

**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN  
SEMILLAS DE *Annona muricata* DE LA REGIÓN CAFETERA**

**YESID FLÓREZ LONDOÑO  
ELIZABETH MARTÍNEZ MUÑOZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2010**

**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN  
SEMILLAS DE *Annona muricata* DE LA REGIÓN CAFETERA**

**YESID FLÓREZ LONDOÑO  
ELIZABETH MARTÍNEZ MUÑOZ**

**TRABAJO DE GRADO  
Documento parcial para optar al título de Tecnólogo Químico**

**Directora  
Dra. GLORIA EDITH GUERRERO ÁLVAREZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2010**

## DEDICATORIA

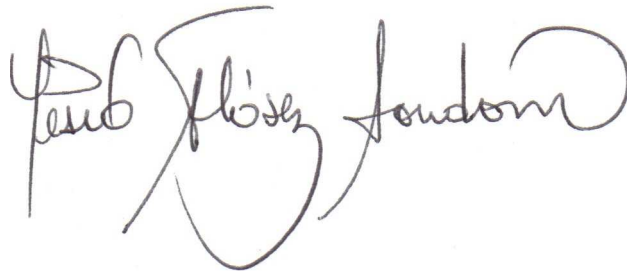
Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a ti Dios, por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presenten.

A mis padres Luz Helena y Antonio, que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento, gracias por todo mamá y papá, por darme una carrera para mi futuro y sobre todo por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto y mucho más les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado y hayan hecho de mí la persona que soy ahora. Madre serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, tu esfuerzo se convirtió en tu triunfo y el mío.

A Tatiana mi hermanita del alma, todo lo que soy ahora siempre ha sido pensando en ti, le doy gracias a Dios por haberme dado el regalo más lindo del mundo que eres tú, te quiero mucho. Ahora lucha por tus ideales, todo lo que deseamos en la vida lo podemos tener, esfuérate y demuéstranos que eres valiente, inteligente y que Ángel será el motorcito que mueva tu vida.

A Gabriel por ser el ángel que ahora alienta mi vida, por su apoyo y comprensión, por sus consejos y ayuda en los momentos difíciles de mi vida, muchas gracias amor de mi vida, por la otra familia que me estas regalando, Melva, Nana, Sergio, Alejo, Gloria, Carmen, Diana, los quiero mucho.

A Betty por enseñarme como encontrar a Dios en una simple canción y a poder disfrutar cada minuto de su presencia, no sabes cómo me ha ayudado, este triunfo también es tuyo. Gracias.

A handwritten signature in black ink, reading "Paul Flores Jarama". The signature is written in a cursive style with a large, stylized initial "P" and a decorative flourish at the end.

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a Dios por ser la razón de mi existencia y llenarme de bendiciones todos los días; gracias Señor por darme fuerzas, por iluminar mi mente, mi corazón y por permitirme culminar esta epata de mi vida.

A mi familia porque hacen mi vida especial, a mi padres Elizabeth y Luis Hernando por darme la vida y por todo su amor, comprensión, paciencia y apoyo incondicional.

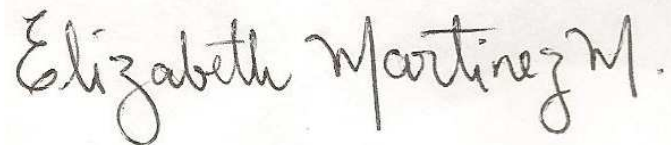
Gracias mami, porque me llenas la vida por ser mi angel, mi guía, por tu dulzura tu paciencia y tu amor.

Gracias papi por enseñarme a luchar sin cansancio, por cuidarme y por tu amor.

A mi hermano Luis David, por apoyarme y cuidarme siempre; porque eres un gran ejemplo de dedicación y de lucha por lo que quieres en la vida.

A mi hermana Adriana, por ser siempre incondicional y apoyarme en todo, por ser mi amiga y confidente, porque me enseñas a ser apasionada con lo que me gusta.

A mis amigos Vero, Yesid y Lele, y a todos los que me han acompañado en este trayecto e incentivado a no desfallecer.



Elizabeth Martinez M.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro Señor, nuestro guía, haz sido esencial para nosotros poder alcanzar esta alegría, esta meta, y a través de ésta podemos siempre de tu mano alcanzar otras que esperamos sean de tu Gloria.

A nuestras familias por darnos la estabilidad emocional, sentimental y económica, para poder llegar a este logro, no hubiese podido ser realidad sin ustedes, Gracias familia.

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

A la Doctora Bárbara Moreno Murillo del Departamento de Química de la Universidad Nacional sede Bogotá, por la realización de los bioensayos con *Culex quinquefasciatus*, por facilitarnos el estándar de Bulatacina, por su disposición para colaborarnos.

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

A nuestras amigas Martica, Alexa, Lele, Maria, por fin... gracias por alientarnos a culminar esta meta.

A todos nuestros amigos pasados y presentes, pasados por ayudarnos a crecer y madurar como personas y presentes por estar siempre con nosotros apoyándonos en todas las circunstancias posibles, también son parte de esta alegría.

Y a todos aquellos, que han quedado en los recintos mas escondidos de nuestra memoria, gracias por estar ahí.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>xii</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
<b>3. MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>7</b>
3.1. FAMILIA ANNONACEA	7
3.2. FAMILIA ANNONACEAE EN COLOMBIA	7
3.3. BIOACTIVIDAD DE LA FAMILIA ANNONACEAE	10
3.4. GENERALIDADES DE LA ANNONA MURICATA L. <GUANÁBANA>	10
3.4.1. Clasificación Botánica	11
3.4.2. Fenología	11
3.4.3. Flores	12
3.4.4. Semillas	12
3.4.5. Fruto	12
3.4.6. Sexualidad	13
3.4.7. Usos	13
3.4.8. Estudio Fitoquímico de <i>Annona muricata</i>	14
<b>4. MARCO TEÓRICO</b>	<b>15</b>
4.1. ACETOGENINAS	15
4.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ACETOGENINAS DE ANNONACEAE	16
4.2.1. Clasificación según cantidad de anillos en su estructura	16

4.2.2. Clasificación de las Acetogeninas según el tipo y ubicación de los sustituyentes y por su estereoquímica.	16
4.2.2.1. Acetogeninas Lineales	16
4.2.2.2. Epoxiacetogeninas	17
4.2.2.3. Acetogeninas mono-THF	17
4.2.2.4. Acetogeninas bis-THF	17
4.2.2.5. Acetogeninas tri-THF	18
4.2.2.6. Acetogeninas THP	18
4.3. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS ACETOGENINAS	19
4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS ACETOGENINAS DE ANNONACEAS	19
4.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	22
4.5.1. Bioensayo de Letalidad en Artemia salina	24
4.5.1.1. Artemia Salina	25
4.5.2. Biensayo de Letalidad en Mosquito Culex quinquefasciatus	26
4.5.2.1. Mosquito Culex quinquefasciatus	27
4.6. DETERMINACION DE LA CL <sub>50</sub> PARA PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA	28
4.7. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS	29
4.7.1. Separación por lixiviación	29
4.7.2. Separación por cromatografía	29
4.7.2.1. Generalidades	29
4.7.2.2. Cromatografía en capa delgada	30
4.7.2.3. Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia (CLAE)	31
4.7.2.4. Cromatografía Liquida en fase normal	32
4.7.2.5. Cromatografía en Fase Reversa (RPLC)	33
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>35</b>
5.1. MUESTRAS DE ANÁLISIS	35

5.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	35
5.3. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS	35
5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	37
5.4.1. Ensayo preliminar	37
5.4.1.1. Incubación de los huevos para la obtención de las larvas de <i>Artemia Salina</i>	37
5.4.1.2. Preparación de extractos	38
5.4.1.3. Análisis de mortalidad de las larvas	38
5.4.2. Ensayo específico	38
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
5.6. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS FRACCIONES	39
5.6.1. Análisis preliminar por CCD	39
5.6.2. Análisis de los Extractos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)	39
5.7. CUANTIFICACIÓN DE ACETOGENINAS	40
5.7.1. Identificación preliminar de Acetogeninas	40
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
6.1. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS	42
6.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	43
6.2.1. Ensayo preliminar con Artemia salina	43
6.2.2. Ensayo confirmativo con larvas del IV estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	46
6.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	49
6.3.1. Análisis preliminar de acetogeninas por cromatografía de capa delgada (CCD)	49
6.3.2. Curva de Calibración	50
6.3.3. Análisis de los extractos por CLAE	51
6.3.3.1. Análisis del extracto Etanólico desengrasado (F001 D)	51



6.3.3.2. Análisis del extracto Metanólico desengrasado (F005 D)	53
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>58</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>59</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Frutos de <i>A. muricata</i>	11
<b>Figura 2.</b> Arbol de <i>A. muricata</i>	11
<b>Figura 3.</b> Flor de <i>A. muricata</i>	12
<b>Figura 4.</b> Semillas de <i>A. muricata</i>	12
<b>Figura 5.</b> Fruto de <i>A. muricata</i>	12
<b>Figura 6.</b> Estructura general de Acetogeninas Lineales	16
<b>Figura 7.</b> Estructura general de Epoxiacetogeninas	17
<b>Figura 8.</b> Estructura general de acetogeninas mono-THF	17
<b>Figura 9.</b> Estructura general de acetogeninas bis-THF	18
<b>Figura 10.</b> Estructura general de acetogeninas tri-THF	18
<b>Figura 11.</b> Estructura general de acetogeninas THP	18
<b>Figura 12.</b> Acetogenina con actividad citotóxica	20
<b>Figura 13.</b> Artemia salina	24
<b>Figura 14.</b> Mosquito <i>Culex Quinquefasciatus</i>	27
<b>Figura 15.</b> Esquema de un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia	32
<b>Figura 16.</b> Método para la Extracción de Acetogeninas	36
<b>Figura 17.</b> Analisis por CCD	39
<b>Figura 18.</b> Comportamiento de la Actividad Biológica de los extractos sin Desengrasar en el Tiempo.	46

<b>Figura 19.</b> Comportamiento de la Actividad Biológica de los extractos Desengrasados en el Tiempo.	<b>46</b>
<b>Figura 20.</b> Curva de calibración por HPLC para el estándar de Bulatacina	<b>50</b>
<b>Figura 21.</b> Cromatograma del Extracto Etanólico desengrasado (AMD 1).	<b>51</b>
<b>Figura 22.</b> Cromatograma del Extracto Metanólico desengrasado (AMD5).	<b>53</b>

## LISTADO DE TABLAS

	Pág.
<b>TABLA 1.</b> Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae de Colombia	9
<b>TABLA 2.</b> Estudio Fitoquímico de la <i>Annona muricata</i> L.	14
<b>TABLA 3.</b> Algunas Especies de Annonaceae que presentan bioactividad	21
<b>TABLA 4.</b> Acetogeninas de annonaceae con actividad biológica pesticida.	22
<b>TABLA 5.</b> Clasificación de la actividad biológica de acuerdo a la CL <sub>50</sub> (ppm)	24
<b>TABLA 6.</b> Masa Obtenida de la Extracción Etanólica de las Semillas sin Desengrasar.	43
<b>TABLA 7.</b> Masa Obtenida de la Extracción Etanólica de las Semillas Desengrasadas.	43
<b>TABLA 8.</b> Toxicidad para <i>Artemia salina</i> L. de las fracciones de semillas de <i>Annona muricata</i> a través de 8 semanas.	44
<b>TABLA 9.</b> CL <sub>50</sub> Obtenidas para los Extractos Etanólico y Metanólico Desengrasados a través del bioensayo con larvas del IV estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	47
<b>TABLA 10.</b> Datos de la curva de calibración realizada por HPLC para el estándar de Bulatacina	51
<b>TABLA 11.</b> Resultados del cromatograma de la Figura 21.	52
<b>TABLA 12.</b> Resultados del cromatograma de la Figura 22.	54

## 1. JUSTIFICACIÓN

El guanábano (*Annona muricata* Linnaeus) pertenece a la familia Annonaceae, es un árbol tropical cuyo centro de origen se encuentra en Colombia y Brasil. Crece entre los 0-1000 m.s.n.m. El guanábano se ha extendido a través de las zonas tropicales y húmedas del mundo, por esto hoy día se cultiva extensamente de manera comercial, (1). Esta especie produce un fruto de interés alimenticio e industrial, el cual está cubierto por una cáscara de color verde oscuro con varias espinas pequeñas, suaves y carnosas que se desprenden fácilmente cuando la fruta está madura. La pulpa es aromática, blanca, cremosa, carnosas, jugosa y ligeramente ácida, la cual recubre totalmente las semillas negras de 1.25 a 2 cm de largo. Su peso fluctúa entre 1 a 5 Kg, (1,2).

Colombia cuenta con una gran variedad de anonáceas, la más cultivada es *Annona muricata*, y la más comercializada es la Elita, por su mayor tamaño. En las regiones del Valle del Cauca y el Eje Cafetero se encuentran cultivos de guanábana, donde se consume localmente en forma de jugos, postres, yogures y helados. Sus propiedades organolépticas hacen que su jugo sea uno de los más apetecidos a nivel nacional (13% de preferencia). Es además fuente de fibra, calcio, fósforo y vitamina C, (1,2).

La creciente demanda e interés en la guanábana por parte del consumidor y la industria, hacen que esta fruta sea muy apreciada por sus propiedades alimenticias y excelente sabor, se usa en la producción de pulpa (69.8%), y el resto para la elaboración de jugos, helados, néctares, mermeladas, dulces y conservas, (2,3).

Esta fruta contiene el 80% de agua, 1% de proteína, el 18% de carbohidratos y la cantidad justa de las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, en la pulpa, la cual hace parte del 60% del total de la fruta y el resto lo conforman la cascara y las semillas, que usualmente se desechan;(1).

Las Annonaceae, en 130 géneros tienen 2300 especies, es químicamente una de las familias de plantas tropicales menos conocidas. Estudios fitoquímicos y en menor extensión estudios farmacológicos sobre especies de Annonaceae han sido intensificados en los últimos 15 años. Este interés es en gran parte debido al descubrimiento de las acetogeninas de Anonáceas, una clase de compuestos naturales con gran variedad de actividades biológicas. (4).

Además de la importancia alimenticia e industrial de la *A. muricata*, ésta tiene gran interés debido a los compuestos activos que se encuentran en la corteza, raíz y semillas de este árbol. Estos metabolitos tienen capacidad de inducir apoptosis (muerte celular programada) en células cancerígenas y también tienen actividad biopesticida. Extractos crudos de acetogeninas de semillas, pueden ser utilizados como pesticidas económicos, efectivos y no contaminantes del medio ambiente, (5, 7).

El mercado de la guanábana muestra una tendencia creciente. El consumo aparente promedio en Colombia ha sido en los últimos años de 15.000 toneladas, esta producción genera toneladas de semillas de guanábana como subproducto, las cuales son la fuente natural disponible mas abundante de acetogeninas, (2).

El aprovechamiento del valor potencial agregado de residuos (semillas y cáscara) con contenidos de acetogeninas de la *A. muricata* L., no solo aportaría en la utilización de estos desechos, sino también en la generación de nuevos productos naturales como biopesticidas, estos productos beneficiarían a los productores de la guanábana y también a industrias que requieran de tratamientos que no deterioren el medio ambiente ni alteren la naturaleza de sus productos, beneficiando así directamente al medio ambiente, (2,9).

Los pesticidas son sustancias químicas, de distinto grado de toxicidad, usadas para combatir plagas (plaguicidas), insectos (insecticidas), malas hierbas (herbicidas), hongos (fungicidas), entre otros. Algunos de estos pesticidas se degradan lentamente, por lo que pueden permanecer en el ambiente durante varios años, llegando a contaminar acuíferos y pasar a la cadena alimentaria. Estas sustancias tóxicas pueden ser absorbidas por animales y dependiendo de sus características fisicoquímicas algunas sustancias se metabolizan de manera natural pero otras son persistentes y se quedan en el animal, formando parte de la dieta del hombre, (8).

Algunos de los pesticidas de uso cotidiano son totalmente sintéticos, y su uso es muy controvertido debido a los indeseables efectos medioambientales sobre la fauna silvestre que tuvieron algunos pesticidas, como los organoclorados, que han sido prohibidos, o son estrictamente controlados en la mayoría de los países, debido a su alta toxicidad y a su bioacumulación persistente, además son degradados con mucha dificultad y pueden ser transportados por la atmósfera a largas distancias, lo que ha extendido los contaminantes por el medio ambiente, (8).

Dada la alarma pública ante los daños que sufren algunas especies útiles, como las abejas, los insectos son considerados otra razón importante para la nueva generación de biopesticidas.

Los biopesticidas son hechos a base de recursos biológicos, se extraen de un ser vivo mediante procesos que no alteran su composición química; éstas toxinas se producen naturalmente y alteran muy poco el equilibrio ecológico del suelo, (6).

En los últimos años se han desarrollado biopesticidas con pocos efectos sobre la salud humana y animal, y con baja influencia negativa sobre el medio ambiente y que sean suficientemente efectivos para los usos propuestos.

En la región cafetera no se han realizado investigaciones de ningún tipo para el uso de los desechos de la guanábana, lo único que se utiliza es la pulpa y los desechos son enviados a la basura, aunque en algunos lugares la cáscara es usada como compost (fertilizante natural), (1).

Con el fin de lograr el aprovechamiento integral de todas las partes de la fruta y teniendo en cuenta los datos de producción de fruta fresca del Valle del Cauca y Risaralda, se considera viable el estudio sobre la actividad biológica de las semillas de la *A. muricata*; ya que sus extractos crudos podrían emplearse para la producción de biopesticidas eficaces, seguros, económicos y que no sean perjudiciales para el medio ambiente.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Obtener y evaluar extractos bioactivos de las semillas de la *Annona muricata* L. (Annonaceae) con el fin de proponer un uso potencial para su aprovechamiento.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Seleccionar e implementar un proceso de extracción de los compuestos activos (acetogeninas) de las semillas de la *A. muricata* con base en los reportados por otros autores.
- ✓ Evaluar la actividad citotóxica con larvas de *Artemia salina* como ensayo preliminar y el mosquito *Culex quinquefasciatus* como prueba específica de la actividad de las fracciones obtenidas de semillas de la *A. muricata*.
- ✓ Analizar mediante CLAE con arreglo de diodos las acetogeninas presentes en las fracciones.

### 3. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1. FAMILIA ANNONACEAE

Las Annonaceae son 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. Esta familia cuenta con 130 géneros y se estima que hay cerca de 2.300 especies en el mundo, distribuidas por las zonas tropicales de América, África, Indochina y Malasia; entre ellas hay numerosos frutales, especialmente en los géneros *Annona* y *Rollinia*; la mayoría de las especies de estos géneros son originarias del Nuevo Mundo. (9, 10, 11).

El género *Annona* se caracteriza por tener una corteza externa que se desprende en tiras y una corteza interna que es reticulada; sus hojas son alternas, simples, enteras, finas o coriáceas, deciduas o persistentes y sin estípulas; las flores son bisexuales, con frecuencia en tonos de color café y amarillo, solitarias o en racimos, compuestas de 3 sépalos y 6 pétalos, generalmente el cáliz es tubular; los estambres son numerosos, aglomerados, con filamentos carnosos portando anteras largas y espirales; la fruta es grande, carnosa, formada por la fusión de los pistilos y los receptáculos; las semillas son grandes, brillantes y algunas veces con arilos (5, 9, 10, 11).

#### 3.2. FAMILIA ANNONACEAE EN COLOMBIA

Las principales Annonaceae que se encuentran cultivadas en Colombia para su producción son, en su orden: *A. muricata*, *A. cherimola* y *A. blanca*. Otras especies de menor importancia se encuentran en forma silvestre, estas son: *Rollinia mucosa* Bail, *A. colorada* y *A. atemoya* (hibrido no comercial), (12).

En Colombia se encuentran alrededor de 4626.4 hectáreas sembradas pertenecientes a la familia Annonaceae, pero aclarando que de estas mas o menos 1700 pertenecen a cultivos de *Annona muricata* L, localizados principalmente en los departamentos de Tolima, Huila, Antioquia, Valle del Cauca y el Eje Cafetero, ya que estas zonas presentan un clima adecuado para su cultivo, (12,13). Una característica común de esta especie, es su potencial económico, ya 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. Aun así, su cultivo comercial es escaso, por lo que se deben realizar avances tecnológicos para reactivar el cultivo en todo el país de diferentes Anonáceas. (12).

Géneros encontrados en Colombia como: *Anaxagorea*, *Annona*, *Cananga*, *Duguetia* y *Xylopia* tienen distribución pantropical, en tanto que *Diclinanona*, *Froesiodendron*, *Guatteria*, *Guatteriaopsis*, *Ruizodendron* y *Trigynaea* son amazónicos y los restantes géneros son neotropicales, (Ver Tabla 1). La familia está ampliamente distribuida en todo el país. La mayor diversidad de especies se encuentra en las regiones amazónica (54 %), pacífica (27.5%) y andina (27%). El 87 % crece en alturas menores de 500 m y solo *Raimondia quinduensis* alcanza los 2600 m.

La familia Annonaceae es importante desde el punto de vista alimenticio pues *Annona cherimola* (Chirimoya), *A. muricata* (Guanábana), *Raimondia cherimolioides*, *R. quinduensis* y *Rollinia mucosa* se cultivan por sus frutos deliciosos. En la región amazónica las anonáceas se conocen como «cargueros», debido a que la corteza externa se emplea como amarre. Algunas especies como *Bocageopsis* spp, *Fusaea longifolia*, *Guatteria megalophylla*, *Guatteria stipitata* y *Oxandra polyantha* son de importancia maderera, otras se utilizan como medicinales y en ocasiones también se emplean por las comunidades indígenas en ritos ceremoniales. (10).

**TABLA 1. Diversidad y distribución de los géneros de Anonáceas en Colombia, (10).**

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. BIOACTIVIDAD DE LA FAMILIA ANNONACEAE**

El estudio sobre la medicina tradicional como fuente que conduce al descubrimiento de nuevos agentes antiparasitarios, ha encontrado que plantas de la familia Annonaceae son utilizadas por comunidades colombianas como antiparasitarias. Algunas especies de esta gran familia, presentan interesantes metabolitos con actividad biológica: polifenoles, aceites esenciales, terpenos, compuestos aromáticos, acetogeninas particularmente activas, moléculas con un amplio espectro de acción anticancerígeno, antiparasitaria e insecticida y los alcaloides de tipo bisbencilisoquinolínicos, protoberberinas, oxoaporfínicos y aporfínicos.

En esta familia se encuentra en mayor proporción los alcaloides que las acetogeninas; a nivel de la raíz, hojas, tallo y fruto, (14).

### **3.4. GENERALIDADES DE LA *Annona muricata*.**

#### **<GUANÁBANA>**

Aunque no se conoce con certeza su lugar de origen, es nativa posiblemente de la parte septentrional de América del Sur; ésta especie se encuentra dispersa tanto en forma silvestre como cultivada en los trópicos de América y de África Occidental; se extiende a lo largo de las Antillas excepto en las Bahamas, también es cultivada en el Sureste de China, Australia, Sur de la Florida, y desde México hasta Brasil. Crece entre 0 – 1000 m de altura; su producción comercial se ha desarrollado en Brasil, Venezuela, Costa Rica y otros países, para el consumo local y la exportación. Hay mucha variación en el tamaño del fruto y en el contenido de azúcares, (5, 12, 15, 16).

Prospera mejor en climas cálidos y húmedos, crece en suelos con buen drenaje. Suelos: arenoso, limoso, arcilloso, arenisca. Se desarrolla en un pH ligeramente ácido de 5.5 a 6.5; se ha cultivado en plantaciones a

pequeña y gran escala, siendo su principal producto el jugo que se extrae de los frutos. Se necesita ampliar las investigaciones para desarrollar variedades altamente productivas que sean resistentes a pestes y enfermedades, ya que el cultivo de *A. muricata* es susceptible a suelos salinos, fríos, a vientos fuertes, ataque por hongos, insectos y daño por parásitos, (17).

### 3.4.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

**Reino:** Plantae  
**División:** Magnoliophyta  
**Clase:** Magnoliopsida  
**Orden:** Magnoliales  
**Familia:** Annonaceae  
**Género:** *Annona*  
**Especie:** *Annona muricata*



**Figura 1.** Frutos de *A. muricata*

### 3.4.2. FENOLOGÍA

Árbol de 3 a 8 m de altura, sus hojas tienen formas elípticas de 6 a 12 cm de largo por 2.5 cm de ancho; su tronco es ramificado en la base y despide mal olor cuando se le tritura. Sus ramas son cilíndricas, arrugadas, ásperas de color café rojizo y con numerosas lenticelas.



**Figura 2.** Árbol de *A. muricata*

### 3.4.3. FLORES

Posee flores solitarias a lo largo del tallo, 3 sépalos ovados de menos de 5mm de largo; 6 pétalos, 3 exteriores ovalados, libres y gruesos de 2 a 3 cm de largo, 3 interiores delgados y pequeños.



**Figura 3.** Flor de *A. muricata*

### 3.4.4. SEMILLAS

Sus semillas son ovoides y aplanadas, de 15 a 20 mm de largo con testa oscura y brillante, una por carpelo.



**Figura 4.** Semillas de *A. muricata*

### 3.4.5. FRUTO

El fruto es verde oscuro, carnososo, cubierto con tubérculos flexibles con aspecto de espinas; su pulpa es blanca algodonosa y jugosa.



**Figura 5.** Fruto de *A. muricata*

### **3.4.6. SEXUALIDAD**

Es una planta hermafrodita, presenta protoginea, las estructuras femeninas maduran antes que las masculinas; existe un periodo de 36 a 48 horas durante el cual se encuentran maduras ambas estructuras sexuales, (18).

Esta especie tiene un alto potencial para la reforestación productiva en zonas degradadas de selva y está siendo utilizada para rehabilitar sitios donde hubo explotación minera, (18, 19).

### **3.4.7. USOS**

Es una fuente de vitaminas B, C y minerales. Contiene 2.07% de pectina y por sus cualidades aromáticas excepcionales y su aptitud para soportar los tratamientos industriales de exportación, la pasteurización en este cultivo es un buen rubro para exportarse en formas de pulpas, néctares y jalea. El emplasto de guanábana se recomienda para la tiña; la infusión de las hojas se utiliza para combatir la hipertensión, cefaleas, palpitaciones, fiebre, influenza e insomnio; y las hojas son molidas y utilizadas en inhalaciones para la pérdida del conocimiento, (20).

Sus flores tienen un olor fuerte, por lo cual son utilizados en la industria de aceites esenciales, su árbol es utilizado como leña, el fruto es usado en la preparación de jugos, dulces, conservas, jaleas, mermeladas y diversas recetas típicas de cada lugar donde se cultiva, (17, 18).

Por su contenido de componentes activos, la *A. muricata* posee propiedades insecticidas debido a la presencia de diversos compuestos como los alcaloides muricina y muricinina, las acetogeninas, flavonoides, entre otros. Las semillas pulverizadas son utilizadas para matar piojos, chinches, polillas y cucarachas, (16, 18, 19).



### 3.4.8. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA *Annona muricata*

Por ser una de las annonaceas ampliamente estudiadas, se han aislado metabolitos como alcaloides, ácidos grasos, amidas y acetogeninas, tanto de la corteza, como de las semillas, el tallo y las hojas. En la Tabla 2, se mencionan algunos de los compuestos aislados para esta especie, (11).

**TABLA 2. Estudio Fitoquimico de la *Annona muricata*, (11).**

<b>NOMBRE DEL COMPUESTO</b>	<b>TIPO DE COMPUESTO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA REPORTADA</b>
Cis-annonacina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomuricin E	Acetogenina	Hoja	Citotóxica
Cohibina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Acetogenina	Acetogenina	Semillas	-----
Acido butanoico	Aceite	Semillas	-----
Javoricina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Motecristin	Precursor de Acetogenina	Raíz	_____
Cis-solamin	Acetogenina	Raíz	Citotóxica
Acetogenina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica
Annopentocina	Acetogenina	Hojas	Citotóxica
Longicin	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomutacin	Acetogenina	Hoja	Citotóxica

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. ACETOGENINAS

Los compuestos de interés, por su comprobada actividad biológica presentes en las Annonaceae, son un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas. Estas acetogeninas poseen un grupo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado o saturado y uno, dos, o tres anillos tetrahidrofuránicos sobre una larga cadena alquílica; las cuales presentan diferentes bioactividades como antitumoral inmunosupresiva, pesticida, antiprotozoal y antimicrobiana, Usualmente las posiciones  $\alpha$  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, cetonizada y/o acetoxilada. (13, 21).

De las Annonaceae, se han reportado numerosas acetogeninas aisladas e identificadas tales como la *Uvaracina*, la primera que fue aislada de la planta de *Uvaria accuminata* en 1982, (13, 21).

las acetogeninas de Annonaceae pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de células resistentes. Las acetogeninas son potentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una enzima esencial en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, (13, 21, 22).

Un estudio realizado en la Universidad de Purdue en Indiana USA, demostró que las acetogeninas pueden inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de las células de tumores, resistentes a la adriamicina (fármaco quimioterapéutico), respetando la integridad de las células de los tejidos sanos. En otro estudio realizado por científicos de la misma Universidad, se demostró que las acetogeninas de la guanábana son extremadamente potentes teniendo una dosis letal 50 ( $ED_{50}$ ) de hasta 10 microgramos por mililitro, con 10,000 veces la potencia de la adriamicina, (23).

## CLASIFICACIÓN DE LAS ACETOGENINAS DE ANNONACEAE

### 4.1.1. Clasificación según cantidad de anillos en su estructura

Las acetogeninas de Annonaceae se clasifican según la cantidad de anillos que tengan en su estructura, como son:

Mono-Tetrahidrofurano (THF), adyacentes bis-THF, no adyacentes bis-THF y sin anillos mono-THF; éstas estructuras también poseen hidroxilos laterales los cuales pueden estar a uno u otro lado de la estructura, seguida por su clasificación de las  $\gamma$ -lactonas o sustituidas por cetolactonas, (22, 24).

Muchas acetogeninas de Annonaceae han sido encontradas y clasificadas por síntesis total o por el método de Esteres de Mosher, (24, 25).

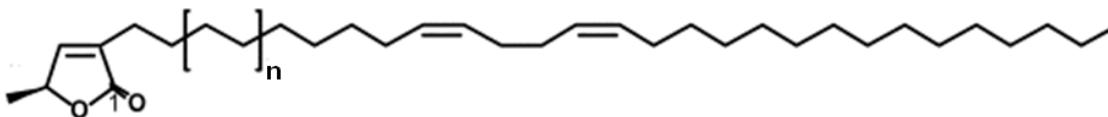
### 4.1.2. Clasificación de las Acetogeninas según el tipo y ubicación de los sustituyentes y por su estereoquímica

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, (27, 28).

#### 4.1.2.1. Acetogeninas Lineales:

Son precursores de las epoxiacetogeninas y acetogeninas THF. Se diferencian por el grado de insaturación e hidroxilación en la cadena alquílica, (29, 30, 31, 32). Su estructura general es:



**Figura 6.** Estructura general de Acetogeninas Lineales

#### 4.1.2.2. 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, (27, 28, 29, 30, 31, 32).

Su estructura general es:

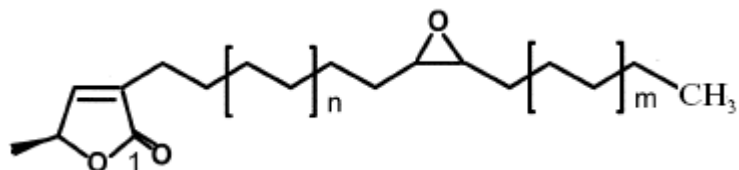
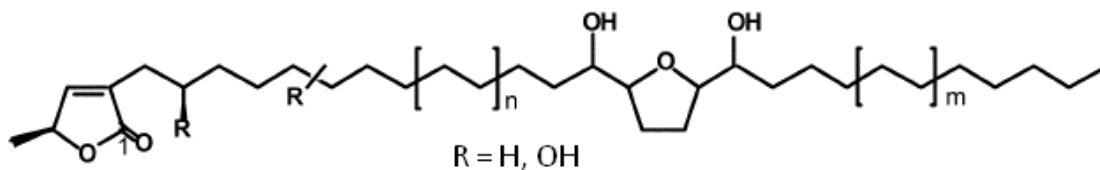


Figura 7. Estructura general de Epoxiacetogeninas

#### 4.1.2.3. Acetogeninas mono-THF:

Se enmarcan en aquellas que poseen un solo anillo THF; usualmente son de 35 carbonos con diferentes grados de oxidación, (27, 28, 29, 30, 31, 32).

Su estructura general es:



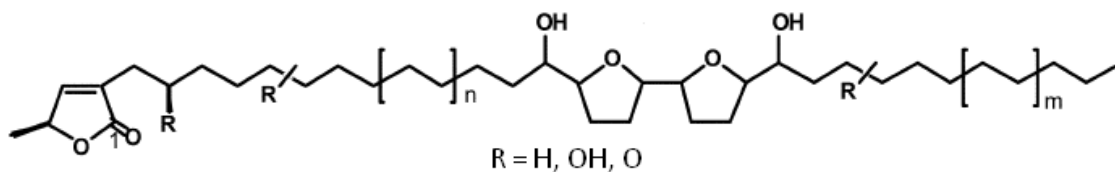
R = H, OH

Figura 8. Estructura general de acetogeninas mono-THF

#### 4.1.2.4. 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, (27, 28, 29, 30, 31, 32).

Su estructura general es:

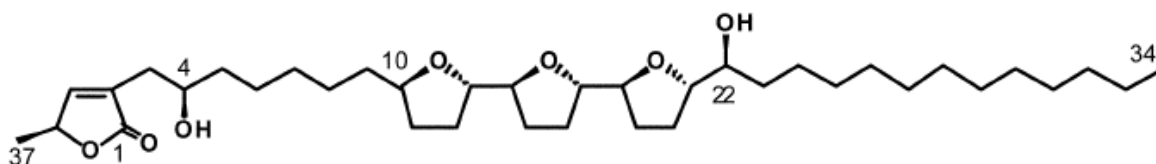


**Figura 9.** Estructura general de acetogeninas bis-THF

#### 4.1.2.5. Acetogeninas Tri-THF:

Son aquellas que poseen 3 anillos THF. Hasta el momento se conoce la Goniocina aislada de *Goniothalamus giganteus*, (29, 30, 31, 32).

Su estructura es:

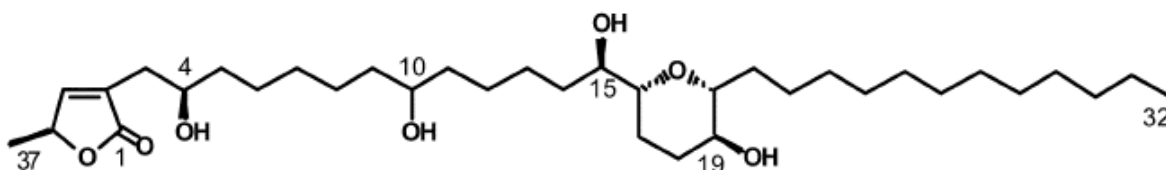


**Figura 10.** Estructura general de acetogeninas Tri-THF

#### 4.1.2.6. Acetogeninas Tetrahidropiránicas (THP):

Son aquellas que poseen un anillo tetrahidropirano como sustituyente en la cadena alquílica, (29, 30, 31, 32).

Su estructura general es:



**Figura 11.** Estructura general de acetogeninas THP

#### **4.2. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS ACETOGENINAS**

En la literatura se han reportado varios métodos para la extracción de acetogeninas, encontradas principalmente en las hojas, semillas y raíces de algunas Annonaceae, (13, 33, 34, 35, 36).

Las acetogeninas son fácilmente solubles en la gran mayoría de solventes orgánicos. Algunas técnicas para el aislamiento de acetogeninas utilizan extracción en éter, filtración en frío con hexano y etanol para extraerlas del material seco de la planta, seguido por la partición en disolventes de diferente polaridad, para concentrar los componentes, (37).

Para la extracción de acetogeninas de otras especies de la familia Annonaceae se encuentran varias metodologías: *Annona crassiflora*, (36). *Annona squamosa*, (34, 35). *Annona montana*, (23). *Annona senegalensis*, (37). *Rollinia mucosa*,(38). *Annona cherimola*, (33). *Annona atemoya*, (39).

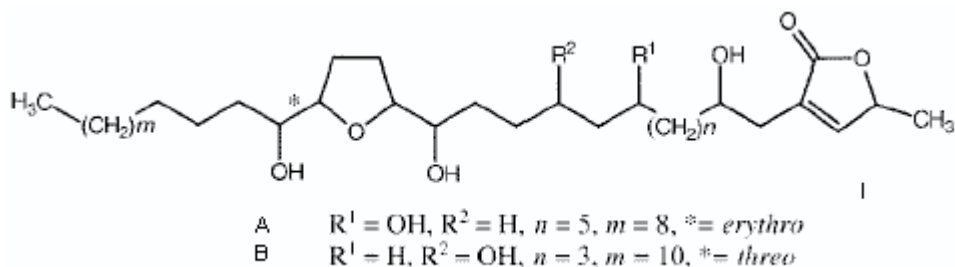
Para la identificación de las diferentes acetogeninas es necesario conocer las configuraciones, la posición de los anillos, la posición de los diferentes grupos y el peso molecular de cada estructura para lo cual se han utilizado técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM), (39, 40, 41).

#### **4.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS ACETOGENINAS DE ANNONACEAS**

Las acetogeninas son sustancias que poseen dos importantes actividades biológicas, tales como: actividad citotóxica y actividad biopesticida. En la actividad citotóxica, una serie de experimentos han mostrado que las acetogeninas son inhibidores de la enzima NADH en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, esta acción agota el ATP e induce en las células una muerte programada (apoptosis), se ha demostrado que las

acetogeninas buscan selectivamente las células cancerígenas para atacarlas y las células normales permanecen intactas, (30, 47).

La actividad leishmanicida de éstas sustancias se atribuye a los hidroxilos vecinos del anillo tetrahidrofurano en la estructura siguiente.



**Figura 12.** Acetogenina con actividad citotóxica

La toxicidad exhibida por la exposición de insectos a las acetogeninas, incluye una disminución lenta en la movilidad y crecimiento antes de la muerte. Tales síntomas son normalmente atribuidos a los bajos niveles de ATP causados por los inhibidores respiratorios, sin embargo se requiere de estudios futuros para conocer el tipo de organismo susceptible a estos componentes, (37).

Dentro de la actividad biopesticida de las acetogeninas, algunas han mostrado fuerte actividad ovicida y larvicida. Si el anillo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado está presente, los resultados de actividad biopesticida son mejores que aquellos obtenidos con acetogeninas saturadas. Sin embargo, mezclas de éstos compuestos encontrados en extractos crudos, dan síntomas de efectos sinérgicos que potencian la cobertura de aplicaciones de las acetogeninas como biopesticidas biodegradables, (27, 28, 48).

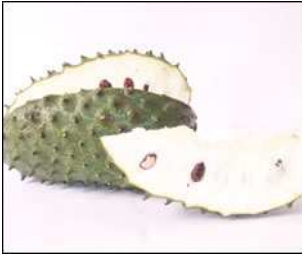
En general, las acetogeninas de mayor potencia son las bis-THF de anillos adyacentes, seguidas por las bis-THF no adyacentes y, en menor cuantía las mono-THF, (68).

**TABLA 3. Algunas especies de Annonaceae que presentan bioactividad, (71).**

<b>ACETOGENINAS</b>	<b>PLANTA</b>	<b>BIOACTIVIDAD</b>
<b>Uleicina</b>	<i>Rollinia ulei</i>	Actividad Leishmanicidal
<b>Senegalena, Squamocina, Asimicina y Molvizarina</b>	<i>Annona senegalensis</i>	Leishmaniasis
<b>Rolliniastatina</b>	<i>Rollinia emarginata</i>	Actividad Leishmanicidal
<b>Annonacina y Goniotalamicina</b>	<i>Annona glauca</i>	Actividad Leishmanicidal
<b>Argentilactona</b>	<i>Annona haementantha</i>	Actividad Leishmanicidal Malaria
<b>Annonacin, Annonacin A y Anomuricin A.</b>	<i>Annona muricata</i>	Leishmaniasis Malaria
<b>Panatelina, Uvariamicina IV, Uvariamicina I, Reticulatacina Solamina</b>	<i>Annona muricata</i>	Antiparasitaria



**TABLA 4. Acetogeninas de Anonaceae con actividad biopesticida, (37, 49, 50, 51, 52)**

ANONÁCEAS	ACETOGENINAS
<p data-bbox="370 464 631 495"><i>Annona muricata</i></p> <p data-bbox="423 543 574 575">(Semillas)</p>  <p data-bbox="412 921 586 953">Guanábana</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="802 390 1062 422">• Annonacina</li> <li data-bbox="802 428 1062 459">• Corossolina</li> <li data-bbox="802 466 1062 497">• Corossolona</li> <li data-bbox="802 504 1135 535">• Diepomuricanina</li> <li data-bbox="802 541 1102 573">• Gigantetrocina</li> <li data-bbox="802 579 1135 611">• Gigantetrocina A</li> <li data-bbox="802 617 1110 648">• Gigantetriocina</li> <li data-bbox="802 655 1110 686">• Muricatetrocina</li> <li data-bbox="802 693 1143 724">• Muricatetrocina A</li> <li data-bbox="802 730 1040 762">• Murisolina</li> <li data-bbox="802 768 1118 800">• Rolliniastatina 1</li> <li data-bbox="802 806 1110 837">• Rolliniastatina2</li> <li data-bbox="802 844 1029 875">• Solamina</li> </ul>

#### 4.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los bioensayos, o pruebas de toxicidad son experimentos que miden el efecto de compuestos, en una o más especies para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa cuya actividad se desconoce.

La elección de un organismo de prueba adecuado para un bioensayo depende del efecto que se desea evaluar y de las características del organismo, para así asegurar que la respuesta de una población expuesta a cierto agente tóxico se deba al efecto de éste y no a variaciones tanto de la sensibilidad de los organismos como de fallas operacionales en la aplicación del método.

Para la realización de los bioensayos es importante determinar la especie e indagar sobre algunos aspectos de la biología básica del organismo (nutrición, ciclo de vida, condiciones óptimas de cultivo y manejo), puesto que es esencial reunir información acerca de los diferentes aspectos de la fisiología de las especies potencialmente aptas para tal fin. Los bioensayos deben ser simples, rápidos, reproducibles y económicos, (53, 54, 79).

La estimación de la toxicidad de un ensayo de laboratorio está determinada por el diseño experimental y los parámetros a evaluar. A pesar de que no corresponden a efectos tomados directamente en el campo, las condiciones particulares bajo las cuales son llevados a cabo los ensayos pueden utilizarse para predecir el efecto nocivo de un tóxico. En el laboratorio, la toxicidad se mide bajo condiciones cuidadosamente controladas que permiten obtener resultados precisos, bajo condiciones estandarizadas que aseguran la reproducibilidad en la estimación. (55, 79).

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la mortalidad del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%. Por ejemplo, la dosis letal media es la dosis o concentración que mata al 50% de la población ( $CL_{50}$ ). Otro indicador que ha ganado gran popularidad es la dosis o concentración más alta a la cual no se observa ningún efecto (NOEC, No Observed Effect Concentration), (55).

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 5. Clasificación de la actividad biológica de acuerdo a la  $CL_{50}$  (76).**

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

#### **4.4.1. BIOENSAYO GENERAL DE LETALIDAD CON LARVAS DE *Artemia salina***

Uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a las larvas *A. salina*. Este procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *A. salina*, para determinar valores de concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ), sin embargo estos valores no indican ninguna actividad fisiológica o biológica en particular, solo son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas, (56).



**Figura 13. Artemia Salina**

#### **4.4.1.1. *Artemia salina***

El "camarón de salmuera" o "brine shrimp", conocido como *Artemia salina* (LEACH), 1819 es el crustáceo anostrácodo usado durante años como un modelo ideal para realizar investigaciones en disciplinas básicas y/o aplicadas. El género *Artemia* agrupa especies que viven y se reproducen en ambientes hipersalinos continentales o costeros alrededor del mundo, excepto en la Antártica, (58).

Hasta hoy se conoce que la *Artemia* se encuentra en casi 400 sitios esparcidos sobre los cinco continentes. Su amplia distribución es atribuida a la dispersión natural por el viento o por aves migratorias y/o introducción deliberada realizada por el hombre con fines comerciales. Estos hábitats presentan características climatológicas, ecológicas y fisicoquímicas particulares, las cuales se reflejan con variaciones en rasgos de la historia de vida, plasticidad fenotípica y/o heterogeneidad genética, (77, 78).

La *Artemia* es un filtrador no-selectivo y se alimenta filtrando materia particulada de origen biológico (detritus orgánico de aguas de manglares) así como también de organismos vivos de tamaño apropiado (bacterias y algas microscópicas). De hecho debido a la ausencia de predadores y competidores por alimento, la *Artemia* frecuentemente se desarrolla en grandes monocultivos, y las densidades son principalmente controladas por la limitación de alimento. La reproducción ovovivípara (nauplios como descendencia) ocurre mayormente en niveles de baja salinidad, considerando que los quistes (reproducción ovípara) son producidos en salinidades más allá de 150 ppt, (58, 78).

Actualmente, la *Artemia* se utiliza como especie de bioensayo para una variedad de objetivos tales como, (60):

- Investigación de la fuente de toxicidad en mezclas de sustancias químicas y muestras ambientales.
- Tamizaje de toxicidad aguda de sustancias químicas.

- Detección de toxinas naturales en comestibles y farmacéuticos.
- Estudios de modelos de acción tóxica de sustancias.
- Estudios de la transferencia trófica de contaminantes.

El potencial de *Artemia* para investigación y aplicaciones en toxicología acuática se ha explorado desde 1975. En 1981 se desarrolló el primer ensayo estandarizado de ecotoxicología marina: el ensayo ARC, que es un ensayo de 24 a 48 horas para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en nauplios de instares II y III. La confiabilidad y precisión de este ensayo fue investigada durante un extenso ejercicio de calibración involucrando a 80 laboratorios americanos y europeos, dando resultados muy satisfactorios. La experiencia obtenida desde entonces ha abierto el camino para mejorar uno de los ensayos de tamizaje más sencillos, más reproducible y rentable en toxicología acuática, (60).

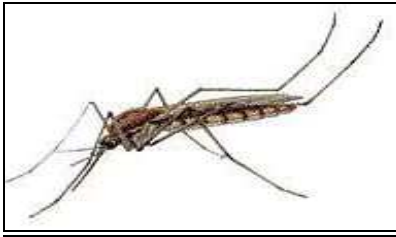
El estudio de la letalidad que producen algunos extractos de plantas sobre larvas de *Artemia salina* ha servido para mostrarlas como fuente de principios bioactivos, además que es un método muy utilizado por ser un organismo fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos, y genera resultados confiables en cuanto a alternativas poco costosas y sencillas; permite crear una base para adelantar posteriores estudios, (61, 86).

Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividades diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, por lo que ha sido utilizado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, entre otros, (61).

#### **4.4.2. BIOENSAYO ESPECIFICO DE LETALIDAD EN LARVAS DEL MOSQUITO *Culex quinquefasciatus***

Los mosquitos constituyen un grupo de insectos de gran importancia, debido a que muchas de sus especies, además de causar diversas

molestias, son vectores de agentes causales de enfermedades humanas con gran importancia en salud pública, por ejemplo la malaria y el dengue. Su combate se ha efectuado tradicionalmente con insecticidas organosintéticos, los cuales han ocasionado daños al medio ambiente, intoxicando a las personas expuestas y desarrollando resistencia. En respuesta a esta problemática se considera necesaria la búsqueda de alternativas de solución con menos riesgos y con bajo costo económico y ambiental, como el uso de extractos vegetales; uno de los métodos más antiguos para el control de plagas.



**Figura 14.** Mosquito *Culex quinquefasciatus*

#### **4.4.2.1. MOSQUITO *Culex quinquefasciatus***

Muchas especies del género *Culex* (Ver figura 14) con sus subgéneros, están distribuidos por todo el mundo, principalmente en regiones cálidas. Estos mosquitos, pequeños o de mediano tamaño, viven principalmente en masas permanentes de agua y su distribución es urbana y rural, (80).

Esta especie se ha relacionado con la transmisión de filarias como *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, (81).

Los estadios inmaduros se desarrollan preferiblemente en depósitos de agua y los criaderos son variados, constituidos por aguas con un alto grado de contaminación, abundante contenido de materia orgánica con detritos en proceso de fermentación y en ambientes sombreados cercanos al ambiente domiciliario, (82).

Debido a su antropofilia acentuada, la resistencia a los insecticidas, su capacidad vectorial y las altas densidades que pueden llegar a alcanzar, *Culex quinquefasciatus* es un factor de riesgo para las poblaciones urbanas. Por tanto, el conocimiento de los aspectos biológicos, fisiológicos y bioquímicos de la especie se constituyen en el primer paso que con lleva a la implementación de medidas que conduzcan al control de las poblaciones de mosquitos en las áreas urbanas, (83, 84).

#### **4.5. DETERMINACIÓN DE LA CL<sub>50</sub> PARA PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

La CL<sub>50</sub> se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias. El valor obtenido de CL<sub>50</sub> indica la mortalidad del 50% de los organismos expuestos y mientras menor sea este, mayor es la toxicidad.

El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como DL<sub>50</sub> por dosis letal media (o DE<sub>50</sub> por dosis efectiva media, CL<sub>50</sub> por concentración letal media, CE<sub>50</sub> por concentración efectiva media y LTM por límite de tolerancia media). El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas CL<sub>50</sub>, esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo, (85).

Los datos obtenidos de un bioensayo no pueden ser analizados con la metodología estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo,

sino que se debe utilizar estadística cuantil, para lo cual es necesario transformar los valores de respuesta obtenidos en unidades Anglit, Logit o Probit y las dosis suministradas en unidades logarítmicas conocidas como dosis metamétricas; la estadística cuantil se caracteriza por la respuesta a un estímulo de  $n$  unidades experimentales, donde  $r$  unidades responden y  $n - r$  no lo hacen, (85).

Existen algunos programas especializados que realizan este tipo de cálculos automáticamente, pero su confiabilidad depende de la persona o institución que los haya desarrollado, (85).

## **4.6. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS**

### **4.6.1. SEPARACIÓN POR LIXIVIACIÓN**

La lixiviación es la separación de uno o varios solutos contenidos en una fase sólida mediante su contacto con un disolvente líquido que los disuelve selectivamente, pudiendo tratarse de una simple disolución física o de una reacción química que libera al soluto de la matriz sólida, (42).

La lixiviación se emplea en la industria alimentaria, farmacéutica y de tratamiento de minerales, separando los componentes deseados de la estructura sólida.

Para aislar las acetogeninas de Annonaceae se utiliza este método ya que son fácilmente solubles en la gran mayoría de los solventes orgánicos.

### **4.6.2. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA**

#### **4.6.2.1. Generalidades**

En general las separaciones analíticas se realizan en la mayoría de los casos por cromatografía y electroforesis, especialmente en el caso de mezclas complejas y multicomponentes, (40).



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, (40, 41, 42).

#### **4.6.2.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)**

La cromatografía en capa delgada es un procedimiento rápido y sencillo para separar mezclas de sustancias, 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 celulosa 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, (40, 41).

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  $R_f$ , (41).

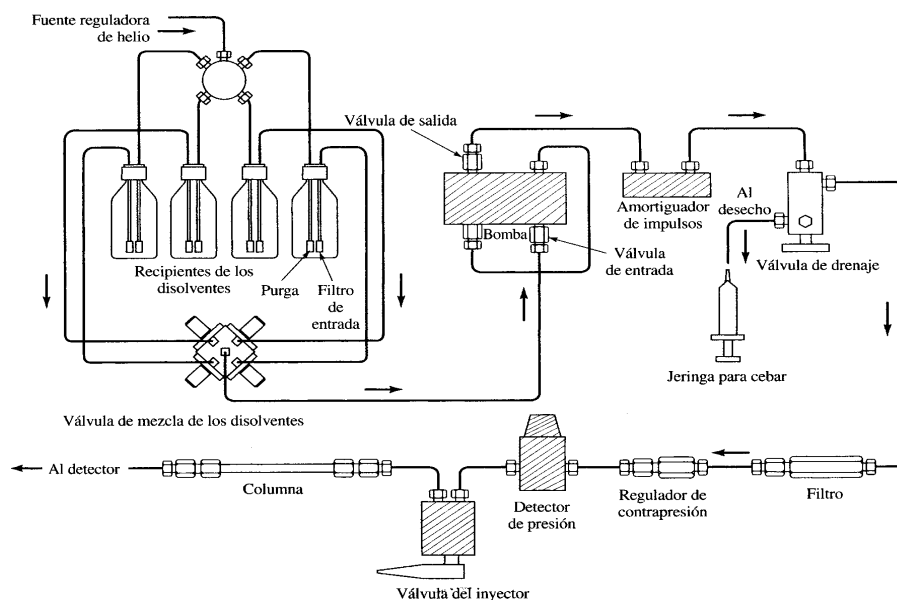
$$R_F = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} = \frac{X}{Y}$$

#### 4.6.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) es la técnica analítica de separación más utilizada, debido a su excelente sensibilidad, su adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y su idoneidad para la separación de sustancias no volátiles.

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.(41).

En 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 (40, 43, 86).



**Figura 15.** Esquema de un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (CLAE)

#### 4.6.2.4. Cromatografía Líquida en Fase Normal

La cromatografía líquido-sólido (LSC) o cromatografía de adsorción es la modalidad cromatográfica más antigua. La cromatografía de adsorción fue usada prácticamente con exclusividad, hasta que Howard y Martin encontraron un problema de difícil resolución debido a la polaridad de la fase móvil: la separación de ácidos grasos de cadena larga. El problema fue resuelto tratando silicagel de baja actividad con vapores de diclorodimetilsilano para obtener una fase estacionaria no polar, (40, 43).

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. La cromatografía en fase normal se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o alúmina microporosas 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, y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil. Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes polares. El mayor inconveniente de la cromatografía en fase normal se debe a la alta actividad del material de relleno, que tiende a absorber agua y solvente polares en su superficie, (40, 42, 43).

#### **4.6.2.5. Cromatografía Líquida en Fase Reversa (RPLC)**

La difusión de la fase reversa se debe a un factor clave: la silicagel (como también la alúmina), es un material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención: por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra, a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria, (41).

Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos, partición del soluto entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida, adsorción sobre una fase estacionaria sólida, o bien un proceso mixto partición-adsorción. En RPLC, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es muy polar (en general mezcla de agua y un modificador orgánico, (MeOH, AcN o THF), (41).

El tipo de sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C18 (grupo octadecilo) y en menor proporción C8 (grupo octil). En RPLC, se observa que para igual carga de carbono, a mayor longitud de cadena corresponde mayor retención y para igual longitud de cadena alquílica, a mayor cobertura, mayor retención. La retención está gobernada por la hidrofobicidad del soluto. A mayor polaridad del soluto,

mayor predilección de éste por la fase móvil y menor tiempo de retención.  
Los solutos no polares tendrán comportamiento inverso, (40, 41).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. MUESTRAS DE ANÁLISIS

Se emplearon semillas de frutos maduros de la *A. muricata* “guanábana”, procedentes de cultivos de Risaralda y Norte del Valle, suministradas por un proveedor de Merca Plaza en la ciudad de Pereira.

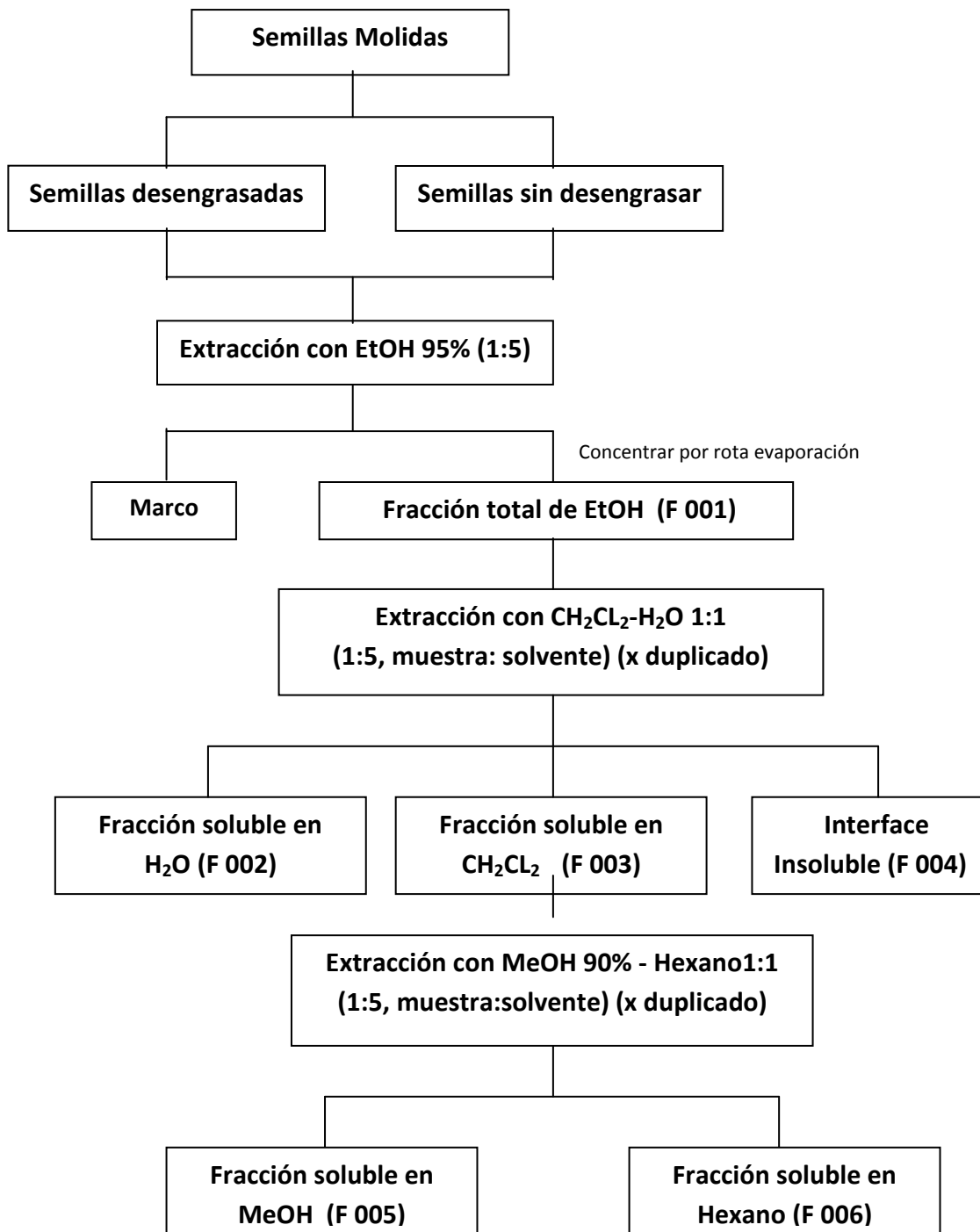
### 5.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En el laboratorio de Oleoquímica de la UTP, se secaron las semillas en estufa a 32°C durante 72 horas, luego fueron molidas utilizando un molino de aspas; las semillas molidas se dividieron en dos porciones, una se almacenó en un congelador a -20 °C en bolsas plásticas con cierre para su posterior análisis, y la otra porción fue desengrasada con hexano por 72 horas, empleando la técnica de extracción soxhlet, en una relación muestra-solvente 1:4, este Hexano fue removido posteriormente por rota-evaporación hasta obtener un aceite ámbar al cual se le realizó una extracción con MeOH<sub>aq</sub> 10%.

### 5.3. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS

Se realizó paralelamente para una misma cantidad de semillas desengrasadas y de semillas sin desengrasar, realizando los ensayos por triplicado, la extracción de acetogeninas por lixiviación, con base en métodos propuestos por diferentes autores, (5, 13).

Las semillas desengrasadas y sin desengrasar, se sometieron a lixiviación con etanol absoluto como solvente extractor, durante 6 días, con agitación magnética constante, empleando una relación de 1:4 (50 g de polvo de semillas y 200 mL de solvente) y por triplicado, se eliminó el solvente a presión reducida y a una temperatura por debajo de 40°C, y se continuó con la separación según el esquema que se representa en la Figura 16.



**Figura 16.** Método para la extracción de Acetogeninas, (32).

## **5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

La actividad biológica de las diferentes fracciones del extracto de semillas de *Annona muricata* L. se evaluó mediante un ensayo preliminar y un ensayo específico, (9, 12).

### **5.4.1. Ensayo preliminar**

El bioensayo *Artemia salina*, se implementó en el Laboratorio de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira siguiendo el protocolo propuesto por varios autores, (10, 18, 47).

La selección del bioensayo se realizó considerando que en repetidas ocasiones se ha encontrado una magnífica correlación entre la presencia de acetogeninas citotóxicas y la toxicidad demostrada frente al crustáceo por los extractos crudos obtenidos a partir de distintas especies de anonáceas. De manera adicional, el ensayo es simple, rápido y económico.

#### **5.4.1.1. Incubación de los huevos para la obtención de las larvas de *Artemia Salina***

Se preparó agua de mar artificial al 38% como medio artificial para el cultivo de *Artemia salina*, con sal marina y agua potable comercial, así eliminamos el procedimiento de suministro de aire a través de bombas, ya que contiene más DO (oxígeno disuelto) que el agua destilada.

Se adecuó un recipiente que hiciera las veces de cámara de incubación para el desarrollo (eclosión) de 45 mg de huevos de *Artemia salina*, esta consta de una zona oscura y una iluminada permanentemente. Se mantuvo a una temperatura constante de 28°C en una incubadora.

De las 24 a las 48 horas del cultivo de los huevos se observa la eclosión de los nauplios, éstos se utilizaron para el bioensayo a las 48 horas.



#### **5.4.1.2. Preparación de extractos**

Para la preparación de las muestras madre, se pesaron 20 mg de cada fracción de las semillas desengrasadas y sin desengrasar y se diluyeron en 2 mL de etanol 95%, a partir de esta se prepararon soluciones a diferentes concentraciones: 1000, 100 y 10 g/L, tomando de la solución madre 0.5 mL, 50  $\mu$ L y 5  $\mu$ L en un pequeño recipiente de vidrio llamado vial, en los cuales primero se deja evaporar el solvente y luego se llevan a un volumen de 5 mL con agua de mar artificial.

De igual manera se realizaron dos tipos de controles, un blanco con agua de mar artificial y un control positivo con Etanol.

En todas las muestras y en los controles se adicionó una gota de dimetilsulfóxido el cual ayuda en la disolución de los compuesto polares que están en la muestra, y a cada vial se le adicionó 10 nauplios, haciendo este ensayo por triplicado para mejor análisis de los resultados.

#### **5.4.1.3. Análisis de mortalidad de las larvas**

Al cabo de 24 horas de contacto con las sustancias y los extractos preparados se realizó el conteo de número de nauplios muertos.

Los resultados obtenidos son procesados para determinar la  $CL_{50}$  a través del software Probit.

#### **5.4.2. Ensayo específico**

Las fracciones que mostraron mayor actividad en el ensayo preliminar con la *Artemia salina* se evaluaron utilizando larvas del IV estadio del *Culex quinquefasciatus*; éste procedimiento se llevó a cabo por el grupo de Productos Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

## 5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

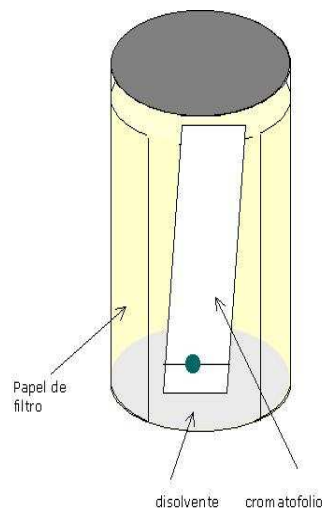
En la cuantificación, las determinaciones se realizaron por triplicado y se hizo un análisis de varianza.

Los datos obtenidos de la actividad biológica se analizaron utilizando el software PROBIT, el cual reporta el índice de mortalidad media por ingesta oral  $DL_{50}$ , (9, 12).

## 5.6. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS FRACCIONES

### 5.6.1. Análisis preliminar por CCD

Se llevó a cabo la caracterización química de las fracciones más activas empleando cromatografía de capa delgada (ver Figura 17) con reveladores universales y específicos para acetogeninas, como una determinación preliminar.



**Figura 17.** Análisis por CCD

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.

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

Se llevó a cabo un análisis específico por cromatografía líquida con los extractos que presentaron mayor actividad implementando condiciones de separación reportadas en estudios previos, (16, 17, 19, 72, 73), para la comparación de los perfiles cromatográficos e identificación preliminar de las acetogeninas por tiempos de retención relativos con un patrón de

acetogeninas, 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 $\mu$ m x140A<sup>o</sup>

**Precolumna:** 20mmx4,4mm Ultra aqueous C18, 5 $\mu$ m

**Temperatura de la Columna:** 40 °C

**Flujo:** 0,8 mL/min.

**Fase Móvil:** H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (A-B)

<b>Gradiente:</b>	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,  $\lambda$ = 200-400 nm

**Tiempo de Corrida:** 16 min

## 5.7. CUANTIFICACIÓN DE ACETOGENINAS

La cuantificación de acetogeninas se hizo en los mismos extractos mediante la técnica del estándar externo, haciendo una curva de calibración de la bulatacina a una  $\lambda=205\pm 4$  nm, por triplicado, (72, 74).

Para el método del estándar externo se empleó una curva de calibración de bulatacina, utilizando concentraciones de 10; 30; 50; 100; 300; 500 y 1000  $\mu$ g/mL, corridas por triplicado.

La cuantificación de cada pico se hizo mediante la Normalización de áreas.

### 5.7.1. 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 ( $\lambda=205\pm 4$  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.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS

En el proceso de extracción se llevaron a cabo los ensayos por triplicado, los extractos obtenidos fueron pesados en todos los casos. Como se aprecia en la Tabla 6, para las semillas sin desengrasar se encontró un porcentaje promedio del extracto de etanol del 18.42% del cual después de hacer el proceso de fraccionamiento líquido-líquido se encontró que el extracto es el 7.39% y el resto debería quedar en fase acuosa; de el total del extracto de etanol aproximadamente el 60% queda en la fracción acuosa y el resto en la de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Para las semillas desengrasadas los porcentajes obtenidos son mucho menores ya que los ingredientes activos son concentrados, se obtuvo un porcentaje promedio del extracto de etanol de 4.62%, del cual se obtiene 2.31% del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , lo que indica que el total del extracto de etanol queda 50% en fracción acuosa y 50% en la de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

La diferencia entre los porcentajes obtenidos en ambos métodos se debe principalmente a la presencia de materia grasa en las semillas sin desengrasar, pero también se debe tener en cuenta la presencia de otros compuestos presentes como flavonoides, alcaloides, resinas, taninos, saponinas y aceites esenciales entre otros, que pueden ser arrastrados de acuerdo a su polaridad, (49).

**TABLA 6. Masa obtenida de la extracción etanólica de las semillas sin desengrasar**

Ensayo	Masa semillas (g)	Masa fracción 001 (EtOH)	% Rendimiento Fracción 001	Masa Fracción 003 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	% Rendimiento Fracción 003
1	100.0060 g	18.5694	18.57	7.5498	7.55
2	100.0152 g	19.5420	19.54	8.1545	8.15
3	100.0060 g	17.1578	17.16	6.4813	6.48
Promedio	100.0091 g	18.4231	18.42	7.3952	7.39

**TABLA 7. Masa obtenida de la extracción etanólica de las semillas desengrasadas.**

Ensayo	Masa semillas (g)	Masa fracción 001 (EtOH)	% Rendimiento Fracción 001	Masa Fracción 003 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	% Rendimiento Fracción 003
1	100.0284 g	4.6088	4.61	2.2468	2.25
2	100.0071 g	4.0896	4.09	2.1273	2.13
3	100.0011 g	5.1490	5.15	2.5628	2.56
Promedio	100.0122 g	4.6158	4.62	2.3123	2.31

## 6.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 6.2.1. ENSAYO PRELIMINAR CON ARTEMIA SALINA

Las fracciones evaluadas en este ensayo fueron: F001, F003, F005 de las semillas sin desengrasar y F001, F003, F005 de las semillas desengrasadas, cada una a las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm y por triplicado para mejor reproducibilidad de los resultados.

Se evaluaron los extractos a través del tiempo iniciando los ensayos recién se obtuvieron los extractos, luego a la segunda, cuarta, sexta y octava

semana, esto con el fin de observar la estabilidad y la efectividad del extracto en el tiempo.

Los nauplios fueron evaluados a las 24 horas de estar en contacto con los extractos y se observó la mortalidad de las larvas, considerando muertas aquellas que no presentan movimiento. Con los datos obtenidos se determinó la  $CL_{50}$  con el 95% de confianza utilizando el método Probit.

**Tabla 8. Toxicidad para *Artemia salina* L. de las fracciones de semillas de *Annona muricata* a través de 8 semanas.**

Fracciones		$CL_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el Tiempo (Semanas)				
		1	2	4	6	8
<b>F001 S</b>	EtOH Sin Desengrasar	8,978	8,978	117,121	887,120	3368,686
<b>F003 S</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ Sin Desengrasar	3,719	5,073	12,167	18,622	77,250
<b>F005 S</b>	MeOH Sin Desengrasar	2,587	3,719	9,778	18,622	31,249
<b>F001 D</b>	EtOH Desengrasado	3,415	3,415	24,691	77,250	117,121
<b>F003 D</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ Desengrasado	1,478	2,052	8,607	26,070	47,892
<b>F005 D</b>	MeOH Desengrasado	1,214	2,587	4,221	8,978	12,167

De manera general, un extracto o fracción se considera activo en este ensayo cuando presentan  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ , mientras que para los compuestos puros se considera una  $CL_{50} < 200 \mu\text{g}/\text{ml}$ , (32). Los resultados de la evaluación biológica se encuentran incluidos en la Tabla 8 y de ellos se desprende que la fracción más activa fue la adquirida con MeOH, para ambos ensayos de semillas desengrasadas y sin desengrasar, mientras que la de menor actividad fue la obtenida con EtOH, ya que en esta fracción las sustancias bioactivas se encuentran menos concentradas.

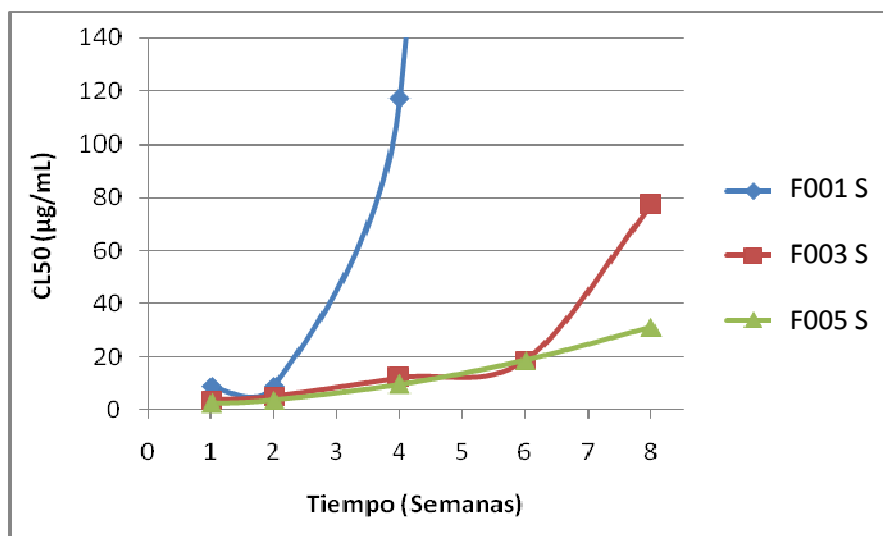
Los extractos recién obtenidos, según su  $CL_{50}$ , mostraron una gran actividad pues presentaron concentraciones en un rango entre 1,214 y 8,978  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los extractos desengrasados presentaron mayor actividad

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.

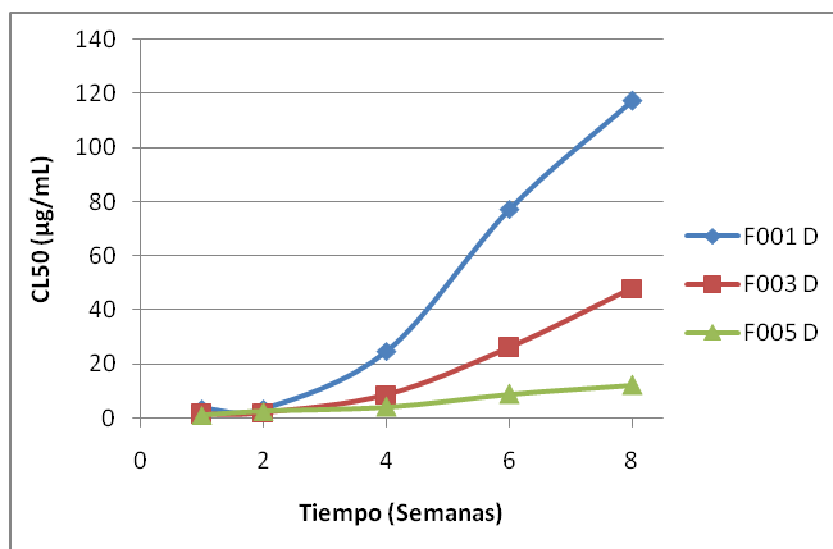
Puede apreciarse que todos los extractos se fueron degradando con el tiempo, sin embargo, a partir de la sexta semana se observa que los extractos sin desengrasar se degradaron más rápidamente que aquellos que fueron desengrasados, debido posiblemente a procesos de oxidación sufridos por los componentes lipídicos presentes en los extractos no desengrasados. Entre la octava y sexta semana la fracción F001 S, se vuelve inactiva, indicando que el efecto toxicológico disminuye rápidamente, pero hay que tener en cuenta que estas muestras fueron conservadas en condiciones normales a temperatura ambiente, y no se les realizó ningún procedimiento especial para evitar su rápida degradación. Los valores de  $CL_{50}$  del extracto metanólico desengrasado aumentó de un seguimiento a otro aproximadamente 1.8 veces en promedio, observándose un incremento de 10 veces del extracto fresco hasta el extracto en la última semana. Para el extracto etanólico desengrasado su incremento fue 34 veces del extracto fresco hasta la última semana, a diferencia del extracto etanólico sin desengrasar que tuvo un aumento de 98 veces solo hasta la sexta semana.

En las figuras 18 y 19, se puede apreciar el comportamiento de la actividad biológica de los extractos desengrasados y sin desengrasar en el tiempo. Ambas muestran claramente la tendencia de las fracciones a degradarse a través del tiempo, lo que es mucho más rápido en las fracciones sin desengrasar y para la fracción F001 S, que se vuelve inactiva a la octava semana. En ambos casos se muestra mayor estabilidad para las fracciones metanólicas, lo que indica que el efecto toxicológico es mucho más duradero en esta fracción, donde las sustancias bioactivas se encuentran más concentradas.





**Figura 18.** Comportamiento de la Actividad Biológica de los extractos sin Desengrasar en el Tiempo.



**Figura 19.** Comportamiento de la Actividad Biológica de los extractos Desengrasados en el Tiempo.

### 6.2.2. ENSAYO CONFIRMATIVO CON LARVAS DEL IV ESTADIO DEL MOSQUITO CULEX QUINQUEFASCIATUS

Para la realización del Bioensayo confirmativo con las Larvas de *Culex quinquefasciatus* se utilizaron los extractos correspondientes a las fracciones metanólica y etanólica desengrasadas y sin desengrasar.

En la Tabla # 9 se compilan los resultados de CL<sub>50</sub> obtenidos del Bioensayo con Larvas de *Culex quinquefasciatus* después de ser expuestos 24 y 48 horas; para los extractos metanólicos y etanólicos desengrasados y sin desengrasar después de 8 semanas de ser obtenidos. Las concentraciones que se utilizaron fueron de 1,0; 0,5; 0,25; 0,10 y 0,005 µg/mL., evaluadas por duplicado.

Para las fracciones etanólicas desengrasadas se obtuvieron concentraciones letales entre 0.01275 y 0.0545 µg/mL. Para las fracciones metanólicas sin desengrasar se obtuvieron concentraciones letales entre 0.055 y 0.0545 µg/mL., estos valores obtenidos son de alta toxicidad según varios autores, (51, 52).

**TABLA 9. CL<sub>50</sub> Obtenidas para los Extractos Etanólico y Metanólico Desengrasados a través del bioensayo con larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus*.**

EXTRACTO	CL <sub>50</sub> (µg/mL) 24 h	CL <sub>50</sub> (µg/mL) 48 h
F001 D	0,0115(0,001/0,014)	0,010 (0,002/0,017)
F001 D	0,014(0,004/0,084)	0,099(0,035/0,091)
<b>Promedio</b>	<b>0.01275(0.0025/0.049)</b>	<b>0.0545(0.0185/0.054)</b>
F001 S	0,077(0,044/0,120)	0,075(0,001/0,016)
F001 S	0,074 (0,005/0,118)	0,073(0,004/0,144)
<b>Promedio</b>	<b>0.0755(0.0245/0.119)</b>	<b>0.074(0.0025/0.08)</b>
F005 D	0,020 (0,01/0,065)	0,024(0,001/0,070)
F005 D	0,090( 0,023/0,166)	0,085( 0,057/0,135)
<b>Promedio</b>	<b>0.055(0.0165/0.1155)</b>	<b>0.0545(0.029/0.1025)</b>
F005 S	0,204(0,121/0,255)	0,188 (0,120/0,260)
F005 S	0,201(0,116/0,261)	0,151(0,09/0,222)
<b>Promedio</b>	<b>0.2025(0.1185/0.258)</b>	<b>0.1695(0.105/0.241)</b>

Al observar los resultados obtenidos de los bioensayos realizados a los extractos etanólicos y metanólicos de las semillas desengrasadas y sin desengrasar; se pudo determinar que las fracciones de las semillas desengrasadas muestran notablemente mayor actividad que las fracciones de las semillas sin desengrasar. Presentando mayor actividad tóxica sobre todas las fracciones, el extracto Etanólico (F001 D) de las semillas desengrasadas a las 24 horas de exposición; mostrando una disminución alrededor de cuatro veces en el efecto a las 48 horas; sin embargo los otros extractos presentan un incremento en la actividad biológica aunque poco significativa, 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.

La mayor actividad en las fracciones desengrasadas con respecto a las sin desengrasar se puede deber principalmente a que los componentes activos se encuentran mas concentrados en las fracciones desengrasadas, pero también puede ser posible que las larvas ingieren mas fácil y rápidamente los extractos polares a diferencia de los extractos no polares, ya que los aceites quedan en mayor cantidad en la superficie y las larvas al respirar lo pueden ingerir.

Hoy día los pesticidas para el control del mosquito *Culex quinquefasciatus* están hechos a base de piretroides; estos interfieren en el transporte de sodio en la membrana celular de las neuronas actuando sobre la transmisión nerviosa de los insectos, poseen una alta estabilidad y su degradación se presenta alrededor de los 6 meses. (53, 54). Estudios realizados en larvas de *C. quinquefasciatus*, (55, 56, 57) han establecido  $CL_{50}$  alrededor de 0,0001 y 0,1 mg/L de algunos piretroides (cypermctrina, deltametrina, permctrina, resmetrina, aletrina, tetrametrina y lambdacialotrina). (58, 59)

Realizando la comparación de estos con los resultados del extracto etanólico desengrasado obtenidos con el bioensayo en las larvas de *Culex*

*quinquefasciatus* ( $CL_{50} = 0.01275 \mu\text{g/mL}$ ) se puede inferir que éste extracto de origen natural posee un alto potencial biopesticida, indicando la posible presencia de acetogeninas, como la anonacina, asimicina y bulatacina, ingredientes activos insecticidas contra larvas de mosquitos, (56); mostrando un efecto toxico similar al que presentan los piretroides, y por su origen natural ayudarían a disminuir la contaminación por sustancias que no son biodegradables.

### **6.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA**

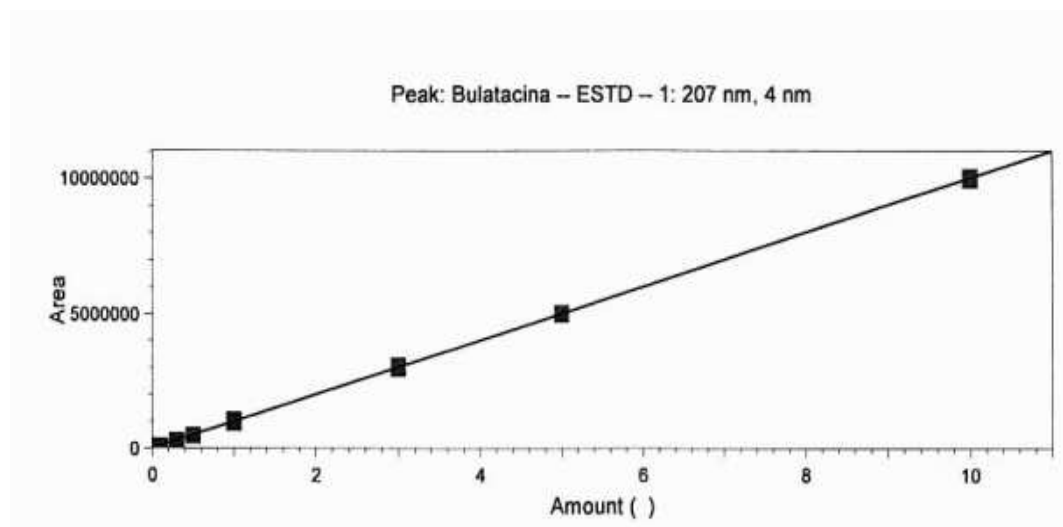
#### **6.3.1. Análisis preliminar de acetogeninas por cromatografía de capa delgada (CCD)**

Los resultados por cromatografía en capa delgada de las fracciones F001D y F005 D se obtuvieron después de realizar varios ensayos con diferentes mezclas de solventes teniendo en cuenta la polaridad y seleccionar así, el sistema que diera mejores resultados en la separación, siendo seleccionada la mezcla  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (9:1).

La separación en las cromatoplasmas de los extractos F001 y F005 desengrasados, utilizando ácido fosfomolibdico como revelador, mostro una mancha sin  $R_f$  medible de color azul grisáceo; y con el reactivo de Kedde, se observó la misma mancha pero de color rosado. La coloración rosada que presentan los extractos en las cromatoplasmas con el reactivo de Kedde indica la posible presencia de acetogeninas con anillo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -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.

### 6.3.2. Curva de Calibración

La curva de calibración se realizó con siete diluciones del patrón de bulatacina (acetogenina); en la figura 20, se presenta dicha curva con su respectiva ecuación y su coeficiente de relación ( $R^2$ ).



$$y = 1.00036 \cdot 10^6 x + 0.000000$$

$$R^2 = 0.999991$$

**Figura 20.** Curva de calibración por CLAE para el estándar de bulatacina

El coeficiente de correlación nos indica una buena linealidad y en consecuencia una alta confiabilidad de los resultados, por consiguiente de la curva de calibración obtenida se puede realizar la cuantificación de las acetogeninas.

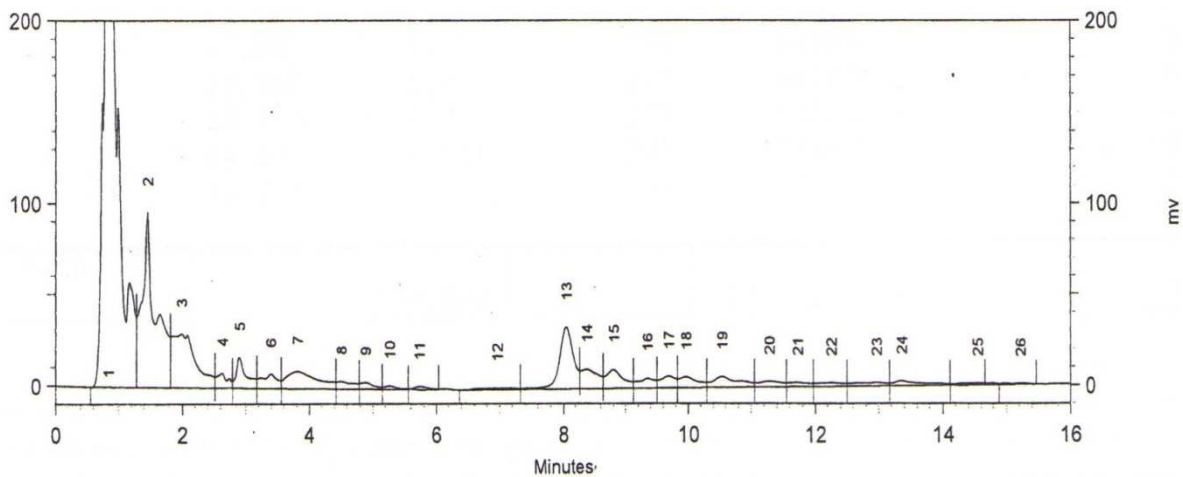
En la tabla 10, se presentan las áreas y concentraciones de bulatacina para cada patrón de la curva de calibración.

**TABLA 10. Datos de la curva de calibración realizada por CLAE para el estándar de Bulatacina.**

# Patrón	Concentración (µg)	Área	Estándar Externo (µg/mL)
1	0.1	88.475	10
2	0.3	286.417	30
3	0.5	484.231	50
4	1.0	1'001.622	100
5	3.0	3'006.089	300
6	5.0	5'011.007	500
7	10.0	9'998.695	1000

### 6.3.3. Análisis de los extractos por CLAE

#### 6.3.3.1. Análisis del Extracto Etanólico desengrasado (F001 D)



**FIGURA 21.** Cromatograma del extracto etanólico desengrasado (F001 D).

En el cromatograma correspondiente al extracto etanólico desengrasado (Ver figura 21) se observa la presencia de 26 compuestos, de los cuales solo tres corresponden posiblemente a acetogeninas de anonaceae al

revisar estudios ya realizados basados en los espectros UV de estas sustancias. Las señales que se detectan con longitudes de onda entre 254 nm y 280 nm, corresponden a compuestos como: alcaloides bencilisoquinolínicos 225 – 280 nm (64, 65) flavonoides 240 – 285 nm (60, 61, 62, 63); fenoles 270 nm (66, 67) entre otros; y por eso no se tendrán en cuenta para realizar la cuantificación.

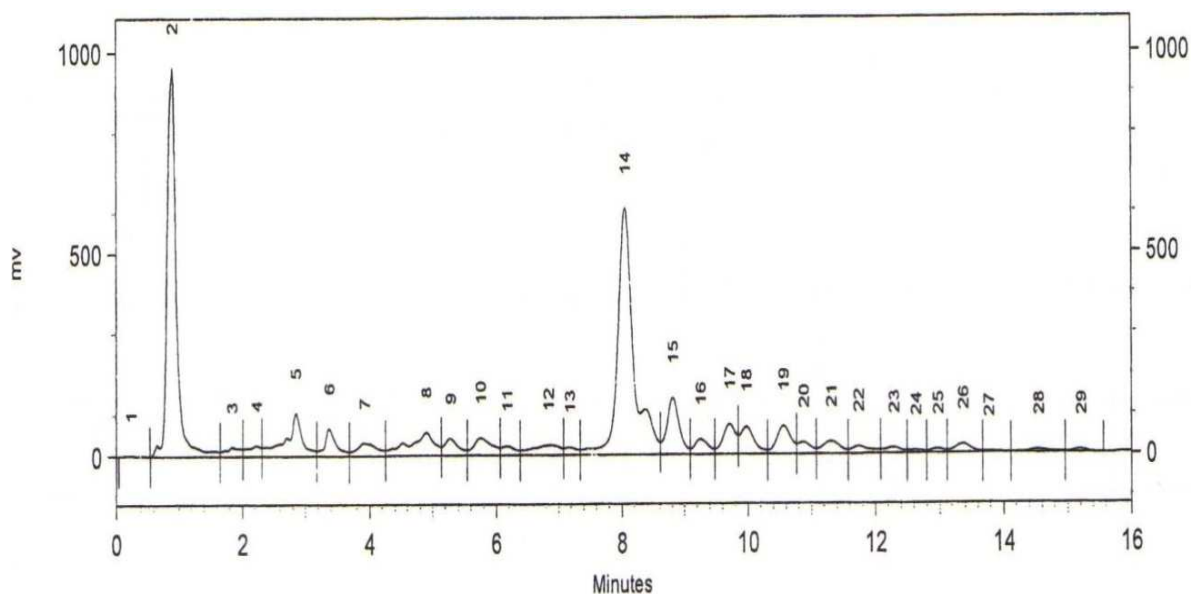
En la tabla 11 se consignaron los resultados que se obtuvieron al eluir el extracto Etanólico desengrasado (F001 D). Se tendrán en cuenta los compuestos que presentan longitudes de onda entre 207nm +/- 5nm.

**TABLA 11. Resultados del cromatograma de la Figura 21.**

<b>PICO</b>	<b>TIEMPO DE RETENCIÓN (min)</b>	<b>λ MÁXIMA</b>	<b>% ÁREA</b>	<b>ESTÁNDAR EXTERNO(μg)</b>
8	4.500	202	0.739	0.28
9	4.880	208	0.532	0.20
13	8.040	203	5.052	1.90

De acuerdo a la literatura sobre la columna, la fase estacionaria de la DB C18, es más afín a los compuestos solubles en metanol que en etanol; por esta razón en el cromatograma del extracto etanólico desengrasado solo se definen claramente tres picos. Los demás picos observados en el cromatograma, no son retenidos fuertemente por la fase estacionaria de la columna, interactuando menos con esta y son arrastrados rápidamente por la fase móvil, mostrando picos sin alta resolución y definición.

### 6.3.3.2. Análisis del extracto Metanólico desengrasado (F005 D)



**FIGURA 22.** Cromatograma del Extracto Metanólico desengrasado (F005D).

En el cromatograma correspondiente al Extracto Metanólico desengrasado (Ver figura 22) se observa la presencia de 29 compuestos, de los cuales 11 corresponden posiblemente a acetogeninas de anonaceae teniendo en cuenta el rango del espectro UV en el cual absorben las acetogeninas de anonaceae.

Al revisar estudios ya realizados basados en los espectros UV de estas sustancias. Las señales que se detectan con longitudes de onda entre 254 nm y 280 nm, corresponden a compuestos como: alcaloides bencilisoquinolínicos 225 – 280 nm (64, 65) flavonoides 240 – 285 nm (60, 61, 62, 63); fenoles 270 nm (66, 67) entre otros; y por eso no se tendrán en cuenta para realizar la cuantificación.

En la tabla 12, se reportan los resultados obtenidos después de eluir el extracto metanólico desengrasado (F005 D). Se tendrán en cuenta los compuestos que presentan longitudes de onda entre 207nm +/- 5nm.



**TABLA 12. Resultados del cromatograma de la Figura 22.**

PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	$\lambda$ MÁXIMA	% ÁREA	ESTÁNDAR EXTERNO( $\mu$ g)
1	0.240	203	0.059	0.022
7	3.920	201	1.882	0.71
8	4.893	204	4.299	1.07
10	5.747	202	2.327	0.87
12	6.833	202	2.120	0.80
14	8.053	204	28.570	10.73
15	8.807	204	5.237	1.97
17	9.707	203	2.788	1.05
18	9.973	204	2.708	1.02
19	10.553	204	2.848	1.07
20	10.867	202	1.092	0.41

De acuerdo a la literatura sobre la columna, la fase estacionaria de la DB C18, es más afín a los compuestos solubles en metanol, por esta razón en el cromatograma del la figura # 22 se definen mejor los picos que no tuvieron buena resolución con el extracto etanólico, en el cromatograma de la figura # 22 podemos ver la presencia de la bulatacina en el pico 20, que fue nuestro patrón externo empleado para realizar la comparación y utilizado para realizar la cuantificación de las acetogeninas.

Teniendo en cuenta que la el total de la suma de las áreas del cromatograma es de 100 unidades, y la curva de calibración del estándar externo de bulatacina nos dio una excelente curva, con un  $R^2=0.999991$ ; utilizamos estos datos para realizar la cuantificación de los picos que correspondientes a las posibles acetogeninas, y vemos que el pico 14 es el

que se encuentra en mayor concentración, con un 28.57% de presencia en el extracto.

Teniendo en cuenta el patrón externo, podemos decir que la bulatacina presente en el extracto metanólico desengrasado de la *A. muricata* tiene una concentración de 0.41µg.

Un factor importante para tenerse en cuenta en los cromatogramas es la compatibilidad del solvente con el detector, esta compatibilidad puede medirse con la longitud de onda de corte ( $\lambda_c$ ), es decir, la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una cubeta de 10mm de paso óptico, es igual a 1 unidad de absorbancia empleando aire como referencia, (86). Teniendo en cuenta la longitud de onda de corte  $\lambda_c$  de los solventes utilizados, sabemos que la  $\lambda_c$  del etanol es igual a 210nm y la del metanol 205nm, con esto podemos decir que nos dara mejor respuesta con el compuesto metanólico que el etanólico, y es lo que se evidencia en los cromatogramas.

## 7. CONCLUSIONES

- Se verificó el potencial tóxico que presentan las semillas de *A. muricata*.
- El método elegido para la extracción de acetogeninas de las semillas de *A. muricata* produjo buenos resultados.
- Los extractos recién obtenidos, según su CL<sub>50</sub>, mostraron una gran actividad pues presentaron concentraciones en un rango entre 1,214 y 8,978 µg/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.
- Los ensayos con *Artemia salina*, permitieron comprobar la toxicidad que presentan las acetogeninas de anonaceae de las semillas de *A. muricata*, esto sirvió como criterio de selección para realizar los ensayos confirmativos con el mosquito *Culex quinquefasciatus*.
- El extracto metanólico desengrasado mostró un importante efecto insecticida en las pruebas de mortalidad realizadas con *Artemia salina*, con un CL<sub>50</sub> de 1.214 µg/mL, por lo que puede concluirse que este tipo de extracto tiene alto potencial para ser usado como componente activo en la elaboración de un biopesticida.
- El bioensayo confirmativo con larvas de *C. quinquefasciatus* mostró que el extracto etanólico desengrasado (F001 D) presentó mayor actividad biológica que el metanólico desengrasado (F005 D), donde el primero presentó una CL<sub>50</sub> de 0,01275 µg/mL y el segundo de 0.055 µg/mL indicando que el extracto crudo de las semillas de *A.*

*muricata* posee un valioso potencial biopesticida y no sería necesario realizarle extracciones para su posible uso.

- Aunque existan diferencias en los mecanismos de la actividad larvívica en los dos organismos estudiados, en ambos ensayos se observa que las fracciones desengrasadas son más activas que las no desengrasadas.
- La toxicidad en vivo de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos.
- Mediante Cromatografía en Capa Delgada se pudo evidenciar la posible presencia de acetogeninas de Annonaceae particularmente con anillo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado.
- 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. muricata*.

## 8. RECOMENDACIONES

- 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. muricata* 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. muricata* para evaluar su actividad individual y en mezclas.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos de las hojas, flores, tallo y raíz de la *A. muricata* para elegir los extractos con mayor actividad para su aplicación como biopesticida.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. GUAPACHA, A. M. Monografía sobre el aprovechamiento de compuestos activos de la Guanábana (*Annona muricata* L.). Universidad Tecnológica de Pereira. 2006. 3-10.
2. CABRA, J.; SÁNCHEZ, M.; SCHOONHOVEN, A. Taller Guanábana para Colombia y el mundo. Revista Optimización de la cadena productiva. 2002. 1: 7-16.
3. RAMÍREZ, M.; URDANETA, A.; LEÓN, A. S. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Rev. Fac. Agron.* 2002. 19: 48-55.
4. SANTOS A. F.; SANT'ANA A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine*. 2001. Vol. 8(2), pp. 115–120.
5. RÍOS, D.; CORRALES, D. Caracterización de la Guanábana Elita, chirimoya y otras anonáceas promisorias para Colombia. *Rev Biotec.* 2003. 3: 180-2000.
6. CARRERO, J. Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales. 1ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 1996. p. 256.
7. McLAUGHLIN, J. L.; ZENG, L.; OBERLIES, N. H.; MATA, R.; ROMEO, J. Recent Advances in Phytochemistry. J. T Plenum Press, 1996. 38: 249-310
8. KAN, C.; MEIJER, G. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and technology*. 2007. 133: 84-108.
9. SANCHEZ, M.; AGUIRREOLEA, J. Fisiología y bioquímica vegetal. Madrid. 1996. 49-90.
10. ORELLANA, A. D.; MARTÍNEZ, E. Distribución Geográfica de Anonáceas en Guatemala. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola. Publicaciones Recursos Naturales. 2005. 3-7.
11. GARCIA, Karol. Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. Tesis. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F. Enero 2009
12. CABRA, J.; SÁNCHEZ, R. N.; MEJÍA, A. La Guanábana una nutritiva fruta del trópico americano con un mercado rentable y promisorio. *Revista optimización de la cadena productiva*. 2002. 3: 132-136.

13. ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z.; HE, K.; McLAUGHLIN, J. L. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy. 2004. 2-6.
14. MURILLO, J. Las Annonaceae de Colombia. Biota Colombiana. 2001. 2: 49-58.
15. KITAJIMA, E.W. *Annona muricata* L. *Species Plantarum*. 1753. 1: 536-537.
16. DE QUEIROZ, P.; A. C. y E. MEDRADO. Graviola para Exportação: Aspectos técnicos de produção. EMBRAPA-SPI. Brasília. pp. 1994. 11-39.
17. ESCOBAR, T. W. Consideraciones para iniciar mejoramiento en Guanábana. Memorias 1er. Curso Nacional de Guanábana. Ibagué, Colombia. pp. 1991. 225-230.
18. ESCOBAR T. W.; ZÁRATE, R. y BASTIDAS, A. Biología floral y polinización artificial del Guanábano *Annona muricata* L. en condiciones del Valle del Cauca. Colombia. Acta Agronómica. pp. 1986. 36(1): 7-20.
19. FIGUEROA, M. El cultivo de la Guanábana. Primer curso Internacional sobre Fruticultura Tropical. Instituto de Investigaciones Agronómicas. CENIAP – FONAIAP. pp. 1978.1-32.
20. MAKABE, H.; HATTORI, Y.; KIMURA, Y.; KONNO, H.; ABE, M.; MIYOSHI, H.; TANAKA, A.; ORITANI, T. Total synthesis of cis-solamin and its inhibitory action with bovine Heart mitochondrial complex I. Tetrahedron. 2004. 60. 10651-10657.
21. HE, K.; ZENG, L.; YE, Q.; SHI, G.; OBERLIES, N. H.; ZHO, G.; McLAUGHLIN, J. L. Comparative Evaluations of Acetogenins for Pesticidal Activity. Nat. Prod. Rep. 1997. 14: 81-84.
22. MARTIN, S. J.; GREEN, D. R. Apoptosis as a Goal of Cancer Therapy. Curr Opin Oncol. 1994. 6: 616 – 621.
23. BALDWINS, S.; MATTO, L.; ALLISHO, A.; KHAND, W.; McLEAN, S. Mono-Tetrahydrofuran Annonaceous from *Annona montana*. Nat. Prod. Rep. 2000. 63: 1235-1238.
24. TORMO, J. R.; GONZÁLEZ, M. C.; CORTÉS, D.; ESTORNELL, E. Kinetic Characterization of Mitochondrial Complex I Inhibitors using Annonaceous Acetogenins. Arch Biochem Biophys. 1999. 369: 119-126.
25. FANG, X. P.; RIESER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAU, G. X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceae Acetogenins. An Updated Review. Phytochemical Analysis. 1993. Vol 28. 4: 35-44.

- 26.** GORDON, J.; JOHNSON, H. A.; McLAUGHLIN, L. Variations in biological activity of *Asimina triloba*. Nat. Prod. Rep. 1996. 85, 609-612.
- 27.** RATNAYEQUE, S.; KENT, J.; POTTER, M.; McLAUGHLIN, J. L. Evaluation of the Pawpaw Tree, *Asimina Triloba*, as a commercial source of the Pesticides Annonaceous Acetogenins. Nat. Prod. Rep. 1997. 85: 108-105.
- 28.** HE, K.; ZENG, L.; YE, Q.; SHI, G.; OBELIS, N. H.; Zho, G.; McLAUGHLIN, J. L. Comparative Evaluations of Acetogenins for Pesticidal Activity. Nat. Prod. Rep. 1997. 14: 81-84.
- 29.** YE, Q.; Zhao, G.; McLAUGHLIN, J. L. Loncigin and Goniiothalamycinone, bioactive Mono-tetrahydrofuran Acetogenins from *Asimicina longifolia*. Nat. Prod. Rep. 1996. 85.
- 30.** RIESER, M.; GU, Z. M.; COLMILLO, X. P.; ZENG, L.; McLAUGHLIN, J.L. Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. Nat. Prod. Rep. 1996. 59: 100-108.
- 31.** ZENG, L.; McLAUGHLIN, J. L.; JOHNSON, H. A. Muricoreacin and murihexocin, MTF acetogenin from the leaves of *Annona muricata*. Nat. Prod. Rep. 1998. 14: 275-306.
- 32.** RUPPRECHT, J.; HUI, Y.; McLAUGHLIN J. L.; Annonaceous Acetogenins: A Review. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences. Purdue University, West Lafayette. Indiana 47097. Nat. Prod. Rep. 1990. 53: 237-278.
- 33.** BORICE, C.; LOUISEAU, P.; GAYVAL, A.; LAURENS, A.; PHILIPPE, D. Antiparasitic Activity of *Annona muricata* L and *Annona cherimola* seeds. Plant Med. 1997. 29: 40-45.
- 34.** HIROSCHI, S.; MISUKI, S.; YOSHHIDA, A.; NURIYUKHARA, F.; Squamocin, O. Two new adjacent bis-tetrahydrofuran Acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Nat. Pharm. 2002. 25: 249-310.
- 35.** FUJIMOTO, J.; MIRISAKY, C.; CHIMODO, H.; NISHIOAHA, S. Annonaceous Acetogenins from the Seed of *Annona squamosa*, non-adjacent bis-tetrahydrofuran Acetogenins. Nat. Pharm. 1996. 54: 27-48.
- 36.** SANTOS, M.; JOHN, M.; CASSADY, L.; Araticulin A. bis-tetrahydrofuran poliketide from *Annona classiflora* seed, J Phytochemistry. 1996. 42.
- 37.** SEVSER, S.; BORIS, P.; LOISEAU, G.; CORTÉS, R.; HOCQUEMILLER, D. Citotoxic and Antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. Plant. Med. 1994. 60: 1911-1916.



38. SHI, G.; DOUGAL, M.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive Annonaceous Acetogenins from *Rollinia mucosa*. J. Nat. Pharm. 1997. 249-310.
39. DURET, P.; WAECHEER, R.; CAVE, A. Atemoyin-1 and 2-two Mono-Tetrahydrofuran lactone Acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. Plant. Med. 1997. 22-28.
40. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. España. pp. 731-809.
41. HERRERA, E. Obtención y Caracterización de la Materia Insaponificable del Aceite de Crisálida de *Bombix Mori* L. Híbrido Pílamó I. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira. 2007. p. 85.
42. RUBINSON, K; RUBINSON, J. Análisis Instrumental. Prentice Hall. Madrid, España. 2001. 636-708.
43. DONG, M.; AHUJA, S. Handbook of Pharmaceutycal Analysis by HPLC. 1ª Edición. Academic Press. 2005. p. 600.
44. SÁNCHEZ, L.; NEIRA, A. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, de las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. Rev. Cultura Científica. 2005. 3: 40-45.
45. SANABRIA, A.; LÓPEZ, S.; y GUALDRON, R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 1997. 26: 15-19.
46. FLÓREZ, L. M.; MESA, V. Monografía Sobre pruebas de actividad biológica con dos organismos modelos en acetogeninas de annonaceae con actividad biopesticida. Universidad Tecnológica de Pereira. 2007. 28-40
47. ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z.; McLAUGHLIN, J. L. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. Nat. Prod. Rep. 1996. 13: 215-306.
48. DANTAS, A.; VALENTE, A.; PINTO, A. A New Isopimarane Diterpenoid from *Vellozia pusilla* Pohl (Velloziaceae). J. Braz. Chem. 2003. 14: 126-128.
49. ARROYO J.; PRASHAD, M.; VÁSQUEZ, Y. Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *annona muricata* y *krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 2005. 22.
50. CASTILLO G. Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. 2004. Cap.5.

51. MORALES, C.; GONZÁLEZ, R.; ARAGÓN, R. Evaluación de la Actividad Larvicida de Extractos Polares y no Polares de Acetogeninas de *Annona muricata* Sobre Larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles a9*: 64-73. Efecto Bioinsecticida del Extracto Etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Mill. *Ibimanus* (Diptera: Culicidae). 2004. 30: 187-192.
52. BOBADILLA, M.; ZAVALA, G.; FRANCO, F.; POLLACK, L.; ARCINIEGAS, M. "Chirimoya" y *A. muricata* Linneus "Guanábana" Sobre Larvas del IV Estadio de *Anopheles sp.* Revista Peruana de Biología. 2002.
53. ORTIZ, M.; YAÑEZ, L.; DÍAZ, F. 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.
54. PALOMINO, M.; LEÓN, W.; VALENCIA, P.; CÁRDENAS, F.; ANCCA, J. Evaluación de Campo del Efecto Residual de la Deltametrina Sobre la Mortalidad y Knock Down en *Triatoma infestans*, Según Tipo de Superficie en Arequipa, Perú. Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 2007. 24: 136-143.
55. RODRÍGUEZ, M.; BISSET, J.; RODRÍGUEZ, L.; DÍAZ, C. 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. 1997. 49: 209-214.
56. BISSET, J.; RODRÍGUEZ, M.; DÍAZ, C.; SOCA, A. Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un área de La Habana. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2000. 52: 180-185.
57. BISSET, J.; RODRÍGUEZ, M.; DÍAZ, C.; SOCA, A. Estudio de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedente de Medellín, Colombia. Revista Cubana de Medicina Tropical. 1998. 50: 133-137.
58. PAL, M. K.; TANDON, N. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bactericide) against *Anopheles stephensi* breeding in Calcutta city. J Commun Dis. 2001. 33:143-6.
59. XUE, R.; BARNARD, Dr.; ALI, A. Laboratory evaluation of 18 repellent compounds as oviposition deterrents of *Aedes albopictus* and as larvicides of *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus* and *Culex quinquefasciatus*. Am Mosq Control Assoc. 2003. 19:397-403.
60. FUERTES, C.; ROQUE, M.; TRISTAN, M. Flavonoides y Alcaloides de *Lupinus ballianus* C.P. Smith con Actividad Antibacteriana y Antifúngica. Ciencia e Investigación. 1998. 1: 71-80.

61. MOSQUERA, O. Seminario: Los Flavonoides. Universidad del Valle. 1979. p. 29.
62. OSCANOVA, J. Estudio Fármaco-Botánico de *Desmodium molliculum*. Monografía. Huancayo, Perú. 2005.
63. MARTÍNEZ, A. Flavonoides. Monografía. Universidad de Antioquia. 2005. p. 76.
64. ARANGO, G. J. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Monografía. Universidad de Antioquia. 2002. p. 88.
65. TORRES, O.; SANTAFE, G.; ANGULO, A.; VILLA, H.; ZULUAGA, J.; DORIA, M. Obtención de Alcaloides a Partir de Corteza y Madera de la Especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae). *Scientia et Technica*. 2007. 13: 333-336.
66. MOSQUERA, O. Características Espectroscópicas de Algunas Funciones Orgánicas. Universidad Tecnológica de Pereira. 1991.
67. ALIA, I.; COLINAS, T.; MARTÍNEZ, M. T. Análisis Preliminar de Compuestos Carotenoides y Compuestos Fenólicos en Frutos de Zapote Mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 2005. 11: 225-231.
68. CARDONA, W. Acetogeninas en el Extracto Hexánico de Raíces de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín. 1993. 9-51.
69. CORREA, C. A. Acetogeninas en las Semillas de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín. 1992. 48-100.
70. BENAVIDES, A. Caracterización numérica de germoplasma de Guanábana (*Annona muricata* L.) muestreado *in situ* en el Pacífico y Norte de Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. *Revista La Calera*. 2002. 29-35.
71. OCAMPO, D. M.; OCAMPO, R. Bioactividad de la familia Annonaceae. *Revista Universidad de Caldas*. 2006. 135-155.
72. ZAFRA-POLO, C.; FIGADERE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J.; CORTES, D. Natural Acetogenins from Annonaceae, Synthesis and Mechanisms of Action. *Phytochemistry*. 1998. 48: 1087-1117.
73. BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: Recent Progress in Isolation, Synthesis and Mechanisms of Action. *Nat. Prod. Rep.* 2005. 22: 269-303.

- 74.** RODIER, S.; LE, Y.; HUEROU, B.; RENOUX, P.R.; GREE, R. New Cytotoxic analogues of Annonaceous Acetogenins, Anti-cancer Drug design, J Med Chem. 2001. 16: 356-360.
- 75.** OBERLIES, N. H.; COBERTT, L.; McLAUGHLIN, J. L.; Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay, Cancer Letter. 1995. 16: 73-76.
- 76.** NARVÁEZ, D. Actividad Citotóxica a través del Ensayo de *Artemia salina* de 31 Plantas del Parque Regional Natural Ucumarí. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira. 2004.
- 77.** CRESPO, J. E.; BAESSOLO, L. A. Biogeografía y Taxonomía del Genero *Artemia* (Crustacea, Anostraca) en Chile: una Revisión, Historia Natural (segunda serie). 2002. 4: 17.
- 78.** AMAT. F. Diferenciación y Distribución de las Poblaciones de *Artemia* (crustáceo braquiópodo). Investigación Pesquera. España. 1980. 44: 485-503,
- 79.** MAYORGA, S. P. Microbioensayos ecotoxicológicos para monitoreo ambiental y otras aplicaciones, II Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Ciudad de Guatemala. 2001. 10-11.
- 80.** MUÑOZ, L. O.; IBÁÑEZ, S. y CORONA, M. C. Los Mosquitos (Díptera: Culicidae) De Tlaxcala, México. Lista Comentada De Especies, Folia Entomol. Mex. 2006. 45(3), 223-224.
- 81.** IBÁÑEZ, S. Los díptera hematófagos y taxa relacionados de dos áreas protegidas del estado de Yucatán, México (Insecta), Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Laboratorio de Entomología e Insectario. 1999. 2-5.
- 82.** SALAZAR, M. J.; MONCADA, L. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Díptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá, Biomédica. 2004. 24: 386-387.
- 83.** PACHECO, C. J. J. Búsqueda de Sustancias Toxicas en Plantas Medicinales, contra Larvas de Mosquito casero *Culex quinquefascitus*,

Tesis de Licenciatura para Citología Agrícola, UACH, 63, Chapingo México. 1983.

**84.** SPINOSA, P. J. Búsqueda de Plantas del Área del Lago de Texcoco con Actividad Tóxica contra Mosquito casero *Culex quinquefascitus*, Tesis de Licenciatura para Citología Agrícola, UACH, 68, Chapingo México. 1985.

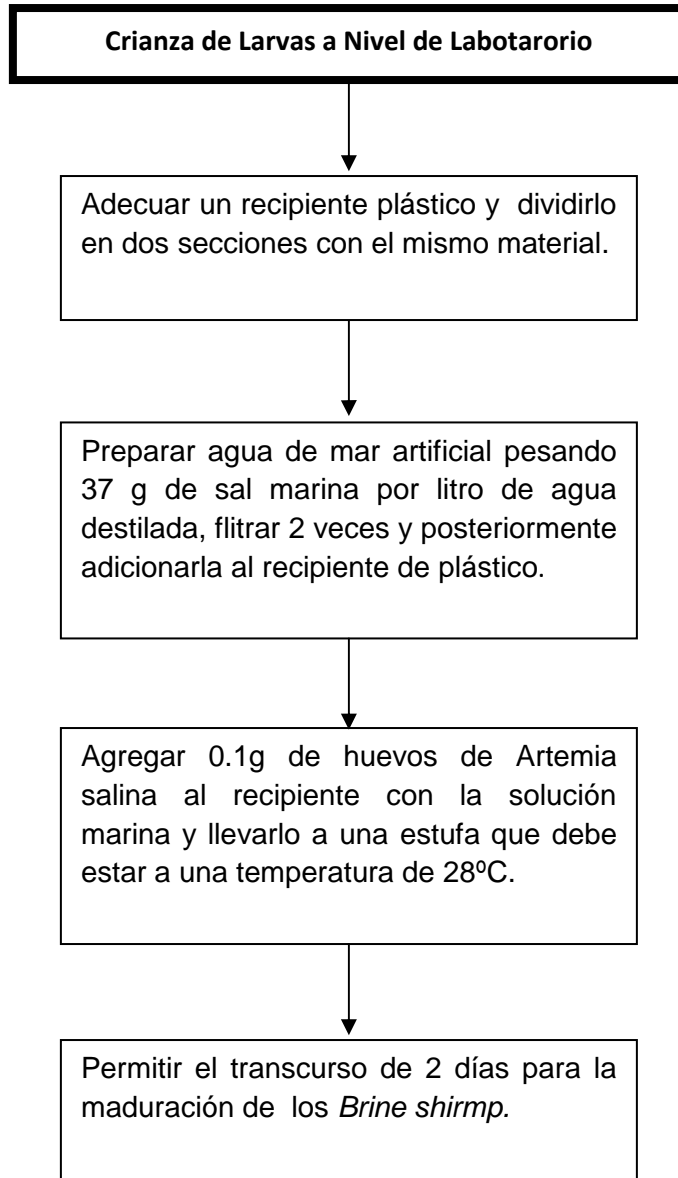
**85.** MARTÍNEZ, P.; OSORIO, J. Análisis del procedimiento para la Determinación de la DL<sub>50</sub> (dosis letal media) a través del método de Probit en un Bioensayo. Revista de investigación de la Universidad del Quindío. 2003. 12: 1-6.

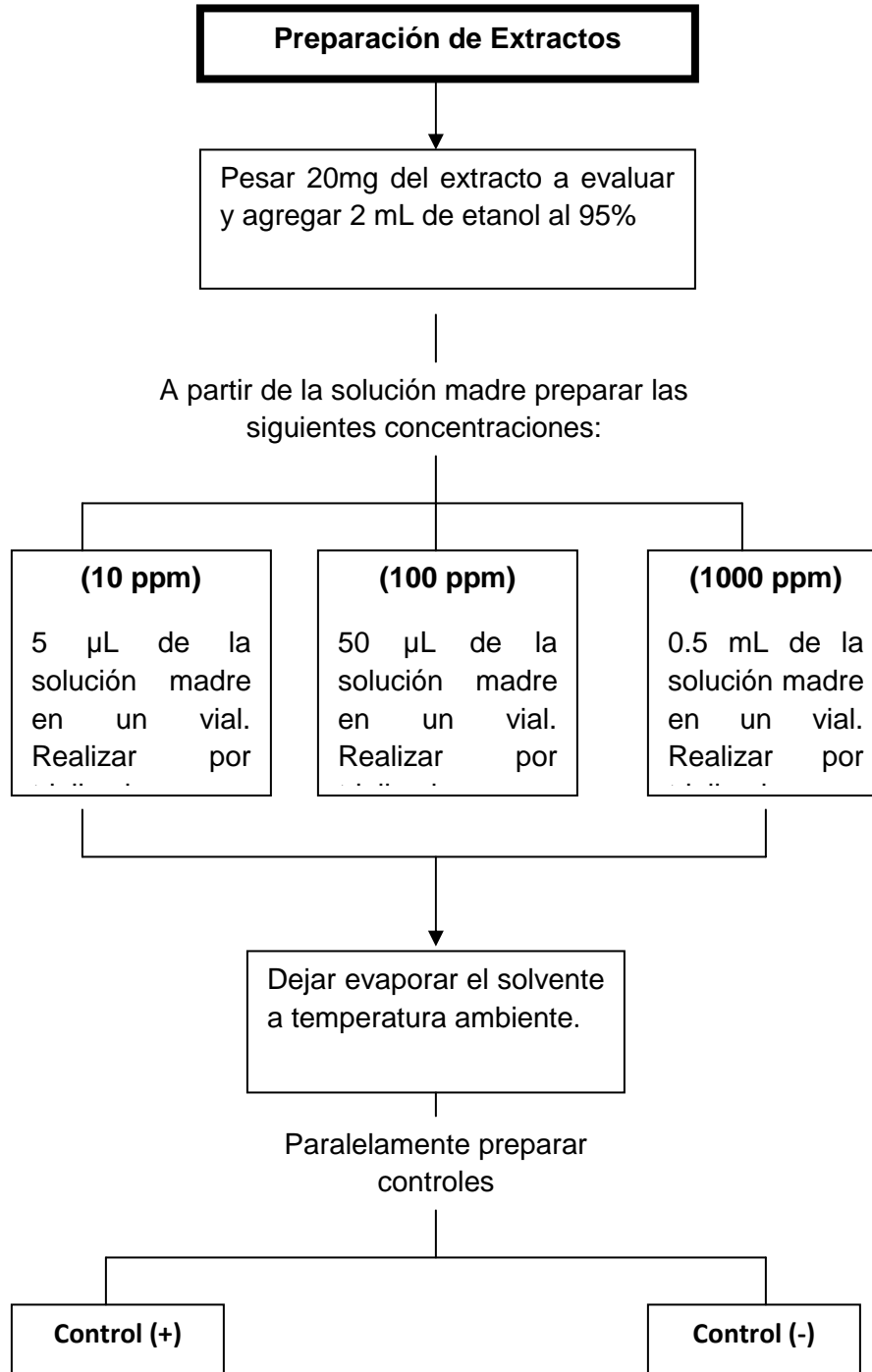
**86.** QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA DE ANDRIZZI, S.; LABA, R. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Buenos Aires, Argentina. 1992. 5-10, 89-266.

# ANEXOS

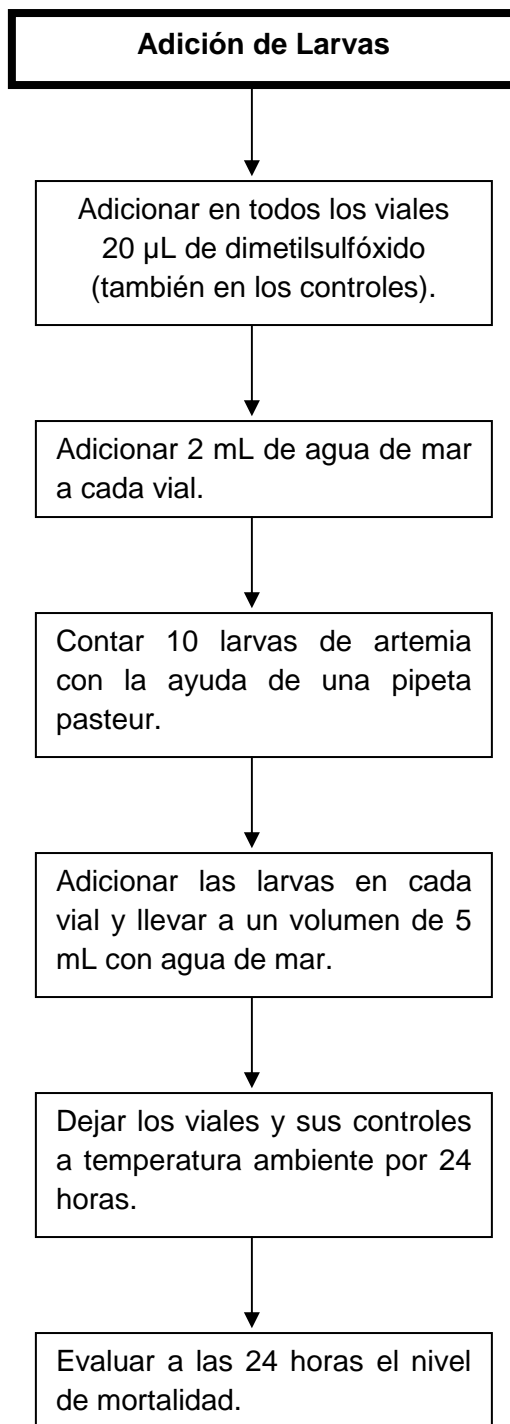
**ANEXO A**  
Diagrama de Flujo

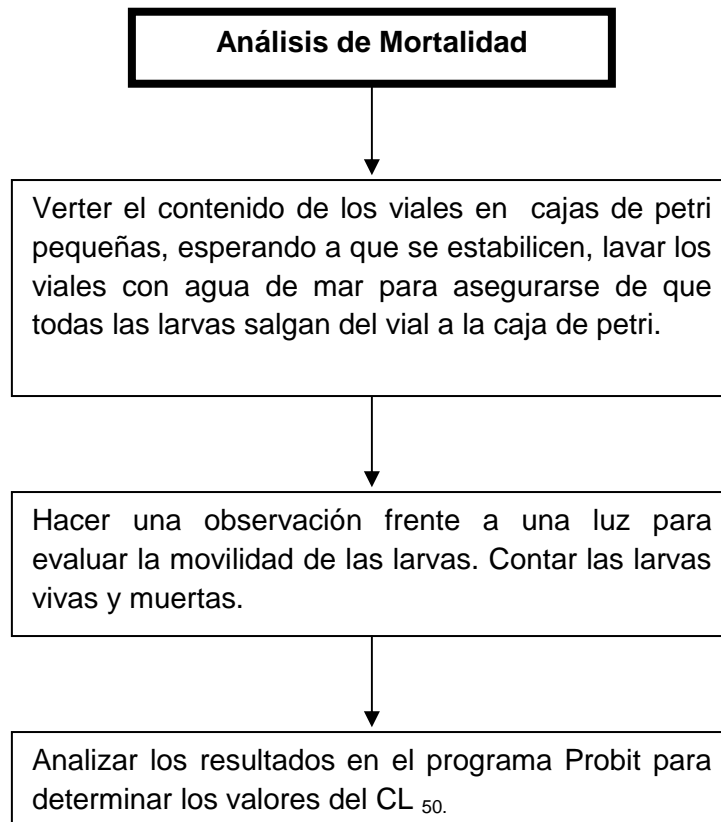
BIOENSAYO PRELIMINAR CON LARVAS DE *Artemia salina*











### Fotos



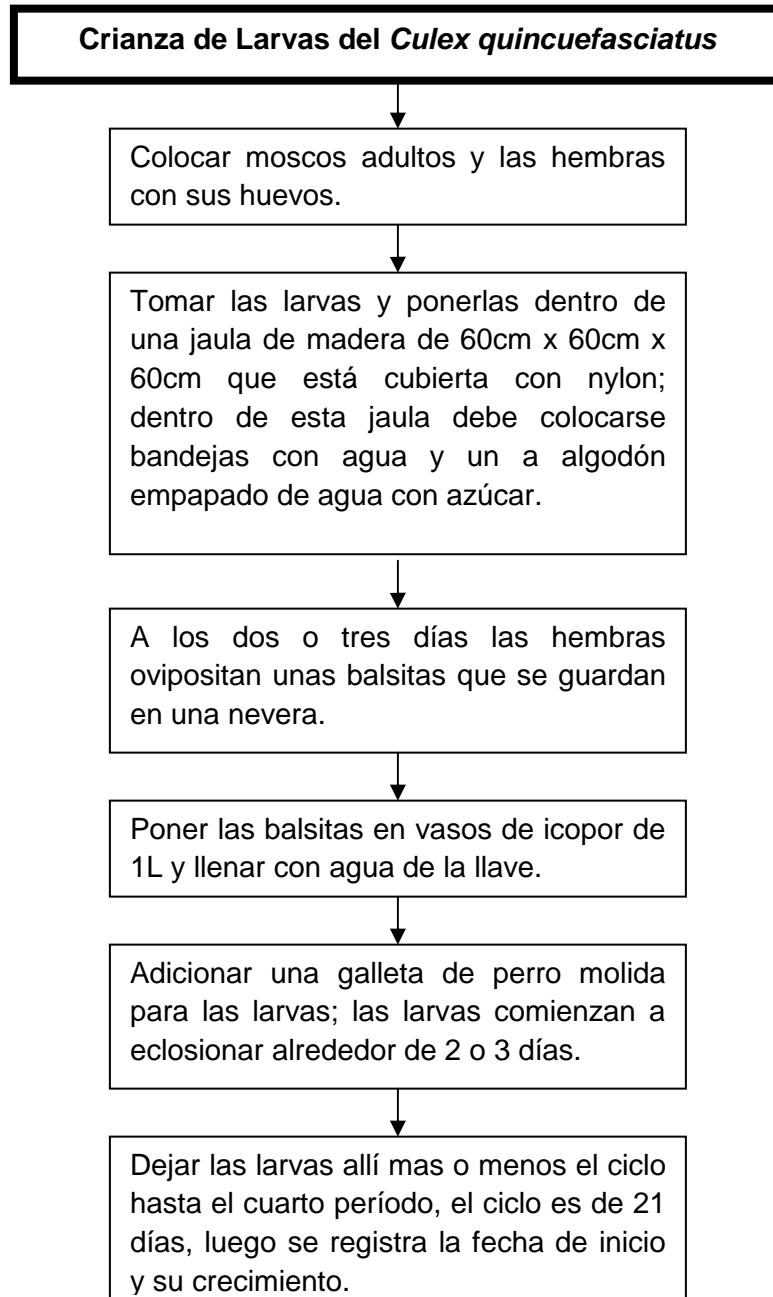
Crianza de nauplios de *Artemia salina* en el laboratorio de Oleoquímica UTP



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

**ANEXO B**  
Diagrama de Flujo

BIOENSAYO CONFIRMATIVO CON EL *Culex quinquefasciatus*



## Preparación de Extractos y Adición de Larvas

Utilizar la placa de 96 pozos con un volumen de 250  $\mu\text{L}$ , esta placa utiliza 8 larvas como replica y concentraciones de 1.0, 0.5, 0.25, 0.10 y 0.005  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cada concentración se evalúa por triplicado

Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de agua y 10  $\mu\text{L}$  de la muestra los cuales deben ser de las diferentes concentraciones que se quiere aplicar de la solución madre de 2500 ppm.

Agregar una larva en cada poso y dejar inmóvil

Paralelamente preparar controles

Control (+)  
metilparabeno  
(60-80 ppm)

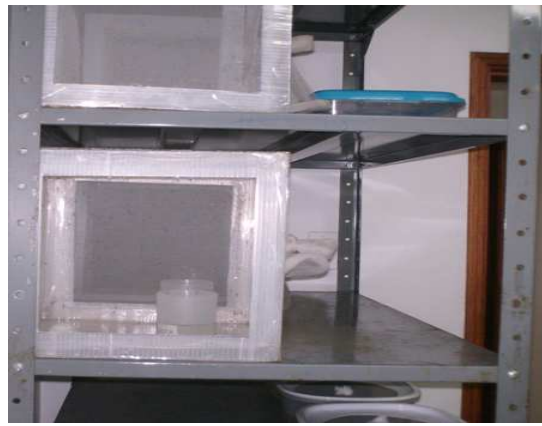
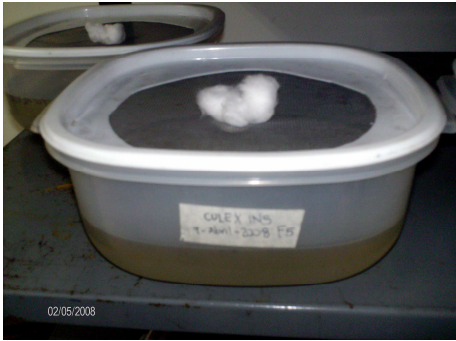
Control (-)  
Agua filtrada  
bidestilada

## Análisis de Mortalidad

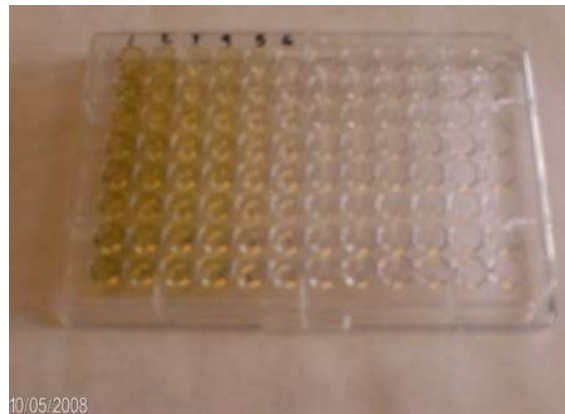
Realizar lecturas a las 24 y 48h. Evaluar la movilidad de las larvas y contar las larvas vivas y muertas.

Utilizar el Probit para evaluar la concentración letal para matar el 50% de la población.

## 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. muricata*

**ANEXO C**  
Fotos

**CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA**



**F 001D**



**F 005D**

Revelados con reactivo de Kedde.