

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Rollinia rufinervis* SOBRE *Leishmania chagasi*

EVALUATION OF THE LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACTS OF *Rollinia rufinervis* ON *Leishmania chagasi*

HERNÁNDEZ C. Jorge E.^{1*}, TENORIO V. José L.¹, ROJAS Claudia M.¹ y VALLEJO Gustavo A.²

Recibido: abril 4 de 2005 Aceptado: agosto 23 de 2005

RESUMEN

En éste estudio se evalúa la bioactividad de las fracciones obtenidas de los extractos etanólicos de las hojas, de la corteza del tronco y de la corteza de la raíz de *Rollinia rufinervis* (Annonaceae), las cuales presentan actividad citotóxica y se detecta la presencia de las acetogeninas, que pueden ser responsables de la actividad antiparasitaria. Las fracciones son probadas a concentraciones entre 0.095 µg/mL y 100 µg/mL contra promastigotes de *Leishmania chagasi*, evaluando la movilidad de los parásitos a las 72 horas. El efecto de las fracciones es contrastado con el medio Schneider-Drosófila sin extracto y con glucantime[®], utilizados como control. Las fracciones de *Rollinia rufinervis* de: acetato de etilo de raíz, éter de petróleo de corteza, acetato de etilo de corteza y acetato de etilo de hojas, presentan actividad leishmanicida. La última fracción es la de mayor actividad causando inmovilidad apreciable o total de los parásitos a lo largo del experimento. De ella se aisló posiblemente el β-sitosterol.

Palabras clave: Annonaceae, *Rollinia rufinervis*, acetogeninas, leishmaniasis, β-sitosterol

ABSTRACT

In this study the bioactivity of the fractions obtained from the ethanolic extracts of the leaves, of the trunk bark and of the root bark of *Rollinia rufinervis* (Annonaceae) is evaluated. It is found that they show cytotoxic activity and that the presence of acetogenins can cause the antiparasitaire activity. The fractions are tested at concentration between 0.095 µg/mL and 100 µg/mL against promastigotes of *Leishmania chagasi*, evaluating the parasite mobility after 72 hours. The effect of the fractions is contrasted with the medium Schneider-Drosófila without extract and with glucantime[®], used as control. The *Rollinia rufinervis* fractions of: ethyl acetate of the root, petroleum ether of the bark, ethyl acetate of the bark and ethyl acetate of the leaves present leishmanicidal activity. The last fraction has the largest activity causing appreciable or total immobility of the parasites during the experiment. Probably β-sitosterol is isolated from this fraction.

Keywords: Annonaceae, *Rollinia*, acetogenins, leishmaniasis, β-sitosterol

¹ Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. A.A 546 Barrio Santa Elena. Ibagué. Tolima. Colombia.

² Laboratorio de parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, A.A 546 Barrio Santa Elena. Ibagué. Tolima. Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: toljihernandez@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La infección por leishmania tiene una distribución mundial: es encontrada en los cinco continentes; es una enfermedad endémica en las regiones tropicales y subtropicales en 88 países del mundo; se estima que hay 12 millones de casos distribuidos en el mundo; de 1,5 a 2 millones de nuevos casos ocurren cada año. La forma cutánea es la más común (1 a 1,5 millones de casos por año), representando del 50 al 75% de todos los nuevos casos, y 500.000 casos son de leishmaniasis visceral. Hasta la semana epidemiológica 53 del año 2003, se notificaron 9.615 casos de leishmaniasis en Colombia, de los cuales 9420 casos son de leishmaniasis cutánea que corresponden al 98%, la leishmaniasis visceral representa el 1% con 125 casos, y 70 casos son de la leishmaniasis mucosa. En Colombia la enfermedad afecta principalmente a los habitantes de los departamentos de Boyacá, Choco, Sucre, y Antioquia (1). En el departamento del Tolima se han reportado 20 casos de leishmaniasis visceral entre los años 2003-2005 (2), situación que no deja de ser preocupante ya que la enfermedad se ha propagado por diferentes regiones del departamento del Tolima afectando comunidades de bajos recursos económicos y principalmente a los niños.

La infección es tratada comúnmente con antimonio pentavalente en la forma de stibogluconato de sodio (pentostam®) o antimoniato de N-metilglucamina (glucantime®) y con pentamidina o anfotericina-B. Esas drogas son potencialmente tóxicas y generalmente administradas en hospitales (3). En las regiones endémicas, los tratamientos son llevados a cabo empleando la medicina popular aprovechando las propiedades farmacológicas de las biomoléculas presentes en los vegetales disponibles en la zona.

Entre los géneros pertenecientes a la familia Annonaceae que muestran una amplia actividad biológica (antitumoral, antiparasitaria, inmunodepresiva y pesticida) (4), gracias a la diversidad de metabolitos secundarios que poseen (acetogeninas, esteroides, sesquiterpenlactonas, quinonas y alcaloides entre otros) se encuentra el género *Rollinia* que comprende 65 especies alrededor del mundo (5). En Colombia se encuentran 11 especies entre ellas *Rollinia rufinervis* (6), de la cual no se encontraron reportes relacionado a la actividad leishmanicida en *Leishmania chagasi*. En el género *Rollinia* se encuentran diferentes tipos de metabolitos propios

de la familia Annonaceae como alcaloides y acetogeninas, a este último grupo de compuestos se les atribuye diversas actividades biológicas, entre ellas la actividad antiparasitaria como lo reporta Cavé y colaboradores (4), al mencionar el aislamiento de acetogeninas de Annonaceas como uleicina de *Rollinia ulei*, senegalene, squamocina y molvizarina de *Annona senegalensis* las cuales fueron efectivas contra la leishmaniasis.

Con la información aportada a esta investigación por los habitantes de las regiones endémicas del departamento del Tolima, se observó que diversas partes de las plantas de la familia Annonaceae entre ellas las pertenecientes a los géneros *Rollinia*, *Annona*, *Xylopia*, son utilizadas de manera empírica para tratar fiebres, gripas y el cocimiento de la corteza y de las hojas la emplean para tratar la leishmaniasis.

Los reportes en cuanto la actividad biológica y química del género *Rollinia* y los pocos estudios que se reportan de *Rollinia rufinervis* hacen de este vegetal una posible fuente de biomoléculas con actividad biológica.

La contribución de esta investigación fue evaluar la actividad leishmanicida en *Leishmania chagasi* de las fracciones bioactivas de diferentes partes de *Rollinia rufinervis* en las que se detectó la presencia de acetogeninas. Además se analizó la composición química de la fracción acetato de etilo de hojas utilizando pruebas químicas, físicas y espectroscópicas. Con ello se avanzó en el estudio de la flora Tolimense, se introdujo a *Rollinia rufinervis* al índice de especies de la familia Annonaceae con actividad leishmanicida, se mostró la presencia de acetogeninas y se encontró una nueva perspectiva terapéutica contra la leishmaniasis visceral usando fracciones provenientes de los extractos etanólicos de la planta estudiada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos experimentales generales

Los espectros ultravioleta fueron realizados en un espectrofotómetro Genesis 5. Los espectros IR se corrieron en un equipo Mattson Genesis UNICAM (FT-IR) utilizando un rango de barrido entre 4000 y 600 cm⁻¹.

Material vegetal

La corteza de la raíz, las hojas y la corteza del tronco fueron colectadas en el bosque del munici-

pio de Mariquita, Colombia, con una temperatura media de 26°C y una altitud de 495 m.s.n.m (7). Los ejemplares colectados fueron confrontados con los depositados en el Herbario TOLI de la Universidad del Tolima (Código 2967).

Material Animal

La prueba citotóxica *in vitro* se realizó con nauplios maduros de *Artemia salina* cultivados bajo condiciones estrictas de salinidad 3.8% y temperatura de 25 a 28°C. Para la prueba leishmanicida se utilizaron formas promastigotes de *Leishmania chagasi* obtenidas de la cepa MHOM/CO/84/CI-044B aportadas por el Instituto Nacional de Salud (Bogotá D. C), conservadas y repicadas en el Laboratorio de Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima (Ibagué) a una temperatura de 28°C y a una altura de 1150 m.s.n.m.

Preparación de extractos

A la corteza de raíz, las hojas y la corteza del tronco previamente secas (30-50°C), se les redujo su tamaño de partícula en un molino THOMAS-WILEY, malla 2.0 mm y fueron sometidas separadamente a extracción continua por 48 horas en un soxhlet usando éter de petróleo de punto de ebullición entre 40°C-70°C. El material vegetal así desengrasado se sometió a una extracción por lixiviación utilizando 250 cm³ de etanol a temperatura ambiente. El solvente se hizo circular por la muestra hasta saturación, después se realizó un proceso igual con otra porción fresca del solvente. El método se repitió hasta agotamiento de la muestra. Los extractos etanólicos obtenidos de cada muestra se guardaron en frascos ámbar rotulados y se almacenaron en nevera a 5°C.

A cada extracto etanólico obtenido se le retiró totalmente el solvente y se le sometió a columna de cromatografía (60cm x 4cm) empacada con sílica gel 60F para cromatografía de columna (J.T. Baker), se adaptó a un equipo de vacío y se trató con tres solventes diferentes, el primero fué éter de petróleo, se continuó con acetato de etilo y por último se usó etanol. Las fracciones obtenidas fueron concentradas a presión reducida.

A cada una de las fracciones se les realizó un ensayo sobre CCD (cromatoplasas de sílica 60 GF₂₅₄). Se utilizó como eluyente diclorometano-acetato de

etilo-metanol (50: 45: 5.) y como revelador ácido fosfomolibdico y el reactivo de Kedde para identificar la presencia de las acetogeninas (8).

Para detectar esteroides se utilizaron como eluentes: éter de petróleo, benceno, éter de petróleo-acetato de etilo (7:3), benceno-acetato de etilo (7:3), benceno-acetato de etilo (3:7), acetato de etilo, benceno-acetona (9:1) y se usaron como reveladores el Cloruro de Cobalto (CoCl₂) y el Ácido sulfúrico 98% (H₂SO₄) (9).

BIOENSAYOS

Actividad citotóxica

En este ensayo se usaron larvas de *Artemia salina* y fue aplicado de acuerdo al protocolo reportado por McLaughlin (10).

Actividad leishmanicida

Las formas promastigote de *Leishmania chagasi* se obtuvieron de cepas cultivadas a 28°C en un medio Schneider-Drosófila, suplementado con suero fetal bovino (10%) inactivado a 56°C, durante 30 minutos. Dicha cepa fue repicada y conservada a 28°C. Se utilizaron 2x10⁶ promastigotes/mililitro para el ensayo biológico.

Las fracciones de *Rollinia rufinervis* fueron disueltas en un volumen conocido de dimetilsulfoxido (DMSO) y después en el medio Shneider-Drosófila. A partir de esta solución madre se hicieron soluciones a concentraciones entre 0.095ppm y 100ppm. El conteo se realizó a las 72 horas. Se determinó la actividad observando al microscopio la movilidad del parásito, buena movilidad (extracto no activo), movilidad media (extracto poco activo), baja movilidad (extracto activo) y ninguna movilidad (extracto muy activo). Se realizó la comparación con los controles sin extracto y con glucantime® como medicamento de referencia (11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de las diferentes partes de *Rollinia rufinervis* (Annonaceae) fueron sometidas a pruebas de CCD para encontrar las fracciones que presentaron acetogeninas (véase tabla 1).

Tabla 1. Determinación de las acetogeninas de las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de *Rollinia rufinervis* mediante CCD.

Fracciones	Parte	Presencia de acetogeninas por CCD
Fracción éter de petróleo	Raíz	-
Fracción acetato de etilo	Raíz	+
Fracción etanol	Raíz	-
Fracción éter de petróleo	Corteza	+
Fracción acetato de etilo	Corteza	+
Fracción etano	Corteza	-
Fracción éter de petróleo	Hojas	-
Fracción acetato de etilo	Hojas	+
Fracción etanol	Hojas	-

Las fracciones, acetato de etilo raíz, éter de petróleo de la corteza, acetato de etilo de la corteza y acetato de etilo de la hoja en las que se detectó la presencia de las acetogeninas fueron escogidas para realizar la prueba de citotoxicidad utilizando nauplios maduros de *Artemia salina*.

Actividad citotóxica

Para el ensayo de citotoxicidad se hizo un análisis univariado de varianza (ANOVA) a través de cuatro extractos a cuatro concentraciones, y se estimó la concentración letal media (LC_{50}) (véase tabla 2).

Tabla 2. Resultados de los ensayos de la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*

Extractos	LC_{50} (ppm)	Intervalo de confianza al 95%
Fracción acetato de etilo corteza	233.720	0-770.87
Fracción acetato de etilo raíz	400.300	0-1000
Fracción acetato de etilo hoja	700.150	132.12-1000
Fracción éter de petróleo corteza	55.225	0-128

El análisis univariado en este caso es débil ya que se han generado intervalos de confianza muy amplios, y se observan valores de LC_{50} que tienden a ser altos puesto que la dosis mayor es un valor atí-

pico. De acuerdo a este resultado se pueden sugerir intervalos de concentración constantes para mejorar la consistencia en la respuesta, ya que se observa que las fracciones obtenidas manifiestan actividad frente al organismo. Para estudiar el comportamiento de forma simultánea de las cuatro fracciones obtenidas de la misma planta, se hizo un análisis multivariado de varianza (MANOVA), mediante el cual se estableció a través de la prueba F ($P < 0.05$) que la muerte de los organismos es debido a las biomoléculas presentes en las fracciones y no a causas aleatorias. Por el contrario el valor F ($P > 0.05$) para el blanco indica que el promedio de nauplios muertos no es significativo y que obedece solo a causas aleatorias.

Se realizó el análisis de componentes principales el cual permitió establecer que el factor F1 (Dosis) aporta porcentualmente mayor varianza que el factor F2 (Blanco), esto se puede apreciar en las dosis 100 y 1000 ppm las cuales están aportando en varianza un porcentaje a F1 de 38.45% y 38.18% respectivamente; lo que indica que al hacer aplicaciones de 100 o 1000 ppm de las fracciones, estas ejercen una misma acción biológica. De acuerdo al análisis de componentes principales se podrá encontrar a una concentración de 100 ppm o por debajo de ella una acción biológica causada por los metabolitos secundarios presentes en la planta. Por tal motivo se decidió estimar el intervalo de concentraciones de cada una de las fracciones para el ensayo leishmanicida entre 0.095 y 100 ppm.

Los resultados del ensayo se analizaron a través de los paquetes estadísticos MINITAB-13 y SPSS 9.0.

Actividad leishmanicida

Teniendo en cuenta la presencia de acetogeninas y la citotoxicidad de las fracciones se evaluó la actividad leishmanicida sobre promastigotes de *Leishmania chagasi*, la actividad antiparasitaria permitió establecer notorias diferencias entre la pérdida del movimiento del parásito ocasionada por los metabolitos secundarios presentes en las diferentes fracciones a través de las concentraciones estimadas. El análisis para las fracciones: acetato de etilo corteza, acetato de etilo raíz, éter de petróleo corteza, se realizó mediante el programa estadístico STATGRAPHICS 5.0 a través del cual se desarrolló el modelo de regresión logística multinomial. Este modelo utilizó el estadístico de prueba (Logaritmo de máxima verosimilitud) el cual permitió establecer la idoneidad del modelo ($P > 0.05$), además se reveló

que existe una relación significativa entre la variable independiente (dosis) y la actividad del extracto sobre el movimiento del parásito, esto es confirmado por el estadístico de prueba del Wald ($P > 0.10$).

El porcentaje de ocurrencia de la actividad biológica originada por la fracción acetato de etilo corteza dada a diferentes concentraciones es de activo con una probabilidad de ocurrencia aproximadamente del 40% a lo largo del experimento, volviéndose muy activa en las tres concentraciones más altas (25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$) en las cuales el parásito pierde su movimiento (véase figura 1).

El análisis estadístico hecho por separado a las fracciones acetato de etilo raíz y éter de petróleo corteza, muestra que el efecto de estas fracciones sobre el comportamiento del organismo a lo largo del experimento es igual a pesar de ser fracciones obtenidas de diferente parte de la planta. La actividad pronosticada para las fracciones antes mencionadas dejan ver que a concentraciones inferiores a 12.5 $\mu\text{g/mL}$ no se presenta actividad significativa sobre el organismo, por el contrario las fracciones se hacen muy activas en las concentraciones más altas (12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$) en las cuales se observa que el organismo pierde su movimiento (véase figura 2). De acuerdo a la similitud de la actividad biológica es posible que las acetogeninas de anonáceas presentes en la raíz y en la corteza sean las mismas, causando efecto sobre promastigotes de *Leishmania chagasi*.

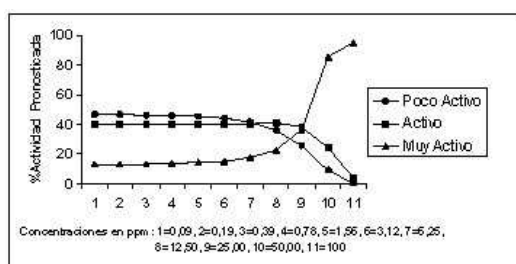


Figura 1. Porcentaje de la actividad pronosticada de la fracción acetato de etilo corteza a diferentes concentraciones.

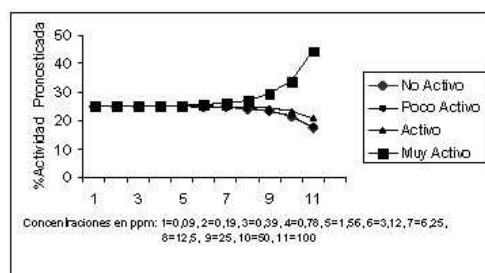


Figura 2. Porcentaje de la actividad pronosticada de las fracciones acetato de etilo raíz y éter de petróleo corteza.

La fracción acetato de etilo-hoja la cual presentó dos actividades (Activo y Muy activo), se analizó estadísticamente a partir del modelo de regresión logística binomial, que utilizó como estadístico de prueba un Chi-Cuadrado que con un $P > 0.05$ permitió establecer la idoneidad del modelo. Al aplicar la fracción acetato de etilo hoja los parásitos pierden su movimiento haciéndose esto más notable a medida que se incrementa la concentración a partir de 1.56 $\mu\text{g/mL}$ hasta 100 $\mu\text{g/mL}$. El análisis binomial permitió establecer que al encontrarse una probabilidad estimada por encima de 0.5 durante el experimento es decir $P(X=i) \geq 0.5$, la fracción tiende a ser muy activa inhibiendo completamente el movimiento del parásito. El pronóstico de ocurrencia de la fracción acetato de etilo hoja sobre los promastigotes de *Leishmania chagasi* está entre lo activo y lo muy activo, lo que ha demostrado una actividad equivalente o mejor que el glucantime®, medicamento de referencia.

El efecto leishmanicida de las diferentes fracciones obtenidas de *Rollinia rufinervis* puede ser atribuido a las acetogeninas de Annonaceas entre ellas rolliniastatina, esquamosina (12), annonacina (13) entre otras. Por tal motivo el resultado obtenido en esta investigación es comparable con investigaciones adelantadas por otros autores en géneros pertenecientes a esta familia.

La actividad antiparasitaria en *Leishmania chagasi*, aunque fue adelantada en formas promastigotes del parásito las cuales se presentan en el tubo digestivo del vector y no en los macrófagos como sucede con los amastigotes que causan la destrucción de la célula, no deja de ser importante, ya que los efectos experimentales observados posiblemente sean semejantes en la forma amastigota, a causa de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas, especialmente por las acetogeninas de Annonaceas que tienen acción comprobada sobre el sistema mitocondrial que es común en las dos formas del parásito (14,17).

Identificación del compuesto aislado

Las pruebas químicas, físicas y espectroscópicas adelantadas al compuesto aislado de la fracción acetato de etilo hoja coinciden con el patrón (Sigma Chemical Co. N° S-5753) del β -sitosterol (véase tabla 3).

Tabla 3: Datos espectroscópicos, químicos y físicos del compuesto aislado de la fracción Acetato de etilo Hoja.

Datos Químicos	Prueba		Resultado
	Lieberman- Bouchard		(+)
	Salkowsky		(+)
	KMnO ₄		(+)
	Br ₂		(+)
Datos Físicos	Punto de Fusión	134°C	
	CCD	Patrón Rf = 0.47	Benceno:9 mL
		Muestra Rf = 0.48	Acetona: 1mL
	Solubilidad	Solvente	Resultado
		CHCl ₃	+
		CH ₃ COCH ₃	+
		CH ₃ CH ₂ OH	+
Datos Espectroscópicos	IR:3345,2928,1601,1448,1267		
	UV: C ₂ H ₅ OH = 204 nm		

El compuesto aislado tiene un punto de fusión (134°C) que coincide con el del β -sitosterol, además al mezclar el compuesto con el β -sitosterol el punto de fusión no mostró depresión apreciable. La solubilidad del compuesto aislado en los solventes utilizados es igual a lo observado con el patrón.

En las pruebas químicas de Lieberman- Bouchard y de Salkowsky, el compuesto se comporta de la misma manera como lo hacen muchos triterpenos y esteroides en especial el β -sitosterol, esto se acompaña con la prueba de Bromo que confirma la presencia de dobles enlaces (18).

Para el análisis en CCF el compuesto presentó un R_f que no presenta diferencia significativa con el β -sitosterol. Estos resultados se acompañan de las bandas observadas en el IR características de los esteroides así: para OH (3363-3400 cm⁻¹) y para C=C (1601 cm⁻¹) y la banda de 2928 cm⁻¹ para el C-H alifático. Las dos bandas a 1448 y 1267.73 cm⁻¹ son características del β -sitosterol y corresponden a torciones de los enlaces C-H en los grupos -CH₂- y (C(CH₃)₂) (18).

Los anteriores datos nos permiten proponer que el compuesto aislado es el β -sitosterol, faltando el análisis de Resonancia Magnética Nuclear que confirmaría la presencia de este compuesto en *Rollinia rufinervis* y sería un aporte de esta investigación al estudio fitoquímico de este vegetal.

Nuestros resultados se convierten en la base para adelantar estudios farmacológicos que permitan evidenciar el poder terapéutico de las fracciones de *Rollinia rufinervis* contra la leishmaniasis visceral. Además sería conveniente realizar estudios sobre formas amastigotes, evaluando el número de organismos muertos a causa de las fracciones a diferentes concentraciones, para garantizar un mejor resultado de la actividad antiparasitaria que posiblemente generen las acetogeninas de *Rollinia rufinervis*.

Esta investigación se convierte en el punto de partida para identificar las acetogeninas de Annonaceas en esta especie que posiblemente causen el efecto antiparasitario y determinar si su acción se acentúa cuando se realiza la aplicación de las acetogeninas separadamente o en su defecto actúan todas ellas de manera sinérgica. En términos generales se podría abrir una posibilidad de trabajo científico tendiente a solucionar la problemática de salud pública que origina la leishmaniasis en habitantes del departamento del Tolima.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación otorgada por el Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima y a entidades públicas como la Secretaría de Salud del Tolima quienes nos proporcionaron el medicamento de referencia y al Instituto Nacional de Salud Pública quien nos facilitó la cepa de *Leishmania chagasi*.

También agradecemos al profesor Octavio Rojas por su colaboración en el análisis estadístico y a las profesora Amparo Viña y Yolanda Flórez por sus aportes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boletín epidemiológico. http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2004/BOLE10_04.htm Consultado: Noviembre 12 de 2004.
2. Secretaría de salud del Tolima. (2004). Base de datos SIVIGILA (Sistema de información de vigilancia de salud pública).
3. Fournet, A., Angelo A., Muñoz, V., et al (1992) Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmania. J. Ethnopharmacol. 37: 159-164.
4. Cavé, A., Cortés, D., Figadère, B., et al. (1997) Acetogenins from Annonaceae. (ED) Springer-Wien-New York. Capítulo 7 pp.265-273
5. Chagas, F., Boaventura, M., Assunsao, A. et al (2003) Acetogeninas de Anonáceas aisladas de Folhas de *Rollinia laurifolia*. Quim. Nova. 26 (3): 319-322.

6. Montoya, G., Osorio, E., Jiménez, N., et al. (2004) Actividad captadora de radicales libres de alcaloides de *Rollinia pittieri* (Annonaceae) por el método del DPPH. Vitae. 11 (2): 52-53
7. Gobernación del Tolima. (1990). El Tolima y sus Municipios. Ediciones El Boga. pp. 6-11.
8. Ruppercht, K., Hui H., McLaughlin L. (1990) Annonaceous acetogenins: a review. J. Nat. Prod. 55:237-278.
9. Domínguez X. (1998) Métodos de investigación fitoquímica. Ed. México, Limusa. pp. 141.
10. Mc. Laughlin, J., Colman-Saizarbitoria T., Anderson J. (1995) Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. Revista de la sociedad venezolana de química 1.18:14-15.
11. Fournet, A., Angelo A., Muñoz V., et al (1994). Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. Phytother Res. 8: 174-178.
12. Organic acids, lipids and acetogenins. http://www.userpage.fuberlin.de/~kayser/lipids_and_aliphatic_compounds.htm. (2000).
13. Jaramillo, M., Arango G., González M., et al. (2000). Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Anona muricata* pericarp. Fitoterapia. 71:183-186.
14. Zafra-Polo, C., Figadére B., Gallardo T. (1998). Natural Acetogenins from Annonaceae, síntesis and mechanisms of action. Phytochem. Anal. 48:1087-1117.
15. Tormo, J., González C., Cortes D., et al (1999). Characterization of mitochondrial complex I inhibitors using Annonaceous Acetogenins. Biochem. Biophys. Res. Commun 369: 119-126.
16. Motoyama, T., Yabunaka H., Miyoshi H. (2002) Essential structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. Bioorg. Med. Chem. Lett. 12: 2089-2092.
17. Yabunaka, H., Abe M., Kenmochi A., et al. (2003) Synthesis and inhibitor with bovine mitochondrial complex I. Bioorg. Med. Chem. Lett. 13: 2385-2388.
18. Tenorio, J.L. (1992) Estudio Químico de *Iserbia pittieri standi II* (Jaboncillo). Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. Departamento de Química, p 15-84.

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS

36 años de labores académicas

Sede central

Programas Adscritos

Ingeniería de Alimentos
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Sede bajo Cauca (Caucasia)

Tecnología de Alimentos

Sede Oriente (Rionegro)

Facultad de Química Farmacéutica - Universidad de Antioquia
Teléfono: 210 54 65 - Correo electrónico: cta@farmacia.udea.edu.co