



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
"La Universidad Católica de Loja"

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TEMA:

"Aislamiento y caracterización de Metabolitos Secundarios Mayoritarios del fruto de *Annona montana*"

*Tesis de Grado Previa a la
obtención del título de
Bioquímica Farmacéutica.*

AUTORA:

Mónica Cecibel Valdivieso Flores.

DIRECTOR DE TESIS:

Ing. Jorge Ramírez Robles.

Loja- Ecuador

2010

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Mónica Cecibel Valdivieso Flores, declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Mónica Valdivieso Flores
Tesisista

Ing. Jorge Ramírez Robles
Director de Tesis

CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN

Loja, 15 de Diciembre del 2010

Ing. Jorge Ramírez Robles.

INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA

Dejo constancia de haber revisado y estar de acuerdo con el Proyecto de fin de carrera, titulado: "**Aislamiento y caracterización de Metabolitos Secundarios Mayoritarios del fruto de *Annona montana***", presentado por la Srta. Mónica Cecibel Valdivieso Flores.

Particular que comunico para los fines legales pertinentes.

Nombres y Apellidos
(DIRECTOR DE TESIS)

Firma
(DIRECTOR DE TESIS)

AUTORÍA

Los conceptos, y análisis emitidos en el presente trabajo de investigación, así como, los resultados, discusiones y conclusiones son responsabilidad directa de la autora.

Mónica Cecibel Valdivieso Flores.

DEDICATORIA

Durante estos años Dios me ha permitido vivir momentos inolvidables, alegres y tristes, que ahora me llenan de nostalgia porque vienen a mi mente como buenos recuerdos colmados de gran aprendizaje, donde he podido compartir con personas de excelente calidad humana. A todos ustedes... Muchas Gracias.

Con inmensa gratitud dedico este trabajo a mis queridos padres: María y José por su apoyo, ánimo y amor incondicional, a mis hermanos: Yohsana, Ronald, Danilo, Jhunion y Juanito porque son la fuerza motivadora de mis sueños que forjan mis metas y propósitos, a quienes ahora no están físicamente conmigo pero que desde el cielo continúan enviando sus bendiciones y a todas mis apreciadas amistades con quienes he compartido y aprendido instantes invaluable de mi vida

Mónica Cecibel Valdivieso Flores

AGRADECIMIENTOS

A Dios por siempre ofrecerme sus bendiciones en los caminos de la vida y darme sabiduría para el desarrollo de este trabajo.

A mi familia porque con su confianza y cariño han impulsado mis metas y sueños.

A mis padres y hermanos por su amor, ánimo y apoyo demostrado incondicionalmente en el transcurso de mi vida.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a mis maestros por haber ofrecido sus conocimientos para mi formación académica y profesional.

Al Ing. Jorge Ramírez Robles por su invaluable apoyo en la dirección y asesoría de esta investigación.

Agradezco inmensamente a la Planta de Productos Naturales del Instituto de Química Aplicada, por la acogida incondicional que permitió el desarrollo de este proyecto, el acceso al material y equipos del laboratorio.

A todas las personas que integran el laboratorio de Productos Naturales especialmente a mis compañeros y amigos quienes con una palabra de aliento impulsaban el desarrollo de esta investigación.

Finalmente agradezco a todas las personas cuyos nombres resultan innumerables y que de una u otra manera me ofrecieron su apoyo y la fuerza entusiasta en el camino de esta investigación.

A todos infinitas gracias por confiar en mí.

INDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.	II
AUTORÍA.	III
DEDICATORIA.	IV
AGRADECIMIENTO	V
CESIÓN DE DERECHOS	VI
CONTENIDOS	VII
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN	2
------------------------	----------

CAPITULO II

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Plantas en la Medicina Tradicional	5
2.2. Metabolitos Secundarios	5
2.3. Importancia de los metabolitos secundarios	5
2.4. Clasificación de los metabolitos secundarios	6
2.4.1. Heterósidos	6
2.4.2. Polifenoles	7
2.4.3. Terpenoides	7
2.4.4. Alcaloides	7
2.5. Otros metabolitos secundarios	7
2.5.1. Mucílagos y gomas	7
2.6. Solventes orgánicos	8
2.6.1 Hexano	9
2.6.2. Acetato de etilo	9
2.6.3 Metanol	9
2.7. Extracto Vegetal Total	9
2.7.1. Consistencia de los extractos	10
2.7.1.1 Extractos blandos	10

2.7.1.2 Extractos firmes o de consistencia pilular	10
2.7.1.3 Extractos secos	10
2.7.1.4 Extractos fluidos	10
2.8. Características de los extractos	10
2.9. Conservación de los extractos	11
2.10. Aplicación de métodos de extracción	12
2.11. Técnicas Cromatográficas	12
2.11.1. Cromatografía en capa fina (CCF-TLC)	12
2.11.2. Cromatografía en columna (CC)	13
2.12. Rf- Factor de retención	13
2.13. Cristalización	13
2.14. Punto de Fusión	13
2.15. Especie en Estudio	13
2.16. Annonaceae en Ecuador	15
2.17. Importancia de la Familia Annonaceae en Medicina Tradicional y el Cáncer	15
2.18. Relación <i>Annona montana</i> - actividad biológica	15
2.19. Descripción de las acetogeninas de la familia Annonaceae	16

CAPITULO III

3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo General	18
3.2. Objetivos específicos	18
3.3. Fin del Proyecto	18
3.4. Propósito del Proyecto	18
3.5. Componentes del Proyecto	19
3.6. Hipótesis del Proyecto	19
3.7. Análisis e Interpretación de Datos	19

CAPITULO IV

4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Recolección de la Muestra Vegetal	21
4.2. Tratamiento de la Muestra Vegetal	21
4.3. Obtención de Extractos	21
4.4. Selección del Extracto a Fraccionar	22
4.5. Separación Líquido- Líquido	23
4.6. Concentración de las fases separadas	24
4.7. Fraccionamiento en Cromatografía de Columna	24
4.8. Cromatografía de Capa Fina (CCF)	24
4.9. Unión, purificación y caracterización de fracciones	25

CAPITULO V

5. RESULTADOS	27
5.1. Rendimiento del material utilizado	27
5.2. Extractos obtenidos	27
5.3. Rendimiento de la fase orgánica resultante de la separación líquido-líquido	28
5.4. Resultado del Fraccionamiento en columna de la fase orgánica	28
5.5. Caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos	30

CAPITULO VI

6. DISCUSIÓN	33
---------------------	----

CAPITULO VII

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
7.1. Conclusiones	36
7.2. Recomendaciones	37
8. BIBLIOGRAFÍA	38

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Biosíntesis de los metabolitos vegetales	8
Fig. 2. Fotografía <i>Annona montana</i> .	14
Fig. 3. Esquema del procedimiento para la obtención de extractos	22
Fig. 4. Esquema de separación líquido-líquido	23
Fig. 5. Medida de los Rf en la placa de sílica gel 60 F ₂₅₄	24

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Heterósidos más importantes con actividad farmacológica que constituyen las plantas.	6
Tabla 2. Ubicación de la especie en estudio	21
Tabla 3. Cantidad de extracto obtenido con cada solvente	21
Tabla 4. Inhibición de los extractos en líneas de cáncer humano.	23
Tabla 5. Unión de las fracciones obtenidas.	25
Tabla 6. Detalle de los extractos obtenidos	28
Tabla 7. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del fruto de <i>Annona montana</i> .	29
Tabla 8. Cuadro de los resultados de caracterización de cada una de las fracciones obtenidas.	30
Tabla 9. Valor del Factor de retención de las fracciones purificadas.	31
Tabla 10. Determinación de alcaloides en CCF	32

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se aisló seis metabolitos secundarios, a partir del extracto de la fruta *Annona montana*.

Los compuestos aislados presentaron Rf de: a) 0.1, b) 0.2, c) 0.4, d) 0.6, e) 0.7, f) 0.9 y puntos de fusión de: a) 280-290 °C, b) 109-130 °C, c) 310-320 °C, d) 194-200 °C, e) 248-253 °C, f) 235-240 °C.

El aislamiento se lo realizó a partir del extracto metanólico de la fruta, en vista de su característica polar y a su considerable porcentaje citotóxico frente a líneas de cáncer humano detallado en el estudio “Inhibición del crecimiento de líneas tumorales humanas, mediante los extractos en acetato de etilo y metanol de *Annona montana* y estudio genotóxico mediante ensayo cometa en linfocitos humanos”, desarrollado en el área de Genética Toxicológica del Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL (Granda y Ojeda, 2010).

El fraccionamiento fue mediante cromatografía de columna (CC) aplicando simultáneamente cromatografía en capa fina (CCF) para la verificación de los compuestos aislados para ello se usó solventes orgánicos de polaridad ascendente; y como reveladores Sulfato Cérico y luz ultravioleta (lámpara UV de 254 y 366 nm).

La purificación de los compuestos mayoritarios se realizó desde 320 fracciones resultantes del fraccionamiento en cromatografía en columna de las cuales se obtuvieron seis fracciones unidas según características afines y Rf expuesto en cromatografía de capa fina (CCF).

Los resultados obtenidos permiten conocer y caracterizar compuestos que constituyen las plantas medicinales con importante aplicación tradicional como fuente de materia prima natural.

Palabras claves: Cromatografía de Capa Fina y columna, punto de fusión, Rf, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

In the present investigation the isolation of six was realized metabolitos secondary, from the fruit *Annona Montana*.

The isolated compounds presented Rf of: a) 0.1, b) 0.2, c) 0.4, d) 0.6, e) 0.7, f) 0.9; fusion point: a) 280-290 °C, b) 109-130 °C, c) 310-320 °C, d) 194-200 °C, e) 248-253 °C, f) 235-240 °C.

Of three extracts obtained with the solvents: hexane, ethyl acetate and methanol, selected the most cytotoxic previous evaluation of his activity in lines of human cancer, information considered from the results obtained in the Center of Cellular and Molecular Biology in the area of toxicological Genetics of Universidad Técnica Particular de Loja.

The isolation realized it from the methanolic extract of the fruit, in view of his polar characteristic and to his considerable cytotoxic percentage opposite to lines of human cancer, in contrast, the extract hexane and ethyl acetate, they presented minor level of citotóxicidad.

The division effected by means of column chromatography (CC) with the help of chromatography in thin cap (CCF) for the check of praise compounds isolated for it ascending polaridad used organic solvents; and as developers Sulfate Cérico and ultraviolet light (lamp UV of 254 and 366 nm).

The purification of the majority compounds was realized from 320 resultant fractions of the division in chromatography in column of which there were obtained six fractions joined according to related characteristics and Rf exposed in chromatography of thin cap (CCF).

The obtained results allow to know and to characterize compounds that constitute the medicinal plants with important traditional application as source of natural raw material.

Key words: Chromatography of Cap Dies and column, fusion point, Rf.

Capítulo I

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo se estudian cada día nuevos metabolitos de origen natural para prevenir o tratar diversas enfermedades que aquejan a la población (Valiente *et al.* 2003). Estos estudios nacen de los sistemas de medicina tradicional, basados en plantas por miles de años (Bruneton, 2001; OMS, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80 % de los más de 6.000 millones de habitantes de la tierra confían en las plantas medicinales para suplir sus principales necesidades de salud. Además registra que el 60 % de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25% contiene principios vegetales modificados químicamente (Barthlott *et al.* 1995; Bussmann, 2006).

En países sudamericanos como Ecuador, la aplicación de la medicina natural constituye relevante importancia en la salud como en el caso de sus comunidades indígenas, donde se aprovechan los recursos naturales de este país que posee mayor biodiversidad por Km² alrededor del mundo (Cerón. 2002). En detalle Loja y Zamora poseen el 36 % del total de las especies del Ecuador (Myers *et al.* 2000; Ordoñez *et al.* 2006; Richter *et al.* 2005).

Actualmente se conoce que los productos naturales han tenido un impacto directo en tratamientos anticancerígenos y de enfermedades infecciosas (Abe, 2005). En el área oncológica, muchos de los medicamentos tradicionales han sido aprovechados alrededor del mundo. Aproximadamente el 62 % de estos han estado relacionados a un producto de origen natural (Bruneton, 2001).

La (OMS), estima que aproximadamente el 53 % de los compuestos usados en clínica como agentes antitumorales a nivel mundial, han surgido de metabolitos secundarios o de algunos de sus derivados semisintéticos.

El relevante interés de aportar y aprovechar el variado recurso natural que nuestro país posee impulsa el desarrollo del presente trabajo desde el Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se investiga los metabolitos secundarios responsables con cierta actividad biológica a partir de especies vegetales que se desarrollan en Loja y Zamora, y que además poseen antecedentes medicinales tradicionales aplicables.

A nivel nacional las provincias de Loja y Zamora Chinchipe son consideradas como zonas muy importantes y de gran relevancia internacional por la diversidad de especies y ecosistemas siendo algunos de ellos únicos en el Ecuador (Cerón, 2002).

En esta investigación se trabajó con el fruto de la especie *Annona montana*, recolectada en Catamayo, provincia de Loja, considerada de relevancia medicinal según sus habitantes. Según Liaw, et al., 2004 todos los tipos de Annonas tienen actividad anticancerígena ya que provoca disminución de energía en las células cancerígenas, por lo tanto, poseen toxicidad selectiva contra diversos tipos de cáncer tal es el caso de las células hepáticas humanas Hep G2 (Liaw, 2004; Miyoshi, 1998). Dicha actividad podría atribuirse al alto contenido de Acetogenina, sustancia que presenta actividad semejante a la Adriamicina que es usada en quimioterapia; pero, a diferencia de esta última su acción es selectiva sobre las células cancerosas sin dañar los tejidos sanos. Se dice que la Acetogenina es cerca de 10.000 veces más efectiva que la Adriamicina (Takada, 2000; Wu, 2005).

Hoy en día se desarrollan y aplican metodologías para fraccionar y aislar metabolitos secundarios presentes en especies con antecedentes terapéuticos entre los cuales está la técnica conocida como cromatografía en columna y de capa fina, que permiten separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas (Skoog *et al.* 2003).

Capítulo II

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas en la Medicina Tradicional

Los sistemas de medicina tradicional basados en plantas, han sido usados alrededor del mundo por miles de años (Bruneton, 2001; OMS, 2000).

Las plantas han cumplido un rol importante para satisfacer necesidades básicas de las generaciones pasadas además de su trascendente papel en la restauración de la salud, acumulando prácticas ancestrales de selección, manejo y conservación de conocimientos que han sido transmitidos de generación en generación (Bruneton, 2001; Pietroni, 1992). Los compuestos de origen natural presentan gran diversidad de estructuras químicas, comparado con las pequeñas moléculas sintéticas, y con frecuencia proveen de actividades biológicas altamente específicas (Encarnación, 1996).

2.2. Metabolitos secundarios

Dentro de los llamados Productos Naturales o Metabolitos Secundarios (MS) se encuentra una gran cantidad de principios activos que son compuestos químicos que se desarrollan en distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de compuestos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, alcaloides, glucósidos o heterósidos, mucílagos, gomas, y taninos. Existen en las plantas principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, además azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y antibióticos (Pengelly, 1996).

2.3. Importancia de los metabolitos secundarios

A través de la historia, los principios activos de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre (Torres, 2004). En la actualidad solo unos pocos metabolitos se utilizan de forma industrial, por lo que se ha creado la necesidad de generar opciones y alternativas de producción enfocadas al uso sostenible de todos aquellos recursos

vegetales disponibles en el entorno, trabajando activamente en la detección y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies promisorias que puedan tener aplicación en la industria (cosmética, farmacéutica, textilera y agroalimentaria) (Torres, 2004).

2.4. Clasificación de los metabolitos

Los metabolitos se clasifican, según su estructura química, en grupos (Pengelly, 1996):

- Productos resultantes del **metabolismo primario** desde procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción como: glúcidos, lípidos, derivados de aminoácidos.
- Productos derivados del **metabolismo secundario** no son esenciales para el metabolismo sino que son sintetizadas como defensa, adaptación, etc., son los más importantes como principios activos los mismos que son conocidos como:

2.4.1. Heterósidos.- Son compuestos que están formadas por 2 partes: una es un azúcar (p.e. glucosa) y la otra no-azúcar o aglucona, aglicón o genina. El enlace entre ambas es hidrolizable y debe romperse para que se active el compuesto; esta ruptura es catalizada por fermentos que contiene la misma planta (Bruneton, 2001).

Tabla. 1. Heterósidos más importantes con actividad farmacológica que constituyen las plantas.

Tipo	Propiedades	Especies
Antraquinónicos	Purgantes	Cáscara sagrada, sen
Cardiotónicos	Diurético. Tónico cardíaco	Digital
Cianogénicos	Anestésicos. Anti-espasmódicas. Hipotensoras	Cerezo. Guindo. Almendro
Cumarínicos	Antibacteriano. Anticoagulante. Protector solar	Avena
Fenólicos	Febrifugas y antipiréticas	Peral. Sauce
Flavónicos	Fragilidad capilar. Vitamina C	Girasol. Ruda
Ranunculósidos	Irritantes para la piel	Ranunculáceas
Saponósidos	Hemolisis. Emolientes. Dermatitis	Abedul, Maíz, Regaliz, Saponaria, violeta.
Sulfurados	Antibióticos	Ajo, cebolla, rábano

Fuente: Bruneton. 2001

2.4.2. Polifenoles. Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes de este grupo son los ácidos fenólicos o fenoles, las cumarinas, los flavonoides, los lignanos, los taninos y las quinonas (Van Ginkel, 2003).

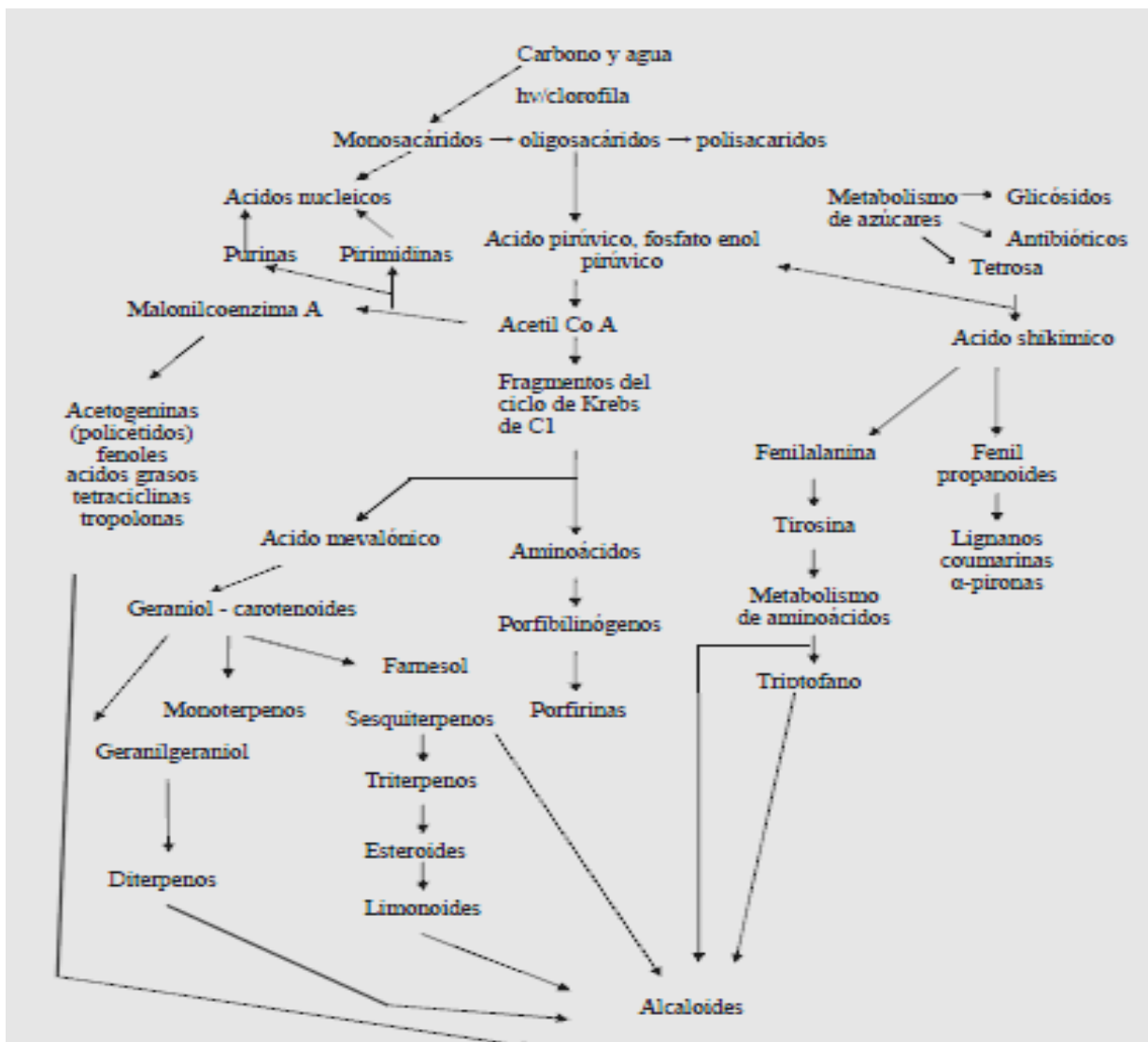
2.4.3. Terpenoides. Están formados por la unión de un número entero de unidades de isopreno (C₅). Según ese número se clasifican en: Monoterpenos (2 unidades de isopreno = C₁₀ ej. Iridoides); Sesquiterpenos (3 unidades de isopreno = C₁₅ ej. Lactonas); Diterpenos (C₂₀); Triterpenos C₃₀ ej.saponinas); Carotenos (C₄₀); Politerpenos (C_n) (Bruneton, 2001).

2.4.4. Alcaloides. Grupo de productos naturales de mayor interés en la farmacognosia. Dentro de este grupo se encuentran sustancias tóxicas incluso a bajas dosis. El primer alcaloide aislado fue la morfina (Sertürner, 1805). En 1819 se le dio el nombre de alcaloides debido a su naturaleza básica. Debido a su gran complejidad, aunque comenzaron a aislarse en el siglo XIX, la determinación de su estructura fue posterior. Ej. Drogas con alcaloides derivados del tropano (Cocaína); drogas con alcaloides derivados de la quinoleína (Quinina); drogas con alcaloides derivados de la isoquinoleína (Opio) (Bruneton, 2001).

2.5. Otros metabolitos secundarios

2.5.1. Mucílagos y gomas.- Son polisacáridos heterogéneos, formados por diferentes azúcares y en general llevan ácidos urónicos. Se caracterizan por formar disoluciones coloidales viscosas, geles en agua. La diferencia entre goma y mucílago es difícil y se suele equiparar todo con gomas. Actualmente se considera que la diferencia está en que los mucílagos son constituyentes normales de las plantas, mientras que las gomas son productos que se forman en determinadas circunstancias, mediante la destrucción de membranas celulares y la exudación (Pengelly, 1996).

Fig.1. Biosíntesis de los metabolitos vegetales



Fuente: Domínguez. 1973

2.6. Solventes orgánicos

Son compuestos orgánicos basados en el elemento químico carbono. Produce efectos similares al alcohol y anestésicos (Gatterman, 1993).

Los solventes industriales de mayor uso son los cementos (tricloroetileno, tetracloroetileno), los pegamentos (tolueno, acetato de etilo y varias acetonas), el thinter (destilados de petróleo, benceno, acetona, tricloroetileno, tetracloroetileno) y los removedores de barniz o pintura (acetona, tolueno, benceno, cloruro de metileno).

Los solventes constituyen un grupo heterogéneo de hidrocarburos volátiles derivados del petróleo y del gas cuyo punto de ebullición es bajo por lo que se evaporan al entrar en contacto con el aire. Su importancia y patrón de uso determinan su clasificación en: solventes activos, cosolventes, solventes laterales y diluyentes.

Dentro de la metodología se hace uso de los solventes Hexano, Acetato de Etilo y Metanol que son solventes orgánicos en polaridad ascendente.

2.6.1 Hexano

Líquido inflamable, volátil e incoloro, componente de la gasolina y del petróleo, olor ligeramente aromático, soluble en alcohol acetona y éter. Se usa especialmente como extractor de aceites vegetales, para efectuar reacciones de polimerización y como materia prima para síntesis orgánicas (Gatterman, 1993).

2.6.2. Acetato de etilo

Líquido incoloro, fácilmente inflamable, hierve a 74-77°C, se obtiene por destilación del alcohol con ácido acético. Se ocupa en extracciones líquidas, en la industria de fragancias, tinta, pintura, saborizantes, etc., (Gatterman, 1993).

2.6.3 Metanol

Líquido incoloro de olor característico, soluble en acetona, esteres. Arde con llama débilmente luminosa y es miscible con agua en todas las proporciones (Gatterman, 1993).

2.7. Extracto Vegetal Total

Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenido con solventes apropiados, por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología (Pardo, 2002). Los extractos de plantas medicinales se utilizan por el hombre desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias. Se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente como: alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo y un proceso de extracción adecuado (Pharmacopea, 2007).

2.7.1 Consistencia de los extractos

Alzate en 1990, descubrió la consistencia ideal que debían tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos:

2.7.1.1 Extractos blandos

Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa (Barreto, 1997).

2.7.1.2 Extractos firmes o de consistencia pilular

Como su nombre lo indica, deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos (Barreto, 1997).

2.7.1.3 Extractos secos

Anteriormente se los conocía con la denominación de “sales esenciales”. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene tan solo del 5 al 8 % de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. La forma farmacéutica de extractos secos aparece en varias farmacopeas (Belga, Norteamericana, Noruega y Mexicana), pero no indican un método exacto para la preparación de este tipo de extractos. Golaz les dio el nombre de extractos unitarios y los recomienda para la preparación de tinturas y jarabe (Barreto, 1997).

2.7.1.4 Extractos fluidos

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada (Barreto, 1997).

2.8. Características de los extractos

Estudios realizados por Corpas y Barrero entre 1988 y 1991, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos:

- a. Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.

- b.** Algunos son de color café amarillento, otros rojizos; los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila
- c.** Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- d.** Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- e.** La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- f.** Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- g.** Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholimétrico del alcohol con el cual han sido preparados.
- h.** Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total (Cordell, 1995), posteriormente se propuso ensayos generales para someter a los extractos a pruebas específicas para observar su calidad y composición final (Barreto, 1997).

2.9. Conservación de los extractos

La incorrecta conservación de los extractos puede alterar o modificar notoriamente la naturaleza del producto. En principio, un extracto de tipo pilular se conserva mejor que un extracto acuoso. Algunos extractos se descomponen al aire, absorben humedad atmosférica, se recubren de hongos y permiten el desarrollo de gérmenes bacterianos (Barreto, 1997).

Según Corpas y Barriga (1993), la conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:

- a.** Se deben conservar protegiéndolos de la luz, aplicado para aquellos extractos a los cuales no se les adicionado ninguna materia extraña como antióxicantes.

b. Los envases deben estar bien tapados. Condición para aquellos extractos que han sido objeto de la adición de productos extraños, de naturaleza físico-química definida.

c. Se deben conservar en un ambiente seco (Barreto, 1997).

2.10. Aplicación de métodos de extracción

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias, presentes en la planta y al propósito de la investigación. Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Algunas veces es conveniente desengrasar el material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así, para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, etanol y acetona (Arévalo, 1996). Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua (Arévalo, 1996).

2.11. Técnicas Cromatográficas

Las técnicas cromatográficas se basan en la separación de las sustancias presentes en una mezcla compleja al poner ésta en contacto con una fase móvil (líquido o gas) y otra estacionaria (sólida o líquida) que permanece fija. Las sustancias van a migrar a través de la fase estacionaria arrastradas por la fase móvil, a distinta velocidad según su afinidad o solubilidad en una u otra fase. Las sustancias más afines por la fase estacionaria migrarán más despacio, y las más afines por la fase móvil, más deprisa. Ajustando los parámetros cromatográficos se separan todos los componentes de una mezcla compleja como lo es un extracto. Los tres tipos más comunes son la cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases (CG) y la de líquidos (HPLC) (Palomino, 2001).

2.11.1. Cromatografía en capa fina (CCF-TLC)

Es una herramienta para determinar el número de componentes de una mezcla y como una prueba preliminar para realizar una cromatografía en columna, entre otros

(Brewster, 1979). En cromatografía en capa fina, el grado de elución de las sustancias depende de su polaridad, así como de la polaridad del eluyente utilizado (Palomino, 2001).

2.11.2. Cromatografía en columna (CC)

Es una técnica de separación de una mezcla compleja en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente, misma que se controla por cromatografía en capa fina, de tal manera que se puede separar cada componente de la mezcla (Abbot, 1970).

2.12. Rf- Factor de retención

Es la relación que existe entre la distancia del punto aplicación a la mancha (a) y la distancia del punto de aplicación al frente del eluyente (b) así: $R_f = a/b$ (Moore J. y Dalrymple D 1976)

2.13. Cristalización

Este proceso consiste en: la disolución de un compuesto sólido en un disolvente ideal, separación de las impurezas insolubles por filtración en caliente, formación de cristales al bajar la temperatura, separación de los cristales de las aguas madres por filtración y lavado de los mismos con el disolvente frío (Svanoe, 1950).

Aunque algunas sustancias son solubles en algunos disolventes y muy insolubles en otros, en estos casos es recomendable un disolvente en que la muestra sea muy soluble y otro en que la muestra sea totalmente insoluble (Abbott, ; Andrews, 1970)

2.14. Punto de Fusión

El punto de fusión de una sustancia sólida, es la temperatura a la cual la fase sólida y la fase líquida se encuentran en equilibrio (Willard, 1976)

2.15. Especie en Estudio

Las Annonaceae son 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, el norte de Australia y las islas del Pacífico. Forman parte del complejo ranaliano lo que las hace tener una historia evolutiva muy antigua, es conocida también como guanábana de monte de las cuales se cultiva sus frutos, además se utiliza la

infusión de esta planta para aliviar la gripe e insomnio. (Mootoo *et al.*, 2000). *Annona montana* se la encuentra principalmente en las áreas tropicales de América, África y Sureste de Asia, ya que estas plantas son importantes fuentes de frutos comestibles, aceite de fragancia, y la medicina popular la utiliza para diversos fines. (Liaw *et al.*, 2004).

***Annona montana*.**



Fig.2. Fotografía *Annona montana*. Tomada en el cantón Catamayo Provincia de Loja. Fruto (izquierda) y hojas (derecha).

- ✿ **FAMILIA:** ANNONACEAE.
- ✿ **NOMBRE CIENTÍFICO:** *Annona montana* MacL.
- ✿ **NOMBRE COMÚN:** Guanabana de monte o falsa guanabana.
- ✿ **ORIGEN:** Amazonia o las Antillas.
- ✿ **DISTRIBUCIÓN:** Costa y Amazonia 0-500.
- ✿ **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:** Árbol pequeño de 10 a 15 m de altura, con ramificaciones bajas, follaje denso, verde oscuro, hojas simples, alternas, verde oscuras y brillosas en el haz, elípticas o elíptico oblanceoladas, hasta 25 cm de largo y 8 cm de ancho, base obtusa y ápice corto y acuminado. Flores grandes, solitarias, ubicadas en el tronco principal o en las ramas, cáliz verde, corola amarilla. El fruto es un sincarpio oviforme o redondeado, hasta 25 cm de largo y 15 cm de diámetro, cáscara verde con numerosos apículos carnosos rectos, frecuentemente color amarillo cuando madura, pulpa blanquecina o amarilla, medio fibrosa, mucilaginoso, con fuerte aroma; numerosas semillas, obovadas, cerca de 1,5 cm, marrón amarillentas.

- ☀ **USOS:** Medicina nativa aplicada en estados de ansiedad, depresión, nerviosismo, antiparasitario, fiebres, astringente para la diarrea y la disentería
- ☀ **MODO DE USO:** Infusión, decocción y maceración.

2.16. Annonaceae en Ecuador

Según el Dr. Xavier Scheldeman, las annonaceas se desarrollan en el sur del Ecuador en regiones montañosas donde constituye el “punto de máxima diversidad”, aunque el origen de las mismas no es definido, ciertos autores sugieren que esta especie podría originarse en Mesoamérica y que fue introducido por comerciantes pre-Incaicos en el Sur del Ecuador y en el Norte de Perú donde la especie sufrió una segunda diversificación (Ordoñez *et al* 2006).

Actualmente, las annonaceas están presentes en sitios naturales o en huertos semi-domesticados en los valles interandinos del Ecuador, Perú y Bolivia.

2.17. Importancia de la Familia Annonaceae en Medicina Tradicional y el Cáncer.

En 1982 se reportó al primer miembro de una nueva clase de metabolitos secundarios en plantas, la uvaricina, aislada de las raíces de *Uvaria acuminata* (Annonaceae) (Alali *et al.*, 1999). El descubrimiento de “acetogeninas de anonáceas” (ACG) con un amplio rango de actividad biológica como la antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica y antitumoral ha dado un impulso importante a las investigaciones bioquímicas y farmacológicas de estas moléculas (Zafra-Polo *et al.*, 1998; Cavé *et al.*, 1997), ya que este tipo de metabolitos secundarios son considerados como compuestos más potentes antitumorales en los últimos años. (Liaw *et al.*, 2005). Su actividad está relacionada con la capacidad inhibitoria del transporte de electrones a nivel del complejo mitocondrial I (NADH ubiquinona oxidoreductasa). (Andrade *et al.*, 1990). Además de su potente actividad citotóxica de xenotransplantes *in vivo* a una concentración de 10 mg/kg (Wang *et al.*, 2002).

2.18. Relación *Annona montana* - actividad biológica

Entre la gran diversidad de plantas usadas en medicina tradicional se encuentra la *Annona montana* (Annonaceae). De esta familia se han obtenido más de 400 compuestos, dieciocho de estos pertenecen a las acetogeninas de *Annona montana* las cuales han sido aisladas a partir de frutas y hojas de la planta. (Wang *et al.*, 2002). Esta

clase de productos naturales son aplicados como anticancerígenos, citotóxicos, antiparasitario, insecticida y efecto inmunosupresor; además de considerarse como el origen para el desarrollo de drogas potenciales. (Liaw *et al.*, 2005).

2.19. Descripción de las acetogeninas de la familia Annonaceae

Estructuralmente, la mayoría de las acetogeninas poseen una cadena alifática de 35 ó 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos (THF) adyacentes o no, así como sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos) localizados a lo largo de ésta. En uno de sus extremos presentan un anillo lactónico metil sustituido, α , β insaturado, en ocasiones saturado o rearrreglado como cetolactona. También se han descrito compuestos con dobles enlaces en la cadena alifática, compuestos con anillos epoxi o tetrahidropirano (THP) así como lineales Fig. 1 (Bermejo *et al.*, 2005).

Capítulo III

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

- Obtención y caracterización de algunos Metabolitos Secundarios mayoritarios del fruto de *Annona montana*.

3.2. Objetivo Específicos:

1. Obtener los extractos orgánicos (hexano, acetato de etilo, metanol) del fruto de *Annona montana*.
2. Seleccionar los extractos más activos con actividad inhibitoria del crecimiento celular en líneas de cáncer humano SNC (Próstata, Leucemia, Colon, Mama, Pulmón).
3. Fraccionar en cromatografía de columna el extracto con mayor actividad biológica.
4. Caracterizar de los metabolitos secundarios aislados del extracto más óptimo.

3.3. Fin del Proyecto

Obtener mediante fraccionamiento en cromatografía de columna los metabolitos secundarios mayoritarios constituyentes del fruto de la especie vegetal en estudio, *Annona montana*, a partir de un extracto previamente seleccionado por su actividad biológica frente a líneas celulares cancerosas.

3.4. Propósito del Proyecto

Determinar características de los metabolitos aislados desde el extracto total seleccionado del fruto de *Annona montana*, y conocer las particularidades físicas de sus compuestos.

3.5. Componentes del Proyecto

1. Ubicación y recolección de la especie vegetal a estudiar.
2. Obtención de los extractos totales.
3. Evaluación citotóxica en líneas de cáncer humano de los extractos totales obtenidos.
4. Fraccionamiento en cromatografía de columna del extracto seleccionado.
5. Purificación de los compuestos obtenidos.
6. Determinación de las características físicas y fitoquímicas de los compuestos aislados.

3.6. Hipótesis del Proyecto

¿Tendrá el género *Annona* metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de crecimiento en líneas celulares de cáncer humano?

3.7. Análisis e Interpretación de Datos

Previos resultados de citotoxicidad de los extractos totales obtenidos del fruto de *Annona montana*, se procederá al fraccionamiento, separación y la purificación de los metabolitos secundarios del extracto seleccionado mediante cromatografía en columna y de capa fina (CCF) (Hostettmann y Hostettmann, 1963; Bolliger y Brenner, 1965). Para la identificación de dichos compuestos se tendrá en cuenta los criterios: color y punto de fusión, cromatografía, eluyentes, coloración, revelador y pruebas químicas cualitativas como espectroscopia UV (Valiente y Torrenegra, 2003).

Capítulo IV

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Recolección de la Muestra Vegetal

El fruto entero y tierno de *Annona montana*. (Annonaceae) fue recolectado en Guayquichuma, ubicado en el cantón Catamayo de la provincia de Loja en agosto del 2007.

Tabla 2. Ubicación de la especie en estudio.

Nombre común	Nombre científico	Lugar de recolección	Provincia
Chirimoya de campo	<i>Annona montana</i>	Guayquichuma	Loja

Fuente: La autora

4.2. Tratamiento de la Muestra Vegetal

El fruto entero de la especie fue triturado uniformemente en pequeñas partes y luego secado a 37 °C durante una semana, para deshidratar la muestra y facilitar su extracción.

4.3. Obtención de Extractos

El fruto seco se sometió a tres extracciones con solventes de polaridad ascendente (hexano, acetato de etilo y metanol respectivamente bajo tres repeticiones sucesivas), mediante el método de maceración estática libre de luz durante 24 h, donde se utilizó 670 g de fruto seco y 3500 mL de solvente para cada extracción.

Tabla3. Cantidad de extracto obtenido con cada solvente.

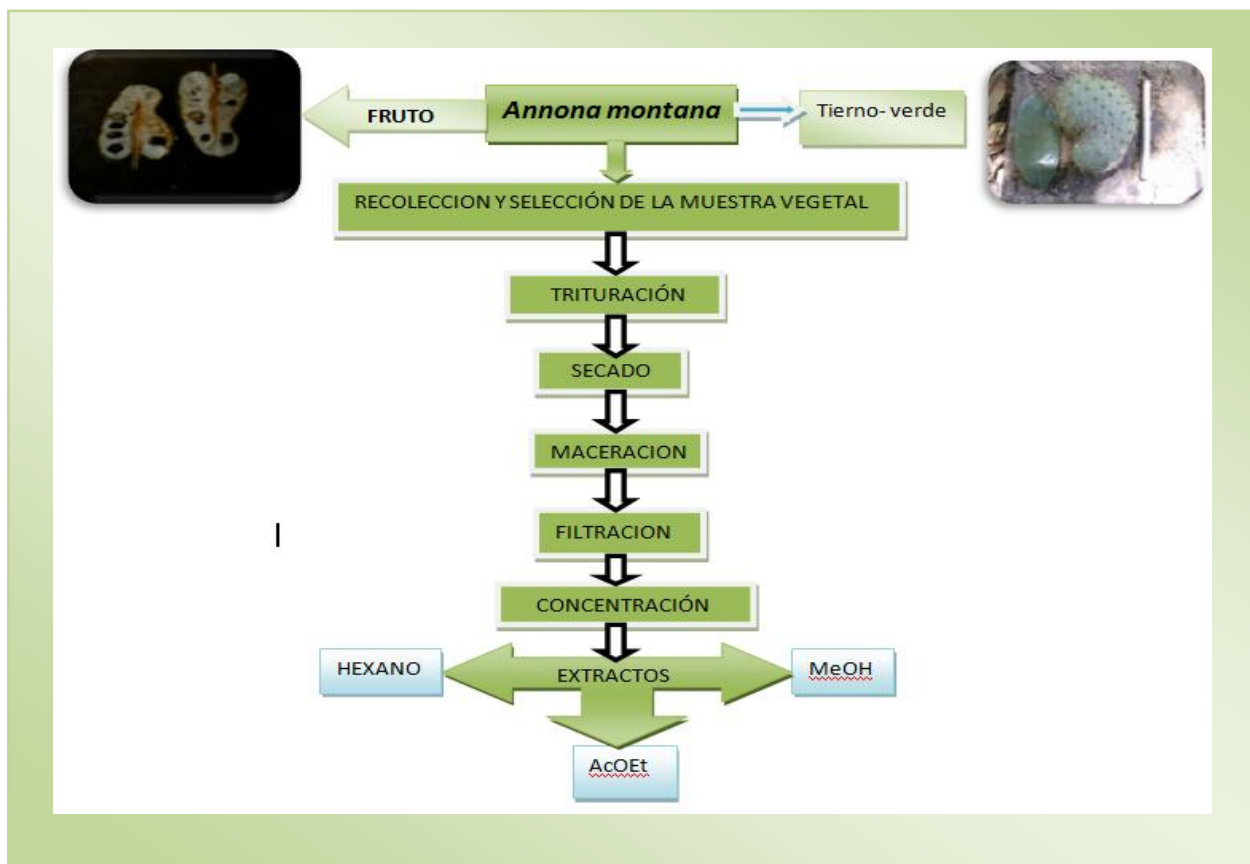
EXTRACTOS	PESO TOTAL(g)
Hexánico	3.13
Metanólico	36.48
Acetato de Etilo	100.5

Fuente: La autora

La extracción se basa en la solubilidad de los diversos compuestos existentes en la materia vegetal, así, para sustancias de baja polaridad como lípidos y clorofila se utilizan como solventes éter de petróleo, hexano y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol, metanol y la acetona (Arévalo,

2010). A continuación se muestra el esquema del procedimiento para la obtención de los extractos.

Fig. 3. Esquema del procedimiento para la obtención de extractos.



Fuente: La Autora

4.4. Selección del Extracto a Fraccionar

La elección se basó en un estudio previo de citotoxicidad en líneas de cáncer humano realizado por las Bioquímicas Glenda Granda y Carla Ojeda en el estudio “Inhibición del crecimiento de líneas tumorales humanas, mediante los extractos en acetato de etilo y metanol de *Annona montana* y estudio genotóxico mediante ensayo cometa en linfocitos humanos”, desarrollado en el área de Genética Toxicológica del Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL

La tabla a continuación detalla el porcentaje de inhibición de los dos extractos con mayor actividad citotóxica, de los que se trabajó el extracto metanolico considerando su característica polar en relación al extracto en Acetato de etilo.

Tabla 4. Inhibición de los extractos en líneas de cáncer humano.

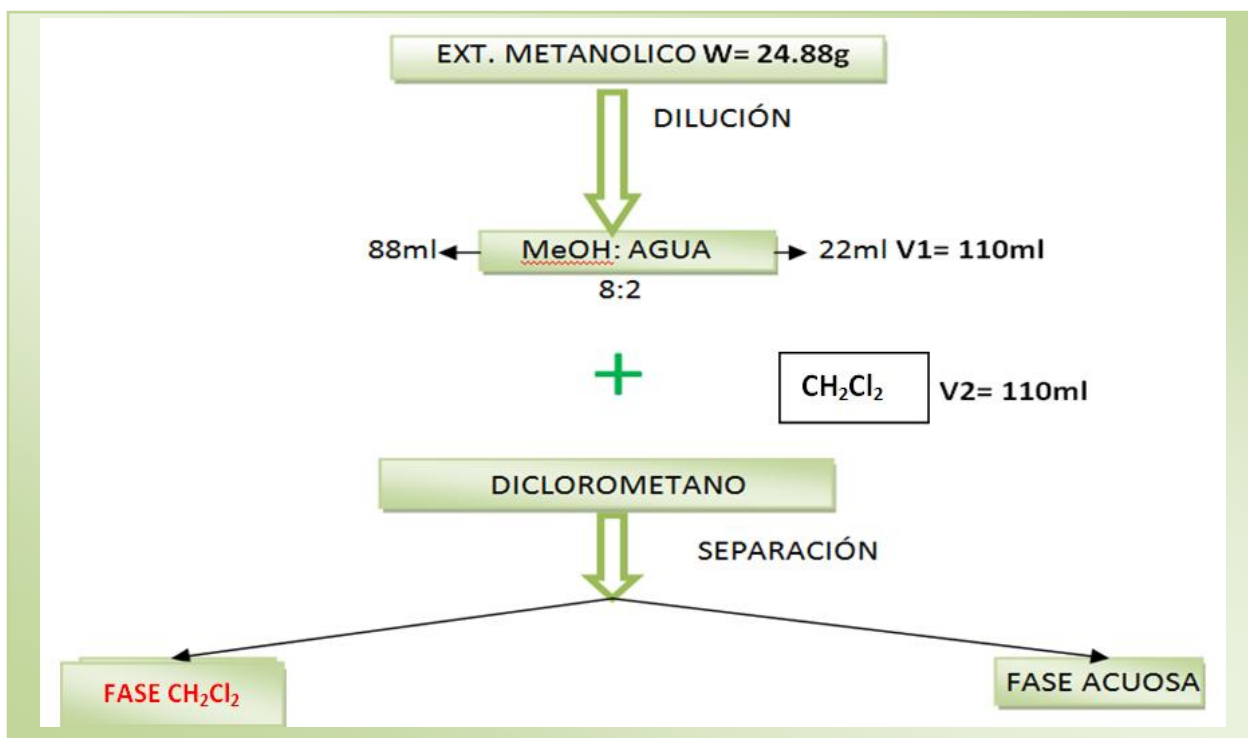
EXTRACTO DE <i>A. Montana</i>	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN LINEAS CELULARES TUMORALES				
	A-549 Pulmón	D-384 Glía	MCF-7 Mama	RKO Colon	PC3 Próstata
Acetato de etilo	90,16	89,67	78,82	88,34	80,99
Metanol	68,26	73,25	70,12	88,42	69,85

Fuente: Granda G, Ojeda C.

4.5. Separación Líquido- Líquido

Se utilizó una mezcla Metanol- agua en relación 8:2 para disolver totalmente el extracto metanolico ya seleccionado, se obtuvo el primer volumen (V1) referente a la cantidad de Diclorometano que se adicionó como segundo volumen (V2), lo que provocó la separación de dos fases.

Fig.4. Esquema de separación líquido-líquido



Fuente: La Autora

4.6. Concentración de las fases separadas

Se realizó con ayuda de un rotavaporador (Heidolph) a una temperatura promedio de 35 °C a presión reducida.

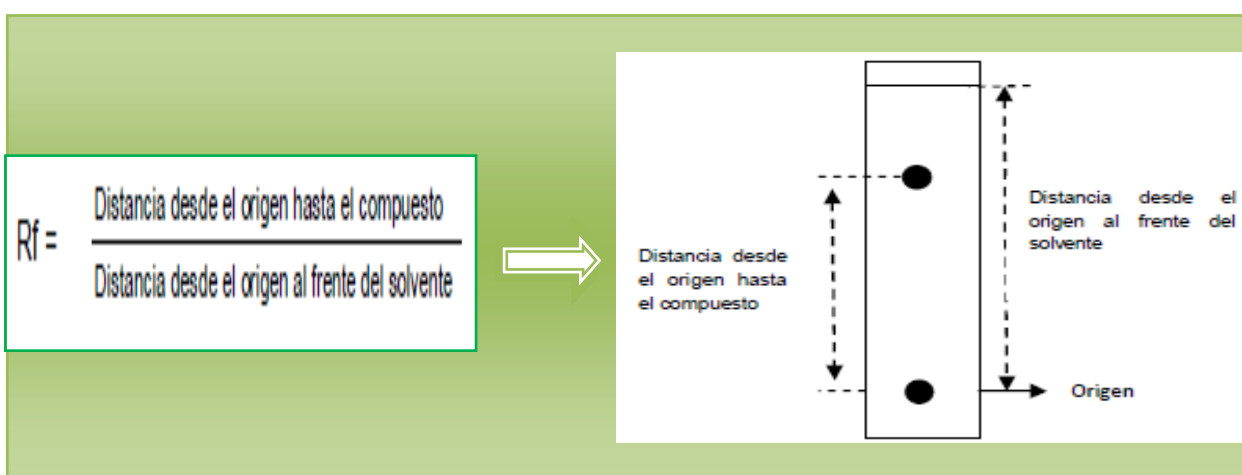
4.7. Fraccionamiento en Cromatografía de Columna

El extracto seco (6,92 g) fue sometido a fraccionamiento en cromatografía en columna (CC) con sílica gel (Merck) 0,015-0,040 mm en relación 50:1, misma que eluída en solventes de polaridad creciente.

4.8. Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Continuamente se realizó ensayos en cromatografía de capa fina (CCF) donde se utilizó una placa de sílica gel 60 F₂₅₄ (fase directa). Los solventes utilizados para la fase móvil fueron: Hexano: Acetato de etilo (1:1), y Acetato de etilo: Metanol (1:1) los cuales permitieron la separación e identificación de los compuestos. La visualización posterior se realizó con luz UV 254 y 366 nm. Luego se midió las distancias recorridas denominada R_f que permite localizar los compuestos bioactivos (Choma 2005). Los R_f de los compuestos químicos que se muestran en las placas se calcularon de acuerdo a la fórmula siguiente:

Fig. 5. Medida de los R_f en la placa de sílica gel 60 F₂₅₄



Fuente: Silva et al 2008

4.9. Unión, purificación y caracterización de fracciones

La unión de las fracciones se efectuó en relación a la altura de las manchas y similitud visual que estas reflejaron ante el revelador utilizado (Sulfato cérico) y ante luz UV 254-366 nm. Las mismas que fueron tratadas mediante la aplicación de solventes de distinta característica polar de tal manera que se purificaran los compuestos mayoritarios por precipitación. La caracterización se efectuó a partir de seis fracciones ya unificadas con ayuda de cromatografía en capa fina, reveladores (Sulfato cérico-lámpara UV 254 y 366 nm) y punto de fusión respectivo a cada una de ellas. La unión y la relación de las proporciones utilizadas para el fraccionamiento se detallan en el cuadro a continuación.

Tabla 5. Unión de las fracciones obtenidas.

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Hex-AcOEt	4:6	109-205
Hex-AcOEt	3:7	206-214
Hex-AcOEt	5:95	224-255
AcOEt-MOH	5:5	256-263
AcOEt-MOH	3:7	264-276
AcOEt-MOH	1:9	284-295

Fuente: La autora

Capítulo V

5. RESULTADOS

Se aisló y caracterizó seis metabolitos secundarios, determinados bajo técnicas de revelado en función de sus Rf, punto de fusión, solubilidad, sus características físicas generales.

En base a las especificaciones ya mencionadas se describe a continuación los resultados obtenidos en cada fase hasta el aislamiento de los compuestos.

5.1. Rendimiento del material utilizado

En relación al peso fresco de material vegetal recolectado (4120 g) con el peso seco (670 g) del fruto en formación de la especie *Annona montana*, el resultado de rendimiento es de 16,3 %. Este valor indica ser bajo en relación al peso de la muestra fresca recolectada según la fórmula detallada a continuación.

$$R (\%) = \frac{\text{Material seco}}{\text{Material húmedo}} \times 100$$

5.2. Extractos obtenidos

Se obtuvo las siguientes cantidades de extractos bajo la utilización de hexano, acetato de etilo y metanol aplicados en el material vegetal seco del fruto de *Annona montana*, mismos que fueron concentrados por rotavaporación. En la siguiente tabla se detalla cantidad en gramos además de sus correspondientes rendimientos.

Tabla 6. Detalle de los extractos obtenidos.

	EXT. 1	EXT. 2	EXT.3
Solvente	Hexano	AcOet	MeOH
Peso (g)	3.13	35.12	77.88
Rendimiento %	0.46	5.24	11.6

Fuente: La autora.

5.3. Rendimiento de la fase orgánica resultante de la separación líquido-líquido

De 77.88 g resultante de extracto metanólico total sometido a separación bajo los solventes: diclorometano, metanol y agua, se obtuvo 6.92 g correspondiente a la fase orgánica, mismo que corresponde al 8.89% de rendimiento.

5.4. Resultado del Fraccionamiento en columna de la fase orgánica.

Los componentes de la mezcla orgánica se separaron en zonas o bandas localizadas a lo largo de la columna. El aislamiento de las especies separadas por su fase móvil permitió recoger las bandas individuales que salen de ella, obteniéndose en total 320 fracciones, de las cuales se obtuvieron seis metabolitos secundarios mayoritarios con características similares determinadas por cromatografía en capa fina.

La tabla a continuación explica datos específicos de las fracciones obtenidas.

Tabla 7. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del fruto de *Annona montana*.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas
Hexano	100	1-5	
Hex:AcOEt	90:10	6-26	
	80:20	27-48	
	75:25	49-65	
	70:30	66-85	
	68:32	86-106	
	65:35	109-121	109-205
	63:37	122-133	
	60:40	134-176	
	55:45	177-188	
	53:47	189-111	
	50:50	112-123	
	47:53	124-145	
	44:56	146-167	
	40:60	168-188	
	35:65	189-205	
30:70	206-210	206-214	
20:85	211-212		
AcOEt	100	215-220	
AcOEt:Metanol	80:20	221-223	
	60:40	224-255	224-255
	55:45	256-263	256-263
	50:50	264-276	264-276
	40:60	277-283	
	30:70	284-295	284-295
	20:80	296-305	
	10:90	306-312	
Metanol	100	313-320	

Fuente. La autora







5.5. Caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos.

Tabla 8. Resultados de caracterización de cada una de fracciones obtenidas.

	AM-a 109-205	AM-b 206-214	AM-c 224-255	AM-d 256-263	AM-e 264-276	AM-f 284-295
PESO(g)	0,028	0,00757	0,0646	0,015	0,0204	0,01
COLOR	Lila	blanquecino	Café claro	Verdoso	Café	Café
SOLUBILIDAD	Cl_2CH_2					
PUNTO DE FUSIÓN °C	280-290	109-130	310-320	194-200	248-253	235-240
LAMPARA UV 254nm/366nm	Fluorescente					
REVELADOR	Sulfato cérico					
Prueba de Dragendorf	+	+	+	-	-	-
Presencia de saponinas	-	-	-	+	+	+




Fuente. La autora

Tabla 9. Valor del Factor de retención de las fracciones purificadas.

Rf	AM-a	AM-b	AM-c	AM-d	AM-e	AM-f
						
Rf	0,1	0,2	0,4	0,6	0,7	0,9

Fuente. La autora

Tabla10. Determinación de alcaloides en CCF

	AM-d	AM-e	AM-f
Reactivo de Dragendorf			
Resultado	+	+	+

Fuente. La autora

Capítulo VI

6. DISCUSION

La medicina natural ha venido desarrollando a largo del tiempo, prácticas terapéuticas que pretende conseguir el alivio o curación de las enfermedades por medio de los productos de origen natural. Se conocen más de 3000 plantas medicinales, pero el número de vegetales en la naturaleza es mucho mayor, por lo que las posibilidades reales en el mundo de la investigación son inmensamente superiores a las conocidas. De ahí la importancia de aplicar metodología confiable que garantice el uso de las plantas medicinales como fuentes de compuestos activos para el tratamiento de varias enfermedades (Botz, *et al.* 2001).

El primer aspecto importante a considerar para el análisis de los resultados lo constituyen las etapas que se cumplieron para este estudio. Inicialmente previos resultados de determinación de citotoxicidad de los tres extractos obtenidos en líneas de cáncer humano realizado en el Centro de Biología Celular y Molecular, se hizo la elección del más óptimo entre ellos; en este caso se utilizó el extracto metanólico total cuyo porcentaje promedio de inhibición es de 73,98 % luego de la exposición, que a pesar de ser un valor ligeramente menor en relación al extracto obtenido con Acetato de Etilo con el 85,50 %; la elección del mismo se basó en estudios ya realizados donde refieren que el metanol es capaz de extraer gran cantidad de: saponinas, triterpenoides, flavonoides, taninos, alcaloides y quinonas además de estar relacionado con aplicación tradicional en que la maceración se efectúa con agua o etanol, solventes de característica polar (Parekh *et al.* 2005; Chih *et al.* 2005). La presencia de terpenoides y saponinas está relacionada con la actividad anticancerígena que posee la familia annonaceae, pues los terpenoides constituyen el más amplio conjunto conocido como metabolitos secundario de los vegetales, la investigación en estos compuestos ha tenido una gran expansión debido a sus diversas actividades biológicas, incluida la antitumoral *in vitro*, citotóxica (Arroyo *et al.* 2005), como pesticida, antiparasitaria y de efecto inmunosupresor.

Estas diversas actividades biológicas son probablemente explicadas por la inhibición de la enzima NADH ubiquinona oxidoreductasa o complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Tormo *et al.* 1999). De esta manera se explica la razón de la actividad citotóxica del extracto ensayado.

Las saponinas además constituyen un amplio grupo de heterósidos muy frecuentes en los vegetales (Bruneton, 2001), con propiedad antimicótica, antibacteriana antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena (Lin *et al.*, 1996). En relación al caso existe una familia de saponinas triterpenoides (avecina de *Acacia victoriae*) que disminuye la proliferación celular del tumor e induce apoptosis (Haridas *et al.*, 2001); también inhiben moléculas proinflamatorias tales como sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX2) (Haridas *et al.*, 2001); como otro ejemplo, las saponinas de la soya suprimen el crecimiento in vitro de las células de adenocarcinoma de colón (Sung *et al.*, 1995); así como las propiedades anticancerígenas atribuidas a la presencia de acetogeninas (Tormo *et al.* 1999).

Los alcaloides como annoretine, argentinine, lirioidenine, oxoaporphine son metabolitos constituyentes de la familia Annonaceae responsables de la actividad citotóxica (Wu, 1992), mismos que podrían estar relacionados con los alcaloides encontrados en la presente investigación pero que podrían cerciorarse con la aplicación de técnicas más específicas como RMN o HPLC.

Capítulo VII

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES

- ✿ Las técnicas y modelos de investigación basados en la medicina tradicional como fuente invaluable de conocimiento, dan inicio a las continuas investigaciones en afán de conocer que elementos son responsables de tal o cual actividad y es capaz de aliviar enfermedades
- ✿ Los modelos en investigación de la citotoxicidad proporcionan datos preliminares importantes a los extractos selectos de las plantas, para que de esta manera se continúe con el aislamiento e identificación de aquellos metabolitos secundarios constituyentes de determinada especie vegetal; como en el caso de la especie estudiada que partió desde su evaluación citotóxica para la presente investigación.
- ✿ En conclusión las fracciones unidas 109-205, 206-214 y 224-255 se detectaron la presencia de saponinas por su característica presencia de espuma en las fracciones 256-263, 264-276, 284-295 se detectaron alcaloides mediante la aplicación de reactivo de Dragendorf, mismas que podrían estar relacionadas con las acetogeninas responsables de la actividad citotóxica relevante en la familia annonaceae, por lo tanto, la especie vegetal *Annona montana* es una fuente importante de compuestos que siendo de origen natural pueden ser utilizados para la síntesis de moléculas útiles farmacológicamente.
- ✿ Además estos resultados hacen referencia al uso de esta especie en la medicina tradicional y estudios ya realizados en la misma entre ellas lo referido a tratamientos de ansiedad, nerviosismo y antiparasitaria o antimicótica gracias a la presencia de alcaloides y saponinas que constituyen un amplio grupo de heterósidos muy frecuentes en los vegetales (Bruneton, 2001).

7.2. RECOMENDACIONES

- ✿ Se recomienda continuar con el estudio de esta especie utilizando sus semillas, hojas o corteza ya que podría ofrecer resultados satisfactorios y específicos, como alternativa a una gran variedad de metabolitos secundarios con aplicación medicinal.
- ✿ Realizar estudios fitoquímicos de mayor profundidad mediante técnicas modernas que permitan la separación de compuestos más puros, su identificación y la evaluación de su actividad: así mismo, se debería continuar buscando mayores evidencias experimentales, que corroboren la actividad biológica.
- ✿ Aplicar estudios *in vitro* ya de las fracciones obtenidas de tal manera que los resultados que se puedan obtener se relacionen con los resultados del extracto total.
- ✿ Determinar la elucidación estructural y realizar las respectivas pruebas biológicas de los compuestos ya aislados.
- ✿ Finalmente continuar con estudios en especies vegetales con antecedentes etnobotánicos a fin de respaldar la aplicación medicinal de los mismos.

8. BIBLIOGRAFIA

1. **Alali FQ, Liu X-X, Mc Laughlin JL.** 1999. Annonaceus acetogenins: Recent progress. *J Nat Prod* 62(3):504-540.
2. **Arroyo J, Prashad M, Vasquez Y, Li E, Tomás G.** Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2005; 22(4): 247-57.
3. **Bermejo A, Figadère B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E, Cortes D.** 2005. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep* 22(3):269-303.
4. **Bruneton, J.** (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales.* 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A.
5. **Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortes D.** 1997. Acetogenins from Annonaceae. *Fortschr Chem Org Naturst* 70:81-288.
6. **Cerón, C. E.** (2002). La etnobotánica en el Ecuador. *Cinchonia* 3(2): 1-16. : a) 109-205, b) 206-214, c) 224-255, d) 256-263 e) 264-276, f) 284-295;
7. **Chih-Chuang Liaw, Fang-Rong Chang, Shu-Li Chen, Chin-Chung Wu, Kuo-Hsiung Lee and Yang-Chang Wu*** "Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins" from *Annona montana* Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung Medical University, 100, Shih-Chuan 1st Road, Kaohsiung, Taiwan Natural Products Laboratory, School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-7360, USA Received 18 February 2005; revised 1 May 2005; accepted 1 May 2005 Available online 13 June 2005
8. **Choma, I.** (2005). The use of Thin Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. LCGC Europe.
9. **Conferencia de la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales** (2001). Preparación de extractos. Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

10. **Gatterman L.** Laboratory Methods of Organic Chemistry. McMillan, London, 1993.
11. **Granda G, Ojeda C:** “Inhibición del crecimiento de líneas tumorales humanas, mediante los extractos en acetato de etilo y metanol de *Annona montana* y estudio genotóxico mediante ensayo cometa en linfocitos humanos”. (2010)
12. **Haridas V, Arntzen C, Gutterman J. Avicins**, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benthams), inhibit activation of nuclear factor-kappaB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(20) 11557-62.
13. **Haridas V, Higuchi M, Jayatilake G, Bailey D Mujoo K, Blade M**, et al., Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benthams) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(10) 5821-26.
14. **Liaw, C. C.; Chang, F. R.; Wu, M. J.; Wu, Y. C. J.** Nat. Prod. 2003, 66, 279–281.
15. **Lin RC, Hanquet B. Lacaille-Dubois MA. Aferoside A**, a steroidal saponin from *Costus afer*. Phytochemistry 1996; 43(3) : 665-68.
16. **Liu, T. S.** (1960) in *Illustrations of Native and Introduced Ligneous Plants of Taiwan*, Vol. 1, p. 87. The College of Agriculture, National Taiwan University, Taiwan.
17. **Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, G., Fonseca, D y Kent, J.** (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403: 853-858.
18. **Miyoshi H, Ohshima M, Shimada H, Akagi T, Iwamura H, McLaughlin JL.**(1998). Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex. Biochim Biophys Acta 1365(3):443-452.
19. **Ordoñez, L., Ambrose, K., Borja, R., Cueva, K y Gonzales, L.** (2006). Proyecto “La biodiversidad como sustento de vida en los bosques de ceja andina: uso sustentable de la agrobiodiversidad de los bosques de ceja de montaña del Carchi- Ecuador”, Anexos 1- 4 Informe final del Proyecto Ceja Andina. Ecopar, IDRC y CRDI. 86 p.

20. **Palomino, O.** (2001). Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).
21. **Parekh, J., Jadea, D., Chanda, S.,** (2005) **Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity.**
22. **Patentabilidad de los extractos vegetales.** José Pardo Zapata Los Lunes del Centro de Patentes Mayo de 2002.
23. **Pengelly, A.** (1996). *The constituents of Medicinal Plants.* 2nd Ed. Cabi Publishing, U. K.
24. **Pharmacopea** (2007). 565 Botanical extracts. USP 30.
25. **Richter, M y Moreira, A.** (2005) Heterogeneidad climática y diversidad de la vegetación en el sur de Ecuador: un método de fitoindicación. Rev. Peru. biol. 12(2): 217- 238.
26. **Roxburgh var. *bicapsularis*** Rafael Valiente¹ y Rubén Torrenegra². **ESTUDIO FITOQUÍMICO DE RAÍCES Y FRUTOS DE *Senna bicapsularis* (L)**
27. **Skoog, D., Holler, J, Nieman T.** (2003). Principios de Análisis Instrumental. España pag. 730.
28. **Sung MK, Kendall CW, Koo MM, Rao AV.** Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on grow and viability of colon carcinoma cells in culture. Nutr Cancer 1995; 23(3:) 259-70.
29. **Takada M, Kuwabara K, Nakato H, Tanaka A, Iwamura Hand Miyoshi H.** (2000). Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. Biochim Biophys Acta 1460(2-3):302-310.
30. **Tormo JR, Gonzalez MC, Cortes D, Estornell E.** Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. Arch Biochem Biophys 1999; 369(1): 119-26.
31. **Valiente R1, y Torrenegra R2** ESTUDIO FITOQUÍMICO DE RAÍCES Y FRUTOS DE ***Senna bicapsularis* (L) Roxburgh var. *bicapsularis***

- 32. Van Ginkel, A.** (2003). Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.”
- 33. Wu, Y. C.** (2005). In *Studies in Natural Products Chemistry. Bioactive Natural Products*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, submitted.
- 34. Yang, T. S. and Chen, C. M.** (1979) *Proc. Natl. Sci. Count. R.O.C.* **3, 63.**
- 35. Yokomori, Y., Sekido, K., Wu, T. S., Tien, H. J. and Hirokawa, S.** (1982) *Bull. Chem. Soc. Jpn* **55, 2236.**
- 36. Zafra-Polo MC, Figadère B, Gallardo T, Tormo JR and Cortes D.** 1998. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry* 48(7):1087-1117.