



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
en Celaya

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CELAYA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



TESIS DE MAESTRÍA

“Extracción de acetogeninas de la semilla de *Annona muricata* en condiciones supercríticas utilizando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente”.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA

I.B.T. Rubén Ricardo Córdova Espíritu

No. De Control M1903028

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco Villaseñor Ortega

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Gabriel Luna Bárcenas

Celaya, Guanajuato, México, Mayo del 2021



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Celaya
Departamento de Ingeniería Bioquímica

Celaya, Gto., 17/Mayo/2021
POSGRADO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
OFICIO No. PIBQ-01-17-2021
Asunto: Autorización de Impresión Tesis

ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ
JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
PRESENTE

De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, para que en reunión de los miembros del comité tutorial de la tesis avalada por la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica se examinara la tesis titulada:

“Extracción de acetogeninas de la semilla de *Annona muricata* en condiciones supercríticas utilizando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente”

Presentada por el alumno: **C. Rubén Ricardo Córdova Espíritu** con número de control **M1903028**, Aspirante al Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Después de intercambiar opiniones, los miembros del comité tutorial, manifestaron **APROBAR y AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

ATENTAMENTE
La técnica por un México mejor ®
EL COMITÉ TUTORIAL



Dr. Francisco Villaseñor Ortega
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Gabriel Luna Bárcenas
ASESOR EXTERNO



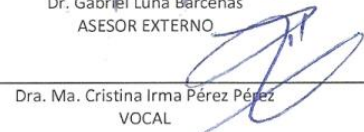
Dr. Hugo Jiménez Islas
SECRETARIO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
en Celaya

DPTO. DE INGENIERÍA
BIOQUÍMICA

COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Dra. Ma. Cristina Irma Pérez Pérez
VOCAL



Dr. Leopoldo González Cruz

C.c. p. Dr. Gerardo Acosta García. - Presidente del Consejo de Posgrado

LGC/mgg



Av. Antonio García Cubas #600 esq. Av. Tecnológico, Colonia
Alfredo V. Bonfil, C.P. 38010 Celaya, Gto.
Tel. 01 (461) 611 75 75
e-mail: lince@celaya.tecnm.mx
tecnm.mx | celaya.tecnm.mx





MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Celaya, Gto., 17/Mayo/2021

Asunto: Carta de Cesión de Derechos

C. DR. JOSÉ LÓPEZ MUÑOZ

DIRECTOR DEL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CELAYA

PRESENTE.

En la ciudad de Celaya, Guanajuato, México, el día 17 del mes de Mayo del año 2021, el que suscribe **C. IBT Rubén Ricardo Córdova Espíritu** alumno del **Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica** con número de control **M1903028**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Francisco Villaseñor Ortega** y del **Dr. Gabriel Luna Bárcenas**, y cede los derechos del trabajo titulado **“Extracción de acetogeninas de la semilla de *Annona muricata* en condiciones supercríticas utilizando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente”** al **Tecnológico Nacional de México en Celaya** para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso del autor y directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: ibtrichard117@gmail.com, francisco.villasenor@itcelaya.edu.mx y gabriel.luna@cinvestav.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

IBT. Rubén Ricardo Córdova Espíritu

Nombre y Firma

AGRADECIMIENTO

A dios por darme la vida, la fuerza y la paciencia para afrontar los retos en mi camino.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional en cada momento.

A mi fiel compañera en todo Ana Karen por su apoyo, amor, paciencia e impulsarme en cada reto presentado.

Al Tecnológico Nacional de México en Celaya por formarme como profesional en el posgrado.

A Dr. Francisco Villaseñor por su entrega, paciencia, profesionalismo y asesoramiento brindado para el presente proyecto.

A los doctores Hugo Jiménez, Cristina Pérez, Gabriel Luna, Claudia Muñoz, Efigenia Montalvo y Pedro Alonso por su dirección, colaboración, asesoramiento y aporte valioso brindado en la elaboración de este trabajo de investigación.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera en la realización de este tema de tesis.

Índice general

Índice general.....	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Resumen	1
Introducción.....	5
Antecedentes	6
1.1 Generalidades de <i>Annona muricata</i>	6
1.1.1 Guanábana.....	6
1.2 Acetogeninas.....	8
1.2.1 Características estructurales de las acetogeninas	8
1.2.2 Características importantes a considerar de las acetogeninas	8
1.2.2. Clasificación de las acetogeninas	11
1.3 Estudios del complejo I mitocondrial	13
1.4 Actividad biológica de las acetogeninas.....	14
1.4.1 Actividad antitumoral (mecanismo de acción citotóxico)	14
1.4.2 Actividad en el tratamiento contra el cáncer.....	16
1.4.3 Estudios del mecanismo de acción de las acetogeninas sobre las células.	16
1.5 Extracción de acetogeninas.....	17
1.5.1 Usando disolventes	17
1.5.2 Extracción en estado súper crítico	19
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos.	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos	23
Materiales y métodos	24
1.6 Acondicionamiento de la materia prima	24
1.7 Extracción de grasas totales y compuestos fitoquímicos a partir de la harina de semillas de guanábana usando la metodología Soxhlet.....	24
1.2.1. Preparación de material y equipo	24

1.7.1	Desengrasado de la muestra con hexano como disolvente	24
1.7.2	Extracción y cuantificación de acetogeninas totales a partir de las grasas de harina de semilla de guanábana.	25
1.7.3	Extracción de acetogeninas con etanol como disolvente	25
1.7.4	Pre-purificación de extractos y fraccionamiento	26
1.7.5	Cuantificación de acetogeninas por espectrofotometría	26
1.7.6	Extracción de aceites y compuestos fitoquímicos de la harina de semillas de guanábana con CO ₂ en condiciones supercríticas	27
1.7.7	Tratamiento 1: extracción de acetogeninas de harina de semilla de guanábana sin desengrasar con CO ₂ en condiciones supercríticas.	27
1.7.8	Tratamiento 2: extracción de las acetogeninas de la harina de semillas de guanábana sin desengrasar utilizando CO ₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.	27
1.7.9	Tratamiento 3: extracción de las acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada con CO ₂ en condiciones supercríticas.	27
1.7.10	Tratamiento 4: muestra expuesta a sonicación con etanol, seguida de la extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada utilizando CO ₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.	28
1.7.11	Tratamiento 5: extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada usando CO ₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.	28
1.7.12	Pruebas de Kedde para determinar presencia de acetogeninas en los extractos obtenidos mediante los diferentes tratamientos con CO ₂ en condiciones supercríticas.	28
1.8	Análisis estadístico	29
Resultados y discusión		29
1.9	Extracción de acetogeninas por método tradicional (Soxhlet)	29
1.10	Extracción de acetogeninas usando CO₂ en condiciones supercríticas	34
1.11	Comparación entre los dos métodos de extracción (Soxhlet utilizando etanol como disolvente y CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas)	36
1.12	Cuantificación de acetogeninas totales en las semillas de guanábana.	37
1.13	Comparación en contenido de acetogeninas con otros estudios en anonáceas	39
1.14	Balance de materia de acetogeninas totales en semillas de guanábana	40
Conclusión.....		41
Referencias bibliográficas.....		42

Índice de figuras

Figura 1.- A) Árbol de <i>Annona muricata</i> , B) Hojas C) Flores y D) Fruto. Moghadamtousi <i>et al.</i> , 2015.	7
Figura 2. Acetogeninas Anonáceas, annocatacin A (1) y B (2), aisladas de <i>A. muricata</i> , y acetogeninas anonáceas adyacente bis-THF (3-9) previamente aisladas de plantas anonáceas. ...	10
Figura 3. Estructura de las acetogeninas lineales.....	11
Figura 4. Estructura de epoxiacetogeninas (Rieser, 1996).....	12
Figura 5. Estructura de acetogeninas mono-tetrahidrofurano (Zeng <i>et al.</i> , 1998).	12
Figura 6. Estructura de las acetogeninas bis-tetrahidrofurano (Zeng <i>et al.</i> , 1998).	12
Figura 7. Estructura de las acetogeninas tri-tetrahidrofurano (Ye <i>et al.</i> , 1996).....	13
Figura 8. Estructura de acetogeninas tetrahidropiranosas (Rupprechet, 1990).....	13
Figura 9. El Complejo I o NADH Deshidrogenasa. Este sistema tiene por función oxidar las coenzimas del tipo NADH + H ⁺ , que se producen en algunas de las reacciones al interior de la mitocondria (Seoane 2014).	14
Figura 10. Modelo de acción de las acetogeninas en su interacción con el complejo I de la membrana mitocondrial (Figadére 2005).	15
Figura 11. Diferencia de porcentaje de contenido de grasa en harina de semilla con y sin cáscara.	29
Figura 12. Prueba con reactivo de Kedde para determinación de acetogeninas a partir del extracto obtenido con método tradicional.	30
Figura 13. Cromatografía en capa fina de extractos acetogénicos, se puede apreciar que la banda correspondiente a las fracciones 1-20 corresponde a la mayor concentración de acetogeninas. ...	33
Figura 14. Identificación de acetogeninas por cromatografía en capa fina, usando diferentes proporciones de cloroformo y metanol, León <i>et al.</i> , 2017.	33
Figura 15. Extracto obtenido mediante el tratamiento 5 (harina desengrasada y etanol como co-solvente) donde se puede apreciar la intensidad de color, característico de la presencia de acetogeninas.	35

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Annona muricata</i>	6
Tabla 2. Comparación de contenido de acetogeninas en anonáceas, Yang <i>et al.</i> , 2009.	20
Tabla 3. Datos de cuantificación de acetogeninas obtenidos por extracción Soxhlet.	31
Tabla 4. Resultados obtenidos de la cuantificación de acetogeninas en fracciones de pre-purificación.....	32
Tabla 5. Resultados obtenidos del 4to tratamiento: muestra expuesta a sonicación con etanol, seguida de la extracción de acetogeninas de la harina de semillas de guanábana desengrasada utilizando CO ₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas	34
Tabla 6. Resultados correspondientes al tratamiento 5: extracción de la harina de semillas de guanábana desengrasada usando CO ₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.....	35
Tabla 7. Resultados obtenidos entre ambos métodos de extracción y sus respectivos resultados.	37
Tabla 8. Cuantificación de acetogeninas en grasas de harina de semilla con cáscara.	38
Tabla 9. Cuantificación de acetogeninas en harina de semilla con cáscara	38
Tabla 10. Yang <i>et al.</i> , 2009. Comparación en contenido de acetogeninas en anonáceas	39

Resumen

La búsqueda de soluciones alternativas a la medicina para tratar y/o curar enfermedades como el cáncer, ha sido un tema de gran relevancia en los últimos años, siendo los compuestos fitoquímicos una de estas alternativas de mayor interés. Algunos compuestos bioactivos se han encontrado en los frutos, cáscara, semillas y hojas de la guanábana (*Annona muricata*), en particular, las acetogeninas. Actualmente las acetogeninas producidas por *A. muricata*, son un tema de estudio de gran interés en el campo de la medicina y de la investigación de terapias alternativas. El objetivo de este trabajo, fue extraer acetogeninas de la semilla de *A. muricata* utilizando CO₂ en condiciones supercríticas con co-solvente etanol y comparar los resultados con el método tradicional (Soxhlet) usando etanol. Para ello se necesitó desengrasar la harina de semillas de guanábana, la cual se usó en ambos procedimientos. Para la extracción usando CO₂ en condiciones supercríticas constó de 5 tratamientos; 1er tratamiento: extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana sin desengrasar, 2do tratamiento: extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana sin desengrasar con etanol como co-solvente, 3er tratamiento: extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada, 4to tratamiento: extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada, sometida a sonicación en etanol y utilizando etanol como co-solvente, y 5to tratamiento: extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada con etanol como co-solvente. De los cuales los tratamientos 4 y 5 resultaron ser los más favorables para la obtención de acetogeninas. Para la extracción de acetogeninas con el método tradicional, primero se desengrasó la harina de semilla de guanábana usando hexano, posteriormente la harina desengrasada se procesó en el equipo Soxhlet utilizando etanol como disolvente para extraer acetogeninas, estos ensayos se realizaron por triplicado. Además, se determinó la cantidad de acetogeninas (ACGs en adelante) que se extraen en conjunto con las grasas. Para la cuantificación de acetogeninas, se utilizó el reactivo de Kedde, el cual reacciona con los anillos α - β -insaturados o γ -lactona saturado, resultando en una coloración rosa, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 505 nm. Los resultados obtenidos demostraron que por medio de la extracción usando CO₂ en condiciones supercríticas se obtuvo mayor rendimiento en concentración de acetogeninas (4to tratamiento: 3.8492 mg ACGs/mL de extracto, el cual corresponde a 1.6736 mg ACGs/g de harina de semilla con cáscara desengrasada;

5to tratamiento: 9.9108 mg ACGs/mL de extracto, que corresponde a 5.7454 mg ACGs/g de harina de semilla con cáscara desengrasada) en comparación con los resultados obtenidos por extracción con el método soxhlet usando etanol como disolvente (1.2874 mg ACGs/mL de extracto, correspondientes a 0.2639 mg ACGs/g de semilla desengrasada). En cuanto a la determinación de acetogeninas del extracto oleoso de la semilla se obtuvo que se encuentran en cantidad de 0.0400 mg ACGs/mL de extracto, correspondientes a 0.5990 mg ACGs/g de grasa de harina de semilla con cáscara. Se concluyó que la extracción de acetogeninas con CO₂ en condiciones supercríticas facilita y mejora hasta 21 veces la extracción de acetogeninas, lo cual es un factor determinante para estudios posteriores de extracción limpia de este compuesto bioactivo.

Abstract

The search for alternative solutions to medicine to treat and/or cure diseases such as cancer has been a topic of great relevance in recent years, with phytochemical compounds being one of the most interesting alternatives. Some bioactive compounds have been found in the fruits, peel, seeds, and leaves of soursop (*Annona muricata*), in particular, acetogenins. Currently, the acetogenins produced by *A. muricata* are a subject of study of great interest in the field of medicine and research on alternative therapies. This work aimed to extract acetogenins from *A. muricata* seed using CO₂ under supercritical conditions with ethanol co-solvent and compare the results with the traditional method (Soxhlet) using ethanol. For this, it was necessary to defeat the soursop seed meal, which was used in both procedures. The extraction using CO₂ under supercritical conditions consisted of 5 treatments; 1st treatment: extraction of acetogenins from soursop seed flour without defatting, 2nd treatment: extraction of acetogenins from soursop seed flour without defatting with ethanol as co-solvent, 3rd treatment: extraction of acetogenins from defatted soursop seed flour, 4th treatment: extraction of acetogenins from defatted soursop seed flour subjected to sonication in ethanol and using ethanol as co-solvent, and 5th treatment: extraction of acetogenins from defatted soursop seed flour with ethanol as co-solvent. Of these, treatments 4 and 5 proved to be the most favorable for obtaining acetogenins. For the extraction of acetogenins with the traditional method, first, the soursop seed flour was defatted using hexane, subsequently, the defatted flour was processed in the Soxhlet equipment using ethanol as solvent to extract acetogenins, these tests were performed in triplicate. In addition, the number of acetogenins (ACGs hereafter) extracted together with fats was determined. For the quantification of acetogenins, Kedde's reagent was used, which reacts with the α - β -unsaturated or -lactone saturated rings, resulting in a pink coloration, the absorbance was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 505 nm. The results obtained showed that using the extraction using CO₂ under supercritical conditions, a higher yield in acetogenin concentration was obtained (4th treatment: 3.8492 mg ACGs/mL of extract, which corresponds to 1.6736 mg ACGs/g of seed meal with defatted shell; 5th treatment: 9.9108 mg ACGs/mL of extract, corresponding to 5.7454 mg ACGs/g of seed meal with defatted shell) compared to the results obtained by extraction with the soxhlet method using ethanol as solvent (1.2874 mg ACGs/mL of extract, corresponding to 0.2639 mg ACGs/g of defatted seed). As for the determination of acetogenins from the oily seed extract, they were found to be 0.0400 mg

ACGs/mL of extract, corresponding to 0.5990 mg ACGs/g of shelled seed meal fat. It was concluded that the extraction of acetogenins with CO₂ under supercritical conditions facilitates and improves up to 21 times the extraction of acetogenins, which is a determining factor for further studies of clean extraction of this bioactive compound.

Introducción

Guanábana (*Annona muricata*) ha sido considerada una fruta muy importante debido a su potencial como alimento nutracéutico, siendo apreciado alrededor de la región del Caribe. Es importante considerar los compuestos bioactivos contenidos en *A. muricata*, en particular las acetogeninas. Para Alali *et al.*, 1999, y Mishra *et al.*, 2013, las acetogeninas anonáceas son agentes prometedores antitumorales, debido a que poseen bioactividades potenciales a través de la reducción de los niveles de ATP, debido a que inhiben el complejo I de la mitocondria y la inhibición del NADH oxidasa en membranas plasmáticas de células tumorales. Por lo tanto, se ha vuelto de vital importancia extraer estos compuestos bioactivos, algunos autores han realizado métodos de extracción como el usado por Aguilar *et al.*, 2020, involucran la extracción usando disolventes y asistida por el método de sonicación a partir de frutos de guanábana, se tiene evidencia de la existencia de acetogeninas en semilla, tal como lo reporta Li *et al.*, 2001, el cual usó hexano para la extracción de acetogeninas e identificando 10 tipos de las mismas. En el presente trabajo se realizó la extracción de acetogeninas, usando el equipo Soxhlet con etanol como disolvente de extracción a partir de harina de guanábana seca y desengrasada, conocido como el método tradicional, por otro lado, se llevó a cabo una extracción de acetogeninas usando CO₂ en condiciones supercríticas. Dichos resultados de concentración de acetogeninas fueron comparados, determinando que la extracción usando CO₂ en condiciones supercríticas y etanol como co-solvente extrajo en mayor concentración las acetogeninas en comparación con el método tradicional. Además de haber obtenido una mayor concentración de acetogeninas, se debe destacar que el método de extracción con CO₂ en condiciones supercríticas con etanol como co-solvente resultó ser 15 veces mejor en rendimiento en comparación con el método tradicional, además es un método de extracción limpia, que usa disolventes que no representan un peligro para el organismo humano, lo cual confiere una ventaja significativa para futuros ensayos usando dichos extractos.

Antecedentes

1.1 Generalidades de *Annona muricata*

1.1.1 Guanábana

Annona muricata es un miembro de la familia de las anonáceas, conocida por sus propiedades benéficas para la salud, ha sido referida como una planta medicinal cuyos compuestos fitoquímicos tienen actividad bactericida, antiparasitaria, antiviral, antifebril, anticonvulsiónante, antihipertensiva y anticancerígena, Moghadamtousi *et al.*, (2015). Su clasificación taxonómica se podrá apreciar en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Annona muricata*.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Supraorden	Magnolianaes
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Género	<i>Annona</i>
Especie	<i>Annona muricata</i> L.

Annona muricata es un árbol perennifolio/caducifolio de unos 10 metros de altura, con hojas oblongo-elípticas a oblongo-abobadas de 6 a 12 cm de largo por 2,5 a 5 cm de ancho. Hay variedades de *A. muricata* con tronco ramificado en su base, otras con un tronco principal y ramificaciones menores alternas. Las inflorescencias, con solo 1 o 2 flores, son axilares, pero también pueden estar implantadas en cualquier parte del tronco o de las ramas. Es una planta originaria de Mesoamérica y se cultiva principalmente en los trópicos de América, África e Islas

del Pacífico. En América se extiende de México hasta Brasil, Méndez *et al.*, (2015). En Sudamérica la mayor producción de guanábana se concentra en Venezuela, Brasil y Colombia, mientras que en América del Norte, México es el mayor productor y consumidor de guanábana. La producción de guanábana principalmente se exportaba y se ha observado un incremento en el consumo en fresco dentro del país, Coelho de Lima *et al.*, 2011. Siendo el estado de Nayarit el principal productor, Jiménez *et al.*, 2016.

Las flores de *A. muricata*, al hacer una infusión tienen actividad expectorante y reduce la fiebre, por lo que se usan en casos de gripe y catarro bronquial. Poseen propiedades astringentes, colagogas (facilitan el vaciamiento de la vesícula biliar), digestivas y también vermífugas (mata o expulsa las lombrices intestinales). En forma de infusión también se recomienda a los hipertensos, obesos, cardíacos y diabéticos (Márquez *et al.*, 1999). En la **Figura 1** se puede apreciar las hojas, tanto las flores como el fruto de guanábana.

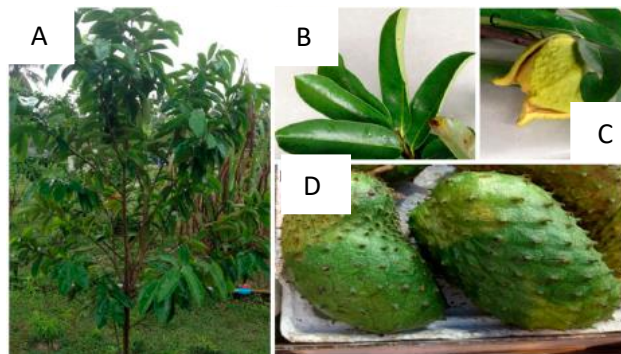


Figura 1.- A) Árbol de *Annona muricata*, B) Hojas C) Flores y D) Fruto. Moghadamtousi *et al.*, 2015.

Dentro de la medicina tradicional, las hojas se usan en infusión como antidiarreico y como digestivo. Las hojas aplicadas localmente como cataplasma, tienen actividad antiinflamatoria y se han empleado en el caso de las paperas (Márquez *et al.*, 1999).

La toxicidad atribuida a los extractos de *A. muricata* y de las anonáceas en general depende en gran parte de la concentración de ciertos metabolitos secundarios llamados acetogeninas. La Guanábana es una de las anonáceas más estudiadas, se le han aislado metabolitos como alcaloides, ácidos grasos, amidas y acetogeninas, tanto de la corteza, como en las semillas, el tallo y las hojas, siendo las acetogeninas los compuestos de interés por su comprobada actividad biológica, Moghadamtousi *et al.*, 2015.

1.2 Acetogeninas

Las acetogeninas son principalmente encontradas en plantas de la familia Annonaceae, químicamente son derivadas de largas cadenas de ácidos grasos, biológicamente exhiben su potencial a través de la reducción de los niveles de ATP por medio de la inhibición del complejo I de la mitocondria, inhibiendo la enzima NADH oxidasa de la membrana plasmática de células tumorales, frustrando así los mecanismos impulsados por ATP (Alali *et al.*, 1999).

1.2.1 Características estructurales de las acetogeninas

Estructuralmente, las acetogeninas anonáceas son una serie constituida de productos naturales de 35-37 carbonos derivados a partir de 32-34 ácidos grasos que son combinados con una unidad 2-propanol. Son usualmente caracterizados por una larga cadena alifática, soportando un anillo terminal metil-sustituido α β -insaturado γ -lactona, con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuranos localizados al largo de la cadena de hidrocarburos conteniendo restos oxigenados (hidroxilos, acetoxilos, cetonas, epóxidos) también dobles enlaces están presentes (Alali *et al.*, 1999). En estudios previos realizados por Fang *et al.*, 1993, se observa que el mecanismo biológico de acción de las acetogeninas anonáceas viene de la toxicidad exhibida en insectos expuestos, los cuales incluyeron una disminución en la movilidad y un aumento del letargo antes del comienzo de la muerte, por lo cual los síntomas son atribuidos normalmente a los niveles reducidos de ATP causados por los inhibidores respiratorios. Más evidencia fue señalada mediante la amplia variedad de organismos susceptibles a esos compuestos, incluyendo mamíferos y helmintos, lo cual sugiere que el modo de acción es la inhibición de la respiración.

1.2.2 Características importantes a considerar de las acetogeninas

Dados los diversos estudios realizados sobre las acetogeninas de *A. muricata*, Liaw *et al.*, 2016 mencionan, de manera resumida, que es importante tener en consideración la relación entre la estructura de éstas y la actividad biológica, considerando las siguientes características:

- Las acetogeninas que contienen en su estructura dos anillos de tetrahidrofurano adyacentes, son las que han presentado mayor actividad biológica. Los estudios realizados han sugerido

que la función del anillo de tetrahidrofurano es anclar la acetogenina a la región que contiene glicerol en la membrana liposomal.

- La gama-lactona terminal es esencial para la actividad, ya que una reducción del doble enlace de la gama-lactona alfa,beta-insaturada reduce la actividad. Las cetolactonas son menos potentes que las gama-lactonas alfa,beta-insaturadas.
- El número de grupos hidroxilo presentes a lo largo de la cadena, también están relacionados con la actividad, presentando mayor actividad aquellas acetogeninas que poseen un mayor número de grupos OH.
- Un grupo hidroxilo en el carbono 4 es esencial para la actividad.
- Acetogeninas con grupos ceto a lo largo de la cadena alifática, son menos activas que aquellas que presentan grupos hidroxilo.
- La presencia de dobles enlaces o de dioles vecinales a lo largo de la cadena hidrocarbonada aumentan la actividad.
- La longitud de la cadena C-35 o C-37 es la ideal para que se presente la actividad.
- Otro factor que afecta la actividad biológica, es la distancia entre los grupos funcionales presentes en la acetogenina.
- Se observa una mayor actividad cuando la distancia entre la gama lactona y el tetrahidrofurano es de 13 carbonos. Las acetogeninas que presentan un hidroxilo en el carbono 9, presentan actividad considerable, así como aquellas que presentan anillos de tetrahidrofuranos flanqueados por OH, Alali *et al.*, 1999. Para ilustrar lo anterior se observa en la **Figura 2**.

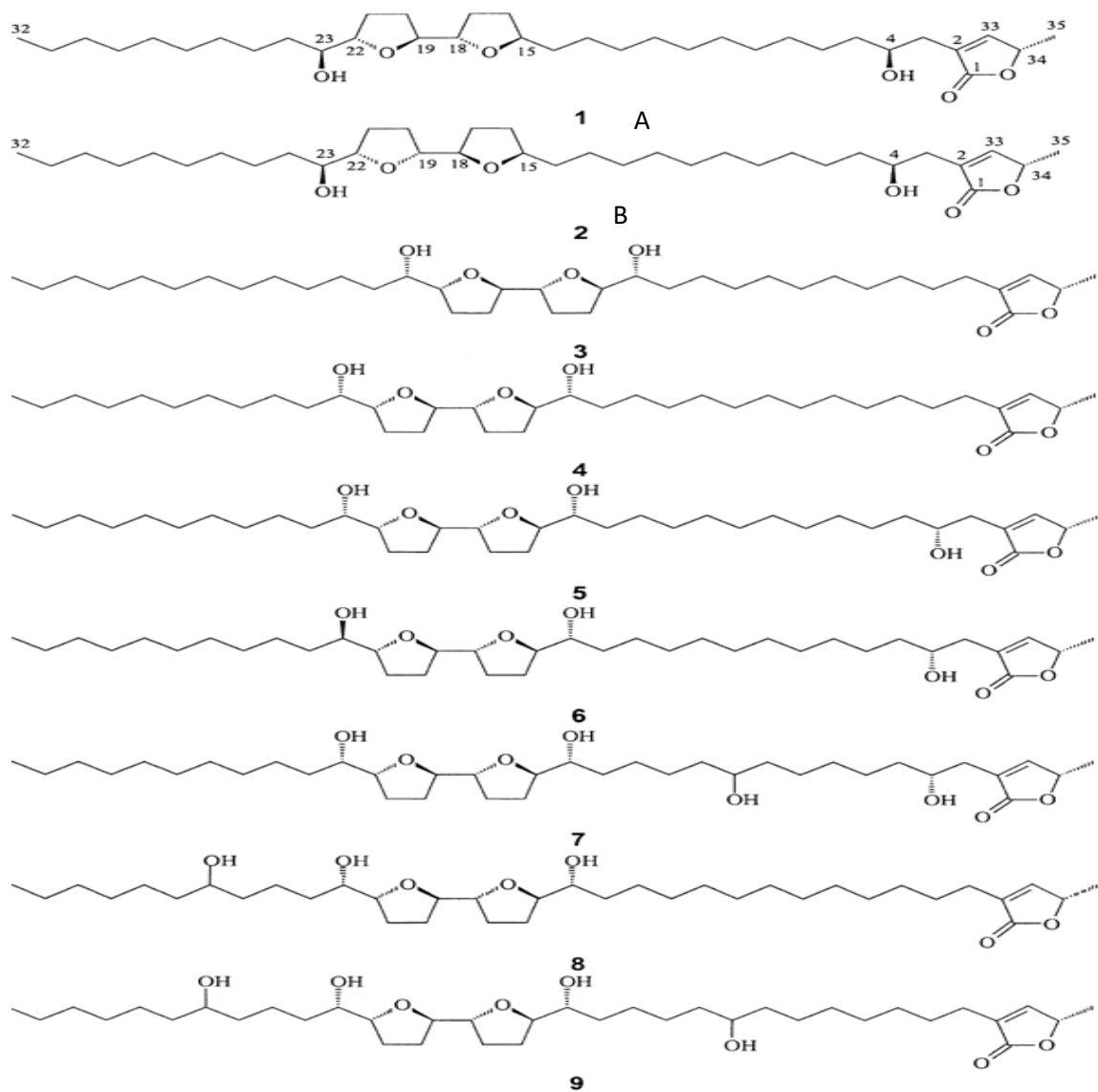


Figura 2. Acetogeninas Anonáceas, annocatacin A (1) y B (2), aisladas de *A. muricata*, y acetogeninas anonáceas adyacente bis-THF (3-9) previamente aisladas de plantas anonáceas.

1.2.2. Clasificación de las acetogeninas

1.2.2.1. Clasificación según cantidad de anillos en su estructura.

Las acetogeninas de Annonaceae se clasifican según la cantidad de anillos que tengan en su estructura, como son: Mono-tetrahidrofurano (THF), adyacentes bis-THF, no adyacentes bis-THF y sin anillos mono-THF; estas estructuras también poseen hidroxilos laterales los cuales pueden estar a uno u otro lado de la estructura, seguida por su clasificación de las γ -lactonas o sustituidas por cetolactonas (Martin y Green, 1994). Muchas acetogeninas de Annonaceae han sido encontradas y clasificadas por síntesis total o por el método de ésteres de Mosher (Fang *et al.*, 1993).

1.2.2.2. Clasificación de las acetogeninas según el tipo, ubicación de los sustituyentes y por su estereoquímica.

Se conocen 6 tipos de acetogeninas: lineales, epoxiacetogeninas, monotetrahidrofuranicas (Mono-THF), bis-tetrahidrofuranicas (Bis-THF), tritetrahidrofuranicas (Tri-THF) y tetrahidropiránicas (THP). En cada uno de los anteriores tipos de acetogeninas hay diferenciación con base en el tipo de ubicación de los sustituyentes, y en especial por su estereoquímica (Gordon, 1996).

1.2.2.3. Acetogeninas lineales

Son precursores de las epoxiacetogeninas y acetogeninas THF. Se diferencian por el grado de insaturación e hidroxilación en la cadena alquílica, como se muestra en la **Figura 3** (Rupprechet, 1990).

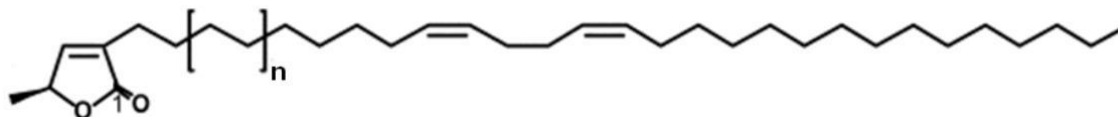


Figura 3. Estructura de las acetogeninas lineales

1.2.2.4. Epoxiacetogeninas

Las acetogeninas, por lo general poseen uno o dos anillos THF. Cuando este anillo es reemplazado por un grupo epóxido se obtienen las epoxiacetogeninas. Este tipo estructural es

considerado como el precursor de las acetogeninas, su estructura se muestra a continuación en la **Figura 4** (Rieser, 1996).

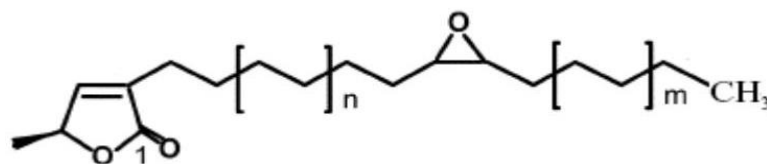


Figura 4. Estructura de epoxiacetogeninas (Rieser, 1996).

1.2.2.5. Acetogeninas mono-tetrahidrofurano

Se enmarcan en aquellas que poseen un solo anillo THF (Ye *et.al.* 1996); usualmente son de 35 carbonos con diferentes grados de oxidación, como se muestra en la **Figura 5** (Zeng *et.al.*, 1998). *corregir figura

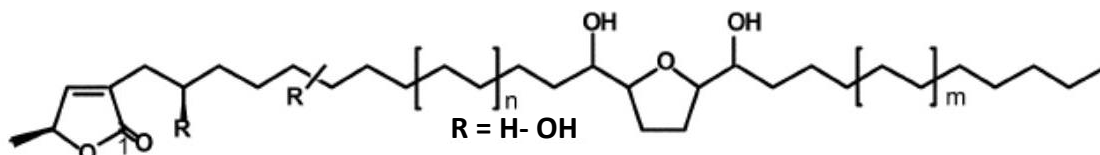


Figura 5. Estructura de acetogeninas mono-tetrahidrofurano (Zeng *et al.*, 1998).

1.2.2.6. Acetogeninas bis-tetrahidrofurano

Son compuestos que poseen 2 anillos THF, adyacentes o no adyacentes; de 35-37 carbonos, diferenciados entre sí por el grado de oxidación, tipo, número y ubicación del sustituyente de su estereoquímica, su estructura se muestra en la **Figura 6** (Zeng *et.al.*, 1998).

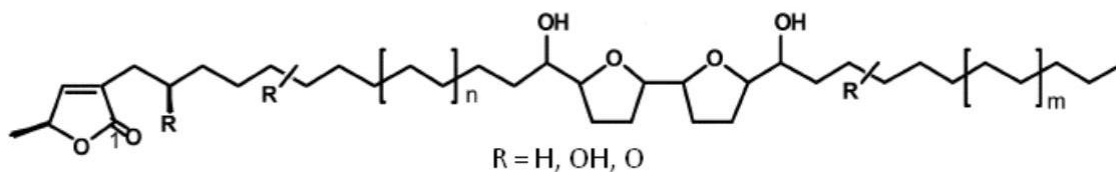


Figura 6. Estructura de las acetogeninas bis-tetrahidrofurano (Zeng *et al.*, 1998).

1.2.2.7. Acetogeninas tri-tetrahidrofurano

Son aquellas que poseen 3 anillos THF. Hasta el momento se conoce la goniacina, aislada de *Goniothalamus gigentus*, su estructura se muestra en la **Figura 7** (Ye *et al.*, 1996).

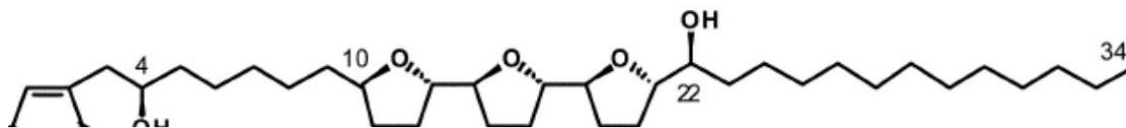


Figura 7. Estructura de las acetogeninas tri-tetrahidrofurano (Ye *et al.*, 1996).

1.2.2.8. Acetogeninas tetrahidropiránicas (THP)

Son aquellas que poseen un anillo tetrahidropirano como sustituyente en la cadena alquílica, su estructura molecular se muestra en la **Figura 8** (Rupprechet, 1990).

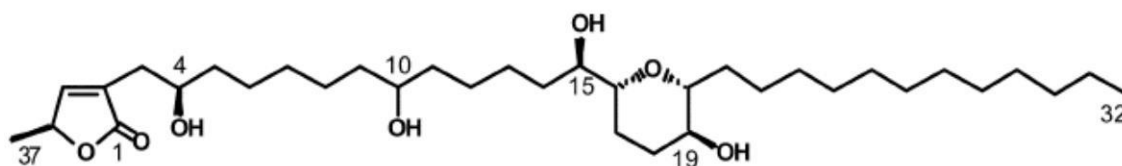


Figura 8. Estructura de acetogeninas tetrahidropiranosas (Rupprechet, 1990).

1.3 Estudios del complejo I mitocondrial

El Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial es de los sistemas enzimáticos implicados en los procesos bioenergéticos de la membrana mitocondrial interna. Su función es la oxidación del NADH formado en la matriz mitocondrial por las vías catabólicas oxidativas, canalizando los equivalentes de reducción hacia el espacio intermembrana. Como se muestra en la figura 8. Los electrones siguen su vía hacia la reducción del oxígeno molecular a través de los complejos III y IV, incrementando así el gradiente de protones en el espacio intermembrana. Finalmente, el gradiente electroquímico generado, es utilizado para la generación de ATP por ATPasa mitocondrial, proceso conocido como fosforilación oxidativa (Seoane, 2014). Así como se puede apreciar en la **Figura 9**.

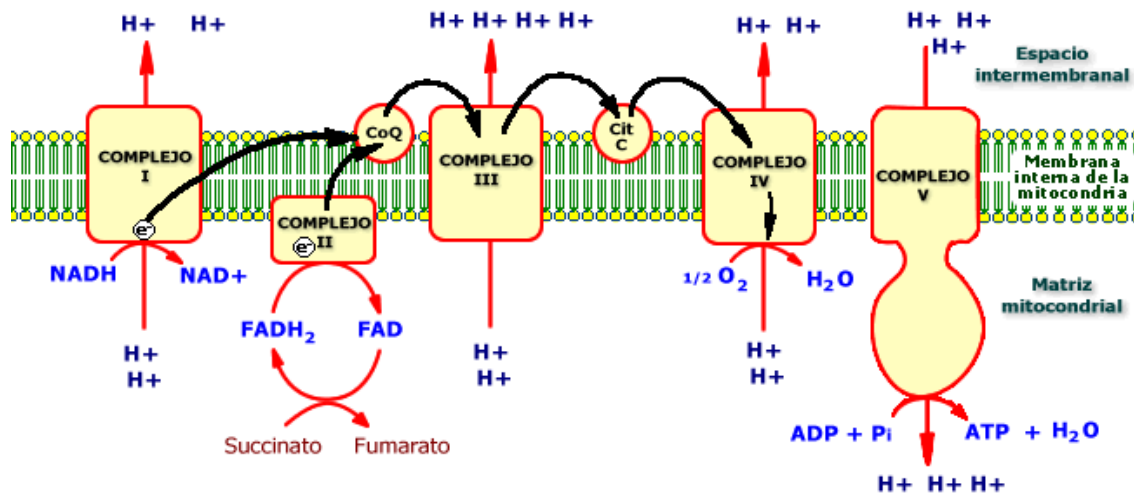


Figura 9. El Complejo I o NADH Deshidrogenasa. Este sistema tiene por función oxidar las coenzimas del tipo NADH + H⁺, que se producen en algunas de las reacciones al interior de la mitocondria (Seoane 2014).

1.4 Actividad biológica de las acetogeninas

Las acetogeninas son sustancias que poseen una importante actividad citotóxica, se ha comprobado que son inhibidores de la enzima NADH en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, esta acción agota el ATP e induce en las células una muerte programada (apoptosis), se ha demostrado que las acetogeninas atacan principalmente a las células cancerígenas respecto a las células normales debido a que las células cancerosas tienen una actividad metabólica acelerada. (González, 2011).

1.4.1 Actividad antitumoral (mecanismo de acción citotóxico)

Para esta actividad se considera que su blanco celular es la NADH-ubiquinona oxidoreductasa, el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. La inhibición por parte de las acetogeninas de la transferencia electrónica a nivel de la oxidoreductasa afecta a la producción de ATP, lo que puede conducir a la muerte celular mediante un mecanismo de necrosis. Existen en la literatura estudios de la inhibición de esta oxidoreductasa en células cancerígenas y células normales, observándose valores de inhibición mayores para células tumorales, incluso para líneas celulares con resistencia múltiple a los fármacos (Lage, 2003).

Si bien existen varias correlaciones de estructura-actividad antitumoral, en algunos casos los resultados no son tan concordantes cuando se amplía al conjunto de acetogeninas estudiadas (Kojima, 2009), por lo que es deseable la continuación de estudios en esta dirección a pesar de las dificultades dadas por la escasa disponibilidad de productos aislados de fuentes naturales (Tormo, *et. al.*, 2005).

La hipótesis de acción de las acetogeninas a nivel de la cadena respiratoria se basa en su unión a la membrana, con el sistema de anillos con hidroxilos adyacentes, la parte más polar de la estructura, funcionando como el anclaje en la interfase membrana-medio acuoso. Por otra parte, la cadena lateral similar a un ácido graso se ubica maximizando las interacciones con los fosfolípidos constituyentes de la membrana (Tormo *et al.*, 2001).

El butenólido, el residuo que interacciona con el complejo I inhibiéndolo, se ubica en uno de los extremos de la estructura, siendo la interacción de un espaciador apolar el responsable de la aproximación al sitio de acción, el complejo I, según se esquematiza en la figura siguiente (Kuwabara, 2000). Tal como se observa en la **Figura 10**.

Es difícil de puntualizar la mayor actividad por las acetogeninas que presentan dos anillos THF en su estructura, lo que lleva a pensar en una posible interacción extra de las estructuras THF en el mecanismo de acción (Figadère, 2005).

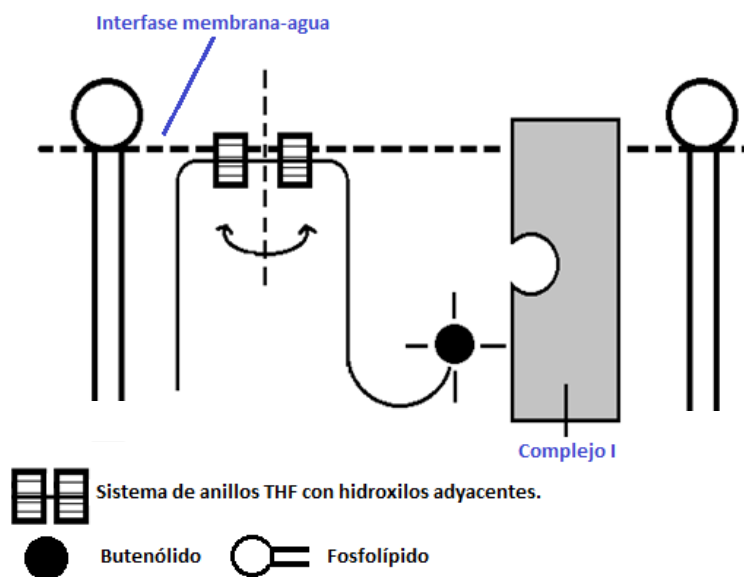


Figura 10. Modelo de acción de las acetogeninas en su interacción con el complejo I de la membrana mitocondrial (Figadère 2005).

De acuerdo a las investigaciones ya realizadas sobre el modo de interacción sobre el complejo I por parte de las acetogeninas, se sabe que el sitio de acción es amplio espacialmente y se cree tiene múltiples sitios de unión, lo cual se podría pensar en diferentes formas de interacción en moléculas complejas como las acetogeninas (Kuwabara, 2000). Esta máxima actividad del sistema reside en la presencia del butenólido, una porción polar con uno o más anillos tetrahidrofuránicos y cadenas laterales lipofílicas de tamaño óptimo para el espaciamiento (Bachan, 2013).

1.4.2 Actividad en el tratamiento contra el cáncer

Se han realizado investigaciones, relacionando a las acetogeninas dentro del sistema del complejo mitocondrial, por ejemplo, encontraron que con respecto a la ubiquinona, la annonacina inhibe a la NADH de una manera parcialmente competitiva. En 1976, una investigación realizada por el Doctor Jerry Mc. Laughlin de la Universidad de Purdue y el Instituto Nacional del Cáncer, se comprobó la efectividad de las acetogeninas en el tratamiento de cáncer de colon y próstata. Mientras que la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Católica de Corea del Sur realizó estudios comparativos con la adriamicina (quimioterapéutica) en tratamientos de cáncer de pulmón (Chahboune, 2006).

Estudios realizados por McLaughlin *et al.*, 2000, han revelado que las acetogeninas son inhibidores del complejo I de la cadena de fosforilación oxidativa con lo cual bloquean la formación de ATP; energía que necesita la célula cancerosa para poner en funcionamiento su bomba mediada por P-glucoproteína, que le permite mantenerse activa (Kojima, 2009). Las acetogeninas, también inhiben la ubiquinona-oxidasa, enzima dependiente del NADH, causando muerte celular programada. McLaughlin *et al.*, 2000, realizó sus investigaciones con las acetogeninas bulatacina y bulatacinona.

1.4.3 Estudios del mecanismo de acción de las acetogeninas sobre las células.

Autores como Schlie *et al.*, 2009, describen a las acetogeninas como metabolitos secundarios, considerados como el grupo más potente de inhibidores del complejo I mitocondrial (NADH ubiquinona reductasa). Éstas moléculas muestran un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares cancerosas, aún en aquellas con multi-resistencia a las drogas; Mishra *et al.*, 2013 mencionan que los fitoquímicos presentes en la planta poseen actividades antioxidantes, las cuales evitan o pueden

ser usadas en el tratamiento de muchas enfermedades incluyendo cáncer. El grupo fitoquímico, acetogeninas anonáceas, parecen jugar un papel importante en las propiedades antitumorales. La guanábana produce esos compuestos naturales en sus hojas y tallos, frutos y semillas. Aunado a esto, Arroyo *et al.*, 2015 hacen mención de que los estudios fitoquímicos indican que, al asociar *A. muricata* más *Krameria lappacea*, se incrementa el número de compuestos fenólicos y triterpenoides, ambos con diferente estructura química, por lo que se plantea que al asociarlas se dispondría de un extracto rico en estos compuestos, que estarían coadyuvando en la actividad citotóxica. Los metabolitos secundarios presentes en estas plantas, entre ellos los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y taninos), son la categoría más grande de compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son biológicamente activos y considerados como potenciales agentes quimiopreventivos del cáncer.

En otro estudio más reciente, Coria *et al.*, 2018 demuestran también que la citotoxicidad implica la inhibición mitocondrial para descontrolar la fase G0/G1 y con ello lleva a la célula a la inducción de apoptosis.

1.5 Extracción de acetogeninas

1.5.1 Usando disolventes

La extracción de acetogeninas ha sido un tema de interés por diversas investigaciones en las cuales se busca obtener dichos compuestos bioactivos por distintos métodos. Autores como Bobadilla *et al.*, 2002 hacen una comparación de extractos de *Annona muricata* con otros extractos, como lo es de *A. cherimolia*, el cual demostró el efecto insecticida de ambos extractos sobre las larvas del IV estadio de *Anopheles sp.*, siendo el extracto etanólico de las semillas de *A. muricata* más tóxico en relación al extracto etanólico de las semillas de *A. cherimolia* (Bobadilla *et al.*, 2002). En ese sentido, el compuesto bioactivo puede ser de gran utilidad como insecticida atacando organismos que son de interés por su acción como vectores de enfermedades, una de ellas la malaria. Otro caso de estudio de aplicación de extractos de acetogeninas es el reportado por Hincapié *et al.* (2008), en la investigación llevada a cabo, se demuestra que, los extractos de semilla de *A. muricata* obtenidos con hexano y aplicados por ingestión son sustancialmente más efectivos para el control de *S. zeamais* que polvos obtenidos a partir de algunas plantas como *P. boldus*, *M. officinalis*, *R. officinalis*, *C. ambrosoides*, *Ar. nobilis*, *Az. indica*, *E. globules*, *La. nobilis*, *O. basilicum*, *Pi. auritum*, *Ri. communis*, *Ci. sinensis*, *L. japonicum* y *Ru. graveolens*, entre otras. Además se ha

reportado el uso de extractos acuosos y con metanol de hojas de *A. muricata* los cuales poseen actividad antibacterial (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*), fueron el objeto de estudio en la investigación llevada a cabo por Solomon *et al.*, (2014), el cual demuestra que, los extractos acuosos y metanólicos mostraron actividad antibacterial. El extracto en metanol de las plantas investigadas mostró una máxima actividad antibacterial que el extracto acuoso. La comparativa actividad antibacterial entre los extractos acuosos y metanólicos de *A. muricata* y el antibiótico estándar estreptomycin revelaron que el extracto metanólico mostró eficacia antibacterial significativa y podría competir con el antibiótico estándar. Con lo cual nos muestra la importancia del compuesto bioactivo y más aún de su extracción con diversos fines de interés para su investigación. Por otro lado, estudios demuestran también su actividad antifúngica, en el caso de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, como menciona Montalvo *et al.*, (2019) contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* con 59 % y 38 % de inhibición, con lo cual se demuestra que los extractos de *A. muricata*, en este caso de pulpa del fruto, hacen posible que en futuras investigaciones se elaboren productos antifúngicos de interés para control biológico post cosecha.

Por otra parte, Vit *et al.*, (2014) mencionan que la actividad antioxidante de las fracciones estudiadas de *A. muricata* fueron mayores en extractos etanólicos que en metanólicos, al igual que el contenido de flavonoides y polifenoles. Lo cual lleva a la necesidad del estudio a profundidad sobre los extractos de acetogeninas y su aplicación.

Además de su actividad antibacterial, antifúngica y funcional como bioinsecticida, las acetogeninas de *Annona muricata* se han estudiado por poseer actividad citotóxica, Raybaudi-Massillia *et al.*, (2015) en su estudio realizado con extractos acuosos y metanólicos de *Annona muricata* proveniente de la semilla y pulpa sobre células tumorales humanas, sugieren que el consumo del fruto de guanábana es una buena alternativa para prevenir enfermedades, como cáncer de próstata o cérvico, sin embargo, se requieren más estudios para la obtención de extractos con el compuesto activo y caracterizar los compuestos específicos de dichos extractos.

1.5.2 Extracción en estado súper crítico

Un fluido supercrítico es un estado de la materia en la que se encuentra bajo condiciones de presión y temperatura superior a su punto crítico, en el que no se pueden distinguir el estado gaseoso del estado líquido. En este punto el compuesto es compresible, comportándose como un gas y tiene la densidad de un líquido y por lo tanto su poder disolvente (Luque de Castro *et al.*, 1993).

El fluido supercrítico más usado es el dióxido de carbono, hay varias razones que lo explican, en primer lugar, el CO₂ es barato y está disponible comercialmente incluso con una alta pureza. Es no inflamable, a diferencia de muchos disolventes orgánicos. La temperatura y presión crítica son moderadas (31.1 °C y 72.84 atm). Estas condiciones lo convierten en un disolvente adecuado para la extracción de compuestos termo sensibles. Desde el punto de vista del proceso, al ser un gas a temperatura ambiente es seguro de manejar y no deja residuos de disolvente en los productos finales. Pero también tiene desventajas, debido a que no es polar, la extracción de analitos polares puede ser un desafío. Esto se puede mejorar mediante la adición de una pequeña cantidad de disolvente modificador polar o un agente tensoactivo (Mendiola, 2008).

Un proceso de extracción supercrítica consta de 4 etapas (Gallego y Castañeda, 2004):

- Presurización
- Ajuste de temperatura
- Extracción
- Separación

La forma en la que opera el sistema se resume a continuación. El material a extraer se carga dentro de la cámara de extracción. Una vez que esté listo se hace pasar el fluido supercrítico dentro de la cámara de extracción mediante una bomba, presurizándose hasta alcanzar la presión y la temperatura por encima del punto crítico. Aquí el disolvente entra en contacto con los componentes de la matriz, solubilizando y arrastrando los componentes afines. El fluido, cargado de analito, fluye a el restrictor, donde se produce la descompresión del fluido cambiando éste de fase y separándose de los componentes disueltos para poder ser recuperados (Valverde, 1995). Para que las extracciones sean efectivas hay que tener en cuenta un factor muy importante como es el diseño del sistema usado para la recolección de los analitos. La extracción off-line consiste en un tubo de

ensayo o vial, el cual contiene un pequeño volumen de disolvente orgánico, en el que el fluido, al salir del restrictor, burbujea. Con este tipo de extracción no es necesario realizar etapas de pre-concentración, ya que los extractos obtenidos se pueden analizar en el correspondiente sistema cromatográfico. En la extracción on-line los analitos extraídos son trasladados y pueden ser colectados en diferentes sistemas como “bucle” de inyección, trampa de termodesorción o la fase estacionaria en la cabeza de columna. En este tipo el sistema cromatográfico se acopla directamente al equipo de extracción. Los sistemas usados pueden ser la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS). Gracias a este acoplamiento la automatización del proceso es más fácil y más sensible, ya que todo el analito que se ha extraído pasa al sistema cromatográfico (Valverde, 1995).

La extracción por fluidos supercríticos satisface en gran manera los requisitos exigidos, puesto que el impacto de este para el medio ambiente es considerablemente más bajo comparado con los métodos de extracción convencionales y los productos obtenidos mantienen sus propiedades. La conservación de las propiedades se debe en gran medida a que las materias primas utilizadas no son sometidas a temperaturas elevadas que alteran las propiedades químicas de los compuestos obtenidos. Por lo tanto es una metodología que es respetuosa con el ambiente y al mismo tiempo no constituye riesgo para la salud, garantizando la integridad y calidad de los productos.

Existen estudios, como el realizado por Yang *et al.*, (2009) donde extraen acetogeninas de diversas anonáceas usando dióxido de carbono en condiciones supercríticas, como se puede apreciar en la tabla

Tabla 2. Comparación de contenido de acetogeninas en anonáceas, Yang *et al.*, 2009.

Muestra	Contenido de acetogeninas
<i>A. squamosa</i>	2.29 mg/g
<i>A. glabra</i>	1.82 mg/g
<i>A. muricata</i>	1.68 mg/g
<i>A. reticulata</i>	1.67 mg/g
<i>A. bullata</i>	1.70 mg/g

Justificación

Actualmente no existe un método eficiente de la extracción de acetogeninas provenientes del fruto, cáscara, hojas y semillas de *Annona muricata*, siendo estas últimas de principal interés debido a la alta concentración contenida del compuesto bioactivo. Hoy día, los compuestos bioactivos ofrecen una gama de posibilidades para el tratamiento contra distintas enfermedades, siendo el cáncer una de las más estudiadas, es por ello que el uso de terapias alternativas ha sido de gran importancia en los últimos años. De modo que el uso de acetogeninas, provenientes de *Annona muricata*, se han vuelto un objeto de estudio considerable para los investigadores debido a su potencial como compuesto citotóxico, en este contexto particularmente contra las células cancerosas. Por lo cual, el presente proyecto se enfoca en la extracción de estos compuestos bioactivos en condiciones supercríticas utilizando CO₂.

Hipótesis

La extracción de acetogeninas por medio del uso de CO₂ en condiciones supercríticas y etanol como co-solvente se obtiene en mayor cantidad que usando el método tradicional (extracción soxhlet con etanol como disolvente), dando como resultado un extracto adecuado para posibles estudios posteriores en seres vivos.

Objetivos.

Objetivo general

Realizar la extracción de acetogeninas provenientes de semilla de *Annona muricata*, mediante CO₂ en condiciones supercríticas y etanol como co-solvente.

Objetivos específicos

- 1.- Extracción de acetogeninas totales de harina desengrasada de semillas de *Annona muricata* mediante método Soxhlet utilizando etanol como disolvente.
- 2.- Extraer las acetogeninas a partir de harina desengrasada de semillas de *A. muricata* usando CO₂ como disolvente en condiciones supercríticas.
- 3.- Extraer las acetogeninas a partir de harina desengrasada de semillas de *A. muricata* usando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.
- 4.- Cuantificar el contenido de acetogeninas en los extractos obtenidos tanto por método soxhlet usando etanol, como a partir de la extracción con CO₂ en condiciones supercríticas.

Materiales y métodos

1.6 Acondicionamiento de la materia prima

Semillas de guanábana procedentes del estado de Nayarit fueron lavadas y secadas durante 48 h a una temperatura de 60°C. Posteriormente, fueron sometidas a una molienda en un molino (procesador de alimentos Goldenwall modelo HC-300Y) durante 45 segundos con el fin de obtener un tamaño de partícula de malla 30 (Robledo *et al.*, 2008). La harina obtenida fue almacenada para sus posteriores análisis (extracción con hexano por metodología Soxhlet y CO₂ en condiciones súper críticas).

1.7 Extracción de grasas totales y compuestos fitoquímicos a partir de la harina de semillas de guanábana usando la metodología Soxhlet

1.2.1. Preparación de material y equipo

En primera instancia se requirieron pesos constantes, para lo cual 6 matraces bola de 250 mL y 6 cartuchos wattman de celulosa (33 x 80 mm) fueron colocados en un horno durante 24 horas a una temperatura de 65 °C con el fin de eliminar la humedad contenida y obtener así el peso en seco del material para las determinaciones posteriores (grasas totales). Una vez pasado el tiempo se colocaron en un desecador para llevarlos a temperatura ambiente, posteriormente matraces y cartuchos fueron pesados en una balanza analítica.

Habiendo obtenido los pesos de los materiales, el siguiente paso fue pesar la materia prima acondicionada (harina de semilla de guanábana seca), 10 gramos de muestra fueron colocados en cada cartucho para, posteriormente, colocarse en el equipo Soxhlet (Novatech modelo VH-6). Dicho proceso de extracción se llevó a cabo en dos fases (desengrasado de la muestra y extracción de acetogeninas) Raybaudi *et al.*, 2015.

1.7.1 Desengrasado de la muestra con hexano como disolvente

Se hizo uso de un tratamiento de 3 repeticiones con una duración de 8 horas por cada repetición, con una temperatura constante de 70 °C usando 150 mililitros de hexano como disolvente, con el fin de desengrasar las muestras de harina de semilla de guanábana. El disolvente fue recuperado

posteriormente en un evaporador rotatorio (Yamato, modelo BM500) usando una temperatura de 70 °C.

1.7.1.1 Obtención de grasas totales

Habiendo desengrasado la harina de semilla de guanábana se procedió a determinar la cantidad de grasas totales por gravimetría mediante el uso de los datos de diferencia de pesos.

1.7.2 Extracción y cuantificación de acetogeninas totales a partir de las grasas de harina de semilla de guanábana.

Como parte de la estrategia de buscar la cantidad de acetogeninas totales en el proceso (grasa y desengrasado) se procedió a cuantificar la cantidad de acetogeninas contenidas en la grasa proveniente de la harina de semillas de guanábana. Para esto se necesitó hacer una mezcla en proporción 1:1 la cual consistió de 3 mililitros de las grasas disueltas en hexano (previo a concentrarse en evaporador rotatorio) y 3 mililitros de una mezcla etanol-agua en proporción 1:1, dado que el hexano es miscible con el etanol pero no con el agua, la mezcla fue agitada vigorosamente para conseguir que las acetogeninas, al tener afinidad con el etanol, se separasen de las grasas, con el fin de obtener acetogeninas en la fase etanol-agua y grasas en la fase hexano-grasas; posteriormente se retiró cuidadosamente la fase de hexano con grasas, dejando únicamente la fase etanol-agua para su posterior análisis. Dicha extracción se hizo en 3 repeticiones a manera de comprobación.

Una vez terminada la operación se procedió a realizar la cuantificación por colorimetría haciendo uso del reactivo de Kedde, 2 mililitros del mismo fueron necesitados más 200 micro litros del extracto proveniente de la fase de etanol-agua. Una vez obtenida la reacción de Kedde se procedió a medir por espectrofotometría, usando una longitud de onda de 505 nm.

1.7.3 Extracción de acetogeninas con etanol como disolvente

Consistió en colocar 10 gramos de muestra desengrasada por cada cartucho de celulosa de marca wattman (33 x 80 mm) y posteriormente fueron colocados en el equipo Soxhlet, usando una temperatura de 65 °C, a su vez fueron requeridos 6 matraces bola de 250 mililitros conteniendo 150 mililitros de disolvente (etanol grado absoluto). El tratamiento consistió de 3 repeticiones con

una duración de 8 horas por repetición. El extracto recuperado fue almacenado en refrigeración durante 24 horas; una vez cumplido el tiempo de reposo se procedió a concentrar el extracto obtenido en un evaporador rotatorio (Yamato, modelo BM500) usando una temperatura de 65 °C, recuperando así etanol y obteniendo el extracto con acetogeninas. El extracto concentrado fue colocado en una campana de extracción a temperatura ambiente durante 48 horas con el objetivo de dejar volatilizar el disolvente contenido en el extracto (Cerón *et al.*, 2012).

1.7.4 Pre-purificación de extractos y fraccionamiento

Los extractos obtenidos (24.6 mililitros de semilla entera y 42 mililitros de semilla sin cáscara) fueron sometidos a una separación cromatográfica usando una columna de 6 cm de diámetro y una altura de 25 centímetros en la cual se empleó sílica gel de malla 200-300 como soporte y eluyendo, usando como gradiente cloroformo:metanol, de acuerdo a la metodología descrita por León *et al.*, 2017, en una proporción inicial de 90:10, con un cambio gradual hasta finalizar con un gradiente de cloroformo:metanol en una proporción final de 88:12. Fueron recolectadas 300 fracciones de 10 mililitros cada una, las cuales se agruparon en función de los gradientes de polaridad usados y que posteriormente fueron presentados en cromatografía en capa fina, en la cual, la presencia de acetogeninas se confirmó mediante revelado con el reactivo de Kedde. Una vez terminado el ensayo de determinar presencia de acetogeninas se procedió a concentrar los extractos agrupados en un evaporador rotatorio (Yamato, modelo BM500) y posteriormente fueron almacenados en frascos y sellados para su cuantificación por espectrofotometría (505 nm).

1.7.5 Cuantificación de acetogeninas por espectrofotometría

El contenido total de acetogeninas fue determinado por reacción colorimétrica de acetogeninas con el reactivo de Kedde, compuesto por: Solución A que consiste en ácido 3,5 dinitrobenzoico 2% disuelto en metanol y solución B que consiste en hidróxido de potasio 5.7% disuelto en agua. La mezcla de la solución A y la solución B en proporción 1:1 dió lugar al reactivo de Kedde. El procedimiento consistió en añadir 2 mililitros de reactivo de Kedde y 200 micro litros del extracto acetogénico, la reacción resultante fue una coloración rosada lo cual indica que el reactivo de Kedde reacciona con la terminal α β -insaturado o saturado γ -lactona. Las absorbancias fueron medidas a 505 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6705, Dunmow, UK).

1.7.6 Extracción de aceites y compuestos fitoquímicos de la harina de semillas de guanábana con CO₂ en condiciones supercríticas

Se realizó una extracción de componentes de la harina de semilla de guanábana usando CO₂ (equipo Teledyne Isco, modelo SFX 2-10, bomba serie D) en condiciones supercríticas, en el cual de 40 a 50 gramos de harina de semilla de guanábana con cáscara fueron procesados, bajo las siguientes condiciones: se usó un flujo de 30 mL/min a una presión de 320 bar y asegurando una temperatura de 50 °C en el cilindro contenedor de la muestra para que así se obtengan las condiciones supercríticas del CO₂ (Dorado *et al.*, 2016). Dicho procedimiento se llevó a cabo en 5 diferentes tratamientos bajo las mismas condiciones.

1.7.7 Tratamiento 1: extracción de acetogeninas de harina de semilla de guanábana sin desengrasar con CO₂ en condiciones supercríticas.

40 gramos de harina de semilla de guanábana con cáscara sin desengrasar fueron procesados en el equipo de extracción con CO₂ en condiciones supercríticas (CSC) con las condiciones anteriormente mencionadas.

1.7.8 Tratamiento 2: extracción de las acetogeninas de la harina de semillas de guanábana sin desengrasar utilizando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.

40 gramos de harina de semilla de guanábana con cáscara sin desengrasar fueron procesados en el equipo de extracción con CO₂ en condiciones supercríticas bajo las condiciones mencionadas, añadiendo además, en el cilindro contenedor con la muestra, 40 mililitros de etanol.

1.7.9 Tratamiento 3: extracción de las acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada con CO₂ en condiciones supercríticas.

50 gramos de harina de semilla de guanábana con cáscara previamente desengrasada por metodología soxhlet usando hexano como disolvente, fueron procesados en el equipo de extracción con CO₂ en condiciones supercríticas usando las condiciones anteriormente mencionadas.

1.7.10 Tratamiento 4: muestra expuesta a sonicación con etanol, seguida de la extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada utilizando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.

50 gramos de harina de semilla de guanábana con cáscara previamente desengrasada por metodología soxhlet usando hexano como disolvente, y posteriormente sometida a un proceso de sonicación, proceso para el cual se usó un equipo procesador ultrasónico de líquidos (Vibra-Cell modelo VC 500), se ajustó una amplitud de onda del 40 %, sumergida 2 centímetros de la solución y con una duración de 15 minutos de sonicación con intervalos de 4 segundos (Aguilar *et al.*, 2019)., la muestra fue colocada en el cilindro contenedor junto con 60 mililitros de etanol (10 mililitros extra que fueron usados para retirar restos de harina en el vaso de precipitado usado en el proceso de sonicación para recuperar las trazas en las paredes del vaso) fueron procesados en el equipo de extracción con CO₂ en condiciones supercríticas usando las condiciones anteriormente mencionadas.

1.7.11 Tratamiento 5: extracción de acetogeninas de la harina de semilla de guanábana desengrasada usando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.

50 gramos de harina de semilla de guanábana con cáscara previamente desengrasada por metodología Soxhlet usando hexano como disolvente, y 50 mililitros de etanol colocados en el cilindro contenedor de muestra fueron procesados en el equipo de extracción con CO₂ en condiciones supercríticas usando las condiciones anteriormente mencionadas.

1.7.12 Pruebas de Kedde para determinar presencia de acetogeninas en los extractos obtenidos mediante los diferentes tratamientos con CO₂ en condiciones supercríticas.

Para cada tratamiento usado, se hizo una prueba de presencia de acetogeninas mediante el reactivo de Kedde bajo las condiciones anteriormente mencionadas y posteriormente una cuantificación por medio de las absorbancias arrojadas por el método de espectrofotometría bajo una longitud de onda de 505 nm, Aguilar *et al.*, (2020).

1.8 Análisis estadístico

Para evaluar si hay cambios significativos durante el proceso se llevaron a cabo los análisis estadísticos mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA, con la prueba de Tukey, $P < 0.05$). Obteniendo un nivel de confianza del 97.8 %.

Resultados y discusión

1.9 Extracción de acetogeninas por método tradicional (Soxhlet)

Para poder extraer las acetogeninas es necesario remover las grasas, usando equipo Soxhlet y utilizando como disolvente hexano, debido a que la presencia de las grasas interfieren en la técnica de cuantificación de las acetogeninas. El contenido de grasas correspondió a 30.59% a partir de 120 gramos de harina seca de semilla con cáscara de guanábana, 28.10% a partir de 60 gramos de harina seca de semilla sin cáscara de guanábana y un 2.49% de grasa contenida en la cáscara, dichos porcentajes se pueden apreciar mejor en la **Figura 11**.

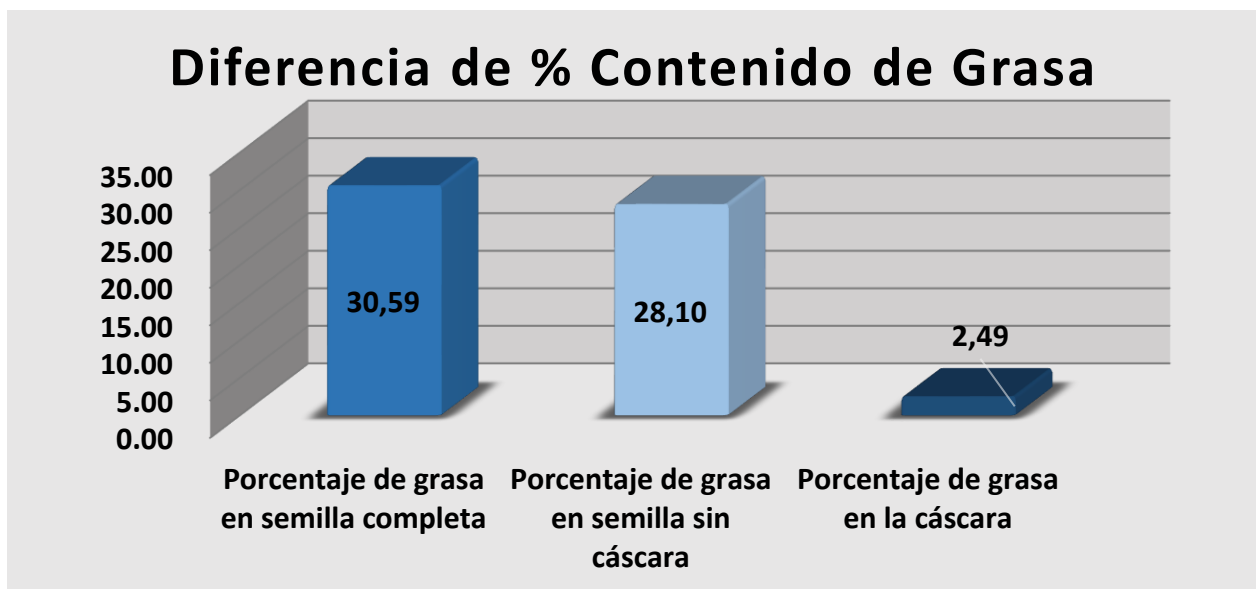


Figura 11. Diferencia de porcentaje de contenido de grasa en harina de semilla con y sin cáscara.

Es importante retirar las grasas debido a que éstas interfieren en la cuantificación de acetogeninas, dado que el reactivo de Kedde al contener hidróxido de potasio reacciona con las grasas, dando como resultado una muestra turbia que hace imposible su medición en el espectrofotómetro, sin embargo, en otro apartado más adelante se determina la concentración de acetogeninas que están presentes en las grasas.

En la extracción de acetogeninas con etanol como disolvente, se obtuvieron 24.6 mililitros de extracto a partir de la semilla entera y 40 mililitros a partir de la semilla sin cáscara, la cuantificación de acetogeninas en el extracto determinada por espectrofotometría dio una lectura de absorbancias dentro de los rangos establecidos correspondientes a acetogeninas y la reacción con el reactivo de Kedde brindó la coloración rosa, tal como reporta Aguilar *et al.*, 2020, característica de la presencia de acetogeninas como se puede apreciar en la **Figura 12**. Estos datos pueden observarse detalladamente en la **Tabla 3**, en la cual se expresan volúmenes y concentraciones de acetogeninas obtenidas.



Figura 12. Prueba con reactivo de Kedde para determinación de acetogeninas a partir del extracto obtenido con método tradicional.

Tabla 3. Datos de cuantificación de acetogeninas obtenidos por extracción Soxhlet.

	Peso de muestra (g)	Volumen total del extracto (mL)	Factor de dilución	Absorbancia	mg ACGs/mL de la última dilución	mg de ACGs/g de harina	mg ACGs/100 g de semilla
Harina de semilla sin cáscara	60	40	1	0.265	1.2307	0.8205	82.05
Harina de semilla completa	120	24.6	1	0.275	1.2874	0.2639	26.39

Es importante retirar las grasas debido a que éstas interfieren en la cuantificación de acetogeninas, dado que el reactivo de Kedde al contener hidróxido de potasio reacciona con las grasas, dando como resultado una muestra turbia que hace imposible su medición en el espectrofotómetro, sin embargo, en otro apartado más adelante se determina la concentración de acetogeninas que están presentes en las grasas.

En cuanto a la purificación de los extractos, 300 fracciones de 10 mL de extracto cada una fueron obtenidas en tubos de ensayo a partir de la columna de sílica gel, en la cual se consiguió que la mejor mezcla de la fase es de cloroformo-metanol en proporción 9:1. Las fracciones 21 a 79 presentaron un contenido alto en grasas, por lo cual fueron descartados debido a que fue imposible cuantificar acetogeninas, mientras que en las fracciones 252 a 300 no se detectaron acetogeninas en la cuantificación.

A las muestras secas, correspondientes a las fracciones agrupada, se les tuvo que añadir 2 mililitros de etanol y se tomó una alícuota de 200 micro litros previamente a los extractos de cada fracción, posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de acetogeninas por espectrofotometría y los resultados obtenidos se pueden apreciar como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la cuantificación de acetogeninas en fracciones de pre-purificación.

Fracciones	Peso del extracto seco de ACGs (g)	Volumen de etanol agregado (mL)	Factor de dilución	Absorbancia	mg ACGs/mL de la última dilución	mg ACGs/mL	mg ACGs
1-20	1.68	2	13	0.224	1.0131	13.1702	26.3404
80-190	0.18	2	18	1.121	0.4664	8.3949	16.7898
195-225	0.13	2	13	0.221	0.9972	12.9632	25.9264
230-251	0.03	2	4	0.085	0.2788	1.1154	2.2308

Con ello se da lugar a una mejor extracción de las acetogeninas provenientes del extracto en cuestión de pureza.

Además, mediante la cromatografía en capa fina se reveló la presencia de acetogeninas en los extractos, en la **Figura 13** se puede observar la presencia de las acetogeninas, en la cual se pueden apreciar las bandas obtenidas durante el proceso, de color rosa-violeta en la parte inferior de la placa.

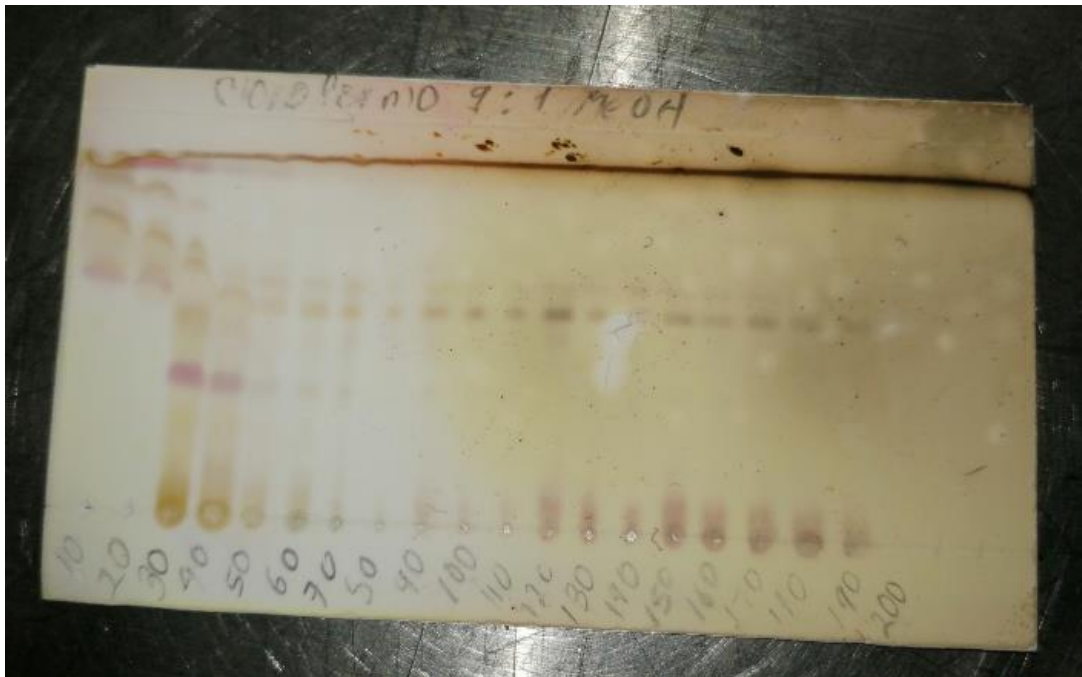


Figura 13. Cromatografía en capa fina de extractos acetogénicos, se puede apreciar que la banda correspondiente a las fracciones 1-20 corresponde a la mayor concentración de acetogeninas.

Dicho método realizado por León *et al.*, 2017, en el cual se puede apreciar de igual manera las bandas obtenidas en cromatografía por capa fina correspondientes a las acetogeninas. El resultado del experimento se puede observar en la **Figura 14**.

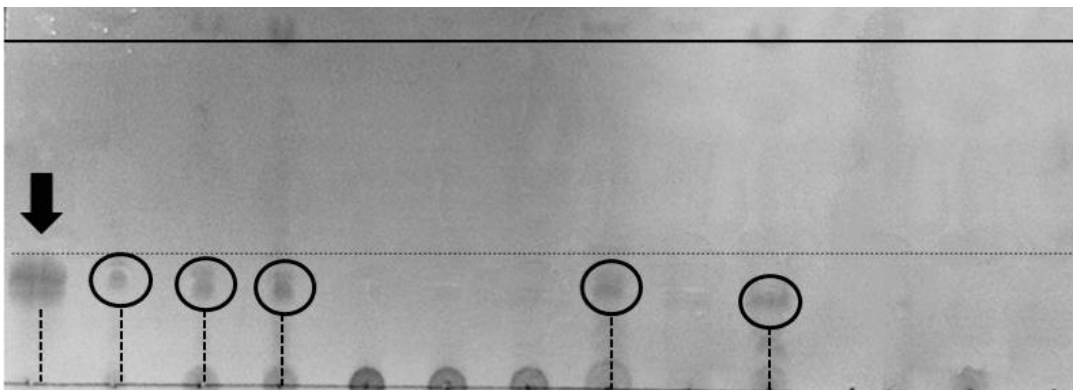


Figura 14. Identificación de acetogeninas por cromatografía en capa fina, usando diferentes proporciones de cloroformo y metanol, León *et al.*, 2017.

1.10 Extracción de acetogeninas usando CO₂ en condiciones supercríticas

Los tiempos de extracción coincidieron con lo reportado con Dorado *et al.*, 2016, los cuales fueron de aproximadamente 8 horas totales de extracción. A partir de los 5 tratamientos obtenidos, dos de ellos (cuarto y quinto tratamiento) fueron los que mejores resultados se obtuvieron, parte de ello se debe a que la muestra desengrasada facilita la cuantificación de acetogeninas; el primer y segundo tratamiento, al ser muestras que no fueron desengrasadas, existió interferencia en la determinación de la concentración de las acetogeninas, por lo cual no se pudo realizar una cuantificación; en el caso del tratamiento 3, en el cual fue usada harina desengrasada, no se obtuvo extracto suficiente para el análisis. Es por ello que el etanol usado como co-solvente facilitó la extracción de acetogeninas, además de su afinidad por las mismas. En la **Tabla 5** se muestran los resultados de cuantificación correspondiente a los tratamientos 4.

Tabla 5. Resultados obtenidos del 4to tratamiento: muestra expuesta a sonicación con etanol, seguida de la extracción de acetogeninas de la harina de semillas de guanábana desengrasada utilizando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas

	Peso de la muestra (g)	Volumen total del extracto (mL)	Factor de dilución	Absorbancia	mg ACGs/mL de la última dilución	mg ACGs/mL extracto	mg ACGs/g de harina desengrasada
Muestra de harina desengrasada *Sonicación con etanol	34.5	15	6	0.154	0.6415	3.8492	1.6736

Cabe resaltar que en el proceso de sonicación se usó etanol, con el propósito de mejorar la extracción de acetogeninas al romper la célula previamente bajo dicho tratamiento, lo cual, si bien resultó efectivo en cuanto a extracción, fue en menor cantidad en comparación con el quinto tratamiento, que a continuación podemos visualizar en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Resultados correspondientes al tratamiento 5: extracción de la harina de semillas de guanábana desengrasada usando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.

	Peso de la muestra (g)	Volumen total del extracto (mL)	Factor de dilución	Absorbancia	mg ACGs/mL de la última dilución	mg ACGs/mL extracto	mg ACGs/g de harina desengrasada
Muestra de harina desengrasada	34.5	20	6	0.344	1.6518	9.9108	5.7454

Como se puede apreciar se obtuvo mejor rendimiento en el tratamiento 5 en comparación con el tratamiento 4. Siendo el etanol como co-solvente mejoró notablemente la extracción de acetogeninas al usarse el CO₂ en condiciones supercríticas, facilitando la cuantificación dado que no genera turbidez en la muestra. Como se puede apreciar en la **Figura 15**, notando un color rosa mucho más intenso que el extracto obtenido por Soxhlet que se mostró en la **Figura 11**.



Figura 15. Extracto obtenido mediante el tratamiento 5 (harina desengrasada y etanol como co-solvente) donde se puede apreciar la intensidad de color, característico de la presencia de acetogeninas.

Dado lo anterior se contempla el uso del quinto tratamiento (extracción de acetogeninas de la harina desengrasada de semillas de guanábana con CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas) como el tratamiento más eficaz, porque como se ha podido demostrar en los experimentos realizados, el etanol como co-solvente facilita la extracción porque la presencia del etanol al final del proceso produce un cambio de polaridad en los disolventes, lo que hace que se extraiga en mayor concentración las acetogeninas.

1.11 Comparación entre los dos métodos de extracción (Soxhlet utilizando etanol como disolvente y CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas)

Una vez teniendo ambos procesos de extracciones realizadas, finalmente se hizo una comparación en cuanto a los rendimientos obtenidos en el proceso de extracción. Para ello se tomaron en cuenta los tratamientos 4 y 5 bajo la extracción de CO₂ en condiciones supercríticas para ser comparados con los resultados obtenidos por medio del método tradicional (Soxhlet utilizando etanol como disolvente). Se toma el tratamiento 5 como el mejor método de extracción de acetogeninas debido a que el etanol como co-solvente ayuda posee también a su vez afinidad por éstas, aumentando los rendimientos en comparación con el método de extracción con soxhlet usando etanol como disolvente, resultando ser 20 veces más efectivo el método de extracción de acetogeninas usando dióxido de carbono en condiciones supercríticas y etanol como co-solvente, además posee la ventaja de usar disolventes que son amigables con seres vivos, lo cual es un factor favorable si se desean hacer estudios posteriores ya que no representan un peligro para el organismo.

Se aprecia en la **Tabla 7** que existe una recuperación de mayor concentración de acetogeninas usando CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas.

Tabla 7. Resultados obtenidos entre ambos métodos de extracción y sus respectivos resultados.

	Peso de la muestra (g)	Volumen total del extracto (mL)	Factor de dilución	Absorbancia	mg ACGs/mL de la última dilución	mg ACGs/mL extracto	mg ACGs/g de harina desengrasada
Extracción por método Soxhlet (harina de semilla con cáscara y desengrasada)	82.8	24.6	1	0.275	1.2874	1.2874	0.2639
Tratamiento 4: sonicación en etanol y extracción supercrítica con CO ₂ y etanol como co-solvente	34.5	15	6	0.154	0.6415	3.8492	1.6736
Tratamiento 5 extracción supercrítica con CO ₂ y etanol como co-solvente	34.5	20	6	0.344	1.6518	9.9108	5.7454

1.12 Cuantificación de acetogeninas totales en las semillas de guanábana.

A manera de complementación, fue necesario saber la cantidad de acetogeninas que se pierden durante el proceso de desengrasado, dado que la reacción del reactivo de Kedde en mezcla con las

grasas produce la coloración rosada característica que se produce cuando hay presencia de las mismas. En la fase oleosa se pudo determinar la presencia de acetogeninas, su cantidad fue de 0.5990 mg ACGs/g grasa con lo cual se descartó la necesidad de recuperar las acetogeninas contenidas en el aceite. En la **Tabla 8** se puede apreciar el contenido de acetogeninas que se pierden al separar las grasas y en la **Tabla 9** se puede apreciar la cantidad de acetogeninas que se recuperan de la harina desengrasada.

Tabla 8. Cuantificación de acetogeninas en grasas de harina de semilla con cáscara.

	Volumen del extracto hexánico (mL)	Volumen del extracto etanol-agua 1:1 (mL)	Factor de dilución	Absorbancia	mg ACGs/mL extracto	mg ACGs en grasas extraídas	Peso de la grasa (g)	mg ACGs/g de grasa
Extracto hexánico de 100 g de harina de semilla con cáscara	450	3	1	0.040	0.0400	18	30.0397	0.5990

Tabla 9. Cuantificación de acetogeninas en harina de semilla con cáscara

A partir de la harina desengrasada	Peso de la muestra (g)	Volumen total del extracto (mL)	Factor de dilución	Absorbancia	mg ACGs/mL extracto	mg ACGs en harina desengrasada	mg ACGs/g de semilla desengrasada
	69.9603	22	11	0.271	13.9271	306.3962	4.3796

La cantidad de acetogeninas contenidas en 100 gramos de harina de semilla con cáscara correspondió a 324.3962 mg.

1.13 Comparación en contenido de acetogeninas con otros estudios en anonáceas

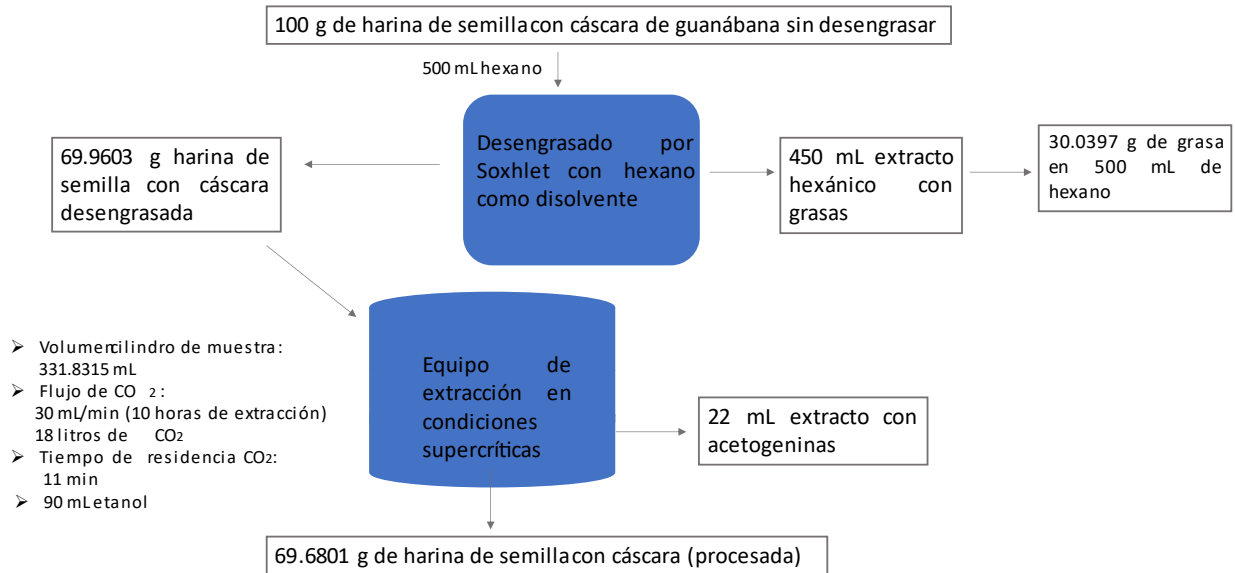
Se ha visto en estudios anteriores, como es el caso de Yang *et al.*, (2009) el contenido de acetogeninas a partir de la semilla en diferentes anonáceas, haciendo uso del CO₂ en condiciones supercríticas como metodología de extracción y cuantificando con HPLC. En la **tabla 10** se puede observar que se ha obtenido mayor cantidad de acetogeninas en *Annona Squamosa* en comparación con *Annona muricata* (2.29 mg/g y 1.68 mg/g respectivamente), sin embargo, en cuanto a el rendimiento obtenido con guanábana, que es el usado en el presente trabajo, se obtuvo una mayor cantidad de este compuesto bioactivo (3.2439 g/mg) con lo que se demuestra que la extracción de acetogeninas a partir de la harina de semillas de guanábana mediante la extracción CO₂ en condiciones supercríticas con etanol como co-solvente se obtuvo una mayor cantidad de acetogeninas.

Tabla 10. Yang *et al.*, 2009. Comparación en contenido de acetogeninas en anonáceas

Muestra	Contenido de acetogeninas
<i>A. squamosa</i>	2.29 mg/g
<i>A. glabra</i>	1.82 mg/g
<i>A. muricata</i>	1.68 mg/g
<i>A. reticulata</i>	1.67 mg/g
<i>A. bullata</i>	1.70 mg/g

1.14 Balance de materia de acetogeninas totales en semillas de guanábana

Balance de materia



Conclusión

Es muy importante desengrasar la harina de semilla de *Annona muricata* porque las grasas interfieren en la cuantificación de acetogeninas debido a que éstas reaccionan con el hidróxido de potasio contenido en el reactivo de Kedde, la extracción de acetogeninas se facilitó considerablemente mediante el uso de CO₂ como disolvente y etanol como co-solvente en condiciones supercríticas de la harina de semilla desengrasada, se obtuvo 21 veces más la extracción de acetogeninas con CO₂ en condiciones supercríticas y etanol como co-solvente respecto al método de extracción soxhlet como etanol como disolvente.

Referencias bibliográficas

- Alali Q, Liu Xiao-Xi, McLaughlin Jerry, (1999). Annonaceous acetogenins: Recent progress. Purdue University, West Lafayette, Indiana. *J. Nat. Prod.* 1999, 62 504-540.
- Álvarez, B., Espejo, G. Z., Franco, F. G., Velásquez, P., & Gonzales, M. S. (2002). *Annona cherimolia* Miller “chirimoya” y *A. muricata* Linneaus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de *Anopheles sp.* 9(2), 64–73.
- Arroyo J., Prashad M., Vásquez Y., Li E., Tomás G. (2005). Actividad citotóxica in Vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria Lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(4), 247–253. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2005.224.1002>.
- Aguilar-Hernández, G., De Los Ángeles Vivar-Vera, M., De Lourdes García-Magaña, M., González-Silva, N., Pérez-Larios, A., & Montalvo-González, E. (2020). Ultrasound-assisted extraction of total acetogenins from the soursop fruit by response surface methodology. *Molecules*, 25(5), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules25051139>.
- Avula, B., Bae, J. Y., Majrashi, T., Wu, T. Y., Wang, Y. H., Wang, M., Khan, I. A. (2018). Targeted and non-targeted analysis of annonaceous alkaloids and acetogenins from *Asimina* and *Annona* species using UHPLC-QToF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 159, 548–566. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.030>
- Ciencias, R. B. I. O. (2007). *Antibacterial , antifungal , antioxidant and toxic effect of fractioned extracts from Soursop pulp . Efecto antibacterial , antifúngico , antioxidante y tóxico de extractos fraccionados de pulpa de Guanábana .* 52(311), 1–17.
- Coêlho de Lima, M. A., & Alves, R. E. (2011). Soursop (*Annona muricata* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1533/9780857092618.363>

- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662–691. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>.
- Dorado, D. J., Hurtado-Benavides, A. M., & Martínez-Correa, H. A. (2016). Extracción con CO₂ Supercrítico de aceite de semillas de guanábana (*Annona muricata*): Cinética, perfil de ácidos grasos y esteroides. *Informacion Tecnologica*. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500005>
- Evaluation, M. L. S., Da, L. A., & Prateleira, V. D. E. (2017). Scientific Communication Dehydration and Spraying of Buriti Pulp. *Rev. Bras. Frutic*, 39, 1–7. <https://doi.org/10.1590/0100-29452017>
- Fang, X. -P, Rieser, M. J., Gu, Z. -M, Zhao, G. -X, & McLaughlin, J. L. (1993). Annonaceous acetogenins: An updated review. *Phytochemical Analysis*, 4(1), 27–48. <https://doi.org/10.1002/pca.2800040108>
- FAO, Analisis Proximales. (s.f.): <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab489s/ab489s03.htm>
- Fernandez AE, L., Ayerdi SG, S., Estrada RM, V., Vallejo LG, Z., E, Y., & Gonzalez E, M. (2017). In Vitro Antioxidant Capacity of Crude Extracts and Acetogenin Fraction of Soursop Fruit Pulp. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 08(06). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000550>
- G., A. Shittu., & E., S. Akor (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activities of the leaf extract of *Entandrophragma angolense*. *African Journal of Biotechnology*, 14(3), 202–205. <https://doi.org/10.5897/ajb2013.13237>.
- Gallego I, Castañeda D. (2004). Diseño conceptual de un sistema de extracción supercrítica, a escala blanco, utilizando dióxido de carbono como disolvente. Universidad EAFIT. Resumen de los trabajos de grado desarrollados en ingeniería de procesos durante el 2003. Medellín. 46-53

- Gomes, I. B., Trindade, R. C. P., Sant'Ana, A. E. G., Lemos, E. E. P. de, & Basílio Júnior, I. D. (2016). Bioactivity of microencapsulated soursop seeds extract on *Plutella xylostella*. *Ciência Rural*, 46(5), 771–775. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141701>
- Gonzalez, A. L. (2011). *Annonaceas, plantas antiguas, estudios recientes*. Tuxtla Gutierrez, Chiapas, Mexico: UNICACH-Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Gordon, J. J. (1996). Variations in biological activity of *Asimina triloba*. *Nat. Prod. Rep.*, 609-612.
- Gromek, D., Hocquemiller, R., & Cavé, A. (1994). Qualitative and quantitative evaluation of annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 5(3), 133–140. <https://doi.org/10.1002/pca.2800050309>
- Hincapié Llanos, C. A., Lopera Arango, D., & Ceballos Giraldo, M. (2008). (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 76–82.
- Jiménez Zurita, J. O., Balois Morales, R., Alía Tejacal, I., Juárez López, P., Sumaya Martínez, M. T., & Bello Lara, J. E. (2016). Caracterización de frutos de guanabana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México* Characterization of soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Tepic, Nayarit, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(41), 1261–1270.
- Kojima, N. T. (2009). Medicinal Chemistry of Annonaceous Acetogenins: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Analogues. *Molecules*, 14(9), 3621- 3661.
- Kuwabara, K. T. (2000). Design syntheses and mitochondrial complex I inhibitory activity of novel acetogenin mimics. *Eur. J. Biochem*, 207, 2538-2546.
- Laboureur, L., Bonneau, N., Champy, P., Brunelle, A., & Touboul, D. (2017). Structural Characterisation of Acetogenins from *Annona muricata* by Supercritical Fluid Chromatography Coupled to High-Resolution Tandem Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. <https://doi.org/10.1002/pca.2700>

- Lage, H. (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents*, 22(3), 188-199.
- León, A., Obledo, E., Vivar, M., Sáyago, S., Montalvo, E., (2017). Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(1), 1–8. <https://doi.org/10.1590/0100-29452017358>.
- Li, D. Y., Yu, J. G., Zhu, J. X., Yu, D. L., Luo, X. Z., Sun, L., & Yang, S. L. (2001). Annonaceous acetogenins of the seeds from *Annona muricata*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 3(4), 267–276. <https://doi.org/10.1080/10286020108040366>.
- Liaw, C. C., Liou, J. R., Wu, T. Y., Chang, F. R., & Wu, Y. C. (2016). Acetogenins from Annonaceae. In *Progress in the chemistry of organic natural products* (Vol. 101). https://doi.org/10.1007/978-3-319-22692-7_2.
- Luque de Castro M.D, Valcárcel M, Tena M.T. (1993). Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. España: Reverté.
- Mariana, E., Vit, P., & Santiago, B. (2014). Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*, 39, 350–353. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33930879008.pdf>
- Márquez, A., Lara, O., Esquivel, R., Mata, E., (1999). Plantas medicinales de México II Composición, uso y Actividad biológica. Ed. UNAM. México, D.F. 49-51
- Martin, S. J., & Green, D. R. (1994). Apoptosis as a Goal of Cancer Therapy. *Curr Opin Oncol*, 6, 616 – 621.
- Mendez, J., Gutierrez, R., Lazalde, B., Rodriguez, E., & Reyes, C. (2015). USOS TERAPÉUTICOS DE LA GUANABANA (*Annona muricata*). *XII Encuentro Participacion de La Mujer En La Ciencia*, (Figura 1), 5.

- Mendiola J.A. (2008). Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. (Tesis doctoral). Universidad autónoma de Madrid.
- Mishra, S., Ahmad, S., Kumar, N., & Sharma, B. K. (2013). *Annona muricata* (The cancer killer): A review. *The Global Journal of Pharmaceutical Research*, 2(1), 1613–1618.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625–15658. <https://doi.org/10.3390/ijms160715625>.
- Raybaudi-Massilia, R., Suárez, A., Arvelo, F., Sojo, F., Mosqueda-Melgar, J., Zambrano, A., & Calderón-Gabaldón, M. (2015). An Analysis In-vitro of the Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Annona muricata* L. Seed and Pulp. *British Journal of Applied Science & Technology*, 5(4), 333–341. <https://doi.org/10.9734/bjast/2015/13587>.
- Rieser, M. G. (1996). Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. *Nat. Prod. Rep.*, 59, 100-108.
- Rodríguez- Couto S., Sanromán A., (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22: 211–219.
- Rupprechet, J. H. (1990). Annonaceous Acetogenins: A Review. *Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences. Purdue University, West Lafayette. Indiana- Nat. Prod. Rep.*, 53.
- Schlie-Guzmán, M. A., González-Esquinca, A. R., & Luna-Cazáres, L. M. (2009). Las acetogeninas de annonaceae: Efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 8(4), 245–257.
- Seoane, G. B. (2014). *Síntesis Química de anillos THF presentes en acetogeninas*. Departamento de Química- Universidad de la Republica.

- Tormo, J. D.-P. (2005). In vitro antitumor structure-activity relationships of threo/trans/threo/trans/erythro bis-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Oncol Res.*, 15(3), 129-38.
- Tormo, J. E.-P. (2001). Gamma-lactone-Functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett.*, 11(5), 681-4.
- U. Hölker, M. Hofer and J. Lenz, (2004). *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 175.
- Valverde A. (1995). Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas. En: Valverde A y Fernandez-Alba A.R. Residuos de plaguicidas '94. Almería: IEA/UAL/COEXPHAL; p.141-154.
- Varshosaz, J., Alinagari, R. (2005). Effect of citric acid as cross-linking agent on insulinloaded chitosan microspheres. En: *Iranian Polymer Journal*. 14 (7):647-656.
- Yang, H., Li, X., Tang, Y., Zhang, N., Chen, J., & Cai, B. (2009). Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in Annona genus plant seeds by HPLC-DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(1), 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.055>
- Ye, Q., Zhao, G., & McLaughlin, J. L. (1996). Loncigin and Goniothalamycinone, bioactive Mono-tetrahydrofuran Acetogenins from *Asimicina longifolia*. *Nat. Prod. Rep.*, 85, 100-108.
- Zeng, L., McLaughlin, J. L., & Johnson, H. A. (1998). Muricoreacin and murihexocin, MTF acetogenin from the leaves of *Annona muricata*. *Nat. Prod. Rep.* , 14, 275-306.

