

Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Annona* como fuente de potenciales fármacos

Estrada-Reyes, Rosa¹
Parra-Delgado, Hortensia²
Martínez-Vázquez, Mariano²

¹Laboratorio de Fitofarmacología
Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón
de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco
Delegación Tlalpan, México 14370, México.

²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior,
Ciudad Universitaria, 04360, México D. F., México.

Introducción

Existen documentos, como el *Código de Hammurabi*, que atestiguan que la humanidad, desde su inicio, ha utilizado diferentes especies vegetales tanto para fines alimenticios como para la procuración de la salud. Como era de esperarse, el desarrollo de una farmacopea basada en plantas medicinales estuvo sujeto a las condiciones específicas de los lugares de asentamiento de las diversas culturas. De esta forma, se desarrollaron por ejemplo, las farmacopeas herbolarias

de las antiguas culturas de China e India. Muchos de estos conocimientos, generados y perfeccionados a través del tiempo, son aplicados hoy en día (Weckerle *et al.*, 2009).

En México, se cuenta con documentos como el *Códice Florentino* y el *Códice de la Cruz Badiano* que ilustran la riqueza de las especies vegetales utilizadas principalmente por la cultura náhuatl. Sin embargo, la principal vía de conservación de la utilidad de las plantas medicinales, por la sociedad mexicana, ha sido oral. Existen varias recopilaciones que rescatan esta información (Argueta *et al.*, 1994; Osuna *et al.*, 2005).

En algunas de estas fuentes se mencionan varias especies del género *Annona* que se han utilizado, con fines medicinales, desde tiempos prehispánicos. Por ejemplo, se indica que la cáscara de *A. cherimola*, en cocimiento, se utilizaba para tratar la pulmonía; sin embargo, se advierte que las semillas son venenosas. También se menciona la *A. glabra* por sus propiedades expectorantes y como remedio en las primeras fases de la tuberculosis (Martínez, 1969). Igualmente se menciona la *A. squamosa*, *A. muricata* y la *A. lutescens* como plantas medicinales (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

La tradición etnobotánica aunada al hecho que las especies del género *Annona* se caracterizan por sintetizar acetogeninas, derivados lipídicos (policétidos) con propiedades citotóxicas a células cancerosas así como alcaloides, principalmente de tipo benzilisoquinolínicos, con actividades en el Sistema Nervioso Central (SNC), hacen de estas especies objetos iniciales de estudio para la obtención de posibles fármacos.

En México se cuenta con un total de 22 especies de *Annona* distribuidas en Chiapas, Guerrero, Yucatán, Michoacán y Morelos. Cabe señalar que en Chiapas se cuenta con 12 especies, ubicándolo como el estado con mayor riqueza de abundancia y diversidad en especies de éste género (MEXU, 1991).

A pesar de que en la medicina tradicional se utiliza la *A. lutescens* como remedio para varios padecimientos, hasta el momento no se conoce la evaluación de sus posibles propiedades sobre el SNC. En este trabajo presentamos los resultados de la evaluación de las propiedades ansiolíticas e hipnóticas de un extracto de hexano de *A. lutescens*, los cuales se comparan con los publicados para los extractos de hexano de

Annona cherimola (chirimoya) (López-Rubalcava *et al.*, 2006) y *Rollinia mucosa* (biribia) (Estrada-Reyes *et al.*, 2010).

Método

Annona lutescens

Las hojas secas y molidas (250 g) de *A. lutescens* fueron extraídas de forma sucesiva con *n*-hexano y metanol y los disolventes fueron eliminados por destilación a presión reducida, obteniéndose 18.7 g de extracto de hexano (EHAL) y 10 g de extracto de metanol.

El extracto de hexano fue dividido en dos partes. Una de ellas (8.7 g) se utilizó para la realización de las pruebas de actividad, mientras que el resto (10 g) en el estudio fitoquímico. El EHAL fue separado por medio de una cromatografía en columna al vacío con gel de sílice (60G Merck, proporción 35:1), utilizando como eluyentes, hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo (AcOEt) de polaridad creciente, acetato de etilo y acetona. Se reunieron aquellas fracciones que presentaron el mismo perfil en cromatografía de capa fina. De las fracciones eluidas con hexano, se obtuvieron por precipitación 12 mg de un sólido amorfo blanco con punto de fusión de 80-82°C, cuyas características físicas y espectroscópicas correspondieron a la 16-hentriacontanona ó palmitona (Komae *et al.*, 1971). A partir de las aguas madres de las fracciones 1-6, se obtuvieron 10 g de un aceite rojo, el cual mostró un perfil complejo en cromatografía en capa fina. El análisis de este aceite se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis de GC-MS del aceite proveniente de las fracciones 1-6

Tiempo de retención	Compuesto	% área	Tiempo de retención	Compuesto	% área
5.53	2-tujano	21.15	14.36	3-cucubeno	0.59
14.06	Desconocido	14.66	23.60	Éster metílico del ácido 14-metil pentanoico	1.46
14.66	3(5),6-cariofileno	6.78	24.78	Éster metílico del ácido 2-metil hexadecanoico	25.89
14.77	4(15)-cucubeno	0.99	26.02	Éster metílico del ácido heptadecanoico	1.21
15.23	α -cariofileno	2.11	26.13	Éster metílico del ácido 8,11-octadecanoico	1.67
15.74	3(15)-cucubeno	27.44	27.36	Éster etílico del ácido 9,12,15-octadecanoico	42.85
15.94	Desconocido	13.99	27.51	Éster etílico del ácido 15-metil heptanoico	6.56
16.27	3.9-cadineno	2.38	27.78	Desconocido	0.88
17.23	Espatulenol	1.0	29.25	Desconocido	1.32
21.87	Éster metílico del ácido 4-metil-pentanoico	0.88	29.68	Desconocido	1.03
22.79	Éster metílico del ácido 2-metil-pentanoico	13.04	29.79	Desconocido	1.02
25.03	Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	10.55	29.93	Metil-2,8-dimetil tridecanoato	1.26
25.21	Éster etílico del ácido octadecanoico	0.65	31.13	Docosano	0.71

De las fracciones eluidas con hexano-AcOEt (9:1), se aislaron 25 mg de un sólido blanco amorfo, identificado como 1-hentricontanol, por comparación de sus datos espectroscópicos (CAS 26444-39-3); mien-

tras que, de las fracciones eluidas con 20% de AcOEt en hexano se obtuvieron 55 mg de β -sitosterol, el cual fue identificado por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con aquellos informados en la literatura.

Evaluación Farmacológica

Animales y fármacos

Se utilizaron ratones adultos (6-8 semanas) machos de la cepa Swiss Webster de 20-30g de peso. Se alojaron en cajas de polipropileno de 44 x 21 x 21 cm, en grupos de ocho, bajo ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) de manera artificial en un cuarto con temperatura controlada. Todos los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento (purina) durante el experimento. Tanto los fármacos como el EHAL se prepararon antes de cada experimento y fueron administrados vía intraperitoneal, en una relación de volumen de 10 mL por kilogramo de peso.

El manejo de animales se realizó conforme a la norma para el manejo y cuidado de animales (NIH pub.85-23, 1985) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Además, se contó con la aprobación del comité de ética del INPRFM.

Los grupos control recibieron el mismo tratamiento, excepto que no se les administró EHAL sino que se les administró el vehículo (Tween 80 al 1% en solución salina), tanto para pentilentetrazol (PTZ) como para pentobarbital sódico (PB), mientras que para el diazepam se utilizó polipropilenglicol (Pg) al 1% en solución salina como vehículo. Los controles positivos recibieron, para la evaluación de crisis convulsiva una dosis de 90 mg /kg de PTZ mientras que para la evaluación de la actividad hipnótica 30 o 42 mg/kg de PB. En ambas evaluaciones se utilizaron 0.5 o 1.0 mg/kg de diazepam.

Todos los experimentos se realizaron con una latencia de administración de 60 min, excepto para el diazepam, el cual se realizó con una latencia de 30 min. Los animales fueron utilizados una sola vez.

Estadística

Todos los experimentos se realizaron con poblaciones desde 8 hasta 10 ratones, por duplicado y los resultados se expresan como la media \pm el error estándar medio. En el caso de la prueba de ansiedad y PB, se realizó la comparación estadística entre los grupos controles y los grupos experimentales, mediante el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), seguido de la prueba de Mann-Whitney. La comparación estadística entre el porcentaje de muerte inducido por PTZ y los grupos control se realizó mediante la prueba de Fisher. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron en el programa Sigmastat 2.0 y Sigmaplot 2.0, respectivamente.

Resultados

Evaluación de la actividad ansiolítica de EHAL

La evaluación de la actividad ansiolítica se realizó en el modelo de la conducta exploratoria ante un ambiente aversivo. Los animales fueron administrados vía intraperitoneal, con diferentes dosis del extracto 60 min antes de iniciar la prueba. El modelo consistió en una cámara de acrílico de 44 x 21 x 21 cm. Un tercio de la cámara se encontraba completamente oscura, mientras que los otros dos tercios fueron iluminados con una lámpara de luz fluorescente. Las dos zonas estaban divididas por una pared de madera con una abertura de 13 x 15 cm, para permitir el libre paso del sujeto experimental. La prueba duró 10 min y al inicio de la misma se colocó al sujeto experimental en la zona iluminada y se registró el número de transiciones que realizó de un compartimiento a otro y se registró el número de transiciones realizadas por cada animal (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). Los resultados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Efecto ansiolítico del extracto de hexano de hojas de *A. lutescens* en la prueba de conducta exploratoria

Tratamiento	Dosis (mg/kg) i.p.	Media de número de transiciones
Control	0.0	17.33 ± 1.915
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464**
	1.0	34.750 ± 3.797***
<i>A. lutescens</i>	0.0	17.867 ± 1.195
	6.25	17.800 ± 5.200
	12.5	23.750 ± 2.403
	25.0	18.000 ± 2.535
	50.0	19.250 ± 1.461
	75.0	22.250 ± 2.576
	100.0	21.250 ± 3.442

Evaluación de los efectos de EHAL sobre la actividad locomotriz

La evaluación de la actividad locomotriz se realizó en una caja de 43 x 36 x 19 cm, dividida en seis cuadrantes simétricos, colocada sobre una placa sensitiva (48 x 40 cm; Stoelting Co., Chicago, USA) conectada a un contador (Stoelting Co., Chicago, USA). El sujeto experimental se colocó en la caja y el número de cruces que realizó el animal fue registrado durante un periodo de 10 min. Este registro se realizó 60 min después de la administración de los extractos o 30 min después de la administración de diazepam. Después de cada prueba la caja se limpió cuidadosamente. Los resultados se expresan como cuentas/10 minutos (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). Los resultados se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Efecto del extracto de hexano de las hojas de *A. lutescens* sobre la actividad locomotriz

Tratamiento	Dosis (mg/kg), i.p.	Actividad motriz (cuentas/10 min)
Control	0.0	82.00 ± 9.422
Diazepam	0.5	103.00 ± 13.260
	1.0	74.125 ± 6.489
<i>A. lutescens</i>	0.0	82.66 ± 9.459
	6.25	73.00 ± 8.405
	12.5	90.37 ± 14.014
	25	72.875 ± 9.078
	50	80.00 ± 5.516
	75	74.25 ± 6.241*
	100	60.25 ± 5.338**

Evaluación de los efectos sedantes de EHAL en la prueba de aumento en el tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico

En un primer experimento los animales fueron administrados con EHAL a diferentes dosis y 60 min después se les administró una dosis de 30 mg/kg de pentobarbital sódico (PB). Inmediatamente fueron colocados de forma individual en una caja de acrílico de 30 x 21 x 21 cm que contenían una cama de aserrín fino y fueron observados cuidadosamente hasta su recuperación total.

Los controles fueron administrados con el vehículo y después de 60 min fueron tratados con 30 mg/kg de PB. Los controles positivos recibieron dosis de 0.5 y 1.0 mg/kg de diazepam y 30 min después fueron tratados con una dosis de 30 mg/kg pentobarbital sódico. Se realizó

un segundo experimento con una dosis de 42 mg/kg de pentobarbital sódico, siguiendo exactamente el mismo procedimiento descrito para la dosis de 30 mg/kg. En ambos experimentos se registró la latencia de sedación (min), definida como el tiempo que transcurre entre la administración de PB y la pérdida de la coordinación motriz; y el tiempo de sueño (min), como el tiempo que transcurre entre la pérdida del reflejo de enderezamiento y su recuperación. Los resultados se muestran en los cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Actividad del extracto de hexano de las hojas de *A. lutescens* en el efecto hipnótico inducido por PB 42 mg/kg

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación	Tiempo de sueño
PB	42	1.160 ± 0.0860	17.866 ± 2.002
Diazepam	1.0	0.975 ± 0.136	52.04 ± 4.003***
<i>Annona lutescens</i>	25	1.76 ± 0.140	10.926 ± 1.749
	50	1.50 ± 0.150	19.73 ± 2.20
	100	1.39 ± 0.154	23.99 ± 3.209*
	310	1.25 ± 0.083	77.73 ± 5.1996**

Cuadro 5. Actividad del extracto de hexano de las hojas de *A. lutescens* sobre el efecto hipnótico inducido por 30 mg/kg de PB

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación	Tiempo de sueño
PB	30.0	2.779 ± 0.22	0.0
Diazepam	1.0	1.75 ± 0.089	9.06 ± 1.095*
<i>A. lutescens</i>	100	1.333 ± 0.333	-----
	310	2.00 ± 0.253	-----

Efecto de EHAL sobre la actividad epiléptica inducida por pentilentetrazol (PTZ)

Los animales fueron administrados vía intraperitoneal, con EHAL a diferentes dosis y 60 min después se les administró, por la misma vía, 90 mg/kg de PTZ. Inmediatamente después, los animales se colocaron de manera individual dentro de una caja de acrílico de 44 x 22 x 21 cm, sobre cama de aserrín fino y se observaron hasta su total recuperación o muerte. Se registró la latencia de crisis (como el tiempo que transcurre entre la administración del PTZ y la aparición de la primera crisis), la latencia de crisis clónicas-tónicas generalizadas (como el tiempo que transcurre entre la administración de PTZ y la aparición de crisis severas, en las cuales se pueden observar clonias y extensión tanto de las patas delanteras como traseras). Ambas conductas fueron registradas en minutos. También, se registró el porcentaje de muerte. Los animales control fueron tratados de la misma forma, sólo que en lugar de PTZ fueron administrados con el vehículo (1% de Tween en solución salina), los controles positivos fueron administrados con diazepam a la dosis de 1.0 mg/kg, 30 min antes de la administración del PTZ.

Cuadro 6. Actividad del extracto de hexano de *A. lutescens* sobre el efecto epiléptico inducido por 90 mg/kg de PTZ

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de crisis (min)	Latencia de crisis tónicas (min)	Mortalidad (%)
Control	0.0	0.799 ± 0.0963	1.735 ± 0.478	87.50
Diazepam	1.0	0.975 ± 0.136	ns	ns
<i>A. lutescens</i>	25	0.657 ± 0.077	4.417 ± 0.684*	100
	50	1.2595 ± 0.464	5.178 ± 0.694*	72.72
	100	0.831 ± 0.136	4.56 ± 0.700*	100

Los resultados son expresados como la media ± el error estándar medio. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas entre los grupos tratados y el grupo control tratado con solución salina, con la ayuda de

un análisis de varianza de Kruskal-Wallis una sola vía, seguida por la prueba de Mann-Whitney $\sum p^* < 0.05$, el porcentaje de muerte fue analizado estadísticamente mediante la prueba de Fisher.

A. cherimola y *R. mucosa*

Los resultados de los análisis químicos y evaluación farmacológica de *A. cherimola* (López-Rubalcava *et al.*, 2006) y *R. mucosa* han sido previamente publicados (Estrada-Reyes *et al.*, 2010).

Discusión

Como parte de nuestra búsqueda sistemática de metabolitos secundarios de origen vegetal con actividades sobre el sistema nervioso central hemos publicado los efectos de los extractos de hexano de la *Annona cherimola* (EHAC) y *Rollinia mucosa* (EHRM) ambas especies pertenecientes a la familia Annonacea.

Nuestros resultados muestran que ambos extractos producen efectos ansiolíticos similares a los producidos por el diazepam, un ansiolítico clásico. Adicionalmente, estos resultados sugieren que los efectos producidos por los extractos pueden ser mediados por el complejo receptor ácido γ -aminobutírico-benzodiazepinas (GABA/BDZ). Sin embargo, otros mecanismos pueden estar mediando los efectos depresivos (López-Rubalcava *et al.*, 2006; Estrada-Reyes *et al.*, 2010).

Por el contrario, los resultados en este trabajo muestran que el extracto de hexano de *Annona lutescens* no mostró propiedades ansiolíticas a ninguna de las dosis evaluadas. Es posible que la diferencia de actividad de los extractos se deba a la diferencia en su composición química. En el cuadro 7 se muestran los principales componentes de los diferentes extractos así como la actividad mostrada.

Cuadro 7. Principales componentes aislados de los extractos de hexano de *A. cherimola*, *A. lutescens* y *R. mucosa*, así como la actividad mostrada

Extracto de hexano	Palmitona	Otros MS	Actividad
<i>A. cherimola</i>	3.3 %	β -sitosterol	Ansiolítica, no sedante
<i>R. mucosa</i>	1.0 %	Lignanos	Ansiolítica y sedante
<i>A. lutescens</i>	0.1 %	β -sitosterol	No ansiolítica, no sedante

De acuerdo con nuestros resultados tal parece que la concentración de la palmitona, una cetona alifática de amplia distribución es especies del género *Annona*, está relacionada con la propiedad ansiolítica mostrada por los extractos. Así, por ejemplo, el extracto de *A. cherimola*, que presentó la mayor concentración de palmitona mostró una mayor actividad ansiolítica, mientras que el extracto de *A. lutescens* con una concentración de 0.1 % fue inactivo.

Esta propuesta se ve apoyada por el hecho que se han publicado varios artículos acerca de las propiedades sobre el SNC de la palmitona. Así, se ha publicado que esta cetona previene el daño neuronal causado por el pentilentetrazol en la región CA3 del hipocampo de ratas pre-pubescentes (Cano-Europa *et al.*, 2010), también se ha informado del efecto de administraciones repetidas de la palmitona en la amígdala de la rata (González-Trujano *et al.*, 2009) y los efectos anticonvulsivos de esta cetona en la actividad convulsivante inducida por penicilina (González-Trujano *et al.*, 2006).

Aunque la presencia de palmitona en los extractos de *A. cherimola* y *R. mucosa* puede explicar las actividad ansiolítica mostradas por ambos extractos, existen algunas diferencias, por ejemplo las dosis activas fueron menores en el extracto de *R. mucosa* que las mostradas por el extracto de *A. cherimola*. Esta diferencia, posiblemente se deba a la presencia de lignanos en el extracto de *R. mucosa* (Estrada-Reyes *et al.*, 2002), hipótesis apoyada por el hecho que a partir del extracto con actividad sedante de *Valeriana officinalis* se han aislado varios lignanos (Schumacher *et al.*, 2002).

Conclusión

Los extractos de hexano de *Annona cherimola* y *Rollinia mucosa* mostraron actividad ansiolítica; sin embargo, el extracto de *A. lutescens* fue inactivo. Los resultados obtenidos sugieren que una mayor concentración en los extractos activos de la cetona lineal palmitona es la responsable de la actividad ansiolítica.

Referencias

- Andrade-Cetto, A. and Heinrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 325–348.
- Argueta, V.A., Cano, A.L. y Rodarte, M.E. (Coord). 1994. Atlas plantas medicinales. Instituto Nacional Indigenista (Edit). México.
- Cano-Europa, E., González-Trujano, M.E., Reyes-Ramírez, A., Hernández-García, A., Blas-Valdivia, V. and Ortiz-Butrón, R. 2010. Palmitone prevents pentylene-tetrazole-caused neuronal damage in the CA3 hippocampal region of prepubertal rats. *Neuroscience Letters*. 470: 111-114.
- Estrada-Reyes, R., Álvarez, A.L., López-Rubalcaba, C., Rocha, L., Heinze, G., Moreno, J. and Martínez-Vázquez, M. 2002. Lignans from leaves of *Rollinia mucosa*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57c: 29-32.
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcaba, C., Rocha, L., Heinze, G., González-Esquinca, A.R. and Martínez-Vázquez, M. 2010. Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*; possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Pharmaceutical Biology*. 48: 70-75.

- González-Trujano, E., Tapia E., M., López-Meraz, L., Navarrete, A., Reyes-Ramírez, A. and Martínez, A. 2006. Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia*. 47: 1810-1817.
- González-Trujano, E., López-Meraz, L., Reyes-Ramírez, A., Aguillón, M. and Martínez, A. 2009. Effect of repeated administration of *Annona diversifolia* Saff. (ilama) extracts and palmitone on rat amygdala kindling. *Epilepsy & Behavior*. 16: 590-595.
- Komae, H., Hayashi, N. and Kosela, S. 1971. Palmitone from the fruits of *Lindera citriodora*. *Phytochemistry*. 10: 3311.
- López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G. and Martínez-Vázquez, M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences*. 78: 730-737.
- Martínez, M. 1969. Plantas medicinales de México. 5 Ed. Ediciones Botas. México.
- MEXU. 1991. Herbario Nacional, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Registro de especies del género *Annona*.
- Osuna, T.L., Tapia, P.M.E. y Aguilar C., A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional Mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Publicacions I. Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Schumacher, B., Scholle, S., Hölzl, J., Khudeir, N., Hess, S. and Müller, C. 2002, Lignans isolated from valerian: identification and characterization of a new olivil derivate with partial agonistic activity at an adenoside receptor. *Journal of Natural Products*. 65: 1479-1485.

Weckerle, S.C., Ineichena, R., Huberb, F.K. and Yang, Y. 2009. Mao's heritage: Medicinal plant knowledge among the Bai in Shaxi, China, at a crossroads between distinct local and common widespread practice. *Journal of Ethnopharmacology*. 123: 213–228.

