

Contenido de acetogeninas a partir de semillas del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.): Evaluación de diferentes condiciones de extracción

Acetogenin content from soursop fruit (*Annona muricata* L.) seeds: Evaluation of different extraction conditions

Aguilar-Hernández G^{1,2}, Zepeda-Vallejo LG³, García-Magaña ML¹, López-García UM¹, Aguilera-Aguirre S¹, Montalvo-González E^{1*}

¹ Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico 2595 Fracc. Lagos del Country, Tepic, Nayarit 63175, México.

² Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara. Ave. Rafael Casillas Aceves 1200, Guadalajara 47600, México.

³ Departamento de Química Orgánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Av. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas, Delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, 11340, México.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la extracción de acetogeninas (ACGs) de semillas de guanábana usando diferentes disolventes, métodos y número de extracciones. El trabajo se desarrolló en cuatro ensayos. En el primer ensayo se evaluaron siete disolventes (metanol, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, éter dietílico, hexano, y éter de petróleo) para extraer ACGs de semillas mediante extracción asistida con ultrasonido (EAU). En el segundo ensayo se comparó la EAU, método soxhlet y disolventes, para obtener ACGs de semillas desengrasadas. En el tercer ensayo se evaluó el efecto del disolvente y número de extracciones con EAU, sobre el contenido de ACGs en endospermo desengrasado. En el cuarto ensayo, se identificaron ACGs. Se observó una mayor presencia de ACGs en los extractos de semillas completas sin desengrasar, con metanol y acetato de etilo. La EAU extrajo más ACGs a partir de la semilla completa desengrasada. Sin embargo, usando el endospermo desengrasado, EAU y cinco extracciones con metanol por 50 min cada una, se obtuvo el mayor contenido de ACGs (25.14 mg/g base seca). Se identificaron dos ACGs (annonacina, y pseudoannonacina) en proporción 73:27. Estas últimas condiciones, son una alternativa para aumentar el rendimiento de extracción de ACGs de semillas de *A. muricata*.

Palabras claves: *Annona muricata*, acetogeninas, semillas, método soxhlet, extracción asistida con ultrasonido.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of soursop seeds acetogenins (ACGs) extraction methods, using different solvents, methods, and the number of extractions. The work was carried out in four trials. In the first trial, seven solvents (methanol, ethyl acetate, dichloromethane, chloroform, diethyl ether, hexane, and petroleum ether) were evaluated to extract ACGs from seeds by ultrasound-assisted extraction (UAE). In the second trial, UAE, soxhlet method, and solvents were compared to obtain ACGs from defatted seeds. In the third trial, the effect of solvents and the number of extractions by UAE on the content of ACGs in defatted endosperm was evaluated. In the fourth trial, ACGs were identified. The

highest presence of ACGs was observed in extracts obtained from defatted whole seeds with methanol and ethyl acetate. UAE extracted more ACGs from the defatted whole seed. However, the highest ACG content (25.14 mg/g dry basis) was obtained using the defatted endosperm, UAE, and five extractions with methanol for 50 min each. Two ACGs were identified (annonacin and pseudoannonacin) in proportion 73:27. The latter conditions are an alternative to increasing the extraction yield of ACGs from *A. muricata* seeds.

Keywords: *Annona muricata*, acetogenins, seeds, soxhlet method, ultrasound-assisted extraction.

INTRODUCCIÓN

Annona muricata (*A. muricata*) mejor conocida como guanábana es un fruto tropical altamente consumido en México por su exquisito sabor, aroma y valor nutrimental. Este fruto es muy apreciado por sus compuestos bioactivos (CB) y entre los más importantes están las acetogeninas (ACGs) (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020; León-Fernández *et al.*, 2016). Las ACGs son moléculas con cadena alifática de 35 a 37 átomos de carbono, unidas a uno, dos o tres anillos de tetrahidrofurano o tetrahidropirano en su región central; por lo que sean reportado más de 500 tipos de ACGs. La cadena alifática también presenta varios grupos oxigenados (OH) y una γ -lactona terminal α - β -insaturada o saturada, reordenada a veces para producir una cetolactona (Rupprecht *et al.*, 1990; Bermejo *et al.*, 2005). Las ACGs son compuestos considerados de alto interés farmacéutico debido a que a dosis muy bajas, pueden inhibir la actividad de la NADH ubiquinona oxidoreductasa del complejo I mitocondrial, y la NADH oxidasa de la membrana plasmática en células cancerosas, lo que reduce la producción de ATP de las células y por lo tanto su muerte (Bermejo *et al.*, 2005). Debido al mecanismo de acción de las ACGs, se ha demostrado su efecto anti-tumoral en una gran cantidad de modelos celulares cancerosos *in vitro* e *in vivo* (Coria-Tellez *et al.*, 2018; Neske *et al.*, 2020).

Por su importancia biológica, las ACGs se han aislado de diversas partes de las plantas de anonáceas, incluyendo el fruto de *A. muricata*; sin embargo, las semillas son las que presentan el mayor contenido de estos compuestos (Durán-

Ruiz *et al.*, 2019; Aguilar-Hernández *et al.*, 2020). Para obtener los extractos crudos y/o fracciones purificadas de ACGs de anonáceas, se han utilizado diferentes solventes: hexano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, metanol y etanol; esto debido a que la estructura química de las ACGs es variada y pueden tener baja polaridad baja (solubles en hexano), polaridad intermedia (solubles en cloroformo, diclorometano y acetato de etilo), y alta (solubles en metanol y etanol), pero son insolubles en agua (Bermejo *et al.*, 2005; Ranisaharivony *et al.*, 2015; León-Fernández *et al.*, 2017; Aguilar-Hernández *et al.*, 2020).

En adición, las tecnologías de extracción de ACGs mayormente reportadas son: fluidos supercríticos (FSC), maceración y método Soxhlet. Con el uso de FSC utilizando como fluido CO₂ y como co-solvente etanol, se obtuvieron concentraciones de 0.10-0.37 mg/g de ACGs a partir de semillas de *A. muricata*, identificando ocho ACGs (12,15-cis-squamostatina-A, squamostatina-A, bullatacina, squamostatina-D, squamocina, isodesacetilivaricina, asiminecina y desacetilivaricina) (Yang *et al.*, 2009). Por otro lado, con el uso de maceración con cloroformo por 7 días, se obtuvo solo el 0.13% de rendimiento de ACGs totales de semilla de *A. muricata* (Aguilar-Hernández *et al.* (2020)); mientras que por el método Soxhlet con metanol por 13 h, Ranisaharivony *et al.* (2015) reportan 0.067% de ACGs purificadas (annonacina, murisolina, annonacinona) a partir de la misma materia prima. Por los rendimientos de extracción de ACGs tan bajos hasta ahora reportados, se siguen estudiando nuevas tecnologías de extracción, y una alternativa es la extracción asistida con ultrasonido (EAU).

La EAU es considerada, una tecnología “verde” o emergente debido a que es fácil de escalar, bajo costo, uso de menor cantidad de solventes, tiempos de extracción corto y con mayores rendimientos (Chemat *et al.*, 2017; Aguilar-Hernández *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). El mecanismo de extracción consiste en la generación de numerosas microburbujas por efecto de la cavitación; éstas crecen exponencialmente y finalmente colapsan violentamente liberando una alta energía en el medio. Esta energía causa la ruptura de células, lo que a su vez, incrementa el área de superficie de contacto entre el compuesto a extraer y el solvente, facilitando su extracción (Chemat *et al.*, 2017). Hoy en día, existen una gran cantidad de estudios usando la EAU para extraer diversos compuestos bioactivos de diferentes plantas (Mohammadpour *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020); sin embargo, esta tecnología ha sido muy poco explorada para extraer ACGs de anonáceas.

En nuestro grupo de investigación se ha utilizado la EAU para extraer ACGs de *A. muricata*. En un primer estudio, León-Fernández *et al.* (2016), reportó que el uso de baño ultrasónico (42 kHz, 3 h) aumentó la extracción de ACGs en la pulpa de guanábana, aunque solo reportan el resultado de manera cualitativa. Aguilar-Hernández *et al.* (2020), optimizaron condiciones de EAU (tiempo de extracción 15 min, pulsos-ciclos 0.7 s, amplitud 100%) usando un equipo con sonda ultrasónica de manera directa, para obtener ACGs de semilla completa de guanábana. Estos autores utilizaron como

disolvente, cloroformo y obtuvieron una mayor concentración (13.01 mg/g) de ACGs comparada con los siete días de extracción por maceración (1.31 mg/g). Sin embargo, a pesar de haberse reportado las primeras condiciones optimizadas de EAU de ACGs en semillas y subproductos de frutos de *A. muricata*, no se evaluaron otros factores que intervienen en la eficacia de la extracción, tales como: preparación de materia prima, diferentes disolventes de extracción, mayor tiempo de extracción y número de veces que se requiere hacer la extracción en la misma matriz. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes disolventes, dos métodos de extracción (EAU y método soxhlet) y aumentar el número y aumentar el número de extracciones para obtener acetogeninas a partir de semillas del fruto de guanábana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Los frutos de *A. muricata* fueron recolectados en un huerto localizado en el municipio de Compostela, Nayarit, México, y se almacenaron hasta que alcanzaron la madurez de consumo (15-19 °Brix). Se despulparon los frutos para obtener las semillas, las cuales se secaron en horno (Memmert LL-50, Schwabach, Alemania) durante 24 h a 50 °C. El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en cuatro ensayos, que se describen a continuación.

Efecto de diferentes disolventes en la extracción de ACGs, a partir de semillas completas usando la EAU

Se usaron semillas completas secas y se pulverizaron en un molino multifuncional de alta velocidad (CGoldenWall HC-2000, San Francisco, CA, USA) hasta un tamaño de partícula de 80-300 µm. Se evaluaron siete disolventes (éter de petróleo, hexano, éter dietílico, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo y metanol) para extraer las ACGs. Las condiciones de EAU fueron: 15 min de extracción, pulsos-ciclos de 0.75 s y amplitud del 100 % (Aguilar *et al.*, 2020). Se empleó un sistema ultrasónico UP400S (400 W, frecuencia de 24 kHz) (Hielscher Ultrasonic, Teltow, Alemania). La sonda ultrasónica (H7 Tip 7, Hielscher, Teltow, Alemania), con máxima amplitud del 100 % (175 µm) y densidad de potencia acústica de 300 W/cm², se sumergió a 2 cm de la solución del extracto. Se colocaron 2 g de semillas completas molidas, en tubos de extracción con 15 mL de cada disolvente y se extrajeron bajo las condiciones antes mencionadas. Después, las muestras fueron centrifugadas (Hermle Z32HK, Wehingen, Alemania) a 9408 xg durante 5 min a 4 °C y los sobrenadantes se recuperaron para su análisis (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020).

Efecto del método y disolventes en la extracción de ACGs, a partir de semillas completas y desengrasadas

El polvo obtenido a partir de semillas completas se desengrasó utilizando el método de Soxhlet. La extracción de grasa se realizó con un equipo Soxhlet (Novatech VH-6, Jalisco, México) usando 10 g de muestra que se colocaron en el cartucho de extracción. Se añadieron 150 mL de hexano en el matraz Soxhlet y se realizó la extracción por 10 h (AOAC,

2005). Una vez que las muestras se desengrasaron, se secaron en el horno (Memmert LL-50, Schwabach, Alemania) durante 4 h a 50 °C.

Extracción de ACGs por los métodos de Soxhlet y ultrasonido

Para la extracción con el método soxhlet, se pesaron 10 g de muestra desengrasada seca y se colocaron en cartuchos de extracción. Se añadió al matraz 150 mL de cada disolvente de extracción, acetato de etilo y metanol, las cuales fueron seleccionados de acuerdo a los resultados cualitativos obtenidos en el primer ensayo. Después las muestras se colocaron en el equipo soxhlet durante 10 h (Durán-Ruiz *et al.*, 2019).

Para la EAU se tomaron los mismos gramos de muestra, se colocaron en un tubo de extracción y se añadió de manera directa 75 mL de cada uno de los disolventes seleccionados (acetato de etilo y metanol) y fueron ultrasonificados en el equipo de ultrasonido UP400S (400 W, frecuencia de 24 kHz) (Hielscher Ultrasonic, Teltow, Alemania) con las siguientes condiciones: pulsos-ciclos 0.75 s, amplitud 100 % y se aumentó el tiempo de extracción por 2 h. Los extractos obtenidos por los dos métodos de extracción fueron centrifugados (Hermle Z32HK, Wehingen, Alemania) a 9408 xg durante 5 min a 4 °C y los sobrenadantes se usaron para su análisis.

Efecto de disolventes y número de extracciones usando la EAU, en el contenido de ACGs del endospermo desengrasado

Se utilizaron semillas secas, se eliminó el tegumento manualmente, luego los endospermos fueron pulverizados. Posteriormente, se llevó a cabo el desengrasado de la muestra con el método Soxhlet como se mencionó anteriormente (AOAC, 2005), con modificaciones: se aumentó el tiempo de extracción de grasa por 24 h y se cambió el disolvente de extracción cada 8 h. Una vez que las muestras se desengrasaron, se secaron en el horno (Memmert LL-50, Schwabach, Alemania) durante 4 h a 50 °C. Después, se realizó la extracción de ACGs con EAU. Se inició el proceso colocando 5 g de muestra con 37.5 mL de cada disolvente (acetato de etilo y metanol, seleccionados desde el primer ensayo) en tubos de extracción y se extrajo por periodos de 50 min (5 veces) con pulsos-ciclos de 0.75 s y amplitud del 100 %. Los extractos obtenidos en cada tiempo fueron centrifugados (Hermle Z32HK, Wehingen, Alemania) a 9408 xg durante 5 min a 4 °C y los sobrenadantes se usaron para su análisis. Durante cada periodo de extracción, se llevó a cabo la medición de ACGs.

Análisis de la presencia y cuantificación de ACGs

Para los dos primeros ensayos, solo se evaluó la presencia de ACGs de manera cualitativa o visual; no se pudo realizar la cuantificación de estos compuestos por interferencias con lípidos presentes. Se hicieron reaccionar 250 µL de cada extracto y fueron mezclados con 2 mL del reactivo de Kedde (Aguilar *et al.*, 2020). En la reacción química, la gama lactona de las ACGs, reaccionan con el reactivo de Kedde (ácido 3,5- hidroxibenzoico disuelto en metanol y solución de

hidróxido de potasio al 5.7 %) formando un anión intermedio en medio alcalino, que se añade nucleofílicamente al ácido 3'5-dinitrobenzoico. Esto da como resultado un enlace C-C que produce un anión estable con una coloración de rosada que puede llegar hasta ser violeta si hay una alta concentración de ACGs (Cavé *et al.*, 1997). Los resultados se presentan como presencia o no de ACGs, considerando también de manera cualitativa, la intensidad de la coloración.

Para el tercer ensayo, fue posible realizar la cuantificación de ACGs. Se siguió el mismo procedimiento de reacción entre los extractos y reactivo de Kedde, y se midió la absorbancia a 505 nm en el espectrofotómetro (Jenway 6705, Dunmow, Reino Unido) en la mezcla de reacción. Se realizó una curva estándar de annonacina ($R^2=0.9745$) y los resultados se expresaron como contenido de acetogeninas totales (CAT) en miligramos equivalentes de annonacina por gramo de muestra seca (mg/g bs).

Cuantificación por HPLC e identificación por resonancia magnética nuclear (RMN) de ACGs aisladas del endospermo desengrasado

En este último ensayo, se extrajeron de nuevo las ACGs con EAU a partir del endospermo desengrasado y utilizando metanol como disolvente, el cual fue seleccionado en el tercer ensayo, por extraer el mayor contenido de ACGs. El extracto acetogénico crudo, se concentró a sequedad en un rotavapor (Yamato RE300, Tokio, Japón). El extracto seco (2 g) se sometió a una columna cromatográfica (6 cm x 25 cm). Como fase estacionaria se usó sílica gel (0.063-2 µm) y como eluyente inicial se utilizó una mezcla de diclorometano:acetato de etilo (2:1 v/v) con un aumento gradual de polaridad hasta finalizar con 100 % de etanol. Las fracciones se sometieron a cromatografía en capa fina (CCF) y reveladas con el reactivo de Kedde y Cerio/Molibdeno para confirmar la presencia o ausencia de ACGs (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020). De acuerdo a los resultados obtenidos en la CCF, se seleccionaron dos fracciones ricas en ACGs (F1 y F7).

Cuantificación de ACGs por HPLC

Las dos fracciones ricas en ACGs fueron resuspendidas en acetonitrilo grado HPLC, se inyectaron (20 µL) en un sistema de HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de arreglo de diodos y una columna de fase reversa C18 (tamaño de partícula de 5 µm, 4.6 mm de diámetro y 250 mm de largo; Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Como fases móviles se utilizó un gradiente constituido por acetonitrilo (eluyente A) y agua (eluyente B). Los estándares y las muestras se analizaron inicialmente con: 60 % A, 0-30 min; 70 % A; 35-40 min, 60 % A; 41-60 min, a un flujo de 0.8 mL/min. Las áreas de los picos en las fracciones analizadas se detectaron a 210 nm y para cuantificar las ACGs se utilizaron curvas de calibración de dos acetogeninas.

Identificación por RMN de ACGs

La fracción F7 fue seleccionada para separar ACGs individuales por medio del HPLC semi-preparativo (Agilent

Technologies 1260 Infinity, Waldbronn, Alemania). Se usó una columna semipreparativa en fase reversa C18, con tamaño de partícula de 8 μm , diámetro de 21.4 mm y longitud de 250 mm (Varian Dynamax). Como fases móviles se utilizaron acetonitrilo (eluyente A) y agua (eluyente B) con un gradiente al 60 % A, 0-30 min; 70 % A; 35-40 min, 60 % A; 41-80 min, flujo de 1.2 mL/min y longitud de onda de 210 nm. Se colectaron aproximadamente 50 mL del pico que presentó mayor área en tubos de vidrio y fueron concentrados hasta sequedad con aire. Las ACGs presentes en el pico colectado, fueron analizadas por resonancia magnética nuclear (RMN).

Para la identificación estructural de las ACGs se usó un equipo de RMN de 500 MHz (Varian VNMR System, Walnut Creek, CA, USA). El procedimiento consistió en colocar de 1-10 mg de muestra disuelta en 0.5 mL de cloroformo deuterado en tubos para RMN. Se obtuvieron espectros en 1D en la frecuencia de ^1H , ^{13}C , y mediante técnicas 2D de correlación homo (COSY) y heteronucleares (HSQC). Los desplazamientos químicos (ppm o δ) fueron asignados con respecto a la señal de referencia del tetrametilsilano (TMS).

Análisis de datos.

El análisis estadístico se aplicó para los datos obtenidos en el tercer ensayo y cuarto ensayo. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía por separado, para evaluar el efecto del número de veces de extracción (5 niveles), el efecto del tipo solvente (2 niveles) y el número de fracción de ACGs aisladas (2 niveles). Además se realizaron prueba de medias usando t-Student para comparación de dos tratamientos y prueba de medias de Tukey para comparar más de dos tratamientos, a un nivel de confianza del 95 %. Se usó el programa STATISTICA (v.8 StatSoft, Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes disolventes en la extracción de ACGs, a partir de semillas completas usando la EAU

En la Tabla 1, se observan los resultados de la presencia cualitativa de ACGs en todos los extractos obtenidos. Al realizar la reacción de las ACGs con el reactivo de Kedde, la mezcla de reacción se tornó de color rosado, característico de la presencia de ACGs; sin embargo la solución no fue transparente, si no turbia o blancuzca tipo emulsión. Por lo anterior, no se pudo cuantificar el CAT; sin embargo, visualmente se observó que en los extractos de acetato de etilo y metanol, el color rosado fue más intenso, por lo que se pudo inferir que en estos extractos había mayor presencia de ACGs. Los lípidos extraídos de las semillas (sin desengrasar) se solubilizaron en los solventes apolares (éter de petróleo, hexano, éter dietílico, cloroformo, diclorometano y acetato de etilo). Aunque el metanol es mayormente polar y no solubiliza los lípidos, la ruptura de las células generada por la alta energía del ultrasonido ocasionó que los lípidos estuvieran presentes en el extracto metanólico (Ketenoglu, 2020). La presencia de lípidos en los extractos, interfirió en la reacción para la cuantificación espectrofotométrica de las ACGs; debido a que en la reacción se agrega KOH para mantener un medio alcalino,

Tabla 1. Presencia cualitativa de acetogeninas en los extractos obtenidos con cada disolvente de extracción (metanol, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo), usando la extracción asistida con ultrasonido, a partir de semillas completas de *A. muricata*.
Table 1. Qualitative presence of acetogenins in extracts obtained with each extraction solvent (methanol, ethyl acetate, dichloromethane, chloroform, diethyl ether, hexane and petroleum ether), using ultrasound-assisted extraction from whole seeds of *A. muricata*.

Tratamiento	Disolvente	Presencia cualitativa de acetogeninas
1	Metanol	+++
2	Acetato de Etilo	+++
3	Diclorometano	+
4	Cloroformo	++
5	Éter dietílico	+
6	Hexano	+
7	Éter de petróleo	+

El mayor número del símbolo "+" indica un color rosado visualmente más intenso en la mezcla de reacción; lo cual infiere que hubo un mayor contenido de ACGs en el extracto.

lo que condujo a la saponificación de los lípidos, presentes en los extractos con dicha base (Proaño *et al.*, 2015).

Por otro lado, la mayor presencia de ACGs en los extractos con acetato de etilo y metanol se atribuye a que las ACGs tienen grupos funcionales polares, como grupos hidroxilos (-OH) y un grupo lactónico; así como grupos funcionales apolares, como anillos de tetrahidrofurano y cadena de carbonos; por lo tanto, los compuestos acetogénicos son solubilizados por solventes con polaridad de intermedia a alta, sin ser solubles en agua (Rupprecht *et al.*, 1990; Bermejo *et al.*, 2005). Es conocido que una sustancia es soluble en un disolvente cuando las fuerzas intermoleculares que unen a las moléculas de cada sustancia son menores o similares a las fuerzas de interacción con el disolvente, de tal manera que estas últimas pueden superar las fuerzas intermoleculares del soluto, solubilizándolo o disociándolo (Hassan *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2020).

Los resultados cualitativos de ACGs, fueron de mucha utilidad ya que a partir de ellos se seleccionaron como disolventes de extracción de ACGs, el acetato de etilo y metanol; además de desengrasar la materia prima.

Efecto del método y disolventes en la extracción de ACGs, a partir de semillas completas y desengrasadas

En el desengrasado de la semilla molida entera se obtuvo 27 % de grasa. Sin embargo, de nueva cuenta se pudo observar, que aun cuando se hizo un desengrasado de la muestra por 10 h, al hacer la reacción de los extractos con el reactivo de Kedde, se siguió presentando turbidez en la mezcla de reacción, siendo mayor en los extractos con acetato de etilo. Esto indicó que el tiempo de desengrasado, no fue suficiente para extraer todos los lípidos de las semillas. Así, tanto el método soxhlet como la EAU extrajeron los lípidos restantes de la materia prima, probablemente con mayor contenido de lípidos en el extracto de acetato de etilo por

tener menor polaridad que el metanol y solubilizar más fácilmente estos compuestos. Además, se observó que el dejar el tegumento en la semilla, el cual tiene un color café oscuro, provocaba cambios de color importante en los extractos, con cualquiera de los dos métodos de extracción.

En este estudio también se obtuvieron resultados positivos de la presencia cualitativa de las ACGs. Cuando se utilizó la EAU para extraer las ACGs, usando cualquiera de los dos solventes, se observó una mayor presencia de ACGs en comparación con el método Soxhlet (Tabla 2). Además, el tiempo de extracción con EAU fue 5 veces menor que usando el método soxhlet. La disminución en el tiempo de extracción y mayor presencia de ACGs por la EAU, se atribuye al fenómeno de cavitación. Este fenómeno provoca el agrandamiento de los poros de la pared celular, reduce el tamaño de las partículas del material vegetal por desintegración ultrasónica, que a su vez aumenta el número de células expuestas directamente al disolvente, causando una mayor extracción (Al-Dhabi *et al.*, 2016). Así mismo, la extracción de compuestos bioactivos mediante sonicación provoca la aceleración de las partículas, que a su vez inducen al soluto a pasar rápidamente al disolvente aumentando su difusividad en el tejido vegetal. Es necesario que el compuesto de interés sea altamente soluble en el disolvente para aumentar la eficiencia de extracción (Chemat *et al.*, 2017).

Tabla 2. Presencia cualitativa de acetogeninas en los extractos obtenidos con dos métodos de extracción (Soxhlet y EAU) y dos solventes (metanol y acetato de etilo), a partir de semillas completas desengrasadas (10 h) de *A. muricata*.

Table 2. Qualitative presence of acetogenins in *A. muricata* defatted (10 h) whole seeds extracts, obtained with two methods (Soxhlet and UAE) and two solvents (methanol and ethyl acetate).

Método de extracción	Disolvente	Presencia cualitativa de acetogeninas
Soxhlet	Metanol	+
Soxhlet	Acetato de etilo	+
EAU	Metanol	++
EAU	Acetato de etilo	++

EAU = Extracción asistida por ultrasonido. El mayor número del símbolo "+" indica un color rosado visualmente más intenso en mezcla de reacción; lo cual indica que existe un mayor contenido de ACGs en el extracto.

No fue posible evaluar de manera cualitativa el efecto del disolvente en la extracción de ACGs, ya que la intensidad en la coloración rosada por la presencia de ACGs, visualmente era similar tanto en el extracto metanólico como en el extracto con acetato de etilo. Así, se decidió realizar el tercer ensayo experimental, conservando los mismos solventes de extracción, se eliminó el tegumento de las semillas, se desengrasó el endospermo por más tiempo y se usó EAU como método de extracción.

Efecto de disolventes y número de extracciones usando la EAU, en el contenido de ACGs del endospermo desengrasado

En este ensayo, se encontró que con el aumento del tiempo de extracción de grasa a 24 h y el cambio de disolvente cada 8 h, se logró incrementar el contenido de grasa extraída del endospermo en un 31 %. Se han reportado 20-22 % de grasa total en semilla de *A. muricata* (Onimawo, 2002; Fasakin *et al.*, 2008); sin embargo, los tiempos de extracción de grasa usados son de 6 h, por lo que la cantidad de grasa reportada es menor a lo encontrado en este experimento.

Con las condiciones de desengrasado usadas en este ensayo, se demostró que no hubo presencia de lípidos en los extractos acetogénicos debido a que ya no se presentó turbidez cuando se indujo la reacción de Kedde, por lo que se realizó la cuantificación de ACGs, sin interferencias. En la Tabla 3 se muestran los resultados de la cuantificación de ACGs. Hubo efecto significativo ($p < 0.05$) del número de veces de extracción. El mayor contenido de ACGs se obtuvo en la primera extracción cuando se utilizó metanol como disolvente, después disminuyó gradualmente conforme avanzó el número de extracciones; mientras que con el acetato de etilo, el contenido de ACGs fue estadísticamente igual en las primeras tres extracciones y después disminuyó significativamente. Respecto al tipo de solvente, también se observó un efecto significativo ($p < 0.05$); estadísticamente fue mayor el CAT cuando se utilizó metanol en la primera extracción; solo en la tercera extracción fue mayor el CAT con acetato de etilo. No obstante, la cantidad final de ACGs fue mayor cuando se utilizó metanol (25.60 mg/g bs), respecto a cuando se usó acetato de etilo (23.62 mg/g bs). Estos resultados se deben a que las ACGs extraídas del endospermo con EAU, son mayormente polares, debido a que las ACGs se extrajeron en mayor cantidad en la primera y segunda extracción con metanol

Tabla 3. Contenido de acetogeninas totales (mg/g bs) obtenidas con extracción asistida con ultrasonido, cinco extracciones consecutivas y dos disolventes (metanol y acetato de etilo), a partir de endospermos desengrasados (24 h) de *A. muricata*.

Table 3. Total acetogenin content (mg/g bs) obtained with ultrasound-assisted extraction, five consecutive extractions and two solvents (methanol and ethyl acetate), from *A. muricata* defatted endosperms (24 h).

Número de extracciones	Extracción con metanol	Extracción con acetato de etilo
1	10.76 ± 0.02^{av}	5.45 ± 0.08^{bv}
2	5.77 ± 1.90^{aw}	6.96 ± 1.61^{av}
3	4.27 ± 0.09^{aw}	6.84 ± 1.45^{bv}
4	2.71 ± 1.13^{ax}	2.81 ± 0.98^{aw}
5	2.08 ± 0.99^{ax}	1.56 ± 0.01^{ax}
Contenido total de acetogeninas (mg/g bs)	25.60 ± 0.78^a	23.62 ± 0.74^b

Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$). Letras diferentes en la misma fila (a, b) indican diferencias estadísticas significativas por efecto del disolvente para cada extracción y las letras diferentes en la misma columna (w, x, y, z) indican diferencias estadísticas significativas por efecto del número de extracción con el mismo disolvente ($\alpha=0.05$).

(Morales *et al.*, 2004); aunque se requiere de 4 h de extracción con ultrasonido.

Comparando el CAT de semillas de *A. muricata* reportado en otros estudios, se encontró que Gromek *et al.* (1994) informaron un contenido de ACGs totales de 10-10.07 mg/g bs después de utilizar como solvente metanol y el método de maceración. Por su parte, Yang *et al.* (2009, 2010) reportaron un contenido de ACGs de 1.67-2.09 mg/g utilizando la extracción FSC; mientras que Aguilar-Hernández *et al.* (2020), usando la EAU con cloroformo reporta 13 mg/g bs. Por ende podemos asumir que con este tercer ensayo, se encontró una mejor alternativa para aumentar el rendimiento de extracción de ACGs a partir de semillas de *A. muricata*.

Cuantificación por HPLC e identificación por RMN de ACGs aisladas del endospermo desengrasado

En la Tabla 4 se puede observar los resultados de la cuantificación de ACGs aisladas por HPLC-DAD, en cada fracción obtenida. Las ACGs con mayor abundancia fueron dos ACGs: annonacina y pseudoannonacina, éstas fueron aisladas y cuantificadas. De acuerdo a Champy *et al.* (2009), la annonacina es una de las acetogeninas mas abundantes en *A. muricata*; sin embargo, la pseudoannonacina no ha sido reportada en semillas de esta especie, por lo que este es el primer estudio donde se reporta. Cabe mencionar que se detectaron más compuestos acetogénicos en las fracciones pero en baja abundancia.

Tabla 4. Cuantificación de annonacina y pseudoannonacina en fracciones ricas en acetogeninas obtenidas a partir del endospermo de las semillas de guanábana, usando extracción asistida con ultrasonido y metanol como solvente de extracción.

Table 4. Quantification of annonacin and pseudoannonacin in acetogenin-rich fractions obtained from soursop seed endosperm, using ultrasound-assisted extraction and methanol as extraction solvent.

Fracción	Annonacina (µg/g bs de endospermo)	Pseudoannonacina (µg/g bs de endospermo)
F1	6672.07 ± 36.29 ^a	4341.71 ± 81.11 ^a
F7	2095.08 ± 33.26 ^b	1792.38 ± 21.55 ^b
Total	8767.15 ± 2.14 ^a	6134.10 ± 45.37 ^b

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). bs= base seca.

La mayor concentración de ACGs se encontró en la fracción F7, siendo la annonacina la ACG predominante. Esto se debe a que para obtener esa fracción rica en ACGs, se uso una mezcla de separación mayormente polar. El contenido total de annonacina y de pseudoannonacina en el endospermo fue de 8767.15 y 6134.10 µg/g bs, respectivamente. El contenido de annonacina fue mayor a los reportes descritos por Wurangian (2005) y Ranisaharivony *et al.* (2015), quienes encontraron 450 µg/g bs y 470 µg/g de annonacina extraída de semillas de *A. muricata*, respectivamente; utilizando el método soxhlet con etanol como disolvente.

En la Figura 1(a) se muestra el espectro de RMN ^1H de las ACGs aisladas por HPLC semi-preparativo. Se pueden observar las expansiones de las señales anchas típicas del protón vinílico (δ 6.96-7.25, H-33), las señales cuádruples de las bases de oxígeno (δ 4.90-5.15, H-34) y las señales dobles del grupo metilo secundario (δ 1.32-1.46, H-35) ubicados en el anillo de la lactona. La integración de las resonancias de los protones vinílicos (H-33) y base de oxígeno (H-34) demuestran que se trata de las ACGs: annonacina y la pseudoannonacina y que corresponden para una proporción 73:27, respectivamente.

En la Figura 1(b) se muestra el espectro de RMN ^{13}C de las ACGs aisladas, en ella se pueden apreciar las señales características del anillo de la lactona terminal de las ACGs: en δ 174.8 (C-1) la señal del carbonilo de la lactona, en δ 152.1 (C-32) y 130.9 (C-2) se observan las señales del doble enlace $\text{CH}=\text{C}$, en δ 78.1 se encuentra la señal del grupo CH (C-34) base del metilo y oxígeno, mientras que la señal del metilo secundario aparece en δ 14.1 (C-35).

El espectro de correlación homonuclear (COSY) (Figura 1c) permitió establecer las correlaciones de las señales cuádruples que confirman la presencia de un anillo THF en

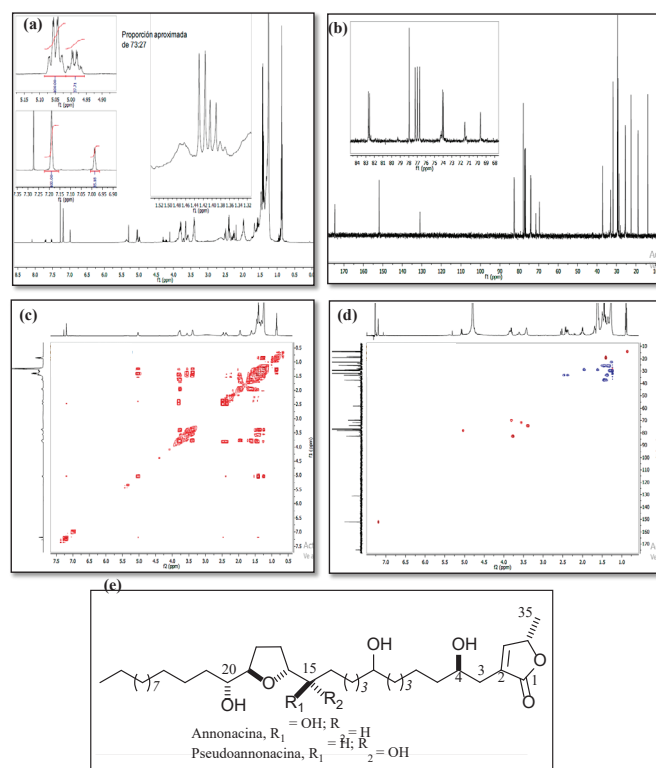


Figura 1. Espectros obtenidos por resonancia magnética nuclear (RMN) de acetogeninas aisladas por HPLC semi-preparativo. (a) Espectro de RMN ^1H . (b) Espectro de RMN ^{13}C . (c) Correlación homonuclear (COSY). (d) Correlación heteronuclear (HSQC). (e) Estructuras con estereoquímica relativa de la annonacina y la pseudoannonacina.

Figure 1. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of acetogenins isolated by semipreparative HPLC. (a) ^1H NMR spectrum. (b) ^{13}C NMR spectrum. (c) Homonuclear correlation (COSY). (d) Heteronuclear correlation (HSQC). (e) Structures with relative stereochemistry of annonacin and pseudoannonacin.

las ACGs (δ 3.2-3.8). Las correlaciones de los protones base de oxígeno del anillo THF con los multipletes cercanos a 1.63 y 1.32 ppm son las pertenecientes a los metilenos del mismo anillo (CH_2 -17 y CH_2 -18). La presencia del grupo OH en C-4 se confirmó por la correlación entre el grupo metileno (δ 2.25 y 2.75, CH_2 -3) con la base de oxígeno que aparece cerca de δ 3.75, la cual pertenece a H-4.

El espectro de correlación heteronuclear a un enlace (HSQC) (Figura 1d) permitió asignar el número de carbonos protonados, entre los que destacan aquellos que soportan grupos funcionales (doble enlace, bases de oxígeno), los adyacentes a estos grupos y los grupos metilenos de las ACGs. La estereoquímica relativa de los centros estereogénicos C-15, C-16, C-19 y C-20 se determinó aplicando la regla de Curran (Curran et al, 2006). En su conjunto, los experimentos de RMN mencionados permitieron determinar que las estructuras de este par de acetogeninas corresponden a la annonacina y la pseudoannonacina (Figura 1e), previamente aisladas de *A. muricata*.

CONCLUSIONES

Con los disolventes acetato de etilo y metanol se observó una mayor presencia de ACGs. Con la EAU se logró reducir significativamente el tiempo de extracción (~ 5 veces) y una mayor presencia de ACGs extraídas, comparando con el método Soxhlet. El desengrasado del endospermo de la semilla de *A. muricata*, el uso de metanol como solvente y la tecnología de ultrasonido (0.75 s pulso-ciclo y 100 % amplitud), con hasta cinco extracciones consecutivas de 50 min cada una, aumentaron el rendimiento de la extracción de ACGs hasta 2.5 %. Las ACGs aisladas en mayor concentración, fueron la annonacina y pseudoannonacina y este es el primer reporte donde se identificó esta última acetogenina. Con este estudio se destaca que las semillas de *A. muricata* son una fuente rica en acetogeninas y que la EAU es una alternativa tecnológica eficiente para extraer estos compuestos bioactivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Tecnológico Nacional de México (5089.19-P) y al CONACyT-México por la beca de posdoctorado otorgada a la Dra. Gabriela Aguilar-Hernández. Este trabajo forma parte de las actividades de la RED TEMATICA CONACYT 12.3, Reducir y Valorizar las Pérdidas y Desperdicios de Alimentos: Hacia Sistemas Alimentarios Sustentables.

REFERENCIAS

- Aguilar-Hernández, G., Vivar-Vera, M.D.L.A., García-Magaña, M.D.L., González-Silva, N., Pérez-Larios, A. y Montalvo-González, E. 2020. Ultrasound-assisted extraction of total acetogenins from the soursop fruit by response surface methodology. *Molecules*. 25: 1-10. <https://doi.org/10.3390/molecules25051139>
- Al-Dhabi, N.A., Pomurugan, K. y Maran, P. 2016. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 206-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18ª ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Bermejo, A.; Figadère, B.; Zafra-Polo, M.C.; Barrachina, I.; Estornell, E. y Cortes, D. 2005. Acetogenins from Annonaceae: Recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Products Reports*. 22: 269-303. <http://doi.org/10.1039/b500186m>
- Cavé, A.; Figadère, B.; Laurens, A. y Cortés, D. Acetogenins from Annonaceae. 1997. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, pp. 81-287. Springer: New York, NY, USA. http://doi.org/10.1007/978-3-7091-6551-5_2
- Champy, P., Höglinger, G. U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprevote, O., Medja, F., Lombes, A., Michel, P. P., Lannuzel, A., Hirsch, E. C. y Ruberg, M. 2004. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of Neurochemistry*. 88: 63-69. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02138.x>
- Coria-Téllez, A.V., Montalvo-González, E., y Obledo-Vázquez, E.N. 2018. Soursop (*Annona muricata*). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*; E. Yahia (ed.), pp 1243-1252. John Wiley & Sons Inc: Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch66>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S. y Abert-Vian, M. 2017. Ultrasound-assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 540-560. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Curran, D.P., Zhang, Q., Lu, H., y Gudipati, V. 2006. On the proof and disproof of natural product stereostructures: Characterization and analysis of a twenty-eight member stereoisomer library of murisols and their mosher ester derivatives. *Journal of the American Chemical Society*. 128: 9943-9956. <http://doi.org/10.1021/ja062469l>
- Duran-Ruiz, C.A., Cruz-Ortega, R., Zaldívar-Riverón, A., Zavaleta-Mancera, H.A., De-la-Cruz-Chacón, I. y González-Esquinca, A.R. 2019. Ontogenic synchronization of *Bephratelloides cubensis*, *Annona macrophyllata* seeds and acetogenins from Annonaceae. *International Journal of Plant Research*. 132: 81-91. <https://doi.org/10.1007/s10265-018-01078-3>
- Fasakin, A. O., Fehintola, E. O., Obijole, O. A., y Oseni, O. A. 2008. Compositional analyses of the seed of soursop, *Annona muricata* L., as a potential animal feed supplement. *Scientific Research and Essay*. 3:521-523. <http://www.academicjournals.org/SRE>
- Gromek, D., Hocquemiller, R. y Cavé, A. 1994. Qualitative and quantitative evaluation of annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*. 5: 133-140. <https://doi.org/10.1002/pca.2800050309>
- Guedes, A.M.M., Antoniassi, R. y de Faria, M.A.F. 2017. Pequi: una fruta brasileña con usos potenciales para la industria de grasas. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*. 24: 1-4. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017040>
- Hassan, S., Adam, F., Abu Bakar, M.R. y Abdul Mudalip, S.K. 2018. Evaluation of solvents' effect on solubility, intermolecular

- interaction energies and habit of ascorbic acid crystals. Journal of Saudi Chemical Society. 23: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.07.002>
- Ketenoglu, O. 2020. Extraction of peanut oil using thermosonication: modeling and multiobjective optimization of process parameters using Box-Behnken design. Journal of Oleo Science. 69: 585-595. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19309>
- Kumar, K., Srivastav, S. y Sharanagat, V.S. 2020. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. Ultrasonics -Sonochemistry. 70: 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultronch.2020.105325>
- León-Fernández, A.E., Obledo-Vázquez, E.N., Vivar-Vera, M.A., Sayago-Ayerdi, S.G. y Montalvo-González, E. 2016. Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp (*Annona muricata* L.). Revista Brasileira de Fruticultura. 39: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017358>
- Mohammadpour, H., Sadrameli, S.M., Eslami, F. y Asoodeh, A. 2019. Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. Industrial Crops and Products. 131: 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.030>
- Morales, C.A., González, R. y Aragón, R. 2004. Evaluación de la actividad larvica de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Dipeta: Culicidae). Revista Colombiana de Entomología. 30: 187-192. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v30n2/v30n2a10.pdf>
- Neske, A., Hidalgo, J.R., Cabedo, N. y Cortes, D. 2020. Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. Phytochemistry. 174: 112332. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112332>
- Proaño, F., Stuart, J. R., Chongo, B., Flores, L., Herrera, M., Medina, Y. y Sarduy, L. 2015. Evaluación de tres métodos de saponificación en dos tipos de grasas como protección ante la degradación ruminal bovina. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 49: 35-39. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802015000100006
- Ranisaharivony, B.G., Ramanandraibe, V., Rasoanaivo, L.H., Rakotova, M. y Lemaire, M. 2015. Separation and potential valorization of chemical constituents of soursop seeds. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 4: 161-171.
- Rupprecht, J. K., Hui, Y. H. y McLaughlin, J. L. 1990. Annonaceous acetogenins: A review. Journal of Natural Products. 53: 237-278. <https://doi.org/10.1021/np50068a001>
- Onimawo, I. A. 2002. Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of soursop (*Annona muricata*). Plant Foods for Human Nutrition. 57: 165-171. <https://doi.org/10.1023/a:1015228231512>
- Sawada, M. M., Venâncio, L. L., Toda, T. A., Rodrigues, C. E. 2014. Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal. Food Research International. 62: 662-670. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.039>
- Silva, P.B., Mendes, L.G. y Rehder, A.P.B. 2020. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Acerola* waste. Journal of Food Science and Technology. 57: 4627-4636. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04500-8>
- Soto, R., Svård, M., Verma, V., Padrela, L., Ryan, K. y Rasmuson, A. C. 2020. Solubility and thermodynamic analysis of ketoprofen in organic solvents. International Journal of Pharmaceutics. 588: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119686>
- Wurangian, F. L. 2005. Determination of annonacin compound by high performance liquid chromatography on the extract of *Annona muricata* Linn seed for pesticide formula. Indonesian Journal of Chemistry. 5: 215-218. <https://doi.org/10.22146/IJC.21792>
- Yang, H., Li, X., Tang, Y., Zhang, N., Chen, J. y Cai, B. 2009. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in Annona genus plant seeds by HPLC-DAD method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 49: 140-144. <https://doi.org/10.1016/j.jfite.2009.01.005>
- Yang, H., Zhang, N., Zeng, Q., Yu, Q., Ke, S. y Li, X. 2010. HPLC Method for the simultaneous determination of ten annonaceous acetogenins after supercritical fluid CO₂ extraction. International Journal of Biomedical Science. 4: 202-207.