

DETERMINACIÓN DE ACETOGENINAS PRESENTES EN SEMILLAS DE *Annona muricata* (GUANÁBANA) MEDIANTE CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

MANUELA ALEJANDRA PAREDES HINCAPIÉ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PASTO
2018

DETERMINACIÓN DE ACETOGENINAS PRESENTES EN SEMILLAS DE *Annona muricata* (GUANÁBANA) MEDIANTE CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

MANUELA ALEJANDRA PAREDES HINCAPIÉ

Trabajo de Grado presentado al Comité Curricular y de Investigación al Departamento de Química como requisito parcial para optar por el título de Químico

Director:
David Arturo Perdomo (Químico)

Co-director:
Juan Pablo Jiménez (Químico)

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PASTO
2018

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva del autor”

Artículo 1° del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

DAVID ARTURO PERDOMO
Director

JUAN PABLO JIMÉNEZ
Co-director

JUAN CAMILO VARGAS
Jurado

NATALIA MOSQUERA
Jurado

San Juan de Pasto, Junio 7 de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Cromatografía, principalmente a los químicos David Arturo y Juan Pablo Jiménez por sus enseñanzas, paciencia y por su vital colaboración en la ejecución de la investigación.

Al grupo de Investigación Estudio de Sistemas Contaminantes (GIESIC) y a su director Ph.D Juan José Lozada por la acogida en su grupo de investigación.

A la Vicerrectoría de Posgrados e Investigaciones, VIPRI, por la financiación de esta investigación.

A los Doctores Elena Ibañez Ezequiel y Lidia Montero del laboratorio FOODOMICS del instituto de investigación en ciencias de la alimentación CIAL CSIC de la Universidad Autónoma de Madrid, por abrir las puertas a esta investigación al proporcionar su apreciado apoyo.

A la sección de Laboratorios especializados UDENAR, especialmente al Laboratorio de Cromatografía.

A la universidad de Nariño. El personal docente del Departamento de Química y todas las personas que han aportado en mi formación profesional.

A mi Padre, mi Madre, mis hermanas quienes me han educado para ser una persona íntegra, y me han brindado su apoyo y dedicación en cada momento de mi vida.

A mis amigos por su compañía, y a Nicolás Herrera por su constante apoyo y colaboración en cada momento importante de la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres Jorge Luis Paredes y Liliana Hincapié por su amor incondicional y por todo su apoyo a lo largo de mi vida. A mi hermana Carolina por su gran cariño, por todos los momentos compartidos y sus enseñanzas. A mis amigos, especialmente a Sebastián, Daniel y Diana por su amistad todos estos años, y a Nicolás por brindarme inspiración.

RESUMEN

Las acetogeninas (AGEs) son metabolitos secundarios provenientes de las plantas de la familia Annonaceae, caracterizados por poseer actividad biológica. Actualmente los estudios se enfocan al análisis de estos compuestos en las hojas de Annonaceas, debido a sus propiedades antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales. Entre los cultivos de plantas anonáceas más extensos de Colombia se encuentra la *Annona muricata* (Guanábana) constituyéndose como parte de la cadena productiva y originando toneladas de desechos anuales como semillas y cáscaras. Estudios fitoquímicos han demostrado la presencia de acetogeninas en las semillas de la guanábana, por lo cual la extracción y posterior aprovechamiento de estos compuestos en este residuo podría constituirse como alternativa eficiente y ambientalmente menos costosa para diversos tratamientos terapéuticos.

La presente investigación se basó en la optimización de la extracción de acetogeninas en semillas de *Annona muricata* provenientes del Departamento de Caldas. La optimización se realizó mediante el desarrollo de un diseño experimental de superficie de respuesta con 2 bloques y 3 niveles, evaluando los factores tiempo de extracción, relación muestra-solvente, y concentración de etanol, obteniéndose factores óptimos de 8h, 1,5 g/100 mL de solvente, y 90% de concentración de etanol. La identificación y cuantificación de acetogeninas se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), identificando tentativamente 5 acetogeninas: Annonacina, Esquamostatina-A, Bullatacina, Isodesacetilivaricina y Desacetilivaricina. Con técnicas cromatográficas complementarias como GC-MS y de LC-MS/MS se identificó: Muricina S, Annonacinona y Esquamocina. La cuantificación del extracto por HPLC, determinó un promedio de 204,15 mg/g de acetogeninas totales por gramo de muestra.

Finalmente, se compararon extractos etanólicos de semillas del Departamento de Caldas y del Departamento de Nariño, siendo estos últimos los que presentaron la

mayor concentración de acetogeninas. Adicionalmente se realizó un análisis comparativo de extractos etanólicos de semillas, cascara y hojas de *Annona muricata* de la región de Caldas, extraídos por los métodos soxhlet y maceración química.

Como ensayo de bioactividad, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos, por medio de la técnica de capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC), encontrándose capacidades antioxidantes cercanas a $2,211 \pm 0,02$ mM de Trolox para extractos de semillas y de 2,612 mM de Trolox para extractos de cáscara de *Annona muricata*.

Palabras Clave: Acetogeninas, *Annona muricata*, Extracción Soxhlet, Técnicas Cromatográficas, Antioxidantes, TEAC. Método de superficie de respuesta.

ABSTRACT

Acetogenins are secondary metabolites from the Annonaceae family, characterized by having biological activities. Currently, studies have been focused on the analysis of these compounds in Annonaceae leaves, due to their antifungal, antioxidant, anti-inflammatory and antitumor properties. *Annona muricata* (Guanábana) is one of the most extensive Annonaceous plant crops in Colombia, constituting an important part of the production chain and originating tons of annual waste, among which are the seeds and peels of this fruit. Phytochemical studies have shown the presence of these compounds in these parts of the plant as seeds, so the extraction and subsequent use of these compounds in this waste could be an efficient and environmentally less expensive alternative for various therapeutic treatments.

The present investigation was based on the optimization of the extraction of Acetogenins in *Annona muricata* seeds from the Department of Caldas. The optimization was carried out through the development of an experimental response surface design with 2 blocks and 3 levels, evaluating the factors of extraction time, sample-solvent ratio, and ethanol concentration, obtaining optimal factors of 8h, 1,5 g / 100 mL of solvent, and 90% ethanol concentration. The identification and quantification of acetogenins was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). 5 Acetogenins corresponding to Annonacin, Squamostatin-A, Bullatacin, Isodesacetyluvaricin and Desacetyluvaricin were tentatively identified. Additionally, complementary chromatographic techniques were performed for the identification of AGEs, such as GC-MS and LC-MS / MS allowing the identification of: Muricin S, Annonacinone and Squamocin. The quantification of the seed extract showed an average of 204.15 mg of total acetogenins per gram of sample.

For the analysis of samples, a comparison was made between seed extracts from the Department of Caldas and the Department of Nariño, the latter, having the highest

concentration of acetogenins. In addition, some comparative analyzes of extraction methods between soxhlet and chemical maceration were carried out, for which ethanolic extracts of seeds, peel, and *Annona muricata* leaves were analyzed.

As an assay of bioactivity, the antioxidant capacity of the extracts obtained from the *Annona muricata* seed was evaluated by means of the antioxidant capacity technique equivalent to trolox (TEAC) using the free radical ABTS●+, with antioxidant capacities close to $2,211 \pm 0.02$ mM Trolox for seed and 2,612 mM de Trolox for peels extracts of *Annona muricata*.

Keywords: Acetogenins, *Annona muricata*, Soxhlet Extraction, Chromatographic Techniques, Antioxidants, TEAC. Response Surface Method.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS.....	4
1.1 OBJETIVO GENERAL:	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	4
2. ESTADO DEL ARTE	5
2.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1.1 Familia Annonaceae	5
2.1.2 Generalidades de la <i>Annona Muricata</i>	6
2.1.3 Fitoquímica.....	8
2.1.4 Acetogeninas (AGEs)	8
2.1.4.1 Estructura Química de AGEs	9
2.1.5 Técnicas Utilizadas en la Extracción, Identificación y Evaluación de Capacidad Antioxidante de extractos etanólicos ricos en Acetogeninas.....	12
2.1.5 Diseño Experimental.....	27
2.2 ANTECEDENTES	32
2.2.1 Descubrimiento de AGEs	32
2.2.2 Extracción e Identificación de AGEs	33
2.2.3 Actividad Antioxidante de AGEs.....	37
3. METODOLOGÍA	39
3.1 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA	42
3.1.1 Recolección de la Materia Prima.....	42
3.1.2 Pretratamiento de las Semillas.....	42
3.2 ENSAYOS PRELIMINARES	43

3.2.1 Extracción de Acetogeninas por el Método Soxhlet para Ensayos Preliminares	43
3.2.2 Análisis por HPLC para Ensayos Preliminares	45
3.2.3 Verificación del Contenido y Estabilidad de Acetogeninas en Extractos Etanólicos de Semillas de <i>Annona muricata</i> por HPLC	45
3.2.4. Ensayos de Purificación para el Análisis de AGEs.....	46
3.3 ADECUACIÓN DEL MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE AGEs POR HPLC	48
3.3.1 Diluyente	48
3.3.2 Longitud de Onda.....	49
3.3.3 Longitud de Columna	49
3.3.4 Fase Móvil.....	50
3.3.5 Ideonidad del Método Cromatográfico	50
3.4. VERIFICACIÓN DEL MÉTODO	52
3.4.1. Linealidad.....	52
3.4.2. Sensibilidad.....	52
3.4.3. Precisión y Límites de Confianza	53
3.4.4. Exactitud	54
3.5 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE AGEs EN SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i> POR EL MÉTODO SOXHLET (Diseño Experimental)	55
3.5.1 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).....	55
3.5.2 Diseño Experimental	56
3.6 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACETOGENINAS EN SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i>	60
3.6.1 Identificación de Acetogeninas en Semillas de <i>Annona Muricata</i>	60
3.6.2 Cuantificación de Acetogeninas en Semillas de <i>Annona Muricata</i>	60

3.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS CON TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i>	61
3.7.1 Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) del Extracto Etanólico de <i>Annona Muricata</i>	61
3.7.2 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Acoplada a Espectrometría de Masas Tandem (LC-MS/MS) del Extracto Etanólico de <i>Annona Muricata</i>	63
3.8. ANÁLISIS DE MUESTRAS	64
3.8.1 Análisis de extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i> de las regiones de Caldas y de Nariño	64
3.8.2 Extractos etanólicos de matrices de <i>Annona muricata</i> de la Región de Caldas	65
3.9 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AL TROLOX (TEAC) CON EL RADICAL ABTS●+ (Acido 2,2'-Azino-Bis-3-Etilbenzotiazolin-6- Sulfónico).....	67
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	69
4.1 ENSAYOS PRELIMINARES EN SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i> DE LA REGIÓN DE CALDAS.....	69
4.1.1 Determinación de Acetogeninas	69
4.1.2 Estabilidad de las Acetogeninas en los Extractos Etanólicos de semillas con Respecto al Tiempo	70
4.1.3 Estabilidad de Acetogeninas en la Matriz con Respecto al Tiempo	73
4.1.4 Purificación.....	74
4.1.4.1 Ensayo de Purificación Fraccionamiento Líquido-Líquido.....	74
4.2 ADECUACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISIS DE AGEs POR HPLC.....	78
4.2.1 Diluyente	79
4.2.2 Longitud de Onda.....	79

4.2.2.3 Selectividad Cromatográfica para la Identificación de Acetogeninas con base en Análisis de Estándares	83
4.2.3 Longitud de Columna	89
4.2.4 Composición de Fase Móvil	90
4.2.5 Ideonidad del Método Cromatográfico	90
4.3 VERIFICACIÓN DEL MÉTODO	99
4.3.1 Linealidad.....	99
4.3.2 Sensibilidad.....	100
4.3.3 Precisión y Límites de Confianza	101
4.3.4 Exactitud	103
4.4 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE AGEs EN SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i> POR EL MÉTODO SOXHLET (Diseño Experimental)	104
4.4.1 Elección de Estándares para la Cuantificación total de AGEs en la Optimización del diseño Experimental	104
4.4.2 Diseño Experimental	106
4.4.3 Acetogeninas en semillas de <i>Annona muricata</i> (mg/g de muestra)	109
4.4.4 Número de Acetogeninas Extraídas.....	118
4.4.5 Optimización del Diseño Experimental.....	124
4.4.6 Influencia de los Factores en la Extracción de AGEs en semillas de <i>Annona muricata</i>	127
4.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACETOGENINAS EN EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i>	130
4.5.1 Identificación de Acetogeninas.....	130
4.5.2 Cuantificación de Acetogeninas Totales (mg/g)	133

4.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i>	135
4.6.1 Análisis de Extractos Etanólicos de Semillas de <i>Annona muricata</i> por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)	135
4.6.2 Análisis de extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i> por Cromatografía de Líquida de Alta Eficiencia Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS)	142
4.7 ANÁLISIS DE ACETOGENINAS EN MUESTRAS	146
4.7.1 Comparación de Extractos Etanólicos de Semillas de <i>Annona muricata</i> de los Departamentos de Caldas y de Nariño	146
4.7.2 Contenido de AGEs en Extractos Etanólicos de Matrices de <i>Annona muricata</i> de la región de Caldas.	155
4.7.3 Comparación Entre Extractos Etanólicos de Matrices de <i>Annona muricata</i> del Departamento de Caldas.	160
4.7.4 Número de AGEs en Extractos Etanólicos de Semillas, Hojas Y Cascara de <i>Annona muricata</i>	167
4.8 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>ANNONA MURICATA</i>	168
4.8.1 Curva de Calibración de Trolox	168
4.8.2 Capacidad Antioxidante de Extractos Etanólicos de Semillas y Cáscara de <i>Annona muricata</i>	170
4.8.3 Relación de la Capacidad Antioxidante con el Contenido de Acetogeninas Presentes en los Extractos.	175
CONCLUSIONES	182
RECOMENDACIONES	184
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXOS	195

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de <i>Annona muricata</i> (guanábana).	7
Tabla 2. Gradientes cromatográficos para la separación de acetogeninas en semillas de <i>Annona muricata</i> . Fase móvil A: Agua, Fase móvil B: Acetonitrilo.	51
Tabla 3. Especificaciones del Equipo Cromatográfico HPLC-PDA para Análisis de Acetogeninas de semillas de <i>Annona muricata</i> en el Laboratorio de Cromatografía – Universidad de Nariño.	55
Tabla 4. Factores del diseño experimental en la extracción de Acetogeninas por el método soxhlet.	57
Tabla 5. Diseño experimental para la extracción de acetogeninas presentes en semillas de <i>Annona muricata</i>	58
Tabla 6: Unidades de variables de respuesta del diseño experimental en la extracción de acetogeninas por el método soxhlet.	59
Tabla 7: Especificaciones del Equipo Cromatográfico GC-MS para Análisis de AGEs en extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i> . Laboratorio de Cromatografía – Universidad de Nariño.	61
Tabla 8: Especificaciones del Equipo Cromatográfico LC-MS/MS IT para Análisis de AGEs en extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i> . Laboratorio FOODOMICS –CIAL- Universidad Autónoma de Madrid.	63
Tabla 9. Condiciones de extracción de las muestras de semillas, hojas y cascaras de <i>Annona muricata</i> por Soxhlet y Maceración Química.	66
Tabla 10. Gradiente cromatográfico 1, publicado por Najihah et al. Flujo de 1,0 mL/min.	91
Tabla 11. Gradiente cromatográfico 2, publicado por Flórez et al. Flujo de 1,0 mL/min.	92
Tabla 12. Gradiente cromatográfico 3, Flujo de 1.0 mL/min.	93
Tabla 13. Gradiente cromatográfico 4, Flujo de 1,0 mL/min.	94
Tabla 14 Gradiente cromatográfico 5, Flujo de 1,0 mL/min.	95
Tabla 15. Gradiente cromatográfico 6, Flujo de 0,8 mL/min,	96

Tabla 16. Sensibilidad de Método de Detección y Cuantificación.....	100
Tabla 17. Datos de Repetibilidad del estándar de Annonacina.....	101
Tabla 18. Reproducibilidad del Método.....	102
Tabla 19: Porcentaje de Recuperación con estándar de Limoneno.....	103
Tabla 20. Coeficiente de variación de los estándares de Limoneno y Annonacina.	105
Tabla 21. Concentración y número de acetogeninas extraídas en la optimización de las condiciones de extracción Bloque 1.	107
Tabla 22. Concentración y número de acetogeninas extraídas en la optimización de las condiciones de extracción Bloque 2.	108
Tabla 23. Efectos estimados para concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno.....	109
Tabla 24. Análisis de Varianza para la concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno.....	111
Tabla 25 Coeficiente de regresión para concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno.....	113
Tabla 26. Efectos estimados para concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.	115
Tabla 27. Análisis de Varianza para la concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.	117
Tabla 28. Efectos estimados para número de AGEs extraídas.....	119
Tabla 29. Análisis de Varianza para número de acetogeninas extraídas	121
Tabla 30: Coeficiente de regresión para número de Acetogeninas.	123
Tabla 31: Factores Óptimos de extracción de AGEs (mg/g) con estándar de limoneno.	125
Tabla 32 Factores Óptimos de extracción de AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.	125
Tabla 33: Factores Óptimos de extracción de número de AGEs.	125
Tabla 34: Condiciones óptimas de extracción soxhlet de acetogeninas en semillas de Annona muricata, Experimento 16, tabla 21, y Experimento 32, tabla 22.	126

Tabla 35. Picos cromatográficos correspondientes a Acetogeninas en extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i>	131
Tabla 36. Pico cromatográfico del estándar de Annonacina en extractos de semillas de <i>Annona muricata</i>	132
Tabla 37. Acetogeninas identificadas en extractos de semillas de <i>Annona muricata</i> en análisis comparativo con lo reportado por Najihah et al (2015).	133
Tabla 38: Concentración de acetogeninas mg/g de muestra.	134
Tabla 39. Concentración de Annonacina en extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i>	135
Tabla 40. Compuestos identificados en extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i> por GC-MS.	137
Tabla 41. Compuestos con actividad biológica presentes en extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i>	139
Tabla 42. Fragmentaciones Características de los Compuestos no identificados.	140
Tabla 43. Compuestos identificados en el análisis de extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i> por LC-MS/MS.	143
Tabla 44. Resumen estadístico de comparación entre extractos de semillas de Nariño y Caldas.	147
Tabla 45. Comparación de medias entre extractos de semillas de Nariño y Caldas. ..	148
Tabla 46. Resumen estadístico de comparación de métodos de extracción Soxhlet y Maceración Química para AGEs en semillas de Caldas.	151
Tabla 47. Comparación de medias de métodos de extracción Soxhlet y Maceración Química para AGEs en semillas de Caldas.	152
Tabla 48. Resumen estadístico de concentración de AGEs en extractos etanólicos de cascara obtenidos por el método soxhlet y maceración química.	155
Tabla 49. Resumen estadístico de concentración de AGEs en extractos etanólicos de hojas obtenidos por el método soxhlet y maceración química.	156
Tabla 50. Resumen estadístico, comparación de gradientes cromatográficos para el análisis de extractos etanólicos de Hojas por Soxhlet y Maceración química.	158

Tabla 51. Concentración de AGEs en muestras de semillas, cáscara y hojas, de Annona muricata de la región de Caldas, extraídas por el método soxhlet.	160
Tabla 52 . Concentración de AGEs en muestras de semillas, cascara y hojas, de Annona muricata de la región de Caldas, extraídas por maceración química.....	161
Tabla 53. Resumen estadístico de concentración de AGEs (mg/g) en extractos etanólicos de semillas, cascara y hojas por los métodos soxhlet y maceración.....	162
Tabla 54. Análisis de Varianza para la concentración de AGEs (mg/g) en extractos etanólicos de semillas, cascara y hojas por los métodos soxhlet y maceración química.	163
Tabla 55. Datos de absorbancias para la construcción de la recta de calibración de Trolox.	168
Tabla 56. Resumen estadístico de la capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cascara de Annona muricata.	171
Tabla 57. Verificación de Varianza para capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cáscara.	172
Tabla 58. Análisis de varianza para capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cáscara de Annona muricata.	172
Tabla 59. Pruebas de Múltiple Rangos para capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cascara de Annona muricata.	173
Tabla 60. Capacidad antioxidante de Annonacina en mM de Trolox.	178

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de fruto de <i>Annona muricata</i> (guanábana).....	6
Figura 2. Estructura general de acetogeninas lineales.....	10
Figura 3. Estructura general de epoxiacetogeninas.	11
Figura 4. Estructura general de acetogeninas mono-THF.....	11
Figura 5. Estructura general de acetogeninas bis-THF adyacentes.	12
Figura 6. Funcionamiento Espectrofotómetro de Masas.	21
Figura 7. Estructura del ABTS•+ antes y después de la reacción con el antioxidante..	27
Figura 8. Montaje de extracción Soxhlet.	44
Figura 9. Montaje Rotaevaporacion.....	44
Figura 10. Montaje purificación con cartuchos de sílica.	48
Figura 11. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia, HPLC-PDA.	56
Figura 12. Montaje de extracción Soxhlet para semillas de <i>Annona muricata</i>	59
Figura 13. Cromatógrafo de Gases-Masas Shimadzu GC-MS QP2010.....	62
Figura 14. Montaje Soxhlet: hojas, cáscara y semillas.	66
Figura 15. Montaje maceración química: hojas y cascaras.	67
Figura 16. Análisis de capacidad antioxidante de las muestras por TEAC.....	68
Figura 17. Cromatograma de extractos de semillas de Caldas a condiciones de extracción y cromatográficas postuladas por Najihah et al (2016).	70
Figura 18. Comparación extractos etanólicos frescos (tiempo cero), y extractos de semillas almacenados (5 meses).	71
Figura 19. Cromatograma de Acetogeninas en semillas de <i>Annona muricata</i> almacenadas por 5 meses.	73
Figura 20. Comparación cromatograma de extracto etanólico de semillas con extracto fraccionado Líquido-Líquido.	75
Figura 21. Cromatograma Annonacina a 220 nm.....	83
Figura 22. Espectro UV-Vis Annonacina, máximo de absorbancia 211 nm	84
Figura 23. Cromatograma Ácido Linoleico a 298 nm.....	85

Figura 24. Espectro UV-Vis Ácido Linoleico a 298 nm.	85
Figura 25. Cromatograma Quercetina a 220 nm.	87
Figura 26. Cromatograma Quercetina Acidificada, 220 nm.	88
Figura 27. Comparación Cromatogramas, Gradiente 4 (negro) y Gradiente 6 (azul). .	97
Figura 28. Cromatograma Gradiente 6, Flujo de 0,8 mL/min.....	98
Figura 29. Curva de Calibración de Annonacina.	99
Figura 30. Picos cromatográficos correspondientes a Acetogeninas en extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i>	130
Figura 31. Acetogeninas identificadas en extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i>	132
Figura 32. Cromatograma GC-MS de extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i> de la región de Caldas.....	136
Figura 33. Espectro de masas de Ácido Palmítico.	138
Figura 34. Espectro de masas de Ácido Oleico.....	138
Figura 35. Espectro de masas de Beta-Sitosterol.	138
Figura 36. Espectro de masas de Ácido Linoleico.....	139
Figura 37. Fragmentación de Muricina S (pico 22).....	141
Figura 38. Cromatograma LC-MS/MS de extractos etanólicos de semillas de <i>Annona muricata</i> de la región de Caldas.....	143
Figura 39. Espectro de masas (LC-MS/MS) de Annonacina-Na+.	144
Figura 40. Espectro de masas (LC-MS/MS) de Esquamocina-Na+.....	145
Figura 41. Espectro de masas (LC-MS/MS) de Annonacinona-Na+.	145
Figura 42. Ruta metabólica de Síntesis General de Acetogeninas en las Plantas.	165
Figura 43. Estructura de Annonacina.	180

LISTA DE GRÁFICOS

Grafica 1. Diagrama de Pareto para AGEs (mg/g) estándar de Limoneno.....	110
Grafica 2. Efectos Principales para AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno.	112
Grafica 3. Gráfico de superficie de respuesta para concentración de AGEs.....	114
Grafica 4. Diagrama de Pareto para AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.....	116
Grafica 5. Efectos Principales para AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.	118
Grafica 6. Diagrama de Pareto para número de AGEs extraídas.....	120
Grafica 7. Efectos principales para número de AGEs extraídas.....	122
Grafica 8. Gráfico de superficie de respuesta para Número de AGEs (rendimiento).	124
Grafica 9. Gráfico de caja y bigotes para la comparación entre extractos de semillas de Nariño y Caldas.....	148
Grafica 10. Gráfico de comparación de concentración de AGEs en extractos etanólicos de Semillas extraídos por el método soxhlet y maceración química	152
Grafica 11. Gráfico de comparación de concentración de AGEs en extractos etanólicos de hojas extraídos por el método soxhlet y maceración química.	157
Grafica 12. Comparación de gradientes cromatográficos para el análisis de extractos etanólicos de Hojas por Soxhlet y Maceración química.	159
Gráfica 13. Concentración de AGEs (mg/g) en extractos etanólicos de semillas, cáscara y hojas por los métodos de extracción soxhlet y maceración química.....	164
Grafica 14. Número de AGEs en extractos etanólicos de semillas, hojas y cáscara de <i>Annona muricata</i> extraídos por los métodos soxhlet y maceración química.	167
Grafica 15. Curva de calibración de Trolox.	169
Grafica 16. Capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cáscara de <i>Annona muricata</i>	174
Grafica 17. Capacidad antioxidantes y concentración de acetogeninas de extractos etanólicos de semillas y cáscara de <i>Annona muricata</i>	176

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Porcentaje de Humedad.....	43
Ecuación 2. Límite de detección.	53
Ecuación 3. Límite de Cuantificación.	53
Ecuación 4. Porcentaje de Recuperación.	54
Ecuación 5. Ecuación de la recta de calibración de Trolox.	169
Ecuación 6. Ecuación de la recta en términos de concentración de Trolox	170
Ecuación 7. Reacción General de Antioxidantes.	177

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Esquema general de la metodología (Parte 1).....	39
Diagrama 2. Esquema General de la Metodología (Parte 2).....	40
Diagrama 3. Purificación Líquido-Líquido de Extractos Etanólicos de Semillas de Annona muricata.	47
Diagrama 4. Purificación con Sílica de Extractos Etanólicos de Semillas de Annona muricata.....	48

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Cromatograma de Repetibilidad.	195
Anexo B: Cromatograma de Reproducibilidad.	195
Anexo C: Gradiente 1, Flujo 1,0 mL/min.	195
Anexo D: Cromatograma condiciones publicadas por Najihah, Flujo de 1,0 mL/min.	196
Anexo E: Gradiente 2, Flujo 1,0 mL/min.	196
Anexo F: Cromatograma condiciones postulado por Flórez et al. Flujo de 1,0 mL/min.	196
Anexo G: Gradiente 3, Flujo 1,0 mL/min.	197
Anexo H: Cromatograma Gradiente 3, Flujo de 1.0 mL/min.	197
Anexo I: Gradiente 4, Flujo 1,0 mL/min.	197
Anexo J: Cromatograma Gradiente 4, Flujo 1,0 mL/min.	198
Anexo K: Gradiente 5, Flujo 1,0 mL/min.	198
Anexo L: Cromatograma Gradiente 5, Flujo de 1,0 mL/min.	198
Anexo M: Gradiente 6, Flujo 0,8 mL/min.	199
Anexo N: Cromatograma Gradiente 6, Flujo de 0,8 mL/min.	199
Anexo O: Comparación Cromatogramas, Gradiente 2 (azul) y Gradiente 4 (negro).	199
Anexo P: Estructuras de Acetogeninas identificadas y sus espectros UV-vis.	200
Anexo Q: Espectros de masas de ácidos grasos por GC-MS identificados por NIST y Wiley.	201
Anexo R: Espectros de masas de acetogeninas por LC-MS.	202
Anexo S: Acetogeninas no identificadas en LC-MS/MS.	203

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ACN	Acetonitrilo
AGEs	Acetogeninas
ANOVA	Análisis de varianza
EI	Impacto electrónico (Sigla en inglés)
EtOH	Etanol
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
GL	Grados de libertad
HPLC-PDA	Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fotoarreglo de diodos.
IPA	Isopropanol
IT	Trampa de iones
Mc	Maceración
MeOH	Metanol
MSR	Metodología de superficie de respuesta
PDA	Análisis de componentes principales (Sigla en Inglés)
R ²	Coefficiente de regresión
RSD	Porcentaje de desviación estándar relativa (Sigla en Inglés)
DS	Desviación estándar (Sigla en inglés)
TE	Trolox equivalente
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a trolox
THF	Tetrahidrofurano
tR	Tiempo de retención
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid.
UV-Vis	Espectrofotometría ultravioleta visible

GLOSARIO

Analito: Sustancia objeto de estudio para su detección, identificación y/o cuantificación así como sus derivados.

ANOVA: Análisis de Varianza estadístico en el cual se comparan más de dos medias entre sí.

Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia.

Límite de detección: concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra que puede ser detectada por un método analítico.

Límite de Cuantificación: cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco

Precisión: Nivel de concordancia entre varios resultados de ensayo independientes obtenidos bajo condiciones predeterminadas.

Repetibilidad: Condiciones en la que un mismo operador o analista obtiene resultados de ensayos independientes para métodos iguales, con los mismos equipos e idénticas muestras a analizar.

Varianza: Medidas de dispersión de datos, se define como el cuadrado de la desviación estándar.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son compuestos orgánicos producidos por organismos vivos como por ejemplo las plantas, en la actualidad estos productos cualquier sustancia producida por p, siendo la mejor fuente de compuestos farmacológicamente activos. Entre los metabolitos secundarios encontrados en diversos productos naturales a lo largo de la historia, se encuentran los alcaloides, terpenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, ácidos grasos, acetogeninas y esteroides¹. Entre estos metabolitos secundarios hay gran variedad de compuestos que en la actualidad son usados como fuente de antioxidantes naturales, combatiendo los radicales libres y disminuyendo los daños que estos causan a la salud asociados a enfermedades como hipoxia de los tejidos, cáncer y el envejecimiento celular.

Entre los metabolitos secundarios reconocidos en el área farmacológica por sus potenciales bioactivos para el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer, se encuentran las acetogeninas. Estas estructuras caracterizadas por una larga cadena de hidrocarburos (derivados de los ácidos grasos), son compuestos propios de la familia de plantas *Annonáceas*. En los últimos años diferentes investigaciones sobre los extractos etanólicos ricos en acetogeninas provenientes de la *Annonáceas*, han revelado que presentan actividad biológica, tales como antiinflamatorios, larvicidas, antioxidantes y a su vez han demostrado que causan la apoptosis de varias células cancerosas *in vitro*, e inhiben el crecimiento del tumor *in vivo* en modelos animales.^{2 3 4} Alrededor de 500 de estos compuestos

¹ GUTIERRES, A., Química Bioorgánica y Productos Naturales, *Uned*, 2013, 213-303 p.

² SUN, S., LIU, J., KADOUH, H., SUN, X. y ZHOU, K. Isolation of three new annonaceous acetogenins from Graviola fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3. *Bioorg Med Chem Lett*, 24. 2015. 2773-2776 p.

³ LIU, N., YANG, H., WANG, P., LU, Y., YANG, Y., WANG, L. y LEE, S. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway: PubMed, 189. 2016. 210-217 p.

han sido identificados y aislados de diferentes partes de plantas *Annonaceas* como raíces, hojas, fruto, semillas y cáscara.

Dentro de la familia de plantas Annonáceas investigadas, se encuentra la *Annona muricata* (guanábana), una de las especies más importantes en Colombia, teniendo una extensión de cultivo de alrededor de 3.444 hectáreas.⁵ La guanábana presenta un alto contenido en acetogeninas, que le confieren propiedades farmacológicas, siendo fuente de estudio su actividad anticancerígena en diversas líneas celulares y teniendo reportes de las condiciones óptimas de extracción de estos compuestos en hojas de *Annona muricata*.^{6 7} Sin embargo las condiciones de extracción de estos metabolitos no han sido reportadas para matrices como son las semillas de este fruto las cuales también contienen acetogeninas.

La importancia de este tipo de compuestos y sus propiedades bioactivas, hacen necesarias investigaciones más detalladas de su extracción, identificación, cuantificación y posterior aprovechamiento en este tipo de matrices. Por ello se realizó la optimización del método de extracción soxhlet mediante la aplicación de un diseño experimental utilizando la metodología de superficie de respuesta (MRS). La separación, identificación y cuantificación de acetogeninas en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*, se realizó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA), siendo la técnica más utilizada en los reportes científicos recientes dedicados al análisis y caracterización de estos

⁴ FARUQ, S., FIRDAUS, M., HAMID, M., BANU, B. y AFIZAN, NR. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line: *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10. 2016. 1290 p.

⁵ FLOREZ, Y. y MARTINEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

⁶ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of *annona muricata* leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

⁷ WU, T., YANG, I., TSAI, Y., WANG, J., SHIURBA, R., HSIEH, T., CHANG, FR. Y CHANG, W. Isodesacetylurvaricin, an annonaceous acetogenin, specifically inhibits gene expression of cyclooxygenase-2: *J Nat Prod*, 75. 2012. 572 p.

compuestos. Se utilizaron técnicas cromatográficas de GC-MS y LC-MS/MS para la confirmación en la identificación de AGEs. De igual forma la capacidad antioxidante equivalente al Trolox se determinó para los extractos etanólicos obtenidos con las condiciones óptimas de extracción soxhlet en dos cultivos de guanábanas de los departamentos de Caldas y de Nariño.

Por medio de esta investigación se pretende promover el aprovechamiento de la *Annona muricata* (Guanábana), y darle un uso más amplio a matrices como las semillas, que son consideradas como desechos después del consumo del fruto. También se implementa la química verde, ya que las extracciones de estos compuestos, se realizan con solventes que no son nocivos al medio ambiente.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinación de las acetogeninas presentes en semillas de *Annona muricata* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-PDA) y evaluación de la bioactividad de los extractos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar las condiciones de extracción de acetogeninas en las muestras de semillas de *Annona muricata*, por el método soxhlet.
- Identificar y cuantificar las acetogeninas presentes en los extractos de *Annona muricata*.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de semillas de *Annona muricata* por medio de la técnica de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC). utilizando el radical libre ABTS ●+.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1.1 Familia Annonaceae

Las Annonaceas son una familia de árboles que crecen principalmente a alturas menores a los 2000 m, y a temperaturas que varían entre los 23 °C y los 28 °C. Están distribuidas en zonas tropicales de América, África, y en varias regiones de Asia. Esta familia cuenta con 130 géneros y alrededor de 2.300 especies en el mundo, especialmente en los géneros *Annona* y *Rollinia*.⁸

Familia Annonaceae En Colombia

En Colombia hay gran variedad de plantas Annonaceas destacando principalmente la *A. muricata*, *A. cherimola* y *A. squamosa*. También existen otros tipos de especies que se presentan de forma silvestre los cuales no han sido comercializados. En el país el cultivo de Annonaceas comprendía un aproximado de 4.626 hectáreas sembradas en el 2011 con un incremento del 20% para el año 2018. Entre las especies de mayor producción de annonaceas en Colombia se encuentra la *Annona muricata* (Guanábana) con alrededor de 3.444 hectáreas,

⁸ SÁNCHEZ, M y AGUIRREOLA, J. *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1996.

distribuidas en los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca, Tolima, Huila y Eje Cafetero.⁹

2.1.2 Generalidades de la *Annona muricata*

La *Annona muricata* o Guanábana es el cultivo de Annonaceae más extenso en Colombia. Se encuentra distribuido a lo largo de los trópicos del continente americano desde México hasta Brasil, en África occidental, China, Australia y algunas regiones de Norte América. Su origen es desconocido pero debido a sus grandes extensiones de cultivo tanto controlado como silvestre, se presume que su proveniencia está en América del Sur. Actualmente entre sus mayores exportadores se encuentra Brasil, México, y Colombia.¹⁰

Su cultivo es favorecido por alturas menores a los 2000 msnm, climas cálidos, húmedos y pH de suelos ligeramente ácidos.

2.1.2.1 Clasificación Botánica

Figura 1. Fotografía de fruto de *Annona muricata* (guanábana).



Fuente: Esta investigación.

⁹ CABRA, J., SANCHEZ, R. N. y MEJIA, A. La Guanábana una nutritiva fruta del trópico americano con un mercado rentable y promisorio. *Optimización de la cadena productiva*. 2002. 132-136 p.

¹⁰ CABRA, J., SANCHEZ, R. N. y MEJIA, A. La Guanábana una nutritiva fruta del trópico americano con un mercado rentable y promisorio. *Optimización de la cadena productiva*. 2002. 132-136 p.

Tabla 1. Clasificación botánica de *Annona muricata* (guanábana).

ESPECIFICACIONES BOTÁNICAS	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Magnoliales</i>
Familia	<i>Annonaceae</i>
Género	<i>Annona</i>
Especie	<i>Annona muricata</i>

Fuente: Fisiología y Bioquímica vegetal (1996).¹¹

Fenología: Se caracteriza por ser un árbol con una altura media que varía desde los 3 a 6 m, su tronco es recto en la base y ramificado a medida que crece, sus hojas tienen formas elípticas de 6 a 12 cm de largo por 3 cm de ancho y presentan un olor característico.

Flores: Las flores son de color amarillo pálido, constan de 6 pétalos entre los cuales hay 3 exteriores ovalados con terminación en punta, siendo los más grandes y gruesos con tamaño entre los 2 y 4 cm de largo, posee 3 sépalos ovados de menor tamaño. Las flores se presentan de manera unitaria a lo largo de las ramas.

Semillas: Sus semillas son de color café brillante, ovaladas y aplanadas, con un tamaño que varía entre los 1,5 a 2 cm de largo.

Fruto: El fruto es verde oscuro, su textura es áspera y está cubierto con protuberancias con aspecto de espinas; su pulpa es blanca jugosa con un olor característico.

¹¹ SANCHEZ, M y AGUIRREOLA, J. *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1996.

Sexualidad: Su sexualidad corresponde a una planta hermafrodita, las estructuras femeninas maduran más rápido que las masculinas, sin embargo hay un periodo comprendido entre las 36 y las 48 horas en las cuales ambos géneros se ven expresados simultáneamente. Debido a sus características de reproducción es comúnmente utilizada por su alto potencial para la reforestación.¹²

2.1.3 Fitoquímica

Los estudios fitoquímicos realizados a diferentes partes de la planta *Annona muricata*, demostraron la presencia de varios metabolitos secundarios, entre los cuales están los alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, ciclopéptidos, taninos y aceites esenciales. Además de estos fitocomponentes, también se encuentran las Acetogeninas (AGEs) como metabolito secundario característico de las plantas Annonaceas.¹³

2.1.4 Acetogeninas (AGEs)

Las acetogeninas son metabolitos secundarios característicos de las especies Annonaceas, son de gran interés para diversos estudios debido a su comprobada bioactividad, destacando su capacidad antioxidante, antitumoral, antifúngica y anticancerígena. Estos compuestos son de carácter polar y elevado peso molecular. Su ruta metabólica no se ha establecido con exactitud, pero se derivan de la ruta de los policétidos, posiblemente por la interacción de ácidos grasos de

¹² FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

¹³ ZOROFCHIAN, S., FADAEINASAB, M., NIKZAD, S., MOHAN, G., MOHD ALI, H. y KADIR, H. *Annona muricata* (Annonaceae). A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities: *International Journal of Molecular Sciences*, 2. 2015. 15626-15641 p.

cadena larga, con una unidad de propanol en el carbono dos para la formación de una lactona terminal y una cadena alifática de 35 a 37 carbonos.¹⁴

Su actividad biológica principal es la anticancerígena, causando la apoptosis en líneas celulares mutadas, e inhibiendo el crecimiento de tumores en modelos animales. El mecanismo anticancerígeno es atribuido principalmente a la modificación del complejo I mitocondrial, en el cual las acetogeninas tienden a unirse con el complejo I mediante enlaces con los pares electrónicos del oxígeno del THF y de la lactona terminal. Estas uniones impiden el transporte electrónico desde la enzima NADH y causan la terminación del ciclo de respiración celular, lo que se traduce en una baja producción en ATP induciendo a las células a una muerte programada (Apoptosis).¹⁵

2.1.4.1 Estructura Química de AGEs

Su estructura general se compone de una cadena alifática de 35 ó 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuranos (THF), así como sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas, ésteres y epóxidos) localizados a lo largo de la cadena. Presenta un anillo lactónico terminal, el cual está α , β insaturado y metil sustituido, bajo algunas condiciones se encuentra saturado o rearrreglado como cetolactona. Por su estructura y número de anillos THF se

¹⁴ LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

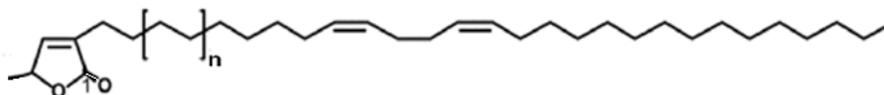
¹⁵ FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

clasifican en cuatro tipos principales: Lineales, Epoxiacetogeninas, Acetogeninas mono-THF y Acetogeninas bis-THF. ¹⁶

Acetogeninas Lineales

Se caracterizan por tener una lactona terminal, una cadena alifática de 35 a 37 carbonos y dobles enlaces en su estructura. No presenta anillos de THF pero pueden tener sustituyentes oxigenados.

Figura 2. Estructura general de acetogeninas lineales



Fuente: Flórez et al. (2010).¹⁷

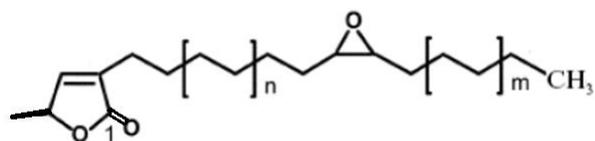
Epoxiacetogeninas

Este grupo de acetogeninas parten del esquema general de las AGEs lineales, pero contienen un epóxido ubicado en la mitad de la cadena alifática. Son consideradas como los precursores de otras acetogeninas más complejas.

¹⁶ FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

¹⁷ FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 16. P.

Figura 3. Estructura general de epoxiacetogeninas.

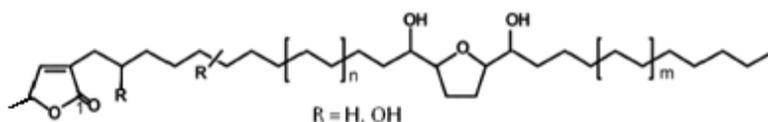


Fuente: Flórez et al. (2010).¹⁸

Acetogeninas Mono-THF.

Son el grupo de acetogeninas más abundantes en las plantas Annonáceas. Su estructura se caracteriza por la presencia de un anillo de THF con uno o dos grupos hidroxilos en la cadena alifática larga.

Figura 4. Estructura general de acetogeninas mono-THF



Fuente: Flórez et al. (2010).¹⁹

Acetogeninas Annonáceas Bis-THF.

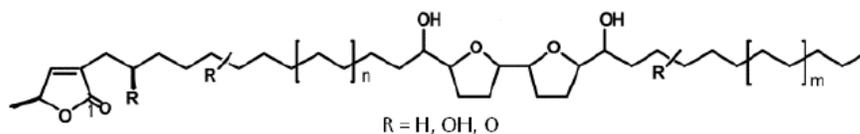
La característica estructural primaria de las AGEs bis-THF es que se componen de dos anillos de THF que contienen uno o dos grupos hidroxilos. Se pueden clasificar en dos tipos de acuerdo en la proximidad de sus anillos. (1) Compuestos con un bis-THF adyacente y (2) aquellos con un bis - THF no adyacente, en el que

¹⁸. Ibid 16 p.

¹⁹ Ibid., p. 18.

este último posee una cadena alifática de cuatro carbonos entre los anillos de THF.^{20 21}

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



Fuente: Flórez et al. (2010).²²

2.1.5 Técnicas Utilizadas en la Extracción, Identificación y Evaluación de Capacidad Antioxidante de extractos etanólicos ricos en Acetogeninas

2.1.5.1 Método de Extracción Soxhlet

El Soxhlet es un método de extracción asistida por solventes. En este método la muestra sólida se encuentra empaquetada en un cartucho soxhlet, mientras que el solvente se evapora y se condensa, pasando gota a gota a través de ella a temperatura de ebullición y en ciclos repetidos de sifonaje. Por lo tanto el método consiste en un “lavado” sucesivo de la muestra con un solvente afín a los metabolitos que se desea extraer. La extracción se realiza por solubilidad de los analitos en el solvente, sin embargo ya que el proceso implica temperaturas

²⁰ FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

²¹ ZOROFCHIAN, S., FADAEINASAB, M., NIKZAD, S., MOHAN, G., MOHD ALI, H. y KADIR, H. *Annona muricata* (Annonaceae). A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities: *International Journal of Molecular Sciences*, 2. 2015. 15626-15641 p.

²² FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 18 p.

elevadas y ciclos sucesivos, se pueden llegar a extraer compuestos cuya solubilidad en el solvente utilizado sea baja.²³

La elección de los solventes de extracción, se realiza con base en la polaridad de los analitos de interés, ya que cada solvente produce extractos y composiciones específicas diferentes para una misma muestra. Los factores más relevantes para la adecuada elección del solvente son: la selectividad en cuanto al tipo de compuestos que se desea extraer, la baja o nula interacción química del solvente con el analito, la estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad y alto límite de saturación.²⁴

La relación muestra-solvente también presenta gran influencia sobre la extracción, lo cual está asociado al límite de saturación del solvente. Para una cantidad determinada de muestra, el volumen del solvente debe ser adecuado para la extracción total del analito, sin que se sature antes de extraer totalmente los compuestos en la matriz y sin que el extracto final sea diluido. El tiempo de extracción también juega un papel en la optimización de los factores por el método soxhlet, siendo óptimo el tiempo en que el solvente alcanza la total extracción del compuesto.²⁵

Otro de los factores que influyen sobre el tipo de extracción soxhlet es el tamaño de las partículas. Estas entre más pequeñas y homogéneas presentan mayor superficie interfacial, lo que quiere decir que presentan más interacción con el solvente de extracción y mayor velocidad de transferencia.

²³ Laboratorio de química analítica e instrumental. Métodos de separación por extracción con solventes. Laboratorio de química analítica e instrumental Sitio web: http://avalon.utadeo.edu.co/comunidades/estudiantes/ciencias_basicas/analitica_instrumental/guia_2_1.pdf. 2001.

²⁴ McMURRY J. Química Orgánica: México: International Thomson editores. 2001. 532 p.

²⁵ McMURRY J. Química Orgánica: México: International Thomson editores. 2001. 532 p.

También se resalta que en algunos casos si el tamaño de partículas es muy reducido, estas pueden apelmazarse dificultando la extracción.²⁶

2.1.5.2 Método de Extracción por Maceración Química

La maceración química es un método de extracción asistido por solventes. En este, la muestra sólida previamente molida es depositada en un recipiente con un solvente específico y dejada en reposo o en agitación durante tiempos prolongados, los cuales en ocasiones superan los 8 días de extracción. Los compuestos químicos de interés son extraídos de la matriz de acuerdo a su solubilidad en el solvente. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como el líquido de extracción.²⁷ Existen dos métodos de acuerdo a la temperatura, caliente y frío.

Maceración en frío

El proceso de maceración en frío se realiza con el solvente a temperatura ambiente y en un tiempo largo dependiendo de la materia prima y los analitos que se deseen extraer. De las ventajas que presenta la maceración en frío, está que no requiere gasto energético y se puede usar para la extracción de compuestos termolábiles, ya que al no involucrar factores como la temperatura no se presentan daños o cambios en las propiedades de lo que se desee extraer. Entre las

²⁶ Revista Colombiana de Química. Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). Volumen 46, Número 2. Received: 27/10/2016: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63015>. Universidad Nacional de Colombia. 2017. 45-50 p.

²⁷ FERAROLI'S, G. Handbook of Flavor Ingredients, Volume I: New York. CRC Press. 1975.

desventajas está que requiere de periodos de tiempo mucho más extensos para lograr una extracción adecuada.^{28 29}

Maceración con calor

El proceso de maceración con calor involucra el aumento de la temperatura del solvente, lo cual puede hacer variar considerablemente el tiempo de extracción en comparación con la maceración tradicional en frío, ya que la temperatura puede acelerar la extracción de los analitos. La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente todos los productos deseados, muchos de los compuestos presentes en las muestras pueden presentar degradaciones a altas temperaturas, por lo cual este tipo de extracción puede destruir algunas propiedades propias de los analitos, además de que se requiere equipos más sofisticados que permitan el control de temperatura, sin mencionar el consumo energético que dicho proceso implica en un tiempo prolongado.³⁰

Variables a tener en cuenta en los métodos de extracción

La eficiencia de la extracción y su velocidad se pueden ver afectadas por diversos factores. El factor más importante en este tipo de extracción es la solubilidad de los analitos en el solvente utilizado. Otros factores que tienen gran relevancia son: la temperatura, concentración del solvente, tamaño de partículas y la agitación. Las propiedades de cada factor pueden llegar a variar considerablemente la extracción de un analito determinado. La temperatura está relacionada con la velocidad de extracción, si se aumenta la temperatura aumenta la velocidad ya

²⁸ Revista Colombiana de Química. Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). Volumen 46, Número 2. Received: 27/10/2016: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63015>. Universidad Nacional de Colombia. 2017. 45-50 p.

²⁹ FERAROLI'S, G. Handbook of Flavor Ingredients, Volume I: New York. CRC Press. 1975.

³⁰ Ibid. 45-50 p.

que la solubilidad es mayor; la temperatura máxima del sistema es la temperatura de ebullición del solvente, en este caso no se llega hasta este límite, ya que implicaría el proceso de condensación de solvente y es atribuido a otro proceso de extracción. La concentración del solvente es importante debido a la saturación y a las interacciones que pueda presentar con la célula vegetal, las cuales pueden ser más selectivas a ciertas concentraciones. La reducción de partículas tiene una gran importancia, porque aumenta el área de contacto y disminuye el tiempo necesario para la extracción, sobre todo para sólidos de baja porosidad; por otra parte la porosidad permite que el líquido penetre a través de los canales formados por los poros dentro del sólido aumentando así el área activa para la extracción. Finalmente la agitación otorga una mayor eficiencia en la extracción debido a que disminuye la resistencia a la difusión, permitiendo un mayor contacto entre las partículas-solvente y así logrando una mayor extracción.³¹

2.1.5.3 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia es un método de separación e identificación de moléculas de estructura química similar mediante el uso de detectores. Se aplica a compuestos no volátiles, como alcaloides, lípidos, esteroides, glúcidos, acetogeninas, ácidos grasos, saponinas, flavonoides, y a sustancias termolábiles, como las proteínas y vitaminas. La técnica consta de una fase estacionaria y una fase móvil de diferente polaridad, la separación de los compuestos se basa en los principios de polaridad y el equilibrio químico de los compuestos con respecto a ambas fases. El extracto es inyectado pasando a través de la columna cromatográfica por medio del bombeo de la fase móvil, la cual “arrastra” a los analitos originando su separación. Los componentes de la

³¹ Revista Colombiana de Química. Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). Volumen 46, Número 2. Received: 27/10/2016: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63015>. Universidad Nacional de Colombia. 2017. 45-50 p.

muestra se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria y la fase móvil a medida que eluyen por la columna. El resultado es un cromatograma, que muestra los compuestos separados y el área del pico de cada uno de ellos, que es proporcional a su concentración.³²

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, el HPLC se clasifica en dos tipos de cromatografía de reparto: una de fase normal y una de fase reversa. En un inicio, la cromatografía de líquidos utilizaba como fase estacionaria recubrimientos polares como el trietilenglicol, colocados sobre partículas de sílice o alúmina, y como fase móvil se utilizaban compuestos apolares, este tipo se conocía como cromatografía de fase normal, en donde el componente menos polar eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un aumento de la polaridad de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de elución. En la cromatografía de fase reversa (utilizada para el análisis de acetogeninas), la fase estacionaria es de carácter apolar y la fase móvil es de polaridad alta a media, los componentes más polares aparecen primero y un incremento de la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución de compuestos polares. Los analitos son retenidos de acuerdo a la naturaleza de del compuesto, su polaridad, y de las interacciones con la fase estacionaria y fase móvil empleada para la separación.³³

La mayoría de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia se lleva a cabo con rellenos de fase inversa. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena de C8 (n-octilo) o una cadena de C18 (n-

³² Agilent Technologies, Inc. (2010). Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC). De Agilent Sitio web: http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf. Febrero 25, 2017.

³³ Agilent Technologies, Inc. (2010). Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC). De Agilent Sitio web: http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf. Febrero 25, 2017.

octadecilo), adecuadas para el análisis de compuestos de polaridad media como los analitos de interés. Las cadenas más largas pueden presentar una mayor retención de analitos. En la mayoría de las aplicaciones de la cromatografía en fase inversa, la elución se lleva a cabo con una fase móvil de elevada polaridad.³⁴

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia para el análisis de AGEs

Mediante el HPLC con PDA, se pueden separar macromoléculas y especies iónicas, materiales poliméricos y una variedad de metabolitos de alto peso molecular como son las acetogeninas. Esta técnica es una alternativa eficiente para la separación de productos naturales sin recurrir a técnicas adicionales de purificación, debido a su variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación. Adicionalmente se puede programar la detección de los compuestos a diferentes longitudes de onda para mejorar la selectividad en el análisis de los compuestos para la identificación o cuantificación.³⁵

Debido a lo mencionado anteriormente, HPLC-PDA es el método de separación de acetogeninas más preciso y fiable, pudiendo utilizarse tanto para la identificación de estos compuestos como para la cuantificación en base a la relación existente entre las áreas y las concentraciones. También es el más utilizado en los reportes científicos recientes dedicados al análisis y caracterización de acetogeninas con columnas de fase reversa.^{36 37}

³⁴ HOLLER, J. y CROUCH, S. *Fundamentos de Química Analítica*: México: Douglas A. Skoog, Mc Graw Hill. 2014.

³⁵ *Ibid.*, p. 12.

³⁶ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of annona muricata leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015, 421-430 p.

³⁷ ZOROFCHIAN, S., FADAEINASAB, M., NIKZAD, S., MOHAN, G., MOHD ALI, H. y KADIR, H. *Annona muricata* (Annonaceae). A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities: *International Journal of Molecular Sciences*, 2. 2015. 15626-15641 p.

2.1.5.4 Cromatografía de Gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica de separación de compuestos volátiles, aplicada a muestras orgánicas complejas, organometálicas y a sistemas bioquímicos como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc. Se emplean los tiempos de retención para la identificación cualitativa, mientras que las alturas de sus picos o sus áreas dan información cuantitativa. La técnica también es útil para evaluar la efectividad de los procedimientos de purificación.

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar a este a través de la columna.³⁸

Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados.^{39 40}

³⁸ Gas Chromatography Mass Spectrometry., University of Bristol.
<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>

³⁹ HOLLER, J. y CROUCH, S. *Fundamentos de Química Analítica*: México: Douglas A. Skoog, Mc Graw Hill. 2014.

⁴⁰ Gas Chromatography Mass Spectrometry., University of Bristol.
<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>

2.1.5.5 La Espectrometría de Masas

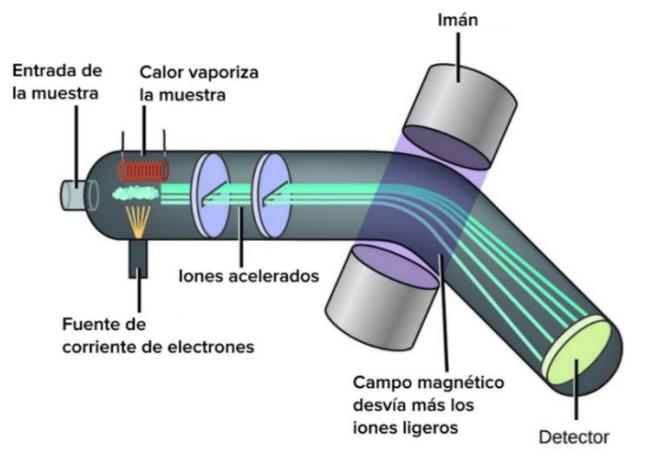
La espectrometría de masas (EM) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc. Sus principales cualidades son la capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula, permite medir la concentración de las sustancias mediante el acople con cromatografía de gases, habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt e incluso ppq, proporciona información estructural sobre la molécula analizada, suministra información isotópica y se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.⁴¹

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos (Figura 6). La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas

⁴¹ GUTIÉRREZ, M. y DROGUET, M. Identificación de compuestos volátiles: Cromgases Sitio web: <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>. 2002.

de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico.^{42 43}

Figura 6. Funcionamiento Espectrofotómetro de Masas.



Fuente: Fundamento y equipos de tecnología avanzada.⁴⁴

2.1.5.6 Acoplamiento Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos

⁴² HOLLER, J. y CROUCH, S. *Fundamentos de química analítica*: México: Douglas A. Skoog, Mc Graw Hill. 2014.

⁴³ Ibid., 102, p.

⁴⁴ SERNA, D. *Espectrometría De Masas (MS)*; Fundamento Y Equipos De Tecnología Avanzada. *Analitek*.

técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

Una mezcla de compuestos es inyectada en el cromatógrafo de gases, las moléculas son retenidas por la columna y eluyen en un tiempo determinado (llamado tiempo de retención), y esto permite que el espectrómetro de masas capture, ionice, acelere, desvíe, para detectar las moléculas ionizadas por separado. El espectrómetro de masas rompe cada molécula en fragmentos ionizados y detecta estos fragmentos usando su relación masa-carga.^{45 46}

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado. La combinación de los dos procesos reduce la posibilidad de error, ya que es extremadamente improbable que dos moléculas diferentes se comporten de la misma manera tanto en un cromatógrafo de gases como en un espectrómetro de masas.⁴⁷

Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas para el análisis de AGEs

Esta técnica es ampliamente utilizada para el análisis fitoquímico de extractos de productos naturales. Ha sido empleada comúnmente con el detector FID para la identificación de acetogeninas en el análisis de extractos etanólicos y metanólicos

⁴⁵ HOLLER, J. y CROUCH, S. *Fundamentos de Química Analítica*: México: Douglas A. Skoog, Mc Graw Hill. 2014.

⁴⁶ GUTIÉRREZ, M. y DROGUET, M. Identificación de compuestos volátiles: Cromgases Sitio web: <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>. 2002.

⁴⁷ Ibid., p. 2002

de partes de la *Annona muricata*, sin necesidad de realizar derivatizaciones. La fase estacionaria más utilizada para la separación de este tipo de muestras es la columna DB-5 compuesta de 5% difenilo 95% polidimetilsiloxano de dimensiones: 30 m de longitud y diámetros internos de 0,25 a 0,32 mm.⁴⁸

2.1.5.7 Acoplamiento Cromatografía Líquida -Espectrometría de Masas (LC-MS)

La Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC-MS) es una técnica de química analítica que combina las capacidades de separación de la cromatografía líquida (HPLC) con las capacidades de análisis de masa de la espectrometría de masas (MS). Este acople es muy popular en el análisis químico porque las capacidades individuales de cada técnica se mejoran sinérgicamente. Mientras que la cromatografía líquida separa las mezclas con componentes múltiples sin necesidad de derivatización, la espectrometría de masas proporciona identidad estructural de los componentes individuales con alta especificidad molecular y sensibilidad de detección.⁴⁹

El acoplamiento de MS con sistemas LC es atractivo porque la cromatografía líquida puede separar las mezclas naturales delicadas y complejas, cuya composición química necesita estar bien establecida. Los sistemas HPLC-MS facilitan el análisis de muestras que tradicionalmente han sido difíciles de analizar por GC-MS es decir, analitos poco volátiles. La alta sensibilidad y la selectividad y

⁴⁸ SHIBULA, K. y VELAVAN, S. Determination of Phytocomponents in Methanolic Extract of *Annona muricata* Leaf Using GC-MS Technique: *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6. 2015. 1251-1255 p.

⁴⁹ HOLLER, J. y CROUCH, S. *Fundamentos de química analítica*: México: Douglas A. Skoog, Mc Graw Hill. 2014.

el alto rendimiento de LC - MS hacen que sea eficaz para la determinación de trazas de compuestos en diferentes matrices.^{50 51}

Además de los dispositivos de cromatografía líquida y espectrometría de masas, un sistema LC-MS contiene una interfaz que transfiere eficientemente los componentes separados de la columna LC a la fuente de iones MS. La interfaz es necesaria porque los dispositivos LC y MS son fundamentalmente incompatibles. Mientras que la fase móvil en un sistema LC es un líquido presurizado, los analizadores de MS funcionan comúnmente bajo vacío (alrededor de 10^{-6} torr). En el punto en el que las fases móviles de líquidos abandonan la columna, la muestra líquida es rociada para producir micro gotas. Estas se evaporan rápidamente, liberando moléculas de analito ionizadas que, a continuación, pueden separarse en el espectrómetro de masas. En la actualidad, las interfaces LC-MS más utilizadas se basan en estrategias de ionización por presión atmosférica (API) como la ionización por electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la foto-ionización por presión atmosférica (APPI).

Como resultado están los espectros de masas obtenidos por HPLC-MS los cuales suelen ser más sencillos que los obtenidos en GC-MS debido a que el nivel de fragmentación de las moléculas es menor.⁵²

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas para el análisis de AGEs

La cromatografía líquida de alta eficiencia es el método más usado para la separación, identificación y cuantificación de los analitos de interés. El acople

⁵⁰ Ibid 114 p.

⁵¹ Agilent Technologies, Inc. (2010). Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC). De Agilent Sitio web: http://polymer.usc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf. Febrero 25, 2017.

⁵² HOLLER, J. y CROUCH, S. *Fundamentos de química analítica*: México: Douglas A. Skoog, Mc Graw Hill. 2014.

tándem con espectrometría de masas permite no solo la separación e identificación tentativa, si no también identificación de los compuestos con 95% de confianza y una mayor sensibilidad. La fragmentación más leve de las moléculas por medio de esta técnica, en comparación con el acople de GC-MS, facilita la identificación de estos compuestos por medio de sus iones principales, debido a que las diferencias estructurales entre ellos, suelen radicar en grupos funcionales pequeños que al fragmentarse completamente pueden originar iones difíciles de identificar a la hora de compararlos con los espectros de masas de las bases de datos o los reportados bibliográficamente.^{53 54}

2.1.5.8 Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC) con el Radical ABTS•+ (Acido 2,2'-Azino-Bis-3-Etilbenzotiazolin-6- Sulfónico)

Un antioxidante es un compuesto químico capaz de oxidarse el mismo, retardando o previniendo la oxidación de otras moléculas. El proceso de oxidación consiste en una reacción química que puede llevarse a cabo por transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Este tipo de reacciones pueden producir radicales libres que reaccionan en cadena generando más de estas especies radicalarias y originando daño celular. Los antioxidantes por lo tanto, tienen como función oxidarse a sí mismos impidiendo que se sigan generando este tipo de reacciones.⁵⁵

⁵³ SMITH, R., LEVINE, R., TRAN, K., RICHARDS, K., RYAN, S., LUO, R., MAIA, J., SABAA-SRUR, A., de MORAES, M., GODOY, H., de MORAES, I., SCHMIDT, F. y THOMAS, A. LC-MS and NMR Analyses of Neurotoxic Fruits in the Annonaceae Family: 1 The U.S. Food and Drug Administration, Lenexa, KS 66214. 2018.

⁵⁴ RANISAHARIVONY, B., RAMANANDRAIBE, V., RASOANAIVO, L., RAKOTOVAO, M. y LEMAIRE, M. Separation and Potential Valorization of Chemical constituents of Soursop Sedes: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2015. 161-171 p.

⁵⁵ RE, R. y PELLEGRINI, N. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay: international antioxidant research centre, *elsevier science publishers* b.v., London. 1998. 1231-1237 p.

El método TEAC utilizando el catión radical ABTS+● es uno de los métodos espectrométricos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante de soluciones o sustancias puras. La técnica para la generación del catión radical ABTS+●, implica la producción directa del cromóforo ABTS+● verde-azul a través de la reacción entre ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈).

Por este método, la capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se mide como inhibición óptica complementaria a la absorbancia (disminución del color), al reaccionar directamente con el catión radical ABTS+●. En la reacción entre el catión-radical ABTS+● y la sustancia antioxidante, la especie radical de ABTS, es neutralizada por un electrón donado por la sustancia antioxidante. De esta manera el grado de decoloración es equivalente al porcentaje de inhibición del catión radical ABTS+● y la concentración del antioxidante se determina usando el Trolox como antioxidante de referencia, por lo cual la técnica se conoce como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox. Los máximos de absorción se presentan a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm.⁵⁶

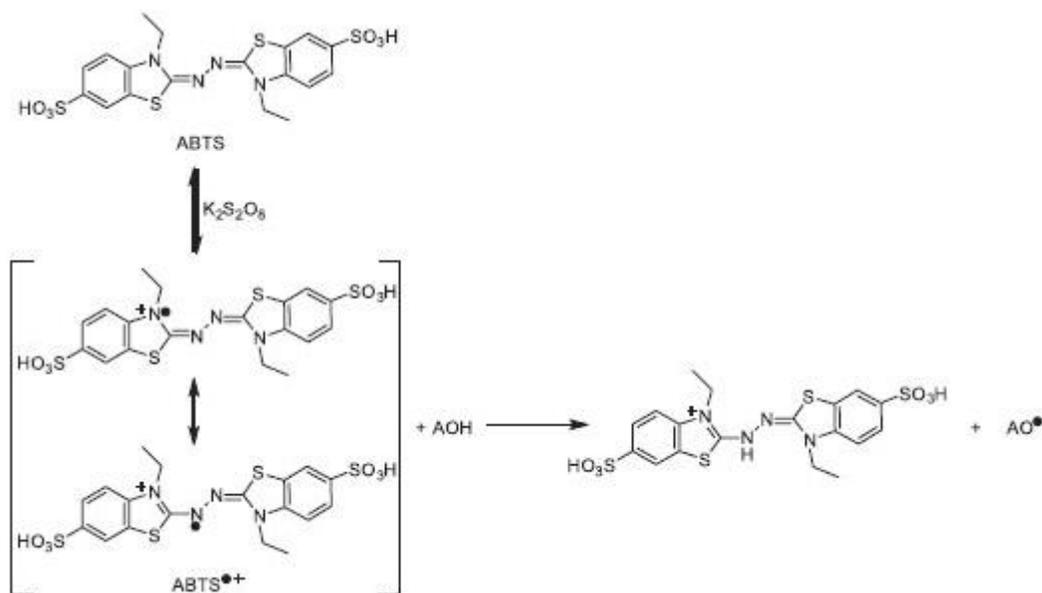
La capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* por TEAC no se ha reportado. La elección del método se realizó en base a su alta la reproducibilidad, su uso es flexible en diferentes medios tales como acuosos o lipofílicos, por lo cual es adecuado para este tipo de muestras de polaridad media.^{57 58} La reacción se representa de la siguiente manera:

⁵⁶ JIMÉNEZ, J.P. y VILLARREAL, J. Estudio Químico de Pigmentos Tipo Antocianina Presentes en el Fruto del Mutilon (*Hyeronima macrocarpa*): Universidad de Nariño. Tesis de Grado. 2008.

⁵⁷ Tovar, J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la región cafetera: Facultad Tecnológica de Pereira Sitio web:<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3636/54763T736.pdf;jsessionid=20D574513A55F18E611A5A01E4DEB34B?sequence=1>. 2013.

⁵⁸ Ugartondo, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante: Universidad de Barcelona Sitio web:http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41765/2/01.VUC_INTRODUCCION.pdf. 2009.

Figura 7. Estructura del ABTS•+ antes y después de la reacción con el antioxidante.



Fuente: Oliveira, S. ⁵⁹

2.1.5 Diseño Experimental

El diseño experimental se define como una serie de pruebas que caractericen los factores X_i (variables independientes de entrada controlables) que tengan mayor influencia en un ensayo, de esta manera se evalúan las variaciones en los factores que generen una respuesta cuantitativa. Este proceso se realiza con el fin de minimizar el efecto de las variables no controlables Z_i o covariables y así minimizar la variabilidad de las respuestas.⁶⁰

⁵⁹ Oliveira, S. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *SciELO*, 37, 2014.

⁶⁰ BARTLETT M. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. En: Proceedings of the Royal Society of London. vol. 160. 1930. 268-282 p.

Un diseño experimental ayuda a determinar si existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos del experimento y en caso que la respuesta es afirmativa, cuál sería la magnitud de esta diferencia. Una segunda meta de los diseños experimentales es verificar la existencia de una tendencia derivado del análisis de los datos del experimento. Los objetivos de un diseño experimental son: (1) verificar si la diferencia entre los tratamientos es una diferencia verdadera o se debe a un proceso al azar, (2) establecer tendencias entre las variables. Es el procedimiento que se sigue para asignar los tratamientos a las unidades experimentales.

Un diseño experimental presenta dos fases principales:

-Caracterización de un proceso: en donde se determinan los rangos de las variables controlables que más influyan en los factores de respuesta y así minimizar el efecto de las covariables.

-Optimización de un proceso: en donde se determinan los niveles de los factores caracterizados que dan una respuesta óptima.⁶¹

2.1.6.1. Tipos de diseño experimental

Para elegir el tipo de diseño experimental hay que tener en cuenta varios factores entre los que se encuentran el objetivo del experimento, el número de factores a controlar, los niveles que se someterán en cada factor, los efectos esperados, entre otros.⁶²

⁶¹ ARTURO F. Estudio Químico de los Alcaloides Presentes en las Hojas de Yerbamora (*solanum nigrum* L.), Originaria de los Municipios de Pasto y Chachagüí. Trabajo de Grado (Químico). En: Universidad de Nariño. Facultad de ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Colombia. 2017. 44-46 p.

⁶² ANSCOMBE F. The Validity of Comparative Experiments. En: Journal Royal of the Statistical Society vol. 61. 1947. 181 -211 p.

Los experimentos se clasifican en dos tipos:

Experimento absoluto: centra su interés en la estimación y las propiedades físicas de la población estudiada, la selección de tratamientos se realiza mediante procesos aleatorios.

Experimento comparativo. Los tratamientos se comparan por sus efectos medios sobre un factor de respuesta con el fin de determinar qué tratamiento es el que más se adecúa a un factor de respuesta óptimo. Sin embargo una forma de clasificar específicamente un diseño es en función del objetivo de experimento, la estrategia de comparación y la cantidad de variables independientes, de esta manera se tienen los siguientes tipos de diseño: ⁶³

- -Comparativos (diseños al azar, diseños de bloques, etc.)
- -Factoriales (2n, 3n, etc.)
- -Diseños de mezclas (diseño de redes, axial, etc.)
- -Robustos (Diseños ortogonales)

2.1.6.2 Metodología de Superficie de Respuesta

Un diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos que le ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta. La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o diseños factoriales.

⁶³ ARTURO F. op, cit. 2017. p.44.

La metodología de superficies de respuesta MRS es un conjunto de técnicas de diseño experimental y optimización de procesos en donde se considera una variable cuantitativa de respuesta (y) que depende de una serie de factores X_i ($i=1, \dots, K$) Y parámetros b_m ($m=1, \dots, l$) relacionados por: $y = f(x_1, \dots, x_k; b_1, \dots, b_l)$.

La MRS se fundamenta en encontrar los niveles óptimos de un factor para una determinada respuesta centrandose la atención en los niveles que den una respuesta de interés óptimo, esto implica mejorar significativamente el resultado de un experimento respecto al tiempo, condiciones, eficiencia, entre otros factores. La interacción de muchas variables afecta el resultado de un experimento, estas variables afectan en diferente proporción por lo tanto para aplicar una buena MRS resulta necesario seleccionar los factores que afecten cierta característica de manera significativa; por esta razón es necesario realizar un análisis de varianza ANOVA.

La diferencia entre una ecuación de superficie de respuesta y la ecuación de un diseño factorial es la adición de los términos elevados al cuadrado (o cuadráticos) que permiten modelar la curvatura en la respuesta, lo que hace la hace útil para:

- Entender o mapear una región de una superficie de respuesta. Las ecuaciones de superficie de respuesta modelan cómo los cambios en las variables afectan una respuesta de interés.
- Hallar los niveles de las variables que optimizan una respuesta.
- Seleccionar las condiciones operativas y cumplir con las especificaciones.^{64 65}

⁶⁴ BARTLETT M. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. En: Proceedings of the Royal Society of London. vol. 160. 1930. 268-282 p.

⁶⁵ ARTURO F. op, cit. 2017. p.44.

Diseños centrales compuestos

El diseño central compuesto es el experimento diseñado de superficie de respuesta que más se utiliza. Los diseños centrales compuestos son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Puede utilizar un diseño central compuesto para:

- Estimar eficientemente los términos de primer orden y segundo orden.
- Modelar una variable de respuesta con curvatura al agregar puntos centrales y axiales a un diseño factorial previamente ejecutada.

Los diseños centrales compuestos son especialmente útiles en los experimentos secuenciales, porque frecuentemente permiten ampliar experimentos factoriales anteriores al agregar puntos axiales y centrales.

Bloques ortogonales

Con frecuencia, los diseños centrales compuestos se ejecutan en más de un bloque. Los diseños centrales compuestos pueden crear bloques ortogonales, lo que permite estimar los términos del modelo y los efectos de bloque de manera independiente y minimizar la variación en los coeficientes de regresión.⁶⁶

⁶⁶ BARTLETT M. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. En: Proceedings of the Royal Society of London. vol. 160. 1930. 268-282 p.

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 Descubrimiento de AGEs

Desde hace más de 30 años, los fitoquímicos han estudiado sobre las familias de plantas con acetogeninas, y las clasificaciones por géneros, encontrándose un recuento de 15 familias, entre las cuales las annonas están clasificadas en 19 especies diferentes.⁶⁷

El estudio de las acetogeninas annonáceas se inició como resultado del primer informe sobre la Uvaricina, aislada de las raíces de *Uvaria acuminata* por (Jolad et al., 1982)⁶⁸. Esta presentó una excelente bioactividad en el sistema de leucemia linfocítica en ratones y sobre la línea celular P-388. Por lo cual la uvaricina fue el primero de la serie de compuestos denominados acetogeninas con una potente actividad anticancerígena.

En base a esto, numerosas acetogeninas han sido aisladas e identificadas, de varias partes de las plantas annonáceas. Estos resultados han promovido nuevos trabajos sobre la estructura y clasificación de las acetogeninas así como sus hipótesis biogénicas.⁶⁹

⁶⁷ PETTIT, GR., MUKKU, VJRV., CRAGG, G., HERALD, DL., KNIGHT, JC., HERALD, CL. y CHAPUIS, JC. Antineoplastic agents. Ampelocissus sp. cancer cell growth inhibitory constituents: *J Nat Prod*, 71, 2008. 130 p.

⁶⁸ JOLAD, SD., HOFFMANN, JJ., SCHRAM, KH., COLE, JR., TEMPESTA, MS., KREIK, GR. y BATES, RB. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria acuminata* (Annonaceae): *J Org Chem*, 47. 1982. 3151 p.

⁶⁹ LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

Cave' et al (1997)⁷⁰, realizaron una contribución sobre las acetogeninas en una serie de libros, que cubre la extracción, clasificación, el aislamiento, la estructura, la hipótesis biogenética, síntesis y actividades biológicas de este tipo de compuestos. Desde ese hecho en 1997, hasta el 2014, se han determinado las estructuras de más de 200 acetogeninas, incluyéndose la revisión realizada por McLaughlin et al. (1997).⁷¹

Debido a las estructuras de las AGEs aisladas, de las cuales no se tenían precedentes, los criterios de Cave' en 1997,⁷² para la clasificación de las acetogeninas, se han modificado y simplificado según las características estructurales. Estudios más recientes han revelado 500 especies de AGEs que han sido identificadas de diferentes plantas de la familia annonácea.^{73 74 75}

2.2.2 Extracción e Identificación de AGEs

Los estudios sobre las acetogeninas annonáceas (AGEs) a partir de 1997 se centraron principalmente en la eficiencia de la extracción e identificación de compuestos mediante técnicas cromatográficas y otros métodos espectroscópicos.

Por la necesidad de aislar las acetogeninas, se llevó a cabo la búsqueda de nuevos enfoques para maximizar la capacidad de separación y facilitar el análisis

⁷⁰ CAVE', A., FIGADÉRE, B., LAURENS, A. y CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: *Prog Chem Org Nat*, 70. 1997. 81 p.

⁷¹ MCLAUGHLIN, J.L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to comercial products: *J. Nat. Prod*, 71. 1997. 1311–1321 p.

⁷² Ibid. 81 p.

⁷³ TEMPESTA, M.S., KRIEK, G.R. y BATES, R.B. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (annonaceae): *J. Org. Chem*, 47. 1982. 3151–3153 p.

⁷⁴ ZAFRA-POLO, MC. FIGADÉRE, B., GALLARDO, T., TORMO, JR., CORTES D., Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action: *Phytochemistry*, 48. 1998. 1087 p.

⁷⁵ LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

cromatográfico. McLaughlin et al (1997),⁷⁶ utilizaron cromatografía contracorriente (CCC) para aislar algunos tipos de acetogeninas de la corteza de *A. squamosa*; conjuntamente con Cave', aplicaron la cromatografía contracorriente de alta velocidad (HSCCC) para la separación de las AGEs presentes en varias especies annonáceas.

Wu et al (1997),⁷⁷ en cooperación con el grupo McLaughlin, analizaron las acetogeninas de *R. mucosa* utilizando cromatografía líquida / espectrometría de masas (LC/MS), con ionización a presión atmosférica. Con lo cual detectaron la presencia de 40 acetogeninas conocidas, junto con cuatro nuevas estructuras, provenientes del crudo de una fracción soluble en metanol de este extracto de una planta annonácea.

García K. (2009),⁷⁸ realizó el aislamiento de acetogeninas proveniente de *Annona muricata* y *Annona cherimolia* a partir de extractos de diclorometano, posteriormente realizaron la comparación de la citotoxicidad entre los extractos, obteniéndose mayor citotoxicidad en los extractos *A. muricata*. La separación se realizó por HPLC, con fase móvil acetonitrilo: agua y la caracterización estructural por RMN.

En otros estudios, se implementó la extracción de acetogeninas en las semillas de guanábana por el método de lixiviación etanólica en semillas desengrasadas y sin desengrasar, con lo cual se determinó que las semillas desengrasadas presentaron mayor cantidad de acetogeninas. La identificación de las acetogeninas de manera cualitativa, se realizó por el método de cromatografía de

⁷⁶ MCLAUGHLIN, J.L. op, cit 1997. p. 1311-1321

⁷⁷ WU, T., YANG, I., TSAI, Y., WANG, J., SHIURBA, R., HSIEH, T., CHANG, FR. Y CHANG, W. Isodesacetyluricin, an annonaceous acetogenin, specifically inhibits gene expression of cyclooxygenase-2: *J Nat Prod*, 75. 2012. 572 p.

⁷⁸ GARCIA, K. Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *annona cherimolia* y *annona muricata*. Evaluación genotóxica y agente terapéutico: *Escuela nacional de ciencias biológicas*. 2009. 1- 80 p.

capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) usando el método de estándar externo con bulatacina.⁷⁹

Castro et al. (2010),⁸⁰ Identificaron las acetogeninas presentes en semillas de *Annona cherimolia* por la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia, para lo cual compararon los espectros UV-Vis experimentales con los reportados en la literatura por Wu et al (1997),⁸¹ y McLaughlin et al (2008).⁸² Con esto identificaron 14 acetogeninas presentes en las semillas, de 26 picos presentados en los cromatogramas. Evaluaron la actividad biológica de los extractos etanólico (extracto crudo) y metanólico (obtenido del fraccionamiento) de las semillas desengrasadas y sin desengrasar de *A. cherimolia* frente a nauplios de *A. salina* como ensayo de letalidad general.

Actualmente se han estandarizado muchos métodos para la extracción e identificación de las acetogeninas anonáceas. Najihah et al (2015),⁸³ estandarizaron la extracción etanólica de estos compuestos en las hojas de *Annona muricata* implementando el método soxhlet; a su vez, reportaron parámetros cromatográficos como fases móviles, flujo adecuado, y gradiente para la identificación de acetogeninas haciendo uso de cromatografía líquida de alta eficiencia, (HPLC).

⁷⁹ FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

⁸⁰ CASTRO, L., ALZATE, M. y GUERRERO, G. Annonaceae. Preliminary bioactivity study of *Annona cherimolia* seeds extracts from Annonaceae family: *Scientia et Technica*, 44, 2010. 326-330 p.

⁸¹ WU, T., YANG, I., TSAI, Y., WANG, J., SHIURBA, R., HSIEH, T., CHANG, FR. Y CHANG, W. Isodesacetylurarin, an annonaceous acetogenin, specifically inhibits gene expression of cyclooxygenase-2: *J Nat Prod*, 75. 2012. 572 p.

⁸² MCLAUGHLIN, J.L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products: *J. Nat. Prod*, 71. 2008. 1311–1321 p.

⁸³ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of *annona muricata* leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

Entre los actuales exponentes de la estandarización de métodos cromatográficos para el análisis de acetogeninas, se encuentra K. Shibula y S. Velavan (2015),⁸⁴ quienes publicaron la identificación fitoquímica de los compuestos de los extractos metanólicos de *Annona muricata* haciendo uso de la técnica de gases masas. (GC-MS), para lo cual incluyeron todos los parámetros para la identificación de las acetogeninas haciendo uso de esta misma técnica.

A partir de los análisis realizados por técnicas cromatográficas y espectroscópicas, se han logrado avances con respecto a la información estructural de las AGEs, lo cual modificó la forma de su clasificación. Actualmente han sido clasificadas, según su linealidad, sus grupos tetrahidrofuranos, la cantidad de grupos hidroxilo en su estructura, los grupos lactona y las posiciones de cada grupo funcional.⁸⁵

Teniendo en cuenta esta nueva clasificación, entre las acetogenias que han sido aisladas, se encontró de tipo lineal, las cuales no contienen grupos THF, pero presentan un epóxido o un enlace doble. De esta clase estructural han sido identificados ciento cuarenta y cuatro compuestos provenientes de varias especies.⁸⁶ ⁸⁷ Ciento diecinueve nuevos compuestos de AGEs mono-THF se aislaron de 15 especies de siete géneros diferentes, incluyendo *Ampelocissus*, *Annona*, *Asimina*, *Disepalum*, *Goniothalamus*, *Rollinia*, y *Uvaria*, desde 1997.

⁸⁴ SHIBULA, K. y VELAVAN, S. Determination of Phytocomponents in Methanolic Extract of *Annona muricata* Leaf Using GC-MS Technique: *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6. 2015. 1251-1255 p.

⁸⁵ YU, JG., GUI, HQ., LUO, XZ. y SUN, L. Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*: *Phytochemistry* 49. 1998. 1689 p.

⁸⁶ GLEYE, C., LAURENS, A., HOCQUEMILLER, R., CAVE', A., LAPRÉVOTE, O. y SERANI, L. Isolation of montecristin, a key metabolite in biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and its structure elucidation by using tandem mass spectrometry: *J Org Chem*, 62. 1997. 510 p.

⁸⁷ Ibid. 1689 p.

Desde 1997 hasta la actualidad, se han encontrado 63 nuevas AGEs bis-THF, incluyendo 48 AGEs adyacentes aisladas de 15 especies de plantas entre las cuales 35 de estas se extrajeron de las plantas anonáceas.⁸⁸

2.2.3 Actividad Antioxidante de AGEs

Los primeros reportes completos de actividad antioxidante de acetogeninas fueron publicados en 2007, por Baskar et al.⁸⁹ En donde determinaron el Potencial antioxidante de hojas de tres diferentes especies de *Annona* mediante el uso de diferentes técnicas como modelos in vitro, ensayo de DPPH, ABTS y óxido nítrico. El ensayo se realizó con *Annona muricata*, *Annona reticulata* y *Annona squamosa*. Como resultado el extracto etanólico de las hojas de *A.muricata* presentó mayor actividad antioxidante.

Otra de las investigaciones realizadas en extractos de acetogeninas fue la postulada por Santos et al. (2010).⁹⁰ Donde midieron la capacidad antioxidante de las acetogeninas provenientes de la *Annona cornifolia* por el método de DPPH determinando un alto contenido en la actividad antioxidante por parte de las acetogeninas mono –THF. Las estructuras de las acetogeninas se determinaron por RMN y ESI-MS. También se encontró que el proceso de estabilización del radical DPPH, contribuye a la estabilización del grupo THF, de las acetogeninas.

En 2011 determinaron el contenido de antioxidantes en el jugo de la *Annona cherimola* rico en acetogeninas, mediante el uso de la técnica de absorción de

⁸⁸ LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

⁸⁹ BASKAR, R., RAJESWARI, V. y KUMAR, T. In vitro antioxidant studies in leaves of Annona species: *NISCAIR Online Periodicals Repository*, 1. 2007. 480-485 p.

⁹⁰ SANTOS, L., PIMENTA, L. y BOAVENTURA, M. Acetogenins from Annona cornifolia and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 122. 2010. 1129–1138 p.

oxígeno (ORAC), el jugo demostró alta cantidad antioxidante. La capacidad antioxidante también se determinó en líneas celulares de cáncer de colon.⁹¹

El estudio que realizaron Rodríguez et al. en 2013,⁹² en pulpa de aguacate, determinó que las acetogeninas presentes en esta matriz tienen actividad antioxidante. Por su capacidad de captación de radicales, los ensayos sugirieron que en presencia de un agente emulsionante las acetogeninas tendrían utilidad como antioxidantes lipofílicos. La identificación de las acetogeninas se realizó mediante HPLC-PDA / MS-TOF.

En los últimos estudios publicados en el 2017, por León et al.,⁹³ reportan la preparación de varios extractos de guanábana (*Annona muricata*), con diferentes disolventes y técnicas de extracción. En los extractos analizaron el contenido de polifenoles, la capacidad antioxidante y presencia cualitativa de acetogeninas. Las acetogeninas se obtuvieron por los métodos soxhlet, sonicación y con microondas. La capacidad antioxidante se determinó por los métodos de ABTS y DPPH, encontrándose que los extractos metanólicos de la pulpa contenían mayor cantidad de antioxidantes.

⁹¹ MITCHELL, P. L.; GUPTA, R.; SINGH, A. K.; KUMAR, P. 2004. Behavioral and developmental effects of neem extracts on *Clavigralla scutellaris* (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae) and Its egg parasitoid, *Gryon fulviventre* (Hymenoptera: Scelionidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 916-923.

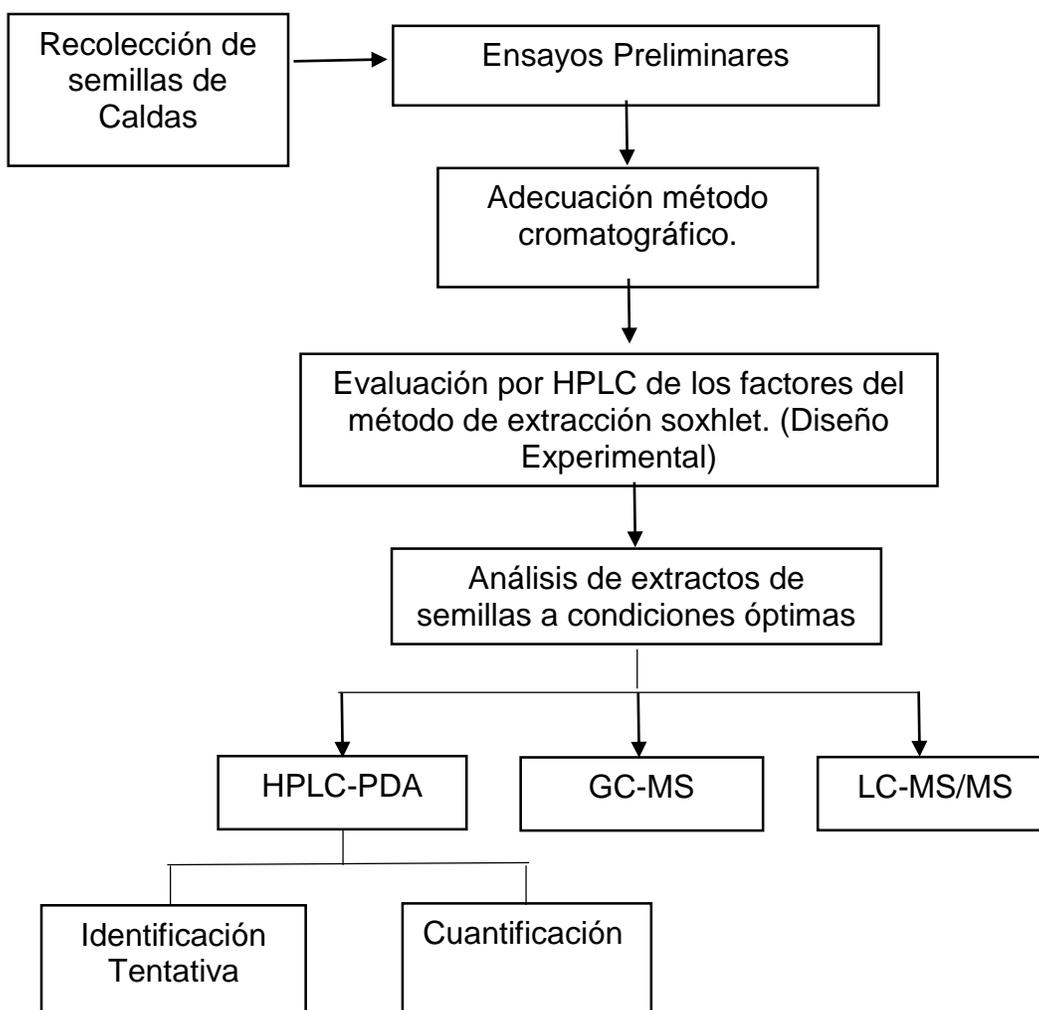
⁹² RODRÍGUEZ, D., SILVA, C., ROJO, R., GARCÍA, N., CISNEROS, R., GARCÍA, G. y HERNANDEZ, C. (2013). Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (*Persea americana*): *Journal of Chromatography B*, 942–943. 37–45 p.

⁹³ LEÓN, A., OBLEDO, E., VIVAR, M., SÁYAGO, S. y MONTALVO, S. Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp (*annona muricata* L.): *Bras. Frutic*, 39. 2017. 1806 p.

3. METODOLOGÍA

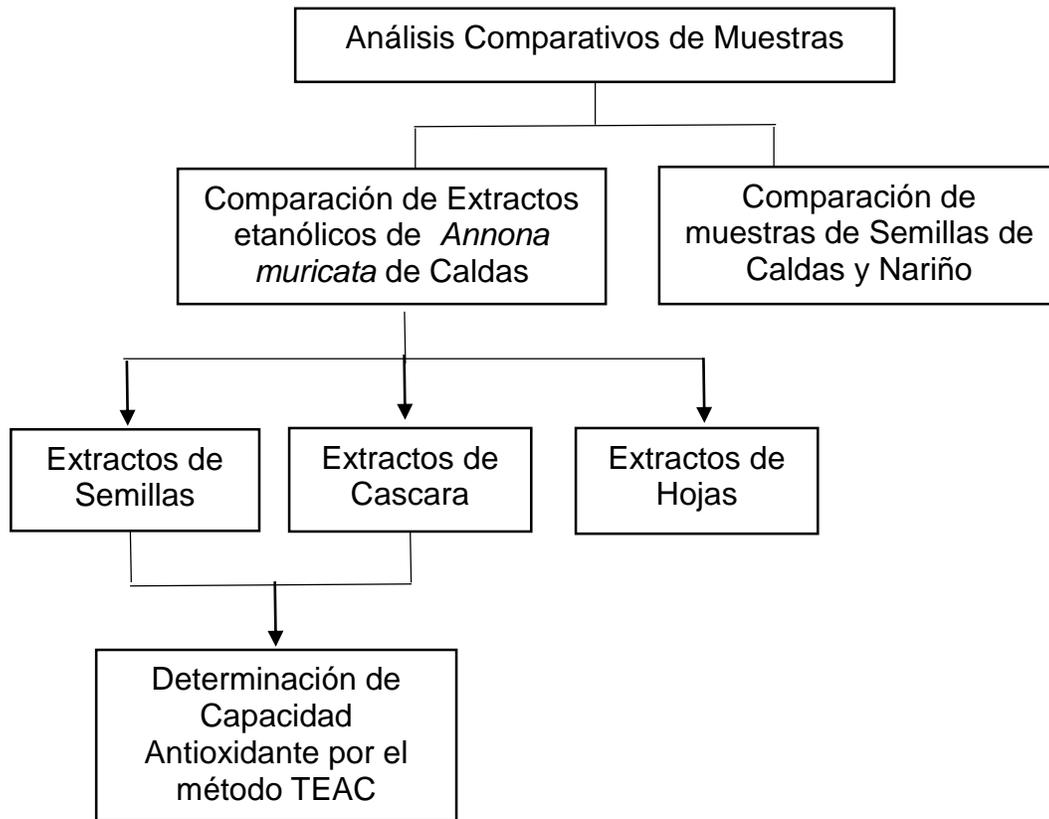
En los siguientes diagramas se ilustran los procedimientos realizados para el desarrollo de la investigación.

Diagrama 1. Esquema general de la metodología (Parte 1).



Fuente: Esta Investigación.

Diagrama 2. Esquema General de la Metodología (Parte 2).



Fuente: Esta Investigación.

MATERIALES Y REACTIVOS

Reactivos Químicos

Los reactivos empleados para los procesos de extracción, análisis y determinación de la capacidad antioxidante fueron los siguientes:

- ✓ Etanol PANREAC, España
- ✓ Acetonitrilo (ACN) HPLC, Merck, Alemania
- ✓ 2-Propanol (IPA), HPLC, Fisher E.U.A
- ✓ Annonacina ALB, Shanghai, China
- ✓ Limoneno Alfa Aesaer, United Kingdom
- ✓ Metanol (MeOH) HPLC, Fisher E.U.A
- ✓ n-Hexano HPLC Honeywell, E.U.A
- ✓ Sulfato de sodio. Merck, Alemania
- ✓ ABTS Sigma, E.U.A
- ✓ Trolox Sigma, E.U.A
- ✓ Ácido Ascórbico CARLO ERBA, Italia
- ✓ Quercetina Aldrich, E.U.A
- ✓ Ácido Linoleico Alfa Aesaer, United Kingdom
- ✓ Persulfato de Potasio Sigma, E.U.A

Materiales y Equipos

- ✓ Balanza Analítica OHAUSS PIONER
- ✓ Montaje de Extracción Soxhlet
- ✓ Rotaevaporador EYELA Japón
- ✓ Equipo de Humedad SEIKO SCALE

3.1 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

3.1.1 Recolección de la Materia Prima

El proyecto se llevó a cabo con semillas de *Annona muricata* (Guanábana), proveniente del cultivo de la finca *La Servia* en el corregimiento de Arauca-Departamento de Caldas, Colombia, con una altitud media de 853 msnm, y una temperatura de 27°C. Los frutos de *Annona muricata* se recolectaron de manera simple aleatoria, el estado de recolección del fruto fue de madurez de consumo, teniendo en cuenta las propiedades de brillo, tiempo de fruto, color y estructura de los terminales estilares, siguiendo las condiciones descritas para la recolección de *Annona muricata*, por la Universidad de Ibagué y la Gobernación del Tolima. La toma de muestras se realizó durante los meses de Mayo y Junio del 2017.⁹⁴

3.1.2 Pretratamiento de las Semillas

Se realizó el despulpado de las guanábanas en forma manual. Posteriormente se lavaron las semillas con el fin de eliminar los desechos contenidos de pulpa. Las semillas, se secaron por 48 h a condiciones ambientales, después se trituraron en un molino de aspas y se homogenizó la muestra. Las semillas se almacenaron a una temperatura de -4°C. Posteriormente se determinó el porcentaje de humedad para hacer la corrección en peso de semillas.

⁹⁴ MORENO, M., TOCORA, F., ZAMBRANO, C., SANDOVAL, C., BOHÓRQUEZ, Y. y BERMEO, P. Protocolo de Buenas Practicas Para Poscosecha de Guanábana (*Annona Muricata*): Logística Para La Cadena Hortofruticola del Tolima. Universidad Del Tolima, Universidad de Ibagué, 2017.

Determinación del Porcentaje de Humedad

Esta operación se realizó por 20 min y por triplicado utilizando una balanza de humedad SEIKO SCALE. Para la determinación del porcentaje de humedad se aplicó la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Porcentaje de Humedad.

$$\%H = \frac{M_i - M_f}{M_i}$$

Donde:

%H: Porcentaje de humedad

Mi: Peso de la muestra inicial en gramos

Mf: Peso de la muestra seca en gramos.

3.2 ENSAYOS PRELIMINARES

3.2.1 Extracción de Acetogeninas por el Método Soxhlet para Ensayos Preliminares

La extracción se realizó con base al método postulado por Najihah, utilizando un equipo de extracción Soxhlet con etanol absoluto como solvente. El tiempo de extracción estimado fue de 6 h, y la relación de muestra solvente fue de 3 g de semillas de *Annona muricata* en 100 mL de etanol absoluto.⁹⁵ Los extractos obtenidos se concentraron mediante presión reducida usando un rotaevaporador EYELA a una temperatura de 40°C y posteriormente se disolvieron en 3 mL de

⁹⁵ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of *Annona muricata* leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

Isopropanol. Las muestras se almacenaron en congelación a -4°C , para su posterior análisis por HPLC.

Figura 8. Montaje de extracción Soxhlet.



Fuente: Esta Investigación.

Figura 9. Montaje Rotaevaporacion.



Fuente: Esta Investigación.

3.2.2 Análisis por HPLC para Ensayos Preliminares

Los análisis preliminares se realizaron utilizando un equipo HPLC Waters Breeze con detector de arreglo de diodos PDA 2998. Para la separación se usó el gradiente reportado por Najihah et al. Se utilizó un sistema con una columna de fase reversa C18 X-Terra-Waters (4,6 x 150 mm, 3,5 micras). La detección se realizó a una longitud de onda de 220 nm (*scan* 190-400 nm). Como fase móvil se empleó una mezcla de Acetonitrilo (A) y Agua (B), usando para la separación un gradiente lineal; 0-40 min (85%A), y 40-60 min (85 a 95% A). El flujo de fase móvil fue de 1,0 mL/min a una temperatura de columna de 30°C.⁹⁶

3.2.3 Verificación del Contenido y Estabilidad de Acetogeninas en Extractos Etanólicos de Semillas de *Annona muricata* por HPLC

3.2.3.1 Determinación de Acetogeninas en semillas de *Annona muricata*

La identificación de acetogeninas en semillas de *Annona muricata*, se realizó mediante la comparación de los espectros UV-Vis de los compuestos separados previamente por HPLC-PDA (sección 3.2.2), con los espectros reportados para el análisis de acetogeninas en las diferentes referencias bibliográficas.

⁹⁶ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of annona muricata leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

3.2.3.2 Estabilidad de acetogeninas con Respecto al Tiempo

La estabilidad de los compuestos en los extractos con respecto al tiempo, se determinó por comparación de los análisis realizados en diferentes intervalos de tiempo para un mismo extracto, los tiempos de análisis fueron: un día de extracción, una semana, un mes y cinco meses. Las condiciones cromatográficas se describen en la sección 3.2.2. Los extractos analizados se preservaron en condiciones de oscuridad y refrigeración a -4°C.

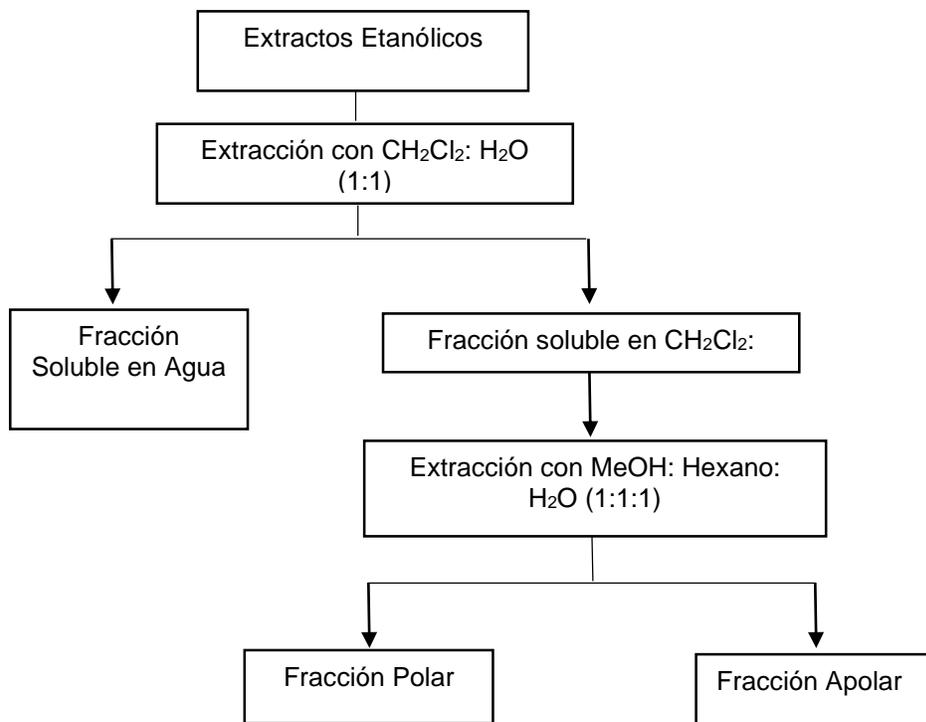
3.2.4. Ensayos de Purificación para el Análisis de AGEs

3.2.4.1 Ensayo de Purificación por Fraccionamiento Líquido-Líquido

Se implementó la metodología de fraccionamiento descrito por Flórez, et al.⁹⁷, para la purificación de los extractos etanólicos de semillas. Se realizó la extracción según lo descrito en el apartado 3.2.1 y se lavó con un 1 mL de diclorometano: 1 mL de agua, la fracción disuelta en diclorometano se lavó con hexano: metanol: agua en relación (1:1:1), de la cual se tomó la fracción polar. El extracto alcohólico se guardó en un congelador a -4°C para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (sección 3.2.2). El diagrama de flujo general para el fraccionamiento se describe a continuación:

⁹⁷ FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

Diagrama 3. Purificación Líquido-Líquido de Extractos Etanólicos de Semillas de *Annona muricata*.

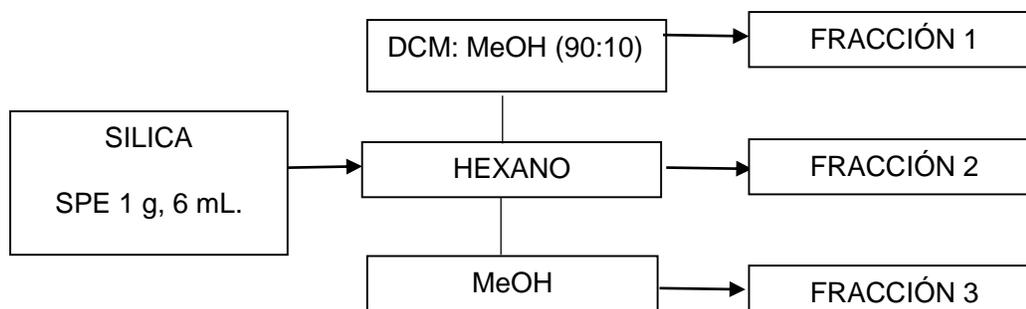


Fuente: Esta Investigación.

3.2.4.2 Ensayo de Purificación con Sílica

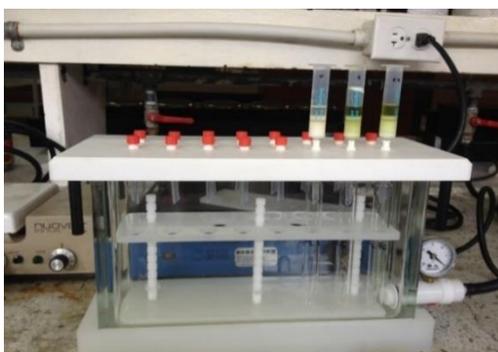
Se realizó la purificación con sílica de los extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* obtenidos según lo descrito en la sección 3.2.1. Se usaron cartuchos de SPE Sílica 1 g, 6 mL (Restek, Bellefonte, EUA), con una fase móvil de Diclorometano: Metanol (90:10), se tomó la fracción polar 1 y se almacenó a -4°C. Posteriormente se lavó la sílica con Hexano (Fracción 2) y con metanol (Fracción 3). El análisis de las fracciones se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia, según las condiciones descritas en el apartado 3.2.2.

Diagrama 4. Purificación con Sílica de Extractos Etanólicos de Semillas de *Annona muricata*.



Fuente: Esta Investigación.

Figura 10. Montaje purificación con cartuchos de sílica.



Fuente: Esta Investigación.

3.3 ADECUACIÓN DEL MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE AGEs POR HPLC

3.3.1 Diluyente

Para la elección del diluyente de los extractos para los análisis cromatográficos, se ensayaron como disolventes etanol, metanol, diclorometano, isopropanol y agua.

La elección del diluyente se realizó con base en la solubilidad y afinidad con las fases móviles utilizadas en cromatografía líquida.

3.3.2 Longitud de Onda

Se determinó la longitud de onda de absorción adecuada para la identificación de acetogeninas mediante un *screening* general desde 205 a 400 nm, adicionalmente se evaluaron todos los picos cromatográficos a longitudes de 205, 220, 298 y 350 nm. Se compararon los espectros UV-Vis de los compuestos, con los reportados en la literatura para las acetogeninas, y se eligió la longitud de onda con base en la disminución de interferencias asociadas a metabolitos secundarios diferentes. Se realizó la verificación de la longitud de onda a 220 nm reportada para el análisis de estos compuestos.

Se determinaron las interferencias a esta longitud de onda causadas por metabolitos secundarios en los extractos etanólicos, mediante el uso de estándares de polifenoles y ácidos grasos (compuestos mayoritarios en semillas de *Annona muricata*) para lo cual se analizaron patrones de Quercetina y Ácido Linoleico, evaluando sus tiempos de retención y espectros UV-Vis en comparación con el estándar de Annonacina.

3.3.3 Longitud de Columna

Se utilizaron dos columnas analíticas C18 de 150 y 250 mm. La longitud de la columna se evaluó según la separación y resolución de picos cromatográficos con relación al flujo de la fase móvil y el tiempo de análisis.

3.3.4 Fase Móvil

Se probó como fase móvil la combinación Agua-Acetonitrilo, Agua-Metanol y Agua Isopropanol. La elección se realizó en base a la polaridad que contribuyó a una adecuada separación de los analitos de interés. Se estableció la composición de fase móvil teniendo en cuenta la afinidad con los analitos, las características de la columna y el gradiente de elución cromatográfico utilizado acorde a los métodos descritos en la bibliografía.

3.3.5 Ideonidad del Método Cromatográfico

La idoneidad del método cromatográfico se determinó en un equipo HPLC Waters Breeze con detector de arreglo de diodos PDA 2998, para lo cual se utilizaron 6 gradientes cromatográficos diferentes, con fase móvil A: agua y fase móvil B: acetonitrilo (ACN). Se utilizó un sistema con una columna de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 micras) Xterra Waters a una temperatura de columna de 30°C.

Los ensayos se realizaron con el extracto de semillas homogenizadas. Se evaluó la idoneidad de método de separación de acetogeninas con base en el número de picos cromatográficos y su resolución. Entre los gradientes reportados en la bibliografía, se utilizó uno publicado por Najihah et al, y otro por Flórez et al.^{98 99} A continuación se presenta la tabla con los gradientes cromatográficos:

⁹⁸ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of annona muricata leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

⁹⁹ FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de Annona muricata de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

Tabla 2. Gradientes cromatográficos para la separación de acetogeninas en semillas de *Annona muricata*. Fase móvil A: Agua, Fase móvil B: Acetonitrilo.

GRADIENTE 1: publicado por Najihah (2015). Flujo de 1,0 mL/min				
	0-40 min	40 min	60 min	70 min
Fase móvil A	100%	15%	5%	100%
Fase móvil B	0%	85%	95%	0%
GRADIENTE 2: publicado por Flórez (2010) Flujo de 1,0 mL/min				
	0-10 min	15 min	20 min	30 min
Fase móvil A	95%	15%	10%	95%
Fase móvil B	5%	85%	90%	5%
GRADIENTE 3: Flujo de 1.0 mL/min Fuente: ésta investigación				
	0-3 min	12 min	15 min	20 min
Fase móvil A	30%	20%	15%	30%
Fase móvil B	70%	80%	85%	70%
GRADIENTE 4: Flujo de 1.0 mL/min Fuente: ésta investigación				
	0 min	15 min	25 min	30 min
Fase móvil A	95%	15%	5%	95%
Fase móvil B	5%	85%	95%	5%
GRADIENTE 5: Flujo de 1.0 mL/min Fuente: ésta investigación				
	0 min	10 min	15 min	25 min
Fase móvil A	30%	15%	5%	30%
Fase móvil B	70%	85%	95%	70%
GRADIENTE 6: Flujo de 0,8 mL/min Fuente: ésta investigación				
	0 min	15 min	25 min	30 min
Fase móvil A	95%	15%	5%	95%
Fase móvil B	5%	85%	95%	5%

Fuente: Esta Investigación.

3.4. VERIFICACIÓN DEL MÉTODO

La verificación de los resultados de la adecuación del método cromatográfico para el análisis de Acetogeninas, se realizó con base en un análisis estadístico de las figuras de mérito:

3.4.1. Linealidad

Para determinar la linealidad, se prepararon 5 soluciones del estándar de Annonacina, en concentraciones de 20, 50, 100, 200, y 500 ppm. Las soluciones se prepararon y analizaron por triplicado para la elaboración de una recta de calibración. La recta obtenida corresponde a la concentración del analito y su relación con el área de pico cromatográfico. Los parámetros de correlación se verificaron mediante el método de regresión lineal.

3.4.2. Sensibilidad

3.4.2.1 Límite de Detección y Cuantificación

Se preparó y se inyectó una solución de 10 ppm de Annonacina. El límite de detección y cuantificación se calculó mediante la relación señal ruido (S/N) por la integración de 10 señales cromatográficas correspondientes a la señal de ruido de fondo (Blanco). El LD se calculó mediante la ecuación 2. El LC se calculó mediante la ecuación 3.

Ecuación 2. Límite de detección.

$$LD = \frac{3X\delta}{b}$$

Dónde:

LD: Límite de detección

δ: Desviación estándar de la señal de ruido.

b: Pendiente de la recta de calibrado.

Ecuación 3. Límite de Cuantificación.

$$LC = \frac{10X\delta}{b}$$

Donde:

LC: Límite de cuantificación.

δ: Desviación estándar de la señal de ruido.

b: Pendiente de la recta de calibrado.

3.4.3. Precisión y Límites de Confianza

3.4.3.1 Repetibilidad

Se preparó una solución del estándar de Annonacina a 200 ppm, posteriormente se realizaron 3 inyecciones el mismo día por el mismo analista. La repetibilidad del método cromatográfico se determinó en términos de %RSD (porcentaje de la desviación estándar relativa) del área del estándar de Annonacina.

3.4.3.2. Reproducibilidad

Para la reproducibilidad del método cromatográfico se inyectó el extracto etanólico 3 veces por día, durante 3 días. La reproducibilidad se expresó en términos de %RSD (porcentaje de la desviación estándar relativa).

3.4.4. Exactitud

La exactitud se determinó en términos de porcentaje de recuperación, para lo cual se realizó el dopaje de la muestra con el estándar de Limoneno (50 ppm) en el proceso de extracción soxhlet descrito en el apartado 3.3.1. Se realizó el análisis comparativo con un blanco sin dopar. Los resultados obtenidos se evaluaron con la siguiente ecuación:

Ecuación 4. Porcentaje de Recuperación.

$$\%R = \frac{C_{exp}}{C_{teo}} \times 100$$

Donde:

C_{exp}: Concentración experimental calculada en la muestra – blanco.

C_{teo}: Concentración teórica de la muestra dopada.

3.5 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE AGEs EN SEMILLAS DE *Annona muricata* POR EL MÉTODO SOXHLET (Diseño Experimental)

3.5.1 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

El análisis de los extractos de semillas de *Annona muricata* para la optimización de los factores de extracción soxhlet, se realizó utilizando un equipo HPLC Waters Breeze con las siguientes especificaciones:

Tabla 3. Especificaciones del Equipo Cromatográfico HPLC-PDA para Análisis de Acetogeninas de semillas de *Annona muricata* en el Laboratorio de Cromatografía – Universidad de Nariño.

DESCRIPCIÓN	CARACTERÍSTICAS HPLC-PDA
Equipo	WATERS BREEZE
Detector	PDA 2998 (190-400 nm)
Columna	C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 micras) Xterra Waters
Inyector	Rheodyne 7525 y LOOP de 20 mL

Fuente: Esta Investigación.

Figura 11. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia, HPLC-PDA.



Fuente: Esta Investigación.

Las condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de estos compuestos se describen en la sección 4.2, como resultado del proceso de adecuación cromatográfica.

3.5.2 Diseño Experimental

La optimización de la extracción de AGEs en semillas de *Annona muricata* por el método soxhlet, se realizó mediante un diseño experimental aplicando la metodología de superficie de respuesta. Los factores que se evaluaron fueron: concentración del etanol, tiempo de extracción, y relación muestra-solvente. Para cada factor se tomaron 3 niveles.

El diseño experimental para la extracción de acetogeninas, se compuso por 3 factores experimentales con 2 respuestas. El número de análisis fue 16, incluyendo 2 puntos centrales por bloque y 2 bloques respectivamente. Los grados de libertad que se manejaron para el error son de 21, siendo un diseño aleatorizado. Los factores se expresaron en las siguientes tablas:

Tabla 4. Factores del diseño experimental en la extracción de Acetogeninas por el método soxhlet.

FACTORES	BAJO	ALTO	UNIDADES
Etanol	90,0	100,0	(%)
Tiempo	4,0	8,0	(h)
muestra solvente	2:100	6:100	(Proporción g/ml)

Fuente: Esta investigación.

La combinación de los factores y niveles del diseño experimental implementado se reporta en la tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental para la extracción de acetogeninas presentes en semillas de *Annona muricata*.

Experimento	FACTORES		
	Etanol (%)	Tiempo (h)	Muestra- solvente (g/mL)
1	95	6	4:100
2	100	4	2:100
3	90	8	6:100
4	100	8	6:100
5	101,436	6	4:100
6	95	8,57438	4:100
7	100	4	6:100
8	95	6	6,5:100
9	90	4	6:100
10	95	6	1,5:100
11	88,5641	6	4:100
12	95	3,42562	4:100
13	95	6	4:100
14	100	8	2:100
15	90	4	2:100
16	90	8	2:100

Fuente: Esta investigación.

Para el procesamiento de datos, se utilizó el paquete estadístico Statgraphics XVI Centurion. Las unidades de respuesta obtenidas son representadas en la tabla 6.

Tabla 6: Unidades de variables de respuesta del diseño experimental en la extracción de acetogeninas por el método soxhlet.

RESPUESTAS	UNIDADES
AGEs	mg/g
Rendimiento	número de picos de AGEs

Fuente: Esta investigación.

Las variables de respuesta del diseño se expresaron en términos de acetogeninas totales (mg/g) y número de picos cromatográficos correspondientes a la identificación de acetogeninas. Los montajes correspondientes al diseño experimental se muestran a continuación:

Figura 12. Montaje de extracción Soxhlet para semillas de *Annona muricata*.



Fuente: Esta investigación.

3.6 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACETOGENINAS EN SEMILLAS DE *Annona muricata*

3.6.1 Identificación de Acetogeninas en Semillas de *Annona Muricata*

La identificación de acetogeninas se realizó con las condiciones de separación cromatográficas obtenidas en el apartado 4.2, realizando un barrido desde 205-400 nm, con el fin de aumentar la selectividad en el análisis. En la identificación tentativa se utilizó el método de comparación de los espectros UV-Vis de los picos cromatográficos con el espectro UV-Vis del estándar de Annonacina.

Se realizó la asignación de acetogeninas, por medio de comparación con referencias bibliográficas, teniendo en cuenta componentes como el espectro UV-Vis y el tiempo de retención, para lo cual se implementaron los gradientes cromatográficos respectivos en los estudios tomados como referencia.

3.6.2 Cuantificación de Acetogeninas en Semillas de *Annona Muricata*

Para la cuantificación de AGEs totales, se implementó la extracción a las condiciones óptimas descritas en la sección 4.4.5. Se integraron los picos cromatográficos correspondientes a acetogeninas y se realizó la sumatoria de áreas cromatográficas. La cuantificación total relativa, se hizo con base en la relación de la sumatoria de áreas de AGEs del extracto, con el área del estándar a concentraciones específicas.

En la cuantificación de la Annonacina en la muestra, se construyó una curva de calibración con el estándar a concentraciones de 20, 50,100, 200, y 500 ppm, la

ecuación de la recta se relacionó la concentración del compuesto con el área, y por medio de extrapolación con la curva se obtuvo la concentración en ppm.

3.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS CON TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE *Annona muricata*

3.7.1 Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) del Extracto Etanólico de *Annona Muricata*

El análisis por GC-MS se llevó a cabo en un equipo GC-MS SHIMADZU QP2010S, con las siguientes especificaciones:

Tabla 7: Especificaciones del Equipo Cromatográfico GC-MS para Análisis de AGEs en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*. Laboratorio de Cromatografía –Universidad de Nariño.

DESCRIPCIÓN	CARACTERÍSTICAS
Técnica	GC-MS
Equipo	Shimadzu GC-MS QP2010S
Detector	MSD modo: <i>Full scan</i> (40-700 umas)
Columna	DB-5MS (30 m x 0,35 mm x 0,25 µm) Agilent Tech, USA
Inyector	<i>Split</i>

Fuente: Esta Investigación

La fase móvil empleada fue Helio UAP (Linde, 99,999%), a un flujo de 1,0 mL/min y un volumen de inyección de 1,0 µL (relación *split* de 10:1). La temperatura del

inyector fue de 250°C; y la temperatura del horno se programó de acuerdo a las condiciones reportadas por Shibula y Velavan, (2015). Las cuales son: 110°C (isotérmica durante 2 min), con un incremento de 10°C /min, a 200°C; y continuación con un aumento de 5°C/min hasta 280°C, terminando con una isoterma 9 min a 280°C. El modo de adquisición fue *full scan* a 70 e.V de EI. ¹⁰⁰

La cantidad porcentual relativa de cada componente se calculó mediante el análisis de su área media de pico en relación a las áreas totales. La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación con los espectros de masas y los iones fragmentos característicos de estos compuestos, de acuerdo a lo reportado en la bases de datos NIST y Wiley.

Figura 13. Cromatógrafo de Gases-Masas Shimadzu GC-MS QP2010.



Fuente: Esta investigación.

¹⁰⁰ SHIBULA, K. y VELAVAN, S. Determination of Phytocomponents in Methanolic Extract of *Annona muricata* Leaf Using GC-MS Technique: *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6. 2015. 1251-1255 p.

3.7.2 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Acoplada a Espectrometría de Masas Tandem (LC-MS/MS) del Extracto Etanólico de *Annona Muricata*

El análisis por LC-MS/MS, se llevó a cabo según las condiciones de separación cromatográfica propuestas por Najihah et al, y descritas en el apartado 3.2.2.

Las especificaciones del equipo son las siguientes:

Tabla 8: Especificaciones del Equipo Cromatográfico LC-MS/MS IT para Análisis de AGEs en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*. Laboratorio FOODOMICS –CIAL- Universidad Autónoma de Madrid.

DESCRIPCIÓN	CARACTERÍSTICAS
Técnica	LC-MS/MS IT
Equipo	Agilent 1200/ (LC/MS-IT) Agilent 6320
Detector	DAD-LC/MS IT
Columna	Zorbax Eclipse (150 mm x 4,6 mm x 3,5 μm)

Fuente: Esta investigación

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida Agilent 1200 con detector DAD y acoplado a un espectrómetro de masas tándem de trampa de iones (LC/MS-IT) Agilent 6320 equipado con interface electrospray (ESI) e inyector automático.

Las condiciones de operación del detector de masas fueron: Drying gas (N_2) a un flujo de $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ a temperatura de 325°C . Nebulizador 35 psi; Voltaje del capilar 3000 V. Rango de masas 100-900. Interface ESI operado en modo negativo y positivo. La adquisición de datos se realizó con el software LC/MS Ion trap

system 6320 series de Agilent. Los espectros de masas se analizaron empleando la base de datos Mass Bank y RANISAHARIVONY.¹⁰¹ .

3.8. ANÁLISIS DE MUESTRAS

3.8.1 Análisis de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* de las regiones de Caldas y de Nariño

Teniendo en cuenta las condiciones óptimas de extracción de acetogeninas en semillas de *Annona muricata* obtenidas como resultado de la realización del diseño experimental (apartado 4.4.5), y las condiciones cromatográficas adecuadas de la sección 4.2, se realizó un análisis de 6 muestras. Se comparó, el número y la concentración de acetogeninas en tres muestras del Departamento de Caldas y tres del Departamento de Nariño. Los resultados se analizaron por pruebas de diferencias significativas mediante ANOVA simple.

De manera adicional, se realizó un análisis comparativo de los métodos de extracción soxhlet y maceración química, para lo cual se tuvo en cuenta las condiciones de maceración descritas en la tabla 9.

¹⁰¹ RANISAHARIVONY, B., RAMANANDRAIBE, V., RASOANAIVO, L., RAKOTOVAO, M. y LEMAIRE, M. Separation and Potential Valorization of Chemical constituents of Soursop Seeds: *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015. 161-171 p.

3.8.2 Extractos etanólicos de matrices de *Annona muricata* de la Región de Caldas

3.8.2.1 Extracción de acetogeninas en cáscaras de *Annona muricata* de la región de Caldas

Se realizó la extracción etanólica de cascara de *Annona muricata*, por el método soxhlet bajo las condiciones establecidas como resultado de la optimización del método de extracción en la sección 4.4.5. Adicionalmente se realizó la extracción etanólica de la matriz por medio del método de extracción de maceración química según las condiciones descritas en la tabla 9.

3.8.2.2 Extracción de Acetogeninas en hojas de *Annona muricata* de la región de Caldas

La extracción etanólica de hojas de *Annona muricata* se realizó según lo descrito por Najihah et al. (2015), bajo las condiciones óptimas de extracción de acetogeninas en esta matriz, (sección 3.2.1). Se realizó la extracción etanólica de hojas por medio del método de extracción de maceración química según las condiciones descritas en la tabla 9.

3.8.2.3 Comparación de extractos etanólicos de semillas, cáscara y hojas de *Annona muricata* de la región de Caldas

El procesamiento de los datos para la comparación de los extractos se realizó con el paquete estadístico Statgraphics XVI Centurion, para lo cual se evaluaron tipos de matrices y métodos de extracción de acetogeninas. Las condiciones de extracción para las diferentes matrices se muestran a continuación en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de extracción de las muestras de semillas, hojas y cáscaras de *Annona muricata* por Soxhlet y Maceración Química.

EXTRACCIÓN SOXHLET

Experimento	Muestra	Etanol	Muestra-Solvente	Horas
1	Semillas	90%	1,5g/100mL	8
2	Semillas *	90%	1,5g/100mL	8
3	Cáscara	90%	1,5g/100mL	8
4	Hojas	100%	1,5g/100mL	6

MACERACIÓN QUÍMICA

Experimento	Muestra	Etanol	Muestra-Solvente	Días
1	Semillas	90%	1,5g/100mL	8
1	Semillas*	90%	1,5g/100mL	8
2	Cáscara	90%	1,5g/100mL	8
4	Hojas	100%	1,5g/100mL	8

*Semillas del departamento de Nariño.

Fuente: Esta Investigación.

Figura 14. Montaje Soxhlet: hojas, cáscara y semillas.



Fuente: Esta Investigación.

Figura 15. Montaje maceración química: hojas y cascaras.



Fuente: Esta Investigación.

3.9 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AL TROLOX (TEAC) CON EL RADICAL ABTS●+ (Acido 2,2'-Azino-Bis-3-Etilbenzotiazolin-6- Sulfónico)

Con este método se estudió la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de cáscara y semillas, obtenidos a las condiciones óptimas de extracción del diseño experimental.

Se generó el radical ABTS●+ tras la reacción de ABTS 7 mM con persulfato potásico 2,45 mM. Se dejó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS●+ se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de $0,7 \pm 0,2$ en una longitud de máxima absorbancia de 734 nm.

Para la reacción, se tomó 3 mL de la solución de ABTS●+ y se agregó 30 μ L del extracto. Agitando constantemente durante 1 minuto y transcurridos 6 minutos de reposo se tomó lectura de la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merk 300. ¹⁰²

¹⁰² RE, R. y PELLEGRINI N. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay: international antioxidant research centre, *elsevier science publishers b.v.*, London. 1998. 1231-1237 p.

Por medio de una curva de calibración con soluciones de Trolox a concentraciones de 0,5; 1,5 y 2 mM y siguiendo la metodología antes descrita se expresó los resultados en mM de Trolox/g de extracto de acuerdo a los requerimientos de cada muestra. La funcionalidad del método se verificó con un patrón de ácido ascórbico 5 mM, el método se realizó con cinco repeticiones.¹⁰³

Figura 16. Análisis de capacidad antioxidante de las muestras por TEAC.



Fuente: Esta investigación.

¹⁰³ JIMÉNEZ, J.P. y VILLARREAL, J. Estudio Químico de Pigmentos Tipo Antocianina Presentes en el Fruto del Mutilon (*Hyeronima macrocarpa*): Universidad de Nariño. Tesis de Grado. 2008.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

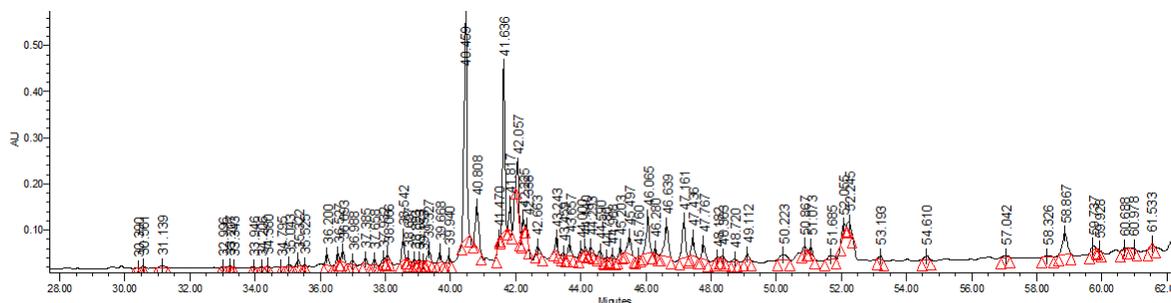
4.1 ENSAYOS PRELIMINARES EN SEMILLAS DE *Annona muricata* DE LA REGIÓN DE CALDAS

Después de la recolección y el secado al ambiente de las semillas de *Annona muricata* del departamento de Caldas, se determinó el porcentaje de humedad implementando la Ecuación 1, obteniéndose un valor promedio de 12%, con el cual se realizó la corrección en peso de semillas para los posteriores análisis.

4.1.1 Determinación de Acetogeninas

Para los ensayos preliminares de determinación de AGEs, se utilizaron las condiciones de extracción e identificación propuestas por Najihah et al descritas en la sección 3.2.1 y 3.2.2, para hojas de *Annona muricata*. El cromatograma general de los extractos etanólicos de semillas a estas condiciones se muestra a continuación:

Figura 17. Cromatograma de extractos de semillas de Caldas a condiciones de extracción y cromatográficas postuladas por Najihah *et al* (2016).



Fuente: Esta Investigación.

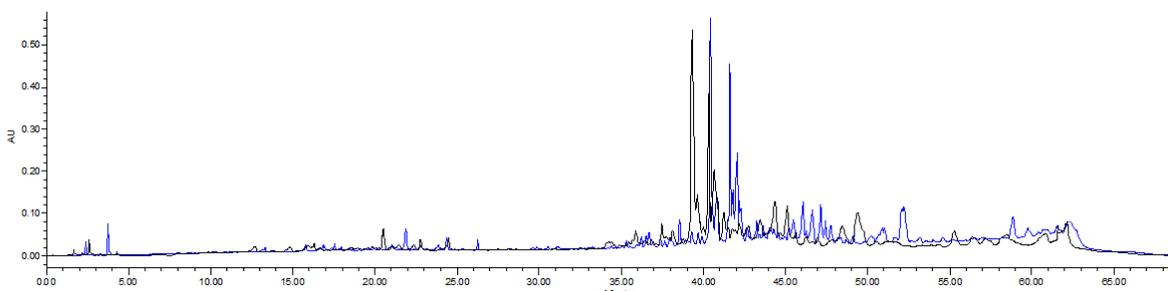
En el cromatograma se identificaron presuntivamente 22 picos que por su espectro UV-Vis en comparación con lo reportado en la literatura, confirman la presencia de acetogeninas en los extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*, concluyendo que el método de extracción soxhlet y el solvente utilizado si permiten la extracción de estos compuestos. Los compuestos de mayor intensidad presentes en el cromatograma (40,450 y 41,636 min), según el análisis espectral corresponden a AGEs. Con esta prueba también se relacionó el tiempo de retención de las acetogeninas con el gradiente cromatográfico, usando un gradiente de elución acetonitrilo: agua, lo que aportó información que se usó posteriormente para las pruebas de idoneidad del gradiente para la separación de las acetogeninas en la muestra de semillas.

4.1.2 Estabilidad de las Acetogeninas en los Extractos Etanólicos de semillas con Respecto al Tiempo

Se determinó la estabilidad de las acetogeninas en los extractos etanólicos refrigerados analizando los extractos en diferentes intervalos de tiempo, para lo cual se evaluó la intensidad de los picos cromatográficos, área de picos de AGEs

y numero de AGEs. A continuación se muestra el cromatograma comparativo de los extractos analizados a tiempo 0 y después de 5 meses de la extracción.

Figura 18. Comparación extractos etanólicos frescos (tiempo cero), y extractos de semillas almacenados (5 meses).



* El cromatograma de color azul, hace referencia al extracto fresco en el tiempo cero.

*El cromatograma de color negro, hace referencia al extracto de las acetogeninas refrigeradas por 5 meses.

Fuente: Esta investigación

Se observa un cambio en el tiempo de retención de los picos cromatográficos, debido a que el disolvente de la muestra tuvo una proporción diferente de relación IPA: ACN), lo cual afectó la polaridad de los extractos cambiando el tiempo de retención 1 minuto.

En el cromatograma en color negro (5 meses) se observa las intensidades de los picos más representativos (acetogeninas) no presentaron cambios significativos en comparación con los picos del cromatograma en color azul (tiempo 0), por lo cual la degradación con respecto a la intensidad de picos fue mínima, este hecho se verificó con los posteriores análisis. La verificación de posibles cambios en el contenido de AGEs debido a degradaciones, se realizó por la comparación de áreas de picos correspondientes a acetogeninas en ambos cromatogramas, la cual no expresó una degradación de este tipo de compuestos con relación al tiempo de almacenamiento de los extractos.

El cromatograma en color negro (tiempo 0) presento 53 picos, de los cuales 19 correspondieron presuntivamente a acetogeninas (en correlación con los espectros UV-Vis de cada pico cromatográfico y los reportes bibliográficos), para el cromatograma en azul (5 meses), fueron 48 picos, de los cuales 17 presuntivamente correspondieron a acetogeninas. La diferencia entre acetogeninas en el extracto fresco y los extractos almacenados fue de dos compuestos. Sin embargo debido a que no se presenta disminución de área cromatográfica para los compuestos de interés, esta diferencia no se asocia a la degradación, sino que es atribuida al disolvente de la muestra, ya que este pudo influir directamente en la separación de los compuestos.

El cambio de disolvente puede interferir directamente con el número de picos y la resolución de los mismos. Los compuestos analizados tienen estructuras muy similares, de cadenas muy largas que presentan isómeros, por lo cual los tiempos de retención son muy cercanos, y se pueden presentar coeluciones o solapamientos entre los picos cromatográficos. El diluyente en este caso IPA:ACN (85:15) presento más afinidad a la fase móvil utilizada para la separación de los compuestos, por lo cual disminuyó las coeluciones y picos asimétricos, logrando una mejor separación evidenciada con el número de picos.

Lo anterior se puede corroborar con base en la resolución cromatográfica, los picos en el primer cromatograma muestran una mayor separación, con lo cual se observan algunos picos de menor intensidad que no se presentan en el segundo cromatograma.

Los compuestos retenidos a tiempos menores de 30 minutos, son atribuidos según los espectros UV-Vis a polifenoles, taninos, entre otros; los cuales presentaron una degradación evidenciada en la disminución de áreas de picos cromatográficos. Lo anterior se observa en el cromatograma en negro (tiempo 0).

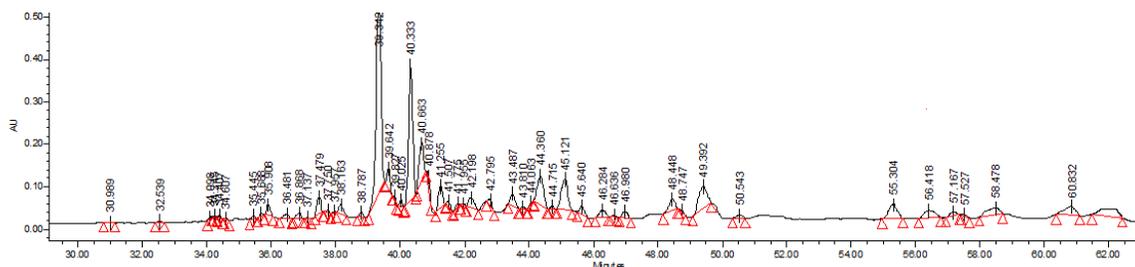
Se realizaron replicas, en las cuales se determinó que los compuestos fueron estables con respecto al tiempo, y se estableció la proporción de acetonitrilo:

isopropanol como disolvente a implementar para los análisis cromatográficos en el diseño experimental (Sección 4.2.1).

4.1.3 Estabilidad de Acetogeninas en la Matriz con Respecto al Tiempo

Se determinó la estabilidad de los compuestos dentro de la matriz estudiada (semillas), para lo cual se siguió la metodología descrita en la sección 3.2.3.2. El cromatograma de las semillas almacenadas a condiciones ambientales por 5 meses se muestra a continuación.

Figura 19. Cromatograma de Acetogeninas en semillas de *Annona muricata* almacenadas por 5 meses.



Fuente: Esta Investigación.

La determinación de la estabilidad de acetogeninas se realizó con base en la intensidad de picos cromatográficos, área de picos de AGEs y número de AGEs.

El cromatograma presentó 55 picos de los cuales 20 corresponden a acetogeninas. Se comparó el cromatograma de los extractos de las semillas guardadas con el cromatograma de la primera extracción (Figura 17), la cual presentó 22 AGEs. No se obtuvo diferencias apreciables en el número de acetogeninas entre un extracto y otro, teniendo en cuenta que las acetogeninas faltantes, corresponden a picos cromatográficos de áreas no significativas, por lo

cual no es considerable la degradación de estos compuestos con respecto a la matriz a estas condiciones.

Con los resultados obtenidos en las pruebas preliminares y las réplicas posteriores de estos ensayos, se determinó que las acetogeninas son compuestos estables con respecto al tiempo tanto dentro de la matriz (semillas), como en los extractos almacenados a temperatura de -4°C , lo cual permitió el almacenamiento de los extractos para los diferentes análisis.

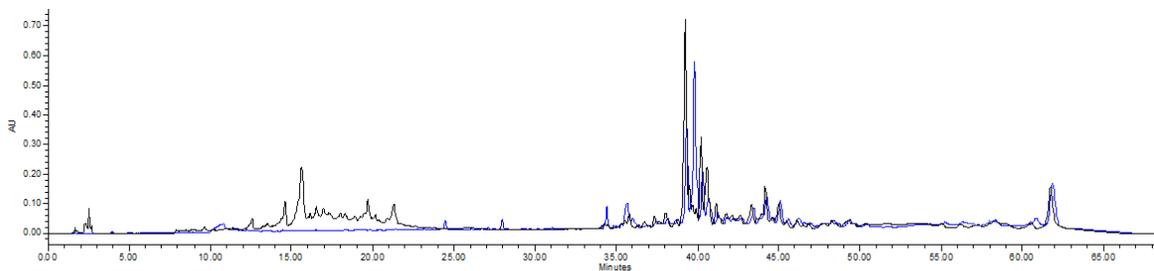
Los compuestos no identificados cuyos tiempos de retención son menores a 30 min, presentaron degradaciones. Estos compuestos pueden atribuirse a los compuestos polifenólicos encontrados en la muestra, debido a la composición fitoquímica de las semillas de *Annona muricata*, la polaridad y los espectros UV-Vis de los picos en esta región cromatográfica.

4.1.4 Purificación

4.1.4.1 Ensayo de Purificación Fraccionamiento Líquido-Líquido

El fraccionamiento líquido-líquido, se realizó acorde a lo descrito en la sección 3.2.4.1. La fracción analizada, correspondió a la fracción polar rica en acetogeninas según lo reportado bibliográficamente para purificación de estos extractos. El extracto apolar rico en ácidos grasos fue descartado. El cromatograma obtenido se muestra a continuación:

Figura 20. Comparación cromatograma de extracto etanólico de semillas con extracto fraccionado Líquido-Líquido.



- * El cromatograma en color negro corresponde al extracto sin purificar.
- * El cromatograma en color azul corresponde a la fracción líquido-líquido.

Fuente: Esta Investigación.

La diferencia entre tiempos de retención de los compuestos en ambos cromatogramas es de 0,359 min, presentándose una mayor retención la muestra fraccionada. Debido al fraccionamiento realizado, el solvente de dilución cambió originando una mayor retención de los compuestos por la interacción del diluyente con la fase móvil y la fase estacionaria.

En la comparación cromatográfica se puede observar una diferencia en la intensidad de los picos. En la muestra no purificada (cromatograma en negro), se presentan picos muy intensos en tiempos de retención menores a 30 min, los cuales no aparecen en la fracción del extracto purificado, la comparación cromatográfica a tiempos de retención superiores a 30 min (área general de retención de acetogeninas), no presentó muchas diferencias entre los picos. Sin embargo las concentraciones relativas de los compuestos se ven disminuidas por la purificación de los extractos, lo cual se evidencia con la intensidad de los picos y fue corroborado con la sumatoria de las de áreas totales de AGEs, lo que permitió establecer una disminución en la concentración de los compuestos de interés después de realizar el fraccionamiento. La polaridad media de las acetogeninas las hace susceptibles a interacciones con solventes polares como apolares, por lo

cual se presentaron pérdidas significativas en la concentración de las mismas al realizar los fraccionamientos.

Con respecto al número de acetogeninas, el cromatograma azul correspondiente al fraccionamiento del extracto etanólico, presentó un total de 44 picos, de los cuales 13 son acetogeninas, lo cual se verificó por comparación con los espectros de UV-Vis experimentales con la bibliografía. El cromatograma de color negro, del extracto crudo, tuvo 58 picos de los cuales 20 correspondieron a acetogeninas. Con la purificación disminuyó el número de picos cromatográficos correspondientes a las acetogeninas, impidiendo la identificación de 7 compuestos de interés.

Por lo anterior se descartó la necesidad de este tipo de purificación ya que no favorece la disminución de compuestos adicionales a las AGEs en el área de interés cromatográfico (30 min-60 min), y por el contrario, originó una disminución en número y concentración de los compuestos a analizar. También se resalta el hecho de que el diluyente de la muestra puede tener influencia en la separación de los compuestos, originando solapamientos de picos o bajas resoluciones cromatográficas.

4.1.4.2 Ensayo de Purificación con Sílica

Se realizó la purificación con sílica de los extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* con la metodología descrita en la sección 3.2.4.2, con el fin de facilitar los posteriores análisis de estos extractos eliminando compuestos de carácter más polar.

La elección de la sílica como fase estacionaria para la separación de acetogeninas se realizó, con base en las metodologías reportadas en la literatura. La sílica es

comúnmente utilizada para separar sustancias polares como (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente, por lo cual en este caso es utilizada para la retención de compuestos polares como polifenoles.¹⁰⁴

En el primer fraccionamiento el extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* se pasó por el cartucho de Sílica, y se lavó con una mezcla de Diclorometano-Metanol en proporción (1:1), esta mezcla fue adecuada para la separación de compuestos medianamente polares como las AGEs, facilitando su solubilidad. La fracción 2 correspondió al lavado realizado con hexano, con el fin de eliminar posibles impurezas de compuestos apolares. La fracción con Metanol se utilizó para la separación de compuestos más polares.

Las diferentes fracciones fueron analizadas por HPLC-PDA a las condiciones establecidas en 3.2.2. La fracción 1 obtuvo un total de 8 acetogeninas presentes en el extracto. La fracción 2 con hexano, presento un total de 2 acetogeninas, y la fracción 3 logró la separación de 4 acetogeninas.

Debido a la polaridad media de las acetogeninas y la gran variedad de estos compuestos, algunos pueden ser separados por solventes polares y otros de la misma naturaleza pueden ser separados por compuestos apolares lo que dificulta la purificación, encontrándose estos compuestos en los diferentes tipos de fracciones.

El análisis cromatográfico de la comparación de las fracciones obtenidas, con el extracto crudo, presentó una disminución de áreas cromatográficas de acetogeninas totales, y una disminución en el número de picos de acetogeninas, (teniendo en cuenta la sumatoria del número de compuestos de cada fracción).

¹⁰⁴ El Gel de Sílice En La Cromatografía: <https://www.quiminet.com/articulos/el-gel-de-silice-en-la-cromatografia-2565789.htm>. 2011.

Por lo anterior se consideró la purificación con sílica como un método innecesario antes de analizar las muestras, ya que ocasiona disminución de los analitos, lo cual no es viable a la hora de realizar las cuantificaciones.

Con respecto al número de AGEs, al realizar la purificación no se evidenciaron 7 de las acetogeninas presentes en los extractos crudos de semillas de *Annona muricata*, lo cual no permite una identificación adecuada de estos compuestos. A su vez, este tipo de purificación implicaría triplicar los análisis (análisis de 3 fracciones) y realizar el adecuamiento cromatográfico para cada fracción, lo cual se traduce con un gasto de reactivos y tiempo de análisis de muestras, sin ofrecer resultados positivos a la identificación y cuantificación de estos compuestos.

Adicionalmente se tiene en cuenta que el HPLC, es una de las formas más eficientes para la separación de compuestos, por lo cual al implementar condiciones cromatográficas adecuadas para análisis específico de una matriz, y sobre todo en el análisis específico de compuestos con espectros UV-Vis característicos, descarta la necesidad de purificaciones adicionales de los extractos.

4.2 ADECUACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISIS DE AGEs POR HPLC

Para la adecuación de la metodología analítica se realizaron diferentes ensayos con el fin de obtener las mejores condiciones cromatográficas para la separación e identificación de las acetogeninas. Se tuvo en cuenta principalmente aspectos relacionados con la influencia de la longitud de onda en la detección, la longitud de columna, el disolvente de la muestra, la composición y flujo de la fase móvil y modo de separación (gradientes cromatográficos).

4.2.1 Diluyente

En la selección del diluyente más adecuado usado para solubilizar la muestra del extracto etanólico concentrado, se determinó la solubilidad de los compuestos en etanol, metanol, diclorometano, acetonitrilo, isopropanol y agua. El extracto concentrado de semillas, presentó una mayor solubilidad en isopropanol a menores volúmenes de dilución en comparación con los otros diluyentes. La importancia de este mínimo volumen de solubilidad, radica en la relación de la concentración de los compuestos de interés (acetogeninas) con su detección y separación en los análisis cromatográficos.

El diluyente final de las muestras fue IPA: ACN en una relación (85:15). Se realizó la combinación del diluyente con acetonitrilo, ya que es aconsejable que el solvente de dilución de la muestra tenga una fracción de fase móvil. El acetonitrilo es utilizado con el fin de disminuir la dispersión de las moléculas en la separación cromatográfica debido a la afinidad con la fase móvil y la interacción con la fase estacionaria, lo que aumenta la definición de picos y aumenta la resolución.¹⁰⁵

4.2.2 Longitud de Onda

Debido a la gran variedad de componentes en los extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*, se realizó un *screening* de detección que va desde 200 a 400 nm, evaluándose los cromatogramas a 205, 220, 298 y 350 nm. Teniendo en cuenta que la detección espectrofotométrica aporta información específica de los compuestos, demostrando según las bandas de absorción en el espectro, la presencia de especies químicas determinadas, se realizó la comparación de los picos cromatográficos que presentaron máximos de absorbancias en estas

¹⁰⁵ ARTURO, D. Laboratorio de Cromatografía, Universidad de Nariño. 2018.

longitudes de onda y se hizo un análisis completo de los picos cromatográficos, comparando sus espectros UV-Vis con los reportados en la bibliografía para AGEs identificar las longitudes de onda a las cuales se presentaban las acetogeninas y a su vez determinar según los espectros UV-Vis, que tipo de compuestos posiblemente presentaron absorbancias a las mismas condiciones.

Se determinó la longitud de onda de 220 nm para el análisis de los extractos, teniendo en cuenta que la absorción de las acetogeninas se encuentra en un rango de 210 a 230 nm, y que los espectros UV-Vis de las acetogeninas, presentan un único máximo de absorción, identificándose fácilmente a esta longitud de onda, con respecto a otros compuestos.

En estudios fitoquímicos de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* se encontraron compuestos como: ácidos grasos, taninos, polifenoles, alcaloides y acetogeninas, de los cuales algunos presentan máximos de absorbancia a 220 nm, por lo cual fue necesario determinar las posibles interferencias en el análisis de AGEs con respecto a estos compuestos a la longitud de onda establecida (220 nm).¹⁰⁶ Una de las consideraciones que se hizo, fue tener en cuenta que cada uno de estos metabolitos secundarios pueden presentar más de un máximo de absorbancia.

Entre los compuestos fitoquímicos de las semillas de *Annona muricata* se encuentran los taninos, los cuales pueden ser extraídos de las células vegetales con solventes polares, en especial con mezclas de solventes de agua-alcoholes, por lo cual pudieron ser extraídos a las condiciones de extracción utilizadas. Sin embargo, estos compuestos presentan máximos de absorción entre 510 y 550 nm. Si bien esta longitud de onda no fue revisada en el *screening*, según los reportes

¹⁰⁶ LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

bibliográficos, presentan en el espectro UV-Vis dos máximos de absorción, y por lo tanto son diferentes de los espectros UV-Vis de acetogeninas.¹⁰⁷

Para los alcaloides presentes en las semillas, la extracción con compuestos muy polares como agua permite sustraer de la matriz aquello que se encuentran en forma de sales solubles. Sin embargo, para una extracción adecuada de este tipo de compuestos es necesario el uso de solventes acidificados, por lo cual en el extracto etanólico la concentración de alcaloides debe ser baja o nula. Considerando también la longitud de onda a la que absorbe este tipo de compuestos, se reporta que presentan dos máximos de absorción, los cuales varían generalmente entre 230-240 nm y 280-290 nm permitiéndose distinguir de los espectros de AGEs. Por el tipo de matriz estudiada, los posibles alcaloides que se encontrarían serían de tipo bencilisoquinolinicos detectados a longitudes de onda de 230 - 280 nm, con lo cual no deberían causar interferencias a la longitud de onda establecida para el análisis de Acetogeninas.¹⁰⁸

Entre los compuestos mayoritarios de las semillas de *Annona muricata*, se encuentran los ácidos grasos, los cuales en su mayoría son insaturados, estos son detectados a longitudes de onda que varían entre 230 - 300 nm. Estos compuestos de baja polaridad pueden ser extraídos aun con uso de solventes polares, debido al método de extracción utilizado y la cantidad de ciclos de extracción. Los ácidos grasos de las semillas de *Annona muricata* presentan máximos de absorbancia a 235 y 285 nm y son analizados a longitudes de onda superiores a los 290 nm. A pesar de presentar espectros UV-Vis diferentes a los de las acetogeninas, los ácidos grasos presentan un máximo de absorción a 235 nm (absorción cercana al rango de AGEs entre 220 y 230 nm), por lo tanto se

¹⁰⁷ ISAZA, J., RAMIREZ, S., GUEVARA, C. y VELOZA, L. Estimación Espectrofotométrica de Taninos Hidrolizables y Condensados en Plantas Melastomatáceas: Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira. Scientia et Technica, Año XIII. 2007.

¹⁰⁸ ARTURO F. Estudio Químico de los Alcaloides Presentes en las Hojas de Yerbamora (*Solanum nigrum* L.), Originaria de los Municipios de Pasto y Chachagüí. Trabajo de Grado (Químico).

evaluaron como posibles interferencias en el análisis a la longitud de 220 nm.¹⁰⁹¹¹⁰ Experimentalmente se estableció este hecho con el análisis de un estándar de ácido linoleico en términos de selectividad, verificando su presencia en las diferentes longitudes de onda anteriormente descritas en la realización del *screening* cromatográfico.

Entre los polifenoles con mayor relevancia encontrados en las semillas de *Annona muricata* según reportes fitoquímicos se encuentran flavonoides, los cuales son analizados a longitudes de onda que varían desde 200 - 300 nm. Estos compuestos se caracterizan por presentar uno de sus máximos de absorbancia en el mismo rango de las acetogeninas (210 -230 nm), sin embargo, los espectros UV-Vis de estos compuestos en general, presentan más de un máximo de absorción según tipo de compuesto, variando entre 2, 3, y 4 máximos de absorbancias, mientras que las acetogeninas presentan espectros con un solo máximo.^{111 112} La diferencia entre los espectros UV-Vis y los tiempos de retención de los polifenoles con respecto a las acetogeninas, permite descartar interferencias en el análisis de AGEs ya que se pueden discriminar estos compuestos debido a sus espectros característicos. Este hecho se verificó con el análisis de selectividad haciendo uso de un patrón de Quercetina.

¹⁰⁹ LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

¹¹⁰ NEUZA, J., BERTANHA, B. y MORENO, L., Actividad Antioxidante y Perfil de Ácidos Grasos de Las Semillas de Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* BERG): Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio. 2011.

¹¹¹ LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

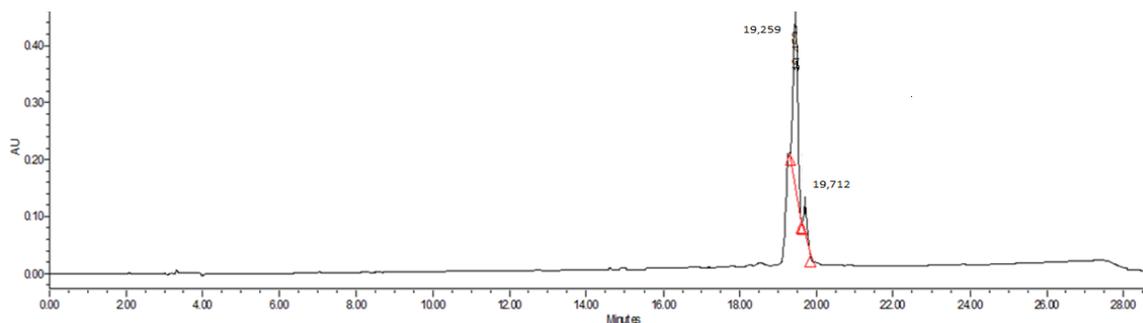
¹¹² KELLER, R. Biosynthesis, Flavonoids. Biological Effects and Dietary Sources: Nutrition and Diet Research Progress Series. 2009.

4.2.2.3 Selectividad Cromatográfica para la Identificación de Acetogeninas con base en Análisis de Estándares

Estándar de Annonacina

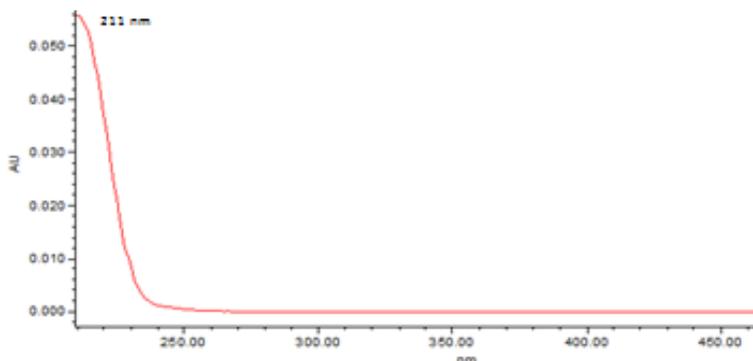
El cromatograma del estándar de Annonacina a 220 nm muestra dos picos cromatográficos con tiempos de retención de 19,259 min y 19,712 min, el compuesto mayoritario corresponde a la L-Annonacina con el 95% de pureza, y el compuesto en menor cantidad corresponde al isómero de Annonacina reportado en las especificaciones técnicas del estándar (ALB Technology Lote No ALB-20170303, Shanghai, China). El cromatograma y el espectro UV-Vis del compuesto se muestran a continuación:

Figura 21. Cromatograma Annonacina a 220 nm.



Fuente: Esta investigación.

Figura 22. Espectro UV-Vis Annonacina, máximo de absorbancia 211 nm



Fuente: Esta investigación.

El espectro UV-Vis de la Annonacina, representa los espectros característicos de las acetogeninas con un máximo de absorbancias entre 210 y 230 nm. Estas especificaciones fueron corroboradas para los reportes de las acetogeninas en los estudios bibliográficos revisados, por lo cual fueron tomadas como referencia para la identificación de estos compuestos en las diferentes muestras analizadas.^{113 114}

Estándar de Ácido Linoleico

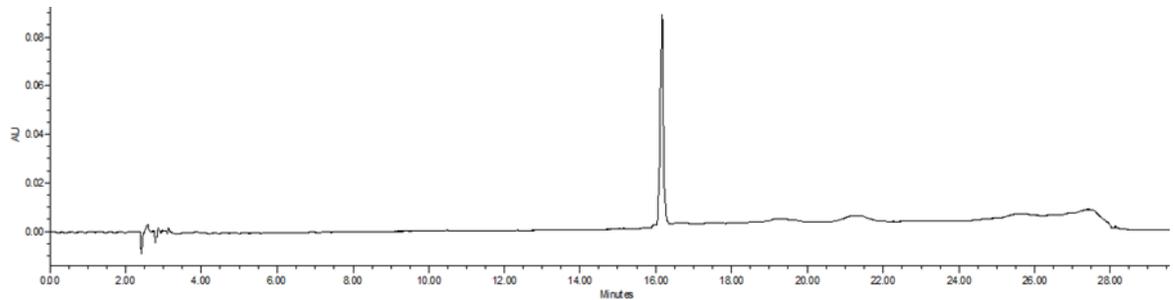
El estándar de ácido linoleico presentó cromatogramas diferentes para las longitudes de onda evaluadas. A longitudes de onda de 205 y 220 nm se evidenciaron picos cromatográficos poco definidos, con tiempos de retención ubicados en la región cromatográfica general de las acetogeninas. El análisis de los espectros UV-Vis presentó varios máximos de absorbancias diferenciándose del espectro de la Annonacina, la cual fue usada como estándar.

¹¹³ FLOREZ, Y. y MARTINEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

¹¹⁴ LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

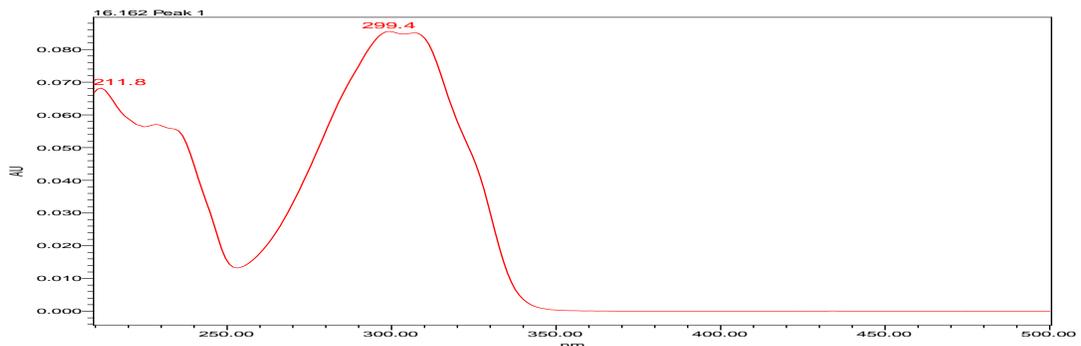
A longitudes de onda de 298 nm el ácido linoleico se observa como un pico definido con un tiempo de retención de 16,162 min (tiempo de retención en la región cromatográfica de acetogeninas). El espectro UV-Vis del compuesto presento 2 máximos de intensidad a 211 y 299 nm. Se puede establecer que la longitud de onda que favorece el análisis de estos compuestos es de 298 nm.

Figura 23. Cromatograma Ácido Linoleico a 298 nm.



Fuente: Esta Investigación.

Figura 24. Espectro UV-Vis Ácido Linoleico a 298 nm.



Fuente: Esta Investigación.

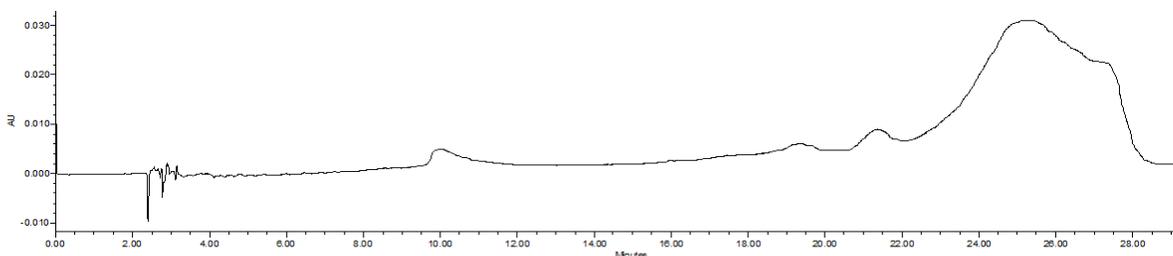
Adicionalmente se compararon los espectros de Ácido Linoleico y Annonacina, con los reportados para diversos ácidos grasos presentes en los extractos de semillas. A pesar de tener tiempos de retención similares y máximos de absorción a longitudes de onda entre 210 y 235 nm, los ácidos grasos presentan picos no simétricos a la longitud de onda de 220 nm, y sus diferencias espectrales son notorias con respecto a las acetogeninas, con lo cual, se puede evitar una identificación errónea, en referencia a la selectividad de la técnica de análisis de los compuestos de interés.

Estándar de Quercetina

Las posibles interferencias de polifenoles en el análisis de AGEs, se evaluaron con Quercetina como compuesto representativo de este grupo, ya que además de ser accequible, presenta las características de los polifenoles reportados en estudios fitoquímicos para este tipo de muestras. Estos compuestos son identificados como grupos mayoritarios en semillas de *Annona muricata*, después de los ácidos grasos, y presentan entre sus máximos de absorción algunos comprendidos entre los 210 y 230 nm.

Los cromatogramas obtenidos a longitudes de onda de 205, 220 y 298 nm, presentaron picos no simétricos, con tiempos de retención altos. La comparación con espectros UV-Vis permitió distinguir dos máximos de absorción, uno correspondiente a 220 nm y otro a 281 nm, presentando diferencias con respecto a los espectros UV-Vis de la Annonacina. El cromatograma a 220 nm muestra a continuación:

Figura 25. Cromatograma Quercetina a 220 nm.



Fuente: Esta Investigación.

El análisis de la Quercetina a las condiciones cromatográficas empleadas, establece de manera general, según el cromatograma obtenido, que estas condiciones no son adecuadas para la separación y análisis de polifenoles, por lo cual este compuesto se presenta en el cromatograma como picos no gaussianos. Las interferencias posibles que pueden causar estos compuestos en el análisis de acetogeninas, se deben específicamente a los tiempos de retención, ya que son retenidas en la misma región cromatográfica de los compuestos de interés, sin embargo este tipo de interferencias son evaluadas y reducidas a la hora de hacer el adecuamiento cromatográfico, teniendo en consideración el pH y proporción de fases móviles a la hora de disminuir el ensanchamiento de los picos cromatográficos.

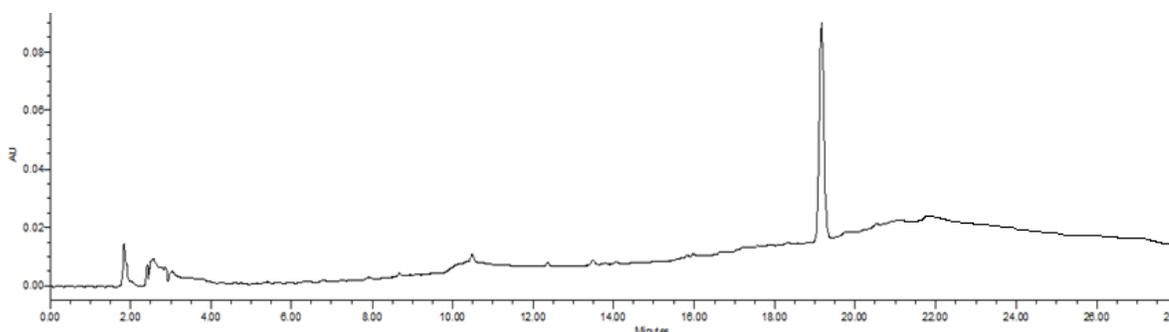
Variación del pH

La retención de los compuestos polifenólicos puede originar la coelucion o solapamiento con los compuestos de interés. Los compuestos polifenólicos no se presentan como picos definidos a pH neutro o básico, tanto en estándares como en muestras. El pH ácido favorece la protonación de los polifenoles, permitiendo una mayor interacción entre fases y equilibrios de separación, lo que induce a que

las bandas cromatográficas presenten simetrías adecuadas.¹¹⁵

Para mejorar la resolución de estos compuestos y disminuir este tipo de interferencias, se realizaron ensayos con la fase móvil acidificada para los estándares, obteniéndose un cromatograma con un pico definido y tiempos de retención más bajos para la Quercetina. Sin embargo, la fase móvil acidificada no permitió una separación adecuada de las acetogeninas. Por lo cual se realizaron ensayos variando la acidez del diluyente del estándar de Quercetina obteniéndose tiempos de retención similares a los de las acetogeninas, pero picos definidos e identificables fácilmente por medio de la comparación con los espectros UV-Vis. El cromatograma muestra un aumento en la simetría del pico de Quercetina a condiciones de pH cercanos a 5, lo que disminuye las interferencias por tiempo de retención.

Figura 26. Cromatograma Quercetina Acidificada, 220 nm.



Fuente: Este Investigación

El análisis de los estándares a longitudes de onda de 220 nm, incluyendo comparación de espectros UV-Vis, tiempos de retención y variaciones de pH, permitieron descartar posibles interferencias de estos compuestos en la identificación de acetogeninas. Con el fin de disminuir las interferencias por

¹¹⁵ KELLER, R. Biosynthesis, Flavonoids. Biological Effects and Dietary Sources: Nutrition and Diet Research Progress Series. 2009.

tiempos de retención, se realizó el acondicionamiento cromatográfico descrito en 4.2.5.

4.2.3 Longitud de Columna

Se utilizó un sistema con una columna de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 micras) X-terra Waters y una C18 (4,6 x 250 mm, 4 micras) Phenomenex-Kinetex, evaluando la separación, cantidad de picos y parámetros de simetría.

Se eligió para el análisis la columna de 150 mm, ya que permitió una adecuada separación de los picos, manteniendo una simetría gaussiana, no se presentaron deformaciones, ni diferencias en el número de picos correspondientes a acetogeninas, en comparación con el número de compuestos separados por la columna 250 mm. La intensidad de los compuestos observable en el cromatograma, fue mayor al usar la columna de 150 mm, ya que al ser una columna más corta, el tiempo de elución cromatográfica es menor, y por lo tanto, los compuestos son retenidos menos tiempo en comparación con la otra columna, impidiendo el ensanchamiento de los picos cromatográficos, lo que se traduce en una tendencia a picos más definidos y con mayores intensidades. De igual forma, la columna de 250 mm presentó una mayor retención de los compuestos en el análisis cromatográfico a las condiciones establecidas, por lo cual los picos presentaron una deformación leve por ensanchamiento de los picos, y una disminución en la intensidad debido a que la longitud de la columna y el tiempo de análisis cromatográfico lograban la retención más prolongada de los compuestos.

4.2.4 Composición de Fase Móvil

Durante el proceso de selección de la fase móvil se estudiaron, con base en los reportes bibliográficos, mezclas de acetonitrilo-agua, y metanol-agua.

La mezcla acetonitrilo-agua permitió una mejor separación de los compuestos polares las cuales eluyeron a tiempos de retención menores a 10 minutos y los compuestos medianamente polares, de mayor interés (AGEs) a tiempos de retenciones más altos. La mezcla metanol-agua, presentó polaridades muy similares entre fases, por lo cual la separación no fue adecuada.

El uso de acetonitrilo como fase móvil, se tuvo en cuenta, ya que aumenta la capacidad hidrofílica de los compuestos, por lo tanto la distribución o equilibrios entre fase móvil y fase estacionaria permiten una mejor separación y simetría de los picos. Además de ser uno de los compuestos más utilizados como fase móvil para la separación de compuestos de polaridades de altas a medias, siendo menos tóxico y menos viscoso que el metanol lo que permite trabajar a menores presiones, y favorece la preservación adecuada de las columnas cromatográficas.

El uso del agua como fase móvil se debe a las características de polaridad de las muestras, ya que fue necesario el uso de un eluyente más polar para aumentar la retención de los compuestos de interés y la separación de compuestos más polares.

4.2.5 Ideonidad del Método Cromatográfico

Se establecieron las condiciones de separación adecuadas utilizando el modo de elución en gradiente para la separación de compuestos presentes en las semillas de *Annona muricata*, se implementaron 6 gradientes diferentes, con fase móvil A:

agua y fase móvil B: acetonitrilo. Para la elección del gradiente cromatográfico se evaluó el factor de capacidad, el factor de separación o índice de retención relativa, la resolución y el factor de asimetría. Los gradientes implementados para el análisis fueron los siguientes:

Gradiente Cromatográfico 1

Tabla 10. Gradiente cromatográfico 1, publicado por Najihah et al. Flujo de 1,0 mL/min.

	0-40 min	40 min	60 min	70 min
Fase Móvil A	100%	15%	5%	100%
Fase Móvil B	0%	85%	95%	0%

Fuente: Esta Investigación.

En el gradiente cromatográfico propuesto por Najihah et al, hasta el minuto 40, la polaridad de la fase móvil es muy alta, lo cual permite separar los compuestos más polares presentes en los extractos etanólicos, atribuyéndose a la separación de compuestos polifenólicos en su mayoría, lo cual también se corroboró con el análisis espectral. A partir del minuto 40 disminuye la polaridad siendo el Acetonitrilo el componente principal de la fase móvil.¹¹⁶

Según los gradientes de las fases móviles, las acetogeninas de carácter medianamente polar, eluyen a tiempos de retención en los cuales el Acetonitrilo de polaridad media, se encuentra en proporciones cercanas al 85%, por lo cual la presencia de acetogeninas en este gradiente cromatográfico se observa a partir de

¹¹⁶ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of annona muricata leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

30 minutos de retención, lo cual fue postulado por Najihah y verificado en el análisis de los compuestos por comparación de los espectros UV-Vis.

En el cromatograma presentó una separación adecuada de los componentes del extracto etanólico, separando los picos hasta la línea base, se identifica que los picos correspondientes a la región de las acetogeninas comprendida entre los 30 y 60 minutos de retención, son de carácter gaussiano y presentan pocas coeluciones. (Anexo D)

Gradiente Cromatográfico 2

Tabla 11. Gradiente cromatográfico 2, publicado por Flórez et al. Flujo de 1,0 mL/min.

	0-10 min	15 min	20min	30 min
Fase Móvil A	95%	15%	10%	95%
Fase Móvil B	5%	85%	90%	5%

Fuente: Esta Investigación.

El gradiente cromatográfico propuesto por Flórez et al, presenta una disminución en la polaridad con el cambio de la fase móvil A (agua) de 95% a 10% en un tiempo de 20 minutos dejando un 90% de acetonitrilo. Los 10 minutos restantes se reestablece la fase móvil a las condiciones iniciales.¹¹⁷

El análisis cromatográfico para este gradiente presentó una disminución en el número de picos en comparación con la separación propuesta del gradiente 1, en la región cromatográfica comprendida entre 11 y 20 min, (región cromatográfica de acetogeninas). El cromatograma presento picos con carácter gaussiano

¹¹⁷ FLÓREZ, Y. y MARTÍNEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

(evidenciado en los picos más representativos), sin embargo se observan coeluciones por lo cual se traduce en una baja resolución de picos.

El cambio acelerado en la polaridad de la mezcla de la fase móvil desde el min 10 al min 15, hace que en estos tiempos de retención se presenten coeluciones de diversos compuestos, mientras que del minuto 15 al minuto 20, se observa una mejor separación debido a que la fase móvil cambia aumentando lentamente la composición de acetonitrilo-agua. (Anexo F). Este hecho se evidenció comparando el número de picos cromatográficos con los obtenidos con el gradiente 1, propuesto por Najihah. (Anexo D)

Con el gradiente 2, se obtuvo un total de 14 picos cromatográficos correspondientes a acetogeninas, los cuales fueron comparados con los reportados por Flórez et al, presentándose una similitud en cantidad de AGEs en semillas bajo este gradiente.

Gradiente Cromatográfico 3

Tabla 12. Gradiente cromatográfico 3, Flujo de 1.0 mL/min.

	0-3 min	12 min	15 min	20 min
Fase Móvil A	30%	20%	15%	30%
Fase Móvil B	70%	80%	85%	70%

Fuente: Esta Investigación.

El gradiente cromatográfico 3, presenta cambios leves en la polaridad, debido a que la variación de proporciones de las fases móviles es baja, se observa en la tabla 12. Este gradiente cromatográfico se evaluó teniendo en cuenta que a las condiciones cromatográficas postuladas por Najihah et al, y Flórez et al, las

acetogeninas empezaban a eluir en una relación aproximada al 85% de acetonitrilo como fase móvil.

Este gradiente cromatográfico presentó una disminución de los picos cromatográficos en comparación con los cromatogramas obtenidos de los gradientes anteriores. Se evidenció también una disminución en la resolución lo cual es observable por las coeluciones y ensanchamiento de los picos cromatográficos, lo cual demuestra una inadecuada separación de los compuestos, impidiendo la identificación de los mismos. (Anexo H) Adicional a esto, el análisis cromatográfico en total es de 15 minutos, sin tener en cuenta el reacondicionamiento inicial de las fases móviles. Por lo cual se estipula que este tiempo no es el adecuado para la separación cromatográfica.

Gradiente Cromatográfico 4

Tabla 13. Gradiente cromatográfico 4, Flujo de 1,0 mL/min.

	0 min	15 min	25 min	30 min
Fase Móvil A	95%	15%	5%	95%
Fase Móvil B	5%	85%	95%	5%

Fuente: Esta investigación.

El gradiente cromatográfico 4, cambia la polaridad de las fases móviles en un periodo de 15 minutos iniciando con la fase móvil A (agua) a 95% hasta un 5% en 25 minutos y 95% de la fase móvil B (ACN). El reacondicionamiento de las condiciones iniciales se realiza en 5 minutos posteriores.

El gradiente presentó una separación adecuada de los compuestos, con base en el número de picos cromatográficos, la resolución y el carácter gausiano de los picos. En el área correspondiente a las acetogeninas se observó una separación

adecuada de picos, pudiéndose identificar compuestos que no eran observables en los gradientes 2 y 3. (Anexo J)

La mejor separación en el área de picos de acetogeninas, se debe a los porcentajes altos de acetonitrilo, en un tiempo más amplio de elución. A su vez, en el perfil cromatográfico los picos más representativos en la región del cromatograma comprendida entre los 14 a los 30 minutos de retención (región de AGEs), son comparables con los picos representativos en tiempos de retención de 20 a 50 minutos en el gradiente cromatográfico 1 propuesto por Najihah.

Gradiente Cromatográfico 5

Tabla 14 Gradiente cromatográfico 5, Flujo de 1,0 mL/min.

	0 min	10 min	15 min	25 min
Fase Móvil A	30%	15%	5%	30%
Fase Móvil B	70%	85%	95%	70%

Fuente: Esta Investigación.

En el gradiente cromatográfico 5 se presenta una disminución en la fase móvil A de 30% a 5% en un tiempo de 15 minutos, a su vez el aumento de la fase móvil B se realiza desde un 70% a un 95% en 15 minutos. Las condiciones iniciales del gradiente se reestablecen en 10 minutos. Al igual que el gradiente cromatográfico 3, la fase móvil tiene una polaridad media en todo el análisis cromatográfico, lo cual originó una mala separación de los compuestos polares a tiempos de retención más bajos, observándose picos asimétricos, correspondientes a coeluciones de varios compuestos en la región cercana a los 2 minutos, a tiempos de retención mayores, presento una baja definición y resolución de los picos. (Anexo L)

Gradiente Cromatográfico 6

Tabla 15. Gradiente cromatográfico 6, Flujo de 0,8 mL/min,

	0 min	15 min	25 min	30 min
Fase Móvil A	95%	15%	5%	95%
Fase Móvil B	5%	85%	95%	5%

Fuente: Esta Investigación.

El gradiente cromatográfico 6, en condiciones de fase móvil es igual al descrito para el gradiente 4, sin embargo teniendo en cuenta que el gradiente 4 presentó una buena separación de compuestos, y un tiempo corto de elución en comparación con el gradiente 1, se tomó en consideración el flujo de la fase móvil, variando de 1 mL/min a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min, para lograr una mejor separación de los picos cromatográficos.

El gradiente implementado a este flujo de fase móvil presentó una buena separación de los picos, sobre todo en el área de las acetogeninas, los picos cromatográficos son de carácter gaussiano y se evidencian pocas coeluciones.

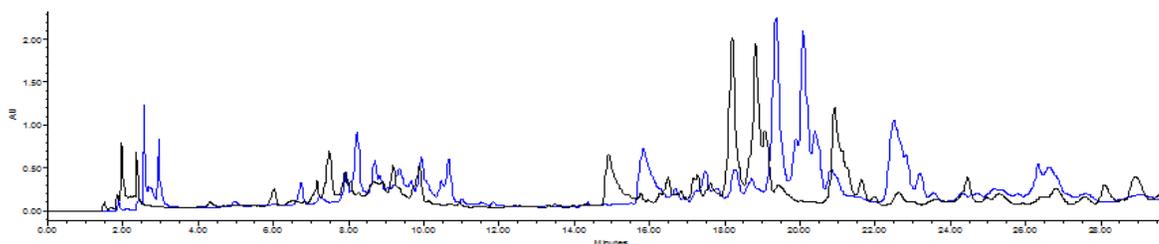
Con la disminución de la velocidad de la fase móvil (flujo de 0,8 mL/min), aumentó la retención de algunos compuestos, logrando la separación de algunas coeluciones en comparación con el gradiente 4, las cuales pueden deberse a las estructuras similares o isómeros, por lo cual este cambio en el flujo, presentó una mejor separación, evidenciándose con un aumento de picos cromatográficos de interés.

Elección de Gradiente Cromatográfico

Los gradientes cromatográficos que permitieron una mejor separación de acetogeninas fueron los gradientes 1 (Publicado por Najihah), el gradiente 4, y el gradiente 6 con flujo de fase móvil de 0,8 mL/min.

Teniendo en cuenta lo anterior, se comparó el gradiente 4 con el gradiente 6 (flujo de 0,8 mL/min). La comparación cromatográfica se muestran a continuación:

Figura 27. Comparación Cromatogramas, Gradiente 4 (negro) y Gradiente 6 (azul).



*Gradiente 4 (negro) *Gradiente 6 (azul).

Fuente: Esta Investigación.

Los cromatogramas corresponden a la misma proporción de fase móvil con diferentes flujos, como se puede observar, la disminución en el flujo cromatográfico genera una mayor retención de los compuestos (cromatograma azul). La separación de los picos cromatográficos en general fué mejor para el gradiente cromatográfico 4, el cual presenta picos con mayor definición, y de carácter gaussiano. Sin embargo con el flujo de 0,8 mL/min, se logró la separación de más compuestos correspondientes a AGEs.

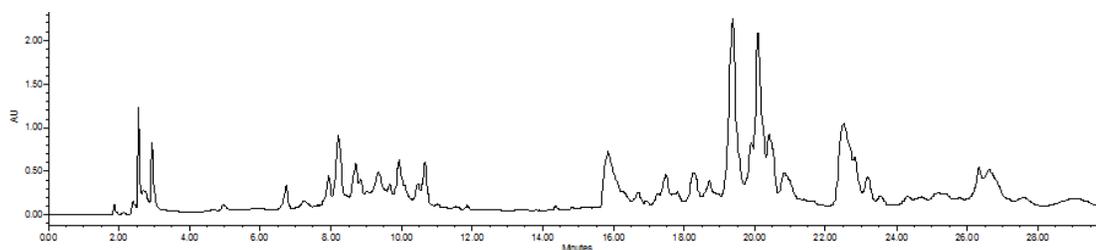
Entre el gradiente 1 postulado por Najihah et al, y el gradiente 6, se realizaron las comparaciones con base en el número de picos correspondientes a acetogeninas. El cromatograma correspondiente del gradiente 1, presento 20 acetogeninas, mientras que con el gradiente 6, se logró la separación de 18 acetogeninas.

A pesar de que el gradiente cromatográfico 1 propuesto por Najihah, permitió la separación de dos AGEs más en comparación con el gradiente 6. Este último se eligió como el gradiente adecuado de separación de AGEs en semillas, debido a que las AGEs adicionales separadas por el gradiente 1, correspondieron a acetogeninas con áreas menores a $6000\mu\text{V}\cdot\text{s}$, por lo cual no representaron una diferencia significativa en la cuantificación total de acetogeninas. Adicionalmente con posteriores replicas, se determinó que estos dos compuestos no se identificaban en todas las muestras.

Para la elección del gradiente cromatográfico, también se tuvo en consideración el tiempo de análisis cromatográfico más favorable y el gasto de solventes, por lo cual el gradiente 6 presentó las mejores condiciones, con un tiempo de separación de 30 minutos y un gasto de solvente equivalente a menos de la mitad del gradiente 1.

El cromatograma obtenido con las condiciones adecuadas de separación fué el siguiente:

Figura 28. Cromatograma Gradiente 6, Flujo de 0,8 mL/min.



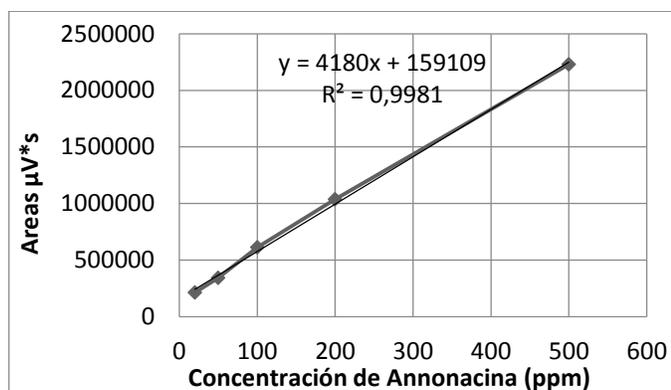
Fuente: Esta Investigación.

4.3 VERIFICACIÓN DEL MÉTODO

4.3.1 Linealidad

Se realizó una curva de calibración con el patrón de Annonacina a diferentes concentraciones, verificando la relación entre concentración vs área cromatográfica ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) aplicando el método de mínimos cuadrados. La gráfica se muestra a continuación:

Figura 29. Curva de Calibración de Annonacina.



Fuente: Esta Investigación.

La curva de calibración presentó una tendencia lineal verificada con coeficiente de correlación R^2 con valores cercanos a la unidad siendo de 0,998. Por lo tanto los valores estadísticos obtenidos para la calibración son aceptables, expresando una dependencia entre concentración y área cromatográfica, y una buena linealidad del método.

4.3.2 Sensibilidad

4.3.2.1 Límite de Detección y de Cuantificación

El límite de detección y cuantificación se calculó mediante la relación señal ruido (S/N) por la integración de 10 señales cromatográficas correspondientes a la señal de ruido de fondo. Los datos se obtuvieron mediante las ecuaciones 2 y 3, descritas en la sección de metodología 3.4.2.1. Los datos de los límites de detección y cuantificación se consignan en la siguiente tabla:

Tabla 16. Sensibilidad de Método de Detección y Cuantificación.

PROMEDIO (S/N) (Área mV*s)	ECUACIÓN CURVA DE CALIBRADO	LOD (mg/L)	LOC (mg/L)
38,8	$Y=3292,1x + 544911$	0,04	0,12

Fuente: Esta Investigación.

Se observa que los límites de detección y cuantificación corresponden a niveles de detección bajos, por lo cual son adecuados para la identificación y cuantificación de acetogeninas ya que este tipo de compuestos de acuerdo a lo reportado en los antecedentes, se encuentran por encima del límite de detección y cuantificación establecido, lo cual le confiere al detector una buena sensibilidad.

4.3.3 Precisión y Límites de Confianza

4.3.3.1 Repetibilidad

La repetibilidad del método cromatográfico se determinó calculando el %RSD para el estándar de Annonacina. Los resultados se consignan en la tabla 17.

Tabla 17. Datos de Repetibilidad del estándar de Annonacina.

REPLICAS	ÁREAS	TR (min)
1	867777	17.804
2	885615	17.814
3	860382	17.829
PROMEDIO	871258	17.816
DS	12971,66	10,274023
%RDS	1,5	0,058

Fuente: Esta Investigación.

El coeficiente de variación obtenido presenta valores menores al 7% por lo cual encaja en las normas establecidas por la ICH (International Conference on Harmonisation), representando la baja dispersión entre los datos de las áreas y el tiempo de retención, por lo cual se puede inferir una adecuada precisión en términos de repetibilidad.¹¹⁸

¹¹⁸ International Conference on Harmonisation, <https://www.ich.org/home.html>

4.3.3.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad del método se calculó en diferentes días bajo las mismas condiciones y diferentes analistas. Las desviaciones obtenidas fueron cercanas para los tiempos de retención y los porcentajes de áreas. Los valores de %RSD fueron menores al 7%, presentando rangos adecuados según la ICH,¹¹⁹ por lo cual se determinó que el método de extracción presento una buena reproducibilidad y por lo tanto una buena precisión.

Tabla 18. Reproducibilidad del Método.

	PICO 1		PICO 2		PICO 3	
	Area (μV*sec)	TR (min)	Area (μV*sec)	TR (min)	Area (μV*sec)	TR (min)
Día 1	27872051,3	19.253	6970060	19.741	5961361	22.543
Día 2	27780049,3	19.240	6312515,3	19.727	6080706,6	22.541
Día 3	29419077	19.239	6976517	19.723	6327251	22.569
Media	28357059,2	19244	6753030,77	19730,33	6123106,2	22551
DS	751898,685	6,3770	66359,07	7,7172	152353,02	12,7540
%RSD	2,65153971	0,0331	2,9772	0,0391	2,4881	0,0565

Fuente: Esta Investigación.

¹¹⁹ Ibid. p

4.3.4 Exactitud

La exactitud se calculó en términos de porcentaje de recuperación mediante el uso de la ecuación 4, descrita en la sección, 3.4.4. La tabla 19 registra los valores de la exactitud del método de extracción, expresado en el cálculo del porcentaje de recuperación del estándar de Limoneno el cual no se encontraba presente en la muestra.

Tabla 19: Porcentaje de Recuperación con estándar de Limoneno.

Concentración	mg/g de muestra	% de Recuperación ^b	%RSD
Experimental	0,0258	95,5	0,94
Teórica ^a	0,027		

a = nivel de concentración de enriquecimiento de las muestras = 50 ppm, b = valor promedio n=3

Fuente: Esta Investigación.

El porcentaje de recuperación fue adecuado teniendo en cuenta la complejidad de la matriz de análisis. El %RSD fue menor al 1%, presentándose una baja dispersión en los datos. Según lo anterior se establece que el método usado de extracción satisface las condiciones de evaluación de métodos analíticos.

4.4 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE AGEs EN SEMILLAS DE *Annona muricata* POR EL MÉTODO SOXHLET (Diseño Experimental)

4.4.1 Elección de Estándares para la Cuantificación total de AGEs en la Optimización del diseño Experimental

La determinación de acetogeninas totales se llevó a cabo mediante la sumatoria total de áreas ($\mu\text{v}\cdot\text{seg}$) de acetogeninas de cada experimento. La relación de las áreas cromatográficas con las concentraciones, se realizó por comparación, empleando concentraciones específicas de los estándares de Limoneno y Annonacina. El análisis estadístico del diseño experimental se comparó con ambos patrones.

El patrón de Limoneno es usado como estándar interno en la determinación de acetogeninas, ya que cumple con las condiciones adecuadas de un estándar interno que son: no se encuentra en la muestra analizada, presenta absorbancia a las mismas longitudes de onda del análisis y un límite de detección similar al de las acetogeninas (0,04 mg/L), lo que permite el análisis a las mismas condiciones cromatográficas. También se eligió como estándar ya que presenta tiempos de retenciones similares a los compuestos de interés, pero no ocasiona coelucion de los picos cromatográficos, lo que permite una comparación adecuada de áreas en correlación con las de los analitos estudiados. El espectro UV-Vis es característico por lo cual no origina interferencias en la identificación y el límite de detección similar a las acetogeninas, permite realizar comparaciones con respecto a la cuantificación de los compuestos.

La Annonacina es una Acetogenina presente en los extractos de semillas analizados, fué empleada para expresar la cantidad de acetogeninas totales

mediante la sumatoria de las áreas cromatográficas de los picos identificados como AGEs. Es usada como estándar a la hora de comparar las áreas cromatográficas con la de las acetogeninas en las muestras, debido a que por ser de la misma naturaleza de los compuestos, presenta una similitud estructural y química, la cual permite hacer aproximaciones más exactas en la cuantificación aumentando la selectividad. La cuantificación se realizó con este estándar ya que la baja disponibilidad de estándares, costos, y pocos estudios fitoquímicos, dificultan la adquisición de estándares individuales de acetogeninas que cumplan con todos los requerimientos establecidos para el uso de este método de cuantificación. Por otra parte, la Annonacina es usada como estándar externo específicamente, para la cuantificación de este compuesto presente en la muestra.

Coeficiente de Variación de los Estándares para la Cuantificación de Acetogeninas

Se calculó el coeficiente de variación de los estándares mediante la comparación de las áreas cromatográficas de cada estándar, en correlación con la concentración de la solución utilizada. Los coeficientes se presentan en la tabla 20.

Tabla 20. Coeficiente de variación de los estándares de Limoneno y Annonacina.

ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
Limoneno	1,5 %
Annonacina	15,10 %

Fuente: Esta Investigación.

El coeficiente de variación con el estándar de limoneno es de 1,5% el cual se presenta como una medida de dispersión mínima para el conjunto de datos en la

cuantificación de áreas con este estándar. El valor obtenido se rige a las normas propuestas por la USP (United States Pharmacopeia) menores al 2% en desviación estándar para análisis de alta calidad en la industria farmacéutica, confirmando la precisión y confiabilidad entre valores obtenidos respecto al método.

El coeficiente de variación para la Annonacina correspondió al 15,10% superando a los coeficientes establecidos según los parámetros de USP e ICH, para control de calidad farmacológica,¹²⁰ sin embargo a pesar de tener una dispersión de datos significativa, es utilizada como estándar de referencia en la optimización del diseño experimental, debido a que presenta un comportamiento químico similar a los analitos de interés.

La optimización de los factores de extracción de AGEs se realizó con los dos estándares de Limoneno y Annonacina para obtener una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos con base en las características de ambos estándares. Para la cuantificación de acetogeninas totales, se tuvo en cuenta el estándar de Limoneno, ya que presentó la menor dispersión entre datos expresada según su %RSD.

4.4.2 Diseño Experimental

Se optimizaron los factores de extracción del método Soxhlet empleando la metodología de superficie de respuesta. Para la optimización de la extracción, se tuvo en cuenta como variables de respuesta, la concentración de acetogeninas extraídas (mg/g), y el número de acetogeninas de acuerdo al número de picos cromatográficos identificados por sus espectros UV-Vis. El análisis estadístico que permitió establecer los efectos estimados de los factores evaluados y sus

¹²⁰ International Conference on Harmonisation, <https://www.ich.org/home.html>

interacciones, se realizó usando el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV. Los resultados generales del diseño se muestran a continuación:

Tabla 21. Concentración y número de acetogeninas extraídas en la optimización de las condiciones de extracción Bloque 1.

Experimento	Etanol (%)	Tiempo (h)	Muestra-Solvente (g/mL)	AGEs (mg/ g muestra)	Número de picos (AGEs)*
1	95	6	4/100	130,5335	18
2	100	4	2/100	147,5682	21
3	90	8	6/100	149,9956	14
4	100	8	6/100	164,3313	18
5	100	6	4/100	158,0426	18
6	95	8,30	4/100	169,2142	16
7	100	4	6/100	157,327	16
8	95	6	6,5/100	121,2548	17
9	90	4	6/100	170,1058	12
10	95	6	1,5/100	177,379	20
11	90	6	4/100	193,8625	20
12	95	3,20	4/100	130,0051	14
13	95	6	4/100	132,8999	20
14	100	8	2/100	191,5095	16
15	90	4	2/100	141,004	19
16	90	8	2/100	204,2615	17

*Número de picos identificados como AGEs.

Fuente: Esta Investigación.

Tabla 22. Concentración y número de acetogeninas extraídas en la optimización de las condiciones de extracción Bloque 2.

Experimento	Etanol (%)	Tiempo (h)	Muestra-Solvente (g/mL)	AGEs (mg/ g muestra)	Número de picos (AGEs)
17	95	6	4/100	129,4532	18
18	100	4	2/100	145,6621	21
19	90	8	6/100	149,1005	14
20	100	8	6/100	165,8144	18
21	100	6	4/100	155,9723	18
22	95	8,30	4/100	169,1412	16
23	100	4	6/100	158,0735	16
24	95	6	6,5/100	120,2556	17
25	90	4	6/100	170,1099	22
26	95	6	1,5/100	174,2487	20
27	90	6	4/100	192,8625	20
28	95	3,20	4/100	130,8227	14
29	95	6	4/100	132,4091	20
30	100	8	2/100	190,9934	16
31	90	4	2/100	140,7652	19
32	90	8	2/100	204,0573	18

*Número de picos identificados como AGEs

Fuente: Esta Investigación.

4.4.3 Acetogeninas en semillas de *Annona muricata* (mg/g de muestra)

4.4.3.1 Evaluación del Diseño Experimental con Estándar de Limoneno

Los valores experimentales obtenidos para cada uno de los experimentos de extracción (tablas 21 y 22), se relacionaron determinando el efecto de cada factor y sus interacciones, permitiendo establecer los efectos que maximizan la extracción de los analitos de interés. De igual manera, se determinó el error estándar de cada uno de los efectos, permitiendo medir el error experimental. Los datos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 23. Efectos estimados para concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno.

EFEECTO	ESTIMADO
Promedio	137,422
A: Etanol	-8,9695
B: Tiempo	25,5553
C: Muestra Solvente	-20,2986
AA	41,3839
AB	1,94957
AC	1,93617
BB	9,58541
BC	-30,0762
CC	9,23197

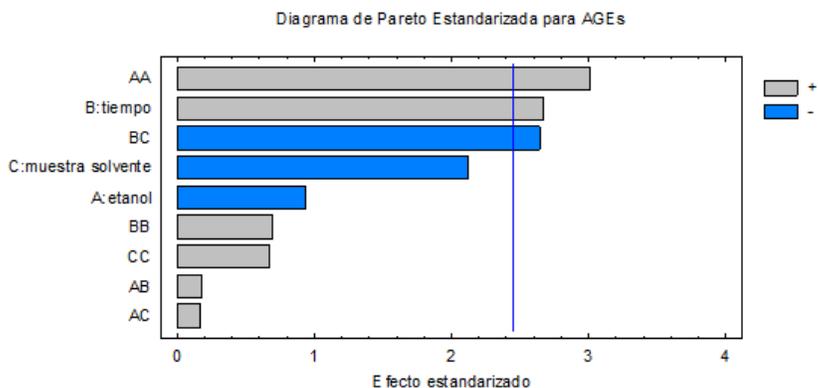
*Errores estándar basados en el error total con 6 Gl.

Fuente: Esta Investigación.

Los experimentos presentaron un error relativo promedio de 9.3170, lo que puede expresarse como una dispersión de datos aceptable. La tabla expresa la relación

global existente entre los parámetros evaluados y la variable de respuestas. Se determinó que el factor estimado para la extracción de acetogeninas según su concentración en la muestra correspondió al tiempo (B), con una correlación positiva (+) en la extracción de acetogeninas. Por otra parte las interacciones que presentaron una influencia positiva en las extracciones correspondieron a las efectos entre los factores AA, AB, AC, BB, y CC. La interacción tiempo y muestra –solvente (BC) no presentó influencia estadísticamente significativa en las extracciones. La influencia de los factores en la extracción de AGEs se puede observar en el diagrama de Pareto.

Grafica 1. Diagrama de Pareto para AGEs (mg/g) estándar de Limoneno.



Fuente: Esta Investigación.

En el gráfico se observa el nivel decreciente de significancia de los efectos estimados. El efecto más significativo corresponde a la interacción de la concentración de etanol-etanol (AA) con un efecto estandarizado superior y positivo. El segundo factor relevante corresponde al factor tiempo. La interacción de etanol con la muestra-solvente presenta el tercer nivel de significancia, superando el efecto estandarizado.

La significancia estadística se realizó con un análisis de varianza representado en la siguiente tabla:

Tabla 24. Análisis de Varianza para la concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno.

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Etanol	227,553	227,553	0,88	0,3844
B: Tiempo	1847,17	1847,17	7,14	0,0369
C: Muestra Solvente	1165,41	1165,41	4,51	0,0780
AA	2350,72	2350,72	9,09	0,0235
AB	7,60169	7,60169	0,03	0,8695
AC	7,49755	7,49755	0,03	0,8704
BB	126,113	126,113	0,49	0,5111
BC	1809,15	1809,15	7,00	0,0383
CC	116,987	116,987	0,45	0,5262

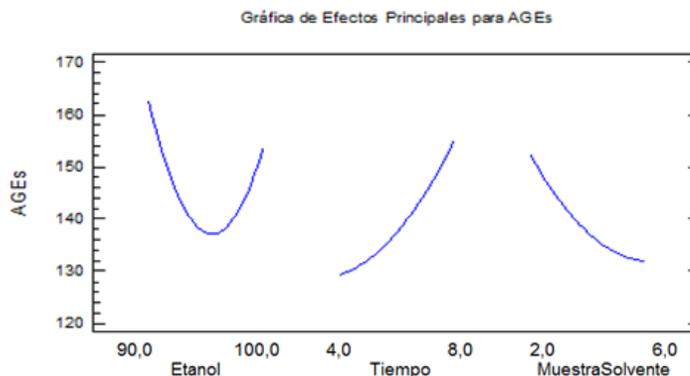
*Gl: 1 Grado de libertad.

Fuente: Esta Investigación.

En la tabla se presenta una partición de la variabilidad para cada uno de los efectos, el valor de significancia se tiene en cuenta según los parámetros del valor-P. En este caso se presentaron 3 efectos (B: 0,03; AA: 0,02; BC: 0,03) que tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero y que presentan un nivel de confianza del 95,0%. Por lo cual se confirma que el factor y la interacción que tienen influencia estadísticamente positiva para la maximización de la extracción de acetogeninas son el tiempo, y la interacción etanol-etanol. Las influencias en la extracción de acetogeninas de estos factores

en sus diferentes niveles se muestran a continuación en la gráfica de efectos principales.

Grafica 2. Efectos Principales para AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno.



Fuente: Esta Investigación.

En el gráfico se pueden observar las influencias de los 3 niveles de cada factor para la extracción de acetogeninas en semillas de *Annona muricata*.

Los niveles de concentración de etanol, muestran una tendencia óptima de extracción a concentraciones de 90% de etanol, en 100% de etanol presenta un valor medio de extracción y a 95% presentó un valor mínimo para la extracción de acetogeninas.

En el grafico se observa, que el tiempo como factor con mayor influencia estadísticamente, presenta una tendencia exponencial en la extracción de acetogeninas, variando desde 4 horas hasta 8 horas, siendo este último rango el valor óptimo de extracción para este factor.

La relación muestra-solvente presenta una tendencia decreciente a medida que aumenta la cantidad de muestra. El punto máximo de extracción se presentó a menor cantidad de semillas, siendo de 2 g/100 mL y el punto estrella de 1,5 g/100

mL. La menor extracción de AGEs corresponde a la relación muestra-solvente los 6 g/ 100mL. El comportamiento que se observa en el gráfico de efectos principales se explica en el apartado 4.4.6.

Con lo anterior se genera un modelo de segundo orden para predecir de manera estadística los factores óptimos para la extracción de acetogeninas con base en su concentración de mg/g de muestra. Los datos se expresan a continuación:

Tabla 25 Coeficiente de regresión para concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno.

COEFICIENTE	ESTIMADO
Constante	7915,64
A: Etanol	-160,289
B: Tiempo	42,9026
C: Muestra solvente	-286,422
AA	0,827677
AB	0,0974788
AC	0,968088
BB	1,19818
BC	-37,5952
CC	115,4

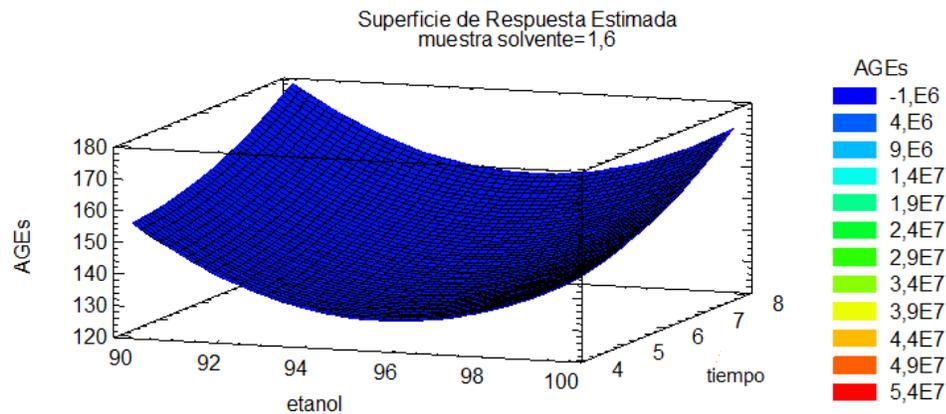
Fuente: Esta Investigación.

Los valores permiten establecer la ecuación cuadrática que se ajusta al modelo, relacionando la concentración de acetogeninas extraídas con los 3 factores de extracción. La ecuación del modelo es:

$$\text{AGEs} = 7915,64 - 160,289 \cdot \text{etanol} + 42,9026 \cdot \text{tiempo} - 286,422 \cdot \text{muestra solvente} + 0,827677 \cdot \text{etanol}^2 + 0,0974788 \cdot \text{etanol} \cdot \text{tiempo} + 0,968088 \cdot \text{etanol} \cdot \text{muestra solvente} + 1,19818 \cdot \text{tiempo}^2 - 37,5952 \cdot \text{tiempo} \cdot \text{muestra solvente} + 115,4 \cdot \text{muestra solvente}^2$$

Las interacciones entre factores se observan mediante el siguiente gráfico de superficie de respuesta:

Grafica 3. Gráfico de superficie de respuesta para concentración de AGEs.



Fuente: Esta Investigación.

En el gráfico se observa la interacción entre el tiempo, concentración de etanol, y la relación muestra-solvente. Donde se evidencian los valores óptimos para la extracción de acetogeninas (mg/g), los valores destacables por lo tanto son 90% de etanol, 8 horas y relación muestra solvente de 1,5 g/100 mL.

4.4.3.2 Evaluación del Diseño Experimental con Estándar de Annonacina

La tabla 26 representa los factores e interacciones de las concentraciones de acetogeninas cuantificadas con el estándar de Annonacina (mg/g).

Tabla 26. Efectos estimados para concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.

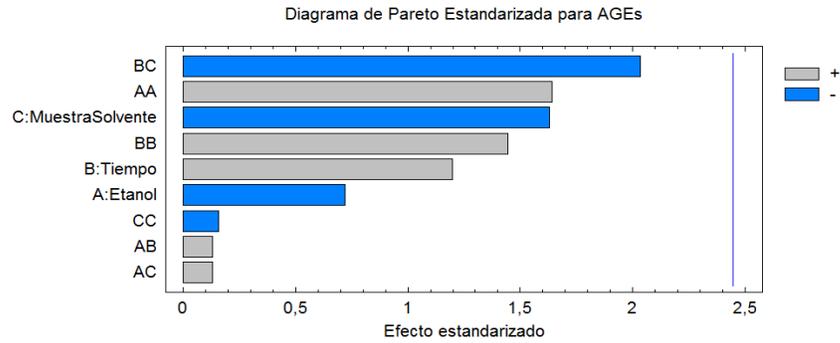
EFEECTO	ESTIMADO
Promedio	202,06
A:Etanol	-101,948
B:Tiempo	169,327
C:Muestra-Solvente	-230,713
AA	333,247
AB	22,165
AC	22,01
BB	293,119
BC	-341,845
CC	-32,1898

*Errores estándar basados en el error total con 6 Gl.

Fuente: Esta Investigación.

La tabla expresa la relación global existente entre los parámetros evaluados y la variable de respuestas. Se determinó que el factor estimado para la extracción de acetogeninas según su concentración en la muestra correspondió al tiempo (B), con una influencia estadísticamente positiva (+) en la extracción de acetogeninas. Por otra parte las interacciones positivas en las extracciones correspondieron a los efectos entre los factores AA, AB, AC y BB. El efecto de los factores se puede observar en el diagrama de Pareto.

Grafica 4. Diagrama de Pareto para AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.



Fuente: Esta Investigación.

En el gráfico se observa que el efecto más significativo corresponde a la interacción de tiempo con el factor de muestra-solvente (-). La segunda y tercera interacción, corresponden a etanol-etanol (+) y al factor muestra-solvente (-). Ninguna de las interacciones superó el valor del efecto estandarizado, por lo cual ninguna correlación fue estadísticamente significativa.

La significancia estadística se confirmó por medio de la prueba ANOVA, los datos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 27. Análisis de Varianza para la concentración de AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.

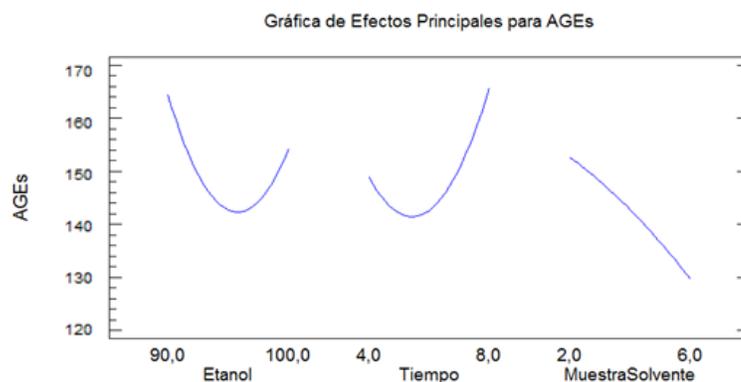
Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Etanol	293,967	293,967	0,52	0,4982
B: Tiempo	81096	81096	1,43	0,2765
C: Muestra-solvente	150553	150553	2,66	0,1540
AA	152431	152431	2,69	0,1519
AB	982,574	982,574	0,02	0,8995
AC	968,88	968,88	0,02	0,9002
BB	117931	117931	2,08	0,1990
BC	233716	233716	4,13	0,0884
CC	1422,25	1422,25	0,03	0,8793

Fuente: Esta Investigación.

El análisis de varianza no arrojó ningún efecto estadísticamente significativo para ninguna de las interacciones presentadas en la extracción de acetogeninas (mg/g) haciendo uso del patrón de Annonacina, con valores P superiores al estimado de (0,05), y 95% de confianza.

Los datos obtenidos del diseño experimental con el estándar de Annonacina se representan en el siguiente gráfico, en el cual se observa la influencia de los niveles de los factores en la extracción.

Grafica 5. Efectos Principales para AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.



Fuente: Esta Investigación.

Los niveles de concentración de etanol, muestran una tendencia de extracción igual a la obtenida en el diseño experimental realizado con el estándar de Limoneno, donde la concentración adecuada de etanol es de 90%. El factor tiempo presenta condiciones óptimas a las 8 h de extracción. La relación muestra solvente presenta una tendencia decreciente de extracción a medida que se aumenta la cantidad de muestra, dando un valor óptimo de 1,5 g /100 mL.

Lo anterior establece que las condiciones adecuadas para maximizar la extracción de acetogeninas (mg/g), con el estándar de Annonacina, fueron las mismas que con el estándar de Limoneno.

4.4.4 Número de Acetogeninas Extraídas

El número de acetogeninas totales se obtuvo por sumatoria de picos correspondientes a AGEs, identificados mediante comparación de los espectros UV-Vis de los picos cromatográficos, con el espectro del estándar de Annonacina. A continuación se expone la tabla de efectos estimados para el número de acetogeninas extraídas:

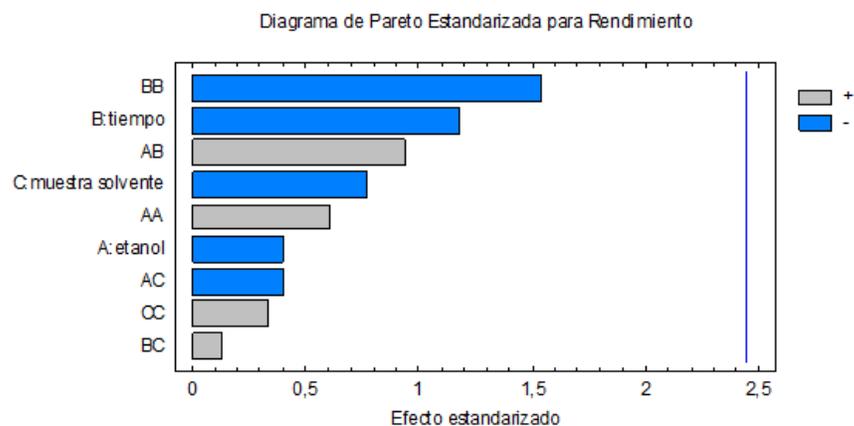
Tabla 28. Efectos estimados para número de AGEs extraídas.

EFEECTO	ESTIMADO
Promedio	18,3551
A: Etanol	-0,631876
B: Tiempo	-1,84301
C: Muestra Solvente	-1,21296
AA	1,35799
AB	1,75
AC	-0,75
BB	-3,47042
BC	0,25
CC	0,75442

Fuente: Esta Investigación.

En la tabla se pueden observar los factores e interacciones que influyen positivamente (+) la extracción de mayor número de acetogeninas, entre los cuales están las interacciones AA, AB, BC, y CC. Los factores presentan una tendencia estadísticamente negativa (-). Los efectos estandarizados se pueden observar en el siguiente gráfico.

Grafica 6. Diagrama de Pareto para número de AGEs extraídas.



Fuente: Esta Investigación.

En el Diagrama de Pareto se observa que ningún factor o interacción supera el efecto estandarizado. El efecto más significativo corresponde a la interacción de tiempo-tiempo, seguido del factor tiempo, ambos con interacción negativa (-). El tercer efecto corresponde a la interacción etanol-tiempo con tendencia positiva (+), por lo cual estas 3 interacciones son las que tienen mayor influencia en la extracción de número de acetogeninas. La significancia estadística se determinó por medio de la prueba ANOVA, como se muestra a continuación:

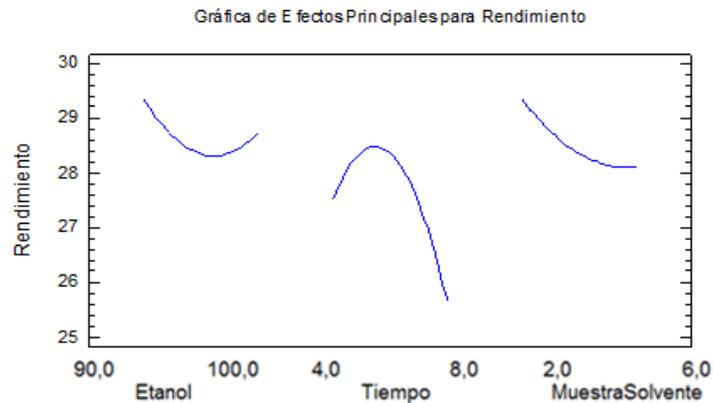
Tabla 29. Análisis de Varianza para número de acetogeninas extraídas

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Etanol	1,1293	1,1293	0,16	0,7006
B: Tiempo	9,60724	9,60724	1,38	0,2839
C: Muestra Solvente	4,16144	4,16144	0,60	0,4681
AA	2,53122	2,53122	0,36	0,5680
AB	6,125	6,125	0,88	0,3837
AC	1,125	1,125	0,16	0,7012
BB	16,5312	16,5312	2,38	0,1737
BC	0,125	0,125	0,02	0,8976
CC	0,781221	0,781221	0,11	0,7486

Fuente: Esta Investigación.

Según lo descrito en la tabla se puede observar que ningún efecto es significativo por si solo para la extracción de acetogeninas (Número de AGEs), ya que el valor-P de cada efecto es superior al estimado de (0,05) con el 95% de confianza. De igual manera se observa que el valor más cercano al valor-P es el correspondiente a la interacción de tiempo. La influencia de los factores se muestra a continuación en el gráfico de efectos principales:

Grafica 7. Efectos principales para número de AGEs extraídas.



Fuente: Esta Investigación.

La gráfica de efectos principales muestra los factores del diseño y su tendencia óptima en la extracción de acetogeninas.

Se observa que el mayor el número de AGEs extraídas, se presentó con etanol a una concentración de 90%, con un mínimo en 95% y un leve incremento en 100%. Lo cual se relaciona con la tendencia presentada para la extracción (mg/g) de AGEs con los estándares.

La relación muestra solvente también presentan una tendencia decreciente a medida que aumenta la cantidad de muestra, como se observa en experimento anterior, que presenta un valor óptimo de relación muestra-solvente a una cantidad de 1,5 g /100 mL de solvente.

El tiempo presenta un valor óptimo de 5 h, disminuyendo a medida que aumenta el número de horas. Este factor resultó ser contrario al presentado en la evaluación del factor tiempo para la extracción de acetogeninas en (mg/g), el cual tuvo un valor óptimo a las 8 h de extracción.

Tabla 30: Coeficiente de regresión para número de Acetogeninas.

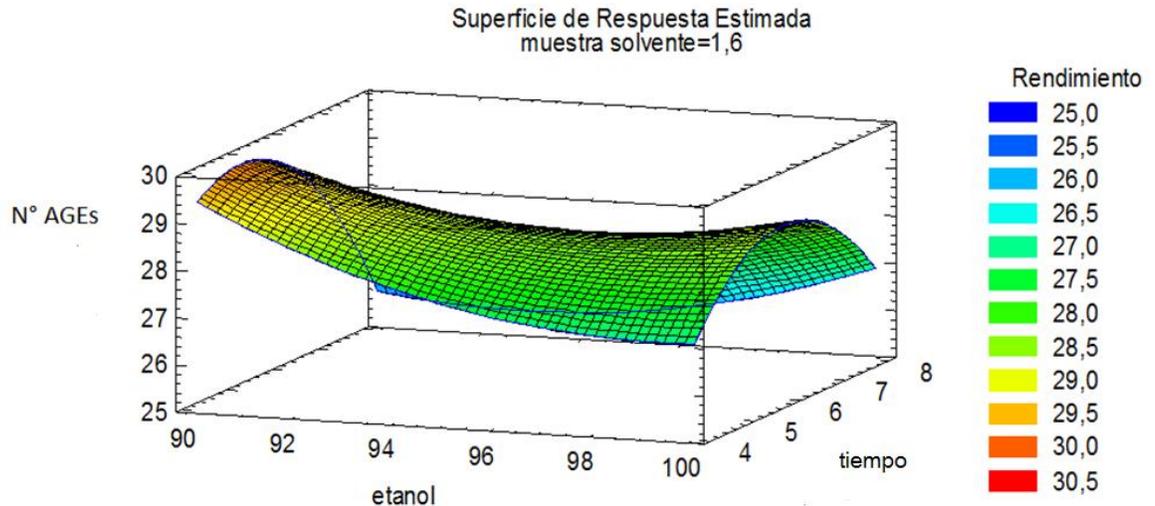
COEFICIENTE	ESTIMADO
Constante	291,49
A: Etanol	-5,14853
B: Tiempo	-4,06762
C: Muestra solvente	0,540791
AA	0,0271597
AB	0,0875
AC	-0,375
BB	-0,433803
BC	0,3125
CC	9,43025

Fuente: Esta Investigación.

La ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos es:

$$\text{Rendimiento} = 291,49 - 5,14853 \cdot \text{etanol} - 4,06762 \cdot \text{tiempo} + 0,540791 \cdot \text{muestra solvente} + 0,0271597 \cdot \text{etanol}^2 + 0,0875 \cdot \text{etanol} \cdot \text{tiempo} - 0,375 \cdot \text{etanol} \cdot \text{muestra solvente} - 0,433803 \cdot \text{tiempo}^2 + 0,3125 \cdot \text{tiempo} \cdot \text{muestra solvente} + 9,43025 \cdot \text{muestra solvente}^2$$

Grafica 8. Gráfico de superficie de respuesta para Número de AGEs (rendimiento).



Fuente: Esta Investigación.

En el gráfico se observa la interacción de los factores y se evidencian los valores óptimos de extracción en términos de número de acetogéninas extraídas, los valores destacables por lo tanto son 90% de etanol, 5 h y relación muestra solvente de 1,5 g /100 mL.

4.4.5 Optimización del Diseño Experimental

La optimización de múltiples respuestas corresponde a la función de deseabilidad maximizada. En este caso no se obtuvo datos de deseabilidad que relacionaran ambas respuestas, ya que en la respuesta de extracción de número de acetogéninas no se presentaron factores o interacciones estadísticamente significativas. Por esto fue necesario evaluar las condiciones óptimas de cada experimento. El proceso estadístico de optimización, permitió relacionar las variables para determinar las condiciones favorables de extracción con base en

las respuestas del diseño, para lo cual se realizó también la optimización comparativa con cada estándar y respuesta experimental.

Tabla 31: Factores Óptimos de extracción de AGEs (mg/g) con estándar de limoneno.

FACTOR	BAJO	ALTO	ÓPTIMO
Etanol	88,5641	101,436	88,5763
Tiempo	3,42562	8,57438	8,55932
Muestra Solvente	1,34256	1,85744	1,34256

Fuente: Esta Investigación.

Tabla 32 Factores Óptimos de extracción de AGEs (mg/g) con estándar de Annonacina.

FACTOR	BAJO	ALTO	ÓPTIMO
Etanol	88,5641	101,436	88,5659
Tiempo	3,42562	8,57438	8,57438
Muestra Solvente	1,42562	6,57438	1,42562

Fuente: Esta Investigación.

Tabla 33: Factores Óptimos de extracción de número de AGEs.

FACTOR	BAJO	ALTO	ÓPTIMO
Etanol	88,5641	101,436	88,5641
Tiempo	3,42562	8,57438	4,81748
muestra solvente	1,34256	1,85744	1,34256

Fuente: Esta Investigación.

Como se puede observar en las tablas de factores óptimos para cada respuesta, los factores etanol y relación muestra solvente presentan valores muy cercanos entre los experimentos, por lo cual se tomó como condiciones óptimas los valores de 90% de etanol, y la relación muestra solvente con 1,5 g de muestra en 100 mL de solvente, valor que fue reproducido como uno de los puntos estrellas en el diseño de experimentos.

El factor tiempo difiere significativamente entre las respuestas de concentración de acetogeninas (mg/g) con el número de acetogeninas. Para la extracción de AGEs (mg/g) con estándar de Limoneno, se estableció el tiempo como un factor positivo (+), estadísticamente significativo con un valor de (0,0369) menor al valor-P, superando el margen de efecto estandarizado. En el número de AGEs extraídas, el factor del tiempo presentó influencia en la extracción, sin embargo este factor o sus interacciones no fueron significativos estadísticamente al no superar la medida de efectos estandarizados, y la significancia del valor-P. Por lo cual, el valor óptimo para este factor se fijó como 8 h, correspondientes a la respuesta del experimento en la extracción de AGEs (mg/g). Los experimentos que más se ajustaron a las condiciones óptimas de extracción se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 34: Condiciones óptimas de extracción soxhlet de acetogeninas en semillas de *Annona muricata*, Experimento 16, tabla 21, y Experimento 32, tabla 22.

Etanol (%)	Tiempo (h)	Muestra-Solvente (g/mL)	AGEs mg/ g muestra	Número de picos
90	8	2/100	204,2615	17
90	8	2/100	204,0573	18

Fuente: Esta Investigación.

4.4.6 Influencia de los Factores en la Extracción de AGEs en semillas de *Annona muricata*

4.4.6.1 Concentración de Etanol

La extracción de metabolitos secundarios como acetogeninas, se realizó aprovechando la permeabilidad de la pared celular y la semi-permeabilidad de la membrana plasmática la cual permite la entrada de moléculas pequeñas como el etanol y el agua. En el caso de las acetogeninas la extracción fue favorecida por la concentración de etanol de 90%. Lo anterior puede explicarse teniendo en cuenta que el etanol puede atravesar libremente la pared celular y puede ingresar a la membrana plasmática, sin embargo, las vacuolas (donde se encuentran la mayoría de metabolitos secundarios) permiten la entrada más fácil de moléculas de agua favoreciendo la concentración de 90% de etanol.^{121 122}

Contrario a lo explicado anteriormente, la concentración del 100% de etanol presento valores mayores de extracción de acetogeninas que la de 95%, lo cual puede deberse a que la concentración de 95% de etanol, constituye una mezcla azeotrópica, la cual presenta un comportamiento similar al etanol puro, sin embargo no se ha estudiado el tipo de interacciones que puede tener a nivel celular.

Por otra parte la mezcla etanol-agua, es necesaria debido a que en este caso la extracción de las acetogeninas de carácter medianamente polar pueden verse afectadas por puentes de hidrogeno y fuerzas electrostáticas de la membrana, por lo tanto las interacciones entre solventes puros pueden no ser suficientes para interrumpir las interacciones con la membrana plasmática, por lo cual se requiere de interacciones más polares que faciliten la movilidad molecular, para romper

¹²¹ DIAZ, I. Membrana Celular: Biología Médica. Seminarios de Biología Celular y Molecular - USMP Filial Norte. Universidad de las Américas (Chile). 2016.

¹²² HERNÁNDEZ, R. Célula Vegetal: Libro Botánica Online. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/celula/>. Universidad de Los Andes - Mérida – Venezuela. 2007.

este tipo de asociaciones.¹²³ La adición de un solvente polar como el agua y un solvente menos polar como el etanol, facilita la extracción de compuestos no solo polares y medianamente polares, sino también por la repetición del ciclo en el método soxhlet, también permite la extracción de compuestos lipídicos a través de la membrana celular.

4.4.6.2 Relación Muestra-Solvente

En el factor muestra solvente la relación óptima fue de 1,5 g /100 mL (sección 4.4.5), el valor corresponde al menor de los puntos estrella del diseño experimental. La interacción entre solvente y muestra, establece que la extracción se favorece en exceso de solvente, ya que este no alcanza la saturación por extracción de compuestos, la cantidad de muestra es reducida y la solución obtenida es diluida, por lo cual el solvente puede seguir admitiendo más soluto, logrando así una extracción más eficiente y casi total de los compuestos. Además entre menor es la cantidad de muestra se presenta mayor interacción entre el solvente y el soluto en el cartucho soxhlet, debido a que se generan más espacios entre partículas, lo cual mejora el contacto del solvente con la superficie de las partículas de la muestra.

Por otra parte, las interacciones en las que se presenta mayor cantidad de muestra, pueden alcanzar la saturación parcial del solvente, evitando que se puedan seguir extrayendo más compuestos o dificultando su extracción debido al exceso de analitos después de los primeros ciclos. La extracción no es selectiva específicamente para las acetogeninas presentes en la matriz, por lo cual se debe extraer la mayor cantidad de analitos afines a este tipo de solvente. Si se lleva a cabo esta saturación, se evitaría la posible extracción de las acetogeninas. Un aumento en la cantidad de muestra también puede afectar la extracción debido a

¹²³ HERNÁNDEZ, R. Célula Vegetal: Libro Botánica Online. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/celula/>. Universidad de Los Andes - Mérida – Venezuela. 2007.

que a pesar del tamaño homogéneo de las partículas, estas se encuentran demasiado juntas en el cartucho de muestra, evitando la libre interacción de estas con etanol.

Las variaciones en los tamaños de partícula son factores que pueden influir en las extracciones, cuantas más pequeñas sean las partículas, mayor es la superficie interfacial y más corta la longitud de los poros, por lo tanto mayor es la velocidad de transferencia de masa. En este caso el tamaño de partículas obtenido en la molienda de las semillas fue constante y la muestra se homogenizó en todos los casos, por lo cual el tamaño de partícula se considera un factor constante en la extracción.¹²⁴

4.4.6.3 Tiempo

El tiempo óptimo de extracción fue de 8 h, el aumento en el tiempo permite que se lleven a cabo mayor cantidad de ciclos de paso del solvente y sifonaje, favoreciendo la extracción de los compuestos. Los tiempos más bajos entonces implican menos ciclos en el método soxhlet. Que el tiempo óptimo de extracción corresponda al valor alto o máximo en el diseño experimental, implica que no se lleva a cabo una saturación en el solvente, en las condiciones de muestra-solvente de 1,5 g /100 mL.

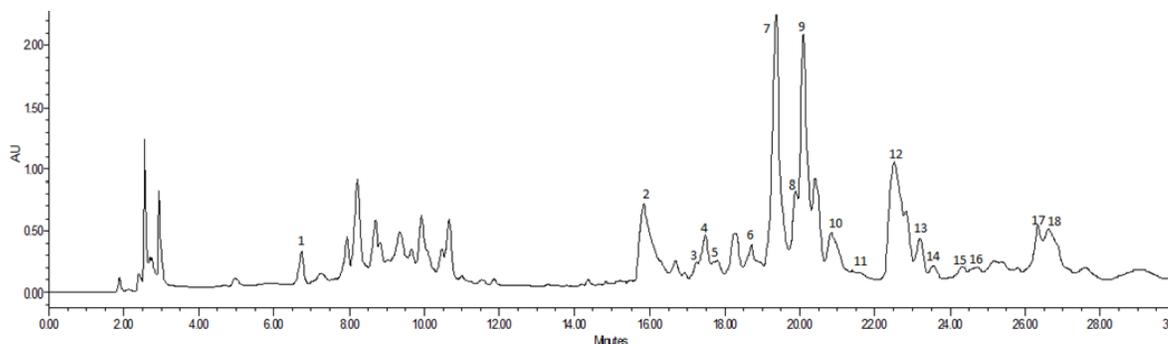
¹²⁴ Facultad de Ciencias Vicedecanato de Actividades Científicas, y de Prácticas Externas. Extracción sólido-líquido y recuperación del disolvente: obtención de aceite de girasol. Universidad de Granada Sitio web: <http://fciencias.ugr.es/practicadocentes/wp-content/uploads/guiones/ExtraccionSolidoLiquido.pdf>. 2006.

4.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACETOGENINAS EN EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SEMILLAS DE *Annona muricata*.

4.5.1 Identificación de Acetogeninas

Los extractos de semillas de *Annona muricata*, obtenidos con las condiciones óptimas descritas en el apartado 4.4.5, presentaron un total de 18 picos que presuntamente corresponden a acetogeninas. De los cuales se identificó la Annonacina por medio de la comparación con el estándar bajo criterios de tiempo de retención y espectros UV-Vis. En el cromatograma (figura 30), se identificaron los picos que corresponden tentativamente a acetogeninas. La tabla 35 muestra los tiempos de retención y áreas de los compuestos de interés.

Figura 30. Picos cromatográficos correspondientes a Acetogeninas en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*.



Fuente: Esta Investigación.

Tabla 35. Picos cromatográficos correspondientes a Acetogeninas en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*.

N° de Picos de AGEs	tR (min)	Área (µV*s)
1	6.742	164470
2	16.677	194298
3	17.212	39206
4	17.458	248406
5	17.762	180652
6	18.704	277623
7	19.281	7193936
8	19.813	1309297
9	20.103	2873174
10	20.940	719966
11	21.578	116336
12	22.672	613866
13	23.073	433853
14	23.403	183694
15	24.150	309872
16	24.518	106403
17	26.687	54392
18	26.993	31719

Fuente: Esta Investigación.

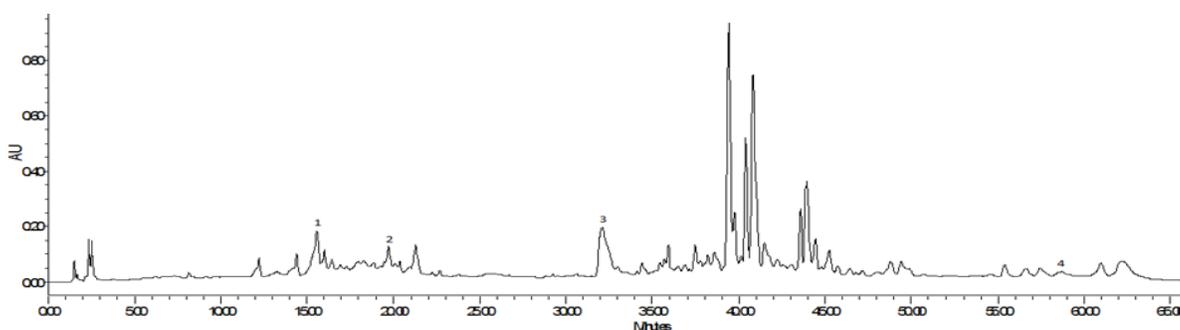
Tabla 36. Pico cromatográfico del estándar de Annonacina en extractos de semillas de *Annona muricata*.

Pico No	tR (minutos)	Compuesto Identificado
7	19.281	Annonacina

Fuente: Esta Investigación.

Se identificaron tentativamente 4 picos cromatográficos por medio de la comparación de factores como tiempo de retención y espectros UV-Vis, con los estudios realizados por Najihah, para lo cual la muestra se analizó según las condiciones cromatográficas descritas en 3.2.2. El cromatograma (figura 31), y la tabla 37, muestran las acetogeninas identificadas en la comparación cromatográfica respecto a las condiciones reportadas. Los espectros UV-Vis de los compuestos identificados se encuentran en la sección de anexos (Anexo P).¹²⁵

Figura 31. Acetogeninas identificadas en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*.



Fuente: Esta Investigación.

¹²⁵ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of annona muricata leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

Tabla 37. Acetogeninas identificadas en extractos de semillas de *Annona muricata* en análisis comparativo con lo reportado por Najihah et al (2015).

Pico No	tR (minutos)	Compuesto
1	15.723	Esquamostatina-A
2	19.811	Bullatacina
3	32.111	Isodesacetilivaricina
4	58.913	Desacetilivaricina

Fuente: Esta Investigación

En la investigación, se logró la identificación total de 5 acetogeninas en los extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* por la técnica HPLC-PDA, implementando el uso de un único estándar y comparaciones cromatográficas de extractos etanólicos de esta planta.

4.5.2 Cuantificación de Acetogeninas Totales (mg/g)

La cuantificación total de acetogeninas se realizó por sumatoria de áreas totales de picos y se determinó su equivalente en miligramos sobre gramo de la muestra por medio de la comparación con áreas y concentraciones del estándar utilizado. A pesar de que ambos estándares, presentaron un valores similares en el desarrollo del diseño experimental, el estándar de referencia que presentó los mejores resultados para la cuantificación fue el Limoneno, según lo descrito en la sección 4.4.1, (tabla 20). La cuantificación se realizó con los extractos obtenidos a las condiciones óptimas de extracción de acetogeninas, de 90% de etanol, 8 h de extracción y relación muestra solvente de 1,5 g /100 mL.

La concentración de acetogeninas totales obtenidas a las condiciones óptimas de extracción establecidas se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 38: Concentración de acetogeninas mg/g de muestra.

Experimentos	AGEs mg/ g Muestra	Número de Picos AGEs
Bloque 1 Exp 16	204,2615	17
Bloque 2 Exp 32	204,0573	18

Fuente: Esta Investigación.

Los experimentos evaluados arrojaron resultados similares obteniéndose una cuantificación promedio correspondiente a 204,15 mg/g de acetogeninas en semillas de *Annona muricata*.

Cuantificación de la Annonacina

La Annonacina se cuantificó por extrapolación por medio de la elaboración de una curva de patrón a diferentes concentraciones. En este caso la elección de la Annonacina como patrón de cuantificación se determinó en base a la fórmula estructural, detección y características químicas. La curva de calibración realizada con el patrón de Annonacina se muestra en la sección 4.3.1. (Figura 29).

Tabla 39. Concentración de Annonacina en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*.

Concentracion ppm (mg/L)	Concentracion mg/g de muestra	Área de Annonacina ($\mu\text{V}^*\text{s}$)
3118	42,934	13193936

Fuente: Esta Investigación.

La ecuación de la recta de la figura 29, se utilizó para la extrapolación de los datos de Annonacina obtenidos en los experimento 16 y 32. El promedio de Annonacina presente en las muestras fue de 3118 ppm correspondiente a 42,934 mg/g de muestra, siendo una de las acetogeninas mayoritarias en los extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*.

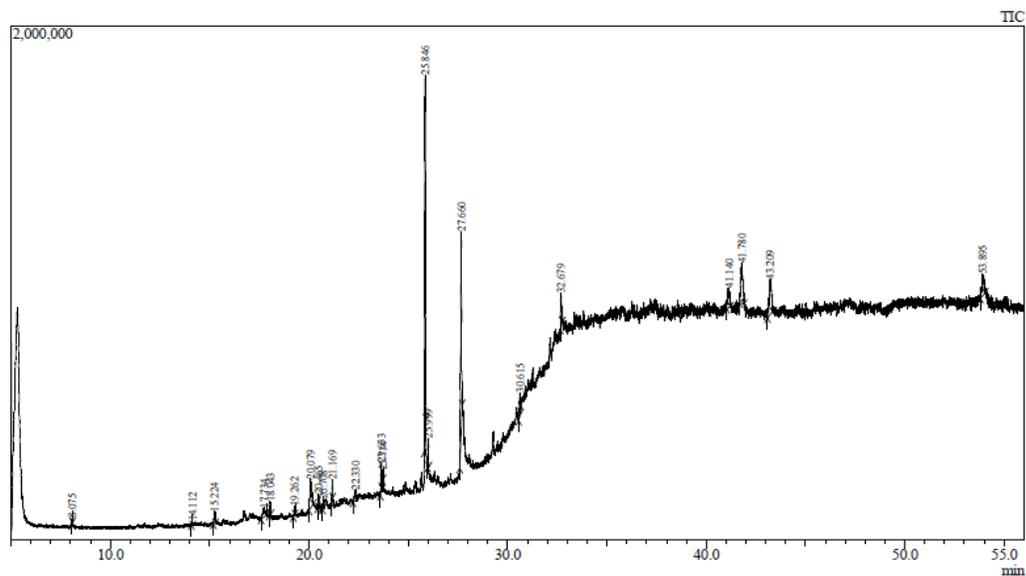
4.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SEMILLAS DE *Annona muricata*

4.6.1 Análisis de Extractos Etanólicos de Semillas de *Annona muricata* por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Con el fin de ampliar el conocimiento de los metabolitos secundarios en las semillas de *Annona muricata*, se realizó un análisis por GC-MS, para lo cual se usó la metodología descrita en el apartado 3.7.1. El análisis cromatográfico permitió la identificación de 15 compuestos mayoritarios presentes en los extractos

etanólicos de semillas de *Annona muricata*, los cuales se indican en la tabla 40. El cromatograma de las muestras analizadas se ilustra a continuación:

Figura 32. Cromatograma GC-MS de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* de la región de Caldas.



Fuente: Esta Investigación.

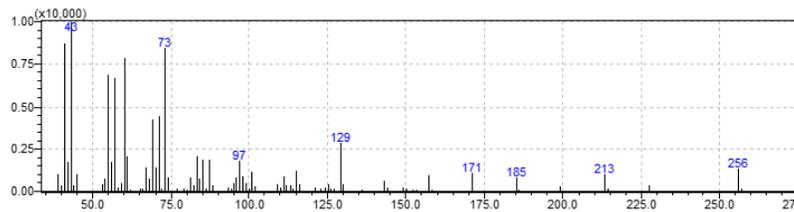
Tabla 40. Compuestos identificados en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* por GC-MS.

Pico N°	Compuesto	tR (minutos)	Iones Fragmento m/z	Porcentaje relativo (%)
1	2-Furanaldehido	8.075	39, 67(100), 96,97	0,19
2	Nonanal	14.112	41(100), 68,98,124	0,27
3	4H-Piran-4-one, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil	15.224	43(100),72,101, 144	1,36
5	Glicerín diacetato	18.043	43, 86,103,146	0,80
6	Vainilina	19.262	51,81,109, 152	0,86
7	9-.beta.-D-Ribofuranosilxantina	20.079	57(100), 63, 114	5,62
8	Spiro[androst-5-ene-17,1'-ciclobutano]-2'-ona, 3-hidroxi-, 3 β	20.465	41, 69,107	0,84
9	Octatriciclo(2,4)dodecano	20.696	77,79, 91(100), 93,95,151,253	0,83
10	Cyclohexeno, 3-(1,5-dimetil-4-hexenil)-6-metileno	20.708	41,69(100),93,109,161,204	0,76
11	Nerolidol	21.169	41, 69,136,204	1,19
12	Ácido Estearico	23.633	43,73,97,129	1,97
14	Ácido Palmítico	25.846	43(100),73,129, 256	27,15
15	Ácido Heptadecanoico etil éster	25.999	43,88,101,157,213	1,74
16	Ácido Oleico	27.660	55(100),69,97,264	20,87
17	Ácido Linoleico	30.615	55(100),67,95,123	2,59
21	β -Sitosterol	43.209	43(100),81,95, 329, 414	8,83

Fuente: Esta Investigación.

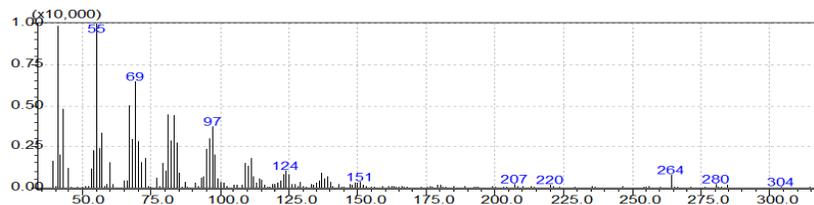
Los ácidos grasos fueron los compuestos mayoritarios presentes en las semillas de *Annona muricata*. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los espectros de masas obtenidos con los referenciados en las bases de datos NIST Y Wiley. Los espectros de masas de los compuestos mayoritarios se muestran a continuación:

Figura 33. Espectro de masas de Ácido Palmítico.



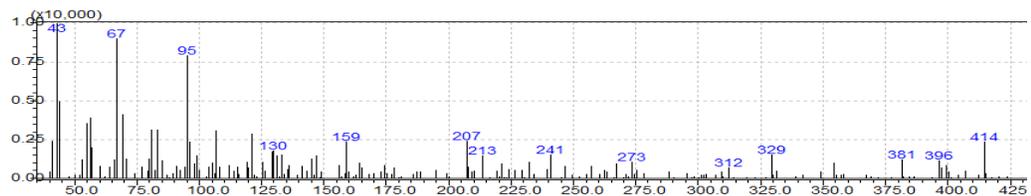
Fuente: Esta Investigación.

Figura 34. Espectro de masas de Ácido Oleico.



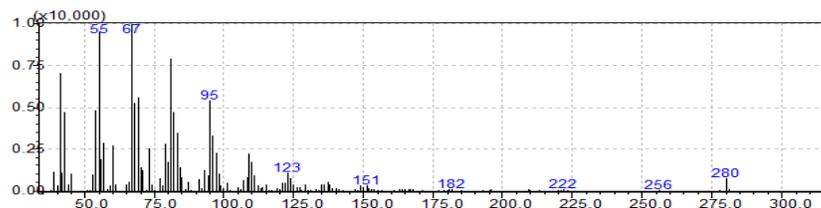
Fuente: Esta Investigación.

Figura 35. Espectro de masas de Beta-Sitosterol.



Fuente: Esta Investigación.

Figura 36. Espectro de masas de Ácido Linoleico.



Fuente: Esta Investigación.

De los compuestos presentes en las semillas de *Annona muricata* se identificaron cuatro que presentan actividad biológica según comparaciones con lo reportado por Shibula et al, y las bases de datos de fitoquímica y etnobotánica para compuestos bioactivos en hojas de Guanábana.¹²⁶ Los compuestos se presentan en la tabla 41.

Tabla 41. Compuestos con actividad biológica presentes en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata*.

NOMBRE DEL COMPUESTO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
4H-Piran-4-one, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-methyl	Anti microbial, Anti inflamatorio
Ácido Heptadecanoico etil ester	Antioxidante, hemolítico
Ácido Palmítico	Antioxidante, hemolítico, pesticida.
Ácido Esteárico	Antibacterial, anti fúngico

Fuente: Esta Investigación.

¹²⁶ SHIBULA, K. y VELAVAN, S. Determination of Phytocomponents in Methanolic Extract of *Annona muricata* Leaf Using GC-MS Technique: International Journal of *Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6. 2015. 1251-1255 p.

Los compuestos de la tabla 42, corresponden a los picos 4, 13, 18, 19, 20, 22 (en orden de elución), los cuales no fueron identificados debido a los bajos porcentajes de similitud con las bases de datos, (menor al 70%). La tabla de picos no identificados se muestra a continuación con sus respectivas fragmentaciones:

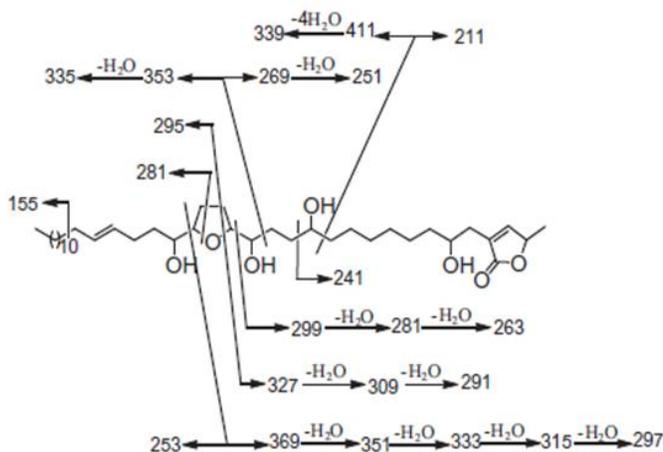
Tabla 42. Fragmentaciones Características de los Compuestos no identificados.

Pico N°	tR (min)	Iones Fragmento m/z	Porcentaje relativo (%)
4	17.734	44, 74,98,145, 197, 234, 249,271,322,355, 407,470,481, 545, 588	2,32
13	23.714	56,89,94,124,152,181,255,280,334,367,409,439,477,594	0,42
18	32.679	55,67,95,123,207,246,322,338, 357,420,574	3,50
19	41.140	41,88,95,135,161,207,277,264,289,311,332,368,401,430,451,598	3,83
20	41.780	41,84,111,121,156,193,208,256,283,300,341,369,391,447,576	8,21
22	53.895	55,82,109,143,155,185,211,220,241,253,281,295,327,369,392,428,517,599	5,23

Fuente: Esta Investigación.

Por las fragmentaciones respectivas, se sugiere que el compuesto del pico número 22 corresponde a una acetogenina mono THF identificada con el nombre de Muricina S. La estructura y fragmentaciones correspondientes a este compuesto se ilustran en la figura 37.

Figura 37. Fragmentación de Muricina S (pico 22).



Fuente: Sun, S et al. ¹²⁷

En la fragmentación general de acetogeninas, se presenta con la ruptura principal desde el oxígeno del anillo THF generando un reordenamiento de Claisen, con la formación de dobles enlaces. Las fragmentaciones m/z 369/253 corresponden al rompimiento del carbono C-17 / C-18 con pérdida de agua para formar el fragmento m/z 351 y pérdida sucesiva de agua formando los fragmentos m/z 333, 315, 297. El fragmento m/z 299 representa la ruptura entre los carbonos C-14/C-13 con pérdida de agua para formar el fragmento m/z 281 y 263. El pico m/z 281, también corresponde a la fragmentación localizada en el carbono C-1 del anillo THF. Los fragmentos m/z 241 y 211, hacen alusión a la escisión de los carbonos (C-11 / C-10 y C-10 / C-9). Las demás fragmentaciones son reportadas y explicadas por Sun, S. et al, la comparación de la fragmentación específica de este compuesto con los fragmentos m/z obtenidos para el pico 22, permite realizar

¹²⁷ SUN, S., LIU, J., ZHOU, N., ZHU, W., DOU, Q., ZHOU, K. Isolation of Three New Annonaceous Acetogenins from Graviola Fruit (*Annona Muricata*) and Their Anti-Proliferation on Human Prostate Cancer Cell Pc-3: Wayne State University, Detroit. Department of Nutrition and Food Science. 20015.

una confirmación tentativa de la identidad del pico cromatográfico como Muricina S.^{128 129}

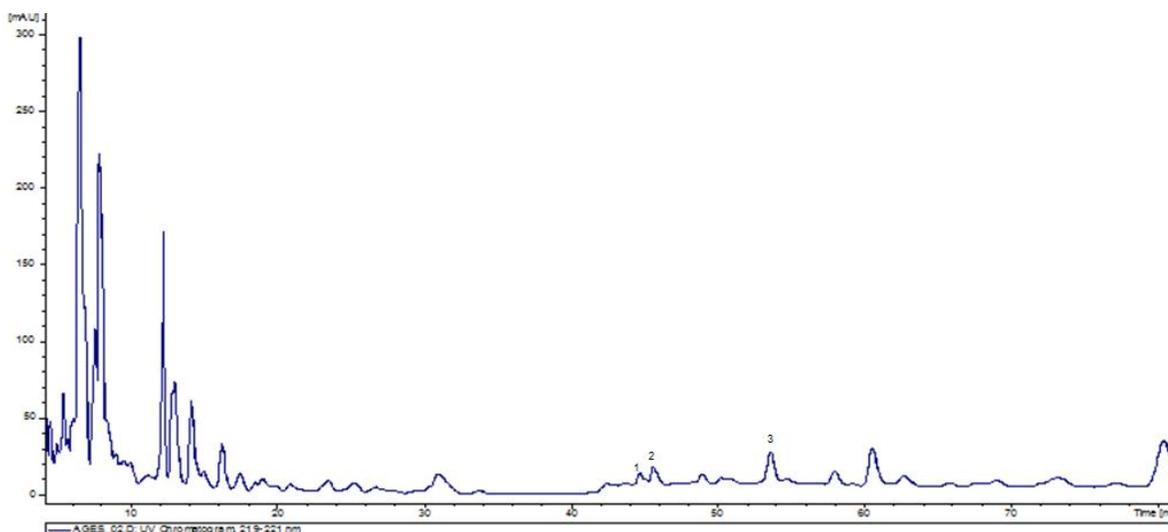
4.6.2 Análisis de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* por Cromatografía de Líquida de Alta Eficiencia Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS)

El análisis por LC-MS/MS se realizó como complemento para la identificación de acetogeninas en las muestras. Las condiciones cromatográficas utilizadas son descritas en el apartado 3.7.2. La identificación de las acetogeninas se realizó mediante la comparación con los espectros de masas, empleando la base de datos Mass Bank. Las acetogeninas identificadas se muestran en la tabla 43. El cromatograma de los extractos etanólicos de semillas se muestra a continuación:

¹²⁸ SUN, S., LIU, J., ZHOU, N., ZHU, W., DOU, Q., ZHOU, K. Isolation of Three New Annonaceous Acetogenins from Graviola Fruit (*Annona Muricata*) and Their Anti-Proliferation on Human Prostate Cancer Cell Pc-3: Wayne State University, Detroit. Department of Nutrition and Food Science. 20015.

¹²⁹ GROWTHER, L. Anticancer Activity of *Annona Muricata* Leaf Extracts and Screening for Bioactive Phytochemicals: International Journal of Pharmacy and Biological Sciences ISSN: 2321-3272 (Print), ISSN: 2230-7605 (Online) IJPBS, Volume 8, Issue 1. JAN-MAR. 2018. 475-481 p.

Figura 38. Cromatograma LC-MS/MS de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* de la región de Caldas.



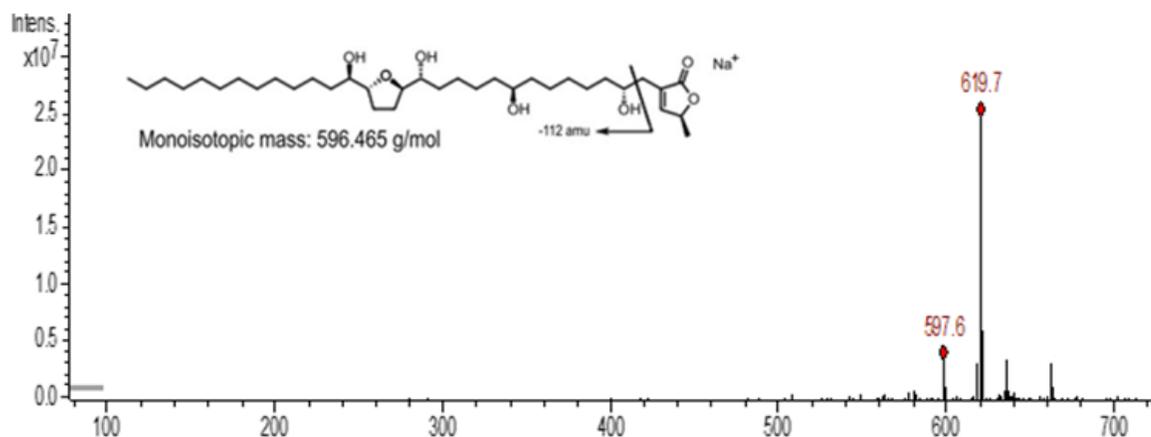
Fuente: Esta Investigación.

Tabla 43. Compuestos identificados en el análisis de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* por LC-MS/MS.

Pico N°	Compuesto	Iones Fragmento (m/z)
1	Annonacina-Na+	619,7 (100), 597,6.
2	Esquamocina-Na+	645(100), 618,
3	Annonacinona-Na+	617(100), 595, 577.

Fuente: Esta Investigación.

Figura 39. Espectro de masas (LC-MS/MS) de Annonacina-Na+.



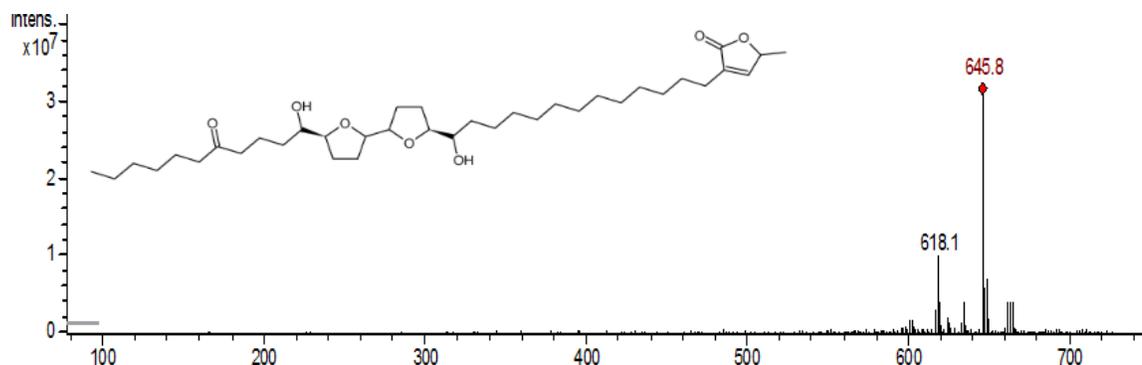
Fuente: Esta Investigación.

El ion $m/z = 597.6$ corresponde a la masa molecular de la Annonacina protonada. El ion $m/z = 619.59$ se atribuye al ión molecular del aducto sodio $[M + Na]^+$, probablemente por impurezas en la cámara de nebulización del LC-MS.¹³⁰¹³¹ El valor señalado en la gráfica de Annonacina representa uno de los fragmentos principales de la fragmentación de este compuesto correspondiente a la pérdida del anillo lactónico.

¹³⁰ RANISAHARIVONY, B., RAMANANDRAIBE, V., RASOANAIVO, L., RAKOTOVAO, M. y LEMAIRE, M. Separation and Potential Valorization of Chemical constituents of Soursop Sedes: *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015. 161-171 p.

¹³¹ SMITH, R., LEVINE, R., TRAN, K., RICHARDS, K., RYAN, S., LUO, R., MAIA, J., SABAA-SRUR, A., de MORAES, M., GODOY, H., de MORAES, I., SCHMIDT, F. y THOMAS, A. LC-MS and NMR Analyses of Neurotoxic Fruits in the Annonaceae Family: 1 The U.S. Food and Drug Administration, Lenexa, KS 66214. 2018.

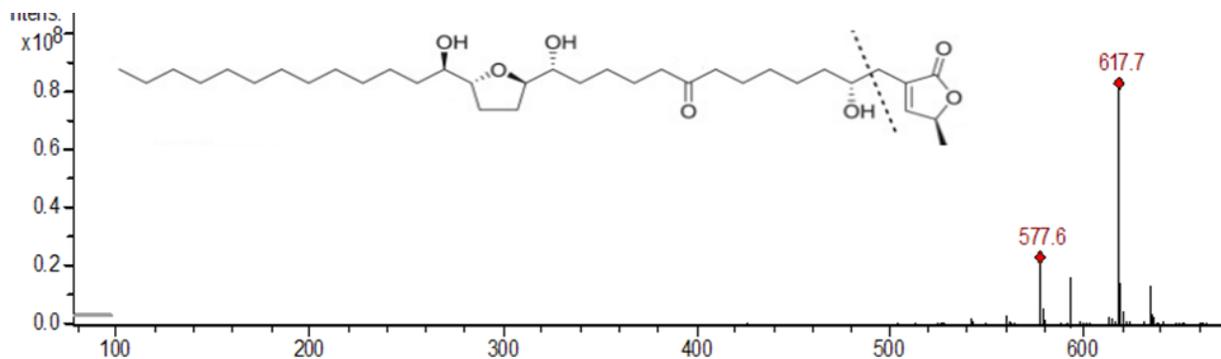
Figura 40. Espectro de masas (LC-MS/MS) de Esquamocina-Na+.



Fuente: Esta Investigación.

El ion principal $m/z= 645.8$ corresponde a la masa molecular del aducto sodio de la molécula Esquamocina. El espectro de masas por LC-MS corresponde al reportado por Smith, R et al. para esta molécula.¹³²

Figura 41. Espectro de masas (LC-MS/MS) de Annonacinona-Na+.



Fuente: Esta Investigación.

¹³² Ibid, p.

En el espectro de masas aparecen 3 fragmentos principales, siendo el ion molecular principal de $m/z= 617,7$ el correspondiente al aducto sodio del compuesto Annonacinona $[M + Na]^+$. El pico pequeño corresponde al ion $m/z= 595$ que es atribuido a la masa molecular de la Annonacinona protonada $[M + H]^+$, y el fragmento con $m/z= 577.6$ corresponde a una pérdida de agua por parte del compuesto protonado de Annonacinona.¹³³ El valor señalado en la gráfica de Annonacinona representa uno de los fragmentos principales de la fragmentación de este compuesto correspondiente a la pérdida del anillo lactónico.

4.7 ANÁLISIS DE ACETOGENINAS EN MUESTRAS

4.7.1 Comparación de Extractos Etanólicos de Semillas de *Annona muricata* de los Departamentos de Caldas y de Nariño

Se determinó el contenido de acetogeninas totales presentes en muestras de semillas de *Annona muricata* de la regiones de Caldas y de Nariño. La extracción de las acetogeninas en las muestras de semillas se realizó por el método soxhlet a las condiciones óptimas de extracción. (Tabla 9).

La siguiente tabla de resumen estadístico, muestra la comparación general de concentraciones de acetogeninas en extractos etanólicos de semillas de Caldas y Nariño. Como puede observarse las muestras de las dos regiones, presentan coeficientes de variación menores al 5%, por lo cual la dispersión de los datos obtenidos fue baja, permitiendo una mayor aproximación en las estimaciones estadísticas realizadas.

¹³³ RANISAHARIVONY, B., RAMANANDRAIBE, V.,RASOANAIVO, L., RAKOTOVAO, M. y LEMAIRE, M. Separation and Potential Valorization of Chemicalconstituents of Soursop Sedes: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2015. 161-171 p.

Tabla 44. Resumen estadístico de comparación entre extractos de semillas de Nariño y Caldas.

	SEMILLAS CALDAS	SEMILLAS NARIÑO
Recuento n=2	3	3
Promedio (mg/g)	123,673	254,589
Desviación Estándar	5,06322	8,35026
Coefficiente de Variación	4,09404%	3,2799%
Mínimo	118,611	248,346
Máximo	128,738	264,074

Fuente: Esta Investigación.

El promedio reportado, determinó un mayor contenido de acetogeninas en las muestras de la región de Nariño. El valor mínimo de la concentración de acetogeninas de la región de caldas correspondió a 118,6 mg/g de AGEs, mientras que para las semillas de Nariño el contenido de acetogeninas fue de 248,3 mg/g, con una diferencia entre ambos de 129,7 mg/g. Los valores máximos obtenidos en las muestras de las regiones de Caldas y Nariño fueron 128,7 mg/g y 264 mg/g respectivamente, con una diferencia de 135,3 mg/g. Por lo cual se estima que el contenido de acetogeninas es el doble en las semillas de Nariño en comparación con las de Caldas, con una diferencia que varía entre 130 y 135 mg/g aproximadamente.

Con lo anterior, para determinar si las muestras presentan diferencias estadísticamente significativas se realizó la prueba de comparación de medias.

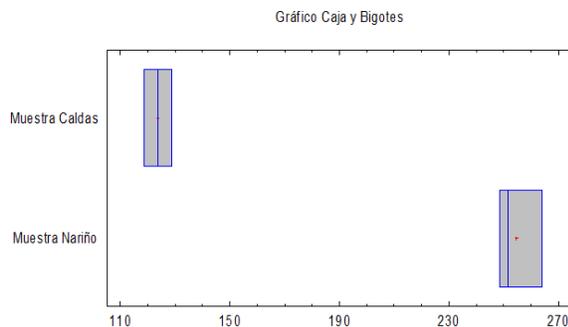
Tabla 45. Comparación de medias entre extractos de semillas de Nariño y Caldas.

Semillas	Comparación de Medias	Intervalos de Confianza	Valor-P
Caldas	123,673 +/- 12,5777	95%	t = -23,2198 valor-P = 0,0000203875
Nariño	254,589 +/- 20,7432	95%	

Fuente: Esta Investigación.

Se compararon las medias de las dos muestras mediante la prueba-t, obteniéndose un intervalo desde 146,57 hasta -115,262, puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia entre las medias de las dos muestras. La prueba de valor-P, arrojó un resultado menor al 0,05 con un nivel de confianza de 95%, por lo cual la diferencia entre muestras es estadísticamente significativa. Lo anterior es observable en el gráfico de caja y bigotes.

Grafica 9. Gráfico de caja y bigotes para la comparación entre extractos de semillas de Nariño y Caldas.



Fuente: Esta Investigación.

El gráfico de caja y bigotes representa las diferencias significativas entre las dos muestras. La muestra de Caldas presentó datos centralizados con una mayor precisión. La muestra de Nariño presentó entre datos mayor dispersión. También se observa que a las mismas condiciones de extracción, la concentración de acetogeninas fue mayor para la muestra de Nariño en comparación con las muestras de Caldas.

Aunque las semillas analizadas de ambas regiones pertenecen a un mismo tipo de especie vegetal, determinada taxonómicamente como *Annona muricata*, el contenido de productos naturales presentes en este tipo de matriz, pudo variar por diversos factores. La concentración de acetogeninas, depende de factores, como el adecuado crecimiento de la especie en cuestión, la recolección, las condiciones climáticas, condiciones de suelo, fungicidas, y tipos de cultivos adyacentes, que intervienen en las interacciones entre la planta y su ambiente.¹³⁴ En el caso de las muestras de semillas de *Annona muricata* analizadas, se tuvo en cuenta la uniformidad a la hora de la recolección, y madurez de la planta, por lo cual la concentración de acetogeninas se deriva en este caso, específicamente de las condiciones climáticas, condiciones de nutrientes de suelos y condiciones de poli o mono cultivo.

En los efectos climáticos se ven involucrados factores como la temperatura, altitud, y el agua del suelo, los cuales regulan los procesos ecofisiológicos interviniendo directamente en la producción de metabolitos. En este caso las semillas provienen de cultivos de condiciones similares en altitud y clima, con variaciones en la humedad relativa de los suelos, presentándose etapas de lluvias variadas en ambas regiones. Sin embargo al ser factores no medibles y no controlados, y al estar ambos cultivos en condiciones semejantes de altitud y

¹³⁴ PÉREZ, A. Producción de Metabolitos Secundarios de Plantas Mediante el Cultivo *In Vitro*: *Bioteología Vegetal* Vol. 11, No. 4. 2011. 195 – 211 p.

temperatura, no se logra establecer una relación adecuada del porcentaje de acetogeninas con respecto a las condiciones climáticas.

Otro factor que pudo influenciar el contenido de acetogeninas, corresponde a la diferencia de cultivos. En la región de Caldas, el muestreo se hizo en un monocultivo de grandes producciones de guanábana, mientras que en la región de Nariño se realizó de un cultivo pequeño y con diversidad. Las condiciones de policultivos poseen diferentes ventajas, la sinergia que tienen los diferentes tipos de plantas en conjunto con el suelo, hace que en condiciones de variedades de plantas adyacentes, se regulen los nutrientes del suelo y se genere una competencia entre tipos de plantas ocasionando un mayor desarrollo y crecimiento.¹³⁵

Las variedades de plantas a pesar de intervenir en la competencia por los nutrientes del suelo, realizan un aporte en el mismo retroalimentándolo, y mejorando su calidad, e incluso llegando a mejorar el control de plagas. Se sabe que la cantidad de nutrientes disponibles en una planta dependen directamente de la cantidad de nutrientes del suelo, y la variedad de estos nutrientes está estrechamente relacionada con la cantidad de producción de metabolitos secundarios. Es por esto que la diferencia entre la concentración de acetogeninas de la región de Nariño y Caldas, más que atribuirse a condiciones climáticas, posiblemente es atribuido en este caso a las condiciones de policultivo que presentan las muestras de Nariño, las cuales pudieron favorecer el desarrollo de plantas más sanas con mayor contenido de metabolitos secundarios entre los cuales se encontraron las acetogeninas.^{136 137}

¹³⁵ ISBELL, F., ADLER, P.R., EISENHAUER, N., FORNARA, D., KIMMEL, K., KREMEN, C., LETOURNEAU, D., LIEBMAN, M., POLLEY, H.W., QUIJAS, S., SCHERER-LORENZEN, M. Benefits of Increasing Plant Diversity In Sustainable Agroecosystems: *Journal of Ecology*. 2017. 871-879 p.

¹³⁶ Ibid, p.

¹³⁷ PÉREZ, A. Producción de Metabolitos Secundarios de Plantas Mediante el Cultivo *In Vitro*: *Bioteología Vegetal Vol. 11, No. 4*. 2011. 195 – 211 p.

4.7.1.1 Comparación de métodos de extracción Soxhlet y Maceración Química para la extracción de AGEs en semillas de Caldas

La comparación de los métodos para la extracción de Acetogeninas en semillas de *Annona muricata* de la región de Caldas, se realizó según las condiciones de extracción descritas en la tabla 9. La muestra de semillas corresponde al mismo cultivo y temporada de recolección. En la siguiente tabla se observan las concentraciones promedio de acetogeninas presentes en las muestras analizadas por ambos métodos de extracción.

Tabla 46. Resumen estadístico de comparación de métodos de extracción Soxhlet y Maceración Química para AGEs en semillas de Caldas.

SEMILLAS	EXTRACCIÓN SOXHLET	MACERACIÓN QUÍMICA
Recuento	3	3
Promedio AGEs (mg/g)	223,673	101,112

Fuente: Esta Investigación.

El método soxhlet presentó un promedio de extracción de 223,67 mg/g de acetogeninas, con el método de maceración se obtuvo 101,11 mg/g de acetogeninas, con una diferencia 122,56 mg/g, siendo el soxhlet el método más eficiente de los implementados para la extracción de estos compuestos bajo las condiciones descritas. Para determinar si las diferencias son estadísticamente significativas, se realizó la prueba de comparación de medias.

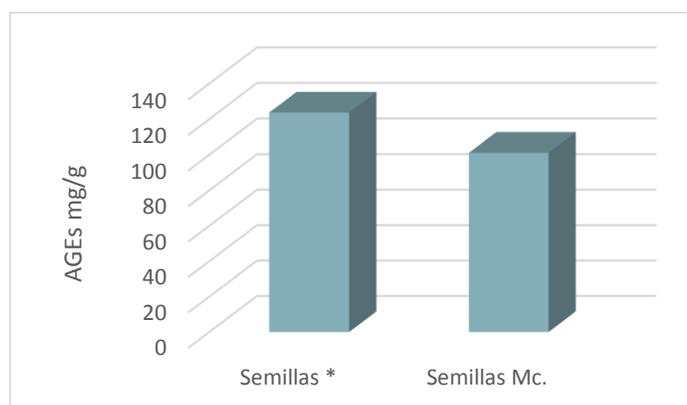
Tabla 47. Comparación de medias de métodos de extracción Soxhlet y Maceración Química para AGEs en semillas de Caldas.

Muestras	Comparación de Medias	Intervalos de Confianza	Valor-P
Extracción Soxhlet	223,673 +/- 20,7432	95%	t = 9,87786 valor-P = 0,00220641
Maceración Química	101,112 +/- 20,0342	95%	

Fuente: Esta Investigación.

Con la comparación de medias mediante la prueba-t se determinó en un intervalo de confianza que existe una diferencia entre las medias de las dos muestras. El valor-p que presentó la prueba estadística fue 0,00220641, menor a 0,05 con diferencias estadísticamente significativas. Los valores promedio se ilustran en el siguiente gráfico:

Gráfica 10. Gráfico de comparación de concentración de AGEs en extractos etanólicos de Semillas extraídos por el método soxhlet y maceración química



*Soxhlet, Mc: Maceración Química

Fuente: Esta Investigación.

En ambos casos, la extracción parte de una muestra de semillas de la región de Caldas previamente molidas. Las condiciones de solvente y porcentaje de muestra en ambos experimentos son los mismos, el tiempo varía según el tipo de método de extracción utilizado, siendo el soxhlet de 8 horas y la maceración química de 8 días. Debido a que la mayor concentración de acetogeninas se obtuvo por el método soxhlet, siendo este el método que requiere menor tiempo de extracción, se puede concluir que este factor no es una variable significativa para las extracciones de acetogeninas en estos experimentos, por lo cual, la diferencia que se presentó en la extracción de acetogeninas en las semillas de Nariño se debe específicamente a las características del método.

Ambos métodos se basan en la extracción asistida por solventes químicos, en el caso del soxhlet, la extracción se realiza por calentamiento del solvente, el cual genera un ciclo de evaporación y condensación repetidas. El solvente pasa por la muestra a temperatura de ebullición, y atraviesa varias veces la muestra en ciclos. La maceración química utilizada se basa en extracción por solventes mediante agitación pero sin calentamiento por un periodo de 8 días. El proceso de agitación remueve las partículas de las semillas presentando un mayor contacto de la superficie de la muestra con el solvente.

Teniendo en cuenta las características de los métodos de extracción evaluados, como son las temperaturas, contacto muestra-solvente y tiempo, y que la mayor concentración de acetogeninas fue extraída por el método soxhlet, se puede descartar la influencia del contacto superficial muestra-solvente como factor que contribuyó directamente en la elección del mejor tipo de extracción, ya que entre los dos métodos, en la maceración química la muestra tiene mayor contacto con el solvente debido a que sus partículas están inmersas en él, mientras que en el soxhlet están empaquetadas y el solvente pasa a través del cartucho de la muestra. Por lo anterior, uno de los factores más relevantes que podría tener influencia en la extracción entre un método y otro, es la temperatura a la cual se realiza la extracción.

La extracción de metabolitos secundarios por medio de solventes químicos, se facilita debido a la permeabilidad de la pared celular para la introducción del solvente hacia el interior de la célula. La membrana plasmática a su vez, presenta una semi-permeabilidad, permitiendo la difusión pasiva de moléculas pequeñas, sin carga, y moléculas con alta solubilidad en grasas como el etanol, las cuales cruzan las membranas prácticamente sin oposición. Entre las moléculas que pueden ingresar al interior de la célula también se encuentran moléculas en estado gaseoso, por lo cual en este caso, el método soxhlet podría presentar una mayor ventaja debido a que el proceso de evaporación y condensación del disolvente, permiten una extracción por la entrada del solvente líquido y por parte de moléculas gaseosas que entren a la célula y que posteriormente se condensen.

138

Las temperaturas elevadas en el método soxhlet también facilitan el ingreso del solvente al interior de la célula vegetal, hasta llegar a las vacuolas. Teniendo en cuenta la total permeabilidad de la pared celular, el ingreso de compuestos a la célula se ve limitado como ya se mencionó, por la membrana plasmática, la cual está compuesta principalmente de bicapas lipídicas, que son conocidos como fosfolípidos o grasas, las cuales regulan la entrada y salida de sustancias en la célula. Estos fosfolípidos también contienen proteínas integradas que permiten a ciertos nutrientes entrar y salir. Al aumentar la temperatura, las colas de ácidos grasos en la bicapa fosfolípido, pueden “derretirse”, lo que significa que se vuelven más fluidas, modificando a su vez la permeabilidad de la célula, permitiendo el ingreso de más sustancias y posiblemente ocasionando un daño celular. Las altas temperaturas a su vez pueden ocasionar una desnaturalización de las proteínas o su rompimiento, produciendo una aceleración de las reacciones que suceden en la célula. ¹³⁹

¹³⁸ DIAZ, I. Membrana Celular: Biología Médica. Seminarios de Biología Celular y Molecular - USMP Filial Norte. Universidad de las Américas (Chile). 2016.

¹³⁹ OLAYA, M., GIRALDO, J. y LOPÉZ, C. Factores Que Afectan La Membrana Celular: <https://prezi.com/tndo9h4byfpu/factores-que-afectan-la-membrana-celular/>. 2013

Según lo anterior, las altas temperaturas que se llevan a cabo en la extracción soxhlet, pudieron influenciar en una mayor extracción de AGEs, debido a un mayor ingreso del solvente al interior de las células. Por el contrario, la extracción con maceración química se llevó a cabo a temperatura ambiente, por lo cual el ingreso de solvente estaba regulado según las condiciones normales de la membrana plasmática.¹⁴⁰

4.7.2 Contenido de AGEs en Extractos Etanólicos de Matrices de *Annona muricata* de la región de Caldas.

4.7.2.1 Contenido de AGEs en Extractos Etanólicos de Cascara de *Annona muricata* por los Métodos Soxhlet y Maceración Química

La tabla del resumen estadístico presenta los valores promedio de la concentración de acetogeninas totales de los extractos de cascara, extraídas por soxhlet y maceración química.

Tabla 48. Resumen estadístico de concentración de AGEs en extractos etanólicos de cascara obtenidos por el método soxhlet y maceración química.

CASCARA	PROMEDIO (mg/g)
Soxhlet	41,24
Mc. Química	34,57

Fuente: Esta Investigación.

¹⁴⁰ Ibid, p.

El mayor contenido de acetogeninas se obtuvo mediante el método soxhlet correspondiente a 41,24 mg/g, mientras que con maceración química se obtuvo un valor de 34,57 mg/g, con una diferencia entre métodos de extracción de 6,67 mg/g de muestra.

Bajo estas condiciones, el método que presentó mejores resultados para la extracción de acetogeninas en la cascara de *Annona muricata*, fue el método soxhlet, lo cual se explica en el apartado 4.7.1.1. En el análisis de muestras de cascara no se realizó comparación de medias debido a que el número de réplicas y la dispersión de los datos no permiten hacer una estimación significativa de la comparación entre ambas muestras.

4.7.2.2 Contenido de AGEs en Extractos Etanólicos de Hojas de *Annona Muricata* por los Métodos Soxhlet y Maceración Química

La extracción soxhlet se realizó de acuerdo a las condiciones reportadas por Najihah, en la optimización de extracción de acetogeninas en hojas de *Annona muricata*. Las condiciones de maceración química son descritas en la tabla 9, sección 3.8.2.3, y las condiciones cromatográficas son las establecidas en la sección 4.2. La tabla 49 muestra el promedio de acetogeninas extraídas por los diferentes métodos en hojas de *Annona muricata*.

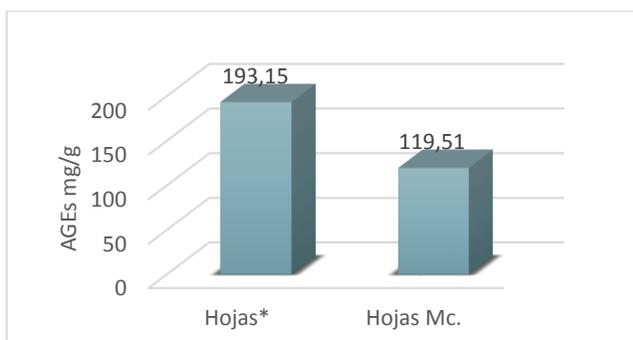
Tabla 49. Resumen estadístico de concentración de AGEs en extractos etanólicos de hojas obtenidos por el método soxhlet y maceración química.

HOJAS	PROMEDIO (mg/g)
Soxhlet	193,15
Mc. Química	119,51

Fuente: Esta Investigación.

El resumen estadístico demuestra que las extracciones por el método soxhlet tuvieron mejores resultados en la extracción de acetogeninas en hojas de *Annona muricata*, obteniendo valores de 193,15 mg/g y de 119,51 mg/g con el método de maceración química, con una diferencia de 72,64 mg/g. Los resultados obtenidos según el método de extracción concuerdan con lo descrito anteriormente en la sección 4.7.1.1. Los resultados son ilustrados en el gráfico de Barras.

Grafica 11. Gráfico de comparación de concentración de AGEs en extractos etanólicos de hojas extraídos por el método soxhlet y maceración química.



*Soxhlet Mc: Maceración Química

Fuente: Esta Investigación.

Acetogeninas Presentes en Extractos Etanólicos de Hojas de *Annona muricata* separadas por el Gradiente Optimo de separación

Las matrices estudiadas, como semillas, cáscara y hojas de *Annona muricata* presentan composiciones químicas diferentes. Por lo cual a pesar de realizarse el análisis de una misma clase de compuestos (Acetogeninas) en las tres matrices, se requiere de condiciones específicas para el análisis de estos dependiendo de cada matriz. Las condiciones de separación cromatográficas específicas pueden evitar coeluciones, y demás interferencias en los picos cromatográficos propios de cada muestra.

Teniendo en cuenta lo anterior, y que las condiciones cromatográficas adecuadas para la separación de Acetogeninas en extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* fueron reportadas por Najihah et al, ¹⁴¹ se realizó un análisis adicional de los extractos etanólicos obtenidos de hojas bajo estas condiciones específicas de separación.

La siguiente tabla presenta las concentraciones de AGEs en hojas como resultado de dos gradientes de separación. El gradiente del acondicionamiento cromatográfico para la identificación de acetogeninas en semillas (Sección 4.2) y el reportado por Najihah como condiciones óptimas para la identificación de estos compuestos en Hojas de *Annona muricata*. (Sección 3.2.2).

Tabla 50. Resumen estadístico, comparación de gradientes cromatográficos para el análisis de extractos etanólicos de Hojas por Soxhlet y Maceración química.

Muestras Hojas	Soxhlet (mg/g)	Maceración Química (mg/g)
Gradiente Najihah^a	276,572	259,301
Gradiente semillas^b	193,15	119,51

a: Condiciones Cromatográficas descritas por Najihah para separación de AGEs en hojas (3.2.2)

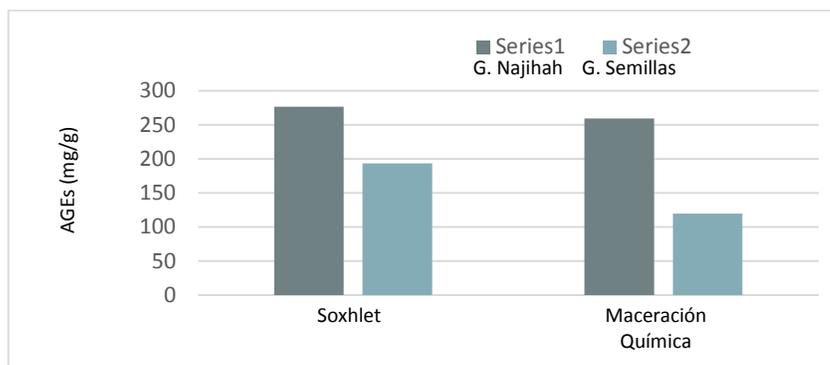
b: Condiciones de adecuamiento cromatográfico para separación de AGEs en semillas. (4.2)

Fuente: Esta Investigación.

¹⁴¹ NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of annona muricata leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

Los datos de la tabla se representan en el siguiente gráfico, donde se observan los métodos de extracción y gradientes cromatográficos en relación de la concentración de acetogeninas.

Grafica 12. Comparación de gradientes cromatográficos para el análisis de extractos etanólicos de Hojas por Soxhlet y Maceración química.



Fuente: Esta Investigación.

Como se pueden observar, los valores obtenidos de concentración de acetogeninas separados por el gradiente de Najihah, fueron mayores en comparación con los resultados obtenidos con el gradiente cromatográfico adecuado para la separación de acetogeninas en semillas, lo cual corrobora el hecho de la influencia de las condiciones cromatográficas en el análisis de los compuestos según la matriz analizada. A su vez se corroboró que los extractos con mayor concentración de acetogeninas entre las muestras, fueron los correspondientes a la extracción soxhlet, lo cual se discutió anteriormente en el apartado 4.7.1.1.

4.7.3 Comparación Entre Extractos Etanolicos de Matrices de *Annona muricata* del Departamento de Caldas.

4.7.3.1 Comparación de Concentración de AGEs en Extractos Etanólicos de Semillas, Cascara y Hojas Extraídos por el Método Soxhlet

Se realizó la comparación de todas las muestras extraídas por el método soxhlet con el fin de determinar cuál de las matrices presentó mayor contenido de acetogeninas. En el análisis de las muestras, se tuvo en cuenta el gradiente cromatográfico adecuado para las semillas (Sección 4.2, gradiente 6), el cual se utilizó para el análisis de extractos etanólicos de cascara, y el gradiente cromatográfico adecuado para el análisis de AGEs en hojas de *Annona muricata*. (Sección 3.2.2, gradiente 1). Los promedios obtenidos de acetogeninas en las muestras son reportados en la tabla 51.

Tabla 51. Concentración de AGEs en muestras de semillas, cáscara y hojas, de *Annona muricata* de la región de Caldas, extraídas por el método soxhlet.

Muestras	Promedio (mg/g)
Semilas	123,673
Hojas ^a	276,572
Cáscara	41,240

a: Condiciones Cromatográficas descritas por Najihah para separación de AGEs en hojas (3.2.2)

Fuente: Esta Investigación.

En el resumen estadístico se determinó que las muestras de hojas presentaron mayores concentraciones de acetogeninas con 276,57 mg/g, seguido por las muestras de semillas con 123,67 mg/g. El contenido de acetogeninas fue mucho menor en las muestras de cascara con un total de 41,240 mg/g.

4.7.3.2 Comparación de Concentración de AGEs en Extractos Etanólicos de Semillas, Cascara y Hojas Extraídos por Maceración Química

Se compararon las muestras extraídas por maceración química, con el fin de identificar la matriz con mayor porcentaje de acetogeninas a la cual favorece este tipo de extracción.

Tabla 52 . Concentración de AGEs en muestras de semillas, cascara y hojas, de *Annona muricata* de la región de Caldas, extraídas por maceración química.

Muestras	Promedio (mg/g)
Semillas	101,112
Hojas ^a	259,301
Cascara	34,57

a: Condiciones Cromatográficas descritas por Najihah para separación de AGEs en hojas (3.2.2)

Fuente: Esta Investigación.

La comparación de la concentración de acetogeninas (mg/g) con este método de extracción, presento mayores resultados para las hojas con una concentración de 259,301 mg/g de AGEs, seguidas por las semillas con 101,112 mg/g. La muestra

de maceración de la cascara correspondió a los valores más bajos de extracción de acetogeninas con 34, 57 mg/g por gramo de muestra.

4.7.3.3 Concentración de AGEs de Acuerdo a la Matriz de Semillas, Cascara y Hojas de *Annona muricata* por Extracción Soxhlet y Maceración Química

En la tabla 53 se observan los promedios de las concentraciones de acetogeninas (mg/g), en las muestras de cáscara, hojas y semillas extraídas por los métodos soxhlet y maceración química.

Tabla 53. Resumen estadístico de concentración de AGEs (mg/g) en extractos etanólicos de semillas, cascara y hojas por los métodos soxhlet y maceración.

Muestras	Promedio (mg/g)
Semillas Soxhlet	123,673
Semillas Maceración	101,112
Hojas Soxhlet ^a	276,572
Hojas Maceración ^a	259,301
Cascara Soxhlet	41,24
Cascara Maceración	34,57

a: Condiciones Cromatográficas descritas por Najihah para separación de AGEs en hojas (3.2.2)

Fuente: Esta Investigación.

Con base en los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico comparativo, mediante pruebas de análisis de varianzas presentado en la siguiente tabla:

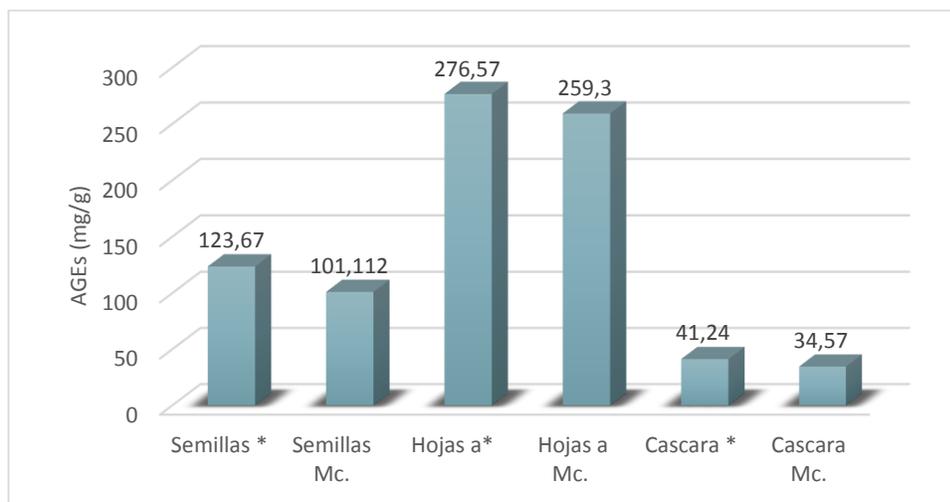
Tabla 54. Análisis de Varianza para la concentración de AGEs (mg/g) en extractos etanólicos de semillas, cascara y hojas por los métodos soxhlet y maceración química.

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	65507,3	9358,19	196,26	0,0001
Intra grupos	190,726	47,6816		
Total (Corr.)	65698,1			

Fuente: Esta Investigación.

Con el análisis de varianza realizado entre-grupos e intra-grupos, se obtuvo una razón-F de 196,26 como cociente estimado. El valor-P de la prueba-F fue menor que 0,05, por lo cual existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 muestras con un nivel del 95,0% de confianza. El promedio de los datos experimentales se ilustran en el siguiente gráfico:

Gráfica 13. Concentración de AGEs (mg/g) en extractos etanólicos de semillas, cáscara y hojas por los métodos de extracción soxhlet y maceración química.



*Extracción Soxhlet Mc: Maceración Química

a: Condiciones Cromatográficas descritas por Najihah para separación de AGEs en hojas (3.2.2)

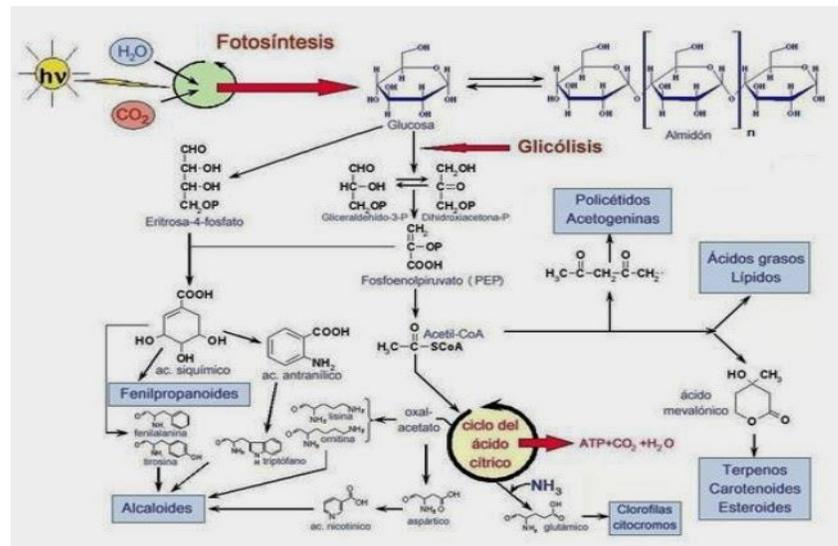
Fuente: Esta Investigación.

En el gráfico se observa el resumen de los resultados del contenido de acetogeninas en mg/g de muestra. La concentración de acetogeninas fue mayor en las muestras de hojas por ambos métodos de extracción, obteniéndose para el soxhlet 276,572 mg/g y para maceración química 259,301 mg/g, seguidas por los extractos de semillas con 123,673 mg/g y con 101,112 mg/g respectivamente. Los extractos de cascara presentaron los contenidos más bajos de acetogeninas por ambos métodos de extracción de 41,24 mg/g con soxhlet y 34,57 mg/g con maceración química.

La diferencia entre el contenido de acetogeninas, se debe a factores como tipo de extracción y rutas metabólicas propias de cada matriz, las cuales contribuyen a la producción de diversos tipos de metabolitos secundarios.

Aunque su biosíntesis aún no ha sido descrita detalladamente, las AGEs parecen derivar de la ruta de los policétidos. La figura muestra las rutas descritas para la formación de acetogeninas en las plantas:

Figura 42. Ruta metabólica de Síntesis General de Acetogeninas en las Plantas.



Fuente: Apuntes de fisiología vegetal. ¹⁴²

La vía de síntesis de las acetogeninas transcurre de un modo similar a la de los ácidos grasos (una condensación de Claisen); donde la molécula de inicio en la mayoría de los casos es el acetil CoA se va adicionando sucesivamente unidades de malonil CoA, con pérdida de un átomo de carbono, de modo que por cada malonil utilizado se integran dos átomos de carbono. Las enzimas que participan se hallan asociadas formando un complejo multienzimático que cataliza todos los pasos de la biosíntesis, y los compuestos que abandonan el complejo son los ácidos poliacétidos íntegramente formados, posteriormente se sugiere que los

¹⁴² Rutas metabólicas, Fisiología Vegetal, <http://fisiologiavegetal.es/tag/rutas-metabolicas>.

anillos THF, THP y epóxidos de las acetogeninas a su vez, se producen mediante la epoxidación y ciclación de dobles enlaces.¹⁴³

Teniendo en cuenta lo anterior y lo reportado en la bibliografía, se podría suponer que el alto contenido de acetogeninas en las semillas de la *Annona muricata* en comparación con la cáscara, podrían deberse a la ruta de síntesis de estos compuestos, la cual sigue la ruta metabólica para ácidos grasos, siendo estos los componentes fitoquímicos principales en las semillas de la mayoría de los frutos.

Con respecto al alto contenido de acetogeninas en las hojas, estudios de fitocomponentes propuestos por Ardi et al.,¹⁴⁴ Madi et al.,¹⁴⁵ y Wang et al.,¹⁴⁶ a su vez relacionan la producción de metabolitos secundarios como acetogeninas en partes externas de la planta, con el estrés oxidativo al cual estén expuestos, por lo cual los niveles de estos compuestos pueden sufrir variaciones según el medio en el que se desarrollen. En concreto no se han especificado las rutas metabólicas para la síntesis de acetogeninas, sin embargo los precursores de estos compuestos están presentes en abundancia en las hojas.

¹⁴³ SCHLIE, M., GONZÁLEZ, A y LUNA, L. Acetogenins from Annonaceae: antiproliferative effect on neoplastic cell lines Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libram. 2009. 245 – 257 p.

¹⁴⁴ ARDI, R., KOBILER, I., JACOBY, B., KEEN, N.T. y PRUSKY, D. *Physiol. Mol: Plant Pathol.* 53. 1998. 269 p.

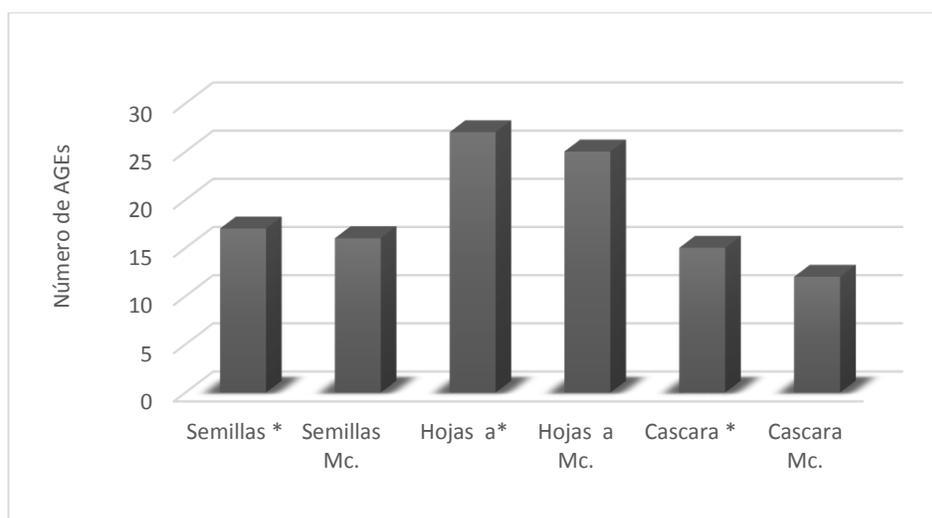
¹⁴⁵ MADI, L., WANG, X., KOBILER, I., LICHTER, A. y PRUSKY D., *Physiol. Mol: Plant Pathol.* 62. 2003. 277 p.

¹⁴⁶ WANG, X.J., BENO-MOUALEM, D., KOBILER, I., LEIKIN-FRENKEL, A., LICHTER, A. y PRUSKY, D. *Mol: Plant Pathol.* 5. 2004. 575 p.

4.7.4 Número de AGEs en Extractos Etanólicos de Semillas, Hojas Y Cascara de *Annona muricata*

Se realizó el análisis del número de acetogeninas extraídas e identificadas en todas las matrices, según los métodos de extracción implementados. Los resultados se muestran a continuación:

Grafica 14. Número de AGEs en extractos etanólicos de semillas, hojas y cáscara de *Annona muricata* extraídos por los métodos soxhlet y maceración química.



*Extracción Soxhlet Mc: Maceración Química

a: Condiciones Cromatográficas descritas por Najihah para separación de AGEs en hojas (3.2.2)

Fuente: Esta Investigación.

Como se observa en el gráfico, los resultados obtenidos con respecto al número de acetogeninas identificadas tentativamente en los extractos, son consistentes con los resultados anteriores (sección 4.7.3.3), en el análisis de concentración de acetogeninas, presentándose un mayor número en los extractos de las hojas con 26 acetogeninas identificadas en la extracción soxhlet, y 24 por el método de maceración química, seguidas a su vez del número de acetogeninas presentes en

las semillas identificándose 17 por el método soxhlet y 16 por maceración química, y por último el número de AGEs presentes en extractos de cascaras, con 15 acetogeninas con soxhlet y 12 acetogeninas en los de maceración química.

4.8 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *ANNONA MURICATA*

4.8.1 Curva de Calibración de Trolox

Los resultados obtenidos en la recta de calibrado de trolox frente al catión radical ABTS●+ se presentan en la tabla 55. En la gráfica 15, se muestra la recta de calibrado.

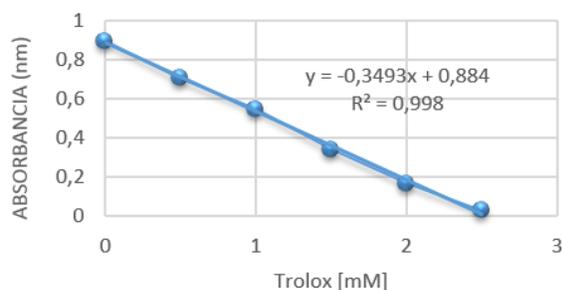
Tabla 55. Datos de absorbancias para la construcción de la recta de calibración de Trolox.

Trolox (Mm)	MEDIA a	%RSD b
0	0,8925	1,45
0,5	0,7025	11,03
1	0,54575	5,44
1,5	0,34375	2,27
2	0,16925	3,40
2,5	0,03025	2,42

a: Absorbancia; b: Porcentaje de coeficiente de variación.

Fuente: Esta Investigación.

Grafica 15. Curva de calibración de Trolox.



Fuente: Esta Investigación.

La curva de calibración con patrones de trolox, presentó la siguiente ecuación de recta:

Ecuación 5. Ecuación de la recta de calibración de Trolox.

$$y = -0,3493x + 0,884 \text{ con } R^2 = 0,998.$$

La pendiente negativa indica la degradación del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ a medida que aumenta la concentración de las soluciones de trolox.

El porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) presento valores menores al 7%, por lo cual los datos presentan baja dispersión. El dato correspondiente a 0,5 obtuvo un coeficiente de variación de 11,3%, sin embargo el valor se encuentra dentro del margen permitido de coeficiente de variación para este tipo de experimentos, el cual equivale al 15% de %RSD.

El coeficiente de correlación fue de $R^2 = 0,998$ cercano a la unidad, lo cual expresa una buena linealidad y un alto grado de correlación entre las absorbancias con respecto a las concentraciones de las soluciones de Trolox. Los datos obtenidos demuestran que la curva de calibración es adecuada como

referencia para las muestras analizadas, en la determinación de capacidad antioxidante por el método TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox).

La verificación del método se realizó por triplicado usando un patrón de ácido ascórbico al 5mM, las absorbancias obtenidas con valores promedio de 0,996 (\pm 0,004) mM de Trolox se compararon con los resultados publicados por Re,¹⁴⁷ y Jiménez,¹⁴⁸ los cuales indicaban valores cercanos a 1 para patrones de ácido ascórbico (1,05 \pm 0,02).

4.8.2 Capacidad Antioxidante de Extractos Etanólicos de Semillas y Cáscara de *Annona muricata*.

Se determinó la capacidad antioxidante en términos de concentración equivalente a Trolox, (mM de Trolox), de extractos etanólicos de semillas de la región de Caldas y Nariño, y extractos de cáscara obtenidos por los métodos Soxhlet y Maceración química.

La capacidad antioxidante de las muestras, se obtuvo relacionando las absorbancias (después de la reacción con ABTS●+), con la recta de calibración de Trolox, para lo cual se empleó la ecuación 6. El promedio de datos obtenidos se encuentra en la tabla de resumen estadístico (tabla 56).

Ecuación 6. Ecuación de la recta en términos de concentración de Trolox

$$\text{Absorbancia (nm)} 734\text{nm}=0,3028* [\text{mM}] \text{ Trolox} + 0,0224$$

¹⁴⁷ RE, R. y PELLEGRINI, N. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay: international antioxidant research centre, *elsevier science publishers* b.v., London. 1998. 1231-1237 p.

¹⁴⁸ JIMÉNEZ, J.P. y VILLARREAL, J. Estudio Químico de Pigmentos Tipo Antocianina Presentes en el Fruto del Mutilon (*Hyeronima macrocarpa*): Universidad de Nariño. Tesis de Grado. 2008.

Tabla 56. Resumen estadístico de la capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cascara de *Annona muricata*.

MUESTRAS	PROMEDIO (mM trolox)	DE	% RSD
Semillas Caldas*	2,211	0,0258818	3,77102%
Semillas Caldas Mc.	2,197	0,0187240	2,95348%
Cascara*	2,612	0,0166208	2,03624%
Cascara Mc.	0,770	0,0679142	26,6853%
Semillas Nariño Mc.	1,963	0,0269382	4,35541%
Semillas Nariño*	1,892	0,0111609	1,88795%

Mc: Maceración Química * Soxhlet

Fuente: Esta Investigación.

En la tabla se observa que las desviaciones estándar de los datos son bajas, por lo cual la medida de dispersión de datos con respecto a la media aritmética de las muestras es poco significativa. El coeficiente de variación de las muestras problemas presenta valores menores al 7% lo cual se traduce en una baja dispersión de datos, y homogeneidad en los valores de las muestras. El coeficiente de variación más alto correspondió a las muestras de cáscara extraídas por maceración química, con un valor de 26,6853%, lo cual puede deberse a errores en el procedimiento de extracción o a la baja estabilidad de los compuestos extraídos de la cáscara por medio de maceración química.

Debido a la diferencia mayor de 3 a 1 entre los mínimos valores de desviación estándar con los máximos y las diferencias presentadas entre coeficientes de variación mayor a la unidad entre las muestras, se realizó la prueba de verificación de varianzas correspondiente a la prueba de Levene's.

Tabla 57. Verificación de Varianza para capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cáscara.

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,13026	0,376647

Fuente: Esta Investigación.

Con la prueba se obtuvo un valor-P mayor que 0,05, por lo cual no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar y los datos, con un nivel de confianza de 95,0%.

La comparación de las muestras se realizó mediante pruebas estadísticas. Para lo cual se usó el análisis de varianza (ANOVA), estableciendo si hay diferencias significativas entre las medias y la prueba de Rango Múltiples para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla 58. Análisis de varianza para capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cáscara de *Annona muricata*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,82424	0,164848	141,29	0,0001
Intra grupos	0,0233354	0,00116677		
Total (Corr.)	0,847575			

Fuente: Esta Investigación.

La razón-F correspondió al cociente entre los valores obtenidos entre los grupos y el estimado dentro de grupos. Ya que el valor-P de la Prueba-F es menor que

0,05, las muestras presentan diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95,0%, por lo cual para determinar el nivel de relación o diferencia entre muestras se realizó la prueba de múltiples rangos.

Tabla 59. Pruebas de Múltiple Rangos para capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cascara de *Annona muricata*.

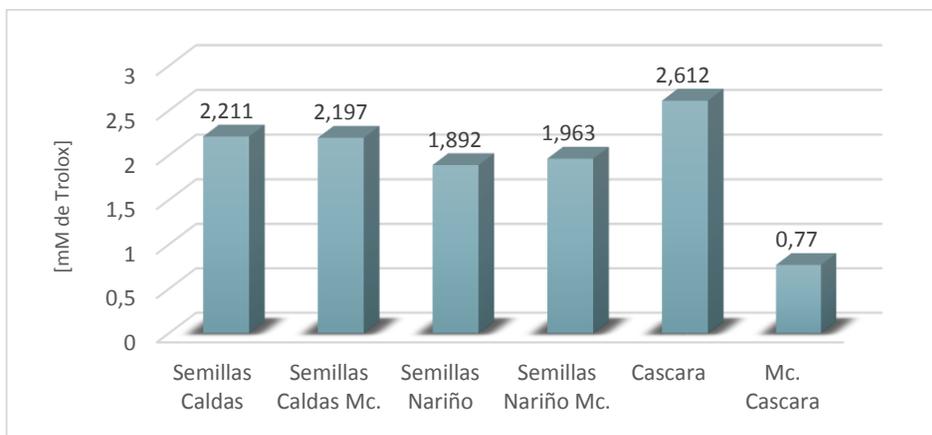
MUESTRAS	PROMEDIO (mM de Trolox)	GRUPOS HOMOGÉNEOS
Cascara Mc.	0,770	X
Semillas Nariño*	1,892	X
Semillas Nariño Mc.	1,963	X
Semillas Caldas*	2,211	X
Semillas Caldas Mc	2,197	..X
Cascara*	2,612	.X

Mc: Maceración Química * Soxhlet

Fuente: Esta Investigación.

En la tabla se observan dos grupos homogéneos, correspondiente a la relación entre capacidad antioxidante de extractos de semillas de Caldas por los métodos soxhlet y maceración química, y el grupo homogéneo de extractos de semillas de Nariño por ambos métodos de extracción, por lo cual se puede decir que entre extractos de semillas del mismo cultivo no se presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la capacidad antioxidante en mM de Trolox. Los extractos de cascara se observan como grupos heterogéneos, con capacidades antioxidantes con diferencias estadísticamente significativas entre ellos. La capacidad antioxidante en las muestras se representa en el siguiente gráfico:

Grafica 16. Capacidad antioxidante de extractos etanólicos de semillas y cáscara de *Annona muricata*.



* Soxhlet Mc: Maceración Química

Fuente: Esta Investigación.

El extracto que presentó mayor capacidad antioxidante fue el de cáscara, obtenido por el método soxhlet con 2,612 mM de trolox. El extracto de semillas de Caldas presentó valores altos, con capacidad antioxidante de 2,211 mM de trolox por extracción soxhlet y 2,197 mM de trolox por maceración química. Los extractos de semillas de Nariño extraídos por soxhlet y maceración química presentaron valores cercanos con 1,892 y 1,963 mM de trolox respectivamente, y los extractos de cáscara obtenidos por maceración química presentaron el mínimo de capacidad antioxidante de 0,77 mM de trolox.

Como puede observarse en la gráfica, los extractos de cáscara por ambos métodos de extracción, presentaron diferencias significativas, las cuales pueden estar asociadas a características propias de los métodos, siendo posiblemente el método soxhlet el que permita mayor extracción de compuestos antioxidantes en esta matriz. También podría deberse a la disminución o degradación con respecto al tiempo, de compuestos con estas características bioactivas, los cuales pueden

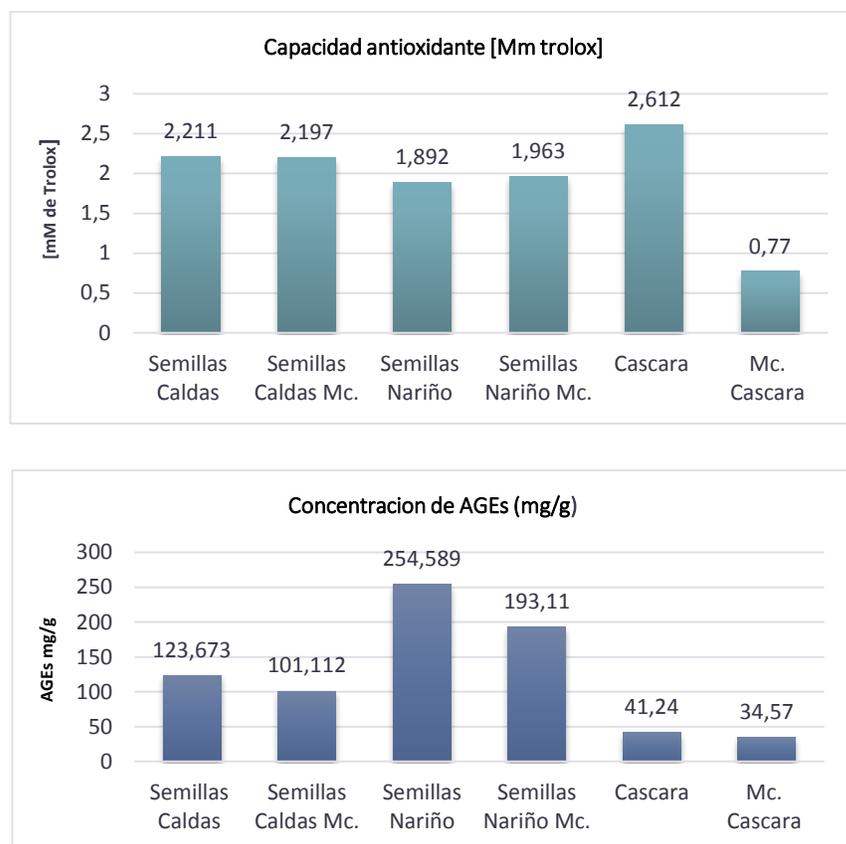
disminuir en el proceso de extracción por maceración química al cabo de los 8 días.

Según el gráfico 16 la capacidad antioxidante de los extractos de semillas fue mayor para los extractos de Caldas en comparación con los de Nariño. Las diferencias de la capacidad antioxidante en semillas de diferente región, para una misma especie de *Annona muricata*, está ligada a los tipos de metabolitos secundarios producidos por la planta según factores agroecológicos, tratamientos del cultivo, e interacciones del cultivo con el ambiente, como se explica en el apartado 4.7.1.

4.8.3 Relación de la Capacidad Antioxidante con el Contenido de Acetogeninas Presentes en los Extractos.

Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos de capacidad antioxidante con el contenido en mg/g de AGEs en los extractos. Los resultados se muestran en los siguientes gráficos de barras:

Grafica 17. Capacidad antioxidantes y concentración de acetogeninas de extractos etanólicos de semillas y cáscara de *Annona muricata*.



Fuente: Esta Investigación.

El gráfico superior corresponde a la capacidad antioxidante de las muestras expresadas en mM de Trolox, el grafico inferior corresponde a las concentraciones de acetogeninas (mg/g). Como se puede observar las semillas de Caldas y de Nariño presentaron valores cercanos a 2 Mm de trolox con respecto a su capacidad antioxidante, en la comparación de la concentración de AGEs en semillas, la región de Nariño presento el doble de acetogeninas que la región de Caldas. Los extractos de cáscara por soxhlet presentaron la mayor capacidad antioxidante (2,616 mM de trolox), y la segunda concentración más baja de acetogeninas (41,24 mg/g).

La capacidad antioxidante de los extractos, evaluada por el método TEAC, depende de la presencia de grupos electro-donadores para ceder electrones y estabilizar al catión radical ABTS+•. Entre estos compuestos con actividad antioxidante presentes en los extractos etanólicos de la *Annona muricata*, se según estudios fitoquímicos reportados en la bibliografía, se encuentran los polifenoles, ácidos grasos, terpenos, fenoles y acetogeninas. La reacción general que se lleva a cabo se presenta a continuación.

Ecuación 7. Reacción General de Antioxidantes.



La mayor capacidad antioxidante por parte de los extractos etanólicos de cáscara, podrían deberse a los altos contenidos polifenólicos. Diversos estudios publicados por Ardi et al.,¹⁴⁹ Madi et al.,¹⁵⁰ y Wang et al.,¹⁵¹ indican que ciertos frutos desarrollan concentraciones más elevadas de antioxidantes en las partes externas de la planta, como cáscara y hojas, debido a que los factores endógenos y exógenos, hacen necesario que generen su resistencia al medio combatiendo hongos y plagas. El medio en el que se desarrollan, por lo tanto desencadena la producción de metabolitos secundarios capaces de combatir radicales libres, lo cual podría explicar los resultados con respecto a la mayor capacidad antioxidante presentada por parte de los extractos etanólicos de cáscara. Estos estudios, también están relacionados con el aumento en la producción de acetogeninas y con su papel antioxidante en la lucha contra el estrés oxidativo.^{152 153}

¹⁴⁹ ARDI, R., KOBILER, I., JACOBY, B., KEEN, N.T. y PRUSKY, D. *Physiol. Mol: Plant Pathol.* 53. 1998. 269 p.

¹⁵⁰ MADI, L., WANG, X., KOBILER, I., LICHTER, A. y PRUSKY D., *Physiol. Mol: Plant Pathol.* 62. 2003. 277 p.

¹⁵¹ WANG, X.J., BENO-MOUALEM, D., KOBILER, I., LEIKIN-FRENKEL, A., LICHTER, A. y PRUSKY, D. *Mol: Plant Pathol.* 5. 2004. 575 p.

¹⁵² De JONG, A.J., YAKIMOVA, E.T., KAPCHINA, V.M. y WOLTERING, E.J. *Planta* 214. 2002. 537 p.

¹⁵³ BENO-MOUALEM, D. y PRUSKY D. *Phytopathology* 90. 2000. 553 p.

Analizando los gráficos anteriores (Gráfico 17), no es posible establecer una relación entre la concentración de acetogeninas y la capacidad antioxidante por el método TEAC. Por lo cual para determinar la actividad antioxidante individual de las acetogeninas, se usó el estándar de Annonacina a diferentes concentraciones. Los datos se muestran en la tabla 60.

Tabla 60. Capacidad antioxidante de Annonacina en mM de Trolox.

Annonacina	Promedio (mM trolox)
100ppm	0,114
200ppm	0,134
500ppm	0,150

Fuente: Esta Investigación.

Como se puede observar la Annonacina presentó una mínima capacidad antioxidante, correspondiendo a una leve decoloración de la solución de ABTS+●. Lo anterior podría suponerse como falta de capacidad antioxidante por parte de este compuesto, sin embargo, estos resultados también pueden atribuirse a que las concentraciones de Annonacina utilizadas fueron muy bajas para presentar actividad biológica, o también al mecanismo de acción de este compuesto frente a método TEAC.

En diferentes estudios se incluye la actividad antioxidante como actividad biológica de las acetogeninas, sin embargo se reporta que las capacidades antioxidantes para estos compuestos deben ser evaluadas por distintos métodos, ya que su acción difiere según el tipo de Acetogenina estudiada. ¹⁵⁴

¹⁵⁴ RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, D., SILVA-PLATAS, C., ROJO, R., GARCÍA, N., CISNEROS-ZEVALLOS, L., GARCÍA-RIVAS, G. y HERNÁNDEZ-BRENES, C. Activity-Guided Identification of

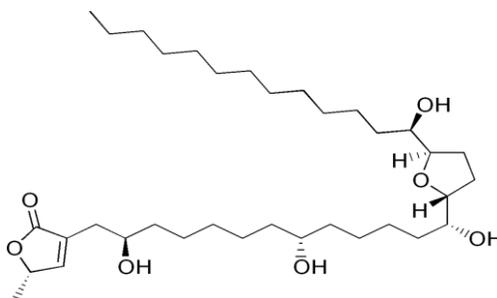
En los reportes se han implementado métodos como el ORAC (basado en transferencia de átomos de hidrogeno), DPPH, y TEAC (basados en mecanismos de transferencias de electrones). Rodríguez-Sánchez, D. et al,¹⁵⁵ propusieron un mecanismo antioxidante de algunas acetogeninas en el cual la cadena alifática, junto con el grupo trans-enona conjugado con el grupo ceto, presente en algunas acetogeninas puede estabilizar especies aniónicas a través de la deslocalización de la carga dentro de su estructura. El grupo ceto de las acetogeninas confiere acidez a los hidrógenos de los carbonos adyacentes en los carbonos C3 y C5, facilitando la perdida de los protones, por lo cual el anion enolato generado se estabiliza por resonancia y puede reaccionar con radicales libres para neutralizarlos. En los mismos estudios se evaluó la toxicidad de estas acetogeninas con relación a su estructura, determinando que las acetogeninas compuestas por C19 con hidroxilos en C-2 y C-4 (alifáticos), presentan una alta citotoxicidad.

Según lo propuesto anteriormente, se podría pensar que la Annonacina presenta actividad antioxidante y baja toxicidad, debido a sus características estructurales, ya que contiene el grupo trans-enona, no presenta hidroxilos en el carbono C4 (alifático) y posee más de 19 carbonos alifáticos. (Figura 43).

Acetogenins as Novel Lipophilic Antioxidants Present In Avocado Pulp (*Persea americana*): Journal of Chromatography B. 2013. 37-45 p.

¹⁵⁵ Ibid, 37-45, p.

Figura 43. Estructura de Annonacina.



Fuente: PubChem Annonacina.

En otros estudios se prevé que las acetogeninas tienen mayor eficiencia en estabilizar radicales libres a través de donación de hidrógeno pero menor en transferencia electrónica. Por lo tanto, los resultados sugieren que el método de ORAC presenta mejores resultados que los métodos de DPPH y ABTS+• a la hora de analizar la actividad antioxidante de estos compuestos.^{156 157} Por anterior, es posible que los resultados de capacidad antioxidante obtenidos para la Annonacina no sean suficientes para establecer la falta de bioactividad con base en a la neutralización catión-radical de ABTS+•.

Con este análisis, y los datos ilustrados en el gráfico 17, podría sugerirse que la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de la *Annona muricata* evaluados por el método TEAC, en este caso, no están relacionados directamente con las concentraciones de acetogeninas si no con metabolitos secundarios diferentes, sin embargo la combinación de los metabolitos antioxidantes en los extractos, incluyendo las acetogeninas, podría permitir que se logre una acción

¹⁵⁶ MENDOZA-WILSON, A.M., ÁVILA-QUEZADA, G.D., BALANDRÁN-QUINTANA, R.R. y GLOSSMAN-MITNIK, D.: J. Mol. Struct. 869. 2008. 67 p.

¹⁵⁷ RAMOS-JERZ, R. Doctoral thesis of Faculty of Life Sciences Graduate Program: Technische Universität Carolo Wilhelmina, Braunschweig Biotechnology, Germany. 2007.

sinérgica, que proporcione una actividad biológica mayor que si se presentaran los compuestos por separado. En este caso puede relacionarse la actividad antioxidante directamente con los contenidos de polifenoles, terpenoides y ácidos grasos, los cuales reaccionan con el ABTS+● por medio de transferencia electrónica.

CONCLUSIONES

1. El método HPLC-PDA para el análisis de AGEs en extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* presentó resultados satisfactorios en términos de: Selectividad, Linealidad (R^2 : 0,998), Sensibilidad (LDO: 0,04ppm y LOC: 0,12ppm), Exactitud (95,5% de recuperación), y Precisión (con respecto a tiempos de retención y áreas de picos) obtenidos en %RSD con valores menores al 7%.
2. Las condiciones óptimas para la extracción de acetogeninas en semillas de *Annona muricata* del departamento de Caldas, por el método de extracción soxhlet, obtenidas mediante un diseño experimental de metodología de superficie de respuesta fueron: 8 horas de tiempo de extracción, 1,5 g de muestra en 100 mL como relación muestra-solvente y una concentración de 90% de etanol.
3. Mediante las condiciones cromatográficas implementadas en HPLC-PDA, se identificaron tentativamente en los extractos de semillas de *Annona muricata* del departamento de Caldas, las acetogeninas: Esquamostatina-A, Bullatacina, Isodesacetilivaricina, Desacetilivaricina y Annonacina.
4. Los valores promedio de Acetogeninas totales en los extractos analizados de semillas de *Annona muricata* del departamento de Caldas y Nariño, bajo las condiciones óptimas de extracción fueron 123,6 mg/g de AGEs y 254,58 mg/g de AGEs respectivamente. La diferencia entre regiones con respecto a las concentraciones de acetogeninas, puede ser atribuida a condiciones de policultivo, factores agroecológicos y factores agroquímicos.

5. Mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS/MS), se confirmó la presencia de Annonacina, y se identificaron las acetogeninas: Muricin S, Esquamocina y Annonacinona. Entre los compuestos identificados se encontró también Ácido Palmítico, Ácido Linoleico, Ácido Oléico. Otros compuestos adicionales fueron esteroides como el β -sitosterol. y compuestos fenólicos.
6. La comparación entre los métodos de extracción soxhlet y maceración química, para la extracción de AGEs (mg/g) en semillas, cáscara y hojas de *Annona muricata*, permitió determinar que el método soxhlet presentó mayor eficiencia en la extracción de Acetogeninas bajo las condiciones descritas, en todas las matrices analizadas.
7. Realizando un análisis comparativo de concentración de AGEs (mg/g) en diferentes partes de la planta de *Annona muricata* de la región de Caldas, se determinó que los extractos etanólicos de hojas presentaron mayor contenido de acetogeninas por los métodos de extracción soxhlet y maceración química, con concentraciones de 276,57 mg/g y 259,301 mg/g respectivamente, seguidos de los extractos de semillas con 123,673 mg/g y 101,112 mg/g y por último los extractos de cáscara con 41,24 mg/g y 34,57 mg/g.
8. Con el método de capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC), en el análisis de extractos de semillas y cáscara de *Annona muricata*, se determinó que la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de cáscara fue mayor presentando valores de 2,612 mM de trolox, seguidos de la capacidad antioxidante de los extractos de semillas de Caldas con 2,211mM de trolox. La comparación de los resultados obtenidos por el método TEAC, con la concentración de AGEs (mg/g) en los extractos, determinó que las Acetogeninas no tuvieron influencia significativa en la capacidad antioxidante.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar seguimiento mediante una mayor cantidad de muestreos aleatorios y comparaciones entre regiones, con el fin de aumentar la información de las Acetogeninas de las semillas de *Annona muricata* (Guanábana) y su concentración con respecto a factores ambientales, agroecológicos y agroquímicos.

Realizar la optimización del proceso de extracción de acetogeninas por maceración química, para ampliar los conocimientos acerca del método y realizar un análisis comparativo de diseños a condiciones óptimas.

Evaluar la actividad antioxidante de las Acetogeninas por varios métodos complementarios como ORAC, y DPPH, para determinar la bioactividad de los compuestos y su mecanismo de acción.

Realizar análisis complementarios de actividad anticancerígena, antitumoral, y antifúngica, con el fin de ampliar los conocimientos de estos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies, Inc. (2010). Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC). De Agilent Sitio web: http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf.
Febrero 25, 2017.

AHAMMADSAHIB, K., HOLLINGWORTH, R., MCGOVREN, J., HUI, YH y MCLAUGHLIN, J. Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin: *Life Sci*, 53. 1993. 1113 p.

ALALI, F., LIU, X. y MCLAUGHLIN, J. Annonaceous acetogenins: recent progress: *J Nat Prod*, 62. 1997. 504 p.

ARDI, R., KOBILER, I., JACOBY, B., KEEN, N.T. y PRUSKY, D. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53. 1998. 269 p.

BASKAR, R., RAJESWARI, V. y KUMAR, T. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species: *NISCAIR Online Periodicals Repository*, 1. 2007. 480-485 p.

BENO-MOUALEM, D. Y PRUSKY D. *Phytopathology* 90. 2000. 553 p.

BONNEAU, N., BALOUL, L., ba NDOB, I., SÉNÉJOUX, F. Y CHAMPY, P. The Fruit of *Annona squamosa* L. as a Source of Environmental Neurotoxins: From Quantification of Squamocin to Annotation of Annonaceous Acetogenins by LC-MS/MS Analysis: *Food Chemistry*. 2016.

BRAND. WILLAMS W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *lebensm wiss technol.* 1995.

CABRA, J., SANCHEZ, R. N. y MEJIA, A. La Guanábana una nutritiva fruta del trópico americano con un mercado rentable y promisorio. *Optimización de la cadena productiva*. 2002. 132-136 p.

CASTRO, L., ALZATE, M. y GUERRERO, G. Annonaceae. Preliminary bioactivity study of *Annona cherimolia* seeds extracts from Annonaceae family: *Scientia et Technica*, 44. 2010. 326-330 p.

CAVE', A., FIGADÉRE, B., LAURENS, A. y CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: *Prog Chem Org Nat*, 70. 1997. 81 p.

CHANG F. y WU, Y. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*: *J Nat Prod*, 64. 2001. 925 p.

CHEN, Y., CHEN, J., XU, S., WANG, Y., XIANG, L., CAI, B. y FAN, N. Antitumor activity of annonaceous acetogenins in HepS and S180 xenografts bearing mice: *PubMed*, 22. 2012. 2717-2719 p.

De JONG, A.J., YAKIMOVA, E.T., KAPCHINA, V.M. Y WOLTERING, E.J. *Planta* 214. 2002. 537 p.

DIAZ, I. Membrana Celular: Biología Médica. Seminarios de Biología Celular y Molecular - *USMP Filial Norte*. Universidad de las Americas (Chile) 2016.

Dirección de Metodología y Producción Estadística., 2011.

Docencia. Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción soxhlet. Febrero 20, 2017. De Ciencias Ambientales Sitio web: https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP5_0405.pdf. 2004

DURET, P., WAECHTER, AI., MARGRAFF, R., FOUCAULT, A., HOCQUEMILLER R. y CAVE', A. High-speed countercurrent chromatography: a promising method for the separation of the annonaceous acetogenins. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 20. 1997 p.627.

El Gel de Sílice En La Cromatografía: <https://www.quiminet.com/articulos/el-gel-de-silice-en-la-cromatografia-2565789.htm>. 2011.

Facultad de Ciencias Vicedecanato de Actividades Científicas, y de Prácticas Externas. Extracción sólido-líquido y recuperación del disolvente: obtención de aceite de girasol. Febrero 20,2017, de Universidad de Granada Sitio web: <http://fciencias.ugr.es/practicadocentes/wp-content/uploads/guiones/ExtraccionSolidoLiquido.pdf>. 2006.

FARUQ, S., FIRDAUS, M., HAMID, M., BANU, B. y AFIZAN, NR. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line: *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10. 2016. 1290 p.

FERAROLI'S, G. Handbook of Flavor Ingredients, Volume I: New York. CRC Press. 1975.

FLOREZ, Y. y MARTINEZ, E. Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera: *Universidad Tecnológica de Pereira*. 2010. 1-87 p.

FRYMAN POTTS, L. Annonacin in *Asimina Triloba* Fruit: Implications For Neurotoxicity: University of Louisville.
ThinkIR: The University of Louisville's Institutional Repository. 2011.

GARCIA, K. Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *annona cherimolia* y *annona muricata*. Evaluación genotóxica y agente terapéutico: *Escuela nacional de ciencias biológicas*. 2009. 1- 80 p.

GLEYE, C., LAURENS, A., HOCQUEMILLER, R., CAVE', A., LAPRÉVOTE, O. y SERANI, L. Isolation of montecristin, a key metabolite in biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and its structure elucidation by using tandem mass spectrometry: *J Org Chem*, 62. 1997. 510 p.

GLEYE, C., RAYNAUD, S., HOCQUEMILLER, R., LAURENS, A., FOURNEAU, C., SERANI, L., LAPREVOTE, O., ROBLOT, F., LEBOEUF, M., FOURNET, A., DE ARIAS, A., FIGADÉRE, B., CAVE', A. Acetogenins of Annonaceae: Muricadienin, muridienins and chatenaytrienins, the early precursors of annonaceous acetogenins. *Phytochemistry*, 47. 1998. 749 p.

GROWTHER, L. Anticancer Activity of *Annona Muricata* Leaf Extracts and Screening for Bioactive Phytochemicals: *International Journal of Pharmacy and*

Biological Sciences ISSN: 2321-3272 (Print), ISSN: 2230-7605 (Online) IJPBS, Volume 8, Issue 1. JAN-MAR. 2018. 475-481 p.

GUTIÉRREZ, M. y DROGUET, M. Identificación de compuestos volátiles: Cromgases Sitio web:
<http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>. 2002.

HE, K., ZENG, L., YE, Q., SHI, G., OBERLIES, NH., ZHO, G. y MCLAUGHLIN, JL. Comparative Evaluations of Acetogenins for Pesticidal Activity. *Nat. Prod*, 14. 1997. 81-84 p.

HERNÁNDEZ, R. Célula Vegetal: Libro Botánica Online. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/celula/>. Universidad de Los Andes - Mérida – Venezuela. 2007.

HOLLER, J. y CROUCH, S. *Fundamentos de Química Analítica*: Mexico: Douglas A. Skoog, Mc Graw Hill. 2014.

HONG, J., LI, Y., XIAO, Y., LI, Y., GUO, Y., KUANG, H. y WANG, X. Annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions based on a self-assembly stabilizer and the significantly improved anti-tumor efficacy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 1. 2016. 319-327 p.

HOPP, DC., CONWAY, WD. y MCLAUGHLIN JL. Using countercurrent chromatography to assist in the purification of new annonaceous acetogenins from *Annona squamosa*. *Phytochem*, 10. 1999. 339 p.

ISELL, F., ADLER, P.R., EISENHAUER, N., FORNARA, D., KIMMEL, K., KREMEN, C., LETOURNEAU, D., LIEBMAN, M., POLLEY, H.W., QUIJAS, S., SCHERER-LORENZEN, M. Benefits of Increasing Plant Diversity In Sustainable Agroecosystems: *Journal of Ecology*. 2017. 871-879 p.

JIMENEZ, J.P. y VILLARREAL, J. Estudio Químico de Pigmentos Tipo Antocianina Presentes en el Fruto del Mutilon (*Hyeronima macrocarpa*): Universidad de Nariño. Tesis de Grado. 2008.

JOLAD, SD., HOFFMANN, JJ., SCHRAM, KH., COLE, JR., TEMPESTA, MS., KREIK, GR. y BATES, RB. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria acuminata* (Annonaceae): *J Org Chem*, 47. 1982. 3151 p.

KITAIMA, E.W., RENATA, F., MARTINS. *Annona muricata*: de Species Plantarum Sitio web:
http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/5-annon2m.pdf. 1993.

KOJIMA, N., FUSHIMI, T., TATSUKAWA, T., TANAKA, T., OKAMURA, M., AKATSUKA, A., YAMORI, T., DAN. S., IWASAKI, H. y YAMASHITA, M. Thiophene-3-carboxamide analogue of annonaceous acetogenins as antitumor drug lead: *PubMed*, 30. 2014. 684-689 p.

Laboratorio de química analítica e instrumental. Métodos de separación por extracción con solventes. Laboratorio de química analítica e instrumental Sitio web:
http://avalon.utadeo.edu.co/comunidades/estudiantes/ciencias_basicas/analitica_instrumental/guia_2_1.pdf. 2001.

LEÓN, A., OBLEDO, E., VIVAR, M., SÁYAGO, S. y MONTALVO, S. Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp (*annona muricata* L.): *Bras. Frutic*, 39. 2017. 1806 p.

LIAW, C., LIOU, J., WU, T., CHANG, F. y WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 101. 2016. 13-205 p.

LIU, N., YANG, H., WANG, P., LU, Y., YANG, Y., WANG, L. y LEE, S. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway: *PubMed*, 189. 2016. 210-217 p.

LU, M., YANG, S., HWANG, S., LU, Y., LIN, Y., WANG, S., WU, Y. y LIN S. Induction of G2/M phase arrest by squamocin in chronic myeloid leukemia (K562) cells. *Life Sci*, 78. 2006. p. 2378.

Maceración Química: Sitio web :
http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/capitulo1.pdf

MADI, L., WANG, X., KOBILER, I., LICHTER, A. y PRUSKY D., *Physiol. Mol: Plant Pathol*. 62. 2003. 277 p.

MARTINEZ, J. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpus terebinthinaceus*. Febrero 25, 2017, de Universidad Tecnológica de la Mixteca Sitio web: http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10150.pdf. 2007.

MASTERS W. J. *Animal Cell Culture*. Oxford, UK.: Practical Approach Series. McMURRY J. Química Orgánica: Mexico: International Thomson editores. 2001. 2000. 532 p.

MCLAUGHLIN, J.L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to comercial products: *J. Nat. Prod*, 71. 2008. 1311–1321 p.

MENDOZA-WILSON, A.M., ÁVILA-QUEZADA, G.D., BALANDRÁN-QUINTANA, R.R. y GLOSSMAN-MITNIK, D.: *J. Mol. Struct.* 869. 2008. 67 p.

MIAOA, Y., SHI, Y., XU, X., CHEN, Y., CHEN, J. y XIANG, L. Three cytotoxic Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*: *Phytochemistry Letters*, 16. 2016. 92-96 p.

MORENO, M., TOCORA, F., ZAMBRANO, C., SANDOVAL, C., BOHÓRQUEZ, Y. y BERMEJO, P. Protocolo de Buenas Practicas Para Poscosecha de Guanabana (*Annona Muricata*): Logística Para La Cadena Hortofruticola del Tolima. Universidad Del Tolima. 2017.

NAJIHAH, N., NORISHA, M., ROSDIA, M., YA'AKOBB, H. y MUSAB, N. Optimization of soxhlet extraction parameter of *annona muricata* leaves using Box-Behnken design (BBD) expert and antioxidant analysis: *Jurnal teknologi*, 77. 2015. 421-430 p.

NEUZA, J., BERTANHA, B. y MORENO, L., Actividad Antioxidante y Perfil de Ácidos Grasos de Las Semillas de Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora BERG*): Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio. 2011

OBERLIES, N., JONES, J., CORBETT, TH., FOTOPOULOS, SS., MCLAUGHLIN, JL. Tumor cell growth inhibition by several annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay: *Cancer Lett*, 96. 1995. 55 p.

OLAYA, M., GIRALDO, J. y LOPEZ, C. Factores Que Afectan La Membrana Celular: <https://prezi.com/tndo9h4byfpu/factores-que-afectan-la-membrana-celular/>. 2013

PETTIT, GR., MUKKU, VJRV., CRAGG, G., HERALD, DL., KNIGHT, JC., HERALD, CL. y CHAPUIS, JC. Antineoplastic agents. Ampelocissus sp. cancer cell growth inhibitory constituents: *J Nat Prod*, 71, 2008. 130 p.

PÉREZ, A. Producción de Metabolitos Secundarios de Plantas Mediante el Cultivo *In Vitro*: *Biotecnología Vegetal Vol. 11, No. 4*. 2011. 195 – 211 p.

PHAN, SH. Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29. 2003. 87-92 p.

RAMOS-JERZ, R. Doctoral thesis of Faculty of Life Sciences Graduate Program: Technische Universitaet Carolo Wilhelmina, Braunschweig Biotechnology, Germany. 2007.

RANISAHARIVONY, B., RAMANANDRAIBE, V., RASOANAIVO, L., RAKOTOVAO, M. y LEMAIRE, M. Separation and Potential Valorization of Chemical constituents of Soursop Sedes: *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015. 161-171 p.

RE, R. y PELLEGRINI, N. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay: international antioxidant research centre, *elsevier science publishers b.v.*, London. 1998. 1231-1237 p.

Revista Colombiana de Química. Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). Volumen 46, Número 2. Received: 27/10/2016: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63015>. Universidad Nacional de Colombia. 2017. 45-50 p.

RIESER, M., GU, ZM., COLMILLO, XP., ZENG, L. y MCLAUGHLIN, JL. Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. *Nat. Prod*, 59. 1996. 100-108 p.

RIOS, D. y CORRALES, D. Caracterización de la Guanábana Elita, chirimoya y otras anonáceas promisorias para Colombia: *Rev Biotec*, 3. 2003. 180-185 p.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, D., SILVA-PLATAS, C., ROJO, R., GARCÍA, N., CISNEROS-ZEVALLOS, L., GARCÍA-RIVAS, G. y HERNÁNDEZ-BRENES, C. Activity-Guided Identification of Acetogenins as Novel Lipophilic Antioxidants Present In Avocado Pulp (*Persea americana*): *Journal of Chromatography B*. 2013. 37-45 p.

SANCHEZ, C., LARRAURI, J. A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols, instituto del frio, departamento de metabolismo y nutricion, consejo superior de investigaciones científicas: *Journal of science food agriculture*. UK. 1998.

SANCHEZ, M y AGUIRREOLA, J. *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1996.

SÁNCHEZ PALACIOS, M. Métodos de Calibrado: Facultad de Ciencias Departamento de Química Mérida – Venezuela http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/angelisa/Downloads/tecnicascalibracio_vr1.pdf.

SANTOS, L., PIMENTA, L. y BOAVENTURA, M. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 122. 2010. 1129–1138 p.

SHIBULA, K. y VELAVAN, S. Determination of Phytocomponents in Methanolic Extract of *Annona muricata* Leaf Using GC-MS Technique: *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6. 2015. 1251-1255 p.

SMITH, R., LEVINE, R., TRAN, K., RICHARDS, K., RYAN, S., LUO, R., MAIA, J., SABAA-SRUR, A., de MORAES, M., GODOY, H., de MORAES, I., SCHMIDT, F. y THOMAS, A. LC-MS and NMR Analyses of Neurotoxic Fruits in the Annonaceae Family: 1 The U.S. Food and Drug Administration, Lenexa, KS 66214. 2018.

SUN, S., LIU, J., KADOUH, H., SUN, X. y ZHOU, K. Isolation of three new annonaceous acetogenins from Graviola fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3. *Bioorg Med Chem Lett*, 24. 2015. 2773-2776 p.

TEMPESTA, M.S., KRIEK, G.R. y BATES, R.B. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (annonaceae): *J. Org. Chem*, 47. 1982. 3151–3153 p.

TOVAR, J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la región cafetera: Facultad Tecnológica de Pereira Sitio web:<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3636/54763T736.pdf;jsessionid=20D574513A55F18E611A5A01E4DEB34B?sequence=1>. 2013.

UGARTONDO, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante: Universidad de Barcelona Sitio web:http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41765/2/01.VUC_INTRODUCCION.pdf. 2009.

WANG, X.J., BENO-MOUALEM, D., KOBILER, I., LEIKIN-FRENKEL, A., LICHTER, A. y PRUSKY, D. Mol: Plant Pathol. 5. 2004. 575 p.

WEYDERT, C. y CULLEN, J. Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue. *PubMed*, 1. 2011. 51-66 p.

WU, T., YANG, I., TSAI, Y., WANG, J., SHIURBA, R., HSIEH, T., CHANG, FR. Y CHANG, W. Isodesacetylurarin, an annonaceous acetogenin, specifically inhibits gene expression of cyclooxygenase-2: *J Nat Prod*, 75. 2012. 572 p.

YU, JG., GUI, HQ., LUO, XZ. y SUN, L. Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*: *Phytochemistry* 49. 1998. 1689 p.

YUAN, S., CHANG, H., CHEN, H., YEH, Y., KAO, Y., LIN, K., WU, Y. y SU, J. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and Causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Sci*, 72. 2003. 2853 p.

ZAFRA-POLO, MC., FIGADÉRE, B., GALLARDO, T., TORMO, JR., CORTES D., Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action: *Phytochemistry*, 48. 1998. 1087 p.

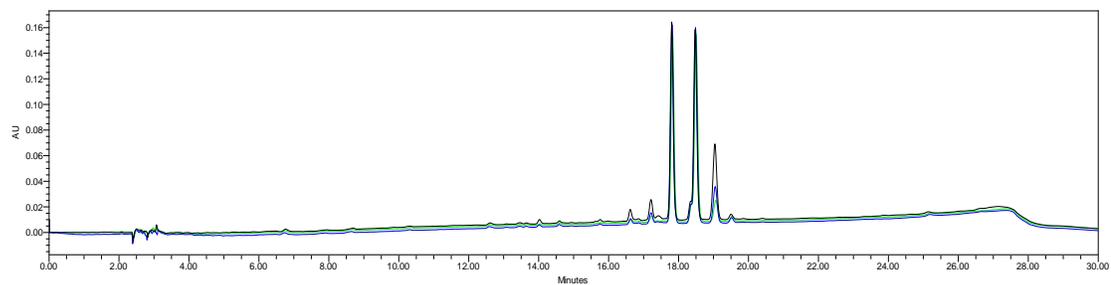
ZENG, L., YE, Q., OBERLIES, NH., SHI, G., GU, Z., HE, K. y MCLAUGHLIN, JL. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. *Departament of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy*. 2004. 2-6 p.

ZOROFCHIAN, S., FADAEINASAB, M., NIKZAD, S., MOHAN, G., MOHD ALI, H. y KADIR, H. *Annona muricata* (Annonaceae). A Review of Its Traditional Uses,

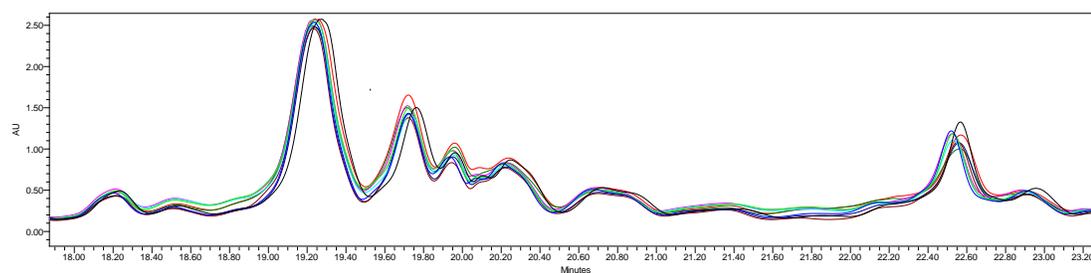
Isolated Acetogenins and Biological Activities: *International Journal of Molecular Sciences*, 2. 2015. 15626-15641 p.

ANEXOS

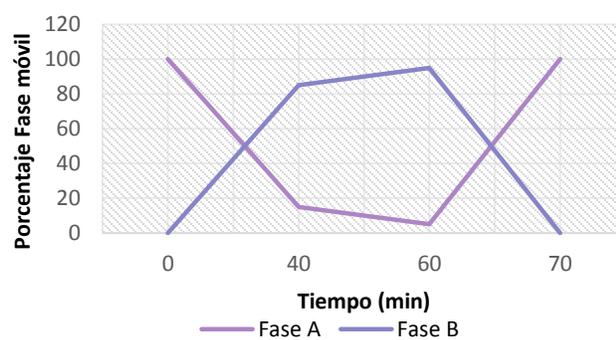
Anexo A: Cromatograma de Repetibilidad.



Anexo B: Cromatograma de Reproducibilidad.

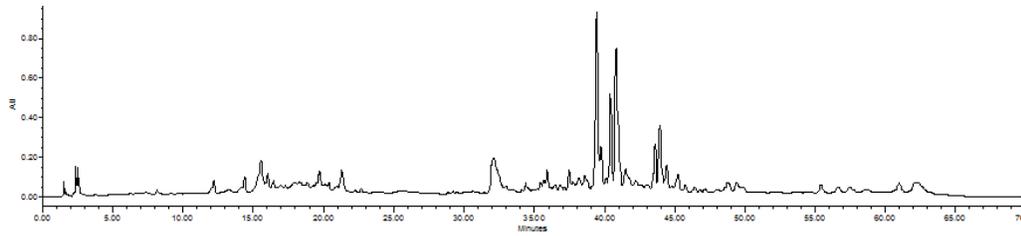


Anexo C: Gradiente 1, Flujo 1,0 mL/min.



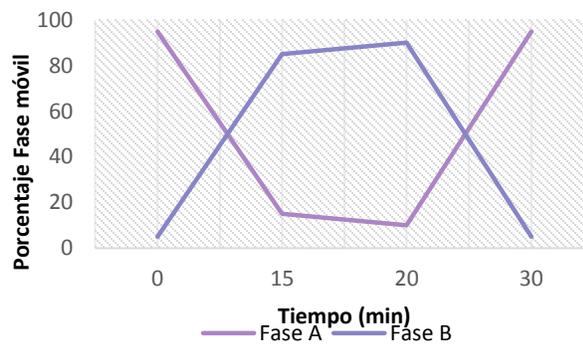
Fuente: Este Investigación.

Anexo D: Cromatograma condiciones publicadas por Najihah, Flujo de 1,0 mL/min.



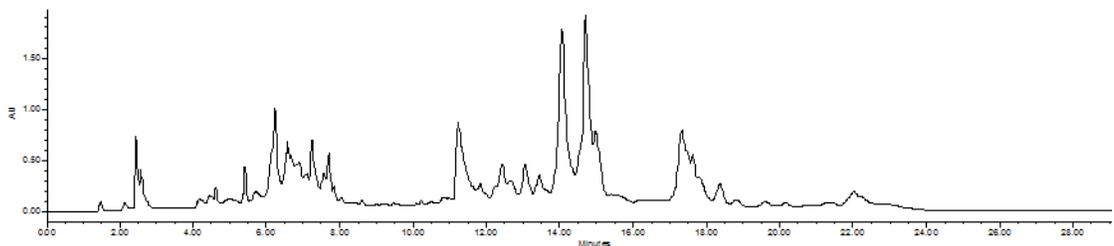
Fuente: Esta Investigación.

Anexo E: Gradiente 2, Flujo 1,0 mL/min.



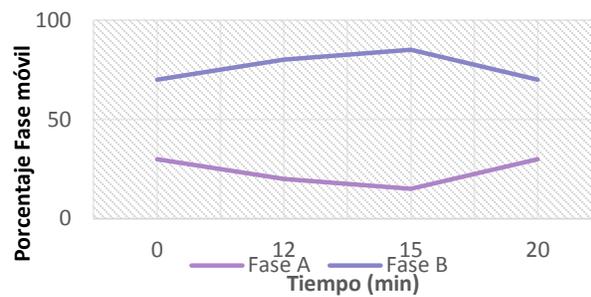
Fuente: Esta Investigación.

Anexo F: Cromatograma condiciones postulado por Flórez et al. Flujo de 1,0 mL/min.



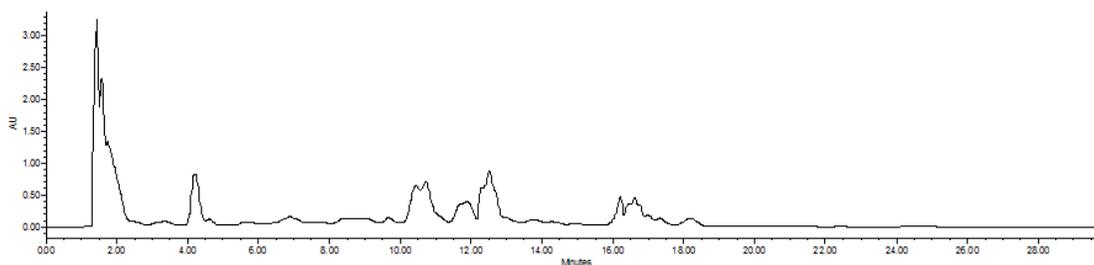
Fuente: Esta Investigación.

Anexo G: Gradiente 3, Flujo 1,0 mL/min.



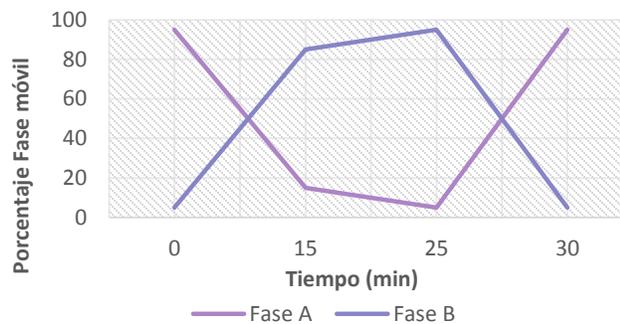
Fuente: Esta Investigación.

Anexo H: Cromatograma Gradiente 3, Flujo de 1.0 mL/min.



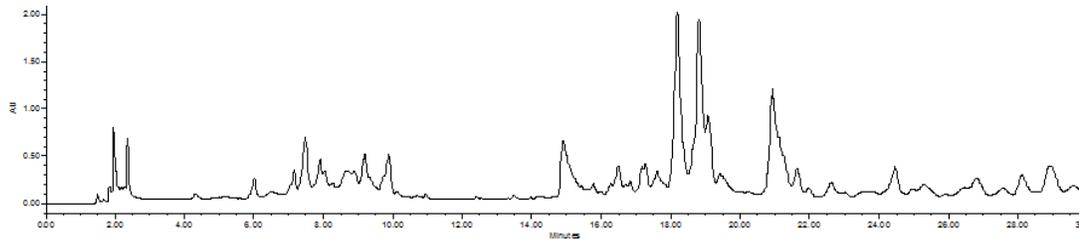
Fuente: Esta Investigación.

Anexo I: Gradiente 4, Flujo 1,0 mL/min.



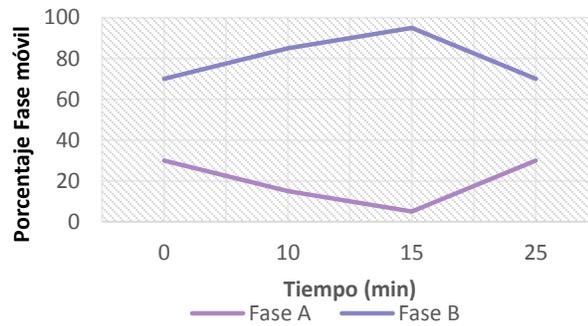
Fuente: Esta Investigación.

Anexo J: Cromatograma Gradiente 4, Flujo 1,0 mL/min.



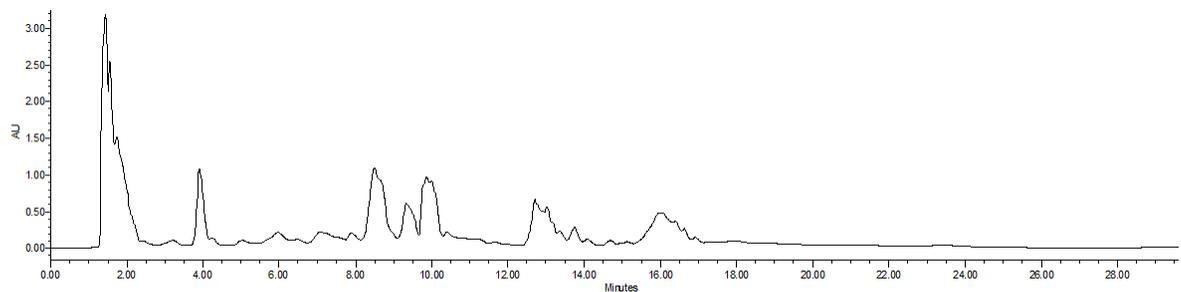
Fuente: Esta Investigación.

Anexo K: Gradiente 5, Flujo 1,0 mL/min.



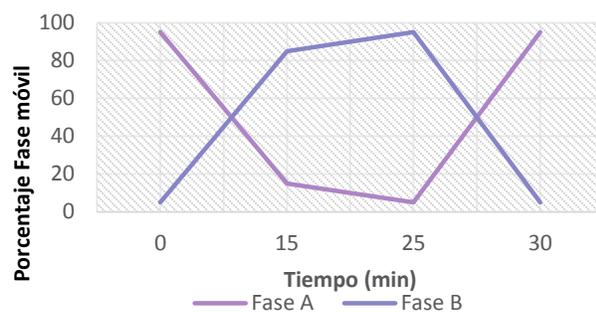
Fuente: Esta Investigación.

Anexo L: Cromatograma Gradiente 5, Flujo de 1,0 mL/min.



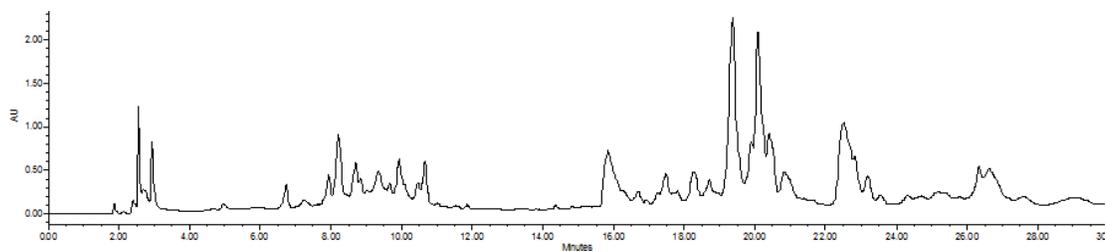
Fuente: Esta Investigación.

Anexo M: Gradiente 6, Flujo 0,8 mL/min.



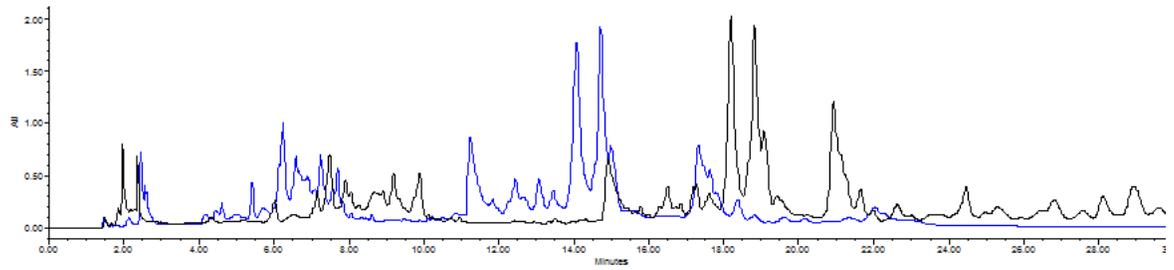
Fuente: Esta Investigación.

Anexo N: Cromatograma Gradiente 6, Flujo de 0,8 mL/min.



Fuente: Esta Investigación.

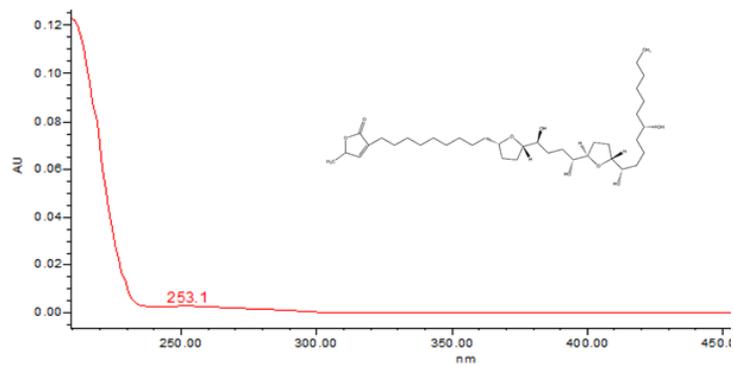
Anexo O: Comparación Cromatogramas, Gradiente 2 (azul) y Gradiente 4 (negro).



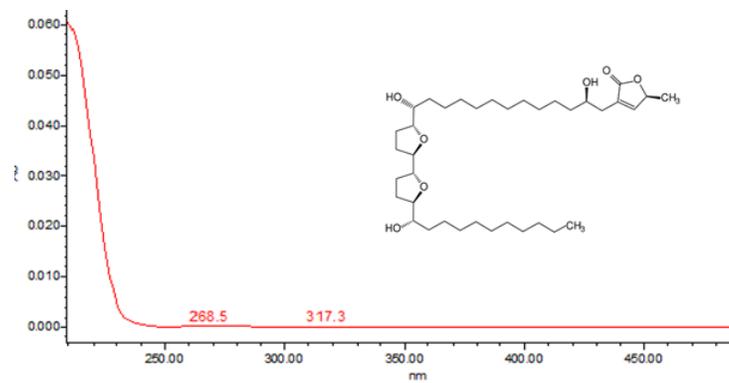
Fuente: Esta Investigación.

Anexo P: Estructuras de Acetogeninas identificadas y sus espectros UV-vis.

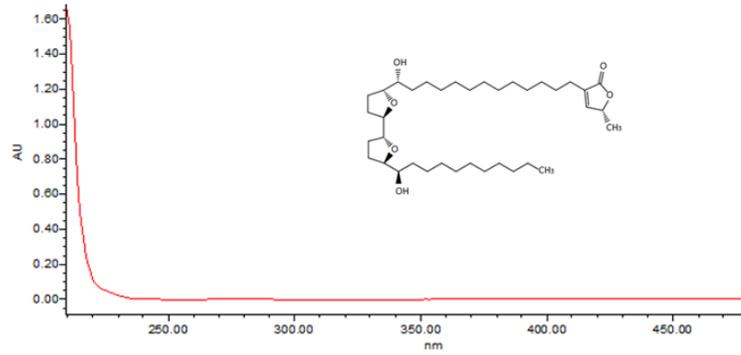
Esquamostatina A.



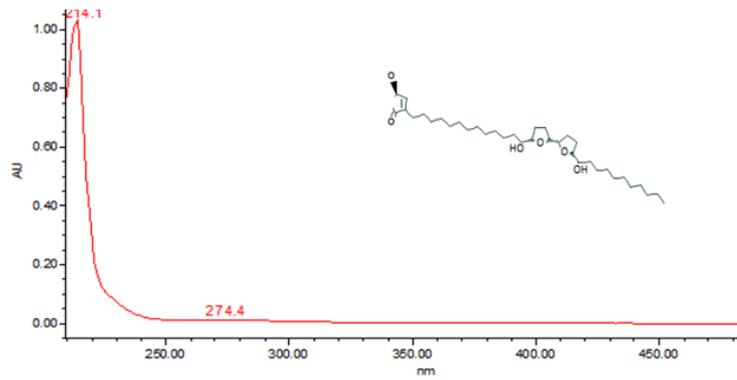
Bullatacina.



Isodesacetilivaricina.



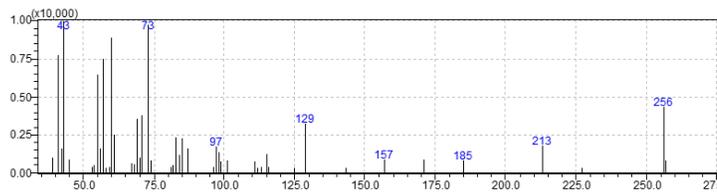
Desacetilivaricina.



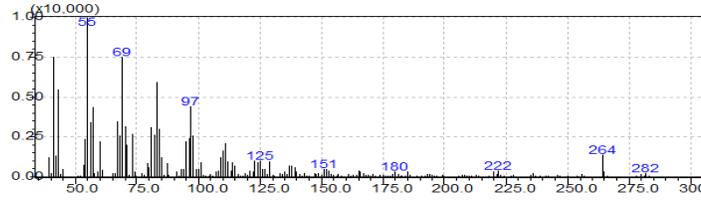
Fuente: Esta Investigación.

Anexo Q: Espectros de masas de ácidos grasos por GC-MS identificados por NIST y Wiley.

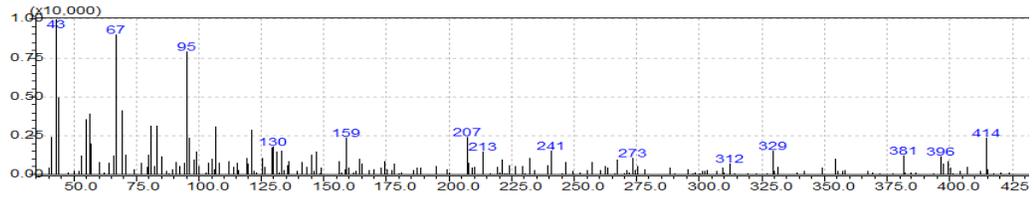
Espectro de masas de Acido Palmítico



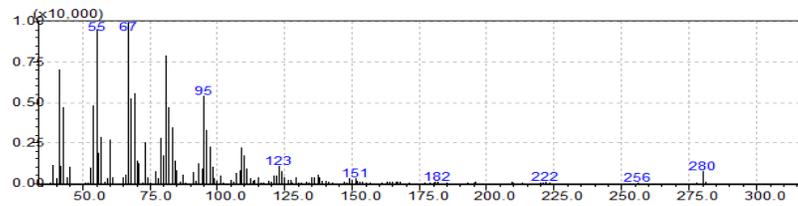
Espectro de masas de Ácido Oleico



Espectro de masas de Beta-Sitosterol

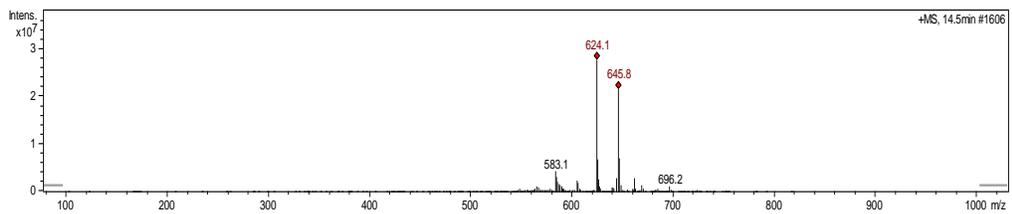
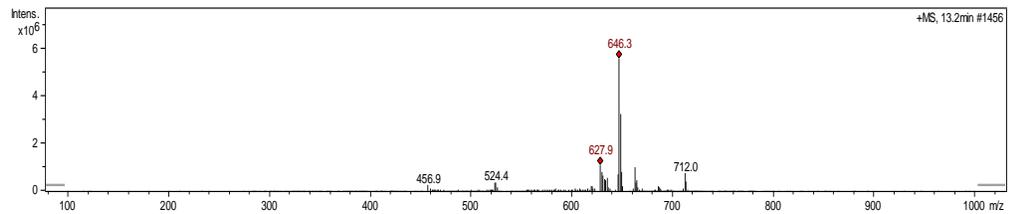


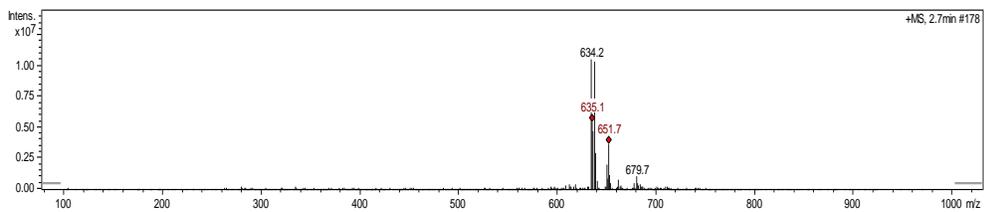
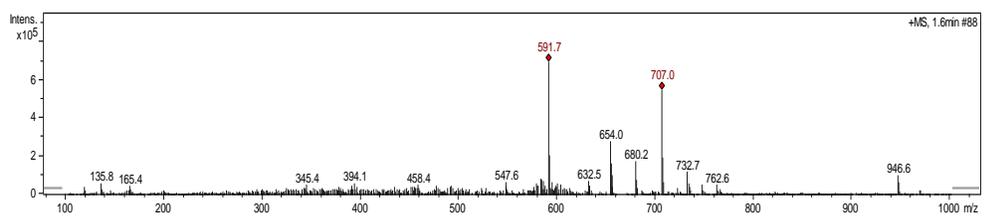
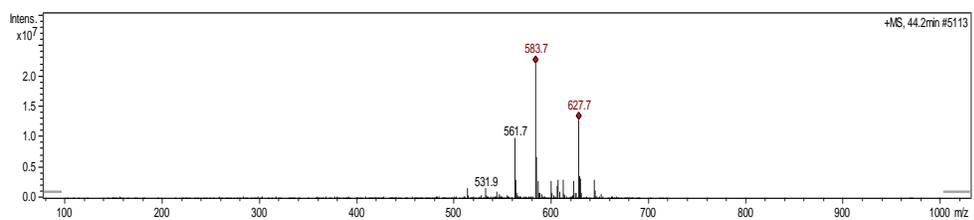
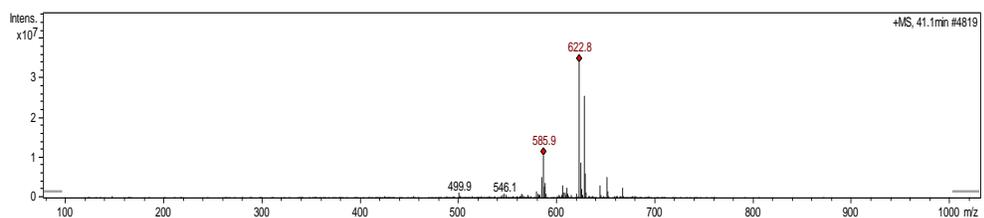
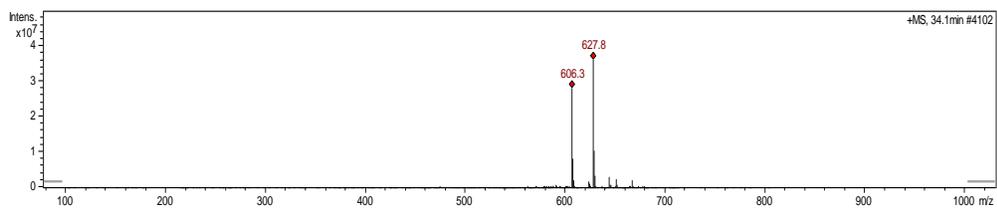
Espectro de masas de Ácido Linoleico



Fuente: NIST Y Wiley

Anexo R: Espectros de masas de acetogeninas por LC-MS





Fuente: Esta Investigación.

Anexo S: Acetogeninas no identificadas en LC-MS/MS.

Pico N°	Iones Fragmento (m/z)
1	624(100), 643,583
2	591(100),707,654
3	634(100),635,661
4	627(100),606
5	634(100),660,679

Fuente: Esta Investigación.