

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

Sede de Occidente, Recinto de Grecia.

Departamento de Ciencias Naturales

**Identificación y fraccionamiento de acetogeninas bioactivas  
en líneas celulares cancerígenas presentes en 13 especies de  
la familia *Annonaceae* de la Península de Osa.**

Tesis sometida a consideración de la Comisión de Trabajos Finales de  
Graduación del Departamento de Ciencias Naturales, para optar por el grado  
académico de Licenciatura en Laboratorista Químico.

Carmen Lilliana Anchía Pérez

B00398

Alajuela, Costa Rica

Enero, 2017.

## HOJA DE APROBACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Esta tesis fue aceptada por los miembros del Tribunal de trabajos finales de graduación, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Laboratorista Químico.

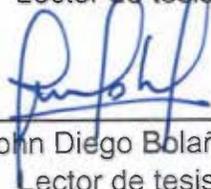
### TRIBUNAL EXAMINADOR



Dr. Randall Loaiza Montoya  
Director de tesis



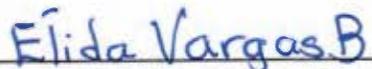
Lic. Rodrigo Muñoz Arrieta  
Lector de tesis



M.Sc. John Diego Bolaños Alfaro  
Lector de tesis



M.B.A. Francisco Bogantes Madrigal  
Miembro de Tribunal



Dra. Elida Vargas Barrantes  
Representante de la directora de Sede de Occidente



Carmen Lilliana Anchía Pérez  
Postulante

## DEDICATORIA

*A Dios, por darme la fuerza para continuar día con día.*

*A mis padres por ser un ejemplo de lucha, a mis hermanas y novio porque son el ente motivador para seguir esforzándome por ser mejor.*

*A mis compañeros de estudio, a mis profesores y amigos, quienes fueron un apoyo incondicional para poder concluir esta tesis.*

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por las oportunidades que a lo largo de mi vida me ha brindado, ha sido un camino largo pero lleno de mucho aprendizaje.

A mi familia por su apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A la Universidad de Costa Rica por brindar las opciones para que podamos concluir nuestros estudios.

A mis profesores por sus consejos, paciencia y apoyo.

Al CENIBiot, por la posibilidad de desarrollar la investigación en sus instalaciones, por permitirme el tiempo para las pruebas y facilitar todos los insumos.

Un sincero agradecimiento al Dr. Randall Loaiza, al Lic. Rodrigo Muñoz y a la Bach. Noelia Mora, por su valioso tiempo, su paciencia al explicarme y por sus consejos, sencillamente sin su ayuda no lo hubiera logrado.

En especial al Lic. Rodrigo Muñoz por ser un gran apoyo, por siempre tener la voluntad de enseñarme y ayudarme en el desarrollo de esta investigación.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE GENERAL .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE CUADROS .....	xi
RESUMEN .....	xii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1    Justificación de la investigación .....	1
1.2    Planteamiento del problema.....	3
1.3    Antecedentes .....	6
1.4    Planteamiento de los objetivos de la investigación.....	9
1.4.1    Objetivo general.....	9
1.4.2    Objetivos específicos .....	9
1.5    Hipótesis .....	9
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO .....	10
2.1    Generalidades.....	10
2.2    Familia <i>Annonaceae</i> .....	12
2.3    Principio activo de las <i>annonaceas</i> .....	17
2.4    Clasificación de las acetogeninas de <i>Annonaceae</i> .....	17
2.5    Extracción e identificación de las acetogeninas .....	22
2.6    Cromatografía de capa fina o TLC (por sus siglas en inglés <i>Thin Layer Chromatography</i> ).....	26
2.7    Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC .....	27
2.8    Espectro de masas por la técnica de infusión directa .....	28
2.9    Pruebas de citotoxicidad .....	30
2.10    Mecanismo de acción de las acetogeninas .....	32
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....	34
3.1    Localización del estudio .....	34
3.2    Material vegetal.....	34

3.3	Método de extracción acetogeninas .....	35
3.3.1	Protocolo experimental 1.....	35
3.3.2	Protocolo experimental 2.....	35
3.4	Tamizaje fitoquímico .....	36
3.5	Fraccionamiento de extractos crudos.....	38
3.6	Obtención del patrón de acetogeninas a partir de las semillas de <i>Annona muricata</i> (PEAAm).....	39
3.7	Espectro LC-MS/MS para la caracterización del patrón de acetogeninas a partir de las semillas de <i>Annona muricata</i> (PEAAm).....	40
3.8	Optimización de la fase móvil para las cromatografías de capa fina reveladas con p-anisaldehído y óleum.....	40
3.9	Método de identificación cualitativo de acetogeninas en patrones y fracciones.....	41
3.9.1	Pruebas de tubo de ensayo y capa fina. ....	41
3.10	Perfil cromatográfico por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) .....	43
3.11	Cuantificación de acetogeninas en la fracción con metanol de extractos de anonáceas por el método de Kedde. ....	44
3.12	Identificación de los extractos con mayor potencia inhibitoria de líneas celulares de cáncer. 45	
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		47
4.1	Resultados del tamizaje fitoquímico .....	47
4.2	Caracterización del patrón de acetogeninas a partir de las semillas de <i>Annona muricata</i> 49	
4.3	Pruebas preliminares de identificación para desarrollar el método de extracción.....	52
4.4	Resultados de pruebas de citotoxicidad y colorimétricas para cada protocolo experimental de extracción .....	54
4.3.1	Protocolo experimental de extracción 1.....	54
4.3.2	Protocolo experimental de extracción 2 y fraccionamiento con hexano: metanol en la proporción de (1:1). ....	56
4.5	Optimización de la fase móvil en la cromatografía de capa fina (TLC) .....	60
4.6	Resultados de cromatografía de capa fina .....	61
4.7	Perfil cromatográfico de fracciones de metanol en extractos de anonáceas.....	63
4.8	Desarrollo del método de cuantificación por la reacción de Kedde.....	68

4.9	Resultados de método de cuantificación de Kedde.....	71
4.10	Resultados de pruebas de citotoxicidad en diferentes líneas celulares .....	74
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		79
5.1	Conclusiones .....	79
5.2	Recomendaciones .....	81
ANEXOS .....		82
Anexo I. Protocolo de ensayos de citotoxicidad del CENIBiot.....		82
Anexo II. Resultados de pruebas de citotoxicidad en extractos con acetato de etilo de corteza y madera .....		85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		90

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las acetogeninas .....	18
Figura 2. Estructura general de Acetogeninas lineales. ....	19
Figura 3. Estructura general de Epoxiacetogeninas.....	19
Figura 4. Estructura general de acetogeninas mono-THF. ....	20
Figura 5. Estructura general de acetogeninas bis-THF adyacentes.....	20
Figura 6. Estructura general de acetogeninas bis-THF no adyacentes.....	21
Figura 7. Estructura de la Gonicina acetogenina Tri-THF. ....	21
Figura 8. Estructura general de acetogeninas THP. ....	21
Figura 9. Fundamento de la reacción de Kedde. ....	24
Figura 10. Fundamento de la reacción de Baljet. ....	25
Figura 11. Esquema general de los componentes principales de un espectrómetro de masas.....	29
Figura 12. Ubicación del sitio de muestreo en el mapa de Costa Rica y lugar de muestreo (Los Charcos, Península de Osa). ....	34
Figura 13. Estructura química de la digoxina. ....	41
Figura 14. Espectro de masas del extracto crudo de acetogeninas (partición MEOH). ....	51
Figura 15. Resultados de las diferentes fases móviles reveladas con p-anisaldehído.....	60
Figura 16. Capa finas de muestras de extractos de cortezas de <i>annonaceas</i> fracción metanólica recién reveladas. Nota: Izquierda revelada con p-anisaldehído y derecha revelada con óleum. ....	62
Figura 17. Capa finas de muestras de extractos de cortezas de <i>annonaceas</i> fracción metanólica, con la numeración de cada mancha.....	62
Figura 18. Perfil cromatográfico de <i>Annona muricata</i> (patrón de acetogeninas). ..	65
Figura 19. Perfil cromatográfico de <i>Duguetia confusa</i> . ....	65
Figura 20. Perfil cromatográfico de <i>Guatteria lucens</i> . ....	66
Figura 21. Perfil cromatográfico de <i>Unonopsis osae</i> .....	66

Figura 22. Perfil cromatográfico de <i>Anaxagorea sp.</i> .....	67
Figura 23. Prueba de taninos (izquierda color natural de extractos) y (derecha extractos + reactivo).....	67
Figura 24. Espectro de absorción de digoxina 0.09 mg/mL en diferentes tiempos de lectura. ....	69
Figura 25. Barrido espectral de extracto <i>A. muricata</i> . ....	70
Figura 26. Linealidad de las mediciones según el tiempo de reacción. ....	71
Figura 27. Curva de extracto patrón de acetogeninas en <i>A. muricata</i> . ....	71
Figura 28. Relación entre el contenido de acetogenina detectada con respecto a la actividad citotóxica en la línea celular NCIH460 .....	73
Figura 29. Correlación entre actividad biológica y miligramos de extracto de <i>A. muricata</i> equivalente medidos por Kedde. ....	74
Figura 30. Comparación de porcentaje de inhibición de la línea celular NCIH460 en extractos etanólicos de hojas y corteza de <i>annonaceas</i> . ....	75
Figura 31. Porcentaje de inhibición de la línea celular NCIH460 con las diferentes fracciones de los extractos de <i>annonaceas</i> . ....	76
Figura 32. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto metanólico <i>U. osae</i> en la línea celular NCIH460. ....	77
Figura 33. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto metanólico de <i>U. osae</i> en la línea celular MCF7. ....	78
Figura 34. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto metanólico de <i>U. osae</i> en la línea celular MIA Mesotelina. ....	78
Figura 35. Diagrama de la distribución espacial de la placa de 96 pocillos empleada en los ensayos in vitro para la determinación de un efecto citostático, citotóxico o proliferativo de los extractos de Annonaceae en las células. ....	84
Figura 36. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>G. rostrata</i> en la línea NCIH460. ....	85
Figura 37. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>D. confusa</i> en la línea NCIH460.....	86

Figura 38. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>G. lucens</i> en la línea NCIH460.....	86
Figura 39. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>G. rostrata</i> en la línea MCF7.....	87
Figura 40. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>D. confusa</i> en la línea MCF7.....	87
Figura 41. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>G. lucens</i> en la línea MCF7.....	88
Figura 42. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>G. rostrata</i> en la línea MIA Mesotelina.....	88
Figura 43. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>D. confusa</i> en la línea MIA Mesotelina.....	89
Figura 44. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de <i>G. lucens</i> en la línea MIA Mesotelina.....	89

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción botánica de las especies de Annonaceas en estudio. ....	13
Cuadro 2. Gradiente del método de caracterización de las acetogeninas .....	44
Cuadro 3. Tamizaje fitoquímico de extractos etanólicos de cortezas de <i>annonaceas</i> .....	48
Cuadro 4. Resultados de análisis HPLC Ms/Ms de patrón de <i>A. muricata</i> . ....	50
Cuadro 5. Resumen de pruebas de identificación realizadas a los extractos de cortezas de <i>annonaceas</i> . ....	52
Cuadro 6. Resumen de pruebas de identificación de anillo lactónico realizadas a los extractos de hojas de <i>annonaceas</i> . ....	54
Cuadro 7. Resultados de extractos etanólicos a 10 µg/mL de cortezas de <i>annonaceas</i> evaluados en pruebas citotóxicas en la línea NCIH460.....	55
Cuadro 8. Resultados de extractos etanólicos a 10 µg/mL de hojas de <i>annonaceas</i> evaluados en pruebas citotóxicas en la línea NCIH460 .....	56
Cuadro 9. Resumen de pruebas de identificación realizadas a los extractos de acetato de etilo de las <i>annonaceas</i> seleccionadas. ....	58
Cuadro 10. Resultados de extractos de acetato de etilo y fracciones hexano: metanol a 20 µg/mL de corteza de <i>annonaceas</i> evaluados en pruebas citotóxicas en la línea NCIH460.....	59
Cuadro 11. Resultados de cromatografía de capa fina revelados con Oleum y p- anisaldehído.....	61
Cuadro 12. Resumen de resultados de cuantificación de acetogeninas en extractos metanólicos de corteza por el método de Kedde.....	72

## RESUMEN

La resistencia tumoral a fármacos de uso frecuente, ha hecho necesario la búsqueda de nuevas sustancias químicas que sirvan de base para el desarrollo de nuevos fármacos. Las plantas han sido y seguirán siendo una alternativa viable, pues son fuente de múltiples metabolitos secundarios. Las Annonaceae son conocidas por poseer diversas actividades biológicas, que se deben a las acetogeninas, compuestos que debido a sus características estructurales, presentan una variedad de actividades biológicas relevantes, como su citotoxicidad y su acción antitumoral.

El método de extracción y fraccionamiento desarrollado en esta investigación presentó mejores resultados que el basado en la patente *United States Patent US005955497A*. Se logró fracciones bioactivas con porcentajes de inhibición en la línea celular NCIH460 de 92.9% para *Duguetia confusa*, 88.0 % para *Anaxagorea sp* y 84.6% para *Unonopsis osae* en la fracción metanólica.

Los ensayos de citotoxicidad permitieron comprobar la actividad citostática con las líneas celulares de NCIH460 (cáncer de pulmón), MCF7 (cáncer de mama), Mia mesotelina (cáncer de páncreas) de *Unonopsis osae*. Además con el método de cuantificación de acetogeninas por Kedde los resultados de acetogeninas coinciden en casi un 95% con la actividad biológica resultante, por tanto el método se puede utilizar para predecir la actividad biológica que tendrá con la línea celular NCIH460 asociada al cáncer de pulmón.

Con base a los resultados obtenidos, las acetogeninas de la especie *Unonopsis osae* presentaron los resultados más consistentes a lo largo del estudio, por lo cual es una especie promisoría para la aplicación de las siguientes etapas de la investigación del proyecto madre.

Las annonaceae *Anaxagorea sp* y *D. confusa* presentaron porcentajes de inhibición importantes con la línea celular NCIH460 por lo cual se pueden ampliar investigaciones en estas especies. En cuanto a *G. púdica* y *G. lucens* no presentaron buenos resultados en el ensayo de citotoxicidad con las líneas

celulares NCIH460, MCF7 y Mia mesotelina con el método de extracción empleado.

**Palabras clave:** *annonaceas*, citotoxicidad, acetogeninas y anticancerígeno.

Cita bibliográfica:

Anchía, C. (2017). *Identificación y fraccionamiento de acetogeninas bioactivas en líneas celulares cancerígenas presentes en 13 especies de la familia Annonaceae de la Península de Osa*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica, Alajuela.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Justificación de la investigación

Las plantas han sido y seguirán siendo una alternativa para la búsqueda de nuevas sustancias químicas que sirvan de base en el desarrollo de nuevos fármacos. Debido a esto, actualmente se destina gran cantidad de recursos a la investigación para su potencial uso clínico. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población de países en desarrollo basa el cuidado de su salud en la medicina tradicional. El 20% restante utiliza, en muchos casos, fármacos derivados de productos naturales (Schlaepfer & Mendoza, 2010). Éstas estadísticas son un incentivo para continuar en la búsqueda de alternativas terapéuticas que permitan disminuir la mortalidad, morbilidad, y disminuir los costos de los tratamientos existentes.

Una gran preocupación en oncología ha sido la resistencia tumoral a fármacos de uso frecuente como la adriamicina, lo que ha creado la necesidad de buscar nuevas alternativas como tratamientos (Sánchez & Benítez, 2006).

El cáncer es una enfermedad destructora que disminuye dramáticamente expectativa de vida de los pacientes, afecta la calidad de vida, la salud emocional del entorno de los pacientes (Vinaccia & Orozco, 2005) y representa un elevado costo económico al sistema de salud costarricense.

Según *The Lancet Oncology* América Latina enfrentará una "epidemia devastadora de cáncer" a menos que los gobiernos actúen rápidamente para mejorar los sistemas de salud y el acceso a los tratamientos. El trabajo, presentado en la conferencia del Grupo de Cooperación en Oncología

Latinoamericano en San Pablo, Brasil, señala que por cada cien casos de cáncer, en la región latinoamericana mueren 59 personas, frente a las 43 de Europa y las 35 de EE.UU. Los investigadores estiman que para 2030, 1,7 millones de casos de cáncer serán diagnosticados en Latinoamérica y el Caribe, y habrá más de un millón de muertes anuales (Ballerino, 2013).

El descubrimiento de nuevos tratamientos antitumorales en la biodiversidad de los países tropicales es una alternativa viable y codiciada que en su mayoría fracasan debido al tamizaje indiscriminado de especies. Una alternativa razonable para reducir el rango de exploración, es enfocarse en fuentes que hayan producido moléculas activas de forma consistente. Por ejemplo, varias especies de la familia de las *Annonaceae* han mostrado actividad documentada en cultivos celulares *in vitro*, en modelos de tumores en animales, y en humanos.

En Costa Rica se conocen 83 especies de esta familia (INBIO, 2015). En este proyecto se efectuó una búsqueda sistemática de acetogeninas bioactivas en especies costarricenses de *Annonaceas* que eventualmente puedan ser incorporadas a estudios rigurosos en modelos animales. En total se trabajó con 13 especies comprendidos en los géneros *Annona*, *Guatteria*, *Duguetia*, *Unonopsis*, *Rollinia* y *Xylopia*.

Una parte muy importante que ahorra tiempo y recursos, es el tamizaje fitoquímico o "*screening*" es una de las etapas iniciales de la investigación. El tamizaje permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta, y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Sharapin, 2000).

El mayor aporte del presente trabajo es el uso de una combinación de técnicas colorimétricas para la detección de grupos funcionales presentes en

las acetogeninas con el objetivo de realizar el tamizaje. Los resultados obtenidos son la base de un estudio sistemático que busca nuevas fuentes de moléculas con actividad contra el cáncer. En este trabajo también se presentan los primeros resultados del proceso de selección de especies de *annonaceas* no estudiadas en Costa Rica hasta el momento. De acuerdo con diferentes investigaciones, se sabe que las *annonaceas* presentan acetogeninas, compuestos con potencial antitumoral, lo cual genera el siguiente cuestionamiento: son las *annonaceas* costarricenses de la Península de Osa fuente de acetogeninas bioactivas con actividad *in vitro* contra líneas celulares de cáncer, esta pregunta se trata de responder en el transcurso de la investigación.

## 1.2 Planteamiento del problema

Evidencia obtenida *in vitro* e *in vivo* incluyendo humanos sugiere que los compuestos llamados acetogeninas son una fuente potencial para desarrollar búsquedas sistemáticas de nuevos tratamiento para varios tipos de tumores. Estos compuestos se encuentran frecuentemente en plantas de la familia *Annonaceae*, que incluye especies como guanábana y anona.

Esta búsqueda de nuevos ingredientes activos ha puesto en la mira a las acetogeninas, compuestos que debido a sus características estructurales, presentan una variedad de actividades biológicas relevantes, como su citotoxicidad y su acción antitumoral (García *et al.*, 2006). Las especies pertenecientes a la familia *Annonaceae*, además de su importancia agrícola, se les atribuyen propiedades insecticidas, antibacterianas, antitumorales y antivirales; además de propiedades como herbicidas, pues afectan los procesos de fotosíntesis (Mata *et al*, 1998 citado en Martínez, (2009).

Asare *et al.*, (2014) evidenciaron que los extractos de las hojas de *Anona muricata* tienen efectos antiproliferativos sobre las células HPB-1 reduciendo el tamaño de la próstata, posiblemente por apoptosis inducida.

Se han propuesto mecanismos para explicar la actividad biológica de las acetogeninas, describiéndose dos sitios blanco en la célula: el complejo I mitocondrial (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) y la NADH oxidasa de las membranas plasmáticas. Actualmente, a las acetogeninas se les considera como uno de los grupos de inhibidores más potentes del complejo I mitocondrial (Schlie, González & Luna, 2009). Pues esta actividad se le atribuye a la acción conjunta del anillo (s) de Tetrahidrofurano (THF) rodeado de grupos hidroxilo, que funciona como un ancla hidrófila en la superficie de la membrana. Por su parte, el anillo de  $\gamma$ -lactona interactúa directamente con el sitio diana del complejo I de la membrana mitocondrial interna (Abe *et al.*, 2005).

Ya que las acetogeninas presentan una cadena alifática de 35 ó 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos (THF) adyacentes o no, así como sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos) localizados a lo largo de esta. En uno de sus extremos presentan un anillo lactónico metil sustituido,  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado, en ocasiones saturado o rearrreglado como cetolactona (Gómez & Molina, 2012).

Ante estos prometedores antecedentes, es de interés del CENIBiot evaluar la actividad citotóxica de los extractos de las *annonaceas* costarricenses. La presente investigación busca estandarizar un método que permita identificar cuáles extractos de material seco de cortezas de las diferentes especies en estudio posean acetogeninas, para luego realizar pruebas de citotoxicidad, y fraccionamiento dirigido por bioensayo de las moléculas más potentes.

La mayoría de investigaciones realizadas se enfocan normalmente en hojas y semillas, principalmente en las semillas porque se tiene amplia evidencia de su contenido de acetogeninas (Florez & Mesa, 2007). Como parte de ofrecer nuevos aportes, se decidió dirigir esta investigación a las cortezas. Si bien hay literatura donde se han basado los extractos en esta parte de la planta, son pocos en comparación con los de hojas y semillas.

Galvis, Ocampo, Ocampo, & Gutiérrez (2011) realizaron su estudio de extractos de corteza de *A. cherimolioides* para ver la toxicidad sobre *Artemia salina*, en cual se obtuvieron resultados positivos con el extracto crudo. Por su parte, Bobadilla *et al.*, (2005) estudiaron la actividad larvicida de diferentes partes de la planta *A. muricata* sobre *Aedes aegypti*, la partes con mejores resultados en orden decreciente fueron las semillas, las flores, las hojas, la corteza y por último la raíz.

Esta investigación se enmarca dentro del proyecto madre titulado *Acetogeninas de annonaceas costarricenses como coadyuvantes para el tratamiento del cáncer*, el mismo se desarrolla en el CENIBiot, y tiene como objetivo descubrir nuevas moléculas de interés para el tratamiento del cáncer.

Esta investigación procura identificar cuáles especies de *Annonaceae* costarricenses producen acetogeninas. Además se busca desarrollar un nuevo protocolo de identificación y caracterización química cualitativa de acetogeninas.

El trabajo es de vital importancia, pues se pretende optimizar los recursos, ya que los resultados obtenidos en esta investigación, serán la base para las siguientes etapas del proyecto madre: *Acetogeninas de annonaceas costarricenses como coadyuvantes para el tratamiento del cáncer* que se desarrolla en el CENIBiot y cuyos objetivos son:

- Seleccionar las *annonaceas* que contienen acetogeninas para utilizarlas en ensayos de citotoxicidad *in vitro*.
- Realizar pruebas de citotoxicidad para definir la potencia farmacológica y selectividad de las acetogeninas bioactivas.
- Realizar subfraccionamientos de las porciones con mayor actividad *in vitro* para aislar compuestos puros.

Este proyecto completo tiene una duración de 3 años, para el desarrollo de las actividades que comprenden cada uno de los objetivos. El aporte por parte de esta investigación, es la ejecución del primer objetivo del proyecto general, el cual tiene como propósito seleccionar los extractos que contienen acetogeninas. Si esta investigación tiene resultados positivos, CENIBiot Natura que es una línea de formulación de nutracéuticos y cosmeceúticos biotecnológicos innovadores, se encargará de hacer estudios rigurosos de potencia y toxicidad *in vivo*.

### 1.3 Antecedentes

Cortes *et al.*,(2014) concluyeron que especies de la familia de las *Annonaceas* son una importante fuente de metabolitos secundarios con actividad anti-cancerosa y plaguicida.

A las acetogeninas también se les atribuye propiedad larvicida. Por ejemplo, se han encontrado dosis letales de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata*, sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Los resultados demuestran que estos compuestos pueden ser un excelente larvicida (Morales, González, & Aragón, 2004).

Estudios sobre la bioactividad de extractos etanólicos y fracciones parcialmente purificadas obtenidas de las hojas, ramas y semillas de la *Annona sylvatica* (especie natural brasileña) contra el escarabajo *Zabrotes*

*subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), se llegó a la conclusión que estos metabolitos constituyen una fuente de prototipos para el desarrollo de análogos sintéticos y una fuente de nuevos bioplaguicidas que pueden ser útiles en programas de gestión de plagas que afectan a los granos almacenados (Padoan *et al.*, 2015). Por otra parte, Krinski, Massaroli, & Machado (2014) sugieren que las plantas de esta familia han ganado prominencia como bioplaguicidas debido a su actividad citotóxica, antitumoral, antimicrobiana, inmunosupresora, inhibidora del apetito y el crecimiento, así como insecticida. La actividad insecticida de *Annonaceae*, se debe a la presencia de acetogeninas, sustancias que actúan sobre las mitocondrias por la inhibición de la NADH, afectando la respiración y finalmente matan a los insectos.

También se han realizado estudios sobre el efecto en el sistema nervioso central ejercido por el extracto hidroalcohólico al 40% de las hojas de *Annona muricata* en ratones albinos de la especie *Mus musculus*. El estudio se enfocó en detectar la posible actividad anticonvulsivante (electrochoque- pentilentetrazol), antidepresiva (nado forzado), hipnótica (potenciación de sueño barbitúrico) y ansiolítica (laberinto en cruz). Los hallazgos sugieren que compuestos de tipo alcaloidal presentes en *Annona muricata* poseen efectos de tipo ansiolítico, es decir, tranquilizante (53% y 58% de tiempo), no vinculados a la activación de receptores de benzodiazepinas y carentes de efectos citotóxicos *in vitro* (Oviedo *et al.*, 2009).

Asimismo se ha demostrado que el *muricin H* (acetogenina proveniente de la *Annona muricata*) tiene una potente actividad citotóxica frente a la línea tumoral H460 con alto grado de selectividad, ya que esta presentó menor citotoxicidad en las células normales en comparación con el 5-fluoruracilo, un fármaco utilizado como tratamiento contra el cáncer. Es

decir, que presenta mayor selectividad para atacar células tumorales que fármacos que ya han sido aprobados en el mercado farmacéutico (Quispe, Zavala, Posso & Vaisberg, 2006).

A nivel nacional, se encontró un trabajo de tesis donde se realizó un estudio de caracterización fitoquímica *en especies de las familias Apocynaceae, Flacourtiaceae y Annonaceae*. En el caso de la *Annonaceae* se trabajó con la especie *Xylopiia frutenses* (Arce, 2011). Sin embargo, esta especie no fue incluida en el presente estudio.

Actualmente, las técnicas más sensibles y modernas aplicadas a la identificación de acetogeninas son resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopia de masas. La metodología mayormente aplicada para la identificación de las acetogeninas fue por espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) (Padoan *et al.*, 2015; Ragasa, Soriano, Torres, Don, & Shen, 2012). Por otra parte, se realiza la identificación de acetogeninas mediante espectros de masas, utilizando estándares de acetogeninas certificados, o bien una combinación de ambas técnicas (García Aguirre, 2009).

Debido a que el CENIBiot no contaba con el presupuesto para la compra de estándares certificados y el alto costo que dichos estándares representan. Tampoco se contaba con el apoyo para la compra de utensilios y equipos para realizar RMN, se desarrolló un método alternativo para la identificación de acetogeninas.

En el presente proyecto se propuso una metodología que permita identificar acetogeninas por métodos colorimétricos, la misma proporciona un rápido tamizaje de las muestras botánicas y a la vez enfocar los esfuerzos en aquellas que contienen acetogeninas.

## 1.4 Planteamiento de los objetivos de la investigación

### 1.4.1 Objetivo general

Identificar y fraccionar extractos de corteza que contengan acetogeninas en 13 especies de *annonaceas* de la Península de Osa con el fin de evaluar su actividad contra líneas celulares de cáncer.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar los metabolitos presentes en las cortezas de especies de *annonaceas*, mediante un tamizaje fitoquímico.
- Establecer un método de identificación y caracterización química cualitativa de acetogeninas.
- Evaluar la presencia de acetogeninas en extractos de cortezas de 13 especies pertenecientes a los géneros *Guatteria*, *Annona*, *Duguetia*, *Unonopsis*, *Rollinia* y *Xylopia* de la familia de *annonaceas* costarricenses de la región de Osa.
- Seleccionar los extractos de cortezas con mayor potencia inhibitoria de líneas celulares de cáncer en colaboración con el laboratorio de ensayos biológicos del CENIBiot.
- Desarrollar un método de extracción y fraccionamiento de compuestos activos presentes en las *annonaceas* costarricenses de la región de Osa.

## 1.5 Hipótesis

Especie de *Annonaceas* costarricenses de la península de Osa son fuente de acetogeninas bioactivas con actividad *in vitro* contra líneas celulares de cáncer.

## CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades

A pesar de los múltiples avances en el diagnóstico temprano, tratamiento, y seguimiento de pacientes con cáncer, la mortalidad, incapacidades, y los costos en atención para el tratamiento de esta compleja enfermedad continúan avanzando de forma alarmante.

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC, 2013) , las principales causas de muerte en orden de frecuencia son infarto agudo al miocardio, tumor maligno del estómago y accidentes de tránsito, enfermedad aterosclerótica del corazón, tumor maligno de la próstata y otras causas.

De acuerdo con (Ministerio de Salud, 2015), para el año 2013, la mortalidad por tumores malignos en hombres se debió a principalmente al cáncer de próstata con un 15,95%, seguido por el cáncer de estómago con un 15,73%, para una tasa ajustada de 100.000 hombres. Por su parte, en las mujeres, para el año 2012, los cánceres con mayor mortalidad son el de piel (43.62 %), mama (42.25%) y cérvix (26.43%); para una tasa ajustada de 100.000 mujeres.

Existen muchos tratamientos para el cáncer, aplicados según el tipo de cáncer y de lo avanzado que esté. Dentro de los principales tratamientos están: cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida, terapia hormonal y trasplante de células madre. Sin embargo, estos tratamientos tienen efectos secundarios dependiendo de la persona, de la frecuencia de aplicación de tratamiento y de la edad (Instituto Nacional del Cáncer, 2015). Por lo cual se debe fomentar la búsqueda de nuevos tratamientos desarrollados a partir de la flora nacional que poseen propiedades curativas, impulsando la investigación en centros de investigación y universidades.

En Estados Unidos un 57% de las fórmulas médicas vendidas están basadas en productos naturales, es decir, son productos naturales en sí o bien son derivados sintéticos o análogos de productos naturales. Más de un 60% de las nuevas drogas aprobadas entre 1983 a 1995 para el tratamiento del cáncer e infecciones estuvieron basados en productos naturales. Por tanto, los bosques tropicales representan una reserva potencial de fuentes medicinales (Setzer et al., 2003).

Desde un punto de vista etimológico, podemos considerar que el término fitoterapia se refiere a la "terapéutica con las plantas", es decir, a la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico (Cañigüeral, 2002).

Los medicamentos fitoterapéuticos se basan en drogas vegetales. Es importante aclarar términos como plantas medicinales o drogas vegetales para evitar confusiones, la OMS en 1978 definió como planta medicinal a cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica. Mientras tanto, la droga vegetal es la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica y el principio activo es la sustancia responsable de la acción farmacológica (Cañigüeral, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

## 2.2 Familia *Annonaceae*

*Annonaceae* es una familia de angiospermas del orden Magnoliales. Consta de 130 géneros con unas 2300 especies que se distribuyen por los trópicos del Nuevo y Viejo Mundo, hasta el norte de Australia y las islas del Pacífico. El principal interés de la familia se centra en los frutos comestibles de algunas especies como: la chirimoya, la guanábana y la anona. Las flores de algunas especies se usan para la extracción de esencias de uso en perfumería. En algunas especies la madera se usa para la fabricación de mangos y tacos de billar, otras son de uso local en la construcción y para postes. Además muchas especies tienen usos locales debido a sus componentes químicos (Arce, 2011).

Las *Annonaceae* poseen porte de árboles y arbustos. En cuanto a sus hojas son alternas, simples, enteras y pecioladas. Las flores son espiraladas, actinomorfas, perfectas o algunas abortadas, terminales laterales o axilares, solitarias o en grupos de 2 o 3. El fruto sincárpico, carnoso o seco, sésil o estipitado, dehiscente o indehiscente, con carpelos libres entre sí. Las semillas son aplanadas, elípticas, de color castaño claro a negro (Condit, Pérez, & Daguerre, 2011).

De acuerdo con datos del INBIO (2015), para Costa Rica se identifican 83 especies diferenciadas en 15 géneros, de los cuales 14 son nativos y uno introducido, entre los cuales se encuentran las especies que se van a analizar en esta investigación (Ver Cuadro 1):

Cuadro 1. Descripción botánica de las especies de Annonaceas en estudio.

Especie	Familia	Género	Hábitat en Costa Rica	Características
<i>Guatteria amplifolia</i>	Annonaceae	<i>Guatteria</i>	Península de Osa	Arbusto. Se reconoce por sus hojas alargadas, anchas y con una textura cartácea, el peciolo engrosado y curvo, además la venación amarillenta muy marcada. El tronco es generalmente delgado y las ramas alargadas. Además debido a su abundancia se hace fácil de aprender y memorizar.
<i>Guatteria chiriquiensis</i>	Annonaceae	<i>Guatteria</i>	Península de Osa	Árbol de 5 a 15 m de altura. Ramitas denso ferrugíneo-pubescentes. Hojas simples, alternas, dísticas, linear-oblonga. Flores solitarias, axilares. Pétalos elíptico-oblongos y redondeados en el ápice, de color dorado-seríceo. Frutos apocárpicos, elípticos, negros cuando están secos. Contienen una semilla. Su característica y hermosa ramificación los hace asemejarse a pagodas chinas y permite reconocerlo a la distancia. Los árboles adultos alcanzan hasta 40 cm de diámetro, con un tronco oscuro y ennegrecido y gambas laminares empinadas que alcanzan hasta 2 m. de altura.
<i>Guatteria rostrata</i>	Annonaceae	<i>Guatteria</i>	Península de Osa, Golfito	Árbol de 7-20 m de altura, tronco 20-60 cm de diámetro, de color negro o gris.; ramas jóvenes densamente cubiertas con pelos adpresos, pronto glabros. Hojas: elíptica lámina a obovadas, cactáceas, no verrugoso, sin brillo, color marrón grisáceo por encima, por debajo de color marrón, las venas secundarias distintas, ambos lados de la vena principal, impresionado por encima. Flores solitarias o en pares; densamente cubiertas de pelos adpresos, pétalos de color verde a verde amarillento in vivo, desiguales, los exteriores ovadas, las interiores oblongo-elípticas a ovadas, 10-15 por 5-9 mm, lado exterior densamente cubierto con pelos adpreso. Semillas elipsoide, el ápice ligeramente puntiagudas, c. 15 en 7 mm, de color marrón pálido, ligeramente tuberculado.
<i>Guatteria</i>	Annonaceae	<i>Guatteria</i>	Península de	Arbusto o árbol pequeño. Se reconoce por sus ramitas y hojas con el envés ferrugíneo

<i>púdica</i>			Osa	pubescente y la vena central de una coloración rojiza amarillenta, las hojas casi sésiles pero con el peciolo algo engrosado. El tronco es delgado, muy ramificado y las ramas algo caedizas. Se puede observar en el sendero Cerro Osa en las cercanías del cruce con el final del sendero Ajo. También hay un individuo, posiblemente plantado, en las cercanías del vivero en la estación Greg Gund. Una especie con muy alto potencial ornamental.
<i>Guatteria diospyroides</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Guatteria</i>	Península de Osa	Árbol de 6 a 10 m de altura, ramitas verdosas, glabras. Hojas simples, alternas, elípticas a oblongo-elípticas, con una venación muy marcada; ápice acuminado. Flores solitarias o de 2 a 3 por axila, los 3 pétalos externos de 1 a 1.5 por 0.5 a 0.8 cm, oblongos y verdosos. Frutos apocárpicos, monocarpas de 10 a 20 (-33), de 7 a 10 por 4 a 6 mm, elipsoidales, estípite de 1 a 1.3 (-1.7) cm de largo; con una semilla.
<i>Guatteria lucens</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Guatteria</i>	Península de Osa	Hojas estrechamente elípticas a obovadas, cartáceas, densamente o no verrugoso, brillante por encima, glabra anteriormente, escasamente, a veces bastante denso cubiertos con pelos adpresos; nervadura central impresionado por encima. Flores solitarias, a veces en pares. Pétalos de color amarillo, naranja, rojo a verde, casi iguales, estrechamente ovadas a ovado-rómbicas, lado exterior densamente cubierta de pelos adpresos. Semillas por poco elipsoide, un poco picada. <i>Guatteria lucens</i> es bien caracterizada por hojas brillantes con una base atenuada, y por su nerviación prominente en el lado superior de la hoja.
<i>Annona amazónica</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Annona</i>	Península de Osa	Árbol alto. Corteza oscura, áspera. Frutos recogidos del suelo. Pulpa de fruta amarilla con olor débil, agudo y desagradable. Semillas verdes. La fruta que se dice tóxica por los lugareños.
<i>Annona montana</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Annona</i>	Península de Osa	Árbol siempre-verde o, alto hasta cerca de los 10 m presenta hojas elípticas o lanceoladas, de largo variable hasta cerca de 25 cm y anchas hasta 8 cm, de color verde intenso brillante en la parte superior, más pálido y opaco en su faz inferior. Las flores nacen sobre las ramas, son generalmente solitarias con corola formada por seis pétalos de color amarillo, tres externos carnosos, largos cerca de 5 cm y engrosados en el ápice, y tres internos, largos cerca de 4 cm prácticamente cerrados. Los frutos son sincarpas (conjunto de frutos simples concrecentes que forman aparentemente un único fruto) casi

				esféricos, hasta cerca de 15 cm de diámetro, de superficie color verde amarillento en su madurez cubierto de espinas suaves; pulpa amarillenta fibrosa, aromática, con sabor que recuerda al de la <i>Annona muricata</i> , pero de calidad inferior.
<i>Annona purpurea</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Annona</i>	Península de Osa	Es un árbol de 6 a 10 metros de altura máxima de bosque secundario seco y húmedo. Hojas grandes, vellosas y flores muy fragantes. El fruto es redondeado, de 15 a 20 cm de ancho y cubierto con una piel marrón de textura afieltrada con proyecciones en forma de garfio. La pulpa, de color anaranjado, es similar en olor, apariencia y sabor a la del mango. Contiene muchas semillas (Chízmar, 2009).
<i>Duguetia confusa</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Duguetia</i>	Península de Osa	Árbol de tamaño mediano de bosque muy húmedo, el tronco es y de corteza color negro. Las hojas son simple, alternas, regularmente espaciadas, clasificadas en dos, con una superficie inferior clara ligeramente amarillento, con una superficie áspera en las hojas. Las flores son color crema y el fruto es del tamaño de una bola de béisbol de apariencia verrugosa.
<i>Rollinia mucosa</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Rollinia</i>	Península de Osa	Árbol de tamaño mediano de bosque nuboso. Hojas bastantes largas, oblongas, dispuestas en un plano liso y regularmente espaciadas a lo largo de las ramas, venas espaciadas, visibles y no muy marcadas. Las puntas de las ramas son ligeramente peludas, flores con tres pétalos carnosos y el fruto es grande, redondo y cubierto con espinas verrugosas.
<i>Xylopia aromática</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Xylopia</i>	Península de Osa	Árbol de carretera muy fácil de reconocer. Las ramas son grandes y cuelgan hacia abajo. El árbol tiene forma cónica similar al árbol de navidad. Las hojas son estrechas, puntiagudas, brillantes por encima, y azules por debajo. Venas secundarias son débiles casi invisibles. Las ramas tienen muchas hojas a su largo, regularmente espaciadas, dispuestas en un plano liso. Las flores son blancas con largos y estrechos pétalos producidos por separado en las ramas entre las hojas.
<i>Unonopsis osae</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Unonopsis</i>	Península de Osa	Arbusto. La especie es fácil de reconocer cuando posee flores o frutos por su condición cauliflora (crecen en el tronco). En estado infértil se puede reconocer por sus hojas lanceoladas alargadas y delgadas, además es frecuente la presencia de cicatrices donde estuvieron los frutos. El tronco suele ser muy delgado.

<i>Anaxagorea</i> <i>sp</i>	Annonaceae	Anaxagorea	Península de Osa	Arbustos, los peciolos generalmente acanalados arriba, además el envés de las hojas tiene una coloración más clara que el haz. También ayuda el hecho de presentar flores o frutos una buena parte del año. Los frutos maduros poseen semillas de una coloración negra lustrosa bastante llamativa.
--------------------------------	------------	------------	------------------	---

Fuente: Elaboración propia a partir de (Chízmar, 2009; Condit et al., 2011; R. H J Erkens, Maas, Chatrou, Schatz, & Zamora, 2006; Roy H.J. Erkens, 2007; INBIO, 2015; Ley López, 2013; Puccio, 2016).

### **2.3 Principio activo de las *annonaceas***

Los metabolitos secundarios son productos sintetizados naturalmente por organismos vivos y juegan un papel importante en su fisiología, su supervivencia y en sus mecanismos de defensa. Estos productos naturales han sido usados desde tiempos ancestrales por el hombre como medicamentos, agroquímicos y cosméticos, entre otros (Yucatán, 2010).

Las *annonaceas* son la única fuente conocida de acetogeninas, metabolitos secundarios en los que se han descubierto diversos efectos farmacológicos como potentes citotóxicos con aplicaciones como insecticidas, antiparasitarios, acaricidas y drogas antitumorales (Do Nascimento, Diamantino Boaventura, Assunção, & Santos Pimenta, 2003; Flórez & Martínez, 2010; Ruiz Hidalgo et al., n.d.).

Se ha propuesto que la acción de las acetogeninas de *annonaceas* está basada en la alta potencia y especificidad inhibitoria del complejo I de la respiración mitocondrial (Robledo Reyes, Jaramillo, & Restrepo, 2008).

Según Schlie et al., (2009) en los estudios sobre el complejo I utilizando partículas submitocondriales, se ha observado que las acetogeninas naturales o sus derivados semisintéticos pueden retener su actividad inhibitoria a pesar de introducir modificaciones en su molécula.

### **2.4 Clasificación de las acetogeninas de *Annonaceae***

Las acetogeninas de *Annonaceae* se clasifican según la cantidad de anillos que tengan en su estructura, es decir: mono-tetrahidrofurano (THF), adyacentes bis -THF, no adyacentes bis -THF y sin anillo mono-THF. Estas estructuras también poseen hidroxilos laterales los cuales pueden estar a uno u otro lado de la estructura, seguida por su

clasificación de las  $\gamma$ -lactonas o sustituidas por cetolactonas (Florez & Mesa, 2007).

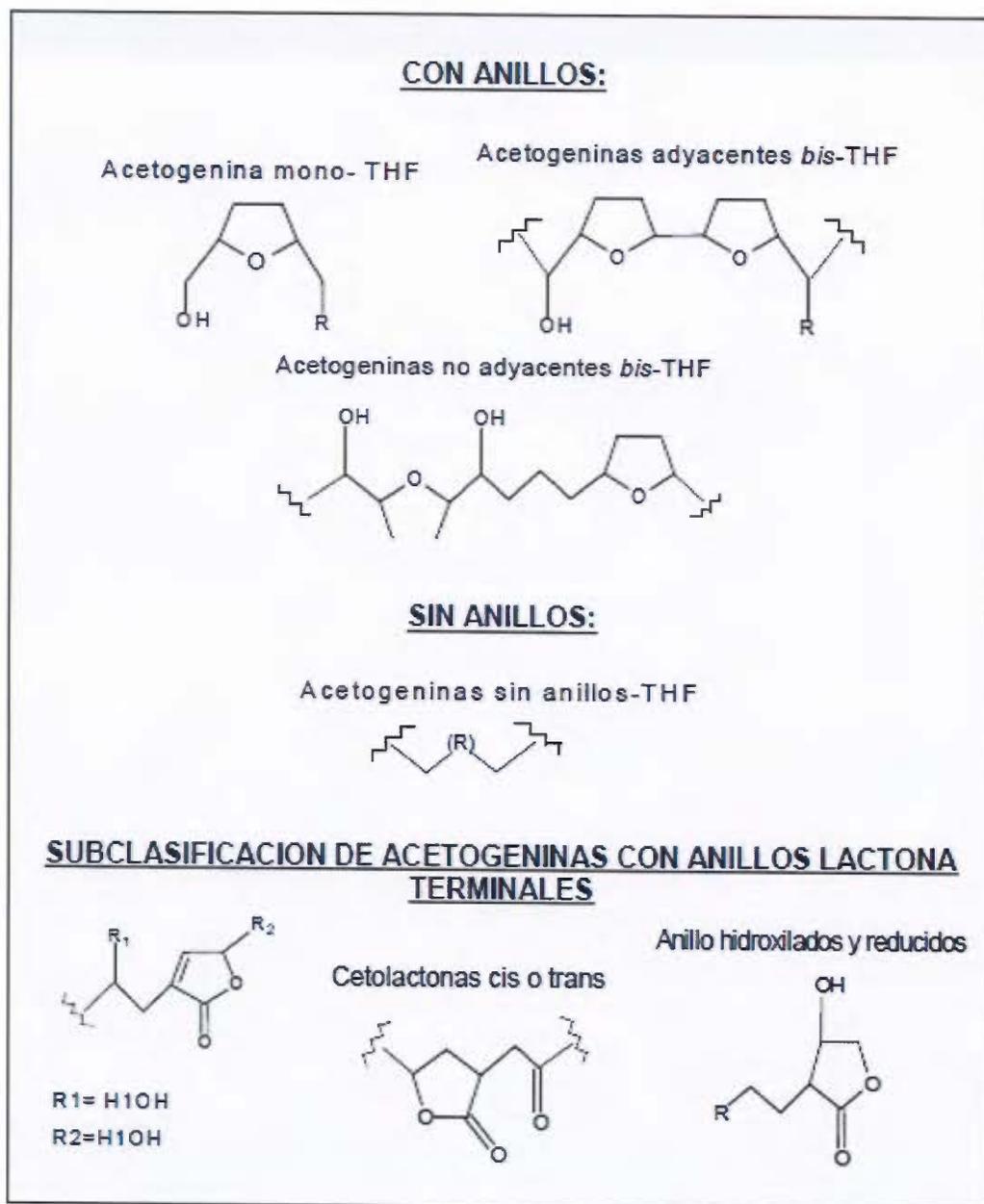


Figura 1. Clasificación de las acetogeninas

Fuente: Florez & Mesa (2007).

## 2.4.1. Clasificación de las Acetogeninas según el tipo y ubicación de los sustituyentes y por su estereoquímica

### 2.4.1.1. Acetogeninas Lineales:

Son precursores de las epoxiacetogeninas y acetogeninas THF. Se diferencian por el grado de insaturación e hidroxilación en la cadena alquílica (Flórez & Martínez, 2010). Su estructura general es:

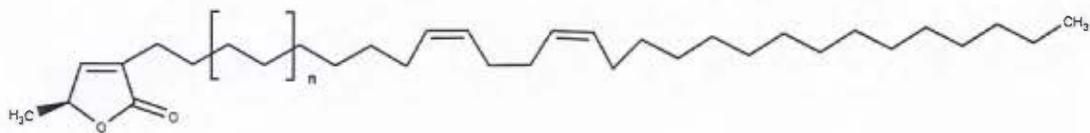


Figura 2. Estructura general de Acetogeninas lineales.

### 2.4.1.2. Epoxiacetogeninas:

Las acetogeninas, por lo general poseen uno o dos anillos THF. Cuando este anillo es reemplazado por un grupo epóxido se obtienen las epoxiacetogeninas. Este tipo estructural es considerado como el precursor de las acetogeninas (Flórez & Martínez, 2010).

Su estructura general es:

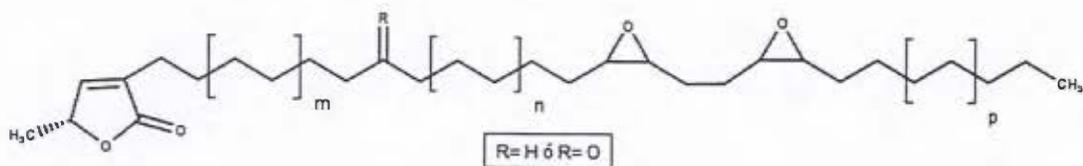


Figura 3. Estructura general de Epoxiacetogeninas.

### 2.4.1.3. Acetogeninas mono-THF:

Se enmarcan en aquellas que poseen un solo anillo THF; usualmente son de 35 carbonos con diferentes grados de oxidación (Flórez & Martínez, 2010).

Su estructura general es:

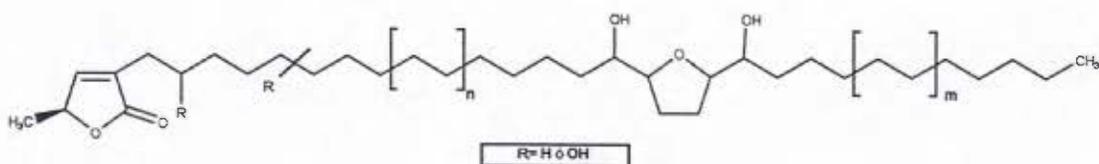


Figura 4. Estructura general de acetogeninas mono-THF.

### 2.4.1.4. Acetogeninas bis-THF:

Son compuestos que poseen 2 anillos THF, adyacentes o no adyacentes; de 35-37 carbonos, diferenciables entre sí por el grado de oxidación, tipo, número y ubicación del sustituyente, así como de su estereoquímica (Flórez & Martínez, 2010).

Su estructura general es:

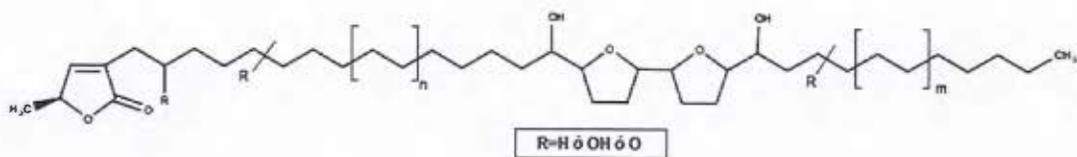


Figura 5. Estructura general de acetogeninas bis-THF adyacentes.

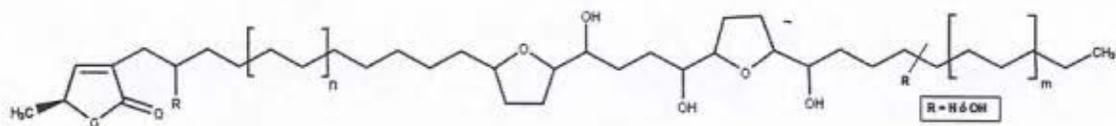


Figura 6. Estructura general de acetogeninas bis-THF no adyacentes.

#### 2.4.1.5. Acetogeninas Tri-THF:

Son aquellas que poseen 3 anillos THF. Hasta el momento se conoce la Goniocina aislada de *Goniothalamus giganteus* (Flórez & Martínez, 2010).

Su estructura es:

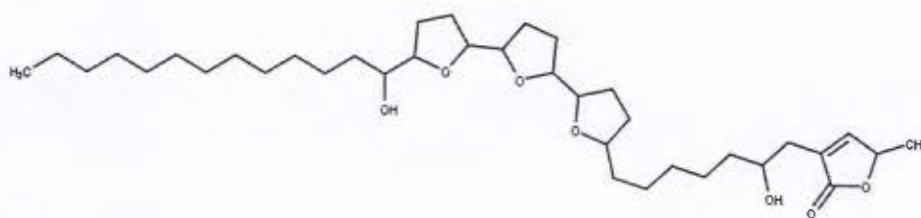


Figura 7. Estructura de la Goniocina acetogenina Tri-THF.

#### 2.4.1.6. Acetogeninas Tetrahidropiránicas (THP):

Son aquellas que poseen un anillo tetrahidropirano como sustituyente en la cadena alquílica (Flórez & Martínez, 2010).

Su estructura general es:

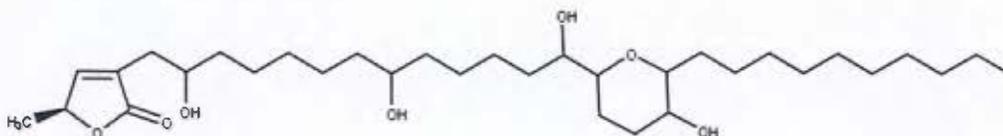


Figura 8. Estructura general de acetogeninas THP.

## 2.5 Extracción e identificación de las acetogeninas

- **Extracción de las acetogeninas**

La extracción de las acetogeninas en *annonaceas*, se realiza de diferentes maneras, depende del objetivo y la pureza que se quieran obtener. Sin embargo, los estudios realizados presentan una serie de similitudes en cuanto solventes y secado. A continuación se presentan algunos ejemplos:

En un estudio sobre *Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using Artemia salina (Brine Shrimp Test)*, (Santos Pimenta, Pinto, Takahashi, e Silva, & Boaventura, 2003) ejecutan el siguiente protocolo de extracción: La madera y semillas se secaron a 40 °C y se extrajeron con curvas de temperatura con disolventes, que se retiraron al vacío para dar los extractos crudos. La madera se extrajo con etanol, las partes de la planta y las semillas se extrajeron con etanol: Agua (7:3) y luego sucesivamente con hexano y cloroformo, luego se concentró al vacío.

Por su parte, (Betancur-Galvis, Saez, Granados, Salazar, & Ossa, 1999) sugieren un procedimiento donde el material vegetal (100 g de semillas, hojas y tallos) se secó en un horno a una temperatura de 40 °C. La planta se extrae con etanol y se filtró con metanol. Los diferentes extractos se evaporaron casi sequedad bajo presión reducida y se almacenaron a una temperatura de 4°C protegido de la luz, hasta que no se utilizaron en los diferentes ensayos citotóxicos, no más de dos meses.

En otro estudio, las hojas se calentaron en un horno a 40°C hasta que se convirtió en quebradiza, después de lo cual se fragmentaron manualmente. Las semillas se secaron al aire a temperatura ambiente y posteriormente maceraron a un polvo. Los extractos se prepararon por remojo del material vegetal macerado en etanol absoluto para 7 días,

seguido de filtración y concentración bajo presión reducida en rotavapor (Ribeiro et al., 2013).

- **Identificación de las acetogeninas**

De acuerdo con los reportes de la literatura, las acetogeninas suelen identificarse por medio de resonancia magnética nuclear o por espectrometría de masas, o una combinación de ambas técnicas (Florez & Mesa, 2007; García Aguirre, 2009). En el presente trabajo de graduación, se adaptó métodos colorimétricos para inferir la presencia de acetogeninas por medio de pruebas colorimétricas diseñadas para detectar los grupos funcionales furano y lactónico.

Para la detección de anillos lactónicos se han reportado tres métodos: Kedde, Legal y Baljet. Mientras que para la detección del anillo furano el método más empleado es la prueba con el revelador universal anisaldehído.

La prueba de Kedde consiste en agregar al extracto a evaluar 1 mL de reactivo de Kedde (5 mL de ácido 3,5-dinitrobenzoico al 3% en etanol y 5 mL de NaOH 2M) (Cofré, 2009). Este reactivo presenta una coloración violeta cuando forma un complejo coloreado con la lactona insaturada.

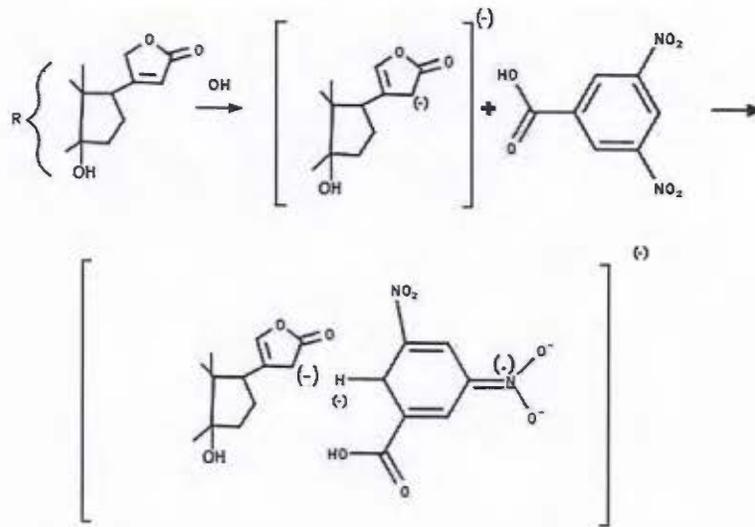


Figura 9. Fundamento de la reacción de Kedde.

Fuente:(Warner & Bladt, 2001).

La prueba de Baljet consiste en añadir a la muestra picrato de sodio o potasio, pues la sesquiterpenlactonas producen una coloración naranja cuando se tratan con dicho reactivo (Alejandro Martínez, 2002), este reactivo se prepara con 1 g de ácido pícrico en 100 mL de metanol (solución A) y 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua (Solución B), a la muestra se le añaden dos o tres gotas de este reactivo para observar la coloración (Villacorta, 2013).

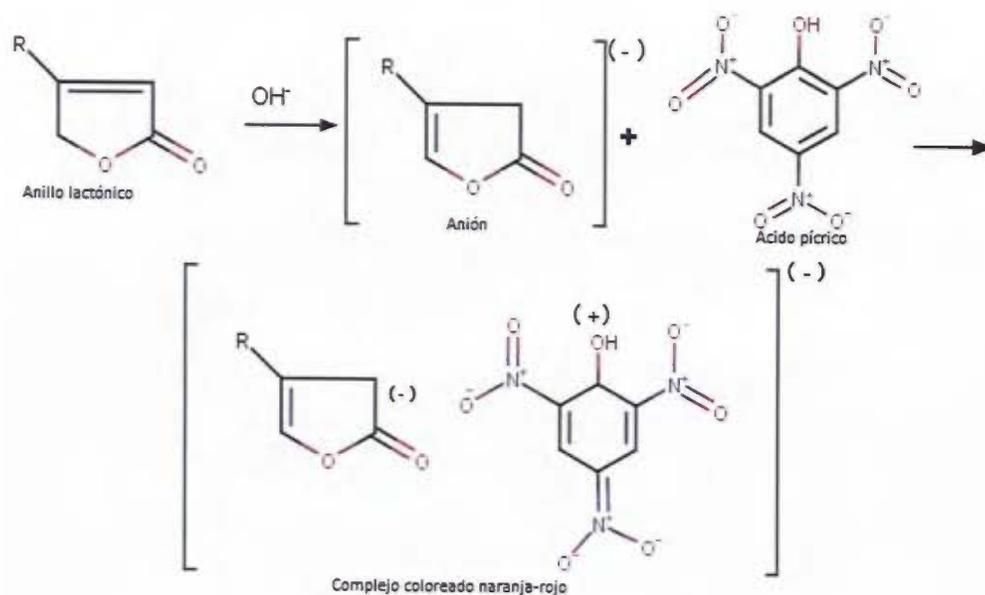


Figura 10. Fundamento de la reacción de Baljet.

Fuente: (Warner & Bladt, 2001).

Tanto la prueba de Kedde como Baljet, son pruebas de identificación de cardenólidos, compuestos en su estructura tienen anillos lactónicos. Kedde da una coloración violeta para anillos  $\alpha$ - $\beta$ -lactona insaturado/  $\gamma$ -lactona insaturadas, en el caso de Baljet reacciona con anillos con  $\gamma$ -lactona insaturadas cis o trans generando un complejo coloreado rojo-naranja (Bhat, Nagasampagi, & Sivakumar, 2006).

Igualmente se utiliza la prueba de Legal, ya que las sesquiterpenlactonas con anillos  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturados producen coloración rosa cuando se disuelven en piridina, se añade nitroprusiato de sodio y un álcali (Alejandro Martínez, 2002). Este reactivo se compone de nitroprusiato 0.5 % e hidróxido de sodio 2N; a la muestra (2 mg) se le añade 1 gota de la solución de nitroprusiato 0.5 %, en seguida se añade gota a gota, 4 gotas de hidróxido de sodio 2N y se observa una coloración roja o naranja (Villacorta, 2013). La prueba también la dan positiva las

lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$  -insaturadas cuando no se controla el pH, ya que se isomerizan en medio alcalino. La prueba también la dan positiva las metiléncetonas (Alejandro Martínez, 2002).

Para la detección del furano, se realiza cromatografía de capa fina con el revelador universal de anisaldehído, este reactivo es una mezcla de 8 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0,5 mL de anisaldehído, 85 mL de metanol y 10 mL de ácido acético glacial, la cromatoplaque se calienta en una estufa a 100-105°C por 5-10 min para desarrollar las muestras coloreadas rojo-naranja-marrón y azul verdosas (Herrera, C; Bolaños, N; Lutz, 2003).

Además en esta investigación se va utilizar el revelador universal de Oleum, el cual permite la identificación de varios tipos de metabolitos, los compuestos orgánicos se carbonizan generando manchas de color marrón, azules violetas y verduzcas. Sin embargo, es comúnmente utilizada para detectar lactonas sesquiterpénicas, compuestos que tiene dentro de su estructura anillos lactónicos, por lo cual es aplicable a las acetogeninas, coloraciones púrpura, vino, rosa o rojo se consideran positivos (Jiménez, 2013).

## **2.6 Cromatografía de capa fina o TLC (por sus siglas en inglés *Thin Layer Chromatography*)**

La cromatografía es un método de análisis rápido que permite separar los componentes de una mezcla, utilizando las diferencias entre las constantes de equilibrio de distribución entre una fase móvil y la fase estacionaria que ejerce un efecto retardador (Gutiérrez, 2002).

La técnica de separación consta de un sistema de dos fases, una sólida que se conoce como fase estacionaria; sobre la cual se aplica la muestra, es una capa delgada, absorbente, con un grosor de 0.10 a

0.25 mm, esta capa es fijada sobre un soporte que puede ser una placa firme de vidrio, plástico o aluminio. A través de la fase estacionaria transita un líquido o solvente llamado fase móvil (Guarnizo & Martínez, 2013).

La caracterización de los compuestos se realiza comparando la migración, el factor de retención ( $R_f$ ) de sustancias desconocidas con la migración de un compuesto patrón. En un sistema particular de disolventes, el  $R_f$  es característico de cada sustancia, y es así posible identificar compuestos desconocidos en una determinada muestra (Herrera, C; Bolaños, N; Lutz, 2003).

De acuerdo con (Walton & Reyes, 1983) el  $R_f$  se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Distancia recorrida por el sustrato}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}} = R_f$$

## **2.7 Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC**

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica que se utiliza para separar los componentes de una mezcla basada en la afinidad que tengan estos con la fase móvil y la fase estacionaria. En este tipo de cromatografía los componentes de la muestra deben estar previamente disueltos en un disolvente adecuado (fase móvil), son forzados a atravesar la columna cromatográfica mediante la aplicación de altas presiones. Una vez en la columna se encuentran con la fase estacionaria que está constituida por un relleno que sostiene la fase líquida o sólida, esta es capaz de retener de forma selectiva los componentes de la muestra (Skoog, James, & Crouch, 2008).

El gran poder de la cromatografía líquida reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores

(Rubinson & Rubinson, 2001). Los diferentes tipos de cromatografía líquida también se clasifican según las interacciones entre la fase estacionaria y el soluto, los cuatro tipos básicos son la cromatografía de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico y de filtración en gel (Rubinson & Rubinson, 2001).

La cromatografía líquida de alta eficiencia a pesar de ser una técnica relativamente nueva, cuenta con numerosas aplicaciones. En la mayoría de los casos, consisten en determinaciones de sustancias cuyo análisis por otra técnica cromatográfica resulta muy difícil, esta técnica es aplicable a muestras con (Swadesh, 1997):

- Compuestos iónicos, como aminoácidos, sales inorgánicas, ácidos orgánicos, entre otros.
- Compuestos de alto peso molecular, como polímeros, hidrocarburos polinucleares, productos naturales, entre otros.
- Compuestos termolábiles y no volátiles, como vitaminas, pesticidas, esteroides, plastificantes, drogas.

## **2.8 Espectro de masas por la técnica de infusión directa**

La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa. El objetivo del sistema de entrada es introducir una pequeña cantidad de muestra (un micromol o menos) en el espectrómetro de masas, donde sus componentes se convierten en iones gaseosos. A menudo, el sistema de entrada contiene un medio para la volatilización de muestras sólidas o líquidas. (Rubinson & Rubinson, 2001).

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica utilizada para la identificación de compuestos desconocidos que cuantifica compuestos conocidos, y permite elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. Una de las ventajas de esta técnica, es que el análisis se realiza con cantidades realmente pequeñas de muestra,

concentraciones en el rango de nanogramos de muestra, además se obtiene información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito (Plascencia, 2003). En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico (electron ionization EI), algunas de las moléculas ionizadas del analito “explotan” en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como su “huella química” para caracterizar el analito (Plascencia, 2003).

El esquema general de los componentes principales de un espectrómetro de masas se muestra en la siguiente figura:

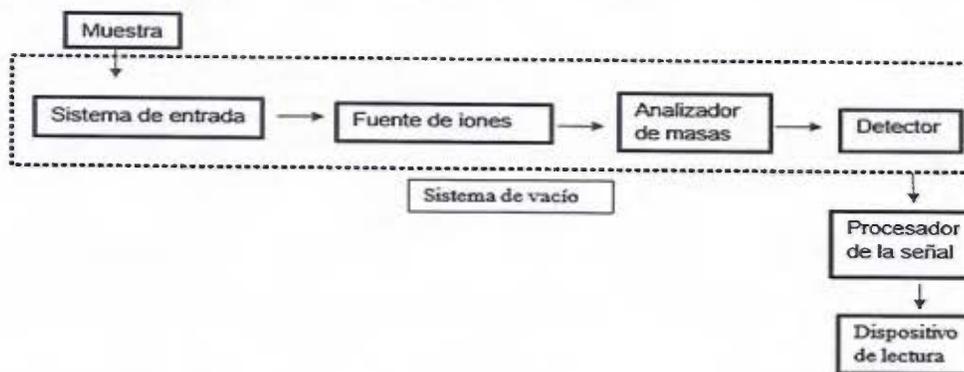


Figura 11. Esquema general de los componentes principales de un espectrómetro de masas.

Fuente: (Rubinson & Rubinson, 2001).

La infusión consiste en introducir un flujo continuo de muestra con caudales bajos en la fuente de iones mediante el uso de una bomba de jeringa. Durante el proceso de optimización de la infusión, el software puede seleccionar los iones precursores y producto, así como optimizar el potencial de desagrupación, la energía de colisión y el potencial de salida de la celda de colisión. Los voltajes de los parámetros de la ruta iónica se

incrementan o reducen de forma gradual para determinar la intensidad de señal máxima de cada ión precursor y producto (AB SCIEX, 2014).

Mediante la técnica aplicada de infusión directa se analizan tanto compuestos puros como mezclas obteniendo del compuesto incógnita la masa molecular. Según la forma en que se reciban las muestras, es necesario un procesamiento previo. Las muestras sólidas deben disolverse utilizando solventes adecuados para poder introducir las en el espectrómetro por infusión directa. Las muestras líquidas pueden utilizarse directamente si están en concentraciones adecuadas. Se configura el equipo para realizar experimentos de espectros de masas (MS) o espectros de masa en tándem (MS/MS). Se introducen las muestras en el equipo y se obtiene el archivo de espectros de masas, que necesita un posterior procesamiento de los datos (Plascencia, 2003).

## **2.9 Pruebas de citotoxicidad**

Las líneas celulares son células de origen vegetal o animal adaptadas para replicarse indefinidamente en cultivo. La adaptación ocurre por el proceso de denominado transformación, el cual puede ocurrir espontáneamente o inducido por compuestos químicos, virus o radiaciones, a través de los cuales las células adquieren la capacidad de multiplicarse *in vitro* durante períodos prácticamente ilimitados (Repetto, 1995). Estas son ampliamente utilizadas para la identificación de agentes quimiopreventivos, es decir, con capacidad de bloquear, retardar o revertir el proceso de carcinogénesis, mediante ensayos de citotoxicidad, antiproliferación, muerte celular, entre otros (Montoya, Orozco, Arango, Maldonado, & Aguillón, 2013).

~ La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño detectable. Diferentes autores han desarrollado bacterias de pruebas *in vitro* para predecir los

efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y líneas celulares establecidas (Arencibia, Rosario, & Curveco, 2003).

Con las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se puede analizar el efecto de compuestos en un ambiente controlado, siendo posible evaluar: la inhibición del crecimiento celular; la permeabilidad de membrana, la replicación y la transcripción del ácido ribonucleico, la síntesis de proteínas, hormonas y enzimas, el metabolismo energético, la transformación celular, la mutagénesis y la carcinogénesis, entre otros (Acevedo *et al.*, 2013).

En los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares se utilizan métodos de tinción con el objetivo de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de ser sometidas a un tratamiento. La principal desventaja es que la mayoría de estos, son destructivos, es decir que solo permiten determinar el punto final (Escobar M., Rivera, & Aristizábal G., 2010).

La resazurina es un compuesto de color azul (no fluorescente) comúnmente utilizado para medir la fluorescencia en ensayos de citotoxicidad, ya que la célula permite el paso de la sal de resazurina y al entrar en contacto, esta se reduce a resofurina (rosado, altamente fluorescente), por medio de oxireductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables. La principal ventaja de este método de tinción es que no es destructivo por lo cual se puede monitorear el crecimiento de la célula (Galindo, Castell, Montell, Segura, & Baeza, 2014). La resazurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias e incluso hongos (Escobar M. *et al.*, 2010).

## 2.10 Mecanismo de acción de las acetogeninas

Las acetogeninas bloquean la respiración mitocondrial al inhibir la NADH ubiquinona reductasa (Complejo I), enzima esencial para la producción de ATP. Al interferir en la producción de ATP, se produce una disminución de esta molécula en el interior de la célula y en consecuencia promueve la muerte (García Aguirre, 2009).

Estudios recientes han demostrado que las acetogeninas también inhiben la NADH oxidasa de la membrana plasmática, lo que causa una disminución del nivel intracelular del ATP, y bloquea la regeneración del NAD e inhibe la fosforilación glicolítica en el citosol. La combinación de estos modos de acción promoverían el proceso de apoptosis el cual se ha propuesto como el principal efecto farmacológico de las acetogeninas en tejidos tumorales (Gallardo *et al.*, 2000; Oberlies, Jones, Corbett, Fotopoulos, & McLaughlin, 1995).

De acuerdo con el estudio de (Takada *et al.*, 2000), el mecanismo de acción que se conoce hasta el momento funciona de la siguiente manera: el anillo THF, con grupos OH cerca del esqueleto de glicerol actúan como anclas hidrófilas en la superficie de la membrana, mientras el anillo  $\gamma$ -lactona interactúa directamente con el sitio diana del complejo I por difusión lateral en el interior de la membrana mitocondrial. Es decir, el anillo (s) de THF rodeado de grupos hidroxilo reacciona cerca de la cadena principal de glicerol de fosfatidilcolina independientemente del número de anillos de THF y actúa como un ancla hidrófila en la superficie de la membrana. Por otro lado, el anillo de  $\gamma$ -lactona interactúa directamente con el sitio diana del complejo I de la membrana mitocondrial interna. En este modelo, el anillo de  $\gamma$ -lactona es considerado como el única especie reactiva que interactúan directamente con la enzima (Abe *et al.*, 2005).

Según Cave *et al.*,(1997), diversos estudios han planteado teorías entre la relación en la estructura de las acetogeninas y la actividad biológica (como se cita en García Aguirre, 2009).

- Las acetogeninas que contienen en su estructura dos anillos THF adyacentes han presentado mayor actividad, debido a la función del anillo de anclar la acetogenina al glicerol de la membrana liposomal.
- La  $\gamma$ -lactona terminal es esencial para la actividad, ya que una reducción del doble enlace de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada reduce la actividad, las cetolactonas ha presentado menor potencia que las  $\gamma$ -lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturadas.
- También el número de grupos hidroxilo presentes a lo largo de la cadena presentan relación con la actividad, según los estudios presentan mayor actividad aquellas acetogeninas que poseen un mayor número de grupos OH.

## CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), ubicado en Pavas, San José. Específicamente, en el Laboratorio de Bioprospección. El CENIBiot fue el ente interesado en realizar esta investigación como parte de sus proyectos a desarrollar en los años 2016-2017.

La recolección del material vegetal se realizó en la provincia de Puntarenas, en la Península de Osa, Los Charcos.



Figura 12. Ubicación del sitio de muestreo en el mapa de Costa Rica y lugar de muestreo (Los Charcos, Península de Osa).

Fuente: Google earth, 2016

### 3.2 Material vegetal

El material vegetal se recolectó en la Península de Osa, con el apoyo del botánico, Lic. Luis Poveda, colaborador de la Universidad Nacional, el cual hizo la identificación taxonómica del material vegetal. Se recolectaron las hojas, y corteza de las siguientes especies de *annonaceae*: *Guatteria amplifolia*, *Guatteria chiriquiensis*, *Guatteria rostrata*, *Guatteria púdica*, *Guatteria diospyroides*, *Guatteria lucens*, *Annona amazónica*, *Annona montana*, *Annona purpurea*, *Duguetia confusa*, *Unonopsis osae*, *Rollinia mucosa* y *Xylopia aromática*, esta elección se efectuó en base a publicaciones obtenidas de cada una de las especies y su abundancia dentro y fuera del país. Debido a que el muestreo se realizó en el Parque Nacional Los Charcos de Osa; se muestreo un solo espécimen por especie, debido a que es una zona protegida.

De las muestras de *annonaceas* se separaron la corteza de la madera, y las hojas. Posteriormente, fueron secadas en un horno de convección interna, a una temperatura inferior a los 40°C en un intervalo de cuatro a seis días, dependiendo del grado de humedad del material recolectado. Una vez seco el material, fue trasladado al Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica, donde se molió en un molino de cuchillas con un tamiz de 1mm y se almacenó a -4 °C en las instalaciones del CENIBiot hasta su análisis.

### **3.3 Método de extracción acetogeninas**

Se realizaron dos metodologías para la obtención de un extracto crudo, con el fin de determinar la mayor concentración de acetogeninas. Para ello, se realizó un ensayo bio-guiado en células carcinogénicas, así como pruebas fitoquímicas de identificación de grupos funcionales.

#### **3.3.1 Protocolo experimental 1**

Para la obtención del extracto crudo de acetogeninas, se pesaron 100 g del material vegetal seco en un matraz de 1L. Al mismo, se le realizaron múltiples extracciones con 500 mL de etanol 95%v/v en baño ultrasónico (Fisher Scientific Modelo FS220) por 1h.

Los extractos obtenidos se combinaron y se filtraron a través de papel Whatman 42, para luego concentrarlos en un rotavapor (HEIDOLPH G5B) a presión reducida y temperatura no mayor a 40°C hasta la eliminación del etanol 95%v/v. El extracto orgánico obtenido, se congeló y se liofilizó. Al liofilizado resultante se llamó extracto crudo.

Este procedimiento se basó en el estudio realizado en la patente de United States Patent US005955497A

#### **3.3.2 Protocolo experimental 2.**

Para la obtención del extracto crudo de acetogeninas, se pesaron 100 g del material vegetal seco en un matraz de 1L. Al mismo, se le realizaron

múltiples extracciones con 700 mL de agua con la ayuda de un baño ultrasónico (Fisher Scientific Modelo FS220) por 1h. Los sobrenadantes se eliminaron por filtración y el material vegetal fue sometido a otro proceso de extracciones múltiples utilizando como solvente acetato de etilo.

Los extractos obtenidos de acetato de etilo, se combinaron y se filtraron a través de papel filtro Whatman 42, para luego concentrarlos en un rotavapor (HEIDOLPH G5B) a presión reducida y temperatura no mayor a 40°C hasta la eliminación del acetato de etilo. El extracto orgánico obtenido, se congeló y se liofilizó. Al liofilizado resultante se le llamó extracto crudo.

Este procedimiento fue un protocolo experimental desarrollado en el CENIBiot.

### **3.4 Tamizaje fitoquímico**

Para la identificación inicial de los compuestos presentes en los extractos se realizaron pruebas químicas de identificación, así como pruebas para grupos funcionales, las cuales se realizaron utilizando la siguiente metodología del protocolo de ejecución de tamizaje fitoquímico del CENIBiot.

#### **3.4.1 Cumarinas volátiles**

En un tubo de ensayo se colocó 2 mL del extracto etanólico de la planta, se tapó con papel filtro impregnado en solución de hidróxido de sodio diluida y se llevó a baño maría a 100 °C por algunos minutos. Se removió el papel filtro y examinó bajo luz UV, siendo la fluorescencia amarilla indicativa de la presencia de cumarinas.

#### **3.4.2 Antocianinas**

En un erlenmeyer se colocó unos 10 mL del extracto crudo, se calentó a ebullición, durante 5 minutos y se filtró.

En un tubo de ensayo se colocó 2 mL del filtrado. Se añadió 1 mL de hidróxido de sodio diluido. Se observó el color formado.

En otro tubo de ensayo se colocó otros 2 mL del filtrado. Se añadió unas 6 gotas de un ácido mineral diluido. Se observó el color formado. Las antocianinas se reconocen por producir diferentes colores a diferentes pH.

### **3.4.3 Flavonoides**

En un erlenmeyer se colocó unos 10 mL de extracto crudo, se calentó a baño maría durante unos 5 minutos, con agitación. Se enfrió y filtró. Al filtrado se le agregó un volumen igual de solución de acetato de plomo al 4% que contenía ácido acético al 0,5%. Se agitó y se dejó reposar por 15 minutos, se filtró. Con el filtrado se realizó el ensayo de reconocimiento de flavonoides.

Se colocó en un tubo de 2 mL del extracto preparado, algunos fragmentos de magnesio y se agregó por las paredes del tubo, unas gotas de ácido clorhídrico diluido. Se observó la coloración, que varía para las diferentes estructuras. La aparición de colores naranja, rosado, rojo o violeta es prueba positiva para la existencia de flavonoides en la muestra.

### **3.4.4 Triterpenos y/o esteroides**

En un tubo de ensayo limpio y completamente seco, se colocó 1 mL del extracto etanólico. Se agregó 1 mL de anhídrido acético. Por la pared del tubo y con mucha precaución, se dejó resbalar 1-2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La formación de colores azules, violetas, rojos o verdes es prueba positiva de que la muestra contiene triterpenos y/o esteroides.

### **3.4.5 Taninos**

Se evaporó 5 mL del extracto etanólico y disolvió el residuo en 10 mL de agua destilada y se filtró.

A 3 mL del extracto acuoso, se le adicionó 1 o 2 gotas de solución de cloruro férrico al 10%. Una coloración azul indica posible presencia de taninos hidrolizables, y coloración verde de taninos condensados.

#### **3.4.6 Antraquinonas**

Mediante la agitación del extracto acuoso con cloruro de hierro (III) y ácido clorhídrico diluido, se calentó para producir la hidrólisis, las antraquinonas liberadas se extrajeron con tetracloruro de carbono y la formación de un color rosa-rojo cuando la disolución se agita con amoníaco diluido es indicativo de presencia de antraquinonas.

#### **3.4.7 Alcaloides**

-Análisis por TLC

Se calentó 20 mg del extracto etanólico con una mezcla de etanol: cloroformo (1:1)

Fase estacionaria: Sílice gel 60 F254

Fase móvil: Cloroformo: metanol (90:10).

Revelador: Reactivo de Dragendorff (Solución A: 1.7 g de nitrato de bismuto (III) y 20 g ácido tartárico en 80 mL de agua/ Solución B: 16 g de yoduro de potasio en 40ml de agua, se mezcló partes iguales de las soluciones A y B, esta solución stock es estable por varios meses, para la disolución spray: Se disolvió 10 g de ácido tartárico en 50 mL de agua y se agregó 10 mL de la solución stock).

La formación de manchas coloración naranja se considera un resultado positivo para alcaloides.

#### **3.5 Fraccionamiento de extractos crudos**

Los extractos crudos obtenidos fueron sometidos a un sistema de partición líquido-líquido, utilizando como solventes hexano y metanol.

Realizando este método de partición se separaron los grupos de compuestos según sus diferencias en polaridad.

Las fases obtenidas, fueron concentradas en un rotavapor (HEIDOLPH G5B) a presión reducida y temperatura no mayor a 40°C hasta la eliminación del solvente. Los extractos orgánicos obtenidos, se liofilizaron para garantizar su total sequedad, luego fueron almacenados en un congelador a -20°C hasta su uso.

### **3.6 Obtención del patrón de acetogeninas a partir de las semillas de *Annona muricata* (PEAAm)**

Las semillas previamente lavadas y secadas se molieron en la Universidad Nacional de Costa Rica en un molino de cuchillas con un tamiz de 1 mm. Posteriormente, en las instalaciones del CENIBiot, se extrajo mediante el siguiente procedimiento:

Para la obtención del extracto patrón de acetogeninas, se pesó 100 g del material vegetal seco en un matraz de 1L. Al mismo, se le realizaron múltiples extracciones con 700 mL de hexano, ultrasonificando por 1h con el equipo de baño ultrasónico (Fisher Scientific Modelo FS220).

Los extractos obtenidos de hexano, se combinaron y se filtraron a través de papel filtro Whatman 42, posteriormente fueron sometidos a un sistema de partición líquido-líquido, utilizando como solventes hexano y metanol. Con este sistema de partición se separaron los diferentes compuestos, bajo el principio de polaridad.

Las fases obtenidas, fueron concentradas en un rotavapor (HEIDOLPH G5B) a presión reducida y temperatura no mayor a 40°C hasta la eliminación del solvente. El extracto orgánico obtenido, se liofilizó para garantizar su total sequedad, luego fue almacenado en un congelador a -20°C hasta su uso.

### **3.7 Espectro LC-MS/MS para la caracterización del patrón de acetogeninas a partir de las semillas de *Annona muricata* (PEAAm)**

El análisis de LC-MS/MS se llevó a cabo con un espectrómetro de masas, MDS SCIEX Applied Biosystems, versión 4000 Q TRAP LC/MS/MS, System Turbo V™ source with TurbolonSpray® en modo positivo, bajo la técnica de infusión utilizando los siguientes parámetros.

- CUR: -18.00
- CAD: Medium
- IS: 5500.00
- TEM: 150
- GS1: 20.00
- GS2: 15
- Ihe: ON
- EP: 10.00
- DP 35

Preparación de muestra: Se transfirió aproximadamente 50 mg de muestra homogenizada a un balón aforado de 25 mL, se agregó 15 mL de metanol (grado HPLC masas), se sonificó por 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó con metanol (grado HPLC masas). De la solución anterior se tomó una alícuota de 5 µL en un balón de 5 mL y se aforó con una mezcla de Metanol grado masas/H<sup>+</sup> al 0.5%. Se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

### **3.8 Optimización de la fase móvil para las cromatografías de capa fina reveladas con p-anisaldehído y óleum.**

Para la selección de la mejor fase móvil se trabajaron diferentes combinaciones de solventes con el patrón experimental de acetogeninas de *Annona muricata*, se utilizó el p-anisaldehído como revelador. Las fases móviles evaluadas fueron:

- Fm 1: Acetato de etilo al 100%.
- Fm 2: Hexano: Acetato de etilo (90:10)
- Fm 3: Cloroformo: etanol (90:10)

- Fm 4: Hexano: Acetato de etilo (80:20)
- Fm 5: Acetato de etilo: metanol (80:20)
- Fm 6: Acetato de etilo: Hexano (90:10)
- Fm 7: Hexano: Acetato de etilo (70:30)

### 3.9 Método de identificación cualitativo de acetogeninas en patrones y fracciones

#### 3.9.1 Pruebas de tubo de ensayo y capa fina.

##### - Identificación del anillo lactónico:

Para estandarizar estas pruebas de identificación del anillo lactónico se utilizó un patrón de digoxina, molécula que dentro de su estructura posee un anillo lactónico, además del patrón de acetogeninas de *A. muricata*.

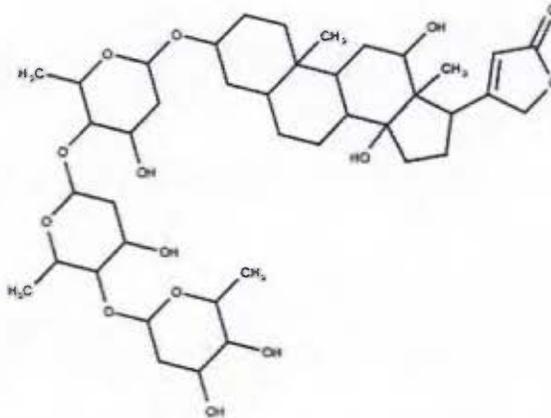


Figura 13. Estructura química de la digoxina.

Fuente:(National Center for Biotechnology, 2016).

Se realizaron tres pruebas de tubo de ensayo para confirmar la presencia del anillo lactónico que poseen las acetogeninas dentro de su estructura, la primera prueba fue Kedde consiste en una reacción de resonancia, que permite la formación de un complejo -coloreado cuando reacciona con el anillo lactónico. La prueba de Kedde (Warner & Blatt, 2001) se preparó de la siguiente manera:

**Solución A:** ácido 3,5 dinitrobenzoico 99% (Cas. N°15639) Sigma-Aldrich® al 3% en etanol (recién preparado).

**Solución B:** hidróxido de potasio (Cas. N°1310-58-3) Merk al 5,7% en etanol.

A la muestra se le añaden cantidades iguales de las soluciones A y B del reactivo. El resultado se tomó como positivo si se desarrollan coloraciones azuladas, rosadas y hasta violetas.

La segunda prueba es la reacción de Legal que al igual a Kedde, forma un complejo coloreado cuando reacciona con un anillo lactónico. Para dicha prueba se tomó aproximadamente de 1-2 mg de muestra en agua o etanol. A la muestra se le agregó 1 mL de solución fresca de nitro prusiato de sodio (Cas. N°13755-38-9) Merk 0.5% en agua y 1-4 gotas de hidróxido de potasio 2M (Cas. N°1310-58-3) Merk. Cuando el resultado es positivo se observó la formación de un color rojo oscuro, característico de la reacción con las lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  insaturada.

Otro de los ensayos de detección del anillo lactónico, es la prueba de Baljet que consiste en la elaboración del reactivo Baljet, el cual se preparó mezclando una **Solución A:** 1 g de ácido pícrico (Cas. N°88-89-1) Sigma-Aldrich® en etanol al 95% y la **Solución B:** 10 g de hidróxido de sodio (Cas. N°1310-73-2) Merk en 100 mL de agua en una proporción de (1:1). Una vez preparado el reactivo, se añadió unas gotas del reactivo a la muestra; si se observa una coloración roja clara a oscura indica que la prueba es positiva.

**- Identificación del anillo furano:**

**a. Preparación del reactivo p-anisaldehído sulfúrico:**

Para esta prueba se disolvió 0,5 mL de p-anisaldehído (Cas. N° 123-11-5) Sigma-Aldrich® en una solución de metanol: ácido acético glacial: ácido sulfúrico 98% (85:10:5), este se preparó en el momento en que va a usarse.

#### **b. Cromatografía en capa fina:**

Se trabajó con el siguiente sistema cromatográfico:

**Fase estacionaria:** Sílica gel 60F<sub>254nm</sub>

**Fase Móvil:** Hexano: acetato de etilo (70:30)

**Revelado:** Se efectuó una vez seco el cromatograma, mediante rociado con el reactivo del p-anisaldehído. Se calentó a 100 °C por 5 min. La presencia de manchas de azules a violetas son resultados positivos.

#### **-Cromatografía de capa fina con revelador universal de Oleum**

Se trabajó con el siguiente sistema cromatográfico:

**Fase estacionaria:** Sílica gel 60F<sub>254nm</sub>

**Fase Móvil:** Hexano: acetato de etilo (70:30).

**Reactivo de Oleum:** Se preparó mezclando ácido sulfúrico, agua y ácido acético en una proporción 1:4:20, respectivamente.

**Revelado:** Se efectuó una vez seco el cromatograma, mediante rociado con el reactivo de Oleum. Se calentó a 100 °C por 5 min. Los compuestos orgánicos se carbonizan generando manchas de color marrón, azules violetas y verduzcas.

### **3.10 Perfil cromatográfico por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Preparación de la muestra: Se transfirió aproximadamente 50 mg de muestra homogenizada a un balón aforado de 25 mL, se agregó 15 mL de metanol (grado HPLC), se sonificó por 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó con metanol (grado HPLC). Se filtró a través de un filtro de 0,45 µm.

- Condiciones cromatográficas:

- Flujo: 1,0 mL/min
- Longitud de onda: 209 nm.
- Detector: DAD (Detector de Arreglo de Diodos)

- Columna cromatográfica: Luna (Phenomenex) C18 250 x 4,6 mm x 5µm
- Volumen de inyección (Loop): 50 µL
- Gradiente:

Cuadro 2. Gradiente del método de caracterización de las acetogeninas

Tiempo (minutos)	Agua (% v/v)	Acetonitrilo (%v/v)
0	70	30
6	70	30
11	20	80
26	20	80
30	0	100
55	0	100
58	70	30

Fuente: Elaboración propia.

### 3.11 Cuantificación de acetogeninas en la fracción con metanol de extractos de annonaceas por el método de Kedde.

#### Preparación de la Curva de calibración de patrón de acetogeninas (PEAAm)

- a) Disolución madre de patrón de acetogeninas.

Se procedió pesando 102,4mg del extracto del patrón experimental de acetogeninas utilizando un balón aforado de 25 mL, el cual se aforó con etanol como disolvente.

- b) Preparación de los patrones para la curva de calibración.

Se procedió tomando alícuotas de 3,00, 5,00, 6,00 y 8,00 mL de la disolución madre del patrón de acetogeninas (4.096 mg/mL), se depositaron en balones de 10,00 mL y se aforaron con etanol, para un rango de concentración de 1.228 mg/mL a 4.096 mg/mL.

c) Procedimiento para la determinación del contenido de acetogeninas presentes en los extractos crudos de las muestras *annonaceas*, empleando el método de Kedde.

Para la determinación del contenido de acetogeninas se utilizó un lector de microplacas Synergy HT de Biotek, el cual emplea microplacas de 96 pozos en el análisis. El protocolo de este análisis se realizó adicionando a una placa de 96 pozos: 80  $\mu$ L de extracto fracción metanólica de muestra, 25 $\mu$ L de cada una solución A y B que componen el reactivo de Kedde, se agregó de último la solución B (KOH al 5.7% en etanol) dado que este inicia la reacción. Luego de la adición de este último reactivo, la microplaca es agitada por al menos 20 segundos en el lector. La reacción colorimétrica tiene una velocidad de reacción elevada, por lo cual se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 535 nm, con un tiempo de reacción de 2 minutos.

Se utilizó como blanco: 80  $\mu$ L de etanol y 25 $\mu$ L de cada una solución A y B que componen el reactivo de Kedde.

### **3.12 Identificación de los extractos con mayor potencia inhibitoria de líneas celulares de cáncer.**

Los extractos con mayor concentración de acetogeninas serán trasladados a la unidad de bioensayos del CENIBiot, donde el personal encargado realizó las pruebas de citotoxicidad.

Para esto, se evaluó por triplicado un ensayo de la actividad de los extractos crudos y las particiones que generen resultados positivos por la presencia de acetogeninas identificados. De acuerdo con los resultados de estos bioensayos, se determinó las especies que continuarán en estudio.

- Estas pruebas se realizaron en colaboración con el Laboratorio de ensayos biológicos del CENIBiot y con la colaboración de la biotecnóloga Noelia

Mora Ugalde, investigadora del CENIBiot bajo la metodología de ensayos de citotoxicidad del CENIBiot.

El ensayo se llevó a cabo en una cámara de bioseguridad ESCD® class II Type A2, con la vestimenta adecuada (guantes, mascarilla y gabacha) y los materiales que se emplearon fueron ser estériles. Se utilizó la línea celular comercial de cáncer de pulmón humano NCI-H460 (H460) ATCC® (HTB177™, USA), mantenidas con medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco®) sin antibióticos en tubos Falcon de 25 cm<sup>2</sup>, e incubadas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

La inhibición del crecimiento tumoral se evaluó observando el crecimiento de las células a los tiempos 0, 24, 72 y 96 h, mediante fluorescencia con el método de resazurina en un lector de microplacas Synergy™ H1 (BioTek) a longitud de onda de excitación 540 nm y 560 nm de emisión y una sensibilidad de 70. La fluorescencia ocasionada por la muestra se determina con la siguiente resta:

Fluorescencia de muestra real= Fluorescencia medida para muestra - Fluorescencia del blanco

Entre más alto sea el valor de fluorescencia hay mayor proliferación de células, y si en cambio el valor de fluorescencia es menor significa que el extracto afecta el crecimiento celular por lo cual hay pocas células que emitan fluorescencia.

Por otra parte, la fórmula de cálculo para el porcentaje de inhibición es la siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left( \frac{\bar{X} \text{ fluorescencia de muestra real (células con extracto)}}{\bar{X} \text{ fluorescencia de las células al 100 \% de viabilidad}} * 100 \right)$$

Un porcentaje positivo significa que el extracto afecta el crecimiento de la célula, ya sea de manera citotóxica o citostática, en su defecto un porcentaje de inhibición negativo significa que el extracto no afecta el desarrollo de la célula. Estas pruebas se realizarán siguiendo el protocolo de ensayos de citotoxicidad del CENIBiot (ver anexo I).

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultados del tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o "screening" es una herramienta que orienta la separación y purificación de los compuestos, es relevante al inicio de la investigación, pues muestra la presencia o ausencia de metabolitos secundarios en la planta (Rivas Morales, Oranday, & Verder, 2016).

Los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etanólicos de las diferentes especies de *Annonaceae* mostró la existencia de varias familias de metabolitos secundarios de interés biológico y farmacológico, entre ellos destacan la presencia de flavonoides, alcaloides, triterpenos, cumarinas y taninos, entre otros (ver Cuadro 3).

Se encontró la presencia de cumarinas en casi todos los extractos, excepto dos especies *A. amazónica* y *A. montana*. En el caso de las antocianinas el resultado fue negativo para todos los extractos evaluados. Los triterpenos y/o esteroides se encontraron en casi todas las especies, con un único resultado negativo para la especie *G. rostrata* en el extracto de madera. Un resultado casi idéntico se obtuvo con los taninos y las antraquinonas, con la diferencia de que además de *G. rostrata* en el extracto de madera, la especie *G. amplifolia* también presentó un resultado negativo para ambas pruebas.

Los tamizajes también contribuyen a la identificación de posibles interferencias, dado que las cumarinas dieron positivo en casi todos los extractos y estas poseen un anillo lactónico, podría ser una fuente de error para las pruebas de identificación. Las furanocumarinas, las cuales tienen dentro de su estructura un anillo furánico, también dan positivo a las pruebas de p-anisaldehído (Muñoz, Montes, & Wilkomirsky, 1999). Además a las cumarinas se les ha asociado propiedades citotóxicas en líneas celulares de HeLa (cáncer de cervico-uterino)(Flores, 2009). De acuerdo con Oliveros, Cordero, Paredes,

Buendia, & Macías (2011), las cumarinas se extraen con una mezcla de etanol: agua en la proporción (1:1).

Por su parte, los flavonoides y alcaloides no mostraron una tendencia, sino que se encuentran presentes en algunas especies y en otras no, lo cual es de esperarse dado que aunque son especies que pertenecen a una misma familia, los diferentes géneros, permiten que sus extractos posean características diferentes. Estos resultados concuerdan con la literatura, ya que en estudios realizados de extractos alcohólicos de anonáceas, se ha encontrado la presencia de alcaloides, lactonas, cumarinas, triterpenos y/o esteroides, fenoles y taninos, azúcares reductores, antraquinonas y flavonoides (Barahona, 2009). Por su parte, Palomino (2007), encontró presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y compuestos fenólicos en extractos de *Annona muricata*.

Cuadro 3. Tamizaje fitoquímico de extractos etanólicos de cortezas de anonáceas.

Especie	Cumarinas	Antocianinas	Flavonoides	Triterpenos	Taninos	Antraquinonas	Alcaloides
<i>G. aromática</i>	+	-	-	+	+	+	-
<i>U. osae</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>D. confusa</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>G. lucens</i>	+	-	+	+	+	+	-
<i>A. amazónica</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>G. rostrata-corteza</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>A. montana</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>G. rostrata-madera</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. purpurea</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>G. amplifolia</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>R. mucosa-madera</i>	+	-	+	+	+	+	-
<i>R. mucosa-corteza</i>	+	-	+	+	+	+	-
<i>G. chiriquiensis</i>	+	-	-	+	+	+	+

+ = Positivo y - = Negativo / Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2 Caracterización del patrón de acetogeninas a partir de las semillas de *Annona muricata*

De acuerdo con Feliciano *et al* (2012), a nivel de productos naturales, dado el faltante de estándares certificados o el alto costo cuando están disponible comercialmente, es válido utilizar como patrón extractos que se haya comprobado la presencia de los principios activos de interés.

El tamizaje general del extracto crudo se llevó a cabo para la búsqueda de picos cromatográficos, así como señales características de  $m/z$  acetogeninas conocidas. La Figura 14, muestra el espectro de masas realizado al patrón de acetogeninas de *A. muricata*, donde se muestra la presencia de diferentes señales identificados en estudios previos de acetogeninas.

En el Cuadro 4 se observa un listado de las acetogeninas encontradas en el estudio de perfiles de acetogeninas presentes en *A. muricata* (Champy, Guérineau & Laprèvote, 2009), cuando se comparan las acetogeninas encontradas con los resultados obtenidos en el espectro de masas mostrado en la Figura 14, se puede inferir que para la señales detectadas corresponden a 597  $m/z$  puede deberse al dieporeticanin, 601.3  $m/z$  a corossolone, 613.1  $m/z$  a muricatocin-A, 614.8  $m/z$  a annonacinone o bien montanacins-D, 618.9  $m/z$  a annonacin, 632.8  $m/z$  a Muracatin-C, 645.7  $m/z$  a xylomatenin , 646.9  $m/z$  a montanacin-H y la 661.8  $m/z$  a gigantecin, por lo que se demuestra que el patrón de acetogeninas de *A. muricata*, es rico en acetogeninas y puede utilizarse como control positivo para las pruebas de identificación, así como patrón para la cuantificación de las mismas por el método de Kedde.

Cuadro 4. Resultados de análisis HPLC Ms/Ms de patrón de *A. muricata*.

<b>Formula</b>	<b>Nombre</b>	<b>Masa</b>	<b>Código de identificación</b>		<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>
$C_{37}H_{66}O_4$	Dieporeticanin	574.4961	Na1	K1	597.4801
$C_{35}H_{62}O_6$	Corosolone	578.4546	Na2	K2	601.4406
$C_{35}H_{64}O_6$	Corosolin	580.4703	Na3	K3	603.4512
$C_{35}H_{60}O_7$	Montanacins-D	592.4340	Na4	K4	615.4237
$C_{35}H_{62}O_7$	Annonacinone	594.4496	Na5	K5	615.4237
$C_{35}H_{64}O_7$	Annonacin	596.4652	Na6	K6	619.4550
$C_{35}H_{60}O_8$	undescribed	608.4288	Na7	K7	631.4186
$C_{35}H_{62}O_8$	Muricatin-C	610.4445	Na8	K8	633.4342
$C_{35}H_{64}O_8$	Muricatocin-A	612.4601	Na9	K9	635.4499
$C_{37}H_{66}O_7$	Xylomatenin	622.4809	Na10	K10	645.4706
$C_{35}H_{62}O_9$	Montanacin-H	626.4394	Na11	K11	649.4292
$C_{35}H_{64}O_9$	Murihexocin A	628.4550	Na12	K12	651.4448
$C_{37}H_{64}O_8$	9-oxoasimicinone	636.4601	Na13	K13	659.4499
$C_{37}H_{66}O_8$	Gigantecin	638.4758	Na14	K14	661.4609
$C_{37}H_{68}O_8$	Montanacin	640.4914	Na15	K15	663.4812

Fuente: Champy *et al.* (2009).

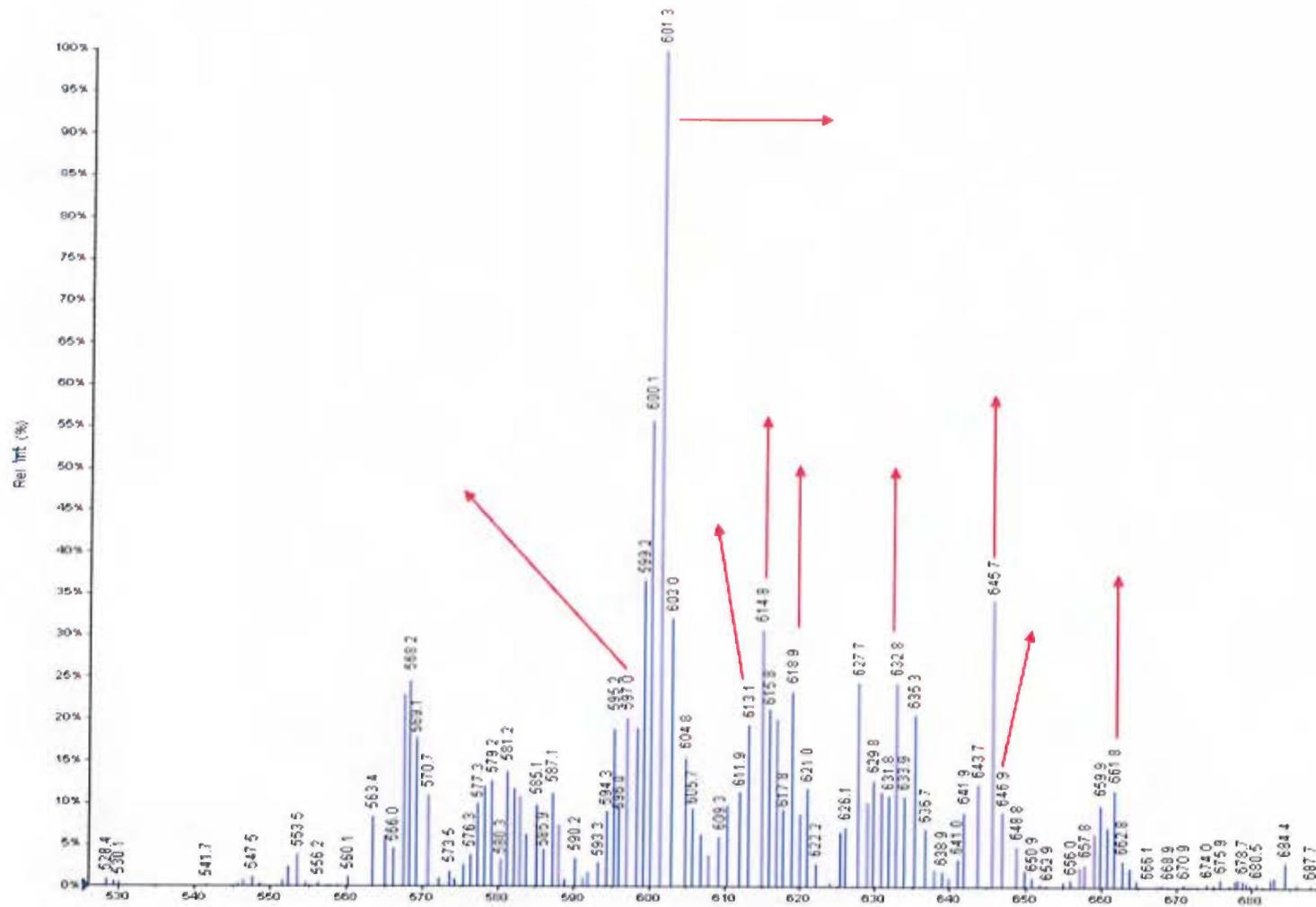


Figura 14. Espectro de masas del extracto crudo de acetogeninas (partición MEOH).  
Fuente: CENIBiot.

### 4.3 Pruebas preliminares de identificación para desarrollar el método de extracción

Además se realizaron las pruebas de identificación a los extractos etanólicos basados en el protocolo experimental 1. Los resultados de estas pruebas se muestran en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Resumen de pruebas de identificación realizadas a los extractos de cortezas de *annonaceas*.

Tipo de extracto	Especie	Prueba Kedde	Prueba Legal	Prueba Baljet	Prueba p-anisaldehído
Cortezas- extractos etanólicos	<i>G. rostrata</i>	-	+	-	+
	<i>Rollinia mucosa</i>	+	+	+	+
	<i>Unonopsis osae</i>	+	+	+	+
	<i>G. chiriquiensis</i>	-	-	-	+
	<i>Annona amazónica</i>	+	+	+	+
	<i>Xylopiá aromática</i>	+	+	+	+
	<i>A. Purpurea</i>	+	+	+	+
	<i>G. lucens</i>	+	+	+	+
	<i>G. amplifolia</i>	-	-	-	+
	<i>D. confusa</i>	+	+	+	+
	<i>Annona montana</i>	+	+	+	+

+ = Positivo y - = Negativo

Fuente: Elaboración propia.

Como se muestra en el Cuadro 5, se realizaron estas pruebas de identificación a los extractos etanólicos de las cortezas, para las cuales se obtuvieron resultados positivos, lo que indica la presencia de anillos lactónicos que pueden deberse a acetogeninas. Sin embargo, el método de identificación tiene la limitante de que reconoce anillos lactónicos estos podrían deberse también a cumarinas.

Las pruebas de identificación realizadas, para el anillo lactónico fueron: el reactivo de Kedde que indica la posible presencia de acetogeninas con anillo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado (Flórez & Martínez, 2010), por su parte el reactivo de

Baljet, permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar también positivo en este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado, por lo cual es aplicable a las acetogeninas debido a que la reacción para la formación del complejo se da con el anillo lactónico (Vega, Pereira, Almeida, & Morales, 2009). En cuanto al reactivo de Legal se utiliza para la identificación de sesquiterpenlactonas, porque reacciona con el anillo lactónico cuando forman un complejo coloreado rojo oscuro o anaranjado (Cuadrado, 2004; Palacios, 2013).

El revelador p-anisaldehído es un revelador universal para productos naturales que produce diferentes colores dependiendo del compuesto con el que reacciona, el revelado es promovido por el calor y los colores logrados son dependientes de la temperatura. Las saponinas triterpénicas se revelan de color azul-violeta-morado y se observan varias bandas, las manchas amarillas se deben a compuestos fenólicos (Mastrogiovanni, 2012). Por lo tanto, este reactivo se utiliza para la identificación del anillo furánico de las acetogeninas, ya que los saponinas triterpénicas poseen un anillo furánico en su estructura (Torres, 2007).

Por otra parte, se evaluó la presencia del anillo lactónico en extractos de hojas y los resultados se muestran en el Cuadro 6. Se logró identificar la presencia del anillo lactónico en la fase orgánica de extractos de hojas, como era de esperarse, dado que las acetogeninas son no polares y para comprobar eso se realizaron pruebas a la fase acuosa, con pocos resultados positivos. Los positivos se pudieron haber dado por una mala separación de las fases, o bien a la presencia de lactonas hidrosolubles en el extracto. Por consiguiente, estas pruebas permiten concluir que los compuestos con anillos lactónicos, que pueden deberse a acetogeninas que se encuentran en la fase orgánica y que hay poca pérdida en la fase acuosa.

Cuadro 6. Resumen de pruebas de identificación de anillo lactónico realizadas a los extractos de hojas de *annonaceas*.

Tipo de extracto	Especie	Prueba Kedde	Prueba Legal	Prueba Baljet
Hojas- Fase orgánica (extracción hexano:agua1:1)	<i>Anaxagorea sp</i>	+	+	+
	<i>A. purpurea</i>	+	+	+
	<i>G. amplifolia</i>	+	+	+
	<i>G. púdica</i>	+	-	+
	<i>A. montana</i>	+	+	+
	<i>Xylopiá aromática</i>	+	+	+
	<i>Rollinia mucosa</i>	+	-	+
	<i>G. lucens</i>	+	+	+
	<i>G diospyroides</i>	+	+	+
	Hojas- Fase acuosa (extracción hexano:agua1:1)	<i>Anaxagorea sp</i>	-	-
<i>A. purpurea</i>		-	+	+
<i>G. amplifolia</i>		-	-	-
<i>G. púdica</i>		-	-	-
<i>A. montana</i>		+	-	-
<i>Xylopiá aromática</i>		-	-	-
<i>Rollinia mucosa</i>		-	-	-
<i>G. lucens</i>		-	-	+
<i>G diospyroides</i>		-	+	-

+ = Positivo y - = Negativo

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.4 Resultados de pruebas de citotoxicidad y colorimétricas para cada protocolo experimental de extracción

##### 4.4.1 Protocolo experimental de extracción 1

Como se muestra en el Cuadro 7, los resultados obtenidos para las pruebas de citotoxicidad expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento celular, muestra que la corteza no produjo porcentajes significativos de inhibición.

El porcentaje de inhibición más alto alcanzado fue por la muestra de corteza *A. purpurea* con 11.8%, dado que es un ensayo bio-guiado, se decidió buscar métodos alternativos de extracción y trabajar los extractos a

concentraciones más altas para aumentar el potencial citotóxico, pues estos porcentajes tan bajos no tienen efecto citotóxico en las células cancerígenas.

Cuadro 7. Resultados de extractos etanólicos a 10 µg/mL de cortezas de *annonaceas* evaluados en pruebas citotóxicas en la línea NCIH460.

<b>Muestra</b>	<b>Fluorescencia</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
<i>G. lucens</i>	15366,5	10,2
<i>A. montana</i>	16615,0	2,9
<i>D. confusa</i>	16047,7	6,2
<i>G. amplifolia</i>	15388,0	10,1
<i>A. amazónica</i>	15466,3	9,6
<i>G. rostrata</i>	15454,7	9,7
<i>A. purpurea</i>	15093,0	11,8
<i>R. mucosa</i>	15264,0	10,8
<i>G. chiriquiensis</i>	17001,3	0,6
<i>U. osae</i>	16226,7	5,2
<i>X. aromática</i>	16146,0	5,6
<b>Células 100% viabilidad</b>	17108,7	N.A

Fuente: CENIBiot.

Debido a los bajos porcentajes de inhibición resultantes de los extractos de cortezas, se decidió evaluar la actividad citotóxica en extractos de hojas. Como se muestra en el Cuadro 8 el porcentaje de inhibición más alto, se encontró en la especie *G. diospyroides* con un 11.6%. Aunque la actividad biológica en esta serie de experimentos fue baja en general, los resultados sugirieron que la corteza es la parte de la planta con la mayor actividad. Dado que los extractos de esta área de las especies evaluados en su mayoría presentaron mejores resultados en cuanto a porcentaje de inhibición.

Cuadro 8. Resultados de extractos etanólicos a 10 µg/mL de hojas de *annonaceas* evaluados en pruebas citotóxicas en la línea NCIH460

Muestra	Fluorescencia	Porcentaje de inhibición *
<i>G. púdica</i>	16085,0	0,4
<i>G. diospyroides</i>	14277,3	11,6
<i>R. mucosa</i>	16581,0	-2,7
<i>D. confusa</i>	16289,7	-0,9
<i>G. amplifolia</i>	16345,0	-1,2
<i>G. lucens</i>	16662,3	-3,2
<i>U. osae</i>	16841,5	-4,3
<i>Anaxagorea sp</i>	17306,0	-7,2
<i>A. purpurea</i>	16548,0	-2,5
<b>Células 100% viabilidad</b>	16147,3	N.A

Fuente: CENIBiot. \*valores con signo negativo indican crecimiento.

Valores con signo positivo indican inhibición del crecimiento.

#### 4.4.2 Protocolo experimental de extracción 2 y fraccionamiento con hexano: metanol en la proporción de (1:1).

El protocolo experimental 1, basado en la patente *United States Patent US005955497A*, utiliza el etanol como el solvente para la extracción de acetogeninas. Sin embargo, debido a la alta capacidad de extracción el solvente no es muy selectivo. Esto implica que todos los compuestos de interés fitoquímico presentan alguna solubilidad en mezclas de etanol o metanol al 80%, por lo cual son comúnmente utilizados en la extracción de principios activos (Bagué & Segundo, 2012). Dado que la preparación de los extractos se realizó a concentraciones muy bajas alrededor de 10 µg/mL, el peso del extracto crudo no fue representativo en cuanto al contenido de acetogeninas, ya que las plantas tienen altos contenidos de metabolitos primarios y secundarios, que funcionaban como interferencias en los ensayos de citotoxicidad. Esto motivó al desarrollo del protocolo de extracción 2, que utiliza el acetato de etilo

como solvente. La extracción con disolventes orgánicos permitió extraer diversos compuestos vegetales, como principios activos, terpenoides y ácidos grasos, lo que permite separar algunas sustancias dependiendo de su solubilidad en distintos disolventes (Maldonado, 1985).

En el sistema de extracción con etanol al 95%, que es un solvente por excelencia pero poco selectivo, se extrajeron metabolitos primarios que actuaban como interferencias a la hora de pesar, ante mayor contenido de estos compuestos en la planta y en el extracto, el porcentaje de acetogeninas disminuyó y de la mano su actividad citotóxica. Las plantas tienen altos contenidos de metabolitos debido a que las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, así como de polímeros derivados de estos compuestos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros), que son esenciales para la vida celular y en general para el desarrollo de la planta (Morán *et al.*, 2009).

Es importante aclarar que el estudio se centralizó en los extractos de cortezas de las especies que tuvieron mejores resultados con el protocolo de extracción 1, pero que además fueran poco estudiadas. También se consideró como en el caso de *U. osae* que es endémica. Las muestras se redujeron a 5 especies: *D. confusa*, *G. lucens*, *Anaxagorea sp*, *U. osae* y *G. púdica*.

En el Cuadro 9, se muestra las pruebas de identificación de anillos característicos de las acetogeninas, las cuales resultaron positivas para la mayoría de las especies, lo que indica que el solvente está extrayendo a compuestos lactónicos, que pueden deberse a acetogeninas.

Cuadro 9. Resumen de pruebas de identificación realizadas a los extractos de acetato de etilo de las *annonaceas* seleccionadas.

Especie	Prueba de Kedde	Prueba de Legal	Prueba de Baljet	TLC/ p-anisaldehído
<i>Anaxagorea sp</i>	+	+	+	+
<i>U. osae</i>	+	+	+	+
<i>G. lucens</i>	+	+	+	+
<i>D. confusa</i>	+	+	+	+
<i>G. púdica</i>	+	+	+	+
<i>A. muricata</i>	+	+	+	+

+ = Positivo y - = Negativo

Fuente: Elaboración propia.

En el Cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de citotoxicidad en muestras de corteza de *annonaceas*. Este protocolo de extracción es más eficiente, lo que permite obtener porcentajes de inhibición mayores cercanos al 90%. Asimismo, de este ensayo se obtiene más información de la fracción con mayor actividad citotóxica, que en su mayoría fue la fracción metanólica la que presentó resultados más prometedores, lo que sugiere que hay una mayor concentración de principio activo.

Cuadro 10. Resultados de extractos de acetato de etilo y fracciones hexano: metanol a 20 µg/mL de corteza de *annonaceas* evaluados en pruebas citotóxicas en la línea NCIH460.

Muestra	Fluorescencia	Porcentaje de inhibición	Extracto
<i>D. confusa</i>	6958.7	6.7	Hexano
<i>D. confusa</i>	1770.3	78.1	Acetato de etilo
<i>D. confusa</i>	571.3	92.9	Metanol
<i>G. lucens</i>	5466.7	25.0	Metanol
<i>G. lucens</i>	4324.7	23.7	Hexano
<i>G. lucens</i>	4658.3	26.1	Acetato de etilo
<i>Anaxagorea sp</i>	1511.0	81.3	Hexano
<i>Anaxagorea sp</i>	945.3	88.3	Metanol
<i>Anaxagorea sp</i>	2100.3	74.0	Acetato de etilo
<i>U. osae</i>	916.0	88.6	Hexano
<i>U. osae</i>	1583.7	80.4	Acetato de etilo
<i>U. osae</i>	1243.0	84.6	Metanol
<i>G. púdica</i>	6013.3	25.5	Metanol
<i>G. púdica</i>	7005.7	13.2	Acetato de etilo
<i>G. púdica</i> *	6330.0	21.5	Hexano
<i>A. muricata</i>	3569.3	55.8	Hexano
<i>A. muricata</i>	3750.7	58.6	Metanol
DMSO	7907.7	2.0	N.A
Doxorrubicina	144.0	98.2	N.A
Doxorrubicina	172.7	97.9	N.A
100% Viabilidad	8064.3	N.A	N.A

\*Precipitado negro Fuente: CENIBiot.

Según los resultados obtenidos en la pruebas de citotoxicidad, la especie con mayor potencia inhibitoria es *D. confusa*, en el extracto de corteza en la fracción de metanol. Sin embargo, se encontraron en general muy buenos resultados en la fracción metanólica. Es importante detallar que en los

experimentos anteriores realizados en esta investigación, la especie más consistente en cuanto a acción citotóxica ha sido la *U. osae*.

#### 4.5 Optimización de la fase móvil en la cromatografía de capa fina (TLC)

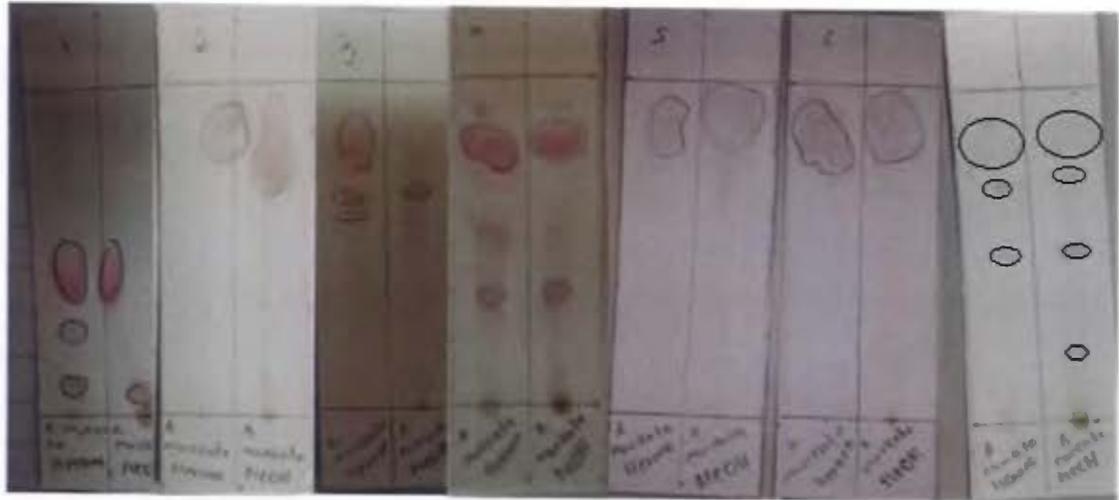


Figura 15. Resultados de las diferentes fases móviles reveladas con p-anisaldehído.

- Fm 1= Acetato de etilo al 100%
- Fm2= Hexano: Acetato de etilo (90:10)
- Fm3= Cloroformo: etanol (90:10)
- Fm4= Hexano: Acetato de etilo (80:20)
- Fm5= Acetato de etilo: Metanol (80:20)
- Fm6= Acetato de etilo: Hexano (90:10)
- Fm7= Hexano: Acetato de etilo (70:30)

En la Figura 15, se muestra la mejor separación de los componentes de los extractos, la cual se logró con la fase móvil hexano: acetato de etilo (70:30). La fase móvil juega un papel primordial en la cromatografía de capa fina pues de ella y de otras variables depende la resolución de las manchas. Usar diferentes combinaciones de eluyentes con diferente polaridad permite

seleccionar la combinación que ofrezca una buena retención y la máxima resolución entre los compuestos de interés, en ocasiones utilizar combinaciones de eluyentes diferentes pero de similar fuerza eluyente permite mantener la retención y mejorar la resolución (Rubinson & Rubinson, 2001).

#### 4.6 Resultados de cromatografía de capa fina

Cuadro 11. Resultados de cromatografía de capa fina revelados con Oleum y p-anisaldehído.

Muestras- cortezas		Numeración	Apariencia		T <sub>R</sub> /Reactivo de revelación	
Especie	Código		Anisaldehído	OLEUM	Anisaldehído	OLEUM
<i>G. Lucens</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Anaxagorea sp</i>	2	A	Vino	Naranja	0,705	0,818
		B	Verde	Violeta	0,614	0,682
		C	Vino	Verde	0,568	0,614
		D	Verde	Vino	0,477	0,545
		E	-	Verde	Ausente	0,455
<i>U. Osae</i>	3	A	Azul	Azul-violeta	0,568	0,568
		B	Naranja	Amarilla	0,455	0,455
		C	Vino	Naranja	0,364	0,364
		D	Verde	Verde	0,295	0,273
		E	-	Verde	Ausente	0,182
<i>D. Confusa</i>	4	A	Azul	Azul-violeta	0,568	0,545
<i>G. Púdica</i>	5	A	Naranja	Verde	0,659	0,705
		B	Vino	Violeta	0,591	0,568
		C	Vino	-	0,477	Ausente
		D	Vino	-	0,250	Ausente
<i>A. Muricata</i> (control)	6	A	Fucsia	Naranja	0,636	0,659
		B	Vino	Verde	0,568	0,614
		C	Vino	Vino	0,227	0,523
		D	Verde	Violeta	0,182	0,205

Fuente: Elaboración propia.

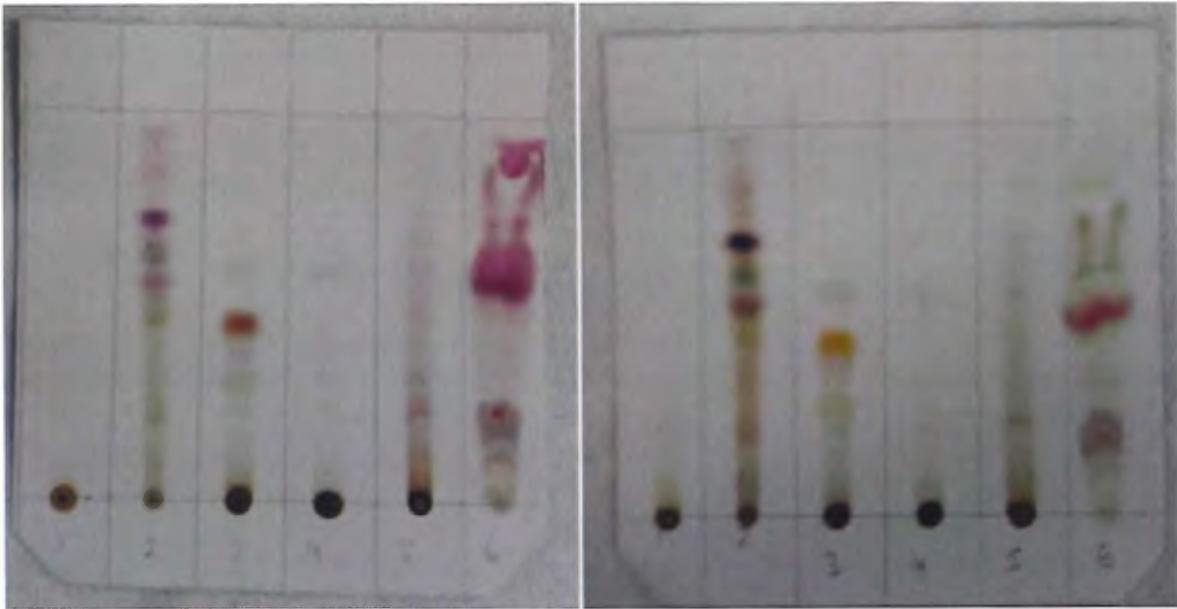


Figura 16. Capa finas de muestras de extractos de cortezas de *annonaceas* fracción metanólica recién reveladas. Nota: Izquierda revelada con p-anisaldehído y derecha revelada con óleum.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 17. Capa finas de muestras de extractos de cortezas de *annonaceas* fracción metanólica, con la numeración de cada mancha.

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de capa fina muestran manchas para las especies *U. Osaë* y *D. confusa*, de color azul característico del anillo furánico, el cual es positivo con p-anisaldehído cuando presenta coloraciones azul-violeta- morado, y con este mismo R<sub>f</sub> presentan positivos para el revelador Oleum.

Además es relevante que el R<sub>f</sub> para estas manchas es casi el mismo alrededor de 0.568, con ambos reveladores. Este hecho comprueba la identificación de los dos anillos principales de las acetogeninas, lo que sugiere la presencia de acetogeninas en los extractos.

Igualmente las especies *G. púdica* y *Anaxagorea sp* presentan una mancha de R<sub>f</sub> 0.568 en el revelado con p-anisaldehído, lo que hace sospechar que pueda tratarse de una acetogenina, ya que el patrón de *A. muricata* también presenta una mancha color vino en ese tiempo de retención, dado que el patrón de *A. muricata* presenta manchas con el mismo R<sub>f</sub> asegura la presencia de acetogeninas en los extractos.

#### **4.7 Perfil cromatográfico de fracciones de metanol en extractos de annonaceas**

En las Figuras 19, 20, 21, 22 y 23 se puede observar los cromatogramas de las fracciones metanólicas tanto del patrón de *A. muricata* como de cada una de las especies estudiadas. Es importante como ya se demostró en la caracterización del patrón de *A. muricata* es rico en acetogeninas, en el cromatograma se muestran una serie de picos de posibles acetogeninas lo cual demuestra que es una fracción enriquecida. Por su parte, en perfil cromatográfico de las especies *D. confusa* y *G. lucens* se observa una posible acetogenina con aproximadamente un tiempo de retención de 45- 46 minutos. En el perfil de *Anaxagorea sp* muestra picos importantes a los 22 minutos, entre los 25 -26 minutos, 31 minutos, 33 minutos y 56 minutos.

Sin duda, el cromatograma que más llama la atención es el de la fracción de *U. osae* porque además de tener otros picos con menor señal, se muestran

dos picos muy pronunciados y definidos, con tiempos de retención de aproximadamente 16 min y 31 min como se observa en la Figura 21, si se compara con el patrón de *A. muricata* hay un pico bastante pronunciado a los 16 min, lo que sugiere que podría ser un compuesto similar presente en la *U. osae*. En estudios anteriores de *A. muricata* y *A. squamosa*, con sistemas cromatográficos similares y usando extractos de las semillas, en los cuales se han utilizado estándares certificados, la bullatacina tiene un tiempo de retención aproximado de 18 minutos, a los 32 minutos la isodesacetilivaricina y a los 56 minutos la desacetilivaricina (Yang et al., 2010), por tanto los picos detectados podrían deberse a estas acetogeninas, u otras con estructuras similares.

Es importante detallar que en los primeros 10 minutos de los cromatogramas de las especies en estudio, se repite un patrón de picos muy similar, que no se observa en el patrón de *A. muricata*, estos se descartaron como posibles acetogeninas debido a que son muy similares a cromatogramas de PACs (proantocianidinas), es un tipo de taninos, metabolito presente en la corteza. De acuerdo con Feliciano *et al* (2012) las PACs forman dos jorobas sin resolver característico de este tipo compuesto a una longitud de onda de 280 nm. Al observar lo cromatogramas obtenidos y compararlos con el obtenido por Feliciano *et al* (2012), se decide realizar pruebas de identificación de taninos a las fracciones inyectadas, para las cuales se obtuvieron resultados positivos mediante la formación de color azul o verde con el reactivo cloruro férrico al 10%, como se muestra en la figura 24, para mayor seguridad de los resultados se utilizó un control positivo de un extracto de cas, fruta en la cual se ha confirmado la presencia de PACs (R. A. Muñoz, 2014), por ende se confirma la presencia de taninos en la muestras de *annonaceas*, excepto para la especie *Anaxagorea sp.*

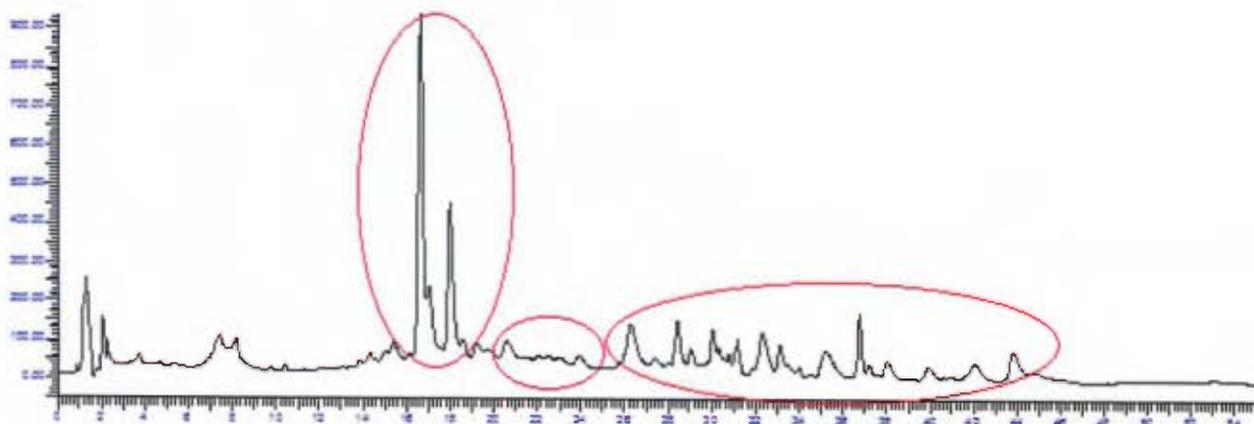


Figura 18. Perfil cromatográfico de *Annona muricata* (patrón de acetogeninas).

Fuente: Elaboración propia.

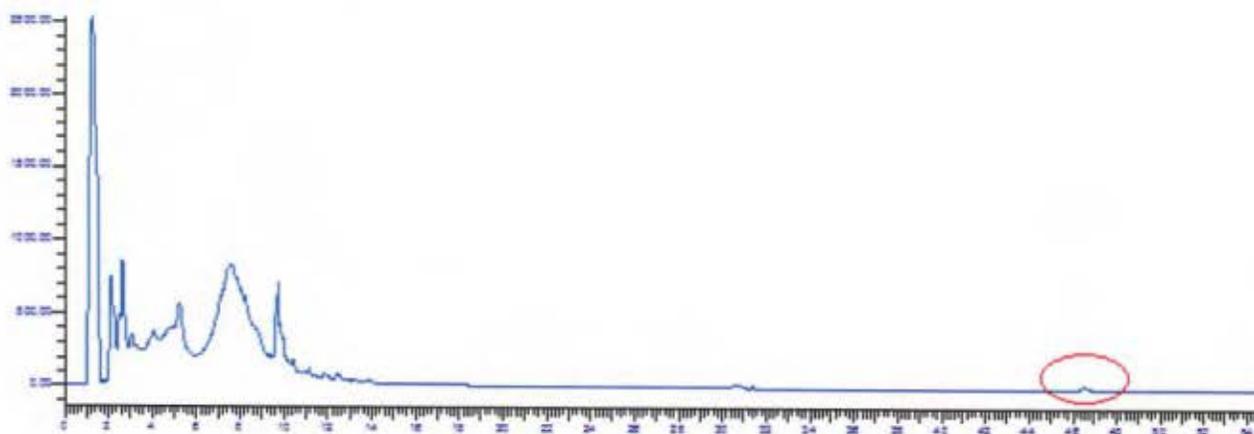


Figura 19. Perfil cromatográfico de *Duguetia confusa*.

Fuente: Elaboración propia.

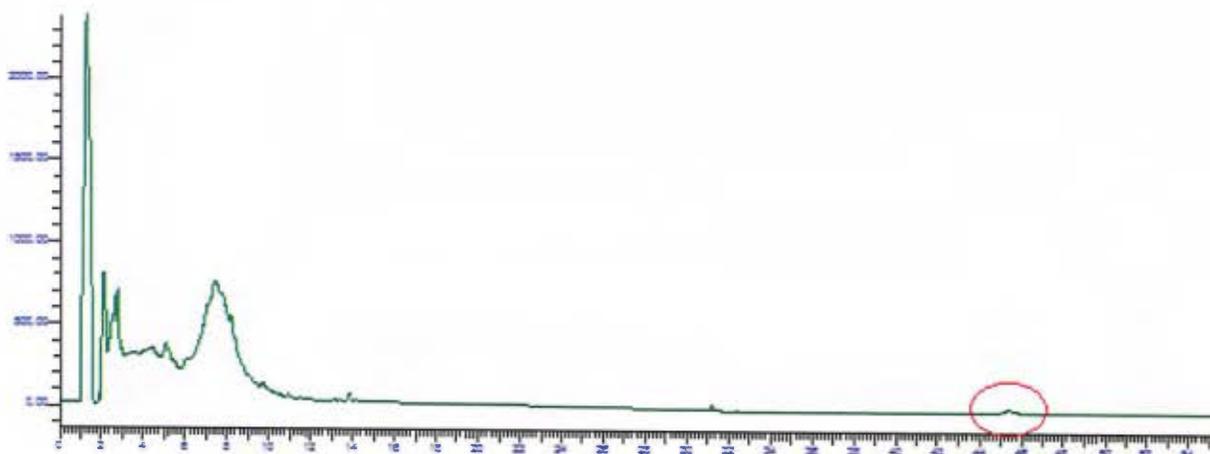


Figura 20. Perfil cromatográfico de *Guatteria lucens*.

Fuente: Elaboración propia.

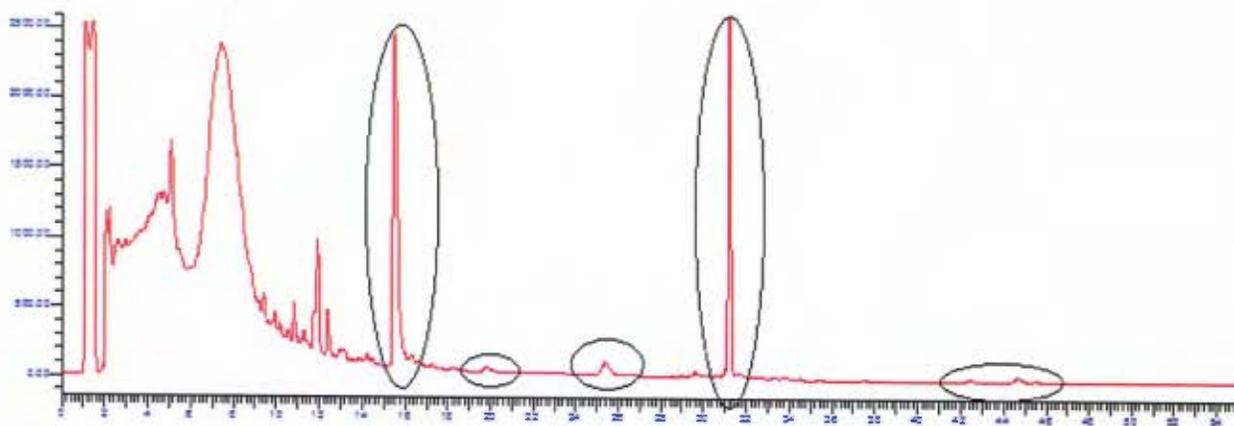


Figura 21. Perfil cromatográfico de *Unonopsis osae*.

Fuente: Elaboración propia.

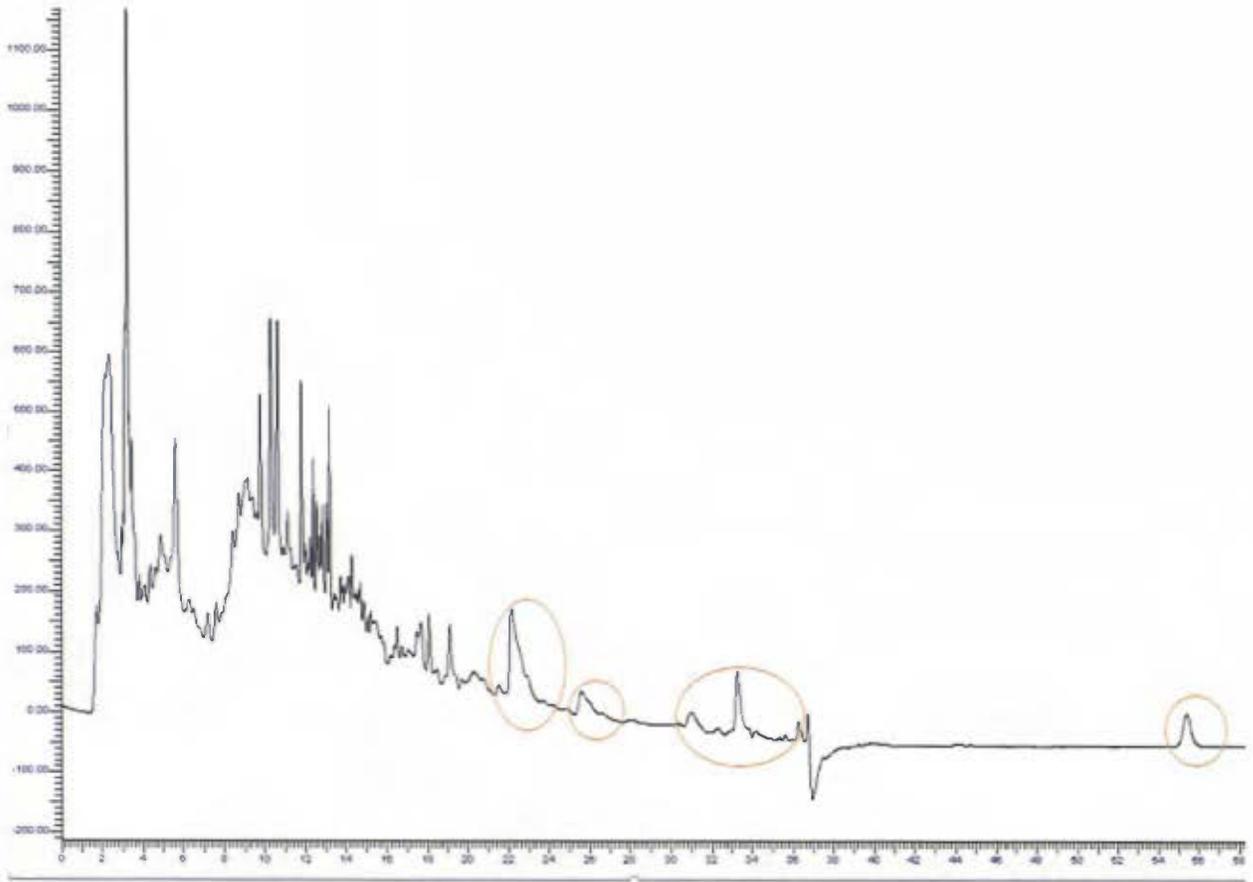


Figura 22. Perfil cromatográfico de *Anaxagorea sp.*

Fuente: Elaboración propia.



Figura 23. Prueba de taninos (izquierda color natural de extractos) y (derecha extractos + reactivo).

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.8 Desarrollo del método de cuantificación por la reacción de Kedde

En cuanto a la optimización del método de identificación y caracterización química cualitativa de acetogeninas, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Detección del anillo lactónico

Se trabajó con tabletas de digoxina debido a que esta molécula posee en su estructura un anillo lactónico.

Por su parte la prueba de Kedde se estableció un método de medición en un lector de microplacas Synergy™ H1 (BioTek), bajo las siguientes condiciones:

- Tamaño de muestra: 80µL
- Cantidad de reactivo de Kedde: 25 µL de cada uno de los reactivos (Kedde: ácido 3,5 nitrobenzoico al 3% en etanol: Hidróxido de sodio al 5.7% en etanol (1:1)).
- Tiempo de reacción: aproximadamente 12 minutos.
- Longitud de onda: 535 nm.

Para obtener este resultado se midieron espectros de digoxina desde los 400nm hasta los 700 nm, con diferentes cantidades de muestra y de reactivo de Kedde y se realizaron lecturas cada 2 min hasta los 16 min. Como se muestra en la siguiente Figura 24, a los 12 minutos se muestra una tendencia en la curva y se obtienen absorbancias significativas de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer, la cual establece que la absorbancia de radiación electromagnética producida por una especie absorbente es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración de la disolución muestra que produce la absorción (Walton & Reyes, 1983), y dentro de sus limitaciones se establece que la precisión de la medida de un fotómetro simple y un espectrofotómetro con un dispositivo de lectura de baja resolución es a menudo limitado de 1 a 2% por la resolución del lector para absorbancias en un rango de 0.2 a 0.9. Por lo cual es importante, que la lectura de

absorbancia se encuentre dentro de este rango para obtener resultados más exactos y precisos (Arenas & López, 2004).

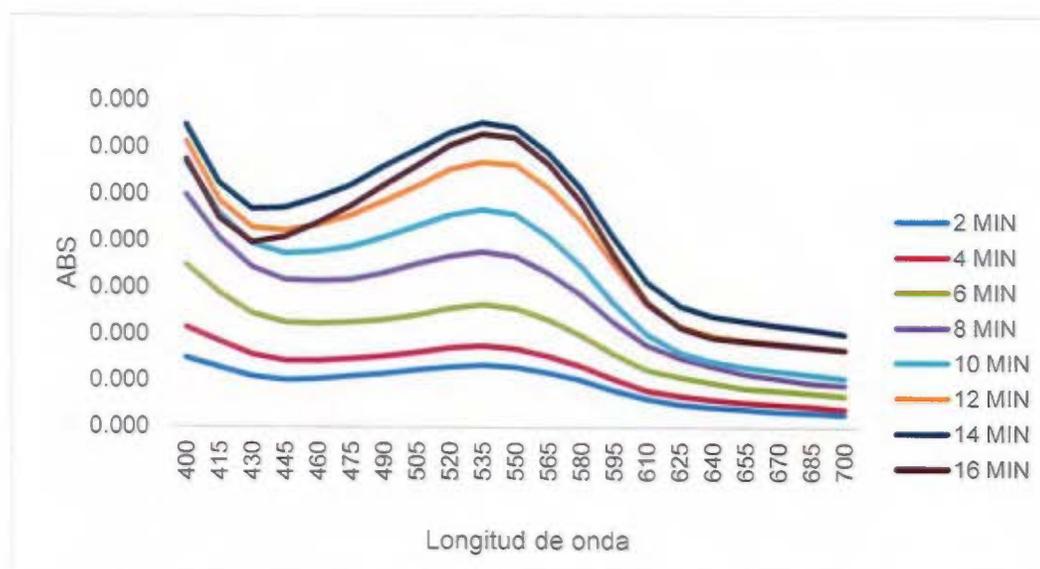


Figura 24. Espectro de absorción de digoxina 0.09 mg/mL en diferentes tiempos de lectura.

Fuente: Elaboración propia.

Respecto a las otras dos pruebas de detección del anillo lactónico se intentó realizar de la misma manera que la prueba de Kedde, para encontrar las condiciones óptimas de análisis. Sin embargo, en la prueba de Baljet, se forma un precipitado rojo-anaranjado por lo cual no se puede leer por el lector de microplacas. En el caso de Legal las muestras dan positivas pero las lecturas no siguen una tendencia, y presentan valores aberrantes, ante esta situación se decidió que se van a realizar solo como pruebas cualitativas colorimétricas.

Una vez optimizadas ciertas condiciones de análisis se procedió a realizar pruebas con el patrón de *A. muricata*, en la Figura 25 se muestra el barrido espectral, el máximo de absorbancia se encuentra entre los 500 y 550 nm, por lo cual se estandarizo la longitud de onda a 535 nm.

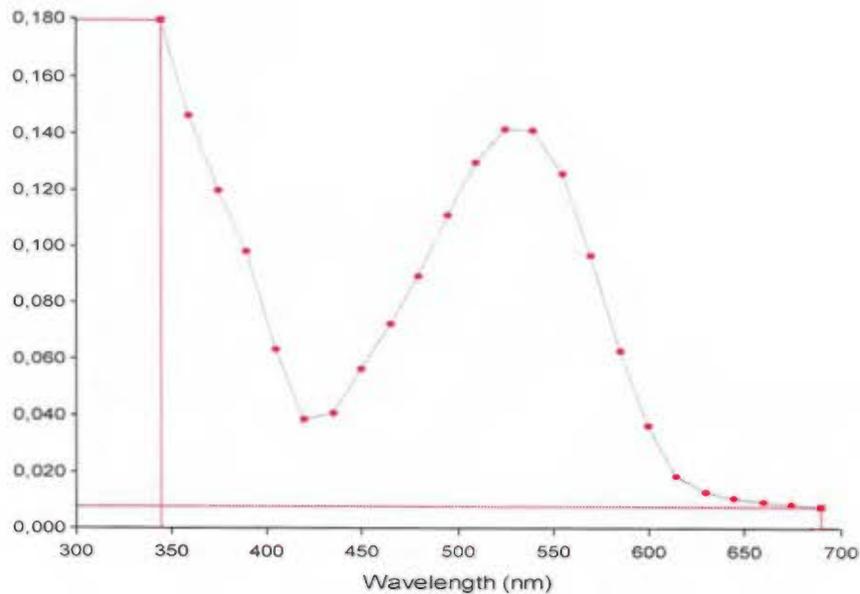


Figura 25. Barrido espectral de extracto *A. muricata*.

Fuente: Elaboración propia.

Se establecieron las condiciones de análisis, como tamaño de muestra de 80  $\mu\text{L}$  y 25  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones del reactivo de Kedde, longitud de onda 535 nm, utilizando etanol más el reactivo de Kedde como blanco.

Una vez establecidas estas variables, se procedió a realizar curvas para determinar si la reacción era lineal en rango de concentración de 1.228 mg/mL a 4.096 mg/mL, en cual presenta absorbancias por debajo 1, lo cual es importante para que se cumpla la ley de Lambert- Beer (Walton & Reyes, 1983).

En la Figura 26, se comprueba cómo después de los 2 minutos de reacción, las curvas dejan de cumplir el coeficiente de correlación, debido a que conforme avanza la reacción se empieza a formar un precipitado lo que impide una lectura adecuada y por ende la curva no es lineal.

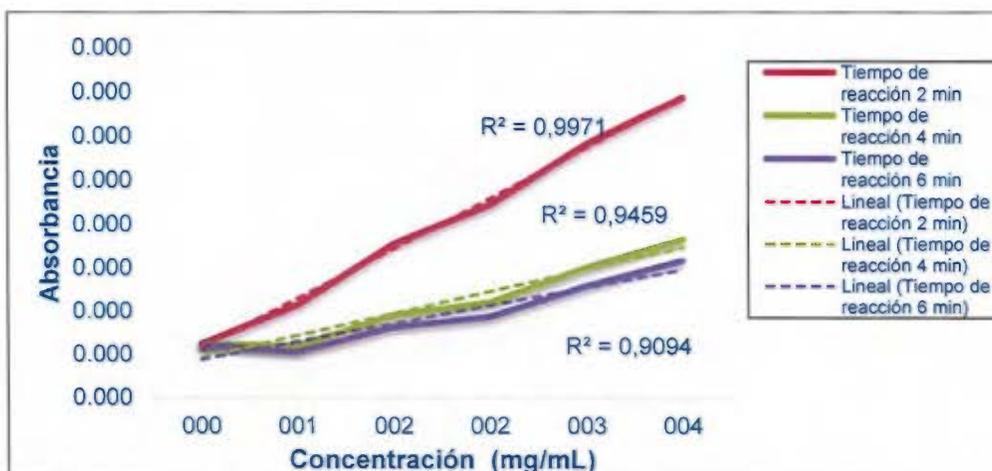


Figura 26. Linealidad de las mediciones según el tiempo de reacción.

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.9 Resultados de método de cuantificación de Kedde.

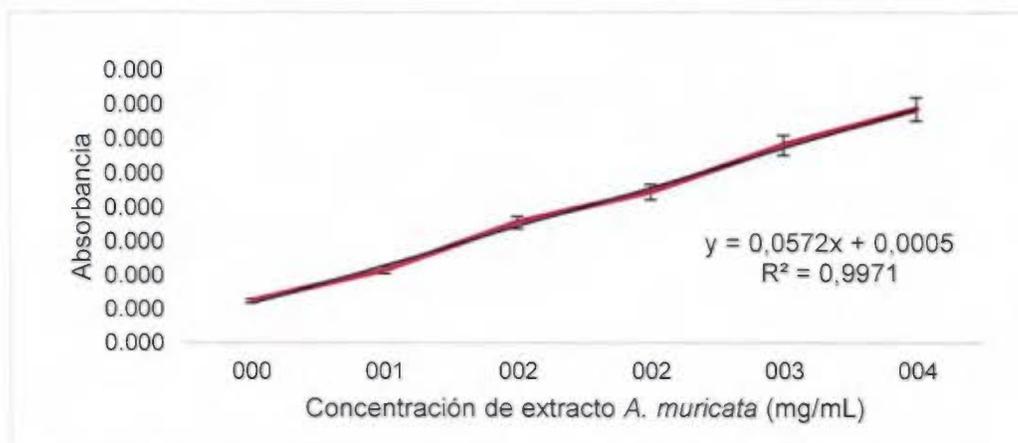


Figura 27. Curva de extracto patrón de acetogeninas en *A. muricata*.

Fuente: Elaboración propia.

Como se muestra en la figura anterior, la curva con el extracto de *A. muricata* es lineal con un  $R^2 = 0.9971$  y la cual tiene la siguiente ecuación de la recta  $y = 0.0572X + 0.0005$ . Utilizando esta ecuación se calculó los miligramos de extracto de muestra equivalentes a mg de extracto de *A. muricata*, como se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Resumen de resultados de cuantificación de acetogeninas en extractos metanólicos de corteza por el método de Kedde.

Parámetro	Muestras			Muestras			Muestras			Muestras			Muestras		
Réplicas	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Réplica-1	0,825	0,833	0,830	1,786	1,656	1,658	1,523	1,528	1,609	0,988	0,970	0,967	0,624	0,520	0,525
Réplica-2	0,809	0,845	0,842	1,628	1,678	1,638	1,560	1,560	1,558	0,982	0,976	0,967	0,723	0,625	0,521
Réplica-3	0,789	0,825	0,825	1,694	1,682	1,652	1,567	1,565	1,549	0,959	0,979	0,981	0,674	0,599	0,552
Réplica-4	0,726	0,816	0,825	1,642	1,655	1,655	1,547	1,549	1,602	0,972	0,977	0,979	0,659	0,570	0,547
Réplica-5	0,771	0,836	0,838	0,566	0,570	0,571	1,598	1,599	1,606	0,999	0,958	0,928	0,630	0,531	0,531
Blanco-1	0,455	0,467	0,46	0,563	0,564	0,562	0,515	0,520	0,536	0,124	0,155	0,154	0,394	0,287	0,299
Blanco-2	0,448	0,475	0,472	0,542	0,555	0,55	0,503	0,518	0,521	0,134	0,148	0,159	0,364	0,298	0,298
Blanco-3	0,461	0,474	0,471	0,542	0,540	0,543	0,512	0,522	0,536	0,130	0,149	0,152	0,394	0,320	0,302
Especie	<i>G. lucens</i>			<i>D. confusa</i>			<i>U. osae</i>			<i>Anaxagorea sp</i>			<i>G. púdica</i>		
% de Inhibición (células NCIH460)	25			92,9			84,6			88			25,5		
Concentración mg de extracto de planta metanólico/ mL	4,2	4,4	4,3	4,3	4,3	4,3	5,31	5,2	5,0	4,8	4,6	4,6	4,6	3,8	3,8
Absorbancia promedio	0,784	0,831	0,832	1,463	1,448	1,435	1,559	1,560	1,585	0,980	0,972	0,964	0,662	0,569	0,535
Blanco	0,455	0,472	0,468	0,553	0,557	0,557	0,510	0,520	0,531	0,129	0,151	0,155	0,384	0,302	0,300
ABS promedio – blanco	0,329	0,359	0,364	0,910	0,891	0,878	1,049	1,040	1,054	0,851	0,821	0,809	0,278	0,267	0,236
Concentración de extracto (mg/mL)	5,749	6,267	6,361	15,899	15,567	15,346	18,330	18,177	18,414	14,863	14,350	14,142	4,851	4,665	4,109
(mg Equivalente de Extracto MEOH <i>A. muricata</i> /mg de Extracto)	1,369	1,424	1,479	3,6719	3,595	3,569	3,452	3,495	3,683	3,096	3,086	3,041	1,048	1,218	1,073
Promedio mg Equivalente de Extracto MEOH <i>A. muricata</i> / mg de Extracto)	1,424			3,612			3,543			3,075			1,113		
Desviación estándar	0,055			0,053			0,123			0,029			0,092		

Fuente: Elaboración propia.

Es importante detallar que todas las especies presentaron una relación de mg de extracto equivalente de extracto metanólico *A. muricata* / mg de extracto de muestra mayor a 1, lo que sugiere que hay mayor concentración de acetogeninas en las especies estudiadas.

Por otra parte, en el siguiente gráfico se observa la relación de las acetogeninas detectadas por el método de cuantificación de Kedde y su actividad biológica, es importante destacar que dicho método sirve para predecir el porcentaje de inhibición que tendrán los extractos de las especies de *annonaceas* con 94.6% de certeza (véase Figura 29), lo cual es un gran resultado pues presenta casi una relación lineal, lo que indica que casi en un 95% de los casos a mayor concentración de mg equivalentes de *A. muricata* se da una mayor actividad biológica.

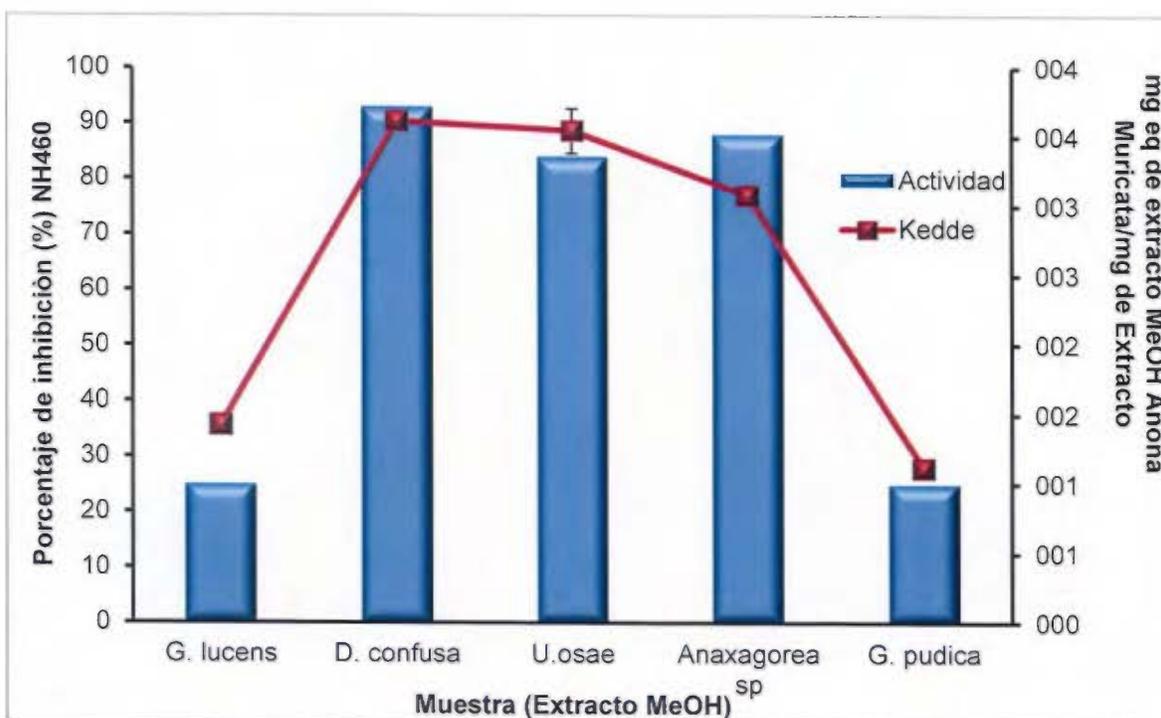


Figura 28. Relación entre el contenido de acetogenina detectada con respecto a la actividad citotóxica en la línea celular NCIH460

Fuente: Elaboración propia.

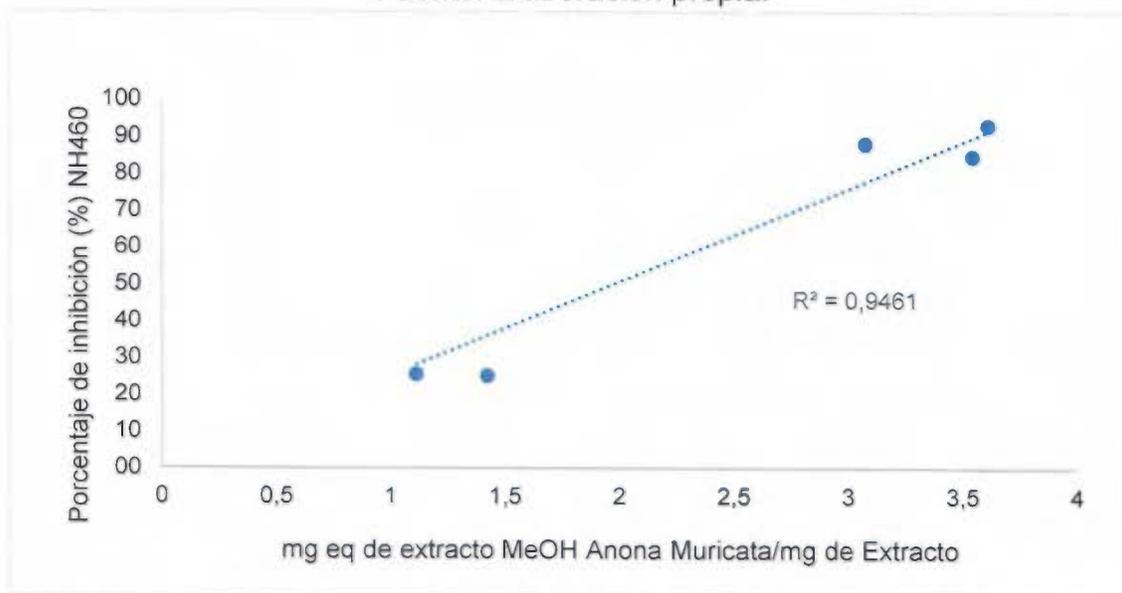


Figura 29. Correlación entre actividad biológica y miligramos de extracto de *A. muricata* equivalente medidos por Kedde.

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.10 Resultados de pruebas de citotoxicidad en diferentes líneas celulares

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron sembrando en los pozos de la placa células con todas las condiciones de viabilidad, otras sometidas al tratamiento con extractos y los controles positivos de doxorubicina una droga utilizada para el tratamiento del cáncer. La placa se incubó a 5 % de CO<sub>2</sub> en aire a 37 ° C, se tomaron lecturas a diferentes horas (como se detalla en el *anexo I*), y el método de reducción de la resazurina fue utilizado como un indicador de viabilidad celular para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad.

En la Figura 30 se muestra el porcentaje de inhibición resultante de los extractos obtenidos con el protocolo experimental 1. Se expone una tendencia de mayor porcentaje de inhibición en la corteza con respecto a las hojas, aunque siendo críticos no se obtuvieron porcentajes de inhibición estadísticamente

significativos con ninguno de los dos órganos, por lo cual se cambia el protocolo de extracción y se aumenta la concentración de metabolitos de 10  $\mu\text{g/mL}$  a 20  $\mu\text{g/mL}$ .

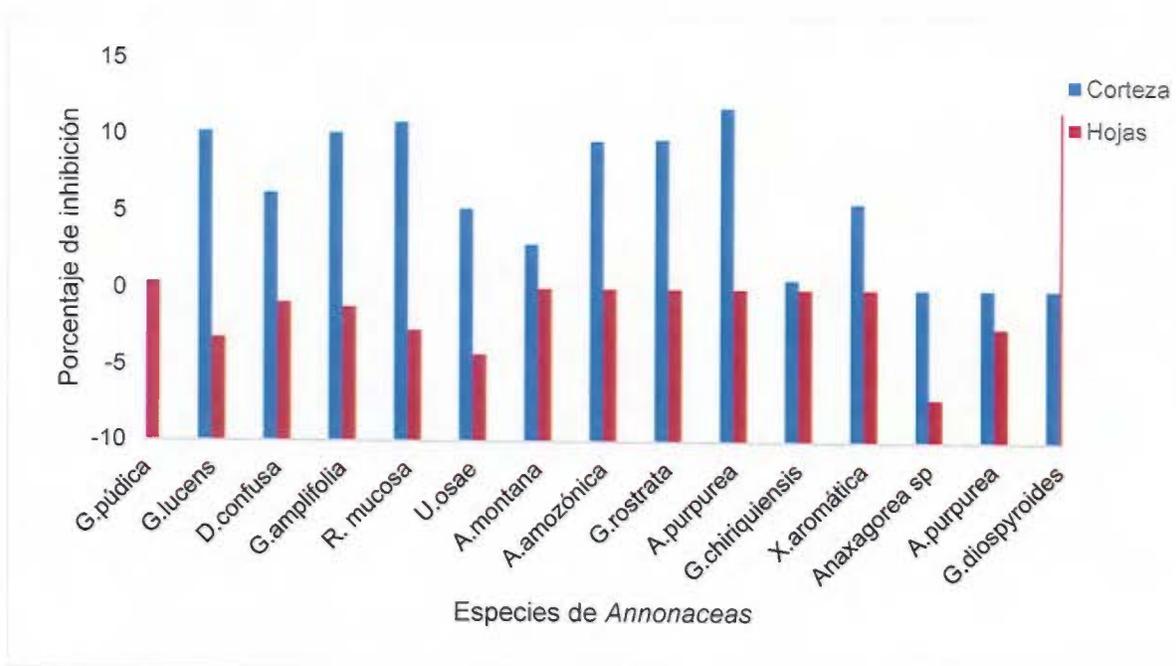


Figura 30. Comparación de porcentaje de inhibición de la línea celular NCIH460 en extractos etanólicos de hojas y corteza de *annonaceas*.

Fuente: Elaboración propia.

Con el protocolo de extracción de acetogeninas experimental 2, se generaron mejores resultados. En la Figura 31, se observa la actividad citotóxica en cada una de las fracciones, en donde se observan dos factores relevantes: 1) la fracción de metanol es la más consistente en altos porcentajes de inhibición para la mayoría de las especies evaluadas y 2) a la misma concentración las especies estudiadas poseen mayor actividad citotóxica en comparación al patrón de *A. muricata*.

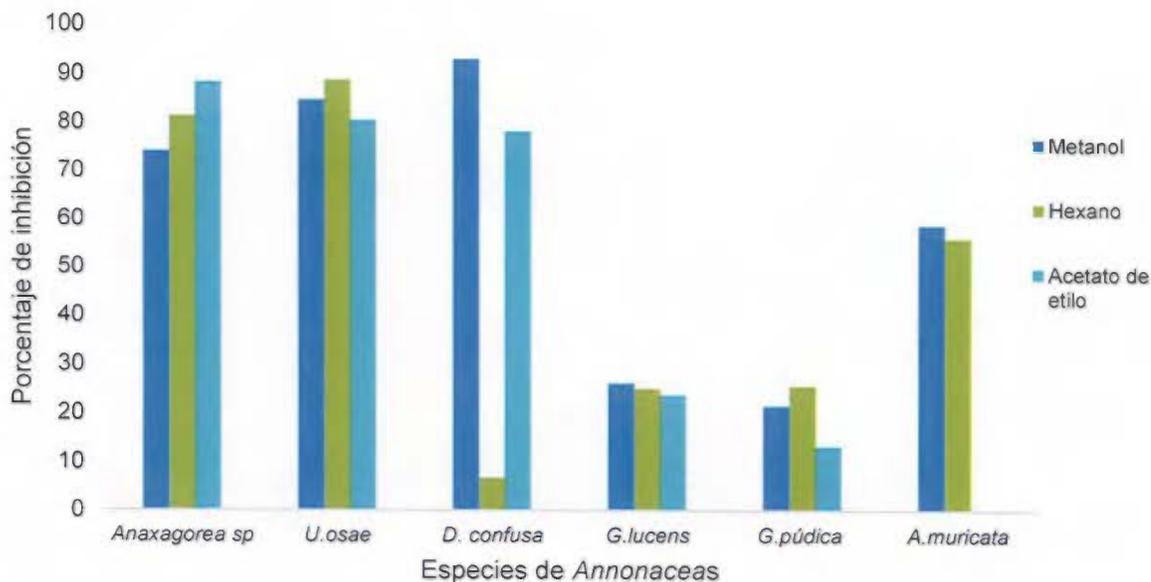


Figura 31. Porcentaje de inhibición de la línea celular NCIH460 con las diferentes fracciones de los extractos de *annonaceas*.

Fuente: Elaboración propia.

También se evaluaron los extractos crudos de acetato de etilo de las especies en estudio con tres líneas de cáncer humano: cáncer de pulmón con la línea celular NCIH460, cáncer de mama con la línea celular MCF7 y cáncer de páncreas con la línea celular MIA Mesotelina. En el caso de la especie endémica *U.osae* se obtuvo mejores resultados (véase las Figuras 32,33 y 34). Es importante detallar, que el extracto *U. osae* es un compuesto no purificado y alcanzó niveles antiproliferativos bastantes aceptables sobre todo para el cáncer de mama y de pulmón, en comparación con la doxorrubicina un compuesto puro utilizado como anticancerígeno. Con el cáncer de páncreas, se muestra es un comportamiento citostático en menor medida que con las otras líneas celulares, es decir, que es una sustancia capaz de inhibir o impedir la evolución de la neoplasia, restringiendo

la maduración y proliferación de células malignas, esto significa que sobre fases específicas del ciclo celular y por ello son activas frente a células que se encuentran en proceso de división (Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, 2003), pero como se muestra en la Figuras 32, 33 y 34, no matan la célula sino que disminuyen el crecimiento (ver anexo IV donde se muestran los gráficos de las demás especies).

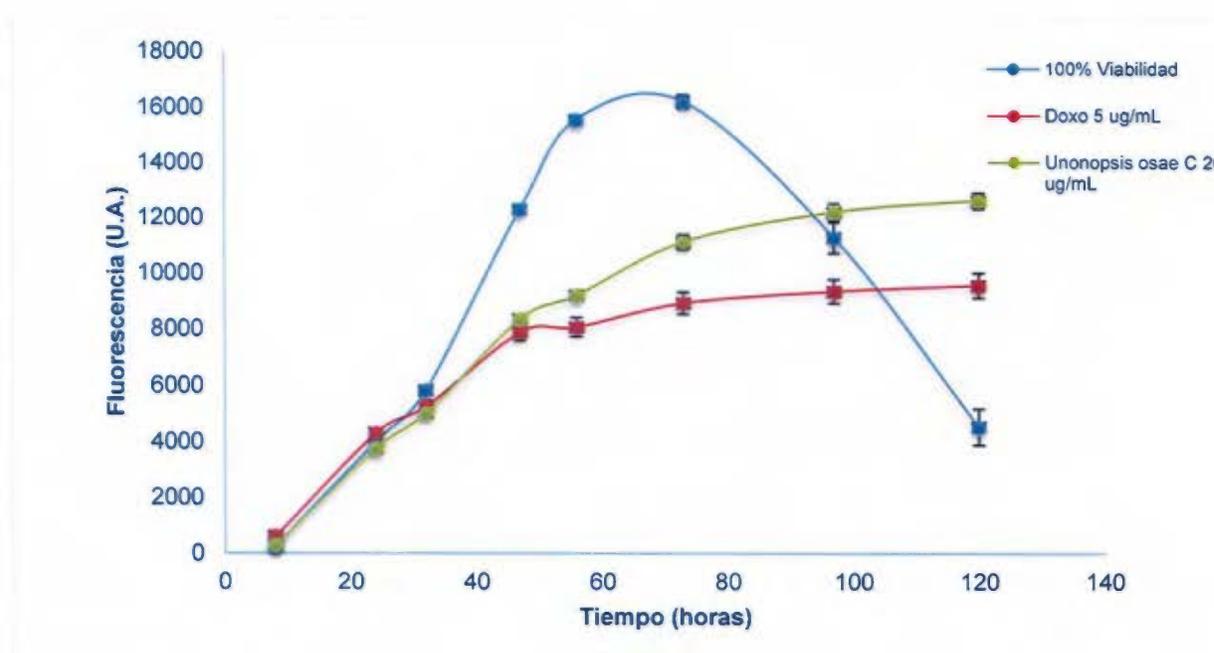


Figura 32. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto metanólico *U. osae* en la línea celular NCIH460.

Fuente: CENIBiot.

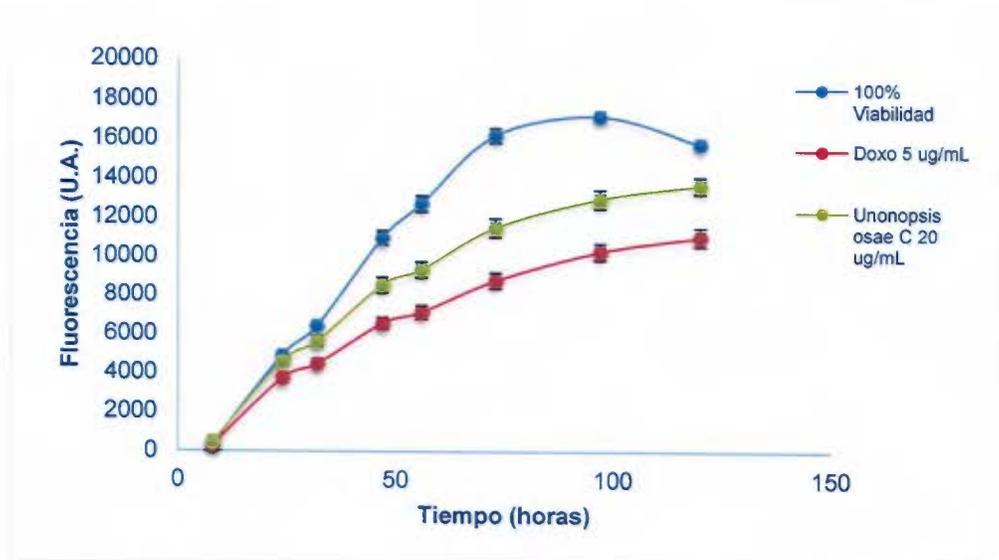


Figura 33. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto metanólico de *U. osae* en la línea celular MCF7.

Fuente: CENIBiot

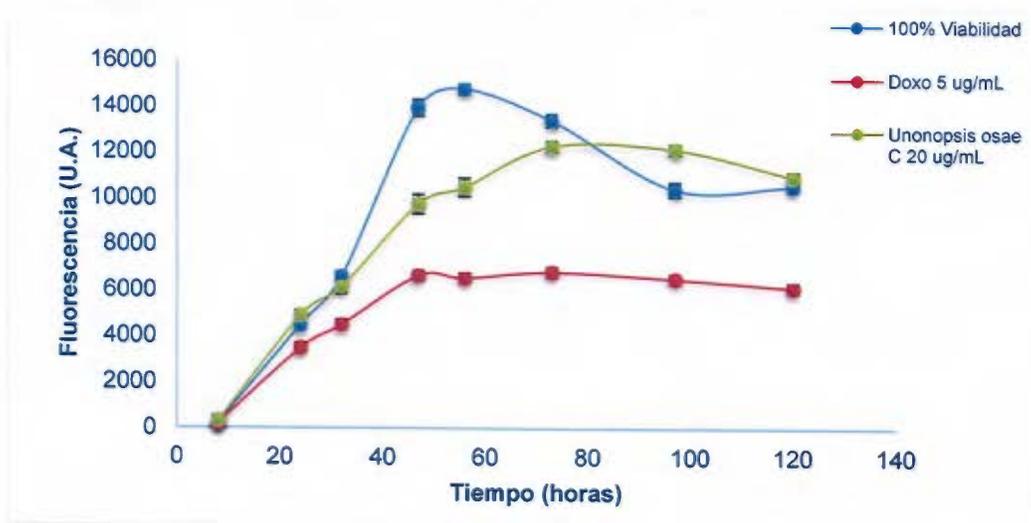


Figura 34. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto metanólico de *U. osae* en la línea celular MIA Mesotelina.

Fuente: CENIBiot

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

- La combinación de técnicas colorimétricas en conjunto con TLC es una alternativa rápida, para sugerir la presencia de acetogeninas en el tamizaje de muestras de plantas.
- Mediante Cromatografía en Capa fina (TLC) y pruebas de tubo de ensayo se consiguió evidenciar la posible presencia de acetogeninas de *Annonaceae* particularmente con anillo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado y anillos THF. Este método de identificación tiene la limitante que compuestos como las cumarinas pueden dar positivo.
- Los perfiles cromatográfico por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector de arreglo de diodos permitió inferir la posible presencia de acetogeninas en las fracciones metanólicas de los extractos de cortezas de annonáceas.
- El método de extracción y fraccionamiento desarrollado en el CENIBiot se relacionó con mejores resultados en comparación con el método basado en la patente de *United States Patent US005955497A* el cual es recomendado en la mayoría de la literatura.
- Las fracciones más activas son las metanólicas, ya que se lograron porcentajes de inhibición de 92.9% para *D. confusa*, 88.0 % para *Anaxagorea sp* y 84.6% para *U. osae* en la línea celular NCIH460.
- Se desarrolló un método de cuantificación de acetogeninas, con una curva de calibración con un coeficiente de correlación de 0.997, en donde los resultados de acetogeninas coinciden alrededor de un 95% actividad citostática resultante, por lo que se concluye que el método se puede utilizar para predecir la actividad biológica que tendrá con la línea celular NCIH460 de cáncer de pulmón.

- Los ensayos de citotoxicidad con las líneas celulares NCIH460 asociado al cáncer de pulmón , MCF7 asociado al cáncer de mama y Mia mesotelina asociado al cáncer de páncreas permiten evidenciar la actividad citostática en la fracción metanólica de la especie *Unonopsis osea*.
- Las acetogeninas de la especie *Unonopsis osea* presentaron los resultados más consistentes a lo largo del estudio, por lo cual es una especie promisoría para la aplicación de las siguientes etapas de la investigación.
- Las annonaceae *Anaxagorea sp* y *D. confusa* presentaron porcentajes de inhibición importantes con la línea celular NCIH460 por lo cual se pueden ampliar investigaciones en estas especies. En cuanto a *G. púdica* y *G. lucens* no presentaron buenos resultados en el ensayo de citotoxicidad con las líneas celulares NCIH460, MCF7 y Mia mesotelina con el método de extracción empleado.

## 5.2 Recomendaciones

- Se recomienda una vez purificados los extractos, comprar estándares certificados para identificar exactamente las acetogeninas que contienen cada una de las especies estudiadas.
- Así como determinar el rendimiento de extracción con el protocolo experimental 2, desarrollado en el CENIBiot.
- También se recomienda validar el método de cuantificación por reacción de Kedde para la determinación de acetogeninas.
- Continuar con estudios de fraccionamiento, identificación y separación de los diferentes componentes de los extractos de corteza de las especies seleccionadas para evaluar su actividad individual y en mezclas.
- Ampliar el estudio de la actividad biológica de los extractos de las hojas, flores, tallo, corteza y raíz de las especies de *annonaceas* seleccionadas para elegir los extractos con mayor actividad para su aplicación como anticancerígeno.

## **ANEXOS**

### **Anexo I. Protocolo de ensayos de citotoxicidad del CENIBiot**

#### **Materiales**

Las líneas celulares humanas NCI-H460 (H460) se adquirieron de ATCC® (HTB177™, EE.UU.) y MIA células mesotelina (células pancreáticas humanas con modificación de sobreexpresión de mesotelina de MIA PaCa-2, ATCC® CRM-CRL-1420™) eran un regalo de doctorado Christian Marin Muller del Baylor College of Medicine (EE.UU.). La solución salina tamponada con fosfato (PBS), resazurina sal de sodio (RSS), dimetil sulfóxido (DMSO) y suero bovino fetal (FBS) fueron todos adquiridos de Sigma-Aldrich (Cat. N. D8418, 12306C).

Los materiales para el cultivo de células incluyen matraces de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon Corning®), placas Falcon de 96 pocillos (Corning®) que se usaron en los ensayos de citotoxicidad. Otros productos usados en estos experimentos fueron Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco®, 31800-105), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco®, 31600-091), ambos medios se utilizaron sin antibióticos. La solución de 0,25% tripsina 0,5 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se adquirió de Sigma-Aldrich (59427C) y Fluka (03609), respectivamente. La Doxorribucina se obtuvo de Sigma-Aldrich (44.583) y se preparó para una concentración 10 mM, se utiliza en una concentración de trabajo, esta se diluyó con medios de cultivo y SRR de 5 y 2 mg / ml. El DMSO se diluyó con medios de cultivo y RSS a 10 y 1 mg / mL.

Los extractos de Annonaceae se prepararon con DMSO a una concentración madre de 10 mg / ml, y se diluyeron en medios de cultivo y de RSS para las soluciones de trabajo de 10 y 1 mg / ml.

Se utilizó el lector de microplacas Synergy™ H1 (BioTek), se utilizó para medir la fluorescencia en 96 - placas de pocillos a longitudes de onda de 540 nm de excitación y 590 nm de emisión.

### **Cultivo de células**

Las células se mantuvieron en matraces de 25 cm<sup>2</sup> de cultivo Falcon bajo condiciones de cultivo estándar de 5 % de CO<sub>2</sub> en el aire a 37 ° C con renovación del medio cada 2 - 3 días. Los medios de cultivo utilizados fueron RPMI para NCIH460, DMEM para MIA mesotelina, tanto suplementado con 10 % FBS.

### **Ensayo de Sales de Rezasurina para la citotoxicidad de células**

NCIH460 y MIA mesotelina se tripsinizaron a partir de cultivos subconfluentes y luego sembradas en pocillos por triplicado de una placa de 96 pocillos (50µL) a concentraciones de  $6 \times 10^2$  -  $5 \times 10^2$  células / mL, respectivamente, en condiciones de cultivo estándar de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire a 37 ° C y se deja durante la noche. Después de alrededor de un período-inicial de 18 h, para permitir la unión de las células, se añadió un volumen de 50µL directamente en un medio de cultivo que contiene RSS 1X y una de estas opciones: las diluciones de trabajo de los extractos de *Annonacea* (M1 a M18), el DMSO, el medio (100 % Viabilidad) o la doxorubicina, y luego volvieron a la incubadora. Se midió la fluorescencia con una sensibilidad de 70 a 3, a los tiempos de 24, 48, 72 y 96 h, se agregó las RSS en cada tiempo para asegurar una adecuada fluorescencia. Debido a que el medio de cultivo no se ha cambiado durante este período, la fluorescencia RSS es un valor acumulativo. Como blanco, SR 1X fue añadido al medio sin células diluidas con las opciones mencionadas antes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Doxorrubicina 5 $\mu$ M			Blanco	M3 10 $\mu$ g/mL			Blanco	M11 10 $\mu$ g/mL			Blanco
B	Doxorrubicina 2 $\mu$ M				M4 10 $\mu$ g/mL				M12 10 $\mu$ g/mL			
C	DMSO 10 $\mu$ g/mL				M5 10 $\mu$ g/mL				M13 10 $\mu$ g/mL			
D	DMSO 1 $\mu$ g/mL				M6 10 $\mu$ g/mL				M14 10 $\mu$ g/mL			
E	100% viabilidad				M7 10 $\mu$ g/mL				M15 10 $\mu$ g/mL			
F	100% viabilidad				M8 10 $\mu$ g/mL				M16 10 $\mu$ g/mL			
G	M1 10 $\mu$ g/mL				M9 10 $\mu$ g/mL				M17 10 $\mu$ g/mL			
H	M2 10 $\mu$ g/mL				M10 10 $\mu$ g/mL				M18 10 $\mu$ g/mL			

Figura 35. Diagrama de la distribución espacial de la placa de 96 pocillos empleada en los ensayos in vitro para la determinación de un efecto citostático, citotóxico o proliferativo de los extractos de Annonaceae en las células.

Fuente: CENIBiot.

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos representan el valor promedio de los datos de fluorescencia +/- la desviación estándar. Valores superiores al control que contiene solo células (100% de viabilidad) se interpretan como un efecto promotor de la proliferación celular. Valores inferiores al control 100% de viabilidad indican un efecto citostático. Valores inferiores al control 100% de viabilidad que además impide el desarrollo de las células indican un efecto citotóxico.

Anexo II. Resultados de pruebas de citotoxicidad en extractos con acetato de etilo de corteza y madera

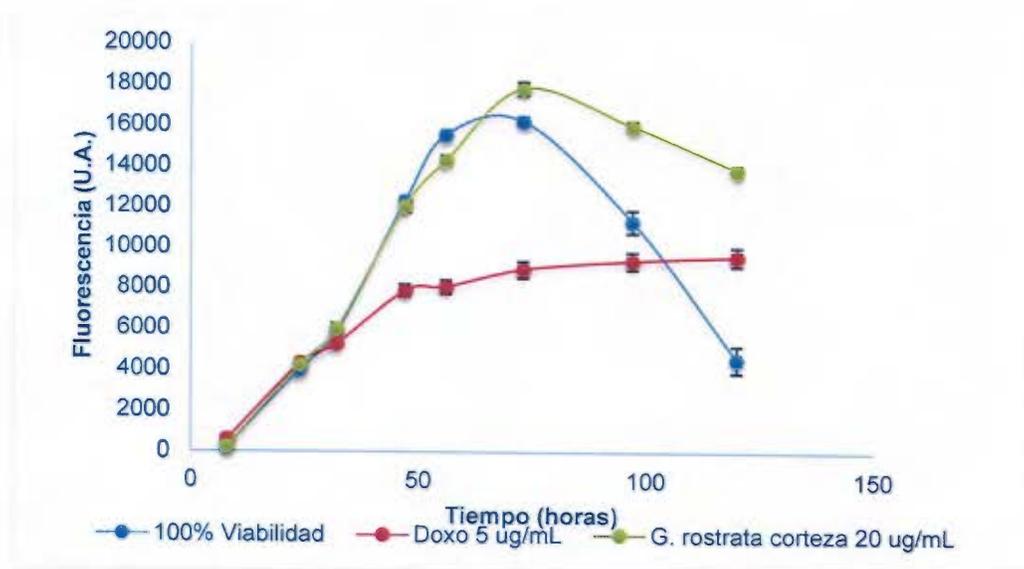


Figura 36. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *G. rostrata* en la línea NCIH460.

Fuente: CENIBiot

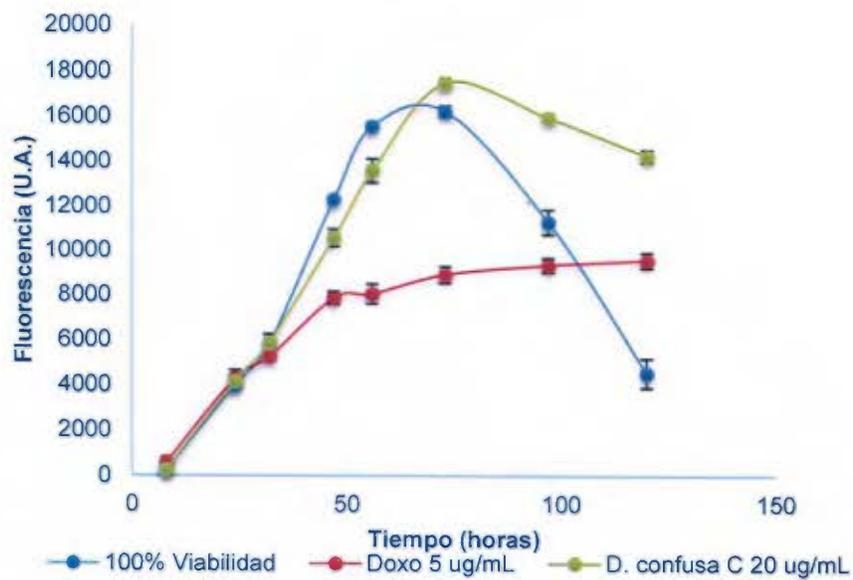


Figura 37. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *D. confusa* en la línea NCIH460.

Fuente: CENIBiot

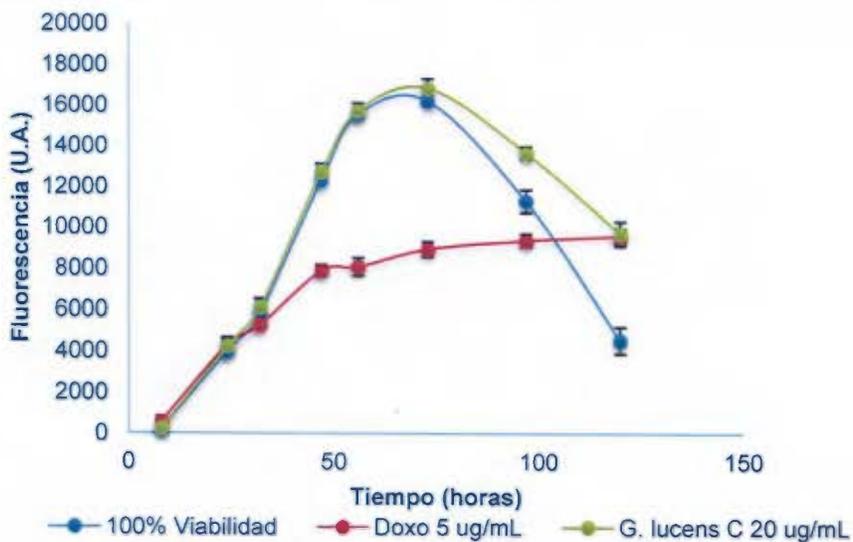


Figura 38. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *G. lucens* en la línea NCIH460.

Fuente: CENIBiot.

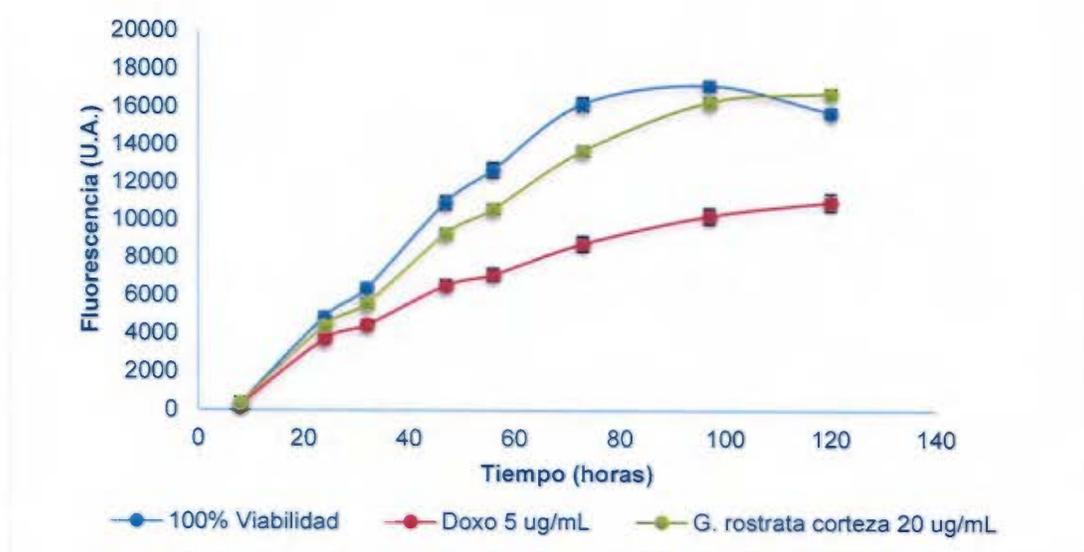


Figura 39. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *G. rostrata* en la línea MCF7.  
Fuente: CENIBiot

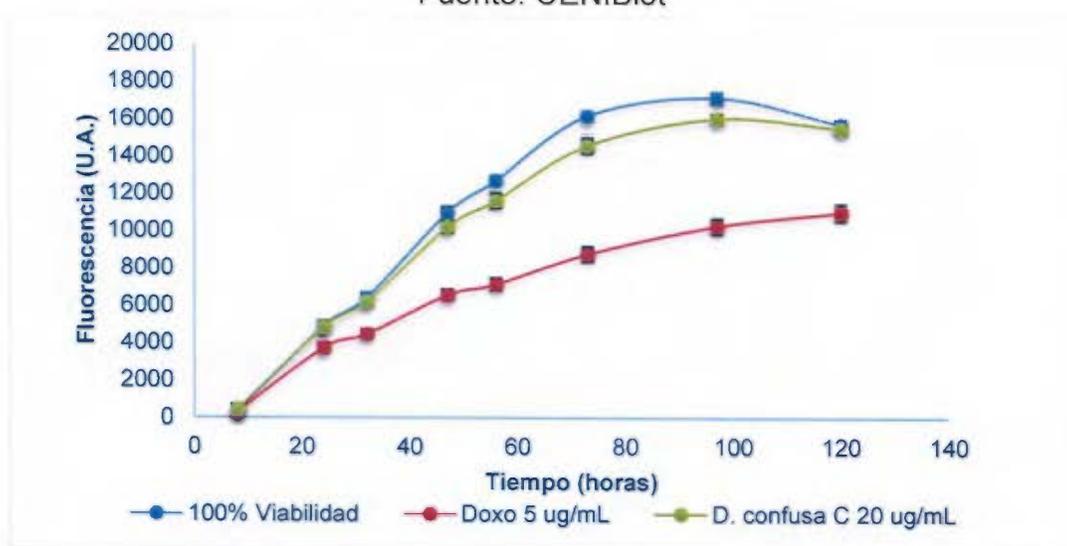


Figura 40. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *D. confusa* en la línea MCF7.  
Fuente: CENIBiot

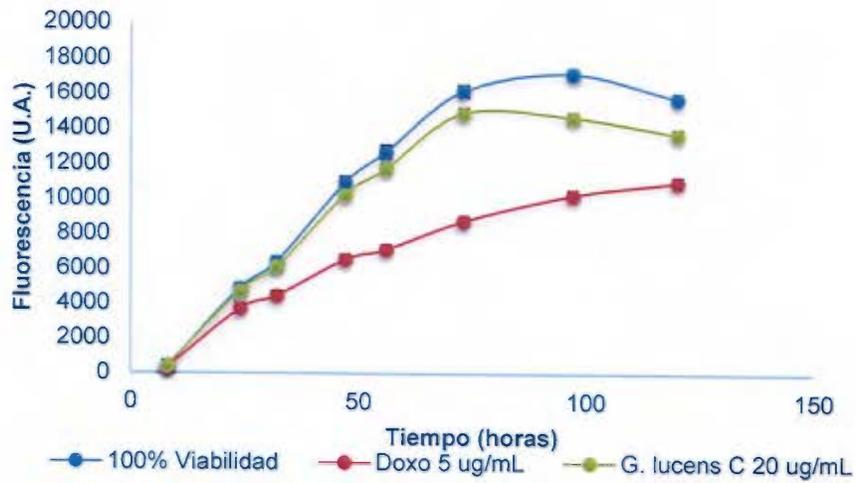


Figura 41. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *G. lucens* en la línea MCF7.

Fuente: CENIBiot

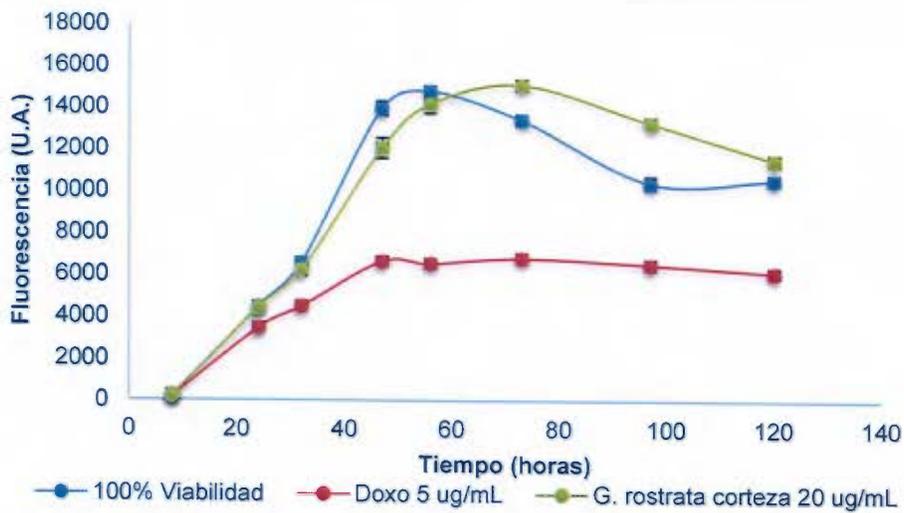


Figura 42. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *G. rostrata* en la línea MIA Mesotelina.

Fuente: CENIBiot.

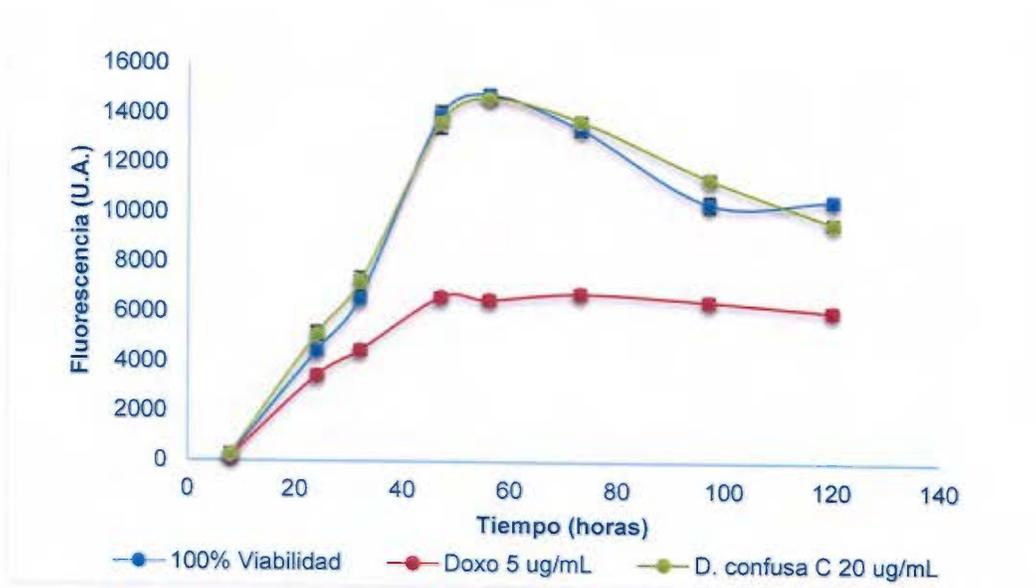


Figura 43. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *D. confusa* en la línea MIA Mesotelina.

Fuente: CENIBiot.

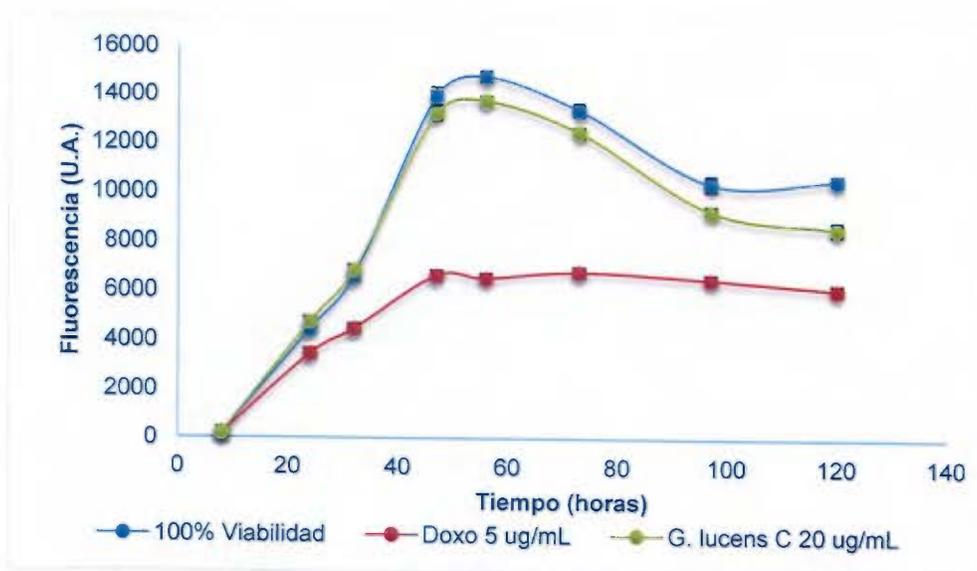


Figura 44. Resultado ensayo de citotoxicidad del extracto con acetato de etilo de *G. lucens* en la línea MIA Mesotelina.

Fuente: CENIBiot.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB SCIEX. (2014). *Triple Quad™ 3500 Guía de usuario del sistema*. Singapur.
- Abe, M., Murai, M., Ichimaru, N., Kenmochi, A., Yoshida, T., Kubo, A., ... Miyoshi, H. (2005). Dynamic function of the alkyl spacer of acetogenins in their inhibitory action with mitochondrial complex I (NADH- Ubiquinone Oxidoreductase). *Biochemistry*, 44, 14898–14906.
- Acevedo, J., Angeles, J., Heriberto, R., Petricevich, V., Nolasco, N., Collí, D., & Santa-olalla, J. (2013). Modelos *in vitro* para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. In *Bioactividad de peptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 29–82). Barcelona: OmniaScience.
- Arce, R. (2011). *Extracción, aislamiento y elucidación estructural de compuestos en especies de las familias Apocynaceae, Flacourtiaceae y Annonaceae*. (Tesis doctoral). Universidad de Costa Rica, Facultad de Química. San José.
- Arenas, I., & López, J. (2004). Espectrofotometría de absorción. Instituto de Biotecnología.
- Arencibia, D., Rosario, L., & Curveco, D. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *RETEL*, 40–52.
- Asare, G. a., Afriyie, D., Ngala, R. a., Abutiati, H., Doku, D., Mahmood, S. a., & Rahman, H. (2014). Antiproliferative Activity of Aqueous Leaf Extract of *Annona muricata* L. on the Prostate, BPH-1 Cells, and Some Target Genes. *Integrative Cancer Therapies*, 14(1), 65–74.
- Bagué, A. J., & Segundo, N. (2012). *Tecnología Farmacéutica*. España: Editorial Club Universitario.
- Ballerino, F. (2013). Una “epidemia devastadora” de cáncer amenaza a América latina. *PERFIL. R*
- Barahona, V. (2009). *Evaluación de la actividad antioxidante y valor nutracéutico*

- de las hojas y frutos de la guanábana (Annona muricata)*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Betancur-Galvis, L. A., Saez, J., Granados, H., Salazar, A., & Ossa, J. E. (1999). Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(4), 531–535.
- Bhat, S., Nagasampagi, B., & Sivakumar, M. (2006). *Chemistry of Natural Products* (2nd ed.). India: Springer.
- Bobadilla, M., Zavala, F., Sisniegas, M., Zavaleta, G., Mostacero, J., & Taramona, L. (2005). Linnaeus « guanábana » sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Revista Peruana de Biología*, 12(1), 145–152.
- Cañigüeral, S. (2002). La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*, 2(2), 101–121.
- Cañigüeral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. L. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22(3), 265–277.
- Champy, P., Guérineau, V., & Laprévotte, O. (2009). MALDI-TOF MS profiling of annonaceous acetogenins in *Annona muricata* products for human consumption. *Molecules*, 14(12), 5235–5246.
- Chízar, C. (2009). *Plantas comestibles de Centroamérica (1ª)*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio.
- Cofré, R. A. (2009). *Evaluación de los efectos ansiolítico y antidepresivo del Extracto metanólico de Modiola caroliniana en ratones*. (Tesis de Grado). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
- Condit, R., Pérez, R., & Daguerre, N. (2011). *Trees of Panama and Costa Rica*. Princeton University Press.
- Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. (2003). *Protocolos de vigilancia sanitaria específica agentes citostáticos*. Madrid.
- Cortes, D., Moreno, L., Párraga, J., Galáñ, A., & Cabedo, N. (2014). Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. *Revista Brasileira de Fruticultura*,

36(spe1), 22–31.

- Cuadrado, L. (2004). *Estudio Bromatológico y Fitoquímico de la jícama (Smallanthus sonchifolia) para determinar el tiempo óptimo de cosecha*. Escuela Politécnica de Chimborazo.
- Do Nascimento, F. D. C., Diamantino Boaventura, M. A., Assunção, A. C. S., & Santos Pimenta, L. P. (2003). Acetogeninas de anonáceas aisladas de hojas de *Rollinia laurifolia*. *Química Nova*, 26(3), 319–322. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300006>
- Erkens, R. H. J. (2007). *From morphological nightmare to molecular conundrum. Phylogenetic, evolutionary and taxonomic studies on Guatteria (Annonaceae)*. Gildeprint Drukkerijen, Enschede.
- Erkens, R. H. J., Maas, P. J. M., Chatrou, L. W., Schatz, G. E., & Zamora, N. (2006). Seven taxonomic discoveries in annonaceae from south-eastern Central America. *Blumea: Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography*, 51(2), 199–220.
- Escobar M., L., Rivera, A., & Aristizábal G., F. A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*, 17(1), 67–74.
- Feliciano, R. P., Shea, M. P., Shanmuganayagam, D., Krueger, C. G., Howell, A. B., & Reed, J. D. (2012). Comparison of isolated cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) proanthocyanidins to catechin and procyanidins A2 and B2 for use as standards in the 4-(dimethylamino)cinnamaldehyde assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4578–4585.
- Flores, F. (2009). *Evaluación de la eficacia de un producto herbario en el tratamiento de neoplasias*. Instituto Politécnico Nacional.
- Florez, L., & Mesa, V. (2007). *Monografía sobre pruebas de actividad biológica con dos organismos modelos en acetogeninas de Annonaceae con actividad biopesticida*. (Tesis de Grado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.

- Flórez, Y., & Martínez, E. (2010). *Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de Annona muricata de la región cafetalera*. (Tesis de Grado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Galindo, C. V., Castell, E. C., Montell, L. T., Segura, E. S., & Baeza, M. M. R. (2014). Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Nutr Hosp.*, 29(6), 1388–1393.
- Gallardo, T. M., Carmen Zafra-Polo, J. R., Tormo, M., Carmen González, X. F., Estornell, E., & Cortes, D. (2000). Semisynthesis of Antitumoral Acetogenins: SAR of Functionalized Alkyl-Chain Bis-Tetrahydrofuranic Acetogenins, Specific Inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(25), 4793–4800.
- Galvis, J., Ocampo, D., Ocampo, R., & Gutiérrez, P. (2011). Actividad tóxica de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimolioides* (annonaceae) sobre *Artemia salina*. *Bol.cient.mus.hist.nat*, 16(31), 17–22.
- García, K. ., Ramón, E. ., Madrigal, E., & Zepeda, L. G. (2006). Evaluación citotóxica *in vitro* de acetogeninas aisladas de *Annona cherimolia* Mill. 2° Congreso Nacional de Química Médica, 4.
- García Aguirre, K. K. (2009). *Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de Annona cherimolia y Annona muricata Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gómez, A; Molina, S. (2012). *Evaluación preeliminar de la actividad insecticida Contra Puto barberi (Cochinilla harinosa) del extracto etanolico de las semillas desengrasadas de Annona muricata*. (Tesis de Grado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Guarnizo, A., & Martínez, P. (2013). *Experimentos de Química Orgánica: Con enfoque en ciencias de la vida*. Colombia: ELIZCOM S.A.
- Gutiérrez, M. (2002). La cromatografía líquida: aplicación de la TLC a la separación de colorantes. *Boletín Intextex*, 1,29–33.

- Herrera, C; Bolaños, N; Lutz, G. (2003). *Química de alimentos: manual de laboratorio*. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- INBIO. (2015). *INBIO*.
- INEC. (2013). *Panorama Demográfico*. San José, Costa Rica: publicaciones del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), Noviembre 2013.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2015). Tipos de tratamientos. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol>.
- Jiménez, M. (2013). *Fraccionamiento y caracterización de del extracto clorofórmico obtenido de las hojas de Tabebuia chrysantha*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Krinski, D., Massaroli, A., & Machado, M. (2014). Potencial insecticida de plantas da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 225–242.
- Ley, J. M. (2013). Los árboles de la Península de Osa sector Piro Una guía para su identificación. *Osa Conservation*, 19–26.
- Maldonado, R. (1985). *Los Productos de las plantas: una visión integral*. Centro de Investigación en Química Aplicada.
- Martínez, A. (2002). Sesquiterpenlactonas. *Universidad De Antioquia*, 1–19.
- Martínez, A. (2009). *Estudio del mecanismo de acción de una acetogeninade A. muricata*. Universidad Veracruzana. Retrieved from
- Mastrogiovanni, M. (2012). *Extracción, purificación y caracterización primaria de saponinas de Quillaja brasiliensis*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República de Montevideo, Uruguay.
- Ministerio de Salud. (2015). Vigilancia de la Salud. Incidencia y mortalidad del cáncer.
- Montoya, Y., Orozco, P., Arango, S., Maldonado, M., & Aguillón, J. (2013). Evaluation of cytotoxic activity of the aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) on groups of cell lines. *2013 Pan American Health Care Exchages (PAHCE)*, 1(May 2013), 6–10.
- Morales, C. A., González, R., & Aragón, R. (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*.
- Morán, L. M., Hernández, J. Z., Pedro, J., Domínguez, C., Elizabeth, K., Vázquez, M., ... Leyva, G. (2009). Importancia del Estudio del Metabolismo Secundario en Plantas. *Instituto Tecnológico de Tlajomulco*, México, 1–17.
- Muñoz, O., Montes, M., & Wilkomirsky, T. (1999). *Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología* (2da ed.). Chile: Universidad de Chile.
- Muñoz, R. A. (2014). *Bioprospección Fitoquímica de dos variedades de cas (Psidium friedrichsthalium y Psidium guineense Sw.) oriundas de Costa Rica*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia.
- National Center for Biotechnology. (2016). PubChem Compound Database.
- Oberlies, N. H., Jones, J. L., Corbett, T. H., Fotopoulos, S. S., & McLaughlin, J. L. (1995). Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an *in vitro* disk diffusion assay. *Cancer Letters*, 96(1), 55–62.
- Oliveros, A., Cordero, I., Paredes, D., Buendía, D., & Macías, F. A. (2011). Extracción y cuantificación de cumarina mediante HPLC-UV en extractos hidroetanólico de semillas de *Dipteryx odorata*. *Revista Latinoamericana de Química*, 39(1–2), 17–31.
- Oviedo, V., García, M., Díaz, C., Marder, M., Costa, M., Sánchez, C., & Guerrero, M. (2009). Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad de tipo ansiolítica en ratones. *Rev. Colomb. Cienc. Quím, Farm.*, 38(1), 105–120.
- Padoan, G., Do Prado, L., Gimenes, L., Vieira, P. C., Das Gracias, M., Forim, M. R., ... Djair, J. (2015). ( Magnoliales : Annonaceae ) extracts to *Zabrotes subfasciatus* ( Coleoptera : Chrysomelidae : Bruchinae ), 98(3), 921–928.
- Palacios, M. (2013). Farmacognosia y Bioquímica. *Universidad Católica Los Angeles De Chimbote*, 1–172.
- Palomino, M. C. (2007). *Efecto del extracto etanolico de hojas Annona muricata L. ("guanabana") sobre la hiperglicemia inducida con aloxano en ratas*. (Tesis de

- maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Plascencia, V. G. (2003). *Espectrometría de masas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Puccio, P. (2016). *Annona montana*. Dr. Giuseppe MAZZA Journalist - Scientific photographer. Recuperado de: <http://www.photomazza.com/?Annona-montana&lang=es>.
- Quispe, A., Zavala, D., Posso, M., & Vaisberg, A. (2006). Efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Medicina Experimentalis*, 23(4), 265–269.
- Ragasa, C. Y., Soriano, G., Torres, O. B., Don, M.-J., & Shen, C.-C. (2012). Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy Journal*, 4(32), 32–37.
- Repetto, M. (1995). *Toxicología avanzada* (3ra ed.). Madrid, España: Ediciones Díasde Santos, S.A.
- Ribeiro, L. R., Santos, M. F., Silva, M., Palmieri, M. J., Andrade-vieira, L. F., & Davide, L. C. (2013). Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* ( *Annonaceae* ). *Biología*, 68(3), 433–438.
- Rivas Morales, C., Oranday, M. A., & Verder, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. México: OmniaScience.
- Robledo Reyes, P. C., Jaramillo, G. I., & Restrepo, J. (2008). Evaluación de la toxicidad de acetogeninas anonáceas sobre ninfas de *Periplaneta americana* L. (Dyctioptera: blattidae). *Boletín Del Museo de Entomología de La Universidad Del Valle*, 9(1), 54–61.
- Rubinson, K., & Rubinson, J. (2001). *Análisis instrumental*. Madrid, España: Pearson Education S.A.
- Ruiz Hidalgo, J., Di, L., Blessing, T., Arrighi, F., Bardón, A., Vera, N., & Neske, A. (n.d.). Acetogeninas Annonáceas de *Annona squamosa* procedente de Brasil, 1, 1–3.
- Sánchez, P; Benítez, L. (2006). Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología*, 1, 187–199.

- Santos Pimenta, L. P., Pinto, G. B., Takahashi, J. a, e Silva, L. G. F., & Boaventura, M. a D. (2003). Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 10(2–3), 209–212.
- Schlaepfer, L; Mendoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 1, 18–27.
- Schlie, M. A., González, A. R., & Luna, L. M. (2009). Las acetogeninas de annonaceae: Efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 8(4), 245–257.
- Setzer, M. C., Moriarity, D. M., Lawton, R. O., Setzer, W. N., Gentry, G. A., & Haber, W. A. (2003). Phytomedicinal potential of tropical cloudforest plants from Monteverde, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 51(3–4), 647–673.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de la tecnología de productos fitoterapéuticos* (1st ed.). Colombia: Convenio Andres Bello, Subprograma X CYTED.
- Skoog, D., James, F., & Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6th ed.). México: Cengage Editores.
- Swadesh, J. (1997). *HPLC: Practical and Industrial Applications*. (2<sup>nd</sup> ed) USA: Analytical Chemistry series.
- Takada, M., Kuwabara, K., Nakato, H., Tanaka, A., Iwamura, H., & Miyoshi, H. (2000). Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1460(2–3), 302–310.
- Torres, F. (2007). Estructura y actividad de sapogeninas triterpénicas. *Scientia et Technica*, (33), 87–90.
- Vega, D., Pereira, S., Almeida, M. S., & Morales, G. (2009). Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas, tallo y

- flores de la *Ixora coccinea* L. *Química Viva*, 8(3), 185–191.
- Villacorta, J. (2013). *Cuantificación de sesquiterpenlactonas provenientes de las hojas de calea urticifolia (juanislama) recolectadas en el período de enero a junio de 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- Vinaccia, S; Orozco, M. (2005). Aspectos psicosociales asociados con la calidad de vida de personas con enfermedades crónicas. *Diversitas*, 1(2), 125–137.
- Walton, H., & Reyes, J. (1983). *Análisis químico e instrumental moderno*. Perú: Editorial Reverté S. A.
- Warner, H., & Bladt, S. (2001). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography Atlas* (2nd ed.). Alemania: Springer.
- Yang, H., Zhang, N., Zeng, Q., Yu, Q., Ke, S., & Li, X. (2010). HPLC Method for the Simultaneous Determination of Ten Annonaceous Acetogenins after Supercritical Fluid CO<sub>2</sub> Extraction. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 6(3), 202–7.
- Yucatán, C. de I. C. de. (2010). *Identificación de metabolitos secundarios con aplicación en farmacia y agricultura*. CICY, México.