

## Actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y de la fracción alcaloidal de *Valeriana pavonii*

Carmen T. Celis, Javier Rincón<sup>1</sup>, Mario F. Guerrero<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490. Bogotá, D.C., Colombia. Correo electrónico: jrinconv@unal.edu.co

<sup>2</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490. Bogotá, D.C., Colombia. Correo electrónico: mfguerrerop@unal.edu.co.

Recibido para evaluación: 24 de julio de 2006

Aceptado para publicación: 12 de febrero de 2007

### RESUMEN

Este trabajo estudia el efecto farmacológico ejercido sobre el sistema nervioso central de una fracción de compuestos de naturaleza alcaloidal obtenidos de *Valeriana pavonii*. Esta especie se utiliza indistintamente en nuestro medio para los mismos fines de *V. officinalis*, pese a que difieren en su composición química, particularmente en la presencia de compuestos de tipo alcaloidal, aspecto que puede implicar diferencias importantes en sus perfiles farmacodinámico y toxicológico.

El estudio mostró que esta fracción posee efectos de tipo anticonvulsivante (*modelo de convulsión por electrochoque*) y antidepresivo (*prueba de desesperación conductual inducida por nado forzado*) con respuestas mayores que las provocadas por el extracto etanólico. Además, no evidenció actividad sedante, a diferencia del extracto etanólico, propiedad que se adjudica a otro grupo de constituyentes, como flavonoides y terpenoides. Estos resultados apoyan el uso etnobotánico de esta especie, y destacan el papel que metabolitos de tipo alcaloidal parecen desempeñar en los efectos que sobre el sistema nervioso central ejerce *V. pavonii*.

**Palabras clave:** *Valeriana pavonii*, extracto etanólico, fracción alcaloidal, sedante, anticonvulsivante, antidepresivo.

### SUMMARY

## Pharmacological activity on central nervous system of the ethanolic extract and the alkaloidal fraction of *Valeriana pavonii*

This work shows the pharmacological effect on the central nervous system induced by an alkaloid fraction obtained from *Valeriana pavonii*. Traditional medicine uses this specie in Colombia for the same purpose of *Valeriana officinalis*, although there

are differences in their chemical structure, particularly in the presence of alkaloid compounds, fact that may imply important differences in their pharmacological and toxicological profiles.

The alkaloid fraction displays anticonvulsant (maximal electroshock seizure) and antidepressant (behavioral despair test) like effects, more pronounced than those induced by the ethanolic extract. The fraction did not show the sedative effects elicited by the ethanolic extract, fact that could be due to another group of constituents, like flavonoids and terpenoids. These results support the ethnobotanical use of this specie and the role that compounds of alkaloid type seem to play in the effects elicited on the central nervous system by *Valeriana pavonii*.

**Key words:** *Valeriana pavonii*, ethanolic extract, alkaloids, sedative, anticonvulsant, antidepressant.

## INTRODUCCIÓN

Varios de los miembros del género Valerinaceae se utilizan en la medicina tradicional de algunos países. En Colombia existen diversas especies reportadas, tales como *V. arborea*, *V. alophis*, *V. pyrolaefolia*, *V. clematidis* y *V. pavonii*, entre otras (6 [1]) De éstas, *V. pavonii* se comercializa en la actualidad con fines terapéuticos. Esta planta se caracteriza morfológicamente por poseer tallos largos y bejuocos. El bejuco se utiliza con fines terapéuticos, principalmente en casos de insomnio y de ansiedad (1), pero no existe suficiente información científica que soporte su uso etnobotánico.

Estudios fitoquímicos de *V. pavonii* evidencian la presencia de alcaloides, esteroides y terpenos, entre sus principales metabolitos (2, 3). La fracción alcaloidal se destaca por su relativa y significativa presencia (0,44%), a diferencia de varias especies del mismo género, incluida *V. officinalis* (0,05% - 0,1%). De manera interesante, esta fracción mostró efectos de tipo anticonvulsivante (3). Esto motivó la necesidad de ampliar el estudio del perfil farmacológico de la especie sobre el sistema nervioso central, utilizando otras pruebas de tamizado *in vivo*.

## METODOLOGÍA

### Material vegetal

El material vegetal fresco se obtuvo del municipio de San Antonio del Tequendama, departamento de Cundinamarca, Colombia. Dos ejemplares se encuentran en el Herbario Nacional Colombiano con los números de identificación taxonó-

mica 495179 y 495756. Se escogieron los bejuco de la especie a partir de una recolección aproximada de 25 kg de material fresco.

### Proceso de extracción

El bejuco se secó durante 48 horas a 40 °C y, posteriormente, se sometió a trituración en un molino de discos, hasta obtener el producto vegetal pulverizado. Parte de éste (1.446 g) se sometió a percolación hasta agotamiento con etanol al 96%. Después se retiró el solvente utilizando un evaporador rotatorio a presión reducida con una temperatura aproximada de 40 °C y a continuación se secó a temperatura ambiente en un desecador a vacío y protegido de la luz. El rendimiento fue del 10,3%.

Otra porción del material pulverizado (678,1 g) se sometió a percolación con una mezcla de hidróxido de amonio-cloroformo-etanol en proporciones de 0.8:1:0.2 hasta agotamiento, para obtener la fracción de alcaloides (1). La solución obtenida se concentró en un evaporador rotatorio hasta la eliminación del solvente. Posteriormente, se llevó a un pH de 2-3, añadiendo ácido clorhídrico (9,6%) y se filtró. Después se adicionó una solución de hidróxido de amonio hasta obtener un pH de 8-9 aproximadamente. A continuación se extrajo con diclorometano obteniéndose una fase orgánica y otra acuosa, que se separó en un embudo de decantación. La fase orgánica se filtró, se secó con sulfato de sodio, se concentró y se almacenó al vacío, protegida de la luz en una campana de desecación. El rendimiento en este caso fue del 0.44%. Se realizaron pruebas de precipitación para la detección de alcaloides con los reactivos de Dragendorff, Mayer, ácido pícrico y Valser. Además, se realizó cromatografía en capa delgada con la técnica de Dragendorff modificado donde se obtuvieron resultados positivos.

### Reactivo biológico

Los experimentos se realizaron con ratones machos, ICR, con pesos de 25 a 35 gramos, suministrados por el Bioterio del Departamento de Farmacia (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia). Se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (22 °C ± 1 °C), con ciclos de 12 horas luz/oscuridad, y con consumo de agua y alimento *ad libitum*.

Respecto a las consideraciones éticas, se tuvieron en cuenta las recomendaciones internacionales acerca del uso de animales, así como lo establecido en la ley 84 de 1989, capítulo sexto, y en las pautas del Bioterio de Farmacia (4).

### Reactivos

En los ensayos se utilizaron los siguientes reactivos: diazepam (Valium-Roche), fenitoína sódica (Parker-Davis), imipramina (Sigma) y pentobarbital sódico (In-

vet). Se empleó como vehículo para la dilución del extracto etanólico, la fracción de alcaloides y la fenitoína sódico una mezcla de propilenglicol, glicerina y polisorbato-80, en concentraciones de 10%, 10% y 2% respectivamente. Imipramina y pentobarbital sódico se diluyeron en solución salina (0,9%), en tanto que diazepam en propilenglicol (30%). Las preparaciones se elaboraron inmediatamente antes de cada prueba y se administraron en un volumen de 0,01 mL/g de peso corporal. El grupo control recibió el vehículo mencionado.

### **Ensayos farmacológicos**

#### **• Modelo de convulsión máxima inducida por electrochoque**

Esta prueba consiste en aplicar un estímulo eléctrico de características tales que generen una convulsión tónico clónico generalizada en el animal (5). Para ello se aplica vía corneal, previa instilación de solución salina normal como agente conductor, una descarga eléctrica de 50 mA, con corriente alterna de 60 Hz y 20 milisegundos de duración. El criterio de protección de una sustancia frente al estímulo eléctrico es la ausencia de extensión tónica de las extremidades posteriores.

La primera serie de experimentos tuvo como fin determinar el tiempo de acción máxima del extracto. Para ello se utilizaron seis grupos de animales (n: 8-10, c/u) tomados de manera aleatoria. A cuatro de ellos se les dosificó con el extracto (0,5 g/kg, vo) y luego se sometieron a la descarga eléctrica 30, 60, 120 y 240 minutos después de la administración. Un quinto grupo recibió fenitoína sódica (20 mg/kg, vo) dos horas antes de la descarga (tiempo de acción máxima de este fármaco) y el sexto grupo recibió el vehículo mencionado (0,01 mL/g, vo) como tratamiento de control.

La segunda serie de experimentos de convulsión inducida eléctricamente se destinó a evaluar el efecto de la fracción alcaloidal tras administraciones sucesivas. Para ello se tomaron tres grupos distintos de animales (n: 8-10, c/u) que se dosificaron por vía oral durante tres días consecutivos a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg, vo, respectivamente. La descarga eléctrica se les aplicó una hora después de la última dosificación, una vez determinado el tiempo de acción máxima en la serie anterior de experimentos.

#### **• Modelo sueño inducido por barbitúrico**

Se utilizaron cinco grupos de ratones (n: 8-10, c/u) a los que se les administró uno de los siguientes tratamientos: extracto etanólico (500 mg/kg, vo), fracción alcaloidal (100, 200 y 400 mg/kg, vo), vehículo (0,01 mL/g, vo) y diazepam (sustancia patrón, 0,5 mg/kg, ip). Una hora después de cada dosificación se les

aplicó pentobarbital sódico (45 mg/kg, ip). Las variables de medición fueron el tiempo de latencia (tiempo que tarda cada animal en perder el equilibrio) y el tiempo de duración total de sueño (tiempo que tarda en recuperar el reflejo de enderezamiento). La observación se realizó por espacio de tres horas (6).

#### • *Modelo de desesperación conductual*

Se emplearon cinco grupos de ratones (n: 8-10, c/u) a los que se les administró uno de los siguientes tratamientos: extracto etanólico (500 mg/kg, vo), fracción alcaloidal (100, 200 y 400 mg/kg, vo), vehículo e imipramina (sustancia patrón, 15 mg/kg, ip). Una hora después de cada administración los animales se colocaron en cilindros plásticos que contenían agua hasta un nivel de 13 cm. La variable de medición fue el tiempo de inmovilidad (entendido como los movimientos que apenas realiza el animal para mantener la cabeza fuera del agua) por espacio de cinco minutos (7).

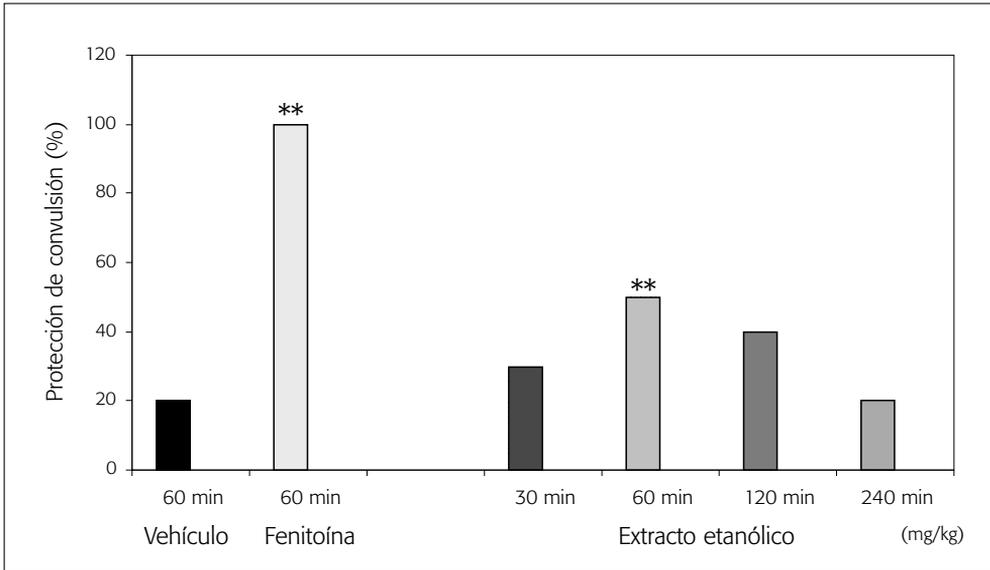
#### **Análisis de datos**

Todos los individuos se distribuyeron al azar en los diferentes grupos. En las pruebas de sueño inducido por pentobarbital y de desesperación conductual se aplicó un análisis de varianza (Anova) de una vía, seguido de la prueba de Tukey de diferencias múltiples. Los datos reportados representan la media  $\pm$  e.m.s. En las pruebas de convulsión por electrochoque, por tratarse de una variable de tipo cuantal, se aplicó la prueba estadística de  $\chi^2$ . El procesamiento de los datos se efectuó a través de los programas *Excel* y *SPSS-12*. El nivel de significancia estadística adoptado fue de  $\leq 0,05\%$

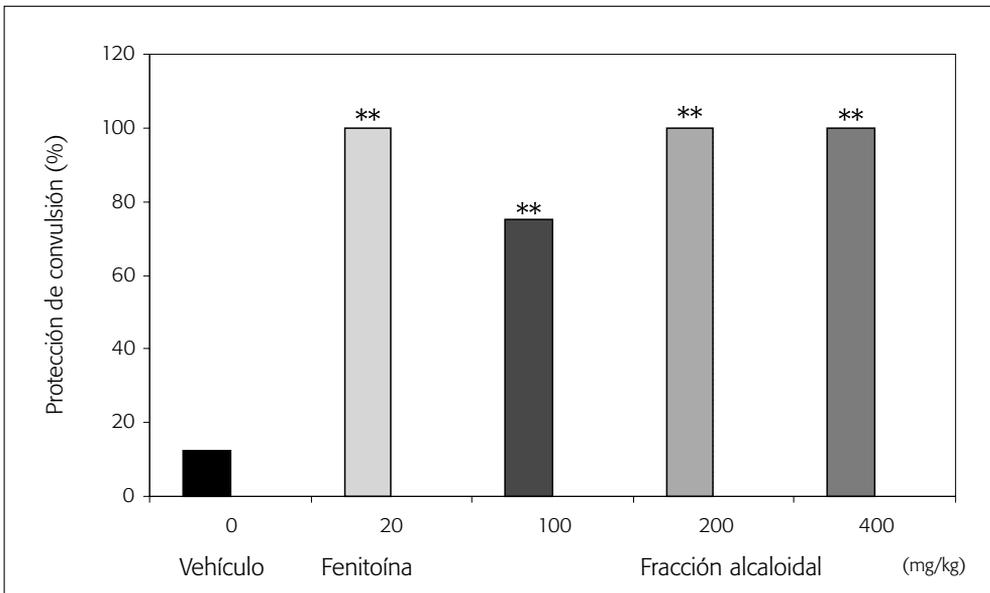
## **RESULTADOS**

### **Convulsión máxima inducida por electrochoque**

El tiempo de protección máxima conferido por el extracto (500 mg/kg, vo) fue de una hora, alcanzando niveles de 50%. Posteriormente, el efecto tiende a desaparecer (Figura 1). Por su parte, la fracción alcaloidal arrojó resultados positivos, tras la administración sucesiva, durante tres días, de las tres dosis utilizadas, 100, 200 y 500 mg/kg, mejorando los índices de protección observados con el extracto en función de la dosis, entre el 75% y el 100% de protección, similar ésta última a la conferida por el patrón, fenitoína sódica (Figura 2).



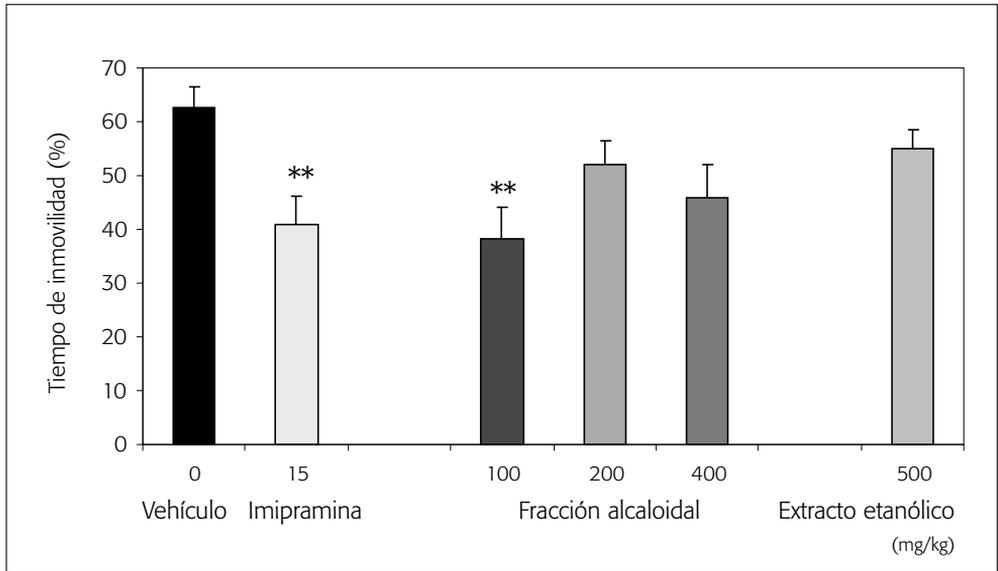
**Figura 1.** Índice de protección del extracto etanólico de *V. pavonii* en la prueba de convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones ICR, evaluada a los 30, 60, 120 y 240 minutos tras la administración por vía oral de 0,5 g/kg, n: 8-10 por grupo, \*\*  $p \leq 0,01$ ,  $\chi^2$ .



**Figura 2.** Índice de protección de la fracción alcaloidal de *V. pavonii* (100, 200, 400 mg/kg, vo) en la prueba de convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones ICR, n: 8-10 por grupo, \*\*  $p \leq 0,01$ ,  $\chi^2$ .

### Modelo de desesperación conductual

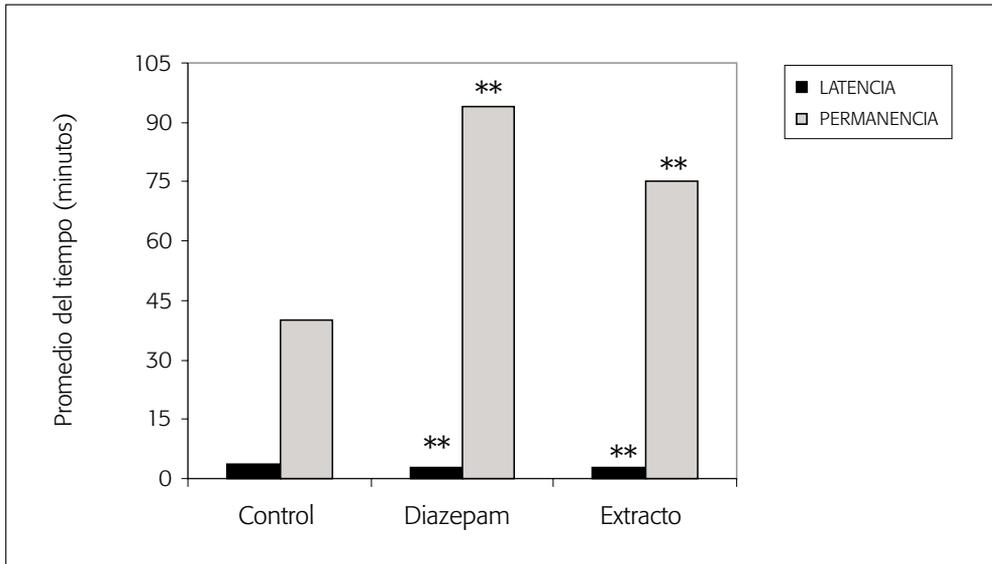
La fracción alcaloidal (100 mg/kg, vo) mostró efectos significativos, similares a los conferidos por imipramina (15 mg/kg, vo), en la disminución del tiempo de inmovilidad. Sin embargo, no se observaron efectos significativos con las dosis mayores de la fracción (Figura 3).



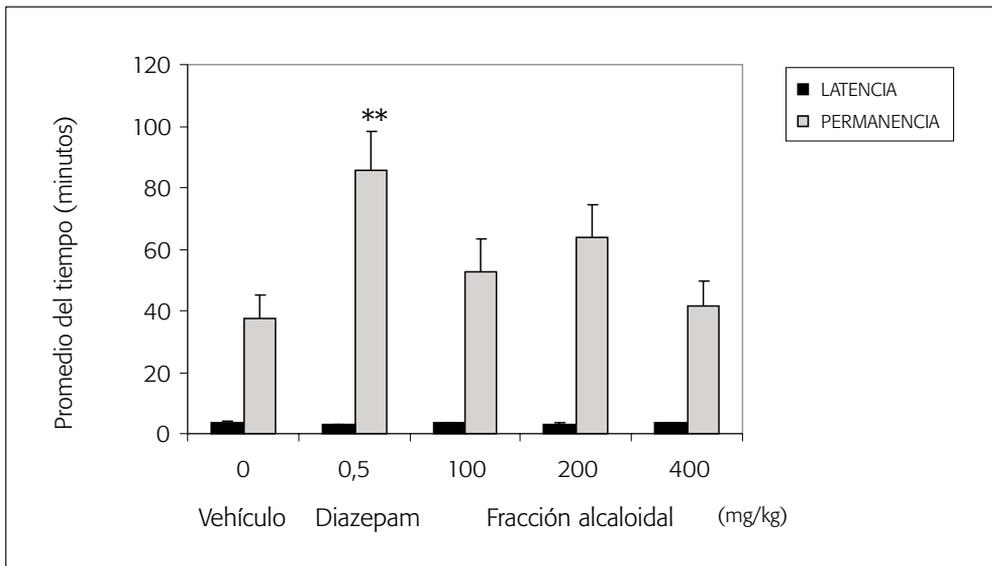
**Figura 3.** Porcentajes de tiempo de inmovilidad inducidos por el extracto etanólico de *V. pavnii* (500 mg/kg, vo) y su fracción alcaloidal (100, 200, 400 mg/kg, vo) en la prueba de desesperación conductual inducida por nado forzado en ratones ICR. Tiempo total de la prueba: cinco minutos. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  e.m.s., \*\* $p \leq 0,01$  Anova/Tukey.

### Modelo de inducción de sueño con barbitúricos

Se observaron diferencias tras la administración de dosis única, tanto con el extracto como con diazepam, en el caso de las variables tiempo de latencia y duración total de sueño (Figura 4). No obstante, en la administración repetida durante tres días, la fracción alcaloidal no arrojó diferencias respecto al control para ninguna de las dos variables. En este caso, diazepam mostró diferencias en cuanto al tiempo de sueño, mas no en relación con el tiempo de latencia (Figura 5).



**Figura 4.** Efecto del extracto de *V. pavonii* en los tiempos de latencia y de duración de sueño inducidos por pentobarbital (40 mg/kg, ip). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  e.m.s., n: 8-10 por grupo, \*\*  $p < 0,01$ . Anova/Tukey.



**Figura 5.** Efecto de la fracción alcaloidal de *V. pavonii* -100, 200 y 400 mg/kg, vo- en los tiempos de latencia y de duración de sueño inducidos por pentobarbital (40 mg/kg, ip). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  e.m.s., n: 8-10 por grupo, \*\*  $p < 0,01$ . Anova/Tukey.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos destacan los efectos centrales de la fracción alcaloidal obtenida de *V. pavonii*, en particular de tipo anticonvulsivante y, posiblemente, de tipo antidepressivo. Aunque está por determinarse qué papel desempeñan los metabolitos de tipo flavonoide y terpénico en los efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central de esta especie, sin duda la fracción alcaloidal desempeña un papel crucial. Teniendo en cuenta su relativa alta proporción comparada con otras especies de *Valeriana*, por ejemplo frente a *V. officinalis* (0,44% y 0,05%, respectivamente), esto podría marcar diferencias notables en su perfil farmacológico (3, 8-10).

Los resultados obtenidos con el extracto etanólico en el modelo de convulsión máxima inducida por electrochoque son similares a los reportados por Arévalo y Martínez (3). Es destacable que la fracción alcaloidal mejore la respuesta anticonvulsivante a niveles de protección similares a los conferidos al patrón utilizado, fenitoína sódica. Es probable, por tanto, que en compuestos de naturaleza alcaloidal se concentre esta propiedad, así como se evidencia el efecto acumulativo de la administración de dosis repetidas.

A juzgar por estos resultados, los compuestos presentes en la fracción alcaloidal tendrían algún potencial terapéutico para el tratamiento de las crisis tónicas clónicas en el humano, dada la alta correlación que existe entre el modelo de convulsión máxima inducido eléctricamente y las crisis generalizadas de tipo tónico clónico, en el humano. Es el caso de fármacos tales como fenitoína, carbamazepina, ácido valproico y fenobarbital, entre otros (11).

También llaman la atención los efectos de tipo antidepressivo mostrados por la fracción alcaloidal, según la prueba de desesperación conductual inducida por nado forzado. Si bien, los antidepressivos utilizados en clínica, como los pertenecientes a la familia de los tricíclicos, muestran efectos positivos incluso con administraciones únicas en esta prueba, la administración repetida parece ser una buena estrategia para mejorar la sensibilidad de la técnica, lo que, por lo demás, guarda correlación con lo observado en clínica, en donde los efectos terapéuticos no se ponen en evidencia sino tras la administración repetida del fármaco, cuando menos de tres semanas. Parece ser ése el caso visto con la fracción alcaloidal.

Si bien, con la fracción alcaloidal se observó un efecto dosis–respuesta en la prueba de convulsión por electrochoque, no fue así en el caso de la prueba de nado forzado. Ensayos posteriores habrán de determinar si las dosis mayores de 100 mg/kg de esta fracción ejercen ya efectos tóxicos que disminuyen el rendimiento en la prueba de desesperación conductual.

Aunque otras especies de *Valeriana* han mostrado efectos centrales interesantes, entre ellas, *V. fauriei*, de tipo antidepresivo (12), parece ser que únicamente *V. officinalis* se ha llevado a pruebas clínicas. Entre éstas, adicionado al extracto de San Juan, ha mostrado efectos antidepresivos en individuos con desórdenes de ansiedad asociados (13).

También es interesante observar que los efectos sedantes se observaron con el extracto etanólico, mas no con la fracción alcaloidal. Es posible, por tanto, que la acción sedante de *V. pavonii* se deba a metabolitos diferentes de los alcaloides. Esto no sorprende, si se tiene en cuenta que esteroides terpenoides, y derivados del ácido valerénico, son los responsables del efecto hipnótico de *V. officinalis* y *V. edulis* (12, 14, 15). Tal perfil habrá de examinarse en metabolitos de tipo flavonoides, esteroides o terpenos presentes en *V. pavonii* (3).

No sorprende tampoco la ausencia de efecto diazepam tras la administración repetida, en cuanto al tiempo de latencia de sueño en la prueba de potenciación del barbitúrico. Esto sugiere el desarrollo de un fenómeno de tolerancia, propio de compuestos de tipo benzodiazepínico, por lo demás descrito en este tipo de pruebas (16).

En conclusión, el extracto etanólico y la fracción alcaloidal de *V. pavonii* muestran un perfil de actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central, caracterizada por su efecto principalmente de tipo anticonvulsivante; además de efectos de tipo sedativo y antidepresivo, respectivamente. Se requieren estudios adicionales para aislar e identificar los alcaloides presentes en *V. pavonii*, así como precisar su mecanismo de acción.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, al Grupo de Investigación: "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas" y al Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias.

### BIBLIOGRAFÍA

1. H. García-Barriga, "Flora medicinal de Colombia", Tercer Mundo editores, Bogotá, 1992, tomo III, pp. 254-263.
2. 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.

3. D. Arévalo y C. Martínez, "Estudio bioguiado de la actividad anticonvulsivante del extracto etanólico de *Valeriana pavonii*", Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, 2004, pp. 20-94.
4. A. Mrad de Osorio y C.A. Cardozo de Martínez, "Utilización de animales de laboratorio en la experimentación biológica", Programa global para la infraestructura de la investigación biológica y biomédica en manejo de animales de laboratorio, Universidad Nacional de Colombia, 2000, pp. 8-26.
5. E. Swinyard, "Experimental selection, quantification and evaluation of anti-convulsivants, antiepileptic drugs", Ed. R. Levy, 1989, pp. 85-102.
6. A.J. Lapa, C. Souccar, M.T. Lima-Landman, M.S. Castro y C.M. de Lima, Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Caracterização farmacológica da atividade farmacológica no sistema nervoso central. Sociedade brasileira de plantas medicinais. Setor de produtos naturais. Departamento de Farmacología. UNIFESP/ EPM. SBPC- Fortaleza-CE, 2005, pp. 95-124.
7. J.F. Cryan, A. Markou y I. Lucki, Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs, *Trends in Pharmacological Sciences*, **23**, 238 (2002).
8. M. Assemi, Herbs affecting the central nervous system: Gingko, Kava, St. John's Wort, and Valerian, *Clinical Obstetrics and Gynecology*, **44**, 824 (2001).
9. C. Gyllenhaal, S.L. Merritt, S.D. Peterson, K. Block y T. Gochenour, Efficacy and safety of herbal stimulants and sedatives in sleep disorders, *Sleep Medicine Reviews*, **4**, 229 (2000).
10. M. Spinella, Herbal medicines and epilepsy: The potential for benefit and adverse effects. Review. *Epilepsy and Behavior*, **2**, 524 (2001).
11. W.J. Giardino, Models of epilepsy: electroshock and chemical induced convulsions in the mouse. Animals models of disease, *Current Protocols in Pharmacology*. Supplement 10. 5.22.1 (2000).
12. A. Dweck, "Medicinal and aromatic plants industrial profile". Chapter 1. An introduction to *Valerian*. *Valeriana officinalis* and related species, Edited by Dr. Peter Houghton, King's Collage, London, 1996, pp. 1-17.
13. D. Müller, T. Pfeil y V. Von den Driesch, Treating depression comorbid with anxiety-results of an open, practice-oriented study with St John's wort WS®

- 5572 and valerian extract in high doses, *Phytomedicine*, **10**, Supplement IV, 25 (2003).
14. M. Marder, H. Viola, C. Wasowski, S. Fernández, J. Medina y A. Paladín, 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on CNS, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **75**, 537 (2003).
  15. I. Oliva, E. González-Trujano, J. Arrieta, R. Enciso-Rodríguez y A. Navarrete, Neuropharmacological profile of hidroacohol extracto *Valeriana edulis ssp. procera* roots in mice, *Phytotherapy Research*, **18**, 290 (2004).
  16. S.E File, Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **9**, 113 (1985).