

Isovaleramida, principio anticonvulsivo aislado de *Valeriana pavonii*

Sara Emilia Giraldo¹, Javier Rincón¹, Pilar Puebla², Mariel Marder³, Cristina Wasowski³,
Nadezdha Vergel¹, Mario Francisco Guerrero¹

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

³ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Introducción. El fraccionamiento fitoquímico de *Valeriana pavonii*, especie vegetal nativa utilizada tradicionalmente en Colombia con fines tranquilizantes, condujo al aislamiento e identificación de la isovaleramida, uno de los principios responsables de su actividad sobre el sistema nervioso central como anticonvulsivo.

Objetivo. Reportar la identificación de la isovaleramida, metabolito de *V. pavonii* activo sobre el sistema nervioso central.

Materiales y métodos. La purificación de la isovaleramida se realizó mediante técnicas cromatográficas. Su estructura se determinó por experimentos de resonancia magnética y espectrometría de masas. Se emplearon las pruebas de convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones como ensayo farmacológico *in vivo* y el ensayo *in vitro* de unión al sitio de las benzodiazepinas sobre el receptor GABA-A.

Resultados. En el modelo de convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones, la isovaleramida, aislada de la fracción más activa de *V. pavonii*, confirió un índice de protección de 90% en una dosis de 100 mg/kg, por vía oral, comparable al agente de referencia utilizado: fenitoína sódica (20 mg/kg, por vía oral, 100%) y superior al control (vehículo, 20%). En el ensayo *in vitro*, la isovaleramida presentó un 42% de inhibición del sitio de unión de flunitrazepam con tritio.

Conclusión. La isovaleramida es uno de los principios activos anticonvulsivos de *V. pavonii*, por primera vez reportado en esta especie. Estos resultados dan soporte al uso tradicional de *V. pavonii* y a su interés como fuente de principios útiles en terapéutica.

Palabras clave: valeriana, medicina tradicional, ácido valproico, anticonvulsivos, epilepsia, epilepsia tónico-clónica.

Isovaleramide, an anticonvulsant molecule isolated from *Valeriana pavonii*

Introduction. Fractioning of an extract of *Valeriana pavonii*, a native species used in Colombian folk medicine as tranquilizer, led to the isolation and identification of isovaleramide, one of the active constituents responsible for its central nervous system activity as anticonvulsant.

Objective. Description of the isolation and identification of isovaleramide, an active principle on central nervous system from *Valeriana pavonii*.

Materials and methods. The purification of isovaleramide was carried out by chromatographic techniques. Its structural elucidation was determined by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. Maximal electroshock seizure was used as *in vivo* pharmacological test, additionally *in vitro* GABA-A/BDZ-binding site studies were performed.

Results. Isovaleramide was isolated from the most active fraction of *Valeriana pavonii*. This compound, at 100 mg/Kg, p.o, evidenced a 90% index protection against the maximal electroshock seizure in mice (MES), comparable to the reference agent: sodium phenytoin (20 mg/kg, p.o, 100%). In the *in vitro* assay, isovaleramide (300 μ M) exhibited a 42% of inhibition of the binding of ³H-FNZ to its sites.

Conclusion. Isovaleramide is one of the active anticonvulsant constituents of *Valeriana pavonii*, for the first time reported in this species. These results support the traditional use of *Valeriana pavonii* and its interest as a therapeutic source.

Key words: valerian; medicine, traditional; valproic acid, anticonvulsants, epilepsy; epilepsy, tonic-clonic.

El género *Valeriana* abarca más de 200 especies, varias utilizadas con fines tranquilizantes, como *V. wallichii*, *V. edulis* y la más conocida y estudiada *V. officinalis*, especie originaria de Europa y del norte de Asia. Las raíces de *V. officinalis* se han utilizado, además, con fines anticonvulsivos, actividad que se atribuye al ácido isovalérico, principal metabolito de degradación, responsable del olor característico de esta especie (1).

Entre otros metabolitos activos de *V. officinalis*, se encuentran: valepotriatos (iridoideas), baldrinales (compuestos de degradación de valepotriatos), terpenoides no volátiles, como el ácido valerénico, y flavonoides, como metilapigenina, hesperidina y linarina (2,3). En Colombia el bejuco de *V. pavonii*, se emplea en la medicina tradicional con fines similares (4); los estudios previos de su extracto y fracciones han mostrado efectos anticonvulsivos en ratones, así como la posible presencia de compuestos de tipo iridoide y alcaloide (5,6).

En Colombia la comercialización de *V. pavonii* y *V. officinalis* se realiza de manera indistinta, aspecto relevante si se tiene en cuenta que son dos especies diferentes (5,6).

Los trastornos epilépticos constituyen una de las alteraciones neurológicas con mayor morbimortalidad en Colombia y otros países latinoamericanos, superior a la de países del hemisferio norte (7,8). La terapia farmacológica disponible, pese a los avances introducidos en las últimas décadas, se enfrenta a un importante perfil de efectos adversos y a la insuficiente efectividad, aproximadamente, en una tercera parte de pacientes (9). Las alternativas terapéuticas de origen natural podrían contribuir a atenuar el curso y las manifestaciones de esta enfermedad (10).

En vista del interés surgido a partir de *V. pavonii* por sus efectos anticonvulsivos, en esta investigación se describe el fraccionamiento bioguiado de la porción alcaloide que se obtuvo, hasta la identificación de la isovaleramida como uno de los principales principios activos. Para ello, se acudió al modelo de convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones (*maximal electroshock seizures*), la prueba

más utilizada en la evaluación inicial de fármacos destinados al manejo del mayor tipo de crisis que se observa en clínica: la epilepsia primariamente tónico-clónica generalizada y las epilepsias parciales secundariamente generalizadas (11,12).

Materiales y métodos

Fraccionamiento y aislamiento de la isovaleramida

El material vegetal se adquirió en un mercado popular de plantas medicinales de Bogotá, D.C., Colombia, y dos de sus ejemplares se enviaron al Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia para su clasificación taxonómica, donde reposan con los números de colección Col 495179 y Col 495756.

Los bejucos de *V. pavonii* (25 kg) se trituraron y, posteriormente, se secaron en un horno de aire circulante a 40°C, hasta obtener un material seco (678 g) que se sometió a extracción por percolación con una mezcla de hidróxido de amonio, cloroformo y etanol en proporción 0,8:1:2, para obtener el extracto de alcaloides totales y, luego, a partir de éste, la fracción alcaloide purificada, de acuerdo con los procedimientos de extracción ácido-base previamente descritos (5,6).

La fracción obtenida (6,25 g) se sometió a cromatografía en columna, utilizando sílica gel 60 (Merck®, 0,063-0,200 mm) como fase estacionaria y la fase móvil en gradiente con una mezcla de hexano:cloroformo:metanol. Posteriormente, se hizo seguimiento por cromatografía en capa delgada hasta obtener las siguientes fracciones, agrupadas según el perfil cromatográfico: FA-3 (11,4%), FA-4 (48,4%), FA-5 (8,2%), FA-6 (6,0%) y FA-8 (9,2%).

La isovaleramida (figura 1) se obtuvo por precipitación como un sólido blanco cristalino a partir de la fracción FA-4, con un rendimiento de 1,8% con respecto a fracción alcaloide purificada. A la muestra obtenida se le determinó el espectro IR (Perkin Elmer HP/FT-IR 1600®) y se disolvió en cloroformo con deuterio (CDCl₃, Sigma®) para los experimentos de RMN monodimensional (¹H y ¹³C, DEPT 90 y DEPT 135) y bidimensional (HOMOCOSY, HMQC, HSQC y HMBC, Bruker DRX® 100,6 y 400 MHz y Bruker Avance® 100 MHz y 400 MHz).

Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm) relativos a un estándar interno de tetrametil-silano (TMS) y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz.

Correspondencia:

Javier Rincón, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, carrera 30 N° 45-03, edificio 450, oficina 314, apartado aéreo 14490, Bogotá, D.C., Colombia.
Teléfono (571) 316 5000, extensiones 14628 y 14662; fax: (571) 316 5060

jrincov@unal.edu.co, segiraldoq@unal.edu.co

Recibido: 05/11/09; aceptado:18/02/10

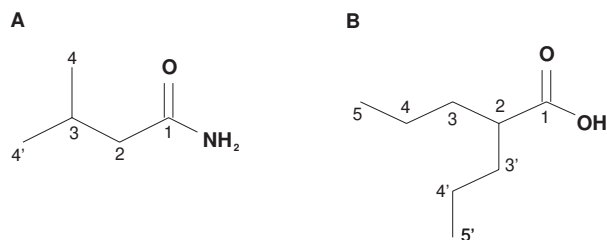


Figura 1. A. Estructura química de isovaleramida (3-metilbutanamida); B. Estructura química del ácido valproico (ácido 2-propilpentanoico)

Su peso y fórmula molecular se confirmaron por impacto electrónico, empleando espectrometría de masas de baja y alta resolución (*VG Micromass ZAB-2F* y *Micromass Autospec* (IE).

Ensayo farmacológico

Se emplearon ratones albinos ICR machos de edades entre 9 y 11 semanas, y pesos entre 28 y 38 g, suministrados por el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, y consumo de agua y alimento a voluntad.

Todos los tratamientos se administraron por vía oral, preparados en un vehículo de glicerina/propilenglicol/polisorbato 80 (10%, 10% y 2%, respectivamente). Para la administración de las fracciones, se utilizaron dosis proporcionales a su rendimiento con respecto a la fracción inicial, así: FA-3: 50, FA-4: 195, FA-5: 35, FA-6: 24 y FA-8: 40 mg/kg. La fracción alcaloide purificada se administró a dosis de 500 mg/kg, según lo establecido en estudios previos (5), mientras que la isovaleramida, compuesto puro aislado de FA-4, se administró a dosis de 100 mg/kg. Se utilizó fenitoína sódica (Sigma®), en dosis de 20 mg/kg, como control positivo y como control negativo, el vehículo. Todos los tratamientos se administraron después de cuatro horas de ayuno, el volumen de administración fue de 0,01 ml/g de peso en todos los casos.

Transcurrida una hora de la administración, se le aplicó a cada animal, por vía corneal y previa instilación de solución salina normal, una descarga eléctrica de corriente alterna de 50 mA, 60 Hz y 20 ms de duración (estimulador, *Coulbourn Instruments*®, E 13-51). Se asumió como criterio de protección la ausencia de la extensión tónica de las extremidades posteriores en un ángulo superior a 45° (13).

Ensayo de unión al sitio de benzodiazepinas del receptor GABA-A

La unión de la isovaleramida al sitio de las benzodiazepinas sobre el receptor GABA-A, se realizó evaluando la inhibición de la unión de flunitracepam con tritio (^3H -FNZ) en membranas sinaptosómicas de corteza cerebral de rata que contenían 0,2 a 0,4 mg de proteína, tal como es descrito por Marder *et al.* (3).

Las membranas fueron suspendidas en presencia de isovaleramida (300 μM) y el ligando radiomarcado (0,4 nM) en un volumen final de 1 ml de una solución tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,3. La incubación se llevó a cabo a 4°C durante una hora. Este ensayo se hizo por triplicado. El desplazamiento de la unión del ^3H FNZ por parte de la isovaleramida, se determinó por medio de un contador de centelleo líquido de acuerdo con procedimientos descritos previamente (3).

Consideraciones éticas

El experimento farmacológico se realizó siguiendo los principios sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio, estipulados en el título V de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de la Protección Social. Este experimento (modelo de convulsión) contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá.

Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizaron 10 animales por cada grupo de tratamiento, cuya asignación se efectuó de forma aleatoria. Dado el carácter cuático de la variable de observación (presencia o ausencia de convulsión), se aplicó la prueba estadística no paramétrica de ji al cuadrado, asumiendo una $p \leq 0,05$. Se utilizó el programa estadístico SPSS (versión 15).

Resultados

Identificación de la isovaleramida

Se obtuvo como un sólido blanco cristalino que precipitó de la fracción de FA-4 de *V. pavonii*. En el espectro IR se distinguieron dos bandas (3.182 y 3.349 cm^{-1}) correspondientes a la vibración C-NH del NH_2 libre. También, se observó una banda aguda en 1.630 cm^{-1} correspondiente a la vibración C=O de la amida y las bandas correspondientes a grupos alifáticos en 2925 y 2953 cm^{-1} .

En el espectro de resonancia magnética ^1H se observaron dos señales intensas a campo alto que permitieron inferir la presencia de un compuesto

Cuadro 1. Asignaciones de ^{13}C y ^1H (δ ppm) y acoplamientos ^1H - ^{13}C a dos, tres y cuatro enlaces observados en el espectro HMBC de isovaleramida.

Posición	^{13}C - δ ppm*	^1H - δ ppm, (J) Hz*	^1H - ^{13}C -HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$		
			$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^4\text{J}_{\text{CH}}$
1	175,8	-	H-2	H-3	H-4,H-4'
2	45,1	2,01 (2H, m)	H-3	H-4,H-4'	
3	25,9	2,01 (2H, m)	H-2,H-4,H-4'		
4, 4'	22,3	0,90 (6H, d, 6,4)	H-3	H-2	
NH ₂		5,92 y 6,29 (2H, sa)	H-3	H-2	

*Las asignaciones se establecieron de acuerdo con experimentos monodimensionales (^1H , ^{13}C , DEPT 90 y DEPT 135), registradas en equipo de resonancia magnética (Bruker DRX[®]400 y 100,6 MHz, utilizando TMS como referencia interna). Los datos (δ) fueron obtenidos en CDCl_3 .

alifático, y a campo bajo se presentaron dos señales ubicadas en δ_{H} 6,29 y 5,92 ppm características de hidrógenos unidos a nitrógeno. De acuerdo con los espectros de resonancia magnética ^{13}C , Dept 90 y Dept 135, y a la integración de las señales en el espectro de resonancia magnética ^1H , se confirmó la presencia de un metino, un metileno y dos metilos en la molécula. Además, en el espectro de resonancia magnética ^{13}C se destacó una señal en δ_{C} 175,8 ppm, correspondiente a carbonilo, que confirmó la presencia de un grupo amida en la molécula. Las asignaciones observadas en los espectros de ^1H y ^{13}C , y los acoplamientos ^1H - ^{13}C a dos, tres y cuatro enlaces, se registran en el cuadro 1. Su fórmula y peso molecular se confirmaron por espectrometría de masas por impacto electrónico de alta baja y alta resolución como $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}$ (m/z 101,0836).

Convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones

Los porcentajes de protección frente a la convulsión inducida por electrochoque se describen en el cuadro 2. Se observó en esas condiciones experimentales, 90% de protección con el patrón (fenitoína sódica), convulsión tónica generalizada en el grupo control donde el vehículo alcanzó 20% de protección, protección del 100% con la fracción mayoritaria FA-4, alta protección con isovaleramida (90%) y significativa con la fracción de partida FA total, que alcanzó el 70% de protección a una dosis de 500 mg/kg, por vía oral.

Ensayo de unión al sitio de benzodiazepinas sobre receptor GABA-A

La isovaleramida en una concentración de 300 μM , alcanzó 42% de inhibición de la unión de flunitracepam marcado (^3H FNZ) al sitio de unión de benzodiazepinas, en las membranas sinaptosómicas de la corteza cerebral de rata.

Cuadro 2. Porcentajes de protección conferidos por isovaleramida y las fracciones obtenidas de *Valeriana pavonii* en la convulsión inducida por electrochoque en ratones ICR.

Tratamiento	Dosis (mg/kg, por vía oral)	Porcentaje
FA total	500	70*
FA-4	195	100*
FA-3	50	20
FA-5	35	10
FA-6	24	10
FA-8	40	20
Fenitoína	20	100*
Isovaleramida	100	90*
Vehículo	-	20

n=10, fármaco de referencia: fenitoína sódica, control: vehículo, * $p \leq 0,05$ respecto al control, χ^2

Discusión

En este estudio se identificó, a partir de un procedimiento dirigido a la obtención de alcaloides, la isovaleramida, un alcaloide presente en *V. pavonii*, eficaz frente a las convulsiones inducidas por electrochoque en ratones. Es la primera vez que se describe la presencia de este compuesto en esta especie vegetal.

Las propiedades anticonvulsivas de esta molécula están descritas en modelos experimentales y en humanos (14-16) y, por su semejanza estructural, se clasifica entre los fármacos tipo ácido valproico de segunda generación (17). La isovaleramida, amida derivada del ácido valerénico, pese a su vida media corta, tendría como ventajas frente al ácido valproico, menor riesgo de hepatotoxicidad y teratogenicidad y mayor potencia farmacológica (18,19).

Los resultados del ensayo con radioligando confirman que isovaleramida no se fija al sitio benzodiazepínico del receptor GABA-A, tal como ocurre con el ácido valproico. En virtud de la

semejanza estructural con este ácido carboxílico de cadena corta (figura 1), cabe plantear que la isovaleramida poseería un perfil farmacodinámico de amplio espectro, con eventuales aplicaciones, no sólo en el tratamiento de trastornos epilépticos como las crisis clónicas, las mioclónicas, las tónicas, las ausencias y las Lennox-Gastaut, sino, también, en el manejo de otros trastornos neurológicos como la migraña, el dolor neuropático y la psicosis maniaco-depresiva (18).

Aunque la isovaleramida, metabolito identificado también en *V. officinalis* (20), es un compuesto representativo en *V. pavonii*, los estudios en desarrollo sugieren que otros compuestos, particularmente de naturaleza iridoide, desempeñan un importante papel en los efectos farmacológicos de esta planta. De ser así, el valor farmacológico de esta especie superaría posiblemente el suscitado con la isovaleramida, por las mutuas interacciones sinérgicas que habrían de establecerse entre los principios activos de esta planta.

En conclusión, la identificación de la isovaleramida como metabolito activo de *V. pavonii* da soporte al uso tradicional de esta especie y a su interés como fuente natural con potencial fitoterapéutico. Se requieren estudios adicionales para identificar otros metabolitos activos de *V. pavonii* y sus posibles mecanismos de acción.

Agradecimientos

Al Grupo de Investigación QUIMIOPLAN del Instituto Universitario de Bio-orgánica Antonio González de la Universidad de La Laguna, Tenerife (España), por su colaboración en la realización de las técnicas de espectrometría de masas. Al Grupo de Investigación Principios Bioactivos en Plantas Medicinales del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, y a la División de Investigación Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Financiación

Este trabajo se realizó con el apoyo económico de Colciencias y la Vicerrectoría de Investigación Sede Bogotá (VRI/DIB), de la Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá (Proyectos de Investigación, códigos Hermes: 8485, 9334, 8035, 5698).

Referencias

1. **Eadie MJ.** Could Valerian have been the first anticonvulsant? *Epilepsia*. 2004;45:1338-43.
2. **Houghton PJ.** The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *J Pharm Pharmacol*. 1999;51:505-12.
3. **Fernández S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M.** Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;77:399-04.
4. **García H.** Flora medicinal de Colombia, Botánica Médica. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá: Mundo Editores; 1992. Tomo 3. p. 254-62.
5. **Arévalo D, Martínez C, Rincón J, Guerrero MF.** Fracción alcaloidal obtenida de *Valeriana pavonii* Poepp con actividad anticonvulsivante. *Rev Colomb Ciencias Quím Farm*. 2006;35:168-76.
6. **Célis CT, Rincón J, Guerrero MF.** Actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y de la fracción alcaloidal de *Valeriana pavonii*. *Rev Colomb Ciencias Quím Farm*. 2007;36:11-22.
7. **Pradilla G, Vesga B, León-Sarmiento F, Grupo Geneco.** Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano. *Rev Panam Salud Pública*. 2003;14:104-11.
8. **Burneo J, Tellez-Zenteno J, Wiebe S.** Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Res*. 2005; 66:63-74.
9. **Löscher W.** Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:113-8.
10. **Schachter SC.** Botanicals and herbs: a traditional approach to treating epilepsy. *Neurotherapeutics*. 2009;6:415-20.
11. **Giardina WJ.** Models of epilepsy: Electroshock and chemical induced convulsions in the mouse. En: *Current Protocols in Pharmacology*. New York: John Wiley & Sons; 2000. Volume 5. p. 1-22.
12. **Wolf P.** Basic principles of the ILAE syndrome classification. *Epilepsy Res*. 2006;70(Suppl.1):S20-6.
13. **Swinyard EA, Woodhead JH.** Experimental detection, quantification, and evaluation of anticonvulsants. En: Woodbury DM, Penry JK, Pippenger CE. *Antiepileptic Drugs*. 2nd edition. New York: Raven Press; 1982. p. 111-26.
14. **Bialer M, Johannessenb SI, Kupferbergc HJ, Levyd RH, Perucca E, Tomson T.** Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the seventh EILAT conference (EILAT VII). *Epilepsy Res*. 2004;61:1-48.
15. **Pollard JR, French J.** Antiepileptic drugs in development. *Lancet Neurol*. 2006;5:1064-7.
16. **America's Pharmaceutical Research Companies.** Pharmaceutical companies researching and developing more than 500 medicines for neurological disorders. En: *Report, medicines in development for neurological disorders*. Washington, D.C.: Pharma, New Medicines, New Hope; 2008. p. 37.

17. **Bialer M, Yagen B.** Valproic acid: second generation. *Neurotherapeutics.* 2007;4:130-7.
18. **Isoherranen N, Yagen B, Bialer M.** New CNS-active drugs which are second-generation valproic acid: can they lead to the development of a magic bullet? *Curr Opin Neurol.* 2003;16:203-11.
19. **Nau H, Siemens H.** Differentiation between valproate-induced antiepileptic effect, teratogenicity and hepatotoxicity. *Pharm Weekbl Sci.* 1992;14:101-5.
20. **Bucková A, Grznár K, Haladová M, Eisenreichová E.** Active principles in *Valeriana officinalis* L. *Cesk Farm.* 1977;26:308-9.