

Fracción alcaloidal obtenida de *Valeriana pavonii* Poepp con actividad anticonvulsivante

Daniel Arévalo, Carlos A. Martínez, Javier Rincón¹, Mario F. Guerrero¹

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá D.C. E-mail: jrinconv@unal.edu.co, mfguerrerop@unal.edu.co

Recibido para evaluación: julio 10 de 2006

Aceptado para publicación: septiembre 11 de 2006

RESUMEN

El extracto etanólico y una fracción alcaloidal, obtenidos de *Valeriana pavonii*, presentaron actividad protectora (40 y 70% respectivamente) contra las convulsiones inducidas por electroshock, modelo murino experimental de las crisis tipo tónico clónico en el humano. A través del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico, se determinó la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides o terpenos como sus principales metabolitos secundarios. Se caracterizó la fracción alcaloidal, y los métodos espectroscópicos utilizados permitieron establecer que los compuestos presentes contienen grupos funcionales de carácter aromático y alifático. Estos estudios señalan que la composición química de *V. pavonii*, difiere de la de *Valeriana officinalis*, pese a que comparte con ella usos etnobotánicos similares relacionados con actividad depresora sobre el sistema nervioso central. La protección conferida por la fracción alcaloidal de *V. pavonii* apoya el uso etnobotánico de esta especie y abre la posibilidad de servir como base para la obtención de moléculas con carácter neuroprotector.

Palabras clave: *Valeriana pavonii*, alcaloides, anticonvulsivante, electroshock.

SUMMARY

ALKALOID FRACTION OBTAINED FROM *VALERIANA PAVONII* POEPP WITH ANTICONVULSANT ACTIVITY

The ethanolic extract and an alkaloid fraction obtained from *Valerian pavonii* showed anticonvulsant effects in maximal electroshock seizures in mice (40 and 70% protection respectively). The alkaloid fraction contains aromatic, and terpenoid functional groups. Flavonoid and steroid/terpenoid compounds are present in *V. pavonii* too. The chemical composition of this specie differs from *V. officinalis* although they both have the same ethnobotanical uses. The anticonvulsant activity of the alkaloid fraction from *V. pavonii* supports its ethnobotanical use and encourages finding new therapeutic alternatives for treatment of neurological disorders.

Keywords: *Valerian pavonii*, alkaloid, anticonvulsant, maximal electroshock seizure

INTRODUCCIÓN

Muchas de las especies de la familia Valerianacea, entre las cuales la más conocida es *Valeriana officinalis*, se utilizan para el tratamiento de desordenes nerviosos y psicógenos como ansiedad, insomnio y epilepsia (1-3). En Colombia es común utilizar *V. pavonni* (bejuco) para los mismos fines de *V. officinales* (raíces). En un estudio preliminar realizado recientemente en el Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, en el que se incluyeron varias especies a las que las comunidades les atribuyen efectos sobre el sistema nervioso central, *Bidens laevis* y *V. pavonii* demostraron actividad anticonvulsivante en el modelo de crisis tipo tónico clónico inducida por descarga eléctrica en ratones (4).

Colombia es uno de los países con mayor prevalencia de epilepsia (5), trastorno para el cual, pese a los avances introducidos por los nuevos fármacos anticonvulsivantes, aún existe un buen número de pacientes que no responden adecuadamente a la medicación (6). Esta razón justifica la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, una de cuyas fuentes pueden ser los productos naturales. El objetivo de este estudio fue, por tanto, avanzar en la caracterización fitoquímica de la fracción responsable de la actividad anticonvulsivante de *V. pavonii*, especie poco estudiada química y biológicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del material vegetal y obtención del extracto etanólico de *Valeriana pavonii* (EEVP)

El material vegetal fresco se colectó en el municipio de San Antonio del Tequendama (Departamento de Cundinamarca, Colombia). Dos ejemplares del mismo se clasificaron taxonómicamente en el Herbario Nacional Colombiano (números de colección: Col. 495179 y 495756) como *V. pavonii* Poepp. El bejuco se secó a 40°C en un horno de aire circulante durante 48 horas; posteriormente se procedió a su molienda hasta obtener material vegetal pulverizado que se sometió a percolación con etanol (96%). El extracto resultante se concentró en evaporador rotatorio a presión reducida con temperatura inferior a 40 °C; finalmente se desecó al vacío.

Obtención de la fracción de alcaloides de *Valeriana pavonii* (FAVP)

Otra porción de material pulverizado se extrajo por percolación con una mezcla de hidróxido de amonio, cloroformo y etanol, en proporción 0.8: 1: 2 hasta agotamiento. La solución obtenida se concentró en evaporador rotatorio y se desecó

al vacío para eliminar totalmente el solvente. El material obtenido se disolvió en HCl al 10%, se agitó durante cierto tiempo, se filtró y alcalinizó con hidróxido de amonio hasta pH: 8. La solución resultante se colocó en un embudo de decantación, se extrajo con cloroformo (50 mL) y la fase orgánica obtenida se filtró, secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en evaporador rotatorio a presión reducida. La fracción de alcaloides obtenida se sometió a cromatografía en columna a media presión y en capa delgada preparativa. Posteriormente, una de las fracciones obtenidas del proceso de purificación (V1) se examinó por espectroscopia de IR y RMN de ^1H y ^{13}C .

Análisis fitoquímico preliminar

Teniendo en cuenta reportes previos de identificación de metabolitos presentes en la especie en estudio (7), se optó por reconfirmar la presencia de esteroides o terpenos y flavonoides mediante cromatografía en capa delgada. Para tal fin se tomaron aproximadamente 10 mg del extracto etanólico disueltos en 1 mL de una mezcla cloroformo-metanol; una vez que las placas se eluyeron en el solvente adecuado, se revelaron con reactivos universales y específicos. Para la comparación se usó un extracto etanólico de *V. officinales*, preparado a partir de material comercial, siguiendo condiciones de extracción similares a *V. pavonii*.

Convulsión inducida por electroshock en ratones

Se utilizaron ratones albino macho, de la colonia ICR, de siete a nueve semanas de edad, suministrados por el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales se mantuvieron en condiciones de ciclos sucesivos de luz y oscuridad de doce horas, 22 °C de temperatura, 60% de humedad, con libre acceso a dieta y agua, excepto dos horas antes de la prueba. A cada ratón se le administró por vía oral uno de los siguientes tratamientos según asignación aleatoria: EEVP (0.5 g/kg), FAVP (0.5 g/kg), difenilhidantoína (DFH, agente patrón, 20 mg/kg) o vehículo (mezcla de glicerina, polipropilenglicol y polisorbato 80; 10, 10 y 1% respectivamente). Se utilizaron entre 10 y 12 animales por tratamiento. Una hora después de la administración oral se les aplicó una descarga eléctrica de 60 Hz, 150 mA, 0.2 ms, vía corneal, previa instilación de una gota de solución salina 0.9%. Entonces se observó la presencia o ausencia de convulsión tipo tónico clónico, asumiendo como criterio de protección la ausencia de extensión de miembros posteriores en un ángulo mayor de 90° con respecto al eje del cuerpo (8, 9).

Todos los procedimientos se efectuaron conforme a las especificaciones concernientes a la protección del animal de laboratorio consignadas en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y en la Ley 84 de 1989 de Colombia.

Prueba hipocrática

Se efectuó la prueba hipocrática en ratas Wistar macho, suministradas por el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, utilizando grupos de dos animales por cada una de las siguientes dosis de EEVP: 5, 50, 100, 250, 500 y 1000 mg/kg, vía oral. Se evaluaron parámetros conductuales antes y después de 5, 15, 30, 60, 90 minutos, 2, 4 y 6 horas tras la administración de EEVP (10, 11).

Tratamiento estadístico

El análisis estadístico se hizo con base en los resultados arrojados por los tratamientos: EEVP, FAVP, DFH o control (vehículo). La variable de medición fue la presencia o ausencia de extensión de las patas posteriores. Por tratarse de una variable de tipo cuantal, se aplicó la prueba de Chi^2 (12). El nivel de significancia asumido fue 95%.

RESULTADOS

Estudio fitoquímico de EEVP

El rendimiento de EEVP fue 10.8% a partir de 1446 g de material seco y molido. El estudio fitoquímico efectuado con EEVP reveló la presencia de esteroides/ terpenoides, flavonoides y alcaloides. La detección de esteroides o terpenoides se realizó por medio de cromatografía en capa delgada, para lo cual se utilizó como fase móvil cloroformo-metanol en proporción 90:10 utilizando como patrones lupeol y beta-sitosterol. Posteriormente se observó al ultravioleta, se reveló con el reactivo de Godín y se calentó a 110°C durante 10 minutos, observando manchas azules y violetas de diferentes tonalidades.

La detección de compuestos flavonoides se realizó por medio de cromatografía en capa delgada utilizando como fase móvil cloroformo-metanol (85:15) y como patrones quercetina y rutina. Las placas se observaron al ultravioleta donde se evidenció la presencia de manchas amarillas características de estos compuestos. Luego se revelaron con el reactivo NP/PEG observando manchas de igual coloración que confirmaron su presencia.

Para la detección de compuestos de tipo alcaloidal se llevaron a cabo ensayos de precipitación y cromatografía en capa delgada. EEVP dio positivo con los reactivos de Dragendorff, Mayer, Valser y Reineckato de amonio. La cromatografía en capa delgada utilizando un sistema de elución cloroformo-metanol-dietilamina en proporción 90:10:0.2 y revelando con el reactivo de Dragendorff modificado, dio positivo para compuestos alcaloidales. Se empleó como patrón quinidina.

Sin embargo, debido a que otros compuestos con grupos funcionales con altas densidades de carga dan esta prueba positiva (13), fue necesario hacer una extracción específica para alcaloides a partir de FAVP.

Como parte de la investigación se realizó una comparación entre los extractos etanólicos de *V. pavonni* y *V. officinalis*, utilizando cromatografía en capa delgada y reveladores específicos. Se concluyó que aunque presentan similitudes, se observan diferencias considerables entre los perfiles. Una de las principales diferencias se relaciona con la mayor proporción de alcaloides en *V. pavonni*.

Estudio fitoquímico de FAVP

El rendimiento de FAVP fue 0.32% a partir de 382 g de material seco y molido. Esta baja proporción concuerda con la escasa presencia de metabolitos alcaloidales reportados para el género (14). La presencia de alcaloides en esta fracción se confirmó por pruebas de precipitación y cromatografía en capa delgada.

En el espectro de infrarrojo de una de las fracciones obtenidas del proceso de purificación (V1), se destacan las siguientes bandas: en 3358 cm^{-1} de estiramiento N-H, 2959 cm^{-1} de vibraciones de estiramiento C-H, características de compuestos orgánicos alifáticos, una banda de absorción en 1666 cm^{-1} de grupo carbonilo, bandas de absorción alrededor de 1516 cm^{-1} de C=C de anillo aromático y bandas de absorción en el intervalo 1125-1036 cm^{-1} , que pueden atribuirse al alargamiento C-N (15-17). Los espectros de RMN de esta misma fracción revelan la presencia de señales que pueden ser atribuidas a moléculas con grupos funcionales alifáticas y aromáticas.

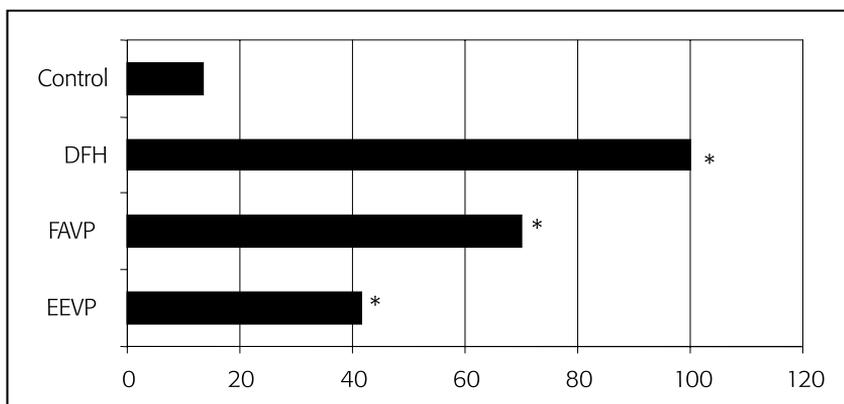


Figura 1. Porcentaje de protección del extracto etanólico (EEVP) y la fracción alcaloidal obtenidos de *Valeriana pavonii* (FAVP, 0.5 g/kg, vo) en el modelo de convulsión máxima inducida por descarga eléctrica en ratones. DFH: difenilhidantoina, (20 mg/kg, vo), control: vehículo (glicerina 10%, polipropilenglicol 10%, polisorbato 80 1%), * $p \leq 0.05$ con respecto al control, (Chi^2).

Convulsión inducida por electroshock en ratones

El EEVP (0.5 g/kg, vo) mostró un índice de protección significativo de 40%, superado por FAVP (0.5 g/kg, vo) con 70%. El patrón utilizado, DFH (20 mg/kg, vo) alcanzó el 100% de protección, en tanto que el control apenas el 13% (Figura 1).

Prueba hipocrática

Tras la administración de EEVP por vía oral, se evidenció disminución de la actividad motora en función de la dosis, perceptible a partir de 50 mg/kg y acentuada con las dosis mayores, 0.5 y 1 g/kg. Estos efectos se observaron desde los 30 minutos posadministración hasta las dos horas. No se observó letalidad ni, tras la necropsia, se evidenciaron cambios macroscópicos mayores.

DISCUSIÓN

Este artículo subraya la notoria actividad anticonvulsivante presentada por la fracción alcaloidal de *V. pavonii* en el modelo de crisis inducidas por electroshock en ratones. Este modelo se utiliza ampliamente en farmacología experimental para detectar sustancias con potencial para el tratamiento clínico de las denominadas crisis de tipo tónico clónico (8, 9), razón por la que ese tipo de compuestos podrían tener potencial terapéutico.

Es interesante destacar que si bien el extracto etanólico de la especie confiere algún grado de protección, la fracción alcaloidal lo supera notoriamente. Es claro que compuestos de tipo alcaloidal suelen ejercer efectos sobre el sistema nervioso central. Pese a ello, no se descarta que exista actividad sinérgica entre los componentes activos de *V. pavonii*, no todos necesariamente de carácter alcaloidal. Cabe considerar que otros metabolitos presentes en esta especie, como flavonoides y terpenoides, también pueden ejercer algún efecto en la respuesta global de esta especie. Están descritos efectos ansiolíticos y antidepresivos en compuestos de esta naturaleza (18). En el caso de *V. officinalis*, así parece ocurrir con aceites esenciales y compuestos mono y sesquiterpenoides, entre los que se destacan ácidos valerénicos y valepotriatos (19, 20).

El extracto etanólico de *V. pavonii* no confirió protección en el modelo de convulsión inducida químicamente con pentilentetrazol, razón por la que la prueba biológica que guió el fraccionamiento fue la descarga eléctrica. Se sabe que sustancias con actividad gabaérgica ejercen efectos protectores en los dos modelos de convulsión, en tanto que sustancias con efectos inhibitorios sobre canales de Na^+ protegen contra el electroshock. A su vez, sustancias que ejercen antagonismo sobre canales de Ca^{2+} son efectivas para el tratamiento de las crisis de

ausencia (21, 22). Esto sugiere que los principios activos de *V. pavonii*, probablemente compuestos de naturaleza alcaloidal, ejercen algún tipo de antagonismo sobre canales de Na⁺. Ahora bien, si los canales de Na⁺ comprometidos están acoplados a aminoácidos excitatorios, el potencial farmacológico de la sustancia se ampliaría, dado que alteraciones asociadas a incrementos en la actividad de glutamato están íntimamente vinculadas con trastornos degenerativos, como cierto tipo de epilepsias refractarias y esclerosis y demencia (23).

A juzgar por la prueba hipocrática efectuada al extracto etanólico, *V. pavonii* carece de efectos tóxicos agudos, incluso a dosis altas, pero posee efectos depresores sobre el sistema nervioso central, que necesitan estudiarse más profundamente. Estos efectos son especialmente notorios a partir de 0.5 g/kg vo, y tienen un carácter transitorio, dado que solo se observan entre los 30 minutos y las dos horas.

En conclusión, compuestos de naturaleza alcaloidal presentes desempeñan un papel crucial en la actividad anticonvulsivante detectada en *V. pavonii*. Se precisan mayores estudios fitoquímicos y farmacológicos con miras a identificarlos y precisar su perfil farmacológico sobre el sistema nervioso central.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas, a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

1. P.J. Houghton, The biological activity of *Valerian* and related plants, *J. Ethnopharmacol*, **22**,121 (1988).
2. O. Temkin, "The Falling Sickness: A History of Epilepsy from the Greeks to the Beginnings of Modern Neurology", Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, 1971.
3. V. Tyler, "Herbs of Choice", Pharmaceutical Products Press, New York, 1994.
4. S.E. Mendoza, "Estudio citofarmacológico de algunas plantas colombianas con posible actividad anticonvulsivante", Trabajo de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2004.
5. R. Díaz-Cabezas, M.I. Ruano-Restrepo, J.A. Chacón-Cardona, A. Vera-González. Epidemiología de la epilepsia en Latinoamérica, *Revista de Neurología*, **43**, 646 (2006).

6. D. Schmidt, The clinical impact of new antiepileptic drugs after a decade of use in epilepsy, *Epilepsy Research*, **50**, 21 (2002).
7. P.A. Parra, "Pasantía en un Laboratorio Nacional de Elaboración de Productos Farmacéuticos con Base en Especies Vegetales", Trabajo de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2003.
8. E. Swinyard, "Experimental selection, quantification and evaluation of anti-convulsivants, antiepileptic drugs", Ed. R. Levy, 1989, pp. 85-102.
9. R. Krall, Antiepileptic drug development: drug screening, *Epilepsia*, **19**, 409 (1978).
10. R.A. Turner, "Screening Methods in Pharmacology", Academic Press, New York. 1965. Vol. I.
11. E.H. Malone, R.C. Robichaud, A Hippocratic screen for pure or crude drug materials, *J. Natural Products*, **25**, 320 (1962).
12. S. Siegel, "Estadística no Paramétrica", Trillas, México, 1991. 3ª ed., p. 120.
13. A. Sanabria, "Análisis fitoquímico preliminar, metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae", Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1983, pp. 17-24.
14. P.M. Dewick, "Medicinal Natural Products", John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2002, pp. 190-191.
15. J.B. Lambert, "Organic Structural Spectroscopy", Prentice Hall, New Jersey, 1998, pp. 189-196.
16. D. Skoog, "Análisis Instrumental", McGraw-Hill Interamericana, México, 1998, pp. 248-251.
17. C.E. Calderón, "Manual para la Interpretación de Espectros Infrarrojos", Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1985.
18. S. Fernández, C. Wasowski, A.C. Paladín, M. Marder, Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **77**, 399 (2004).
19. X.Q. Gao, L. Bjork, Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*, *Fitoterapia*, **71**, 19 (2000).
20. L. Salles, A.L. Silva, S.B. Rech, N. Zanatta, G.L. von Poser, Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer, *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, 907 (2000).

21. Y. Futatsugi, J.J. Jr. Riviello, Mechanisms of generalized absence epilepsy, *Brain Development*, **20**, 75 (1999).
22. J.R. Huguenard, Block of T type channels is an important action of succinamide antiabsence drugs, *Epilepsy Currents*, **2**, 49 (2002).
23. S.K. Sonkusare, C.L. Kaul, P. Ramarao, Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders-memantine, a new hope, *Pharmacological Research*, **51**, 1 (2005).