

Artículo original

Composición química del aceite esencial de hojas frescas de *Annona muricata* L., de Mérida, Venezuela.

Chemical composition of the essential oil of fresh leaves of *Annona muricata* L., from Mérida, Venezuela.

Gina Meccia^{1*}, Patricia Vit², Luis B. Rojas¹, Juan Carmona³, Bertha Santiago², Alfredo Usubillaga¹.

¹Instituto de Investigaciones, ²Departamento Ciencia de los Alimentos, ³Departamento Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101. República Bolivariana de Venezuela.

Recibido marzo 2015 - Aceptado julio 2015

RESUMEN

El aceite esencial de las hojas frescas de *Annona muricata* L. (guanábana) fue obtenido por hidrodestilación, con un rendimiento de 0,06 %. La identificación de sus componentes químicos se realizó por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. En este estudio se identificaron 38 compuestos, de los cuales *trans*-cariofileno (21,3 %), germacreno A (14,2 %), germacreno D (8,8 %) y α -E-bergamoteno (7,9 %) resultaron mayoritarios. Este es el primer reporte sobre los constituyentes volátiles presentes en las hojas de *A. muricata* L. en Venezuela.

PALABRAS CLAVE

Aceite esencial, *Annona muricata*, guanábana, Venezuela.

ABSTRACT

The essential oil of fresh leaves of *Annona muricata* L. (soursop) was obtained by hydrodistillation, with a yield of 0.06 %. The identification of its chemical compounds was achieved by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. In this study 38 compounds were identified, the major constituents were *trans*-caryophyllene (21.3 %), germacrene A (14.2 %), germacrene D (8.8 %) and α -E-bergamotene (7.9 %). This is the first report on the

chemical composition of volatiles from leaves of *A. muricata* L. in Venezuela.

KEY WORDS

Essential oil, *Annona muricata*, soursop, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La guanábana, *Annona muricata* (Annonaceae) es una fruta tropical originaria de Perú, ampliamente consumida por sus cualidades sensoriales y nutricionales. Recientemente su popularidad se ha incrementado por sus atributos anticáncer, más poderosos que la quimioterapia [1]. Es un árbol mediano de 4-5 m de altura, hojas simples, alternas, verde brillante por la cara superior y verde pálida en la cara inferior; flores con pedúnculos gruesos, pétalos gruesos amarillentos, acuminados en el ápice. La fruta es de color verde oscuro cubierta de espinas suaves, la pulpa es blanca, carnosa, jugosa y ligeramente ácida [2].

La familia Annonaceae produce importantes cosechas en los países tropicales. Diferentes especies de *Annona* se consumen frescas y han sido estudiadas por su bioactividad: *A. muricata* (guanábana), *A. cherimola* (chirimoya), *A. crassifolia* (marolo), *A. diversifolia* (ilama), *A. glabra* (anona), *A. reticulata* (anón), *A. squamosa* (riñón) [1, 3-8]; sin embargo, ninguna fue incluida

en el estudio de múltiples propiedades nutricionales de veinte frutas exóticas [9].

En los últimos años se han realizado algunos estudios fitoquímicos de las hojas de *A. muricata*, reportándose la presencia de alcaloides como anonaina, xilopina, isolaurelina, coclaurina y otras bases del tipo benciltetrahidroisoquinolina [10]; también se han aislado compuestos megastigmanos, conocidos como annoionoles A, B y C, así como algunos derivados glicosilados [11]. Por otra parte, el aceite esencial de las hojas de *A. muricata* ha sido estudiado en algunos países, reportándose como componentes mayoritarios: *trans*-cariofileno, δ -cadineno, *epi*- α -cadinol y α -cadinol [12-13].

Las hojas y las semillas de *A. muricata* no son utilizadas como alimento, por ello su interés para el aprovechamiento medicinal. En la Amazonía brasileña las hojas son usadas para tratar problemas del hígado. El aceite de las hojas y de los frutos inmaduros mezclado con aceite de oliva se ha usado en aplicaciones tópicas para el tratamiento de neuralgias, reumatismo y dolores artríticos; mientras que las semillas se han utilizado para controlar insectos y parásitos [12]. La aplicación intravenosa del extracto acuoso de hojas tiene efecto hipotensor en ratas [14]. Por otra parte, el extracto etanólico de *Piper nigrum* (pimienta negra) mostró acción sinérgica con las semillas de *A. muricata* para la acción larvicida del vector del dengue *Aedes aegypti* [15]. El extracto acuoso de las hojas tiene acción antihelmíntica en huevos, larvas y formas adultas del nemátodo *Haemonchus contortus* que parasita ovejas [16]. La acción antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas mostró sinergia en presencia de aminoglucósidos [17].

En relación a la actividad antitumoral, en un experimento realizado con hojas molidas de *A. muricata* contenidas en cápsulas de suplemento nutricional, se demostró que la guanábana inhibe el metabolismo celular e induce necrosis en implantes de células de cáncer pancreático, ya que subreguló la expresión de indicadores de hipoxia y glicólisis celular HIF-1 α , NF- κ B, GLUT1, GLUT4, HKII, LDHA [18].

Por otra parte, un estudio reciente sobre mecanismos de acción anti-inflamatoria de la ingesta de extracto etanólico de las hojas de *A. muricata* mostró su actividad en inflamación aguda con el modelo de edemas e inflamación crónica

como la artritis inducida en ratas, donde redujo significativamente los niveles de indicadores de inflamación TNF- α e IL-1 β , y quizás suprime las citoquinas proinflamatorias [19].

En mediciones preliminares, se encontró que el extracto etanólico de las hojas frescas de *A. muricata* tiene mayor actividad antioxidante ($219,2 \pm 1,0$ μ moles equivalentes de Trolox/100 g) que el extracto metanólico ($182,3 \pm 2,0$ μ moles equivalentes de Trolox/100 g) [20].

Basados en los estudios previos reportados en la literatura y en aras de contribuir con el conocimiento sobre la composición química de las plantas de la región, en la presente investigación se planteó como objetivo identificar los componentes químicos del aceite esencial de las hojas frescas de *A. muricata* cultivada en Mérida, Venezuela.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal. Las hojas de *A. muricata* L. fueron recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. El voucher (JC 1000) fue depositado en el herbario MERF "Dr. Luis Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, para su identificación por el Ingeniero Forestal Juan Carmona.

Obtención del aceite esencial. Se procesó 1 kg de hojas frescas de *A. muricata*, por hidrodestilación en la trampa de Clevenger durante 3 horas, siguiendo el método de Borges y col. [21]. El aceite obtenido fue separado con hexano, secado con sulfato de sodio anhidro y almacenado a 4 °C.

Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM). El aceite esencial fue analizado en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard modelo 6890 serie II, provisto de columna capilar HP-5 (5 % fenil - 95 % metil silicona) de 30 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interno, con un espesor de película de 0,25 μ m. Se inyectó una muestra de 1,0 μ L de una solución al 2 % del aceite esencial en n-heptano, con reparto de 100:1. Se utilizó Helio como gas portador, a un flujo de 1 mL/min. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: temperatura inicial 60 °C (5 min); temperatura final 260 °C (20 min); gradiente de temperatura 4 °C/min; tiempo total del análisis 60 min; temperatura del inyector 250 °C; temperatura

de la interfase 280 °C.

Cromatografía de Gases. Se analizó el aceite esencial en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo AutoSystem, provisto de una columna capilar AT-5 (60 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno). Se utilizó Helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min, con un reparto de 1:100. Las condiciones utilizadas fueron las mismas descritas anteriormente.

Los Índices de Kovats fueron determinados contra una serie de 10 *n*-alcanos (de C8 a C18) utilizados como estándares internos. La identificación de los componentes del aceite esencial se realizó mediante comparación computarizada de sus espectros de masas con las bases de datos del equipo (Librería Wiley, 6a. Ed., Nist 0,5) y por comparación de los índices de Kovats calculados con los IK de referencia reportados en la literatura [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aceite obtenido por hidrodestilación de hojas de *A. muricata* fue medianamente viscoso y presentó un color amarillo claro. Se obtuvieron 0,6 mL de aceite esencial, lo que corresponde a un rendimiento de 0,06 %. El análisis por CG/EM permitió identificar un total de 38 compuestos (91,4 %), siendo los componentes mayoritarios *trans*-cariofileno (21,3 %), germacreno A (14,2 %), germacreno D (8,8 %) y α -E-bergamoteno (7,9 %). En la Tabla 1 se muestran los componentes identificados en el aceite esencial.

Del total de componentes identificados (91,4 %) en el aceite esencial de hojas de *A. muricata* recolectada en Mérida, Venezuela, la mayor parte corresponde a compuestos sesquiterpénicos (86,9 %), encontrándose además algunos hidrocarburos, alcoholes, ácidos grasos y ésteres en pequeña cantidad. No se detectaron monoterpenos. Esta composición química resultó ser similar a la reportada por Ramírez y col. (2011) [23] para la especie *A. cherimola* Mill. de los Andes venezolanos en cuanto al predominio de los sesquiterpenos, siendo muchos de ellos comunes en ambos aceites, aunque difieren en su abundancia relativa. Sin embargo, se observan importantes diferencias en relación a los compuestos mayoritarios de ambas especies: en *A. cherimola* el principal componente resultó ser el germacreno D (con un 57,7 %), el cual se encuentra en *A. muricata* en solo un 8,8 %, mientras que el

trans-cariofileno, que es el componente mayoritario de *A. muricata* (21,3 %) aparece como segundo componente más abundante en *A. cherimola* con un 8,9 %, junto con biciclogermacreno (8,8 %) y germacreno B (5,02 %); por otra parte, el germacreno A y el α -E-bergamoteno, presentes en alto porcentaje en *A. muricata* (14,2 % y 7,9 %, respectivamente), no se encontraron en el aceite de *A. cherimola* de los Andes venezolanos.

TABLA 1

Compuestos químicos identificados en el aceite esencial de *A. muricata* L.

Compuesto	IK	Área (%)
<i>cis</i> -3-Hexenol	854	0,3
δ -Elemeno	1350	0,5
β -Bourboneno	1391	1,0
7-epi-Sesquitujeno	1395	0,5
β -Elemeno	1397	4,4
Sesquitujeno	1411	0,3
α -Gurjuneno	1416	0,3
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1422	1,1
<i>trans</i> -Cariofileno	1429	21,3
β -Gurjuneno	1438	0,3
α -E-Bergamoteno	1445	7,9
β -Z-Farneseno	1452	1,5
epi- β -Santaleno	1457	0,4
α -Humuleno	1465	2,4
β -E-Farneseno	1467	2,0
Elixeno	1485	0,4
Germacreno D	1494	8,8
E,E- α -Farneseno	1496	0,9
Biciclogermacreno	1509	4,8
<i>cis</i> - α -Bisaboleno	1513	1,2
Germacreno A	1518	14,2
δ -Cadineno	1534	3,0
Elemol	1557	0,3
Germacreno B	1565	1,3
Acido dodecanoico	1568	0,6
<i>cis</i> -3-Hexenil benzoato	1575	0,4
Espatulenol	1582	1,2
Oxido de cariofileno	1588	2,7
Cariofila-4(12),8(13)-dien-5 β -ol	1645	0,5
Tau-cadinol	1650	0,7
α -Cadinol	1666	1,3
8-Heptadeceno	1689	0,5
Epi- α -Bisabolol	1697	0,9
α -Bisabolol	1700	0,8
Heptadecano	1712	0,9
Acido tetradecanoico	1774	0,3
Acido hexadecanoico	1961	0,3
<i>trans</i> -Fitol	2136	1,2
Total identificado		91,4

IK: índices de Kovats

En contraste, en una investigación realizada en México con el aceite esencial de hojas de *A. cherimola* [24] la composición resultó ser muy diferente, reportándose como componentes principales: biciclogermacreno (18,20 %), *trans*-cariofileno (11,50 %), δ -amorfenol (7,57 %) y α -copaeno (5,63 %); en dicho estudio el aceite esencial mostró una significativa actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, y el *trans*-cariofileno puro mostró una actividad moderada contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Shigella sonnei*.

Costa y col. [25] (2009) determinaron la composición química del aceite esencial de las hojas de *A. foetida* en la región amazónica de Manaos (Brasil), encontrando como componentes mayoritarios el biciclogermacreno (35,12 %), (E)-cariofileno (14,19 %) y α -copaeno (8,19 %). Este aceite presentó una potente actividad antimicrobiana contra *Candida albicans* y *Rhodococcus equi* y una significativa actividad antileishmánica, principalmente contra *Leishmania guyanensis*.

En otro estudio realizado recientemente en Brasil de los aceites esenciales de dos especies de *Annona* [26], se reportan como compuestos mayoritarios para *A. emarginata*: (E)-cariofileno (29,29 %), (Z)-cariofileno (16,86 %), γ -muroleno (7,54 %), α -pineno (13,86 %) y tricicleno (10,04 %), y para *A. squamosa*: (E)-cariofileno (28,71 %), (Z)-cariofileno (14,46 %), canfeno (18,10 %), α -pineno (7,37 %) y β -pineno (8,71%). Puede observarse que en ambas especies el componente principal resultó ser igualmente el *trans*-cariofileno.

De igual forma, al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio del aceite esencial de hojas de *A. muricata* venezolana con trabajos realizados a la misma especie en otros países, encontramos en todos ellos al β -cariofileno como componente principal. Así, en una investigación realizada en África Central [27] se reporta al β -cariofileno como compuesto mayoritario con un 31,4 % de abundancia relativa, mientras que un estudio realizado por Kossouoch y col. en Benin [28] describen como componentes principales: β -cariofileno (13,6 %), δ -cadineno (9,1 %), epi- α -cadinol (8,4 %) y α -cadinol (8,3 %). Otro estudio sobre el aceite esencial de *A. muricata* recolectada en Nigeria [29] también reporta como componente mayoritario al (E)-cariofileno (38,9 %), acompañado de eugenol (30,2%) y menores cantidades de α -humuleno (4,3 %), δ -cadineno (6,0 %) y óxido de

cariofileno (5,0 %). Este aceite mostró una notable actividad citotóxica *in vitro* sobre células MCF-7 (99,2 % de muerte a una concentración de 100 μ g/mL), que pudiera ser atribuida a los componentes mayoritarios.

El sesquiterpeno (E)-cariofileno, es frecuentemente reportado en las especies de *Annona*, y junto con el óxido de cariofileno podría ser considerado un marcador quimiotaconómico para este género [29].

CONCLUSIONES

En países menos desarrollados el uso de la medicina tradicional es frecuente y más del 70 % de la población urbana ha usado al menos una vez remedios tradicionales [30]; por ello es de interés investigar la composición química de plantas utilizadas popularmente, como la guanábana. En particular, las hojas de guanábana se comercializan molidas y encapsuladas como suplementos nutricionales, debido al auge actual por sus propiedades anticáncer [1]. De los 38 compuestos identificados, el componente mayoritario del aceite esencial de las hojas frescas de *A. muricata* resultó ser el *trans*-cariofileno con 21,3 % de abundancia relativa, seguido por 14,2 % de germacreno A, 8,8 % de germacreno D y 7,9 % de α -E-bergamoteno.

Los resultados obtenidos en el presente estudio representan un aporte al conocimiento sobre los constituyentes volátiles del aceite esencial obtenido de las hojas de *A. muricata* L. en Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA, proyecto FA-526-12-08-B), Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal CVI-ADG-FA-01-95-08, Apiterapia y Bioactividad CVI-ADG-FA-04-97-01, por el financiamiento recibido para realizar esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Arroyo JA, Prashad MG, Vásquez YB, Li EP, Tomás GC. Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. Rev Peru Med Exp Salud

Pública. 2005; 22: 247-253.

[2] Hoyos J. Frutales en Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 36. 2° Ed. Caracas. 1994. pp 41-42.

[3] Gupta-Elera G, Garrett AR, Martinez A, Robinson RA, O'Neill KL. The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. Food Res Int. 2011; 44: 2205-2209.

[4] Vilar JB, Ferri PH, Chen-Chen L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. Braz J Biol. 2011; 71: 197-202.

[5] Julián-Loeza AP, Santos-Sánchez NF, Valadez-Blanco R, Sánchez-Guzmán BS, Salas-Coronado R. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. Ind Crop Prod. 2011; 34: 1262-1268.

[6] Cochrane CB, Nair PKR, Melnick SJ, Resek AP, Ramachandran C. Anticancer effects of *Annona glabra* plant extracts in human leukemia cell lines. Anticancer Res. 2008; 28: 965-971.

[7] Mondal SK, Mondal NB, Mazumder UK. In vitro cytotoxic and human recombinant caspase inhibitory effect of *Annona reticulata* leaves. Indian J Pharmacol. 2007; 39(5): 253-254.

[8] Beena J, Remani P. Antitumor constituents from *Annona squamosa* fruit pericarp. Med Chem Res. 2008; 17(2-7): 345-355.

[9] Dembitsky VM, Poovarodom S, Leontowicz H, Leontowicz M, Vearasilp S, Trakhtenberg S, et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. Food Res Int. 2011; 44: 1671-1701.

[10] Fofana S, Keita A, Balde S, Ziyaev R, Aripova SF. Alkaloids from leaves of *Annona muricata*. Chem Nat Comp. 2012; 48(4): 714.

[11] Matsushige A, Matsunami K, Kotake Y, Otsuka H, Ohta S. Three new megastigmanes from the leaves of *Annona muricata*. J Nat Med. 2012; 66: 284-291.

[12] Branch LC, da Silva IMF. Folk Medicine of Alter do Chao, Para, Brazil, Acta Amazonica. 1983; 13: 737-797.

[13] Fekam F, Amvam PH, Menut C, Lamatry G, Bessiére JM. Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXVII. Comparative study of the volatile constituents of five Annonaceae species growing in Cameroun. Flavour Fragr J. 1996; 11(6): 333-338.

[14] Nwokocha CR, Owu DU, Gordon A, Thaxter

K, McCalla G, Ozolua RI, et al. Possible mechanisms of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive Sprague-Dawley rats. Pharm Biol. 2012; 50: 1436-1441.

[15] Grzybowski A, Tiboni M, Silva MAN, Rodrigo F, Chitolina RF, Passosa M, et al. Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic extracts of *Annona muricata* and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. Pest Manag Sci. 2013; 69: 589-601.

[16] Ferreira LE, Castro PMN, Chagas ACS, França SC, Belebony RO. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. Exp Parasitol. 2013; 134: 327-332.

[17] Bento EB, Matias EFF, Brito Jr. FE, Oliveira DR, Coutinho HDM, Costa JGM, et al. Association between food and drugs: Antimicrobial and synergistic activity of *Annona muricata* L. Int J Food Prop. 2013; 16: 738-744.

[18] Torres MP, Rachagani S, Purohit V, Pandey P, Joshi S, Moore ED, et al. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. Cancer Lett. 2012; 323: 29-40.

[19] Chan PF, Roslida AH. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. Braz J Pharmacogn. 2012; 22: 1301-1307.

[20] Santiago B, Ruíz J, Pérez E, Vit P. Composición físico-química de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* (Resumen). Memorias de la LXII Convención Anual de AsoVAC, Universidad Metropolitana, 2012. Caracas, Venezuela.

[21] Borges R, Rojas LB, Cegarra JA, Usubillaga A. Study of the essential oils from the leaves and flowers of *Lepechinia conferta* (Benth) Epl. Flavour Fragr J. 2006; 21: 155-157.

[22] Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation; 2007. 804 pp.

[23] Ramírez RN, Mora FD, Avila JL, Rojas LB, Usubillaga A, Segnini S, et al. Composición química y actividad larvicida contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.) del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de los Andes venezolanos. Rev Fac Farm. 2011; 53(2): 2-6.

[24] Ríos MY, Castrejón F, Robledo N, León I, Rojas G, Navarro V. Chemical Composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). Rev Soc Quím México. 2003; 47(2): 139-142.

[25] Costa EV, Pinheiro MLB, Silva JRA, Maia BHLS, Teixeira MC, Fernandes AC, et al. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). Quím Nova. 2009; 32(1): 78-81.

[26] Giroto F, Baron D, Ortiz M, Ferreira G, Fernandes CS. Characterization of the chemical composition of the essential oils from *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer 'terra-fria' and *Annona squamosa* L. Fevereiro. 2014; 36: 202-208.

[27] Pélissier Y, Marion Ch, Kone D, Lamatry G, Menut Ch, Bessièrre JM. Volatile components of *Annona muricata* L. J Essent Oil Res. 1994; 6: 411-414.

[28] Kossouoh C, Moudachirou M, Adjakidje V, Chalchat J-, Figuéredo G. Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin. J. Essent Oil Res. 2007; 19: 307-309.

[29] Owolabi MS, Ogundajo AL, Dosoky NS, Setzer WN. The cytotoxic activity of *Annona muricata* leaf oil from Badagary, Nigeria. Am. J Essent Oils Nat Prod. 2013; 1(1): 1-3.

[30] Organización Mundial de la Salud (OMS). Medicina tradicional. Nota descriptiva N° 134, Diciembre de 2008. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/index.html>