

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS
DE *Annona cherimolia* Mill.**

**LINA MARCELA CASTRO PIEDRAHITA
MONICA YORLADY ALZATE ZULUAGA**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2008**

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS
DE *Annona cherimolia* Mill.**

**LINA MARCELA CASTRO PIEDRAHITA
MONICA YORLADY ALZATE ZULUAGA**

**Documento presentado como requisito parcial para optar al título de
TECNÓLOGO QUÍMICO**

**Director
Gloria Edith Guerrero Álvarez
Doctor en Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2008**

NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO DE GRADO

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS
DE *Annona cherimolia* Mill.**

Presentado por:

**Lina Marcela Castro Piedrahita
Mónica Yorlady Alzate Zuluaga**

**Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez
revisada la versión escrita y presenciando la sustentación oral decidimos
otorgar:**

La nota de: _____

Con la connotación de: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy _____

**Director: _____
Gloria Edith Guerrero Álvarez
Doctor en Ciencias Químicas**

**Jurado: _____
Jaime Niño Osorio**

DEDICATORIA

Este documento está dedicado a **Dios**, por darme las fuerzas para seguir siempre adelante.

A **mis padres**, por ser las personas más bellas que jamás conocí. Todo lo que soy se lo debo a mis padres. Atribuyo todos mis éxitos en esta vida a la enseñanza moral, intelectual y física que recibí de ellos.

Y a **mi esposo**, por ser el ángel que alienta mi vida, por su apoyo incondicional, amor y comprensión.

Agradezco a todos, en especial a ti Mamá, por haberme dado las alas que necesitaba para poder volar.

Mónica Yorlady Alzate Zuluaga

DEDICATORIA

A Dios.

Que desde el cielo ilumina mi camino.

A mi Mamá Isabel.

Quien entregó sus sueños para poder realizar los míos, por darme sus noches, su vida y su tiempo, por brindarme todas las posibilidades para llegar a ser quien soy, ser mi fuerza motivadora y la razón de mi vida. Te amo mamá.

A mi Papá Heiber.

Por ser ese padre con el que en mi infancia soñé, por tus consejos y motivación que me han permitido ser una persona de bien. Gracias papá por compartir conmigo parte de tu tiempo.

A mis abuelos Carmen y Miguel

Los cuales tengo la dicha de tenerlos vivos, mis segundos padres, quienes me brindaron todo su cariño y apoyo emocional durante mi vida profesional y personal.

A mi novio José David

El amor de mi vida, quien ha estado conmigo todos estos años brindándome su apoyo y amor incondicional. Gracias por darle sentido a mi esfuerzo, por tus consejos y ayuda en los momentos difíciles de mi vida.

Lina Marcela Castro Piedrahita

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque a pesar de que muchas veces pusimos nuestros intereses por encima de ti nunca nos faltaste y aunque no somos tus hijas más devotas, en ti confiamos, siempre nos has ayudado a seguir adelante y por ti aún no perdemos la esperanza. Gracias por ser la luz en el camino y permitirnos terminar satisfactoriamente nuestros estudios.

A nuestras familias porque sin ellos no habríamos podido llegar hasta este punto; por su amor, comprensión, motivación y apoyo incondicional para salir adelante.

A nuestra directora Gloria Edith Guerrero por darnos la oportunidad de ser partícipes de este proyecto y por su apoyo constante.

A la profesora Barbara Moreno Murillo del Departamento de Química de la Universidad Nacional sede Bogotá, por la realización de los bioensayos con *Culex quinquefasciatus*.

Al profesor José Hipólito Isaza por dedicarnos parte de su tiempo y prestarnos su servicio en el equipo de HPLC.

Al Ingeniero Agrónomo de la UNISARC Hernan Giraldo por su ayuda con la clasificación botánica de la planta estudiada.

A los profesores Diego Cortes y Miguel Bobadilla por su colaboración en la obtención de artículos de investigación.

A nuestras amigas Angela Cardona, Mónica Ibarguen, Marcela Bernal, Catalina Agudelo, Lina Escobar, Alexandra Ospina y Jessica Usma por darnos muchos días felices y llenos de risas, por darnos sus hombros para llorar y dejarnos entrar en sus vidas, por compartir con nosotras un poco de cada una de ustedes.

A Javi, Germán, Vicky y Carlos Humberto, por su ayuda incondicional y aguantar nuestra intensidad en el transcurso de la carrera.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xiv
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GENERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1. FAMILIA ANNONACEA: GENERALIDADES	4
3.2. FAMILIA ANNONACEAE EN COLOMBIA	4
3.3. ANNONA CHERIMOLIA MILL. (CHIRIMOYA)	6
3.3.1. Clasificación Botánica	6
3.3.2. Fenología	6
3.3.2.1. Hojas	6
3.3.2.2. Flores	7
3.3.2.3. Fruto	7
3.3.2.4. Semillas	7
3.3.3. Ecología	7

3.3.4. Distribución Geográfica y Zonas de Producción	8
3.3.5. Propiedades y Usos	8
3.4. ACETOGENINAS	9
3.4.1. Clasificación de las Acetogeninas	9
3.4.4.1. Acetogeninas Lineales	9
3.4.1.2. Epoxiacetogeninas	10
3.4.1.3. Acetogeninas mono-THF	10
3.4.1.4. Acetogeninas bis-THF	10
3.4.1.5. Acetogeninas tri-THF	10
3.4.1.6. Acetogeninas THP	11
3.4.2. Actividad Biológica de las Acetogeninas	11
3.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	11
3.5.1. Clasificación de la Actividad biológica	12
3.5.2. Ensayo de actividad biológica con <i>Artemia salina</i>	12
3.5.3. Ensayo de actividad biológica con <i>Culex quinquefasciatus</i>	13
3.5.4. Determinación de la CL ₅₀ para Pruebas de Actividad Biológica	14
3.6. CROMATOGRAFÍA	14
3.6.1. Generalidades	14
3.6.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	15
3.6.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)	15
3.6.3.1. Cromatografía Líquida en Fase Normal	16
3.6.3.2. Cromatografía Líquida en Fase Reversa	16
3.7. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA	17

3.7.1. Microorganismos Mesófilos Aerobios	17
3.7.2. Método de Recuento en Placa	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1. MUESTRA DE ANALISIS	18
4.2. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS	18
4.3. REACTIVOS	18
4.4. PRETRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS	19
4.5. EXTRACCION DE ACETOGENINAS	19
4.6. ANÁLISIS PRELIMINAR POR CCD	20
4.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	20
4.7.1. Ensayo Preliminar con Nauplios de <i>Artemia salina</i>	20
4.7.2. Ensayo Confirmativo con Larvas del IV Estadío del <i>Culex quinquefasciatus</i>	20
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
4.9. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	21
4.9.1. Análisis de los Extractos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)	21
4.9.1.1. Cuantificación de Acetogeninas	21
4.9.1.2. Identificación de Acetogeninas	21
4.10. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DESENGRASADO (ED F001) DE LAS SEMILLAS de <i>A. cherimolia</i>	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6. DISCUSIÓN GENERAL	37
CONCLUSIONES	39

RECOMENDACIONES	30
GLOSARIO	41
ANEXOS	43
BIBLIOGRAFÍA	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Frutos de <i>A. cherimolia</i> Mill.	6
Figura 2. Hojas de <i>A. cherimolia</i> Mill.	6
Figura 3. Tipos de Superficie de <i>A. cherimolia</i>	7
Figura 4. Estructura general de Acetogeninas Lineales	9
Figura 5. Estructura general de Epoxi-acetogeninas	10
Figura 6. Estructura general de acetogeninas mono-THF	10
Figura 7. Estructura general de acetogeninas bis-THF	10
Figura 8. Estructura general de acetogeninas tri-THF	11
Figura 9. Estructura general de acetogeninas THP	11
Figura 10. Nauplios de <i>Artemia salina</i>	13
Figura 11. Larvas del cuarto estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i>	14
Figura 12. Esquema de un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia	16
Figura 13. Método para la Extracción de Acetogeninas	19
Figura 14. Esquema de la separación por CCD de los extractos ED F001, ESD F001, ED F005, ESD F005, ED F002 y EDF006 utilizando Acido fosfomolibdico y reactivo de Kedde como reveladores	24
Figura 15. Comportamiento de la Actividad Biológica de los Extractos en el Tiempo	27
Figura 16. Rectas de Mortalidad Probit de Larvas de <i>A. salina</i> por el Logaritmo de las concentraciones de los Extractos Etanólicos (ED F001, ESD F001) y metanólicos (ED F005, ESD F005) de las semillas de <i>A. cherimolia</i> a las 24 horas de Exposición para c/u de los Seguimientos	28
Figura 17. Cromatograma por CLAE del Extracto Etanólico desengrasado (ED F001) de semillas de <i>A. cherimolia</i>	31

Figura 18. Cromatograma por CLAE del Extracto Metanólico desengrasado (ED F005) de semillas de <i>A. cherimolia</i>	31
Figura 19. Estructura de la Bulatacina	33
Figura 20. Foto de las cajas de Petri a las 48 horas de incubación para el análisis de Microorganismos Aerobios Mesófilos	36

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae de Colombia	5
TABLA 2. Zonas de producción de <i>A. cherimolia</i> Mill. en Colombia	8
TABLA 3. Clasificación de la Actividad Biológica de acuerdo a la CL ₅₀ (ppm)	12
TABLA 4. Masa Obtenida de la Extracción Etanólica por el Método 1 (Semillas sin Desengrasar)	23
TABLA 5. Masa Obtenida de la Extracción Etanólica por el Método 2 (Semillas Desengrasadas)	23
TABLA 6. Concentración Letal Cincuenta ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Obtenida para cada Extracto con el Bioensayo de <i>Artemia salina</i> a lo largo de 9 semanas	26
TABLA 7. CL ₅₀ Obtenidas para los Extractos Etanólico y Metanólico Desengrasados a través del bioensayo con Larvas del IV estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i>	29
TABLA 8. Análisis Cromatográfico por CLAE del Extracto F001 Desengrasado de Semillas de <i>A. cherimolia</i>	34
TABLA 9. Análisis Cromatográfico por CLAE del Extracto F005 Desengrasado de Semillas de <i>A. cherimolia</i>	35

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Diagrama de Flujo: BIOENSAYO PRELIMINAR CON LARVAS DE <i>Artemia salina</i>	44
ANEXO B. Diagrama de Flujo: BIOENSAYO CONFIRMATIVO CON EL <i>Culex quinquefasciatus</i>	49
ANEXO C. Figura: CURVA DE CALIBRACIÓN POR CLAE PARA EL ESTÁNDAR DE BULATACINA	52
ANEXO D. Fotos: CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA	53
ANEXO E. MORTALIDAD DE NAUPLIOS DE <i>Artemia salina</i>	54
ANEXO F. Tabla: RESULTADOS PROBIT	60
ANEXO G. Tabla: ACETOGENINAS IDENTIFICADAS EN SEMILLAS DE <i>Annona cherimolia</i> Mill.	61

RESUMEN

En este estudio se realizó el análisis preliminar de la actividad biológica de los extractos etanólico y metanólico de las semillas de *Annona cherimolia* frente a larvas de *Artemia salina* como bioensayo predictivo y larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus* como bioensayo confirmativo.

Los extractos analizados fueron obtenidos a partir de semillas desengrasadas y sin desengrasar encontrándose que la actividad biológica de todos ellos frente a las larvas de *A. salina* fue muy alta presentando CL_{50} entre 1,351 y 8,871 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, los extractos desengrasados mostraron una mayor actividad, por lo que fueron elegidos para realizar el bioensayo frente a las larvas de *C. quinquefasciatus*, obteniéndose que el extracto etanólico desengrasado fue el que presentó la mayor actividad con una $CL_{50} = 0,102$ $\mu\text{g/mL}$ en un tiempo de exposición de 24 horas. Dicha actividad pudo deberse posiblemente a una interacción o efecto sinérgico de principios activos dada por un complejo alcaloidal benciltetrahydroisoquinolínico de acción citotóxica y por acetogeninas conocidas por tener propiedades insecticidas, citotóxicas y anticancerígenas.

Palabras clave: actividad biológica, *Annona cherimolia*, *Artemia salina*, *Culex quinquefasciatus*, CL_{50} , sinergia.

ABSTRACT

A biological activity study was made using methanolic as well as ethanolic extracts obtained from *Annona cherimolia* seeds. A preliminar activity analysis was made using Brine shrimps larvae; in a confirmative analysis was used a fourth stage larvae of *Culex quinquefasciatus*.

Extracts were obtained from both greased seeds and ungreased seeds. Results showed a high activity in all extracts studied, with LC_{50} values between 1,351 and 8,871 $\mu\text{g/mL}$. However, ungreased extracts exhibited a higher activity than others and for this reason were used in the confirmative bioassay. The LC_{50} obtained with the ethanolic extract was 0,102 $\mu\text{g/mL}$ in 24 hours of exposure. Activity could be associated with the synergy between an alkaloidal benzyltetrahydroisoquinolines complex which presents cytotoxic activity, and acetogenins of Annonaceae which have insecticidal and anticarcinogenic properties and cytotoxic activity.

A chromatographic analysis by HPLC showed that there were more than 14 acetogenins in the ethanolic extract, and that Bullatacin was probably one of them. A quantitative analysis reported a concentration of 2,4% of acetogenins in *Annona cherimolia* seeds.

Un análisis cromatográfico por CLAE mostró la posible presencia de 14 acetogeninas en el extracto etanólico y posiblemente la Bulatacina fue una de ellas y el análisis cuantitativo reportó en las semillas de *A. cherimolia* una concentración de acetogeninas del 2,4%.

Key words: biological activity, *Annona cherimolia*, Brine shrimp, *Culex quinquefasciatus*, LC₅₀, synergy.

1. JUSTIFICACION

El uso indiscriminado de pesticidas y herbicidas sintéticos poco degradables, trae como consecuencia problemas en el medio ambiente y en la salud del hombre. En la actualidad, los bioinsecticidas han alcanzado gran importancia debido a que estudios previos realizados muestran que tienen la ventaja de proveer modos de acción novedosos que reducen el riesgo de resistencia, son eficaces y más seguros para el medio ambiente, son degradables y más específicos para las diferentes especies de insectos, larvas y otros tipos de plagas, produciendo poco o ningún daño ambiental, mostrando así la superioridad de estos frente a los netamente sintéticos, (1, 2). Por esta razón, se hace necesario incentivar e incrementar la búsqueda de insecticidas naturales de las fuentes más promisorias y/o disponibles. En la región cafetera colombiana se dispone de cultivos de especies pertenecientes a la familia Annonaceae, las cuales se caracterizan por poseer, principalmente en las semillas, compuestos de gran bioactividad conocidos como acetogeninas. Estas presentan un rango amplio de actividades biológicas con aplicaciones promisorias como biopesticidas (1, 3, 4), antiparasitarias (1, 5, 6), citotóxicas (1, 4, 5, 7, 8) y antitumorales (1, 3, 6), entre otras.

La familia Annonaceae está constituida por 120 géneros y más de 2.000 especies, despertando el interés tanto de químicos como de farmacólogos, debido a su creciente importancia en aplicaciones médicas tradicionales.

Datos estadísticos de 1.999 revelan que Colombia poseía 4626.4 hectáreas sembradas pertenecientes a la familia Annonaceae de las cuales 1.700 pertenecen a *Annona muricata*, (2, 5, 7). Dichos cultivos están establecidos principalmente en los departamentos de Tolima, Huila, Antioquia, Valle del Cauca y Eje Cafetero. Una característica común de ésta familia es su potencial económico, puesto que por su alto valor nutritivo y las diversas formas de transformación que pueden tener sus frutos, logran enormes posibilidades de crear su propio espacio en el mercado local e internacional. Aún así, su cultivo comercial es escaso, por lo cual actualmente se viene realizando avances tecnológicos para incentivar el cultivo en todo el país de las diferentes especies de la familia Annonaceae y disminuir las altas importaciones de Venezuela y Ecuador, (7).

La *Annona cherimolia* Mill., conocida comúnmente como chirimoya es una especie de la familia Annonaceae, representativa de Colombia. Debido a que es una fruta climatérica cuya maduración en condiciones ambientales se produce de forma extraordinariamente rápida (3 a 4 días), limita su posible comercialización, puesto que la maduración va acompañada de cambios de color, textura y sabor del fruto. En cuanto a sus usos puede decirse que se consume como fruta fresca, en postres y helados; también son comunes los jugos, néctares, concentrados y otros, (9, 10).

Con el fin de contribuir al aprovechamiento integral del fruto y generar nuevos usos alternativos de la *A. cherimolia*, el presente proyecto plantea evaluar la actividad biológica de las semillas y su uso potencial como biopesticida partiendo de estudios previos realizados sobre las acetogeninas presentes en *A. cherimolia*, (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9), empleando como organismos modelos *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus*.

La *A. salina* se seleccionó por su viabilidad y conveniencia debido a que esta especie posee una amplia distribución geográfica, presenta sensibilidad a cualquier tipo de agentes tóxicos; se conoce bien su hábitat y biología; es muy fácil de mantener en condiciones de laboratorio, esto incluye poco espacio, su alimentación de bajo costo y es fácil de manipular. Por otro lado el mosquito *C. quinquefasciatus*, debido que es actualmente una de las especies de mosquitos más abundantes en el país, lo que ocasiona grandes molestias tanto al hombre como a los animales, es un organismo importante en la transmisión de agentes vectores de enfermedades y su crianza y alimentación es económicamente viable, (7,8,11,12,13,14).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica de los extractos etanólico y metanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Mill., con el propósito de establecer su potencial como bioinsecticida para el aprovechamiento integral del fruto.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar e implementar un método de extracción de acetogeninas presentes en las semillas de *A. cherimolia*, con base en estudios previos.
- Realizar el análisis preliminar de los extractos de las semillas de *A. cherimolia* por medio de cromatografía de capa delgada (CCD).
- Evaluar la actividad biológica in vitro de los extractos de *A. cherimolia*, empleando como prueba preliminar el bioensayo con *Artemia salina*.
- Confirmar la actividad biológica in vitro de los extractos de *A. cherimolia* a través del bioensayo con larvas del IV estadio del *Culex quinquefasciatus*.
- Caracterizar las acetogeninas presentes en extractos de las semillas de *A. Cherimolia*, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1. FAMILIA ANNONACEA: GENERALIDADES

La Annonaceae es una familia de árboles de zonas bajas que crecen principalmente en el sotobosque, tiene distribución pantropical y se encuentra principalmente en alturas menores de 2000 m; comprende unas 2000 especies y 130 géneros que se distribuyen por las zonas tropicales de América, África, Indochina y Malasia; desde zonas secas hasta pluviales, (15,16).

La familia Annonaceae se caracteriza por tener una corteza externa que se desprende en tiras y una corteza interna que es reticulada; las hojas son simples, enteras y generalmente aromáticas; las flores son solitarias o reunidas en cimas helicoides con todas las ramas en un mismo plano, llamadas ripidios; los frutos son sincarpes carnosos o monocarpes libres, las semillas son grandes, brillantes y algunas veces con arilos, (15, 16).

Los frutos de las Annonaceae no deben ser vistos solamente como artículos de lujo sino como parte de la alimentación de las poblaciones nativas, por las características especiales de su sabor y por ser altamente nutritivos, (17).

3.2. FAMILIA ANNONACEAE EN COLOMBIA

Para Colombia el conocimiento que se tiene de las anonáceas es escaso. En la mayoría de trabajos solo se hacen descripciones de especies nuevas para la ciencia o se presentan nuevos registros para la flora colombiana; no obstante, el número de especies en Colombia ha ido aumentando pues se están describiendo nuevos taxones en *Annona*, *Crematosperma*, *Guatteria*, *Pseudoxandra* y *Unonopsis*. Los géneros más diversos son: *Guatteria*, *Duguetia*, *Annona* y *Xilopia*; los restantes géneros tienen menos de 13 especies (Ver Tabla 1), (15).

La familia Annonaceae esta ampliamente distribuida en todo el país. La mayor diversidad de especies se encuentra en la región Amazónica (54%), Pacífica (27.5%) y Andina (27%). El (87%) crece en alturas menores de 500 m y solo *Raimonda quinduensis* alcanza los 2600 m, (15).

Esta familia es importante desde el punto de vista alimenticio pues *Annona Cherimolia*, *Annona muricata* y *Rollinia mucosa* se cultivan por sus frutos deliciosos. Algunas especies son de importancia maderera, otras se utilizan como medicinales y en ocasiones también se emplean por las comunidades indígenas en ritos ceremoniales, (15).

TABLA 1. Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae de Colombia (15)

Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae de Colombia					
Géneros	Número de Especies		Distribución		
	Mundial	Colombia	Pantropical	Neotropical	Amazonía
<i>Xylopia</i>	170	22	X		
<i>Annona</i>	150	26	X		
<i>Duguetia</i>	100	27	X		
<i>Anaxagorea</i>	29	11	X		
<i>Cananga</i>	2	1	X		
<i>Guatteria</i>	265	74		X	
<i>Rollinia</i>	44	11		X	
<i>Oxandra</i>	35	10		X	
<i>Unonopsis</i>	30	13		X	
<i>Crematosperma</i>	30	4		X	
<i>Cymbopetalum</i>	27	6		X	
<i>Desmopsis</i>	13	1		X	
<i>Pseudoxandra</i>	10	4		X	
<i>Ephedranthus</i>	10	2		X	
<i>Klarobelia</i>	10	2		X	
<i>Mosanona</i>	14	3		X	
<i>Porcelia</i>	7	2		X	
<i>Malmea</i>	6	1		X	
<i>Tetrameranthus</i>	6	3		X	
<i>Stenanona</i>	5	1		X	
<i>Bocageopsis</i>	4	2		X	
<i>Raimondia</i>	3	2		X	
<i>Fusaea</i>	2	2		X	
<i>Pseudomalmea</i>	2	2		X	
<i>Trigymaea</i>	8	1			X
<i>Guatteriopsis</i>	5	1			X
<i>Diclinanona</i>	3	2			X
<i>Froesiodendron</i>	3	2			X
<i>Guatteriella</i>	2	1			X
<i>Ruizodendron</i>	1	1			X

3.3. ANNONA CHERIMOLIA MILL. (CHIRIMOYA)

3.3.1. Clasificación Botánica:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Magnoliales
Familia: Annonaceae
Genero: *Annona*
Especie: *cherimolia*



Figura 1. Frutos de *A. cherimolia* Mill.

3.3.2. Fenología

Es un árbol entre pequeño y mediano, poco esparcido, de copa redondeada y ramas que nacen en forma irregular. Es semicaduco, lo cual indica que pierde la mayoría de sus hojas antes de emitir los nuevos brotes, (9).

3.3.2.1. Hojas:

Son alternas, varían de forma pudiendo ser oblongas, lanceoladas, acorazonadas, enteras y pubescentes, de superficie llana o ligeramente ondulada y peciolo corto; de 7-14 cm de longitud y 4-9 cm de ancho. El color varia de verde brillante a verde profundo, siendo la cara superior de un verde mas oscuro que la cara inferior. La capa superior de la hoja es escasamente vellosa y la cara inferior es tomentosa y aterciopelada. Las vellosidades de la parte inferior son útiles para distinguir la chirimoya de las demás especies, (9, 18).



Figura 2. Hojas de *A. cherimolia* Mill.

3.3.2.2. Flores:

De 2.5 cm de longitud. Se producen en las axilas de las hojas, en troncos y ramas; poseen 3 pétalos carnosos, pequeños, blancos verdosos o crema y 3 sépalos pequeños. Tienen gran número de pistilos blancos rodeados de estambres amarillentos, (9).

3.3.2.3. Fruto:

Es un sincarpio; tiene cerca de 10 cm de alto por 8-10 cm de diámetro y un peso que puede variar de 150-500 g. Su superficie puede ser lisa, impresa, umbonada, papilonada o tuberculada. El color externo de la fruta es verde oscuro que al madurar pasa a gris, haciéndose rojo purpura y casi negro a la completa madurez. La pulpa es blanca cremosa, (9, 18, 19).

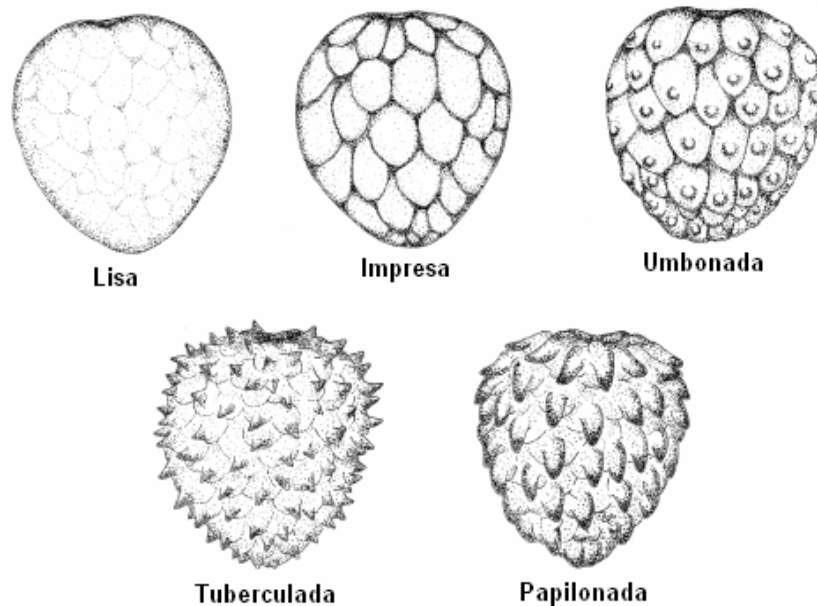


Figura 3. Tipos de Superficie de *A. cherimolia*

3.3.2.4. Semillas:

Generalmente son pocas; el color puede ser café, pardo o negro, (5, 9).

3.3.3. Ecología

Su zona óptima de cultivo esta entre los 1000-2500 m.s.n.m y con una temperatura de 18-22 °C. Los climas calientes y húmedos le son muy perjudiciales pues el calor y los vientos secos pueden causar quemaduras en las hojas.

Los suelos óptimos son los calcáreos y de fácil drenaje. Aunque el cultivo es poco exigente y se adapta a suelos pendientes y áridos, prefiere los arcillosos, con buen contenido de materia orgánica y con un pH de 6.5-7.6. Es poco tolerante a la acidez, (9).

3.3.4. Distribución Geográfica y Zonas de Producción

La *Annona cherimolia* en Colombia se encuentra silvestre en el departamento del Chocó. Según ejemplares del Herbario Nacional Colombiano (HNC), en Colombia esta especie ha sido coleccionada en los departamentos de Cundinamarca, Santander y Valle, en alturas comprendidas entre los 1000 a 2000 m.s.n.m. Según ejemplares del Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA), ha sido coleccionada en los departamentos de Antioquia y Caldas, a una altura de 1700 m.s.n.m, (5).

En Colombia existen 4 zonas de producción que son (9):

TABLA 2. Zonas de producción de *A. cherimolia* Mill. en Colombia

ZONA	DEPARTAMENTO	MUNICIPIOS
1	Nariño	Tarigua, Funes, Linares, La Unión, San José
2	Cundinamarca	Machetá, Manta, Tiberita
	Boyacá	Guateque, Sutatausa, Tenza, Pachavita, Garagoa, Chinavita, Samondoco, Guatayá
3	Antioquia	Rionegro, La Ceja, Abejorral, Sonsón, Carmen del Viboral
4	Santander	García Rovira, Charalá

3.3.5. Propiedades y Usos

- Se considera que las hojas, la corteza y los frutos verdes de *A. cherimolia* son medicinales y se emplean como astringentes para combatir las diarreas y disenterías crónicas, (20). El extracto de la corteza del tallo y las semillas es usado como veneno para peces y como insecticida, (21). La corteza y las hojas cocidas e ingeridas sirven como antihelmíntico y las hojas aplicadas localmente sirven contra las hemorroides. El fruto de *A. cherimolia* es refrescante y ligeramente laxante (22).

- Las semillas poseen un aceite fijo que parece dar a todas las especies de este género las propiedades eméticas e insecticidas que poseen, (20); repele las garrapatas, mata los piojos y una especie de mariposa conocida como *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae), también se reconocen en la cura del cáncer, úlceras y tumores malignos, (23). El aceite de la raíz de *A. cherimolia* tiene propiedades insecticida y repelente contra la palomilla del repollo (*Plutella xylostella*). Los frutos deshidratados actúan como antídoto en las intoxicaciones provocadas por bebidas o alimentos, (5, 24).

3.4. ACETOGENINAS

Varias especies de la familia Annonaceae, entre ellas la *Annona cherimolia* Mill., producen un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas. Estas acetogeninas poseen un grupo γ -lactónico α,β -insaturado o saturado y uno o dos anillos tetrahidrofuránicos sobre una larga cadena alquílica. Usualmente las posiciones α a los anillos son hidroxiladas. Son compuestos de 35 o 37 carbonos de origen policétido, con una cadena alifática que se presenta, según el caso, hidroxilada, cetonzada y/o acetoxilada, (3, 4).

Una serie de experimentos han mostrado que las acetogeninas de Annonaceae son inhibidoras de la enzima NADH en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Se encontró que inicialmente la toxicidad presentada por la exposición de insectos a las acetogeninas de Annonaceae, incluye una disminución lenta de la movilidad y crecimiento antes de la muerte. Tales síntomas son normalmente atribuidos a los bajos niveles de ATP causados por los inhibidores respiratorios, (8, 25).

3.4.1. Clasificación de las Acetogeninas

Se conocen 6 tipos de acetogeninas: lineales, epoxiacetogeninas, mono-tetrahidrofuránicas (Mono-THF), bis-tetrahidrofuránicas (Bis-THF), tri-tetrahidrofuránicas (Tri-THF) y tetrahidropiránicas (THP).

En cada uno de los anteriores tipos hay diferenciación con base en el tipo y ubicación de los sustituyentes y en especial por su estereoquímica, (3, 4).

3.4.4.1. Acetogeninas Lineales:

Son precursores de las epoxiacetogeninas y acetogeninas THF. Se diferencian por el grado de insaturación e hidroxilación en la cadena alquílica, (26, 27, 28, 29). Su estructura general es:

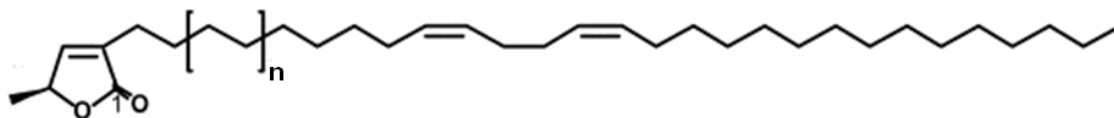


Figura 4. Estructura general de Acetogeninas Lineales

3.4.1.2. Epoxiacetogeninas:

Las acetogeninas, por lo general poseen uno o dos anillos THF. Cuando este anillo es reemplazado por un grupo epóxido se obtienen las epoxiacetogeninas. Este tipo estructural es considerado como el precursor de las acetogeninas, (3, 4, 26, 27, 28, 29). Su estructura general es:

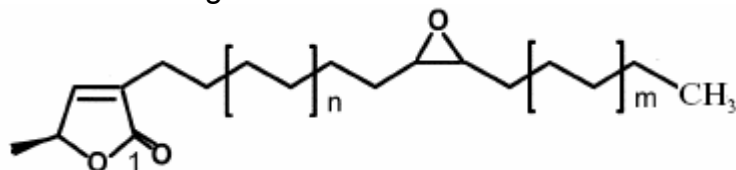


Figura 5. Estructura general de Epoxi-acetogeninas

3.4.1.3. Acetogeninas mono-THF:

Se enmarcan en aquellas que poseen un solo anillo THF; usualmente son de 35 carbonos con diferentes grados de oxidación, (3, 4, 26, 27, 28, 29). Su estructura general es:

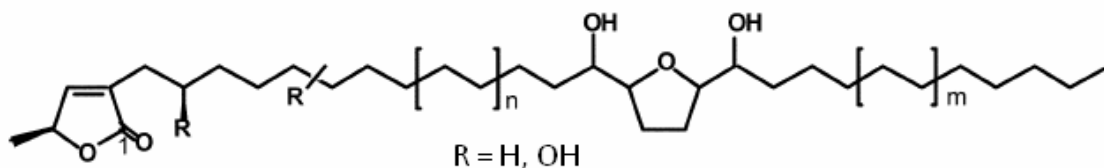


Figura 6. Estructura general de acetogeninas mono-THF

3.4.1.4. Acetogeninas bis-THF:

Son compuestos que poseen 2 anillos THF, adyacentes o no adyacentes; de 35-37 carbonos, diferenciables entre sí por el grado de oxidación, tipo, número y ubicación del sustituyente, así como de su estereoquímica, (3, 4, 26, 27, 28, 29). Su estructura general es:

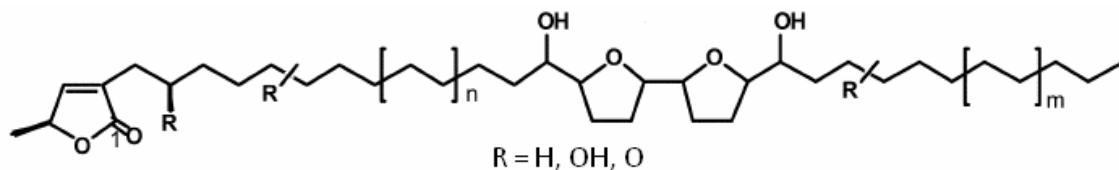


Figura 7. Estructura general de acetogeninas bis-THF

3.4.1.5. Acetogeninas tri-THF:

Son aquellas que poseen 3 anillos THF. Hasta el momento se conoce la Goniocina aislada de *Goniothalamus giganteus*, (26, 27, 28, 29). Su estructura es:

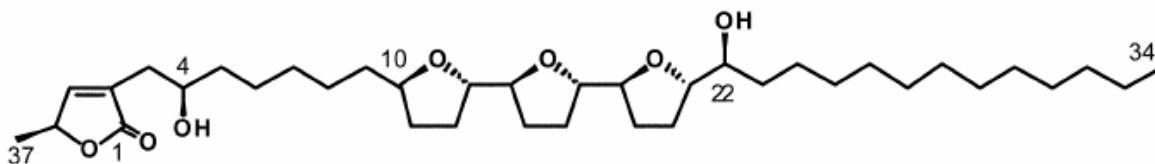


Figura 8. Estructura general de acetogeninas tri-THF

3.4.1.6. Acetogeninas Tetrahidropiránicas (THP):

Son aquellas que poseen un anillo tetrahidropirano como sustituyente en la cadena alquímica, (26, 27, 28, 29). Su estructura general es:

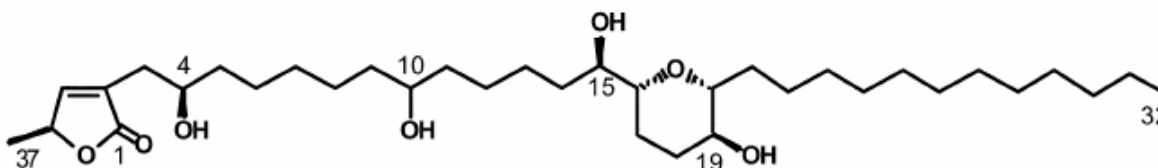


Figura 9. Estructura general de acetogeninas THP

3.4.2. Actividad Biológica de las Acetogeninas

A pesar de no conocerse el mecanismo exacto de acción de las acetogeninas, el uso folclórico de ellas ha permitido demostrar que presentan actividad pesticida, antitumoral, antiparasitaria, etc., (3, 4, 6, 25, 26, 30, 31).

Dentro de la actividad pesticida de las acetogeninas, algunas han mostrado fuerte actividad ovicida y larvicida. Si el anillo γ -lactónico α,β -insaturado está presente, los resultados de actividad pesticida son mejores que aquellos obtenidos con acetogeninas saturadas. Sin embargo, mezclas de estos compuestos encontradas en extractos crudos, dan síntomas de efectos sinérgicos que potencian la cobertura de aplicaciones de las acetogeninas como pesticidas biodegradables, (3, 4, 32).

En general, las acetogeninas de mayor potencia son las bis-THF de anillos adyacentes, seguidas por las bis-THF no adyacentes y, en menor cuantía las mono-THF, (3).

3.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Para la realización de los bioensayos es importante determinar la especie o grupo de especies útiles para desarrollar estas pruebas; para cumplir con este requisito se indaga sobre algunos aspectos de la biología básica de los organismos (nutrición, ciclo de vida, condiciones óptimas de cultivo y manejo), puesto que es esencial reunir información a cerca de los diferentes aspectos de la fisiología de

las especies potencialmente aptas para tal fin. Los bioensayos deben ser simples, rápidos, reproducibles y económicos, (12, 33).

Los tipos de bioensayos pueden ser clasificados en 5 grandes grupos (33):

1. Organismos bajos en la escala evolutiva.
2. Sistemas subcelulares aislados: enzimas, receptores, organelas.
3. Cultivo de células de origen animal o humano.
4. Órganos aislados de vertebrados.
5. Animales enteros.

3.5.1. Clasificación de la Actividad Biológica

De acuerdo a investigaciones previas realizadas (12) se determinaron cuatro criterios basados en la CL_{50} para la clasificación de los extractos, otorgando los niveles de actividad consignados en la siguiente tabla:

TABLA 3. Clasificación de la Actividad Biológica de acuerdo a la CL_{50} (ppm)

CL_{50} (ppm)	Actividad
$CL_{50} \geq 1000$	Inactivo
$500 \leq CL_{50} < 1000$	Medianamente Activo
$100 \leq CL_{50} < 500$	Activo
$0 \leq CL_{50} < 100$	Muy Activo

3.5.2. Ensayo de Actividad Biológica con *Artemia salina*

La *Artemia salina* o Brine Shrimp pertenece a un grupo de crustáceo que ha habitado la tierra por 300 millones de años y ha sido un importante eslabón en la cadena alimenticia desde entonces. La *A. salina* tal cual como lo indica su nombre, no es un habitante directo del mar sino de salinas. Este pequeño camarón es utilizado comercialmente como alimento en la cría de peces y crustáceos, también ha sido usado durante años como modelo para realizar investigaciones en disciplinas básicas y/o aplicadas, en el análisis de residuos de pesticidas y micotoxinas, entre otras, (8, 12, 34).

Los huevos de *A. salina* pueden obtenerse fácilmente y una vez colocados en agua de mar artificial, estos eclosionan en aproximadamente 48 horas obteniéndose grandes cantidades de nauplios, lo que permite su uso para comprobar la actividad biológica en extractos de productos naturales, (12, 41).

El bioensayo de la *Artemia salina* Leach se basa en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y la letalidad en un organismo

simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos. Este ensayo se caracteriza principalmente por ser de bajo costo, no requiere condiciones estériles de trabajo, es relativamente rápido y no utiliza medios de cultivo, (12, 33).



Figura 10. Nauplios de *Artemia salina*

Actualmente, el ensayo de Toxicidad contra *A. salina* se utiliza en la investigación de la fuente de toxicidad en mezclas de compuestos químicos y muestras ambientales, toxicidad aguda, estudios de modelos de acción tóxica de sustancias y para detectar la actividad biológica de sustancias tan diversas como pesticidas, micotóxicas, anestésicos, aceites esenciales, compuestos tipo morfina, entre otros. Algunos investigadores han demostrado su utilidad en la determinación de compuestos antitumorales y en el fraccionamiento biodirigido para el aislamiento de moléculas a partir de productos naturales, (35, 36, 37).

3.5.3. Ensayo de Actividad Biológica con *Culex quinquefasciatus*

Las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* se pueden encontrar en las masas de agua que contienen un alto grado de contaminación orgánica, para luego desarrollarse en una pupa, con forma de *coma*, que no se alimenta y se convierte en adulto en uno o dos días. El mosquito adulto puede medir de 4-10 mm, y morfológicamente se compone de una cabeza, tórax y abdomen. Posee además alas las cuales lo habilitan para volar, un factor importante en la capacidad del artrópodo para transmitir enfermedades, (38, 39).

Esta especie es un vector de la malaria aviar, uno de los principales vectores de *Wuchereria bancrofti* y *Dirofilaria immitis*, del virus del Nilo Occidental y de los virus causantes de la Encefalitis de San Luis y la Encefalitis Equina Venezolana, entre otros. En áreas donde no existe riesgo de transmisión de agentes patógenos por parte de esta especie, constituye un problema de salud pública debido a la alergia ocasionada por su picadura y a las molestias causadas por las altas densidades de población, (38, 39).

Debido a su antropología acentuada, la resistencia a los insecticidas, su capacidad vectorial y a las altas densidades que pueden llegar a alcanzar, el *C. quinquefasciatus* es un factor de riesgo para las poblaciones urbanas; por lo tanto, el conocimiento de los aspectos biológicos, fisiológicos y bioquímicos de la especie se constituyen en el primer paso que conlleva a la implementación de medidas que conduzcan al control de las poblaciones de mosquitos en áreas urbanas, (8, 40).



Figura 11. Larvas del cuarto estadio de *Culex quinquefasciatus*

3.5.4. Determinación de la CL₅₀ para Pruebas de Actividad Biológica

La CL₅₀ se utiliza para cuantificar y comparar la toxicidad de determinadas sustancias. El valor obtenido de CL₅₀ indica la mortalidad del 50% de los organismos expuestos y mientras menor sea este mayor es la toxicidad.

La determinación de la CL₅₀ requiere de la estadística cuantil, para lo cual es necesario transformar los valores de respuesta obtenidos en unidades Anglit, Logit o Probit y existen algunos programas especializados que realizan este tipo de cálculos automáticamente, (41).

3.6. CROMATOGRAFIA

3.6.1. Generalidades

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente

retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez, (42, 43, 44).

3.6.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

La cromatografía en capa delgada es un procedimiento rápido y sencillo para separar mezclas de sustancias, identificar, caracterizar o determinar semicuantitativamente componentes individuales.

Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a la fase móvil (normalmente, un disolvente) y a la fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel o silicagel). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación. Las separaciones se realizan por el procedimiento “ascendente”, introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente, que será succionado por acción de las fuerzas capilares del recubrimiento de la superficie de la placa, (43, 44).

Para los análisis cualitativos, la mancha en una placa de CCD se caracteriza por la distancia que recorre con relación a la distancia recorrida por la fase móvil. El parámetro usado para caracterizar esta relación es lo que se llama factor de retención o índice de retención, abreviado como R_f , (43).

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} = \frac{X}{Y}$$

3.6.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

Como su nombre lo indica, en la cromatografía líquida (CLAE) la fase móvil es un líquido. El gran poder de la cromatografía líquida reside en la combinación de un alto intervalo de posibles propiedades de la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores, (43, 44).

En la *CLAE* el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la

naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil, (42, 45).

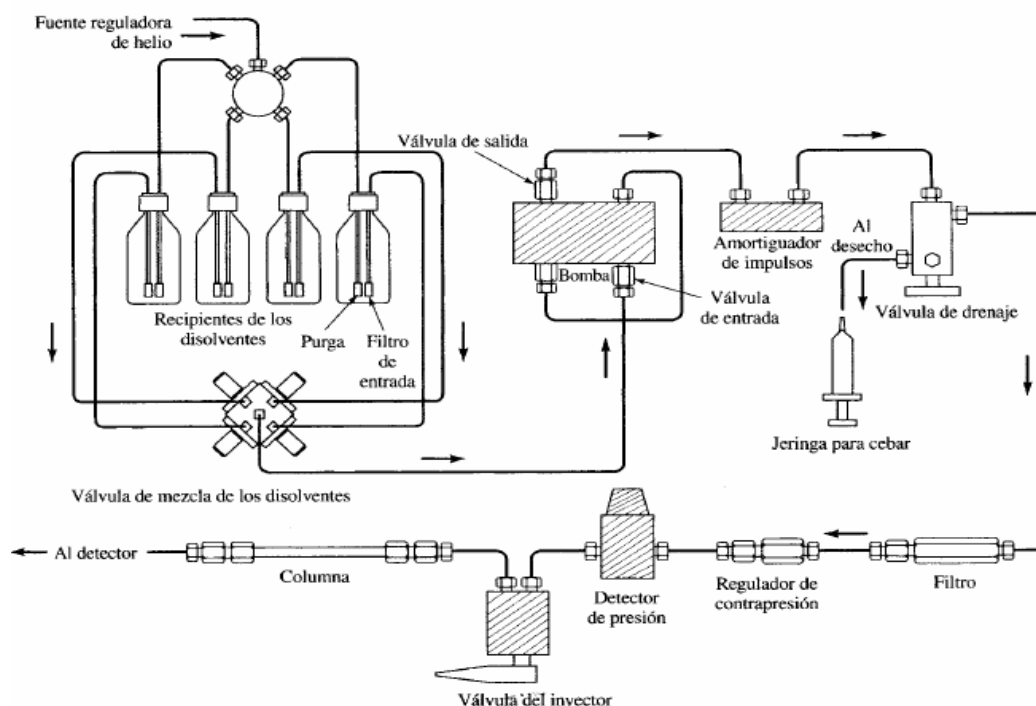


Figura 12. Esquema de un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (CLAE)

3.6.3.1. Cromatografía Líquida en Fase Normal:

La fase sólida es más polar que la fase móvil y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y cuando aumenta la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar aumenta también el tiempo de retención. Las fases estacionarias son normalmente polímeros inorgánicos (sílice o alúmina) con un gran número de poros de tamaño molecular (de pocos nm a decenas de nm), de manera que su área superficial es muy grande, (42, 44).

3.6.3.2. Cromatografía Líquida en Fase Reversa:

La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases, estando la más común formada por grupos no polares unidos a la sílice ($-CH_3$, $-C_8H_{17}$, y $-C_{18}H_{37}$). De ellos, la cadena de 18 carbonos (grupo octadecilo) es la más común. El segundo tipo de fase estacionaria usada está compuesto de partículas esféricas de polímero orgánico.

Un polímero típico es una resina compuesta de poliestireno y divinilbenceno. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos, (42, 43).

3.7. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA

El análisis microbiológico de un extracto mediante el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, se realiza con el propósito de observar la estabilidad microbiológica de este después de cierto tiempo de ser obtenido, lo que permite tener un criterio sobre el estado sanitario en el que se encuentra dicho extracto.

3.7.1. Microorganismos Mesófilos Aerobios

La mayoría de estos microorganismos se encuentran en casi todos los productos. En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30° C en las condiciones establecidas, debido a que su temperatura de desarrollo es óptima para muchas formas de vida libre, se encuentran difundidos en el medio ambiente. El recuento de estos microorganismos estima la microflora total, sin especificar tipos de microorganismos, reflejando la calidad sanitaria del producto a examinar, las condiciones de manipulación y las condiciones higiénicas de la materia prima, (46).

3.7.1. Método de Recuento en Placa

Es el método comúnmente utilizado para determinar el número de unidades formadoras de colonia (ufc) en un alimento. Este recuento se considera como indicador del grado de contaminación de los alimentos en cualquier etapa del proceso de producción, permite también obtener información sobre la alteración y la vida útil de un producto, (47).

4. METODOLOGÍA

4.1. MUESTRA DE ANÁLISIS

Se emplearon semillas de frutos maduros de *A. cherimolia* (Annonaceae) “Chirimoya” procedentes del departamento de Cundinamarca, suministradas por un proveedor de Merca Plaza en la ciudad de Pereira. La clasificación botánica de la planta fue verificada por el ingeniero agrónomo Hernán Giraldo de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal (UNISARC). En el laboratorio de Oleoquímica de la UTP se secaron las semillas en estufa a 37 °C durante 72 horas, fueron molidas y almacenadas en un congelador a -20 °C para análisis posteriores.

4.2. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- Estufa marca APT line™ BINDER
- Molino marca Corona
- Nevera TEMPLow
- Balanza Analítica Electrónica Metler Toledo AB204 Precisión ±0.0001 g
- Rotavapor Laborota 4003-Control Heidolph
- Microjeringa Hamilton de 10 µL
- Jasco HPLC 2000 Plus:
 - Bomba: Jasco PU-2089 Plus
 - Detector: Arreglo de Diodos Jasco MD-2015 Plus
 - Automuestreador: Jasco AS-2059 Plus
 - Horno para Columna: Jasco CO-2065 Plus
 - Interfase: LC-Net II/ADC
 - Software: EZChrom Elite

4.3. REACTIVOS

- Éter de Petróleo
- Etanol Absoluto
- Metanol Grado Analítico
- Reactivo de Kedde (ácido 3,5-dinitrobenzoico/MeOH - KOH/MeOH)
- Acido Fosfomolibdico al 5% / MeOH
- Dicromato de Potasio
- Acetonitrilo Grado HPLC
- Agua Grado HPLC
- Sal Marina
- Larvas de *Artemia salina*
- Cromatofolios Al TLC 20X20 cm Silicagel 60 Merk
- Patrón de Bulatacina

4.4. PRETRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS

Las semillas fueron molidas en molino de aspas y el polvo obtenido se dividió en dos porciones: una que se conservó en congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de bolsas plásticas y la otra se desengrasó siguiendo la metodología propuesta por otros autores, (2, 6), empleando Éter de Petróleo como solvente en una relación muestra-solvente 1:4 y 72 horas de extracción.

4.5. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS

Se llevó a cabo por lixiviación, implementando dos métodos de análisis y realizando los ensayos por triplicado.

En el Método 1 (1, 2, 6), la extracción se hizo con polvo de semillas sin desengrasar empleando etanol absoluto como solvente extractor en una relación 1:4 (50 g de polvo de semillas y 200 mL de solvente), durante una semana a temperatura ambiente y agitación magnética permanente.

En el Método 2 se empleó el mismo procedimiento anterior pero se partió de semillas desengrasadas.

Los extractos obtenidos se concentraron en rotaevaporador y se continuó con la separación según el esquema que se representa en la Figura 13.

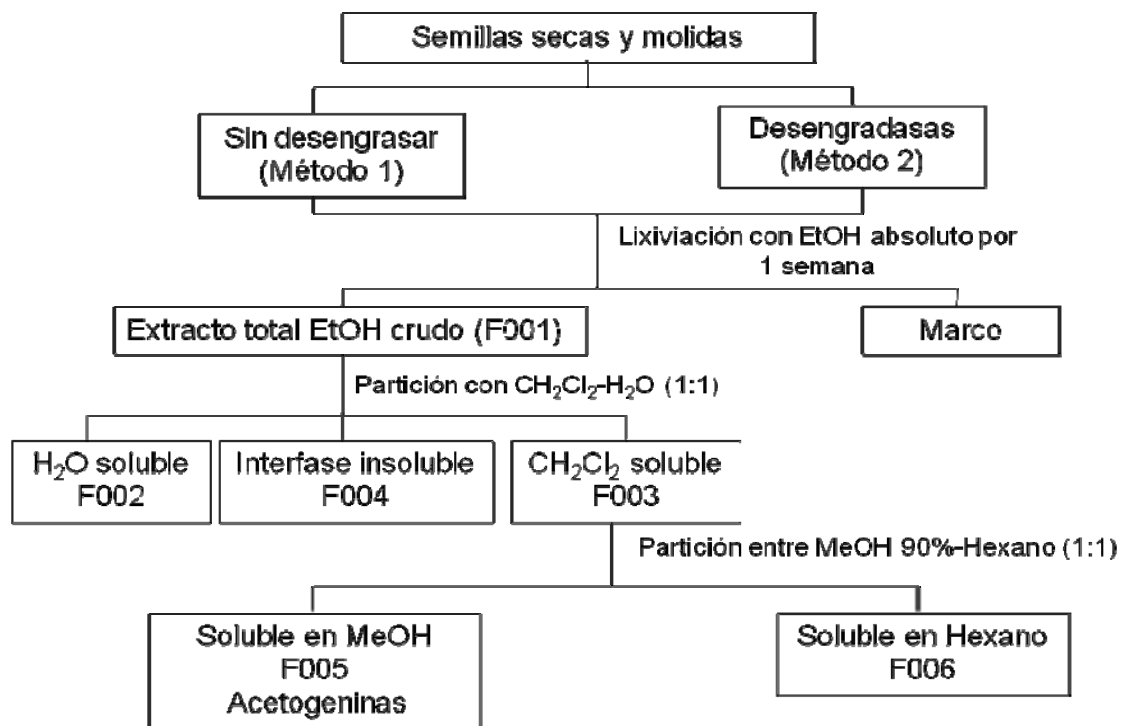


Figura 13. Diagrama de Flujo de la Extracción de Acetogeninas de Semillas de *A. cherimolia* ,(48).

4.6. ANÁLISIS PRELIMINAR POR CCD

Se realizó el análisis cromatográfico a las fracciones F001, F002, F005 y F006 obtenidas de semillas desengrasadas y sin desengrasar. Se emplearon placas de silicagel 60 soportadas en aluminio de 2.5 x 7.0 cm.

Se ensayaron diferentes sistemas de elución según estudios previos, (3, 4) y se utilizaron como reveladores el reactivo de Kedde en aerosol y el Acido fosfomolibdico al 5% / MeOH.

Este análisis se realizó con los extractos recién obtenidos y a los dos meses para verificar la presencia de las acetogeninas.

4.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.7.1. Ensayo Preliminar con Nauplios de *Artemia salina*

Se llevó a cabo siguiendo la metodología de McLaughlin, (49). Se preparó una solución de 1000 ppm con los extractos de las fracciones etanólica (F001) y metanólica (F005) obtenidas de semillas desengrasadas y sin desengrasar. A partir de esta solución se realizaron diluciones para evaluar por triplicado, a concentraciones de 1, 5, 9, 10, 100 y 1000 ppm, disueltas en 20 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) según Anexo A. Los ensayos se llevaron a cabo en frascos de vidrio de 5 mL. En estos se adicionaron las diluciones de las fases correspondientes disueltas en DMSO, se depositaron 10 larvas de *Artemia salina* y se adicionaron 5 mL de la solución salina al 3.7%, (49). El conteo de larvas se llevó a cabo a las 24 horas.

La evaluación de los extractos se realizó simultáneamente con un blanco preparado con solución marina al 3.7% y como control positivo dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) a 50, 100, 200, 400 y 600 ppm, (Ver ANEXO A).

Este procedimiento se repitió cada dos semanas durante dos meses para un total de cinco repeticiones.

4.7.2. Ensayo Confirmativo con Larvas del IV Estadío del *Culex quinquefasciatus*

Se realizaron pruebas con larvas del IV estadío del *Culex quinquefasciatus* utilizando las fracciones que mostraron mayor actividad en el Ensayo Preliminar con *A. salina*. Este procedimiento fue realizado por el grupo de Productos Naturales de la Universidad Nacional, sede Bogotá siguiendo una modificación de la metodología de McLaughlin, (41, 50) como se indica en el ANEXO B.

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la determinación de la CL_{50} se procesaron los datos de la evaluación de la actividad biológica con el programa EPA Probit Analysis Program Versión 1.5, que además realiza el cálculo automático de la fórmula de Abbott.

4.9. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ACETOGENINAS

4.9.1. Análisis de los Extractos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE).

Siguiendo una modificación de la metodología de Gromek (51) se realizó el análisis cromatográfico de los extractos que presentaron mayor actividad (Extractos desengrasados F001 y F005) así como del estándar de Bulatacina empleando el equipo Jasco HPLC 2000 Plus con las siguientes condiciones de análisis:

Columna: Restek Pinnacle DB C18, 100mmx3,2mmx3 μ m x140A°

Precolumna: 20mmx4,4mm Ultra aqueous C18, 5 μ m

Temperatura de la Columna: 40 °C

Flujo: 0,8 mL/min

Fase Móvil: H₂O-CH₃CN (A-B)

Gradiente:	t (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
	0,0	30,0	70,0
	3,0	30,0	70,0
	12,0	20,0	80,0
	16,0	20,0	80,0

Detector: Arreglo de diodos, λ = 200-400 nm

Tiempo de Corrida: 16 min

4.9.1.1. Cuantificación de Acetogeninas

La cuantificación de acetogeninas se hizo en los mismos extractos por el método del estándar externo empleando una curva de calibración de Bulatacina a una λ =205 \pm 4 nm, utilizando concentraciones de 10; 30; 50; 100; 300; 500 y 1000 μ g/mL, corridas por triplicado, (Ver ANEXO C).

4.9.1.2. Identificación Preliminar de Acetogeninas

La identificación preliminar de las acetogeninas se realizó según su espectro ultravioleta obtenido en la separación cromatográfica para cada uno de los picos con el detector de arreglo de diodos (λ =205 \pm 4 nm) y la identificación de la Bulatacina se llevó a cabo por comparación con el tiempo de retención (t_R) del estándar analizado en la mismas condiciones.

4.10. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DESENGRASADO (ED F001) DE LAS SEMILLAS de *A. cherimolia*

La determinación de mesófilos aerobios viables del extracto ED F001 se realizó por triplicado implementando el Método de Recuento en Placa propuesto por el INVIMA (47), 4 meses después de su obtención con la finalidad de observar la estabilidad microbiológica del extracto después de este tiempo.

En cabina de flujo laminar se realizaron diluciones sucesivas de 10^0 , tomando 1 mL de muestra y 9 mL de agua peptonada estéril y de la cual se tomó el volumen correspondiente para preparar las demás diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . De cada dilución se tomó 1 mL, se adicionó a la caja de Petri estéril, se vertió el Agar Plate Count a 45 °C, se mezcló y posteriormente se incubó a 37 °C por 48 horas. Paralelamente se realizó el control del medio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS

Como se aprecia en las Tablas 4 y 5, de las semillas de *A. cherimolia* sin desengrasar se obtuvo un porcentaje de rendimiento en el extracto total de 7,39%; mientras que para las semillas desengrasadas fue del 4,24%. Esta diferencia puede atribuirse principalmente a la presencia de materia grasa en el extracto etanólico sin desengrasar (ESD F001) y se considera que no implica una mayor cantidad de componentes activos en dicho extracto.

Tabla 4. Masa Obtenida de la Extracción Etanólica por el Método 1 (Semillas sin Desengrasar)

Ensayo	Masa Semillas (g)	Masa Extracto Etanólico (g)	% Rendimiento
1	50,0033	4,0033	8,00
2	50,0014	4,2709	8,54
3	50,0014	2,8128	5,62
Total	150,0061	11,0870	-----
Promedio	50,0020	3,6957	7,39

Tabla 5. Masa Obtenida de la Extracción Etanólica por el Método 2 (Semillas Desengrasadas)

Ensayo	Masa Semillas (g)	Masa Extracto Etanólico (g)	% Rendimiento
1	50,0061	1,8034	3,61
2	50,0040	2,2125	4,42
3	50,0032	2,3379	4,68
Total	150,0133	6,3538	-----
Promedio	50,0044	2,1179	4,24

5.2. ANÁLISIS PRELIMINAR DE ACETOGENINAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (CCD)

Los resultados por cromatografía en capa delgada de las fracciones ED F001, ED F005, ESD F001, ESD F005, ED F002 y ED F006 se esquematizan en la Figura 14 (placas originales en ANEXO D).

Fue necesario realizar varios ensayos con diferentes mezclas de solventes (3, 4) teniendo en cuenta la polaridad y seleccionar así, el sistema que mejor separación produjera, siendo seleccionada la mezcla CHCl_3 -MeOH (9:1).

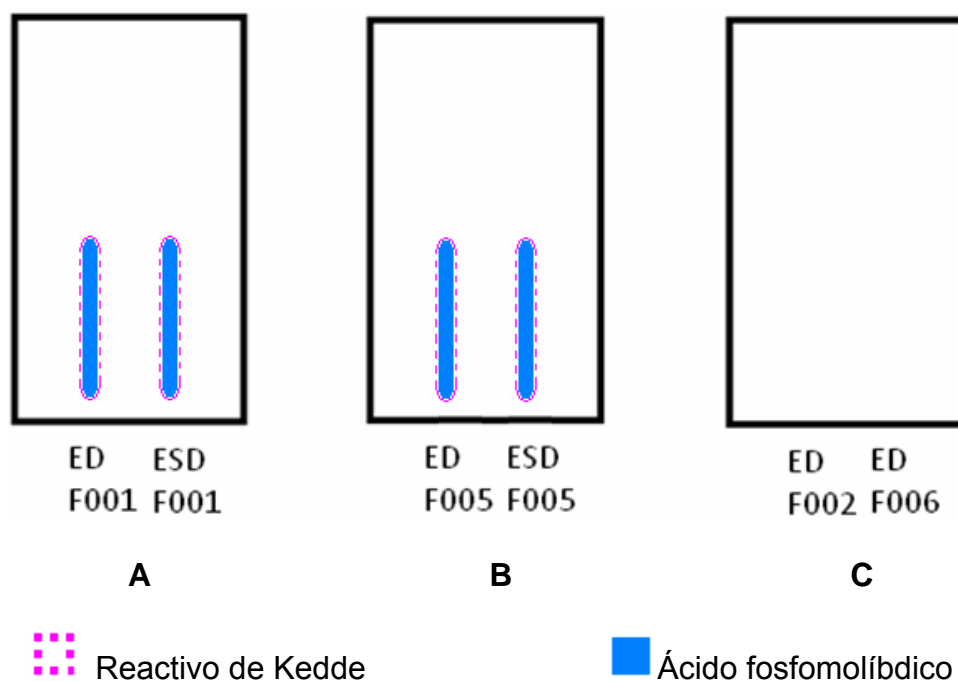


Figura 14. Esquema de la separación por CCD de los extractos ED F001, ESD F001, ED F005, ESD F005, ED F002 y ED F006 utilizando Acido fosfomolibdico y reactivo de Kedde como reveladores.

La separación en las cromatoplasmas de los extractos etanólicos (F001) frescos desengrasados (ED) y sin desengrasar (ESD), al revelar con ácido fosfomolibdico evidenció una única mancha sin R_f medible de color azul grisáceo; y con el reactivo de Kedde, se observó la misma mancha pero de color rosado, (Ver Figura 14 A). Con los extractos metanólicos se presentó un comportamiento similar a los etanólicos, encontrándose igualmente una mancha de color azul grisáceo con el ácido fosfomolibdico y una mancha rosada con el reactivo de Kedde, (Ver Figura 14 B). La coloración rosada que presentan los extractos en las cromatoplasmas con el reactivo de Kedde indica la posible presencia de acetogeninas con anillo γ -lactónico α,β -insaturado en todos los extractos, (4). En éste análisis no fue posible identificar las acetogeninas por R_f , pues la aparición de manchas continuas muestra la alta complejidad de estos extractos y la posible presencia de acetogeninas isoméricas de diversas polaridades.

Al cabo de dos meses, tanto para los extractos etanólicos como metanólicos, se encontraron los mismos resultados, indicando que en los extractos no se había degradado las acetogeninas presentes.

Como se aprecia en la figura 14 C, los extractos acuoso (F002) y orgánico (F006) desengrasados (ED) no revelaron manchas con el ácido fosfomolibdico

ni con el reactivo de Kedde, indicando que las acetogeninas podrían estar presentes en concentraciones no detectables por los reveladores empleados.

5.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.3.1. Ensayo Preliminar con Nauplios de *Artemia salina*

Las concentraciones utilizadas inicialmente para determinar la Concentración Letal Cincuenta (CL₅₀) de los extractos de semillas de *A. cherimolia* Mill., fueron de 1000, 100 y 10 µg/mL (8, 12). Cada concentración se evaluó por triplicado con el fin de observar la reproducibilidad de la respuesta. Al analizar la mortalidad de las larvas por parte de estos extractos se encontró que con todos fue del 100% mostrando una alta actividad biológica y una CL₅₀=0, por lo tanto, se decidió ensayar concentraciones de los extractos menores a 10 µg/mL, empleando concentraciones de 9, 5 y 1 µg/mL, con las cuales no se obtuvo el 100 % de mortalidad en todos los extractos (ver ANEXO E). Según los resultados obtenidos se encontró que los extractos a concentraciones de 9 y 5 µg/mL mostraron en su mayoría una mortalidad de los nauplios superior al 50%, mientras que para los extractos de 1 µg/mL se obtuvo una mortalidad menor al 50%.

En cuanto a los ensayos con K₂Cr₂O₇ como control positivo, se encontró que de las concentraciones evaluadas (50, 100, 200, 400 y 600 µg/mL), se obtuvo mortalidad total con 200, 400 y 600 µg/mL, seleccionando estas para los bioensayos.

En la Tabla 6 se compilan los resultados del seguimiento de la actividad biológica de los extractos evaluados a lo largo de 9 semanas, frente a nauplios de *A. salina* como bioensayo preliminar. Durante este periodo, se observó que todos los extractos se encontraron dentro de un rango de concentraciones letales entre 1,351 y 8,871 µg/mL que de acuerdo con la tabla 3 corresponden a extractos con una alta actividad biológica, (1, 12).

Los extractos recién obtenidos (seguimiento 1), según su CL₅₀, mostraron una gran actividad pues presentaron concentraciones en un rango entre 1,516 y 2,570 µg/mL. Sin embargo, se observó que existen diferencias entre los extractos etanólicos y metanólicos, siendo los metanólicos ligeramente más activos que los etanólicos. Además, los extractos desengrasados presentaron mayor actividad que los extractos sin desengrasar posiblemente porque en estos, los componentes activos se concentran, indicando que en la fracción lipídica eliminada no hay una cantidad apreciable de dichos componentes. Este mismo comportamiento se mantuvo en los demás ensayos hasta la novena semana (seguimiento 5).

La actividad biológica de cada uno de los extractos según el bioensayo preliminar con nauplios de *A. salina*, se da en el siguiente orden de menor a mayor:

ESD F001 < ESD F005 < ED F001 < ED F005
—————→
 Actividad Creciente

Tabla 6. Concentración Letal Cincuenta (CL₅₀) Obtenida para cada Extracto con el Bioensayo de *Artemia salina* a lo largo de 9 semanas.

# SEGUIMIENTO	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL) 24 h	Límites del 95% de confianza	Actividad (12)
1 (1 ^{ra} Semana)	ED F001	1,516	0,831-2,223	MA+
	ED F005	1,351	0,697-2,014	MA+
	ESD F001	2,570	1,735-3,525	MA+
	ESD F005	1,796	0,805-2,834	MA+
2 (3 ^{ra} Semana)	ED F001	1,891	1,146-2,693	MA+
	ED F005	1,410	0,585-2,240	MA+
	ESD F001	3,054	1,844-4,438	MA+
	ESD F005	2,718	1,718-3,908	MA+
3 (5 ^{ta} Semana)	ED F001	2,383	1,497-3,387	MA+
	ED F005	1,792	0,973-2,655	MA+
	ESD F001	3,191	1,814-4,561	MA+
	ESD F005	2,678	1,672-3,870	MA+
4 (7 ^{ma} Semana)	ED F001	2,589	1,650-3,680	MA+
	ED F005	2,420	0,803-4,446	MA+
	ESD F001	3,337	1,838-4,840	MA+
	ESD F005	2,663	1,629-3,892	MA+
5 (9 ^{na} Semana)	ED F001	3,321	2,244-4,675	MA+
	ED F005	2,875	1,986-3,910	MA+
	ESD F001	8,871	4,494-155,932	MA+
	ESD F005	4,789	2,324-15,848	MA+

ED F001: Extracto EtOH Desengrasado

ED F005: Extracto MeOH Desengrasado

ESD F001: Extracto EtOH Sin Desengrasar

ESD F005: Extracto MeOH Sin Desengrasar

MA+: Muy Activo

En la figura 15 se representa el gráfico del comportamiento de la actividad biológica de los extractos analizados. En ella puede apreciarse que la CL₅₀ del extracto metanólico desengrasado aumentó de un seguimiento a otro, observándose un incremento de 2,13 veces del extracto fresco (CL₅₀= 1,351 µg/mL) hasta el extracto en la novena semana (CL₅₀= 2,875 µg/mL). Un comportamiento similar se observó para el extracto etanólico desengrasado cuya CL₅₀ en la primer semana (seguimiento 1) incrementó con respecto a la última semana (seguimiento 5) en un factor de 2,19 veces.

La CL₅₀ del extracto metanólico sin desengrasar aumentó 2,67 veces desde la primera semana del seguimiento hasta la última, lo que significa una disminución de la actividad biológica en más de la mitad; mientras que la CL₅₀ del extracto etanólico sin desengrasar aumentó 3,45 veces. Puede observarse que éste extracto fue el que presentó la mayor disminución en la actividad biológica a lo largo de las 9 semanas de análisis. Aunque todos los extractos presentaron incrementos a través del tiempo en la CL₅₀, estos siguen considerándose como Muy Activos, (1, 12).

Puede apreciarse que todos los extractos se fueron degradando con el tiempo, sin embargo, a partir de la séptima semana se observa que los extractos sin desengrasar se degradaron más rápidamente que aquellos que fueron desengrasados, debido posiblemente a procesos de oxidación sufridos por los componentes lipídicos presentes en los extractos no desengrasados. La degradación que sufren los extractos en general, puede considerarse, por una parte, ventajosa pues indica que el posible biopesticida elaborado a partir de estos extractos no permanecería en el ambiente por mucho tiempo, evitando la contaminación de aguas e incorporación a suelos, animales y seres humanos, contrario a lo que ocurre con los pesticidas de origen sintético cuya degradación es lenta, (52, 53); y por otra parte, desventajosa pues la corta permanencia de este biopesticida sobre la planta u objeto para realizar su actividad insecticida ocasionaría un aumento en la cantidad y veces de aplicación, así como una mayor inversión económica.

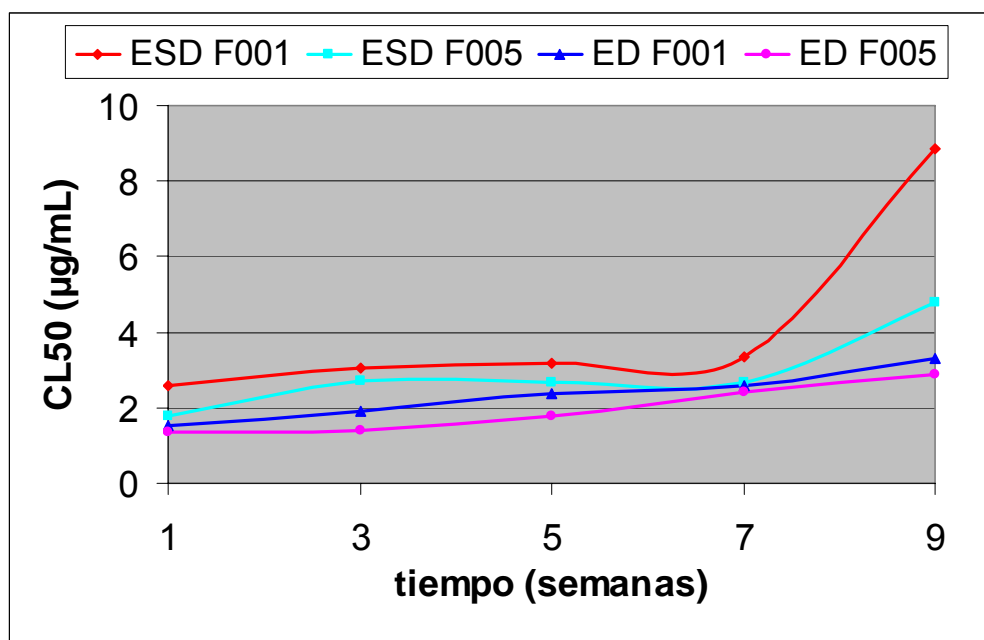


Figura 15. Comportamiento de la Actividad Biológica de los Extractos en el Tiempo.

Otro apoyo gráfico para evidenciar el comportamiento de la actividad biológica de los extractos puede apreciarse en las curvas de concentración-respuesta, (48, 54) representadas en la Figura 16. Todas las curvas presentaron una pendiente positiva cuyo valor no fue cero, lo que permitió demostrar que todos los extractos tuvieron un efecto tóxico sobre los nauplios de *A. Salina* a lo largo de las 9 semanas de análisis, (Ver Anexo F).

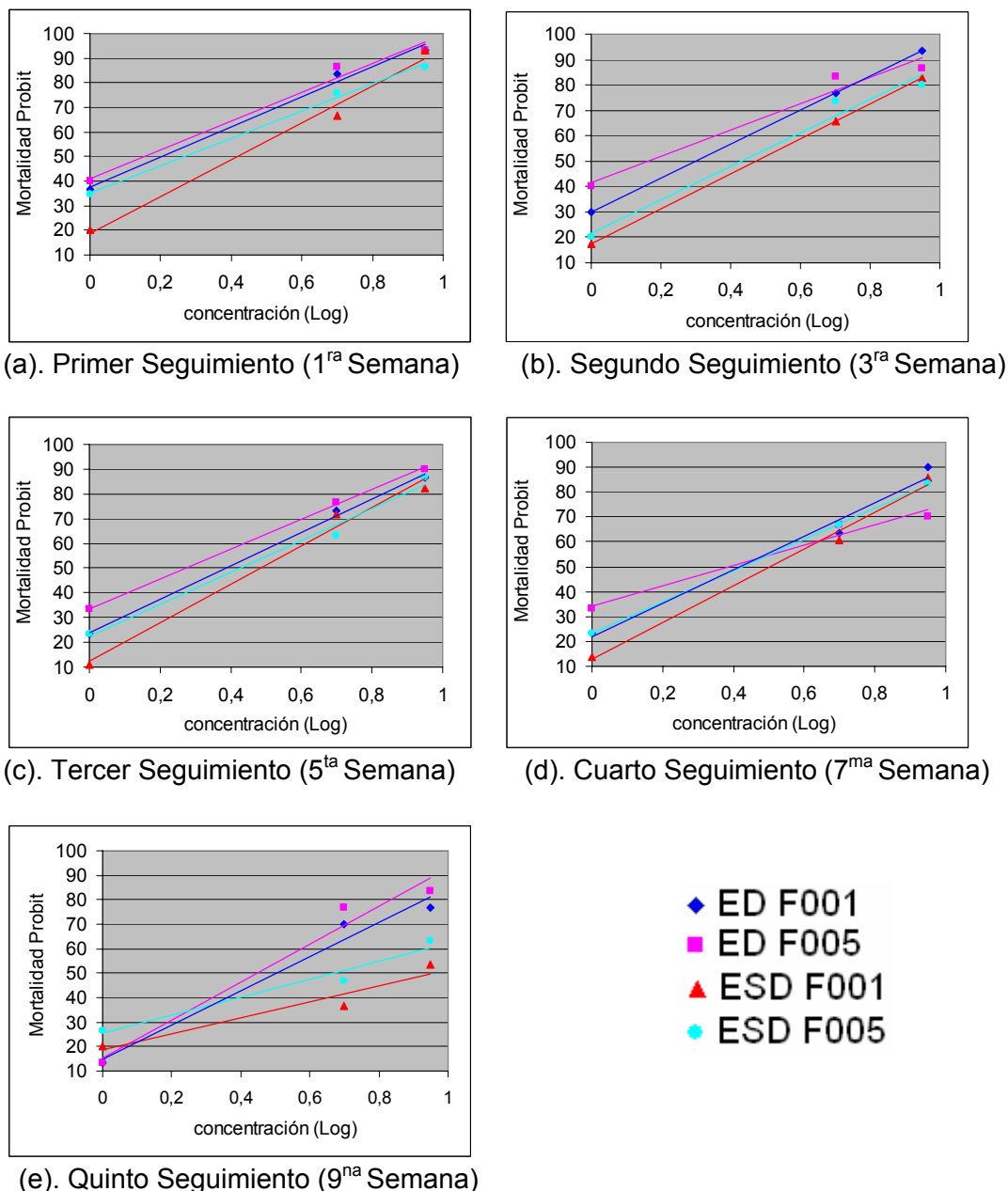


Figura 16. Rectas de Mortalidad Probit de nauplios de *A. salina* por el Logaritmo de las concentraciones de los Extractos Etanólicos (ED F001, ESD F001) y metanólicos (ED F005, ESD F005) de las semillas de *A. cherimolia* a las 24 horas de Exposición para c/u de los Seguimientos.

De acuerdo con la mortalidad y con la inclinación de la pendiente puede observarse en cada seguimiento que los extractos más tóxicos fueron los desengrasados, presentando el extracto metanólico los mayores porcentajes de mortalidad para cada una de las concentraciones evaluadas. De otro lado, los extractos sin desengrasar presentaron la menor toxicidad siendo menos efectivo el extracto etanólico. A medida que avanza el tiempo puede apreciarse la disminución en la mortalidad causada por cada uno de los extractos; sin embargo, los más tóxicos siguen siendo los extractos desengrasados.

5.3.2. Ensayo Confirmativo con Larvas del IV Estadío del *Culex quinquefasciatus*

Mediante el bioensayo preliminar con nauplios de *A. salina* se encontró que los extractos etanólico y metanólico desengrasados presentaron los mejores resultados, con los cuales se realizó el bioensayo con *C. quinquefasciatus* para confirmar cuál produce la mayor mortalidad.

En la Tabla 7 se presentan los valores de CL₅₀ encontrados para los extractos etanólico y metanólico desengrasados después de 9 semanas de ser obtenidos, frente a larvas de *C. quinquefasciatus* a las 24 y 48 horas de exposición. Las concentraciones utilizadas de cada extracto para hallar la CL₅₀ fueron de 1,0; 0,5; 0,25; 0,10 y 0,005 µg/mL, evaluadas por triplicado.

Ambos extractos se encontraron dentro de un rango de concentraciones letales entre 0,095 y 0,214 µg/mL, considerándose de alta actividad según varios autores, (1,2).

TABLA 7. CL₅₀ Obtenidas para los Extractos Etanólico y Metanólico Desengrasados a través del bioensayo con larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus*.

EXTRACTO DESENGRASADO	CL₅₀ (µg/mL) 24 h	CL₅₀ (µg/mL) 48 h
F001	0,115 (0,078-0,168)	0,102 (0,057-0,161)
F001	0,090 (0,023-0,166)	0,085 (0,067-0,121)
F001	-----	0,099 (0,065-0,150)
promedio	0,102 (0,050-0,167)	0,095 (0,063-0,144)
F005	0,202 (0,110-0,287)	0,192 (0,107-0,290)
F005	0,223 (0,009-0,302)	0,220 (0,110-0,210)
F005	0,217 (0,121-0,365)	0,194 (0,105-0,320)
promedio	0,214 (0,080-0,318)	0,202 (0,107-0,273)

El incremento en la actividad biológica para el extracto etanólico desengrasado desde las 24 hasta las 48 horas fue del 6,86% y para el extracto metanólico fue del 5,6% lo cual indica que el evaluar las larvas a las 24 horas fue suficiente, pues el efecto observado a las 48 horas no produjo un aumento importante. Sin embargo, se observa que existen diferencias entre los extractos etanólico y metanólico, siendo el etanólico 2,1 veces más activo que el metanólico en ambos tiempos de exposición. Por lo tanto, se consideró de mayor toxicidad el extracto etanólico desengrasado (ED F001) de las semillas de *A. cherimolia*, pues requirió menor concentración que el metanólico en el mismo tiempo de exposición.

Actualmente los pesticidas a base de piretroides son una de las principales armas para el control del mosquito *C. quinquefasciatus*. Su acción, es a nivel del sistema nervioso, generando una alteración de la transmisión del impulso nervioso, poseen una alta estabilidad y su degradación se presenta alrededor de los 6 meses, (55, 56). Estudios realizados en larvas de *C. quinquefasciatus*, (14, 57, 58) han establecido CL_{50} alrededor de 0,0001 y 0,1 mg/L de algunos piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina). Comparando esto frente a lo que se encontró para el extracto etanólico desengrasado en el bioensayo con larvas de *C. quinquefasciatus* ($CL_{50} = 0,102 \mu\text{g/mL}$), puede apreciarse que éste extracto natural posee un potencial biopesticida valioso, causando un efecto tóxico similar al de los piretroides.

5.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

5.4.1. Análisis de los Extractos Etanólico y Metanólico Desengrasados (ED F001 y ED F005)

Con las condiciones de separación utilizadas se obtuvieron los cromatogramas que se presentan en las Figuras 17 y 18.

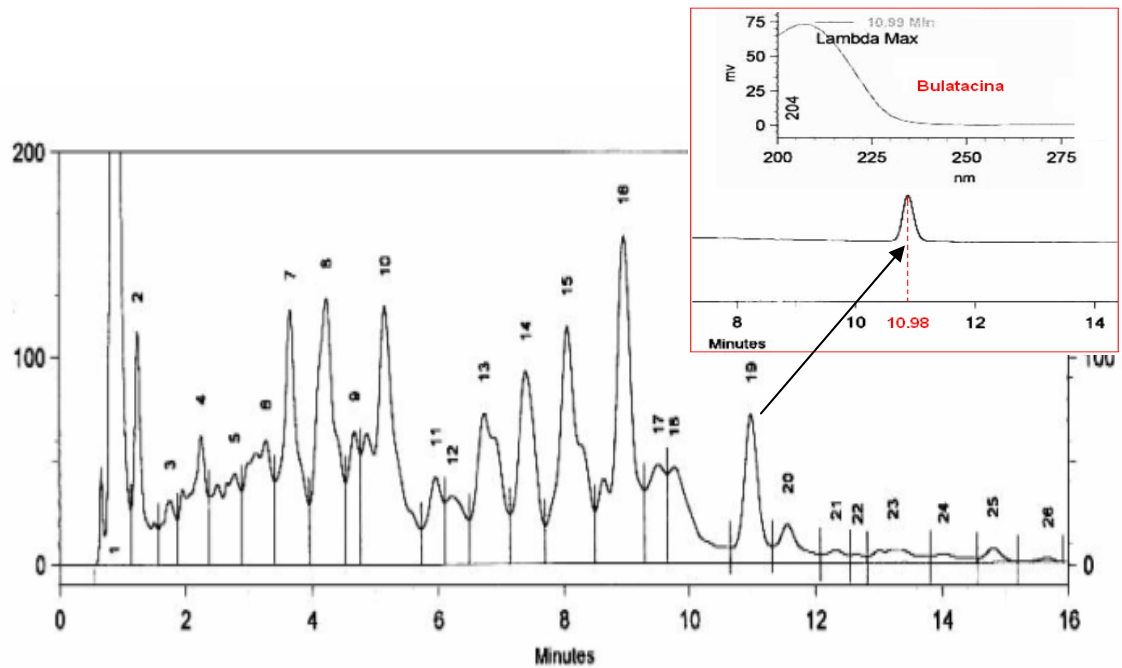


Figura 17. Cromatograma por CLAE del Extracto Etanólico desengrasado (ED F001) de semillas de *A. cherimolia*.

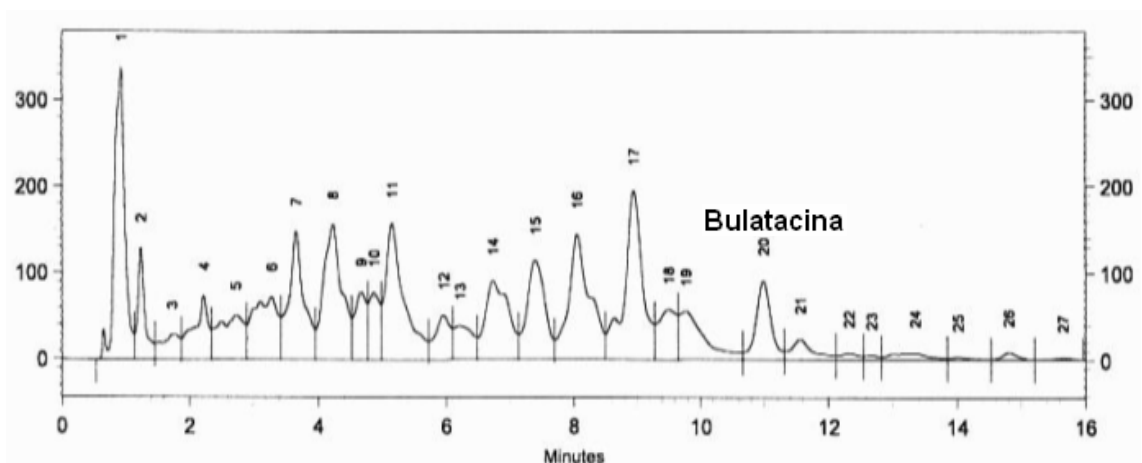


Figura 18. Cromatograma por CLAE del Extracto Metanólico desengrasado (ED F005) de semillas de *A. cherimolia*.

Como se aprecia en el cromatograma del extracto etanólico desengrasado (Ver Figura 17) se lograron detectar 26 compuestos de los cuales, según estudios previos basados en el espectro ultravioleta, se puede inferir que 14 correspondieron posiblemente a acetogeninas de Annonaceae; mientras que en el cromatograma del extracto metanólico desengrasado (Ver Figura 18) se observan 27 picos de los cuales 15 correspondieron posiblemente a acetogeninas. Los demás picos (resaltados en rojo en las Tablas 8 y 9) presentaron longitudes de onda entre 276 nm y 281 nm, correspondientes posiblemente a compuestos como: flavonoides 240-285 nm (59, 60, 61, 62), alcaloides bencilisoquinolínicos 225-280 nm (63, 64) o fenoles 270 nm (65, 66).

Se observa que para ambos extractos se mantienen los mismos componentes, apreciándose una diferencia en la integración de un pico más para el extracto metanólico.

De acuerdo con el tiempo de retención del estándar de Bulatacina (10,98 minutos) se puede inferir la posible presencia de éste compuesto en los extractos etanólico y metanólico. Sin embargo, sería importante utilizar otras técnicas como Espectroscopía de Masas (EM) o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para confirmar lo inferido. Siendo así, sería la primera vez que se reportaría esta acetogenina en las semillas de *A. cherimolia* y su presencia podría atribuirse al origen de la planta, pues los metabolitos secundarios varían según el lugar de procedencia pudiendo servir como marcadores de origen, (67, 68, 69).

La gran similitud encontrada entre los perfiles cromatográficos de ambos extractos podría indicar que durante el proceso de fraccionamiento, no hubo pérdidas importantes de las posibles acetogeninas.

En cromatografía líquida en fase reversa, a mayor número de grupos hidroxilo (-OH), más corto es el tiempo de retención (51). Al analizar la estructura de la Bulatacina (Ver Figura 19) se observa que tiene tres grupos -OH, uno en C-4, otro en C-15 y el último en C-24. Pero el hecho de que sea más apolar que los otros picos, puede ser explicado por la capacidad que poseen las acetogeninas con grupos -OH en C-4 de formar puentes de hidrógeno con la función carbonilo de la γ -lactona, reduciendo la interacción con la fase móvil e incrementando el tiempo de retención; es decir, aunque el grupo hidroxilo es más efectivo que el grupo carbonilo en incrementar la polaridad, la formación de enlaces de hidrógeno internos entre el grupo hidroxilo del C-4 y el carbonilo de la γ -lactona, conduce a una disminución de la misma (aumento del tiempo de retención) de la Bulatacina con respecto a los picos de los compuestos que eluyeron antes que ella.

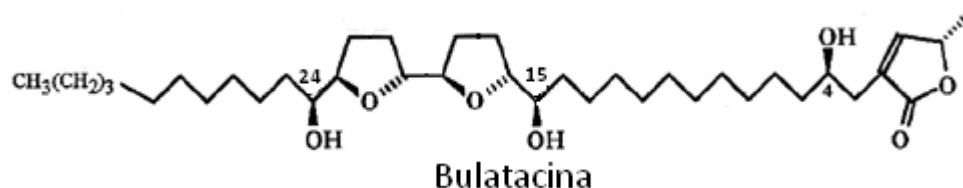


Figura 19. Estructura de la Bulatacina

En estudios previos realizados con semillas de *A. cherimolia* se han reportado hasta 24 acetogeninas, (25, 27, 28, 29, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80), indicando que es posible la presencia de más de estos compuestos en los extractos evaluados pero que es necesario estandarizar la separación cromatográfica para obtener mejores resultados. En el Anexo G se aprecian las acetogeninas que han sido reportadas hasta la fecha para las semillas de *A. cherimolia*.

En las Tablas 8 y 9 pueden apreciarse los resultados de la cuantificación de acetogeninas realizada por el método del estándar externo. En ellas se observa que ambos extractos poseen una mezcla de posibles acetogeninas de las cuales 3 están en mayor proporción y corresponden a tiempos de retención relativos de 0,469; 0,733 y 0,814 minutos, lo que significa igualmente que durante el proceso de fraccionamiento no se están perdiendo acetogeninas, simplemente se están concentrando en el extracto metanólico las mismas que están presentes en el extracto etanólico, por lo tanto, el método empleado para la extracción de dichos compuestos resultó ser eficiente.

En cuanto al rendimiento de la extracción de acetogeninas puede decirse que en 1 mL de extracto metanólico hay en total 2936 µg de acetogeninas, por lo tanto, el rendimiento de la extracción de estas en dicho extracto fue del 2.4%. Estudios previos realizados por otros autores para semillas de algunas especies del género *Annona*, (1, 79) han reportado rendimientos que oscilan entre 0.7% y 0.8 %, lo que indica que por el método de extracción utilizado, se obtuvo un rendimiento 3 veces mayor a los reportados.

TABLA 8. Análisis Cromatográfico por CLAE del Extracto F001 Desengrasado de Semillas de *A. cherimolia*

# pico	t _R (min)	t _R relativo (min)	λ máx. (nm)	Área	Concentración (Bulatacina µg/mL extracto)
1	0,867	0,079	279	4.500.242	-----
2	1,240	0,113	276	1.062.272	-----
3	1,753	0,160	281	443.625	-----
4	2,247	0,204	275	1.194.827	-----
5	2,780	0,253	201	1.178.660	118
6	3,273	0,298	202	1.567.398	157
7	3,653	0,332	203	2.042.607	204
8	4,227	0,385	204	2.621.148	262
9	4,673	0,425	203	786.735	79
10	5,153	0,469	204	3.310.197	331
11	5,953	0,542	201	691.780	69
12	6,220	0,566	202	671.479	67
13	6,727	0,612	202	1.890.940	189
14	7,393	0,673	202	1.847.433	185
15	8,053	0,733	204	2.721.052	272
16	8,953	0,814	202	3.219.200	322
17	9,507	0,865	276	927.457	-----
18	9,760	0,888	280	1.311.901	-----
19	10,987	-----	204	1.191.494	119
20	11,560	1,052	201	440.452	44
21	12,327	1,122	279	135.833	-----
22	12,667	1,153	278	59.530	-----
23	13,220	1,203	280	279.837	-----
24	14,013	1,275	278	131.329	-----
25	14,800	1,347	278	125.636	-----
26	15,667	1,426	281	42.323	-----

TABLA 9. Análisis Cromatográfico por CLAE del Extracto F005 Desengrasado de Semillas de *A. cherimolia*

# pico	t _R (min)	t _R relativo (min)	λ máx. (nm)	Área	Concentración (Bulatacina µg/mL extracto)
1	0,927	0,084	279	3.774.157	-----
2	1,233	0,112	276	1.002.529	-----
3	1,720	0,157	281	578.410	-----
4	2,220	0,202	276	1.144.160	-----
5	2,713	0,247	201	1.390.279	139
6	3,273	0,298	202	1.898.036	190
7	3,653	0,333	203	2.421.854	242
8	4,227	0,385	204	3.153.031	315
9	4,667	0,425	203	955.509	95
10	4,867	0,443	203	908.908	91
11	5,147	0,469	204	3.147.924	315
12	5,953	0,542	201	830.402	83
13	6,207	0,565	203	802.633	80
14	6,727	0,612	202	2.342.325	234
15	7,393	0,673	202	2.274.262	227
16	8,053	0,733	204	3.374.233	337
17	8,940	0,814	202	3.854.428	385
18	9,493	0,864	276	1.162.574	-----
19	9,767	0,889	277	1.532.409	-----
20	10,980	-----	204	1.476.899	148
21	11,553	1,052	201	554.548	55
22	12,320	1,122	278	144.218	-----
23	12,677	1,154	278	74.369	-----
24	13,340	1,215	279	300.158	-----
25	14,007	1,275	278	61.851	-----
26	14,800	1,348	279	131.190	-----
27	15,647	1,425	281	37.462	-----

5.5. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DESENGRASADO (ED F001) DE LAS SEMILLAS de *A. cherimolia*

Se realizó el análisis microbiológico del extracto ED F001 después de 4 meses de su obtención, para evaluar su estabilidad microbiológica por medio del recuento de microorganismos aerobios mesófilos.

En la caja de Petri correspondiente a la dilución de mayor concentración (Ver Figura 20, Caja #1) no se observó la formación de colonias y en las cajas de las diluciones de menor concentración se observó el mismo resultado, por lo tanto, se reporta el recuento como menor de 10 ufc/mL.

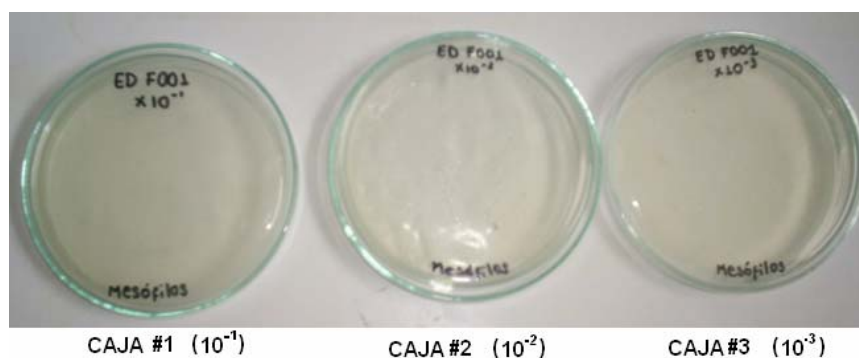


Figura 20. Foto de las cajas de Petri a las 48 horas de incubación para el análisis de Microorganismos Aerobios Mesófilos

Este resultado puede considerarse promisorio pues indica que el extracto no fue afectado significativamente por manipulación o condiciones ambientales y que no ha sufrido alteraciones, evidenciándose la estabilidad microbiológica del extracto en condiciones de laboratorio, después de 4 meses de su obtención.

6. DISCUSIÓN GENERAL

El uso de pesticidas sintéticos para el control de plagas ha ocasionado un efecto negativo sobre los seres humanos y el medio ambiente. En respuesta a esta problemática se considera necesaria la búsqueda de alternativas de solución con menos riesgos y bajo costo económico y ambiental, como el uso de extractos vegetales viables.

Esta investigación esta encaminada al estudio de compuestos activos de las semillas de *A. cherimolia* a través del análisis de los extractos etanólico y metanólico, permitiendo discutir lo siguiente:

Los resultados del análisis preliminar de acetogeninas por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) permitieron evidenciar que en los extractos estan presentes acetogeninas de diferente polaridad, entre las cuales, según el reactivo de Kedde, se encuentran acetogeninas con anillo γ -lactónico α,β -insaturado. Sin embargo, algunos extractos no respondieron a estos reactivos, posiblemente por la baja concentración de acetogeninas.

El bioensayo preliminar con nauplios de *A. salina* mostró que los extractos etanólico y metanólico desengrasados y sin desengrasar presentaron una elevada actividad biológica siendo más activos los extractos desengrasados entre los cuales se observó ligeras diferencias.

A partir de los mejores resultados con *A. salina* se seleccionaron los extractos desengrasados para el ensayo confirmativo con *C. quinquefasciatus*, en el cual se aprecia que el extracto etanólico presentó mayor actividad frente a las larvas de éste organismo. Al exponer las larvas 24 horas se obtuvo una CL_{50} de 0,102 $\mu\text{g/mL}$, siendo el tiempo de exposición suficiente pues no se observó un incremento importante de la letalidad a las 48 horas de exposición.

Hay que tener en cuenta que pueden existir diferencias en la actividad biológica de los extractos desengrasados frente a los dos organismos ensayados, posiblemente por las diferencias en la absorción, metabolismo y excreción de las acetogeninas u otros metabolitos secundarios por parte de estos organismos, es decir, a sus diferencias genéticas y fisiológicas (2, 48, 53).

La actividad larvicida contra *Culex quinquefasciatus* de las acetogeninas de las semillas de *A. cherimolia* podría explicarse por ingesta y por contacto. Por ingesta, porque al alimentarse las larvas mediante filtración y al no poseer una ingestión selectiva de partículas, los larvicidas pueden ingresar libremente produciendo toxicidad digestiva (1, 2); y por contacto, mediante tres mecanismos interdependientes: transporte desde la parte exterior de las larvas al sitio de acción, inhibición enzimática y efecto sobre el sistema respiratorio mitocondrial (2), éste producto de las acetogeninas que actúan mediante un mecanismo de inhibición de la NADH ubiquinona oxidoreductasa del complejo I

mitocondrial de la cadena respiratoria, presentes en mamíferos e insectos, que reducirían los niveles de ATP desacoplando ciertos mecanismos de resistencia, (2, 8, 25, 26, 27, 28).

Los resultados obtenidos indican que el extracto crudo de las semillas de *A. cherimolia* posee un potencial biopesticida valioso sin necesidad de realizar fraccionamientos que conducen al gasto de solventes, logrando así minimizar costos.

En Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia el perfil cromatográfico de los extractos ED F001 y ED F005 sugiere la presencia de los mismos compuestos, correspondiendo posiblemente a acetogeninas, flavonoides, fenoles y alcaloides bencilisoquinolínicos, al poseer t_R relativos iguales y absorciones características para estos compuestos. Según los resultados de los bioensayos tanto en *A. salina* como en *C. quincuefasciatus* se encontró que la actividad biológica de las semillas de *A. cherimolia* puede deberse a una interacción o efecto sinérgico de principios activos dada por un complejo alcaloidal benciltetrahidroisoquinoleínico de acción citotóxica (2) y por acetogeninas conocidas por tener propiedades insecticidas, larvicidas, citotóxicas y anticancerígenas, (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 20, 53). Sin embargo, para poder establecer cuáles tienen mayor incidencia, sería importante continuar con estudios de fraccionamiento, identificación y separación de los diferentes componentes para evaluar su actividad individual y en mezclas.

Es de importancia mencionar que mediante la realización de este trabajo y según revisión bibliográfica realizada desde el año 1982 hasta la fecha (25, 27, 28, 29, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80) no se encontró un reporte sobre la presencia de Bulatacina en las semillas de *A. cherimolia*, infiriéndose la posible presencia de esta acetogenina en las semillas de chirimoya procedentes del departamento de Cundinamarca, Colombia, posiblemente a que ésta es un metabolito secundario que actúa como marcador de origen. Los marcadores de origen han sido estudiados por la quimiosistemática con la finalidad de resolver problemas de relaciones entre especies y variaciones ecológicas y geográficas entre taxas, particularmente cuando las diferencias morfológicas no son muy evidentes, (67, 68, 69). Sin embargo sería importante implementar métodos de elucidación estructural que permitan confirmar lo inferido.

CONCLUSIONES

- Las semillas de *A. cherimolia* poseen un potencial como biopesticida pudiendo ser utilizadas para lograr el aprovechamiento completo e integral de la cadena productiva de especies de la familia Annonaceae.
- El método implementado para la extracción de acetogeninas de las semillas de *A. cherimolia* produjo resultados promisorios.
- Mediante Cromatografía en Capa Delgada se pudo evidenciar la posible presencia de acetogeninas de Annonaceae particularmente con anillo γ -lactónico α,β -insaturado.
- Todos los extractos de las semillas de *A. cherimolia* presentaron una actividad biológica elevada sobre nauplios de *A. salina* siendo de mayor actividad los desengrasados: el metanólico con una CL_{50} de 1,351 $\mu\text{g/mL}$ y el etanólico con una CL_{50} de 1,516 $\mu\text{g/mL}$.
- El bioensayo preliminar con nauplios de *A. salina* permitió apreciar que los extractos desengrasados presentaron mayor estabilidad en el tiempo que aquellos sin desengrasar, duplicándose la concentración al cabo de 9 semanas en los extractos desengrasados y triplicándose en el caso de los extractos sin desengrasar.
- El bioensayo confirmativo con larvas de *C. quinquefasciatus* mostró que el extracto etanólico desengrasado (ED F001) presentó mayor actividad biológica que el metanólico desengrasado (ED F005), donde el primero presentó una CL_{50} de 0,102 $\mu\text{g/mL}$ y el segundo de 0,214 $\mu\text{g/mL}$ indicando que el extracto crudo de las semillas de *A. cherimolia* posee un valioso potencial biopesticida, que minimizaría los costos en caso de su posible aplicación.
- Mediante el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector de arreglo de diodos se pudo inferir la posible presencia de acetogeninas en los extractos analizados de las semillas de *A. cherimolia*.
- Se detectó la posible presencia de Bulatacina en las semillas de *A. cherimolia* procedentes del departamento de Cundinamarca, Colombia.
- El rendimiento de las acetogeninas totales de las semillas de *A. cherimolia* fue del 2.48%.
- El análisis microbiológico del ED F001 después de 4 meses de su obtención mostró que el extracto crudo de las semillas desengrasadas de *A. cherimolia* presentó una estabilidad microbiológica considerable.

RECOMENDACIONES

- Implementar en el Laboratorio de Oleoquímica de la UTP el bioensayo con *C. quinquefasciatus* y realizarlo paralelamente con el de *A. salina* en las mismas condiciones, para minimizar el error en la comparación de la actividad biológica de los extractos a analizar.
- La alta toxicidad y estabilidad de los extractos conteniendo acetogeninas y otros metabolitos secundarios, observadas bajo condiciones de laboratorio, ameritan la realización de evaluaciones a pequeña escala en condiciones de campo, en donde se evalúe si estos resultados son igualmente válidos en condiciones naturales.
- Realizar bioensayos con otros organismos vectores de enfermedades para confirmar la actividad biológica que poseen las semillas de *A. cherimolia* y comparar esos resultados, con los obtenidos en esta investigación frente al *Culex quinquefasciatus*.
- Continuar con estudios de fraccionamiento, identificación y separación de los diferentes componentes de los extractos de las semillas de *A. cherimolia* para evaluar su actividad individual y en mezclas.
- Continuar esta investigación con los extractos de semillas de *A. cherimolia* cultivada en otra región del país y analizar si realmente la Bulatacina es marcador de origen de la chirimoya colombiana.
- Evaluar paralelamente la actividad biológica de los extractos de las hojas, flores, tallo y raíz de la *A. cherimolia* frente a larvas de *A. salina* y larvas del IV estadio de *C. quinquefasciatus* y elegir los extractos más promisorios para su aplicación como biopesticida.

GLOSARIO

Antihelmíntico: Se denomina antihelmíntico a cada uno de los fármacos utilizados en el tratamiento de las helmintiasis, es decir las infestaciones por vermes, helmintos o, usando un término menos técnico: lombrices. Los Antihelmínticos son medicinas que provocan la expulsión de los helmintos o lombrices parásitas del cuerpo, ya sea matándolos e incitando en ellos una conducta de huida.

Antiparasitario: Medicamento empleado para eliminar los parásitos.

Bioactividad: Expresión que describe los efectos beneficiosos o nocivos de una droga en la materia viva.

Biopesticidas: También conocidos como Agentes de Control Biológico (ACB). Son productos que contienen un ingrediente activo o bien se extraen de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Pueden estar constituidos de toda o una parte de la sustancia extraída, concentrada o no, adicionada o no a sustancias coadyuvantes. Una gran variedad de biopesticidas naturales se han desarrollado y aprobado para el control de plagas de insectos, pestes y enfermedades bacterianas; estos nuevos derivados botánicos resultan más amigables con el medio ambiente, y además se pueden convertir en una herramienta útil para los cultivos de alimentos donde se pueda fumigar.

Calcáreo: Aquel material u organismo que en su estructura contiene un alto porcentaje de carbonato de calcio; por ejemplo, esponjas, algunos tipos de suelos, corales, algas calcáreas, etc.

Citotóxica: Agente o proceso que es tóxico a las células lo cual significa que suprime las funciones de la célula o le provoca la muerte. Se refiere especialmente a células cancerosas o infectadas.

Efecto sinérgico: Aquel que se produce cuando el efecto conjunto de la presencia simultánea de varios agentes supone una incidencia ambiental mayor que el efecto suma de las incidencias individuales contempladas aisladamente.

Emética: Cualquier sustancia que provoca el vómito: las plantas amargas se hacen eméticas cuando se fuerza la dosis.

Fruta Climatérica: Es aquella que sufre una maduración brusca y grandes cambios de color, textura y composición. Normalmente se recolectan en estado preclimatérico, y se almacenan en condiciones controladas para que la maduración no tenga lugar hasta el momento de sacarlas al mercado.

Lanceolada: Indica que algunas hojas vasculares poseen forma de lanza.

Lixiviación: Es un proceso en el cual se extrae uno o varios solutos de un sólido, mediante la utilización de un disolvente líquido. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido.

Neotropical: Se refiere a la ecozona terrestre que incluye América del Sur, Centroamérica, y el Caribe. Tiene fauna y flora diferente de la región neártica por su separación temprana del continente del norte. Esta ecozona incluye Sur y Centroamérica, las tierras bajas mexicanas, las islas caribeñas, y Florida del Sur, porque estas regiones comparten un gran número de plantas y grupos de animales.

Oblonga: Dícese de la hoja más larga que ancha.

Pantropical: Es un grupo de diferentes términos que pueden utilizarse para definir un área geográfica de ocurrencia de un organismo, o grupo de organismos. Cuando la distribución de un taxón es pantropical, significa que el taxón se produce en las regiones tropicales de todos los grandes continentes, es decir, en África, en Asia y en América.

Papilonada: Superficie de un fruto con protuberancias en forma de tetillas.

Pesticida: Es cualquier sustancia elaborada para controlar, matar, repeler o atraer a una plaga. Tal plaga puede ser cualquier organismo vivo que provoque daño, pérdidas económicas, que transmita o produzca alguna enfermedad.

Pubescente: Hoja cubierta de vellosoidad algodonosa.

Sincarpos: Fruto compuesto de carpelos unidos al eje carnosos.

Sotobosque: Se le llama a cualquier grupo de arbustos encontrado debajo o cerca de un árbol o bosque. El sotobosque normalmente se ubica en climas húmedos y preferentemente en áreas con sombra pero también puede ser encontrado en lugares soleados como en el estado de Texas. También alberga una variedad única en color y textura de las hojas. Las plantas van desde el verde oscuro hasta el amarillo pálido y a menudo contienen aceite, lo que puede provocar incendios forestales

Tomentosa: Hoja cubierta de vellosidades.

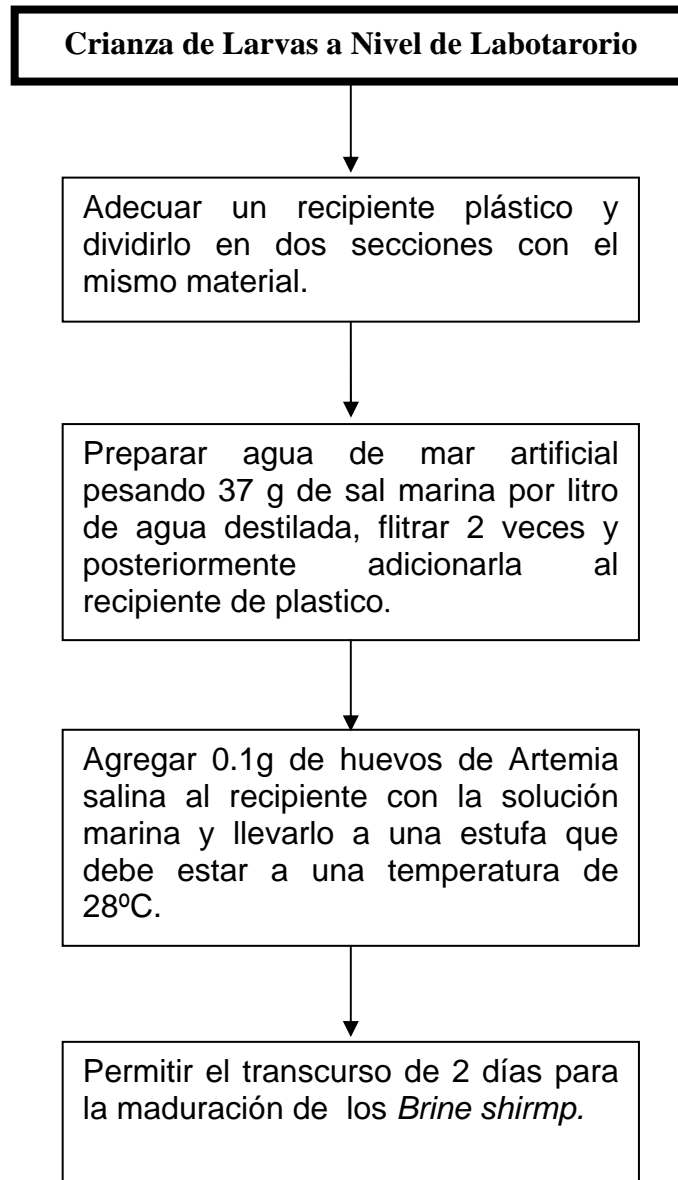
Tuberculada: Superficie de un fruto con protuberancias cónicas o en forma de verrugas.

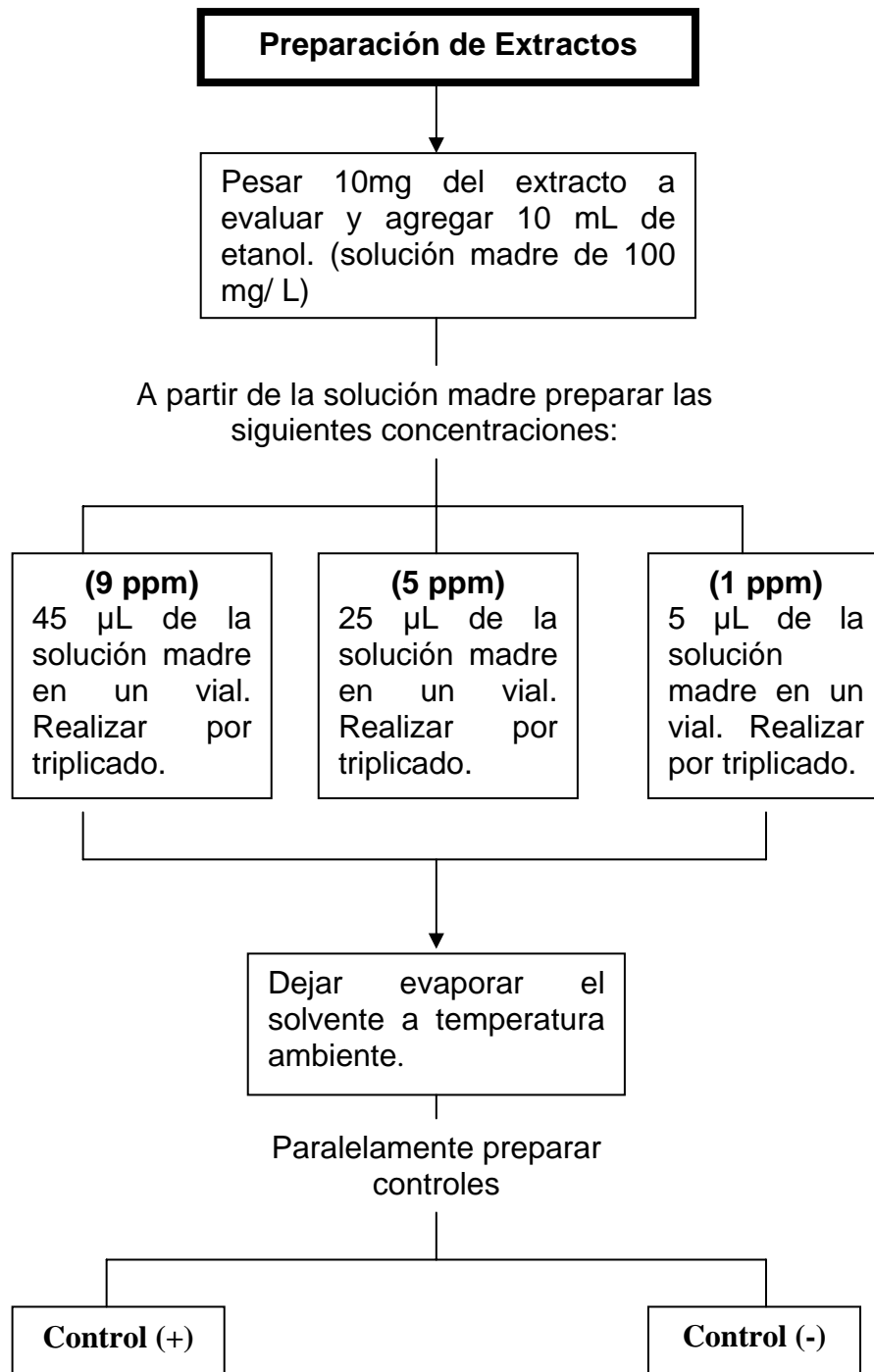
Umbonada: Superficie de un fruto con protuberancias redondeadas.

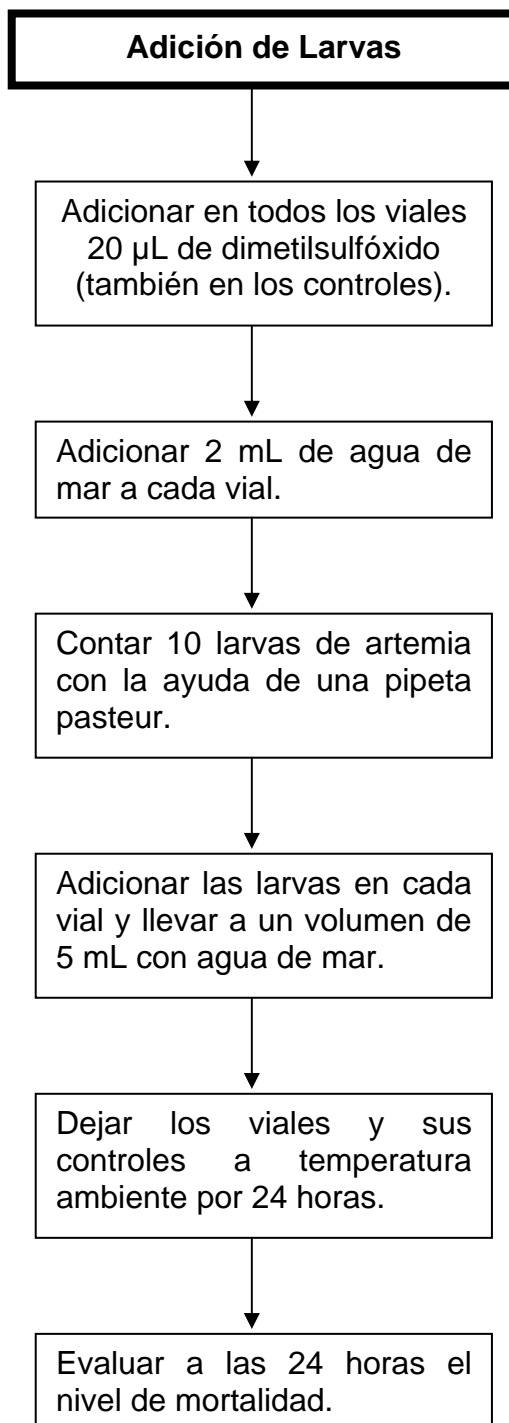
ANEXOS

ANEXO A
Diagrama de Flujo

BIOENSAYO PRELIMINAR CON LARVAS DE *Artemia salina*







Análisis de Mortalidad

verter el contenido de los viales en cajas de petri pequeñas, esperando a que se estabilicen, lavar los viales con agua de mar para asegurarse de que todas las larvas salgan del vial a la caja de petri.

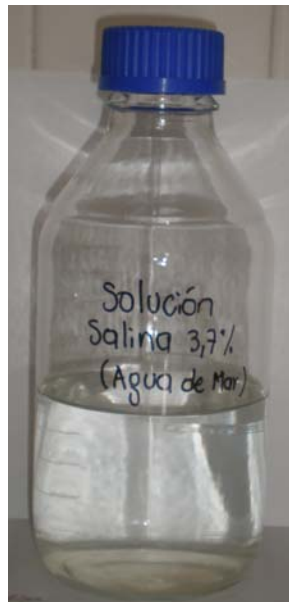
Hacer una observación frente a una luz para evaluar la movilidad de las larvas. Contar las larvas vivas y muertas.

Analizar los resultados en el programa Probit para determinar los valores del CL₅₀.

Fotos



Crianza de nauplios de *Artemia salina* en el laboratorio de Oleoquímica UTP



Solución salina al 3.7% (Agua de mar)



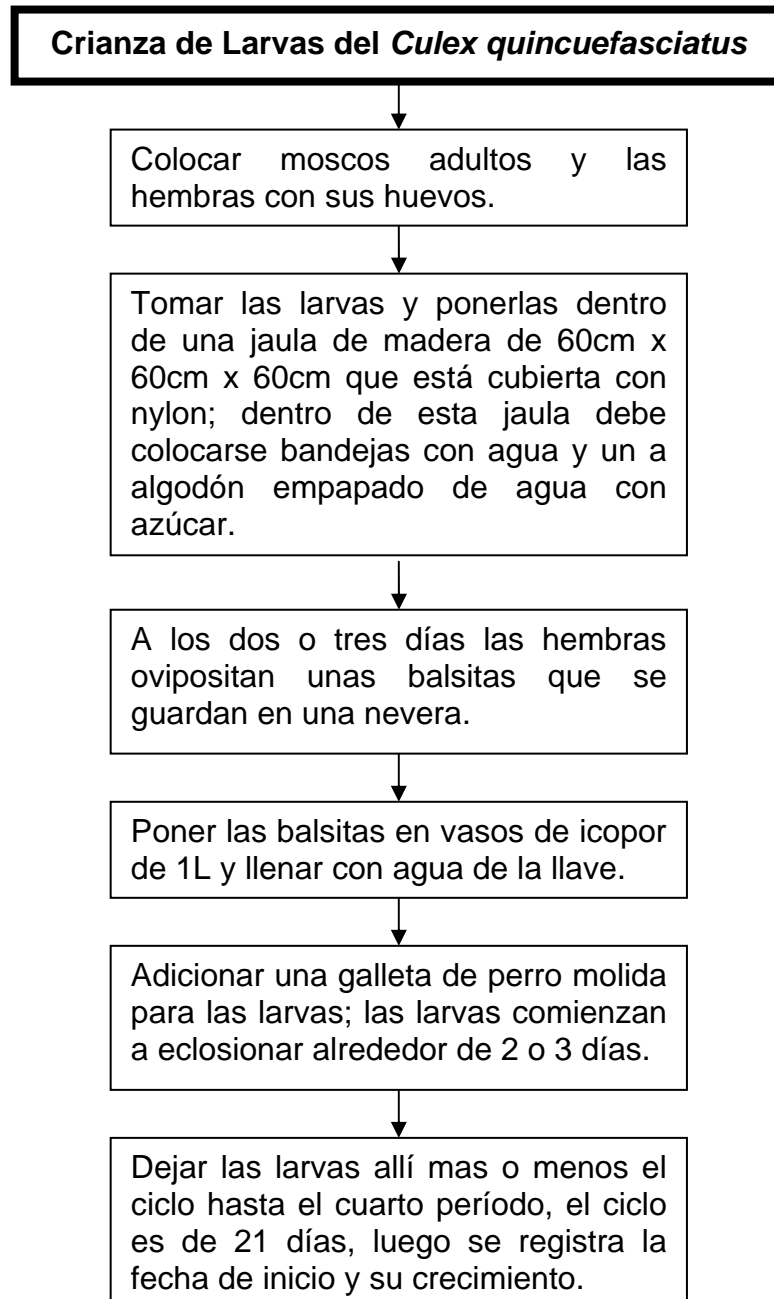
Nauplios de *A. salina* en los Extractos Etanólico y Metanólico de *A. cherimolia*

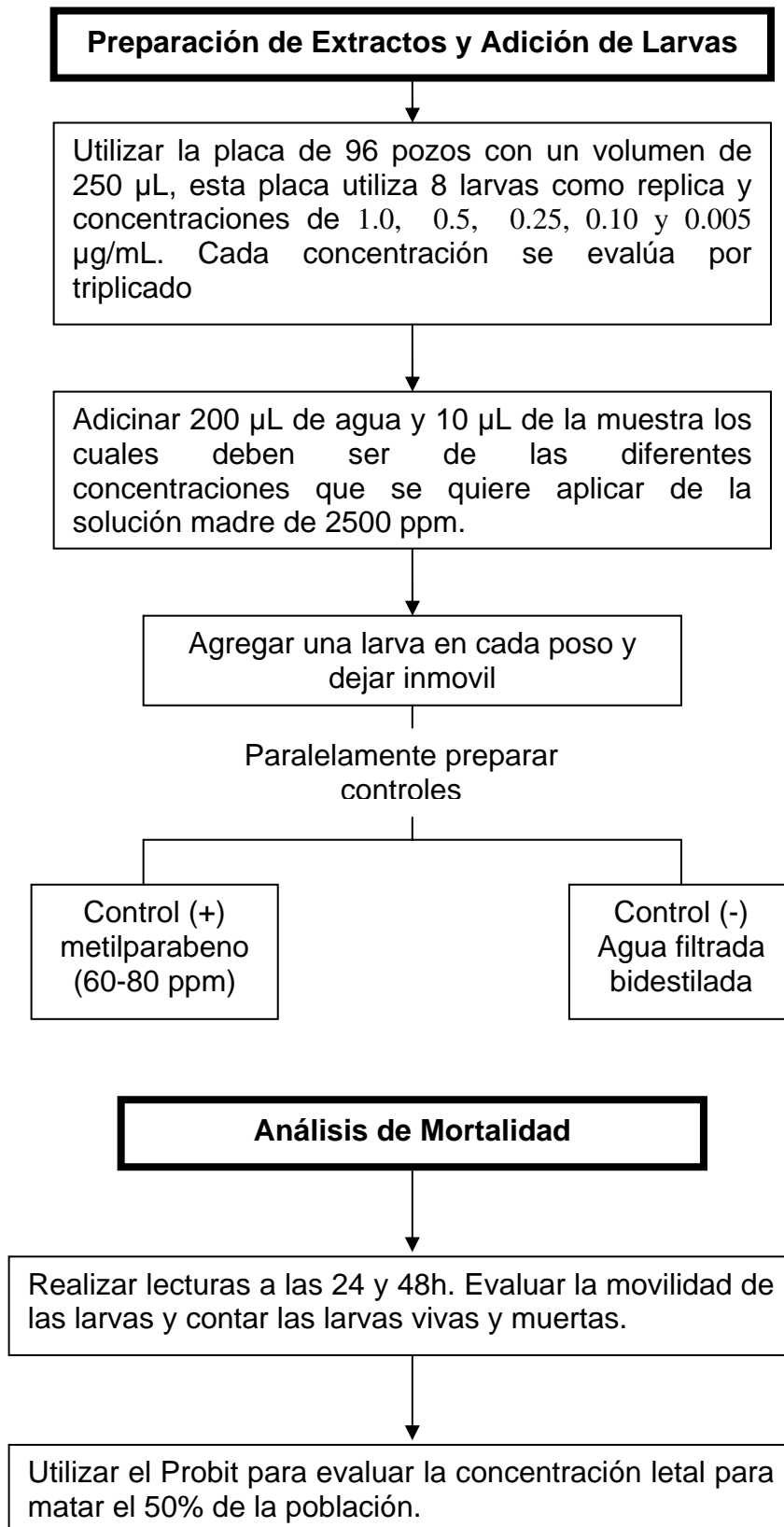


Nauplios de *A. salina* en los Controles Positivos de $K_2Cr_2O_7$

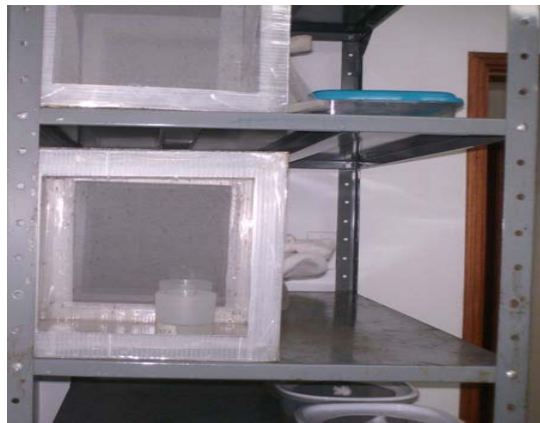
ANEXO B
Diagrama de Flujo

BIOENSAYO CONFIRMATIVO CON EL *Culex quinquefasciatus*

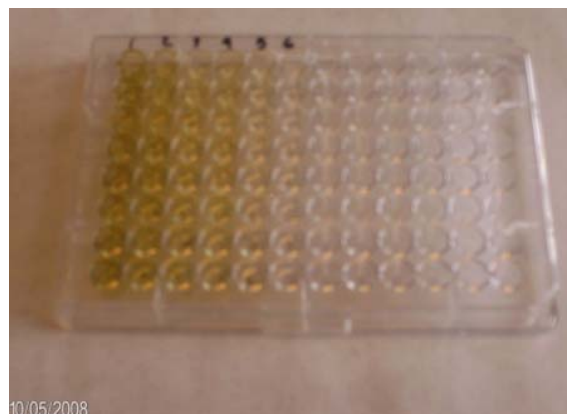




Fotos



Crianza de larvas de *Culex quinquefasciatus* realizada por el grupo de Productos Naturales de la Universidad Nacional, sede Bogotá.

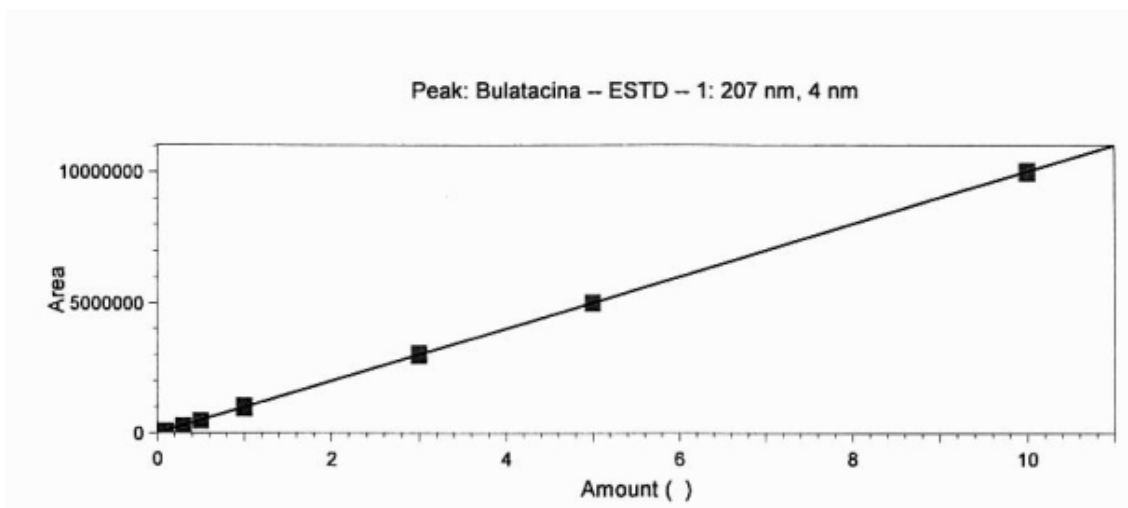


Larvas de *Culex quinquefasciatus* en los extractos de *A. cherimolia*

ANEXO C

Figura

CURVA DE CALIBRACIÓN POR CLAE PARA EL ESTÁNDAR DE BULATACINA



$$y = 1,00036 \times 10^6 x + 0,000000$$

$$R^2 = 0,999991$$

$$SD = 2180548$$

$$\% RSD = 3,25$$

$$LD(ppm) = 0,004630$$

$$LC(ppm) = 0,015434$$

DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR DE BULATACINA REALIZADA POR CLAE.

# Patrón	Cantidad (µg)	Área	SD	% RSD	Estandar Externo (µg/mL)
1	0,1	88.475	12.150,7	13,73	10
2	0,3	286.417	6.782,2	2,37	30
3	0,5	484.231	1.396,1	0,29	50
4	1,0	1.001.622	45.063,1	4,50	100
5	3,0	3.006.089	37.343,8	1,24	300
6	5,0	5.011.007	10.147,4	0,20	500
7	10,0	9.998.695	39.755,1	0,40	1000

SD = Desviación estándar **RSD** = Desviación estándar relativa

ANEXO D

Fotos

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA



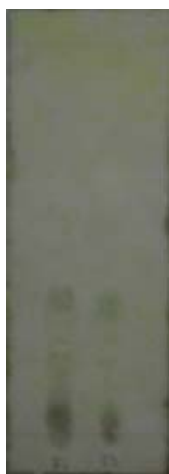
A



B



C



D



E

- A. De izquierda a derecha ED F001 y ESD F001 revelados con reactivo de Kedde.
- B. De izquierda a derecha ED F005 y ESD F005 revelados con reactivo de Kedde.
- C. De izquierda a derecha ED F002 y ED F006 revelados con ácido fosfomolibdico.
- D. De izquierda a derecha ED F001 y ESD F001 revelados con ácido fosfomolibdico.
- E. De izquierda a derecha ED F005 y ESD F005 revelados con ácido fosfomolibdico.

ANEXO E

MORTALIDAD DE NAUPLIOS DE *Artemia salina* PRIMER SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	0	10	100
		2	10	1	10	100
		3	10	1	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	9	90
		2	10	3	8	80
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	6	4	40
		2	10	7	4	40
		3	10	8	3	30
		Control (-)	10	10	0	0
ED F005	9	1	10	1	10	100
		2	10	1	9	90
		3	10	2	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	9	90
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	5	5	50
		2	10	6	4	40
		3	10	7	3	30
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	2	9	90
		2	10	2	9	90
		3	10	1	10	100
		Control (-)	10	9	0	0
	5	1	10	3	6	60
		2	10	4	7	70
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	9	0	0
	1	1	10	8	1	10
		2	10	7	4	40
		3	10	9	1	10
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F005	9	1	10	1	10	100
		2	10	2	7	70
		3	10	3	9	90
		Control (-)	10	9	1	10
	5	1	10	2	7	70
		2	10	2	7	70
		3	10	4	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	4	40
		2	10	8	4	40
		3	10	8	3	30
		Control (-)	10	9	0	0

SEGUNDO SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	0	10	100
		2	10	1	9	90
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	3	7	70
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	6	4	40
		2	10	7	3	30
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ED F005	9	1	10	1	9	90
		2	10	1	9	90
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	5	5	50
		2	10	6	4	40
		3	10	7	3	30
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	3	7	70
		2	10	4	6	60
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	9	1	10
	1	1	10	8	2	20
		2	10	7	3	30
		3	10	9	1	10
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F005	9	1	10	1	9	90
		2	10	2	8	80
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	9	1	10
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	4	6	80
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	2	20
		2	10	8	2	20
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0

TERCER SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	1	9	90
		2	10	1	9	90
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	3	7	70
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	7	3	30
		2	10	8	2	20
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	9	0	0
ED F005	9	1	10	0	10	100
		2	10	0	10	100
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	6	4	40
		2	10	7	3	30
		3	10	7	3	30
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	9	1	10
	5	1	10	3	7	70
		2	10	2	8	80
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	9	1	10
	1	1	10	8	2	20
		2	10	9	1	10
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F005	9	1	10	1	9	90
		2	10	0	10	100
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	3	7	70
		2	10	4	6	60
		3	10	4	6	60
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	7	3	30
		2	10	8	2	20
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0

CUARTO SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	0	10	100
		2	10	1	9	90
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	3	7	70
		2	10	5	5	50
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	2	20
		2	10	7	3	30
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ED F005	9	1	10	2	8	80
		2	10	4	6	60
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	1	9	90
		2	10	4	6	60
		3	10	5	5	50
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	2	20
		2	10	6	4	40
		3	10	6	4	40
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	1	9	90
		2	10	1	9	90
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	4	6	60
		2	10	3	7	70
		3	10	4	6	60
		Control (-)	10	9	1	10
	1	1	10	6	4	40
		2	10	9	1	10
		3	10	9	1	10
		Control (-)	10	9	1	10
ESD F005	9	1	10	1	9	90
		2	10	1	9	90
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	4	6	60
		3	10	4	6	60
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	6	4	40
		2	10	9	1	10
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0

QUINTO SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	3	7	70
		2	10	2	8	80
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	3	7	70
		2	10	3	7	70
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	9	1	10
		2	10	8	2	20
		3	10	9	1	10
		Control (-)	10	10	0	0
ED F005	9	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	2	20
		2	10	10	0	0
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	4	6	60
		2	10	5	5	50
		3	10	5	5	50
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	7	3	30
		2	10	9	1	10
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	7	3	30
		2	10	9	1	10
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F005	9	1	10	4	6	60
		2	10	4	6	60
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	5	5	50
		2	10	5	5	50
		3	10	6	4	40
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	7	3	30
		2	10	7	3	30
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0

MORTALIDAD DE NAUPLIOS DE *Artemia salina* EN CONTROLES (+) DE $K_2Cr_2O_7$ DURANTE EL PERIODO DE SEGUIMIENTO

EXTRACTO SEGUIMIENTO	ED F001	ED F005	ESD F001	ESD F005	C (mg/L)
1	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	8	7	9	8	100
	1	4	2	5	50
2	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	9	7	9	6	100
	1	2	4	3	50
3	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	8	6	9	7	100
	1	2	1	1	50
4	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	9	8	6	7	100
	4	5	3	1	50
5	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	8	9	7	6	100
	1	1	1	4	50

ANEXO E

MORTALIDAD DE NAUPLIOS DE *Artemia salina* PRIMER SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	0	10	100
		2	10	1	10	100
		3	10	1	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	9	90
		2	10	3	8	80
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	6	4	40
		2	10	7	4	40
		3	10	8	3	30
		Control (-)	10	10	0	0
ED F005	9	1	10	1	10	100
		2	10	1	9	90
		3	10	2	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	9	90
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	5	5	50
		2	10	6	4	40
		3	10	7	3	30
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	2	9	90
		2	10	2	9	90
		3	10	1	10	100
		Control (-)	10	9	0	0
	5	1	10	3	6	60
		2	10	4	7	70
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	9	0	0
	1	1	10	8	1	10
		2	10	7	4	40
		3	10	9	1	10
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F005	9	1	10	1	10	100
		2	10	2	7	70
		3	10	3	9	90
		Control (-)	10	9	1	10
	5	1	10	2	7	70
		2	10	2	7	70
		3	10	4	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	4	40
		2	10	8	4	40
		3	10	8	3	30
		Control (-)	10	9	0	0

SEGUNDO SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	0	10	100
		2	10	1	9	90
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	3	7	70
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	6	4	40
		2	10	7	3	30
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ED F005	9	1	10	1	9	90
		2	10	1	9	90
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	5	5	50
		2	10	6	4	40
		3	10	7	3	30
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	3	7	70
		2	10	4	6	60
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	9	1	10
	1	1	10	8	2	20
		2	10	7	3	30
		3	10	9	1	10
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F005	9	1	10	1	9	90
		2	10	2	8	80
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	9	1	10
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	4	6	80
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	2	20
		2	10	8	2	20
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0

TERCER SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	1	9	90
		2	10	1	9	90
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	3	7	70
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	7	3	30
		2	10	8	2	20
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	9	0	0
ED F005	9	1	10	0	10	100
		2	10	0	10	100
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	6	4	40
		2	10	7	3	30
		3	10	7	3	30
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	9	1	10
	5	1	10	3	7	70
		2	10	2	8	80
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	9	1	10
	1	1	10	8	2	20
		2	10	9	1	10
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F005	9	1	10	1	9	90
		2	10	0	10	100
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	3	7	70
		2	10	4	6	60
		3	10	4	6	60
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	7	3	30
		2	10	8	2	20
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0

CUARTO SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	0	10	100
		2	10	1	9	90
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	3	7	70
		2	10	5	5	50
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	2	20
		2	10	7	3	30
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ED F005	9	1	10	2	8	80
		2	10	4	6	60
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	1	9	90
		2	10	4	6	60
		3	10	5	5	50
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	2	20
		2	10	6	4	40
		3	10	6	4	40
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	1	9	90
		2	10	1	9	90
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	4	6	60
		2	10	3	7	70
		3	10	4	6	60
		Control (-)	10	9	1	10
	1	1	10	6	4	40
		2	10	9	1	10
		3	10	9	1	10
		Control (-)	10	9	1	10
ESD F005	9	1	10	1	9	90
		2	10	1	9	90
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	4	6	60
		3	10	4	6	60
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	6	4	40
		2	10	9	1	10
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0

QUINTO SEGUIMIENTO

EXTRACTO	C (mg/L)	Ensayo	# total de nauplios	# nauplios vivos	# nauplios muertos	% mortalidad
ED F001	9	1	10	3	7	70
		2	10	2	8	80
		3	10	2	8	80
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	3	7	70
		2	10	3	7	70
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	9	1	10
		2	10	8	2	20
		3	10	9	1	10
		Control (-)	10	10	0	0
ED F005	9	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	1	9	90
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	2	8	80
		2	10	2	8	80
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	8	2	20
		2	10	10	0	0
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F001	9	1	10	4	6	60
		2	10	5	5	50
		3	10	5	5	50
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	7	3	30
		2	10	9	1	10
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	7	3	30
		2	10	9	1	10
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0
ESD F005	9	1	10	4	6	60
		2	10	4	6	60
		3	10	3	7	70
		Control (-)	10	10	0	0
	5	1	10	5	5	50
		2	10	5	5	50
		3	10	6	4	40
		Control (-)	10	10	0	0
	1	1	10	7	3	30
		2	10	7	3	30
		3	10	8	2	20
		Control (-)	10	10	0	0

MORTALIDAD DE NAUPLIOS DE *Artemia salina* EN CONTROLES (+) DE $K_2Cr_2O_7$ DURANTE EL PERIODO DE SEGUIMIENTO

EXTRACTO SEGUIMIENTO	ED F001	ED F005	ESD F001	ESD F005	C (mg/L)
1	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	8	7	9	8	100
	1	4	2	5	50
2	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	9	7	9	6	100
	1	2	4	3	50
3	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	8	6	9	7	100
	1	2	1	1	50
4	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	9	8	6	7	100
	4	5	3	1	50
5	10	10	10	10	600
	10	10	10	10	400
	10	10	10	10	200
	8	9	7	6	100
	1	1	1	4	50

ANEXO F

RESULTADOS PROBIT

Valores Estadísticos de las Concentraciones Letales al 50% (CL₅₀) de los Extractos Etanólicos (ED F001, ESD F001) y Metanólicos (ED F005, ESD F005) de las Semillas de *A. cherimolia* sobre nauplios de *A. salina*.

Seguimiento	Extracto	b	S	LC (95%)	X ² (c)	X ² (t)
1	ED F001	1,908	0,388	1,146-2,669	0,012	3,841
	ED F005	1,881	0,394	1,108-2,625	0,041	3,841
	ESD F001	2,218	0,395	1,444-2,993	1,547	3,841
	ESD F005	1,565	0,377	0,825-2,304	0,001	3,841
2	ED F001	1,994	0,384	1,242-2,747	0,398	3,841
	ED F005	1,522	0,366	0,804-2,240	0,401	3,841
	ESD F001	1,968	0,422	1,140-2,795	0,015	3,841
	ESD F005	1,843	0,374	1,110-2,575	0,528	3,841
3	ED F001	1,928	0,377	1,190-2,667	0,000	3,841
	ED F005	1,748	0,371	1,021-2,475	0,076	3,841
	ESD F001	2,295	0,519	1,278-3,312	0,418	3,841
	ESD F005	1,810	0,372	1,082-2,539	0,746	3,841
4	ED F001	1,917	0,377	1,179-2,656	1,461	3,841
	ED F005	1,053	0,341	0,384-1,722	0,287	3,841
	ESD F001	2,195	0,520	1,175-3,215	0,428	3,841
	ESD F005	1,745	0,368	1,023-2,466	0,069	3,841
5	ED F001	2,007	0,391	1,241-2,773	0,851	3,841
	ED F005	2,284	0,403	1,493-3,075	0,922	3,841
	ESD F001	0,927	0,359	0,223-1,631	0,355	3,841
	ESD F005	0,962	0,346	0,284-1,640	0,322	3,841

CL₅₀ = Concentración Letal al 50%; **b** = Valor de la pendiente; **S** = Desviación estándar
LC = Límites de Confianza de Pendiente; **X²(c)** = "chi" cuadrado calculado; **X²(t)** = "chi" cuadrado tabulado.

En la Tabla se encuentran algunos valores importantes para establecer respuestas de las larvas evaluadas, los cuales fueron hallados mediante la transformación Probit de aplicación muy extensa en toxicología y en ensayos biológicos. Este modelo implica llevar a logaritmo las distintas intensidades del estímulo y transformar la respuesta a unidades Probit. Los valores obtenidos para determinar si éstos se ajustan o no a dicha transformación se demuestran mediante el cálculo de los valores χ^2 calculados los cuales son inferiores a los χ^2 tabulados con un $\alpha = 0,05$, lo que a la vez indica que las diferencias entre los resultados de cada uno de los seguimientos no son estadísticamente significativas. En la misma tabla se indican los valores de los intervalos de confianza y de las pendientes, cuyo recorrido no incluyó al valor cero, demostrando el efecto tóxico de los extractos sobre las larvas, (2, 51).

ANEXO G

Tabla

ACETOGENINAS IDENTIFICADAS EN SEMILLAS DE *Annona cherimolia* Mill.

Número	Nombre	Tipo	Referencia
1	Almunequin (ó Annonin xvi ó Squamostatin A)	Bis-THF No Ady	25, 27, 28, 29, 73, 79
2	Annocherin	Mono-THF	29, 75
3	Annocherimolin	Mono-THF	29, 77
4	Annocherinone	Mono-THF	62
5	Annomolin	Mono-THF	29, 77
6	Annomolon-A +34 epi	Mono-THF	29, 78
7	Annomolon-B +34 epi	Mono-THF	29, 78
8	Asimicin	Bis-THF Ady	25, 79
9	Cherimolin I (ó Annonin viii ó Bullatalicin)	Bis-THF No Ady	25, 27, 28, 29, 71, 74, 79
10	Cherimolin II (ó Annonin iv ó Bullatanocin)	Bis-THF No Ady	27, 28, 29, 73, 74, 76, 79
11	Desacetyluvaricin	Bis-THF Ady	25
12	Dihydrocherimolin	Bis-THF No Ady	25, 71
13	Itrabin	Bis-THF Ady	25, 27, 28, 29, 73, 79
14	Jetein	Mono-THF	25, 27, 28, 29, 73
15	Laherradurin	Bis-THF Ady	25, 27, 28, 29, 73, 79, 80
16	Molvizarin	Bis-THF Ady	25, 27, 28, 72, 73, 74, 76, 79
17	Motrilin (ó Annonin iii)	Bis-THF Ady	25, 27, 28, 72, 73, 74, 76, 79
18	Otivarin	Bis-THF No Ady	25, 27, 28, 29, 73
19	Squamocin	Bis-THF Ady	25, 74, 79
20	Tucumanin	Bis-THF Ady	29
21	Uvariamicin I	Mono-THF	28
22	Uvariamicin II (ó Reticulatacin)	Mono-THF	28
23	Uvariamicin III	Mono-THF	28
24	Uvariamicin IV	Mono-THF	28

BIBLIOGRAFIA

1. MORALES, Carlos; GONZALEZ, Ranulfo; ARAGÓN, Raúl. (2004). Evaluación de la Actividad Larvicida de Extractos Polares y no Polares de Acetogeninas de *Annona muricata* Sobre Larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 30: 187-192.
2. BOBADILLA, Miguel; ZAVALA, Gina; FRANCO, Fanny; POLLACK, Luis; SISNIEGAS, Manuel. (2002). Efecto Bioinsecticida del Extracto Etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Mill. "Chirimoya" y *A. muricata* Linneus "guanábana" Sobre Larvas del IV Estadio de *Anopheles sp.* *Revista Peruana de Biología*, 9: 64-73.
3. CARDONA, Wilson. (1993). Acetogeninas en el Extracto Hexánico de Raíces de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín, p. 9-51.
4. CORREA, Carlos Arturo. (1992). Acetogeninas en las Semillas de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín, p. 48-100.
5. CORREA, Jaime; BERNAL, Henry. (1989). Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello Tomo I. Editorial Guadalupe Ltda. Bogotá, Colombia, p. 196-217.
6. ARANGO, Gabriel; DICKSON, John; VELEZ, Iván; MUÑOZ, Diana. (1999-2000). Actividad *Leishmania panamensis*. *Revista Vitae*, 7: 38-42.
7. GUAPACHA, Angélica M. (2006). Monografía Sobre el Aprovechamiento de Compuestos Activos de la Guanábana. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira, p. 48-64.
8. FLOREZ, Lina; MESA, Viviana. (2007). Monografía Sobre Pruebas de Actividad Biológica con Dos Organismos Modelos de Acetogeninas de Annonaceae con Actividad Biopesticida. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira, p. 6-66.
9. TORO, Rafael. (1981). Algunas Anonáceas Comunes en Antioquia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Medellín, p. 89.
10. JASME, María E. (1998). *Revista Alimentación, Equipo y Tecnología*, 17: 149-154.
11. SANABRIA, Antonio; LOPEZ, Sandra; GUALDRON, Roberto. (1997). Estudio Fotoquímico Preliminar y Letalidad sobre *Artemia salina* de plantas Colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 26: 15-19.

12. NARVAEZ, Diana. (2004). Actividad Citotóxica a través del Ensayo de *Artemia salina* de 31 Plantas del Parque Regional Natural Ucumari. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira.
13. SANCHEZ, Lisbeth; NEIRA, Adriana. (2005). Bioensayo General de Letalidad en *Artemia salina* a las Fracciones del Extracto Etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium gineense* Sw. Revista Cultura Científica, 3: 40-45.
14. RODRIGUEZ, María; BISSET, Juan; RODRIGUEZ, Ileana; DIAZ, Cristina. (1997). Determinación de la Resistencia a Insecticidas y sus Mecanismos Bioquímicos en Dos Cepas de *Culex quinquefasciatus* Procedentes de Santiago de Cuba. Revista Cubana de Medicina Tropical, 49: 209-214.
15. MURILLO, José. (2001). Las Annonaceae de Colombia. Biota Colombiana, 2: 49-58.
16. MORALES, León. Notas para el curso "Dendrología". Universidad Nacional de Colombia.
17. ORELLANA, Álvaro; MARTINEZ, Edgar. (2005). Distribución Geográfica de Anonáceas en Guatemala. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola. Publicaciones Recursos Naturales, p. 3-7.
18. De la ROCHA, German. (1978). Cultivo de la Chirimoya. El campo, 49. México.
19. Bioersivity International y CHERLA. (2008). Descriptores para Chirimoyo (*Annona cherimolia* Mill.). Bioersivity International, Roma, Italia; Proyecto CHERLA, Málaga, España, p. 51.
20. JARAMILLO, A. R. (1952). Monografías Botánicas. Revista Facultad Nacional de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 12: 247- 417.
21. LEWIS, Walter; LEWIS, Elvin. (1975). Medical Botany. Plants Affecting Man's Health. Jhon Wiley Sons, p. 515.
22. MENDIETA, Rosa; DEL AMO, Silvia. (1981). Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos. Compañía Editorial Continental, S.A. México, p. 28.
23. GARCIA, HERNANDO. (1974). Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica. Tomo I. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Talleres Editoriales de la Imprenta Nacional. Bogotá, p. 340.
24. JUSCAFRESA, Baudilio. (1975). Enciclopedia Ilustrada. Flora Medicinal, Toxica, Aromática, Condimenticia. Editorial Aedos. Barcelona, p. 192-193.

25. FANG, Xin-Ping; RIESER, Matthew; GU, Zhe-Ming; ZHAU, Gen-Xian; MCLAUGHLIN, Jerry. (1993). Annonaceous Acetogenins: An Updated Review. *Phytochemical Analysis*, 4: 35- 44.
26. ZENG, Lu; YE, Quing; OBERLIES, Nicholas; SHI, Guoen; GU, Zhe-Ming ; HE, Kan; MACLAUGHLIN, Jerry. (1996). Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. *Natural Products Reports*, 13: 215-306.
27. ZAFRA-POLO, Carmen; GONZALEZ, Carmen; ESTORNELL, Ernesto; SAHPAZ, Sevser; CORTES, Diego. (1996). Acetogenins from Annonaceae, Inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Phytochemistry*, 42: 253-271.
28. ZAFRA-POLO, Carmen; FIGADERE, Bruno; GALLARDO, Teresa; TORMO, José; CORTES, Diego. (1998). Natural Acetogenins from Annonaceae, Synthesis and Mechanisms of Action. *Phytochemistry*, 48: 1087-1117.
29. BERMEJO, Almudena; FIGADÉRE, Bruno; ZAFRA-POLO, María Carmen; BARRACHINA, Isabel; ESTORNELL, Ernesto; CORTES, Diego. (2005). Acetogenins from Annonaceae: Recent Progress in Isolation, Synthesis and Mechanisms of Action. *Natural Product Report*, 22: 269-303.
30. DAS CHAGAS, Francisco; DIAMANTINO, María; ASSUNÇÃO, Angela; SANTOS, Lucía. (2003). Acetogeninas de Anonáceas Isoladas de Folhas de *Rollinia Laurifolia*. *Química Nova*, 26: 319-322.
31. HE, Kan; ZENG, Lu; Ye, Q.; SHI, Guoen; OBERLIES, Nicholas; ZHAU, Gen-Xian; NJOKU, C.J.; MCLAUGHLIN, Jerry. (1997). Comparative SAR Evaluations of Annonaceous Acetogenins for Pesticidal Activity. *Pesticide Science*, 49: 372- 378.
32. LEATEMIA, Audrey; ISMAN, Murray. Toxicity and Antifeedant Activity of Crude Seed Extracts Lepidopteran Pests and Natural Enemies. (2004). *International Journal of Tropical Insect Science*, 24: 150-158.
33. NIÑO, Jaime; MOSQUERA, Oscar; CORREA, Yaneth; ESPINAL, Cristina. (2002). Evaluación Preliminar de Actividad Biológica y Tamizados Fotoquímicos de Cincuenta Plantas del Parque Regional Natural Ucumari. *Scientia et Technica*, 19: 151-157.
34. Guía de Cuidados. Introducción a la *Artemia salina* o *Brine Shrimps*. [En línea] URL: <http://www.acuariolasmercedes.com>
35. MAYORGA, Pablo. (2001). Microbioensayos ecotoxicológicos para monitoreo ambiental y otras aplicaciones. II Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Ciudad de Guatemala, p. 24.

36. IRAHOLA, Pablo; GIMENEZ, Alberto. (2000). Dos Ensayos Biológicos: Inhibición de Germinación de Semillas y Toxicidad en *Artemia salina*, como Indicadores de Actividad Antitumoral. BIOFARBO, 8: 81-85.
37. ORANDAY, Azucena; CARDENAS, Maria; RIVAS, Catalina; RAMIREZ, Cindy; VAZQUEZ, Juan. (2007). Actividad Biológica de Extractos de Chile (*Capsicum* spp.) Habanero, Jalapeño y Serrano sobre *Artemia salina*. IV Convención Mundial de Chile, p. 97.
38. SALAZAR, Myriam; MONCADA, Ligia. (2004). Ciclo de Vida del *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) Bajo Condiciones no Controladas en Bogotá. Revista Biomédica, 24: 385-392.
39. BOHART, Richard. (1956), Insects of Micronesia Diptera: Culicidae. Honolulu Star Bulletin. Haway, 12: 77.
40. PEREZ, Rafael; RODRIGUEZ, Cesáreo; LARA, Joel; MONTES, Roberto; RAMIREZ, Gustavo. (2004). Toxicidad de Aceites, Esencias y Extractos Vegetales en Larvas de Mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Acta Zoológica Mexicana, 20:141 -152.
41. DIAZ, María; BULUS, Gustavo; PICA, Yolanda. (2004). Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. 1ª Edición. México D.F., p. 202.
42. SKOOG, Douglas; HOLLER, James; NIEMAN, Timothy. (2001). Principios de Análisis Instrumental. 5ª Edición. McGraw-Hill. Madrid, España, p. 785-809.
43. RUBINSON, Kenneth; RUBINSON, Judith. (2001). Análisis Instrumental. Prentice Hall. Madrid, España, p. 636-708.
44. HERRERA, Eliud. (2007). Obtención y Caracterización de la Materia Insaponificable del Aceite de Crisálida de *Bombix Mori* L. Híbrido Pílamó I. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira, p. 85.
45. DONG, Michael; AHUJA, Satinder. (2005). Handbook of Pharmaceutycal Analysis by HPLC. 1ª Edición. Academic Press, p. 600.
46. GARCIA, Natalia; MONCADA, Martha. (2006). Estudio Microbiológico del Aceite de *Luffa cylindrica* para su Potencial Uso en la Industria Cosmética. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira, p. 55.
47. CAÑON, Francisco; GRACIA, Tomás. (1998). Manual de Tecnicas de Análisis para Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para Consumo Humano. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA. Santafé de Bogotá, p. 17-18.

48. Información suministrada por el Dr. Miguel Bobadilla Alvarez, profesor de la Universidad Nacional de Trujillo en Perú. 2008.
49. McLAUGHLIN, Jerry; ROGERS, Lingling; ANDERSON, Jon. (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal*, 32: 513-524.
50. QUEVEDO, Rodolfo; ANTOLINEZ, Sergio; MORENO, Barbara. (2007). Tabienina A: Un Nuevo Alcaloide ApofinaBencilisoquinolina Oxidado. *Scientia et Technica*, 13: 167-169.
51. GROMEK, Danuta; HOCQUEMILLER, Reynald; CAVÉ, André. (1993). Determination of Annonaceous acetogenins by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 5: 133-140.
52. Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente. Problemas en el uso de Pesticidas. [En línea] URL: <http://www.tecnun.es/asignaturas/Ecología/Hipertexto/09ProdQui/111ProbPest.htm>
53. CARRERO, J. (1996). Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales. 1ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, p. 256.
54. BOBADILLA, Miguel; SISNIEGAS, Manuel; ZAVALA, Fatima; ZAVALETA, Gina; MOSTACERO, José; TARAMONA, Luis. (2005). Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). *Revista Peruana de Biología*, 12: 145-152.
55. ORTIZ, María; YAÑEZ, Leticia; DIAZ, Fernando. Identificación de Indicadores para el Monitoreo de la Deltametrina y del DDT y sus Metabolitos en Muestras Humanas y Ambientales. Informe Técnico Apoyado por la Comisión de Cooperación Ambiental de América del Norte. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México, p. 39.
56. PALOMINO, Miriam; LEON, Walter; VALENCIA, Pedro; CARDENAS, Fanny; ANCCA, Jenny. (2007). Evaluación de Campo del Efecto Residual de la Deltametrina Sobre la Mortalidad y KnockDown en *Triatoma infestans*, Según Tipo de Superficie en Arequipa, Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 24: 136-143.
57. BISSET, Juan; RODRIGUEZ, María; DIAZ, Cristina; SOCA, Alaín. (2000). Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un área de La Habana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 52: 180-185
58. BISSET, Juan; RODRIGUEZ, María; DIAZ, Cristina; SOCA, Alain. (1998). Estudio de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedente de Medellín, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 50: 133-137.

59. FUERTES, Cesar; ROQUE, Mirtha; TRISTAN, Maribel. (1998). Flavonoides y Alcaloides de *Lupinus ballianus* C.P. Smith Con Actividad Antibacteriana y Antifúngica. *Ciencia e Investigación*, 1: 71-80.
60. MOSQUERA, Oscar. (1979). Seminario: Los Flavonoides. Universidad del Valle, p. 29.
61. OSCANO, Julio. (2005). Estudio Fármaco-Botánico de *Desmodium molliculum*. Monografía. Huancayo, Perú.
62. MARTINEZ, Alejandro. (2005). Flavonoides. Monografía. Universidad de Antioquia, p. 76.
63. ARANGO, Gabriel Jaime. (2002). Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Monografía. Universidad de Antioquia, p. 88.
64. TORRES, Omar; SANTAFE, Gilmar; ANGULO, Alberto; VILLA, Hiltony; ZULUAGA, Juan; DORIA, María. (2007). Obtención de Alcaloides a Partir de Corteza y Madera de la Especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae). *Scientia et Technica*, 13: 333-336.
65. MOSQUERA, Oscar. (1991). Características Espectroscópicas de Algunas Funciones Orgánicas. Universidad Tecnológica de Pereira.
66. ALIA, Iran; COLINAS, Teresa; MARTINEZ, Maria Teresa. (2005). Análisis Preliminar de Compuestos Carotenoides y Compuestos Fenólicos en Frutos de Zapote Mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11: 225-231.
67. GRANT, W.F. (1974). Chemosystematics in the Clasification of cultivars. Nobel Symposio of Medicine and Natural Sciences. New York.
68. RAVEN, Peter; CURTOIS, H. (1981). Biology of Plants. The Biochemistry of Plants. Academic Press. 7ª Edición. Academic Press. New York, p. 140-141.
69. SEIGLER, David. (1981). Secondary Metabolites and Plant Systematics. The Biochemistry of Plants. 7ª Edición. Californie, p. 139-176.
70. JOLAD, Shivanand; HOFFMANN, Joseph; SCHRAM, Karl; COLE, Jack. (1982). Uvaricin, A New Antitumor Agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, 47: 3151-3153.
71. CORTES, Diego; RIOS, Jose Luis; VILLAR, Angel; VALVERDE, Serafín. (1984). Cherimoline Et Dihydrocherimoline: Deux Nouvelles γ -lactones Bis-Tetrahydrofuranniques Possedant Une Activite Antimicrobienne. *Tetrahedrom Letters*, 25: 3199-3202.

72. CORTES, Diego; MYINT, Saw; HOCQUEMILLER, Reynald. (1991). Molvizarin and Motrilin: Two Novel Cytotoxic Bis-Tetrahydrofuranic γ -lactone Acetogenins from *Annona cherimolia*. *Tetrahedron Letters*, 47: 8195-8202.
73. CORTES, Diego; FIGADERE, Bruno; CAVE, André. (1993). Bis-Tetrahydrofuran Acetogenins from Annonaceae. *Phytochemistry*, 32: 1467-1473.
74. CORTES, Diego; MYINT, Saw; DUPONT, Beatrice; DAVOUST, Daniel. (1993). Bioactive Acetogenins from Seeds of *Annona cherimolia*, 32: 1475-1482.
75. WOO, Mi-Hee; KIM, Dal-Hwan; FOTOPOULOS, Sophia; McLaughlin, Jerry. (1999). Annocherin and (2,4)-*cis*- and *trans*-Annocherinones, Monotetrahydrofurane Annonaceous Acetogenins with a C-7 Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. *Journal Natural Product*, 62: 1250-1255.
76. ARNASON, John; MATTA, Ranyia; TOMEO, J. T. (1995). Recent Advances in Phytochemistry. *Phytochemistry of Medicinal Plants*, 29: 249-309.
77. KIM, Dal Hwan; MA, Eun Sook; SUK, Kui Duk; SON, Jong Keun; LEE, Jong Soon; WOO, Mi Hee. (2001). Annomolin and Annocherimolin, New Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* Seeds. *Journal Natural Product*, 64: 502-506.
78. SON, Jong Keun; KIM, Dal Hwan; WOO, Mi Hee. (2003). Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. *Journal Natural Product*, 66: 1369-1372.
79. ÁLVAREZ, Olga; NESKE, Adriana; POPICH, Susana; BARDON, Alicia. (2007). Toxic Effects of Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pesticide Science*, 80: 63-67.
80. LUNA, Lorena. M.; GONZALEZ, Alma Rosa; De La CRUZ, I. (2004). Actividad Larvícida y Antibacteriana de la Acetogenina Laherradurina. *Sociedad Cubana de Farmacología: II Congreso Internacional de Farmacología y Terapéutica*.