

ACTIVIDAD TÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE LA CORTEZA DE TALLO DE *ANNONA CHERIMOLIOIDES* (ANNONACEAE) SOBRE *ARTEMIA SALINA**

Jhon Henry Galvis García^{1*}, Diana Marcela Ocampo², Rogelio Ocampo³, Paul David A. Gutiérrez-Cárdenas⁴

Resumen

La familia Anonáceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química. De esta familia se han caracterizado y reportado alcaloides, flavonoides y acetogeninas. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas anonáceas está asociada a su efecto como insecticidas, antitumoral, antibacterial, antimalarial, leishmanicida, propiedades antihelmínticas y actividad citotóxica. Desde 1982, se han venido desarrollando bioensayos para la determinación de la citotoxicidad con la utilización de “camarones de mar” (*Artemia salina*), el cual es utilizado para el tamizaje toxicológico de extractos de elevada toxicidad, por dichas razones esta investigación estuvo encaminada a evaluar la actividad tóxica de los extractos de diferente polaridad obtenidos de la corteza de tallo de *Annona cherimolioides*. Se aplicó cromatografía de columna y cromatografía en capa preparativa para la extracción y aislamiento de los alcaloides presentes en la corteza del tallo de *Annona cherimolioides*. Extractos, fracciones y compuestos depurados de tipo alcaloidal fueron evaluados para determinar la actividad tóxica *in vivo* sobre *Artemia salina*. Se obtuvo un compuesto depurado, en el cual se determinó la presencia de un núcleo aporfínico según resonancia magnética nuclear 1-H y espectrofotometría. El extracto crudo mostró mayor toxicidad sobre *Artemia salina* (< 250 ppm), debido al sinergismo de los alcaloides presentes en tal extracto y a las propiedades farmacológicas atribuidas al núcleo aporfínico presente en los extractos, fracciones y compuestos depurados.

Palabras clave: alcaloides, *Annona cherimolioides*, *Artemia salina*, toxicidad.

TOXICACTIVITY OF *ANNONA CHERIMOLIOIDES* (ANNONACEAE) STEAM BARK EXTRACTS ON *ARTEMIA SALINA*

Abstract

The Annonaceae family is characterized by the presence of many bioactive substances from different chemical nature. Alkaloids, flavonoids and acetogenins have been characterized and reported in this family. The bioactivity of this type of Annonaceae plant metabolites

* FR: 20-VII-2011. FA: 10-V-2012.

¹ Biólogo. BSc. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, A. A. 275 Manizales, Colombia.

² Licenciada en Biología y Química. MSc. Profesor Auxiliar. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, A. A. 275 Manizales, Colombia.

³ Licenciado en Biología y Química. MSc. PhD. Profesor titular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, A. A. 275 Manizales, Colombia.

⁴ Grupo de Ecología y Diversidad de Anfibios y Reptiles, Departamento de Ciencias Biológicas, Oficina B410-45, bloque B, Universidad de Caldas, Calle 65 # 26 – 10, Manizales, Colombia.

** Autor correspondiente: jhongalvis@live.com; Teléfono: (576) 8870738; Dirección: Cll 67 No. 31C-34, Caldas, Colombia.

is associated with its effect as insecticidal, antitumoral, antibacterial, antimalarial, leishmanicidal, anthelmintical and cytotoxic properties. Since 1982, bioassays have been developed for the determination of cytotoxicity with the use of “Brine Shrimp” (*Artemia salina*), which is used for toxicological screening of high toxicity extracts. This research aims to evaluate the toxic activity of different polarity extracts obtained from *Annona cherimolioides* stem bark. Column chromatography and preparative layer chromatography were applied for extraction and isolation of the alkaloids present in the *Annona cherimolioides* stem bark. Extracts, fractions and alkaloidal type purified compounds were tested *in vivo* on *Artemia salina* to determine cytotoxic activity. A purified compound was obtained, in which the presence of an aporphine nucleus was obtained according to nuclear magnetic resonance 1-H (NMR 1-H) and spectrophotometry. The crude extract showed higher toxicity on *Artemia salina* (< 250 ppm), due to the synergism of the alkaloids found in this extract and the pharmacological properties attributed to the aporphine nucleus present in extracts, fractions and purified compounds.

Key Words: Alkaloids, *Annona cherimolioides*, *Artemia salina*, toxicity.

INTRODUCCIÓN

En países como Colombia, poseedores de una alta biodiversidad, resulta especialmente importante el estudio de las plantas, extractos o sustancias puras que presentan significativa actividad terapéutica. Dentro de las múltiples estrategias que se pueden utilizar para la selección de especies vegetales como fuentes de principios activos; el estudio de la letalidad que producen los extractos sobre larvas de *Artemia salina*, ha demostrado ser útil para tales propósitos (MEYER *et al.*, 1982; LEWAN *et al.*, 1992).

Desde 1982 se han venido desarrollando bioensayos para la determinación de la toxicidad con la utilización de “camarones de mar” (*Artemia salina*); los cuales son utilizados como vía inicial de tamizaje tóxico de extractos, fracciones y compuestos depurados para discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la toxicidad *in vitro*, demostrando ser un método adecuado para poner de manifiesto metabolitos secundarios relacionados con actividades biológicas interesantes (SANABRIA *et al.*, 1997).

La familia Anonáceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, en hojas, raíz, corteza de tallo, frutas y semillas. De esta familia se han caracterizado y reportado alcaloides, flavonoides y acetogeninas (LEBOEUF *et al.*, 1982; OCAMPO, 2009). La bioactividad de tal tipo de metabolitos de plantas anonáceas está asociada a su efecto como insecticidas, antitumoral, antibacterial, antimalarial, leishmanicida, propiedades antihelmínticas y actividad citotóxica (LEBOEUF *et al.*, 1982; CASTRO *et al.*, 2010; FLORES & MARTÍNEZ, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

El material vegetal se colectó en el municipio de Aranzazu, departamento de Caldas; un ejemplar reposa en el Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe de

Medellín bajo el número JAUM 037843. Dicho material se extrajo de esta región, debido a que la población de *A. cherimolioides* es silvestre, es decir, no presenta alteraciones antrópicas, que podrían alterar la composición de los extractos. La corteza seca y molida se sometió a extracciones sucesivas con etanol al 96% mediante el método de maceración en frío (AGUILAR *et al.*, 2003), esta percolación se llevó a cabo hasta que se obtuvieron filtrados incoloros, momento en el cual se descartó el marco (residuo). Al extracto etanólico se le realizó un desengrase con hexano, luego se hizo la extracción clásica de alcaloides totales, donde el extracto se disuelve en HCl diluido, con el fin de obtener los alcaloides totales en forma de sales y, luego, extraerlos puros en medio básico con diclorometano (LOCK, 1994). Tales sales fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina (CCF), reactivo de Dragendorff y lámpara de luz UV, y fraccionadas utilizando cromatografía de columna (CC), empleando un sistema de solventes como fase móvil (CHCl₃/AcOET/MeOH/Hexano). Las fracciones reagrupadas fueron purificadas por CC y cromatografía en capa preparativa (CCP).

Actividad biológica

A los extractos y fracciones obtenidas de diferente polaridad, además de un compuesto depurado, se les determinó el potencial tóxico de los extractos mediante la evaluación de su toxicidad para el crustáceo *A. salina*. La selección del bioensayo se realizó, considerando que en repetidas ocasiones se ha encontrado una correlación entre la presencia de alcaloides y acetogeninas tóxicas y la toxicidad mostrada frente al crustáceo por los extractos crudos obtenidos a partir de distintas especies de Anonáceas (MCLAUGHLIN *et al.*, 1995).

Protocolo experimental para la preparación de bioensayos de citotoxicidad con *Artemia salina*

Los huevos de *A. salina* se incubaron en una solución de sal marina a temperatura ambiente durante 48 h. Las muestras analizadas mediante el bioensayo fueron llevadas a concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL, solubilizadas en etanol, el cual se dejó durante 24 horas a temperatura ambiente para su evaporación; posterior a ello, la goma se solubilizó en la solución de sal marina (en todos los casos los ensayos se efectuaron por triplicado). A cada tubo se le agregaron 10 organismos y se incubaron a temperatura ambiente por 24 h, en este tiempo se realizó un monitoreo cada 4, 6, 8, 12 y 24 horas. Como control se usó la solución de sal marina (MCLAUGHLIN *et al.*, 1995). El cálculo de la concentración letal 50 (CL₅₀) se efectuó por medio del método *Probit* (FINNEY, 1978).

RESULTADOS

Del extracto etanólico de corteza fueron identificados 2 alcaloides (X1 y Clor Q1), por medio de espectrofotometría (Figura 1); evidenciando, para la fracción X1, picos máximos de absorción en 320 y 400 nm, y para la fracción Clor Q1, picos máximos de absorción en 320 y 420 nm, típico de sistemas alcaloidales 1, 2, 3 sustituidos oxoaporfinicos o aporfinico (SHAMMA, 1972).

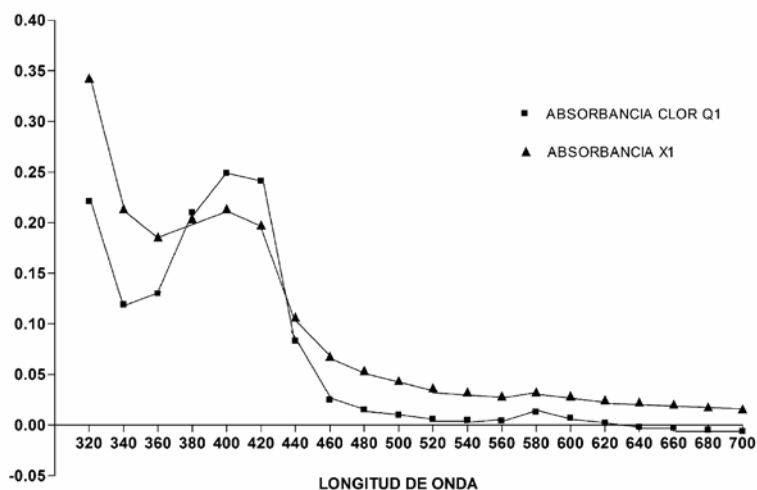


Figura 1. Absorbancias obtenidas por espectrofotometría a diferentes longitudes de onda de las fracciones X1 y Clor Q1.

El compuesto depurado X1 se caracterizó por medio de RMN ^1H , donde, el espectro (CDCl_3 , 300 MHz) (Figura 2), muestra picos a los σ 7,9 - 8,4 ppm y σ 8,5 ppm y 8,8 ppm; evidenciando la presencia de un núcleo oxoapofinico; basados en datos reportados en la literatura; en el cual se presenta 1 singulete correspondiente a un grupo metoxilo a $\delta = 3,96$ ppm, además de un singulete correspondiente a un grupo metilendioxi a $\delta = 6,31$ ppm y la presencia de 6 protones en la región aromática. El sistema AB en $\delta = 7,72$ ppm (1H, d, $J = 6,4$) y $\delta = 8,83$ ppm (1H, d, $J = 4,7$) fue asignado a los protones 4 y 5 del anillo B y 4 protones pertenecientes a un sistema aromático completo del anillo D; el protón 8 a 8,53 ppm (d, $J = 7,7$), el protón 9 a 7,52 ppm (m, $J = 6,4$), el protón 10 a 7,15 ppm (s, $J = 11,8$) y el protón 11 a 9,11 ppm (m, $J = 4,7$). El grupo metoxilo acopló en la posición 3 a 3,96 ppm y el grupo metilendioxi acopló en posiciones 1 y 2 a 6,31 ppm.

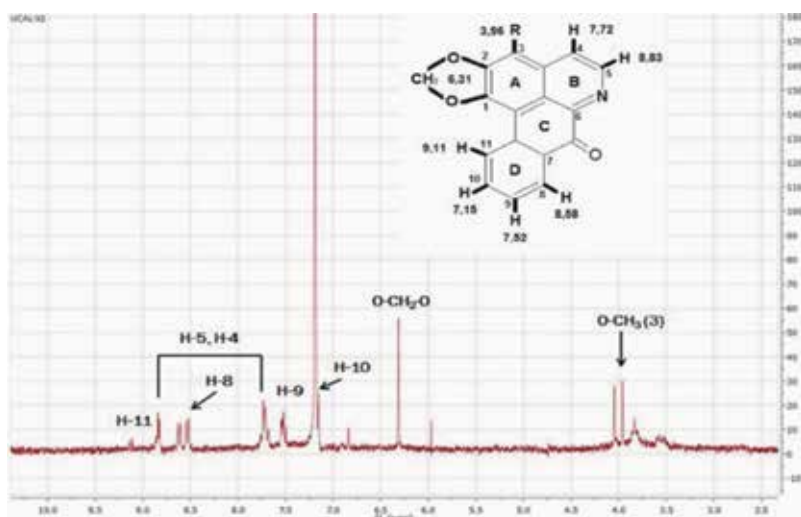


Figura 2. Espectro RMN ^1H fracción X1 (Oxoapofinico)

Los bioensayos de toxicidad *in vivo* se realizaron para aquellos extractos y fracciones con los cuales se contaba con la cantidad necesaria: E.C.; A.T.; FH2; FH3; HB4 y HB6. Se observó que los extractos E.C. y A.T. presentaron mayor toxicidad, lo cual se puede deber al sinergismo que ocurre entre los alcaloides presentes en dichos extractos. Para las fracciones FH2; FH3 y los compuestos depurados HB4; HB6, se evidenció menor número de individuos muertos, debido a que éstos presentan un mayor grado de purificación y sus CL₅₀ presentaron valores mayores a 1000 µg/mL (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad tóxica *in vivo* de los extractos de la corteza de tallo de *A. cherimolioides*.

TIEMPO/ EXTRACTO	\bar{X} CL ₅₀ (ppm)					
	A.T.	E.C.	FH2	FH3	HB4	HB6
4	21,97	0	43,97	5684,16	323176,28	5684,16
6	168,79	43,97	14484,57	13477,02	168,79	14484,57
8	314,97	30,22	6617,76	8388,54	5684,16	14484,57
12	168,79	107,32	630,60	168,79	1344,33	11374,89
24	0	208,28	17,25	1435,38	324,52	11374,89

De acuerdo al espectro RMN ¹H, se evidencia un potencial farmacológico de tipo tóxico, atribuido al núcleo aporfinoide, el cual está presente en los extractos y fracciones sometidos a los ensayos; por estas razones, los resultados permiten concluir que en la corteza de tallo de *A. cherimolioides* se encuentran metabolitos de tipo alcaloidal que poseen propiedades farmacológicas de tipo tóxico, por lo cual, se hace necesario continuar estudiando tales principios activos que permitan determinar las propiedades antitumorales de dichos compuestos, por medio de estudios de fraccionamiento, identificación y separación de los diferentes componentes para evaluar su actividad individual y en mezclas.

El uso medicinal de las plantas del género *Annona* por la población en diferentes partes del mundo ha encontrado apoyo en los estudios científicos que demuestran la eficacia de estas plantas en diferentes modelos experimentales. En este contexto, algunos efectos biológicos o farmacológicos, se relacionan con los efectos biológicos de tipo tóxico, principalmente de los compuestos de tipo alcaloidal. La bioactividad reportada por la etnobotánica colombiana para esta especie, podría fundamentarse no sólo en los diferentes mecanismos ejercidos por los compuestos fenólicos (flavonoides, acetogeninas, taninos y quinonas), sino además al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios que pudieran evidenciarse en la planta y a los cuales también se les reconoce tal actividad (alcaloides y terpenos), explicando así la alta toxicidad mostrada por el extracto crudo y la fracción de los alcaloides totales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Caldas por el apoyo financiero, también es apreciada la asistencia técnica de Gerardo Herrera del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Caldas.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, J.; ROJAS, P.; MARCELO, A.; PLAZA, A.; BAUER, R.; REININGER, E.; KLAAS, C. A. & MERFORT, I. 2003.- Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 81 (2): 271-277.
- CASTRO, L.; ALZATE, M. & GUERRERO, G. E. 2010.- Estudio preliminar de la bioactividad de extractos de semillas de *Annona cherimolia* de la familia Annonaceae. *Scientia Et Technica* 44: 326-330.
- FINNEY, D.L. 1978. - Statistical Method in Biological Assay, London and High Wycombe, UK.
- FLÓREZ-LONDOÑO, Y. & MARTÍNEZ-MUÑOZ, E. 2010.- Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. Tesis de Grado. pp. 87
- LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B. & MUKHERJEE, R. 1982. - The phytochemistry of Annonaceae. *Phytochemistry*, 21 (12): 2783-2813.
- LEWAN, L.; ANDERSSON, M. & MORALES-GÓMEZ, P.1992.- The use of *Artemia salina* in toxicity. *Testing Alternatives Lab. Anim.*, 20: 297-301.
- LOCK, O. 1994.- Investigación Fitoquímica. En: *Métodos en el Estudio de Productos Naturales*. Fondo Editorial PUCP, Lima, Perú.
- Mc LAUGHLIN, J.; COLMAN-SAIZARBITORIA, T. & ANDERSON, J. 1995.- Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Rev. Soc. Ven. Quim.*, 18: 13-21.
- MEYER, B.M.; FERRIGNI, N.R.; PUTMAN, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E. & Mc LAUGHLIN, J.L. 1982.- Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.*, 45 (1): 31-34.
- OCAMPO, D. M. 2009.- Seguimiento cromatográfico de algunos principios bioactivos presentes en *Annona cherimolioides* (Annonaceae). *Vector* 2: 103-112.
- SANABRIA-GALINDO, A.; LOPEZ, S.I. & GUALDRON, R. 1997.- Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, 26 (1): 15-19.
- SHAMMA, M. 1972.- "The isoquinoline alkaloids: Chemistry and Pharmacology", Academic Press, Verlag Chemie, NY, USA.