

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOPESTICIDA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS  
POLARES DE LAS SEMILLAS DE *Annona squamosa* FRENTE A *Culex*  
*quinquefasciatus*

MANUEL ALEJANDRO SALAZAR

RONALD FERNANDO SOTO

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA

2012

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOPESTICIDA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS  
POLARES DE LAS SEMILLAS DE *Annona squamosa* FRENTE A *Culex*  
*quinquefasciatus*

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de QUÍMICO INDUSTRIAL

Presentado por:

MANUEL ALEJANDRO SALAZAR

RONALD FERNANDO SOTO

Director:

Dra. CIENCIAS QUÍMICAS

GLORIA EDITH GUERRERO ÁLVAREZ

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA

2012

**NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO DE GRADO**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOPESTICIDA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS POLARES DE LAS SEMILLAS DE *Annona squamosa* FRENTE A *Culex quinquefasciatus***

**Presentado por:**

**MANUEL ALEJANDRO SALAZAR  
RONALD FERNANDO SOTO**

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

**La nota de: \_\_\_\_\_**

**Con la connotación de: \_\_\_\_\_**

**Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy \_\_\_\_\_**

**Director: \_\_\_\_\_**

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

**Jurado: \_\_\_\_\_**

**Jaime Niño**

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a Dios por darme estos años de vida, por bendecirme con la mejor familia que pueda existir y por rodearme con grandes amigos.

A mis padres Gilberto y Luz Elena y a mi hermana Maria Camila que son la razón y el motor de mi vida. Mis padres, los mejores del mundo, por mi formación, por estar presentes en todo momento, con su amor, su compañía, sus consejos, su paciencia y su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida. Mi hermana, gran bendición, por todo su amor, su alegría y su inigualable compañía. A ellos, gracias por todo y por tanto.

A mis abuelas Mery y Letty, a mis tíos, a mis tías, a mis primos y a mis primas por estar siempre pendientes de mi suerte, con palabras de amor, ánimo y de apoyo incondicional.

A Camilo, Fernando, David, Jonathan, Diego, Andrés, Sergio, Duván, Sebas, Gregorio, Valentina, Carolina, Estefanía, Jennifer, Vanessa, Angélica, Stefani, Pamela, Maritza, Sandra, Alejandra, Leidy, Ana Pérez, Ana Sepúlveda, Laura, Ángela y Vico, algunos desde el comienzo y otros que se fueron sumando a lo largo del camino, gracias por su amistad, su confianza, su alegría, sus enseñanzas, por tantas mañanas, tardes y noches de compañía incondicional, gracias por compartir conmigo parte de esta etapa que culmina.

Manuel Alejandro Salazar P.

## **DEDICATORIA**

Este documento se lo dedico primero a Dios por darme la oportunidad de vivir los años suficientes para culminar esta etapa de mi vida, colmarme de tantas bendiciones como la salud, la familia y ahora una carrera, por todo esto y mucho más le agradezco y lo amo gracias Dios.

A mis padres por brindarme apoyo incondicional, tanto sentimental como económico, sin ellos no sería la persona que soy, y no estaría en esta posición esta parte de mi vida no sería posible, les agradezco todas las cosas que me han enseñado, por eso agradezco a Dios por tener los padres que tengo son lo mejor los amo.

A mi hermana que al igual que mis padres hizo muchos sacrificios para ayudarme en mis estudios me apoyó como cualquier madre lo haría, e hizo que todo esto fuera posible también le agradezco a Dios por ella, es otra persona que amo con todo mi corazón.

A mi tía Margarita que es mi segunda madre porque siempre estuvo pendiente de mí, me entendió y apoyó en todas las formas que le fue posible, es el complemento de mi hermosa familia otra persona que tengo para amar y agradezco nuevamente a Dios por eso.

Y en general a toda mi familia que siempre estuvo pendiente de mí apoyándome y alentándome, los quiero mucho.

Y a los muchos amigos con los que he compartido los mejores momentos de mi vida, con los que viví cosas buenas y malas y fueron una parte importante en todo este proceso también los quiero mucho y les agradezco todas las cosas buenas que me enseñaron.

*RONALD FERNANDO SOTO QUINTERO*

## AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias por el amor, la paciencia, la motivación y el apoyo incondicional a lo largo de nuestro peregrinaje universitario.

A la Universidad Tecnológica de Pereira por haber apoyado nuestra propuesta realizando la financiación total del proyecto.

A nuestra directora Gloria Edith Guerrero por brindarnos la oportunidad de ser partícipes de este proyecto y por su tiempo, colaboración e incondicional apoyo durante la realización del mismo.

A la Doctora Bárbara Moreno Murillo del Departamento de Química de la Universidad Nacional sede Bogotá, por su hospitalidad, tiempo y colaboración en la realización de los bioensayos con *Culex quinquefasciatus*.

Al Doctor Jaime Niño Osorio por su tiempo y disponibilidad para ser el evaluador de este trabajo.

A la Doctora Luz Ángela Veloza del Grupo Polifenoles por prestarnos el equipo de HPLC para el análisis de los extractos

Al Ingeniero Agrónomo de la UNISARC Juan Felipe Peña por su ayuda con la clasificación botánica de la planta estudiada.

A Vanessa y al profesor Hugo por su tiempo, dedicación y colaboración durante la utilización del equipo de HPLC.

A las(o) integrantes del Grupo de Investigación Oleoquímica por hacer más amenas aquellas extensas jornadas de trabajo en el laboratorio.

A Carlos Humberto, Javi, Mancho y Vicky y por su colaboración y disponibilidad a lo largo de toda la carrera.

A Sandra y a Johana por su hospitalidad, su amabilidad y su colaboración durante nuestra estadía en Bogotá.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABLAS</b>	xii
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	xiv
<b>RESUMEN</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>1. JUSTIFICACION</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	5
2.1. OBJETIVO GENERAL	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
<b>3. MARCO DE REFERENCIA</b>	6
<b>4. MARCO TEÓRICO</b>	8
4.1. FAMILIA ANNONACEAE	8
4.1.1. Composición química y bioactividad de la familia Annonaceae	9
4.1.2. Acetogeninas de Annonaceae	10
4.1.2.1 Clasificación de las acetogeninas de Annonaceae	10
4.1.2.2. Acetogeninas mono-THF	11
4.1.2.3. Acetogeninas adyacentes bis-THF	11
4.1.2.4. Acetogeninas no adyacentes bis-YHF	12
4.1.2.5. Acetogeninas tri-THF	13
4.1.2.6. Acetogeninas Tetrahidropirano (THP)	13
4.1.2.7. Acetogeninas lineales	14
4.1.3. Separación e identificación de acetogeninas de Annonaceae	14
4.1.4. <i>ANNONA SQUAMOSA</i>	15
4.1.4.1. Clasificación Botánica	16

4.1.4.2. Fenología	16
4.1.4.3. Hojas	17
4.1.4.4. Flores	18
4.1.4.5. Frutos	18
4.1.4.6. Semillas	19
4.1.4.7. Usos tradicionales	19
4.2. FAMILIA ANNONACEAE EN COLOMBIA	20
4.2.1. <i>Annona squamosa</i> en Colombia	22
4.3. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	22
4.3.1. Ensayo de actividad biológica con <i>Artemia salina</i>	24
4.3.2. Ensayo de actividad biológica con <i>Culex quinquefasciatus</i>	26
4.3.3. Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) en pruebas de actividad biológica	27
4.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS	28
4.4.1. Cromatografía	28
4.4.2. Cromatografía en capa delgada (CCD)	29
4.4.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	29
4.4.3.1. Cromatografía líquida en fase normal	30
4.4.3.2. Cromatografía líquida en fase reversa	31
<b>5. METODOLOGÍA</b>	32
5.1. MUESTRA DE ANÁLISIS	32
5.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	32
5.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN	32
5.4. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	33
5.4.1. Bioensayo preliminar con <i>Artemia salina</i>	33
5.4.1.1. Obtención nauplii de <i>Artemia salina</i>	33

5.4.1.2. Preparación de los extractos y análisis de mortalidad	34
5.4.2. Bioensayo confirmativo con <i>Culex quinquefasciatus</i>	34
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
5.6. CARACTERIZACIÓN DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAE	35
5.6.1. Análisis preliminar por cromatografía en capa delgada (CCD)	35
5.6.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de los extractos de semillas desengrasadas de <i>Annona squamosa</i>	35
5.6.2.1. Análisis cualitativo por CLAE	35
5.6.2.1.1. Condiciones del análisis por CLAE	35
5.6.2.1.2. Identificación preliminar de acetogeninas de Annonaceae	36
5.6.2.2. Análisis cuantitativo por CLAE por el método del estándar externo	36
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
6.1. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAE	37
6.2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	39
6.2.1. Bioensayo preliminar con <i>Artemia salina</i>	39
6.2.2. Bioensayo confirmativo con <i>Culex quinquefasciatus</i>	44
6.3. CARACTERIZACIÓN DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAE	47
6.3.1. Análisis preliminar por cromatografía en capa delgada (CCD)	47
6.3.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de los extractos de semillas desengrasadas de <i>Annona squamosa</i>	49
6.3.2.1. Análisis cualitativo por CLAE	49
6.3.2.1.1. Identificación preliminar de acetogeninas de Annonaceae	49
6.3.2.2. Análisis cuantitativo por CLAE por el método del estándar externo	56
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>60</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>61</b>



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura de una acetogenina de Annonaceae (Squamocin-F)	2
<b>Figura 2.</b> Mapa de distribución de la familia Annonaceae en el mundo	8
<b>Figura 3.</b> Mapa de distribución <i>Annona squamosa</i> en el mundo	15
<b>Figura 4.</b> Árbol de <i>Annona squamosa</i>	17
<b>Figura 5.</b> Hojas de <i>Annona squamosa</i>	17
<b>Figura 6.</b> Frutos de <i>Annona squamosa</i>	18
<b>Figura 7.</b> Semillas de <i>Annona squamosa</i>	19
<b>Figura 8.</b> Nauplios de <i>Artemia salina</i>	25
<b>Figura 9.</b> Larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	27
<b>Figura 10.</b> Esquema de equipo para cromatografía líquida de alta eficiencia	30
<b>Figura 11.</b> Esquema de extracción de acetogeninas de semillas de <i>Annona squamosa</i>	33
<b>Figura 12.</b> Comportamiento de la actividad biológica en el tiempo de la fracción etanólica	41
<b>Figura 13.</b> Comportamiento de la actividad biológica en el tiempo de la fracción de diclorometano	42
<b>Figura 14.</b> Comportamiento de la actividad biológica en el tiempo de la fracción metanólica	43
<b>Figura 15.</b> Esquema de las cromatoplasmas obtenidas en el análisis por CCD utilizando reactivo de Kedde como revelador	48
<b>Figura 16.</b> Cromatograma y espectro UV del estándar de Bulatacina	49
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAE- <b>a</b> Fracción etanólica, <b>b</b> Fracción diclorometano y <b>c</b> Fracción metanólica	50
<b>Figura 18.</b> Superposición de cromatogramas obtenidos por CLAE	51
<b>Figura 19.</b> Espectro UV de máxima absorción para el pico # 7 del cromatograma de la fracción metanólica que corresponde a una posible acetogenina	52

**Figura 20.** Espectro UV de máxima absorción para uno de los picos que no fue considerado como acetogenina 53

**Figura 21.** Estructura de la Bulatacina 55

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición química por cada 100 g de pulpa de tres Annonaceae	9
<b>Tabla 2.</b> Acetogeninas mono-THF	11
<b>Tabla 3.</b> Acetogeninas adyacentes bis-THF	12
<b>Tabla 4.</b> Acetogeninas no adyacentes bis-THF	12
<b>Tabla 5.</b> Acetogeninas tri-THF	13
<b>Tabla 6.</b> Acetogeninas tetrahidropirano (THP)	13
<b>Tabla 7.</b> Acetogeninas lineales	14
<b>Tabla 8.</b> Composición nutricional por cada 100 g de pulpa de <i>Annona squamosa</i>	19
<b>Tabla 9.</b> Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae de Colombia	21
<b>Tabla 10.</b> Clasificación de la actividad biológica de acuerdo a la CL <sub>50</sub> (ppm)	28
<b>Tabla 11.</b> Condiciones de análisis por CLAE	36
<b>Tabla 12.</b> Rendimientos obtenidos de la extracción y fraccionamiento a partir de las semillas sin desengrasar	38
<b>Tabla 13.</b> Rendimientos obtenidos de la extracción y fraccionamiento a partir de las semillas desengrasadas	38
<b>Tabla 14.</b> Valores de concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) obtenidos en el bioensayo con <i>Artemia salina</i> a través del tiempo	39
<b>Tabla 15.</b> Valores de concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) obtenidos en el bioensayo con <i>Culex quinquefasciatus</i> para las fracciones etanólica, diclorometano y metanólica	44

<b>Tabla 16.</b> Algunas acetogeninas reportadas de semillas de <i>Annona squamosa</i>	54
<b>Tabla 17.</b> Datos de la curva de calibración realizada para el estándar de bulatacina	56
<b>Tabla 18.</b> Análisis Cromatográfico por CLAE de la fracción etanólica desengrasada de semillas de <i>Annona squamosa</i> , método del estándar externo	57
<b>Tabla 19.</b> Análisis Cromatográfico por CLAE de la fracción de diclorometano desengrasada de semillas de <i>Annona squamosa</i> , método del estándar externo	57
<b>Tabla 20.</b> Análisis Cromatográfico por CLAE de la fracción metanólica desengrasada de semillas de <i>Annona squamosa</i> , método del estándar externo	58

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>ANEXO A.</b> Diagrama de Flujo: BIOENSAYO PRELIMINAR CON LARVAS DE <i>Artemia salina</i>	72
<b>ANEXO B.</b> Diagrama de Flujo: BIOENSAYO CONFIRMATIVO CON <i>Culex quinquefasciatus</i>	76
<b>ANEXO C.</b> Fotos: CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA	79
<b>ANEXO D.</b> Figuras: ESPECTROS UV DE MÁXIMA ABSORCIÓN POSIBLES ACETOGENINAS	80
<b>ANEXO E.</b> Figuras: ESPECTROS UV DE MÁXIMA ABSORCIÓN OTROS COMPUESTOS	82
<b>ANEXO F.</b> Figura: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ESTÁNDAR DE BULATACINA	86

## RESUMEN

El mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) es una plaga muy común a nivel mundial el cual es considerado como el vector de enfermedades de gran importancia como el virus del Nilo y la Filariasis linfática. En este estudio se evaluó la actividad biopesticida de los extractos polares obtenidos a partir de semillas desengrasadas y sin desengrasar de *Annona squamosa*. Los extractos crudos fueron obtenidos en etanol, seguidos por una separación líquido-líquido con diclorometano-agua y metanol-hexano, para completar las tres fracciones de trabajo (etanólica, diclorometano, metanólica). Las fracciones fueron evaluadas frente a nauplii de *Artemia salina* durante nueve semanas, como bioensayo preliminar, y frente a larvas en el IV estadio del *Culex quinquefasciatus*, como bioensayo confirmativo.

Los valores de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) obtenidos en el ensayo preliminar fueron entre 1,471 y 8,703 ppm. Las fracciones desengrasadas presentaron una mayor actividad biológica obteniendo valores de CL<sub>50</sub> entre 1,471 y 7,536 ppm; entre las fracciones desengrasadas se destacó la fracción metanólica que fue la más activa presentando una CL<sub>50</sub> de 1,471 ppm. Para el ensayo confirmativo la fracción que presentó mayor actividad fue la metanólica mostrando valores de CL<sub>50</sub> de 169,294 y 33,077 ppm a las 22 h y 40 h, respectivamente. El análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) mostró la presencia de 9 posibles acetogeninas en el extracto metanólico, entre las cuales se evidenció de manera preliminar Bulatacina. En la cuantificación por el método del estándar externo se obtuvo un valor de 1745 µg de posibles acetogeninas por mililitro de extracto metanólico lo que equivale al 79,5% del extracto.

**Palabras clave:** actividad biológica, *Annona squamosa*, *Artemia salina*, concentración letal media (CL<sub>50</sub>), *Culex quinquefasciatus*, semillas

## ABSTRACT

*Culex quinquefasciatus* mosquito (Diptera: Culicidae) is a very common pest in the world that is considered as the vector of important diseases such as West Nile virus and lymphatic Filariasis. This study evaluated the biopesticide activity of polar extracts obtained from degreased and greased *Annona squamosa* seeds. The crude extracts were obtained with ethanol, followed by a liquid-liquid separation with dichloromethane-water and methanol-hexane, to complete the three fractions worked. The fractions were evaluated using Brine shrimp nauplios, as a preliminary bioassay, and against third instar larvae of *Culex quinquefasciatus*, as confirmatory bioassay.

The CL<sub>50</sub> values obtained in preliminary bioassay were between 1,471 and 8,703 ppm. The degreased fractions showed a higher biological activity with CL<sub>50</sub> values between 1,471 and 7,536 ppm; and the methanolic fraction presented the highest activity with a CL<sub>50</sub> value at 1,471 ppm. In the confirmatory bioassay methanolic fraction showed the highest activity with CL<sub>50</sub> values at 169,294 and 33,077 ppm at 22 h and 40 h respectively. A chromatographic analysis by HPLC showed that there were 9 acetogenins in the methanol fraction, and that Bullatacin was probably one of them. A quantitative analysis reported a concentration of 79,5% of acetogenins in methanolic fraction.

**Key words:** biological activity, *Annona squamosa*, Brine shrimp, median lethal concentration (LC<sub>50</sub>), *Culex quinquefasciatus*, seeds

## 1. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad más de 200 especies de artrópodos de importancia médica han mostrado resistencia a muchos de los pesticidas contemporáneos; cada vez se hace necesario desarrollar agentes industriales más potentes, originando mayores costos económicos y ambientales. Estos problemas han popularizado el concepto de manejo integrado de plagas (MIP), que implica no sólo trabajar en la búsqueda de controladores biológicos y el manejo ambiental, sino también en la investigación del posible uso de insecticidas botánicos, los cuales tienen la ventaja de proveer modos de acción novedosos que reducen el riesgo de resistencia cruzada, que al mismo tiempo sean más eficaces, seguros para el medio, degradables y más específicos para las diversas especies de insectos, produciendo poco o ningún impacto ambiental (1).

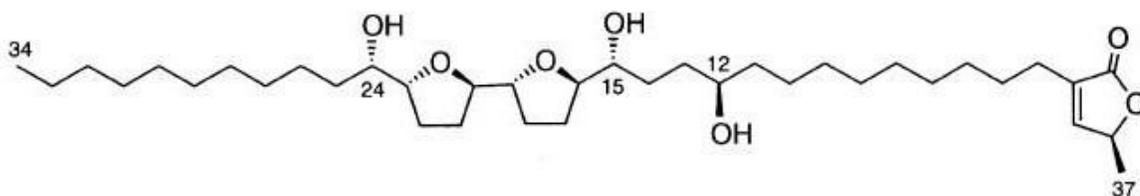
Numerosas especies de plantas superiores producen metabolitos secundarios a los cuales se les atribuyen acciones alelopáticas y de defensa contra microorganismos y fitófagos. Actúan principalmente como toxinas a través de los ciclos de vida de las especies de insectos; otros interfieren en el desarrollo y la reproducción o pueden actuar a nivel de los receptores olfatorios siendo responsables de atracción o repelencia (1).

Varios insecticidas orgánicos han sido extraídos y/o sintetizados a partir de plantas. Entre los innumerables compuestos insecticidas de origen botánico que han sido sintetizados son de importancia la nicotina, las piretrinas y la rotenona. Una de las familias de plantas más promisorias para la obtención de bioinsecticidas es la Annonaceae. Entre las especies que se destacan por sus propiedades insecticidas se encuentran: *A. cherimolia*, *A. glabra*, *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. melitu*, *A. palustri*, *A. reticulata* y *A. spinescens*, todas pertenecientes al género *Annona* (1).

La familia Annonaceae, a pesar de su gran tamaño (130 géneros y 2000 especies), es químicamente una de las familias de plantas tropicales menos

conocida. Los estudios fitoquímicos y farmacológicos se han incrementado en los últimos 15 años; esto en gran parte se debe al descubrimiento de las acetogeninas de Annonaceae, una clase de compuestos naturales con una amplia variedad de actividades biológicas (2).

Las acetogeninas (Fig. 1) son una serie de compuestos naturales de origen policétido que poseen de 35 a 37 carbonos, su estructura general está caracterizada por una gran cadena alifática con un grupo metil terminal, una lactona insaturada con un metil como sustituyente, con uno o dos anillos tetrahidrofurano y varios sustituyentes hidroxilo o cetónicos en los mismos. Las acetogeninas presentan un amplio rango de actividades biológicas tales como inmunosupresoras, antiparasitarias, citotóxicas, antimicrobianas, antitumorales y además pueden actuar como pesticidas (1).



**Figura 1.** Estructura de una acetogenina (Squamocin-F) de Annonaceae (3)

Estudios realizados en España, Brasil, Canadá, Estados Unidos, entre otros, han demostrado que las acetogeninas presentes en las semillas de la familia Annonaceae poseen potentes propiedades antitumorales, antiparasitarias e insecticidas. Se ha comprobado su potencial terapéutico con estudios que muestran a las acetogeninas de Annonaceae como inhibidoras potentes del crecimiento de células cancerosas, presentando selectividad frente a las células sanas y eficacia frente a células cancerosas resistentes a medicamentos (4, 5). Otros estudios comprueban la actividad antiparasitaria frente a *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei brucei*, *Entamoeba histolytica*, *Nocardia brasiliensis*, *Molinema dessetae* y *Artemia salina*; además muestran actividad citotóxica frente a las líneas celulares tumorales KB y VERO (6,7).

Por otro lado, existen estudios que han perfilado a las acetogeninas de Annonaceae como una buena alternativa para el control de plagas debido a sus propiedades como biopesticida, demostrando efectos tóxicos, repelentes e inhibición del crecimiento frente a diferentes organismos tales como larvas de mosquito, arañas, escarabajos, ácaros, entre otros (8, 9).

De los géneros de Annonaceae encontrados en Colombia *Anaxagorea*, *Annona*, *Cananga*, *Duguetia* y *Xylopia* tienen distribución pantropical, en tanto que *Diclinanona*, *Froesiodendron*, *Guatterrella*, *Guatterriopsis*, *Ruizodendron* y *Trigynaea* son amazónicas y los restantes géneros son neotropicales. 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 msnm y sólo la *Raimondia quinduensis* alcanza los 2600 msnm (10). Sin embargo, las más conocidas son *Annona muricata*, *Annona squamosa* y *Annona cherimolia* Mill debido a la importancia económica que poseen sus frutos: Guanábana, Anón y Chirimoya, respectivamente.

En Colombia se han realizado estudios acerca de la evaluación de la actividad biológica de las acetogeninas presentes en la familia Annonaceae que demuestran actividad antiparasitaria frente a *Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* y actividad citotóxica frente a las líneas celulares tumorales KB Y VERO (11). Otros estudios demuestran actividad insecticida frente a organismos como el gorgojo del maíz, las larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, así como las larvas en el IV estadio del *Culex quinquefasciatus*, resultados que son prometedores y que le adjudican a la familia Annonaceae un potencial destacado para el posible control natural de diversas plagas que afectan varios cultivos de importancia agroindustrial (1, 12, 13).

Con el fin de aportar al conocimiento sobre la actividad biológica de la familia Annonaceae, contribuir al aprovechamiento integral del fruto y generar nuevos usos alternativos de *Annona squamosa*, se plantea evaluar la actividad biológica de las semillas y su uso potencial como biopesticida partiendo de estudios previos realizados sobre las acetogeninas presentes en Annonaceae (14, 15, 16) empleando como organismo modelo preliminar *Artemia salina* y como organismo confirmativo larvas en el IV estadio del *Culex quinquefasciatus*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener y evaluar la actividad biopesticida *in vitro* de los extractos polares de las semillas de *Annona squamosa* frente a *Culex quinquefasciatus*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proponer un método de extracción de acetogeninas presentes en las semillas de la *Annona squamosa*, con base en estudios previos.
- Realizar el análisis preliminar de los extractos polares de las semillas de *Annona squamosa* por medio de cromatografía de capa delgada (CCD) y a través del bioensayo con *Artemia salina*.
- Realizar el seguimiento de la actividad biológica en el tiempo, de los extractos polares de las semillas de *Annona squamosa* a partir del bioensayo con *Artemia salina*.
- Evaluar la actividad biopesticida *in vitro* de los extractos polares de mayor actividad biológica preliminar de *Annona squamosa* a través del bioensayo con larvas en el IV estadio de *Culex quinquefasciatus*.
- Caracterizar las acetogeninas presentes en los extractos polares de mayor actividad biológica de las semillas de *Annona squamosa*, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE).

### 3. MARCO DE REFERENCIA

El desarrollo de insecticidas botánicos a partir de extractos de plantas, los cuales se consideran más amigables con el medio ambiente, se presenta como una gran alternativa para los insecticidas sintéticos industriales. Así, las plantas se erigen como una fuente alternativa para el control de plagas puesto que constituyen una fuente potencial de compuestos bioactivos (17).

Investigaciones previas de las acetogeninas de Annonaceae han reportado propiedades insecticidas (5, 8); y estudios realizados a nivel mundial sobre extractos provenientes de *Annona squamosa* frente a *Culex quinquefasciatus* han mostrado gran eficiencia, postulándolos así como alternativa para el control biológico de esta plaga.

Los extractos acetónicos de semillas de *Annona squamosa* presentaron una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) a 25 ppm contra *Culex quinquefasciatus* (18). Así mismo, los extractos acetónicos de semillas de *Annona squamosa* evaluados frente a *Culex quinquefasciatus* presentaron porcentajes de letalidad del 80% (19). Los resultados de ambas investigaciones le otorgan propiedades insecticidas importantes a los extractos evaluados.

Extractos de éter de petróleo procedentes de semillas de *Annona squamosa* mostraron una CL<sub>50</sub> de 436,110 ppm frente a *Culex quinquefasciatus* (20).

Los extractos etanólico y metanólico provenientes de las hojas de *Annona squamosa* obtuvieron resultados positivos frente a larvas de *Culex quinquefasciatus* con una CL<sub>50</sub> de 6,96 ppm y 17,70 ppm para el etanólico y el metanólico, respectivamente (21).

Extractos de éter de petróleo provenientes de hojas de *Annona squamosa* evaluados frente a *Culex quinquefasciatus* presentaron una CL<sub>50</sub> entre 100-200 ppm, este valor le confiere propiedades insecticidas al extracto evaluado (22).

El extracto etanólico de hojas de *Annona squamosa* mostró una CL<sub>50</sub> de 11,01 ppm frente a larvas de *Culex quinquefasciatus*, el cual se considera muy activo (23).

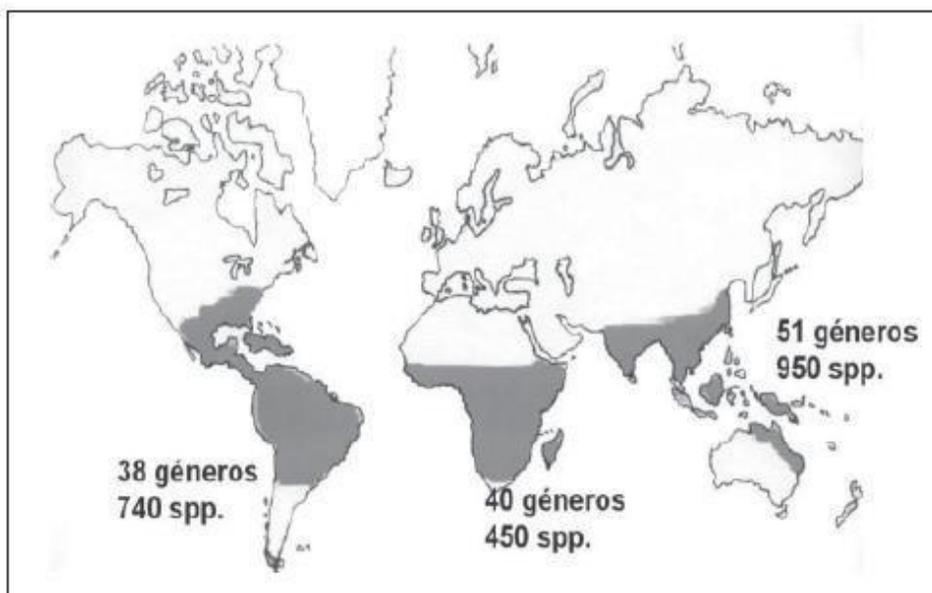
De cinco extractos provenientes de la corteza del árbol de *Annona squamosa* evaluados frente a larvas de *Culex quinquefasciatus* se destacó el de acetato de etilo presentando una CL<sub>50</sub> de 43,07 ppm, lo que indica un alto potencial para el control de esta plaga (24).

Finalmente, estudios realizados en Colombia con extractos provenientes de semillas de otras especies de Annonaceae tales como *Annona muricata* y *Annona cherimolia* presentaron resultados prometedores para el uso posible de especies de la familia Annonaceae como fuente alternativa para el control del *Culex quinquefasciatus* (13, 25).

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. FAMILIA ANNONACEAE

La Annonaceae es una familia principalmente pantropical, se encuentra en alturas menores de 2000 m y está constituida por árboles, arbustos y lianas que se distribuyen en 130 géneros y cerca de 2200 especies confinadas a las regiones tropicales de América, África y Asia (ver Figura 2) (26, 27, 28).



**Figura 2.** Mapa de distribución de la familia Annonaceae en el mundo (28).

La familia Annonaceae se caracteriza porque la corteza externa se desprende en tiras y la corteza interna es reticulada; las hojas son simples, dísticas, enteras y generalmente aromáticas; las flores simples o en inflorescencias terminales o axilares, frecuentemente con tres sépalos y seis pétalos en dos verticilos de tres. Los pétalos aparecen libres o fusionados. La mayoría de las especies tienen más de doce estambres. Los frutos son de diversos tamaños, lisos o con proyecciones. Las semillas son lisas o tuberculadas pueden presentar o no tapón micropilar. El endospermo ruminado es de consistencia normal o vidriosa (26, 28).

Los géneros con un mayor número de especies son: *Guatteria* (250 especies); *Uvaria* (175 especies); *Xylopia* (150 especies); *Polyalthia* (150 especies); *Goniothalamus* (115 especies); *Artabotrys* (100 especies); *Rollinia* (65 especies) y *Annona*, con 120 especies; 110 de ellas en América tropical (28).

#### 4.1.1. Composición química y bioactividad de la familia Annonaceae

La familia Annonaceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, en las hojas, raíces, frutos y semillas (ver Tabla 1). Estudios fitoquímicos de esta familia han caracterizado y reportado alcaloides, carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos, terpenoides, flavonoides, acetogeninas, polifenoles, aceites esenciales y compuestos aromáticos típicos de ésta familia. La bioactividad de este tipo de metabolitos presentes en plantas de Annonaceae está asociada con las actividades citotóxica, antitumoral, antibacterial, antimalarial, anti-leishmaniasis, propiedades antihelmínticas y con efecto pesticida (29, 30).

**Tabla 1.** Composición química por cada 100 g de pulpa de fruta de tres Annonaceae (31).

<b>Componentes</b>	<b><i>Annona cherimola</i></b>	<b><i>Annona reticulata</i></b>	<b><i>Annona muricata</i></b>
Agua (g)	77,3	75,8	81,0
Proteínas (g)	1,60	1,85	1,00
Lípidos (g)	0,30	0,35	0,60
Carbohidratos (g)	18,42	18,70	17,25
Fibra (g)	1,64	2,55	0,86
Acidez total (g)	0,58	-----	1,00
Ceniza (g)	0,70	0,95	0,61
Energía (calorías)	68,6	75,0	65,0
Calcio (mg)	27,14	24,00	15,00
Fósforo (mg)	35,2	26,0	28,0
Hierro (mg)	0,6	1,0	0,7
Vitamina A (mg)	-----	trazas	14,45
Vitamina B1 (mg)	0,09	0,07	0,07
Vitamina B12 (mg)	0,12	0,12	0,08
Vitamina B5 (mg)	0,8	0,7	1,2

#### **4.1.2. Acetogeninas de Annonaceae**

Las acetogeninas de Annonaceae son una de las clases de más rápido crecimiento de nuevos productos naturales, las cuales ofrecen actividades antitumorales, citotóxicas, antiparasitarias, plaguicidas, antimicrobianas, antifúngicas, inmunosupresivas, herbicidas y prometen convertirse en nuevos quimiotipos de agentes antitumorales y pesticidas. Estructuralmente, las acetogeninas de Annonaceae son una serie de productos naturales que poseen entre 35 a 37 carbonos. Usualmente se caracterizan por tener una larga cadena alifática que finaliza en un anillo  $\gamma$ -lactona, metil sustituido  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado, a veces con arreglo de ceto-lactona; así mismo, esta cadena puede poseer uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos (THF) localizados a lo largo de la cadena y con algunos sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos), o en ciertos casos dobles enlaces. También, en menor proporción, se han descrito compuestos con anillos tetrahidropiránicos (THP) y compuestos acíclicos (2, 28, 30).

Las acetogeninas de Annonaceae son inhibidores poderosos conocidos del complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) en los mamíferos y de los sistemas de transporte electrónico mitocondrial de los insectos; además, se les conoce como inhibidoras potentes del crecimiento de células cancerosas, presentando selectividad frente a las células sanas y eficacia frente a células cancerosas resistentes a medicamentos (2, 32, 33).

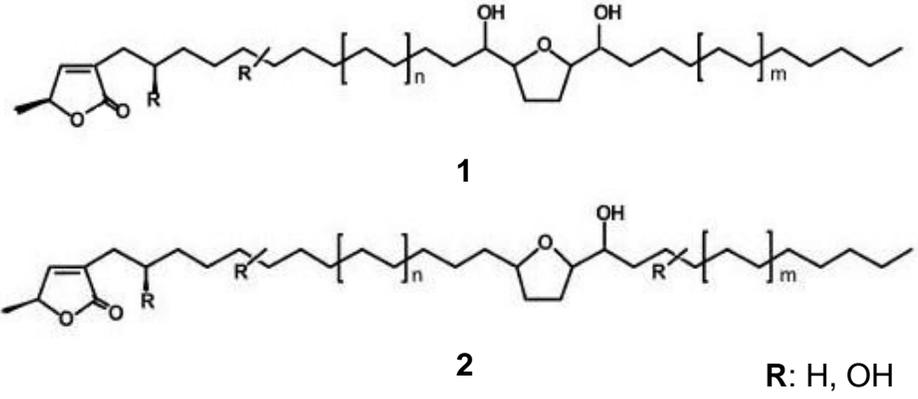
##### **4.1.2.1. Clasificación de las acetogeninas de Annonaceae**

Las acetogeninas de Annonaceae se clasifican en seis grandes tipos principales, de acuerdo al número y a la posición del anillo THF (34), mono-tetrahidrofurano (mono-THF), bis-THF adyacentes, bis-THF no adyacente, tri-THF, tetrahidropirano (THP) y lineales.

#### 4.1.2.2. Acetogeninas mono-THF

Los compuestos mono-THF son el grupo más grande de acetogeninas de la Annonaceae, de los cuales han sido reportados un total de noventa y cuatro. Presentan un solo núcleo tetrahidrofuránico (THF) (ver Tabla 2) (2, 35, 36, 37, 38).

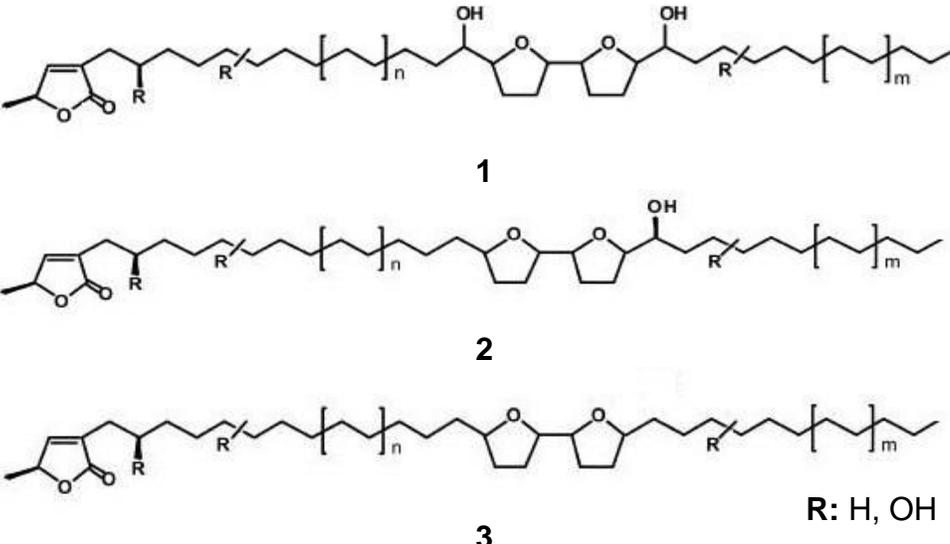
**Tabla 2.** Acetogeninas mono-THF

Tipo de acetogenina	Características	
Mono-THF	1	Grupos hidroxilos en $\alpha$ y $\alpha'$
	2	$\alpha$ -monohidroxiladas
	 <p style="text-align: center;">1</p> <p style="text-align: center;">2</p> <p style="text-align: right;">R: H, OH</p>	

#### 4.1.2.3. Acetogeninas adyacentes bis-THF

Los compuestos bis-THF adyacentes son el segundo grupo más grande de acetogeninas de Annonaceae, de los cuales han sido reportados un total de ochenta compuestos. Presentan dos núcleos THF adyacentes (ver Tabla 3) (2, 33, 36, 37, 39).

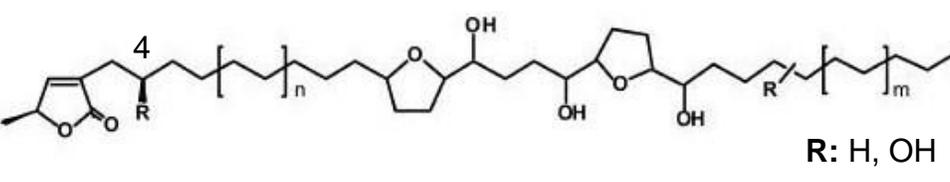
**Tabla 3.** Acetogeninas adyacentes bis-THF

Tipo de acetogenina	Características	
Adyacentes bis-THF	1	Grupos hidroxilos en $\alpha$ y $\alpha'$
	2	$\alpha$ -monohidroxiladas
	3	Sin grupo hidroxilo en $\alpha$
	 <p style="text-align: right;">R: H, OH</p>	

#### 4.1.2.4. Acetogeninas no adyacentes bis-THF

Han sido reportados un total de veintiocho compuestos. Presentan dos núcleos THF no adyacentes, separados por cuatro metilenos. El THF del lado de la lactona tiene sólo un grupo hidroxilo en su carbono adyacente (ver Tabla 4). (2, 37).

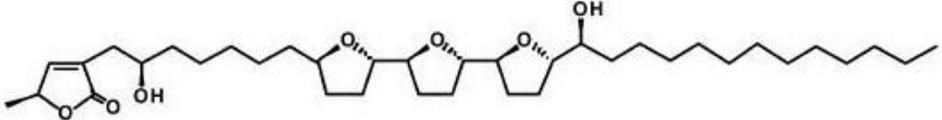
**Tabla 4.** Acetogeninas no adyacentes bis-THF

Tipo de acetogenina	Características	
No adyacentes bis-THF	1	Grupo hidroxilo en posición 4
	2	Sin grupo hidroxilo en posición 4
	 <p style="text-align: right;">R: H, OH</p>	

#### 4.1.2.5. Acetogeninas tri-THF

La Goniocina, aislada de *Goniiothalamus giganteus*, representa la primera y única acetogenina de este tipo que se conoce hasta el momento. (ver Tabla 5) (2, 36, 37, 40).

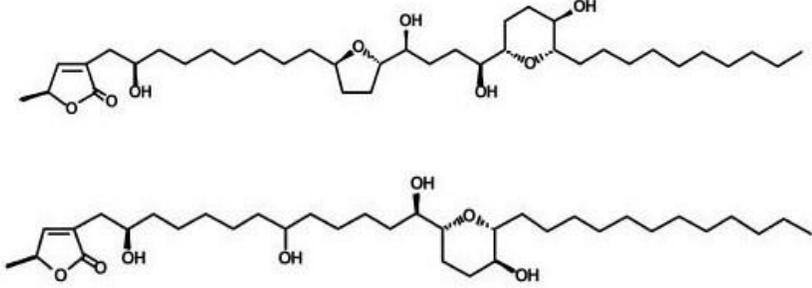
**Tabla 5.** Acetogeninas tri-THF

Tipo de acetogenina	Características
tri-THF	Presenta tres núcleos THF adyacentes
	 <p data-bbox="812 861 1185 892">Estructura de la Goniocina</p>

#### 4.1.2.6. Acetogeninas tetrahidropirano (THP)

Son el tipo de acetogeninas menos conocido de la familia Annonaceae. Han sido reportados un total de cuatro compuestos. Presentan un núcleo del tetrahidropirano (THP) en su estructura (ver Tabla 6) (2, 36, 37).

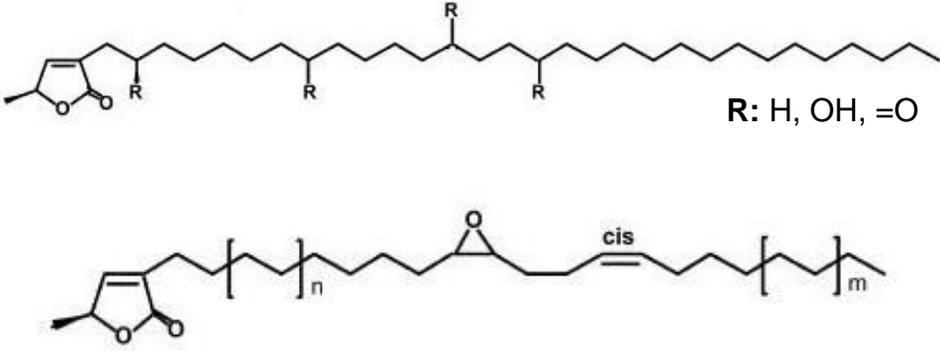
**Tabla 6.** Acetogeninas tetrahidropirano (THP)

Tipo de acetogenina	Características	
Tetrahidropirano (THP)	1	Con núcleo THF
	2	Sin núcleo THF
	 <p data-bbox="1356 1627 1485 1659">1 Mucocina</p> <p data-bbox="1356 1795 1502 1827">2 Piranicina</p>	

#### 4.1.2.7. Acetogeninas lineales

Son aquellos compuestos que presentan una larga cadena alifática variando su grado de insaturación o hidroxilación y que a su vez carecen de núcleos THF o THP (ver Tabla 7) (2, 36, 37).

**Tabla 7.** Acetogeninas lineales

Tipo de acetogenina	Características
Lineales	Precusores biogénéticos de las epoxiacetogeninas
	 <p>The image shows two chemical structures. The top structure is a long-chain aliphatic precursor with a furfuryl ring at one end and three 'R' groups along the chain. The bottom structure is Epoxymurin-A, which features a furfuryl ring, a polyethylene glycol-like chain with 'n' units, an epoxide ring, a 'cis' double bond, and another polyethylene glycol-like chain with 'm' units.</p> <p>R: H, OH, =O</p> <p>Epoxiacetogenina (Epoxymurin-A)</p>

#### 4.1.3. Separación e identificación de acetogeninas de Annonaceae

La extracción clásica de acetogeninas de Annonaceae se lleva a cabo por extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente, o de separación líquido/líquido a partir de un extracto alcohólico inicial (36).

La separación de mezclas complejas de acetogeninas en extractos de plantas de Annonaceae, por su aislamiento, caracterización y evaluación biológica, se ha facilitado debido a los métodos de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Además, la cromatografía en contracorriente ha sido útil para el aislamiento de nuevas acetogeninas. Su identificación cuantitativa es ya algo habitual utilizando

CLAE combinada con la espectrometría de masas (CLAE / MS / MS), siendo estos métodos bastante exitosos en estudios de detección.

Las acetogeninas son compuestos cerosos, no cristalizan con facilidad, por lo tanto, no son fácilmente susceptibles análisis cristalográficos de rayos X, por lo cual se ha desarrollado una combinación de métodos de resonancia magnética nuclear RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  para contribuir a su elucidación estructural (2, 36, 41).

#### 4.1.4. *Annona squamosa*

No se conoce con exactitud el lugar de origen del anón. Antes se creía que era nativo de la India, pero datos históricos y filogenéticos tienden a confirmar que es de origen americano. Probablemente es originario de las regiones tropicales de Centroamérica o las Antillas.

Es la especie más ampliamente distribuida del género *Annona* en el mundo. Se cultiva en la zona tropical de Suramérica, el sur de México, las Bahamas, Bermudas, Puerto Rico, Jamaica, Barbados y en el sur de la Florida (ver Figura 3) (35, 42).



**Figura 3.** Mapa de distribución *Annona squamosa* en el mundo (43).

Las temperaturas medias más convenientes para el crecimiento del anón varían de 10 a 20°C como mínimas y de 22 a 28°C como máximas. Pese a ser propia de climas cálidos es, junto con la chirimoya, la Annonaceae más resistente al frío; sin embargo, cuando la temperatura desciende bajo 0°C produce la muerte de árboles jóvenes.

El anón es poco exigente de la clase de suelos, tolerando suelos pobres, pedregosos y con pH de 7 a 8 de zonas semiáridas; sin embargo, las mejores cosechas se obtienen en suelos fértiles, sueltos y profundos, con pH neutro o ligeramente alcalino y de texturas arenosas o franco arenosas (42).

#### **4.1.4.1. Clasificación Botánica**

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Magnoliales

**Familia:** Annonaceae

**Género:** *Annona*

**Especie:** *Annona squamosa*

#### **4.1.4.2. Fenología**

Es un árbol semicaducifolio de porte bajo o arbusto de 3 a 7 m de altura, con copa esparcida o abierta, formada por ramas que crecen en forma irregular, (ver Figura 4). El árbol presenta un sistema radicular bastante superficial y ramificado, pudiendo originar dos o tres pisos o planos de raíces a diferentes niveles pero poco profundos. El anón se ramifica cerca de la base y posee un tallo con una

corteza externa de color castaño, desde lisa hasta agrietada; la corteza interna es amarillo claro, algo amarga (42).



**Figura 4.** Árbol de *Annona squamosa*

#### **4.1.4.3. Hojas**

Las hojas son sencillas, alternas, elípticas o elíptico-lanceoladas y con margen entero, de 5 a 11 cm de largo por 2 a 5 cm de ancho, subagudas en el ápice, cuneiformes en la base; a veces ligeramente asimétricas; grisáceo-cerosas cuando jóvenes, negruzcas al secarse, verde oscuro en la cara superior, verde-azul pálido en la inferior y lisas en los bordes (ver Figura 5) (42).



**Figura 5.** Hojas de *Annona squamosa*

#### 4.1.4.4. Flores

Las flores son péndulas, axilares, hermafroditas y por lo general solitarias aunque pueden crecer en grupos de dos a cuatro opuestos a las hojas; fragantes y de coloración verde en la parte externa y crema en la parte interna. Presentan seis pétalos en dos series: los externos lineal-oblongos, obtusos, de 1 a 3 cm de largo, carnosos; los pétalos internos son rudimentarios de más o menos 1 mm de largo (42).

#### 4.1.4.5. Frutos

Los frutos son globosos-oviformes, casi de forma acorazonada, de 5 a 12 cm de diámetro y un peso de 200 a 800 g. Es de color verde amarillento pero se conocen variedades de color púrpura, (ver Figura 6). La pulpa es blanca o amarillenta entre la unión de los carpelos, es dulce y aromática, mantecosa, comestible de agradable sabor. Los frutos son del tipo sincarpo formados por numerosos pistilos de una flor; cada escama pertenece a un carpelo fecundado (42).



**Figura 6.** Frutos de *Annona squamosa*

#### 4.1.4.6. Semillas

Las semillas son oblongas, negro-lustrosas o café oscuras, de 1,25 cm de longitud (ver Figura 7), constituyen entre el 31% y el 41% del total del fruto, y contienen entre el 14% y 49% de aceite (42).



**Figura 7.** Semillas de *Annona squamosa*

#### 4.1.4.7. Usos tradicionales

Sus frutos se consumen principalmente frescos ya que tienen un sabor cremoso y dulce; son muy nutritivos, ricos en azúcares, proteínas y fósforo, con una pulpa muy digestiva por lo que se recomienda en la dieta de niños y ancianos, (ver Tabla 8). También se utilizan en postres y en la elaboración de jugos, refrescos, zumos, sorbetes, vinos y helados (42).

**Tabla 8.** Composición nutricional por cada 100 g de pulpa de *Annona squamosa* (29).

<b>Componentes</b>	<b><i>Annona squamosa</i></b>
Agua (g)	72,6
Proteínas (g)	1,6
Lípidos (g)	0,4
Carbohidratos (g)	19,6
Fibra (g)	1,4
Acidez total (g)	0,1

#### Continuación Tabla 8.

Componentes	<i>Annona squamosa</i>
Ceniza (g)	0,7
Energía (calorías)	96,0
Calcio (mg)	26,2
Fósforo (mg)	42,0
Hierro (mg)	0,8
Vitamina A (mg)	0,005
Vitamina B1 (mg)	0,1
Vitamina B12 (mg)	0,13
Vitamina B5 (mg)	0,9
Ácido ascórbico (mg)	37,38

El té obtenido de las raíces sirve como purgante, mientras el que se hace con las hojas es ligeramente laxante. La cáscara, las hojas, los tallos y las semillas contienen fibras, aceites, alcaloides y otros metabolitos los cuales tienen aplicaciones como insecticidas, fungicidas, medicinales e industriales en la fabricación de jabón, con fines comestibles y con un uso limitado en perfumes (2, 23, 31, 42).

#### 4.2. FAMILIA ANNONACEAE EN COLOMBIA

En Colombia, 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 sólo *Raimondia quinduensis* alcanza los 2600 m. Los géneros más diversos encontrados son *Guatteria* (74 especies), *Duguetia* (27 especies), *Annona* (26 especies) y *Xylopia* (22 especies); los restantes géneros tienen menos de 13 especies. De los géneros encontrados en Colombia *Anaxagorea*, *Annona*, *Cananga*, *Duguetia* y *Xylopia* tienen distribución pantropical; mientras que *Diclinanona*, *Froesiodendron*, *Guatteriella*, *Guatteriopsis*, *Ruizodendron* y *Trigynaea* son amazónicos y los restantes géneros son neotropicales, (ver Tabla 9) (26).

**Tabla 9.** Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae de Colombia (26).

<b>Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae de Colombia</b>					
<b>Géneros</b>	<b>Número de especies</b>		<b>Distribución</b>		
	<b>Mundial</b>	<b>Colombia</b>	<b>Pantropical</b>	<b>Neotropical</b>	<b>Amazonía</b>
<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>Rollina</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>Pseudooxandra</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

#### **4.2.1. *Annona squamosa* en Colombia**

Existen varias zonas productoras de anón en Colombia que cuentan con las condiciones agroclimáticas óptimas para el desarrollo de este frutal. El anón se encuentra a lo largo de la Costa Atlántica y en las zonas secas de los valles interandinos en los departamentos de Valle, Caldas, Huila, Tolima, Cundinamarca, Meta y los santanderes, entre los 450 y 1500 msnm (42).

#### **4.3. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Muchos compuestos naturales nuevos son aislados, caracterizados y presentados sin realizarles ninguna prueba biológica. Para un posible desarrollo de dichos compuestos naturales se plantea, como una tecnología de vital importancia, los ensayos biológicos o bioensayos (44, 45).

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología, la cual se ocupa del estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuícolas y terrestres. Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en el terreno o en el laboratorio (46).

Dependiendo de la investigación que se realice, el compuesto se administra de diferentes formas según el tipo de los seres vivos objeto de estudio, el compuesto químico y el objetivo de la investigación. En el caso de animales se puede suministrar una concentración conocida del tóxico vía oral (con la comida), o por medio de una inyección (peritoneal o intravenosa), por contacto o por vía respiratoria. En el caso de vegetales la exposición se puede realizar por contacto o por vía sistémica (penetrando la planta). En las investigaciones con microorganismos o en el medio acuático el tóxico se puede añadir al medio de cultivo o al agua, a una concentración conocida (concentración nominal) (47).

En el diseño del bioensayo se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

**a) Selección y determinación de la condición de los organismos**

Los organismos seleccionados deben mantenerse bajo observación durante un periodo de tiempo determinado con el fin de determinar su buena condición. A su vez, se deben evitar cambios bruscos en las condiciones ambientales que dañen a los organismos durante su manipulación, ya que ambos factores pueden causar el descarte de la población para posteriores experimentos (47).

**b) Réplicas**

Se deben realizar como mínimo tres réplicas de cada tratamiento (dosis de tóxico), lo que permitirá un tratamiento estadístico adecuado. El número de individuos por réplica dependerá de las limitaciones impuestas por las características de los organismos a estudiar (47).

**c) Determinación del efecto**

En la mayoría de los casos se determinará la mortalidad o algún efecto subletal, dependiendo del objetivo del estudio. En la mayoría de las especies es fácil reconocer la muerte de un individuo. Sin embargo, en algunos moluscos, poliquetos o crustáceos inferiores se debe buscar la forma de constatarla. Por ejemplo, en los nauplii de *Artemia salina* (forma larvaria) se determina la muerte cuando el individuo no presenta movimiento alguno durante un lapso determinado de tiempo, unos segundos, puesto que un periodo considerable de tiempo antes de la muerte del individuo se puede percibir algún movimiento si la observación prosigue lo suficiente. Respecto a los aspectos subletales se puede tener en cuenta la conducta, parámetros bioquímicos o cualquier otra característica propia de la especie en estudio (47).

#### d) **Controles**

En cualquier experimento de tipo ecotoxicológico los grupos control, es decir, grupos de organismo no expuestos o tratados con el tóxico, son fundamentales para asegurar que los experimentos se han llevado a cabo correctamente. Los grupos control deben presentar una mortalidad prácticamente nula, ya que si ésta se presenta por encima del 1% es indicativo de que algún factor, además del tóxico en estudio, está afectando los organismos de experimentación, invalidando así los resultados (47).

#### e) **Finalización del bioensayo**

Una vez terminadas las observaciones en cada grupo los datos deberán ser sometidos a un tratamiento estadístico para así determinar las correlaciones de los diferentes parámetros ecotoxicológicos estudiados (47).

#### **4.3.1. Ensayo de actividad biológica con *Artemia salina***

La *Artemia salina* son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz (ver Figura 8); pertenecen al *Phylum Arthropoda*, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de artemia, también llamados “monos de mar” o “brine shrimp” en inglés (48).

Esta especie de crustáceo se encuentra distribuida en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados. Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más.

La *Artemia* es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como

fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos presentando a su vez las siguientes ventajas:

- No hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente.
- Las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario.
- Se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica (49).



**Figura 8.** Nauplios de *Artemia salina*

Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los agentes a evaluar sobre las larvas de *Artemia salina* y de esta manera predecir su capacidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (49).

Las larvas de *Artemia salina* se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos y se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales. El ensayo se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte en el 50% de las

larvas de *Artemia salina* en 24 horas bajo condiciones ambientales determinadas. Esta concentración es conocida como la concentración letal media LC<sub>50</sub> (44, 45).

#### **4.3.2. Ensayo de Actividad Biológica con *Culex quinquefasciatus***

Los mosquitos del grupo *Culex pipiens* Linnaeus (Diptera: Culicidae) se distribuyen a lo largo y ancho de este planeta, principalmente con dos especies: *Culex pipiens*, presente en zonas templadas y *Culex quinquefasciatus*, que habita en regiones tropicales y subtropicales y abarca las isothermas de 20°C; abunda principalmente en América y África tropical, en el medio y lejano Oriente, sur de Asia, Nueva Guinea, Australia y el sur de Estados Unidos.

La especie *Culex quinquefasciatus* es el mosquito del género *Culex* que se encuentra asociado con mayor frecuencia al hábitat humano tanto urbano como rural (ver Figura 9). 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 zonas sombreadas cercanas al ambiente domiciliario. 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 humanas urbanas, tanto así que se les consideran agentes causantes de enfermedades de gran incidencia como la Filariasis linfática y el virus del Nilo (25, 50, 51).

Las acciones para combatir esta y otras especies tradicionalmente se han efectuado con insecticidas organosintéticos, los cuales han ocasionado daños al ambiente, intoxicado a las personas expuestas y desarrollado resistencia. En respuesta a esta problemática se considera necesaria la búsqueda de alternativas con menos riesgo y con bajo costo económico y ambiental, como extractos vegetales; uno de los métodos de control más antiguos de plagas de insectos (52).



**Figura 9.** Larvas de *Culex quinquefasciatus*

#### **4.3.3. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en pruebas de actividad biológica**

El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta de 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 parámetro importante de caracterización denotado como concentración letal media (CL<sub>50</sub>) o dosis letal media (DL<sub>50</sub>). El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado; por ejemplo, 24 horas DL<sub>50</sub>, esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo (53, 54).

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 lo que se llama estadística cuantil; es decir, se deben transformar los valores de respuesta obtenidos en unidades Anglit, Logit o Probit y las dosis suministradas en unidades logarítmicas conocidas como dosis metamétricas (54).

De acuerdo a investigaciones previas realizadas internacionalmente se determinaron cinco criterios de actividad para la clasificación de los extractos que se presentan en la tabla 10, basados en la CL<sub>50</sub>.

**Tabla 10.** Clasificación de la actividad biológica de acuerdo a la CL<sub>50</sub> (ppm) (55)

<b>CL<sub>50</sub> (ppm)</b>	<b>Actividad</b>
CL <sub>50</sub> ≥ 1000	Inactivo
500 ≤ CL <sub>50</sub> < 1000	Medianamente activo
100 ≤ CL <sub>50</sub> < 500	Activo
10 ≤ CL <sub>50</sub> < 100	Muy activo
0 < CL <sub>50</sub> < 10	Altamente activo

#### **4.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

##### **4.4.1. Cromatografía**

La cromatografía es la ciencia de separar entre sí los componentes de una mezcla. La separación se consigue a través de una gran variedad de técnicas cuyas bases moleculares tienen diferencias muy diversas (56).

La elución cromatográfica es el proceso mediante el cual la fase móvil pasa continuamente a través de la fase estacionaria, en la cual se introduce la mezcla en una cantidad conocida. Los diferentes componentes de la mezcla, en función de las diferentes afinidades que presentan por ambas fases, se mueven a diferentes velocidades y eluyen a distintos tiempos. Así, los componentes con mayor afinidad por la fase estacionaria quedarán retenidos durante más tiempo, por lo que tardarán en eluir más que aquellos componentes que presenten menor afinidad por dicha fase. Como consecuencia de esta diferencia de afinidad, los componentes se separan en bandas diferenciadas que, al pasar por el detector, darán una señal que se registrará en forma de bandas o picos. La representación gráfica de la señal obtenida en función del tiempo (o volumen) de elución se denomina cromatograma (56, 57).

#### 4.4.2. Cromatografía en capa delgada (CCD)

La CCD consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de absorbente inerte como sílica gel, alúmina, celulosa o poliamidas (fase estacionaria), retenida sobre una superficie plana que puede ser de vidrio, plástico o metálica. La fase móvil (normalmente un disolvente) se desplaza por la fase estacionaria por acción capilar con ayuda de la gravedad.

La separación de los componentes se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes de ambas fases. Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual lo cual permite su separación e identificación, (58).

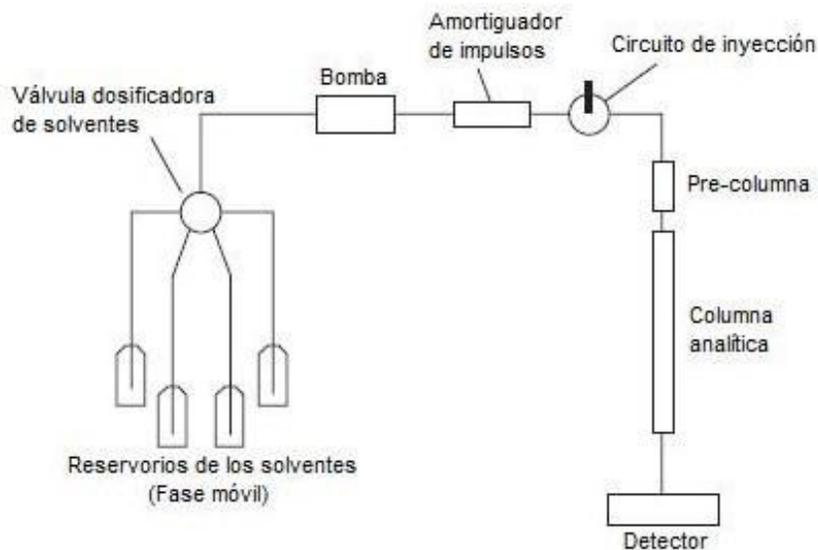
Para los análisis cualitativos, la mancha en una placa de CCD se caracteriza por la distancia que recorre con relación a la distancia recorrida por la fase móvil. El parámetro usado para caracterizar esta relación es lo que se llama factor de retención o índice de retención, abreviado como  $R_f$  (59).

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

#### 4.4.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

La cromatografía líquida (CL) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. En la CL, una muestra es separada en los componentes que la constituyen (analitos) mediante la distribución entre la fase móvil (un líquido que fluye) y la fase estacionaria (un absorbente empaquetado en una columna) (ver Figura 10). Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacciones entre cada uno de estos componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o

la fase estacionaria. Así, el componente con mayor afinidad por la fase estacionaria se retiene más y tarda más en salir de la columna y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes (60).



**Figura 10.** Esquema equipo para cromatografía líquida de alta eficiencia (61).

#### 4.4.3.1. Cromatografía líquida en fase normal

En la cromatografía líquida en fase normal, la fase sólida (estacionaria) es más polar que la fase móvil. Por lo general, como fase estacionaria se utilizan polímeros inorgánicos hidrofílicos polares con un gran número de poros de tamaño molecular tales como la sílice o alúmina microporosas. Como fase móvil se utilizan disolventes no polares o medianamente polares tales como el hexano, *iso*-octano o el diclorometano. Así, 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 y la fase estacionaria polar aumenta también el tiempo de retención. La cromatografía líquida en fase normal es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de gran utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes polares (61, 62).

#### **4.4.3.2. Cromatografía líquida en fase reversa**

En la cromatografía líquida en fase reversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Por lo general, como fase estacionaria se utilizan grupos orgánicos no polares unidos a la sílice tales como  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_8\text{H}_{17}$  y  $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  siendo este último el más utilizado. Como fase móvil se utilizan disolventes polares, principalmente mezclas de diferentes composiciones de metanol-agua o acetonitrilo-agua. Así, el tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía líquida en fase reversa es adecuada para el análisis de solutos polares, medianamente polares y algunos no polares, convirtiéndola así en el modo de CL más utilizado, con más de un 70% en todos los análisis de realizados por esta técnica (59, 62).

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. MUESTRA DE ANÁLISIS**

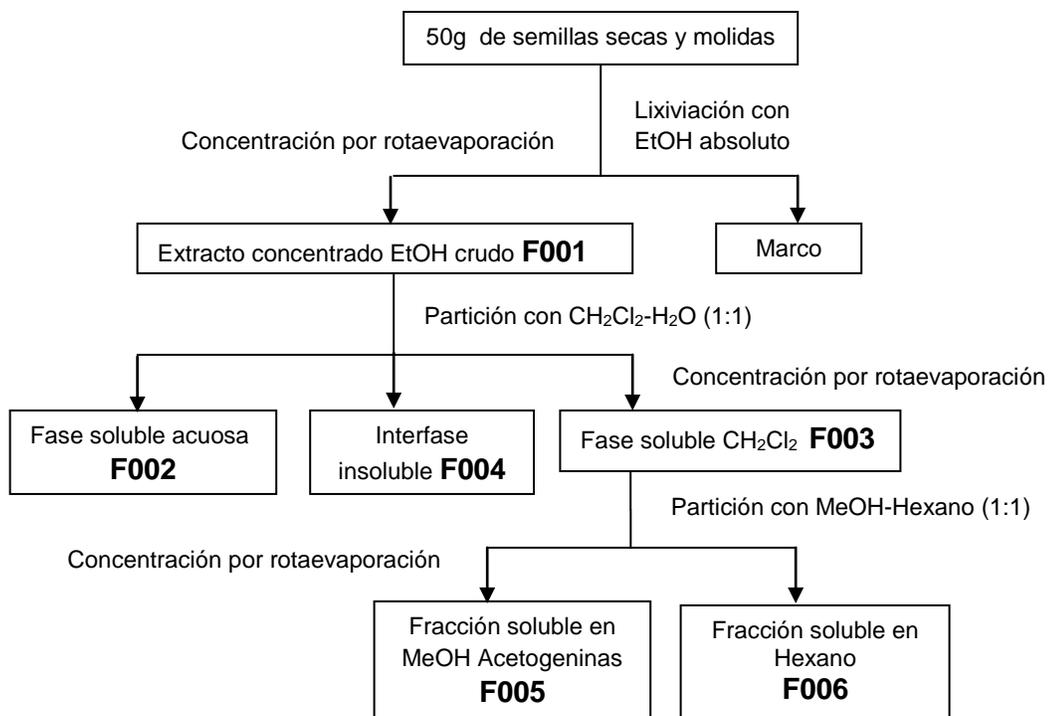
Se emplearon semillas de frutos maduros de *Annona squamosa* procedentes del municipio de Buga, Norte del Valle del Cauca. La clasificación botánica de la planta fue verificada por el Ingeniero Agrónomo Juan Felipe Peña de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal (UNISARC). Las semillas fueron secadas al sol durante 3 días y en estufa a 40°C por 24 horas y posteriormente fueron almacenadas en congelador a -20°C.

### **5.2. PRETRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS**

Las semillas secas fueron pulverizadas en un molino eléctrico de cuchillas y fraccionadas en dos porciones: una se conservó en congelador a -20 °C, y la otra se desengrasó, utilizando hexano como solvente en una relación muestra-solvente de 1:5 (100 g de polvo de semillas y 500 mL de solvente), empleando un equipo de extracción Soxhlet por 10 horas (13). Este procedimiento fue realizado en el laboratorio del Grupo de investigación de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira.

### **5.3. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS**

La extracción de las acetogeninas se realizó por triplicado para ambas porciones de semillas: desengrasadas y sin desengrasar. Se llevó a cabo por agitación, utilizando etanol absoluto como solvente en una relación 1:10 (50 g de polvo de semillas y 500 mL de solvente) y durante una hora, con base en estudios de otros autores (63). Los extractos obtenidos se concentraron en rotaevaporador y se continuó con la separación líquido-líquido según una modificación de la metodología descrita por McLaughlin (Fig. 11) (9). Las fracciones F002, F004 y F006 no fueron tenidas en cuenta a lo largo del estudio.



**Figura 11.** Esquema de extracción de acetogeninas de semillas de *Annona squamosa* (9)

## 5.4. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 5.4.1. Bioensayo preliminar con *Artemia salina*

El ensayo preliminar de la actividad biológica con *Artemia salina*, se realizó siguiendo la metodología descrita por McLaughlin (45) (ver Anexo A). Este procedimiento se repitió cada dos semanas hasta completar cinco seguimientos.

#### 5.4.1.1. Obtención de nauplii de *Artemia salina*

Se preparó una solución salina al 3,7%, pesando 37 g de sal marina y adicionándolos a 1 L de agua destilada. Para la eclosión de las larvas se acondicionó una jabonera plástica como incubadora dejando una zona iluminada y una zona oscura. Se adicionaron alrededor de 40 mg de huevos de *Artemia salina* y se introdujo el recipiente en una estufa a 32°C durante 18 horas. Pasado este tiempo se observó la aparición de los nauplii que posteriormente fueron utilizados en los bioensayos.

#### **5.4.1.2. Preparación de los extractos y análisis de mortalidad**

Se prepararon soluciones madre de 10000 ppm de cada extracto de las fracciones etanólica (F001), diclorometano (F003) y metanólica (F005), obtenidas a partir de las semillas desengrasadas y sin desengrasar de *Annona squamosa*. A partir de las soluciones madre se realizaron diluciones de 1, 5, 9, 10, 100 y 1000 ppm, para evaluarlas por triplicado. Los ensayos se realizaron en viales de vidrio de 5 mL, en estos se adicionó el extracto según la dilución correspondiente y 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), posteriormente se agregaron 2 mL de la solución salina, se depositaron 10 larvas de *Artemia salina* y finalmente se aforó el volumen hasta 5 mL con la solución salina al 3,7%. El conteo de nauplii se llevó a cabo a las 24 horas (45). Paralelamente se utilizó como control negativo 5 mL de la solución salina al 3,7% y como control positivo una solución de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a 200 ppm.

#### **5.4.2. Bioensayo confirmativo con *Culex quinquefasciatus***

El ensayo confirmativo se llevó a cabo con las fracciones que mostraron mayor actividad biológica en el ensayo preliminar. Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá siguiendo una modificación de la metodología descrita por McLaughlin para *Aedes aegypti* (ver Anexo B) (45).

### **5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la determinación de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) los datos obtenidos en ambos ensayos de evaluación de actividad biológica fueron procesados con el programa EPA Probit Analysis Program Versión 1.5.

## **5.6. CARACTERIZACIÓN DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAE**

### **5.6.1. Análisis preliminar por cromatografía en capa delgada (CCD)**

Se realizó el análisis por CCD a todas las fracciones obtenidas de las semillas desengrasadas y sin desengrasar. Para ello, se emplearon placas de silicagel 60 Merck soportadas en aluminio de 2.5 x 7.0 cm. Se utilizó como sistema de elución una mezcla CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1) (13, 25); y como revelador reactivo de Kedde (2).

### **5.6.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de los extractos de semillas desengrasadas de *Annona squamosa***

#### **5.6.2.1. Análisis cualitativo por CLAE**

##### **5.6.2.1.1. Condiciones del análisis por CLAE**

El análisis por CLAE se realizó según una modificación de la metodología descrita por Gromek (64). Se empleó un equipo Jasco HPLC 2000 Plus con las siguientes especificaciones y con las condiciones de análisis presentadas en la tabla 11.

**Bomba:** Jasco PU-2089 Plus

**Detector:** Arreglo de Diodos Jasco MD-2015 Plus

**Automuestreador:** Jasco AS-2059 Plus

**Horno para Columna:** Jasco CO-2065 Plus

**Interfase:** LC-Net II/ADC

**Software:** EZChrom Elite

**Tabla 11.** Condiciones de análisis por CLAE.

<b>Columna</b>	Restek Pinnacle DB C18, 100mm x 3,2mm x 3 $\mu$ m x 140 A°		
<b>Temperatura Columna</b>	40 °C		
<b>Flujo</b>	0,5 mL/min		
<b>Fase móvil</b>	H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN (A-B)		
<b>Gradiente</b>	t (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
	0	30	70
	3	30	70
	12	20	80
	16	20	80
<b>Detector</b>	Arreglo de diodos, $\lambda$ = 200-400 nm		
<b>Tiempo de corrida</b>	16 min		

#### **5.6.2.1.2. Identificación preliminar de acetogeninas Annonaceae por CLAE**

La identificación preliminar de las acetogeninas se realizó según su espectro ultravioleta obtenido por CLAE para cada uno de los picos con el detector de arreglo de diodos (DAD) y la identificación de la bulatacina se llevó a cabo por comparación con el tiempo de retención ( $t_R$ ) del estándar analizado en las mismas condiciones.

#### **5.6.2.2. Análisis cuantitativo por CLAE por el método del estándar externo**

La cuantificación de acetogeninas se hizo por CLAE por el método del estándar externo empleando una curva de calibración de bulatacina en las mismas condiciones de análisis antes descritas, utilizando concentraciones de 30; 50; 100; 300; 500  $\mu$ g/mL, corridas por triplicado.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAE

Las tablas 12 y 13 muestran los rendimientos obtenidos en el proceso de extracción y utilizando las semillas desengrasadas y las semillas sin desengrasar. Para los ensayos llevados a cabo con las semillas sin desengrasar se obtuvo un porcentaje de rendimiento promedio de 22,96% para el extracto etanólico (F001). A partir de éste y después de realizar el proceso de fraccionamiento, se obtuvo un rendimiento promedio del 13,19% para la fracción de diclorometano (F003), lo cual demuestra que el 42% del extracto etanólico quedó en la fase acuosa y que el 58% restante permaneció en la fase de diclorometano. Finalmente, para la fracción metanólica (F005) se obtuvo un rendimiento promedio de 1,13%, lo cual indica que el 91% de la fracción diclorometano quedó en la fracción de hexano y el 9% restante en la fracción metanólica.

Por otro lado, en los ensayos realizados con las semillas desengrasadas se obtuvieron porcentajes de rendimiento promedio más bajos. Para F001 (etanólico) se obtuvo un rendimiento promedio de 10,25%. Para F003 (diclorometano) el valor obtenido fue de 5,88%, lo cual demuestra que el 42% del extracto etanólico quedó en la fase acuosa y el 58% restante en la fase de diclorometano. Finalmente, para la fracción metanólica (F005) el valor obtenido fue de 0,60%, lo cual indica que el 90% de la fracción de diclorometano quedó en la fracción de hexano y el 10% restante en la fracción metanólica.

Los mayores porcentajes de rendimiento obtenidos con las semillas de *Annona squamosa* sin desengrasar pueden atribuirse al aceite o materia grasa presente que sirve como material de reserva (65). También, se deben tener en cuenta otros compuestos tales como aceites esenciales, flavonoides, terpenos y alcaloides que pudieron ser removidos de las semillas desengrasadas, de acuerdo a su polaridad, con el solvente desengrasante (28).

Estudios previos realizados por otros autores con semillas de *Annona muricata* y *Annona cherimolia* reportaron porcentajes de rendimiento promedios más bajos que los obtenidos con semillas de *Annona squamosa*. Para *Annona muricata* se obtuvo un rendimiento promedio de 18,42% para la fracción etanólica y 7,39% para la de diclorometano a partir de semillas sin desengrasar y un rendimiento de 4,62% y 2,31% para las mismas fracciones a partir de semillas desengrasadas (25). Para *Annona cherimolia* se obtuvo un rendimiento de 4,24% y 7,39% para la fracción etanólica a partir de semillas desengrasadas y sin desengrasar respectivamente (13). Estas diferencias pueden atribuirse al método de extracción utilizado en otros estudios previos y a la diferencia en la composición química de las semillas de las tres especies de la familia Annonaceae estudiadas (42, 66, 67).

**Tabla 12.** Rendimientos obtenidos de la extracción y fraccionamiento a partir de las semillas sin desengrasar

Ensayo	Masa Semillas (g)	Masa Fracción F001 (g)	Rendimiento (%)	Masa Fracción F003 (g)	Rendimiento (%)	Masa Fracción F005 (g)	Rendimiento (%)	Total masa (g)
1	50,1179	9,8880	19,73	5,1064	10,19	0,5026	1,00	15,4970
2	50,0732	12,8003	25,56	7,5898	15,16	0,6150	1,23	21,0051
3	50,0156	11,8016	23,60	7,1174	14,23	0,5853	1,17	19,5043
Promedio	50,0689	11,4966	22,96	6,6045	13,19	0,5676	1,13	18,6688

**Tabla 13.** Rendimientos obtenidos de la extracción y fraccionamiento a partir de las semillas desengrasadas

Ensayo	Masa Semillas (g)	Masa Fracción F001 (g)	Rendimiento (%)	Masa Fracción F003 (g)	Rendimiento (%)	Masa Fracción F005 (g)	Rendimiento (%)	Total masa (g)
1	50,0091	3,5212	7,04	2,0183	4,03	0,1868	0,37	5,7263
2	50,0126	6,3920	12,78	3,4433	6,88	0,3632	0,73	10,1985
3	50,0132	5,4703	10,94	3,3718	6,74	0,3454	0,69	9,1875
Promedio	50,0116	5,1278	10,25	2,9445	5,88	0,2985	0,60	8,3708

## 6.2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 6.2.1. Bioensayo preliminar con *Artemia salina*

Para la determinación de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) se utilizaron las tres fracciones (F001, F003, F005) de los extractos obtenidos a partir de las semillas sin desengrasar y desengrasadas. Inicialmente se prepararon concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm, (45); cada concentración se evaluó por triplicado mostrando alta actividad biológica con una mortalidad de las larvas del 100% en todos los extractos, lo cual muestra un valor de  $CL_{50} = 0$ . Por esta razón, se llevó a cabo una variación en las concentraciones preparando soluciones de 9, 5 y 1 ppm, evaluándolas por triplicado, donde no se obtuvo una mortalidad de las larvas de un 100% en todos los extractos.

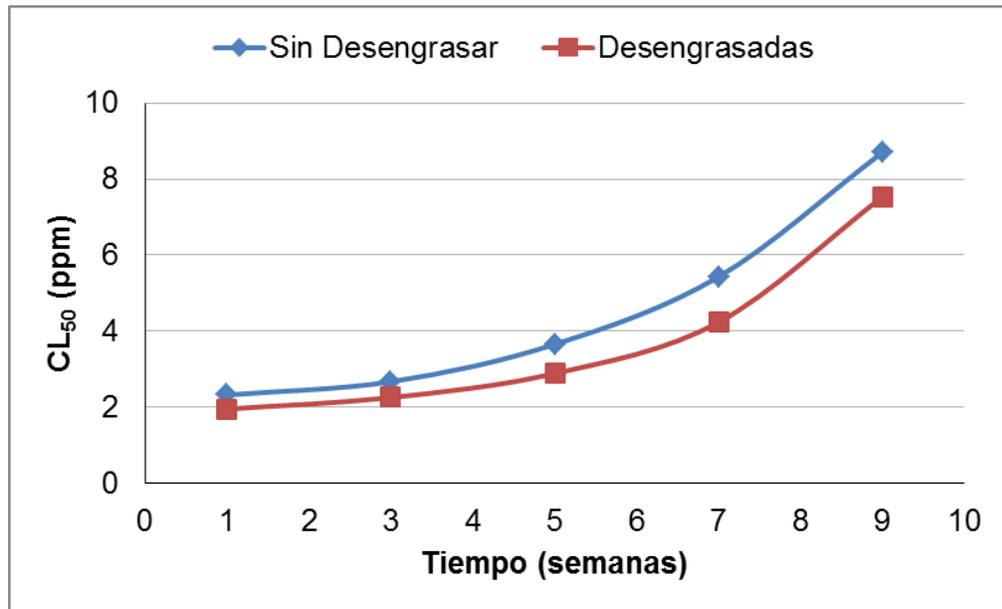
La tabla 14 muestra los resultados del seguimiento de actividad biológica para el bioensayo realizado con nauplii de *Artemia salina* con todas las fracciones. Se encontró que el rango de concentración letal obtenido durante las nueve semanas de seguimiento incluyendo todas las fracciones fue 1,471 – 8,703 ppm, lo cual indica que todos los extractos son altamente activos ( $0 \text{ ppm} < CL_{50} < 10 \text{ ppm}$ ) teniendo en cuenta la información presentada en la Tabla 10.

**Tabla 14.** Valores de concentración letal media ( $CL_{50}$ ) obtenidos en el bioensayo con *Artemia salina* a través del tiempo.

Estado Semillas	Fracción	$CL_{50}$ (ppm) en semanas				
		1	3	5	7	9
Sin Desengrasar	SDF001 (EtOH)	2,330	2,678	3,659	5,435	8,703
	SDF003 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	2,003	2,403	3,138	4,738	7,142
	SDF005 (MeOH)	1,756	2,087	2,590	4,047	6,214
Desengrasadas	DF001 (EtOH)	1,960	2,261	2,893	4,241	7,536
	DF003 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	1,739	2,179	2,788	3,860	5,874
	DF005 (MeOH)	1,471	1,819	2,144	3,695	5,218

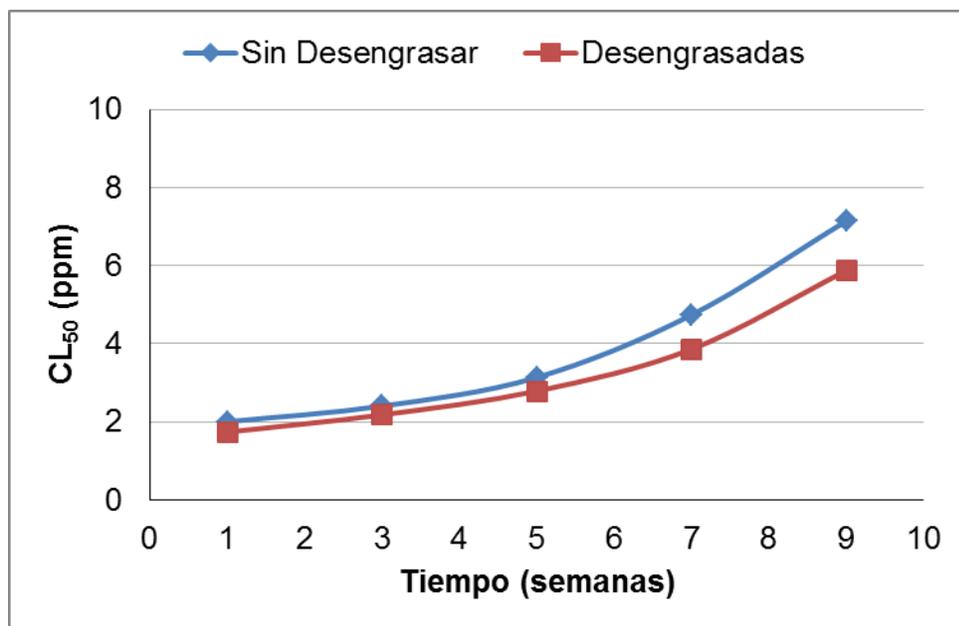


A pesar de tener los valores de  $CL_{50}$  más altos en la novena semana, las fracciones etanólicas siguen siendo altamente activas ( $0 \text{ ppm} < CL_{50} < 10 \text{ ppm}$ ) por lo que habría que realizar un seguimiento más largo para determinar el momento en el que pasan a ser medianamente activas o poco activas.



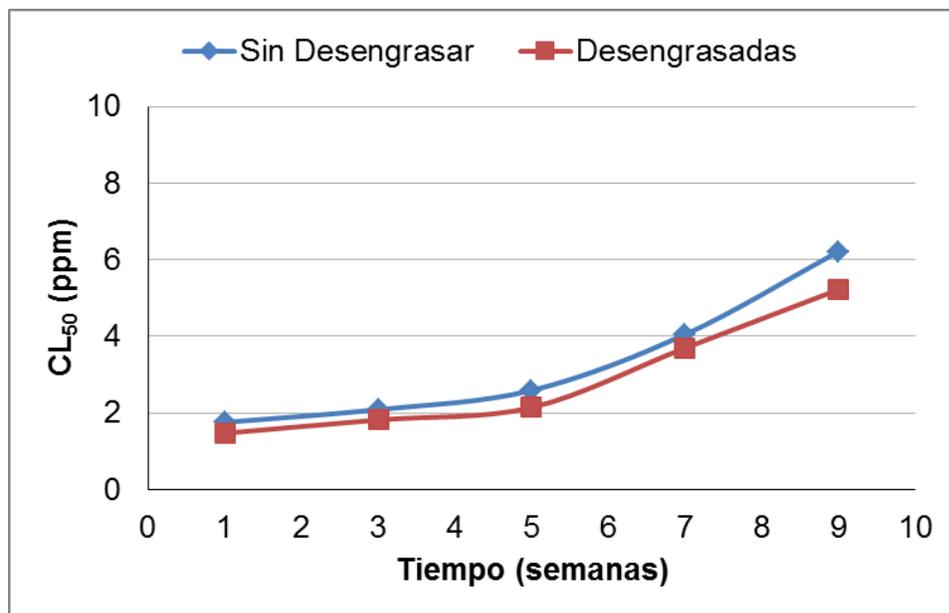
**Figura 12.** Comportamiento de la actividad biológica en el tiempo de la fracción etanólica

En la figura 13 correspondiente a la fracción de diclorometano, las curvas de actividad presentaron la misma tendencia encontrada en las de la fracción etanólica; sin embargo, mostraron una menor pendiente lo que indica una mayor estabilidad de la fracción en términos de letalidad del extracto, alcanzando luego de las nueve semanas de seguimiento, valores de  $CL_{50}$  de 5,874 ppm y 7,142 ppm para las fracciones desengrasadas y sin desengrasar, respectivamente; estos fueron menores a los alcanzados por la fracción etanólica. Al igual que para la fracción etanólica, la fracción de diclorometano desengrasada tuvo menor tendencia a la degradación que la procedente de semillas sin desengrasar.



**Figura 13.** Comportamiento de la actividad biológica en el tiempo de la fracción de diclorometano

Finalmente, en las curvas correspondientes a la fracción metanólica (Fig. 14) se observó un comportamiento similar a las otras dos fracciones en cuanto a la estabilidad de la actividad biológica, presentándose a partir de la quinta semana aumento en la pendiente relacionado con la disminución en la actividad biológica y al llegar a la novena semana de seguimiento se encontraron los valores de  $CL_{50}$  de 5,218 ppm y 6,214 ppm para la fracción desengrasada y sin desengrasar, respectivamente; siendo la fracción desengrasada más estable, es decir, con la menor disminución de la actividad biológica medida como  $CL_{50}$  para *Artemia salina*.



**Figura 14.** Comportamiento de la actividad biológica en el tiempo de la fracción metanólica.

La degradación presentada por todas las fracciones estudiadas permite conferirles el carácter de amigables, ya que al momento de aplicarse como biopesticida no quedarían presentes en el ambiente, evitando así la contaminación que conlleva el uso de pesticidas de origen sintético tal como el Malatión que posee un tiempo de vida media de unos días hasta doce semanas (69), o el DDT (diclorodifeniltricloroetano) el cual es muy persistente en el ambiente teniendo un tiempo de vida media de varios meses hasta veinte años (69).

Otros estudios realizados con extractos de semillas de Annonaceae frente a *Artemia salina* reportan valores significativos de  $CL_{50}$  para la primera semana de seguimiento ( $CL_{50} < 20$  ppm) (13, 25). Las fracciones provenientes de las semillas de *Annona cherimolia* mostraron una tendencia leve a la degradación en el tiempo pero siempre se mantuvieron en el rango de fracciones altamente activas ( $0$  ppm  $< CL_{50} < 10$  ppm) (13). Sin embargo, las fracciones etanólicas provenientes de las semillas de *Annona muricata* presentaron tendencia a la degradación alcanzando un valor máximo de  $CL_{50}$  de 3368,686 ppm convirtiéndose así en una fracción inactiva ( $CL_{50} > 1000$  ppm) (25).

### 6.2.2. Bioensayo confirmativo con *Culex quinquefasciatus*

El bioensayo confirmativo frente a larvas en el IV estadio de *Culex quinquefasciatus* se llevó a cabo con las tres fracciones provenientes de semillas desengrasadas las cuales mostraron los mejores resultados en el bioensayo preliminar con *Artemia salina*.

La tabla 15 presenta los valores de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) obtenidos para las fracciones desengrasadas frente a larvas de *Culex quinquefasciatus* después de 22 y 40 horas de exposición. Las concentraciones que se utilizaron fueron de 5000, 500, 50, 5 y 0,5 ppm, evaluadas por duplicado.

**Tabla 15.** Valores de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) obtenidos en el bioensayo con *Culex quinquefasciatus* para las fracciones etanólica, diclorometano y metanólica

<b>Extracto desengrasado</b>	<b>CL<sub>50</sub> (ppm) 22 h</b>	<b>CL<sub>50</sub> (ppm) 40 h</b>
F001	663,394 (148,100 - 3695,563)	349,060 (21,313 - 2577,625)
F001	705,632 (212,872 - 2475,255)	376,850 (67,649 - 1688,044)
<b>Promedio</b>	<b>684,513 (180,486 - 3085,409)</b>	<b>362,955 (44,481 - 2132,835)</b>
F003	303,088 (68,375 - 2219,635)	186,045 (28,159 - 2901,244)
F003	298,479 (80,413 - 1324,730)	170,025 (38,053 - 1011,249)
<b>Promedio</b>	<b>300,784 (74,394 - 1772,183)</b>	<b>178,035 (33,106 - 1956,247)</b>
F005	122,704 (22,028 - 980,201)	13,438 (0,862 - 88,781)
F005	215,884 (53,942 - 1075,834)	52,715 (8,514 - 332,916)
<b>Promedio</b>	<b>169,294 (37,661 - 1028,018)</b>	<b>33,077 (4,688 - 210,849)</b>



acción, inhibición enzimática y el efecto sobre el sistema nervioso central, respiratorio u otro sistema involucrado como una consecuencia bioquímica del primer mecanismo (1).

Por lo tanto, es factible que la actividad insecticida de los extractos pueda atribuirse a las acetogeninas presentes, cuya acción es la de inhibir a la NADH ubiquinona oxidoreductasa ubicada en el complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria (1, 2, 36, 37, 41, 71). Sin embargo, y según estudios previos realizados por otros autores (14), la actividad insecticida también puede deberse a una interacción o efecto sinérgico de principios activos dada por un complejo alcaloidal benciltetrahidroisoquinoleínico de efectos neurotóxicos.

Los resultados obtenidos en el bioensayo con nauplii de *Artemia salina* y con larvas en el IV estadio de *Culex quinquefasciatus* les confiere a las fracciones etanólica, de diclorometano y metanólica de semillas de *Annona squamosa* potencial como fuente natural de agentes alternativos, para el control de esta plaga (21, 24, 72).

Estudios realizados con diferentes extractos provenientes de semillas de *Annona squamosa* demostraron buena actividad biológica frente a larvas del *Culex quinquefasciatus*. Extractos acuosos al 5, 15 y 25% presentaron mortalidades de 11,7, 15 y 33,6%, respectivamente; con extractos acetónicos al 0,001% y al 0,03% se obtuvieron mortalidades del 71,6 y 80%; mientras que en otro bioensayo realizado con un extracto de éter de petróleo se presentó un valor de  $CL_{50}$  de 436,110 ppm, todos a las 24 horas de exposición (18, 19, 20).

Por otro lado, estudios realizados con las hojas y la corteza de la *Annona squamosa* reportaron valores de  $CL_{50}$  significativos. Así mismo, los extractos etanólicos y metanólicos de hojas obtuvieron valores de  $CL_{50}$  de 6,96 ppm y 17,70 ppm; mientras que con extractos acetónicos, metanólicos y de acetato de etilo provenientes de la corteza de *Annona squamosa* obtuvieron mortalidades del 75, 80 y 82% respectivamente (21, 24). Los resultados obtenidos en estos trabajos

demuestran el potencial que tiene *Annona squamosa* para el control del *Culex quinquefasciatus* siendo considerada por los autores como una alternativa natural importante para el manejo integrado del mosquito.

Otros estudios realizados con extractos de semillas y de hojas de diferentes Annonaceae contra *Culex quinquefasciatus* (13, 23, 25), reportaron valores de CL<sub>50</sub> entre 0,102 ppm hasta 56,47 ppm, los cuales son considerados altamente activos, convirtiendo a las especies de esta familia en miembros promisorios para el control natural de esta plaga.

El control del mosquito *Culex* se lleva a cabo por medio de pesticidas sintéticos, los cuales están hechos a base de piretroides; estos actúan sobre el sistema nervioso de los insectos alterando la transmisión del impulso nervioso, son altamente estables y su degradación se presenta alrededor de los 6 meses (73, 74). Estudios realizados en larvas de *Culex quinquefasciatus* (75, 76) han establecido CL<sub>50</sub> alrededor de 0,0001 y 0,1 ppm para algunos piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina). A pesar del alto valor de CL<sub>50</sub> obtenido para la fracción metanólica (CL<sub>50</sub> = 33,077 ppm) en comparación con los valores presentados por los piretroides, este extracto puede catalogarse como una gran alternativa para el control del mosquito debido al efecto tóxico mostrando y a la degradación progresiva evaluada en el bioensayo preliminar dándole el carácter de amigable con el medio ambiente.

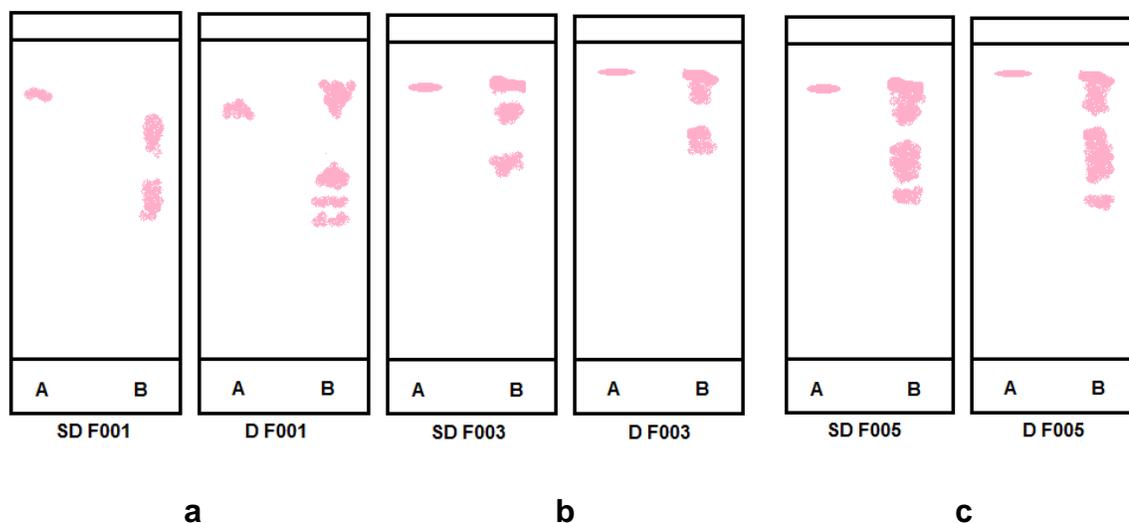
### **6.3. CARACTERIZACIÓN DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAE**

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

El análisis por CCD se realizó a todas la fracciones obtenidas de las semillas de *Annona squamosa* sin desengrasar y desengrasadas. En cada cromatoplaque se llevó a cabo la siembra del estándar de Bulatacina y de los respectivos extractos, la separación se realizó con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1) como sistema de

elución (13, 47) y se reveló con el reactivo de Kedde (2), el cual fue preparado al momento de ser utilizado.

Los resultados obtenidos en el análisis por CCD se esquematizan en la figura 15. (cromatoplasmas originales en Anexo C). Luego de realizar el revelado con el reactivo de Kedde por aspersion se observaron manchas continuas de color rosado a lo largo del carril del extracto. La identificación de las acetogeninas por  $R_f$  no fue posible debido a las manchas rosadas continuas, las cuales demuestran la alta complejidad de estos extractos y la posible presencia de acetogeninas isoméricas de diferentes polaridades. La coloración rosada obtenida en las cromatoplasmas de las tres fracciones estudiadas, indican la posible presencia de acetogeninas con anillo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado (2, 71).



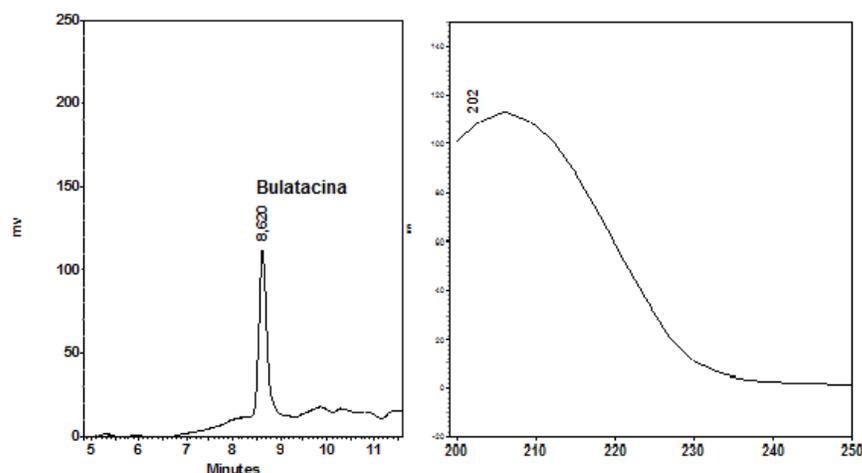
**A:** Estándar; **B:** Extractos; **SD:** sin desengrasar; **D:** desengrasados

**Figura 15.** Esquema cromatoplasmas obtenidas en el análisis por CCD utilizando reactivo de Kedde como revelador

### 6.3.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de los extractos de semillas desengrasadas de *Annona squamosa*

La figura 16 presenta el cromatograma obtenido para el estándar de Bulatacina y el espectro UV de máxima absorción correspondiente. Se obtuvo un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 8,620 minutos y un máximo de absorbancia a 202 nm.

#### 6.3.2.1. Análisis cualitativo por CLAE

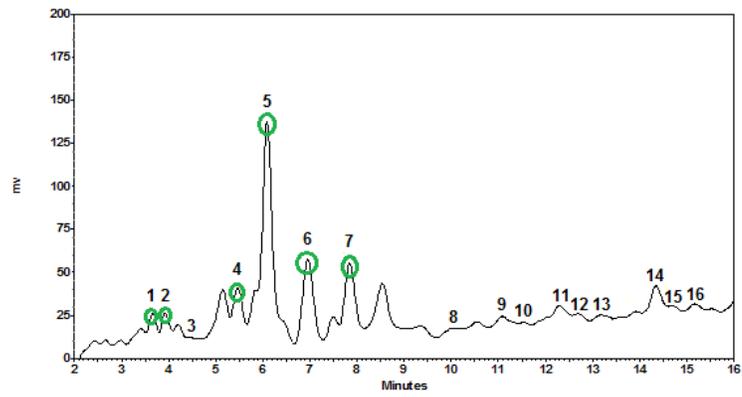


**Figura 16.** Cromatograma y espectro UV del estándar de Bulatacina

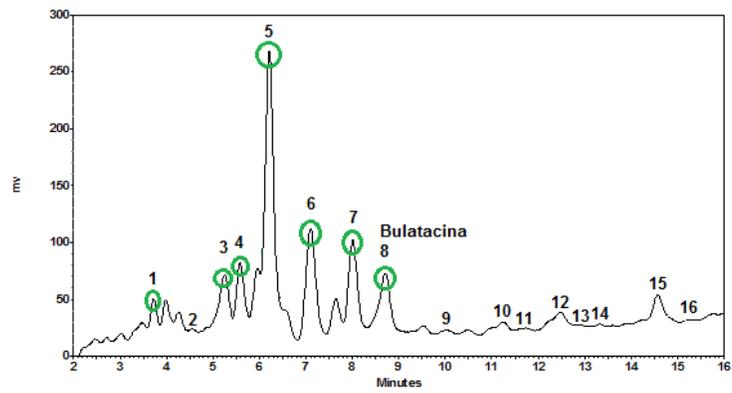
#### 6.3.2.1.1. Identificación preliminar de acetogeninas de Annonaceae

La identificación preliminar de acetogeninas de Annonaceae se llevó a cabo mediante el análisis de los máximos de absorbancia UV para cada pico presente en los cromatogramas obtenidos, teniendo en cuenta que para las acetogeninas de Annonaceae el rango de máxima absorbancia es de 200 nm – 225 nm (72, 77, 78).

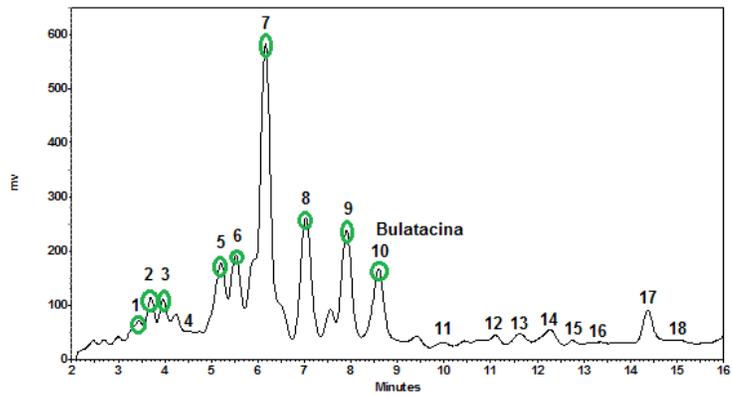
Las figuras 17 a, b y c muestran los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAE para las tres fracciones estudiadas. Se observa una separación cromatográfica aceptable a pesar de la presencia de algunas superposiciones entre los picos, lo cual se podría mejorar utilizando como fase móvil otros sistemas propuestos en estudios previos como metanol-agua o hexano-THF-metanol (2, 32, 37).



**a**



**b**

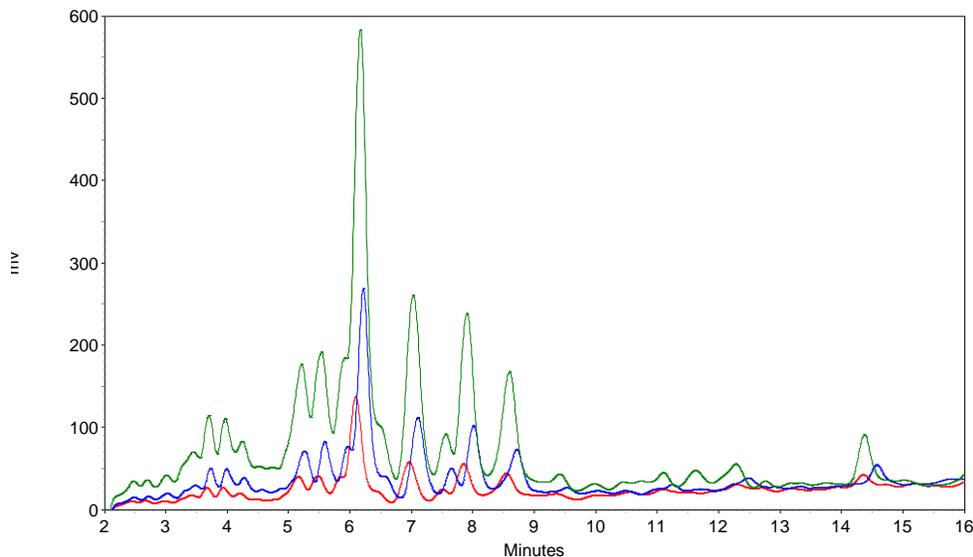


**c**

**Figura 17.** Cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAE. **a.** Fracción etanólica; **b.** Fracción diclorometano; **c.** Fracción metanólica

Luego de realizar el análisis de los máximos de absorbancia UV para capa pico, se evidenció la presencia de seis posibles acetogeninas en la fracción etanólica, los picos 1, 2, 4, 5, 6, 7 (Fig. 17 a); siete posibles acetogeninas en la fracción de diclorometano, los picos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (Fig. 17 b); y nueve posibles acetogeninas en la fracción metanólica, los picos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (Fig. 17 c). La diferencia en el número de acetogeninas encontrada en los tres cromatogramas se atribuye a la baja concentración de los compuestos en la fracción etanólica y de diclorometano; la cual estuvo por debajo del límite de detección (LD= 0,1313 ppm) y no permitió obtener el espectro UV.

La figura 18 presenta una superposición de los cromatogramas en la cual evidencia una gran similitud en los perfiles cromatográficos lo que sugiere la presencia de los mismos compuestos, presentándose sólo variación en la concentración.

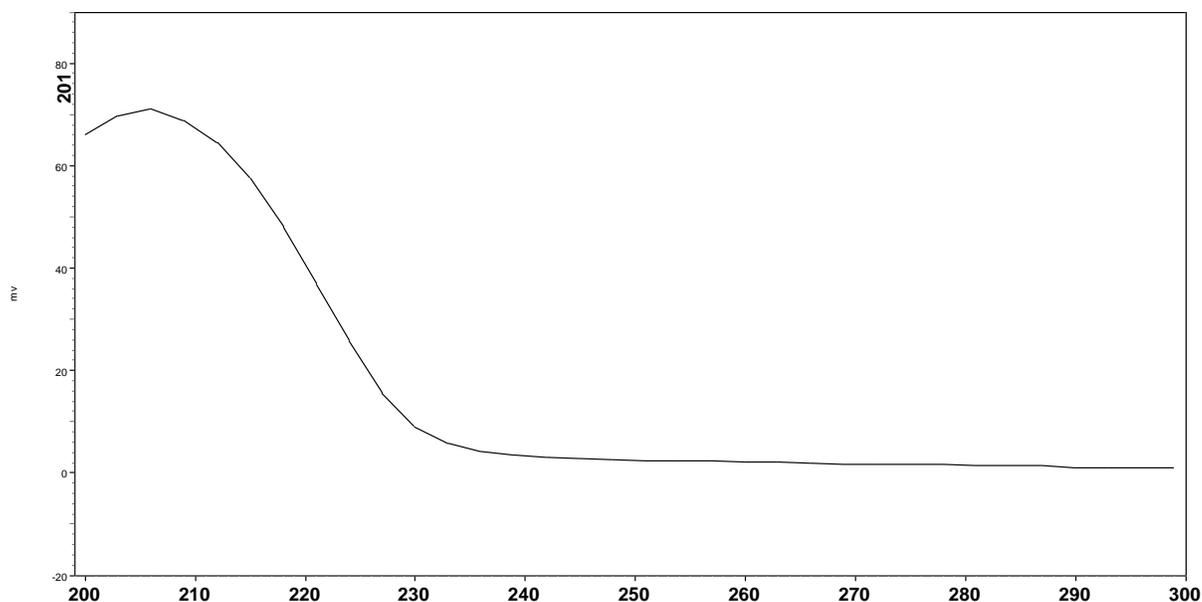


F001: Rojo; F003: Azul; F005: Verde

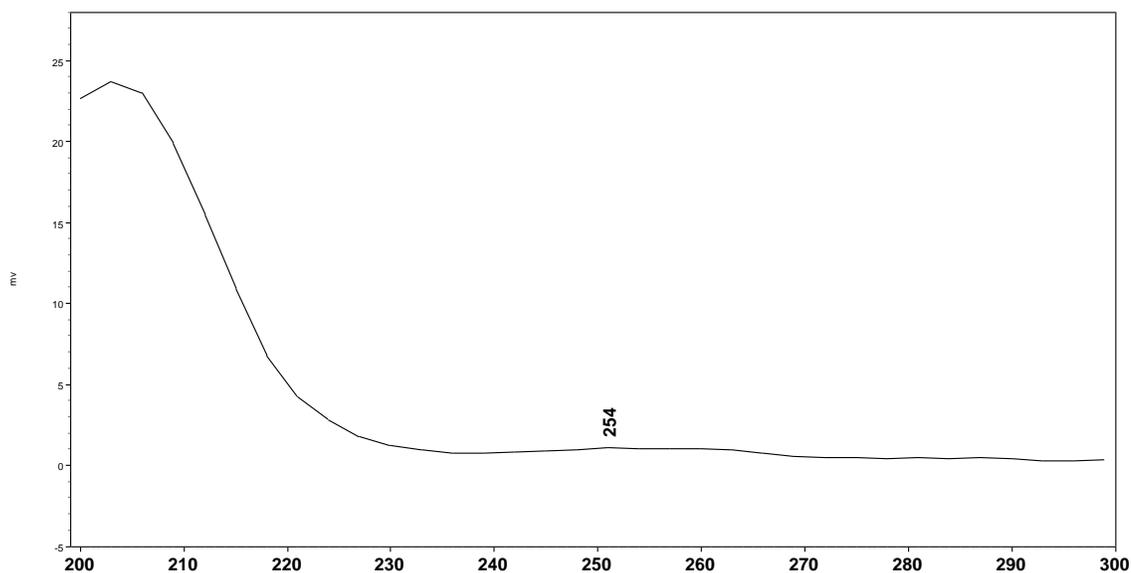
**Figura 18.** Superposición de cromatogramas obtenidos por CLAE, ara las tres fracciones estudiadas

La figura 19 presenta el espectro UV de máxima absorción obtenido para el pico 7 del cromatograma perteneciente a la fracción metanólica el cual corresponde a una posible acetogenina (Fig. 17 c). En el Anexo D se muestran los espectros UV obtenidos para los demás picos.

Los picos restantes presentaron máximos de absorción al UV comprendidos entre 254 nm y 275 nm, pertenecientes probablemente a compuestos del tipo fenólicos (240 nm - 285 nm) (79, 80, 81, 82) y/o alcaloides (225 nm - 295 nm) (79, 83), por lo cual no se tuvieron en cuenta para realizar la cuantificación. La figura 20 muestra el espectro UV de máxima absorción obtenido para uno de los picos que no fue considerado como acetogenina en el cromatograma de la fracción metanólica (Fig. 17 c). El Anexo E muestra los espectros UV obtenidos para los picos restantes.



**Figura 19.** Espectro UV de máxima absorción para el pico 7 del cromatograma de la fracción metanólica que corresponde a una posible acetogenina



**Figura 20.** Espectro UV de máxima absorción para uno de los picos que no fue considerado como acetogenina

Por medio del tiempo de retención y el espectro UV de máxima absorción obtenidos para el estándar de Bulatacina (Fig. 16) se dedujo la posible presencia del compuesto en la fracción de diclorometano y en la metanólica (Fig. 17 b y c). La ausencia de un pico característico para la Bulatacina en el cromatograma de la fracción etanólica (Fig. 17 a) puede atribuirse a una concentración muy baja del compuesto, el cual estuvo por debajo del límite de detección del método (LD= 0,1313 ppm).

Estudios previos han reportado la presencia de mezclas de al menos 39 acetogeninas provenientes de extractos de semillas de *Annona squamosa* (36, 77, 84, 85, 86, 87, 88, 89), lo cual indica la posible aparición de más compuestos en los extractos evaluados. Sin embargo, para establecer con exactitud la clase de compuestos se deben realizar estudios con más estándares o utilizar la técnica analítica de HPLC-MS para la identificación de las acetogeninas presentes en las semillas *Annona squamosa*. La tabla 16 muestra algunas de las acetogeninas aisladas e identificadas en semillas de *Annona squamosa* reportadas hasta la fecha.

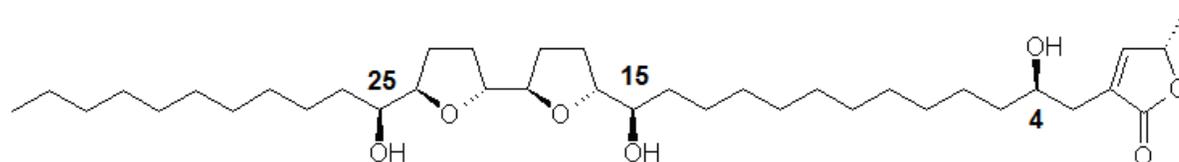
**Tabla 16.** Algunas acetogeninas reportadas de semillas de *Annona squamosa*

<b>Número</b>	<b>Nombre</b>	<b>Tipo</b>	<b>Referencia</b>
1	Annoglaxin	Mono-THF	84
2	Annonacin	Mono-THF	89
3	Annonacin-A	Mono-THF	36, 89
4	Annonastatin	Mono-THF	89
5	Annonin III	Bis-THF Ady	36
6	AnnoninVI	Bis-THF Ady	89
7	Annonin VIII	Bis-THF Ady	86
8	Annonin XIV	Bis-THF Ady	86
9	Annonisilin A	Bis-THF Ady	36
10	Annotemoyin-1	Mono-THF	85, 89
11	Annotemoyin-2	Mono-THF	89
12	Asiminacin (Squamocin-D)	Bis-THF Ady	36, 84
13	Bullatacin (Squamocin-G)	Bis-THF Ady	84
14	Desacetyluvaracin (Squamocin-L)	Bis-THF Ady	84
15	Isoacetyluvaracin	Bis-THF Ady	84
16	Mosin-B	Mono-THF	36
17	Mosin-C	Mono-THF	36
18	Mosinone-A	Mono-THF	36
19	Murisolin	Mono-THF	84
20	Neoannonin	Bis-THF Ady	36, 85
21	Squamocin	Bis-THF Ady	36, 84, 85, 89
22	Squamocin-B	Bis-THF Ady	36
23	Squamocin-D	Bis-THF Ady	36
24	Squamocin-E (Parviflorin)	Bis-THF Ady	36
25	Squamocin-F	Bis-THF Ady	36
26	Squamocin-I	Bis-THF Ady	36
27	Squamocin-K	Bis-THF Ady	36
28	Squamocin-N	Bis-THF Ady	36
29	Squamocin-O1	Bis-THF Ady	36, 77, 89
30	Squamocin-O2	Bis-THF Ady	36, 77, 89
31	Squamostatin-A (Almunequin)	Bis-THF No Ady	36, 84
32	Squamostatin-B (Bullatalicin)	Bis-THF No Ady	88
33	Squamostatin-C (Bullatanocin)	Bis-THF No Ady	88, 89

### Continuación Tabla 16.

Número	Nombre	Tipo	Referencia
34	Squamostatin-D	Bis-THF No Ady	36, 88, 89
35	Squamostatin-E	Bis-THF No Ady	36, 88
36	Squamosten-A	Mono-THF	87, 89
37	Squamoxinone-B	Mono-THF	36
38	Squamoxinone-C	Mono-THF	36
39	Reticulacin-1	Mono-THF	89

Entre las acetogeninas presentes en las semillas de *Annona squamosa* se encuentra la Bulatacina (84). Debido a que su estructura presenta dos núcleos tetrahidrofurano (THF) adyacentes y tres grupos hidroxilo en los carbonos 4, 15 y 25 (ver Fig. 21), es considerada como uno de los compuestos con mayor actividad biológica dentro de las acetogeninas de Annonaceae (30, 45, 71).



**Figura 21.** Estructura de la Bulatacina

En cromatografía líquida en fase reversa los compuestos polares eluyen más rápidamente que las moléculas con carácter medianamente polar o poco polar. Por lo tanto, sería de esperarse que las posibles acetogeninas que poseen tiempos de retención más bajos que la Bulatacina, y que no se evidenciaron por falta de más estándares, presenten una cantidad mayor de grupos hidroxilo (OH) en su estructura otorgándoles un carácter más polar originando así su elución anticipada.

### 6.3.2.2. Análisis cuantitativo por CLAE por el método del estándar externo

La tabla 17 presenta las concentraciones y las áreas obtenidas para cada patrón utilizado en la elaboración de la curva de calibración para el estándar de Bulatacina. A partir de estos datos se realizó la cuantificación de acetogeninas.

**Tabla 17.** Datos de la curva de calibración realizada para el estándar de Bulatacina

Patrón	Cantidad (µg)	Área	Desviación estándar (SD)	% Desviación estándar relativa (%RSD)	Estándar externo (ppm)
1	0,3	887.599	95.438,9	9,59	30
2	0,5	1.635.947	202.370,0	12,37	50
3	1,0	3.159.335	169.331,0	5,36	100
4	3,0	9.541.943	499.304,0	5,23	300
5	5,0	14.947.822	88.520,7	0,59	500

La curva de calibración obtenida presentó la ecuación  $y = 30449,5x + 0,00000$  con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,998155$ , el cual indica una buena linealidad y por lo tanto una alta confiabilidad en los resultados. La desviación estándar (DS) del método fue **1332,50** y los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) fueron **0,1313 ppm** y **0,4376 ppm**, respectivamente, indicando una buena exactitud y precisión para la identificación y cuantificación de las acetogeninas (89) (ver Anexo F).

Las tablas 18, 19 y 20 presentan los resultados de la cuantificación de acetogeninas de Annonaceae realizada por el método del estándar externo. En estas se evidencia que las tres fracciones estudiadas estaban constituidas por una mezcla de posibles acetogeninas, entre ellas la Bulatacina a concentraciones de 128 ppm y 213 ppm en la fracción de diclorometano y metanólica, respectivamente (Ver Tabla 18 y 19 en verde). También se observó un aumento progresivo en la cantidad y en la concentración de las posibles acetogeninas lo cual indica que

durante la partición líquido-líquido realizada no hubo pérdidas importantes, sólo se concentraron en la fracción metanólica aquellas posibles acetogeninas que estaban presentes en la fracción etanólica y en la de diclorometano. Finalmente, de la tabla 20 se infiere que en un mL de extracto metanólico de semillas de *Annona squamosa* estaban presente un total de 1745 µg de acetogeninas de Annonaceae, lo que equivale al 79,5% del contenido del extracto metanólico.

**Tabla 18.** Análisis cromatográfico por CLAE de la fracción etanólica desengrasada de semillas de *Annona squamosa*, método del estándar externo

# Pico	Tiempo de retención (min)	λ máxima (nm)	Área	Estándar externo (ppm)
1	3,667	202	2'108.524	65
2	4,193	202	2'113.410	66
4	5,460	201	2'466.507	77
5	6,093	204	7'555.547	246
6	6,960	201	3'593.681	115
7	7,840	201	2'936.303	93

**Tabla 19.** Análisis cromatográfico por CLAE de la fracción de diclorometano desengrasada de semillas de *Annona squamosa*, método del estándar externo

# Pico	Tiempo de retención (min)	λ máxima (nm)	Área	Estándar externo (ppm)
1	3,727	201	2'093.237	65
3	5,253	203	5'063.851	164
4	5,580	201	2'703.520	85
5	6,213	204	9'251.238	303
6	7,100	201	4'026.665	129
7	8,007	202	3'098.825	98
8	8,707	200	3'975.479	128

**Tabla 20.** Análisis cromatográfico por CLAE de la fracción metanólica desengrasada de semillas de *Annona squamosa*, método del estándar externo

# Pico	Tiempo de retención (min)	$\lambda$ máxima (nm)	Área	Estándar externo (ppm)
1	3,447	201	3'788.616	121
2	3,700	203	3'019.340	96
3	3,960	203	3'034.480	96
5	5,213	203	6'051.520	197
6	5,533	201	4'667.593	151
7	6,173	204	13'950.346	459
8	7,027	201	6'864.654	224
9	7,907	203	5'789.376	188
10	8,593	202	6'453.544	213

## 7. CONCLUSIONES

- Se comprobó el efecto citotóxico de los extractos polares de semillas de *Annona squamosa* frente a los nauplii de *Artemia salina* y la acción insecticida de las larvas en el IV estadio del *Culex quinquefasciatus*.
- El método propuesto para la extracción de acetogeninas presentes en las semillas de *Annona squamosa* presentó resultados satisfactorios para el desarrollo de la investigación.
- Todos los extractos provenientes de semillas de *Annona squamosa* evaluados en el bioensayo preliminar con *Artemia salina* presentaron gran actividad biológica en el tiempo con un rango de CL<sub>50</sub> entre 1,471 y 8,703 ppm.
- A pesar de la tendencia a la degradación presentada por los extractos en el bioensayo preliminar con *Artemia salina* se evidenció una letalidad alta durante las nueve semanas de seguimiento.
- El bioensayo con larvas en el IV estadio de *Culex quinquefasciatus* mostró que la fracción metanólica presentó mayor poder larvicida con un valor de CL<sub>50</sub> de 33,077 ppm para las 40 horas de exposición.
- A través del análisis realizado por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con el detector de arreglo de diodos (DAD) se evidenció y cuantificó la posible presencia de acetogeninas en los extractos analizados de semillas desengrasadas de *Annona squamosa* por el método del estándar externo, entre las cuales se identificó de manera preliminar la Bulatacina.

## 8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de actividad biológica frente a *Artemia salina* con un seguimiento en el tiempo más amplio con el fin de determinar el momento en el que los extractos pierden su letalidad.
- Realizar estudios de actividad biológica frente *Culex quinquefasciatus* con mayores tiempos de exposición para establecer las curvas de letalidad en función del tiempo y obtener la mayor efectividad de los extractos con respecto a esta variable.
- Realizar el análisis de los extractos utilizando análisis de HPLC-MS para la identificación y cuantificación de acetogeninas presentes en las semillas *Annona squamosa*.
- Utilizar otros organismos en el bioensayo confirmativo con el propósito de proponer los extractos de semillas de *Annona squamosa* como alternativa para el control natura de otras plagas.
- Realizar el estudio de actividad biológica frente a *Culex quinquefasciatus* con extractos provenientes de otras partes de la planta tales como tallo, raíces, hojas, con el fin de aprovechar otros subproductos como fuente de ingredientes activos para el control natural de plagas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. MORALES, C.; GONZÁLEZ, R.; ARAGON, R. Evaluación de la actividad larvívica de extractos polares y no polares de acetogéninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Revista colombiana de Entomología, 30: 187-192 (2004)
2. ALALI, F.; LIU, X.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. Journal of Natural Products, 62: 504-540 (1999)
3. ARAYA, H.; SAHAI, M.; SINGH, S.; SINGH, A.K.; YOSHIDA, M.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Squamocin-O1 and squamocin-O2, new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Phytochemistry, 61: 999–1004 (2002)
4. OBERLIES, N.H.; JONES, J.L.; CORBETT, T.H.; FOTOPOULOS, S.S.; McLAUGHLIN, J.L. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an *in vitro* disk diffusion assay. Cancer Letters, 96: 55-62 (1995)
5. AHAMMADSAHIB, K.I.; HOLLINGWORTH, R.M.; McGOVREN, J.P.; HUI, Y.; McLAUGHLIN, J.L. Mode of action of Bullatacin: a potent antitumor and pesticidal Annonaceous acetogenin. Life Sciences, 53: 1113-1120 (1993)
6. BORIES, C.; LOISEAU, P.; CORTÈS, D.; MYINT, S.H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P.; CAVÉ, A.; LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. Plant Med., 57: 434-436 (1991)
7. SAHPAZ, S.; BORIES, Ch.; LOISEAU, P.M.; CORTÈS, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. Plant Med., 60: 11-13 (1994)
8. McLAUGHLIN, J.L.; ZENG, L.; OBERLIES, N.H.; ALFONSO, D.; JOHNSON, H.A.; CUMMINGNS, B.A. Annonaceous acetogenins as new natural pesticides: Recent progress. Phytochemical for Pest Control, 117-133 (1997)

9. RATNAYANKE, S.; RUPPRECHT, J.; POTTER, W.M.; McLAUGHLIN, J.L. Evaluation of the pawpaw tree, *Asimina triloba* (Annonaceae), as a commercial source of the pesticidal annonaceous acetogenins. *Journal of Economic Entomology*, 85: 644-648 (1992)
10. LEÓN, J. Botánica de los cultivos tropicales. 3ª Edición. Editorial Agroamericana de IICA., 50 (2000)
11. BETANCUR, L.A.; SAEZ J.; GRANADOS H.; SALAZAR A.; OSSA J.E. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 531-535 (1999)
12. HINCAPIÉ, C.A.; LOPERA, D.; CEBALLOS, M. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Annonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34: 76-82 (2008)
13. CASTRO, L.M.; ALZATE, M. Estudio preliminar de la actividad biológica de extractos de *Annona cherimolia* Mill. Tesis de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. (2008)
14. BOBADILLA, M.; ZAVALA, G.; FRANCO, F.; POLLACK, L.; SISNIEGAS, M. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Mill. "chirimoya" y *Annona muricata* Linneus "guanábana" sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. *Revista Peruana de Biología*, 9: 64-73 (2002)
15. ROBLEDO, P.C.; GONZÁLEZ, R.; JARAMILLO, J.I.; RESTREPO, J. Evaluación de la toxicidad de acetogeninas Annonaceae sobre ninfas de *Periplaneta americana* L. (Dictyoptera:Blattidea). *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 9: 54-61 (2008).
16. CRAIG, D.; ALALI, F.Q.; GU, Z.; McLAUGHLIN, J.L. Three new bioactive Bis-adjacent THF-ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6: 569-575 (1998)
17. LEATEMIA, J.A. Development of a botanical insecticide from Ambon and surrounding areas (Indonesia) for a local use. Tesis de grado PhD. University of British Columbia. (2003)

18. PÉREZ-PACHECO, R.; RODRÍGUEZ, C.; LARA-REINA, J.; MONTES, R.; RAMÍREZ, G. Toxicidad de esencias, aceites y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *Acta zoológica mexicana* (n.s), 20: 141-152 (2004)
19. MEHRA, B.K.; HIRADHAR, P.K. Effect of crude acetone extract of seeds of *Annona squamosa* Linn. (Family: Annonaceae) on possible control potential against larvae of *Culex quinquefasciatus* Say. *Journal of Entomological Research*, 24: 141-146 (2000)
20. GEORGE, S.; VINCENT, S. Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes. *Journal of vector borne diseases*, 42: 159–163 (2005)
21. DAS, N.G.; GOSWAMI, D.; RABHA, B. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. *Journal of vector borne diseases*, 44: 145-148 (2007)
22. SAKTHIVADIEL, M.; DANIEL, T.; Evaluation of certain insecticidal plants for the control of vector mosquitoes viz. *Culex quinquefasciatus*, *anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Appl. Entomol. Zool.*, 43: 57-63 (2008)
23. MAGADULA, J.J.; INNOCENT, E.; OTIENO, J.N. Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 674-680 (2009)
24. KAMARAJ, C.; ABDUL RAHUMAN, A.; BAGAVAN, A.; ABDUZ ZAHIR, A.; ELANGO, G.; KANDAN, P.; RAJAKUMAR, G.; MARIMUTHU, S.; SANTHOSHKUMAR, T. Larvicidal efficacy of medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Tropical Biomedicine*, 27: 211-219 (2010)
25. FLÓREZ, Y.; MARTÍNEZ, E. Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. Tesis de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. (2010)
26. MURILLO, J. Las Annonaceae de Colombia. *Biota Colombiana*, 2: 49-58 (2001)

27. WILLIAMS, L.H. Anatomía xilemática de 26 especies de la familia Annonaceae en Venezuela. *Revista forestal venezolana*, 51: 165-177 (2007)
28. GONZÁLEZ, A.R. La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Revista Ciencia y Tecnología en la Frontera*, 3: 41-52 (2005)
29. OCAMPO, D.M.; BETANCUR, L. A.; ORTIZ, A.; OCAMPO, R. Estudio cromatográfico comparativo de los ácidos grasos presentes en semilla de *Annona cherimolioides* y *Annona muricata* L. *Revista Vector*, 2: 103-112 (2007)
30. RUPPRECHT, J.K.; HUI, Y.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products*, 53: 237-278 (1990)
31. PINTO, A.C. de Q.; CORDEIRO, M.C.; ANDRADE, S.R.; FERREIRA, F.R.; FILGUEIRAS, H.A. de C.; ALVES, R.E.; KINPARA, D.I. *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops. University of Southampton. Southampton, UK. 37-38 (2005)
32. HOPP, D.C.; ALALI, F.Q.; GU, Z-M.; McLAUGHLIN, J.L. Three new bioactive bis-adjacent THF-ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6: 569-575 (1998)
33. SPURR, I.B.; BROWN, R.C.D. Total synthesis of annonaceous acetogenins belonging to the non-adjacent bis-THF and non-adjacent THF-THP subclasses. *Molecules*, 15: 460-501 (2010)
34. KIM, G-S.; ZENG, L.; ALALI, L.; ROGERS, L.L.; WU, F-E.; SASTRODIHARDJO, S.; McLAUGHLIN, J.L. Muricoreacin and murihexocinc, mono tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, 38: 454-460 (1998)
35. DE CÁSSIA, R.; SHIKANO, I.; AKHTAR, Y.; ISMAN, M. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*, 29: 20–24 (2010)
36. 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.*, 22: 269-303 (2005)

37. ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N.H.; SHI, G.; GU, Z.-M.; HE, K.; McLAUGHLIN, J.L. Recent advances in annonaceous acetogenins. *Natural Product Reports*, 13: 275-306 (1996)
38. HOPP, C.; ALALI, F.Q.; GU, Z.-M.; McLAUGHLIN, J.L. Mono-THF ring Annonaceous acetogenins from *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, 47: 803-809 (1998)
39. ZHAO, G.-X.; CHAO, J.-F.; ZENG, L.; RIESER, M.J.; McLAUGHLIN, J.L. The absolute configuration of adjacent bis-THF acetogenins and asimincin, a novel highly potent asimincin isomer from *Asimina triloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4: 25-32 (1996)
40. SINHA, S.C.; SINHA, A.; SINHA, S.C.; KEINAN, E. Total synthesis of goniocin and cyclogoniocin. Unique biosynthetic implications. *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 4017-4018 (1998)
41. McLAUGHLIN, J.L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *J. Nat. Prod.*, 71: 1311–1321 (2008)
42. FISCHER, G.; GUERRERO, E. Manejo integrado en el cultivo del anón (*Annona squamosa* L). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1: 154-169 (2007)
43. ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; SIMONS A. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (2009). (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>)
44. MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34 (1982)
45. McLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32: 513-524 (1998)
46. SILVA, J.; TORREJON, G.; BAY-SCHMITH, E.; LARRAIN, A. Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (crustacea: cladocera) usando un tóxico de referencia. *Gayana (Concepc.)*, 67: 87-96 (2003)
47. SERRANO, R. Introducción al análisis de datos experimentales: Tratamiento de datos en bioensayos. *Castello de la Plana: Universitat Jaume I, D.L.*, 2: 147-150 (2003)

48. SCHMIDT, R. Optical motility test for the detection of trichothecenes using Brine shrimp. *Mycotoxin Res.*, 1: 25-29 (1985)
49. PINO, O.; LAZO, F. Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.*, 22: 34-43 (2010)
50. SALAZAR, M.J.; MONCADA, L. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá, *Biomédica*, 24: 386-387 (2004)
51. MUÑOZ, L.O.; IBÁÑEZ, S. y CORONA, M.C. Los mosquitos (Diptera: Culicidae) de Tlaxcala, México. Lista comentada de especies, *Folia Entomol. Mex.*, 45: 223-224 (2006)
52. PEREZ, R.; RODRIGUEZ, C.; LARA, J.; MONTES, R.; RAMIREZ, G. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 20: 141 -152 (2004)
53. RAMÍREZ, J.A.; LACASAÑA, M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor.*, 4: 67-75 (2001)
54. 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*, 12: 1-6 (2003)
55. SÁNCHEZ, L.; NEIRA, A. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. *Sw. Cultura Científica*, 3: 40-45 (2005)
56. SIERRA, I.; PÉREZ, D.; GÓMEZ, S.; MORANTE, S. Análisis instrumental. Netbiblio, S.L. La Coruña, España. Pp. 143 (2010)
57. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. Principios de Análisis Instrumental. 6ª edición. Cengage learning editores. México. pp. 762-763 (2008)
58. SHARAPIN, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello. Colombia. pp. 161-163 (2000)

59. RUBINSON, K; RUBINSON, J. Análisis Instrumental. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 584-586 (2001)
60. QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA DE ANDRIZZI, S.; LABA, R. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Buenos Aires, Argentina. pp. 5-10, 89-266 (1992)
61. HARVEY, D. Modern analytical chemistry. Primera edición. McGraw-Hill. U.S.A. pp. 579-590 (2000)
62. DONG, M.W. Modern HPLC for practicing scientists. John Wiley & sons, Inc. United States of America. pp.1-2 (2006)
63. CARULLA J.E.; LASCANO C.E.; KLOPFENSTEIN T. Reduction of taninns level in tropical legumes (*Desmodium ovalifolium*) with polyethylene glycol (PEG): effects on intake and N balance, digestion and absorption by sheep. Archives Latin-American's of Production Animal, 9: 17-24 (2001)
64. GROMEK, D.; HOCQUEMILLER, R; CAVÉ, A. Qualitative and quantitative evaluation of annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. Phytochemical. Analysis, 5: 133–140 (1994)
65. LEBOEUF M.; CAVE A.; BHAUMIK P.K.; MUKHERJEE B.; MUKHERJEE R. The phytochemistry of the Annonaceae. Phytochemistry, 21: 2783-2813 (1980)
66. ONIMAWO, I.A. Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of soursop (*Annona muricata*). Plant Foods for Human Nutrition, 57: 165-171 (2002)
67. AMOO, I.A.; EMENIKE A.E.; AKPAMBANG, V.O.E. Compositional evaluation of *Annona cherimoya* (Custard apple) fruit. Trends in applied sciences research, 3: 216-220 (2008)
68. SHI, G.; MAcDOUGAL, J.M.; McLAUGHLIN, J.L. Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia Mucosa*. Phytochemistry, 45: 719-723 (1997)
69. RAMÍREZ, J. A.; LACASAÑA, M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch Prev Riesgos Labor, 4: 67-75 (2001)

70. HERNÁNDEZ, J.E.; TENORIO J.L.; ROJAS, C.M.; VALLEJO, G.A. Evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos etanólicos de *Rollinia rufinervis* sobre *Leishmania chagasi*. *Vitae*, 12: 37-43 (2005)
71. ZAFRA-POLO, M.C.; FIGADERE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J.R.; CORTES, D. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*, 48: 1087-1117 (1998)
72. GU, Z-M.; ZHOU, D.; LEWIS, N.J.; WU, J.; JOHNSON, H.A.; MCLAUGHLIN, J.L.; GORDON, J. Quantitative evaluation of annonaceous acetogenins in monthly samples of Paw Paw (*Asimina triloba*) twigs by liquid chromatography/electrospray ionization/ tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 10: 32–38 (1999)
73. ORTIZ, M.; YAÑEZ, L.; DIAZ, 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. pp. 39.
74. PALOMINO, M.; LEON, W.; VALENCIA, P.; CARDENAS, F.; ANCCA, J. Evaluación de campo del efecto residual de la Deltametrina sobre la mortalidad y knockdown en *Triatoma infestans*, según tipo de superficie en Arequipa, Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 24: 136-143 (2007)
75. 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*, 52: 180-185 (2000)
76. 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*, 50: 133-137 (1998)
77. ARAYA, H.; SAHAI, M.; SINGH, S.; SINGH, A.K.; YOSHIDA, M.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Squamocin-O1 and squamocin-O2, new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, 61: 999–1004 (2002)

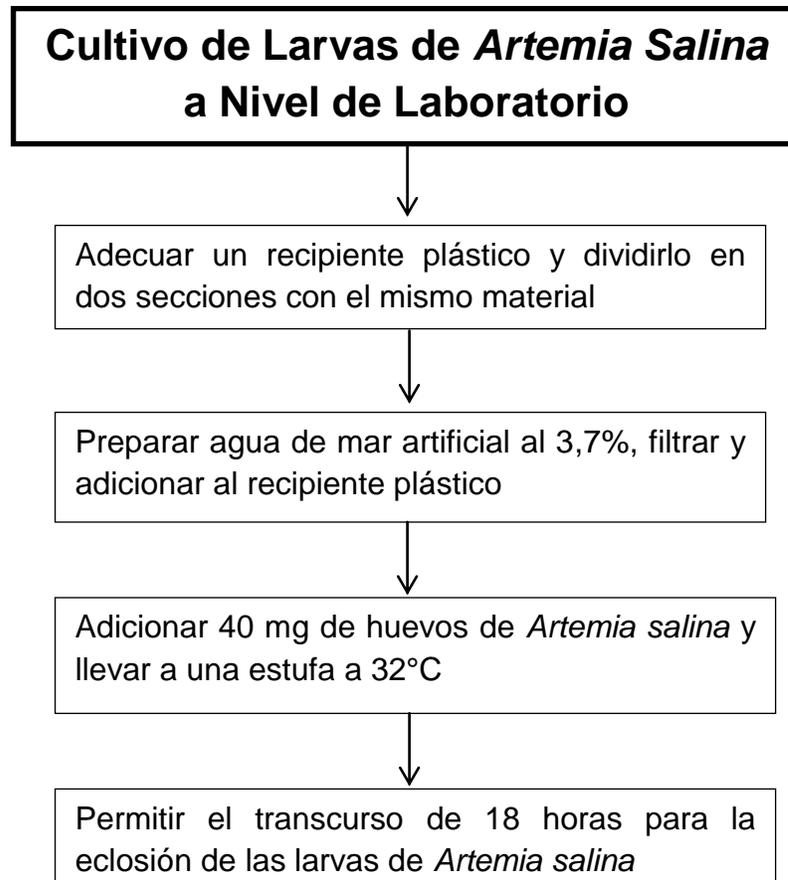
78. LIAW, C-C.; CHANG, F-R.; CHEN, S-L.; WU, C-C.; LEE, K-H.; WU, Y-C. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona Montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 4767-4776 (2005)
79. MOSQUERA, Oscar. Características espectroscópicas de algunas funciones orgánicas. Universidad Tecnológica de Pereira. (1991)
80. MARCANO, D.; HASEGAWA, M. Fitoquímica orgánica. Segunda edición. Editorial Torino. Universidad Central de Venezuela. pp.143-145 (2002)
81. AVALOS, K.R.; SGROPPO, S.C.; AVANZA, J.R. Actividad antioxidante y contenido en fenoles totales en vinos de origen nacional. *Facena*, 19: 11-19 (2003)
82. GUTIERREZ, Y.; MIRANDA, M.; HENRIQUES, A.; DEL BARRIO, G. Análisis de flavonoides en una fracción butanólica obtenida de *Phyllanthus orbicularis* HBK. *Rev Cubana Farm.*, 44: 367-373 (2010)
83. ARANGO, G. J. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Monografía. Universidad de Antioquia. Colombia. pp. 55, 67 (2002)
84. YANG, H.; ZHANG, N.; ZENG, Q.; YU, Q.; KE, S.; LI, X. HPLC method for the simultaneous determination of ten annonaceous acetogenins after supercritical fluid CO<sub>2</sub> extraction. *International journal of Biomedical science*, 6: 202-207 (2010)
85. CASTILLO-SÁNCHEZ, L.E.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J.J.; DELGADO-HERRERA, M.A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 445-462 (2010)
86. NONFON, M.; LIEB, F.; MOESCHLER, M.; WENDISCH, D. Four annonins from *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, 29: 1951-1954 (1990)
87. ARAYA, H.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; SRIVASTAVA, A.; SAHAI, M. Squamosten-A, a novel Mono-tetrahydrofuranic acetogenin with a double bond in the hydrocarbon chain, from *Annona squamosa* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 42: 388-391 (1994)

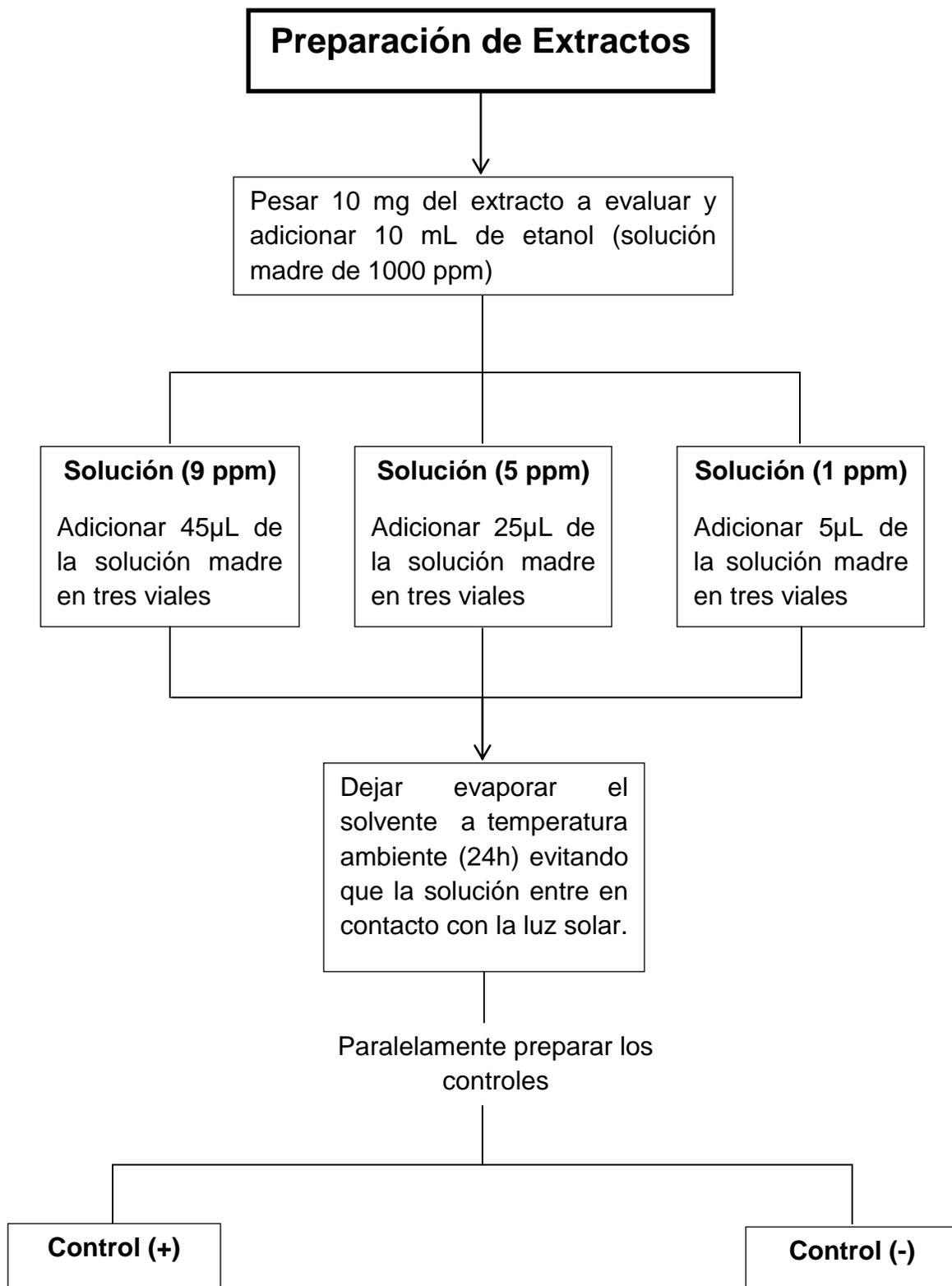
88. FUJIMOTO, Y.; MURASAKI, C.; SHIMADA, H.; NISHIOKA S.; KAKINUMA, K.; SINGH, S; SINGH, M.; KUMAR GUPTA, Y.; SAHAI, M. Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Non-adjacent Bis-tetrahydrofuranic acetogenins. Chem. Pharm. Bull., 42: 1175-1184 (1994)
89. PANDEY, N.; BARVE, D. Phytochemical and pharmacological review on *Annona squamosa* Linn. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2: 1404-1412 (2011)
90. HERRERA, V.; TICONA, J.C.; UDAETA, E.; CHUQUI, R.; GIMÉNEZ, A. Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolínicos del extracto de *Galipea longiflora* Krause Kallunki. Biofarbo, 16: 47-53 (2008)

# **ANEXOS**

**ANEXO A**  
Diagrama de Flujo

BIOENSAYO PRELIMINAR CON LARVAS DE *Artemia salina* SEGÚN LA METODOLOGÍA PROPUESTA POR McLAUGHLIN (45)





## Adición de Larvas

Adicionar en todos los viales 20 $\mu$ L de dimetilsulfoxido (incluidos los controles)

Adicionar 2 mL de agua de mar artificial en cada vial

Con la ayuda de una pipeta Pasteur transferir 10 larvas de *Artemia* en cada vial y aforar a un volumen de 5 mL con el agua de mar artificial

Dejar los viales, incluidos los controles, a temperatura ambiente

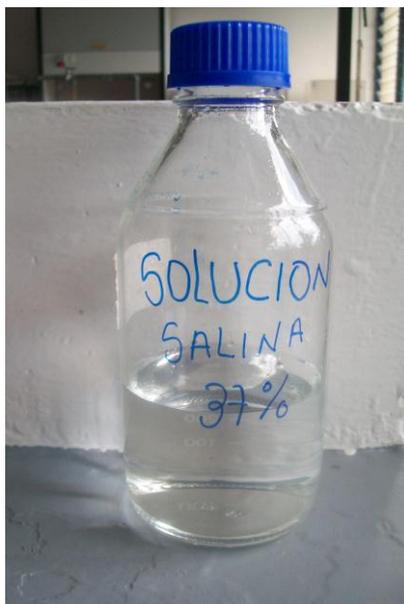
Evaluar a las 24 horas el nivel de mortalidad de las larvas

## Análisis de Mortalidad

Verter el contenido de los viales en cajas de Petri pequeñas, esperando a que se estabilice, Lavar los viales con agua de mar para asegurarse de que todas las larvas salgan del vial a la caja de Petri

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

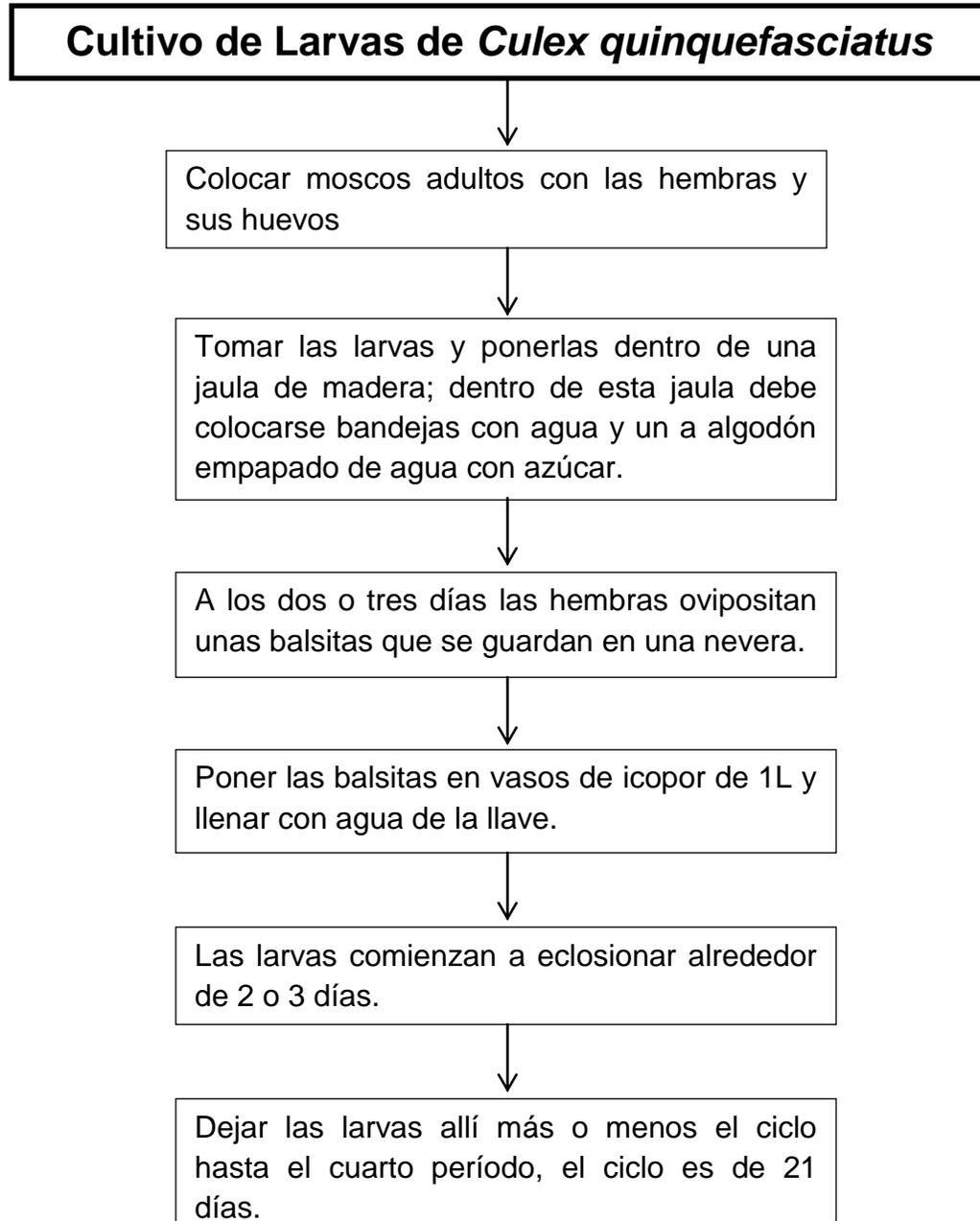
Analizar los resultados en el programa probit para analizar los resultados del  $CL_{50}$



Cultivo de los nauplii de *Artemia salina* en laboratorios de la escuela de química

**ANEXO B**  
Diagrama de Flujo

BIOENSAYO CONFIRMATIVO CON *Culex quinquefasciatus* SEGÚN UNA MODIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA POR MCLAUGHLIN PARA *Aedes aegypti* (45)



## **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 réplica y concentraciones de 5000, 500, 50, 5 y 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Cada concentración se evalúa por duplicado.

Adicionar 250  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones preparadas en los diferentes pozos, dejar que se evapore el solvente.

Adicionar una larva del mosquito en cada pozo y llenar el mismo con agua reposada.

## **Análisis de mortalidad**

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

Analizar los resultados en el programa Probit para analizar los resultados del  $\text{CL}_{50}$

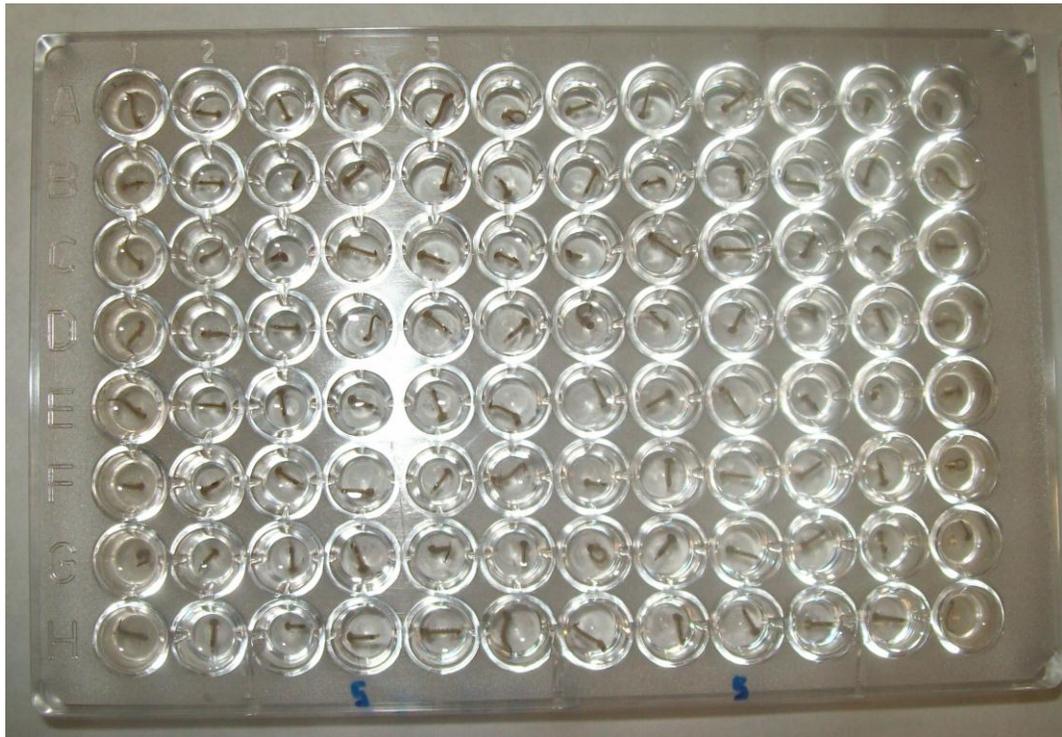
FOTOS



A



B



C

**A y B.** Cultivo de larvas del *Culex quinquefasciatus*; **C.** Bioensayo confirmativo con larvas en el IV estadio del *Culex quinquefasciatus*

## ANEXO C

Fotos

### CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA



**A**    **B**

**a)**    SDF001



**A**    **B**

DF001



**A**    **B**

**b)**    SDF003



**A**    **B**

DF003



**A**    **B**

**c)**    SDF005



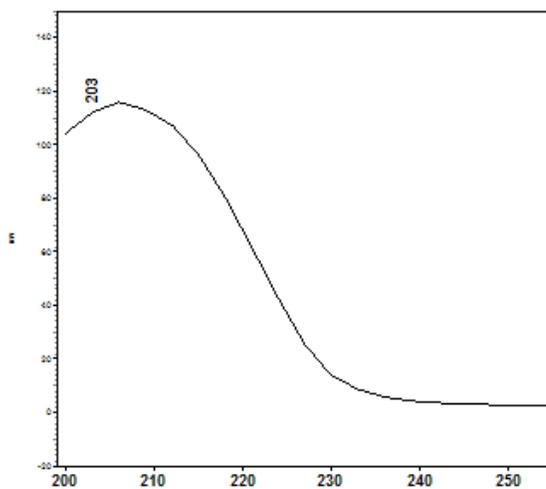
**A**    **B**

DF005

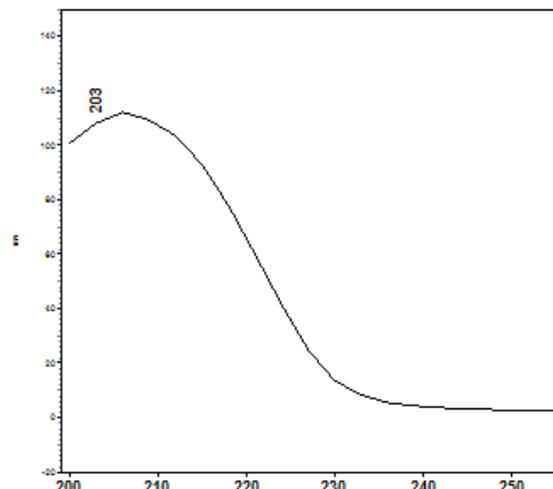
**A:** Estándar; **B:** Extractos; **SD:** sin desengrasar; **D:** desengrasados

**ANEXO D**  
Figuras

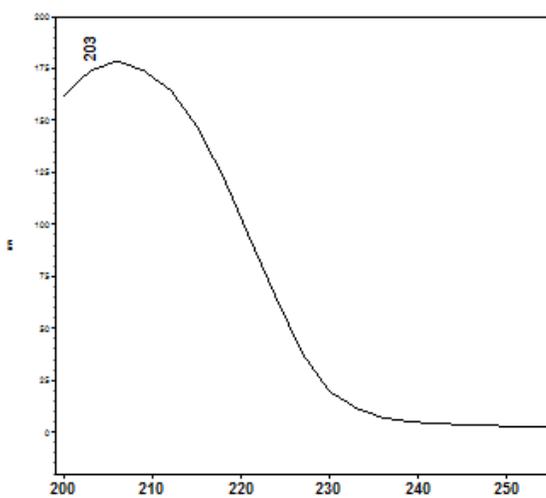
**ESPECTROS UV DE MÁXIMA ABSORCIÓN POSIBLES ACETOGENINAS**



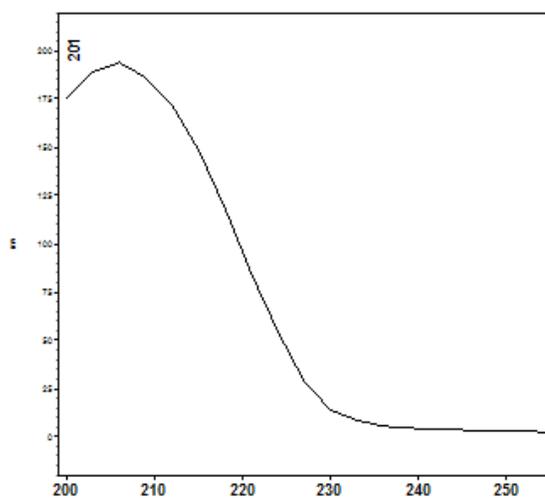
Pico 8



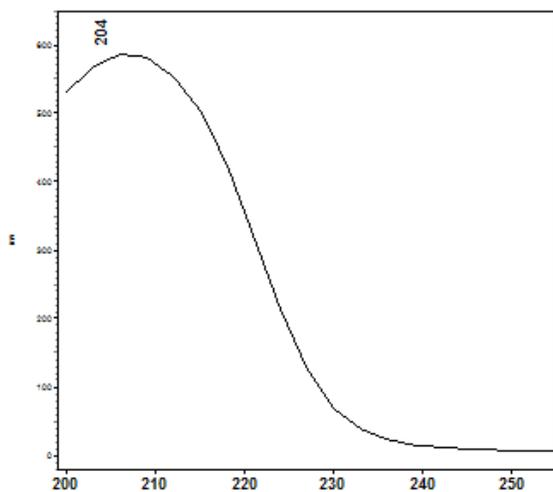
Pico 9



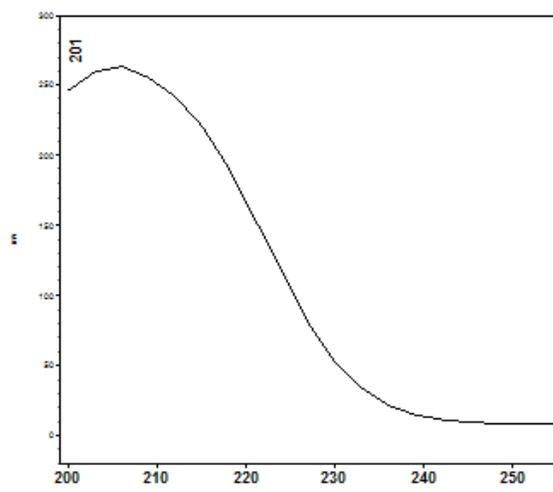
Pico 13



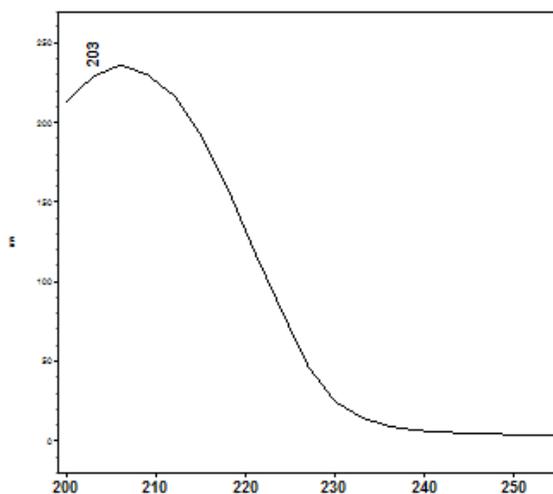
Pico 14



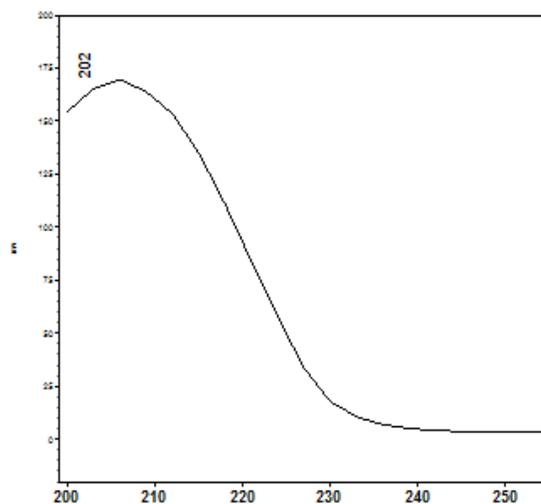
Pico 15



Pico 16



Pico 18

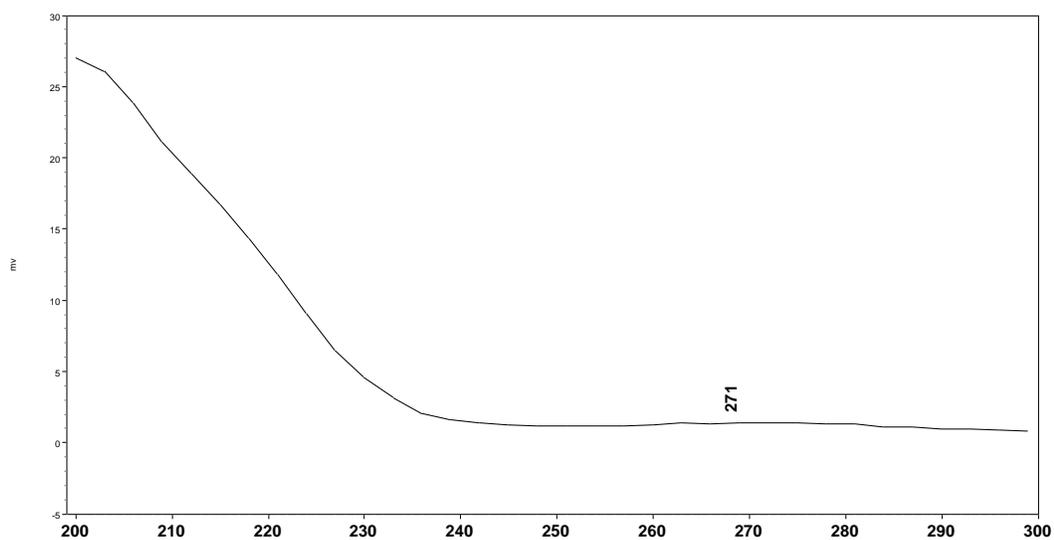


Pico 19

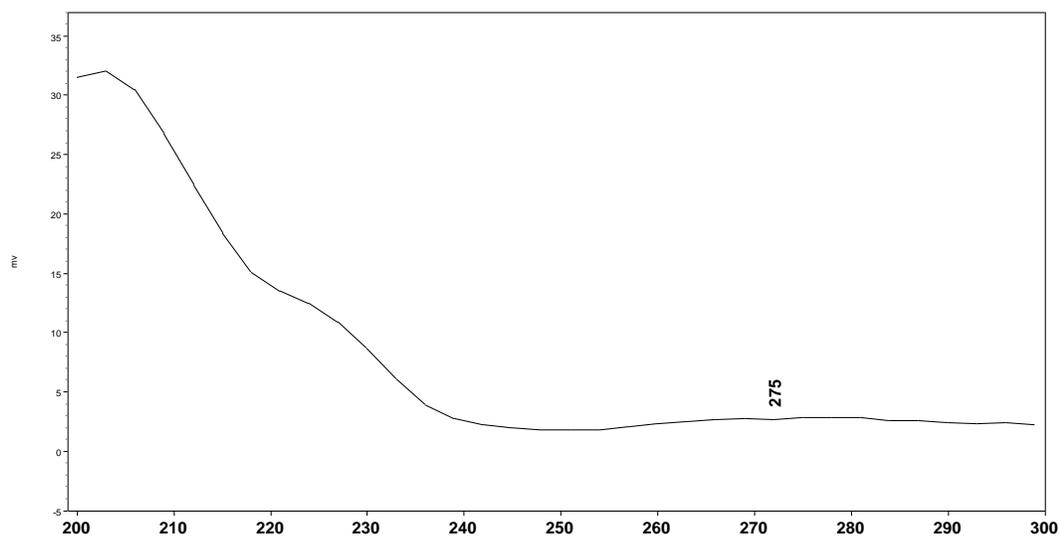
## ANEXO E

### Figuras

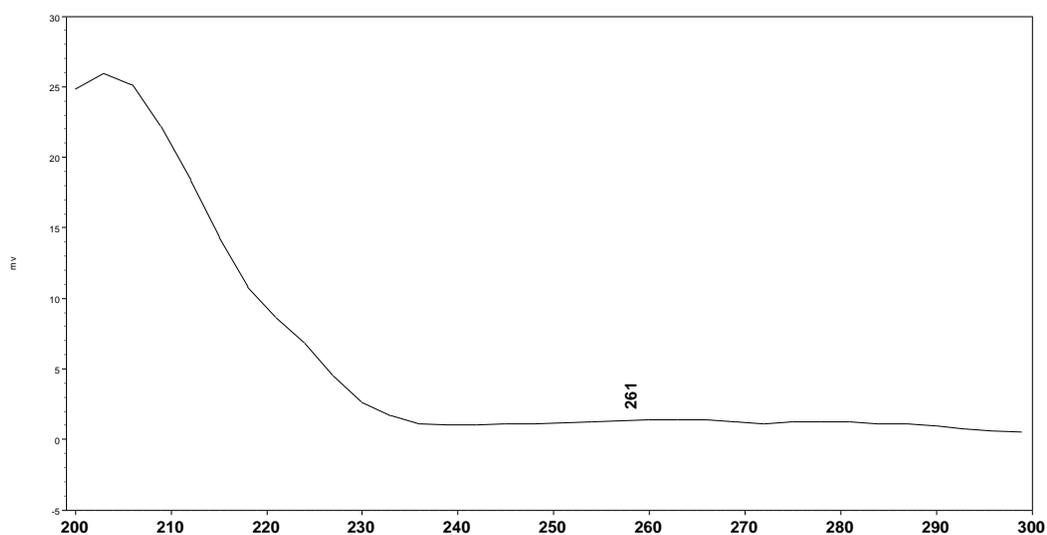
#### ESPECTROS UV DE MÁXIMA ABSORCIÓN OTROS COMPUESTOS



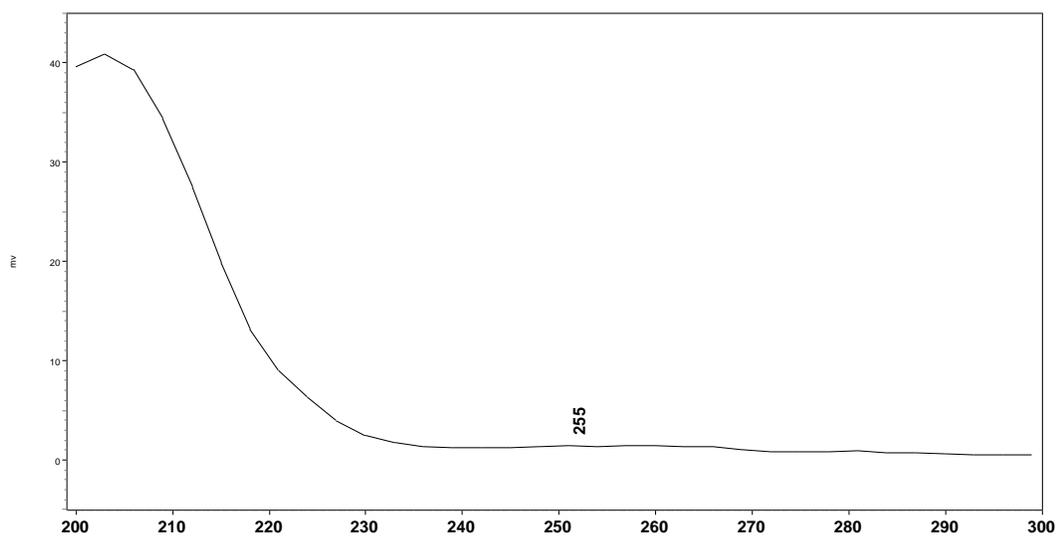
Pico 4



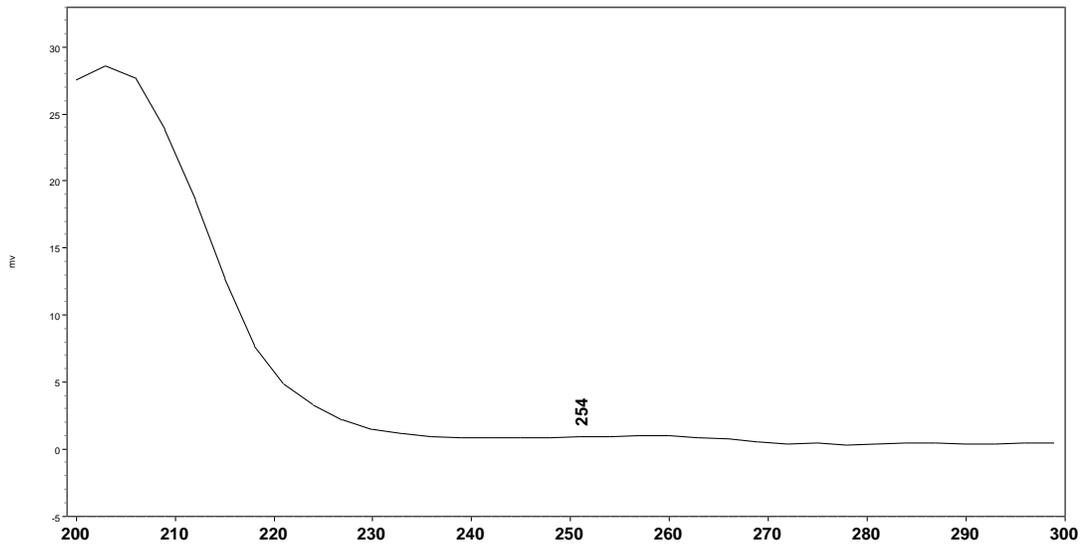
Pico 12



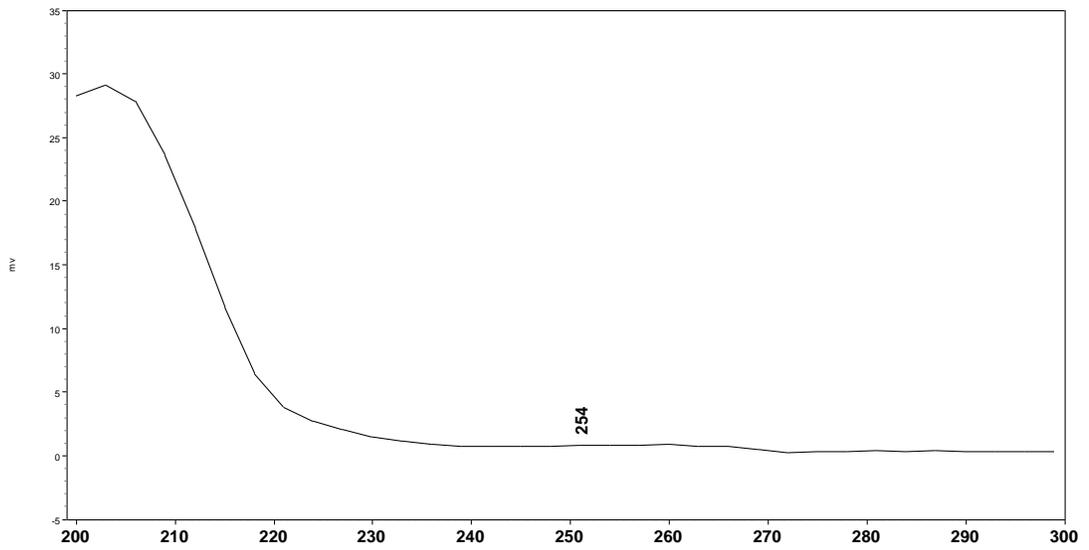
Pico 13



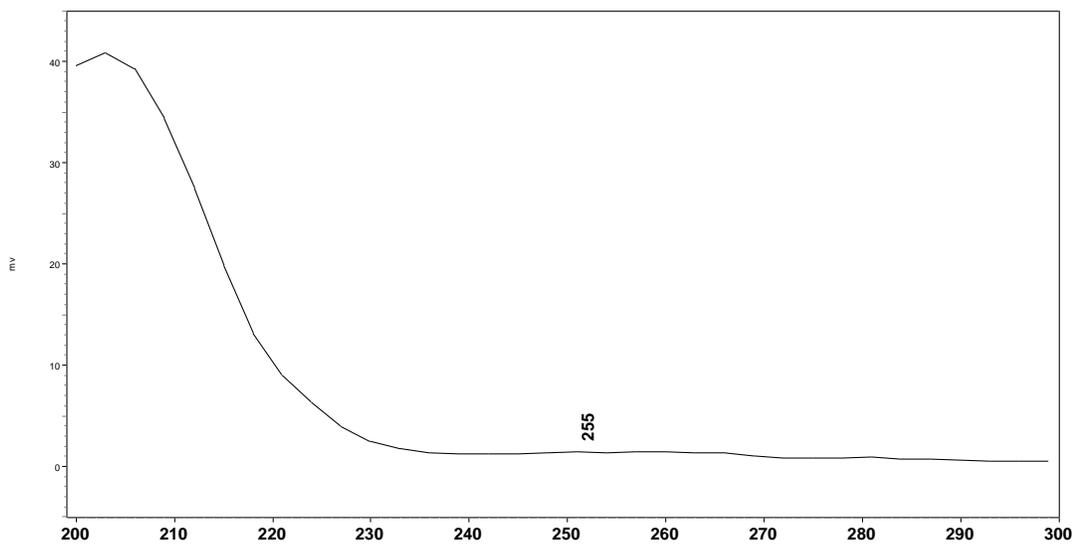
Pico 14



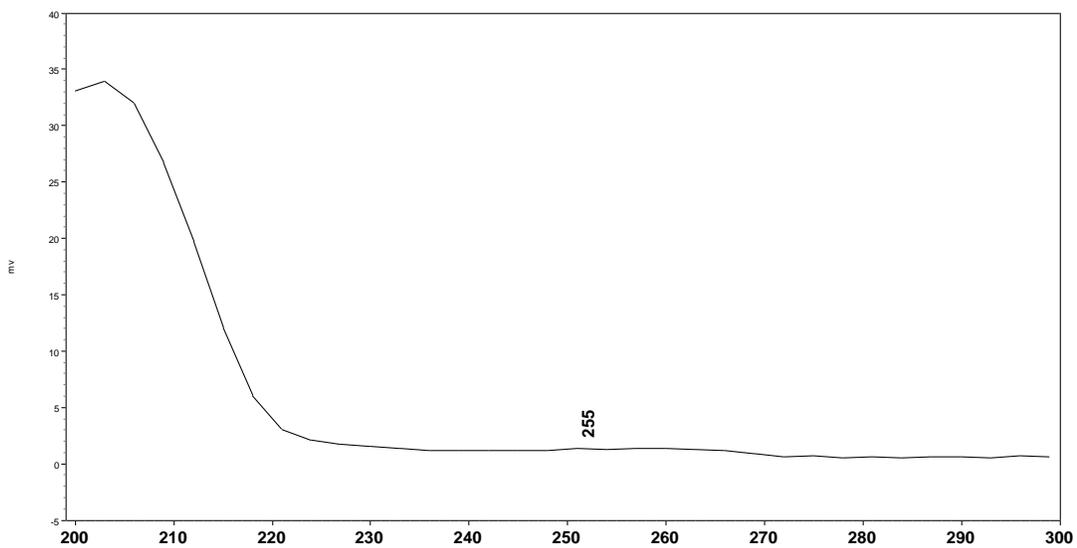
Pico 15



Pico 16



Pico 17

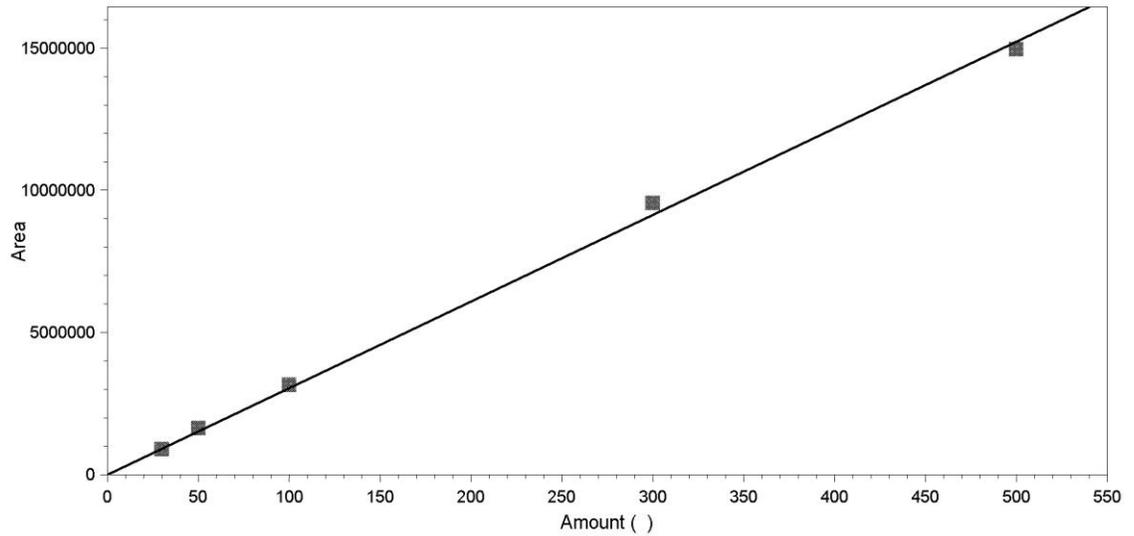


Pico 18

## ANEXO F

Figura

### CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ESTÁNDAR DE BULATACINA



**Ecuación de la recta:  $y = 30449,5x + 0,00000$**

**Coefficiente de correlación ( $R^2$ ): 0,998155**

**Desviación estándar = 1332,50**

**Límite de detección (LD) = 0,1313 ppm**

**Límite de cuantificación (LC) = 0,4376 ppm**