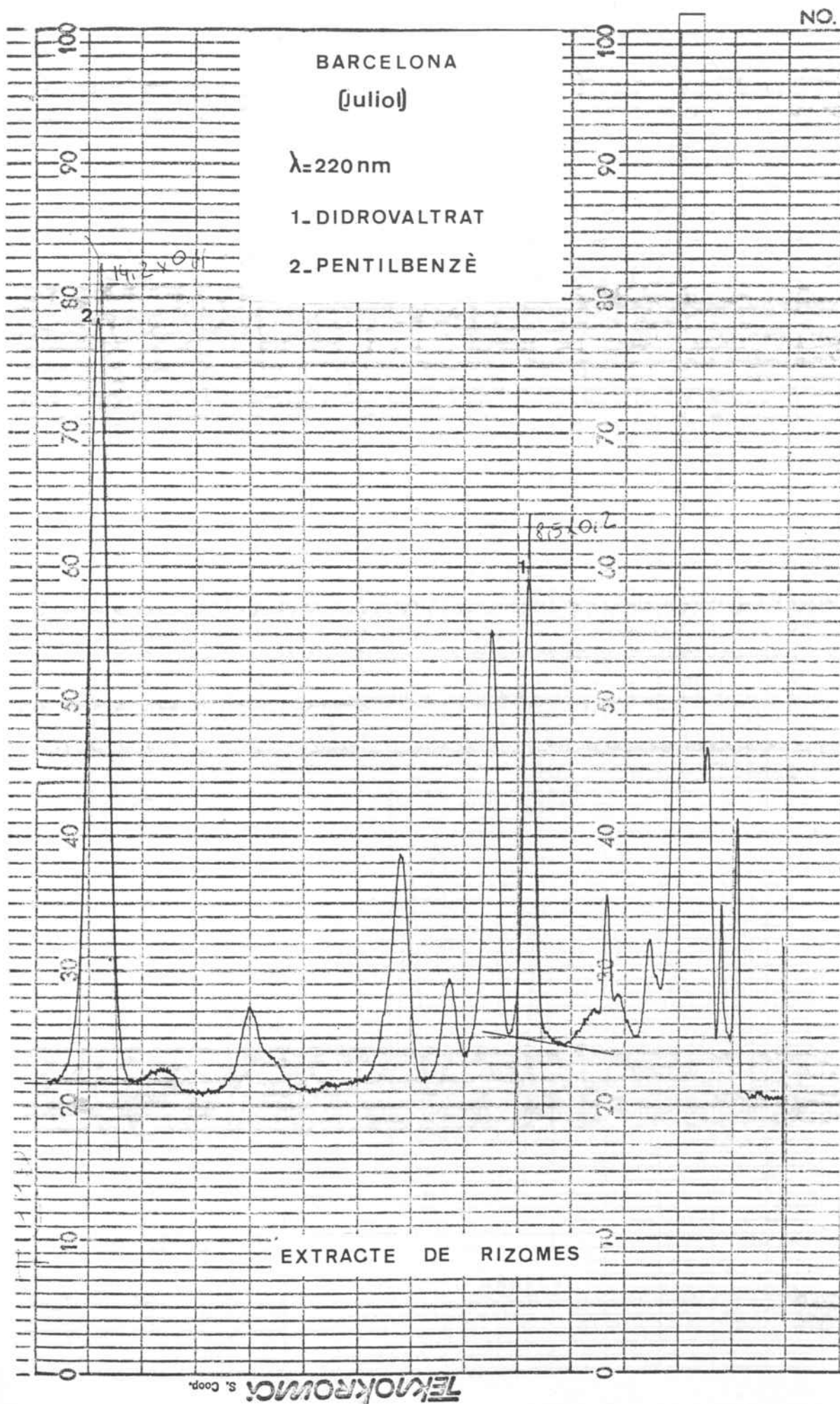
llavors

 $\lambda = 220 \text{ nm}$

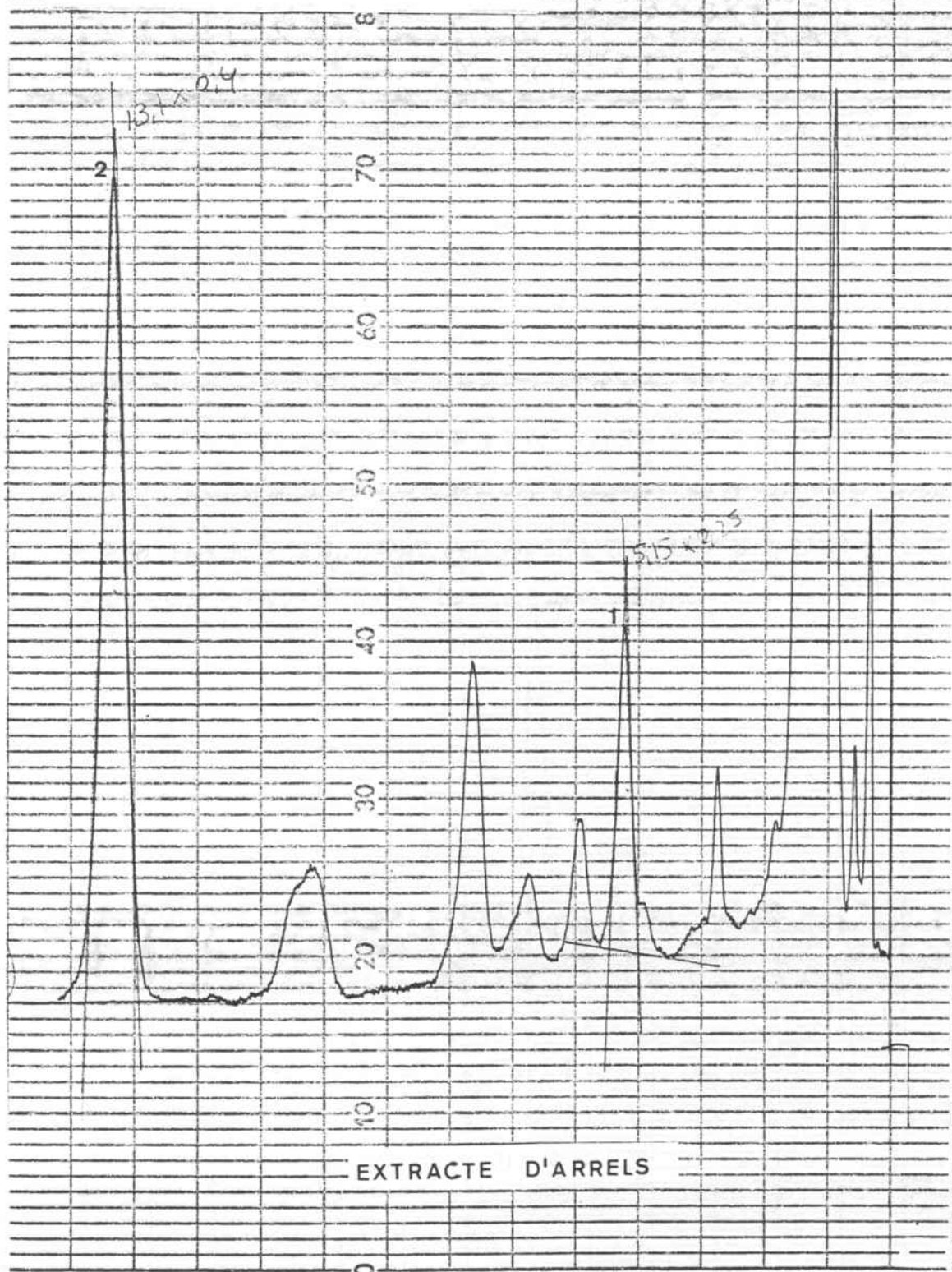
1- DIDROVALTRAT

2- PENTILBENZÈ





159 - 1003

BARCELONA
(Juliol) $\lambda = 220\text{nm}$ 1-DIDROVALTRAT
2-PENTILBENZÈ

BARCELONA

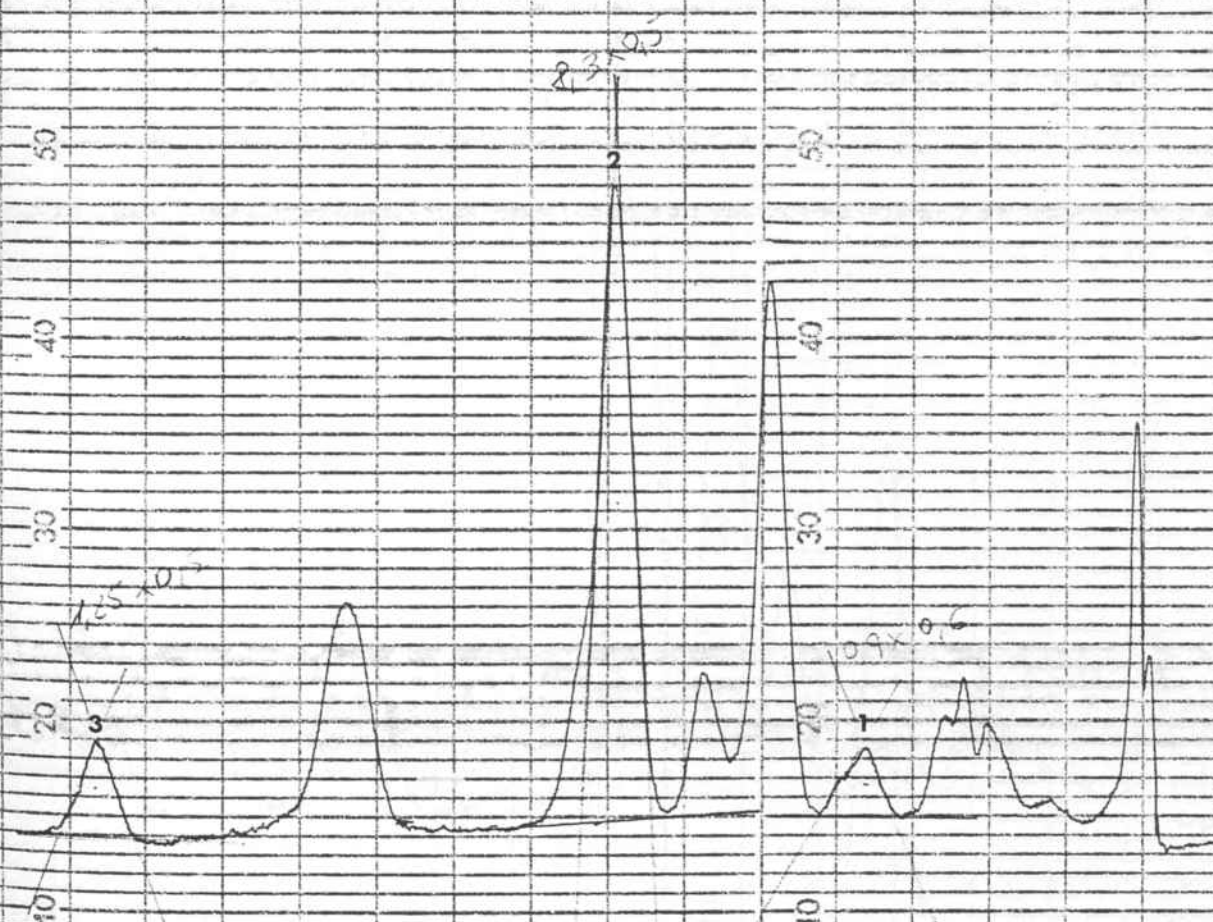
Juliol

 $\lambda = 256 \text{ nm}$

1-ACEVALTRAT

2-VALTRAT

3-PENTILBENZÈ



EXTRACTE DE RIZOMES

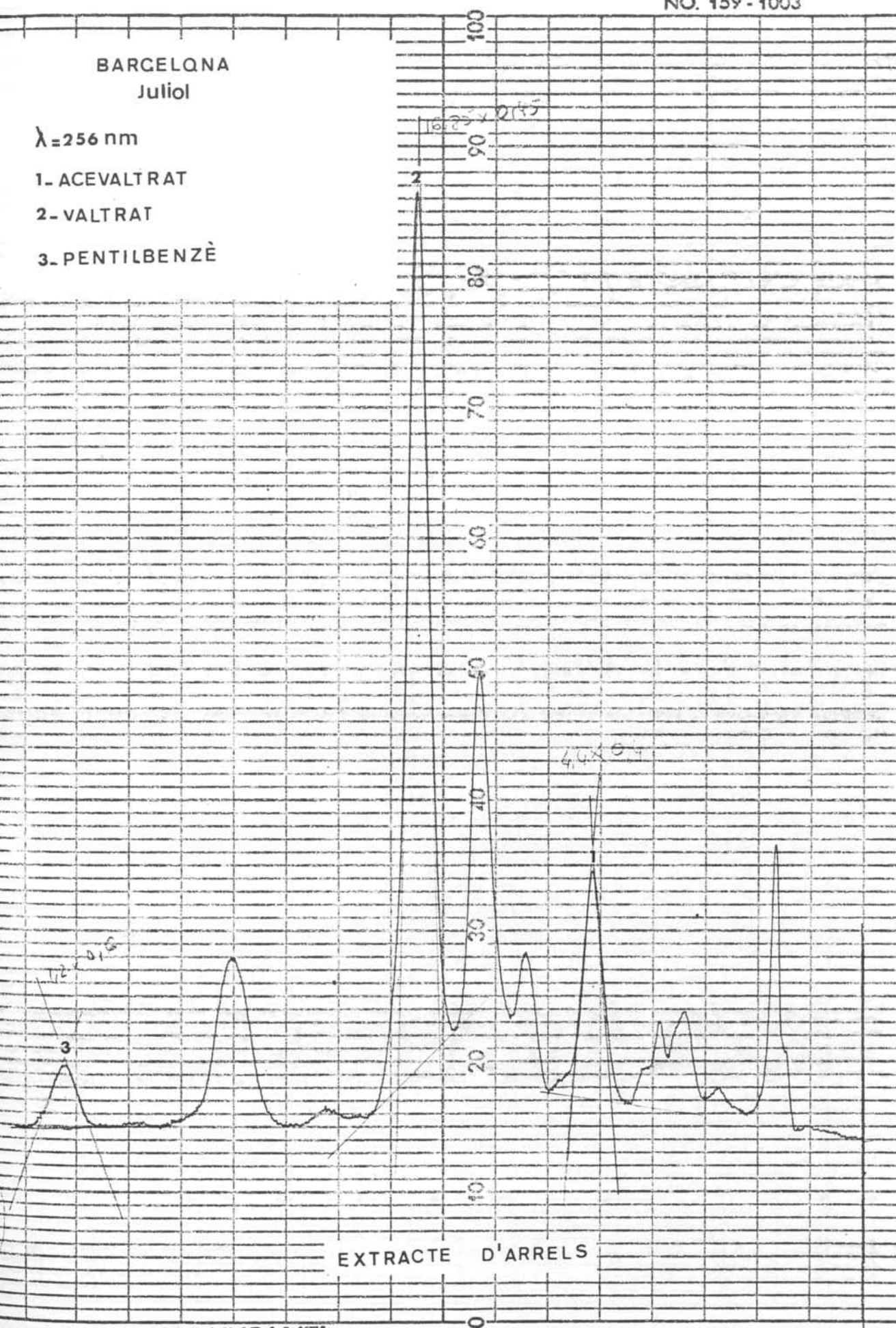
NO. 159-1003

BARGELQNA
Juliol $\lambda = 256 \text{ nm}$

1- ACEVALTRAT

2- VALTRAT

3- PENTILBENZÈ



NO. 159-1003

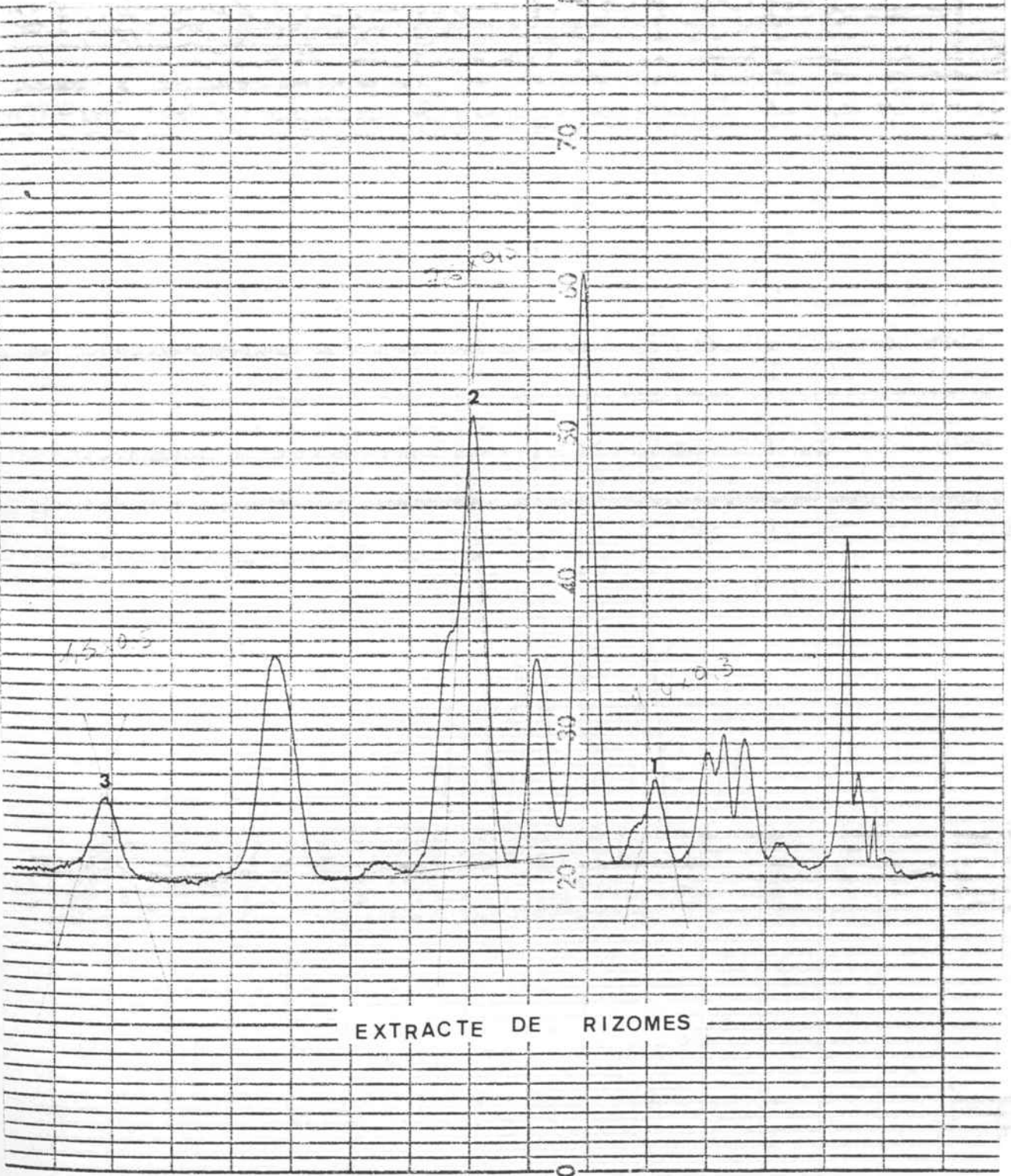
QLOT. [Octubre]

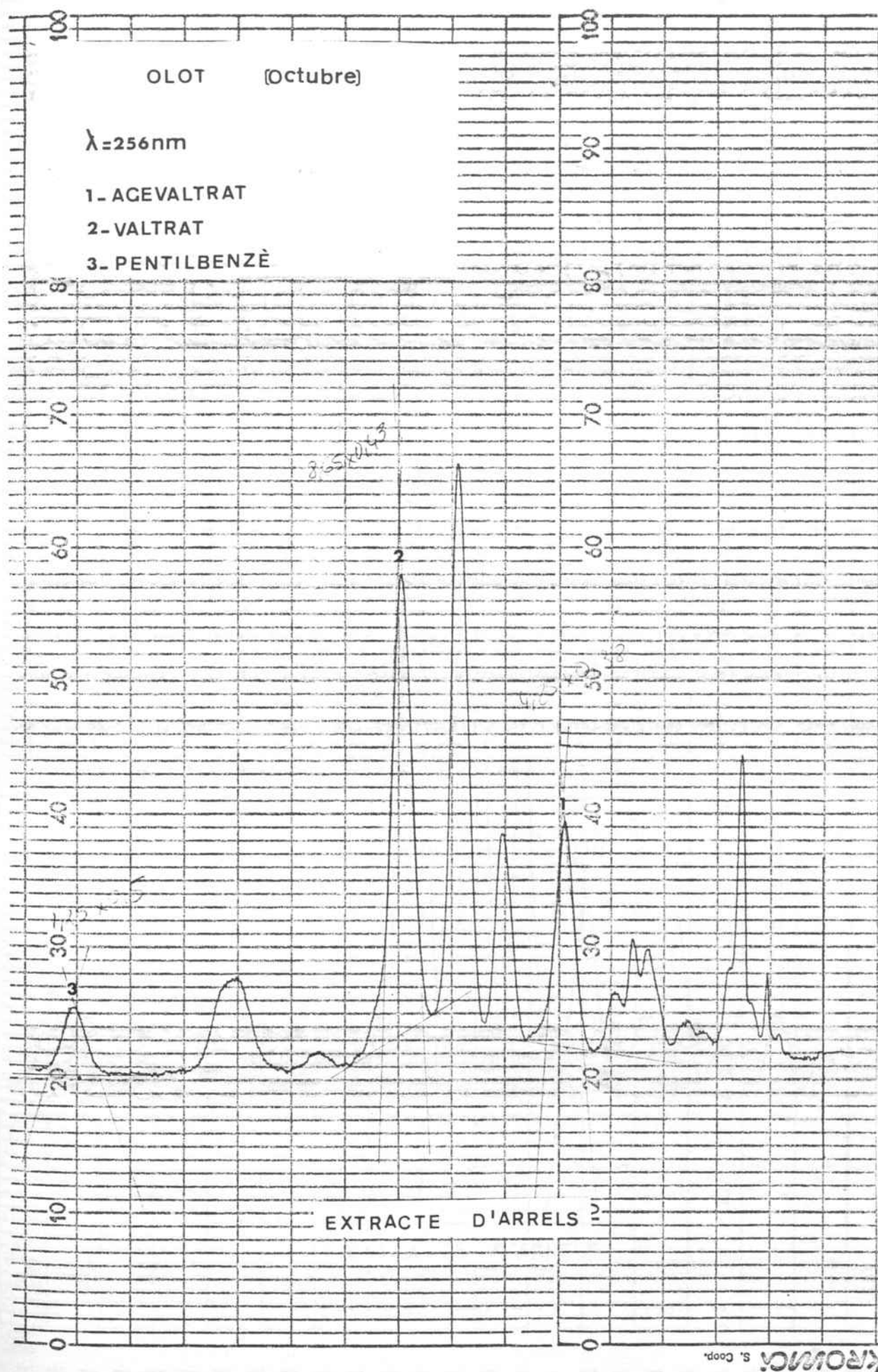
 $\lambda = 256 \text{ nm}$

1- ACEVALTRAT

2- VALTRAT

3- PENTILBENZÈ





NO. 159-1003

DELTA EBRE (Setembre)

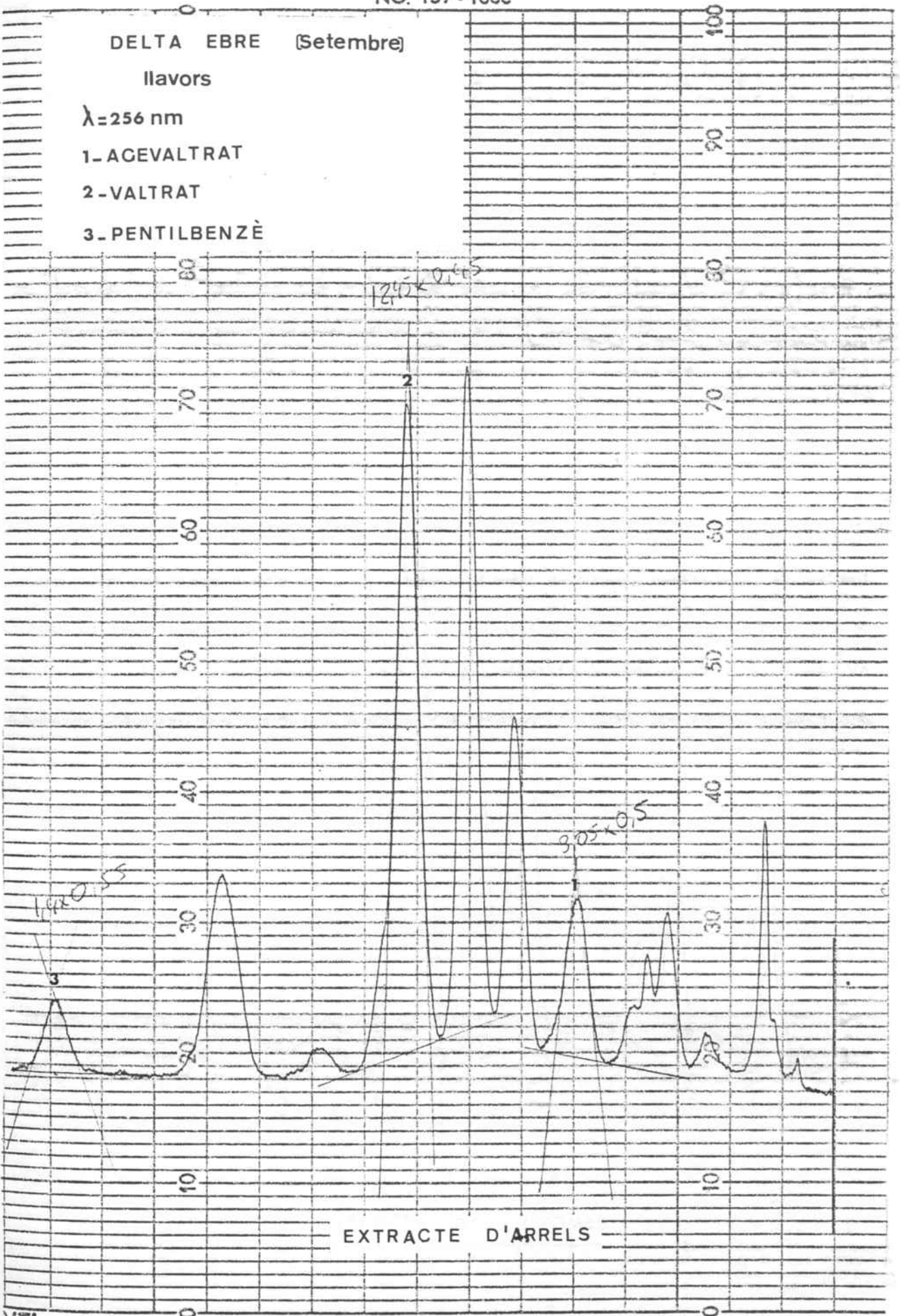
llavors

 $\lambda = 256 \text{ nm}$

1- ACEVALTRAT

2- VALTRAT

3- PENTILBENZÈ



NO. 159-1003

DELTA EBRE (Setembre)

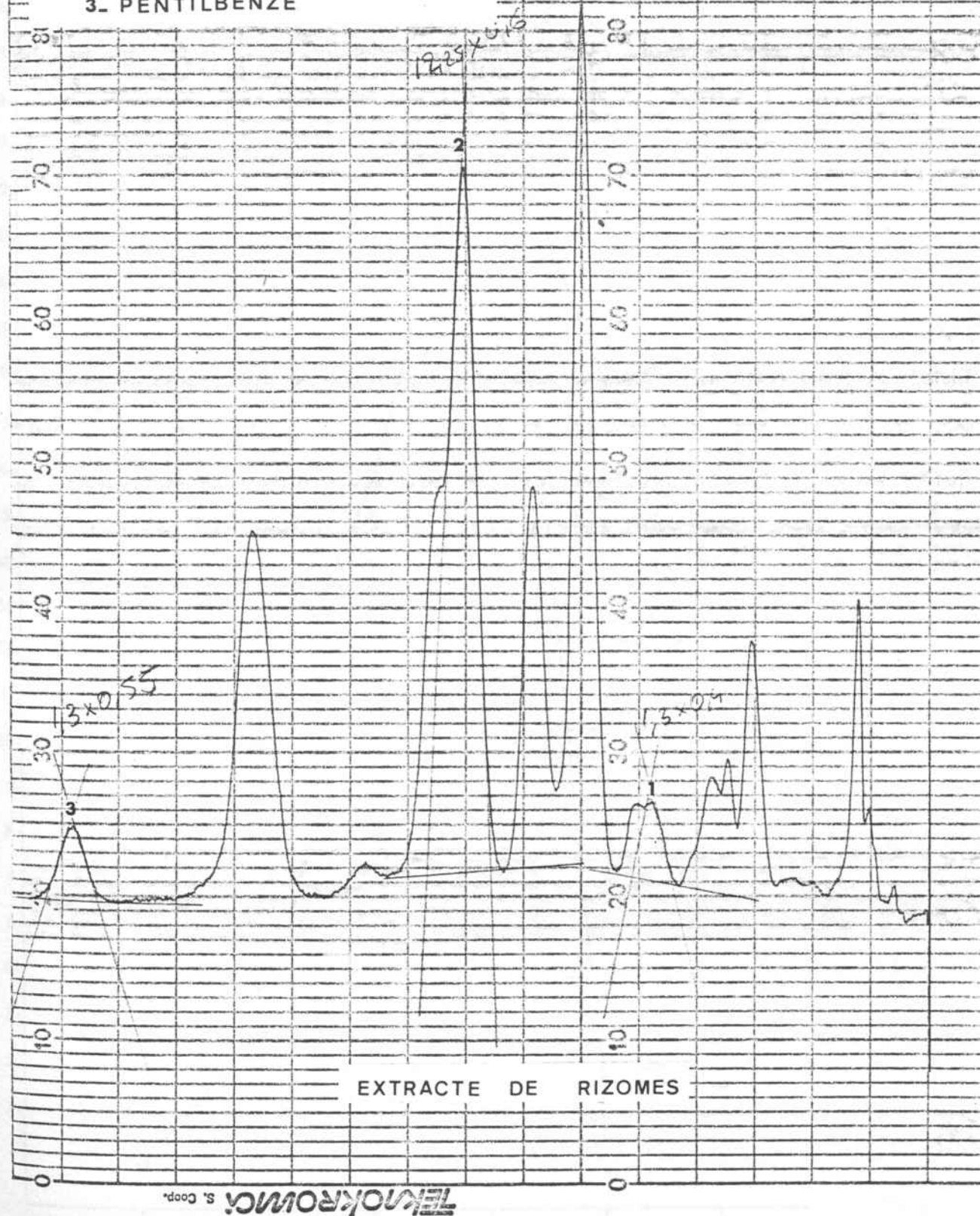
llavors

 $\lambda = 256 \text{ nm}$

1. ACEVALTRAT

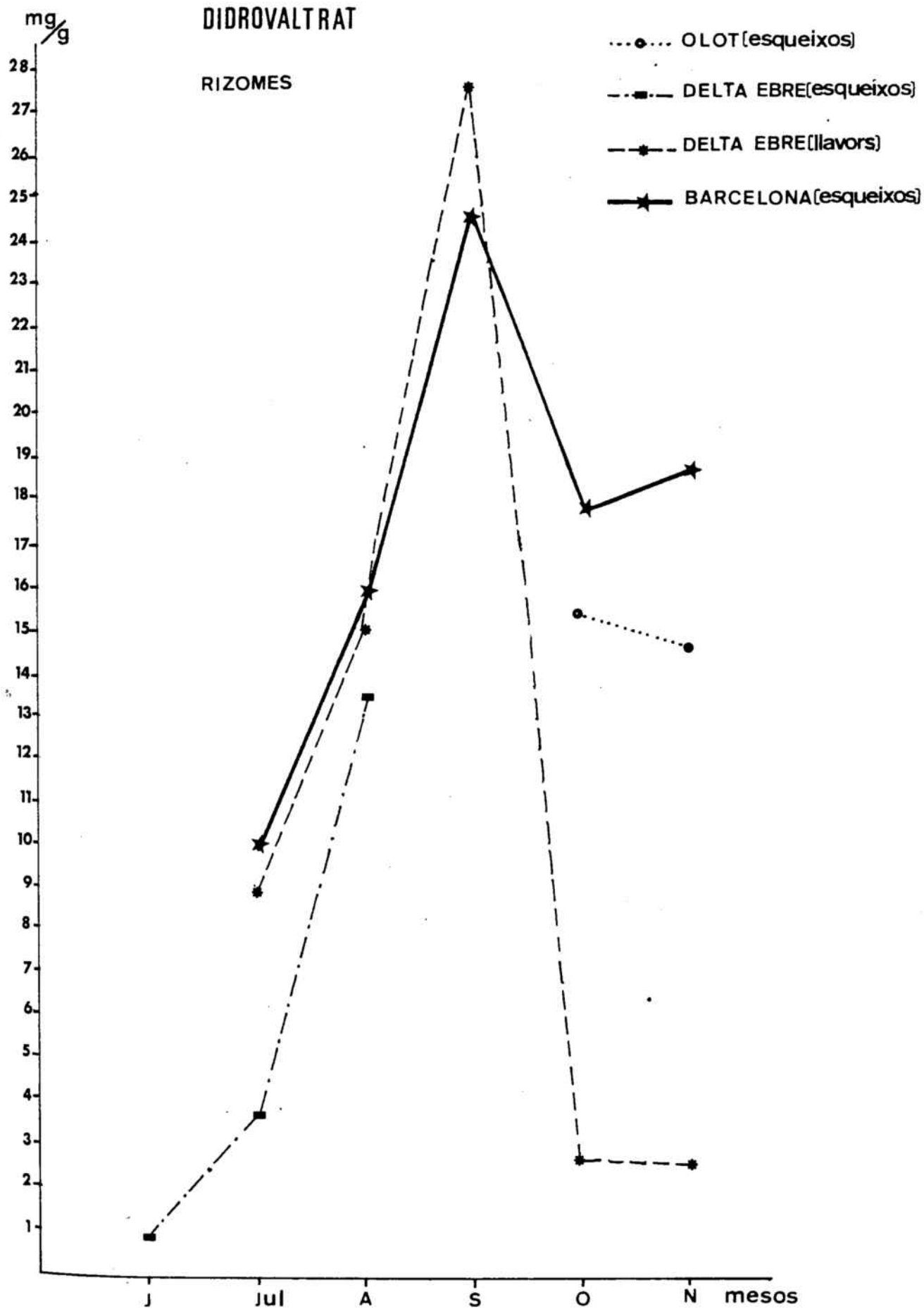
2. VALTRAT

3. PENTILBENZÈ



DIDROVALTRAT

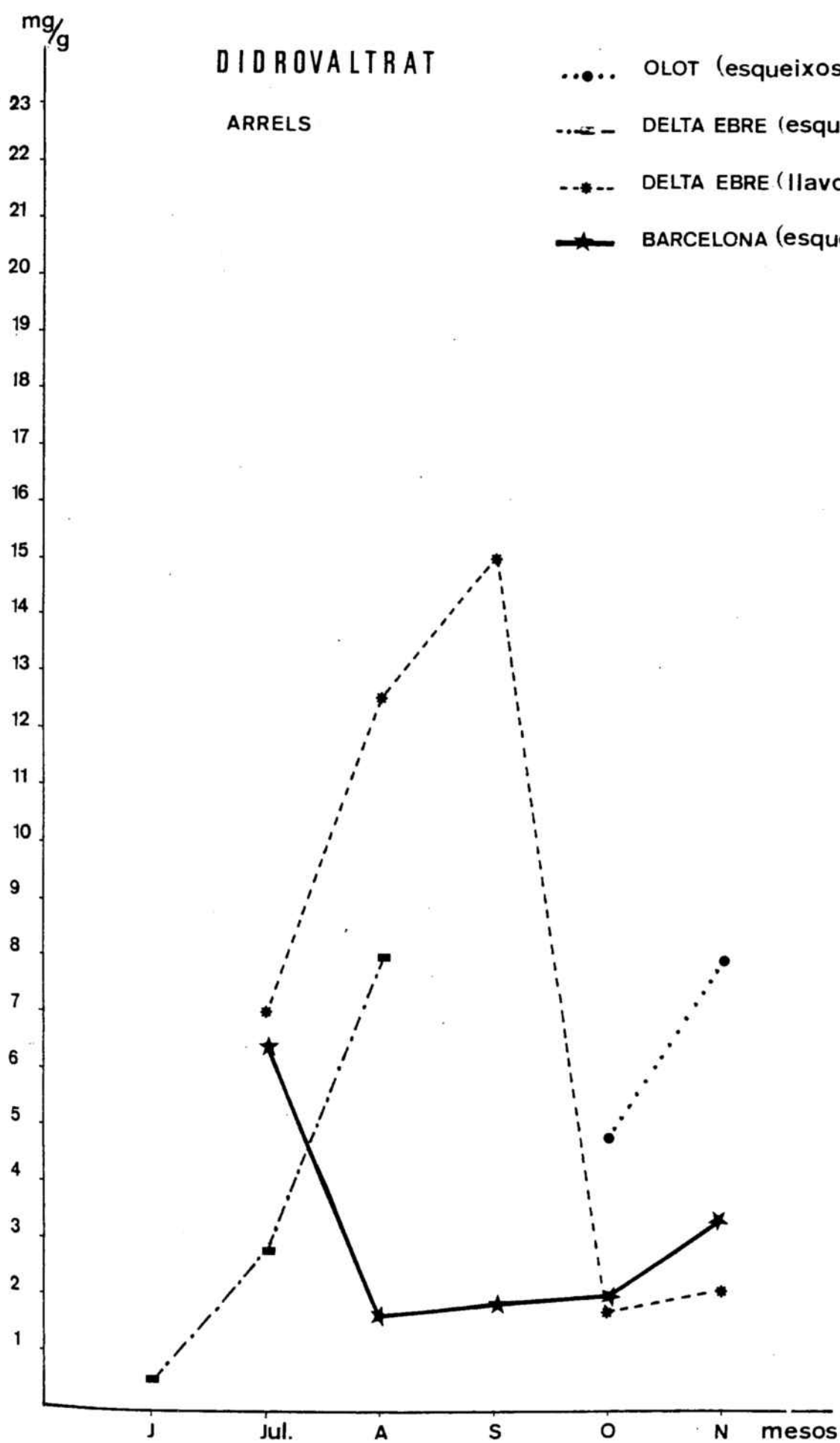
RIZOMES



DIDROVALTRAT

ARRELS

- ...•... OLOT (esqueixos)
- DELTA EBRE (esqueixos)
- *--- DELTA EBRE (llavors)
- ★— BARCELONA (esqueixos)



VALTRAT

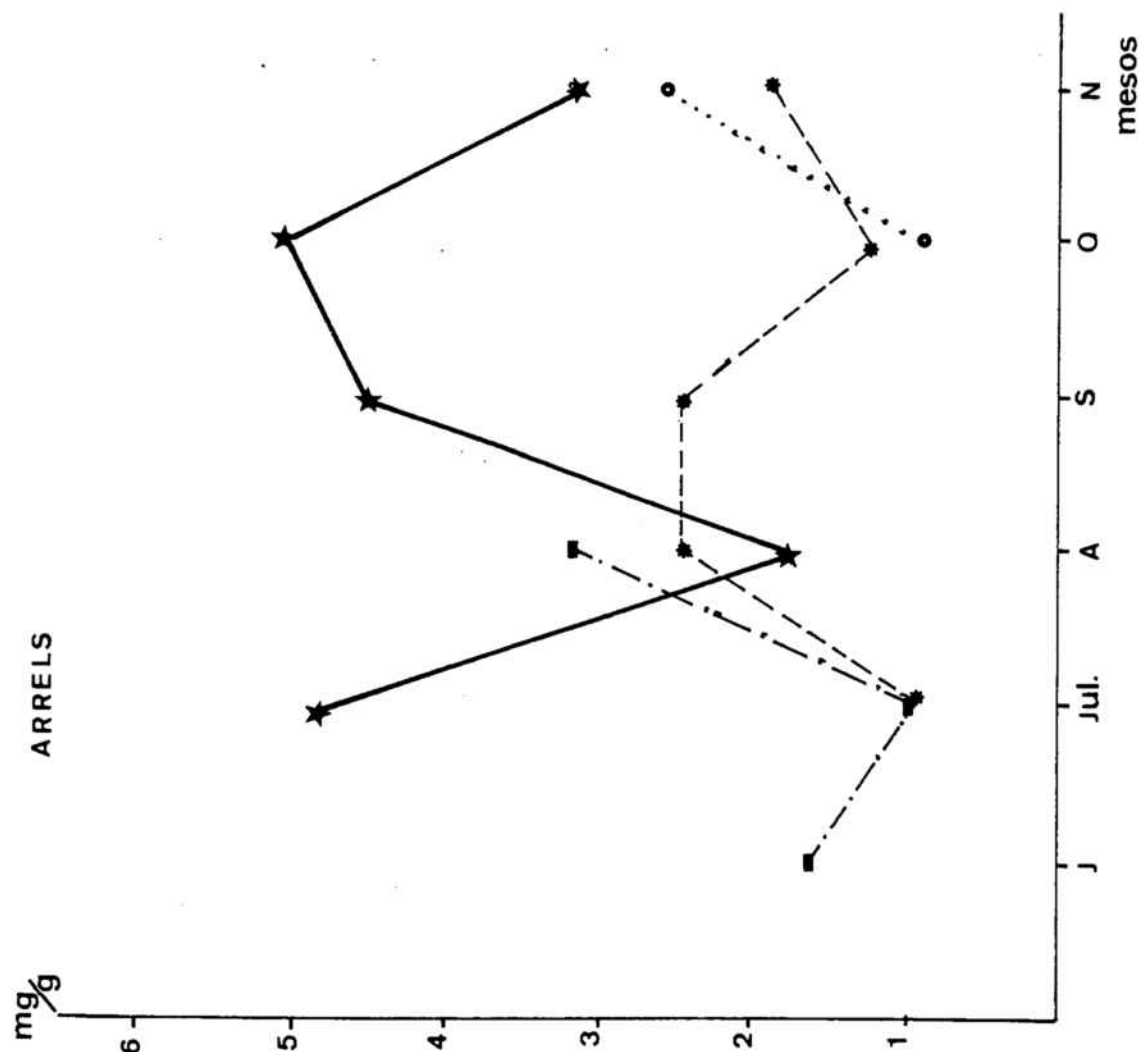
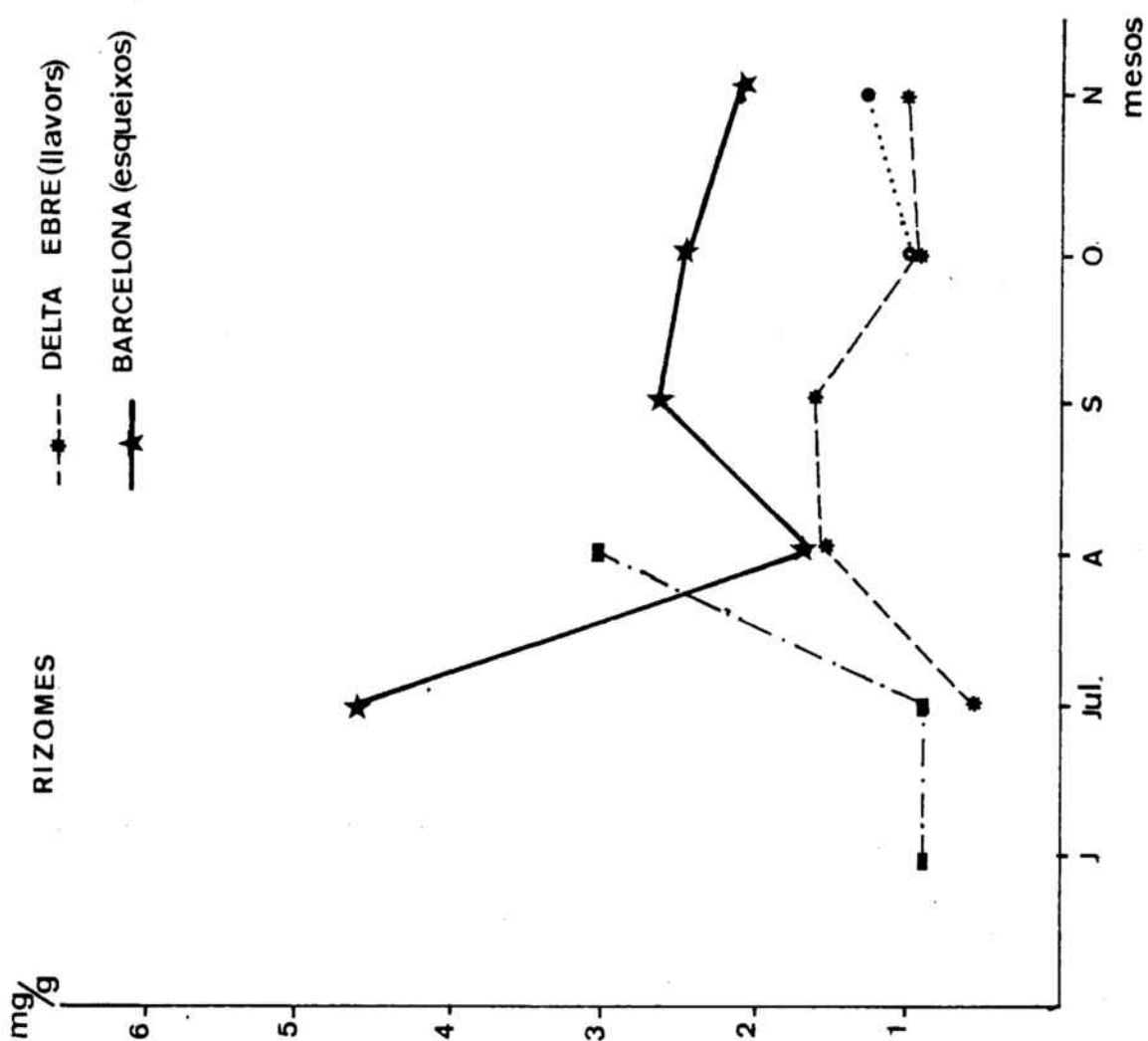
mg/g

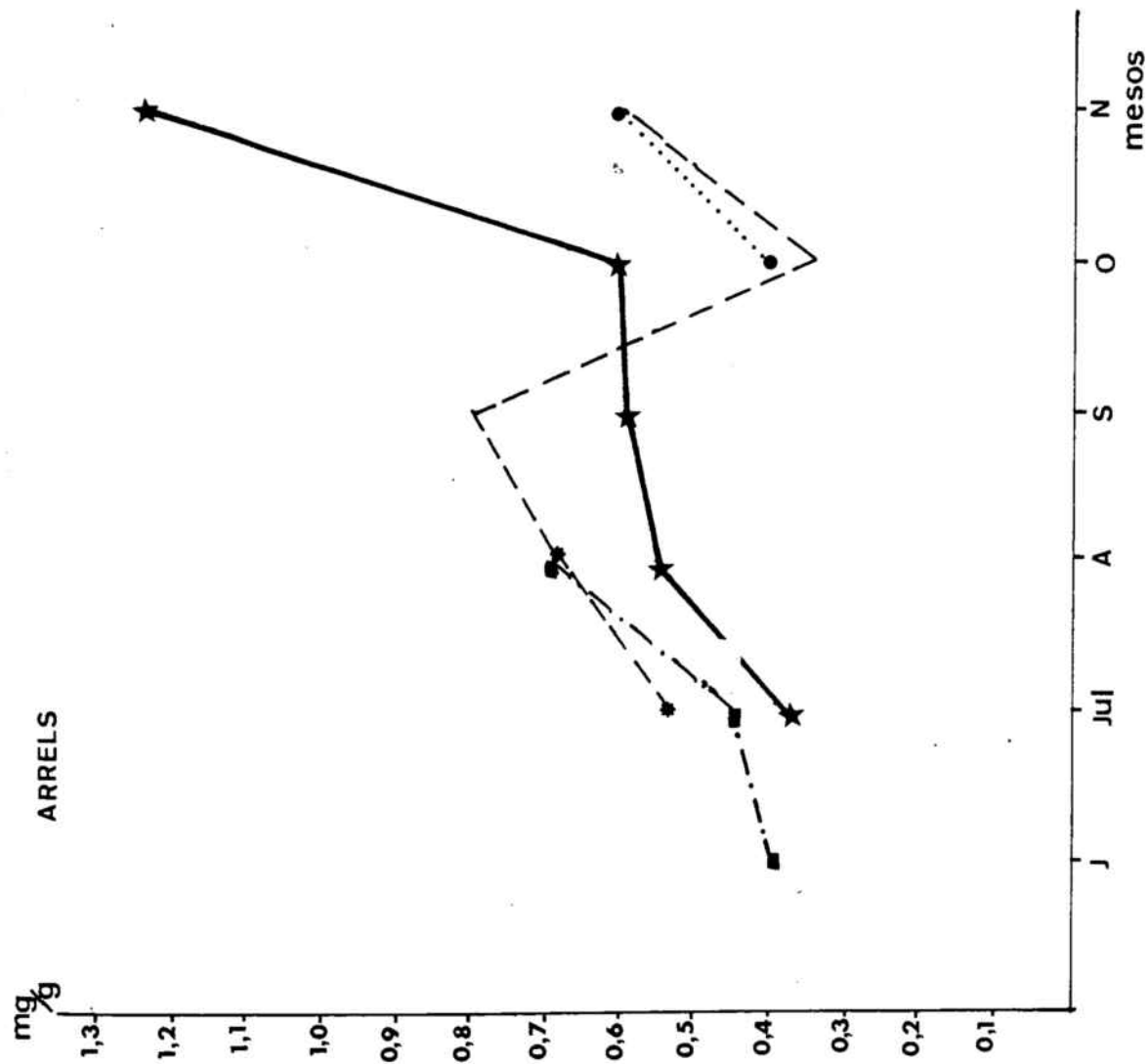
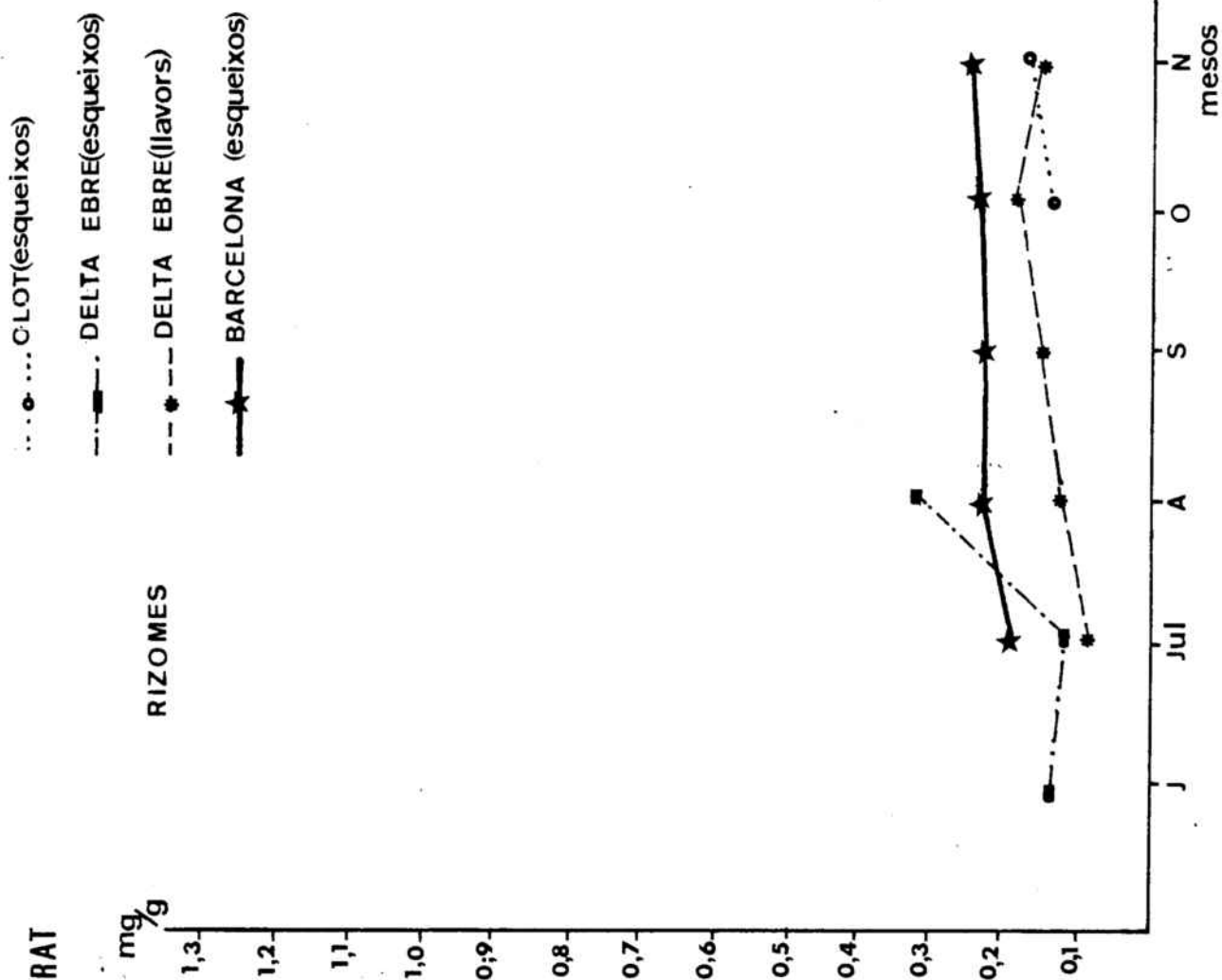
ARRELS

mg/g

RIZOMES

- OLOT (esqueixos)
 --- DELTA EBRE (esqueixos)
 - - - DELTA EBRE (llavors)
 — BARCELONA (esqueixos)





BARCELONA

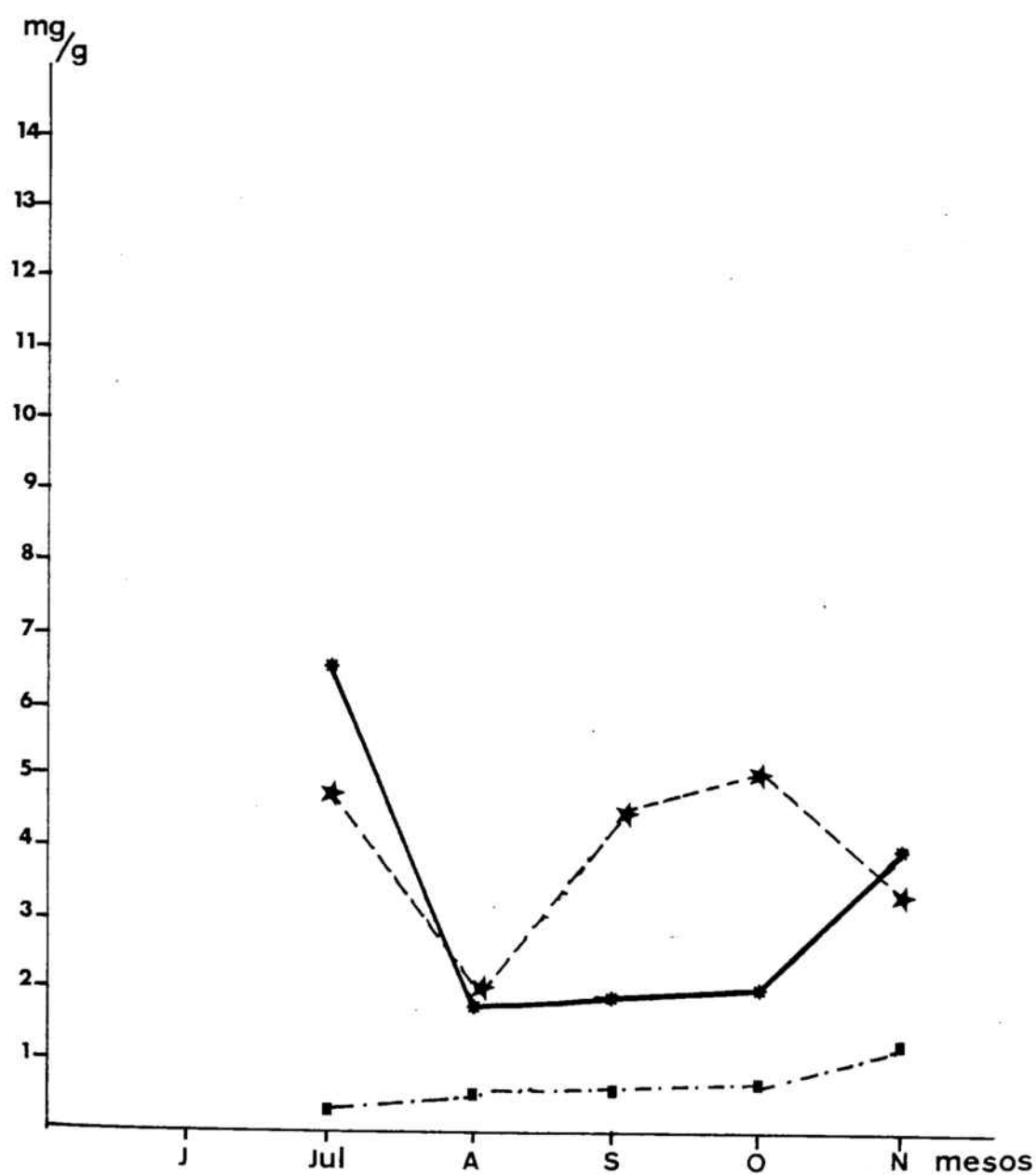
esqueixos

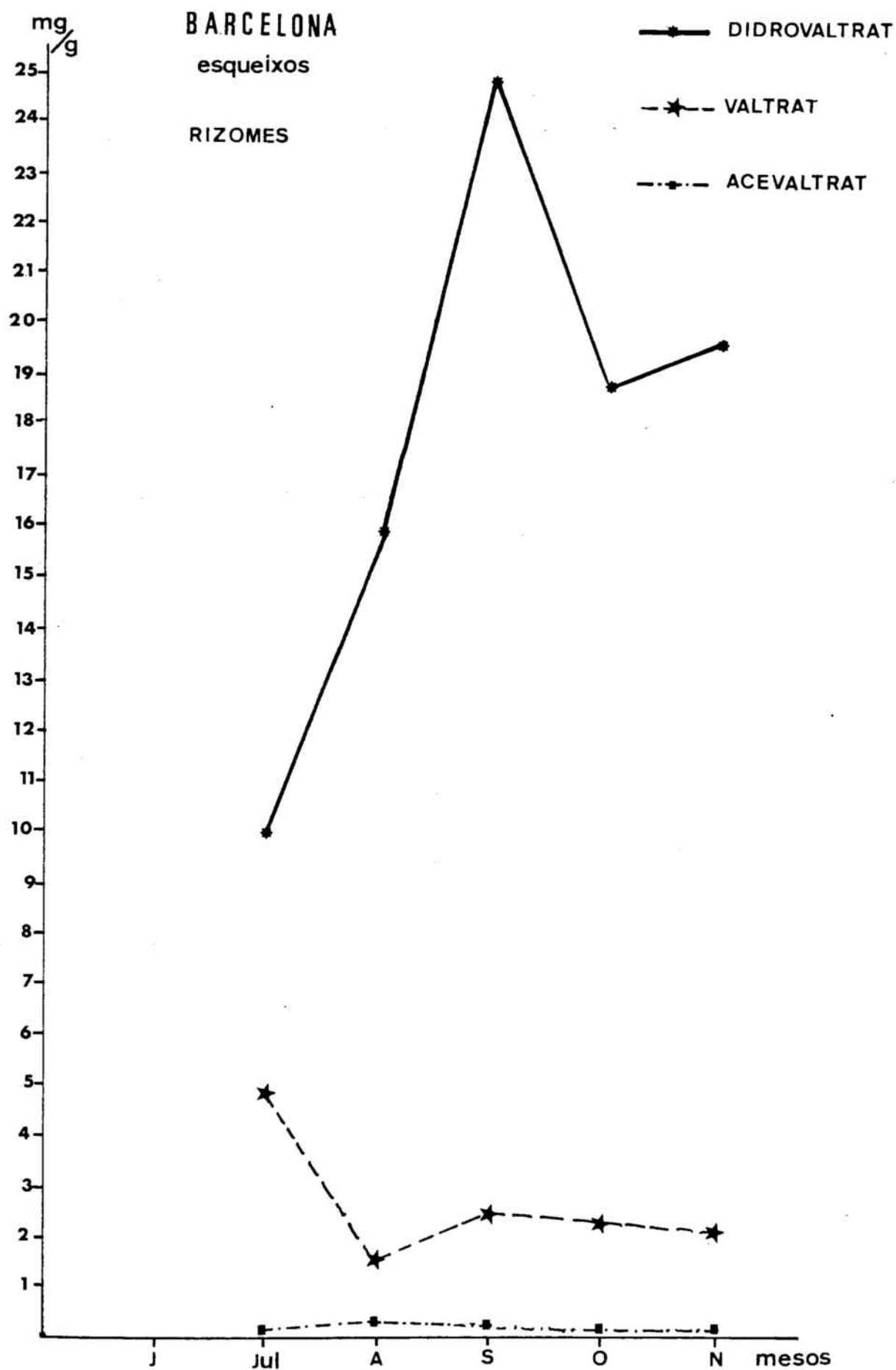
ARRELS

—●— DIDROVALTRAT

--★-- VALTRAT

-.-■- ACEVALTRAT

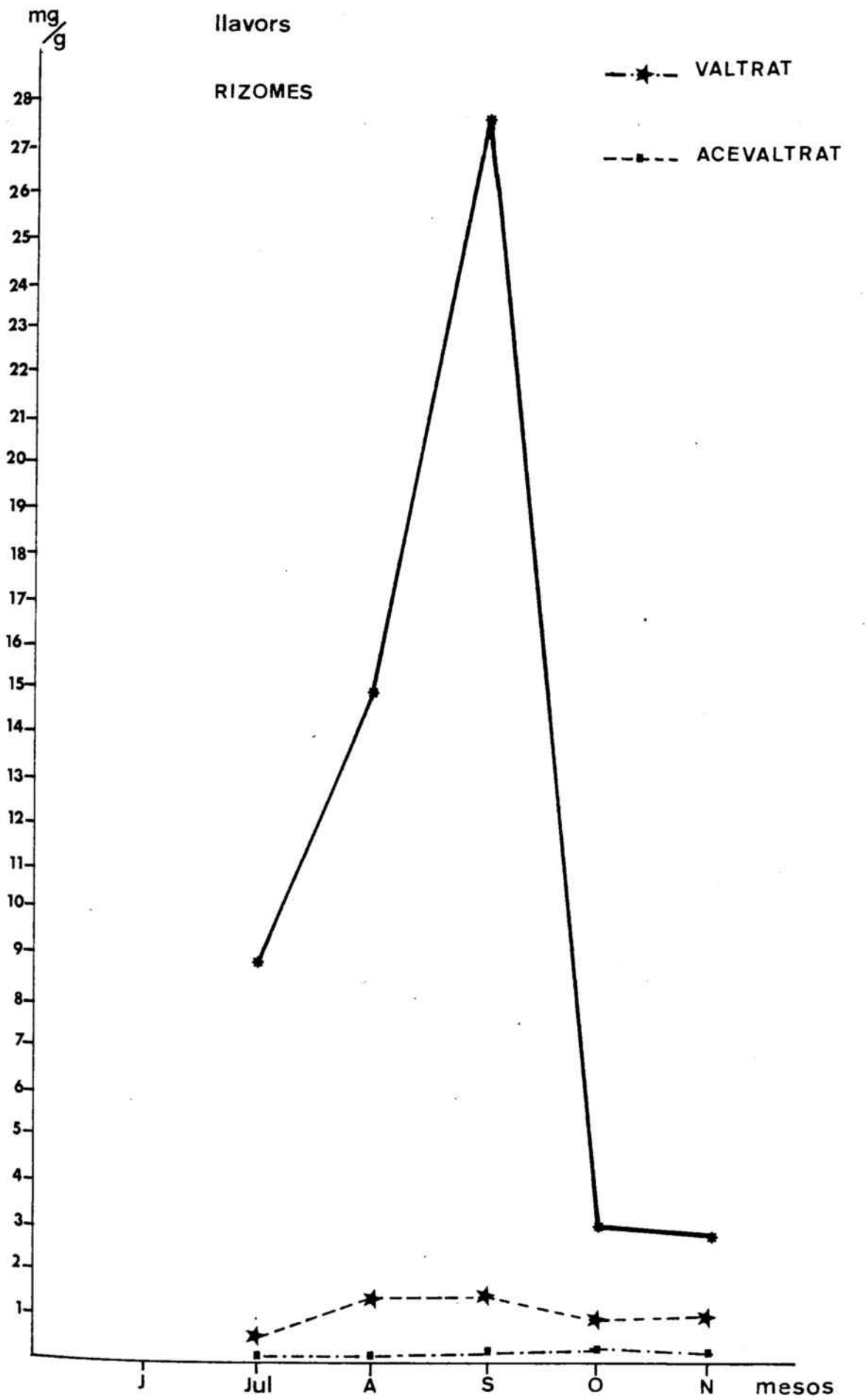




DELTA EBRE

llavors

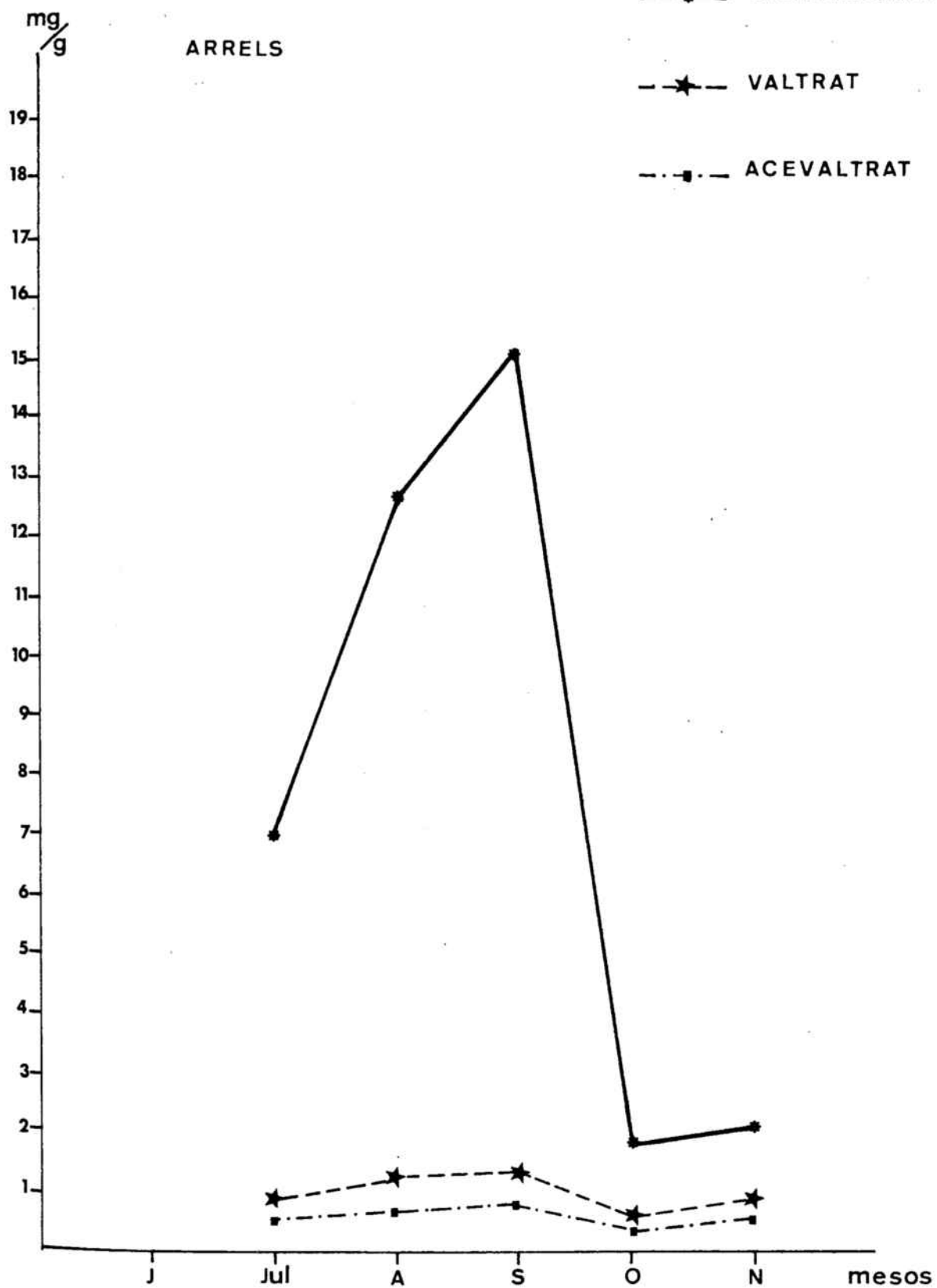
RIZOMES



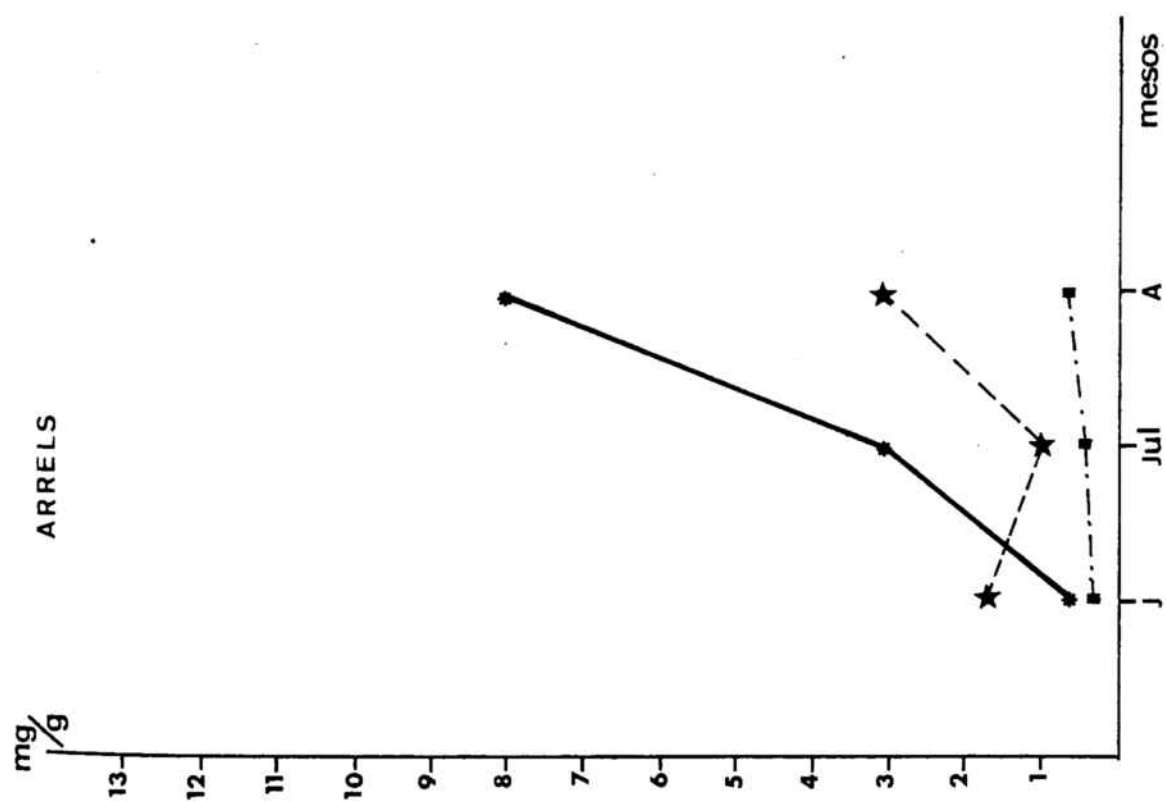
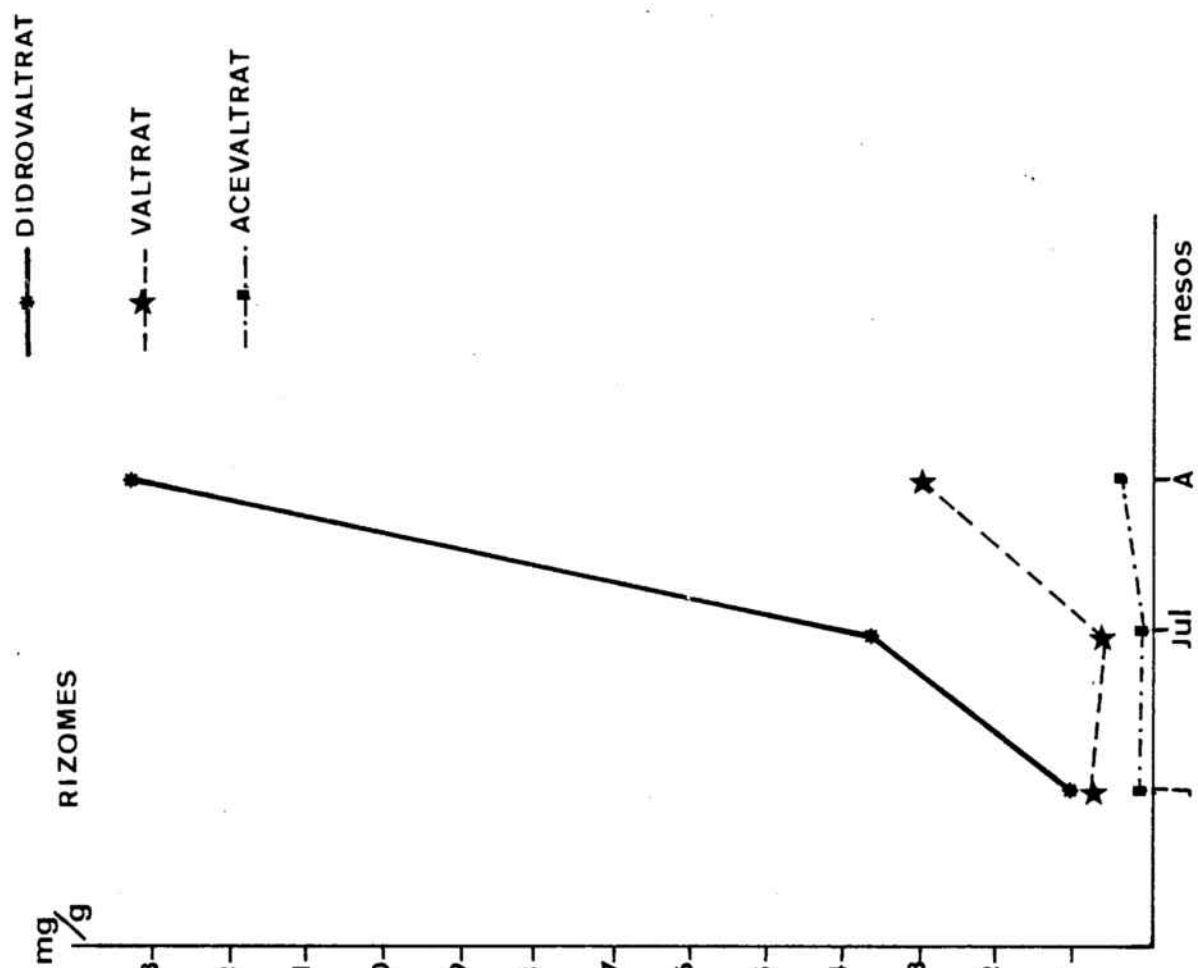
DELTA EBRE

llavors

ARRELS

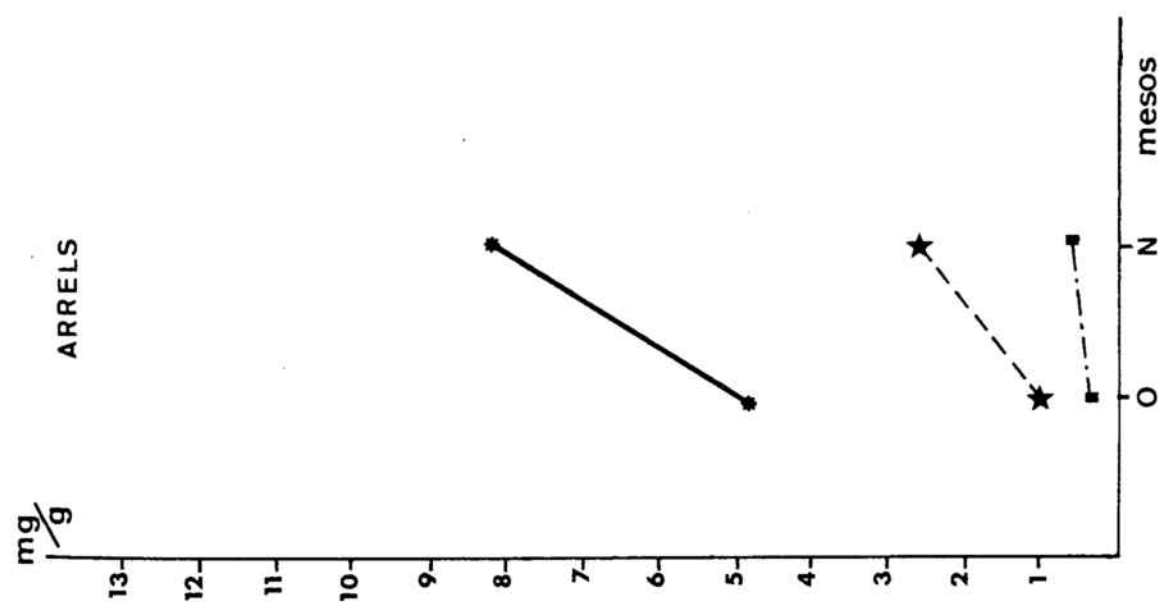
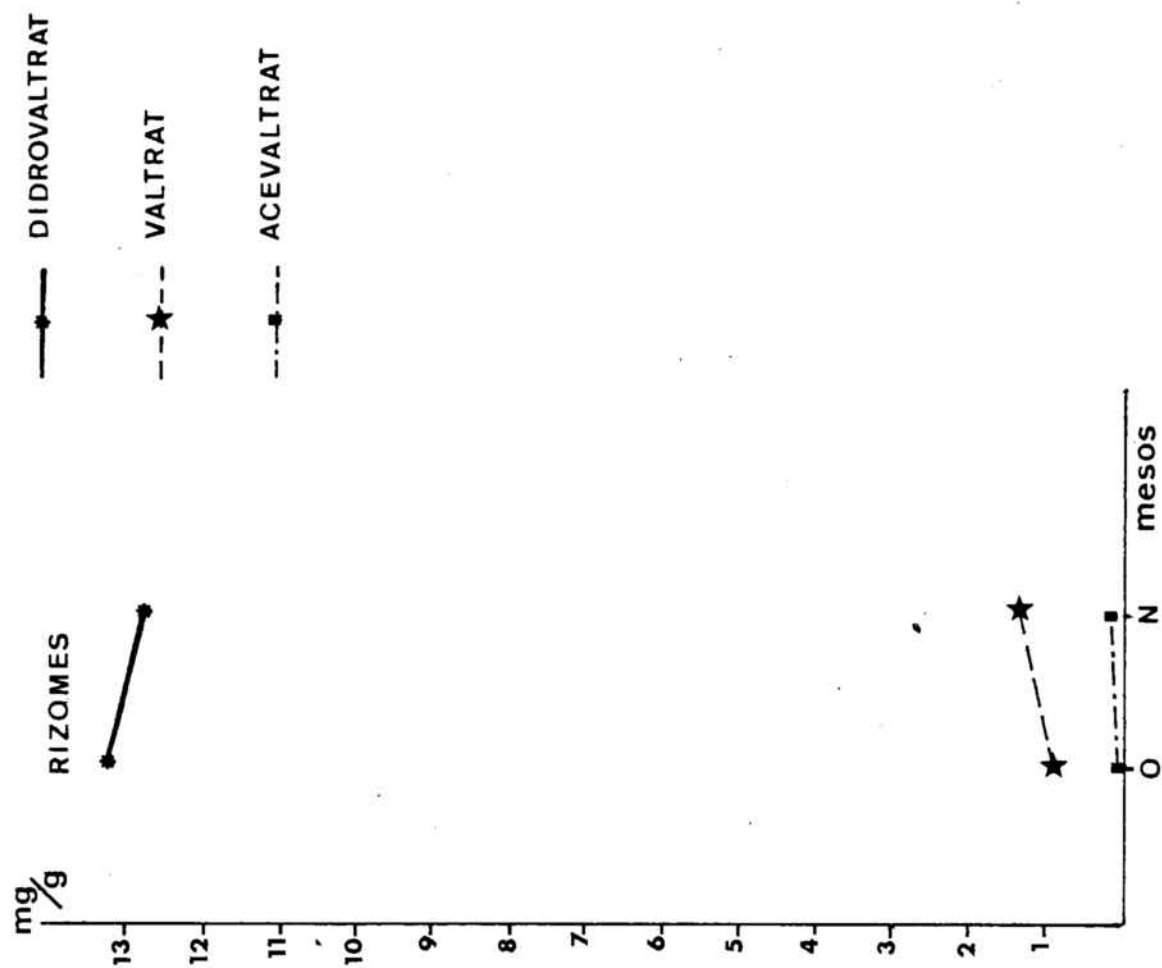


DELTA EBRE esqueixos



010T

esqueixos



9.- DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

En primer lloc, a partir de les dades experimentals obtingudes, es pot deduir que Valeriana wallichii DC s'ha aclimatat a les condicions del nostre país.

Per l'aspecte i l'evolució del cultiu, s'observa que les millors condicions ambientals es troben a Barcelona i a Sant Privat d'En Bas. Al delta de l'Ebre, per causes diverses, els cultius no s'han desenvolupat de la forma desitjada. Els principals factors que hi han contribuït són:

a) els nemàtodes: malgrat que al delta es cultiven també altres plantes amb predisposició a ésser atacades pels nemàtodes, com són: patata, tomàquet i pastanaga, només el cultiu de V.wallichii DC ha presentat problemes importants.

b) la presència de Fusarium oxysporum: paràsit dels feixos conductors que ataca la base de la tija.

c) el fet de tallar la part aèria de les plantes: per a evitar una excessiva transpiració deguda a les elevades temperatures estivals.

Quant a les condicions climàtiques, la zona d'Olot és semblant a la de l'entorn original de V.wallichii DC a l'Himàlaia; tant és així que ambdós llocs presenten vegetacions similars.

Amb tot, abans d'iniciar un cultiu de V.wallichii DC s'ha de tenir en compte les següents premisses:

-fer anàlisis del sòl per a determinar si hi ha o no nemàtodes o fongs.

-si n'hi ha o n'hi havia en cultius de l'any anterior,

no es farà el nou cultiu.

-no utilitzar, per a fer els nous cultius, esqueixos de plantes parasitades.

L'extracció i separació dels valepotriats per cromatografia en columna segons THIES(116) no ha resultat eficaç per a fer l'anàlisi rutinària de mostres ja que precisa d'una quantitat elevada de droga, a la vegada que es produeixen importants degradacions dels valepotriats durant el procés d'elució.

Quant als sistemes d'eluent emprats en cromatografia en capa fina, s'observa, gràcies al revelat amb 2,4-dinitrofenilhidracina clorhídrica, que es produeix una millor separació dels valepotriats amb toluè:acetat d'etil:etilmetilcetona (85:15:5), perquè els altres dos sistemes utilitzats comporten una superposició de taques.

Mitjançant la cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR) s'ha aconseguit una bona separació dels valepotriats, excepte en algunes mostres, en les que el pic corresponent al valtrat es superposa amb un altre que no hem pogut identificar per tal com no hem disposat de suficients patrons.

Com es pot apreciar en els cromatogrames, els isòmers i homòlegs del didrovaltrat, valtrat i acevaltrat representen també una fracció important del conjunt de valepotriats, sobretot els que es determinen a 256 nm., és a dir, els corresponents als dos darrers.

Per a la valoració dels resultats obtinguts, s'ha considerat que les plantes procedents d'esqueixos de V.wallichii DC plantades l'any anterior estaven ja en el segon any de

desenvolupament, mentre que les plantes procedents de llavors eren plantes noves. D'aquesta manera, en els cultius del delta de l'Ebre hi ha plantes d'un any (procedents de llavors) i plantes de dos anys (procedents d'esqueixos); a Olot hi ha plantes de dos anys (procedents d'esqueixos) i a Barcelona plantes de tres anys (procedents d'esqueixos, plantats dos anys abans de la recol·lecció).

En la majoria dels casos, tant en les arrels com en els rizomes, el valepotriat majoritari és el didrovaltrat, el qual es troba en quantitat superior en els rizomes, al contrari del valtrat i l'acevaltrat. Això podria ésser indicatiu d'un transport de didrovaltrat des de les arrels al rizoma.

Els continguts màxims de didrovaltrat es troben el mes de Setembre, el més alt el presenten els rizomes de plantes procedents de llavors del delta de l'Ebre (27,28 mg/100 g. droga), seguits de les plantes procedents d'esqueixos de Barcelona (24,32 mg/100 g. droga). El més baix es troba en arrels de plantes procedents d'esqueixos del delta de l'Ebre.

S'observa, també, que els valors d'acevaltrat obtinguts són poc significatius, ja que representen una fracció mínima dels valepotriats, sobretot en els rizomes, els quals presenten una quantitat d'acevaltrat molt petita i pràcticament sense oscil·lacions.

Els continguts més alts de valtrat i acevaltrat es troben en arrels de V.wallichii DC de Barcelona. En canvi, les plantes procedents de llavors del delta de l'Ebre presenten els més baixos.

En plantes d'un any les evolucions del contingut en valepotriats, tant en arrels com en rizomes, són més o menys paral·leles; en canvi, en plantes de tres anys, s'observa una tendència que les variacions siguin contràries, ja que quan augmenta el didrovaltrat, el valtrat disminueix.

Les plantes procedents d'Olot tenen una quantitat intermèdia tant en didrovaltrat, com en valtrat i acevaltrat respecte a les del delta de l'Ebre i Barcelona; això sembla assenyalar que els valepotriats augmenten amb l'edat de la planta.

Finalment, s'observa que al mes d'Octubre es produeix un descens brusc del contingut en didrovaltrat en els rizomes de les plantes del delta de l'Ebre procedents de llavors, mentre que en les de Barcelona el descens és menor i més suau.

CONCLUSIONS

10.- CONCLUSIONS

1) S'ha cultivat Valeriana wallichii DC, per primera vegada, en diverses zones del nostre país, amb resultats positius a Barcelona i a Sant Privat d'En Bas (Girona), on es donen les condicions ambientals més adequades.

2) En el delta de l'Ebre, els conreus s'han vist atacats per nombrosos paràsits, tant vegetals com animals, entre els quals s'han identificat alguns fongs imperfectes (Fusarium sp.), nemàtodes (Meloidogyne i Ditylenchus sp.) i pugons (Doralis fabae i Myzodes persicae), la disseminació dels quals es veu afavorida per la climatologia de la zona.

3) L'anàlisi de les mostres recol·lectades sistemàticament en els diversos cultius, ha posat en evidència que el contingut en valepotriats es troba, qualitativament i quantitativa, dins dels valors establerts per la bibliografia.

4) D'entre tots els sistemes assajats per obtenir una bona resolució dels valepotriats per cromatografia en capa fina, el més adient ha resultat ésser l'integrat per Toluè: Acetat d'etil: Etilmetilcetona (80:15:5) com a solvent; plaques de Silicagel F₂₅₄ com a suport; i 2,4-dinitrofenilhidracina clorhídrica com a revelador.

5) La tècnica de cromatografia líquida en fase inversa, utilitzant una columna Lichrosorb RP-18 i Metanol:Aigua (70:30) com a eluent, i emprant el pentilbenzè com a es-

tàndard intern, aplicada a l'anàlisi dels valepotriats, resulta un mètode molt sensible i ràpid, que ens demostra que hi ha diferències patents en la composició qualitativa i quantitativa entre les arrels i el rizoma d'una mateixa planta.

6) Els continguts més elevats de Didrovaltrat es produeixen en els rizomes recol·lectats el mes de Setembre.

7) Les quantitats més grans de Valtrat i d'Acevaltrat, es troben els mesos d'Octubre i Novembre, respectivament, en les arrels de plantes del tercer any, procedents de Barcelona.

8) Tant els continguts en Didrovaltrat dels rizomes, com els de Valtrat i Acevaltrat en les arrels, augmenten amb l'edat de la planta.

9) Les elevades temperatures estivals al delta de l'Ebre i les parasitosis detectades, han incidit més en les plantes multiplicades per esqueixos (segon any) que en les procedents de llavors (primer any); en aquestes últimes, el contingut en valepotriats no s'ha vist pràcticament afectat pels factors esmentats.

10) Per a obtenir el millor rendiment del cultiu de Valeriana wallichii DC al nostre país, des del punt de vista dels seus principis actius, cal fer la recol·lecció de les arrels i rizomes el Setembre del primer any.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ADZET, T.; IGLESIAS, J.; SAN MARTIN, R. i TORRENT, M.T.:
 Étude de certains ésters de la racine de Centranthus ruber et action pharmacodynamique de quelques-unes de ses préparations galéniques.
 Planta Medica, 1975, 27:194-198.
- 2.- ADZET, T.; IGLESIAS, J.; SAN MARTIN, R. i TORRENT, M.T.:
 Activité de la teinture de Centranthus ruber par voie digestive.
 Planta Medica, 1976, 29:305-309.
- 3.- ARORA, R.B. i ARORA, C.K.: Pharmacology of oriental plants,
 in: Proceedings of the 2nd. Int. Pharmacol.
 Meeting, Prague (CHEN, K.K.; MUKERJI, B. and VOLICER, L., Eds.), Pergamon Press, Oxford. 1963. p. 51-60.
 Citat per: HAZELHOFF, B. i col. en: Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1979, 1:140-148.
- 4.- BECKER, H.; SCHRALL, R. i HARTMANN, W.: Cultivation of tissue cultures of Valeriana wallichii DC and first analytical determination.
 Arch. Pharm. (Weinheim), 1977, 310:481-484.
- 5.- BECKER, H.: Production of substances with therapeutic activity from cultures of isolated plant cells. Use for valepotriates.
 Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1980, 40(3):173-179.
- 6.- BECKER, H. i SCHRALL, R.: Valepotriates in tissue cultures of nine different Valerianaceae species in comparison to literature data of the intact

plants.

J.Nat.Prod.,1980,43(6):721-723.

- 7.- BENIGNI,R.;CAPRA,C. i CATTORINI,P.E.:Piente Medicinale.
Chimica Farmacologia e Terapia.II^oVolume.
Inverni i della Beffa(Milano,1964).p.1649-1672.
- 8.- BLANKENHORN,B.:Pollenmorphologisch-systematische unter-
suchungen an Valerianaceae.
Bot.Jahrb.Syst.,1978,99:108-138.
- 9.- BLATTER,E.:Beautiful flowers of Kashmir.Vol.I.Staples
and Staples Limited(London).p.148-150.
- 10.- BORKOWSKI,B.:Herba Pol.,1972,18:11,citat per WAGNER,H.
i col. en:Planta Medica,1980,38:358-365.
- 11.- BOUNTHANH,C.;BERGMANN,C.;BECK,J.P.;HAAG-BERRURIER,M. i
ANTON,R.:Valepotriates,a new class of citotoxic
and antitumor agents.
Planta Medica,1981,41(1):21-28.
- 12.- BRAUN,R.;DITTMAR,W.;MACHUT,M. i WEICKMANN,S.:Valepo-
triate mit Epoxidstruktur-beachtliche Alkylan-
tien.Keine akute Unverträglichkeit von valepo-
triathaltigen Arzneimitteln bei oraler Appli-
kation.
Dtsch.Apoth.Ztg.,1982,122(21):1109-1113.
- 13.- BUCHTHALA,M.:Hippokrates,1968,39:466,citat per:THIES,
P.W. en:Synthesen neuartiger Heterocyclen aus
Valeriana-Inhaltsstoffen ,en Pharmacognosy and
Phytochemistry Ist.Int.Congress Munich,1970.
Wagner,H. i Hörhammer Eds.Springer Verlag(Ber-
lin,1971). p.41-63.

- 14.- CADEVALL i DIARS, J.: Flora de Catalunya. Vol. III. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències. 1919-1923. p.160-176.
- 15.- CAMARASA, J.M.; FOLCH i GUILLEN, R.; MASALLES, R.M. i VELASCO, E.: El paisatge vegetal del delta de l'Ebre. En el llibre: Els sistemes naturals del delta de l'Ebre. Institució Catalana d'Historia Natural. 1977. p.51-101.
- 16.- CHAPELLE, J.P. i DENOEL, A.: Contribution à l'étude des valépotriates dans la racine de Valériane officinale. Plantes médicinales et phytothérapie, 1972, 4(2):91-105.
- 17.- COMPENDIO FITOSANITARIO BAYER; Tomo II. Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft, 1968, Leverkusen (Alemania).
- 18.- CZABAJSKA, W.; JARUZELSKI, M. i UBYSZ, D.: New methods in the cultivation of Valeriana officinalis. Planta Medica, 1976, 30:9-13.
- 19.- DE CANDOLLE: Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis. Tomo IV. Parisiis, 1830. p.623-642.
- 20.- DEMOLON, A.: Crecimiento de los vegetales cultivados. Principios de agronomía. E.Omega, S.A. Barcelona, 1966. p.319-460.
- 21.- DENEÉ, R.; BOS, R. i HAZELHOFF, B.: Isolation and structure elucidation of isovaltral, a decomposition product of isovaltrate. Planta Medica, 1979, 37(1):45-48.

- 22.- DUCHAUFOR, P.: Manual de Edafología. Ed. Toray-Masson, S.A. Barcelona, 1975. p. 84-157.
- 23.- EISENHUTH, F.: Pharmazie, 1955, 10: 501, citat per: BENIGNI, R. i col. en: Pianta Medicinale. Chimica Farmacologia e Terapia. II^o Volume. Inverni i della Beffa (Milano, 1964). p. 1651.
- 24.- EISENHUTH, F.: Pharmazie, 1956, 11: 271, citat per: WAGNER, H. i col. en: Arzneim. Forsch. (Drug Res.), 1972, 7: 1204-1209.
- 25.- EICKSTEDT, K.W. von: Arzneim. Forsch. (Drug Res.), 1969, 19: 993, citat per: WAGNER, H. i col. en: J. of Chromatography, 1978, 148: 459-468.
- 26.- EICKSTEDT, K.W. von, i RAHMAN, S.: Psycopharmacologische Wirkungen von Valepotriaten. Arzneim. Forsch. (Drug Res.), 1969, 19(3): 316-319.
- 27.- FARMACOPEA OFICIAL ESPAÑOLA, IX Ed. Madrid, 1954. p. 1122-1123.
- 28.- FIRPO, G.: Apuntes de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Colegio Oficial de Químicos de Barcelona. Perkin-Elmer Hispania, S.A. p. 13-90.
- 29.- FLÜCKIGER, F.A. i HANDBURY, D.: Histoire des drogues d'origine végétale. Tome premier. Ed. Octavie Doin. Paris, 1878. p. 656-660.
- 30.- FONT I QUER, P.: Dioscórides renovado. Plantas medicinales. Ed. Labor, S.A. Barcelona-Madrid, 1962. p. 757-760.
- 31.- FORNI, G.P.: Thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography in the analysis

of extracts.

Fitoterapia, 1980, 51(1):13-33.

- 32.- FUNKE, E.D. i FRIEDRICH, H.: Valepotriate in oberirdischen organen einiger arten der Valerianaceen.
Phytochemistry, 1974, 13:2023-2024.
- 33.- FUNKE, E.D. i FRIEDRICH, H.: Valepotriate in oberirdischen organen weiterer arten der Valerianaceen.
Planta Medica, 1975, 28:215-224.
- 34.- FURUYA, T. i KOJIMA, H.: J. Chromatogr., 1967, 29, 341, citats per: HAZELHOFF, B. i col. en: Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1979, 1:140-148.
- 35.- GARCIA DE PEDRAZA, L. i GARCIA SANJUAN, J.: Diez temas sobre el clima. 2ª edición. Ministerio de Agricultura. Madrid, 1978.
- 36.- GIMENO, E.: Himàlaia, en: Gran Enciclopèdia Catalana. Volum 8. 1ª edició. Enciclopèdia Catalana, S.A. Barcelona, 1975. p.429-430.
- 37.- GIRGUNE, J.B.; JAIN, N.K. i GARG, B.D.: Antimicrobial activity of the essential oil from Valeriana wallichii DC. (Valerianaceae).
Indian J. Microbiol., 1980, 20(2), 142-143.
- 38.- GRAEBNER, P.: Die Gattungen der natürlichen Familie der Valerianaceae.
Bot. Jahrb. Syst., 1906, 37:464-480.
- 39.- GUIBOURT, N.J.B.G.: Histoire naturelle des drogues simples. Tome troisième. Sixième édition. Ed. J.B. Baillièrre et Fils. Paris, 1869. p.71-83.

- 40.- HAENSEL, R. i SCHULZ, J.: GABA und andere Aminosäuren in der Baldrianwurzel.
Arch. Pharm. (Weinheim), 1981, 314(4): 380-381.
- 41.- HÄNSEL, R i SCHULZ, J.: Valerensäuren und Valerenal als Leitstoffe des offizinellen Baldrians. Bestimmung mittels HPLC-Technik. 2. Mitteilung zur Qualitätssicherung von Baldrianpräparaten.
Dtsch. Apoth. Ztg., 1982, 122(5): 215-219.
- 42.- HANDJEVA, N. i ZAIKIN, V. G.: DIA-valtrate, a new valepotriate from Centranthus ruber (L.) DC.
Planta Medica, 1978, 34(2): 203-206.
- 43.- HAZELHOFF, B.: Vortrag auf der Jahrestagung der Pharmaz. Gesellschaft in Münster, 1978; citat per: WAGNER, H. i col. en: Planta Medica, 1980, 38: 358-365.
- 44.- HAZELHOFF, B.; SMITH, D.; MALINGRÉ, TH. M. i HENDRIKS, H.: The essential oil of Valeriana officinalis L. s. l.
Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1979, 1(2): 443-449.
- 45.- HAZELHOFF, B.; WEERT, B.; DENEE, R. i MALINGRÉ, TH. M.: Isolation and analytical aspects of Valeriana compounds.
Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1979, 1: 140-148.
- 46.- HAZELHOFF, B.; WEERT, B. i MALINGRÉ, TH. M.: Isolation and analytical aspects of Valeriana compounds. II. A statistical comparison of extraction procedures and of quantitative determinations of (iso)valtrate.
Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1981, 3: 106-110.

- 47.- HAZELHOFF, B.; JELLEMA, R.; GROBBEN, H. i MALINGRÉ, TH.M.:
Separation of valtrate and isovaltrate by
means of preparative liquid chromatography.
Pharm.Weekblad Sci.Ed., 1982, 4:21-24.
- 48.- HEEGER e BAUER : Pharmazie, 1946, 1:27, citat per: BENIGNI, R. i col. en: Piante Medicinali. Chimica Farmacologia e Terapia. II^o Volume. Inverni i della Beffa. Milano, 1964. p.1650.
- 49.- HEEGER: Heil. u. Gewürz-Pflanzen, 1942, 21:1, citat per: BENIGNI, R. i col. en: Piante Medicinali. Chimica Farmacologia e Terapia, II^o Volume. Inverni i della Beffa. Milano, 1964. p.1651.
- 50.- HENDRIKS, H.; SMITH, D. i HAZELHOFF, B.: Eugenyl isovalerate and isoeugenyl isovalerate in the essential oil of Valerian root.
Phytochemistry, 1977, 16:1853-1854.
- 51.- HENDRIKS, H.; BOS, R.; ALLERSMA, D.P.; MALINGRÉ, TH.M. i KOSTER, A.SJ.: Pharmacological Screening of Valerenal and some other components of Essential Oil of Valeriana officinalis.
Planta Medica, 1981, 42:62-68.
- 52.- HÖCK, F.: Beiträge zur Morphologie, Gruppierung und geographischen Verbreitung der Valerianaceen.
Bot. Jahrb. Syst., 1882, 3(1):1-73.
- 53.- HOLM, E.; LANGHANS, W.; AMMELOUNX, P.; SCHERER, H.-D. i BLATTER, J.: Vergleichende neurophysiologische Untersuchungen mit Valepotriaten und extractum Valerianae an Katzen.
Planta Medica, 1978, 33:232.

- 54.- HÖLZL, J.: Zur Herstellung von ^{14}C -markierten valepotriaten mit Valeriana wallichii.
Planta Medica, 1972, 24:66-72.
- 55.- HÖLZL, J. i JURCIC, K.: Valepotriates in the leaves of Valeriana jatamansii.
Planta Medica, 1975, 27:133-139.
- 56.- HÖLZL, J.: The role of chemical races, sources, cultivars and species for the in vivo preparation of radioactive labelled natural compounds, described from Valeriana.
Planta Medica, 1975, 28:301-313.
- 57.- INFORMACIÓN TÉCNICA DE NEMACUR^R. Bayer Pflanzenschutz. Leverkusen. 1971.
- 58.- INOUE, H.; UEDA, S.; UESATO, S. i SHINGU, T.: Die absolute konfiguration von Valerosidatum und von Didrovaltratum.
Tetrahedron, 1974, 30:2317-2325.
- 59.- JACKSON, R.M. i RAW, F.: La vida en el suelo. Segunda edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1981.
- 60.- JANOT, M.-M.; GUILHEM, J.; CONTZ, O.; VENERA, G. i CIONGA, E.: Study of valerian alkaloids (Valeriana officinalis): Actinidine and naphthyridilmethylketone, a new alkaloid.
Ann. Pharm. Fr., 1979, 37(9):413-420.
- 61.- JUSCAFRESCA, B.: Lucha contra los parásitos vegetales. Tratado de fitoparasitología. Corrección de enfermedades carenciales, fisiológicas y patológicas. Ed. Sintet, S.A. Les Fonts de Tarrassa. Barcelona. 1973.

- 62.- JURCIC, K.: Thesis. Munich, 1974. Citat per: HAZELHOFF, B. i col. en: Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1979, 1:140-148.
- 63.- KREPINSKY, J.; HEROUT, V. i SORM, F.: Collect. Szelchosl. Chem. Comm., 1959, 24:1884, citat per: CHAPELLE, J.P. i DENOEL, A. en: Plantes médicinales et Phytothérapie, 1972, 4(2):91-105.
- 64.- KUCABA, W.; THIES, P.W. i FINNER, E.: Isodidrovaltratum, ein neues valepotriat aus Valeriana vaginata. Phytochemistry, 1980, 19:575-577.
- 65.- KUPCHAN, S.M.; SHIZURI, Y.; MURAE, T.; SWEENEY, J.G.; HAYNES, H.R.; SHEN, M.S.; BARRICK, J.C.; BRYAN, F.R.; VAN DER HELM, D. i WU, K.K.: J. Am. Soc., 1976, 98:5719, citat per: BOUNTHANH, C. i col. en: Planta Medica, 1981, 41:21-28.
- 66.- LAWALRÉE, A.: Le groupe du Valeriana officinalis L. en Belgique.
Bulletin du Jardin Botanique de l'État. Ministère de l'Agriculture. Bruxelles, 1952, Vol. XXII (3 et 4):193-200.
- 67.- LIPTÁK, J. i VERZÁR-PETRI, G.: Titrimetrische Bestimmung der Valepotriate.
Sci. Pharm., 1980, 48(3):203-206.
- 68.- LLORET, T.: S. Privat d'En Bas, en: Gran Enciclopèdia Catalana. Volum 13. 1ª edició. Enciclopèdia Catalana, S.A. Barcelona, 1979. p.303-304.
- 69.- MALDONADO, A.: Introducció geològica al delta del Ebro. En el llibre: Els sistemes naturals del delta de l'Ebre. Institució Catalana d'Historia Na-

tural.1977. p.7-45.

- 70.- MANNETSTATTER,E.;GERLACH,H. i POETHKE,W.:Die Pharmazie, 1966,21:321,citat per:PARIS,R. i MOURY,J. en: Ann.Pharm.Fr.,1967,25(12):775-778.
- 71.- MANNETSTATTER,E.;GERLACH,H. i POETHKE,W.:Pharm.Zentralhalle,1967,106:797-803,citat per:CHAPELLE,J.P. i DENOEL,A. en:Plantes médicinales et phytothérapie,1972,4(2):91-105.
- 72.- MANNETSTATTER,E.;GERLACH,H. i POETHKE,W.:Pharm.Zentralhalle,1968,107:105-113,citat per:CHAPELLE,J.P. i DENOEL,A. en:Plantes médicinales et phytothérapie,1972,4(2):91-105.
- 73.- MANN,J.:Secondary metabolism.Oxford Chemistry Series. Oxford University Press Inc.New York,1980. p.96-98.
- 74.- MARTINDALE:The Extra Pharmacopoeia.Twenty-seventh edition. The Pharmaceutical Press.London,1977. p.1828.
- 75.- MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CROMATOGRÁFO PERKIN-ELMER SERIE 3.
- 76.- MARGALEF,R.:Ecología.Ed.Omega,S.A.Barcelona,1974. p.213-222.
- 77.- MEER,J.H.VAN,i LABADIE,R.P.:Combined use of different techniques in the analysis of Valepotriates. Planta Medica,1977,32(A),51.
- 78.- MEER,J.H.VAN,i LABADIE,R.P.:Valepotriates:Positional isomers and homologues. Plantaardige Geneesmiddelen in the Gezondheidszorg,1980,p.156-161.

- 79.- MEER, J.H.VAN, i LABADIE, R.P.: Preparative Liquid Chromatography of Closely related Valepotriates. *Planta Medica*, 1980, 39:269-270.
- 80.- MEER, J.H.VAN, i LABADIE, R.P.: Straight-phase and reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of valepotriate isomers and homologues. *J.Chromatogr.*, 1981, 205(1):206-212.
- 81.- NYLANDER: Ref. Pharmaz. Ztg., 1935, 80:1031, citat per: BENIGNI, C. i col. en: *Piante Medicinali. Chimica Farmacologia e Terapia. II^a Volume. Inverni i della Beffa. Milano, 1964. p.1651.*
- 82.- PARIS, R.R. i MOYSE, H.: *Précis de Matière Médicale, I i III* Masson et Cie., Ed. Paris, 1967. Tome I p.14-26, Tome III p.386-397.
- 83.- PARIS, R. i MOURY, J.: Sur les constituants du Centranthe (Centranthus ruber DC); essais de fractionnement d'esters à action sédative. *Ann. Pharm. Fr.*, 1967, 25:775-778.
- 84.- PETRICIĆ, J.: Stability and estimation of Valerian (Radix Valerianae). *Acta Pharm. Jugoslavica*, 1979, 29(1):23-28.
- 85.- PLOUVIER, V. i FAVRE-BONVIN, J.: Les iridoïdes et seco-iridoïdes: répartition, structure, propriétés, biosynthèse. *Phytochemistry*, 1971, 10:1697-1722.
- 86.- POPOV, S.; HANDJIEVA, N. i MAREKOV, N.: A new valepotriate: 7-epi-deacetylisovaltrate from *Valeriana officinalis*.

Phytochemistry, 1974, 13:2815-2818.

- 87.- POPOV, S.; HANDJIEVA, N. i MAREKOV, N.: AHD-valtrate, a new valepotriate from Centranthus ruber.

Phytochemistry, 1978, 17:561-563.

- 88.- PROKOPCHUK, A.F.; KHANIN, M.L.; PEROVA, T.V.; PROKOPCHUK, YU.A. i NIKOLAEVA, L.A.: Antifungal action of spicy and medicinal-aromatic plant raw material on Candida albicans.

Izv Sev-Kavk Nauchn Tsentra Vyssh Shk Estestv Nauki, 1979, 4(3):81-83.

- 89.- PUIGGRÓS, J.M.: Nemátodos principales de los cultivos españoles y su control.

Actualidades fitosanitarias 1/81. Bayer Hispania Comercial, S.A. Barcelona, 1981.

- 90.- ROSENFELD, L.I. i CHAZANOWITSCH : Aptekhnos Delo, 1958, 7: 22, citat per: BENIGNI, R. i col. en: Pianta Medicinali. Chimica Farmacologia e Terapia. II^a Volume. Inverni i della Beffa. Milano, 1964. p.1667.

- 91.- RÜCKER, G.; HÖRSTER, H. i TAUTGES, J.: Valeranon-gehalt in den unterirdischen teilen von Nardostachys jatamansi und Valeriana officinalis.

Phytochemistry, 1977, 16:1070-1071.

- 92.- RÜCKER, G.: Arzneimittel-Forsch., 1978, 28:7, citat per: HAZELHOFF, B. i col. en: Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1979, 1:140-148.

- 93.- RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M. i SHARAF EL DIN, M.: Quantitative Dünnschichtchromatographische Analyse von Valepotriaten.

Planta Medica, 1981, 43:299-311.

- 94.- SAN MARTIN CASAMADA, R.: Tratado de Farmacognosia. Ed. Científico-Médica. Barcelona, 1977.
- 95.- SCHAETTE, R.: Thesis. Munich, 1971. Citat per: HAZELHOFF, B. i col. en: Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1979, 1:140-148.
- 96.- SCHULTZ, O.E. i ECKSTEIN, K.: Arzneimittel-Forsch., 1962, 12:12-15, citat per: CHAPELLE, J.P. i DENOEL, A. en: Plantes médicinales et phytothérapie, 1972, 4(2):91-105,
- 97.- SCHROEDER, G.; ROHMER, M.; BECK, J.P. i ANTON, R.: Planta Medica, 1979, 35:235, citat per: BOUNTHANH, C. i col. en :Planta Medica, 1981, 41:21-28.
- 98.- SOLÉ I SABARÍS, LL.: Geografia de Catalunya. I, II, i III. Ed. AEDOS. Barcelona, 1958-1964-1968. Tomo I p. 163-186. Tomo II p. 385-394. Tomo III p. 113-118, 497-512.
- 99.- SOLÉ I SUGRANYES, LL.: Barcelona, en: Gran Enciclopèdia Catalana. Volum 3. 1ª edició. Enciclopèdia Catalana, S.A. Barcelona, 1971. p. 193-194.
- 100.- STAHL, E.: Analyse chromatographique et microscopique des drogues. Entreprise Moderne d'Édition. Paris, 1975. p. 207-210.
- 101.- STAHL, E. i SCHILD, W.: Thin-layer Chromatography for determination of Pharmacopoeia Drugs. Part IV: Valerian root, Valeriana radix. Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.), 1969, 19(3): 314-316.

- 102.- STAHL,E. i SCHILD,W.:Über die verbreitung der aequilibrierend wirkenden valepotriate in der familie der Valerianaceen.
Phytochemistry,1971,10:147-153.
- 103.- STAHL,E. i SCHULTZ,E.:Extraction of labile natural substances with supercritical gases:4.Extraction of valepotriates from Valeriana wallichii.
Planta Medica,1980,40(3):262-270.
- 104.- STOLL,A.;SEEBECK,E. i STAUFFACHER,D.:Helv.Chim.Acta, 1957,40:1205-1229,citat per:BENIGNI,R. i col. en:Piante Medicinali.Chimica Farmacologia e Terapia.II^aVolume.Inverni i della Beffa.Milano,1964. p.1658.
- 105.- STOLL,A.;SEEBECK,E. i STAUFFACHER,D.:Sweiz.Apoth.Ztg., 1957,95:115,citat per:WAGNER,H. i col. en:Arzneim.Forsch.(Drug Res.),1970,20(8):1149-1152.
- 106.- STRASBURGER,E.:Tratado de Botánica.Ed.Marín,S.A. Barcelona,1974. p.699.
- 107.- STROH,G.:Valeriana L.Repertorium specierum novarum regnis vegetabilis,1936,1031/1039,XL 11-19: 225-233.
- 108.- SURI,R.K. i THIND,T.S.:Antibacterial activity of some essential oils.
Indian Drugs Pharm.Ind.,1978,13(6):25-28.
- 109.- SUTCLIFFE,J.:Las plantas y la temperatura.Cuadernos de Biología.Ed.Omega,S.A.Barcelona,1979. p.4-8.

- 110.- SUTCLIFFE, J.F. i BAKER, D.A.: Las plantas y las sales minerales. Cuadernos de Biología. Ed. Omega, S.A. Barcelona, 1979. p.1-29.
- 111.- TAKAMURA, K. i col.: Yakugaku Zasshi, 1973, 93:599, citat per: HAZELHOFF, B. i col. en: Pharm. Weekblad Sci. Ed., 1979, 1:140-148.
- 112.- THIES, P.W. i FUNKE, S.: Über die wirkstoffe des Baldrians. 1. Mitteilung. Nachweis und isolierung von sedativ wirksamen isovaleriansäureestern aus wurzeln und rhizomen von verschiedenen Valeriana-und Kentranthus-arten. Tetrahedron Letters, 1966, 11:1155-1162.
- 113.- THIES, P.W.: Über die wirkstoffe des Baldrians. 2. Mitteilung. Zur konstitution der isovaleriansäure-ester valepotriat, acetoxylepotriat und dihydrovalepotriat. Tetrahedron Letters, 1966, 11:1163-1170.
- 114.- THIES, P.W.: Zur Chemie der Valepotriate. 4. Mitteilung über die wirkstoffe des Baldrians. Deutsche Apotheker-Zeitung, 1967, 40:1411-1412.
- 115.- THIES, P.W.: Linarin-isovalerianat, ein bisher unbekanntes flavonoid aus Valeriana wallichii DC. 6. Mitteilung über die wirkstoffe des Baldrians. Planta Medica, 1968, 16:361-371.
- 116.- THIES, P.W.: Die Konstitution der Valepotriate. 3. Mitteilung über die wirkstoffe des Baldrians. Tetrahedron, 1968, 24:313-347.

- 117.- THIES, P.W.: Zum chromogenen Verhalten der Valepotriate.
5. Mitteilung über die wirkstoffe des Baldrians.
Arzneim-Forsch (Drug Res.), 1969, 19(3): 319-322.
- 118.- THIES, P.W.: Valerosidatum, ein iridoidesterglycosid
aus Valeriana-arten. VII. Mitteilung über die
wirkstoffe des Baldrians.
Tetrahedron Letters, 1970, 28: 2471-2474.
- 119.- THIES, P.W.: Stereochemie des didrovaltratum und Syn-
these einiger 2,9-Dioxatricyclo(4,3,1,0^{3,7})
decane. VIII. Mitteilung über die wirkstoffe
des Baldrians.
Tetrahedron Letters, 1970, 35: 3087-3090.
- 120.- THIES, P.W.: Synthesen neuartiger Heterocyclen aus
Valeriana-Inhaltsstoffen; en: Pharmacognosy and
Phytochemistry 1st. Int. Congress Munich, 1970
(Wagner, H. and Hörhammer, L., Eds.) Springer
Verlag. Berlin, 1971. p. 41-63.
- 121.- THIES, P.W.: Über die wirkstoffe des Baldrians, 9. Notiz
über eine vereinfachte Synthese von 2,9-Dioxa-
tricyclo(4,3,1,0^{3,7})decanen aus Didrovaltratum.
Chem. Ber., 1972, 105: 3491-3494.
- 122.- THIES, P.W.; FINNER, E. i ROSSKOPF, F.: Über die wirkstoffe
des Baldrians. X. Die konfiguration des valtra-
tum ind anderer valepotriate.
Tetrahedron, 1973, 29(20): 3213-3226.
- 123.- THIES, P.W.; KONOVAL, A. i SNATZKE, G.: Circular dichroism-
LXVIII. Compounds from Valerian-XII. On the
chiroptical properties of valepotriates and
related compounds.
Tetrahedron, 1978, 34: 253-258.

- 124.- THIES, P.W.; FINNER, E. i DAVID, S.: On the active agents of Valerian. XIV. Assignment of type and location of the Acyloxy Substituents in Valepotriates via ^{13}C -NMR-Spectroscopy.
Planta Medica, 1981, 41:15-20.
- 125.- TITTEL, G. i WAGNER, H.: High performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of valepotriates in Valeriana drugs and preparations.
J. Chromatography, 1978, 148:459-468.
- 126.- TREASE and EVANS: Textbook of Pharmacognosy. Ninth edition. Baillière, Tindall and Cassell. London, 1966. p.636.
- 127.- TUTIN, T.G.; HEYWOOD, V.H.; WALTERS, S.M. i WEBB, D.A.: Flora europea. University Press. Cambridge, 1964. p.48-56.
- 128.- VERLAQUE, R.: Rapports entre les Valerianaceae, les Morinaceae et les Dipsacaceae.
Bull. Soc. Bot. Fr., 1977, 124:475-482.
- 129.- VÍA, J. i SOLÉ I SABARÍS, LL.: En el llibre: Els sistemes naturals del delta de l'Ebre. Institució Catalana d'Història Natural. 1977. p.18.
- 130.- VILA, M^aD.: Índia, en: Gran Enciclopèdia Catalana. Volum 8. 1^a edició. Enciclopèdia Catalana, S.A. Barcelona, 1975. p.588-589.
- 131.- WAGNER, H.; HÖRHAMMER, L.; HÖLZL, J. i SCHÄETTE, R.: A quantitative Method for Determination of the Drug Radix Valerianae and its preparations.

Arzneim-Forsch.(Drug Res.),1970,20(8):1149-1152.

- 132.- WAGNER,H.;SCHAETTE,R.;HÖRHAMMER,L. i HÖLZL,H.:On the dependence of the Valepotriate and Ethereal Oil Content in Valeriana officinalis L.s.l. upon different Exogenous and Endogenous Factors.

Arzneim-Forsch.(Drug Res.),1972,7:1204-1209.

- 133.- WAGNER,H. i JURCIC,K.:Spasmolytic effect of Valeriana.
Planta Medica,1979,37(1):84-87.

- 134.- WAGNER,H. i JURCIC,K.:In vitro and in vivo metabolism of carbon-14-labeled didrovaltrate.

Planta Medica,1980,38(4):366-376.

- 135.- WAGNER,H.;JURCIC,K. i SCHAETTE,R.:Comparative studies on the sedative effect of Valeriana extracts, valepotriates and their degradation products.
Planta Medica,1980,39(4):358-365.

- 136.- WALLIS,T.E.:Textbook of Pharmacognosy.Fourth edition.
J. and A. Churchill LTD.London,1960. p.852-856.

- 137.- WALTER,H.:Vegetació i climes del món.Opera Botanica Basica Vol.I.2ªEdició,1973.Romargraf,S.A.
Barcelona,1976. p.1-22,162-168,193-195.

- 138.-WEBERLING,F.:Monographie der Gattung Nardostachys DC
(Valerianaceae).

Bot.Jahrb.Syst.,1978,99:188-221.

- 139.- YOUNGKEN,H.W.:A textbook of Pharmacognosy.Sixth edition.The Blakiston Company.Philadelphia,1948.
p.375-376.

140.- YOST, R.W.; ETTRE, L.S. i CONLON, R.D.: Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. Perkin-Elmer Corporation, Norwalk (U.S.A.), 1981. p.1-96, 122-143, 214-247.