

CONTENIDO

	Página
1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	5
2.1 Guanábana (<i>Annona muricata L.</i>)	6
2.1.1 Descripción botánica	7
2.1.2 Actividad polifenólica de <i>Annona Muricata L.</i>	9
2.2 Compuestos fenólicos	11
2.2.1 Estructura y clasificación de los compuestos polifenólicos.....	12
2.2.2. Fenoles totales	12
2.2.3 Flavonoides	13
2.2.4 Saponinas	17
2.3 Determinación de compuestos metabolitos secundarios	18
2.3.1 Antioxidantes.....	21
2.4 Vermicomposta	21
2.5 Roca fosfórica.	24
2.6 Lixiviado	27
3.JUSTIFICACIÓN	29
4.OBJETIVOS	30
4.1 General.....	30
4.2 Específicos	30
5.MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Material vegetal	31
5.2 Obtención de extractos.....	32
5.2.1 Extracto metanólico	32
5.3 Analisis de los datos iniciales	32
5.4 Análisis de metabolitos secundarios en extractos de <i>Annona Muricta L.</i>	33

5.4.1 Estimación de fenoles totales.....	33
5.4.2 Estimación de Flavonoides.....	34
5.4.3 Estimación de taninos condensados (Proantocianidinas)	34
5.4.4 Estimación de saponinas.....	35
5.4.5 Análisis estadístico	35
6.RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
6.1 Análisis de parámetros.....	37
6.2 Estimación del contenido de fenoles totales.....	38
6.3 Estimación del contenido de flavonoides.....	39
6.4 Estimación del contenido de taninos condensados (Proantocianidinas)	40
6.5 Estimación del contenido de saponinas.	41
7.CONCLUSIONES.....	43
8.RECOMENDACIONES	45
9 BIBLIOGRAFÍA.....	46
ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Annona Muricata L</i>	9
Figura 2. Ácidos Fenólicos: Benzoicos (hidroxibenzoicos), cinnámicos (hidroxicinámicos) y derivados (estilbenos).....	13
Figura 3. Esqueleto comun difenil-pirano de flavonoides.....	14
Figura 4. Síntesis de naringenina; precursor de algunos grupos de flavonoides.....	15
Figura 5. Clases de taninos	16
Figura 6. Forma glucosilada de flavonoides.....	16
Figura 7. Estructura de una saponina.....	17
Figura 8. Complejos formados entre un flavonoide y un $AlCl_3$	20
Figura 9. Grafica de contenido de fenoles totales por tratamiento.....	38
Figura 10. Grafica de contenido de flavonoides por tratamiento.....	39
Figura 11. Grafica de contenido de taninos por tratamiento.....	40
Figura 12. Grafica de contenido de saponinas por tratamiento.....	41

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Annona Muricata</i> L.....	8
Cuadro 2 Resumen estadístico para altura.....	32
Cuadro 3 Resumen estadístico para hojas	33
Cuadro 4 Analisis efectos significativo altura,numero de hojas y clorofila	37
Cuadro 5 Analisis efectos significativo metabolitos secundarios	37

RESUMEN

Annona Muricata L. es una planta perenne que se encuentra en varios países con clima tropical o subtropical, que ha sido tradicionalmente empleada para el tratamiento de dolor, insomnio, gripa, y otros padecimientos. Se ha correlacionado la propiedad medicinal de muchas plantas con su contenido de metabolitos secundarios, por lo que en este trabajo se planteó el objetivo de evaluar el efecto de los insumos orgánicos sobre el contenido compuestos fenólicos en hojas de guanábana.

Por lo tanto el estudio del efecto de los niveles de metabolitos secundarios sobre la evaluación de diferentes tratamientos y concentraciones mediante el uso de vermicomposta, roca fosfórica, y lixiviados de vermicomposta como fuentes de insumos orgánicos aun nose ha reportado tanto para el crecimiento de plantas de guanábana (*Annona Muricata L.*), y en la producción de metabolitos secundarios en las hojas de las plantas. En este proyecto se realizaron datos estadísticos de altura y numero de hojas por cada tratamiento, en cuanto al estudio de metabolitos se inicio con la obtencion de éstos, mediante un método de extracción metanólica y se analizaron el contenido de fenoles, flavonoides, taninos y saponinas por métodos de colorimetría.

Durante el desarrollo de este proyecto en las muestras recolectadas se observó diferencias significativas en el contenido de clorofila en hojas adicionadas con vermicomposta. Sin embargo ninguno de los diferentes tratamientos de abonos aplicados (vermicomposta, roca fosfórica, y lixiviados de vermicomposta) tuvieron influencia estadística significativa sobre la altura de planta, y número de hojas evaluado en las plantas de guanábana. Como finalización del estudio los resultados obtenidos determinaron que hay una influencia estadística significativa en el contenido de los metabolitos secundarios evaluado en las extracciones metanolicas de hojas de guanábana del cual se presentaron mayor contenido de fenoles totales y flavonoides, que en taninos y saponinas.

1.INTRODUCCIÓN

La alimentación aporta las sustancias necesarias para el metabolismo humano (azúcares, proteínas, grasas, etc.), pero al mismo tiempo como resultado del proceso metabólico, se pueden producir daños al organismo mediante los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) que se liberan en el proceso. Los radicales libres son moléculas derivadas ya sea por el metabolismo celular normal o por un estímulo medioambiental como rayos ultravioletas (UV-A/B), contaminación o una alimentación rica en grasas saturadas, entre otros. Entre los daños que pueden causar estas especies se cita la alteración al ADN, provocando mutaciones, inactivación de enzimas y peroxidaciones lipídicas sobre la membrana celular, incluso como respuesta inmune en tejidos vegetales, provocan lisis celular (Ali et al., 2008).

El daño celular es consecuencia de un *estrés oxidativo*; estado del organismo en el que el equilibrio entre antioxidantes y pro-oxidantes se inclina hacia los últimos. Para contrarrestar el daño, la célula cuenta con dos mecanismos de protección: uno endógeno (compuesto por los enzimas superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa) y otro exógeno. El último es el más extenso, y está formado por compuestos que pueden disminuir y/o eliminar la actividad reactiva de los compuestos oxidantes (ERO o RL). A este grupo se le conoce como antioxidantes e incluye a las vitaminas (A, E, C), carotenoides y polifenoles.

La importancia del grupo de los polifenoles aumentó en la última década debido a las investigaciones que relacionan su consumo con la disminución de padecimientos varios, demostrando actividad antioxidante y antiradical.

Estos compuestos se hallan en las plantas, y se obtienen por el consumo de vegetales en la dieta y por el uso coloquial de plantas medicinales; consumidas en forma de bebidas tradicionales aromáticas o alcohólicas (cerveza, vino, café y té) (Chung et al, 1998; Wong et al., 2006).

El interés por el cultivo de esta planta se ha incrementado porque se ha descubierto que en diversos órganos contiene compuestos de interés farmacológico tales como acetogeninas en hojas (Geum-Soog et al., 1998; Regasa et al., 2012) y ciclopéptidos (Chao-Ming et al., 1998), encontrados en semillas. En hojas y raíces se ha detectado la presencia de acetogeninas (Geum-Soog et al., 1998). En *A. muricata* se han aislado más de 300 acetogeninas diferentes (Gleye et al., 1999). Las acetogeninas son moléculas que tienen interesantes propiedades biológicas que incluyen la citotoxicidad, lo que sugiere que tienen potencial para usarse como agentes anti-tumorales (Álvarez-González et al., 2008).

Con respecto a las necesidades nutricionales de las plantas de guanábana, no se han reportado estudios que clarifiquen como las plantas podrían responder al fertilizarse tanto con macro nutrientes como micro nutrientes, sin embargo, en algunas regiones del mundo, la guanábana crece en suelos calcáreos que generalmente tienen un bajo contenido de materia orgánica, pH de 7.5–8.5, y una alta concentración de bicarbonatos (Ojeda et al., 2004).

Las prácticas comunes utilizadas en la agricultura tales como el uso excesivo de fertilizantes, degrada los suelos, promueve la contaminación de fuentes de agua y contaminan la atmósfera, por lo que una opción es usar los abonos orgánicos (Diacono y Montemurro et al., 2010). Los abonos orgánicos se han utilizado como un sustituto parcial para alimentos nutritivos inorgánicos, particularmente nitrógeno. También se han utilizado los abonos orgánicos para controlar patógenos originados en el suelo, en diversos cultivos (Rovesti y Romero, 2003); (Adriano-Anaya et al., 2011). Uno de los abonos orgánicos más utilizados es la vermicomposta que es producida por la bio-oxidación y estabilización de los residuos, como resultado de las interacciones entre algunas especies de lombrices y microorganismos.

Algunas de las ventajas de la vermicomposta son: es un material rico en todos los nutrientes esenciales que requieren los vegetales y contienen vitaminas, enzimas y hormonas, tales como auxinas y giberelinas.

Benefician el crecimiento de las plantas fomentando los brotes y hojas nuevas, es un producto fácil de aplicar, manejar y almacenar. Mejora la estructura del suelo, la textura, la aireación y la capacidad de retención de agua y previene la erosión. La vermicomposta es rica en microorganismos benéficos tales como los solubilizadores de fosfato, degradadores de celulosa, fijadores de nitrógeno, etc. Previene pérdidas de nutrientes e incrementa el uso eficiente de los fertilizantes químicos e incrementa la descomposición de la materia orgánica del suelo (Vennila et al., 2012)

Otro de los insumos que se utilizan para el cultivo orgánico es la roca fosfórica debido a que el fósforo es uno de los macro nutrientes esenciales más importantes ya que induce la formación de un activo y potente sistema radicular. Los cultivos resultan más resistentes a las plagas y enfermedades y responden mejor a los efectos negativos del granizo, heladas, vientos, alta temperatura y otros factores estresantes para la planta (Indriyani and Karsinah, 2011). Entre las fuentes de fósforo que se disponen para la nutrición de plantas se encuentra la roca fosfórica, la cual se compone principalmente del mineral fosforita. La fosforita es un cristal amorfo formado por óxidos no metálicos de fósforo. En su forma natural la roca fosfórica presenta poca solubilidad, sin embargo, el fósforo contenido se libera por la acción de ácidos presentes en el medio. Así mismo, la acción de la flora microbiana natural del suelo promueve la biodisponibilidad de fósforo (Arévalo et al., 2003).

El lixiviado de vermicomposta es el líquido producido en la descomposición de la materia orgánica y al percolar el agua de lluvia a través de la misma.

Las características del lixiviado en cuanto a cantidad y composición dependen del tipo de residuo, de la precipitación media y de la evapotranspiración existente en el emplazamiento, posee nutrientes solubles y microorganismos benéficos, y se ha reportado su uso como un fertilizante líquido para diversos cultivos tales como sorgo (Gutiérrez-Miceli et al., 2008), maíz (García-Gómez et al., 2008; Méndez-Moreno et al., 2012), chile pimiento (Oliva-Llaven et al., 2008), tomate (Oliva-

Llaven et al., 2010), rábano (Gutiérrez-Miceli et al., 2011), zacate limón (León-Anzuetto et al., 2011).

No se ha encontrado ningún reporte sobre la evaluación del efecto de la vermicomposta, roca fosfórica, y lixiviados de vermicomposta en el crecimiento de plántulas de guanábana y sobre la producción de compuestos fenólicos en las hojas de las plántulas.

Por lo que el análisis de metabolitos secundarios ha sido implementado por el consumo de infusiones que son llevadas a cabo en muchas culturas, lo que es una costumbre importante que existe desde la antigüedad. La variedad de plantas que se consumen en forma de infusión es variada, y entre ellas se menciona comúnmente la guanábana (*Annona Muricata L.*), quien ha llamado la atención debido al sin número de propiedades medicinales que se le atribuyen. Al hacer infusión de las hojas se obtiene un efecto sedativo, que además se considera un analgésico, antiespasmódico y remedio para problemas de: vejiga, catarro e indigestión, las hojas se usan para aliviar problemas de la piel y reumatismo (Heninrich, 2005).

Por ello la necesidad de conocer su composición y sobre todo el interés de analizar cualitativamente y cuantitativamente los distintos productos metabólicos secundarios obtenidos a partir de un extracto de plantas de guanábana (*Annona Muricata L.*), las cuales son cultivadas con el objetivo de ver el efecto que conlleva las diferentes concentraciones de insumos orgánicos.

2.ANTECEDENTES

El reino más amplio en el planeta es el vegetal. La función de las plantas es variada; para el ser humano es una de las fuentes principales de alimentación debido a su fruto y productos secundarios. La composición general de las plantas incluye una variedad de compuestos químicos, entre los que destacan los metabolitos secundarios, quienes se encargan de proteger a la planta de los efectos dañinos que puede provocar el medio ambiente a su sistema, la protege de daño celular y de los depredadores; esto debido a olores, sabores y la capacidad antimicrobiana y antifúngica que pueden presentar. Ciertas plantas presentan propiedades medicinales y son las que se utilizan contra padecimientos como gripa, dolores, insomnio, ciertas infecciones, etc., consumidas directamente en la dieta o como bebidas; siendo el té, café, vino y cerveza las más populares (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

En la mayoría de los casos la función y beneficio de los metabolitos secundarios aún se desconoce. Algunos de ellos son producidos por razones fácilmente apreciables, como por ejemplo las toxinas que proveen una defensa contra los depredadores, compuestos volátiles que atraen a ciertas especies en *pro* de la reproducción del organismo, colorantes o como advertencia a otras especies; pero es lógico asumir que todos y cada uno de ellos juega un papel vital para quien lo produce (Dewick, 2009).

2.1 Guanábana (*Annona muricata* L.)

El árbol de la guanábana es uno de los primeros que se introdujeron en los trópicos del viejo mundo. Su origen es de las regiones tropicales de Sudamérica.

Nombre Común.- Guanábana

Especie Botánica.- *Annona muricata*

Familia.- Fruta de familia de las ANNONACEA.

El árbol es ampliamente conocido en los países tropicales por la exquisitez de sus frutos, no se conoce a ciencia cierta la región de origen, probablemente sea de las Antillas de donde se difundió a todos los países tropicales de América y África Occidental.

Variedades.- Por su sabor se clasifica en:

- Semi ácida
- Semi dulce
- Dulce

Forma.- Su forma ovalada se asemeja mucho a un corazón, le recubre una cáscara de color verde oscuro con varias espinas pequeñas, suaves y carnosas que se desprenden fácilmente cuando la fruta ya está madura.

Tamaño y peso.- La fruta alcanza los 10 a 30 cm de longitud y su peso va de 1 a 10 kilos.

Descripción de: Pulpa.- Su textura suave y blanca es muy similar al algodón, además es cremosa y jugosa, y recubre las semillas negras de un tamaño que va desde 1.25 a 2cm de largo, cada fruta puede tener hasta 200 semillas. Sabor.- Su sabor se caracteriza por ser muy similar al de la chirimoya es sub-ácido.

Su uso en la medicina tradicional es amplio, ya que en muchos países es consumida como bebida. La infusión o decocción de hojas secas se ha utilizado para tratar diferentes padecimientos: antiespasmódico, anti-hipertensivo, dolor

estomacal, relajante y como auxiliar del sueño en pacientes con fiebre (Figueirinha et al., 2008).

En India es utilizado contra problemas gastrointestinales (Ortiz et al. 2002), en China como ansiolítico, y en Nigeria y otros países en desarrollo se emplea para tratar la diabetes mellitus (Adeneye y Agbaje, 2007). Se ha reportado su uso contra gripa, fiebre, neumonía y contra problemas gástricos, ciertas infecciones en garganta y contra hongos en los pies (Adeneye y Agbaje, 2007; Negrelle y Gomes, 2007). Estudios de los extractos de *C. citratus* han demostrado su actividad anti-inflamatoria, vasodilatadora y diurética (Leite et al., 1986; Ortiz et al., 2002; Figueirinha et al., 2008). De forma que Leite et al. (1968) reportaron que en Brasil es usado como relajante, contra insomnio, ansiedad e irritabilidad y posiciona a la especie como una de las plantas medicinales con más uso en el mundo.

2.1.1 Descripción botánica

El Árbol es casi siempre verde (solo pierde las hojas al florecer), mide 3 a 7 m de altura, con crecimiento erecto, las hojas son alternadas, simples, enteras, de superficie exterior coriácea y color verde brillante, muy atractivas y de forma alargada, al estrujarse despiden un olor característico. El tronco es recto y de color grisáceo, ramifica a baja altura.⁷

Flores.- Posee tres sépalos, tiene de tres a seis pétalos y numerosos estambres, tiene varios pistilos y un solo óvulo. Las semillas son negras, brillantes y se encuentran diseminadas en la pulpa.

Raíces.- 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, por lo que, al seleccionar un sitio para establecer una plantación comercial, se deben buscar suelos con esa profundidad mínima efectiva.⁸

Sistema de propagación.- La guanábana es una planta que puede propagarse tanto por vía sexual (semilla) como por vía asexual o vegetativa por medio de yemas o estacas.

Propagación sexual.- Esta consiste en la propagación a través de semillas las cuales son seleccionadas de los mejores frutos de los árboles que previamente han sido escogidos rigurosamente comparando que tengan mayor resistencia a las enfermedades, su producción, el tamaño, la textura y sabor de la fruta.

Las semillas se extraen solo de los árboles que hayan completado su madurez fisiológica. Estas semillas son lavadas, limpiadas, sumergidas en agua por una hora y finalmente se las pone a secar para su uso final.

Propagación asexual.- Consiste en propagar la guanábana por medio de injertos, estacas y acodos.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Annona muricata* L.

Reino:	Plantae
Familia:	Annonaceae
Orden	Ranales
Genero	Annona
Especie	Muricata
Nombre científico	<i>Annona muricata</i> L:

Fuente: (García Soto et al., 2008).

La clasificación taxonómica de la planta se muestra en el cuadro 1. Los nombres con los que se le conoce a esta especie después de *Annona Muricata* L. son Guanábana en México. Otros términos incluyen Guayabano, Guyabano, Yabana, Guanábano, Graviola, entre otros. Los nombres comunes pueden ser tan variados, tanto como el número de países donde se emplea como medicina tradicional.



Figura 1. *Annona Muricata* L. a) Crecimiento ramificado; b) Fruto; c) Hojas.

2.1.2 Actividad polifenólica de *Annona Muricata* L.

Las plantas medicinales son comúnmente ricas en compuestos polifenólicos, tales como los flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos, cumarinas, lignanos y ligninas. Estos compuestos tienen múltiples efectos biológicos, incluyendo actividad antioxidante (Packer et al., 1999). En experimentos *in vitro* en un compuestos antioxidantes en las plantas muestran la forma en que se protegen contra el daño de la oxidación mediante la inhibición de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Ali et al., 2008). El papel de estos compuestos como antioxidantes puede ser inferido por su similitud con los antioxidantes sintéticos de estructuras relacionadas.

Los compuestos polifenólicos, tales como flavonoides, ácido fenólico y taninos, poseen propiedades anti-inflamatorias, anti-cancerígenas, anti-ateroscleróticas y otras propiedades que pueden ser relacionadas a sus actividades antioxidantes (Chung et al, 1998;Wong et al., 2006). Los flavonoides y flavonoles son dos poli-compuestos fenólicos que juegan un papel importante en la estabilización la oxidación de lípidos y están asociados con actividad antioxidante (Yen et al., 1993). Los compuestos fenólicos pueden contribuir directamente a la acción antioxidante (Duh et al., 1999).

Los compuestos polifenólicos pueden tener un efecto inhibitorio sobre mutagénesis y la carcinogénesis en los seres humanos al ingerir hasta 1 gramo, todos los días de una dieta rica en frutas y verduras-vegetales (Tanaka et al., 1998). Las actividades antioxidantes observando se pueden atribuir tanto a los diferentes mecanismos de ingestas ejercidas por diferentes compuestos fenólicos y para los efectos sinérgicos de diferentes compuestos.

Annona pertenece a la familia de la chirimoya la mayorías de las piezas de la planta, son usadas en la medicina herbal y se encuentra que es una buena fuente de antioxidantes naturales sus hojas y constituyentes incluyen varios alcaloides, por lo que algunos informes han demostrado que especies de *Annona* presentan actividad antioxidante en diferentes modelos *in vitro* debido a la presencia de flavonoides como la rutina y hiperósido.

De manera que algunos compuestos se presentan en *Annona muricata*, (Familia Annonaceae) como Cyclohexapéptidos, acetogeninas, acetogeninas annonaceas son los principal fitoquímico estudiados de esta planta medicinal. Un análisis fitoquímico de la planta reveló la presencia de taninos, esteroides y glucósidos cardíacos que están en los principales compuestos fitoquímicos. La pulpa obtenida de la planta se muestra la propiedad difusividad térmica. Esta revisión incluye la aplicación potencial de la planta más arriba en el campo farmacéutico debido a sus actividades farmacológicas.

El fruto es de valor económico y por lo tanto cultivado y utilizado ampliamente como un alimento comestible y potencial en compuesto medicinales por lo que esto indica diferentes formas de trabajar en el futuro (Gonzales-Esquinca et al., 2011).

2.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios en las plantas, con variadas estructuras químicas y actividad (Martínez-Valverde et al., 2000). Su forma más frecuente es la de polímeros o lignina insoluble, mientras que su presencia en los tejidos animales está relaciona con el consumo de alimentos vegetales.

En los vegetales, son metabolitos esenciales para el crecimiento, reproducción y como agentes protectores frente a la acción de patógenos (secretados como mecanismo de defensa) y los pigmentos como atrayentes de polinizadores (Dirzo, 1985; Martínez-Valverde et al., 2000; Martínez, 2010). En los alimentos están directamente relacionados a la calidad sensorial de los productos alimenticios vegetales, tanto frescos como procesados. Contribuyen a las pigmentaciones de todos los vegetales, siendo las antocianinas responsables de las coloraciones roja, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y sus productos.

Por otro lado, los taninos condensados o proantocianidinas son los que se asocian con la astringencia que presentan muchas frutas comestibles antes de la maduración, además del sabor característico que le da a los vinos, en los que contribuye con el sabor amargo y a la apreciación organoléptica de los mismos, pudiendo distinguir a un vino tinto de uno blanco.

2.2.1 Estructura y clasificación de los compuestos polifenólicos

La clasificación de los polifenoles está basada en la distinción entre compuestos no flavonoides (ácidos fenólicos, fenoles simples e hidroxicinámicos) y flavonoides, siendo los últimos quienes poseen una estructura más compleja; poseen un esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆ (Flanzy, 2003).

2.2.2. Fenoles totales

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos están caracterizados por un núcleo bencénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos, es decir, están formados por un esqueleto carbonado C₆-C₃; esta denominación abarca a los ácidos fenólicos, que a su vez se dividen en ácidos benzoicos (ácido gálico) (C₆-C₁) y ácidos cinnámicos (ácidos cinnámico, caféico y cumárico) quienes portan una cadena lateral insaturada (C₆-C₃), pero también incluyen a otros derivados fenólicos como los estilbenos (Figura 3). La reactividad de este tipo de molécula es debida tanto a la presencia de la función fenol que, por la movilidad de su átomo de hidrógeno, presenta un carácter ácido, como al núcleo bencénico que puede sufrir sustituciones electrófilas (Flanzy, 2003).

La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos y derivados, hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos condensados o proantocianidinas. Pueden estar también en formas conjugadas (glucósidos) con uno o más restos de azúcares unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático; forma más común de hallar a esta clase de compuestos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los azúcares más comunes son la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos glucorónico y galacturónico.

Aunque también pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos o ácidos orgánicos (ácidos fenil-acéticos), aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos.

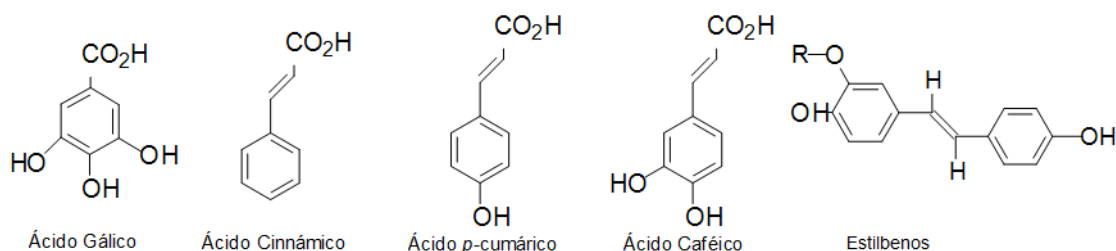


Figura 2. Ácidos Fenólicos: Benzoicos (hidroxibenzoicos), cinnámicos (hidroxicinámicos) y derivados (estilbenos).

Los polifenoles cumplen ciertas funciones en los alimentos, incluyendo color y astringencia. La astringencia en frutos inmaduros se relaciona con los compuestos tánicos; grupo diverso de moléculas con pesos cercanos a 3000 Da que se forman de ácidos carbocíclicos, fenólicos y azúcares. Suelen agruparse de acuerdo a su estructura química (Harborne, 1986; Flanzky, 2003), aunque también a su forma de extracción (Martínez, 2010).

El segundo grupo de los polifenoles está integrado por los flavonoides; la familia más amplia entre los polifenoles, con cerca de 5000 diferentes compuestos (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

2.2.3 Flavonoides

Los flavonoides (del latín *flavus*; amarillo) constituyen el grupo más importante dentro de la clasificación de los polifenoles. Son sustancias de origen vegetal que se hallan en forma libre (aglucona) o glucosilada en el líquido vacuolar, cloroplastos y membranas celulares. Son responsables de la coloración (rojo, azul y amarillo) en flores y en las hojas en otoño, y protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos UV, la contaminación ambiental y contra depredadores (Martínez-Flórez, 2002).

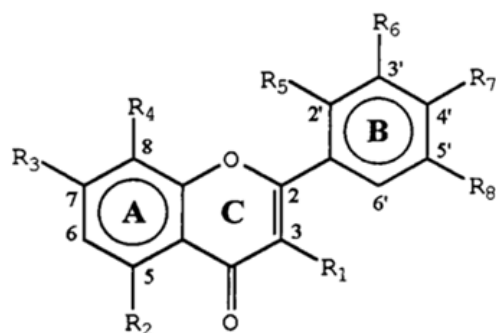


Figura 3. Esqueleto común difenil-pirano de flavonoides (Burda y Oleszek, 2002).

Fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-Györgyi, quien en 1930 aisló la citrina de la cáscara de limón; sustancia que regulaba la permeabilidad de los capilares. En un principio, los flavonoides fueron denominados como *vitamina P* (por permeabilidad), hecho que no pudo comprobarse y alrededor de 1950 se abandonó dicha denominación (Martínez-Flórez, 2002).

Su estructura está formada por un esqueleto difenil-pirano ($C_6-C_3-C_6$); dos anillos (**A** y **B**) que provienen ya sea de la ruta del acetato o la del shikimato, unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico (**C**) (Figura 4). Hasta ahora, esta familia incluye 13 tipos de flavonoides: chalconas, dihidrochalconas, uronas, flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles (flavononoles), flavanonas, flavanoles, flavonodiolos o leucoantocianidinas (4-flavanoles y 3,4-flavanodiolos), antocianidinas (antocianoalidos), isoflavonoides, biflavonoides y proantocianidinas o taninos condensados (Pérez-Trueba, 2003); algunos de estos grupos tienen como precursor a la naringenina, que a su vez proviene de una chalcona formada por la elongación del ácido 4-hidroxicinámico y 3 unidades de malonil-CoA (Figura 5) (Dewick, 2009). Las diferencias entre grupos es debida al grado de oxidación (sustituyentes $-OH$), naturaleza y número de alquilaciones, sustituyentes glucósidos y el grado de polimerización de la estructura carbonada.

Estructuras más complejas de estos compuestos forman polímeros conocidos como taninos, las cuales se clasifican ya sea como taninos condensados o taninos hidrolizables.

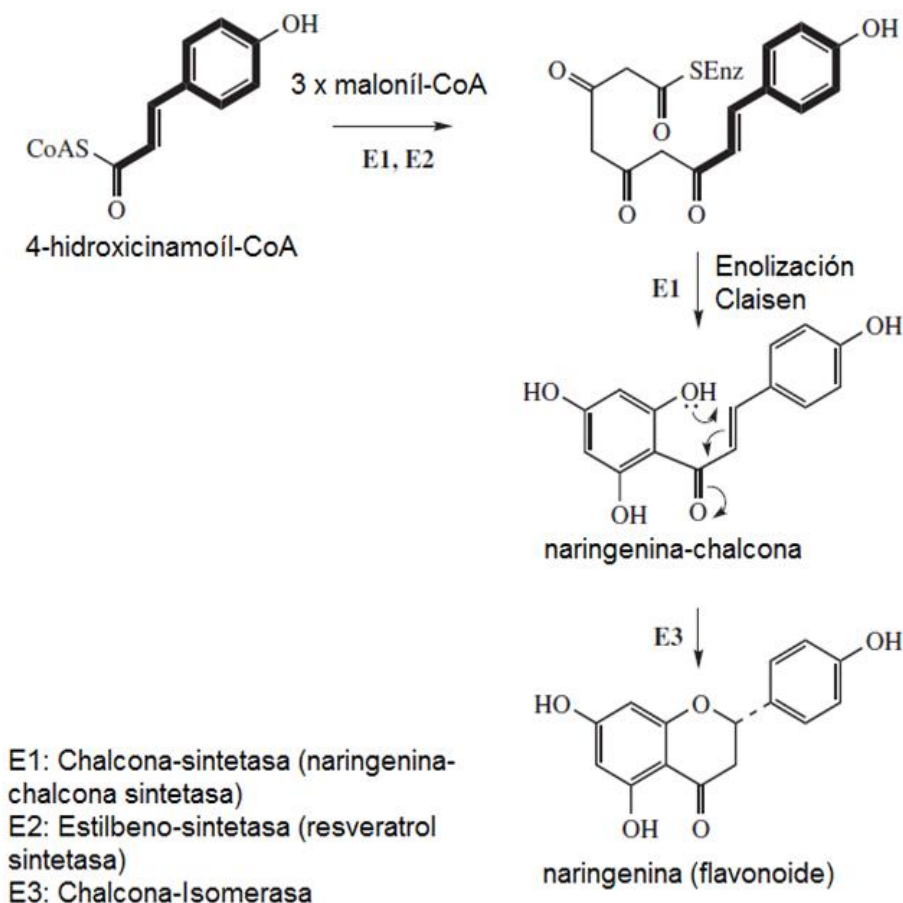


Figura 4. Síntesis de naringenina; precursor de algunos grupos de flavonoides (Dewick, 2009).

Ambos grupos pueden ser hidrolizados, la diferencia radica en los productos de diferente índole que se genera al hidrolizar cada uno. Los taninos condensados son los derivados de la estructura flavan-3,4-diol o proantocianidinas, mientras que los taninos hidrolizables son polímeros de ácido gálico esterificado a glucosa y fenoles simples, pudiendo formar galotaninos (polímero de ácido gálico) o elagitaninos (polímero de ácido elágico) (Fig. 6) (Dewick, 2009). El término tanino hace referencia a su capacidad de interactuar con las proteínas, antiguamente empleado en el curtido de pieles (Flanzy, 2003).

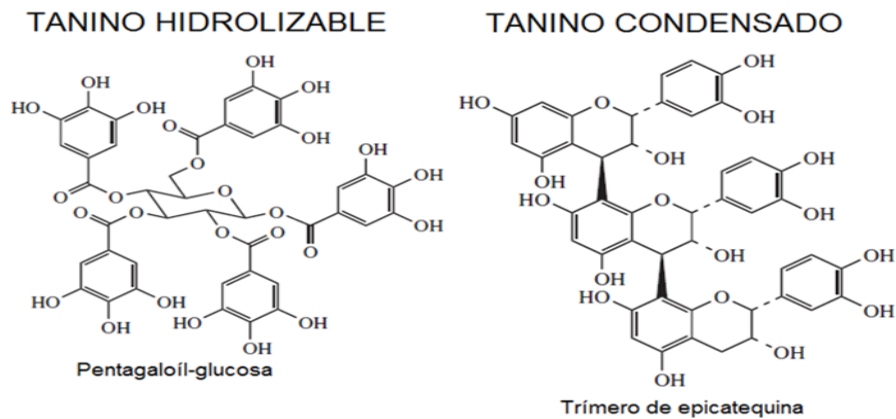


Figura 5. Clases de Taninos (Dewick, 2009)

En las plantas superiores, los flavonoides se hallan comúnmente en su forma glucosídica, esto quiere decir que están ligados con uno o más azúcares a un grupo hidroxilo (*O-glucósidos*) o directamente a uno de los carbonos del esqueleto común (*C-glucósidos*), lo que los hace solubles en agua, solventes orgánicos y mezclas alcohólico-acuosas (Martínez-Valverde *et al.*, 2000; Andersen y Markham, 2006). Ejemplos de flavonoides glucosilados son la rutina, en la que un disacárido [3-*O-rutinosa* o ramnosil-($\alpha 1 \rightarrow 6$)-glucosa] se une a la quercetina, y la naringenina en el que el disacárido (7-*O-neohesperidosa*) se une a la naringina (Figura 7) **Figura 6. Forma glucosilada de flavonoides (Dewick, 2009)..**

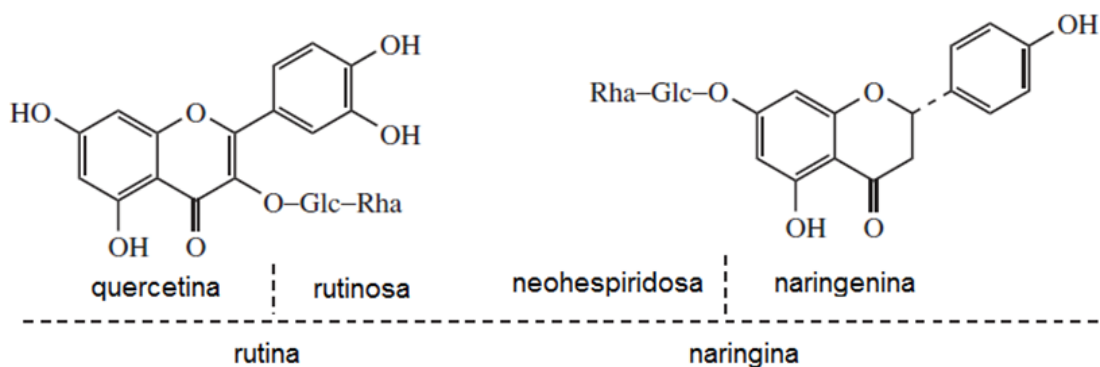


Figura 6. Forma glucosilada de flavonoides (Dewick, 2009).

El grado de saturación es lo que define las características que presentan todos los compuestos fenólicos. Su solubilidad está definida por el tipo de sustituyentes en la cadena carbonada; es más soluble en su forma glucosilada que en la respectiva aglucona. Además, estudios han revelado que su actividad antioxidante y antiradical depende también de ello; grupos hidroxilo libres en posición C-3 dan a los flavonoles elevada actividad antioxidante, mientras que el doble enlace en C2-C3 y sustituyentes –OH libres en C-3' aumentan las características antiradicales (Burda y Oleszek, 2001).

2.2.4 Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los glicósidos, donde se incluyen a las sustancias constituidas por azúcares en forma de acetales. Consisten de un núcleo lipofílico que puede presentar una estructura esteroide o triterpenoide, con una o más cadenas de carbohidratos (Figura 7). Al núcleo lipofílico se le denomina aglicón, por ser el grupo que está enlazado a un átomo de carbono anomérico, que es el átomo de carbono enlazado a dos oxígenos, o a un oxígeno y cualquier otro heteroátomo, como nitrógeno (Wade, 2004). La naturaleza química del aglicón definirá la clasificación de la saponina como esteroide o triterpenoide.



Figura 7. Estructura de una de saponina triterpenoide de Quillaja saponaria (Kimet al ., 2006).

El aglicón proporciona un grupo hidroxilo para la formación de un acetal, un derivado que surge de la reacción entre un grupo funcional cetona o un aldehído, y dos moléculas de alcohol, con la pérdida de una molécula de agua. Los carbohidratos que se unen al aglicón deben estar en forma de un hemiacetal (derivado de un aldehído o cetona resultante de la adición de una molécula de alcohol al grupo carbonilo) (Kirk y Othmer, 1969; Wade, 2004). Los carbohidratos también se pueden unir mediante una función éster (Meesapyodsuket et al., 2007).

Dependiendo del número de cadenas de azúcares que contenga la molécula se aplican los términos monodesmósido, bidesmósido y tridesmósido, para una, dos y tres cadenas respectivamente (en griego “desmos” quiere decir cadena) (Oleszek, 2002). Cuando se separan los carbohidratos del aglicón, por vía enzimática o hidrólisis ácida, la porción lipofílica generada recibe la denominación genérica de “sapogenina” (cuando una saponina se hidroliza, se cambia la terminación –ina por –genina, por ejemplo, dioscina se vuelve diosgenina).

Las saponinas están ampliamente distribuidas en las plantas, sin embargo no son exclusivas de los vegetales, ya que también se han encontrado en algunas bacterias y en animales marinos inferiores del filum Echinodermata, como las estrellas (clase Asteroidea) y los pepinos de mar pertenecientes a la clase Holothuridea (Oleszek, 2002)

2.3 Determinación de compuestos metabolitos secundarios

Para la identificación de estos compuestos, muchos autores citan el uso de equipos avanzados como son el cromatógrafo de gases o el de líquidos de alta resolución. Estos equipos son costosos, pero precisos y confiables. Sin embargo, el uso de técnicas colorimétricas es de uso común en la fase inicial de un estudio fitoquímico, sobre todo si se trata de determinar concentraciones totales de familias de compuestos.

Para la elucidación de estructuras y cuantificación de estos compuestos se requiere el uso de variadas técnicas. Por ejemplo, para el análisis de polifenoles en propóleo se han empleado métodos colorimétricos, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (CG), espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución (Chang *et al.*, 2002); de esta manera, en los últimos años la mayoría de trabajos sobre análisis de polifenoles se basan en dichos métodos cromatográficos. El equipo más empleado para separar y cuantificar estos compuestos es el HPLC (Martínez, 2010). Por supuesto, existe una amplia variedad de soportes y fases móviles disponibles, tanto para flavonoides, proantocianidinas, ácidos benzoicos y otros.

Esta metodología es habitualmente empleada en la identificación y cuantificación de polifenoles presentes en sistemas acuoso-orgánicos de alimentos sólidos o bebidas. Sin embargo, la cuantificación de taninos condensados o proantocianidinas de alto peso molecular y polifenoles hidrolizables, principales compuestos polifenólicos presentes en los residuos de extracción, se ha basado hasta ahora en el empleo de métodos espectrofotométricos (Martínez, 2010). Así, la técnica colorimétrica empleada para determinar compuestos polifenólicos, se basa en la reacción que se da entre las estructuras que posean un anillo aromático y el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999), nombre con el cual se denomina la técnica. Los resultados suelen expresarse comparándose con un estándar como el ácido gálico, tánico o algún ácido benzoico similar, dependiendo la muestra analizada. El método se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, mezcla formada por óxido de tungsteno y molibdeno. El producto reducido del reactivo genera un complejo con coloración azul que presenta un pico de máxima absorción a 765 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de los fenoles que reaccionan. El desarrollo de color tras la reacción es lento, pero el proceso se puede acelerar mediante el calentamiento de la mezcla, sin embargo, si el calentamiento es excesivo la pérdida de coloración es inevitable, provocando que los resultados sean difíciles de reproducir (Waterhouse, 2002).

El método colorimétrico con tricloruro de aluminio (AlCl_3) y el de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH) fue empleado por Chang *et al.* (2002) para la determinación complementaria de flavonoides. El tricloruro de aluminio forma complejos ácidos estables con el grupo ceto en C-4 o en grupos hidroxil libres en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, y aunque también puede reaccionar con el grupo hidroxilo C-5 de flavanonas, las absorbencias de los complejos generados son casi insignificantes. Además, el tricloruro forma complejos ácido-lábiles con los grupos orto-dihidroxilo en los anillos A o B de los flavonoides; estos complejos muestran un máximo de absorbencia entre 415-440 nm; producto del efecto batocrómico del complejo con tricloruro de aluminio (Figura 8).

Los flavonoides en general poseen una coloración amarilla, cuya intensidad está relacionada al pH de la solución; mientras más básica sea ésta, la coloración será más intensa; característica que se aprovecha en su determinación. Una característica de los flavonoides que es de gran utilidad en su análisis, es la presencia del anillo aromático. Éste es un excelente cromóforo, y por consiguiente, absorbe en la región UV del espectro electromagnético, proveyéndonos de valiosa información estructural, con lo que se distingue el tipo de fenol y grado de oxidación en su estructura (Andersen y Markham, 2006).

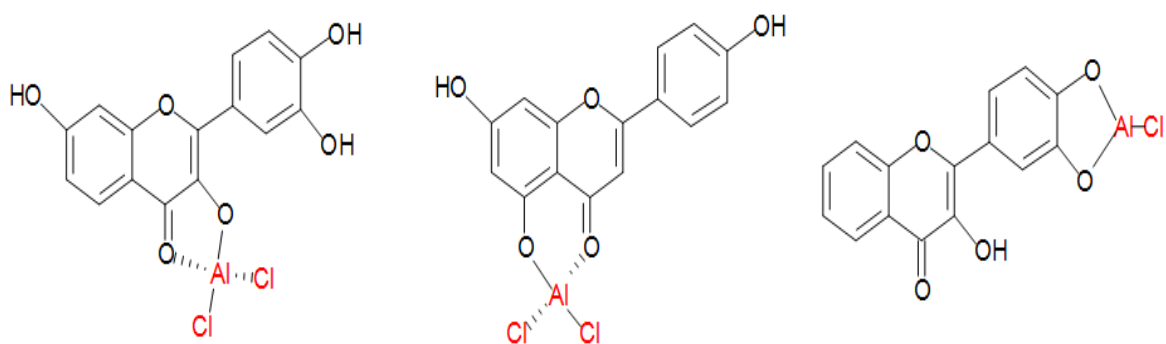


Figura 8. Complejos formados entre un flavonoide y el AlCl_3 . (Chang, 2002)

2.3.1 Antioxidantes

Un compuesto antioxidante, es cualquier sustancia capaz de neutralizar a los radicales libres y sus reacciones (Davasagayam *et al.*, 2004). Impiden que otras moléculas se unan al oxígeno al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno que con el resto de moléculas presentes en un ambiente determinado (Durán y Padilla, 1993) y su acción se puede realizar tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Compuestos como los ácidos fenólicos y flavonoides actúan como eliminadores (*Scavengers*) de radicales libres como los peróxidos, hidroperóxidos o peroxilos (producto de la oxidación de lípidos) con el fin de mantener el equilibrio pro-oxidante/antioxidante a favor de estos últimos (Durán y Padilla, 1993; Venereo, 2002; Vidal, 2008). Las fuentes principales de antioxidantes son los granos, frutas y vegetales. Los antioxidantes naturales protegen al organismo, mientras los agregados químicos protegen de la degeneración o rancidez a los alimentos.

Se denominan suplementos antioxidantes a las vitaminas (carotenos, vitaminas A, E y C), polifenoles, enzimas (catalasas, peroxidasas y dismutasa superperoxidasas) y minerales necesarios para que el sitio activo enzimático lleve a cabo la catálisis (selenio, magnesio, zinc y cobre, entre otros) (Benezer-Benezer *et al.*, 2007; Vidal, 2008).

2.4 Vermicomposta

La palabra composta proviene del latín *componere*, juntar; por lo tanto composta es la reunión de un conjunto de restos orgánicos que sufren un proceso de fermentación y da un producto de color marrón oscuro, con olor a humus. Este abono orgánico resultante contiene materia orgánica (parte de la cual es semejante al humus de la tierra), así como nutrientes: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro y otros oligoelementos necesarios para la vida de las plantas. Es un producto con vida, con una gran variedad y densidad de microorganismos que sintetizan enzimas, vitaminas, hormonas, etc. y que repercuten favorablemente en el equilibrio biótico del suelo.

Esta técnica fue iniciada por Sir Alfred Howar en la India en 1925, quien procesaba residuos orgánicos como basuras, pajas y hojas, con capas alternadas con estiércol y fango cloacal. Este proceso tiene diversidad de variantes, pero siempre manteniendo el mismo principio; el proceso fue modificado por el Consejo de Investigación Agronómicas de la India para acelerar la acción aerobia y reducir los malos olores. La composta realizada con basuras debe dar un producto de grano fino, no debe llevar materiales inertes como vidrio y plástico, y ha de estar pasteurizado para no contener gérmenes patógenos, ni semillas sin germinar. Debido a su materia orgánica y al humus que se deriva de ella, la composta posee la facultad de enmendar las características físicas del suelo: contribuyendo a la estabilidad de las estructuras de sus agregados (los suelos compactados se sueltan bajo la acción de la materia orgánica y los suelos arenosos se compactan por la misma acción), aumentando la capacidad de retención de agua; mejorando su porosidad, lo que facilita su aireación. La acción química de la composta se manifiesta por su capacidad de intercambio catiónico superior a la de cualquier arcilla, suministra directamente a las plantas los tres elementos básicos N, P, K y hace una importante aportación de oligoelementos tales como hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, etc. Además, por efecto de su oxidación lenta, produce gas carbónico, que contribuye a solubilizar algunos elementos minerales del suelo, facilitando su asimilación por las plantas (Cegarra, 1996).

La actividad biológica del suelo se ve favorecida por el aporte de un número importante de bacterias que se encuentran en la composta, pero es sobre todo su riqueza en materia orgánica lo que favorece el desarrollo de los microorganismos del mismo suelo, que con su actividad estimulan el crecimiento vegetal, especialmente para las raíces. Esta acción biológica favorece la descomposición de los componentes minerales insolubles, como los fosfatos, que son necesarios para el desarrollo de las plantas; y el nitrógeno soluble, que puede desaparecer fácilmente por lixiviación, es transformado en nitrógeno orgánico en el cuerpo de los microorganismos. De forma que cuando éstos mueren, quedan de nuevo disponibles para las raíces de las plantas y mientras tanto es menos probable que se pierdan por lixiviación o como amoníaco en el aire (Cegarra, 1996).

El compostaje y el vermicompostaje (lombricompostaje) son procesos aeróbicos de transformación de residuos orgánicos, animales y vegetales, que ocurren constantemente en la naturaleza bajo la acción de lombrices, bacterias y hongos de la materia orgánica. El aprovechamiento de estos residuos orgánicos cobra cada día mayor importancia como medio eficiente de reciclaje racional de nutrientes, que ayuda al crecimiento de las plantas y devuelven al suelo muchos de los elementos extraídos durante el proceso productivo (Cegarra, 1996).

Asimismo, mejoran las características físicas y previenen la erosión del suelo, reducen la dependencia de insumos externos de alto costo económico y ambiental, enfocado a una agricultura sostenible, en donde se disminuye y elimina el empleo de agroquímicos a fin de proteger el ambiente, y la salud animal y humana. La fracción líquida que se obtiene del proceso de compostaje del estiércol se conoce como lixiviados de composta, extractos de composta y té de composta y presenta como ventaja una densidad más uniforme. Los lixiviados de composta se producen directamente de las pilas, son ricos en elementos nutritivos y contienen microorganismos y se caracterizan por una coloración negruzca. Los lixiviados han sido considerados, tradicionalmente, como un fertilizante líquido orgánico (Cegarra, 1996).

Además, estos materiales están siendo utilizados para el control de plagas y enfermedades, puesto que tienen una gran abundancia y diversidad de microorganismos benéficos, por lo que no son considerados pesticidas. Otros contienen químicos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de hongos; dada la gran variedad de lixiviados es muy difícil determinar el número de microorganismos benéficos presentes. La composición física de los residuos sólidos vegetales de tipo agroindustrial y agropecuario, se deben aprovechar para disminuir en gran medida la presión sobre el medio ambiente como soporte de actividades antrópicas; y con ello, estos se reincorporarán en forma de nutrientes para fertilidad de los suelos agrícolas, así como una alternativa de control biológico de plagas y enfermedades de los mismos, disminuyendo el uso y aplicación de agroquímicos.

Este aprovechamiento conduce de manera directa a la disminución de impactos ambientales y sociales generados, en especial, en el componente de disposición final, lo cual es competencia de la gestión y manejo ambiental (Cegarra, 1996).

2.5 Roca fosfórica.

Roca fosfórica es un nombre colectivo utilizado para denominar todos los minerales que contienen fosfatos. Las rocas fosfóricas constituyen un recurso natural finito, no renovable y los depósitos geológicos de diferente origen se encuentran en todo el mundo. En la actualidad son explotados pocos yacimientos de roca fosfórica y cerca del 90 por ciento de la producción mundial es utilizada por la industria para la fabricación de fertilizantes fosfatados, mientras que el resto se emplea para la producción de alimentos para animales, detergentes y otros productos químicos.

Sin embargo, muchos yacimientos de roca fosfórica que se encuentran en las zonas tropicales y subtropicales no son explotados. Una razón es que las características de estas rocas fosfóricas, si bien son adecuadas para la aplicación directa, no reúnen las normas de calidad requeridas para producir fertilizantes fosfatados solubles en agua utilizando la tecnología convencional de procesamiento industrial. Otra razón es que los depósitos son demasiado pequeños para justificar las inversiones necesarias para su explotación minera y procesamiento.

Las rocas fosfóricas son la materia prima básica para la producción de los fertilizantes fosfatados. El compuesto fosfatado en las rocas fosfóricas es algún tipo de apatita. Según el origen del depósito de la roca fosfórica y su historia geológica, las apatitas pueden presentar propiedades físicas, químicas y cristalográficas diferentes. Con las rocas fosfóricas se hallan asociados grupos definidos de minerales accesorios de diversos orígenes y edades geológicas. Por lo tanto, es imperativo establecer procedimientos simples para la caracterización normalizada de las rocas fosfóricas, definir las normas de calidad para fines de la aplicación directa y luego clasificarlas.

Las fuentes de roca fosfórica de calidad conocida pueden ser utilizadas como materiales de referencia para los fines de comparación.

Las características mineralógicas, químicas y texturales de los minerales de fosfatos y sus concentrados determinan: i) su conveniencia para los diversos tipos de procesos de «beneficio» o enriquecimiento para mejorar la calidad de los minerales y eliminar las impurezas, ii) su adecuación a los varios tipos de procesamiento químico y, iii) su capacidad para ser utilizada como roca fosfórica para la aplicación directa. Los factores más importantes en su evaluación para la aplicación directa son: el grado o ley, la conveniencia para el beneficio y la reactividad de la apatita. Una matriz completa de caracterización basada en la integración de todos los datos obtenidos por varios métodos analíticos determina el potencial de beneficio y los mejores usos posibles de la roca fosfórica en la producción de los fertilizantes fosfatados solubles o como fertilizante de aplicación directa.

La aplicación de roca fosfórica al suelo como fuente de fósforo requiere de un ambiente apropiado que facilite el proceso de disolución de la misma.

En este orden de ideas se ha sugerido que la aplicación de diversos materiales orgánicos, el estiércol de diversos orígenes, entre éstos, en forma conjunta a la roca fosfórica (RF) permite incrementar los niveles de fósforo liberados por ésta, con relación a eso He et al. (1997) muestran resultados según los cuales la solubilidad de la roca se incrementó notablemente con la aplicación de celulosa; efecto que sería posible cuando se incorpora estiércol de bovino dado sus elevados contenidos de celulosa. Una de las teorías propuestas para explicar tal efecto supone que, el calcio liberado por la roca durante su proceso de disolución puede ser quelatado por los compuestos orgánicos (CO) gracias a grupos funcionales o aniones como el citrato y el oxalato.

Amberger y Singh (1994), señalan que en el caso de la materia orgánica (MO) estable del suelo, la fracción correspondiente a los ácidos fúlvicos es, en gran medida, responsable de los procesos de quelación. Este mecanismo, sea mediado por la MO estable o por productos orgánicos de incorporación reciente, permite “eliminar” del sistema uno de los productos de la reacción de disolución de la RF, ello conducirá a un desplazamiento de los equilibrios y en consecuencia al incremento de la disolución de la misma. La producción de este fenómeno requiere, según estimaciones hechas, periodos de dos a cuatro semanas.

Otro enfoque importante es aquel que sostiene que es la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, durante las primeras etapas de descomposición de los CO añadidos (Christ y Davies, 1996; Baziramakenga y Simard, 1998), la responsable del incremento del proceso de disolución. En este caso se considera que los mencionados ácidos suministran los H⁺ necesarios para el ataque de fosfatos altamente insolubles tales como la RF Fox et al., 1990; Gerke et al., 2000). Es evidente que existe la posibilidad de que ambos fenómenos ocurran y que el predominio de uno u otro dependerá de la combinación de suelo, clima y CO incorporados, así como de las características de la roca utilizada. Existe, no obstante otro enfoque, que de acuerdo a nuestro punto de vista no ha sido considerado, y es el hecho de que el estiércol constituye un inóculo rico en un gran número de cepas bacterianas que han sido señaladas como solubilizadoras de fósforo, tal es el caso de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Xanthomonas* (De Freitas et al., 1997; Sahn y Jana, 2000).

2.6 Lixiviado

Debido al creciente interés en el cultivo de la guanábana debido a la identificación de metabolitos de alto valor agregado, es necesario que los agricultores tengan alternativas de cultivo diferentes a los tradicionales donde suelen aplicarse fertilizantes químicos y el cual se ha demostrado que no son sustentables con el medio ambiente.

Es necesario promover el uso de abonos orgánico, algunos de los cuales pueden ser producidos por los mismos agricultores y otros pueden ser adquiridos a bajo costo (Gómez et al 2013).

Una justificante científica es que no se tienen reportes del uso de vermicomposta, lixiviados de vermicomposta y de roca fosfórica y su efecto sobre el crecimiento de las plántulas de guanabana y la producción de metabolitos secundarios.

El humus de lombriz ha sido considerado en los últimos años el mejor fertilizante orgánico. El humus de lombriz puede almacenarse durante mucho tiempo sin que sus propiedades se vean alteradas, pero es necesario mantenerlas bajo condiciones óptimas de humedad (40%). Los beneficios más significativos son entre otros los siguientes:

Los hongos y las bacterias que se encuentran inmersos en el humus de lombriz, facilitan de gran forma a las plantas a controlar ciertas plagas, debido a que dichas plantas poseen la potestad de absorber los nutrientes por medio de los estomas, los cuales se hallan en la parte superior de sus hojas.

El humus de lombriz líquido puede fácilmente emplearse como fertilizante líquido en los denominados o conocidos sistemas de fertirrigación, a su vez puede utilizarse como abono foliar, en tanto a que este se caracteriza por ser un producto completamente natural, lo cual acarrea los beneficios de ser más eficiente y mucho menos dañino o perjudicial para el campo y la floricultura.

Es suma importancia mencionar que el humus de lombriz líquido posee los elementos de carácter soluble con más importancia, los cuales se encuentran contenidos en el humus de lombriz sólido, en los cuales están los humatos de gran

vitalidad como lo son los ácidos fúlvicos, úlmicos, húmicos. Seguidamente es conocido que el alto contenido de ácidos fúlvicos y húmicos aumenta la reabsorción de los minerales que se encuentran en el suelo, como los son fosforo, nitrógeno, potasio, hierro, magnesio, molibdeno, entre otros. Siendo este producto entonces, muy apropiado para cualquier tipo de cultivos, sean extensivos o intensivos. (Escobar Carbaja, I 2013)

El humus de lombriz posee una elevada carga microbiana del orden de los 20 mil millones de grano seco, contribuyendo a la protección de la raíz de bacterias y nemátodos sobre todo, para el cual está especialmente indicado. Produce además hormonas como el ácido indol acético y ácido giberélico, estimulando el crecimiento y las funciones vitales de las plantas. Los excrementos de la lombriz contienen: 5 veces más nitrógeno, 7 veces más fósforo, 5 veces más potasio y 2 veces más calcio que el material orgánico que ingirieron.” (Silvimart, 2007)

Al ser el humus un fertilizante puede estar en el suelo por cinco años, manteniendo que el suelo posea un ph neutro, esto ayuda para que no existan problemas de dosificación y mucho menos de fitotoxicidad, el tiempo ideal o las estaciones para suministrar el humus es en otoño y primavera; éste se debe suministrar sobre la superficie debido a que las bacterias del humus necesitan del oxígeno para poder cumplir con sus principales funciones

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de alternativas medicinales ha ido cada vez en aumento. O sólo por el uso indiscriminado de químicos contra ciertos padecimientos, sino por el hecho de que los microorganismos generan, eventualmente, una resistencia hacia estos. Ambos factores hace menos viable su uso en un futuro no lejano y por ende la necesidad de búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento o cura de las variadas dolencias humanas en cuestión de salud.

El empleo de elementos naturales como remedio a algunas dolencias humanas ha existido desde la antigüedad. Las plantas medicinales fueron durante mucho tiempo (y en muchos pueblos y regiones aún lo es) la fuente directa de elementos curativos de ciertos problemas de salud; dolores, amibiasis, gastritis, entre otros. La composición de las plantas es muy compleja, sobresaliendo los compuestos conocidos como *polifenoles*, que han mostrado capacidad antioxidantes e incluso inhibidores de crecimiento de ciertos microorganismos patógenos para el ser humano.

Debido al creciente interés en el cultivo de la guanábana se han identificado metabolitos de alto valor agregado, es necesario que los agricultores tengan alternativas de cultivo diferentes a los tradicionales que usan fertilizantes químicos y que se ha demostrado que no son sustentables con el medio ambiente. Es necesario promover el uso de abonos orgánico, algunos de los cuales pueden ser producidos por los mismos agricultores y otros pueden ser adquiridos a bajo costo. Una justificante científica es que no se tienen reportes del uso de vermicomposta, lixiviados de vermicomposta y de roca fosfórica y su efecto sobre el crecimiento de las plántulas y la producción de metabolitos secundarios.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar el contenido de metabolitos secundarios en extractos de diferentes tratamientos de guanábana (*Annona Muricata*) cultivadas con insumos orgánicos.

4.2 Específicos

- ✓ Evaluar la influencia de la adición de los insumos orgánicos en los parámetros de crecimiento de plantas de guanábana (*Annona muricata* L.).
- ✓ Determinaciones del efecto de concentraciones de vermicomposta, roca fosfórica y lixiviada de vermicomposta sobre el contenido de metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, taninos y saponinas) de las hojas de plántulas de Guanábana.
- ✓ Analizar el resultado del contenido de metabolitos secundarios producidos a partir de cada uno de las diferentes concentraciones de los tratamientos de insumo orgánico aplicados en las plantas de Guanábana.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

El material vegetal fue colectado dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, en las áreas de invernadero, fue ahí donde primeramente se adicionaron los abonos orgánicos, a los diferentes lotes de plantas, las cuales fueron divididas en cinco grupos de nueve plantas, este lugar se encuentra a una altura promedio de 600 msnm.

Se realizó una siembra de cien semillas de las cuales noventa plántulas germinaron, para la realización de este proyecto eran necesarias un mínimo de cuarenta y cinco plántas, al obtener tener noventa se optó por hacer un duplicado de cada lote, se procedió con el tratamiento de insumos orgánicos que fueron la vermicomposta, la roca fosfórica y el lixiviado de vermicomposta, haciendo cinco lotes con nueve plántas cada uno, estos lotes con su duplicado.

Cada bolsa se marcó con la cantidad que se añadió de vermicomposta las cuales fueron de 50g y 100g, roca fosfórica con 1g, 2g y 3g y lixiviado de vermicomposta 50ml, 33.33ml y 25ml con diluciones en agua, antes de la aplicación de los tratamientos se miden datos como altura de la planta y número de hojas.

La parte colectada, se lavó con agua de la llave y un poco de detergente líquido para eliminar los rastros de suciedad. Para su secado, se mantuvo a 40 ± 2 °C durante 120 horas en un horno incubadora y luego de ser triturada en una licuadora común, se conservó protegido de la luz en un frasco de vidrio color ámbar.

En el muestreo, se descartó cualquier hoja que estuviera maltratada, seca o contaminada con algún tipo de microorganismo. Las hojas colectadas poseían una coloración verde característica, sin ningún tipo de magulladura.

5.2 Obtención de extractos

5.2.1 Extracto metanólico

La muestra vegetal seca se maceró inmersa en metanol (1:13 p/v) a temperatura ambiente durante 2 horas en un sonicador. La materia orgánica recuperada se maceró una vez más de la misma forma. Ambas extracciones se mezclaron, filtraron a través de papel Whatman #2, y centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm para luego recuperar el sobrenadante, al que se le eliminó el exceso de solvente mediante un rotavapor (≤ 40 °C). El producto se re suspendió en metanol grado HPLC y se conservó, protegido de la luz, a -20 °C hasta su análisis.

5.3 Analisis de los datos iniciales

Como factor importante de referencia se tomaron previo a la aplicación de los insumos orgánicos los datos y medidas de la altura y número de hojas de cada una de las plantas que se sometieron a estudio, para tener datos de comparación del antes y después de los tratamientos con insumos orgánicos y así evaluar la influencia de estos en las plantas.

Cuadro 2 Resumen estadístico para altura.

Recuento	45
Promedio	9.08444
Desviación Estándar	1.83092
Coefficiente de Variación	20.1544%
Mínimo	4.2
Máximo	13.0
Rango	8.8
Sesgo Estandarizado	-0.120277
Curtosis Estandarizada	0.416073

En el Cuadro 2 se muestra los datos estadísticos del número de muestras que se estudiaron, los valores máximos y mínimos de las alturas de las plantas e Incluye el promedio de las alturas. Los rangos de alturas iniciales de las plántulas fueron desde 4.2cm a 13.0cm.

Cuadro 3 Resumen estadístico para número de hojas.

Recuento	45
Promedio	5.44444
Desviación Estándar	1.25328
Coefficiente de Variación	23.0194%
Mínimo	2.0
Máximo	8.0
Rango	6.0
Sesgo Estandarizado	-2.71654
Curtosis Estandarizada	1.9621

En el Cuadro 3 se muestra los datos estadísticos del número de muestras que se estudiaron, los valores máximos y mínimos del número de hojas, donde los rangos de número de hoja iniciales de las plántulas fueron desde 2.0 a 8.0

5.4 Análisis de metabolitos secundarios en extractos de *Annona Muricata L.*

5.4.1 Estimación de fenoles totales

El análisis del contenido de fenoles totales se determinó de acuerdo al método colorimétrico de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999), empleando ácido gálico como estándar. Una alícuota de 100 μL de muestra se transfirió a un tubo de ensayo junto a 4.2 mL de agua y 500 μL mL del reactivo de Folin Ciocalteu (1N). La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 minuto para luego agregar 1.0 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio al 20% y 4.2 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo cubierto de la luz durante 1 hora, para luego leer su absorbencia a 765 nm en un espectrofotómetro HACH DR 5000. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de hoja seca (mg EAG/g) empleando una curva estándar de ácido gálico de 0.0 a 1000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ANEXO I).

5.4.2. Estimación de Flavonoides

El análisis del contenido de flavonoides se determinó mediante el método colorimétrico del tricloruro de aluminio (Chang *et al.*, 2002). Una alícuota de 0.5 mL de muestra se mezcló con 1.5 mL de etanol al 95% y 100 μ L de tricloruro de aluminio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{-H}_2\text{O}$) al 10%, luego de agitar se agregó 100 μ L de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo 30 minutos para luego medir su absorbencia a 415 nm en un espectrofotómetro. El volumen de tricloruro de aluminio fue reemplazado por agua destilada en la preparación del blanco. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por gramo de hoja seca (mg EQ/g) empleando una curva estándar de quercetina de 0.0 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ANEXO II).

5.4.3. Estimación de taninos condensados (Proantocianidinas)

La determinación de taninos condensados (proantocianidinas) se llevó a cabo de acuerdo al método de vainillina- H_2SO_4 con las modificaciones de Sun *et al.* (1998). Dicho método cuantifica monómeros de taninos condensados obtenidos después de una hidrólisis ácida del material a analizar (García, 2004), basándose en la reacción de condensación entre los monómeros de taninos y la vainillina. En tubos de ensaye se hizo reaccionar 1.0 mL del extracto o estándar junto a 2.5 mL del reactivo vainillina (1% en MeOH) y 2.5 mL de ácido sulfúrico (10.5%), luego de 20 minutos de reacción a ~ 30 °C en una habitación con luz tenue, se midió la absorbencia de las muestras en un espectrofotómetro HACH DR 5000 a 500 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes a (+)-catequina por gramo de hoja seca (mg EC/g). (ANEXO III).

5.4.4. Estimación de saponinas

La cuantificación de saponinas esteroidales se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Qin et al. (2009). Brevemente, se construyó una curva de estándar de diosgenina, para lo cual se preparó una solución patrón de diosgenina disuelta en cloroformo (1 mg/mL) y se tomaron volúmenes de 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 y 1800 μL , los cuales fueron diluidos con el correspondiente volumen de cloroformo para obtener concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 y 0.9 mg/mL. Se tomaron muestras de 20 μL de cada concentración, las cuales fueron colocadas en tubos de ensayo, entonces a cada tubo se agregaron 200 μL de vainillina al 5% en metanol y 800 μL de ácido perclórico. Los tubos fueron agitados en un vortex y posteriormente calentados en una parrilla a 70°C por 15 minutos para desarrollar color. Transcurrido dicho tiempo, los tubos fueron enfriados a 0°C por 2 min y se agregaron 1480 μL de ácido acético glacial. Se dejó estabilizar la reacción por 30 minutos. La absorbancia de las muestras se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 454 nm. La medición del contenido de saponinas esteroidales en los extractos se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito arriba, tomando 20 μL de extracto en vez de la solución de diosgenina. El blanco fue sometido al mismo tratamiento que las demás muestras, colocando 20 μL de ácido acético glacial en vez de solución de diosgenina (Wagner & Bladt, 1996), (ANEXO IV).

5.4.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico Stat-Graphics-Centurion XV, empleando un análisis de varianza simple (ANOVA) y la prueba de Tukey de rangos múltiples ($P=0.05$). Mediante correlación se determinó las relaciones entre parámetros de crecimiento y metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, taninos y saponinas).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente proyecto después de haber hecho los análisis de parámetros de crecimiento, con respecto a la altura de la planta y número de hojas no hubo un valor significativo; es decir que indicaran que hubo efecto por parte de las diferentes concentraciones de tratamiento a las plántulas, en el que cada sujeto de estudio tuviese mayor contenido de hojas que otros o mayor altura sin embargo estos análisis se hicieron hasta en periodos determinados y monitorearon durante ciertos meses en lo cual no mostraron contenido variable.

De acuerdo a González Fresneda et al. (2001) las catequinas (y los flavonoides) son fuente de protección debidas a su propiedad. Es decir, la actividad que presentan ciertas muestras se relaciona con su composición fitoquímica o su composición polifenólica: flavonoides, ácidos fenólicos, catequinas, taninos, etc. La presencia de estos metabolitos se suelen relacionar con la actividad medicinal, nutricional u organoléptica (Sun et al., 1998) que una determinada muestra pueda presentar. Por lo que Gavamukulya et al., 2014 demostraron que *A. muricata* son fuentes de agentes anticancerígenos y capacidades antioxidantes.

6.1 Análisis de parámetros

Cuadro 4. Analisis de efectos significativo altura,numero de hojas y clorofila

Fertilizante orgánico	Aplicación	Altura	Numero de hojas	Clorofila
roca fosfórica	1	9.7 a	4.6 a	30.46 a
	2	8.1 a	4.5 a	34.7 a
	3	8.8 a	4.6 a	34.9 a
vermicomposta	0	9.7 a	4.9 a	33.56 a
	50	8.9 a	4.3 a	34 b
	100	8.6 a	4.5 a	32.66 a
lixiviado	1	8.1 a	4.7 a	34.7 a
	2	8.7 a	4.5 a	31.4 a
	3	9.8 a	4.5 a	33.9 a

*valores con letras diferentes presentan diferencias significativas entre los rangos de aplicación de cada tratamiento.

Cuadro 5. Analisis de efectos significativo metabolitos secundarios

Fertilizante orgánico	Aplicación	Fenoles totales	Flavonoides	Taninos	Saponinas
roca fosforica	1	0.39 a	1.39 a	0.23 a	1.32 a
	2	0.50 b	1.83 b	0.23 b	1.21 b
	3	0.47 c	1.56 c	0.23 b	1.14 c
vermicomposta	0	0.46 a	1.26 a	0.23 a	1.27 a
	50	0.40 b	1.20 b	0.24 b	1.04 b
	100	0.49 c	2.33 c	0.23 a	1.36 c
lixiviado	1	0.45 a	1.54 a	0.23 a	1.00 a
	2	0.47 b	1.86 b	0.23 a	1.22 b
	3	0.43 b	1.39 c	0.23 a	1.45 c

*valores con letras diferentes presentan diferencias significativas entre los rangos de aplicación de cada tratamiento.

6.2 Estimación del contenido de fenoles totales.

La variación del contenido polifenólico en los diferentes extractos de guanábana para el contenido de fenoles totales se presenta en la Figura 9, en donde se observa que la mayor composición de estos metabolitos la presentó el extracto de la muestra “E”, donde se obtuvo 0.58 mg de EAG por gramos de muestra seca.

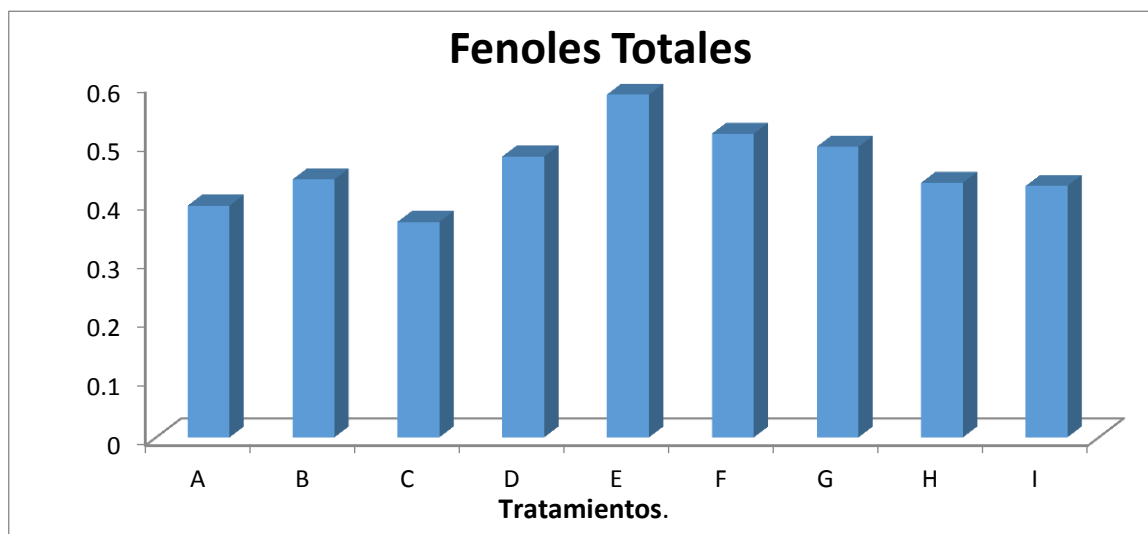


Figura 9. Contenido de fenoles totales en extractos de *Annona Muricata L.* con 9 diferentes tratamientos.

Donde el tratamiento E con concentraciones (100g vermicomposta, 2g de roca fosfórica y dilución 1:2 lixiviado de vermicomposta) se obtiene mejor contenido fenólico seguido de los tratamientos F (100g roca fosfórica, 3 g de roca fosfórica y dilución 1:1 lixiviado de vermicomposta) y observándose con menor contenido fenólico se ubica el tratamiento C (50g vermicomposta, 1g de roca fosfórica y dilución 1:1 lixiviado de vermicomposta).

Gavamukulya et al., 2014 demostraron que hay contenido fenólico en otra especie de *Annona* y que todos los resultados fueron expresados como EAG. Es decir los compuestos de fenólicos típicos que poseen actividad antioxidante han sido caracterizados como los ácidos fenólicos donde obtuvo así 37.6 mg/ml de estos compuestos con el mismo método que aquí se evaluó.

Es el caso que los fenoles están entre los compuestos poco enzimáticos y pueden ser obtenidos a partir de fuentes naturales y por lo cual han recibido un gran enfoque en su obtención.

En el cuadro observamos los datos estadísticos realizados y analizados con el programa “statgraphics” viéndose como el valor-P es menor de 0.05, es decir que indica que los tratamientos aplicados tienen un efecto significativo sobre la cantidad de fenoles totales de las hojas en la plantas con un 95.0% de nivel de confianza.

6.3 Estimación del contenido de flavonoides

La variación del contenido de flavonoides en extractos de hojas de guanábana se observa en la Figura 10. El mayor contenido de estos compuestos se halló en el tratamiento de la muestra E(100g de vermicomposta, 2g de roca fosfórica y dilución 2:1 de lixiviado) con 2.93 mg EQ/g seguido de la muestra A con 2.88 mg EQ/g y por ultimo la muestra H(50g de vermicomposta, 3g de roca fosfórica y dilución 3:1 de lixiviado) con 1.06 mg EQ/g.

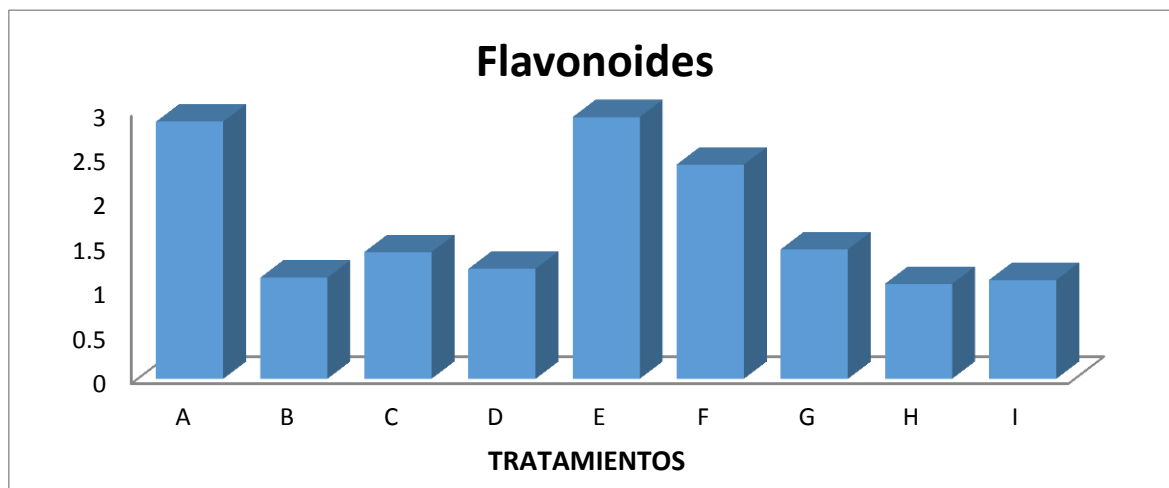


Figura 10. Contenido de flavonoides en extractos de *Annona Muricata L.* con 9 diferentes tratamientos

Viéndose que hay buen contenido de este tipo de compuesto metabólico con esta especie de planta con lo que comparado al utilizar la misma metodología con lo reportado en plantas del continente Asiático (Yu-Ling, 2012) donde obtuvieron valores de 1.2 a 7 mg EQ/g.

En el cuadro observamos que con los datos estadísticos obtenidos con valor-P es menor que 0.05, es decir que los tratamientos aplicados tienen un efecto significativo sobre la cantidad de flavonoides de las hojas en la plantas con un 95.0% de nivel de confianza.

6.4 Estimación del contenido de taninos condensados (Proantocianidinas)

La mayor concentración de estos metabolitos se halló en el tratamiento C(50g de vermicomposta, 1g de roca fosfórica y dilución 2:1 de lixiviado) con 0.24 mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de hojas (mg EC/g).

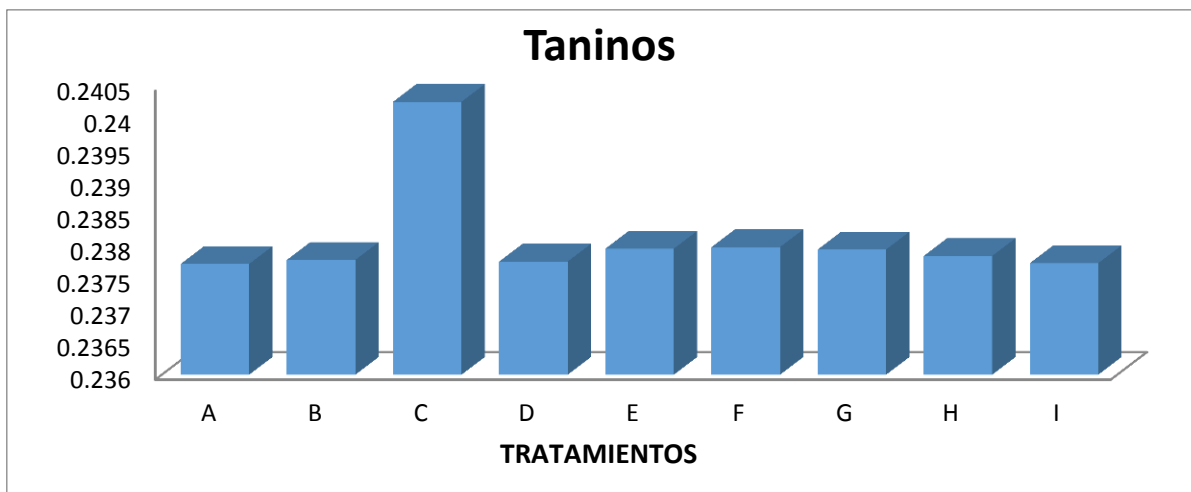


Figura 11. Contenido de Taninos Condensados (Proantocianidinas) en extractos de *Annona Muricata L.* en 9 diferentes tratamientos

La variación entre extracciones del contenido tánico puede deberse a la polaridad de los mismos compuestos, ya que al no ser glúcidos tienden a ser menos solubles en agua, pero se ha reportado su presencia cualitativa en extracciones alcohólicas (Ojo *et al.*, 2010; Hindumathy, 2011; Sha'a *et al.*, 2011) y acuosas (Negrelle y Gomes, 2007; Ojo *et al.*, 2010; Hindumathy, 2011; Sha'a *et al.*, 2011), y cuantitativa en una extracción metanólica (Pansera *et al.*, 2003)

Los datos de la composición de taninos presentados en esta investigación pueden sólo dar una idea del contenido total, así como secundar el hecho de la existencia de éstos en las extracciones analizadas, ya que de acuerdo a Sun *et al.* (1998) es recomendable separar catequinas de proantocianidinas en la muestra a analizar, de lo contrario el método es menos preciso. De acuerdo a los resultados de éste, factores como la acidez del medio, el tiempo de reacción y la cantidad de agua disminuyen la estabilidad del color de reacción (estabilidad de coloración).

6.5 Estimación del contenido de saponinas.

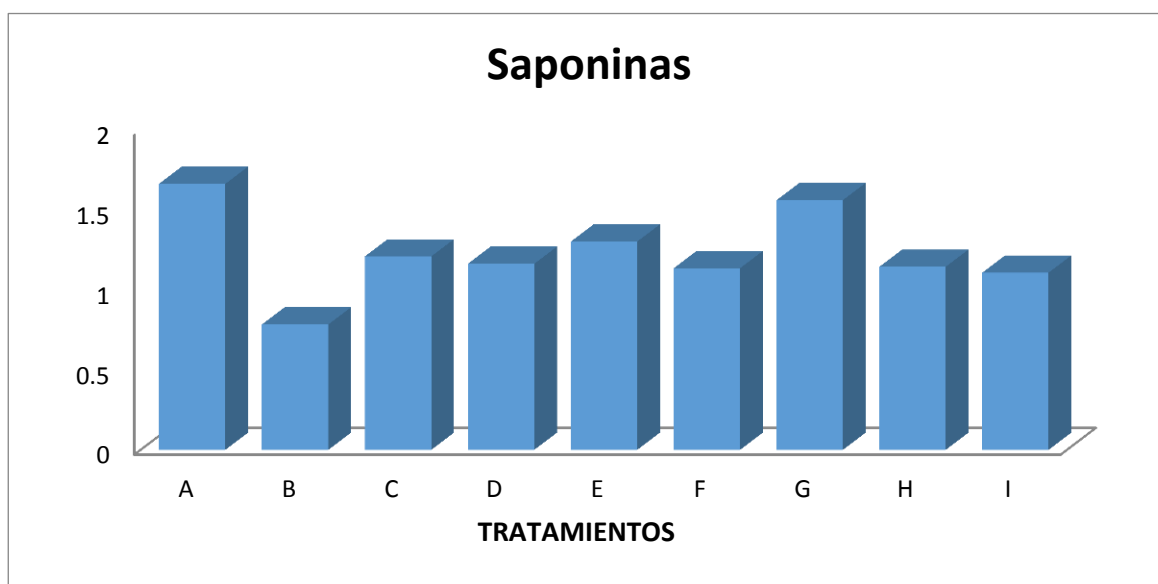


Figura 12. Contenido de saponinas en extractos de *Annona Muricata L.* en nueve tratamientos diferentes.

Por otro lado, la mayor concentración de estos tipo de metabolitos se halló en el tratamiento de la muestra A(100g de vermicomposta, 1g de roca fosfórica y dilución 3:1 de lixiviado) con 1.66 mg equivalentes de (+)-diosgenina por gramo de hojas (mg ED/g). seguido del tratamiento G del cual se obtuvo 1.5 mg equivalentes de (+)-diosgenina por gramo de hojas (mg ED/g) y con un bajo contenido de saponina en el tratamiento de la muestra B(50g de vermicomposta, 2g de roca fosfórica y dilución 1:1 de lixiviado).

Dentro de lo que cabe las saponinas son compuestos metabólicos que normalmente se hayan en diferentes partes de las plantas, por ello las saponinas son los compuestos del bioactivo más notables que demuestran muchas funciones biológicas, si bien la variación de este compuesto puede hallarse en diferente partes de la plantas. (Jau-Tien, 2007).

7 CONCLUSIONES

La presencia de metabolitos secundarios se vio influenciada por las diferentes tipos de concentraciones de cada uno de los insumos organicos.

El contenido total de metabolitos secundarios en hojas se vio afectado significativamente por lixiviado, roca fosfórica y vermicomposta demostrado en estudios anteriores sobre la aplicación de insumos organicos (Lujan-hidalgo et al 2016).

Para fenoles totales y flavonoides mostraron diferencias significativas entre los tres tratamientos de roca fosfórica, sin embargo la roca fosfórica tiene un efecto negativo sobre los compuestos de metabolitos secundarios ya que al incrementarse la cantidad de roca fosfórica hubo menos concentración de fenoles, flavonoides y saponinas en las hojas de guanabana. Comparando resultados con estudios anteriores también se vio afectado la concentración de metabolitos al incrementar la cantidad de roca fosfórica(Lujan-hidalgo et al 2016).

La mayor concentracion lo presento los flavonoides, después saponinas y fenoles totales en estos tres metabolitos las presencia de la vermicomposta con 100g fue la que marco los tratamientos mas altos y en cuanto a taninos el compuesto del que se obtuvo menor contenido, ya que el tratamiento que mas presento concetracion de taninos solo contenia 50g de vermicomposta pero con una concentracion de lixiviado 2:1 desmostrando que con un lixiviado menos diluido fue el tratamiento que mas contenido obtuvo.

El nivel de compuestos fenólicos en las plantas depende de su estado de madurez, variedad, almacenamiento y factores genéticos entre otros y puede estar presente en diferentes niveles en la misma planta cultivada en diferentes condiciones del suelo. Los compuestos fenólicos antioxidantes, especialmente los flavonoides, neutralizan las especies de oxígeno reactivo antes de que puedan dañar las células y la práctica de cultivo puede interferir con la cantidad de estos compuestos (Upadhyaya, Khatiwora y Lakhi 2010).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos puede depender de factores tales como las condiciones de crecimiento, calidad y origen (ubicación geográfica) de las plantas, así como los métodos de extracción y purificación (tipo y polaridad de los disolventes y condiciones de extracción (Moure et al. 2000).

El lixiviado tuvo diferencias significativas en sus tres tratamientos siendo la dilución 2:1 en combinación con la vermicomposta la que aportó mayor concentración de fenoles totales y flavonoides, descartando la dilución 3:1 ya que reduce la concentración de estos metabolitos. Sin embargo para las saponinas tuvo un mejor efecto la dilución 3:1 de lixiviado.

Una alternativa para disminuir los costos y la dependencia de fertilizantes sintéticos, es la utilización de algunos materiales orgánicos líquidos como el lixiviado de vermicomposta (Pant et al., 2009; Preciado et al., 2011), el cual puede ser aplicado en sistemas de riego presurizado (Shrestha et al., 2012) por lo que es de utilidad en sistemas de producción intensiva en ambientes protegidos, además de que promueve el reciclaje de residuos orgánicos.

La mayor concentración obtenida se ve reflejada en los tratamientos donde hubo mayor cantidad de vermicomposta, considerando esto el insumo que más aportó para las concentraciones de metabolitos secundarios. El suelo enriquecido con vermicomposta provee sustancias adicionales que no son encontradas en los fertilizantes químicos (Ansari and Ismail 2008).

Se ha demostrado que la acumulación de estos diversos metabolitos secundarios está influenciada por las interacciones entre el genotipo de la planta (especie y variedad dentro de la especie) y los factores ambientales, incluyendo la técnica de cultivo, la estación, el estrés abiótico y biótico y el estado nutricional (Downey et al., 2013).

Demostrando que la vermicomposta, roca fosfórica y lixiviado como insumos orgánicos tienen aportaciones significativas al contenido de metabolitos secundarios en plantas de Guanabana.

8 RECOMENDACIONES

La experiencia obtenida durante el desarrollo de este trabajo de investigación, aunada a la literatura revisada durante el mismo proceso, permite dar las siguientes recomendaciones:

- Un punto de gran interés sería el conocer la composición de metabolitos secundarios en extracción con solventes de diferente polaridad (no polar): acetato de etilo, éter de petróleo, acetona, entre otros. Esto permitiría una estimación con mayor precisión de la composición polifenólica de la planta.
- Debido a que la etapa fenológica juega un papel importante en la composición metabólica secundaria, sería un factor importante a controlar muestras con la misma edad de maduración, al igual que analizar distintas etapas.
- Se tiene poca información en la composición cuantitativa de taninos en esta especie vegetal, tema de sumo interés, ya que estos metabolitos son compuestos que se emplean de forma industrial.

9 BIBLIOGRAFÍA

Adeneye A & Agbaje E (2007). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. Journal of Ethnopharmacology 112, 440-444.

Andersen ØM & Markham KR (Eds.) (2006). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. USA: Taylor & Francis Group.

Andrade-Cetto, y Heinrich M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology 99: 325-348.

Ansari, A. A., and S. A. Ismail. 2008. Reclamation of sodic soils through vermitechnology. Pakistan Journal of Agricultural Research 21:92–97

Benezzer-Benezzer M, Castro-Mercado E & García-Pineda E (2008). La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 26, 56-61.

Burda S & Oleszek W (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (6), 2774-2779.

Cabrera Silva M, Lissi Gervaso E & Honeyman Mauro J (2006). Radiación Ultravioleta y Salud. Santiago de Chile: Universitaria.

Castañeda C, Ramos LE & Ibáñez V (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico 8, 56-72.

Cegarra, J. (1996). Compostaje de desecho orgánicos y criterios de calidad de compost. Ed Palmira

Chang CC, Yang MH, Wen HM & Chern JC (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drugs Analysis*, 10 (3), 178-182.

Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J & Schmeda-Hirschmann G (2005). Free radical scavenger and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2511-2517.

Dawidowicz AL & Olszowy M (2010). Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by β -caroteno bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant. *European Food Research and Technology*, 231, 835-840.

Devasagayam T, Tilak J, Bloor K, Sane KS, Ghaskadbi SS & Lele R(2004). Free radicals and antioxidants on human health: current status and future prospects. *JAPI*, 52, 794-804.

Dewick PM (2009). *Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach* (3rd ed.). UK: Wiley.

Dirzo R (1985). Metabolitos secundarios en las plantas ¿Atributos panglossianos o de valor adaptativo? *Ciencia* (36), 137-145.

Downey, P. J., L. H. Levine, M. E. Musgrave, M. McKeon-Bennett, and S. Moane. 2013. Effect of hypergravity and phytohormones on isoflavonoid accumulation in soybean (*Glycine max*.L.) callus. *Microgravity Science and Technology* 25:9–15

Duarte-Almeida JM, Dos Santos RJ, Genovese MI & Lajolo FM (2006). Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico E Método De Seqüestro De Radicais DPPH*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* , 446-452.

Durán RM & Borja Padilla R (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla, España.

Escobar Carbajal A.(2013) Usos potenciales del humus (abono organico lixiviado y solido) en la empresa fertilombriz.

Ferreira IC, Baptista P, Vilas-Boas M & Barros L (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100, 1511-1516.

Figueirinha A, Paranhos A, Pérez-Alonso JJ, Santos-Buelga C & Batista MT (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry* (110), 718-28.

Flanzy C (2003). *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos* (2 ed.). (Gómez AL, Quevedo JM, Vicente AM y Cenzano AM, Trads) París: Mundi-Prensa.

Fuentes, Yague, Joseluís. (2007). *La crianza de la lombriz roja*. Servicio de extensión agraria Madrid.Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Gavamukulya Y., Abou-Ellella F., Wamunyokoli F., AEI-Shemy H.,. (2014). Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 10.1016/S1995-7645(14)60258-3

Garcia Soto (2008) Evaluacion del metodo de propagacion y tipo de fertilizacion sobre la calidad fisico-quimicia de frutos de guanabana. (*Annona muricata* L.).

García DE (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27 (1), 1-12.

Gómez R. S., Angeles M., Antonio Méndez J. Et al. (2013) Uso de lixiviados de humus de lombriz para la producción de forraje verde. INIFAP

Gonzales-Esquinca A.R., Lunas-Cazares L.M., Gutiérrez-Jimenez J., et al., (2011). Anonáceas plantas antiguas, estudios recientes, UNICACH

González Fresnada Y, Peña Sánchez M, Sánchez Álvarez R & Santana JL (2001). Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas , 20, 16-20.

Hindumathy CK (2011). Invitro Study of Antibacterial Activity of *Cymbopogon citratus*. World Academy of Science, 74.

Jau-Tien L., Deng-Jye Y. (2007). Determination of steroidal saponins in different organs of yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). ELSEVIER. Food Chemistry 108 :1068–1074

Kruawan K & Kangsadalampai K (2006). Antioxidant activity, phenolic compound contents and antimutagenic activity of some water extract of herbs. Journal of Pharmaceutical Sciences, 30, 28-35.

Kulisic T, Rodonic A, Katalinic V & Milos M (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry (85), 633-640.

Kumar A, Abrol E, Koul S & Vyas D (2012). Seasonal low temperature plays an important role in increasing metabolic content of secondary metabolites in *Withania somnifera* (L.) Dunal and effects the time of harvesting. Acta Physiologiae Plantarum, 34, 2027-2031.

Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J & Fett R (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25 (4), 726-732.

Leite JR, V. Seabra ML, Maluf E, Assolant K, Suchecki D, Tufik S, Klepacz S, Calil H y Carlini EA (1986). Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *Journal of Ethnopharmacology*, 17, 75-83.

Luján-Hidalgo María Celina, Gómez-Hernández, Villalobos-Maldonado, Abud-Archila, Montes-Molina, EncisoSaenz, Ruiz-Valdiviezo & Gutiérrez-Miceli (2016): Effects of Vermicompost and Vermiwash on Plant, Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Mexican Pepperleaf (*Piper auritum* Kunth) Cultivated in Phosphate Rock Potting Media, *Compost Science & Utilization*

Martínez SA (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) En alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Memoria Doctoral, Universidad Complutense De Madrid; Facultad de Farmacia, Nutrición y Bromatología II, Madrid.

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM & Tuñón MJ (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17 (6), 271-278.

Martínez-Valverde I, Jesús Periago M & Ros G (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Lationamericanos de Nutrición*, 50 (1).

Miean KH & Mohamed S (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49 (6), 3106-3112.

Molyneux P (2004). The Use of the stable free radical diphenylpicryl-hidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26 (2), 211-219.

Moraes-de-Souza RA, Oldoni TL, Regitano-d'Arce MA & Alencar SM (2008). Actividad antioxidante y compuestos fenólicos en infusiones herbarias consumidas en Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 6 (1), 41-47.

Moure, A., D. Franco, J. Sineiro, H. Dominguez, M. L. Nuñez, and J. M. Lema. 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3890–3897

Negrelle R & Gomes E (2007). *Cymbopogon citratus* (DC:) Stapf: Chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 91, 80-92.

Peñarrieta JM, Alvarado JA, Akesson B & Bergenstahl B (2007). Separation of phenolic compounds from foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Revista Boliviana de Química*, 24 (1).

Ojo O, Anibijuwon I & Ojo O (2010). Studies on Extracts of Three Medicinal Plants of South-Western Nigeria: *Hoslundia opposita*, *Lantana camara* and *Cymbopogon citratus*. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 4 (1), 93-98.

Pant, A. P., T. J. K. Radovich, N. V. Hue, S. T. Talcott, and K. A. Krenek. 2009. Vermicompost extracts influence growth, mineral nutrients, phytonutrients and antioxidant activity in pakchoi (*Brassica rapa* cv. Bonsai, Chinensis group) grown under vermicompost and chemical fertilizer. *J. Sci. Food Agric.* 89: 2383-2392

Pansera MR, Santos ACA, Paese K, Wasum R, Rossato M, Rota LD, Pauletti GF & Serafini LA (2003). Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais

cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 13 (1), 17-22.

Pereira RP, Fachinetto R, Prestes A, Puntel RL, Santos da Silva GN, Heinzmann BM, et al. (2009). Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemistry Research*, 34, 973-983.

Pérez-Trueba G (2003). Los flavonoides: antioxidantes o pro-oxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22 (1), 48-57.

Preciado R., P., M. Fortis H., J. L. García H., E. Rueda P., J. R. Esparza R., A. Lara H., M. A. Segura C. y J. Orozco V. 2011. Evaluación de soluciones nutritivas orgánicas en la producción de tomate en invernadero. *Interciencia* 36: 689-693

Rubio D, Gobbo-Neto L, Sakamoto HT, Peprine Lopes N & Callegari JL (2012). Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniaeae) LEAVES. *Química Nova*, 35 (11), 2139-2145.

Sha'a KK, Oguche S & Ajayi JA (2011). The in vivo analgesic activity of aqueous and ethanolic extracts of *Anacardium occidentale* Linn and *Cymbopogon citratus* DC. *Journal of Medicine in the Tropics*, 13 (2), 115-118.

Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B & Man A (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2 (1), 3-8.

Sharma OP & Bhat KT (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* (113), 1202-1205.

Singleton V, Orthofer R & Lamuela-Raventós R (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178.

Shrestha, K., K. Walsh, and D. Midmore. 2012. Microbially enhanced compost extract: Does it increase solubilisation of minerals and mineralisation of organic matter and thus improve plant nutrition. *J. Biorem. Biodegrad.* 3: 2155-6199.

Sun B, Ricardo-da-Silva JM & Spranger I (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4274.

Suryanto E & Katja DG (2008, Octubre). Singlet oxygen quenching activities of phenolic extract from lemon grass leaves (*Cymbopogon citratus* Stapf). *The International Seminar on Chemistry* , 500-506.

Szöllösi R & Szöllösi Varga I (2002). Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation fo FRAP method). 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 46 (3-4), pp. 125-127. Hungary.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L & Byrne DH (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.

Upadhyaya, S., E. Khatiwora, and R. S. Lakhi. 2010. Comparison of total phenol and flavonoid content in *Adhatoda vasica* Nees.: Grown using different organic manure. *Journal of Pharmacy Research* 3:2408–2409

Venereo Gutiérrez JR (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar*, 2 (31), 126-133.

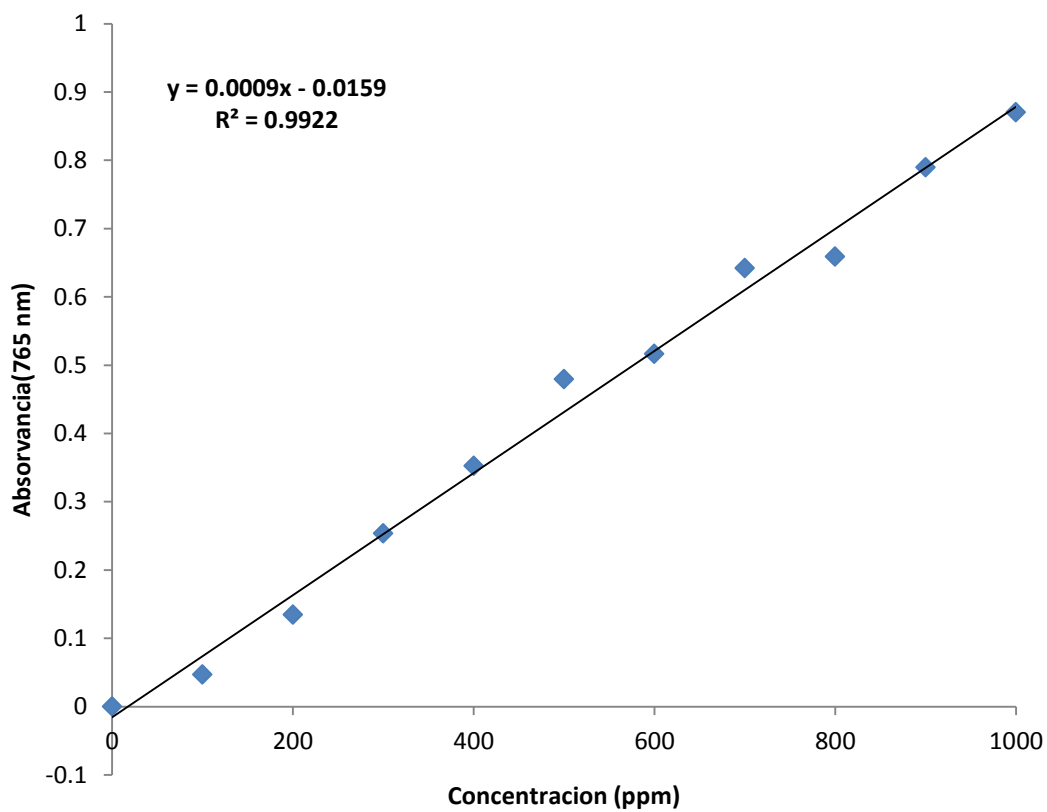
Vidal Quintanar RL (2008). Protección antioxidante en los alimentos. Revista Universidad De Sonora , 26-28.

Waterhouse AL (2002). Determination on total phenolics. Wiley.

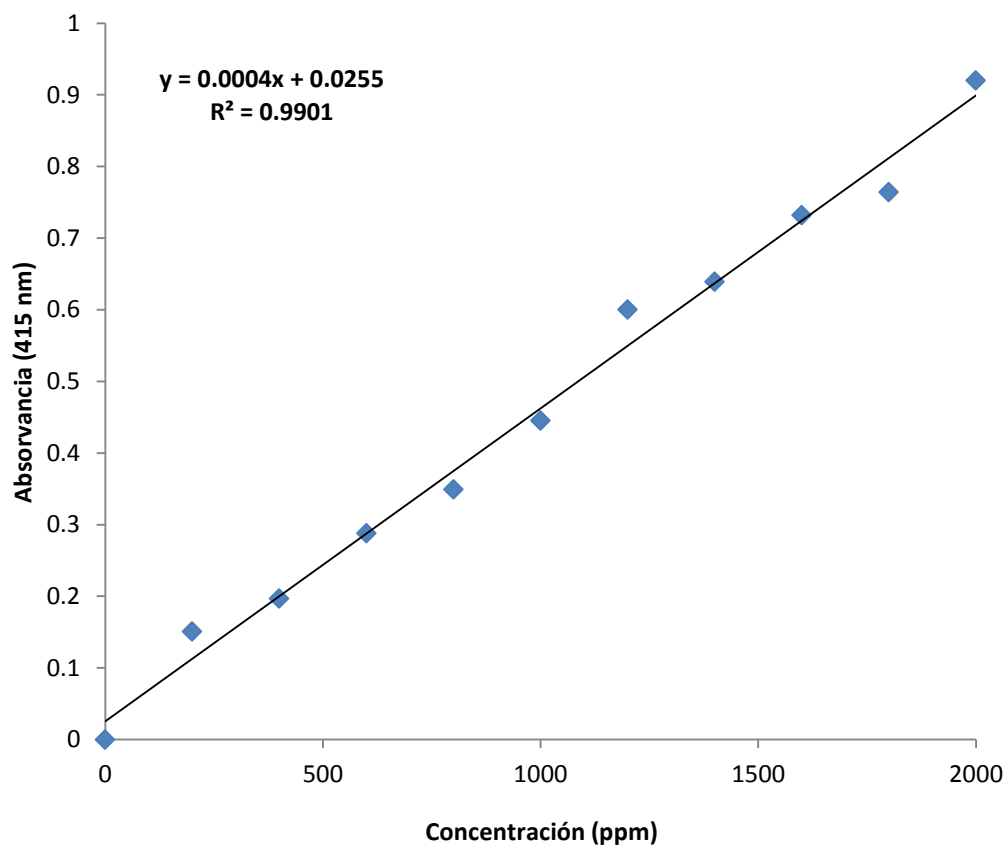
Yoo KM, Lee CH, Lee H, Moon B& Lee CY (2007). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Food Chemistry, 106, 926-936.

ANEXOS

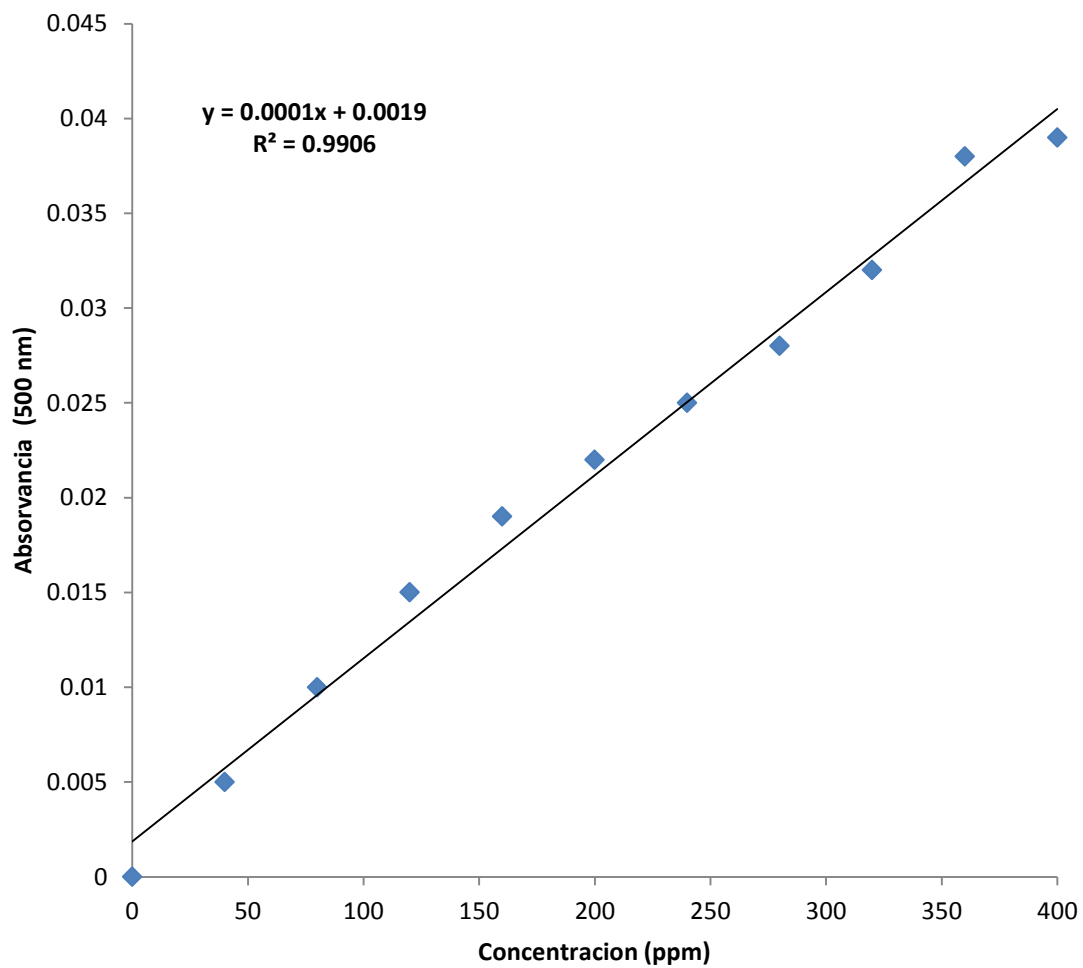
ANEXO I. Curva Estándar de Ácido Gálico (Método de Folin Ciocalteu). Cuantificación de Fenoles Totales.



**ANEXO II. Curva estándar Quercetina (Método de Cloruro de Aluminio):
Cuantificación de de Flavonoles y Flavonas.**



ANEXO III. Curva Estándar de (+)-Catequina. Determinación de Taninos Condensados (proantocianidinas) de acuerdo a Sun *et al.* (1998).



ANEXO IV. Curva Estándar de diosgenina. Determinación de Saponinas esteroideas de acuerdo al método descrito por Qin et al. (2009).

