



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y VALOR
NUTRACÉUTICO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA
GUANÁBANA (*Annona muricata*)”.**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR

VIVIANA CATHERINE BARAHONA CALLE

RIOBAMBA – ECUADOR

2013

DEDICATORIA

A mis padres Mercedes y Abraham el pilar fundamental que me han enseñado principios y valores que me han servido para consolidar mis metas propuestas a lo largo de mi vida.

A mi abuelita Bacha que aunque ya no se encuentra con nosotros y esta junto al Padre celestial ha sido fue y será la persona que me impulsa a seguir adelante.

A todos aquellos, que fueron partícipes de esta investigación los llevo en mi mente y corazón.

AGRADECIMIENTO

A Dios por dame la vida, salud, sus bendiciones en todo mi camino y por la dicha de tener a mis padres a mi lado.

A mis padres en especial a la persona que es también mi mejor amiga por su amor incondicional y apoyarme en cada momento. Gracias mamita

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH por formarme como profesional competitiva con ética y valor.

A las Doctoras Susana Abdo y Olga Lucero por su dirección, colaboración, asesoramiento y aporte valioso brindado en la elaboración de este trabajo de investigación.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera en la realización de este tema de tesis.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que El trabajo de investigación: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y VALOR NUTRACÉUTICO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*)**”, de responsabilidad de la señorita egresada Viviana Catherine Barahona, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez DECANO FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dr. Iván Ramos DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dra. Susana Abdo DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Dra. Olga Lucero MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Dra. Ana Albuja MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----
NOTA DE TESIS	-----	

Yo Viviana Catherine Barahona Calle, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la tesis de grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

(VIVIANA CATHERINE BARAHONA CALLE)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS
ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE CUADROS
ÍNDICE DE GRÁFICOS
ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS
ÍNDICE DE ANEXOS
INTRODUCCIÓN

1	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	Valor nutracéutico	1
1.1.1	Definición	1
1.1.2	Características	- 2 -
1.1.3	Clasificación general de los nutraceúticos.....	- 3 -
1.1.3.1	Compuestos Nutritivos	- 3 -
1.1.3.2	Compuestos Químicos	- 3 -
1.1.3.3	Probióticos	- 3 -
1.2	Calidad nutritiva	- 4 -
1.2.1	Valoración energética de los alimentos.	- 4 -
1.2.2	Valoración nutritiva de los alimentos	- 5 -
1.2.2.1	Nutrientes.....	- 5 -
1.2.2.1.1	Macronutrientes	- 5 -
1.2.2.1.2	Micronutrientes.....	- 7 -
1.3	Radicales libres	- 8 -
1.3.1	Formación de los radicales libres	- 8 -
1.3.2	Reactividad de los radicales libres.....	- 10 -
1.3.3	Enfermedades causadas por los radicales libres	- 11 -
1.3.4	Mecanismos y sistemas de defensas antioxidantes.....	- 12 -
1.4	Antioxidantes	- 13 -
1.4.1	Clasificación de los antioxidantes	- 13 -
1.4.1.1	Según su función.....	- 14 -
1.4.1.1.1	Primarios.....	- 14 -
1.4.1.1.2	Secundarios.....	- 14 -

1.4.1.2	Según su sitio de acción.....	- 14 -
1.4.1.3	Según su origen.....	- 15 -
1.4.2	Importancia de las enzimas como antioxidantes	- 16 -
1.4.2.1	Catalasa (CAT)	- 16 -
1.4.2.2	Glutación peroxidasa (GP _x)	- 16 -
1.4.2.3	Superóxido dismutasa.....	- 17 -
1.4.3	Importancia de los antioxidantes exógenos	- 17 -
1.4.3.1	Vitamina E.....	- 17 -
1.4.3.2	Vitamina C.....	- 18 -
1.4.3.3	Compuestos fenólicos	- 21 -
1.4.3.3.1	Clasificación de los compuestos fenólicos	- 22 -
1.4.3.3.2	Actividad biológica de los compuestos fenólicos.....	- 24 -
1.4.3.3.3	Actividad antioxidante de los fenoles en los alimentos.....	- 24 -
1.4.4	Antioxidantes naturales	- 25 -
1.4.5	Actividad antioxidante.....	- 25 -
1.4.5.1	Análisis de la actividad antioxidante	- 26 -
1.4.5.1.1	Inhibición de la Polifenoloxidasa (PPO)	- 27 -
1.5	Guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	- 29 -
1.5.1	Origen y distribución	- 29 -
1.5.2	Nomenclatura botánica	- 30 -
1.5.2.1	Aspectos Taxonómicos.....	- 30 -
1.5.2.2	Etimología y nombres comunes.....	- 30 -
1.5.3	Descripción botánica	- 31 -
1.5.3.1	Hojas	- 31 -
1.5.3.2	Flores	- 31 -
1.5.3.3	Frutos y Semillas	- 31 -
1.5.4	Cultivos.....	- 32 -
1.5.5	Producción de guanábana en el Ecuador	- 33 -
1.5.6	Composición química	- 33 -
1.5.6.1	Componente químicos de las Hojas de <i>Annona muricata</i>	- 33 -
1.5.6.2	Valor nutricional y componentes químicos de los frutos de la guanábana-	34 -
1.5.7	Acciones farmacológicas	- 35 -
1.5.7.1	Oncología experimental.....	- 35 -
1.5.7.2	Actividad antiparasitaria.....	- 35 -
1.5.7.3	Actividad antimicrobiana.....	- 35 -

1.5.7.4	Actividad S.N.C.....	- 36 -
1.5.7.5	Actividad Antioxidante.....	- 36 -
1.5.7.6	Otras actividades.....	- 36 -
1.5.8	Usos etnomedicinales	- 36 -
2	PARTE EXPERIMENTAL	- 38 -
2.1	Lugar de investigación.....	- 38 -
2.2	Reactivos, materiales y equipos.....	- 38 -
2.2.1	Reactivos.....	- 38 -
2.2.2	Material vegetal y alimenticio	- 40 -
2.2.3	Material de laboratorio	- 40 -
2.2.4	Equipos	41
2.3	Técnicas y métodos.....	- 41 -
2.3.1	Secado y molienda de las hojas de guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	- 41 -
2.3.1.1	Método de desecación en estufa industrial de aire caliente (Jambi Kiwua)-	41
-		
2.3.2	Determinación de los parámetros de calidad de la droga vegetal.....	- 42 -
2.3.2.1	Método Físico-Químico de Análisis	- 42 -
2.3.2.1.1	Determinación de humedad relativa	- 42 -
2.3.2.1.2	Determinación de cenizas totales.....	- 43 -
2.3.2.1.3	Determinación de cenizas solubles en agua.....	- 44 -
2.3.2.1.4	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....	- 45 -
2.3.3	Estudio fitoquímico (Screening o tamizaje fitoquímico).....	- 46 -
2.3.4	Obtención de los extractos.....	- 50 -
2.3.4.1	Elaboración extracto alcohólico (etanólico) de las hojas de <i>Annona muricata</i>	- 50 -
2.3.4.1.1	Método por Percolación.....	- 50 -
2.3.4.2	Elaboración del Extracto Acuoso de hojas de <i>Annona muricata</i>	- 52 -
2.3.4.3	Elaboración extracto alcohólico (etanólico)y acuoso de los frutos de <i>Annona muricata</i>	- 52 -
2.3.5	Control de calidad de los extractos	- 53 -
2.3.5.1	Determinación de los requisitos organolépticos	- 53 -
2.3.5.2	Determinación de la densidad relativa.....	- 53 -
2.3.5.3	Determinación del índice de Refracción.....	- 54 -
2.3.5.4	Determinación del pH.....	- 55 -
2.3.5.5	Determinación de Sólidos totales.	- 56 -
2.3.6	Análisis cromatográfico de flavonoides.	- 57 -

2.3.7	Cuantificación de flavonoides totales.....	- 58 -
2.3.8	Cuantificación De Fenoles Totales Expresados Por El Pocentaje De Ácido Gálico	- 59 -
2.3.8.1	Micrométodo Folin Ciocalteu.....	- 59 -
2.3.9	Evaluación del valor nutracéutico de las hojas y frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	- 59 -
2.3.9.1	Análisis sensorial.....	- 59 -
2.3.9.2	Determinación de humedad	- 60 -
2.3.9.2.1	Método de Dean Stark o por Destilación a Reflujo con solventes Inmiscibles con el agua.	- 61 -
2.3.9.2.2	Método por desecación en estufa de aire caliente.	- 62 -
2.3.9.3	Determinación de cenizas.	- 62 -
2.3.9.3.1	Método de incineración en mufla	- 63 -
2.3.9.4	Determinación de proteína. Método Macro-Kjeldhal.....	- 64 -
2.3.9.5	Determinación de fibra cruda. Método de Weende	- 66 -
2.3.9.6	Determinación de extracto etéreo. Método Soxhlet	- 68 -
2.3.9.7	Extracto libre no nitrogenado (ELnN).....	- 69 -
2.3.9.8	Cálculo del Valor Calórico. (NTE INEN 1 333-2 2011).....	- 69 -
2.3.9.9	Determinación de pH y Acidez.....	- 70 -
2.3.9.10	Azúcares y °BRIX.....	- 71 -
2.3.9.10.1	Determinación de Azúcares Reductores: Método de Fehling (Oxido-reducción)	- 71 -
2.3.9.10.2	Análisis cualitativo de azúcares no reductores	- 72 -
2.3.9.10.3	Determinación de °BRIX.....	- 72 -
2.3.9.11	Índice de maduración.....	- 73 -
2.3.9.12	Determinación de Vitamina C	- 73 -
2.3.9.12.1	Método del Yodo	- 73 -
2.3.9.12.2	Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC.	- 74 -
2.3.9.13	Determinación de Pectina y Almidón para establecer su presencia en los extractos del fruto de guanábana	- 75 -
2.3.9.13.1	Determinación cualitativa de Pectina (Test del Ácido Múxico).....	- 75 -
2.3.9.13.2	Determinación cualitativa de almidón (Prueba del Lugol).....	- 76 -
2.3.10	Evaluación de la Capacidad Antioxidante Total	- 76 -
2.3.10.1	Metodología.....	- 76 -
2.3.10.2	Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el método Enzimático de Inhibición de la Polifenoloxidasas	- 77 -

3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 81 -
3.1	Control de calidad de la droga cruda vegetal.....	- 81 -
3.2	Tamizaje fitoquímico.....	- 82 -
3.3	Determinación de parámetros de calidad del extracto alcoholico y acuoso de las hojas y frutos de guanábana.	- 85 -
3.3.1	Descripción organoléptica	- 85 -
3.3.2	Parámetros físicos	- 86 -
3.4	Análisis cromatográfico de flavonoides.	- 89 -
3.4.1	Cromatografía TLC	- 89 -
3.5	Cuantificación de flavonoides totales.....	- 90 -
3.6	Cuantificación de compuestos fenólicos totales expresados como porcentaje de ácido gálico.	- 92 -
3.7	Evaluación del valor nutracéutico de las hojas y frutos de guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	- 94 -
3.7.1	Evaluacion sensorial	- 94 -
3.7.2	Análisis bromatológico	- 95 -
3.8	Actividad antioxidante de los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas y frutos de la guanábana (<i>Annona Muricata</i>). Expresados por el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la PPO.	- 101 -
3.8.1	Análisis estadístico	- 105 -
4	CONCLUSIONES	- 108 -
5	RECOMENDACIONES	- 110 -
6	RESUMEN	- 111 -
7	BIBLIOGRAFÍA	- 115 -
8	ANEXOS.....	- 128 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
Ab	Absorbancia
AA	Ácido L – ascórbico
°C	Grados Celsius
Conc.	Concentración
CAT	Catalasa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERO	Especies reactivas de Oxígeno
GP_x	Glutación peroxidasa
g	Gramo
HCl	Ácido clorhídrico
%H	Porcentaje de Humedad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
kg	Kilogramo
L	Litro
L-B	Liebermann- Buchard
M	Molar
mL	Mililitro
mg	Miligramo
Min	Minuto
No	Número.
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
OH	Grupo hidroxilo
ppm	Partes por millón
pH	Potencial hidrógeno
Pr. A.	Ensayo Principios amargos
PPO	Polifenoloxidasa
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
Rf	Franja de referencia

RL	Radicales libres
%	Porcentaje
SOD	Superóxido dismutasa
TLC	Cromatografía en capa fina
U	Unidad enzimática
µg	Microgramo

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción	15
TABLA No. 2	Clasificación de los antioxidantes	15
TABLA No. 3	Clasificación de los flavonoides	23
TABLA No. 4	Taxonomía de la guanábana	30
TABLA No. 5	Recolección del material vegetal y alimenticio utilizados en la evaluación de la Actividad Antioxidante y Valor Nutracéutico de las hojas y frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>)”.	40
TABLA No. 6	Técnica del tamizaje fitoquímico.	48
TABLA No. 7	Esquema para la determinación de la actividad antioxidante total	79

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Determinación de los parámetros de calidad en droga seca molida de las hojas de la guanábana (<i>Annona muricata</i>) Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Junio 2012.	81
CUADRO No. 2	Tamizaje fitoquímico de la droga seca y molida de las hojas de la Guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Julio del 2012.	83
CUADRO No. 3	Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico y acuoso de los Frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Julio del 2012.	84
CUADRO No. 4	Descripción organoléptica del extracto fluido y acuoso de las Hojas de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Julio del 2012.	85
CUADRO No. 5	Descripción organoléptica del extracto alcohólico y acuoso de los frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Julio del 2012.	86
CUADRO No. 6	Determinación de los parámetros de calidad del extracto fluido y acuoso de las hojas de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Julio del 2012.	86
CUADRO No. 7	Determinación de los parámetros de calidad del extracto alcohólico y acuoso de los frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Julio del 2012.	87
CUADRO No. 8	Determinación del RF de la cromatografía en capa fina para flavonoides de las hojas de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Julio del 2012.	89
CUADRO No. 9	Curva de calibración para cuantificación de flavonoides utilizando como patrón quercetina.	90
CUADRO No. 10	Cuantificación de flavonoides de las hojas y frutos de la Guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Julio del 2012.	91

CUADRO No. 11	Curva de calibración para cuantificación de fenoles totales utilizando como patrón ácido gálico.	92
CUADRO No. 12	Cuantificación de fenoles totales de los extractos alcohólicos Acuosos de las hojas y frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto del 2012.	93
CUADRO No. 13	Resultado de la evaluación sensorial de las hojas frescas y frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>) laboratorio de Productos Naturales.-Facultad de Ciencias ESPOCH. Junio 2012	94
CUADRO No. 14	Resultados del análisis proximal de las hojas y frutos (pulpa) de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de bromatología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Junio del 2012.	95
CUADRO No. 15	Resultados del valor energético de las hojas y frutos (pulpa) de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de bromatología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Junio del 2012.	97
CUADRO No. 16	Resultados del análisis complementario de los frutos (pulpa) de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de bromatología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Junio del 2012.	98
CUADRO No. 17	Resultados de la cuantificación de vitamina C por HPLC de los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas y frutos de la Guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de bromatología Facultad de Ciencias. ESPOCH. Junio del 2012..	100
CUADRO No. 18	Actividad antioxidante de los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas y frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto del 2012.	101
CUADRO No.19	Análisis de varianza de dos factores para los porcentajes de inhibición.	106
CUADRO No. 20	Resultado estadístico del porcentaje de inhibición para grupos homogéneos de los extractos y la vitamina C aplicando Tukey	107
CUADRO No. 21	Resultado estadístico del porcentaje de inhibición para grupos homogéneos de las concentraciones aplicando Tukey	107

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Curva de absorbancia vs concentración de quercetina para cuantificación de flavonoides. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Agosto del 2012.	91
GRÁFICO No. 2	Curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Agosto del 2012.	93
GRÁFICO No. 3	Contenido de nutrientes realizado en el análisis proximal de las hojas y frutos (pulpa) de la guanábana (<i>Annona muricata</i>). Laboratorio de Bromatología. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Junio del 2012.	97
GRÁFICO No. 4	Crecimiento de la actividad enzimática de la PPO en relación a la concentración. Laboratorio de Análisis Instrumental. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Agosto del 2012	103
GRÁFICO No. 5	Crecimiento promedio de la actividad antioxidante de los extractos y la vitamina C a diferente concentración. Laboratorio de Análisis Instrumental. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. Agosto del 2012	104

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Peroxidación lipídica iniciada por el radical el radical (R [•])	10
FIGURA No. 2	Estrés oxidativo	10
FIGURA No. 3	Mecanismos de defensa antioxidante	12
FIGURA No. 4	Oxidación de la vitamina E	17
FIGURA No 5	Estructura de la Vitamina C	19
FIGURA No 6	Diferentes estados redox del Ascorbato	20
FIGURA No 7	Compuestos Fenólicos sencillos	22
FIGURA No 8	Actividad de la polifenoloxidasas	28
FIGURA No 9	Extracciones sucesivas del material vegetal.	47

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Árbol de guanábana, <i>Annona muricata</i>	29
FOTOGRAFÍA No. 2	Cromatografía en capa delgada de las hojas de la guanábana (<i>Annona muricata</i>)	89
FOTOGRAFÍA No. 3	Hojas y frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>)	127
FOTOGRAFÍA No. 4	Determinación de humedad de la droga vegetal seca y molida	127
FOTOGRAFÍA No. 5	Determinación de cenizas totales solubles e insolubles de la droga vegetal seca y molida	128
FOTOGRAFÍA No. 6	Resultados del tamizaje para los ensayos de Lieberman Burchard, Shinoda, Fehling	128
FOTOGRAFÍA No. 7	Resultados del tamizaje para los ensayos de Baljet, Cloruro férrico, Wagner	128
FOTOGRAFÍA No. 8	Elaboración del extracto alcohólico de las hojas (extracto fluido)	129
FOTOGRAFÍA No. 9	Elaboración del extracto alcohólico y acuosos de los frutos	129
FOTOGRAFÍA No. 10	Elaboración del extracto acuoso de las hojas	130
FOTOGRAFÍA No. 11	Equipos utilizados en la determinación de ph, Índice de refracción y densidad.	130
FOTOGRAFÍA No. 12	Cuantificación de flavonoides totales a partir de la materia prima	131
FOTOGRAFÍA No. 13	Cuantificación de fenoles totales a partir de los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas y frutos de guanábana	131
FOTOGRAFÍA No. 14	Determinación de humedad. método de Dean Stark	132
FOTOGRAFÍA No. 15	Determinación de cenizas. método de incineración en mufla	132
FOTOGRAFÍA No. 16	Determinación de proteína, fibra, grasa por el método macro Keldahl, Weende, Soxhlet respectivamente	132
FOTOGRAFÍA No. 17	Determinación de PH y acidez.	133

FOTOGRAFÍA N ^o . 18	Determinación de azúcares y medición de ° Brix	133
FOTOGRAFÍA N ^o . 19	Determinación de vitamina C. método del yodo	134
FOTOGRAFÍA N ^o . 20	Determinación cualitativa de pectina y almidón	137
FOTOGRAFÍA N ^o . 21	Espectrofotómetro utilizado en la determinación de la actividad antioxidante.	137
FOTOGRAFÍA N ^o . 22	Espectros de inhibición del blanco y del antioxidante (vitamina C)	138
FOTOGRAFÍA N ^o . 23	Espectros de inhibición de los extractos alcohólicos y acuoso de las hojas	138
FOTOGRAFÍA N ^o . 24	Espectros de inhibición de los extractos alcohólico y acuoso de los frutos.	139

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Materia Prima Utilizada.	127
ANEXO No. 2	Parámetros de Calidad en Droga Seca y molida de las Hojas de Guanábana (<i>Annona muricata</i>). .	127
ANEXO No. 3	Tamizaje Fitoquímico de las Hojas y Frutos de la Guanábana (<i>Annona muricata</i>).	128
ANEXO No. 4	Elaboración de los Extractos Alcohólicos y Acuosos de las Hojas Y Frutos de la Guanábana (<i>Annona muricata</i>).	129
ANEXO No. 5	Determinación de los parámetros de Calidad de los Extracto Alcohólicos y Acuoso de las Hojas y Frutos de la Guanábana (<i>Annona muricata</i>).	130
ANEXO No. 6	Cuantificación de Flavonoides y Fenoles Totales de las Hojas y Frutos de Guanábana (<i>Annona muricata</i>).	131
ANEXO No. 7	Análisis proximal de las Hojas y Frutos de la Guana nábana (<i>Annona muricata</i>).	132
ANEXO No. 8	Análisis complementario de los Frutos de la Guanábana (<i>Annona muricata</i>)	133
ANEXO No. 9	Cromatogramas de la determinación de Vitamina C por HPLC	134
ANEXO No. 10	Determinación Cualitativa de Pectina Y Almidón	137
ANEXO No. 11	Determinación de la actividad antioxidante de los extractos alcohólicos y acuosos de las Hojas y frutos de la guanábana (<i>Annona muricata</i>).	137
ANEXO No. 12	Referencia del Análisis Proximal de las Hojas de Guanábana	140
ANEXO No. 13	Etiqueta del Valor Nutricional de la Pulpa de la Guanábana FRISCO	141

INTRODUCCIÓN

La idea de que los beneficios de los alimentos puedan ir más allá de la nutrición básica se remonta, a más de 2.500 años atrás, cuando Hipócrates dijo “Dejad que los alimentos sean vuestra medicina y que la medicina sea vuestro alimento”. En 1989 De Felice establece el concepto de nutraceutico como un “alimento o parte de alimento que tiene efectos beneficiosos para la salud del individuo” denominándose así a los alimentos nutraceuticos que incluyen nutrientes y no nutrientes, por ejemplo, los antioxidantes nutrientes, como las vitaminas C y E y el betacaroteno, se complementan con antioxidantes no nutrientes, como licopeno, resveratrol y otros para producir el efecto antioxidante sobre el alimento o el organismo. (47)

En las últimas décadas la incidencia de enfermedades oncógenas, cardiovasculares, el envejecimiento prematuro, la aterosclerosis, hipertensión arterial, diabetes mellitus ha aumentado. Esto se debe entre otros factores a un exceso de RL (moléculas o porciones de ellas, que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y son extraordinariamente reactivos) rompen el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo. Se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco, etc. (15)

Según datos obtenidos a través del INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos), las principales causas de muerte en el Ecuador en el 2010 son las enfermedades hipertensivas con el 7% de incidencia, la diabetes con 6.5%, la neumonía con 5.4%, los accidentes de tránsito con 5.4%, los accidentes cerebrovasculares con 5.3% y los homicidios con 3.8%. (84)

Al encontrarse la diabetes como una de las principales causas de muertes se les recomienda a los pacientes una ingesta apropiada de alimentos antioxidantes porque al presentar descompensación metabólica se producirá una mayor producción de radicales libres generando a su vez un mayor estrés oxidativo con posibilidad de mayores complicaciones de la enfermedad de base, al estar expuestos a la contaminación del tabaco. (84)

Los antioxidantes previenen daño a moléculas biológicas por parte de los radicales libres. Una ingesta adecuada de legumbres, frutas, café, hierbas medicinales y verduras aseguraría los requerimientos necesarios para evitar el estrés oxidativo. Una dieta acorde a los requerimientos diarios debería determinarse de forma individual según las necesidades propias de cada individuo. (84)

Dentro de la dieta, una de las frutas con alto poder antioxidante es la guanábana que se produce en nuestro país y que en los últimos años ha aumentado su producción a nivel nacional debe ocupar un papel importante.

Por lo expuesto, la presente tesis tuvo como objetivo general, evaluar la actividad antioxidante y el valor nutracéutico de las hojas y frutos de la guanábana (*Annona muricata*).

La hipótesis planteada fue los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas y frutos de la guanábana tienen diferente actividad antioxidante y valor nutracéutico.

Se inició con el control de calidad de la droga cruda, elaboración de extractos, tamizaje fitoquímico, control de calidad de los extractos, cuantificación de flavonoides, fenoles totales. Seguido del análisis bromatológico para la determinación de los nutrientes (agua, proteína, carbohidratos, minerales), de la fibra y prueba complementarias para establecer el pH, acidez, °Brix, azúcares y vitamina C. Se concluyó con la actividad antioxidante total.

Como resultados se estableció que el valor nutritivo del fruto corresponde según bibliografía al de un fruto acuoso, destacando su contenido de proteína (1,1%) y minerales (0,75), el de la hoja destaca el alto contenido de proteína (3,92), fibra (4,34).

El valor nutracéutico de las hojas y frutos de guanábana es alto debido a la presencia de vitamina C en las fracciones alcohólicas (0,025 y 0,023 mg/ 100g respectivamente) y compuestos fenólicos totales para los extractos: alcohólico de las hojas, acuoso de las hojas, alcohólico de los frutos, acuoso de los frutos (484, 318, 454, 388 mg/ 100g respectivamente); la actividad antioxidante en los extractos (etanólicos y acuosos) es alta destacando (83 % para el extracto alcohólico del fruto y 77 % para el extracto acuoso del fruto).

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 VALOR NUTRACÉUTICO

1.1.1 DEFINICIÓN

Son componentes de los alimentos o partes del mismo que aportan un beneficio añadido para la salud, capaz de proporcionar beneficios médicos, inclusive para la prevención y el tratamiento de enfermedades. Es un agente bioactivo proporcionado en forma concentrada para mejorar las características nutritivas, es un componente del alimento, o una mezcla compleja de sustancias químicas, fisiológicamente activas, cumpliendo una función igual que los nutrientes de los alimentos, contribuyendo a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas. (86)

Los alimentos nutraceuticos son alimentos o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades juntamente con capacidad terapéutica definida, a parte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético; también son productos de origen natural con propiedades biológicas activas. El mundo de los nutraceuticos es el mundo de los medicamentos de origen natural. (12)

Los alimentos nutraceuticos de hoy, se pueden considerar como los precursores de los que serán los alimentos del siglo XXI. Al respecto, se está dando grandes cambios en la preparación de los alimentos. (12)

Existen varias definiciones con matices distintos:

- ❖ La doctora Mureen Mackey de la Monsanto Company, define como alimentos nutracéuticos a “los alimentos que proveen beneficio para la salud más allá de la nutrición básica”. (8)
- ❖ En una reciente encuesta sobre los “alimentos santé”, versión francesa de los alimentos nutracéuticos, la revista RIA (No 590) propone como definición: “alimento que contiene un ingrediente (nutritivo o no) con efecto específico sobre una o varias funciones del organismo con el fin de obtener efectos positivos que puedan justificar las alegaciones funcionales/fisiológicas, hasta las alegaciones de salud”. (8)

Alrededor de estos nuevos alimentos se está desarrollando también una industria que suministra ingredientes “nutracéuticos” o “funcionales”. Estos ingredientes pueden ser: aromas, preservantes, texturantes, colorantes, antioxidantes, ciertos ácidos grasos. (8)

1.1.2 CARACTERÍSTICAS

Cuando hablamos de nutracéuticos, nos referimos a una medicina biológica y de una categoría muy amplia de productos que deben cumplir los siguientes criterios:

- ❖ Ser productos de origen natural
- ❖ Que aporten estabilidad temporal
- ❖ Que aporten efectos beneficiosos para la salud, como son: mejora de una más funciones fisiológicas, acción preventiva y/o curativa y mejora de la calidad de vida
- ❖ Que aporten reproductibilidad, calidad, seguridad y eficacia.
- ❖ Estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas. (12)

1.1.3 CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS NUTRACEÚTICOS

1.1.3.1 Compuestos Nutritivos

Son sustancias que pueden ser utilizadas por el organismo en su metabolismo y que desempeñan funciones bien establecidas. En esta categoría que representa la fracción mayoritaria del alimento en sustancias seca (90%), se incluyen proteínas, hidratos de carbono, minerales y vitaminas. (17)

Estos son los azúcares y las grasas, dentro del primero cabe mencionar al chocolate, porque contiene alta cantidad de antioxidantes que evitan el daño y el riesgo de enfermedades crónicas y enfermedades trombóticas, potencia a otros antioxidantes que cuidan el cuerpo. (37)

1.1.3.2 Compuestos Químicos

Tenemos como punto de partida los antioxidantes, carotenos, fibra; antioxidantes porque, normalmente los seres humanos estamos expuestos a un gran número de agentes oxidantes como la contaminación, el estrés, humo del cigarro; además nuestro cuerpo produce radicales libres, los cuales van a producir la oxidación de membranas y daño al DNA desencadenando una serie de reacciones no deseables que conocemos con el nombre de cáncer, problemas cardiovasculares y envejecimiento. (72)

1.1.3.3 Probióticos

Son microorganismos vivos que una vez ingeridos en cantidades razonables ejercen acciones positivas en la fisiología intestinal que promueven o favorecen la salud. La forma más frecuente de consumo probióticos es en alimentos lácteos, que contienen bacterias que se reproducen en el intestino, como los lactobacilos y las bifidobacterias, por lo que estos alimentos tiene efectos benéficos adicionales a los de su función nutritiva. (5)

Entre algunos de los beneficios de estos alimentos se incluyen su acción coadyuvante en las enfermedades infecciosas gastrointestinales; también en enfermedades crónicas intestinales como la colitis ulcerosa, actúan como inmunomoduladores, favorecen la biodisponibilidad de los nutrientes y contribuyen al tratamiento de algunas enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulina dependiente, obesidad osteoporosis, cáncer. (5)

1.2 CALIDAD NUTRITIVA

La calidad nutritiva propiamente dicha de un alimento está determinada tanto por la calidad de los nutrientes que contiene. Estos dos aspectos “cantidad” y “calidad” permiten diferenciar entre dos conceptos de calidad nutritiva teórica es decir, su aporte en nutrientes (composición química), y el de calidad nutritiva real, que hace referencia a la proporción de los nutrientes que puede ser aprovechada por el organismo, tanto a nivel digestivo como metabólico (biodisponibilidad). (17)

1.2.1 VALORACIÓN ENERGÉTICA DE LOS ALIMENTOS.

La energía se puede obtener en los alimentos, y más concretamente de los tres macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) y del alcohol etílico contenidos en ellos. Por lo tanto, el valor energético de un alimento dado dependerá de su contenido en los citados componentes. (17)

El valor energético de un alimento es el calor almacenado en el mismo en forma de energía química, mientras que el valor nutritivo del mismo es un concepto más amplio, que además de depender del valor energético también depende de su digestibilidad y del contenido en el resto de principios nutritivos como son, fundamentalmente las proteínas. (10)

En el organismo, la cantidad de energía extraída es aproximadamente de 4 kcal/g en el caso de la oxidación de hidratos de carbono y proteínas de 9 kcal/g en el caso de la oxidación de lípidos y de 7 kcal/g para el alcohol. Conociendo los contenidos de estos cuatro componentes en el alimento, podrá estimarse la cantidad total de energía de dicho elemento. (17)

1.2.2 VALORACIÓN NUTRITIVA DE LOS ALIMENTOS

Este viene dado por la cantidad de nutrientes que aportan a nuestro organismo cuando son consumidos. Estos nutrientes pueden ser lípidos, glúcidos, proteínas, vitaminas y minerales. El valor nutritivo es diferente en cada grupo de alimentos, algunos alimentos posee más o menos nutrientes que otros. Es por eso, que para clasificarlos se debe tomar en cuenta el nutriente que más abunda en la composición. (79)

1.2.2.1 Nutrientes.

Las sustancias necesarias para que nuestro organismo funcione correctamente se denominan nutrientes. Son tan importantes que su carencia puede llegar a producir enfermedades graves o incluso la muerte. Y es que las células que conforman nuestros tejidos corporales necesitan nutrientes para mantenerse vivas. (73)

Los nutrientes contenidos en los alimentos, después de digeridos y absorbidos en el epitelio intestinal, entran en la circulación sanguínea y son distribuidos y utilizados en diferentes tejidos con fines de obtención de energía o como elementos estructurales o reguladores de las funciones biológicas. Algunos nutrientes son considerados como esenciales ya que el organismo no puede sintetizar, entre estos están algunos aminoácidos y ácidos grasos, así como minerales y vitaminas, que han de ingerirse con la dieta en cantidades adecuadas. (73)

Los nutrientes se clasifican en dos grandes grupos: macronutrientes (proteínas, hidratos de carbono lípidos) y micronutrientes (vitaminas y minerales. Por otro lado consideremos al agua. (31)

1.2.2.1.1 Macronutrientes

Los macronutrientes se requieren diariamente en grandes cantidades y están constituidos por macronutrientes orgánicos, que son proteínas, lípidos y glúcidos. (31)

Los macronutrientes orgánicos son los compuestos que utiliza el organismo para la obtención de energía y la formación de tejidos. Todos ellos son dirigidos en el tracto gastrointestinal para generar unidades básicas: aminoácidos, monosacáridos, ácidos grasos y glicerol, que son absorbidos y utilizados para la biosíntesis de macromoléculas y la obtención de energía. (31)

El agua es también un macronutriente, pero debido a que no obtenemos ningún “alimento” de ella (ni energía ni otros componentes esenciales), a menudo no se la considera como tal. No obstante, se trata del elemento más importante de nuestro cuerpo, tanto cuantitativa como cualitativamente. No sólo representa en torno a un 60% del peso total de nuestro cuerpo, sino que también es el elemento más indispensable. Generalmente, una pérdida de sólo un 8% del agua del cuerpo (alrededor de unos 4 litros) es suficiente para provocar una enfermedad grave. En cambio, en el caso de las proteínas; el segundo elemento en importancia; el margen de pérdida posible es de un 15% aproximadamente, cifra que, en el elemento más prescindible, la grasa, llega hasta el 90%. (83)

Las Proteínas son compuestos orgánicos, cuyas estructuras son formadas por aminoácidos. Los aminoácidos a su vez son compuestos formados por moléculas de carbón, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno y un grupo amino. La proteína supone aproximadamente el 17% de la masa corporal. Las proteínas desempeñan funciones estructurales como: facilitan la movilidad; intervienen en el transporte de numerosas sustancias en los fluidos corporales y a través de las membranas; intervienen como biocatalizadores en numerosas reacciones biológicas; participan en la regulación del sistema inmune. (7)

Los lípidos de la dieta están constituidos mayoritariamente por triglicéridos (grasas) y pequeñas cantidades de otros lípidos complejos tales como fosfolípidos, colesterol y otros componentes minoritarios (ceras, glicolípidos, vitaminas liposolubles, etc.). Las funciones más importantes de los lípidos de la dieta son servir de fuente de energía metabólica, proveer de elementos estructurales para las membranas celulares, servir como fuente de agentes emulsionantes, para la propia absorción de los triglicéridos, y como lubricantes de las superficies corporales, servir de vehículo para el transporte de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y actuar como precursores de hormonas y de otras moléculas de señalización celular. (27)

Los Glúcidos también conocidos como carbohidratos. Son combinaciones de tres elementos C, H y O. Forman estructuras moleculares complejas que por hidrólisis pueden dar lugar a los denominados azúcares simples como azúcares mono y disacáridos y también forman polisacáridos almidón, celulosa, hemicelulosa y pectinas. Para dosificar los azúcares existen variedades de métodos que se basan en distintas propiedades de estos compuestos. Los métodos más usados para la dosificación de azúcares son: Cromatográfico, refractométricos, enzimáticos, químicos. (11)

1.2.2.1.2 Micronutrientes

A diferencia de los macronutrientes, los micronutrientes casi no aportan energía, sino que constituyen unos factores de colaboración esenciales para que el metabolismo funcione. (83)

Los Micronutrientes son principalmente:

- ❖ Vitaminas (por ejemplo, las vitaminas A, B, C, D, E y K)
- ❖ Minerales (como el calcio y fósforo)
- ❖ Oligoelementos (como pueden ser el hierro, zinc, selenio y manganeso).

Aunque estos nutrientes se necesitan en cantidades muy pequeñas, son, sin embargo los elementos alimentarios clave. Sin ellos no tendrían lugar los procesos de crecimiento y producción de energía, al igual que otras muchas funciones normales. (83)

Las vitaminas son un tipo de nutrientes esenciales para que se puedan producir con normalidad las funciones metabólicas de nuestro organismo. Son pequeñas piezas indispensables para que puedan realizarse ciertas reacciones metabólicas, funcionando muchas de ellas como cofactores de las reacciones enzimáticas. Las vitaminas se dividen en dos grupos: hidrosolubles (grupo B y C) y liposolubles (A, E, D y K). Las primeras son solubles en agua y actúan en reacciones para la formación de tejidos y energía a partir de los macronutrientes. (25)

Los macro minerales con funciones electrolíticas (tiene una carga positiva o negativa) son el sodio, el potasio, el cloro, el calcio, magnesio y fósforo. (3)

Desempeñan un papel importante en los procesos vitales y forman parte de la composición de los elementos químicos que constituyen la materia orgánica. Se encuentran en forma de sales y se ingieren disueltos en agua. Los minerales son elementos que el cuerpo requiere en proporciones pequeñas para su conservación, crecimiento y reproducción. (3) (25)

Los oligoelementos son micronutrientes que se necesitan en poquísima cantidad pero son esenciales para que puedan desarrollarse correctamente las funciones metabólicas. Entre ellos encontramos el selenio, hierro, azufre, etc. (25)

1.3 RADICALES LIBRES

Los radicales libres (RL) o más modernamente llamados especies reactivas de Oxígeno (ERO), son moléculas que tienen un número impar de electrones, su otro nombre se debe a que la mayor parte de los radicales libres de interés derivan del oxígeno. Esta peculiaridad química les hace muy reactivos y forma la base de su posible toxicidad. (19)

1.3.1 FORMACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES

Los mismos se forman por fuentes endógenas y exógenas.

Hablando de las fuentes endógenas, la mitocondria es el principal productor de las ERO, ya que la respiración celular se verifica específicamente a este nivel. Como se sabe el 90% del total del oxígeno inhalado se consume en la mitocondria y alrededor del 2 % del oxígeno reducido se transforma en el radical superóxido ($O_2\cdot$). (39)

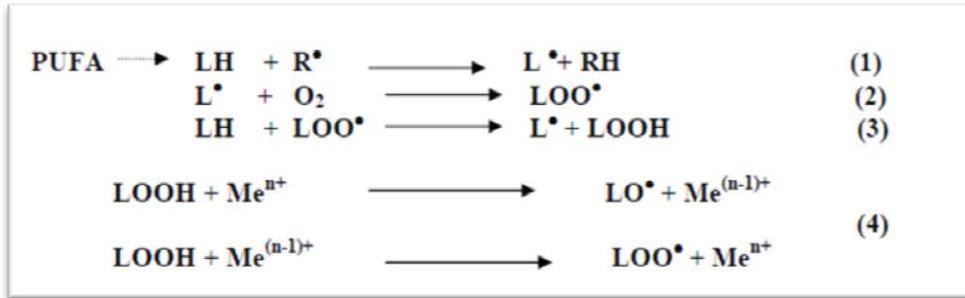
Otra fuente de este radical son los fagocitos activados que producen el superóxido como mecanismo protector frente a agentes u organismos extraños. Dentro de las fuentes exógenas tenemos: Ambientales (tabaco, radiación electromagnética, luz solar, ozono etc.), farmacológicas (xenobióticos, drogas etc.), nutricionales (contaminantes, aditivos etc.) (78)

La peroxidación lipídica se relaciona con la formación de radicales libres, reactivos e inestables a nivel de la membrana celular, con reacciones en cadena subsiguiente que dan pie a oxidación y muerte celular. (36)

De particular importancia son las reacciones mediadas por radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado ($\text{R}\cdot$). Este último reacciona con oxígeno para formar peróxidos cíclicos y radicales hidroperóxidos ($\text{ROO}\cdot$) que propagan esta reacción en cadena. Se forman igualmente radicales alcoxílicos lipofílicos ($\text{RO}\cdot$). La peroxidación lipídica puede seguir propagándose en presencia de metales de transición (Men^+) existentes en el plasma, los que son catalizadores oxidativos. (36)

Fase de iniciación de la peroxidación lipídica provocada por el radical ($\text{R}\cdot$), el que reacciona con un grupo metileno de un PUFA. La segunda etapa de propagación; el oxígeno molecular reacciona con el radical carbonilo y forma rápidamente el radical lipoperóxido ($\text{LOO}\cdot$). Éste puede sustraer un hidrógeno de otro ácido graso poliinsaturado (PUFA), análogo a (1); (3) reacción que termina la propagación formándose el producto estable de la peroxidación, el hidroperóxido lipídico (LOOH), pero implica la posible conversión de numerosos PUFAs en hidroperóxidos; (4) en presencia de metales de transición el hidroperóxido lipídico (LOOH) puede generar radicales capaces de reiniciar la lipoperoxidación lipídica por el ciclo redox de estos iones metálicos. Como lo muestra la Figura No 1. (36)

La formación de cierta tasa de radicales libres en las células es un proceso normal e inevitable, los radicales libres producidos por el cuerpo para llevar a cabo determinadas funciones son neutralizados fácilmente por nuestro propio sistema. (36)

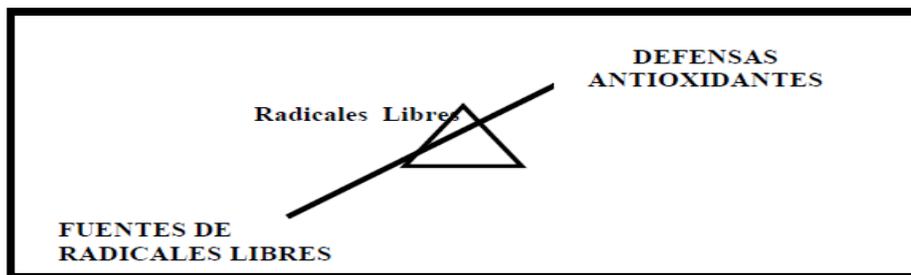


FUENTE: <http://www.ciencia-ahora.cl/Revista17/03RadicalesLibres.pdf>

FIGURA No. 1 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA INICIADA POR EL RADICAL EL RADICAL (R')

1.3.2 REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES

La reactividad de los radicales libres formados durante los procesos metabólicos normales, les permite inducir un amplio espectro de reacciones nocivas para el organismo humano, se crea un estrés oxidativo que se produce cuando el aumento del contenido intracelular de EROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas ya que atacan a los lípidos y proteínas de la membrana celular por lo que la célula no puede realizar sus funciones vitales (transporte de nutrientes, eliminación de desechos, división celular). Como se observa en la Figura 2. (36) (6)



FUENTE: <http://www.ciencia-ahora.cl/Revista17/03RadicalesLibres.pdf>

FIGURA No. 2 ESTRÉS OXIDATIVO

En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas de oxígeno que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. (36)

Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiopatías, enfermedades neurológicas y el cáncer. (36)

El radical superóxido, O_2^- , que se encuentra normalmente en el metabolismo provoca una reacción en cadena de la lipoperoxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular. Atacan al DNA impidiendo que tenga lugar la replicación celular y contribuyendo al envejecimiento (6)

1.3.3 ENFERMEDADES CAUSADAS POR LOS RADICALES LIBRES

Se han propuesto dos formas de producir enfermedades por radicales: en la primera el estrés oxidativo origina la enfermedad y en la segunda una enfermedad causada por noxas diferentes, origina estrés oxidativo el cual en algunos casos puede agravar o hacer crónica esta enfermedad. (26)

En el primer caso se puede mencionar la radiación ionizante la cual genera directamente OH^- a partir de moléculas de agua. Muchas de las consecuencias biológicas del exceso de exposición a la radiación puede ser debidas al daño producido por los radiales libres a los lípido, proteínas y al DNA. (26)

En el segundo caso se ha encontrado suficiente evidencia de que las reacciones de los radicales libres contribuyen en forma importante en la patología de las siguientes enfermedades: arteriosclerosis, artritis reumatoidea, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, injuria de reoxigenación y daño traumático o isquémico del sistema nervioso central. (26)

1.3.4 MECANISMOS Y SISTEMAS DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los mecanismos de defensas antioxidante comprenden componentes enzimáticos y no enzimáticos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Como se ilustra en la figura No. 3. Conociéndose como antioxidante a las sustancias que cuando están presentes retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de las ERO. (35)



FUENTE: BOVERI, A. 1999

FIGURA No. 3 MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Para protegerse de los daños oxidativos, los organismos han desarrollado una variedad de sistemas de defensa antioxidantes, los cuales incluyen a las proteínas secuestrando ERO y materiales de transición, vitaminas C,E y enzimas antioxidantes especializadas, sin embargo cuando los sistemas antioxidantes defensivos del organismo se ven superados por la actividad antioxidante dañina de los radicales aparece un estrés oxidativo iniciador de situaciones patológicas con una mayor o menor trascendencia sobre la salud . (6) (29)

El sistema de enzimas antioxidantes, se encuentra en los sitios donde se producen los oxidantes (orgánulos o estructuras supramoleculares), con la finalidad de reducirlos parcialmente y con ello disminuir o anular la capacidad electrofílica de los oxidantes. (43)

Para poder realizar la reducción de los oxidantes se requiere tener un par reductor que se oxide, estos son los cosustratos antioxidantes, tales como el glutatión y el NADPH. Otro juego de enzimas se encarga de la regeneración los cosustratos de las enzimas antioxidantes y de algunos antioxidantes, lo que permite mantener la capacidad de acción de las enzimas y el poder reductor antioxidante de la célula. (43)

La otra línea de defensa son los antioxidantes endógenos y los exógenos, los cuales ofrecen electrones con gran afinidad para los oxidantes y que estos reaccionen con el antioxidante en lugar de que reaccionen y oxiden a las macromoléculas. (6)

Todos estos mecanismos y respuestas condicionan el estrés oxidativo inducido por el insulto oxidativo y la calidad y cantidad de ambos determina el daño oxidativo resultante. (43)

1.4 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son fuertes agentes reductores debido a las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxilo y las relaciones estructurales entre diferentes partes de su estructura química, poniendo fin a la reacción en cadena, estabilizando así al átomo, que ha estado intentando encontrar una pareja para su electrón desaparejado. Ejercen sus propiedades protectoras previniendo la producción de radicales libres o neutralizando los producidos en el cuerpo en sus funciones habituales, como la respiración o la digestión. (14) (69)

1.4.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

La clasificación que establece Céspedes Teresita y Daniel Sánchez dice que: los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios y terciarios, en dependencia de su mecanismo de acción o función, también se los clasifica según el sitio donde ejercen su acción y según su origen. (41)

1.4.1.1 Según su función

1.4.1.1.1 Primarios

Previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. (37)

Por ejemplo:

- ❖ Superóxido dismutasa (SOD): convierte O_2 en peróxido de hidrógeno
- ❖ Glutación peroxidasa (GP_X): convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres
- ❖ Proteínas de unión a metales (Ferritina, Ceruloplasmina): Limitan la disponibilidad de Fe necesaria para formar el radical OH. (64) (3)

1.4.1.1.2 Secundarios

Capturan los radicales libres, evitando la reacción en cadena. Por ejemplo Vitamina E, vitamina C, ácido úrico, albúmina. (35)

Terciarios

Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. (35)

1.4.1.2 Según su sitio de acción

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente –membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. (40). Como miramos en la Tabla No. 1.

Las enzimas intracelulares son responsables del atrapamiento de radicales libres producidos in situ como resultados del metabolismo celular. (2)

Las sustancias antioxidantes extracelulares están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y pueden desempeñar un papel en la prevención de la aterosclerosis, teóricamente, porque protegen a las lipoproteínas de la oxidación en el líquido extracelular. (2)

TABLA No. 1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES SEGÚN EL SITIO DONDE EJERCEN SU ACCIÓN

INTRACELULAR	MEMBRANA	EXTRACELULAR
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Tranferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistema proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

FUENTE: CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES <http://es.scribd.com/doc/81016103/Proyecto-2>

1.4.1.3 Según su origen

Los antioxidantes se clasifican en ENDÓGENOS, fabricados por la propia célula, y EXÓGENOS, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes. (28). Como se observa en la Tabla 2.

TABLA. 2 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

EXÓGENOS	ENDÓGENOS	COFACTORES
VITAMINA E	GLUTATIÓN	COBRE
VITAMINA C	COENZIMA Q	ZINC
BETACAROTENO	ÁCIDO FÓLICO	MANGANESO
FLAVONOIDES	EZIMAS: CATALASA SUPERÓXIDO DISMUTASA	HIERRO

FUENTE: ACTUALIZACIONES EL MÉDICO "VITAMINAS Y ANTIOXIDANTES 2009 GRUPO SANED . BARCELONA MOYA M. CRIADO C. PG 11

1.4.2 IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS COMO ANTIOXIDANTES

Hace unas tres décadas se descubrió que existe una enzima en nuestras células cuya única función aparente es la eliminación de un radical libre formado a partir del oxígeno y conocido con el nombre de Superóxido (3)

Hasta entonces se pensaba que los radicales libres eran tan malos que producirlos nuestras células; pero la presencia de esta enzima, la superóxido dismutasa (SOD), demostró lo contrario, ya que cuando los glóbulos blancos se encuentran con una bacteria, producen superóxido para eliminarla, protegiéndonos de la infección. Fue así como se llegó a la conclusión de que en nuestra relación con el oxígeno también se forman radicales libres derivados del simple hecho de respirar y que su presencia no está relacionada exclusivamente con el deterioro. Las principales enzimas antioxidantes son: (3)

1.4.2.1 Catalasa (CAT)

La catalasa convierte el peróxido de hidrogeno en agua y O_2 . Tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular: mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos); presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa, forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. (3) (34)

1.4.2.2 Glutación peroxidasa (GP_x)

La función antioxidante más importante del glutati3n es eliminar H_2O y la peroxidasa lipídica. El glutati3n también está implicado en la reducci3n de diversos antioxidantes a su estructura original. (33)

Existen al menos 3 formas de GP_x seleno dependientes que difieren en su ubicación y en su especificidad de sustrato: una forma intracelular o celular, una extracelular o plasmática y otra con actividad específica para los fosfo lipoperóxidos que, por lo general, está asociada a la membrana celular. (28)

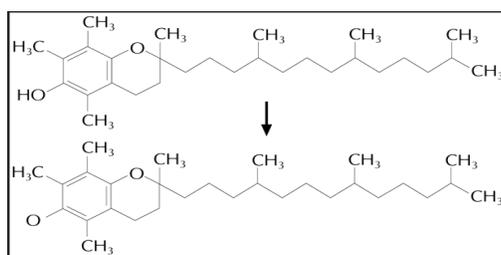
1.4.2.3 Superóxido dismutasa.

La Superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno. Está presente en todas las células, con una concentración diferente en los distintos tejidos proporcional a la actividad metabólica de cada célula. En humanos existen tres formas de superóxido dismutasa. SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular. SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo. (27)

1.4.3 IMPORTANCIA DE LOS ANTIOXIDANTES EXÓGENOS

Los vegetales producen una gran diversidad de compuestos antioxidantes que incluyen carotenos, flavonoides, ácido cinámico, ácido benzoico, ácido fólico, ácido ascórbico. Otros antioxidantes, como los taninos y terpenos, tienen funciones adicionales; así, los taninos precipitan proteínas y los terpenos protegen a las plantas porque son tóxicos para los insectos. Otros antioxidantes, como los taninos y terpenos, tienen funciones adicionales; así, los taninos precipitan proteínas y los terpenos protegen a las plantas porque son tóxicos para los insectos. (2)

1.4.3.1 Vitamina E



FUENTE: VITAMINA E <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n17/antioxidantes.htm>

FIGURA No. 4 OXIDACIÓN DE LA VITAMINA E

Existen ocho estructuras químicas en la naturaleza con actividad vitamínica E: Cuatro son tocoferoles y cuatro tocotrienoles. (2)

La vitamina E, en su actividad antioxidante pierde un átomo de hidrógeno del hidroxilo aromático formándose un radical mucho menos reactivo -radical tocoferoxil. (44) .Como se representa en la Figura No 4

La reactividad de la vitamina E con los radicales orgánicos peroxilos se asocia con las propiedades redox del anillo cromano y es la responsable de su capacidad antioxidante. La vitamina funciona *in vivo* como un antioxidante que protege a los lípidos tisulares del ataque por los radicales libres. (44)

Los radicales peroxilos (LOO), pueden generarse, por ejemplo, a partir de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de las membranas o en las lipoproteínas después de la pérdida de hidrógenos (proceso llamado iniciación) y la adición de una molécula de oxígeno.

En plasma y en eritrocitos, la vitamina E es el principal antioxidante liposoluble que protege los lípidos contra el daño oxidativo. (44)

1.4.3.2 Vitamina C

El ácido L – ascórbico (AA) o vitamina C es el antioxidante más abundante en los tejidos vegetales. Su concentración es el orden de mili molar, aunque hay que tener en cuenta que el contenido de AA varía en función del tipo de tejido, del estado fisiológico de la planta, así como de las condiciones medioambientales. Los mayores niveles de AA se encuentran en tejidos fotosintéticos, frutos y órganos de almacenamiento y su contenido es mayor en tejidos jóvenes que en adultos. (87)

El ácido L – ascórbico (ácido 2,3-enediol gutónico o 2-oxo-L-treo-hexono-1,4-lactona-2,3-enediol), este es un compuesto químicamente sencillo aunque presenta una estructura atípica cuya fórmula empírica es $C_6H_8O_6$. Es un derivado lactónico del ácido hexurónico y se corresponde con una forma oxidada de la glucosa. (17)

En concreto es una cetolactona de seis átomos de carbono que muestra un anillo de lactona de cinco miembros y un grupo enediol bifuncional con un grupo carbonilo adyacente. El grupo enediol es esencial para su actividad biológica. Figura No 5. (17)



FUENTE: GIL, A. 2010

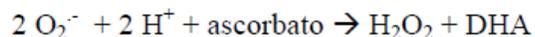
FIGURA No. 5 ESTRUCTURA DE LA VITAMINA C

Es un potente agente reductor que es capaz de neutralizar radicales libres en sistemas biológicos. A pH fisiológico la forma predominante es el ascorbato (87)

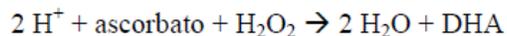
A nivel celular, el AA se encuentra en el citosol, cloroplasto, vacuola, mitocondria y apoplasto. Sus niveles son especialmente elevados en el citosol y en los cloroplastos y su concentración oscila entre 10 y 20 mM, respectivamente. (87)

La acción antioxidante del AA es bien conocida (ver Figura No 6). Así, este compuesto "

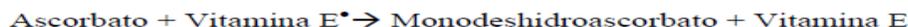
1. Reacciona directamente con O_2^- , $\cdot OH$, y O_2 . El AA puede actuar reduciendo al O_2^- dando lugar a H_2O_2 y dehidroascorbato (DHA) de acuerdo con la reacción:



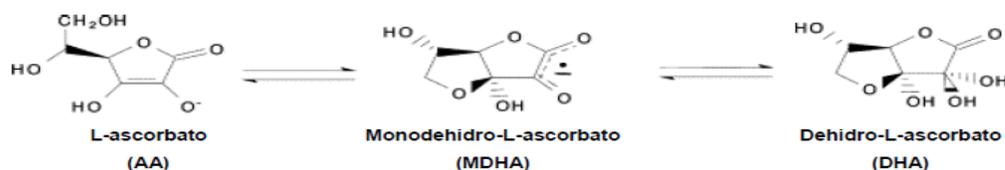
El ascorbato también es un secuestrador eficiente del oxígeno singlete y es capaz de reaccionar con los radicales $\cdot OH$ y con el peróxido de hidrogeno, según la reacción:



2. Regenera la vitamina E, mediante la reducción del radical tocofeoxil en un ciclo redox en el cual se transfiere un solo electrón según la ecuación:



3. Es esencial en la protección de enzimas que poseen metales de transición como grupos protéticos. Por todo ello, el ácido ascórbico se considera un antioxidante muy eficiente aunque no debe ignorarse que en algunas circunstancias, como en presencia de metales traza y en condiciones de pH adecuadas, puede actuar como pro-oxidantes e incluso tener efectos mutagénicos. (87)



FUENTE:<http://repositorio.bib.upct.es/dspace/bitstream/10317/159/2/proyecto%20del%20tomillo-def.pdf>

FIGURA N.º. 6 DIFERENTES ESTADOS REDOX DEL ASCORBATO

La forma disociada, el anión ascorbato (AA) es la predominante a pH fisiológico (5-7). El primer producto de la oxidación del AA es un radical libre similar a las semiquinonas denominado monodehidroascorbato (MDHA). El MDHA dismuta espontáneamente a AA y a deshidroascórbico (DHA). (87) Figura No 6

Además de su actividad antioxidante, el ácido ascórbico actúa como cofactor de un gran número de enzimas – dioxigenasas implicadas en diversas rutas metabólicas clave y participa en la regulación de diversos procesos celulares como la foto protección (ciclo de las xantofilas) y la regulación de la fotosíntesis, la expansión celular y el ciclo celular.

El contenido foliar de ascórbico puede modular la expresión de genes implicados en la defensa vegetal y en el control del desarrollo. (87)

Algunos estudios han puesto de manifiesto la capacidad antioxidante de esta vitamina en los leucocitos, en lo que se genera gran cantidad de radicales libres durante la fagocitosis y activación de los neutrófilos como consecuencia de procesos inflamatorios o infecciosos. La vitamina C neutraliza al hipoclorito, potente oxidante generado por la mieloperoxidasa producida por los neutrófilos y los monocitos activados. (17)

Existen diversos métodos para la determinación de Vitamina C, dentro de los que se podrían destacar el método de titulación de óxido reducción con 2,6 diclorofenol indofenol, y el de oxidación del ácido ascórbico a dehidroascórbico. La técnica de cromatografía (HPLC), ha sido utilizada para la determinación de vitamina C, previamente de una curva de calibración de soluciones patrón de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm de concentración de ácido ascórbico de pureza conocida. (61)

1.4.3.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10.000 compuestos: algunos son solubles sólo en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glicósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles. (16)

La fórmula general AR-OH, donde AR es un anillo aromático y el -OH está directamente unido a este anillo, son caracterizados por un núcleo bencénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos. Actúan como antioxidantes naturales, esta actividad puede variar significativamente dependiendo de ciertas variables como su concentración, la estructura química de la molécula y su grado de oxidación. En cuanto a la concentración se ha encontrado que aún con cantidades pequeñas de antioxidantes, algunos antioxidantes fenólicos entran a la circulación sistémica y causan un aumento significativo en el estado antioxidante del plasma. (16) (66)

1.4.3.3.1 Clasificación de los compuestos fenólicos

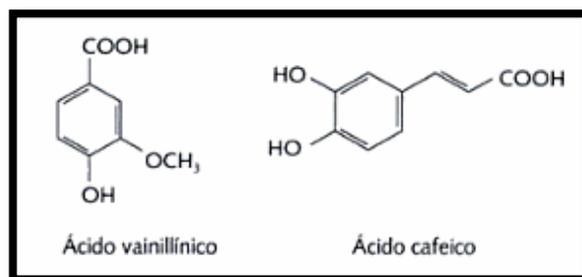
Su clasificación está basada sobre la distinción entre compuestos no flavonoides y flavonoides. Estos últimos tienen esqueleto en C6-C3-C6. Los polifenoles incluyen también a los derivados (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) que resultan de las sustituciones de la estructura base. (16)

Los compuestos no flavonoides

Esta denominación abarca a los ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos (C6-C1) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada (C6-C3), pero también a otros derivados fenólicos como los estilbenos. (16)

Los fenoles libres y los ácidos fenólicos se consideran en un mismo grupo, ya que generalmente se identifican simultáneamente durante el análisis de las plantas. La estructura básica de los ácidos fenólicos es un anillo aromático con un grupo carboxilo. Los ácidos de la serie benzoica, tales como el gálico, el vainillínico, el p-hidroxibenzoico son abundantes en las espermatofitas y los helechos. En el caso de la serie cinámica, los ácidos cinámicos (cafeíco, ferúlico, p-cumárico y sináptico) raramente se encuentran libres y en general se hallan en forma de derivados. (13)

Como apreciamos en la Figura No. 7



FUENTE: CASTILLO, E. MARTÍNEZ, I. 2007

FIGURA NO. 7 COMPUESTOS FENÓLICOS SENCILLOS

Los Estilbenos son compuestos formados por 2 anillos de benceno separados por 2 átomos de carbono, Se encuentra en una gran número de especies vegetales, fundamentalmente en la médula del tronco de especies como el pino o el eucalipto. (13)

Flavonoides

Flavo proviene del latín *flavus* y significa de color entre amarillo y rojo, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Los flavonoides son moléculas polifenólicas que pueden ser vistos como dos anillos de benceno unidos por una pequeña cadena de tres carbonos. Uno de estos átomos de carbono está siempre conectado a uno de los anillos de benceno; ya sea directamente o por puente de hidrógeno, formando así un tercer anillo en el centro, el cual puede tener cinco o seis miembros. (42)

Se han caracterizado más de 5000 flavonoides que existen en la naturaleza proveniente de varias plantas; se clasifican en varios subgrupos de acuerdo a la posición del sustituyente sobre el anillo C. Tanto el estado de oxidación del anillo heterocíclico como la posición del anillo B, son importantes para la clasificación. En la Tabla No 3 se muestra a los principales subgrupos de flavonoides que son: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas e isoflavonoides. (42)

TABLA. No 3 CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo -OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Antocianidina	
Flavanos	Con un grupo -OH en posición 3 del anillo C	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. (42)

1.4.3.3.2 Actividad biológica de los compuestos fenólicos

.La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento. (62)

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora. Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticáncer, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. (62)

1.4.3.3.3 Actividad antioxidante de los fenoles en los alimentos

Los taninos también son una fuente importante de antioxidantes. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos consumen compuestos fenólicos a diario. El rango de consumo es de 25 mg a 1g por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias). En dosis muy elevadas, más de un 5% contenido en los alimentos o más de 100 mg / diarios, puede resultar tóxico, pues pueden provocar alguna alteración digestiva, como dolor de estómago, diarrea, falta de apetito, sangre en la orina, etc. (67) (70)

Las frutas en general, y en particular, las frutas pequeñas ó berries, contienen una amplia gama de flavonoides y ácidos fenólicos que muestran actividad antioxidante. Los principales subgrupos en berries y frutas son los antocianos, proantocianidinas, flavonoles y catequinas. (62)

Los extractos crudos de frutas, hierbas, verduras, cereales y otros materiales vegetales ricos en fenoles están generando interés en la industria de los alimentos debido a que retardan la degradación oxidativa de los lípidos, y por lo tanto mejoran la calidad y el valor nutricional de los alimentos. La importancia de los constituyentes antioxidantes de los materiales vegetales en el mantenimiento de la salud y la protección contra la enfermedad coronaria y el cáncer aumenta el interés de los elaboradores de alimentos y de los consumidores. (70)

1.4.4 ANTIOXIDANTES NATURALES

Los antioxidantes naturales provienen de la dieta. Dentro de este grupo también cuentan la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. (12)

El selenio, el más tóxico de los minerales incluidos en nuestra dieta, actúa junto con la vitamina E como antioxidante. Sus fuentes son la carne, pescado, cereales integrales y productos lácteos. (12)

Existe un grupo de compuestos naturales, los polifenoles, que son potentes antioxidantes presentes en verduras y frutas, en los que ejercen acciones secundarias como otorgar coloración y participan en el proceso de polinización. En esta familia se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos y taninos. Estas sustancias son capaces de captar especies reactivas de oxígeno, consumiéndose en este proceso. (12)

Entre las fuentes de polifenoles podemos citar legumbres verdes, ajo, té verde, aceite y frutos del olivo, semillas de café, uvas, y frutos cítricos. La Vitamina C se encuentra en frutos como guanábana, guayaba, papaya, mora y en verduras como tomate, espinaca, rábano, brócoli. (12)

1.4.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia antioxidante de inhibir la degradación oxidativa disminuyendo la presencia de las especies reactivas de oxígeno antes de su ataque a diversos sustratos (lípidos, proteínas, DNA). Los compuestos antioxidantes son esencialmente importantes para los seres vivos, porque tiene la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo de los radicales libres, cumpliendo un rol preventivo en el desarrollo del envejecimiento y de ciertas enfermedades. (32) (69)

Esto es de suma importancia debido a que las especies reactivas de oxígeno producen diversas acciones sobre el metabolismo que puede ser el origen del daño celular, porque actúan:

1. Sobre los lípidos polinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).
2. Sobre los glúcidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
3. Sobre las proteínas produciendo inactividad y desnaturalización
4. Sobre los ácido nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el organismo también utiliza a los radicales libres para la destrucción de bacterias y patógenos invasores. Por lo tanto, el problema real se presenta cuando las EROS sobrepasan tanto las defensas endógenas como las exógenas ocasionando los daños antes mencionados. (46)

Cabe mencionar que la actividad antioxidante puede ser evaluada tanto experimental como teóricamente. Cada uno de los métodos que se enfoca en la evaluación de esta propiedad ofrece diferente con fiabilidad de resultados. Si bien, las determinaciones hechas mediante métodos experimentales muestran el grado de interacción entre el radical libre y e antioxidante mediante un valor, lo métodos teóricos puede proporcionar los factores estructurales que provocan ese grado de interacción. (46)

1.4.5.1 Análisis de la actividad antioxidante

Los métodos para ensayar la actividad antioxidante de una muestra pueden ser clasificados, en principio, en dos categorías: 1) Aquellos métodos que miden la capacidad para ceder un electrón (o un átomo de hidrógeno) a una EAO específica o a cualquier otro aceptor electrónico; y 2) métodos que determinan la capacidad para eliminar la fuente de inicio del proceso oxidativo, por ejemplo, inhibición de enzimas, quelatación de metales de transición, absorción de luz UV, etc. (87)

Dentro de los métodos se enumeran los siguientes:

- 1) Capacidad de absorbencia del radical oxígeno (ORAC).
- 2) Método de blanqueamiento de Crocina.
- 3) Parámetro total del atrapamiento de radicales por antioxidantes.
- 4) Fenoles totales por reactivo Folin-Ciocalteu.
- 5) Poder reductor
- 6) Potencial antioxidante total usando Cu(II)
- 7) Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH●)
- 8) Inhibición de la Polifeniloxidasas (PPO)

Las Técnicas *in vivo* de detallan a continuación

1. Evaluación de efecto citotóxico.
2. Evaluación de oxidación de lípidos *in vivo*. (69)

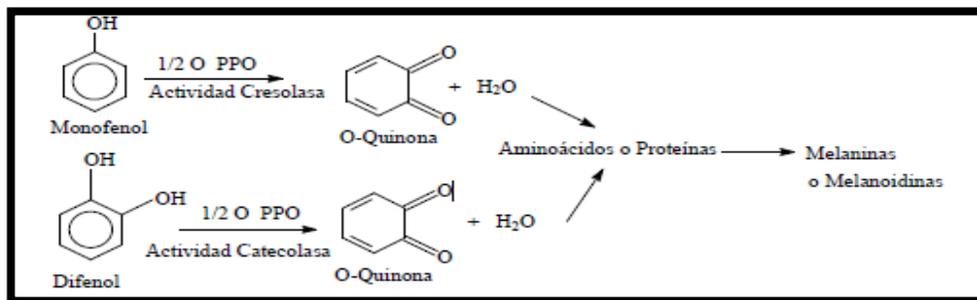
1.4.5.1.1 Inhibición de la Polifenoloxidasas (PPO)

La Comisión de Enzimas (EC) clasifica la polifenol oxidasas, con el número 1.10.3.1. dentro de la clase de las Oxido reductasas, actuando sobre difenoles con oxígeno como aceptor. (69)

En las plantas, la enzima es mayormente conocida como polifenoloxidasas (PPO), ya que sus principales sustrato son compuestos fenólicos (monofenoles u o-difenoles presentes en los tejidos vegetales, como aminoácidos tirosina, la catequina, el ácido cafeico, el ácido clorogénico, y otros. En los tejido vegetales intactos, la PPO y los sustratos están separados por estructuras celulares y el pardeamiento no se lleva a cabo; al realizar un corte, o al dañar en cualquier forma la integridad del fruto o verdura, se permite que la enzima y sus sustratos se pongan en contacto y den lugar a la aparición de coloraciones oscuras o pardas. (20)

En la reacción de pardeamiento enzimático, los monofenoles son hidroxilados por la PPO, en presencia de oxígeno y forman orto- dihidroxifenoles tales como el catecol, los cuales son oxidados por la enzima y forma o- quinonas. (20)

Las quinonas pueden reaccionar con grupos nucleofílicos presentes en las proteínas, como algunos aminoácidos, grupos fenólicos y otros, generalmente pigmentos oscuros de estructura desconocida y denominados en forma genérica como “melanoidinas”. (20). Como se observa en la Figura No. 8



FUENTE: GUERREO, C. 2009

FIGURA NO. 8 ACTIVIDAD DE LA POLIFENOLOXIDASA

El pardeamiento enzimático puede ser controlado a través del uso de métodos químicos y físicos, a menudo empleados en combinación. Los métodos físico comúnmente utilizados son la reducción de la temperatura, el oxígeno y el uso de atmosferas modificadas o películas de recubrimiento. La utilización de los métodos químicos dependerá de lo que se desee inhibir, ya sea la enzima, el sustrato (oxígeno o compuestos fenólicos) o los productos. (20)

Actúan sobre las enzimas mediante acidificación, alcalinización y tratamientos térmicos son frecuentemente aplicados para inhibir la actividad enzimática. La alcalinización no puede ser aplicada a compuestos fenólicos por su alta sensibilidad a la oxidación a pH alcalinos. (20)

La PPO muestra su actividad optima a un pH entre 5 y 7 y la enzima parece relativamente sensible a pH ácidos. Pero, el control del pardeamiento enzimático únicamente por acidificación es muy difícil, a menos que sea a pH muy bajo. La remoción completa del oxígeno es una forma muy satisfactoria para el control de la oxidación fenólica catalizada por la PPO, aunque este método no puede ser aplicado a tejidos vivos porque puede causar condiciones anaeróbicas y tampoco es aceptable en algunos productos frescos. (60)

1.5 GUANÁBANA (*Annona muricata*)



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA No. 1 ÁRBOL DE GUANÁBANA, *Annona muricata*.

1.5.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Leon (1968) cita al Brasil como centro de origen de la guanábana. Fouqué (1972) lo amplía a las tierras de América tropical distribuida en la cuenca amazónica . Hernández de Oviedo describió por primera vez este frutal en 1526 en su Historia Natural de las Indias, donde menciona que los exploradores españoles lo encontraron creciendo en forma abundante en Centro y Sur América. La guanábana fue una de las principales frutas en ser llevadas desde el nuevo mundo a otras regiones tropicales. Es una fruta popular en zonas tan lejanas como el sur de China, Australia y África. (4)

El área de distribución natural de la *guanábana* es desde la región tropical del sur de México, Centro América, el norte de América del Sur y las Antillas. Hoy en día, crece en áreas tropicales y húmedas a nivel mundial ya que es una especie que climas húmedos, baja altitud y no es exigente en cuanto al suelo. (4)

1.5.2 NOMENCLATURA BOTÁNICA

1.5.2.1 Aspectos Taxonómicos

Las especies de la familia Anonaceae se caracterizan por el arreglo en espiral de los estambres y carpelos de la flor y por tener semilla con endospermo ruminado. La Guanábana pertenece al género Guanabí y a la sección Evannonna. (59)

Como se especifica en la Tabla No 4.

TABLA. 4 TAXONOMÍA DE LA GUANÁBANA

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Spermatophytia
SUBDIVISIÓN	Angiosperma,
CLASE	Dicotiledónea
SUBCLASE	Archylamudae
ORDEN	Ranae
FAMILIA	Anonaceae
GÉNERO	Annona
ESPECIE	Muricata L.

FUENTE: CHICAIZA, G. PUCHA, M. UTIGUEN, P. 2003

1.5.2.2 Etimología y nombres comunes

Annona, del nombre taíno *anona* aplicado al anón (*Annona squamosa*); *muricata*, palabra latina que significa "erizado", en referencia al aspecto de la piel del fruto.

Español: guanábana, guanaba (Guatemala), graviola

Portugués: graviola, chirimoya brasilera.

Filipinas: se usan nombres derivados del español, *laguaná* en el idioma chamorro mientras que en tagalo es *guyabano*. (1)

1.5.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Se trata de un pequeño árbol perenne, perteneciente a la familia de las Annonáceas, caracterizado por presentar una altura cercana a los 6-8 metros hasta 10. Su tronco es recto, de corteza lisa y color grisáceo, ramifica a baja altura siendo el ramaje intenso con ramas delgadas y grisáceas o pardeo grisácea. Su sistema radicular extensivo le permite soportar períodos relativamente largos de sequía, ya que explora y cubre una amplia franja de terreno. En suelos sin ningún obstáculo, las raíces llegan a penetrar más de un metro de profundidad. (1) (59)

1.5.3.1 Hojas

Ovadas - oblongas y ocasionalmente elíptico - oblongas , miden de 5 a 15 cm de largo por 2 a 6 cm de ancho, usualmente coto – acuminadas en el ápice y agudas o un poco redondeadas en la base, de color verde oscuro, brillante en el haz, amarillentas con estructuras semejantes a bolsas en las axilas de los nervios laterales por el envés. (6) (21)

1.5.3.2 Flores

Las flores, hermafroditas, se forman sobre ramitas cortas auxiliares o directamente sobre el tronco. Poseen tres sépalos color verde oscuro y seis pétalos de color cremoso. Los estambres son numerosos y dispuestos alrededor de los pistilos. Tienen abundantes ovarios. (77)

1.5.3.3 Frutos y Semillas

El fruto de la guanábana es el más grande en su género; es al igual que en las otras anonáceas. (4)

Es asimétrico, elipsoidal u ovoide y mide de 14 a 40 cm de largo por 12 a 18 cm de ancho, está cubierta por una cáscara delgada de color verde oscuro con varias espinas pequeñas de 0,3 a 0,5 suaves y carnosas que se desprenden fácilmente cuando la fruta está madura. (21)

La aromática pulpa, con textura similar a la del algodón, es blanca, cremosa y suaves, recubre totalmente las semillas negras de 1 a 2cm de largo , cada fruta puede tener hasta 200 semillas, la mayoría de los segmentos no contienen semilla, su sabor ácido sub ácido ha sido descrito como similar al de la piña o mango . El peso de la fruta va de 1 a 10 kilos, y cuando el fruto está maduro este se vuelve verde mate y adquiere una consistencia blanda con apariencia verticulada, de sabor agridulce, por lo que no es comestible como fruta fresca. La fruta es climatérica, considerada como tropical exótica, con características sensoriales excelsas que le brindan un potencial para su utilización bien como producto fresco o transformado. (59)

1.5.4 CULTIVOS

La guanábana es una planta permanente que empieza a producir al tercer año del trasplante, aunque la cosecha comercial se debe esperar al cuarto año en plantas francas y al tercer año en plantas injertadas. (4)

De todas las anonáceas comestibles la guanábana es la de requerimiento más tropical prefiere los climas *cálidos* y húmedos con altitudes no mayores a 1000 m. Las temperaturas de 7°C provoca en el árbol la caída de hojas y frutos y la temperatura bajo los cero grados dañan la madera. Los suelos en que se plante guanábana comercialmente deben ser profundos, arenosos y con muy buen drenaje. Son más convenientes los suelos con pH entre 5,5 y 6,5. (24)

Por ser una fruta demasiado delicada, relativamente grande y de cáscara muy delgada, se debe cosechar antes de estar madura. De acuerdo al índice de respiración, definido como la tasa de producción de CO₂ unidad de peso de fruta y por unidad de tiempo, y al comportamiento fisiología en poscosecha, las frutas se pueden clasificar como climatérica y no climatérica; el CO₂ extra durante el período climatérico procede de la descorboxilación del ácido málico que transita directamente a ácido pirúvico para iniciar el nuevo ciclo. Durante el periodo climaterico las frutas adquieren la madurez de consumo como se puede mencionar a la guanábana, aguacate, babano, manzana, papaya entre otras. (59)

1.5.5 PRODUCCIÓN DE GUANÁBANA EN EL ECUADOR

La producción de guanábana se remonta en 1998, según datos del Banco Central del Ecuador. En el 2000 se presenta un incremento del 28,2% frente al volumen exportado en el 2003. (59)

Los sitios representativos para el cultivo de esta fruta en el Ecuador son: Esmeraldas, Tachina, Río Verde, Borbón, Muisne, Pedernales, Chone, Santa Ana, Pedro Carbo, Babahoyo, Milagro, El Triunfo, La Troncal, Tena, Puyo, Balao y otras zonas amazónicas. (59)

Se puede hablar de cuatro tipos de guanábana nacidas por semillas, se las clasifica en tres grupos generales basados por su sabor dulce, semiácidez y semidulce, que se las utiliza para bebidas, jugos y postres. (38)

1.5.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA

1.5.6.1 Componente químicos de las Hojas de *Annona muricata*

Alcaloides de tipo isoquinolínico: annomonicina, annomurina, annonaína, annoníina, (+) coclaurina, (+) coreximina, (+) reticulina. Alcaloides misceláneos: muricina, muricinina, estefarina, aterospermina, aterosperminina. (23)

Las acetogeninas de la hoja con actividad anticancerígena: muricapentocin, muricatocin C, muricatocin A, annomuricin B, annomuricin A, murihexocin C, muricoreacin, bullatacinone, y bullatacin. (74)

Entre los lípidos tenemos: Acido esteárico, ácido linoleico, ácido lignocérico, y ácido gentísico (23)

Además se reportan las siguientes lactonas: annomontacina, annonacina, solamina, muricatacina. (23)

También están presentes los siguientes compuestos:

- ❖ Taninos carcinogénicos

- ❖ Compuestos fenólicos: ácido cafeíco, ácido p-cumarico, leucoantocianidinas
- ❖ Ácido ascórbico
- ❖ Compuestos cianogénicos: ácido hidrocianico
- ❖ Aceite fijo en las semillas (23,9%)
- ❖ Fitoesteroles: β sitoesterol, estigmasterol, arronol, ipuranol) (1)

1.5.6.2 Valor nutricional y componentes químicos de los Frutos de la Guanábana

El valor nutritivo de la Guanábana destaca por su bajo contenido en grasas, tan solo posee 0,97 gramos por cada 100 gramos de parte comestible, escaso aporte proteico (1 gramo por cada 100 gramos de parte comestible). (23)

Es buena fuente de agua 82,8 gramos por cada 100 gramos de parte comestible, lo que lógicamente le hace tener un bajo aporte calórico, para ser más exactos aporta de 53,1 a 63,1 Kcal. por cada 100 gramos de parte comestible. También es una moderada fuente de fibra (0,4-0,79 gramos por cada 100 gramos de parte comestible), y su pulpa contiene glúcidos de fácil metabolización. (1)

El fruto contiene ácido málico y vitaminas como tiamina (0,11 mg por cada 100 gramos de parte comestible), vitamina C (29,6 mg por cada 100 gramos de parte comestible), riboflavina (0,05 mg por cada 100 gramos de parte comestible), provitamina A (5mg por cada 100 gramos de parte comestible.) (80)

En cuanto a su contenido mineral la guanábana es fuente de calcio (10,3 mg por cada 100 gramos de parte comestible), fósforo (27,7 mg de por cada 100 gramos de parte comestible), hierro, magnesio y sobre todo potasio (45,8 mg por cada 100 gramos de parte comestible). (80)

1.5.7 ACCIONES FARMACOLÓGICAS

De las variadas actividades biológicas halladas en esta especie sobresalen aquellas relacionadas con una probable actividad antitumoral y antiparasitaria demostrada tanto en animales como in vitro. (71)

1.5.7.1 Oncología Experimental

Las acetogeninas anomutacina (cis y trans) 10-anonacin-A-ona han demostrado poseer citotoxicidad selectiva en cultivos de células tumorales del pulmón, otro estudio demostró un efecto citotóxico selectivo frente a células adenocarcinomas del colon con una potencia muy superior a adriamicina Las muricinas H,I evidenciaron citotoxicidad en los cultivos de hepatomas humanos. (1)

Estudios realizados en los años 1,998 al 2,000 han revelado que las acetogeninas son inhibidores del complejo I de la cadena de fosforilación oxidativa con lo cual bloquean la formación de ATP; energía que necesita la célula cancerosa para poner en funcionamiento su bomba mediada por P-glicoproteína, que le permite mantenerse activa. (71)

1.5.7.2 Actividad antiparasitaria

El extracto etanólico de *Annona muricata* ha demostrado propiedades antiparasitarias y antiprotozoarias sobre: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Artemia salina* encontrándose que las acetogeninas serían los compuestos responsables probablemente por un mecanismo de acción similar al hallado en la actividad antitumoral. Un informe da cuenta de la propiedad antileishmaniásica ejercida por el extracto hexánico, metnólico y etilacetato de *A. muricata* resultando el extracto de etilacetato el más eficaz entre las estructuras que se identificaron anonacina A y anomuricina A. (1)

1.5.7.3 Actividad antimicrobiana

El extracto etanólico de las hojas demostró ser efectivo frente al herpes simple virus 1 y2 demostrando para e primer caso una concentración inhibitoria mínima 1 mg/ml. (1)

1.5.7.4 Actividad S.N.C.

De los diferentes estudios la reticulina se comporta como un estimulante del SNC, en tanto la efedrina y la aterosperminina tendrían un efecto sedativo. (1)

Esta última presenta efectos anticonvulsivantes en animales. La (+) coclaurina administrada por vía intracerebroventricular suprime la actividad motora inducida por agentes dopaminérgicos. (1)

1.5.7.5 Actividad Antioxidante

Investigadores determinaron por ABTS en diferentes tiempos para pulpa congelada de guanábana, expresado a equivalentes Trolox, valores de $4.3 \pm 0.4 \mu\text{molTrolox/g}$ y $4.8 \pm 0.3 \mu\text{molTrolox/g}$, transcurridos 1 y 7 min, respectivamente. Comparando éstos valores con los de mango: $11.8 \pm 0.9 \mu\text{molTrolox/g}$ (1 min) y $13.2 \pm 0.3 \mu\text{molTrolox/g}$ (7 min), resultó menor la actividad antioxidante de guanábana en todos los casos. (48)

1.5.7.6 Otras Actividades

El alcaloide cloreximina presenta efecto estimulante respiratorio y antihipertensor, mientras que la arterosperminina demostró efectos anti arrítmicos, anestésicos y antifúngicos. La presencia de ácido málico en la pulpa del fruto de guanábana se considera de utilidad como fuente de hidroxiácidos para ser empleados en cosmética para tratamientos antiacné. (1)

1.5.8 USOS ETNOMEDICINALES

En Costa Rica, las hojas en forma de infusión se han empleado como analgésico gastrointestinal, la decocción de las hojas y las semillas tostadas y molidas se han administrado como antihelmínticas y antidiarreicas. (9)

. La fruta madura es recomendada en casos de reumatismo y gota, pues algunos autores manifiestan que la guanábana es antiescorbútica, vermífuga y antibiliosa. (88)

Por vía externa se recomienda la decocción de las hojas y los tallos para aplicar como cataplasmas sobre los músculos cansados para relajarlos. También se utilizan para tratamientos contra la diabetes. (87)

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN.

La presente investigación se llevó a cabo en los siguientes laboratorios de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH:

- ❖ Productos Naturales
- ❖ Fitoquímica
- ❖ Química Instrumental
- ❖ Investigación (HPLC)
- ❖ Bromatología

2.2 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPO

2.2.1 REACTIVOS

- | | |
|----------------------------|---------------------------------|
| ❖ Ácido clorhídrico al 10% | Nitrato de plata 0.1 mol/L |
| ❖ Éter de petróleo | ❖ Ácido clorhídrico al 1% |
| ❖ Agua destilada | ❖ Ácido clorhídrico concentrado |
| | ❖ Reactivo de Dragendorff |

- ❖ Reactivo de Mayer
- ❖ Reactivo de Wagner
- ❖ Reactivo de Lieberman – Buchard
- ❖ Reactivo de Borntrager
- ❖ Reactivo de Baljet
- ❖ Anhídrido acético
- ❖ Reactivo de Sudan III
- ❖ Carbonato de Sodio
- ❖ Solución de Cloruro Férrico al 5%
- ❖ Solución de Fehling A y B
- ❖ Acetato de Sodio
- ❖ Cloroformo
- ❖ Alcohol amílico
- ❖ Etanol al 50%
- ❖ Alcohol potable al 96%
- ❖ Metanol
- ❖ Solución de Sulfato de Cerio
- ❖ Ácido Clorhídrico concentrado
- ❖ Granallas de Magnesio Metálico
- ❖ Acetato de Etilo
- ❖ Etanol al 70%
- ❖ Ácido Sulfúrico concentrado
- ❖ Acido fórmico
- ❖ Tolueno
- ❖ Ácido fórmico
- ❖ Ácido fosfórico 0.05M
- ❖ Ácido ascórbico 50 ppm
- ❖ Carbón activado
- ❖ ácido acético glacial
- ❖ acetato de sodio anhidro
- ❖ Dimetilsulfóxido)
- ❖ Catecol 0,5M
- ❖ Vitamina C
- ❖ Reactivo de Folin- Ciocalteu
- ❖ Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro
- ❖ Ácido gálico
- ❖ Peróxido de hidrógeno
- ❖ Mezcla catalizadora (.8 g de sulfato de sodio más 0,2 g de sulfato cúprico)
- ❖ ácido bórico al 4%
- ❖ indicador mixto (rojo metilo y verde de bromocresol)
- ❖ HCl al 0.1N.
- ❖ Hexano
- ❖ Ácido sulfúrico al 1.25%
- ❖ Hidróxido de sodio 1.25%
- ❖ Carrez I y Carrez II
- ❖ Solución indicadora de azul de metileno al 1%
- ❖ Hidróxido de sodio al 5%
- ❖ Ácido nítrico concentrado
- ❖ Isopropanol
- ❖ Butanol
- ❖ Hidroxido de sodio 0,1N
- ❖ Solución de Yodo
- ❖ Agua Bidestilada
- ❖ Fenolftaleína

2.2.2 MATERIAL VEGETAL Y ALIMENTICIO

La materia prima utilizada en al presente investigación se detalla en la Tabla No 5.

TABLA No 5. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y ALIMENTICIO UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y VALOR NUTRACÉUTICO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*)”.

PARTE RECOLECTADA	PROCEDENCIA	DÍA DE RECOLECCIÓN	DE ETAPA DE MADURACIÓN
Hojas y frutos del árbol de guanábana	Provincia de los Ríos, cantón Montalvo, parroquia Montalvo, recinto la Maravilla.	Sábado, 2 de Junio del 2012	Fruto semimaduro

Las hojas que se usaron fueron enviadas a secar y moler en Jambi Kiwua – Riobamba

2.2.3 MATERIAL DE LABORATORIO

- ❖ Cápsulas de porcelana
- ❖ Embudo simple
- ❖ Embudo Buchner
- ❖ Balones esmerilados 250, 1000ml
- ❖ Crisol
- ❖ Gradillas
- ❖ Kitazato
- ❖ Balones aforados 10, 25, 100, 500 ml
- ❖ Vasos de precipitación 50,100,250,500 ml
- ❖ Embudo de separación
- ❖ Mortero + pistilo
- ❖ Reverbero
- ❖ Aspersor (atomizador)
- ❖ Equipo de reflujo
- ❖ Picnómetros de 10ml
- ❖ Cámara cromatográfica
- ❖ Equipo de percolación

- ❖ Placa de sílica gel
- ❖ Vidrio reloj
- ❖ Micropipetas de 250 y 1000 μ L de capacidad
- ❖ Cubeta de vidrio de 1 cm de recorrido óptico
- ❖ Probeta de 100 ml
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Equipo de destilación por Dean Starck
- ❖ Crisol de Gooch
- ❖ Bureta
- ❖ Equipo Soxhlet
- ❖ Baso de Berzellius
- ❖ Cronómetro
- ❖ Desecador

2.2.4 EQUIPOS

- ❖ Balanza analítica (BOECO) (ADAM) (MEMMET)
- ❖ Estufa (MEMMERT)
- ❖ Mufla (SNOL)
- ❖ Bomba de vacío (GAST)
- ❖ Cabina extractora de gases (MEMMRT)
- ❖ pH – metro (HANNA INSTRUMENT)
- ❖ Refractómetro (BAUSC Y LOMS)
- ❖ Macro Kjeldahl (GERHARDT)
- ❖ Espectrofotómetro (HELYOS β)
- ❖ Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)
- ❖ Centrífuga (CLAY ADAMS)
- ❖ HPLC (SHIMADZU)
- ❖ Cámara fotográfica (SONY)
- ❖ Computadora (HP MINI)
- ❖ Refrigeradora (DUREX)
- ❖ Licuadora (OSTER)

2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.3.1 SECADO Y MOLIENDA DE LAS HOJAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata*).

2.3.1.1 Método de desecación en estufa industrial de aire caliente (Jambi Kiwua)

Principio

El secado del material vegetal interrumpe los procesos enzimáticos en las células vegetales e impiden el crecimiento de microorganismos.

La molienda tiene como objetivo las disminuciones del tamaño de las partículas de la droga vegetal. (30)

Procedimiento

- ❖ Limpieza de la muestra: La muestra fresca si contiene polvo o vestigios de contaminación se lava con abundante agua destilada, y se deja secar un poco al aire.
 - ❖ Secado de la muestra: Se toma una cantidad de muestra seleccionada y se somete a un secado en estufa durante a 60 °C por 3 horas, después se cambia a 35 °C por 4 días
 - ❖ Molienda. Una vez seca la muestra, se muele y homogeniza en molino industrial
 - ❖ Almacenamiento: Las muestras se almacenan en bolsas plásticas exentas de humedad.
- (30)

2.3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA DROGA VEGETAL

2.3.2.1 Método Físico-Químico de Análisis

2.3.2.1.1 Determinación de humedad relativa

Principio

Se entiende por humedad el agua libre que contiene el material vegetal. Para una buena conservación a de ser inferior al 10%, para evitar los procesos enzimáticos, y para expresar la valoración de los principios activos referidos a materia seca. (9)

Procedimiento

De la especie vegetal se pesa 2 g con desviación permisible de 0,5 mg y se transfieren a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105°C hasta masa constante; seguidamente se deseca a 105°C durante 3 horas. La cápsula se coloca en el desecador, donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante 1h, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante. (26)

Expresión de los resultados:

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} * 100$$

FÓRMULA No.1

% H = pérdida en peso por desecación (%).

M₂ = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g).

M₁ = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g).

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

2.3.2.1.2 Determinación de cenizas totales

Principio

Las cenizas que quede después de la calcinación de los materiales procedentes de plantas medicinales, se determinan mediante tres métodos diferentes, que miden las cenizas totales, las cenizas insolubles en ácido y las cenizas solubles en agua. El método de cenizas totales está diseñado para medir la cantidad total de materia que queda después de la ignición. (9)

Procedimiento

Incinerar 2.0 g de la muestra de ensayo en un crisol de porcelana previamente tarado, a una temperatura no mayor de 450°C hasta que esté libre de carbón, enfriar y pesar. Si no se puede obtener una ceniza libre de carbono de esta manera, añadir agua caliente a la masa quemada y recoger el residuo sobre papel filtro libre de cenizas, incinerar el mismo junto con el papel, evaporar a sequedad e incinerar a una temperatura no mayor de 450°C. (26)

Se enfría el crisol en un desecador y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 mg por g (masa constante). Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco. (26)

Expresión de los resultados:

$$\%C_T = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

FÓRMULA No.2

$\%C_T$ = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g).

M_1 = masa del crisol con la porción de ensayo (g).

M_2 = masa del crisol con la ceniza (g).

100 = factor matemático para los cálculos.

2.3.2.1.3 Determinación de cenizas solubles en agua

Principio

Las cenizas solubles en agua son la diferencia en peso entre las cenizas totales y el residuo después del tratamiento de las cenizas totales con agua. (26)

Procedimiento

A las cenizas totales obtenidas en A, se le añaden de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapa y se hierve suavemente a la llama del mechero durante 5min. La solución se filtra a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera por 15 minutos a una temperatura no mayor de 450°C. (26)

Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

Expresión de los resultados:

$$\%C_A = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} * 100$$

FÓRMULA No.3

$\%C_A$ = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M_2 = masa del crisol con las cenizas totales (g).

M_a = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

M_1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.3.2.1.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Principio

Las cenizas insolubles en ácido son el residuo obtenido después de hervir las cenizas totales con ácido clorhídrico diluido y llevar a la ignición el material insoluble restante. Estas miden la cantidad de sílice presente, especialmente como arena y tierra silíceas. (75)

Procedimiento

A las cenizas totales obtenidas se añadieron 2-3 ml de ácido clorhídrico al 10%, el crisol se tapó y calentó en un baño de agua hirviendo por 10 min, el residuo se filtró y lavó con agua, se añadió solución de nitrato de plata, para precipitar cloruros, el papel filtro se secó a 105°C el que se transfirió al crisol original y se incineró en la mufla a 550°C durante 10min. (26)

Expresión de los resultados:

$$\%C_I = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

FÓRMULA No.4

$\%C_I$ = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M_1 = masa del crisol con la porción de ensayos (g).

M = masa del crisol vacío (g).

M₂ = masa del crisol con las cenizas ácido clorhídrico (g).

100 = factor matemático.

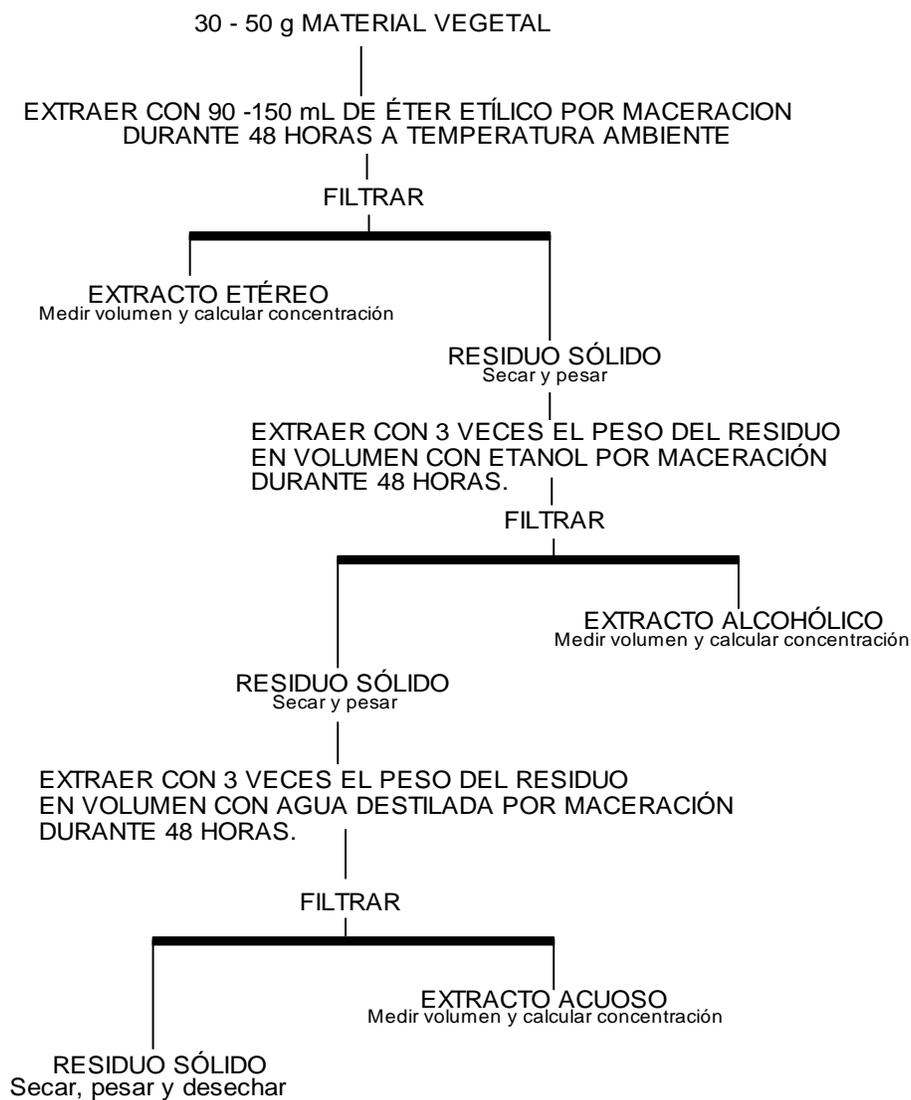
2.3.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO (SCREEENING O TAMIZAJE FITOQUÍMICO)

Principio

El estudio fitoquímico tiene como finalidad aislar e identificar los diferentes tipo de compuestos que biosintetiza la planta (los que podrá tener o no alguna actividad o toxicidad). (75)

Procedimiento

En este caso se emplea un esquema general que utiliza la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente. Como se ilustra en la Figura No 9. La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; es sometida a una extracción sucesiva, al extracto se le mide el volumen obtenido y se le calcula su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto. (26)



FUENTE: MIRANDA, M. 2002

FIGURA No. 9 EXTRACCIONES SUCESIVAS DEL MATERIAL VEGETAL.

Para iniciar, se tomó el extracto etéreo el cual se dividió en 4 fracciones, 3 fracciones de 5 mL cada una, para el ensayo de Sudan, Baljet, y Liebermann-Buchart, y la última fracción fue de 10 mL, 5 mL se tomaron tanto para Dragendorff y Wagner. Una vez obtenido el extracto alcohólico, se dividen en 12 fracciones, una de 1mL para el ensayo de catequinas, las otras 10 fracciones con un volumen de 2 mL cada una, para ensayo de: resinas, Fehling, Baljet, Liebermann-Buchart, espuma, cloruro férrico, Borntrager, shinoda, y antocianidina y finalmente la última fracción debe volverse a dividir en 2 porciones con un volumen de 2mL cada una para los ensayos de Dragendorff y Wagner. (26). Como se aprecia en la Tabla No 6

Al extracto acuoso se divide también en fracciones, una con 6 mL, en la cual se ocupa un volumen de 2 mL para los ensayos de Dragendorff y Wagner, se necesita 2 mL tanto para el ensayo de: cloruro férrico, shinoda, Fehling y espuma, 1 o 2 gotas para el ensayo de principios amargos y 10 mL para el ensayo de mucílagos. (26)

TABLA No 6. TÉCNICAS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

ENSAYO	METABOLITO	PROCEDIMIENTO	RESULTADO +
Sudan	Compuestos grasos	Se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.	Si aparecen gotas o una película coloreada de rojo
Dragendorff	Alcaloides	Si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, éste debe evaporarse, en un baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo	Si hay opalescencia se considera (+) turbidez definida (++) , precipitado (+++).
Wagner	Alcaloides	Se parte de igual manera en los casos anteriores de la solución acida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo	Clasificando los resultados de la misma forma.

Baljet	Compuestos con agrupamiento lactónico		si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1mL de reactivo	La aparición de una coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.
Borntrager	Quinonas		Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1mL de cloroformo. Se adiciona 1mL hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación	Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado o rojo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).
Liebermann-Buchart	Triterpenos y/o Esteroides		Se adiciona 1mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.	1. Rosado 2. Verde intenso – visible 3. Verde oscuro – negro
Catequinas	Catequinas		Tome una gota de la fracción alcohólica, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio	Verde carmelita a la luz UV
Resinas	Resinas		Adicione a 2mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada	Precipitado
Fehling	Azúcares reductores		Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 – 2 mL de agua. Se adicionan 2mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5 – 10 min la mezcla.	Solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo
Espuma	Saponinas		Si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5 – 10 min.	Si aparece espuma en la superficie del líquido
Cloruro Férrico (FeCl ₃)	Compuestos fenólicos y/o taninos		Si el extracto es acuoso se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica A una alícuota del extracto alcohólico se adiciona el reactivo	Coloración rojo – vino, verde intensa, azul

Shinoda	Flavonoides		Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen	Cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.
Antocianidinas	Estructuras de secuencia C3-C6 del grupo de los flavonoides		Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 minutos con 1 mL de HCl concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases.	La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica
Mucilagos	Estructura tipo polisacárido		Una alícuota del extracto en agua se enfría a 0 - 5 C	Consistencia gelatinosa
Principios Amargos			Saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal reconociendo el sabor de cada uno de los principios, bien diferenciado por el paladar	

FUENTE: MIRANDA, M. 2002

2.3.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

2.3.4.1 Elaboración extracto alcohólico (etanólico) de las hojas de *Annona muricata*.

Las principales técnicas extractivas son: maceración, lixiviación o percolación, digestión, infusión, destilación y extracción continua. En esta investigación el método utilizado para realizar el extracto fluido alcohólico (etanólico) de las hojas de *Annona muricata* es la percolación. (25)

2.3.4.1.1 Método por Percolación

Principio

El extracto fluido es un extracto hidro-alcohólico cuya metodología es la percolación que consiste en empacar la droga vegetal previamente humectada en un percolador en la cual contiene un regulador para controlare el goteo. Se dice que por cada gramo de droga vegetal se obtiene 1 ml de extracto alcohólico. (25)

Procedimiento

- ❖ Se parte de 100 g de droga cruda pulverizada, la cual se coloca en un recipiente amplio y cerrado y se humedece con 200 mL de alcohol potable para que este penetre la estructura celular y disuelva las sustancias. Se deja reposar durante 1h.
- ❖ En un percolador cuyo orificio de salida se cubre con algodón o gasa u otro material inerte, se transfiere la droga humectada. La superficie se cubre con papel o placa de filtro o un disco metálico con orificio y se presiona.
- ❖ Para garantizar que no queden burbujas de aire en la masa vegetal, se vierte alcohol con el orificio de salida del percolador abierto y cuando este comienza a salir se cierra el mismo. Se sigue vertiendo alcohol hasta que este cubra la masa vegetal y quede de 3-5 cm por encima de ella. Se macera durante 24h.
- ❖ Al día siguiente se obtiene del percolador 75 mL del extracto directo y guardar en un frasco ámbar.
- ❖ Abrir el orificio de salida, dejar salir el percolado a la vez que se añade más alcohol, estableciéndose un flujo de 25-30 gotas/min, hasta que el filtrado sea un líquido claro y se pueda obtener un volumen de 400 ml.
- ❖ Concentrar en el rotavapor a una temperatura 50 °C a 200 rev/ min el extracto recogido que fue aproximadamente de 400 mL hasta obtener un volumen de 70 mL.
- ❖ Unir el extracto concentrado más el primer extracto recogido de la percolación.
- ❖ El volumen obtenido fue de 100 mL de extracto alcohólico a partir de 100 mL de droga cruda que se guarda frasco ámbar de vidrio
- ❖ Llevar a refrigeración para estabilizar el extracto obtenido
- ❖ Finalmente se filtra el extracto alcohólico para eliminar las impurezas. (25)

2.3.4.2 Elaboración del Extracto Acuoso de hojas de *Annona muricata*.

Método infusión.

Principio

La droga se extrae con agua caliente, pero sin someterla a ebullición o con agua fría.

Procedimiento

- ❖ Pesar 10 gramos de hojas de guanábana
- ❖ Colocar en una vaso de precipitación 100 ml de agua destilada
- ❖ Una vez que el agua haya hervido verter las hojas
- ❖ Dejar unos segundos tapar y apagar la llama
- ❖ Enfriar, filtrar y envasar en un frasco ámbar.

2.3.4.3 Elaboración extracto alcohólico (etanólico)y acuoso de los frutos de *Annona muricata*.

- ❖ Tomar 5 g de pulpa de la zona ecuatorial
- ❖ Ajustar a 100 ml con etanol o agua según el solvente que desea utilizar
- ❖ Licuar 3 min
- ❖ Filtrar al vacío
- ❖ Centrifugar 2000 rev por 5 min
- ❖ Obtener el sobrenadante
- ❖ Sustrato para rea realizar las pruebas. (61)

2.3.5 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS

2.3.5.1 Determinación de los requisitos organolépticos

A los extractos se procede a analizar el aspecto, color, olor, sabor.

- ❖ **Aspecto:** Extracto hidroalcohólico se determina observando contra luz la presencia de partículas y/o turbidez en el tubo de ensayo donde se encuentra la muestra a ser analizada mediante visualización directa.
- ❖ **Color:** Líquido con coloración determinada por el tinte que presenta la muestra.
- ❖ **Olor:** Característico a las plantas
- ❖ **Sabor:** Característico a las plantas y al solvente. (65)

2.3.5.2 Determinación de la densidad relativa.

Principio

Se entiende por densidad relativa a la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico. (26)

Procedimiento

Primeramente pésele el picnómetro vacío y seco a 25 °C y llénese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 15 min y ajústesele el líquido al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso seque exteriormente el picnómetro. (26)

Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repite la operación con el agua destilada a 25 °C, después de limpiar el picnómetro. (26)

Expresión del resultado.

La densidad relativa a 25°C se calcula por la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

FÓRMULA N° 5.

Dónde:

D = densidad relativa.

M₁ = peso del picnómetro con la muestra (g).

M₂ = peso del picnómetro con el agua (g).

M = peso del picnómetro vacío (g).

2.3.5.3 Determinación del índice de Refracción.

Principio

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio. (26)

Procedimiento

Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada. (26)

Utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajusta el equipo seleccionado la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. (26)

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua. (26)

2.3.5.4 Determinación del pH.

Principio

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno (pH). El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$\text{pH} = - \log [\text{H}^+]$$

FÓRMULA No.6

$[\text{H}^+]$ = actividad de los iones hidrógeno.

Procedimiento

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea igual o analógico. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo. (26)

Se ajusta el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra. (26)

2.3.5.5 Determinación de Sólidos totales.

Procedimiento

La determinación de la variación de la masa, debido a la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por acción del calor, mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en estufa, hasta masa constante, se le asigna como sólidos totales. 5.0 mL del extracto se llevan a una cápsula previamente tarada a 105 °C, se evapora sobre baño de agua hasta que el residuo esté aparentemente seco. Se pasa entonces hacia una estufa y se deja hasta peso constante (aproximadamente 3 horas). (26)

Se retira la cápsula de la estufa y se coloca, en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente. Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se mantendrá un tiempo de secado de 60 minutos. (26)

Expresión de los resultados:

La cantidad de sólidos totales, expresado en %, R, se calcula por la siguiente fórmula;

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

FÓRMULA No.7

Dónde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo (g).

P == masa de la cápsula vacía (g).

V = volumen de la porción de ensayo.

100 == factor matemático para el cálculo.

2.3.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE FLAVONOIDES.

Cromatografía en capa fina (TLC)

- ❖ Mezclar 1 g de droga en polvo con 10 mL de metanol por 5 min en un baño de agua (60°C)
- ❖ Tomar 5mL de la solución metanólica y concentrar hasta sequedad
- ❖ Colocar 3 mL de agua y 5 mL de acetato de etilo, agitar por 10 min.
- ❖ Separar la fase de etil-acetato y concentrar hasta sequedad y se reconstituye con etanol al 70% .
- ❖ Usar el concentrado para la cromatografía.
- ❖ Se aplica 10µL del concentrado en una placa cromatográfica de sílica gel 60 F₂₅₄ con la ayuda de un capilar.
- ❖ Dejar secar después de cada aplicación
- ❖ Se introduce la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las ¾ partes de la placa.
- ❖ Revelar la placa, dejar secar, y anotar los Rf. (65)

✚ **Adsorbentes:** Sílica gel 60 F₂₅₄ MERK

✚ **Sistema de solventes:** Tolueno – Acetato de etilo –Ácido fórmico (36:12:5)

✚ **Revelado:** sulfato de Cerio (68)

Cálculo

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{Distancia recorrida del solvente}}$$

FÓRMULA No.8

2.3.7 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Análisis espectrofotométrico del marcador químico: flavonoides totales expresados como porcentaje de quercetina de la droga seca, tanto de la hoja como de la fruta. (65)

- ❖ Pesar 1g de muestra comprimir y colocar en un balón redondo de 250 mL
- ❖ Añadir 20 mL de etanol al 50% y 8 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- ❖ Reflujar por dos horas en baño de agua
- ❖ Dejar enfriar y filtrar a través de filtro Buchner, utilizando papel de filtración
- ❖ Lavar el residuo con 10 mL de etanol al 50% para desecharlo finalmente.
- ❖ El filtrado se evapora en baño de agua hasta la mitad del volumen inicial
- ❖ Enfriar sobre un baño de agua fría durante 30 min
- ❖ Filtrar, el papel con residuo se lava con 70 mL de etanol al 96% caliente a 50 °C
- ❖ Se trasvasa a un balón volumétrico de 100 mL y se afora con etanol al 96%
- ❖ Tomar una alícuota de 2mL y llevar a un balón de 25 mL aforar con etanol al 96 %
- ❖ Determinar la absorbancia a 258 nm
- ❖ Como patrón se emplea 0.04 g de quercetina, los cuales se deben disolver con etanol al 96% hasta completar un volumen de 50 mL., de esta solución tomar 1 mL y se diluye a 100 mL con etanol al 50 %. (65)

Curva de calibración

Se realiza empleando concentraciones crecientes de quercetina : 4, 8, 16 y 20 mg/L. Los datos obtenidos se someten a un análisis de regresión lineal, obteniéndose la ecuación que vincula la concentración con la lectura de densidad óptica a 258 nm. (65)

La expresión empleada para el cálculo es la siguiente:

$$A = a + b C$$

2.3.8 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES EXPRESADOS POR EL PORCENTAJE DE ÁCIDO GÁLICO

2.3.8.1 Micrométodo Folin Ciocalteu

En un matraz aforado de 10 mL, se introducen respetando el orden, 100 μ L de muestra (extracto acuoso y alcohólico de las hojas o frutos de guanábana), 500 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 ml de la solución de carbonato de sodio y se enrasa a 10 mL con agua destilada.

Se agita el matraz para homogeneizar, se espera 60 min para estabilizar la reacción y se mide la absorbancia a 765 nm con una cubeta de 1 cm de paso óptico, frente a un blanco preparado con agua destilada. (63)

Curva de Calibración

Se realiza empleando concentraciones crecientes de ácido gálico: 20, 60, 80 mg/L. Se emplean 100 μ L de muestra y se opera de igual modo que con una muestra problema. Las determinaciones se hacen por triplicado. Los datos obtenidos se someten a un análisis de regresión lineal, obteniéndose la ecuación que vincula la concentración con la lectura de densidad óptica a 765 nm. La ecuación a obtener es del tipo: $y = a + (b * DO\ 765\ nm)$. (63)

2.3.9 EVALUACIÓN DEL VALOR NUTRACÉUTICO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*)

2.3.9.1 Análisis sensorial

Estudia los componentes de las percepciones humanas, que son el resultado de los tratamientos que los centros nerviosos hacen llegar a la información bruta que ellos reciben de los órganos receptores periféricos (boca, nariz, ojos). Los atributos sensoriales son:

- ❖ **Color y apariencia:** El color observado en un alimento depende de la composición espectral de la fuente luminosa. Se puede afirmar que la visión es el primer sentido que interviene en la evaluación de un alimento, captando todos los atributos que se relacionan con la apariencia: aspecto, tamaño, color, forma, defectos, etc. (58)

- ❖ **Textura:** Es la propiedad de los alimentos apreciada por los sentidos del tacto, la vista y el oído; se manifiesta cuando el alimento sufre una deformación. Nos permitirán decir de la fruta si presenta fibrosidad, granulosidad, etc. (58)

- ❖ **Sabor y Olor:** El sabor (dulce, amargo, ácido) no suele quedar afectado por los procesos de elaboración, excepto los provocados por: la respiración metabólica de los alimentos frescos y los cambios de acidez y dulzor producidos durante las fermentaciones. Olor es la sensación producida al estimular el sentido del olfato, en la fruta y verdura los cambios se deben a: degradación, recombinación o volatilización de: aldehídos, cetonas, azúcares, lactonas, aminoácidos y ácidos orgánicos. (58)

2.3.9.2 Determinación de humedad

Principio

El contenido de humedad de los alimentos es de gran importancia por muchas razones científicas, técnicas y económicas, pero su determinación precisa es muy difícil. El agua se encuentra en los alimentos especialmente en dos formas, como agua enlazada y como agua disponible o libre; el agua enlazada incluye moléculas de agua unidas en forma química, o a través de puentes de hidrógeno a grupos iónicos o polares, mientras que el agua libre es la que no está físicamente unida a la matriz del alimento y se puede congelar o perder con facilidad por evaporación o secado. (22)

2.3.9.2.1 Método de Dean Stark o por Destilación a Reflujo con solventes Inmiscibles con el agua.

Procedimiento.

- ❖ Pesar 10 a 20 g de muestra previamente (hortaliza o fruta, previamente hecho el desmuestre) y colocar en el matraz del equipo.
- ❖ Añadir 100 ml de tolueno (P_e 100°C)
- ❖ Conectar el matraz al brazo colector y este al condensador de bolas del equipo
- ❖ Hacer circular el agua de enfriamiento a través del condensador.
- ❖ Calentar el matraz y contenido sobre manta calefactora y hacer que el contenido entre en ebullición
- ❖ Ajustar la manta calefactora de modo que el contenido del matraz se mantenga justamente en ebullición y continuar calentando durante al menos 1 1/2h.
- ❖ Desconectar la manta calefactora y dejar que el aparato se enfríe, especialmente el brazo colector graduado.
- ❖ Registrar el volumen de agua en el brazo colector graduado. (22)

Cálculos.

$$(\%)Humedad = \left(\frac{V}{W}\right) \times 100$$

FÓRMULA No.11

W= peso de la muestra en g

V= volumen de agua recogida en ml

2.3.9.2.2 Método por desecación en estufa de aire caliente.

Procedimiento.

- ❖ Pesar 1 a 10 g de muestra (previamente realizado el desmuestre) directamente en la capsula de porcelana previamente tarada.
- ❖ Colocar en la estufa a $103^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por un lapso de 2 a 3h, hasta peso constante.
- ❖ Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar
- ❖ La determinación debe realizarse por duplicado. (22)

Cálculos.

$$(\%)Humedad = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \right) X 100$$

FÓRMULA No.12

m = masa de la capsula en g

m_1 = masa de la capsula con la muestra en g

m_2 = masa de la capsula en g con la muestra después del calentamiento

2.3.9.3 Determinación de cenizas.

Principio

Las cenizas representan la fracción correspondiente a los minerales del alimento. Para su determinación se toma una cierta cantidad de alimento previamente pesada y se combustiona totalmente en una mufla u horno a 550°C . Toda la materia orgánica del alimento se incinera y solo quedará los compuestos inorgánicos. (22)

2.3.9.3.1 Método de incineración en mufla

Procedimiento

- ❖ Colocar la cápsula con la muestra seca resultado de la determinación del contenido de humedad en un reverbero, calcinar hasta ausencia de humos en la sorbona.
- ❖ Transferir la cápsula a la mufla e incinerar a 500 – 550 °C, hasta obtener cenizas libres de residuo carbonoso (esto se obtiene al cabo de 2 a 3 horas).
- ❖ Sacar la cápsula y colocar en el desecador, enfriar y pesar.
- ❖ La determinación debe hacerse por duplicado. (22)

Cálculos

$$\%Cbs = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

FÓRMULA No.13

Dónde:

%Cbs = Porcentaje de ceniza en base seca

m = masa de la cápsula vacía en gramos

m₁ = masa de la cápsula con la muestra antes de la incineración en gramos.

m₂ = masa de la cápsula con las cenizas después de la incineración en gramos.

Cenizas en base húmeda

$$\%Cenizas \text{ base húmeda} = \% \text{ ceniza base seca} \times \frac{(100 - \text{humedad})}{100}$$

FÓRMULA No.14

2.3.9.4 Determinación de proteína. Método Macro-Kjeldhal

Principio

Sometiendo a un calentamiento y digestión una muestra problema con ácido sulfúrico concentrado, los hidratos de carbono y las grasas se destruyen hasta formar CO_2 y agua, la proteína se descompone con la formación de amoníaco, el cual interviene en la reacción con el ácido sulfúrico y forma el sulfato de amonio este sulfato en medio ácido es resistente y su destrucción con desprendimiento de amoníaco sucede solamente en medio básico; luego de la formación de la sal de amonio actúa una base fuerte al 50% y se desprende el nitrógeno en forma de amoníaco, este amoníaco es retenido en una solución de ácido bórico al 2.5% y titulado con HCl al 0.1 N. (18)

Procedimiento

- ❖ Pesar el papel aluminio y añadir 0,5 g de la muestra.
- ❖ Encender el digestor y scrubber 15min antes de iniciar el ensayo y limpiarlos.
- ❖ Agregar 1.8 g de sulfato de sodio más 0,2 g de sulfato cúprico llamada también muestra catalizadora. Todo este contenido se coloca en cada tubo al cual se añade 20mL de H_2SO_4 concentrado (grado técnico).
- ❖ Agitar el contenido de cada balón con todo este contenido es llevado al Macro Kjeldahl para su digestión, a una temperatura graduada en 80°C por un tiempo de 90 minutos a partir del momento que se clarifica la digestión.
- ❖ Luego de este tiempo son enfriados.
- ❖ Una vez terminada la fase de digestión. Se procede a preparar la etapa de destilación para lo cual colocamos en los matraces Erlenmeyer 250 ml. Colocar 50 ml de ácido bórico al 4% mas indicador mixto (rojo metilo y verde de bromocresol) y los colocamos en cada una de las terminales del equipo de destilación.

- ❖ Transferir las muestras frías de los tubos de digestión a los tubos de destilación con mucho cuidado Agregar a los tubos poco a poco 25ml de agua destilada y agregar Hidróxido de Sodio 6N (NaOH) con la válvula dosificadora hasta obtener un color café
- ❖ Se enciende el equipo para inicial la destilación que dura hasta que el contenido del matraz adquiera un color verde esmeralda este proceso dura aproximadamente 30segundos Se retira los tubos con su contenido, se desechan.
- ❖ Para la fase de titulación se arma el soporte universal con la bureta con HCl al 0.1N.
- ❖ Se titula hasta obtener un color grisáceo transparente que es el punto final de la titulación.
- ❖ El número de ml. de HCl al 0.1 N. gastado se registra para el cálculo respectivo. (18)

Cálculos (82)

Porcentaje de Proteína:

$$\%P \text{ cruda en base seca} = \frac{V \times 0.014 \times 100 \times F \times N}{m}$$

FÓRMULA No.15

Donde:

V= ml de HCl gastado durante la titulación

N= Normalidad del HCL

F= Factor de Nitrógeno para convertir a proteínas. 6.25 para la mayoría de alimentos

m= Peso de la muestra

Proteína cruda en Base Húmeda:

$$\%P \text{ cruda en húmeda} = \%P \text{ cruda en base seca} \frac{(100 - \text{humedad})}{100}$$

FÓRMULA No.16

2.3.9.5 Determinación de fibra cruda. Método de Weende

Principio

El método consiste en someter la muestra seca y desengrasada a una primera digestión ácida y posteriormente a una segunda alcalina. La materia orgánica del residuo obtenido se considera fibra cruda. Los resultados obtenidos por este método son menores que los reales ya que en la digestión ácida se disuelve parte de la hemicelulosa y en la alcalina parte de la lignina. (86)

Procedimiento

- ❖ Se pesa 2 gramos de muestra seca y desengrasada y colocar en el bazo de Berzellius con núcleos de ebullición y 250 ml de ácido sulfúrico 1.25%.
- ❖ Colocar el vaso en el equipo y ajustar al condensador, subir la parilla y calentar hasta ebullición.
- ❖ Mantener la ebullición por media hora exacta, contados partir de que empieza a hervir.
- ❖ Desconectar el vaso del condensador, enfriar y filtrar al vacío.
- ❖ Lavar el vaso y el residuo del papel con 250 ml de agua destilada caliente.
- ❖ El residuo trasvasar cuantitativamente al vaso de Berzellius y añadir 250 ml de NaOH 1.25%.
- ❖ Colocar el vaso en el equipo y ajustar al condensador, subir la parilla y calentar hasta ebullición.
- ❖ Mantener en ebullición media hora exacta, contados partir de que empieza a hervir.
- ❖ Lavar el vaso y el residuo de papel con 250 ml de agua destilada caliente.
- ❖ Lavar por último con 15 ml de hexano o etanol.
- ❖ Colocar el crisol de Gooch en la estufa a 105 durante toda la noche, luego enfriar en desecador y pesar
- ❖ Colocar el crisol de Gooch en la mufla a 600°C por media hora, enfriar en desecador y pesar. (22)

Cálculos

Porcentaje de Fibra:

$$\%Fibra\ cruda\ base\ seca = \frac{P_1 - P}{m} \times 100$$

FÓRMULA No.17

Dónde:

F = fibra cruda en base seca y desengrasada

P₁ = masa del crisol más el residuo desecado en la estufa

P = masa del crisol más la ceniza de la incineración en mufla en g.

m = masa de la muestra seca y desengrasada tomada para la determinación en g.

Fibra bruta en base húmeda:

$$\%Fibra\ cruda\ en\ base\ húmeda = \%FBS \times \frac{100 - (\%H + \%ExE)}{100}$$

FÓRMULA No.18

Dónde:

%F.B.S = % Fibra en Base Seca.

%H = % Humedad

%ExE = % Extracto Etéreo

2.3.9.6 Determinación de extracto etéreo. Método Soxhlet

Principio

El método Soxhlet utiliza un sistema de extracción cíclica de los compuestos solubles en éter que se encuentran en el alimento. Insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos. Proporcionan energía y son la principal reserva energética del organismo. Fuente de ácidos grasos esenciales, transporte de combustible metabólico y disolvente de algunas vitaminas. Influyen en la absorción de las proteínas y en la calidad de la grasa que se deposita en el cuerpo y de los productos grasos que se obtienen. (22)

Procedimiento:

- ❖ Pesar 2 gramos de muestra seca y colocar en el dedal, luego introducirlo en la cámara de sifonación.
- ❖ En el balón previamente tarado, adicionar 50 mL de éter etílico o éter de petróleo (se puede usar también hexano) o la cantidad adecuada dependiendo del tamaño del equipo.
- ❖ Embonar la cámara de sifonación al balón.
- ❖ Colocar el condensador con las mangueras sobre la cámara de sifonación.
- ❖ Encender la parrilla, controlar la entrada y salida de agua y extraer por 8 a 12 horas.
- ❖ Al terminar el tiempo, retirar el balón con el solvente más el extracto graso y destilar el solvente.
- ❖ El balón con la grasa bruta o cruda colocar en la estufa por media hora, enfriar en desecador y pesar.(22)

Cálculos:

$$\%Ex. E BS = \frac{P_1 - P}{m} \times 100$$

FÓRMULA No.19

%Ex. E BS= grasa cruda o bruta en muestra seca expresado en porcentaje en masa.

P₁= masa del balón más la grasa cruda o bruta extraída en gramos.

P= masa del balón de extracción vacío en gramos

m= masa de la muestra seca tomada para la determinación en gramos.

Grasa bruta en base húmeda:

$$\% \text{ Grasa fruta en base húmeda} = \% \text{Ex. E BS} \frac{(100 - \text{humedad})}{100}$$

FÓRMULA No.20

2.3.9.7 Extracto libre no nitrogenado (ELnN)

$$\% \text{ELnN} = 100 - \sum (\%H + \%C + \%F + \% \text{Ex. E} + \%P)$$

FÓRMULA No.21

Dónde:

%ELnN= porcentaje de carbohidratos digeribles.

%H= porcentaje de humedad

%C porcentaje de cenizas

%F= porcentaje de fibra

%Ex. E= porcentaje de extracto etéreo

%P= porcentaje de proteína

2.3.9.8 Cálculo del Valor Calórico. (NTE INEN 1 333-2 2011)

Cálculo de nutrientes

Cálculo de energía: La cantidad de energía que ha de declararse debe calcularse utilizando los siguientes factores de conversión:

Carbohidratos 17kJ = 4 Kcal /g

Proteínas 17kJ = 4 Kcal /g

Grasa	37kJ = 9 Kcal /g
Alcohol (etanol)	29kJ = 7 Kcal /g
Ácidos orgánicos	13kJ = 3 Kcal /g

Presentación del contenido en nutrientes

La información sobre el valor energético debe expresarse en kJ y por kcal por 100g o por 100cm³ (ml) o por porción, si se indica el número que contiene el envase. (52)

2.3.9.9 Determinación de pH y Acidez.

- ❖ Se pesa una cantidad de muestra (previamente realizado su demuestre) comprendido entre 5 y 10 g y coloque en un erlenmeyer de 250 ml
- ❖ Se añade agua destilada 50 a 100 ml y agítara por dos minutos, tome su pH y dejar en reposo un rato.
- ❖ Licuar por tres minutos y cernir
- ❖ Titular con NaOH 0,1 N en presencia de solución indicadora de fenolftaleína hasta color rosa persistente. (22)

Cálculos

$$\%Acidez = \frac{VNaOh \times N NaOH \times meq Acido málico}{W muestra} \times 100$$

FÓRMULA No.22

Donde:

ml NaOH = ml de hidróxido de sodio titulados.

N NaOH = Normalidad de hidróxido de sodio.(0,1N)

meq. Ac. Málico = mili equivalentes del ácido málico. (0,06704)

W muestra = peso de la muestra utilizados en gramos.

2.3.9.10 Azúcares y °BRIX

2.3.9.10.1 Determinación de Azúcares Reductores: Método de Fehling (Oxido-reducción)

- ❖ Se pesa 5g de muestra previamente preparada (desmuestra).
- ❖ Se trasvasa en un balón volumétrico de 250mL y se añade 100mL de agua destilada.
- ❖ Se adiciona 15mL de solución de Carrez I y 15mL de solución de Carrez II, agitando después de cada adición.
- ❖ Se afora a 250mL con agua destilada y se filtra por filtro de pliegues.
- ❖ El filtrado se coloca en una bureta de 50mL.
- ❖ En un erlenmeyer de 250mL se coloca 5 mL de solución del Fehling A y 5 mL de solución del Fehling B.
- ❖ Se mezcla y se añade 40mL de agua destilada, núcleos de ebullición, se coloca en una fuente calórica y se calienta hasta ebullición.
- ❖ En este momento y controlando el tiempo con un cronómetro se empieza a añadir lentamente cada 2 segundos y en pequeña cantidad de 0.5mL de solución problema desde la bureta, sin dejar de hervir.
- ❖ A 1 minuto y 55segundos de ebullición, se adiciona 3 gotas de solución indicadora de azul de metileno al 1% y se continúa la titulación a ritmo de 0.1mL por segundo hasta color rojo brillante (22)

Cálculos:

$$\%AR = \frac{Ax a}{W x V} \times 100$$

FÓRMULA No.23

Dónde:

%AR = porcentaje de azúcares reductores.

A= aforo de la muestra

a= título de Fehling (10 cm³ de solución de Fehling es igual a 0,05 g de glucosa)

W= peso de la muestra en g

V= volumen de la solución problema gastado en la titulación

2.3.9.10.2 Análisis cualitativo de azúcares no reductores

- ❖ A 4ml de la solución problema. Se añade 2ml de FelingA y 2ml de Feling B.
- ❖ Se calienta a fuego directo.
- ❖ Si dio la prueba positiva para azúcares reductores, filtre y el filtrado investigue la presencia de no reductores.
- ❖ Poner 2-3 ml en el tubo de ensayo y se añade 3ml de HCl 10 %
- ❖ Se calienta a ebullición en baño de agua por 2min
- ❖ Enfriar y se añadir Carbonato de Sodio para neutralizar el ácido, hasta que no se produzca efervescencia. Si se obtiene un color rojo ladrillo indica la presencia de azúcares no reductores. (22)

2.3.9.10.3 Determinación de °BRIX

- ❖ A 5g de pulpa de guanábana añadir 3ml de agua destilada y homogenizar
- ❖ Colocar una gota de la solución en el refractómetro, y observar.
- ❖ Se ve una escala y un lugar donde existe un cambio de color o una división con una línea horizontal, el lugar donde cambia el color es el sitio de lectura e indica el total de grado brix de la muestra. (58)

2.3.9.11 Índice de maduración

Principio

El índice de maduración es un parámetro de calidad de la gran mayoría de frutas, dándonos así una idea de que tan buena o en qué estado se encuentra la fruta en análisis. (58)

PROCEDIMIENTO

- ❖ Medir los ° Brix
- ❖ Calcular la acidez titulable de la fruta

CÁLCULOS

$$IM = \frac{^{\circ}\text{Brix}}{\%A}$$

FÓRMULA No.24

2.3.9.12 Determinación de Vitamina C

2.3.9.12.1 Método del Yodo

- ❖ Pesar 5g de muestra preparada y colocar en un Erlenmeyer de 250ml
- ❖ Añadir 100 ml de agua destilada y 1ml de HCl conc.
- ❖ Titular inmediatamente con solución de yodo N/10 en presencia de sol. Indicadora de almidón soluble hasta coloración azul. (22)

CÁLCULOS

$$\text{Vitamina C} = \text{Volumen consumido yodo} \times \text{Normalidad del yodo}$$

FÓRMULA No.25

2.3.9.12.2 Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC.

Principio

Consiste en una cromatografía de partición en fase reversa, fase móvil polar con la detección en el campo ultravioleta a una longitud de onda de 254nm.

Condiciones para el análisis:

Columna: C18

Longitud: 25cm

Flujo: 1mL/min

Detector: UV/ Visible λ 254 nm

Fase móvil: H₃PO₄ 0.05 M

Preparación del Estándar de Vitamina C

- ❖ Se pesa exactamente 0,005 g de ácido ascórbico estándar.
- ❖ Se afora a 100 mL con ácido fosfórico 0,05 M grado HPLC.
- ❖ Se toma una alícuota de 2 mL y se afora a 10 mL. (dilución estándar a 50 ppm)
- ❖ Se filtra al vacío y se procede a desgacificar
- ❖ Se filtra con acrodiscos de membrana.
- ❖ Se coloca en vial de vidrio para su inyección. (58)

Extracción del principio activo de los extractos acuosos y alcohólicos de las hojas y frutos guanábana

- ❖ Se mide 2ml del extracto respetivo
- ❖ Se afora a 10 mL con ácido fosfórico 0,05 M grado HPLC.
- ❖ Se realiza un filtrado simple
- ❖ Se filtra el sobrenadante con acrodiscos de membrana.
- ❖ Se coloca en vial de vidrio para su inyección. (58)

CÁLCULOS

$$\text{Vitamina C} = \frac{AM \times CE \times FD}{AE}$$

FÓRMULA No.26

Donde:

A. M = Área de la muestra

C.E. = Concentración del Estándar

A. E = Área del estándar

F.D = Factor de Dilución

2.3.9.13 Determinación de Pectina y Almidón para establecer su presencia en los extractos del fruto de guanábana

2.3.9.13.1 Determinación cualitativa de Pectina (Test del Ácido Múxico)

Principio

Este ensayo permite determinar cualitativamente a la D-galactosa, a este monosacárido como tal o bien formando parte de oligosacáridos, ya que por oxidación con ácido nítrico se genera el ácido D-galactárico que es insoluble en el medio de reacción, a diferencia de los restantes ácidos aldárico

Procedimiento

- ❖ Al extracto acuoso del fruto de guanábana añadir 2ml de alcohol al 96%. Filtrar al vacío. Mientras que al extracto alcohólico del fruto se filtra directamente al vacío
- ❖ El precipitado se trasfiere a un tubo de ensayo
- ❖ Se añade agua destilada y se agita el tubo

- ❖ Se adiciona Ácido Nítrico conc.
- ❖ Llevar a refrigeración por 15 min
- ❖ Si se forma cristales o agujas la prueba es positiva. (85)

2.3.9.13.2 Determinación cualitativa de almidón (Prueba del Lugol).

Principio

Este método se basa en la identificación de la presencia de almidón por la aparición de una coloración azul al combinarse la muestra con gotas de lugol cuando ésta contiene almidón.

Procedimiento

- ❖ Tomar una pequeña cantidad de muestra en un matraz Erlenmeyer
- ❖ Añadir unas gotas de lugol, si aparece una coloración azul oscura, indica la presencia de almidón. (54)

2.3.10 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

2.3.10.1 Metodología

El método general utilizado se basó en la valoración *in vitro* como una manera de cuantificar el poder reductor de ciertos compuestos, se medirá la capacidad de ellos de inhibir la enzima del tipo oxidasa. Como ensayo biológico se utilizará la polifenoloxidasa (PPO) extraída de la enzima.

2.3.10.2 Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el método Enzimático de Inhibición de la Polifenoloxidasas

Extracto Enzimático

Se homogeneiza 10g de pulpa de manzana en 20mL de buffer acetato de sodio/ácido acético 20mM (pH 5). Se centrifuga a 20.000rev/min y se utiliza el sobrenadante como solución enzimática. (70)

Buffer

Acetato de sodio/ácido acético 20mM pH 5. Se prepara primeramente las soluciones de acetato de sodio y ácido acético de la siguiente manera:

Solución concentrada A: Se diluye 11,55mL de ácido acético glacial (CH_3COOH) en un litro de agua destilada (solución 0.2M). (70)

Solución concentrada B: Se diluye 16,41g de acetato de sodio anhidro (CH_3COONa) ó 27,22g de acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada (solución 0.2M también). (70)

Se mezclan los volúmenes de soluciones concentradas presentadas a continuación, y se aforó a 100mL con agua destilada para obtener los valores mencionados de pH.

mL A	mL B	pH final
14,8	35,2	5,0

Sustrato

Catecol 0,5M preparado en el buffer acetato. Para lo cual se pesa exactamente 0,2752g de catecol (peso molecular 110,06g/mol) y se diluye con 5mL de buffer acetato de sodio/ácido acético cantidad que es suficiente para los análisis. (70)

Cabe destacar que el catecol se prepara para cada análisis ya que se degrada fácilmente por factores ambientales tales como la luz y el oxígeno del aire. (70)

Muestra a Ensayar

Las muestras de las que se mide la capacidad antioxidante son preparadas a tres diferentes concentraciones: 10.000µg/mL, 1000 µg/mL y 100 µg/mL, de manera que al ser agregadas las otras sustancias las concentraciones finales son de: 1000 µg/mL y 100 µg/mL y 10 µg/mL. (70)

A estas muestras se las prepara pesando 0,0500g del extracto de la planta (se anota en el libro record la cantidad exacta) se pasa a un vial limpio y seco diluyéndola con 5mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) lo que da como resultado tener una solución con una concentración de 10.000µg/mL. (70)

Sucesivamente se realiza diluciones al décimo para obtener las concentraciones de 1000 µg/mL y 100 µg/mL. Al agregar las otras soluciones como son el catecol, el extracto enzimático y el buffer se obtiene las siguientes concentraciones: 1000 µg/mL y 100 µg/mL y 10 µg/mL que se considerarán responsables de la actividad antioxidante. (70)

El Antioxidante (Vitamina C)

Como agente antioxidante positivo se utiliza la vitamina C a una concentración de 1000 µg/mL que al final de la dilución con el catecol, el extracto enzimático y el buffer resulta ser de 100 µg/mL. Dicha solución se la prepara diluyendo 0,0500g de vitamina C en 5mL de buffer 10.000µg/mL; se la diluye al décimo con buffer y se obtiene la solución de 1000 µg/mL.

La adición del solvente, la muestra, el sustrato, y las enzimas se realiza directamente a la cubeta en la cual se llega a un volumen final de 1mL. Se da inicio a la reacción mediante la adición de extracto enzimático y se comienza inmediatamente a leer y anotar la absorbancia inmediatamente a leer la absorbancia a 420nm con la ayuda de un espectrómetro. (70)

De la curva cinética de aparición de producto obtenida se determina la velocidad inicial de la reacción, la que corresponde a la actividad de la enzima. Es posible definir arbitrariamente una Unidad enzimática (U) como el cambio de unidades de Abs/seg. Se anotaran las lecturas que da el fotómetro cada 15 segundos desde el inicio del experimento hasta que hayan transcurrido 120 segundos. Es decir se realizan ocho lecturas. (70)

Primeramente se lleva a cero el aparato con buffer acetato, ya que este es el solvente que interviene en mayor volumen dentro del experimento. Se lee primeramente el blanco, luego las diluciones de muestra de menor a mayor concentración y por último un testigo positivo; la vitamina C a 100 µg/mL que efectivamente tiene poder antioxidante. Este procedimiento se repite por dos ocasiones más en cada muestra. (70). El esquema a seguir se representa en la Tabla No 7

TABLA No 7. ESQUEMA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Volumen en mL	Blanco	Muestra 1° dilución	Muestra 2° dilución	Muestra 3° dilución	Antioxidante Vitamina C
Buffer Acetato	2.4	2.1	2.1	2.1	2.1
Sustrato catecol	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Muestra	-	0.3	0.3	0.3	-
Extracto enzimático	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Antioxidante	-	-	-	-	0.3

FUENTE: TORREZ, G. 2012

Se considera como inhibición nula la absorbancia correspondiente al blanco, en el que las enzimas actuaron libremente sobre el catecol. Asimismo, se toma como inhibición absoluta la que presenta la cubeta con el antioxidante de poder previamente probado. El porcentaje de inhibición se determina relacionando la lectura del blanco con la lectura de cada uno de los extractos. (70)

$$(\%)\text{Inhibición} = \frac{\Delta A_{420 \text{ nm blanco}} - \Delta A_{420 \text{ nm muestra}}}{\Delta A_{420 \text{ nm blanco}}} \times 100$$

FÓRMULA No.10

Donde

$\Delta A_{420 \text{ nm}}$ = diferencia entre lectura final e inicial

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo constituye la esencia de la actividad investigativa realizada, la información fue compilada durante toda la etapa de experimentación, procesada y organizada para ser presentada en forma de tablas y figuras, las cuales son el insumo para el análisis y la discusión, a partir de esta actividad, poder extraer las conclusiones consideradas pertinentes, al igual que plantear algunas recomendaciones que le darían continuidad al estudio.

3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA VEGETAL

CUADRO No. 1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD EN DROGA SECA Y MOLIDA DE LAS HOJAS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO 2012.

% HUMEDAD RESIDUAL	% CENIZAS TOTALES	% CENIZAS SOLUBLES EN AGUA	% CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO
7,13± 0,05	5,17 ± 0,007	3,74 ± 0,08	1,65 ± 0,04
máximo 14%	máximo 12%	máximo7%	máximo5%

LÍMITES USP (FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA), 1985

± Desviación estándar para tres repeticiones. Valor p 0,05

En el Cuadro No. 1 se puede apreciar que el porcentaje de humedad residual, cenizas totales, cenizas solubles e agua, cenizas insolubles en ácido para las hojas de guanábana encuentran dentro de los límites normales establecidos por la USP # 18 para productos naturales. (56)

El porcentaje de humedad encontrado en la droga seca y molida fue de 7,13% siendo menor al 14% que es el máximo en la mayoría de monografías encontradas en las farmacopeas, permitiendo así la conservación de la droga en un tiempo prolongado ya que evita la hidrólisis de sus componentes y el crecimiento microbiano. Con el valor de la humedad se puede optimizar el proceso de secado de la materia prima. (56)

Las cenizas totales indican el contenido de sales minerales de la planta, al realizar esta determinación el valor encontrado fue de 5,17% que podrían corresponder a las concentraciones de algunos metales como Plomo, Arsénico, Mercurio y Cadmio. El contenido de cenizas totales es importante e indica, en cierta medida, el cuidado que se ha tenido en la preparación de la droga. (82)

Las cenizas solubles en agua son de 3,74 % que se encuentran dentro de los límites establecidos que es de menos 7 %. La guanábana presenta 1,65% de cenizas insolubles en ácido que indica su bajo contenido en sílice y que la especie vegetal no está contaminada con productos térreos. (82)

3.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico constituye una de las etapas que nos ayuda a determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en la planta.

CUADRO No. 2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA DROGA SECA Y MOLIDA DE LAS HOJAS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2012.

Ensayo	Metabolito	Ex. etéreo	Ex. alcohólico	Ex. acuoso
Sudan	Aceites y grasas	-		
Dragendorff	Alcaloides	-	++	-
Wagner	Alcaloides	-	++	-
Baljet	Lactonas y cumarinas	-	+++	
L-B	Triterpenos y/o esteroides	+	++	
Catequinas	Catequinas		-	
Resinas	Resinas		+	
Fehling	Azúcares reductores		++	+
Espuma	Saponinas		-	-
FeCl ₃	Fenoles y Taninos		++	+
Borntrager	Antraquinonas		+++	
Shinoda	Flavonoides		++	+
Antocianidinas	Flavonoides		+++	
Mucilagos	Mucilagos			-
Pr. A	Pr. a			+

Interpretación de la tabla: (-) no presencia del Metabolito, (+) baja evidencia, (++) evidencia, (+++) alta evidencia

En el Cuadro No. 2 se muestran los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico, realizado a las extracciones etéreas, alcohólicas (etanólicas) y acuosas a partir de las hojas de guanábano que arrojó la alta evidencia de: Lactonas y cumarinas, Flavonoides del tipo antocianidinas, Antraquinonas. Presenta evidencia de Alcaloides, Esteroides por su coloración verde oscuro-negro final de la reacción, Azúcares reductores, Fenoles - Taninos, Flavonoides. En el ensayo de Pr. A las fracciones ligeramente amargas. Baja evidencia de resinas. Estos resultados concuerdan con bibliografía según Alonso, J. 2004. (1)

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados según PALOMINO, C. 2007. A excepción de las Saponinas y Antocianidinas las primeras dieron negativo en esta investigación, mientras que PALOMINO no realizó su análisis para las segundas. Los Alcaloides reportados son abundantes difiriendo de la tesis que hemos realizado. (63). Según SALINAS, D. 2011. La guanábana presenta los siguientes metabolitos secundarios: Taninos, Compuestos fenólicos, Alcaloides, Terpenos. Todos los compuestos coinciden con los realizados en nuestra investigación a excepción de los Terpenos. (46)

CUADRO No. 3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO Y ACUOSO DE LOS FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2012.

Ensayo	Metabolito	Ex. alcohólico	Ex. acuoso
Sudan	Aceites y grasas		
Dragendorff	Alcaloides	-	+
Wagner	Alcaloides	-	+
Baljet	Lactonas y cumarinas	+	
L-B	Triterpenos y/o esteroides	-	
Catequinas	Catequinas	-	
Resinas	Resinas	-	
Fehling	Azucres reductores	++	++
Espuma	Saponinas	+	-
FeCl ₃	Taninos	+	+
Borntrager	Antraquinonas	-	
Shinoda	Flavonoides	+	-
Antocianidinas	Flavonoides	-	
Mucilagos	Mucilagos		-
Pr. A	Pr. a		-

Interpretación de la tabla: (-) no presencia del Metabolito, (+) baja evidencia, (++) evidencia, (+++) alta evidencia

En el Cuadro No. 3 se muestran los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico, realizado a los extractos alcohólicos (etanólicos) y acuosos a partir del fruto fresco de guanábana que arrojó la presencia de alcaloides, azúcares reductores, saponinas, taninos y flavonoides. El ensayo de Wagner y Dragendorff identifica compuestos nitrogenados como arginina, ácido caproico y ácidos grasos esenciales que se encuentra en el fruto de guanábana. (74)

3.3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD DEL EXTRACTO ALCOHOLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE GUANÁBANA.

3.3.1 DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA

CUADRO No. 4 DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA DEL EXTRACTO FLUIDO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2012.

PARÁMETROS	EXTRACTO ALCOHÓLICO (ETANÓLICO) HOJAS	EXTRACTO ACUOSO HOJAS
COLOR	Verde claro intenso	Café amarillento
OLOR	Herbario	Herbario
SABOR	Amargo	Ligeramente amargo
ASPECTO	Ligeramente turbio	Transparente

En el cuadro No.4 se aprecia las características organolépticas de los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas. Se emplea los órganos de los sentidos para poder indicar las características de cada uno de los extractos, diferenciándose significativamente en el color de acuerdo al solvente utilizado.

CUADRO No.5 DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LOS FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2012.

PARÁMETROS	EXTRACTO ALCOHOLICO (ETANÓLICO) FUTOS	EXTRACTO ACUOSO FRUTOS
COLOR	transparente	Blanco
OLOR	alcohol	Característico de la fruta
SABOR	Insípido	Ligeramente dulce
ASPECTO	Transparente	Turbio

Se puede apreciar diferencias drásticas en la descripción organoléptica de los extractos de la fruta, esto puede deberse a que el extracto alcohólico se encuentra libre de pectina.

3.3.2 PARÁMETROS FÍSICOS

CUADRO No.6 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL EXTRACTO FLUIDO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2012.

DETERMINACIONES	EXTRACTO ALCOHÓLICO (ETANÓLICO) HOJAS	EXTRACTO ACUOSO HOJAS
pH	5,49± 0,02	5,68± 0,11
ÍNDICE DE REFRACCIÓN	1,370 ±0,002	1,336 ± 0,000
DENSIDAD RELATIVA (g/mL)	0,933 ± 0,004	1,012 ± 0,007
SÓLIDOS TOTALES (%)	9,856 ± 0,023	7,567 ± 0,091

± Desviación estándar para tres repeticiones. Valor p 0,05

CUADRO No. 7 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LOS FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2012.

DETERMINACIONES	EXTRACTO ALCOHÓLICO FRUTOS	EXTRACTO ACUOSO FRUTOS
pH	4,98 ± 0,060	4,60 ± 0,15
ÍNDICE DE REFRACCIÓN	1,367 ± 0,004	1,334 ± 0,000
DENSIDAD RELATIVA (g/mL)	0,878 ± 0,049	0,998 ± 0,26
SÓLIDOS TOTALES (%)	1,140 ± 0,15	2,483 ± 0,255

± Desviación estándar para tres repeticiones. Valor p 0,05

En el cuadro No 6 se muestran los resultados del análisis físico químico realizados en los extractos de las hojas de guanábana utilizando como solventes el alcohol (etanol) y agua. Se muestran las determinaciones de control de calidad del extracto fluido y acuoso de los frutos en el cuadro N o 7.

Los valores de pH encontrados son: 5,49 y 5,68 para los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas, indicando que los extractos mencionados presentan un pH ácido posiblemente por la presencia de (fenoles, taninos, flavonoides). Mientras que el pH promedio del extracto alcohólico de los frutos es de 4,98 y del acuso es de 4,60, presentando estos últimos extractos una mayor acidez a los de la hoja.

Los índices de refracción promedio determinados son: 1,370 para el extracto alcohólico (etanólico) de las hojas 1,367 para el acuso de esta misma parte del árbol de guanábana y al compararlo con el índice de refracción del etanol absoluto que es de 1,360 indica la presencia de compuestos extraídos con este solvente en hojas y frutos. Los extractos acuosos de las hojas y frutos presentan el siguiente índice de refracción 1,336; 1334 respectivamente, al relacionarles con el índice de refracción del agua que es de 1,333 indica la presencia mínima de metabolitos extraídos. (81)

El resultado de la densidad relativa determinada de los extractos acuosos de las hojas y frutos es de 1,012g/mL para la primera y 0,998 g/mL para la segunda, al compáralo con la densidad del agua que es de 1 g/mL mencionamos que en el caso de las hojas es ligeramente mayor sucediendo lo contrario en el extracto de los frutos. Utilizando el etanol como solvente la densidad relativa de los extractos resulto ser de 0,933 para las hojas y 0,878 para los frutos siendo estos resultados mayores que la densidad del etanol 0,790 estableciendo así la presencia de compuestos densos disueltos.

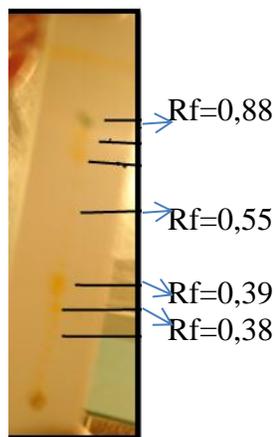
Los sólidos totales indican la presencia de sales y residuos orgánicos en el extracto, los resultados fueron 9,856 % para el extracto alcohólico de las hojas de guanábana, mientras que para el extracto acuoso es de 7,567%. Los extractos de los frutos de guanábana presentan los siguientes valores de sólidos totales: 1,140% extracto alcohólico y 2,483 para el extracto acuoso. Estos valores corresponden con la composición química determinada en los diferentes extractos.

3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE FLAVONOIDES.

3.4.1 CROMATOGRAFÍA TLC

CUADRO No. 8 DETERMINACIÓN DEL R_f DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA FLAVONOIDES DE LAS HOJAS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2012.

BANDA OBSERVADA	R _f	COMPUESTO IDENTIFICADO
1	0,88	Flavona
2	0,81	
3	0,75	
4	0,55	Ácido p-cumárico
5	0,39	Quercetina
6	0,38	Ácido cafeíco
7	0,30	



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA No. 2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA DE LAS HOJAS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*)

✚ **Adsorbentes:** Sílica gel 60 F₂₅₄

✚ **Sistema de solventes:** Tolueno – Acetato de etilo –Ácido fórmico (36:12:5)

✚ **Revelado:** sulfato de Cerio

La cromatografía de capa fina para la presencia de flavonoides en las hojas de guanábana, permitió la evidencia de 7 componentes con los R_f mostrados en el cuadro N o8, sin embargo en bibliografía SARIC, M. et al. 2004, tan solo se pudo identificar 4, los compuestos 1, 4,5 y 6, siendo la flavona, ácido p-cumárico, quercetina, ácido cafeíco. (68)

La flavona concuerda con la investigación realizada por POMA, M. et al. 2011 en su análisis cromatográfico en donde se utilizó el sistema BAW (n-BuOH: AcOH: H₂O, 4:1:5). (49)

Los ácidos fenólicos como el ácido p-cumárico y cafeíco, identificados mediante cromatografía de capa fina coinciden con los datos bibliográficos de composición química de la guanábana que se encuentran en ALONSO. 2004. (1)

3.5 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.

Para realizar la cuantificación de flavonoides se basó en los siguientes datos de la curva de calibración:

CUADRO No 9. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES UTILIZANDO COMO PATRÓN QUERCETINA.

CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA A 258 nm
4	0,233
8	0,448
12	0,675
16	0,953
20	1,136

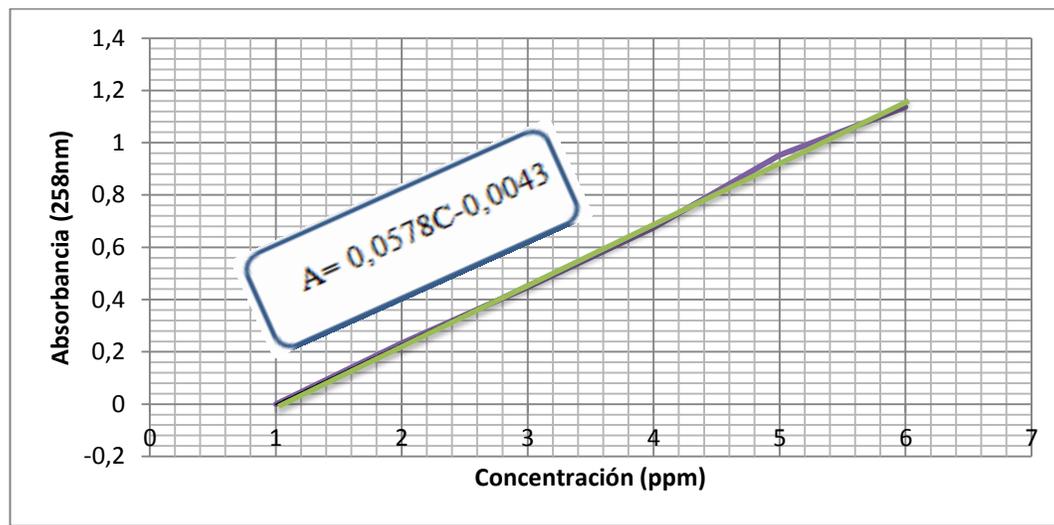


GRÁFICO No1 CURVA DE ABSORBANCIA VS. CONCENTRACION DE QUERCETINA PARA CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES. LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2012.

CUADRO No. 10 CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2012.

MUESTRA	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN	CONTENIDO DE FLAVONOIDES %
HOJAS DE GUANÁBANA	0,596	13 ppm	1,3
FRUTOS DE GUANÁBANA	0,560	8,16 ppm	0,81

Para la cuantificación de flavonoides, se reemplazó los valores de las absorbancias obtenidas en la ecuación de la curva de calibración de la quercetina (gráfico No. 1), así se obtuvo un valor de 1,3 g de quercetina/ g planta en el caso de las hojas de guanábana, y 0,8 g de quercetina/ g frutos.

Lo cual no concuerda con el parámetro señalado por POMA, M. et al. .2011 en donde se obtuvo una concentración de 3,167 µg/mL para las hojas de guanábana. La diferencia puede deberse a que la cuantificación se realizó a partir del extracto, o al lugar de procedencia de la materia prima. (49)

3.6 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EXPRESADOS COMO PORCENTAJE DE ÁCIDO GÁLICO.

Primeramente se realizó la curva de calibración del ácido gálico para obtener la ecuación de la recta utilizada para la determinación.

CUADRO No 11. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES UTILIZANDO COMO PATRÓN ÁCIDO GÁLICO.

CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA A 765 nm
20	0,558
40	0,925
60	1,458
80	1,869

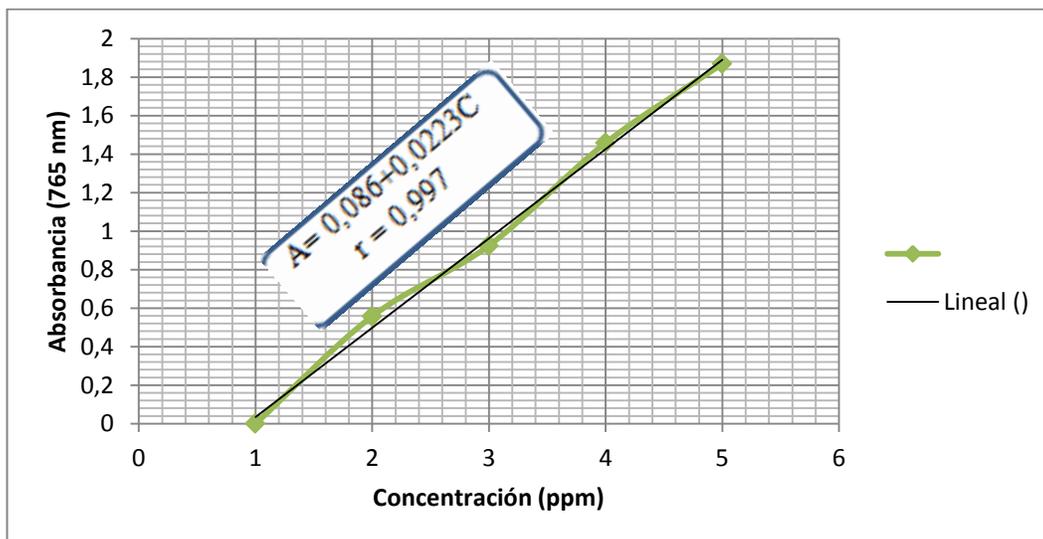


GRÁFICO No2 CURVA DE ABSORBANCIA VS CONCENTRACION DE ÁCIDO GÁLICO PARA CUANTIFICACION DE FENOLES TOTALES. LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2012.

CUADRO No.12 CUANTIFICACION DE FENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2012.

MUESTRA	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN ppm	CONCENTRACIÓN Mg ácido gálico /100 g de parte comestible o planta.
Extracto Alcohólico Hojas	0,951	4,84	484
Extracto Acuoso Hojas	0,937	3,18	318
Extracto Alcohólico Frutos	1,099	4,54	454
Extracto Acuoso Frutos	0,953	3,88	388

En el Cuadro No 12 se aprecia la concentración de fenoles totales para los diferentes extractos una vez que se reemplazó las absorbancias obtenidas en la ecuación de la recta del ácido gálico. El extracto alcohólico de las hojas presenta una mayor concentración de fenoles que los demás extractos pudiendo deberse que en el tamizaje realizado de las hojas se encontró ácidos fenólicos como el ácido p- cumárico y el ácido cafeíco.

La concentración del extracto alcohólico del fruto es de 454 mg de ácido gálico en 100 g de la parte comestible siendo este valor superior al obtenido en la investigación realizada por MURILLO, E. 2002 que fue de 368 mg/g. (48)

Se observa también una mejor extracción de compuestos fenólicos en el solvente alcohólico (etanólico) que en el acuoso.

3.7 EVALUACIÓN DEL VALOR NUTRACÉUTICO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE GUANÁBANA (*Annona muricata*)

3.7.1 EVALUACION SENSORIAL

CUADRO No. 13 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE LAS HOJAS FRESCAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA LA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2012.

PARÁMETROS	HOJAS DE GUANÁBANA	FRUTOS DE GUÁNABANA
COLOR	Verde	Blanco
OLOR	Herbario	Característico
SABOR	Herbario	Ligeramente dulce
ASPECTO	Normal	Sólido

En el cuadro anterior se encuentra la evaluación sensorial de las hojas frescas y frutos de guanábana que se llevó a cabo para las primeras para conocer su inocuidad en la recolección para su posterior análisis tanto bromatológico como fitoquímico. En el caso de los frutos para saber su maduración, tiempo de recolección y estado óptimo del fruto.

En la tesis presentada por MARQUEZ, C. 2009, dice que las frutas inmaduras presentaron una pulpa ligeramente más brillante y un color blanco más intenso, al compararlo con el color de nuestra fruta que fue blanca se puede dar el criterio que se encontraba en una etapa semi-madura. (61)

Los órganos sensoriales olfativos y de las papilas gustativas ubicadas en la cavidad bucal, especialmente las orientadas a percibir los sabores ácidos, dulces y sus contrastes. En esta investigación se percibió el sabor ligeramente dulce que podía deberse a la época de recolección que fue e principios del mes de junio o a la variedad de guanábana utilizada.

3.7.2 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

CUADRO No. 14 RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS HOJAS Y FRUTOS (PULPA) DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2012.

Parámetro	Valor obtenido en la experimentación para los frutos (%)	Referencia bibliográfica base fresca	Valor obtenido en la experimentación para las hojas (%)	Referencia bibliográfica base fresca (%)
Humedad	83,43±0,26	83,40(55) 83,4(50)	67,01±0,09	70,61 LAB CESTA
Ceniza	0,715±0,005	0,700(55) (50)	3,62 ±0,03	2,27 LAB CESTA
Proteína	1,085 ±0,02	1,00(55) 1,10 (50)	3,92 ±0,016	4,45 LAB CESTA
Fibra	1,325 ±0,005	1,40(55) 1,60 (50)	4,34 ±0,01	1,82 LAB CESTA
Grasa	0,325±0,29	0,20 (55) 0,20 (50).	2,305±0,08	0,87 LAB CESTA
ELnN	13,12±0,29	13,00(50) 14,70 (57)	18,805±0,62	19,98 LAB CESTA

± Desviación estándar para dos repeticiones. Valor p 0,05

Se realizó el análisis proximal de las hojas frescas y frutos de guanábana obteniéndose resultados (Cuadro No 14). Para el caso del fruto los resultados de humedad, cenizas, proteína, fibra y ELnN concuerdan los datos bibliográficos tanto de Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos como de las Fichas Técnicas de la FAO exceptuando el porcentaje de grasa que es ligeramente mayor que la bibliografía ya mencionada. Mientras que los carbohidratos o ELnN se encuentran disminuidos según el valor nutricional de la pulpa de guanábana de acuerdo a los datos registrados en FRISCO. Ver en el Anexo No. 13

Para el Análisis bromatológico de las hojas no se encontró Norma Técnica ni datos bibliográficos por tal razón se toma como referencia los resultados del Laboratorio de Análisis Ambiental e Inspección CESSTTA que se realizó en el mes de julio del 2012(Anexo No 12), cabe mencionar que se trata de una Laboratorio Calificado. El porcentaje de humedad y de proteínas es menor que la referencia, en cambio la ceniza, fibra y grasa presentan datos elevados. La diferencia de estos resultados puede ser por la diferencia de métodos realizados, los equipos utilizados. La grasa presenta un mayor porcentaje en la investigación realizada que los datos de referencia por que la clorofila no se extrajo y está formando parte del valor obtenido de la grasa que se realizó por el método Soxhlet. Las cenizas totales de las hojas frescas es de 3,62% mientras que de la droga seca y molida es de 5,17 % esta variación de porcentaje puede deberse al contenido de agua presente en las hojas al realizar el análisis, mencionando que en la droga seca y molida aumenta la concentración de solutos por lo tanto el porcentaje de cenizas totales mayor.

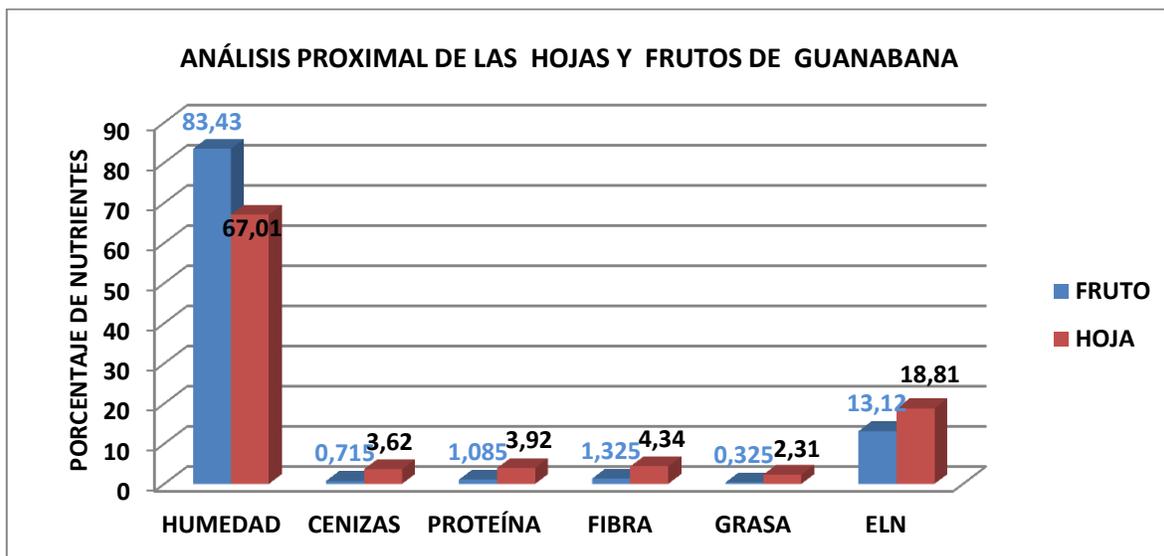


GRÁFICO No 3. CONTENIDO DE NUTRIENTES REALIZADO EN EL ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS HOJAS Y FRUTOS (PULPA) DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2012.

En el gráfico anterior se puede observar el contenido de nutrientes de estas dos partes del árbol de guanábana en donde el % de proteína nos indica el valor nutritivo que puede tener tanto la hoja como el fruto ya que este macronutriente es importante en funciones estructurales y motoras de nuestro cuerpo. El alto contenido de agua en el fruto es importante ya que una pérdida de solo un 8% del agua del cuerpo es suficiente para provocar una enfermedad grave.

CUADRO No.15 RESULTADOS DEL VALOR ENÉRGICO DE LAS HOJAS Y FRUTOS (PULPA) DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2012.

VALOR ENÉRGICO	Valor obtenido en la experimentación para los frutos	Referencia bibliográfica	Valor obtenido en la experimentación para las hojas	Referencia bibliográfica
kJ/100g	250,33 ± 4,98		473,025± 11,12	442,25 LAB CESTA
kcal/100g	59,74± 1,10	53,1 - 63,1(45)	112,895± 2,65	105,55 LAB CESTA

En el cuadro No 15 se aprecia que el valor energético de la pulpa obtenido en la investigación es de 59,74 kcal/100g que es bajo por tratarse de una fruta que presenta mayor porcentaje de humedad y concuerda con el dato bibliográfico de 53,1 - 63,1 kcal/100g reportado por OJEDA, G. et al. 2007. (45)

En cambio el valor de energía obtenido en las hojas es superior al de referencia reportado por el Laboratorio de Análisis Ambiental e Inspección CESSTTA (Anexo No 12), siendo estos valores elevados por el alto contenido de proteína que es característico de las hojas.

El valor energético de un alimento dado dependerá de su contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos que en el análisis proximal nos demuestra que tanto el fruto como la hoja contienen este valor.

CUADRO No. 16 RESULTADOS DEL ANÁLISIS COMPLEMENTARIO DE LOS FRUTOS (PULPA) DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2012.

Parámetro	Valor obtenido en la experimentación para los frutos (%)	Referencia bibliográfica base fresca
Azúcares	6,795±0,045	6,9 (57) 15,63 (74) 13,80–18,00 (33)
Acidez	0,775±0,015	0,7 (51)
pH	4,42±0,01	3,38- (51) 3,8–4,2 (33)
Grados Brix	6,875±0,125	11 (52) 7 (57)
Vitamina C	0,038±0	0,026 (33)
Índice de Maduración	8,87±0,01	25,20–36,80 (33)

± Desviación estándar para dos repeticiones. Valor p 0,05

Las azúcares totales promedio para las pulpas de guanábanas 6,79 % (Cuadro No 20). Los valores encontrados se son menores que los reportados (13- 18%) por Vélez y Vélez (1990), y similares a los datos que se encuentran en la etiqueta de la pulpa de guanábana de marca FRISCO que es de 6,9 que fue elaborada en el mes de Junio la misma época de recolección de nuestra materia alimenticia para el análisis o también concuerda con la etiqueta porque se trata de una variedad ecuatoriana. (33) (57)

Los valores de acidez titulable de las muestras de guanábana son iguales a los de la Norma técnica Colombiana. 2003. que es 0,7 éstos indican que los frutos cultivados en la zona mantienen su grado de acidez en las diferentes épocas del año. (51)

Las pulpas de guanábana son ligeramente ácidas; los rangos de pH es de 4,42 encontrándose dentro del rango de la Norma Colombiana y sus valores son superiores que similar al reportado por OJEDA, G. y demás autores. (45)

Lo sólidos solubles (Grados Brix) que se encuentran en las pulpas investigadas en de 6,8 que son inferiores a las reportadas por la INEN 2237-1. 2008. Y similares a los de la etiqueta de pulpa de Guanábana. Por los valores bajos de los sólidos solubles los datos del índice de maduración son inferiores a los bibliográficos, posiblemente la fruta estaba semi-madura por su época de recolección lo cual no influyo en el resto de parámetros ya que el cuadro No 14 se pudo apreciar que se encontraban dentro de los valores de referencia. (52)

La Vitamina C se cuantifico por HPLC y el método del Yodo, siendo la Cromatografía líquida en alta resolución (HPLC) el más sensible y que sus resultados son más confiables. Mediante el método del Yodo se obtuvo el valor de 0,038% que es superior al de referencia de 0,026% reportado por Vélez y Vélez (1990). (33)

CUADRO No. 17 RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA C POR HPLC DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2012.

TRATAMIENTOS	%	Vitamina C de Referencia mg/100g
Extracto alcohólico hojas	0,025 ±1,35	
Extracto acuoso hojas	0,995X10 ⁻³ ±0,00	-
Extracto alcohólico frutos	0,023±0,84	
Extracto acuoso frutos	0,415X10 ⁻³ ±0,002	0,026(33)

± Desviación estándar para dos repeticiones. Valor p 0,05

En el Cuadro No 17 se aprecia que el extracto alcohólico de las hojas presenta un mayor porcentaje de Vitamina C que es del 0,025% que se puede corroborar con la bibliografía de ALONSO que dice que las hojas tiene en su composición química esta vitamina. Mientras que el extracto alcohólico de los frutos presentan un 0,023% que es ligeramente inferior al valor reportado de 0,026% Vélez, Vélez. 1990. (1) (33)

En los extractos acuosos de las hojas y frutos existió una degradación de la Vitamina C porque estos no se encontraban en medio ácido lo que tuvo como consecuencia los resultados de valores ínfimos de Vitamina C a los reportados tanto por bibliografía como por los extractos alcohólicos. También se realizó como pruebas adicionales el Análisis cualitativo de pectinas y almidón que resulto positivo para la fruta de guanábana con la formación de cristales para la primera y adoptó una coloración azul para la segunda prueba. Anexo No 11

3.8 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). EXPRESADOS POR EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PPO.

En este parámetro se analizó la actividad antioxidante de los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas y frutos de la guanábana mediante la valoración *in vitro* de la dosis efectivas a concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm; para apreciar el efecto inhibitorio a la oxidación causado por un agente enzimático activo extraído de la pulpa de manzana (polifenoloxidasas) sobre un sustrato específico (catecol), a su vez empleando ácido ascórbico, como patrón antioxidante. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

CUADRO No. 18 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2012

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE			
TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA $\Delta\text{Abs}_{420}/\text{min/ml}$)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA PPO
Blanco	-	0,038	-
Extracto alcohólico hojas	1000	0,029±0,0004	22,80±1,24
	100	0,009±0,0004	75,44±1,24
	10	0,008±0,0004	77,19±1,24
Extracto acuoso hojas	1000	0,044±0,0004	-17,16±1,14
	100	0,026±0,0004	30,71±1,23
	10	0,020 ± 0,0009	45,61±2,47

Extracto alcohólico frutos	1000	0,015± 0,0009	61,38±2,40
	100	0,008±0,0004	78,08±1,24
	10	0,006±0,0004	83,33±1,24
Extracto acuoso frutos	1000	0,013±0,0004	64,91±1,24
	100	0,012±0,0004	67,54±1,24
	10	0,008±0,000	78,94±0
Vitamina C	1000	0,001±0,0008	97,45±1,2
	100	0,0006±0,0004	98,24±1,25
	10	0,001±0,0008	97,45±2,04

± Desviación estándar para dos repeticiones. Valor p 0,05

En el Cuadro No 18 se muestra el efecto de los extractos inhibidores y vitamina C sobre la acción de la PPO además del blanco que es donde las enzimas actúan libremente sobre el catecol.

Comparando el porcentaje de inhibición con el blanco (>actividad) observamos que los extractos y la vitamina C presenta inhibición de la actividad a partir de 1000 ppm siendo de manera considerable en la Vitamina C que es del aproximado del 97%, caso contrario sucede con el extracto acuoso de la hoja donde no se observa inhibición porque la actividad de la enzimática es mayor que el blanco, presentando inhibición intermedia con los demás extractos.

A 10 ppm la actividad del ácido ascórbico es similar a las demás concentraciones siendo diferente su comportamiento en los extractos en estudio. El extracto alcohólico del fruto muestra una mayor actividad antioxidante al inhibir la actividad de la PPO llegando a un 83 % de inhibición a esta misma concentración.

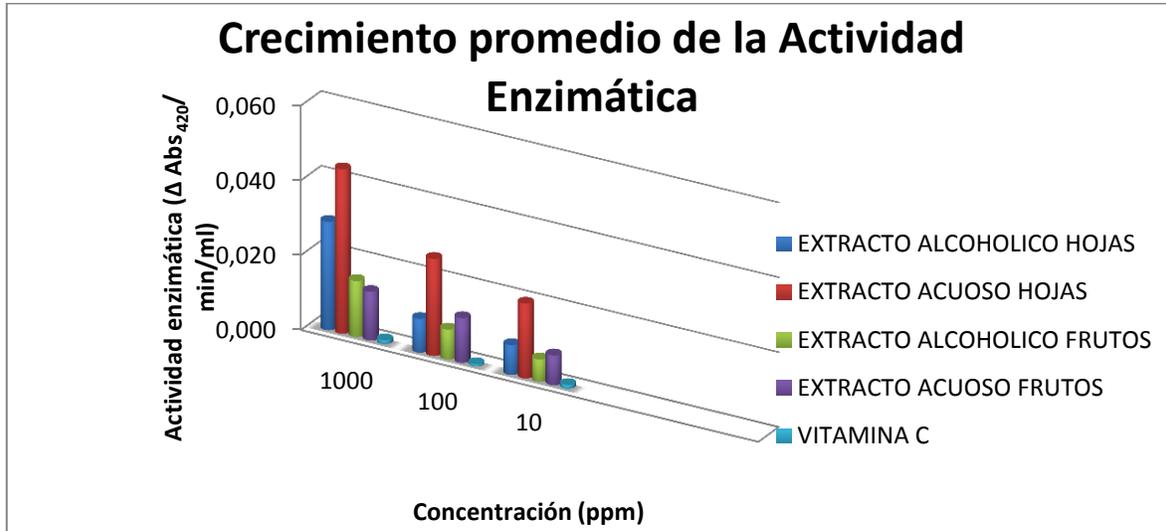


GRÁFICO No 4. CRECIMIENTO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PPO EN RELACIÓN A LA CONCENTRACIÓN. LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2012

En el gráfico anterior se aprecia la actividad enzimática de la polifenoloxidasasa en relación a la concentración, en donde se presenta una mayor actividad del extracto acuoso de la hoja en la concentración de 1000ppm seguido del extracto alcohólico de las hojas, acuoso de los frutos, alcohólico de los frutos que va disminuyen hasta la concentración de 10 ppm. La actividad enzimática de la vitamina C es mínima en las tres concentraciones.

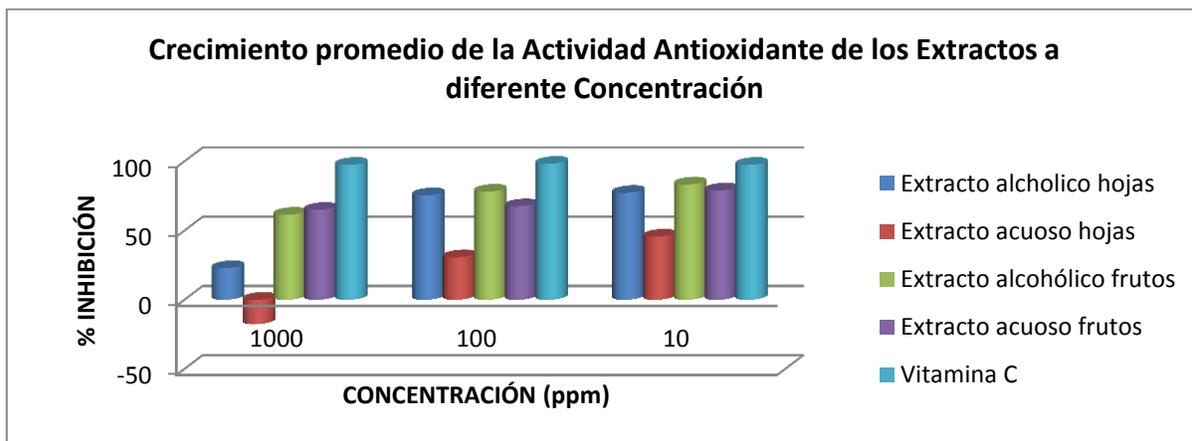


GRÁFICO No 5. CRECIMIENTO PROMEDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS Y LA VITAMINA C A DIFERENTE CONCENTRACIÓN. LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO DEL 2012

El crecimiento de la Actividad Antioxidante se encuentra demostrado por el % de Inhibición el cual es mayor para la Vitamina C siendo un aproximado del 98% a las diferentes concentraciones. De las muestras en estudio, el extracto alcohólico de los frutos presenta un mayor porcentaje de inhibición que es de 83 % a la concentración de 10 ppm al compararlo con la Vitamina C. Mientras que el extracto Acuoso de la hoja presenta una inhibición negativa.

La evolución de la actividad antioxidante, presentó un comportamiento creciente hasta la concentración de 10 ppm en los diversos extractos exceptuando la vitamina C.

Estos resultados que demuestran que la guanábana presenta menor actividad que la Vitamina C lo cuál puede ser justificado por investigaciones realizadas como el resumen publicado por GORDILLO, J.et al. 2012, que menciona que sus hojas, al igual que sus jugos y vinos, no contienen concentraciones elevadas de actividad o compuestos antioxidantes. (71)

3.8.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó comparando los promedios de cada uno de los extractos con la Vitamina C que es el grupo control utilizando la prueba de ANOVA y el test de Tukey para determinar qué valores presentaban una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

Las Hipótesis Estadísticas a probar fueron:

Hipótesis nula 1:

Ho: No existe diferencia significativa en la actividad antioxidante entre los 4 extractos y el standard de referencia aplicado (Vitamina C).

Hipótesis alternativa 1:

H1: Al menos dos formulaciones aplicadas tienen diferente actividad antioxidante.

Hipótesis nula 2:

Ho: No existe diferencia significativa en la actividad antioxidante entre los 3 concentraciones.

Hipótesis alternativa 2:

H1: Al menos dos concentraciones tienen diferente actividad antioxidante.

Nivel de Significancia: $\alpha = 0.05$.

Región Crítica:

F calculado) es de 49,718 y el F tabulado (valor crítico) es de 2,6189 para los tratamientos

F calculado) es de 26,413 y el F tabulado (valor crítico) es de 3,244 para las concentraciones

CUADRO No. 19 ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS FACTORES PARA LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	gl	CUADRADO MEDIO	PRUEBA F	VALOR P
EXTRACTOS	29.596.090	4	7.399.023	49.718	.000
CONCENTRACIONES	7.861.809	2	3.930.905	26.414	.000
Error	5.655.133	38	148.819		
Total	228.003.073	45			

En el Cuadro No 19 se muestra el análisis de varianza para los extractos y la concentración. Esto quiere decir que hay diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de inhibición desarrollados de los tratamientos, y la Vitamina C.

DECISIÓN

Se rechaza la hipótesis nula en ambos casos porque el F calculado) es de mayor que el F tabulado (valor crítico), por lo que se decide que al menos dos extractos tienen diferente actividad antioxidante. Para la otra variable se concluye que al menos dos de las concentraciones aplicadas tienen diferente actividad antioxidante.

El valor p correspondiente a los extractos y a las concentraciones son menores que 0.05, por lo que corrobora el rechazo de las Ho

CUADRO No. 20 RESULTADO ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN PARA GRUPOS HOMOGÉNEOS DE LOS EXTRACTOS Y LA VITAMINA C APLICANDO TUKEY

TRATAMIENTO	N	Subconjunto		
		1	2	3
B	9	195.689		
A	9		584.800	
D	9		704.644	
C	9		742.656	
E	9			977.156
Sig.		1.000	.066	1.000

En el Cuadro No 20 se muestra la prueba de comparación de pares de medias de Tukey para los tratamientos presenta tres subconjuntos.

En el primer grupo se encuentra únicamente la Vitamina C (B). En el segundo grupo los extractos alcohólicos de las hojas, frutos y acuoso de los frutos de guanábana (A, D, C) respectivamente. En el tercer grupo se encuentra el extracto acuoso de las hojas (E)

CUADRO No. 21 RESULTADO ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN PARA GRUPOS HOMOGÉNEOS DE LAS CONCENTRACIONES APLICANDO TUKEY

CONCENTRACIÓN	N	Subconjunto	
		1	2
1000	15	457.873	
100	15		700.027
10	15		765.067

En el primer grupo se encuentra la concentración de 1000 ppm y en el segundo grupo las concentraciones de 100 y 10 ppm. La aplicación de las concentraciones de 10 y 100 son estadísticamente homogéneas y significativamente mayores a la concentración de 1000.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES

1. Con la materia prima recolectada en el Recinto la Maravilla del Cantón Montalvo y secada en Jambi Kiwua, se elaboró los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas y frutos de la guanábana. Para cumplir con los requisitos de calidad se basó en las buenas prácticas de manufactura durante la recolección, manipulación, secado adecuado y elaboración de los extractos; lo que se vio reflejado en el control de calidad de la droga cruda.
2. En el análisis nutracéutico se evidencio el alto porcentaje de nutrientes en comparación con la Tabla de Composición de los Alimentos Ecuatorianos y los resultados reportados por Laboratorio de Análisis Ambiental e Inspección CESSTTA, en el caso de la fruta destaca el contenido en humedad, proteína que permiten al ser humano un aumento en funciones vitales como motoras y en el valor energético. Para la hoja encontramos un valor elevado de proteína, fibra. Los resultados del análisis complementario permiten reiterar que el fruto presenta contenido de Vitamina C realizado en la materia prima alimenticia. Mencionando que la investigación se realizó en un fruto semi- maduro por lo que intervino variando los resultados de azúcares y sólidos solubles.

3. Se evaluó la actividad antioxidante total de los extractos utilizando el Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el método Enzimático de Inhibición de La Polifenoloxidasa, con los resultados obtenidos se realizó el Test de ANOVA indicando que al menos dos extractos presentan diferente actividad antioxidante al compararlos con el Estándar. Los extractos del fruto presentan ligeramente una mejor actividad inhibitoria que de las hojas, en el caso de los solventes las fracciones etanólicas son antioxidantes en relación con las fracciones acuosas, que son más bien inductoras de la oxidación concluyendo así que de todos los extractos en estudio el extracto alcohólico de los frutos de guanábana presenta la mejor actividad antioxidante a concentraciones de 100 y 10 ppm posiblemente debido a que a menor concentración exista una menor interacción entre compuestos como pectina y almidón dejando actuar al antioxidante. También se realizó la cuantificación de Vitamina C por HPLC conociendo así que el extracto alcohólico de las hojas presenta un mayor porcentaje de este micronutriente lo que nos permite deducir que la actividad antioxidante total presentada se debe a su contenido en Vitamina C que es un antioxidante exógeno. Al hablar de los compuestos fenólicos el extracto alcohólico de los frutos presentan un mayor porcentaje lo que puede incidir en la actividad investigada.

CAPÍTULO V

5 RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar investigaciones aplicativas tanto de los extractos alcohólicos como acuosos de las hojas y frutos de guanábana en cosméticos, Fitomedicamentos, alimentos.
2. Para formulaciones cosméticas se recomendaría las hojas de guanábana debido a que el fruto presenta azúcares, polisacáridos como la pectina que podría causar inconvenientes en la estabilidad del producto.
3. Es importante realizar las investigaciones en frutas con índice de maduración de cosecha optimo para que no exista variación en algún resultado

CAPÍTULO VI

6 RESUMEN

Se evaluó la Actividad Antioxidante y el valor Nutracéutico de las Hojas Y Frutos de la Guanábana (*Annona muricata*) ".en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Se usó como metodología experimental el ensayo de la capacidad antioxidante según el método enzimático de inhibición de la polifenoloxidasas y el análisis bromatológico tanto de las hojas y frutos de la guanábana recolectados en el Recinto la Maravilla de la Provincia de Los Ríos. El estudio se realizó en diferentes concentraciones de los extractos siendo estos 1000 µg/mL, 100 µg/mL y 10 µg/mL. Los resultados se expresaron en porcentajes de inhibición y con la ayuda de métodos estadísticos ANOVA y TUKEY se comprobó al menos uno de los extractos presentan diferente actividad antioxidante.

En el caso de los extractos de las hojas el porcentaje de inhibición es de aproximadamente 75 % en la fracción alcohólica, mientras que en la fracción acuosa es del aproximado del 35 %. El extracto de los frutos (pulpa) de graviola su actividad antioxidante es del 79% para la fracción acuosa y del 82% para la fracción alcohólica. En el valor nutritivo del fruto, destaca su contenido de Proteína (1,1%) y minerales (0,75), el de la hoja destaca el alto contenido de proteína (3,92), fibra (4,34).

Se concluye que las hojas y frutos de la guanábana presentan actividad antioxidante y propiedades nutraceutica por los resultados mencionados en el estudio bromatológico.

Por lo que se recomienda realizar investigaciones aplicativas en el área de cosmética, Fitomedicamentos y alimentos.

SUMMARY

It was evaluated the Antioxidant Activity and the Nutraceutical Value from the leaves and fruit of the soursop (*Annona muricata*), in to the labs of the Science Faculty of the Higher Polytechnic School of Chimborazo.

It was used the experimental methodology, the essay of the antioxidant capacity according to the enzymatic method of inhibition of the polyphenoloxidase and the compositional analysis of both the leaves and fruit of the soursop collected in precinct La Maravilla in Los Rios Province. The study was made in different concentrations of the extracts, being these 1000 µg/mL, 100 µg/mL y 10 µg/mL. The outcomes were expressed in percentages of inhibition and the help of statistical methods such as ANOVA and TUKEY was proved that at least one of the extracts present different antioxidant activities.

In the case of the extracts of leaves the percentage of inhibition is nearby 75% in alcoholic fraction, whereas the aqueous fraction is roughly 35%. The fruit extract (pulp) of soursop its antioxidant activity is 79% for the aqueous fraction and 82 % for the alcoholic fraction. In the nutritive value of the fruit highlights its protein content (1,1 %) and minerals (0,75), from the leaf highlights because of the high content of protein (3,92) and fiber (4,34)

It is concluded that the soursop leaves and its fruit present an antioxidant activity and nutraceutical properties by means of means of the mentioned outcomes in the compositional analysis.

It is recommended to make applicative investigations in the cosmetic area, phytomedicine, and food.

CAPÍTULO VII

7 BIBLIOGRAFÍA

1. **ALONSO, J.**, Tratado de fitofármacos y nutracéuticos., Rosario - Argentina., Corpus., 2004., Pp. 641- 646, 927-930,1037-1041.
2. **ARANCETA, J., y otros.**, Dieta y Riesgo Cardiovascular., S. ed., Madrid – España., Panamericana S.A., 2007., Pp.105-109.
3. **BAEZA, M., y otros.**, Alimentación y nutrición familiar., S. ed., Meíco DF – México., EDITEX., Pp 16-19
4. **BARAONA, M., y otros.**, Guanábana Y Macadamia Fluricultura Especial., Fluricultura II., San José - Costa Rica., EUNED., 1992., Pp. 17-21
5. **BARBERÁ, J., y otros.**, Alimentos funcionales aproximación para una buena alimentación., Madrid- España., INUTCAM., 2010., Pp. 32-38.
6. **BELLO, J.**, Calidad de vida, alimentos y salud humana: Fundamentos científicos., Madrid- España., Ediciones Días de Santos., 2005., Pp. 304-308.

7. **BORDENAVE, J.**, La Dieta Anti- Inflamatoria. El rol de la dieta y las enfermedades Crónicas., S.ed., Bloomington- United States of America., Balboa Press., 2012., Pp. 52-65
8. **BOUCHER , F.**, Los productos nutraceuticos: oportunidad para los recursos naturales Autóctonos el papel de los investigadores., No11., Lima - Perú., PRODAR., 2000., Pp. 9-12.
9. **BRUNETON, J.**, Farmacognosia. Fitoquímica., Plantas medicinales., 2a ed., Zaragoza – España., Acribia., 2001., Pp. 115-119
10. **BUXADE, C.**, Zootecnia Bases de Producción Animal., Tomo 13., Reproducción y Alimentación., S. ed., Barcelona- España., Ediciones Mundi – Prensa., 1995., Pp. 205
11. **CARAVACA, F., y otros.**, Bases de la producción animal., Sevilla- España., Los Autores., 2003., Pp. 230-243
12. **CARPER, J.**, Alimentos medicina milagrosa. Que comer y que no comer para prevenir más de 100 enfermedades y problemas., 5a ed., Barcelona- España., Amat., 2008., Pp. 444-447
13. **CASTILLO, E., y otros.**, Manual de Fitoterapia., S. ed., Barcelona., Elsevier Masson., 2007., Pp. 33- 38, 57-63, 69, 79-87
14. **CHALLEM, J., RUEDA, C.**, Antioxidantes Naturales Guías de Practicas de Salud Nutrifarmacia y Medicina Natural., Madrid- España., NOWTILUS., 2008., Pp. 15-18

15. **ELEJALDE, J.**, Anales de Medicina Interna., S. ed., Madrid- España., ARAN Ediciones S.A., 2001., Pp. 326-335.
16. **FLANZY, C.**, Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos., 2a ed., Madrid- España., Ediciones Mundi Prensa., 2003., Pp. 114-124
17. **GIL, A.**, Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos., 2a ed., Tomo 2., Madrid- España., Editorial Médica Panamericana., 2010., Pp. 460-465; 483-490
18. **GRISALES, K., y otros.**, Manual para el Análisis de Agua Residuales. Bogotá – Colombia., Editorial de la Universidad Militar Nueva Granada., 2012., Pp. 38-40
19. **HERNANDEZ, M., y otros.**, Tratado de nutrición., S. ed., Madrid- España., Díaz de Santos S.A., 1999. , Pp. 718-719
20. **HERRERA, C., BOLAÑOS, N., LUTZ, G.**, Química de Alimentos. Manual de laboratorio., San José- Costa Rica., Editorial de la Universidad de Costa Rica Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”., 2003., Pp. 39-49
21. **LEON, J.**, Fundamentos Botánicos de Cultivos Tropicales., Lima – Perú ., Editorial IICA., 1968., Pp. 471-472
22. **LUCERO, O.**, Guías de Prácticas de Laboratorio de Bromatología I y II., S. ed., Riobamba – Ecuador., Editorial ESPOCH., 2010., Pp.11-28
23. **MAHABIR, P.**, Plantas Medicinales Iberoamericanas., Santa Fe de Bogotá- Colombia., Editorial Converse., 1995., Pp. 26-27.

24. **MENDEZ, J.**, Perfil de Mercado y Productivo de la Guanábana., Nueva Guatemala de la Asunción - Guatemala., Abt. Assocites Inc., 2003., Pp. 1-4
25. **MERI, A.**, Fundamentos de Fisiología de las Actividad Física y el Deporte., Madrid-España., Editorial Médica Panamericana S.A., 2005., Pp.86-94
26. **MIRANDA, M.**, Farmacognosia y productos naturales., La Habana- Cuba., Editorial de la Universidad de la Habana., 2006., Pp. 32-44, 56-62.
27. **MORA, R.**, Soporte nutricional especial., 3a ed., Santa Fe de Bogotá- Colombia., Editorial Médica Panamericana S.A., 2002., Pp. 125-127
28. **MOYA, M., y otros.**, Actualizaciones el médico “Vitaminas y Antioxidantes., S. ed., Barcelona- España., Saned., 2009., 11p
29. **QUINTERO, M., y otros.**, Osteoartrosis., Biología, fisiopatología, clínica y tratamiento., Madrid- España., Editorial Médica Panamericana S.A., 2010., Pp. 171-174
30. **SHARAPIN, N.**, Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos., Santa Fe de Bogotá- Colombia., CYTED., 2000., Pp. 27-30
31. **TEIJON, J., y otros.**, Fundamentos de Bioquímica Metabólica., 2a ed., Madrid-España., TEBAR.SL., 2006., Pp. 157-166
32. **VALDERRAMA, J.**, Información Tecnológica., 3a ed., La Serena – Chile., CIT., 2003., Pp 15-20
33. **VELEZ, F., y otros.**, Plantas alimenticias de Venezuela. Soc. Ciencias Naturales., Caracas - Venezuela., La Salle., 1990., Pp. 109–110.

34. **VIRU, A., y otros.,** Análisis y control del rendimiento deportivo., Barcelona- España., Paidotribo., 2003., Pp 127-129
35. **YEN, G., y otros.,** Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Various Tea Extracts.,J Agric., Food Chem., S. ed., Bloomington- United States of America., Abt. Associates Inc., 1997., Pp. 30-34,45.
36. **AVELLO, M., y otros.,** Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular., Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España Y Portugal., Concepción - Chile., 2006., Pp 162-168
37. **BIRUETE, A., y otros.,** Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología., Revista Mexicana de Pediatría., México DF - México., 2009., Pp. 136
38. **SÁNCHEZ, C.,** La Guanábana, Cultivo y Manejo., Revista Tierra Adentro., Imbabura-Ecuador., 2011., 1p
39. **TUERNES, J.,** Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. Antioxidantes y calidad de vida., Revista Med Milit., La Habana-Cuba., 1994., Pp. 16-19
40. **VENEREO, J.,** Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes., Revista Med Milit., La Habana- Cuba., 2002., Pp. 127-131.
41. **CÉSPEDES, T., y otros.,** Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación., Revista Cubana Cardiol., La Habana-Cuba., Vol. 14., 2000., Pp 55-60.

- 42. ESCAMILLA, C., CUEVAS, E., GUEVARA, J.,** Flavonoides y sus acciones antioxidantes., Revista de la Facultad Medica. UNAM., México DF- México., Vol. 52., 2009., Pp 12-13
- 43. ESCORZA, M., CALDERÓN, J.,** La Capacidad antioxidante total, bases y aplicaciones., Revista de Educación Bioquímica., México DF- México., Vol. 2., 2009., Pp. 89-98
- 44. FEBLES, C., y otros.,** Funciones de la vitamina E. Actualización., Revista Cubana Estomatol., La Habana- Cuba., Vol. 40., 2002., Pp. 28-30
- 45. OJEDA, G., y otros.,** Caracterización Fisicoquímica de la Pulpa de la Guanábana (*Annona muricata*) cultivada en el occidente de Venezuela., Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas Universidad Del Zulia., Maracaibo –Venezuela., Vol. 41. No. 2., 2007., Pp. 151–160
- 46. SALINAS, D.,** Inhibición del tránsito intestinal por el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L (Guanábana) en ratones., Revista Peruana de Ciencia e investigación., Lima- Perú., Vol .14., No11., 2011., Pp. 9-13.
- 47. ZEZOLA, T., RAMOS ,A.,** Nutracéuticos., Revista de la OFIL Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos., México DF- México., Vol. 18., 2008., Pp 1-2
- 48. MURILLO, E.,** Actividad Antioxidante de bebidas de frutas y té comercializadas en Costa Rica., Universidad de Panamá. Instituto de Alimentación y Nutrición., Panamá – Panamá., 2002. pp. 6-10

49. **POMA, M., y otros.,** Estudio Fitoquímico y Actividad Antiinflamatoria de la *Annona Muricata* L. (Guanábana) de Cuzco. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara., UNMSM., Cuzco- Perú., 2011., Pp. 29-32
50. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA., (FAO),** Fichas Técnicas productos frescos y procesados. 2006., Pp 1-2
51. **COLOMBIA., NORMA TÉCNICA COLOMBIANA., (INCOTEC),** Frutas frescas Guanábana., Especificaciones. , Santa Fe de Bogotá – Colombia., NTC. INCOTEC 5208., 2003., Pp. 6-9
52. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN)** Rotulado de Productos Alimenticios para Consumo Parte 2., Rotulado Nutricional. Requisitos., NTE INEN 1334-2., 2011., 4p.
53. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN)** Jugos, Pulpas, Concentrados, Néctares, Bebidas de Frutas y Vegetales. Requisitos. NTE INEN 2237-1., Quito – Ecuador., 2008. 1p.
54. **MEXICO., NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.,** Almidón. Determinación Cualitativa (Prueba del Lugol), México DF- México., 1983., Pp. 1-2
55. **MINISTERIO DE PREVISIÓN SOCIAL Y SANIDAD. INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN.,** Tabla de Composición de los Alimentos Ecuatorianos., Guayaquil - Ecuador., 1975., Pp 17

56. **PHARMACOPEIA NATIONAL FORMULARY.**, Normas de Estándar Internacional USP XXVIII NF 18., 1985., Pp. 1267-1268, 1477, 2258, 2262, 2268, 2296, 2309-2310.
57. **ETIQUETA DEL VALOR NUTRICIONAL DE LA PULPA DE GUANÁBNA FRISCO.**, Ambato - Ecuador., 2012-06
58. **AVILES, K.**, Estudio del proceso de Rehidratación de Tomate de Árbol Deshidratado (*Solanum Betaceum Cav*) variedad Anaranjado Gigante”, Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba - Ecuador., **TESIS.**, 2012., Pp. 43-47- 57-49
59. **CHICAIZA, G., y otros.**, Proyecto para la Producción y Exportación de la Guanábana en la Hacienda “María Dolores” del Cantón el Guabo. Provincia del Oro., Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas (ICHE)., Carrera de Economía y Gestión Empresarial., Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)., Guayaquil-Ecuador., **TESIS.**, 2003., Pp. 27-40.
60. **GUERREO, C.**, Inhibición de la Actividad Enzimática de la Polifenol Oxidasa Extraída del Banano (Cavendish Valery) mediante sistemas Bifásicos Acuoso con Isoespintanol y Ácido Ascórbico., Facultad de Ciencias Agropecuarias.. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín., Medellín – Colombia., **TESIS.**, 2009., Pp. 15-21.
61. **MÁRQUEZ, C.**, Caracterización Fisiológica, Físico-Química, Reológica, Nutraceútica, Estructural Y Sensorial De La Guanábana (*AnnonaMuricata*L. Cv. elita)., Facultad de Ciencias Agropecuarias., . Universidad Nacional De Colombia Sede Medellín., Medellín- Colombia., 2009., **TESIS.**, Pp 31-36, 111-117,150-156, 183

62. **PALADINO, S.**, Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos contenidos en las semillas de la Vid (*Vitis vinifera* L.), Facultad de Ciencias Agrarias., Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis Sede Mendoza., Mendoza-Argentina., 2009., **TESIS.**, Pp. 13- 17, 39-43
63. **PALOMINO, C.**, Efecto del extracto etanólico de hojas *Annona muricata* L. (“Guanábana”) sobre la Hiperglicemia Inducida con Aloxano en Ratas., Facultad de Farmacia y Bioquímica., Universidad Nacional de San Marcos., Lima - Perú., **TESIS.** 2007. Pp. 14-16
64. **PETKOVA, M.**, “El efecto del agua oxigenada en la carcinogénesis”., Facultad de Odontología., Unidad de Post- Grado., Universidad Nacional Mayor de San Marcos., Lima - Perú., **TESIS.**, 2007., Pp. 21-24
65. **PILCO, G.**, Comprobación Del Efecto Adelgazante De La Tintura De Apio (*Apium Graveolens*) Y El Perejil (*Petroselinum Sativum*) En Voluntarios Con Sobrepeso., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba - Ecuador., **TESIS.**, 2012., Pp. 36-48
66. **RAMIREZ, A.**, Efecto de la administración oral de extractos vegetales con actividad antioxidante, sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en la rata., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Universidad de San Carlos de Guatemala., San Carlos - Guatemala., **TESIS.** 2004. Pp. 23-25
67. **SAMANIEGO, M.**, Evaluación de la Actividad Antimicrobiana y Antioxidante de Matico para la elaboración de un fitofármaco., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica Farmacia., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba – Ecuador., **TESIS.**, 2007., Pp. 36-37

68. **SARIC, M., y otros.**, Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flanoids and Phenolic Acids., Faculty of Pharmacy and Biochemistry., University of Zagreb., Zagreb – Croatia., **TESIS.**, 2004., Pp. 362-364
69. **SERRANO, M.**, Evaluación de la actividad antioxidante para el aprovechamiento del muérdago que infesta la zona chinampera de Xochimilco., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Universidad Autónoma Metropolitana., Unidad Iztapalapa., México DF- México., **TESIS.**, 2010., Pp. 7-18
70. **TORREZ, G.**, Determinación de la Actividad Antioxidante de los Extractos Clorofórmico, Etanólico Y Acuoso Del Arrayán, Calaguala, Canayuyo, Y Tipo., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica Farmacia., Riobamba – Ecuador., **TESIS.**, 2012., Pp.25-33

BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

71. **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)**
http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=83956&id_seccion=3737&id_ejemplar=8277&id_revista=168
2012-11-02
72. **ALIMENTOS FUNCIONALES: PREBIÓTICOS PROBIÓTICOS**
NUTRACEUTICOS ELEMENTALES
http://www.monografias.com/trabajos36/alimentos-funcionales/alimentos_funcionales2.shtml
2012-06-24

73. ASPECTOS BÁSICOS DE LOS ALIMENTOS Y DE LA NUTRICIÓN

[http://www.agustoconlavida.es/agclv/aprende-con-nestle/nutricion/cursos_online / Documents/cursos_nutricion_nestle_aspectos_basicos_de_los_alimentos_y_de_la_nutricion_1.pdf](http://www.agustoconlavida.es/agclv/aprende-con-nestle/nutricion/cursos_online/Documents/cursos_nutricion_nestle_aspectos_basicos_de_los_alimentos_y_de_la_nutricion_1.pdf)

2012-11-01

74. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA GUANÁBANA

[http://www.yerbasana.cl/?a=364.](http://www.yerbasana.cl/?a=364)

2011-06-08

75. CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO

<http://www.wikiteka.com/apuntes/pelota-66/>

2012-11-02

76. DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

<http://cbs.xoc.uam.mx/td/docs/bromatologia.pdf>

2012-09-14

77. EFECTO DEL ÁCIDO GIBERELICO Y AGUA A 4° C EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE GUANABA (*Annona muricata L.*)

http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2168.pdf

2005-05-01

78. EL ESTRÉS OXIDATIVO.

<http://es.scribd.com/doc/81016103/Proyecto-2>

20012- 10-18

79. EL VALOR NUTRITIVO DE LOS ALIMENTOS.

<http://www.buenastareas.com/ensayos/Valor-Nutritivo-De-Los-Alimentos/3165963.html>

2012-10-01

80. ESTUDIO DE SEIS PLANTAS MEDICINALES

Dominicanas

<http://www.bvs.org.do/revistas/amd/1999/21/03/AMD-1999-21-03-086-093.pdf>

1999-05

81. ETANOL ABSOLUTO.

http://www.merckmillipore.com/ecuador/pharmaceutical-ingredients/etanol-absoluto/MDA_CHEM101986/p_Wlqb.s1Oa5AAAAEtxZpHj29e?PortalCatalogID=merck4pharma

2012-12-01

82. HOJAS DE GUANÁBANA.

http://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/fichaproducto/hojas_de_guanabana1.pdf

2012-04-04

83. LA IMPORTANCIA DE LOS MACRO Y MICRONUTRIENTES EN LA NUTRICIÓN

<http://www.quiminet.com/articulos/la-importancia-de-los-macro-y-micronutrientes-en-la-nutricion-18625.html>

2012-11-09

**84. LAS ENFERMEDADES HIPERTENSIVAS, LA DIABETES, LA NEUMONÍA Y
LOS ACCIDENTES DE TRÁNSITO SON LOS PRINCIPALES MOTIVOS DE
MUERTE EN EL PAÍS**

<http://www.vivesaludtotal.com/index.php/especial/salud-preventiva/102-causas-fatales-enigmas-de-la-vida.html>

2012-06-19

85. ANÁLISIS QUÍMICO PARA HIDRATOS DE CARBONO

<http://es.scribd.com/doc/33466567/Practico-de-Carbohidatos-2010>

2010-06-30

**86. ALIMENTOS FUNCIONALES Y SU VALOR NUTRACÉUTICO. PATAGONIA.
SEMINARIO REGIÓN**

<http://www.region.com.ar/productos/semanario/archivo/684/alimentos684.htm>

2004-10-04

87. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES DEL TOMILLO

<http://repositorio.bib.upct.es/dspace/bitstream/10317/159/2/proyecto%20del%20tomillo-def.pdf>

2012-10-01

88. USOS MEDICINALES DE LA GUANÁBANA

<http://www.misabueso.com/salud/Guan%C3%A1bana>

2012-11-01

CAPÍTULO VIII

8 ANEXOS

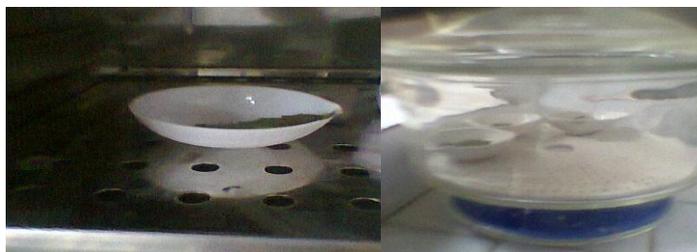
ANEXO No. 1 MATERIA PRIMA UTILIZADA.



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 3 HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*)

ANEXO No. 2 PARÁMETROS DE CALIDAD EN DROGA SECA Y MOLIDA DE LAS HOJAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata*).



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

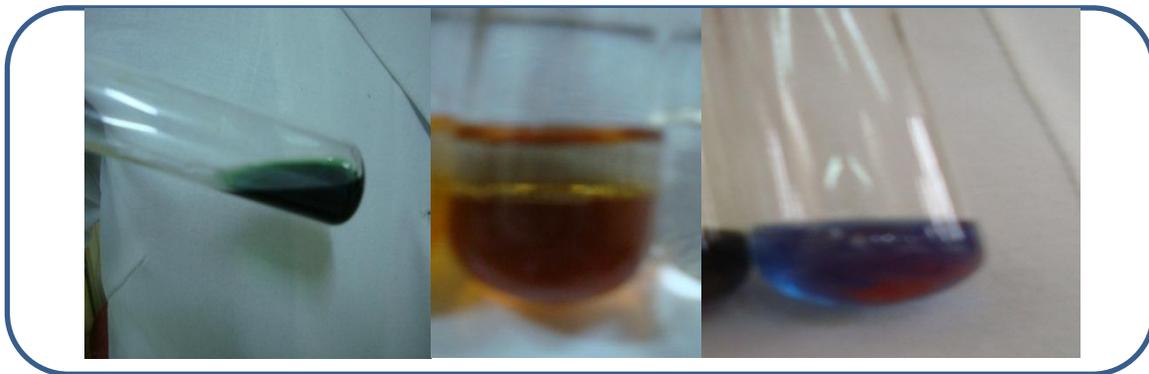
FOTOGRAFÍA N^o. 4 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE LA DROGA VEGETAL SECA Y MOLIDA



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 5 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES SOLUBLES E INSOLUBLES DE LA DROGA VEGETAL SECA Y MOLIDA

ANEXO N^o. 3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*).



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 6 RESULTADOS DEL TAMIZAJE PARA LOS ENSAYOS DE LIEBERMAN BURCHARD, SHINODA, FEHLING



FOTOGRAFÍA N^o. 7 RESULTADOS DEL TAMIZAJE PARA LOS ENSAYOS DE BALJET, CLORURO FÉRRICO, WAGNER

ANEXO No. 4 ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*).



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 8 ELABORACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DELAS HOJAS (EXTRACTO FLUIDO)



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 9 ELABORACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO Y ACUOSOS DE LOS FRUTOS



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N_o. 10 ELABORACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS

ANEXO No. 5 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS EXTRACTO ALCOHÓLICOS Y ACUOSO DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*).



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

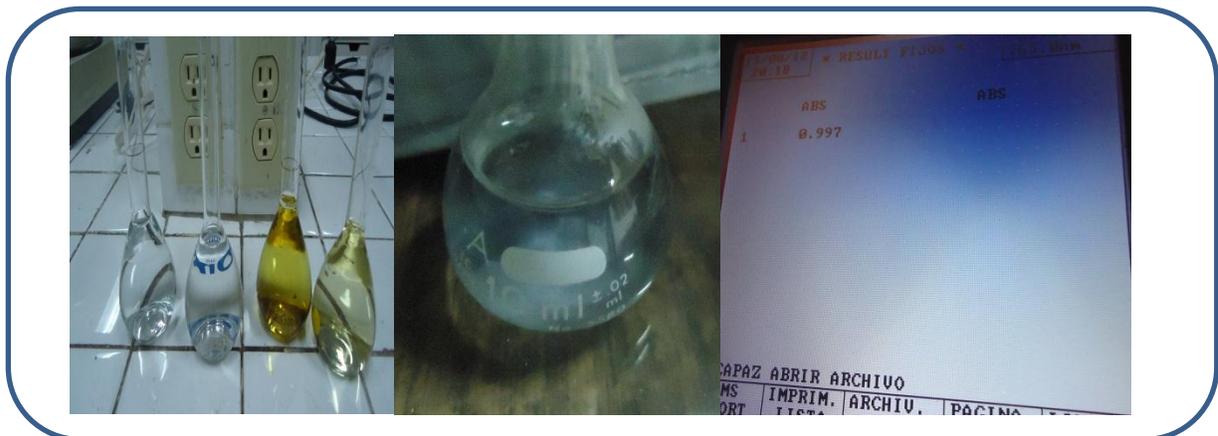
FOTOGRAFÍA N_o. 11 EQUIPOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE pH, ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y DENSIDAD.

ANEXO No. 6 CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES Y FENOLES TOTALES DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE GUANÁBANA (*Annona muricata*).



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 12 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES A PARTIR DE LA MATERIA PRIMA



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 13 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES A PARTIR DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE GUANÁBANA

ANEXO No. 7 ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*).



FUENTE: BARAHONA, V. 2012

FOTOGRAFÍA N_o. 14 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD. MÉTODO DE DEAN STARK



FUENTE: BARAHONA, V. 2012

FOTOGRAFÍA N_o. 15 DETERMINACIÓN DE CENIZAS. MÉTODO DE INCINERACIÓN EN MUFLA



FUENTE: BARAHONA, V. 2012

FOTOGRAFÍA N_o. 16 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA, FIBRA, GRASA POR EL MÉTODO MACRO KJELDAHL, WEENDESOXHLET RESPECTIVAMENTE

ANEXO No 8 ANÁLISIS COMPLEMENTARIO DE LOS FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*)



FUENTE: BARAHONA, V. 2012

FOTOGRAFÍA N^o. 17 DETERMINACIÓN DE pH y ACIDEZ.



FUENTE: BARAHONA, V. 2012

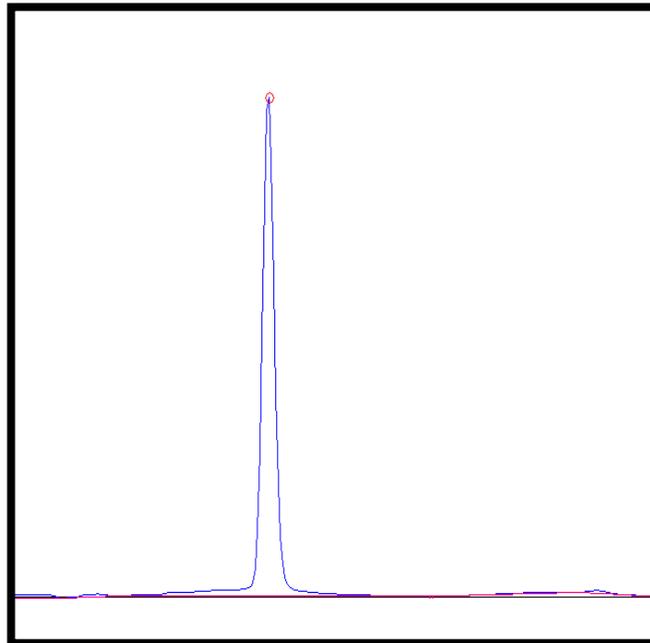
FOTOGRAFÍA N^o. 18 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES Y MEDICIÓN DE ° BRIX



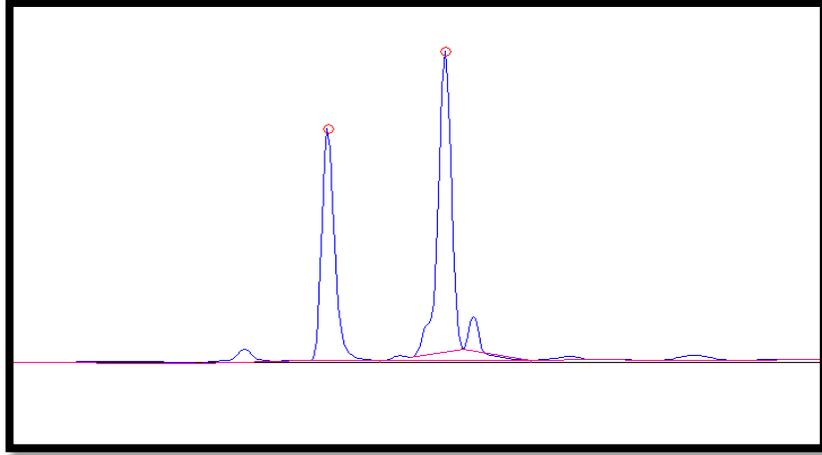
FUENTE: BARAHONA, V. 2012

FOTOGRAFÍA N.º 19 DETERMINACIÓN DE VITAMINA C. MÉTODO DEL YODO

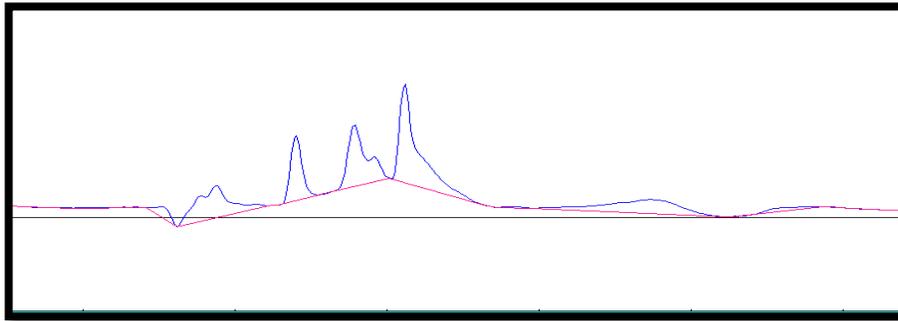
ANEXO No. 9 CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA C POR HPLC.



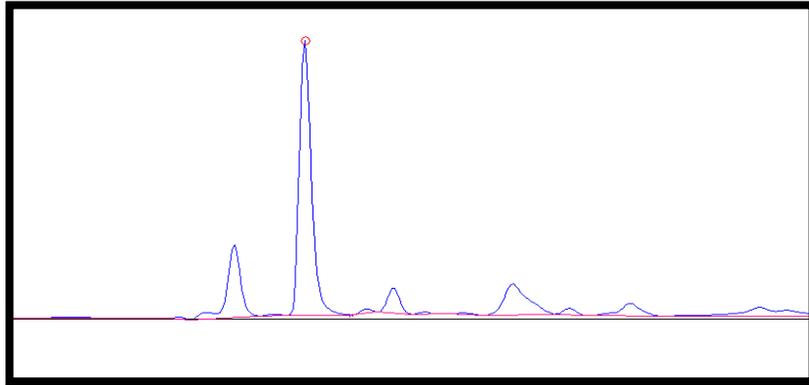
CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR VITAMINA C



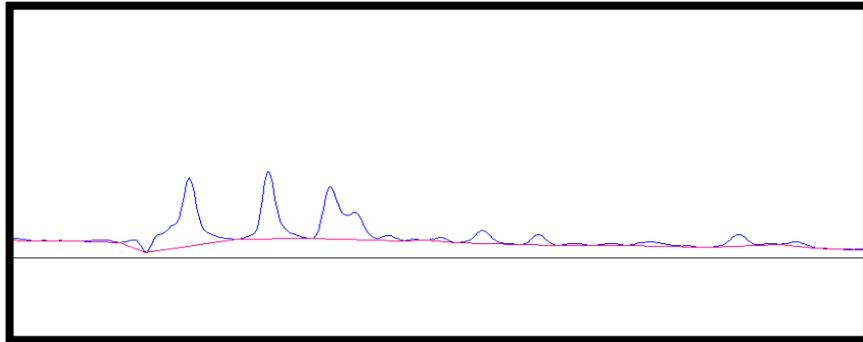
CROMATOGRAMA DE VITAMINA C DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS



CROMATOGRAMA DE VITAMINA C DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS

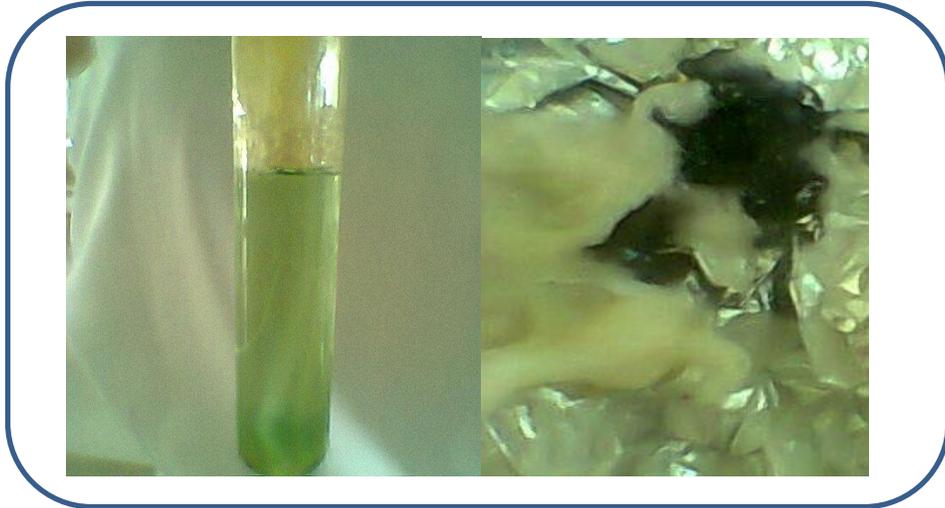


CROMATOGRAMA DE VITAMINA C DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DEL FRUTO



CROMATOGRAMA DE VITAMINA C DEL EXTRACTO ACUOSO DEL FRUTO

ANEXO No. 10 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PECTINA Y ALMIDÓN.



FUENTE: BARAHONA, V. 2012

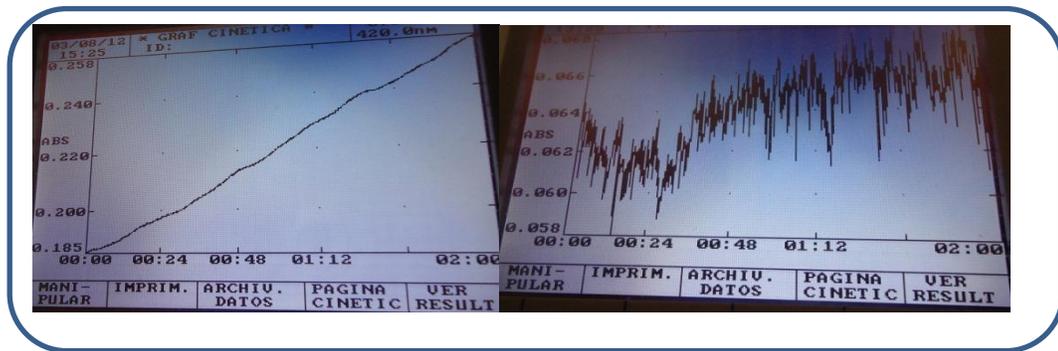
FOTOGRAFÍA No. 20 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PECTINA Y ALMIDÓN

ANEXO No. 11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*).



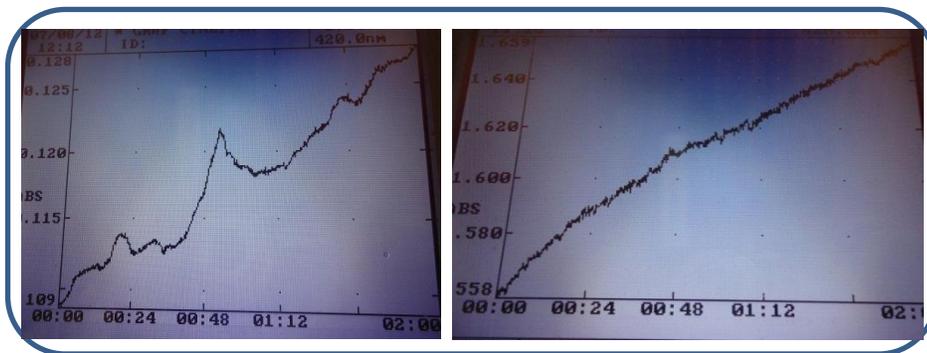
FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA No. 21 ESPECTROFOTÓMETRO UTILIZADO EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 22 ESPECTROS DE INHIBICIÓN DEL BLANCO Y DEL ANTIOXIDANTE (VITAMINA C)



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N^o. 23 ESPECTROS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS ALCÓHOLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS



FUENTE: BARAHONA, V. 2012.

FOTOGRAFÍA N_o. 24 ESPECTROS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS ALCÓHOLICO Y ACUOSO DE LOS FRUTOS.

ANEXO No. 12 REFERENCIA DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS HOJAS DE GUANÁBANA.

 <p>LABCESTTA Tecnología & Soluciones SGC</p>	<p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléf.: (03)2998232 ESPOCH FACULTAD DE CIENCIAS RIOBAMBA - ECUADOR</p>
---	---

INFORME DE ENSAYO No: 0731
ST: 12 - 0063 ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Nombre Peticionario: N.A
Atn: Viviana Barahona
Dirección: Ayacucho y Colón

FECHA: 03 de Julio del 2012
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2012 / 06/ 25 - 16:00
FECHA DE MUESTREO: 2012 / 06/ 22 - 16:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2012/ 06/ 25- 2012 /07 / 03
TIPO DE MUESTRA: Hoja de Guanábana
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-Alm 122-12
CÓDIGO DE LA EMPRESA: N.A
PUNTO DE MUESTREO: N.A
ANÁLISIS SOLICITADO: Análisis Proximal
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Viviana Barahona
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.:25.0 °C. T min.: 15 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETRO	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LIMITE PERMISIBLE
Grasa	PEE /LABCESTTA/154 AOAC/ Gravimétrico	%	0,87	-
Humedad	PEE/LABCESTTA/152 AOAC/ Gravimétrico	%	70,61	-
Cenizas	PEE /LABCESTTA/153 AOAC/ Gravimétrico	%	2,27	-
Fibra	PEE /LABCESTTA/103 AOAC/ Gravimétrico	%	1,82	-
Proteína	PEE /LABCESTTA/151 AOAC/ Volumétrico	%	4,45	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en laboratorio.
- Los datos están expresados en base fresca

RESPONSABLES DEL INFORME:


BQF. Ximena Carrión
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH


Dra. Nancy Veloz M
JEFE DE LABORATORIO

ANEXO N^o. 13 ETIQUETA DEL VALOR NUTRICIONAL DE LA PULPA DE GUANÁBANA FRISCO

Pulpa congelada de
Guanábana
Pasteurizada

Peso Neto: 500 g

Información Nutricional	
Tamaño de la porción 100 g (1 vaso de 240ml)	
Porción por envase 8.3	
Cantidad por porción	
Energía (Calorías) 19 kJ (58 Cal)	
Energía de Grasa/Calorías de grasa (kJ/Cal)	
% del Valor Diario*	
Grasa Total 0.2 g	0.0 %
Sodio 0 mg	0.0 %
Carbohidratos Totales 14.7 g	1.0 %
Azúcares 6.9 g	
Proteína 1.0 g	

*Porcentajes de Valores Diarios basados en una dieta de 8500 kJ (2000 calorías)

PREPARACION:
Líquar este contenido con 2 litros de agua o leche para obtener un delicioso jugo o bebida.

Mantener en congelación

Reg. Sanitario N^o: 01312 INHOAN 1202

Fecha de Elaboración,
Expiración, Lote y P.V.P.:
Ver centro de la Etiqueta

Frisco
GMMJ1312
ELB 01 06 2012 PUP:
EXP 01 12 2012 2 35
Conserva la fruta natural y deliciosa...

Planhófa
PLANTA PRODUCTORA Y COMERCIALIZADORA
Fabricado y distribuido por Planhófa
Av. Bolívariana y Av. El Cóndor
Telfs: (593-3) 241 0017 | 284 7782
ventasplanhófa@andianet.net
Ambato - Ecuador

