

Actividad Leishmanicida de Annonacina, Aislada de *Annona muricata* contra *Leishmania panamensis*.

Gabriel Jaime Arango A*,
John Scott Dickson*,
Ivan Dario Velez B.[†]
Diana Lorena Muñoz.[‡]

* Grupo de Investigaciones en Sustancias Bioactivas, Facultad de Química Farmacéutica (CPT)- Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín, Colombia.

† Programa de Estudios y control de Enfermedades Tropicales (PECET)- Corporación de Estudios en Patologías Tropicales (CPT)- Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín, Colombia

RESUMEN

Una acetogenina bioactiva monotetrahidrofuránica fue aislada de semillas de *Annona muricata*. La estructura fue elucidada usando métodos espectrales, determinando que su estructura corresponde a la annonacina. La actividad leishmanicida contra amastigotes axénicos de *Leishmania panamensis* UA140 se realizó por un método espectrofotométrico basado en la hidrólisis enzimática del p-nitrofenilfosfato, por acción de la fosfatasa ácida presente en los parásitos, encontrándose una DI_{50} de 2.1 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2=0.997$; $P<0.01$).

SUMMARY

A bioactive monotetrahydrofuranic acetogenin was isolated from seeds of *Annona muricata*. The structure was elucidated using spectral methods determining that its structure corresponds to the annonacin. The leishmanicidal activity against amastigotes axenically cultured of *Leishmania panamensis* (strain UA140) was measured for method spectrophotometric assay based in the enzymatic hidrólisis of the p-nitrophenylphosphate, for action of the acid phosphatases

of leishmania parasites, being a LD_{50} of 2.1 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2=0.997$; $P<0.01$).

Palabras claves: *Annona muricata*, acetogenina, antileishmania.

INTRODUCCIÓN

Varias especies de la familia Annonaceae, producen un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas. Estos compuestos policétidos cuentan con una prometedora actividad antitumoral, antiparasitaria e insecticida¹; algunas acetogeninas exhiben actividad antiparasitaria contra cepas 4-aminoquinoleinas resistentes de *Plasmodium falciparum*, la uleicin encontrada en *Rollinia ulei*, se ha ensayado contra *Leishmania donovani* con un buen índice terapéutico; acetogeninas de *Annona senegalensis* fueron evaluadas contra *Leishmania major*, *L. donovani* y *Tripanosoma brucei* y las aisladas de *Annona muricata* y *A. cherimolia* han mostrado actividad filaricida contra *Molinema dessetae*. Estudios sobre su modo de acción han establecido que las acetogeninas son un poderoso inhibidor especi-

E-mail: gjarango@quimbaya.udca.edu.co

acetogeninas son un poderoso inhibidor específico del complejo I en la cadena transportadora de electrones², en la serie monotetrahidrofuránica, la acetogenina que ha presentado mayor actividad es la annonacina cuya acetilación provoca una reducción de su acción, una oxidación del hidroxilo en el C-10 a carbonilo significa un incremento de la actividad y la ausencia de hidroxilo en el C-4 implica una reducción apreciable de la potencia¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo se realizó con semillas de *Annona muricata*, procedentes de un árbol conocido en Colombia como "Guanábano". Del extracto de acetato de etilo, fue aislada una acetogenina hidroxilada en el C-4 como una cera blanca. Su peso molecular fue determinado por FABMS mostrando un fragmento a m/z 619 $[M+Na]$ indicando un peso molecular de 596, correspondiente a una fórmula molecular de $C_{33}H_{44}O_7$. Una banda de absorción a 1751 cm^{-1} (C=O) y 3400 (OH) en el espectro de IR(CHCl₃) sugiere una γ -lactona α,β -insaturada, confirmada por la reacción positiva del reactivo Kedde, e indicando una acetogenina tipo 1³. El compuesto 1 (véase figura 1.) mostró señales a δ 2.41 (3-Ha), 2.50 (3-Hb), 3.8 (4-H), 1.66 (5-H), 7.18 (33-H), 5.05 (34-H), 1.39 (35-H) en el espectro de ¹H-RMN(250 MHz, CDCl₃); así como señales a δ 171.8 (1-C), 131.0 (2-C), 33.2 (3-C), 69.75 (4-C), 151.9 (33-C), 77.5 (34-C), y 19.0 (35-C) en el espectro de ¹³C-RMN, todas estas señales espectrales corresponden a una γ -lactona α,β -insaturada. Del compuesto 1 en el EIMS se observaron fragmentos a m/z 141 (11%) como un pico de débil intensidad, en el compuesto acetilado (1^{*}) se observa a m/z 551 (M - m/z 214) (14%) un pico débil formado por la ruptu-

ra del enlace entre el 4-C y el 5-C lo que muestra la presencia de un hidroxilo en 4-C. Estas características corresponden a una acetogenina subtipo 1b¹. (Véase Figura 1). La presencia de un anillo de THF en 1 con dos hidroxilos en posición α, α' al anillo, fue deducido por ¹H-RMN a δ 3.39 (15-H/20-H), 3.80 (16-H/19-H), y ¹³C-RMN a δ 74.08 (15-C/20-C), 82.67 (16-C/19-C), 28.75 (17-C/18-C), característicos para acetogeninas monotetrahidrofuránicas con hidroxilos adyacentes al anillo. La estereoquímica relativa de 15-C/16-C y 20-C/19-C, fue definida por comparación de las señales no derivadas en ¹³C-RMN de los carbonos hidroxilados 15-C/20-C (δ 74.08) y de ¹H-RMN, correspondientes a 15-H/20-H (δ 3.39) y 16-H/19-H (δ 3.80) en 1, con modelos de estereoquímica relativa conocida, sintetizados por Fujimoto et al⁴. (comparación solo por ¹³C) y Harmange et al (comparación por ¹H y ¹³C)⁵. Estos datos sugieren que la configuración relativa entre 15-C/16-C y 19-C/20-C es de *threo* para ambos. Las señales ¹H-RMN a δ 1.97 y a 1.66 corresponden a 19-H y 20-H son típicas señales de protones metilénicos de anillos *trans*-THF, la configuración relativa de estos cuatro centros quirales fue asignada como *threo/trans/threo*⁴. El número de hidroxilos fue determinado por la sucesiva pérdida de 4 moléculas de agua (m/z 18) en el FABMS, determinándose la posición de los cuatro grupos hidroxilos unidos a los 4-C, 10-C, 15-C y 20-C (m/z 578, 560, 542, 524). El número de carbonos entre el anillo γ -lactona α,β -insaturada y el anillo de THF fue establecido por el análisis de la fragmentación de 1, que mostró fragmento intenso a m/z 309 y uno a m/z 291 ambos conteniendo el anillo de γ -lactona α,β -insaturada, permitiendo determinar la posición del anillo de THF entre el 15-C y el 20-C en la molécula 1. (véase Figura

1). Por comparación con los datos espectrales reportados, se determinó que la estructura corresponde a annonacina, ya antes reportado en semillas de *A. muricata*^{2,7}.

La actividad se determinó contra *Leishmania panamensis* UA140 (causal de leishmaniosis cutánea del nuevo mundo), esta es la especie más ampliamente distribuida en Colombia¹. Se encontró una DL₅₀ de 2,1 µg/ml (R²=0.997; P<0.01)⁸, significativamente más activa *in vitro*

que el Pentostan* (Estibogluconato de sodio) usado en el tratamiento de leishmaniosis, el cual a mostrado en otros trabajos una DL₅₀ contra amastigotes axénicos de *L. mexicana*, *L. amazonensis* (causales de leishmaniosis cutánea del nuevo mundo) y *L. infantum* de 220, 270 y 134 µg de Sb(V)/ml respectivamente, igualmente se observa la annonacina más activa que la Pentamidina* (Isotionato de pentamidina), en iguales cepas de leishmania, con una DL₅₀ de 4.7; 2.7 y 2.7 µg/ml respectivamente². La

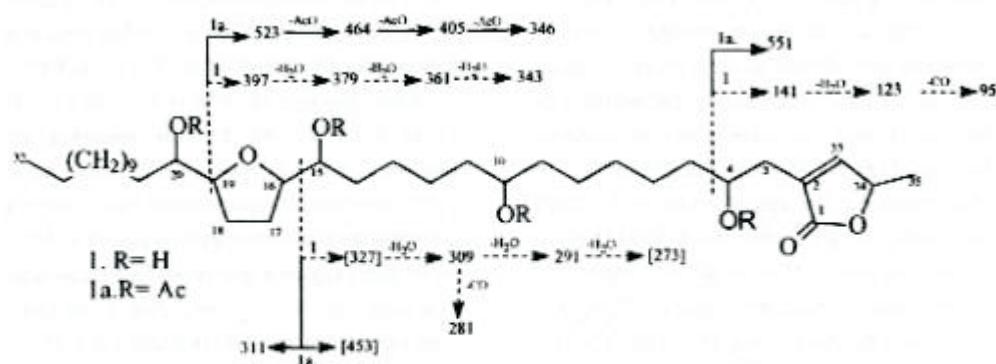


Figura 1. Fragmentaciones en EIMS de annonacina y annonacina tetraacetilado.

annonacina en comparación con otras acetogeninas aisladas, seneganel, squamocin y molvizarin, muestra una mayor actividad, estas presentaron una actividad contra *L. major* (causal de leishmaniosis cutánea del viejo mundo) y *L. donovani* en un rango de concentración 25 µg/ml-50 µg/ml³

SECCION EXPERIMENTAL

Procedimientos Experimentales Generales. El espectro de IR fue registrado en un espectrofotometro Perkin-Elmer 1320. EIMS fue determinado en un VG Auto Spec Fisons Espectrómetro. Los espectros de NMR fueron obtenidos de un Bruker Ac-250 y un Varian Unity-300 MHz y 62.5 MHz para ¹H y para ¹³C respectivamente. Usando como solvente CDCl₃ (δ 7.26, δ 77.0).

8 Realizado a 6 concentraciones por triplicado y tres repeticiones.

Planta *Annona muricata* L. (Anonaceae) «Guanábano». Se colectaron semillas de frutos maduros obtenidos de las zonas cálidas del departamento de Antioquia (Colombia). Fue identificado por A. Cogollo (HUA). Espécimen N° AC013259, Herbario Universidad de Antioquia.

Extracción y Aislamiento. Se partió de 1.2 kg de semillas, se secaron bajo una corriente de aire a una temperatura de 40°C por 24 horas para posteriormente triturar en un molino de cuchillas. El proceso de desengrase se realizó con hexano en un extractor soxhlet por 72 horas, el hexano es removido del extracto por destilación a presión reducida, obteniéndose 12.6 gm de un aceite ámbar (E01). El material vegetal libre de hexano se sometió a repetidas percolaciones con acetato de etilo por 96 horas, obteniéndose 9.8 gm de extracto con olor agradable (E02). Una vez se eliminó todo el acetato de etilo del material vegetal se procedió a percolación con metanol obteniendo 4.2 gm de extracto (E03).

Ensayos preliminares de bioactividad revelaron una mayor actividad de E02, este se disolvió en metanol y se filtró sobre papel de filtro, obteniéndose 0.3 gm de un residuo (F01), posteriormente se sometió a una extracción líquido-líquido en repetidas ocasiones con hexano, obteniéndose 8.5 gm en la fracción metanólica (F02) y 0.5gm (F03) en la fracción de hexano. F02 se paso por una cromatografía líquida al vacío, desarrollada por Targett et al.⁶, se empacó con sílica gel H60 (Merck 7736) y como eluyente se usó una mezcla inicial de hexano: acetato de etilo, el cual fue variando en su polaridad de 10%, 20%, hasta 100% por variaciones en la cantidad de acetato de etilo, para luego cambiar a igual relación, pero usando acetato de etilo: metanol. Se obtuvieron cuatro fracciones

0.8gm (F04), 6.1gm (F05), 1.1gm (F06), 0.5 gm (F07). La fracción F05 se separó por cromatografía de columna usando sílica gel H 60 (MERCK 7736) como fase estacionaria y como eluyente una mezcla de hexano: acetona (1:1), se obtuvieron 6 fracciones con un peso de 0.42gm (F8), 1.10gm (F09), 1.00gm (F10), 0.25gm (F11), 0.12gm (F12), 0.08gm (F12). En la (F09) se formaron unos cristales amorfos de carácter ceroso y color blanco correspondiente a annonacina

Bioensayo.

Parásito. *Leishmania panamensis* (MHOM/CO/87/UA140) aislados de pacientes del norte de Colombia con lesiones cutáneas y conservadas en el Criobanco del PECET, en fase logarítmica de crecimiento en medio Schneider suplementado con 10% SFB a pH 5.5 y 32°C.

Ensayo de citotoxicidad. Se desarrollo basado en la reacción metabólica de la fosfatasa ácida, presente en el parásito, para producir p-nitrofenol a partir de p-nitrofenilfosfato^{8,9,7}. La annonacina microencapsulada con PVP-10 (Polivinil pirrolidona, Sigma[®]) fue suspendido en PBS (buffer sodio fosfato). Los parásitos fueron dispensados 199µl/pozo a una concentración de 10⁵parasitas/ml en placas de 96 pozos, mientras que la suspensión de annonacina se adicionó 1µl/pozo. Para corregir la posible absorbancia de los componentes del medio se preparó un blanco con todos estos exceptuando los parásitos. Las placas se incubaron a 32°C por 48 horas al cabo de las cuales se les adicionó más medio con la suspensión de prueba, conservando las concentraciones iniciales. La actividad de la fosfatasa fue medida a las 96 horas, por adición de 20µl de un buffer de lisis de acetato de sodio 1.0M

por 3 horas. La producción de p-nitrofenol fue medida a 405nm en un lector de microplacas⁹.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Diego Miguel Cortes M. De la Universidad de Valencia - España, por la realización de los espectros de Masas y Resonancia Magnética Nuclear. Al Comité para el Desarrollo de la Investigación -CODI- (Universidad de Antioquia) por la financiación de este proyecto y a todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron para su ejecución.

REFERENCIAS

¹ Rupprecht J. K., Hui Y.H. and McLaughlin J. L. Annonaceous Acetogenins: a Review. *J. Nat. Prod.* Vol. 53, 237-278, (1990).

² Zafra-Polo M.C., González M. C., Estornell E., Sahpaz S. and Cortes D. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry.* Vol. 42, (2), 253-271, 1996.

³ Cavé A., Figadère B., Laurens A., and Cortes D. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.* Verlag, Springer, 1997, pág. 270-271.

⁴ Fujimoto, Y., Murazaki C., Shimada H., et al.. Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Non-adjacent Bistetrahydrofuranic Acetogenin. *Chem. Pharm. Bull.* Vol. 42, 1175-1184, 1994.

⁵ Harmange J.C., Figadère B., and Cavé A. Stereocontrolled Synthesis of 2,5-Linked Monotetrahydrofuran Units of Acetogenins. *Tetrahedron Lett.* Vol. 33, 5749-5752, 1992.

⁶ Lieb, F., Nonfon M., Wachendorff- Newmann U., and Wendisch D. Annonacins and annonastatin from *Annona squamosa*. *Planta Med.* Vol. 56, 317-319, 1990.

⁷ Rieser, M. J., Fang X.-P., Rupprecht J.K., Hui Y.-H., Smith D.L., and McLaughlin J.L. Bioactive Single-Ring Acetogenins From Seed Extracts of *Annona muricata*. *Planta Med.* Vol. 59, 91-92 (1993).

⁸ Botero D., Restrepo M. *Parasitosis Humanas.* 3^a ed, Medellín, Editorial CIB., 1998.

⁹ Sereno D., Lemesre, J-L. Axenically Cultured Amastigote Forms as an In Vitro Model for Investigation of Antileishmanial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* May 1997, p 001-005.

¹⁰ Sahpaz S., Bories C., Loiseau P.M., Cortes D., Hocquemiller R., Laurens A. and A. Cavé. Cytotoxic and Antiparasitic from *Annona senegalensis* Seeds. *Planta Med.* Vol. 60, 538-540, 1994.

¹¹ Targett N. M., Kilocyne J. P and Green B. J. *Org. Chem.* Vol.44, 4962, 1979.

¹² Bodley A. L., McGarry M.W. and Shapiro T. A. Drug Cytotoxicity Assay for African Trypanosomes and *Leishmania* Species. *J. Infect. Dis.* Vol. 172, 1157-1159, 1995.

¹³ Lovelace J.K. and Gottlieb M. Comparison of Extracellular acid Phosphatases from Various Isolates of *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 35, (6), 1121-1128, 1986.

¹⁴ Moody S. F. Molecular Variation in *Leishmania*, *Acta Trop.* Vol. 53, 185-204. 1993.

Fecha de Recepción: Agosto 24 de 1999

Fecha de Aceptación: Noviembre 30 de 1999