

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA FRENTE A *Artemia salina*
(*Artemiidae*) E INSECTICIDA SOBRE *Corythucha gossypii*
(*Tingidae*) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Annona
reticulata* (*Annonaceae*).**

Presentado por:

KEVIN ESTIVEN SARASA BARCO

DIANA MARIELA BURBANO OBANDO

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

QUÍMICA INDUSTRIAL

2015

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA FRENTE A *Artemia salina*
(*Artemiidae*) E INSECTICIDA SOBRE *Corythucha gossypii*
(*Tingidae*) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Annona
reticulata* (*Annonaceae*).**

**TRABAJO DE GRADO
Requisito parcial para optar al título de QUÍMICO INDUSTRIAL**

Presentado por:

**KEVIN ESTIVEN SARASA BARCO
DIANA MARIELA BURBANO OBANDO**

**Grupo de Investigación:
OLEOQUÍMICA**

**Directora:
GLORIA EDITH GUERRERO ÁLVAREZ
Dra. CIENCIAS QUÍMICAS**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2015**

CONTENIDO

CONTENIDO	<i>i</i>
LISTADO DE TABLAS	<i>iv</i>
LISTADO DE FIGURAS	<i>vi</i>
LISTA DE ANEXOS	<i>ix</i>
RESUMEN	<i>x</i>
ABSTRAC	<i>xi</i>
1. MARCO TEORICO	<i>1</i>
1.1. FAMILIA <i>Annonaceae</i>	<i>1</i>
1.1.1. Genero <i>Annona</i>	<i>1</i>
1.1.1.1. <i>Annona reticulata</i>	<i>1</i>
1.1.1.1.1. Clasificación Botánica	<i>1</i>
1.1.1.1.2. Origen y distribución	<i>2</i>
1.1.1.1.3. Fenología	<i>3</i>
1.1.1.1.3.1.Hojas	<i>3</i>
1.1.1.1.3.2.Flores	<i>4</i>
1.1.1.1.3.3.Frutos	<i>4</i>
1.1.1.1.3.4.Semillas	<i>4</i>
1.1.1.1.4. Usos tradicionales	<i>5</i>
1.1.2. COMPOSICION QUÍMICA Y BIOACTIVIDAD DE LA FAMILIA <i>Annonaceae</i>	<i>5</i>
1.1.2.1. ACETOGENINAS	<i>5</i>
1.1.2.1.1.Generalidades.	<i>5</i>
1.1.2.1.2.Clasificación.	<i>7</i>
1.1.2.1.3.Biogenesis	<i>10</i>
1.1.2.1.4.Actividad biológica reportada	<i>11</i>
1.1.2.1.4.1.Actividad larvica y antitumoral.	<i>12</i>
1.1.2.1.4.2.Actividad insecticida.	<i>12</i>
1.1.2.2. ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS DE <i>Annonaceae</i>.	<i>13</i>
1.1.2.2.1.Origen biositetico de alcaloides isoquinolínicos.	<i>13</i>
1.1.2.2.2.Tipos de alcaloides isoquinolínicos en <i>Annona</i> .	<i>14</i>
1.1.2.2.3.Bioactividad de alcaloides aislados del genero <i>Annona</i>	<i>15</i>
1.2. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA	<i>16</i>
1.2.1. Evaluación de la actividad biológica con <i>Artemia salina</i>	<i>16</i>
1.2.1.2. Aspectos experimentales	<i>17</i>
1.2.1.2.1.Bioensayo general para productos naturales con actividad biológica	<i>17</i>

1.3. <i>Corythucha gossypii</i> (chinche de encaje).	18
1.3.1. Taxonomía	18
1.3.2. Ciclo de vida	18
1.3.2.1. Huevos	19
1.3.2.2. Ninfas	20
1.3.2.3. Adulto	20
1.3.3. Distribución- hospederos	20
1.3.4. Daños	21
1.3.5. Control en cultivos de <i>Annona muricata</i> .	21
1.4. FUNDAMENTOS EN TECNICAS DE ANALISIS	22
1.4.1. Cromatografía	22
1.4.1.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)	23
1.4.1.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	24
1.4.1.2.1. Cromatografía líquida en fase normal	24
1.4.1.2.2. Cromatografía líquida en fase reversa	25
1.4.2. Métodos de análisis para resultados de toxicidad	25
1.4.2.1. Metodo Probit	26
2. MARCO DE REFERENCIA	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. OBJETIVOS	33
5.1. OBJETIVO GENERAL	33
5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	33
6. METODOLOGIA	34
6.1. OBTENCION DE EL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS SEMILLAS DE <i>Annona reticulata</i> .	34
6.1.1. Obtención de las semillas	34
6.1.2. Tratamiento de las semillas previo a la extracción	34
6.1.3. Extracción por maceración de semillas de <i>Annona reticulata</i>	35
6.2. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE <i>Annona reticulata</i>	36
6.2.1. Obtención de la fracción metanólica	36
6.2.2. Obtención de la fracción de alcaloides	37
6.3. ANALISIS QUIMICO DEL EXTRACTO Y LAS FRACCIONES DE SEMILLAS DE <i>Annona reticulata</i>	37
6.3.1. Caracterización de acetogeninas	37
6.3.1.1. Evaluación preliminar del extracto etanólico y la fracción F005 por cromatografía de capa delgada (CCD)	37
6.3.1.2. Análisis del extracto etanólico y la fracción F005 de <i>Annona reticulata</i> por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).	38

6.3.1.2.1. Condiciones del análisis por CLAE.	38
6.3.2. Caracterización de alcaloides	39
6.3.2.1. Análisis preliminar de la fracción (F007) por cromatografía de capa delgada (CCD)	39
6.3.2.2. Análisis de la fracción F007 por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	39
6.3.2.2.1. Condiciones del análisis por CLAE	39
6.4. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	40
6.4.1. Ensayo Larvicida frente a <i>Artemia salina</i> .	40
6.4.2. Ensayo insecticida	43
6.4.2.1. Ensayo <i>in vitro</i> con <i>Corythucha gossypii</i>	43
6.5. ANALISIS ESTADÍSTICO	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS SEMILLAS DE <i>Annona reticulata</i> .	46
7.1.1. Extracción por maceración de la semillas de <i>Annona reticulata</i> .	46
7.2. FRACCIONAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	47
7.3. ANALISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO DE SEMILLAS DE <i>Annona reticulata</i>	48
7.3.1. Caracterización de acetogeninas.	48
7.3.1.1. Evaluación preliminar del extracto etanólico y fracción F005 por cromatografía de capa delgada (CCD).	48
7.3.1.2. Análisis del extracto etanólico y fracción F005 de <i>Annona reticulata</i> por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).	49
7.3.2. Caracterización de alcaloides.	54
7.3.2.1. Evaluación preliminar del extracto enriquecido en alcaloides (F007) por cromatografía de capa delgada (CCD).	54
7.3.2.2. Análisis de la fracción de alcaloides (F007) de <i>Annona reticulata</i> por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).	55
7.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	58
7.4.1. Ensayo larvicida con <i>Artemia salina</i>	58
7.4.2. Ensayo insecticida frente <i>Corythucha gossypii</i> .	62
8. CONCLUSIONES	69
9. RECOMENDACIONES	70
10. BIBLIOGRAFIA	71

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación botánica de <i>Annona reticulata</i>	2
Tabla 2 Valor alimenticio por cada 100 g de fruta de <i>Annona reticulata</i> . Niveles mínimos y máximos de los constituyentes de análisis realizados en América central, Filipinas y otros lugares	5
Tabla 3 Algunas acetogeninas aisladas de <i>Annona reticulata</i>	6
Tabla 4 Clasificación de las acetogeninas de acuerdo a sus anillos tetrahidrofurano (THF) y tetrahidropirano (THP).	8
Tabla 5 Algunos alcaloides aislados de <i>Annona reticulata</i>	15
Tabla 6 Clasificación de toxicidad según CYTED.....	16
Tabla 7 Clasificación de <i>Corythucha gossypii</i>	18
Tabla 8 Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.....	23
Tabla 9 Comparación de algunos parámetros entre fase normal y fase reversa	25
Tabla 10 Resumen de actividades reportadas para la <i>Annona reticulata</i> frente a diferentes insectos.	28
Tabla 11 Algunas ventajas del uso de alternativas naturales para el control de insectos en la agricultura y desventajas del uso de plaguicidas sintéticos.....	31
Tabla 12 Características del equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).	38
Tabla 13 Condiciones bajo las cuales se analizó el extracto etanólico y la fracción F005 por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en fase reversa.	38
Tabla 14 Condiciones para análisis cualitativo de alcaloides por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en fase reversa.....	40
Tabla 15 Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico (F001) a partir de semillas desengrasadas de <i>Annona reticulata</i>	46
Tabla 16 Porcentaje de rendimiento de la fracción metanólica (F005) y de alcaloides (F007) a partir de semillas desengrasadas de <i>Annona reticulata</i>	47

Tabla 17 Número de cada pico correspondiente a acetogeninas en el cromatograma A y B con sus respectivos tiempos de retención.	52
Tabla 18 Máximos de absorbancia de los picos correspondientes a alcaloides al analizar por CLAE la fracción F007	57
Tabla 19 Concentración letal media (CL ₅₀) del extracto etanólico (F001) de <i>Annona reticulata</i> frente a larvas de <i>Artemia salina</i>	58
Tabla 20 Concentración letal media (CL ₅₀) del extracto etanólico (F001), la fracción metanólica (F005) y la fracción de alcaloides (F007)	60
Tabla 21 Porcentajes de mortalidad de nauplios de <i>Artemia salina</i> causado por el extracto etanólico (F001) y las fracciones metanólica (F005) y de alcaloides (F007) de los diversos extractos y sus respectivas concentraciones evaluadas en el ensayo larvívica.....	60
Tabla 22 Resultados del ensayo insecticida del extracto etanólico de <i>Annona reticulata</i> frente a <i>Corythucha gossypii</i> a las 24 y 48 horas.	63

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Fruto de <i>Annona reticulata</i>	1
Figura 2 Distribución nativa y naturalizada de <i>Annona reticulata</i>	2
Figura 3 Árbol de <i>Annona reticulata</i>	3
Figura 4 Hojas de <i>Annona reticulata</i> (a) Haz (b) <i>Envés</i>	3
Figura 5 (a) Medida fruto de <i>Annona reticulata</i> . (b) Fruto maduro de <i>Annona reticulata</i> . (c) Pulpa de <i>Annona reticulata</i>	4
Figura 6 Semillas de <i>Annona reticulata</i>	4
Figura 7 Estructura de la uvaricina	6
Figura 8 Estructura general de las acetogeninas	7
Figura 9 Ejemplo de configuración del núcleo de tetrahidrofurano en la (+)-Trilobina	7
Figura 10 Biosíntesis propuesta para la <i>Goniocina</i> aislada del <i>Goniothalamus giganteus</i> que posee tres anillos THF en su estructura	11
Figura 11 Representación de la Bulatacina una acetogenina que presenta alta actividad por sus características estructurales.	12
Figura 12 Bio síntesis del anillo de isoquinolína	13
Figura 13 Origen biosintético de los alcaloides isoquinolínicos a partir del esqueleto benzilisoquinolínico.	14
Figura 14 Metamorfosis de la <i>Artemia salina</i>	17
Figura 15 Ciclo de vida de <i>Corythucha gossypii</i> (a) huevo,(b) primer instar ninfal (c) segundo instar ninfal, (d) tercer instar ninfal, (e) cuarto instar ninfal, (f) quinto instar ninfal (g) adulto, dibujos hechos por Antonio J. López M. (1982).	19
Figura 16 Colonias de huevos de <i>Corythucha gossypii</i>	19
Figura 17 <i>Corythucha gossypii</i>	20
Figura 18 Daño foliar causado por <i>Corythucha gossypii</i>	21

Figura 19 Relación entre polaridad y los tiempos de elución en cromatografía en fase normal y en fase reversa.	25
Figura 20 Ubicación y coordenadas exactas del punto de recolección del fruto.	34
Figura 21 Imágenes del proceso previo a la extracción de metabolitos secundarios (a) semillas lavadas y secas de <i>Annona reticulata</i> , (b) semillas trituradas, (c) desengrase, (d) extracción por maceración y filtración al vacío, (e) rota evaporación del extracto, (f) secado con nitrógeno, (g) almacenamiento del extracto crudo.	35
Figura 22 Proceso del tratamiento de la semilla y obtención del extracto crudo	36
Figura 23 Esquema para el fraccionamiento del extracto etanólico de semillas de <i>Annona reticulata</i>	37
Figura 24 Proceso para la obtención de nauplios de <i>Artemia salina</i> en el laboratorio.	41
Figura 25 Esquema de la metodología utilizada para la obtención de nauplios de <i>Artemia salina</i> en el laboratorio.	41
Figura 26 Esquema que representa la metodología utilizada para el ensayo larvicial con <i>Artemia salina</i>	42
Figura 27 Ensayo <i>in vitro</i> larvicial del extracto etanólico de <i>Annona reticulata</i> frente a <i>Artemia salina</i>	43
Figura 28 Esquema que representa metodología implementada para la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad insecticida del extracto etanólico de <i>A. reticulata</i> frente a <i>Corythucha gossypii</i>	44
Figura 29 Imágenes del ensayo insecticida <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Annona reticulata</i> con <i>Corythucha gossypii</i> . (a) material de partida: extracto etanólico, ninfas de <i>C. gossypii</i> , hojas de guanábana frescas y sanas. (b) concentraciones a evaluar a partir del extracto. (c) Asperjar la hoja por el envés. (d) Dejar secar la hoja. (e) Inocular las ninfas. (f) Sellar el recipiente... ..	45
Figura 30 Cromatoplasmas obtenida en el análisis de CCD (A) extracto etanólico y fracción F005 utilizando como revelador ácido fosfomolibdico al 5% en metanol. (B) Extractos etanólicos utilizando como revelador el reactivo de Kedde.	49
Figura 31 Perfiles Cromatográficos para los compuestos de tipo acetogenina presentes en (A) extracto etanólico de <i>Annona reticulata</i> - (B) fracción F005. ..	51

Figura 32 Cromatogramas obtenidos para el extracto etanólico (verde) y el de la fracción F005 (azul) sobrepuestos	53
Figura 33 Cromatoplaqueta obtenida en el análisis por CCD para la fracción F007 utilizando como revelador el reactivo de dragendorff	55
Figura 34 Reacción de tetra-yoduro de bismuto con el nitrógeno del alcaloide.....	55
Figura 35 Cromatograma obtenido para el extracto enriquecido en alcaloides (F007)	56
Figura 36 (A) cromatograma del extracto crudo bajo el método usado con las acetogeninas; (B) espectro ultravioleta del pico 1 representativo de alcaloide; (C) espectro ultravioleta del pico 2 representativo de alcaloide.	54
Figura 37 Comportamiento de la actividad larvicida del extracto etanólico de semilla de <i>Annona reticulata</i> frente a <i>Artemia salina</i> a temperatura ambiente durante un tiempo de nueve semanas.	59
Figura 38 Resultados del análisis de varianza ANOVA mediante el software InfoStat.....	61
Figura 39 Ensayo insecticida del extracto etanólico de <i>Annona reticulata</i> frente a <i>Corythucha gossypii</i>	62
Figura 40 Grafica de los resultados del ensayo insecticida a las 24 y 48 horas del extracto etanólico frente a <i>Corythucha gossypii</i>	64
Figura 41 Incremento de la ovoposición de <i>Corythucha gossypii</i> , al encontrarse en una hoja asperjada con el extracto etanólico de <i>Annona reticulata</i>	66

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	81
Anexo 2. Espectros UV obtenidos por DAD para cada pico del cromatograma obtenido en el análisis del extracto etanólico (crudo) por CLAE	83
Anexo 3. Espectros UV obtenidos por DAD para cada pico del cromatograma obtenido en el análisis enriquecido en alcaloides (F007) por CLAE.....	85

RESUMEN

Annona reticulata es una especie perteneciente a la familia *Annonaceae*, esta familia ha sido de gran interés debido a la presencia de metabolitos secundarios tales como acetogeninas de anonáceas y alcaloides de tipo isoquinolinico; los cuales han sido estudiados por su variada actividad biológica.

En este estudio, se evaluó la actividad larvicida frente a *Artemia salina*, del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata*, obtenido por maceración pasiva, y de dos fracciones del extracto etanólico, obtenidas mediante extracción líquido-líquido; una metanólica (F005) y otra de alcaloides (F007).

En la evaluación de la actividad larvicida se obtuvieron valores de CL_{50} de 0,0672 $\mu\text{g/mL}$, 0,049 $\mu\text{g/mL}$ y 0,0716 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto F001, las fracciones F005 y F007 respectivamente; debido a que los valores de CL_{50} son $<10 \mu\text{g/mL}$, tanto el extracto como las fracciones son consideradas altamente activas frente a *Artemia salina*.

Se evaluó la actividad insecticida del extracto etanólico frente a *Corythucha gossypii*, insecto plaga que se presenta en Colombia, se evaluaron concentraciones de 100, 50, 25, 10 $\mu\text{g/mL}$ variando el tiempo de exposición (24 y 48 horas). Se encontró que el extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* presenta actividad insecticida frente a *Corythucha gossypii*; de acuerdo al rango de concentraciones evaluadas, el mayor porcentaje de mortalidad se presentó a 10 $\mu\text{g/mL}$ siendo de 46.66%.

Se realizó un perfil cromatográfico por CLAE- FR, para el extracto etanólico y la fracción F005, se destacó la presencia de varios compuestos, al compararse el espectro UV- vis de cada uno de los picos, algunos presentaron máximos de absorbancia característicos de acetogeninas; y el perfil cromatográfico realizado para la fracción F007, comparándose el espectros UV-vis de los picos y los máximos de absorbancia característicos de alcaloides de tipo isoquinolínico, se encontró la presencia de cuatro de estos posibles compuestos.

Palabras clave: Larvicida, insecticida, concentración letal media (CL_{50}), *Annona reticulata*, *Artemia salina*, *Corythucha gossypii*, acetogeninas, alcaloides, CLAE-FR.

ABSTRAC

Annona reticulata is a species belonging to the Annonaceae family, this family has been of great interest due to the presence of secondary metabolites such as acetogenins of Annonaceae and isoquinoline alkaloids; these compounds have been studied for their varied biological activity.

In this study, the cytotoxic activity was evaluated against *Artemia salina*, of ethanolic extract of seeds of *Annona reticulata*, the ethanolic extract was obtained by passive maceration, and two fractions of ethanolic extract, obtained by liquid-liquid extraction; one methanolic (F005) and other alkaloids (F007).

Larvicidal activity evaluation of ethanolic extract and two fractions (F005- F007) was evaluated against *Artemia salina*, the values of median lethal concentration (LC_{50}) were 0,0672 $\mu\text{g/mL}$, 0,049 $\mu\text{g/mL}$ and 0,0716 $\mu\text{g/mL}$ for F001 extract, F005 and F007 fractions respectively; because the LC_{50} values are $<10 \mu\text{g / mL}$, both the extract and the fractions are considered highly active against *Artemia salina*.

Insecticidal activity against *Corythucha gossypii*, insect pest presented in Colombia, of ethanolic extract was evaluated at concentrations of 100, 50, 25, 10 $\mu\text{g / mL}$ of the extract By different time of exposure (24 and 48 hours); This evaluation found that the ethanolic extract of seeds of *Annona reticulata* has insecticidal activity against *Corythucha gossypii*; according to the range of concentrations tested, the highest percentage of mortality was 10 $\mu\text{g / mL}$ being of 46.66%.

Chromatographic profile was performed by HPLC-RP, for the ethanolic extract and fraction F005, the presence of many compounds are highlighted, comparing the UV-vis spectrum of each of the peaks, showed some characteristic absorbance maximum acetogenins; and the chromatographic profile for fraction F007, comparing the UV-vis spectra of the peaks and characteristic absorbance maximum isoquinoline alkaloid type, the presence of 4 of these compounds were found possible.

Key words: Larvicide, insecticide, median lethal concentration (LC_{50}), *Annona reticulata*, Brine shrimp, *Corythucha gossypii*, acetogenin, alkaloid, HPLC-RP.

1. MARCO TEORICO

1.1. FAMILIA *Annonaceae*

Las anonáceas se consideran miembros del orden Magnoliales constituyen una familia casi exclusivamente tropical encontrándose principalmente a alturas menores de 2000 msnm; Presenta un buen número de especies frutales o productoras de aceites esenciales [1-3]; sólo cinco géneros *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria*, *Melodorum* y *Asimina* producen frutos comestibles [4]. La familia de las anonáceas incluye unos 130 géneros y alrededor de 2500 especies, casi exclusivamente de las zonas tropical y subtropical tanto del viejo como del nuevo mundo, con excepción del género *Asimia*, que se encuentra en la parte oriental de Norteamérica [5].

1.1.1. Genero *Annona*

El género *Annona* comprende unas 120 especies de árboles y lianas arbusto, cuenta con distribución tropical, se encuentran 30 géneros en la Amazonia, que es la zona de mayor concentración de especies de esta familia en America. Continente varias especies productoras de frutos comestibles, como la guanábana (*Annona muricata*), el anon (*Annona squamosa*) y anón colorado (*Annona reticulata*) [46].

1.1.1.1. *Annona reticulata*

1.1.1.1.1. Clasificación Botánica

En la figura 1 se presenta el fruto de *Annona reticulata* y en la tabla 1 la clasificación botánica de la especie.



Figura 1 Fruto de *Annona reticulata* [autores].

Tabla 1 Clasificación botánica de *Annona reticulata* [6].

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Magnolidaes
Familia	Annonaceae
Genero	<i>Annona</i>
Especie	<i>Annona reticulata</i>

1.1.1.1.2. Origen y distribución

La *Annona reticulada* es nativa de las Indias occidentales, probablemente de las Antillas como se presenta en la figura 2, pero fue introducida en tiempo primitivos a través de América Central hasta el sur de México. Durante mucho tiempo se ha cultivado y naturalizado por el sur como Perú y Brasil. Se cultiva en las Bahamas, en ocasiones en las Bermudas, en el sur de la Florida, y se introdujo en los países africanos y asiáticos, hace muchos siglos [7].



Figura 2 Distribución nativa y naturalizada de *Annona reticulata* [8].

La especie *Annona reticulata* en Colombia se encuentra reportada en bases de datos como: Sistema de Información sobre Biodiversidad en Colombia (SiB) y el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional, donde se ha reportado la presencia de esta especie en Antioquia, Santander y Tolima; pero se desconoce en qué otras partes de Colombia se puede encontrar; Teniendo en cuenta el clima y la altura sobre el nivel del mar óptima para el desarrollo de la especie se puede desarrollar en diversos departamentos de la región andina y caribe de Colombia [9].

1.1.1.1.3. Fenología

Un pequeño árbol que crece de 3 a 10 m de altura, presenta una gran cantidad de ramificaciones cerca de la base con diámetro de tronco de 25 a 35 cm, copa del árbol irregular y con algunas ramas teretes pubescentes, como se observa en la figura 3 [7]. Es raro encontrarlo por encima de los 1.500 msnm totalmente desarrollado [9].

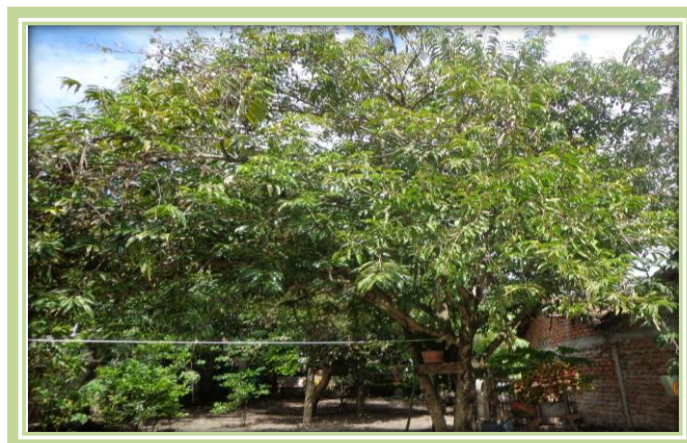


Figura 3 Árbol de *Annona reticulata* [autores].

1.1.1.1.3.1. Hojas

Como se observa en la figura 4 presenta: hojas dísticas, alternas, cortamente pecioladas, coriáceas, oblongas-lanceoladas, con 10 a 20 cm de largo por 2.5 hasta 3.5 cm de ancho, ápice acuminado, margen entero, con venas visibles, de color verde oscuro por encima y verde pálido por debajo [7, 9].

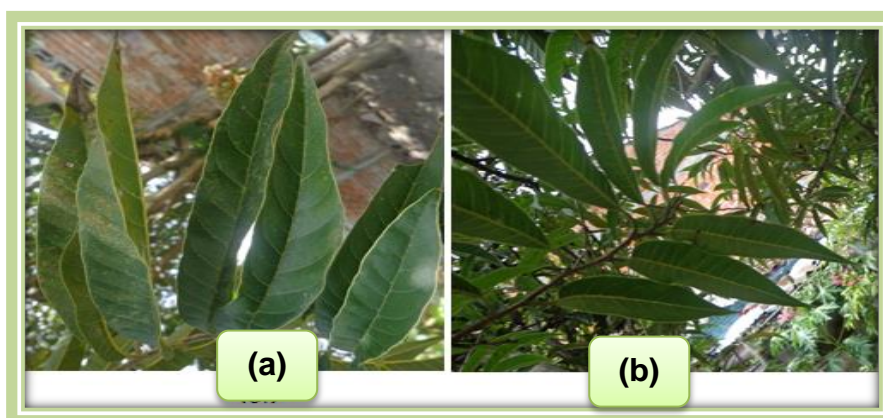


Figura 4 Hojas de *Annona reticulata* (a) Haz (b) Envés [autores].

1.1.1.1.3.2. Flores

Flores en racimos caídos, son fragantes, con 3 pétalos externos carnosos, estrechos de 2 a 3 cm de largo; de color verde claro en el exterior y con una mancha de color rojo oscuro o púrpura en el interior de la base de color amarillo pálido. Las flores nunca se abren completamente [9].

1.1.1.1.3.3. Frutos

El fruto es en forma de corazón o esférica, de 8 a 15 cm de diámetro, como se presenta en la figura 5, areolas más o menos suaves, romboidales o hexagonales separadas por un reticulado marcado pero no tuberculoso, de color marrón rojizo o rojo cuando madura, la pulpa de color blanco o crema, aromático, granular, se adhiere estrechamente a las semillas. Un núcleo de punta, fibroso, central, unido al tallo grueso, se extiende a más de la mitad de la fruta. El sabor es dulce y agradable; Tanto el color exterior y el interior varía según el cultivo [7, 9].

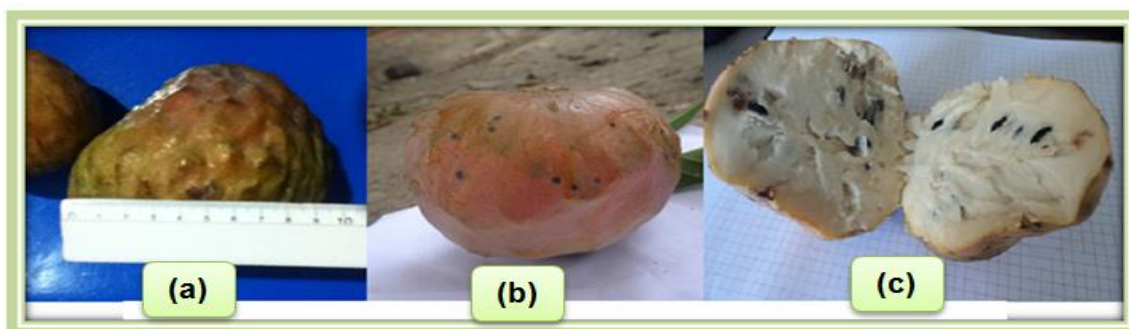


Figura 5 (a) Medida fruto de *Annona reticulata*. (b) Fruto maduro de *Annona reticulata*. (c) Pulpa de *Annona reticulata* [autores].

1.1.1.1.3.4. Semillas

Semilla brillante, oblonga, suave, de color marrón oscuro, como se muestra en la figura 6, con menos de 1,25 cm de largo, numerosas; recuentos reales de semillas han sido de 55 a 76 por fruto [7, 9]



Figura 6 Semillas de *Annona reticulata* [autores].

1.1.1.1.4. Usos tradicionales

En la tabla 2 se presenta el aporte nutricional de la especie debido a este, su excelente aroma y sabor, se le ha dado al fruto usos esencialmente culinarios; En América Central, México y las Indias Occidentales, la fruta se utiliza para salsas, jugo, helado y pudines [9].

Tabla 2 Valor alimenticio por cada 100 g de fruta de *Annona reticulata*. Niveles mínimos y máximos de los constituyentes de análisis realizados en América central, Filipinas y otros lugares [9].

Calorías	80-101	Fosforo	14.7-32.1 mg
Humedad	68.3-80.1 g	Hierro	0.42-1.14 mg
Proteínas	1.17-80.1 g	Caroteno	0.007-0.018 mg
Grasas	0.5-0.6 g	Tiamina	0.075-0.119 mg
Carbohidratos	20-25.2 g	Riboflavina	0.086-0.175 mg
Fibra	0.9-6.6 g	Niacina	0.528-1.190 mg
Cenizas	0.5-1.11 g	Ácido ascórbico	15.0-44.4 mg
Calcio	17.6-27 mg	Acido nicotínico	0.5 mg

1.1.2. COMPOSICION QUÍMICA Y BIOACTIVIDAD DE LA FAMILIA *Annonaceae*

La familia *Annonaceae* presenta numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, en las raíces, semillas, frutos y hojas. De esta familia se han caracterizado y reportado alcaloides, terpenoides, flavonoides, acetogeninas y aceites saponificables [10]. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas anonáceas está asociada a su efecto como insecticidas, actividad larvicida, antitumoral, antidiabética, antibacterial, pesticida, antimalarial, anti-leishmaniasis, propiedades antihelmítica, entre otras [11-16]

1.1.2.1. ACETOGENINAS

1.1.2.1.1. Generalidades.

Las acetogeninas de anonáceas (ACG) constituyen una serie de productos naturales aislados a partir exclusivamente de la familia *Annonaceae* que se distribuyen ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales, La *annona reticulata* perteneciente al género *Annona* presenta una apreciable cantidad de estos compuestos como se observa en la tabla 3. En 1982 con el descubrimiento de la uvaricina, su estructura se presenta en la figura 7, esta fue la primera acetogenina identificada a partir de las raíces de *Uvaria acuminata* perteneciente a la familia *Annonaceae* y después de observarse su actividad como agente anti leucémico se generó un interés por esta familia de compuestos; más de 593 miembros se han identificado a partir de 51 especies y 13 géneros [17-19].

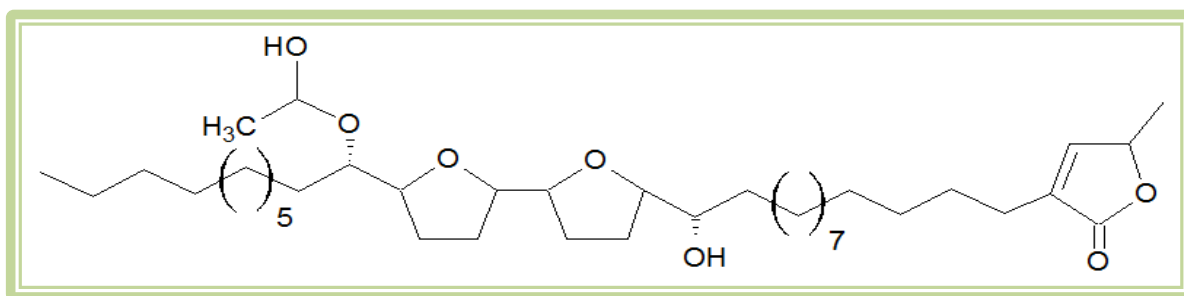


Figura 7 Estructura de la uvaricina [19].

Tabla 3 Algunas acetogeninas aisladas de *Annona reticulata* [20-22]

Nombre	Estructura	Parte de la planta	Ref.
Cis/ Trans isomurisolenina		Semillas	[23, 30, 62]
Anoreticina		Semillas Hojas	[30, 62]
Anoreticina 9-1		Semillas Hojas	[30, 62]
Cis/trans murisolinona		Semillas	[30, 62]
Bulatacina		Semillas	[20, 22]
squamocina		Semillas	[20, 22]
Cis/ trans bulatacinona		Semillas	[20, 22]
Asimicina		semillas	[20]
Molvizarina		semillas	[20]
Parviflorina		semillas	[20]

En la figura 8 se presenta la estructura general de las acetogeninas, Las cuales son una serie de productos naturales de 35 a 37 Carbonos que termina en una γ -lactona, derivados de ácidos grasos de 32 a 34 carbonos; tienen varias funciones oxigenadas, tales como hidroxilos, cetonas, epóxidos; 1, 2 o 3 tetrahidrofuranos (THF) 2,5-disustituidos y tetrahidropiranos (THP), así como enlaces dobles y triples [17, 18, 23, 24].

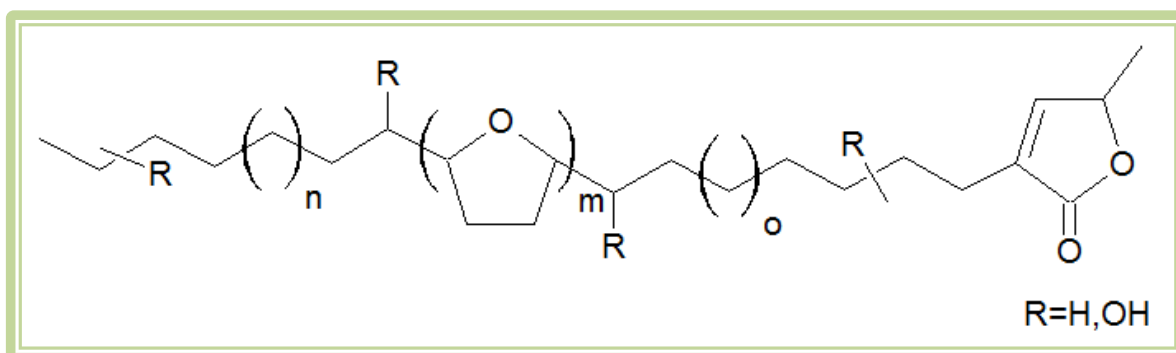


Figura 8 Estructura general de las acetogeninas [25].

Las acetogeninas más abundantes presentan anillos bis-THF adyacente, rodeado por respectivos grupos hidroxilo de las cadenas laterales. Aunque es posible una gran variedad de isómeros según la estereoquímica relativa de las funciones oxigenadas (alcoholes en *eritro* o *treo* respecto a los anillos, anillos *cis* o *trans*, disposición *eritro* o *treo* entre los anillos adyacentes), en las acetogeninas de anonáceas predominan ampliamente las disposiciones *trans/treo/trans* entre los anillos, existiendo también disposiciones *cis/treo/trans*, pero es muy rara la relación *eritro* entre los anillos adyacentes (hay menos de 5 ejemplos descritos entre ellas, ejemplo la trilobina, representada en la figura 9. Asimismo, los hidroxilos de la cadena lateral pueden disponerse en posiciones *treo* (mayormente) o en *eritro* respecto al anillo adyacente [25].

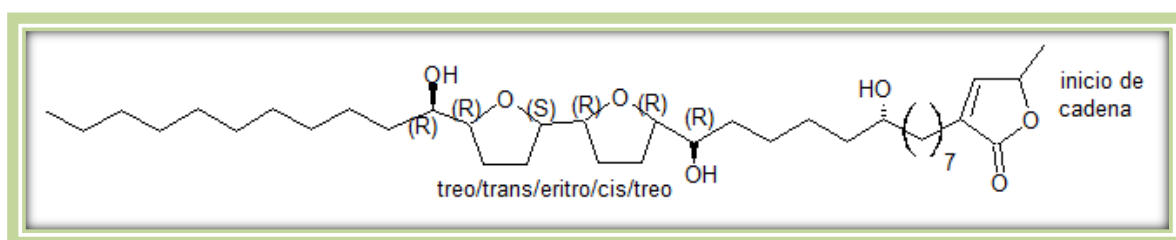


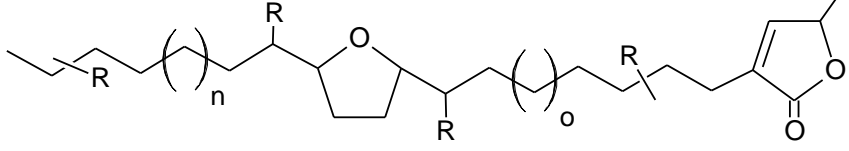
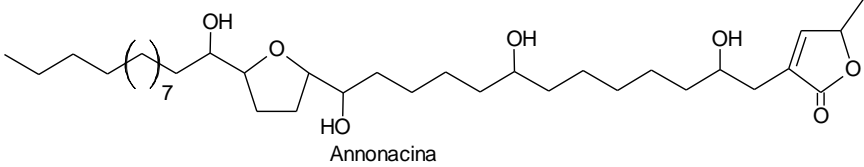
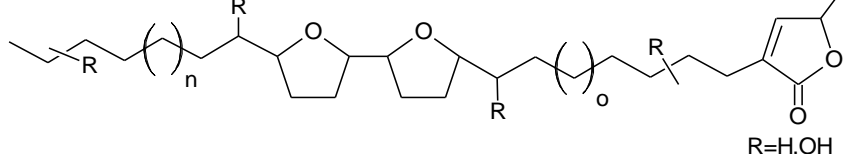
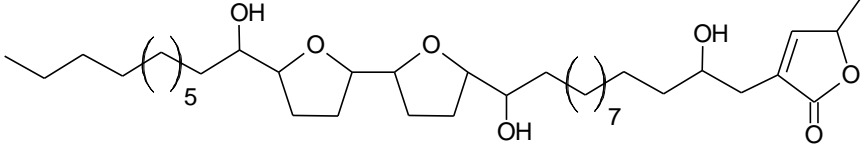
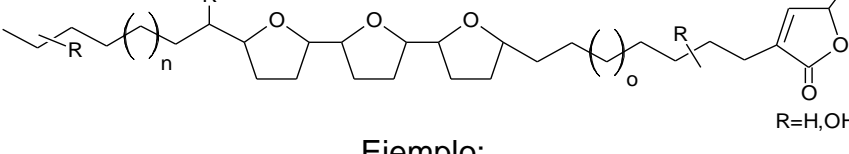
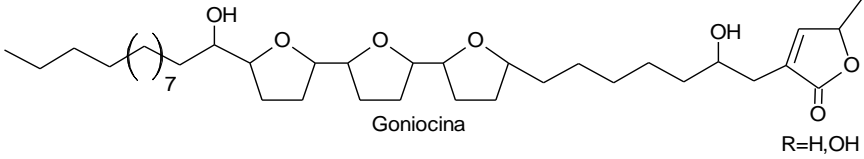
Figura 9 Ejemplo de configuración del núcleo de tetrahidrofurano en la (+)-Trilobina [25].

1.1.2.1.2. Clasificación.

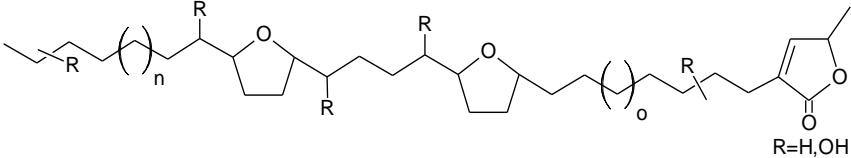
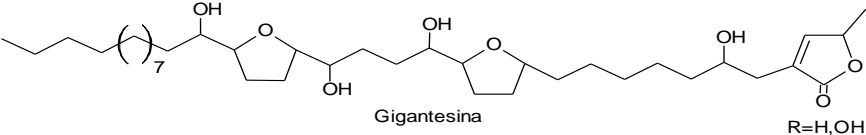
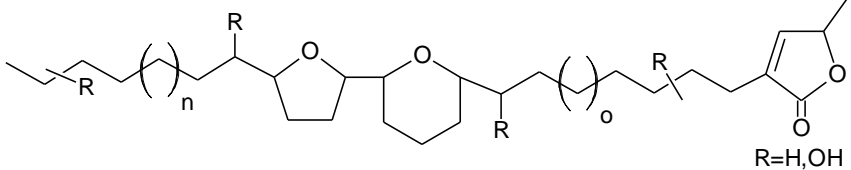
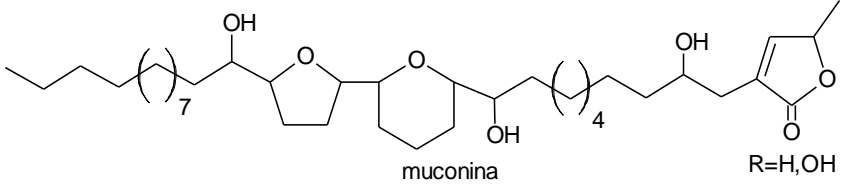
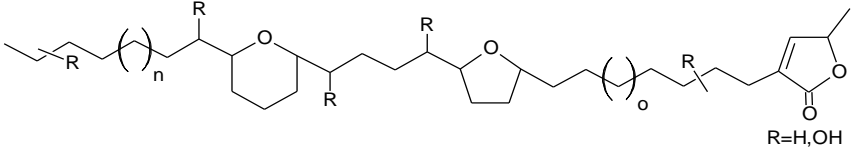
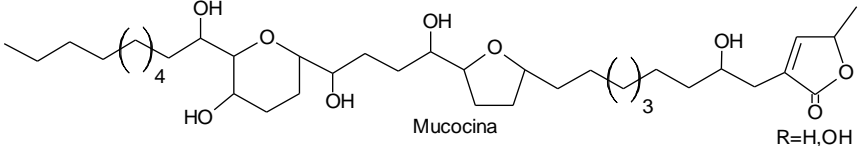
Esencialmente las acetogeninas se clasifican de acuerdo a la presencia, cantidad y/o posición de los grupos tetrahidrofurano y/o tetrahidropirano con respecto a otros del mismo tipo en: mono tetrahidrofurano, bis tetrahidrofurano adyacentes, bis-tetrahidrofurano no adyacentes, tri- tetrahidrofurano adyacentes, adyacente tetrahidropirano-tetrahidrofurano, no adyacente

tetrahidrofurano- tetrahidropirano, sin anillo tetrahidrofurano (acetogeninas lineales que contienen γ -lactonas sin anillo THF) y no clásicas que pueden ser: mono- tetrahidropirano y tetra hidropirano- tetrahidrofurano hidroxilados como se presenta en la tabla 4 [17-19, 21, 24].

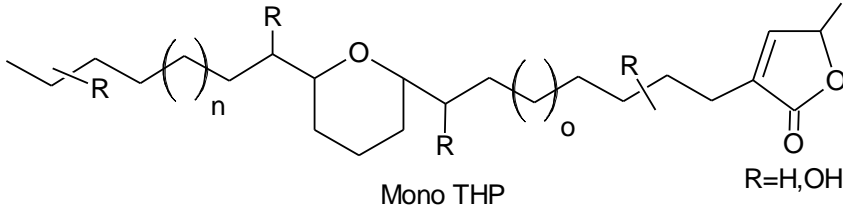
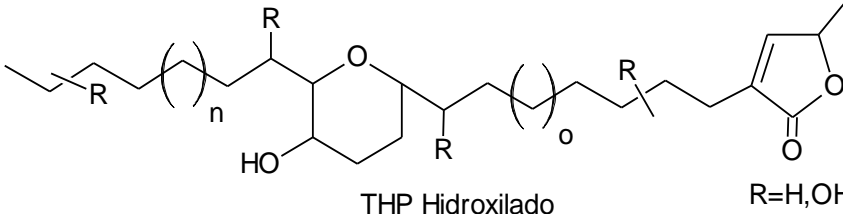
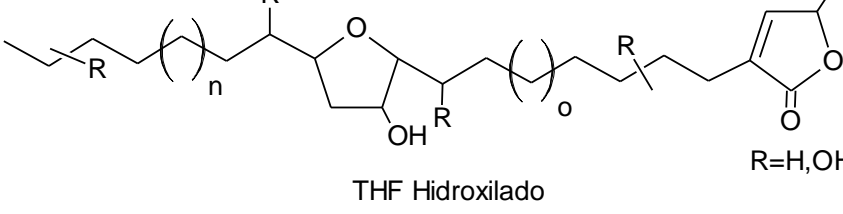
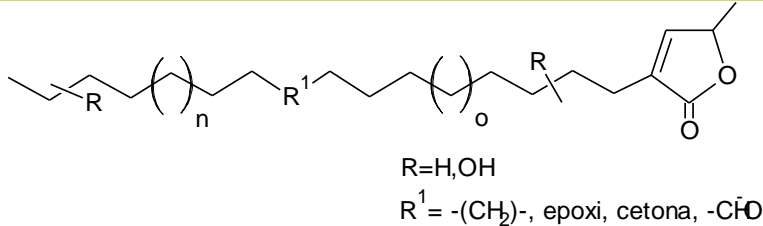
Tabla 4 Clasificación de las acetogeninas de acuerdo a sus anillos tetrahidrofurano (THF) y tetrahidropirano (THP) [17, 21, 26].

Tipo de acetogenina	Estructura
<p>1. Mono-THF</p>	 <p style="text-align: right;">R=H,OH</p> <p style="text-align: center;">Ejemplo:</p>  <p style="text-align: center;">Annonacina</p>
<p>2. Bis-THF adyacentes</p>	 <p style="text-align: right;">R=H,OH</p> <p style="text-align: center;">Ejemplo:</p>  <p style="text-align: center;">Bullatacina</p>
<p>3. Tri-THF adyacentes</p>	 <p style="text-align: right;">R=H,OH</p> <p style="text-align: center;">Ejemplo:</p>  <p style="text-align: center;">Goniocina</p> <p style="text-align: right;">R=H,OH</p>

Continuación de la tabla 4

Tipo de acetogenina	Estructura
<p>4. Bis-THF no adyacentes</p>	 <p style="text-align: right;">R=H,OH</p> <p style="text-align: center;">Ejemplo:</p>  <p style="text-align: center;">Gigantesina</p> <p style="text-align: right;">R=H,OH</p>
<p>5. (THF-THP) adyacentes</p>	 <p style="text-align: right;">R=H,OH</p> <p style="text-align: center;">Ejemplo:</p>  <p style="text-align: center;">muconina</p> <p style="text-align: right;">R=H,OH</p>
<p>6. (THF-THP) no adyacentes</p>	 <p style="text-align: right;">R=H,OH</p> <p style="text-align: center;">Ejemplo:</p>  <p style="text-align: center;">Mucocina</p> <p style="text-align: right;">R=H,OH</p>

Continuación de la tabla 4

Tipo de acetogenina	Estructura
7. No Clásicas: - Mono-THP - THF y THP hidroxilado	 <p style="text-align: center;">Mono THP R=H,OH</p>  <p style="text-align: center;">THP Hidroxilado R=H,OH</p>  <p style="text-align: center;">THF Hidroxilado R=H,OH</p>
8. Sin anillo THF	 <p style="text-align: center;">R=H,OH R¹ = -(CH₂)-, epoxi, cetona, -C=O</p>

1.1.2.1.3. Biogenesis

Desde el punto de vista biosintético mostrado en la figura 10, se propone que los anillos de THF, THP y los epóxidos se forman a partir de las especies que han podido aislarse con dobles enlaces mediante epoxidación y ciclación. El descubrimiento y aislamiento de precursores (compuestos sin anillos, epóxidos, cetonas, dioles y dobles enlaces), la localización de los dobles enlaces en las posiciones adecuadas, y la semisíntesis de anillos adicionales de THF a partir de acetogeninas que contienen dobles enlaces apoyan esta hipótesis [21, 26].

Los descubrimientos de las *muridieninas* y *chatenaytrieninas*, precursores propuestos para las acetogeninas mono-THF y las bis-THF respectivamente, añaden una nueva evidencia sobre que las acetogeninas derivan de los ácidos grasos lacceroico (32 C) y ghedoico (34 C) por combinación enzimática con una unidad de tres átomos de carbono. Estos ácidos grasos o sus productos

esterificados, nunca se han aislado de los extractos realizados a las plantas, esto sugiere que los ácidos solo actúan como intermediarios de corta vida en el proceso biosintético, que son procesados por complejas subunidades enzimáticas y son posteriormente metabolizados para la formación de la γ -lactona, para sufrir después deshidrogenación, epoxidación y ciclación [21, 26].

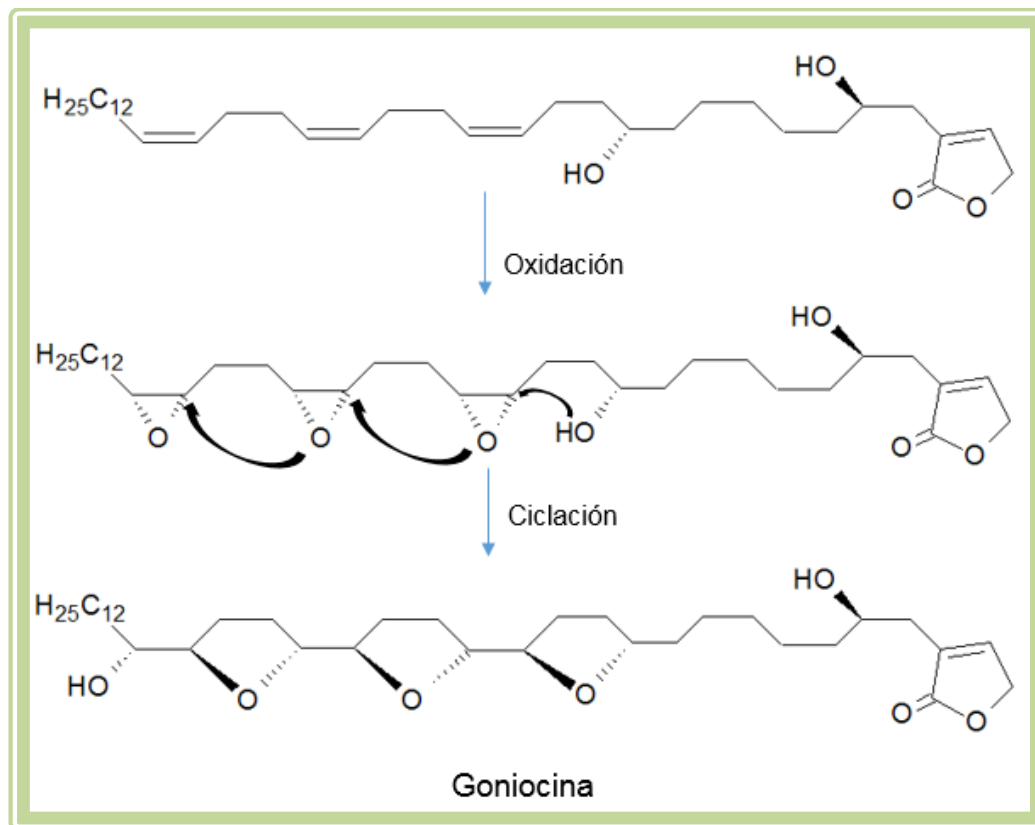


Figura 10 Biosíntesis propuesta para la *Goniocina* aislada del *Goniiothalamus giganteus* que posee tres anillos THF en su estructura [26].

1.1.2.1.4. Actividad biológica reportada

Las Acetogeninas presentan un amplio rango de actividad biológica, incluyendo: antioxidante [27], larvicida, antitumoral, pesticida, vermicide, antimicrobiano, actividad antihelmíntica, antimalárica, antibiótica, deterrente, inmunosupresora, leismanicida, inhibidor de crecimiento e inhibidor del apetito entre otras [23, 25, 28, 29].

Diversos estudios indican que existe una relación entre la actividad biológica de las acetogeninas y su estructura, y en los cuales se consideran los siguientes características que dan una mayor actividad al compuesto como se muestra en la figura 11, que posea dos grupos THF adyacentes (A), un grupo terminal γ -lactona intacto (B), mayor cantidad de grupos OH a lo largo de la cadena (un grupo OH en el C-4 (C) es indispensable para la actividad), la presencia de dobles enlaces o de dioles vecinales a lo largo de la cadena, que tenga una longitud de 35 C a 37 C, grupos THF rodeados por hidroxilos (D), y que el THF este a 13 carbonos de γ -lactona [24].

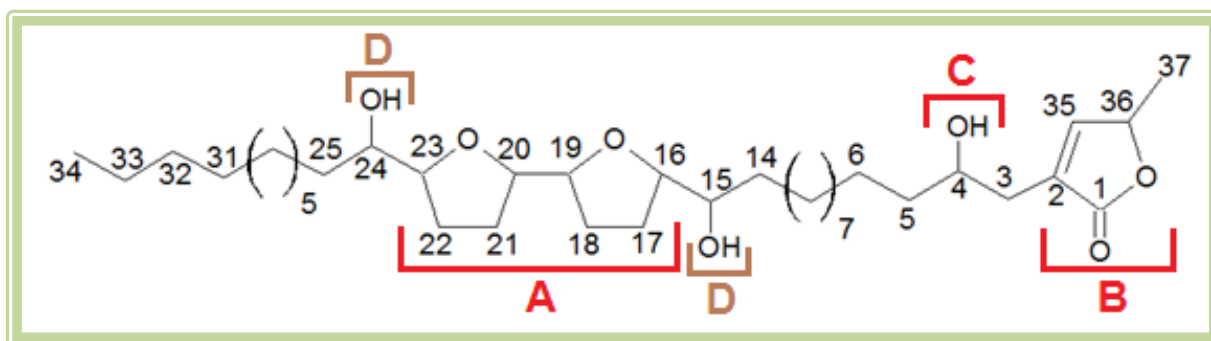


Figura 11. Representación de la Bulatacina una acetogenina que presenta alta actividad por sus características estructurales.

1.1.2.1.4.1. Actividad larvícida y antitumoral.

Desde 1982 las acetogeninas han sido consideradas como prometedores candidatos para una nueva generación de fármacos contra tumores resistentes a la quimioterapia. En 1991, el complejo mitocondrial I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) de la cadena respiratoria mitocondrial fue identificado como la enzima objetivo de las acetogeninas. El complejo I juega un importante papel dentro del mantenimiento de la función bioenergética de la célula llevando a cabo la síntesis de ATP [25, 26].

Unos años más tarde, las acetogeninas fueron caracterizadas como unos de los inhibidores más potentes (son efectivas en concentración nanomolar) del complejo I, y también como inhibidores de NADH oxidasa encontrada en la membrana plasmática de células tumorales. Ambas acciones conllevan la privación de ATP para la célula y conduce a procesos de apoptosis [25, 26].

1.1.2.1.4.2. Actividad insecticida.

Se ha estudiado su actividad insecticida contra insectos, como el mosquito transmisor de la fiebre amarilla, las cucarachas, garrapatas, *Drosophila melanogaster*, algunas especies de arañas y para el control de plagas que afectan la producción agrícola. Existen en la bibliografía varios reportes sobre la actividad de acetogeninas en insectos de las siguientes especies: *Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae*, *S. frugiperda* y *Oncopeltus fasciatus*, entre otros ejemplos. La actividad estudiada se basa en ensayos de consumo de la sustancia activa por ingesta de una dieta estándar en el estadio larvario, con búsqueda de una alta toxicidad para bajas concentraciones del compuesto [24, 25].

1.1.2.2. ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS DE *Annonaceae*.

Los alcaloides isoquinolínicos constituyen uno de los grupos más numerosos de alcaloides (más de 15.000), son importantes por las propiedades farmacológicas que presentan algunos y por su gran potencial químico debido a la enorme variabilidad de sus estructuras. Se caracterizan estructuralmente por tener en común un esqueleto de isoquinolina (frecuentemente como tetrahydroisoquinolina) [30].

Se ha encontrado que solo en plantas de las familias *Annonaceae*, *Berberidaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Menispermaceae*, *Monimiaceae*, *Ranunculaceae* (orden Ranales), *Papaveraceae* (orden Rhodales) y *Rhamnaceae* (orden Rhamnales), se encuentran Los alcaloides aporfínicos los cuales tienen una amplia representación dentro del grupo de alcaloides de isoquinolínicos [31].

1.1.2.2.1. Origen biosintético de alcaloides isoquinolínicos.

El origen biosintético de los alcaloides isoquinolínicos comienza por ruta del ácido shikímico a partir de hidratos de carbono. Este ácido es responsable de la formación de aminoácidos aromáticos como L-fenilalanina y L-tirosina, estos son los precursores de los alcaloides isoquinolínicos [32]. Mediante una serie de hidroxilaciones y metilaciones sucesivas el aminoácido tirosina puede dar simples derivados de β -fenetilamina, o bien mediante una reacción tipo Mannich formar el anillo de tetrahydroisoquinolina, como se presenta en la figura 12. El ácido fórmico y la metionina actúan como fuentes de fragmentos de un átomo de carbono. Con estos precursores y mediante reacciones enzimáticas se lleva a cabo la formación de estos alcaloides. Los alcaloides isoquinolínicos más sencillos junto con las isoquinolinas simples son las 1-bencilisoquinolinas [30, 33].

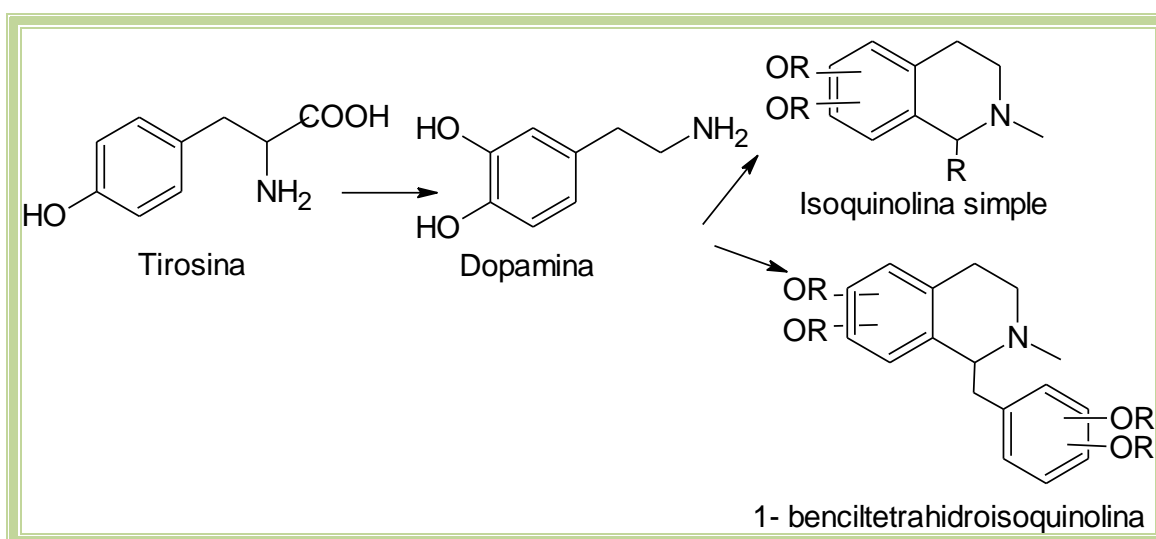


Figura 12 Bio síntesis del anillo de isoquinolina [30].

1.1.2.2.2. Tipos de alcaloides isoquinolínicos en *Annona*.

Los alcaloides isoquinolínicos de tipo benzilisoquinolínico son encontrados con gran frecuencia en la familia *Annonaceae* distribuidos en las siguientes series: isoquinolínicos simples (cularinas, isoquinolonas y benzilisoquinolínicos), aporfinas, fenatrenicos, berberinas y alcaloides de morfina, como se presenta en la figura 13 [32]; En la tabla 5 se presentan algunos alcaloides isoquinolínicos que han sido aislados de *A. reticulata*.

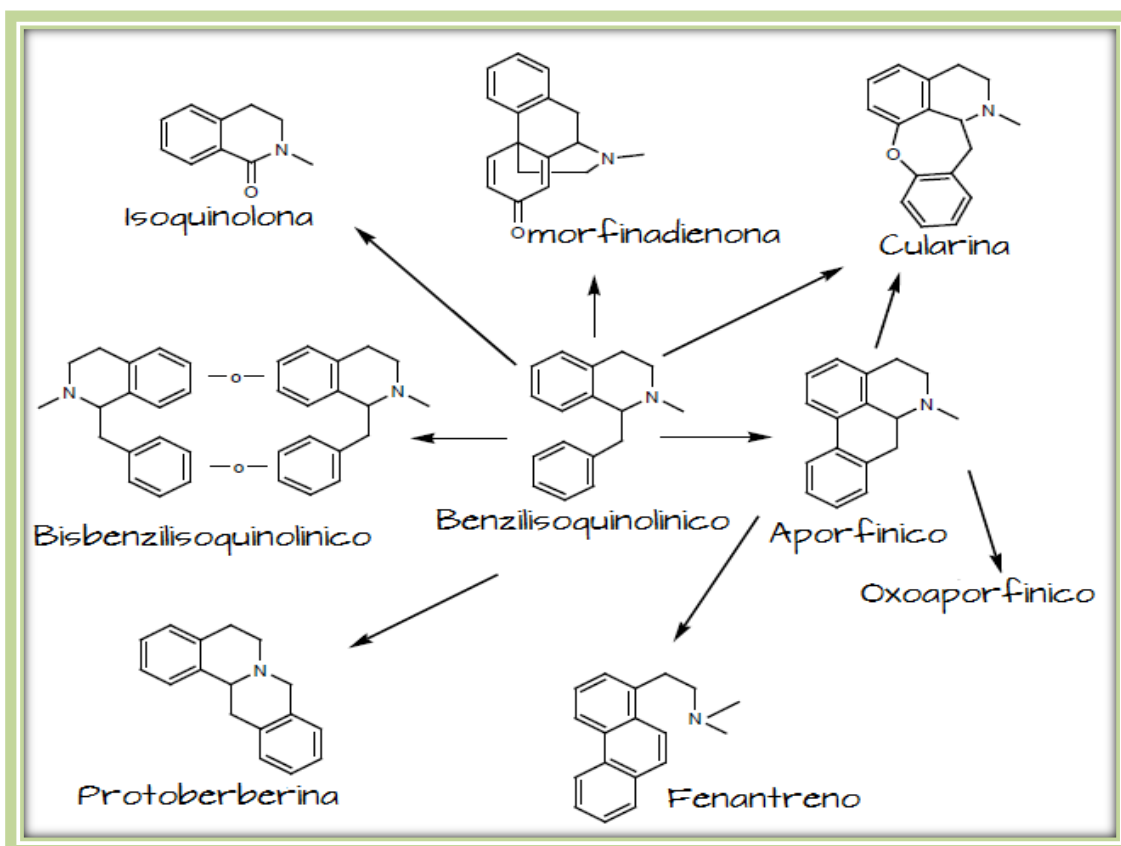
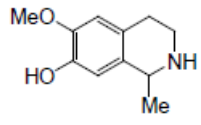
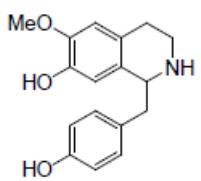
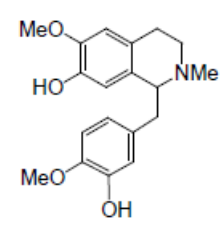
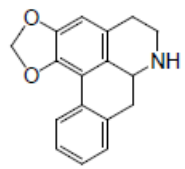
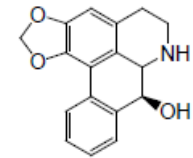
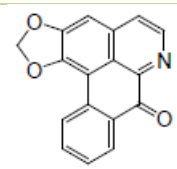


Figura 13 Origen biosintético de los alcaloides isoquinolínicos a partir del esqueleto benzilisoquinolínico [32].

Tabla 5 Algunos alcaloides aislados de *Annona reticulata*.

Clasificación	Nombre	Alcaloide	Referencia
Isoquinolinico simple	Salsolinol		[34]
Benzilisoquinolinico	Coclaurina		[34]
Benzilisoquinolinico	Reticulina		[34]
Aporfinico	Anonaina		[34]
Aporfinico	norushinsinina (michelalbina)		[34]
Oxoaporfinico	Liriodenina (cont)		[32]

1.1.2.2.3. Bioactividad de alcaloides aislados del genero *Annona*

Los alcaloides encontrados en el género *Annona* han mostrado importantes efectos tales como antiprotozoaria [35, 36] y larvicida contra *A. salina* [37]; Alcaloides de tipo tetra-hidroprotoberberina como coritencina e isocoreximina

aislados de *A. cherimolia*, presentan actividad larvicida contra cepas de células tumorales, siendo la coritencina la más activa [38]. Se ha verificado la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos y etanólicos de *A. squamosa* debido a la presencia de alcaloides de tipo benzilisoquinolínicos en dicho extracto [39].

1.2. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los bioensayos son pruebas en las que se usan organismos vivos para detectar o medir la presencia y efectos de una o más sustancias tóxicas, así como determinar el límite de tolerancia de los organismos a dichas sustancias.

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Para la evaluación de la actividad biológica se pueden tomar en cuenta los siguientes parámetros: Mortalidad, Proporción de crecimiento, biomasa, reproducción, estimulación o inhibición de sistemas metabólicos o enzimáticos, cambios de conducta, histopatológica, nutrición entre otros [40].

1.2.1. Evaluación de la actividad biológica con *Artemia salina*

El bioensayo de letalidad frente a *Artemia salina* es uno de los biomodelos más usados en las etapas preliminares de una investigación fitoquímica. El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *A. salina*, para determinar valores de concentración letal media (CL₅₀), expresada en µg/ml, la toxicidad se puede clasificar según los rangos de CL₅₀ presentados en la tabla 6. Sin embargo el CL₅₀ no advierte de una actividad fisiológica o biológica en particular; es un indicador de toxicidad a nivel celular que puede orientar investigaciones más específicas [41].

Tabla 6 Clasificación de toxicidad según CYTED [41].

I	Extremadamente tóxico	0-10	µg/ml
II	Altamente tóxico	10-100	µg/ml
III	Moderadamente tóxico	100-500	µg/ml
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	µg/ml
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	µg/ml
VI	Relativamente inocuo	<1500	µg/ml

1.2.1.1. Aspectos biológicos generales

Como se observa en la figura 14 la *Artemia salina* son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de artemia, también llamados “monos de mar” o “brine shrimp” en inglés [36].

Estas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan

de algas y bacterias. Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm, se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7mm [42].

Se han vuelto muy importantes para este tipo de investigaciones debido a que no hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente, las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario y se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica [42].

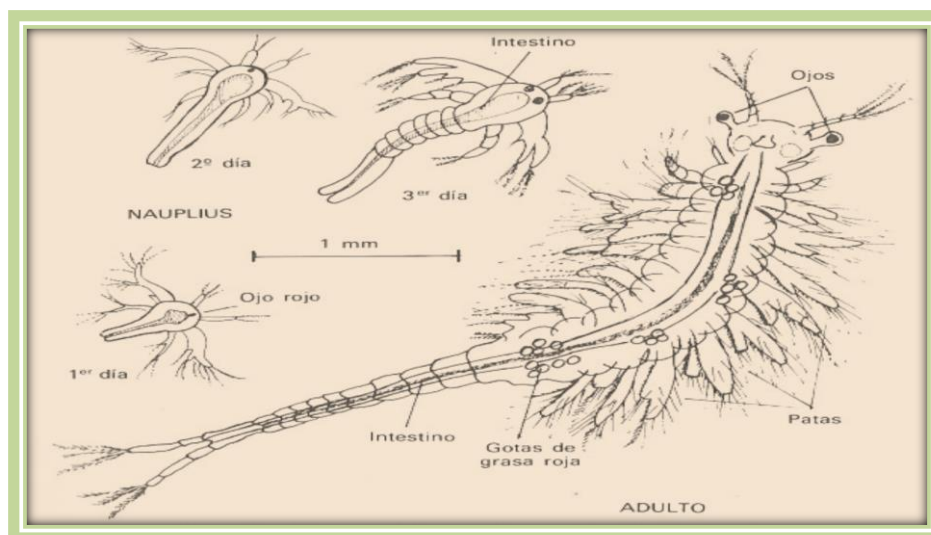


Figura 14 Metamorfosis de la *Artemia salina*. [40].

1.2.1.2. Aspectos experimentales

Según Vanhaecke y Persoone, se deben tener algunos aspectos considerados para desarrollar una prueba de *Artemia* spp. utilizar los estadios larvales tempranos para pruebas de toxicidad aguda, los huevos tienen que eclosionar bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, salinidad, aireación, luz y pH, las larvas tienen que ser exactamente de la misma edad al inicio de cada prueba, durante la prueba, la larva no debe transformarse en otro estadio con una sensibilidad diferente, las pruebas deben realizarse con quistes del mismo origen geográfico, las condiciones experimentales de la prueba tienen que ser definidas con gran exactitud y se debe realizar una prueba control en paralelo con un químico de referencia [43].

1.2.1.2.1. Bioensayo general para productos naturales con actividad biológica

Esta variante la desarrollaron en 1982 y ha sido mejorada desde entonces por diferentes investigadores. Aquí se presenta la versión publicada en 1998 por McLaughlin [44]. El ensayo permite la evaluación rápida y conveniente de extractos crudos, fracciones y compuestos puros; y además comparar varias

partes de la planta y establecer variaciones estacionales en plantas individuales. También puede ser utilizado para establecer la actividad biológica de compuestos sintéticos. Principalmente se basa en la determinación de la mortalidad *in vivo* de un organismo zoológico simple, las larvas de *Artemia* spp. En 24 horas a dosis iguales o menores de 1000 mg.mL⁻¹ [42, 44].

1.3. *Corythucha gossypii* (chinche de encaje).

1.3.1. Taxonomía

En la tabla 7 se presenta la clasificación taxonómica del insecto *Corythucha gossypii*.

Tabla 7 Clasificación de *Corythucha gossypii* [45].

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Hemíptera
Suborden	Heteróptera
Familia	Tingidae
Nombre científico	<i>Corythucha gossypii</i>
Nombre común	Chinche de encaje

1.3.2. Ciclo de vida

En la figura 15 se esquematiza el ciclo de vida del insecto, este es relativamente corto en términos de tiempo; La duración total promedio del huevo adulto es de 28,11 días; los adultos machos viven en promedio 26,75 días y las hembras 14,66 días [46].

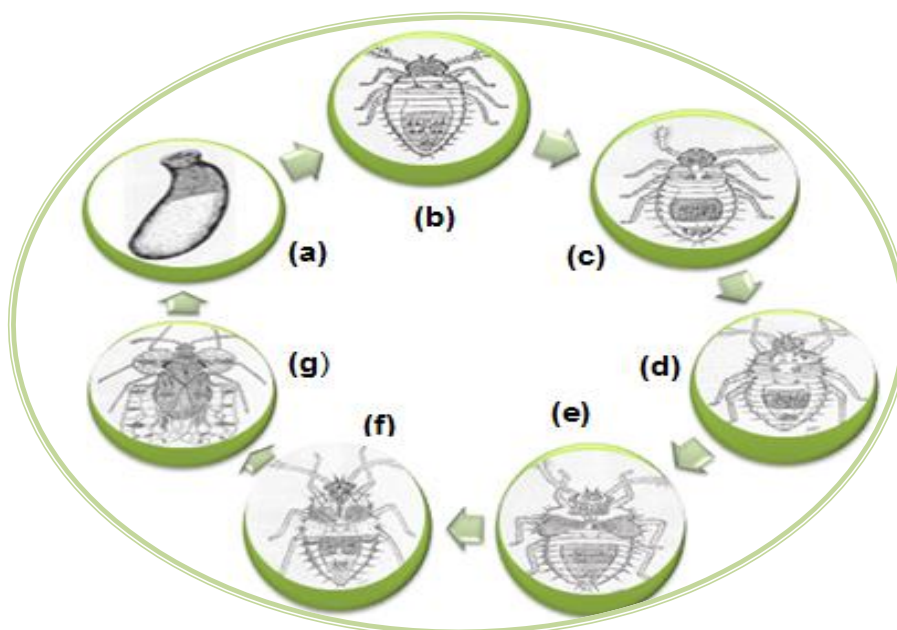


Figura 15 Ciclo de vida de *Corythucha gossypii* (a) huevo, (b) primer instar ninfal (c) segundo instar ninfal, (d) tercer instar ninfal, (e) cuarto instar ninfal, (f) quinto instar ninfal (g) adulto, dibujos hechos por Antonio J. López M. (1982) [46].

1.3.2.1. Huevos

Generalmente son depositados en grupos, en el envés de las hojas cerca de la nervadura principal o a las secundarias. Como se observa en la figura 16, los huevos están incrustados total o parcialmente en dirección oblicua en el tejido y se presentan agrupados pero independientes unos de otros, generalmente, están cubiertos por una secreción gomosa negra. El periodo de incubación tarda de 4 a 14 días, el promedio de deposición de huevos es 62,17 por cada hembra [46, 47].



Figura 16 Colonias de huevos de *Corythucha gossypii* [autores].

1.3.2.2. Ninfas

El insecto *Corythucha gossypii* pasa por cinco instares antes de llegar a la adultez; en el primer instar dura de 2 a 6 días ,en segundo y tercer instar dura de 1 a 5 días en cada uno, el cuarto instar tiene una duración de 2 a 5 días y finalmente para el quinto instar una duración de 3 a 8 días; al emerger del huevo la ninfa es color amarillo pálido, pero poco después aparece una mancha verde oscura en el centro del abdomen, correspondiente al contenido intestinal; la cabeza también cambia de color tornándose ligeramente parda. Para el primer instar las exuvias tiene una longitud promedio de $0,51 \pm 0,044$ mm y el ancho de la capsula cefálica un promedio de $0,12 \pm 0,016$ mm, y para el quinto instar El ancho de la capsula cefálica de las exuvias mide $0,22 \pm 0,017$ mm, y la longitud del cuerpo es de $1,78 \pm 0,086$ mm [46].

1.3.2.3. Adulto

Su duración varía entre 2 para las hembras y 60 días para los machos. Presenta un tamaño variable, por lo general cerca de tres mm de largo y 1,6 mm de ancho. El pronoto castaño pálido; reticulaciones blancas manchadas de pardo o fosco; areolas hialinas. Capucha moderadamente grande, ligeramente contraída detrás de la parte media, apretadamente reticulada más o menos manchada de pardo o fosco; Su longitud iguala a la mitad de su ancho; patas y antenas testáceas. Las alas un poco más largas que el abdomen, como se observa en la figura 17 [46].

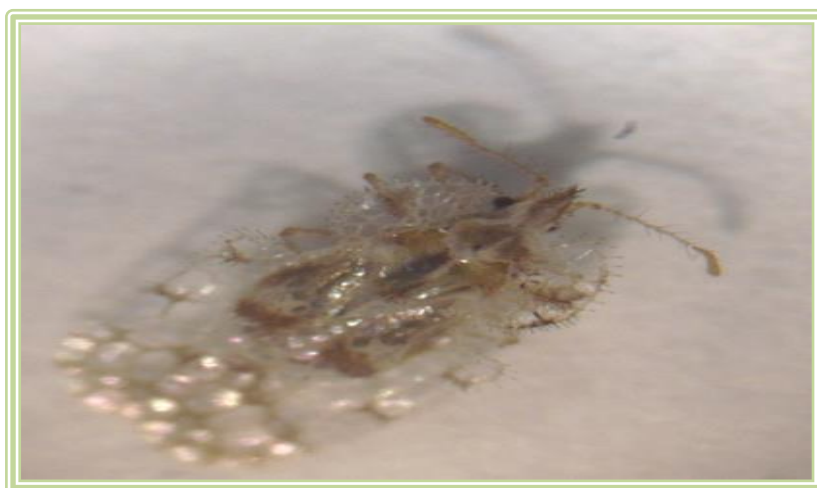


Figura 17 *Corythucha gossypii* [45].

1.3.3. Distribución- hospederos

El *Corythucha gossypii* es una de las especies más comunes y de mayor distribución su presencia se ha informado en el sur de Estados Unidos, México, América Central y El Caribe. Se considera que se encuentra en más de 30

hospederos, entre ellos *Musa paradisiaca* L.(platano), *Ricinus communis* L.(higuerilla), *Citrus* s.p. (cítricos), *Carica papaya* L. (papaya), *Canavalia ensimorfis* (frijol blanco), *Annona cherimolia* Mill (chirimoya), *Annona squamosa* L. (anon), *Annona muricata* L. (guanabana) entre otros [46-48].

1.3.4. Daños

Son insectos chupadores, tanto las ninfas como los adultos chupan los jugos celulares de las plantas vivas generalmente sobre el envés de las hojas, a menudo cerca de una vena principal. Debido a la succión de savia se produce senescencia prematura, se observa primero un punteado blanco cremoso, seguido por áreas de amarillamiento o bronceado en el haz de las hojas, como se puede observar en la figura 18; en grandes poblaciones retardan el crecimiento, especialmente durante condiciones secas. *C. gossypii* es una plaga importante en guanábana durante la época seca [46, 49].



Figura 18 Daño foliar causado por *Corythucha gossypii* [autores].

1.3.5. Control en cultivos de *Annona muricata*.

Para el control se deben de tener en cuenta las recomendaciones generales de manejo de insectos chupadores, se deben realizar inspecciones periódicas para la detección oportuna de la plaga, asociar el daño con el estado fenológico del cultivo, marcar y asperjar los árboles o focos con altas poblaciones de la plaga. La aspersión debe ser dirigida hacia el envés de las hojas usando adherentes o coadyuvantes pues la lámina foliar del guanábano es lisa. Entre los insecticidas más usados se conoce Diazinon (Basudin), Dimetoato (Roxion), Malation (Malathion 57%), Dicrotofos (Bidrin) entre otros, en dosis que varían entre 2 y 3: 1000. También hay que tener en cuenta que el guanábano es semicaduco y que por tal razón no se justifican aspersiones cuando ya el follaje se va a desprender [48].

1.4. FUNDAMENTOS EN TECNICAS DE ANALISIS

1.4.1. Cromatografía

La cromatografía es un potente método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. La técnica fue inventada y denominada así por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX. La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas; muchas de dichas separaciones son imposibles por otros medios [50, 51].

En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve con una fase móvil, cualidad que permite hacer una clasificación de los métodos cromatográficos, como se presenta en la tabla 8, puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico; la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil, en cambio, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar de forma cualitativa y cuantitativa [50, 51].

La cromatografía líquida tiene una característica particular: solo esta puede llevarse a cabo en columnas o sobre superficies planas; por otra parte, tanto la cromatografía de gases como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna de tal manera que las paredes de la columna contienen la fase móvil [50].

Tabla 8 Clasificación de los métodos cromatográficos en columna [50].

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de gases (CG)	Cromatografía gas-liquido (CGL)	Líquido adsorbido unido a una superficie sólida.	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas – sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de líquidos (CL)	Líquido- líquido, o reparto	Líquido adsorbido o unido a una especie sólida	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución exclusión
	Afinidad	Grupo de líquidos específicos unido a una superficie sólida	Distribución entre el líquido de la superficie y el líquido móvil
Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS: fase móvil fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada.

1.4.1.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se encuentra entre los métodos de cromatografía en plano; la fase estacionaria es una capa de partículas de unos milímetros de espesor, fijadas sobre un soporte sólido de aluminio, plástico o vidrio. La fase móvil se desplaza por la fase estacionaria por acción capilar, a veces ayudada por la gravedad o por la aplicación de un potencial eléctrico [50, 51].

Para los análisis cualitativos la mancha de una placa de CCD se caracteriza por la distancia que recorre con relación a la distancia recorrida por la fase

móvil. El parámetro usado para caracterizar esta relación se le llama factor de retención o índice de retención (R_F).

$$R_F = \frac{\text{Distancia desde el punto de aplicación hasta la mancha}}{\text{Distancia desde el punto de aplicación al frente del disolvente}}$$

El valor R_F depende de la composición de la fase móvil, tipo de fase estacionaria, temperatura y el tipo de compuestos separados [50].

1.4.1.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

La cromatografía como técnica analítica de separación es ampliamente utilizada, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles pero sobre todo su amplia aplicabilidad a sustancias importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general [50].

Actualmente, la técnica puede clasificarse en fase normal (FN) y fase reversa (FR), de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz [52].

1.4.1.2.1. Cromatografía líquida en fase normal

En la cromatografía líquida en fase normal, la fase sólida es más polar que la fase móvil. Las fases estacionarias son normalmente polímeros inorgánicos con un gran número de poros de tamaño molecular, de manera que su área superficial es muy grande. Los dos materiales más comunes son óxidos de silicio hidratados (sílice o gel de sílice) y polímeros de óxido de aluminio hidratados (alúmina).

En la cromatografía en fase normal la polaridad del disolvente es el principal factor que determina los volúmenes de elución. Con disolventes más polares los solutos se mueven más rápidamente y eluyen antes; debido a que los disolventes más polares compiten mejor por el soluto que los menos polares, en este tipo de cromatografía el componente menos polar se eluye primero; al aumentar la polaridad de la fase móvil ocasiona una disminución en el tiempo de elución, lo cual se presenta en la figura 19 [50, 51].

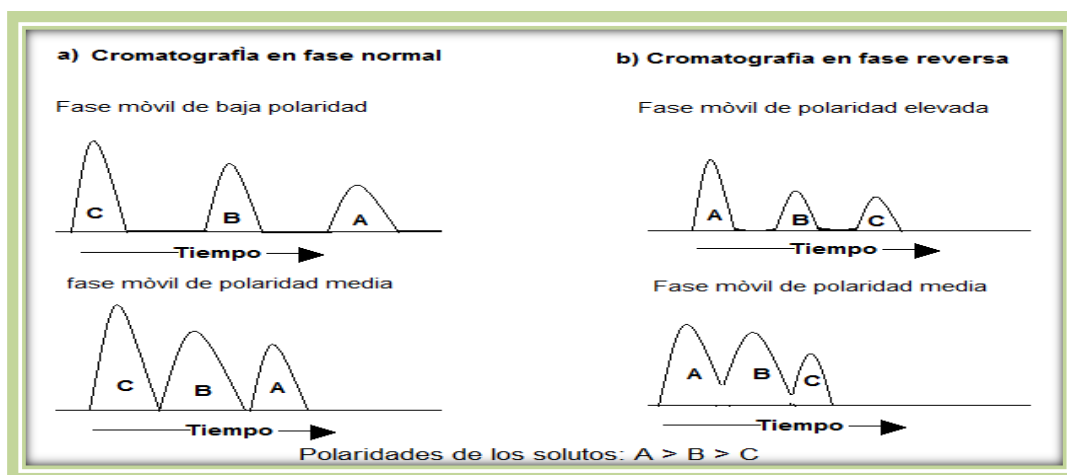


Figura 19 Relación entre polaridad y los tiempos de elución en cromatografía en fase normal y en fase reversa [50].

1.4.1.2.2. Cromatografía líquida en fase reversa

En esta, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases estacionarias, estando formada las más común por grupos no polares unidos a la sílice; siendo los más utilizados los grupos orgánicos $-CH_3$, $-C_8H_{17}$, y $-C_{18}H_{37}$. De ellos la cadena de 18 carbonos es la más común para denominar este tipo de fase estacionaria se usan abreviaturas ODS y C18; y la fase móvil es un solvente relativamente polar como agua, metanol, acetonitrilo, entre otros. En la cromatografía en fase inversa los componentes más polares aparecen primero y un aumento de polaridad en la fase móvil incrementa el tiempo de elución, como se ilustra en la figura 19 [50, 51]. En la tabla 9 se puede apreciar una comparación entre la fase normal y la fase reversa.

Tabla 9 Comparación de algunos parámetros entre fase normal y fase reversa [52].

	FASE NORMAL	FASE REVERSA
Polaridad del relleno	ALTA	BAJA
Polaridad del solvente	BAJA	ALTA
Orden de elución	Primero el menos polar	Primero el más polar
Efecto del incremento de la polaridad del solvente	Reduce los tiempos de retención	Aumenta los tiempos de retención

1.4.2. Métodos de análisis para resultados de toxicidad

El método a usar para determinar los valores de CL_{50} en pruebas de toxicidad aguda depende de la forma de la distribución de tolerancias, es decir el porcentaje de organismos de una población dada que se verá afectada a una

cierta dosis. Generalmente los métodos más usados suelen ser el método Probit (paramétrico), método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico), método de Sperman-Karber (no paramétrico) y el método gráfico [53].

1.4.2.1. Metodo Probit

El Probit se basa en la cuantificación probabilística de la vulnerabilidad ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. Dicho método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables a los fenómenos físicos peligrosos. El método de análisis Probit permite estimar la CL_{50} ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit. Una de las restricciones del método es que para el cálculo de la

CL_{50} deben obtenerse valores intermedios entre 0 y 100% de mortalidad.

Al realizar las pruebas de toxicidad aguda, se obtienen las siguientes variables para el cálculo de la CL_{50} :

- Concentración de la sustancia o dosis (d).
- Número de individuos (n).
- Número de organismos muertos o afectados (r).
- Porcentaje de efecto (p).

La representación gráfica de p vs. d relación dosis-respuesta, genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal. Existen procedimientos matemáticos para abordar este problema; pero para facilitar los cálculos, simplemente se puede usar un software como: SAS, SPSS, BACKTRAN, INFOSTAD, BMDS, ACE (suministrado por la EPA para análisis de toxicidad), entre otros; El procedimiento Probit permite encontrar estimadores m-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos, analizando porcentajes de efecto vs dosis dentro del marco de la regresión.

Para darle validez a los resultados se debe tener en cuenta algunos aspectos como:

- La mortalidad en el control negativo no debe exceder el 10%.
- La concentración final de oxígeno disuelto debe ser mayor de 2 mg/L
- La CL_{50} para el tóxico de referencia deberá estar dentro de los límites de confianza preestablecidos en la carta control [53].

2. MARCO DE REFERENCIA

La *Annona reticulata* contiene gran cantidad de sustancias en los frutos inmaduros, hojas, raíces y semillas que son muy efectivas en el control de plagas, funcionan como veneno de contacto e ingestión [8, 54]. Es conocida su alta efectividad principalmente en extractos acuosos y alcohólicos, y se sabe que posee compuestos que la hacen más tóxica comparada con otras especies del mismo género [55]. Según la revisión bibliográfica realizada, no se encontraron estudios que analizaran algún tipo de actividad de la familia *Annonaceae* frente al insecto *Corythucha gossypii* (chinche de encaje), sin embargo una recopilación muestra que la *Annona reticulata* es activa sobre variedad de insectos, se presenta un resumen de algunas de las actividades de la especie en la tabla 11.

La familia *Annonaceae* reporta gran variedad de estudios mostrando una fuerte actividad insecticida, principalmente por sus metabolitos secundarios, acetogeninas y alcaloides, siendo estos primeros los de mayor importancia [56]; Actualmente debido a la abundancia de la *Annona muricata* esta es reportada en gran variedad de estudios mostrando fuerte actividad, con extractos apolares frente a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) [57], extractos polares frente a *Aedes aegypti* y *Anopheles Albimanus* (Diptera: Culicidae) [12, 58], extractos polares de *Annona muricata* y *Annona cherimolia mill* frente a larvas del IV estadio de *Anopheles sp.* [59] y una evaluación de la toxicidad de acetogeninas *Annonaceas* sobre ninfas de *Periplaneta americana L.* (Dictyoptera: Blattidae) realizada en la universidad del valle (Cali- Colombia) dando buenos resultados para ser usado en el control de insectos [60].

Otras plantas relevantes reportada en gran variedad de trabajos que han demostrado fuerte actividad biológica y que son buenos candidatos para ser usados en control biológico de plagas son la *Annona cherimolia* y *Annona squamosa*, esta última fue comparada en un estudio realizado en la Universidad de Caldas (Manizales- Colombia) junto con otras 4 plantas con propiedades insecticidas frente a *Cosmopolites sordidus* (Coleóptera: Dryophthoridae) y en la cual esta *Annona* fue la más letal, dando 100% de mortalidad con todas las concentraciones analizadas [61]. Un Estudio realizado con extractos crudos metanólicos de semillas de *Annona squamosa* y *Atemoya* frente a *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), mostraron inhibición del crecimiento, efecto tóxico y actividad disuasoria de la alimentación en estos insectos [62].

Tabla 10 Resumen de actividades reportadas para la *Annona reticulata* frente a diferentes insectos.

Insecto	Resumen del ensayo	Autor-año	Referencia
<i>Lecanium spp.</i> (chinche)	Los extractos acuosos de las semillas de <i>A. reticulata</i> provocan alta mortalidad en este insecto en el oeste de África.	Jacobson (1975).	[55]
Insectos escama	El extracto alcohólico de semillas de <i>A. reticulata</i> al 0.125% en agua provoca del 70 al 80% de mortalidad. Además extractos alcohólicos de hoja, corteza de tallo y raíz al 10% en agua ocasionan 70, 100 y 60% de mortalidad.	Tattersfield y Potter (1940).	[55]
Áfido M. Sanborni	En la evaluación de la actividad toxica de diversas annonáceas sobre este insecto, los autores indican que las estructuras vegetales de <i>A. reticulata</i> son más toxicas que otras especies del mismo género.	Tattersfield y Potter (1940).	[55]
<i>humanus capitis</i> (Piojo P.) y	El autor afirma que extractos acuosos de semillas de <i>A. reticulata</i> fueron usados en Filipinas para controlar dicho insecto, además indica que en india se usa para controlar insectos en animales domésticos.	Jacobson (1975).	[55]
<i>Achaea janata</i> <i>Callosobruchus</i> <i>chinensis</i> <i>Epacromia tamulus</i> <i>Eupoctris fraterna</i> <i>Hypsa ficus, M.</i> <i>samborn</i> <i>P. humanus capitis</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Spodoptera litura</i> <i>Idiocerus spp.</i>	El autor afirma que el fruto posee propiedades insecticidas frente a nematodos y ortópteros en general, además de insectos en el cultivo del arroz.	Grainge et al. (1986).	[55]
Larvas lepidópteros de Áfidos Esperanzas Trips Saltamontes Escamas	Extractos de <i>A. muricata</i> y <i>A. reticulata</i> funcionan como veneno de contacto e ingestión pero el proceso es lento Aproximadamente 2 hasta 3 días después de la aplicación aparecen los primeros efectos.	Andrea., B. (2004).	[54]
<i>Tetranychus tumidus</i> Banks	Una serie de experimentos realizados en la Universidad Agraria de la Habana con extractos acuosos de <i>A. squamosa</i> , <i>A. muricata</i> y <i>A. reticulata</i> muestra una letalidad total a las 24 horas de la aplicación dando mejores resultados los extractos de <i>A. cherimolia</i> y <i>A. reticulata</i> debido posiblemente a una inhibición del ciclo biológico del insecto inhibiéndole el apetito.	Castillo N., Gómez J., Gonzales C. (2013).	[63]

Una Evaluación de actividad insecticida y repelente de extractos etanólicos y hexanoicos obtenidos a partir de semilla de *Annona diversifolia* sobre *Zabrotes subfasciatus* (Gorgojo común del frijol) muestran que a pesar que ambos tipos de extracción dan resultados a nivel de mortalidad, el etanólico tiene mayor actividad sobre el insecto y mejor efecto disuasorio, presentando además una mejor extracción del principio activo [64]. También ensayos de letalidad sobre larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus* usando extractos de semillas de *Annona muricata* [65], *Annona cherimolia* Mill [66] y *Annona squamosa* [67] en la universidad tecnológica de Pereira comprueban que estos frutos tienen fuerte actividad biológica a bajas concentraciones.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Corythucha gossypii es un insecto chupador el cual se alimenta de la savia por el envés de las hojas, afectando el follaje de los cultivos en los que se encuentra, dando como resultado la senescencia prematura de las hojas y en el peor de los casos llevando a una defoliación total, lo cual altera el desarrollo normal de la planta y produce pérdidas económicas a los agricultores; quienes se ven obligados al uso de insecticidas sintéticos para su control aun sabiendo, que el uso de estos insecticidas sintéticos desmesuradamente, ha dejado como consecuencia impactos negativos al medio ambiente; y teniendo en cuenta la gran variabilidad de actividad biológica reportada de *Annona reticulata* entre ellas: actividad insecticida, repelente y anti alimentaria se plantea, que puede presentar actividad insecticida el extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* frente al insecto *Corythucha gossypii*.

4. JUSTIFICACIÓN

Durante muchos años la sociedad agrícola utiliza insecticidas sintéticos para el control de plagas, debido a que estas constituyen una limitante severa en la producción; el uso de estos insecticidas sintéticos desmesuradamente ha dejado como consecuencia impactos negativos al medio ambiente [68]. Consecuente a esto, la agricultura moderna en los últimos años, se ha dedicado a investigar y encontrar nuevas estrategias que permitan el desarrollo de una agricultura no contaminante, basada en recursos naturales renovables [61]. Considerando los posibles usos de especies vegetales como alternativas naturales al uso de plaguicidas sintéticos, lo cual presenta grandes beneficios para el medio ambiente, algunas de estas ventajas se presentan en la tabla 11 [65, 69-71].

Tabla 11 Algunas ventajas del uso de alternativas naturales para el control de insectos en la agricultura y desventajas del uso de plaguicidas sintéticos.

		Referencia
Ventajas del uso de una alternativa natural para el control de insectos en la agricultura.	<ul style="list-style-type: none"> • Al estar basados en recursos renovables localmente disponibles, es una alternativa más económica • Son sustancias biodegradables que persisten por lo general poco tiempo en el ambiente, reduciendo la contaminación y la presencia de residuos en los alimentos • Los extractos vegetales están constituidos por un conjunto de principios activos, químicamente distintos entre sí, cuyas proporciones son variables. Esto hace que la presión de selección sobre los organismos a controlar no sea siempre la misma, disminuyendo así, las probabilidades de desarrollar resistencia 	[72]
Desventajas del uso de los plaguicidas sintéticos.	<ul style="list-style-type: none"> • Debido al uso inadecuado que se les da provocan un gran deterioro ambiental. • Han causado grandes perjuicios a la salud humana, la Organización Mundial de Salud ha calculado que alrededor de 20.000 personas mueren anual mente como consecuencia de la exposición a insecticidas, entre el 2000 y 2002, Colombia se reportaron 4735 casos de intoxicaciones con sustancias químicas, dentro de las cuales la mayoría fueron por plaguicidas. 	[68, 73, 74]

Según investigaciones, más de 2.000 especies en el mundo tienen propiedades plaguicidas [61]. Numerosas especies de plantas superiores producen metabolitos secundarios a los cuales se les atribuyen acciones de defensa y alelopáticas contra microorganismos y fitófagos. Actúan principalmente como

toxinas a través de los ciclos de vida de las especies de insectos, inhibidores de la alimentación, o inducir perturbaciones sutiles en el crecimiento, desarrollo, reproducción, diapausa y comportamiento o pueden actuar a nivel de los receptores olfatorios siendo responsables de atracción o repelencia [12, 61].

Una de las familias de plantas más promisorias para la obtención de bioinsecticidas es la *Annonaceae*, esta familia se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química; Se han caracterizado y reportado alcaloides, terpenos, flavonoides y acetogeninas. Este tipo de metabolitos de plantas anonáceas están asociados a actividades biológicas tales como: antioxidante [14, 27], antimicrobiana, larvicida, insecticidas [67], antitumoral [15], antibacteriana, repelente, antialimentaria, anti diabética [16], antimalarial, leishmanicida [13], propiedades antihelmínticas, entre otras [31, 67, 75, 76].

En los últimos 15 años se han incrementado los estudios fitoquímicos y farmacológicos respecto a esta familia, esto en gran parte se debe al descubrimiento de las acetogeninas de *Annonaceae*, las cuales son una serie de productos naturales aislados a partir exclusivamente de la familia *Annonaceae* [11]; estos han presentado un gran potencial insecticida [21, 77]. Los alcaloides isoquinolínicos son otros compuestos presentes en esta familia [31] que también han sido de gran interés por su actividad biológica [34-38].

Una de las especies de la familia *Annonaceae* a la que se le ha reportado presencia de acetogeninas y alcaloides isoquinolínicos es la *Annona reticulata* [19, 21, 22, 33], esta especie ha reportado una gran variabilidad de actividad biológica entre ellas: actividad insecticida, repelente y anti alimentaria, las cuales se han atribuido a la presencia de los compuestos anteriormente mencionados [55, 58, 63, 78, 79].

Tomando en cuenta la bioactividad reportada por la especie *Annona reticulata* se plantea evaluar la actividad biológica del extracto etanolito de semillas de *Annona reticulata* frente a *Corythucha gossypii*, la ejecución del proyecto podría contribuir: en la ampliación de información acerca de una especie que se encuentra en Colombia [48, 80] y por otra sobre una alternativa natural para control del insecto *Corythucha gossypii*, el cual se encuentra reportado actualmente como plaga en más de 30 hospederos, muchos de ellos cultivados en Colombia (cítricos, algodón, papaya, tomate, guanábana, mango, maracuyá entre otros) [48, 73, 81, 82].

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* (Annoanaceae), frente al insecto *Corythucha gossypii* (Tingidae).

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener el extracto etanólico de las semillas de la *Annona reticulata*, y a partir de este una fracción de alcaloides y de acetogeninas.
- Implementar una metodología para evaluar la actividad insecticida *in vitro* del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata*, frente a *Corythucha gossypii* (chinche de encaje).
- Evaluar la actividad larvicida del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata*, y sus fracciones, frente a *Artemia salina*.
- Establecer la degradación del extracto etanólico de *Annona reticulata* frente al estudio de la actividad larvicida con *Artemia salina*.
- Analizar la presencia de acetogeninas y alcaloides isoquinolínicos el extracto etanólico mediante técnicas cromatografías.

6. METODOLOGIA

6.1. OBTENCION DE EL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS SEMILLAS DE *Annona reticulata*.

6.1.1. Obtención de las semillas

Se obtuvieron los frutos de *Annona reticulata* procedentes del barrio centenario ubicado en la zona urbana del municipio de Zarzal, Valle del Cauca, en la figura 20 se presenta la ubicación y coordenadas exactas del punto de recolección de los frutos, las condiciones de fertilidad del suelo en el que se desarrollaba la especie se encuentran adjuntas en la tabla A del anexo 1, este reporte de fertilidad fue generado por Multilab Agroanalítica; La clasificación del fruto fue realizada por Francisco Javier Roldan Palacio, curador del Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA). Los frutos maduros fueron despulpados y las semillas fueron transportadas al laboratorio del Grupo de Investigación de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira.

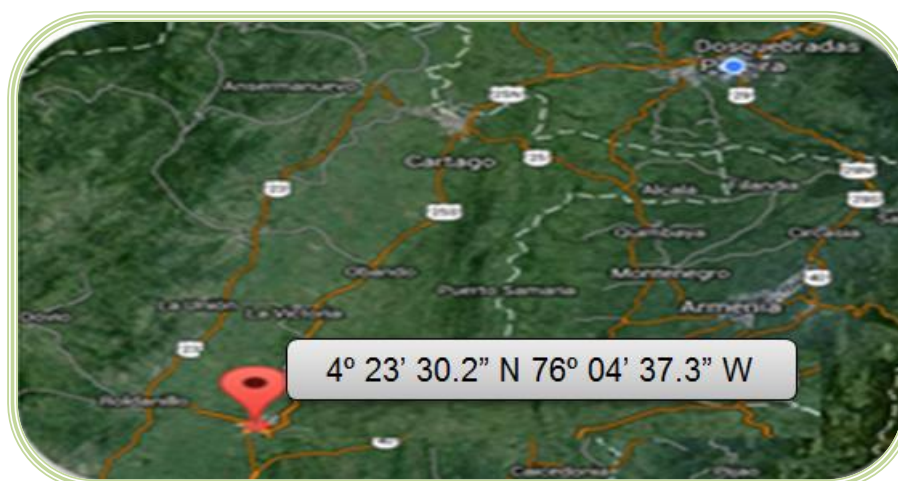


Figura 20 Ubicación y coordenadas exactas del punto de recolección del fruto.

6.1.2. Tratamiento de las semillas previo a la extracción

Las semillas fueron lavadas con Jabón TEGO y secadas en estufa a 37°C durante 72 horas. Las semillas secas fueron molidas en un molino eléctrico de cuchillas, para finalmente obtener un polvo, este se dividió en dos porciones, una parte se conservó en el congelador a la temperatura de -20°C y la otra fue B desengrasada siguiendo el procedimiento ya descrito por otros autores, empleando hexano como solvente en una relación muestra-solvente 1:4 por medio de la técnica de soxhlet durante 24 horas, como se presenta en las figuras 21 y 22 [65-67, 83].

6.1.3. Extracción por maceración de semillas de *Annona reticulata*

La extracción se realizó al material vegetal desengrasado mediante el método de maceración utilizando como solvente etanol absoluto en una relación 1:4 (muestra-solvente), a temperatura ambiente con agitación regular durante una semana; una vez finalizada la semana se procedió a filtrar la solución mediante filtración al vacío. Posteriormente se rota-evaporo el extracto y se secó la muestra con corriente de nitrógeno durante 3 horas finalmente, el extracto obtenido (F001) se refrigeró a 4°C para posteriores análisis, en las figuras 21 y 22 se presenta el procedimiento mediante un esquema e imágenes [59, 65, 66, 84].

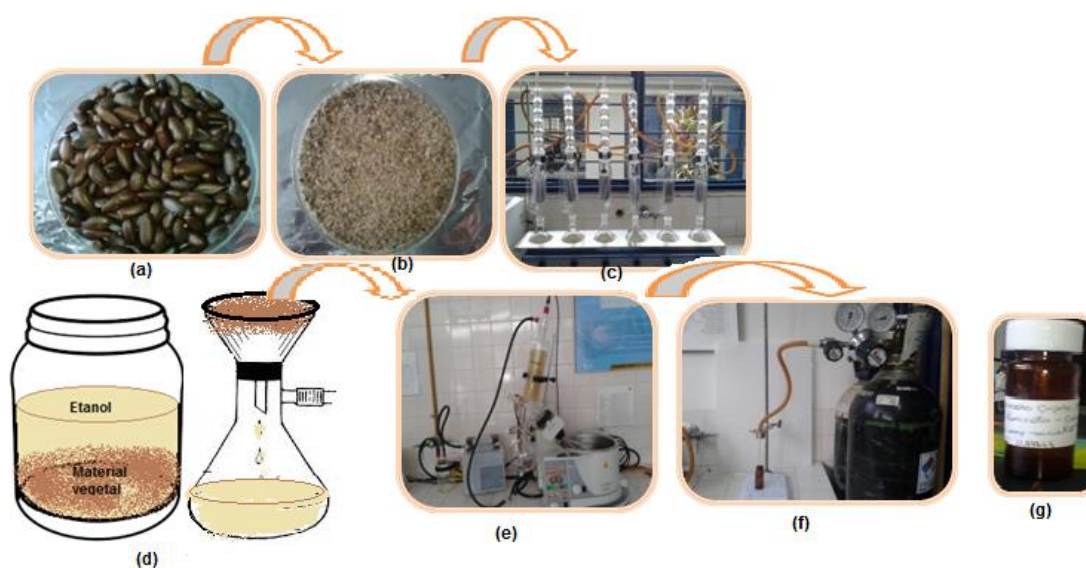


Figura 21 Imágenes del proceso previo a la extracción de metabolitos secundarios **(a)** semillas lavadas y secas de *Annona reticulata*, **(b)** semillas trituradas, **(c)** desengrase, **(d)** extracción por maceración y filtración al vacío, **(e)** rota evaporación del extracto, **(f)** secado con nitrógeno, **(g)** almacenamiento del extracto crudo [autores].

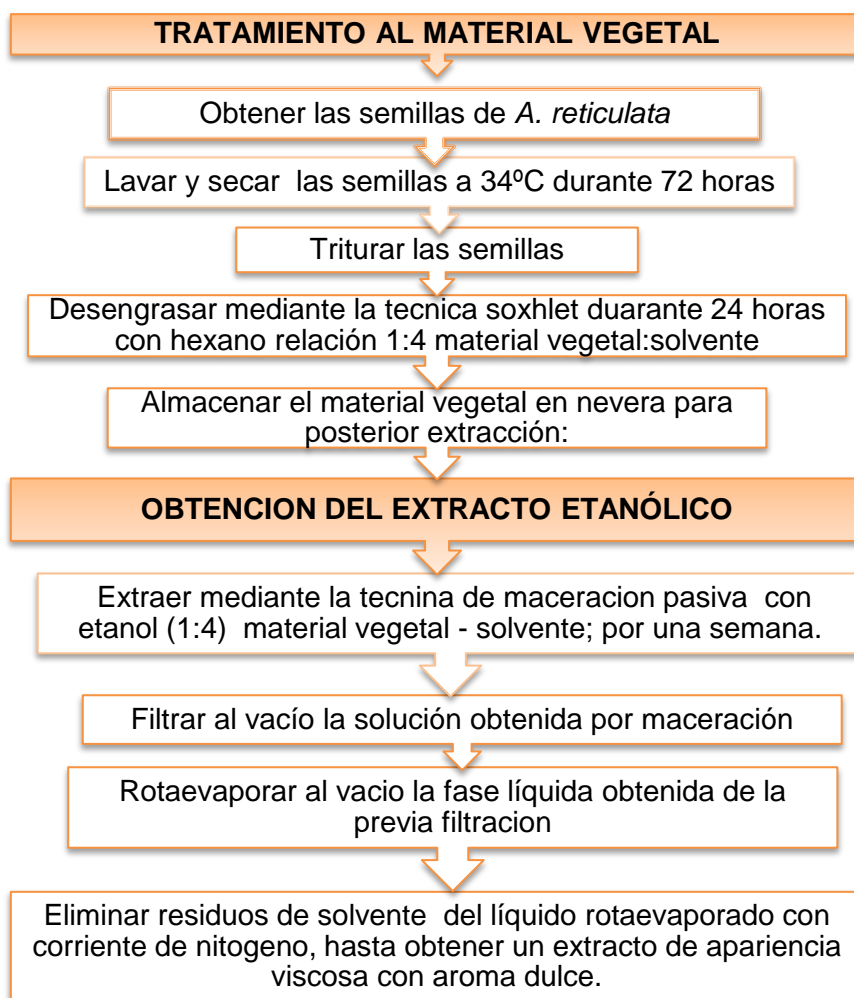


Figura 22 Proceso del tratamiento de la semilla y obtención del extracto crudo [autores]

6.2. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Annona reticulata*

6.2.1. Obtención de la fracción metanólica

El extracto F001 se fracciona mediante una extracción sucesiva líquido-líquido utilizando la metodología descrita por McLaughlin, esta se muestra en la figura 23 [85]. La fracción F005 fue tenida en cuenta a lo largo del estudio.

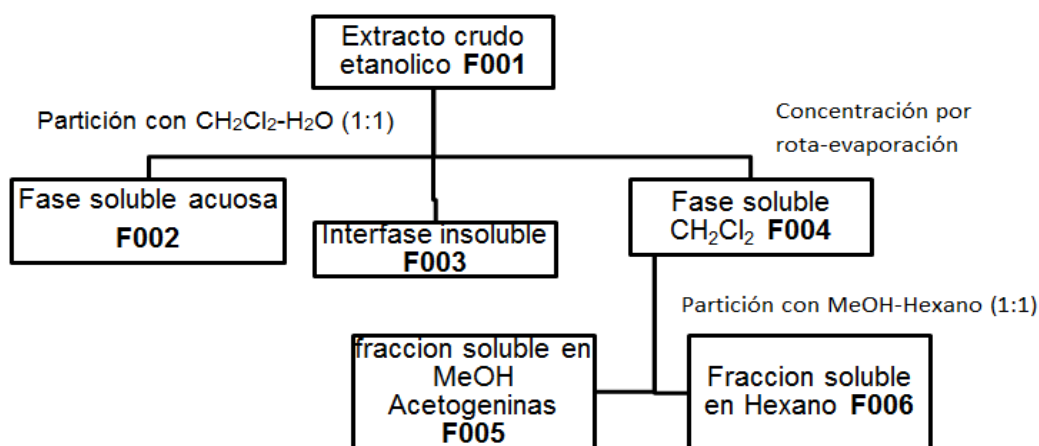


Figura 23 Esquema para el fraccionamiento del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* [85].

6.2.2. Obtención de la fracción de alcaloides

Este fraccionamiento se realizó a partir del extracto etanólico (F001); El extracto F001 se diluyó en una solución de agua-etanol en proporción 1:1, en proporción 1:9 muestra- solución, posteriormente se le adicionó 10 mL de HCl al 5% a temperatura ambiente. La solución obtenida fue basificada con NH_4OH al 10% hasta pH 8, y se fracciono con CH_2Cl_2 en una relación 1:1 por triplicado. Finalmente el solvente fue eliminado por rota evaporación, obteniéndose un residuo viscoso de coloración café, lo que equivale a la fracción de alcaloides (F007) [86-89].

6.3. ANALISIS QUIMICO DEL EXTRACTO Y LAS FRACCIONES DE SEMILLAS DE *Annona reticulata*

6.3.1. Caracterización de acetogeninas

6.3.1.1. Evaluación preliminar del extracto etanólico y la fracción F005 por cromatografía de capa delgada (CCD)

Se llevó a cabo el análisis cromatográfico por CCD del extracto etanólico (F001) y la fracción F005, utilizando cromatoplasmas de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) y como fase móvil CHCl_3 :MeOH en proporciones 9:1 y como reveladores: ácido fosfomolibdico al 5% en metanol y el reactivo de kedde para determinar la posible presencia de de acetogeninas con anillo γ -lactónico α , β -insaturado [21, 65, 66].

6.3.1.2. Análisis del extracto etanólico y la fracción F005 de *Annona reticulata* por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

6.3.1.2.1. Condiciones del análisis por CLAE.

Se analizó el extracto F001 y la fracción F005 por cromatografía líquida de alta eficiencia, en un equipo Jasco HPLC 2000 Plus, las especificaciones de este equipo se dan a conocer en la tabla 12, la metodología en fase reversa utilizada para el análisis se presenta descrita en tabla 13 [67].

Tabla 12 Características del equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) [autores].

Bomba	Jasco PU-2089 Plus
Detector	Arreglo de Diodos Jasco MD-2015 Plus
Automuestreador	Jasco AS-2059 Plus
Horno para Columna	Jasco CO-2065 Plus
Interfase	LC-Net II/ADC
Software	EZChrom Elite

Tabla 13 Condiciones bajo las cuales se analizó el extracto etanólico y la fracción F005 por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en fase reversa [autores].

Columna	Restek Pinnacle DB C18, 140 Å, 3 µm, 100 mm x 3,2 mm
Flujo	0,4mL/min
Temperatura	30 °C
Volumen de inyección	20 µL
Fase móvil	Acetonitrilo (A) 90% - Agua (B) 10%
Método	Isocrático
Detector	Arreglo de diodos
Tiempo de corrida	10 min

6.3.1.2.2. Análisis cualitativo de Acetogeninas en el extracto F001 y la fracción F005

El reconocimiento de las acetogeninas, se realizó según su espectro ultravioleta obtenido por CLAE para cada uno de los picos con el detector de arreglo de diodos (DAD), teniendo en cuenta los máximos de absorbancia característicos de acetogeninas de acuerdo a una revisión bibliográfica y por comparación de estos con los obtenidos en presente estudio.

6.3.2. Caracterización de alcaloides

6.3.2.1. Análisis preliminar de la fracción (F007) por cromatografía de capa delgada (CCD)

Mediante cromatografía de capa delgada (CCD) utilizando como fase estacionaria placas de silica, como fase móvil cloroformo: metanol en proporción (9:1) y como revelador el reactivo *Dragendorff*, para determinar la posible presencia de alcaloides en la fracción analizada [90-92]

6.3.2.2. Análisis de la fracción F007 por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

6.3.2.2.1. Condiciones del análisis por CLAE

Se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia con una columna C18 en fase reversa, empleando un detector de arreglo de diodos con el equipo Jasco HPLC 2000 Plus, ver especificaciones del equipo en la tabla 12; el análisis se hizo bajo las condiciones reportadas por otros autores las cuales se muestran en la tabla 14 [92-95].

6.3.2.2.2. Análisis cualitativo de alcaloides en la fracción F007

El reconocimiento de los alcaloides isoquinolínicos se realizó por comparación con el espectro ultravioleta obtenido por CLAE para cada pico mediante el detector de arreglo de diodos (DAD), teniendo en cuenta los máximos de absorbancia característicos de alcaloides de tipo isoquinolínico de acuerdo a una revisión bibliográfica y por comparación de estos con los obtenidos en presente estudio.

Tabla 14 Condiciones para análisis cualitativo de alcaloides por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en fase reversa [autores].

Columna	Symmetry C18, 100Å, 5 µm, 4,6 x 250 mm		
Flujo	0,7 mL/min		
Temperatura	30 °C		
Volumen de inyección	20 µL		
Fase móvil	KH ₂ PO ₄ 0,02M, pH 5,2 (A) - Acetonitrilo (B)		
Gradiente	Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
	0	80	20
	15	80	20
	20	50	50
	40	50	50
	50	30	70
Detector	Arreglo de diodos		
Tiempo de corrida	50 min		

6.4. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

6.4.1. Ensayo Larvicida frente a *Artemia salina*.

A partir del extracto etanólico (F001), la fracción metanólica (F005) y la fracción de alcaloides (F007) se prepararon soluciones a distintas concentraciones, la actividad larvicida de cada una de estas fue evaluada mediante un ensayo de toxicidad con *Artemia salina*, siguiendo la metodología de McLaughlin [44]. Para este ensayo, se requirió la incubación y eclosión de huevos de *Artemia salina* en el laboratorio, esta metodología se representa en las figuras 24 y 25.

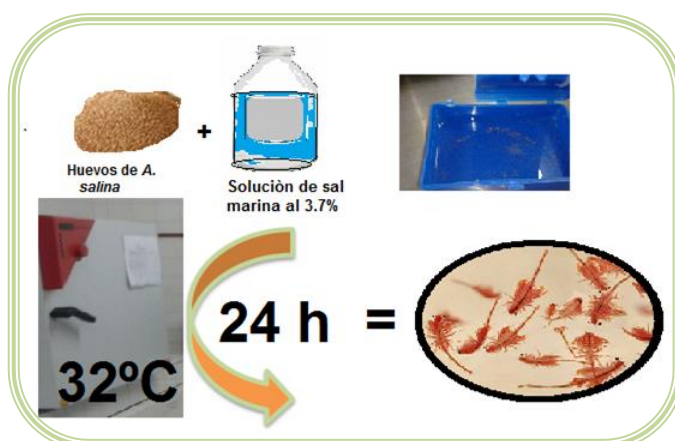


Figura 24 Proceso para la obtención de nauplios de *Artemia salina* en el laboratorio [autores].

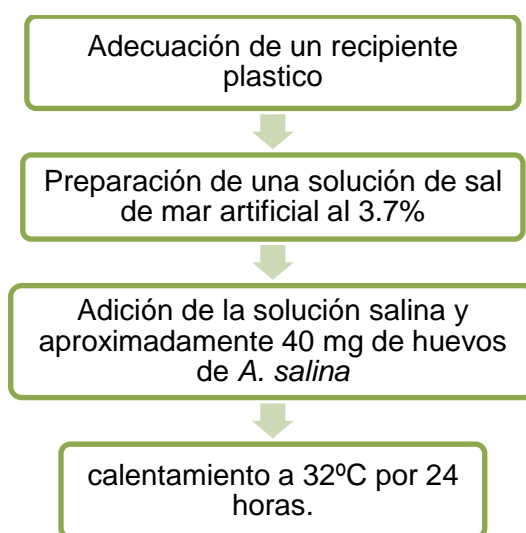


Figura 25 Esquema de la metodología utilizada para la obtención de nauplios de *Artemia salina* en el laboratorio [autores].

Para evaluar la toxicidad tanto del extracto (F001) y sus respectivas fracciones (F005 y F007); se preparó una solución patrón de 10 $\mu\text{g/mL}$ del extracto en etanol. El cual fue diluido para preparar soluciones a concentraciones 0.02, 0.07, y 0.14 $\mu\text{g/mL}$, tomando de la solución patrón 10, 40 y 70 μL respectivamente, dejando evaporar el solvente; a cada una de las muestras se adiciono 20 μL de dimetil sulfoxido (DMSO) y luego se aforo a 5 mL con agua de mar artificial. Los ensayos se hicieron y evaluaron por triplicado. El estudio se llevó a cabo en frascos de vidrio, donde se adiciono 10 nauplios de *Artemia Salina* posteriormente, el conteo de nauplios se inició a partir de las 24 horas considerando muertas aquellas que no presentaron movimiento [41, 44, 83]. La metodología usada se representa en las figuras 26 y 27.

La evaluación se realizó simultáneamente con dos tipos de controles, un blanco agua de mar artificial al 3.4 % y como control positivo una solución de 60 μL de etanol en 5 ml de agua de mar artificial. En los controles se adicionaron igualmente 20 μL de dimetil sulfóxido y 10 nauplios de *A. salina*.

Con el extracto crudo se hizo este ensayo durante dos meses (semana de por medio – con el extracto a temperatura ambiente) para un total de 5 ensayos; finalmente se evaluó la toxicidad de las fracciones F005 y F007, cada uno de ellos por triplicado siguiendo la misma metodología descrita, esta se puede observar en la figura 26 y 27 [41, 44, 83].

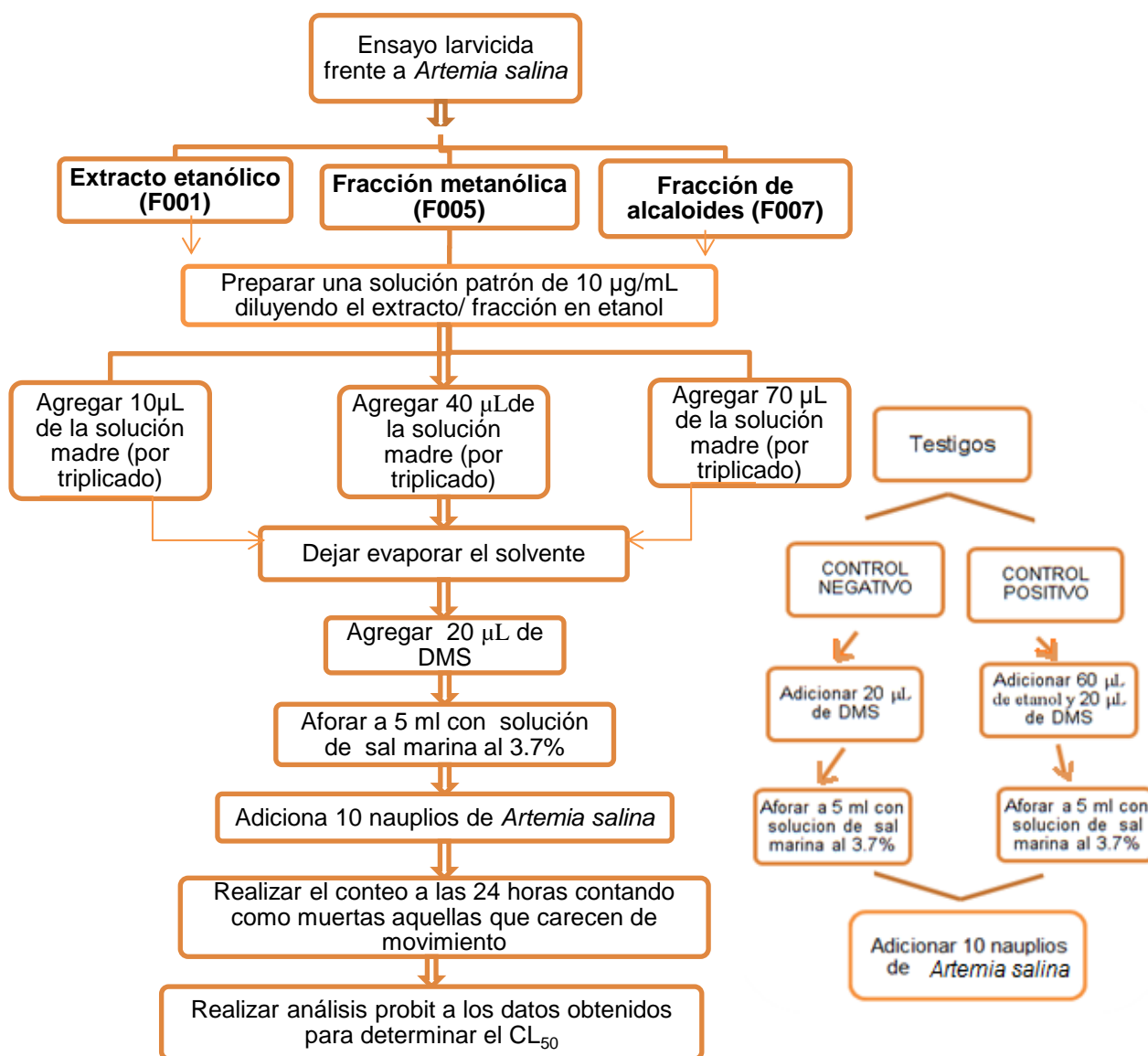


Figura 26 Esquema que representa la metodología utilizada para el ensayo larvicida con *Artemia salina* [autores].

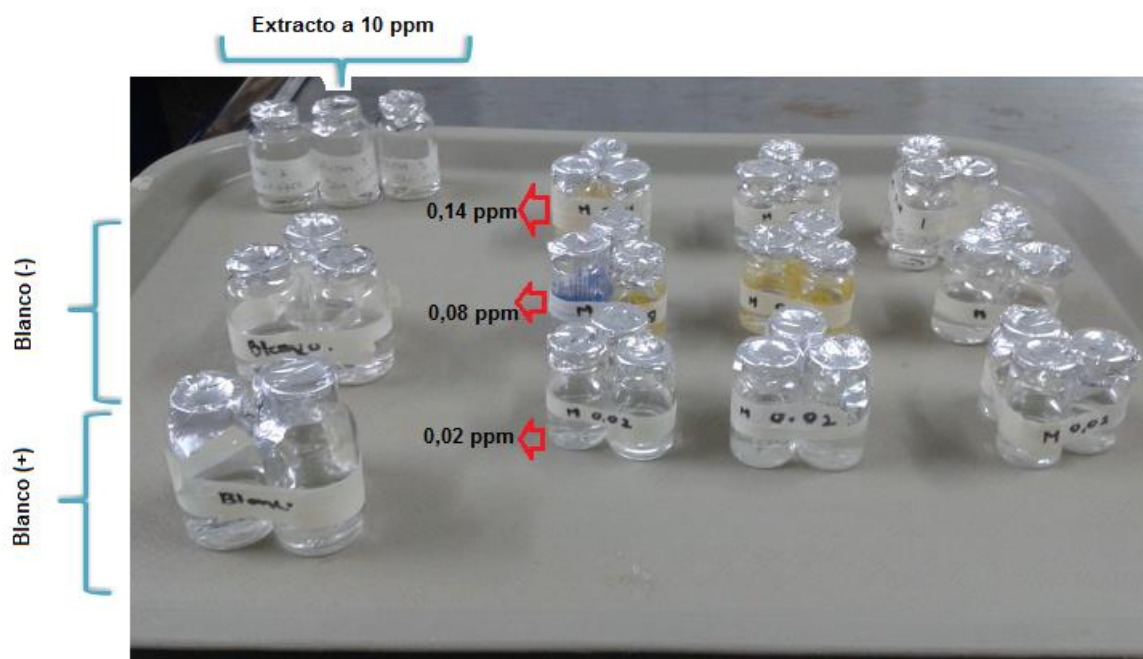


Figura 27 Ensayo *in vitro* larvicida del extracto etanólico de *Annona reticulata* frente a *Artemia salina* [autores].

6.4.2. Ensayo insecticida

6.4.2.1. Ensayo *in vitro* con *Corythucha gossypii*

Se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira. En recipientes plásticos se adicionaron hojas frescas de guanábana que sirvieron como alimento para el insecto, a partir del extracto crudo se prepararon soluciones de 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ posteriormente, se asperjó la hoja por el envés con las concentraciones preparadas, (es necesario dejar evaporar el solvente en su totalidad) finalmente, se colocaron 5 ninfas en estado avanzado de *Corythucha gossypii* en las hojas y se cerró el recipiente.

Para cada concentración se hace un ensayo por triplicado y se realiza conteo de insectos a las 24 y 48 horas considerando muertos aquellos que no presentan movimiento; paralelamente, se montaron tres tipos de testigo: la hoja sola con el insecto, una hoja asperjada con bifentrina a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una hoja asperjada con etanol y agua; cada uno de estos testigos por triplicado, la metodología usada se presenta en las figuras 28 y 29.

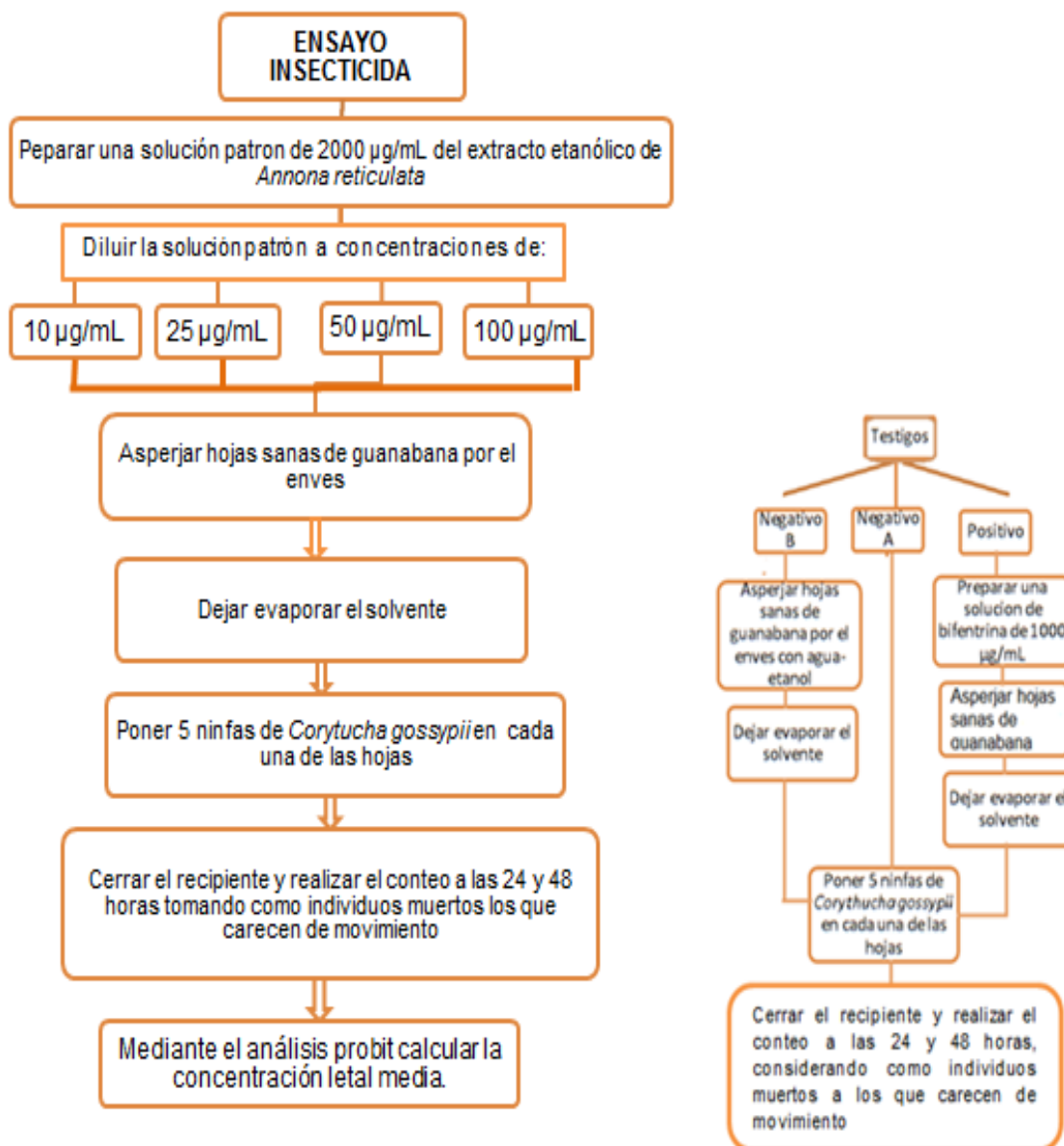


Figura 28 Esquema que representa metodología implementada para la evaluación *in vitro* de la actividad insecticida del extracto etanólico de *A. reticulata* frente a *Corythucha gossypii* [autores].

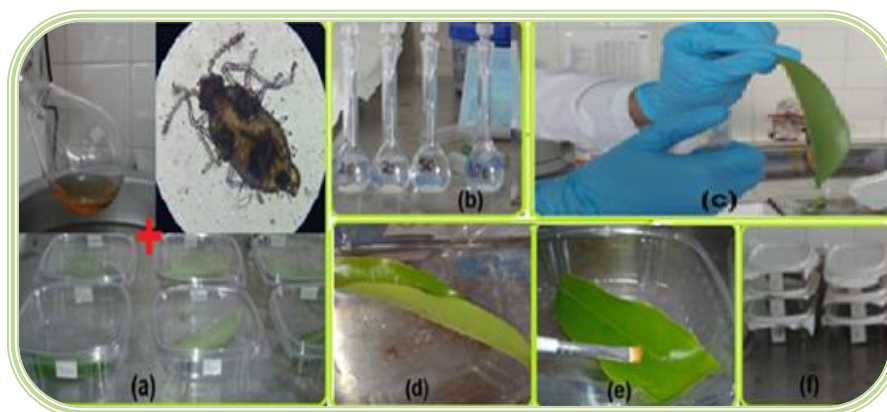


Figura 29 Imágenes del ensayo insecticida *in vitro* del extracto etanólico de *Annona reticulata* con *Corythucha gossypii*. **(a)** material de partida: extracto etanólico, ninfas de *C. gossypii*, hojas de guanábana frescas y sanas. **(b)** concentraciones a evaluar a partir del extracto. **(c)** Asperjar la hoja por el envés. **(d)** Dejar secar la hoja. **(e)** Inocular las ninfas. **(f)** Sellar el recipiente [autores].

6.5. ANALISIS ESTADISTICO

Para la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) del ensayo de actividad larvicida e insecticida, los datos fueron procesados con el Software Infostat versión 2014e mediante la regresión Probit, la cual relaciona la concentración del extracto/ fracciones, los organismos muertos y el porcentaje de efecto del mismo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS SEMILLAS DE *Annona reticulata*.

7.1.1. Extracción por maceración de la semillas de *Annona reticulata*.

A partir de semillas desengrasadas de *Annona reticulata* se realizó extracción con etanol por triplicado, obteniendo así el extracto etanólico F001; durante el proceso de extracción se tuvieron en cuenta la masa tanto del material vegetal de partida como del extracto final obtenido, con el fin de determinar el porcentaje de rendimiento, estos resultados se presentan en la tabla 15.

Tabla 15 Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico (F001) a partir de semillas desengrasadas de *Annona reticulata*.

Ensayo	Material vegetal (g)	F001 (g)	Rendimiento (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (CV)
1	70,0012	2,3838	3,41		
2	70,0068	2,3824	3,40		
3	70,0000	2,5179	3,60	0,001127	3,25%
Promedio	70,0027	2,4280	3,47		

En otro trabajo realizado, en el cual se usó como material vegetal semillas *Annona muricata*, realizando el mismo método de extracción, se obtuvo un porcentaje de rendimiento promedio de 3,22% [92], siendo este un valor inferior al porcentaje de rendimiento promedio obtenido en este trabajo para el extracto F001, las diferencias de los porcentajes de rendimiento para el extracto etanólico, son aceptables, teniendo en cuenta, que este depende de la especie del material vegetal utilizado, cada especie presenta una composición química diferente, aun perteneciendo al mismo género *Annona* [9, 96].

El coeficiente de variación es una medida que resume la variabilidad de los datos en términos porcentuales. De tal forma que entre menor sea el valor de este, menor incertidumbre se tiene de la estimación y advierte que ésta es más precisa. La utilización del coeficiente de variación depende directamente de las condiciones del estudio, por lo cual no existen reglas universales; sin embargo, según los criterios de aceptación estipulados por el departamento administrativo nacional de estadística (DANE), el porcentaje de rendimiento del

extracto F001 se considera de buena calidad por encontrarse en un rango del 3 al 5% [97]

7.2. FRACCIONAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

A partir del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* se obtuvieron las fracciones F005 y F007; durante estos procesos se tuvieron en cuenta las masas tanto del material vegetal de partida, como de la fracción final obtenida, con el fin de determinar el porcentaje de rendimiento, los resultados para la fracción F005 se presentan en la tabla 16 y para F007 en la tabla 17. Se obtuvieron porcentajes promedio de rendimiento de: 0,45% para la fracción F005 y 0,54% para la fracción F007 con base al material de partida (semilla desengrasada).

Debido a que el procedimiento de partición se realizó al extracto etanólico y no fue exhaustivo, mediante los resultados obtenidos no se puede decir que estos porcentajes corresponden a una masa equivalente por cada 100 g. del material vegetal de partida, al observarse una cercanía en los datos es posible que el aporte de cada uno de estas fracciones a la masa del extracto crudo sea similar.

Tabla 16 Porcentaje de rendimiento de la fracción metanólica (F005) y de alcaloides (F007) a partir de semillas desengrasadas de *Annona reticulata*.

FRACCIÓN	Ensayo	Material vegetal (g)	F005 (g)	Rendimiento (%)	Desviación estándar	Coficiente de variación (CV)
F005	1	70,0012	0,2981	0,43	0,0002646	5,87%
	2	70,0068	0,3361	0,48		
	3	70,0000	0,3062	0,44		
	Promedio	70,0027	0,3135	0,45		
F007	1	35,0078	0,1834	0,52	0,0002516	4,63%
	2	35,0285	0,18911	0,54		
	3	35,2601	0,2006	0,57		
	Promedio	35,0988	0,1910	0,54		

Según los criterios de aceptación estipulados por el departamento administrativo nacional de estadística (DANE), el porcentaje de rendimiento de la fracción F007 se considera de buena calidad por encontrarse en un rango del 3 al 5% mientras que la fracción F005 se considera aceptable por encontrarse en un rango del 5 al 15% [97].

Los valores de coeficiente de variación de las fracciones F005 y F007 son mayores que el encontrado del extracto F001; se debe tener en cuenta que el extracto F001 es un paso intermedio para la obtención de las fracciones, por esta razón pueden generarse más pérdidas a medida que el proceso implica mayor cantidad de pasos y por ende una mayor variación en los datos.

7.3. ANALISIS QUIMICO DEL EXTRACTO DE SEMILLAS DE *Annona reticulata*

7.3.1. Caracterización de acetogeninas.

7.3.1.1. Evaluación preliminar del extracto etanólico y fracción F005 por cromatografía de capa delgada (CCD).

En la figura 30 se presentan las cromatoplasmas obtenidas para el análisis del extracto etanólico y la fracción F005; en la cromatoplasma (A) se analizó el extracto etanólico y la fracción F005 mediante CCD usando como revelador ácido fosfomolibdico al 5% en metanol en ambos casos se observó una coloración azul siendo más dispersa la de la fracción F005; en la cromatoplasma (B) se analizó el extracto etanólico por triplicado, evidenciándose una coloración rosada al utilizar como revelador el reactivo de kedde, lo que indica la posible presencia de acetogeninas con anillo γ -lactónico α , β -insaturado [21, 31, 96]

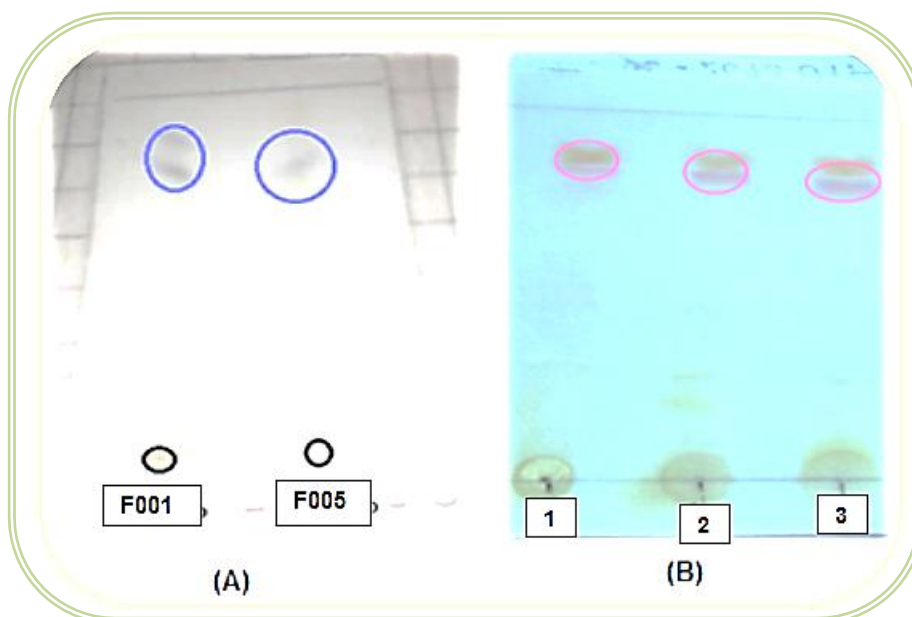


Figura 30 resultados del análisis de CCD para acetogeninas **(A)** extracto etanólico y fracción F005 utilizando como revelador ácido fosfomolibdico al 5% en metanol. **(B)** Extractos etanólicos utilizando como revelador el reactivo de Kedde.

7.3.1.2. Análisis cualitativo de acetogeninas del extracto etanólico y fracción F005 de *Annona reticulata* por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Se llevó a cabo el análisis cualitativo mediante los máximos de absorbancia UV-vis para cada pico presente en los cromatogramas obtenidos, considerando que el rango de máxima absorbancia para las acetogeninas de *Annonaceae* está entre 200- 230 nm [21, 98]

Como se aprecia en la figura 31, en el perfil cromatográfico del extracto etanólico se encontraron 5 picos correspondientes a acetogeninas, como se muestra en la figura 31 A y en la fracción F005 se observaron 8 picos correspondientes a acetogeninas mostrados en la figura 31 B; la selección de cada uno de estos picos se realizó según su espectro UV-Vis de acuerdo a los rangos de máxima absorbancia reportado para acetogeninas y la comparación con el espectro UV de la Bulatacina (acetogenina usada como estándar en otras investigaciones) [67], los espectros tanto del extracto como de las fracciones se encuentran en el anexo 2. Esto indica que, en el extracto etanólico de *A. reticulata* y la fracción F005 hay presencia de acetogeninas.

Una caracterización específica de las acetogeninas presentes en el extracto F001 y en la fracción F005 resulta muy compleja solo con un espectro UV-vis debido a que acetogeninas diferentes pueden tener un espectro muy similar. En el anexo 1, tabla B se presenta la muricatocina B y la Reticulataina-2, dos

acetogeninas de tipo mono-tetrahidrofurano de 35 y 37 carbonos respectivamente, aisladas de semillas de *Annona reticulata*; en una recopilación hecha por el grupo de investigación del profesor McLaughlin [99] se presentan los λ_{\max} de diferentes acetogeninas, la annosenagalina una acetogenina aislada de la *Annona muricata* con formula molecular $C_{37}H_{68}O_7$ presenta el mismo máximo de absorción de la Reticulataina-2 con formula molecular $C_{37}H_{68}O_5$ de 207 nm, ambas acetogeninas tienen la misma cantidad de carbonos pero la primera tiene dos grupos OH en C4 y C10 con lo que se esperaría que su absorbancia fuera diferente, sin embargo esta presenta el anillo tetra hidrofurano después de C15 y la Reticulataina-2 después de C19, ambas presentan grupos OH a ambos lados de los anillos.

La gran cantidad de centros estereogénicos en las acetogeninas permiten amplias posibilidades de isomería posicional a lo largo de la cadena con respecto a los sustituyentes [24]. Para realizar una caracterización concluyente con respecto al tipo de acetogeninas presentes en el extracto, se requiere el uso de estándares para realizar una adecuada identificación teniendo en cuenta los tiempos de retención de estos o usando el método de HPLC-MS [19, 21, 22, 33].

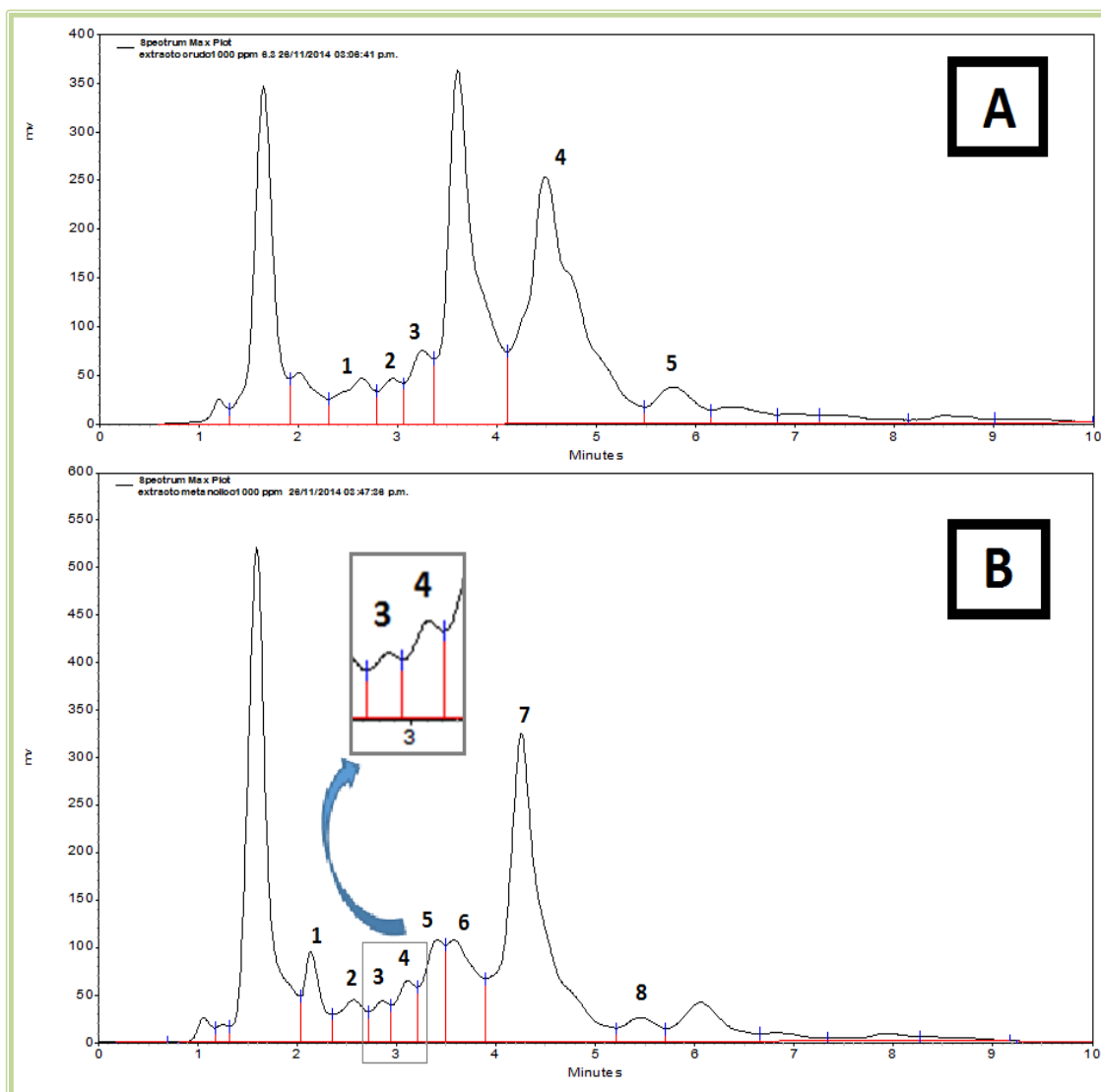


Figura 31 Resultados de la análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) **(A)** perfil cromatográfico del extracto etanólico de *Annona reticulata* - **(B)** perfil cromatográfico de la fracción F005.

En la tabla 17 se presentan cada uno de los picos correspondientes a acetogeninas del perfil cromatográfico para el extracto etanólico y la fracción F005.

Tabla 17 Número de cada pico correspondiente a acetogeninas en el cromatograma A y B con sus respectivos tiempos de retención.

cromatograma (A)	cromatograma (B)	Tiempos de retención (min)
--	1	2,13
1	2	2,63
2	3	2,94
3	4	3,26
--	5	3,41
--	6	3,61
4	7	4,49
5	8	5,77

En la figura 32 se presenta una superposición de los cromatogramas del extracto etanólico, con el de la fracción F005, los compuestos presentes en la fracción F005 presentaron una absorbancia mayor debido a que el fraccionamiento realizado al extracto etanolico para obtener F005, permitió obtener una fracción con una menor cantidad de compuestos, lo que confiere a la fracción menos interferencias en el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

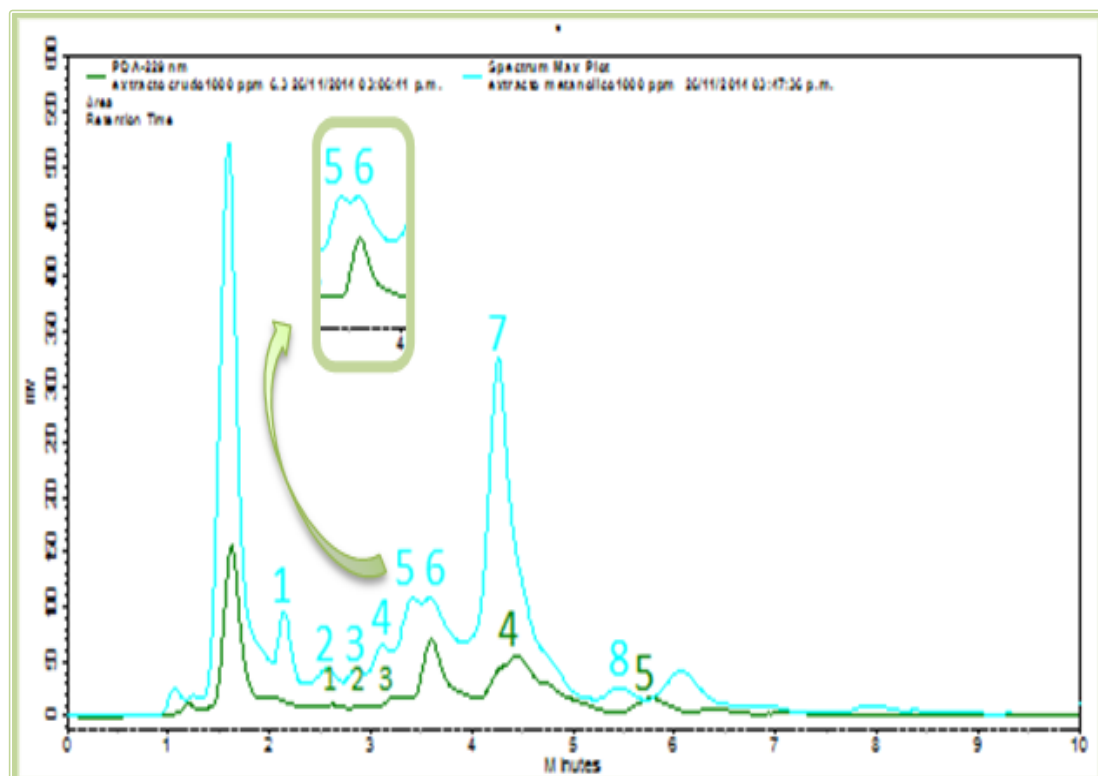


Figura 32 Cromatogramas obtenidos para el extracto etanólico (verde) y el de la fracción F005 (azul) superpuestos.

En ambos cromatogramas se presenta una separación aceptable pero con algunas superposiciones lo cual indica que la polaridad de estos compuestos es muy similar entre sí, las acetogeninas presentes en semillas de *Annona reticulata* son de alta polaridad debido a que aparecen entre el minuto dos y seis del método.

Para mejorar la resolución de los picos se debe tener una buena separación, por lo cual se recomienda el uso de una columna de mayor longitud que tenga una mayor cantidad de platos teóricos, debido a que el poder separativo de una columna se mide en función del número de estos presentes, el número de platos teóricos es inversamente proporcional al ancho de los picos del cromatograma [52].

En el extracto etanólico probablemente se encuentran otros compuestos los cuales generan interferencias en el análisis de acetogeninas por cromatografía líquida de alta eficiencia; aparte de las acetogeninas se evidencia la presencia de compuestos de tipo alcaloidal; observándose que los picos 5 y 6 correspondientes a acetogeninas en la fracción F005, se encuentran traslapados en el cromatograma del extracto etanólico por un compuesto de tipo alcaloidal, esto se resalta en el recuadro interno de la figura 32; es posible que dicho compuesto sea de origen alcaloidal debido al máximo de absorbancia y al espectro UV-Vis que presenta. En el apartado 7.3.2.2. de este

documento se dan a conocer el rango de máxima absorción de alcaloides de tipo isoquinolínico.

En el análisis cromatográfico que se le realizó al extracto F001 mediante el método utilizado para el análisis de acetogeninas, se logran observar dos picos, los cuales se encuentran enumerados en la figura 33, el primero (A) al minuto 1,64 y el segundo (B) al minuto 3,61 con espectro UV-vis característico de alcaloides. Para la figura 33 el pico número dos es el que se encuentra traslapando en el cromatograma del extracto etanólico el pico 3 y 4 que si se evidencia en el cromatograma de la fracción F005.

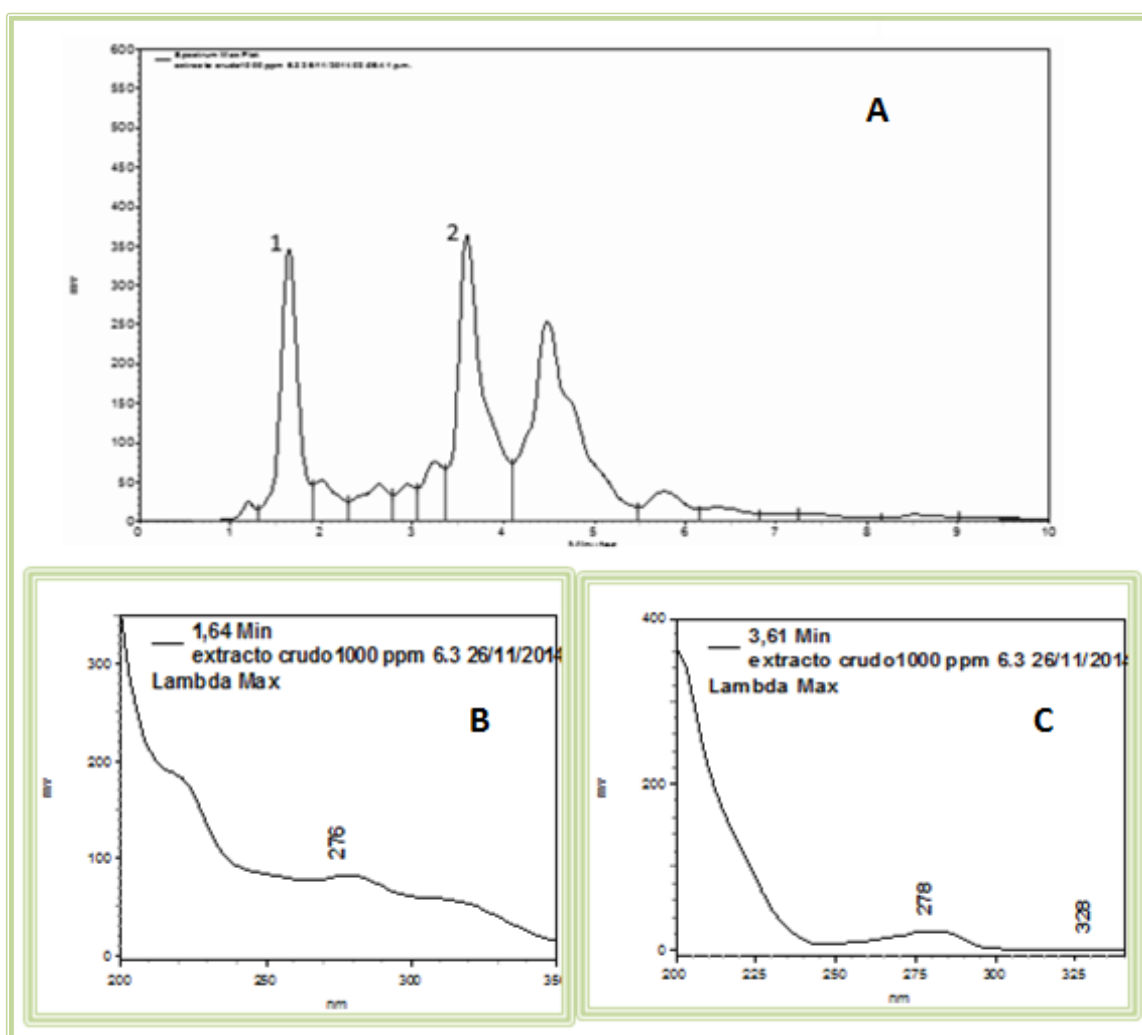


Figura 33 (A) cromatograma del extracto crudo bajo el método usado con las acetogeninas; **(B)** espectro ultravioleta del pico 1 representativo de alcaloide; **(C)** espectro ultravioleta del pico 2 representativo de alcaloide.

7.3.2. Caracterización de alcaloides.

7.3.2.1. Evaluación preliminar de la fracción F007 por cromatografía de capa delgada (CCD).

Los resultados obtenidos en el análisis por CCD con el reactivo de Dragendorff se muestran en la figura 34, se puede observar manchas continuas de color naranja.



Figura 34 Cromatoplaqueta obtenida en el análisis por CCD para la fracción F007 utilizando como revelador el reactivo de dragendorff [autores].

Los reactivos utilizados para evidenciar la presencia de alcaloides generalmente son sales o metales pesados en solución; al usar reactivo de dragendorff (yoduro de potasio-nitrato de bismuto) se genera un acoplamiento entre el átomo del metal pesado del reactivo con el nitrógeno del alcaloide, se da una reacción entre BiI_4^- y el alcaloide, como se presenta en la figura 35 y se forma un complejo coloreado, de color naranja-rojo. En este análisis se observó la coloración de unas secciones anaranjadas dando como resultado positivo la presencia de alcaloides en la fracción F007 [99, 100].

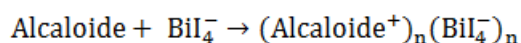


Figura 35 Reacción de tetra-yoduro de bismuto con el nitrógeno del alcaloide [99].

7.3.2.2. Análisis cualitativo de la fracción F007 de *Annona reticulata* por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Se analizaron los máximos de absorbancia de cada pico presente el cromatograma obtenido, teniendo en cuenta para los alcaloides isoquinolínicos el rango de máxima absorbancia es de 204 nm a 461 nm [101].

Como se aprecia en la figura 36, en el perfil cromatográfico de la fracción F007 se encontraron 4 picos correspondientes a alcaloides isoquinolínicos según su espectro UV-Vis (ver Anexo 3).

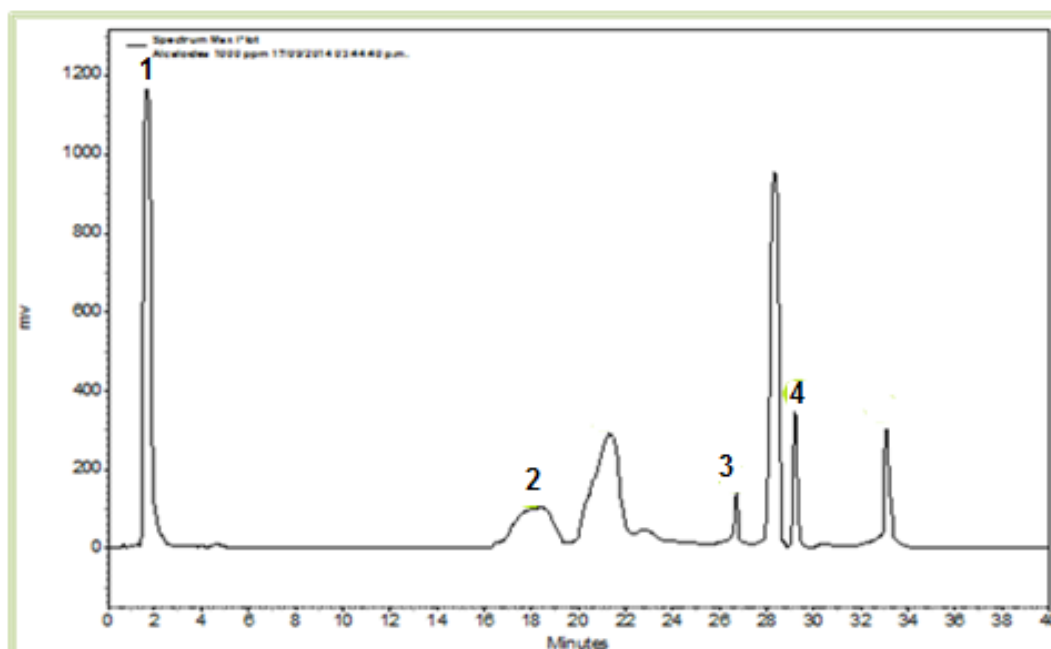


Figura 36 Cromatograma obtenido para la fracción F007.

Los alcaloides isoquinolínicos dependiendo de su clasificación, tienen diferentes máximos de absorbancia (ver anexo 1 tabla C). Se ha reportado que la especie *Annona reticulata* presenta los siguientes tipos de alcaloides:

- Isoquinolinico simple como el salsolinol
- Bezisiquinolínico como la coclaurina y reticulina.
- Aporfínico como la anonaina y la norushinsinina.
- oxoaporfínico como la liriodeina [34]

Las estructuras de estos alcaloides se representan en la tabla 5- pag 15.

Se encuentran máximos de absorbancia reportados para la reticulina de 285 nm, norushinsinina de 275 y 328 nm, liriodeina de 247, 268, 309 y 417 nm [101]. Comparando estos valores, se encuentra una cercanía con los máximos de absorbancia obtenidos al analizar por cromatografía líquida de alta eficiencia el extracto F007 de acuerdo a estas cercanías se propone un tipo de alcaloide para cada uno de los picos como se muestra en la tabla 18.

Al comparar los valores de los máximos de absorbancia reportados, con los resultados de este trabajo se debe tener en cuenta, que la mayor parte de los espectros de los alcaloides y sales de alcaloides se han determinado en disolventes hidroxílicos polares (etanol, metanol, o agua). Por esta razón rara vez se presentan diferencias significativas reflejadas en los espectros; pero en muchos casos, las variaciones en el pH causan cambios estructurales significativos en la molécula que se reflejan en los cambios de los espectros ultravioleta [101].

Tabla 18 Máximos de absorbancia de los picos correspondientes a alcaloides al analizar por CLAE la fracción F007.

Pico	Tiempo de retención (min)	Máximo de absorbancia (nm)	Tipo de alcaloide	Ref.
1	1,68	270	Aporfinico	[101, 102]
2	18,04	275	Aporfinico	[101, 102]
3	26,78	220	Aporfinico	[101, 102]
4	29,23	237,281	Isoquinolinico simple-Tetrahydroisoquinolína	[101]

De acuerdo a los resultados hay presencia de alcaloides de tipo Isoquinolinico en la fracción F007, tres son de tipo aporfinico y un único alcaloide de tipo isoquinolinico simple-tetrahydroisoquinolína.

El trabajo fue dirigido a la obtención del extracto crudo de semillas de *A. reticulata* para análisis de actividad insecticida; y fue en base a este extracto que se realizó el fraccionamiento para la obtención de la fracción F007 se entiende la baja presencia de alcaloides en esta, debido a que la metodología utilizada para la obtención del extracto etanólico no fue implementada con el fin de obtener la mayor cantidad de alcaloides de las semillas. Para realizar una mejor caracterización de alcaloides se sugiere una extracción inicial a partir de las semillas con un solvente más afín para después realizar el fraccionamiento, lo cual podría mejorar la cantidad y concentración de alcaloides presentes en la fracción F007.

7.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

7.4.1. Ensayo larvicial con *Artemia salina*

Se utilizó el extracto F001 y las fracciones F005 y F007 para la determinación de la concentración letal media de cada una de las fracciones y el extracto frente a *A. salina*. Inicialmente se evaluaron concentraciones de 1, 3, 6 $\mu\text{g/mL}$; cada concentración se evaluó por triplicado con su respectivo blanco positivo y blanco negativo, mostrando alta actividad larvicial, con una mortalidad de larvas del 100%. La ausencia de individuos vivos no permitió determinar el CL_{50} mediante el método PROBIT; Por esta razón, se llevó a cabo una variación en las concentraciones disminuyendo la concentración del extracto. Se prepararon soluciones de 0.02, 0.08 y 0.14 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos al evaluar estas concentraciones permitieron realizar el análisis mediante el método PROBIT. Para el extracto etanólico se hizo un seguimiento de toxicidad durante nueve semanas, con el objetivo de conocer la actividad del extracto frente a *A. salina* a través del tiempo a temperatura ambiente los resultados se dan a conocer en la tabla 19; y para la fracción metanólica (F005) y la de alcaloides (F007) se hizo un único análisis por triplicado los resultados se presentan en la tabla 20.

Tabla 19 Concentración letal media (CL_{50}) del extracto etanólico (F001) de *Annona reticulata* frente a larvas de *Artemia salina*.

SEMANA	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	$0.0672 \pm 0,00410$
3	$0.0752 \pm 0,00642$
5	$0.0873 \pm 0,00417$
7	$0.0969 \pm 0,00449$
9	$0.1200 \pm 0,00706$

En la figura 37 se puede observar el comportamiento de la actividad larvicial del extracto etanólico, frente a *Artemia salina* durante nueve semanas a temperatura ambiente; Se obtuvo un CL_{50} para la primera semana de 0.0627 $\mu\text{g/mL}$ y para la novena semana un valor de 0.1200 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados indican que los compuestos citotóxicos se degradan progresivamente a temperatura ambiente. En la novena semana se duplicó aproximadamente el valor de la concentración necesaria para producir la muerte del 50% de las larvas expuestas al extracto etanólico.

El extracto etanólico durante las nueve semanas de evaluación fue considerado altamente activo, debido a que la concentración letal media (CL_{50}) durante las nueve semanas fue inferior a $10 \mu\text{g/mL}$ [41].

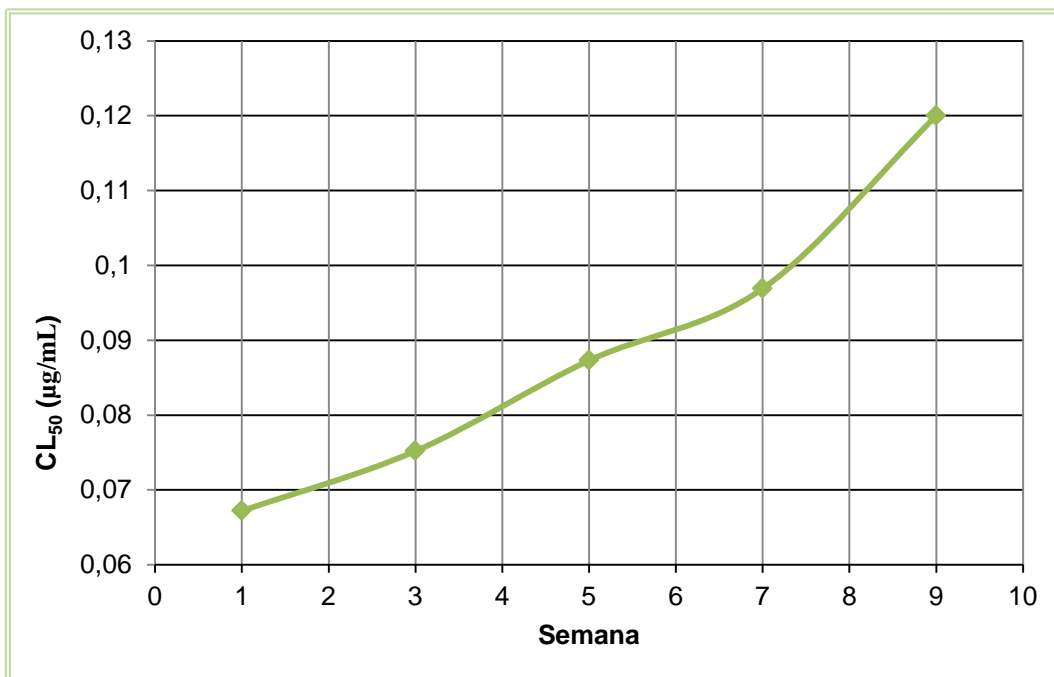


Figura 37 Comportamiento de la actividad larvicida del extracto etanólico de semilla de *Annona reticulata* frente a *Artemia salina* a temperatura ambiente durante un tiempo de nueve semanas.

En la curva de la figura 37 se observa un aumento en la pendiente a partir de la semana 7; lo que indica que a partir de este punto el extracto aumenta su degradabilidad; evaluar la actividad larvicida del extracto por un tiempo más prolongado permitiría establecer cuando pierde su actividad.

La degradabilidad del extracto al ser utilizado en el medio para aprovechar su actividad biológica por ejemplo como plaguicida, se considera por una parte ventajosa, debido a que la baja permanecería en el ambiente, evita la contaminación de aguas e incorporación a suelos, animales y seres humanos, muy por el contrario de lo que comúnmente ocurre con los plaguicidas de origen sintético; los plaguicidas que persisten más tiempo en el ambiente, tienen mayor probabilidad de interactuar con los diversos elementos que conforman los ecosistemas. Si la vida media y la persistencia del extracto es mayor a la frecuencia con la que se aplican, los plaguicidas tienden a acumularse tanto en los suelos como en la biota [72, 103]; y por otra parte, desventajosa pues la baja persistencia en el tiempo de este extracto sobre la planta u objeto que se desee aplicar para aprovechar su actividad biológica,

podría ocasionar un aumento en la cantidad y veces de aplicación conduciendo a una mayor inversión económica.

En la tabla 20 se presentan los resultados de la concentración letal media (CL₅₀) de las fracciones F005 y F007 obtenidas del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata*.

Tabla 20 Concentración letal media (CL₅₀) del extracto etanólico (F001), la fracción metanólica (F005) y la fracción de alcaloides (F007).

FRACCIÓN	CL ₅₀ (µg/mL)
F001	0,0672 ± 0,00410
F005	0,0490 ± 0,00610
F007	0,0716 ± 0,00536

La fracción F005 presenta un valor menor de Concentración letal media (CL₅₀); para determinar si existe diferencias significativas entre la actividad larvica del extracto etanólico (F001) y las fracciones F005 y F007 se realizó un análisis de varianza ANOVA, determinando la variación del porcentaje de mortalidad de nauplios de *Artemia salina*, tomando como variables de clasificación: el tipo de extracto y la concentración evaluada, datos presentados en la tabla 21.

Tabla 21 Porcentajes de mortalidad de nauplios de *Artemia salina* causado por el extracto etanólico (F001), la fracción metanólica (F005) y de alcaloides (F007) en el ensayo larvica.

Extracto/ Fracciones	Numero de ensayo	Concentración evaluada (µg/mL)	Mortalidad (%)
F001	1	0,02	34,32
	2	0,08	63,16
	3	0,14	82,17
F007	1	0,02	22,18
	2	0,08	54,31
	3	0,14	91,53
F005	1	0,02	45,40
	2	0,08	70,57
	3	0,14	88,93

Se considera que no hubo diferencia significativa entre los resultados de las variables analizadas si el p-valor es > 0.05 y si el p-valor es < 0.05 la hipótesis anterior se considera no valida.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% A. MUERTAS	9	0,96	0,91	11,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4550,09	4	1137,52	21,46	0,0058
EXTRACTO	236,99	2	118,50	2,24	0,2229
CONCENTRACIÓN	4313,10	2	2156,55	40,69	0,0022
Error	212,01	4	53,00		
Total	4762,10	8			

Figura 38 Analisis de varianza ANOVA de la mortalidad causada entre el extracto F001 y las fracciones F005 y F007 con el software InfoStat.

La figura 38 presenta los resultados obtenidos para el análisis de varianza ANOVA, con un p-valor de 0.2229, lo que indica que no hay una diferencia significativa entre la mortalidad causada a las mismas concentraciones del extracto F001 y las fracciones F005 y F007, aunque el valor de CL₅₀ para la fracción F005 fue menor con respecto al extracto y la fracción F007, la letalidad causada por la fracción F005, no es significativamente diferente a la letalidad causada por el extracto etanólico y la fracción F007.

Mediante el proceso de extracción usado, se obtiene una mezcla compleja de compuestos [21, 32, 67], según revisión bibliográfica, en extractos de *Annona reticulata* se ha encontrado la presencia de compuestos fenólicos, taninos, terpenos y flavonoides que también pueden aportar un grado de actividad al extracto [104, 105].

Es probable que en el extracto etanólico de *Annona reticulata* se dé un efecto sinérgico entre todos los compuestos presentes, confiriéndole al extracto etanólico (F001) una bioactividad similar a las fracciones F005 y F007 evaluadas [13, 106]; Se sugiere la realización de otro tipo de ensayos que permitan corroborar o descartar la anterior hipótesis.

Se encontraron otros autores que han evaluado la actividad larvicida frente a *Artemia salina* de diferentes extractos etanólicos, de semillas del genero *Annona* (anexo 1 tabla D); comparando los reportes de concentración letal media frente a nauplios de *Artemia salina* de esas especies del genero *Annona* (*A. squamosa*, *A. muricata*, *A. cherimolia* Mill), se encuentra que el extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* evaluado en este proyecto, presenta una mayor actividad larvicida frente a *Artemia salina* que las especies del genero *Annona* reportadas en la tabla D – anexo 1, con un valor de un valor de concentración letal media (CL₅₀) de 0,0672 µg/mL, inferior al de las otras especies.

El resultado de mortalidad de las larvas puede significar la existencia de grupos de compuestos potencialmente activos presentes en el extracto, debido a que 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 [107]. Debido a esto la realización de ensayos larvicidas para determinar la toxicidad de un extracto de plantas de la familia *Annonaceae* contra nauplios de *Artemia salina* se ha considerado en estudios anteriores directamente proporcional a la presencia de acetogeninas citotóxicas [108].

7.4.2. Ensayo insecticida frente *Corythucha gossypii*.

Se implementó una metodología para la evaluación *in vitro* de la actividad insecticida como se muestra en la figura 39, se evaluaron concentraciones de 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto etanólico frente a el insecto *Corythucha gossypii*, las hojas frescas de guanábana fueron colocadas dirigiendo el envés hacia la parte inferior del recipiente plástico que las contenía.

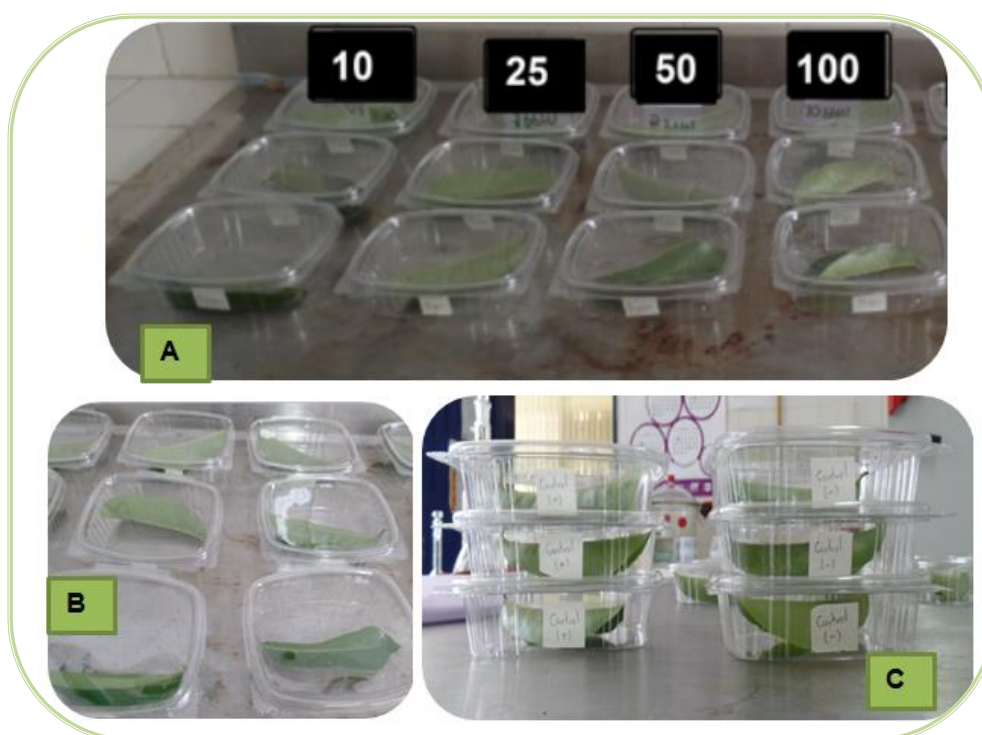


Figura 39 Ensayo insecticida del extracto etanólico de *Annona reticulata* frente a *Corythucha gossypii* (A) montaje para la evaluación del extracto etanólico frente a *Corythucha gossypii* (B) disposición de las hojas en los recipientes (C) testigos [autores].

En la tabla 22 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad larvicida del extracto etanólico de semillas desengrasadas de *A. reticulata*. El modelo de evaluación usado, permitió evaluar concentraciones de 100, 50, 25, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ variando el tiempo de exposición (24 y 48 horas).

Tabla 22 Resultados del ensayo insecticida del extracto etanólico de *Annona reticulata* frente a *Corythucha gossypii* a las 24 y 48 horas.

Concentración de extracto etanólico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Número total de ninfas	Tiempo de exposición			
		24 horas		48 horas	
		Número de insectos muertos	Mortalidad (%)	Número de insectos muertos	Mortalidad (%)
10	15	2	13,33	7	46,66
25	15	2	13,33	6	40,00
50	15	2	13,33	5	33,33
100	15	1	6,67	2	13,33
TESTIGO 1	15	0	0	0	0
TESTIGO 2 Agua-etanol	15	0	0	0	0
TESTIGO 3 Bifentrina 1000 $\mu\text{g}/\text{MI}$	15	15	100	--	--

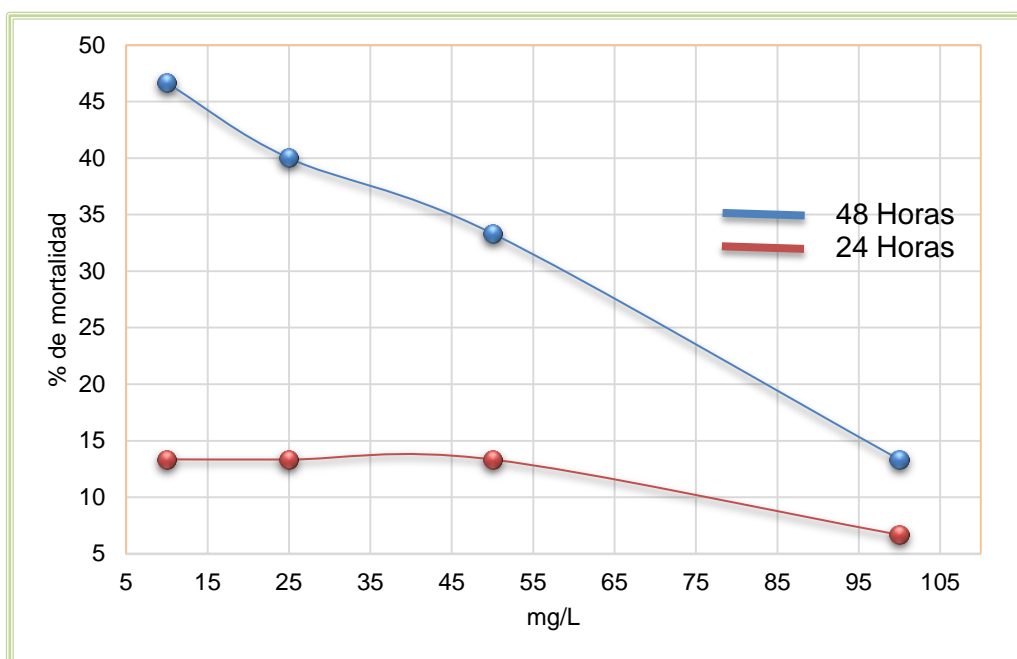


Figura 40 Tendencia de los resultados del ensayo insecticida a las 24 y 48 horas. Concentración del extracto etanólico vs porcentaje de mortalidad de *Corythucha gossypii*.

En la figura 40 se presenta la gráfica de los resultados de la evaluación de la actividad insecticida del extracto etanólico de *Annona reticulata* frente a *Corythucha gossypii*, se puede observar que la pendiente es negativa en ambos casos (tanto a 24 como a 48 horas), debido a que, concentraciones menores evaluadas presentaron un porcentaje de mortalidad mayor con respecto a las demás concentraciones.

La disminución en el porcentaje de mortalidad, causada por el aumento de la concentración, posiblemente es debido a que a bajas concentraciones hay ingestión del extracto por parte de los insectos, pero a altas concentraciones posiblemente haya una deterrencia de los insectos por parte del extracto y por tanto no lo ingiera. Esta hipótesis ya fue mencionada anteriormente, en la evaluación del extracto etanólico de *A. muricata* frente a *Corythucha gossypii*, donde el extracto presentó un comportamiento similar [92].

Se plantea que probablemente el insecto es capaz de detectar la presencia de los compuestos del extracto etanólico de *Annona reticulata* y por esta razón no lo ingieran, otros autores han encontrado que la evaluación a altas concentraciones de extractos de *Annona reticulata* presentan actividad antialimentaria frente a *epilachna vigintioctopunctata* [78].

El rango de concentraciones evaluadas no fue concluyente, puesto que no se evaluaron rangos de bajas concentraciones, que permitieran establecer hasta

que concentración las ninfas no detectan el extracto y lo consumen con la hoja; Por lo tanto el ensayo no permite concluir un valor de concentración que cause un porcentaje de mortalidad superior al 46,66%, obtenido a las 48 horas a 10 $\mu\text{g/mL}$.

No se encuentran otro tipo de ensayos que evalúen la actividad insecticida del extracto etanólico de *Annona reticulata* frente a *Corythucha gossypii*; teniendo en cuenta los resultados de este análisis el extracto etanólico presenta un alto potencial para ser usado como alternativa para el control del insecto, se sugiere continuar con el estudio realizando otros ensayos que evalúen concentraciones inferiores a 10 $\mu\text{g/mL}$ que permitan establecer si hay o no, un porcentaje de mortalidad mayor al obtenido en este trabajo a las 48 horas.

Otros estudios han mostrado que algunos de los compuestos de *Annona reticulata* actúan de forma lenta, aproximadamente en un tiempo de 48 a 72 horas después de la aplicación aparecen los primeros efectos; presentando actividad insecticida de contacto e ingestión contra Larvas de lepidópteros, Áfidos, Esperanzas, Trips, Saltamontes y escamas [54].

Teniendo en cuenta los resultados, durante las primeras 24 horas no se presentó una mortalidad significativa, a las concentraciones evaluadas, pero a las siguientes 48 horas se presentó un incremento significativo en la mortalidad únicamente a las concentraciones bajas, como se ve en la figura 38 no hay diferencias importantes en los porcentajes de mortalidad de acuerdo al tiempo de exposición a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$; pero se desconoce la posible influencia del tiempo de exposición en la actividad insecticida a concentraciones bajas; adicional a la sugerencia anterior, de evaluar concentraciones menores a 10 $\mu\text{g/mL}$ del extracto etanólico de *Annona reticulata*, también se sugiere la evaluación incrementando el tiempo de exposición; debido a que este puede también favorecer la actividad insecticida del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* frente a *Corythucha gossypii* a concentraciones bajas.

Cabe resaltar que en el ensayo insecticida se observó que las hojas de guanábana, asperjadas con la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ presentaban grandes colonias de huevos por el envés como se presenta en la figura 41.

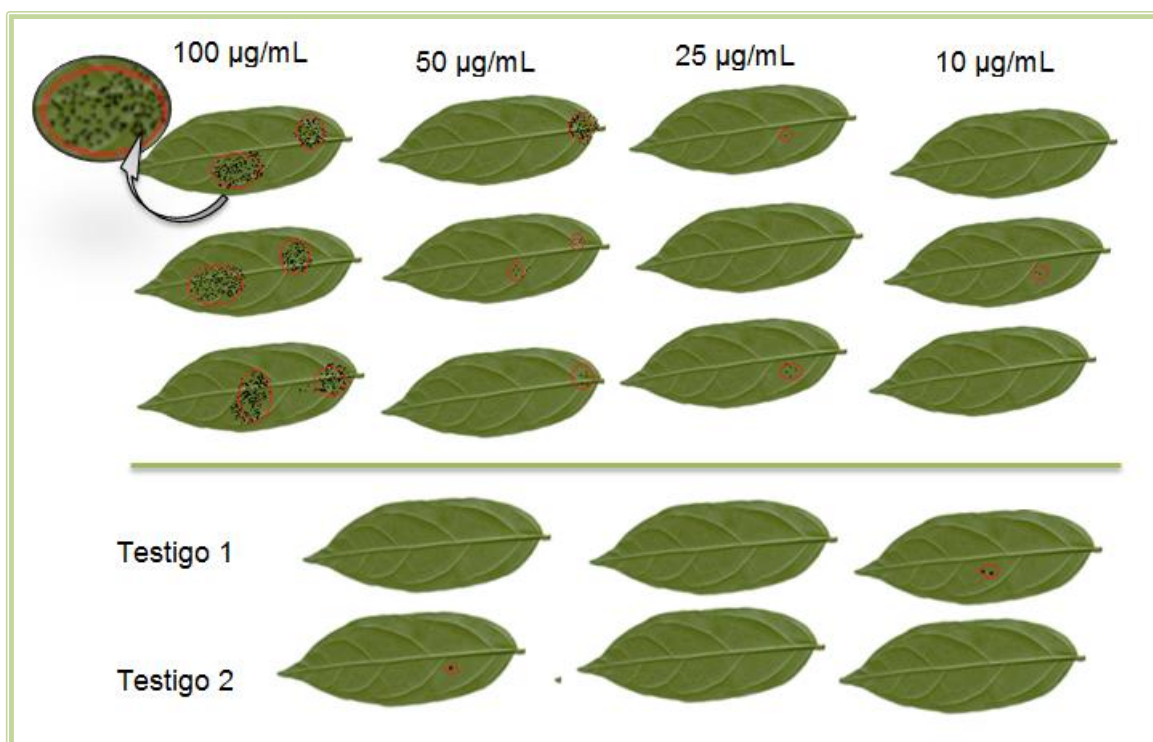


Figura 41 Incremento de la ovoposición de *Corythucha gossypii*, al encontrarse en una hoja asperjada con el extracto etanólico de *Annona reticulata* [autores].

La ovoposición generada por el insecto posiblemente se dé como resultado del estrés; se plantea que el insecto es capaz de detectar compuestos presentes en el extracto los cuales ponen en estado de alerta/ estrés al insecto, y como respuesta, el insecto inicia el proceso de reproducción [109].

Debido a que a concentraciones inferiores a 100 µg/mL y en los testigos, también se observa ovoposición, pero cubriendo una menor área de la hoja, se plantea que el modelo de evaluación igualmente causa estrés en el insecto pero en menor escala; se sugiere utilizar otra metodología que permita establecer las razones por las cuales se presentó la excesiva ovoposición del insecto a concentraciones altas.

La actividad biológica detectada en extractos de varias plantas miembros de la familia *Annonaceae*, ha sido atribuido a la presencia de alcaloides de tipo isoquinolínico; los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la familia *Annonaceae* [32] y de acetogeninas [77]. Teniendo en cuenta que posiblemente estos compuestos sean los que principalmente confieren la actividad biológica [57] al extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata*, se recomienda evaluar los compuestos por separado para establecer el aporte en bioactividad de cada uno de ellos al extracto etanólico.

Los alcaloides de tipo isoquinolínicos presentan una amplia gama de actividades biológicas entre ellas: citotóxica, antifúngica [90, 110] tienen efecto antialimentario e insecticida [111] de deterrence y repelencia. [112] El mecanismo de estos compuestos radica en la inhibición de la síntesis del ADN, la biosíntesis de proteínas, la inhibición de la permeabilidad de la membrana y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Las interacciones con neuroreceptores, la inhibición de la ATPasa, y la unión a los microtúbulos afectará principalmente a los insectos y vertebrados [113].

En las semillas de *Annona reticulata* se han encontrado dos tipos de acetogeninas mono THF y bis THF adyacentes; la mayoría de sus estructuras como se puede observar en la tabla 3, presentan dioles vecinales, gran cantidad de OH, y algunas de ellas presentan en su estructura dos anillos THF en posición adyacente; Estas características confieren un alto potencial biológico a las acetogeninas [114]; entre las acetogeninas que se han reportado en semillas de *Annona reticulata* se encuentra bulatacina, y squamocina; la squamocina originalmente reportada en la *A. squamosa* se considera como uno de los más potentes inhibidores del transporte de electrones a nivel del complejo mitocondrial I [77], característica principal que se confiere a las acetogeninas desde el año de 1991 [26] y la cual ha sido confirmada por estudios realizados usando *Saccharomyces cerevisiae* [77], además la asimicina es un componente activo de varios plaguicidas de origen natural [115].

Probablemente la presencia de este tipo de compuestos confiere al extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* la actividad insecticida frente a *Corythucha gossypii*.

El mecanismo de acción de las acetogeninas de acuerdo a la literatura que le confiere a estos compuestos su bioactividad; es debido a que las acetogeninas reaccionan inhibiendo el transporte de electrones procedentes del NADH a través del complejo I, los cuales deberían secuencialmente continuar a través de la ubiquinona, el complejo III, el citocromo c y finalmente al complejo IV donde se ceden al oxígeno molecular [116], generando una afectación a la asimilación del oxígeno en las células.

Adyacente a esto los complejos I, III y IV envían protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, generando un potencial el cual es usado por la ATP sintasa para realizar la síntesis de ATP a partir de ADP [116], si se inhibe el transporte en el complejo I se ven afectados el complejo III y IV por esta vía, lo que genera una considerable reducción en la síntesis de ATP (molécula de intercambio de energía en la célula); dejando toda la carga sobre los electrones de FADH₂ en la cadena mitocondrial II. Este potencial de

membrana también es usado como fuente de energía para el importe de proteínas y otras moléculas hacia la célula; afectando principalmente las regiones corporales que abarquen un mayor requerimiento energético en los organismos. Una acción similar ocurre con la rotenona el cual es un insecticida botánico de origen natural.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* presenta un alto potencial para ser usado como alternativa para el control del insecto plaga *Corythucha gossypii*; dado que los resultados fueron obtenidos mediante un modelo *in vitro* se recomienda evaluarlo sobre un modelo *in vivo* que permita unas condiciones más cercanas a usar el extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* sobre *Corythucha gossypii* a nivel agroindustrial.

8. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* presentó actividad larvicida frente a nauplios de *Artemia salina* con un valor de CL₅₀ de 0,0672 µg/mL.
- Por medio del análisis de degradación frente a *Artemia salina*, para el extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata*, se encontró que este se degrada en el tiempo, presentando un CL₅₀ para la primera semana de 0,0627µg/mL y para la novena semana un valor de 0,12 µg/mL, indicando que en la novena semana se duplico el valor de la concentración necesaria (con base en la primera semana), para producir la muerte del 50% de las larvas expuestas, sin embargo en este periodo el extracto continuo siendo altamente activo.
- El extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* presento actividad insecticida frente a *Corythucha gossypii*; para una concentración de 10 µg/mL la mortalidad fue de 13,33% y 46,66% con un tiempo de exposición de 24 y 48 horas respectivamente y para una concentración de 100 µg/mL la mortalidad fue de 6,67% y 13,33% con un tiempo de exposición de 24 y 48 horas respectivamente, los resultados obtenidos indican que el extracto etanólico presenta un alto potencial para ser usado como alternativa para el control del insecto *Corythucha gossypii*.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis cuantitativo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) al extracto etanólico de *Annona reticulata*, empleando estándares de acetogeninas y de alcaloides isoquinolínicos.
- Evaluar el extracto etanólico de *Annona reticulata* a concentraciones inferiores de 10 µg/mL y por un tiempo mayor a 48 horas frente a *Corythucha gossypii*, debido a que su potencial insecticida puede incrementarse.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Kerrigan R.A., Cowie I.D., Dixon D.J. Flora of the Darwin región *Annonaceae*. National Library of Australia. V 1: 2011. p. 2-15.
2. Lawrence M.K. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Annonaceae* Juss. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Fascículo 31. 2000. p. 1-5.
3. Leon J. Botánica de los cultivos tropicales. Editorial Agroamerica. San José, Costa Rica. Tercera Ed. Revisado y aumentado. 2000. p. 50.
4. Taha H.A.A., Mohd M.A., Hamid A.A.H. Bioactive Compounds of Some Malaysian *Annonaceae* Species. 4th International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Science Singapore. 2013. p. 5-7.
5. Fero. M.M. Magnoliidae, Nymphaeidae y Ranunculidae de Guinea Ecuatorial y revisión taxonómica del género *Neostenanthera* Exell (*Annonaceae*). facultad de ciencias biológicas. Universidad complutense de Madrid. Tesis Doctoral. 2013.
6. Pathak K., Zaman K. An Overview on Medicinally Important Plant - *Annona reticulata* Linn. Department of Pharmaceutical Sciences. Dibrugarh University. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. V 5(4): 2013-14. p. 299-301.
7. Lim. T.K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. V 1: 2012.
8. Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., Simons A. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide. Version 4.0. 2009. Citado 20 junio 2014.
9. Morton J.F. Fruits of warm climates. Custard Apple. Miami FL. disponible online: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/custard_apple.html citado 2 febrero 2014. p. 80-83.
10. Ocampo S.D., Betancur J.L., Ortiz A., Ocampo C.R. Estudio cromatográfico comparativo de los ácidos grasos presentes en semilla de *Annona cherimolioides* y *Annona muricata* L. Revista Vector. V 2: 2007. p. 103-112.
11. McLaughlin J.L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. Natural Products. V 71: 2008. p. 1311-1321.
12. Morales C.A., González R., Aragon R. Evaluación de la actividad larvívica de extractos polares y no polares de acetogéninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: culicidae). Revista colombiana de Entomología. V 30(2): 2004. p. 187-192.

13. Galvis G.J.H., Ocampo D.M., Ocampo R., Gutiérrez C.P.D.A. Actividad toxica de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimolioides* (*Annonaceae*) sobre *Artemia salina*. boletin científico centro de museos-museo de historia natural. V 2: 2012. p. 17-22.
14. Gupta E.G., Garrett A.R., Martinez A., Robison R.A., O'Neill K.L. The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. Food Research international. V 44(7): 2011. p. 2205-2209.
15. 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. revista Perú medicina experimental salud pública. V 23(4): 2006. p. 265-269.
16. Gupta R.K., Kesari A.N., Murthy P.S., Chandra R., Tandon V., Watal G. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology. V 99(1): 2005. p. 75-81.
17. Nianguang L., Zhihao S., Yuping T., Jianwei C., Xiang L. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from *Annonaceae*. Beilstein Journal of Organic Chemistry. V 4(48): 2008. p. 1-62.
18. Spurr I.B., Brown R.C. Total Synthesis of Annonaceous Acetogenins Belonging to the Non-Adjacent Bis-THF and Non-Adjacent THF-THP Sub-Classes. Revista molecules. V 15(1): 2010. p. 460-501.
19. González E.A.R., Chacón I., Castro M.M., Orozco C.J.A., Riley S.C.A. Alkaloids and acetogenins in *Annonaceae* development: biological considerations. Rev. Bras. Frutic. edição especial. V 36: 2014. p. 1-16.
20. Yang C.W. New research and development on the formosan annonaceous plants. Atta-ur-Rahman. Studies in natural products chemistry. V 33: 2006. p. 957-1018.
21. Feras Q.A., Xiao X.L., McLaughlin J.L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. Journal of Natural Products. V 62(3): 1999. p. 504-540.
22. Fang R.C., Jien L.C., Hui F.C., Ming J.W., Yang C.W. Acetogenins from seeds of *Annona reticulata*. Phytochemistry. V 47(6): 1998. p. 1057-1061.
23. Santos L.A.R., Pimenta L.P.S., Boaventura M.A.D. Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia*. St - Hil. Revista Bras. Pl. med. Boutacatu. V 9(3): 2007. p. 48-51.
24. García A.K.K. Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Mexico, D.F. Tesis de posgrado. 2009.
25. Ramos J.C. Síntesis quimioenzimática de anillos THF presentes en acetogeninas. Departamento de química orgánica. Facultad de química. Universidad de la Republica. Tesis Doctoral. 2014.
26. Castellanos T.A. Oxidación y epoxidación estereoselectiva de α -hidroxi sulfonil dienos y derivados: aplicación a la síntesis de tetrahidrofuranos.

- Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis Doctoral. 2007.
27. Santos L.L.A.R., Pimenta L.P.S., Boaventura M.A.D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*. V 122(4): 2010. p. 1129-1138.
 28. Raynaud L.G.S., Fourneau C., Laurens A., Bories C., Hocquemiller R., Loiseau P.M. in vitro antileishmanial activity of acetogenins from *Annonaceae*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. V 58(6-7): 2004. p. 388-392.
 29. Ohsawa K., Atsuzawa S., Mitsui T., Yamamoto I. Isolation and insecticidal activity of three acetogenins from seeds of pond apple, *Annona glabra* L. *Journal of Pesticide Science*. V 16(1): 1991. p. 93-96.
 30. Díaz M.A. Transformaciones, reactividad y síntesis de protopionas. Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Memoria Doctoral. 2003.
 31. Avelar L.G. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. Departamento de química. Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação Mestre. 2011.
 32. Nani R.M.V. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. facultade de ciencias farmacéuticas. Universidad de São Paulo. Dissertação Mestre. 2007.
 33. Barcia J.C.B. Nuevas aportaciones a la síntesis de compuestos tetracíclicos de naturaleza isoquinolínica y naftoquinónica: 5,12b-dihidro-6H-isoindolo [1,2 a] isoquinolin-8-onas, 5,6,13,13a tetrahydroisoquino [3,2-a] isoquinolin-8-onas, 5H-benzo[b]carbazol-6,11 dionas y compuestos relacionados. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química. Universidade de Santiago de Compostela. 2005.
 34. Leboeuf M., Cavé A., Bhaumika P.K., Mukherjee B., Mukherjee R. The phytochemistry of the *Annonaceae*. *Phytochemistry*. V 21(12): 1982. p. 2783-2813.
 35. Hermine F.D.C., Amorim G.N.C., Bachiega D., Salerno C.C., Nogueira L.F., Bonotto S.V., Oliveira A.M., Yogia Á., Di S.S.M., Avilac P.E., Kirchgatter K., Hrihorowitsch M.P.R. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Tropica*. V 92(3): 2004. p. 261-266.
 36. Tempone A.G., Borborema S.E., de Andrade H.F.J., de Amorim G.N.C., Yogi A., Carvalho C.S., Bachiega D., Lupo F.N., Bonotto S.V., Fischer D.C. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*. V 12(5): 2005. p. 382-390.
 37. Santos P.L.P., Pinto G.B., Takahashia J.A., Silvaa L.G.F., Boaventuraa M.A.D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*. V 10(2-3): 2003. p. 209-212.

38. Martínez V.M., Cueva L.D.G., Estrada R.R., González L.N.M., Ramírez A.T., Heinze G. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. *Phytoterapy*. V 76(7-8): 2005. p. 733-736.
39. Shokeen P., Ray K., Bala M., Tandon V. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually transmitted diseases*. V 32(2): 2005. p. 106-111.
40. Ortuño B.L., Rosa U.E.S., Guzmán A.D.G. Ejecución de bioensayos y asistencia en estudios de impacto ambiental. *Educación en Ciencia y Tecnología del Mar. Guía de aprendizaje*. 2009.
41. Sánchez L., Neira A. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *psidium guajava*. L y *Psidium Guineense*. Sw. Fundación Universitaria Juan de Castellanos. Cultura científica. 2005. p. 40-45.
42. Pino P.O., Lazo F.J. Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista Protección Vegetal*. V 22(1): 2010. p. 34-43.
43. Vanhaecke P., Persoone G. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicological Testing for the Marine Environ*. V 2: 1984. p. 143-157.
44. McLaughlin J.L., Rogers L.L., Anderson J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. V 32: 1998. p. 513-524.
45. Forest and Kim Starr, Starr Environmental, United States 2007. disponible online <http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5294099>. citado 18 junio 2014.
46. López M.A.J., Villa B.M., Madrigal J.A.C. Ciclo de vida de la chinche de encaje *Corythucha gossypii* (F) (Hemiptera: Tingidae) en girasol (*Helianthus annuus* L.). *Revista colombiana de entomología*. V 8: 1982. p. 19-27.
47. Coto A.D., Saunders J.L. Insectos plaga de la guanabana (*Annona muricata*) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. V 61: 2001. p. 60-68.
48. Escobar T.W., Sánchez L.L.A. Control de plagas y enfermedades del guanábano, in manual fruticultura Colombiana guanábano. 1992. p. 61-78.
49. Coto D., Saunders J.L. Insectos plagas de cultivos perennes con énfasis en frutales de América Central. *Manual técnico*. 2004.
50. Skoog A.D., Holler F.J., Crouch S.R. Principios de análisis instrumental. sexta edición, ed. E.M.-H.I.d.E. S.A.U. 2008. p. 730-830.
51. Rubinson JF., Rubinson K.A. Analisis instrumental. edición P.E.S.A. Madrid. 2001. p. 584-673.
52. Quattrocchi O., Abelaira S., Laba R. Análisis cuantitativo. Introducción a la cromatografía líquida de alta performance. aplicación y práctica. 1992. p. 91-92.

53. Gámez R.C.M., Ramírez R.E.J. Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Universidad de la Salle. Bogotá D.C. Trabajo de grado. 2008.
54. Brechelt A. El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA). República Dominicana. Primera edición. 2004.
55. São J.A.R. Anonáceas: produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). Departamento de Fitotecnia e Zootecnia. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 1997. 228-239.
56. Castillo S.L.E., Jiménez O.J.J., Delgado H.M.A. Secondary metabolites of the *Annonaceae*, *solanaceae* and *meliaceae* families used as biological control of insects. *Revista Tropical and Subtropical Agroecosystems*. V 12: 2010. p. 445-462.
57. Hincapié L.C.A., Arango D.L., Ceballos G.M. Actividad insecticida de extractos de semilla de *annona muricata* (anonaceae) sobre *sitophilus zeamais* (coleoptera: curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*. V 34(1): 2008. p. 76-82.
58. Parra H.G.J., García P.C.M., Cotes T.J.M. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *Revista ces medicina*. V 21(1): 2007. p. 47-54.
59. Bobadilla Á.M., Zavaleta E.G., Gil F.F., Pollack V.L., Sisniegas G.M. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller “chirimoya” Y *A. muricata* Linneaus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Revista Perú. Biol.* V 9(2): 2002. p. 64 - 73.
60. Robledo R.P.C., González R., Jaramillo G.I., Restrepo J. Evaluación de la toxicidad de acetogeninas anonáceas sobre ninfas de *Periplaneta americana* L. (Dictyoptera: Blattidae). *Boletín del museo de Entomología de la Universidad del Valle*. V 9(1): 2008. p. 54-61.
61. Gomez R.C., Soto G.A. Productos alternativos para el manejo de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Agron.* V 16(2): 2008. p. 45-50.
62. Cássia S.R., Shikano I., Akhtar Y., Isman M.B. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*. V 29(1): 2010. p. 20-24.
63. Castillo N., González D., Gómez J.V., González C. Efecto de los extractos acuosos de anonáceas sobre *Tetranychus tumidus* Banks. *Métodos en Ecología y Sistemática*. V 8(3): 2013. p. 42-53.
64. Ascencio A.J.I. Evaluación de la actividad insecticida y repelente del extracto obtenido a partir de la semilla de *Annona diversifolia* (anona)

- sobre el *Zabrotes subfasciatus* (gorgojo común del frijol). Facultad de Química y Farmacia. Universidad del Salvador. Trabajo de grado. 2012.
65. Flores L.Y., Martínez M.E. Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira. Trabajo de grado. 2010.
 66. Castro P.L.M., Alzate Z.M.Y. Estudio preliminar de la actividad biológica de extractos de *Annona cherimolia* Mil. Universidad Tecnológica de Pereira. Trabajo de grado. 2008.
 67. Salazar M.A., Soto R.F. Estudio de la actividad biopesticida in vitro de los extractos polares de las semillas de *Annona squamosa* frente a *Culex quinquefasciatus*. Universidad Tecnológica de Pereira. Trabajo de grado. 2012.
 68. Devine G.J., Eza D., Oigusuku E., Furlong M.J. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Revista Perú Medicina Experimental Salud Publica. V 25(1): 2008. p. 74-100.
 69. Kianmatee S., Ranamukhaarachchi S.L. Combining pest repellent plants and biopesticides for sustainable pest Management in Chinese kale. Asia-Pacific Entomology. V 10(1): 2007. p. 69-74.
 70. Nathan S.S., Kandaswamy K., Kim S., Murugan K. The toxicity and behavioural effects of neem limonoids On *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee), the rice leaf folder. Chemosphere. V 62(8): 2006. p. 1381-1387.
 71. Nathan S.S., Chung P.G., Murugan K. Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (the rice leaf folder) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). Ecotoxicology and Environmental Safety. V 64(3): 2006. p. 382-389.
 72. Millán C. Las plantas una opción saludable para el control de plagas, Impreso en I. Rosgal S.A. Dep. Legal. 2008.
 73. Ordoñez M., Pabón H., Martínez A.M., Figueroa A., Lopera M., Probst R., Páez Y., Moreno G., Bustamante C., Pinzón F. Guía ambiental hortofrutícola de Colombia. Viceministerio de ambiente. 2009. p. 4-22.
 74. Gupta R.D., Chakravorty P.P., Kaviraj A. Susceptibility of epigeic earth worm *Eisenia fetida* to agricultural application of six insecticides. Chemosphere. V 84(5): 2011. p. 724-726.
 75. Aamir J., Kumari A., Nadeen K.M., Kumar M.S. Evaluation of the Combinational Antimicrobial Effect of *Annona squamosa* and Phoenix Dactylifera Seeds Methanolic Extract on Standard Microbial Strains. International Research Journal of Biological Sciences, V 2(5): 2013. p. 68-73.
 76. Rajini. R., Nisha J.M.R. Potential bioactivity of *Annona reticulata* L. leaf extract and it's compound identification by GCMS. V 3(1): 2013. p. 202-211.
 77. Martínez N., Concepción A. Estudio del mecanismo de acción de una acetogenina de *A. muricata*. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Tesis. 2009.

78. Karunaratne M.M.S.C., Arukwatta A.P.K.M.C.P. Efficacy of three plant species on the mortality and food consumption of *Epilachna vigintioctopunctata*. Department of Zoology. University of Sri Jayewardenepura. Nugegoda, Sri Lanka. *Vidyodaya Journal of Science*. V 14: 2009. p. 167-176.
79. Prasad G.J, Amruta S.W., Sanjay S.P., Prakash G.C. Antioxidant, antimicrobial activity and in silico PASS prediction of *Annona reticulata* Linn. Root extract. Beni-Suef University journal of Basic and Applied Sciences, V 3(2): 2014. p. 140–148.
80. Tobasura A.I. Una visión integral de la biodiversidad en Colombia. 2006. disponible online: http://lunazul.ucaldas.edu.co/downloads/cd41ee01Revista2_4.pdf. citado 31 agosto 2014
81. Varón E.H., Moreira M.D., Corredor J.P. Efecto de *Corythucha gossypii* sobre las hojas de higuera: criterios para su muestreo y control con insecticida. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria. V 11(1): 2010. p. 41-47.
82. Murillo A.J. Las *Annonaceae* de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. *Biota Colombia*. V 2(1): 2001. p. 49-58.
83. Gómez L.A.F., Molina R.S.L. Evaluación preliminar de la actividad insecticida contra *puto barberi* (cochinilla harinosa) del extracto etanólico de las semillas desengrasadas de *Annona muricata*. Universidad Tecnológica de Pereira. Trabajo de grado. 2012.
84. Chen Y., Chen J.W., Li X. Mono tetra-hydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry Letters*, 2012 5(1): p. 33-36.
85. Ratnayake S., Rupprecht J.K., Potter W.M., McLaughlin J.L. Evaluation of the pawpaw tree, *Asimina triloba* (*Annonaceae*), as a commercial source of the pesticidal annonaceous acetogenins. *Journal of Economic Entomology*, 1992. 85(6): p. 2353-2356.
86. Mahioua V., Roblot F., Fournet A., Hocquemiller R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (*Annonaceae*). *Phytochemistry*. V 54(7): 2000. p. 709-716.
87. Torres O., Santafé G., Angulo A., Villa H., Zuluaga J., Doria M. Obtención de alcaloides a partir de corteza y madera de la especie *rollinia pittieri* (*Annonaceae*). *Revista scientia et technica*. V 1(33): 2007. p. 333-336.
88. Egydio M.A.P., Valvassoura A.T., Santos D.Y.A.C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* mart. From cerrado, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*. V 46: 2013. p. 145-151.
89. Suau R., Cabezudo B., Rico R., Nájera F., Lopez R.J.M. Direct Determination of Alkaloid Contents in *Fumaria* Species by GC-MS. *Phytochem Analysis*. V 13: 2002. p. 363-367.

90. Arango A.G.J., Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín. 2002.
91. Oviedo V., García M., Díaz C., Marder M., Costa M., Rincón J., Sánchez C., Guerrero M. Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad de tipo ansiolítica en ratones. Universidad Nacional de Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. V 38(1): 2009. p. 105-120.
92. Hurtado, N.C., Evaluación de la actividad insecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona muricata* L. (*Annonaceae*) cultivada en el eje cafetero frente al *Corythucha gossypii* (chinche de encaje). Universidad tecnológica de Pereira. Trabajo de grado. 2014.
93. El-Gindy A. HPLC and chemometric assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of diprophylline, phenobarbitone and papaverine hydrochloride. *Farmaco*. V 60(9): 2005. p. 745-753.
94. Kursinszki L., Sárközi Á., Kéry Á., Szöke É. Improved RP-HPLC Method for Analysis of Isoquinoline Alkaloids in Extracts of *Chelidonium majus*. *Chromatographia*. V 63(13): 2006. p. S131-S135.
95. Eun K.K., Eun K.J., Sang B.H., Jee H.J., Jongki H. HPLC Separation of Isoquinoline Alkaloids for Quality Control of *Corydalis* species. *Bull. Korean Chemical Society*. V 32(10): 2011. p. 3597-3602.
96. Kimbonguila A., Nzikou J.M., Matos L., Loumouamou B., Ndanguic.B., Pambou-Tobi N.P.G., Abena A.A., Silou Th., Scher J., Desobry S. Proximate Composition and Physicochemical Properties on the Seeds and Oil of *Annona muricata* grown In Congo-Brazzaville. *Journal of Environmental and Earth Sciences*. V 2(1): 2010. p. 13-18.
97. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Guía para la interpretación del error muestral en términos del coeficiente de variación e intervalo de confianza estimado. Diseño – DSO. Dirección de Metodología y Producción Estadística – DIMPE. 2014. p 1-2.
98. Zeng L., Ye Q., Oberlies N.H., Shi G., Gu Z.M., He K., McLaughlin J.L. Recent Advances in Annonaceus Acetogenins. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy. Purdue University. Natural Product Reports. V 13(4): 1996. p. 275-306.
99. Katavic P.L. *Chemical investigations of the alkaloids from the plants of the family elaeocarpaceae*. School of Science/ Natural product Discovery (NPD). Faculty of Science. Griffith University. 2005.
100. Flores E., Andrés M., Vela P., Eliana P., Ríos M.E., RUIZ R.S.G. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “Jengibre” de la ciudad de Chanchamayo. Región Junín. Perú. *Revista Médica Vallejana*. V 5(1): 2008. p. 50–64.
101. Sangster A.W., Stuart K.L. Ultraviolet spectra of alkaloids. Department of Chemistry, University of the West Indies, Kingston, Jamaica. V 65(1): 1995. p. 69-130.
102. Narzullaev A.S., Yunusov M.S., Yunusov S.Y. Alkaloids of *Delphinium dictyocarpum*. *Chemistry of Natural Compounds*. V 8(4): 1972. p. 491-493.

103. Humberto C.N. "Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales". Monografía. 2011. p. 1-58.
104. Satyanarayana T., Gangarao B., Surendra G., Rajesh K. Pharmacognostical and phytochemical studies of *Annona reticulata* linn. International journal of research in pharmacy and chemistry. V 3(2): 2013. p. 2231-2781.
105. Nayak J.B. Efficacy of Crude extracts of *Annona reticulata* and *Pongamia pinnata* as larvicidal for the Management of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say Diptera: Culicidae. International journal of research in botany. V 4(1): 2014. p. 1-5.
106. Martínez M.M., Ocampo D.M., Galvis J.H., Valencia A. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanolitos de *Bauhinia variegata* L. revista cubana de plantas medicinales. V 16(4): 2011. p. 313-323.
107. González P.Y., Aportela G.P. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. Centro de Toxicología y Biomedicina. Anuario Toxicología. V 1(1): 2001. p. 104-108.
108. Rojas I, Rosalba S, Arvizu G, Muñoz D, Pérez D, Sucilla M. Análisis químico y biológico preliminar de las semillas de *Annona muricata* L. (*Annonaceae*). Facultad de tecnologías. Revista de investigación de la universidad Simón Bolívar. V 3: 2004. p. 7-12.
109. Lo X., Zhang X., Lin T. Predation and functional responses of *stethorus siphonulus kapur* (coleoptera, coccinellidae) on the citrus red mite. Institute of Agricultural Information. Chinese Academy of Agricultural Sciences. V 18(1): 2009.
110. Cortes D., Moreno L., Párraga J., Galán A., Cabedo N. Nuevos farmacos inspirados en *Annonaceas*. Revista brasileira de fruticultura. V 36: 2014. p. 22-31.
111. Mullin C.A., González C.A., Gutiérrez C., Reina M., Eichenseer H., Hollister B., Chyb S. Antifeedant effects of some novel terpenoids on chrysomelidae beetles: Comparisons with alkaloids on an alkaloid-adapted and nonadapted species. Journal of Chemical Ecology. V 23(7): 1997. p. 1851-1866.
112. Park I.K., Lee H.S., Lee S.G., Park J.D., Ahn Y.J. Antifeeding Activity of Isoquinoline Alkaloids Identified in *Coptis japonica* Roots Against *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Galerucinae). Economic Entomology. V 93(2): 2000. p. 331-335.
113. Grycová L., Dostál J., Marek R. Quaternary protoberberine alkaloids. Phytochemistry. V 68(2): 2007. p. 150-175.
114. Lima M.D. Perfil cromatografico dos extractos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. a través de cromatografía líquida de alta eficiencia. Instituto de Química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas. Tesis Maestría en Química e Biotecnología. 2007.

115. Pérez L.D. Plaguicidas botánicos: una alternativa a tener en cuenta. Instituto de investigación de sanidad vegetal. Fitosanidad. V 16(1):2012. p. 51-59.
116. Pérez M.A. Cadena de transporte de electrones mitocondrial, una nueva visión. Hospital real y provincial de nuestra señora de gracia. Zaragoza. Discurso leído en la solemne apertura del curso de la academia de farmacia reino de Aragón el día 6 de febrero de 2013.
117. Azimova S.S., Yunusov M.S. Natural Compounds: Alkaloids. New York: Springer. 2013.

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla (A) Reporte de suelos de fertilidad realizado por Multilab Agroanalitica

Ph	N	MO	P	K	Ca	Mg	Textura
	%		mg Kg ⁻¹	cmol(+) Kg ¹			
7,4	0,08	1,4	433	0,93	18,88	2,86	Arcilloso

Tabla (B). Máximos de absorbanca de dos acetogeninas aisladas de semillas de *Annona reticulata*.

Estructura	λ_{max}	fuelle	Ref.
<p>Muricatocina B</p>	214	Semillas de <i>Annona reticulata</i>	98
<p>Beticulataina_2</p>	207	Semillas de <i>Annona reticulata</i>	98

Tabla (C). Máximos de absorbancia de alcaloides isoquinolínicos

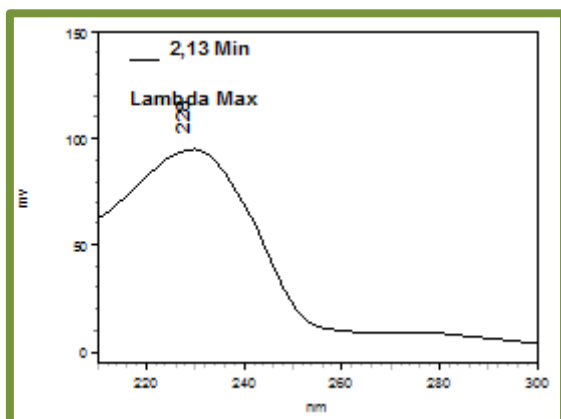
Tipo de alcaloides		Máximos de absorbancia (nm)	Ref.
Isoquinolinico simple	tetraidroisoquinolíνας	233, 278, 285, 298, 320, 284, 310, 315.	[101]
	Bencilisoquinolíνας	225,283, 285,287	[101]
Aporfinicos		217, 220, 247, 268, 270, 283, 304, 315, 329	[101, 102]
proaporfinicos		209, 232, 284	[117]
Protoberberinas		230, 267, 344, 352	114

Tabla (D). Actividad larvica frente a *A. salina* de algunas especies de la familia Annonaceae.

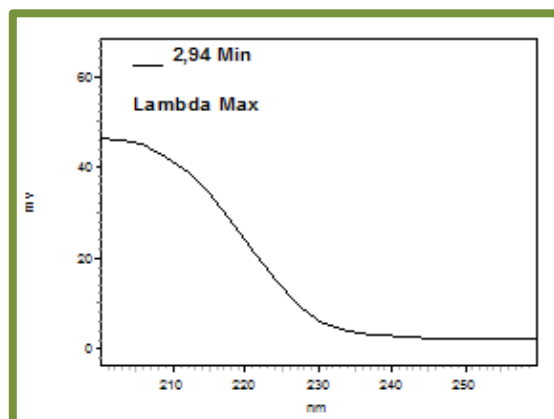
Especie	CI ₅₀ (μg/mL) Extracto etanólico	CI ₅₀ (μg/mL) fracción soluble en MeOH	Ref.
<i>A.squamosa</i>	1,960	1,471	[67]
<i>A.cherimolia</i> <i>Mill</i>	1,516	1,351	[66]
		3,415	1,214
<i>A.muricata</i>	0,231	----	[83]
	1,7191	----	[92]
<i>A. crassiflora</i>	23,85	----	[37]
<i>A. nutans</i>	0,20	----	[37]

Anexo 2. Espectros UV obtenidos por DAD para cada pico del cromatograma obtenido en el análisis del extracto etanólico (crudo) por CLAE

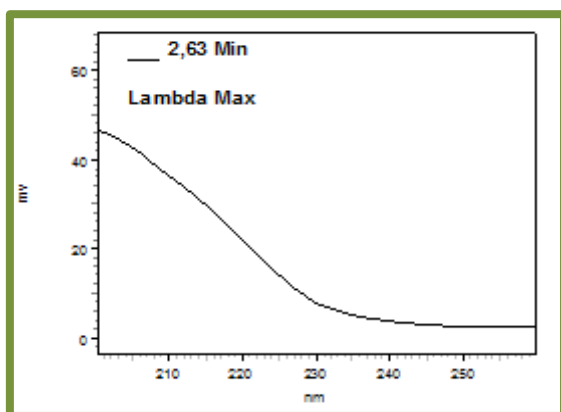
1. Espectro UV de la acetogenina correspondiente al tiempo de retención de 2,13 minutos



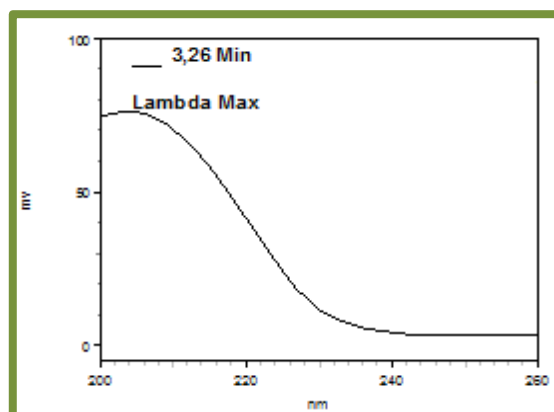
3. Espectro UV de la acetogenina correspondiente al tiempo de retención de 2,94 minutos



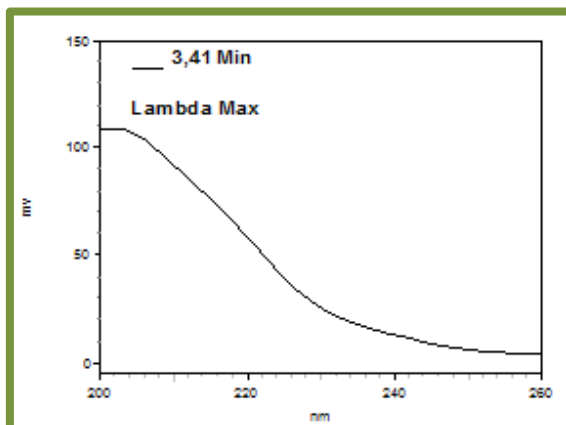
2. Espectro UV de la acetogenina correspondiente al tiempo de retención de 2,63 minutos



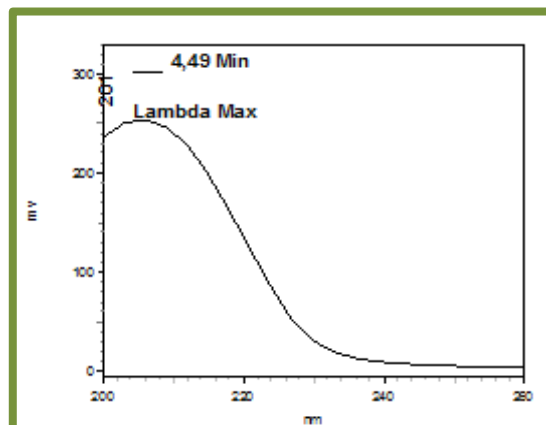
4. Espectro UV de la acetogenina correspondiente al tiempo de retención de 3,26 minutos



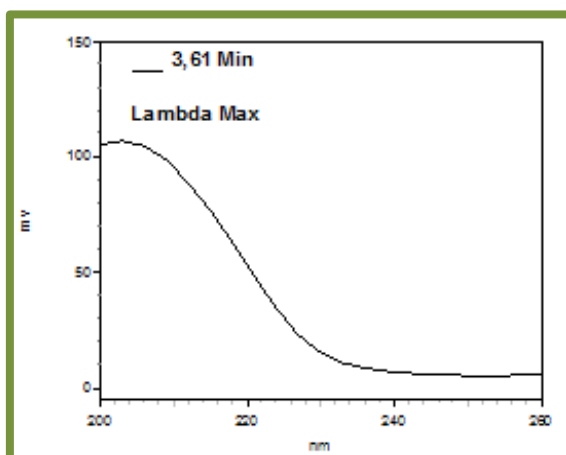
5. Espectro UV de la acetogenina correspondiente al tiempo de retención de 3,41 minutos



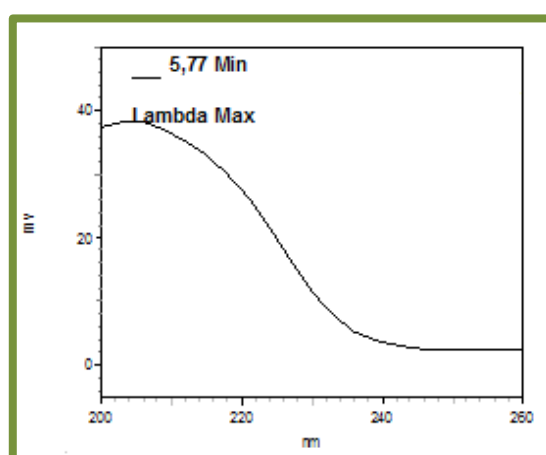
7. Espectro UV de la acetogenina correspondiente al tiempo de retención de 4,49 minutos



6. Espectro UV de la acetogenina correspondiente al tiempo de retención de 3,61 minutos

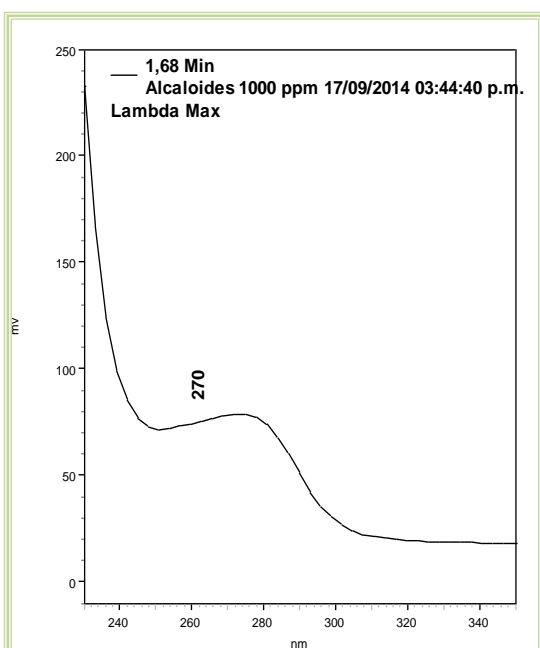


8. Espectro UV de la acetogenina correspondiente al tiempo de retención de 5,77 minutos

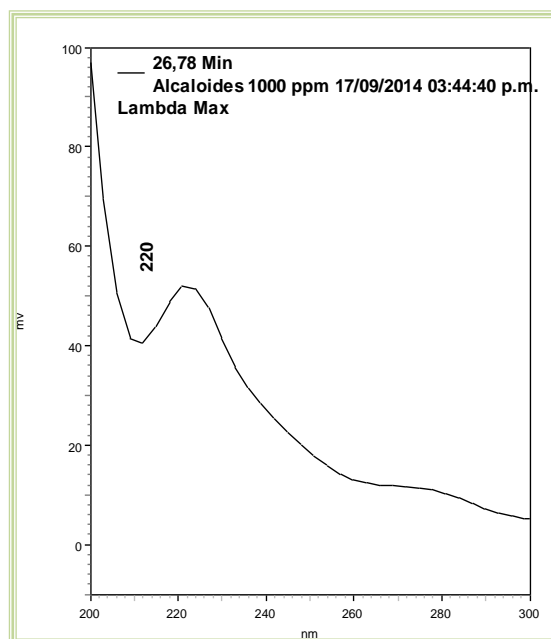


Anexo 3. Espectros UV obtenidos por DAD para cada pico del cromatograma obtenido en el análisis enriquecido en alcaloides (F007) por CLAE.

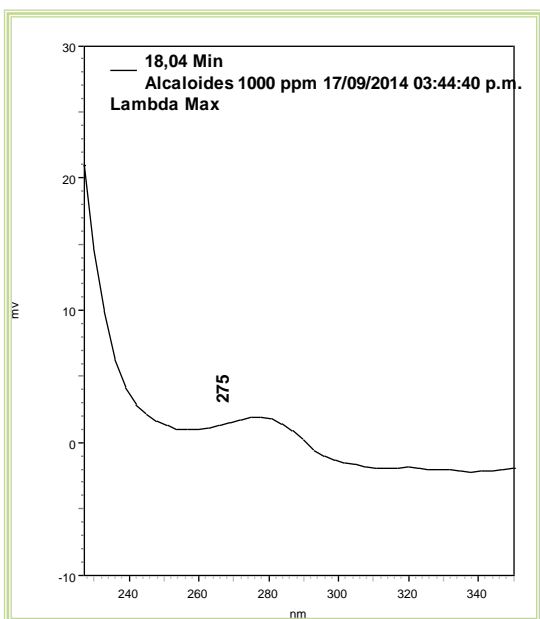
Pico 1



Pico 3



Pico 2



Pico 4

