

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS, TERPENICOS Y PERFIL CROMATOGRÁFICO EN DISTINTOS SISTEMAS DE ANNONA CHERIMOLA MILL. "CHIRIMOYA" (ANNONACEAE).

DETERMINATION OF POLYPHENOLIC, TERPENIC AND CHROMATOGRAPHIC PROFILES IN DIFFERENT SYSTEMS OF ANNONA CHERIMOLA MILL. "CHIRIMOYA" (ANNONACEAE).

Griselda Haag, GO.^{1,2}; M.E Del Valle,¹; S Scioli Montoto,³; M.E Ruiz,³; M.A Rosella,¹; Gustavo H. Marin²

1 Cátedras de Farmacobotánica y Farmacognosia, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Argentina

2 Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 120, La Plata, Argentina, CP 1900

3 Cátedras de Ensayo y Valoración de Medicamentos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Argentina

Abstract

The objective of the present work was to extract, isolate, characterize and identify, from the leaves of A. cherimola, polyphenols and triterpenes steroids that could support their uses in traditional medicine; As well as to establish chromatographic profiles for the extracts of this species in order to establish the identity and the quality control of the same. The results found allow to determine the presence of flavonoids and other polyphenolic compounds in the methanolic extracts n-butanol and aqueous; As well as terpenoids in the chloroform extract. TLC and HPLC-DAD against controls show that flavonoids and polyphenolic compounds correspond to rutin, isoquercetin and caffeic acid; While among the terpenes were ursolic and oleanolic acids. Given the aforementioned antecedents, it is reasonable to argue that traditional uses of cherimoya could be related to the activity and / or synergy of some of the flavonoids and polyphenols (rutin, isoquercetin, caffeic acid) and terpenoids (ursolic and oleanolic acids) found.

Palabras Clave: cherimola, chirimoya, extracto

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue el de extraer, aislar, caracterizar e identificar, a partir de las hojas de A. cherimola, polifenoles y triterpenos esteroides que pudieran avalar sus usos en la medicina tradicional; así como establecer perfiles cromatográficos para los extractos de dicha especie a fin de establecer la identidad y el control de calidad de la misma. Los resultados hallados permiten determinar la presencia de flavonoides y otros compuestos polifenólicos en los extractos metanólicos n-butanol y acuoso; así como terpenoides en el extracto clorofórmico. La TLC y HPLC-DAD contra testigos muestra que los flavonoides y compuestos polifenólicos corresponden a rutina, isoquercetina y ácido caféico; en tanto que entre los terpenos se encontraron los ácidos ursólico y oleanólico. Dados los antecedentes ya mencionados, es razonable plantear que los usos tradicionales de la chirimoya podrían estar relacionados con la actividad y/o sinergia de algunos de los flavonoides y polifenoles (rutina, isoquercetina, ácido caféico) y terpenoides (ácidos ursólico y oleanólico) hallados.

Key Word: cherimola, chirimoya, extract

INTRODUCCIÓN:

Las plantas son una de las fuentes más importantes de medicamentos. Desde los comienzos de la civilización, la humanidad ha utilizado las plantas medicinales por su valor terapéutico. Fuente de principios activos medicinales durante miles de años, un gran número de principios activos que hoy forman parte de medicamentos modernos han sido aislados a partir de fuentes naturales, muchas veces en base al uso tradicional (Rivera et al., 2013; Walker, 2015)

Según la OMS, los sistemas de medicina tradicional siguen desempeñando un papel esencial en el cuidado de la salud. Se calcula que aproximadamente un 80% de la población mundial utiliza las plantas y sus derivados para la atención primaria de salud (OMS, 2000; OMS, 2013).

La "chirimoya", *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) es una especie originaria de América (Safford, 1914). Tradicionalmente, algunas especies del género *Annona* han sido utilizadas en el tratamiento de diversas afecciones entre las que se incluyen distintos tipos de cáncer (Quispe et al., 2006; Ruiz Hidalgo et al., 2014).

Las hojas de *Annona cherimola* se utilizan en la medicina popular para el tratamiento de diarreas, golpes o torceduras, por su acción antiinflamatoria y debido a su proximidad quimio-taxonomica con otra especie de la familia Annonaceae, la "Graviola" o "guanábana" (*Annona muricata* L.), se les atribuye también actividad contra distintos tipos de cáncer, (Quispe et al., 2009)

Los tallos y semillas de *Annona cherimola* poseen compuestos tales como alcaloides, terpenoides, flavonoides, ácidos grasos saturados e insaturados, acetogeninas, (González Vega, 2013) que han demostrado actividad antitumoral. (M. Quispe et al., 2009)

Hasta el momento, las pruebas que se han hecho para validar el uso tradicional de *A. cherimola* se han centrado principalmente en las semillas y frutos, pero muy pocas sobre sus hojas (Lima et al., 2012; González Vega, 2013).

Objetivos:

- Extraer, aislar, caracterizar e identificar, a partir de las hojas de *A. cherimola*, polifenoles y triterpenos esteroides que pudieran avalar sus usos en la medicina tradicional.
- Establecer perfiles cromatográficos para los extractos de *A. cherimola*, a fin de establecer identidad y control de calidad de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas se recolectaron en Argentina, provincia de Tucumán durante el 2013.

La determinación la realizó la Dra. María Rosella. Un ejemplar se depositó en el Museo "Carlos Spegazzini" de la Facultad de Cs. Exactas UNLP bajo el registro LPE1165.

Polifenoles

Extracción:

Las hojas de *A. cherimola* (15g) fueron extraídas por maceración con metanol durante 48 hs. El extracto obtenido fue evaporado a presión reducida, y posteriormente se efectuó una partición líquido-líquido con cloroformo y n-butanol quedando un remanente acuoso.

Simultáneamente se realizó una infusión seguida de filtración y liofilización.

Reacciones de caracterización:

Sobre las fracciones clorofórmicas, n-butanolica y acuosa se efectuaron diversas reacciones a fin de investigar la presencia de polifenoles (flavonoides) con los reactivos de Shinoda, Rosenheim, y

soluciones etanólicas al 2% de cloruro de aluminio, cloruro férrico, ácido bórico e hidróxido de sodio. (Dominguez X.A., 1973).

Cromatografía en capa delgada (TLC):

Los extractos obtenidos se cromatografiaron en dos sistemas de solventes adecuados para polifenoles (Wagner y Bladt, 1995), en las siguientes condiciones:

Fase estacionaria: Cromatofolios de silicagel F254, 60 Merck, 0,25 mm.

Fases móviles: Sistema 1: Acetato de Etilo/Acido fórmico/ Ácido acético glacial/ Agua destilada (100:11:11:27) Fase superior y Sistema 2: Ácido acético/ Metanol/ Agua destilada (100:13,5:10).

Revelado: Luz UV de 366 nm, con vapores de amoníaco y Solución de ácido 2-aminoetil-difenilbórico y calor (105 °C durante 5 min.)

Siembra: Extractos metanólico, n-butanólico y acuoso de las hojas de *A. cherimola*

Sustancias de referencia: Soluciones metanólicas 1 mg/ml de rutina, isoquercetina y ácido caféico.

HPLC

Los extractos liofilizados fueron resuspendidos en 1 mL de metanol y centrifugados 13000 rpm durante 10 min. A partir del sobrenadante se realizaron diluciones en fase móvil (1:100 para el extracto butanólico y 1:3 para los extractos en agua y metanol) las cuales fueron filtradas a través de una membrana de nylon (0,45 µm) antes de su inyección (20 µl) en el sistema cromatográfico. El equipo empleado fue un Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA) configurado con una bomba de doble gradiente terciario (DGP-3000), un detector de arreglo de diodos DAD-3000 y una columna BDS Hypersil RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm, Thermo Scientific).

La fase móvil consistió en una mezcla tetrahidrofurano: metanol: agua (15:5:85 v/v) cuyo pH se ajustó a 2,5 con ácido fosfórico. Se trabajó a un flujo de 1 ml/min y la detección se realizó a 330 nm.

Compuestos Terpénicos:

Las hojas de *A. cherimola* fueron extraídas mediante una maceración al 20% P/V en cloruro de metileno (primer extracto).

Simultáneamente, se efectuó una decocción al 10% (segundo extracto) seguida de un fraccionamiento en ampolla de decantación con acetato de etilo. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro obteniéndose el "extractivo de acetato de etilo" (tercer extracto).

Sobre los extractos y fracciones obtenidas se practicaron las siguientes reacciones:

Reacciones de caracterización de terpenos: Reacción de Liebermann Bouchard.

Reacciones de caracterización de saponinas: Capacidad Afrógena, Poder emulgente, Reacciones de precipitación con soluciones de hidróxido de calcio, y subacetato de plomo; Reacción de Fehling indirecta. (Dominguez X.A., 1973).

Cromatografía en capa delgada (TLC)

Se determinaron los perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones obtenidos en dos sistemas de solventes, en las siguientes condiciones:

Fase estacionaria Silicagel 60 F254: 0,25 mm (Merck)

Fase móviles: Sistema 1: Tolueno : Acetato de etilo (8:2); Sistema 2: DCM : Metanol (9,5:5).

Detección: anisaldehído sulfúrico y calor a 105° C durante 5 min.

Siembra: Extractos acuoso, ext. DCM y extracto acetato de etilo de las hojas de *A. Cherimola*.

Sustancias de referencia: soluciones metanolicas al 1% de acido oleanólico y acido ursólico

RESULTADOS

Los ensayos para flavonoides permitieron establecer la presencia de este grupo fitoquímico en los extractos metanólico, n-butanol y acuoso.

La TLC contra testigos en los dos sistemas de solventes utilizados mostraron la presencia de rutina, isoquercetina y acido caféico, lo cual fue confirmado por HPLC-UV contra testigos (ver Figuras 3, 4 y 5).

Los ensayos fitoquímicos para terpenos permitieron establecer su presencia en el extracto diclorometano. Las TLC contra testigos en los distintos sistemas de

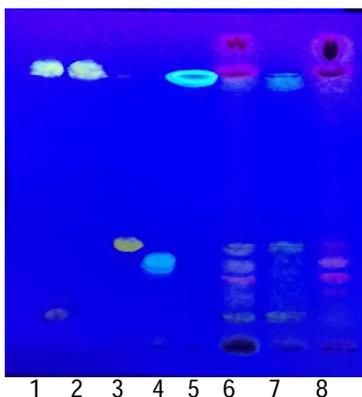
solventes ensayados, demostraron la presencia de ácido ursólico y ácido oleanólico.

Los sistemas cromatográficos ensayados para terpenos, no presentaron buena resolución para el extracto acuoso.

Para los extractos DCM y Acetato de Etilo se determinó la presencia, contra testigos, de ácidos ursólico y oleanólico en ambos sistemas de solventes.

Rf_{Sistema1} acido oleanólico 0,34; acido ursólico 0,32

Rf_{Sistema2} acido oleanólico; acido ursólico ambos juntos 0,61



1. Rutina Rf:0,38 Vis: Amar UV: Amar Fluor
2. Quercetina Rf:1 Vis: Amar UV: Amar Fluor
3. Isoquercetina Rf:0,52 Vis: Amar UV: Amar Fluor
4. Ac. Clorogénico Rf: 0,47 Vis: incol UV: cel fluor
5. Ac. Caféico: Rf:0,98 Vis: Marr UV: cel fluor
6. Ext. Metanólico Rf:0,38 Vis: Amar UV: Amar Fluor
Rf:0,44 Vis: Amar UV: Rosa Fluor
Rf:0,47 Vis: Amar UV: Rosa Fluor



1. Rutina Rf:0,41 Vis: Amar UV: Amar Fluor
2. Quercetina Rf:0,89 Vis: Amar UV: Amar Fluor
3. Isoquercetina Rf:0,52 Vis: Amar UV: Amar Fluor
4. Ac. Clorogénico Rf: 0,25 Vis: incol UV: cel fluor
5. Ac. Caféico: Rf:0,73 Vis: Marr UV: cel fluor
6. N-Butanol Rf:0,41 Vis: Amar UV: Amar fluor
Rf:0,52 Vis: Amar UV: Amar fluor
Rf:0,73 Vis: marrón UV: cel fluor
7. Ext. Cloroformo

Fig. 1 2. TLC en el S1 EtOAc/MetOH/H₂O (100:13,5:10)

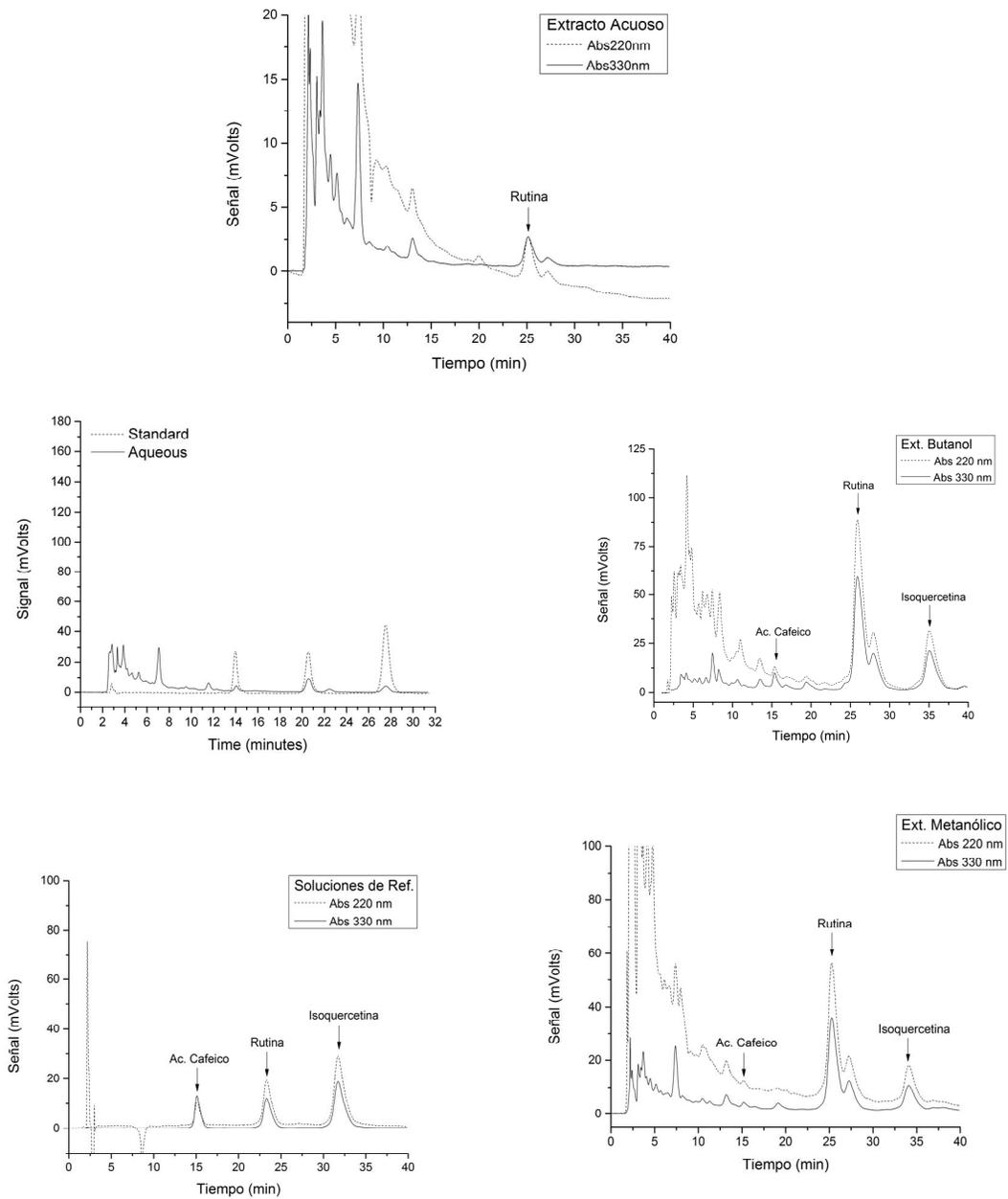


Fig.3. Perfil por HPLC-DAD del extracto acuoso (dilución 1:3). Se pueden observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R=13.95$ min), rutina ($t_R=20.65$ min) e isoquercetina ($t_R=27.8$ min).

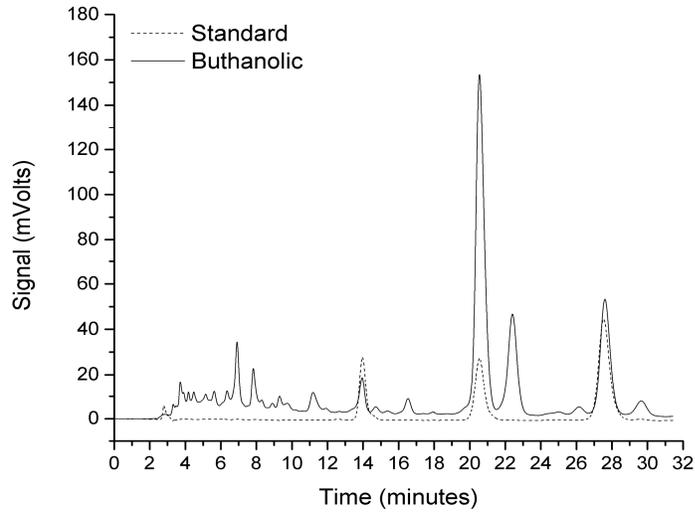


Fig.4. Perfil por HPLC-DAD del extracto butanólico (dilución 1:10). Se pueden observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R=13.95$ min), rutina ($t_R=20.65$ min) e isoquercetina ($t_R=27.8$ min).

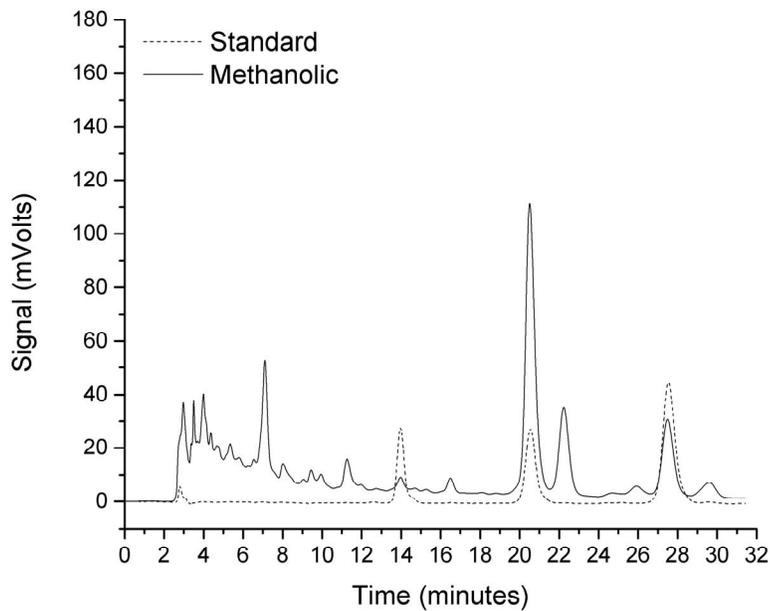


Fig.5. Perfil por HPLC-DAD del extracto metanólico (dilución 1:3). Se pueden observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R=13.95$ min), rutina ($t_R=20.65$ min) e isoquercetina ($t_R=27.8$ min).

Para los compuestos encontrados en hojas de *A. cherimola* existen diversos antecedentes acerca de sus actividades biológicas.

Así, para los flavonoides, Ugandhar (2013) alude a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Del mismo modo es ampliamente conocida la capacidad antioxidante de estos compuestos (Pineda *et al.*, 1999; Salkia *et al.*, 2016) y su actividad antiinflamatoria (Liu, *et al.* 1995; Rauf *et al.*, 2016), cicatrizante en lesiones gástricas (Rodríguez *et al.*, 2003), e incluso otras tales como: antitumoral (Zhang *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 1997; Kiekow, 2016); hepatoprotector (Jeong, 1999; Zhao *et al.*, 2015); anti VIH (Kashiwada *et al.*, 1998; Raphael y Kuttan, 2003; Ahman *et al.*, 2015), Antipertensiva (Somova *et al.*, 2003).

Para los ácidos ursólico y oleanólico se ha estudiado su efecto inhibitorio del crecimiento tumoral en ratones (Yin *et al.*, 1997; Gimenez *et al.*, 2015), hepatoprotector (Gwang, 1999), anti HIV (Yoshiri *et al.*, 1998; Liu, 1995; Dang *et al.*, 2015), inmunomodulador (Raphael y Kuttan, 2003), y otros efectos relacionados con la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de estos compuestos (Somova *et al.*, 2003; Penxia *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

1) Las reacciones preliminares realizadas permiten determinar la presencia de flavonoides y otros compuestos polifenólicos en los extractos metanólicos n-butanol y acuoso; así como terpenoides en el extracto clorofórmico.

2) La TLC y HPLC-DAD contra testigos muestra que los flavonoides y compuestos polifenólicos corresponden a rutina, isoquercetina y ácido caféico; en tanto que

entre los terpenos se encontraron los ácidos ursólico y oleanólico.

3) Dados los antecedentes ya mencionados, es razonable plantear que los usos tradicionales de la chirimoya podrían estar relacionados con la actividad y/o sinergia de algunos de los flavonoides y polifenoles (rutina, isoquercetina, ácido caféico) y terpenoides (ácidos ursólico y oleanólico) hallados.

Referencias

1. Ahmad A., Kaleem M., Ahmed Z., Shafiq H. 2015. *Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review Food Research International* 77 221–235
2. Chanh, P.H. Ifansyah N, Chahine R, Mounayar-Chalfoun A, Gleye J, Moulis C. 1986. *Comparative effects of total flavonoids extracted from Ribes nigrum leaves, rutin and isoquercitrin on biosynthesis and release of prostaglandins in the ex vivo rabbit heart. Prostaglandins Leukotrienes & Medicine.* 22: 295-300
3. Dang ATT, Pham CT, Le TA, Truong HH, Vu HTT, Soldatenkov AT,
4. Nguyen TV 2015 *New hybrids between triterpenoid acids and nucleoside HIV-RT inhibitors Mendeleev Commun.* 25, 96–98.
5. Dizzeo de Strimatter, C. 1973. *Nueva Técnica de diafanización. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 15:126-129.
6. Domingue, Xorge A. 1973, *Métodos de investigación fitoquímica.* Ed. Limusa S.A. México.
7. González Vega M. E. 2013 *Chirimoya (Annona cherimola Miller), fruit-bearing tropical and sub-tropical of promissory values Cultivos Tropicales.* 34 (3): 52-63.
8. Hsu Hsue Yin, Yang Jenq- Jer, Lin Chin Ching, 1997. *Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery hematopoietic system postirradiation in mice. Cancer Letters.* 111: 7-11.

9. Giménez E., Juan M.E., Calvo-Melià S., Barbosa J., Sanz-Nebota V., Planas JM. 2015. Pentacyclic triterpene in *Olea europaea* L: A simultaneous determination by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1410: 68–75
10. Jeong Hye Gwang, 1999. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride- induced hepatic injury. *Toxicology Letters*. (105) 215-222.
11. Kashiwada Yoshiki, Wang Hui- Kang, Nagao Tsuneatsu, Kitanaka Susumu, Yasuda Ichiro, Fujioka Toshihiro, Yamagishi Takashi, Consentino Mark, Kozuka Mutsuo, Okabe Hikaru, Ikeshiro Yasumasa, Hu Chan-Qi, Yeh Eric, Lee Kuo- Hsiung, 1998. Anti- AIDS Agents. 30. Anti-VIH activity of oleanolic acid, Pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* Vol. 61. Pp. 1090-1095.
12. Kiekow C J., Figueiró F., Dietrich F., Dalla Vecchia F., Pires E N.S., Jandrey E.H.F., Gnoatto S.C.B. , Salbego C.G., Battastini A.M.O., Gosmann G. 2016. Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating NF-KB nuclear translocation and caspase-3 activation *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 :116–122
13. Lima, L.A.R.S.; Lopes, M.T.P.; Cunha, M.M.; Pimenta, L.P.S.; Boaventura, M.A.D. 2012. Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae) / Evaluation of the cytotoxic activity of seeds of *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae) *Rev. bras. plantas med*;14 (4): 629-634.
14. Liu J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 49. Pp. 57-68.
15. Nelson A.T., Camelio A.M., Claussen K.R., Cho J., Tremmel L, DiGiovanni J, Siegel D. 2015. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 : 4342–4346
16. OMS. 2000. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional, Geneva, Switzerland. 1-80.
17. OMS, 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ediciones de la OMS, Organización Mundial de la Salud, 20 Avenue Appia, 1211 Ginebra 27, Suiza
18. Pérez, G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 22(1):48-57
19. Pineda AD, Salucci M, Lázano R, Madani G, Ferro-Luzzi A. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentos y Nutrición* 13(2): 104 – 111.
20. Raphael T. J., Kuttan G., 2003. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. *Phytomedicine.* 10: 483-489.
21. Rauf A, Uddin G, Siddiqui B.S. , Khan H., Shah S.U.A., Hadda T.B., Mabkhot Y.N., Farooq U., Kha A. 2016. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls *Complementary Therapies in Medicine* 25 : 132–138
22. Rodriguez J, Astudillo L, Schemeda G, 2003. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid- induced chronic gastric lesions in rats. *Pharmacological Research.* 48: 291-294.
23. Saikia S., Mahnot N.K., Mahanta C.L. 2016. Phytochemical content and antioxidant activities of thirteen fruits of Assam, India. *Food Bioscience* 13: 15–20.
24. Somova L.I., Shode F.O., Ramnandan P., Nadar A., 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africa* leaves. *Journal of Ethnopharmacology.* 84 : 299-305.
25. Ugandhar Raju D, Sudhakar Babu K, Raghavendra H G, Sridhar C, Suresh Kumar S V, Udaya Sree K and Trimurthulu Golakoti. 2013. Phytochemical constituents, anti-inflammatory and analgesic effects of methanol extract of leaves of *Annona cherimola*. *Pharmacie globale international journal of*

- comprehensive pharmacy*. 04: (02) 1-5. ISSN 0976-8157
26. Wagner, H. y S. Bladt. 1995. *Análisis de Medicamentos de Plantas*. 2^a ed. Springer-Verlag. Berlín, Heidelberg, Nueva York.
 27. Pengxia Z., Hongmei L., Dong C., Juhua N., Yuming K., Shuqiu W., 2007. *Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cell through caspase activation and poly (ADP- ribose) polymerase cleavage*. *Acta biochimica et biophysica sinica*. 39 : (10) 803-809.
 28. Quispe A., Zavala D, Rojas J., Posso M., Vaisberg A. 2006 *Efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (acetogenina de Annona muricata) en cultivos celulares de cáncer de pulmón*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 23 (4), 265-269
 29. Quispe, M. D. Callacondo Riva, A. Vaisberg, D. Zavala, J. Rojas, M. Posso *Acta Med Per* 2009. *Cytotoxic activity of seeds of Annona cherimola in cell cultures of cervical and breast cancer and chronic myeloid leukemia*. 26 (3) 156-161
 30. Rivera JO, Loya AM, Ceballos R. 2013. *Use of Herbal Medicines and Implications for Conventional Drug Therapy* *Medical Sciences Altern Integ Med*, 2:6
 31. Ruiz Hidalgo J., Di Toto Blessing L., Arrighi F., Bardón A., Vera N., Neske A. 2014. *Acetogenina annonáceas de Annona squamosa procedente de brasil* 30° Congreso Argentina de Química. *Anales de la Asociación Química Argetnina AAQAE* 095-196
 32. SAFFORD, W. E. 1914. *Classification of the genus Annona, with de- scriptions of new and imperfectly know species*. *Countributions U. S. National Herbarium* 18: 1-68.
 33. Walker D.R. 2015. *Report on the regulation of herbal medicines and practitioners* <http://www.dscience.net>
 34. Zhaoa P., Chao Qia C., Wanga G., Daia X., Houb X. 2015. *Enrichment and purification of total flavonoids from Cortex JuglandisMandshuricae extracts and their suppressive effect on carbontetrachloride-induced hepatic injury in Mice* *J. Chromatogr. B* 1007 ; 8-17