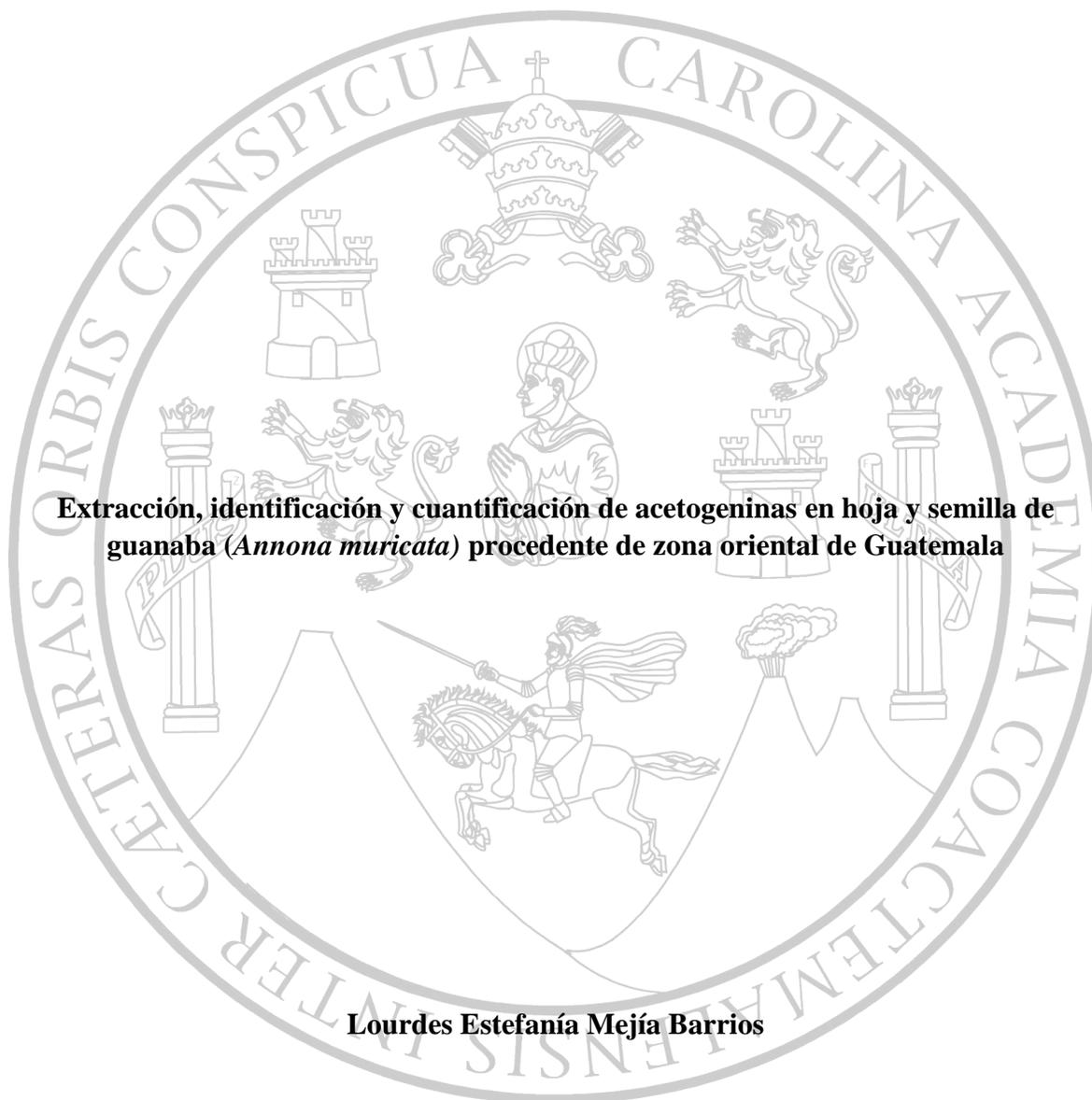


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



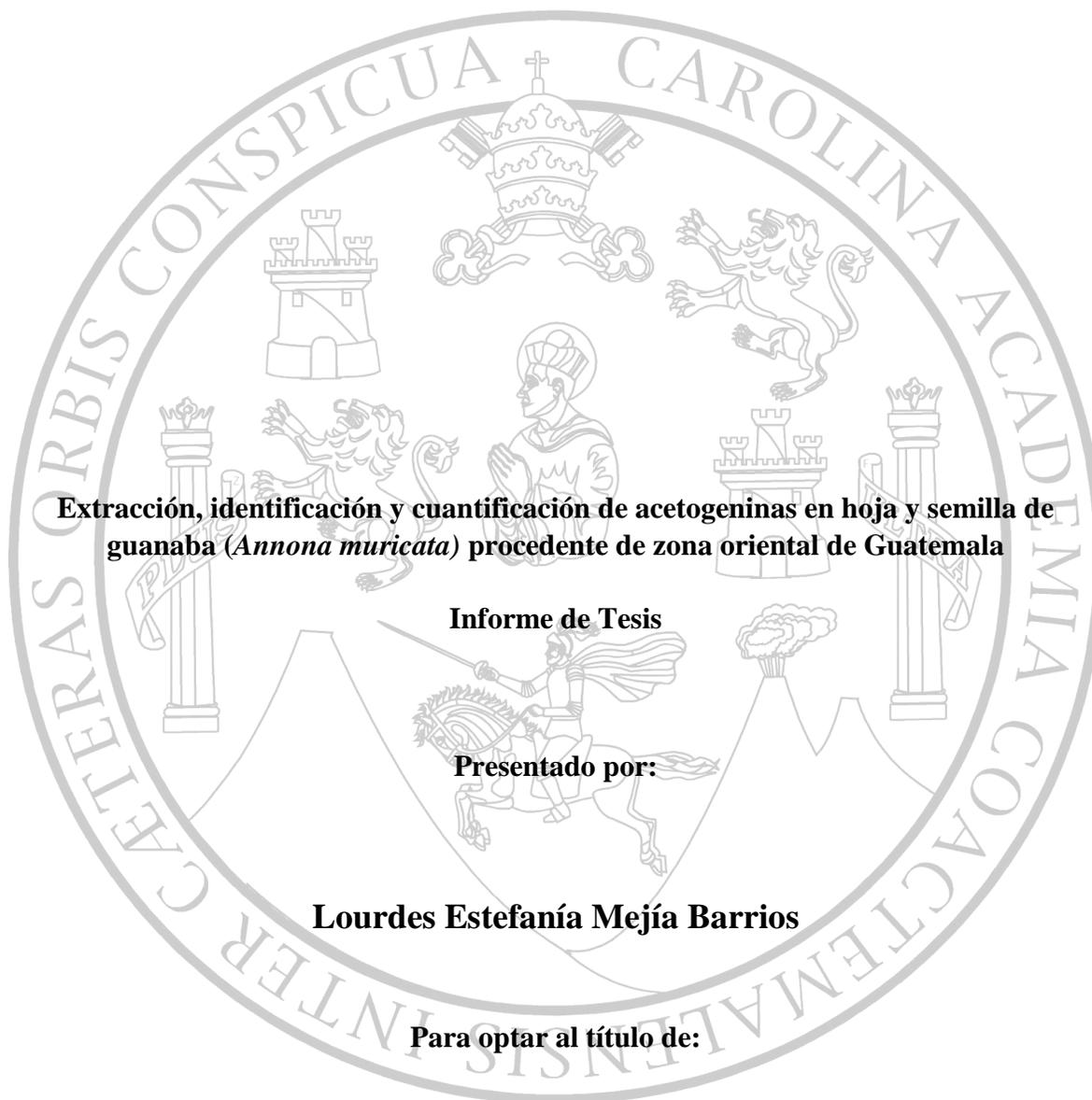
Extracción, identificación y cuantificación de acetogeninas en hoja y semilla de guanaba (*Annona muricata*) procedente de zona oriental de Guatemala

Lourdes Estefanía Mejía Barrios

Química Farmacéutica

Guatemala, septiembre de 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Extracción, identificación y cuantificación de acetogeninas en hoja y semilla de
guanaba (*Annona muricata*) procedente de zona oriental de Guatemala**

Informe de Tesis

Presentado por:

Lourdes Estefanía Mejía Barrios

Para optar al título de:

Química Farmacéutica

Guatemala, septiembre de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

DEDICATORIA

A Dios, Por ser mi pilar, por ser la luz de entendimiento y sabiduría, por guiarme en la vida y darme todo lo necesario para seguir en la lucha por mis objetivos.

A mis padres, Oscar Mejía y María Eugenia de Mejía, por brindarme siempre su amor y apoyo incondicional. Por ser un ejemplo de vida, de sacrificio y esfuerzo. Por exaltarme siempre a la superación personal y demostrarme que con trabajo cada meta propuesta puede ser lograda.

A mis hermanas, Sofía, por ser el ejemplo de hermana mayor que mis padres pidieron para mí e ir más allá de éste. Por cuidarme siempre, por su apoyo y amor. A María Eugenia por su cariño y apoyo a lo largo de estos años. Por demostrarme que la madurez es impuesta por uno mismo y no por la edad.

A mi abuela, Consuelo (Mamá Cony) por cuidarme y velar para que no me faltara nada en mi infancia, por creer en mis sueños de niña y apoyarlos. Por sacar lo mejor de mi cuando el momento lo ameritaba. Gracias hasta el cielo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas las bendiciones derramadas en mi vida, por darme la sabiduría y el entendimiento necesario para culminar esta fase. Por mi familia y las personas puestas en mi camino que hicieron que todo fuera más fácil de realizar.

A mi padre, por ser el ejemplo de trabajo y esfuerzo para mi vida. Por apoyarme en cada momento de esta carrera universitaria, por estar conmigo, aunque el cansancio se hiciera presente.

A mi madre, por su amor y apoyo incondicional, por creer en mí en todo momento. Por hacerme ver que cada meta propuesta puede ser alcanzada. Por ser ejemplo de trabajo, superación y liderazgo. Por la confianza puesta en mí para finalizar la carrera universitaria.

A mis hermanas, por demostrarme siempre su cariño, por corregirme si era necesario y por sus ejemplos de esfuerzo y perseverancia. Por estar conmigo y apoyarme desde el momento que elegí esta carrera.

A mis amigos, por hacer más amena y alegre la estancia a lo largo de la carrera universitaria, por el apoyo brindado por todos, por creer en que siempre se puede dar más para lograr nuestras metas. Por estar directa o indirectamente a mi lado. Por cruzar o romper largas distancias y mostrar su cariño.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Por brindarme conocimientos, bases y herramientas necesarias para llegar a ser un profesional con ética y valores. Por darme la preparación necesaria para retribuir a mi país a través de lo adquirido.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por ser mi alma máter, por permitirme ingresar para adquirir todo el conocimiento necesario para llegar a ser profesional más para Guatemala.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Clasificación Botánica de las Annonaceae.....	4
3.3. Clasificación botánica	5
3.3.1. La semilla como reservorio	6
3.5. Origen y diversidad de la especie.....	7
Distribución geográfica de <i>Annona muricata</i>	8
3.6. Compuestos activos de las Annonaceae.....	9
3.7. Clasificación de las Acetogeninas de Annonaceae	9
3.8. Estudio fitoquímico de <i>Annona muricata</i>	10
3.9. Acetogeninas (ACG).....	11
3.9.1. Características estructurales	11
3.10. Separación e identificación de las Acetogeninas.....	12
3.11. Actividad biológica Biopesticida	13
3.11.1. Actividad biológica de las Acetogeninas de Annonaceae	13
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. OBJETIVOS	26
5.1. OBJETIVO GENERAL	26
Extraer e identificar acetogeninas a partir de semillas y hojas de <i>Annona muricata</i> de cuatro departamentos de Guatemala para la selección del mejor cultivar.....	26
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5.2.1. Separar y determinar ACG de los extractos de semillas y hojas por medio de HPLC/UV-VIS.	26
5.2.2. Caracterizar las ACG y cuantificarlas mediante un estándar externo por medio de HPLC. ...	26
5.2.3. Comparar las ACG identificadas en cada uno de los extractos de semillas y hojas de <i>A. muricata</i> en base a su procedencia.	26
6. HIPÓTESIS	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.2. Muestra	28

7.3.	Recursos	28
7.4.	Metodología	29
7.4.2.	Secado y molienda	29
7.4.6.	Separación de ACG por el método cromatográfico mediante HPLC.....	33
7.4.8.	CUANTIFICACIÓN DE ACG.	33
9.	RESULTADOS	35
10.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
11.	CONCLUSIONES	51
12.	RECOMENDACIONES	53
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
14.	ANEXOS	57

1. RESUMEN

Se estudió la especie *A. muricata* del género *Annona* de la familia *Annonaceae* con el fin de extraer, identificar y cuantificar acetogeninas (ACG) a partir de sus semillas y hojas, y así comparar y determinar diferencias entre los grupos.

Se colectaron muestras de la especie en estudio en diferentes departamentos del país dentro de la zona central y oriental (Siquinalá, Escuintla; Guazacapán, Santa Rosa; Finca Patache, El Progreso; Yalcachimba, Guatemala).

Se realizó la extracción de aceite fijo mediante extracción continua, utilizando el equipo soxhlet con hexano como solvente y se concentró por medio de rotaevaporación. El mayor rendimiento de aceite para las semillas de *A. muricata* fue de Guazacapán, Santa Rosa (21.4%) y el de menor rendimiento fue Finca Patache, El progreso (20.9%). Para las hojas de *A. muricata*, el mayor rendimiento fue de Guazacapán, Santa Rosa (14.8%) y el menor fue El Progreso (12.9%). En cuanto a los extractos diclorometánicos, el mayor rendimiento para las semillas fue Guazacapán, Santa Rosa (10.80%) y el menor rendimiento lo tuvo Yalcachimba, Guatemala (10.67%). Y para las hojas, el extracto diclorometánico con mayor rendimiento fue el de Santa Rosa (7.22%) y el menor El Progreso (5.52%).

Para la caracterización química de ACG, se realizó un análisis preliminar por medio de cromatografía en capa fina, en la cual se pudo observar manchas continuas de color rosado en la trayectoria de cada muestra sin R_f medible. Al presentar los extractos la coloración rosada con el reactivo de Kedde se indicó la posible presencia de compuestos como las acetogeninas con anillo γ -lactónico α,β -insaturado particularmente.

Se realizó una la curva de calibración a partir de siete diluciones del patrón de bulatacina (acetogenina), con su ecuación y coeficiente de correlación (R^2). Al obtener un coeficiente de correlación aproximadamente de 1, indicó una relación lineal entre las variables. Por lo que se utilizó posteriormente para la cuantificación de acetogeninas de los extractos de semillas y hojas de *A. muricata*.

Se realizó un barrido de cada extracto de semilla y hoja de las diferentes procedencias en un espectrofotómetro, en el cual se determinó que la máxima absorbancia era una longitud de onda de 205 nm. La cual se tomó como referencia para realizar posteriormente el análisis de los extractos por HPLC.

Se caracterizaron y cuantificaron ACG en semillas *A. muricata* por medio del método del estándar externo por HPLC y la normalización de áreas, y se pudo observar que en Escuintla la mayor concentración fue (1.06 μ g) y la menor (0.15 μ g). Santa Rosa, la mayor concentración (0.62 μ g) y la menor (0.11 μ g). El Progreso, la mayor concentración (0.84 μ g) (0.143 μ g). Guatemala con la mayor concentración (0.54 μ g) y la menor (0.24 μ g).

Al cuantificar ACG en hojas por estándar externo y normalización de áreas se observó a Escuintla con la mayor concentración de (1.24 μ g) y menor (0.24 μ g). Santa Rosa, la

mayor (0.40 μg) y la menor (0.08 μg). El Progreso, la mayor concentración (15.32 μg), y la menor 4 (0.86 μg). Guatemala, la mayor concentración (0.59 μg) y la menor (0.013 μg).

No existe diferencia significativa en la cantidad de ACG detectada en semillas de *A. muricata* de las diferentes procedencias del país.

Existe diferencia significativa en la cantidad de ACG detectada en hojas de *A. muricata* de las diferentes procedencias del país.

La concentración de ACG en hojas de *A. muricata* resultó mayor que la concentración de ACG en semillas, específicamente se observó que es mayor en la región oriental del país sobre la central.

El objetivo de extraer, identificar y cuantificar ACG a partir de semillas y hoja de *A. muricata* de diferentes procedencias fue alcanzado y se pudieron generar datos para su comparación.

2. INTRODUCCIÓN

La familia Annonaceae que consta de 130 géneros y 2,300 especies, es químicamente una de las familias de plantas tropicales menos conocidas. Estudios fitoquímicos y en menor extensión estudios farmacológicos sobre especies de Annonaceae han sido intensificados en los últimos 15 años. Este interés es en gran parte debido al descubrimiento de las acetogeninas de Anonáceas, una clase de compuestos naturales con gran variedad de actividades biológicas.

Entre las actividades biológicas de las Anonáceas cabe destacar su actividad plaguicida y larvicida, por lo que los estudios se han enfocado más en la actividad biopesticida. Ya que los mosquitos son una plaga en todo el mundo, debido a las enfermedades transmitidas a los seres humanos procedentes de mamíferos o aves que migran de un lugar a otro. En muchos países, el empleo de agentes biológicos ha cobrado gran relevancia y se les considera con frecuencia alternativas ideales. Un ejemplo de estos agentes biológicos es la guanaba con su actividad plaguicida, los estudios en relación a esta actividad han mostrado efectos positivos contra insectos, como el mosquito trasmisor de la fiebre amarilla, las cucarachas, *Drosophila melanogaster* y algunas especies de arañas.

Los repelentes de insectos han sido definidos como compuestos químicos que producen en el insecto movimientos orientados que lo alejan de la fuente emisora. Sin embargo algunos de estos productos han resultado tener toxicidad en los humanos después de la exposición dérmica prolongada aunque demuestren efectividad frente a las plagas. Por lo que se ha buscado el uso de productos naturales que tengan la misma efectividad y una toxicidad nula en los humanos. Hoy en día entre los compuestos de origen natural se cuentan muchos aceites esenciales de plantas y sus componentes.

Las acetogeninas son una clase exclusiva de productos naturales de la familia Annonaceae, que han resultado ser prometedoras para ser utilizadas como agentes antitumorales, prototipos y pesticidas.

Ya que Guatemala cuenta con una abundante y diversa flora, y para la obtención de especies que se puedan utilizar en estudios se utilizan prácticas etnobotánicas y bioprospección, por medio de sus extractos.

Por todo lo anterior, se buscó extraer, identificar y cuantificar acetogeninas por métodos establecidos, tanto de la semilla como de la hoja de guanábana, enfocándose en las acetogeninas identificadas con mayor actividad biopesticida según estudios previos, las cuales son, asimicina, esquamocina y anonacina. La fruta fue procedente de la zona oriental de Guatemala. A través de la extracción del aceite de la semilla y la hoja de la guanaba (*Annona muricata*), así como de su identificación y cuantificación se podrá tener un porcentaje de las acetogeninas mencionadas pertenecientes a esta especie y poder comparar así con la literatura pertinente.

3. ANTECEDENTES

3.1. Clasificación Botánica de las Annonaceae

La familia Annonaceae cuenta con 130 géneros y se estima que hay 2,300 especies en el mundo. Entre ellas hay numerosos frutales, especialmente en los géneros *Annona* y *Rollinia*; la mayoría de las especies del género *Annona* y todas las del género *Rollinia* son originarias del Nuevo Mundo.

El género *Annona* se caracteriza por tener sus hojas alternas, simples, enteras, finas o coriáceas, decíduas o persistentes y sin estípulas. Las flores son bisexuales, con frecuencia en tonos de color café y amarillo, solitarias o en racimos, compuesta de 3 sépalos y 6 pétalos, generalmente el cáliz es tubular (Ávila, 2005).

Los estambres son numerosos, aglomerados, con filamentos carnosos portando anteras largas y espirales. La fruta es grande, carnosa, estando formada por la fusión de los pistilos y los receptáculos.

Los indígenas cultivaron cuidadosamente muchas de ellas, en Mesoamérica, los valles interandinos, Amazonia y otros lugares. Hay tres especies, *Annona cherimola*, *A. muricata* y *A. squamosa*, marginales en varias regiones de América tropical; otras tres, *A. diversifolia*, *A. reticulata* y *A. scleroderma* en cambio, han sido marginadas, a pesar de su valor intrínseco y potencial como fruta fresca (Cabra, 2002).

3.2. *Annona muricata*



Figura 1. *Annona muricata* (Pérez, 2010).

La *Annona muricata* es comúnmente conocida como guanábana. Su origen no se conoce con certeza, sin embargo, actualmente se cultiva en América tropical, el sudeste Asiático y en las islas Filipinas. Dentro de la medicina tradicional las hojas se usan en infusión como antidiarreicas y como digestivas. Aplicadas localmente como cataplasma, son antiinflamatorias y se han empleado en el caso de las paperas (Marmara, 2004).

Las flores son pectorales y febrífugas, por lo que se usan en tisana en casos de gripe y catarro bronquial. Poseen propiedades astringentes, colagogas (facilitan el vaciamiento de la vesícula biliar), digestivas, y también vermífugas. Se recomienda a los hipertensos, obesos, cardíacos, y diabéticos (Méndez, 2003).

3.3. Clasificación botánica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona muricata*



Figura 2. Frutos de *A. muricata* (Lyncott, 2009).

Fenología

Árbol de 3 a 8 m de altura, sus hojas tienen formas elípticas de 6 a 12 cm de largo por 2.5 cm de ancho, con el haz de color verde brillante y el envés amarillo mate. Su tronco es ramificado en la base y despide mal olor cuando se le tritura. Sus ramas son cilíndricas, arrugadas, ásperas de color café rojizo y con numerosas lenticelas. La fructificación comienza entre 3-5 años y alcanza su pleno desarrollo a los 6-8 años, según las condiciones de clima y suelo (García, 2006).

Flores

Posee flores solitarias a lo largo del tallo, 3 sépalos ovados de menos de 5mm de largo; 6 pétalos, 3 exteriores ovalados, libres y gruesos de 2 a 3 cm de largo, 3 interiores delgados y pequeños. Las flores, hermafroditas, se forman sobre ramitas cortas auxiliares o directamente sobre el tronco. Poseen tres sépalos color verde oscuro y seis pétalos de color cremoso. Los estambres son numerosos y dispuestos alrededor de los pistilos. Tienen abundantes ovarios (García, 2006)

Semillas

Sus semillas son ovoides y aplanadas, de 15 a 20 mm de largo con testa oscura y brillante, una por carpelo (García, 2006).



Figura No. 3 Semillas *A. muricata* (Conabio, 2000).

Fruto

El fruto es verde oscuro, carnoso, cubierto con tubérculos flexibles con aspecto de espinas; su pulpa es blanca algodonosa y jugosa. El fruto verde presenta olor fuerte, el cual se torna suave y agradable a medida que avanza la maduración. La pulpa contiene numerosas semillas alargadas, de forma ovoide y comprimida con endospermo de construcción complicada y variable, de color oscuro brillante, con una longitud aproximada de dos centímetros. El fruto es de forma ovoide, acorazonada o irregular, de color verde oscuro brillante, cuando tierno, y verde mate cuando está maduro. Su longitud varía entre 15-30 centímetros y su diámetro entre 10-20 centímetros; puede llegar a pesar cuatro kilogramos o más.

La corteza es débilmente coriácea, erizada de espinas carnosas y de sabor amargo. La pulpa es blanca, blanda, carnosa, jugosa de sabor muy agradable y ligeramente ácida. (García, 2006).

3.3.1. La semilla como reservorio

La semilla es el primordio seminal fecundado y maduro. Los tejidos que formaban la nucela, que estaban agrupados en dos capas, primaria y secundaria, se transforman respectivamente en tegmen (interior) y testa (exterior), que son las dos cubiertas de la semilla, cuyo conjunto forma el epispermo. En el interior de la semilla se encuentra el embrión, procedente de la fecundación del gameto femenino (oosfera) por el masculino (núcleo espermático); su forma es la de una plantita en miniatura. Rodeando al embrión se encuentra el endospermo o albumen, con funciones de reserva. A veces entre el epispermo y el endospermo se desarrolla un tejido de reserva que se denomina perispermo (Flórez, 2010).

En el embrión se puede distinguir la gémula o yema Terminal del brote, una radícula o raíz inicial y los cotiledones, en número de uno, dos o más. Los cotiledones son las hojas iniciales y pueden tener funciones de asimilación fotosintética en el inicio de la germinación, funciones de reserva o ambas (Flórez, 2010).

3.3.2. Sexualidad

Planta hermafrodita. Presenta protógina, las estructuras femeninas maduran antes que las masculinas; existe un período de 36 a 48 horas durante el cual se encuentran maduras ambas estructuras sexuales.

Las flores de las anonáceas son dicógamas y protógenas. Dicógamas: aunque sus flores son perfectas, sus órganos sexuales no maduran al mismo tiempo. Protógenas: durante el período en que la flor permanece abierta, los estigmas solo están receptivos al principio mientras que los estambres sueltan el polen más tarde, impidiendo la autopolinización, o sea, los pistilos están maduros y son receptivos, mientras tanto los estambres aún no están maduros y por lo tanto no liberan polen (Conabio, 2000).

3.4. Composición química, nutricional y principales usos

Entre sus atributos están su valor nutritivo, los bajos niveles de grasa, altos contenidos de sales minerales y carbohidratos. Se obtiene 28,5 mg por porción de 100 g de pulpa de promedio de calcio. La guanaba también es rica en fósforo, con un promedio de 35,2 g/100 g de porción comestible, contenido que se da en pocas frutas. En cuanto a las vitaminas del complejo B, la guanaba y el pepino dulce son los frutos que contienen mayor cantidad de tiamina y junto al aguacate son los frutos que tienen una alta concentración de riboflavina. Por último la guanaba tiene una alta concentración de niacina. También es rica en proteína, de 1 a 2,9 g por porción de 100 g comestibles (Castro 2007).

Es un fruto para consumir como “fruta fresca” o “fruta de mesa” y en ensaladas de frutas o agregando su pulpa a jugos de otras frutas. Rico en azúcares solubles y vitamina C, por lo que su pulpa, además de ser muy blanca y cremosa, blanda y aromática, es también muy dulce, con una acidez poco perceptible. Además de su consumo fresco, es también posible consumirla procesada, en forma de yogur, helados y otros tipos de postres.

Debido a su contenido de componentes activos, la guanaba, posee propiedades insecticidas por la presencia de diversos compuestos como los alcaloides muricina y muricinina, las acetogeninas, flavonoides, entre otros. Las semillas pulverizadas son utilizadas para matar piojos, chinches, polillas y cucarachas entre otros insectos (Castro, 2007).

3.5. Origen y diversidad de la especie

La mayoría de las especies del género *Annona* de la familia Annonaceae, han tenido su origen en América tropical y subtropical; otras lo son de África, y su cultivo se ha extendido a todos los continentes.

La guanaba es oriunda y muy común en América tropical y las islas del Caribe. De América fue llevada a otros países y continentes, como China, Australia y África. Se cultiva a menos de 300 m de altura sobre el nivel del mar en suelos variados y requiere alrededor de 100 mm. de precipitación anual. Es muy susceptible a las heladas (Orellana, 2005).

Figura No. 4 Distribución de *Annona muricata* L. en Guatemala. (Superficie en hectárea y producción en kilogramos).

Departamento y cultivo	Número de Fincas	Superficie cultivada			Número de Plantas dispersas	Producción Obtenida (kg)
		Total (ha)	Con Plantación en edad			
			Productiva (ha)	No Productiva (ha)		
Guatemala	12	2.1	1.4	1.4	31	772.73
El Progreso	39	0	0	0	121	1,954.55
Sacatepéquez	1	1.4	0	1.4	0	0
Chimaltenango	5	0	0	0	22	272.73
Escuintla	70	0	0	0	403	3,454.55
Santa Rosa	51	2.8	1.4	1.4	97	2,863.44
Sololá	0	0	0	0	0	0
Totonicapán	0	0	0	0	0	0
Quetzaltenango	56	1.4	1.4	0	119	2,136.36
Suchitepéquez	35	0	0	0	87	772.73
Retalhuleu	114	2.1	1.4	0.7	246	3,272.73
San Marcos	31	9.1	9.1	0	132	3,590.91
Huehuetenango	5	0	0	0	11	136.36
Quiché	13	0	0	0	60	272.73
Baja Verapaz	42	0	0	0	152	1,636.36
Alta Verapaz	109	2.8	2.8	0	409	6,136.36
Petén	96	1.4	0.7	0.7	449	7,727.27
Izabal	50	2.8	2.8	0.7	133	3,409.09
Zacapa	26	0	0	0	47	818.18
Chiquimula	35	0.7	0.7	0	120	1,272.73
Jalapa	8	0	0	0	27	181.82
Jutiapa	24	0	0	0	53	1,500.0
Total Republica	822	26.6	21.7	5.6	2,719	42,181.83

(INE, 2004)

Distribución geográfica de *Annona muricata*

Especie	Departamento	Altura (m)
<i>A. muricata</i>	Jutiapa, Chiquimula	600 o menos
	Santa Rosa, Jalapa, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Guatemala, Chimaltenango, Sololá, Quiché, Huehuetenango, Totonicapán, San Marcos	900 – 1,800 a veces hasta 2,400
	Izabal, Chiquimula	Elevaciones bajas a veces hasta 1,200
	Petén, El Progreso, Escuintla, Retalhuleu	1,200 o menos

(García, 2006).

3.6. Compuestos activos de las Annonaceae

Los compuestos de interés por su comprobada actividad biológica presentes en las Annonaceae se conocen como acetogeninas, estas son un grupo de sustancias conformadas por una cadena larga de C-32 o C-34 de ácidos grasos que pueden estar combinados con una unidad 2-propanol en el C-2 para formar una γ -lactona; las cuales presentan diferentes bioactividades como antitumoral inmunosupresiva, pesticida, antiprotozoal y antimicrobiana. De las Annonaceae, se han reportado numerosas acetogeninas aisladas e identificadas tales como la Uvaracina, la primera que fue aislada de la planta de *Uvaria accuminata* en 1982 (García, 2009).

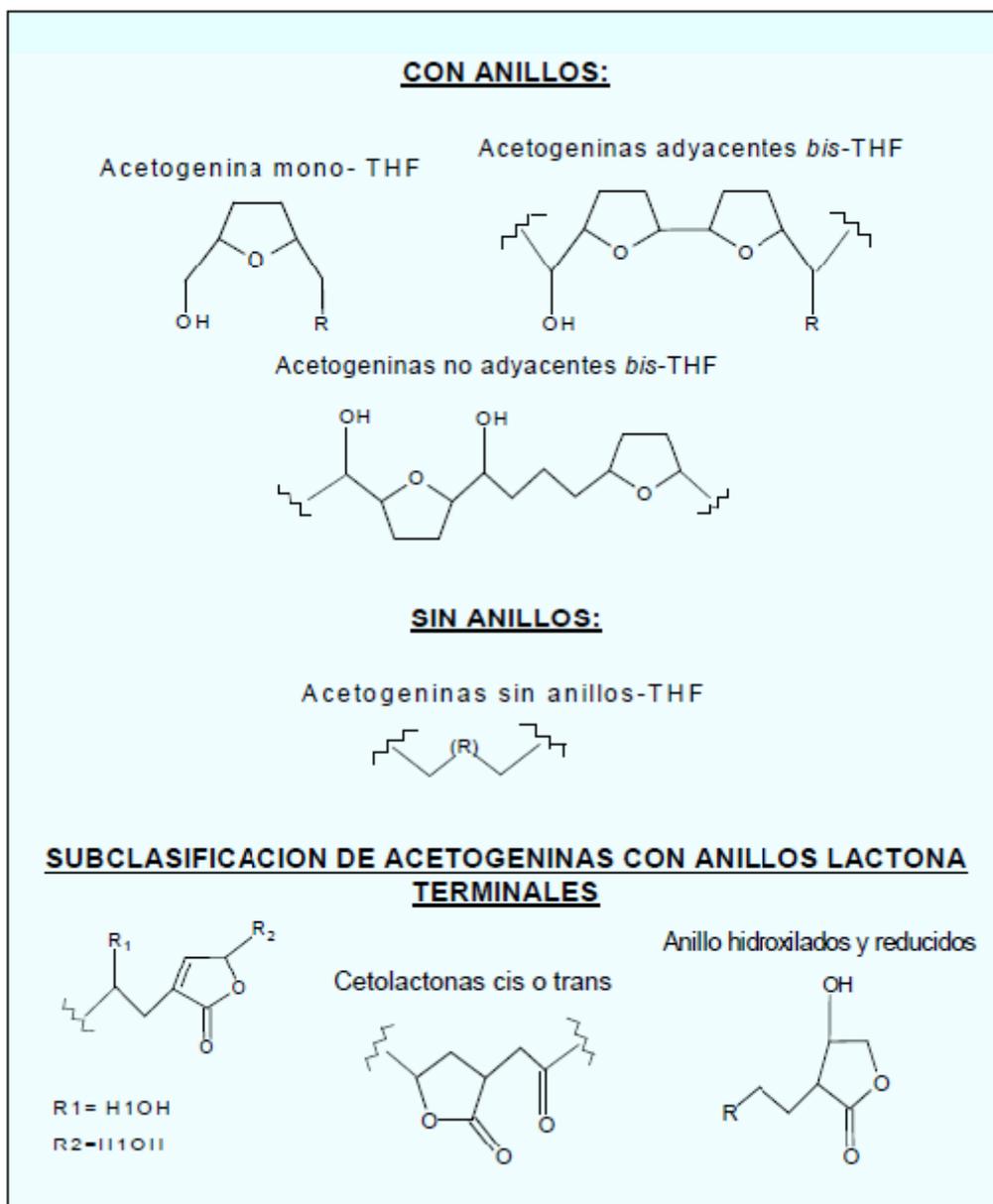
Se ha reportado que las acetogeninas de Annonaceae pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de células resistentes. Las acetogeninas son potentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una esencial enzima en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (García, 2009).

3.7. Clasificación de las Acetogeninas de Annonaceae

Las acetogeninas de Annonaceae se clasifican según la cantidad de anillos que tengan en su estructura, como son: Mono-Tetrahydrofurano (THF), adyacentes bis-THF, no adyacentes bis-THF y sin anillo mono-THF estas estructuras también poseen hidroxilos laterales los cuales pueden estar a uno u otro lado de la estructura, seguida por una subclasificación de las γ -lactonas o sustituidas por cetolactonas (Zeng, 2004).

Muchas acetogeninas de Annonaceae han sido encontradas y clasificadas por síntesis total o por el método de Ester Mosher (Zeng, 2004).

Figura No. 5 Clasificación de Acetogeninas de Annonaceae



(Rieser, 1996).

3.8. Estudio fitoquímico de *Annona muricata*.

Es una de las annonaceas ampliamente estudiadas, lo mismo que en el caso de *Annona cherimolia*, se han aislado metabolitos como alcaloides, ácidos grasos, amidas y ACG tanto de corteza, como de la semilla, el tallo y las hojas. En la siguiente tabla, se mencionan algunos de los compuestos aislados para esta especie (Poma, 2011).

Tabla No. 1 Compuestos aislados de *Annona muricata*

Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	Fuente	Actividad biológica reportada
Cis-annonacina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomuricin E	Acetogenina	Hoja	Citotóxica
Cohibina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Acetogenina	Acetogenina	Semillas	Larvicida
Ácido butanoico	Aceite	Semillas	-----
Javoricina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Motecristin	Precursor de acetogenina	Raíz	-----
Cis-solamin	Acetogenina	Raíz	Citotóxica
Acetogenina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica y larvicida
Annopentocina	Acetogenina	Hojas	Citotóxica
Longicin	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomutacin	Acetogenina	Hoja	Citotóxica y larvicida

(García, 2009).

3.9. Acetogeninas (ACG)

Las acetogeninas, son compuestos bioactivos presentes tanto en las raíces como en las semillas de algunas frutas, son componentes naturales los cuales presentan una extensa gama de actividades biológicas: antitumoral, citotóxica, antimicrobiana, plaguicida, antiprotozoaria y antihelmíntica (Flórez, 2010).

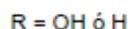
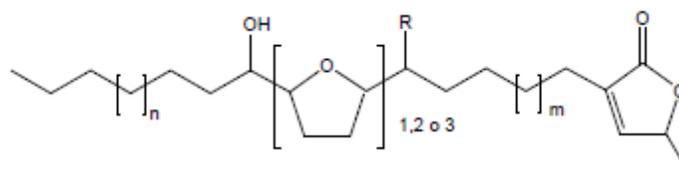
Se encuentran presentes en semillas de plantas de la familia Annonaceae como la *Annona cherimolia*, *Annona glabra*, *Annona muricata*, *Annona squamosa* y otras. Algunos estudios han sugerido que ciertas acetogeninas de la guanábana y de otras anonáceas tienen un excelente potencial como biopesticidas (Flórez 2010).

3.9.1. Características estructurales

Estructuralmente, las ACG son una serie de productos naturales de 35 o 37 carbonos derivados de ácidos grasos de 32 a 34 carbonos enlazados a una unidad de 2-propanol. Usualmente, se caracterizan por una larga cadena alifática unida en la parte terminal a un anillo de una γ -metil- γ -lactona- α,β -insaturada, uno, dos o tres anillos de tetrahydrofurano

(THF) y algunos sustituyentes oxigenados a lo largo de la cadena, particularmente alfa a un tetrahidrofurano, y en algunos casos puede contener dobles enlaces o epóxidos (Cave, 1997).

Figura No. 6 Estructura general de las ACG



(Cave, 1997).

En el caso de ACG con fórmula mínima C₃₅H₆₄O₇ se tienen reportes de diversas fuentes, donde la variación no solamente es la posición de los sustituyentes hidroxilo a lo largo de la cadena, sino también de la estereoquímica que presentan (Cave, 1997).

3.10. Separación e identificación de las Acetogeninas

Las acetogeninas de Annonaceae son fácilmente solubles en la gran mayoría de los solventes orgánicos. La extracción por etanol del material seco de la planta seguida por la partición de solventes para concentrar los componentes.

Se han reportado algunas técnicas nuevas para el aislamiento de acetogeninas a partir de la planta; siendo los más utilizados, la extracción por filtración en frío y la extracción en éter, hexano y etanol (García, 2009).

Se han reportado varias metodologías para la extracción de acetogeninas, las cuales se pueden obtener de las hojas, semillas y raíces.

Así mismo para la extracción de Acetogeninas de las semillas y hojas de *Annona muricata* se han dado a conocer varios procedimientos.

Para la extracción de acetogeninas de otras especies de la familia de Annonaceae como: *Annona crassiflora*, *Annona squamosa*, *Annona montana*, *Annona senegalensis*, *Rollinia mucosa*, *Annona bullata rich*, *Annona cherimola*, *Annona glauca*, *Annona reticulata* y *Annona atemoya*, se pueden encontrar varias metodologías (García, 2009).

Para la identificación de las diferentes acetogeninas es necesario conocer las configuraciones, la posición de los anillos, la posición de los diferentes grupos y el peso molecular de cada estructura para lo cual se han utilizado técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM).

Otra de las formas de identificación que viene siendo utilizada es el método del Ester Moshier, el cual permite la determinación estereoquímica absoluta por medio de epimeros y enantiomeros de las acetogeninas (García, 2009).

3.11. Actividad biológica Biopesticida

Los biopesticidas o Agentes de Control Biológico (ACB) son productos que contienen un ingrediente activo o bien se extraen de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Pueden estar constituidos por toda o una parte de la sustancia extraída, concentrada o no, adicionada o no a sustancias coadyuvantes.

Una gran variedad de biopesticidas naturales se han desarrollado y aprobado para el control de plagas de insectos, pestes y enfermedades bacterianas, estos nuevos derivados botánicos resultan más amigables con el medio ambiente, y además se pueden convertir en una herramienta útil para los cultivos de alimentos donde no se pueda fumigar (Guapacha, 2006).

3.11.1. Actividad biológica de las Acetogeninas de Annonaceae

Las acetogeninas de Annonaceae son sustancias que poseen dos importantes actividades biológicas, actividad citotóxica y actividad biopesticida; en la citotóxica se inhibe la enzima NADH en el complejo I en la cadena respiratoria mitocondrial, esta acción agota el ATP e induce en las células una muerte programada (apoptosis), se ha demostrado que las acetogeninas buscan selectivamente las células cancerígenas para atacarlas y las células normales permanecen intactas (Montoya, 2005).

La actividad biopesticida además de ser favorable para el medio ambiente, es una herramienta útil para los cultivos donde no se puede fumigar (Montoya, 2005).

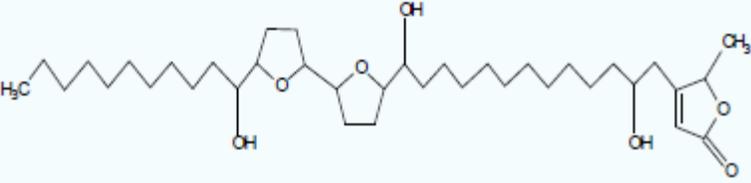
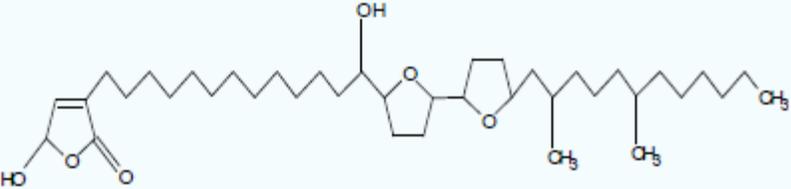
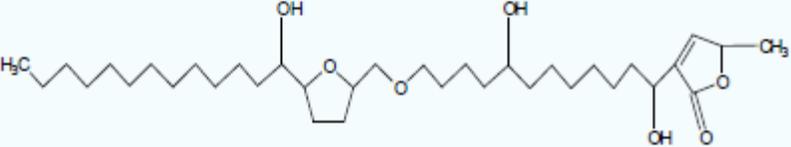
Tabla No. 2 Acetogeninas de *Annona muricata* con actividad biológica Biopesticida

Annonaceae	Acetogeninas aisladas
<p><i>Annona muricata</i> (Semillas)</p> 	<p>Annonacina Corossolina Corossolona Diepomuricanina Gigantetrocina Gigantetrocina A Gigantetriocina Muricatetrocina</p>

	Muricatetrocina A Murisolina Rolliniastatina 1 Rolliniastatina 2 Solamina
--	---

(Flórez, 2007).

Figura No. 7 Acetogeninas con mayor actividad biopesticida

ACETOGENINAS	ESTRUCTURAS
ACETOGENINAS DEL TIPO ASIMICINA Bullatacina o Asimicina, Rolliniastatina-1, Rolliniastatina-2.	 <p>The structure shows a long-chain polyketide with a methyl group (H₃C) at the left end, a hydroxyl group (OH) on the chain, a furanose ring, another hydroxyl group (OH), a second furanose ring, a third hydroxyl group (OH), and a terminal furanone ring with a methyl group (CH₃).</p>
SQUAMOCINA	 <p>The structure features a long-chain polyketide with a furanone ring at the left end containing a hydroxyl group (HO) and a carbonyl group (C=O). The chain includes a hydroxyl group (OH), two furanose rings, two methyl groups (CH₃), and a terminal methyl group (CH₃).</p>
ANONACINA	 <p>The structure consists of a long-chain polyketide with a methyl group (H₃C) at the left end, a hydroxyl group (OH), a furanose ring, an ether linkage, another hydroxyl group (OH), and a terminal furanone ring with a methyl group (CH₃) and a hydroxyl group (OH).</p>

(Bobadilla, 2002).

Los mosquitos son una plaga en todo el mundo, debido a las enfermedades transmitidas a los seres humanos procedentes de mamíferos o aves que migran de un lugar a otro. En

muchos países, el empleo de agentes biológicos ha cobrado gran relevancia y se les considera con frecuencia alternativas ideales. Un ejemplo de estos agentes biológicos es la guanaba con su actividad plaguicida, los estudios en relación a esta actividad han mostrado efectos positivos contra insectos, como el mosquito trasmisor de la fiebre amarilla, las cucarachas, *Drosophila melanogaster* y algunas especies de arañas.

Con base en los resultados observados se puede considerar que las ACG son un buen candidato para el desarrollo de plaguicidas. En este sentido también es pertinente mencionar que en algunas regiones de Sudamérica los aceites extraídos a partir de ciertas especies de Annonaceae son empleados como plaguicidas en forma tradicional (Villegas, 2013).

Se estima que hay 2,300 especies de Anonáceas en el mundo. Estos frutales en Guatemala tienen una notable diversidad y adaptación a diferentes ambientes, y son un material rico para trabajos de hibridación, selección y propagación vegetativa. El alto valor nutritivo de los frutos, sus sabores y aromas muy distintos, así como de formas y colores atractivos, justifican esos esfuerzos (García, 2006).

Guatemala por ubicarse tanto en el área tropical como subtropical, así como por sus rasgos topográficos adquiere condiciones ecológicas de gran significancia, importantes para el desarrollo de especies vegetales incluyendo la guanaba *Annona muricata* L. (Solís, 2010).

Estudios previos reportan la separación e identificación de acetogeninas en diferentes especies como *A. indica*, *A. muricata* y *C. papaya*, utilizando distintas partes de las mismas de las cuales se ha obtenido diferentes tipos de acetogeninas así como alcaloides libres que resultaron ser efectivos como insecticidas y larvicidas. La actividad de cada planta se incrementó en la semilla de estas ya que se observó una mayor cantidad de metabolitos secundarios.

En Guatemala no existen muchos estudios de la guanaba, pero se puede resaltar el siguiente:

“Efecto del ácido giberélico y agua a 4° c en la germinación de las semillas de guanaba (*Annona muricata* L.)”. En la evaluación del efecto del ácido giberélico y agua a 4° centígrados, en la viabilidad de la semilla de guanaba *Annona muricata* L. bajo condiciones de laboratorio se determinó la concentración de éste que incrementa la germinación de las semillas de guanaba. A cargo de Francisco José Ávila León en el año 2005 (Ávila, 2005).

Existen investigaciones a nivel internacional en estudios de la guanaba, entre las cuales se encuentran:

“Efecto insecticida de extractos vegetales, sobre larvas de *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) en laboratorio”. Los extractos de semillas de *Annona muricata* causaron porcentajes de mortalidad mayores que los frutos y hoja debido a la concentración de metabolitos secundarios acumulados en las semillas. Sin embargo, la obtención de semillas

es más difícil ya que se requiere de grandes cantidades de fruta para obtener un kilo de semillas. A cargo de Rebeca González Villegas en el año 2013 (Villegas, 2013).

“Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera”. Se obtuvieron y evaluaron extractos bioactivos de las semillas de la *Annona muricata* L. (Annonaceae) con el fin de proponer un uso potencial para su aprovechamiento. A cargo de Yesid Flórez Londoño en el año 2010 (Flórez, 2010).

“Pruebas de actividad biológica con dos organismos modelos en acetogeninas de Annonaceae con actividad biopesticida”. Se informó sobre pruebas de actividad biológica con dos organismos modelos *Artemia salina* y Mosquitos (Diptera: Culicidae), se seleccionó un método para la evaluación de la actividad biológica de las Acetogeninas de Annonaceae como biopesticida, y contribuir al aprovechamiento integral de subproductos de las Annonaceae. A cargo de Lina Marcela Flórez Acevedo en el año 2007 (Flórez, 2007).

“Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae)”. En la evaluación realizada todas las suspensiones mostraron toxicidad larvicida. Los resultados favorecen a la suspensión acuosa de las semillas, por ser un órgano de reserva con mayor probabilidad de contener los principios activos de *A. muricata*, en comparación a la corteza de raíces cuya toxicidad fue muy baja. La mortalidad varió en función a la parte vegetal, proporción de principios activos y variación de concentraciones. A cargo de Miguel Bobadilla en el año 2005 (Bobadilla, 2005).

“Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller “chirimoya” Y *A. muricata* Linnaeus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp”. Se demostró el efecto bioinsecticida 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*. A cargo de Miguel Álvarez Bobadilla en el año 2002 (Bobadilla, 2002).

“Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de “almendra” de guanábana (*Annona muricata*, L)”. A partir de la caracterización fisicoquímica del aceite de guanaba se encontró que las almendras de las semillas de guanábana contienen un porcentaje de aceite de 37.7% en base seca, mismo que tiene una composición con predominio de AG no saturados (principalmente oleico y algo de palmitoleico y linoleico) y estando presentes en cantidades importantes los ácidos palmítico y esteárico. A cargo de J.A. Solís Fuentes en el año 2010 (Solís, 2010).

“Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico.” Se obtuvieron las ACG a partir de los extractos de las semillas en CH₂Cl₂. Se validó un método cromatográfico para la purificación de las ACG. Se caracterizaron las ACG

aisladas mediante métodos espectroscópicos. Se cuantificó el efecto genotóxico producido por la ACG mediante la determinación de eritrocitos normocrómicos micronucleados. Se evaluó el efecto quimioterapéutico de la ACG en un modelo murino de lesiones preneoplásicas en colon. A cargo de Karol Karla García Aguirre en el año 2009 (García, 2009).

“Evaluación de la Actividad Antioxidante y Valor Nutracéutico de las Hojas y Frutos de la Guanaba (*Annona muricata*)”. En el análisis nutracéutico se evidenció el alto porcentaje de nutrientes. Los resultados del análisis complementario permiten reiterar que el fruto presenta contenido de Vitamina C realizado en la materia prima alimenticia. Mencionando que la investigación se realizó en un fruto semi- maduro por lo que intervino variando los resultados de azúcares y sólidos solubles, a cargo de Viviana Catherine Barahona Calle, en el año 2013 (Barahona, 2013).

“Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (Guanábana) de Cuzco”. Se comprobó que el extracto acuoso de hojas secas de *Annona muricata* L. produjo un efecto antiinflamatorio, con eficacia del 53,18% en comparación con la indometacina, a cargo de Elizabeth M. Poma, en el año 2011 (Poma, 2011).

3.12. Fundamento de los métodos para análisis

3.12.1. Métodos de separación

3.12.1.1. Extracción Sólido-Líquido

En el proceso de extracción sólido-líquido (S/L) pueden considerarse las siguientes etapas:

- Disolución de los constituyentes solubles y separación del sólido inerte.
- Recuperación del disolvente, si es económicamente viable.
- Lavado del sólido inerte para recuperar mayor cantidad de soluto.

La extracción S/L es una operación básica o unitaria mediante la cual se separan uno o varios constituyentes solubles contenidos en un sólido inerte mediante la utilización de un disolvente adecuado (Universidad de Granada, 2010).

En un proceso de extracción S/L las operaciones implicadas son:

- Cambio de fase del soluto. Esta etapa se considera prácticamente instantánea.
- Difusión del soluto a través del disolvente contenido en los poros del sólido inerte.
- Transferencia del soluto desde las inmediaciones de la interfase S/L hasta el seno de la masa principal de disolvente.

En consecuencia, los factores más importantes que influyen sobre la velocidad de extracción son:

a) Tamaño de las partículas sólidas. Evidentemente cuanto más pequeñas sean, mayor es la superficie interfacial y más corta la longitud de los poros. Por tanto mayor es la velocidad de transferencia. Sin embargo, tamaños excesivamente pequeños pueden hacer que las partículas se apelmacen dificultando la extracción (Universidad de Granada, 2010).

b) Tipo de disolvente. El disolvente debe ser lo más selectivo posible y se recomienda de baja viscosidad.

c) Temperatura. Un aumento de la temperatura favorece la solubilidad y aumentan los coeficientes de transferencia de materia. El límite superior se fija atendiendo a criterios de calidad del producto, criterios económicos y de seguridad con respecto al disolvente.

d) Agitación del disolvente-soluto. Favorece la transferencia por aumento de coeficientes de transferencia de materia en la interfase S/L. Además se evita la sedimentación y apelmazamiento de las partículas sólidas (Chuqui, 2013).

3.12.2. Técnicas de separación por Cromatografía

3.12.2.1. Cromatografía en Capa Fina

Es una técnica de partición líquido-líquido, la fase estacionaria es una delgada capa de un soporte sólido granulado, tal como gel de sílica, alumina, ácido silícico u otros, que se depositan sobre una placa de vidrio, aluminio u otro soporte inerte. Sólo es necesaria una pequeña cantidad de muestra, y su movimiento relativo con respecto al frente del eluente es una propiedad característica y reproducible. La placa seca se sumerge en un pequeño volumen de fase móvil (mezcla de solventes). La polaridad de la mezcla de solventes se elige de acuerdo a la mezcla de compuestos que se desea separar (Universidad Central de Venezuela, 2008).

Al quedar sólo la base de la placa sumergida, el solvente comienza a mojar la fase estacionaria y asciende por capilaridad. Al recorrer la placa la fase móvil arrastra a las sustancias apolares y aquellas más polares son retenidas por la fase estacionario dando lugar a la separación. El movimiento se expresa como factor de retención R_f , el cual es el cociente de dividir la distancia recorrida de la sustancia de interés entre la distancia recorrida del eluente (Universidad Central de Venezuela, 2008).

3.12.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) (HPLC)

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la más utilizada. Esta técnica deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna, en la que la cromatografía se realizaba en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. Para aumentar la eficacia de la separación y así incrementar la resolución era necesario emplear fases estacionarias

con tamaño de partícula mucho menor (entre 2 y 5 μm), ya que la difusión de los solutos entre las fases móvil y estacionaria se hace más rápida. Pero ello implica la necesidad de impulsar la fase móvil con un sistema de alta presión, nace así la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Sogorb, 2004).

Instrumentación general

Un cromatógrafo de líquidos consta de una serie de elementos indispensables, normalmente constituyendo módulos con funciones bien definidas. La circulación de fase móvil entre los distintos módulos se hace a través de conductos tubulares. Deben emplearse siempre diámetros de tubo muy pequeños a fin de reducir el efecto del ensanchamiento de banda extracolumnar (Sogorb, 2004).

Los elementos indispensables en cualquier cromatógrafo de HPLC son:

a) Sistema de suministro de fase móvil (con depósito de disolventes y bomba de alta presión), sistema de inyección y detector continuo. Existen además otros elementos adicionales que pueden mejorar algunos aspectos de la separación o la detección.

En HPLC, para una fase estacionaria concreta, la naturaleza de la fase móvil es el factor clave en la separación. Puede trabajarse en dos modalidades: Isocrática: la composición de la fase móvil permanece constante durante la separación. En gradiente: la composición se va modificando durante la separación. Para trabajar en esta modalidad el cromatógrafo debe disponer de un sistema de programación de gradiente, que permita la mezcla reproducible de disolventes en distintas proporciones durante la separación cromatográfica.

b) Sistema de inyección de muestra: La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto período de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación de fase móvil establecido en la columna y el detector.

c) Columna cromatográfica: Las columnas de HPLC son tubos rectos de acero que miden entre 3 y 30 cm de longitud. Su diámetro entre 2 y 5 mm. La fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados en los extremos de la columna.

En HPLC no suele ser necesario un control estricto de la temperatura de la columna, aunque si resulta aconsejable controlarla en un intervalo de unos pocas décimas de grado para obtener resultados más reproducibles (Sogorb, 2004).

d) Detector

Un detector ideal en HPLC debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal amplia, tener poco ruido de fondo y ser estable en el tiempo que dura el cromatograma. Además, en caso de que se utilice gradiente debe ser insensible a los cambios de composición de la fase móvil. Es también importante que la celda de flujo del

detector tenga un volumen mínimo para no provocar ensanchamiento de las bandas. Algunos de los detectores más usados son:

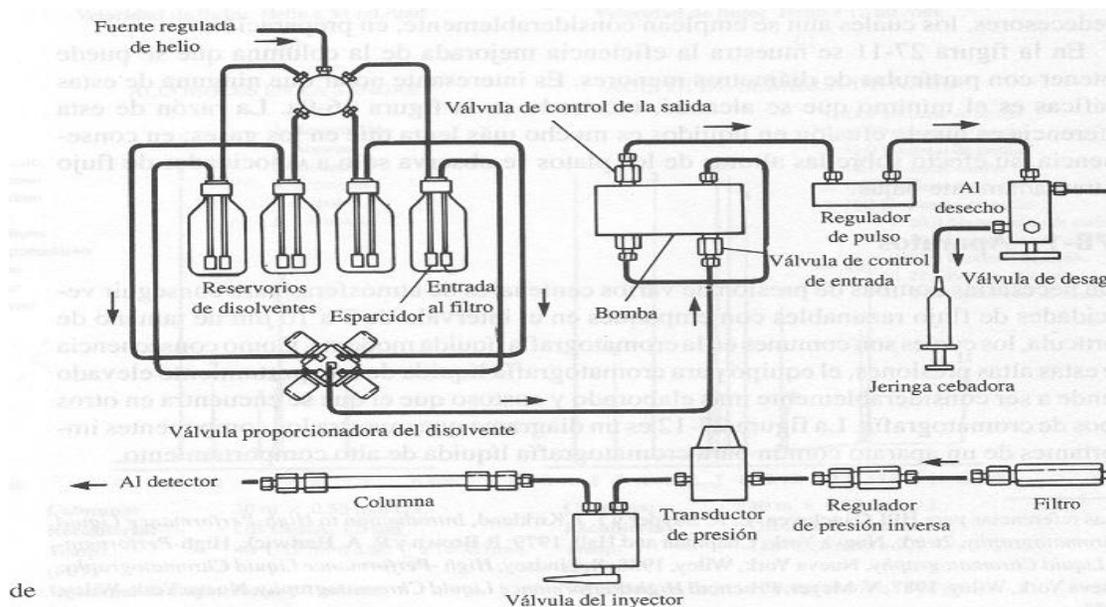
Detectores espectrofotométricos. Miden la absorbancia a una o varias longitudes de onda en el ultravioleta o en el visible. La fase móvil no debe ser muy absorbente. Es muy frecuente emplear detección en UV a 254 nm donde absorben gran cantidad de compuestos orgánicos. En instrumentos más versátiles pueden seleccionarse otras longitudes de onda e incluso registrar espectros completos. Este detector puede emplearse con gradiente si se utilizan disolventes no absorbentes (Universidad de Granada, 2010).

Detectores de fluorescencia: miden la emisión fluorescente por parte de los analitos. Es un detector muy sensible, pero aplicable solo a compuestos fluorescentes.

Detectores electroquímicos: se basan en métodos electroanalíticos como la amperometría, coulombimetría, voltamperometría. Detectan compuestos electroactivos, es decir, susceptibles de sufrir reacciones de oxidación o reducción.

Detectores refractométricos: se basan los cambios del índice de refracción de la fase móvil por la presencia de un soluto. En general su funcionamiento se basa en lo que sucede cuando un haz luminoso pasa a través de una celda que está dividida en dos compartimientos, uno de los cuales contiene el disolvente empleado como fase móvil y el otro el efluente de la columna (Sogorb, 2004).

Figura No. 8 Esquema de un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (HPLC)



(Suárez, 2008).

3.12.2.3. Cromatografía Líquida en Fase Reversa (RPLC)

El mecanismo por el que se produce la retención en la cromatografía de fase inversa se puede explicar de dos formas:

- Reparto entre dos fases líquidas.
- Adsorción del soluto a la fase estacionaria.

En el primero de ellos, se considera que la molécula orgánica ligada al relleno se comporta como un líquido o cuasi-líquido, y el soluto experimentará un reparto entre la fase móvil y la estacionaria atendiendo exclusivamente a la polaridad de las fases en juego (Suárez, 2008).

Este mecanismo es sólo admisible para aquellos casos en los que la molécula ligada al relleno sea lo suficientemente grande y se elimine cualquier punto de la superficie que pueda ser activo para un fenómeno de adsorción, bien porque el contenido de agua en la fase móvil sea elevado y desactive el soporte (normalmente sílice), o bien porque el soporte sea de tipo polimérico e inerte (Sogorb, 2004).

Se puede resumir este mecanismo diciendo que el soluto es expulsado de la fase móvil contra la fase estacionaria, y es en esta situación cuando se forma el complejo soluto-fase estacionaria, de cuya estabilidad depende la retención del soluto en la columna. Por otro lado, también han de considerarse los fenómenos de adsorción del soluto sobre las moléculas de la fase estacionaria ligadas químicamente; estas interacciones, de tipo débil, entre la fase estacionaria y el soluto serían las causantes de la retención del soluto, y la fase móvil jugaría el papel de regulador de las interacciones al enviar al soluto contra las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria, repeliéndolo de la fase móvil debido a su hidrofobicidad (Sogorb, 2004).

En la cromatografía en fase inversa es habitual que la fase móvil tenga un elevado contenido en agua, lo que da lugar a que compuestos cargados se disuelvan perfectamente en ella y no sean repelidos hacia la fase estacionaria con lo que no se producirá interacción ni, consecuentemente, retención. En estos casos, es necesario anular la carga del soluto mediante la presencia de un modificador incluido en la fase móvil. El tipo de sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C18 (grupo octadecilo) le sigue el C8 (grupo octil). En RPLC, se observa que para igual carga de carbono, a mayor longitud de cadena corresponde mayor retención y para igual longitud para la cadena alquílica, a mayor cobertura, mayor retención. La retención está gobernada por la hidrofobicidad del soluto. A mayor polaridad del soluto, mayor predilección de éste por la fase móvil y menor tiempo de retención. Los solutos no polares tendrán comportamiento inverso (Suárez, 2008).

3.12.2.4. Aplicaciones de técnicas cromatográficas

3.12.2.4.1. Análisis cualitativo

Un análisis cromatográfico puede dar una amplia información cualitativa si se escoge el sistema de detección adecuado para determinar y evaluar los analitos separados, así si se utiliza un detector que permita obtener un espectro de cada compuesto separado y a su vez contenga una base de datos que pueda realizar su comparación con una biblioteca de espectros se podría, de una forma muy precisa, establecer la identidad de los componentes de una muestra, de hecho esto se logra fácilmente con cromatógrafos que contienen sistema de detección como el Infrarrojo (IR), el de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o el espectrómetro de Masas (MS). Sin embargo, estos sistemas son muy costosos, es por ello que la mayoría de los laboratorios cuentan con cromatógrafos con sistemas de detección sencillos como el detector de ionización a la llama (siglas en inglés, FID) o el detector de conductividad térmica en el caso de cromatografía de gases o detectores de absorbancia o índice de refracción para los casos de cromatografía de líquidos (Universidad de Jaén, 2006).

La única información cualitativa que pueden ofrecer estos sistemas es el tiempo de retención del analito, el cual, solo puede ser usada controlando bien las condiciones cromatográficas como: flujo, temperatura, tipo de fase estacionaria en el caso de gases o composición química de la fase móvil además de las otras variables mencionadas anteriormente para el caso de cromatografía de líquida, además de que se debe tener conocimiento de los posibles compuestos de la muestra y una amplia variedad de patrones para realizar comparaciones. Sin embargo, se puede dar el caso que dos compuestos tengan el mismo tiempo de retención, lo que imposibilita su identificación. Por supuesto que, a partir de cromatogramas obtenidos con diferentes fases móviles (para cromatografía líquida) y estacionarias y a diversas temperaturas de elusión (para cromatografía gaseosa), se puede obtener datos adicionales (Universidad de Jaén, 2006).

3.12.2.4.2. Análisis cuantitativo

El uso de la cromatografía se ha extendido en todo el mundo, en las últimas cuatro décadas, no solo por su capacidad de separar compuestos sino porque se puede realizar un análisis cuantitativo de las especies proporcionadas (Suárez, 2008).

En la cromatografía en columna, el análisis cuantitativo se basa en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la de uno o más patrones inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas. El uso de una u otro termino dependerá de las características de la banda obtenida, aunque en la actualidad con el uso de sistemas de integración de área computarizados, la precisión es muy alta para el cálculo de área, sin embargo siempre es importante conocer las otras herramientas a utilizar para calcular el

área de una banda y en qué momento es mejor usar altura en vez de área por si llega a faltar el sistema computarizado (Suárez, 2008).

Para lograr un análisis cuantitativo de los componentes separados de una muestra existe una gran variedad de métodos de análisis entre los que se pueden mencionar:

Calibración absoluta

Para realizar el cálculo de composición, se inyecta masas exactas del componente puro al cromatógrafo y se determina el área. Se realiza un gráfico relacionando el área de pico con la masa, se obtendrá entonces una curva de calibración que debe ser lineal y pasar por el origen (Universidad de Jaén, 2006).

Método del estándar interno

Este método es conocido como calibración relativa o indirecta. Para ello, relación de masas conocidas de un patrón de la muestra y de un estándar deber ser preparadas e inyectadas al cromatógrafo para luego determinar las relaciones de área. Estas relaciones de áreas son graficadas en función de la relaciones de masa.

Entonces se adiciona una masa conocida del estándar interno a una masa conocida de muestra y esta mezcla se inyecta al cromatógrafo. Del cromatógrama se obtienen las áreas de analito y del estándar y luego con la ecuación de calibración y conociendo la masa del estándar se puede obtener la masa del analito en la muestra (Universidad de Jaén, 2006).

Requerimientos para un buen estándar interno:

- Debe ser resuelto de los otros picos
- Debe eluir cercano al pico de interés
- Debe usarse una concentración similar al pico de interés.
- Debe ser de las mismas características estructurales.

Normalización de área

La normalización de área es un medio para establecer el porcentaje de cada componente en la muestra. Se calcula dividiendo el área de cada componente entre el área total y multiplicando por 100%, es decir:

$$\% * 100 \text{ Area total, Area de A}$$

Este término es independiente del volumen de inyección de muestra y debe cumplirse que todos los picos deben estar separados. Sin embargo, esta ecuación solo se puede aplicar para una serie homologa de compuestos de punto de ebullición muy parecidos y con similares respuestas del detector, algo más acorde con la realidad es usar el factor de respuesta (Suárez, 2008).

La respuesta de un detector de ionización a la llama (FID) es independiente de la temperatura, del flujo de gas de arrastre y de la velocidad de flujo. Esto hace más sencillos los cálculos, ya que se puede realizar relaciones directas de peso de muestra, lo cual contribuye a que este sea el detector ideal para el análisis cuantitativo.

El cálculo de factor de respuesta se realiza experimentalmente de la siguiente forma. Se pesa una cantidad exactamente conocida del patrón del analito a estudiar, se determina su su área en el cromatógrafo y luego se realiza el cálculo (Suárez, 2008).

4. JUSTIFICACIÓN

Estudios en relación a la actividad plaguicida de la guanaba (*Annona muricata L.*) de la cual su principal compuesto son las acetogeninas (ACG). Han mostrado efectos positivos contra insectos, como el mosquito trasmisor de la fiebre amarilla, las cucarachas, *Drosophila melanogaster* y algunas especies de arañas.

Con base en los resultados observados se puede considerar que las ACG son buenas candidatas para el desarrollo de plaguicidas. En este sentido también es pertinente mencionar que en algunas regiones de Sudamérica los aceites extraídos a partir de ciertas especies de Annonaceae son empleados como plaguicidas en forma tradicional.

Las acetogeninas, son compuestos bioactivos presentes tanto en las raíces como en las semillas de algunas frutas, son componentes naturales los cuales presentan una extensa gama de actividades biológicas: antitumoral, citotóxica, antimicrobiana, plaguicida, antiprotozoaria y antihelmíntica. La fuente natural de las ACGs (Familia Annonaceae, particularmente el género *Annona*) es abundante, por lo cual ofrecen una buena oportunidad de seguir explorando sus propiedades biológicas.

Se encuentran presentes en semillas de plantas de la familia Annonaceae como la *Annona cherimolia*, *Annona glabra*, *Annona muricata*, *Annona squamosa* y otras. Algunos estudios han sugerido que ciertas acetogeninas de la guanaba y de otras anonáceas tienen un excelente potencial como biopesticidas.

Ante la alternativa de la incorporación de la guanaba con las propiedades mencionadas y considerando que se trata de un cultivo no tradicional, de exportación y comercialización de Guatemala, se pretende extraer, identificar y cuantificar las ACG en el estado fitogenológico de las hojas y semillas de éste fruto.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Extraer e identificar acetogeninas a partir de semillas y hojas de *Annona muricata* de cuatro departamentos de Guatemala para la selección del mejor cultivar.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1. Separar y determinar ACG de los extractos de semillas y hojas por medio de HPLC/UV-VIS.

5.2.2. Caracterizar las ACG y cuantificarlas mediante un estándar externo por medio de HPLC.

5.2.3. Comparar las ACG identificadas en cada uno de los extractos de semillas y hojas de *A. muricata* en base a su procedencia.

6. HIPÓTESIS

Existe diferencia en la cantidad de acetogeninas detectadas en semillas y hojas de *A. muricata* dependiendo de su procedencia.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo de trabajo

Extractos de semillas y hojas de guanaba colectadas en Escuintla, Santa Rosa, El Progreso y Guatemala, almacenados en condiciones controladas de temperatura, pH, luz y humedad relativa.

7.2. Muestra

Mapa de recolección de Guanaba se muestra en Anexos.

7.3. Recursos

7.3.1. Recursos humanos

Investigador: Lourdes Estefanía Mejía Barrios

Asesor: Lic. Estuardo Serrano

Revisor: Dra. Sully Cruz

Coordinador de Lipronat: Dra. Sully Cruz

7.3.2. Recursos Institucionales

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Departamento de Análisis Aplicado, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Centro de Documentación Biblioteca CEDOF. De la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.3.3. Recursos materiales

7.3.3.1. Estándares

- Específico para el metabolito en estudio.

7.3.3.2. Materiales y equipo

- Asperjador
- Balanza semianalítica y balanza analítica Denver Instrument
- Bomba de vacío Brinkmann
- Campana de extracción de gases
- Cristalería de Laboratorio: Ampolla de decantación, Balones aforados, Erlenmeyer, Beaker, Probetas, Pipetas volumétricas, embudos, micropipetas de plástico y vidrio etc.

- Cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck soportadas en aluminio
- Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV Vis
- Equipo de extracción Soxhlet
- Estufa eléctrica
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Refrigeradora
- Refrigerante
- Rotavapor Buchi
- Viales de 10 mL y 5 mL
- Vórtex

7.3.3.3. Reactivos y solventes de laboratorio

- Agua destilada
- Disolventes: Hexano, metanol, cloroformo
- Reactivos para extracción: Diclorometano, Agua destilada, hexano, metanol al 90%
- Reactivos para tamizaje fitoquímico

7.4. Metodología

7.4.1. Obtención del material vegetal

Los frutos procesados para la obtención de semilla y las hojas recolectadas de *A. muricata* de la familia Annonaceae se colectaron en las regiones central y oriental del país, Yalcachimba, Guatemala; Siquinalá Escuintla; Finca Patache, El Progreso; Guazacapán, Santa Rosa.

Se colectó una muestra representativa en cada departamento, de las cuales se llevó a cabo la extracción de aceites fijos y pruebas de laboratorio como porcentaje de humedad, tamizaje fitoquímico e identificación y cuantificación por HPLC.

7.4.2. Secado y molienda

Semillas

Las semillas de la guanaba se secaron en horno a 30°C durante 48 horas, y se continuó con el análisis cuando el porcentaje de humedad de las muestras fue menor al 10%. Posteriormente fueron molidas utilizando un molino de aspas; las semillas molidas se dividieron en porciones de 30 gramos cada una, se almacenaron tres porciones en la refrigeradora en bolsas plásticas con cierre para su posterior análisis, y la cuarta porción de semillas se desengrasó con hexano por 72 horas. De igual manera se procedió con las porciones almacenadas. Rotuladas con fecha y procedencia.

Hojas

Las hojas de la guanaba se secaron en sombra por 7 días a temperatura ambiente, igualmente se secaron en horno a 30°C por 24 horas. Posteriormente fueron molidas utilizando el mortero y luego utilizando un molino de aspas, se reunieron cuatro porciones de 30 gramos de muestra vegetal y se almacenaron para su posterior análisis. Rotuladas con fecha y procedencia.

7.4.3. Estudio del porcentaje de rendimiento de aceites fijos

Para determinar el porcentaje de rendimiento de aceites fijos de hojas y semillas de la especie en estudio del género *Annona* de diferentes procedencias, se realizó la extracción por soxhlet de acuerdo a métodos establecidos (Kuklinski, 2000; Medinilla, 1996).

7.4.4. Extracción de aceite fijo por Soxhlet

7.4.4.1. Preparación de la muestra

- Se molieron 50 g de materia seca vegetal y se pesaron de 20 a 30 g de material molido, para semilla o para hoja de especie en estudio.
- Se transfirió el material a un cartucho de papel filtro.

7.4.4.2. Uso del equipo Soxhlet

- Se colocó un pedazo de algodón como tapón y se introdujo el cartucho de papel filtro con materia seca vegetal en el cuerpo del extractor.
- Se añadió 275 mL de disolvente orgánico (hexano) en balón colector de 500 mL. Relación muestra solvente 1:4.
- Se conectaron las boquillas esmeriladas del cuerpo extractor con muestra con la del balón colector con hexano.
- Se conectó la bomba que circula la solución refrigerante para enfriamiento del sistema.
- Se conectó sistema de calentamiento (estufa eléctrica) bajo el balón colector con hexano.
- Se extrajo a temperatura constante durante 3 horas continuas o según lo especifique la literatura para la especie en particular, el equipo realizó 6 lavadas al cartucho con muestra.
- El inicio de la extracción se determinó al momento de la ebullición del disolvente, ya que cuando esto sucede, sus vapores ascienden por el tubo lateral y se condensan con el refrigerante, y luego retorna a cuerpo extractor y cae sobre la muestra de materia vegetal.
- La extracción continuó hasta que el disolvente se niveló en los tubos comunicantes, luego este sifonea y cayó al balón colector para repetir el ciclo sucesivas veces, hasta que se agotó el material vegetal,

- Se esperó a que todo el sistema conectado se enfriara antes de coleccionar el aceite extraído.
- Se eliminó el disolvente orgánico utilizado por rotaevaporación hasta obtener un aceite ámbar para las semillas y verde oscuro para las hojas.
- Se pesó el aceite obtenido en balanza analítica, se vertió en vial color ámbar y se almacenó a 4°C.
- Se determinó el porcentaje de rendimiento de las muestras a partir del peso del aceite extraído entre el peso de la materia vegetal del inicio por cien.

7.4.4.3. Concentración en rotavapor

Se encendió el baño de María y se llevó a la temperatura a $40 \pm 1^\circ\text{C}$. Se engrasó todas las bocas esmeriladas y se armó el rotavapor Buchi según el instructivo específico. Se colocó la muestra (solución obtenida por soxhlet) en un balón de recuperación con rotación constante.

Se conectó la bomba de vacío y se mantuvo entre 270 y 310 mbar ya que facilitó la evaporación. Se inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente (hexano) hasta ver un aceite ámbar para las semillas y verde oscuro para las hojas. Se vertió el extracto concentrado en un beacker para terminar la evaporación. Cuando el extracto se observó con más viscosidad, se pasó a viales pequeños debidamente tarados y rotulados. Se calculó el rendimiento del extracto y los viales se guardaron en refrigeración.

7.4.4.4. Extracción de acetogeninas a partir del extracto crudo

Se realizó la extracción de acetogeninas con base a métodos propuestos por diferentes autores (Núñez, 2008). Usando hexano una relación muestra solvente 1:4 por triplicado para cada muestra tanto de hoja como de semilla, se eliminó el solvente por rotaevaporación y se continuó con la extracción como se indica en el diagrama representado en la Figura 9.

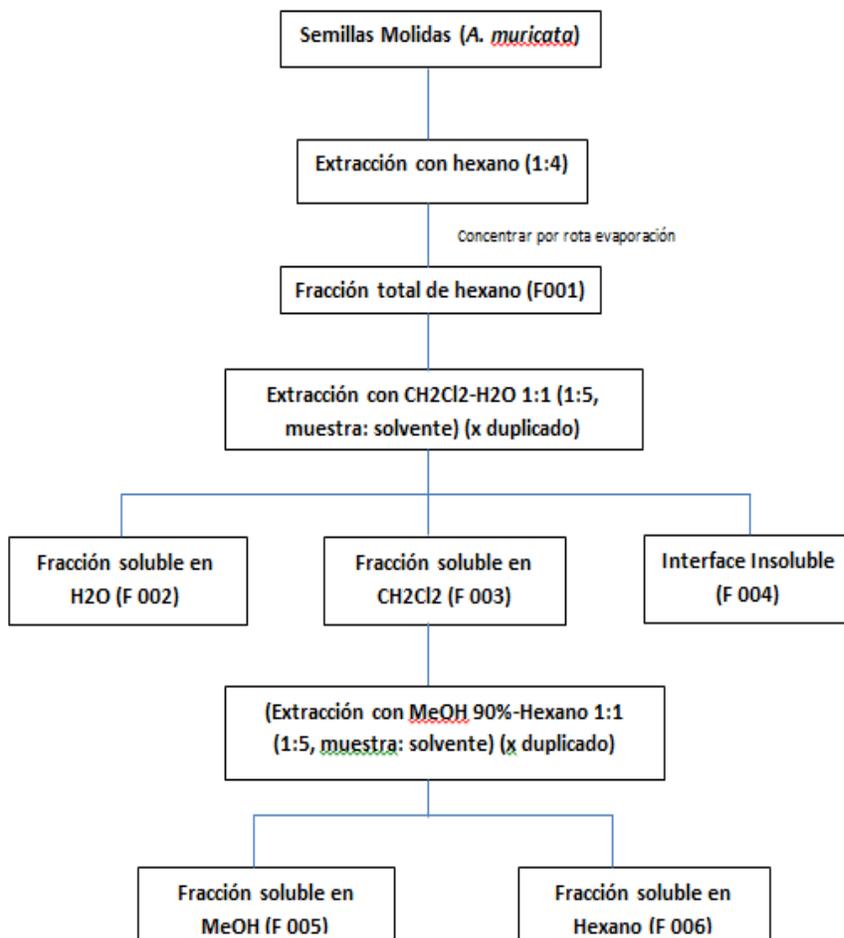


Figura No. 9 Método de extracción de acetogeninas.

7.4.5. Caracterización química de ACG

7.4.5.1. Caracterización preliminar por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se realizó un análisis preliminar por CCF para caracterizar las acetogeninas presentes en los extractos obtenidos de la semilla y hoja de *A. muricata* de distintas regiones del país. Utilizando las fracciones metanólicas (F 005). Las fracciones obtenidas se aplicaron en placas de sílica gel 60F₂₅₄ sobre aluminio Merck.

- Fase móvil: Cloroformo-metanol (9:1)
- Reactivos reveladores: Reactivo de Kedde y ácido Fosfomolibdico
- Identificación: Zonas de color rosa para reactivo de Kedde, zonas de color azul grisáceo para ácido fosfomolibdico (visible).

7.4.6. Separación de ACG por el método cromatográfico mediante HPLC.

Por medio de este proceso se separaron las acetogeninas presentes como la anonnacina y la squamocina, en los extractos obtenidos de la semilla y de la hoja de *A. muricata*. Y se utilizaron las fracciones metanólicas (F 005) de hoja y semilla de las diferentes procedencias. Conociendo sus tiempos de retención teóricos con un sistema de detección UV-VIS. Se empleó un equipo HPLC Shimadzu Prominence LC-20A System, con las siguientes especificaciones:

- Bomba: LC-20 AT
- Detector: UV-VIS SPD-20
- Muestreador: Manual
- Horno para columna: CTO- 20AC
- Controlador: CBM-20Alite
- Software: LCSOLUTION

Las muestras se analizaron empleando las siguientes condiciones:

- Columna: fase reversa C18 (250 x 4.6 mm d.i.)
- Temperatura: 25°C
- Flujo: 0.4mL/min
- Volumen de inyección: 20µL
- Fase móvil: MeOH:H₂O en una proporción 85:15
- Detector: UV-VIS SPD-20
- Tiempo de corrida: 15 minutos
- Número de análisis: Cada muestra por triplicado

7.4.7. Identificación de ACG por método cromatográfico HPLC

Previo a realizar el análisis de los extractos por HPLC se realizó un barrido en el espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV Vis, para determinar las zonas de mayor absorbancia de dichos extractos, resultando ser 205 nm la mayor absorbancia tanto para hoja como semilla así como por departamento. La identificación preliminar se realizó con un sistema de detección UV-VIS por medio del equipo de HPLC. Esta identificación se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros obtenidos de cada pico con el espectro obtenido para el pico de la bulatacina. Realizando la detección a 205 nm.

7.4.8. CUANTIFICACIÓN DE ACG.

La cuantificación de acetogeninas se hizo a partir de los extractos de semilla y hoja de *A. muricata* de diferentes procedencias mediante la técnica del estándar externo, realizando una curva de calibración de la bulatacina a una $\lambda=205$ nm por triplicado, se utilizó esta longitud de onda ya que resultó ser la zona con mayor absorción y está dentro del rango de absorción máxima para las ACG. Se utilizaron concentraciones de bulatacina de 0.1; 0.3;

0.5; 1.0, 3.0, 5.0; 10.0 μg , para el método del estándar externo, y se hicieron corridas por triplicado. La cuantificación de cada pico para las semillas y hojas de *A. muricata* de diferente procedencia del país se hizo mediante la normalización de áreas (Flórez, 2010).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación de la cuantificación de ACG se hicieron 8 extracciones de hoja y semilla de guanaba, obteniendo su media aritmética y desviación estándar de cada una de las 4 procedencias. Se hizo un análisis de varianza para diseño estratificado, tomando como estratos en el estudio a los tratamientos de cada órgano de la planta y a sus procedencias para determinar si existe diferencia en los promedios de ACG.

Una vez que se ha determinado que existen diferencias entre las medias de ACG de cada procedencia, se realizará una prueba de rango *post hoc* para determinar qué medias difieren. Utilizando el método de la diferencia mínima de Fisher, comparando los promedios por pares según sus procedencias para construir así intervalos de confianza del 95% para las diferencias de dichos pares. Pretendiendo lograrse un nivel de significancia menor al 0.05 (α).

9. RESULTADOS

9.1. De campo

Durante el período de noviembre de 2015 y enero de 2016 se realizó la colecta del material vegetal luego de identificar la planta, *A. muricata*, de cada procedencia en 4 departamentos de Guatemala que se detallan a continuación:

1. Siquinalá, Escuintla
2. Guazacapán, Santa Rosa
3. Finca Patache, El Progreso
4. Yalcachimba, Guatemala

9.2. Porcentaje de rendimiento de aceite fijo de semilla de *A. muricata*

En el cuadro no. 1 se muestra el porcentaje de rendimiento de aceite fijo en semillas de la especie evaluada de diferentes procedencias.

Cuadro no. 1. Porcentaje de rendimiento de aceite fijo en semilla de *A. muricata* extraído por soxhlet

Procedencia	Peso semillas (g)	Peso de extracto (g)	Porcentaje de rendimiento	Peso Fracción 003 (CH ₂ Cl ₂)	Porcentaje de rendimiento 003
Siquinalá, Escuintla	30.3164	6.4918	21.4%	3.2743	10.80%
Guazacapán, Santa Rosa	30.2304	6.9323	22.9%	3.2938	10.89%
Finca Patache, El Progreso	29.5930	6.1846	20.9%	3.1893	10.77%
Yalcachimba, Guatemala	29.1519	6.5570	22.5%	3.1119	10.67%
Promedio	29.8229	7.6914	25.8%	3.2173	10.8%
Desviación estándar	0.0093			0.0009	
Coefficiente de variación	3.61%			0.84	

Fuente: Datos experimentales.

Como se puede observar, la semilla de la especie *A. muricata*, procedente de Guazacapán, Santa Rosa, presentó mayor rendimiento de aceite y la especie *A. muricata*, procedente de Finca Patache, El Progreso presentó el menor rendimiento.

Cuadro no. 2. Porcentaje de rendimiento de aceite fijo en hoja de *A. muricata* extraído por soxhlet

En el cuadro no. 2 se muestra el porcentaje de rendimiento de aceite fijo en hojas de la especie evaluada de diferentes procedencias.

Procedencia	Peso semillas (g)	Peso de extracto (g)	Porcentaje de rendimiento	Peso Fracción 003 (CH₂Cl₂)	Porcentaje de rendimiento 003
Siquinalá, Escuintla	24.3085	3.5570	14.6%	1.7340	7.13%
Guazacapán, Santa Rosa	25.2104	3.7323	14.8%	1.8220	7.22%
Finca Patache, El Progreso	22.3980	2.8846	12.9%	1.2376	5.52%
Yalcachimba, Guatemala	23.1429	3.1530	13.6%	1.5432	6.67%
Promedio	23.7649	3.3317	13.975%	1.5842	6.63%
Desviación estándar	0.0088			0.0078	
Coefficiente de variación	6.36%			11.78%	

Fuente: Datos experimentales.

Como se puede observar, las hojas de la especie *A. muricata*, procedente de Guazacapán, Santa Rosa, presentó mayor rendimiento de aceite y la especie *A. muricata*, procedente de Finca Patache, El Progreso presentó el menor rendimiento.

9.3. Caracterización Química

9.3.1. Caracterización preliminar por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

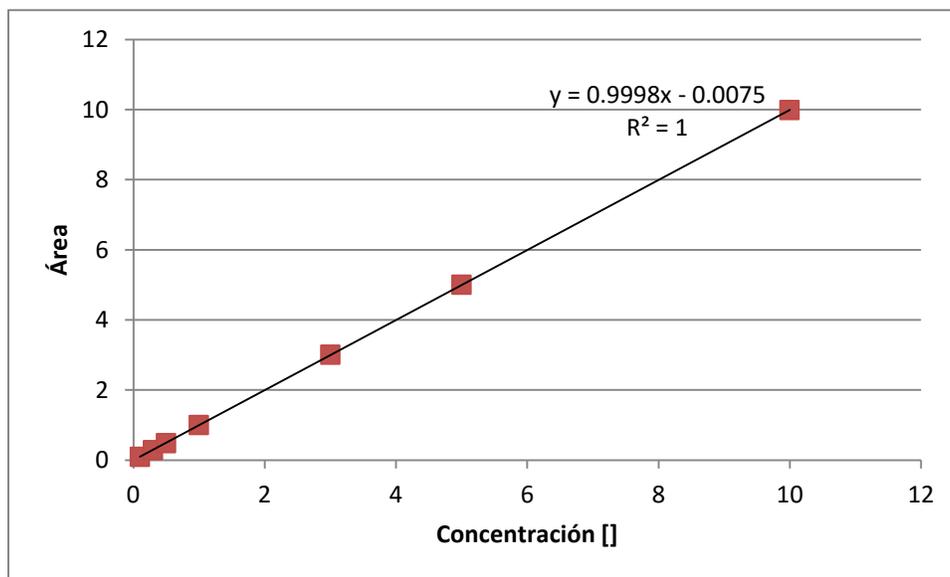
Se obtuvieron resultados en cromatografía en capa fina de las fracciones solubles en metanol (F 005) luego del método de extracción de acetogeninas, separando por semilla y hoja, así como por su procedencia, se usó como fase móvil la mezcla de CHCl_3 -MeOH (9:1).

Los resultados obtenidos en el análisis por CCF con el reactivo de Kedde se muestran en anexos, en la figura no. 11, aparecen los extractos de semilla de *A. muricata* de los diferentes departamentos (Guatemala, Escuintla, Santa Rosa, El Progreso); y con el revelador Ácido Fosfomolibdico se muestra en la figura 12, en las dos cromatoplasas se puede observar manchas continuas de color rosado para reactivo de Kedde y azul grisáceo para ácido fosfomolibdico a lo largo de la trayectoria del extracto, pero sin R_f medible. Y en la figura 13, aparecen los extractos de hoja de *A. muricata* de los diferentes departamentos (Guatemala, Escuintla, Santa Rosa, El Progreso).

9.3.2. Curva de Calibración

Se realizó una curva de calibración con siete diluciones del patrón, es este caso de la bulatacina, en la figura # se presenta dicha curva con la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2).

Figura No. 10 Curva de calibración de bulatacina por HPLC



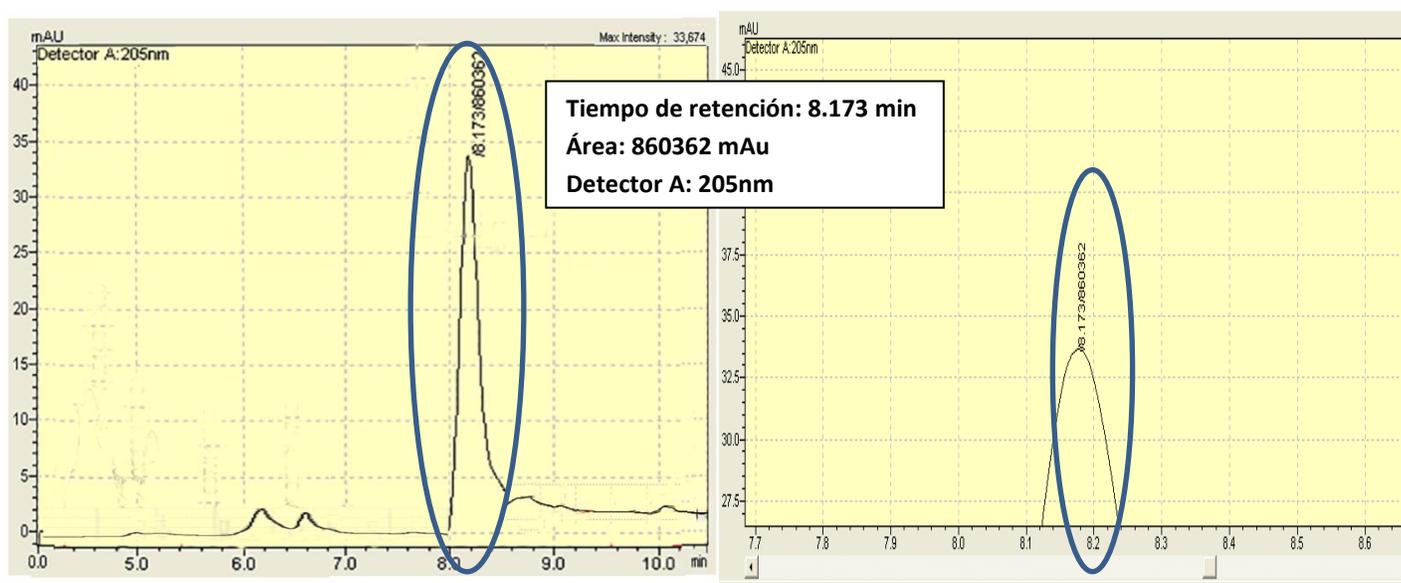
Cuadro no. 3. Curva de calibración realizada por HPLC para bulatacina

Dilución no.	Concentración (μg)	Área
1	0.1	0.088331726

2	0.3	0.285953184
3	0.5	0.483446849
4	1.0	1.000012113
5	3.0	3.00122102
6	5.0	5.002892309
7	10.0	9.98250338

9.3.3. Análisis por HPLC de estándar de bulatacina

Figura No. 11 Cromatograma de estándar de bulatacina

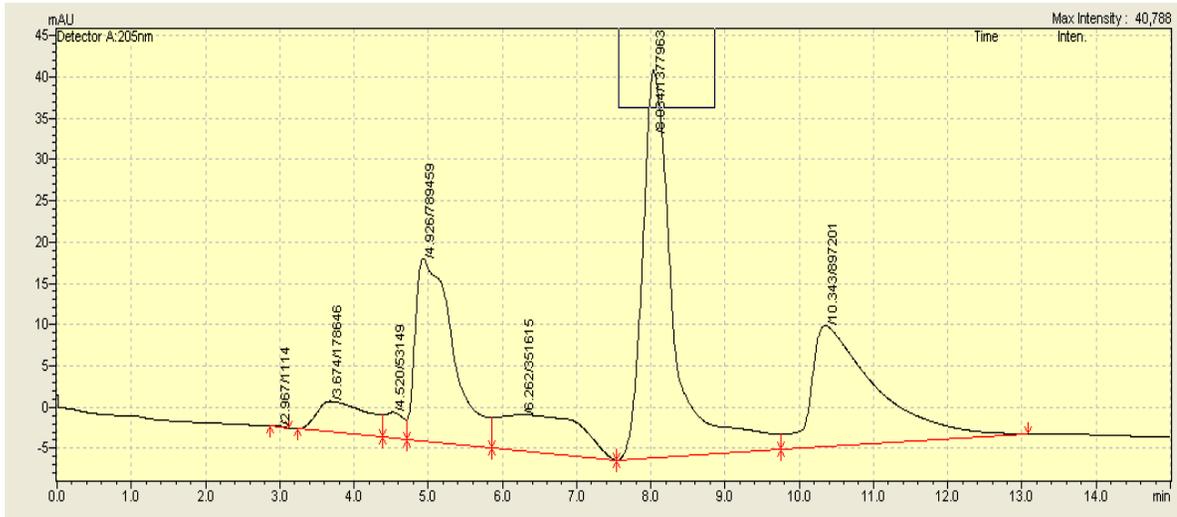


Fuente: Datos experimentales.

9.3.4. Análisis por HPLC de los extractos metanólicos (F 005)

9.3.4.1. Análisis por HPLC del extracto metanólico de semilla de Escuintla

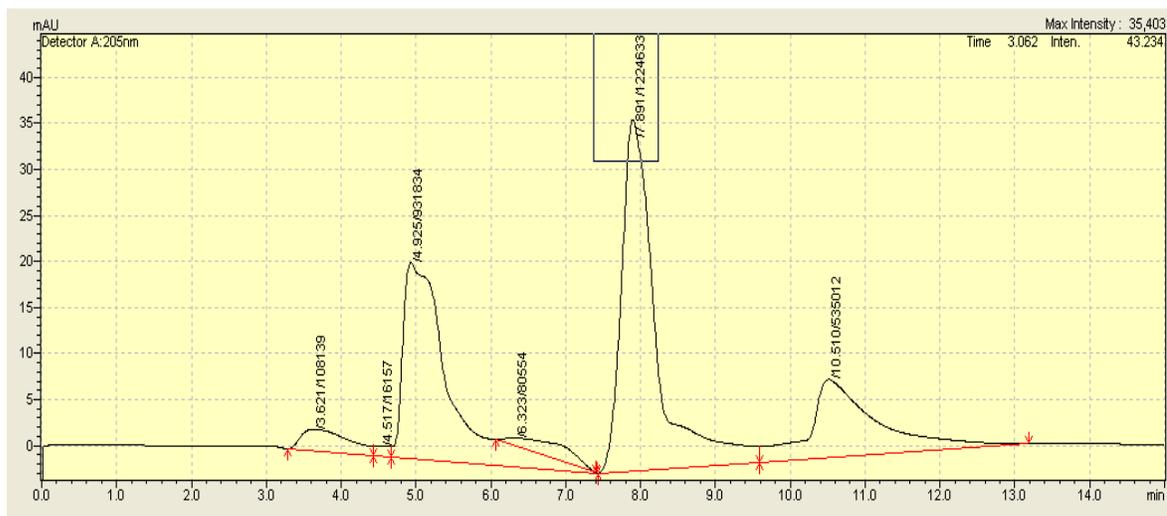
Figura No. 12 Cromatograma de extracto de semilla de Escuintla



Cuadro no. 4. Resultados del cromatograma semilla de Escuintla a 205 nm

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Concentracion (µg)
2	3.674	0.178	0.15
4	4.926	0.788	0.47
6	8.034	1.375	1.06
7	10.343	0.896	0.58

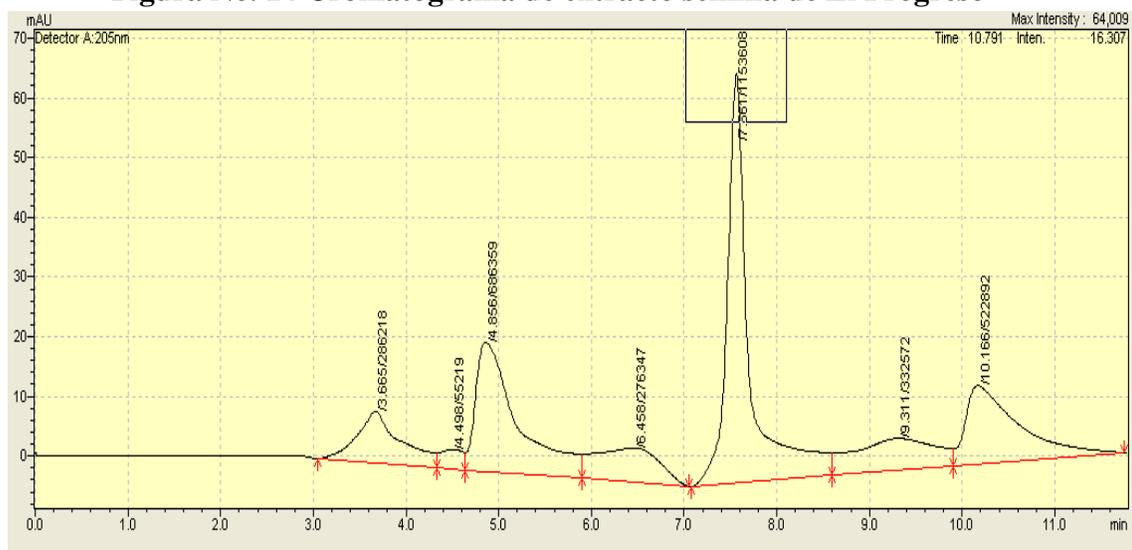
Figura No. 13 Cromatograma de extracto semilla de Santa Rosa



Cuadro no. 5. Resultados del cromatograma semilla de Santa Rosa a 205 nm

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Concentracion (µg)
1	3.621	0.108	0.11
3	4.925	0.93	0.62
5	7.891	0.859	0.54
6	10.510	0.53	0.22

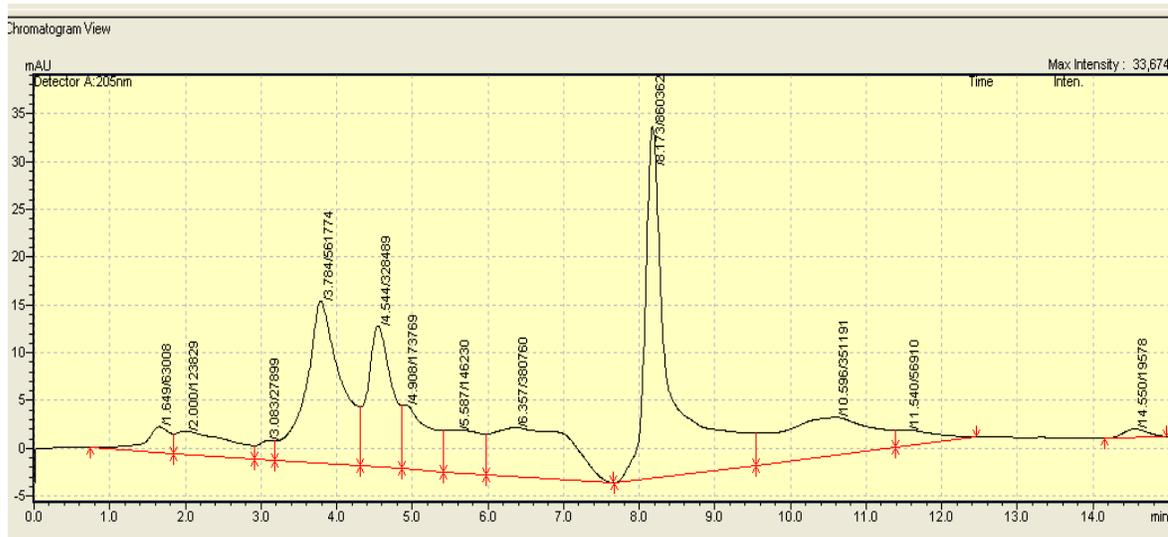
Figura No. 14 Cromatograma de extracto semilla de El Progreso



Cuadro no. 6. Resultados del cromatograma semilla de El Progreso a 205 nm

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Concentracion (µg)
1	3.665	0.286	0.143
3	4.856	0.685	0.37
5	7.561	1.152	0.84
7	10.166	0.522	0.21

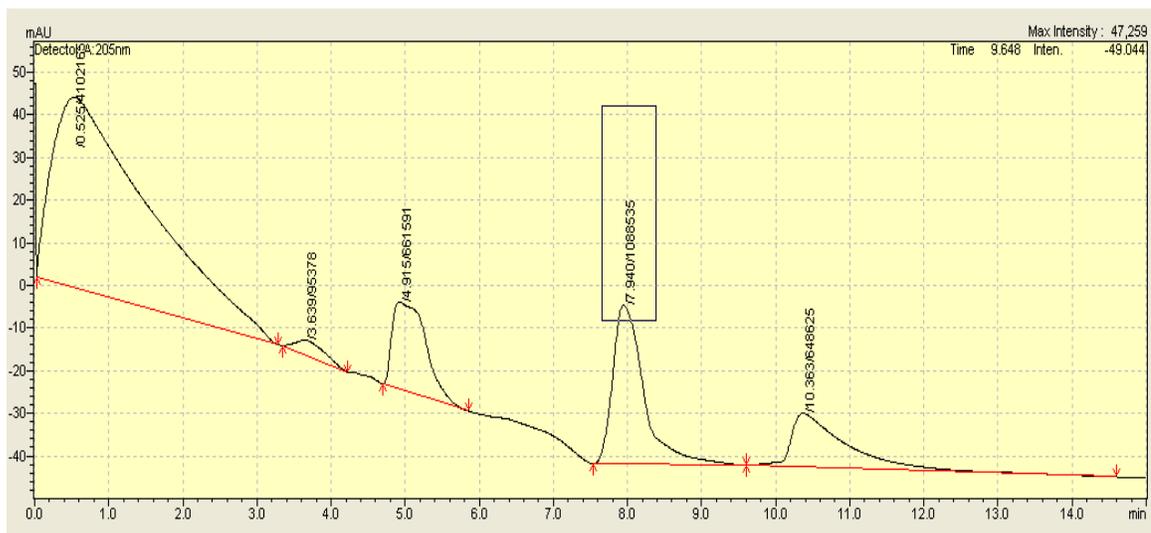
Figura No. 15 Cromatograma de extracto semilla de Ciudad de Guatemala



Cuadro no. 7. Resultados del cromatograma semilla de Guatemala a 205 nm

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Concentracion (µg)
4	3.784	0.561	0.31
5	4.544	0.328	0.24
9	8.163	0.859	0.54

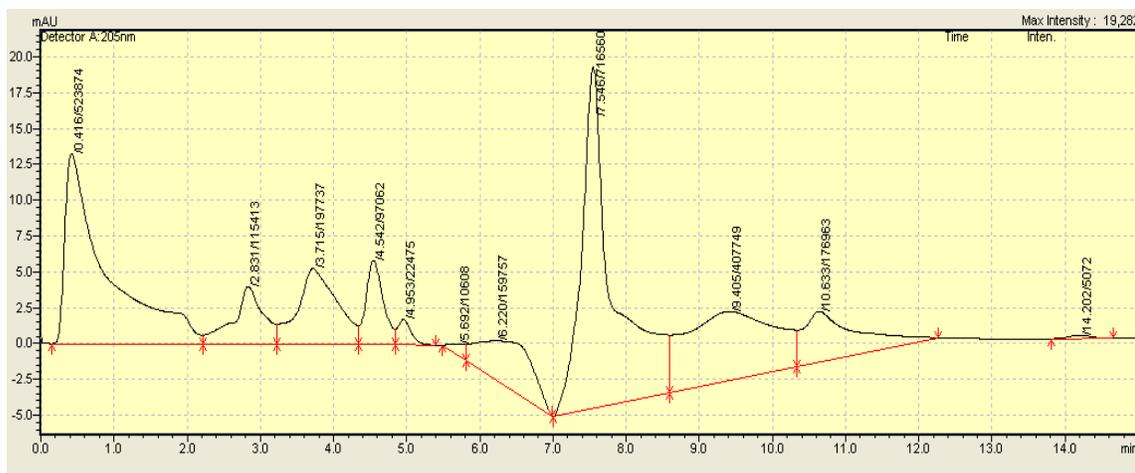
Figura No. 16 Cromatograma de extracto hoja de Escuintla



Cuadro no. 8. Resultados del cromatograma hoja de Escuintla a 205 nm

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Concentracion (µg)
1	0.525	4.095	1.24
3	3.639	0.660	0.35
4	7.940	1.087	0.77
5	10.363	0.648	0.33

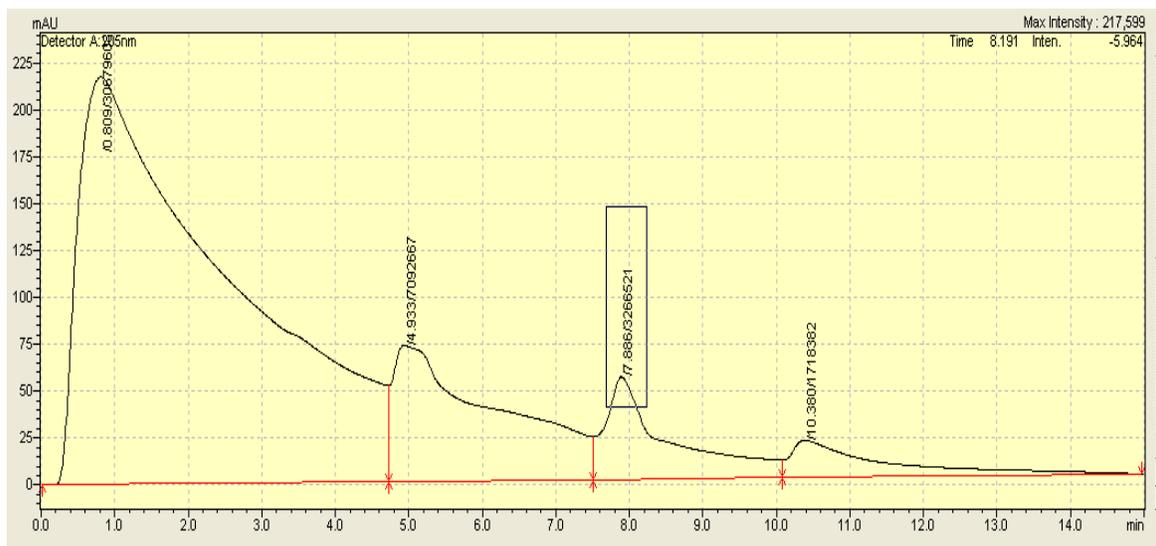
Figura No. 17 Cromatograma de extracto hoja de Santa Rosa



Cuadro no. 9. Resultados del cromatograma hoja de Santa Rosa a 205 nm

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Concentracion (µg)
1	0.416	0.523	0.21
2	2.831	0.115	0.08
3	3.715	0.197	0.12
4	4.542	0.097	0.33
8	7.546	0.715	0.40
9	9.405	0.407	0.19

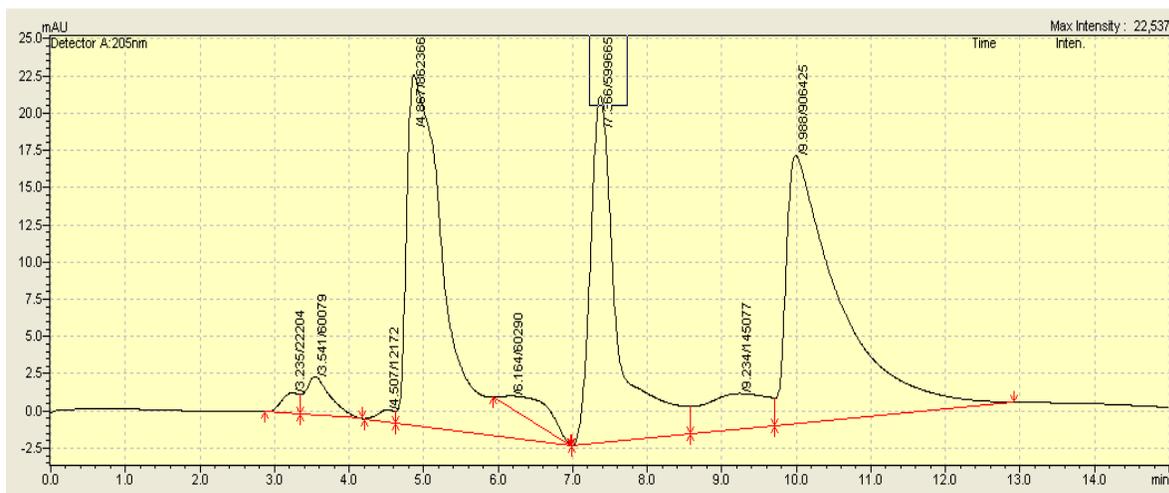
Figura No. 18 Cromatograma de extracto hoja de El Progreso



Cuadro no. 10. Resultados del cromatograma hoja de El Progreso a 205 nm

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Concentracion (µg)
1	0.809	30.63	15.32
2	4.933	7.08	3.87
3	7.886	3.26	1.14
4	10.380	1.716	0.86

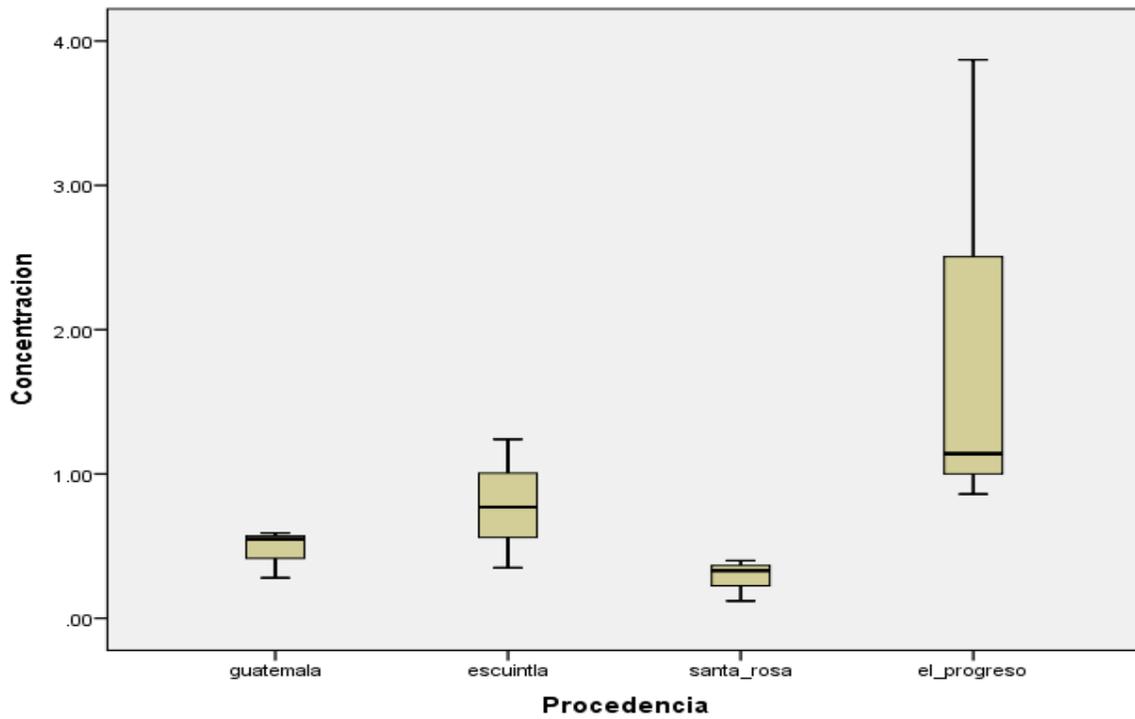
Figura No. 19 Cromatograma de extracto hoja de Ciudad de Guatemala



Cuadro no. 19. Resultados del cromatograma hoja de Ciudad de Guatemala a 205 nm

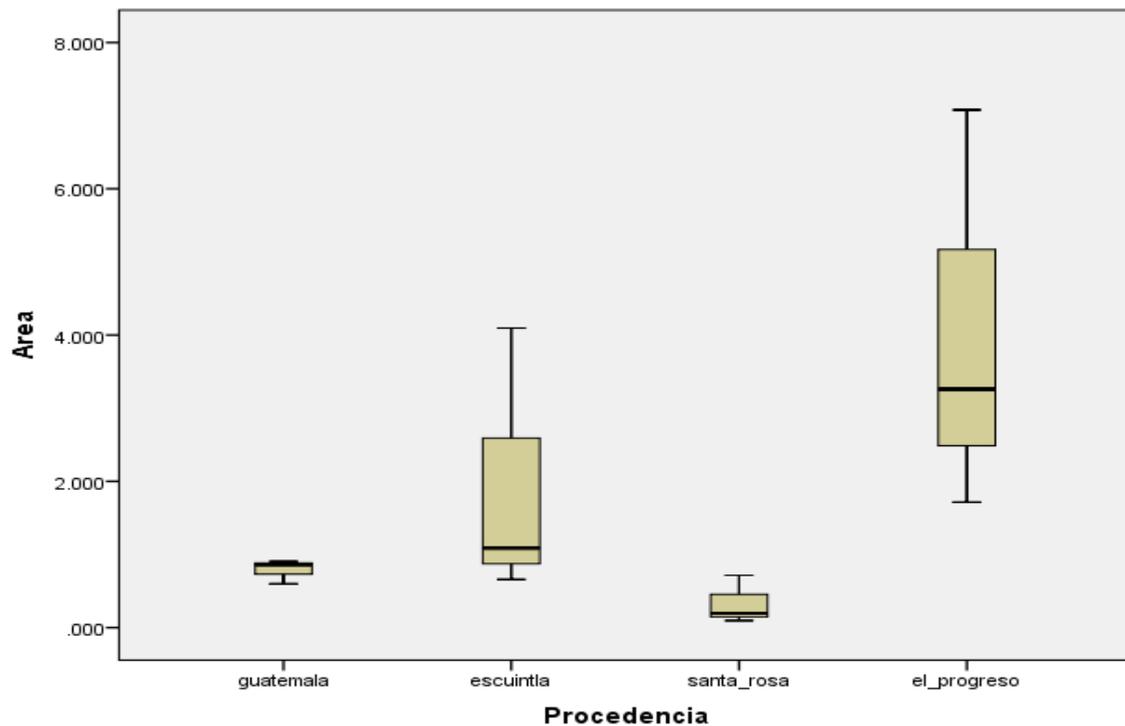
Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Concentracion (µg)
2	3.541	0.060	0.013
4	4.867	0.860	0.55
6	7.366	0.599	0.28
8	9.988	0.905	0.59

Figura No. 20 Diagrama de Área vs Procedencia de hojas de *A. muricata*



Fuente: Datos obtenidos en Software SPSS.

Figura No. 21 Diagrama de Concentración vs Procedencia de hojas de *A. muricata*



Fuente: Datos obtenidos en Software SPSS.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizaron colectas del material vegetal durante el período de noviembre de 2015 y enero de 2016 luego de identificar la planta, *A. muricata*, de cada procedencia en 4 departamentos de Guatemala, se visitaron los siguientes lugares: Siquinalá, Escuintla, Guazacapán, Santa Rosa, Finca Patache, El Progreso, Yalcachimba, Guatemala.

Se realizó la extracción de aceite fijo de las semillas de la especie en estudio, por medio de extracción continua utilizando el equipo soxhlet, obteniendo así los porcentajes de rendimientos de cada una de ellas. Como se observa en el cuadro No. 1, La semilla de la especie *A. muricata* procedente de Guazacapán, Santa Rosa, presentó mayor rendimiento de aceite (21.4%) y la semilla de la especie *A. muricata*, procedente de Finca Patache, El Progreso presentó el menor rendimiento (20.9%). Posteriormente se realizó la extracción de acetogéninas por medio de una marcha analítica, la cual se observa en la figura 9, y se obtuvo el porcentaje de rendimiento de dichos extractos para la semilla de la especie en estudio de cada procedencia. En el cuadro No. 1 se observa que el extracto de la semilla de Guazacapán, Santa Rosa obtuvo el mayor rendimiento (10.8%) y el extracto de la semilla de Yalcachimba, Guatemala obtuvo el menor rendimiento (10.67%). Por lo que se pudo observar que aproximadamente el 50% del extracto con hexano quedó en la fracción acuosa de la separación y el resto quedó en la de CH_2Cl_2 . También se puede observar, para las semillas en su coeficiente de variación (CV) que los datos tienen homogeneidad respecto a su promedio. Esto coincide con lo estipulado por la USP (United States Pharmacopeia), donde se estipula que la extracción por soxhlet proporciona datos menos dispersos (Núñez, 2008).

Esta similitud de rendimientos también puede deberse a que se muestreó estratégicamente en departamentos del país donde el cultivo y el número de especies de *A. muricata* es alto. Y que se encuentran en la altura ideal en cuanto a distribución geográfica, entre 900 – 1,800 m. La guanaba es una fruta tropical y subtropical, por lo que es sensible a bajas temperaturas o heladas cuando está en crecimiento activo. Los departamentos designados para la colecta mantienen el clima ideal durante época seca y lluviosa para su producción, que son los meses de febrero a mayo y de junio a septiembre (Orellana, 2005).

Se realizó también la extracción de aceite fijo a partir de las hojas de *A. muricata* de las procedencias antes mencionadas, por medio de extracción continua, utilizando equipo soxhlet. La variación en la preparación de la muestra respecto a la semilla, estuvo en el secado y la molienda. Posteriormente se obtuvieron los porcentajes de rendimiento. En el cuadro No. 2 se observa que el aceite extraído de Guazacapán, Santa Rosa tiene el mayor rendimiento (14.8%) y el aceite extraído de Finca Patache, El Progreso tiene el menor rendimiento (12.9%). Por medio de la marcha analítica utilizada también para las semillas, se obtuvieron los extractos para cada procedencia, dando como resultado, el mayor

rendimiento (7.22%) para Santa Rosa y el menor rendimiento (5.52%) para El Progreso.

Se observa también que el coeficiente de variación (CV) es más alto para los aceites extraídos a partir de las hojas y aún más para los extractos por separación líquido-líquido, por lo que sus rendimientos se encuentran más dispersos respecto a su promedio. Sin embargo se pudo observar que las semillas son mucho más oleoginosas respecto a las hojas, lo que dio como resultado más heterogeneidad en los datos obtenidos (Suárez, 2008).

En comparación con otros autores, el porcentaje de rendimiento de este estudio está entre los parámetros esperados para los extractos por soxhlet. Un estudio en 2010 reportó un promedio de 18.42% de rendimiento y otro en 2014 reportó un promedio de 3.22% de rendimiento para los extractos. La diferencia en el porcentaje de rendimiento puede verse afectada por la temperatura, debido a que pueden degradarse ciertos compuestos o su extracción no este favorecida (Flórez, 2010; Cardona, 2014).

Probablemente, en los extractos pueden estar presentes otros compuestos, que puedan ser extraídos de acuerdo a su polaridad.

Según la revisión bibliográfica, en ambas extracciones para cada procedencia, se puede suponer la presencia de compuestos activos de *A. muricata* como lo son las acetogeninas, flavonoides, resinas, saponinas, taninos, péptidos, glicósidos, esteroides y alcaloides, útiles para investigación de actividad biológica (Bobadilla, 2005).

Para la caracterización de los metabolitos secundarios, que en este caso son las acetogeninas de Annonaceae para *A. muricata*, se realizó un análisis preliminar por cromatografía en capa fina (CCF) en los extractos etanólicos de cada procedencia (F 005), utilizando como fase móvil CHCl_3 -MeOH. Los resultados obtenidos por CCF con el reactivo de Kedde como revelador, para las semillas se muestran en Anexos, en la figura No. 11, en donde se puede observar la cromatoplaqueta con manchas continuas de color rosado en la trayectoria de cada muestra sin Rf medible. También se realizó un segundo análisis que se muestra en Anexos, en la figura No. 12 para las semillas utilizando ácido fosfomolibdico como revelador, en el cual se pudo observar en la cromatoplaqueta, manchas azul grisáceo en la trayectoria de cada muestra sin Rf medible. Posteriormente se realizó el mismo análisis preliminar de caracterización de acetogeninas para las hojas, utilizando los extractos etanólicos (F 005) de cada procedencia. El análisis por CCF muestra en Anexos en la figura No, 13, donde se observan manchas de color rosado juntas e irregulares en las trayectorias de las muestras sin Rf medible (García, 2009).

Al presentar los extractos la coloración rosada con el reactivo de Kedde se indica la posible presencia de compuestos como las acetogeninas con anillo γ -lactónico α,β -insaturado. Estas reacciones se atribuyen a la presencia de un hidrógeno activo unido al doble enlace, en posición al carbonilo del anillo láctónico se agregan a la muestra ácido 3-5 dinitrobenzoico

con gotas de NaOH, dando una coloración rosa-violácea (Solís, 2010).

No fue posible medir el Rf en el análisis realizado para identificar acetogeninas ya que las manchas fueron continuas y se le atribuye a la complejidad de los extractos de la especie en estudio, además existe la posibilidad de la presencia de acetogeninas con diferentes características, como por ejemplo la variación en su polaridad (Flórez, 2010).

En la figura No. 10 se puede observar la curva de calibración a partir de siete diluciones del patrón de bulatacina (acetogenina), con su ecuación y coeficiente de correlación (R^2). Al obtener un coeficiente de correlación aproximadamente de 1, indicó una relación lineal entre las variables (área del pico vs concentración) y nos brinda datos más confiables. Por lo que se utilizó posteriormente para la cuantificación de acetogeninas de los extractos de semillas y hojas de *A. muricata*. En el cuadro No. 3 se muestran las concentraciones y las áreas de los picos de la curva de calibración de bulatacina para cada dilución.

Se realizó un barrido de cada extracto de semilla y hoja de las diferentes procedencias en un espectrofotómetro, en el cual se determinó que la máxima absorbancia era una longitud de onda de 205 nm. La cual se tomó como referencia para realizar posteriormente el análisis de los extractos por HPLC. Lo que concuerda con la teoría, ya que el rango de máxima absorbancia para las acetogeninas de *Annonaceae* está entre 200 – 225 nm. Y se descartaron lecturas de longitudes de onda entre 225-280 nm ya que corresponden a alcaloides bencilisoquinolínicos; flavonoides de 240-285 nm; fenoles a 270 nm (Zeng, 2004).

Se inició el Análisis con Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) con la bulatacina, la cual presentó un tiempo de retención de 8.173 minutos a una longitud de onda de 205 nm, lo que concuerda con estudios previos donde se observaron tiempos de retención siempre cercanos a 8 minutos y presentando su absorbancia en 202 ± 5 nm. Luego se procedió con los extractos metanólicos (F 005) de semillas y hojas de *A. muricata* de cada procedencia, en una corrida de 20 minutos cada uno, en donde todos presentaron un pico igual o muy cercano al tiempo de retención del estándar utilizado, por lo que se confirma la presencia de bulatacina en todas las muestras. En estudios previos se ha podido apreciar que los compuestos como las acetogeninas según su polaridad salen antes de los 15 minutos, éste tiempo se aumenta al usar una fase móvil como en este caso, que fue metanol- agua, ya que la columna utilizada (C18 fase reversa) es más afín a los compuestos solubles en metanol. Por lo que se puede observar que los picos tuvieron una buena resolución. Además el metanol tiene una longitud de onda de corte de 205 nm, que es la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una cubeta de paso óptico es igual a 1 unidad de absorbancia, por lo que fue más compatible con el detector y con el solvente (Bobadilla, 2005).

Luego de realizar la sumatoria de las áreas de los cromatogramas por medio de normalización de áreas, y al tener una curva de calibración del estándar externo (bulatacina) con un R^2 muy cercano a 1, se pudo proceder con estos datos, a cuantificar los picos correspondientes de las acetogeninas para cada uno de los extractos de semilla y hoja de *A. muricata*. En donde se pudo observar que la hoja de El Progreso presenta mayor concentración de bulatacina (1.14 μg) mientras que la de Guatemala presenta la menor (0.28 μg). En cambio en las otras procedencias, las semillas presentaron mayores concentraciones de bulatacina entre 0.54 μg y 1.06 μg .

En el cuadro No. 4 para semilla de Escuintla se puede observar % de área de pico vs la concentración del extracto respecto al estándar externo. El pico no. 6 tuvo la mayor concentración (1.06 μg) y el pico no. 2 la menor (0.15 μg). En el cuadro no. 5 para semilla de Santa Rosa, la mayor concentración fue el pico no. 3 (0.62 μg) y el pico no. 1 con la menor (0.11 μg). En el cuadro no. 6 se puede observar para semilla de El Progreso, la mayor concentración en el pico no. 5 (0.84 μg) y pico no. 1 con la menor (0.143 μg). En el cuadro no. 7 se observa a semilla de Guatemala con el pico no. 9 con la mayor concentración (0.54 μg) y el pico no. 5 con la menor (0.24 μg).

Se procedió con el análisis por CLAE igualmente para las hojas de la especie en estudio de cada procedencia. En el cuadro no. 8 se observa la hoja de Escuintla con el pico no. 1 con la mayor concentración (1.24 μg) y el pico no. 5 con la menor (0.24 μg). En el cuadro no. 9 para hoja de Santa Rosa, la mayor concentración la tiene el pico no. 8 (0.40 μg) y el pico no. 2 con la menor (0.08 μg). En el cuadro no. 10 para hoja de El Progreso, la mayor concentración es para el pico no. 1 (15.32 μg), y la menor para el pico no. 4 (0.86 μg). En el cuadro no. 11 se puede observar para hoja de Guatemala, el pico no. 8 tiene la mayor concentración (0.59 μg) y el de menor es el pico no. 2 (0.013).

En comparación con otros autores, las concentraciones de ACG en este estudio están entre lo esperado ya que un estudio en 2008 reportó concentraciones entre 0.91 μg y 38.5 μg y otro estudio en 2010 reportó concentraciones entre 0.022 μg y 10.73 μg utilizando bulatacina como estándar externo de igual manera. Las diferencias entre las concentraciones obtenidas se pueden explicar en el uso de un equipo de HPLC diferente, y a su vez diferentes condiciones de trabajo como temperatura, flujo y la selección de fase móvil (Castro, 2008; Flórez, 2010).

Para el análisis estadístico, se dividieron las muestras como un estudio estratificado para determinar diferencias significativas con la diferencia mínima significativa de Fisher entre los órganos de la especie en estudio y sus procedencias de los extractos, luego se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (Sogorb, 2004).

Para establecer diferencias entre las concentraciones evaluadas de las semillas para cada procedencia, se puede observar en la cuadro no. 3 en anexos se observa el valor de $F =$

0.109, a un nivel de significancia de 0,05, por lo que el estudio fue preciso ya que es menor a 1 de acuerdo a al grado de libertad de regresión y al grado de libertad. Se obtuvo el valor de 2.287 de diferencia mínima significativa para las semillas, por lo que las concentraciones no son significativamente diferentes.

En el cuadro no. 5 que se encuentra en anexos se observa para las hojas la determinación del valor de $F= 2.878$ a un nivel de significancia de 0,05 por lo que el estudio en este caso deja un poco a un lado la precisión. Al obtener 5.765 como diferencia mínima significativa para las hojas, se puede decir que las concentraciones si son significativamente diferentes. Debido a que los valores de significancia obtenidos en los cuadros 13 y 15 (0.103 y 0.185) son menores de 0,05 se determina que el modelo de regresión es válido (Sogorb, 2004).

Según sus medias aritméticas, que se observan en el cuadro 1 en anexos, las hojas tienen más concentración de acetogeninas (bulatacina) respecto a las semillas. Y la zona oriental del país tiene más concentración de acetogeninas (bulatacina) respecto a la zona central del país, según la colecta de dichos departamentos (INE, 2004).

11. CONCLUSIONES

- 11.1. El mayor rendimiento de aceite fijo para las semillas, lo presentó *A. muricata* de Guazacapán, Santa Rosa (21.4%) y el de menor rendimiento fue *A. muricata* de Finca Patache, El Progreso (20.9%).
- 11.2. El mayor rendimiento de aceite fijo para las hojas, lo presentó *A. muricata* de Guazacapán, Santa Rosa (14.8%) y el de menor rendimiento fue *A. muricata* de Finca Patache, El Progreso (12.9%).
- 11.3. Los extractos diclorometánicos con mayor rendimiento para las semillas fueron los de *A. muricata* procedente de Guazacapán, Santa Rosa (10.80%) y los de menor rendimiento fueron los de Yalcachimba, Guatemala (10.67%).
- 11.4. Los extractos diclorometánicos con mayor rendimiento para las hojas fueron los de *A. muricata* procedente de Guazacapán, Santa Rosa (7.22%) y los de menor rendimiento fueron los de Finca Patache, El Progreso (5.52%).
- 11.5. Por medio de Cromatografía en capa fina se evidenció la posible presencia de acetogeninas con anillo γ -lactónico α,β -insaturado de Annonaceae en los extractos tanto de hojas como semillas de *A. muricata* de diferentes procedencias.
- 11.6. Se confirmó la presencia de bulatacina en todas las muestras ya que presentaron un pico igual o muy cercano al tiempo de retención del estándar. La hoja de El Progreso presentó la mayor concentración (1.14 μg) y la de Guatemala la menor (0.28 μg). Mientras que las semillas de las otras procedencias presentaron mayores concentraciones.
- 11.7. Se caracterizaron y cuantificaron ACG presentándose la mayor concentración en las semillas de Escuintla (1.06 μg) y la menor concentración en Guatemala menor (0.24 μg). Al cuantificar ACG en hojas se observó en El Progreso, la mayor concentración (15.32 μg) y en Santa Rosa, la menor (0.08 μg).
- 11.8. No existe diferencia significativa en la cantidad de ACG detectada en semillas de *A. muricata* de las diferentes procedencias del país.
- 11.9. Existe diferencia significativa en la cantidad de ACG detectada en hojas de *A. muricata* de las diferentes procedencias del país.

11.10. La concentración de ACG en hojas de *A. muricata* resultó mayor que la concentración de ACG en semillas, específicamente se observó que es mayor en la región oriental del país sobre la central.

12. RECOMENDACIONES

- 12.1.** Continuar con estudios químicos en extractos de semilla y hojas de *A. muricata* y evaluar actividad biológica.
- 12.2.** Realizar extracción, identificación y cuantificación de ACG en raíz, tallo y flores de *A. muricata*, para comparar y determinar si existe diferencia.
- 12.3.** Realizar colecta de otras regiones del país que también tienen un alto cultivo de *A. muricata* como lo son otros departamentos de la región nororiental, suroriental y suroccidental y realizar estudios de identificación y cuantificación de ACG.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ávila, F. (2005). *Efecto del ácido giberelico y agua a 4° c en la germinación de las semillas de guanaba. (Annona muricata L.)* Recuperado de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2168.pdf

Barahona, V. (2013). *Evaluación de la actividad antioxidante y valor nutracéutico de las hojas y frutos de la guanábana (Annona muricata).* Recuperado de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2453>

Bobadilla, M. et al. (2002). *Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de Annona cherimolia Miller “chirimoya” Y A. muricata Linneaus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de Anopheles sp. Rev. peru. biol. 9(2): 64 – 73.*

Bobadilla, M. et al. (2005). *Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de Annona muricata Linnaeus «guanábana» sobre Aedes aegypti Linnaeus (Diptera: Culicidae).* Rev. Perú. Biol. 12(1):145-152.

Cabra, J., Sánchez, R., Mejía, A. (2002). *La guanábana una nutritiva fruta del trópico americano con un mercado rentable y promisorio.* Revista optimización de la cadena productiva, 3,132-136. 2002.

Cardona, N. (2014). *Evaluación de la actividad insecticida del extracto etanólico de semillas de Annona muricata L. (Annonaceae) cultivada en el eje cafetero frente al Corythucha gossypii (Chinche de encaje).* Recuperado de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/4929/6329517C268.pdf;jsessionid=1092A2EB9FF84E19EA528DD40113714D?sequence=1>

Castro, J. (2007). *Cultivo de la Anona.* Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. Recuperado de: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00109.pdf>

Castro, L., Alzate, M. (2008). *Estudio preliminar de la actividad biológica de extractos de A. cherimolla Mill.* Recuperado de: <https://www.yumpu.com/es/document/view/16011625/estudio-preliminar-de-la-actividad-biologica-de-9>

Cave, A. et al. (1997). *Acetogenins from Annonaceae. Progress in the chemistry of Organic Natural Products.* Springer-Verlay, New-York: 81-287.

Chuqui, M. (2013). *“Evaluación de la actividad Antiinflamatoria de la escorzonera (Perezia multiflora) en ratas (Rattus norvegicus).* Recuperado de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2604/1/56T00383.pdf>

Conabio, México. (2000). *Annona muricata*. Recuperado de: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/5-annon2m.pdf

Flórez, L., Mesa, V. (2007). *Monografía sobre pruebas de actividad biológica con dos organismos modelos en Acetogeninas de Annonaceae con actividad biopesticida*. Recuperado de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/351/1/58322F634ms.pdf>

Flórez, Y., Martínez, E. (2010). *Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de Annona muricata de la región cafetera*. Recuperado de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1828/1/63441F634.pdf>

García, S. (2006). *Caracterización agromorfológica de frutos de cuatro especies de Annona en los departamentos de santa rosa y jutiapa*. Recuperado de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2337.pdf

García, K. (2009). *Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de Annona cherimolia y Annona muricata. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico*. Recuperado de: <http://tesis.ipn.mx/jspui/handle/123456789/4071>

Guapacha, A. (2006). *Monografía sobre el aprovechamiento de compuestos activos de la Guanábana (Annona muricata L.)*. Universidad Tecnológica de Pereira. 2006. 3-10.

INE (Instituto Nacional de Estadística). (2004). Número de fincas censales, superficie cultivada y producción obtenida de cultivos permanentes y semipermanentes. tomo 3. Guatemala.

Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.

Lyncott. (2009). *Propiedades de la guanábana*. Recuperado de: <http://lyncott.mx/wordpress/?author=1&paged=66>

Marmara, L. (2004). *Veinte plantas medicinales*. Instituto de Ciencia Y Tecnología Agrícola, Publicaciones Recursos Naturales, 28-35. 2004.

Medinilla, B. (1996). *Manual de Laboratorio de Farmacognosia*, USAC.

Méndez, J. (2003). *Perfil de Mercado y Productivo de la Guanaba*. Nueva Guatemala de la Asunción – Guatemala: Abt. Assocites Inc.

Montoya, J, Colmenares, A. J. (2005). *Acetogeninas de Annonaceae como pesticidas naturales sobre larvas del cogollero del maíz spodoptera frugiperda (lep: noctuidae)*. Colombia: Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle, 32-40.

Núñez, C. (2008). Extracciones con soxhlet. Recuperado de: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>

Orellana, A.D., Martínez, E. (2005). *Distribución Geográfica De Anonáceas en Guatemala*. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola, Publicaciones Recursos Naturales, 3-7.

Pérez, R. (2010). *Árboles, Arbustos y Palmas de Centro América*. Recuperado de: <http://ctfs.si.edu/webatlas/findinfo.php?specid=377&leng=spanish>

Poma, E. et al. (2011). *Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la Annona muricata L. (guanábana) de Cuzco*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú: Ciencia e Investigación 2011; 14(2): 29-33.

Rieser, M. (1996). *Cinco Acetogeninas del Anillo mono-tetrahidrofurano de las semillas de Annona muricata L.*, J. Nat Prod, 59, 100-108. 1996.

Suárez, L. (2008). Docencia: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. Recuperado de: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf

Sogorb, S., Vilanova, E. (2004). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos: Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias*. España: Ediciones Díaz de Santos.

Solís, J.A. et al. (2010). *Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de "almendra" de guanábana (Annona muricata, L)*. Rev. Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana. 61(1): 58-66.

Universidad de Granada. (2010). Extracción sólido-líquido y recuperación del disolvente: obtención de aceite de girasol. Recuperado de: <http://fciencias.ugr.es/practicadocentes/wp-content/uploads/guiones/ExtraccionSolidoLiquido.pdf>

Universidad de Jaén (2006). Química Analítica: Técnicas Cromatográficas. Recuperado de: http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf

Universidad Central de Venezuela. (2008). Guía de Cromatografía. Recuperado de: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>

Villegas, R. et al. (2013). *Efecto insecticida de extractos vegetales, sobre larvas de Culex tarsalis (Diptera: Culicidae) en laboratorio*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 4(2): 273-284

Zeng, L. et al. (2004). *Recent Advances in Annonaceous Acetogenins*. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy. (1). 2-6.

Recolección de Guanaba

14. ANEXOS

Puntos de Recolección



Punto 1 de Recolección,
Escuintla



Punto 2 de Recolección, Santa
Rosa



Punto 3 de Recolección, El
Progreso



Punto 4 de Recolección,
Ciudad de Guatemala

Fincas de Siembra de Guanaba



Siquinalá, 14.30452, -90.96534



Guazacapán, 14.07364,
-90.41487

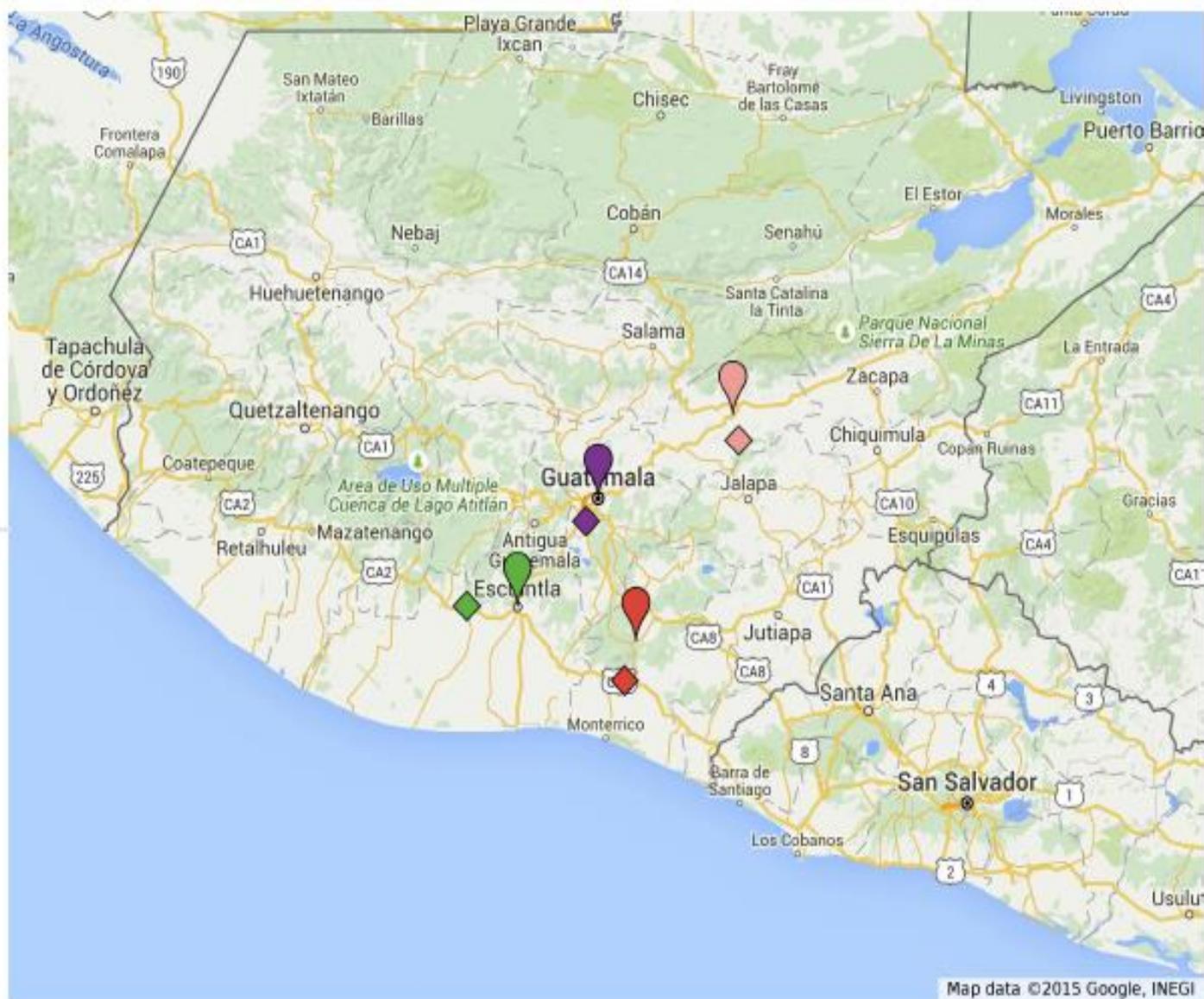


Finca Patache, 14.8167,
-90.0167



Empresa

Yalcachimba, 14.56566,
-90.54967



Tamizaje Fitoquímico



Figura No. 1 Tamizado de semillas de *A. muricata*



Figura No. 2 Tamizado de hojas de *A. muricata*



Figura No. 3 Extracción de aceite semillas por soxhlet

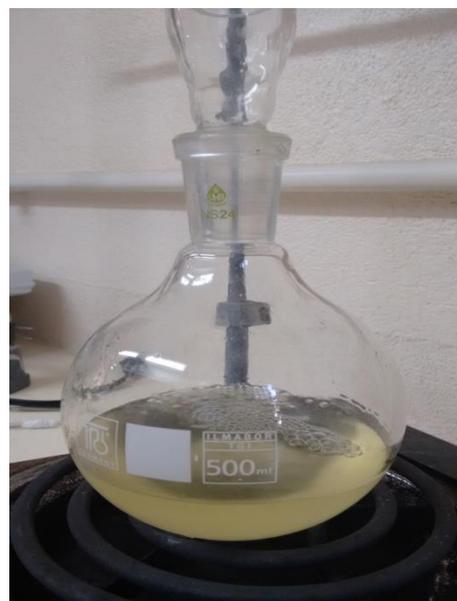


Figura No. 4 Extracción de aceite por soxhlet

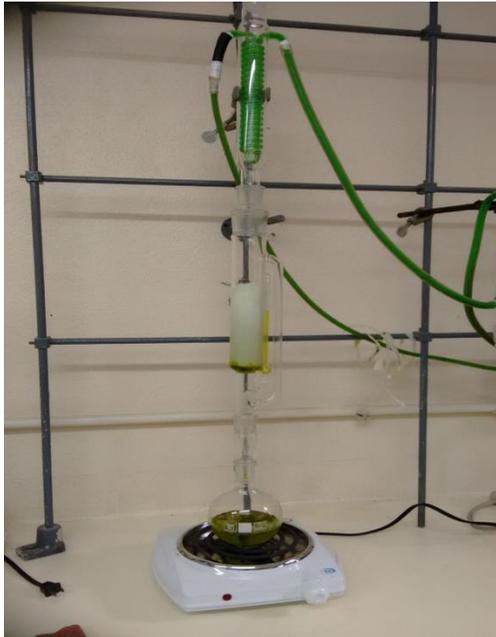


Figura No. 5 Extracción de aceite de hojas por soxhlet



Figura No. 6 Concentración de extracto por rotavapor



Figura No. 7 Extracto de semilla de *A. muricata*

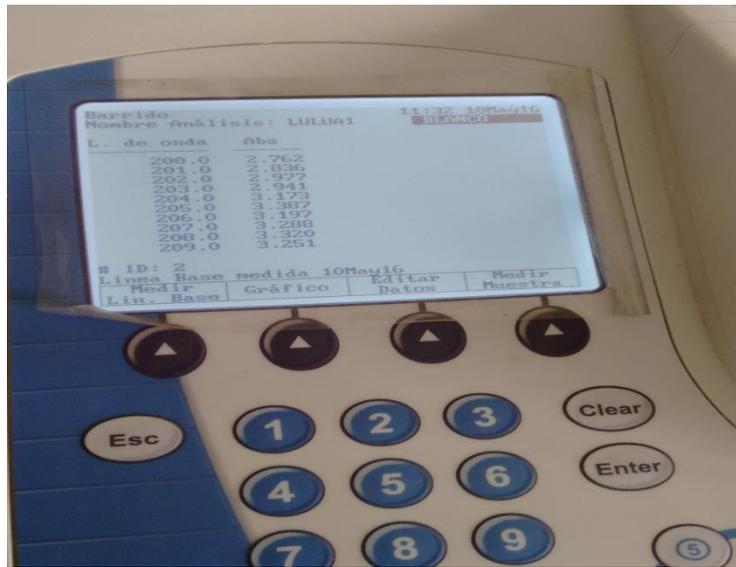


Figura No. 8 Barrido de extractos en espectrofotómetro

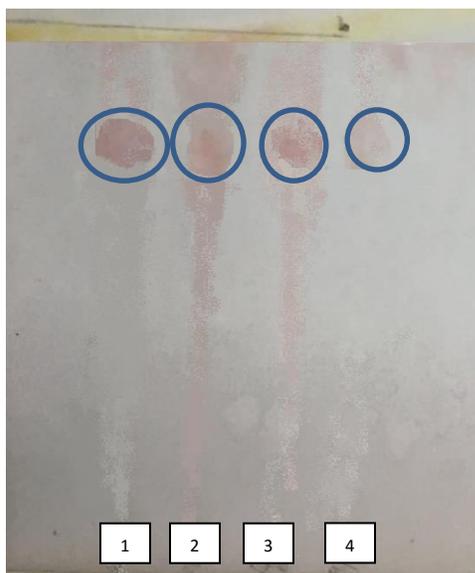


Figura No. 9 Identificación y cuantificación por HPLC



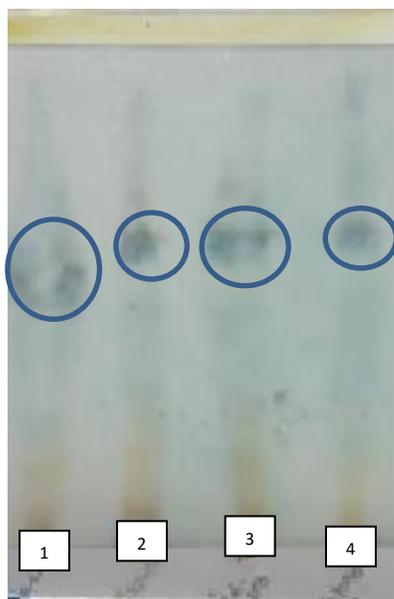
Figura No. 10 Identificación y cuantificación por HPLC

Cromatografía en Capa Fina (CCF)



1. Semilla *A. muricata*, Procedencia: Guatemala
 2. Semilla *A. muricata*, Procedencia: Escuintla
 3. Semilla *A. muricata*, Procedencia: Santa Rosa
 4. Semilla *A. muricata*, Procedencia: El Progreso
- Fase móvil: Fase móvil: Cloroformo-metanol (9:1)
Reactivo revelador: Reactivo de Kedde

Figura No. 11 CCF Extracto Semillas *A. muricata*



1. Semilla *A. muricata*, Procedencia: Guatemala
 2. Semilla *A. muricata*, Procedencia: Escuintla
 3. Semilla *A. muricata*, Procedencia: Santa Rosa
 4. Semilla *A. muricata*, Procedencia: El Progreso
- Fase móvil: Fase móvil: Cloroformo-metanol (9:1)
Reactivo revelador: Ácido Fosfomolibdico

Figura No. 12 CCF Extracto Semillas *A. muricata*



1. Hoja, *A. muricata*, Procedencia: Guatemala
 2. Hoja, *A. muricata*, Procedencia: Escuintla
 3. Hoja, *A. muricata*, Procedencia: Santa Rosa
 4. Hoja, *A. muricata*, Procedencia: El Progreso
- Fase móvil: Fase móvil: Cloroformo-metanol (9:1)
 Reactivo revelador: Reactivo de Kedde

Figura No. 13 CCF Extracto Hojas *A. muricata*

Cuadro No. 1 Datos estadísticos descriptivos generales de semillas de *A. muricata* de Escuintla, Santa Rosa, El Progreso y Guatemala

Procedencia	Area		Concentracion	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Guatemala	.583	.266	.363	.157
Escuintla	.780	.599	.560	.462
Santa Rosa	.632	.455	.423	.274
El Progreso	.708	.433	.451	.355

Cuadro No. 2 Datos estadísticos descriptivos de semillas de *A. muricata* de Escuintla, Santa Rosa, El Progreso y Guatemala

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Varianza	Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar
Area	12	.108	1.375	.67575	.395009	.156	-.795	1.232
Concentracion	12	.110	1.060	.44942	.292271	.085	.193	1.232
N válido (por lista)	12							

Cuadro No. 3 Análisis de la Varianza para semillas de *A. muricata*

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Area	Entre grupos	.068	3	.023	.109	.952
	Dentro de grupos	1.649	8	.206		
	Total	1.716	11			
Concentración	Entre grupos	.061	3	.020	.185	.904
	Dentro de grupos	.879	8	.110		
	Total	.940	11			
	LSD	2.287				

Cuadro No. 4 Datos estadísticos descriptivos de hojas de *A. muricata* de Escuintla, Santa Rosa, El Progreso y Guatemala

Procedencia		Área	Concentración
Guatemala	Media	.78800	.4733
	N	3	3
	Desviación estándar	.165218	.16862
	Varianza	.027	.028
Escuintla	Media	1.94733	.7867
	N	3	3
	Desviación estándar	1.872148	.44523
	Varianza	3.505	.198
Santa Rosa	Media	.33633	.2833
	N	3	3
	Desviación estándar	.331725	.14572
	Varianza	.110	.021
El Progreso	Media	4.01867	1.9567
	N	3	3
	Desviación estándar	2.761305	1.66290
	Varianza	7.625	2.765
Total	Media	1.77258	.8750
	N	12	12
	Desviación estándar	2.063913	1.00426
	Varianza	4.260	1.009

Cuadro No. 5 Análisis de la Varianza para hojas de *A. muricata*

			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Area * Procedencia	Entre grupos	(Combinado)	24.323	3	8.108	2.878	.103
	Dentro de grupos		22.534	8	2.817		
	Total		46.857	11			
Concentracion * Procedencia	Entre grupos	(Combinado)	5.068	3	1.689	2.242	.161
	Dentro de grupos		6.026	8	.753		
	Total		11.094	11			
LSD			5.765				

Extracción con Soxhlet en el momento en que se produce el sifonamiento del solvente

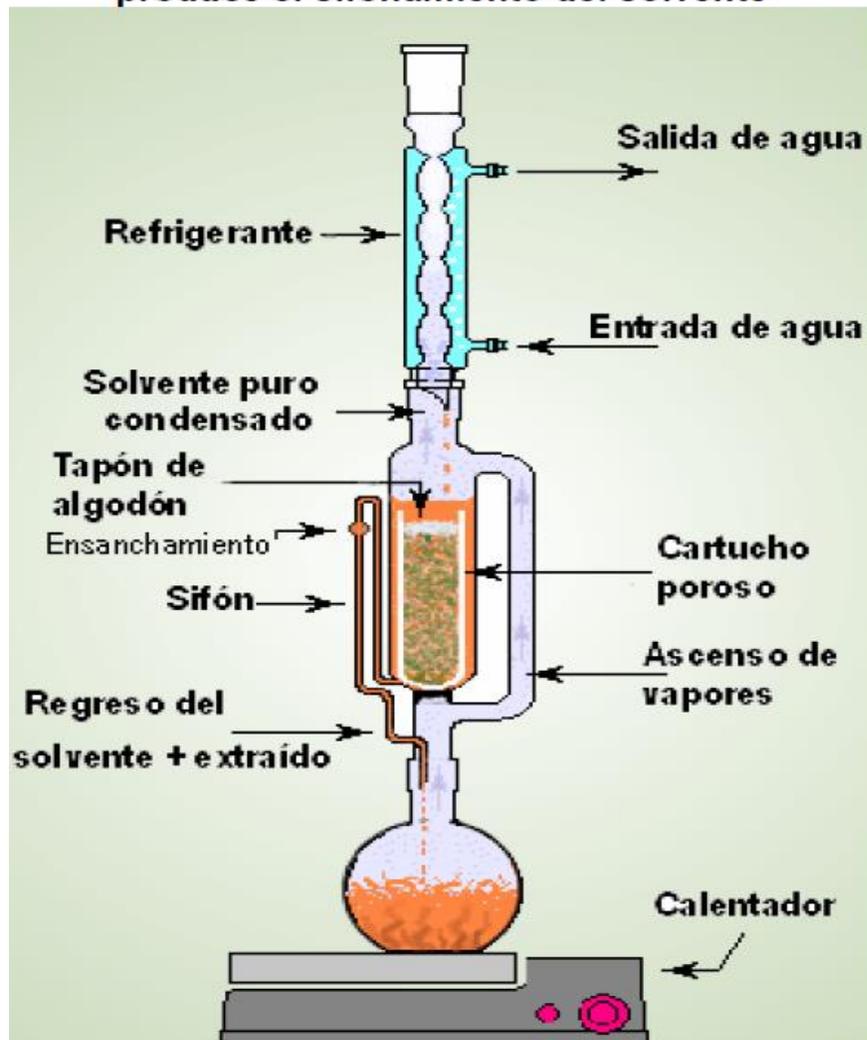
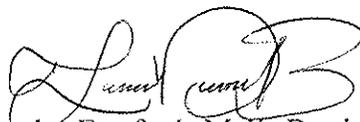


Figura No. 13 Esquema de Extracción de aceite mediante soxhlet



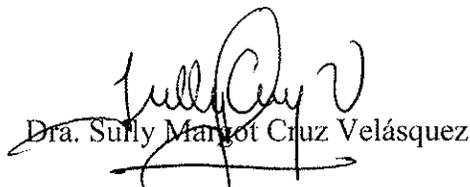
Br. Lourdes Estefanía Mejía Barrios

Autora



Lic. Estuardo Serrano Vives

Asesor



Dra. Sully Margot Cruz Velásquez

Revisora



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta, Ms.A.

Directora de Escuela



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

Decano