

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE  
UN EXTRACTO DE HOJAS DE *Annona muricata* (GUANÁBANA) FRENTE A  
LAS LÍNEAS CELULARES MCF-7, 4T1, B16 y 3T3.**



**DIANA PAOLA DUEÑAS CELY**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de:**

**MICROBIOLOGA INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BOGOTÁ D.C  
2019**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE  
UN EXTRACTO DE HOJAS DE *Annona muricata* (GUANÁBANA) FRENTE A  
LAS LÍNEAS CELULARES MCF-7, 4T1, B16 y 3T3.**



**DIANA PAOLA DUEÑAS CELY**

---

**CONCEPCIÓN JUDITH PUERTA**

PhD

Decana facultad de ciencias

---

**MARCELA FRANCO CORREA**

PhD

Directora de carrera

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BOGOTÁ D.C  
2019**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE  
UN EXTRACTO DE HOJAS DE *Annona muricata* (GUANÁBANA) FRENTE A  
LAS LÍNEAS CELULARES MCF-7, 4T1, B16 y 3T3.**



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**DIANA PAOLA DUEÑAS CELY**

---

**GEISON MODESTI COSTA**

Q.F., MSc., PhD  
Director

---

**ALFONSO BARRETO PRIETO**

Bio., MSc., PhD  
Co-director

---

**JORGE ELIECER ROBLES CAMARGO**

Bio., MSc., PhD  
Evaluador

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BOGOTÁ D.C  
2019**

## **NOTA DE ADVERTECIA**

Artículo 23 de la resolución N°13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

## DEDICATORIA

*Este trabajo se lo dedico en primer lugar a Dios, quien es el principal guía en mi vida, quien con su inmenso amor me permite culminar y cumplir cada uno de mis metas y mis sueños, llenándome de sabiduría, perseverancia y seguridad con cada uno de los pasos que doy y de las decisiones que tomo.*

*A mis padres Pedro y Claudia por ser los pilares de mi vida, por su apoyo incondicional, por acompañarme y apoyarme a cumplir mis sueños, por su inmenso amor y la confianza que siempre depositan en mí.*

*A mi hermana Pilar por su cariño, su amor, su apoyo y por siempre creen en mí, dándome la seguridad necesaria para seguir adelante en cada momento de mi vida.*

*A cada integrante de mi hermosa familia por ser parte de mi vida y por siempre apoyarme y acompañarme en cada triunfo que he tenido a lo largo del camino.*

*A mis amigas quienes han sido testigos de mi esfuerzo y dedicación en cada proyecto y de quienes siempre recibo un apoyo incondicional.*

*A John Avellaneda, la persona que Dios puso en mi camino para ser mi gran apoyo en cada momento de mi vida y a quien agradezco por siempre estar presente.*

*Diana Paola Dueñas Cely*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer principalmente a Dios, a mis padres y mi hermana por acompañarme en cada paso de mi vida y por su inmenso apoyo para realizar cada uno de los proyectos que me he propuesto hasta la culminación de estos.

A mi Director Geison Costa y mi Codirector Alfonso Barreto por su paciencia y entrega en mi trabajo de grado, por ser unos grandes guías que con su apoyo me permitieron iniciar y culminar este gran proyecto.

Al grupo de Inmunobiología y Biología celular y al Grupo de Fitoquímica de la Universidad Javeriana por permitirme ser parte de esta investigación y en especial a Laura Rojas por ser una gran maestra en este camino y por compartirme sus conocimientos y siempre tener la disposición para darme el apoyo para culminar con éxito esta investigación.

A mis amigas Alejandra Villalba y Laura Díaz por su gran amistad durante toda mi carrera universitaria, por su apoyo e incondicionalidad.

A la Pontificia Universidad Javeriana por brindarme una formación integral y profesional como Microbióloga Industrial.

A COLCIENCIAS, por la financiación de este trabajo, bajo el Programa “Generación de alternativas terapéuticas en cáncer a partir de plantas a través de procesos de investigación y desarrollo transnacional, articulados en sistemas de valor sostenibles ambiental y económicamente” (Código 60671), en el Proyecto “Aproximación biológica, fitoquímica y agronómica para la gestión de recursos vegetales con potencial farmacológico: Aporte a cadena de valor para el sector de los fitomedicamentos en Colombia” (Código 61882).

## Tabla de contenido

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Justificación y planteamiento del problema.....	3
3.1. Planteamiento del problema .....	3
3.2. Justificación .....	4
3.3. Pregunta de investigación.....	5
4. Marco teórico.....	5
4.1. Cáncer .....	5
4.2. Terapias contra el cáncer .....	5
4.3. Plantas medicinales como terapia alternativa o fuente de compuestos contra el cáncer .....	6
4.4. Generalidades de <i>Annona muricata</i> .....	6
4.4.1. Clasificación taxonómica .....	7
4.4.2. Usos tradicionales .....	7
4.4.3. Composición química.....	8
4.4.4. Antecedentes.....	10
4.5. Ensayos de citotoxicidad por <i>MTT</i> .....	11
4.6. Líneas celulares .....	11
4.6.1. MCF-7 .....	11
4.6.2. 4T1 .....	12
4.6.3. B16.....	12
4.6.4. Fibroblastos 3T3 .....	13
4.7. Caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones .....	14
4.7.1. Marcha fitoquímica preliminar.....	14
4.7.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD).....	14
4.7.3. Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia (UPLC) .....	14
5. Objetivos.....	15
5.1. Objetivo general .....	15
5.2. Objetivos específicos .....	15
6. Metodología .....	16

6.1. Material vegetal .....	16
6.2. Preparación de extracto etanólico y fraccionamiento .....	16
6.3. Evaluación de la actividad biológica .....	18
6.3.1. Cultivo de las líneas celulares .....	18
6.3.2. Ensayos de citotoxicidad por <i>MTT</i> .....	18
6.4. Caracterización fitoquímica de los extractos .....	19
6.4.1. Marcha fitoquímica preliminar .....	19
6.4.2. Cromatografía en capa delgada (CCD) .....	20
6.4.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC) .....	21
7. Resultados y discusión .....	21
7.1. Obtención de extractos y fracciones .....	22
7.2. Actividad citotóxica en líneas celulares .....	22
7.3. Caracterización fitoquímica de extractos .....	30
7.3.1. Marcha fitoquímica preliminar .....	30
7.3.2. Cromatografía en capa delgada (CCD) .....	31
7.3.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC) .....	34
8. Conclusiones .....	39
9. Perspectivas .....	40
10. Referencias .....	41



## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Annona muricata</i> .....	7
<b>Tabla 2.</b> Usos tradicionales reportados para <i>A. muricata</i> . ....	8
<b>Tabla 3.</b> Metabolitos secundarios aislados de <i>A. muricata</i> . ....	8
<b>Tabla 4.</b> Fases móviles y reveladores utilizados dependiendo del metabolito a evaluar para extracto y fracciones obtenidas de hojas de <i>A. muricata</i> .....	21
<b>Tabla 5.</b> Rendimientos de las fracciones obtenidas a partir de extracto etanólico de hojas de <i>A. muricata</i> .....	22
<b>Tabla 6.</b> Datos obtenidos de las CI50 del extracto total y las fracciones de <i>A. muricata</i> sobre las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3. ....	26
<b>Tabla 7.</b> Índice de selectividad a partir de la CI50 de extracto y fracciones de hojas de <i>A. muricata</i> sobre la línea celular normal 3T3 y la línea celular tumoral MCF-7. ....	27
<b>Tabla 8.</b> Índice de selectividad a partir de la CI50 de extracto y fracciones de hojas de <i>A. muricata</i> sobre la línea celular normal 3T3 y la línea celular tumoral 4T1. ...	27
<b>Tabla 9.</b> Índice de selectividad a partir de la CI50 de extracto y fracciones de hojas de <i>A. muricata</i> sobre la línea celular normal 3T3 y la línea celular tumoral B16. ...	28
<b>Tabla 10.</b> Resultados obtenidos de la realización de la marcha fitoquímica preliminar al extracto etanólico de hojas de <i>A. muricata</i> . ....	30

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Fruto de <i>Annona muricata</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura general de los flavonoides.....	9
<b>Figura 3.</b> Principales núcleos de los flavonoides .....	9
<b>Figura 4.</b> Ejemplo de una estructura general de alcaloide, del tipo quinolinico. ...	10
<b>Figura 5.</b> Estructura general de las acetogeninas .....	10
<b>Figura 6.</b> Reducción de MTT a formazán .....	11
<b>Figura 7.</b> Línea celular MCF-7 .....	12
<b>Figura 8.</b> Línea celular 4T1 .....	12
<b>Figura 9.</b> Línea celular B16.....	13
<b>Figura 10.</b> Línea celular fibroblastos 3T3 .....	13
<b>Figura 11.</b> Secado de hojas de <i>Annona muricata</i> .....	16
<b>Figura 12.</b> Material vegetal después de molido. ....	16
<b>Figura 13.</b> Filtración del líquido extractor transcurrido 72 horas. ....	17
<b>Figura 14.</b> Secado del extracto en evaporador rotatorio.....	17
<b>Figura 15.</b> Fraccionamiento del extracto etanólico por cromatografía líquida al vacío.....	18
<b>Figura 16.</b> Ensayo de citotoxicidad (MTT) del extracto y las fracciones de <i>A. muricata</i> sobre la línea celular MCF-7.....	23
<b>Figura 17.</b> Ensayo de citotoxicidad (MTT) del extracto y las fracciones de <i>A. muricata</i> sobre la línea celular 4T1. ....	24
<b>Figura 18.</b> Ensayo de citotoxicidad (MTT) del extracto y las fracciones de <i>A. muricata</i> sobre la línea celular B16. ....	24
<b>Figura 19.</b> Ensayo de citotoxicidad (MTT) del extracto y las fracciones de <i>A. muricata</i> sobre la línea celular 3T3. ....	25
<b>Figura 20.</b> Cambios morfológicos del extracto total de <i>A. muricata</i> y las fracciones de acetato de etilo e hidroalcohólico sobre las líneas celulares tumorales MCF-7.. ..	28
<b>Figura 21.</b> Cambios morfológicos del extracto total de <i>A. muricata</i> y las fracciones de acetato de etilo e hidroalcohólico sobre las líneas celulares tumorales 4T1. ....	29

<b>Figura 22.</b> Cambios morfológicos del extracto total de <i>A. muricata</i> y las fracciones de acetato de etilo e hidroalcohólico sobre las líneas celulares tumorales B16. ...	29
<b>Figura 23.</b> Perfil cromatográfico para flavonoides glicosilados de extracto y fracciones obtenidas de hojas de <i>A. muricata</i> en sistema de solventes, Acetato de etilo- ácido acético- agua (100:11:26) revelado con reactivo natural/UV 365nm...	32
<b>Figura 24.</b> Perfil cromatográfico para taninos de extracto y fracciones obtenidas de hojas de <i>A. muricata</i> en sistema de solventes, Acetato de etilo- ácido acético- agua (100:20:30) revelado con cloruro férrico.....	32
<b>Figura 25.</b> Perfil cromatográfico para alcaloides de extracto y fracciones obtenidas de hojas de <i>A. muricata</i> en sistema de solventes, Tolueno- acetato de etilo- dietilamina (70:20:10) revelado con reactivo Dragendorff. ....	33
<b>Figura 26.</b> Perfil cromatográfico para alcaloides de extracto y fracciones obtenidas de hojas de <i>A. muricata</i> en sistema de solventes, Tolueno- acetato de etilo- dietilamina (70:20:10) visto a 254nm.....	33
<b>Figura 27.</b> Perfil cromatográfico de UPLC del extracto etanólico de hojas de <i>A. muricata</i> en acetonitrilo (Solvente A) y ácido fórmico al 0.1% (Solvente B) monitoreado en un rango de 200 a 400nm. ....	35
<b>Figura 28.</b> Espectro de absorción ultravioleta-visible de un tipo de flavonoide encontrado en el perfil cromatográfico del extracto etanólico de hojas de <i>A. muricata</i> .....	36
<b>Figura 29</b> Espectro de absorción ultravioleta-visible de un posible tanino encontrado en el perfil cromatográfico del extracto etanólico de hojas de <i>A. muricata</i> a las longitudes de onda 340, 280 y 254nm .....	36
<b>Figura 30.</b> Perfil cromatográfico de UPLC de la fracción hidroalcohólica del extracto de hojas de <i>A. muricata</i> en acetonitrilo (Solvente A) y ácido fórmico al 0.1% (Solvente B) monitoreado en un rango de 200 a 400nm.....	37
<b>Figura 31.</b> Espectro de absorción ultravioleta-visible de un tipo de flavonoide encontrado en el perfil cromatográfico de la fracción hidroalcohólica de hojas de <i>A. muricata</i> .....	38

## 1. Resumen

El cáncer es el responsable del 63% de las muertes a nivel mundial, siendo que existen más de 100 tipos de cáncer dentro de los cuales se destacan el cáncer de seno y el melanoma de piel. Tradicionalmente los principales tratamientos son la quimioterapia, radioterapia y la cirugía, las cuales no garantizan una completa eliminación del tumor y por el contrario causan efectos secundarios debido a que eliminan células proliferativas, sean estas malignas o no. Esto conlleva a un deterioro en la salud del paciente, además de los elevados costos que implica para el sistema de salud. Por tal razón se han estudiado distintas alternativas terapéuticas como es el uso de extractos de plantas que pueden ser potencialmente anticancerígenas. *Annona muricata* comúnmente llamada guanábana, es una de las plantas en estudio frente a líneas tumorales, estudios previos en la literatura muestran que en su composición química se han detectado alcaloides, flavonoides y acetogeninas, componentes que se consideran tienen actividades anticancerígenas. Por tal razón en el presente estudio se realizó un extracto etanólico de hojas de *A. muricata* y se fraccionó con distintos solventes de polaridad creciente; hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol 50% para evaluar la actividad citotóxica del extracto y sus fracciones en las líneas celulares tumorales MCF-7, 4T1 y B16 y la línea celular no tumoral 3T3 por medio de la técnica MTT. Adicionalmente se analizó la composición química del extracto y sus fracciones por medio de una marcha fitoquímica preliminar, por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) y Cromatografía líquida de Ultra Eficiencia (UPLC). Como resultados, se encontraron valores de concentración inhibitoria 50 (CI50) de 35.58, 14.65, 16.32 y 17.64 µg/mL para las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3 respectivamente en la fracción hidroalcohólica, la cual fue la que presentó mayor actividad para todas las líneas celulares. Por otro lado las fracciones que presentaron menor actividad fueron las de hexano y diclorometano con valores de CI50 superiores a 250 µg/mL. En relación a la composición química, se observó la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides como metabolitos secundarios predominantes del extracto.

## 2. Introducción

En Colombia el cáncer se presenta como una de las principales causas de muerte convirtiéndolo en un problema progresivo tanto para el área de la salud como en los costos que implica en el país los tratamientos que se manejan para esta enfermedad. El instituto nacional de cancerología (INC) ha reportado las importantes cifras frente a la mortalidad con respecto a la incidencia de diferentes tipos de cáncer en el país, dentro de estos el cáncer de seno es la causa más frecuente de muerte en mujeres después del cáncer de cuello uterino, también se encuentra el cáncer de melanoma de piel [1].

Actualmente se están utilizando e investigando alternativas para el tratamiento contra el cáncer por medio de la medicina tradicional con tratamientos etnomedicinales los cuales pueden ayudar a tratar el cáncer y aumentar eficacia y/o aliviar los efectos secundarios de las terapias clínicas comunes (quimioterapia, radioterapia y cirugía) [2] Entre los años 1940 y 2002 se registró que el 40% de los fármacos antitumorales provienen de los productos naturales o derivados de estos [3].

*Annona muricata*, también conocida como guanábana o graviola, es un árbol que se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, sus frutos son comestibles y se utilizan para preparar bebidas, helados y batidos. Durante mucho tiempo la planta ha sido utilizada como tratamiento etnomedicinal para diferentes afecciones, que incluyen cistitis, diabetes, hipertensión, cefaleas, insomnio, reumatismo e infección parasitaria y más recientemente se ha utilizado como etnomedicina contra distintos tumores [2].

Por tal razón el presente trabajo busca analizar la composición química y evaluar el efecto citotóxico del extracto y fracciones obtenidos a partir de hojas de *Annona muricata* (guanábana) frente a líneas celulares. En la primera parte del documento se abordarán los conceptos generales como las generalidades del cáncer, características generales de *A. muricata* y características de los ensayos a realizar. En la segunda parte del documento se describe la metodología de cada una de las técnicas desarrolladas y por último se presentan los resultados y la discusión de estos y así, de esta forma poder responder la pregunta de investigación planteada en este trabajo, donde los resultados serán de gran aporte tanto para el Grupo de Investigación de Inmunobiología y Biología Celular de la Pontificia Universidad Javeriana, así como para el Grupo de Investigación en Fitoquímica (GIFUJ) de la misma Universidad.

### 3. Justificación y planteamiento del problema

#### 3.1. Planteamiento del problema

El cáncer es una enfermedad con una alta prevalencia a nivel mundial y con una elevada tasa de mortalidad provocando hasta 8,2 millones de muertes en la población al año, aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios entre los cuales se encuentra un índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol [4]. Existen más de 100 tipos de cáncer entre los cuales los más comunes según los nuevos casos estimados en 2018 esta en primer lugar el cáncer de seno, seguido del cáncer de pulmón y bronquios, cáncer de próstata, cáncer de colon y recto, melanoma de piel, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y pelvis renal, cáncer de endometrio, leucemia, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides y en último lugar el cáncer de hígado [5].

Dentro de las terapias disponibles para el tratamiento del cáncer se encuentran; la quimioterapia, radioterapia y la cirugía: se asume que tratar el cáncer en Colombia costaría más de 30'000.000 por paciente debido a los gastos en consultas, diagnósticos, biopsias y el tratamiento como tal del tumor independiente del tipo de terapia que se maneje. Por lo tanto, el tratamiento de estas enfermedades tiene un impacto importante sobre los gastos del país [6]. Además de los costos que se manejan estas técnicas no son completamente exitosas debido a que muchos fármacos anticancerígenos establecidos destruyen las células proliferativas, sean o no malignas. Este enfoque solo causa una pequeña especificidad tumoral y los tejidos proliferativos normales no tumorales también se ven afectados. De esta forma, la aplicación de dosis de fármaco lo suficientemente altas para destruir todas las células tumorales, no se puede aplicar sin provocar efectos secundarios graves en pacientes con cáncer. Como consecuencia, las dosis de medicamentos subóptimas pueden dejar que pocas células tumorales resistentes no se vean afectadas, lo que posteriormente crece y conduce a la reaparición de tumores. Estos tumores ya no responden a la terapia desencadenando resultados fatales para los pacientes [7].

Por tal razón, se han venido estudiando nuevas alternativas en el tratamiento del cáncer dentro de las cuales se han empezado a trabajar con plantas medicinales, de las cuales se destacan algunas como *Artemisa*, *Curcumina*, *Withania somnifera* [8,9]. En este sentido, *Annona muricata* también se destaca entre las especies vegetales con potencial uso terapéutico, se ha utilizado para tratar una amplia gama de enfermedades humanas, como la inflamación, el reumatismo, la diabetes, la hipertensión, el insomnio y las infecciones parasitarias e incluso cáncer [10].

### 3.2. Justificación

Entre los tratamientos tradicionales contra el cáncer se encuentra la quimioterapia, radioterapia y cirugía las cuales conllevan altos costos al ser implementados y adicionalmente algunas terapias convencionales presentan una alta toxicidad; por lo tanto, se ha venido investigando a las plantas medicinales como una alternativa terapéutica o tratamiento complementario. Como ejemplo se puede citar el Taxol®, cuyo principio activo fue obtenido originalmente de la especie vegetal *Taxus brevifolia* la cual actúa al irrumpir la red microtubular esencial para la división celular y otras funciones celulares normales lo que finalmente causa la muerte celular, de esta forma puede ser usado como coadyuvante de las terapias convencionales y de así disminuir la cantidad de fármacos utilizados [11].

Por lo tanto, se mantiene relevante los estudios buscando alternativas terapéuticas para el tratamiento contra el cáncer, preferencialmente implementando los recursos naturales a disposición, que sean cultivables propios del país; además de que se trata de seguir avanzando en la investigación y encontrar otras especies de plantas que puedan presentar actividad citotóxica contra células tumorales. En este sentido, *A. muricata* se presenta con potencial farmacológico. Anteriormente en el Grupo de Investigación Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ) se evaluó un extracto etanólico de semillas de *A. muricata*, en la línea celular MCF-7, de adenocarcinoma de seno, dando bases para seguir desarrollando investigaciones en búsqueda de actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares y con otras partes del material vegetal [12].

Dentro de las perspectivas en el tema, recientemente el Grupo Investigación de Inmunobiología y Biología Celular de la Pontificia Universidad Javeriana, juntamente con el grupo GIFUJ, vienen trabajando en una nueva iniciativa para la búsqueda de nuevas alternativas con plantas medicinales que puedan presentar actividad antitumoral para el desarrollo de nuevos tratamientos, dentro del marco del Programa Colombia Científica. Con base en esto este trabajo buscó evaluar el efecto citotóxico de *A. muricata* (guanábana) frente a líneas celulares tumorales y no tumorales.

De esta forma los aportes aquí observados podrán permitir estudios posteriores que indiquen sobre los mecanismos de muerte celular, componentes químicos involucrados en la actividad observada, y así poder proceder a evaluar a futuro en un modelo experimental que pueda controlar el tumor. Adicionalmente, la utilización de las hojas de la guanábana proporcionaría un valor agregado al cultivo, visto que esta parte del vegetal es considerado un sub-producto de cosecha [2].

### **3.3. Pregunta de investigación**

¿Extracto y fracciones obtenidos a partir de hojas de *Annona muricata* (guanábana) pueden presentar efecto citotóxico frente a las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3?

## **4. Marco teórico**

### **4.1. Cáncer**

El cáncer se refiere a un conjunto de enfermedades relacionadas, el cual puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano, esto sucede cuando algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos que se encuentran alrededor. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita, de esta forma cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren y nuevas células las reemplazan. Sin embargo, en el cáncer, este proceso se descontrola y las células se comienzan a reproducir sin interrupción y pueden formar masas que hacen referencia a los tumores [13].

### **4.2. Terapias contra el cáncer**

Dentro de las terapias tradicionales contra el cáncer se encuentra la quimioterapia, radioterapia y la cirugía; sin embargo, se han estudiado otras alternativas en Colombia y ha tomado impulso recientemente el tratamiento con inmunoterapia el cual actúa específicamente en la zona del tumor, potenciando el sistema inmunológico para que este elimine el tumor. Esto hace que sean tratamientos con una toxicidad muy baja, siendo esta una ventaja frente a las otras terapias con respecto a los efectos secundarios; además de que esta terapia ha demostrado generar memoria inmunológica que permite mantener la respuesta antitumoral en el tiempo. Entre esta terapia se encuentra que el principal fármaco es ipilimumab (fármaco de la quimioterapia Yervoy®) utilizado en pacientes con melanoma metastásico [14] y nivolumab siendo la nueva alternativa para el tratamiento contra distintos tipos de cáncer. No obstante, esta terapia tiene ciertos inconvenientes entre los cuales destaca el alto costo de los fármacos y la carga económica para la salud pública, y el hecho de que no es un tratamiento seguro, el sistema inmunológico también puede atacar células sanas y dar un tipo de toxicidad autoinmune.



### **4.3. Plantas medicinales como terapia alternativa o fuente de compuestos contra el cáncer**

Las plantas son consideradas como una de las principales fuentes de productos biológicamente activos, ya sea a partir de las plantas enteras o de sus fracciones bioactivas son consideradas de gran atractivo para proporcionar nuevas terapias. Algunos productos naturales derivados de plantas han contribuido significativamente a reforzar las quimioterapias antitumorales, como lo son alcaloides vinblastina y vincristina aislados de la Vinca rosea (*Catharantus roseus*). Adicionalmente, un exponente en el tema es el Taxol® el cual es un compuesto obtenido originalmente a partir de la corteza del árbol llamado tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) [11]. Estas terapias han sido útiles debido a que contribuyen al desarrollo tardío de la metástasis y disminuyen la supervivencia libre de la enfermedad [15]. También se pueden citar ejemplos como los fitomedicamentos usados en distintos países a base de *Artemisa*, *Curcumina*, *Withania somnifera*, extractos de muérdago (*Viscum*) [8,9].

Entre los principales antecedentes en el tema en Colombia, se encuentra los estudios con el extracto P2Et, realizados por el Grupo de Investigación de Inmunobiología y Biología Celular de la Pontificia Universidad Javeriana, el cual es proveniente de la planta *Caesalpinia spinosa* y presenta actividad citotóxica tanto *in vitro* como *in vivo*, con ensayos exitosos incluso en humanos. Por otro lado, en estudios realizados en el grupo de investigación GIFUJ se evaluó un extracto etanólico de semillas de *A. muricata* dando resultados favorables en citotoxicidad para línea celular de cáncer de seno humano.

### **4.4. Generalidades de *Annona muricata***

*Annona muricata* conocida comúnmente en Colombia como guanábana, pertenece a la familia Annonaceae, es un árbol pequeño delgado y llega a medir de 4 a 8 metros de altura, produce frutas generalmente en forma de corazón de color verde en la parte exterior y blanca al interior, llegando a medir hasta 40 cm de largo, conformado por una gruesa cáscara con prolongaciones, pulpa, piel y semillas de las cuales se encuentran de 127 a 170 en toda la pulpa (figura 1). Las hojas son duras de color verde oscuro brillante, ovaladas, miden de 5 a 15 cm de largo por 2 a 6 cm de ancho, el peso promedio de la fruta es de 1600g [2, 16].



**Figura 1.** Fruto de *Annona muricata* [17]

#### 4.4.1. Clasificación taxonómica

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Annona muricata*

<b>Reino</b>	<b>Vegetal</b>
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Magnoliales
<b>Familia</b>	Annonaceae
<b>Género</b>	Annona
<b>Especie</b>	<i>A. muricata</i>

#### 4.4.2. Usos tradicionales

Este árbol ha sido ampliamente cultivado en muchos países tropicales y tradicionalmente es utilizado para diferentes enfermedades y dolencias, tales como en tratamientos contra infecciones por parásitos, bacterias y virus, calmante, insecticida, en el combate a convulsiones, altos niveles de azúcar en la sangre y otros usos según la parte del vegetal (tabla 2). Y lo más importante en el contexto de este trabajo, sus propiedades de combate al cáncer [18].

**Tabla 2.** Usos tradicionales reportados para *A. muricata*.

Parte de la planta	Uso	Referencia
<b>Hojas</b>	En decocción: <ul style="list-style-type: none"><li>• Catarro y tos</li><li>• Aumenta sudoración</li><li>• Antiespasmódico</li><li>• Digestivo</li></ul> Aplicada: <ul style="list-style-type: none"><li>• Inflamaciones y lavar pies hinchados</li></ul>	[19]
<b>Semillas</b>	Antiparasitario	[20]
<b>Fruto</b>	Jugo: <ul style="list-style-type: none"><li>• Facilita secreción de orina y alivia uretritis</li></ul>	[19]

#### 4.4.3. Composición química

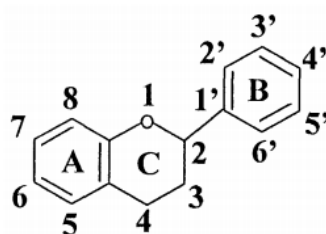
Se ha observado que la especie *A. muricata* es rica en flavonoides, alcaloides y acetogeninas [21], las cuales se encuentran distribuidas de la siguiente forma (tabla 3).

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios aislados de *A. muricata*.

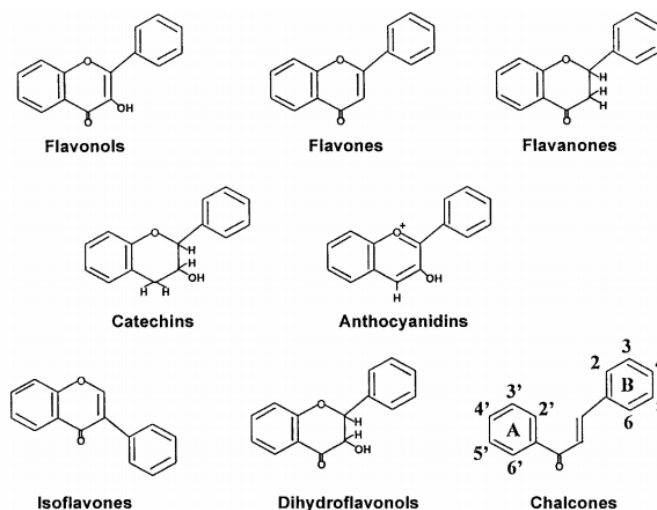
Metabolito secundario	Tipo de compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Flavonoides</b>	Rutina	Hojas	[22]
<b>Alcaloides</b>	Reticulina Coclaurina Annomuricina	Hojas y semillas	[23, 24]
<b>Acetogeninas</b>	Muricina J Muricina K Muricina L	Fruto	[25]

## Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, diversos en su estructura y características químicas, se encuentran de forma ubicua en las plantas. Los flavonoides son potentes antioxidantes, eliminadores de radicales libres, quelantes de metales e inhiben la peroxidación de lípidos. Para estas actividades, algunos de los requisitos estructurales previamente descritos son el grupo hidroxilo en la posición 3, un doble enlace entre las posiciones 2 y 3, un grupo carbonilo en la posición 4 y la polihidroxilación de los anillos aromáticos A y B (figura 2). Se han identificado más de 64000 flavonoides dentro de los cuales principalmente se encuentran flavonoles, flavonas, flavononas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonoles y chalconas (figura 3) [26].



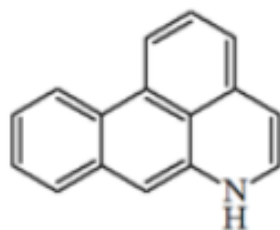
**Figura 2.** Estructura general de los flavonoides [26]



**Figura 3.** Principales núcleos de los flavonoides [26]

## Alcaloides

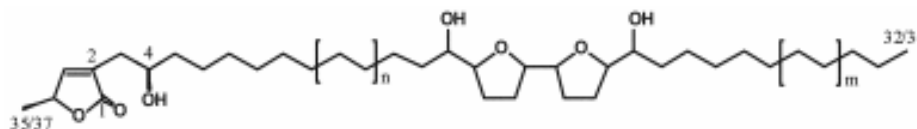
Los alcaloides son compuestos que contienen nitrógeno, un anillo heterocíclico, con carácter alcalino (figura 4). Los alcaloides poseen una amplia clasificación, dependiendo el aminoácido del que proceden, de esta forma se encuentran alcaloides derivados de ornitina, lisina, tirosina, fenilalanina y triptófano [27].



**Figura 4.** Ejemplo de una estructura general de alcaloide, del tipo quinolinico. [27]

## Acetogeninas

Las acetogeninas son un conjunto único de derivados de ácidos grasos de cadena larga enlazados a una unidad 2- propanol. Se caracterizan por una larga cadena alifática unida en la parte terminal a un anillo de lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, uno o dos anillos tetrahidrofurano (THF) y algunos sustituyentes oxigenados a lo largo de la cadena (figura 5) [28]



**Figura 5.** Estructura general de las acetogeninas [29]

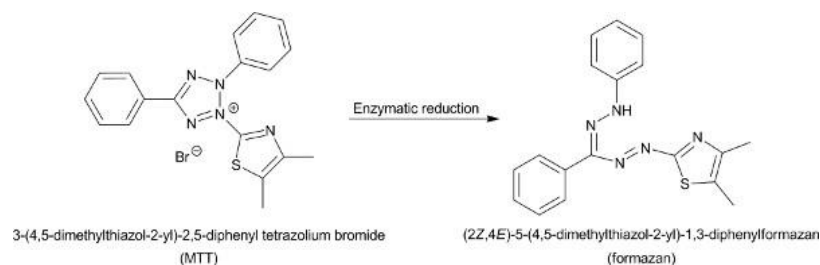
### 4.4.4. Antecedentes

Se ha demostrado que las acetogeninas anonáceas activas inducen con éxito la muerte en células cancerosas que son resistentes incluso a los fármacos quimioterapéuticos, pero a pesar de su notable eficacia antiproliferativa, estas acetogeninas anonáceas se han atribuido a efectos secundarios debilitantes como la neurotoxicidad, lo que restringe su desarrollo como nuevas entidades farmacológicas. Sin embargo, los estudios han demostrado un posible papel quimioterapéutico del extracto de *A. muricata* contra el cáncer [10]. Otro estudio ha demostrado que los extractos etanólicos de hoja de *A. muricata* ejercen una propiedad antioxidante significativa, siendo superior a la de otras especies de *Annona* como lo son *A. squamosa* y *A. reticulata* [30]. En estudios anteriores realizados en el grupo de investigación GIFUJ se realizó un trabajo de grado con extracto etanólico de semillas de *A. muricata* dando como resultado  $IC_{50} = 9 \mu\text{g/mL}$  con un mejor tratamiento a concentración de  $25 \mu\text{g/mL}$  sobre la línea celular MCF-7. Por tal razón se siguen estudiando distintos extractos provenientes de otras partes de la planta con el fin de obtener resultados relevantes adicionales [12].

## 4.5. Ensayos de citotoxicidad por MTT

Los cultivos celulares son de gran importancia para la investigación debido a que se asocia con la extracción de células, tejidos u órganos de un animal o planta para su posterior adaptación a un ambiente artificial propicio para su desarrollo y proliferación [31], uno de los criterios utilizados para definir la muerte celular es la pérdida en la integridad de la membrana celular, para determinarlo se realizan diferentes ensayos que permite comprobar la integridad de la membrana permitiendo a los colorantes como el azul de tripán y cromóforo derivado de la toluidina, ingresar a la célula y teñir el citoplasma de azul, mientras que las células vivas permanecen incoloras [32].

Este método corresponde al MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) el cual es un método colorimétrico cuantitativo que consiste en la reducción que sufre el MTT a formazán que es su forma insoluble (figura 6), esto se da por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, la cual está activa en las células vivas. El formazán producido tras la reducción del MTT se retiene en las células y se libera por solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) dando una coloración púrpura, la cual se mide en un espectrofotómetro a 540nm. Teniendo en cuenta la cantidad de células viables será proporcional a la cantidad de formazán producido a partir de la absorbancia obtenida [32].

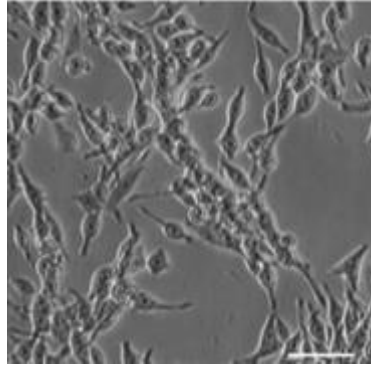


**Figura 6.** Reducción de MTT a formazán [33]

## 4.6. Líneas celulares

### 4.6.1. MCF-7

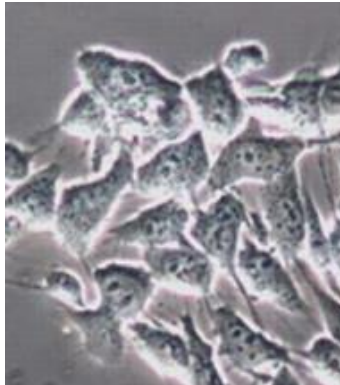
Es una línea celular humana obtenida a partir de tejido metastásico en efusión pleural de una paciente de género femenino, caucásica con adenocarcinoma de la glándula mamaria (Figura 7). Esta línea celular es adherente y expresan el oncogén WNT7B. Además, expresan los genes de la proteína de unión al factor de crecimiento del tipo insulina (IGFBP), BP-2, BP-4 y BP-5 [34].



**Figura 7.** Línea celular MCF-7 [35]

#### **4.6.2. 4T1**

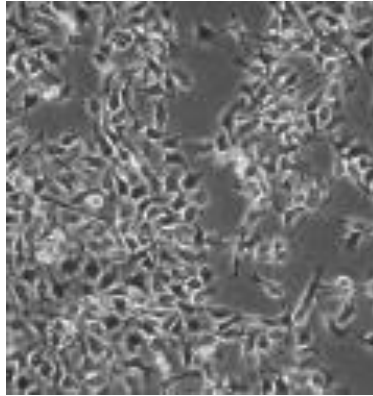
Es una línea celular de tumor mamario de ratón, utilizada como modelo para la etapa IV de cáncer de mama (figura 8). Al ser inoculada en ratones BALB/c, las células 4T1 generan tumor primario y además hacen metástasis de forma espontánea a los pulmones, hígado, ganglios linfáticos y cerebro, mientras que el tumor primario crece *in situ* [36].



**Figura 8.** Línea celular 4T1 [37]

#### **4.6.3. B16**

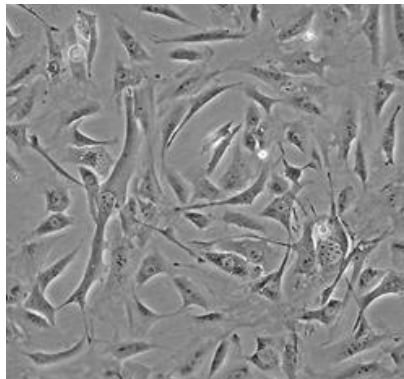
Es una línea celular obtenida a partir de tumor de melanoma de ratón, utilizada como modelo para etapa IV de cáncer de piel al ser inoculada en ratones C57BL/6 singénicos, esta línea celular tiene capacidad de formar nódulos tumorales pulmonares [38].



**Figura 9.** Línea celular B16 [38]

#### 4.6.4. Fibroblastos 3T3

Las células 3T3, son fibroblastos primarios de embriones de ratón. Su denominación se debe a que fueron cultivados en un protocolo 3T3 es decir transferidas cada tres días en una densidad de  $3 \times 10^5$  células. Estas células son utilizadas generalmente en el cultivo de queratinocitos debido a que secretan factores de crecimiento favorables para esta clase de células creando la capa externa resistente en la piel. [40].



**Figura 10.** Línea celular fibroblastos 3T3 [40]



## **4.7. Caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones**

### **4.7.1. Marcha fitoquímica preliminar**

Esta es una técnica que produce una reacción química que reconoce rápidamente la estructura molecular del compuesto generando así un cambio de color, es utilizada para la caracterización de metabolitos secundarios [41].

### **4.7.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)**

Método de separación de una mezcla de compuestos de una muestra. Su fundamento consiste en el desplazamiento de una fase móvil, en estado líquido. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria, de tal forma los compuestos que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria migran lentamente con el flujo de la fase móvil, por otro lado los compuestos que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con mayor rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativamente [42].

### **4.7.3. Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia (UPLC)**

Técnica de separación, identificación y cuantificación de compuestos de una mezcla compleja en una columna de cromatografía en función de la polaridad de los compuestos de interés en la muestra y la interacción que tienen con la columna y su polaridad, debido a que está basada en la diferente distribución de los componentes entre dos fases, una móvil y una estacionaria la cual va a ser retenida dentro de la columna. El principio básico cromatográfico es similar al mencionado previamente en CCD [43].

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo general**

Analizar la composición química y evaluar el efecto citotóxico del extracto etanólico y fracciones obtenidos a partir de hojas de *Annona muricata* (guanábana) frente a distintas líneas celulares.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la actividad citotóxica del extracto y fracciones obtenidas a partir de hojas de *Annona muricata* sobre las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16, 3T3 por la técnica de MTT.
- Analizar la composición química de extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* y fracciones (diclorometano, acetato de etilo y etanol 50%) por técnicas analíticas.

## 6. Metodología

### 6.1. Material vegetal

Hojas de guanábana (*Annona muricata*) fueron colectadas en el municipio de Pereira, bajo el Permiso Marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la Diversidad Biológica para investigación con fines no comerciales” otorgados a la Pontificia Universidad Javeriana (resolución No. 00778 del 07 de julio de 2017) emitido por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA), al cual está suscrito el Tutor del Trabajo de Grado. El contrato de Acceso a Recurso Genético y sus productos derivados se encuentra en trámite por parte de los investigadores en el marco del Programa Colombia Científica.

### 6.2. Preparación de extracto etanólico y fraccionamiento

Las hojas se limpiaron externamente y se secaron en un horno de secado por 96 horas a 32°C con un 80% de ventilación forzada (figura 11). Posterior al secado, el material vegetal fue molido en un procesador de alimentos (figura 12).



**Figura 11.** Secado de hojas de *Annona muricata*



**Figura 12.** Material vegetal después de molido.

El material vegetal seco y molido se extrajo por maceración con etanol (proporción 1:10, m/v) durante 72 horas, a frio, con agitación ocasional y en oscuridad. Transcurrido las 72 horas, el líquido extractor se filtró (figura 13) y el proceso se repitió otras 2 veces, totalizando 3 ciclos de extracción, de 72 horas cada uno. Posteriormente, los extractos fueron agrupados y secados en evaporador rotatorio (figura 14).



**Figura 13.** Filtración del líquido extractor transcurrido 72 horas.



**Figura 14.** Secado del extracto en evaporador rotatorio.

El fraccionamiento del extracto etanólico (30g) se realizó por Cromatografía Líquida al Vacío (CLV), utilizando sílica (sílicaFlash) como fase estacionaria (50g) y como fase móvil los siguientes solventes (400mL cada solvente) en polaridad creciente (hexano, diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt) y etanol 50% (hidroalcohólico) (figura 15). Las fracciones obtenidas fueron secadas en evaporador rotatorio, el residuo acuoso de la fracción etanol 50% se congeló y se liofilizó.



**Figura 15.** Fraccionamiento del extracto etanólico por cromatografía líquida al vacío.

### **6.3. Evaluación de la actividad biológica**

Para las pruebas biológicas se utilizaron las siguientes líneas celulares adherentes: La línea celular MCF-7 de adenocarcinoma mamario humano, la línea celular 4T1 de adenocarcinoma mamario murino, la línea celular B16 de melanoma murino y la línea celular 3T3 de fibroblastos de origen murino.

#### **6.3.1. Cultivo de las líneas celulares**

Las líneas celulares adherentes fueron mantenidas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado al (10%), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0.01 M de buffer de HEPES, 1mM de piruvato de sodio y se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células adherentes alcanzaron el 75% de confluencia, fueron tratadas con tripsina/EDTA 1X por 4 minutos, posteriormente lavadas con buffer fosfato 1X (PBS) y resuspendidas en medio RPMI suplementado.

#### **6.3.2. Ensayos de citotoxicidad por MTT**

Para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de los extractos que se trabajaron en esta investigación se realizó la prueba de MTT. La citotoxicidad de los extractos se determinó usando el ensayo MTT, en los cuales se sembró alrededor de  $3 \times 10^3$  células en placas de 96 pocillos, los extractos se administraron 24h después y se aplicaron haciendo una dilución en serie de 250 µg/mL hasta 1,95 µg/mL, luego se incubó 48 h. Después de las horas de incubación, se reemplazó el medio con 100 µL de medio nuevo, con 50 µL de MTT y se incubaron por 4 h a 37°C. La lectura de la densidad óptica se realizó a 540 nm.

#### 6.4. Caracterización fitoquímica de los extractos

Los extractos y fracciones fueron analizados cualitativamente por Marcha Fitoquímica, por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) fase normal, con uso de distintas fases móvil y por Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia (UPLC), en fase reversa, con uso de distintas condiciones cromatográficas.

##### 6.4.1. Marcha fitoquímica preliminar

Se realizaron pruebas para detectar Carotenoides, Esteroides, Flavonoides, Taninos, Saponinas, Cardiotónicos, Cumarinas y Alcaloides.

Se realizó la siguiente prueba para detección de carotenoides:

- **Prueba de Salkowski:** para realizar este ensayo se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico al 85% suavemente por las paredes a 1 mL de extracto.

Se realizaron las siguientes pruebas para detección de esteroides:

- **Prueba de Liebermann-Buchard:** para realizar este ensayo se adicionó 4 gotas del reactivo Liebermann-Buchard a 0.5 mL de extracto.
- **Prueba de vainillina-ácido orto-fosfórico:** para realizar este ensayo se adicionó 4 gotas de reactivo VAO por las paredes del tubo a 0.5 mL de extracto.

Se realizaron las siguientes pruebas para detección de flavonoides:

- **Prueba de Shinoda:** para realizar este ensayo se adicionó un trozo de magnesio metálico y 5 gotas de HCL 10% a 0.5 mL del extracto etanólico.
- **Prueba Rosenhein:** para realizar este ensayo se adicionó 0.5 mL de HCl concentrado a 0.5 mL de extracto, se mezcló y calentó por 10 minutos, se enfrió y agito con 0.4 mL de alcohol amílico.
- **Prueba Leucoantocianidinas:** para realizar este ensayo se adicionó 1 mL de HCL al 10% al extracto etanólico y se calentó por 10 minutos.

Se realizaron las siguientes pruebas para detección de taninos:

- **Prueba de Cloruro férrico:** para realizar este ensayo se adicionó 2 gotas de solución de cloruro férrico en etanol al 1% a 0.5 mL de extracto.
- **Prueba de Gelatina-sal:** para realizar este ensayo se adicionó 1 mL de reactivo gelatina-sal a 1 mL de extracto.

Se realizaron las siguientes pruebas para detección de saponinas:

- **Prueba de Espuma:** para realizar este ensayo se adicionó 5 mL de agua a 1 mL de extracto y se agitó vigorosamente durante 5 minutos.

- **Prueba de Rosenthaler:** para realizar este ensayo se adicionó 4 gotas de reactivo VAO por las paredes del tubo a 0.5 mL del extracto.

Se realizaron las siguientes pruebas para detección de cardiotónicos:

- **Prueba de Baljet:** para realizar este ensayo se adicionó 0.5 mL de reactivo de Baljet a 0.5 mL de extracto.
- **Prueba de Molish:** para realizar este ensayo se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico a 0.5 mL de extracto, posteriormente se adicionó 0.5 mL de reactivo de Molish gota a gota por las paredes del tubo.

Se realizó la siguiente prueba para la detección de cumarinas:

- **Prueba de Erlich:** para realizar este ensayo se adicionó 1 mL de reactivo de Erlich a 1 mL de extracto.

Se realizaron las siguientes pruebas para la detección de alcaloides:

- **Prueba de Dragendorff:** para realizar este ensayo se adicionó 4 gotas de reactivo Drangendorff a 1 mL de extracto.
- **Prueba de Valser:** para realizar esta prueba se adicionó 4 gotas de reactivo de Valser a 1 mL de extracto.
- **Prueba de Mayer:** para realizar esta prueba se adicionó 4 gotas de reactivo de Mayer a 1 mL de extracto.
- **Prueba de Wagner:** para realizar esta prueba se adicionó 4 gotas de reactivo de Wagner a 1 mL de extracto.

#### **6.4.2. Cromatografía en capa delgada (CCD)**

Para la realización de la cromatografía en capa delgada se utilizó como fase estacionaria cromatofolios (10 x 7 cm) Merck de Sílica Gel 60G F<sub>254</sub>. Se utilizaron distintas fases móviles dependiendo del grupo de metabolito a caracterizar con respecto a los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica como lo muestra la tabla 4, adicionalmente cada uno cuenta con su respectivo revelador.

**Tabla 4.** Fases móviles y reveladores utilizados dependiendo del metabolito a evaluar para extracto y fracciones obtenidas de hojas de *A. muricata*.

Metabolito	Fase móvil	Revelador
Flavonoides	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua. [100:12:12:24)</li> <li>➤ Cloroformo, acetona, ácido fórmico. (75:16.5:8.5)</li> <li>➤ Acetato de etilo, acetona, ácido acético, agua. (100:11:11:26)</li> <li>➤ Acetato de etilo, ácido acético, agua. (100:11:26)</li> </ul>	Reactivo natural
Taninos	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Acetato de etilo, ácido acético, agua. (100:20:30)</li> <li>➤ Acetato de etilo, metano, agua. (100:13,5:10)</li> <li>➤ N-butanol, ácido acético, agua. (7:1.5:1.5)</li> </ul>	Cloruro férrico
Alcaloides	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tolueno, acetato de etilo, dietilamina. (70:20:10)</li> </ul>	Reactivo Dragendorff

#### 6.4.3. Cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC)

El análisis de UPLC se llevó a cabo en Aquity H Class UPLC Waters® con un detector de matriz de fotodiodos (PDA), bomba cuaternaria, desgasificador y automuestreador. Los datos fueron procesados usando el software Empower® 3. Se empleó una columna BEH Shield C18 2.6 µm 100 mm X 2.1 mm Kinetex®, mantenida a 35°C ± 1 con gradiente de elución de acetonitrilo (Solvente A) y ácido fórmico al 0.1% (Solvente B) de la siguiente manera: 10% A (0-2 min), 15% A (3-4min), 20% A (5-7min), 30% A (8-9min), 10% A (10min), con un flujo de corrida de 0.6 mL min<sup>-1</sup> y un volumen de inyección de 3µL. Para la detección, la longitud de onda empleada fue 340nm mientras que el espectro UV fue monitoreado en un rango de 200 a 400nm.

### 7. Resultados y discusión

Al finalizar la metodología descrita anteriormente en este trabajo de investigación se obtienen los siguientes resultados dentro de los cuales se encuentra la obtención de extracto y sus fracciones con su respectiva caracterización fitoquímica realizada por medio de técnicas analíticas como lo son la marcha fitoquímica preliminar, la cromatografía en capa delgada (CCD) y la cromatografía de ultra eficiencia (UPLC), además se realizó la evaluación citotóxica del extracto y fracciones frente a las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3.



### 7.1. Obtención de extractos y fracciones

A partir de 30g de hojas de *A. muricata* obtenidos después de moler se realizó el extracto etanólico descrito anteriormente del cual se obtuvo 3g de masa final, siendo un rendimiento del 10%. Posteriormente se hizo el fraccionamiento empleando 2g del extracto obtenido. En el momento de realizar el fraccionamiento se utilizó en primer lugar el solvente con menor polaridad hasta el de mayor polaridad. Específicamente para la fracción diclorometano (DCM), esta fue dividida en 2 simplemente por el cambio de color que presentó, la primera parte (DCM 1) correspondió a una elución de compuestos de color amarilla, en la cual se entiende que corresponda en su mayoría a carotenos y en la segunda parte (DCM 2) se encuentran las clorofilas debido a que este presentó color verde. La fracción que obtuvo un mayor rendimiento corresponde a la de DCM 2 con un 45,9% y la que menos obtuvo rendimiento fue la fracción de hexano con 1,0% (tabla 5), por tal razón con esta fracción se realizó la evaluación de la actividad citotóxica pero no se caracterizó fitoquímicamente.

**Tabla 5.** Rendimientos de las fracciones obtenidas a partir de extracto etanólico de hojas de *A. muricata*.

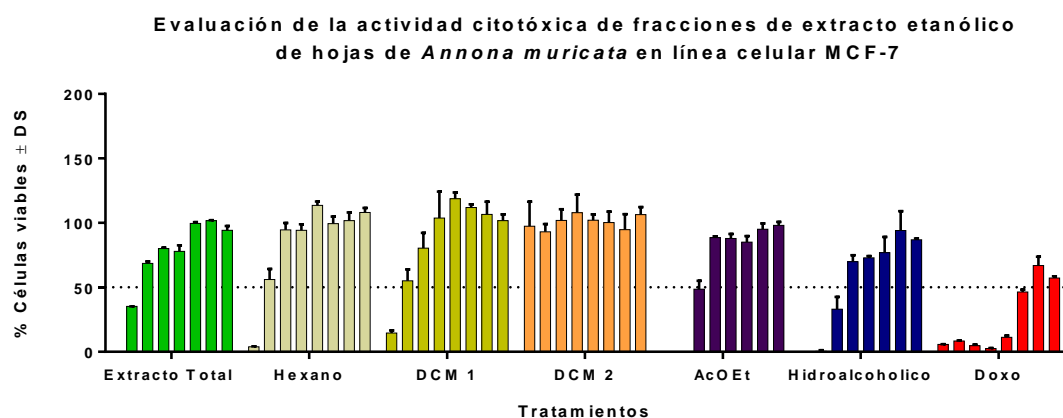
<b>Fracciones</b>	<b>Masa a partir de 2g de extracto</b>	<b>Rendimiento a partir de 2g de extracto</b>
<b>Hexano</b>	20,4mg	1,0%
<b>DCM 1</b>	35,5mg	1,7%
<b>DCM 2</b>	919,9mg	45,9%
<b>AcOEt</b>	328,5mg	16,4%
<b>Hidroalcohólico</b>	438,2mg	21,9%

### 7.2. Actividad citotóxica en líneas celulares

Para establecer la actividad citotóxica del extracto total y las fracciones sobre las líneas tumorales MCF-7, 4T1, B16 y los fibroblastos 3T3 se utilizaron placas de 96 pozos con un rango de concentraciones iniciando por 250 µg /mL, seguido por 125 µg /mL, 62.5 µg /mL, 31.2 µg /mL, 15.6 µg /mL, 7.8 µg /mL, 3.9 µg /mL y finalmente 1,95 µg /mL, uno de los parámetros para comparar la citotoxicidad entre el extracto y las fracciones es la concentración inhibitoria 50 (CI50) que corresponde a la inhibición del 50% del crecimiento de las células tumorales.

En la figura 16 se observa la disminución significativa en término de viabilidad celular entre las células MCF-7 tratadas con el extracto total, las fracciones AcOEt, hidroalcohólico y las tratadas con hexano, DCM 1 y DCM 2, las cuales no presentan datos significativos, al estimar la concentración inhibitoria 50 (CI50) de cada uno de los tratamientos con respecto al control negativo que fue etanol para las fracciones

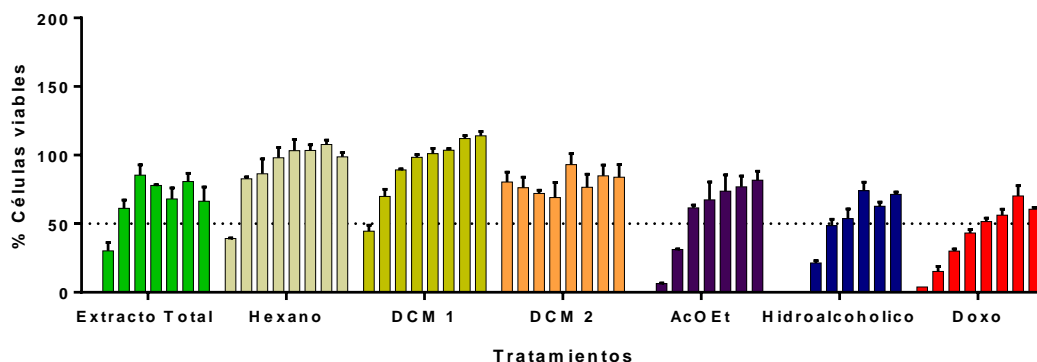
y DMSO para el extracto total, se observa que el tratamiento con mayor actividad es el hidroalcohólico con un CI50 de 35.58  $\mu\text{g}/\text{mL}$  seguido por el tratamiento con la fracción de acetato de etilo (AcOEt) con 59.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , posteriormente el extracto total con 79.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y las fracciones con menor actividad corresponden a Hexano con 131.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , DCM 1 con 127.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y DCM 2 con un CI50  $>250 \mu\text{g}/\text{mL}$  lo cual quiere decir que la muerte celular fue muy poca o nula en comparación a los primeros extractos nombrados.



**Figura 16. Ensayo de citotoxicidad (MTT) del extracto y las fracciones de *A. muricata* sobre la línea celular MCF-7.** Las células fueron tratadas con el extracto total y las fracciones de *A. muricata* por 48 horas a concentraciones entre 250 y 1.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El efecto citotóxico fue evaluado utilizando la técnica de MTT. Como control negativo se utilizó DMSO para el extracto total y etanol para las fracciones y como control positivo Doxorubicina (DOXO) a concentraciones de 2.5 hasta 0.019  $\mu\text{M}$ . La significancia estadística fue evaluada por ANOVA y con respecto al control negativo por medio de la prueba Bonferroni's.\* P <0,05

Para las células 4T1 tratadas con el extracto y las fracciones obtenidas de hojas de *A. muricata* (figura 17) se observa disminución en término de viabilidad celular en las fracciones: hidroalcohólico y acetato de etilo con un CI50 de 14.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 26.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, seguido se observa el extracto total con un CI50 de 55.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$  posteriormente está la fracción de hexano con 214.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , DCM 1 con 215.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y por último la fracción DCM 2 con una concentración inhibitoria 50  $>250 \mu\text{g}/\text{mL}$  en las cuales se evidencia un aumento en la proliferación celular.

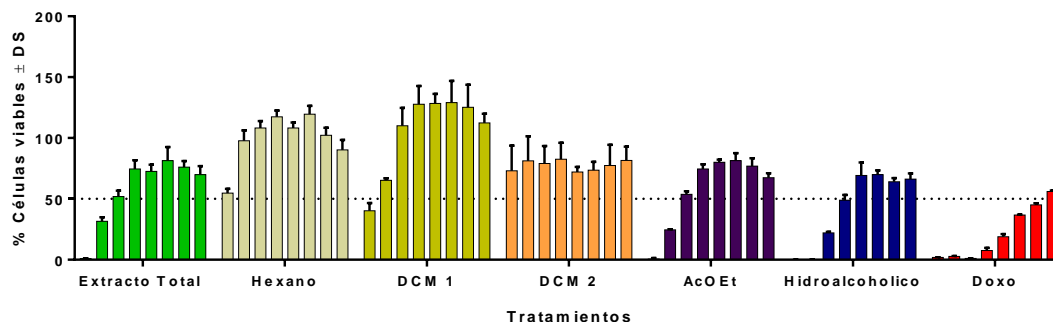
Evaluación de la actividad citotóxica de fracciones de extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* en línea celular 4T1



**Figura 17. Ensayo de citotoxicidad (MTT) del extracto y las fracciones de *A. muricata* sobre la línea celular 4T1.** Las células fueron tratadas con el extracto total y las fracciones de *A. muricata* por 48 horas a concentraciones entre 250 y 1.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El efecto citotóxico fue evaluado utilizando la técnica de MTT. Como control negativo se utilizó DMSO y como control positivo Doxorubicina (DOXO) a concentraciones de 2.5 hasta 0.019  $\mu\text{M}$ . La significancia estadística fue evaluada por ANOVA y con respecto al control negativo por medio de la prueba Bonferroni's. \*  $P < 0,05$

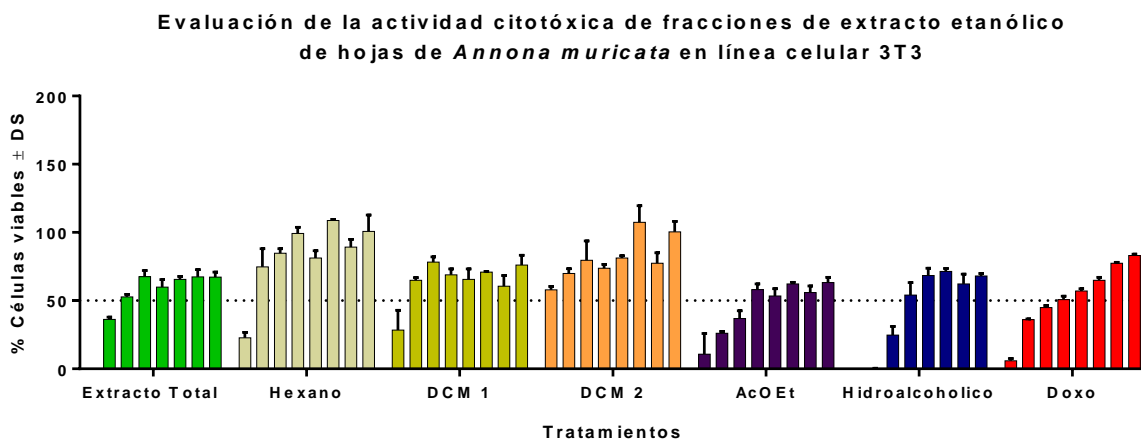
Por otro lado los resultados obtenidos para las células tumorales B16 (figura 18) se observa una similitud con respecto a las líneas tumorales MCF-7 y 4T1 debido a que las fracciones con mayor actividad con respecto a la disminución en la viabilidad celular son el hidroalcohólico y el de acetato de etilo con  $\text{CI}_{50}$  de 16.32 y 49.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , además el extracto total también presenta actividad con 47.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de igual forma los extractos con menor actividad corresponden a hexano, DCM 1 y DCM 2 como se observó en las otras líneas tumorales tratadas, estos últimos con un  $\text{CI}_{50} > 250$ , 195.4 y  $> 250$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente.

Evaluación de la actividad citotóxica de fracciones de extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* en línea celular B16



**Figura 18. Ensayo de citotoxicidad (MTT) del extracto y las fracciones de *A. muricata* sobre la línea celular B16.** Las células fueron tratadas con el extracto total y las fracciones de *A. muricata* por 48 horas a concentraciones entre 250 y 1.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El efecto citotóxico fue evaluado utilizando la técnica de MTT. Como control negativo se utilizó DMSO y como control positivo Doxorubicina (DOXO) a concentraciones de 2.5 hasta 0.019  $\mu\text{M}$ . La significancia estadística fue evaluada por ANOVA y con respecto al control negativo por medio de la prueba Bonferroni's. \*  $P < 0,05$

Por último se realizó la evaluación de la citotoxicidad en células 3T3 las cuales corresponden a fibroblastos, se realiza esta evaluación para determinar la CI50 del extracto total y las fracciones de la misma forma que en las células tumorales y así posteriormente poder evaluar el índice de selectividad y determinar si los extractos son más tóxicos para las células tumorales o para las células normales, como se observa en la figura 19 los extractos que generan una disminución en la viabilidad celular son: el extracto total y las fracciones hidroalcohólico y acetato de etilo con CI50 de 30.5, 17.64 y 15.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente y los menos citotóxicos con respecto a su CI50 son los de hexano con 169  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y las fracciones de DCM 1 y DCM 2 con un CI50  $>250 \mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 19. Ensayo de citotoxicidad (MTT) del extracto y las fracciones de *A. muricata* sobre la línea celular 3T3.** Las células fueron tratadas con el extracto total y las fracciones de *A. muricata* por 48 horas a concentraciones entre 250 y 1.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El efecto citotóxico fue evaluado utilizando la técnica de MTT. Como control negativo se utilizó DMSO y como control positivo Doxorubicina (DOXO) a concentraciones de 2.5 hasta 0.019  $\mu\text{M}$ . La significancia estadística fue evaluada por ANOVA y con respecto al control negativo por medio de la prueba Bonferroni's.\*  $P < 0,05$

En la tabla 6 se reportan las CI50 obtenidas para el extracto y las fracciones de *A. muricata* donde se observa que el extracto total y las fracciones de AcOEt y el hidroalcohólico presentan actividad citotóxica significativa en las diferentes líneas celulares.

**Tabla 6.** Datos obtenidos de las CI50 del extracto total y las fracciones de *A. muricata* sobre las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3.

	Fracciones	Líneas celulares			
		MCF-7	4T1	B16	3T3
CI50 µg/mL	Extracto total	79.41±50	55.86±14	47.54±11	30.5±11
	Hexano	131.4±15	214.2±41	>250	169±19
	DCM 1	127.8±	215.4±	195.4±	>250
	DCM 2	>250*	>250	>250	>250
	AcOEt	59.75±29	26.63±7	49.5±15	15.27±24
	Hidroalcohólico	35.58±25	14.65±9	16.32±7	17.64±1

\*>250 representa los valores de CI50 superiores a 250 µg/mL.

Con respecto a los resultados obtenidos anteriormente en las líneas celulares tratadas con el extracto y las fracciones se observó que las fracciones de acetato de etilo y el hidroalcohólico junto al extracto total presentan una disminución representativa en cada una de las líneas celulares, en especial la fracción hidroalcohólica en todas las líneas celulares presenta concentraciones inhibitorias 50 menores a las de los demás extractos.

En comparación con trabajos previos se ha observado que el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* en células tumorales de próstata PC-3 presenta un IC50 de 63 µg/mL [10] el cual no difiere con los resultados obtenidos en el presente trabajo con otras líneas celulares ya que en el extracto etanólico total se evidenció una disminución en la viabilidad celular en las líneas tumorales MCF-7, 4T1 y B16 con CI50 de 79.41, 55.86 y 47.54 µg/mL respectivamente. Por otro lado en otro estudio se observó la actividad citotóxica que presenta la fracción de acetato de etilo frente a la línea celular MCF-7 con un CI50 de 6.39 µg/mL [44] lo cual también es coherente con los datos obtenidos en este trabajo donde esta fracción fue de las que presentó una mayor actividad frente a todas las líneas celulares tratadas.

Sin embargo se conoce que la mayoría de los fármacos con actividad antitumoral presentan toxicidad frente a células normales [45] aunque con los derivados de plantas esta toxicidad disminuye, por tal razón se realizó la evaluación citotóxica del extracto y las fracciones obtenidas de hojas de *A. muricata* sobre células normales o fibroblastos primarios de embriones de ratón (3T3), de igual forma que en las células tumorales los tratamientos fueron puestos en placas de 96 pozos con diferentes concentraciones partiendo de 250 µg/mL hasta 1.95 µg/mL durante 48 horas. Adicionalmente se determina el índice de selectividad [46]

$$IS = \frac{CI50 \text{ fibroblastos } 3T3}{CI50 \text{ célula tumoral}}$$

El índice de selectividad indica si el tratamiento es más tóxico para células tumorales que para células normales. Si el valor es >1 las fracciones son más citotóxicas para

las células tumorales que para las normales, pero si el valor es  $<1$  significa que es más citotóxico para las células normales que para las tumorales. [47] Como se observa en la tabla 7, el extracto que presenta una actividad mayor en la célula tumoral MCF-7 que en la normal corresponde a la fracción de hexano, aunque la actividad frente a la línea celular no es representativa ya que no presenta citotoxicidad. Los demás muestran una mayor citotoxicidad para las células normales. Por otro lado para las líneas celulares 4T1 y B16 (tabla 8 y 9) se observa que la fracción con mayor actividad citotóxica y con un índice de selectividad  $>1$  corresponde al hidroalcohólico por lo tanto esta sería la fracción que podría arrojar un mejor resultado con respecto al tratamiento en dichas líneas celulares debido a que resulta ser más citotóxico para las células tumorales que para las normales. En estudios previos donde se evalúan diferentes extractos y fracciones del fruto y semillas de *A. muricata* se observó un valor de IS  $>1$  lo que indica que fue más tóxico para las células tumorales que para las normales [48], este resultado difiere con lo visto en este estudio ya que como se nombró anteriormente solo se encontró que en el extracto hidroalcohólico hay más citotoxicidad en las células 4T1 y B16 que en las células normales 3T3 y para las demás fracciones resultó ser más tóxico para las células normales.

**Tabla 7.** Índice de selectividad a partir de la CI50 de extracto y fracciones de hojas de *A. muricata* sobre la línea celular normal 3T3 y la línea celular tumoral MCF-7.

	Fracciones	Líneas celulares		Índice de selectividad
		MCF-7	3T3	
CI50 µg/mL	Extracto total	79.41	30.5	0.38
	Hexano	131.4	169	1.2
	DCM1	127.8	$>250$	$>1$
	DCM2	$>250^*$	$>250$	$>1$
	AcOEt	59.75	15.27	0.25
	Hidroalcohólico	35.58	17.64	0.49

\* $>250$  representa los valores de CI50 superiores a 250 µg/mL.

**Tabla 8.** Índice de selectividad a partir de la CI50 de extracto y fracciones de hojas de *A. muricata* sobre la línea celular normal 3T3 y la línea celular tumoral 4T1.

	Fracciones	Líneas celulares		Índice de selectividad
		4T1	3T3	
CI50 µg/mL	Extracto total	55.86	30.5	0.54
	Hexano	214.2	169	0.78
	DCM1	215.4	$>250$	$>1$
	DCM2	$>250^*$	$>250$	$>1$
	AcOEt	26.63	15.27	0.57
	Hidroalcohólico	14.65	17.64	1.2

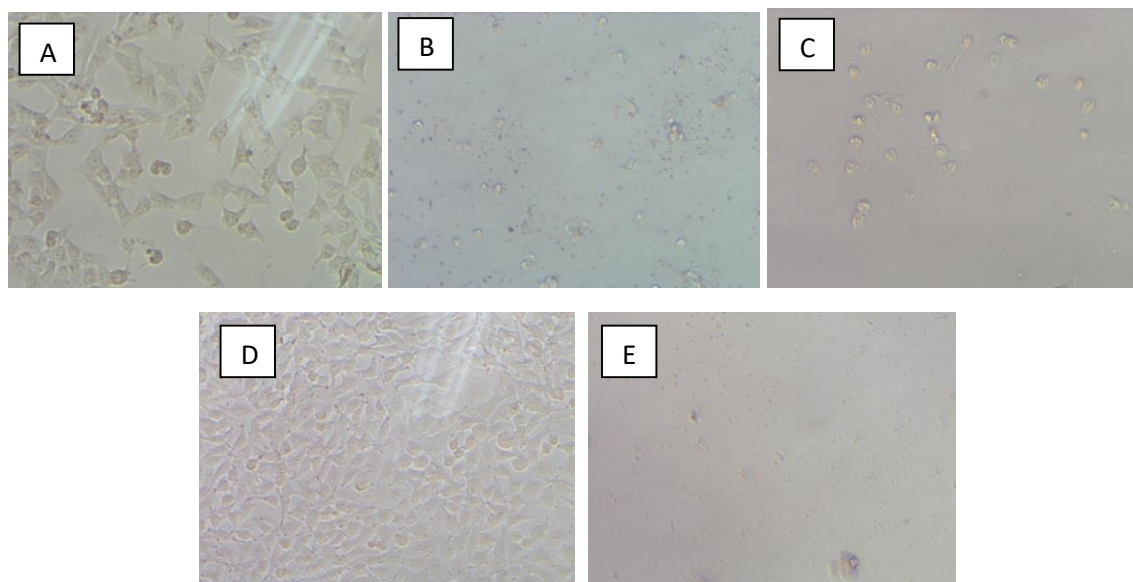
\* $>250$  representa los valores de CI50 superiores a 250 µg/mL.

**Tabla 9.** Índice de selectividad a partir de la CI50 de extracto y fracciones de hojas de *A. muricata* sobre la línea celular normal 3T3 y la línea celular tumoral B16.

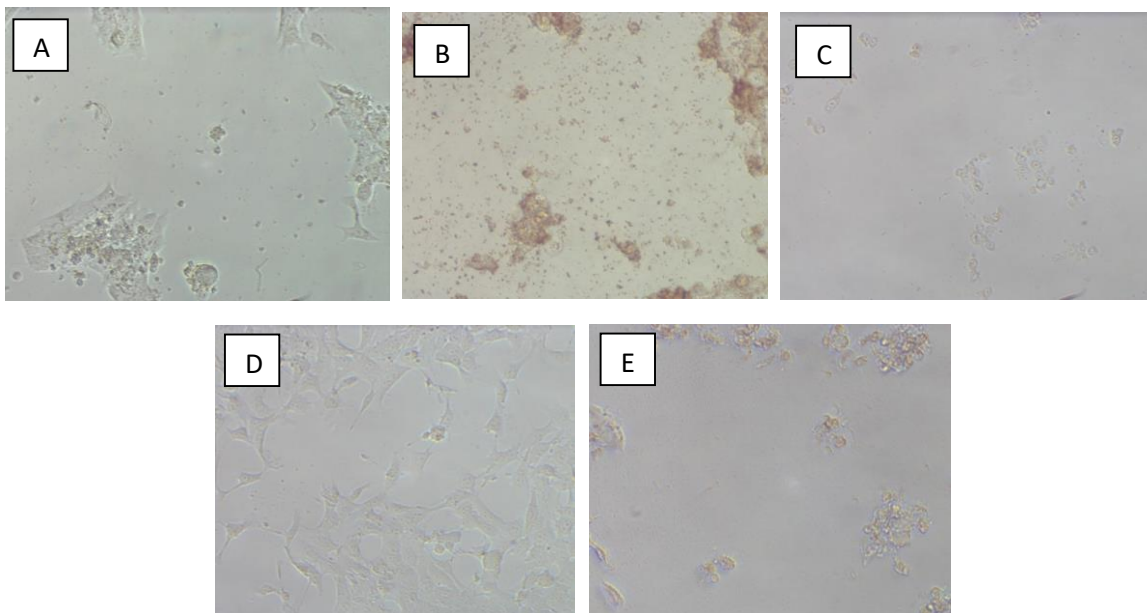
	Fracciones	Líneas celulares		Índice de selectividad
		B16	3T3	
CI50 µg/mL	Extracto total	47.54	30.5	0.64
	Hexano	>250	169	<1
	DCM1	195.4	>250	>1
	DCM2	>250*	>250	>1
	AcOEt	49.5	15.27	0.31
	Hidroalcohólico	16.32	17.64	1.08

\*>250 representa los valores de CI50 superiores a 250 µg/mL.

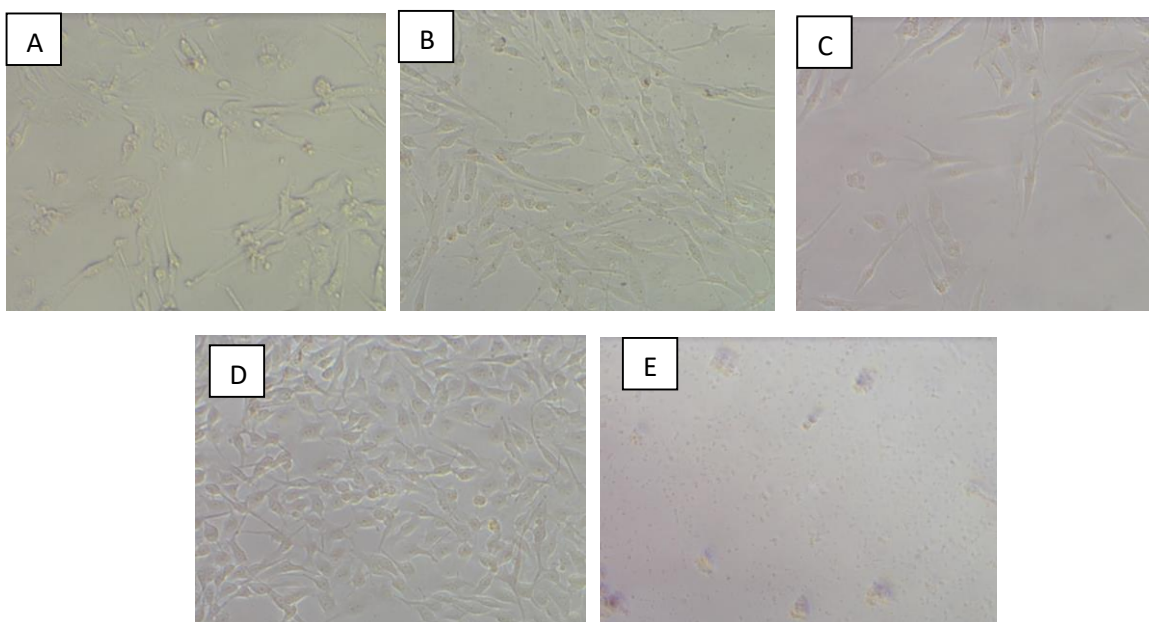
Adicionalmente se analizó el efecto en la morfología como se observa en las figuras 20, 21 y 22 de las líneas celulares tumorales tratadas con el extracto total y las fracciones que presentaron mayor actividad como lo son la de acetato de etilo y el hidroalcohólico a una concentración de 125 µg/mL se observan cambios que comúnmente son observados en células tumorales que están en proceso de muerte, cambios tales como aparición de vesículas intracelulares, alteraciones en la membrana celular, restos celulares y en algunas se observan células destruidas en comparación con el control negativo (etanol) donde no se altera su morfología.



**Figura 20.** Cambios morfológicos del extracto total de *A. muricata* y las fracciones de acetato de etilo e hidroalcohólico sobre las líneas celulares tumorales MCF-7. Las células MCF-7 fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto y las fracciones por 48 horas. Se evaluaron los cambios por observación directa al microscopio utilizando objetivo 20X. (A) Extracto total a 125 µg/mL, (B) AcOEt a 125 µg/mL, (C) Hidroalcohólico a 125 µg/mL (D) Control negativo (etanol) a 125 µg/mL, (E) Control positivo (DOXO) a 1.25µM.



**Figura 21. Cambios morfológicos del extracto total de *A. muricata* y las fracciones de acetato de etilo e hidroalcohólico sobre las líneas celulares tumorales 4T1.** Las células 4T1 fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto y las fracciones por 48 horas. Se evaluaron los cambios por observación directa al microscopio utilizando objetivo 20X. (A) Extracto total a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (B) AcOEt a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (C) Hidroalcohólico a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (D) Control negativo (etanol) a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (E) Control positivo (DOXO) a 1.25 $\mu\text{M}$ .



**Figura 22. Cambios morfológicos del extracto total de *A. muricata* y las fracciones de acetato de etilo e hidroalcohólico sobre las líneas celulares tumorales B16.** Las células B16 fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto y las fracciones por 48 horas. Se evaluaron los cambios por observación directa al microscopio utilizando objetivo 20X. (A) Extracto total a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (B) AcOEt a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (C) Hidroalcohólico a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (D) Control negativo (etanol) a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (E) Control positivo (DOXO) a 1.25 $\mu\text{M}$ .



### 7.3. Caracterización fitoquímica de extractos

#### 7.3.1. Marcha fitoquímica preliminar

Después de realizar las metodologías descritas anteriormente para cada uno de los compuestos buscados, se obtuvo los resultados de cada una de las pruebas (tabla 10), demostrando principalmente la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides en el extracto etanólico analizado.

**Tabla 10.** Resultados obtenidos de la realización de la marcha fitoquímica preliminar al extracto etanólico de hojas de *A. muricata*.

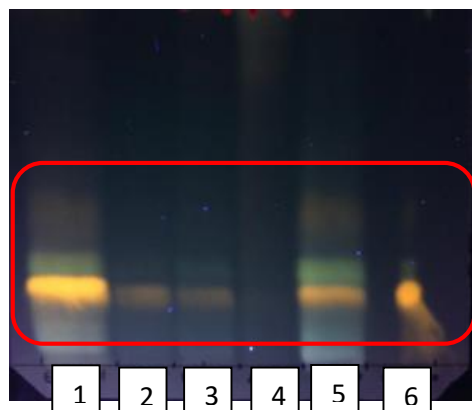
<b>METABOLITO SECUNDARIO</b>	<b>PRUEBA QUIMICA</b>	<b>Resultados para <i>Annona muricata</i></b>
<b>CAROTENOIDES</b>	<b>Salkowski</b>	-
<b>ESTEROIDES</b>	<b>Liebermann-Burchard</b>	-
	<b>Vainillina-Ácido orto-fosfórico</b>	-
<b>Flavonoides</b>	<b>Shinoda</b>	+
	<b>Rosenhein</b>	+
	<b>Leucoantocianidinas</b>	+
<b>TANINOS</b>	<b>Cloruro férrico</b>	++
	<b>Gelatina-sal</b>	-
<b>SAPONINAS</b>	<b>Espuma</b>	+
	<b>Rosenthaler</b>	-
<b>CARDIOTONICOS</b>	<b>Baljet</b>	-
	<b>Molish</b>	-
<b>CUMARINAS</b>	<b>Erlich</b>	+

<b>ALCALOIDES</b>	<b>Dragendorff</b>	<b>+++</b>
	<b>Valsler</b>	<b>+++</b>
	<b>Mayer</b>	<b>+++</b>
	<b>Wagner</b>	<b>++</b>

Como se observa en los resultados obtenidos por la marcha fitoquímica preliminar (tabla 10), el extracto etanólico de hojas de *A. muricata* presenta flavonoides, taninos y alcaloides, lo cual es coherente con lo encontrado en estudios anteriores donde se ha demostrado gran cantidad de estos metabolitos presentes en extractos de la misma planta. [22,23].

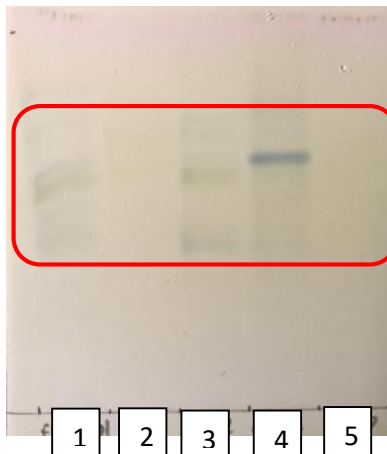
### 7.3.2. Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se realizó la cromatografía en capa delgada para determinar únicamente flavonoides, taninos y alcaloides debido a que fueron los resultados obtenidos anteriormente en la marcha fitoquímica preliminar. Para la identificación de flavonoides en el extracto y fracciones, las placas fueron reveladas con reactivo natural y observado bajo luz UV a 365nm. Se observaron diferentes colores, los cuales dependen del tipo de núcleo del flavonoide. En la figura 23 se observan bandas de colores amarillos y verdes los cuales corresponden a flavonoides. Adicionalmente, debido a polaridad de la fase móvil, y en comparación con el estándar de rutina, se puede inferir que estos flavonoides sean glicosilados [49]. El acúmulo de estos compuestos se observó en el extracto total y en las fracciones DCM 1, DCM 2 e hidroalcohólica. Estos resultados concuerdan con lo descrito en estudios anteriores donde se ha encontrado la presencia de flavonoides en el extracto etanólico de hojas de *A. muricata* [10], adicionalmente se observa la presencia de rutina que se usó como control y esto según con lo descrito en otros estudios es coherente, debido a que se han reportado presencia de flavonoides como quercetina, quenferol y rutina [50].



**Figura 23.** Perfil cromatográfico para flavonoides glicosilados de extracto y fracciones obtenidas de hojas de *A. muricata* en sistema de solventes, Acetato de etilo- ácido acético- agua (100:11:26) revelado con reactivo natural/UV 365nm. Los puntos de siembra corresponden a: (1) Extracto total, (2) DCM 1, (3) DCM 2, (4) AcOEt, (5) hidroalcohólico (6) rutina

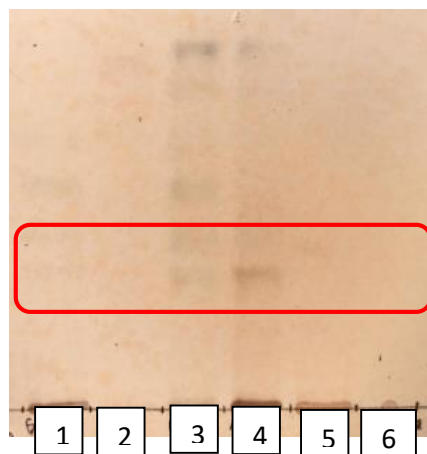
Para la identificación de taninos se utilizó cloruro férrico el cual revela por medio de calor color azul para taninos hidrolizables y verde para taninos condensados [51] como se observa en la imagen 24, el extracto total y las fracciones DCM 2 y AcOEt presentan coloraciones características para taninos tanto hidrolizables como condensados para el extracto y dichas fracciones.



**Figura 24.** Perfil cromatográfico para taninos de extracto y fracciones obtenidas de hojas de *A. muricata* en sistema de solventes, Acetato de etilo- ácido acético- agua (100:20:30) revelado con cloruro férrico. Los puntos de siembra corresponden a: (1) Extracto total, (2) DCM 1, (3) DCM 2, (4) AcOEt, (5) hidroalcohólico.

Para la identificación de alcaloides se utilizó el reactivo Dragendorff el cual revela inmediatamente colores entre café y naranja [52] como se observa en la imagen 25, el extracto total y las fracciones DCM 2 y AcOEt presentan coloraciones características para alcaloides. En luz UV a 254nm (imagen 26) los alcaloides causan fluorescencia que con el tiempo disminuye su intensidad. Con respecto al

patrón, la cafeína solo se observa a 254nm y comparándolo con el extracto y fracciones se observa que la fracción de AcOEt presenta este metabolito, además se ha reportado la presencia de alcaloides como: Annomuricina, reticulina y coclourina [50] los cuales podrían corresponder a las demás bandas observadas.



**Figura 25.** Perfil cromatográfico para alcaloides de extracto y fracciones obtenidas de hojas de *A. muricata* en sistema de solventes, Tolueno- acetato de etilo- dietilamina (70:20:10) revelado con reactivo Dragendorff. Los puntos de siembra corresponden a: (1) Extracto total, (2) DCM 1, (3) DCM 2, (4) AcOEt, (5) hidroalcohólico, (6) cafeína.



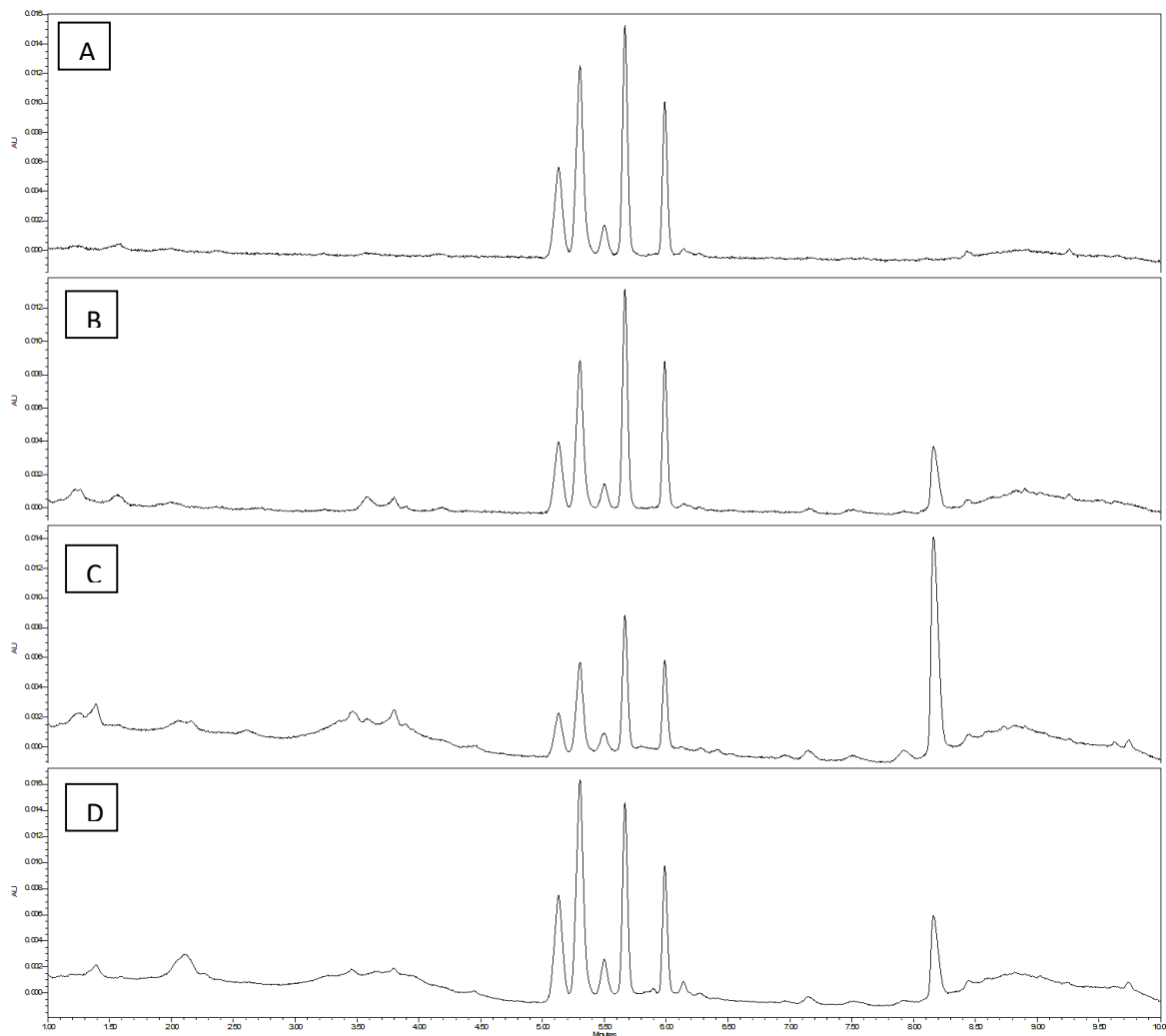
**Figura 26.** Perfil cromatográfico para alcaloides de extracto y fracciones obtenidas de hojas de *A. muricata* en sistema de solventes, Tolueno- acetato de etilo- dietilamina (70:20:10) visto a 254nm. Los puntos de siembra corresponden a: (1) Extracto total, (2) DCM 1, (3) DCM 2, (4) AcOEt, (5) hidroalcohólico, (6) cafeína.

Con respecto a los resultados encontrados en las cromatografías en capa delgada, se puede inferir que la actividad citotóxica encontrada en los MTT puede deberse a la presencia de estos metabolitos (flavonoides, alcaloides y taninos). Los flavonoides fueron encontrados en el extracto total y las fracciones DCM 1, DCM 2 y el hidroalcohólico el cual fue el que presentó una mayor actividad citotóxica y que según el índice de selectividad resulta ser más tóxico en las líneas tumorales 4T1 y B16 y menos tóxico en las células normales 3T3, el extracto total también presentó citotoxicidad frente a las células tumorales, sin embargo su toxicidad fue mayor en

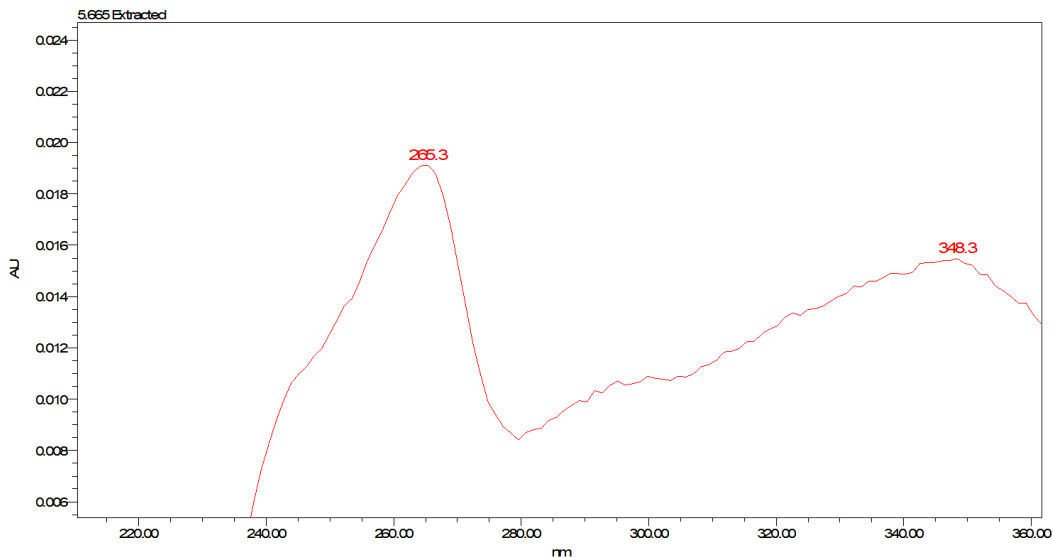
las células normales, por otro lado se observó la presencia de taninos y alcaloides en la fracción AcOEt lo cual se relaciona con estudios previos donde se demostró el contenido de alcaloides en la fracción de acetato de etilo[53] lo que también podría corresponder a la citotoxicidad presentada en las líneas celulares. La citotoxicidad elevada que presenta el extracto total y las fracciones frente a los fibroblastos podría deberse también a la presencia de acetogeninas, las cuales se ha demostrado que inducen con éxito la muerte en células tumorales pero con efectos secundarios debilitantes como neurotoxicidad [10] lo cual nos indica su alto nivel de toxicidad en las células.

### **7.3.3. Cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC)**

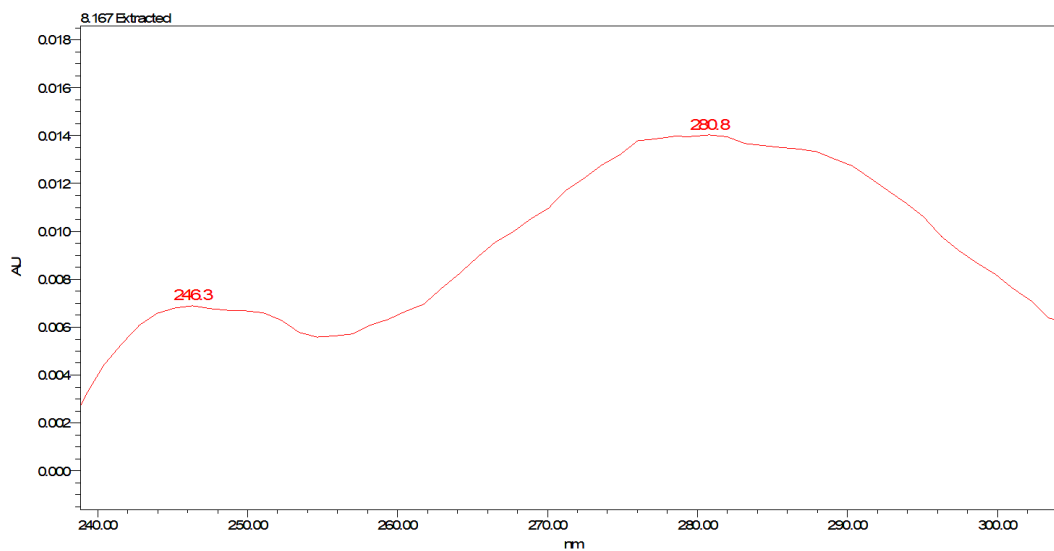
Se realizó la cromatografía líquida de ultra eficiencia para determinar la presencia de flavonoides en los extractos que presentaron mayor actividad citotóxica los cuales fueron el extracto total y las fracciones acetato de etilo e hidroalcohólico, en los resultados no se muestra el cromatograma de acetato de etilo debido a que no se observaron resultados significativos en este, por otro lado en la figura 27 se observa el perfil cromatográfico del extracto total donde se encuentran las bandas comprendidas entre los minutos 5 y 6.1 cuyo espectro UV observado en la figura 28 es característico de flavonoides tipo flavonol donde la primera banda se ha observado que se encuentra entre 250 y 300nm y el segundo entre 350 y 400nm [54]. Adicionalmente, se observa la presencia de una banda entre los minutos 8.1 y 8.3 hacia la región apolar (parte derecha) del cromatograma en las longitudes de onda 320, 280 y 254nm (figura 27) la cual al ser analizada por el espectro UV (figura 29) se determina que es diferente al encontrado en las demás bandas que corresponden a flavonoides y se podría inferir que esta correspondería a un tanino.



**Figura 27. Perfil cromatográfico de UPLC del extracto etanólico de hojas de *A. muricata* en acetonitrilo (Solvente A) y ácido fórmico al 0.1% (Solvente B) monitoreado en un rango de 200 a 400nm. Los cromatogramas corresponden a las longitudes de onda: (A) 340nm, (B) 320nm, (C) 280nm, (D) 254nm**

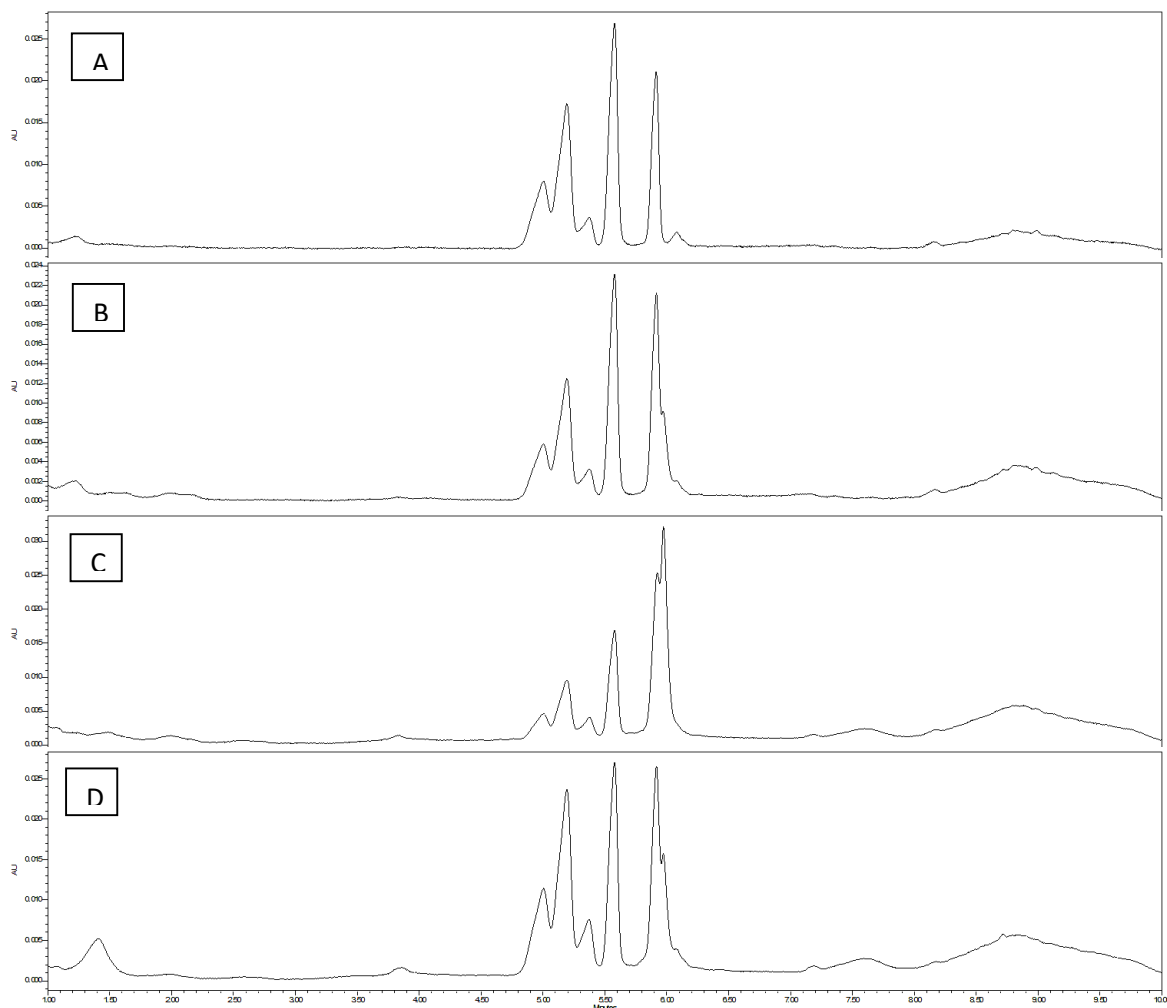


**Figura 28. Espectro de absorción ultravioleta-visible de un tipo de flavonoide encontrado en el perfil cromatográfico del extracto etanólico de hojas de *A. muricata*.**



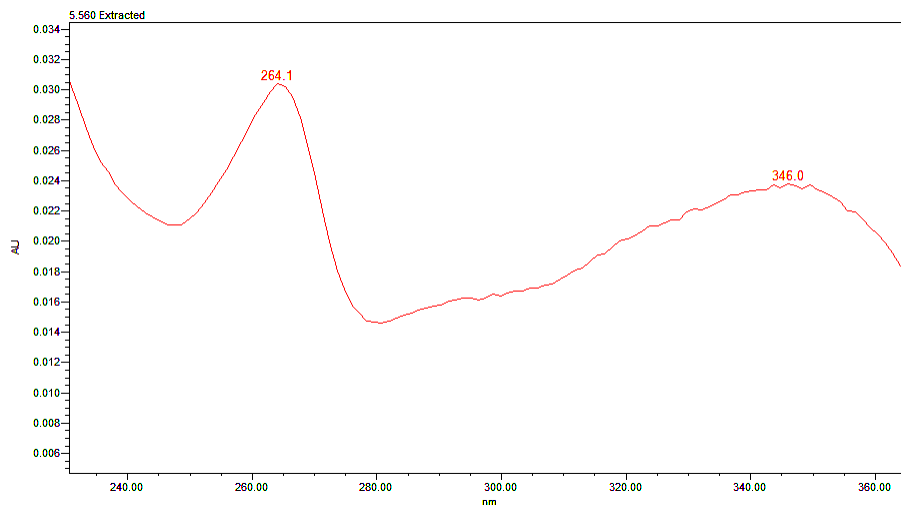
**Figura 29 Espectro de absorción ultravioleta-visible de un posible tanino encontrado en el perfil cromatográfico del extracto etanólico de hojas de *A. muricata* a las longitudes de onda 340, 280 y 254nm**

En la figura 30 se observa el cromatograma para la identificación de flavonoides presentes en la fracción hidroalcohólica donde se encuentran bandas comprendidas entre los minutos 4.8 y 6.3 a diferentes longitudes de onda; 340, 320, 280 y 254nm, los cuales al observar el espectro de absorción (figura 31) demuestran un perfil característico para flavonoides de tipo flavonol donde la primera banda observada se encuentra entre 250 y 300nm y el segundo entre 350 y 400nm [54].



**Figura 30.** Perfil cromatográfico de UPLC de la fracción hidroalcohólica del extracto de hojas de *A. muricata* en acetonitrilo (Solvente A) y ácido fórmico al 0.1% (Solvente B) monitoreado en un rango de 200 a 400nm. Los cromatogramas corresponden a las longitudes de onda: (A) 340nm, (B) 320nm, (C) 280nm, (D) 254nm.





**Figura 31. Espectro de absorción ultravioleta-visible de un tipo de flavonoide encontrado en el perfil cromatográfico de la fracción hidroalcohólica de hojas de *A. muricata*.**

Con respecto a los resultados observados en los cromatogramas y sus respectivos espectros de absorción se puede determinar que los metabolitos presentes en el extracto total y la fracción hidroalcohólica corresponden a flavonoides y podrían indicar a flavonoides de tipo flavonol debido a los espectros de absorción que presentan, además se encontró la presencia de un posible tanino en el extracto total el cual es acorde a lo encontrado en la marcha fitoquímica, de acuerdo a esto se puede inferir que la presencia de flavonoides en el extracto total y en la fracción hidroalcohólica se da al ser las fracciones más polares, de acuerdo a estudios previos se observa que habría una mayor actividad antioxidante en el extracto realizado con etanol que en uno con metanol debido a que los compuestos extraídos en extracto etanólico son ligeramente más polares que los extraídos con metanol [55].

En relación con los resultados obtenidos por la cromatografía en capa delgada se corrobora la presencia de flavonoides en el extracto total y en la fracción hidroalcohólica, además también se observó el escaso o nulo contenido de flavonoides en la fracción de acetato de etilo (AcOEt) los cuales no se observaron en ninguna de las dos cromatografías realizadas (CCD y UPLC). Al relacionar todos los resultados obtenidos en este estudio se puede decir que la citotoxicidad presentada tanto para el extracto total como para las fracciones de acetato de etilo y la hidroalcohólica se debe a la presencia de los metabolitos secundarios encontrados, los cuales corresponden a taninos, alcaloides y flavonoides para el extracto total, se encontró que la fracción de acetato de etilo esta enriquecida con taninos y alcaloides y la fracción hidroalcohólica se encuentra enriquecida con flavonoides, a estos últimos se le podría atribuir la actividad citotóxica presente la cual dio mayor para las líneas celulares tumorales que para las no tumorales o fibroblastos 3T3.

## 8. Conclusiones

El extracto etanólico obtenido de hojas de *A. muricata* y especialmente sus fracciones de mediana-alta polaridad como acetato de etilo y el hidroalcohólico fueron las que presentaron actividad citotóxica frente a las células tumorales tratadas con respecto a las demás fracciones. Adicionalmente se observó que estas fracciones poseen un mayor contenido de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y alcaloides, por lo cual sugiere que estos compuestos puedan estar relacionados con la actividad biológica encontrada. Sin embargo, valores del índice de selectividad indica que la fracción hidroalcohólica es más citotóxica para líneas celulares tumorales (4T1 y B16) en comparación a la fracción acetato de etilo y el extracto total que resultan ser citotóxicas para los fibroblastos 3T3 y para las células tumorales.

## 9. Perspectivas

Teniendo en cuenta la actividad citotóxica elevada que presenta el extracto etanólico de hojas de *A. muricata* y sus fracciones a las células normales o fibroblastos 3T3 se recomienda realizar los ensayos en otras líneas celulares normales para comparar la actividad que se presenta.

Es importante continuar con los ensayos que permitan definir cuál es el tipo de muerte celular en las diferentes líneas celulares e incluso estudiar otras líneas celulares que se han encontrado se presenta actividad favorable.

Por otro lado se debe continuar con la caracterización fitoquímica del extracto y sus fracciones para encontrar otros metabolitos presentes por medio de la cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Adicionalmente realizar el fraccionamiento de la fracción hidroalcohólica y evaluar su actividad biológica y su composición fitoquímica.

## 10. Referencias

- [1] Bravo L, García L, Carrascal E, Rubiano J. Burden of breast cancer in Cali, Colombia. *Salud pública de México*. 2014; 56(5); 448-456.
- [2] Liu N, Yang HL, Wang P, Lu YC, Yang YJ, Wang L, et al. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *J Ethnopharmacol*. 2016; 189:210–7.
- [3] Cragg, G, Newman, D. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*. 2013; 1830(6); 3670-3695.
- [4] OMS | Datos y cifras sobre el cáncer [Internet]. Who.int. 2018 [citado 9 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- [5] Instituto nacional de cáncer. Estadísticas del cáncer [Internet]. 2018 [citado 9 diciembre 2018] Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>
- [6] Gamboa Ó, Buitrago LA, Lozano T, Dieleman S, Gamboa C, León Gúzman É, et al. Costos directos del cáncer de mama en Colombia. *Rev Colomb Cancerol*. 2016; 20(2):52–60.
- [7] Efferth T, Saeed M, Mirghani E, Alim A, Yassin Z, Saeed E, Khalid H, Daak S. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. *Oncotarget*. 2017; 8(30): 50284–50304.
- [8] Vanneman M, Dranoff G; Nature Publishing Group. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(4):237–51.
- [9] R. IAF, L. ML, Serrano H, Orozco S, Lozoya X. Aplicación de la biología molecular en el control de calidad de los fitomedicamentos. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2007; 38(1):49–57.
- [10] Yang C, Gundala S, Mukkavilli R, Vangala S, Reid M, Aneja R. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola* (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cáncer. *Carcinogenesis*. 2015; 6(36): 656-665
- [11] OncoLink [internet]. 2019 [citado el día 12 de febrero de 2019] Disponible en: <https://es.oncolink.org/tratamiento-del-cancer/oncolink-rx/paclitaxel-taxol-r>
- [12] Ardila D. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos etanólicos de las plantas *Annona muricata*, *Annona cherimola* y *Physalis peruviana* en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de seno [tesis de pregrado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 2014; 62p.

- [13] Instituto nacional de cáncer. ¿Qué es el cáncer? [Internet].2018 [citado 9 diciembre 2018] Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- [14] Rojo-León V, Aguilar-Cázares D, Prado-García H, Carlos-Reyes A, López-González JS. Participation of damage-associated molecular patterns in conventional treatment of cancer | Participación de los patrones moleculares asociados al daño en el tratamiento convencional del cáncer. *Rev Investig Clin.* 2012; 64(3):284–93.
- [15] Ministerio de Salud [Internet]. Bogotá, 2018. Cáncer; [citado 9 diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/Prevenciondel-cancer.asp>
- [16] Arroyo J, Prashad M, Vásquez 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. *Medicina experimental y salud pública.* 2005; 22: 4
- [17] Bradie N, Schauss, A. Soursop (*Annona muricata* L.) uses: composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. *Bioactive Foods in promoting Health: fruits and vegetables.* 2009; 621-643
- [18] Gavamukulya Y, Abou-Elella F, Wamunyokoli F, AEI-Shemy H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and wáter leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2014; 7(1): S355-S363
- [19] Morón F, Morón S, Nodarse R. Valoración de la evidencia científica para recomendar *Annona muricata* L. (guanábana= como tratamiento o prevención del cáncer. *Revista cubana de plantas medicinales.* 2012: 15(3).
- [20] Garcia K. Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. [Tesis de posgrado]. México. Escuela nacional de ciencias biológicas. 2009; 117p
- [21] Coria A, Montalvo E, Yahia E, Obledo E. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry.* 2018; 11(5): 662-691
- [22] Jiménez C, Martínez M, C. S. Análisis fitoquímico de una composición etnofarmacológica a base de seis extractos de plantas para el tratamiento de la hipertensión. *Bioetnia.* 2009: 6(1); 53.
- [23] 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. Revista peruana de medicina experimental y salud pública. 2005; 22(4); 247-253

[24] Komansilan A, Abadi A, Yanuwadi B, Kaligis D. Isolation and identification of biolarvicide from soursop (*Annona muricata* Linn) seeds to mosquito (*Aedes aegypti*) larvae. Int J Eng Technol. 2012: 12(03); 28-32.

[25] Sun S, Liu J, K. H, Sun X, Zhou K. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2014: 24(12); 2773-2776.

[26] Cook N, Samman S. Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. The journal of Nutritional Biochemistry. 1996: 7(2): 66-76

[27] Arango G. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia. Medellín. Colombia: 2008

[28] Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortes D. Acetogenins from annonaceae. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe Progress in the Chemistry of Organic Natural Products: 1997; 70: 81-288

[29] Bermejo A, Figadere B, Zafra-Polo M, Barrachina I, Estornell E, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. Nat Prod Rep. 2005; 22(2):269-303

[30] Roduan M, Hamid R, Cheah Y, Mohtarrudin N. Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* in vitro. Herbal Medicine. 2018; 15

[31] Arora M. Cell cultura media: a review. Mater methods. 2013; 3: 175.

[32] Morgan E, Varro R, S. H, Ember J, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. Clinical Immunology. 2004: 110(3); 252-266.

[33] Brescia P, Banks P. BioTek. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. 2009

[34] ATCC. Credible leads to incredible. MCF7 (ATCC®HTB-22™) [internet] 2019 [citado 25 abril 2019] Disponible en: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#characteristics>

[35] Li Y, Zhang Y, Zhang X.  $\beta$ -elemene decreases cell invasion by upregulating E-cadherin expression in MCF-7 human breast cancer cells. Oncology Reports. 2013; 30(2): 745-750

- [36] ATCC. Credible leads to incredible. 4T1 (ATCC®CRL-2539™) [internet] 2019 [citado 25 abril 2019] Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2539.aspx#generalinformation>
- [37] Addexbio. 4T1 Cell [internet] 2019 [citado 25 abril 2019] Disponible en: <http://www.addexbio.com/productdetail?pid=13>
- [38] Fildler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* 1975; 35(1): 218-224
- [39] ATCC. Credible leads to incredible. B16-F10 (ATCC®CRL-6475™) [internet] 2019 [citado 25 abril 2019] Disponible en: <https://lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx>
- [40] Kerfast Reagents for the Greater Good. 3T3-J2 Cell Line. [Internet] 2019 [citado 25 abril 2019] Disponible en: <https://www.kerfast.com/product/2285/3t3-j2-cell-line>
- [41] Rojas L, Uribe Y, Martinez N, Niño D. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana krukoff*). *Revista Colombia forestal.* 2009; 12; 161-170
- [42] Cseke L, Kirakosyan A, Kaufman P, Warber S, Duke J, Brielmann H. *Natural products from plants.* 2nd Edition. Taylor & Francis Group; 2006
- [43] Gratz S, Stalcup A. Inclusion complexation: liquid chromatography. *Encyclopedia of separation science.* 2000.
- [44] Moghadamtousi S, Kadir H, Paydar M, Rouhollahi E, Karimian H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in a549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF-κB. *BMC Complement Altern Med.* 2014; (14);299
- [45] Pombo L. Valoración de la actividad antitumoral de extractos y fracciones obtenidas de *Caesalpinia spinosa* Molina Kuntze sobre diferentes líneas celulares tumorales. [Tesis de Magister]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 2008.
- [46] Rahman A. *Advances in Natural Product Chemistry: Proceedings of the Fifth International Symposium and Pakistan-US Binational Workshop on Natural Product Chemistry Vol. 4-9.* H. a. publishers. 1992
- [47] Quispe A, Zavala D, Rojas J, Posso M, Vaisberg A. Efecto citotóxico selectivo *in vitro* de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2006; 23(4); 265-269
- [48] Rojas L. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos y fracciones de pulpa y semillas de *Annona muricata* sobre las líneas celulares tumorales y normales [tesis de pregrado]. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 2015; 76p

- [49] Wagner S. Plant Drug Analysis a thin layer chromatography atlas. Vol. 2. Springer; 1996: 196-197
- [50] Rinaldi, M. V. N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. Universidade de São Paulo. 2007
- [51] Robles M, Aguilar A, Gutierrez M, Rodriguez F, Morales J, Guerrero P, Madrigal J, Del Toro C. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). Biotecnia. 2016: 18 (3)
- [52] Wagner S. Plant Drug Analysis a thin layer chromatography atlas. Vol. 2. Springer; 1996: 6-7
- [53] Kingsley C, Pailinus N. Proximate composition, phytochemical analysis, and *in vitro* antioxidant potentials of extracts of *Annona muricata* (Soursop). Food science & Nutrition. 2017: 5(5); 1029-1036
- [54] Markham K. Techniques of Flavonoids Identification. Londres: Academic Press, 1982.
- [55] Vit P, Santiago B, Perez E. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. Interciencia. 2014: 39(5); 350-353