



© 2016

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 15 (2): 99 - 111

ISSN 0717 7917

www.blacpma.usach.cl

Artículo Original | Original Article

Citotoxicidad/Capacidad antiradicalaria *in-vitro* y caracterización estructural por GC-MS/¹H-¹³C-RMN de los aceites esenciales de hojas de árboles joven/adulto de *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal de Repelón (Atlántico, Colombia)

[*in-vitro* Cytotoxicity/Anti-Radical Capability and structural characterization by GC-MS/¹H-¹³C- NMR of the leaves essential oils of young/old trees of *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal from Repelón (Atlántico, Colombia)]

Amner Muñoz-Acevedo¹, Solangel Aristizábal-Córdoba¹, Juan D Rodríguez¹, Erika A Torres¹,
Andrés M Molina¹, Ricardo G Gutiérrez¹ & Vladimir V Kouznetsov²

¹Grupo de Investigación en Química y Biología, Departamento de Química y Biología, Universidad del Norte,
Barranquilla, Colombia

²Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
Contactos / Contacts: Amner Muñoz-Acevedo - E-mail address: amnerm@uninorte.edu.co

Abstract: *Annona purpurea* is a plant used in ethnomedicine in the northern region of Colombia, which has no scientific reports on the composition of their essential oil (EO) and biological activities. In this work, the leaves EO of young/old trees were characterized by GC-MS and NMR, and their antiradical/cytotoxic properties were evaluated. β-Eudesmol (68.9%) and α-eudesmol (16.8%), and germacrene D (55.6%) and bicyclogermacrene (20.3%), were the representative compounds of the leaves EO of young/old trees, respectively. The NMR analysis showed the distinctive signals of the main constituents identified. The TAA values (mmol Trolox®/kg ES) obtained from the EO of young/old trees were 165 ± 8 and 602 ± 38. The EO of young/old trees evaluated on human lymphocytes were “moderately toxic” with LC₅₀ (μg/mL) of 145.5 ± 0.7 and 346 ± 8. Finally, the cytotoxicity in human erythrocytes revealed that the old tree EO was not haemolytic (LC₅₀ > 1000 μg/mL, 4.3 ± 0.6%); while the young tree EO was hemolytic (LC₅₀ 490 ± 48 μg/mL).

Keywords: *Annona purpurea*, β-Eudesmol, Germacrene D, Antiradical capacity, Cytotoxicity in lymphocytes, Cytotoxicity in erythrocytes

Resumen: *Annona purpurea* es una planta empleada en etnomedicina, en la región norte de Colombia, que no tiene reportes científicos relacionados con la composición de su AE y sus actividades biológicas. En este trabajo, los AE de hojas de árboles joven/adulto se caracterizaron por GC-MS y RMN y se evaluaron sus propiedades antiradicalarias/citotóxicas. Los AE de hojas de árboles joven/adulto estuvieron representados por β-eudesmol (68.9%) y α-eudesmol (16.8%), y germacrene D (55.6%) y bicyclogermacrene (20.3%), respectivamente. El análisis por RMN mostró las señales distintivas de los constituyentes mayoritarios identificados. Los valores de TAA (mmol Trolox®/kg SE) obtenidos por los AE de árboles joven/adulto fueron 165 ± 8 y 602 ± 38. Los AE de árboles joven/adulto evaluados sobre linfocitos humanos fueron “moderadamente tóxicos” con valores de CL₅₀ (μg/mL) de 145.5 ± 0.7 y 346 ± 8. Finalmente, la citotoxicidad en eritrocitos humanos reveló que el AE de árbol adulto no fue hemolítico (CL₅₀ > 1000 μg/mL, 4.3 ± 0.6%); mientras que, el AE de árbol joven fue hemolítico (CL₅₀ 490 ± 48 μg/mL).

Palabras clave: *Annona purpurea*, β-Eudesmol, Germacrene D, Capacidad antiradicalaria, Citotoxicidad en linfocitos, Citotoxicidad en eritrocitos.

Recibido | Received: 24 de Noviembre de 2014

Aceptado | Accepted: 27 de Julio de 2015

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 20 de Enero de 2016

Publicado en línea | Published online: 30 de Marzo de 2016

Declaración de intereses | Declaration of interests: AM-A y RGG agradecen a la Universidad del Norte, por el apoyo financiero a través del proyecto “Bioprospección y Diversidad Genética de Especies Vegetales Promisorias del Bosque Seco Tropical del Caribe Colombiano” (Código 2013-DI0024) que forma parte del Área Estratégica en Biodiversidad, Servicios Ecosistémicos y Bienestar Humano. EAT agradece al Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias (2014).

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: A Muñoz-Acevedo, S Aristizábal-Córdoba, JD Rodríguez, EA Torres, AM Molina, RG Gutiérrez, VV Kouznetsov. 2016. Citotoxicidad/Capacidad antiradicalaria *in-vitro* y caracterización estructural por GC-MS/¹H-¹³C-RMN de los aceites esenciales de hojas de árboles joven/adulto de *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal de Repelón (Atlántico, Colombia). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 15 (2): 99 – 111.

LISTA DE ABREVIATURAS

AE – Aceite esencial; MWHD – Hidrodestilación asistida por la radiación de micro-ondas; GC-MS – cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; I_R – índice de retención con programación lineal de temperatura; RMN – resonancia magnética nuclear; BHA – Butilhidroxianisol; ABTS⁺ – catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico; FBS – Suero fetal bovino; SDS – Dodecil sulfato de sodio; D.I. – Diámetro interno; d.f. – Espesor de fase estacionaria; @ – gradiente de temperatura; EI – ionización electrónica; CDCl₃ – cloroformo deuterado; TAA – Capacidad antioxidante total; ca. – aproximadamente; SE – Sustancia evaluada; CL₅₀ – Concentración letal al 50%; RBC – Red Blood Cells; rpm – revoluciones por minuto.

INTRODUCTION

Annonaceae es una familia pantropical con cerca de 128 géneros y 2300 especies (900 spp., en América) (Kessler, 2011) que crecen en alturas menores de 2000 m (Murillo, 2001). La mayoría de las especies son árboles (2-20 m) con frutos los cuales se utilizan como alimento (Condit et al., 2011) y sus hojas y ramas, en medicina tradicional (Bele et al., 2011). Uno de los géneros de mayor importancia económica es *Annona* cuyas especies se distinguen por tener frutos con carpelos fusionados (Kelly, 2000; Vidal-Hernández et al., 2014). Dentro de las especies de *Annona* más importantes y estudiadas (composición química y bioactividades) se encuentran *A. muricata* L., *A. squamosa* L., *A. cherimola* Mill., *A. reticulata* L. entre otras (Gupta, 2004; Bermejo et al., 2005; Pandey & Barve, 2011; Ragasa et al., 2012; Alitonou et al., 2013; Ferreira et al., 2013; Chavan et al., 2014; González-Esquinca et al., 2014; Ngueguim et al., 2014; Ravaomanarivo et al., 2014; Solomon-Wisdom et al., 2014).

Por su parte, *A. purpurea*, la especie de interés, tiene algunos reportes sobre la química de los metabolitos fijos (alcaloides aporfínicos y acetogeninas) de hojas, tallo y semillas así como de las actividades biológicas de sus extractos y sustancias aisladas, e.g., citotoxicidad en línea celular tumoral, acción antiplaquetaria, antibacteriana y leishmanicida (Cepleanu et al., 1993; Chang et al., 1998a; Chang et al., 1998b; Chávez & Mata, 1999; Chang et al., 2000; Cárdenas et al., 2005; Luna-Cazares y González-Esquinca, 2008).

En Colombia, el género *Annona* comprende

26 especies que incluye a *Annona purpurea* Moc & Sessé ex Dunal (árbol de 2-10 m), que en la región norte colombiana se encuentra en los departamentos de Sucre, Córdoba, Bolívar y Atlántico (Murillo, 2001; Rodríguez et al., 2012). Las hojas y corteza de esta especie se han utilizado en las comunidades campesina/afrodescendiente, preparadas en baños y cociones, con fines mágico-religiosos y para tratar estados febriles, inflamatorios y como antimalárico (Gómez-Estrada et al., 2011; Jiménez-Escobar, 2012; Vásquez-Londoño, 2012). La especie se le conoce como Matimbá, Guanábana Matimbá, Guanábana cimarrona, Guanacóna, Gallina Gorda, Gallina ciega, Mal olor (debido a olor “desagradable” que presentan sus hojas) (Rodríguez et al., 2012; Vásquez-Londoño, 2012). En otros países latinoamericanos se le denomina llama, Chincua (México), Toreta, Soncoya (Costa Rica), Sincuya (El Salvador), Soncuya (Honduras), Guanábana Torete (Panamá), Catiguire, Tucuria (Venezuela) (Salazar & Soihet, 2001; Grandtner, 2005; Grandtner & Chevrette, 2013).

De acuerdo con los usos etnobotánicos anteriormente mencionados, se hace necesario estimar un grado de “seguridad” de la utilización de la planta, relacionada con estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre linfocitos y eritrocitos, por el empleo de las hojas en cocción (ingesta) y baños (uso tópico), respectivamente; junto con la valoración de la capacidad antiradicalaria asociada al uso de las mismas para los procesos inflamatorios. Asimismo, la comunidad que ha empleado *A. purpurea* señala que las hojas tienen un “olor desagradable”, lo que resulta de interés para el análisis de metabolitos secundarios volátiles. Así, el propósito de este trabajo fue caracterizar químicamente los componentes responsables del olor de la hojas (relativo a la composición de los aceites esenciales) por GC-MS, de plantas joven/adulta de *A. purpurea*, del municipio de Repelón (Atlántico, Colombia) y determinar algunas bioactividades *in-vitro*, e.g., capacidad antiradicalaria (método catión-radical ABTS+) y toxicidad en modelo celular humano (linfocitos y eritrocitos), de estos mismos AE.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Los reactivos utilizados fueron diclorometano (grado analítico, J.T. Baker), etanol (grado analítico, J.T. Baker), metanol (grado analítico, J.T. Baker), dimetilsulfóxido (grado ACS, Merck), Trolox®

(ácido-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-arboxílico, 97%, Sigma), α -tocoferol (97%, Sigma), butilhidroxianisol (BHA, 99%, Sigma), ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, 99%, Sigma), persulfato de potasio (97%, Merck), medio RPMI 1640, [+] L-Glutamine (Gibco®) Suero fetal bovino (FBS Certificado, Gibco®), Solución *buffer* PBS (pH 7.4), SDS (Dodecil sulfato de sodio, 99%, Merck), azul Tripán (C₃₄H₂₄N₆Na₄O₁₄S₄, Sigma), Penicillin Streptomycin (Gibco®).

Material vegetal

Las muestras (en estado fresco) de hojas de árboles joven/adulto de *A. purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal se recolectaron en los meses de noviembre (2013) y junio (2014) en la zona rural del municipio de Repelón (Atlántico), en las coordenadas 75° 10'33.33" longitud Oeste y 10° 32' 24.13" latitud Norte. La identificación taxonómica (N° COL579240) fue realizada en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia por J. Murillo.

Aislamiento de aceites esenciales

El aislamiento de los AE se llevó a cabo por el método de hidrodestilación en un equipo tipo Clevenger modificado con reservorio *Dean-Stark*, colocando el material vegetal (200 g) en un balón de 1 L con agua (400 mL). El calentamiento del sistema se realizó a través de la radiación de micro-ondas en un horno convencional (marca Whirlpool modelo WMS07ZDHS - Potencia de salida 700 W) y se efectuaron cuatro extracciones consecutivas, con tiempos de 15 min. El AE se separó por decantación, se secó con Na₂SO₄ anhidro y una alícuota del AE recolectado (50 μ L) se diluyó con 1 mL de CH₂Cl₂ para su análisis por GC-MS.

Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas

Los AE de hojas de *A. purpurea* se analizaron en un cromatógrafo de gases Trace1310 acoplado a un detector selectivo de masas ISQ (Thermo Fisher Scientific, Inc.), con inyector *split/splitless* (relación *split* 1:20) y columna Rxi®-1ms (30 m x 0.25 mm D.I. x 0.50 μ m d.f., Restek Co., Bellefonte) con fase estacionaria 100% poli-dimetilsiloxano. El gas de arrastre utilizado fue helio (99.999%) a 1 mL/min. La rampa de calentamiento utilizada en el horno cromatográfico fue: 50° C (5 min) @ 2° C/min hasta

150° C (10 min) y @ 3° C/min hasta 250° C (5 min). Los espectros de masas se obtuvieron por ionización electrónica (EI, 70 eV) en un analizador másico cuadrupolar con rango de masas *m/z* 40-350, en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). Las temperaturas de la fuente de iones y línea de transferencia fueron 230° C y 250° C, respectivamente. Los datos cromatográficos y espectroscópicos se procesaron con el *software Thermo Xcalibur™* (Versión 2.2 SP1.48, Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Los índices de retención fueron obtenidos usando los datos de hidrocarburos alifáticos saturados entre C₇-C₃₅. La identificación de los metabolitos secundarios fue realizada por comparación de los espectros de masas con las bases de datos NIST11, NIST Retention Index y Wiley9 y por comparación de los índices de retención reportados en la literatura (Joulain & König, 1998; Adams, 2004; NIST Chemistry WebBook, 2014).

Análisis por resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN de hidrógeno (¹H) y de carbono (¹³C) de los AE fueron adquiridos a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente, en un espectrómetro Bruker avance-400. Los desplazamientos químicos se reportaron en ppm usando TMS como referencia interna (escala δ) y se empleó cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente y patrón interno (¹H: δ 7.26 ppm; ¹³C: δ 77.00 ppm). Las constantes de acoplamiento (*J*) se expresaron en Hz.

Capacidad antiradicalaria frente al catión-radical ABTS⁺

La estimación de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox®, expresada como capacidad antioxidante total (TAA, mmol Trolox®/kg SE - Sustancia evaluada) de los AE y los antioxidantes "control" (α -tocoferol y BHA) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Muñoz-Acevedo *et al.* (2011). Para estas mediciones se utilizó un lector multipozo multimodal FLUOstar Omega (BMG LabTech, Germany). Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado.

Citotoxicidad in-vitro sobre linfocitos humanos

El aislamiento de los linfocitos se realizó de acuerdo con los procedimientos de Márquez *et al.* (2008) y Calderón-Segura *et al.* (2012) utilizando sangre periférica de donantes sanos (18-30 años). De este

tipo de sangre se separaron las células monocitos y se resuspendieron en medio RPMI 1640, enriquecido con suero fetal bovino (15%) y antibiótico (penicilina- estreptomycin 1%). La suspensión celular fue ajustada a *ca.* 3000 células/ μ L y se sometieron a diferentes concentraciones de los AE entre 100-1000 μ g/mL (preparadas a partir de una solución estándar del AE de 10000 μ g/mL en DMSO), durante 30 min a 37° C. Después de la incubación una alícuota de la muestra se mezcló con una solución de azul Tripán 0.4% (1:1). La viabilidad celular porcentual se determinó utilizando la cámara de Neubauer en un microscopio de contraste ZEIS (Microscopio Nikon, 40 X), discriminando células vivas (blancas) y células muertas (azules). Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado. Los donantes voluntarios firmaron el permiso de consentimiento ético.

Actividad hemolítica in-vitro sobre eritrocitos humanos

Para la evaluación de la actividad hemolítica se siguió la metodología propuesta por Yang *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Se tomaron muestras de sangre periférica de pacientes sanos en tubos heparinizados de la cual se separaron los eritrocitos (Red Blood Cells - RBC) por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min. A partir de este procedimiento se preparó una suspensión de RBC al 4 % en PBS (pH 7.4) y se sometió a diferentes concentraciones de los AE entre 100-1000 μ g/mL, durante 30 min a 37° C. Luego de la incubación, la solución se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se tomó el líquido sobrenadante, al cual se le midió la absorbancia a 540 nm, en el lector multipozo FLUOstar Omega. Todos los experimentos se llevaron a cabo por quintuplicado y se utilizaron como controles positivo y negativo soluciones de SDS al 1% y de *buffer* PBS (pH 7.4), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de los AE por GC-MS

En los AE de las hojas de los árboles joven/adulto de *A. purpurea* se identificaron por GC-MS, 6-13

compuestos (cantidades relativas > 0.9%). Estos correspondieron *ca.* 100% del total. El análisis composicional, los I_R calculados y reportados en la literatura, las cantidades relativas y rendimientos porcentuales de los AE de las hojas se presentan en la **Tabla 1**. Según este análisis, se encontró que β -eudesmol (68.9%) y α -eudesmol (16.8%) fueron los componentes mayoritarios del AE de hojas del árbol joven y, que germacreno D (55.6%) y biciclogermacreno (20.3%) caracterizaron al AE de hojas del árbol adulto. Además, de la diferencia basada en la química de los dos AE, estos también difirieron en sus características físicas así: el AE de las hojas del árbol joven fue un sólido blanco en forma de agujas; mientras que, el AE de las hojas del árbol adulto fue un líquido traslúcido ligeramente amarillo. Los rendimientos respectivos de los dos AE fueron 0.06% y 0.1%. Las corrientes iónicas totales reconstruidas y los espectros de masas de los componentes mayoritarios de los dos AE se muestran en las **Figuras 1 y 2**.

Debido a que en la literatura científica revisada no se encontraron reportes sobre la composición química del AE de las hojas de *A. purpurea* ni sobre sus actividades biológicas, la discusión se basará en los reportes de las especies estrechamente relacionadas. Así, de acuerdo con la revisión realizada por Fournier *et al.* (1999) sobre los AE de la familia Annonaceae, hasta la fecha de su publicación los AE de las hojas de las especies de esta familia se caracterizaron por su alto contenido de hidrocarburos sesquiterpénicos, siendo el más frecuente el cariofileno. Al comparar con los AE bajo estudio, existió cierta correlación, en cuanto a la familia de compuestos mayoritarios (sesquiterpenos) para el AE de las hojas del árbol adulto, aunque difirió en el compuesto representativo (germacreno D); mientras que, para el AE de hojas del árbol joven no hubo coincidencia. Así, se reporta por primera vez a los eudesmoles (α - y β -) como componentes mayoritarios (~ 86%) del AE de una de las especies perteneciente al género *Annona*, a pesar de que estos sesquiterpenoides se han identificado en otras especies del género, pero en cantidades relativamente bajas.

Tabla 1
Análisis composicional por GC-MS de los AE de hojas de árboles joven/adulto
de *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal.

Constituyentes	I _{R-Calc}	I _{R-Lit}	Cantidad relativa, %	
			I	II
α -Pinenol	929	931	1.4	3.7
Sabinol	965	964	----	tr
β -Pinenol	972	970	1.7	3.2
β -Mircol	977	979	----	tr
<i>trans</i> - β -Ocimenol	1042	1041	----	0.9
Bicicloelemol	1327	1327	----	tr
δ -Elemol	1333	1334	----	tr
α -Cubebol	1342	1344	----	tr
α -Copaenol	1378	1376	tr	1.5
β -Bourbonol	1387	1386	tr	tr
β -Cubebol	1383	1384	tr	1.4
β -Elemol	1387	1387	----	0.9
β -Cariofilol	1423	1424	tr	5.3
β -Copaenol	1429	1430	----	tr
γ -Elemol	1433	1432	----	tr
α -Humulol	1454	1456	----	tr
<i>allo</i> -Aromadendrol	1460	1459	tr	1.9
Germacrenol D	1481	1480	----	55.6
Biclogermacrenol	1493	1499	----	20.3
α -Muurolool	1495	1494	----	tr
γ -Cadinol	1508	1507	----	tr
δ -Cadinol	1513	1514	----	1.5
Germacrenol B	1533	1534	----	2.1
Elemol	1534	1535	tr	----
<i>trans</i> -Nerolidol	1547	1548	tr	1.9
Espatulol	1578	1577	8.5	----
Óxido de cariofilol	1576	1576	2.6	----
γ -Eudesmol	1625	1626	tr	----
τ -Cadinol	1628	1628	----	tr
τ -Muurolool	1627	1628	----	tr
α -Cadinol	1636	1637	----	tr
β -Eudesmol	1642	1641	68.9	----
α -Eudesmol	1644	1643	16.8	----
7- <i>epi</i> - α -Eudesmol	1647	1644	----	----
Benzoato de benzilo	1766	1765	----	tr
Benzoato de feniletilo	1845	1848	----	tr
Carisona	1923	1926	tr	----
Total, %			100	100
Rendimiento AE, %			0.06	0.1

Calc. – Calculado; Lit. – Literatura; I – AE hojas de árbol joven;
 II – AE hojas de árbol adulto

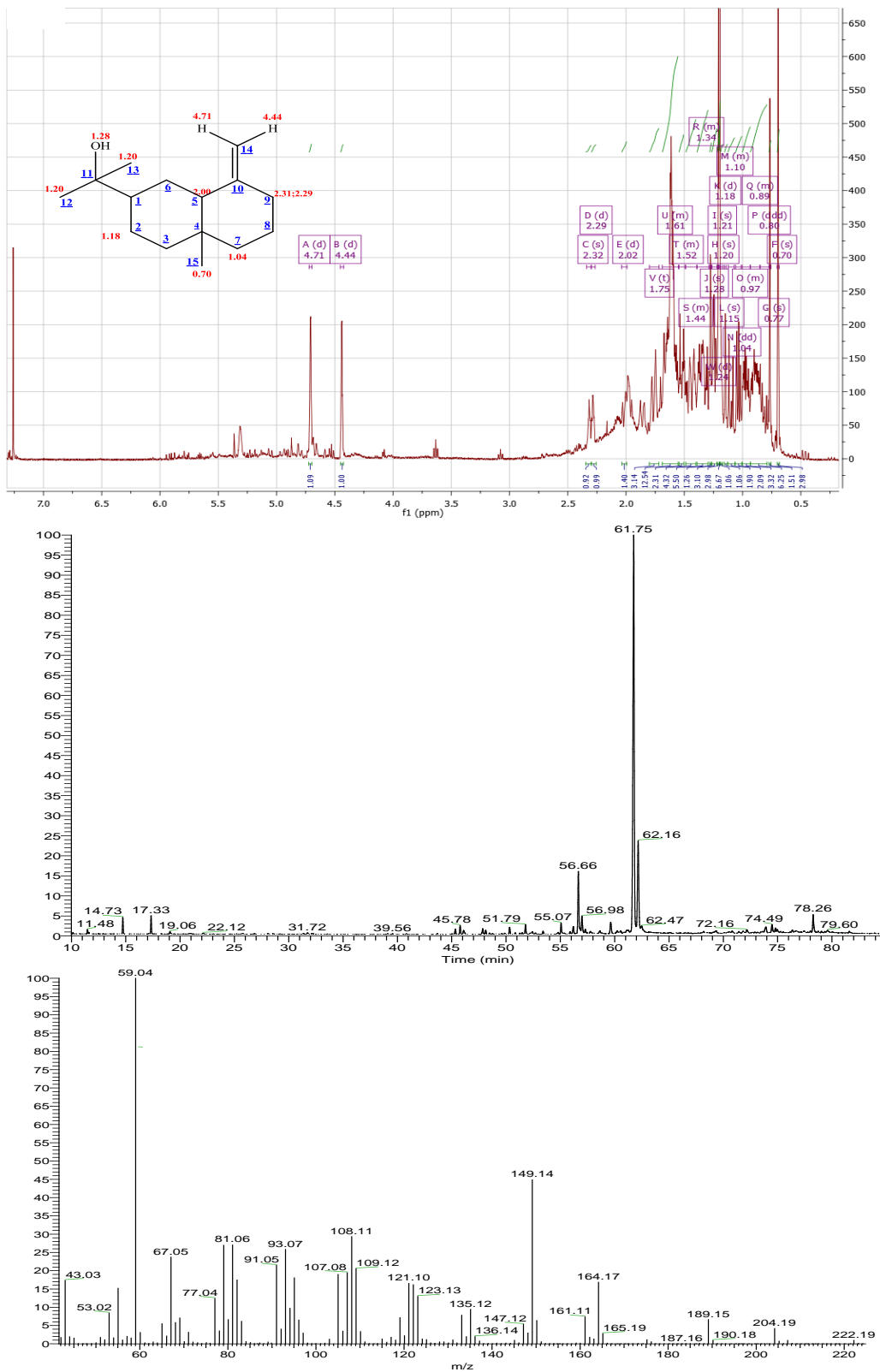


Figura 1

Espectro de ¹H-RMN y corriente iónica total reconstruida del AE de hojas de árbol joven de *Annona purpurea* junto con el espectro de masas (EI, 70 eV) del β-eudesmol

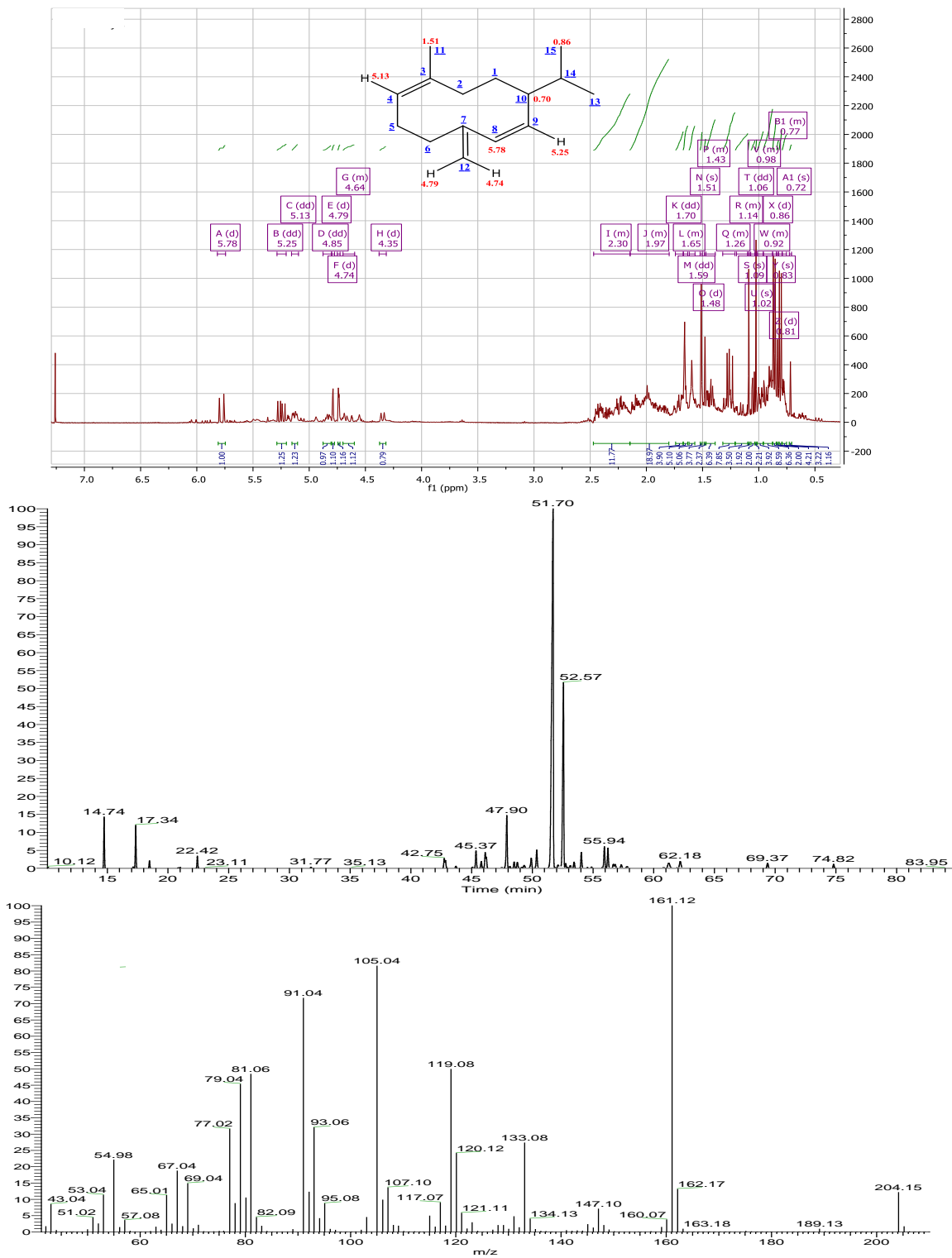


Figura 2

Espectro de ¹H-RMN y corriente iónica total reconstruida del AE de hojas de árbol adulto de *Annona purpurea* junto con el espectro de masas (EI, 70 eV) del germacreno D

Asimismo, la comparación de la composición química entre los AE bajo estudio con los de otras especies difirieron en algunos casos, con los componentes identificados y por otro lado, en cuanto a sus cantidades relativas: así, los AE de las especies de *A. cherimola* (México, Venezuela y Egipto), *A. muricata* (Benin, Nigeria, Vietnam y Egipto), *A. reticulata* (Nigeria y Vietnam), *A. coriacea*, *A. senegalensis*, *A. glabra* (Vietnam y Egipto), *A. squamosa* (Vietnam y Egipto), *A. crassiflora*, *A. vepretorum*, *A. pickelii*, *A. salzmännii* y *A. foetida* (Brasil) estuvieron caracterizados respectivamente por el alto contenido de biclogermacreno (18.2%), germacreno D (57.7%) y β -elemeno (25.0%); β -cariofileno (13.6-38.9%), eugenol (30.2%), β -pineno (20.6%) y bicloelemeno (23.6%); acetato de *trans*, *trans*, farnesilo (19.0%), *ar*-turmerona (12.0%) y β -elemeno (5.9-16.6%), β -cariofileno (8.3-14.9%), germacreno D (9.3-22.8%); biclogermacreno (39.8%); citronelal (30.0%), geranial (17.2%) y citronelol (14.8%); β -cariofileno (21.5-37.1%), germacreno D (17.7%); β -cariofileno (24.5%) y β -gurjuneno (42.5%); α -amorfeno (43.6%) y E-cariofileno (17.7%); biclogermacreno (43.7%) y espatulenol (11.4%); biclogermacreno (20.3-45.4%) y E-cariofileno (14.6-27.8%), δ -cadineno (22.6%); biclogermacreno (35.1%) y E-cariofileno (14.2%) (Ríos et al., 2003; Kossouh et al., 2007; Costa et al., 2009; Siqueira et al., 2011; Ameen et al., 2011; Ramírez et al., 2011; Costa et al., 2011; Costa et al., 2012; Costa et al., 2013; Elhawary et al., 2013; Oliani et al., 2013; Owolabi et al., 2013; Thang et al., 2013; Sirena et al., 2014).

Finalmente, en la literatura científica revisada sólo se encontró una especie (*Guatteriopsis friesiana*) perteneciente a la familia Annonaceae que contiene un AE con alto contenido de eudesmolos (particularmente β -eudesmol (51.6%)) (Costa et al., 2008).

Caracterización estructural de los AE por ^1H - ^{13}C -RMN

De acuerdo con el análisis por GC-MS (Tabla 1), los componentes más abundantes para los AE de las hojas de los árboles joven/maduro fueron el β -eudesmol y el germacreno D, en cantidades superiores al 55%. Para confirmar la presencia de los dos componentes mayoritarios y obtener los perfiles característicos de los AE, éstos fueron analizados por ^1H - ^{13}C -RMN (Figuras 1 y 2). Las señales registradas en los perfiles de los AE y la asignación de las

mismas relacionadas con β -eudesmol y germacreno D se presentan a continuación.

AE hojas árbol joven

Sólido blanco en forma de agujas. Componentes mayoritarios: β -eudesmol (~ 69%) - $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ GC-MS (EI, 70 eV), m/z (%): 222.19 (M^+ , 2), 59.04 (100) y α -eudesmol (~ 17%) - $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$. GC-MS (EI, 70 eV), m/z (%): 222.19 (M^+ , 4), 59.04 (100). Señales características. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4.71 (d), 4.44 (d), 2.32 (t), 2.29 (t), 2.02 (t), 1.75 (t), 1.70-1.30 (m), 1.28 (s), 1.24 (d), 1.21 (s), 1.20 (s), 1.18 (dd), 1.15 (s), 1.13-1.08 (m), 1.04 (dd), 1.00-0.80 (m), 0.77 (s), 0.70 (s) ppm; ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ 151.3, 121.2, 105.5, 73.1, 50.1, 49.9, 49.6, 46.8, 42.0, 41.3, 40.3, 38.0, 37.0, 36.0, 32.3, 27.7, 27.3, 27.3, 26.9, 25.2, 24.5, 23.6, 23.1, 22.6, 22.5, 21.3, 16.4, 15.7 ppm.

Las señales que correspondieron a β -eudesmol fueron ^1H - δ 4.71 (1H_a , "d", $J=1.6$ Hz, $\text{H}_{2ab}\text{C}=\text{C}$), 4.44 (1H_b , "d", $J=1.6$ Hz, $\text{H}_{2ab}\text{C}=\text{C}$), 2.32 (1H_a , "t", $J=4.0$ Hz, $=\text{C}-\text{CH}_{2ab-}$), 2.29 (1H_b , "t", $J=3.6$ Hz, $=\text{C}-\text{CH}_{2ab-}$), 2.02 (1H , "t", $J=2.8$ Hz, $=\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_2)-\text{C}-$), 1.70-1.30 (9H , "m", $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}-$), 1.28 (1H , s, $-\text{OH}$), 1.20 (6H , s, $-\text{C}-(\text{CH}_3)_2$), 1.18 (1H_a , dd, $-\text{C}-\text{CH}_{2ab}-\text{C}$), 1.04 (1H_a , dd, $-\text{C}-\text{CH}_{2ab}-\text{C}$), 0.70 (3H , s, $-\text{CH}_3$) ppm; ^{13}C - δ 151.3 ($-\text{C}=\text{CH}_2$), 105.5 ($-\text{C}=\text{CH}_2$), 73.1 ($-\text{C}-(\text{CH}_3)_2$), 49.9 ($-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}=\text{C}$), 49.6 ($-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-$), 42.0 ($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 41.3 ($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 37.0 ($=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 36.0 ($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 27.3 ($-\text{C}-(\text{CH}_3)_2$), 27.3 ($-\text{C}-(\text{CH}_3)_2$), 25.2 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 23.6 ($-\text{CH}_3$), 22.5 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 16.4 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) ppm. Las señales remanentes de los espectros de ^1H - ^{13}C -RMN adquiridos pertenecieron al α -eudesmol.

AE hojas árbol maduro

Líquido traslúcido ligeramente amarillo. Componentes mayoritarios: germacreno D (~56%) - $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$. GC-MS (EI, 70 eV), m/z (%): 204.15 (M^+ , 12), 161.11 (100) y biclogermacreno (~20%) - $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$. GC-MS (EI, 70 eV), m/z (%): 204.15 (M^+ , 10), 121.09 (100). Señales características. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.78 (d), 5.25 (dd), 5.13 (dd), 4.85 (dd), 4.79 (d), 4.74 (d), 4.72-4-60 (m), 4.35 (d), 2.47-2.15 (m), 2.14-1.80 (m), 1.70 (dd), 1.67-1.63 (m), 1.59 (t), 1.51 (s), 1.48 (d), 1.47-1.39 (m), 1.32-1.21 (m), 1.20-1.10 (m), 1.09 (s), 1.06 (dd), 1.02 (s), 1.01-0.96 (m), 0.95-0.88 (m), 0.86 (d), 0.83 (s), 0.81 (d), 0.79-0.75 (m), 0.72 (s) ppm; ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ 149.0, 135.7, 134.1, 133.7, 129.8,

126.6, 124.8, 109.2, 53.1, 41.3, 40.9, 37.3, 34.6, 32.9, 30.2, 29.4, 27.1, 26.9, 26.6, 26.1, 23.7, 20.9, 19.5, 16.7, 16.0, 15.6 ppm.

Las señales características para germacreno D fueron ^1H - δ 5.78 (**1H**, d, $J=16$ Hz, =C-HC=CH-CH-), 5.25 (**1H**, dd, $J=16$, $J=10$ Hz, =C-HC=CH-CH-), 5.13 (**1H**, dd, $J=11.2$, $J=4.8$ Hz, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$ -), 4.79 (**1H_a**, d, $J=2.4$ Hz, -C=CH_{2ab}), 4.74 (**1H_b**, d, $J=2.4$ Hz, -C=CH_{2ab}), 2.47-1.80 (**7H**, m, -CH₂-CH₂-CH-CH-, =CH-CH₂-CH₂-C=), 1.51 (**3H**, s, CH₃-C=CH-), 1.47-1.10 (**3H**, m, -CH₂-CH-CH-(CH₃)₂), 0.86 (**6H**, d, $J=6.8$ Hz, -CH-(CH₃)₂) ppm; ^{13}C - δ 149.0 (-C=CH₂), 135.7 (H₃C-C=CH-), 134.1 (=C-HC=CH-CH-), 133.7 (=C-HC=CH-CH-), 129.8 (H₃C-C=CH-), 109.2 (-C=CH₂), 53.1 (-CH-CH-(CH₃)₂), 40.9 (=C(CH₃)-CH₂-CH₂-), 34.6 (-CH₂-CH₂-C=), 32.9 (-CH-CH-(CH₃)₂), 29.4 (-CH₂-CH₂-CH-), 27.1 (=HC-CH₂-CH₂-), 20.9 (-CH=C-CH₃), 19.5 (-CH-(CH₃)₂), 19.5 (-CH-(CH₃)₂) ppm. Las señales

restantes de los espectros de ^1H - ^{13}C -RMN adquiridos pertenecieron al bicilogermacreno.

Las señales y sus multiplicidades junto con los acoplamientos de todos los hidrógenos y carbonos olefínicos y metílicos en los espectros de ^1H - ^{13}C -RMN de los AE coincidieron con las mismas multiplicidades, señales y acoplamiento de los espectros de RMN de β -eudesmol y germacreno D, de acuerdo con los reportes de la literatura (Maatooq, 2002; Kusuma *et al.*, 2004; Cascón *et al.*, 2012), confirmando así la presencia de estos dos compuestos en los AE.

Actividades biológicas in vitro

Después de la caracterización estructural de los aceites volátiles de *A. purpurea*, estos fueron evaluados para estimar *in vitro* sus capacidades antiradicalarias y sus citotoxicidades. Los resultados de estas determinaciones junto con los valores de las sustancias control se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2
Capacidad anti-radicalaria, actividad hemolítica y citotoxicidad en linfocitos de los AE de hojas de *Annona purpurea* junto con las sustancias "control"

Sustancia evaluada	TAA (mmol Trolox®/kg SE)	Actividad hemolítica, CL ₅₀ (µg/mL)	Citotoxicidad en linfocitos, CL ₅₀ (µg/mL)
α -Tocoferol (Control)	2157 ± 63	NA	NA
BHA (control)	7162 ± 147	NA	NA
Metanol (Control)	NA	NA	(30 ± 2 %, 20 %)
SDS (Control)	NA	(100 ± 0 %, 1000 µg/mL)	ND
AE hojas jóvenes	165 ± 8	490 ± 48	145.5 ± 0.7
AE hojas adultas	602 ± 38	(4.3 ± 0.6 %, 1000 µg/mL)	346 ± 8

NA – No aplica

Capacidad antioxidante equivalente al Trolox®

Según los valores determinados de TAA (mmol Trolox®/kg AE) de los dos AE evaluados (165 ± 8 - AE árbol joven, 602 ± 38 - AE árbol adulto), las reactividades de los AE hacia el catión radical ABTS⁺, como una medida de su capacidad antioxidante, no fueron mayores a los de las sustancias "control"; no obstante, la capacidad antioxidante del AE del árbol adulto fue aproximadamente 4 veces mayor que la del AE del árbol joven.

La baja reactividad de mostrada por los dos AE hacia el catión-radical ABTS⁺, posiblemente

estuvo correlacionada con la ausencia de compuestos capaces de donar electrones y protones (fenoles), simultáneamente (Sánchez-Moreno, 2002; Prior *et al.*, 2005; Graßmann, 2005). Al comparar estos resultados con los reportados en la literatura para especies relacionadas se encontró similitud, en cuanto a la tendencia de una baja capacidad antiradicalaria, con los AE de *A. muricata* y *A. squamosa* (con altos contenidos de sesquiterpenoides) evaluados por el método del radical DPPH· (Alitonou *et al.*, 2013), el cual tiene un mecanismo similar al del catión-radical ABTS⁺ (Huang *et al.*, 2005).

Citotoxicidad en linfocitos

La estimación de la citotoxicidad en linfocitos mostró que los AE estuvieron catalogados como “moderadamente tóxicos” puesto que sus CL_{50} fueron mayores que 100 $\mu\text{g/mL}$ pero menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (145.5 \pm 0.7 - AE árbol joven, 346 \pm 8 - AE árbol adulto); sin embargo, el AE del árbol joven fue dos veces más activo que el AE árbol adulto.

Los componentes responsables de la actividad mostrada por el AE del árbol joven son los eudesmoles, que de acuerdo con un reporte de literatura, los dos eudesmoles (α - y β -) junto con el AE que los contuvo mostraron alta actividad antitumoral y baja toxicidad sistémica *in vitro* e *in vivo* (Ma et al., 2008; Britto et al., 2012).

La comparación de los resultados obtenidos para el AE del árbol adulto con los reportes de literatura para los AE de especies relacionadas e.g., *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. muricata*, *A. squamosa* (con alto contenido de hidrocarburos sesquiterpénicos), evaluados sobre diferentes líneas celulares cancerígenas (mama (MCF-7), colon (CACO-2) e hígado (HEPG2)) (Elhawary et al., 2013; Owolabi et al., 2013) mostró similitudes, en cuanto a una moderada citotoxicidad.

Actividad hemolítica en eritrocitos

La citotoxicidad en eritrocitos según la actividad hemolítica, como una medida de irritabilidad, permitió determinar que el AE de árbol adulto no fue hemolítico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$); mientras que, el AE de árbol joven fue moderadamente hemolítico ($CL_{50} 490 \pm 48 \mu\text{g/mL}$, ca. 50% respecto a SDS 1%). La actividad hemolítica mostrada por el AE de árbol joven tuvo cierta correspondencia con la toxicidad mostrada en linfocitos humanos y aporta información sobre el cuidado en posibles aplicaciones de dicho AE. Para el caso del AE de árbol adulto, la no actividad hemolítica fue útil para excluir la posibilidad de toxicidad adicional asociada.

De esta manera, se reportan por primera vez la capacidad anti-radicalaria frente ABTS^+ , la citotoxicidad en linfocitos y actividad hemolítica en eritrocitos humanos de los AE de las hojas de árboles joven/adulto de *A. purpurea*.

CONCLUSIONES

Se reportaron por primera vez las diferencias composicionales de los AE de hojas de árbol joven y adulto de *A. purpurea* junto con sus bajas capacidades antiradicalarias (método ABTS^+) y

citotoxicidades moderadas a bajas en células primarias humanas (linfocitos y eritrocitos). Así, β -eudesmol (68.9%) y germacreno D (55.6%) fueron los constituyentes mayoritarios para los AE de árbol joven y adulto. La capacidad antiradicalaria de los AE no fue mayor a la de las sustancias “control”; sin embargo, la capacidad antioxidante del AE del árbol adulto fue aproximadamente cuatro veces mayor que la del AE del árbol joven. Con base en el ensayo de citotoxicidad en linfocitos, los AE evaluados se catalogaron como “moderadamente tóxicos” (1000 $\mu\text{g/mL} > CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$), siendo el AE del árbol joven dos veces más activo que el AE árbol adulto. Finalmente, la citotoxicidad en eritrocitos según la actividad hemolítica, como una medida de irritabilidad, permitió determinar que el AE de árbol adulto no fue hemolítico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$); mientras que el AE de árbol joven fue moderadamente hemolítico (~50% respecto a SDS 1%).

AGRADECIMIENTOS

AM-A y RGG agradecen a la Universidad del Norte, por el apoyo financiero a través del proyecto “Bioprospección y Diversidad Genética de Especies Vegetales Promisorias del Bosque Seco Tropical del Caribe Colombiano” (Código 2013-DI0024) que forma parte del Área Estratégica en Biodiversidad, Servicios Ecosistémicos y Bienestar Humano. EAT agradece al Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias (2014). VVK agradece respectivamente a Colciencias (RC-0346-2013), a la UIS y UniNorte por la realización del año sabático 2014 (Contrato 4/2013).

REFERENCIAS

- Adams RP. 2004. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Alitonou GA, Tchobo FP, Sessou P, Avlessi F, Menut C, Sohounhloue DCK. 2013. Chemical composition, antiradical and anti-inflammatory activities of four Annonaceae from Benin. **Int J Pharmaceut Chem Biol Sci** 3: 914 - 923.
- Ameen OM, Usman LA, Oganija FS, Hamid AA, Muhammed NO, Zubair MF, Adebayo SA. 2011. Chemical composition of leaf essential oil of *Annona senegalensis* Pers.

- (Annonaceae) growing in North Central Nigeria. **Int J Biol Chem Sci** 5: 375 - 379.
- Bele MY, Focho DA, Egbe EA, Chuyong BG. 2011. Ethnobotanical survey of the uses of Annonaceae around mount Cameroon. **Afr J Plant Sci** 5: 237 - 247.
- Bermejo A, Figadère B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E, Cortes D. 2005. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Nat Prod Rep** 22: 269 - 303.
- Britto AC, de Oliveira AC, Henriques RM, Cardoso GM, Bomfim DS, Carvalho AA, Moraes MO, Pessoa C, Pinheiro ML, Costa EV, Bezerra DP. 2012. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Med** 78: 409 - 414.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Martínez-Valenzuela C, Carbajal-López Y, Calderón-Ezquerro M del C, Cortés-Eslava J, García-Martínez R, Flores-Ramírez D, Rodríguez-Romero MI, Méndez-Pérez M, Bañuelos-Ruíz E. 2012. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides news. **J Toxicol** 2012: 612 - 647.
- Cárdenas DL, Lora JA, Márquez RL, Blanco PJ. 2005. Actividad leishmanicida de *Annona purpurea*. **Actual Biol** 27: 35 - 37.
- Cascón O, Touchet S, Miller DJ, González V, Faraldos JA, Allemann RK. 2012. Chemoenzymatic preparation of germacrene analogues. **Chem Commun** 48: 9702 - 9704.
- Cepleanu F, Ohtani K, Hamburger M, Hostettmann K, Gupta MP, Solis P. 1993. Novel acetogenins from the leaves of *Annona purpurea*. **Helv Chim Acta** 76: 1379 - 1388.
- Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. 1998a. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. **Phytochemistry** 49: 2015 - 2018.
- Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. 1998b. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. **J Nat Prod** 61: 1457 - 1461.
- Chang FR, Chen CY, Wu PH, Kuo RY, Chang YC, Wu YC. 2000. New alkaloids from *Annona purpurea*. **J Nat Prod** 63: 746 - 748.
- Chavan SS, Shamkuwar PB, Damale MG, Pawar DP. 2014. A comprehensive review on *Annona reticulata*. **Int J Pharmaceut Sci Res** 5: 45 - 50.
- Chávez D, Mata R. 1999. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. **Phytochemistry** 50: 823 - 828.
- Condit R, Pérez R, Daguerre N. 2011. **Trees of Panama and Costa Rica**. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Costa EV, Texeira SD, Marques FA, Duarte MCT, Delarmelina C, Pinheiro MLB, Trigo JR, Maia BHLNS. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteriaopsis* species. **Phytochemistry** 69: 1896 - 1899.
- Costa EV, Pinheiro MLB, Silva JRA, Maia BHLNS, Duarte MCT, Amaral ACF, Machado GMC, Leon LL. 2009. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Quim Nova** 32: 78 - 81.
- Costa EV, Dutra LM, de Jesus HC, Nogueira PC, Moraes VR, Salvador MJ, Cavalcanti SC, dos Santos RL, Prata AP. 2011. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Nat Prod Commun** 6: 907 - 912.
- Costa EV, Dutra LM, Nogueira PC, Moraes VR, Salvador MJ, Ribeiro LH, Gadelha FR. 2012. Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. **Nat Prod Commun** 7: 265 - 266.
- Costa EV, Dutra LM, Salvador MJ, Ribeiro LH, Gadelha FR, de Carvalho JE. 2013. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumor and trypanocidal activities. **Nat Prod Res** 27: 997 - 1001.
- Elhawary SS, El Tantawy ME, Rabeah MA, Fawaz NE. 2013. DNA fingerprinting, chemical composition, antitumor and antimicrobial activities of the essential oils and extractives of four *Annona* species from Egypt. **J Nat Sci Res** 3: 59 - 68.
- Ferreira LE, Castro PMN, Chagas ACS, França SC,

- Beleboni R. 2013. *In vitro* anthelmintic of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experim Parasitol** 134: 327 - 332.
- Fournier G, Leboeuf M, Cavé A. 1999. Annonaceae essential oils: a review. **J Essent Oil Res** 11: 131 - 142.
- Gómez-Estrada H, Díaz-Castillo F, Franco-Ospina L, Mercado-Camargo J, Guzmán-Ledezma J, Medina JD, Gaitán-Ibarra R. 2011. Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. **J Ethnobiol Ethnomed** 7: 27 - 37.
- González-Esquinca AR, De-La-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno M, Orozco-Castillo JA, Riley-Saldaña CA. 2014. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Rev Brasil Frutic** 36: 1 - 16.
- Graßmann, J. 2005. **Terpenoids as plant antioxidants**. En: Plant hormones. Volume 72. Gerald Litwack (Ed.). Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Grandtner MM. 2005. **Elsevier's dictionary of trees**. Volume I. Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Grandtner MM, Chevrette J. 2013. **Dictionary of trees. South America. Nomenclature, taxonomy and ecology**. Volume 2. Academic Press (Elsevier). San Diego, USA.
- Gupta M. 2004. Investigaciones farmacognósticas sobre la flora panameña. **An R Acad Nac Farm** 70: 839 - 883.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Agric Food Chem** 53: 1841 - 1856
- Jiménez-Escobar ND. 2012. **Uso y conocimiento de árboles en la comunidad campesina de la bahía de Cispatá, departamento de Córdoba-Colombia**. Tesis de Maestría en Ciencias - Biología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Joulian D, König WA. 1998. **The atlas of spectral data of sesquiterpenes hydrocarbons**. Ed. E.B.-Verlag, Hamburg, Germany.
- Kelly LM. 2000. **Annonaceae Juss.** In: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Vol. 31. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Kessler PJA. 2011. **Annonaceae**. In: Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Series title - The families and genera of vascular plants. K Kubitzki, JG Rohwer & V Bittrich (Eds.). Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kossouoh C, Moudachirou M, Adjakidje V, Chalchat JC, Figuérédo G. 2007. Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin. **J Essent Oil Res** 19: 307 - 309.
- Kusuma IW, Ogawa T, Itoh K, Tachibana S. 2004. Isolation and identification of an antifungal sesquiterpene alcohol from *Amboyna* wood. **Pak J Biol Sci** 7: 1735 - 1740.
- Luna-Cazáres LM, González-Esquinca AR. 2008. Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia* Safford y *Annona purpurea* Mociño & Sessé ex Dunal. **Polibotánica** 25: 120 - 125.
- Ma EL, Li YC, Tsuneki H, Xiao JF, Xia MY, Wang MW, Kimura I. 2008. Beta-eudesmol suppresses tumour growth through inhibition of tumour neovascularisation and tumour cell proliferation. **J Asian Nat Prod Res** 10: 159 - 167.
- Márquez F, Pareja A, Márquez F, Martínez M. 2008. Evaluación citotóxica y clastogénica en linfocitos humanos de un 5 α ,8 α -epidioxiesterol. **Vitae** 15: 274 - 278.
- Maatooq GT. 2002. Microbial transformation of a β - and γ -eudesmols mixture. **Z Naturforsch** 57c: 654 - 659.
- Murillo J. 2001. Las Annonaceae de Colombia. **Biota Colomb** 2: 49 - 58.
- Muñoz-Acevedo A, Vargas Méndez L, Stashenko E, Kouznetsov V. 2011. Improved Trolox® equivalent antioxidant capacity assay for efficient and fast search of new antioxidant agents. **Anal Chem Lett** 1: 86 - 102.
- NIST Chemistry WebBook. 2015. National Institute of Standards and Technology. [En línea] <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [Consultado Diciembre 2015].
- Ngueguim TF, Massa ZB, Kouamouo J, Tchuidjang A, Dzeufiet DPD, Kamtchoung P, Dimo T. 2014. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol** 151: 784 - 790.
- Oliani J, Siqueira CAT, Sartoratto A, Queiroga CL, Moreno PRH, Reimão JQR, Tempone AG, Diaz IEC, Fischer DCH. 2013. Chemical

- composition and *in vitro* antiprotozoal activity of the volatile oil from leaves of *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae). **Pharmacology** 3: 8 - 15.
- Owolabi MS, Ogundajo AL, Dosoky NS, Setzer WN. 2013. The cytotoxic activity of *Annona muricata* leaf oil from Badagary, Nigeria. **Am J Essent Oil Nat Prod** 1: 1 - 3
- Pandey N, Barve D. 2011. Phytochemical and Pharmacological review on *Annona squamosa* Linn. **Int J Res Pharmaceut Biomed Sci** 2: 1404 - 1412.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem** 53: 4290 - 4302.
- Ragasa CY, Geneveve S, Torres OB, Don MJ, Shen CC. 2012. Acetogenins from *Annona muricata*. **Phcog J** 4: 32 - 37.
- Ramírez R, Mora F, Avila J, Rojas L, Usubillaga A, Segnini S, Carmona J. 2011. Composición química y actividad larvicida del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de Los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.). **Rev Fac Farm** 53: 2 - 6.
- Ravaomanarivo LHR, Razafindraleva HA, Raharimalala FN, Rasoahantaveloniaina B, Ravelonandro PH, Mavingui P. 2014. Efficacy of seed extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata* (Annonaceae) for the control of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Asian Pac J Trop Biomed** 4: 798 - 806.
- Ríos MY, Castrejón F, Robledo N, León I, Rojas G, Navarro V. 2003. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). **J Mex Chem Soc** 47: 139 - 142.
- Rodríguez GM., Banda-R K, Reyes SP, Estupiñán AC. 2012. Lista comentada de las plantas vasculares de bosques secos prioritarios para la conservación en los departamentos de Atlántico y Bolívar (Caribe colombiano). **Biota Colomb** 13: 8 - 39.
- Salazar R, Soihet C. 2001. *Annona purpurea* Moc & Sesse ex Dunal. Nota Técnica No. 146. En: Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina. Volumen 2. Serie técnica. Manual técnico CATIE N° 48. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Proyecto de Semillas Forestales. Turrialba, Costa Rica.
- Sánchez-Moreno C. 2002. Review: methods use to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci Technol Int** 8: 121 - 137.
- Siqueira CAT, Oliani J, Sartoratto A, Queiroga CL, Moreno PRH, Reimão JQ, Tempone AG, Fischer DCH. 2011. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity. **Rev Bras Farmacogn** 21: 33 - 40
- Sirena JT, Flach A, da Costa LAMA, Silva CSF, Peixoto CRM, de Moura NF. 2014. Chemical composition of the essential oil from *Annona crassiflora*. **Chem Nat Comp** 50: 543 - 544.
- Solomon-Wisdom GO, Ugoh SC, Mohammed B. 2014. Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Annona muricata* (L) leaf extract. **Am J Biol Chem Pharmaceut Sci** 2: 1 - 7
- Thang TD, Dai DN, Hoi TM, Ogunwande IA. 2013. Study on the volatile oil contents of *Annona glabra* L., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L. and *Annona reticulata* L., from Vietnam. **Nat Prod Res** 27: 1232 - 1236.
- Vásquez-Londoño CA. 2012. **Clasificación por categorías térmicas de las plantas medicinales, en el sistema tradicional de salud de la comunidad afrodescendiente de Palenque San Basilio, Bolívar, Colombia.** Tesis de Maestría en Medicina Alternativa - Medicina. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Vidal-Hernández L, López-Moctezuma L, Vidal-Martínez NA, Ruiz-Bello R, Castillo-Rocha DG, Chiquito-Contreras RG. 2014. La situación de las Annonaceae en México: principales plagas, enfermedades y su control. **Rev Bras Frutic** 36: 44 - 54.
- Yang ZG, Sun HX, Fang WH. 2005. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. **Vaccine** 23: 5196 - 5203.