

Evaluación de la actividad leishmanicida *in vitro* de extractos de *Annona cherimolioides*

Assessment of the *in vitro* leishmanicide activity of *Annona cherimolioides* extracts

Jhon H. Galvis,^I Diana L. Muñoz,^{II} Diana M. Ocampo,^{III} Rogelio Ocampo,^{IV} Sara M. Robledo^V

^IBiólogo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.

^{II}Bacterióloga y Laboratorista Clínico. Máster en Ciencias. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

^{III}Licenciada en Biología y Química. Máster en Ciencias. Profesor Auxiliar. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.

^{IV}Licenciado en Biología y Química. Máster en Ciencias. Doctor en Ciencias. Profesor Titular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.

^VBacterióloga y Laboratorista Clínico. Máster en Ciencias. Doctora en Ciencias. Profesora Asociada. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la utilización de nuestra flora permite un acercamiento en la búsqueda de nuevas sustancias con alto nivel de bioactividad característico de la familia Annonaceae, en donde se reportan una serie de metabolitos secundarios muy promisorios para combatir estos patógenos.

OBJETIVO: evaluar la actividad leishmanicida sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania (V.) panamensis* y la actividad tóxica en macrófagos humanos y *Artemia salina*.

MÉTODOS: se aplicó cromatografía de columna y cromatografía en capa preparativa para la extracción y el aislamiento de los alcaloides presentes en la corteza de tallo de *Annona cherimolioides* Triana & Planch. Extractos y fracciones alcaloidales se evaluaron para determinar la actividad leishmanicida por medio de citometría de flujo, además de la actividad citotóxica sobre la línea celular U937 y sobre macrófagos peritoneales de hámster. La actividad citotóxica *in vivo* fue evaluada sobre *Artemia salina*.

RESULTADOS: se obtuvo un compuesto depurado, en el cual se determinó la presencia de un núcleo aporfínico según resonancia magnética nuclear 1-H y

espectrofotometría. No se encontró actividad contra los parásitos de *Leishmania*. El extracto crudo mostró mayor toxicidad sobre *Artemia salina*, mientras que el compuesto depurado mostró una citotoxicidad moderada sobre la línea celular U937.

CONCLUSIONES: se encontró una actividad citotóxica selectiva contra las células tumorales (línea celular U937), en comparación con la toxicidad observada en células en cultivo primario (no tumorales). Debido a la citotoxicidad mostrada sobre la línea celular U937, no se pudo determinar la concentración efectiva de los extractos contra amastigotes intracelulares, por lo que se hace necesario continuar las evaluaciones en los sistemas *in vitro* utilizando células no tumorales.

Palabras clave: alcaloides, actividad leishmanicida, *Annona cherimolioides*, citotoxicidad.

ABSTRACT

INTRODUCTION: the use of our flora allows a approach to search of new substances with a high level of bioactivity characteristic of the *Annonaceae* family where it is reported a series of secondary metabolites very promissory to attack these pathogens.

OBJECTIVE: to assess the leishmanicidal activity on intracellular amastigotes of *Leishmania (V) panamensis* and the toxic activity on human macrophages and *Artemia salina*.

METHODS: it was applied the column chromatography and the preparative layer chromatography for extraction and isolation of alkaloids present in the stem bark of *Annona cherimolioides* Triana & Planch. Alkaloid extracts and fractions were assessed to determine the leishmanicidal activity by flow cytometry as well as cytotoxic activity on the U937 cellular line and on the peritoneal macrophages of hamster. The *in vivo* cytotoxic activity was assessed on *Artemia salina*.

RESULTS: a purifying compound was obtained in which the presence of an aporphine nucleus was determined by ¹-H nuclear magnetic resonance and spectrophotometry. There wasn't activity against the *Leishmania* parasites. The crude extract showed the highest toxicity on *Artemia salina* whereas the purifying compound showed a moderate toxicity on the U937 cell line.

DISCUSSION: there was a selective cytotoxic activity against tumoral cells (U937 cell line) compared to toxicity seen in the primary culture (non-tumoral). Due to the cytotoxicity showed on the above cell line, it was impossible to determine the effective concentration of extracts against intracellular amastigotes, thus it is necessary to continue the assessments of *in vitro* systems using non-tumoral cells.

Key words: alkaloids, leishmanicide activity, *Annona cherimolioides*, cytotoxicity.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad que se encuentra dentro del grupo llamado *enfermedades huérfanas*, debido al poco interés que genera para la industria farmacéutica en el desarrollo de medicamentos para estas enfermedades. En

Colombia la leishmaniasis es endémica en la mayor parte del territorio nacional, que afecta principalmente habitantes de zonas rurales y semirurales.¹

Desde hace 70 años, el tratamiento se basa en el empleo de sales de antimonio; no obstante, su eficacia ha disminuido ostensiblemente por la aparición de cepas resistentes, lo cual al parecer se asocia con tratamientos incompletos. Por estas razones se hace necesario continuar con la búsqueda de nuevos medicamentos que brinden alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis. Los productos naturales constituyen una fuente esencial de metabolitos para el desarrollo de medicamentos. Es por ello que muchos investigadores se han volcado a la realización de estudios etnobotánicos, con el fin de obtener sustancias bioactivas con actividad leishmanicida.²

Desde mediados de los años ochenta del siglo xx, se inició la investigación formal y constante sobre los metabolitos naturales con actividad leishmanicida y antiparasitaria.³ Hasta el presente son numerosos los productos naturales que se han evaluado para demostrar la actividad sobre protozoos, incluidas naftoquinonas,⁴ alcaloides y acetogeninas.⁵

La familia Anonaceae, más conocida popularmente como la familia de la guanábana,⁶ comprende cerca de 2 500 especies agrupadas en 130 géneros, constituidos por árboles, arbustos y lianas, distribuidas en las regiones tropicales de América, Asia y Madagascar.^{7,8} La familia Annonaceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química en hojas, raíz, frutas y semillas. De esta familia se han caracterizado y reportado alcaloides, terpenoides, flavonoides, acetogeninas y aceites saponificables. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas anonáceas está asociada a su efecto como insecticidas, actividad citotóxica, antitumoral, antibacterial, pesticida, antimalarial, anti-leishmaniasis y propiedades antihelmínticas.⁹

Annona cherimolioides Triana & Planch. o *Raimondia cherimolioides* (Triana & Planch.) R. E. Fr. según el herbario de la Universidad de Caldas, es una especie conocida con el nombre vulgar de "anón de monte", o "guanabanito de monte" en Colombia. Esta es una especie de anonaceae tropical andina, propia del eje cafetero, es un ejemplo típico de la presencia de los metabolitos presentes en las anonaceas, principalmente del tipo alcaloidal. Sin embargo, *A. cherimolioides* Triana & Planch. presenta escasos reportes en la literatura, desde el punto de vista etnobotánico y químico, lo cual indica que esta planta requiere la atención de la comunidad científica.¹⁰

MÉTODOS

Colección del material vegetal

La corteza de tallo de *Annona cherimolioides* Triana & Planch. 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. El material se extrajo de esta región, debido a que la población de *Annona cherimolioides* Triana & Planch. es silvestre, es decir, no presenta alteraciones antrópicas como la realización de prácticas agrícolas, que podrían alterar la composición de los extractos.

Extracción y fraccionamiento

La corteza seca a temperatura ambiente durante 48 h y molida se sometió a extracciones sucesivas con etanol 96 % mediante el método de maceración en frío, esta percolación se llevó a cabo hasta que se obtuvieron filtrados incoloros. Al extracto etanólico de corteza se le realizó un desengrase con hexano y 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.¹¹

Estas sales fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina (CCF), reactivo de *Dragendorff* y lámpara de luz UV, fraccionadas utilizando cromatografía de columna (CC), con empleo de sílica gel y un sistema de solventes como fase móvil (CHCl₃/AcOET/MeOH/hexano); las fracciones reunidas fueron purificadas por CC y cromatografía en capa preparativa (CCP) sobre sílica gel. Una vez obtenidos los extractos, se solubilizaron en DMSO y se usaron en los ensayos a una concentración no superior a 0,5 % de DMSO.

Ensayos de actividad biológica

Los extractos y las fracciones obtenidas de diferente polaridad fueron sometidos a ensayos de citotoxicidad y de actividad leishmanicida *in vitro* y a bioensayos de toxicidad con *Artemia salina*.

Actividad citotóxica in vitro en células mamíferas

La actividad citotóxica de extractos o fracciones se evaluó sobre la línea celular promonocítica humana U937 (CRL-1593.2™ de ATCC), así como sobre macrófagos peritoneales de hámster dorados (*Mesocricetus auratus*), los cuales son mantenidos en el bioterio del Programa para el Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), de acuerdo con las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio mundialmente aceptadas. Los macrófagos peritoneales fueron colectados de la cavidad peritoneal de hámster dorados en RPMI-1640, siguiendo los procedimientos aprobados por el Comité de Ética para Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia.

Para las evaluaciones, las células se cultivaron en platos para cultivo celular de 96 pozos, a una concentración de 100 000 células/mL para las U937 o 750 000 células/mL para los macrófagos peritoneales en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB, y la correspondiente concentración de los extractos a partir de 200 µg/mL por duplicado. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 72 h en presencia de los extractos y, posteriormente, el efecto se determinó mediante el ensayo de MTT, que se incubó a 37 °C durante 3 h. La producción de formazán se midió a 570 nm en un espectrofotómetro. Como control de viabilidad se usaron células cultivadas en ausencia de los extractos, para control de citotoxicidad se usó anfotericina B. Los resultados son expresados como concentración letal media (CL₅₀) calculada por el método *Probit*.¹²

Actividad leishmanicida in vitro

Para los ensayos de actividad leishmanicida *in vitro* se utilizaron promastigotes de *Leishmania (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140epir GFP). Para asegurar una buena infección *in vitro* los parásitos son aislados periódicamente a partir de lesiones en hámster dorados, los cuales han sido infectados de modo experimental; una vez obtenidos los parásitos se cultivaron en medio bifásico NNN modificado, se empleó como fase líquida PBS más glucosa a un pH de 6,9 e incubados a una temperatura de 26 °C y después usados para obtener amastigotes.

La actividad leishmanicida sobre amastigotes intracelulares fue medida por citometría de flujo, para lo cual las células U937 se dispensaron en platos de 24 pozos a una concentración de 300 000 células/pozo, las cuales fueron tratadas con 1 µM de acetato de forbol miristato (PMA) durante 48 h a 37 °C, luego se infectaron con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento en medio NNN modificado, a una proporción de 1:15 células/parásito, luego de 3 h de incubación a 34 °C en 5 % de CO₂, se lavaron los parásitos no internalizados y se incubó de nuevo a 34 °C y 5 % de CO₂ para permitir la diferenciación a amastigotes. Después de 24 h de incubación se adicionaron los extractos con la correspondiente dilución a evaluar por duplicado, partiendo de la CL₅₀, usando una concentración no superior a 100 µg/mL. Las células infectadas y tratadas se mantuvieron a 34 °C y 5 % de CO₂ durante 72 h. El efecto leishmanicida fue medido a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión en un citómetro de flujo.

Los resultados son expresados como la concentración efectiva media (CE₅₀) calculada por el método estadístico *Probit*. Como control de viabilidad se usaron células infectadas y cultivadas en ausencia de los extractos y como control de efectividad se usó anfotericina B. El índice de selectividad (IS) se calculó dividiendo la actividad citotóxica entre la actividad leishmanicida (IS= CL₅₀/CE₅₀).

Bioensayos de toxicidad con Artemia salina

Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en una solución de sal marina en presencia de luz artificial a temperatura ambiente durante 48 h. Las muestras se evaluaron a concentraciones de 1 000, 100 y 10 µg/mL, solubilizadas en etanol, el cual se dejó durante 24 h 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 h. Como control se usó la solución de sal marina. Al cabo de ese tiempo se contabilizaron los organismos vivos y por diferencia se determinó el porcentaje de mortalidad.¹³ El cálculo de concentración letal media (CL₅₀) se efectuó por medio del método estadístico *Probit*.

RESULTADOS

Del extracto etanólico de corteza fueron identificados 2 alcaloides (D3 y D4), por medio de espectrofotometría ([Fig. 1](#)); evidenció, para la fracción D3, picos máximos de absorción en 320 y 400 nm, y para la fracción D4, picos máximos de absorción en 320 y 420 nm; típico de sistemas alcaloidales 1, 2, 3 sustituidos oxoaporfínicos o aporfínicos.

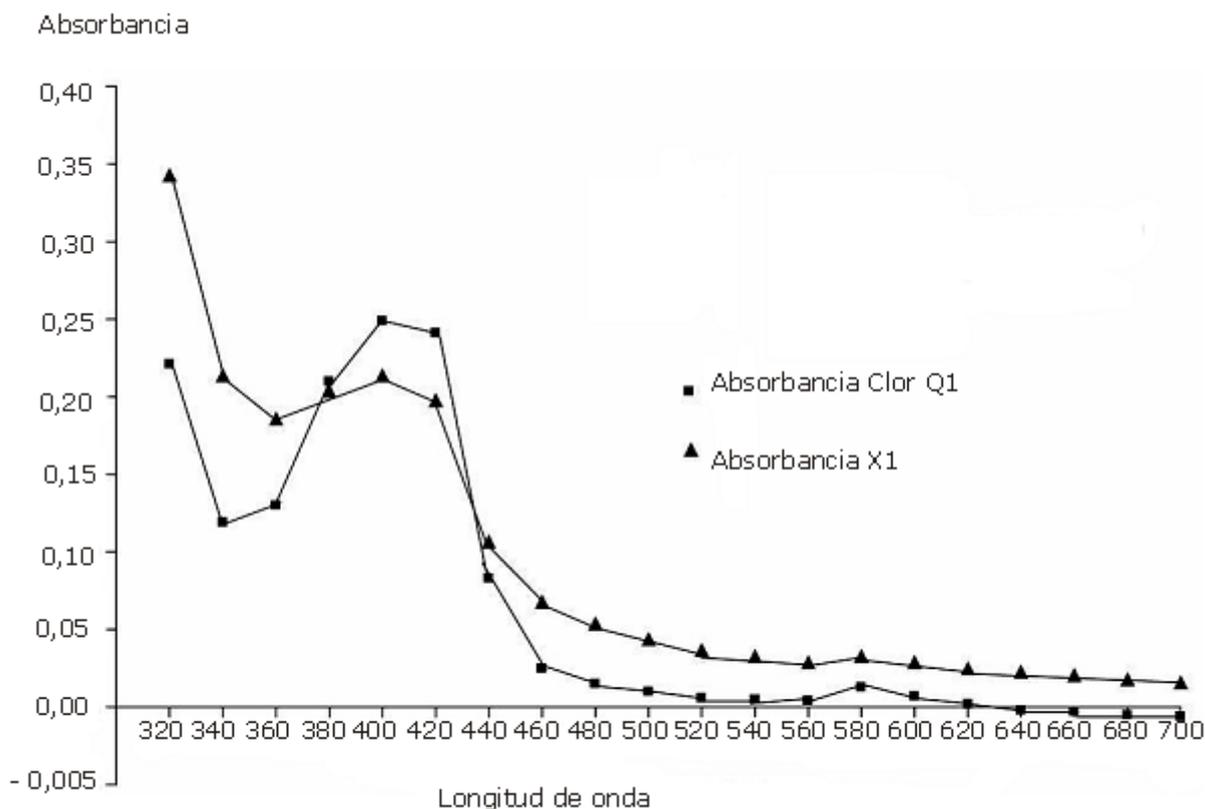


Fig. 1. Absorbancias obtenidas por espectrofotometría a diferentes longitudes de onda de las fracciones X1 y Clor Q1.

Solo el compuesto depurado D3 se caracterizó por medio de RMN 1-H, en donde, el espectro (CDCl₃, 300 MHz) (Fig. 2), muestra picos a los δ 7,9 8,4 ppm y δ 8,5 ppm y 8,8 ppm; que evidencia 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 δ = 3,96 ppm; además de un singulete correspondiente a un grupo metilendioxi a δ = 6,31 ppm y la presencia de 6 protones en la región aromática. El sistema AB en δ = 7,72 ppm (1H, d, J = 6,4) y δ = 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.

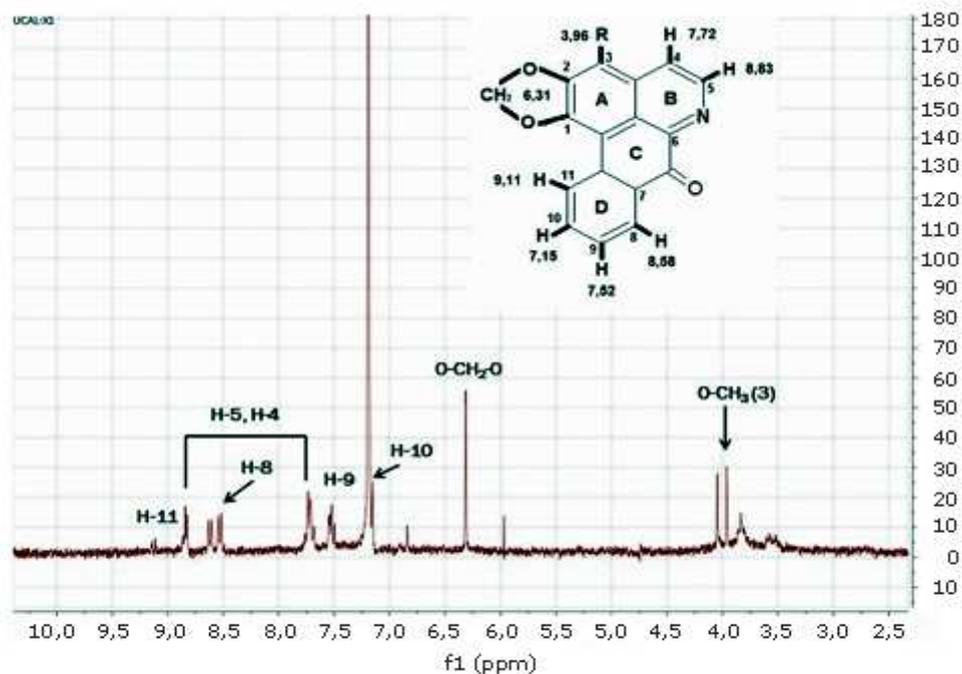


Fig. 2. Espectro RMN 1-H fracción X1 (oxoaporfino).

En términos generales se observó que los extractos fueron más tóxicos para las células U937 y menos tóxicos para los macrófagos peritoneales. La CL₅₀ de los extractos evaluados en células U937 varió entre 5,3 y 200,0 µg/mL, la fracción D4 (> 200 µg/mL) resultó menos citotóxica, mientras que la CL₅₀ de los mismos extractos y fracciones evaluadas en macrófagos peritoneales varió entre 55,6 y > 200 µg/mL (tabla).

Tabla. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimolioides*

Nombre producto	Tipo	CL ₅₀ (µg/mL) ^a		CE ₅₀ (µg/mL) ^b	Índice de selectividad	
		0 ± DE		0 ± DE	U937	MPh
		U937	MPh	<i>Leishmania panamensis</i>	U937	MPh
A. ch E1	Extracto	8,9 ± 2,7	> 200,0	> 8,9	< 1	> 22,47
A. ch E2	Extracto	14,9 ± 1,9	> 200,0	> 14,9	< 1	> 13,42
A. ch E3	Extracto	36,6 ± 2,4	99,9 ± 3,0	> 36,6	< 1	< 2,7
A. ch F1	Fración	5,3 ± 1,0	73,8 ± 6,6	> 5,3	< 1	< 13,92
A. ch F2	Fración	7,7 ± 0,2	120,2 ± 12,5	> 7,7	< 1	< 15,61
A. ch F3	Fración	9,1 ± 0,8	68,0 ± 16,8	> 9,1	< 1	< 7,47
A. ch F4	Fración	8,9 ± 1,9	> 200,0	> 8,9	< 1	> 22,47
A. ch F5	Fración	10,3 ± 0,4	> 200,0	> 10,3	< 1	> 19,4
A. ch D1	Compuesto depurado	16,1 ± 1,9	ND ^c	> 16,1	< 1	NC ^e
A. ch D2	Compuesto depurado	8,0 ± 0,5	55,6 ± 7,3	> 8,0	< 1	< 6,95
A. ch D3	Compuesto depurado	8,5 ± 0,6	> 200,0	> 8,5	< 1	> 23,5
A. ch D4	Compuesto depurado	> 200,0	> 200,0	> 100,0	< 1	> 1
Anfotericina B	Anfotericina	32,1 ± 0,1	23,8 ± 0,1	0,09 ± 0,01	356,7	264,4

- a) CL₅₀: concentración letal 50; b) concentración efectiva 50; c) MPh: macrófagos peritoneales de hámster;
 d) ND: no dato por no disponibilidad de compuesto; e) NC: dato no calculado; A. ch: *A. cherimolioides*

Ninguno de los extractos mostró actividad leishmanicida a las máximas concentraciones evaluadas, las cuales fueron seleccionadas según la concentración tóxica mostrada por cada extracto para las células U937.

Por su parte, los bioensayos de toxicidad *in vivo* se realizaron para aquellos extractos y fracciones con los cuales se contaba con la cantidad necesaria: E1, E2, F3, F4, D3 y D4. Se observó que los extractos E1 y E3 presentaron mayor toxicidad. Para las fracciones F3, F4, y los compuestos depurados D3 y D4, se evidenció menor número de individuos muertos; debido a que estas fracciones presentan un mayor grado de purificación.

DISCUSIÓN

Los resultados aquí mostrados sugieren que los extractos y/o fracciones tienen una toxicidad selectiva hacia células de origen tumoral como las células U937, lo que les confiere potencial actividad antitumoral que requiere ser evaluada en detalle. Aunque ninguno de los extractos mostró actividad leishmanicida a las concentraciones evaluadas, debido a que esta toxicidad fue menor en los macrófagos peritoneales de hamsters, se hace necesario evaluar la actividad leishmanicida de los extractos menos tóxicos, es decir aquellos que mostraron CL₅₀ iguales o mayores que 100 µg/mL sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania*, pero utilizando los macrófagos peritoneales como células hospederas, en reemplazo de las células U937. De esta manera se podrán determinar las concentraciones efectivas para el parásito, las cuales permitirán concluir si los extractos tienen o no actividad leishmanicida. De acuerdo al espectro RMN 1-H, se evidencia un potencial

farmacológico de tipo citotóxico, atribuido al núcleo aporfinoide, el cual está presente en los extractos y las fracciones sometidas a los ensayos.

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 citotóxico. Se hace necesario continuar estudiando estos principios activos que permitan determinar las propiedades antitumorales de estos compuestos. Así mismo, es importante continuar estudios para determinar la actividad antiparasitaria utilizando sistemas *in vitro* con células no tumorales, como los son los cultivos primarios de macrófagos humanos o de hámster.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Caldas y el Centro para el Desarrollo de Medicamentos - CIDEPRO de la Universidad de Antioquia por el apoyo financiero. La asistencia técnica de Carol V. Mesa de PECET en la Universidad de Antioquia es también muy apreciada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quiñones W, Vélez ID, Robledo S, Cruz V, Notario R, Cardona DP. Moléculas bioactivas contra *Leishmania (V.) panamensis*. Actividad y optimización molecular. Colombia: V Congreso de Ciencias Farmacéuticas y IX Simposio Colombiano de Ciencia y Tecnología Cosmética. Medellín, Colombia; 2006.
2. Schwikkard S, Van Heerden F. Antimalarial activity of plants metabolites (1990 to 2000). *Nat Prod Rep Articles*. 2002;19:675-92.
3. Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep Articles*. 2001;18:674-88.
4. Kayser O, Kiderlen AF, Laatsch H, Croft SL. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica*. 2000;76:131-8.
5. Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Pinto AD, et al. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001;45:1349-54.
6. Walter JW. Contributions for the GRAY HERBARIUM. Pollen, Morphology, phytogeography and Phylogeny of the Annonaceae. En: Reed C, Rollins, Roby K, editors. Cambridge, Massachusetts: Harvard University; 1971; p. 202.
7. Murillo A. Las Annonáceas de Colombia. *Biota Col*. 2001;2:49-58.
8. Hennisos GJM, De Oteyra MA, Nieto A, Farvé JM. The Spanish Germplasm Bank of Chirimoya (*Annona cherimolia* Mill). *Acta Hort*. 1999;497:201-12.
9. Leboeuf M, Cave A, Bhaumik PK, Mukherjee B, Mukherjee R. The phytochemistry of Annonaceae. *Phytochemistry*. 1982;12:2783-813.

10. Ocampo DM. Seguimiento cromatográfico de algunos principios bioactivos presentes en *Annona cherimoloides* (Annonaceae). Vector. 2009;2:103-12.
11. Lock O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Lima, Perú: Fondo editorial; 1994.
12. Finney DL. Statistical Method in Biological Assay. London: High Wycombe; 1978.
13. Mc Laughlin J, Colman-Saizarbitoria T, Anderson J. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. Rev Soc Ven Quim. 1995;18:13-21.

Recibido: 2 de septiembre de 2010.

Aprobado: 7 de octubre de 2010.

Lic. *Jhon H. Galvis*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, A. A. 275 Manizales, Colombia. Teléf.: (576) 8870738. Correo electrónico: jhongalvis@live.com