

EVALUACION PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA CONTRA *Puto barberi* (COCHINILLA HARINOSA) DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS SEMILLAS DESENGRASADAS DE *Annona muricata*

**ANDRÉS FELIPE GÓMEZ LOZADA
SARAH LUCÍA MOLINA RAGA**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2012**

EVALUACION PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA CONTRA *Puto barberi* (COCHINILLA HARINOSA) DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS SEMILLAS DESENGRASADAS DE *Annona muricata*

**ANDRÉS FELIPE GÓMEZ LOZADA
SARAH LUCÍA MOLINA RAGA**

TRABAJO DE GRADO

Documento parcial para optar al título de Tecnólogo Químico

Directora

**GLORIA EDITH GUERRERO ÁLVAREZ
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**

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

2012

NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO DE GRADO

EVALUACION PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA CONTRA *Puto barberi* (COCHINILLA HARINOSA) DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS SEMILLAS DESENGRASADAS DE *Annona muricata*.

Presentado por:

**ANDRÉS FELIPE GÓMEZ LOZADA
SARAH LUCÍA MOLINA RAGA**

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: _____

Oscar Marino Mosquera

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme siempre por el camino correcto, por darme la oportunidad de cumplir esta gran meta en mi vida y le agradezco inmensamente la oportunidad que me dio de contar con la familia que tengo.

A mi papá Ferney Gómez, por brindarme siempre ese apoyo incondicional, por los consejos que me ha dado y que me han servido mucho para la vida, por la gran cantidad de valores que me ha inculcado y que me han ayudado para cumplir esta meta de una manera satisfactoria.

A mi mamá Mónica Lozada, por siempre estar ahí en los momentos buenos y no tan buenos de mi vida, por el apoyo que siempre me ha brindado y el ejemplo que me ha dado de persona a seguir para luchar por lo que quiero.

A mis hermanos Sebastián Gómez y Diana Gómez, por siempre estar ahí cuando los he necesitado, muchas gracias por el apoyo incondicional que me han otorgado.

En especial a mi abuelita que aunque ya no este conmigo en este momento, le agradezco demasiado el ejemplo de persona que me dio a seguir, nunca olvidare todas la enseñanzas que dejo para mi vida, su alegría y el alma de adolescente que siempre tuvo.

Andrés Felipe Gómez L.

DEDICATORIA

A Dios doy gracias por darme la fortaleza, la inteligencia y la perseverancia para realizar este trabajo. Por regalarme mi familia, la mejor de todas y a la cual está dedicado este trabajo.

A mi mamá, a quien le entrego todos mis éxitos y agradezco sus infinitos esfuerzos y maravillosos consejos; a mis hermanos por ser mis ejemplos, por las miles de palabras de ánimo, por su cariño y comprensión; a mi tía Amanda quien considero mi segunda mamá por su apoyo incondicional y su interés en mi bienestar; a mi tía Luzma por su confianza y respaldo; a mi tía Ana por su inmenso amor. En fin, a mis tíos, primos y sobrino por confiar siempre en mí y darme toda la energía positiva para afrontar esta etapa de mi vida.

“Tengo una buena estrella que destella, que me guía, brilla y me maravilla, un buen ángel me arrastra el ala y no me desampara y me cuida desde arriba...” A tí abuelito por ser siempre mi motivación. Para tí cada sonrisa y cada logro alcanzado... para tí que desde el cielo celebras conmigo la culminación de este trayecto y el comienzo de uno nuevo.

SARAH LUCÍA MOLINA RABA

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias por el apoyo incondicional que nos brindaron, muchas gracias por la ayuda para el cumplimiento de esta gran meta.

A la Universidad Tecnológica de Pereira, vicerrectoría de investigación por el financiamiento de este proyecto.

A la despulpadora Belfruit por suministrarnos el material vegetal.

A Cenicafé por suministrarnos el material biológico para la realización del bioensayo insecticida.

Al grupo de polifenoles de la Universidad Tecnológica de Pereira por prestarnos el equipo HPLC y brindarnos su colaboración con el manejo de este.

A nuestra directora Gloria Edith Guerrero Álvarez por el apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

A nuestro jurado Oscar Marino Mosquera por su colaboración y asesoría durante este trabajo

Y a todos los que de alguna manera aportaron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. MARCO DE REFERENCIA	4
4. MARCO TEORICO	7
4.1. FAMILIA ANNONACEAE	7
4.1.1. ANNONACEAS DE COLOMBIA	8
4.1.2. <i>Annona muricata</i> (Guanábana)	9
4.1.2.1. Producción mundial	9
4.1.2.2. Producción nacional	10
4.1.2.3. Descripción	10
4.1.2.4. Clasificación botánica	11
4.1.2.5. Fenología	11
4.1.2.5.1. Flores	12
4.1.2.5.2. Semillas	12
4.1.2.5.3. Fruto	12
4.1.2.5.4. Pulpa y piel	13
4.1.2.6. Sexualidad	14
4.1.2.7. Usos	14

4.1.2.8. Estudio fitoquímico de la <i>Annona muricata</i>	14
4.2. ACETOGENINAS	16
4.2.1. Clasificación de acetogeninas	17
4.2.1.1. Acetogeninas sin anillo tetrahidrofuránico	18
4.2.1.2. Acetogeninas mono tetrahidrofuránicas	18
4.2.1.3. Acetogeninas bis- tetrahidrofuránicas	18
4.2.1.4. Acetogeninas tri tetrahidrofuránicas adyacentes	19
4.2.1.5. Acetogeninas con anillos tetrahidropiránicos	19
4.2.1.6. Epoxiacetogeninas	19
4.2.2. Separación e identificación de acetogeninas	20
4.2.3. Actividad biológica de las acetogeninas de Annonaceae	20
4.2.3.1. Relación estructura-actividad	22
4.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	23
4.3.1. Bioensayo de toxicidad con larvas de <i>Artemia salina</i>	23
4.3.1.1. <i>Artemia salina</i>	24
4.3.2. Bioensayo insecticida con insectos de <i>Puto barberi</i>	26
4.3.2.1. <i>Puto barberi</i> (Cochinilla harinosa)	27
4.4. DETERMINACION DE LA CL ₅₀ PARA PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	27
4.5. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS	30
4.5.1. Separación por lixiviación	30
4.5.2. Separación por cromatografía	31
4.5.2.1. Generalidades	31
4.5.2.2. Cromatografía en capa delgada (CCD)	32
4.5.2.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	32
4.5.2.4. Cromatografía líquida en fase normal	33

4.5.2.5. Cromatografía líquida en fase reversa	34
5. METODOLOGÍA	35
5.1 MATERIAL VEGETAL	35
5.1.1. Pretratamiento de las semillas	35
5.1.2. Extracción de acetogeninas	35
5.2. BIOENSAYOS	35
5.2.1. Ensayo de citotoxicidad	35
5.2.1.1. Preparación de extractos	36
5.2.1.2. Análisis de mortalidad de las larvas	36
5.2.2. Ensayo insecticida	36
5.2.2.1. Análisis de mortalidad de insectos	37
5.3. ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO DE SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i>	37
5.3.1. Evaluación preliminar del extracto etanólico desengrasado por cromatografía en capa delgada (CCD).	37
5.3.2. Análisis del extracto etanólico desengrasado por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).	
5.3.3. Cuantificación de acetogeninas por CLAE.	38
5.3.4. Identificación preliminar de acetogeninas	38
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
6. RESULTADOS Y DISCUSION	39
6.1. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS	39
6.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	39
6.2.1. Ensayo citotóxico con <i>Artemia salina</i>	40
6.2.2. Actividad insecticida con insectos de <i>Puto barberi</i>	42
6.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	45

6.3.1. Análisis preliminar de acetogeninas por cromatografía de capa delgada (CCD)	45
6.3.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).	45
6.3.2.1. Curva de calibración	45
6.3.2.2. Análisis del extracto etanólico desengrasado por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).	46
7. CONCLUSIONES	49
8. RECOMENDACIONES	50
9. BIBLIOGRAFIA	51
ANEXOS	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Distribución de Annonaceae en el mundo	7
FIGURA 2. <i>Annona muricata</i>	11
FIGURA 3. Árbol de <i>Annona muricata</i>	11
FIGURA 4. Flor <i>Annona muricata</i>	12
FIGURA 5. Semillas de <i>Annona muricata</i>	12
FIGURA 6. Fruto de <i>Annona muricata</i>	13
FIGURA 7. <i>Annona muricata</i>	13
FIGURA 8. Clasificación de acetogeninas de Annonaceae	17
FIGURA 9. Estructura general de Acetogeninas Lineales	18
FIGURA 10. Estructura general de acetogeninas mono-THF	18
FIGURA 11. Estructura general de acetogeninas bis-THF	19
FIGURA 12. Estructura general de acetogeninas tri-THF	19
FIGURA 13. Estructura general de acetogeninas THP	19
FIGURA 14. Estructura general de Epoxi-acetogeninas	20
FIGURA 15. <i>Artemia salina</i>	24
FIGURA 16. <i>Puto barberi</i> (Cochinilla harinosa)	27
FIGURA 17. Esquema de selección del método de análisis	28
FIGURA 18. Esquema de un cromatografo liquido de alta eficiencia (CLAE)	33
FIGURA 19. Comportamiento de la Actividad Biológica de los extractos etanólicos de semillas desengrasadas de <i>Annona muricata</i> en el Tiempo.	41
FIGURA 20. Cromatograma del extracto etanólico de semillas desengrasadas de <i>Annona muricata</i> .	46

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae	9
TABLA 2. Compuestos aislados de <i>Annona muricata</i>	15
TABLA 3. Acetogeninas de algunas especies de Annonaceae que presentan bioactividad.	21
TABLA 4. Métodos para la estimación de CL ₅₀	29
TABLA 5. Clasificación de la Actividad Biológica de acuerdo a la CL ₅₀ (ppm)	38
TABLA 6. Porcentaje de rendimiento de la extracción etanólica de las semillas desengrasadas de <i>Annona muricata</i> .	39
TABLA 7. Citotoxicidad para <i>Artemia salina</i> de los extractos etanólicos crudos de semillas desengrasadas de <i>Annona muricata</i> a través de 8 semanas.	40
TABLA 8. Controles utilizados en el ensayo de citotoxicidad para <i>Artemia salina</i> .	40
TABLA 9. CL ₅₀ Obtenidos para el extracto etanólico de semillas desengrasadas de <i>Annona muricata</i> frente a <i>Punto barberi</i> .	43
TABLA 10. Controles utilizados en el ensayo insecticida frente a <i>Punto barberi</i> .	43
TABLA 11. Resultados del cromatograma	47

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. BIOENSAYO PRELIMINAR CON LARVAS DE <i>Artemia salina</i>	63
ANEXO B. BIOENSAYO INSECTICIDA CONTRA <i>Puto barberi</i>	69
ANEXO C. COCHINILLAS HARINOSAS MUERTAS AL CABO DE 24 HORAS	73
ANEXO D. FOTOS: CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (CCD)	74
ANEXO E. ESPECTROS UV DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAE OBTENIDOS	75
ANEXO F. ANALISIS POR CLAE DEL ESTÁNDAR DE BULATACINA	79

RESUMEN

Se evaluó la bioactividad del extracto etanólico crudo de semillas desengrasadas de *Annona muricata*, el cual presentó actividad citotóxica frente a *Artemia salina* y actividad insecticida frente a *Puto barberi*. Este último bioensayo fue evaluado a concentraciones de 25, 15 y 9 ppm del extracto variando el tiempo de exposición (5, 15 y 30 minutos) de las raíces de *Talinum paniculatum* en el extracto, empleadas como alimento del *Puto barberi* y la movilidad de los insectos a las 24 horas. El efecto del extracto fue comparado con Lorsban 4E[®], utilizado como control positivo. Se obtuvieron resultados prometedores con CL₅₀ bajos, indicando una alta actividad insecticida del extracto. Se verificó la presencia de las acetogeninas con anillo γ -lactónico α , β - insaturado por cromatografía en capa delgada (CCD) y se cuantificaron siete acetogeninas por cromatografía de alta eficiencia (CLAE) en el extracto etanólico crudo de semillas desengrasadas de *Annona muricata*.

Palabras claves: Citotoxico, insecticida, acetogenina, *Annona muricata*, *Puto barberi*, Lorsban 4E[®].

ABSTRACT

In this experience the bioactivity of the crude ethanolic extract of the degreased seeds of *Annona muricata* was evaluated, which presented cytotoxic activity against *Artemia salina* and insecticide activity against *Puto barberi*. This last bioassay was evaluated with concentrations of 25, 15 and 9 ppm of the extract, changing the exposition time (5, 15 and 30 minutes) of the roots of *Talinum paniculatum* in the extract, it was used like feed to the *Puto barberi* and the mobility of the insects after 24 hours. The effect of the extract was compared with Lorsban 4E®, used like a positive control. The results obtained with CL₅₀ were promising; this indicates a high insecticide activity of the extract. The presence of acetogenins with a γ -lactone α , β -unsaturated ring was checked with high performance liquid chromatography (HPLC) in the crude ethanolic extract of the degreased seeds of *Annona muricata*.

Key words: Cytotoxic, insecticide, acetogenins, *Annona muricata*, *Puto barberi*, Lorsban 4E®.

1. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de pesticidas y herbicidas sintéticos poco degradables, trae como consecuencia problemas en el medio ambiente y en la salud del hombre. En la actualidad, los bioinsecticidas han alcanzado gran importancia, debido a que tienen la ventaja de proveer modos de acción novedosos, que reducen el riesgo de resistencia, son eficaces y más seguros para el medio ambiente, son degradables y más específicos para las diferentes especies de insectos, larvas y otros tipos de plagas, produciendo poco o ningún daño ambiental, mostrando así la superioridad de estos frente a los netamente sintéticos [1,2]. En la obtención de insecticidas botánicos se emplean extractos de plantas, destacándose las siguientes familias por su bioactividad: Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Labiateae, Piperaceae y Annonaceae. En la familia Annonaceae, la *Asimina triloba*, *Annona muricata* y *Annona squamosa* L. son las especies que han sido más ampliamente estudiadas por sus efectos insecticidas ya que producen un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas [3, 4, 5, 6, 7,8]. La familia Annonaceae es una gran familia de árboles y arbustos casi exclusivamente tropicales que comprende unos 130 géneros [9] y 2300 especies [10] distribuidas en el mundo, en América, África, Indochina y Malasia. En Colombia, la familia Annonaceae está ampliamente distribuida en todo el país. La mayor diversidad de especies se encuentra en las regiones Amazónica, Pacífica y Andina [3, 4, 5]. Las principales annonaceas que se encuentran cultivadas para su producción son: *Annona muricata*, *Annona cherimolia* y *Annona blanca*. En el país se encuentran 4626.4 hectáreas sembradas pertenecientes a la Familia Annonaceae [6] y de estas más o menos 1300 pertenecen a los cultivos establecidos de *Annona muricata*, esta conocida comúnmente como guanábana ha comenzado a perfilarse en los últimos años como una alternativa para el desarrollo sostenible en algunas regiones del país. El dato mas reciente encontrado de producción de *Annona muricata* (guanábana) fue de 10010 toneladas, en un área de 1.441 Ha, las cuales están distribuidas entre los departamentos de Antioquia, Bolívar, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Risaralda, Santander, Tolima y Valle, siendo los más grandes productores, Tolima y Valle [8]. En la zona cafetera y principalmente en el departamento de Risaralda existe una producción importante de *Annona muricata* (guanábana), obteniéndose alrededor dos mil toneladas de guanábana al año.

En muchas de las industrias destinadas a la producción de pulpas de fruta, las semillas se convierten en desecho sin ningún valor aparente. Tal es el caso de la guanábana donde existe la posibilidad de dar un valor agregado a través de la utilización de sus semillas como materia prima para la elaboración de biopesticidas, de acuerdo con los estudios de las acetogeninas de Annonaceae las de mayor actividad biopesticida corresponden a la Asimicina, Squamocina y Annonacina, que se encuentran presentes en la *Annona muricata*, lo que indica que sería posible el aprovechamiento de las semillas para la obtención de dicho producto [11].

Se han adelantado varios estudios sobre las annonaceas en Colombia, identificando nuevas acetogeninas, aisladas de especies como la *A. cherimolia* [12, 13, 14], encontrando actividad Antileishmanial [15, 16], antiprotozoal [17] y biopesticida [1], entre otras. En la región cafetera se han realizado estudios sobre la actividad de los extractos de las semillas de *A. cherimolia* frente a *Culex quinquefasciatus*, obteniéndose un CL₅₀ de 0,102 µg/mL indicando un valioso potencial biopesticida [18].

Entre los insectos que afectan el cultivo y la calidad del café en el país, con carácter de importancia económica en algunas regiones cafeteras esta el *Puto barberi* (cochinilla harinosa), en los últimos años ha aumentado la preocupación por la alta incidencia de las cochinillas harinosas, en siembras nuevas y renovación de cafetales, lo que repercute en la muerte del árbol antes de llegar a su etapa productiva, este insecto fitófago se alimenta directamente del floema de las plantas ya sea en la raíz o en la parte aérea y ocasiona su debilitamiento por la succión de savia, lacera los tejidos de los granos que se están formando y provoca un debilitamiento general de la planta, originando como consecuencia la caída de los frutos. El control de esta plaga es complicado debido a su hábito críptico y a la protección cerosa que recubre los estados móviles y las masas de huevos es por esto que se requiere de algún tipo de control con un mecanismo de acción diferente a los químicos usados actualmente, estos son: Lorsban 4E, Capxan I y Verdadero 600 WG [19].

Debido a los altos costos de los controles químicos específicos se requieren otros mecanismo de control como el uso de compuestos activos, por esto se adelanto el presente trabajo como una primera aproximación del efecto de la ingesta de extractos de semillas de *Annona muricata* procedentes del proceso de despulpado, contribuyendo por una parte al aprovechamiento del subproducto y por otra al control de una plaga importante actualmente en la caficultura nacional.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

- Realizar un estudio preliminar de la actividad insecticida contra *Puto barberi* (cochinilla harinosa) y de la actividad citotóxica frente *Artemia salina* del extracto etanólico de las semillas desengrasadas de *Annona muricata* procedentes del subproducto de una despulpadora de la región cafetera.

Objetivos específicos

- Efectuar un estudio de la actividad insecticida del extracto etanólico de las semillas desengrasadas de *Annona muricata* frente a *Puto barberi* (cochinilla harinosa).
- Evaluar la actividad citotóxica del extracto etanólico de las semillas desengrasadas de *Annona muricata* empleando *Artemia salina* como control.
- Evidenciar y cuantificar por cromatografía de capa delgada (CCD) y por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con detector de arreglo de diodos las acetogeninas presentes en el extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata*.

3. MARCO DE REFERENCIA

A pesar de que las poblaciones dañinas de cochinillas harinosas en las plantas de café requieren programas permanentes de manejo integrado, en Colombia se ha generado muy escasa información básica como soporte para implementar tales programas.

Entre los investigadores que han estudiado las cochinillas en el país se encuentran: Figueroa (1946), Varela y Belloti (1981), Mosquera (1989) y recientemente Castillo y Bellotti (1990), Gallego y Vélez (1992) contribuyeron a aumentar la lista de registros de diferentes familias, géneros y especies de coccóideos, Williams y Granara de Willink (1992) han aportado de manera importante al conocimiento de cochinillas harinosas (*Pseudococcidae*) del país y de la región neotropical, Kondo (2001) elaboró una amplia lista de las especies de cochinillas para Colombia, Cárdenas et al. (2003) llevaron a cabo un reconocimiento de estos insectos asociados al cultivo de banano en Urabá (Antioquia) [20].

Las cochinillas fueron la primera plaga de insectos contra la que se utilizó la lucha biológica, esto fue en el año de 1888 y se ha extendido por todo el mundo debido al gran éxito que ofrece si se compara con el tradicional insecticida [20].

La gran mayoría de productos que se utilizan para el control de esta plaga son químicos pero los tratamientos con insecticidas suelen terminar fracasando debido a la morfología de estos insectos, se deben tener en cuenta dos factores importantes para su manejo:

- Realizar un monitoreo en las plantaciones que se encuentran próximas a renovar por siembra nueva y en los almácigos para determinar presencia de la plaga y así elaborar un plan de manejo [19].
- Es importante resaltar que el uso de plantas de almácigos infestados con cochinillas harinosas se constituyen en fuente de dispersión de la plaga, por lo cual se recomienda adquirir material sano para la siembra [19].

PRODUCTOS QUÍMICOS MÁS REPRESENTATIVOS PARA EL CONTROL DE *Puto barberi*.

LORSBAN 4E

Insecticida organofosforado formulado como concentrado emulsionable que contiene 480 g de ingrediente activo por litro de producto comercial, de amplio espectro y recomendado para el control de plagas en diversos cultivos. El producto LORSBAN 4E actúa por contacto, ingestión e inhalación (fase vapor), inhibiendo la acción de la enzima acetil-colinesterasa, ocasionando disturbios en el sistema nervioso de los insectos y la muerte de los mismos, también posee una marcada acción en profundidad siendo específicamente activo contra insectos minadores y áfidos. Su versatilidad lo hace ciertamente un producto eficaz frente a la gran variedad de insectos masticadores (larvas), chupadores (pulgones) o aquellos protegidos por bolsas, telas, escudetes o ubicados en lugares de difícil acceso (cochinillas, barrenadores, etc.) [21].

CAPXAN I

Es un insecticida organofosforado que actúa en forma sistémica, por contacto y por ingestión cubriendo un amplio espectro de plagas y teniendo una moderada persistencia, es apto para el control de pulgones, cochinillas, trips, arañuela roja, mosca blanca, barrenador de la hoja, orugas, gusano blanco y gusanillo verde, isoca, etc [22].

VERDADERO 600 WG

Es usado para el control de enfermedades fungosas e insectos en los cultivos de café, este actúa sobre los receptores post – sinápticos en las neuronas e interfiere los receptores de la acetilcolina causando una rápida inhibición de la alimentación y del movimiento ya sea volar o caminar [23].

PRODUCTOS BIOLÓGICOS MÁS REPRESENTATIVOS PARA EL CONTROL DE *Puto barberi*.

SANAHIERBA INSECT

Contiene diversos extractos vegetales que tienen acción insecticida de forma natural. El principal factor que actúa en los productos es un neurotransmisor que le provoca

espasmos al insecto. Al ser un producto natural, también actúa mejorando el sistema vegetal de la planta. Sanahierba Insect actúa por contacto y es efectivo durante dos horas, sólo se puede aplicar vía foliar [24].

La experiencia mundial en el combate contra las cochinillas en general, ha demostrado que la vía más efectiva, es el empleo de la lucha biológica, utilizando parasitoides y depredadores [25]. A largo plazo, este método es el que ha dado mejor resultado en el manejo de la plaga y se debe implementar una vez que la misma se haya establecido en una región.

BEAU-BIOL (*Beauveria bassiana*)

Insecticida biológico que cuenta con la mezcla de dos cepas las cuales han sido aisladas de sistemas de bosque primario, estos son microorganismos benéficos en el control de la Cochinilla harinosa de las plantas del café [26].

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

En un agroecosistema las plagas son controladas por la acción de sus enemigos naturales, predadores, parásitos y patógenos, evitando que estas alcancen niveles perjudiciales. Los microorganismos patógenos han sido usados para obtener una reducción de las poblaciones de insectos plagas, dentro de los cuales se incluyen bacterias, virus, nematodos, protozoos y hongos, por su habilidad de controlar plagas los hongos inician su proceso de infección con la germinación de las esporas adheridas sobre el tegumento de la plaga. Posteriormente este produce un tubo germinativo y un apresorio como producto de la dilatación de la hifa, la cual rompe las áreas membranosas esclerosadas y el químico resultante de la acción enzimática (proteasas, lipasas y quitinasas) facilita la penetración mecánica. A partir de la penetración se inicia el proceso de colonización, en el cual la hifa se ramifica en el cuerpo del insecto y a partir de ese momento se forman pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales (blastosporas). Por lo general los hongos entomopatógenos son de acción lenta, tardan una semana como mínimo en causar mortalidad o al menos en que el insecto deje de alimentarse. Algunos atacan a gran cantidad de especies distintas de insectos pero dependen de las condiciones ambientales de temperatura y de elevada humedad relativa para alcanzar una mayor patogenicidad y virulencia. Los hongos entomopatógenos son fácilmente aplicados por introducción, manipulación ambiental o aumento inoculativo [27].

4. MARCO TEORICO

4.1. FAMILIA ANNONACEAE

La Annonaceae es una familia importante en el orden Ranales. Esta familia suma aproximadamente 120 géneros, pero solo tres géneros producen frutos comestibles, estos son: *Asimina*, *Rollinia* y *Annona*. Existen 2.100 especies muy extendidas en el trópico y subtropical, como se ilustra en la figura 1 las partes coloreadas en rojo. Las más importantes a nivel comercial son:

- *Annona squamosa* (Soncoya)
- *Annona muricata* (Guanábana)
- *Annona cherimolia* (Anona)



FIGURA 1. Distribución de Annonaceae en el mundo [28]

Las annonaceas se caracterizan por poseer flores perfectas con numerosos estambres y numerosos carpelos monocárpicos libres o unidos formando un fruto múltiple, estas son bisexuales aunque rara vez unisexuales, de la corteza externa se desprenden tiras y la corteza interna es reticulada; las hojas son simples, dísticas, enteras y generalmente aromáticas; las flores son solitarias o reunidas en cimas helicoides con todas las ramas en un mismo plano, llamadas ripidios; el perianto es trímero y generalmente con dos verticilos de pétalos; Los estambres son numerosos, los carpelos libres y los frutos generalmente apocárpicos [4].

Algunos miembros de la familia producen alcaloides del grupo bencil-isoquinolina, otros acumulan sílice, taninos y proantocianinas, aceites esenciales u oxalato de calcio [28].

La familia Annonaceae por lo general se desarrolla en clima tropical, sólo algunas especies de los géneros *Asimina* y *Deeringothamnus* aparecen en zonas templadas de Norteamérica. En general, hay un marcado contraste entre las formas del Viejo Mundo, que tienden a ser trepadoras o de formas muy extendidas en las selvas húmedas a baja altitud, hasta los 1500 m de altura, rara vez los 2000 m, mientras que en el Nuevo Mundo tienden a ser árboles o arbustos y a crecer en zonas de sabana y cerrado, donde algunas especies están altamente especializadas como pirófitos, ciertas especies de *Annona* y *Duguetia*, lo cual no es obstáculo para que alguna especie, como *Raimondia quinduensis* alcance los 2600 m en las montañas colombianas [29].

4.1.1. ANNONACEAS DE COLOMBIA

En Colombia se reporta alrededor de 240 especies pertenecientes a 30 géneros, las principales annonaceas que se encuentran cultivadas para su producción son en su orden: *Annona muricata*, *Annona cherimola* y *Annona blanca*. Otras especies de menor importancia se encuentran en forma silvestre estas son: *Rollinia mucosa* Bail, *Annona colorada* y *atemoya* (hibrido no comercial) [7,8]. Los cultivos se encuentran distribuidos entre 10 departamentos (Antioquia, Bolívar, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Risaralda, Santander, Tolima y Valle), siendo los más grandes productores, Tolima (Falán, Guamo y San Luis) y Valle (Toro) con el 76% de la producción total nacional [4].

De los géneros encontrados en Colombia: *Anaxagorea*, *Annona*, *Cananga*, *Duguetia* y *Xylopia* tienen distribución pantropical, en tanto que *Diclinanona*, *Froesiodendron*, *Guatterrella*, *Guatterriopsis*, *Ruizodendron* y *Trigynaea* son amazónicos y los restantes géneros son neotropicales (ver tabla 1). La familia está ampliamente distribuida en todo el país. La mayor diversidad de especies se encuentra en las regiones amazónica (54 %), pacífica (27.5%) y andina (27%). El 87 % crece en alturas menores de 500 m y solo *Raimondia quinduensis* alcanza los 2600 m [4].

La familia es importante desde el punto de vista alimenticio pues *Annona cherimola* (Chirimoya), *Annona muricata* (Guanábana), *Raimondia cherimolioides*, *Raimondia quinduensis* y *Rollinia mucosa* se cultivan por sus frutos deliciosos. En la región amazónica las annonaceas se conocen como cargueros, debido a que la corteza externa se emplea como amarre. Algunas especies como *Bocageopsis spp*, *Fusaea longifolia*, *Guatteria megalophylla*, *Guatteria stipitata* y *Oxandra polyantha* son de

importancia maderera, otras se utilizan como medicinales y en ocasiones también se emplean por las comunidades indígenas en ritos ceremoniales [30, 31].

TABLA 1. Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae [32].

Géneros	Número de especies		Distribución		
	Mundial	Colombia	Pantropical	Neotropical	Amazonia
<i>Xylopia</i>	170	22	X		
<i>Annona</i>	150	26	X		
<i>Duguetia</i>	100	27	X		
<i>Anaxagorea</i>	29	11	X		
<i>Cananga</i>	2	1	X		
<i>Guatteria</i>	265	74		X	
<i>Rollinia</i>	44	11		X	
<i>Oxandra</i>	35	10		X	
<i>Unonopsis</i>	30	13		X	
<i>Crematosperma</i>	30	4		X	
<i>Cymbopetalum</i>	27	6		X	
<i>Desmopsis</i>	13	1		X	
<i>Pseudoxandra</i>	10	4		X	
<i>Ephedranthus</i>	10	2		X	
<i>Klarobelia</i>	10	2		X	
<i>Mosanona</i>	14	3		X	
<i>Porcelia</i>	7	2		X	
<i>Malmea</i>	6	1		X	
<i>Tetrameranthus</i>	6	3		X	
<i>Stenanona</i>	5	1		X	
<i>Bocageopsis</i>	4	2		X	
<i>Raimondia</i>	3	2		X	
<i>Fusaea</i>	2	2		X	
<i>Pseudomalmea</i>	2	2		X	
<i>Trigymaea</i>	8	1			X
<i>Guatterriopsis</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

4.1.2. *Annona muricata* (Guanábana)

4.1.2.1. Producción mundial

La guanábana es originaria de las regiones tropicales de América del Sur, es muy abundante en las Indias Occidentales, hoy en día se encuentra en las Bermudas y las Bahamas tanto silvestre como cultivada, desde el nivel del mar hasta una altitud de 1150m [33].

Fue uno de los primeros árboles frutales llevados desde América a los trópicos del Viejo Mundo de donde ha sido ampliamente distribuida por el sureste de China, Australia y las tierras del este y del oeste de África. Es común en los mercados de Malasia y el sureste de Asia. Frutos muy grandes y simétricos se han visto en venta en Vietnam del Sur. Quedó definitivamente establecido en una fecha temprana en las Islas del Pacífico. El árbol se ha plantado con éxito, pero nunca ha dado frutos en Israel [33].

La guanábana es uno de los frutos más abundantes en República Dominicana y uno de los más populares en Cuba, Puerto Rico, las Bahamas, Colombia, el noreste de Brasil, el sur de México, Perú y Argentina [33]. Esta es una de las 14 frutas tropicales recomendadas por el Instituto Latinoamericano de Mercadeo Agrícola para la plantación y comercialización a gran escala.

4.1.2.2. Producción nacional

El cultivo de guanábana en Colombia tiene un área aproximada de 1.300 hectáreas y una producción anual de 10010 ton, los principales departamentos productores son: Tolima, Valle del Cauca y Huila, el mercado de esta fruta tropical exótica es cada vez más amplio, tanto para consumo interno como para el exterior, básicamente por sus excelsas características sensoriales [8].

4.1.2.3. Descripción

Los árboles de la guanábana requieren mucho calor, humedad y buenas porciones de agua, serán dañados por temperaturas debajo de 32 °F/0°C. En las zonas tropicales, la guanábana se produce a nivel del mar hasta 1000 m, particularmente en las regiones húmedas el árbol crece bien. La guanábana no puede tolerar el agua derecha y sus raíces son bajas, así requiere de una buena profundidad en la tierra [34].

La propagación de la guanábana se produce comúnmente de la semilla, los árboles se pueden también propagar por métodos del injerto y del florecimiento. El injerto de los manzanos de la chirimoya y de azúcar (y viceversa) sobre la guanábana hasta el momento ha sido un fracaso. Las semillas de la guanábana se pueden almacenar por varios meses antes de plantar, la germinación de semillas toma generalmente tres semanas, pero bajo condiciones sub-óptimas puede ser retrasado por hasta 2-3 meses. Las plantas de semillero de la edad del mes 6-9 son generalmente bastante grandes para ser precisadas en el campo, o ser utilizadas como rizomas para injertar [34].

4.1.2.4. Clasificación botánica [35]

Reino: Plantae

División: Spermatophytia

Clase: Dicotiledónea

Orden: Ranales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona muricata*



FIGURA 2. *Annona muricata* [35]

4.1.2.5. Fenología

El árbol de guanábana como se ve en la figura 3 es de ramas caídas, bajas, delgadas y alcanza una altura de 7.5 a 9 m, las hojas de fuerte olor, algo desagradable son normalmente perennes, alternas, lisas, brillantes, de color verde oscuro en la superficie superior y más claras por la inferior, oblongas y elípticas, son de 6.25 a 20 cm de largo y de 2.5 a 6.25 cm de ancho [36].



FIGURA 3. Árbol de *Annona muricata* [35].

4.1.2.5.1. Flores

Las flores son simples y pueden surgir en cualquier lugar en el tronco, ramas o ramillas. Son de corto peciolo, tienen 4 a 5 cm de largo, regordeta y triangular-cónica, de 3 pétalos externos algo anchos y carnosos de color amarillo-verdoso y tres pétalos más estrechos interiores de color amarillo pálido como se presenta en la figura 4 [36].



FIGURA 4. Flor *Annona muricata* [36].

4.1.2.5.2. Semillas

Sus semillas como se ven en la figura 5 son ovaladas, lisas y duras, de color negro de 1,25 a 2 cm de largo. Una fruta puede contener desde unas pocas docenas a 200 o más semillas [36].



FIGURA 5. Semillas de *Annona muricata* [36].

4.1.2.5.3. Fruto

La guanaba es una fruta de forma ovalada semejante a un corazón, ovoide o de forma irregular, esto último debido a un desarrollo inapropiado del cárpelo o vacíos producidos por insectos, la fruta alcanza los 10 a 30 cm de longitud, está cubierta por una cáscara de color verde oscuro con varias espinas pequeñas, suaves y carnosas que se desprenden fácilmente cuando la fruta está madura como se muestra en la figura 6. La aromática pulpa, con textura similar a la del algodón, es blanca, cremosa, jugosa y suave, recubre totalmente las semillas negras de 1.25 a 2 cm de largo, cada fruta puede tener hasta 200 semillas, la mayoría de los segmentos no contienen semilla, su sabor ácido-subácido ha sido descrito como similar al de la piña y el mango [33].

El peso de la fruta va de 1 a 10 kilos y cuando el fruto está maduro éste se vuelve verde mate y adquiere una consistencia blanda con apariencia verticulada, de sabor agrídulce, por lo que no es comestible como fruta fresca, además tiene un número indefinido de espinas blandas [34].



FIGURA 6. Fruto de *Annona muricata* [34]

4.1.2.5.4. Pulpa y piel

La pulpa es blanca, cremosa, carnosa, jugosa y ligeramente ácida, mide de 2 a 3 dm de largo, puede llegar a pesar 2,5 kg, está cubierta con una piel coreácea, delgada, reticulada, no comestible, de la que surgen desde pocas, hasta muchas protuberancias finas, curvadas y blandas que semejan espinas como se ve en la figura 7, estas protuberancias se van haciendo mas cortas a medida que la fruta madura, el aroma de la pulpa es típico algo similar a la piña, de sabor ácido-subácido y único. La piel se rompe fácilmente cuando la fruta está madura, es verde oscuro en la fruta inmadura, convirtiéndose a ligeramente amarillento-verde cuando madura, es suave al tacto [36].



FIGURA 7. *Annona muricata* [36].

4.1.2.6. Sexualidad

La flor es hermafrodita, colgante y poco llamativa, compuesta por los estambres y los pistilos. Las flores de las anonaceas son dicógamas y protógenas. Dicógamas: aunque sus flores son perfectas, sus órganos sexuales no maduran al mismo tiempo [37]. Protógenas: durante el período en que la flor permanece abierta, los estigmas solo están receptivos al principio mientras que los estambres sueltan el polen más tarde, impidiendo la autopolinización [38]. Es decir, los pistilos están maduros y son receptivos, mientras tanto los estambres aún no están maduros y por lo tanto no liberan polen. El comportamiento dicogámico es la causa principal del bajo grado de auto polinización ya que la condición de dicogamia impide la autopolinización, porque la parte femenina y masculina no son coincidentes en la apertura bajo las mismas condiciones del medio [39].

4.1.2.7. Usos

La pulpa de la guanábana está constituida principalmente por agua; además proporciona sales minerales, potasio, fósforo, hierro, calcio, lípidos, tiene un alto valor calórico debido a la presencia de hidratos de carbono; además es rica en vitamina C y provitamina A, así como de vitamina B [33].

Todas las partes del árbol en general tienen propiedades insecticidas, debido a los alcaloides muricina y muricinina, acetogeninas, flavonoides, entre otros [30,41].

El polvo y aceite de las semillas ha sido usado para matar piojos, chinches, polillas y cucarachas en diferentes partes del mundo [40,41].

Las hojas tienen aplicaciones medicinales para reumatismo, enfermedades de la piel, resfriados, dolores de estómago, diabetes, sedante y antiespasmódico.

El té de sus flores se mezcla con miel para los resfriados, dolor del pecho y desórdenes nerviosos, la corteza y frutos jóvenes al contener taninos se usan para tratar diarrea y la corteza verde se frota en heridas como coagulante [40,41].

4.1.2.8. Estudio fitoquímico de la *Annona muricata*

Los compuestos fitoquímicos de sus hojas, tallos y flores tienen una destacada aplicación en la fitomedicina. Aproximadamente el 70% de los ácidos grasos de la guanábana son insaturados, ubicando los aceites que tiene dentro de un rango aceptable entre los aceites alimenticios convencionales, tan estables como el aceite de algodón, maíz y soya. Sin embargo hay que advertir que al extraer el aceite de semilla de *Annona muricata* con otros solventes, éste es extraído junto con sustancias químicamente bioactivas y citotóxicas que pueden actuar como inhibidores del crecimiento de larvas, insectos y microorganismos, también se han reportado como tóxicas para los humanos [42,43].

Se han aislado metabolitos como alcaloides, ácidos grasos, amidas y acetogeninas, tanto de la corteza, como de las semillas, el tallo y las hojas. En la Tabla 2, se mencionan algunos de los compuestos aislados de esta especie [44, 45].

TABLA 2. Compuestos aislados de *Annona muricata* [46].

NOMBRE DEL COMPUESTO	TIPO DE COMPUESTO	FUENTE	ACTIVIDAD BIOLÓGICA REPORTADA	REFERENCIA
Cis-annonacina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	45
Annomuricina E	Acetogenina	Hoja	Citotóxica	47
Cohibina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	48
Ácido butanoico	Ácido	Semillas	-----	49
Javoricina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	45
Montecristina	Acetogenina	Raíz	-----	44
Cis-solamina	Acetogenina	Raíz	Citotóxica	50
Annopentocina	Acetogenina	Hojas	Citotóxica	51
Longicina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	52
Annomutacina	Acetogenina	Hoja	Citotóxica	53
Ácido linoleico	Ácido	semillas	-----	54
Ácido oleico	Ácido	semillas	-----	54
Ácido palmitoleico	Ácido	semillas	-----	54
Ácido palmítico	Ácido	semillas	-----	54
Ácido esteárico	Ácido	semillas	-----	54

Continuación **TABLA 2.** Compuestos aislados de *Annona muricata* [46].

NOMBRE DEL COMPUESTO	TIPO DE COMPUESTO	FUENTE	ACTIVIDAD BIOLÓGICA REPORTADA	REFERENCIA
Annomurina	Alcaloide	-----	Antitumoral Antibacteriana antifúngicas	55
Coclaurina	Alcaloide	-----	Antitumoral Antibacteriana antifúngicas	55
Reticulina	Alcaloide	-----	Antitumoral Antibacteriana antifúngicas	55

4.2. ACETOGENINAS

Los compuestos de interés por su comprobada actividad biológica presentes en las annonáceas se conocen como acetogeninas, actualmente comprende a un grupo de más de 430 compuestos naturales, encontrados únicamente en las familias Annonaceae y Lauraceae. Estructuralmente, la mayoría de las acetogeninas poseen una cadena alifática de 35 ó 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos (THF) adyacentes o no, así como sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos) localizados a lo largo de ésta. En uno de sus extremos presentan un anillo lactónico metil sustituido, α,β insaturado, en ocasiones saturado o rearrreglado como cetolactona. También se han descrito compuestos con dobles enlaces en la cadena alifática, compuestos con anillos epoxi o tetrahidropirano (THP) así como lineales [56].

Se ha reportado que *Annona muricata* posee más de 50 acetogeninas con diferentes actividades biológicas encontradas en frutos, semillas, corteza y hojas. Otros estudios han reportado el aislamiento de 21 acetogeninas citotóxicas en las hojas de esta planta [57].

Desde la primera acetogenina, uvaricina, reportada en 1982 [58], la investigación en estos compuestos ha tenido una gran expansión debido a sus diversas actividades biológicas, incluida la antitumoral in vitro, citotóxica, pesticida, antiparasitaria y de efecto inmunosupresor [56]. Estas diversas actividades biológicas son probablemente explicadas por la inhibición de la enzima NADH ubiquinona oxidoreductasa o complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial [59].

4.2.1. Clasificación de acetogeninas

De acuerdo con el arreglo de los anillos THF, las acetogeninas se clasifican en seis tipos como se muestra en la figura 8: mono THF, bis THF adyacentes, bis THF no adyacentes, tri THF, tetrahidropirano (THP) y lineales. Y según el tipo de lactona terminal, en tres subtipos.

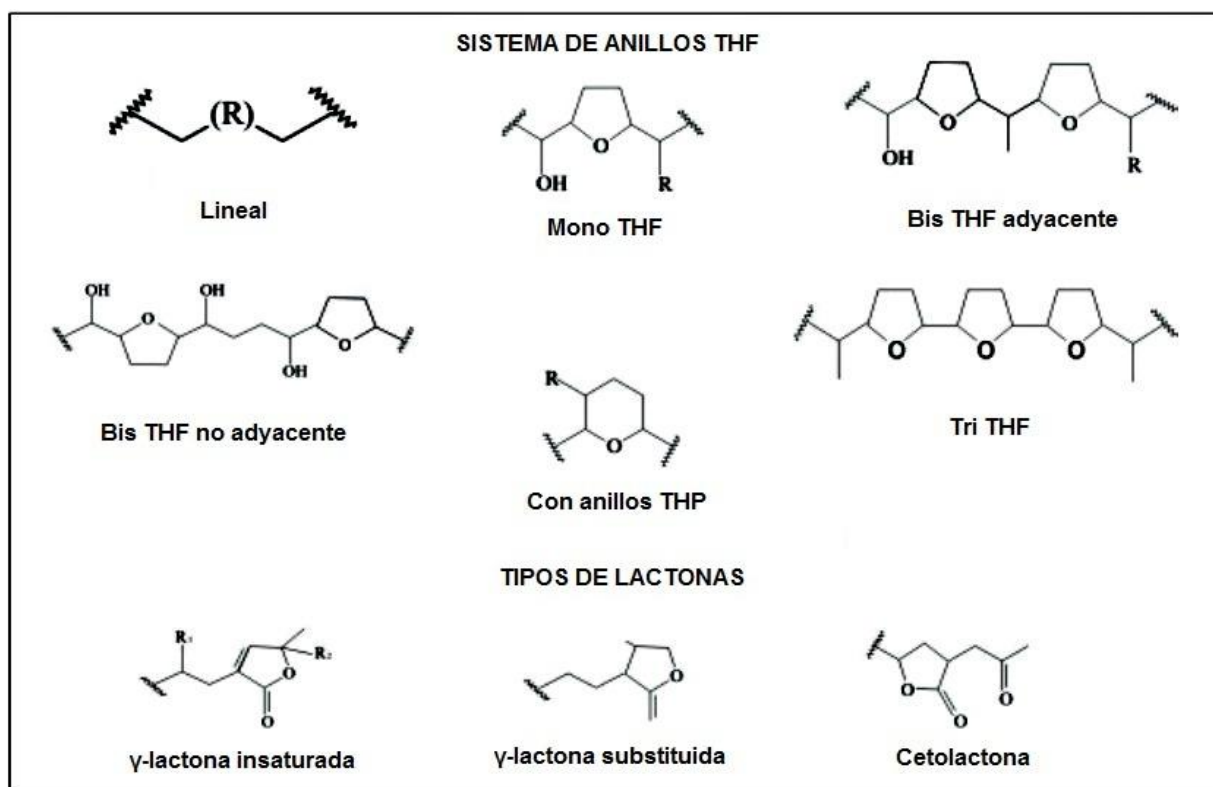


FIGURA 8. Clasificación de acetogeninas de Annonaceae [47, 59].

4.2.1.1. Acetogeninas sin anillo tetrahidrofuránico

También llamadas acetogeninas lineales, varían en el grado de insaturación e hidroxilación de la cadena alquílica. Se reportan 37 en los géneros *Annona*, *Goniothalamus*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Xylopia*. La diepomuricanina A es el único compuesto encontrado sólo en *Annona* y *Rollinia* [55]. Su estructura general es:



FIGURA 9. Estructura general de Acetogeninas Lineales [55].

4.2.1.2. Acetogeninas mono tetrahidrofuránicas

Con un solo núcleo tetrahidrofuránico (THF), en la mayoría el grupo THF está flanqueado por dos hidroxilos en las posiciones α y α' (THF 1), otras más son α monohidroxiladas (THF 2). Se conocen 131 acetogeninas mono THF 1 y 26 mono THF 2, siendo las primeras las de mayor diversidad. Las moléculas mono THF 1 más frecuentemente aisladas de especies de Chiapas (México) son la Annonacina que se encuentra en *Annona* y *Xylopia* y la gigantetrocina A, la goniotalamicina y la uvariamicina III de especies del género *Annona*; las mono THF 2, más frecuentes son la gigantetronenina aislada de los géneros *Annona* y *Xylopia* y la isoannonacina de *Annona* [55]. Su estructura general es:

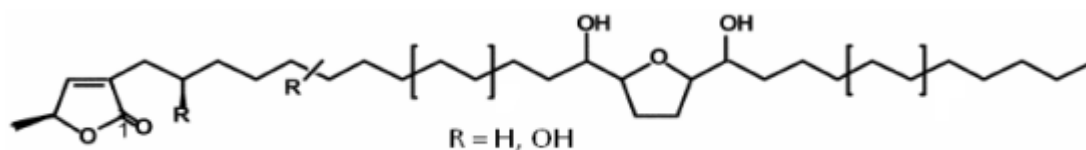


FIGURA 10. Estructura general de acetogeninas mono-THF [55].

4.2.1.3. Acetogeninas bis- tetrahidrofuránicas

Son compuestos que poseen 2 anillos THF, adyacentes o no adyacentes; de 35-37 carbonos, diferenciables entre sí por el grado de oxidación, tipo, número y ubicación del sustituyente, así como de su estereoquímica [55]. Su estructura general es:

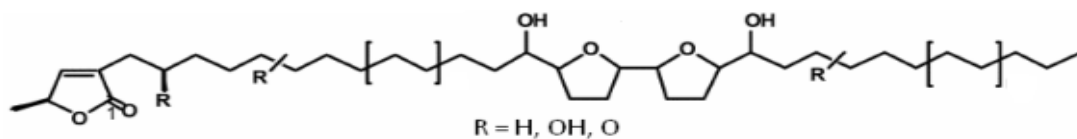


FIGURA 11. Estructura general de acetogeninas bis-THF [55]

4.2.1.4. Acetogeninas tri tetrahidrofuránicas adyacentes

Con tres anillos THF adyacentes, hasta el momento sólo dos moléculas aisladas de *Annona* y *Goniothalamus giganteus* pertenecen a este tipo [55]. Su estructura general es:

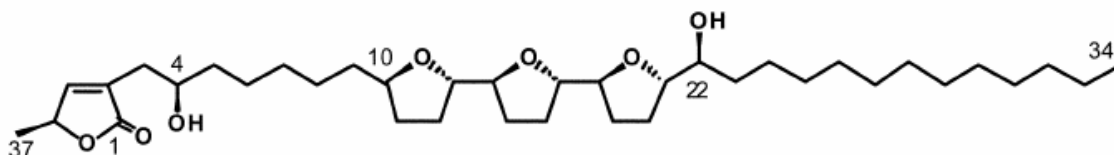


FIGURA 12. Estructura general de acetogeninas tri-THF [55].

4.2.1.5. Acetogeninas con anillos tetrahidropiránicos

Caracterizadas por la presencia de un anillo tetrahidropiránico, son las menos reportadas de la familia. Solamente se han obtenido cuatro, de *Rollinia* y *Goniothalamus* [55]. Su estructura general es:

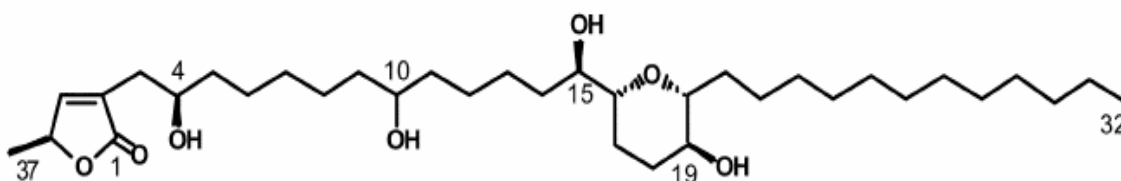


FIGURA 13. Estructura general de acetogeninas THP [55].

4.2.1.6. Epoxiacetogeninas

Las acetogeninas, por lo general poseen uno o dos anillos THF. Cuando este anillo es reemplazado por un grupo epóxido se obtienen las epoxiacetogeninas. Este tipo estructural es considerado como el precursor de las acetogeninas [55]. Su estructura general es:

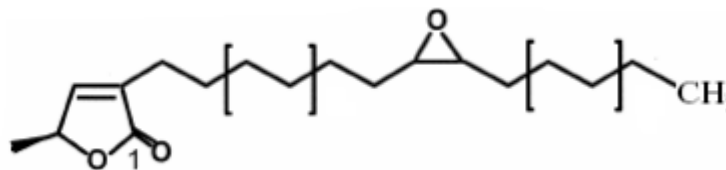


FIGURA 14. Estructura general de Epoxi-acetogeninas [55].

4.2.2. Separación e identificación de acetogeninas

En la literatura se han reportado varios métodos para la extracción de acetogeninas, encontradas principalmente en las hojas [60, 61], semillas [62, 63] y raíces [64] de algunas anonáceas. Las acetogeninas son fácilmente solubles en la gran mayoría de solventes orgánicos. Algunas técnicas para el aislamiento de acetogeninas utilizan extracción en éter, filtración en frío con hexano y etanol para extraerlas del material seco de la planta, seguido por la partición en disolventes de diferente polaridad, para concentrar los componentes [65].

Para la extracción de acetogeninas de otras especies de la familia Annonaceae se encuentran varias metodologías: *Annona crassiflora* [64], *Annona squamosa* [62, 63], *Annona montana* [66], *Annona senegalensis* [65], *Rollinia mucosa* [67], *Annona cherimola* [61], *Annona atemoya* [68] entre otros.

Para la identificación de las diferentes acetogeninas es necesario conocer las configuraciones, la posición de los anillos, la posición de los diferentes grupos y el peso molecular de cada estructura para lo cual se han utilizado técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN) [68], infrarrojo (IR) [69] y espectrometría de masas (EM) [70].

4.2.3. Actividad biológica de las acetogeninas de anonáceas

Las acetogeninas de las anonáceas, descritas por primera vez en 1982 por Jolad et al. [71], son compuestos policetidos con actividades antitumorales, citotóxicas, antiparasitarias, plaguicidas, antimicrobianas, antifúngicas, inmunosupresivas y herbicidas. Estos compuestos son de particular interés porque sus intermediarios de la biosíntesis se asemejan a los de organismos muy primitivos, lo que tiende a confirmar el arcaísmo de la familia Annonaceae [55].

Se ha reportado que las acetogeninas de Annonaceae pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de las células resistentes. Las acetogeninas son potentes inhibidoras de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una esencial enzima en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial [60, 72,73].

La actividad antiprotozoaria asociada con esta familia radica en su importancia en el tratamiento tradicional para enfermedades como la malaria, el mal de chagas y la leishmaniasis, asociadas a metabolitos encontrados en varias partes de las plantas de esta familia como los alcaloides, acetogeninas, esteroides y terpenos [74].

Las acetogeninas representan al menos en potencia, una fuente de drogas antitumorales, al estar entre los agentes citotóxicos más potentes que se conocen, incluso con actividad citotóxica sobre células tumorales resistentes a multifármacos. La actividad de estas acetogeninas está en relación con su estructura y con el carcinoma probado; es decir, tienen actividad selectiva. En la tabla 3 se mencionan algunas especies de annonaceas que presentan bioactividad y su respectiva acetogenina, entre las más potentes están las acetogeninas bis-THF adyacentes, seguidas por las bis-THF no adyacentes; y en algunas líneas tumorales las más potentes son las mono THF [55].

TABLA 3. Acetogeninas de algunas especies de Annonaceae que presentan bioactividad.

ACETOGENINA	PLANTA	ACTIVIDAD	REFERENCIA
Uvaricina	<i>Uvaria acuminata</i>	Antileucémico	43
Annonacina	<i>Annona glauca</i>	Citotóxico y antihelmíntico	75
Crasiflorina	<i>Annona crasifolia</i>	Citotóxico	76
Bullatacina	<i>Annona atemoya</i>	Induce apoptosis	77
Rolliniastatina I	<i>Rollina emarginata</i>	Antileishmaniasis	78
Muricina H	<i>Annona muricata</i>	Citotóxico	79
Annomuricina A	<i>Annona muricata</i>	Antimalárico	74

4.2.3.1 Relación estructura-actividad

Diversos estudios han sugerido una relación entre la estructura de las acetogeninas y la actividad biológica al considerar las siguientes características.

- Las acetogeninas que contienen en su estructura dos anillos tetrahidrofurano adyacentes son las que han presentado mayor actividad biológica. Los estudios realizados han sugerido que la función del anillo tetrahidrofuránico sea anclar las acetogeninas a la región que contiene glicerol en la membrana liposomal [80].
- La γ -lactona terminal es esencial para la actividad biológica, ya que una reducción del doble enlace de la γ -lactona α , β -insaturada reduce la actividad [80].
- El número de grupos hidroxilo presentes a lo largo de la cadena también está relacionado con la actividad biológica, presentando mayor actividad aquellas acetogeninas que poseen un mayor número de grupos OH [80].
- Un grupo hidroxilo en C-4 es esencial para la actividad biológica [80].
- Acetogeninas con grupos ceto a lo largo de la cadena alifática son menos activas que aquellas que presentan grupos hidroxilo [80].
- La presencia de dobles enlaces o de dioles vecinales a lo largo de la cadena hidrocarbonada aumenta la actividad biológica [80].
- La longitud de la cadena C-35 o C-37 es la ideal para que se presente actividad biológica [80].
- Se observa una mayor actividad biológica cuando la distancia entre la γ -lactona y el anillo tetrahidrofuránico es de trece carbonos. Las acetogeninas que presentan un hidroxilo en C-9 presentan actividad considerable, así como aquellas que presentan anillos tetrahidrofuránicos flanqueados por OH [80].

4.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los bioensayos de toxicidad son una herramienta utilizada con el objeto de evaluar en forma efectiva y eficiente los efectos tóxicos agudos y crónicos de la contaminación en los organismos vivos. En la práctica, esta técnica cuantifica la relación concentración-efecto de compuestos químicos conocidos o mezclas complejas, por medio de respuestas biológicas medidas bajo condiciones controladas y estandarizadas, es una excelente herramienta para determinar el grado de nocividad de algún producto y permite también estimar el riesgo potencial para el ambiente de una manera mucho más aproximada que si solamente se hicieran los análisis físicos y químicos tradicionales [81].

Los mejores organismos indicadores son los que manifiestan sensibilidad al contaminante que se quiere estimar y su mayor o menor presencia en el hábitat provee una indicación a veces muy precisa del nivel de contaminación. En los ambientes acuáticos es común la utilización de organismos indicadores para evaluar parámetros tales como concentración de materia orgánica, en forma de nutrientes, la presencia de pesticidas, plaguicidas y fertilizantes, metales pesados y otros productos que afectan el normal desarrollo del organismo usado como indicador. La importancia de estos controles por bioensayos se basa en que permiten predecir en el laboratorio y a campo el efecto que la sustancia ensayada puede tener sobre la biota [81].

Los organismos de prueba pueden ser:

- Organismos *in vitro*.
- Organismos colectados en campo.

En general, es preferible utilizar organismos criados en el laboratorio en vez de los recolectados en el campo porque los exámenes estandarizados requieren de un abastecimiento siempre disponible de organismos en buena salud provenientes de cultivos con condiciones conocidas y constantes [81].

4.3.1. Bioensayo de toxicidad con larvas de *Artemia salina*

El bioensayo con la *Artemia salina* Leach es usado para evaluar diferentes actividades farmacológicas de las plantas, en donde los compuestos son bioactivos a dosis más bajas, que la toxicológica, mientras que la letalidad de un organismo puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos, considerando los valores menores de 1,000 ppm como bioactivos [82,83].

Es la primera técnica utilizada para obtener la letalidad *in vivo* utilizando un crustáceo diminuto y desde su introducción en 1982, esta prueba se ha utilizado para el aislamiento *in vivo*. La mayoría de los trabajos han sido con el nauplio salido del cascarón, aunque la inhibición de los huevos también se ha estudiado.

Por medio de esta técnica es posible determinar la concentración letal media (CL₅₀) en ppm de componentes activos de extractos en un medio salino. La *Artemia salina* ha sido utilizada en ensayos o en análisis de residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, toxinas dinoflagelares, toxinas en ambiente marino, compuestos químicos en muestras ambientales, toxinas naturales presentes en alimentos, productos farmacéuticos y toxicidad dispersa del aceite, debido a que la larva de este crustáceo es altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas [84,85].

4.3.1.1. *Artemia salina*

La *Artemia salina* es un crustáceo perteneciente a la Subclase Branchiopoda, cuyos componentes se caracterizan por estar dotados de apéndices torácicos en forma de hoja y al Orden Anostraca, dada la ausencia de caparazón rígido [86].

El cuerpo de *Artemia* es delgado y alargado como se muestra en la figura 15, está cubierto por un caparazón blando. Su longitud y aspecto son variables según la población/especie que se considere (bisexuales o partenogenéticas y diploides o poliploides) y según la salinidad y otras características físico-químicas del medio en que viven. Su tamaño oscila entre 7 y 12 mm de longitud, aunque puede alcanzar los 17-18 mm y en casos extremos de algunas cepas partenogenéticas poliploides, pueden llegar a los 20 mm [86].



FIGURA 15. *Artemia salina* [86].

El éxito en la inoculación de *Artemia* en diferentes zonas de todo el mundo y su amplia distribución natural en diferentes ambientes continentales y litorales permite atribuirle una gran capacidad de adaptación y tolerancia a muy diversas situaciones y a un amplio rango de características medioambientales. Uno de los rasgos más notables de *Artemia* es su capacidad para habitar aguas de salinidades extremas, tanto aguas dulces como salinas saturadas de cloruro sódico (desde 10-20 g/L a más de 300 g/L), lo cual implica unas peculiaridades fisiológicas muy interesantes en lo que respecta al control de la concentración osmótica [86].

La *Artemia* es un habitante típico de lagos y charcas hipersalinos que están caracterizados por albergar comunidades con una pequeña diversidad de especies y una estructura trófica bastante simple [86].

La *Artemia salina* tiene una gran importancia en la industria acuícola por sus resultados en la alimentación de larvas de peces y crustáceos, pero además ha sido propuesta como un sistema de prueba mundial para medir toxicidad de sustancias químicas y para estudios en el desarrollo de la toxicología [86], entre los criterios que avalan dicha propuesta se encuentra que:

- Se puede coleccionar poblaciones homogéneas de nauplios del instar I metanaupliar.
- Inmediata caracterización del desarrollo por simples técnicas de medición y demostrar vulnerabilidad diferencial de nauplios durante su desarrollo.
- Se afirma que la *Artemia* cubre ampliamente todos los requisitos de disponibilidad segura, métodos sencillos de obtención, europlasticidad y

versibilidad en el uso, ya que los nauplios son fáciles de obtener a través de quistes secos que se encuentran disponibles en cualquier parte del mundo.

- Los nauplios son muy tolerantes a diversas condiciones de cultivo, resistiendo incluso manejos bruscos, pueden ser desinfectados, pueden crecer a un tamaño adecuado y ser usados como transportadores de sustancias.

La única desventaja, es la variabilidad de la calidad de eclosión que se ha demostrado entre cepas diferentes y entre un mismo lote de quistes.

Los ensayos de toxicidad con *Artemia salina* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, agua de poro y extracciones de sedimentos, entre otros [86].

4.3.2. Bioensayo insecticida con insectos de *Puto barberi*

A nivel regional, el manejo de las plagas del café se ha tornado un problema de difícil control por la gran cantidad de plagas que atacan directamente la calidad física de los granos de café. Las condiciones de humedad relativa y temperatura son idóneas para la propagación a gran escala de toda clase de insectos. Las plagas no sólo afectan la calidad, sino que además, son precursores de hongos y otros microorganismos indeseables.

Las cochinillas de la raíz del café (Hemíptera: Pseudococcidae) son insectos que succionan la savia de la planta, la debilitan y causan heridas que permiten la entrada de enfermedades como la llaga macana. Pueden llegar a constituirse en una importante plaga, ya que afectan directamente el desarrollo, producción y calidad del fruto [87].

La cochinilla harinosa se alimenta directamente del floema de las plantas, ya sea en la raíz o en la parte aérea y ocasiona su debilitamiento por la succión de savia. También puede comportarse como transmisora de virus, afecta la calidad de la fruta por depósito de melaza con posterior presencia de fumaginas (hongo saprófito de color negro). La presencia de fumagina atrae hormigas, las que impiden la actividad de los enemigos naturales, produciéndose verdaderas simbiosis hormigas-cochinillas, este

insecto tiene un amplio rango de hospederos, se alimenta de muchas especies agrícolas, malezas, plantas de interior, ya que las condiciones ambientales de lugares cerrados favorecen su desarrollo, puede afectar a casi cualquier planta ornamental y árboles frutales, entre las plantas más afectadas, encontramos la *Dracaena*, el *Cissus*, el café, los Helechos, las orquídeas, las palmeras, la *Saintpaulia*, la *Buganvilla*, aguacate, bambú, cacao, dalia, dáttil, granado, higo, jojoba, jujube, mango, manzana, membrillo, nuez de nogal, oleander, sauce, e incluso los cactus y frutos como cítricos y las uvas [88].

Entre los problemas principales para contrarrestar esta plaga se encuentran el momento oportuno de aplicación, el largo periodo de incubación de los huevos, la escasa actividad alimentaria de los estadios juveniles y la natural tolerancia (no resistencia) que el insecto ofrece.

4.3.2.1. *Puto barberi* (Cochinilla Harinosa)

Puto barberi pertenece a la familia *Pseudococcidae* del orden Hemiptera, es un insecto fitófago conocido también como “chanchito blanco o piojo harinoso” y debe su nombre vulgar a la presencia de una cera pulverulenta que recubre todo su cuerpo, su cuerpo es de forma ovoide, uniformemente recubierto por una fina secreción cerosa, pulverulenta, blanca, que da al cuerpo del insecto un color blanco grisáceo. Posee 17 pares de filamentos laterales cortos, bien definidos como se muestra en la figura 16 [88].



FIGURA 16. *Puto barberi* (Cochinilla harinosa) [88].

La Cochinilla harinosa completa su ciclo biológico -desde huevo hasta adulto- entre 30 y 60 días según las temperaturas. Cada hembra coloca 400 huevos en promedio en una bolsa de fibra cerosa, después de la puesta que dura de 5 a 10 días, la hembra muere. Las cochinillas jóvenes, que son muy móviles, se dispersan para encontrar un lugar adecuado de alimentación y comienzan a succionar savia de la planta. Hay 3 estadios de ninfas. La hembra adulta es de cuerpo ovalado y de color blanquecino, cubierto por una delgada capa de cera. Su tamaño es de 3 a 4mm de largo y los machos son más pequeños y alados [89].

4.4. DETERMINACION DE LA CL₅₀ PARA PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA

Uno de los aspectos importantes en toxicología y ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como la relación dosis-respuesta, constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio ambiente [90].

Existen muchas formas de determinar la toxicidad y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50% [90]. En la figura 17 se muestra un esquema que facilita la selección del método de análisis.

Una prueba de toxicidad típica involucra un agente o estímulo (un pesticida, un metal pesado o una muestra ambiental con contaminantes químicos), el cual se aplica a un organismo o grupo de organismos (un cultivo bacterial o de un alga, animales, o plantas) al que se denomina genéricamente sujeto, sobre el que se evalúa una cierta respuesta preseleccionada. La magnitud del estímulo o dosis puede medirse como un peso, un volumen o una concentración [90].

La respuesta del sujeto se valora mediante la cuantificación final de alguna características (peso del cuerpo, peso del hígado, ritmo cardiaco, etcétera), el cambio de ella (aumento en el peso corporal, disminución en la presión sanguínea) o por la ocurrencia o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, una contracción muscular, etcétera) [90].

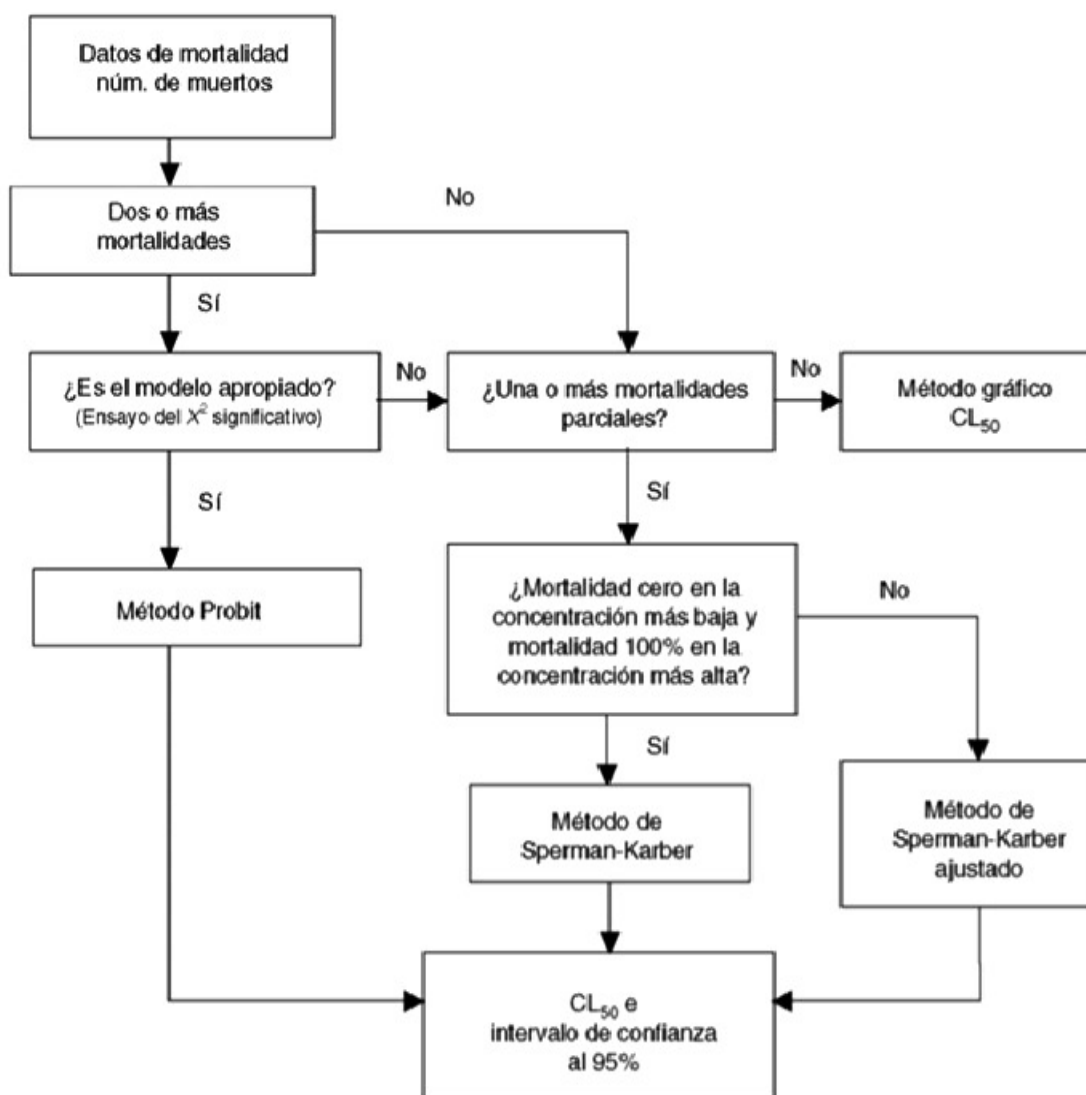


FIGURA 17. Esquema de selección del método de análisis [90].

Partiendo de la base de que la magnitud o la frecuencia de la respuesta dependerá de la dosis aplicada, las pruebas de toxicidad suelen diseñarse utilizando distintas dosis. La información obtenida de este tipo de ensayos permite la cuantificación de la relación entre las dos variables (dosis y respuesta), caracterizando toxicológica o ecotoxicológicamente al compuesto. Normalmente, las pruebas de toxicidad se diseñan para comparar o estimar la potencia de un agente con relación a una preparación estándar o control [90]. Se recomiendan los métodos de la tabla 4 para la estimación de CL_{50} .

TABLA 4. Métodos para la estimación de CL₅₀

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Método Probit (paramétrico).	La respuesta acumulada de los organismos se transforma a unidades probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual se puede interpolar el 50% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta (CL ₅₀).	90
Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico).	Se construye una gráfica a partir de los datos de las pruebas de toxicidad aguda. Mediante el uso de la recta trazada se obtiene en el eje logarítmico la concentración correspondiente al 50% del efecto observado sobre el eje probabilístico.	90
Método de Sperman-Karber (no paramétrico).	<p>Proporciona una buena estimación de la media y la desviación estándar</p> $CL_{50} = m = X_k - d(S_1 - 1/2)$ <p>Donde:</p> <p>X_k = dosis mínima a partir de la cual todas las reacciones son del 100%.</p> <p>d = distancia entre cada dos dosis</p> <p>S₁ = suma de las fracciones de individuos que presentaron reacción</p>	90

Continuación **TABLA 4.** Métodos para la estimación de CL₅₀

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Método gráfico	Se parte de los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda y utilizando papel logarítmico se grafican en el eje X las concentraciones (mg/L) (lineales) y en el eje Y el porcentaje de mortalidad (logarítmicas). Se colocan los puntos de los porcentajes de mortalidad observados en función de las concentraciones probadas; se conectan los puntos obtenidos más cercanos al 50% del efecto observado y a partir de la recta trazada, se obtiene el punto de corte correspondiente al 50% del efecto observado. Este valor corresponde al Cl ₅₀ del agente estudiado.	91

4.5. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS

4.5.1. Separación por lixiviación

La lixiviación produce el desplazamiento de sustancias solubles o de alta dispersión. Es un proceso en el cual se extrae uno o varios solutos de un sólido mediante la utilización de un disolvente líquido, ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido. Industrialmente la lixiviación se utiliza para preparar elixires, para ello se toma la materia prima, se pulveriza y se mezcla con el disolvente regularmente etanol. Aunque dicho proceso de extracción es comúnmente utilizado en la extracción de minerales metálicos y es estudiado en el proceso ambiental por la difusión de contaminantes o sales en el suelo a través del agua; es un proceso apto para la extracción del sabor y aromas vegetales [92].

4.5.2. Separación por cromatografía

4.5.2.1. Generalidades

La cromatografía es un método de separación de diferentes componentes de una muestra, este método logra la separación de los mismos a través del paso de una muestra por una fase estacionaria con la ayuda de la fase móvil, cada componente de la muestra tiene propiedades particulares que permitirá su interacción en forma diferente entre la fase estacionaria y móvil, de esta forma cada componente se retrasa en forma particular y si el caudal, las características de la fase estacionaria y móvil y la longitud de la columna son las adecuadas se lograra la separación completa de todos los componentes de la muestra. El objetivo principal de un estudio cromatográfico es lograr la separación de todos los componentes en una muestra, para ello es necesario jugar con una serie de factores cromatográficos [69].

La cromatografía incluye una amplia gama de técnicas, que se pueden clasificar atendiendo al fundamento fisicoquímico en el que se basa la separación (cromatografía de adsorción, de reparto, de cambio iónico, de filtración molecular, hidrofóbica y de afinidad), o al material sobre el que se lleva a cabo (cromatografía en papel, capa fina, en columna y de gases) [93].

Todas las técnicas intentan explotar las diferencias físicas, químicas y biológicas de las distintas biomoléculas para llevar a cabo su separación y aislamiento.

Entre dichas propiedades se pueden citar:

- Diferencias en solubilidad en diferentes solventes, tanto orgánicos como acuosos.
- Diferencias en tamaño y forma.
- Diferencias en carga.
- Diferencias en afinidad por otras biomoléculas.

Todas estas propiedades y por tanto, la separación de diferentes compuestos están influenciadas por las condiciones del medio de separación, pH, temperatura, fuerza iónica e hidrofobicidad [93].

4.5.2.2. Cromatografía en capa delgada (CCD)

La cromatografía en capa delgada es un caso de cromatografía de reparto en la que los componentes de una mezcla se separan por diferencia de solubilidad entre dos sistemas disolventes. Los elementos del sistema cromatográfico son: soporte, fase estacionaria y fase móvil o eluyente [93].

Es una técnica simple en cuanto al equipamiento necesario (placa y cámara cromatográfica) y de fácil desarrollo. El parámetro experimental asociado a la técnica es el R_f (coeficiente de reparto), relacionado con la solubilidad relativa de un compuesto entre la fase estacionaria y fase móvil que depende de su estructura química y su hidrosolubilidad/liposolubilidad [93].

4.5.2.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

La Cromatografía líquida de alta eficiencia, es una técnica cromatográfica usada para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica. Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector, en la figura 18 se muestra un esquema del equipo. El analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión, la muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para el analito, el cual depende de la naturaleza de este, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil [94].

Los solutos más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos, los más comunes son Metanol y Acetonitrilo, también suelen usarse sales y buffers para contribuir a la separación de componentes. Estas combinaciones introducen el concepto de gradiente de elución, consiste en la variación de la composición de la fase móvil para adaptarse a los diferentes analitos y conseguir mejores resultados. El gradiente separa la matriz del analito en función de la afinidad de este por la composición de la fase móvil. Cada analito tiene un gradiente de elución óptimo para obtener la máxima separación de picos en el detector [94].

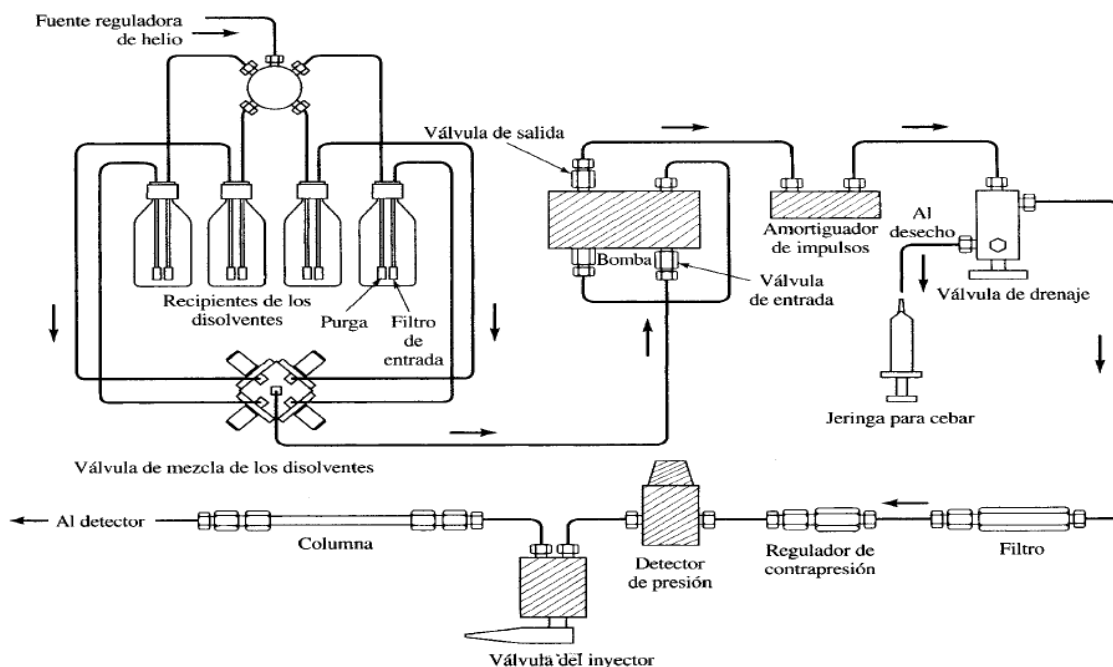


FIGURA 18. Esquema de un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (CLAE) [94].

4.5.2.4. Cromatografía líquida en fase normal

Fue el primer tipo de CLAE, separaba analitos basándose en la polaridad. Este método usa una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar que se usa cuando el analito es polar, el analito es retenido por la fase estacionaria polar, la adsorción aumenta con la polaridad del analito y la interacción entre analito y fase estacionaria, esto incrementa el tiempo de elución. La fuerza de interacción depende no solo de los grupos funcionales, sino también de factores estéricos e isómeros estructurales [94].

El uso de disolventes polares disminuye el tiempo de retención, mientras que disolventes hidrófobos aumentan el tiempo de retención. Algunos solutos polares interaccionan con la fase estacionaria y desactivan la columna [94].

4.5.2.5. Cromatografía líquida en fase reversa

La difusión de la fase reversa se debe a un factor clave: la silicagel (como también la alúmina), es un material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma

capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención: por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra, a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria [70].

Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos, partición del soluto entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida, adsorción sobre una fase estacionaria sólida, o bien un proceso mixto partición-adsorción. En RPLC, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es muy polar (en general mezcla de agua y un modificador orgánico, (MeOH, AcN o THF) [70].

El tipo de sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C18 (grupo octadecilo) y en menor proporción C8 (grupo octil). En RPLC, se observa que para igual carga de carbono, a mayor longitud de cadena corresponde mayor retención y para igual longitud de cadena alquílica, a mayor cobertura, mayor retención. La retención está gobernada por la hidrofobicidad del soluto. A mayor polaridad del soluto, mayor predilección de éste por la fase móvil y menor tiempo de retención. Los solutos no polares tendrán comportamiento inverso, [69, 70].

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron 3 paquetes de semillas de frutos maduros de *Annona muricata* (guanábana), suministradas por la empresa despulpadora Belfruit ubicada en Combia en el departamento de Risaralda. Las semillas fueron recolectadas en tres tiempos diferentes y transportadas a el laboratorio de Oleoquímica de la UTP, cada paquete fue escaldado a una temperatura de 90 °C durante 5 minutos, después de esto se procedió a agregarles agua fría, posteriormente se secaron a 37 °C por 72 horas y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

5.1.1. Pretratamiento de las semillas

Las semillas se molieron en molino eléctrico de cuchillas y el polvo obtenido, fue desengrasado por 24 horas con hexano como solvente, empleando la técnica de extracción Soxhlet en una relación muestra-solvente 1:4, el solvente fue removido posteriormente por rotaevaporación hasta obtener un aceite ámbar [13].

5.1.2. Extracción de acetogeninas

Se llevo a cabo por lixiviación con base en otros estudios [2], realizando tres extracciones con diferentes semillas. La extracción se hizo con polvo de semillas desengrasadas empleando etanol absoluto como solvente en una relación 1:4 (50 g de polvo de semillas y 200 mL de solvente), durante una semana a temperatura ambiente y agitación regular [2]. El extracto obtenido fue concentrado en rotaevaporador.

5.2. BIOENSAYOS

La actividad del extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* L. se evaluó mediante un ensayo citotóxico frente *Artemia salina* y un ensayo insecticida utilizando cochinilla harinosa [95, 96,97].

5.2.1. Ensayo de citotoxicidad

La actividad de los extractos etanólicos 1, 2 y 3 obtenidos de semillas suministradas por la despulpadora, se evaluaron a diferentes concentraciones (9, 5 y 1 ppm), esto se realizo mediante un ensayo de control frente *Artemia salina*.

Se evaluaron los extractos a través del tiempo iniciando los ensayos en la semana de obtención luego en la segunda, cuarta, sexta y octava semana con el fin de observar la pérdida de actividad y la efectividad de los extractos.

5.2.1.1. Preparación de extractos

Para la solución madre, se pesaron 2 mg del extracto crudo desengrasado y se disolvieron en 2 mL de etanol absoluto. A partir de esta solución se prepararon diluciones de 9, 5 y 1 mg/L, tomando en un vial 45 μ L, 25 μ L y 5 μ L de la solución madre respectivamente; se dejo evaporar el solvente, se agregaron 20 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) y luego se llevo a volumen de 5 mL con agua de mar artificial [98].

De igual manera se realizaron dos tipos de controles, un blanco con agua de mar artificial y un control positivo con Etanol. A cada vial se le adicionó 10 nauplios de *Artemia salina*, haciendo este ensayo por triplicado.

5.2.1.2. Análisis de mortalidad de las larvas

Se procedió a contar los nauplios a las 24 horas de estar en contacto con las soluciones y se observó la mortalidad de las larvas considerando muertas aquellas que no presentaban movimiento.

5.2.2. Ensayo insecticida

Con el extracto que presento menor perdida de actividad citotóxica se realizo el ensayo de actividad insecticida utilizando insectos de *Puto barberi* suministrados por Cenicafé.

Se pesaron 2 mg del extracto crudo desengrasado y se diluyo en 2 mL de etanol absoluto, a partir de este se prepararon soluciones a diferentes concentraciones: 25,

15 y 9 mg/L y con estos se evaluó la actividad biológica frente insectos de *P. barberi* (Cochinilla harinosa), esto se hizo mediante el suministro de una dieta artificial utilizando raíces de *Talinum paniculatum* (cuero de sapo) las cuales fueron pesadas antes de ser sumergidas en las soluciones, variando el tiempo entre 5, 15 y 30 minutos en que se sumergió la raíz, posteriormente fueron pesadas nuevamente y se llevaron a cajas de petri en las cuales se depositaron 5 insectos de *Puto barberi*.

De igual manera se realizaron dos tipos de controles, un blanco con la semilla de *Tallinum paniculatum* y un control positivo con Lorsban 4E. A cada caja de petri se le adicionó 5 insectos de *Puto barberi*, haciendo este ensayo por duplicado.

5.2.2.1. Análisis de mortalidad de insectos

Al cabo de 24 horas de contacto de los insectos con las raíces impregnadas del extracto se realizó el conteo del número de insectos muertos.

5.3. ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO DE SEMILLAS DE *Annona muricata*

5.3.1. Evaluación preliminar del extracto etanólico desengrasado por cromatografía en capa delgada (CCD).

Se llevo a cabo el análisis cromatográfico del extracto crudo desengrasado para el reconocimiento preliminar de acetogeninas y de alcaloides presentes en el extracto. Se emplearon placas de sílica gel 60 (Merck) y el sistema de elución utilizado fue la mezcla CHCl_3 -MeOH (9:1) y como reveladores el reactivo de Kedde en aerosol y ácido fosfomolibdico al 5% / MeOH [99,100].

5.3.2. Análisis del extracto etanólico desengrasado por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Se realizo en fase reversa, empleando un detector de arreglo de diodos con el extracto crudo desengrasado. La comparación del perfil cromatográfico se realizo con el estándar de Bulatacina a cinco diferentes concentraciones (30, 50, 100, 300 y 500 ppm) empleando el equipo Jasco HPLC 2000 Plus con las siguientes condiciones de análisis:

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

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

Temperatura de la Columna: 40 °C

Flujo: 0,5 mL/min.

Fase Móvil: A: H₂O y B: CH₃CN

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

Detector: Arreglo de diodos, $\lambda = 204 \pm 4$ nm

Tiempo de Corrida: 16 min

5.3.3. Cuantificación de acetogeninas por CLAE.

La cuantificación de acetogeninas se hizo mediante la técnica del estándar externo, haciendo una curva de calibración de la Bulatacina a una $\lambda = 204 \pm 4$ nm, por triplicado, [101, 102].

Para el método del estándar externo se empleo una curva de calibración de Bulatacina, utilizando concentraciones de 30; 50; 100; 300 y 500 μ g/mL, corridas por triplicado. La cuantificación de cada pico se hizo mediante la normalización de áreas.

5.3.4. Identificación preliminar de acetogeninas

La identificación preliminar de las acetogeninas se realizo por CLAE según su espectro ultravioleta obtenido en la separación cromatográfica para cada uno de los picos con el detector de arreglo de diodos ($\lambda = 204 \pm 4$ nm) y la identificación de la Bulatacina se llevo a cabo por comparación con el tiempo de retención (t_R) del estándar analizado en las mismas condiciones.

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la cuantificación, las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos de ambos ensayos (Citotóxico e Insecticida) fueron procesados para determinar la CL_{50} a través del software Probit versión 1.5 [103, 43], utilizando la tabla 5 para seleccionar el rango de actividad biológica de los extractos.

TABLA 5. Clasificación de la Actividad Biológica de acuerdo a la CL_{50} (ppm)

CL_{50} (ppm)	Actividad
$CL_{50} \geq 1000$	Inactivo
$500 \leq CL_{50} < 1000$	Medianamente Activo
$100 \leq CL_{50} < 500$	Activo
$10 \leq CL_{50} < 100$	Muy Activo
$0 \leq CL_{50} < 10$	Altamente Activo

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS

Se obtuvieron tres extractos etanólicos de las semillas desengrasadas de *Annona muricata*, los cuales fueron pesados con el fin de obtener el porcentaje de rendimiento en la extracción como se aprecia en la tabla 6.

TABLA 6. Porcentaje de rendimiento de la extracción etanólica de las semillas desengrasadas de *Annona muricata*.

ENSAYO	Masa semillas desengrasadas (g)	Masa extracto etanólico	% Rendimiento
Extracto 1	50.0305	1.6099	3.22
Extracto 2	50.0109	0.7797	1.56
Extracto 3	50.0071	1.2334	2.47
Promedio	50.016	1.2076	2.416

Los porcentajes de rendimiento obtenidos son bajos, se obtuvo un porcentaje promedio del extracto etanólico del 2.416%.

Al comparar con un estudio anterior [104] en el cual se utilizó el mismo método de extracción pero utilizando 100 g de semillas, se observó que el promedio del porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* obtenidas directamente de los frutos maduros (4.62%), fue mayor al promedio obtenido en este trabajo (Ver tabla 6), esta diferencia se debe a la cantidad de semillas utilizadas en ambos trabajos e indica que el uso de semillas procedentes del proceso de despulpado es óptimo para la obtención de un extracto etanólico crudo desengrasado.

6.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Hay que tener en cuenta que pueden existir diferencias en la actividad biológica de los extractos desengrasados frente a los dos organismos ensayados, por las diferencias

que tienen estos en la absorción, metabolismo y excreción de las acetogeninas u otros metabolitos secundarios, también a sus diferencias genéticas y fisiológicas [2].

6.2.1. Ensayo citotóxico con *Artemia salina*

Se evaluó la actividad citotóxica de los extractos crudos de semillas desengrasadas de *Annona muricata* a concentraciones: 9, 5 y 1 ppm frente a las larvas de *Artemia salina* que es un identificador de la actividad biológica de los extractos crudos o compuestos puros aislados de plantas superiores.

TABLA 7. Citotoxicidad para *Artemia salina* de los extractos etanólicos crudos de semillas desengrasadas de *Annona muricata* a través de 8 semanas.

ENSAYOS	Actividad citotóxica CL 50 (µg/mL)				
	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8
1	0.210	0.404	0.536	0.662	1.126
2	0.136	0.430	0.752	0.788	1.175
3	0.347	0.529	0.695	1.862	2.251

TABLA 8. Controles utilizados en el ensayo de citotoxicidad para *Artemia salina*.

Tipo de control	Sustancia	Número de expuestos	Número de muertos
Control +	Etanol	10	10
Control -	Agua de mar artificial	10	0

Los nauplios de *Artemia salina* de 24 horas presentan una cutícula muy fina, lo que las hace especialmente sensibles a los tóxicos en el extracto, los cuales penetran a través de las barreras fisiológicas absorbiéndose rápidamente y provocando diferentes alteraciones en estos organismos como la muerte de la larva por citotoxicidad [103].

El resultado de mortalidad de las larvas significó la existencia de grupos de compuestos potencialmente activos presentes en el extracto. De manera general un

extracto se considera altamente activo en este ensayo cuando presentan $CL_{50} < 10$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ [43] y como se observa en la Tabla 5 la CL_{50} a través del tiempo sigue estando en el rango de altamente activo.

Al observar la tabla 5 se evidencia que la primera semana es la de mayor actividad ya que las CL_{50} están en un rango de 0.136 a 0.347 $\mu\text{g}/\text{mL}$, es decir son altamente activas. Confirmando en estudios anteriores [104] los extractos desengrasados poseen mayor actividad frente a extractos que no han sido desengrasados posiblemente porque en el extracto desengrasado los componentes activos se concentran, indicando que en la fracción lipídica eliminada no hay una cantidad apreciable de dichos componentes.

En los tres extractos se observó que al pasar el tiempo la CL_{50} iba aumentando (Ver tabla 7) lo que indica que su actividad citotóxica tiende a disminuir posiblemente por la degradación de los componentes presentes en el extracto, pero en ninguno de los casos el extracto se inactivo por lo contrario todos están en el rango de altamente activos (Ver tabla 5).

En la figura 19 se observa el comportamiento de la actividad biológica de los tres extractos, en los tres casos se observa la tendencia que tiene el extracto a degradarse con el paso del tiempo.

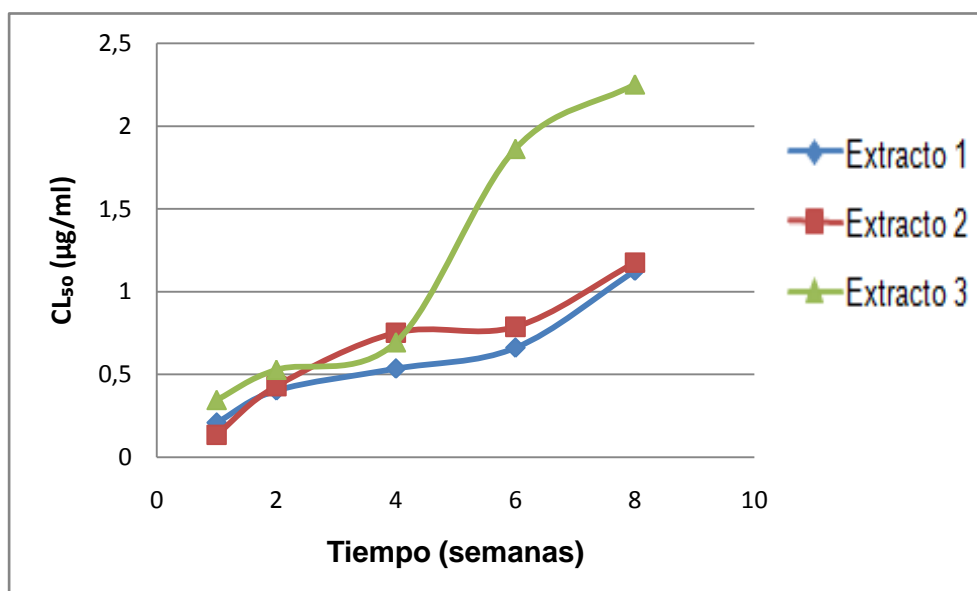


FIGURA 19. Comportamiento de la Actividad Biológica de los extractos etanólicos de semillas desengrasadas de *Annona muricata* en el Tiempo.

Al observar la figura 19, se evidencia que el extracto 3 presentó mayor pérdida de actividad a través del tiempo, esto pudo ser a que las semillas de *Annona muricata* que fueron utilizadas para su extracción no recibieron el tratamiento adecuado en la despulpadora para su buena preservación. También se observa en la figura 19 que el extracto 1 se comportó de manera más estable, ya que presentó menor pérdida de actividad biológica frente a *Artemia salina* en el tiempo, por lo que se escogió este para continuar con el ensayo insecticida frente a los insectos de *Puto barberi*.

6.2.2. Actividad insecticida con insectos de *Puto barberi*

Para realizar el ensayo insecticida frente a los insectos de *Puto barberi* se utilizó el extracto crudo desengrasado (Extracto 1) puesto que este fue el que perdió menor actividad biológica en el tiempo con *Artemia salina*.

A las 24 horas de estar expuestas las cochinillas con las raíces de *Talinum paniculatum* (cuero de sapo) impregnada con las soluciones del extracto etanólico desengrasado, se notó que varios de estos insectos se encontraban muertos sobre la raíz, considerando muertos los que no presentaban movimiento, por lo que se puede decir que las cochinillas ingirieron el extracto al succionar la savia que contiene la raíz, encontrando así que el extracto tiene compuestos imperceptibles para las cochinillas y letales para ellas, probablemente esta letalidad se puede explicar por la inhibición de la enzima NADH ubiquinona oxidoreductasa o complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. También se observó que no hubo reproducción de cochinillas lo que indica que posiblemente el extracto inhibe la reproducción de estas.

Al tener tan poco material biológico para realizar el análisis estadístico se tuvo una dificultad para expresar los resultados obtenidos en este bioensayo, por esto se calculó la CL_{50} a tres diferentes tiempos (5, 15 y 30 minutos) uniendo las tres concentraciones evaluadas (9, 15 y 25 ppm).

En la Tabla 9 se muestran los resultados de la CL_{50} obtenidos del Bioensayo con insectos de *Puto barberi* después de ser expuestos 24 horas con la raíz de *Talinum paniculatum* (cuero de sapo) impregnada con las soluciones del extracto etanólico desengrasado tras 6 semanas de haberlo obtenido. Las concentraciones del extracto 1 que se utilizaron fueron de 9, 15 y 25 ppm, evaluadas por duplicado.

TABLA 9. CL₅₀ Obtenidos para el extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* frente a *Punto barberi*.

EXTRACTO 1	Actividad Insecticida CL ₅₀ (µg/mL)		
	5 Minutos	15 Minutos	30 Minutos
9 ppm	9.831	5.141	4.826
15 ppm			
25 ppm			

TABLA 10. Controles utilizados en el ensayo insecticida frente a *Puto barberi*.

Tipo de control	Sustancia	Número de expuestos	Número de muertos
Control +	Lorsban	5	5
Control -	Raíz de <i>Talinum paniculatum</i>	5	0

En la tabla 9, se observa que al aumentar el tiempo de exposición de la raíz con el extracto las CL₅₀ disminuyen, lo que indica que su actividad insecticida aumenta a mayor tiempo de exposición, por lo que sumergir 30 minutos la raíz en el extracto presenta mejores resultados debido a que la raíz absorbe mayor cantidad de extracto siendo más efectivo al momento de estar en contacto con el *Puto barberi*. También se observa que las CL₅₀ están en un rango de 4.826 a 9.831 µg/mL y comparando los datos con la tabla 5, el extracto es altamente activo [98], por lo que el extracto en las tres concentraciones estudiadas da muy buenos resultados y como se muestra en el Anexo C el extracto aun en la concentración más baja estudiada de 9 ppm tiene actividad siendo viable la utilización del extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* como posible insecticida para el control del *Puto barberi* (Cochinilla harinosa).

Se realizó un control empleando el producto químico LORSBAN (ver tabla 10) a las 24 horas de exposición se realizó el conteo, el cual dio como resultado la muerte de las

cinco cochinillas expuestas pero también la degradación de la raíz impregnada. Al ser un producto tan fuerte y causar tal daño a la raíz no es recomendable su uso, ya que afecta a la planta sobre la cual es usado, lo que no se observó al utilizar el extracto obtenido de las semillas desengrasadas de *Annona muricata*.

El café es uno de los principales productos de importancia económica en la región cafetera y al ser este atacado por *Puto barberi* causa pérdidas y bajos rendimientos a los caficultores de la región. En el campo las plantas de café atacadas presentan amarillamiento, necrosis y caída de hojas, durante la cosecha hay una caída prematura de los frutos y con frecuencia se observa la muerte de las plantas, tanto en crecimiento como en producción [105,106]. Cuando las cochinillas harinosas atacan las raíces de las plantas, las debilitan y las hacen más propensas a ser infectadas por enfermedades fungosas como la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* Berkeley y Cooke) [106]. Igualmente, se ha observado la presencia del hongo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted en plantaciones productivas, asociados a altas poblaciones de cochinillas harinosas. Esto último, quizás debido a que las heridas causadas a las raíces sirven de entrada a estos agentes patógenos del suelo.

Actualmente se usan diferentes pesticidas para el control de esta plaga en el café, siendo el más utilizado el Lorsban que al igual que otros controles químicos utilizados por aspersión no son lo suficientemente efectivos por lo difícil de alcanzar muchos lugares donde se refugian las cochinillas, además la capa cerosa que presentan estos insectos dificulta la penetración del producto en el cuerpo [107].

Existe poca información acerca del control no químico del *Puto barberi* siendo muy importante esta primera aproximación puesto que se evidenció que el extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* si tiene actividad insecticida frente a la plaga. La actividad insecticida contra *Puto barberi* del extracto podría explicarse por ingestión. Es necesario que se realicen más estudios con bajas concentraciones para determinar cuál sería la menor concentración posible para el control de esta plaga y así aprovechar al máximo el extracto.

Los costos de los controles químicos específicos, su poca efectividad ante esta plaga y los resultados obtenidos en este trabajo, hacen de esta primera aproximación un buen indicador del uso del extracto de semillas desengrasadas de *Annona muricata* frente a insectos de *Puto barberi* por ingestión oral, además se contribuyó al

aprovechamiento de un subproducto lo que genera muy bajos costos para su obtención.

6.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

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

Los resultados por cromatografía en capa delgada del extracto etanólico se obtuvieron al realizar los ensayos con la mezcla CHCl_3 - MeOH (9:1) siendo seleccionada según estudios previos [18].

La separación en las cromatoplasmas del extracto etanólico desengrasado utilizando ácido fosfomolibdico como revelador, mostro una mancha sin R_f medible de color azul oscuro y con el reactivo de Kedde, se observó la misma mancha pero de color rosado, ver anexo D. La coloración rosada que presentan los extractos en las cromatoplasmas con el reactivo de Kedde indica la posible presencia de acetogeninas con anillo γ -lactónico α , β - insaturado en el extracto [4].

En éste análisis no fue posible identificar las acetogeninas por R_f , pues la aparición de manchas continuas muestra la alta complejidad del extracto y la posible presencia de acetogeninas isoméricas de diversas polaridades.

Según lecturas realizadas se encontró que en los extractos de annonaceas hay presencia de alcaloides por lo que se trato de verificar la presencia de este por medio de esta técnica cromatográfica, para esta identificación se utilizo la cafeína como patrón y como revelador acido fosfomolibdico, resultando dos puntos con igual R_f (0.75) pero de diferente color, el patrón de cafeína tuvo un punto de color café y el punto de la muestra era de color azul oscuro por lo que no se pudo confirmar la presencia de este.

6.3.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

6.3.2.1. Curva de calibración

La curva de calibración (Ver anexo E) se realizó con cinco concentraciones del patrón de Bulatacina (acetogenina).

La ecuación de la grafica:

$$y = 30449.5x + 0.00000$$

$$R^2 = 0.998155$$

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

6.3.2.2. Análisis del extracto etanólico desengrasado por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

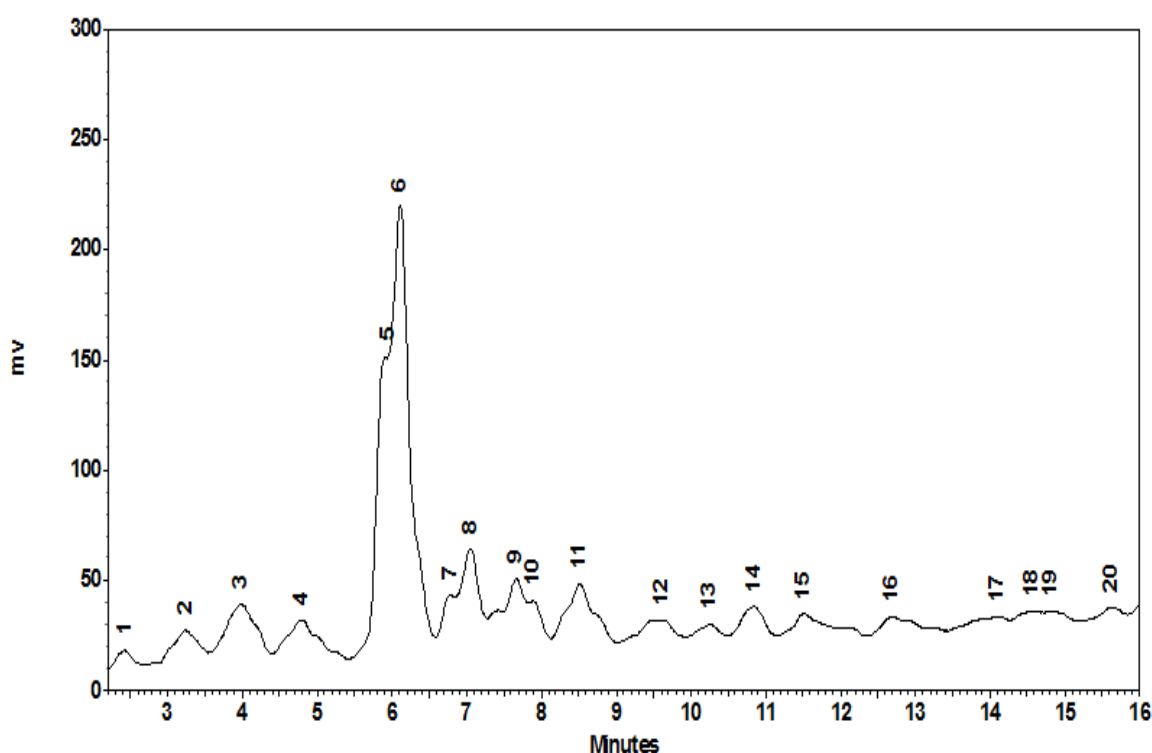


FIGURA 20. Cromatograma del extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata*.

En el cromatograma correspondiente al extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* (figura 20), se observa la presencia de 20 compuestos, al comparar los espectros UV de cada pico con el espectro UV del estándar de Bulatacina (Ver Anexo F), se encontró que 7 picos corresponden a acetogeninas de annonaceas (Ver Anexo E).

De acuerdo a la literatura sobre la columna, la fase estacionaria de la DB C18, no es muy afín a los compuestos solubles en etanol; por esta razón en el cromatograma se definen pocos picos. Los demás picos observados en el cromatograma, no son retenidos fuertemente por la fase estacionaria de la columna, interactuando menos con esta y son arrastrados rápidamente por la fase móvil, pero de igual forma en el cromatograma obtenido si se observan los picos correspondientes.

En la Tabla 11 pueden apreciarse los resultados de la cuantificación de acetogeninas realizada por el método del estándar externo, se tuvieron en cuenta los compuestos que presentaron longitudes de onda entre 204nm +/- 4nm, ya que se sabe que esta longitud de onda es característica de las acetogeninas de annonaceas. En la tabla 11 se observa que el extracto posee una mezcla de acetogeninas de las cuales 2 están en mayor proporción y corresponden a tiempos de retención relativos de 3,987 y 6,113 minutos, lo que significa que el método empleado para la extracción de dichos compuestos resultó ser eficiente.

TABLA 11. Resultados del cromatograma

PICO	TIEMPO DE RETENCION (min)	λ MAXIMA	AREA	ESTANDAR EXTERNO (µg/mL)
1	2,433	-----	5165432	-----
2	3,240	245	5918676	-----
3	3,987	201	6820100	222
4	4,800	-----	7229639	-----
5	5,913	204	4567642	147
6	6,113	203	7413414	242
7	6,787	202	1823205	56
8	7,053	202	3045714	97
9	7,707	200	1269531	38
10	7,901	201	2241475	70
11	8,513	-----	4609077	-----
12	9,487	256	2139321	-----
13	10,253	258	2016628	-----
14	10,827	-----	22163309	-----

Continuación **TABLA 11.** Resultados del cromatograma

PICO	TIEMPO DE RETENCION (min)	λ MAXIMA	AREA	ESTANDAR EXTERNO (µg/mL)
15	11,513	260	2268173	-----
16	12,693	-----	1579834	-----
17	14,107	249	1076086	-----
18	14,607	251	372648	-----
19	14,820	250	342278	-----
20	15,620	252	148996	-----

Teniendo en cuenta que el total de la suma de las áreas del cromatograma es de 100 unidades y 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 (ver Anexo F), se utilizaron estos datos para realizar la cuantificación de los picos que corresponden a las posibles acetogeninas y se observa que el pico 3 y 6 son los que se encuentran en mayor concentración con 8,296% y 9,018% de presencia en el extracto.

En estudios anteriores de las semillas de *Annona muricata* se ha evidenciado la presencia de Bulatacina en los extractos, pero también se ha demostrado que no es uno de los componentes mayoritarios y solo en extractos fraccionados se ha podido ver claramente el pico en el cromatograma. Como en este estudio se utilizó el extracto crudo desengrasado de *Annona muricata* no fue posible evidenciar dicho compuesto ya que al trabajar con un extracto crudo hay muchos otros compuestos que pueden apantallar la Bulatacina, por esta razón no se evidenció la presencia de la Bulatacina puesto que en el cromatograma de la figura 20 ningún compuesto tuvo un tiempo de retención que coincidiera con el tiempo de retención del estándar de Bulatacina (8,620 minutos) (ver anexo E). Sin embargo, sería importante utilizar otras técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN) [63], infrarrojo (IR) [64] y espectrometría de masas (EM) [65] para confirmar este hecho.

De igual forma en estudios anteriores [54] se ha detectado la presencia de algunos alcaloides en la *Annona muricata* con diferentes actividades como son actividad antitumoral, Antibacteriana, antifúngicas e insecticida pero en este estudio no fue posible su identificación debido a que no se contaba con estándares de alcaloides.

7. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se pudo establecer que el extracto etanólico crudo obtenido de semillas desengrasadas de *Annona muricata*, subproducto de procesos agroindustriales para obtención de jugos, presentó una alta actividad insecticida frente a *Puto barberi* contribuyendo con fuentes naturales alternativas para el control de plagas de la caficultura colombiana.
- El método implementado para la extracción de acetogeninas de las semillas de *Annona muricata* produjo resultados promisorios.
- El extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* presentó poca pérdida de actividad a través del tiempo.
- Los extractos utilizados con *Artemia salina*, permitieron comprobar la citotoxicidad que presenta el extracto crudo de semillas desengrasadas de *Annona muricata*.
- El extracto crudo etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* mostró un importante efecto citotóxico en las pruebas de mortalidad frente a *Artemia salina*, al cabo de 8 semanas presentó un CL₅₀ entre 0.210 y 1.126 µg/mL, se eligió el extracto 1 utilizando como criterio de selección que perdió menos actividad a través del tiempo para realizar el ensayo insecticida con el *Puto barberi*.
- Mediante Cromatografía en Capa Delgada se evidenció la posible presencia de acetogeninas de Annonaceae particularmente con anillo γ -lactónico α , β -insaturado.
- Según los resultados del análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) del extracto crudo etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* subproducto de despulpado, se evidenció la presencia de 7 acetogeninas que corresponden a la concentración de 33,062% en el extracto, estas acetogeninas no pudieron ser identificadas por falta de estándares.

8. RECOMENDACIONES

- Debido a los resultados promisorios que arrojó este trabajo respecto a la actividad insecticida del extracto crudo etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* frente a *Puto barberi* se recomienda realizar más estudios en laboratorio.
- Continuar con los estudios sobre las acetogeninas de Annonaceae, utilizando para esto semillas de *Annona muricata* u otras annonaceas que sean subproducto de industrias despulpadoras de frutas.
- Realizar más estudios sobre la actividad insecticida del extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Annona muricata* frente a *Puto barberi* contando con diferentes estándares de acetogeninas y de otros metabolitos secundarios para hacer posible su identificación mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).
- Se debe repetir esta experiencia contando con número suficiente de material biológico para así realizar mayor cantidad de ensayos y obtener un buen análisis estadístico.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos de las hojas, flores, tallo y raíz de la *Annona muricata* frente a otros insectos plaga y así elegir los extractos más promisorios para su posible acción insecticida.

9. BIBLIOGRAFIA

- [1]. MORALES, Carlos; GONZALEZ, Ranulfo; ARAGÓN, Raúl. Evaluación de la Actividad Larvicida de Extractos Polares y no Polares de acetogeninas de *Annona muricata* Sobre Larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Revista Colombiana de Entomología, 2004. 30: 187-192.
- [2]. BOBADILLA, Miguel; ZAVALETA, Gina; FRANCO, Fanny; POLLACK, Luis; SISNIEGAS, Manuel. Efecto Bioinsecticida del Extracto Etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Mill. "Chirimoya" y *A. muricata* Linneus "guanábana" Sobre Larvas del IV Estadío de *Anopheles* sp. Revista Peruana de Biología, 2002. 9: 64-73.
- [3]. CABRA MARTÍNEZ, Jorge Arturo; MEJIA SANCHEZ, Myriam; SHOONHOVEN, Van aart, MOYA ROYERO, Nelson Arturo, MEJIA, Álvaro; GARCIA, Ronald. La guanábana una nutritiva fruta del trópico americano con un mercado rentable y promisorio. Revista optimización de la cadena productiva, 2002. 3,132-136.
- [4]. MURILLO ALDANA, José Carmelo. Las Annonaceae de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia. 2001. 2: 49-58.
- [5]. RIOS CASTAÑO, Danilo; CORRALES MEJIA, Diego Mauricio; DAZA GOMEZ, Gerardo Jair. Caracterización de la guanábana "elita", chirimoya "CH 16.18" y otras anonáceas promisorias para Colombia; Villagorgona Candelaria, Valle del Cauca; Colombia. 2004
- [6]. CORREA, Jaime; BERNAL, Henry. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello, Tomo I. Editorial Guadalupe Ltda. Bogotá, Colombia, 1989. p. 196-217
- [7]. GUAPACHA, Angélica María. Monografía sobre el aprovechamiento de compuestos activos de la guanábana (*Annona Muricata* L) Universidad Tecnológica De Pereira, Química Industrial, 2006. p. 3-10.
- [8]. MÁRQUEZ CARDOZO, Carlos Julio. Caracterización fisiológica, físico-química, reológica, nutraceútica, estructural y sensorial de la guanábana (*Annona muricata* L.). Tesis. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 2009.

- [9]. RAIZADA, M. B.; SRIVASTAVA, M. K.; KAUSHAL, R. A.; SINGH, R. P. Azaridachtin a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. *Food and chemical toxicology*, 2001. 39, 477-483.
- [10]. NATHAN, Sengottayan Senthil; CHUNG, Paul Gene; MURUGAN, Kadarkarai. Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (the rice leaffolder) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006. 64, 382–389.
- [11]. CEBALLOS GIRALDO, Mariluz; HINCAPIÉ LLANOS, Carlos Augusto; LOPERA ARANGO, David. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología* v.34 n.1 Bogotá ene. /jun. 2008.
- [12]. CORTES, Diego; MYINT, Saw; HOCQUEMILLER, Reynald. Molvizarin and Motrilin: Two Novel Cytotoxic Bis-Tetrahydrofuranic γ -lactone Acetogenins from *Annona cherimolia*. *Tetrahedron Letters*, 1991. 47: 8195-8202.
- [13]. CORTES, Diego; FIGADERE, Bruno; CAVE, André. Bis- Tetrahydrofuran Acetogenins from Annonaceae. *Phytochemistry*, 1993. 32: 1467-1473.
- [14]. CORTES, Diego; RIOS, Jose Luis; VILLAR, Angel; VALVERDE, Serafín. Cherimoline Et Dihydrocherimoline: Deux Nouvelles γ -lactones Bis-Tetrahydrofuranniques Possedant Une Activite Antimicrobienne. *Tetrahedron Letters*, 1984. 25: 3199-3202.
- [15]. ARANGO, Gabriel; DICKSON, John; VELEZ, Iván; MUÑOZ, Diana. Actividad *Leishmania panamensis*. *Revista Vitae*, 1999-2000. 7: 38-42.
- [16]. JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZALEZ, M. C.; ROBLEDO, S. M.; VELEZ, Iván Darío. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, 2000. 71,183-186.
- [17]. OSORIO, Edison; ARANGO, Gabriel Jaime; JIMENEZ, Nora; ALZATE, Fernando; RUIZ, Grace; GUTIERREZ, David; PACO, Marco Antonio; GIMENEZ, Alberto; ROBLEDO, Sara. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae, 2007. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 630–635.

- [18]. CASTRO, Lina; ALZATE, Mónica. Estudio preliminar de la actividad biológica de extractos de *Annona cherimolia* Mill. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, 2008. p 1-68.
- [19]. VILLEGAS, Clemencia. Las cochinillas harinosas asociadas a las raíces del café. Boletín de la Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN, No.103 Vol. 37 Abril-junio-2009.
- [20]. RAMOS PORTILLA, Andrea Amalia; SERNA CARDONA, Francisco Javier. Coccoidea de Colombia, con énfasis en las cochinillas harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae). Revista Facultad Nacional De Agronomía – Medellín. Universidad Nacional de Colombia. 2004. v.57 fasc.2 p.2383 – 2412.
- [21]. LORSBAN 4E. Dow AgroSciences (Online)
< www.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/LORSBAN%204E.pdf >
[Consultada: Martes, 6 de marzo de 2012]
- [22]. Productos GLACOXAN, hoja de datos de seguridad de materiales; Capxan I; julio 2003. (Online)
<www.glacoxan.com/dif_h_Seg_Capxan_I.htm> [Consultada: Martes, 6 de marzo de 2012]
- [23]. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Resolución número 0227. Febrero 4 de de 2010.
- [24]. Sanahierba Insect. (Online)
<www.sanahierba.com> [Consultada: Martes, 6 de marzo de 2012]
- [25]. MOORE, D. Agents used for biological control of mealybugs (Pseudococcidae). Biocontrol News and Information.1988; 19(4):209-225.
- [26]. RODRÍGUEZ, Daniela; CHAVARRÍA, Marena. Control de cochinilla en Helecho Hoja de Cuero por medio de *Beauveria bassiana*. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica, 2010.
- [27]. GRATEREAUX, Wilkin Vladimir. Potencial del uso de hongos entomopatógenos para el control de cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*) en producción orgánica de piña

(Ananas comosus). Tesis. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza, Turrialba; Costa Rica. 2009.

[28]. CASTRO RETANA, Juan José. Cultivo de la anona (*Annona cherimola*, Mill). Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica, 2007. 42 p

[29]. CABAÑAS SAENZ, Mercedes; DE LA LUZ, María; LAMOTHE, Angel; AUÁREZ, D.; DOMÍNGUEZ, Y. Prácticas de Botánica Morfológica y Sistemática, 2005.

[30]. SÁNCHEZ M. Catálogo preliminar comentado de la flora del Medio Caquetá. Estudios en la Amazonía Colombiana XII Impreandes Presencia, Bogotá, 1997. 557p.

[31]. MURILLO J.; RESTREPO D. Las Annonaceae de la región de Araracuara Estudios en la Amazonía Colombiana XX Soporte Editorial, Bogotá, 2000. 218 pp.

[32]. ORELLANA, A. D.; MARTÍNEZ, E. Distribución Geográfica de Anonáceas en Guatemala. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola. Publicaciones Recursos Naturales. 2005. 3-7.

[33]. RICO, Xochitl. Propiedades nutritivas y medicinales de la guanábana o *Annona muricata* L. Tlahui - Medic No. 29, 1/2010.

[34]. MORTON, J. Frutas de Climas Calientes. Revista Agrícola del Perú, 25-27. Perú. 2000.

[35]. ESCOBAR, W.; SANCHEZ, L. Control de plagas y enfermedades de guanábano. ICA. Edición Produmedios. Tibaitata, Colombia. 100 p. 2000.

[36]. SAFFORD, J. *Annona muricata* L. (1753). Species Plantarum. 1: 536-537.

[37]. BARAONA, M. Jocote, Anona y Cas: Tres frutas campesinas de América. Heredia, Costa Rica, EUNA, 151 p. 2000.

[38]. GUIRADO, E.; HERMOSO, J.; PÉREZ, M.; GARCÍA-TAPIA, J.; FARRÉ, J. Polinización del chirimoyo. Finca Experimental La Nacla. España Ed. Caja Rural de Granada. 2001. P. 52

[39]. VENKATARATNAN. Floral morphology and bolsón biology studies on some Annonaceae. Indian Journal. Agriculture Science, 1959. 29(4):69-76.

- [40]. BARAHONA, M. La guanábana. Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 1989. 50 p.
- [41]. ALIX, C. Frutales y condimentarias del trópico húmedo. UNAH/CURLA PROFORFITH, La Ceiba, Honduras. 1999. 345 p.
- [42]. BUESO, C. E. Soursop, Tamarind and Cherimoya. Tropical and Subtropical Fruits- Composition, properties and uses. Connecticut. USA. 1980. p 375-387.
- [43]. RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins. Review Journal of Natural Products, 53 (2). 1990. p.237-278.
- [44]. GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Isolation of montecristin, a key metabolite in biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and its structure elucidation by using Tandem Mass Spectrometry. Journal organic chemistry. 1997. 62:510-513.
- [45]. MATTHEW, J.; RIESER, M. J.; GU ZHE-MING.; FANG XIN-PING; ZENG L.; WOOD, K. V.; MCLAUGHLIN, J. L. Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. Journal of Natural Products. 1996. 59: 100-108.
- [46]. GARCIA, Karol. Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. Tesis. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F. Enero 2009.
- [47]. GEUM-SOOG, K.; LU ZENG, FERAS, A.; LINGLING, L. R.; FENG-E, WU; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHARDJO, S. Two New Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. Journal of Natular Products. 1998. 61:432-436.
- [48]. CAVE, A.; FIGADERE, A; LAURENS. ; D. CORTES. *Acetogeninas from annonaceae*. (W.Herz, G.W. Kirbi, R.E. Moore & W. Steglich, ed.), Tamm, Austria, 1997. p. 288.

- [49]. JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; NGASSOUM, M. Essential Oil Compounds of the *Annona muricata* Fresh Fruit Pulp from Cameroon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997. 46:3719-3720.
- [50]. GLEYE, C.; DURET, P.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Cis-Monotetrahydrofuran Acetogenins from the Roots of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 1996. 61:576-579
- [51]. MCLAUGHLIN, J. L.; OBERLIES, N.; WU, F.; ZENG, L. Five New Monotetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 1996. 59:1035-1042.
- [52]. GENG XIAN, Zhao; LU ZENG, Yan Zhang; MCLAUGHLIN, J.L.; QUINGY, E. Longicin and goniotalamicinone: novel bioactive monotetrahydrofuran acetogenins from *Asimina*. *Journal of Natural Products*. 1995. 58:1398-1406.
- [53]. GENG XIAN, Wo; LU ZENG, Yang Zhang; SCHWEDIER, J. T.; WU, F. Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2, d-trans and cis)-10-R-annonacin a ones from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural products*. 1995. 58:1430-1437
- [54]. SOLÍS FUENTES, J. A.; AMADOR HERNÁNDEZ, C.; HERNÁNDEZ MEDEL, M. R.; DURÁN DE BAZÚA, M. C. Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de “almendra” de guanábana (*Annona muricata*, L). Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, México. 2010.
- [55]. GONZÁLEZ ESQUINCA, Alma Rosa. La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. México. Ciencia y Tecnología en la frontera. Año II, numero 3, julio-diciembre 2005.
- [56]. GONZÁLEZ ESQUINCA, Alma Rosa; LUNA CAZÁRES, Lorena Mercedes; SCHLIE-GUZMÁN, María Adelina. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica Chile. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Volumen 8, Número 4, julio, pp. 245-257. 2009.
- [57]. ALALI, F.; KIM, G.S.; ROGERS, LL.; SASTRODIHARDJO, S.; WU, F.E.; ZENG, L.. Muricoreacin and murihexocin C, monotetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 49(2): 565-71. 1998.

- [58]. ARROYO, J.; LI, E.; PRASHAD, M.; TOMÁS, G.; VASQUEZ, Y.. Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. Revista Peruana Medicina. Exp Salud Pública; 22(4): 247-57. 2005.
- [59]. CORTES, D.; ESTORNELL, E.; GONZALEZ, M.C.; TORMO, J.R. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. Arch Biochem Biophys; 369(1): 119-26. 2000.
- [60]. GU, Z-M.; HE, K.; MCLAUGHLIN, L.; OBERLIES, Nicholas; SHI, G.; YE, Q.; ZENG, L. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins, Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, 2-6. 2004.
- [61]. BORICE, C.; GAYVAL, A.; LAURENS, A.; LOUISEAU, P.; PHILIPPE, D. Antiparasitic Activity of *Annona muricata* L and *Annona cherimola* seeds. Plant Med. 29: 40-45. 1997.
- [62]. HIROSCHI, S.; MISUKI, S.; NURIYUKHARA, F.; SQUAMOCIN, O.; YOSHIDA, A. Two new adjacent bis-tetrahydrofuran Acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Nat. Pharm. 25: 249-310. 2002.
- [63]. CHIMODO, H.; FUJIMOTO, J.; MIRISAKY, C.; NISHIOAHA, S. Annonaceous Acetogenins from the Seed of *Annona squamosa*, noadjacent bis-tetrahydrofuran Acetogenins. Nat. Pharm. 54: 27-48. 1996.
- [64]. CASSADY, L.; JOHN, M.; SANTOS, M. Araticulin A, bistetrahydrofuran Poliketide from *Annona classiflora* seed, J Phytochemistry. 1996.
- [65]. BORIS, P.; CORTÉS, R.; HOCQUEMILLER. D.; LOISEAU, G.; SEVSE, S. Citotoxic and Antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. Plant. Med. 60: 1911-1916. 1994.
- [66]. ALLISHO, A.; BALDWINS, S.; KHAND, W.; MATTO, L.; McLEAN, S. Mono-Tetrahydrofuran Annonaceous from *Annona montana*. Nat. Prod. Rep. 63: 1235-1238. 2000.
- [67]. DOUGAL, M.; McLAUGHLIN, J. L.; SHI, G. Bioactive Annonaceous Acetogenins from *Rollinia mucosa*. J. Nat. Pharm. 249-310. 1997.

- [68]. CAVE, A.; DURET, P.; WAECHER, R. Atemoyin-1 and 2-two Mono-Tetrahydrofuran lactone Acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. Plant. Med. 22-28. 1997.
- [69]. HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; SKOOG, D. A. Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. España. pp. 731-809.
- [70]. HERRERA, E. Obtención y Caracterización de la Materia Insaponificable del Aceite de Crisálida de *Bombix Mori* L. Híbrido Pílamio I. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira. p. 85. 2007.
- [71]. JOLAD, S.D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R.; TEMPESTA, M. S.; KRIEK, G. R.; BATES, R. B. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria acuminate* (Annonaceae). The Journal of Organic Chemistry 47 (16):3151-3153. 1982.
- [72]. ABE, M.; HATTORI, Y.; KIMURA, Y.; KONNO, H.; MAKABE, H.; MIYOSHI, H.; ORITANI, T.; TANAKA, A. Total synthesis of cis-solamin and its inhibitory action with bovine Heart mitochondrial complex I. Tetrahedron. 60. 10651-10657. 2004.
- [73]. GREEN, D. R.; MARTIN, S. J. Apoptosis as a Goal of Cancer Therapy. Curr Opin Oncol. 6: 616 – 621. 1994
- [74]. OCAMPO, Diana Marcela; OCAMPO Rogelio. Bioactividad de la familia Annonaceae. Revista Universidad de Caldas, p. 135 – 15. 2006.
- [75]. RIESER, M. J.; KOZLOWSKI, J.; WOOD, F.; MCLAUGHLIN, J. Muricatacin: a simple biologically active acetogenin derivate from the seed of *Annona muricata* (Annonaceae). Tetrahedron letters, 32:1137-1140. 1991.
- [76]. PINHEIRO, S.L.; BOAVENTURA D. M. A.; DE OLIVEIRA, B. A. Crassiflorina, una acetogenina tetra-hidrofuranica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). Química Nova, 17(5)387-391. 1994.
- [77]. CHIU, H.; CHIH, T.; HSIAN, Y.; TSENG, C.; WU, M.; WU, Y. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. Biochemical pharmacology. 65(3):319-327. 2003.

- [78]. RAYNAUD-LE, G.S.; FOURNEAU C.; LAURENS A.; BORIES C.; HOCQUEMILLER R.; LOISEAU P, M. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomed. Pharmacother.* 58: 388-392. 2004.
- [79]. QUISPE, M.A.; ZAVALA C., D.; ROJAS C., J.; POSSO R., M.; VAISBERG W., A. Efecto citotóxico selectivo *in vitro* de Muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Rev. Perú Med Exp Salud Pública.* 23(4): 265-269. 2006.
- [80]. CAVE, A.; CORTES, D.; FIGADERE, B. And LAURENS, A. Acetogenins from annonaceae progress in the chemistry of organic natural products. Springer-Verlag, New-York. 81-287. 1997.
- [81]. PROSPERI, Carlos H. Los microorganismos y la evaluación de calidad de agua. Laboratorio de Hidrobiología - Fac. CEFyN - Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 2002.
- [82]. NEWELL, J. "Remedios antiguos y nuevos contra las serpientes". *Revista Info Médica. Educación para la salud.* 13 : 36–37. 2002.
- [83]. COLEGATE STEVEN, Molyneux. "Bioactive natural products, detection, isolation and structural determination". *Boca raton ann arbor, USA.* 442-456. 1993.
- [84]. CANNELL, R. "Methods in biotechnology natural products isolation". Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA. 4: 1-89. 1998.
- [85]. LEAR BOHLIN BRUÑÍ, Jan. "Bioassay methods in natural product research and drug development". Kluwer academic publisher . USA. 4:37-50. 1998.
- [86]. CARBALLO, Gustavo; CONCEPCION, joel; HONDAL, Onelio; MOLLEDA, Mercedes. *Los Bioensayos de Toxicidad en Sedimentos Marinos*, Centro de Investigaciones Pesqueras. La Habana. Cuba. 2003.
- [87]. GARCIA, A..Las cochinillas, parásitos del cafeto. Anacafé, Guatemala. 19 p. 2000.
- [88]. CICHÓN, Liliana; FERNANDEZ, Darío; GARRIDO, Silvina. Cochinilla Harinosa. *Revista Fruticultura y Diversificación* N° 60 de 2009.

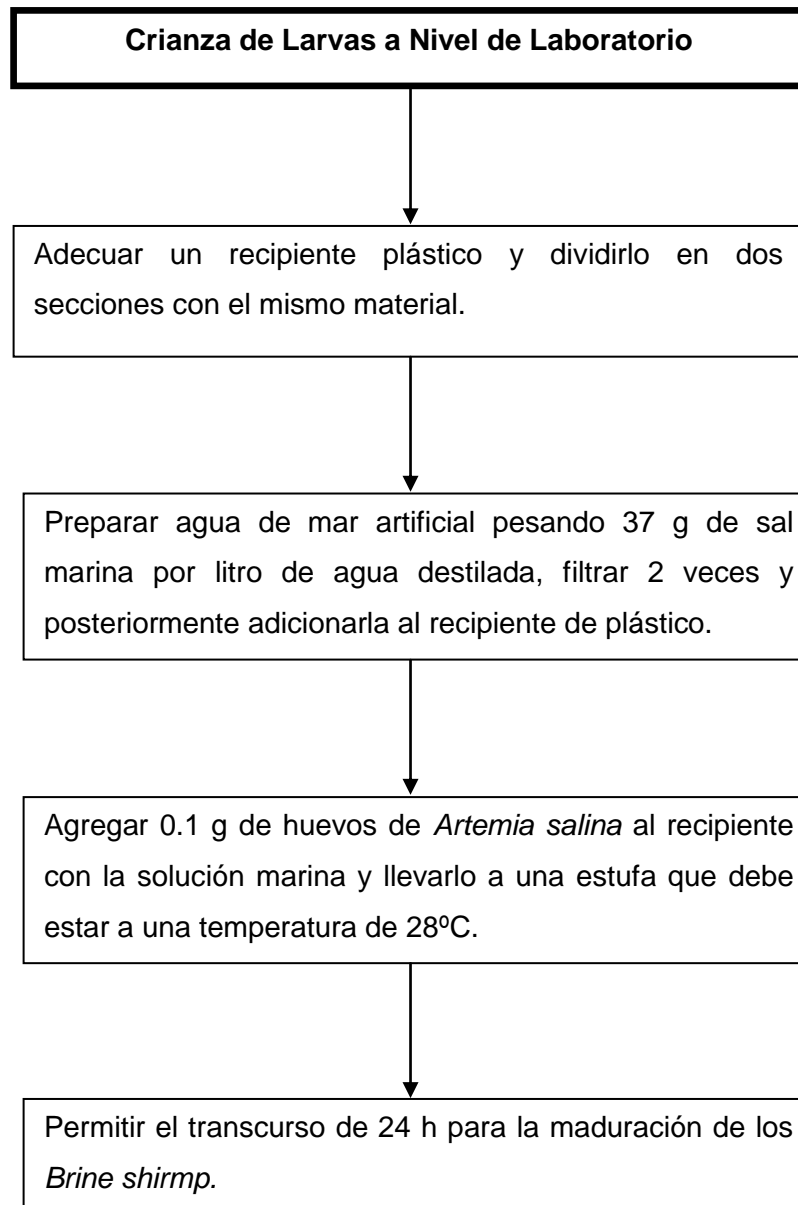
- [89]. JALIRI RAMOS, Paul D.; PARI ZAPANA, David; TELLERÍA CONDE, Luis Miguel. La Tuna y la Cochinilla. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias Agrícolas. Tacna, Perú. 2007.
- [90]. BULUS, Gustavo Daniel; DIAZ, María Consuelo; GRANADOS, Yolanda. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. 2004.
- [91]. CASTILLO, M.G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC-IMTA, México. 2004.
- [92]. RUBINSON, J.; RUBINSON, K. Análisis Instrumental. Prentice Hall. Madrid, España. 636-708. 2001.
- [93]. ABRIL DÍAZ, M^a Nieves; BÁRCENA RUIZ, José A.; JORRÍN NOVO, Jesús V. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales. Córdoba. 2005.
- [94]. ABURRÁ, Rogelio; SBARATO, Darío. Manejo de los residuos convencionales y no-convencionales. Universidad Tecnológica Nacional, facultad regional de San Francisco. Buenos aires, Argentina. 2009.
- [95]. BORIES, C.; CORTES, D.; LOISEAU, P. Antiparasitic Activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* Seeds. J. Plant. Med. 29: 40-45. 1997.
- [96]. FLÓREZ, L. M.; MESA, V. Monografía Sobre pruebas de actividad biológica con dos organismos modelos en acetogeninas de Annonaceae con actividad biopesticida. Universidad Tecnológica de Pereira. 28-40. 2007
- [97]. HE, K.; OBERLEIS, G-X.; SHI, G.; YE, Q.; ZENG, L. Comparative SAR Evaluations of Annonaceous Acetogenins for Pesticidal Activity. J. Nat. Prod. 14: 81-84. 1997
- [98]. ANDERSON, Jon; McLAUGHLIN, Jerry; ROGERS, Lingling. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. Drug Information Journal. 32: 513-524. 1998.

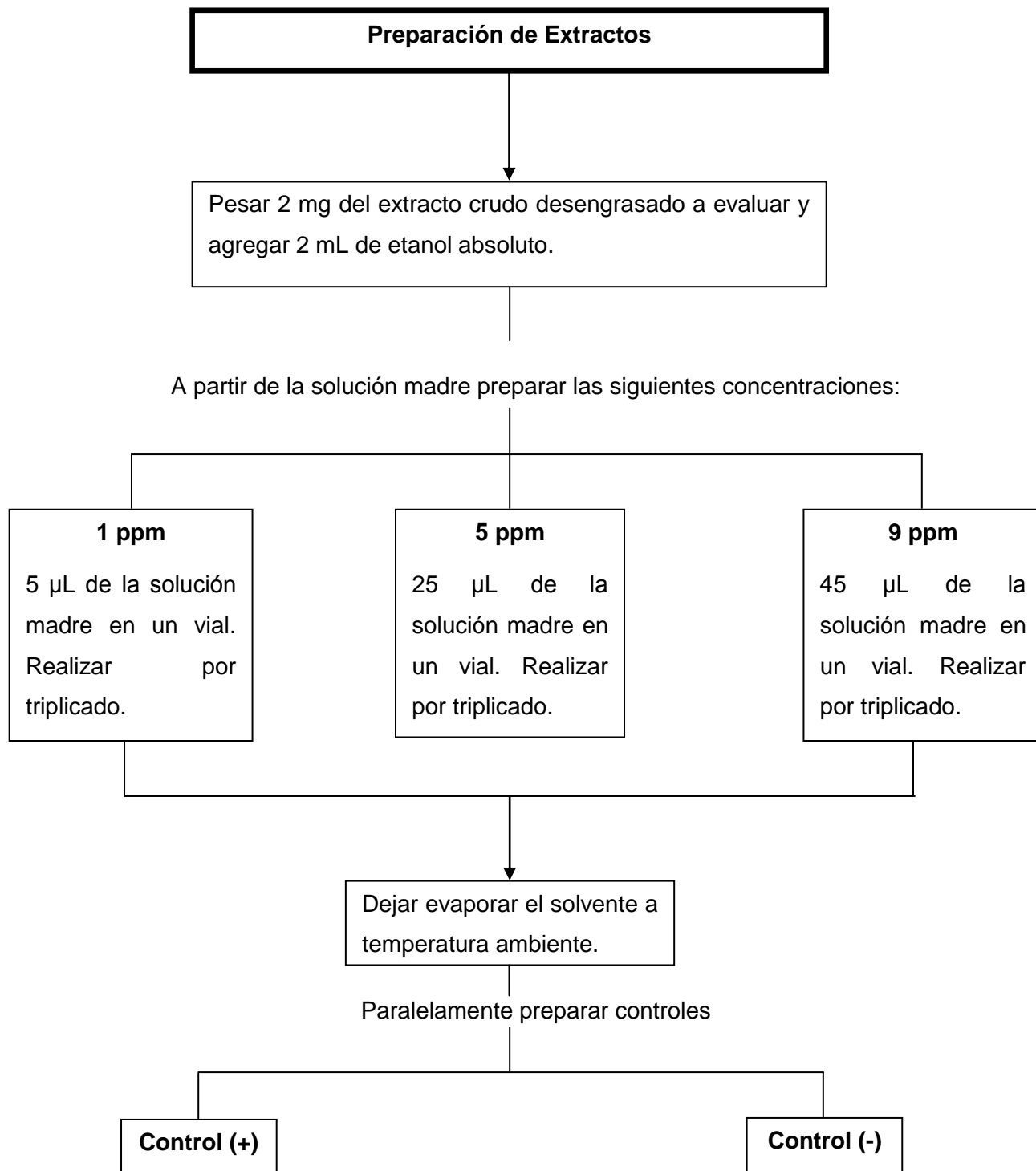
- [99]. CARDONA, Wilson. Acetogeninas en el Extracto Hexánico de Raíces de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín. p 9-51. 1993.
- [100]. CORREA, Carlos Arturo. Acetogeninas en las Semillas de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín. p 48-100. 1992.
- [101]. CORTES, D.; FIGADERE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J.; ZAFRA POLO, C. Natural Acetogenins from Annonaceae, Synthesis and Mechanisms of Action. *Phytochemistry*. 48: 1087-1117. 1998.
- [102]. GREE, R.; HUEROU, B.; LE, Y.; RODIER, S.; RENOUX, P.R. New Cytotoxic analogues of Annonaceous Acetogenins, Anti-cancer Drug design, *J Med Chem*. 16: 356-360. 2001.
- [103]. GONZÁLEZ PÉREZ, Yuleidis; APORTELA GILLING, Patricia. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. Centro de Toxicología y Biomedicina. *Anuario Toxicología*. 1(1):104-8. 2001.
- [104]. FLÓREZ, Yesid; MARTÍNEZ, Elizabeth. Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, p 1-67. 2010.
- [105]. CARDENAS M., R; BENAVIDES G.,M. La palomilla del cafeto. *Avances Técnicos* No. 29. Chinchiná: Cenicafé, 2 p.
- [106]. GUHARAY, F.; MONTERREY, J.; MONTERROSO, D.; STAVER, C. Manejo integrado de plagas en el cultivo del café. Managua: CATIE, 267 p. 2000.
- [107]. SIBAJA, Guillermo. Plan de acción Cochinilla rosada. Comisión Técnica Fitosanitaria. 2006

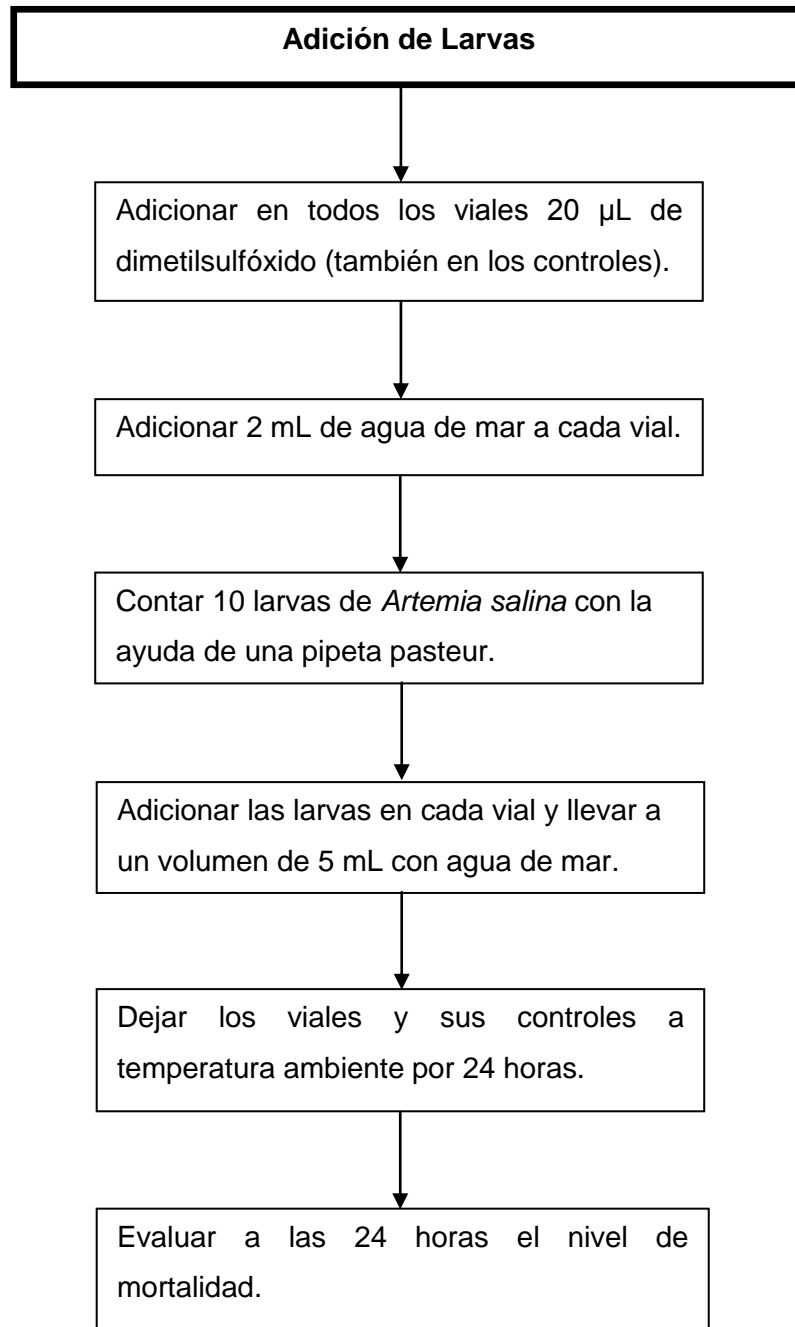
ANEXOS

ANEXO A
Diagrama de Flujo

BIOENSAYO PRELIMINAR CON LARVAS DE *Artemia salina*







Análisis de Mortalidad

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

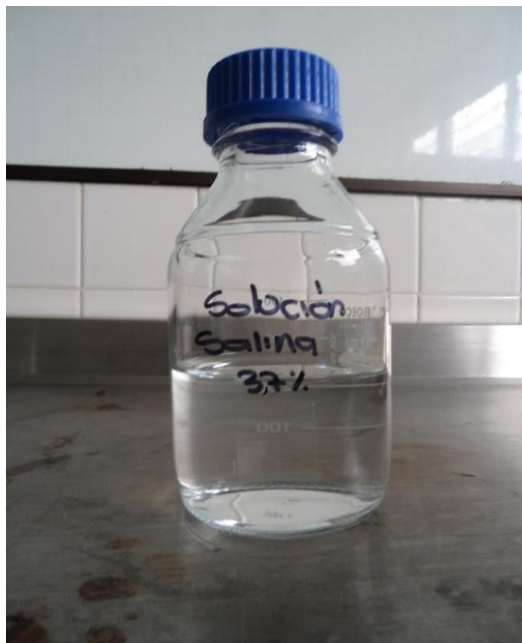
Hacer una observación frente a una luz para evaluar la movilidad de las larvas. Contar las larvas muertas.

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

FOTOS



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



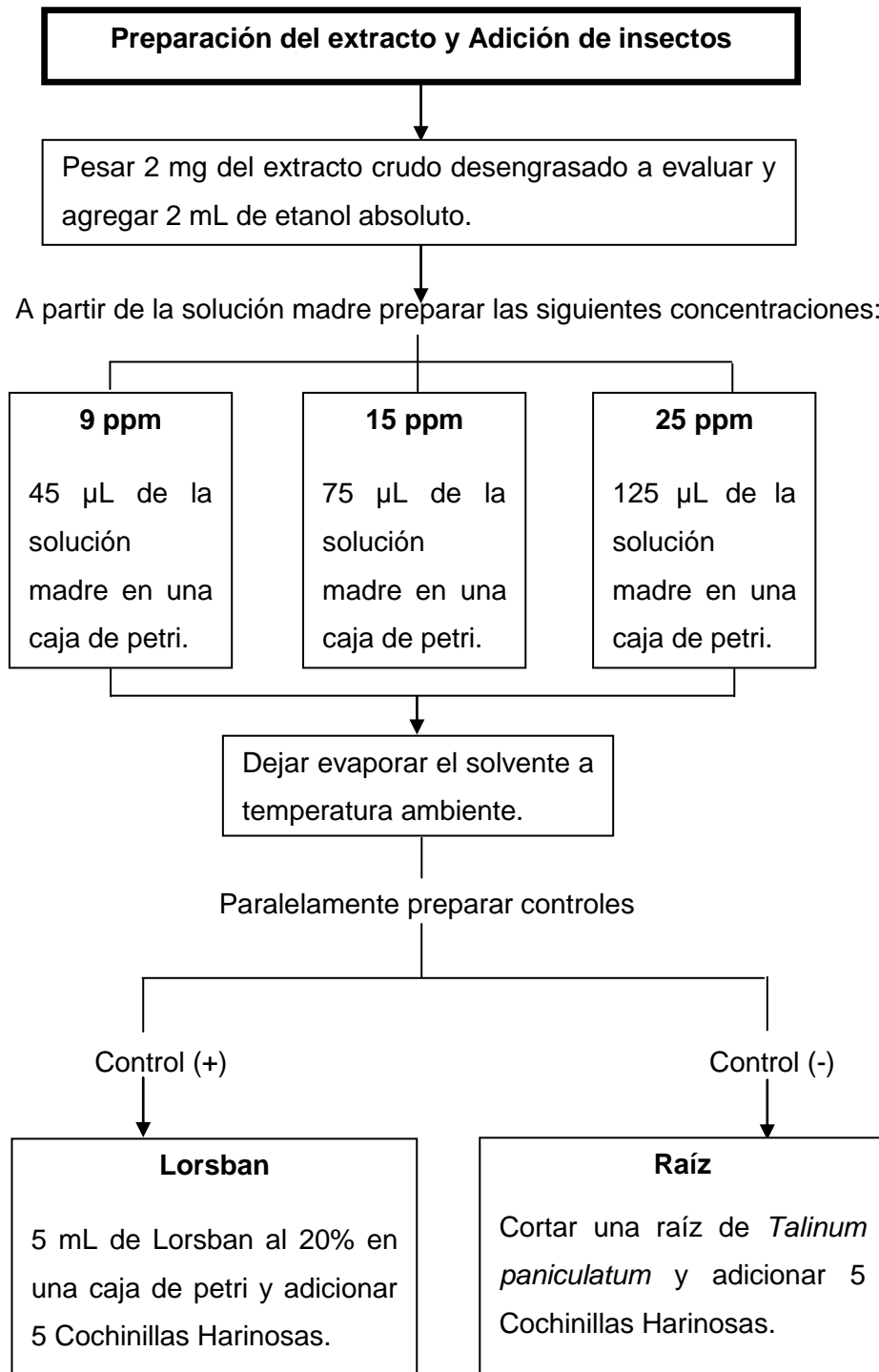
Solución salina al 3.7% (Agua de mar)

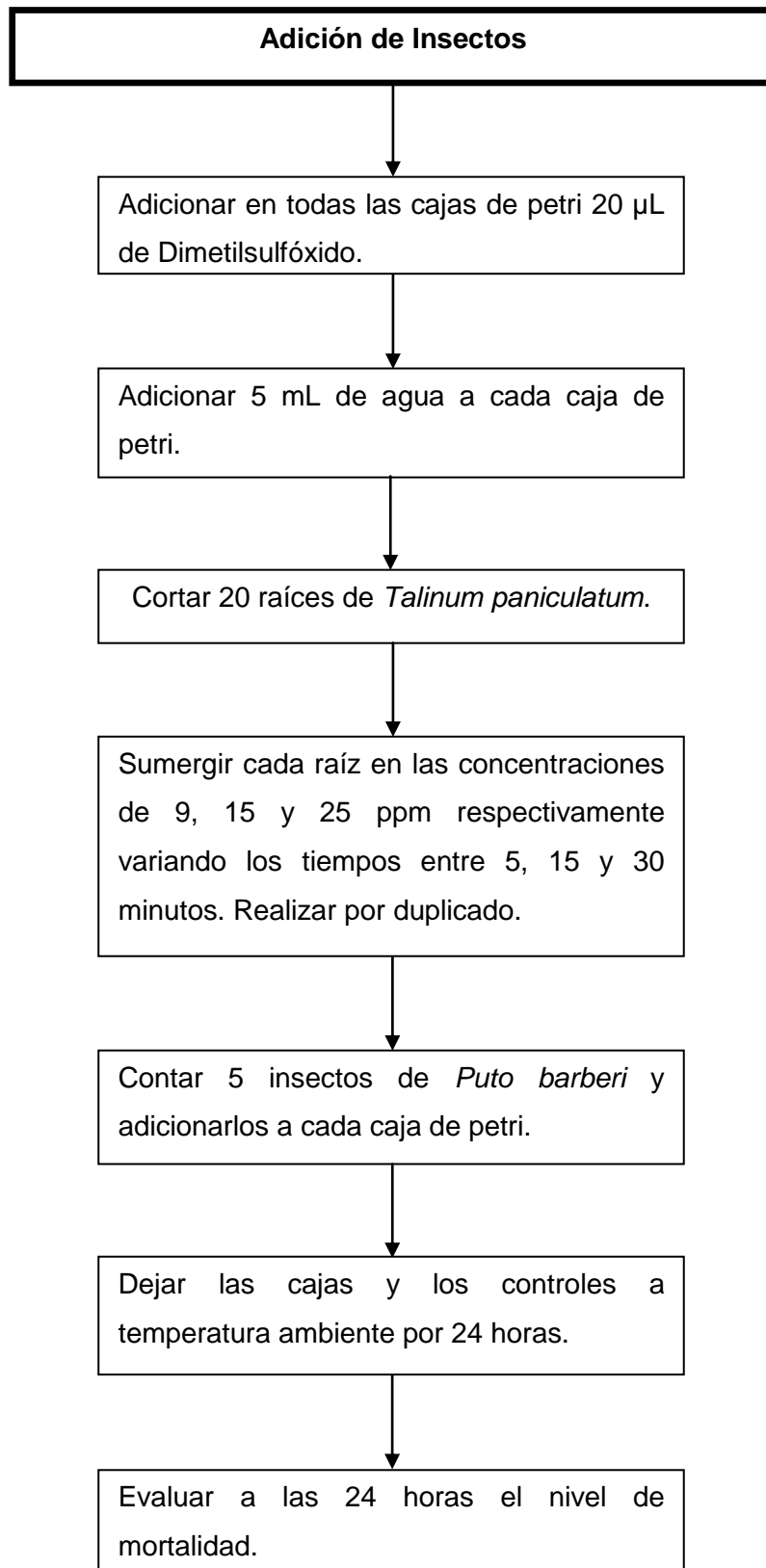


Nauplios de *Artemia salina* en el Extracto crudo etanólico desengrasado.

ANEXO B
Diagrama de flujo

BIOENSAYO INSECTICIDA CONTRA *Puto barberi*





Análisis de mortalidad

Realizar lecturas a las 24 y 48 horas. Evaluar la movilidad de los insectos y contar los muertos.

Utilizar el Programa Probit para evaluar la dosis letal media de cada tiempo y así conocer cuál es el mejor tiempo para sumergir la raíz en las tres concentraciones mencionadas.

FOTOS



Cochinillas Harinosas en raíces de *Talinum paniculatum* en el laboratorio de Oleoquímica UTP.



***Puto barberi* en el Extracto crudo etanólico desengrasado.**

ANEXO C

COCHINILLAS HARINOSAS MUERTAS AL CABO DE 24 HORAS

Número de Cochinillas harinosas expuestas por caja: 5

9 ppm – 5 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
1	2
9 ppm - 15 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
3	2
9 ppm - 30 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
3	3

15 ppm – 5 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
2	2
15 ppm - 15 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
3	2
15 ppm - 30 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
4	3

25 ppm – 5 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
3	3
25 ppm - 15 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
4	3
25 ppm - 30 minutos	
CAJA 1	CAJA 2
5	4

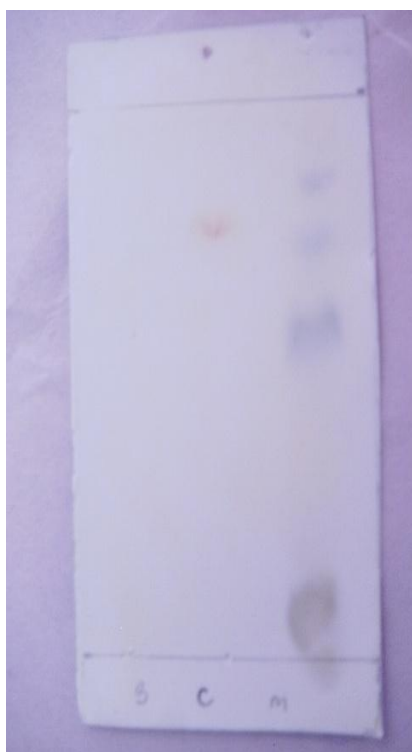
CONTROL 1 (COCHINILLA + RAIZ) = 5 VIVAS

CONTROL 2 (COCHINILLAS + RAIZ CON LORSBAN)= 5 MUERTAS Y SEMILLA DETERIORADA

ANEXO D

FOTOS

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (CCD)



A



B

A. De izquierda a derecha Bulatacina, Cafeína y Extracto crudo etanólico desengrasado revelados con Acido Fosfomolibdico.

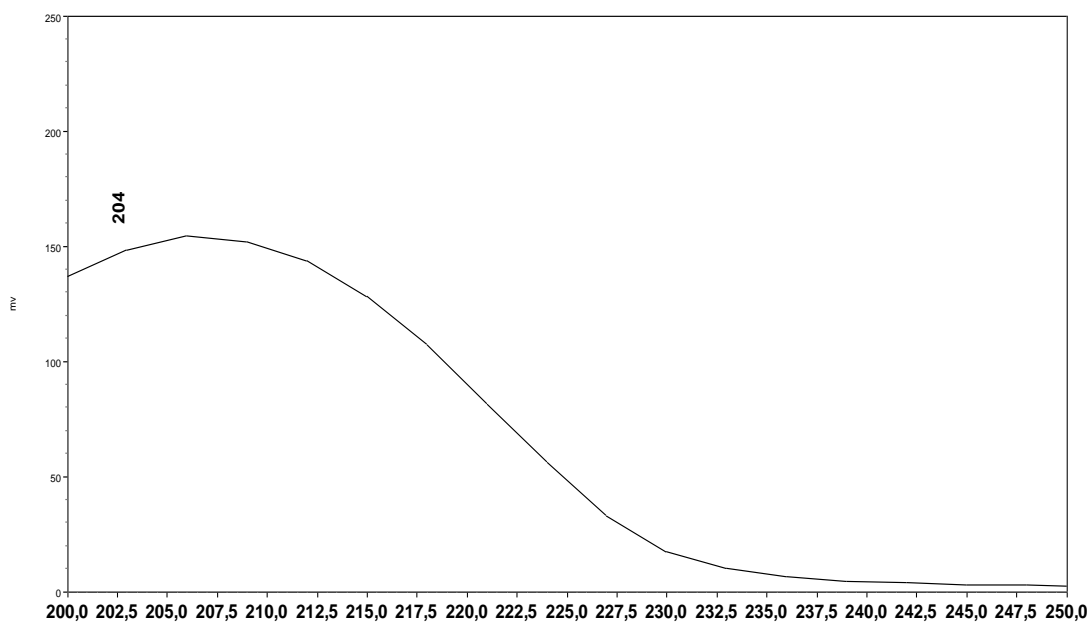
B. De izquierda a derecha Bulatacina, Cafeína y Extracto crudo etanólico desengrasado revelados con reactivo de Kedde.

ANEXO E
ESPECTROS UV DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAE OBTENIDOS

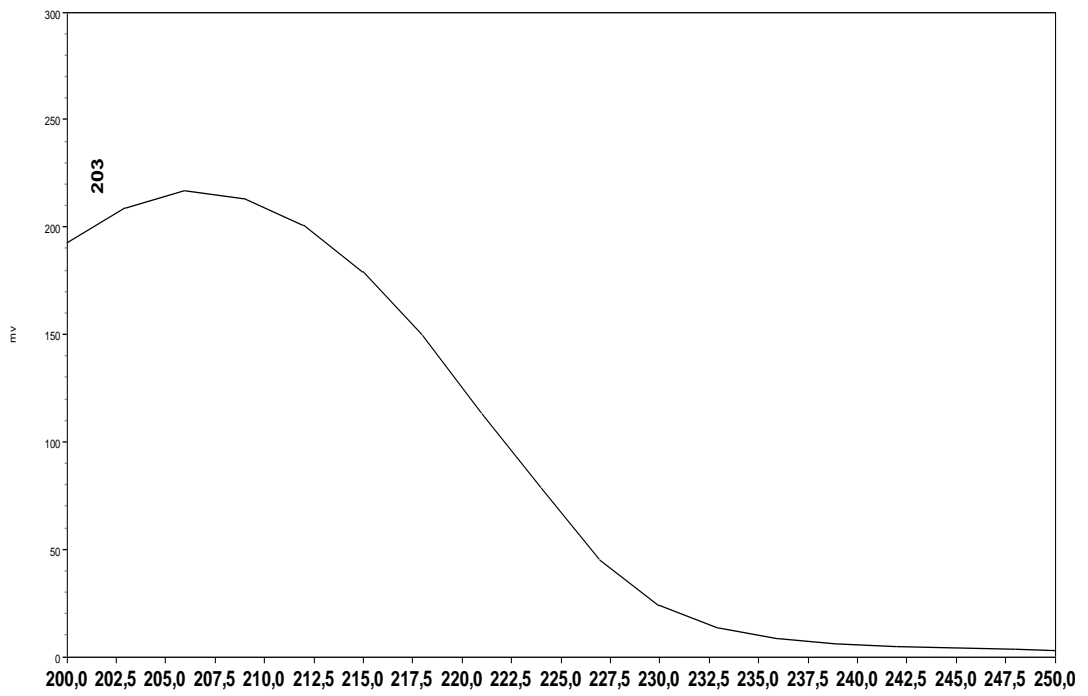
PICO 3



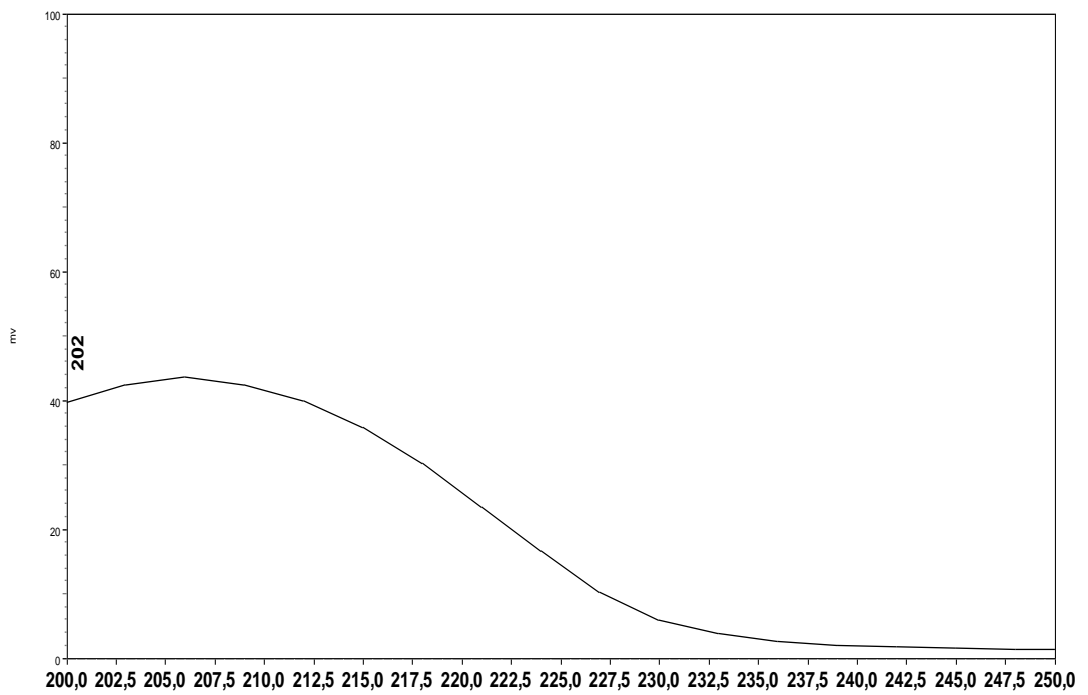
PICO 5



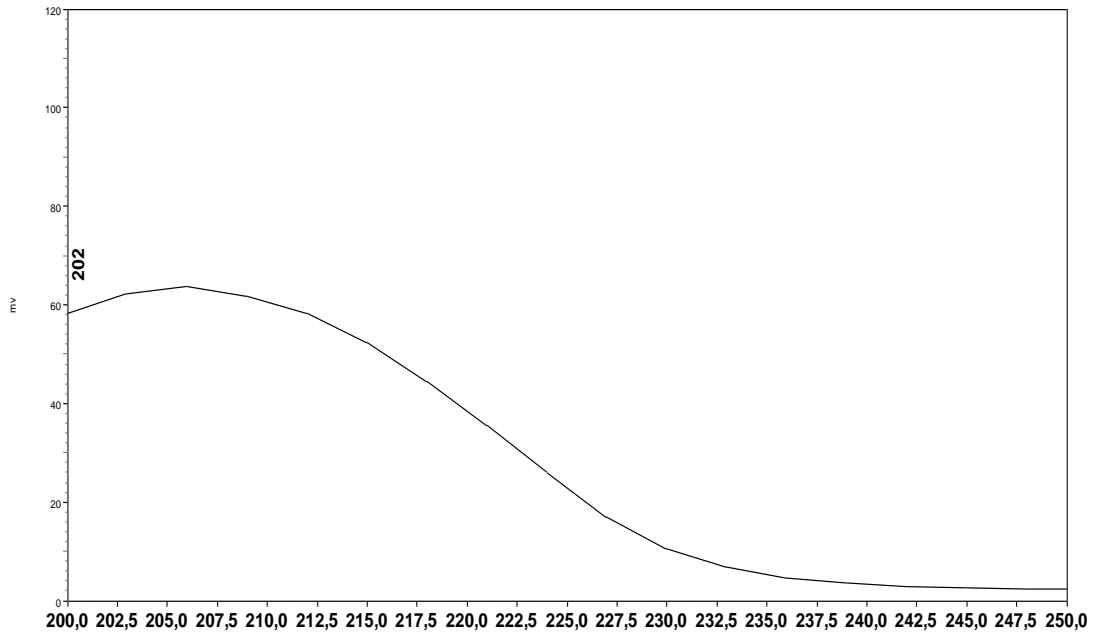
PICO 6



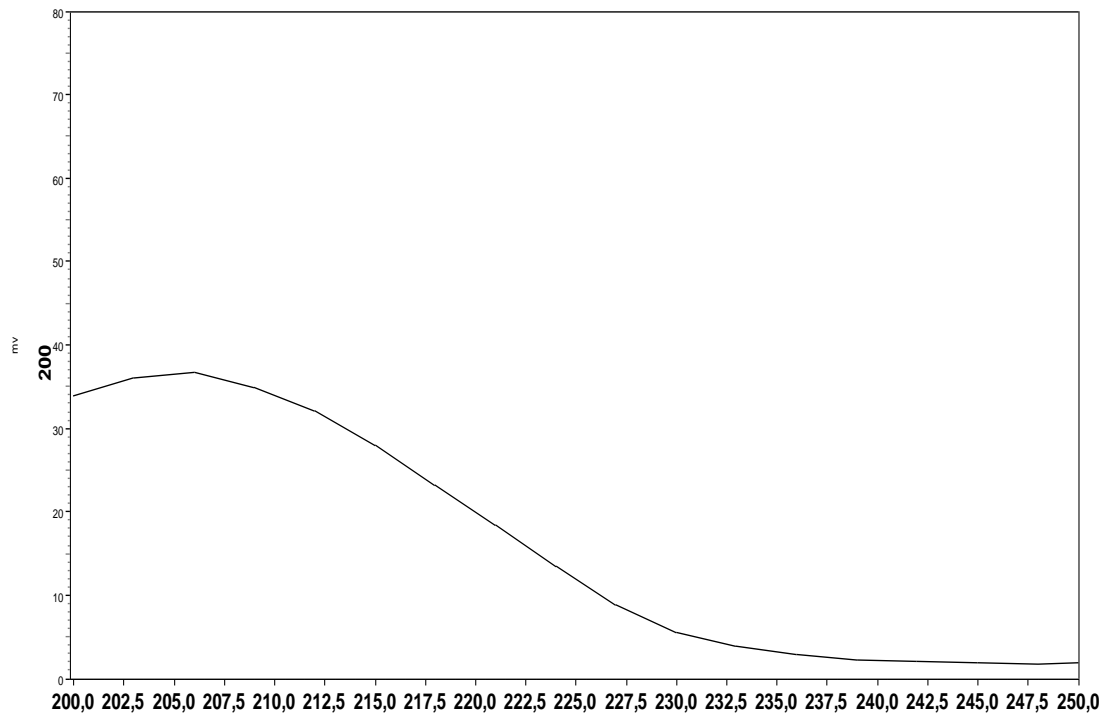
PICO 7



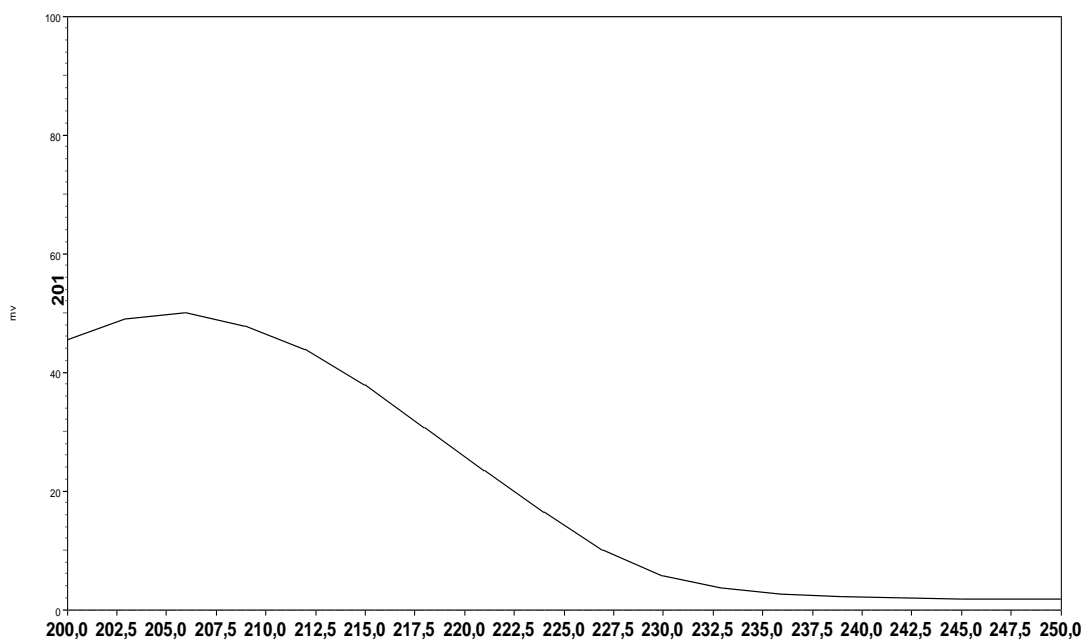
PICO 8



PICO 9

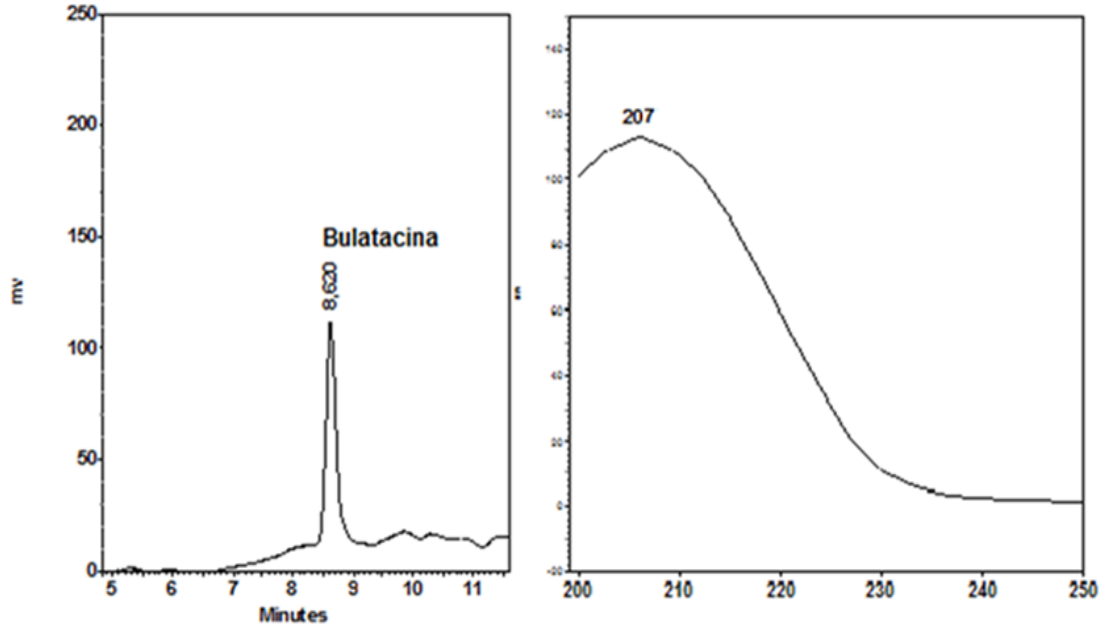


PICO 10



ANEXO F

CROMATOGRAMA Y ESPECTRO UV DEL ESTÁNDAR BULATACINA

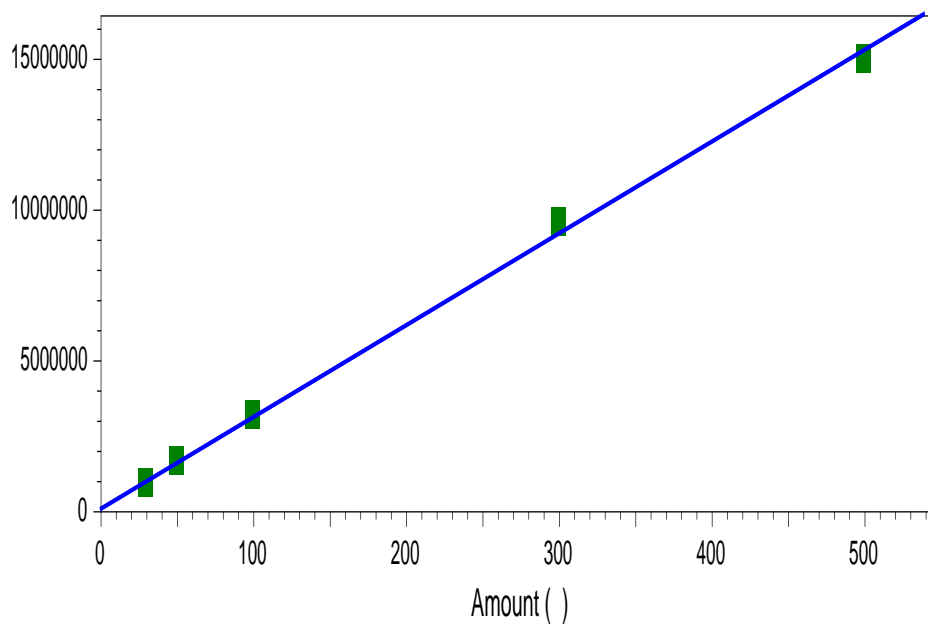


DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN REALIZADA POR CLAE PARA EL ESTÁNDAR DE BULATACINA.

Patrón	Área	Estándar externo (µg/mL)
1	887599	30
2	1635947	50
3	3159335	100
4	9541943	300
5	14947822	500

CURVA DE CALIBRACIÓN POR CLAE PARA EL ESTÁNDAR DE BULATACINA.

Peak: Bulatácina -- ESTD -- 1: 207 nm, 4 nm



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