

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA BIOACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE SEMILLAS de *Annona cherimolia* DE LA FAMILIA Annonaceae.

Preliminary bioactivity study of *Annona cherimolia* seeds extracts from Annonaceae family.

RESUMEN

Se evaluó la bioactividad de extractos metanólicos (F005) y etanólicos (F001) de semillas de *Annona cherimolia* desengrasadas y sin desengrasar. El bioensayo predictivo se realizó frente a nauplios de *Artemia salina* y el confirmativo con larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus*. El extracto etanólico (F001) que corresponde al extracto crudo total de semillas desengrasadas presentó la mayor actividad frente a las larvas de *C. quinquefasciatus* con una CL_{50} de 0,102 $\mu\text{g/mL}$ en un tiempo de exposición de 24 horas. El análisis por Cromatografía Líquida de Alta eficiencia (CLAE) de este extracto, mostró la presencia de posiblemente 14 acetogeninas en el extracto etanólico y particularmente de bulatacina según el tiempo de retención del estándar.

PALABRAS CLAVES: acetogeninas, *Annona cherimolia*, *Artemia salina*, bulatacina, CL_{50} , *Culex quinquefasciatus*, Annonaceae.

ABSTRACT

It was evaluated the bioactivity of methanolic (F005) and ethanolic (F001) extracts obtained from Annona cherimolia seeds. It was made using original seeds and ungreased seeds. Brine shrimp nauplis was used as a preliminary bioassay and fourth instar of larvae of Culex quinquefasciatus as a confirmative bioassay. The higher activity in front of fourth stage larvae of C. quinquefasciatus was exhibited by total raw ethanolic extract of ungreased seeds (F001). The LC_{50} obtained was 0,102 $\mu\text{g/mL}$ in 24 hours of exposure. Chromatographic analysis by High Performance liquid chromatography (HPLC) showed 14 acetogenin compounds in the ethanolic extract, and bullatacin was probably one of them by time standard retention.

KEYWORDS: acetogenins, *Annona cherimolia*, Brine shrimp, bullatacin, LC_{50} , *Culex quinquefasciatus*, Annonaceae.

1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de pesticidas y herbicidas sintéticos poco degradables, trae como consecuencia problemas en el medio ambiente y en la salud del hombre. En la actualidad, los bioinsecticidas han alcanzado gran importancia debido a que tienen la ventaja de proveer modos de acción novedosos que reducen el riesgo de resistencia, son eficaces y más seguros para el medio ambiente, son degradables y más específicos para las diferentes especies de insectos, larvas y otros tipos de plagas, produciendo poco o ningún daño ambiental, mostrando así la superioridad de estos frente a los netamente sintéticos [1, 2]. Por esta razón, se hace necesario incentivar e incrementar la búsqueda de insecticidas naturales de las fuentes más promisorias y/o disponibles.

En la región cafetera colombiana se dispone de cultivos de especies pertenecientes a la familia Annonaceae, las cuales se caracterizan por poseer, principalmente en las

semillas, compuestos de gran bioactividad conocidos como acetogeninas. Estas presentan un rango amplio de actividades biológicas con aplicaciones promisorias como biopesticidas [1, 3, 4], antiparasitarias [1, 5, 6], citotóxicas [1, 4, 5] y antitumorales [1, 3, 6], entre otras.

Con el fin de contribuir al aprovechamiento integral del fruto y generar nuevos usos alternativos de la *Annona cherimolia*, el presente estudio plantea evaluar la actividad biológica de los extractos etanólico y metanólico de las semillas de esta especie y su potencial uso como biopesticida partiendo de estudios previos realizados sobre las acetogeninas presentes en *Annona cherimolia*, empleando como organismos modelos *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus*, así como su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

LINA CASTRO

Tecnóloga en Química
Universidad Tecnológica de Pereira

MÓNICA ALZATE

Tecnóloga en Química
Universidad Tecnológica de Pereira
yorlase@hotmail.com

GLORIA EDITH GUERRERO

Profesor Asistente
Universidad Tecnológica de Pereira
gguerre@utp.edu.co

Los frutos de *A. cherimolia* (Annonaceae) "Chirimoya" fueron suministrados por un proveedor de la central de productos "Merca Plaza" de la ciudad de Pereira, quien los recolectó en el municipio de Choachi, Cundinamarca. La clasificación botánica de la planta fue verificada por el ingeniero agrónomo Hernán Giraldo de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal (UNISARC). En el laboratorio de Oleoquímica de la UTP las semillas se secaron en estufa a 37 °C durante 72 horas, fueron molidas y almacenadas en un congelador a -20 °C para su posterior análisis.

2.2. Pretratamiento de las Semillas

Las semillas fueron molidas en molino de aspas y el polvo obtenido se dividió en dos porciones. Una de estas se conservó en congelador a -20 °C dentro de bolsas plásticas y la otra se desengrasó con base en la metodología propuesta por otros autores, empleando éter de petróleo como solvente, una relación muestra-solvente 1:4 y un periodo de extracción de 72 horas, [2, 6].

2.3. Extracción de acetogeninas

Se llevó a cabo por lixiviación, implementando dos métodos de análisis y realizando los ensayos por triplicado. En el Método 1, la extracción se hizo con polvo de semillas sin desengrasar empleando etanol absoluto como solvente en una relación 1:4 (50 g de polvo de semillas y 200 mL de solvente), durante una semana a temperatura ambiente y agitación magnética permanente, [1, 2, 6]. En el Método 2 se empleó el mismo procedimiento anterior pero se partió de semillas desengrasadas. Los extractos obtenidos se concentraron en rotaevaporador y se continuó con la separación según el esquema que se presenta en la Figura 1.

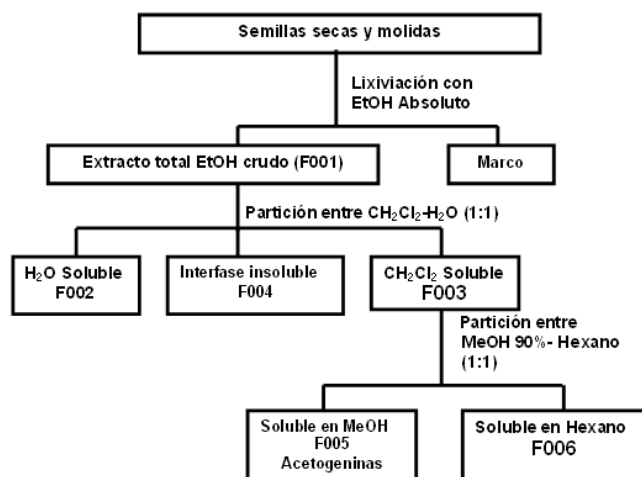


Figura 1. Diagrama de flujo de la extracción de acetogeninas de semillas de *Annona cherimolia*.

2.4. Bioensayos

Se evaluó la actividad biológica de los extractos etanólico (extracto crudo) y metanólico (obtenido del fraccionamiento) de las semillas desengrasadas y sin desengrasar de *A. cherimolia* frente a nauplios de *A. salina* como ensayo de letalidad general, [7]. Este bioensayo se realizó cada dos semanas durante dos meses para un total de cinco repeticiones.

Como bioensayo específico se evaluó la actividad de los extractos frente a larvas del IV estadio del mosquito *C. quinquefasciatus* suministradas por el Grupo de Productos Naturales de la Universidad Nacional de Bogotá, siguiendo la metodología propuesta en estudios anteriores, [7, 8]. Este bioensayo se realizó por triplicado con los extractos que arrojaron los mejores resultados en el bioensayo preliminar.

Los datos de actividad fueron procesados con el programa EPA Probit Versión 1.5, y se expresaron como concentración letal al 50% (CL₅₀).

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

Los extractos que presentaron la mayor actividad fueron analizados por CLAE, empleando el cromatógrafo Jasco 2000 plus, equipado con bomba de gradiente cuaternario (PU-2089 Plus), automuestreador inteligente (AS-2059 Plus), horno para columna (CO-2065 Plus), detector inteligente de arreglo de diodos (MD-2015 Plus), y el software EZChrom Elite. Se empleó una columna en fase reversa C 18 Ultra-aqueous DB (100mm×3,2mm x 3µm Restek), y un gradiente binario con agua (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 0,8 mL/min, iniciando con 70% de B por 3 minutos hasta 80% en B durante 12 minutos, para un tiempo total de corrida de 16 minutos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Bioensayos

El bioensayo preliminar con nauplios de *A. salina* mostró que los extractos etanólico (crudo) y metanólico desengrasados y sin desengrasar presentaron una elevada actividad biológica siendo más activos los extractos desengrasados entre los cuales se observaron ligeras diferencias (ver tabla 1).

A partir de los mejores resultados con *A. salina* se seleccionaron los extractos desengrasados para el ensayo confirmativo con *C. quinquefasciatus*. Como se aprecia en la Tabla 2, el extracto etanólico presentó la mayor actividad frente a las larvas de éste organismo, obteniéndose una CL₅₀ de 0,102 µg/mL con 24 horas de

exposición; tiempo suficiente pues no se observó un incremento importante de la letalidad a las 48 horas.

# Seguimiento	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL) 24 h	Límites del 95% de confianza
1	F001A	1,516	0,831/2,223
	F005A	1,351	0,697/2,014
	F001B	2,570	1,735/3,525
	F005B	1,796	0,805/2,834
2	F001A	1,891	1,146/2,693
	F005A	1,410	0,585-2,240
	F001B	3,054	1,844/4,438
	F005B	2,718	1,718/3,908
3	F001A	2,383	1,497/3,387
	F005A	1,792	0,973/2,655
	F001B	3,191	1,814/4,561
	F005B	2,678	1,672/3,870
4	F001A	2,589	1,650/3,680
	F005A	2,420	0,803/4,446
	F001B	3,337	1,838/4,840
	F005B	2,663	1,629/3,892
5	F001A	3,321	2,244/4,675
	F005A	2,875	1,986/3,910
	F001B	8,871	4,494/15,932
	F005B	4,789	2,324/15,848

F001: Extracto EtOH; **F005:** Extracto MeOH
A: Desengrasado **B:** Sin Desengrasar

Tabla 1. Concentración Letal Cincuenta (µg/mL) Obtenida para cada Extracto a través del Bioensayo de *Artemia salina*.

EXTRACTO	CL ₅₀ (µg/mL) 24 h	LC (95%)	CL ₅₀ (µg/mL) 48 h	LC (95%)
F001A	0,102	0,050/0,167	0,095	0,063/0,144
F005A	0,214	0,080/0,318	0,202	0,107/0,273

LC = Límite de Confianza

Tabla 2. CL50 Obtenidas para los Extractos Etanólico y Metanólico Desengrasados a través del bioensayo con Larvas del IV estadio de *Culex quinquefasciatus*.

Las diferencias en la actividad biológica de los extractos desengrasados frente a los dos organismos ensayados, pueden atribuirse a las diferencias en la absorción, metabolismo y excreción de las acetogeninas u otros metabolitos secundarios por parte de estos organismos, es decir, a sus diferencias genéticas y fisiológicas, [2, 9].

La actividad larvicida contra *C. quinquefasciatus* de las acetogeninas de las semillas de *A. cherimolia* podría explicarse por ingesta y por contacto. Por ingesta, porque al alimentarse las larvas mediante filtración y al no poseer una ingestión selectiva de partículas, los larvicidas pueden ingresar libremente produciendo toxicidad digestiva [1,2]; y por contacto, mediante tres mecanismos interdependientes: transporte desde la parte exterior de las larvas al sitio de acción, inhibición enzimática y

efecto sobre el sistema respiratorio mitocondrial [2]; éste último, por causa de acetogeninas que actúan mediante mecanismo de inhibición de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, del complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria, presente en mamíferos e insectos, reduciendo los niveles de ATP y desacoplando ciertos mecanismos de resistencia, [2, 10, 11, 12, 13, 14].

Estudios realizados en *C. quinquefasciatus* [14], han establecido CL₅₀ de 0.0001 a 0.1 mg/L de algunos piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina), comparando esto frente a lo que se encontró para el extracto etanólico desengrasado (0,102 µg/mL) puede apreciarse que este posee un potencial biopesticida valioso y sin necesidad de realizar fraccionamientos logrando así minimizar costos y disminuyendo el impacto ambiental por uso de solventes.

3.2. Caracterización Química

Según los resultados del análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (ver figuras 2 y 3), se detectaron para el extracto crudo (F001A) 26 compuestos de los cuales 14 fueron acetogeninas de annonaceas, los demás según su espectro ultravioleta pueden tratarse de flavonoides, fenoles y alcaloides bencilisoquinolímicos; algo similar se encontró en el extracto metanólico (F005A), encontrándose en este caso un total de 27 picos donde 15 de ellos son acetogeninas.

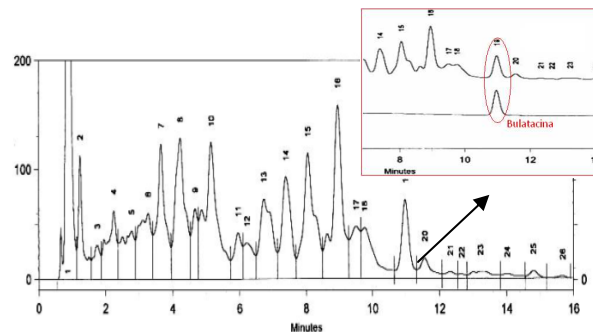


Figura 2. Cromatograma por CLAE del Extracto Etanólico desengrasado (F001A) de semillas de *A. cherimolia*.

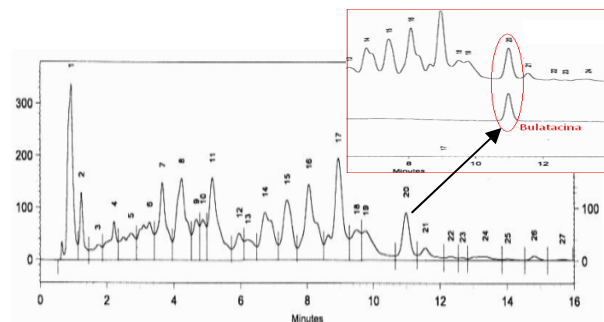


Figura 3. Cromatograma por CLAE del Extracto Metanólico desengrasado (F005A) de semillas de *A. cherimolia*.

De acuerdo con el tiempo de retención del estándar de bulatacina (ver figura 4), esta acetogenina se encontró presente en los extractos, siendo la primer vez que se reportaría este compuesto en *A. cherimolia* según revisión bibliográfica realizada desde el año 1982 hasta la fecha [11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25]. Sin embargo se requiere de su aislamiento para su elucidación estructural por diferentes técnicas espectroscópicas, que permitan confirmar su presencia en este material.

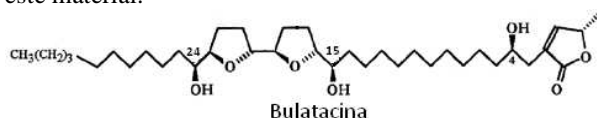


Figura 4. Estructura de la bulatacina

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en los bioensayos general de letalidad con larvas de *A. salina* y en el ensayo específico con larvas del 4° estadio de *C. quinquefasciatus* se encontró que la actividad biológica de las semillas de *A. cherimolia* puede deberse a una interacción o efecto sinérgico de principios activos dada por un complejo alcaloidal benciltetrahidroisoquinoleínico de acción citotóxica [2] y por acetogeninas conocidas por tener propiedades insecticidas, larvicidas, citotóxicas y anticancerígenas, [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Sin embargo, para poder establecer cuáles tienen mayor incidencia, sería importante continuar con estudios de fraccionamiento, identificación y separación de los diferentes componentes para evaluar su actividad individual y en mezclas.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de entomología médica de la facultad de medicina de la Universidad Nacional quienes suministraron las larvas de *C. quinquefasciatus* y a la profesora Bárbara Moreno directora del grupo de investigación "Productos naturales vegetales bioactivos y química ecológica" de la Universidad Nacional quien hizo las pruebas de actividad larvicida.

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] MORALES, Carlos; GONZALEZ, Ranulfo; ARAGÓN, Raúl. (2004). Evaluación de la Actividad Larvicida de Extractos Polares y no Polares de acetogeninas de *Annona muricata* Sobre Larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Revista Colombiana de Entomología, 30: 187-192.

[2] BOBADILLA, Miguel; ZAVALA, Gina; FRANCO, Fanny; POLLACK, Luis; SISNIEGAS, Manuel. (2002). Efecto Bioinsecticida del Extracto Etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Mill. "Chirimoya" y *A. muricata* Linneus "guanábana" Sobre

Larvas del IV Estadio de *Anopheles sp.* Revista Peruana de Biología, 9: 64-73.

[3] CARDONA, Wilson. (1993). acetogeninas en el Extracto Hexánico de Raíces de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín, p. 9-51.

[4] CORREA, Carlos Arturo. (1992). acetogeninas en las Semillas de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín, p. 48-100.

[5] CORREA, Jaime; BERNAL, Henry. (1989). Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello Tomo I. Editorial Guadalupe Ltda. Bogotá, Colombia, p. 196-217.

[6] ARANGO, Gabriel; DICKSON, John; VELEZ, Iván; MUÑOZ, Diana. (1999-2000). Actividad *Leishmania panamensis*. Revista Vitae, 7: 38-42.

[7] McLAUGHLIN, Jerry; ROGERS, Lingling; ANDERSON, Jon. (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. Drug Information Journal, 32: 513-524.

[8] QUEVEDO, Rodolfo; ANTOLINEZ, Sergio; MORENO, Barbara. (2007). Tabienina A: Un Nuevo Alcaloide ApofinaBencilisoquinolina Oxidado. Scientia et Technica, 13: 167-169.

[9] CARRERO, J. (1996). Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales. 1ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, p. 256.

[10] FLOREZ, Lina; MESA, Viviana. (2007). Monografía Sobre Pruebas de Actividad Biológica con Dos Organismos Modelos de acetogeninas de Annonaceae con Actividad Biopesticida. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira, p. 6-66.

[11] FANG, Xin-Ping; RIESER, Matthew; GU, Zhe-Ming; ZHAU, Gen-Xian; McLAUGHLIN, Jerry. (1993). Annonaceous Acetogenins: An Updated Review. Phytochemical Analysis, 4: 35- 44.

[12] ZENG, Lu; YE, Quing; OBERLIES, Nicholas; SHI, Guoen; GU, Zhe-Ming ; HE, Kan; MACLAUGHLIN, Jerry. (1996). Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. Natural Products Reports, 13: 215-306.

[13] ZAFRA-POLO, Carmen; GONZALEZ, Carmen; ESTORNELL, Ernesto; SAHPAZ, Sevser; CORTES, Diego. (1996). Acetogenins from Annonaceae, Inhibitors of Mitochondrial Complex I. Phytochemistry, 42: 253-271.

[14] ZAFRA-POLO, Carmen; FIGADERE, Bruno; GALLARDO, Teresa; TORMO, José; CORTES, Diego.

(1998). Natural Acetogenins from Annonaceae, Synthesis and Mechanisms of Action. *Phytochemistry*, 48: 1087-1117.

[15] BERMEJO, Almudena; FIGADÉRE, Bruno; ZAFRA-POLO, María Carmen; BARRACHINA, Isabel; ESTORNELL, Ernesto; CORTES, Diego. (2005). Acetogenins from Annonaceae: Recent Progress in Isolation, Synthesis and Mechanisms of Action. *Natural Product Report*, 22: 269-303.

[16] JOLAD, Shivanand; HOFFMANN, Joseph; SCHRAM, Karl; COLE, Jack. (1982). Uvaricin, A New Antitumor Agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, 47: 3151-3153.

[17] CORTES, Diego; RIOS, Jose Luis; VILLAR, Angel; VALVERDE, Serafín. (1984). Cherimoline Et Dihydrocherimoline: Deux Nouvelles γ -lactones Bis-Tetrahydrofuranniques Possédant Une Activité Antimicrobienne. *Tetrahedron Letters*, 25: 3199-3202.

[18] CORTES, Diego; MYINT, Saw; HOCQUEMILLER, Reynald. (1991). Molvizarin and Motrilin: Two Novel Cytotoxic Bis-Tetrahydrofuranic γ -lactone Acetogenins from *Annona cherimolia*. *Tetrahedron Letters*, 47: 8195-8202.

[19] CORTES, Diego; FIGADERE, Bruno ; CAVE, André. (1993). Bis- Tetrahydrofuran Acetogenins from Annonaceae. *Phytochemistry*, 32: 1467-1473.

[20] CORTES, Diego; MYINT, Saw; DUPONT, Beatrice; DAVOUST, Daniel. (1993). Bioactive Acetogenins from Seeds of *Annona cherimolia*, 32: 1475-1482.

[21] WOO, Mi-Hee; KIM, Dal- Hwan; FOTOPOULOS, Sophia; McLaughlin, Jerry. (1999). Annocherin and (2,4)-cis- and trans-Annocherinones, Monotetrahydrofurane Annonaceous Acetogenins with a C-7 Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. *Journal Natural Product*, 62: 1250-1255.

[22] ARNASON, John; MATTA, Ranyia; ROMEO, J. T. (1995). Recent Advances in Phytochemistry. *Phytochemistry of Medicinal Plants*, 29: 249-309.

[23] KIM, Dal Hwan; MA, Eun Sook; SUK, Kui Duk; SON, Jong Keun; LEE, Jong Soon; WOO, Mi Hee. (2001). Annomolin and Annocherimolin, New Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* Seeds. *Journal Natural Product*, 64: 502-506.

[24] SON, Jong Keun; KIM, Dal Hwan; WOO, Mi Hee. (2003). Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. *Journal Natural Product*, 66: 1369-1372.

[25] ÁLVAREZ, Olga; NESKE, Adriana; POPICH, Susana; BARDON, Alicia. (2007). Toxic Effects of Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pesticide Science*, 80: 63-67.