

00570



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO QUÍMICO Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA
DE LAS PROPIEDADES ANSIOLÍTICAS, HIPNÓTICAS Y ANTICONVULSIVAS DE
Annona cherimolia, *Annona lutescens* y *Rollinia mucosa*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
(QUÍMICA FARMACÉUTICA)

PRESENTA
QUÍMICA ROSA ESTRADA REYES

m340374



TUTOR: Dr. Mariano Martínez Vázquez

2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

PRESIDENTE	Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
VOCAL	Dr. RAFAEL CASTILLO BOCA NEGRA
SECRETARIO	Dr. ENRIQUE ÁNGELES ANGUIANO
PRIMER SUPLENTE	M. en C. EMMA MALDONADO JIMÉNEZ
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. RICARDO JORGE CÁRDENAS PÉREZ

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fitofarmacología y el laboratorio de Farmacología conductual del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" y en el Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Mariano Martínez Vázquez, con apoyo parcial de CONACYT (34992-N).

Sustentante

Tutor

Química Rosa Estrada Reyes

Dr. Mariano Martínez Vázquez

DEDICATORIA

A la Dra. Lydia Rodríguez Hahn
In memoriam

Al M. en C. Jorge Cárdenas Pérez

A Erika Ortiz Estrada

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Emma Maldonado Jiménez del Instituto de Química de la UNAM, por su colaboración en la redacción de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Heinze Martín del Instituto Nacional de Psiquiatría por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	5
LISTA DE ESPECTROS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1. FITOQUÍMICA	9
2.2 FARMACOLOGÍA	17
2.2.1. EPILEPSIA	17
2.2.2. ANSIEDAD	25
2.2.3. SEDANTES	32
3. OBJETIVOS	34
4. PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1.0. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA	36
4.1.1. ANIMALES Y FÁRMACOS	36
4.1.2. ESTADÍSTICA	37
4.1.3. Modelo de la conducta exploratoria ante un ambiente aversivo	37
4.1.4. Modelo de actividad locomotriz	38
4.1.5. Prueba de potenciación de hipnosis inducida con pentobarbital sódico	38
4.1.6. Efecto sobre la actividad epiléptica inducida por PTZ	39
4.1.7. Auto-radiografía	39

4.2.0. ESTUDIO FITOQUÍMICO	41
4.2.1 <i>Annona cherimolia</i>	43
4.2.2. <i>Annona lutescens</i>	48
4.2.3. <i>Rollinia mucosa</i>	50
5.0. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	55
6.0. CONCLUSIONES	87
APÉNDICE	89
7.0. BIBLIOGRAFÍA	90
8.0. ESPECTROS	98

ABREVIATURAS

Ácido γ -aminobutírico	GABA
4-dimetilaminopiridina	4-AMP
S-aminometionina	SAM
Benzodiazepinas	BDZ
Diazepam	DZ
Sulfóxido de dimetilo	DMSO
Densidad óptica	DO
Diámetro interno	d.i.
Extracto hexánico de <i>Annona cherimolia</i>	EHAC
Extracto hexánico de <i>Annona lutescens</i>	EHAL
Extracto hexánico de <i>Rollinia mucosa</i>	EHRM
Extracto de alcaloide de <i>Annona lutescens</i>	EAAL
Extracto de alcaloide de <i>Rollinia mucosa</i>	EARM
Fosfato de adenina nicotinamida dinucleótido	NADP ⁺
Fosfato de adenina nicotinamida dinucleótido (reducida)	NADPH
5'-fosfato de piridoxal	PLP
Fenilalanina amoníalíasa	PAL
Índice de Retención	IR
Intraperitoneal	ip
Modelos Experimentales de Epilepsia	MEE
Pentilentetrazol	PTZ
Polipropilenglicol	Pg
Pentobarbital sódico	PB
Sistema Nervioso Central	SNC
Temperatura Ambiente	TA
Tiempo de Retención	TR
Trifosfato de adenosina	ATP

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla No. 1** *Annonas* utilizadas en la medicina tradicional
- Tabla No. 2** *Annonas* de México
- Tabla No. 3** Características de la ansiedad
- Tabla No. 4** RMN ^{13}H de liriodenina y anonaina
- Tabla No. 5** RMN ^{13}C de liriodenina y anonaina
- Tabla No. 6** Constituyentes del extracto hexánico de *A. cherimolia*
- Tabla No. 7** Constituyentes del extracto hexánico de *A. lutescens*.
- Tabla No. 8** Productos de metilación de extracto hexánico de *A. lutescens*
- Tabla No. 9** Efecto de los extractos hexánicos de hojas de *Annona cherimolia*, *A. lutescens* y *Rollinia mucosa* en el modelo de la conducta exploratoria
- Tabla No. 10** Efecto de los extractos de alcaloides totales de *A. lutescens*, *Rollinia mucosa* y liriodenina en el modelo de la conducta exploratoria.
- Tabla No. 11** Efecto de los extractos hexánicos de las hojas de *Annona cherimolia*, *A. lutescens* y *Rollinia mucosa* sobre la actividad locomotriz
- Tabla No. 12** Efecto de los extractos de alcaloides totales de *Annona lutescens*, *Rollinia mucosa* y liriodenina sobre la actividad locomotriz.
- Tabla No. 13** Efecto de los extractos hexánicos de las hojas de *A. cherimolia*, *A. lutescens* y *R. mucosa* sobre efecto hipnótico inducido por 42 mg/kg de PB
- Tabla No. 14** Efecto de los extractos hexánicos de las hojas de *A. cherimolia*, *A. lutescens* y *R. mucosa* sobre efecto hipnótico inducido por 30 mg/kg de PB
- Tabla No. 15** Efecto de los extractos hexánicos de *A. cherimolia*, *A. lutescens* y *R. mucosa* sobre el efecto epiléptico inducido por 90 mg/kg de PTZ
- Tabla No. 16** Tabla de estructuras cerebrales de EHRM
- Fig. No. 1** Alcaloides del género *Annona*
- Fig. No. 2** Ruta biogénica de los alcaloides aporfínicos
- Fig. No. 3** Ruta biogénica de los lignanos
- Fig. No. 4** Mecanismo de acción de GABA

- Fig. No. 5** Modelo de sinapsis excitatoria
- Fig. No. 6** Receptor GABA_A
- Fig. No. 7** Estrategia general de trabajo
- Fig. No. 8** Efecto de EHAC sobre la conducta exploratoria
- Fig. No. 9 A** Efecto de EHAC sobre el efecto hipnótico inducido con 42 mg/kg de PB
- Fig. No. 9 B** Efecto de EHAC sobre el efecto hipnótico inducido con 30 mg/kg de PB
- Fig. No. 10** Efecto de EHAL sobre el efecto hipnótico inducido con 42 mg/kg de PB
- Fig No.11** Efecto de EHRM sobre la conducta exploratoria
- Fig. No. 12** Efecto de EHRM sobre el efecto hipnótico inducido con 42 mg/kg de PB
- Fig. No. 13** Fotografía de cortes cerebrales administrados con EHRM
- Fig. No. 14** Porcentaje de unión a BDZ producido por el EHRM
- Fig. No. 15** Efecto de EAAL sobre la conducta exploratoria
- Fig. No. 16** Efecto de EARM sobre la conducta exploratoria
- Fig. No. 17** Efecto de liriodenina sobre la conducta exploratoria

LISTA DE ESPECTROS

NÚMERO	ESPECTRO
1	16-hentriacontanona o palmitona (RMN ^1H)
2	Liriodenina (RMN ^1H)
3	Liriodenina (RMN ^{13}C)
4	Anonaina (RMN ^1H)
5	Anonaina (RMN ^{13}C)
6	Epimembrina (RMN ^1H)
7	Epimembrina (RMN ^{13}C)
8	Epieudesmina (RMN ^1H)
9	Epieudesmina (RMN ^{13}C)
10	Epimagnolina (RMN ^1H)
11	Epimagnolina (RMN ^{13}C)
12	Membrina (RMN ^1H)
13	Membrina (RMN ^{13}C)

1. INTRODUCCIÓN

La ansiedad, la depresión y la epilepsia son enfermedades que comprometen el funcionamiento del sistema nervioso central, con importantes repercusiones cognitivas, conductuales y emocionales sobre el individuo. El acelerado ritmo de vida de las grandes ciudades ha agravado estas enfermedades consideradas ahora problemas de salud pública de importancia mundial. Para paliar estos padecimientos se han sintetizado fármacos con potentes propiedades hipnóticas y reducidas vidas medias. Sin embargo, en la actualidad presentan inconvenientes en su uso debido a los efectos secundarios que presentan.

Por otro lado, la investigación en productos naturales orientada a la obtención de nuevos agentes farmacológicamente activos, ha conducido al descubrimiento de sustancias que hoy en día tienen un papel importante en el tratamiento de algunas enfermedades mentales, entre estas sustancias se pueden citar: las bilobalidas y gíngolidas, obtenidas del *Ginkgo biloba*; la pasiflorina y la crisina de *Pasiflora ssp.*; el ácido valérico de *Valeriana officinalis* y la hipericina, e hiperforina de *Hipericum perforatum*,¹ entre otras.

La medicina folclórica mexicana cuenta con una gran tradición sobre el uso de plantas para el tratamiento de un sin número de enfermedades. Entre ellas se conocen algunas especies que tienen efecto sobre el Sistema Nervioso Central (SNC). Por ejemplo, se tiene al toloache, la pasiflora y los toronjiles. Además de estas especies, en nuestro país existen otras que muestran un perfil adecuado para su estudio y evaluación neurofarmacológica. Tal es el caso de algunas especies de *Annonas* (*Annonaceae*), las cuales son utilizadas en medicina tradicional por sus propiedades insecticidas, antitumorales, sedantes y tranquilizantes, entre otras.^{2, 3}

2. ANTECEDENTES

2.1. Fitoquímica

Algunas especies del género *Annona* tienen un gran reconocimiento como remedios herbolarios para el tratamiento de varias enfermedades. Inclusive hoy día son utilizadas por culturas tan diversas como las que se encuentran en la India, Indochina, Malasia y Sudamérica.

Las *Annonas* pertenecen a la familia Annonaceae, la cual está constituida aproximadamente por 120 géneros y más de 2000 especies.⁴

Estas especies generalmente son árboles, arbustos y enredaderas trepadoras, varias de ellas de madera y hojas aromáticas y algunas presentan frutos comestibles.

Su uso tradicional está relacionado con las propiedades de sus tejidos y órganos; por ejemplo, la corteza de muchas de ellas es aromática, estimulante y astringente, mientras que algunas otras presentan un sabor ligeramente amargo, tienen propiedades vermícidas y son empleadas por sus propiedades insecticidas, analgésicas y sedantes.

En México el uso de estas plantas se remonta a la época prehispánica, como se describe en el libro de “Las plantas medicinales de México”, donde por ejemplo, se citan a las especies *Annona cherimolia* Mil., *A. glabra* L., *A. muricata* L. y *A. ssp.*. Las cuales han tenido un uso intenso en la terapéutica tradicional.⁵ (Tabla 1)

Tabla 1

Algunas *Annonas* utilizadas en la terapéutica tradicional.

Especie	Nombre común	Usos
<i>Annona cherimolia</i> Mill.	Anona, chirimoya, pox o chirimoya	En México usan la cáscara (epicarpio) en cocimiento 'contra la pulmonía', las semillas pulverizadas se usan como insecticida. Son venenosas.
<i>Annona glabra</i> L.	Yucatán, x-max, coecho o palo de corcho	Según Gaumer, esta planta tiene propiedades expectorantes y se usa como remedio en las primeras fases de la tuberculosis y contra la ictericia. Es la misma planta que se llama corcho en Veracruz, Tabasco, Michoacán y Guerrero, palo de corcho o max, en Yucatán.
<i>Annona muricata</i> , L.	Tak-ob o guanabana.	El fruto se dice que cura la disentería, las hojas curan la pérdida del espíritu. Es ampliamente distribuida en la República mexicana.
<i>Annona ssp.</i>	Anona de monte	"Cura las cámaras de sangre", su raíz es ponzoñosa y según se refiere aquel que tomase la raíz en polvo, tardará en morir el tiempo que ocupó en secarla al sol.

En la actualidad algunas de estas especies aun se emplean para curar diversos padecimientos; por ejemplo, en el libro "Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social" se describe el uso de las hojas y frutos de *A. muricata* para el tratamiento de la diarrea, tristeza y la pérdida del espíritu, mientras que las hojas y frutos de *A. reticulata* se emplean únicamente para el tratamiento de la tristeza y la pérdida del espíritu.⁶

En México existen un total de 22 especies de *Annonas* distribuidas, en Guerrero, Yucatán, Michoacán, Morelos y Chiapas. (Tabla 2)

Tabla 2 Especies del género *Annona* presentes en México

<i>Annona squamosa</i>	<i>A. cherimolia</i>
<i>A. montana</i>	<i>A. glabra</i>
<i>A. muricata</i>	<i>A. bullata</i>
<i>A. atemoya</i>	<i>A. senegalensis</i>
<i>A. densicoma</i>	<i>A. crassiflora</i>
<i>A. purpurea</i>	<i>A. reticulata</i>
<i>A. coricea</i>	<i>A. glauca</i>
<i>A. diversifolia</i>	<i>A. globiflora</i>
<i>A. scleroderma</i>	<i>A. holoserica</i>
<i>A. spp</i>	<i>A. spraguei</i>
<i>A. macrophyllata</i>	<i>A. lutescens</i>

Trece de estas especies se localizan en distintas regiones del estado de Chiapas. Sin embargo, en el Herbario Nacional de México, solo se tiene el registro de 12 de ellas (Registro de especies del género *Annona*, MEXU, 1997.⁷) Las especies más comunes son: *A. diversifolia* (papausa), *A. purpurea* (chincuya), *A. lutescens* (anona amarilla) y *A. muricata* (guanábana), cuya propagación es favorecida en los solares. Estas cuatro especies, son localizadas prácticamente en todas las zonas cálidas del estado, a una altura que varía de 0 a 900 m s.n.m. Todas ellas son árboles con una altura de 3 a 5 m, a excepción de la *A. purpurea* que alcanza hasta 8 m. Las etapas de fructificación no están sincronizadas, así la *A. diversifolia* y la *A. purpurea* fructifican de septiembre a noviembre, mientras que la *A. lutescens* lo hace de abril a mayo, aunque se encuentran frutos en diversas épocas del año.⁸ Como se puede apreciar, el uso medicinal así como la abundancia y diversidad de estas especies, las hace una fuente potencial para la obtención de sustancias bioactivas. No cabe duda que las propiedades biológicas tan diversas que poseen estas plantas son debidas a la gama de metabolitos secundarios que sintetizan. Así, se ha informado de la

presencia de alcaloides con estructuras variadas, aceites esenciales, flavonas, terpenos, glicósidos y acetogeninas. Las propiedades citotóxicas que presentan éstas últimas han influido para que, recientemente, la investigación sobre las *Annonas* se haya dirigido principalmente a la búsqueda de éste tipo de compuestos.

Por otro lado, la presencia de alcaloides, además de involucrar conceptos evolutivos, es de gran importancia por las diversas actividades biológicas que éstos poseen.

Así por ejemplo, se ha descrito que los alcaloides aporfínicos: xilopina, noecorudina, coridina, glaucina, asimilobina, oxonanterina y liriodenina, poseen actividad vaso relajante.⁹

También se ha descrito la actividad vasodilatadora y relajante de los alcaloides aporfínicos; lirondenina, roemerina y norushinsunina, aislados de *A. cherimolia*.^{10, 11}

Por otro lado, la *A. muricata* es quizá la especie químicamente más estudiada, ya que es utilizada en Sudamérica por los efectos tranquilizantes atribuidos a sus hojas y frutos.

Recientemente se ha descrito que el extracto metanólico de esta especie posee actividad agonista a receptores 5HT_{1A}, siendo estos receptores predominantes en el SNC y al estar involucrados en la modulación de las emociones, puede explicar el efecto antidepresivo que muestra esta especie.¹² En estudios posteriores realizados por el mismo autor, se describe a

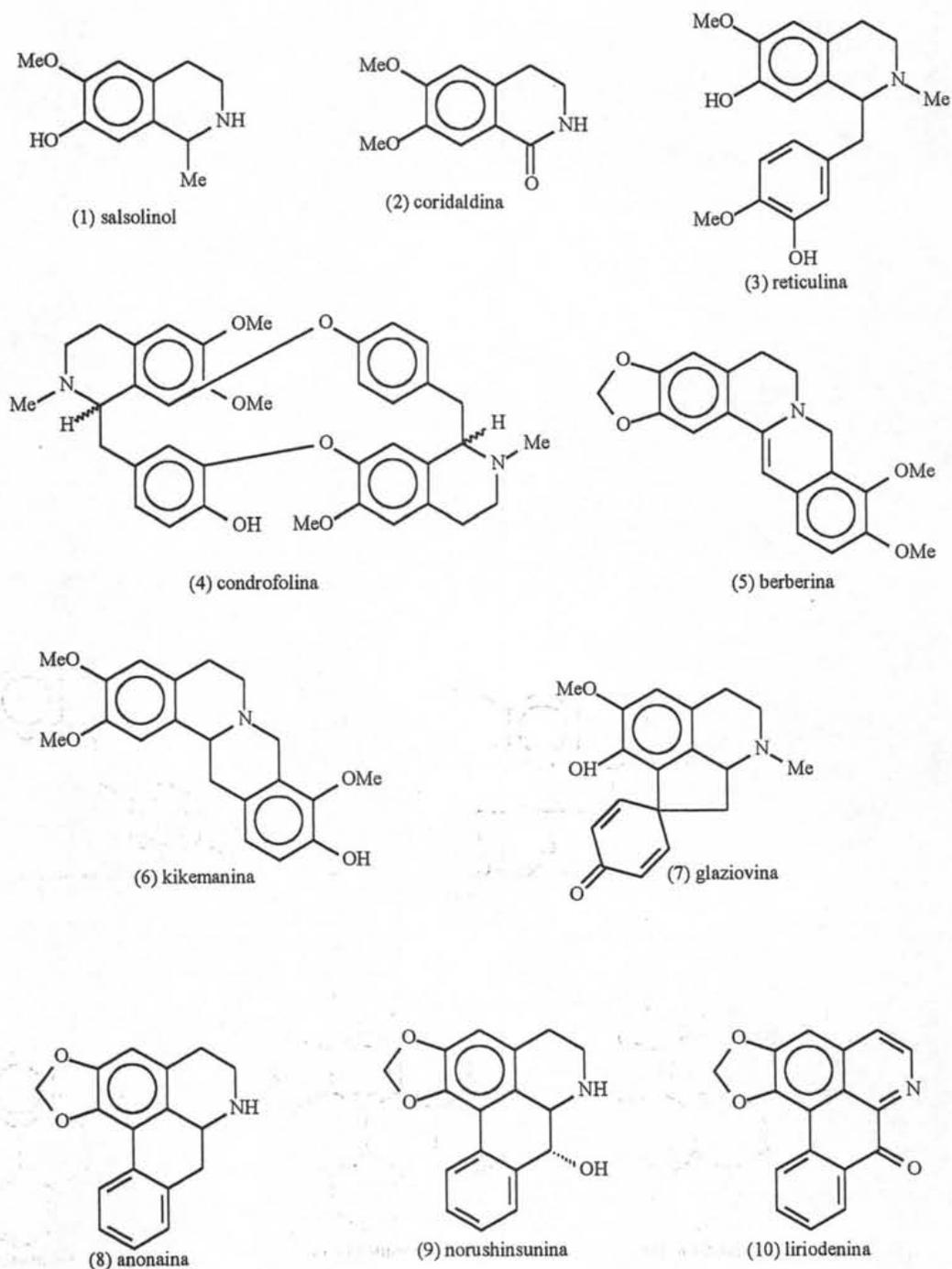
la asimilobina, anonaina y nornuciferina como responsables del efecto antidepresivo mostrado por *A. muricata*, ya que estos alcaloides muestran afinidad por los receptores 5HT_{1A}.¹³ Los estudios químicos de diversos géneros de la familia *Annonaceae* han

demostrado que estas especies biosintetizan una gran variedad de alcaloides, casi todos con una estructura derivada de la isoquinolina. En la Figura 1 se muestran algunos ejemplos de

las diversas estructuras, considerando: tetraisoquinolinas simples (1, 2), benciltetrahidroisoquinolinas (3), bisbenciltetrahidroisoquinolinas (4), protoberberinas (5),

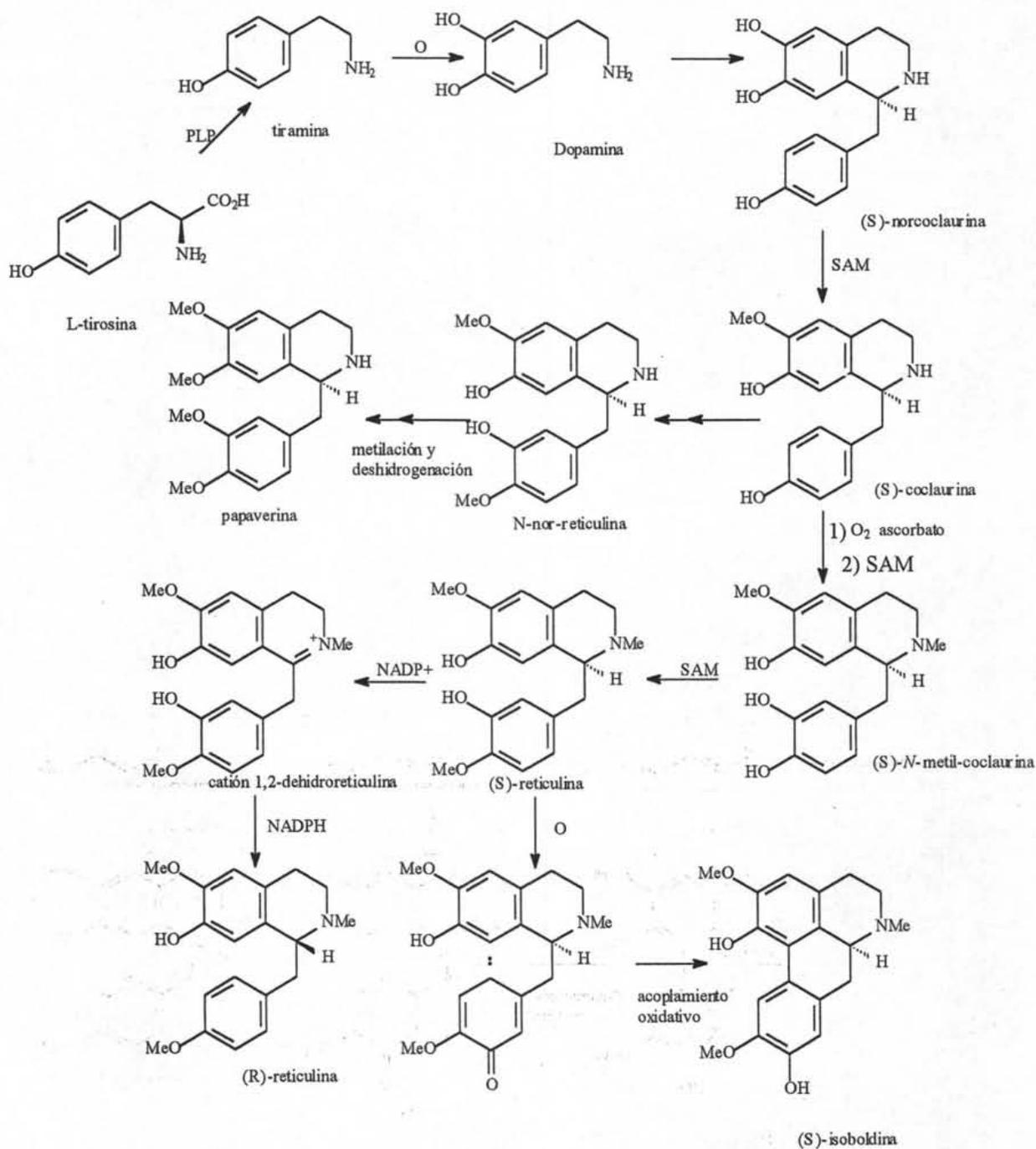
tetrahidroprotoberberinas (6), proaporfinas (7), aporfinoides incluyendo aporfinas (8), aporfinas 7-sustituidas (9), oxoaporfinas (10), fenantrenos (aporfinas abiertas), además de otro tipo de alcaloides. (Fig. 1)

Figura 1 Tipo de alcaloides aislados del género *Annona*.



La mayoría de estos alcaloides tienen en común la misma ruta biogénica.¹⁴ (Fig. 2)

Figura 2 Ruta biogénica de alcaloides benzoquinolínicos.¹⁵



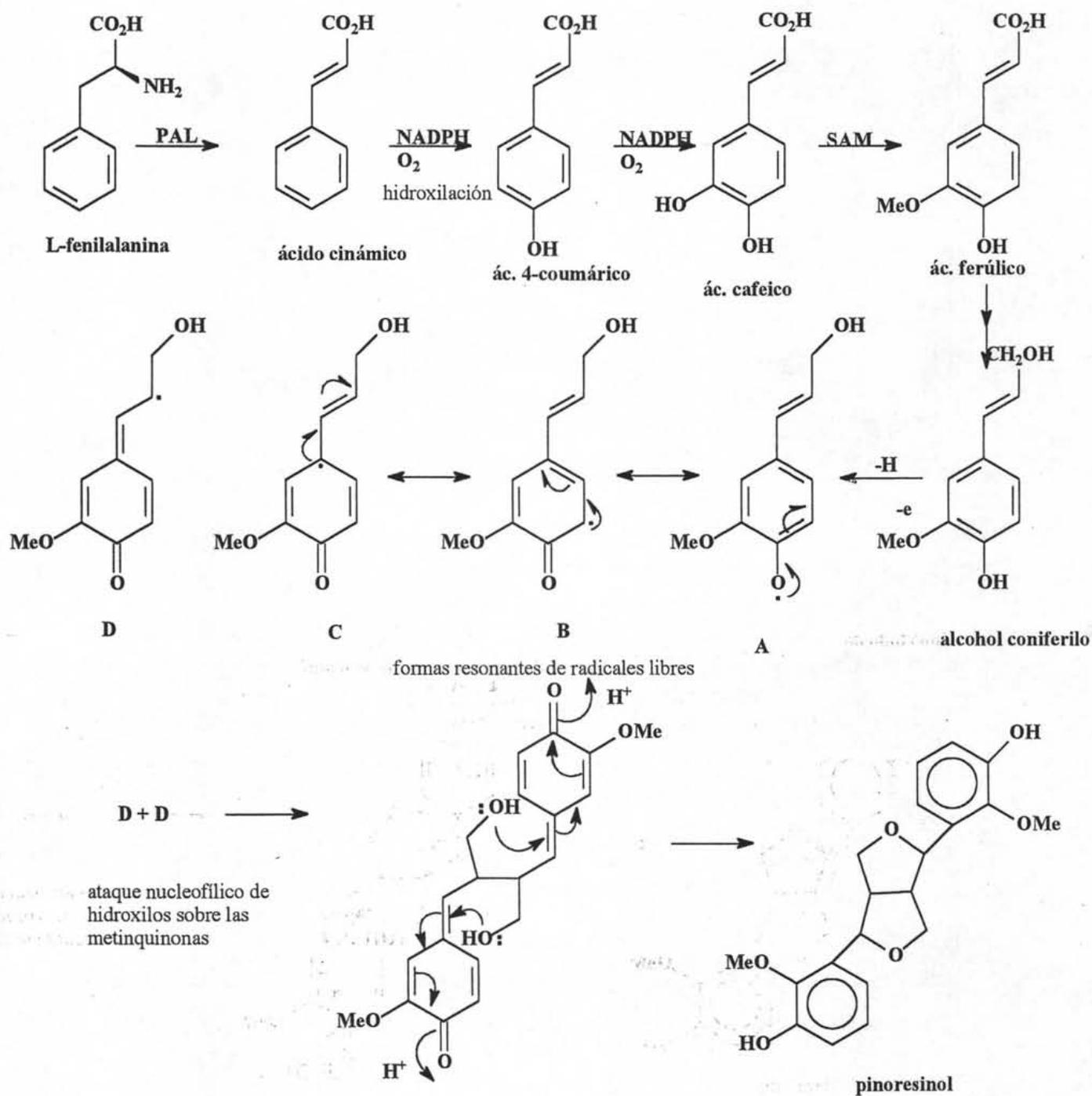
No obstante la variedad estructural de los alcaloides que producen las especies del género *Annona* los de tipo aporfinico y berberínico son los más abundantes. Así mismo, se han aislado una gran variedad de metabolitos secundarios, entre los que destacan: carbohidratos, lípidos, polifenoles, compuestos aromáticos, aceites esenciales y los policétidos denominados acetogeninas, característicos de la familia Annonaceae, los cuales debido a la actividad citotóxica que presentan, han sido objeto de una intensa investigación en los últimos veinte años.¹⁶ En cuanto a los metabolitos secundarios lipofílicos, a partir de las ceras de las hojas de algunas especies, como la *A. senegalensis*, se han logrado aislar ácidos grasos saturados e insaturados, alcoholes primarios de 28, 30 y 32 carbonos y palmitona, una cetona alifática de 31 átomos de carbono cuya presencia es común en varios géneros.¹⁷ Por otro lado, debido a las propiedades farmacológicas que presentan y a su importancia económica, los aceites esenciales presentes en especies de la familia Annonaceae han sido ampliamente estudiados, un ejemplo de ello son los aceites esenciales obtenidos a partir de *Cananga odorata*, los cuales tiene un alto valor comercial en la industria de la perfumería.¹⁸

La mayoría de los aceites esenciales aislados de esta familia contienen principalmente terpenoides como: α -pineno, cariofileno, β -pineno, farnesano y linalool, entre otros. Algunos de éstos presentan efectos sobre el SNC, ejemplos de ellos son el cariofileno, principio activo del bálsamo de limón, el cual es utilizado como agente sedante y el linalool, del cual se ha descrito su actividad sedante y antiepiléptica.¹⁹

También se ha informado del aislamiento de lignanos y neolignanos de algunas especies de los géneros *Annona* y *Rollinia*. Al igual que los alcaloides presentes en esta familia, los

lignanos y neolignanos son producidos a partir de la fenilalanina como se muestra en la Figura 3

Fig. 3 Ruta biogénica de los lignanos



Al igual que los alcaloides, los lignanos presentan también una variedad de actividades biológicas, siendo sus propiedades antiinflamatorias y citotóxicas las más citadas.²⁰

2.2. FARMACOLOGÍA

2.2.1. EPILEPSIA

La epilepsia es una alteración neurológica, que se caracteriza por la recurrencia (repetición) de crisis que pueden manifestarse como pérdida del conocimiento, movimientos involuntarios, sensaciones raras, alteraciones autonómicas, del humor y de las funciones mentales.

Uno de cada diez individuos puede esperar la manifestación de una crisis epiléptica en su vida. Una crisis epiléptica es un síntoma de irritación cerebral que puede producirse por un gran número de causas. Una vez que la irritación se vuelve persistente de manera tal que las crisis se repiten, se alcanza una condición llamada epilepsia. La epilepsia es la alteración primaria más común del sistema nervioso central y afecta al 1 % de la población mundial.²¹

La epilepsia, siempre se ha ligado a creencias religiosas y en ocasiones mágicas. En la medicina tradicional, diversos padecimientos convulsivos han sido tratados con remedios herbolarios como “la flor de corazón” y “la tumba vaqueros” (*Ipomea stans*²²), según se cita en el Códice de la Cruz.²³ Sin embargo, basar hoy en día el estudio de plantas para el tratamiento de la epilepsia en este tipo de referencias resulta complicado debido a que en ocasiones es difícil relacionar las propiedades atribuidas a algunas plantas y su eficacia contra los ataques de alferecía, como sinónimo de un ataque de epilepsia, o las propiedades anticonvulsivas de algunas especies con propiedades antipiréticas o antibióticas, ya que tanto fiebres o algunas infecciones pueden provocar convulsiones, sin que se trate realmente del síndrome epiléptico.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la epilepsia se define como “una afección crónica, de etiologías diversas, caracterizada por la repetición de crisis resultantes de la descarga excesiva de neuronas cerebrales (crisis epilépticas), independientemente de los síntomas clínicos o paraclínicos eventualmente asociados”.

En general la epilepsia se considera un síndrome de origen multifactorial. Es un trastorno paroxístico del SNC, que es recurrente, con manifestaciones estereotipadas, como resultado de una descarga neuronal excesiva, que es hipsincrónica y autolimitada, el fenómeno es resultado de una alteración del equilibrio que debe existir entre los estímulos inhibitorios y los excitatorios que determinan la descarga neuronal normal.

MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA. (MEE)

El uso de modelos experimentales de epilepsia (MEE) es de primordial importancia en la búsqueda de productos naturales o extractos de plantas con propiedades antiepilépticas.

El análisis experimental de los mecanismos fisiopatológicos del fenómeno convulsivo, el conocimiento de sus características y la investigación de procedimientos terapéuticos que prevengan, impidan o disminuyan la epilepsia han sido siempre motivo de interés de los neurocientíficos. Los modelos experimentales de epilepsia han sido fundamentales para demostrar la efectividad de un probable nuevo fármaco anticonvulsivo. Más aún, estos modelos parecen ser los que aportarán en un momento dado, el conocimiento sobre los mecanismos básicos neuronales que determinan la epilepsia en el ser humano. De esta forma se considera que la epilepsia en animales, y las crisis convulsivas provocadas experimentalmente, puede integrar un modelo válido de epilepsia cuando los anticonvulsivos que son efectivos para los animales de experimentación, lo sean también para el tratamiento de la epilepsia en el ser humano. Asimismo, se considera un modelo experimental de epilepsia verdadero cuando las alteraciones paroxísticas inducidas se

repiten de manera espontánea. Estos modelos se clasifican tomando en cuenta tres criterios principales:

- a. Procedimiento de inducción.
- b. Mecanismos neuronales implicados en su producción.
- c. Manifestaciones conductuales.

a. Procedimiento de inducción.

Los MEE pueden ser inducidos por agentes físicos o por agentes químicos. En la primera categoría, los agentes físicos pueden afectar receptores sensoriales (como en la epilepsia refleja) o afectar directamente áreas encefálicas (como en el electrochoque) A su vez, la categoría de los modelos experimentales de epilepsia inducidos por agentes químicos incluye a los provocados por la aplicación tópica (penicilina, crema de alúmina, etc.), intracisternal (rojo de rutenio, etc.) o sistémica (rojo de rutenio, pentilentetrazol [PTZ], ácido kaínico, etc.) de sustancias; o a los inducidos por supresión de la administración de un agente químico (barbitúricos, etanol, GABA, etc.) o por carencia metabólica de algunos componentes. (piridoxina, calcio, etc.)

b. Mecanismos neuronales.

Los MEE son inducidos generalmente por interferencia en la función de sinapsis inhibitorias, como los provocados por bicuculina, estricnina, picrotoxina etc., o por la facilitación de las funciones excitatorias específicas, como las provocadas por acetilcolina, glutamato, aspartato, kaínato, etc. También pueden inducirse por alteraciones inespecíficas de la excitabilidad neuronal (electrochoque, etc.) Otros mecanismos de inducción de las crisis pueden alterar el metabolismo neuronal (hidrazonas del fosfato de piridoxal, alilglicina, etc.) o destruir neuronas inhibitorias. (crema de alúmina, ácido quinolínico, etc.)

c. Manifestaciones conductuales.

Los MEE se pueden identificar sin manifestaciones motoras o con ellas. En el primer caso, la validez del modelo está dada por la caracterización eléctrica de la crisis, mientras que en el segundo, las manifestaciones pueden incluir crisis paroxísticas de actividad motora, como carrera compulsiva, actividad tónica, actividad clónica o combinaciones de éstas. También se debe considerar si las manifestaciones motoras son focalizadas y de manera secundaria generalizadas; y si se presentan de una manera crónica o aguda.

Se ha descrito que los MEE tienen tres aplicaciones fundamentales:

- A. En la evaluación de fármacos anticonvulsivos que pudieran tener aplicación en la terapéutica de la epilepsia en el hombre.
- B. En la investigación de los mecanismos neuronales básicos implicados en la generación, propagación y supresión de las crisis epilépticas, sean o no convulsivas y que a pesar de los diversos mecanismos de inducción o precipitación de las crisis y la variedad de manifestaciones eléctricas y clínicas, debe haber factores comunes implicados en los mecanismos básicos de todos los tipos de crisis.²⁴
- C. En el estudio de los mecanismos neuronales que en condiciones normales se relacionan con la regulación de la excitabilidad del SNC y de la actividad motora.

Por otro lado, un modelo experimental ideal debe considerar los siguientes criterios:

- a. Tener un control experimental del tamaño y de los aspectos morfológicos de la lesión epiletogénica.
- b. Las alteraciones patológicas deben ser mínimas.
- c. Las crisis se deben controlar en términos de su aparición y del tiempo de duración.
- d. Después de un tiempo, se deberán observar crisis espontáneas crónicas.

Los MEE en general ponen de manifiesto la hipótesis de que la causa de la epilepsia puede ser en general una disminución de la regulación inhibitoria, lo que implica un mecanismo de desinhibición.

Como ya se mencionó, la inducción de los cambios de excitabilidad se puede realizar por la administración de sustancias convulsivantes. Los compuestos convulsivos son una herramienta útil para entender cómo el cerebro genera los eventos eléctricos y conductuales de las crisis generalizadas y brindan la posibilidad de modificar en forma específica la acción de neurotransmisores, mediante los efectos de fármacos dosis dependientes.

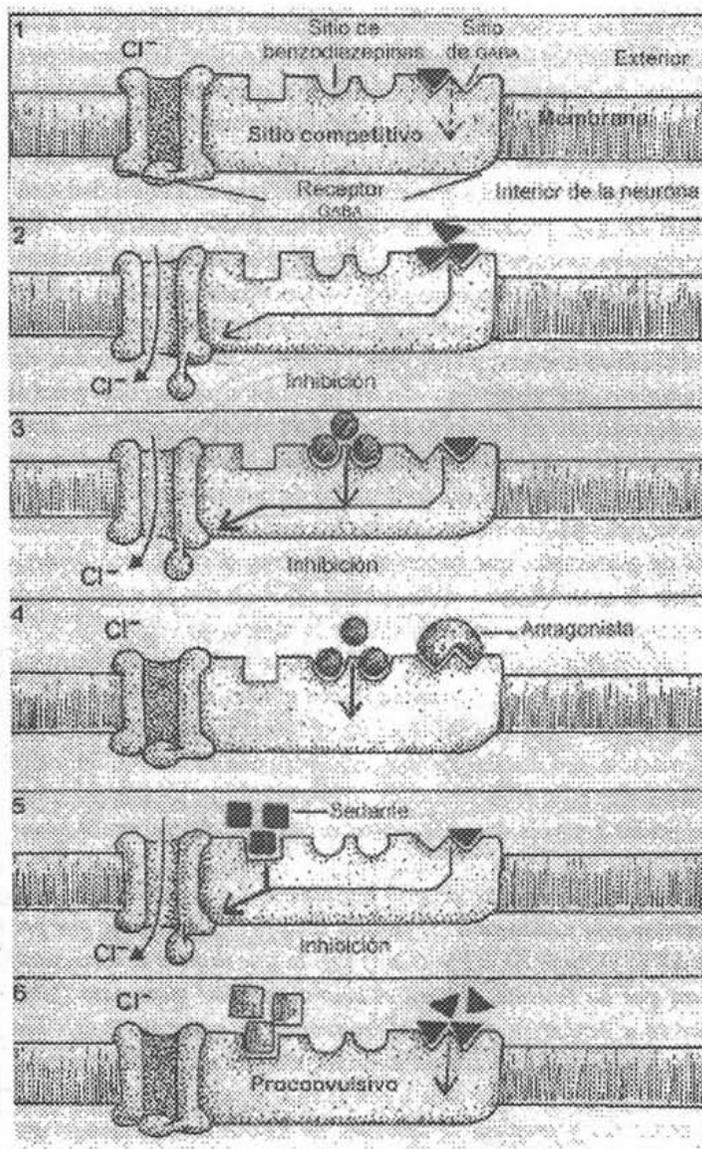
Las sustancias químicas convulsivas se pueden definir por lo general por su mecanismo de acción. La mayoría de ellas son antagonistas de la transmisión GABAérgica y tienen su sitio de acción sobre el receptor GABA_A o su canal asociado. Ejemplos de estas sustancias son bicuculina, picrotoxina, 4-AP y PTZ que son potentes agentes convulsivos, como se observa en la Figura 4.

El GABA y la glicina son los aminoácidos inhibidores predominantes en el cerebro; cualquier factor que impida su acción será pro convulsivo. El efecto inverso, que favorece su acción, se relaciona con efectos antiepilépticos, aunque también de sedación y en algunos de ellos, de fármaco dependencia. Tal es el caso de los barbitúricos (fenobarbital, tiopental, primidona), de las benzodiazepinas (clonazepam, lorazepam, etc.) o de los derivados del valproato y del gabapentin.

Otra posibilidad de que se desarrolle la hiperexcitabilidad neuronal es que predomine la neurotransmisión excitatoria. Los principales aminoácidos excitadores en el cerebro son el glutamato y el aspartato. En oposición concertada con la inhibición, cualquier fármaco que facilite la acción de estos aminoácidos es pro convulsiva. Actualmente la investigación sobre epilepsia se ha encaminado a la búsqueda de antagonistas de glutamato que no

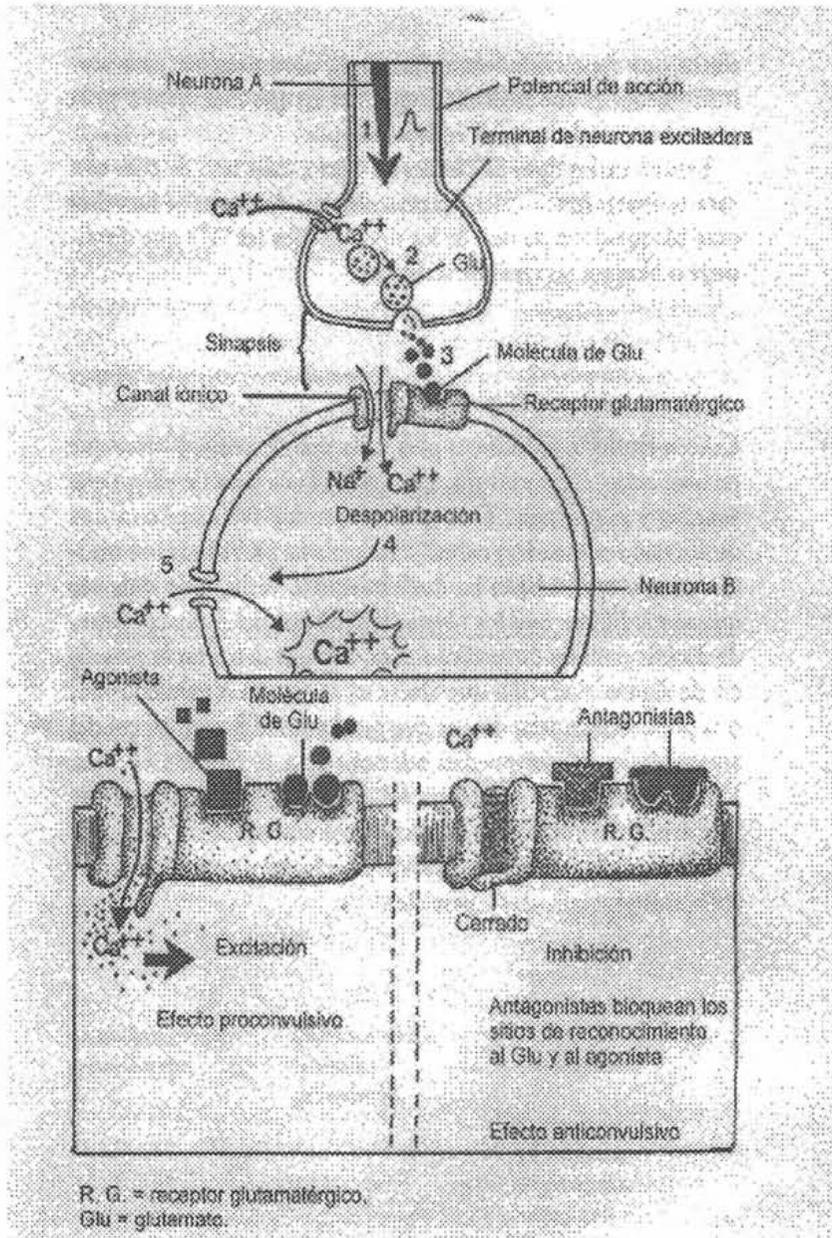
tengan efectos adversos o colaterales, pues se ha demostrado mediante MEE que estos antagonistas son excelentes anticonvulsivos. Además pueden ser útiles para proteger el tejido cerebral de la muerte por la llamada excitotoxicidad, que es la muerte celular producida por concentraciones excesivas de glutamato, que hacen que aumente el calcio dentro de la célula de manera desmedida, acarreado con ello la activación de procesos de muerte celular como se muestra en la Figura 4.

Figura 4 Mecanismos que favorecen o bloquean la acción del GABA a nivel del receptor



- En el segmento 1 se observan sitios específicos para cada neurotransmisor. Asimismo, se señala que al existir un nivel bajo de GABA, el canal iónico de cloro (Cl^-) no se abre.
- En el segmento 2 se observa que el aumento en los niveles de GABA permite que se abra el canal y el cloro penetre, lo cual produce hiperpolarización en el interior de la célula.
- En el segmento 3 se indica que el aumento de los niveles de benzodiazepinas incrementa la acción de GABA, aún cuando sus niveles sean bajos.
- En el segmento 4 por el contrario, la presencia de un neurotransmisor antagonista como bicuculina evita que se abra el canal a pesar de los altos niveles de benzodiazepinas.
- En el segmento 5 la presencia de valproato (un sedante) provoca la apertura del canal y por lo tanto favorece el efecto inhibitorio.
- En el segmento 6 se ilustra el efecto proconvulsivo del neurotransmisor picrotoxina, el cual, al ocupar sitios de compuestos sedantes evita que se abra el canal de cloro, aun cuando existan niveles altos de GABA en el receptor.

Figura 5 Modelo de sinapsis excitadora.



La llegada del impulso nervioso a la **neurona A** (1) facilita la apertura de canales que permiten la entrada de calcio (Ca^{++}) (2), lo que dispara el mecanismo para que las vesículas liberen el neurotransmisor glutamato (Glu), que va a ocupar su sitio en el receptor de la **neurona B**. (3) Esto provoca la apertura del canal iónico de este receptor para permitir la entrada de Ca^{++} y Na^+ , con lo cual la neurona se despolariza o excita (4) y propicia la apertura de nuevos canales por los que entra calcio.(5)

2.2.2. ANSIEDAD

La ansiedad se puede definir como un estado no placentero, caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia, en la que se desencadenan una serie de reacciones vegetativas como la sudoración, taquicardia, tensión muscular, insomnio, temor, etc.²⁵ El estado de ansiedad se presenta cuando el individuo presiente un peligro, por lo tanto, la ansiedad no es por si sola una enfermedad ni es exclusivamente un síntoma de enfermedad sino que es más bien una respuesta instintiva y fundamental que proporciona al organismo un mecanismo de alerta o alarma que lo prepara para enfrentarse a un peligro inminente.²⁶ Por lo tanto, se puede considerar a la ansiedad como una función adaptativa del mismo organismo. De hecho, se ha propuesto que la ansiedad representa un proceso cerebral con una función crucial de sobrevivencia en diferentes especies animales.²⁷ Por lo tanto, un estado de ansiedad es normal cuando el ser humano siente que es agredido o cuando está asociado a un evento adaptativo. Sin embargo, existen otras condiciones que hacen que persista un estado de ansiedad lo que se traduce en una mala adaptación constituyéndose así en un desorden psiquiátrico.

La ansiedad excesiva o sostenida se considera patológica y en la actualidad es el desorden psiquiátrico más común, que afecta a cerca del 10 % de la población general y su frecuencia aparentemente va en aumento sobre todo en las grandes ciudades donde la tensión y el estrés son mayores.^{28, 29}

MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA ANSIEDAD

Los modelos para el estudio de ansiedad se basan en la capacidad de los animales para responder ante estímulos que reconocen como ajenos y que son potencialmente peligrosos.

Estas reacciones de miedo pueden ser cuantificables, proporcionando así información acerca de los niveles de ansiedad y de la respuesta ante el tratamiento farmacológico.³⁰

El estudio del efecto de los fármacos sobre la conducta animal tiene al menos tres objetivos principales:

- a) Dar información sobre el mecanismo de acción de los fármacos.
- b) Analizar procesos conductuales a través del uso de fármacos que alteran la conducta.
- c) Desarrollar nuevos fármacos con acción sobre el SNC en el humano.³¹

Sin embargo, hay muchos factores que pueden intervenir dificultando el logro de estos objetivos; por ejemplo, las diferencias entre las especies animales estudiadas, o entre las cepas de una misma especie e inclusive variaciones individuales de los organismos en estudio. No obstante, se han establecido y perfeccionado diferentes técnicas para la observación de la conducta animal y los datos bioquímicos y fisiológicos que se han derivado de estos experimentos han sido de gran importancia para aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de las diferentes conductas animales y humanas.³²

A continuación se enuncian algunos síntomas que presentan los roedores susceptibles de ser evaluados en modelos de conducta y que son utilizados propiamente como índices de miedo y los criterios que caracterizan a la ansiedad generalizada en los seres humanos, de acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadísticas de Trastornos Mentales. (DSM IV)³³

Tabla 3 Características de la Ansiedad.

Signos de miedo en los animales	Signos y síntomas de ansiedad en los seres humanos
Aumento de la frecuencia cardiaca y del volumen sistólico	Aumento de la frecuencia cardiaca y del volumen sistólico
Disminución de salivación	Boca seca
Úlceras gástricas	Malestar gástrico
Alteración de la frecuencia respiratoria	Aumento de la frecuencia respiratoria
Exploración y vigilancia	Exploración y vigilancia
Aumento de la respuesta de sobresalto	Nerviosismo, sobresaltado fácilmente
Micción frecuente	Micción frecuente
Defecación frecuente	Diarrea
Aumento del acicalamiento	Impaciencia
Períodos de inmovilidad (“congelamiento”)	Aprehensión (experiencia de que algo malo va a suceder)

Modelos animales para el estudio de la ansiedad.

Del surgimiento de una diversidad de fármacos con supuestas propiedades ansiolíticas, y de la imposibilidad de probarlos directamente en el ser humano, surgió la necesidad de crear pruebas o modelos animales en los cuales se pudieran estudiar los efectos de cualquier nuevo fármaco ansiolítico. La mayoría de los modelos se fundamentan en criterios farmacológicos, tomando como patrones de comparación los efectos que tienen algunos fármacos que se han caracterizado en la clínica como ansiolíticos, con los distintos patrones de conducta animal.

Así, los modelos de ansiedad se basan en la capacidad de los animales para responder ante un estímulo que reconocen como ajeno y potencialmente peligroso. La razón por la cual se han establecido y validado estos modelos con bases farmacológicas, se debe a que nuestro conocimiento fisiológico de la ansiedad es menos claro que el farmacológico.

Aunque los modelos por definición son solamente un símil de la realidad, para tener un valor heurístico y predictivo, un modelo animal deberá cumplir con los siguientes requisitos:

- a) Reproducir las características conductuales y patológicas del síndrome de ansiedad.
- b) Permitir el estudio de los mecanismos neurobiológicos que subyacen en la ansiedad y que no son factibles de estudiarse directamente en el humano.
- c) Permitir una evaluación confiable de los fármacos ansiolíticos, o en su caso identificar probables propiedades ansiogénicas de los mismos.³⁴

Los modelos de ansiedad que actualmente se utilizan se pueden dividir en diferentes categorías dependiendo del estímulo utilizado para inducir la reacción de temor en los animales.³⁵ Entre estos se incluyen:

- a) Modelos basados en temor condicionado o de conflicto.
- b) Ansiedad generada por estimulación eléctrica en zonas cerebrales discretas.
- c) Ansiedad generada por ambientes o estímulos novedosos.

Con el propósito de detectar respuestas ansiolíticas o ansiogénicas, los modelos condicionados utilizan manipulaciones instrumentales de aprendizaje aversivo. Estos paradigmas involucran procedimientos de castigo y también se les conoce como modelos de conflicto. El castigo se refiere a la presentación de un estímulo aversivo, generalmente un leve choque eléctrico a un animal, que está entrenado o condicionado, para que emita una respuesta determinada. Existen también modelos donde el animal bajo estudio evita activamente un estímulo que reconoce como aversivo.³⁶

El segundo grupo de paradigmas lo presentan los modelos que inducen la ansiedad por medio de estimulación eléctrica de ciertas áreas cerebrales relacionadas con el temor y la ansiedad, como la sustancia gris periacueductal y el *locus coeruleus*.³⁷

El tercer tipo de modelos, en contraste con las pruebas de conflicto, utiliza conductas naturales que son condicionadas y emplea tendencias naturales del repertorio conductual especie-específico de los animales. Como ejemplos se tienen: la prueba de conducta

exploratoria en un ambiente aversivo,³⁸ el modelo de interacción social,³⁹ el laberinto en forma de cruz⁴⁰ y el modelo de conducta defensivo de enterramiento.⁴¹ Los modelos condicionados utilizan manipulaciones instrumentales de aprendizaje aversivo, tales como la supresión condicionada, la evitación activa y el castigo.

Modelo de la Conducta Exploratoria en un Ambiente Aversivo.

Este modelo fue propuesto por Crawley y Goodwin en 1980 y se basa en las tendencias naturales que tienen los roedores de evitar áreas iluminadas y de explorar zonas desconocidas. Esta prueba utiliza ratones y hámsters como sujetos experimentales. La cámara de prueba consiste en una caja de acrílico con las siguientes características. Un tercio de la caja se encuentra completamente oscuro, mientras que los otros dos tercios se encuentran iluminados con una lámpara de luz fluorescente. Entre las dos zonas hay una división de madera con una abertura, por la cual el sujeto experimental puede pasar libremente. Al inicio de la prueba se coloca al sujeto experimental en la zona iluminada y se registra el número de transiciones que realiza de un compartimiento a otro. Se ha descrito que los ansiolíticos clásicos como las benzodiazepinas aumentan en forma dosis dependiente el número de transiciones. Existen evidencias que demuestran que los ansiolíticos aumentan selectivamente la conducta exploratoria, sin incrementar la actividad motriz en general. Aún más, cuando los ratones del grupo control son colocados en cajas abiertas estos muestran niveles de actividad comparables a los ratones tratados con ansiolíticos y colocados en cajas con dos compartimentos. Estos resultados sugieren que la actividad locomotriz de los ratones no tratados en una cámara de dos compartimentos es suprimida por la zona iluminada y es restaurada con agentes ansiolíticos.^{42, 43}

Blumstein y Crawley en 1983 señalaron que los animales pueden ser utilizados varias veces en este modelo y la prueba se puede realizar a cualquier hora del día ya que la

conducta exploratoria no se ve afectada por estos factores.⁴⁴ Sin embargo, se ha informado que la cepa de animales utilizada puede influir en el experimento.^{45, 46}

Actividad locomotriz

Este modelo se utiliza para medir la actividad general de los animales. El modelo consiste en una caja de registro que tiene fotoceldas en todas sus paredes y con ellas se registra tanto la actividad ambulatoria como la actividad exploratoria de los animales. La evaluación de estos dos parámetros se realiza por comparación con la conducta mostrada por los controles. Este modelo es útil para detectar efectos inespecíficos de los fármacos.

Mecanismo de acción celular de benzodiazepinas

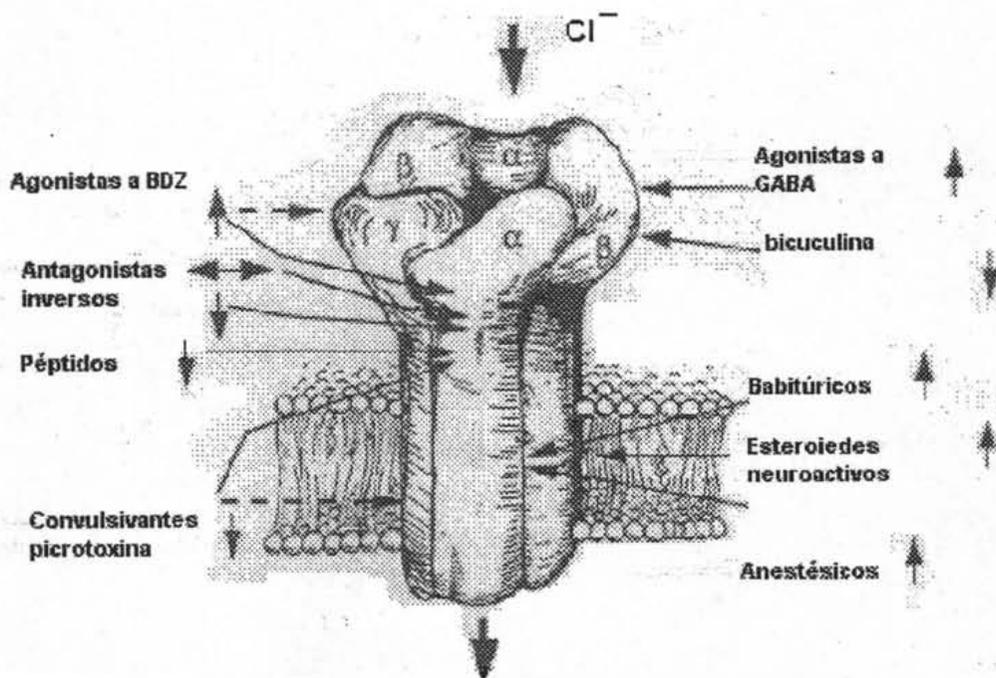
Las benzodiazepinas (BDZ) son ampliamente utilizadas en la clínica, debido a que poseen una afortunada combinación de importantes propiedades terapéuticas, entre las que se cuentan su efectividad en el tratamiento de dos condiciones clínicas comunes: la ansiedad y el insomnio. También han sido útiles en el tratamiento de trastornos de crisis epilépticas y ciertas clases de espasticidad. Dos características importantes de las BDZ son que aparentemente no presentan efectos secundarios significativos y poseen una baja toxicidad, factores que han contribuido a su amplio uso terapéutico. Desde la introducción del clorhidrato de clordiazepóxido (Librium) en 1960, la investigación de los mecanismos de acción celular de las BDZ se ha incrementado de manera paralela al uso de estos agentes. Las principales líneas de investigación sobre BDZ se enmarcan en dos categorías generales, la bioquímica y la electrofisiológica, que han generado estrategias complementarias para lograr un panorama comprensible de su acción.⁴⁷

Uno de los neurotransmisores involucrados en la regulación de la ansiedad y la epilepsia es el ácido gama aminobutírico (GABA). A su principal receptor se le conoce como GABA/Benzodiazepínico o del tipo A, ya que éste también reconoce a las benzodiazepinas.

Este receptor se localiza en el cerebro de muchos mamíferos, incluido el hombre,^{48, 49} formando un complejo molecular que contiene sitios de acoplamiento no solamente para GABA y benzodiazepinas, sino que también reconoce a barbitúricos, fármacos convulsivantes y esteroides. Adicionalmente, las subunidades de este receptor conforman un canal de cloro.^{50, 51} La unión de benzodiazepinas, barbitúricos y esteroides a los sitios moleculares específicos señalados, provocan una modificación alostérica del complejo, favoreciendo la afinidad entre GABA y el receptor, lo cual permite la apertura del canal de cloro que hiperpolariza la neurona e inhibe la transmisión de los impulsos nerviosos.⁵²

Por otra parte, con relación a la conducta animal, se ha demostrado que las benzodiazepinas ejercen su efecto ansiolítico potenciando la unión del GABA al sitio del receptor, lo que da como resultado las acciones inhibitorias de este neurotransmisor a nivel del sistema nervioso central. Lo anterior se fundamenta en los experimentos que inhiben la síntesis del GABA y que anulan los efectos tranquilizantes de las BDZ.⁵³ De manera similar, cuando se administran antagonistas del receptor GABAérgico, se reducen o bloquean las acciones de las BDZ como se observa en la Figura 6

Figura 6 Receptor GABA_A



2.2.3. SEDANTES

ASPECTOS GENERALES SOBRE LOS BARBITÚRICOS

Todos los derivados del ácido barbitúrico son llamados barbitúricos. Estos fármacos inhiben la fosforilación de la adenosina en la neurona. Se distribuyen ampliamente en los lípidos y en la mayoría de las barreras incluida la del SNC, son metabolizados en el hígado y excretados en la orina. La acción primaria de todos los barbitúricos es la depresión del SCN; causando sedación e hipnosis. Estos efectos se inician en un intervalo variable después de la administración (etapa I o periodo de inducción), y son acompañados por una considerable agitación cuando se utilizan agentes lentos o débiles como el éter di etílico. (Etapa II) En humanos, la etapa III se caracteriza por un estado de relajación inconsciente, por lo que esta etapa es la de la anestesia.

En 1975 se determinó mediante técnicas electrofisiológicas que los fármacos sedante-hipnóticos, como las BDZ y barbitúricos pueden aumentar las propiedades inhibitorias de GABA.

Las BDZ fueron descubiertas y desarrolladas en gran medida para sustituir a los barbitúricos por sus potenciales efectos letales. Lo curioso es que a pesar de que las BDZ y los barbitúricos son estructuralmente diferentes, y que fueron descubiertos sin conocimiento del mecanismo de acción subyacente, actualmente, se conoce que comparten el mismo blanco molecular: los receptores GABA_A. Sin embargo, las rutas que siguen son diferentes.

Los barbitúricos presentan una acción dual para enriquecer la conductancia del ion cloruro (Cl⁻), la cual está mediada por el receptor GABA_A. Así, a bajas concentraciones (subanestésicas), los barbitúricos aumentan la afinidad del receptor GABA_A por GABA e incrementan el tiempo medio de apertura del canal. Por otro lado, a concentraciones altas

(anestésicas), los barbitúricos incrementan directamente la apertura del canal, aún en ausencia de GABA. Mientras que las BDZ no tienen efectos directos sobre la apertura del canal, sólo incrementan la afinidad del receptor por GABA, así como la frecuencia de apertura del canal activado por GABA. Eso es una importante distinción porque esto significa que las BDZ podrían aumentar marcadamente las acciones de GABA a concentraciones intrasinápticas bajas, pero podrían tener poco o nulo efecto a concentraciones de saturación de GABA. Estas diferencias explican la relativa baja toxicidad de las BDZ comparadas con la toxicidad de los barbitúricos.

Hoy en día existe evidencia considerable a cerca de que otros fármacos con actividades sedantes, hipnóticas y anestésicas también interactúan con los receptores GABA a concentraciones farmacológicamente relevantes.

3.0 OBJETIVO GENERAL

Determinar si las especies *Annona lutescens*, *Annona cherimolia* y *Rollinia mucosa* poseen actividades ansiolíticas, hipnóticas y/o anticonvulsivas.

Aislar y caracterizar los productos presentes en los extractos activos.

OBJETIVOS PARTICULARES

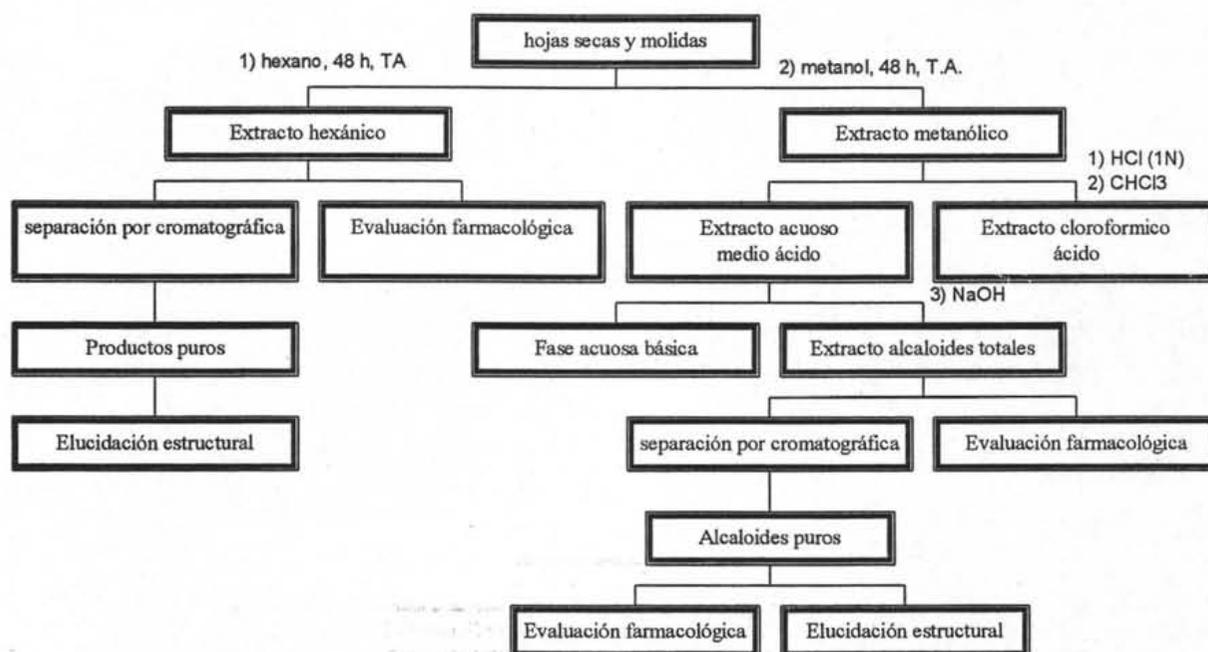
- Evaluar la actividad ansiolítica de los extractos hexánicos y de alcaloides totales de las hojas de *A. cherimolia*, *A. lutescens* y *Rollinia mucosa* en el modelo animal de conducta exploratoria ante un ambiente aversivo y su correlación con la actividad locomotriz.
- Evaluar la actividad antiepiléptica de los extractos hexánicos y de alcaloides totales de dichas especies en el modelo de epilepsia inducida por pentilentetrazol en ratones.
- Evaluar la actividad sedante de los extractos en la prueba de potenciación de hipnosis inducida por pentobarbital sódico en ratones.
- Caracterizar químicamente de los extractos hexánicos y de alcaloides totales de hojas de *Annona lutescens*, *Annona cherimolia* y *Rollinia mucosa*.

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

Fig. 7

ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

A. cherimolia, *A. lutescens* y *Rollinia mucosa*



4.1.0. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

4.1.1. ANIMALES Y FÁRMACOS

Se utilizaron ratones machos adultos (6-8 semanas) de la cepa Swiss Webster de 20-30 g de peso. Se alojaron en cajas de polipropileno de 44 x 21 x 21 cm, en grupos de ocho, bajo ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) de manera artificial, en un cuarto con temperatura controlada. Todos los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento (purina) durante el experimento. Tanto los fármacos como los extractos se prepararon antes de cada experimento y se administraron vía intraperitoneal, en una relación de volumen de 10 ml por kilogramo de peso del animal.

El manejo de animales se realizó conforme a la norma oficial mexicana para el manejo y cuidado de animales (NOM-06202000-1999), aprobada por el Comité Institucional de Ética de CINVESTAV.

Los grupos control recibieron el mismo tratamiento, sólo que fueron administrados únicamente con el vehículo correspondiente (Tween 80 al 1% en solución salina) tanto para pentilentetrazol (PTZ) como para pentobarbital sódico (PB), mientras que para Diazepam se utilizó polipropilenglicol (Pg) al 1 % en solución salina.

En el ensayo de actividad anticonvulsiva, los controles positivos recibieron una dosis de 90 mg/kg de PTZ, mientras que en el ensayo de potenciación de hipnosis los controles positivos recibieron 30, 42 mg/kg de PB, o 0.5 o 1.0 mg/kg de Diazepam.

Todos los experimentos se realizaron con una latencia de administración de 60 min, excepto para Diazepam, el cual se realizó con una latencia de 30 min. Los animales fueron utilizados una sola vez.

4.1.2. ESTADÍSTICA

Todos los experimentos se realizaron con poblaciones de 8 a 10 ratones, por duplicado y expresados como la media \pm el error estándar medio, excepto para el estudio de autoradiografía para el cual se utilizaron poblaciones de 6 ratones en una sola evaluación.

Para los resultados obtenidos en los ensayos de ansiedad y PB se realizó la comparación estadística entre los grupos tratados con solución salina y los grupos experimentales, mediante el análisis de varianza de una sola vía de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba pareada de Mann-Whitney. ($P^* < 0.05$) Por otro lado, para los resultados obtenidos en el estudio de autorradiografía se realizó un análisis de Dunnet ($p^* < 0.05$) después del análisis de varianza de una sola vía. La comparación estadística entre el porcentaje de muerte inducido por PTZ y los grupos control se realizó mediante la prueba de Fisher. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron en el programa Sigmastat 2.0 y Sigmaplot 2.0 respectivamente.

4.1.3. MODELO DE LA CONDUCTA EXPLORATORIA ANTE UN AMBIENTE AVERSIVO

En este ensayo se utilizó una cámara de acrílico de 44 x 21 x 21 cm. Un tercio de la cámara se encontraba completamente oscura, mientras que los otros dos tercios fueron iluminados con una lámpara de luz fluorescente. Las dos zonas estaban divididas por una pared de madera con una abertura de 13 x 15 cm, para permitir el libre paso del sujeto experimental.

La prueba duró 10 min y al inicio de la misma se colocó al sujeto experimental en la zona iluminada y se registró el número de transiciones que realizó de un compartimiento a otro.

Los animales fueron administrados con diferentes dosis del extracto. Cada dosis se probó en grupos de 8 a 10 animales. 60 min después se realizó la prueba y se determinó el número de transiciones realizadas por cada animal durante los 10 min que duró la prueba.

4.1.4. PRUEBA DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ.

La evaluación de la actividad locomotriz se realizó en una caja de 43 x 36 x 19 cm, dividida en seis cuadrantes simétricos, colocada sobre una placa sensitiva (48 x 40 cm; Stoelting Co., Chicago USA) conectada a un contador (Stoelting Co., Chicago, USA). El sujeto experimental se colocó en la caja y el número de cruces que realizó el animal fue registrado durante un período de 10 min. Este registro se realizó 60 min después de la administración de los extractos o 30 min después de la administración de Diazepam. Después de cada prueba la caja se limpió cuidadosamente. Los resultados se expresan como cuentas/ 10 minutos

4.1.5. PRUEBA DE POTENCIACIÓN DE HIPNOSIS INDUCIDA CON PENTOBARBITAL SÓDICO.

En un primer experimento grupos de 8 a 10 animales se administraron con los extractos a diferentes dosis y 60 min después con una dosis de 30 mg/kg de pentobarbital sódico e inmediatamente fueron colocados de forma individual en una caja de acrílico de 30 x 21 x 21 cm que contenía una cama de aserrín fino y fueron observados cuidadosamente hasta su recuperación total.

Los controles fueron administrados con el vehículo y 60 min después se administró PB (30 mg/kg). Los controles positivos recibieron dosis de 0.5 o 1.0 mg/kg de Diazepam (1 % de Pg 200 en solución salina) en lugar del extracto y 30 min después fueron administrados con PB (30 mg/kg).

En un segundo experimento se siguió exactamente el mismo procedimiento, sólo que en esta ocasión los animales fueron administrados con una dosis de 42 mg/kg de PB.

En ambos experimentos se registraron tanto los tiempos de latencia de sedación (considerada como el tiempo en minutos que transcurrió entre la administración de PB y la pérdida de la coordinación locomotriz), como de sueño (el tiempo que transcurre entre la pérdida del reflejo de enderezamiento y su recuperación).

4.1.6. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD EPILÉPTICA INDUCIDA POR PTZ.

A los animales se les administró intraperitonealmente, con diferentes dosis de los extractos, 60 min antes de la administración por la misma vía de una sola dosis de 90 mg/kg de PTZ. Posteriormente los animales se colocaron de manera individual dentro de una caja de acrílico de 44 x 22 x 21 cm, sobre una cama de aserrín fino y fueron observados hasta su total recuperación o muerte. Se registraron los tiempos de latencia de crisis (como el tiempo que transcurre entre la administración del PTZ y la aparición de la primera crisis) y de latencia de crisis clónicas-tónicas generalizadas (como el tiempo que transcurre entre la administración de PTZ y la aparición de crisis severas, en las cuales se pueden observar caídas, clonías y extensión tanto de las patas delanteras como traseras. Ambos parámetros fueron medidos en minutos. También se determinó el porcentaje de muerte. Los animales control se trataron de la misma forma, sólo que en lugar de PTZ fueron administrados con el vehículo, los controles positivos se administraron con Diazepam a la dosis de 1.0 mg/kg.

4.1.7. AUTORADIOGRAFÍA.

Para este experimento, los ratones de prueba fueron habituados a la manipulación mediante una administración ip diaria de solución salina, durante los 5 días previos a la realización del experimento. Al sexto día fueron administrados con diferentes dosis de EHRM y 24 h después fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros se removieron rápidamente, se

congelaron en hielo seco y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se realizaron cortes coronales de $20\text{ }\mu\text{m}$ en un criostato, los cuales fueron montados por descongelación en laminillas cubiertas con gelatina y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el día de incubación, en el que las secciones cerebrales se lavaron con buffer de Tris HCL (170 mM , $\text{pH} = 7.4$) durante 30 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se incubaron durante 45 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una solución 2 nM de ^3H -flunitrazepam (88 Ci/mM ; Amersham, Arlington Heights, IL), para marcar los sitios de unión de BDZ. Posteriormente se lavaron con una solución 170 mM de buffer Tris, en ausencia o presencia de $1\text{ }\mu\text{M}$ de clonazepam como agonista a BDZ. La unión obtenida en presencia de clonazepam fue considerada como inespecífica. La incubación se terminó con dos lavados sucesivos de (1 min cada uno) con una solución 170 mM de buffer Tris y lavados con agua destilada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las secciones fueron secadas rápidamente con aire frío. Las laminillas se colocaron en magazines de plomo para autorradiografía, junto con estándares de tritio (Amersham), y en contacto con una película sensible a tritio. Las películas son conservadas en un lugar oscuro a TA durante tres semanas. Posteriormente se procesan con un revelador Kodak (D 19) y fijador rápido a TA. Las distintas regiones del cerebro de ratón son identificadas con base en el atlas de la rata de Paxinos y Watson (1986). La densidad óptica (DO) de las estructuras seleccionadas, presentes como autorradiogramas fueron entonces determinadas usando un programa de análisis de imágenes (JAVA, Jandel Software), las imágenes se observan en la figura 9. Las lecturas de DO de los estándares se utilizan para determinar los valores de la radioactividad del tejido de las laminillas adyacentes. Para cada estructura se realizaron 10 lecturas de DO en por lo menos 5 secciones y se obtuvo un promedio. Las lecturas de DO de los estándares fueron usadas para determinar los valores de radioactividad del tejido al compararlos con

las secciones de tejido tratados con el extracto hexánico de *R. Mucosa* (EHRM). Las lecturas de DO fueron convertidas a fmol/mg de tejido.⁵⁴

Las uniones a receptores a BDZ se analizaron en las siguientes estructuras: corteza frontal, temporal y entorrinal, amígdala, caudado putamén, hipocampo y tálamo.

4.2.0. PARTE EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO.

APARATOS Y MATERIAL UTILIZADO

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johnes y no están corregidos.

Para las cromatografías “relámpago”⁵⁵ se utilizó Sílica gel de malla 230-400 marca Aldrich y para las cromatografías al vacío⁵⁶ se utilizó Sílica gel para cromatografía en capa fina.

La pureza de los productos y el avance de las reacciones se determinaron por cromatografía en placa fina (ccf) en cromatofolios Macherey- Nagel, usando como revelador una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. La presencia de alcaloides se detectó mediante ccf, utilizando como revelador los reactivos de Dragendorff y Mayer. La presencia de acetogeninas se detectó mediante el empleo del reactivo de Kedde.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro de Masas JEOL JMS 105, mediante técnicas de impacto electrónico a 70 eV o por ionización química utilizando metano para producir los iones.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro en un Nicolet FT-5X en solución de cloroformo o en pastilla con KBr y solo se describen señales diagnóstico en cm^{-1} . Las rotaciones específicas se determinaron en un polarímetro Jasco modelo DIP-360.

El análisis de aceites esenciales se llevó a cabo en dos etapas, primero se obtuvo su perfil cromatográfico, utilizando como referencia una serie de *n*-alcanos, empleando un

cromatógrafo de gases marca Agilent 6890 equipado con una columna capilar HP-5 (5-metilfenil Silicón) de 30 m x 0.32 d. i. x 24 μm de espesor y un detector de ionización de flama. La temperatura de la columna se programó a partir de 40 °C hasta 300 °C a una velocidad de 7 °C/ min. La temperatura del detector y el inyector fue de 300 °C, el gas transportador utilizado fue helio con una apertura de 1:100 y una velocidad de flujo de 12 ml/ min. Una vez establecido el perfil cromatográfico de las distintas fracciones, éstas se analizaron mediante técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El equipo que se utilizó fue un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, serie II equipado con una columna capilar ultra 2 (crosslinked 5-metilfenil-silicón) de 25 m x 20 mm d.i. x 0.33 μm de espesor y un detector de ionización de flama, la temperatura (T) de la fuente fue de 300 °C. La T del horno se programó iniciando con 40 °C (1 min) seguida por un incremento de 7 °C por minuto hasta 300 °C. Este cromatógrafo de gases está a su vez acoplado a un espectrómetro de masas JMS-AX505HA marca JEOL, con potenciales de aceleración y ionización de 3 KV y 70 eV respectivamente. La identificación de los componentes de las diferentes fracciones se realizó mediante la comparación de los índices de retención obtenidos mediante el método descrito por Van der Dool⁵⁷ y por comparación de sus patrones de fragmentación utilizando la biblioteca de espectros de masas del equipo (National Institute of Standards and Technology NIST 3.0). La cuantificación relativa de sus componentes se realizó basándose en las áreas de los picos del cromatograma respectivo y no se determinó el factor de respuesta.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se determinaron en instrumentos: Varian Gemini 200 ó Varian UNITY-300. Los desplazamientos químicos de los espectros de RMN

^1H se dan en ppm con respecto al TMS y los de RMN ^{13}C con respecto a CDCl_3 (77ppm).

Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz.

4.2.1 *Annona cherimolia*

El espécimen de *Annona cherimolia* utilizado en este estudio, se colectó en septiembre de 1999 en Metepec, Puebla, fue identificada por la Dra. N. Diego de la Facultad de Ciencias de la UNAM y depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM, con número de voucher 584162.

Las hojas secas y molidas (2600 g) se extrajeron dos veces con 10 litros de hexano a temperatura ambiente durante 48 h y posteriormente con 10 litros de metanol. Ambos extractos se filtraron por separado y los disolventes se evaporaron a presión reducida. Se obtuvieron 74.23 g de extracto hexánico y 50 g de extracto metanólico (2.85 % y 1.92 % respectivamente, en relación al peso seco del material vegetal inicial).

Para la evaluación farmacológica se utilizaron 14.23 g del extracto hexánico.

El fraccionamiento del extracto hexánico (60 g) se efectuó mediante cromatografía en columna al vacío, utilizando una columna de vidrio de 8 cm de diámetro interno, empacada con sílice gel (60G Merck) hasta una altura de 15cm. La elución se efectuó con hexano y mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente.

Las fracciones se analizaron por ccf y aquellas que mostraron el mismo perfil se reunieron.

De las fracciones 1-5, obtenidas con hexano, se aislaron 150 mg (0.005 %) de *n*-**hentriacontano**⁵⁸ como un sólido amorfo blanco con pf de 58-60 °C;

IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 2318, 2849, 1467 y 1174.

EM: IE 436 $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{31}\text{H}_{64}$); se observan pérdidas sucesivas de 14 unidades de masa.

RMN ^1H (200MHz) (CHCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 1.25 (s ancho), 0.88 (t, J = 6.9).

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (9:1), se aislaron 10 mg de **1-hentriacontanol**⁵⁹ como un sólido amorfo blanco con pf de 76-78 °C;

IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 3424 (OH), 1463 (CH₂), 720-730 ([CH₂]_n).

EM: IE m/z 452 [M⁺] no observado (C₃₁H₆₄O), 434 [M⁺-18] (1), 420 [M⁺-32] (10) y 28 pérdidas sucesivas de 14 unidades de masa atómica.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ 3.64 (t, 2H, J = 6.9), δ 1.54 (m, 8H), δ 1.25 (H, s ancho) δ 0.80 (t, 3H, J = 6.9).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), 63.34, (C-1 -OH), 33.1, (C-2, β -OH) 32.2 (C-3, γ -OH), 29.9 (C-4, δ -OH), 26 (C-5, ϵ -OH), 22.9 y 14.33 (CH₃).

De las fracciones eluidas con hexano, se obtuvieron por precipitación 2.10 g de **16-hentriacontanona o palmitona**⁶⁰ como un sólido amorfo blanco con pf de 82-83 °C;

IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ 2927, 2854, 1708, 1463 y 1375

EM: IE 450 [M⁺], (C₃₁H₆₂O), 268 (8), 255 (42), 239 (100), 194 (9), 71 (36), 57 (43)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 Mhz), δ 2.37 (4H, t, J= 7.5Hz), δ 1.55 (4H, m), δ 1.25 (48H, s), δ 0.877 (6H, t, J = 6.7). Espectro No. 1

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 210, 32.82, 31.92, 29.69, 29.63, 25.74, 22.69 y 14.11.

De las aguas madres de la palmitona, se obtuvieron 22 g (0.84 %) de un aceite rojo, el cual se separó mediante cromatografía en placa preparativa utilizando hexano como eluyente, se obtuvieron las fracciones 6B1, 6B2 y 6B3, éstas fracciones mostraron un perfil complejo en cromatografía en capa fina, por lo que sus componentes se identificaron por cromatografía de gases según el método descrito por Van den Dool y por cromatografía de gases acoplado al espectrómetro masas y análisis de los patrones de fragmentación.

De las fracciones 32-40 (hexano/acetato de etilo 8:2), se aislaron por cristalización 175 mg de β -sitosterol (0.006 %) en forma de cristales blancos.⁶¹

Las fracciones 13-15 eluidas con hexano (2.0 g, 0.076 %) y las fracciones 42-44 eluidas con hexano/acetato de etilo 8:2 (4.3 g, 0.163 %), se analizaron también por este método.

Extracto metanólico de *Annona cherimolia*

Del extracto metanólico (50 g) se obtuvieron por filtración y recristalización 30 g de **glucosa** en forma de un sólido blanco cristalino.

Una vez filtrado el extracto metanólico se llevó a pH ácido con una solución 1 N de ácido clorhídrico y se extrajo con cloroformo (3 x 20 ml), la fase acuosa se alcalinizó con una solución 1 N de hidróxido de amonio hasta un pH=8 y se extrajo nuevamente con cloroformo (3 x 20 ml), que al evaporarse, dejó 50 mg de un residuo que dio positiva la prueba de Dragendorff. El extracto de alcaloides crudos se separó en sus componentes por medio de una cromatografía en placa preparativa, utilizando como sistema de elución una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:9).

De la fracción de menor polaridad se obtuvieron 5 mg de **liriodenina** como un producto sólido cristalino amarillo, con pf 278-280 °C, el cual da positivas las pruebas de Dragendorff y Mayer;

IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} 2987, 2918, 1660, 1598, 1578, 1467, 1442, 1420, 1308, 1258 y 1055,

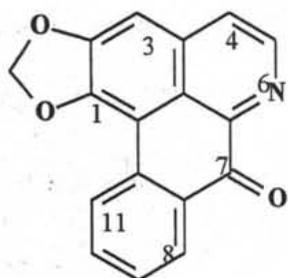
EM: IE 275 [M^+], (7) ($\text{C}_{17}\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$).

RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$, 300 MHz), Tabla 4. Espectro No.2.

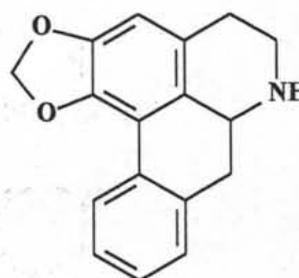
RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$, 75 MHz) Tabla 5. Espectro No. 3.

Tabla 4 Datos de RMN ^1H de los alcaloides liriodenina y anonaina

H	Liriodenina	Anonaina
3	7.28s	6.64s
4 α	7.87d (5.1)	}
4 β		
5 α	8.8d (5.1)	} 2.8-3.2m
5 β		
6a		34.38dd(13.8,4.0)
8	8.43 dd (7.9, 1.2)	} 7.30 - 7.4dt
9	7.57dt (8.0, 1.2)	
10	7.78td (7.9, 1.1)	
11	8.64dd (7.9)	8.09d (7.4)
-O-CH ₂ -O-	6.43s	6.01d (1.5)
		6.16d (1.5)



Lirodenina



Anonaina

Tabla 5 Datos de RMN ^{13}C de los alcaloides Liriodenina y Anonaina.

C	Liriodenina	Anonaina
1	151.9	142.5
2		146.8
3	107.0	107.9
4	124.5	29.1
5	144.3	43.3
7	181.8	36.9
8	127.3	127.0*
9	132.8	127.0*
10	130.9	127.5*
11	128.5	127.5*
1 a	135.8	128.1
2 a	124.5	126..5
3 a	103.1	116.1
4 a		131.0
5 a	134.4	135.0
6 a	144.3	53.4
-O-CH ₂ -O-	102.5	100.6

* señales intercambiables

De la fracción de polaridad intermedia se obtuvieron 4 mg de un sólido cristalino café claro, con punto de fusión de 120-122 °C, el cual da positivas las pruebas de

Dragendorff y Mayer, éste producto fue identificado como **anonaina**.⁶²

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 2896, 2834, 1451, 1220 y 1048

ME: IE 265 [M^+] (78) ($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$), 264 (100), 236 (18), 206 (13), 178 (13).

RMN ^1H (CDCl_3 + DMSO, 300 MHz) Tabla 4, Espectro No. 4.

RMN ^{13}C (CDCl_3 + DMSO), (75 MHz) Tabla 5, Espectro No. 5.

De la fracción de mayor polaridad se aislaron 25 mg de **11-hidroxi-16-hentricontanona**⁶³ como un sólido amorfo blanco, con punto de fusión de 72-76 °C.

IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} 3150-3300 y 1700.

EM: IE 466 [M^+] (10) ($\text{C}_{31}\text{H}_{62}\text{O}_2$), 448 (33), 339(35), 321 (34), 307 (30), 270 (32), 254 (100), 239 (90), 194 (50), 125 (38), 97 (87), 83 (70), 57 (97), 43 (83).

RMN ^1H (CDCl_3), (300 MHz), δ 3.57 (s ancho, 1H), δ 2.37 (m, 4H), δ 1.56 (m), δ 1.41 (m), δ 1.25 (s ancho), δ 0.88 (6H, t, J = 6.7).

RMN ^{13}C , (50 MHz), 211.4 (C-16), 71.5 (C-11), 41.5 (C-15), 37.5 (CH_2), 36.0 (CH_2), 31.9 (CH_2), 29.6-29.3 (CH_2), 25.6 (CH_2), 23.9 (CH_2), 14.0 (CH_3).

4.2.2 *Annona lutescens*

Las hojas de *Annona lutescens* se colectaron en julio del 2000, en el municipio de Tlayacapan en el estado de Morelos, México, y se identificaron por la Dra. N. Diego de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Las hojas secas y molidas (250 g) de *A. lutescens* se extrajeron con *n*-hexano y metanol, de manera similar a la antes descrita. Se obtuvieron 18.7 g de extracto hexánico y 10 g de extracto metanólico. Para la evaluación farmacológica se utilizaron 8.7 g, del extracto hexánico.

El extracto hexánico (10 g) se separó por medio de una cromatografía en columna al vacío empacada con 350 g de sílica gel (60G Merck). Se utilizaron como eluyentes:

hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, acetato de etilo y acetona. Se reunieron aquellas fracciones que presentaron el mismo perfil cromatográfico en placa fina.

De las fracciones 1-6, eluidas con hexano, se obtuvieron por precipitación 12 mg de **16-hentriacontanona o palmitona**.

De las aguas madres de palmitona se obtuvieron 4 g de un aceite rojo, el cual mostró un perfil complejo en ccf. El análisis de este aceite se realizó por cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas siguiendo el método antes descrito.

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (9.5:0.5), se obtuvieron 4.2 g de un aceite incoloro, el cual de acuerdo a su perfil en ccf, mostró ser una mezcla.

100 mg de esta mezcla se sometieron a condiciones de metilación con 2 ml de éterato de trifluoruro de boro en agitación con 1 ml de metanol, la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 15 min, después de lo cual se dejó que la reacción alcanzara la TA y una alícuota de 50 µl se analizó por cromatografía de gases, los productos de reacción se identificaron por comparación de sus tiempos de retención, con los tiempos de retención de estándares.

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (9:1), se aislaron 25 mg de **1-hentricontanol**.

De las fracciones eluidas con AcOEt/hexano (2:8) se obtuvieron 55 mg de β-sitosterol, como un sólido blanco cristalino, con pf de 134-136 °C.

Extracto metanólico *Annona lutescens*

El extracto metanólico (10 g) se trató con una solución 1 N de ácido clorhídrico, hasta un pH = 4. La solución resultante se extrajo con cloroformo (3 x 20 ml) y la fase acuosa se alcalinizó con una solución 1 N de hidróxido de amonio hasta un pH = 8 y se extrajo con cloroformo (3 x 20 ml), que al evaporarse, dejó 25 mg de un residuo de alcaloides totales que dio positivo en las pruebas de Dragendorff y Mayer. Una alícuota del extracto de alcaloides (10 mg) se separó en sus componentes por medio de una cromatografía en columna abierta, utilizando como sistema de elución mezclas de cloruro de metileno y metanol de polaridad creciente.

De las fracciones de menor polaridad (cloruro de metileno/metanol, 8:2) se obtuvieron 2 mg del alcaloide aporfínico **liriodenina**.

De las fracciones eluidas con cloruro de metileno/metanol (2:8), se obtuvieron 8 mg de **anonaina**, como sólido cristalino café claro, con pf de 120-122 °C

4.2.3 *Rollinia mucosa*

El material vegetal de *Rollinia mucosa* se colectó en Ocosingo Chiapas y lo identificó la Dra. Alma Rosa González Esquinca de la Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas (UNICACH), un ejemplar de la especie colectada se depositó en el herbario de la escuela de Biología de la UNICACH. (Voucher: A. R. González- Esquinca)

Las hojas secas y molidas de *Rollinia mucosa* (1428 g) se maceraron en 10 litros de hexano y posteriormente en 5 litros de metanol, como se describió anteriormente.

Se obtuvieron 20 g de extracto hexánico, una parte de este extracto (10 g) se utilizó para la realización de las pruebas de actividad biológica

El extracto hexánico (10 g) se separó en sus componentes por medio de una cromatografía en columna al vacío. Se utilizó como eluyente hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente y por último acetato de etilo.

De las fracciones eluidas con hexano, se obtuvieron 96 mg (0.067 %) de **palmitona**.

De las fracciones eluidas con acetato de etilo/hexano (5:95), se aislaron 30 mg de **1-hentricontanol**. (0.021 %)

De las fracciones eluidas con acetato de etilo/hexano (5:95), se aislaron 65 mg (0.045 %) de una mezcla β - **sitosterol** y **estigmasterol**.

De las mismas fracciones, se aisló (+)-**epimembrina** (1),⁶⁴ como un sólido blanco cristalino con pf 133-135 °C, $[\alpha]^{25} = + 134.6^\circ$ (CHCl₃; c 1.2).

IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}} \text{cm}^{-1}$: 2963, 2938, 2865, 2839, 1612, 1591, 1515, 1464, 1462, 1417 y 1375.

EM m/z (% abundancia relativa): 356 [M⁺] (100), (C₂₁H₂₄O₅), 325 (10), 189 (22), 177 (28), 165 (33), 147 (29), 135 (68), 121 (36).

EMAR, FAB⁺, C₂₁H₂₄O₅, masa observada 356.1624.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ 7.29 (Ar, 2H, m), δ 6.88 (Ar, 5H, m), δ 4.87 (H-2, d, J=5), δ 4.46 (H-6, d, J=7.2), δ 4.13 (H-4ax, d, J = 9.5), δ 3.85 (H-8eq, m), δ 3.85 (H4eq, m), δ 3.32 (H-8ax, m), δ 3.32 (H-1, m), δ 2.91 (H-5, m), δ 3.90 (MeO, s) δ 3.88 (MeO, s), δ 3.80 (MeO, s). Espectro No. 6.

RMN ¹³C (CDCl₃), (75 MHz), δ (ppm): 159.2 (Ar, C-4''), 148.8 (Ar, C-3'), 133.2 (C-1''), 131.0 (C-1'), 127.3 (C-3''), 127.3 (C-5''), 117.7 (C-6') 113.5 (C-6''), 113.5 (C-2''), 111.1 (C-5'), 109.0 (C-2'), 87.5 (C-6), 82.0 (C-2), 71.0 (C-4), 69.7 (C-8), 54.5 (C-5), 50.2 (C-1).

Espectro No. 7.

De las fracciones eluidas con acetato de etilo/ hexano (3:7) se aislaron 5 mg (0.0035 %) de (+) – **epieudesmina** (**2**)⁶⁵ como cristales blancos con pf 131-132 °C, $[\alpha]_D = +65.0$ (c 0.095; CHCl₃)

IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 2963, 2938, 2864, 2839, 1516, 1465, 126 y 1028.

EM: IE m/z (% de abundancia relativa) 386 [M⁺], (C₂₂H₂₆O₆), 355 (8), 219(14), 194 (13), 177 (32), 165 (47), 151 (28), 138 (7).

RMN ¹H (CDCl₃, 300, MHz), δ 6.94 (Ar, m), δ 6.86 (Ar, m), δ 4.85 (H-2, d, J=5.5), δ 4.45 (H-6, d, J=7), δ 4.13 (H-4ax, d, J=10), δ 3.85 (H-4eq, m), δ 3.35 (H-8eq, m), δ 3.30 (H-8ax, m), δ 3.30 (H-1, m), δ 2.90 (H-5, m), δ 3.93 (Me-O, s), δ 3.92 (MeO, s), δ 3.90 (MeO, s), δ 3.89 (MeO, s). Espectro No. 8.

RMN ¹³C (CDCl₃), (75 MHz), δ (ppm): 149.0 (C-4''), 148.6 (C-3'), 147.8 (C-3''), 133.5 (C-1''), 130.8 (C-1'), 118.3 (C-6''), 117.5 (C-6'), 110.9 (C-5''), 110.9 (C-5'), 109.0 (C-2'), 108.8 (C-2''), 87.5 (C-6), 81.9 (C-2), 70.9 (C-4), 69.6 (C-8), 54.4 (C-5), 50.1 (C-1).

Espectro No.9.

Las fracciones eluidas con acetato de etilo/hexano, (1:4) que mostraron una similitud cromatográfica en placa fina se reunieron y se recromatografiaron en una placa preparativa obteniéndose 2 mg de (+)-**epimagnolina A** (**3**).⁶⁶ $[\alpha]_D = +128.5$ (c = 1.5; CHCl₃)

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 2963, 2938, 2864, 2839, 1516, 1465, 1266 y 1028.

EM, IE: m/z (% abundancia relativa), 416 [M⁺] (C₂₃H₂₈O₇) (100), 387 (12), 386 (22), 220 (18), 219 (14), 197 (13), 177 (22), 165 (35), 151 (24), 138 (7).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), (J = Hz): δ 6.94 (Ar, s), δ 6.84 (Ar, d, J=8), δ 4.87 (H-2, d, J=5.5), δ 4.44 (H-6, d, J=7.2), δ 4.16 (H-4ax, d, J = 9.5), δ 3.87 (H-4eq, m), δ 3.87 (H-8eq,

m), δ 3.35 (H-8ax, m), δ 3.35 (H-1, m), δ 2.92 (H-5, m), δ 3.91 (Me-O, s), δ 3.88 (MeO, s), δ 3.87 (MeO, s), δ 3.87 (MeO, s), δ 3.84 (MeO, s). Espectro No.10.

RMN ^{13}C (CDCl_3), (75 MHz), δ (ppm): 153.2 (C-3''), 153.2 (C-5''), 147.8 (C-4'), 148.7 (C-3'), 137.2 (C-4''), 136.7 (C-1''), 130.7 (C-1'), 117.7 (C-6'), 110.9 (C-5'), 109.0 (C-2'), 108.8 (C-2''), 102.7 (C-6''), 87.6 (C-6), 81.8 (C-2), 70.8 (C-4), 69.6 (C-8), 54.4 (C-5), 49.9 (C-1). Espectro No.11.

De las fracciones eluidas con acetato de etilo/hexano (1:3), se obtuvo por precipitación de un sólido amorfo verdoso (13.4 mg), cuyo perfil en ccf mostró la presencia de un producto mayoritario. Este se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa, utilizando como sistema de elución una mezcla de acetato de etilo/hexano (7:3). Este procedimiento permitió el aislamiento de 5 mg de un sólido blanco cristalino con un p.f. de 132-134 °C, $[\alpha]_{25} = +63.3^\circ$ ($c = 0.10$, CHCl_3), identificado como **membrina 4**.⁶⁷

IR (KBr) (cm^{-1}) 2958, 2837, 1514, 1246 y 1030.

EM, IE (% abundancia relativa) 356 [M^+] ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$) (100), 325 (12), 189 (20), 165 (43), 147 (42), 135 (55), 121 (32).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz,) δ 7.26-7.30 (m, 2H, Ar), δ 6.82, δ 6.92 (m, 5H, Ar), δ 6.90 (d, $J = 8$, 2H), δ 4.76 (dd, $J = 10.2$, 7, H2), δ 4.76 (dd, $J = 10.2$, 7, H6), δ 4.20 (m, H4ax), δ 4.20 (m, H8eq), δ 3.90 (s, 3H, OMe), δ 3.88 (s, 3H, OMe), δ 3.84 (m, H4eq), δ 3.84 (m, H8ax), δ 3.81 (s, 3H, OMe), δ 3.11 (m, H1), δ 3.11 (m, H5). Espectro No.12

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 159.2 (C4''), 149.2 (C4'), 148.6 (C3'), 133.6 (C1''), 133.1 (C1'), 127.3 (C 3''), 127.3 (5''), 118.2 (C 6'), 113.0 (C 3''), 113.0 (C6''), 111.0 (C

5'), 109.2 (C 2'), 85.8 (C 6), 85.6 (C 2) , 71.8 (C 4), 71.5 (C 8), 56.0 (OMe), 55.4 (OMe), 55.3 (OMe), 54.2 (C 5), 54.1(C 1). Espectro No.13

Extracto metanólico de *Rollinia mucosa*

El extracto metanólico se trató con una solución 1 N de ácido clorhídrico, hasta pH = 4, y se extrajo con cloroformo (3 x 20 ml), la fase acuosa se alcalinizó con una solución de 1 N hidróxido de amonio hasta un pH = 8, se extrajo con cloroformo (3 x 20 ml), al evaporarse, dejó 25 mg de un residuo y dio positiva la prueba para alcaloides. El extracto de alcaloides crudos se separó en sus componentes por medio de cromatografía en placa preparativa, utilizando como eluyente una mezcla de cloruro de metileno/metanol (8:2).

De esta cromatografía en placa preparativa se obtuvieron 10 mg de **liriodenina** y 7 mg de **anonaina**.

5.0. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Debido a la presencia de acetogeninas, productos citotóxicos característicos de la familia *Annonaceae*, los estudios de diversas especies del género han sido dirigidos principalmente a la evaluación farmacológica y caracterización de estos metabolitos.

No obstante, se ha descrito que algunas especies de esta familia presentan otro tipo de actividades como: antidepresivas, sedantes y antiepilépticas. La presente investigación fue dirigida a la evaluación de las posibles actividades sobre SNC de extractos y sustancias obtenidas de *A. cherimolia*, *A. lutescens* y *R. mucosa*. La ausencia de acetogeninas en los extractos evaluados fue determinada por el reactivo de Kedde.

Como paso previo a la evaluación farmacológica se determinó la dosis letal mínima de todos y cada uno de los extractos hexánicos, resultando que la dosis mínima letal es superior a 1000 mg/kg de extracto administrado vía ip. Desafortunadamente, en el caso de los extractos de alcaloides totales, la cantidad obtenida no fue suficiente para realizar esta determinación.

Extractos hexánicos

Extracto hexánico de las hojas de *Annona cherimolia* (EHAC)

Los resultados de la administración del EHAC a ratones que fueron evaluados en el modelo de la conducta exploratoria en un ambiente aversivo, mostraron que este extracto produce un efecto ansiolítico. Experimentalmente este efecto se estableció por el incremento en el número de transiciones del compartimiento iluminado al oscuro, conducta que es interpretada como un decremento en la ansiedad. Además, es importante mencionar que la gráfica que relaciona la dosis con el número de transiciones, muestra una curva en

forma de U invertida, efecto similar al producido por el diazepam, un ansiolítico clásico utilizado clínicamente (Fig. 8).

La actividad exploratoria también involucra la actividad locomotriz, de manera que todos los animales evaluados en el modelo de ansiedad, fueron sometidos inmediatamente después a la prueba de actividad locomotriz, eliminando de esta manera la posibilidad de efectos inespecíficos producidos por el extracto. Los resultados presentados a continuación

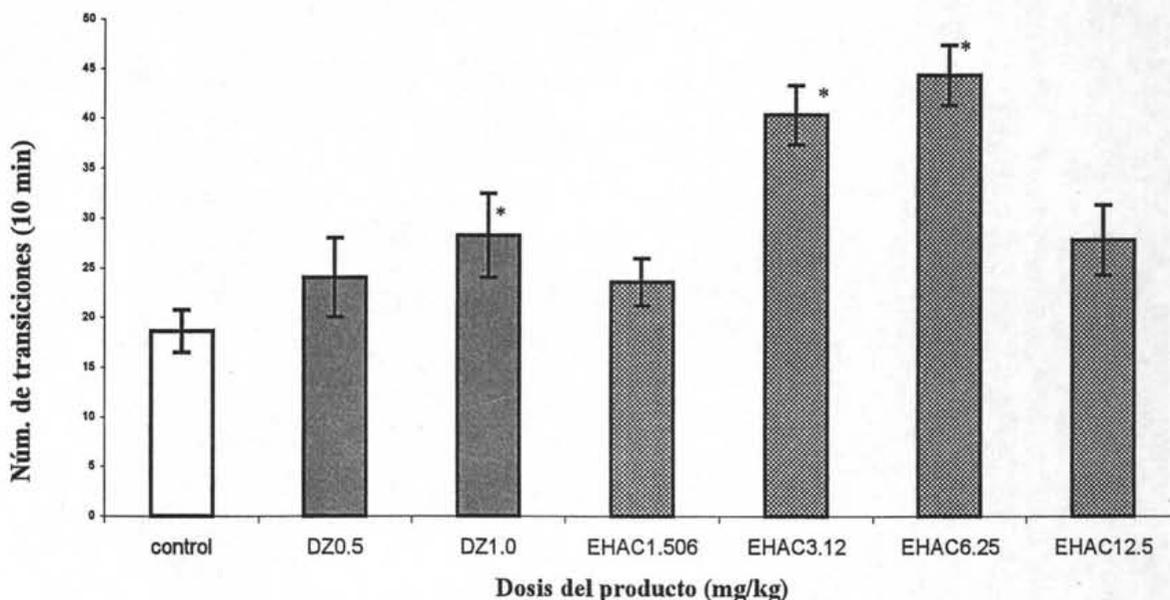
Actividad locomotriz de EHAC

Tratamiento	Dosis (mg/kg), ip	Actividad motriz (cuentas/10min)
Control	0.0	82.00 ± 9.422
Diazepam	0.5	103 ± 13.260*
	1.0	74.125 ± 6.489*
<i>A. cherimolia</i>	0.0	82.00 ± 9.422
	1.60	107.90 ± 7.861
	3.12	66.80 ± 9.825
	6.25	79.30 ± 6.915
	12.50	62.80 ± 9.862

p* ≤ 0.05

muestran que ninguno de los animales tratados modificó su actividad locomotriz, lo cual confirma que la conducta mostrada por los sujetos experimentales es debida al efecto ansiolítico del extracto como se observa en la Fig. 8.

Fig. 8 Efecto del EHAC sobre la conducta exploratoria.



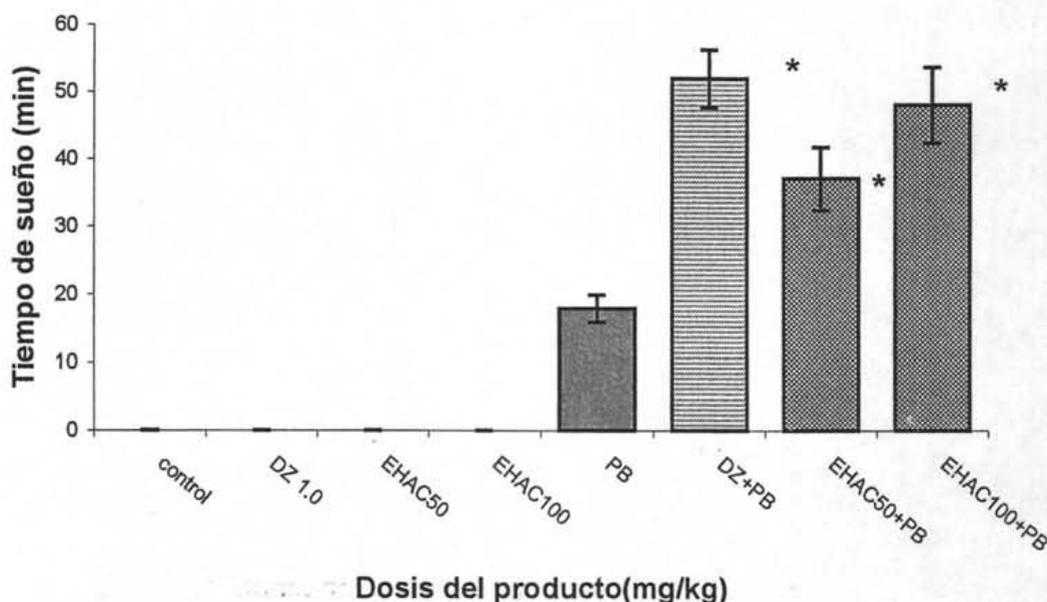
Tratamiento	Dosis (mg/kg) ip	Número de transiciones
Control	0.0	17.33 ± 1.915
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464
	1.0	34.750 ± 3.797
<i>A. cherimolia</i>	0.0	17.33 ± 1.915
	1.60	23.50 ± 2.399
	3.12	40.40 ± 6.738*
	6.25	44.40 ± 3.052*

Los resultados de la prueba de hipnosis inducida por 42 mg/kg de PB indican que solamente a las dosis de 50 y 100 mg/kg de EHAC, el tiempo de sueño se incrementa de forma significativa (Fig. 9 A). Estos resultados indican que el EHAC a dosis bajas posee un efecto ansiolítico, mientras que a dosis mayores presenta un efecto sedante. Patrón de actividad típico de las BDZ, como el Diazepam.

Para confirmar el efecto depresor del EHAC se realizó el mismo experimento pero administrando una dosis de 30 mg/kg PB (Fig. 9 B) la cual no es suficiente para inducir sueño por sí sola. Los resultados confirman que el aumento en el tiempo de sueño inducido

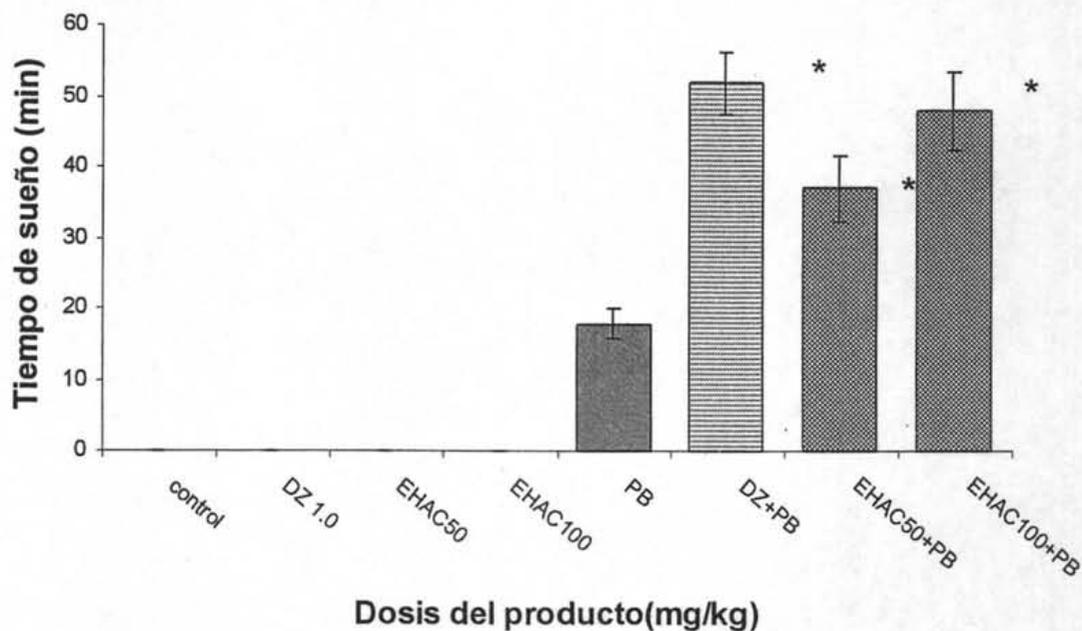
por PB se debe a un efecto central. En los animales administrados con la dosis subumbral de PB, el tiempo de sueño aumenta de manera dosis dependiente. Aun más, los resultados de este experimento muestran también un decremento en la latencia de sueño inducida por esta dosis de PB, cuando los animales son administrados con las dosis de 50 y 100 mg/kg de EHAC, confirmando así la acción depresora del extracto.

Fig. 9 A. Efecto del EHAC sobre el efecto hipnótico inducido con 42 mg/kg de PB



Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación (min)	Tiempo de sueño (min)
Control	0.0	1.160 ± 0.0860	17.866 ± 2.002
Diazepam	1.0	0.975 ± 0.136	52.04 ± 4.003
<i>Annona cherimolia</i>	3.1	1.494 ± 0.0738	10.087 ± 0.813
	6.25	1.846 ± 0.130	19.461 ± 1.275
	12.5	2.604 ± 0.370	19.525 ± 4.867
	25	1.941 ± 0.176	16.175 ± 3.298
	50	1.170 ± 0.164	37.060 ± 4.654*
	100	1.063 ± 0.116	48.037 ± 5.616*

Fig.9 B. Efecto del EHAC sobre el efecto hipnótico inducido con 30 mg/kg de PB



Tatamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación (min)	Tiempo de sueño (min)
Control	0.0	2.779 ± 0.22	0.0
Diazepam	1.0	1.75 ± 0.089	9.06 ± 1.095*
<i>A cherimolia</i>	50	1.222 ± 0.11	17.95 ± 2.14*
	100	1.427 ± 0.104	33.81 ± 3.977*

Por otro lado, en el experimento de crisis convulsivas inducidas por PTZ, el extracto no mostró un efecto de todo o nada. Como puede observarse en la tabla siguiente, la administración de 25, 50 y 100 mg/kg de EHAC, no produjo cambios significativos en la latencia de las crisis. Sin embargo, retardó la aparición de las crisis tónicas, además de que redujo significativamente el porcentaje de muerte.

Efecto de EHAC sobre la actividad epiléptica inducida con PTZ

Tratamiento	Dosis(mg/kg)	Inicio de las convulsiones (min)	Latencia de crisis tónicas (min)	Mortalidad (%)
Control	0.0	0.799 ± 0.0963	1.735 ± 0.478	87.50
Diazepam	1.0	0.975 ± 0.136	nc**	nm**
EHAC	25	1.872 ± 0.2157	6.842 ± 0.877**	71.42
	50	1.098 ± 0.380	4.572 ± 1.363	28.57*
	100	0.995 ± 0.044	14.515 ± 1.403**	28.57*

nc = no-crisis, nm = no-muerte

Estos hallazgos sugieren que los efectos producidos por EHAC pueden ser mediados por el complejo receptor ácido γ -amino butírico-benzodiazepinas (GABA/BDZ), de forma similar a las BDZ y el PB que muestran efectos ansiolíticos y sedantes. Es conocido que el PB aumenta la conductancia del ión cloro inducido por GABA, mientras que el PTZ es un antagonista del receptor GABA_A, de tal forma que el extracto puede estar actuando como un agonista del receptor GABA_A incrementando la concentración de GABA en el cerebro,^{68, 69} aunque otros mecanismos pueden estar mediando los efectos depresores del extracto. Sin embargo, para dilucidar esto es necesario realizar otros estudios en los que se exploren sus efectos en otros modelos experimentales de epilepsia y ansiedad.

Del extracto hexánico de *A. cherimolia* se aislaron *n*-hentriacontano, palmitona, β -sitosterol y 1- hentriacontanol. Además por el método de cromatografía de gases acoplado a masas se identificó la presencia de 34 componentes en las fracciones de menor polaridad de este extracto, siendo los de mayor abundancia relativa γ -cadineno (14.83 %), limoneno (53.26 %), β -farneseno (42.80 %), citral (11.72 %) y 9,12,15-octadecatrien-1-ol (Tabla 7).

Recientemente se ha descrito que palmitona posee efectos antiepilépticos en ratones, lo cual puede explicar el efecto producido por el extracto de *A. Cherimolia*.⁷⁰

Tabla 6 Constituyentes del extracto hexánico de *A. cherimolia*.

No	Producto	% área	IR	No	Producto	% área	IR
fracción 6B1				fracciones 42-44			
1	β -Cubebeno	1.03	1390	1	Sulcatona	5.78	839
2	β -Cariofileno	1.20	1413	2	α -Pinoeno	3.26	939
3	α -Humuleno	4.29	1453	3	Linalool	1.56	1219
4	<i>cis</i> -Cariofilenp	0.94	1463	4	Citral	11.72	1256
5	NI C ₁₅ H ₂₄	5.89	1478	5	Mentol	1.88	1316
6	β -Ionona	4.89	1497	6	β -Ionona	3.06	1462
7	γ -Cadineno	14.83	1515	7	Dihidroactinidiolida	3.13	1495
8	β -Calacoreno	10.48	1534	8	NI C ₁₅ H ₂₄	3.74	1550
9	NI C ₁₅ H ₂₄	6.54	1540	9	β -Caracoleno	5.49	1551
10	β -Germacreno	4.27	1557	10	Acetato de nerilo	3.41	1755
11	Dehidroionona	2.31	1565	11	Ácido tetradecanoico	2.91	1795
12	NI C ₁₅ H ₂₄	6.21	1588	12	Fitona	1.85	1887
13	NI C ₁₅ H ₂₄	0.94	1602	13	9,12,15-octadecatrien-1-ol	19.26	2146
14	NI C ₁₅ H ₂₄	1.34	1609	estándares			
15	NI C ₁₅ H ₂₄	11.19	1641		Dodecano		1200
16	NI C ₁₆ H ₁₂ O ₄	20.76	1868		Tridecano		1300
fracción 6B12					Hexadecano		1600
1	β -Carifileno	2.62	1417		Octadeceno		1800
2	α -Humulleno	4.42	1453		Docosano		2200
3	β -Selineno	2.72	1466				
4	3,4-Dehidroienena	2.21	1541				
5	NI C ₁₆ H ₁₂ O ₄ , M ⁺ 268	52.57	1749				
6	NI C ₁₆ H ₁₂ O ₄ , M ⁺ 268	25.09	1820				
Fracción 6B13							
1	NI C ₁₀ H ₁₆	28.216	670				
2	Limoneno	53.26	1034				
3	<i>Cis</i> -p-menta-2-en-1-ol	0.008 ^t	1120				
4	Carvacrol	0.012	1270				
5	α -Cubebeno	0.005 ^t	1345				
Fracciones 13-15							
1	α -Cucubeno	2.57	1371				
2	β -Gurjuneno	1.34	1381				
3	β -Cariofileno	22.37	1404				
4	Espatuleno	2.89	1417				
5	α -Cariofileno	3.26	1427				
6	β -Farneseno(<i>Z</i>)	25.85	1441				
7	β -Selineno	11.07	1446				
8	β -Farneseno (<i>E</i>)	16.95	1450				
9	β -Bulgareno	9.57	1455				

I.R.^a = índice de retención, calculado de acuerdo al método de Van der Dool y Kratz.

NI = No Identificado.

Extracto hexánico de las hojas de *Annona lutescens* (EHAL).

En la tabla siguiente se muestran los resultados obtenidos al administrar EHAL a animales de prueba, en el modelo de ansiedad, los cuales muestran que no se manifiesta ningún efecto sobre la conducta exploratoria de los sujetos de prueba con respecto a los sujetos control; Así mismo, los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad motriz, muestran que el extracto de *A. lutescens* no modifica la actividad locomotriz de los animales de prueba.

Actividad locomotriz de EHAL

Tratamiento	Dosis (mg/kg) ip	Número de transiciones
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464
	1.0	34.750 ± 3.797
<i>A. lutescens</i>	0.0	17.867 ± 1.195
	6.25	17.800 ± 5.200
	12.5	23.750 ± 2.403
	25.0	18.00 ± 2.535
	50.0	19.250 ± 1.461
	75.0	22.250 ± 2.576
	100.0	21.250 ± 3.442

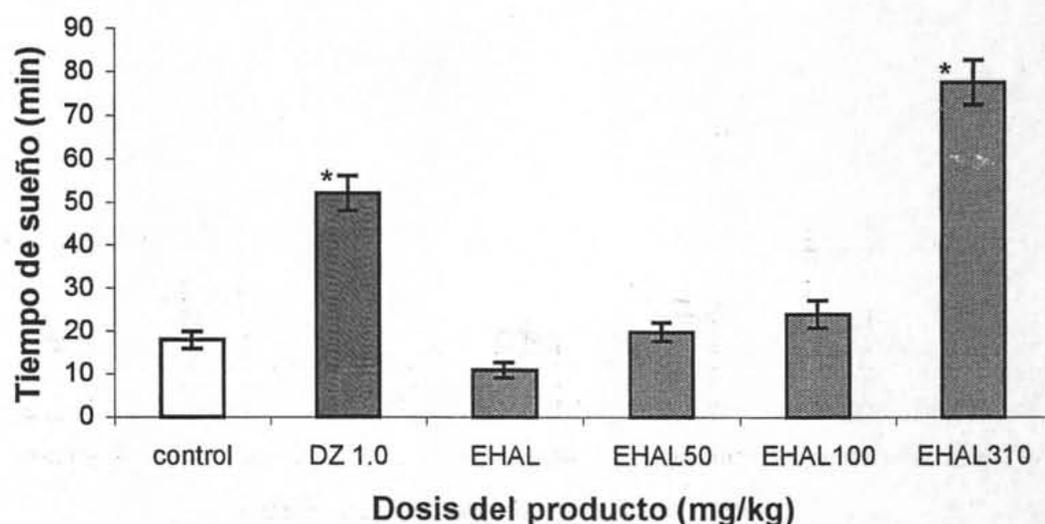
Además, el extracto no mostró efecto alguno sobre la actividad convulsiva inducida por PTZ, como se observa en la siguiente tabla, lo cual indica que el extracto no tiene actividad sobre el SNC.

Efecto de EHAL sobre la actividad epiléptica inducida con PTZ

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de crisis (min)	Latencia de crisis tónicas (min)	Mortalidad (%)
Control	0.0	0.799 ± 0.0963	1.735 ± 0.478	87.50
<i>A. lutescens</i>	25	0.657 ± 0.077	4.417 ± 0.684*	100
	50	1.2595 ± 0.464	5.178 ± 0.6946*	72.72
	100	0.831 ± 0.136	4.56 ± 0.700*	100

Por otro lado, el EHAL produjo un aumento significativo en el tiempo de sueño inducido por 42 mg/kg de PB (Fig. 10), únicamente a la dosis más alta (310 mg/kg). los resultados observados en la prueba de potenciación de hipnosis inducida por 42 mg/kg de PB muestran que el efecto de potenciación observado a esta dosis puede deberse probablemente a que el extracto interviene con el metabolismo del PB, y no a un efecto central, lo cual es confirmado por los resultados obtenidos con la administración de una dosis subóptima (30 mg/kg) de PB, la cual no es suficiente por si sola para inducir la pérdida del reflejo de enderezamiento en los animales control. Los resultados muestran que éste efecto no fue modificado por la administración del EHAL a ninguna de las dosis probadas.

Fig. 10 Efecto del EHAL sobre el efecto hipnótico inducido por 42 mg/kg de PB



Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación (min)	Tiempo de sueño (min)
Vehículo		1.160 ± 0.0860	17.866 ± 2.002
Diazepam	1.0	0.976 ± 0.136	52.04 ± 4.003
<i>Annona lutescens</i>	25	1.76 ± 0.140	10.926 ± 1.749
	50	1.50 ± 0.150	19.73 ± 2.20
	100	1.39 ± 0.154	23.99 ± 3.209*
	310	1.25 ± 0.083	77.73 ± 5.1996*

La composición química del EHAL, determinada mediante cromatografía de gases acoplada a masas, se muestran en las Tablas 7 y 8, la composición de las fracciones más abundantes del extracto, constituido principalmente por ácidos grasos, a cuya presencia puede deberse este último efecto, ya que es conocido que una alta concentración de ácidos grasos puede retardar el metabolismo de algunos anestésicos, impidiendo su degradación, produciendo así un efecto prolongado del mismo.

Tabla 7 Constituyentes del extracto hexánico de las hojas de *A. lutescens*.

No.	Producto	TR. (min)	% área	IR
1	2-Tujano	5.53	21.15	792
2	2-Tujano	5.563	0.79	794
3	Elematrieno	13.00	0.88	1266
4	Desconocido	14.06	14.66	1334
5	3(5),6-Cariofileno	14.66	6.78	1372
6	4(15)-Cucubeno	14.77	0.99	1379
7	α -Cariofileno	15.23	2.11	1408
8	3(15)-Cucubeno	15.74	27.44	1440
9	NI	15.94	13.99	1453
10	3.9-Cadineno	16.27	2.38	1474
11	Espatulenol	17.23	1.0	1535
12	4-Metilpentanoato de metilo	21.87	0.88	1830
13	2-Metilpentanoato de metilo	22.79	13.04	1888
14	9,12,15-Octadecatrienoato de metilo	25.03	10.55	2030
15	Octadecanoato de etilo	25.21	0.65	2042
	Estándares			
	Dodecano	12.01		1200
	Tridecano	14.23		1300
	Octadecano	19.65		1800
	Docosano	28.67		2200

NI = No Identificado

Tabla 8 Productos de metilación de las fracciones no polares del EHAL

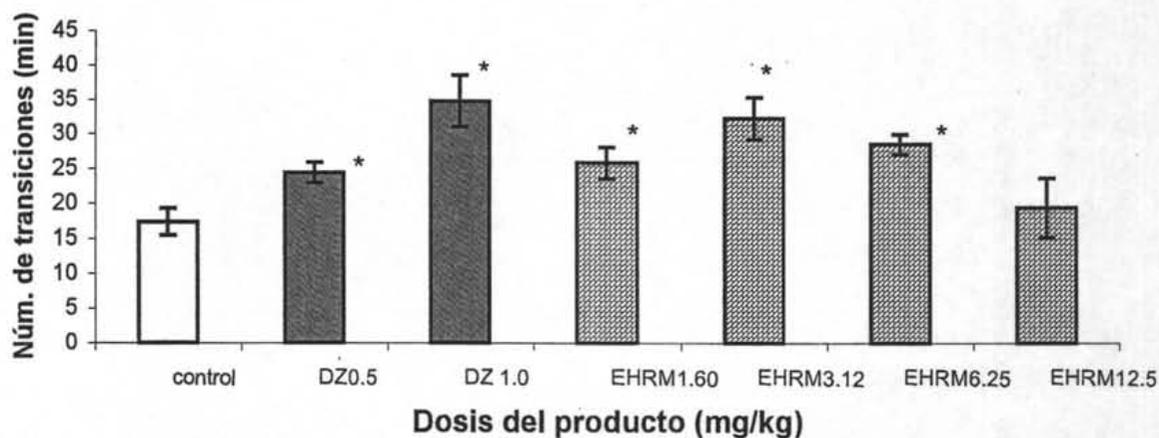
Producto	TR (min)	% de área
No identificado	11.27	1.02
Palmitato de metilo	12.33	81.64
No identificado	14.06	2.86
Etearato de metilo	14.10	9.83
Estearato de metilo	14.33	3.35

Extracto hexánico de las hojas de *Rollinia mucosa* (EHRM).

La administración del EHRM a los ratones que fueron sujetos al modelo de ansiedad, indica que provocó un efecto ansiolítico similar al producido por el EHAC, sólo que en este caso las dosis efectivas fueron menores. De igual forma se puede inferir que estos efectos son similares a los producidos por el Diazepam. En la gráfica de la Fig. 11 se observa un

incremento en el número de transiciones entre el compartimiento iluminado y el oscuro, lo cual es considerado como un efecto ansiolítico del EHRM, a las dosis de 1.6, 3.12 y 6.25 mg/kg, mientras que a la dosis de 12.5 mg/kg muestra ya un efecto sedante y no ansiolítico. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de actividad locomotriz, que muestra que a la dosis de 12.5 mg/kg de peso, el EHRM produce un efecto depresor modificando significativamente la actividad locomotriz de los sujetos de prueba.

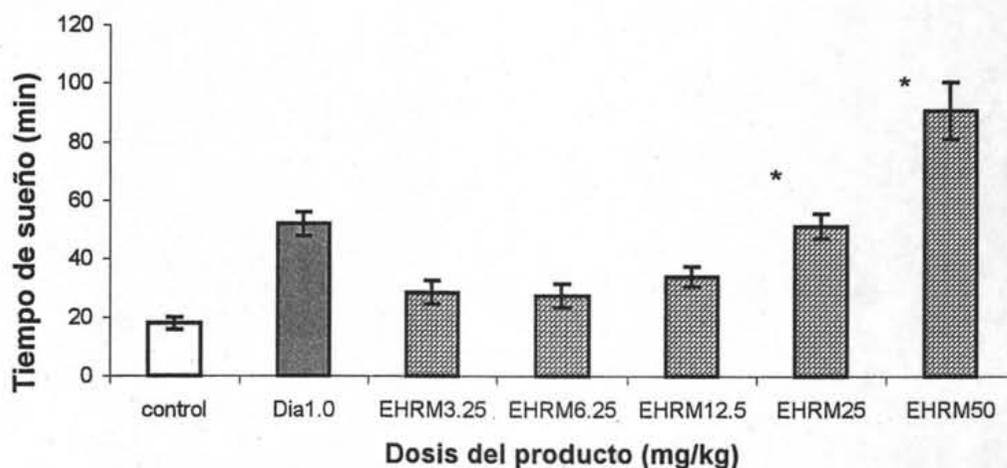
Fig. 11 Efecto del EHRM en la conducta exploratoria



Tratamiento	Dosis (mg/kg) ip	Número de transiciones
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464
	1.0	34.750 ± 3.797
	12.5	19.375 ± 4.288
<i>Rollinia mucosa</i>	0.0	17.333 ± 1.915
	1.60	25.800 ± 2.240*
	3.12	32.250 ± 3.081*
	6.25	28.50 ± 1.4529*
	12.5	19.375 ± 4.288

La actividad depresora del EHRM fue corroborada también con la prueba de potenciación de hipnosis inducida por PB en la cual los resultados obtenidos en el EHRM, muestran un patrón dosis dependiente. (Figura 12)

Fig. 12. Efecto de EHRM en la prueba de potenciación de hipnosis inducida con 42 mg/kg de PB.



Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación (min)	Tiempo de sueño (min)
Control		1.160 ± 0.0860	17.866 ± 2.002
Diazepam	1.0	0.977 ± 0.136	52.04 ± 4.003
<i>Rollinia mucosa</i>	3.25	2.2559 ± 0.508	28.524 ± 4.018 *
	6.25	1.722 ± 0.0918	27.459 ± 4.064*
	12.5	1.834 ± 0.0869	34.041 ± 3.317*
	25	1.574 ± 0.102	51.273 ± 4.242*
	50	1.631 ± 0.202	90.939 ± 9.612*

En cuanto a la prueba de la actividad convulsiva inducida por PTZ, los resultados muestran que no hay ningún efecto en el tiempo de aparición de las crisis, ni se presentó una reducción en el porcentaje de mortalidad a ninguna de las dosis probadas. Sin embargo, se observa que el EHRM produjo un aumento en la latencia de aparición de las crisis tónicas, estos resultados pueden deberse a que el EHRM tiene un efecto depresor del SNC como se observa en los resultados obtenidos en ambas pruebas de potenciación de hipnosis inducida por PB. El EHRM no elimina la toxicidad del PTZ, como se observa en la siguiente tabla lo cual se ve reflejado en el porcentaje de muerte, para probar lo anterior es necesario realizar pruebas de actividad convulsiva a dosis menores de PTZ o pruebas de epilepsia inducida por otros medios por ejemplo, la estimulación eléctrica sobre áreas específicas del cerebro.

inducida por otros medios por ejemplo, la estimulación eléctrica sobre áreas específicas del cerebro.

Efecto de EHRM sobre la actividad epiléptica inducida con PTZ

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Inicio de las convulsiones (min)	Latencia de crisis tónicas (min)	Muerte (%)
Control	0.0	0.799 ± 0.0963	1.735 ± 0.478	87.50
Diazepam	1.0	0.975 ± 0.136	-----	-----
<i>Rollinia mucosa</i>	6.5	1.169 ± 0.173	4.300 ± 0.670*	100
	12.5	1.596 ± 0.173	4.164 ± 0.928*	87
	25	2.036 ± 0.401	5.741 ± 1.587*	87
	50	1.564 ± 0.336	2.904 ± 0.446	87

Ya que el EHRM mostró un patrón similar al Diazepam en la prueba de la conducta exploratoria, se decidió corroborar sus efectos mediante experimentos de unión de receptores a BDZ *in vitro*. Los resultados confirmaron el efecto depresor de dicho extracto sobre el SNC.

En el experimento de unión a receptores a BDZ, se utilizaron dosis de 3.12, 6.25 y 12.5 mg/kg de EHRM, dosis a las cuales el extracto resultó efectivo en la prueba de ansiedad. La autorradiografía de receptores es un procedimiento experimental confiable para el estudio *in vitro* de los niveles de receptores, particularmente en tejidos complejos en los que la información de cambios en áreas anatómicas específicas es deseable. Así, por medio de un lavado adecuado de las preparaciones se evita la acción de ligandos endógenos, por lo que los cambios detectados se deben a alteraciones de los receptores *per se*.

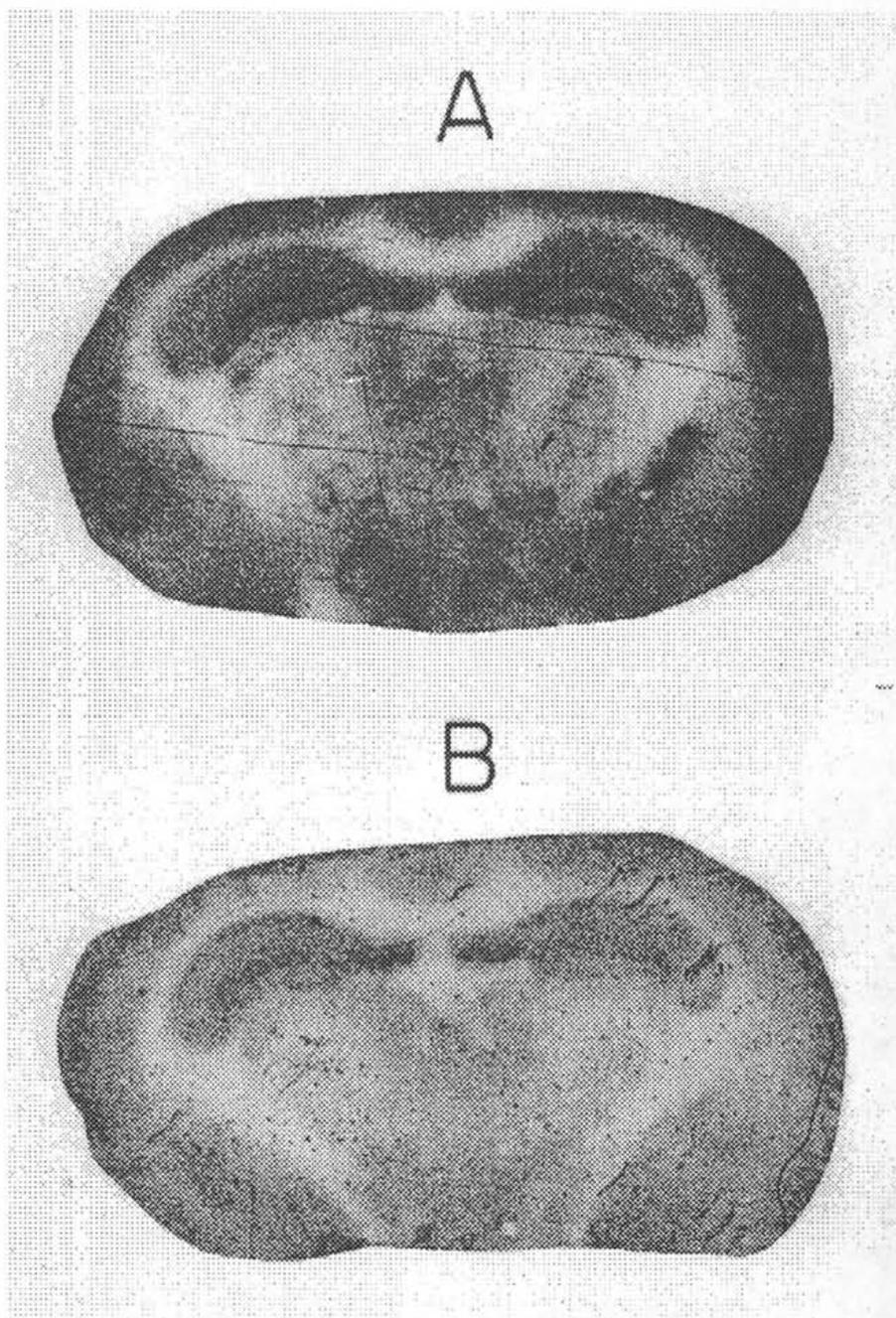
Los resultados observados en el estudio de unión a receptores de BDZ muestran que la administración del EHRM disminuye la unión a receptores de BDZ en estructuras límbicas y corteza temporal, áreas que participan en los procesos de ansiedad y depresión.

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con la administración crónica de Diazepam, un agonista de BDZ, cuya administración resulta también en una disminución de la unión a receptores a BDZ o en una facilitación indirecta de mecanismos GABAérgicos.

Así, los resultados muestran que hubo una disminución significativa de los niveles de flunitrazepam tritiado en áreas específicas de la corteza cerebral, dependiendo de la dosis administrada, como se observa en la Fig. 13.

Figura 13

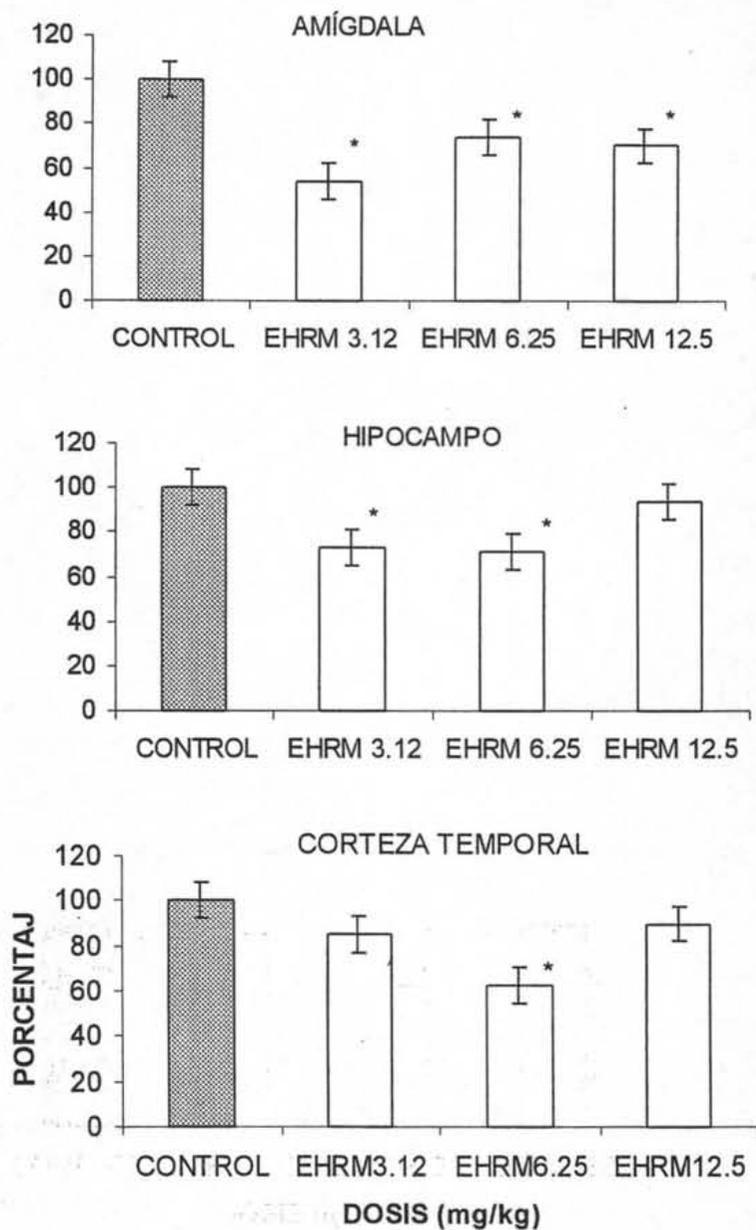
Distribución de los sitios de unión de los receptores a BDZ marcados con ^3H -flunitrazepam en cortes coronales de cerebro de ratón.



Las zonas claras indican la unión del ligando marcado y las zonas oscuras indican la ausencia de la unión del ligando marcado (A = control y B = tratamiento con EHRM).

Los animales administrados con una dosis de 3.12 mg/kg presentaron un decremento en amígdala (46%) y en hipocampo (27%), a la dosis de 6.25 se produjo también una reducción en amígdala (26%), en hipocampo (29%) y en corteza temporal (36%), finalmente los animales que recibieron 12.5 mg/kg mostraron un decremento de unión BDZ sólo en amígdala (30%), mientras que en otras regiones evaluadas no se observó diferencia con respecto al control, como se observa en la Fig. 14.

Figura 14 Porcentaje promedio de unión a receptores a BDZ del EHRM.



Estos resultados son importantes ya que demuestran el EHRM interactúa con áreas específicas del cerebro como son la amígdala y el hipocampo, estructuras del sistema límbico, involucradas en la regulación de las emociones, la ansiedad y la depresión. El decremento de unión tanto en amígdala como en hipocampo puede ser explicado mediante diferentes mecanismos. Una explicación es que el EHRM al igual que Diazepam puede

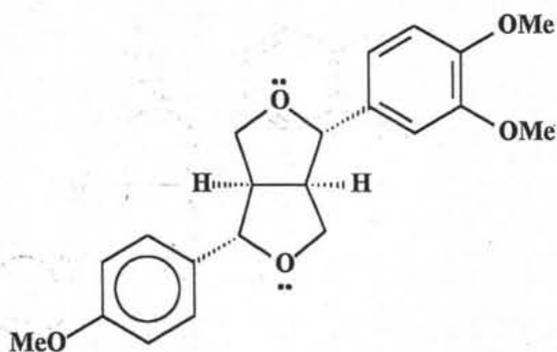
actuar como un agonista de BDZ y su administración resulta en una disminución de la unión a BDZ o por una facilitación indirecta de los mecanismos GABAérgicos.

En cuanto a la composición química, la separación del extracto hexánico de *Rollinia mucosa* permitió que:

De las fracciones eluidas con AcOEt/hexano (8:3) se aislara un producto blanco amorfo (1) con un pf de 128 – 130 °C y que mostró en el espectro de masas de alta resolución un ion molecular a 356.1642, m/z para una fórmula mínima de C₂₁H₂₄O₅ y fragmentos de m/z 165 y 151 que fueron asignados a la presencia de un grupo veratrilo, mientras que los picos a m/z 135 y 121 se atribuyeron a la formación de un grupo p-metoxibenzaldehído.⁷¹ La presencia de los dos grupos aromáticos se confirmó por RMN ¹H y ¹³C.

Lo anterior y la presencia en el espectro de RMN ¹H de señales para ocho protones alifáticos cuyos desplazamientos y multiplicidad son consistentes (δ = 2.91, 3.32, 3.85, 4.13, 4.46 y 4.87 ppm) con un 2,6-diaril-3,7-dioxabicyclo[3,3,0]octano condujeron a una estructura de lignano furofuránico para este producto.

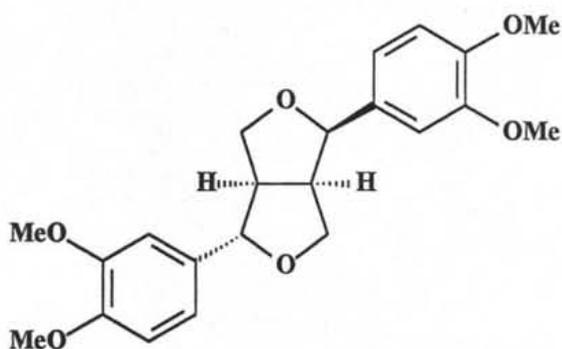
Una posibilidad estructural para este producto sería la asignada para la membrina. (4)



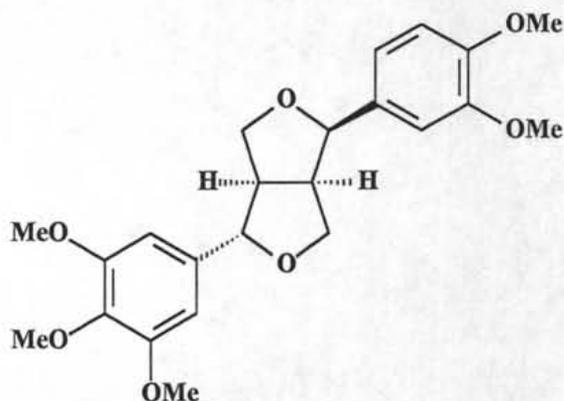
4

Sin embargo, existen notorias discrepancias en los desplazamientos observados en el espectro de RMN ¹H y ¹³C entre la membrina y el producto aislado de *R. mucosa* indicando

que la diferencia entre estos productos podría deberse a las diferentes orientaciones de los grupos arilo. A partir de la comparación de los desplazamientos químicos de los ocho protones alifáticos en el espectro de resonancia protónica, con aquellos para (+)-epieudesmina (2) y (+)-epimagnolina (3), las orientaciones de los arilos para el producto aislado se propusieron del tipo como se muestra en las figuras 2 y 3.



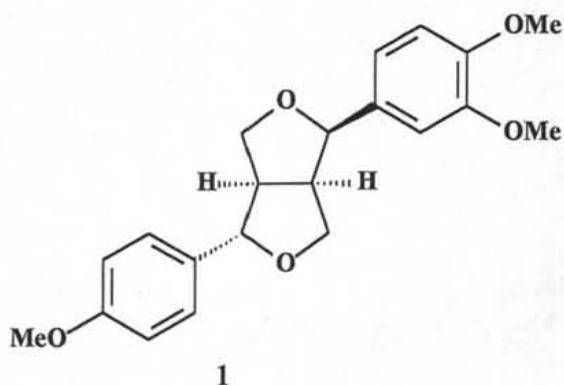
2



3

Esta propuesta se confirmó por el espectro de RMN ^{13}C del producto 1, ya que los desplazamientos químicos de las señales asignadas a los seis átomos de carbono alifáticos fueron casi idénticos a los asignados a la (+)-epieudesmina y (+)-epimagnolina. La rotación óptica de 1 resultó ser positiva.

Por lo tanto se propone la estructura (2R,6S)-2-(3,4-dimetoxifenil)-6-(4-metoxifenil)-3,7-dioxabicyclo[3,3,0]octano, para el producto 1.

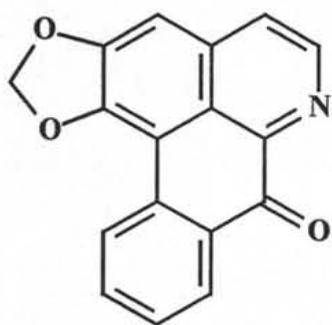


A partir de éste extracto se aisló también (+)-epieudesmina (2) y (+)-epimagnolina A (3), así como palmitona y una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.

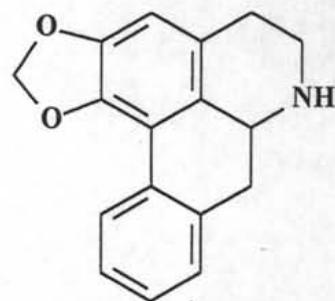
Extractos metanólicos:

El estudio de los extractos metanólicos fue dirigido hacia la obtención de los metabolitos de tipo alcaloide, ya que (dados los antecedentes) son metabolitos con potencial actividad biológica.

Los resultados observados en los experimentos con los extractos totales de alcaloides de *A. lutescens* y *R. mucosa* muestran como ambos extractos poseen un efecto ansiolítico sólo a una de las dosis (Figs. 15 y 16), lo cual no representa un efecto claro de los extractos. Sin embargo, este efecto se presentó en la misma dosis en ambos extractos por lo que se continuó la evaluación en este modelo de los productos puros, aislados en suficiente cantidad. En cuanto al extracto de alcaloides de *A. cherimolia*, la cantidad aislada no fue suficiente para realizar ninguna prueba de actividad. A partir de los tres extractos de alcaloides estudiados se logró aislar e identificar liriodenina (5) y anonaina (6), el primero es un alcaloide de tipo oxoaporfina y anonaina es un alcaloide aporfínico, ambos alcaloides han sido descritos en diversas especies pertenecientes a la familia Annonaceae.

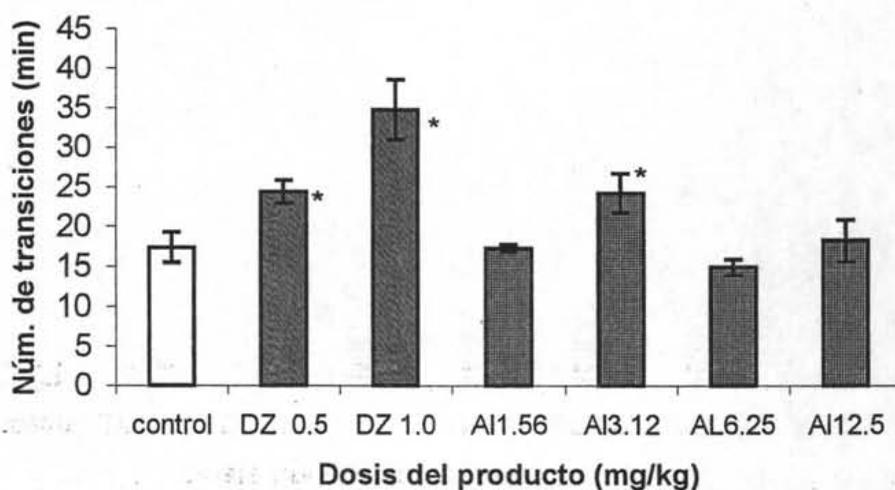


Liriodenina 5



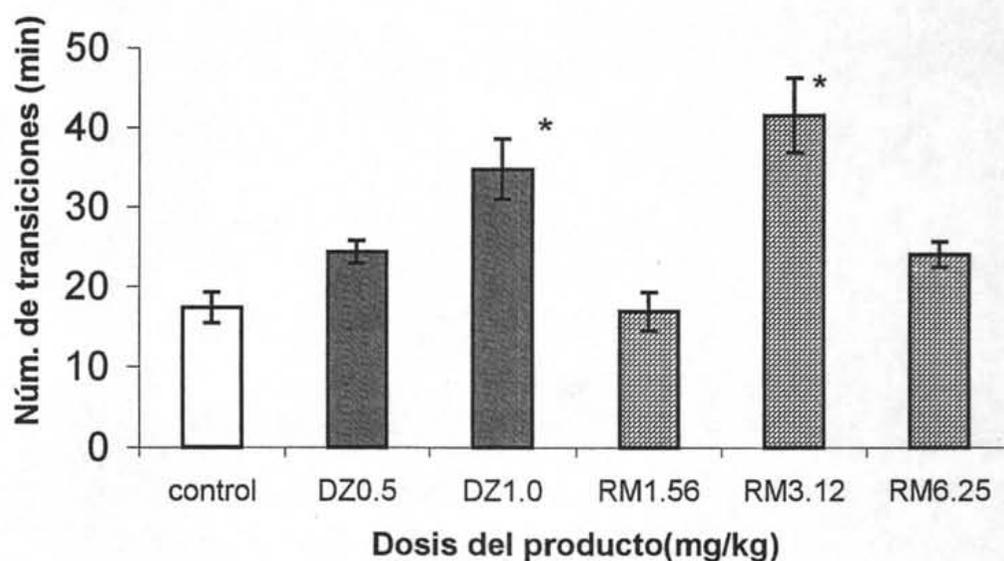
Anonaina 6

Fig. 15 Conducta exploratoria de alcaloides totales de *A. lutescens*.



Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Núm. de transiciones
Control	0.0	17.33 ± 1.915
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464
	1.0	34.750 ± 3.797
<i>A. lutescens</i>	0.0	17.33 ± 1.915
	1.56	17.200 ± 0.490
	3.12	24.222 ± 2.504*
	6.25	14.889 ± 0.949
	12.5	18.22 ± 2.655

Fig. 16 Conducta exploratoria de alcaloides totales de *Rollinia mucosa*.



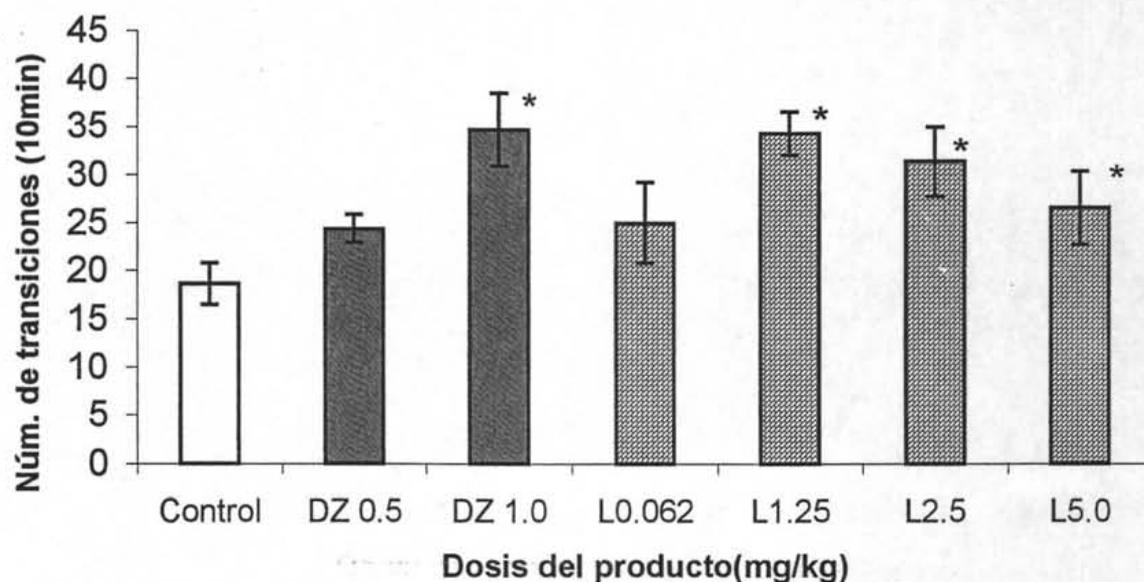
Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Núm. de transiciones
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464
	1.0	34.750 ± 3.797
<i>Rollinia mucosa</i>	0.0	18.667 ± 2.380
	1.56	16.800 ± 2.380
	3.12	41.556 ± 4.688*
	6.25	24.00 ± 1.606*

Liriodenina fue el único alcaloide aislado en cantidad suficiente, que permitió la realización de la prueba de ansiedad.

Como se observa en la Fig. 17, liriodenina mostró un aumento en el número de transiciones de un compartimiento a otro, siendo significativo a las dosis de 1.25 y 2.5 mg/kg. A estas dosis no se alteró la actividad locomotriz de los animales de prueba, lo cual es interpretado como un efecto ansiolítico. Se ha descrito en estudios *in vitro*, que liriodenina es un

agonista a los receptores serotoninérgicos, los cuales están implicados en los procesos de ansiedad, lo anterior podría explicar los efectos observados para liriodenina en los ensayos conductuales realizados.

Fig. 17 Actividad exploratoria de liriodenina



Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Núm. de transiciones
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464
	1.0	34.750 ± 3.797
liriodenina	0.0	18.600 ± 2.130
	0.625	25.00 ± 4.208*
	1.25	32.400 ± 2.286*
	2.50	31.429 ± 3.644*
	5.0	26.556 ± 3.848

Finalmente en las Tablas 9 a la 16 se presentan en conjunto los resultados de los diferentes ensayos para las tres especies evaluadas.

Tabla 9

Efecto de los extractos hexánicos de hojas de *Annona chirimolia*, *A. lutescens* y *Rollinia mucosa* en la prueba de **conducta exploratoria**

Tratamiento	Dosis (mg/kg) ip	Media de número de transiciones
Control	0.0	17.33 ± 1.915
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464
	1.0	34.750 ± 3.797
<i>A. cherimolia</i>	0.0	17.33 ± 1.915
	1.60	23.50 ± 2.399
	3.12	40.40 ± 6.738*
	6.25	44.40 ± 3.052*
<i>A. lutescens</i>	0.0	17.867 ± 1.195
	6.25	17.800 ± 5.200
	12.5	23.750 ± 2.403
	25.0	18.00 ± 2.535
	50.0	19.250 ± 1.461
	75.0	22.250 ± 2.576
	100.0	21.250 ± 3.442
<i>Rollinia mucosa</i>	0.0	17.333 ± 1.915
	1.60	25.800 ± 2.240*
	3.12	32.250 ± 3.081*
	6.25	28.50 ± 1.4529*
	12.5	19.375 ± 4.288

P* < 0.05

Tabla 10

Efecto de los extractos de alcaloides totales de *A. lutescens*, *Rollinia mucosa* y liriodenina en la prueba de conducta exploratoria

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Núm. de transiciones
Control	0.0	17.33 ± 1.915
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464
	1.0	34.750 ± 3.797
<i>A. lutescens</i>	0.0	17.33 ± 1.915
	1.56	17.200 ± 0.490
	3.12	24.222 ± 2.504*
	6.25	14.889 ± 0.949
	12.5	18.22 ± 2.655
<i>Rollinia mucosa</i>	0.0	18.667 ± 2.380
	1.56	16.800 ± 2.380
	3.12	41.556 ± 4.688*
	6.25	24.00 ± 1.606*
liriodenina	0.0	18.600 ± 2.130
	0.625	25.00 ± 4.208*
	1.25	32.400 ± 2.286*
	2.50	31.429 ± 3.644*
	5.0	26.556 ± 3.848

P* < 0.05

Tabla 11

Efecto de los extractos hexánicos de las hojas de *Annona chirimolia*, *A.*

***lutescens* y *Rollinia mucosa* sobre la actividad locomotriz.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg), ip	Actividad motriz (cuentas/10min)
Control	0.0	82.00 ± 9.422
Diazepam	0.5	103 ± 13.260*
	1.0	74.125 ± 6.489*
<i>A. cherimolia</i>	0.0	82.00 ± 9.422
	1.60	107.90 ± 7.861
	3.12	66.80 ± 9.825
	6.25	79.30 ± 6.915
	12.50	62.80 ± 9.862
<i>A. lutescens</i>	0.0	82.667 ± 9.459
	6.25	73.00 ± 8.405
	12.5	90.375 ± 14.014
	25.0	72.875 ± 9.078
	50	80.000 ± 5.516
	75	74.250 ± 6.241
	100	60.250 ± 5.338
<i>Rollinia mucosa</i>	0.0	82.00 ± 9.422
	1.60	68.300 ± 7.173
	3.12	86.400 ± 5.814
	6.25	81.500 ± 9.582
	12.5	36.500 ± 6.284*

P* < 0.05

Tabla 12

Efecto de los extractos de alcaloides totales de *Annona lutescens*, *Rollinia mucosa* y liriodenina, sobre la actividad locomotriz.

Tratamiento	Dosis (mg/kg), ip	Actividad locomotriz (cuentas/10 min)
Control	0.0	82.00 ± 9.422
Diazepam	0.5	103 ± 13.260
	1.0	74.125 ± 26.489
<i>A. lutescens</i>	0.0	82.00 ± 9.422
	3.12	52.70 ± 10.478
	6.25	69.50 ± 6.969
	12.5	48.30 ± 11.424
<i>Rollinia mucosa</i>	0.0	82.000 ± 9.422
	1.56	75.800 ± 9.093
	3.12	65.889 ± 16.665
	6.25	86.700 ± 7.573
Liriodenina	0.0	82.000 ± 9.422
	0.62	86.200 ± 14.363
	1.25	90.200 ± 7.828
	2.50	77.571 ± 7.705
	5.0	88.900 ± 14.606

P* < 0.05

Tabla 13

Efecto de los extractos hexánicos de las hojas de *A. cherimolia*, *A. lutescens* y *R. mucosa* en la prueba de potenciación de hipnosis inducida por PB (42 mg/kg)

tratamiento	Dosis (mg/kg), ip	Latencia de sedación (min)	Tiempo de sueño (min)
vehículo		1.160 ± 0.0860	17.866 ± 2.002
Diazepam	1.0	0.978 ± 0.136	52.04 ± 4.003
<i>Annona cherimolia</i>	3.1	1.494 ± 0.0738	10.087 ± 0.813
	6.25	1.846 ± 0.130	19.461 ± 1.275
	12.5	2.604 ± 0.370	19.525 ± 4.867
	25	1.941 ± 0.176	16.175 ± 3.298
	50	1.170 ± 0.164	37.060 ± 4.654*
	100	1.063 ± 0.116	48.037 ± 5.616*
<i>Annona lutescens</i>	25	1.76 ± 0.140	10.926 ± 1.749
	50	1.50 ± 0.150	19.73 ± 2.20
	100	1.39 ± 0.154	23.99 ± 3.209*
	310	1.25 ± 0.083	77.73 ± 5.1996*
<i>Rollinia mucosa</i>	3.25	2.2559 ± 0.508	28.524 ± 4.018 *
	6.25	1.722 ± 0.0918	27.459 ± 4.064*
	12.5	1.834 ± 0.0869	34.041 ± 3.317*
	25	1.574 ± 0.102	51.273 ± 4.242*
	50	1.631 ± 0.202	90.939 ± 9.612*

P* < 0.05

Tabla 14

Efecto de los extractos hexánicos de las hojas de *A. cherimolia*, *A. lutescens* y *R.*

***mucosa* en la prueba de potenciación de hipnosis inducida por 30 mg/kg de PB.**

tratamiento	Dosis (mg/kg), ip	Latencia de sedación (min)	Tiempo de sueño (min)
vehículo		2.779 ± 0.22	0.0
Diazepam	1.0	1.75 ± 0.089	9.06 ± 1.095*
<i>A. cherimolia</i>	50	1.222 ± 0.11	17.95 ± 2.14*
	100	1.427 ± 0.104	33.81 ± 3.977*
<i>A. lutescens</i>	100	1.333 ± 0.333	0.0
	310	2.00 ± 0.253	0.0
<i>R. mucosa</i>	no se realizó		

P* < 0.05

Tabla 15

Efecto de los extractos hexánicos de *A. cherimolia*, *A. lutescens* y *R. mucosa* sobre el efecto epiléptico inducido por 90 mg/kg de PTZ.

tratamiento	Dosis (mg/kg), ip	Latencia de crisis (min)	Latencia de crisis tónicas (min)	Mortalidad (%)
Control	0.0	0.799 ± 0.0963	1.735 ± 0.478	87.50
Diazepam	1.0	0.975 ± 0.136	sc	-----
<i>A. cherimolia</i>	25	1.872 ± 0.2157	6.842 ± 0.877	71.42
	50	1.098 ± 0.380	4.572 ± 3.363	28.57*
	100	0.995 ± 0.044	14.515 ± 1.403	28.57*
<i>A. lutescens</i>	25	0.657 ± 0.077	4.417 ± 0.684*	100
	50	1.2595 ± 0.464	5.178 ± 0.6946*	72.72
	100	0.831 ± 0.136	4.56 ± 0.700*	100
<i>Rollinia mucosa</i>	6.5	1.169 ± 0.173	4.300 ± 0.670	100
	12.5	1.596 ± 0.173	4.164 ± 0.928	87
	25	2.036 ± 0.401	5.741 ± 1.587	87
	50	1.564 ± 0.336	2.904 ± 0.446	87

sc = sin crisis, P* < 0.05

Tabla 16

Efecto producido por la administración del extracto hexánico de *Rollinia mucosa*, sobre receptores a BDZ, en algunas regiones de cerebro de ratón, evaluadas por autorradiografía.

DOSIS (mg/kg), ip	0.0	3.12	6.25	12.5
ESTRUCTURA	fmoles/mg de tejido			
Corteza frontal	407 ± 22	378 ± 64	471 ± 47	454 ± 40
Corteza temporal	463 ± 56	395 ± 33	296 ± 30*	418 ± 26
Corteza entorrinal	402 ± 50	405 ± 36	370 ± 74	496 ± 76
Caudado putamen	129 ± 11	142 ± 43	140 ± 14	129 ± 11
Amígdala	441 ± 36	234 ± 38*	326 ± 35*	308 ± 32*
Hipocampo	504 ± 16	365 ± 35*	358 ± 40*	474 ± 45
Tálamo	168 ± 28	91 ± 20	80 ± 21	94 ± 14

P* < 0.05

6.0 CONCLUSIONES

Se realizó el estudio químico de los extractos hexánicos y de alcaloides de las hojas de tres especies de la familia *Annonaceae*, dos de ellas pertenecientes al género *Annona* (*A. cherimolia* y *A. lutescens*) y una del género *Rollinia* (*R. mucosa*).

El extracto hexánico de *A. cherimolia* posee un efecto ansiolítico dependiente de la dosis, sin modificar la actividad locomotriz de los animales de prueba además, reduce de forma importante la aparición de crisis tónicas inducidas con PTZ y a dosis mayores a las cuales ejerce éstos efectos, produce un efecto sedante, este patrón de actividad es similar a los efectos producidos por Diazepam, un fármaco utilizado en la clínica como ansiolítico y antiepiléptico. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar el mecanismo de acción de este extracto, así como para determinar cuál o cuales son sus principios activos.

El extracto hexánico de *A. lutescens* no mostró un efecto central.

En cuanto al extracto hexánico de *R. mucosa*, éste posee un efecto ansiolítico a dosis bajas y un efecto sedante a dosis mayores, los efectos centrales producidos por el extracto hexánico de *R. mucosa* se corroboraron mediante un experimento *in vitro* de unión a receptores, en el cual, el extracto mostró afinidad por receptores a BDZ en estructuras implicadas en los procesos de ansiedad.

Del extracto hexánico de *Rollinia mucosa* se aislaron e identificaron cuatro metabolitos de tipo lignano; epimagnolina, epiudesmina, membrina y epimembrina, este último no descrito en la literatura.

Se aislaron e identificaron liriodenina, un alcaloide de tipo oxoaporfina y anonaina de tipo aporfina a partir de las tres especies estudiadas. Liriodenina mostró un efecto ansiolítico.

APÉNDICE

Reveladores

Revelador Dragendorff para identificación de alcaloides

Solución A: 0.85 g de nitrato de bismuto, 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua destilada.

Solución B. 8.8 g de yoduro de potasio y 20 ml de agua destilada

Se mezclan las soluciones A y B.

Revelador de Mayer para identificación de alcaloides

A 1.355 g de nitrato de bismuto y 5.0 g de yoduro de potasio se les adiciona agua destilada hasta un volumen de 100 ml.

Reactivo de Kenddle para identificación de acetogeninas

Solución A: 1% de ácido 2, 4 dinitrobenzoico en una solución 0.5 N de metanol-agua

Solución B. 0.7 g de hidróxido de potasio en 25 ml de metanol

Se aplica la solución A sobre la cromatoplaca, se deja secar, se aplica la solución B y se

revela la cromatoplaca.

7.0 BIBLIOGRAFÍA

¹ Cott, J. (1995) Natural product formulations available in Europe for Psychotropic indications. *Psychopharmacology Bull.* 31, 4, 745-751.

² Tortoriello J. y Romero, O. (1992) Plants used by Mexican traditional medicine with presumable sedative properties: An ethnobotanical approach. *Archives of Medical Research.* 23, 111-116.

³ Gupta, M. P. (1995) En: Gupta, M. P. (ed) *270 Plantas medicinales Iberoamericanas*, pp 26-27.

⁴ Mahiou, V. Roblot, F. y Hocquemiller (1994) Alkaloids from *Annonaceae* *J. Nat. Prod.* 57, 890-895.

⁵ Martínez, M. *Las Plantas Medicinales de México*. Ediciones Botas, México, 1990.

⁶ Aguilar, A., Chino, S., Camacho, J. R., Jáquez, P. y López, M. E. (1994) Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. pp 202.

⁷ Registro de especies del género *Annona* para el estado de Chiapas, Flora de Mesoamérica, Herbario Nacional de México, MEXU, 1991.

⁸ González-Esquinca A. R., (1996) *Revista Investigación de Ciencias y Artes de Chiapas UNICACH* 1, 2, 1-9.

⁹ Chang, F. R., Chen, K. S., Ko, F. N., Teng, C. M. y Wu, Y. C. (1995) *Chinese Pharm. J.*, 47, 483-491.

¹⁰ Chulia, S., Cavé, M.D. Cortés, D., Noguera M.A. y D'Ocón M.P. (1995) Relaxant activity of three aporphine alkaloids from *Annona cherimolia* on isolated aorta of rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 47, 647-650.

-
- ¹¹ Chuliá, S. , Noguera, M.A, Ivorra, M.D., Cortés, D. y .D'Ocón M.P (1995) Vasodilator effects of liriodenine and norushinsunine, two aporphine alkaloids isolated from *A. cherimolia*, in rat aorta. *Pharmacology* 50: 380-387.
- ¹² Hasrat, J. A., Pieters, L. y DeBacker, J. P. (1997) Screening of medical plants from Suriname for 5HT_{1A} ligands: Bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata* *J. of Phytomedicine* 4, 133-140.
- ¹³ Hasrat, J. A., De Bruyne, T., DeBacker, J. P., Vauquelin, G. y Vlietinck, A. J. (1997) Isoquinoline derivatives isolated from the fruits of *Annona muricata* as 5-Htergic, 5-HT_{1A} receptors agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. *J. of Pharmacy and Pharmacology*, 49, 1145-1149.
- ¹⁴ Lebouf, M. A., Cavé A., Bhaumik P. K., Mukherjee B. y Murkhrjee R. (1982) The Phytochemistry of *Annonaceae*. *Phytochemistry* 21, 12, 2783-2813.
- ¹⁵ Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. Paul M Dewick , John Wiley & Sons, USA, 295-301,1997.
- ¹⁶ Zafra-Polo, M. C., González, M. C., Sahpaz, S. y Cortes, D. (1996) Acetogenins from *Annonaceae*, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*, 42, 2, 253-271.
- ¹⁷ Osborne R. y Stevens J F. (1996) Epicuticular waxes and glaucousness of *encephalartos* leaves. *Phytochemistry*, 42, 5, 1335-1339.
- ¹⁸ Martínez-Vázquez M. Anonáceas, II Congreso Internacional de Anonáceas, 9-13, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 1999.
- ¹⁹ Yoshiaki S., Chihiro H., Keiko T. y Tamostsu, F. (1998) Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalool. *Analytical Chimica Acta*. 365, 293-299.

²⁰ Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Masakazu Ogata, Xiao Yang Mou, Harukuni Tokuda, Hoyoku Nishino y Hiroshi Furukawa (2001) Lignans as anti-tumor-promoter from the seed of *Hernandia ovigera*. *Planta Medica* 67, 166-1168.

²¹ Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología. Brailowsky, S. Colección: La Ciencia para todos/130. México. Fondo de Cultura Económica, SEP, pp 223-243, 1998.

²² Navarro.Ruíz, A. De la Mora, G.P., Villanueva-Michel M.T. Domínguez-Rodríguez J. R. , Bastidas-Ramírez, B. F., Quezada-Arellano, J.D. y Ruíz-Madrigal B. (1996) Anticonvulsant effect of aqueous hydroalcohol and chloroforms extracts from *Ipomea stans* root in the rat. *Phytotherapy reserch*. 10, 242.244.

²³ De la Cruz, N (1964). Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis. Manuscrito Azteca de 1552 según traducción latina de Juan Badiana. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F.

²⁴ Epilepsia, Aspectos neurológicos, médicos y sociales. Alfredo Feria Velasco, Dalila Martínez de Muñoz y Francisco Rubio Donnadiou Ediciones del Instituto de Neurología y Neurocirugía Departamento de Publicaciones Científicas con la colaboración del programa de investigación en salud de la UNAM, 1997.

²⁵ Rosembaun, J.F. (1982) The drug treatment of anxiety. *N. Engl. J. Med.* 306, 401-404.

²⁶ Tallman J., Paul S., Skolnick, P. y Gallager, D. (1980) Gabaergic modulation of benzidiazepines binding site sensitivity. *Nature* 274, 383-385.

²⁷ Panksepp, J. The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animal models in understading human anxiety. En: *The Neurobiology of anxiety* (Burrows, G. D., Roth, S.M. y Noyes, R, eds.), pp 3-58.Elsevier, Amsterdam 1990.

-
- ²⁸ Juan F. Rodríguez –Landa y Carlos M. Contreras. (1998). Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos de ansiedad. *Rev. Biomed.* 9: 181-191.
- ²⁹ Rodríguez-Landa, J. F. y Contreras C. M. (1998) Algunos datos recientes sobre la fisiología de los trastornos por ansiedad. *Rev. Biomed.* 9, 181-191.
- ³⁰ Treit, D. (1985) Animals models for the study of antianxiety agents: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 203-222.
- ³¹ Behavioral Pharmacology. Iversen, S.D. e Iversen, L.L. Oxford University Press, Nueva York. 1981.
- ³² Psychopharmacology fourth generation of progress. Floyd E. Bloom y David J. Kuffer. An official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 1994.
- ³³ Manual Diagnostico y Estadístico de los Transtornos Mentales. American Psychiatric Association. Ed. Masson, S.A. Barcelona, España, 1997.
- ³⁴ Lal , H. y Emmett-Oglesby, M.W. (1983) Behavioral Analogues of Anxiety: Animal Models. *Neuropharmacology*, 22, 1423-1441.
- ³⁵ File, S.E. Testing new antianxiety agents: pharmacology and biochemistry. En: The Neurobiology of Anxiety (Burrows, G.D., Roth, S.M. y Noyes, R. Eds.), pp 141-164. Elsevier, Ámsterdam, 1990.
- ³⁶ Crawley, J. (1981) Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepinas. *Pharmacol Biochem Behav.* 15, 695.
- ³⁷ Scheberg L.C. y Graeff F.G. (1978) Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of the benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9, 287-295.
- ³⁸ Crawley J. y Goodwin FK. (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13: 167-170.

-
- ³⁹ File, S.E. y Hide, J.R.G. (1979) A test of anxiety that distinguishes between the action of benzodiazepinas and those of other minor tranquilizer and stimulants. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11, 65-69.
- ⁴⁰ Pellow, S. y File, S. E. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem. Behav.* 24, 525-529.
- ⁴¹ Treit, D. (1985) Animal models for the study of antianxiety agents: a review. *Neurosci. Biobehav. R.* 9, 203-222.
- ⁴² Crawley J. y Goodwin FK. (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13: 167-170.
- ⁴³ Fernández-Guasti, A. y López-Rubalcava, C. (1990) Evidence for the involvement of the 5-HT_{1A} receptor in the anxiolytic action of indorenate and ipsapirone. *Psychopharmacology*, 101, 354-358.
- ⁴⁴ Blumstein L K y Crawley J N. (1983) Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepinas. *Pharmacol Biochem Behav.* 18, 37-40.
- ⁴⁵ Crawley J. y Davis L. G. (1982) Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Res. Bull* 8: 609-612.
- ⁴⁶ López-Rubalcava C., Saldivar A. y Fernández-Guasti (1992) A Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharm. Biochem. Behav.* 43:433-440.
- ⁴⁷ Lawrence, D. y Grouse, N. D. (1982) Cellular Mechanisms of Benzodiazepines Action, *JAMA*, 247, 16, 2147-2151.

⁴⁸ Costa E., Guidotti A, Mao, C. C y Surdia A. (1975) New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines *Life Sciences* 17, 167-186.

⁴⁹ Haefely, W., Kulcsar, A., Moler, H., Pieri, L., Polc, P. y Schaffner, R. (1975) Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. En: Mechanism of actions of benzodiazepines (Costa, E. y Greengard, P. Eds), pp 131-151. Raven Press, Nueva York.

⁵⁰ Haefely, W. (1989) Pharmacology of the Benzodiazepines Receptors. *Eur Arch. Psychiat. Neurol. Sci.* 238, 294-301.

⁵¹ Majewska, M. (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38, 379-395.

⁵² Haefely, W. The GABA-benzodiazepine receptor complex and anxiety. En: Anxiety Psychological, Biological and Clinical Perspectives. Sartorius N., Andreoli V., Cassano G, Eisenberg L., Kielholz P., Pancheri P. y Racagni G. Ed. Hemisphere Publishing Corporation, pp23-26, New York. 1990.

⁵³ Tallman, J.F. Paul, S. Skolnik, P. y Gallager, D.W. (1980) Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines. *Science* 207, 274-281.

⁵⁴ Méndez, M. Lecriche, M y Calva J. C. (2001) Acute ethanol administration differentially modulates μ opioid receptors in the rat meso-accumbens and mesocortical pathway. *Brain Res. Mol Brain Res* 94 (1-2), 148-156.

⁵⁵ Still, S. H. (1978) Rapid Chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chem.* 8, 148.

⁵⁶ Coll, R. M. (1986) The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal Natural Products* 49, 934.

-
- ⁵⁷ Van den Dool H. y Kratz P.D. (1963) Generation of Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *Journal of Chromatography*. 11, 463-71.
- ⁵⁸ Macey M J K y Barber H N. (1970) Chemical genetics of wax formation on leaves of *pisum sativum*. *Phytochemistry*. 9, 5-12.
- ⁵⁹ Noriega, M. A., Oliveira, J. S., y Feraz, S. (1995) Nematicidal hydrocarbons from *mucuna aterrima*. *Phytochemistry*, 42, 4, 997-998.
- ⁶⁰ Hayashi, N. y Komae, H. (1971) Isolate and identification of palmitone from the leaves of *Lauraceae* plants (*Cinnamoum camphora* Sieb., *Neolitsea serica* Koidz., *Lindera umbrellata* Thunb.) *Jour. Indian Chem. Soc.*, 48, 3, 10.
- ⁶¹ Achenbach H. y Schwinn, A. (1995) Aporphinoid alkaloids and terpenoids from *piptostigma fugax*, *Phytochemistry*, 38, 4, 1037-1048.
- ⁶² Guinaudeau, H., Lebceuf, M. y Cavé, A. (1994) Aporphinoid alkaloids V. *Journal of Natural Products*. 57, 8, 1033-1135.
- ⁶³ Chibnall A C. (1981) *J. Biochem.* 31, 1937.
- ⁶⁴ Estrada-Reyes, R., Alvarez A L., A., López-Rubalcava, C., Rocha , L. , Heinze, G., Moreno, J. y Martínez-Vázquez, M. (2002) Lignans from leaves of *Rollinia mucosa* *Zeitschrift fur Naturforschung*. 57c, 29-32.
- ⁶⁵ Paulo, M. O., Kaplan, M. A. Laprévotte, O., Rublot, F., Hocquermiller, R y Cave, A. (1991) Lignans and other non-alkaloid constituents from *Rollinia mucosa*. *Fitoterapia*, 62, 150-152.
- ⁶⁶ Miyazawa M. Kasahara H. y Kameoka H. (1992) Phenolic Lignans from flower buds of *Magnolia fargesii*. *Phytochemistry*, 31, 3666-3668.

Miyazawa, M., Ishikawa, Y. Kasahara, H., Yamanaka H. y Kameoka H. (1994a) An insect growth inhibitory lignan from *Magnolia fargesii*. *Phytochemistry* 35,611-613.

⁶⁷ Chen, Y. Y., Frang-Rong, C. y Yang-Yang, W. (1996) Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. *Journal Nat. Prod.* 59, 580-584.

Saez J. (1993) *J. Nat. Prod.* 56, 351.

Paulo, M. Q., Kaplan, M. A. C., Lapr evote, O. Rublot, F., Hocquemiller, R. y Cave, A. (1991) Lignans and other non-alkaloidal constituents from *Rollinia mucosa*. *Fitoterapia*, 62, 150-162.

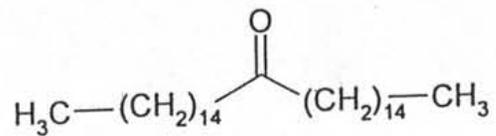
⁶⁸Olsen, R. W., Walmsley, J. K, Lee, R. J, y Lomas, P. (1986) Benzodiazepine/Barbiturate/GABA receptor-chloride ionophore complex in a genetic model for generalized epilepsy. *Adv Neurol*, 44, 365-378.

⁶⁹ Petty F. (1995) GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *J. Affective Disorders*, 34 (4), 275-281.

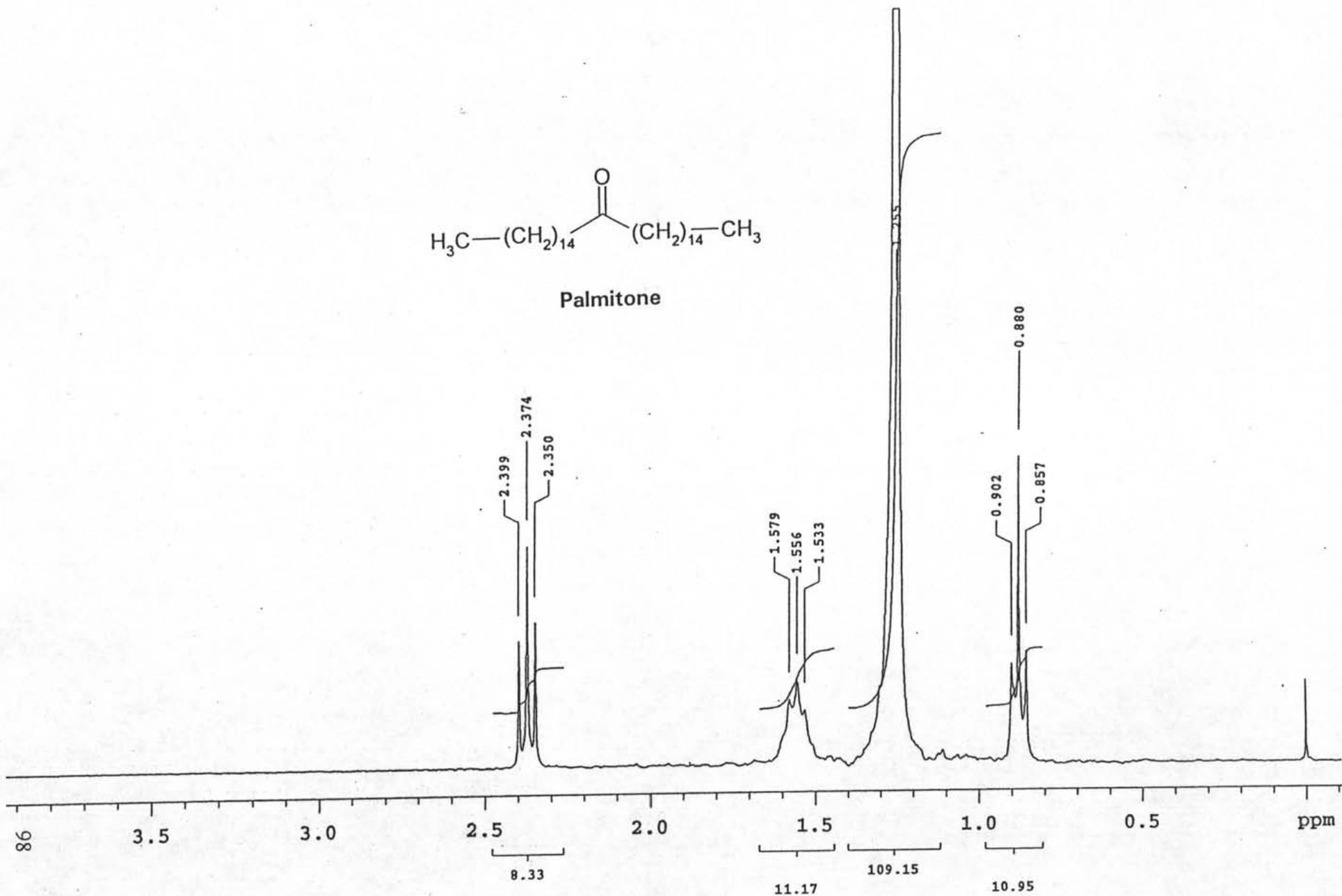
⁷⁰ G onzales-Trujano, M. E, Navarrete, A., Reyes, B., Hong, E. y Cedillo-Portugal, E. (2001) Anticonvulsant properties and bio-guided isolated of palmitone from leaves of *Annona diversifolia* *Planta Medica*, 67, 136-141.

⁷¹ Pelter, A., Ward, R. S., Rao, E. V. y Sastry, K. V. (1976) Revised structures for pluvaviatilol, methyl pluvaviatilol an xanthoxylol. *Tetrahedron*, 32, 2783-2788.

ESPECTROSCOPIA

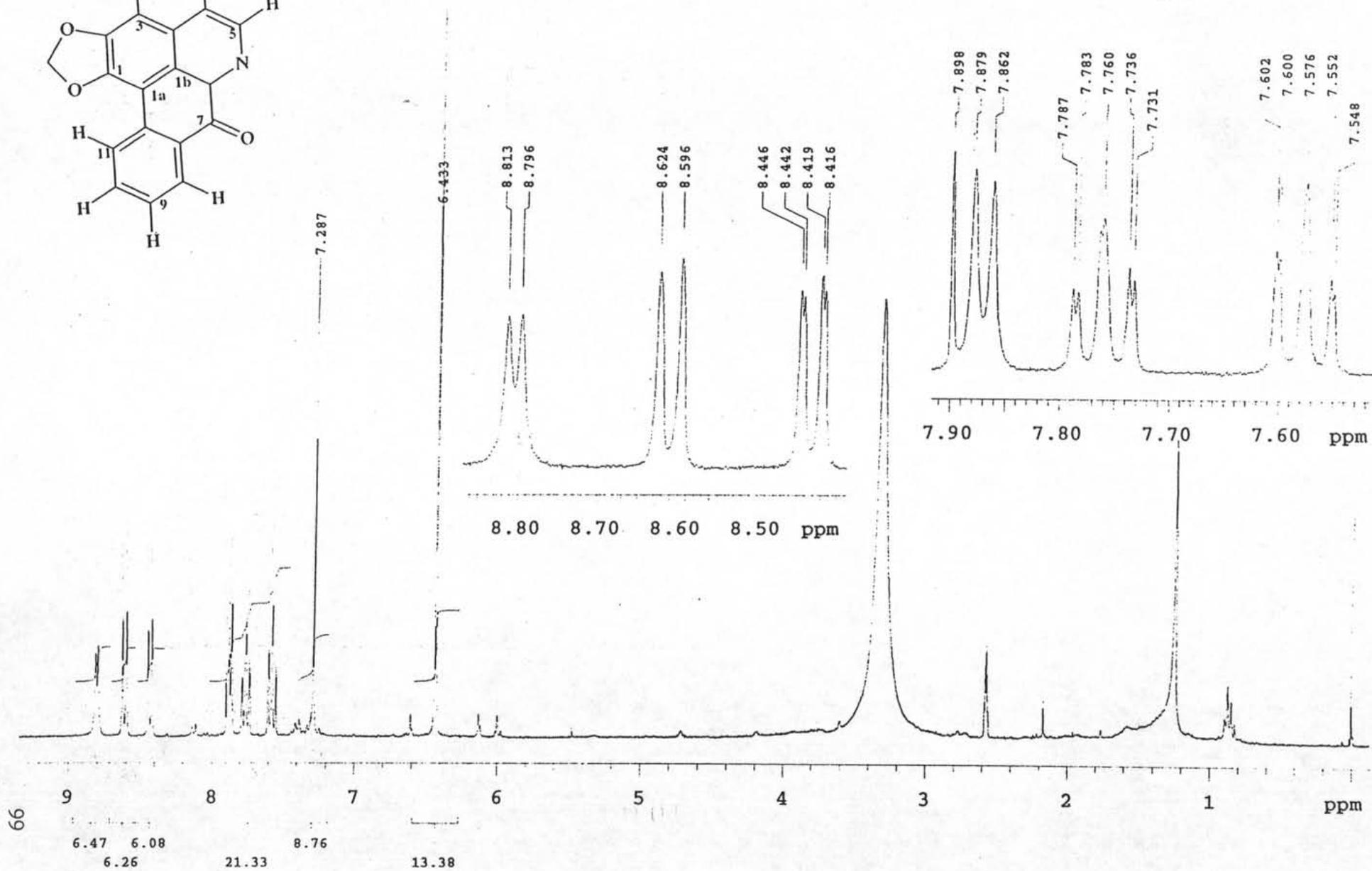
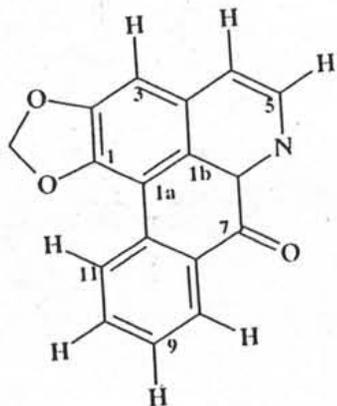


Palmitone



ESPECTRO No. 1

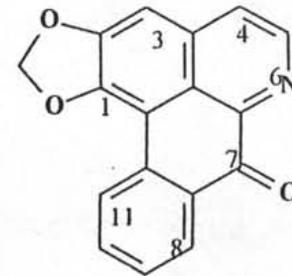
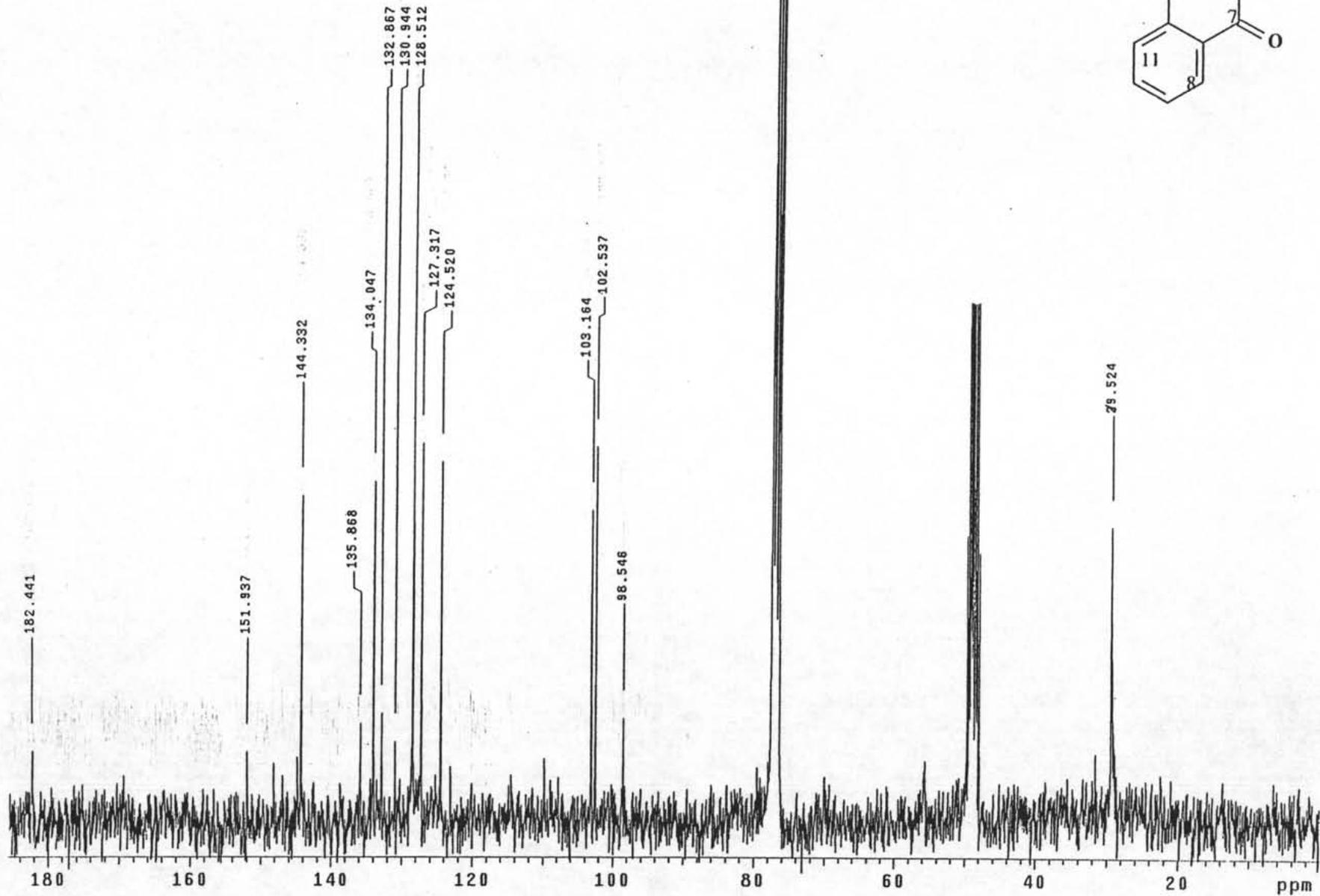
16-hentriacontanona



ESPECTRO No. 2

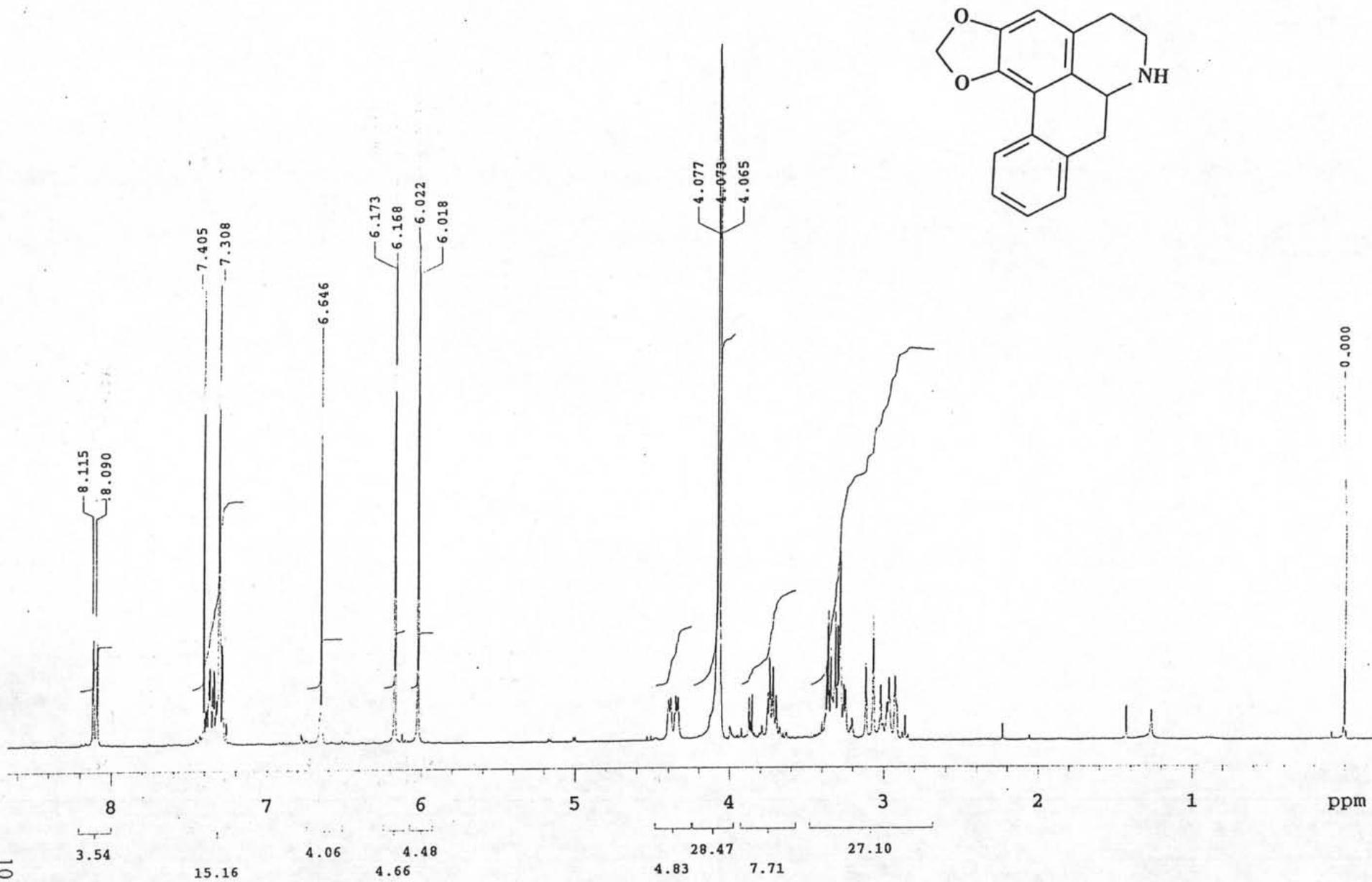
Liriodenina

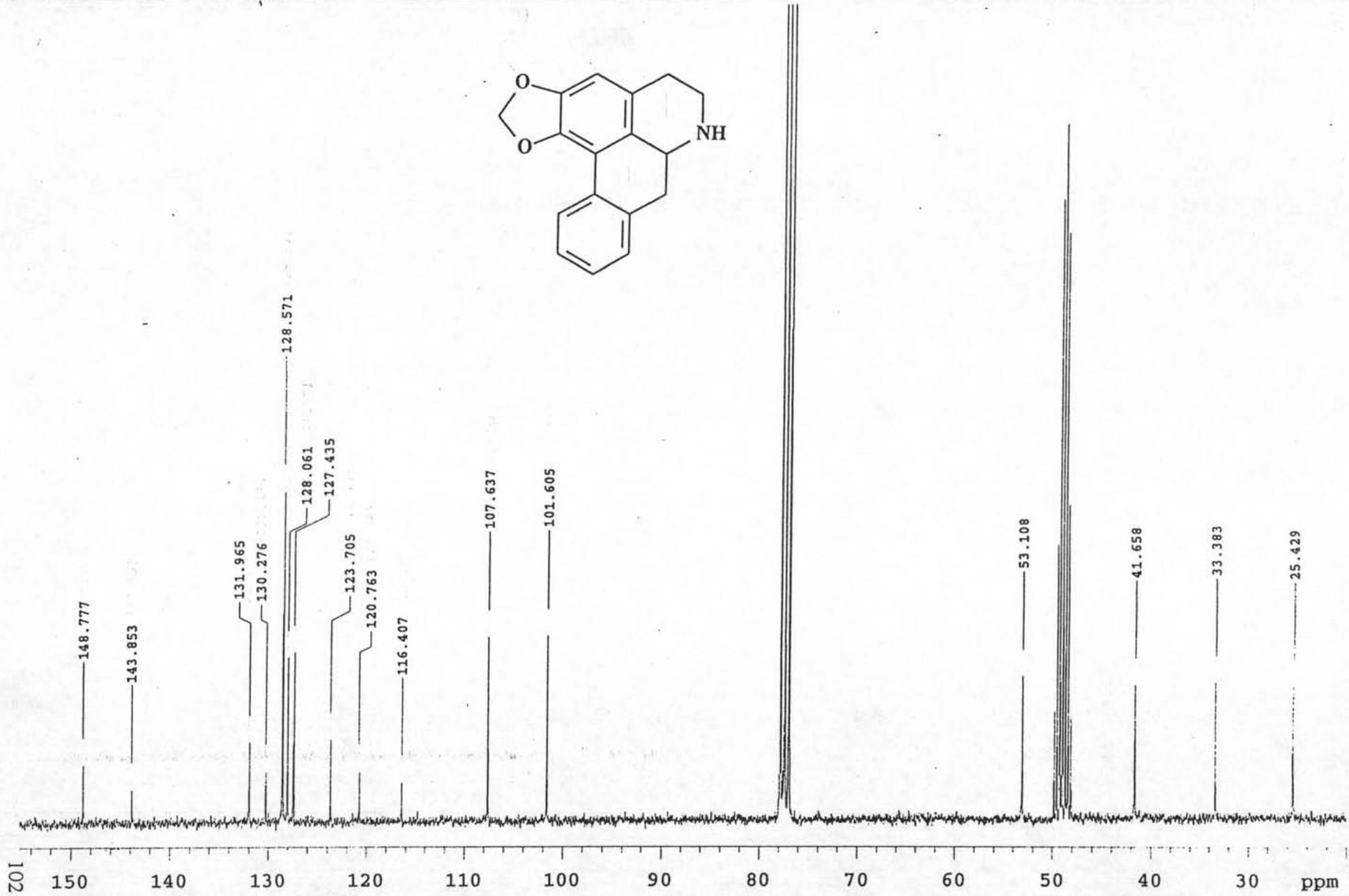
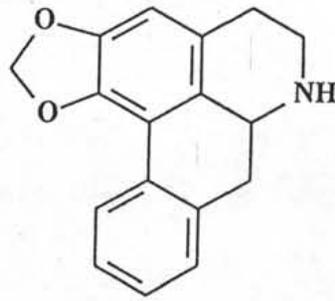
001



ESPECTRO No. 3

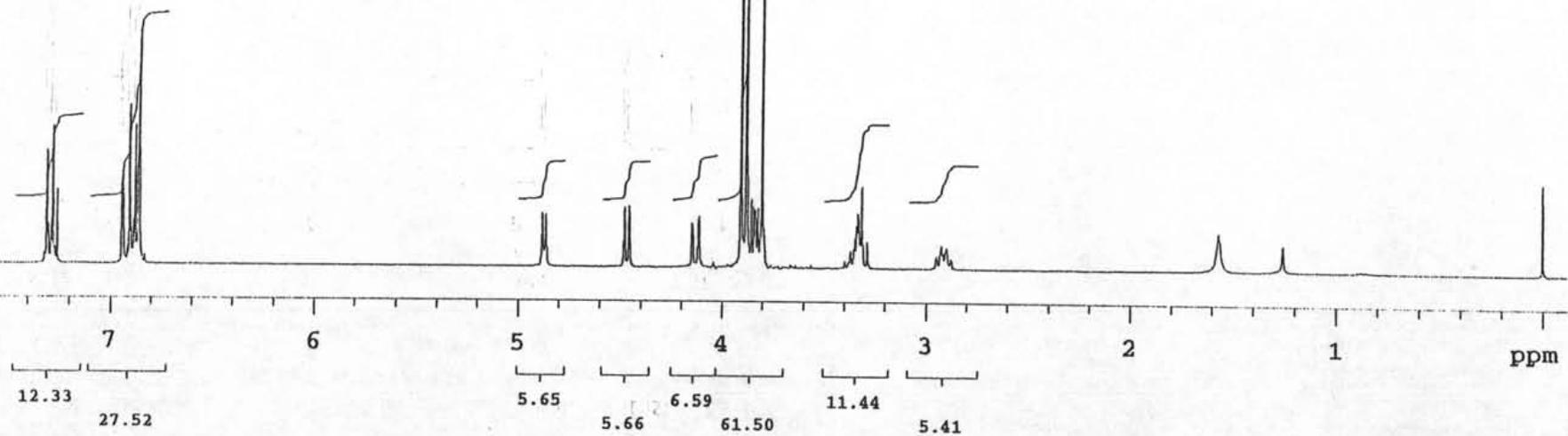
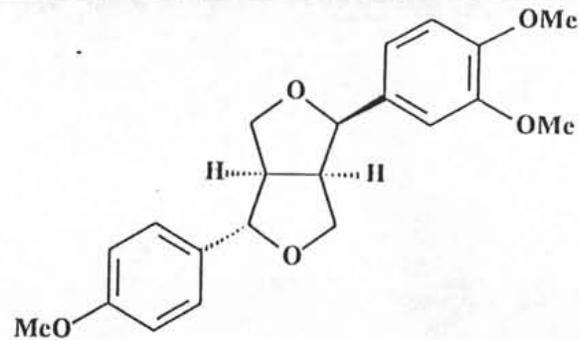
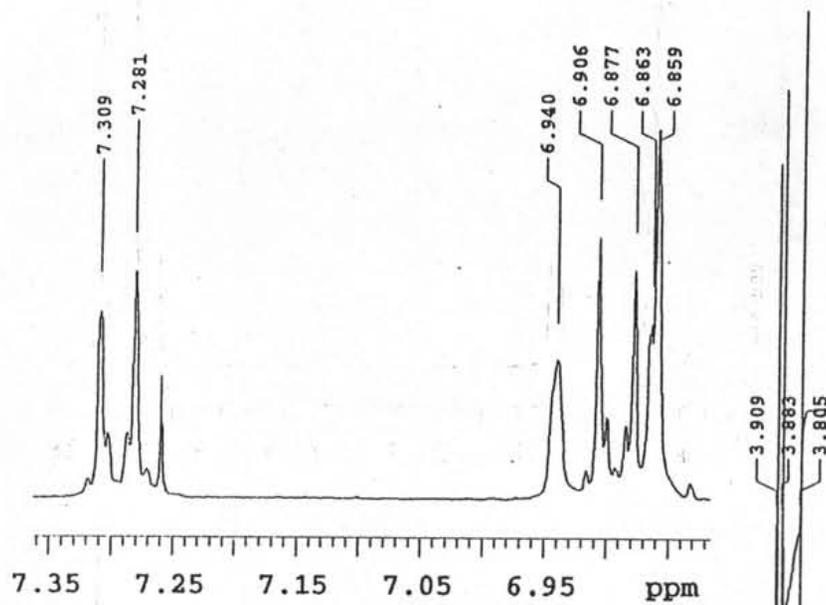
Liriodenina





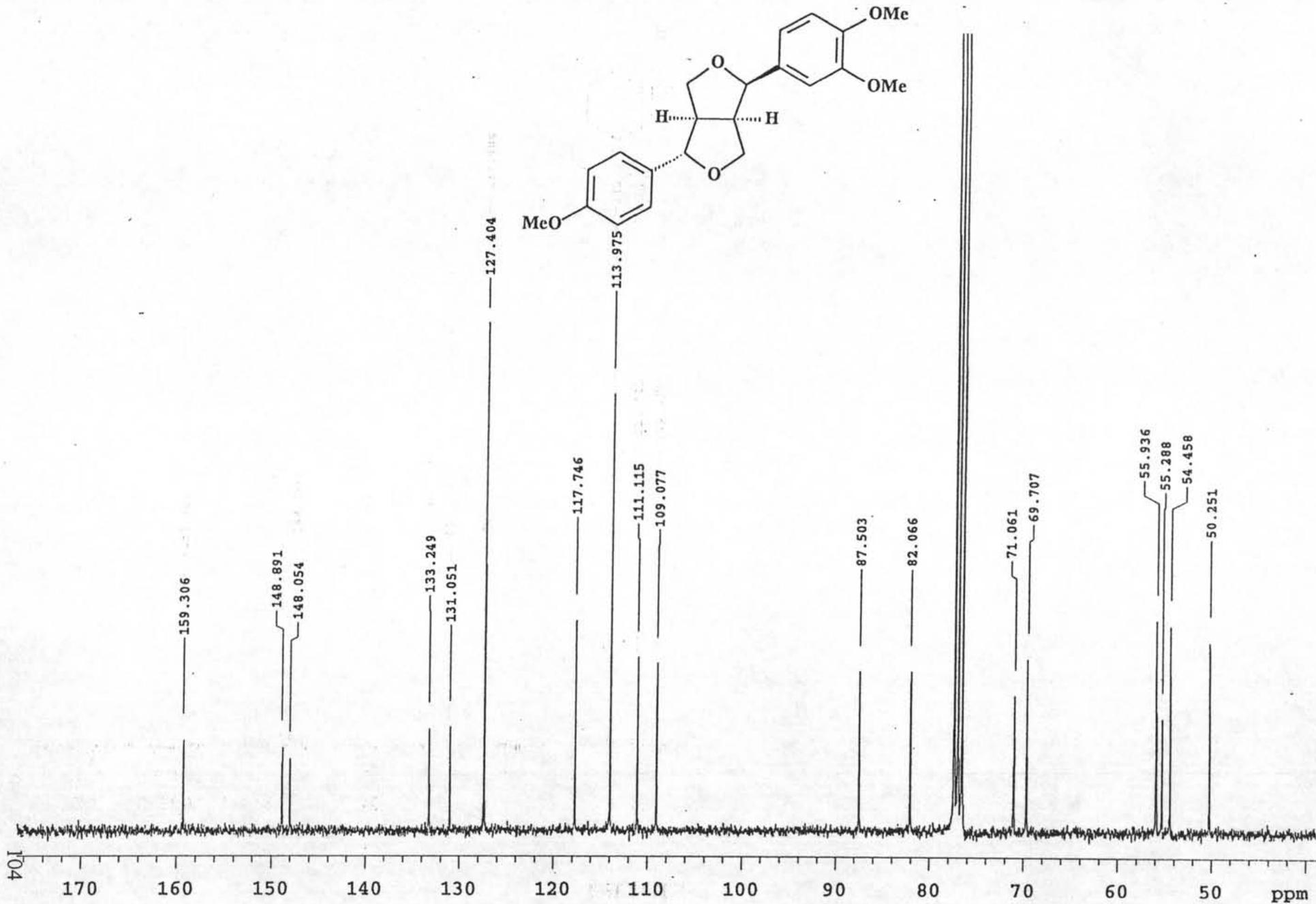
ESPECTRO No. 5

Anonaina



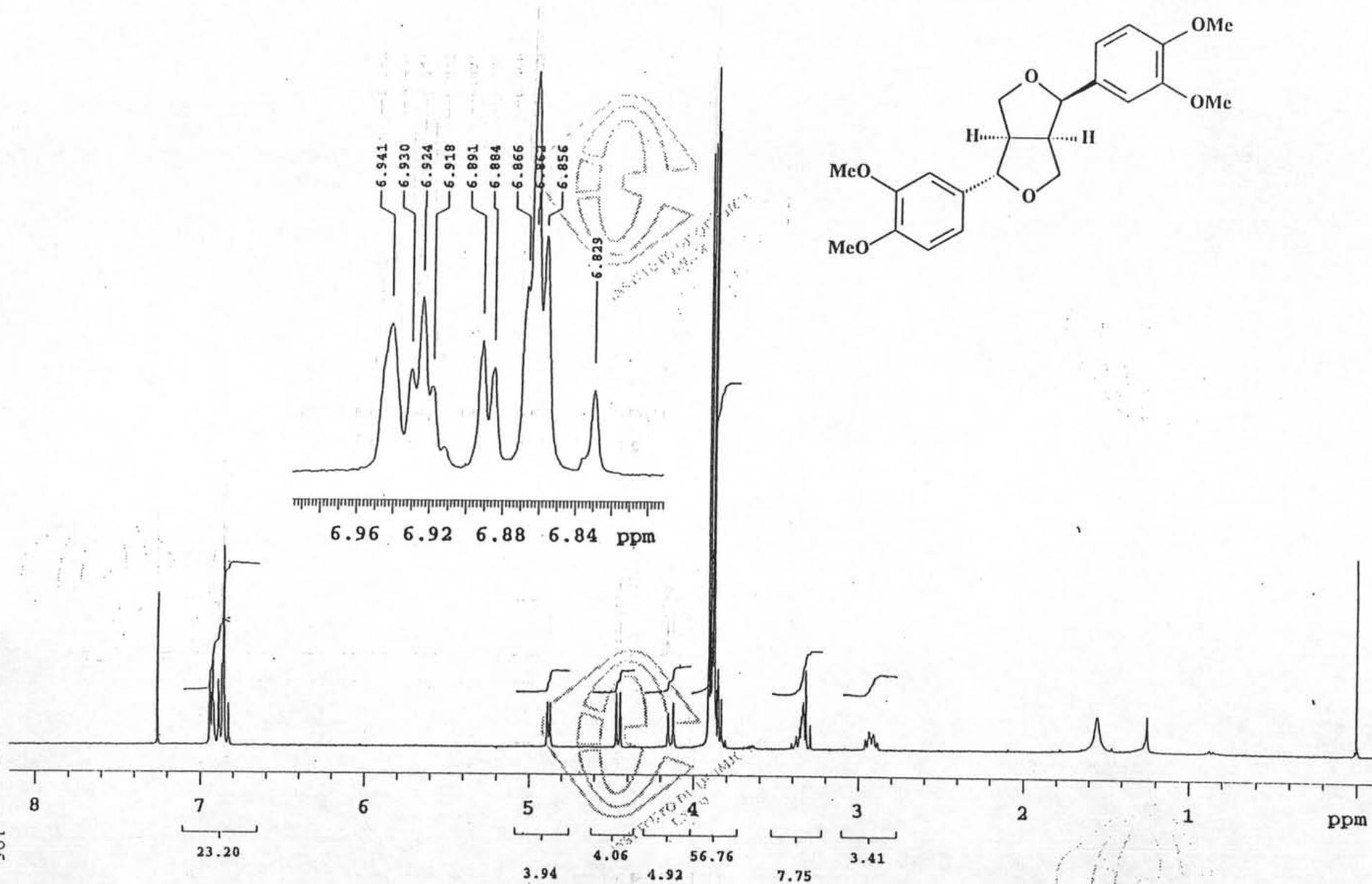
103

ESPECTRO No. 6 Epimembrina



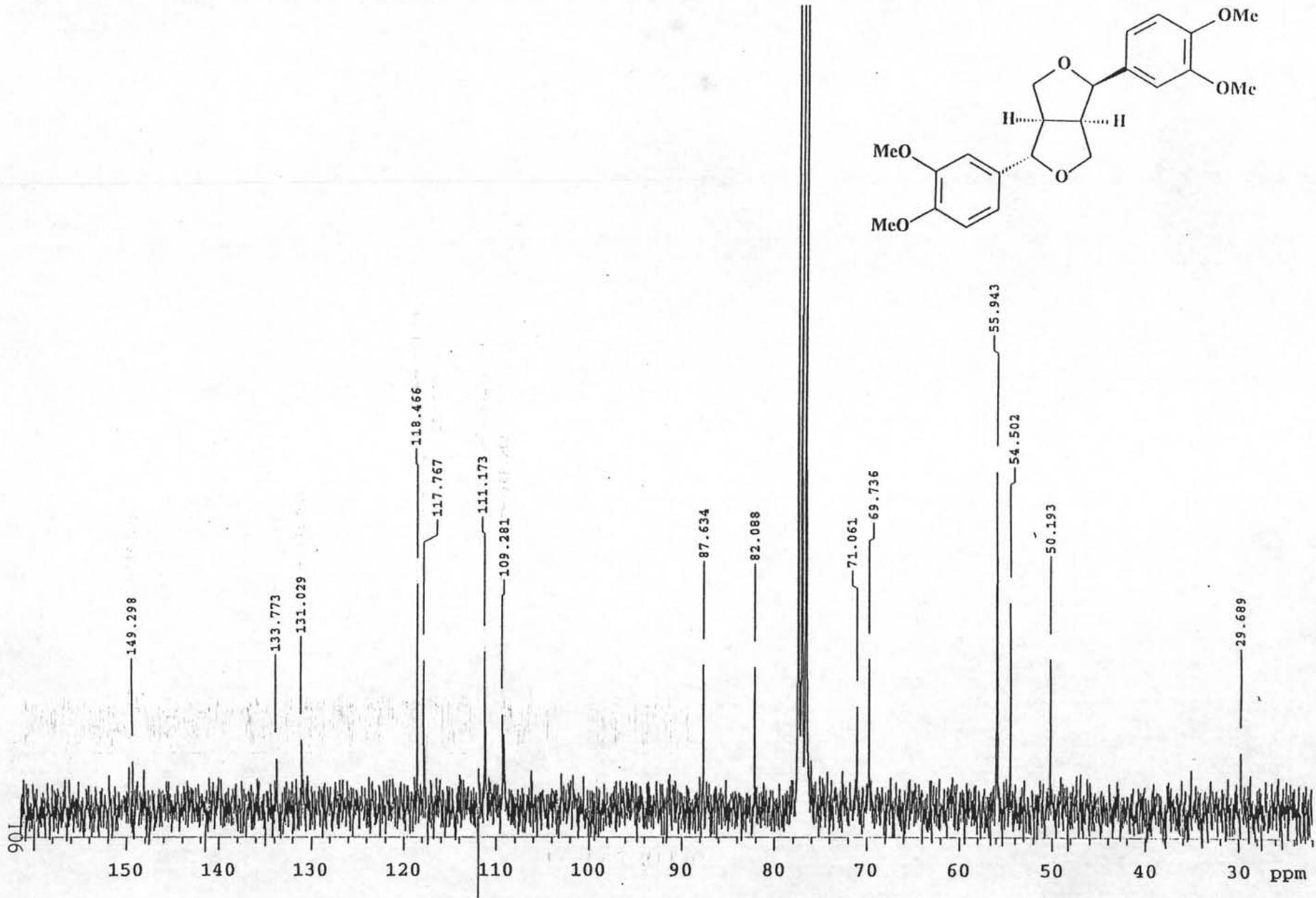
ESPECTRO No. 7

Enimembrina



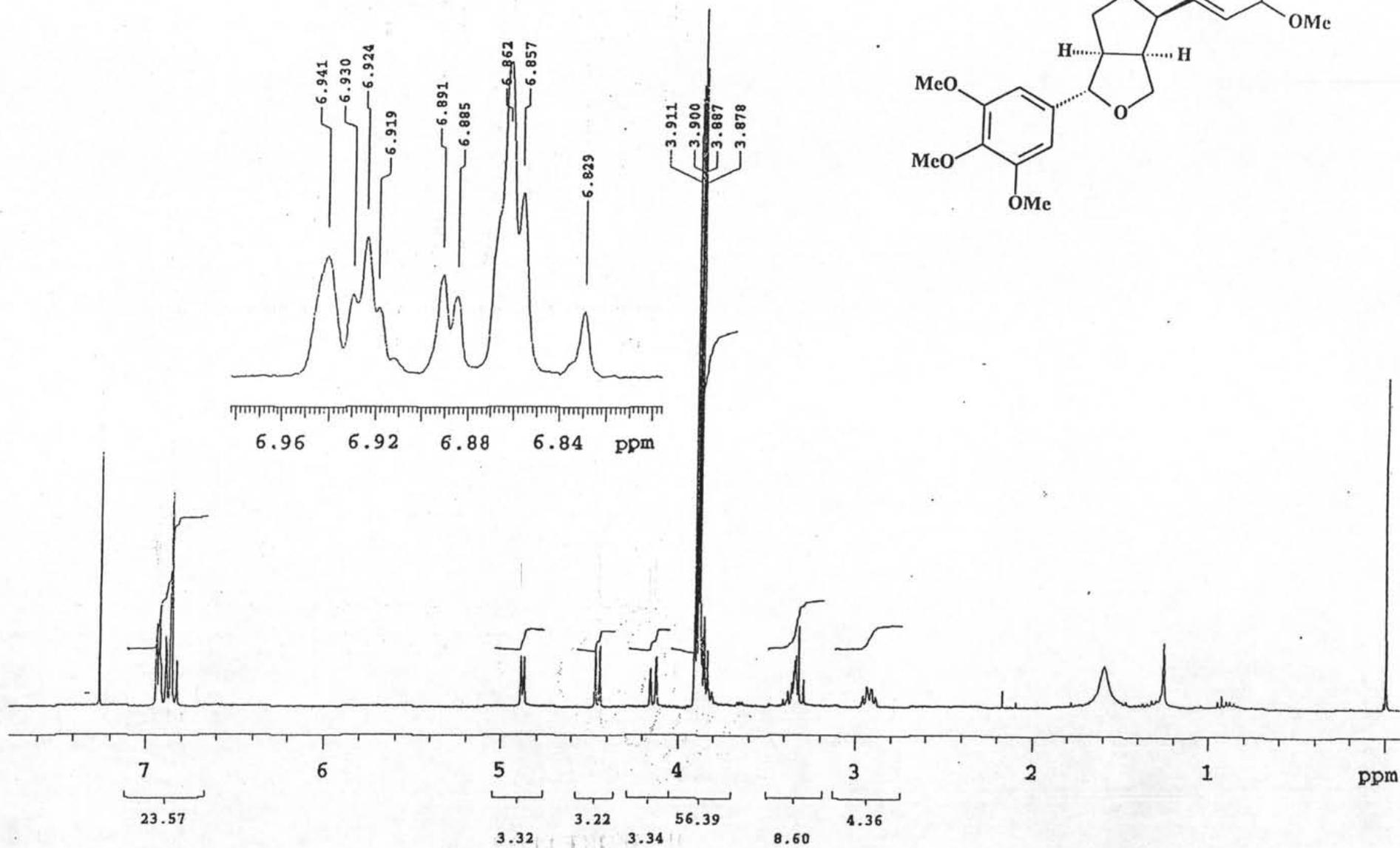
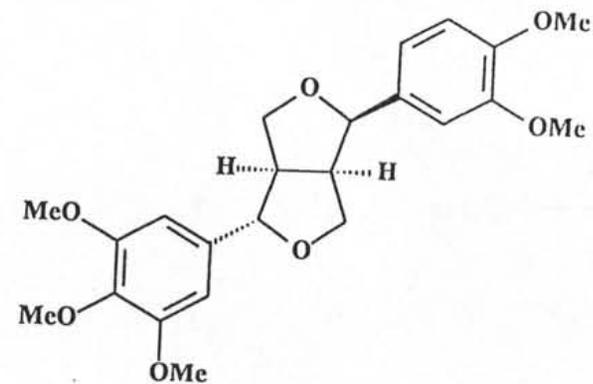
ESPECTRO No. 8

Epiudesmina



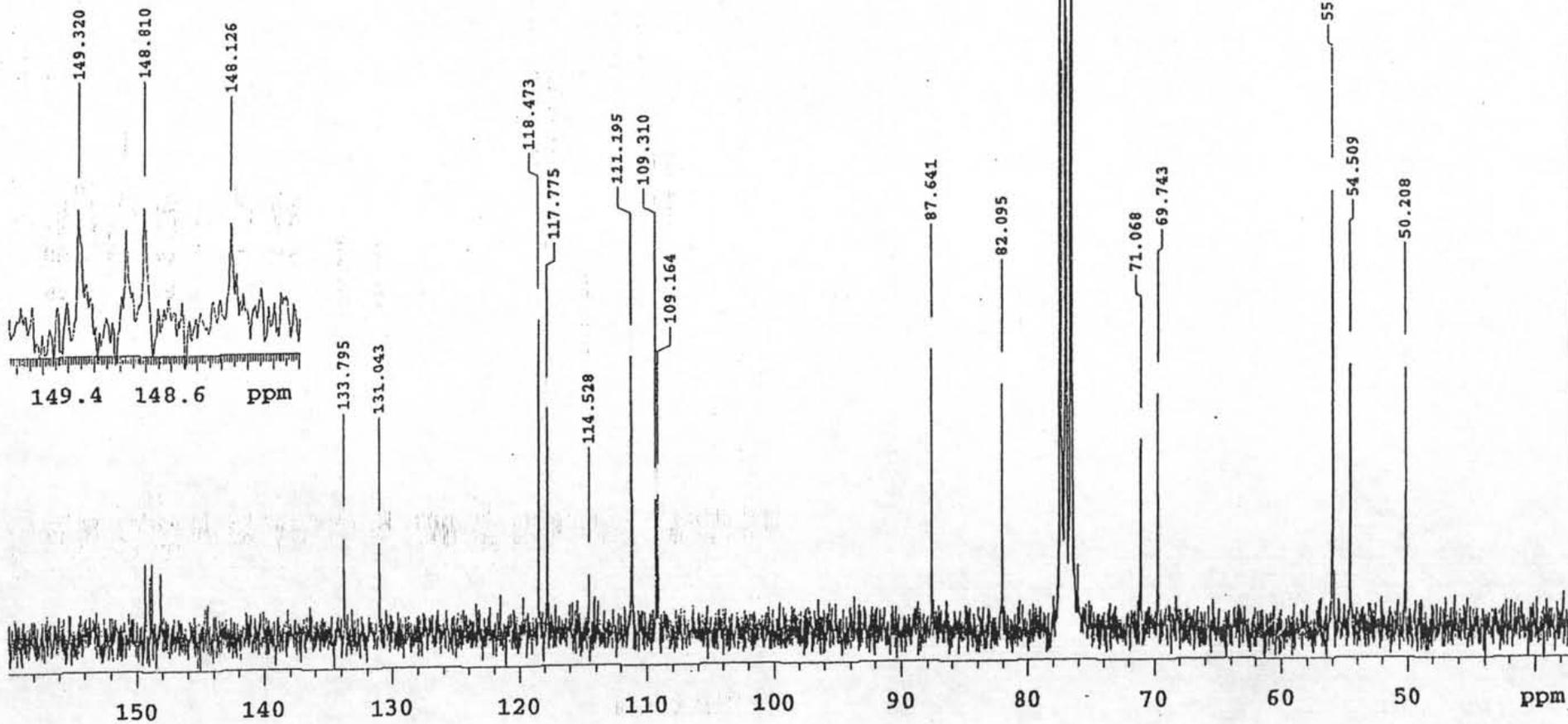
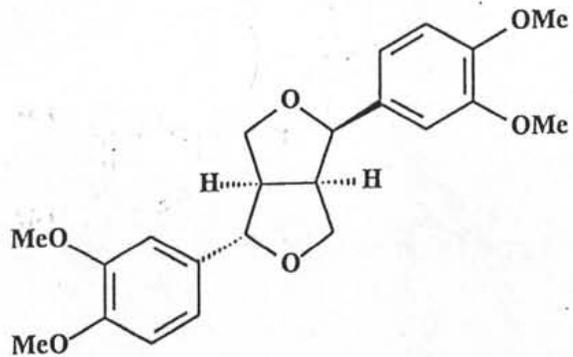
ESPECTRO No. 9

Epiudesmina



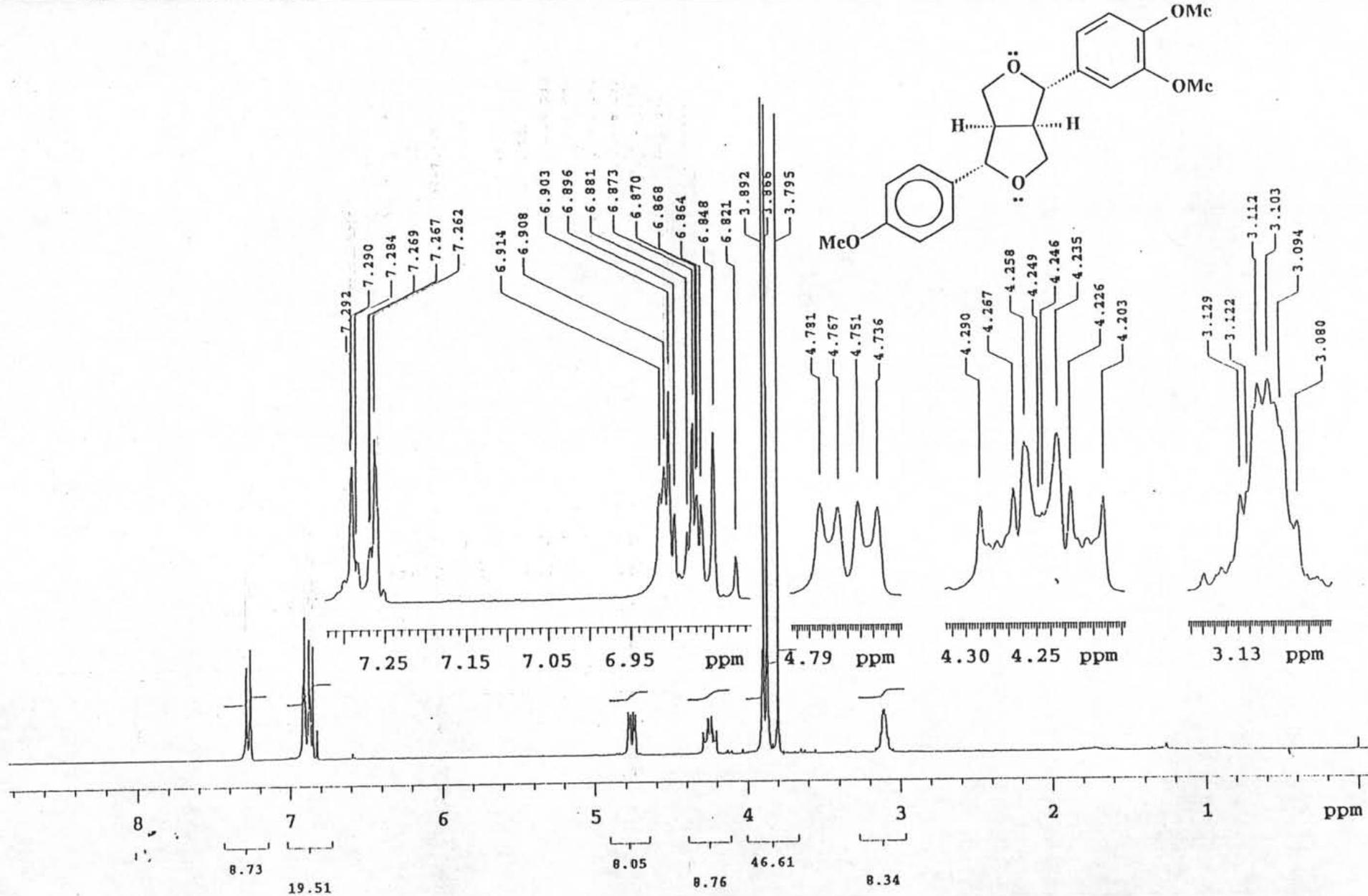
ESPECTRO No. 10

Epimagnolina



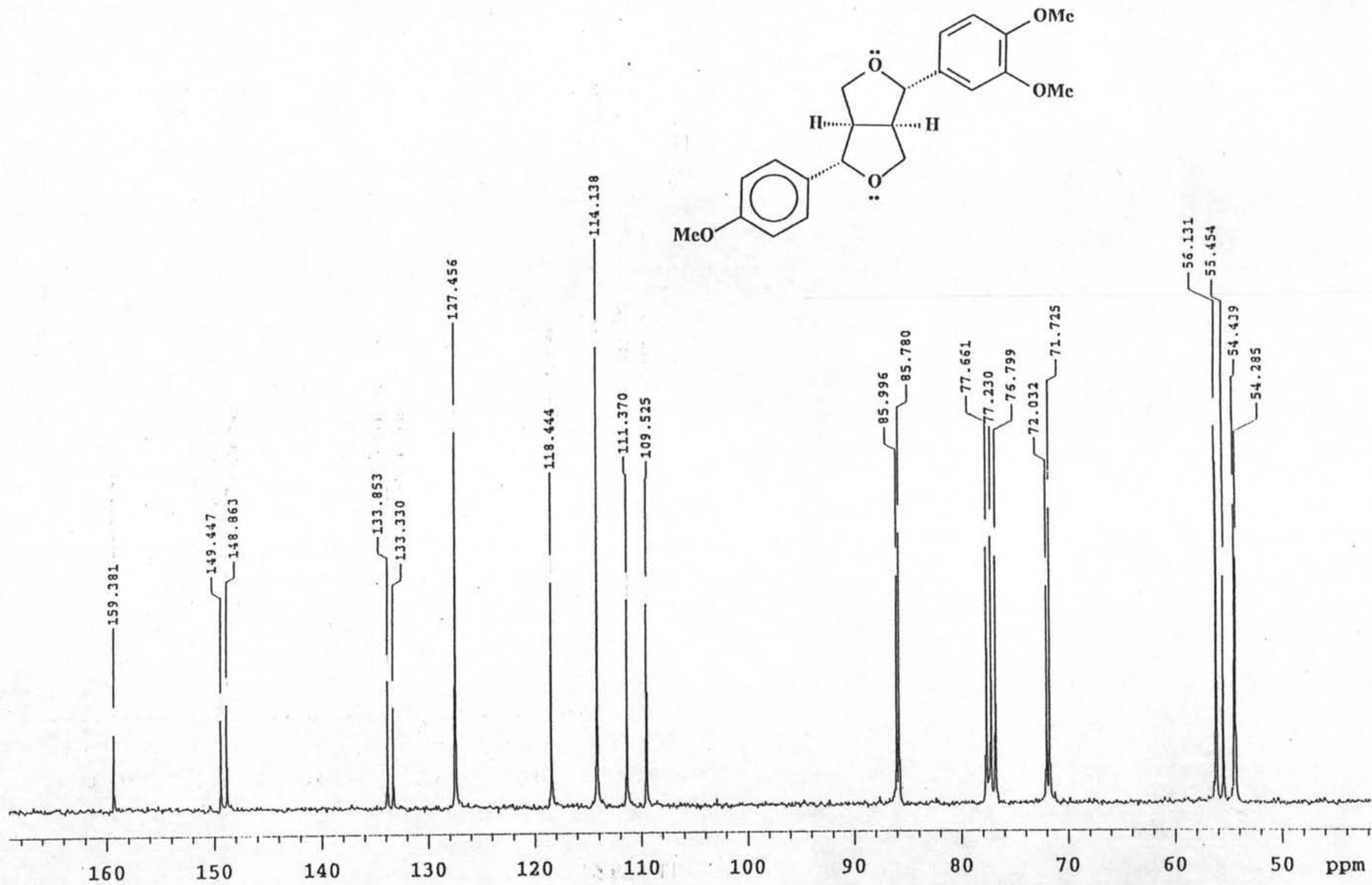
ESPECTRO No. 11

Epimagnolina



ESPECTRO No. 12

Membrina



ESPECTRO No. 13

Membrina

Lignans from Leaves of *Rollinia mucosa*

Rosa Estrada-Reyes^a, Ana Laura Alvarez C.^b, Carolina López-Rubalcava^c,
Luisa Rocha^c, Gerardo Heinze^a, Julia Moreno^a and Mariano Martínez-Vázquez^{*.b}

^a Instituto Nacional de Psiquiatría, Av. México-Xochimilco 101, Tlalpan, México,
14370, México

^b Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior,
Coyoacán, México, 04510, México

^c Departamento de Farmacobiología Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados IPN

* Author for correspondence and reprint requests

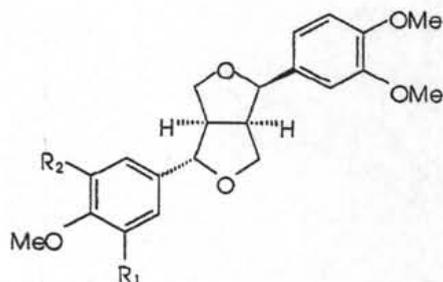
Z. Naturforsch. 57c, 29–32 (2002); received August 27/October 2, 2001

Rollinia mucosa, Lignans, (+)-Epimembrine

A new furofuranic lignan named (+)-epimembrine together with known (+)-epieudesmine and (+)-epimagnoline were isolated from leaves of *R. mucosa*. Their structures were determined by spectroscopic data. Palmitone and a mixture of β -sitosterol and stigmasterol were also isolated.

Introduction

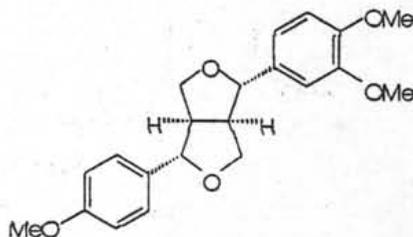
As part of our ongoing investigation on biologically active compounds from Mexican medicinal plants (Martínez-Vázquez and García-Argáez, 2001), we have studied the leaves of *Rollinia mucosa* (Jacquin) Baillon (syn. *R. jimenezii* Safford) (Annonaceae). Previous studies of this species reported the isolation of acetogenins, alkaloids (Pettit *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; and Chávez *et al.*, 1998) and the lignans (+)-yangambine, (+)-magnoline, (+)-eudesmin, (+)-epieudesmin and (+)-membrine from mature fruits (Paulo *et al.*, 1991; and Chen *et al.*, 1996). In this paper, we describe the structure elucidation of the furofuranic lignan 1.



(+)-epimembrine (1)	R ₁ =H	R ₂ =H
(+)-epieudesmine (2)	R ₁ =H	R ₂ =OMe
(+)-epimagnolin A (3)	R ₁ =OMe	R ₂ =OMe

Results and Discussion

Leaves of *R. mucosa* were extracted with *n*-hexane and the resulting extract was chromatographed on silica gel eluting with *n*-hexane containing increasing concentrations of ethyl acetate. Compound 1 was isolated from fractions eluted with 8:2 (*n*-hexane: ethyl acetate v/v), while compounds 2 and 3 were isolated from fractions eluted with a solvent ratio of 7:3. Also palmitone (16-hebtriacontanone) (Hayashi and Komae, 1971) and a mixture of β -sitosterol and stigmasterol were isolated. The lignans isolated were (+)-epieudesmine (2) (Pelter *et al.*, 1976) and (+)-epimagnolin (3) (Miyazawa *et al.*, 1994a, b).



(+)-membrin (4)

The high-resolution mass spectrum of compound **1** showed its $[M]^+$ at m/z 356.1642 for a $C_{21}H_{24}O_5$ formula. The peaks at m/z 165 and 151 were attributable to cleavage of fragments containing a veratryl group and the peaks at m/z 135 and 121 were also attributable to cleavage of a *p*-methoxyphenyl group (Pelter *et al.*, 1976). The presence of these two aryl groups in **1** was confirmed by its NMR spectral data (Tables I and II).

Compound **1** had a basal 2,6-diaryl-3, 7-dioxabicyclo [3,3,0]-octane skeleton as shown by its 1H NMR spectrum where the eight aliphatic protons are present at δ 2.91, 3.32, 3.85, 4.13, 4.46 and 4.87 (Miyazawa *et al.*, 1992).

Therefore the gross structure of **1** corresponds to that of *membrane* (**4**). However the notorious variance in their NMR data (Tables I and II) indicates that the difference between them should correspond to the relative orientation of the aryl groups.

From a comparison of the chemical shifts of the eight aliphatic protons of **1** with those of (+)-epieudesmine (**2**) (Pelter *et al.*, 1976) and (+)-epimagnolin A (**3**) (Miyazawa *et al.*, 1994b), the stereochemistries of the two aromatic rings were proposed as of the axial-equatorial type. The ^{13}C NMR spectral data of **1** confirmed the stereo-

chemistries of the two aromatic rings, because six aliphatic carbon signals were almost identical to those of **2** and **3** (Table II).

Furthermore, the carbon signals assigned to the veratryl group were consistent with those of phyllygenin and (+)-epimagnolin A (axial-veratryl type). A NOESY experiment of **1** confirms the relative stereochemistry of the protons at positions 2 and 6.

Therefore, the structure of **1** named (+)-epimembrine is assigned as *rel* (2*R*, 6*S*)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo [3,3,0] octane.

Experimental

Plant material

Leaves of *R. mucosa* were collected from plants growing in the surroundings of Ocosingo Chiapas, México. A voucher specimen was deposited in the herbarium of Escuela de Biología de la UNICACH. (Voucher: A. R. González-Esquinca) Dried and ground leaves (1428 g) were extracted with hexane, EtOAc and MeOH successively (5 l \times 3 times, each) at room temperature during 48 h. The hexanic extract (20 g, residue dry weight) was absorbed on 2 g of silica gel and then chromato-

Table I. 1H NMR spectral data of compounds **1**–**4**.

H	1	2	3	4
1	3.32 m	3.30 m	3.35 m	3.11 m
2	4.87 d (5)	4.85 d (5.5)	4.87 d (5.5)	4.76 dd (10.2, 7)
4ax	4.13 d (9.5)	4.13 d (10)	4.16 d (9.5)	4.20 m
4eq	3.85 m	3.85 m	3.87 m	3.84 m
5	2.91 m	2.90 m	2.92 m	3.11 m
6	4.46 d (7.2)	4.45 d (7)	4.44 d (7.2)	4.76 dd (10.2, 7)
8ax	3.32 m	3.30 m	3.35 m	3.84 m
8eq	3.85 m	3.35 m	3.87 m	4.20 m
Ar	6.88 m (5H) 7.29 m (2H)	6.94 m 6.86 m	2' 6.94 s 5' 6.84 d (8)	6.82–6.92 m (5H) 7.26–7.30 m (2H)
OMe	3.80 s 3.88 s 3.90 s	3.89 3.90 3.92 3.93	3.84 s 3.87 s 3.87 s 3.88 s 3.91 s	3.81 s 3.88 s 3.90 s

Table II. ¹³C NMR spectral data of lignans 1–4.

C	1	2	3	4
1	50.2	50.1	49.9	54.1
2	82.0	81.9	81.8	85.6
4	71.0	70.9	70.8	71.8
5	54.5	54.4	54.4	54.2
6	87.5	87.5	87.6	85.8
8	69.7	69.6	69.6	71.5
1'	131.0	130.8	130.7	133.1
2'	109.0	109.0	108.8	109.2
3'	148.8	148.5	148.7	148.6
4'	148.8	148.6	147.8	149.2
5'	111.1	110.9	110.9	111.0
6'	117.7	117.5	117.5	118.2
1''	133.2	133.5	136.7	133.6
2''	113.5	108.8	102.7	113.0
3''	127.3	147.8	153.2	127.3
4''	159.2	149.0	137.2	159.2
5''	127.3	110.9	153.2	127.3
6''	113.5	118.3	102.7	113.0
OMe	55.2 55.9 56.0	55.8	55.7 55.7 55.9 55.9 60.5	55.3 55.4 56.0

graphed on a column packed with 60 g of silica gel 60 (Merck). Elution with gradients of hexane and ethyl acetate afforded palmitone, (96 mg, 100% *n*-hexane), a mixture of β -sitosterol and stigmasterol (65 mg, 8:2) and the furofuranic lignans **1** (10 mg, 8:2), **2** (5 mg, 7:3) and **3** (2 mg, 7:3).

The identification of the known compounds was achieved by comparison of their physical and spectroscopic data with those published in the literature.

(+)-Epimembrine (**1**)

White crystal mp 128–130 °C. HRMS: *m/z*: 356.1642 ([M]⁺, calcd for C₂₁H₂₄O₅: 356.1624). MS *m/z* (rel int.) 356 ([M]⁺) (100), 325 (10), 189 (22), 177 (28), 165 (33), 147 (29), 135 (68), 121 (36). [α]_D²⁵ + 134.6° (CHCl₃; c 1.2). IR ν max cm⁻¹: 1591, 1515, 1464, 1417, 1375, 1071 and 1031. ¹H and ¹³C NMR see Tables I and II.

Acknowledgements

We are indebted to Héctor Ríos, Rocío Patiño and Javier Pérez for technical assistance. Partial financial support from CONACYT (34992-N) is acknowledged.

- Chavez A., Acevedo A. L. and Mata R. (1998), Jimenezin, a novel Annonaceous acetogenin from the seeds of *Rollinia mucosa* containing adjacent tetrahydrofuran-tetrahydropyran ring systems. *J. Nat. Prod.* **61**, 419–421.
- Chen Y. Y., Fang-Rong C. and Yang-Chang W. (1996), Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. *J. Nat. Prod.* **59**, 904–906.
- Hayashi N. and Komae H. (1971), Isolation and identification of palmitone from the leaves of *Lauraceae* plants (*Cinnamomum camphora* Sieb., *Neolitsea sericea* Koidz., *Lindera umbrellata* Thumb.). *J. Indian Soc.* **48**, 288.
- Martínez-Vázquez M. and García-Argáez A. N. (2001), Phytochemical studies and biological evaluations of some Mexican plants. *Recent. Res. Devel. Phytochemistry* **5**, 59–85.
- Miyazawa M., Kasahara H. and Kameoka H. (1992), Phenolic lignans from flower buds of *Magnolia fargesii*. *Phytochemistry* **31**, 3666–3668.
- Miyazawa M., Ishikawa Y., Kasahara H., Yamanaka H. and Kameoka H. (1994a), An insect growth inhibitory lignan from flower buds of *Magnolia fargesii*. *Phytochemistry* **35**, 611–613.
- Miyazawa M., Kasahara H. and Kameoka H. (1994b), Microbial oxidation of (+)- epimagnolin A by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* **35**, 1191–1193.
- Paulo M. Q., Kaplan M. A. C., Laprévotte O., Rublot F., Hocquemiller R. and Cave A. (1991), Lignans and other non-alkaloid constituents from *Rollinia mucosa*. *Fitoterapia* **62**, 150–152.
- Pelter A., Ward R. S., Rao E. V. and Sastry K. V. (1976), Revised structures for pluviatilol, methyl pluviatilol and xanthoxylol. *Tetrahedron* **32**, 2783–2788.
- Pettit G. R., Cragg G. M., Polonoki J., Herald D. L., Goswami A., Smith C. R., Moretti C., Schmidt J. M. and Weisleder D. (1987), Isolation and structure of rollinastatin 1 from the South American tree *Rollinia mucosa*. *Can. J. Chem.* **65**, 1433–1435.
- Shi G., Xe Q., He K. and McLaughlin J. L. (1996), Rollinacins A and B: two New bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. *J. Nat. Prod.* **59**, 548–551.