

Estudio cromatográfico comparativo de los ácidos grasos presentes en semilla de *Annona cherimolioides* y *Annona muricata* L

Ocampo S., Diana M.*
Betancur J., Luz A.*
Ortiz, Aristóteles **
Ocampo C., Rogelio*



Resumen

La familia *Anonáceae* se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, en hojas, raíz, frutas y semillas. De esta familia se han caracterizado y reportado alcaloides, terpenoides, flavonoides, acetogeninas y aceites saponificables. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas anonáceas está asociada a su efecto como insecticidas, actividad citotóxica, antitumoral, antibacterial, pesticida, antimalarial, anti-leishmaniasis y propiedades antehelmiticas.

A nivel de fruto, esta familia es importante por la pulpa, que usualmente es utilizada como alimento y particularmente para la elaboración de productos industriales alimenticios tales como jugos, cremas y productos saborizantes.

Las especies de la familia anonácea, contienen en la semilla triglicéridos basados en ácidos grasos saturados e insaturados. Los más característicos son: ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico y ácido linolenico, entre otros. Los aceites y otros extractos de la planta contienen trazas de acetogeninas de reconocida citotoxicidad, que le confieren importantes propiedades e interés a esta familia botánica.

En este estudio, los ácidos grasos del aceite de semilla de *annona cherimolioides* y *annona muricata* fueron aislados por extracción de la fracción grasa con hexano, y derivatizados mediante transesterificación con metanol en presencia catalítica de BF_3 . Los respectivos ésteres de metilo fueron analizados comparativamente para las dos especies, mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).

Palabras clave: *Annona*, *Annona cherimolioides*, Ácidos grasos libres, CG-MS, derivatización de ácidos grasos libres.

Comparative chromatographic study of fatty acids present in *Annona cherimolioides* and *Annona muricata* L seed

Abstract

The family Anonaceae is characterized by the presence of numerous bioactive substances of diverse chemical nature, in leaves, root, fruits and seeds. Saponifiable alkaloids, terpenoids, flavonoids, acetogenins and oils of this family have been characterized and reported. The bioactivity of this type of metabolites of soursop plants is associated to its effect as an insecticide; cytotoxic, antitumorlike, antibacterial, pesticide and antimalarial activity, anti-leishmaniasis and antehelminthic properties.

* Departamento de Química, Universidad de Caldas. E-mail: docamposerna@gmail.com

** Centro de Investigaciones del Café, CENICAFÉ

At the fruit level of this family, the pulp is important, which is usually used as foods and particularly for industrial food product elaboration such as juices, creams and flavoring products.

The species of the anonacea family contain triglycerides based on saturated and unsaturated fatty acids in the seeds. The most characteristic being: linoleic acid, oleic acid, stearic acid, and linolenic acid, among others. The oils and other extracts of the plant contain traces of acetogenins of recognized cytotoxicity, which confers important properties and interest to this botanical family.

In this study, the fatty acids of the seed oil of *Annona cherimolioides* and *Annona muricata* were isolated by extraction of the greasy fraction with hexane, and derivatized by means of transesterification with methanol in catalytic presence of BF₃. The respective methyl esters were analyzed comparatively for the two species, by means of gas chromatography- mass spectrometry (GC-MS).

Key words: Soursop, *Annona cherimolioides*, free fatty acids, CG-MS, derivatization of free fatty acids.

Antecedentes

La familia Anonácea, más conocida popularmente como la familia de la Guanábana,¹ comprende cerca de 2500 especies agrupadas en 130 géneros, constituidos por árboles, arbustos y lianas, distribuidas en las regiones tropicales de América, Asia y Madagascar.^{2,3}

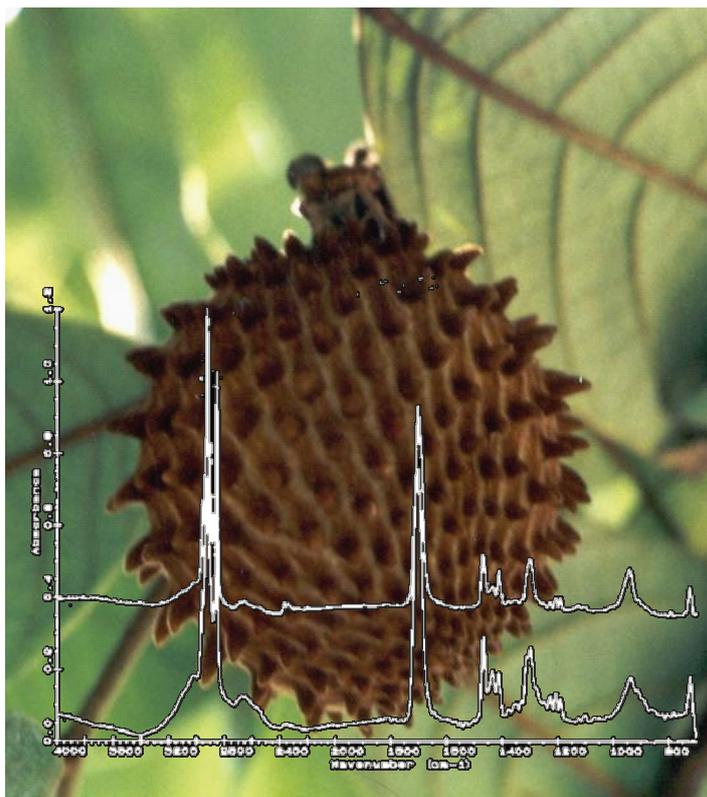
Desde 1982 se ha intensificado la investigación de sus especies por haberse descubierto un gran potencial de productos naturales con una amplia variedad de actividades Biológicas.⁴

Dentro de la familia Annonaceae hay géneros que se caracterizan por el interés económico de sus frutos. Tal es el caso de la *Annona squamosa*,⁵ *Annona muricata*,⁶ *Annona cherimolia*^{7,8} y *Annona reticulata*.⁹

La literatura reporta estudios sobre aceites esenciales y ácidos grasos en varios géneros de esta familia buscando la posibilidad de que sean usados como aditivos aromáticos naturales, principalmente en alimentos,¹⁰ bebidas o su aplicación como insecticidas.⁷ La especie mas estudiada a nivel mundial es *la Annona muricata* (Guanábana).¹¹ Aproximadamente el 70% de los ácidos grasos de la guanábana son insaturados, ubicando los aceites que tiene dentro de un rango aceptable entre los aceites alimenticios convencionales,¹² tan estables como el aceite de algodón, maíz y soya. Sin embargo hay que advertir que, al extraer el aceite de semilla de *Annona muricata* con otros solventes, éste es extraído junto con sustancias químicamente bioactivas y citotóxicas que pueden actuar como inhibidores del crecimiento de larvas en insectos y microorganismos, y que se han reportado como tóxicas para los humanos.^{13,14}

El objeto de este artículo es mostrar, de manera comparativa, el estudio de los ácidos grasos presentes en *Annona cherimolioides* frente a los ácidos grasos presentes en otras especies del mismo género, ya que es una planta que no presenta reportes de este tipo en la literatura Internacional.^{15,16} Los ácidos grasos, derivatizados en forma de sus ésteres de metilo, fueron analizados mediante la técnica de CG-MS.

Annona cherimolioides (Triana y Plancton) R.F.Fries, especie conocida con el nombre vulgar o vernáculo de "anón de monte", o "guanabanito de monte" (en Colombia), y clasificada en el herbario de la Universidad de Caldas como *Raimondia cherimolioides* es una especie Anonácea tropical andina, muy confinada en Colombia, poco estudiada hasta el momento por la comunidad científica mundial.¹⁵



Métodos y materiales

Materiales y reactivos

Reactivos

Se utilizó etanol de 98% de pureza (marca Merck). Los solventes grado cromatográfico metanol y hexano, fueron comprados a Merck.

Material Vegetal: Los frutos de *Annona cherimolioides* (Anón de monte) se recolectaron en el municipio de Aranzazu, Departamento de Caldas ubicado en las coordenadas norte 05°15.054, No y 75°29.966' longitud oeste, altitud 1940m.s.n.m. El estudio de los aspectos botánicos y la geoubicación de la planta en el Departamento de Caldas fueron realizados por el profesor José Jaramillo Plitt y sus colaboradores.¹⁶

Una muestra Botánica fue clasificada en el herbario Nacional de Colombia, Sede Medellín y comparadas con los ejemplares que se tienen en la Universidad de Caldas. Los frutos de *annona muricata* L (Guanábana) fueron obtenidas comercialmente.

CROMATOGRAFO DE GASES

Condiciones cromatográficas:

Cromatógrafo de gases 6890 plus. Columna HP-5 (5 % fenil-metilsilicona, 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). Gas, helio. Rampa de temperatura horno: 280 °C, 0.50 °C/min hasta 360, 3 °C/min durante 12 min., 380 hasta 15.29 min.

Modo: Split. Temperatura inicial: 360 °C. Presión: 24.59 psi. Velocidad Split: 25:1. Flujo split: 32.5 mL/min. Flujo total: 36.4 mL/min. Temperatura del inyector: 360°C. Flujo constante: 1,1 ml/min. Presión a 50 °C: 10,5 psi.

Detector Masas: Mass selective detector 5973 HP.

Modo SCAN. MS source: 240. Total flow: 36.4. MS quard: 180. EM volts: 2294

DC polarity: negative. Ion polarity: positive. Foreline: 75

EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO

Preparación de los extractos

Se llevó a cabo el siguiente protocolo para la obtención de los ésteres de metilo de los ácidos grasos, ilustrado gráficamente en la figura 1:

a. Percolación con etanol durante 2 semanas: Las semillas de *Annona cherimoliodes* (500g) libres de impurezas, se secaron a temperatura ambiente y fueron molidas y sometidos a percolación con etanol de 96% durante 2 semanas. Cada día se recogía el filtrado y se sometía a evaporación mediante vacío, y el solvente era reemplazado día a día. Los extractos obtenidos diariamente se fueron combinando hasta completar las dos semanas de la operación. Se obtuvo así un jarabe aceitoso de color café, fracción que fue denominada **F01-SG** (*fracción etanólica de semilla de guanábana*).

Idéntico procedimiento fue llevado a cabo con semillas de *Annona muricata* L (500g), dandolugar a la fracción **F01-SA** (*fracción etanólica de semilla de Anón de monte*).

Las fracciones **F01-SA** y **F01-SG** fueron sometidas a secado mediante evaporación rotatoria. El marco se desechó en cada caso.

b. Partición de cada extracto etanólico entre hexano y metanol-agua (90:10): La fracción **F01-SA** fue sometida a partición entre hexano y metanol acuoso 90:10. Se separó la fase metanólica acuosa de la fase en hexano. Cada fracción se sometió a secado mediante evaporación rotatoria, y posteriormente, aplicación de alto vacío. De esta manera se obtuvieron las siguientes fracciones: fracción metanólica de anón de monte (**F02-SA**), un jarabe café con aceite, y la fracción en hexano de semilla de anón de monte (aceite amarillo) rotulada como **F03-SA**.

Idéntico procedimiento de partición se llevó a cabo partiendo de la fracción **F01-SG** de guanábana, dando lugar a la fracción metanólica de guanábana **F02-SG** y a la fracción en hexano de semilla de Guanábana (**F03-SG**).

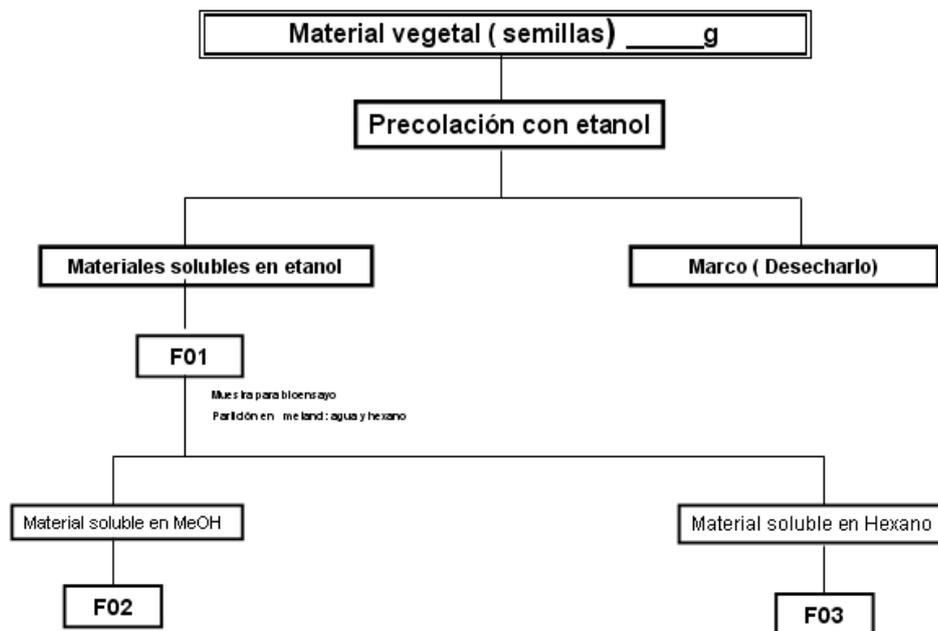


Figura 1. Proceso de extracción de los ácidos grasos en semilla de *annona cherimolioides* (anón de monte) y *annona muricata* L. (Guanábana)

DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA GC-MS

Estándares: Con el fin de verificar el factor de respuesta, dos patrones de ácidos grasos que estaban presentes en las muestras por analizar, fueron sometidos a análisis cromatográfico, previa preparación y derivatización a diferentes concentraciones. Se siguió el procedimiento que se detalla a continuación:

Preparación de los estándares para calibración: Se partió de dos ácidos grasos grado reactivo Merck: ácido palmítico y ácido esteárico. De cada uno de ellos se preparó una solución stock a una concentración de 1000ppm y a partir de allí se realizaron 5 diluciones a las siguientes concentraciones 1000ppm, 500ppm, 250 ppm, 125 ppm y 63 ppm, las cuales fueron sometidas al siguiente protocolo de esterificación (figura 2), para luego ser llevadas a análisis cromatográfico y construir la respectiva curva de calibración:

- De cada estándar se hizo una solución a una concentración de 1000 ppm en hexano.
- De las soluciones anteriores se prepararon las diferentes diluciones a concentraciones de 1000ppm, 500ppm, 250ppm 125ppm y 63ppm. Cada solución se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso.
- A cada una se le adicionaron 3mL de BF_3 en MeOH al 20%. Se sometieron a calentamiento a 80°C durante una hora mediante reflujo.
- A cada dilución se le adicionaron 500µL de hexano, pasados uno minutos se recuperó la fase superior correspondiente a la fase que contiene los ácidos grasos metilados presentes en el material vegetal.
- Los ésteres de metilo de los ácidos grasos estándares fueron entonces llevados a análisis cromatográfico obteniendo las siguientes ecuaciones de estandarización:

ÁCIDO ESTEÁRICO	ÁCIDO PALMÍTICO
Repuesta= $1.02 \times 10^4 * \text{Amt} + 3.36 \times 10^5$ Coeficiente de detección= 0.990	Repuesta= $1.05 \times 10^4 * \text{Amt} + 2.80 \times 10^5$ Coeficiente de detección= 0.994

Preparación de las muestras de la fracción en hexano de anón de monte y Guanábana para CG-MS

Se tomaron por separado las fracciones en hexano de la semilla de anón de monte y de Guanábana (F03-SA y F03-SG), y se sometieron al mismo protocolo ilustrado en la figura 2.

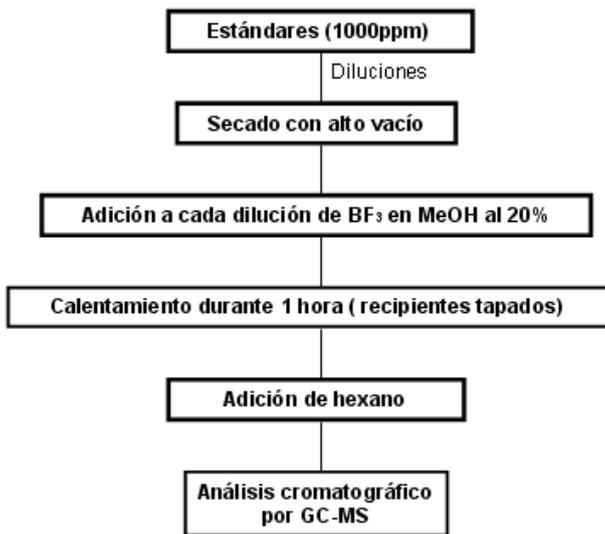
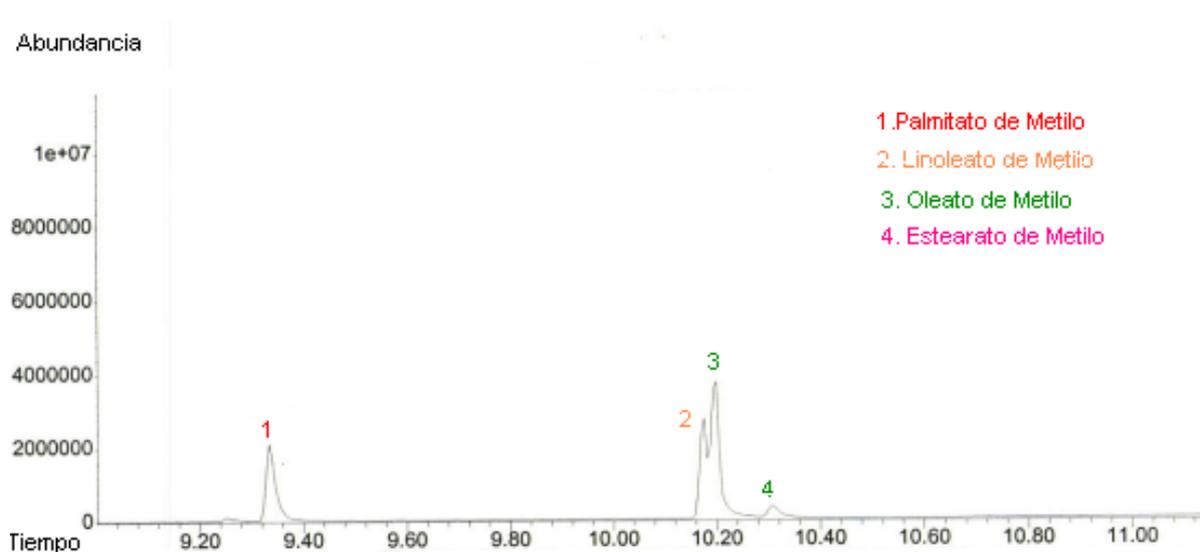
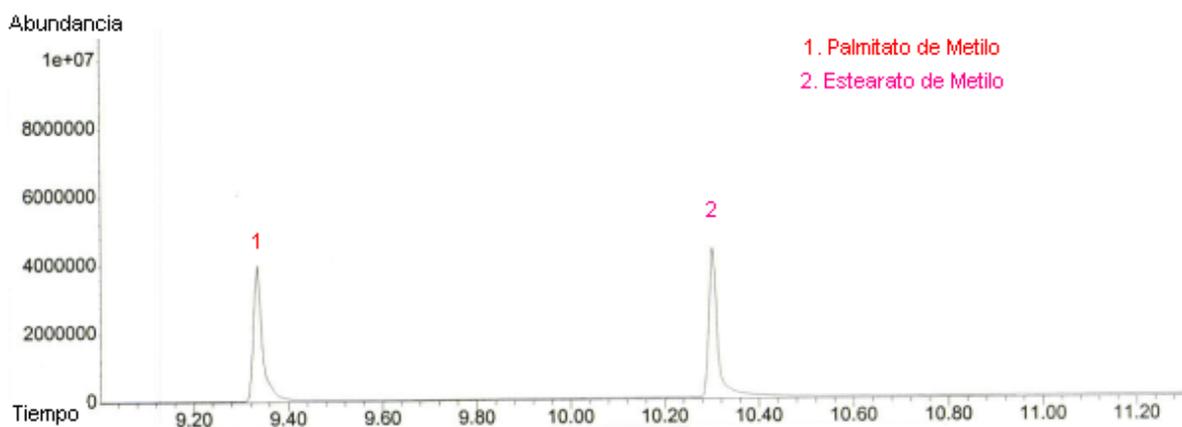
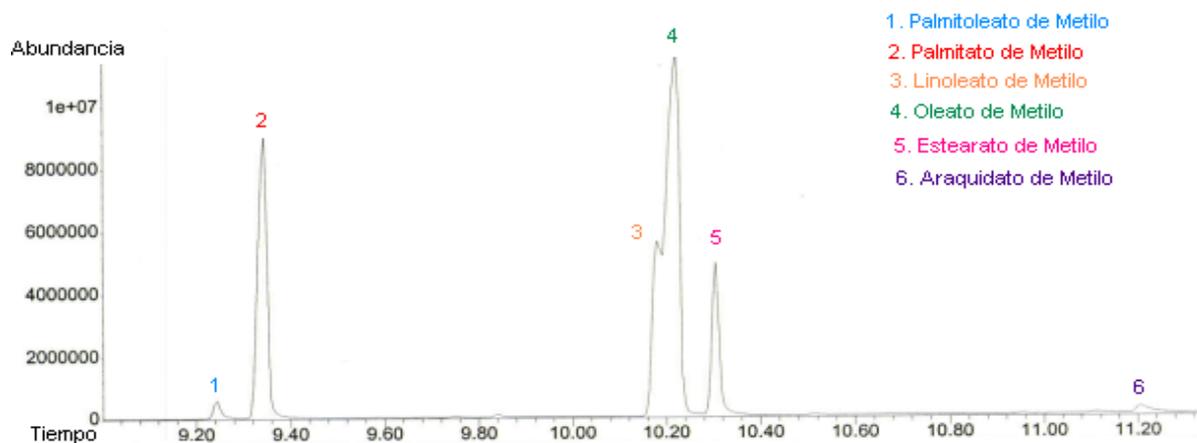


Figura 2. Protocolo derivatización de ácidos grasos

Resultados y discusión

Los cromatogramas muestran el aceite de *annona cherimolioides* (6 señales), *Annona muricata* (4 señales) y los estándares utilizados (2 señales). En las muestras analizadas se encontraron los picos correspondientes a los estándares ácido palmítico y ácido esteárico. A otros tiempos de retención aparecieron otras señales correspondientes a los isómeros de los estándares de tipo insaturado, para el ácido palmítico (C:16), el ácido palmitoleico (C16:1Δ⁹), el ácido esteárico (C:18) los ácidos oleico(C18:1Δ⁹), linoleico (C18:2Δ^{9,12}) y linoléico (C18:3Δ^{9,12,15}). También aparece el ácido araquidónico (C20:4Δ^{5,8,11,14}) en muy poca cantidad.





El análisis de los fragmentos principales de cada espectro dio como resultado los ácidos grasos en la tabla 1, de donde se puede decir que al comparar el aceite de semilla de *annona muricata* y *annona cherimolioides* –mediante el análisis de su composición porcentual en ácidos grasos- es similar para el ácido palmítico, en guanábana con una composición del 25.65% y en anón de monte con una composición 25.43%.; para el ácido linoleico en guanábana con una composición del 23.86% y en anón de monte con una composición del 20.46%; para el ácido Oleico en Guanábana con una composición del 44.60% y en anón de monte con una composición del 46.37%. Con algunas diferencias en composición se encuentra el ácido esteárico con una composición en guanábana del 5.89% y en anón de monte del 11.15%.

Tabla 1.

Tiempos de retención de los ésteres de metilo de los ácidos grasos de aceite y de guanábana y de aceite de anón de monte

ACEITE GUANABANA			ACEITE ANON DE MONTE		
PICO	COMPUESTO	T.R. (min)	PICO	COMPUESTO	T.R. (min)
1	Palmitato de Metilo	9,34	1	Palmitoleato de Metilo	9,24
2	Linoleato de Metilo	10,18	2	Palmitato de Metilo	9,34
3	Oleato de Metilo	10,19	3	Linoleato de Metilo	10,19
4	Estearato de Metilo	10,31	4	Oleato de Metilo	10,22
			5	Estearato de Metilo	10,31
			6	Araquidato de Metilo	11,21

A partir del contraste entre el aceite de *Annona muricata*¹⁰ y *Annona cherimolioides* se puede concluir que la *Annona cherimolioides* tiene la presencia en cantidades mínimas del ácido palmitoleico (composición 1.42%) y ácido araquidónico con una composición del 1.08%.

Comparando los ácidos grasos presentes en *Annona cherimolioides* con los reportados en la literatura para otras especies del mismo género *Annona* como lo son *Annona muricata*¹⁷, *Annona cherimolia*⁶, *Annona squamosa*⁸; se puede decir que su composición es similar en ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido esteárico como se observa en la tabla 2.

Tabla 2.

Composición porcentual de los ácidos grasos de varias especies anonáceas

ACIDO GRASO	<i>A. muricata L.</i>	<i>A. cherimola</i>	<i>A. squamosa</i>	<i>A. muricata L. U de C</i>	<i>A. cherimolioides U. de C</i>
Oleato de Metilo	44%	43%	37%	45%	46.37%
Linoleato de Metilo	30%	35%	10.9%	24%	14.55%
Palmitato de Metilo	19%	12%	0%	26%	25.43%
Estearato de Metilo	5%	8%	9.3%	6%	11.15%
Linoleniato de Metilo	0,00%	1%	0%	0%	0%
Palmitoleato de Metilo	2%	0%	0%	0%	1.42%
Araquidato de Metilo	0%	1%	3.3%	0%	1.10%
Isoricinoleato de Metilo	0%	0%	9.8%	0%	0%

De acuerdo con los análisis realizados, se puede concluir que, los ácidos grasos comunes presentes tanto en el anón de monte como en la guanábana son: ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico y ácido linoleico. Como ácidos grasos diferentes aparecen el araquidico y palmitoleico, ácidos grasos que son de alto uso en alimentos. En el caso específico de los aceites de semillas de especies anonáceas, la comunidad científica ha advertido de su alto potencial citotóxico, por lo cual está contraindicada su aplicación en la industria alimenticia.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vice-Rectoría de Investigaciones y postgrados de la Universidad de Caldas por el apoyo económico para la financiación de este proyecto, y al Doctor Néstor Riaño de CENICAFE. Igualmente agradece la asesoría del profesor Néstor Riaño Cabrera del Departamento de Química de la Universidad de Caldas.

Referencias

1. Walter, J. W. (1971). *Contributions for the GRAY HERBARIUM. Pollen, Morphology, phytogeography and Phylogeny of the Annonaceae.*, Edit Reed C, Rollins and K. Roby. 202.
2. Murillo, A., Jesús. (2001). *Las Annonáceas de Colombia. Biota colombiana* 2(1). Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. pp. 49-58.
3. Hennesos, G. J. M., Perez, De Oteyra, M. A., Ruiz, Nieto, A. and Farvé J. M. (1999).. *The Spanish Gemplasm Bank of Chirimoya (Annona cherimolia Mill)*. Ecuador: Acta Horticultura. pp. 497; 201-212.
4. Smith, N. J. H., Williams, J. T., Plucknett, D. L., Amnd, Talbot, J. P (1992).. *Tropical Forests and Their Crops Cornell*. New York: University Press. Ithaca.
5. Singh, S. P. (1992). *Fruit crops for Wasteland*. Scientific Publisher, Jodhpur. Indis.
6. Castro, M., Cautin, R. and Biancani, L. (1999). *.Evaluation of three Disinfection Protocols and three protocols for the use of antioxidants in In vitro cultivation off cherimoya(Annona cherimolia Mill) and three Quantitative Determination of Branch Phenolic Content*. Acta Horticulture, 497. pp. 303-307.
7. Manica, I. (1997). *Taxonomic, Morphology and Anatomiprocedinnngs of I Brazilian Symposium on Annonaceous*. Brasil: Universidade Estadual do Suroeste da Bahia. Depto e Fitotecnica e Zootecnica. Vitória da conavista Bahia. pp. 20-35.
8. Lizana, L. A. and Reginato, G. (1990).. *“Cherimoya”*. *Fruits of Tropical and Subtropical. Composition, properties and uses*. Florida: Florida Science Source. Lake Alfred. pp. 131-148.
9. León, J. (1987). *Botánica de cultivos Tropicales*. San José. Costa Rica: IICA.
10. Jirovetz, L., Buchbaver, G. and Ngassoum, M. B. (1988).. *Essential Oil compounds of the Annona muricata Fresh Fruit Pulp from Cameroon*. En: *Journal of Agricultural Chemistry* 46. pp. 3719-3720.
11. Pinto, A. C., De Q. and Silva, E. M. (1996).. *Graviola para exportación. Aspectos técnicos y producción*. Brasil: EMBRAPA/ SPI. Brasilia.
12. Nakasone, H. Y. and Paull, R. E. (1998). *“Annonas”*. *Tropical Fruits*. London, UK: Edited CAB International. pp. 45-75.
13. Bueso, C. E (1980).. *Soursop, Tamarind and Cherimoya. Tropical and Subtropical Fruits- Composition, properties and uses*. Connecticut. USA: pp. 375-387.
14. Rupprecht, J. K., Hui, Y. M. and Mclaughlin, J. L. (1990). *Annonaceous Acetogenins*. En: *Review Journal of Natural Products*, 53 (2). pp.237-278.

- ¹⁵ Ocampo Cardona, Rogelio. y otros. (2001). *estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la toxicidad de raimondia cherimolioides (annonaceae) (raimondia monoica safford)*. Colombia: Universidad de Caldas. pp. 67
- ¹⁶ Jaramillo, José., Rodas, Mauricio. (2003). *Geoubicación y Reproducción de Anón de Monte Raimondia cherimolioides (Triana y Plancton)*. R.E. Fries. pp. 6-10.
- ¹⁷ Hernández, C. R. and Ángel D. N. (1997). *(Anonáceas com propriedades Insecticidas)*. Brasil: Edited by A. R. São José Beas 1. V., Morais O. m. and Reboucas T. N.H. Universidade Estadual do Sudoeste de Bahin. Depto. de Fitotecnia e Zootecnia. Vitória da Conquista, Bahia. pp. 229-239.