

Artículo de investigación

Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad de tipo ansiolítica en ratones

Vivian Oviedo,¹ Mildred García,² Cecilia Díaz,³ Mariel Marder,⁴ Mirtes Costa,⁵ Javier Rincón,¹ Ceferino Sánchez,⁶ Mario Guerrero¹

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A. A: 11430. Correo electrónico: mfguerrerop@unal.edu.co

² Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, PRONAPLAMED, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 2060, Costa Rica. Correo electrónico: mildredg@cariari.ucr.ac.cr

³ Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología y Departamento de Bioquímica, Escuela de Medicina, UCR. Correo electrónico: cdiaz@cariari.ucr.ac.cr

⁴ IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Junin 956, (C1113AAD), Buenos Aires (Argentina). Correo electrónico: mmarder@qb.ffyb.uba.ar

⁵ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Farmacologia. Correo electrónico: mcosta@ibb.unesp.br

⁶ Facultad de Medicina, Universidad de Panamá. Correo electrónico: ceferino@promed.com.pa

Recibido para evaluación: abril 20 de 2009.

Aceptado para publicación: mayo 18 de 2009.

RESUMEN

Se evaluó el efecto neurológico ejercido por el extracto hidroalcohólico (40%) obtenido de las hojas de *Annona muricata* (0,5 g/kg, vo) en ratones albinos ICR mediante pruebas tendientes a detectar posible actividad de tipo anticonvulsivante (electrochoque- pentilentetrazol), antidepresiva (nado forzado), hipnótica (potenciación de sueño barbitúrico) y ansiolítica (laberinto en cruz). Además se examinó la unión con radioligando del extracto a receptores de benzodiazepina, se efectuó el análisis fitoquímico y a la fracción alcaloidal obtenida se le aplicó la prueba del laberinto en cruz (0,5 g/kg, vo), según los resultados previos obtenidos con el extracto. Finalmente se evaluó la toxicidad del extracto (0,1-10 mg/mL) sobre las líneas celulares ECV-304 y κ562. Los hallazgos sugieren que compuestos de tipo alcaloidal presentes en *Annona muricata* tendrían efectos de tipo ansiolítico (53% y 58% de tiempo y frecuencia de acceso a las zonas abiertas en la prueba de laberinto en cruz elevado), no vinculados

a la activación de receptores de benzodiazepinas y carentes de efectos citotóxicos *in vitro*. Estos datos ayudan a dar soporte al uso etnobotánico de esta especie.

Palabras clave: *Annona muricata*, ansiolítico, alcaloide, sistema nervioso central, cribado farmacológico, ratón de laboratorio.

SUMMARY

Anxiolytic-like effect of the extract and alkaloid fraction from *Annona muricata* in mice

The present study evaluated the neuropharmacological effect exerted by the hydroalcoholic extract (40%) obtained from leaves of *Annona muricata* (0.5 g/kg, po) in ICR albino mice using tests to detect anticonvulsant (electroshock-pentylenetetrazol), antidepressant (forced swimming test), hypnotic (barbiturate sleeping time) and anxiolytic activities (elevated plus maze). The putative binding of the extract to the benzodiazepine receptor by radioligand techniques was also studied. The phytochemical analysis of the extract led to the isolation of an alkaloid fraction that was evaluated in the elevated maze test (0.5 g/kg, po), in agreement with previous results obtained with the extract. Finally, it was assessed the toxicity of the extract (0.1-10 mg/ml) in cell lines K562 and ECV-304. The results suggest that alkaloid metabolites present in *Annona muricata* exert anxiolytic effects (53% and 58% of the time and frequency of access to open areas in the elevated plus maze), unrelated to the activation of benzodiazepine receptors and without cytotoxic effects *in vitro*. These data help support the ethnobotanical use of this plant specie.

Key words: *Annona muricata*, anxiolytic, alkaloid, central nervous system, drug screening, laboratory mouse.

INTRODUCCIÓN

Los trastornos de ansiedad, en sus diversas formas, ocupan la mayor prevalencia entre los trastornos mentales y causan gran efecto en la morbilidad de la población mundial (1). Factores de orden psicológico, biológico, genético y ambiental inciden en su etiopatogenia (2, 3) configurando sus diferentes tipos: pánico, ansiedad generalizada, fobias, estrés postraumático y desorden obsesivo compulsivo (4). En todos ellos se requiere siempre un abordaje psicoterapéutico, pero con frecuencia también farmacológico (2, 5).

Cuando están indicados, mediante el uso adecuado de psicofármacos como benzodiacepinas, antidepresivos tricíclicos e inhibidores selectivos en la recaptación de serotonina, se consigue mejoría en la mayoría de los casos de trastornos de ansiedad; no obstante, persiste un grupo de pacientes que abandona la medicación: por sus efectos adversos, en unos casos, o por su escasa respuesta, en otros (6). Fuentes de origen natural podrían ser la base para la consecución de nuevas alternativas terapéuticas (7, 8).

Se utiliza popularmente con fines tranquilizantes la infusión de las hojas de *A. muricata* (N. V. "guanábana") y otras especies de la familia *Annonaceae* (9-11). Entre los principales metabolitos de esta especie figuran acetogeninas y alcaloides isoquinolínicos (12), cuyo interés farmacológico y toxicológico es materia de investigación. Aunque a los compuestos de tipo alcaloidal se les han atribuido posibles efectos de tipo sedante y antidepresivo (13, 14), no existe información suficiente obtenida de pruebas de cribado sobre el sistema nervioso central que dé soporte a estos usos. En este estudio se muestran efectos neurológicos en ratones de laboratorio inducidos por el extracto hidroalcohólico (40%) de *A. muricata* y la fracción alcaloidal obtenida de su análisis fitoquímico.

METODOLOGÍA

Obtención y caracterización del extracto

El material vegetal fresco de *A. muricata* se recolectó en la región de Guápiles (Limón, Costa Rica) y se clasificó en el Herbario Nacional de Costa Rica con el código 1363. El extracto de las hojas se preparó por maceración de 750 g de material vegetal seco y molido con etanol al 40% después de calentar a 50 °C, dejando en reposo durante 24 horas. Posteriormente el extracto se filtró y se concentró en rotavapor a presión reducida hasta sequedad total y por último se liofilizó.

Al extracto seco obtenido se le determinó la presencia de metabolitos secundarios utilizando las reacciones de precipitación: Dragendorff, Mayer, Valser y Reineckato de amonio y preparaciones en cromatografía en capa delgada, utilizando cromatofolios de silicagel HF₂₅₄, con la mezcla de solventes CHCl₃:CH₃OH en proporción: 6:4 y los reveladores UV, Dragendorff modificado, NP/PEG y Godin.

Fracción alcaloidal

El extracto hidroalcohólico seco (3,1 g) se trató con 20 mL de HCl al 5%, a 60 °C, seguido por un proceso de filtración en el que se pasó a un embudo de decantación y se alcalinizó con amoniaco hasta pH 8. Posteriormente se realizó una extracción con 3 x 50 mL de CH₂Cl₂, se separó la fase orgánica y se secó con Na₂SO₄. Finalmente, se

concentró en rotavapor, se pesó y se evaluó por reacciones de precipitación y por cromatografía en capa fina (15).

Animales

Se utilizaron ratones ICR machos de siete a nueve semanas de edad, suministrados por el *bioterio* del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C) y humedad (60%), expuestos a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con agua y alimento a libre demanda. Se utilizaron en número de ocho a diez por tratamiento.

Fármacos y soluciones

Se utilizaron los siguientes fármacos y soluciones: difenilhidantoína (Epamín[®] suspensión —Parke Davis—), clonazepam (Rivotril[®] gotas —Roche—), clorhidrato de imipramina (Sigma), diazepam, (Valium[®] ampolla —Roche—) y pentilentetrazol (PTZ, Sigma). El vehículo utilizado fue agua destilada.

Convulsión máxima inducida por electrochoque

Se siguió el procedimiento descrito por Swinyard *et al.* (16). Los animales se dosificaron por vía oral con el extracto (0,5 g/kg), difenilhidantoína (20 mg/kg, control positivo) o agua destilada (0,1 mL/10 g de peso, control negativo). Una hora después, luego de instilar una gota de solución salina isotónica en cada ojo, se les aplicó, vía corneal, una descarga de corriente alterna de 60 Hz, 50 mA y 20 ms (estimulador eléctrico E13-51 —Coulbourn Instruments[®]—), para provocar una convulsión de tipo tónico clónico generalizado. El criterio de protección fue la ausencia de extensión tónica de las extremidades posteriores.

Convulsión inducida por pentilentetrazol

Se siguió el procedimiento descrito por Swinyard *et al.* (16). Los animales se dosificaron por vía oral con el extracto (0,5 g/kg), clonazepam (0,5 mg/kg, control positivo) o agua destilada. Una hora después se les inyectó pentilentetrazol (80 mg/kg, s. c.) y se observaron durante una hora para determinar la presencia o ausencia de convulsiones clónicas en cabeza, tronco o extremidades con una duración mínima de cinco segundos (16).

Prueba de nado forzado

Se siguió el procedimiento descrito por Porsolt *et al.* (17-18). Los animales se dosificaron con el extracto (0,5 g/kg, vo), imipramina (15 mg/kg, i. p.) o agua destilada (0,01 mL/g, vo). Una hora después se pusieron en cilindros plásticos que contenían agua hasta 13,5 cm de altura a temperatura aproximada de 22 °C. Durante un período

de observación de cinco minutos, se registró el tiempo total de inmovilidad definido como aquel en el que el animal efectuó los movimientos apenas necesarios para mantener la cabeza a flote (17, 18).

Prueba de laberinto en cruz elevado

Se siguió el procedimiento validado por Lister para ratones (19), tras determinar el nivel basal de exploración del animal mediante la prueba de placa perforada (20). En ésta se determinó el número de veces que cada animal exploró, introduciendo la cabeza hasta el nivel de las orejas, orificios de 2 cm de diámetro dispuestos equidistantemente en una caja de acrílico (50 x 50 x 10 cm). Esto permitió distribuir uniformemente los tratamientos: extracto (0,5 g/kg, vo), diazepam (0,5 mg/kg, i. p.), fracción alcaloidal (0,5 g/kg, vo) o agua destilada (0,01 mL/g).

Transcurrida una hora de la dosificación, los animales se sometieron a la prueba del laberinto en cruz elevado. En un ambiente de baja iluminación (15 W) se registró durante un período de cinco minutos el número de ocasiones y el tiempo total en los que cada animal ingresó completamente tanto a la zona de brazos abiertos como a la de brazos cerrados del aparato. Cada uno de los brazos del laberinto tenía una dimensión de 30 x 5 cm, dispuestos en cruz, a una altura de 25 cm sobre la zona neutral: una plataforma central de 5 x 5 cm. Al comienzo de cada sesión se situó al animal sobre esta zona con el eje del cuerpo hacia una zona cerrada.

Prueba de sueño inducido por éter etílico

Se siguió el procedimiento descrito por Vieira (21), en el que se aplican para el éter etílico los criterios de la prueba de potenciación de sueño barbitúrico descrita por Carlini *et al.* (22). La prueba tiene la ventaja de que este anestésico no arroja los falsos positivos propios de aquellas sustancias que compiten con pentobarbital por el metabolismo microsomal hepático. Una hora después de la dosificación con el extracto (0,5 g/kg, vo), diazepam (0,5 mg/kg, i. p.), o agua destilada (0,1 mL/10g, vo) cada animal se situó en una cámara saturada con éter etílico (5 mL en frasco hermético con capacidad de 3 L). El ratón se retiró de la cámara 60 segundos después de la pérdida del reflejo postural. Se registró tanto el tiempo de latencia (tiempo que tarda en perder el reflejo de postura) como el de duración total de sueño (intervalo comprendido entre el momento en que pierde la postura y el momento en que la recupera).

Ensayo de unión al sitio de benzodiazepinas (su-BDZ)

El método empleado consiste en la inhibición de la unión del flunitrazepam tritiado ($[^3\text{H}]\text{-FNZ}$, 81,8 Ci/mmol; NEN) a las fracciones semipurificadas de membranas sinap-

tosomales de corteza cerebral de rata lavadas exhaustivamente para eliminar el GABA endógeno presente.

Para la preparación de las membranas, los cerebros de ratas Wistar se disecaron rápidamente sobre hielo y las diferentes estructuras se homogenizaron en 10 volúmenes de sacarosa 0,32 M y se centrifugaron durante 10 min a 900 x g. El sobrenadante resultante se centrifugó 30 min a 100.000 x g y el *pellet* se lavó dos veces con *buffer* Tris HCl 25 mM, pH 7,4, a 100.000 x g durante 30 min. Las membranas así obtenidas se guardaron a -20 °C hasta su utilización. Las muestras de membranas, que contenían 0,2-0,4 mg de proteína, se suspendieron en *buffer* 0,25 mM Tris-HCl, pH 7,3 hasta un volumen final de 1 mL. La incubación se realizó a 4 °C durante 60 min con una solución de [3H]-FNZ 0,6 nM. La unión inespecífica se determinó en incubaciones paralelas con la presencia de FNZ en una concentración de 3 µM, y representó un 5-15% del total. Los ensayos se terminaron por filtración al vacío a través de papel Whatman GF/A, después de tres lavados con 3 mL del medio de incubación. Seguidamente se tomaron los filtros y se contó la radiactividad en un contador líquido de centelleo (*Tracor*) después de adicionar 1,5 mL de fluido de centelleo (*OptiPhase 'HiSafe 3'*). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. En todos ellos las fracciones se disolvieron en *buffer*: etanol (1:1) con una cantidad de DMSO que no excedió el 1% del volumen final del ensayo. El FNZ se disolvió en etanol (23).

Pruebas de citotoxicidad

Dos líneas celulares K562 (vejiga) y ECV-304 (leucemia), obtenidas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC) se incubaron por 48 horas con un rango de concentración de 0,1 a 10 mg/mL del extracto de *A. muricata* disuelto en PBS. El efecto citotóxico se evaluó mediante las técnicas de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol) y XTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2Htetrazolio-5-carboxianilida), cuyos valores de absorbancia a 570 y 450 nm, respectivamente, indican el grado de viabilidad celular. El desarrollo de la coloración es proporcional al estado oxidativo de las células, por lo que una disminución en la absorbancia implica una disminución en la supervivencia celular. Los experimentos se realizaron por triplicado (24, 25).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron en términos de promedio \pm el error estándar (ems), excepto los referentes a las pruebas de convulsiones, que por ser de carácter *cuantitativa* (presencia o ausencia de convulsión), se examinaron mediante la prueba de χ^2 (26). A los datos obtenidos en las pruebas de nado forzado y laberinto en cruz elevado se les aplicó un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de diferencias múltiples de Tukey/Kramer. En la prueba de sueño inducido por éter se aplicó la prueba no paramétrica de

Mann Whitney. Los resultados obtenidos en las pruebas de convulsión y de laberinto en cruz se expresaron en términos de porcentaje de protección anticonvulsivante y de tiempo y de frecuencia de acceso a las zonas abiertas, respectivamente. El valor de p adoptado como significativo fue $\leq 0,05$. Se utilizaron la hoja de cálculo EXCEL[®] y el paquete estadístico SPSS[®] para el procesamiento de los datos.

Aspectos éticos

Las pruebas *in vivo* efectuadas, incluso las de convulsiones experimentales, que son las que representan mayor riesgo neurológico, son definitivamente indispensables para identificar posibles efectos farmacológicos y no se dispone de técnicas alternativas que las reemplacen con el suficiente grado de sensibilidad. Se utilizó el menor número posible de animales que permitiera efectuar los análisis estadísticos. Todos los procedimientos se efectuaron con sujeción a los principios del cuidado de animales de laboratorio estipulados en la resolución 8430 de 1993, del Ministerio de la Protección Social de Colombia, y a las directrices éticas de la Organización Mundial de la Salud.

RESULTADOS

Extracto hidroalcohólico y fracción alcaloidal

Las reacciones preliminares de precipitación con los reactivos de Dragendorff, Mayer, Valser y Reineckato de amonio dieron positivas para alcaloides. También se identificó la presencia de flavonoides y se confirmó la presencia de alcaloides en la muestra acidulada con HCl al 5% por medio de CCD utilizando $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, 6:4 como solvente y los reactivos de NP/PEG y Dragendorff modificado.

Convulsión máxima inducida por electrochoque y por PTZ

En las Figuras 1 y 2 se observa que los patrones utilizados en las pruebas de convulsiones inducidas por electrochoque y PTZ —difenilhidantoina y clonazepam— confririeron altos índices de protección (80% y 90%, respectivamente). El efecto del extracto, en cambio, no difirió del control.

Nado forzado

En la Figura 3 se observa el tiempo total de inmovilidad de los animales al ser expuestos a la prueba de nado forzado durante 5 minutos, que fue significativamente menor en el caso de imipramina con respecto tanto al extracto de *A. muricata* como al control (93, 180 y 210 s, respectivamente).

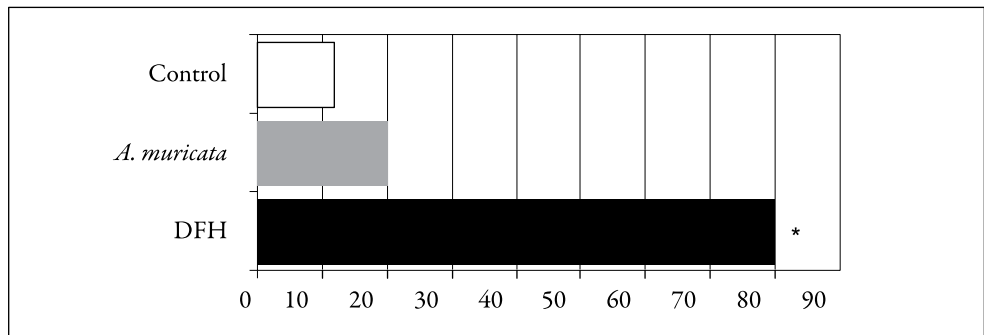


Figura 1. Porcentaje de protección frente a la convulsión máxima inducida por electrochoque. Extracto hidroalcohólico seco de *A. muricata* (1 g/kg, vo), difenilhidantoína (DFH, 20 mg/kg, vo) y control (agua destilada: 0,01 mL/g de peso, vo). * $p < 0,05$ χ^2 respecto al control.

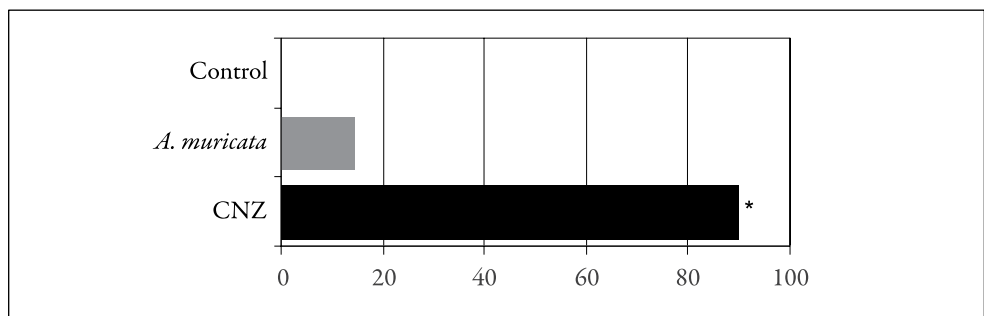


Figura 2. Porcentajes de protección frente a la convulsión inducida por PTZ. Extracto hidroalcohólico seco de *A. muricata* (1 g/kg, vo), clonazepam (CNZ, 0,5 mg/kg, vo) y control (agua destilada: 0,01 mL/g de peso, vo). * $p < 0,05$ χ^2 respecto al control.

Laberinto en cruz elevado (LCE)

En la Figura 4 se observa que tanto diazepam como el extracto y la fracción alcaloidal de *A. muricata* ejercieron efectos significativamente superiores tanto en frecuencia (59, 45 y 58% frente a 20%) como en tiempo (69, 45, 52% frente a 16%) de acceso a las zonas abiertas.

Sueño inducido por éter

En la Tabla 1 se observa que el agente patrón utilizado, diazepam (0,5 g/kg, vo) mas no el extracto de *A. muricata*, aumentó el tiempo de sueño inducido por éter etílico con respecto al control (180, 117 y 114 s, respectivamente).

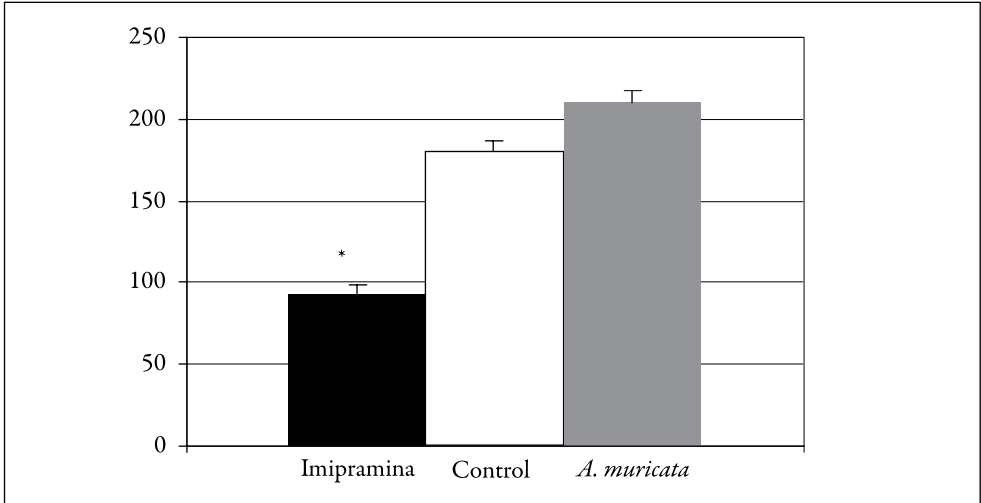


Figura 3. Tiempo de inmovilidad en el modelo de natación forzada. Extracto de *A. muricata* (1 g/kg vo), imipramina (15 mg/kg i. p.) y control (agua destilada, 0,01 mL/g de peso, vo). Los datos se expresan como tiempo de inmovilidad \pm ems. * $p < 0,05$. ANOVA/Tukey-Kramer.

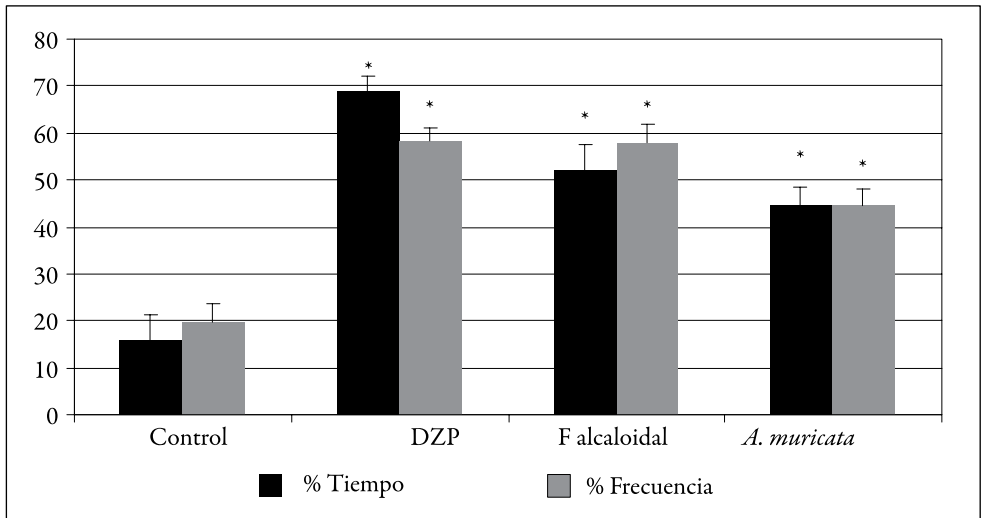


Figura 4. Efecto de diazepam (DZP, barras negras, 0,5 mg/kg, i. p.) extracto seco de *A. muricata* (1 g/kg, vo), fracción alcaloidal de *A. muricata* (0,5 g/kg, vo, barras punteadas) y control (agua destilada, 0,01 mL/g, vo, barras blancas) en la frecuencia de entradas y el tiempo de acceso a las zonas iluminadas del laberinto en cruz elevado. Los datos se expresan como el porcentaje del total de tiempo y frecuencia \pm ems. * $p < 0,05$. ANOVA/Tukey-Kramer.

Tabla 1. Efecto del extracto de *A. muricata* (1 g/kg, vo), diazepam (1 mg/kg, i. p.) y control (agua destilada, 1 mL/kg, vo) en la prueba de sueño inducido por éter etílico. Los datos se presentan como el promedio y el intervalo intercuartil (Q1-Q3). * $p < 0,05$ con respecto al control. Prueba de Mann-Whitney.

	Tratamiento agudo-dosis única		
	Extracto <i>n</i> = 7	Control <i>n</i> = 7	DZP <i>n</i> = 7
Latencia (s)	36 (32-40)	37 (31-42)	31 (27-38)
Duración de sueño (s)	117 (116-148)	114 (106-127)	180 (154-214) *

Ensayos de unión al sitio de benzodiazepinas

El extracto de *A. muricata* en el rango de 100 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no inhibió la unión del ligando marcado $[3\text{H}]\text{-FNZ}$ en las condiciones del ensayo.

Ensayo de citotoxicidad

Como se observa en la Figura 5, el extracto de *A. muricata* solamente presentó toxicidad a concentraciones mayores de 1 mg/mL para el caso de la línea K562 y 2 mg/mL para la línea ECV-304

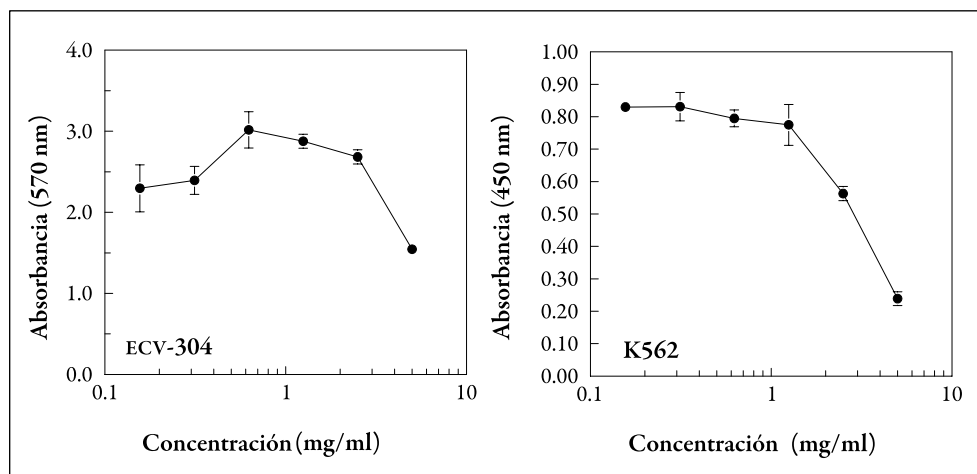


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones del extracto de *A. muricata* sobre la línea tumoral de vejiga ECV-304 y la línea leucémica K562. La absorbancia es un indicador de la viabilidad celular. Los datos se expresan como promedios de tratamientos realizados en triplicado con sus respectivos errores estándar.

DISCUSIÓN

En este estudio se observa que el extracto hidroalcohólico (40%) obtenido de las hojas de *A. muricata* no confiere protección anticonvulsivante frente a la descarga eléctrica ni frente a pentilentetrazol; tampoco logra disminuir el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, ni ejerce efectos hipnóticos, a juzgar por la prueba de sueño inducida por éter. No obstante, ejerce efectos significativos en los parámetros de frecuencia y tiempo de acceso a las zonas abiertas en la prueba de laberinto en cruz, efecto que tiende a aumentarse cuando se evalúa la fracción alcaloidal obtenida del análisis fitoquímico. Estos resultados habrán de considerarse dentro de las limitaciones de un estudio de dosis única; no obstante, cotejados con los obtenidos en las pruebas *in vitro* de unión al sitio de benzodiazepinas y viabilidad celular, sugieren que *A. muricata* tiene metabolitos de tipo alcaloidal con efectos de tipo ansiolítico, no relacionados con mecanismos benzodiazepínicos y sin efectos citotóxicos.

Alcaloides isoquinolínicos como annonaina, nornuciferina y asimilobina se han descrito en los frutos de *A. muricata*, y es posible que estén presentes también en alguna cantidad en las hojas. Se les han atribuido posibles efectos de tipo antidepresivo relacionados con interacción sobre el receptor 5-HT_{1A} (13,14). Aunque en este estudio, a juzgar por la prueba de *Porsolt*, no hay elementos para apoyar efectos de este tipo, en pruebas posteriores conviene utilizar un protocolo de administración sostenida que mejore la sensibilidad de la respuesta (27).

A juzgar por los resultados de este trabajo, parece improbable que mecanismos gabaérgicos estén implicados en la farmacodinamia de la fracción alcaloidal de *A. muricata*: no se fijan al sitio de unión de benzodiazepinas y carecen de efectos protectores frente a las convulsiones inducidas tanto por pentilentetrazol como por electrochoque. Se describe que pentilentetrazol ejerce mecanismos inhibitorios sobre GABA y que agentes gabaérgicos del tipo benzodiazepinas y barbitúricos protegen de las convulsiones inducidos por estos dos métodos. Aunque otros autores han señalado algún efecto protector de los alcaloides de *A. muricata* frente a pentilentetrazol, éstos serían discretos porque si bien logran aumentar el tiempo de latencia antes de la convulsión y disminuir la mortalidad asociada, carecen de la eficacia suficiente para prevenir la crisis (28). Paralelamente parece también improbable que mecanismos bloqueantes de canales de sodio estén implicados, en virtud de la ausencia de protección frente a la descarga eléctrica máxima.

Aunque existen numerosas pruebas orientadas a detectar agentes con potencial ansiolítico, la de laberinto en cruz elevado (*elevated plus maze*) sigue siendo la más utilizada. Su sensibilidad alcanza a agentes con mecanismos de acción diversa, tales como antagonistas 5-HT₃, agonistas 5-HT_{1A} y benzodiazepinas (29-30), si bien la prueba no suele

ser útil para detectar grupos farmacológicos del tipo de los antidepresivos tricíclicos e inhibidores selectivos de recaptación de serotonina, que también se usan como agentes ansiolíticos (2, 31). En consecuencia, teniendo en cuenta el perfil neurofarmacológico evidenciado por *A. muricata* en este trabajo, conviene establecer si mecanismos serotoninérgicos, eventualmente vinculados con los receptores 5-HT₃ o 5-HT_{1A} son los responsables de la actividad farmacológica de los alcaloides de esta especie.

Aunque el hecho de evidenciar escasos efectos sobre la viabilidad de las líneas κ562 y ECV-304 sugiere que el extracto de *A. muricata* carecería de importantes efectos citotóxicos agudos, debe señalarse que desde luego se trata de una prueba *in vitro* que, como tal, no es extrapolable al organismo *in vivo* y no cabe hacer afirmaciones ligeras sobre la seguridad farmacológica de su uso por la población. Por cierto, el consumo de los frutos y la infusión de las hojas de esta especie parece ser un importante factor en la fisiopatología de una forma atípica de parkinsonismo de la Costa Caribe centroamericana, particularmente en la isla de Guadalupe, asociada a demencia y signos oculomotores (32).

No obstante, los estudios realizados hasta la fecha señalan a acetogeninas, lactonas producto de la combinación de ácidos grasos de cadena larga (C32 ó C34) con una unidad de 2-propanol en el carbono 2, como los probables responsables de la neurotoxicidad de *A. muricata*. Su compuesto mayoritario es anonacina, y su mecanismo de toxicidad se relaciona con la inhibición de la cadena respiratoria en la mitocondria (33), factor a su vez vinculado con sus efectos citotóxicos (34).

Si bien los alcaloides han mostrado también efectos neurotóxicos *in vitro* en neuronas dopaminérgicas, su potencia es de orden micromolar, en tanto que la de anonacina es de orden nanomolar y son las acetogeninas las particularmente tóxicas sobre la mitocondria (35). En todo caso, es necesario que en estudios posteriores se discrimine cuál es el papel específico que los alcaloides de *A. muricata* desempeñan en la toxicidad neurológica crónica que induciría esta especie.

En conclusión: compuestos de tipo alcaloidal presentes en las hojas de *A. muricata* ejercerían efectos ansiolíticos, lo que ayuda a dar soporte al uso etnobotánico de esta especie. Se requieren mayores estudios con el fin de identificar los alcaloides responsables de la actividad farmacológica, precisar su mecanismo de acción y determinar su perfil de seguridad.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto x.8: “Obtenção de Medicamentos Inovadores com Atividade Ansiolítica/Antidepressiva a partir de Plantas Medicinais Iberoamericanas Validadas” del Pro-

grama Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED; a la División de Investigación de Bogotá, Vicerrectoría de Investigación, Universidad Nacional de Colombia (Proyecto Hermes 9334).

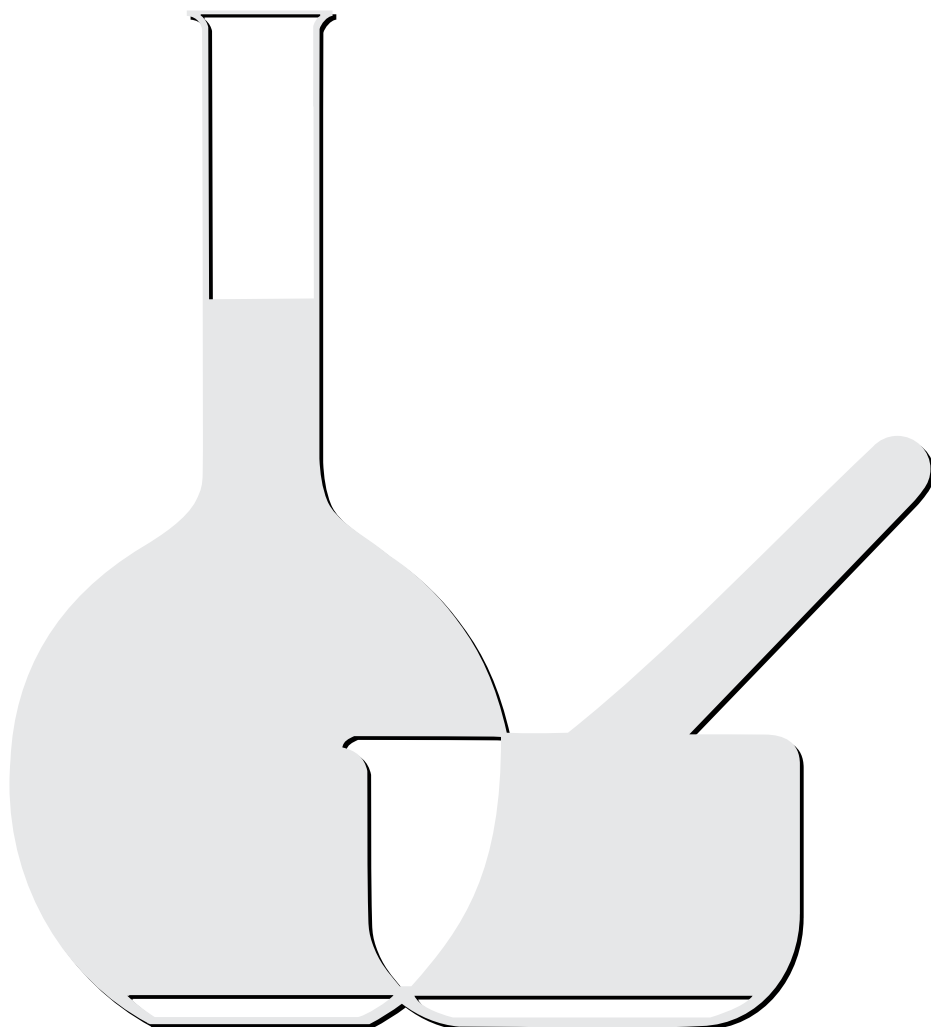
BIBLIOGRAFÍA

1. J. P. Lepine, The epidemiology of anxiety disorders: Prevalence and societal costs, *J. Clin. Psychiatry*, **63**, 4 (2002).
2. Stein, E Hollander, editors. "Textbook of anxiety disorders", American Psychiatric Publishing Eds., Arlington (VA), 2003.
3. J. M. Gorman, J. M. Kent, G. M. Sullivan y J. D. Coplan, Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, *Am. J. Psychiatry*, **157**, 493 (2000).
4. American Psychiatric Association, "Diagnostic and statistical manual of mental disorders", Washington, 2009.
5. A. Stoudemire, Epidemiology and psychopharmacology of anxiety in medical patients, *J. Clin. Psychiatry*, **54** suppl 5, 64 (1993).
6. J. C. Ballenger. Panic disorder in primary care and general medicine. En: "Panic disorder and its treatment", Ed. por J. F. Rosenbaum y M. H. Pollack, Dekker Inc, New York, 1998, pp. 1-36.
7. M. S. Butler, The role of natural product chemistry in drug discovery, *J. Nat. Prod.*, **67**, 2141 (2004).
8. P. Vuorelaa, M. Leinonenb, P. Saikkuc, P. Tammela, J. P. Rauhad, T. Wennberge y H. Vuorela, Natural products in the process of finding new drug candidates, *Curr. Med. Chem.*, **11**, 1375 (2004).
9. J. Tortoriello y, O. Romero, Plants used by Mexican traditional medicine with presumable sedative properties: An ethnobotanical approach, *Arch. Med. Res.*, **23**, 111 (1992).
10. J. F. Morton, A survey of medicinal plants of Curacao, *Econ. Bot.*, **22**, 87 (1968).
11. M. M. Iwu, "Handbook of african medicinal plants", CRC Eds., Boca Ratón, 1993, p. 113,

12. G. S. Kim, L. Zeng, F. Alali, L. L. Rogers, F. Wu, S. Sastrorihardjo y J. L. Mc Laughlin, Muricoreacin and murihexocin c, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*, *Phytochemistry*, **49**, 565 (1998).
13. J. A. Hasrat, L. Pieters, J. P. De Backer, G. Vauquelin y A. J. Vlietinck, Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT_{1A} ligands: Bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*, *Phytomedicine*, **4**, 133 (1997).
14. J. A. Hasrat, T. De Bruyne, J. P. De Backer, G. Vauquelin y A. J. Vlietinck. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 1145 (1997).
15. A. Sanabria, "Análisis fitoquímico preliminar", Universidad Nacional de Colombia Eds., Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Bogotá, 1983, pp. 65-69.
16. E. A. Swinyard, W. C. Brown y L. S. Goodman, Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **106**, 319 (1952).
17. R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet y M. Jalfre, Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments, *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 379 (1978).
18. R. D. Porsolt, P. Martin, A. Lenegre, S. Fromage y K. Drieu, Effects of an extract of *Ginkgo biloba* (EGB 761) on "learned helplessness" and other models of stress in rodents, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **36**, 963 (1990).
19. R. G. Lister, Ethologically-based animal models of anxiety disorders, *Pharmacol. Ther.*, **46**, 321 (1990).
20. S. E. File y S. Pellow, The effects of triazolobenzodiazepines in two animal test of anxiety and in the holeboard, *Br. J. Pharmacol.*, **86**, 729 (1985).
21. R. A. Vieira, Avaliacao da possivel atividade central da *Stachytarpheta cayennensis* (gervao-roxo). M. Sc. Dissertacion, Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
22. E. A. Carlini, J. D. Contar, A. R. Silva-Filho, N. G. Silveira-Filho, M. L. Frochtengarten y O. F. Bueno, Pharmacology of lemongrass. Effects of teas prepared from the leaves on the laboratory animals, *J. Ethnopharmacol.*, **17**, 37 (1986).
23. F. S. Duarte, M. Marder, A. A. Hoeller, M. Duzzioni, B. G. Mendes, M. G. Pizzolatti y T. C. De Lima. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds

- isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: In vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites, *J. Ethnopharmacol.* (Berl), **197**, 351 (2008).
24. F. Denizot y R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods*, **89**, 271 (1986).
 25. C. P. Cordero y, F. A. Aristizábal, Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos, *Rev. Colomb. Biotecnol.*, **4**, 100 (2003).
 26. S. Siegel, "Estadística no paramétrica", Trillas Eds., México, D. F., 1991, p. 120.
 27. M. J. Detke, M. Rickels e I. Lucki, Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants, *Psychopharmacology*, **121**, 66 (1995).
 28. P. N'Gouemo, B. Koudogbo, H. P. Tchivounda, C. Akono-Nguema y M. M. Etoua, Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice, *Phytother. Res.*, **11**, 243 (1997).
 29. G. R. Dawson y M. D. Tricklebank, Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents, *Trends. Pharmacol. Sci.*, **16**, 33 (1995).
 30. S. Hogg, A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **54**, 21 (1996).
 31. F. Borsini, J. Podhorna y D. Marazziti, Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?, *Psychopharmacology (Berl.)*, **163**, 121 (2002).
 32. A. Lannuzel, G. U. Höglinger, S. Verhaeghe, L. Gire, S. Belson, M. Escobar-Khondiker, P. Poullain, W. H. Oertel, E. C. Hirsch, B. Dubois y M. Ruberg, Atypical parkinsonism in Guadeloupe: A common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain*, **130**, 816, (2007).
 33. A. Cavé, B. Figade`re, A. Laurens y D. Cortes, Acetogenins from Annonaceae. En: "Progress in the chemistry of organic natural products", Ed. por W. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich y C. Tamm, Springer, Vienne, New York, 1997, pp. 81–288.

34. F. R. Chang, C. C. Liaw, C. Y. Lin, C. J. Chou, H. F. Chiu y Y. C. Wu, New adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*, *Planta Med.*, **69**, 241 (2003).
35. A. Lannuzel, G. U. Höglinger, P. Champy, P. P. Michel, E. C. Hirsch y M. Ruberg, Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae?, *J. Neural Transm. Suppl.*, **70**, 153 (2006).



NORMAS PARA PUBLICACIÓN

La Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas es editada por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá), con una periodicidad semestral y tiene como objetivo publicar artículos originales de diversos tópicos relacionados con las ciencias farmacéuticas tales como recursos naturales, atención farmacéutica, evaluación clínica y preclínica, y los relacionados con la industria farmacéutica, la salud y los medicamentos.

Además de artículos completos la revista acepta revisiones, comunicaciones breves y cartas al editor. Las contribuciones pueden enviarse en español, portugués o inglés, en letra Times New Roman, tamaño 12, por triplicado (original y dos copias) conjuntamente con una copia en medio magnético especificando el procesador de textos utilizado.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el comité editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el comité editorial serán remitidas al autor con el fin de que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de tres semanas para responder cada una de las observaciones, introducir en el texto las modificaciones del caso y retornar el documento corregido al comité editorial. Después de que los evaluadores

y/o el comité editorial lleven a cabo una segunda revisión del manuscrito, la revista comunicará a los autores la decisión sobre la publicación o no del mismo. Los originales de los artículos permanecerán en los archivos de la revista por un año. Los manuscritos deberán acompañarse de una carta firmada por todos los autores en la cual se declare que el trabajo es inédito, es decir, que el artículo ni parte de él ha sido publicado o está en vía de publicación en otra revista, y en la que se responsabilizan por la información publicada. Se entiende claramente que los trabajos enviados no están siendo considerados para publicación en otros medios. Siempre que se acepte un trabajo para publicación, el autor principal recibirá sin costo tres ejemplares del número de la revista correspondiente.

Los manuscritos deben ir a doble espacio, incluyendo tablas, con un mínimo de 2.5 cm de margen por todos los lados. No se admiten notas a pie de página.

Todos los manuscritos deben incluir:

Título, centrado y minúscula.

Autor(es), cursiva, izquierda, incluyendo dirección postal completa, correo electrónico y fax.

Resumen y Summary. Al principio del manuscrito y con título centrado. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Incluir además el título del artículo y el resumen en inglés

(Summary) independiente del idioma del manuscrito.

Palabras clave (debajo del Resumen) y Key words (debajo de Summary). De tres a seis palabras en minúscula, excepto la primera, y separadas por coma y espacio. Preferiblemente tomadas del Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

Los artículos se dividirán en las siguientes secciones: introducción, metodología, resultados y discusión, agradecimientos y bibliografía. Los títulos deben estar separados por 2 espacios en sus partes superior e inferior, centrados y en negrilla. Los detalles acerca de la metodología experimental utilizada deberán ser lo suficientemente claros como para repetir la experimentación.

Las tablas deben llevar numeración arábica de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir en su parte superior y las notas en la parte inferior. En los encabezamientos de las columnas se deben anotar los símbolos de las unidades utilizadas. Las fotografías, gráficas, dibujos y esquemas se denominan Figuras y deben llevar numeración arábica de acuerdo con el orden de aparición en el texto.

Los artículos relacionados con experimentación con animales deben ajustarse plenamente a los lineamientos éticos trazados por la Organización Mundial de la Salud. Los extractos y/o fracciones evaluadas *in vitro* o *in vivo* deben definirse químicamente, cuando menos en cuanto a la

clase de constituyente. El material vegetal deberá estar clasificado botánicamente.

Las abreviaturas de pesos y medidas serán las indicadas por la Farmacopea de los Estados Unidos en su edición oficial y/o unidades SI.

Los datos espectroscópicos se deben presentar de la siguiente manera:

UV λ max (solvente ϵ) nm (log I). Ej.: uv λ max (MeOH) 275 (log ϵ 2.94).

IE ν max (medio) cm^{-1} . Ej.: ir ν max (KBr) 1740, 1720 cm^{-1} .

EM m/z (% intensidad relativa). Ej.: em m/z (%): 340 (M^+ , 100), 295 (10), 134 (26) ...

RMN ^1H (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 3.84 (1H, *d*, J = 10.3 Hz, H-30).

RMN ^{13}C (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) 16.60 (*t*, C-12).

Las abreviaturas usadas para describir la multiplicidad de las señales en RMN son: *s* = singlete, *d* = doblete, *t* = triplete, *m* = multiplete, *dd* = doble de dobletes, *ddd* = doble de doble de dobletes.

Las abreviaturas para los solventes y reactivos más comúnmente usados son: EtOH = etanol, MeOH = metanol, CHCl_3 = cloroformo, C_6H_6 = benceno, AcOEt =

acetato de etilo, EP = éter de petróleo, Me₂CO = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

Se evitará el uso excesivo de tablas y figuras que estarán numeradas y que se anexarán en hojas separadas con su respectiva descripción.

Las referencias se citarán en el texto con su respectiva numeración. Solo se pueden citar tesis y libros o artículos que hayan sido publicados. Deben incluir: autor(es), título de la publicación, año, volumen y páginas, de la siguiente manera:

Revistas: Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. La referencia se cita en letra itálica, volumen en negrilla, página inicial y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith y B. Fleming, A comparative study of..... keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, 322, 269 (1973).

Comunicaciones personales: Iniciales del nombre, apellido completo e Institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

Libros: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro entre comillas, editorial, Ciudad, año, volumen y página. Ej.:

3. D.R. Morris, "The Biochemistry of Disease", Morris et Marton Eds., London, 1981, Vol. 8, p. 223.

Capítulos de libros escritos por varios autores: Iniciales del nombre y apellido completo del autor del capítulo seguido de la palabra En, título del libro entre comillas, editores, editorial, ciudad, año, volumen, páginas. Ej.:

4. A.D. Elbein y R.J. Molyneux. En "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol.5, pp. 1-54.

Tesis: Autores, título seguido de la palabra Tesis de..., Institución, año, páginas. Ej.:

5. F. Salcedo, "Contribución al estudio de las Cinchonas colombianas", Tesis de Grado, Universidad del Valle, 1983, pp. 14-16.

Referencias de Internet: Inicial del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat. Lipid thermotropic phase transition database. Ohio State University. URL: <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, septiembre 2001

La correspondencia debe enviarse a la siguiente dirección:

Comité Editorial

Revista Colombiana

de Ciencias Químico Farmacéuticas

Departamento de Farmacia - Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Colombia

Apartado Aéreo 14490

Fax: 57-1-3165060

Bogotá - Colombia

Correo electrónico:

rcciquifa_fcbog@unal.edu.co

Revista Colombiana
de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 38(1)
se terminó de imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.