

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE LA HOJA ANNONA MURICATA EMPLEANDO COMO SOLVENTES ETANOL Y METANOL

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por la Br. Palacios B., Verónica
Para optar al Título
de Ingeniera Química

Caracas, 2015

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE LA HOJA ANNONA MURICATA EMPLEANDO COMO SOLVENTES ETANOL Y METANOL

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Francisco Yáñez

COTUTOR ACADÉMICO: Prof. Jaime Hernández

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por la Br. Palacios B., Verónica
Para optar al Título
de Ingeniera Química

Caracas, 2015

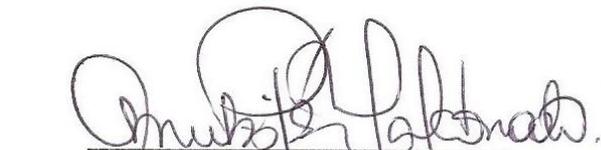
Caracas, Noviembre 2015.

Los abajo firmantes, miembros del Jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por la bachiller Palacios B. Verónica, titulado:

**ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS DE LA HOJA ANNONA MURICATA
EMPLEANDO COMO SOLVENTES ETANOL Y METANOL**

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudio conducente al título de Ingeniero Químico, y sin que esto signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran **APROBADO**


Prof(a). Clarimar Camacho
Jurado


Prof(a). Anubis Pérez
Jurado


Prof. Francisco Yáñez
Tutor Académico


Prof. Jaime Hernández
Cotutor Académico

DEDICATORIA

A mis padres, medios por el cual Dios, fuente de luz, fuerza y sabiduría se comunica conmigo.

A la casa que vence la sombra, por darme su techo, experiencias inolvidables, amigos y profesores que ahora son parte de mi historia.

A Aquiles Tobías, Carlos Palacios y Laura Febres por ser estrellas en el cielo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Diana Barrález y José Palacios, por su apoyo, amor, paciencia, consejos y múltiples observaciones.

A mi hermano Gerardo Palacios por su constante compañía, apoyo y comidas.

A mis tutores Francisco Yáñez y Jaime Hernández por sus enseñanzas.

A mis hermanas de vida por su compañía de larga y corta distancia. Siempre atentas a escuchar y felicitar. Especialmente a Daniela García por despertar en las mañana para trepar en el árbol de guanábana y recolectar las hojas.

A mi tía Ligia Montañez por su limpieza ortográfica y redacción. Ser una cobija en tiempo fríos.

A mi prima Alicia Sanabria por su apoyo para la información, su gran disposición y entender estos momentos de la vida.

A Luis A. Quevedo por compañía, paciencia, cariño, sonrisas, abrazos y demás.

A mi prima Aracely Henrique, por sus correcciones y sugerencias.

A la familia Rojas González, por brindarme su casa como mi hogar y ser mi familia en la capital.

A Ciro Yadarola, por ser una luz cuando las cosas se pusieron grises.

A Luis Hernández y Gerardo González, por el team de tesis, apoyo y chistes en todo momento.

A Manuel Martínez, por su incondicional presencia, apoyo y su siempre lado positivo para seguir adelante.

A Yashira Torrealba, amiga perdida, por su ojo clínico lleno de luz, apoyo a toda hora, paciencia, información y sabiduría.

Al profesor Miguel Ríos y la profesora María Rodríguez por su presencia y apoyo en toda la realización de las pruebas.

A la profesora Omarira Camacaro por su amistad, compañía, cuidado y apoyo en el transcurso de la carrera.

A la Sra. Iraida Rojas por su apoyo dentro de la escuela, por su magia que transforma lágrimas en sonrisas y hacerme sentir que todo saldría bien.

A Liz Cubillan y al IVIC por el servicio de infrarrojo.

A Juan Donis, Carlos Rivero, Yhonny Torres y Prof. Rosales, por escuchar mis discusiones, compañía en los almuerzos, soportar mis lágrimas y reír conmigo.

A la profesora Johliny Casanova por su detallismo, cariño y apoyo.

A Sarabasti Cabral y amigos de esta etapa, por ser parte de mi formación como persona y momentos inolvidables que estarán en mi memoria.

A la Sra. Yednnia Vegas por sus saludos en la mañana y las limpiezas del laboratorio.

Sin Uds. todo hubiese sido más difícil.

Gracias.

Palacios B. Verónica

**ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS DE LA HOJA ANNONA MURICATA
EMPLEANDO COMO SOLVENTES ETANOL Y METANOL**

Tutor académico: Francisco Yáñez. Cotutor académico: Jaime Hernández.

Tesis. Caracas, U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.

2015. 92 pp.

Palabras claves: Acetogeninas, Annona Muricata, Extracción, Soxhlet,
Hidrodestilación.

Resumen. El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de dos métodos para la extracción de la hoja de la Annona Muricata (guanábana). Se compararon los métodos Soxhlet e Hidrodestilación. Se evaluó la relación soluto-solvente 1:30; 1:35; 1:40; se compararon los solventes etanol y metanol empleando el método Soxhlet y el tiempo de contacto de 6 y 12 horas empleando el método Hidrodestilación, para determinar los parámetros óptimos de extracción. Se compararon ambos métodos en condiciones óptimas por su porcentaje de rendimiento. A los extractos óptimos se les realizó un análisis de espectroscopía de infrarrojo (IR). Se encontró como condición óptima una relación soluto solvente 1:40 por el método Soxhlet. No se observaron diferencias significativas entre ambos solventes en el porcentaje de rendimiento de extracción, sin embargo, el etanol es el más recomendado para fines farmacéuticos. El mejor tiempo de contacto fue 6 horas, el mejor método de extracción el Soxhlet para la obtención del mejor rendimiento de extracción, y se encontraron por el análisis IR, longitudes de onda características de grupos funcionales de Acetogeninas mas no es suficiente para asegurar la presencia de las mismas.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2 ANTECEDENTES.....	5
1.3 OBJETIVOS	13
1.3.1 Objetivo General	13
1.3.2 Objetivos Específicos	13
CAPÍTULO II.....	14
MARCO TEÓRICO	14
2.1 FAMILIA ANONÁCEAS.....	14
2.2 ANNONA MURICATA.....	15
2.2.1 Clasificación Botánica de la Annona Muricata	15
2.2.2 Fenología.....	16
2.2.3 Composición química de la hoja de Annona Muricata.....	16
2.2.4 Annona Muricata en Venezuela	19
2.3 ACETOGENINAS	19
2.3.1 Importancia de las Acetogeninas	20
2.3.2 Clasificación de Acetogeninas según su estructura	21
2.4 PROCESOS DE EXTRACCIÓN.....	23

2.4.1 Definición del proceso de extracción	23
2.4.2 El extracto vegetal	25
2.5 DESCRIPCIÓN DE LOS SOLVENTES USADOS EN LOS PROCESOS DE EXTRACCIONES	25
2.5.1 El solvente etanol	25
2.5.2 El solvente Metanol	26
2.6 EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET	27
2.6.1 Definición.....	27
2.6.2 Etapas de la extracción Soxhlet.....	28
2.6.3 Ventajas y desventajas del método Soxhlet	28
2.7 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO HIDRODESTILACIÓN	29
2.7.1 Definición.....	29
2.7.2 Etapas de la extracción Hidrodestilación	29
2.7.3 Ventajas y desventajas de Hidrodestilación (HD).....	29
2.8 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS POR MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	30
2.8.1 Análisis por espectroscopía de infrarrojo	30
2.8.2 Descripción del espectro infrarrojo (IR).....	30
2.8.3 Aplicaciones del análisis por Infrarrojo.....	31
2.8.4 Ventajas y desventajas de análisis por espectroscopía de infrarrojo	31
CAPÍTULO III	33
METODOLOGÍA.....	33
3.1 PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	33
3.2 EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA.....	34
3.2.1 Extracción Convencional por el método Soxhlet	34
3.2.2 Extracción convencional por el método Hidrodestilación	39
3.2.3 Comparación de los dos métodos de extracción Soxhlet e Hidrodestilación	41
3.2.4 Estudio del error en las muestras.....	42
3.2.5 Prueba de significancia t	42
3.2.6 Análisis por la técnica de infrarrojo (IR) de los extractos óptimos obtenidos mediante los dos métodos Soxhlet e Hidrodestilación.....	43

CAPÍTULO IV.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
4.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA DE DOS ARBUSTOS PROVENIENTES DE LOCALIDADES DIFERENTES ...	44
4.2 EVALUACIÓN DE LAS RELACIONES SOLUTO-SOLVENTE CON EL MÉTODO SOXHLET EN BASE AL RENDIMIENTO OBTENIDO EN LA EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA	47
4.3 EVALUACIÓN DE SOLVENTES A TRAVÉS DEL MÉTODO SOXHLET EN BASE AL RENDIMIENTO OBTENIDO EN LA EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA	50
4.4 EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO EN BASE AL RENDIMIENTO OBTENIDO POR EL MÉTODO HIDRODESTILACIÓN UTILIZANDO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS OBTENIDAS POR EL MÉTODO SOXHLET PARA LA EXTRACCIÓN DE LA HOJA DE ANNONA MURICATA.....	53
4.5 COMPARACIÓN DEL MÉTODO SOXHLET E HIDRODESTILACIÓN EN BASE AL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA	56
4.6 ANÁLISIS POR TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR) DE LOS EXTRACTOS ÓPTIMOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DOS MÉTODOS SOXHLET E HIDRODESTILACIÓN	60
APORTE DE LA INVESTIGACIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	68
RECOMENDACIONES.....	69
REFERENCIAS.....	70
APÉNDICE.....	74
ANEXOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Planta y fruto de la Annona Muricata	16
Figura N° 2 Estructura general de las Acetogeninas.....	21
Figura N° 3 Estructura general de Epoxiacetogeninas.....	22
Figura N° 4 Estructura general de Acetogeninas mono-THF.....	22
Figura N° 5 Estructura general de Acetogeninas bis-THF	22
Figura N° 6 Estructura general de Acetogeninas Tri-THF	23
Figura N° 7 Estructura general de Acetogeninas Tetrahidropiránicas (THP).....	23
Figura N° 8 Esquema de la metodología para el cumplimiento de los objetivos planteados.....	33
Figura N° 9 Esquema del Extractor Soxhlet	35
Figura N° 10 Esquema del extractor Hidrodestilación	40
Figura N° 11 Muestra de hoja de A. Muricata húmeda con corte de 0,5 cm de diámetro.....	56
Figura N° 12 Muestra de la hoja de Annona Muricata con solventes de la extracción	57
Figura N° 13 Muestra de la hoja Annona Muricata luego del secado	57
Figura N° 14 Extracto de hoja de Annona Muricata usando como solvente etanol ...	57
Figura N° 15 Extracto de hoja de Annona Muricata usando como solvente etanol luego del secado	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Composición química de la hoja de <i>Annona Muricata</i> (Barahona 2013).	17
Tabla N° 2 Propiedades físico-químicas de etanol	26
Tabla N° 3 Propiedades físico-químicas del metanol	27
Tabla N° 4 Ventajas y desventaja del equipo Soxhlet	28
Tabla N° 5 Ventajas y desventajas del equipo Hidrodestilación	29
Tabla N° 6 Ventajas y desventajas del IR.....	32
Tabla N° 7 Extracción con Muestra 1 por el método Soxhlet	44
Tabla N° 8 Extracciones con Muestra 2 de Cumbres de Curumo por el método Soxhlet.....	45
Tabla N° 9 Extracciones con relación soluto-solvente 1:30 por el método Soxhlet...	47
Tabla N° 10 Extracciones con relación soluto-solvente 1:35 por el método Soxhlet.	48
Tabla N° 11 Extracciones con relación soluto-solvente 1:40 por el método Soxhlet.	49
Tabla N° 12 Extracciones con etanol por el método Soxhlet	51
Tabla N° 13 Extracciones con metanol por el método Soxhlet	51
Tabla N° 14 Extracción por 6 horas por el método Hidrodestilación.....	54
Tabla N° 15 Extracciones por 12 horas por el método Hidrodestilación.....	54
Tabla N° 16 Extracciones óptimas con el método Soxhlet.....	58
Tabla N° 17 Extracciones óptimas con el método Hidrodestilación	59
Tabla N° 18 Comparación de 4 ACG aisladas con los números de onda de los extractos obtenidos.....	64
Tabla N° 19 Referencias de IR de las estructuras de las ACG	65

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1 Comparación de la muestra 1 y 2	46
Gráfico N° 2 Comparación de relación soluto-solvente	49
Gráfico N° 3 Comparación de los solventes	52
Gráfico N° 4 Comparación del tiempo de extracción	55
Gráfico N° 5 Comparación de los métodos de extracción	59
Gráfico N° 6 Espectro infrarrojo obtenido del extracto de la hoja de Annona Muricata por el método Soxhlet usando como solvente etanol	61
Gráfico N° 7 Espectro infrarrojo obtenido del extracto de la hoja de Annona Muricata por el método Soxhlet usando como solvente metanol	62
Gráfico N° 8 Espectro infrarrojo obtenido del extracto de la hoja de Annona Muricata por el método Hidrodestilación usando como solvente etanol.....	63

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1 Equipo Hidrodestilación	¡Error! Marcador no definido.
Anexo N° 2 Equipo Soxhlet.....	¡Error! Marcador no definido.
Anexo N° 3 Equipo de infrarrojo	¡Error! Marcador no definido.

INTRODUCCIÓN

Desde hace 60.000 años, en las cuevas de Shanidar (Irak), datan las huellas más antiguas del uso de las plantas con fines medicinales. Si bien en sus orígenes fueron considerados efectos mágicos-religiosos, progresivamente y en base al método científico con experimentaciones controladas y optimizadas, los compuestos orgánicos provenientes de las plantas han sido procesados y convertidos, a otra escala, en productos al servicio de la calidad de vida de las poblaciones. La química y la ingeniería química realizan investigaciones sobre extracciones que posteriormente son usadas para diversos fines. Es dentro de este propósito que ha surgido el presente Trabajo Especial de Grado.

Esta investigación se titula “Estudio preliminar para la extracción de compuestos de la hoja *Annona Muricata* empleando como solventes etanol y metanol”. Es un trabajo experimental, para evaluar condiciones óptimas de extracción, tales como, relación soluto-solvente y solvente óptimo mediante el método Soxhlet, evaluación del tiempo de retención mediante el método de Hidrodestilación, evaluación de ambos métodos y análisis espectroscópico de las muestras óptimas obtenidas, con el fin de proponer un método de extracción eficiente de principios activos de la hoja de *Annona Muricata*.

Está organizado en cuatro capítulos. El primero se refiere a los fundamentos de la investigación e incluye el planteamiento del problema en términos de la importancia de las Acetogeninas (principio activo que interesa en el presente trabajo) provenientes de la *Annona Muricata* como componentes anticancerígenas y biopesticidas y los métodos para su extracción; resumen también siete investigaciones que antecedieron a este trabajo: unas relativas a la extracción de Acetogeninas provenientes de distintas partes de la planta de guanábana, otra estudia las condiciones óptimas y características de la hoja de *Annona Muricata* y dos más están referidas a metodologías de extracción. Finalmente el capítulo incluye los objetivos generales y específicos que estructuran esta investigación.

El segundo capítulo lo conforma el marco teórico. Se inicia con la descripción de los elementos que caracterizan a la familia Anonácea y a la *Annona Muricata* en particular y a la clasificación y estructura de las Acetogeninas. Prosigue con la definición de los métodos de extracción, su aplicación a extractos vegetales, y la descripción de los solventes orgánicos etanol y metanol. Se enfoca la atención en dos métodos de extracción, Soxhlet e Hidrodestilación, su caracterización, ventajas y desventajas. Cierra este capítulo con las nociones teóricas relativas a los análisis de las muestras por espectroscopía de infrarrojo.

El tercer capítulo trata de la metodología utilizada para la preparación de la materia prima. Para la extracción de la hoja de *Annona Muricata* se evaluaron los dos métodos ya mencionados: se establecieron parámetros óptimos como relación soluto-solvente, mejor solvente de extracción y tiempos de extracción. Cierra el capítulo con el análisis por espectroscopía de Infrarrojo de las muestras obtenidas.

El cuarto y último capítulo contiene los resultados obtenidos en la experimentación realizada y describe paso por paso los parámetros que se establecieron como óptimos. Se hace uso de organizadores gráficos como (cuadros, figuras y otros) que van mostrando los resultados, comparándolos e integrando los elementos de análisis teóricos con los datos obtenidos. Hacia el final del capítulo se desarrolla el análisis de los resultados, se cierra con las conclusiones y recomendaciones que se desprenden de la investigación.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Se detallan a continuación los fundamentos de la presente investigación.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas, objeto tradicional de estudio de la botánica, también han sido materia prima para extracciones en la ingeniería química, y las plantas frutales, en particular, han despertado el interés de los investigadores por sus diferentes y versátiles propiedades. Se puede citar por ejemplo el uso de la cáscara de la naranja y de la parchita para extracción de pectinas (Arias, D y López, A. 2013; Álvarez, A. y Burgos, F. 2012). También la planta de la guanábana ha sido objeto de métodos de extracción, para la obtención de compuestos activos recientemente descritos, denominados Acetogeninas. (Schile, M., González, A. y Luna, L. 2009) provenientes de la familia *anonácea*, particularmente del género *anona*.

La primera publicación que describe las Acetogeninas (ACG) data del año 1982; a partir de dicha publicación, su extracción ha captado el interés de investigadores, tanto en países latinoamericanos como, asiáticos y norteamericanos, por sus versátiles cualidades (Xiang, H. y otros 2008). La familia de las Acetogeninas tiene uso en campos muy diversos: en el área agrícola como biopesticida, en el área de la salud su uso puede ser antiparasitario, nutricional, citotóxico, antitumoral, inmunosupresor, entre otros (Gleye, C. 2008; García, K. 2009). Por su valor biomédico destacan aquellas Acetogeninas empleadas en terapias para el cáncer de colon. García, K. (2009) concluye que según la dosis de las ACG de la *Annona Muricata* (conocida en Venezuela como guanábana) suministrada a células cultivadas *in vitro* de un modelo murino de cáncer de colon, hay una reducción hasta de un 80% en el índice de lesiones preneoplásticas. También Yang, H. y otros (2008) reportaron el uso de las ACG para la elaboración de compuestos anticancerígenos. Dado que el cáncer es la

segunda causa de muerte en el mundo y se estima un aumento del 49% de incidencia y mortalidad para el año 2020 (Solidoro, A. 2006), estas investigaciones son de gran valor para la medicina. En el campo de la agricultura, Flórez, Y. y Martínez, E. (2010) han estudiado las ACG para la producción de biopesticidas, en función de una agricultura con criterios ecológicos y prevención de consumo de productos tóxicos de pesticidas químicos tradicionales. Por este uso, creciente y diverso, la extracción de ACG como materia prima es un reto para la ingeniería química.

Otras investigaciones han reportado que las ACG se encuentran en la semilla, sugiriendo estudios para lograr su extracción también en el tallo, la pulpa, la flor y la hoja de la familia anona, en particular de la guanábana, que se cultiva en tierras de zonas tropicales como las venezolanas, donde puede desarrollarse a gran escala (Flores, Y. y Martínez, E. 2010). El uso de la hoja para la extracción de Acetogeninas tiene la ventaja comparativa con la fruta y el resto de la planta, que es posible acceder a ellas en el transcurso de todo el año, sin limitaciones de estaciones, de allí su atractivo para la extracción.

La ingeniería química, por su parte, ha tenido desde sus inicios como disciplina, a los métodos de extracción como procedimientos básicos para obtener sustancias de usos diversos, ya sean materias primas para otras industrias o productos de consumo directo; estos últimos pueden contribuir a elevar la calidad de vida de las poblaciones, dado que permiten la producción de alimentos, vestidos, medicamentos, biopesticidas, entre otros. Con esta finalidad han sido diseñados diversos métodos de extracción, según las sustancias a separar: líquido-líquido, gas-líquido, y sólido-líquido. Para estas extracciones se requiere un disolvente que permita la solubilidad del componente deseado, separado de su residuo. El valor de uso de cada método es su capacidad de extracción y el grado en que él favorezca un alto rendimiento, económico y reproducible.

Este trabajo se propuso realizar un estudio comparativo de dos métodos de extracción convencionales, Soxhlet e Hidrodestilación, para extraer compuestos de la hoja de la

anona Muricata, a fin de determinar cuál de ellos es el más efectivo según su rendimiento y aportar elementos que favorezcan la toma de decisiones en la extracción de ACG como materia prima.

1.2 ANTECEDENTES

A continuación se describen las investigaciones que constituyen antecedentes significativos para el presente trabajo.

1. Yang y otros (2008) llevaron a cabo un estudio de extracción con dióxido de carbono (CO₂) supercrítico bajo condiciones óptimas y se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la identificación de Acetogeninas provenientes de semillas de plantas de Annona. La separación se llevó a cabo con semillas secas, durante una hora, a temperatura ambiente; luego se molieron, se pesaron y se procedió a realizar una extracción con fluido supercrítico usando dióxido de carbono (CO₂), mediante el equipo extracción de fluido supercríticos (SFE) a una presión de 30 MPa, T=35 °C, tiempo de extracción de 1h y 95 % modificador de etanol. Después de evaporar el etanol hasta sequedad mediante un evaporador rotatorio, el residuo fue disuelto en metanol en un matraz de 25 mL y luego se filtró empleando un filtro miliporo de 0,45 µm. Finalmente se llevó a cabo la caracterización de las Acetogeninas de los extractos usando el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando una longitud de onda de 220nm.

El proceso de extracción con CO₂ súper crítico generó un rendimiento de 95,81 %. El contenido total de Acetogeninas varió entre 1,67mg/g a 2,29 mg/g; con el método cromatográfico se determinaron 8 tipos de Acetogeninas con purezas del 98%. Las Acetogeninas son de cadenas largas (C₃₅ a C₃₇), tienen baja polaridad y sus estructuras moleculares pueden cambiar cuando se encuentran a una temperatura mayor a 60 °C. Las soluciones de trabajo se almacenaron a 4 °C y todos los estudios se llevaron a cabo por triplicado.

2. Bajin ba Ndob y otros (2009) con el fin de extraer y caracterizar Acetogeninas de las semillas de una planta de A. Squamosa (Chirimoya), publicaron un estudio que

realizó una separación por Soxhlet con 2 Kg de semillas secas y pulverizadas, utilizando como solvente 10 L de ciclohexano durante 48 horas para luego evaporar, dando resultado como masa final 390 g de un extracto de aceite color marrón. Para la caracterización de la muestra se utilizó la técnica de Infrarrojo (IR) empleando como equipo un Buker Vector 22 y se realizó un estudio por análisis HPLC. Como parte de la investigación se logró la extracción de 20 tipos de Acetogeninas, sin embargo cuatro de ellas se encontraron presentes en altas concentraciones y fueron por ello el centro de estudio: Dieposabadelin, Squamocenin, Lepirenin y Dostestenin. Se logró determinar la fórmula molecular de las 4 Acetogeninas: $C_{35}H_{62}O_4$, $C_{35}H_{60}O_4$, $C_{35}H_{62}O_5$ y $C_{35}H_{62}O_5$, respectivamente. Los espectros de IR mostraron una banda de absorción de correspondiente al grupo carbonilo (C=O) igual a 1737 cm^{-1} para Dieposabadelin; para Squamocein: 1752 cm^{-1} ; para Lepirenin: 1755 cm^{-1} ; y para Dostistenin: 1756 cm^{-1} . Estos valores fueron de gran utilidad como valores de referencia para el análisis de los resultados de infrarrojo (IR) del presente estudio.

3. García K. (2009), investigó el aislamiento y caracterización estructural de Acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona Cherimolia* y *Annona Muricata*. El objetivo general de esta investigación fue el aislamiento y caracterización a partir de la semilla de *A. Cherimolia* Mill y *A. Muricata* y la evaluación de la toxicidad de una ACG tetrahidroxilada obtenida de la semilla de *Annona Muricata* en un estudio subcrónico *in vivo*; definió como objetivos específicos: obtener las ACG a partir de los extractos de semillas disueltos en CH_2Cl_2 ; validar un método cromatográfico para la purificación de ACG; caracterizar las ACG aisladas mediante métodos espectroscópicos; obtener DL_{50} de la ACG; cuantificar el efecto genotóxico producido por las ACG mediante la determinación de eritrocitos normocrómicos micronucleados; evaluar el efecto quimioterapéutico de la ACG de un modelo murino de lesiones preneoplásticas de cáncer de colon; determinar el efecto citotóxico de la ACG mediante la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos en sangre periférica de ratón y finalmente, evaluar la prueba Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) para apoptosis en sangre.

Para la realización de este estudio se usaron semillas, pulverizadas y maceradas en etanol por 7 días; luego se filtraron para separar restos vegetales. El extracto crudo se obtuvo después de evaporar el disolvente en un rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 65 °C. El extracto crudo etanólico se sometió a un proceso de partición empleando hexano-agua; posteriormente la fracción acuosa se extrajo de nuevo con una mezcla de cloruro de metileno-agua en relación 1:1. La fracción de CH₂Cl₂ se secó con sulfato de sodio anhidro para eliminar las trazas de agua, se filtró y se evaporó en el rotavapor a una temperatura de 30 °C, obteniéndose los extractos respectivos en forma de una miel color café claro. Para la caracterización de las ACG se llevó a cabo una separación cromatográfica preliminar por cromatografía de capa fina (CCF) empleando sílica gel de malla 200-300 correspondiente a un tamaño de partícula entre 45 y 75 µm como soporte y diluyendo con un gradiente de hexano-acetato-etanol, con una posición inicial 80:10:10 y un aumento gradual de polaridad hasta finalizar con etanol al 100%. Para la obtención de las muestras con mayor pureza se realizó una segunda separación cromatográfica empleando como solventes el cloruro de metileno-etanol-hexano en un gradiente de proporción 2:1:7 hasta llegar a una proporción de 50:50 CH₂Cl₂:EtOH. Se utilizó una columna de 3 cm de diámetro y 22 cm de altura empacada con sílica gel malla 200-300. Las muestras se validaron por la técnica de HPLC para separación de ACG eluyendo con MeOH:H₂O en una proporción 85:15 con un flujo de 1 mL/min y leyendo a 220 nm. El volumen inyectado fue de 20 µm y cada muestra se analizó por triplicado. Interesa señalar que el rendimiento para la extracción de la semilla con cloruro de metileno fue de 83,67 % para los extractos etanólicos. La dosis letal medida para ACG de *Annona Muricata* fue de 2,7 mg/Kg. La administración del compuesto durante la evaluación de este parámetro produjo disminución del peso corporal de 20 % en los ratones luego de 24 horas de la administración. Los espectros de IR mostraron una banda de absorción intensa a 1755 cm⁻¹ característico de un grupo C=O conjugado, sugiriendo la presencia de una Y-lactosa-α,β-insaturada. Se logró aislar 1 ACG tetrahroxilada de la *A. Muricata*, y conocer su estructura con fórmula molecular mínima C₃₅H₆₄O₇. La ACG evaluada presentó un efecto quimioterapéutico inhibiendo hasta un 50 % el

desarrollo de lesiones preneoplásticas inducidas en un modelo murino de cáncer de colon.

Estos resultados permiten conocer el rendimiento del método de extracción para su caracterización; los solventes seleccionados para la separación, la concentración letal en estudios *in vitro*, datos de los resultados de IR, el número de veces que se realizaron las pruebas y características de las estructuras de las ACG encontradas.

4. Flórez y Martínez (2010), estudiaron la obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona Muricata* de la región cafetera. Establecieron como objetivo general obtener y evaluar extractos bioactivos de las semillas de *Annona Muricata* L. (Anonácea) con el fin de proponer un uso potencial para su aprovechamiento. Sus objetivos específicos fueron los siguientes: seleccionar e implementar un proceso de extracción de los compuestos activos (Acetogeninas) de las semillas de *Annona Muricata* con base a resultados obtenidos por otros autores; evaluar la actividad citotóxica con larvas de *Artemia salina* como ensayo preliminar y el mosquito *Culex quinquefasciatus* como prueba específica de la actividad de las fracciones obtenidas de semillas de la *A. Muricata*, y analizar las Acetogeninas presentes en las fracciones mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con arreglo de diodos. Este trabajo siguió como procedimiento la separación por Lixiviación de semillas de *Annona Muricata*, desengrasadas y no desengrasadas. Para las desengrasadas se usó hexano por 72 h empleando la técnica de separación de Soxhlet en una relación muestra-solvente 1:4. Los dos sistemas se sometieron a lixiviación con etanol absoluto como solvente extractor durante 6 días, con agitación magnética constante, empleando una relación de 1:4 (50 g de polvo de semillas y 200 mL de solvente); se llevó a cabo la caracterización de la muestra de manera preliminar por cromatografía de capa fina (CCF) con solvente cloroformo-metanol en relación 9:1 y realizó un análisis de los extractos por HPLC con los extractos de mayor actividad.

Vale resaltar que el proceso de extracción se llevó a cabo por triplicado; la extracción de ACG por lixiviación arrojó como resultado un promedio de 18,42 % de extracto etanólico para las semillas sin desengrasar y de 4,62 % para las semillas desengrasadas. Con la Cromatografía de capa fina se observaron Acetogeninas con anillos γ -lactónico α,β -insaturados. En este análisis no fue posible identificar las Acetogeninas por radio frecuencia (Rf) pues la aparición de manchas continuas muestra la alta complejidad de estos extractos y la posible presencia de Acetogeninas isoméricas de diversas polaridades. Con la cromatografía líquida (HPLC) se encontraron entre los extractos etanólicos desengrasados 3 posibles compuestos de Acetogeninas con un rango de longitud de onda de $207 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$. En este trabajo se obtuvo concentraciones letales para las Larvas *Culex quinquefasciatus* en las fracciones etanólicas desengrasadas entre 0,01275 y 0,0545 $\mu\text{g/mL}$; los compuestos obtenidos se fueron degradando con el tiempo a partir de la sexta y octava semana por un proceso de oxidación; las muestras fueron conservadas en condiciones normales a temperatura ambiente, y no se realizó ningún procedimiento especial para evitar su degradación.

5. Obtención de pectina de la cáscara de la parchita amarilla (*Passiflora Edulis* F. *Flavicarpa*) fue de la investigación realizada por Álvarez y Burgos (2012). El objetivo general fue obtener pectina a partir de la cáscara de la parchita amarilla (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) con el fin de maximizar rendimientos y disminuir tiempos de extracción; los objetivos específicos fueron: determinar el mejor tiempo de operación en la extracción tipo Soxhlet, basándose en el rendimiento del extracto; determinar el tiempo de exposición límite en la extracción asistida por microondas (EAM), operando a máxima potencia y basándose en el rendimiento del extracto; determinar el tiempo factible de operación en la extracción asistida por microondas (EAM) variando intervalos de tiempo y basándose en el rendimiento del extracto; determinar la potencia de operación adecuada en la extracción asistida por microondas (EAM), variando potencia y manteniendo constante el tiempo obtenido en el objetivo anterior, basándose en el rendimiento del extracto; determinar el rendimiento del extracto

empleando la técnica de extracción por hidrólisis ácida; determinar el rendimiento del extracto empleando la técnica de Hidrodestilación; comparar los diferentes métodos de extracción, con el fin de determinar la técnica que permitiría obtener un mayor rendimiento del extracto y, finalmente, realizar el análisis de los extractos obtenidos mediante el método de espectroscopía de infrarrojo.

Este estudio realizó una separación por el método Soxhlet con una potencia de la manta de calentamiento en 40 %, con el empleo de perlas de ebullición en el balón, con tiempos de extracción de 3, 6, 12 y 24 horas; luego se secó el residuo en la estufa por 24 horas para determinar la masa de la muestra final y obtener el rendimiento de la extracción. Las extracciones se llevaron a cabo por triplicado. Para la separación por Hidrodestilación también se trabajó con la manta de calentamiento en 40 %, con 24 horas de extracción, se secó el residuo por 24 horas en la estufa y las muestras de los extractos se almacenaron en recipientes color ámbar, sellados. Para el estudio de espectroscopía de infrarrojo se analizaron las muestras por duplicado. La metodología empleada por el método Soxhlet e Hidrodestilación permitió puntualizar la potencia de la manta de calentamiento, los tiempos de extracción y el tiempo de secado; para cada método se realizó el estudio por triplicado.

6. Comparación de los métodos de extracción de la pectina contenida en el albedo de la naranja (Citrus Síntesis 1.) y estudio de su comportamiento como inhibidor de hidratos, realizado por Arias y López (2013). Plantearon como objetivo general evaluar los métodos de extracción de la pectina contenida en el albedo de la naranja y las condiciones que influyen en el proceso. Los objetivos específicos de esta investigación fueron 6: determinar las mejores condiciones de extracción de la pectina contenida en el albedo de la naranja en cuanto a humedad y tamaño promedio de la materia vegetal, empleando el método de extracción convencional tipo Soxhlet, mediante el rendimiento de los extractos obtenidos en cada prueba; determinar el mejor solvente a utilizar empleando el método de extracción convencional tipo Soxhlet mediante el rendimiento del extracto obtenido; determinar el tiempo de residencia y la mejor potencia de extracción a utilizar en el equipo de extracción

asistida por microondas (EAM) mediante el rendimiento del extracto obtenido; evaluar el % de rendimiento de extracto de pectina obtenido por el método de hidrólisis ácida (HA); comparar los diferentes métodos de extracción con el método de hidrólisis ácida para determinar cuál permite el mejor rendimiento y la mejor calidad del extracto obtenido y, por último, evaluar el comportamiento del extracto de pectina del albedo de naranja obtenido a través de los métodos de extracción en estudio, como sustituto de diferentes químicos convencionales usados en la industria para la inhibición de hidratos, con el propósito de disminuir el daño ambiental.

En este estudio se realizó una evaluación de la relación peso/volumen ($\%p/v$), por triplicado y se evaluó el rendimiento de la extracción de cada uno, determinando la mejor relación con el mayor porcentaje de extracción. Esta investigación se realizó mediante el método Soxhlet con una potencia en la manta de calentamiento de 30%; el análisis se llevó a cabo durante 24 horas continuas contadas a partir de la aparición de la primera gota condensada, luego el residuo se llevó a la estufa por 24 horas a 55 °C para la eliminación del solvente. Los extractos se conservaron en recipientes de color ámbar para evitar la degradación y oxidación del compuesto y fueron refrigerados inmediatamente. Se determinó el tamaño de la matriz vegetal por el método Soxhlet con el mismo procedimiento anterior, por triplicado y se hizo lo mismo para la evaluación del solvente óptimo de extracción.

Esta investigación de Arias y López (2013) contiene información de interés para el presente estudio. Vale señalar: el uso del método Soxhlet para la determinación de la mejor relación soluto/solvente, el tiempo de extracción necesario, la potencia de la manta de calentamiento, la determinación del mejor tamaño de la matriz vegetal y el mejor solvente para el mejor rendimiento de extracción.

7. El estudio más reciente, el cual se encargó de determinar el porcentaje de humedad y tamaño de partícula óptimo por el rendimiento del método Soxhlet en la hoja de la *Annona Muricata*, realizado por Bermúdez (2015) en el cual planteo determinar el porcentaje de humedad presente en la hoja de la *Annona Muricata* y determinar el

tamaño óptimo de la partícula para obtener un mayor rendimiento en la extracción. Este estudio realizó las pruebas empleando el método Soxhlet, con una duración de 24 horas para cada extracción, agua destilada como solvente y una relación soluto/solvente 1:40. Para el análisis de humedad se secó la muestra en una estufa por 24, 48 y 72 horas. En la evaluación del tamaño de las partículas se utilizó un tamaño vegetal de 1cm de cada lado de forma cuadrada y 0,5 cm de diámetro; se utilizó la forma circular para facilitar el corte. Concluye que la humedad de la hoja de *A. Muricata* es de 46 ± 3 %. El rendimiento de la muestra de 1 cm es de $63,9\pm 0,5$ % y el de 0,5 cm de diámetro $66,8\pm 0,5$ %, lo que permitió concluir que se logra un mayor rendimiento en la extracción con tamaños de muestras pequeños.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Realizar un estudio preliminar comparativo de los métodos de extracción Soxhlet e Hidrodestilación para la obtención de compuestos de la hoja de la *Annona Muricata* (guanábana).

1.3.2 Objetivos Específicos

- (a) Evaluar las relaciones soluto-solvente (p/v) 1:30; 1:35 y 1:40 con el método Soxhlet en base al rendimiento obtenido en la extracción de compuestos de la hoja de *Annona Muricata*.
- (b) Evaluar los solventes etanol y metanol con el método Soxhlet en base al rendimiento obtenido en la extracción de compuestos de la hoja de *Annona Muricata*.
- (c) Evaluar los tiempos de contacto de 6 y 12 horas en base al rendimiento obtenido por el método Hidrodestilación utilizando las condiciones óptimas (solvente y relación soluto-solvente) obtenidas por el método Soxhlet para la extracción de compuestos de la hoja de *Annona Muricata*.
- (d) Analizar por la técnica de espectroscopia de infrarrojo (IR) los extractos óptimos obtenidos mediante los dos métodos Soxhlet e Hidrodestilación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

A continuación se exponen los aspectos teóricos estudiados para el desarrollo de la presente investigación.

2.1 FAMILIA ANONÁCEAS

Las Anonáceas son una familia de árboles de zonas bajas que crecen principalmente en sotobosques, tienen distribución pantropical y se encuentran a alturas menores de 2000 m. Esta familia cuenta con 130 géneros y se estima que hay cerca de 2.300 especies en el mundo, distribuidas en zonas tropicales de América, África, Indochina y Malasia; entre ellas hay numerosos frutales, especialmente en los géneros *Annona* y *Rollinia*. La mayoría de las especies de estos géneros son originarias de Sur América. (Sánchez, M. y Aguirreolea, J. 1996).

El género *Annona* tiene una corteza externa que se desprende en tiras y una interna que es reticulada; sus hojas son simples, alternas, enteras, finas, persistentes y sin estípulas; sus flores se caracterizan por ser hermafroditas, de color café y amarillo, dispuestas en solitario o en racimos, estructuradas en 3 sépalos y 6 pétalos, generalmente el cáliz es tubular; los estambres son numerosos, aglomerados, con filamentos carnosos portando anteras largas y espirales; la fruta suele ser grande, carnosa, verde por fuera y blanca por dentro, formada por la fusión de los pistilos y los receptáculos; las semillas son grandes, de color marrón oscuro, brillantes (Ríos, D. y Corrales, D. 2003).

La familia Anonácea ha sido de interés reciente para la medicina tradicional como fuente de nuevos agentes antiparasitarios, nutricionales y anticancerígenos. Algunas especies de esta familia, presentan metabolitos con actividad biológica: polifenoles, aceites esenciales, terpenos, compuestos aromáticos, acetogeninas particularmente activas, moléculas con un amplio espectro de acción anticancerígena, antiparasitaria e

insecticida y alcaloides de tipo bisbencilisoquinolínicos, protoberberinas, oxoaporfínicos y aporfínicos, (Murillo, Y. 2001).

2.2 ANNONA MURICATA

Los investigadores disienten sobre el origen de la *Annona Muricata* aunque la mayoría coincide en afirmar que proviene de la parte septentrional de América del Sur. Se encuentra distribuida tanto en forma silvestre como cultivada en los trópicos de América y de África Occidental, extendiéndose a lo largo de las Antillas; también es cultivada en el Sureste de China, Australia, Sur de la Florida, y en América Latina desde México y hasta Brasil. Puede crecer en zonas desde 0 a 1000 metros de altura. Se comercializa en Brasil, Venezuela, Costa Rica, entre otros. Hay mucha variación en el tamaño del fruto y en el contenido de azúcares según la región donde se cultiva. (Cabra, J., Sánchez, R. y Mejía, A. 2012). Su cultivo y cosecha se ve favorecido en climas cálidos y húmedos, y suelos con buen riego. Se desarrolla con un pH ligeramente ácido de 5,5 a 6,5; se ha cultivado en plantaciones a pequeña y gran escala. (Escobar, T. 1991).

2.2.1 Clasificación Botánica de la *Annona Muricata*

EL arbusto guanábana se clasifica según su reino en Plantae, su división es del tipo Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, del orden de las Magnoliales; pertenece a la familia Anonácea, del genero *Annona* y su especie particular es la *Annona Muricata*.



Figura N° 1 Planta y fruto de la Annona Muricata

2.2.2 Fenología

Es un arbusto de 3 a 8 m de altura; sus hojas tienen forma elíptica de 6 a 12 cm de largo por 2,5 cm de ancho; su tronco es ramificado en la base. Sus ramas son cilíndricas, arrugadas, ásperas, de color café rojizo y con numerosas lenticelas.

2.2.3 Composición química de la hoja de Annona Muricata

La composición química de la hoja de la A. Muricata ha sido descrita por Barahona, V. (2013). Se caracteriza por contener principalmente alcaloides de tipo isoquinolínicos y misceláneos, lípidos y acetogeninas. En la tabla N°1 se exponen los tipos de cada componente químico y se presentan algunas de sus estructuras para reconocer los grupos funcionales que los describen. Entiéndanse por grupos funcionales aquellos que están conformados por un átomo o conjunto de átomos que experimentan las mismas reacciones químicas, independientemente del resto de la estructura molecular. (Weiniger, S. y Stermitz F. 1988). Ninguno de los componentes químicos de la hoja de A. Muricata posee grupo funcional carbonilo enlazado a un anillo (anillo lactónico metil sustituido, α , β insaturados), con excepción de las Acetogeninas. Esta característica es importante para identificar las ACG a través de

análisis con IR por los valores de longitud de onda de los grupos C=O con el ciclo aromático.

Tabla N° 1 Composición química de la hoja de Annona Muricata (Barahona 2013)

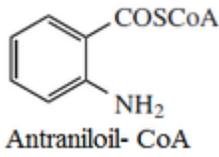
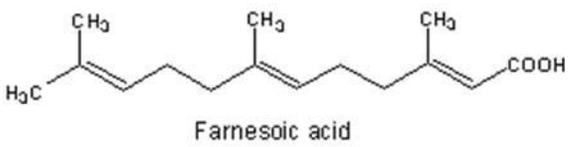
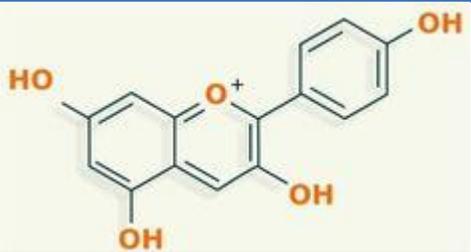
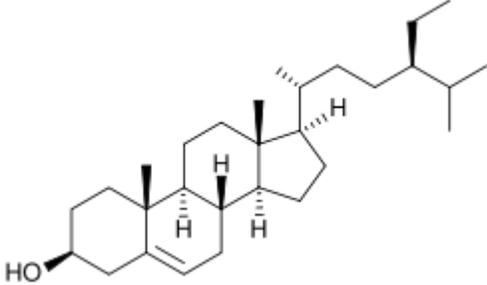
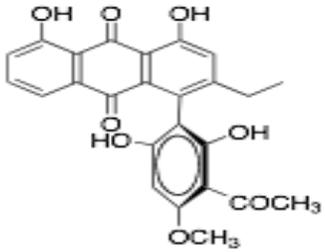
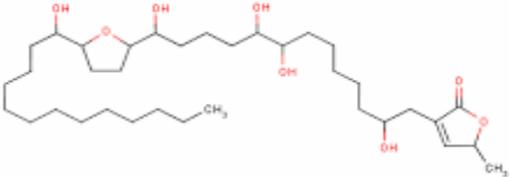
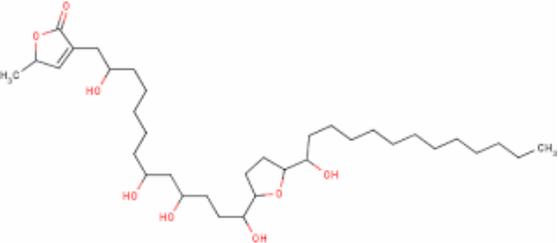
COMPONENTES QUÍMICOS	TIPO	ESTRUCTURA
Alcaloides	Annomicina	 <p>Coclaurina</p>
	Annomurina	
	Annonaína	
	Annoníina	
	Coclaurina	
	Coreximina	
	Reticulina	
	Muricina	
	Miricinina	
	Estefarina	
	Aterospermina	
	Aterosperminina	
Saponinas	-	 <p>Antraniloil- CoA</p>
Terpenoides	-	 <p>Farnesoic acid</p>
Flavonoides	-	

Tabla N° 1 (continuación) Composición química de la hoja de Annona Muricata

COMPONENTES QUÍMICOS	TIPO	ESTRUCTURA
Fitoesteroles	-	
Antraquinonas	-	 <p style="text-align: center;">Antraquinona</p>
Acetogeninas	Muricatocina C	
	Muricatocina A	

2.2.4 Annona Muricata en Venezuela

En Venezuela entre las especies comestibles de Annonas, la guanábana es la más conocida. Su cultivo presenta grandes perspectivas para el país debido a su adaptación a diferentes condiciones climáticas. Se estima que Venezuela es el país con mayor superficie sembrada de este arbusto en América del Sur (Cruz, L. y Hernández, H. 2007). Son zonas ideales para su cultivo una gran variedad de localidades: el piedemonte andino, la zona costera caribeña y las planicies aluviales del Sur de Maracaibo. Urdaneta, J. (2013), refiere que hace menos de un década sólo habían siembras dispersas de estos árboles en el país; recientemente y debido a sus variados usos se ha iniciado un cultivo a nivel nacional. Actualmente hay aproximadamente dos mil hectáreas cultivadas. Existen potencialmente cinco mil hectáreas aptas en el occidente venezolano para su cultivo, considerado en la actualidad como el de mayor perspectiva dentro de los programas de “Frutas Tropicales” cultivadas en el país.

2.3 ACETOGENINAS

De 1982 data el primer reporte de una Acetogenina aislada, la uvaricina, extraída de las raíces de *Uvaria Acuminata*, así lo refieren Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999), presenta un amplio rango de actividad biológica como, por ejemplo, antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica y antitumoral, lo cual ha dado impulso a las investigaciones bioquímicas y farmacológicas de estas moléculas (Zafra-Polo y otros 1998). Hasta la fecha han sido descritos más de 430 tipos de acetogeninas, encontradas únicamente en la familia Anonácea, (Makabe, H., Konno, H. y Miyoshi, H. 2008).

Estructuralmente las Acetogeninas poseen una cadena alifática de 35 ó 37 átomos de carbono, con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos (THF) adyacentes o no, así como sustituyentes oxigenados: hidroxilos, cetonas y epóxidos. En uno de sus extremos presentan un anillo lactónico metil sustituido, α , β insaturado o saturado,

también se han descrito compuestos con dobles enlaces en la cadena alifática; compuestos con anillos epoxi o tetrahidropirano (THP), (Bermejo y otros 2005).

Aunque su biosíntesis aún no ha sido descrita, las ACG parecen derivar de la ruta de los policétidos y se sugiere que los anillos THF, THP y epóxidos se producen mediante la epoxidación y ciclación de dobles enlaces, (Schlie, M., Gonzalez, A. y Luna, L. (2009).

2.3.1 Importancia de las Acetogeninas

La importancia de las Acetogeninas viene dada por sus propiedades anticancerígenas, biopesticidas, antiparasitarias, entre otras. Con relación a sus propiedades anticancerígenas Flórez, Y. y Martínez, E. (2010) y Zh-Ming Gu. y otros (1996), señalan que las Acetogeninas son 10.000 veces más potentes que la adriamicina medicina quimioterapéutica usada en la actualidad, con un efecto biológico positivo adicional, dado que las ACG no destruyen las células sanas ni producen efectos secundarios. García, K. (2009) confirma este planteamiento cuando reseña que las Acetogeninas de la hoja de la guanábana logran la disminución en un 80% de lesiones preneoplásticas de un cáncer de colon inducido en ratones. Quispe, A. y otros (2007) por su parte encontraron que el extracto etanólico de hojas de *Annona Muricata* mostró tener efecto citotóxico sobre las líneas tumorales C678 y H460. Y Geum-Soog, K. y otros (1998) concluyeron buena efectividad contra cáncer de páncreas y próstata.

Con relación a sus propiedades como biopesticida, Flórez, Y. y Martínez, E. (2010) afirman que los extractos etanólicos presentaron alta efectividad contra las larvas *C. quinquefasciatus*. Bobadilla, M. y otros (2005) estudiaron el uso de Acetogeninas para el control de larvas *Aedes aegypti*, lograron concentraciones letales y concluyeron que después de 48 horas de exposición se logró una eficacia de más del 90% de mortalidad de las muestras de larvas.

2.3.2 Clasificación de Acetogeninas según su estructura

Las Acetogeninas de Anonácea se clasifican según la cantidad de anillos que tengan en su estructura como: Mono-Tetrahydrofurano (THF), adyacentes bis-THF, no adyacentes bis-THF y sin anillos mono-THF; estas estructuras también poseen hidroxilos laterales los cuales pueden estar a uno u otro lado de la cadena, seguidas por las γ -lactonas o sustituidas por cetolactonas, La clasificación categoriza seis tipos de Acetogeninas: lineales, epoxiacetogeninas, monotetrahydrofuránicas (Mono-THF), bis-tetrahydrofuránicas (Bis-THF), tritetrahydrofuránicas (Tri-THF) y tetrahydropiránicas (THP). Se describen a continuación cada una de ellas. (Flórez, Y. y Martínez, E. 2010).

- **Acetogeninas Lineales**

Las acetogeninas lineales son precursores de las epoxiacetogeninas y acetogeninas THF. Se caracterizan por el grado de insaturación e hidroxilación en la cadena alquílica. Su estructura general es la siguiente:

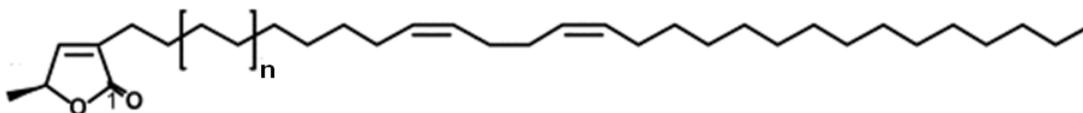


Figura N° 2 Estructura general de las Acetogeninas

- **Epoxiacetogeninas**

Las Acetogeninas por lo general poseen uno o dos anillos THF. Cuando este anillo es reemplazado por un grupo epóxido se obtienen las epoxiacetogeninas. Su estructura general es:

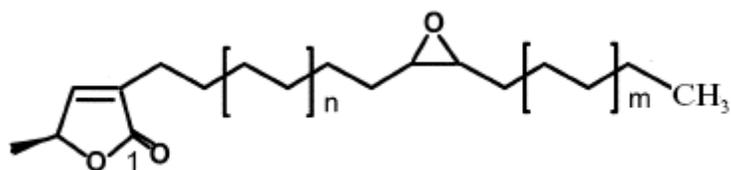


Figura N° 3 Estructura general de Epoxiacetogeninas

- **Acetogeninas mono-THF**

Son aquellas que poseen un solo anillo THF; usualmente son de 35 carbonos con diferentes grados de oxidación. Su estructura básica es:

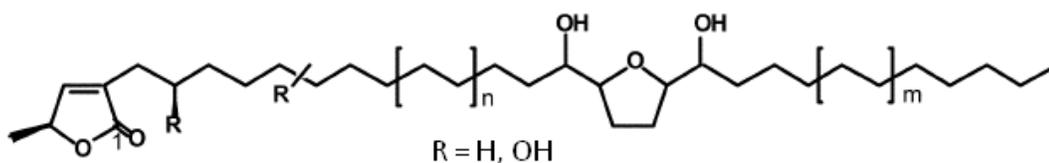


Figura N° 4 Estructura general de Acetogeninas mono-THF

- **Acetogeninas bis-THF**

Son compuestos que poseen 2 anillos THF, adyacentes o no adyacentes; de 35-37 carbonos diferenciables entre sí por el grado de oxidación, tipo, número y ubicación del sustituyente, así como de su estereoquímica. Su estructura se muestra en la figura N°5:

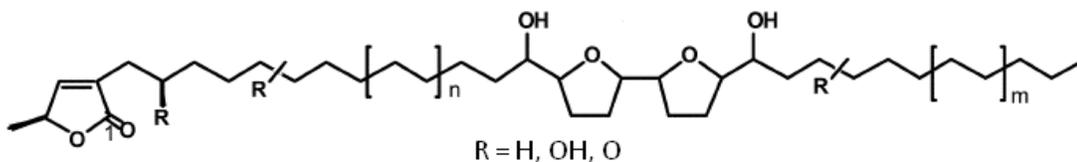


Figura N° 5 Estructura general de Acetogeninas bis-THF

- **Acetogeninas Tri-THF**

En la figura N°6 se muestran las Acetogeninas que poseen 3 anillos THF. Su estructura es:

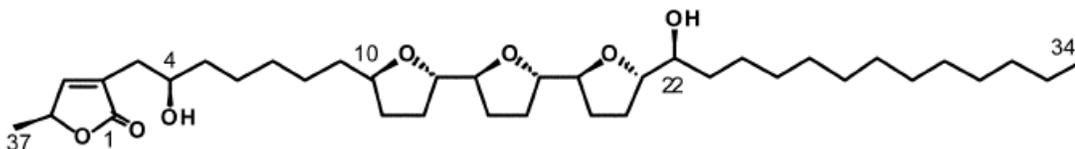


Figura N° 6 Estructura general de Acetogeninas Tri-THF

- **Acetogeninas Tetrahidropiránicas (THP)**

Son aquellas que poseen un anillo tetrahidropirano como sustituyente en la cadena alquílica. Su estructura general es:

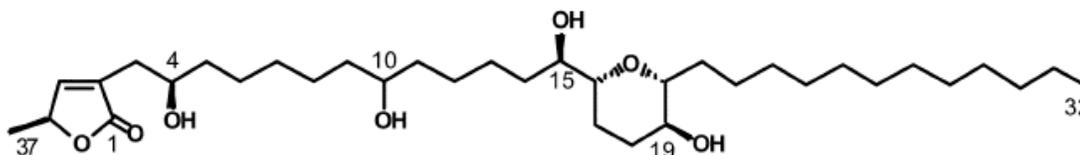


Figura N° 7 Estructura general de Acetogeninas Tetrahidropiránicas (THP)

2.4 PROCESOS DE EXTRACCIÓN

2.4.1 Definición del proceso de extracción

Núñez, C. (2008) caracteriza a la extracción como una de las operaciones básicas del laboratorio, la cual consiste en la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible. Caldas, A. (2012), por su parte, define la extracción como una técnica empleada para separar un producto o para aislarlo de sus fuentes a través de un disolvente. Destaca que es importante para la realización de extracciones, establecer los parámetros a fin de lograr la estandarización de un proceso, esto garantiza la calidad, el rendimiento, la seguridad y la eficacia del producto a lograr. Esos parámetros consisten en definir

tipos de solventes a utilizar, relaciones solutos-solventes, temperaturas, presiones, preparación y almacenamiento de las muestras y métodos de extracción, entre otros.

Se pueden realizar extracciones desde los tres estados de la materia:

- Extracción líquido – líquido: consiste en la separación de dos sustancias líquidas.
- Extracción gas – líquido: consiste en separar una fase gaseosa con un líquido.
- Extracción sólido – líquido: consiste en separar un sólido haciendo uso de un líquido.

Proceso de extracción sólido-líquido

Específicamente la separación sólido- líquido involucra la transferencia de soluto a un solvente, en donde la mezcla a ser separada es sólida y el medio de separación es el solvente, basándose en la diferencia de solubilidad en el mismo. La forma más eficaz de favorecer la extracción sólido-líquido es a través de la difusión, disminuyendo el tamaño de las partículas para aumentar el área de transferencia de masa.

Gamse, T. (2002), señala que generalmente el tipo de transferencia de masa a través de sustancias extractivas del material sólido en el disolvente, se puede describir mediante la Ley de Fick. Las condiciones de difusión para realizar la extracción están en estado no estacionario, de modo que la tasa de cambio de la concentración de sustancias extractivas se describe por esta ley, siempre y cuando ninguna reacción química se lleve a cabo. Al dar inicio al proceso de extracción se ponen en contacto la materia prima y el solvente, para que el solvente penetre en los poros de la materia prima y solubilice el extracto o componente a extraer. La difusión se da debido al cambio de concentración que existe entre la solución en el material de extracción y la solución que se encuentra alrededor de las partículas sólidas. Es un proceso usado para la extracción de sales, hidrocarburos y materias vegetales, entre otros.

2.4.2 El extracto vegetal

El extracto vegetal es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos orgánicos cuyo origen proviene de las plantas. El carácter especial de los extractos vegetales es que a partir de una misma planta se pueden extraer diferentes principios activos, lo cual depende del solvente empleado, (Caldas, A. 2012).

2.5 DESCRIPCIÓN DE LOS SOLVENTES USADOS EN LOS PROCESOS DE EXTRACCIONES

En la rama química un solvente es una sustancia líquida que tiene la capacidad de disolver gases, sólidos o líquidos; permite la disolución de un soluto, es decir, extraer componentes deseados de su origen. Se caracterizan según su polaridad y estructura molecular, en polares y no polares, orgánicos y sintéticos, y siempre está en mayor proporción que el soluto. Los más comunes son los alifáticos, aromáticos, alcoholes, ésteres, cetonas e hidrocarburos. Su selección va a depender de la selectividad o capacidad para atraer los compuestos de interés: sustancias iguales atraen a sus iguales (Thornton, R. y Neilson, R. 1998).

Para realizar extracciones de materia prima vegetal como las ACG, se han utilizado solventes orgánicos como el etanol y el metanol por su baja toxicidad y la facilidad para la separación una vez obtenido el soluto. A continuación la caracterización de cada uno de ellos.

2.5.1 El solvente etanol

Es un líquido incoloro, volátil, con olor característico y sabor picante. Se obtiene principalmente al tratar etileno con ácido sulfúrico concentrado y posterior hidrólisis. De manera natural, se obtiene a través de fermentación por medio de levaduras a partir de frutas, caña de azúcar, maíz, cebada, sorgo, papas, arroz, entre otros. Es usado para bebidas alcohólicas, en la industria cosmética y farmacéutica (Gennaro, A. 2003). El metanol tiene fórmula molecular $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ o $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$; peso molecular

46,07g/mol y composición: C=52,24%; H=13,13% y O=34,73%, (Química Unam s.f).

A continuación se presentan las propiedades físico-químicas del etanol.

Tabla N° 2 Propiedades físico-químicas de etanol

Propiedades Físico-químicas	
Densidad (g/mL) a 20°C	0,7809
Punto de fusión °C	130
Punto de ebullición °C a 760mmHg	78,3
Índice de refracción	1,361
Punto de congelación	-114,1
Solubilidad	Miscible con agua en todas las proporciones, en metanol, cloroformo, acetonas y otros disolventes
Manejo	Utilizar bata, lentes de seguridad en un área bien ventilada y, si el uso es prologando, guantes

2.5.2 El solvente Metanol

Es un líquido incoloro y venenoso. Arde con flama no luminosa. Es utilizado industrialmente como disolvente. Durante mucho tiempo se obtuvo por destilación destructiva de madera a altas temperaturas; en la actualidad se produce por hidrogenación catalítica de monóxido de carbono a presiones y temperaturas altas, con catalizadores de cobre-óxido de cinc; como oxidación de hidrocarburos y como subproducto en la síntesis de Fischer-Tropsch, (Química Unam s.f).

El metanol tiene fórmula molecular CH_3OH o CH_4O , peso molecular 32,04g/mol y composición C=37,48%; H=12,58% y O=49,93%.

Tabla N° 3 Propiedades físico-químicas del metanol

Propiedades Físico-químicas del metanol	
Densidad (g/mL) a 20°C	0,7915
Punto de fusión °C	-97,8
Punto de ebullición °C a 760mmHg	64,7
Índice de refracción	1,3292
Punto de congelación	-97,68
Solubilidad	Miscible con agua, etanol, éter, benceno, cetonas y otros disolventes orgánicos
Manejo	El manejo de este solvente debe hacerse en un lugar bien ventilado, utilizando bata, lentes de seguridad y, si el uso es prologando, guantes

Estos solventes para la extracción de ACG de la hoja de *Annona Muricata*, se han utilizado en los métodos de extracción Soxhlet e Hidrodestilación, los cuales se describen a continuación.

2.6 EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET

2.6.1 Definición

El método Soxhlet tiene como función recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente del disolvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo los principios activos de la materia prima. Consiste en el lavado sucesivo de un sólido con un determinado solvente que va “lavando y extrayendo” de la muestra. El extracto vegetal obtenido es el resultado de concentrar los principios activos de las plantas (Caldas, A. 2012). La extracción sólido-líquido se realiza en este método sobre el material húmedo o seco o hecho polvo. La extracción tipo Soxhlet se efectúa por lotes, con un solvente. (Caldas, E., Cortés, J. y Cortés, F. 2014)

2.6.2 Etapas de la extracción Soxhlet

Según Núñez, C. (2008), la extracción Soxhlet se desarrolla en las siguientes etapas:

- a) Preparación de la muestra.
- b) Colocación del solvente en un balón. La cantidad de solvente debe ser la necesaria para que al ascender al extractor y antes de que se haga la sifonada, no quede seco el balón inferior y así evitar que se quemé; también permite evitar que cuando caiga el líquido de la sifonada sobre el vidrio recalentado del balón se produzca una explosión de los vapores con el consiguiente riesgo de accidente.
- c) Ebullición del solvente por una manta de calentamiento que se evapora hasta un condensador a reflujo constante con agua corriente.
- d) Condensación del solvente cuando hace contacto con el condensador y luego cae sobre un recipiente que contiene la muestra en su interior.
- e) Ascenso del nivel del solvente cubriendo la muestra hasta un punto en que se produce el reflujo en el sifón; éste vuelve con el material extraído al balón.
- f) Repetición del proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón.

2.6.3 Ventajas y desventajas del método Soxhlet

Caldas, A. (2012) categoriza las ventajas y desventajas que ofrece el equipo Soxhlet en la extracción. Se presentan a continuación:

Tabla N° 4 Ventajas y desventaja del equipo Soxhlet

Ventajas	Desventajas
Instrumentación simple	Proceso lento
No requiere filtración posterior	Requiere gran volumen de solvente
El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido	Necesita etapa de evaporación final del proceso
El solvente siempre se encuentra puro cuando está en contacto con la muestra	

2.7 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO HIDRODESTILACIÓN

2.7.1 Definición

Ortuño, M. (2006), afirma que el método de Hidrodestilación consiste en separar mediante la adición de calor los diferentes componentes de una mezcla, aprovechando las diferencias de volatilidad de los compuestos.

2.7.2 Etapas de la extracción Hidrodestilación

La extracción por Hidrodestilación se desarrolla en las siguientes etapas:

- a) La materia vegetal es colocada en contacto directo con el solvente en el balón.
- b) Se le aplica calor y comienza a destilar cuando alcanza el punto de ebullición del solvente.
- c) El vapor del solvente generado por el incremento de la temperatura extrae consigo compuestos contenidos en el interior del material vegetal.
- d) El solvente condensa por la baja temperatura del condensador y cae nuevamente al balón.
- e) Se reproduce este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada.

2.7.3 Ventajas y desventajas de Hidrodestilación (HD)

Ortuño, M. (2006) describe las ventajas y desventajas que ofrece el equipo Hidrodestilación para la extracción. Se exponen continuación.

Tabla N° 5 Ventajas y desventajas del equipo Hidrodestilación

Ventajas	Desventajas
Circulación constante de solvente	Largos tiempo de extracción
Metodología simple	Requiere filtración luego de la extracción
Bajos costos de inversión	No es posible la agitación del sistema

2.8 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS POR MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Una vez obtenidos los extractos con el componente que se desea, se procede a realizar análisis con la finalidad de caracterizar y cuantificar la estructura molecular característica de la muestra obtenida. Hay muchos tipos de análisis para las muestras, su selección depende del tipo de muestra que se obtenga, pueden señalarse análisis por espectroscopía de masa, espectroscopía de infrarrojo, UV, cromatografía de capa delgada, cromatografía de alta eficiencia, entre otros. A continuación se detallan las características del análisis por espectroscopía de infrarrojo.

2.8.1 Análisis por espectroscopía de infrarrojo

De todas las propiedades de un compuesto orgánico, la que más da información acerca de su estructura es su espectro infrarrojo. El espectro infrarrojo ayuda a conocer la estructura de un compuesto nuevo al informar de los grupos funcionales que se encuentran en una molécula. Un grupo de átomos determinados da origen a bandas de absorción características, es decir, un grupo funcional específico absorbe luz de frecuencia determinada, que son prácticamente las mismas de un compuesto a otro, (Thornton, R. y Neilson, R. 1998).

2.8.2 Descripción del espectro infrarrojo (IR)

El espectrofotómetro infrarrojo consta de una fuente emisora que origina un haz de luz compuesto de todas las frecuencias de la radiación infrarroja, cuya absorción es la que se desea medir. Este haz se hace pasar a través de la muestra y luego a un monocromador, en el que se seleccionan las frecuencias de una en una y se hacen pasar al detector, sistema capaz de emitir una señal electrónica proporcional a la intensidad de la luz que recibe. En la práctica, el detector recibe dos haces, uno que ha pasado a través de la muestra, y otro de referencia que sólo ha atravesado el disolvente si la muestra se haya disuelta. De este modo, el espectrofotómetro puede medir directamente la fracción de luz absorbida sólo por la muestra y a cualquier

longitud de onda. Un registrador representa gráficamente de forma continua la cantidad de luz transmitida o absorbida para cada frecuencia; la gráfica resultante se denomina espectro infrarrojo del compuesto. Los sólidos insolubles en los disolventes usuales en IR, pueden dispersarse en un disco delgado de KBr. Se trituran juntos la muestra y el KBr, y luego la mezcla se comprime en una prensa de alta presión, hasta convertirla en un disco delgado y traslúcido. El KBr no absorbe la radiación infrarroja, de modo que al colocarlo en el espectrómetro, sólo se registrará el espectro de la muestra (Weiniger, S. y Stermitz F. 1988).

2.8.3 Aplicaciones del análisis por Infrarrojo

Arias, D y López, A. (2013) identifican los posibles aportes del análisis por IR de acuerdo a:

- a) Identificación de los compuestos, haciendo coincidir el espectro de un compuesto desconocido con un espectro de referencia (huellas).
- b) Identificación de los grupos funcionales de sustancias desconocidas.
- c) Identificación de la orientación molecular en las películas de polímero.
- d) Detección de impurezas o aditivos moleculares presentes.
- e) Identificación de polímeros, plásticos y resinas.

2.8.4 Ventajas y desventajas de análisis por espectroscopía de infrarrojo

Arias, D y López, A. (2013) categorizan las ventajas y desventajas que ofrece el análisis de muestras por infrarrojo. A continuación se resumen en la tabla N° 5.

Tabla N° 6 Ventajas y desventajas del IR

Ventajas	Desventaja
Técnica de manejo sencillo	Estudios Superficiales (materiales en capas)
No es necesario la preparación de la muestra	No es cuantitativo
Técnica no destructiva	Debido a la sensibilidad puede detectar contaminantes
Técnica rápida	Las moléculas deben ser activas en la región IR
Técnica sensible	

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo de investigación se llevó a cabo el esquema de la figura N° 8.

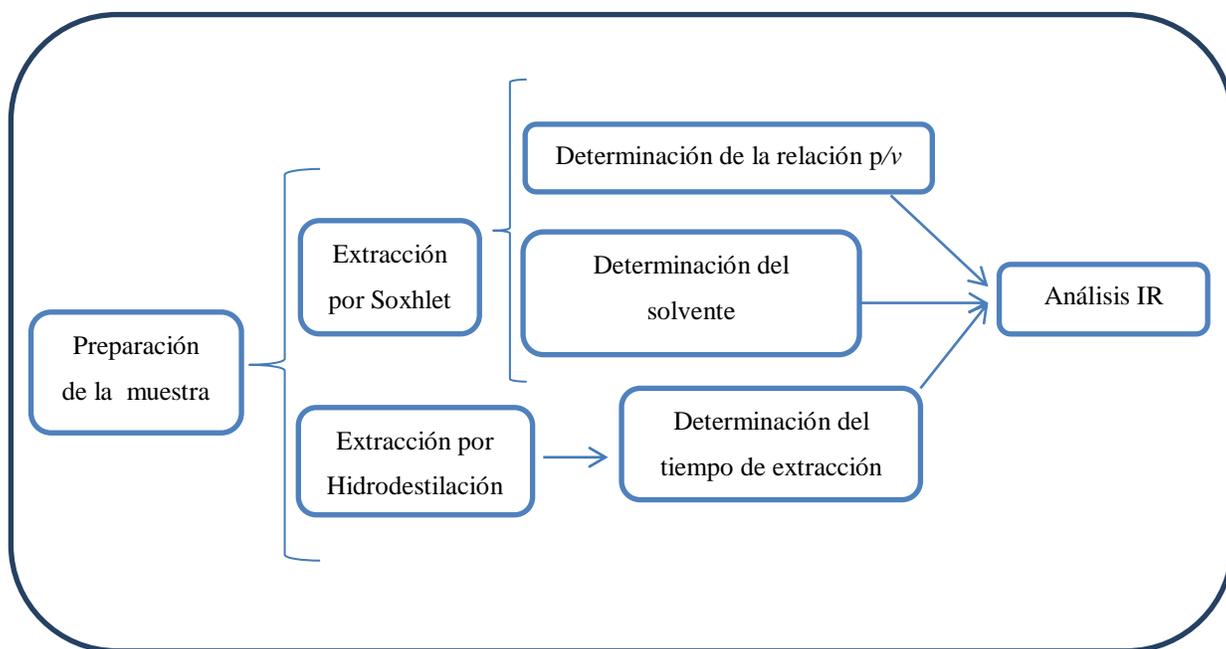


Figura N° 8 Esquema de la metodología para el cumplimiento de los objetivos planteados

La metodología que se describe a continuación se estructuró en base a la revisión de las investigaciones realizadas sobre la extracción de la planta de *Annona Muricata* y sobre las extracciones con los métodos Soxhlet e Hidrodestilación. Dichas investigaciones ya fueron debidamente descritas en los antecedentes.

3.1 PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

A fin de verificar que el rendimiento de extracción de la hoja de *Annona Muricata* es igual para cualquier planta, se evaluaron las hojas de dos arbustos provenientes de dos localidades de la ciudad de Caracas: Jardín de la Facultad de Ciencias de la UCV

y un jardín familiar en la Urb. de Cumbres de Curumo. Estas serán identificadas como Muestra 1 y Muestra 2 respectivamente. Se realizaron los siguientes pasos:

- a) Selección: A fin de tener una muestra sana se seleccionaron hojas completamente verdes, sin presencia de hongos. Las hojas fueron tomadas de la parte baja y alta del arbusto para lograr una muestra significativa de la planta.
- b) Lavado: Las hojas seleccionadas se pasaron por un primer lavado con agua corriente y luego con agua destilada.
- c) Secado: Las hojas se secaron cuidadosamente con papel absorbente para eliminar el agua sin romper la estructura de la hoja.
- d) Corte: Las hojas se cortaron de forma circular con un perforador de oficina de diámetro de 0,5 cm de orificio.

3.2 EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA

La extracción de las hojas de la *Annona Muricata* se realizó mediante los métodos de Extracción Convencional Soxhlet e Hidrodestilación. Con el primer método se determinaron tres parámetros: la relación óptima soluto/solvente, el solvente que permite una mayor extracción y el rendimiento de extracción. Con el segundo método se estudió el tiempo de extracción con la relación soluto/solvente usando el solvente óptimo identificado con el método Soxhlet, lo cual permitió determinar el rendimiento del mismo con los parámetros óptimos. Luego se llevó a cabo una comparación de los resultados obtenidos con ambos métodos para identificar el más eficiente.

3.2.1 Extracción Convencional por el método Soxhlet

El equipo Soxhlet utilizado está ubicado en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología (Módulo III) de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela. A continuación (figura N°9) se muestra el esquema de equipo Soxhlet.

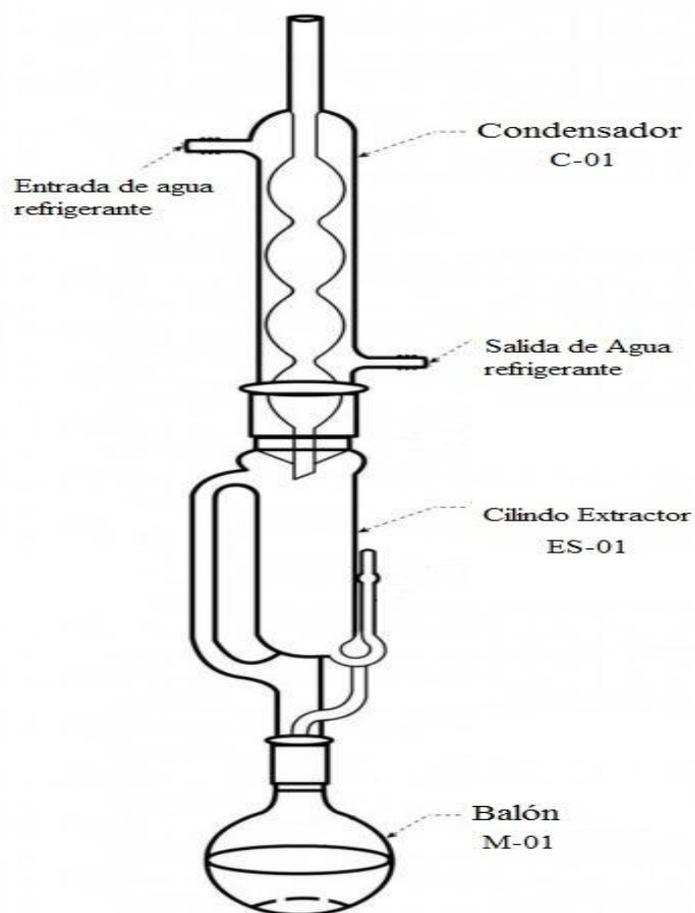


Figura N° 9 Esquema del Extractor Soxhlet (Soxhlet Extractors 2014)

3.2.1.1 Evaluación de las relaciones soluto-solvente con el método Soxhlet en base al rendimiento obtenido en la extracción de las hojas de *Annona Muricata*.

En este estudio se comparó el efecto del volumen de solvente con respecto a la masa de hojas de *Annona Muricata* que se utilizó en el proceso de extracción. Se estudiaron las siguientes relaciones p/v : 1:30, 1:35 y 1:40. Se realizaron tres pruebas por cada relación, con un total de 9 pruebas, para luego determinar el porcentaje de rendimiento obtenido y seleccionar la relación óptima para la extracción. El estudio se llevó a cabo con la siguiente metodología:

- (a) Se lavó con agua destilada y secó el material de vidrio del equipo Soxhlet.

- (b) Se tomó una muestra de forma circular de hoja de *Annona Muricata* (5 gramos aproximados), de 0,5 cm de diámetro.
- (c) Se realizó el montaje del equipo Soxhlet colocando en el balón un volumen de solvente de prueba (agua destilada) de 150 mL medido con un cilindro graduado (relación 1:30 % *p/v*). Se colocaron dentro del balón 20 perlas de ebullición aproximadamente, para mantener en constante movimiento el solvente, controlar la ebullición brusca y la formación de burbujas.

Se usó agua destilada sólo para encontrar las condiciones óptimas de extracción (relación *p/v*), no para extraer principios activos de la hoja de *Annona Muricata*

- (d) Se aplicó el mismo procedimiento que se expone a continuación para la relación (1:35; 1:40% *p/v*).
- (e) Se colocó el balón en la manta de calentamiento con el solvente y las perlas de ebullición.
- (f) Se instaló el extractor tipo Soxhlet ES-01 insertándolo con la boquilla del balón M-01. Se colocó dentro de ES-01 la carga vegetal del paso (b) con un tapón de lana de vidrio suavemente colocado en la parte inferior de la columna para evitar el paso de las partículas y/o de las perlas al ducto del Soxhlet (ver figura N°9).
- (g) Se acopló el condensador vertical C-01 al extractor ES-01 (como se muestra en la figura N°9), y se procedió a abrir el agua de enfriamiento, lo cual permitió la condensación del solvente para su caída sobre la muestra de hojas de *Annona Muricata*.
- (h) Se encendió la manta de calentamiento, ajustando la potencia en 30 % para lograr la evaporación del solvente (agua destilada).
- (i) El proceso de extracción se llevó a cabo durante 24 horas continuas, contadas a partir de la formación de la 1^{era} gota de solvente en el separador Soxhlet.
- (j) Luego de 24 horas se procedió al desmontaje del equipo. La materia vegetal (residuo) se llevó a secar en estufa dentro de una cápsula de Petri, por 24 horas, a 55 °C, para eliminar el solvente presente.

- (k) Tras 24 horas del secado del residuo después de la extracción, se determinó el porcentaje de rendimiento en base seca a partir de las masas de la extracción, de acuerdo a las siguientes ecuaciones.

$$masa_{IS} = masa_{IH} - (masa_{IH} * \%humedad) \quad \text{Ecuación N}^\circ 1$$

$$\%R = \frac{masa_{IS} \text{ (g)} - masa_{FS} \text{ (g)}}{masa_{IS} \text{ (g)}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación N}^\circ 2$$

Dónde:

masa_{IS}= masa inicial seca de matriz vegetal (sin agua)

masa_{IH}= masa inicial húmeda de matriz vegetal (con agua)

%humedad= porcentaje de humedad = 46,4% (Bermúdez 2015)

masa_{FS}= masa final seca de matriz vegetal (sin solvente)

%R= porcentaje de rendimiento de extracción.

- (l) Se seleccionó como la mejor relación de materia soluto/solvente, aquella cuyo porcentaje de rendimiento obtenido mediante la ecuación N°2, fue el valor más alto.

3.2.1.2 Evaluación de los solventes con el método Soxhlet en base al rendimiento obtenido en la extracción de las hojas de *Annona Muricata*.

Se llevó a cabo el análisis de dos solventes: etanol y metanol, a fin determinar entre ambos cuál era el óptimo en términos de rendimiento de extracción. Se realizaron las extracciones con la relación mínima posible (1:30) encontrada en el punto 2.3.1.1 *Evaluación de la relación peso/volumen (% p/v)* de manera triplicada para cada solvente. (Esta decisión estuvo condicionada por el difícil acceso a un mayor volumen de solventes). Luego de identificar el solvente óptimo, se realizaron tres extracciones más, con la relación óptima encontrada en el punto anterior. De esta manera se obtuvo el rendimiento de extracción con la relación óptima soluto-solvente

y el solvente que aportó el mejor rendimiento de extracción. Se realizaron 9 pruebas para este estudio.

El estudio se llevó a cabo con la siguiente metodología:

- (a) Se lavó con agua destilada y secó el material de vidrio del equipo Soxhlet.
- (b) Se tomó una muestra de forma circular de hoja de *Annona Muricata* (5 gramos aproximados), de 0,5 cm de diámetro.
- (c) Se realizó el montaje del equipo Soxhlet colocando en el balón un volumen de solvente (etanol) de 150 mL medido con un cilindro graduado (relación 1:30 % p/v). Se colocó dentro del balón 20 perlas de ebullición aproximadamente, para mantener en constante movimiento el solvente, controlar la ebullición brusca y la formación de burbujas.
- (d) Se aplicó el mismo procedimiento que se expone a continuación para el metanol.
- (e) Se colocó el balón en la manta de calentamiento con el solvente y las perlas de ebullición.
- (f) Se instaló el extractor tipo Soxhlet ES-01 insertándolo con la boquilla del balón M-01. Se colocó dentro de ES-01 la carga vegetal del paso (b) con un tapón de lana de vidrio suavemente colocado en la parte inferior de la columna para evitar el paso de las partículas y/o de las perlas al ducto del Soxhlet.
- (g) Se acopló el condensador vertical C-01 al extractor ES-01 (como se muestra en la figura N°9) y se procedió a abrir el agua de enfriamiento, lo cual permitió la condensación del solvente para su caída sobre la muestra de hojas de *Annona Muricata*.
- (h) Se encendió la manta de calentamiento ajustando la potencia en 20 % (por la volatilidad de los mismos) para lograr la evaporación del solvente.
- (i) El proceso de extracción se llevó a cabo durante 24 horas continuas, contadas a partir de la formación de la 1^{era} gota de solvente en el separador Soxhlet.

- (j) Luego de 24 horas se procedió al desmontaje del equipo. La materia vegetal (residuo) se llevó a secar en estufa en una cápsula de Petri por 24 horas a 55 °C para eliminar el solvente presente.
- (k) Tras 24 horas del secado del residuo después de la extracción, se determinó el porcentaje de rendimiento en base seca a partir de las masas de la extracción, de acuerdo a las ecuaciones N°1 y N°2.
- (l) Se seleccionó como solvente aquél cuyo porcentaje de rendimiento obtenido mediante la ecuación N°2, fue el valor más alto.

Todas las muestras obtenidas de la extracción se almacenaron en envases color ámbar y luego se guardaron en un refrigerador a -30 °C dentro del Laboratorio de Bioquímica y Microbiología (Módulo III) de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela (EIUCV) para su posterior análisis.

3.2.2 Extracción convencional por el método Hidrodestilación

La extracción por el método Hidrodestilación se utilizó para estudiar el tiempo de retención en la extracción durante 6 y 12 horas. El equipo está ubicado en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología (Módulo III) de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela (EIUCV).

3.2.2.1 Evaluación del tiempo de contacto en base al rendimiento obtenido por el método Hidrodestilación utilizando las condiciones óptimas obtenidas por el método Soxhlet para la extracción de las hojas de *Annona Muricata*

Se realizaron las extracciones por el método de Hidrodestilación con el tamaño de partícula ya mencionado (0,5 cm), la mejor relación soluto/solvente y el mejor solvente obtenido por el método Soxhlet ya descrito. Se evaluó el tiempo de extracción (6 y 12) horas. En la figura N°10 se muestra el esquema del equipo de Hidrodestilación.

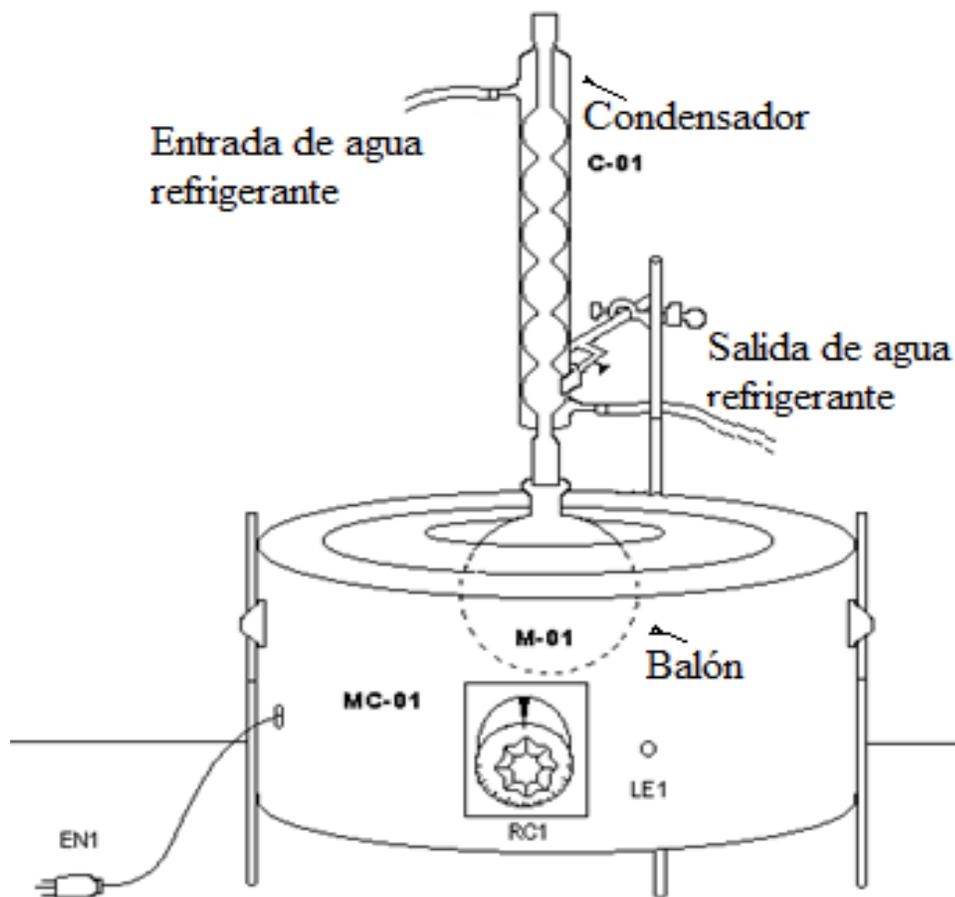


Figura N° 10 Esquema del extractor Hidrodestilación (Capítulo 4. Técnicas de extracción y concentración s.f)

El estudio se llevó a cabo con la siguiente metodología.

- (a) Se lavó, secó y curó el material de vidrio con el solvente a utilizar.
- (b) Se tomó una muestra de hoja de *Annona Muricata* (5 gramos aproximadamente), con formas circulares de 0,5 cm de diámetro, la mejor relación %p/v y el mejor solvente, determinado con el método Soxhlet.
- (c) Se realizó el montaje del equipo de Hidrodestilación colocando en el balón el volumen de solvente óptimo y la materia vegetal. Se colocaron dentro del balón 20 perlas de ebullición aproximadamente.
- (d) Se coló el balón en la manta de calentamiento.

- (e) Se instaló el equipo de Hidrodestilación ajustando el balón con el condensador vertical C-01 (como se muestra en la figura N°10). Se procedió a abrir el agua de enfriamiento, la cual permitió la condensación del solvente para que cayera sobre la muestra de hojas de *Annona Muricata*.
- (f) Se encendió la manta de calentamiento, ajustando la potencia en 40 % para lograr la evaporación de solvente dentro del equipo sin degradar los componentes de la matriz vegetal y el solvente.
- (g) El proceso de extracción se llevó a cabo durante 12 horas continuas, contadas a partir de la formación de la 1^{era} gota de solvente.
- (h) Luego de 12 horas se procedió al desmontaje del equipo. El residuo al vacío se llevó a la estufa durante 24 horas de secado a una temperatura de 55°C para eliminar el solvente presente.
- (i) Tras el secado del residuo después de la extracción, se determinó el porcentaje de rendimiento en base seca a partir de las masas de la extracción, de acuerdo a las ecuaciones N°1 y N°2.
- (j) Se aplicó el mismo procedimiento para las 6 horas de extracción.
- (k) Se seleccionó como el mejor tiempo de extracción el que aportó un porcentaje de rendimiento mayor obtenido mediante la ecuación N°2.

Las muestras obtenidas de la extracción se almacenaron en envases color ámbar y en un lugar refrigerado a -30° C dentro del Laboratorio de Bioquímica y Microbiología (Módulo III) de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela (EIQUCV) para su posterior análisis.

3.2.3 Comparación de los dos métodos de extracción Soxhlet e Hidrodestilación

Ya determinados los parámetros óptimos se compararon los dos métodos en función del porcentaje de rendimiento de extracción, a fin de identificar el método más eficiente siguiendo la metodología antes descrita.

3.2.4 Estudio del error en las muestras

Los rendimientos óptimos de los extractos por el método Soxhlet e Hidrodestilación fueron sometidos a un análisis de error con su desviación estándar (ver ecuación N°3).

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_i (x_i - X)^2}}{n} \quad \text{Ecuación N°3}$$

Dónde:

σ = desviación estándar

x_i = porcentaje de rendimiento de cada experimento

X = promedio del porcentaje de rendimiento

n = número total de experimentos a evaluar

3.2.5 Prueba de significancia t

Los resultados de los rendimientos óptimos con diferencias similares $\pm 3,0$ fueron sometidos a la prueba de significancia t para determinar si la diferencia entre los valores de rendimiento de extracción eran significativamente diferentes. Se calcula una desviación estándar promedio (ver ecuación N°4), se realiza el cálculo de t (ver ecuación N°5) y el cálculo de los grados de libertad (ver ecuación N°6). Se localiza en la tabla de la distribución t (ver apéndice A) los grados de libertad, tomando un intervalo de confianza de 95% $P_{0,05} = 2,78$. Si el valor de $|t| < t_{\epsilon}$ no es significativa la diferencia, en cambio Si $|t| > t_{\epsilon}$ si es significativa la diferencia.

$$s^2 = \frac{n_1 - 1 * s_1^2 + n_2 - 1 * s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Ecuación N°4}$$

$$t = \frac{(X_1 - X_2)}{s^* \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \quad \text{Ecuación N°5}$$

$$\varepsilon = n_1 + n_2 - 2 \quad \text{Ecuación N°6}$$

3.2.6 Análisis por la técnica de infrarrojo (IR) de los extractos óptimos obtenidos mediante los dos métodos Soxhlet e Hidrodestilación

Para lograr la identificación de los extractos y poder señalar la posible presencia de Acetogeninas en la hoja de *Annona Muricata*, se llevó a cabo el análisis mediante espectroscopia de infrarrojo (IR) a los extractos óptimos obtenidos, luego de aplicar los métodos Soxhlet e Hidrodestilación.

Para los análisis de Infrarrojo se utilizó el equipo de Nicolet Is10 del modelo Thermo Fisher Scientific, se realizaron corridas 32 scans comprendidos entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , con una resolución de 4, con una ganancia de 8, una velocidad óptica de 0,4747 y una apertura de 80, utilizando accesorio smart OMNI-TRANSMISSION. Antes de las lecturas de las muestras se acondicionó el equipo realizando un background. Las muestras se colocaron directamente sobre la ventana de KBr y se utilizó el programa OMNI para procesar los espectros.

De esta manera se logró conocer en los extractos la presencia del grupo carbonilo característico de las ACG. Luego se realizó una comparación con las estructuras aportadas por las investigaciones descritas en los antecedentes. El estudio se llevó a cabo en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta sección se ofrecen los resultados obtenidos en la presente investigación a fin de dar cumplimiento a los objetivos planteados.

4.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA DE DOS ARBUSTOS PROVENIENTES DE LOCALIDADES DIFERENTES

Se seleccionaron hojas provenientes de 2 arbustos localizados, uno, en el Jardín de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y el otro, en un Jardín familiar de Cumbres de Curumo de la ciudad de Caracas. A ambos, se les sometió a condiciones de cuidado y suelo diferentes con la finalidad de evaluar el porcentaje de extracción usando 2 muestras distintas. Se llevó a cabo una extracción con el método Soxhlet, con una relación fija soluto-solvente de 1:35, usando agua destilada como solvente. La muestra del jardín de la Facultad de Ciencias fue identificada como *Muestra 1* y la del jardín de Cumbres de Curumo como *Muestra 2*.

A continuación se presentan las extracciones realizadas con el método Soxhlet, con una relación soluto-solvente de 1:35 en la Muestra 1.

Tabla N° 7 Extracción con Muestra 1 por el método Soxhlet

Método de extracción Soxhlet					
Muestra 1					
Relación soluto-solvente 1:35 - Agua destilada					
Exp#	(masa _{IH} ±0,0003)g	(masa _{IS} ±0,0003)g	(masa _{FS} ±0,0003)g	% R	% R _{Promedio}
1	5,0140	2,6884	1,3606	49,4	49,7±0,3
2	5,0130	2,6879	1,3547	49,6	
3	5,0458	2,7055	1,3470	50,2	

Donde:

Exp #: Experimentos

masa_{IH}: masa inicial húmeda (con agua)

masa_{IS}: masa inicial seca (sin agua)

masa_{FS}: masa final seca (sin solvente)

%R: porcentaje de rendimiento de la extracción de la hoja de Annona Muricata

%R_{promedio}: promedio del porcentaje de rendimiento de los tres experimentos

En la Tabla N°8 se observan los experimentos # 1,2 y 3 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda, de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, la cual fue lavada, secada y cortada. Luego con el porcentaje de humedad de la hoja calculado por Bermúdez, L. (2015) y a través de la Ecuación N°1 se calculó la masa inicial seca aproximadamente de 2,7 gramos. Luego de la extracción por el método Soxhlet y el secado en la estufa a 55 °C por 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,4 gramos aproximadamente para calcular el porcentaje de extracción con la Ecuación N°2. Se obtuvo como promedio un porcentaje de extracción de 49,7±0,3 % de la Muestra 1.

A continuación se presentan las extracciones realizadas por el método Soxhlet con una relación soluto-solvente de 1:35 con la Muestra 2.

Tabla N° 8 Extracciones con Muestra 2 de Cumbres de Curumo por el método Soxhlet

Método de extracción Soxhlet					
Muestra 2					
Relación soluto-solvente 1:35- Agua destilada					
Exp#	(masa _{IH} ± 0,0003)g	(masa _{IS} ± 0,0003)g	(masa _{FS} ± 0,0003)g	%R	%R _{Promedio}
4	5,0350	2,6997	1,3289	50,8	50,2±0,6
5	5,0876	2,7003	1,3395	50,4	
6	5,0538	2,5864	1,3089	49,4	

En la Tabla N°9 se observan los experimentos # 4, 5 y 6 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, la cual fue lavada, secada y cortada. Con el porcentaje de humedad de la hoja calculado por Bermúdez, L. (2015) y a través de la Ecuación N°1 se calculó la masa inicial seca aproximadamente de 2,6 gramos. Luego de la extracción por el método Soxhlet y el secado en la estufa a 55 °C por 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,3 gramos aproximadamente para calcular el porcentaje de extracción con la Ecuación N°2. Se obtuvo como promedio un porcentaje de extracción de $50,2 \pm 0,6$ % de la Muestra 2.

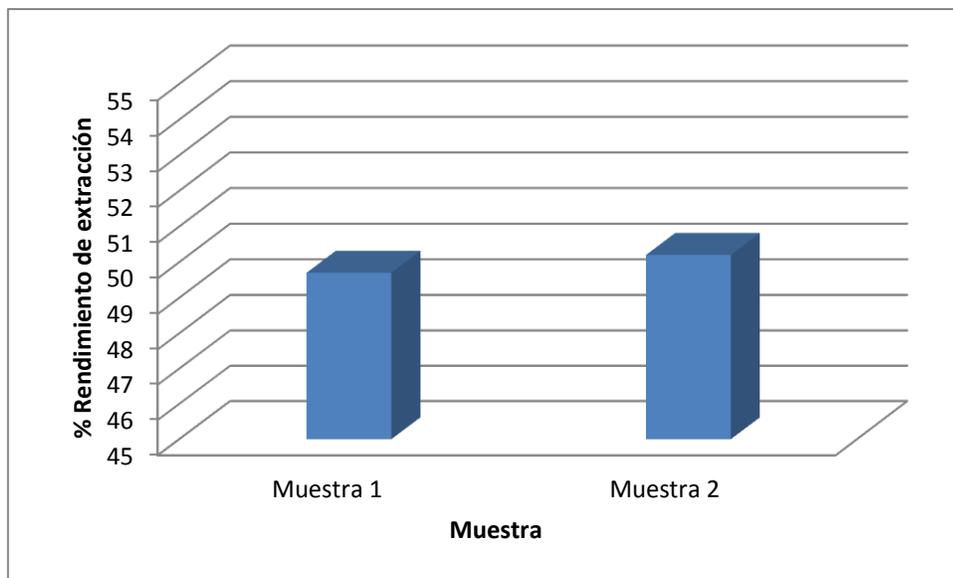


Gráfico N° 1 Comparación de la muestra 1 y 2

Al comparar el porcentaje promedio de rendimiento de la extracción de la hoja de *Annona Muricata*, entre las extracciones de las muestras 1 y 2, (ver gráfico N°1) se encontró es similar en ambos casos; se sustenta esta afirmación por la aplicación de la prueba t, (para valores de $s = 0,4743$, $|t| = 1,2820$, ver apéndice A, son iguales en un 95% $p = 0,05$). No hay diferencias significativas entre los valores obtenidos debido a que éstos coinciden al tomar en cuenta el error de cada valor. Esto implica que el porcentaje de rendimiento promedio para una planta de *A. Muricata*, siguiendo el procedimiento, antes detallado, es de 49,95%, independientemente de la zona donde se encuentre en una ciudad.

4.2 EVALUACIÓN DE LAS RELACIONES SOLUTO-SOLVENTE CON EL MÉTODO SOXHLET EN BASE AL RENDIMIENTO OBTENIDO EN LA EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA

Para llevar a cabo una extracción se deben establecer los parámetros respectivos (Caldas, A. 2012). A fines de este estudio uno de ellos es la relación de la materia a usar con el volumen del solvente de extracción. Para ello se evaluaron 3 relaciones soluto-solvente: 1:30, 1:35 y 1:40 a fin de determinar cuál de ellas logra un mayor rendimiento de extracción. Se tomó una muestra inicial húmeda de 5 gramos aproximadamente, se llevó a cabo la extracción Soxhlet por 24 horas variando la relación soluto-solvente, con volúmenes de solventes de 150 mL, 175 mL y 200 mL respetivamente. Se utilizó como solvente agua destilada sólo para la determinación de parámetros óptimos debido a la limitación en el acceso a volúmenes de solventes.

Debido a que no hay diferencia en el rendimiento de extracción con muestras de diferentes arbustos, se utilizó en forma permanente la Muestra 2 por accesibilidad a la planta. Se presentan las extracciones realizadas con la relación soluto-solvente 1:30 con el método Soxhlet.

Tabla N° 9 Extracciones con relación soluto-solvente 1:30 por el método Soxhlet

Método de extracción Soxhlet					
Muestra 2					
Relación soluto-solvente 1:30=5 g:150 mL - Agua destilada					
Exp#	(masa _{IH} ±0,0003)g	(masa _{IS} ±0,0003)g	(masa _{FS} ±0,0003)g	%R	%R _{Promedio}
7	5,0670	2,7168	1,4003	48,5	48,3±0,2
8	5,0530	2,7034	1,4032	48,1	
9	5,0741	2,7529	1,4192	48,5	

En la Tabla N°10 se observan los experimentos # 7, 8 y 9 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,1 gramos aproximadamente para cada uno, que fue lavada, secada y cortada. Luego a través de la ecuación para el cálculo de la masa inicial seca se obtuvo un peso de 2,7 gramos aproximadamente. Mediante la extracción por el

método Soxhlet y el secado en la estufa por 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,3 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de $48,3 \pm 0,2$ % de la Muestra 2.

En la siguiente tabla se presentan las extracciones realizadas con la relación soluto-solvente 1:35 mediante el método Soxhlet.

Tabla N° 10 Extracciones con relación soluto-solvente 1:35 por el método Soxhlet

Método de extracción Soxhlet					
Muestra 2					
Relación soluto-solvente 1:35- Agua destilada					
Exp#	(masa _{IH} ±0,0003)g	(masa _{IS} ±0,0003)g	(masa _{FS} ±0,0003)g	% R	% R _{Promedio}
10	5,0350	2,6997	1,3289	50,8	50,2±0,6
11	5,0876	2,7003	1,3395	50,4	
12	5,0538	2,5864	1,3089	49,4	

En la Tabla N°11 se observan los experimentos # 10, 11 y 12 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,1 gramos aproximadamente para cada uno, la cual fue lavada, secada y cortada. Luego, a través de la ecuación para el cálculo de la masa inicial seca, se obtuvo un peso de 2,7 gramos aproximadamente. Mediante la extracción por el método Soxhlet y el secado en la estufa por 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,3 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de $50,2 \pm 0,6$ %.

En la próxima tabla se presentan las extracciones realizadas con la relación soluto-solvente 1:40 con el método Soxhlet.

Tabla N° 11 Extracciones con relación soluto-solvente 1:40 por el método Soxhlet

Método de extracción Soxhlet					
Muestra 2					
Relación soluto-solvente 1:40- Agua destilada					
Exp#	(masa _{IH} ±0,0003)g	(masa _{IS} ±0,0003)g	(masa _{FS} ±0,0003)g	%R	%R _{Promedio}
13	5,0210	2,6922	1,2851	52,3	52,0±0,6
14	5,0563	2,7249	1,2934	52,5	
15	5,0125	2,3591	1,1536	51,1	

En la Tabla N°12 se observan los experimentos # 13, 14 y 15 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, la cual fue lavada, secada y cortada. Luego, a través de la ecuación para el cálculo de la masa inicial seca, se obtuvo un peso de 2,6 gramos aproximadamente. Mediante la extracción por el método Soxhlet y el secado en la estufa por 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,2 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de 52,0±0,6 %.

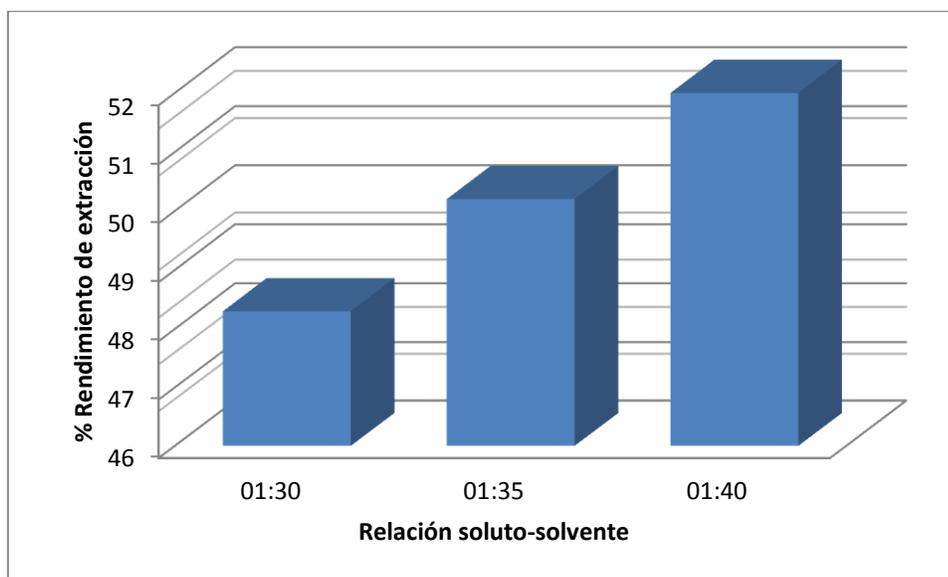


Gráfico N° 2 Comparación de relación soluto-solvente

Se realizó una prueba t de significancia, donde se compararon los resultados de los rendimientos promedios de las tablas N°10 y N°11 y luego las tablas N°11 y N°12. Dando como resultado que la diferencia si es significativa para ambas comparaciones con valores de $s=0,45$, $|t|=2,78$ y $s=0,55$, $|t|=3,99$ (ver apéndice A) respectivamente tomando $p=0,05$.

El Gráfico N°2 muestra que el rendimiento de extracción para la relación soluto-solvente 1:30 es igual a $48,3\pm 0,2$ %, para la relación soluto solvente 1:35 es igual a $50,2\pm 6$ % y para la relación soluto-solvente 1:40 es igual a $52,0\pm 6$ %. El mayor rendimiento de extracción de hojas de *Annona Muricata* con la relación soluto-solvente es de 1:40. Al emplear una relación soluto-solvente 1:40, se obtiene un rendimiento mayor que en la relación 1:30 y 1:35. Esto debido a que, por haber más cantidad de solvente para la misma cantidad de soluto, es menos probable que el solvente se sature y además hay más interacción entre las moléculas solvatadas y el solvente, lo que permite que la extracción sea más efectiva. A medida que aumente la relación soluto-solvente, en esa medida aumenta el rendimiento de la extracción, coincidiendo con los resultados de (Arias, D. y López, A. 2013).

4.3 EVALUACIÓN DE SOLVENTES A TRAVÉS DEL MÉTODO SOXHLET EN BASE AL RENDIMIENTO OBTENIDO EN LA EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA

La determinación del mejor solvente es fundamental para llevar a cabo una buena extracción. Los solventes polares atraen sustancias polares y los solventes no polares atraen sustancias apolares (Guillen, J. s.f). Se hace el estudio de dos solventes polares, etanol y metanol, debido a la polaridad de las Acetogeninas (componente principal de esta investigación), para ver cuál de ellos logra un mayor rendimiento en la extracción. Se tomó una muestra inicial húmeda de 5 gramos aproximadamente, se llevaron a cabo 6 extracciones Soxhlet por 24 horas, con relación fija soluto-solvente 1:30, la mínima posible descrita en la determinación de la relación soluto-solvente,

debido a las limitaciones de la investigación. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

A continuación se señalan las extracciones realizadas con etanol por el método Soxhlet.

Tabla N° 12 Extracciones con etanol por el método Soxhlet

Método de extracción Soxhlet					
Muestra 2					
Solvente etanol - Relación 1:30					
Exp#	(masa _{IH} ±0,0003)g	(masa _{IS} ±0,0003)g	(masa _{FS} ±0,0003)g	% R	% R _{Promedio}
16	5,0112	2,6869	1,6000	40	44±2
17	5,0450	2,7050	1,4855	45	
18	5,0380	2,7013	1,4820	45	

En la Tabla N°13 se observan los experimentos # 16, 17 y 18 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, la cual fue lavada, secada y cortada. Luego se calculó la masa inicial seca y se obtuvo un peso de 2,7 gramos aproximadamente. Mediante la extracción por el método Soxhlet y el secado en la estufa por 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,6 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de 44±2 %.

Se muestran las extracciones realizadas con metanol por el método Soxhlet.

Tabla N° 13 Extracciones con metanol por el método Soxhlet

Método de extracción Soxhlet					
Muestra 2					
Solvente metanol - Relación 1:30					
Exp#	(masa _{IH} ±0,0003)g	(masa _{IS} ± 0,0003)g	(masa _{FS} ± 0,0003)g	% R	% R _{Promedio}
19	5,0060	2,6841	1,3650	49	42±5
20	5,0001	2,6810	1,6900	37	
21	5,0700	2,7184	1,6270	40	

En la Tabla N°14 se observan los experimentos # 19, 20 y 21 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, la cual fue lavada, secada y cortada. Luego se calculó la masa inicial seca y se obtuvo un peso de 2,7 gramos aproximadamente. Mediante la extracción por el método Soxhlet y el secado en la estufa durante 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,6 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de 42 ± 5 %.

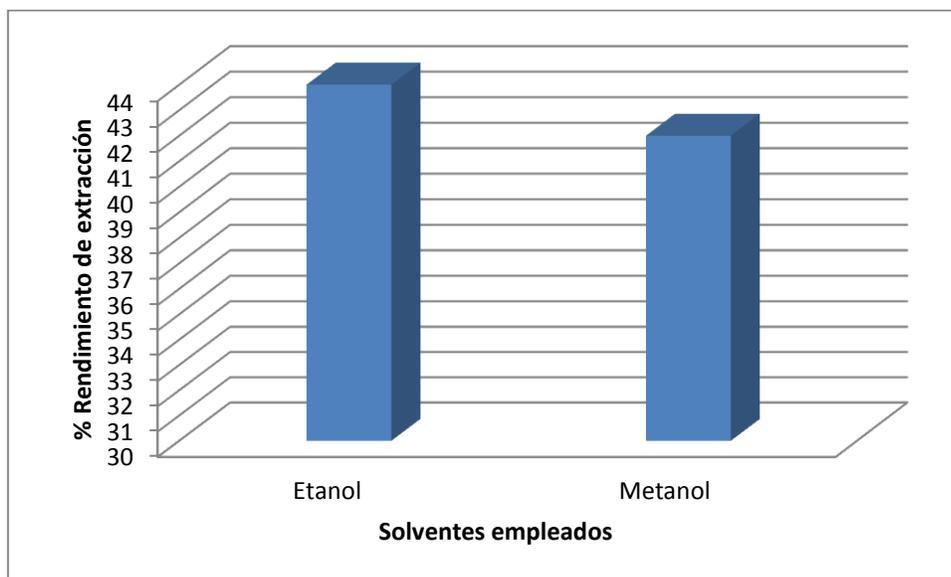


Gráfico N° 3 Comparación de los solventes

Realizando la prueba de significancia, t, para el resultado de extracción de la hoja de *Annona Muricata* aporta que los dos valores no son significativamente diferentes, con un valor de $s=3,8$, $|t|=0,64$ (ver apéndice A) y tomando un valor de $p=0,05$.

Comparando los valores de rendimiento de extracción de los solventes utilizados, expuestos en el gráfico N° 3, se observa que se obtiene un rendimiento con el solvente etanol de 44 ± 2 % y con el metanol 42 ± 5 %. Se concluye que ambos solventes generan igual rendimiento de extracción debido a las fuerzas intermoleculares generadas gracias a los puentes de hidrógeno. Tanto las ACG como los solventes empleados, tienen grupos hidroxilo (-OH) en su estructura, los cuales pudieran interactuar vía puente de hidrógeno. Esto concuerda con la teoría de las

atracciones intermoleculares, la cual señala que se logra una mayor extracción con solventes similares a la sustancia a extraer: una sustancia disuelve a otra similar (Thornton, R. y Neilson, R. 1998). El etanol como solvente tiene una ventaja comparativa con el metanol, su uso no presenta riesgos para la salud, no tiene toxicidad para el consumo humano, si la extracción de acetogeninas es para uso farmacéutico en investigaciones anticancerígenas o nutricionales, debe seleccionarse como mejor solvente. Además se ha determinado (Gavamukulya, Y. y otros, 2014) que los compuestos con actividad anticancerígena están presentes en los extractos etanólicos.

4.4 EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO EN BASE AL RENDIMIENTO OBTENIDO POR EL MÉTODO HIDRODESTILACIÓN UTILIZANDO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS OBTENIDAS POR EL MÉTODO SOXHLET PARA LA EXTRACCIÓN DE LA HOJA DE ANNONA MURICATA

Cuando se lleva un proceso a escala industrial, el tiempo es un factor valioso. Por ello, uno de los parámetros importantes para una extracción es el tiempo mínimo necesario para alcanzar la máxima extracción. Se le conoce como tiempo óptimo de extracción. Para realizar este estudio se tomó una muestra inicial húmeda de 5 gramos aproximadamente y se llevaron a cabo 6 extracciones por el método Hidrodestilación durante 6 y 12 horas, con relación fija soluto-solvente 1:40, la óptima encontrada por el método Soxhlet, con agua destilada como solvente y todas las extracciones se realizaron por triplicado.

A continuación se presentan las extracciones realizadas con un tiempo de retención de 6 horas por el método Hidrodestilación.

Tabla N° 14 Extracción por 6 horas por el método Hidrodestilación

Método de extracción Hidrodestilación					
Muestra 2					
6 horas de extracción - solvente agua destilada - Relación 1:40					
Exp#	(masa _{IH} ±0,0003)g	(masa _{IS} ±0,0003)g	(masa _{FS} ±0,0003)g	% R	% R _{Promedio}
22	4,9496	2,6539	1,1830	55	50±4
23	5,0090	2,6857	1,3410	50	
24	5,0475	2,7064	1,4650	46	

En la Tabla N°14 se observan los experimentos # 22, 23 y 24 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, lo cual fue lavada, secada y cortada siguiendo los pasos de la metodología descrita. Luego se calculó la masa inicial seca y se obtuvo un peso de 2,7 gramos aproximadamente. Mediante la extracción por el método Hidrodestilación durante 6 horas y el secado en la estufa durante 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,3 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de 50±4 %.

Se presentan a continuación las extracciones realizadas con un tiempo de retención de 12 horas por el método Hidrodestilación.

Tabla N° 15 Extracciones por 12 horas por el método Hidrodestilación

Método de extracción Hidrodestilación					
Muestra 2					
12 horas de extracción - solvente agua destilada - Relación 1:40					
Exp#	(masa _{IH} ± 0,0003)g	(masa _{IS} ± 0,0003)g	(masa _{FS} ± 0,0003)g	% R	% R _{Promedio}
25	5,0102	2,6864	1,3180	51	49±1
26	5,0710	2,7190	1,3690	50	
27	5,0835	2,7257	1,4310	47	

En la Tabla N°15 se observan los experimentos # 25, 26 y 27 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, lo cual fue lavada, secada y cortada siguiendo los pasos mencionados en la metodología. Luego se calculó la masa inicial seca y se obtuvo un peso de 2,7 gramos aproximadamente.

Mediante la extracción por el método Hidrodestilación durante 12 horas y el secado en la estufa por 24 horas, se obtuvo la masa final seca de 1,3 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de 49 ± 1 %.

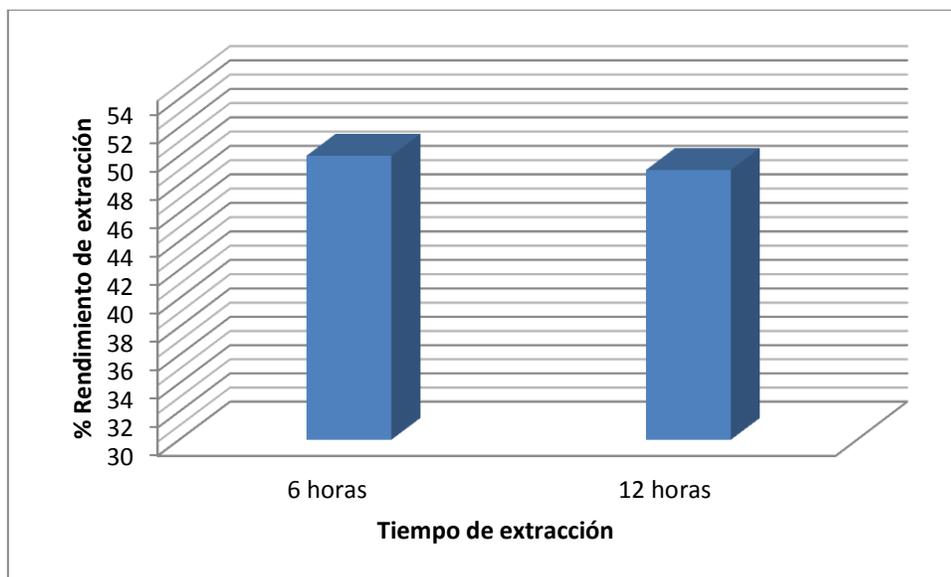


Gráfico N° 4 Comparación del tiempo de extracción

La prueba de significancia t aportó que entre los dos valores de rendimiento con tiempo de extracción 6 y 12 horas no hay diferencias significantes. Con $s=2,92$, $|t|=0,42$ (ver apéndice A) y $p=0,05$.

Se puede observar en los resultados de extracción descritos en el gráfico N° 4 que no hay cambios significativos en el rendimiento de extracción luego de transcurrir las 6 horas. Por ello se puede concluir que luego de 6 horas se logra extraer todo el soluto posible. Se observa una pequeña disminución, poco significativa cuando el tiempo de retención es de 12 horas, lo cual puede ser atribuido a la degradación de la materia vegetal en tiempos prolongados (Kratchanova, M., Pavlova, E. y Panchev, I. 2003).

4.5 COMPARACIÓN DEL MÉTODO SOXHLET E HIDRODESTILACIÓN EN BASE AL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS DE ANNONA MURICATA

Para el análisis de ambos métodos, se utilizaron muestras de 0,5 cm de diámetro aproximadamente (ver figura N°11), se llevó a cabo la extracción con las condiciones óptimas encontradas en el presente trabajo: 1.- Relación soluto-solvente igual a 1:40, 2.- solvente etanol y 3.- tiempo de 6 horas, por triplicado. Luego de la extracción se obtuvo la muestra húmeda con solvente (ver figura N°12) la cual fue secada por 24 horas en la estufa a 55 °C y se obtuvo la muestra final seca (ver figura N° 13). Los extractos etanólicos obtenidos luego de la extracción, fueron de color verde (ver figura N°14) y se secaron en la estufa por 24 horas a 55°C para la evaporación del solvente (ver figura N°15). Para finalizar, se llevó a cabo el análisis por espectroscopia de infrarrojo con los extractos secos.



Figura N° 11 Muestra de hoja de A. Muricata húmeda con corte de 0,5 cm de diámetro



Figura N° 12 Muestra de la hoja de Annona Muricata con solventes de la extracción



Figura N° 13 Muestra de la hoja Annona Muricata luego del secado



Figura N° 14 Extracto de hoja de Annona Muricata usando como solvente etanol



Figura N° 15 Extracto de hoja de Annona Muricata usando como solvente etanol luego del secado

En la tabla N° 17 se muestran las extracciones obtenidas mediante el método Soxhlet empleando el solvente óptimo y la relación óptima soluto-solvente.

Tabla N° 16 Extracciones óptimas con el método Soxhlet

Método de extracción Soxhlet					
Muestra 2					
Solvente etanol - Relación 1:40					
Exp#	(masa _{IH} ± 0,0003)g	(masa _{IS} ± 0,0003)g	(masa _{FS} ± 0,0003)g	%R	% R _{Promedio}
28	5,0074	2,6849	1,1783	56,1	55,9±0,3
29	5,0348	2,6996	1,1823	56,2	
30	5,0450	2,7050	1,2046	55,5	

En la Tabla N°17 se observan los experimentos # 28, 29 y 30 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, la cual fue lavada, secada y cortada siguiendo los pasos mencionados en la metodología. Luego se calculó la masa inicial seca y se obtuvo un peso de 2,7 gramos aproximadamente. Mediante la extracción por el método Soxhlet y el secado en la estufa, se obtuvo la masa final seca de 1,2 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de 55,9±0,3 %.

Se presentan a continuación las extracciones realizadas mediante el método Hidrodestilación en las condiciones ya determinadas.

Tabla N° 17 Extracciones óptimas con el método Hidrodestilación

Método de extracción Hidrodestilación					
Muestra 2					
6 horas de extracción - solvente etanol - Relación 1:40					
Exp#	(masa _{IH} ±0,0003)g	(masa _{IS} ± 0,0003)g	(masa _{FS} ±0,0003)g	%R	%R _{Promedio}
31	5,0534	2,7095	1,9574	28	29±2
32	5,0046	2,6839	1,8395	31	
33	5,0451	2,7051	1,9134	29	

En la Tabla N°18 se observan los experimentos # 30, 31 y 32 en los cuales se utilizó una masa inicial húmeda de 5,0 gramos aproximadamente para cada uno, la cual fue lavada, secada y cortada siguiendo los paso mencionados en la metodología. Luego se calculó la masa inicial seca y se obtuvo un peso de 2,7 gramos aproximadamente. Mediante la extracción por el método Soxhlet y el secado en la estufa, se obtuvo la masa final seca de 1,9 gramos aproximadamente. El porcentaje de rendimiento de extracción fue de 29±2 %.

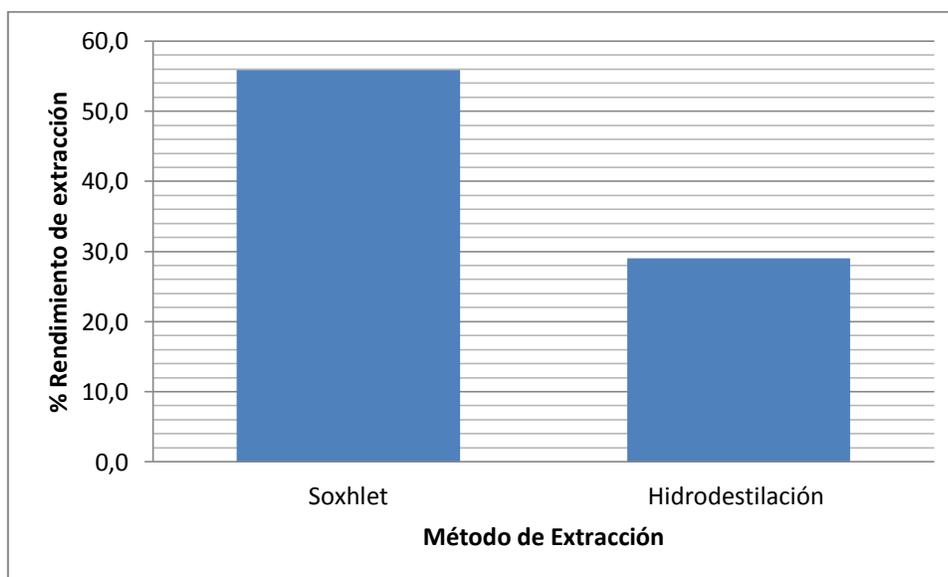


Gráfico N° 5 Comparación de los métodos de extracción

Se concluye que el método Soxhlet logra una mayor extracción (55,9±0,3 %), en comparación con el método Hidrodestilación (29±2 %)(ver gráfico N°5). Con el

método Soxhlet se inundan las partículas del sólido siempre con solvente puro, destilado en el equipo, logrando que el solvente nunca esté saturado en contacto con el soluto, en cambio en el método Hidrodestilación la muestra está sumergida siempre en el solvente a medida que se va saturando. La saturación del solvente impide la difusión entre el sólido y el solvente. (Arias, D. y López, A. 2013 y Landaeta, F. y Orta, L. 2010).

4.6 ANÁLISIS POR TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR) DE LOS EXTRACTOS ÓPTIMOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DOS MÉTODOS SOXHLET E HIDRODESTILACIÓN

Una vez obtenidos los extractos por ambos métodos y a fin de identificar dentro de los extractos de la hoja de *Annona Muricata* la presencia de anillo lactónico característicos de las estructuras de las ACG, se llevó a cabo un análisis por espectroscopia de infrarrojo. Se procesaron 3 extractos luego del secado: etanólico (Exp # 28) y metanólico (Exp # 34) con el método Soxhlet para comparar la afinidad de los solventes con las ACG y etanólico (Exp #31) con el método Hidrodestilación para comparar la extracción de Acetogeninas con ambos métodos.

A continuación se muestran los análisis de IR para cada muestra evaluada.

En el Gráfico N°6 se observa el porcentaje versus el número de onda de absorción del experimento # 28 que fue realizado con el método Soxhlet, con relación soluto-solvente 1:40, con etanol como solvente durante 24 horas y se obtuvo como resultado un %R = $56,1 \pm 0,3$.

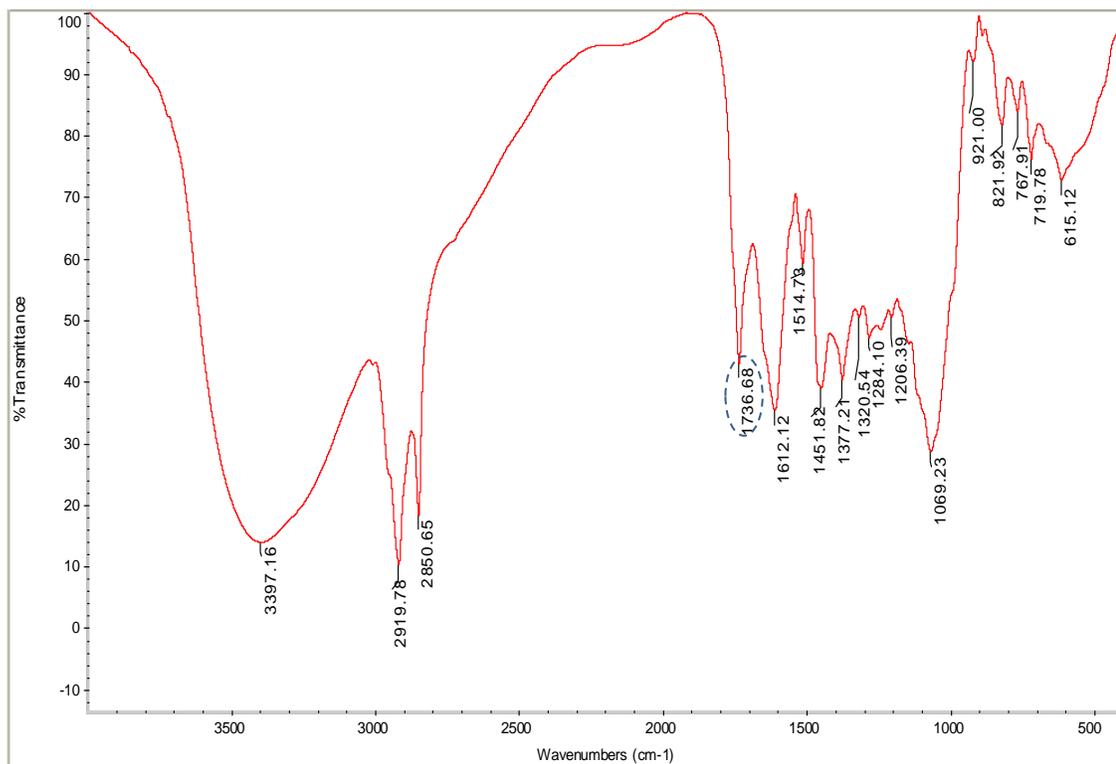


Gráfico N° 6 Espectro infrarrojo obtenido del extracto de la hoja de *Annona Muricata* por el método Soxhlet usando como solvente etanol

En el Gráfico N°7 se observa el porcentaje de tramitancia versus el número de onda de absorción del Experimento # 34, el cual fue realizado con el método Soxhlet, con relación soluto-solvente 1:40, con metanol como solvente durante 24 horas y se obtuvo como resultado un $\%R = 51 \pm 7$.

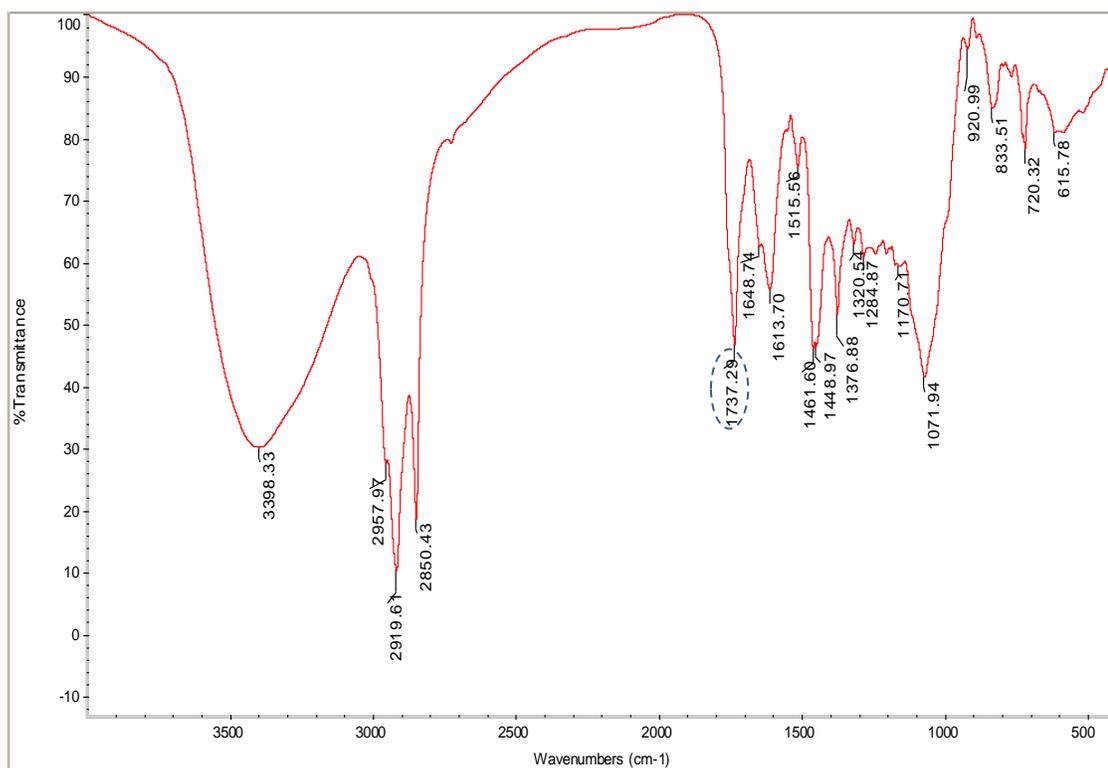


Gráfico N° 7 Espectro infrarrojo obtenido del extracto de la hoja de *Annona Muricata* por el método Soxhlet usando como solvente metanol

En el Gráfico N°8 se observa el porcentaje de tramitancia versus el número de onda de absorción del Experimento # 31. Fue realizado con el método Hidrodestilación, con relación soluto-solvente 1:40, con etanol como solvente durante 6 horas y se obtuvo como resultado un $\%R=28\pm 2$.

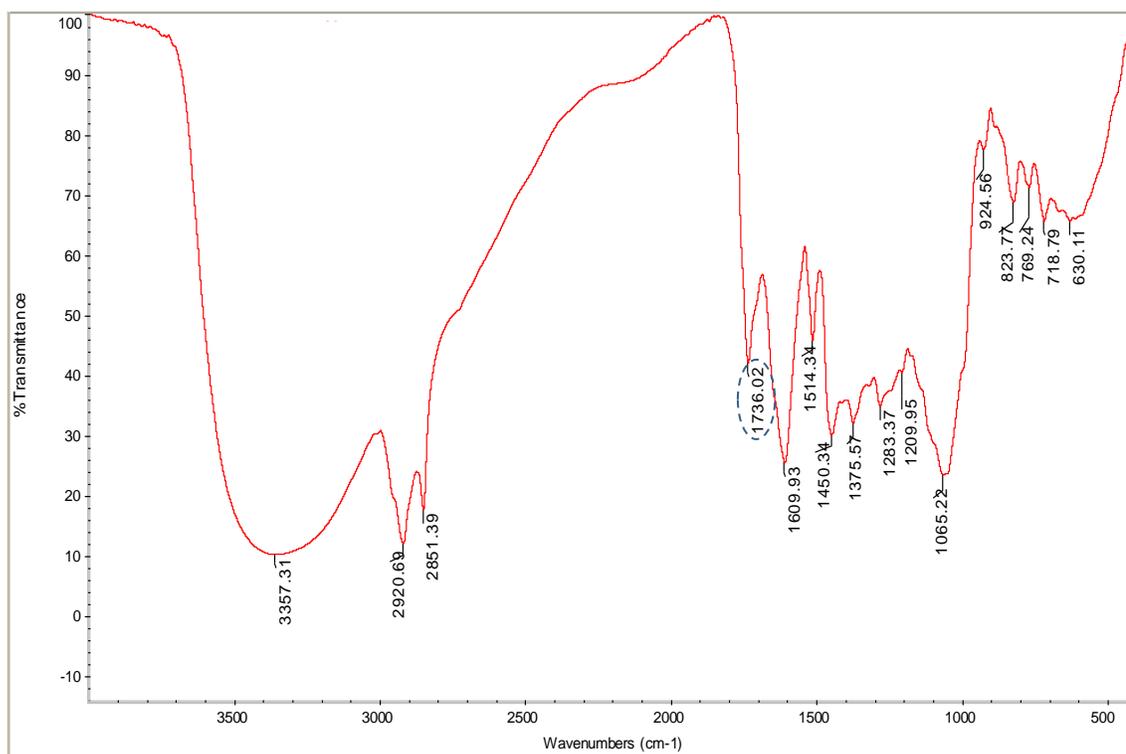


Gráfico N° 8 Espectro infrarrojo obtenido del extracto de la hoja de *Annona Muricata* por el método Hidrodestilación usando como solvente etanol

Al evaluar las estructuras de las ACG se aprecia la presencia en todas ellas de un anillo lactónico metil sustituido α, β insaturado, por ello para este análisis se evaluó la presencia de ACG por la absorción (1750 cm^{-1}) de un anillo lactónico (Pavia, D. 2001) (ver apéndice B). El anillo lactónico tiene dentro de sí un grupo carbonilo y este pico es característico de la vibración de tensión de enlace $\text{C}=\text{O}$. La posición exacta de absorción $\text{C}=\text{O}$ varía un poco según la estructura que se tenga. (Weiniger, S. y Stermitz, F 1988). Al observar los gráficos N° 6,7 y 8 el pico con una absorción cercana al grupo lactónico 1736, 1737 y 1736 respectivamente, observamos una diferencia de 13 cm^{-1} para el extracto metanólico con el método Soxhlet y de 14 cm^{-1} para los extractos etanólicos del método Soxhlet e Hidrodestilación, esta diferencia se le puede atribuir al metil sustituido que se encuentra dentro del anillo de las ACG, mas no en el anillo lactónico del cual se hace referencia. Dentro del espectro infrarrojo se puede tener una diferencia de $\pm 20 \text{ cm}^{-1}$ para referirse a un mismo grupo

funcional, las diferencias están dentro de este intervalo, lo cual sugiere la presencia de un anillo lactónico metil sustituido α,β insaturado característico de las ACG.

Se realizó una segunda comparación (ver tabla N° 18) con los números de ondas de 4 acetogeninas aisladas (Bajin ba Ndob. y otros 2009), y con los valores de absorción de los espectros obtenidos en este trabajo especial de grado. No se tomaron en cuenta los valores característicos de los solventes etanol y metanol.

Tabla N° 18 Comparación de 4 ACG aisladas con los números de onda de los extractos obtenidos

ACG [1]				Soxhlet		Hidrodestilación
Dieposabelin	Squamocenin	Lepirenin	Dotistenin	etanol	metanol	etanol
3398	3443	3381	3450	3397	3398	3357
2915	2923	2924	2924	2919	2919	2920
2850	2853	2853	2854	2850	2850	2851
1737	1752	1755	1756	1736	1737	1736
-	-	-	-	1612	1613	1609
-	-	1561	-	1514	1515	1515
1469	1462	1461	1464	1451	1461	1450
1374	1374	1375	1374	1377	1376	1375
1320	1319	1319	1319	1320	1320	
1277	1262	1262	-	1284	1284	1283
				1206		1209
1177	1177	1181	1195	-	1170	-
1083	1074	1076	1076	1069	1070	1065
1029	1027		1027	-	-	-
930	930	929	-	921	920	924
826	804	-	-	821	833	823
-	-	-	-	767		769
718	722	722	721	719	720	718
-	-	-	-	615	615	630

Se observa en la tabla N°18 la igualdad en la absorción en 1737 de la Dieposabelina y el valor del extracto metanólico, y una diferencia de 1cm^{-1} los extractos etanólicos. En los demás números de onda que no corresponden a los solventes, hay dos valores que coinciden con las ACG, pero no se logró conocer a que grupo funcional corresponden.

Se realizó una tercera comparación de los espectros con los numero de ondas de Acetogeninas aisladas por varios autores, tomando en cuenta el valor de absorción de 1750 donde se reporta el anillo lactónico característico.

Tabla N° 19 Referencias de IR de las estructuras de las ACG

Acetogeninas	Numero de onda cm ⁻¹	Referencia
Sabadelina	1740	Gleye, C. y otros (1999)
Epomuricenins	1760	Roblot, F. y otros (1993)
Dieposabadelina	1737	Bajin, I. y otros (2008)
Squamoceina	1752	Bajin, I. y otros (2008)
Lepirenina	1755	Bajin, I. y otros (2008) y García, K. (2009)
Dostisterina	1756	Bajin, I. y otros (2008)
Annojahnina	1737	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999)
Chatenaytrienina	1761	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999)
Trilobalicina	1738	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Membrarollina	1750	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Bullacina	1756	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Purpurenina	1751	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Microcarpacina	1740	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Rollinacina	1731	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Rollitacina	1743	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Carolina	1749	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Tonkinesina	1737	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Tonkinina	1738	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Annoglacina B	1735	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).
Goniotrionina	1721	Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999).

Al evaluar los gráficos N°6, 7 y 8 se observa: en el gráfico N° 6 se aprecia un pico definido con una banda de absorción de $1736,68\text{ cm}^{-1}$; en el gráfico N°7 se aprecia un pico definido con una banda de absorción de $1737,28\text{ cm}^{-1}$ coincidiendo con el valor de la ACG Dieposabadelin (ver tabla N°19) y en el gráfico N°8 se observa un pico bien definido con una banda de absorción de $1736,02\text{ cm}^{-1}$. Observamos un intervalo de absorción de banda entre 1721 y 1761 cm^{-1} (ver tabla N°19). Aunque los valores de los gráfico N° 6 y 8 no coinciden con los valores de las referencias, están dentro de los intervalos de valores mínimo y máximo de la tabla N°19, por ello se concluye que es posible la presencia de ACG en los extractos obtenidos en esta investigación. Se aclara que para afirmar la presencia de Acetogeninas en los extractos se deben realizar otros pasos para la purificación de las Acetogeninas, ya que en los extractos obtenidos se tienen todos los compuestos presentes en la hoja de *Annona Muricata*, para luego realizar un análisis por NMR y HPLC.

APORTES DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo de investigación experimental sobre dos métodos para la extracción de acetogeninas de la hoja de *Annona Muricata*, deja como aporte a la comunidad científica lo siguiente:

- Hay posible presencia de Acetogeninas en las hojas de la *Annona Muricata*.
- Este trabajo especial de grado representa la apertura de una línea de investigación dado que es el primer estudio realizado en la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela, sobre la extracción de los componentes de la hoja de *Annona Muricata*.
- El método Soxhlet es un método valido confiable y sencillo para la extracción de componentes de la hoja de *Annona Muricata*.

CONCLUSIONES

Una vez concluida la presente investigación se puede afirmar lo siguiente en función de los objetivos planteados:

- 1) Al comparar los rendimientos obtenidos mediante los dos métodos de extracción utilizados, se puede concluir que el método Soxhlet permite obtener un mayor rendimiento que el método de Hidrodestilación, garantizando más absorción de los compuestos de la hoja de *Annona Muricata*. Desde el punto de vista de ingeniería, este resultado se traduciría en alta eficiencia en la extracción.
- 2) La extracción de los compuestos polares de la hoja *Annona Muricata* fue realizada empleando etanol y metanol como solventes; se obtuvo un porcentaje de extracción bajo las condiciones óptimas determinadas: relación solvente-soluto (1:40) y tiempo de contacto (6 horas), sin variación significativa. La elección del solvente para ser empleada con fines farmacéuticos dependerá de los ensayos biológicos y su reactividad hacia diferentes enfermedades.
- 3) La caracterización realizada mediante espectroscopía de infrarrojo, a pesar de no ser concluyente para la identificación de las familias de compuestos presentes en la hoja de la *Annona Muricata*, revela indicios de la existencia de acetogeninas. Sin embargo son necesarios análisis posteriores de RMN y espectrometría de masas su identificación correcta.

RECOMENDACIONES

A continuación, las recomendaciones que surgen luego de realizar este trabajo de investigación, a fines de

- Lograr una mayor purificación de los extractos obtenidos.
- Realizar un análisis de HPLC y RMN a los extractos obtenidos para caracterizar y cuantificar las muestra.
- Probar con relaciones mayores a 1:40 a fin de observar si se logran mejores rendimientos.
- Realizar el estudio con otros métodos de extracción como microondas o lixiviación para comparar porcentajes de extracción.
- Realizar nuevamente análisis IR con muestras puras de Acetogeninas para tener el espectro característico de ella.

REFERENCIAS

- Alali, F., Lui, X. y Mc Laughlin, J. (1999). Annonaceous acetogenins: Recent progress. *J Nat Prod.* 62(3): 504-540.
- Álvarez, A. y Burgos, F. (2012). Obtención de Pectina de la cáscara de la parchita amarilla (*Passiflora Edulis* F. *Flavicarpa*). Trabajo Especial de Grado. Inédito. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Arias, D y López, A. (2013). Comparación de los métodos de Extracción de la Pectina contenida en el albedo de la naranja. Trabajo Especial de Grado. Inédito. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Barahona, V. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante y valor nutracéutico de las hojas y frutos de la guanábana (*Annona Muricata*). Trabajo especial de grado. Inédito. Escuela superior politécnica de Chimborazo, Rimbomba.
- Bajin ba Ndob. y otros (2009). Annonaceous Acetogenins: Precursors from the Seeds of *Annona Squamosal*. *Phytochemistry Letters* 2: 72-76.
- Bermejo, A. y otros (2005). Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep* 22 (3): 269-303.
- Bermúdez, L. (2015). Determinación del porcentaje de humedad y tamaño de partícula óptimo por el rendimiento del método Soxhlet en la hoja de la *Annona Muricata* (guanábana). Pasantías de investigación. Inédito. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Bobadilla, M. y otros (2005). Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona Muricata* Linnaeus (guanábana) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Rev. Perú. Biol.* 12(1): 145-152.
- Caldas, A. (2012). Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido. Trabajo Especial de Grado. Inédito. Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Caldas, E., Cortés, J. y Cortés, F. (2014). Extracción y caracterización de aceite de Naidí. *Revista NOOS.* 6: 13-20.
- Capítulo 4. Técnicas de extracción y concentración (s.f). Consultado el 29 de julio de 2015. Universidad Nacional Abierta y a Distancia: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401552/Capitulo_4/42hidrodestilación.html
- Cabra, J., Sánchez, R. y Mejía, A. (2012). La guanábana una nutritiva fruta del trópico americano con un mercado rentable y promisorio. *Revista optimización de la cadena productiva.* 3: 132-136.

Cruz, L. y Hernández, H. (2007). Precios de la guanábana en Venezuela. UNESUR. Consultado el 24 de septiembre del 2015. Página web: www.guanabanaunesur.blogspot.com

Domínguez, C. (2011). Determinación del método de extracción y las condiciones de operación óptimas para la extracción de la pectina de la cáscara de la parchita amarilla (*Passiflora Edulis* F. *Flavicarpa*). Trabajo Especial de Grado. Inédito. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Escobar, T. (1991). Consideraciones para iniciar el mejoramiento de la guanábana. Memorias 1er curso Nutricional de Guanábana. Ibagué, Colombia: 225-230.

Flórez, Y. y Martínez, E. (2010). Obtención y evaluación de extractos Bioactivos presentes en semillas de *Annona Muricata* de la región cafetera. Trabajo de grado. Universidad Tecnológica de Pereira: Pereira, Colombia.

Gamse, T. (2002). "Liquid - liquid extraction and solid-Liquid extraction". Institute of Thermal Process and Environmental Engineering. Graz University of Technology. Austria.

García, K. (2009). Aislamiento y caracterización estructural de Acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona Cherimolia* y *Annona Muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. Trabajo de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México D.F.

Gavamukulya, Y. y otros (2014). Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona Muricata* Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.

Gennaro A. (2003). Remington Farmacia. 20° Edición. Tomo 1. Editorial Medica panamericana. Madrid, España.

Geum-Soog, K. y otros (1998). Muricoreacin and murihexocin C, Mono-tetrahydrofuran acetogenins, from leaves of *Annona Muricata*. *Phytochemistry* 49(2): 565-571

Gleyen, C y otros (1999). Insolation and structure elucidation of sabadelin, an acetogenin from roots of *Annona Muricata*. *Phytochemistry*. 52:1403-1408.

Gleyen, C. (2008). Annonacina, un inhibidor lipofílica del complejo I mitocondrial, induce la neurodegeneración nigral y Eestriado en ratas: posible relevancia para el Parkinsonismo atípico en Guadalupe. Obtenida el 8 de junio de 2015, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14675150>.

Goncalves, G (s.f). Extracto en extractor Soxhlet. Obtenidas el 29 de julio de 2015, de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAelB0AC/relatorio-extracao-extractor-sohlet>.

Guillen J. (ULA) (s.f). Reglas de solubilidad, Química General. Universidad De Los Andes. Consultado el 18 de octubre 2015. Página web: webdelprofesor.ula.ve/farmacia/juanguillen/PDF/Teoria/Tema_3/Tema_3.

Kratchanova, M., Pavlova, E. y Panchev, I. (2003). "The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin". *Carbohydrate Polymers* (56), 181-185. Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences. Bulgaria.

Landaeta, F. y Orta, L. (2010). "Extracción de la pectina de la semilla del mango (*Mangifera Indica L.*)". Trabajo Especial de Grado. Inédito. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Le Ven, J. y otros (2012). Comprehensive characterization of Annonaceous acetogenins within a complex extract by HPLC-ESI-LTQ-OrbitrapW using post-column lithium infusion. *Journal of Mass Spectrometry*, 47 : 1500 – 1509.

Makabe, H., Konno, H. y Miyoshi, H. (2008). Current topics of organic and biological chemistry of annonaceous acetogenins and their synthetic mimics. *Curs Durg Discov Technol* 5(3): 213-229.

Murillo, Y. (2001). Annonaceae de Colombia. *Bio Colombia*. 2: 49-58.

Núñez, C. (2008). Extracción con equipo Soxhlet. Consultado: el 24 de septiembre del 2015. Pag web: www.cenunez.com.ar

Ortuño, M. (2006). "Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes". Ediciones AIYANA. España. 22.

Pavia D. (2001). *Introduction to Spectroscopy*. Tercera edición. Books/cole. Canada.

Química Unam (s.f). Consultado el 12 de julio del 2015. Página web: (quimica.unam.mx/ING/pdf/12etanol.pdf)

Química Unam (s.f). Consultado el 12 de julio del 2015. Página web: (quimica.unam.mx/ING/pdf/9metanol.pdf)

Quispe, A. y otros (2007). Efecto citotóxico de *Annona Muricata* (guanábana). Obtenido el 23 de septiembre del 2015. Página web: [Ciencia%20e%20Investigación%20Médica%20Estudiantil%20Latinoamericana%20-%20%20B%20Efecto%20citotóxico%20de%20Annona%20muricata%20\(guanabana\)%20en%20cultivo%20de%20líneas%20celulares%20de%20adenocarcinoma%20gástrico%20y%20pulmonar%20%20B%20.html](http://Ciencia%20e%20Investigación%20Médica%20Estudiantil%20Latinoamericana%20-%20%20B%20Efecto%20citotóxico%20de%20Annona%20muricata%20(guanabana)%20en%20cultivo%20de%20líneas%20celulares%20de%20adenocarcinoma%20gástrico%20y%20pulmonar%20%20B%20.html)

Ríos, D. y Corrales, D. (2003). Caracterización de la guanábana, elita, chirimoya y otros anonáceas promisorias para Colombia. *Rev. Biotec.* 3: 180-2000.

Sánchez, M. y Aguirreolea, J. (1996). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid. 49-90

Schlie, M., Gonzalez, A. y Luna, L. (2009). Las Acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile.

Solidoro, A. (2006). Cáncer del siglo XXI. Acta Médica Peruana. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal, Sistema de Información Científica. Lima, Perú.

Soxhlet Extractors (2014). Extractor Soxhlet. Mindiamart. Obtenido el 8 de agosto del 2015. Página web: <http://trade.indiamart.com/details.mp?offer=6794651397>.

Thornton, R. y Neilson, R. (1998). Química Orgánica. Editorial Pearson Educación. 5ta Edición. México.

Urdaneta, J. (2013). Guanábana gigante. El cultivo del fruto. Consultado el 20 de septiembre del 2015. Página web: www.guanabanagigante.com

Weiniger, S. y Stermitz F. (1988). Química Orgánica. Editorial Reverenté, S. A. Barcelona – Bogotá – Buenos Aires – Caracas – México.

Yang, H. y otros (2008). Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight Annonaceous Acetogenins in annona genus plant seeds by HPLC–DAD method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 49:140-144.

Zafra-polo y otros (1998). Natural acetogenins from annonaceae synthesis and mechanism of action. Phytochemistry 48(7): 1087-1117.

Zh-Ming Gu y otros (1996). Five novel mono-tetrahydrofuran ring from the seed of Annona Muricata. J Nat. Prod 59: 100-108.

APÉNDICE

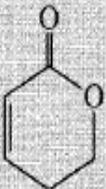
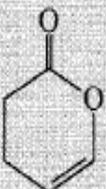
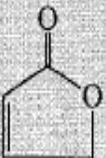
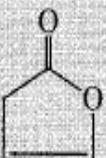
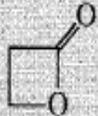
El apéndice A nos permite encontrar por los grados de libertad y el valor de p el valor comparativo para concluir si la diferencia de dos valores es significativa.

Apéndice A Distribución t para el cálculo de la significancia

Tabla A.2. La distribución t .

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de t para valores de P de número de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Apéndice B. número de onda del anillo lactónico

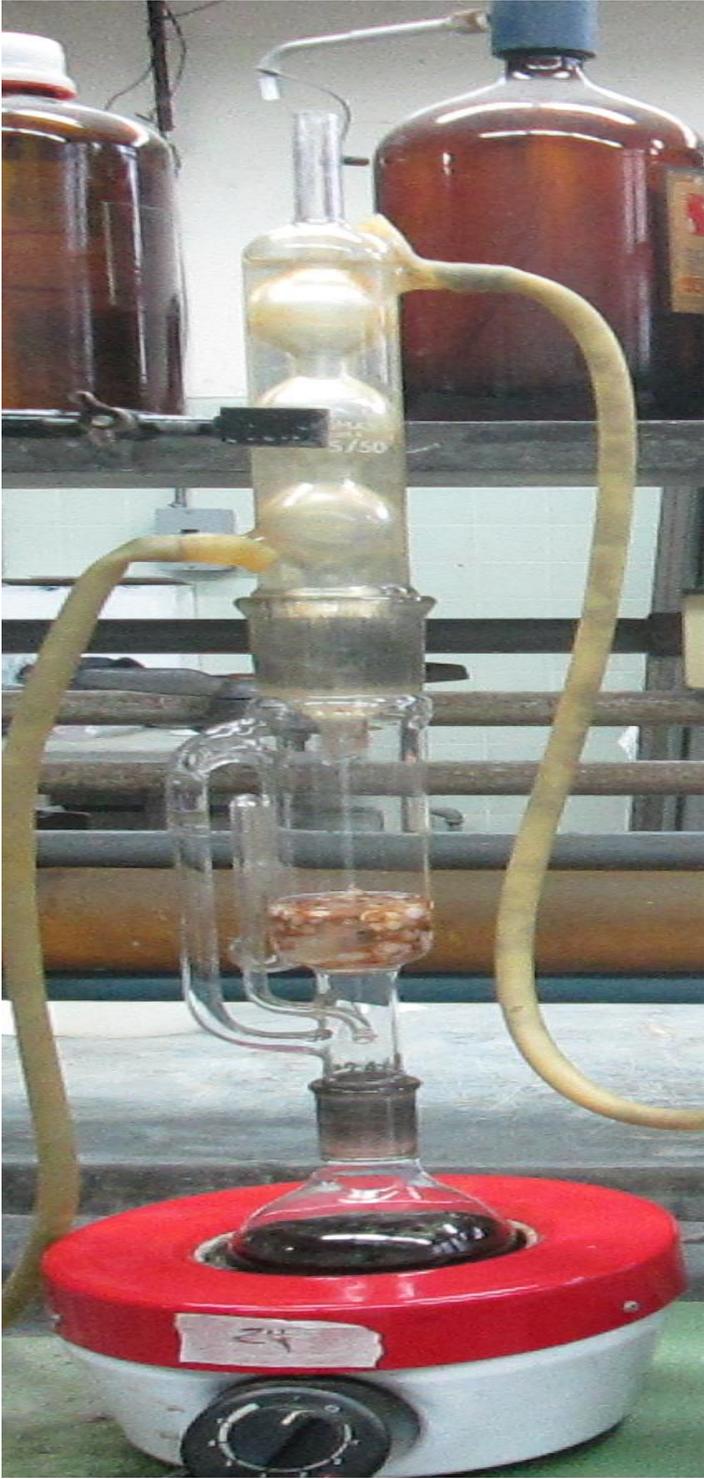
Ring-Size Effects (cm^{-1})	α, β Conjugation (cm^{-1})	Conjugation with Oxygen (cm^{-1})
 1735	 1725	 1760
 1770	 1750	 1800
 1820		

ANEXOS

Anexo N° 1 Equipo Hidrodestilación



Anexo N° 2 Equipo Soxhlet



Anexo N° 3 Equipo de infrarrojo

