



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Aislamiento y Caracterización Estructural de  
Péptidos Bioactivos obtenidos del bagazo de las  
semillas de *Annona muricata* (Guanábana)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**GEORGINA ALMAGUER CORREA**



**MÉXICO,D.F.**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO:**

- ❖ **PRESIDENTE:** Dra. Rocío Pozas Horcasitas
- ❖ **VOCAL:** M. en C. Blas Flores Pérez
- ❖ **SECRETARIO:** Dr. Lino Joel Reyes Trejo
- ❖ **1er. SUPLENTE:** José Guadalupe López Cortes
- ❖ **2er. SUPLENTE:** Guillermina Yazmin López Cortes

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química UNAM.  
Laboratorios L-208 de Química Orgánica y L-111 de Fisicoquímica.

Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento  
de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo.

**ASESOR DEL TEMA:** Lino Joel Reyes Trejo

-----  
**FIRMA**

**SUPERVISOR TECNICO:** Benito Reyes Trejo

-----  
**FIRMA**

**SUSTENTANTE:** Georgina Almaguer Correa

-----  
**FIRMA**



---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad realizarme como persona y como profesionista, porque me ayudo a culminar cada una de mis metas propuestas durante mi estadía en ella y logra mi mayor meta de mi vida.

A la Universidad Autónoma de Chapingo por brindarme la oportunidad de elevar mi conocimiento, así como la facilidad de trabajar en sus instalaciones del Departamento de Preparatoria Agrícola complementando mi formación como profesionista.

Al Doctor Lino Joel Reyes Trejo por aceptarme para realizar el proyecto pero sobre todo porque deposito su confianza en mí para obtener los mejores resultados, por cada uno de sus consejos , su ayuda y apoyo que me brindo para que realizar cada parte del proceso de este proyecto, no tengo más que decir GRACIAS POR TODO.

Al Doctor Benito Reyes Trejo por brindarme el apoyo para realizar el trabajo experimental en su laboratorio y darme más herramientas con las que me forje mis conocimiento que fortaleció mi proyecto.

A la Doctora Roció Pozas Horcasitas por brindarme su apoyo e interés en mi proyecto que fueron el granito de arena que ayudo a culminar mis conocimientos y aprender lo que ni en los mejores libros se aprende, Gracias Doctora.

AL Maestro Lucio Antonio Reyes Chumacero por permitirme trabajar en su laboratorio y compartir todo su conocimiento e invitarme siempre a ser más y a siempre lograr mis metas.

A las Maestras Alejandrina Acosta Huerta e Irene Sara Audelo Méndez, por su paciencia en realizar los análisis de Resonancia Magnética Nuclear y estar al pendiente y esforzarse de que siempre estuviera bien hecho el trabajo,



---

A mi mamita Hilda Correa Cruz por ser mi amiga, mi brazo derecho en todo momento y ayudarme a enfrentar cada momento en este proceso.

A mi tío Francisco Correa Cruz por todo su apoyo incondicional, cada uno de sus cuidados y lo más importante por alentarme a salir adelante cada día.

A Adriana Vera Soriano por ser mi apoyo en cada paso que daba en este proyecto, por estar ahí cuando mis manos no eran suficientes y compartír las suyas para que todo saliera mejor que bien y por qué hiso que este proyecto fuera el mejor proyecto de mi vida, GRACIAS AMIGA.

A Nerida por ser una gran compañera y amiga en cada día en el laboratorio, por resolver mis dudas cuando nadie las sabía y compartirme sus conocimientos, sus risas y su amistad sincera,



## DEDICATORIAS

Quiero dedicar mi trabajo a todas y cada una de las personas que me apoyaron durante todos estos años, que estuvieron conmigo en las buenas y en las no tan buenas, sin cada uno de ustedes no hubiera logrado concluir este gran ciclo de mi vida.

En especial a mi abuelo Sebastián Correa Montalvo por enseñarme que hay que luchar cada día por tus sueños sin detenerse para convertirlos en realidad, por cada una de las palabras que me brindo, porque me enseñó a ser una mujer respetable y valiosa, fuiste *mi inspiración en cada letra y cada esfuerzo para lograr este éxito.*

A mi gran amiga y confidente, a la persona que siempre espera lo mejor de mí, que comparte cada tristeza y cada alegría conmigo, que me ayuda hasta morir en el intento, que me ama como a nadie en el mundo y que por ella logro ser cada día mejor. A ti *MAMITA GRACIAS* por que siempre estas a mi lado ayudándome a superarme y pase lo que pase siempre estarás conmigo.

A Jorge Abraham Almaguer Correa sin ti la vida no sería divertida, no hubiera tenido mejor compañero de vida que tú para compartir cada momento, gracias por todo tu amor y apoyo eres parte de cada uno de mis éxitos. *Te quiero hermano.*







---

INDICE	Pag.
Índice de tablas.....	A
Índice de figuras.....	B
Índice de espectros.....	C
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo general.....	3
2.1.1 Objetivos particulares.....	3
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>4</b>
<b>4. MARCO TEORICO.....</b>	<b>5</b>
4.1 Manejo de residuos.....	3
4.1.2 Residuos de Alimentos.....	3
4.1.3 Valorización de residuos de alimentos.....	7
4.1.4 Residuos alimenticios como materia prima.....	10
4.1.5 Frutas y vegetales como materia prima para la obtención de compuestos funcionales.....	11
4.1.5.1 Uva.....	11
4.1.5.2 Cítricos.....	11
4.1.5.3 Mango.....	12
4.1.6 Manejo de Residuos Alimenticios en México.....	12

---



---

4.1.7 Ejemplos de aprovechamiento de residuos alimenticios en México.....	14
4.1.8 Residuos de <i>Annona muricata</i> como materia prima.....	15
4.2. Annonáceas.....	16
4.2.1 <i>Annona muricata</i> .....	16
4.2.2 Distribución de <i>Annona muricata</i> en Latinoamérica.....	18
4.2.3 Distribución de <i>Annona muricata</i> en México.....	19
4.3 Semilla de <i>Annona muricata</i> .....	20
4.3.1 Almacenamiento de la semilla.....	20
4.3.2 Bagazo de la semilla de <i>Annona muricata</i> .....	21
4.3.2.1 Propiedades fisicoquímicas del bagazo.....	21
4.3.2.2 Contenido de fibra en el bagazo.....	23
4.3.3 Aceite de la semilla.....	23
4.4. Acetogeninas presentes en Annonáceas.....	23
4.4.1 Acetogeninas en <i>Annona muricata</i> .....	25
4.4.2 Ciclopéptidos de <i>Annona muricata</i> .....	26
4.4.2.1 Estructura de ciclopéptidos aislados de <i>Annona muricata</i> .....	27
4.5. Identificación de ciclopéptidos por Resonancia Magnética Nuclear RMN.....	29
4.6. Identificación de ciclopéptidos por Resonancia Magnética Nuclear RMN.....	31

---



---

<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
5.1 Parte Experimental.....	34
5.2 Materia vegetal.....	35
5.3 Equipo y Reactivos.....	35
5.4 Limpieza de semillas.....	36
5.5 Análisis selectivo de semillas.....	37
5.6 Caracterización de semilla.....	37
5.7 Vida de anaquel de la semilla.....	37
5.7.1 Temperatura.....	38
5.7.2 Color y Aspecto.....	38
5.7.3 Densidad.....	38
5.7.4 Dureza.....	38
5.7.5 Humedad.....	39
5.8 Extracción del aceite de la semilla.....	39
5.8.1 Método de Soxhlet.....	39
5.8.2 Método de Extracción por Maceración.....	40
5.9 Pruebas de calidad del aceite.....	41
5.9.1 Determinación de Acidez (IA).....	42
5.9.2 Determinación de yodo (IY).....	42
5.9.3 Viscosidad cinemática.....	43
5.9.4 Densidad.....	43

---



---

5.9.5 Espectro de RMN <sup>1</sup> H de Aceite.....	43
5.10 Obtención del extracto metanólico.....	44
5.11 Obtención de particiones a partir del extracto metanólico.....	45
5.11.1 Partición de hexano.....	44
5.11.2 Partición de diclorometano.....	45
5.11.3 Partición de Acetato de etilo.....	45
5.11.4 Partición de <i>n</i> -butanol.....	45
5.11.5 Fase acuosa.....	45
5.12 Detección de ciclopéptidos.....	47
5.12.1 Síntesis de 2,5-piperazona.....	47
5.12.2 Solución de ninhidrina (detección de aminoácidos y péptidos)...	48
5.12.3 Sistema de revelado solución de Cl <sub>2</sub> / <i>o</i> -tolidina (Detección de ciclopeptidos).....	48
5.13 Separación de ciclopéptidos por cromatografía en columna.....	49
5.13.1 Purificación de ciclopéptidos aislados por cromatoplaça preparativa.....	50
5.14 Identificación de ciclopéptidos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	50
5.15 Determinación de actividad anticancerígena de ciclopéptidos aislados de la partición de acetato.....	52
5.16 Detección de acetogeninas.....	54
5.16.1 Identificación de acetogeninas en la partición de diclorometano.....	54
5.16.2 Purificación de acetogeninas de la partición de diclorometano....	54

---



---

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	55
6.1 Materia prima.....	55
6.2 Análisis Selectivo de la semilla.....	55
6.3 Caracterización de la semilla.....	57
6.4 Vida de anaquel de la semilla.....	58
6.4.1 Temperatura.....	58
6.4.2 Color y aspecto.....	59
6.4.3 Densidad.....	60
6.4.4 Dureza.....	61
6.4.5 Humedad.....	61
6.5 Extracción del aceite de la semilla.....	62
6.6.Pruebas de calidad del aceite .....	63
6.7 Estudio del bagazo de la semilla.....	65
6.7.1 Obtención del extracto metanólico.....	65
6.7.2 Obtención de particiones a partir del extracto metanólico.....	65
6.8 Detección de aminoácidos, péptidos y ciclopéptidos.....	67
6.8.1 Síntesis de ciclopéptido.....	67
6.8.2 Extractos revelados con disolución de ninhidrina.....	68
6.8.3Extractos revelados con el sistema de revelado Cl <sub>2</sub> / o-tolidina.....	71
6.9 Separación de ciclopéptidos por cromatografía en columna partición de acetato de etilo.....	72

---



---

6.9.1 Purificación de ciclopéptidos aislados de la partición de acetato de etilo .....	74
6.10 Identificación de ciclopéptidos por Resonancia Magnética Nuclear RMN.....	75
6.10.1 Partición de acetato de etilo.....	75
6.10.2 Partición de <i>n</i> -butanol.....	76
6.10.3 Fase acuosa.....	77
6.11 Determinación de actividad anticancerígena de ciclopéptidos y acetogeninas aislados de la partición de acetato .....	80
6.12 Detección de acetogeninas.....	83
6.12.1 Identificación de acetogeninas en la partición de diclorometano.....	83
6.12.2 Purificación de acetogeninas de la partición de diclorometano.....	84
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>87</b>

---



## INDICE DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.</b> Generación estimada de residuos sólidos municipales en México 2013	13
<b>Tabla 2.</b> Generación de residuos sólidos en el D.F	13
<b>Tabla 3.</b> Producción de <i>Annona muricata</i> año 2013	15
<b>Tabla 4.</b> Propiedades fisicoquímicas del bagazo de <i>Annona muricata</i>	22
<b>Tabla 5.</b> Acetogeninas presentes en <i>Annona muricata</i>	25
<b>Tabla 6.</b> Análisis selectivo de la semilla de <i>Annona muricata</i> en 5 Kg	54
<b>Tabla 7.</b> Determinación de las características físicas de la semilla de <i>Annona muricata</i>	57
<b>Tabla 8.</b> Determinación de temperatura	58
<b>Tabla 9.</b> Extracción de aceite del bagazo de la almendra de <i>Annona muricata</i>	61
<b>Tabla 10.</b> Pruebas de calidad del aceite de <i>Annona muricata</i>	62
<b>Tabla 11.</b> Particiones del extracto metanólico	65



## INDICE DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Flujo de materiales y generación de residuos.....	5
<b>Figura 2.</b> Los componentes presentes en los residuos generados en la cadena alimenticia y su uso en productos de interés comercial.....	8
<b>Figura 3.</b> Jerarquía de residuos de alimentos.....	9
<b>Figura 4.</b> Caracterización promedio de los residuos orgánicos del Distrito Federal (Duran et al.2013).....	14
<b>Figura 5.</b> Producción de <i>Annona muricata</i> año 2013.....	15
<b>Figura 6.</b> Clasificación científica de <i>Annona muricata</i> .....	17
<b>Figura 7.</b> Distribución de <i>Annona muricata</i> en Latinoamérica.....	18
<b>Figura 8.</b> Distribución de <i>Annona muricata</i> en México.....	19
<b>Figura 9.</b> Estructura de acetogeninas de <i>Annonaceae</i> .....	24
<b>Figura 10.</b> Estructura de <i>Annomuricatin C</i> de <i>Annona muricata</i> .....	29
<b>Figura 11.</b> Extracción de aceite de la almendra de la semilla de <i>Annona muricata</i> .....	40
<b>Figura 12.</b> Extracción de extracto metanólico del bagazo de la almendra de <i>A. muricata</i> y sus particiones.....	45
<b>Figura 13.</b> Reacción de la obtención del ciclopéptido 2,5-piperazindiona.....	46
<b>Figura 14.</b> Cromatografía de columna.....	50
<b>Figura 15.</b> Aislamiento y Caracterización de ciclopéptidos.....	49
<b>Figura 16.</b> Análisis selectivo de la semilla de <i>Annona muricata</i> .....	55
<b>Figura 17.</b> Semilla con daño por insecto.....	56



<b>Figura 18.</b> Semilla y Almendra de <i>Annona muricata</i> .....	56
<b>Figura 19.</b> Almendra y cascara de la semilla de <i>Annona muricata</i> .....	57
<b>Figura 20.</b> Determinación de color de <i>Annona muricata</i> .....	58
<b>Figura 21.</b> Índice de flotación.....	59
<b>Figura 22.</b> Extracto metanólico.....	67
<b>Figura 23.</b> Partición de diclorometano.....	68
<b>Figura 24.</b> Partición de acetato de etilo.....	68
<b>Figura 25.</b> Partición de <i>n</i> -butanol.....	69
<b>Figura 26.</b> Fase acuosa.....	69
<b>Figura 27.</b> Particiones de acetato de etilo, <i>n</i> -butanol, fase acuosa.....	70
<b>Figura 28.</b> Cromatoplasmas de fase móvil.....	71
<b>Figura 29.</b> Ciclopéptidos aislados de la partición de acetato de etilo....	72
<b>Figura 30.</b> Estructura de la Annonomicatina aislada de semillas de <i>Annona muricata</i> colectadas en China (Li Chao Ming, 2006).....	78
<b>Figura 31.</b> Fragmentos característicos deducidos del espectro de RMN de <sup>1</sup> H a 400 MHz que ayudan a proponer la estructura de las acetogeninas.....	80
<b>Figura 32.</b> Resultados de líneas celulares de acetogeninas y ciclopéptidos.....	82



## INDICE DE ESPECTROS

	Pag.
<b>Espectro 1.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de aceite de la almendra de <i>Annona muricata</i> .....	64
<b>Espectro 2.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN $^1\text{H}$ , $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz) de la separación de ciclopéptidos por cromatografía de columna de la partición de acetato de etilo.....	76
<b>Espectro 3.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (60 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) del triptófano mostrando señales para protones aromáticos entre 7 y 8 ppm (Bhacca et al, 1962).....	77
<b>Espectro 4.</b> Espectro integrado de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN $^1\text{H}$ , $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz) de la separación de ciclopéptidos por cromatografía de columna de la partición de acetato de etilo.....	78
<b>Espectro 5.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) del ciclopéptido phakellistanina aislada de una esponja marina.....	79
<b>Espectro 6.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) obtenida de la cromatografía de columna de la partición de acetato de etilo.....	79
<b>Espectro 7.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) del extracto de partición de diclorometano....	83



## 1. INTRODUCCIÓN

La dieta actual requiere el aporte de proteínas que contengan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos de nuestro organismo, como consecuencia de la digestión de las proteínas además de aminoácidos libres, se liberan péptidos, las cuales son cadenas con distinto y diferente número de aminoácidos, en los últimos años ha crecido el interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas de la dieta, los cuales tienen actividad biológica que regula algunos procesos fisiológicos, además de elevar su valor nutricional.

Los primeros trabajos realizados sobre este tema refieren a los péptidos provenientes de la leche y sus derivados para consumo humano. Recientemente se han estado aprovechando proteínas de fuentes no convencionales, cabe destacar el estudio de semillas de girasol, estos estudios son realizados tras la extracción industrial de sus aceites con lo cual se obtiene también la harina desgrasada o bagazo con un alto contenido de proteína, la cual podría ser aprovechada para la obtención de péptidos bioactivos. Estos péptidos son pequeñas secuencias de aminoácidos inactivos dentro de la proteína, pero que pueden ser liberados tras la hidrólisis de estas proteínas y ejercer diversas funciones. Entre los más importante destacan los péptidos con actividad antitrombótica, inmunomoduladora, transportadora de iones o hipotensora.

La familia de las anonáceas incluye especies de importancia etnobotánica y económica, en las semillas de sus frutos se ha encontrado una serie de sustancias y compuestos de interés biológico como acetogeninas y ciclopéptidos. Estos péptidos han mostrado diversas actividades, tales como: citotóxica y antiinflamatoria, en especies como: *Annona muricata* y *Annona. cherimola*, entre otras de la familia de las *Annonas*.



En el caso de la *Annona muricata* (guanábana), se ha documentado que existen diferencias al estudiar los diferentes tipos de semilla debido al origen de la misma, aislándose ciclo péptidos diferente tales como las *Annomuricatinas* A y B de china, o la *Annomuricata* C de Senegal.

En México la semilla de la guanábana se ha considerado como un desecho de la industria alimentaria, sin embargo, como ya se mencionó, tiene importantes propiedades terapéuticas que la hacen una semilla muy valiosa y con propiedades que pueden combatir enfermedades como el cáncer.

Considerando la importancia de las semillas de este fruto como fuente de potenciales fármacos con actividad el presente proyecto tiene como objetivo principal aislar y caracterizar estructuralmente los péptido o ciclopéptidos bioactivos contenidos en el bagazo de las semillas de la *Annona muricata* (guanábana) cultivada en México.



---

## 1. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

❖ Aislamiento y caracterización estructural de péptidos bioactivos obtenidos del bagazo de las semillas de *Annona muricata* (Guanábana).

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

❖ Realizar el análisis selectivo y de calidad de las semillas de *Annona muricata* para el aprovechamiento de los componentes que la constituyen.

❖ Extracción del aceite proveniente de la almendra de la semillas de *Annona muricata* como subproducto obtenido en el aprovechamiento del bagazo.

❖ Aislamiento de ciclopéptidos a partir de las diferentes extracciones (acetato de etilo, *n*-butanol, fase acuosa) para su identificación y caracterización RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

❖ Aislamiento de las acetogeninas a partir de la extracción de diclorometano por cromatografía de capa delgada (CCD) y su identificación por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



### 3. HIPOTESIS

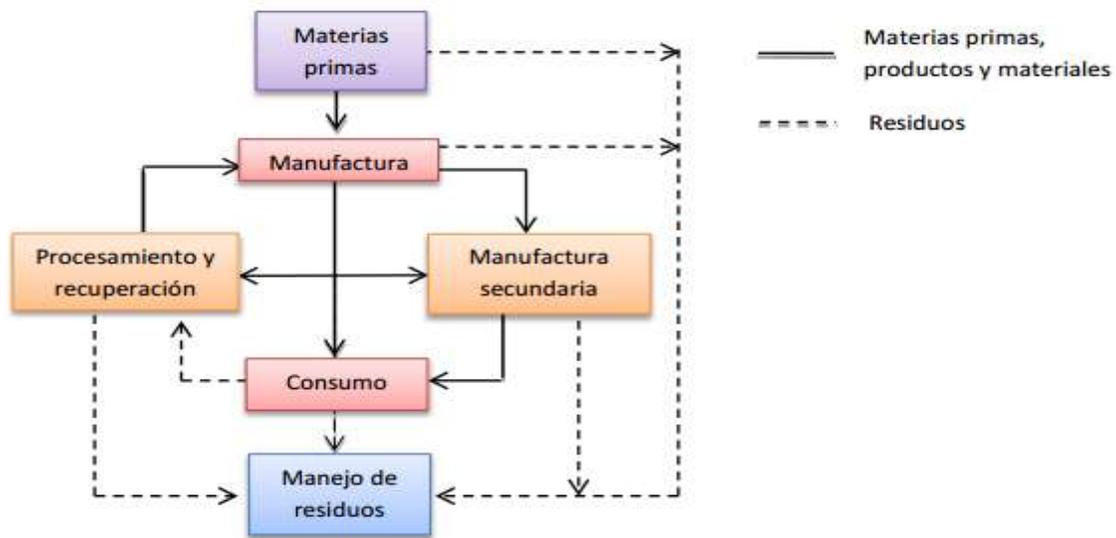
La semilla residual de *Annona muricata* presentará una buena calidad para la extracción de compuestos bioactivos y su utilización será un proceso viable y sustentable para la obtención de ciclopéptidos. Estos ciclopéptidos podrán ser aislados e identificados en términos de sus actividad citotóxica y biológica.



## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 Manejo de residuos

Las actividades humanas producen grandes cantidades de residuos, los cuales son generados en distintos tipos de procesos como son: extracción de materias primas, procesos de manufactura y en el consumo de productos. En la Figura 1 se puede observar que para reducir la cantidad de residuos la estrategia es incrementar la recuperación y reusó de materiales y residuos (UNEP, 2013).



**Figura 1.** Flujo de materiales y generación de residuos

Los residuos en la actualidad son un gran problema en todo el mundo y su manejo es una actividad cada vez más importante en países desarrollados. Los diferentes tipos de residuos se pueden clasificar en función de su origen.: residuos urbanos, industriales, agrícolas, sanitarios.. La reutilización de residuos influirá positivamente en beneficios para la industria y la sociedad, al generarse nuevos recursos y ampliarse las oportunidades de innovación (Segre-Gaiani, 2012).



### 4.1.2 Residuos de Alimentos

Los residuos de alimentos (RA) se pueden definir como los productos finales de diversas industrias provenientes del procesamiento de alimentos que no han sido reciclados o utilizados para otros fines. Es el flujo de productos de materias primas cuyo valor económico es menor que el coste de la recuperación para su reutilización (Dobbs *et al*, 2011).

Alrededor de 89 millones de toneladas de RA se generan cada año en la Comunidad Europea (UE) de esta cantidad, 38% corresponde al sector manufacturero y el 42 % al de los hogares. Los RA representan un problema desde el punto de vista logístico, lo que hace difícil su recolección y concentración en un solo lugar.

La RA se produce en todas las etapas de la cadena de suministro de alimentos, siendo más evidente en el sector minorista y el consumidor. Recientes informes de la FAO estima que hasta un 50 % de los alimentos producidos se pierde o se desperdicia antes y después de llegar al consumidor, lo que representa 1,3 mil millones de toneladas anuales de alimentos producidos a nivel mundial para el consumo humano (Parfin- Barthel, 2010).

La cadena de suministro de alimentos abarca una amplia variedad de procesos de fabricación que generan cantidades acumulativas de diferentes residuos orgánicos. La creciente demanda de productos químicos y combustibles, junto con otros productos, alientan a la reutilización y valorización eficiente de los residuos orgánicos de la cadena de suministro de alimentos para la producción de materiales de valor añadido novedosos, productos químicos así como combustibles (Gómez *et al*, 2010).

Los residuos producidos por los sectores agrícola y de procesamiento de alimentos se generan de una forma más selectiva y por lo tanto sería más fácil su recolección.



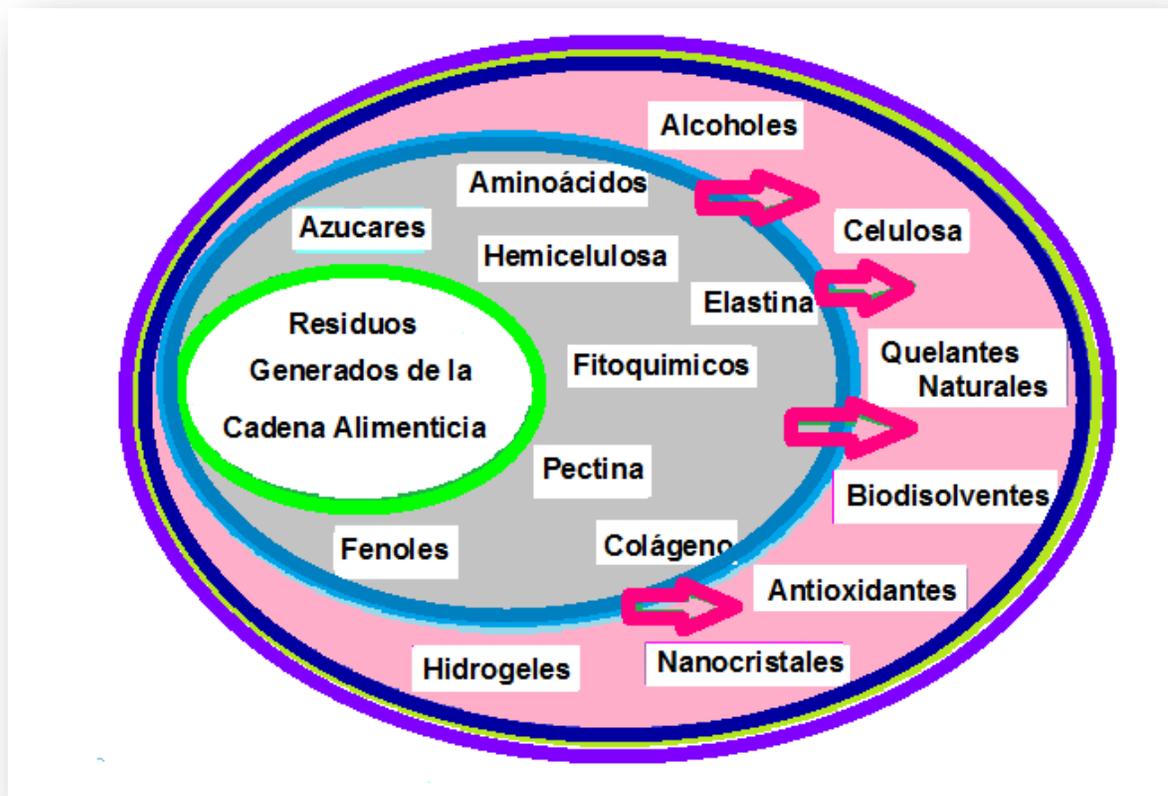
Los problemas asociados con este tipo de residuos incluyen:

- ❖ Problemas de contaminación graves debido a los alta concentración de compuestos químicos asociados ( Kroyer, 1995).
- ❖ La variación de la composición química y el pH debido a las variaciones estacionales y los cambios en el procesamiento de alimentos (Kroyer,1995)
- ❖ Los materiales propensos a la contaminación bacteriana por ejemplo, frutas y subproductos vegetales, ( Schieber *et al*, 2001)

#### **4.1.3 Valorización de residuos de alimentos**

La sociedad actual necesita en términos de competitividad económica, una mayor eficiencia en el manejo de los residuos y una minimización en el consumo de energía. El diseño y desarrollo de estrategias avanzadas para el procesamiento de residuos alimenticios son necesarios para generar productos con alto valor agregado que puedan ser introducidos a los mercados existentes (Gustavsson, 2011). El objetivo principal es proporcionar un enfoque amplio y multidisciplinario sobre las prácticas avanzadas e innovadoras de la valorización de alimentos y su contribución al futuro (Segre-Gaiani, 2012).

Esta valorización es absolutamente necesaria para mejorar la sustentabilidad y rentabilidad de la cadena alimentaria, junto con sus aspectos éticos y ambientales. Lo anterior, considerando los últimos avances tecnológicos y el impulso hacia la reutilización de los residuos alimentarios como materia prima. En la Figura 2, se muestran algunos materiales que pueden están presentes en los residuos alimenticios y su uso como materia prima para la obtención de compuestos útiles en la manufactura de productos comerciales diversos (Gómez, 2010).



**Figura 2.** Los componentes presentes en los residuos generados en la cadena alimenticia y su uso en productos de interés comercial.

El aumento del desarrollo de las prácticas de valorización sobre los residuos y subproductos de RA se debe a las cantidades significativas de moléculas funcionales que se encuentran en ellos es decir, hidratos de carbono, proteínas, triglicéridos, ácidos grasos, compuestos fenólicos como se muestra en la Figura 2 éstas se encuentran disponibles en los RA. La escala y la velocidad a la que nuestra cadena de suministro de alimentos produce residuos y su naturaleza representa un problema para la industria. En este contexto, los residuos de la cadena de suministro de alimentos, emerge como una materia prima realmente sostenible para ser empleado en la producción de bioderivados químicos,



materiales y combustibles, en nuestro escenario actual existe un aumento de 147% en los precios de las materias primas desde el cambio de siglo y cada vez es mayor (Schieber *et al*, 2001).

El manejo integral de los residuos alimenticios comúnmente está relacionado con el término “jerarquía del manejo de residuos” señalado en la Figura 3. Esta jerarquía prioriza las opciones de manejo de residuos en un orden de preferencia, la cual parte de la prevención de la generación, del reusó, reciclaje, valorización, recuperación de energía y por ultimo su disposición. La reutilización y el reciclaje son las opciones preferidas, debido a que a partir de los RA pueden obtenerse productos químicos y materiales útiles, a partir de la extracción de sus compuestos funcionales (World Economic Forum, 2012).



**Figura 3.** Jerarquía del manejo de residuos.

Las estrategias de manejo de RA plantean preocupaciones ambientales significativas, ya que estos residuos tienen un gran impacto en la emisión directa e indirecta de GEI ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ). Se ha determinado que por cada tonelada de RA se producen 4,2 toneladas de  $\text{CO}_2$  y otros contaminantes (Gómez *et al*, 2010).



En la actualidad no existen presiones sociales o éticas para obligar la sociedad al buen manejo de residuos alimenticios. Esto parece estar relacionado con el hecho de que la mayoría de la población en los países desarrollados no han experimentado escasez de alimentos (Banbury, 2008).

#### **4.1.4 Residuos alimenticios como materia prima**

Los residuos alimenticios incluyen frutas y vegetales entre otros, son recolectados como materias primas del procesamiento de productos estos residuos son: cáscaras, semillas, aceite vegetal y los residuos de la fábrica de oleoquímicos. En la producción de alimentos el empaque, enlatado, congelado, operaciones de secado son los principales responsables de la producción de esos residuos (Kroyer, 1995), estas fracciones conforman una importante fuente de azúcares, lípidos, hidratos de carbono, ácidos minerales, compuestos inorgánicos, fibras dietéticas o fitoquímicos, incluyendo compuestos fenólicos, carotenoides y tocoferoles. Los fitoquímicos representan una oportunidad especialmente prometedora como compuestos de gran demanda para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética entre otros sectores (Djilas, 2009).

La industria de bebidas de uva y manzana genera al año grandes cantidades de residuos de estos frutos, por ejemplo, de 5 a 9 millones de toneladas de bagazo de uva y de 3 a 4,2 millones de toneladas de bagazo de manzana (Djilas, 2009). Sin embargo, los cultivos de estos tipos de residuos son propensos a la descomposición microbiana, se necesitan operaciones de secado antes de la implementación de nuevas estrategias de valorización. Los residuos pueden ser valorizados inmediatamente o después de su generación mediante tecnologías limpias compatibles con el alto contenido de humedad.



### **4.1.5 Frutas y vegetales como materia prima para la obtención de compuestos funcionales**

Los subproductos utilizados como materia prima para la obtención de compuestos funcionales provienen de procesamiento de frutas templadas, tropicales y subtropicales. Debido al aumento en la producción de estos frutos, la eliminación de sus residuos representa un problema cada vez mayor, el cual se ve agravado por las restricciones sanitarias. Por lo tanto, el desarrollo de procesos de utilización eficiente, de bajo costo y ambientalmente amigable de estos materiales es cada vez más importante (Buckmaster, 1995).

Algunos ejemplos de aprovechamiento de frutas como materia prima para la obtención de productos funcionales se describen a continuación:

#### **4.1.5.1 Uva**

Es el producto con mayor cosecha mundial dentro de las frutas, con más de 60 millones de toneladas producidas anualmente. A partir del bagazo de uva se obtiene una gran variedad de productos, tales como etanol, tartratos, ácido cítrico, aceite, hidrocoloides, y fibra dietética (Girdhar y Satyanarayana, 2000; Arrigoni, Esteban, y Amado, 1999). Adicionalmente, se pueden obtener Antocianinas, catequinas, glucósidos de flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos. Las antocianinas han sido consideradas los componentes más valiosos del bagazo de la uva y se han desarrollado varios métodos para su extracción (Mazza, 1995; Mazza y Miniati, 2002).

#### **4.1.5.2 Cítricos**

En la actualidad en la industria se procesan grandes cantidades de cítricos para la obtención de jugo, lo que ha dado como resultado una mejora en el aprovechamiento de las cáscaras residuales, semillas, y otros subproductos (Hasegawa, 2000; Budarin, 2010).



Los residuos provenientes de la producción de jugos de cítricos son una fuente importante de pulpa seca, melaza, fibra, pectina, esencias, limonoides y flavonoides entre otros. (Braddock, 1995; Hasegawa, 2000). Los principales flavonoides que se encuentran en las diferentes especies de cítricos son: hesperidina, Narirutina, naringina y eriocitrina (Mouly-Arzouyan, 2010). Los residuos de limón contienen principalmente hesperidina y eriocitrina (Pourbafrani, 2010).

#### **4.1.5.3 Mango**

El mango es una de las frutas tropicales más importantes (Ramteke *et al*, 1999). En la actualidad los productos del mango experimentan un aumento en su popularidad a nivel mundial. Sin embargo, las pérdidas obtenidas durante el procesamiento de mango son muy altas, las cuales pueden oscilar entre el 35 % y el 60 % del peso total del fruto (Loeillet, 1994)

Las semillas del Mango son utilizadas como una fuente de antioxidantes naturales, los cuales han sido caracterizados como compuestos fenólicos y fosfolípidos (Puravankara, Boghra y Sharma, 2000). Los principales compuestos fenólicos presentes en el mango son: ácidos gálico, elágico y galatos. También se han reportaron galotaninos y polifenoles en la almendra de hueso de mango (Arogba, 2000).

#### **4.1.6 Manejo de Residuos Alimenticios en México**

En México como en otros países, entre mayor es el grado de urbanización la cantidad de residuos generados se incrementa. En las zonas metropolitanas hay una mayor contribución de los residuos generados en el país, mientras que en las zonas rurales o semiurbanas representa una menor contribución, ver Tabla 1 (SEMARNAT, 2013).



**Tabla 1.** Generación estimada de residuos sólidos municipales en México 2013

Localidad	Generación (Kt)	Porcentaje %
Zonas Metropolitanas	18,004	43
Ciudades medias	15,824	38
Ciudades pequeñas	3,548	8
Localidades rurales o semiurbanas	4,726	11
<b>TOTAL</b>	<b>42,102</b>	<b>100</b>

Por ejemplo, de acuerdo con el inventario de residuos Sólidos del Distrito Federal (IRSDF-2012) en el año 2012, se generaron en promedio 12 mil 664 toneladas de residuos por día como se muestra en la Tabla 1 se muestran las distintas fuentes de generación de residuos por día y su respectivo porcentaje.

**Tabla 2.** Generación de residuos sólidos en el D.F.

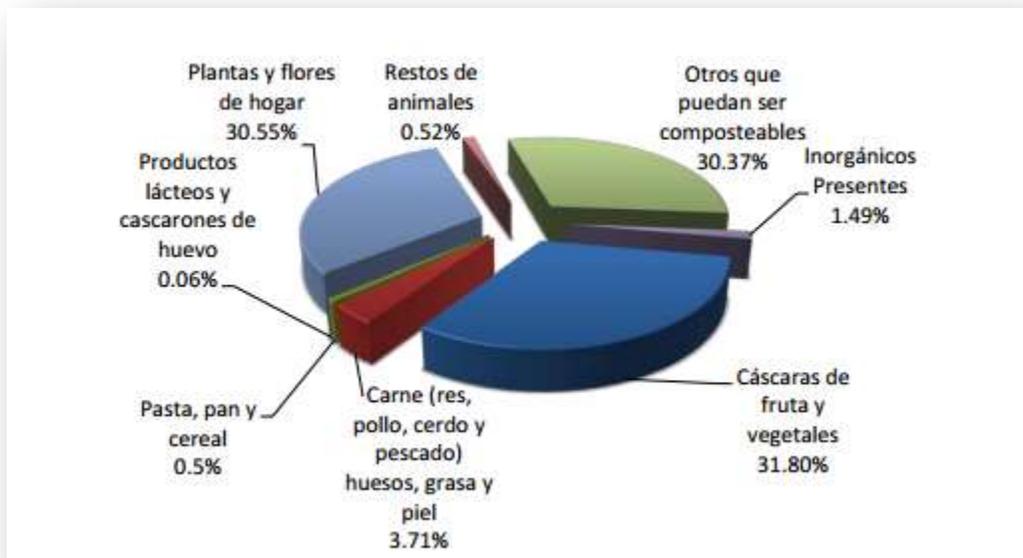
FUENTE	Domicilios	Comercios	Mercados	Servicios	Controlados	diversos	CEDA
t/día	5987	1897	1323	1918	358	566	585
Porcentaje	47%	15%	10%	15%	3%	4%	5%

Es importante hacer notar que la central de Abasto (CEDA) contribuye con un 5% en el total de residuos generados en el Distrito Federal (SMADF, 2012).

El Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales (SNIARN) indica que en el año 2011, la fracción orgánica de residuos del Distrito Federal correspondió al 52 %, lo cual significa que en promedio se generaron 6 mil 585 toneladas de residuos orgánicos por día.



En la Figura 4 se muestra que en los residuos sólidos orgánicos del Distrito Federal, el 31.80 % corresponde a cáscaras de frutas y vegetales, mientras que el 30.55 % corresponde a la categoría de plantas y flores producidas en el hogar (Duran *et al*, 2013).



**Figura 4.** Caracterización promedio de los residuos orgánicos del Distrito Federal (Duran *et al*, 2013).

#### 4.1.7 Ejemplos de aprovechamiento de residuos alimenticios en México

En México existen pocos casos relacionados con el aprovechamiento de residuos alimenticios. Un ejemplo del aprovechamiento de residuos de frutas y vegetales es el estudio del contenido de azúcares totales y cuantificación de nitrógeno libre en extractos de la pulpa y bagazo de semillas del mango (Solis Fuentes, 2003). Otro caso está relacionado con la producción de bioetanol de residuos de agave provenientes de la producción de tequila (Alvarado *et al*, 2010).



#### 4.1.8 Residuos de guanábana como materia prima

Los residuos provenientes de *Annona muricata* (hojas, cascara y semillas) contiene componentes con actividad biológica importante, los cuales pueden ser extraídos y aprovechados (Claveron, 1999). Estos residuos generados en su mayoría por la industria como parte de la obtención de pulpa y jugo a partir de los procesos con el fruto, los cuales pueden ser aprovechados, evitando así una fuente de contaminación y siendo una forma de generar nuevos productos a partir de ellos (Kim *et al*, 2003).

**Tabla 3.** Producción de *Annona muricata* año 2013

Estado de producción	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Campeche	71.7	4.94	496.65
Colima	1,630.00	8.27	7,666.10
Guerrero	1,039.55	5.41	4,026.25
Jalisco	51	5.67	163.2
Michoacan	903.1	5.98	6,500.40
Morelos	474.7	12.49	3,047.65
Nayarit	14,254.60	8.45	54,795.98
Puebla	90.9	5.68	234
Tabasco	524.3	11.92	9,099.58
Veracruz	475.2	15.33	2,122.98
Yucatan	12	4.8	86.6
	<b>19,527.05</b>	<b>8.2</b>	<b>88,239.38</b>

En la Tabla 3 se observa la producción del fruto en el año 2013, teniendo un total de 19.527.05 toneladas anuales en toda la República Mexicana. La cual tuvo un impacto en la producción de 88.239.38 anuales en el año 2013, lo que nos indica que la producción del fruto es altamente remunerado (Kim *et al*, 2003). Los estados de Nayarit y Yucatán son los que tienen mayor producción. La industria jugos y néctares tiene una mayor contribución en la producción de residuos de *Annona muricata*.



## 4.2. Anonáceas

Las anonáceas son una familia que pertenece a las plantas tropicales, originaria del Hemisferio Occidental (Díaz, 2004). Familia con aproximadamente 130 géneros y 3200 especies. En México se encuentran 8 géneros y alrededor de 20 especies (Kelly, 2000). Esta familia se caracteriza por ser una gran productora de frutos comestibles y de aceites esenciales así como de contener compuestos bioactivos únicos para cada uno de sus géneros (León, 1969). Las especies más representativas de este género comprenden la *Annona cherimolla* (chirimoya) *Annona muricata* (guanábana) y *Annona diversifolia* (ilama).

El uso de los árboles como productores de madera, sólo tiene importancia a nivel local ya que cada parte de la planta como las hojas, raíces, semillas son utilizadas para la medicina natural. Esta familia de plantas, también es popular porque se utilizan en remedios tradicionales, como para el tratamientos de infecciones sépticas, tos, hepatomegalia, diarrea y cánceres (Reen-Yen *et al*, 2002). Por lo que el aislamiento de ciertos compuestos se han estudiado para el desarrollo de fármacos.

### 4.2.1 *Annona muricata*

La *Annona muricata* (guanábana) es una planta originaria de Sudamérica, América del Centro y del Sur, Asia y África. Actualmente se encuentra ampliamente distribuida, las diferentes partes de la planta son usadas en la medicina natural, incluyendo cortezas, hojas, raíces, semillas, su creciente industrialización e importancia desde el punto de vista alimentario y farmacológico ha crecido en los últimos años (Kelly, 2000).



El nombre de *Annona muricata* proviene de su especie, la cual pertenece al reino de las plantas, de la Familia *Annonaceae* y Género *Annona*, de un árbol de hoja perenne.

Su fruto es delicado, de color verde oscuro cubierto de espinas en forma de huevo, llega a medir hasta 30 centímetros de largo es relativamente grande, es de cáscara muy delgada de textura firme, su pulpa es jugosa de color blanquecino de sabor ácido-dulce y está estrechamente relacionada con otras *Annonas* por los diferentes componentes que se encuentran en ellas (Li Chao-Ming, 1997).



<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>División :</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase :</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden :</b>	<i>Magnoliales</i>
<b>Familia :</b>	<i>Annonaceae</i>
<b>Subfamilia :</b>	<i>Annonoideae</i>
<b>Genero :</b>	<i>Annona</i>
<b>Especie :</b>	<i>Annona muricata</i>

**Figura 6.** Clasificación científica de *Annona muricata*



#### 4.2.2 Distribución de *Annona muricata* en Latinoamérica

Se encuentra ampliamente cultivada en suelos de elevaciones bajas de Latinoamérica, con climas húmedos y calientes. Las elevaciones son entre 0 m a 700 m por lo cual se encuentra principalmente en Sudáfrica, América del Centro, America del Sur, Asia y África en la Figura 7 se muestra la distribución de los países en donde se encuentra distribuido el fruto (Li Chao-Ming *et al*,1997).

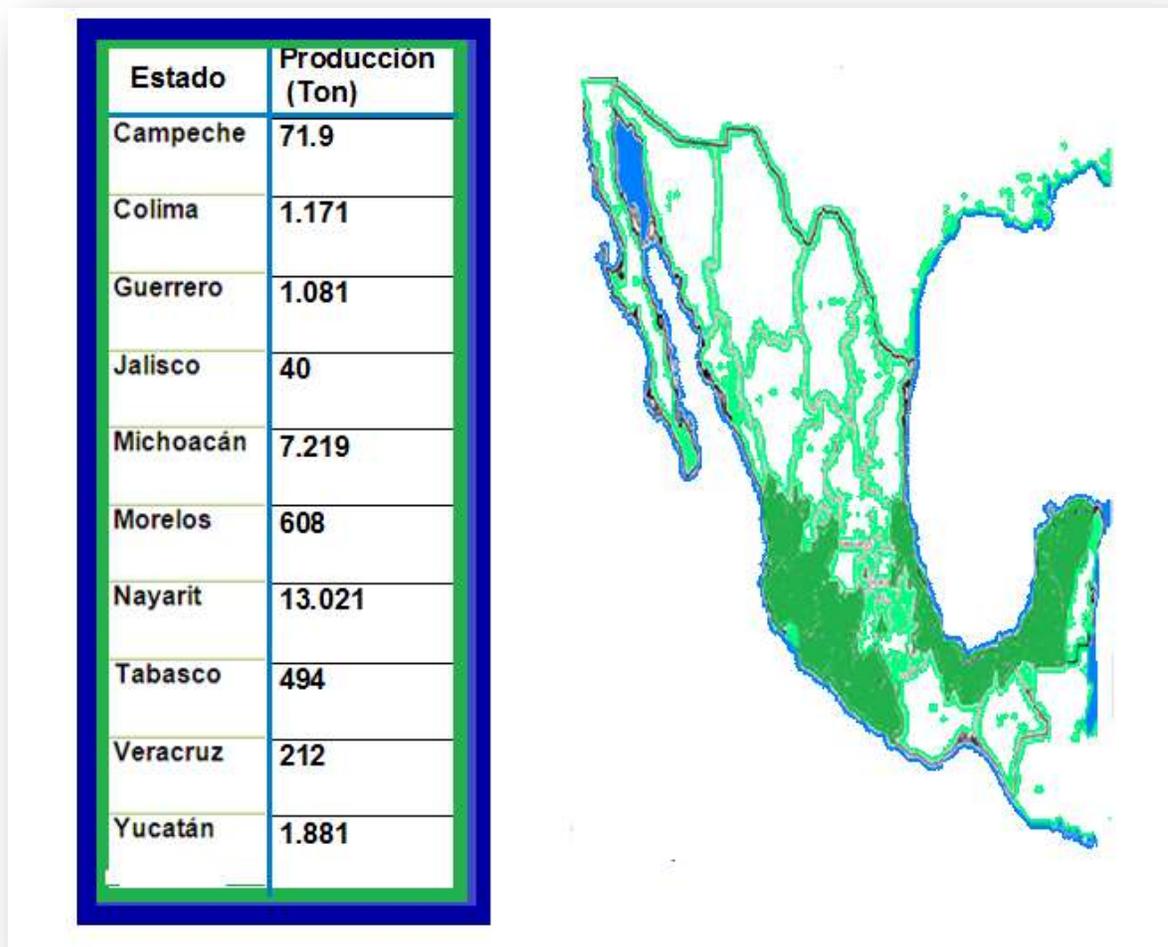


Figura 7. Distribución de *Annona muricata* en Latinoamérica



### 4.2.3 Distribución de *Annona muricata* en la República Mexicana

En la República Mexicana la *Annona muricata* se encuentra distribuida principalmente en los estados que tienen suelos y elevaciones bajas. Sus climas son principalmente húmedos o calientes. En la actualidad este fruto ha sido cultivado en más estados por sus propiedades y cualidades (Li Chao-Ming, 1997).



**Figura 8.** Distribución de *Annona muricata* en la República Mexicana

En México se comercializa la pulpa de guanabana natural o congelada, en mermelada, nectar, jaleas y pure entre las más importantes, la fruta es apreciada para diferentes bebidas, es utilizado en alimentos de la gastronomía, sus hojas y semillas han sido utilizadas para aliviar distintos tipos de padecimientos.



### 4.3 Semilla de *Annona muricata*

Las semillas se encuentran dentro del fruto de la *Annona muricata* son ovoides y aplanadas, tienen de 15 a 20 mm de largo dependiendo cada semilla. Su textura es lisa y de color café o verde olivo dependiendo del estado en que se encuentre la semilla.

La calidad de la semilla es el conjunto de atributos que identifican una muestra de semilla, el cual se destinará para diferentes procesos y usos, en función a sus características particulares, por lo que se determinan las siguientes pruebas: temperatura y humedad.

Se obtienen las condiciones en la que se encuentra la semilla, con lo que se puede brindar las condiciones adecuadas para su conservación y almacenamiento, como la reducción de las pérdidas de la muestra de semilla (Stunbsgaard-Poulsen, 2000). La preservación de la semilla es importante ya que se previene lesiones y alteraciones que descarten a la semilla para la extracción de sus diferentes componentes, como la adecuada conservación y almacenamiento.

#### 4.3.1 Almacenamiento de la semilla

Las condiciones adecuadas durante el almacenamiento de las semillas toman gran importancia. Existen distintos tipos de insectos tales como las moscas de la fruta, *Anastrepha suspensa* y *A. striata* (Kim *et al*, 2003) que pueden estar presentes y anular la posterior utilización de semilla, entre las más perjudiciales se encuentran las siguientes:

- ❖ La avispa *Bephratelloides (Bephrata) maculicollis*, sus larvas viven en las semillas y al salir perforan agujeros, engullendo la almendra.
- ❖ La polilla *Cerconota (Stenomoma) anonella*, que establece sus huevos en los frutos pequeños impidiendo el crecimiento del fruto y el desarrollo de la semilla.



- ❖ *Corythuchagossipii*, que ataca las hojas, semillas y fruto.
- ❖ *Cratosomusinaequalis*, que afecta a la fruto, las ramas, semillas y el tronco.

Estas plagas son ocasionadas por factores internos y externos en que crece y se desarrolla el fruto como en la obtención de las semillas. La prevención se logra al controlar los factores que intervienen, obteniendo materia prima de mejor calidad y en mejores condiciones.

### ❖ Temperatura

La temperatura es un indicador de la estabilidad de la semilla durante el almacenamiento se identifica la temperatura más elevada que contiene la muestra. Para llevar a cabo su conservación aumentando la vida útil de la semilla (Stunbsgaard-Poulsen, 2000). La elevación de la temperatura en la semilla durante su almacenamiento es síntoma de:

- ❖ Falta de regulación de rehidratación de la semilla por alta humedad.
- ❖ Desarrollo de hongos favorecidos por la alta temperatura intergranular.
- ❖ Desarrollo de insectos dentro de la semilla.

Al exponer la semilla a temperaturas extremas podemos ocasionar factores que produzcan lesiones o que destruyan los componentes bioactivos que contiene la almendra y así inhibir la extracción de los mismos.

### ❖ Humedad

La humedad es un factor primordial para el almacenamiento ya que todas las semillas contienen humedad, esta cantidad de humedad varía dependiendo de los factores y condiciones en el cual se encuentra la semilla (Hiroshi *et al*, 2000).

Las moléculas de agua están en permanente en estado de vibración, si están localizadas cerca de la superficie de la semilla, podrán evadirse ocasionalmente en el aire, esto es por evaporación, de forma similar las moléculas de agua en el aire se encuentran vibrando algunas de ellas entran en contacto con la semilla por



absorción. Estos dos procesos evaporación (desorción) y absorción funcionan continuamente, cuando la absorción supera la evaporación, la semilla adquiere humedad la cual puede afectar su calidad y conservación de la semilla.

### 4.3.2 Bagazo de *Annona muricata*

El bagazo proveniente de la almendra de la semilla de *Annona muricata* está constituido por una gran cantidad de componentes tales como son: lípidos (aceite), hidratos de carbono, fibra, péptidos y los ciclopéptidos, sus propiedades fisicoquímicas que lo componen hacen que estos puedan ser extraídos y estudiar sus diferentes funciones y actividades. (Li Chao-Ming, 1997).

#### 4.3.2.1 Propiedades fisicoquímicas del bagazo

Debido a las características fisicoquímicas de la semilla se ha logrado el aislamiento y cuantificación de sus diferentes componentes los cuales tienen actividades biológicas importantes como son: antitumorales, citotóxicas, anticancerígenas entre otras (Hiroshi *et al*, 2000).

El estudio de ciclopéptidos se debe a sus características estructuras y a la estabilidad que presentan, así como a su actividad biológica anticancerígena, (We'le *et al*, 2004a, 2004b, 2005). En la Tabla 4 se muestran el análisis fisicoquímico de cada uno de los componentes que lo constituye el bagazo de la almendra (Solis-Fuentes, 2010).

**Tabla 4.** Propiedades fisicoquímicas del bagazo de *Annona muricata*

Componente	Porcentaje en 100 g de bagazo de almendra de <i>Annona muricata</i>
Cenizas	2.5 %
Fibra cruda	17.9%
Proteína	15.7%
Hidratos de carbono	26.7%
Aceite	37.7%
Acetogeninas	45.6%
Ciclopéptidos	25.3%



#### **. 4.3.2.2 Contenido de fibra en el bagazo**

La Fibra es un componente de los carbohidratos el cual está presente en las plantas como en las semillas de los frutos, tiene como objetivo principal constituir parte de la estructura fibrosa de la semilla.

La Fibra cruda presente en el bagazo refiere al residuo de esqueleto fibroso, que puede ser disuelto con disolventes químicos como son el ácido sulfúrico e hidróxido de sodio para obtener el porcentaje de fibra cruda en el bagazo el cual constituye el 17.9 % del porcentaje de la almendra (Solis-Fuentes, 2010).

El contenido de fibra cruda presente en el bagazo es un dato primordial ya que refiere a uno de los principales componentes de la almendra de la semilla de *Annona muricata*.

#### **4.3.3 Aceite de la semilla**

Es uno de los subproductos importantes que se obtienen de la utilización del bagazo es la extracción del aceite.

El aceite proveniente de las almendras de *Annona muricata* contiene un porcentaje de aceite del 37.7 % en base seca (Tabla 4. propiedades fisicoquímicas del bagazo de *Annona muricata*), su composición se basa en aceites grasos no saturados, principalmente oleico, palmítico y linoleico. Estos se encuentran en cantidades importantes que son representativas respecto a otro tipo de aceites provenientes de las oleaginosas (Solis-Fuentes, 2010).

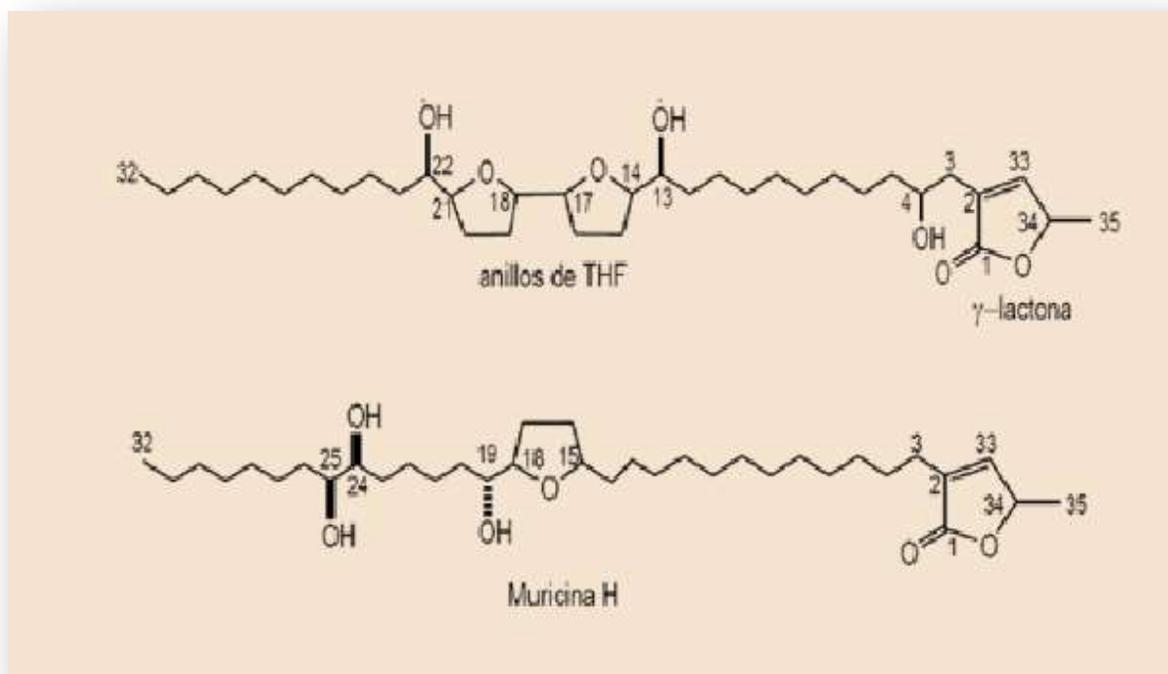
#### **4.4. Acetogeninas presentes en Annonáceas**

Las acetogeninas son características de la familia *Annonaceae*, la presencia de estos metabolitos hacen que el aceite de las semillas no sea apto para el consumo humano, debido a su toxicidad. Se conoce que estos compuestos también presentan actividad biológica como: antiparasitaria, insecticida,



antimicrobiana, antifúngica, antitumoral y la más importante anticancerígena. Representan una oportunidad para encontrar un tratamiento menos agresivo para combatir el cáncer, ejercen un efecto citotóxico y antitumoral mediante la inhibición del proceso de fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial. Reducen el abasto de energía necesario para el crecimiento y desarrollo celular, también inhiben la NADH-ubiquinona reductasa de las membranas plasmáticas de las células cancerosas (Chávez, 2000).

La estructura de las acetogeninas aisladas de *Annonaceae*, consisten una cadena alifática de 32 ó hasta 34 átomos de carbono con una  $\gamma$ -lactona insaturada o saturada, como es mostrada en la Figura 9, También pueden tener anillos de tetrahidrofurano (THF), odetrahidropirano (THP), como dobles o triples enlaces (Luna, 2009). Son solubles en disolventes orgánicos. Se identifican utilizando técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas (EM).





**Figura 9.** Estructura de acetogeninas de *Annonaceae*.

#### 4.4.1 Acetogeninas en *Annona muricata*

La *Annona muricata* ha sido ampliamente estudiada por lo que conocemos diferentes cualidades de los compuestos que contiene cada una de las partes que conforma al fruto como son la corteza, semillas, tallos y hojas, cada uno contiene compuestos funcionales como son: alcaloides, acetogeninas, ácidos grasos, entre algunos de los compuestos aislados de esta especie ( Ragasa Consolacion, 2012)

**Tabla 5.** Acetogeninas presentes en *Annona muricata*

Nombre del compuesto	Tipo del compuesto	Fuente de donde Proviene	Actividad Biológica
Cis-annonacia	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomuricin E	Acetogenina	Hoja	Citotóxica
Cohibina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica
Javoricina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica
Cis-solamin	Acetogenina	Raiz	Citotóxica
Aceogenica	Acetogenina	Semilla	Citotóxica

Las acetogeninas son derivados de las largas cadenas de ácidos grasos que tienen acción directa sobre las mitocondrias, el ATP, el Aparato de Golgi, las membranas y el plasma celular de las células cancerosas, destruyéndolas selectivamente sin dañar a las células y tejidos sanos en el organismo (Ragasa Consolación, 2012), siendo esta la propiedad más importantes de las acetogeninas.

Las acetogenina encontrada *Annorecticuin-9-ona* mostro actividad biológica y citotóxica en la línea tumoral pancreática humana (PACA-2), adenocarcinoma de próstata humano (PC-3) y carcinoma de pulmón humano (A-549) (Consolación, 2012) mostrando su efecto inhibitor y eficacia en estas líneas de cáncer y la posibilidad de que surtan el mismo efecto anticancerígeno en otras líneas de cáncer como son de próstata, colon y mama.



#### 4.4.2 Ciclopéptidos de *Annona muricata*

Una gran cantidad de ciclopéptidos de origen natural han sido aislados de diversas fuentes, tales como plantas, semillas y raíces de diferentes frutos. La estructura característica de ciclopéptidos y su estabilidad molecular hacen notable su actividad biológica, tales como anti-tumoral, antifúngico, antiviral y anticancerígena, entre las más destacadas.

Los ciclopéptidos son moléculas compuestas de secuencias de aminoácidos, estos se encuentran principalmente en el bagazo de la almendra de la semilla de *A. muricata*, el cual tiene un alto contenido y calidad de aminoácidos libres, péptidos, ciclopéptidos y proteínas, los cuales pueden ser obtenidos para realizar el análisis de la actividad biológica (Alassame Wele, 2004).

Previas investigaciones sobre la presencia de ciclopéptidos en la familia de las *Annonas*, reportan la presencia de *Annomuricatin A*, hexapeptido cíclico que fue aislado de las semillas de *Annonamuricata*, así como la presencia de nuevos ciclopéptidos provenientes *Annonacin*, *Annonacin A* y *Annomuricin* de la almendra de la semilla (Li Wu-Ming, 1997). Se ha estudiado la posibilidad de la extracción de compuestos bioactivos como son los ciclopéptidos de las almendras de *Annona muricata* como la posibilidad del tratamiento de distintas enfermedades.

El extracto de acetato de etilo ha sido estudiado con anterioridad y se determinó la presencia de acetogeninas y ciclopéptidos como *Annomuricatin A* (Li Wu, 2007), el cual ha demostrado ser el extracto con mayor actividad respecto que los otros extractos obtenidos provenientes del bagazo de la almendra de *Annona muricata*.

En los últimos años se ha encontrado ciclopéptidos que han cobrado importancia por su actividad biológica, tal es el caso de *Annomuricatin C* el cual se encontró que es citotóxico frente a las células tumorales KB CL<sub>60</sub> (1.0 mM), sin dañar células sanas en el organismo (Alassame, 2004).



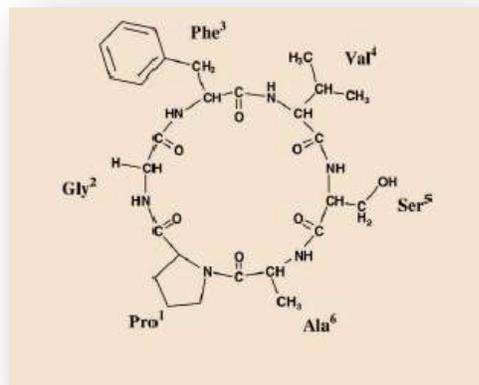
#### 4.4.2.1 Estructura de ciclopéptidos aislados de *Annona muricata*

Los ciclopéptidos son compuestos de cadenas de varios aminoácidos se encuentran conformados por enlaces peptídicos que se forma entre el grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) y un grupo carboxílico ( $-\text{COOH}$ ) dentro de su estructura que los hace difuncionales (Li Wu, 2007).

Contienen carbonos- $\alpha$  donde se encuentran posicionados los  $\alpha$ -aminoácidos, que le dan quiralidad de la molécula del ciclopéptido y su reactividad según en el medio en el que se encuentren estos, los grupos funcionales que conforman la estructura del ciclopéptido son:

- Un grupo amino,  $-\text{NH}_2$ , que aparece como su forma protonada  $-\text{NH}_3^+$
- Un grupo carboxilo,  $-\text{COOH}$ , que aparece como su forma disociada  $-\text{COO}^-$
- Un hidrógeno,  $-\text{H}$
- Una cadena lateral, que es la que distingue a cada uno de los diferentes aminoácidos de los cuales está constituido el ciclopéptido
- Aminoácidos L

Cabe mencionar que la estructura de cada ciclopéptido varía dependiendo a los aminoácidos que se encuentren ligados a su estructura, así como de la rotación de los enlaces (Li Wu-Yang Lu, 2004).



**Figura 10.** Estructura de *Annonuricin C* de *Annona muricata*



Los enlaces que conforman a los ciclopéptidos son cruciales para determinar la bioactividad de cada una de las secuencias de aminoácidos en la molécula.

Existen dos tipos de enlaces intramoleculares:

Los enlaces de hidrógeno que se estabilizan en la columna vertebral del macrocíclico de la molécula formado por aminoácidos.

Así como la distancia entre el oxígeno y el nitrógeno involucrado en los dos enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los aminoácidos como es el caso de Phe-NH, Ala-CO, teniendo en cuenta que la distancia cambia entre los enlaces con cada aminoácido, así como también la distancia entre los enlaces N-O, N-H dentro de la estructura (Li Wu-Yang Lu, 2004).

La estructura característica de los ciclopéptidos de la familia de las *Annonas*, así como su estabilidad con diferentes factores, proporcionan importantes actividades biológicas que desempeñan como son: anticancerígenas, antitumoral, antifúngicas y antiviral.

Estas actividades biológicas han sido previamente analizadas, se ha reportado que están estrechamente relacionadas con la conformación estructural del ciclopéptido, así como el tipo y procedencia de la *Annona* que es estudiada. Se tiene información sobre los ciclopéptidos que han sido aislados de la *Annona muricata* previa de otras investigaciones (Li Wu a Yang Lu, 2006; Li chao-ming *et al*, 1997).



#### **4.5 Actividad anticancerígena de ciclopéptidos bioactivos de *Annona muricata***

El aislamiento de los distintos compuestos extraídos de la almendra de *Annona muricata*, como son las acetogeninas y recientemente los ciclopéptidos, han sido evaluados en estudios de líneas celulares para determinar su actividad citotóxica selectiva contra el cáncer, mostrando que tiene actividad anticancerígena como antitumoral (Sulaiman, 2005)

Actualmente el cáncer es considerado como la segunda causa de muerte a nivel mundial y en el caso particular de México de acuerdo con los datos reportados por el INEGI en relación al índice de mortalidad, la incidencia de tumores malignos es la tercera causa de muerte.

El cáncer es uno de los padecimientos multifactoriales que ha llamado la atención del medio científico debido a la diversidad que éste presenta y al hecho de que no se conoce un sistema que lo controle por completo de forma eficiente. Por tal motivo se han desarrollado un sin fin de investigaciones con el propósito de encontrar alternativas para su tratamiento y prevención, dichas alternativas involucran el estudio y empleo de los productos naturales como posible agentes quimioterapéuticos (Kosuge Yokota, 1985). Las investigaciones previas sobre la familia de las *Annonas* es una fuente potencial para el desarrollo de productos naturales con un alto beneficio para la salud del ser humano.

En los últimos años se ha reportado que las *Annonaceas* es la fuente potencial de *Annonaceusacetogenin* que es proveniente de la *Annona muricata*. Éste es un tipo de producto natural con actividad biológica anti-tumoral, convirtiéndose en un producto eficaz y sin consecuencias secundarias (Li Wu-Yang, 2004). Por lo que la obtención de nuevos ciclopéptidos de esta *Annona* es una promesa para el mejoramiento de la medicina natural.



Uno de los mayores problemas en la quimioterapia moderna ha sido el surgimiento de líneas celulares que han desarrollado resistencia a los agentes terapéuticos convencionales, como la adriamicina, vincristina, taxol entre otros. Considerando el mecanismo de acción de las acetogeninas se han encontrado que estos compuestos producen un efecto citostático o citotóxico en líneas celulares resistentes a fármacos (Scudiero, 2001).

Se ha evaluado la actividad citotóxica in Vitro de los extractos de la *Annona muricata* contra diversas líneas celulares tumorales como el carcinoma pancreático línea PAKA-2 12, cáncer prostático línea PC-3 13, carcinoma pulmonar (A-549), adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma epidermoide (KB), células HepG2 o células de hepatoma humano 14. Su actividad citotóxica se podría explicar por la presencia de la uvaricina, que es una acetogenina que estaría inhibiendo la enzima NADH, ubiquinona oxidoreductasa o complejo de la cadena respiratoria mitocondrial (Chang-Liaw, 2003).

La actividad citotóxica fue determinada de acuerdo con el método de Monks. El cual evalúa la citotoxicidad de las muestras en tres líneas celulares: cáncer de glándula mamaria (MCF-7), cáncer de pulmón (H-460) y cáncer del sistema nervioso central (SF268), proporcionadas por el Instituto Nacional del Cáncer (Sulaiman, 2005).



#### 4.6. Identificación de Ciclopéptidos por Resonancia Magnética Nuclear RMN

Los métodos espectroscópicos son técnicas para la identificación y análisis de distintos tipos de compuestos orgánicos. Con ella podemos encontrar señales de los fragmentos de la secuencia de la estructura de la muestra de interés (Polfer, 2009).

La determinación de la secuencia o desplazamiento químico de cada residuo específico de la cadena, principalmente de los aminoácidos L residuales en el ciclopéptido es determinado por RMN (Resonancia Magnética Nuclear), la cual es una técnica basada en un fenómeno físico basado en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos. (Bythell, 2010).

Esta técnica es de gran utilidad por su práctica aplicación en la identificación de las moléculas y fragmentos reactivos que conforman la muestra, así como la asignación secuencial y la determinación de la estructura tridimensional de la misma (Josipa Grzeting, 2012).

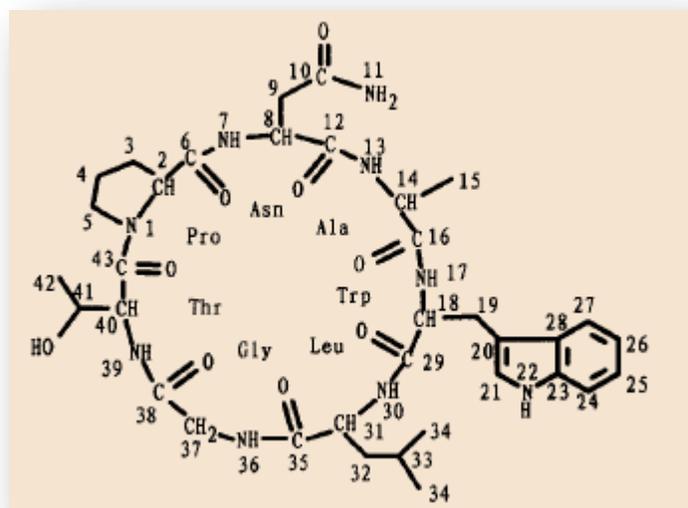
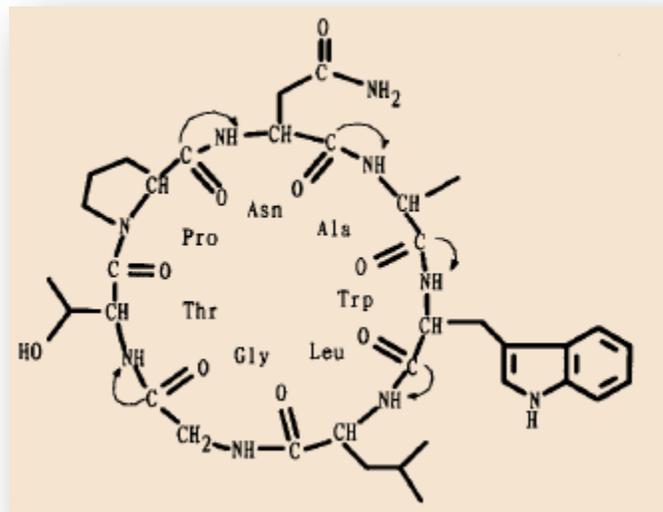
El estudio de la conformación de macrociclos como de su estructura, depende de la identificación de la línea de secuencia de los fragmentos que son identificados en los ciclopéptidos. A continuación se presentan las tablas y las estructuras de los ciclopéptidos de *Annona muricata* que han sido aislados en investigaciones anteriores, los cuales sirvieron como referencia para su identificación de los ciclopéptidos encontrados.



### Annomuricatin B

Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y estructura de *Annomurictain B* (Li Chao Ming, 2006)

	H	C
1		
2	4.42 (t, 8.0)	62.0
3	2.04 (m), 1.94 (m)	29.7
4	1.80 (m), 1.35 (m)	25.0
5	3.89 (m), 3.68 (m)	48.8
6		172.6
7	9.17 (d, 5.2)	
8	5.04 (m)	51.3
9	3.89 (m), 3.68 (m)	36.2
10		174.8
11	9.44 (s), 8.57 (s)	
12		172.1
13	9.29 (d, 3.2)	
14	4.50 (m)	53.1
15	1.12 (d, 7.2)	16.8
16		172.7
17	8.75 (d, 8.4)	
18	5.75 (m)	55.7
19	3.89 (m)	29.5
20		123.0*
21	7.25 (t, 7.4)	121.6
22	11.79 (s)	
23		137.5
24	7.18 (t, 7.4)§	119.2
25	7.54 (dd, 2.6, 17.0)	112.2†
26	7.54 (dd, 2.6, 17.0)	112.0†
27	7.83 (d, 7.6)§	119.2
28		129.2*
29		173.0
30	8.36 (d, 9.6)	
31	5.44 (m)	57.9
32	1.94 (m), 1.80 (m)	44.7
33	1.94 (m)	25.1
34	0.90 (m)	22.6
35		172.8‡
36	10.42 (dd, 4.4, 8.0)	
37	4.82 (dd, 8.2, 17.0), 3.89 (m)	44.0
38		169.7
39	8.75 (d, 8.4)§	
40	5.44 (m)	54.5
41	4.50 (m)	69.1
42	1.65 (d, 5.2)	20.3
43		170.2‡

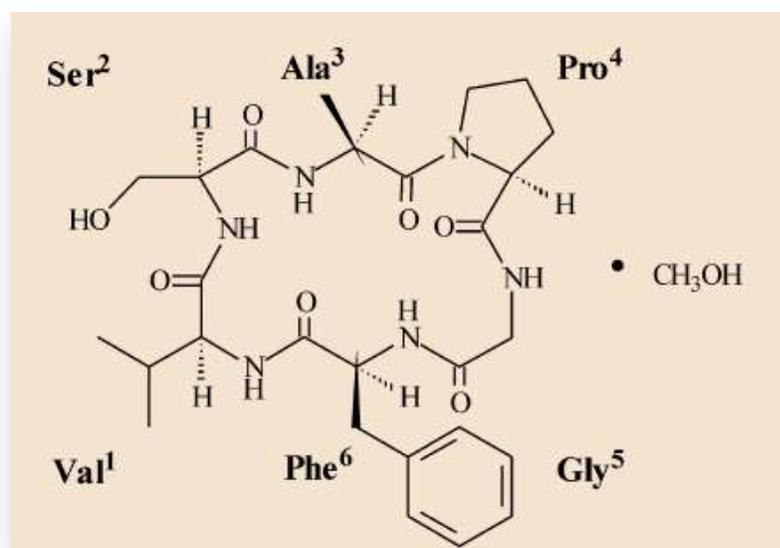




## Annomicatin A

Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  estructura y datos de *Annomicatin A* (Li Wu-Yang Lu, 2006)

ENLACES DE HIDROGENO	DISTANCIA (Å)	SIMETRIA
N-61 ... O-31	2.836	$x,y,z$
N-31 ... O-61	4.054	$x,y,z$
O-M ... O-21	2.770	$1-x, -1/2+y, 1/2-z$



Componente	Annomicatin A
Dimensión del cristal (mm <sup>3</sup> )	0.08 × 0.10 × 0.50
Formula Química	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> ·CH <sub>3</sub> OH
Peso molecular	590.68
Temperatura (K)	296 (2)
Sistema de cristalización	Orthorhombic
Volumen (Å <sup>3</sup> )	3079.4 (11)
Z	4
Densidad (mg/m <sup>3</sup> )	1.274
Coefficiente de Adsorción (mm <sup>-1</sup> )	0.094
Difractómetro	Mac DIP-2030K/ω



## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Parte Experimental

La parte experimental se dividió en cinco etapas principales:

- ❖ Análisis selectivo y de calidad de la semilla
- ❖ Extracción del aceite de la almendra de la semilla
- ❖ Pruebas de calidad del aceite
- ❖ Extracción e identificación de ciclopéptidos del bagazo de la almendra
- ❖ Determinación de actividad anticancerígena de extractos bioactivos

### 5.2 Materia vegetal

Se trabajó con 5 kg de semillas de *Annona muricata* procedentes de residuos de la empresa de Extractos y Aromáticos Botánicos S.A. de C.V. Ubicada en Calle Matlame No.48, Col. Zapata Vela, Delegación Iztacalco, México D.F.

### 5.3 Equipo y Reactivos

#### EQUIPO

Balanza analítica Galaxy 160 OHAUS	Viscosímetro Stabinger marca Anton Paar modelo SVM 3000
Termómetro digital Equipar ERTcoHART Modelo 850	Espectrómetro Varian modelo Unity Inova 300 Autosuitable
Pantone modelo 3478FRG	Cámara de UV modelo 74RET
Waterbath B-480 BUCHI	Parrilla eléctrica CORNING 6795-220
Rotavapor R-124 BUCHI	



**REACTIVOS**

Hexano	Aminoácidos : l-glicina, l-valina, l-metionina, l-isoleucina, l-fenil-alanina
Metanol	Etilenglicol
Diclorometano	Agua destilada
Acetato de Etilo	Alcohol etílico
<i>n</i> -butanol	Hidróxido de potasio
Fenolftaleína	Reactivo de wijs
Tiosulfato de sodio	Disolución de ninhidrina
Almidón soluble	Disolución <i>o</i> -tolidina/KI
Yoduro de potasio	Ácido acético glacial
Sulfato de sodio anhidro	Hipoclorito de sodio
	PLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> , 2mm Merck KGaA
	Silica gel SiO <sub>2</sub> de Barker-flex 60 IB2

**5.4 Limpieza de semillas**

A las semillas se les retiró la mayor cantidad de pulpa proveniente del fruto, después se lavaron con agua y posteriormente fueron colocadas sobre papel absorbente, donde se dejaron secar a la sombra durante 3 días. Una vez secas las semillas, se realizó su análisis selectivo y caracterización física para posteriormente separar físicamente la cascara de la almendra y hacer la molienda de esta última para obtener el bagazo.



## 5.5 Análisis selectivo de semillas

El análisis selectivo de las semillas consistió en seleccionar las que estaban en óptimas condiciones para continuar con la extracción de los compuestos bioactivos. En este análisis se realizó la determinación de impurezas y sanidad, en la cual se separaron las semillas con defectos evidentes, tales como:

- ❖ Semilla rota
- ❖ Semilla seca
- ❖ Daño por insectos
- ❖ Semilla traza de carbón
- ❖ Materia extraña

Las semillas seleccionadas fueron pesadas y se les determinó el porcentaje de cada semilla, tomando en cuenta el total de las semillas empleadas (5 Kg), se realizó esta separación con el objetivo de una selección adecuada de las semillas, así como aportar los atributos que identifican a la muestra.

## 5.6 Caracterización de semilla

Se tomó al azar una muestra de 30 semillas de *A. muricata*, a las cuales se les determinó las medidas con un Vernier (largo, ancho y grosor), tanto de la almendra como de la semilla completa. Se determinó el peso la semilla completa y su almendra por separado. Después se utilizó una pinza mecánica para separar la cáscara de la semilla, la almendra obtenida se molió en la licuadora para obtener el bagazo correspondiente.

## 5.7 Vida de anaquel de la semilla

Para la determinación de la vida de anaquel de la semilla se realizaron las siguientes determinaciones: temperatura, color y aspecto físico, densidad, dureza y humedad.



### 5.7.1 Temperatura

Se tomó una muestra de 5 Kg de semilla y se colocó en una bolsa de plástico, la bolsa cerrada se agitó vigorosamente e inmediatamente se introdujo un termómetro de mercurio en 5 zonas diferentes de esta bolsa. Se anotaron las temperaturas registradas por el termómetro y se determinó su promedio, el cual se comparó con la temperatura ambiente.

### 5.7.2 Color y Aspecto

Para examinar el color de la semilla se tomó una muestra representativa del total de la semilla, se comparó el color de ésta con la escala de color pantone (amarillo a café) y se le asignó el número correspondiente al color que porta, con el cual se comparó con el registrado en la literatura (Gajalakshmi *et al*, 2007).

### 5.7.3 Densidad

Para la determinación de la densidad se utilizó el Índice de Flotación. Se colocaron 100 semillas de la muestra en un vaso de precipitados de 250 mL y se agregó una cantidad de agua destilada equivalente a 3 veces el volumen de las semillas. La densidad se determinó considerando el número de semillas que flotaron después de dejar reposar la mezcla durante dos intervalos de tiempo: 15 min y 6 horas.

### 5.7.4 Dureza

La dureza se determinó mediante la técnica: Resistencia al Impacto y Resistencia de Abrasión. Se tomaron 20 g de semilla y se colocaron en una probeta de plástico de 1 L y desde el borde del recipiente se dejó caer una pesa de metal de 100 g sujeta con un cordón y se repitió el procedimiento 10 veces. Al término se recolectaron las fracciones de las semillas: semilla entera, semilla quebrada y polvo desprendido de la semilla. Estas fracciones se pesaron en una balanza analítica y se reportó el porcentaje de cada una de las fracciones, tomando en cuenta los 20 g como el cien por ciento.



Para la determinación de Resistencia a la Abrasión se tomaron y pesaron 10 semillas de la muestra, éstas se tallaron con una lija de agua del número 2, recorriendo toda la longitud de cada semilla. Al finalizar este proceso, se recolectaron los residuos desgastados y los no desgastados de la semilla y se pesaron en una balanza analítica, Se registró el porcentaje de las dos fracciones tomando en cuenta el peso de las 10 semillas como el 100 %.

### 5.7.5 Humedad

La humedad se determinó empleando una muestra de 10 g de semilla, la cual se sometió a secado en la estufa, calculándose el porcentaje de humedad a través del peso que se pierde durante el secado. Para obtener el porcentaje de humedad se divide la pérdida de peso de la muestra entre el peso original de ella y el resultado se multiplica por 100:

$$\text{Contenido de humedad (en \%)} = \frac{P_i - P_f}{P_f} \times 100$$

## 5.8 Extracción del aceite de la semilla

### 5.8.1 Método de Soxhlet

Se utilizó una muestra de 50 g de almendra molida, la cual se colocó en un cartucho de papel filtro que posteriormente se introdujo en la cámara del soxhlet. En un matraz de bola de 500 mL se colocaron 300 ml de hexano, perlas de ebullición y se calentó a reflujo a temperatura constante de 60 °C durante un periodo de 18 horas (tiempo óptimo para una extracción completa de aceite). Después de la extracción del aceite, la mezcla se sometió a un tratamiento de secado con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró en un evaporador rotatorio. Obtenido el aceite se conserva la molienda de los cartuchos para posteriores determinaciones.



### 5.8.2 Método de Extracción por Maceración

Para la extracción por maceración se utilizaron 5 kg de almendra previamente molida, la cual se colocó en un recipiente de vidrio con 5 L de hexano y se dejó reposar durante un periodo de 3 días. Transcurrido este tiempo, el extracto hexánico se decantó y se filtró con papel filtro mediano para separar el bagazo. Una vez realizado este proceso, se evaporó el hexano en un evaporador rotatorio para concentrar el aceite. Este proceso se realizó 2 veces más con las mismas condiciones para hacer un total de 3 extracciones en 9 días, una vez terminado el proceso se recolectaron las extracciones para obtener el aceite.

#### ❖ Rendimiento de aceite

El porcentaje de rendimiento del aceite obtenido de la almendra, se obtuvo por medio de una relación entre el peso del extracto y la cantidad de materia utilizada por 100, empleando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{peso extracto (g)} \times 100}{\text{peso materia prima (g)}}$$



Figura 11. Extracción de aceite de la almendra de la semilla de *Annona muricata*



## 5.9 Pruebas de calidad del aceite

### 5.9.1 Determinación de Índice de Acidez (IA)

Se pesó 1 g de muestra de aceite en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se le adicionaron 10 mL de alcohol etílico y 2 gotas de fenolftaleína. La mezcla se mantuvo en agitación vigorosa a 60°C y se tituló con una disolución previamente valorada de KOH 0.0839 N, hasta ver el vire (se sustituyó la mezcla de etanol-éter de petróleo (1:1) que señala la MGA 0001 por el uso de etanol). Se realizaron 3 repeticiones para cada muestra de aceite: soxhlet y maceración. Se registró el volumen gastado de la disolución de KOH y se realizaron los cálculos utilizando la ecuación:

$$IA = \frac{(mL_{KOH})(N_{KOH})(56.1mg_{KOH})}{g_{muestra}}$$

IA= Índice de Acidez

$mL_{KOH}$  = mililitros de KOH utilizados

$N_{KOH}$  = Normalidad de KOH

$g_{muestra}$  = gramos de muestra utilizados

### 5.9.2 Determinación de Índice de yodo (IY)

Se pesaron de 0.1 g a 0.2 g de aceite en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se cubrió con papel aluminio para evitar el paso de luz al matraz, dejando la boquilla destapada, se añadieron 10 mL de diclorometano y 10 mL del reactivo de Wijs, se le colocó un tapón, agitándose fuertemente y se guardó en un lugar oscuro durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se sacó el matraz y se le adicionó 10 mL de una disolución de yoduro de potasio al 10% en 100 mL de agua destilada previamente hervida y enfriada. Después se tituló con una disolución de tiosulfato de sodio 0.16 N previamente valorada, hasta obtener un color



amarillo paja. Una vez obtenida esta coloración, se le adicionó 1 mL de disolución de almidón, se continuó titulando hasta que desapareció la coloración azul. Finalmente se anotó el volumen de tiosulfato de sodio utilizado y calculándose el índice de yodo con la siguiente ecuación:

$$IY \frac{(T_2 - T_1) \times 127 \text{ gI}_2 \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \times 100}{\text{peso del aceite (g)}}$$

Donde  $T_1$  es volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación de la muestra y  $T_2$  es el volumen de tiosulfato de sodio gastado por el blanco,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  es la normalidad a la cual se realizó el experimento, peso del aceite (g) es el peso de la muestra utilizada

### 5.9.3 Viscosidad cinemática

La determinación se realizó en un viscosímetro Stabinger marca Anton Paar, modelo SVM 3000, se inyectó una muestra de 4 mL de aceite, el equipo empezó a realizar la medición cuando el tubo en U quedó lleno con la muestra, permitiendo que el rotor de medición (con el imán integrado) flote en la muestra permitiendo eliminar la influencia de fricción externa. El rotor magnético gira a velocidad constante y queda centrado por las fuerzas centrífugas. Por otra parte, la regulación en los cambios de temperatura es por acción del sistema integrado al equipo, lo que permitió que con la misma muestra inyectada al equipo se hicieran mediciones a diferentes temperaturas.

### 5.9.4 Densidad

La determinación de densidad se basa en la relación existente entre el peso de un determinado volumen de muestra. Comúnmente la prueba se realiza empleando el método oficial MGA 0251 que se describe en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. En este caso particular, la determinación se realizó con el mismo equipo empleado para la prueba de viscosidad, un tubo en forma de "U" oscilante que permitió una determinación simultánea de densidad, viscosidad



cinemática y dinámica.

### 5.9.5 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de Aceite

Para el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno se pesaron 0.0050 g de la muestra de aceite, el análisis se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Se utilizó un espectrómetro Varian modelo Unity Inova 300 Autosuitable con frecuencia de 300 MHz. Se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

### 5.10 Obtención del extracto metanólico

Realizada la extracción del aceite se obtuvo el bagazo desengrasado, el cual se colocó en una superficie limpia con adecuada ventilación, donde se dejaron evaporar los residuos de hexano. Se colocaron 5 kg de este bagazo en un recipiente de vidrio con tapa y se adicionaron 5 L de metanol para su extracción. La mezcla se dejó reposar durante un periodo de 3 días, agitando de manera ocasional, transcurrido este tiempo se decantó el disolvente, se filtró con papel filtro mediano para separar el bagazo del extracto y se recuperó el metanol en un evaporador rotatorio. El procedimiento anterior se realizó 2 veces más para hacer un total de 3 extracciones en 9 días, las cuales se juntaron para constituir una sola muestra de extracto metanólico.

### 5.11 Obtención de particiones a partir del extracto metanólico

Partiendo del extracto metanólico obtenido del bagazo de la almendra de la semilla de *A. muricata*, se obtuvieron las particiones siguientes: partición de hexano, diclorometano, acetato de etilo y *n*-butanol.

#### 5.11.1 Partición de hexano

En un vaso de precipitados de 250 mL se pesaron 30.53 g del extracto metanólico, adicionándose 50 mL de agua destilada y 70 mL de hexano. La mezcla se



transfirió a un embudo de separación de 250 mL, se agitó fuertemente y se dejó reposar para llevar a cabo la separación de la fase hexánica de la fase acuosa. Se realizaron 2 lavados más con hexano, se recolectaron los tres lavados obtenidos y fueron secados con sulfato de sodio anhidro y el disolvente fue evaporado en un evaporador rotario.

#### 5.11.2 Partición de diclorometano

De la partición anterior (partición de hexano) se tomó la fase acuosa y se le realizaron 3 lavados con 100 mL de diclorometano, entre cada lavado se separó la fase correspondiente a la porción de diclorometano, al finalizar se incorporaron las 3 fases de diclorometano extraídas, a las cuales se les evaporó el disolvente y concentró en un evaporador rotatorio.

#### 5.11.3 Partición de acetato de etilo

De la partición anterior (partición de diclorometano) se tomó la fase acuosa resultante, se le realizaron 3 lavados con 100 mL de acetato de etilo, entre cada lavado se separó la fase correspondiente a la porción de acetato de etilo, al finalizar se juntan las 3 fases obtenidas las cuales se les evapora el disolvente y concentran en un evaporador rotario.

#### 5.11.4 Partición de *n*-butanol

De la partición anterior (partición de acetato de etilo) se tomó la fase acuosa resultante, se le realizan 3 lavados con 100 mL de *n*-butanol, entre cada lavado se separa la fase correspondiente al porción de *n*-butanol, al finalizar se juntan las 3 fases obtenidas las cuales se les evaporó el disolvente y se concentran en un evaporador rotario para así obtener la partición de *n*-butanol.

#### 5.11.5 Fase acuosa

A la fase acuosa final resultante de las particiones anteriores, se le evaporó el agua para la formación de cristales y se recuperó el residuo sólido.

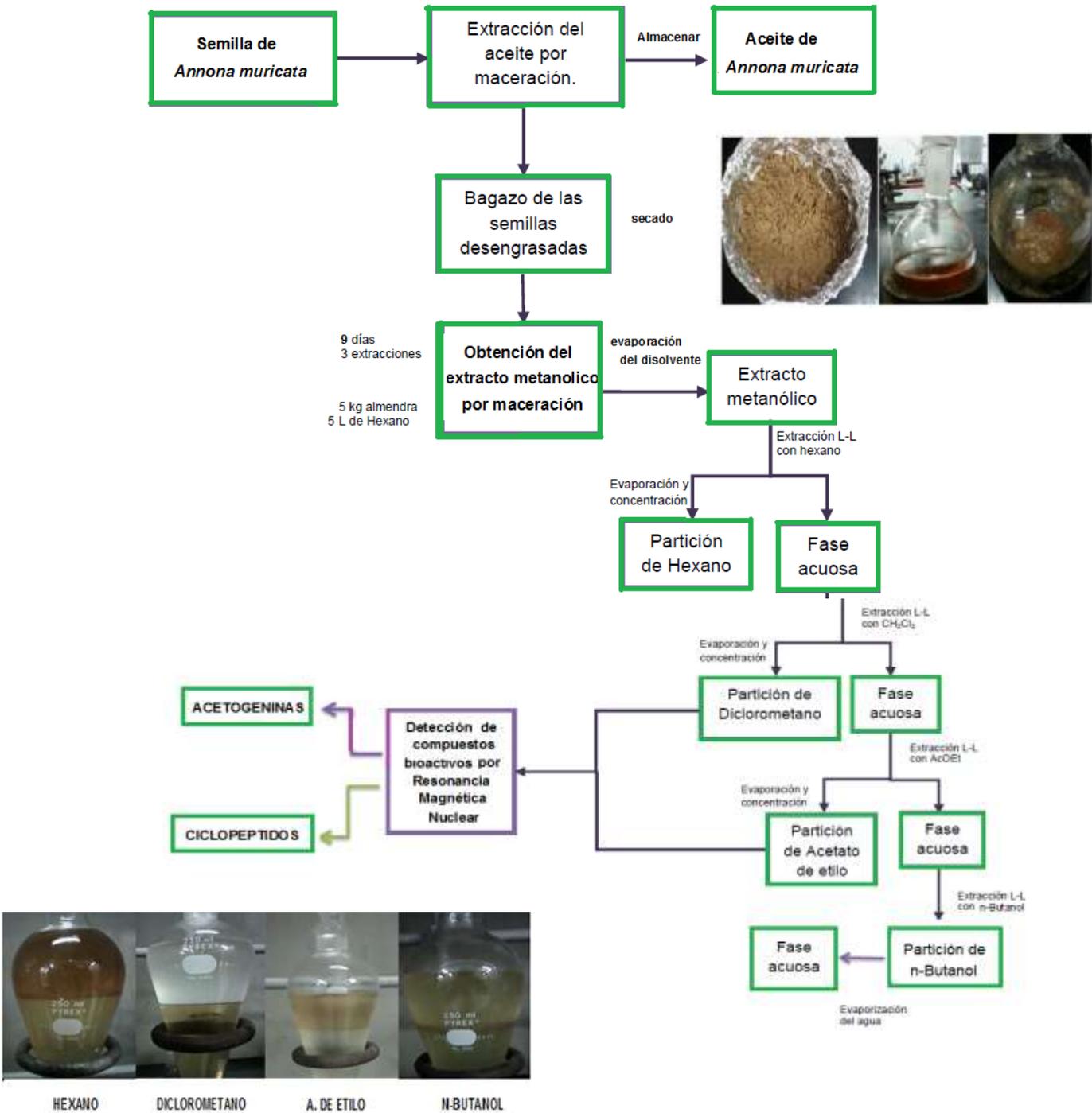


Figura 12. Extracción de extracto metanólico del bagazo de la almendra de *A. muricata* y sus particiones.



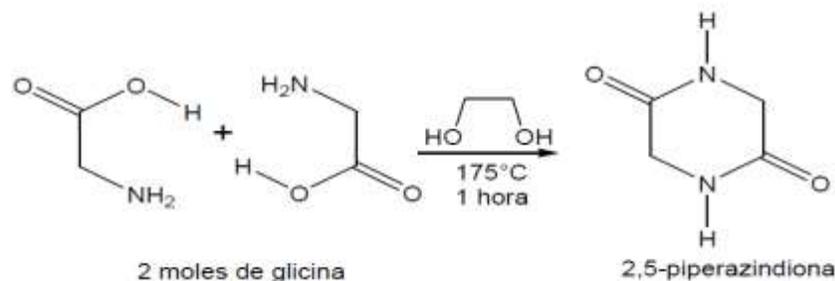
## 5.12 Detección de ciclopéptidos

La detección de aminoácidos y péptidos se llevó a cabo por cromatografía en capa delgada, utilizando cromatoplasacas de silica gel como fase estacionaria y como fase móvil se empleó una mezcla de metanol, diclorometano y agua (5:4:1). Como referencia se emplearon los aminoácidos: l-Glicina, l-Valina, l-Metionina, l-Isoleucina, l-fenil-alanina y el ciclopéptido 2,5-piperazona, el cual fue sintetizado. También se prepararon los reveladores necesarios para la detección de los ciclopéptidos presentes en los extractos analizados (disolución de ninidrina y disolución de *o*-tolidina).

### 5.12.1 Síntesis de 2,5-piperazona

Para la detectar la posible presencia de ciclopéptidos en el extracto metanólico y sus particiones, se realizó la síntesis del ciclopéptido 2,5-piperazona para tener una base para realizar las pruebas de detección e identificación de ciclopéptidos en cada uno de los extractos.

El ciclopéptido se obtiene de la reacción de la glicina sometida al calentamiento constante a 175 °C por una hora en presencia de etilenglicol seguido de un tratamiento de recristalización, la reacción de la formación de la 2,5-piperazona se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Reacción de la obtención del ciclopéptido 2,5-piperazindiona



### 5.12.2 Disolución de ninhidrina (Detección de aminoácidos y péptidos)

Se disolvieron 0.0868 mg de ninhidrina en 15 mL de *n*-butanol y 0.45 mL de ácido acético, la mezcla se colocó en un aspersor de vidrio con el cual se rociaron las cromatoplasmas y se expusieron a calentamiento 95 °C para su revelado. La solución de ninhidrina revela el grupo amino y los  $\alpha$ -aminoácidos terminales y residuales de la cadena peptídica, dando como resultado la presencia de manchas de color rosa intenso, que indica una prueba positiva, esta prueba da negativa para los ciclopéptidos.

### 5.12.3 Sistema de revelado disolución de $\text{Cl}_2$ /o-tolidina (Detección de ciclopéptidos)

Se disolvieron 40 mg de o-tolidina en 8 mL de ácido acético glacial, y se aforó la disolución a 62.5 mL con agua destilada y finalmente se agregó 0.25 g de yoduro de potasio a mezcla se colocó en un aspersor de vidrio con el cual se rociaron las cromatoplasmas para su revelado, las cuales previamente fueron expuestas a una cámara de hipoclorito de sodio durante 20 minutos y después se dejó evaporar el cloro que estaba en exceso a temperatura ambiente por 5 horas. Este paso es importante realizarlo antes de la aspersion con el revelador ya que de lo contrario se tendrán falso positivo como resultado.



### 5.13 Separación de ciclopéptidos por cromatografía en columna

Una vez detectados los ciclopéptidos por el análisis de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en alguna de las particiones, el extracto correspondiente se sometió a la separación de los ciclopéptidos empleando cromatografía en columna usando silica gel como fase estacionaria. Previamente, se realizaron ensayos con diferentes mezclas de los disolventes metanol y diclorometano para establecer la polaridad adecuada de la fase móvil que sería empleada en la columna.

Se realizó el montaje de la columna y se introdujo en la parte superior 2 g de una de las particiones obtenidas del extracto metanólico adsorbida previamente en 2 g de silica gel, se partió de una mezcla de metanol/diclorometano 5:95, terminando la elución de la columna con una mezcla 50:50.

A medida que se fue eluyendo la columna se formaron una serie de bandas coloridas, lo cual nos indicó que la separación de los componentes de la muestra. Se colectaron fracciones de 20 ml en matraces Erlenmeyer, obteniéndose un total de 30 fracciones.

Recolectadas las fracciones se detectó la presencia de los ciclopéptidos que se encontraban en ellas por medio de cromatografías de capa delgada, empleando los reveladores correspondientes: disolución de ninhidrina y sistema de revelado disolución de  $\text{Cl}_2/o$ -tolidina.

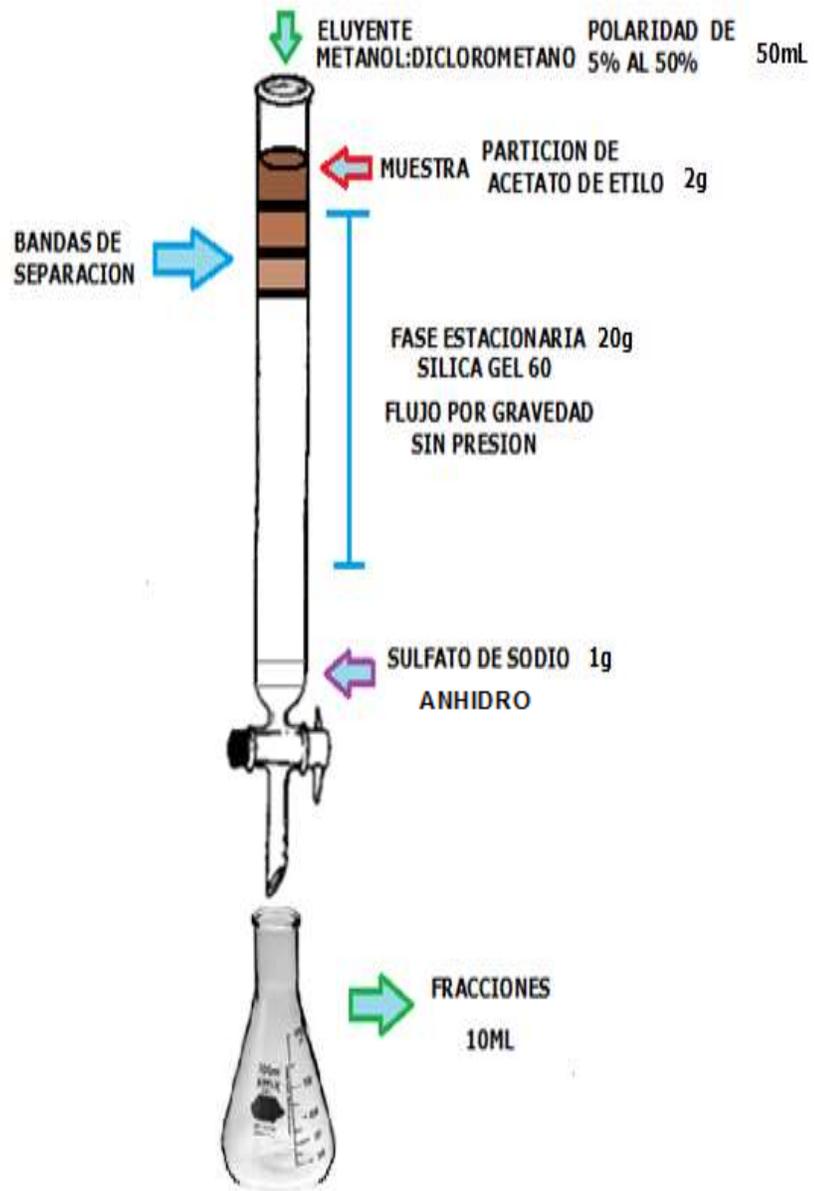


Figura 14. Cromatografía en columna de la partición de acetato de etilo



### 5.13.1 Purificación de ciclopéptidos por cromatoplaça preparativa

Identificadas los ciclopéptidos aislados por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se purificaron por cromatografía de capa delgada en placa preparativa de Silica gel 60 F<sub>254</sub>, en la cual fue impregnada con 200 mg de la mezcla de ciclopéptidos, se usó como fase móvil diclorometano, metanol (9:1), se eluyó 10 veces consecutivas, dejando evaporar los disolventes de la placa entre cada elución y revelando con cámara de UV para seguir su separación de los ciclopéptidos.

La purificación se llevó a cabo por filtración a vacío para retirar la silica gel de la muestra y obtener los compuestos puros.

Los compuestos puros fueron analizados por Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para lo cual se pesaron 0.0030 g de cada uno, el análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo, en donde se obtuvieron los espectros 2, 4 y 6 en donde se analizó los fragmentos presentes en los ciclopéptidos aislados para posteriormente determinar su posible estructura.

## 5.14 Identificación de ciclopéptidos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se realizó la identificación de los ciclopéptidos contenidos en el bagazo de la almendra de *A. muricata* por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

El análisis de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizó para cada una de las particiones obtenidas del extracto metanólico. Para lo cual se pesó 0.0050 g de cada una, el análisis se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM, de donde se obtuvo el espectro 7.



Se utilizó un espectrómetro Varian modelo Unity Inova 300 Autosuitable con frecuencia de 300 MHz. Se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

### **5.15 Determinación de actividad anticancerígena de ciclopeptidos aislados de la partición de acetato de etilo**

Los ciclopeptidos aislados de la semilla de *Annona muricata* presentan distintos tipos actividad biológica como son: antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral y la más importante anticancerígena (Wu Lu Y *et al*, 2007). Por lo cual representan una oportunidad para encontrar un tratamiento menos agresivo para combatir el cáncer.

Se realizó el estudio de líneas celulares a los extractos obtenidos de la separación de ciclopeptidos. El cual se llevó a cabo en el Instituto de Química, UNAM. Tomando las cuatro líneas celulares cancerosas humanas, de los principales tipos de cáncer que afectan a la población que fueron: PC-3= próstata, HCT15= colón, MCF-7=mama; SKLU-pulmón.

Para el análisis se pesaron 0.0050 g de cada compuesto bioactivo se realizó un ensayo MTT con 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solución stock 5mg/ml. El ensayo realizado fue el MTT en el cual cuantifica la viabilidad celular. Las células se expusieron por 48 hrs, después de este periodo, se agregó a los pozos una solución de MTT en una razón de  $10\mu/100\mu\text{l}$  y se dejó por un periodo de 4 hrs. Se solubilizo el formazano con DMSO ( $100\mu\text{l}$ ) y se leyó en un lector de Elisa a 570 nM. Se reporta el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar de la media.

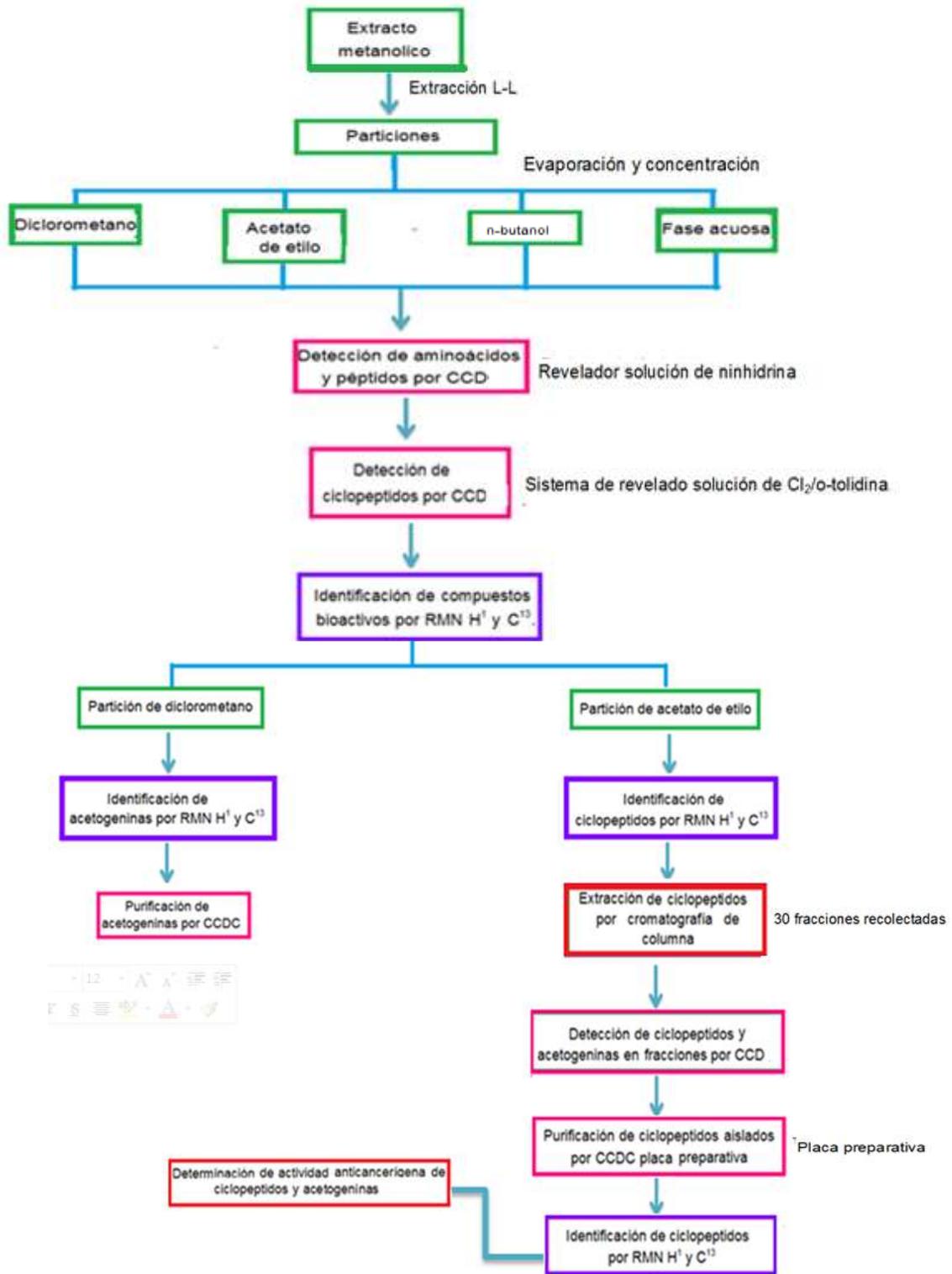


Figura 15. Aislamiento y Caracterización de ciclo péptidos



## 5.16 Detección de acetogeninas

### 5.16.1 Identificación de acetogeninas en la partición de diclorometano

Se realizó el reconocimiento de la presencia de acetogeninas en la partición de diclorometano por medio del análisis de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el cual se pesaron 0.0050 g.

Después fueron purificados por filtración a vacío para retirar la silica gel de ellos y obtener las acetogeninas puras.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Materia prima

A la semilla se le eliminó la pulpa proveniente del fruto, se lavó con jabón y se colocaron sobre una superficie limpia con ventilación, donde se dejó secar durante tres días.

Ya secas la semillas se realizó el análisis selectivo de éstas para extraer compuestos de buena calidad sin ningún tipo de contaminante que pudiera interferir en el estudio.

### 6.2 Análisis Selectivo de la semilla

En el análisis selectivo se procedió a la selección de las semillas que consistió en eliminar aquellas que presentan daños físicos como: semilla rota, seca, daño por insecto, semilla traza de carbón, materia extraña.

**Tabla 6.** Análisis selectivo de la semilla de *Annona muricata* en 5 Kg

FRACCIONES	PESO(g)	%DECIMAL
Semilla seca	29.9476	2.99
Daño por insecto	18.0786	1.80
Semilla rota	1.4968	0.14
Semilla traza de carbón	11.6809	1.16
Materia extraña	1.8721	0.18

La semilla presentó diferentes tipos de defectos que son evidentes más la proporción en la que se encuentran no resultaron significativas para evitar llevar a cabo la extracción de sus diferentes componentes, el porcentaje aproximado del total de las semillas con defectos corresponde al 10 % del total de la semilla utilizada (5 Kg), los datos correspondientes a cada una de las fracciones se encuentran en la Tabla 6 Análisis selectivo de la semilla de *Annona muricata*.



Es importante el estado en que se encuentra la semilla ya que al provenir de un residuo orgánico podemos encontrar la presencia de otros factores como son rancidez, hongos, entre otros. Con la realización del análisis selectivo se evitó contaminaciones en la realización de los procesos consecutivos.



Semilla



Almendra



Semilla seca



Semilla rota



Semilla raspada



Daño por insecto



Traza de carbon



**Figura 16.** Análisis selectivo de la semilla de *Annona muricata*



En la Figura 17 se muestran algunos de los diferentes defectos que puede presentar la semilla, es de suma importancia retirar las fracciones que correspondan a estos tipos de semilla, ya que como se puede observar al abrir la semilla no se encuentra la almendra solo se encuentra la cascara ya que los insectos se la han engullido.



**Figura 17.** Semilla con daño por insecto

### 6.3 Caracterización de la semilla

Para la determinación de las características físicas se utilizaron semillas en buen estado resultado del análisis selectivo realizado, en la Figura 18 se observa cómo debe de encontrarse la semilla por dentro y por fuera para realizar su caracterización.



**Figura 18.** Semilla y almendra de *Annona muricata*



De estas semillas se tomó al azar una muestra de 30 semillas, a las cuales se les determinó las medidas de largo, ancho y grosor con un Vernier, tanto de la cascara como de la almendra de la semilla, así como el peso de ambas partes de la semilla por separado en Tabla 7 se muestran los valores obtenidos para cada una de las determinaciones que fueron realizadas.

**Tabla 7.** Determinación de las características físicas de la semilla de *Annona muricata*

CARCATERISTICAS	SEMILLA	ALMENDRA
<b>LARGO(mm)</b>	16.741±1.1643	12.3162±1.9012
<b>ANCHO(mm)</b>	09.220±1.1510	07.8622±1.2160
<b>GROSOR(mm)</b>	06.1350±0.06120	04.251±0.05620
<b>PESO(g)</b>	0.3712±0.0530	0.818±0.03540

Las medidas de largo, ancho, grosor y el peso no muestran una variación significativa, se encontraron dentro del estándar de las medidas reportadas en los distintos artículos e investigaciones previamente realizadas (Jun zhou - Ninghua tan, 2000).



**Figura 19.** Almendra y cascara de la semilla de *Annona muricata*



## 6.4 Vida de anaquel de la semilla

### 6.11.3 Temperatura

La semilla presenta una temperatura de almacenaje de 24.8°C, por lo cual no debe rebasar los 25 °C para la conservación de los diferentes componentes que la constituyen. Se debe considerar la temperatura ambiente en que se realizó la determinación para dar un parámetro de almacenamiento y mejorar de su conservación.

**Tabla 8.** Determinación de temperatura

ZONA	TEMPERATURA(°C)	T.AMBIENTE(°C)
1	24.5	24-25
2	24.5	
3	25	
4	25	
5	25	

### 6.4.2 Color y aspecto

Las semillas se encuentran dentro de la escala de color (amarillo-café) que representa el número 4 en la escala del Pantone, se observaron distintas coloraciones como son: verde olivo, café marrón y algunas pintas entre naranjas y amarillo comparando con investigaciones previas (Gajalakshmi *et al*, 2007), la semilla porta un color natural propio de la semilla y que nos indica que no se encuentra en descomposición, por lo cual puede contener los componentes bioactivos que se buscan, en la Figura 20 se observa la coloración que presento la semilla.



**Figura 20.** Determinación de color de *Annona muricata*



### 6.4.3 Densidad

La densidad fue determinada con la prueba de índice de flotación, la cual se llevó a cabo durante 15 min y 5 hr. Obteniendo los siguientes resultados, aportando atributos para la caracterización de la muestra de la semilla.

En el índice de flotación se tomaron las siguientes medidas: el peso en volumen de 100 semillas = 50 mL, el peso en volumen de agua agregada = 150 mL y se realizó en agua destilada.

Transcurrido el tiempo (15 minutos) se observó que las semillas en su totalidad flotaron y cuando se realizó el mismo experimento pero con un intervalo mayor tiempo 5 horas, suben a la superficie  $\geq 20$  semillas. Esto se debe a que la cascara visualmente se infla por la adsorción de agua, teniendo un cambio de coloración a rojo intenso en el centro y trazas negras en las orillas de la semilla, con ablandamiento parcial de la cascara como se muestra en la Figura 21.

En ambos casos la semilla presenta un cambio de coloración de verde oliva o rojo intenso, a mayor tiempo que transcurre las semillas descienden al fondo del vaso presentando una coloración negra y ablandamiento total de la cascara lo que indica que la semilla a saturado la adsorción de agua en su pericarpio lo cual nos dice que es totalmente permeable la membrana de la cascara.



**Figura 21.** Índice de flotación



#### 6.4.4 Dureza

En la determinación de resistencia al impacto se obtuvieron los siguientes resultados : semilla entera 19.892 g, semilla quebrada 0.098 g, polvo de semilla 0.01 g y en la determinación de resistencia de abrasión se obtuvieron residuos no desgastados 1.8005 g, 0.08 % de pérdida de 1.8792 g de muestra utilizada.

La semilla presentó un alto índice de dureza por lo cual es resistente al impacto y a la abrasión, éste es un factor importante para su almacenamiento ya que mientras más alta es la dureza que presente la semilla mejor será el almacenamiento de la almendra para la posterior extracción de sus componentes.

#### 6.4.5 Humedad

En la determinación de humedad se obtuvieron los siguientes resultados: peso de la semilla sin secar 10.09 g, peso de la semilla seca 8.67 g, el porcentaje de humedad obtenido fue de 16.38 % por lo que si no se tiene un buen almacenamiento de la semilla esta es propensa al desarrollo fúngico.

Esta determinación se realizó para prevenir el crecimiento de hongos y el temprano deterioro de la semilla en el transcurso de su almacenamiento, ya que es el factor de mayor importancia para almacenamiento seguro de la semilla y la prolongación de los compuestos bioactivos de la almendra.



## 6.5 Extracción del aceite de la semilla

La extracción del aceite se llevó a cabo como parte del aprovechamiento del bagazo de la almendra teniendo como resultado la obtención de un subproducto, esta se llevó a cabo por medio de dos métodos: Soxhlet y maceración, en los cuales las condiciones de temperatura, cantidad de muestra y tiempo de extracción fueron diferentes, por lo que el rendimiento obtenido en cada extracción del aceite fue distinto, en la Tabla 9 se muestran las cantidades y rendimientos del aceite extraído.

**Tabla 9.** Extracción de aceite del bagazo de la almendra de *Annona muricata*

Propiedades/Extracción de bagazo de almendra	Soxhlet	Maceración
Cantidad de materia(g)	150.125	5000
Volumen de aceite obtenido (ml)	48.10	1653
Masa del aceite (g)	46.47	1589
Rendimiento (%)	30	32

Se observa que se obtuvo un total de 48.10 mL de aceite proveniente de la extracción Soxhlet proveniente de 150.125 g de bagazo de la almendra, teniendo así un rendimiento del 30 %, mientras que por el método de maceración se obtuvo un total de 1653 mL de aceite proveniente de 5000 g de bagazo de almendra, teniendo un rendimiento del 32 %.



Las diferencias de cada uno de los rendimientos se debió a la cantidad de muestra utilizada y el tiempo de extracción, en el método de maceración es un mejor método para la extracción del aceite ya que se obtuvo un mayor rendimiento.

Los disolventes fueron recuperados y destilados para su posterior reusó.

### 6.6 Pruebas de calidad del aceite

Las pruebas de calidad del aceite fueron realizadas para determinar las propiedades de los aceites extraídos por ambos métodos, se realizó las determinaciones de índice de acidez, índice de yodo, densidad, viscosidad cinemática y dinámica. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para cada determinación realizada.

**Tabla 10.** Pruebas de calidad del aceite de *Annona muricata*

Determinación/Extracción de bagazo de almendra	Soxhlet	Maceración
Índice de Acidez (mg KOH/1 g de aceite)	2.34±0.33	1.23±0.03
Índice de Yodo (g de I/100 g de aceite)	93.04±1.05	88.67±1.03
Densidad (g/cm <sup>3</sup> ) 40°C	0.86	0.87
Viscosidad cinemática a 40 °C (mm <sup>2</sup> /s)	27.85	27.33
Viscosidad dinámica A 40 °C (mPa.s)	25.73	25.21
Densidad relativa a 20 °C	0.9089±0.01	0.9190±0.01



En cada una de las determinaciones de calidad que se les realizaron a ambos aceites extraídos, se observó que entre los valores no existe una variación significativa. Fueron comparados con datos previamente determinados (Juarez Rico, 2012) en donde pudimos analizar que ambas muestras de aceite presentan parámetros similares en cada una de las pruebas realizadas.

En la determinación de acidez es necesario que el aceite sea rico en triglicéridos de ácidos grasos insaturados con un contenido bajo de ácidos grasos libres ( $\leq$  del 2%), para que sea usado en otro tipo de reacciones como es la transesterificación en donde se obtiene biodiesel el cual es un combustible alternativo al diésel pero que es amigable con el planeta (Juárez Rico, 2012).

La determinación de índice de yodo indica la presencia de insaturaciones de los ácidos grasos, si el índice de yodo es alto significa que hay mayor cantidad de ácidos grasos insaturados y si es menor indica que hay mayor cantidad de ácidos grasos saturados y estos tienen un punto de fusión mayor, por lo cual se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente.

La información que nos indica que tan susceptible es el aceite a la oxidación, al presentar mayor porcentaje de insaturaciones está más expuesto a la oxidación ambas muestras de aceite se encuentran en intervalos de índice de yodo de 73-100 lo que nos indica mayor contenido en ácidos grasos insaturados, estos intervalos también se encuentran cerca de los intervalos de los aceites comerciales que están alrededor de 100g I<sub>2</sub>/ 100 g de muestra, el índice de yodo no debe ser demasiado alto ya que el aceite se oxidaría muy rápido por contener una gran cantidad de dobles y triples enlaces en la estructura del ácido graso.

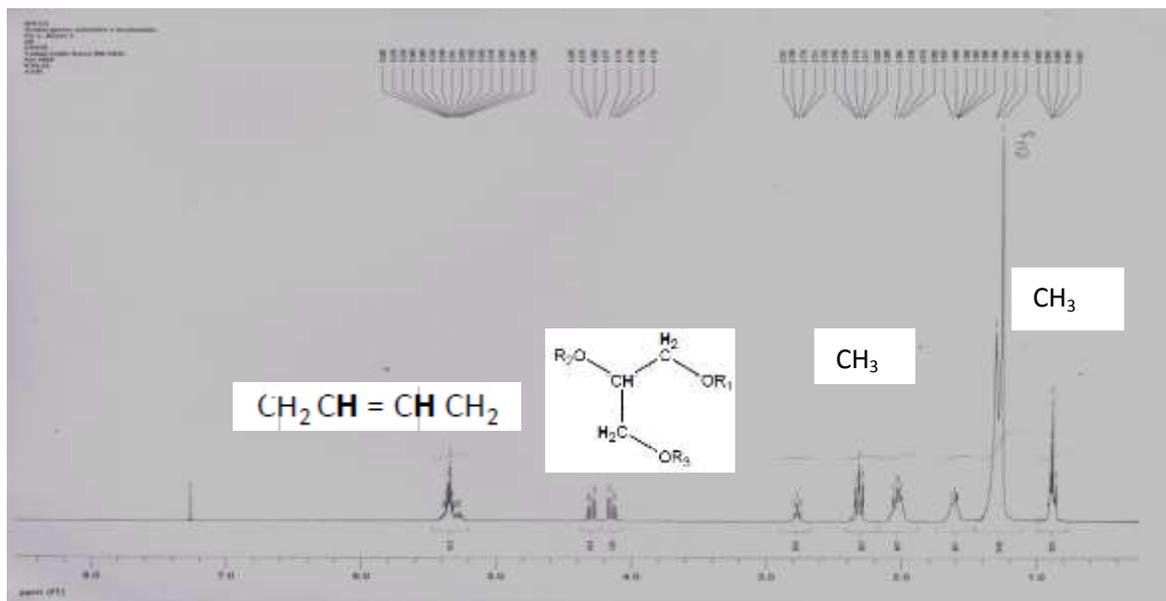
La densidad es asociada con la energía térmica, entre mayor sea la densidad, mayor será la energía (Atabani et al, 2012), los intervalos de densidad de los aceites comestibles abarcan de 0.81 a 0.92 y son muy similares, por lo que



la energía térmica en teoría debería de ser análoga, las determinaciones de densidad a 20 °C y 40 °C son semejantes a las reportadas para los aceites comerciales, en las determinaciones de viscosidad cinemática y dinámica se encuentra que la viscosidad disminuye al aumentar la temperatura a 40 °C, por lo cual la densidad a esta temperatura también puede ser ligeramente menor.

❖ Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Aceite

El análisis de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno se realizó con 0.0050 g de muestra aceite. Se utilizó un espectrómetro Varian modelo Unity Inova 300 Autosuitable con frecuencia de 300 MHz. Con el cual se obtuvo como resultado el espectro en donde se encontró que presenta triglicéridos de cadena largas los cuales pueden ser empleados para la reacción de transesterificación donde el producto principal es el biodisel (Juárez Rico, 2012)



**Espectro 1.** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN <sup>1</sup>H,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de aceite de la almendra de *Annona muricata*.



## 6.7 Estudio del bagazo desengrasado de la semilla

La mayor parte de los residuos procedentes de la industria alimenticia son ricos en fibra, contienen proteínas y péptidos de manera natural. Especialmente se han detectado y aislado una serie de ciclopeptidos útiles para ser empleados como sustancias funcionales.

Estas biomoléculas se han obtenido principalmente de extractos preparados de con disolventes orgánicos como son el metanol y etanol empleados en distintos tipos de bagazos.

### 6.7.1 Obtención del extracto metanólico

El extracto metanólico se realiza después de la extracción del aceite del bagazo de la almendra de *Annona muricata*. Se llevó por el método de extracción de maceración con metanol, en el cual encontramos los diferentes compuestos bioactivos como son los ciclopéptidos como acetogeninas.

Se obtuvo 556.15 g de extracto metanólico proveniente de 5000 g de bagazo de almendra de *Annona muricata*, teniendo así un rendimiento del 11.12 %. Al ser concentrado en el rotavapor aumenta su viscosidad dándole más espesor y aumentando su coloración, la evaporación de todo el disolvente es fundamental para poder concentrar los compuestos bioactivos que contiene la muestra.

## 6.8 Obtención de particiones a partir del extracto metanólico

A partir del extracto metanólico previamente obtenido del bagazo de la almendra se realizaron las particiones siguientes: partición de hexano, diclorometano, acetato de etilo y *n*-butanol.

Las particiones de se realizaron a partir de 30.53 g del extracto metanólico. En la Tabla 11 se muestran la cantidad de partición obtenida como el porcentaje al que corresponde a cada partición y la recuperación de la fase acuosa la cual fue cristalizada.



**Tabla 11.** Particiones del extracto metanólico

Particion del extracto metanolico	Cantidad (g)	Porcentaje (%)
Particion de hexano	1.66	5.51
Particion de diclorometano	8.86	29.42
Particion de acetato de etilo	9.98	33.14
Particion de <i>n</i> -butanol	7.33	24.33
Fase acuosa	2.29	7.60

Durante la realización de la partición de hexano fue complicada la separación a la mezcla de las dos fases (acuosa y orgánica) por lo que se le suministró calentamiento 40 °C para aumentar la solubilidad y se separar las fases, cabe mencionar que esta partición no se analizó para posteriores procesos. ya que se tiene la referencia de que en ella no se encuentran los componentes bioactivos de interés (Wu Lu *et al*, 2007). En esta partición se encuentra reportada la presencia de lípidos residuales de la muestra, que no fueron extraídos durante el desengrasado.

Cabe destacar que el bagazo de las semillas anteriormente había sido tratado con hexano para la extracción de aceite, por lo que podemos suponer que el porcentaje de lípidos solubles se encuentran en el aceite extraído.



La partición de diclorometano fue de 29.42 % este porcentaje fue mucho más alto que el obtenido en la partición de hexano, mientras que en la partición de acetato de etilo se obtuvo el 33.14 % y para la partición de *n*-butanol se obtuvo el 24.33 %, cada una de estas particiones posteriormente fueron analizadas para saber su contenido de componentes bioactivos.

La fase acuosa fue cristalizada ya que en ella existía la posibilidad de encontrar suspendidas fracciones peptídicas ya que son solubles en agua, por lo cual se realizó el mismo estudio que se le realizó a demás particiones y así determinar si contenía algún compuesto de interés.

Debido a los porcentajes obtenidos de cada una de las particiones anteriores se pudo deducir que hay una variación entre cada partición, dependiendo de la composición de cada una de ellas. La solubilidad de éstas no es la misma en los disolventes empleados, debido a la polaridad de cada uno de los disolventes y la solubilidad de los compuestos bioactivos presentes en cada partición.

## **6.9 Detección de aminoácidos, péptidos y ciclopéptidos**

Para conocer la presencia de ciclopéptidos, se procedió a realizar dos tipos de cromatoplasmas (con los extractos a analizar y con las muestras de referencia) y reveladas con disolución de ninhidrina y con el sistema de revelado de  $\text{Cl}_2$ /*o*-toluidina para descartar o aceptar la posible presencia de ciclopéptidos en cada una de las particiones obtenidas.



### 6.9.1 Síntesis de ciclopéptido

Se realizó la síntesis de 2,5 piperazindiona ya que se requirió de un ciclopéptido que indicara en las cromatoplasmas de capa delgada (CCD) de las diferentes particiones extraídas la posible presencia de ciclopéptidos en ellas, cabe destacar que este ciclopéptido no se encuentra en las estructuras ya reportadas (Li Chao Ming, 2006), este se sintetizó utilizando la glicina como reactivo, fue utilizado en la prueba de  $\text{Cl}_2/o$ -tolidina. El rendimiento que se encuentra reportado es del 45 % y el obtenido fue de 6.78 %, el rendimiento bajo se pudo deber a la pérdida del producto durante los lavados del producto durante su síntesis.

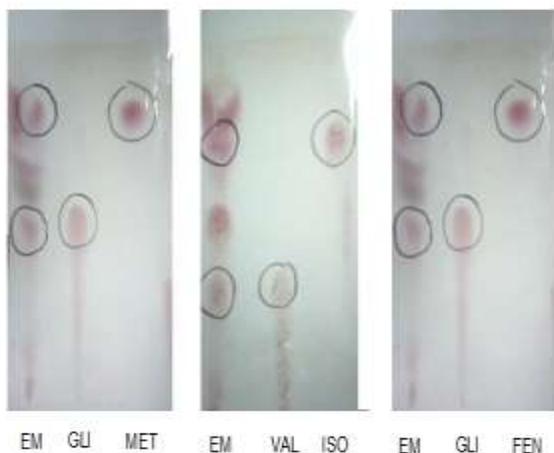
### 6.9.2 Extractos revelados con disolución de ninhidrina

La detección de aminoácidos y péptidos se llevó a cabo con cromatoplasmas de sílica gel las cuales contenían el extracto metanólico y las distintas particiones realizadas y los aminoácidos: l-glicina, l-valina, l-metionina, l-isoleucina, l-fenilalanina, variando la aplicación de estos.

El revelado de las cromatoplasmas se realizó con la disolución de ninhidrina y a una temperatura de  $150^\circ\text{C}$  que al presentar compuestos con grupo amino y  $\alpha$ -aminoácidos terminales o residuales de la cadena peptídica, se observó un compuesto con coloración rosa intenso, lo cual indica la presencia de los compuestos en la muestra. A continuación se presentan las cromatoplasmas que fueron realizadas:



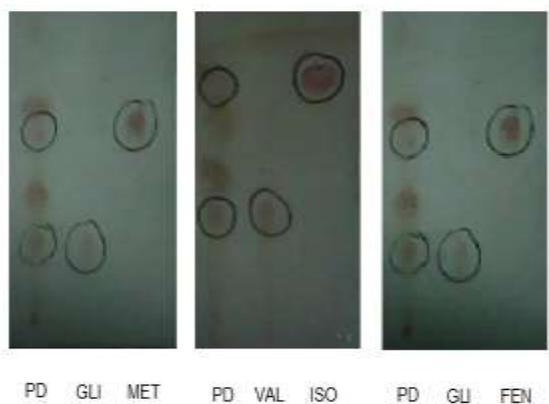
**Figura 22.** Extracto metanólico



Se observa que el extracto metanólico (EM) de *Annona muricata* presenta los aminoácidos aplicados en las cromatoplasmas, revelando manchas rosa intenso y definidas a la misma altura de cada uno de los aminoácidos como se muestra en la Figura 22.

**Extractos Aplicados:** Extracto metanólico (EM), Glicina (GLI), Metionina (MET), Valina (VAL), Isoleucina (ISO), Glicina (GLI) y Fenil-alanina (FEN)

**Figura 23** Partición de diclorometano

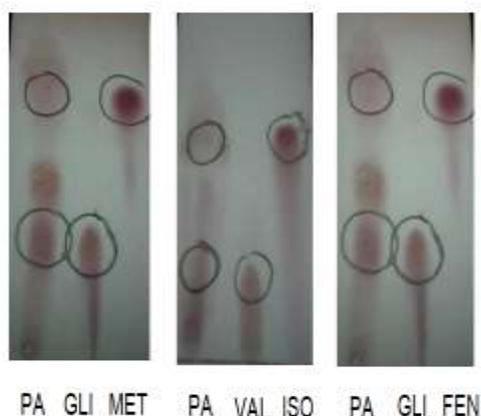


Se observa que la partición de diclorometano contiene los aminoácidos que fueron aplicados, ya que reveló manchas rosa intenso como se muestra en la Figura 23, con lo que se concluyó la detección de aminoácidos para esta partición.

**Extractos aplicados:** Partición de Diclorometano (PD), Glicina (GLI), Metionina (MET), Valina (VAL), Isoleucina (ISO), Glicina (GLI) y Fenil-alanina (FEN)



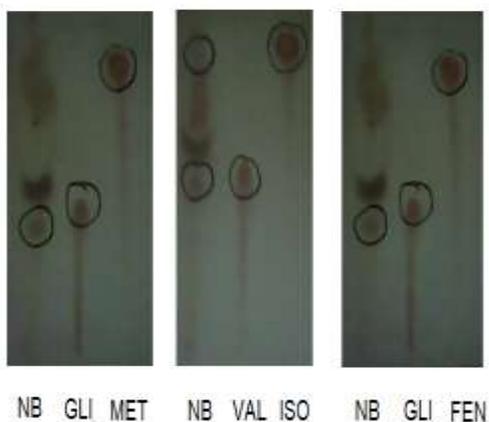
**Figura 24.** Partición de acetato de etilo



Se muestra que la partición de acetato de etilo están presentes los aminoácidos que fueron aplicados en las cromatoplasmas, revelaron manchas de color rosa intenso a la misma altura de cada uno de los aminoácido como se observa en la Figura 24,

**Extractos aplicados:**Particion de acetato de etilo (PA), Glicina (GLI), Metionina (MET), Valina (VAL), Isoleucina (ISO),Glicina (GLI) y Fenil-alanina (FEN)

**Figura 25.**Partición de *n*-butanol

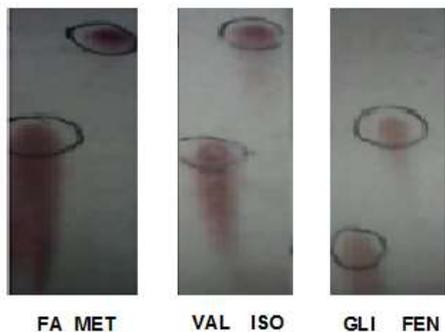


Se observó que la partición de *n*-butanol se observó contiene los aminoácidos que fueron aplicados, revelando manchas definidas rosa intenso a la altura de cada aminoácido aplicado como se observa en la Figura 25.

**Extractos aplicados:** Partición de *n*-butanol (NB), Glicina (GLI), Metionina (MET), Valina (VAL), Isoleucina (ISO),Glicina (GLI) y Fenil-alanina (FEN)



**Figura 26.** Fase acuosa



**Extractos aplicados:** fase acuosa (FA), Glicina (GLI), Metionina (MET), Valina (VAL), Isoleucina (ISO), Glicina (GLI) y Fenilalanina (FEN)

Se observa que en la fase acuosa solo presenta una mancha de color rosa intenso que coincidió con el aminoácido valina, los demás aminoácidos aplicados no fueron detectados como se muestra en la Figura 26.

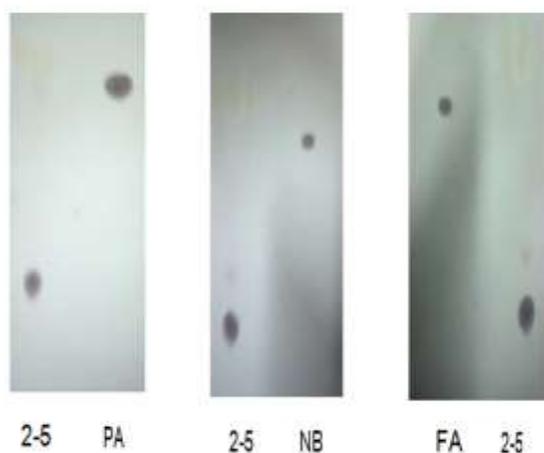


### 6.9.3 Extractos revelados con el sistema de revelado $\text{Cl}_2$ / *o*-tolidina

Las cromatoplasmas para la detección de ciclopéptidos fueron reveladas con cámara de vapores de  $\text{Cl}_2$ / *o*-tolidina, el cual detecta las ligaduras peptídicas que reacciona con el grupo amida con  $\text{Cl}_2$ , formando un N-halógeno que es revelado por una solución *o*-tolidina/KI observándose una coloración azul oscuro purpura, indicando la presencia de ciclopéptidos en cada una de las muestras (acetato de etilo, *n*-butanol, fase acuosa). Para observar la presencia de la posible existencia de ciclopéptidos se utilizó el ciclopéptido 2,5-piperazona el cual fue sintetizado con el aminoácido l-glicina.

A continuación se presentan las cromatoplasmas realizadas para la detección de ciclopéptidos.

**Figura 27.** Particiones de acetato de etilo, *n*-butanol, fase acuosa



Se observa en las particiones de acetato de etilo, *n*-butanol y la fase acuosa revelaron cada una manchas de color azul oscuro purpura, lo que indicó la presencia de ciclopéptidos en las mismas, como se muestra en la Figura 27, con este resultado se pudo proceder a la separación e identificación de los ciclopéptidos presentes.

**Extractos Aplicados:** Partición de acetato de etilo (PA), 2,5-piperazona (2-5), Partición de *n*-butanol (NB), Fase acuosa (FA)



## 6.10 Separación de ciclopéptidos por cromatografía en columna partición de acetato de etilo

La partición de acetato de etilo obtenida previamente se sometió a una separación por cromatografía en columna, empleando silica gel como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de los disolventes diclorometano y metanol. Se inició el proceso de elución partiendo de una mezcla de metanol/ diclorometano 5:95 incrementándose la polaridad hasta llegar a una mezcla 50:50 de los disolventes mencionados en la Figura 28 se muestra cómo se van separando conforme se va aumentando la polaridad de la mezcla de los disolventes.

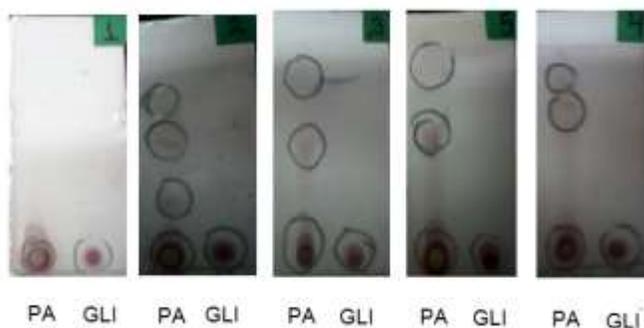


Figura 28. Cromatoplasmas de fase móvil

PA= Partición de Acetato de etilo, GLI= L-Glicina

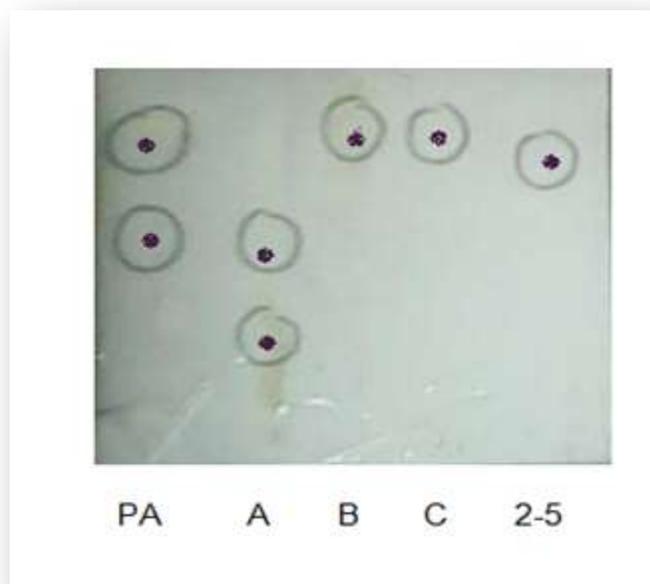
### 6.10.2 Cromatografía en columna

La separación de los ciclopéptidos presentes en la muestra de partición de acetato de etilo, se realizó tomando 2 g de muestra. Durante el proceso se observó la separación de los componentes observando las distintas bandas y la disminución de la intensidad coloración de la muestra. Al final se recolectaron 30 fracciones de 20 ml cada una, las cuales posteriormente se analizaron por cromatografía de capa delgada (CCD).

En las fracciones recolectadas se les llevó acabo la detección de ciclopéptidos por medio de cromatografía de capa delgada (CCD), se comparó y confirmó la presencia de los componentes bioactivos en cada una de las fracción.



Al finalizar se reunieron las fracciones que correspondían al mismo componente de la muestra. Se obtuvieron componentes diferentes en los que se separó la partición de acetato de etilo, en la Figura 29 se muestra la cromatoplaaca, en donde se observa los ciclopéptidos aislados de la muestra.



**Figura 29.** Ciclopéptidos aislados de la partición de acetato de etilo

Se confirmó el aislamiento de los ciclopéptidos por medio de cromatografía de capa delgada (CCD), que fueron reveladas con el sistema de  $CL_2$  / *o*-Tolidina. Se puede observar que las fracciones recolectadas corresponden al mismo componente ya que se encuentran a la misma distancia, tomando en cuenta estos resultados podemos decir, que la muestra se separó en tres distintos componentes los cuales posiblemente pertenecen a los ciclopéptidos aislados de la muestra.



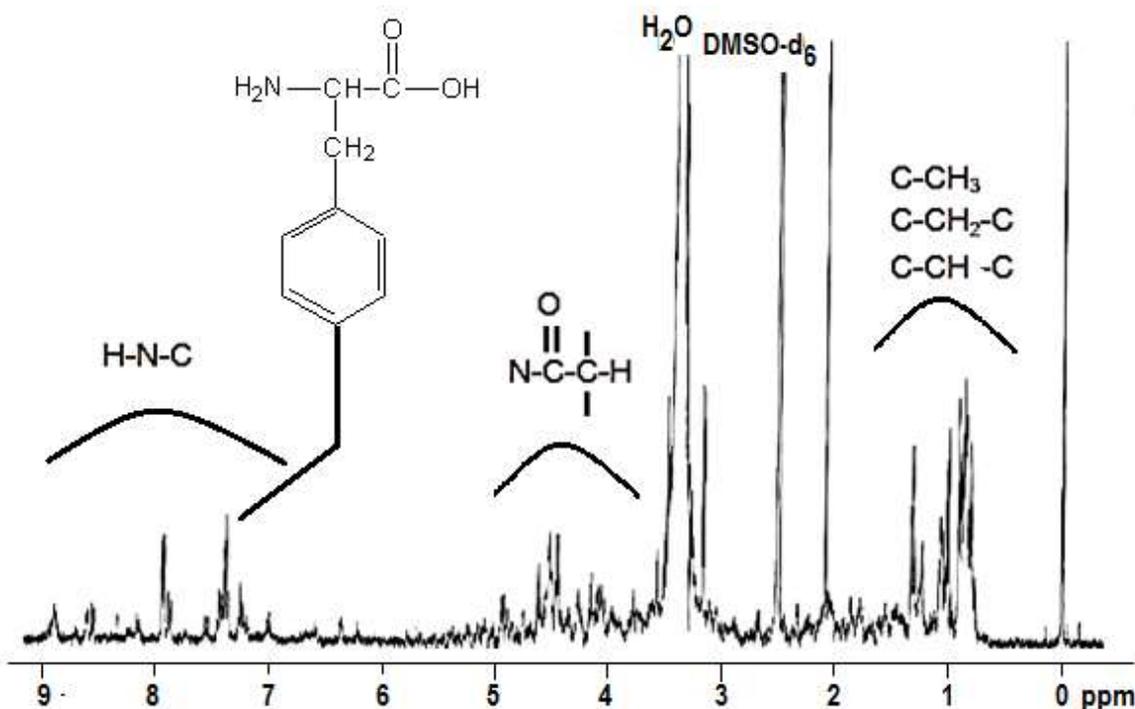
A estos compuestos aislados se les realizó un análisis de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , en donde se obtuvieron los espectros correspondientes con los que se identificó cada fragmento de cada uno de ellos.

#### 6.10.1 Purificación de ciclopéptidos aislados de la partición de acetato de etilo

Los ciclopéptidos aislados fueron purificados por cromatografía en capa delgada en placa preparativa de Silica gel 60 F<sub>254</sub>, usando como fase móvil diclorometano, metanol (9:1), y revelando con cámara de UV. Al finalizar se separaron los ciclopéptidos obtenidos y se retiró la silica gel de la muestra por medio de filtración a vacío obteniendo así los compuestos.

### 6.11 Identificación de ciclopéptidos por Resonancia Magnética Nuclear RMN

Los ciclopéptidos fueron identificados por medio Resonancia Magnética Nuclear en donde se obtuvieron como resultado espectros de  $^1\text{H}$  a 300 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub> a cada una de las fracciones obtenidas (F1 a F5) de la columna cromatográfica de la partición de acetato de etilo. En donde se encontró un conjunto de señales dobles que corresponden a los protones de los grupos N-H entre 6 y 9 ppm, por su acoplamiento con los hidrógenos  $\alpha$ - al grupo carbonilo del residuo de aminoácido, dichos protones residuos de aminoácidos (N-CO-CH) a la vez se pueden observar entre 3.8 y 5 ppm, así como los protones a baja frecuencia entre 0.7 y 1.5 ppm que corresponden a la cadena lateral R, de la parte alifática de los aminoácidos, indicando la presencia de grupos metilo (CH<sub>3</sub>), metileno (CH<sub>2</sub>) y metinos (CH). Algunas veces es posible como es este caso, la presencia de grupos fenilo como señales intensas en 7.3 ppm correspondientes a fenilalanina, tirosina y triptófano, como se muestra en el Espectro 2 de este último aminoácido (Bhacca et al, 1962)



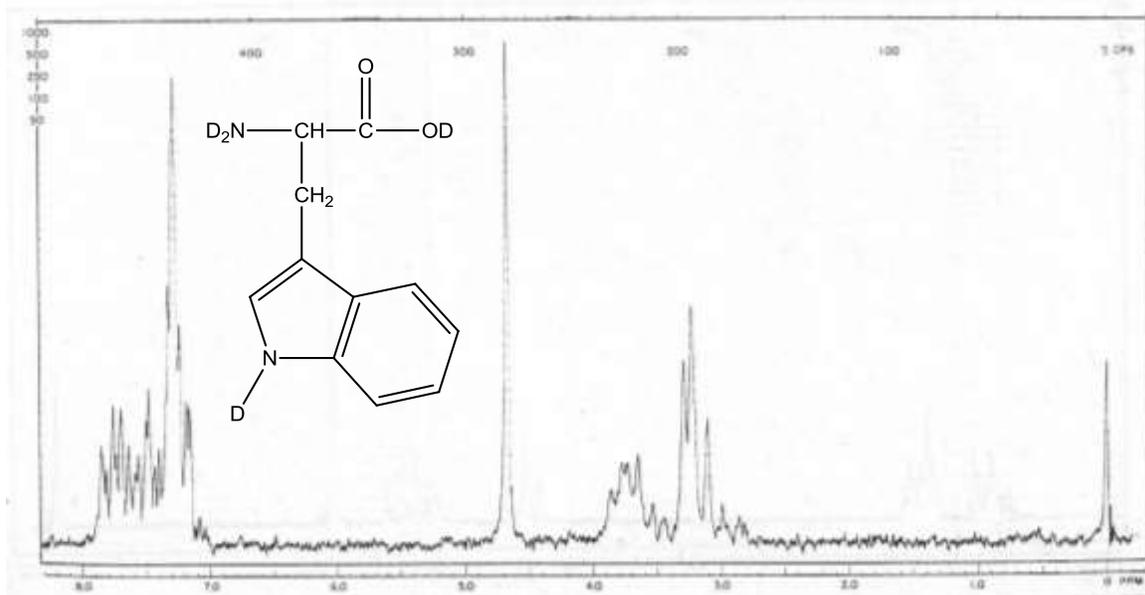
**Espectro 2.** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ , DMSO- $d_6$ , 300 MHz) de la separación de ciclopéptidos por cromatografía de columna de la partición de acetato de etilo.

Para efectos de comparación, se ha insertado un espectro publicado (Espectro 3) de un ciclopéptido aislado de la esponja marina *Phakellia fusca* (Hong-Jun et al, 2010), donde se puede corroborar la información proporcionada en el espectro 1 de la fracción F2 procedente de las semillas de *A. muricata*.

Las señales observadas en el espectro de RMN fueron comparadas con los espectros obtenidos en las investigaciones reportadas por (Li-Wu et al. 2012), en donde se muestran señales características de ciclopéptidos presentes en la semilla de *Annona muricata* las cuales están presentes en esta mezcla del compuesto, por lo cual corroboramos la presencia de ciclopéptidos en la partición de acetato de etilo. Para lograr la separación de la mezcla de los ciclopéptidos de las fracciones analizadas, se necesita de una purificación más selectiva y fina por

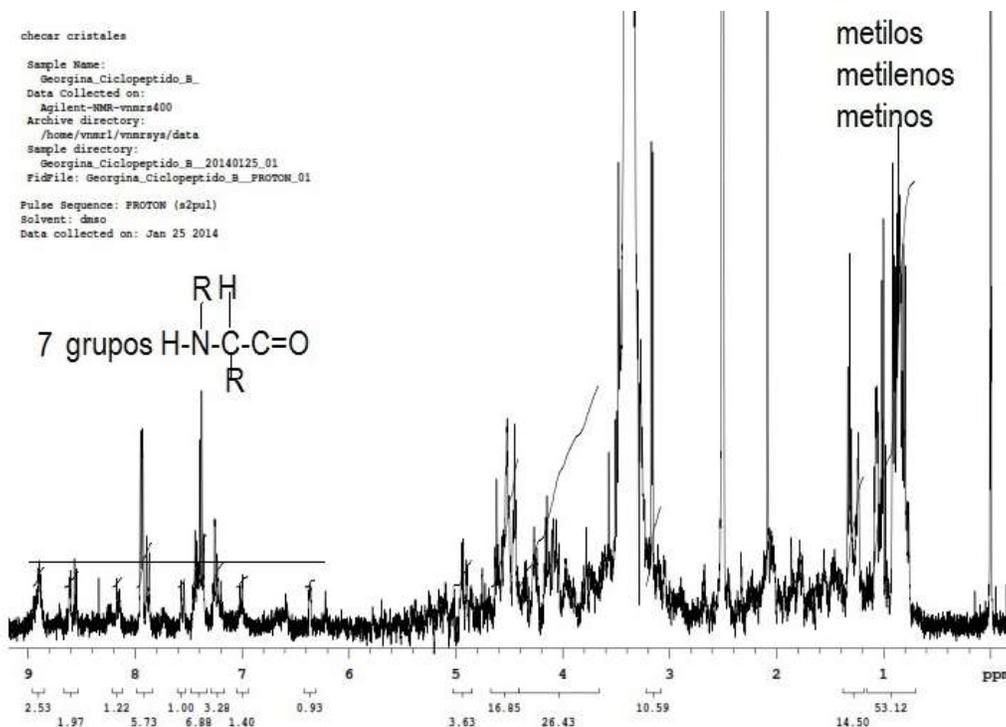


cromatografía de líquidos de alto desarrollo (HPLC, por sus siglas en inglés)



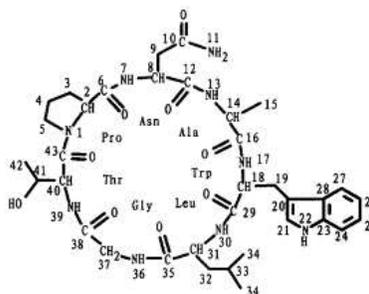
**Espectro 3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del triptófano mostrando señales para protones aromáticos entre 7 y 8 ppm (Bhacca *et al*, 1962)

La integración de las señales diagnósticas en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 2) de grupos  $\text{H-N-CH-C=O}$  del ciclopeptido en la mezcla que es rica en estas biomoléculas, indica al menos 7 señales dobles entre 7 y 9 ppm, que sugieren al menos un cicloheptapéptido que está presente en mezcla, observándose además una serie de señales para protones aromáticos que permiten suponer la presencia de los aminoácidos triptófano y fenilalanina. Así mismo, al integrar la zona entre 0.5 y 1.5 ppm del mismo espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se contabilizaron 67 hidrógenos distribuidos entre grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ), metileno ( $\text{CH}_2$ ) y metino ( $\text{CH}$ ) que pertenecen a las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman al cicloheptapéptido.

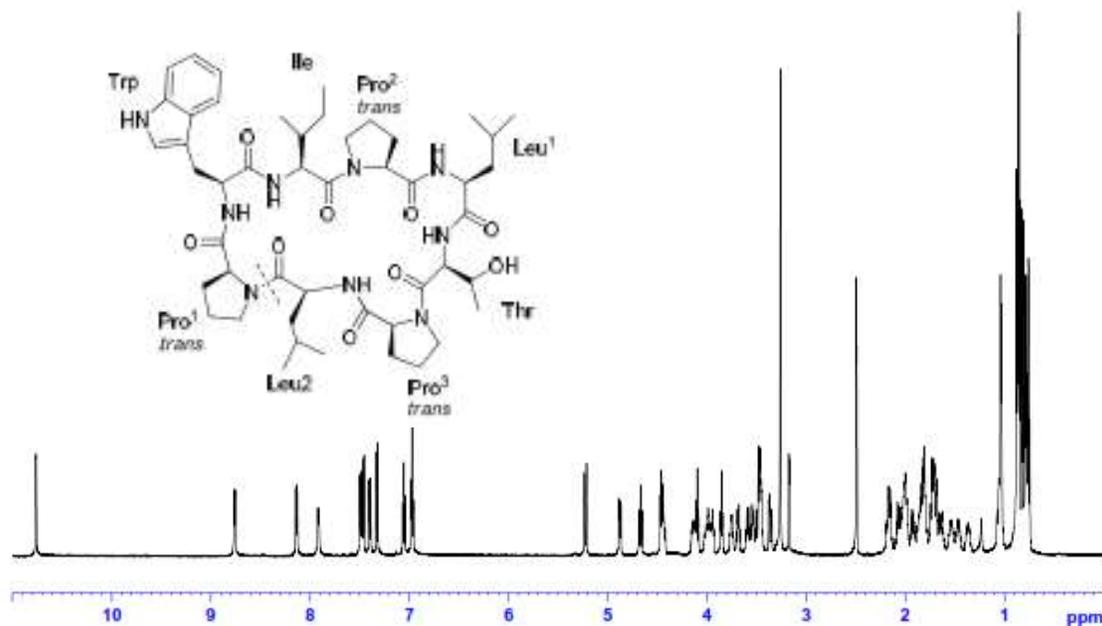


**Espectro 4.** Espectro integrado de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN  $^1H$ , DMSO- $d_6$ , 300 MHz) de la separación de ciclopeptidos por cromatografía de columna de la partición de acetato de etilo.

Esta información permite deducir que en esta mezcla se encuentran al menos tres cicloheptapéptidos del tipo de la anomuricataina (Figura 26) de la que se contabilizan 22 Hidrógenos y al suponerse tres ciclopeptidos resultaran 66 hidrogenos.



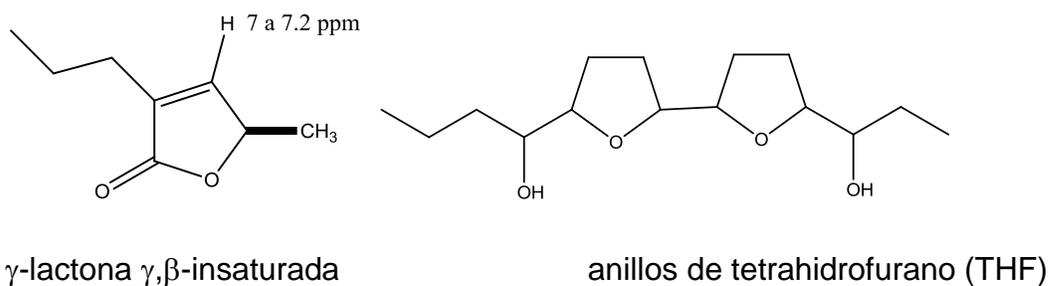
**Figura 30.** Estructura de la Annomuricataina aislada de semillas de *Annona muricata* colectadas en China (Li Chao Ming, 2006)



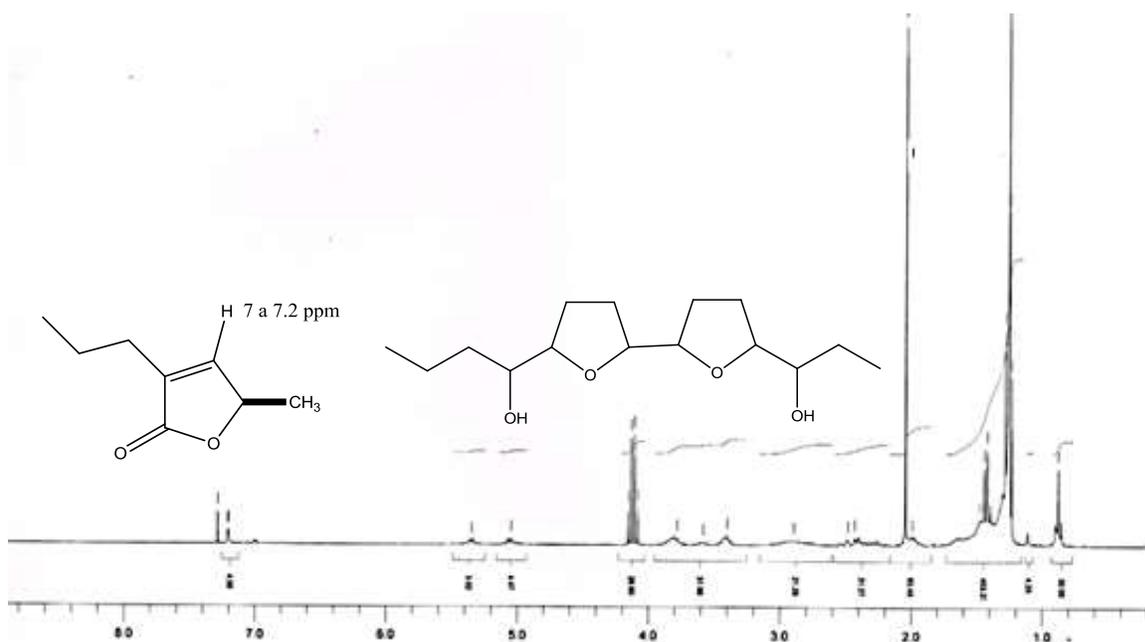
**Espectro 5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) del ciclopéptido phakellistatina aislada de una esponja marina.

#### 6.11.1 Detección de otros metabolitos del extracto de partición de Acetato de etilo de las semillas de *A. muricata*

En la fracción F1 obtenida de la cromatografía de columna de la partición de acetato de etilo, fue sometida a un análisis de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$  esperando encontrar otro ciclopéptido, el perfil de señales del espectro (Espectro 5) indica que se trata de una mezcla de acetogeninas, ya que se observan señales características entre 7.1 y 7.3 ppm de una  $\gamma$ -lactona  $\gamma,\beta$ -insaturada, una señal triple e intensa en 0.8 ppm asignable a un grupo metilo terminal de la cadena de la acetogenina ya sea de 35 o 37 átomos de carbono, otro conjunto de señales entre 3 y 4 ppm corresponden a los protones base de oxígeno de una serie de anillos de tetrahydrofurano (THF) de la mayoría de las acetogeninas aisladas de anonáceas como se muestra en la Figura 31.



**Figura 31.** Fragmentos característicos deducidos del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz que ayudan a proponer la estructura de las acetogeninas.



**Espectro 6.** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) obtenida de la cromatografía de columna de la partición de acetato de etilo.



## 6.12 Determinación de actividad anticancerígena de ciclopéptidos aislados de la partición de acetato

Las ciclopéptidos aislados reportados en las referencias (Gianfranco La Manna, 2003) presentan distintos tipos actividad biológica como son: antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral y la más importante anticancerígena por lo que representan una oportunidad para encontrar un tratamiento menos agresivo para combatir el cáncer.

Para determinar su actividad anticancerígena se realizó el estudio de líneas celulares en el Instituto de Química, UNAM. Tomando las cuatro líneas celulares cancerosas humanas de los principales tipos de cáncer que afectan a la población, las cuales fueron PC-3= próstata, HCT15= colón, MCF-7=mama; SKLU-pulmón, en el A-5 Resultados de líneas celulares de acetogeninas y ciclopeptidos *Annona muricata* se muestran los resultados obtenidos de este estudio



**Informe de Resultados**  
**Laboratorio de Pruebas Biológicas**  
**LSA del Instituto de Química, UNAM**

Página 1 de

Nombre o razón social del usuario Dr. Benito Reyes Trejo  
 Dirección del usuario Universidad de Chapingo  
 Método empleado para el ensayo MTT  
 Nombre de las muestras STE:4227-4228  
 Fecha de recepción 23 ENERO 2014

**Ensayo:** Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

**Concentración :** 1, 10  $\mu\text{M}$ , **solubilizado en dmsó.**

PC-3= próstata; HCT15= colón, MCF-7=mama; SKLU-pulmón

MTT:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ) sol stock 5mg/ml

Archivo STE-4227-4228

Muestra	Código	CONC $\mu\text{M}$	% Viabilidad Celular			
			PC-3	HCT15	MCF-7	SKLU
Acetogeninas	STE4227	1	69.5 $\pm$ 6.7	72.7 $\pm$ 10.0	53.6 $\pm$ 10	76.1 $\pm$ 4.6
		10	36.4 $\pm$ 11.0	44.2 $\pm$ 18.0	45.7 $\pm$ 7.4	54.3 $\pm$ 6.6
Ciclopeptidos	STE4228	1	80.6 $\pm$ 6.0	78.9 $\pm$ 7.2	51.7 $\pm$ 11.0	87.8 $\pm$ 4.5
		10	47.6 $\pm$ 9.1	46.7 $\pm$ 14.0	47.58 $\pm$ 6.9	67.6 $\pm$ 3.0

**Figura 32.** Resultados de líneas celulares de acetogeninas y ciclopéptidos

En estos resultados se muestran la actividad anticancerígena que demostraron las acetogeninas y los ciclopéptidos aislados de la partición de acetato de etilo, en las diferentes líneas celulares (PC-3= próstata, HCT15= colón, MCF-7=mama; SKLU-pulmón), la concentración que se usó en ambas muestras fue del 1 $\mu\text{m}$  y 10 $\mu\text{m}$  ya que presentaron alta actividad anticancerígena en el experimento.



Las acetogeninas presentaron alta actividad anticancerígena a 1  $\mu\text{m}$  en las líneas celulares HCT15-colón y en SKLU-pulmón y a 10  $\mu\text{m}$  en SKLU-pulmón y en MCF-7=mama sin dejar de mencionar que la actividad en las otras dos líneas celulares analizadas también presentan una buena actividad anticancerígena.

La actividad anticancerígena que presenta las acetogeninas aisladas de la partición de acetato de etilo es alta, ya que entre mayor sea la concentración de acetogeninas mayor será su actividad, estos compuestos actúan seleccionando solo sobre las células cancerosas y sin dañar las células sanas en el organismo.

Mientras que los ciclopéptidos aislados presentaron un alta actividad anticancerígena a 1  $\mu\text{m}$  en las líneas celulares SKLU-pulmón, PC-3= próstata y HCT15= colón y 10  $\mu\text{m}$  en las líneas celulares SKLU-pulmón, PC-3= próstata y MCF-7=mama, en este caso los ciclopéptidos fueron aún más activos durante el experimento teniendo no sólo en dos líneas celulares actividad alta si no en tres, en la línea celular faltante también tuvo una excelente actividad anticancerígena, se observó que a menor cantidad del ciclopéptido se obtiene mayor actividad, lo que nos dice que son más activos que las acetogeninas, por lo cual pueden llegar a ser aún más específicos con el cáncer que se quiera combatir, principalmente en cáncer de pulmón y próstata.

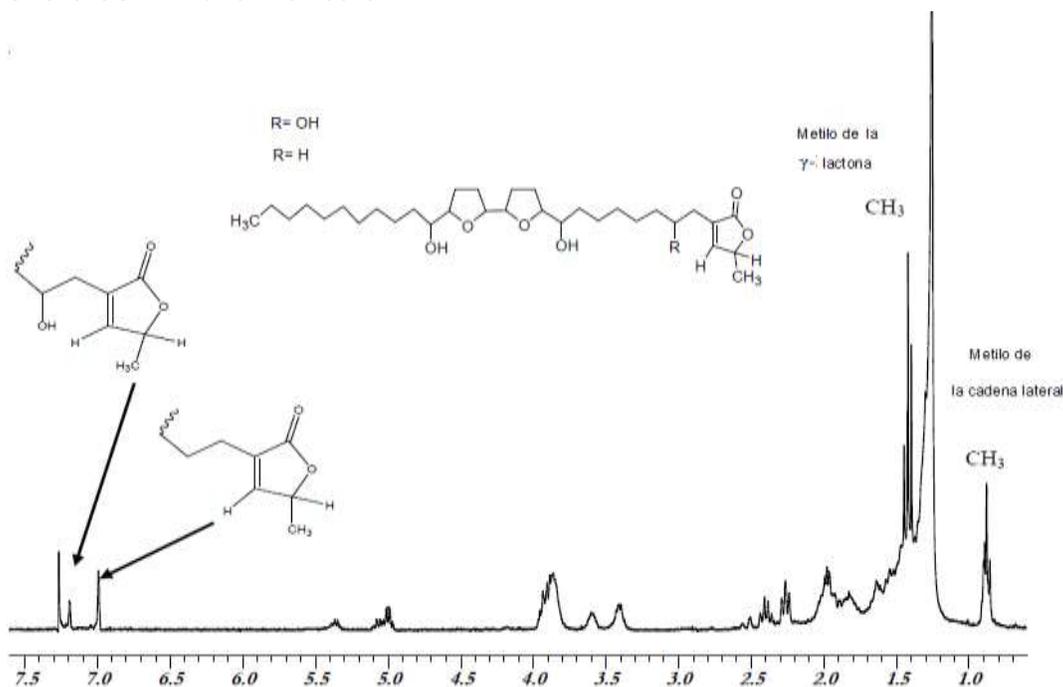


## 6.13 Detección de acetogeninas

### 6.13.1 Identificación de acetogeninas en la partición de diclorometano

Se realizó el reconocimiento de la presencia de acetogeninas en la partición de diclorometano, para el análisis de Resonancia Magnética Nuclear  $H^1$  y  $C^{13}$

Por medio de este se obtuvo el Espectro 1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN  $^1H$   $CDCl_3$ , 300 MHz) del extracto de partición de diclorometano de las acetogeninas de la Almendra de la semilla de *Annona muricata* compararon los espectros obtenidos con los reportados (Ragasa Consolacion *et al.* 2012) previas con lo que se pudo observar las señales características de dos tipos principales de acetogeninas en la particion de diclorometano, por lo cual corroboramos la existencia de acetogeninas en la particion de diclorometano proveniente del extracto metanólico del bagazo de la almendra de *Annona muricata*.



**Espectro 7.** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN  $H^1$ : $CDCl_3$ , 300 MHz) del extracto de partición de diclorometano.





## 7. CONCLUSIONES

La extracción del aceite de la semilla de *Annona muricata* se considera económicamente viable, por la cantidad de aceite que es extraído del bagazo de la almendra que es el 32 % tomando en cuenta que estamos partiendo de un residuo el cual no es aprovechado. Este es un subproducto del desengrasado en el proceso de extracción de compuestos bioactivos en el bagazo.

El método más eficiente de extracción de aceite fue el método de maceración, con el que se obtuvo una mayor cantidad de aceite de las almendras, utilizando hexano como disolvente que presenta un menor costo y menor toxicidad que otros disolventes.

Las pruebas de calidad caracterizaron y evaluaron el aceite obtenido por ambos métodos de extracción, para comprobar que estuviera en los intervalos establecidos. Al aceite de la almendra de *Annona muricata* no es necesario realizarle un tratamiento previo para bajar el nivel de acidez lo que lo hace viable para otro tipo de reacciones como lo es la transterificación (Juárez Rico, 2012)

De las particiones realizadas del extracto metanólico obtenido del bagazo, se extrajo un compuesto con un alto contenido de ciclopéptidos, el cual se encontró en la partición de acetato de etilo, al igual que en la partición de *n*-butanol.

En la partición de acetato de etilo también fue detectada la presencia de acetogeninas las cuales se obtuvieron en el proceso de aislamiento de los ciclopéptidos, al igual que fueron encontradas en la partición de diclorometano.



El bagazo de la almendra de *Annona muricata* es viable para la extracción de compuestos bioactivos, como los ciclopéptidos y las acetogeninas. De los cuales se demostró su importante actividad biológica contra células cancerosas, en específico presentan una alta actividad contra cáncer de pulmón, próstata y colon.

Los ciclopéptidos son compuestos que pueden ser utilizados en ámbito de la industria de alimentos y farmacéutica para el desarrollo de nuevos productos, que representen una mejora continua en la vida del ser humano.



## 8. BIBLIOGRAFIA

Abdu-Aguye, I. Sannusi, A., Alafiya-Tayo, R. A., Bhusnurmath, S. R. Acute Toxicity Studies with *Jatropha curcas*. Hum. Toxicol. **1986**, 5, 269-274 34.

Auvin, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Lezenven, F. ; Pousset, J.-L.; Bodo, B. Curcacycline B, a cyclic nonapeptide from *Jatropha curcas* enhancing rotamase activity of cyclophilin. Tetrahedron Lett. **1997**, 38- 2845.

Auvin-Guette, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Pousset, J.-L.; Bodo, B. Cyclogossine B, a Cyclic Octapeptide from *Jatropha gossypifolia*. Journal of Natural Products **1997**, 60, 1155-1157 .

Arens, P. Introducción al reciclaje de Materia Orgánica. Boletín de suelos de la FAO. 51- 250. Antero, José M. (1974) Botánica introducción al mundo de las plantas, **1983**, 203 -209.

Arroyo J, Rojas J, Raez E, Ronceros G, Bonilla P, Li E. Influencia de compuestos fenólicos y triterpenoides de *Annona muricata* más *Krameria lappacea* sobre el proceso inflamatorio crónico. Estudio preclínico y clínico. An Fac Med. **2004**, Vol. 3.

Bannon CD, Craske JD, Hai NT, Harper NL, O'Rourke K. (). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride-methanol. *J. Chrom. A*. **1982**, 247, 63-69.

Becker, K., Makkar, H.P.S. Toxic effects of phorbol esters in carp (*Cyprinus carpio* L.) Vet. Hum. Toxicol. **1998**, 40, 82-86.

Bories C, Loiseau P, Cortes D, Myint SH, Hocquemiller R, Gayral P, Cavé A, Laurens A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds *Planta Medica*. **1991**, 57, 434-436.

Cardellina JH, Fuller RW, Gamble WR, Westergaard C, Boswell J, Munro, M, et al. Evolving strategies for the selection, de replication and prioritization of antitumor



and HIV-inhibitory natural products extracts. In: Bohlin L, Bruhn JG (Eds.). Bioassay methods in natural product research and development. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, **1999**, 25-36.

Chang FR, Liaw CC, Lin CY, Chou CJ, Chiu HF, Wu YC. New adjacent Bis-tetrahydrofuran *Annonaceous* acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med*, **2003**, 46-241.

Cordell G, Beecher C, Pezzuto J. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *J Ethnopharmacol*, **1991**, 33-117.

Chen, Chung-Yi, Fang-Rong, Chiu Hui-Fen, Wu Ming-Jung, Wu Yang-Chang Aromin-A, an *Annonaceous* Acetogenin from *Annona cherimola* *Phytochemistry* . **1999**, 429 - 433.

Claveron, R. Perspectivas de la investigación para la producción orgánica. I Forum Nacional de Agricultura Orgánica, **1996**, 1-14.

Cruz, O. Marrero, P. Herrera, M. García, L. Selección de textos sobre Ecología. **2005**.

Damico DCS, Freire MGM, Gomes VM, Toyama MH, Marangoni S, Novello JC, Macedo MLR. Isolation and Characterization of a Lectin from *Annona muricata* Seeds. *Journal of Protein Chemistry* (1996). **2003**, 22, 655-661.

Dai Hwan Kim, Eun Sook Ma, Kui Duk Suk, Jong Keun Son, Jong Soon Lee, Mi Hee Woo, *Annomalin* and *Annocherimolin* , New Cytotoxic *Annonaceous* Acetogenins from *Annona cherimolia* Seeds, *J. Nat. Prod.* **2001**. 64. 502-506.

Digel W, Lübbert M. DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: Preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol*, **2005**. 1-11.

Dos Santos AF, Sant'Ana AEG. Molluscicidal properties of some species of



*Annona*. Phytomed. **2001**, 82: 115–20.FAO:

Organización de la Naciones Unidas de la Agricultura y la Alimentación. Mantengamos viva la tierra: Causas y Remedios de la Erosión del Suelo. Boletín **1983-a**, 50.77p.

Gandhi, V.M., Cherian, K.M.; Mulky, M. J. Toxicological studies on ratanjyot oil. Food. Chem. Toxicol. **1995**, 33, 39-42.

Granhof, J.. Seed extraction , 2,Extraction of pine sedes by mens of sun dryng on elevated trays followed by tumbling ,DFSC, Humiebaek, Denmark Technical Note. **1984**, No.17 209-226.

Gleye C, Laurens A, Hocquemiller R, Faucheur N, Serani L, Laprévotte O. Mass spectrometry and structure elucidation of 15-palmitoyl- and 15-oleylsolamin, the first known fatty acid esters of acetogenins from *Annona muricata* L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 1051-1056.

Havrilesky LJ, Elbendary A, Hurteau JA, Whitaker RS, Rodriguez GC, Berchuck A. Chemotherapy induced apoptosis in epithelial ovarian cancers. Obst Gynecol. **1995**.

Hiroshi M, Yumiko S, Kit-Lam C, Chee-Yan C, Hideji I, Koichi T, Jun'ichi K. Samoquasine A, a Benzoquinazoline Alkaloid from the Seeds of *Annona squamosa* J. Nat. Prod. **2000**. 63, 1707-1708.

Horwitzs, W. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. AOAC. Washington, DC. EEUU. **1980**.

Hopp DC, Zeng L, Gu ZM, Kozlowski JF, McLaughlin JL. Novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line. **1997**



Hopp DC, Zeng L, Gu Z, McLaughlin JL. Squamotacin: an *Annonaceous* acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line PC-3. *J Nat Prod*, **1997**, 97-99.

Huschtscha LI, Bartier WA, Ross CE, Tattersall MH. Characteristics in cancer death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *Brit J Cancer*, **1996**, 54-60.

Jong Keun Son, Dal Hwan Kim, Hee Woo, Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66. 1369-1372.

Jun, Z.; Ninghua, T. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants *Chinese Science Bulletin*. **2000**, 45, 1825-1831.

Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol*, **1998**, 29-43.

Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer*. **1989**.

Kim DH, Ma ES, Suk KD, Son JK, Lee JS, Woo MH. Annomolin and Annocherimolin, new cytotoxic *Annonaceous* acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 502-506.

Kim GS, Zeng L, Alali L, Wu F, Sastrodihardjo S, McLaughlin J. Muricoreacin and murihexocin C. monotetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, **1998**, 71-565.

Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, Yamamoto T, Yan SC. Studies on antitumor activities and antitumor principles of Chinese herbs I. [Antitumor activities of Chinese herbs]. *Yakugaku Zasshi*. **1985**.



Kikuchi Y, Sasa H, Kita T, Hirata J, Tode T, Nagata I. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by ginsenoside Rh2 and adjuvant effects to cisplatin in vivo, *Anticancer Drugs*. **1991**.

Liberalino, A. A. Bambilra, E. A., Moraes-Santos, T., Vieira, E.C. *Jatropha curcas* L. seeds: chemical analysis and toxicity.. *Arq. Biol. Technol*. **1988** 31, 539-550.

Mampane, K.J., Joubert, P.H., Hay. I.t. *Jatropha curcas*: Use as a traditional. **1987**.

Monks A, Scudiero DA, Johnson GS, Pauli KD, Sausville EA. The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. *Anticancer Drug Des*. **1997**.

M. Pourbafrani, G. Forgacs, I. S. Horvath, C. Niklassonand M. Taherzadeh, *Bioresour. Technol*, **2010**, 101, 4246.

Rivas, L.A.C y E.Arends. Biomasa y contenido de nutrientes del *Brosimum alicastrum* y *pouteria anibaifolia* en la reserva forestar de Caparo, Estado de Barinas. *Revista Forestal Venezolana*. **1990**, 14 (34): 29.44.

Rivero, Carmen y J. Paulini. Efecto de la incorporación de residuos orgánicos sobre la evolución del CO<sub>2</sub>, de los suelos venezolanos. *Rev. de la Facultad de Agronomía*. **1995**, 21(1-2): 3749.

Rodríguez F. Pedro. *Edafología y Agrobiología*. Diplomado en soporte digital, UO, Santiago de Cuba. **2005**.

Rodríguez F. Pedro. *Evaluación del impacto ambiental en la producción agrícola*. Diplomado en soporte digital, UO, Santiago de cuba. **2006**.

Rost ET, Al. *Botánica, Introducción a la Biología Vegetal*, **1988**,133-135.



Tan, N-H.; Zhou, J. Plant Cyclopeptides. *Chemical Reviews*, **2006**, 106, 840-895.

Tan M, Sulaiman S, Najimuddin N, Samian M, Muhammad T. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *J Ethnopharmacol*, **2005**, 94-287.

Tswana medicine and its role as a cause of acute poisoning. *Phytother, Res. I*, 50-51. Maas.P.J.M; Mennega. E.A & Westra. L.Y.TH. Studies in *Annonaceae*. XXI. Index to species and intraespecific taxa of neotropical *Annonaceae* *Candollea* **1994**, 49: 389-481.

Tormo J, Gonzalez M, Cortes D, Estornell E. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using *Annonaceus* acetogenins. *Arch Biochem Biophys*, **1999**, 26-119.

Stavric B. Role of chemo preventers in human diet. *Clin Biochem*. **1994**.

Seward. B. R. T. The production, handling and testing of forest tree seed in Zimbabwe. a review of methods and results, *Zimbabwe Bull, For. Res.* **1980**, No. 8 Commission, Salisbury.

Onimawo IA. Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed pulp and oil of sour sop (*Annona Muricata* L.). *Plant Foods for Human Nutrition* **2002**, 57, 165-171.

Padma P, Pramod NP, Thyagarajan SP, Khosa RL. Effect of the extract of *Annona muricata* and 1FUVOJBOZDUBHJOJ¼PSB on herpes simplex virus. *J Ethnopharmacol*. **1998**, 61, 3-81.

Peters M, Badrie N, Comissiong E. Processing and quality evaluation of sour sop (*Annona Muricata*L) *Journal of Food Quality Nectar*, **2001**, 24, 361-374.

Son JK, Kim DH, Woo MH. Two new epimeric pairs of acetogenins bearing a carbonyl group from *Annona cherimolia* seeds *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1369- 1372.



We'le' A, Landon C, Labbe' H, Vovelle F, Zhang Y, Bodo B. A. *Sequence and solution structure of cherimola cyclopeptides A and B, novel cyclooctapeptides from the seeds of Annona cherimola. Tetrahedron* **2004**, 60, 405-414.

We'le' A, Zhang Z, Ndoye I, Brouard JP, Pouset JL, Bodo B. A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *J. Nat. Products* **2004**, 67, 1577-1579.

We'le' A, Ndoye I, Zhang Y, Brouard JP, Bodo B. Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry* **2005**, 66, 693-696.

Wu L, Lu Y, Zheng QT, Tan NH, Li CM, Zhou J. Study on the spatial structure of *Annomuricatin A*, a cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Journal of Molecular Structure* **2007**, 827, 145-148.

Van der Weid, J.M. Agroecología y agricultura Sustentable. Agroecología y desarrollo. **1994**, 7-10.

Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente A.; Pedroche, J.; Yust, M.M.: Milan, F. Péptidos Bioactivos en proteínas de reserva. Grasas y aceites. **2000**, 51, 361-65.

V. L. Budarin, J. H. Clark, B. A. Lanigan, P. Shuttleworth and D. J. Macquarrie, *Bioresour. Technol.*, **2010**, 101, 3776.

Zamora, N. *Annonaceae*. En *Manual de Plantas de Costa Rica*. Missouri Botanical Garden- Instituto Nacional de Biodiversidad- Museo Nacional de Costa Rica. (en prep.). **1999**