



UNIVERSIDAD DE MATANZAS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Propiedades fitoquímicas, antioxidante y antibacteriana de extractos de *Annona muricata* L.



Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo

Autora: Lázara Lilianni Vinent Pérez

Tutores: MSc. Conrado Camacho Campos

MSc. Yunel Pérez Hernández

Julio, 2018

*“Cualquier fracaso que podamos
sufrir en la vida, lo podemos
convertir en un pequeño éxito
si seguimos el camino adecuado.*

¡Sigue caminando!

Michelangelo Saez.

Declaración de Autoridad

Declaro que yo, **Lázara Lilianni Vinent Pérez**, soy la única autora de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo con la finalidad que estime pertinente.

Firma

DEDICATORIA

A mi familia, que es lo más grande y preciado que tengo en este mundo, sin ellos no soy nada.

A las deidades que han guiado mi camino y mi espíritu.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, que con tanto esfuerzo se mantuvo firme a mi lado dándome siempre su apoyo incondicional y en momentos realmente estresantes brindándome la tranquilidad.

A mi padre que en momentos difíciles, siempre confió en mí.

A mi hermano que siempre me brida su risa y me alegra el día.

A mis tíos que me brindaron las herramientas necesarias y fueron de suma importancia en mi preparación.

A todos ellos mis más sinceros agradecimientos.

OPINIÓN DEL TUTOR

Hacemos constar que el Trabajo de Diploma presentado en opción al título de Ingeniero Agrónomo titulado: “Propiedades fitoquímicas, antioxidante y antibacteriana de extractos de *Annona muricata* L.” es resultado de una consagrada labor investigativa de la aspirante Lázara Lilianni Vinent Pérez.

El uso de fitofármacos para el tratamiento de enfermedades microbianas constituye una temática de interés para las ciencias médicas y veterinarias. El uso excesivo de antibióticos convencionales durante décadas ha incrementado la resistencia a dichos productos y constituye un elemento de atención a nivel mundial. Por ello, la búsqueda de nuevos candidatos terapéuticos de origen vegetal, representan una vía económica sostenible y de fácil acceso a los habitantes de todas las regiones del planeta.

Durante este tiempo la aspirante ha demostrado capacidad para dar respuesta a cada tarea que se le planteó y se superó de manera autodidacta en temáticas como la fitoquímica de las plantas y procedimientos bioquímicos de laboratorio, que le permitieron aportar al desarrollo de la investigación y concluir esta etapa de su vida académica. Además, ha desarrollado un grupo de habilidades que le permitirán desempeñarse como una futura Ingeniera Agrónoma.

La bibliografía fue adecuadamente consultada y los resultados pueden presentarse como artículos científicos y en eventos relacionados con el tema.

Quisiéramos plantear que, dada nuestra condición de Tutores, asumimos nuestra total responsabilidad con los aciertos y dificultades que este trabajo pudiera presentar

Tutores:

MSc. Conrado Camacho Campos

MSc. Yunel Pérez Hernández

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las propiedades fitoquímicas, antioxidantes y antibacterianas de extractos de hojas de *Annona muricata* L. (guanábana), presentes en la provincia de Matanzas. Para ello, las hojas de plantas sanas fueron lavadas y secadas en estufa a 45°C y luego maceradas. Las extracciones se realizaron en etanol 90% y agua destilada y las mezclas se filtraron y concentraron. Se determina la presencia de varias familias de metabolitos secundarios y se cuantifica el contenido de proteínas, carbohidratos solubles totales, azúcares reductores y polifenoles solubles. Se evalúa la actividad antimicrobiana mediante la técnica de los pocillos, contra especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. La caracterización fitoquímica de los extractos mostró la presencia de terpenos, flavonoides, taninos, cumarinas y saponinas, los cuales poseen diversas actividades biológicas. El etanol resultó ser un mejor disolvente que el agua para la extracción de los metabolitos secundarios. La presencia de compuestos polifenólicos sugiere el uso de la *Annona muricata* L. como candidato farmacéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Se determinaron las concentraciones de azúcares reductores, carbohidratos y proteínas para esta especie como parte de la caracterización fitoquímica general. El extracto etanólico de hojas mostró una actividad antibacteriana notable frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Proteus* sp., lo que indica un uso potencial de los extractos de *Annona muricata* L. para el tratamiento de enfermedades infecciosas y relacionadas con el estrés oxidativo en humanos y animales.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Importancia de las plantas como fuente de metabolitos secundarios con fines médicos, farmacéuticos y agropecuarios.....	4
2.2. Propiedades funcionales de los metabolitos secundarios de plantas	6
2.2.1. Aspectos generales sobre el origen y las propiedades de los metabolitos secundarios.	6
2.2.1.1. Terpenos.....	7
2.2.1.2. Compuestos polifenólicos	8
2.2.1.2.1. Flavonoides.....	9
2.2.1.2.2. Antocianinas (flavonoides).....	10
2.2.1.2.3. Ácidos fenólicos.....	11
2.2.1.2.4. Cumarinas.....	11
2.2.1.2.5. Taninos.....	11
2.2.1.2.6. Propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos ...	12
2.2.1.3. Compuestos nitrogenados	12
2.2.1.3.1. Alcaloides.....	13
2.2.1.3.2. Glucósidos.....	13
2.3. Familia Annonaceae.....	13
2.4. La guanábana (<i>Annona muricata</i> L.).....	14
2.4.1. Clasificación taxonómica.	14
2.4.2. Origen y características botánicas de <i>Annona muricata</i> L.....	14
2.4.3. Principales usos etnobotánicos de <i>Annona muricata</i> L.....	16
2.4.4. Estudios fitoquímicos de <i>Annona spp</i>	17
2.4.5. Propiedades antibacterianas y fungicidas de extractos de <i>Annona spp</i>	18
2.4.6. Propiedades antioxidantes de extractos de <i>Annona muricata</i> L....	21
2.4.7. Propiedades citotóxicas de <i>Annona muricata</i> L.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Selección, identificación y caracterización del material vegetal.....	24
3.2. Preparación de los extractos.....	25
3.3. Análisis fitoquímico de los extractos.....	26

3.3.1. Análisis cualitativo de metabolitos secundarios.....	26
3.3.2. Carbohidratos solubles totales.....	28
3.3.3. Cuantificación de azúcares reductores	28
3.3.4. Contenido de proteínas solubles totales	28
3.3.5. Cuantificación de fenoles solubles, ligados a pared celular y totales.....	28
3.4. Ensayo de actividad antimicrobiana.....	29
3.5. Diseño experimental y análisis estadístico.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. Caracterización fitoquímica.....	31
4.2. Contenido de metabolitos primarios.....	35
4.2.1 Carbohidratos solubles totales y azúcares reductores.....	35
4.2.2 Contenido de proteínas solubles totales.....	36
4.2.3 Contenido de polifenoles.....	37
4.3 Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de <i>A. muricata</i> L	40
4.4 Valoración económica-ambiental del uso de los extractos de <i>Annona muricata</i> L.....	44
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	62

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, las plantas se utilizan para el tratamiento de numerosas enfermedades y en la actualidad, aproximadamente un 25% de las drogas son derivadas de plantas y otras son sintéticos análogos construidos a partir de compuestos prototipos aislados de plantas. En muchas comunidades en países subdesarrollados, las plantas medicinales constituyen la base principal para combatir las enfermedades; ya sea por cuestiones culturales o por el costo elevado de muchos de los medicamentos (Tamilselvan *et al.*, 2014).

La búsqueda creciente de plantas con valores medicinales permite día a día incrementar el conocimiento sobre las propiedades invaluable de muchas especies vegetales y su explotación para el tratamiento de numerosas patologías (Ekaluo *et al.*, 2015a). Estas propiedades están relacionadas con la presencia de compuestos fitoquímicos, que debido a la naturaleza vegetal de los mismos, son generalmente seguros para el consumo, más accesibles y de bajo costo (Ikpeme *et al.*, 2014; Ekaluo *et al.*, 2015b).

La resistencia a antibióticos comerciales constituye uno de los problemas más serios y generalizados en el mundo, tanto en hospitales como en comunidades y provoca una mortalidad elevada cada año (Gyles, 2011). El uso inapropiado de estos fármacos es el factor que más influye en la resistencia a antibióticos, lo que hace ineficaces y costosos los tratamientos médicos y pueden conducir a la muerte del paciente (Djeussi *et al.*, 2013; WHO, 2014).

En muchos animales afectivos o de interés zootécnico, el problema de la resistencia a antibióticos también es una situación patente; lo cual provoca pérdidas económicas cuantiosas, debido a la incidencia elevada de enfermedades con base infecciosas como la mastitis, que disminuye la calidad y el precio de la leche (Gasque, 2015). Por estas razones, se buscan constantemente nuevas clases de antibióticos de origen vegetal para reducir el fenómeno de la resistencia bacteriana a estos compuestos (Wikaningtyas y Sukandar, 2016).

La guanábana (*Annona muricata* L.) constituye una especie con una tradición amplia como planta medicinal, cuyo uso data desde la etapa precolombina en América Central (Singh *et al.*, 2014). Las investigaciones relacionadas con la composición fitoquímica de esta especie y otras anonáceas, refieren la presencia de numerosos metabolitos secundarios con propiedades bioactivas como flavonoides, acetogeninas, taninos, vitamina C, polifenoles, saponinas, alcaloides, β -carotenos, que pueden tener diversas propiedades farmacológicas como antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes y antibacterianas, entre otras (Usunomena y Paulinus, 2016; Kumar, 2017; Robert *et al.*, 2018). El estudio químico y biológico de ejemplares de *Annona muricata* L. presentes en la provincia, contribuirá a valorar las potencialidades de la misma para el tratamiento de patologías asociadas a procesos infecciosos y al estrés oxidativo en humanos y animales de interés zootécnico.

Problema científico:

Se desconocen las propiedades fitoquímica, antioxidantes y antibacteriana de extractos de hoja de *Annona muricata* L. presentes en la provincia de Matanzas.

Hipótesis científica:

La caracterización fitoquímica, antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de *Annona muricata* L. presentes en la provincia de Matanzas, permitirá tener una valoración de las potencialidades que presenta esta especie, para su uso en el tratamiento de enfermedades bacterianas y relacionadas con el estrés oxidativo en humanos y animales de interés zootécnico.

Objetivo general:

Evaluar las propiedades fitoquímica, antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de plantas de *Annona muricata* L. presentes en la provincia de Matanzas.

Objetivos específicos:

- Caracterizar la composición fitoquímica de extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L.
- Determinar las propiedades antioxidantes de extractos acuosos y etanólicos hojas de *Annona muricata* L.
- Determinar el efecto antibacteriano de extractos de hojas de *Annona muricata* L. frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importancia de las plantas como fuente de metabolitos secundarios con fines médicos, farmacéuticos y agropecuarios

Las plantas medicinales se exploran desde la antigüedad desde el punto de vista terapéutico para aliviar enfermedades humanas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 80% de los países en desarrollo como Brasil, China, la India y Tailandia, utilizan la medicina tradicional como base fundamental y el 85% emplean plantas o sus extractos como sustancias activas.

Se estima actualmente que existen aproximadamente 420 000 especies de plantas en la naturaleza, de las cuales un grupo se consideran plantas medicinales ya que producen uno o más constituyentes activos, capaces de prevenir o curar enfermedades. Estas plantas contienen un rango de compuestos efectivos y pueden producir diferentes efectos de acuerdo a la vía de aplicación de la droga (Jayaprakash, 2017).

En la actualidad se realizan numerosos estudios relacionados con la identificación de compuestos bioactivos nuevos, obtenidos a partir de extractos de plantas medicinales. Se conoce que las plantas constituyen un reservorio de metabolitos secundarios que son explotados como fuente de sustancias activas para varios propósitos médicos.

Los metabolitos secundarios de las plantas tienen una aplicación amplia en las industrias farmacéutica y alimentaria, en el sector agropecuario, en la medicina y en estudios de ciencias básicas (Ngo *et al.*, 2013). En las últimas dos décadas, cerca de las dos terceras de los medicamentos nuevos aprobados fueron obtenidos a partir de productos naturales de las plantas (Newman y Cragg, 2007). Entre los medicamentos disponibles obtenidos por esta vía se pueden citar la artemisinina (Njuguna *et al.*, 2012), el paclitaxel (Qi *et al.*, 2013) y la camptotecina (Mollica *et al.*, 2012), entre otros.

El interés por las especies vegetales ricas en metabolitos secundarios con propiedades farmacéuticas y medicinales aumenta cada día, debido a que numerosos autores determinaron que existe una correlación entre los usos tradicionales de las plantas y la presencia de compuestos bioactivos que justifican sus propiedades biológicas (Consolación *et al.*, 2014). Además, constituye una vía para resolver el problema de la resistencia a antibióticos convencionales, que representa una de las cuestiones a resolver más importantes que enfrenta la medicina moderna.

El problema de la resistencia a antibiótico es un problema mundial. Hasta la fecha, no se conoce ningún método disponible para revertir la resistencia a antibióticos en las bacterias. El descubrimiento y desarrollo del antibiótico penicilina durante el siglo pasado, ofreció esperanza a las ciencias médicas; sin embargo, este antibiótico es inefectivo contra la mayoría de las bacterias susceptibles (Chandra *et al.*, 2017).

La resistencia a antibióticos en las bacterias es un fenómeno natural y un mecanismo que presentan estos microorganismos para enfrentar y adaptarse a los agentes antibacterianos. Cuando una bacteria adquiere resistencia frente a un determinado antibiótico, esta propiedad genética pasa a la descendencia. El uso indiscriminado e irracional de los antibióticos provoca la formación de nuevas cepas resistentes, las cuales pueden considerarse más letales que las formas parentales (Iwu *et al.*, 1999).

Los cambios en la constitución genética de las bacterias que adquieren resistencia es tan rápido, que la efectividad de los antibióticos comunes puede anularse en períodos cortos de cinco años (Bush, 2004). La Organización Mundial de la Salud mostró su preocupación en el caso de las infecciones bacterianas letales como las respiratorias y las que provocan diarrea, meningitis, tuberculosis, entre otras (WHO, 2002).

Entre los microorganismos referidos como casos de resistencia a antibióticos está *Staphylococcus aureus*. Los estudios con cepas clínicas aisladas de pacientes mostraron resistencia a más de tres antibióticos y por ello son consideradas cepas de resistencia múltiple (Styers *et al.*, 2006).

Los microorganismos desarrollan la resistencia a antibióticos por varias vías como la inactivación de estos por acción de enzimas hidrolíticas (Wright, 2005; Wilke *et al.*, 2005), modificación e inactivación de la estructura de los antibióticos (fosforilación, acetilación, adelinación) (Bush y Fisher, 2011) y mecanismos de transporte a nivel de membrana que permite la expulsión de los antibióticos hacia el medio exterior (Lin *et al.*, 2002).

2.2. Propiedades funcionales de los metabolitos secundarios de plantas

2.2.1. Aspectos generales sobre el origen y las propiedades de los metabolitos secundarios

Las plantas producen numerosos compuestos orgánicos derivados del metabolismo primario denominados metabolitos secundarios. Estos compuestos, a diferencia de los metabolitos primarios, no tienen una función directa en procesos vitales como la fotosíntesis, la respiración celular, la síntesis de proteínas, el transporte de solutos y la asimilación de nutrientes (Olivoto *et al.*, 2017). La síntesis de un metabolito secundario específico no se observa en todas las especies del reino de las plantas, sino que es restringido a una o a pocas especies (Taiz y Zeiger, 2010).

La importancia de los metabolitos secundarios tardó mucho tiempo en esclarecerse. El avance de la tecnología, en especial la secuenciación y la edición de genes del genoma de diferentes especies, permitió dilucidar las funciones de estos compuestos (Wu *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2015; Bortesi y Fischer, 2015). Hoy se conoce con seguridad las funciones importantes pero no vitales de estos compuestos, tales como la protección contra hongos, insectos y bacterias patógenas; proporcionar características atractivas a los polinizadores como color, hedor y sabor y en la dispersión de las semillas. También actúan como componentes químicos principales en la competencia planta-planta y en la simbiosis planta-microorganismo. Sin embargo, los mismos metabolitos que potencian el desarrollo de las plantas, pueden también hacer indeseables a estas especies para el consumo humano (Olivoto *et al.*, 2017).

La producción de los metabolitos secundarios por las plantas depende, al igual que muchos otros caracteres cuantitativos de las plantas, de la interacción genotipo – ambiente. Esta interacción está basada fundamentalmente en las variaciones de los elementos meteorológicos como la temperatura, la humedad, las características del suelo, etc. (Gurung *et al.*, 2011).

Los metabolitos secundarios se dividen en tres grupos químicos fundamentales: los terpenos, los compuestos fenólicos y los compuestos nitrogenados. A continuación se describen las características y funciones generales de estos compuestos.

2.2.1.1. Terpenos

Los terpenos son conocidos también como isoprenoides y constituyen una clase amplia de metabolitos secundarios que contiene aproximadamente unas 50 000 sustancias identificadas (Vranová *et al.*, 2012). Estos compuestos se forman por la unión de cinco unidades de carbono que tiene una ramificación hidrocarbonada. Se dividen en monoterpeno (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos) y diterpenos (20 carbonos). Los terpenos de mayor peso molecular son los triterpenos, los tetraterpenos y los politerpenos con 30, 40 y más de 40 carbonos, respectivamente (Taiz y Zeiger, 2010).

Muchas plantas tienen una mezcla de terpenos con compuestos volátiles que confieren un olor característico. Entre estas especies están el limón (*Citrus limonum* L.), la menta (*Mentha arvensis* L.) y la salvia (*Salvia officinalis* L.), entre otras. Estos compuestos conocidos como aceites esenciales pueden ser extraídos de las plantas y son comercialmente importantes en las industrias farmacéuticas, de alimentos y cosméticos (Olivoto *et al.*, 2017). Algunos terpenos muestran funciones importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas como las giberelinas (diterpenos) y los brasinoesteroides (triterpenos). Aunque algunos terpenos tienen importancia metabólica, una parte importante de estos compuestos están asociados básicamente con la defensa de muchas plantas contra herbívoros e insectos (Veitch *et al.*, 2008), nemátodos (Soriano *et al.*, 2004), hongos (Franceschi *et al.*, 2005) y además, son utilizados como

materia prima para la elaboración de un rango amplio de productos industriales (Hall *et al.*, 2013).

La síntesis de los terpenos puede ser inducida por factores ambientales tales como la temperatura, las radiaciones y la evotranspiración de las plantas (Rodríguez-García *et al.*, 2015), por la aplicación exógena de estimulantes químicos como los jasmonatos (Dar *et al.*, 2015) o por daños mecánicos (Ruel *et al.*, 1998).

2.2.1.2. Compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. Los polifenoles presentan como característica de su estructura molecular uno o varios anillos fenólicos. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Kefeli *et al.*, 2002; 2003).

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares puede deberse, en parte, a las características fisicoquímicas de estas sustancias, que les permite participar en distintas reacciones metabólicas de oxidación-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos (Quiñones *et al.*, 2012).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan los mismos. Los principales grupos de polifenoles son: los ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), los estilbenos, los lignanos, los alcoholes fenólicos y los flavonoides (Figura 1).



Figura 1. Estructura química de diferentes compuestos fenólicos.

Fuente: <http://blog.cromlab.es/compuestos-fenolicos-en-aceite-de-oliva-virgen/>

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario ocurre a través de dos rutas primarias importantes: la vía del ácido siquímico y la vía de los poliacetatos (Bravo, 1998). La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) (Anexo 1). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas.

2.2.1.2.1. Flavonoides

Los flavonoides constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. Se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (llamados agliconas flavonoides). Existen varios subgrupos de flavonoides, entre los que están: flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonas y antocianidinas (Quiñones *et al.*, 2012) (Figura 2).

Estos compuestos desempeñan un papel importante en la biología vegetal ya que responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y el proceso de diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización. Otra propiedad que poseen es la capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

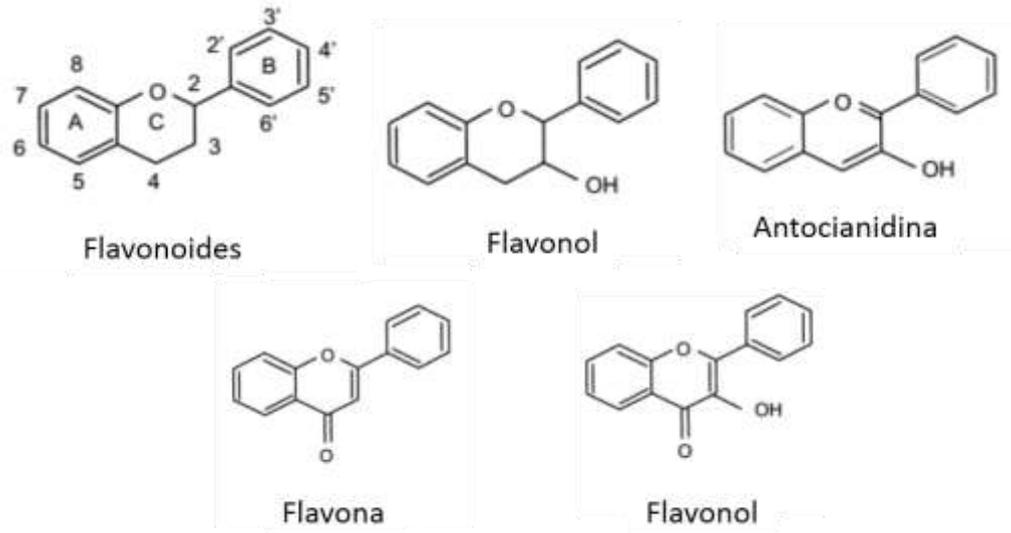


Figura 2. Estructura básica y tipos de flavonoides.

Fuente: Martínez-Flórez *et al.* (2002)

Algunos polifenoles son específicos de determinados alimentos (flavanonas en cítricos, isoflavonas en soja); otros, como la quercetina, se pueden encontrar en un gran número de plantas (frutas, vegetales, cereales, leguminosas, té, vino, etc.). Los alimentos contienen generalmente una mezcla compleja de polifenoles. Además, numerosos factores medioambientales como la luz, el grado de madurez o el grado de conservación, pueden afectar al contenido total de polifenoles. El clima (exposición al sol, precipitaciones, etc.) o factores agronómicos (diferentes tipos de cultivos, producción de fruta por el árbol, etc.) tiene un efecto importante. La exposición a la luz es uno de los principales condicionantes para determinar el contenido de la mayoría de los polifenoles (Quiñones *et al.*, 2012).

2.2.1.2.2. Antocianinas (flavonoides)

Estos compuestos están dentro de los flavonoides más importantes y confieren coloraciones entre rojo y púrpura, por lo cual actúan como agentes que atraen a los polinizadores (Sivankalyani *et al.*, 2016). Cuando están presentes en la dieta humana actúan como antioxidantes (Homoki *et al.*, 2016).

2.2.1.2.3. Ácidos fenólicos

Se caracterizan por estar formados por un anillo de benceno, un grupo carboxilo y uno o más grupos hidroxilos en la molécula, lo que le confiere propiedades antioxidantes y la posibilidad de ser utilizadas en el tratamiento y prevención de un grupo numeroso de enfermedades como el cáncer (Chang *et al.*, 2015; Espinosa *et al.*, 2015; Heleno *et al.*, 2015; Kurth *et al.*, 2015).

2.2.1.2.4. Cumarinas

Las cumarinas están constituidas por anillos fusionados de benceno y dipirona con una gran importancia terapéutica. En dependencia de la configuración que presenten es la capacidad de estas sustancias para regular vías celulares relacionadas con las citotoxicidad (Thakur *et al.*, 2015), la actividad antibacteriana (Widelski *et al.*, 2009); así como otras funciones del sistema nervioso central (Skalicka-Woźniak *et al.*, 2015).

2.2.1.2.5. Taninos

Los taninos se consideran uno de los grupos de metabolitos secundarios de mayor importancia en la defensa de las plantas (Adamczyk *et al.*, 2013). Se distinguen dos categorías para estos compuestos: los taninos condensados (formados por la adición de flavonoides constituyentes de la madera de las plantas leñosas) y los taninos solubles, que son polímeros que presentan ácidos fenólicos y azúcares simples (Taiz y Zeiger, 2010).

Los herbívoros tales como el ganado, el ciervo, los monos y los pájaros, evitan el consumo de plantas o partes de éstas que tienen concentraciones elevadas de taninos. Diversos estudios demostraron que la interacción de estos compuestos con proteínas, determinan la selectividad de algunos herbívoros por determinadas plantas (Zungu y Downs, 2015).

Las concentraciones de taninos en las estructuras reproductoras y en frutas inmaduras son relativamente altas, y disminuyen durante la maduración (Robil y Tolentino, 2015). La distribución específica tanto espacial como temporal de los taninos puede indicar la función protectora que tienen los mismos con las

diferentes partes de la planta y una obvia adaptación para hacer más palatable el fruto, sólo cuando está fisiológicamente maduro con la presencia de semillas viables. Este mecanismo permite el éxito en la dispersión de algunas especies.

Estudios recientes indican un posible uso de estos compuestos en el mejoramiento de la calidad de algunos productos alimenticios. La adición de aislados específicos de taninos en la harina de comer, mejoró sus propiedades, ya que aumentaron las interacciones proteínas carbohidratos, lo que produjo un gluten más compacto (Wang *et al.*, 2015).

2.2.1.2.6. Propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos

Los polifenoles son los principales antioxidantes de la dieta y su ingesta es 10 veces superior a la vitamina C, y 100 veces superior a la vitamina E o los carotenoides (Rice-Evans y Miller, 1996).

Los flavonoides como la catequina o la quercetina pueden neutralizar directamente las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el O_2^- , eH_2O_2 (Binsack *et al.*, 2001) o el $HClO^-$ (Cotelle *et al.*, 1996). El grupo fenólico presente en su estructura puede capturar los electrones desapareados de las ERO, y transformar estas especies en compuestos menos reactivos (Korkina y Afanas, 1997). Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones, y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, mucho menos reactivo, ya que en él los electrones desapareados están más deslocalizados. Además, los flavonoles como la quercetina pueden quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, lo que evita la formación de las ERO producidas por la reacción de Fenton, donde el hierro puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para producir el potente radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Krinsky *et al.*, 1992).

2.2.1.3. Compuestos nitrogenados

Existen numerosos metabolitos secundarios que presentan nitrógeno en sus estructuras químicas. Los principales compuestos nitrogenados que se encuentran en las plantas son los alcaloides, los glucósidos y los aminoácidos no proteicos (Taiz y Zeiger, 2010).

2.2.1.3.1. Alcaloides

Constituyen un grupo numeroso de más de 15000 sustancias que se encuentran en el 20% de las plantas vasculares. Estos compuestos se caracterizan generalmente por la presencia de un átomo de nitrógeno en estado oxidado dentro de un anillo heterocíclico. Estos compuestos tienen la función principal de defensa en las plantas, debido a su toxicidad y a la capacidad de inhibir en el animal de deseo de consumo de aquellas plantas ricas en alcaloides (Wink, 1988).

De manera general, todos los alcaloides son tóxicos para los humanos si son ingeridos en cantidades suficientes; sin embargo, muchos de estos compuestos se emplean en la medicina como drogas y se comercializan con cifras en el orden de los miles de millones de dólares (Julsing *et al.*, 2006).

2.2.1.3.2. Glucósidos

Los glucósidos también actúan en la protección de las plantas. Se dividen en dos grupos, los glucósidos cianogénicos y los glucosinolatos. Los primeros no son tóxicos en su estado natural. Se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas, mientras que las enzimas responsables de la síntesis del gas tóxicos están en el mesófilo (Poulton, 1990). Cuando las plantas son dañadas físicamente, los glucósidos cianogénicos (dentro de la vacuola) son mezclados con las enzimas hidrolíticas (presentes en el mesófilo) y se produce cianuro de hidrógeno volátil (Taiz y Zeiger, 2010).

2.3. Familia Annonaceae

La familia Annonaceae es la más numerosa del orden Magnoliales con 80 géneros y más de 850 especies. Presenta árboles y arbustos aromáticos con hojas alternas dísticas dispuestas sobre un mismo plano y sin estípulas. Habitan casi exclusivamente en regiones tropicales y son abundantes en América. Tienen la corteza gruesa con tejidos secretores de sustancias aromáticas.

Las flores son solitarias, grandes, bisexuales o rara vez unisexuales con el perianto cíclico de dos a tres verticilos de tres piezas. Los carpelos son receptáculos cónicos, a veces se reúnen para formar frutos agregados, coniformes mientras que otros permanecen aislados. Los estambres son numerosos con el conectivo que se prolonga más allá de los sacos polínicos. Los estambres y los carpelos se insertan a lo largo del eje que forma el receptáculo. Los pétalos son primitivos, carnosos y de coloración poco intensa, pálido verdosos. Las semillas presentan un albumen con la superficie irregular y el tegumento forma repliegues. El género tipo es *Annona* con más de 90 especies, casi todas de América tropical (Bonani *et al.*, 1987).

2.4. La guanábana (*Annona muricata* L.)

2.4.1. Clasificación taxonómica

La clasificación de *Annona muricata* L. es la siguiente (Strasburger *et al.*, 1971):

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Subdivisión: Magnoliophytina

Clase: Magnoliatae

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona muricata* L.

2.4.2. Origen y características botánicas de *Annona muricata* L.

Es una planta originaria de Mesoamérica y se cultiva principalmente en los trópicos de América, África e Islas del Pacífico. En América se extiende desde México hasta Brasil (CONABIO, 2009).

La guanábana constituye un árbol o arbusto frutal de poca altura y perennifolio, de 3 a 8 m (hasta 10 m) de altura. Las hojas son de forma

oblongo-elípticas a oblongo-obovadas y punteadas. Tienen una longitud entre 6 y 12 cm de largo y entre 2,5 y 5 cm de ancho (Figura 3).

El tronco es ramificado cerca de su base. Las ramas son cilíndricas, arrugadas, ásperas, de color café rojizo y con numerosas lenticelas. La corteza externa es de color castaño más o menos lisa, pardo grisácea y astringente.



Figura 3. Planta y hojas de *Annona muricata* L.

Fuente: <http://www.eljardinensupuerta.es/graviola---guanabana---guyabano---annona>.

La planta es hermafrodita y protoginea. Las flores se presentan solitarias a lo largo del tallo, tiene tres sépalos ovados, de menos de 5 mm de largo; los pétalos son 6, los 3 exteriores son ovados, libres, gruesos, de 2 a 3 cm de largo; los interiores, delgados y pequeños (Figura 4). Las estructuras femeninas maduran antes que las masculinas. Existe un período de 36 a 48 horas durante el cual se encuentran maduras ambas estructuras sexuales.

El fruto es carnoso, agregado, verde-oscuro, cubierto con tubérculos flexibles con aspecto de espinas (Figura 4), ovoide-elipsoide, de 20 a 25 cm de largo por 10 a 12 cm de diámetro, con una pulpa blanca algodonosa y jugosa. Presenta numerosas semillas por fruto, una por carpelo. Las semillas son ovoides y aplanadas, de 15 a 20 mm de largo con testa oscura y brillante (Roig, 1928).



Figura 4. Flor y frutos de *Annona muricata* L.

Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Annona_muricata.

2.4.3. Principales usos etnobotánicos de *Annona muricata* L.

El fruto de la guanábana es comestible, de sabor agradable y alta aceptación en diferentes países. Entre los usos tradicionales de esta especie están los medicinales. Las hojas son usadas para la preparación de té y para el tratamiento de patología como el cáncer, la diabetes, como antiespasmódicos, sedativo y vasodilatador; mientras que la corteza se emplea para el tratamiento de infecciones bacterianas y procesos ulcerosos (Barriga, 1994; Rutter, 1990).

Se utiliza también para dolores de cabeza, la hipertensión, la toz, el asma y como antiespasmódico (Lans, 2006). En otros trabajos se demostró el efecto antibacteriano (Sundarrao *et al.*, 1993), antifúngico (Heinrich *et al.*, 1992) y antimalario (Antoun *et al.*, 1993), que tienen los diferentes órganos y estructuras de esta planta (hoja, corteza, raíces, tallo, fruto y semilla). En el caso particular de los extractos de sus hojas también presentaron actividades antioxidante y antiinflamatoria (Mohammed y Abbas, 2016; Oyekachukwu *et al.*, 2017), analgésica (Roslida *et al.*, 2010) y molusquicida (Lans, 2006).

En Perú, las hojas de la guanábana se utilizan contra el catarro y la semilla machacada para eliminar los parásitos. Las raíces, la corteza y las hojas se usan para la diabetes y como un sedante y antiespasmódico. Las tribus de Guyana utilizan las hojas y/o la corteza de guanábana como sedante y tónico del corazón. En el Amazonas brasileño la infusión de hojas se usa para problemas de hígado. En países caribeños como Jamaica y Haití el jugo y/o la fruta se emplean para la fiebre, los parásitos y la diarrea, mientras que la corteza y las hojas como antiespasmódico, sedante, para la gripe, el asma, la astenia, la hipertensión, los parásitos y para problemas nerviosos (Soumya *et al.*, 2009).

En la actualidad se demostró el efecto antipediculicida de tres extractos de semillas de *A. muricata* (Vijayalingam *et al.*, 2016). Los mejores resultados se obtuvieron con el uso de acetato de etilo como disolvente, donde se observó una mortalidad elevada contra el ácaro *Menopan gallinae*.

2.4.4. Estudios fitoquímicos de *Annona* spp.

Los estudios fitoquímicos de *A. muricata* y otras anonáceas muestran una composición variada de metabolitos secundarios con variados efectos biológicos. Entre los compuestos de mayor presencia están los taninos, las saponinas, los flavonoides, los terpenoides, los fenoles y los glucósidos. En la Tabla 1 se muestran los resultados de estudios fitoquímicos en diferentes especies del género *Annona*.

Tabla 1. Resultados de estudios fitoquímicos en *Annona* spp.

Especie / órgano	Metabolitos secundarios	Autor (es)
<i>A. muricata</i> L./ hoja	Alcaloides, terpenos, flavonoides, saponinas, taninos y glucósidos	Chauhan y Mittu (2014)
<i>A. muricata</i> L./ hoja	Tanninos, saponinas, flavonoides, β -cianinos, quinonas, glucósidos cardiotónicos, terpenoides, fenoles, cumarinas, esteroides y alcaloides.	Vijayalingam <i>et al.</i> (2016)
<i>A. muricata</i> L./ hoja	Saponinas, alcaloides, flavonoides, taninos, β -carotenos y ácido	Usunomena y Paulinus

	ascórbico.	(2016)
<i>A. muricata</i> L./ hoja	Flavonoides, saponinas, taninos, terpenoides y glucósidos cardiotónicos.	Akinseye <i>et al.</i> (2016)
<i>A. muricata</i> L./ fruto	Taninos, flavonoides, glucósidos, saponinas, alcaloides y esteroides	Mohammed y Abbas (2016)
<i>A. muricata</i> L./ fruto, hoja	Alcaloides, antraquinona, taninos, flavonoides, glucósidos, saponinas, terpenoides y esteroides.	Ojezele <i>et al.</i> (2016)
<i>A. muricata</i> L./ hoja	Flavonoides, esteroides y taninos.	Hidayat <i>et al.</i> (2016)
<i>A. muricata</i> L./ hoja	Taninos, saponinas, flavonoides, terpenos y glucósidos cardiotónicos.	Robert <i>et al.</i> (2018)
<i>A. squamosa</i> L./ hoja	Taninos, saponinas, flavonoides y terpenos.	Sharma <i>et al.</i> (2013)
<i>A. squamosa</i> L./ fruto	Alcaloides, taninos, saponinas, flobataninos, flavonoides, terpenoides, glucósidos y esteroides.	Kowsalya <i>et al.</i> (2014)
<i>A. squamosa</i> L./ hoja	Taninos, saponinas, flavonoides, terpenos y glucósidos cardiotónicos.	Robert <i>et al.</i> (2018)
<i>A. reticulata</i> / hoja	Terpenos, cumarinas, taninos y esteroides.	Rani <i>et al.</i> (2013)
<i>A. mucosa</i> (Jacq.)/ hoja	Alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos y saponinas.	De Sousa <i>et al.</i> (2015)

2.4.5. Propiedades antibacterianas y fungidas de extractos de *Annona* spp.

El género *Annona* constituye un grupo taxonómico con potencialidades para el tratamiento de enfermedades provocadas por patógenos de origen bacteriano y fungoso. La literatura refiere numerosos estudios en varias

especies que avalan las propiedades antibacterianas y antifúngicas de éstas, asociadas a varios metabolitos secundarios con principios bioactivos diversos.

En la Tabla 2 se resumen algunos resultados importantes obtenidos relacionados con la actividad antimicrobiana de extractos de *A. muricata* L.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de extractos de *Annona muricata* L.

Órgano	Actividad antimicrobiana	Autor (es)
Hoja	<i>Escherichia coli</i>	Chukwuka <i>et al.</i> (2011)
Hoja	<i>Alternaria solani</i> , <i>Aspergillus erithrocephalus</i> , <i>Aspergillus albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	Abubacker y Deepalakshmi (2013)
Hoja	<i>Listeria monocytogenes</i> MTCC 657	Chauhan y Mittu (2014)
Hoja	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Haro <i>et al.</i> (2014)
Hoja y corteza	<i>Escherichia coli</i>	Arun <i>et al.</i> (2015)
Hoja	<i>Edwardsiella tarda</i>	Rarassari y Maftuch (2016)
Hoja	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	García <i>et al.</i> (2016)
Fruto	<i>Bacillus</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Escherichia coli</i>	Chithra <i>et al.</i> (2016)
Hoja	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lawal <i>et al.</i> (2017)
Hoja	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kamath <i>et al.</i> (2017)
Hoja	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> y <i>Salmonella</i> sp.	Uchegbu <i>et al.</i> (2017)

Otras especies dentro del género *Annona* también mostraron propiedades antibacterianas y antifúngicas. Prasad *et al.* (2016) observó una actividad antibacteriana notable de extractos de corteza de *A. reticulata* L. contra cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram +), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* (Gram -). De manera similar, este autor refirió una actividad antifúngica contra *Trichoderma viride* y *Candida albicans*.

Estudios similares realizados por Rani *et al.* (2013) con extractos de hojas de *Annona reticulata* L. preparados con solventes orgánicos de diferentes rangos de polaridad, refirieron que los extractos con acetato de etilo y metanol mostraron las mayores actividades antibacterianas contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y *Lactobacillus acidophilus*. En esta especie vegetal también se observó una actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger* (Kaladhar y Apparao, 2014) y frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus niger* (Sangeetha y Beena, 2017).

Kowsalya *et al.* (2014) determinaron un efecto inhibitorio de extractos de *Annona squamosa* L. frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*.

Los extractos a partir de hojas secas de *Annona squamosa* L. también mostraron una fuerte actividad inhibitoria frente a las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como frente a los hongos patógenos *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, lo cual sugiere la presencia abundante en el extracto de metabolitos con actividad antimicrobiana (Simon *et al.*, 2016). En otros estudios relacionados con *Annona squamosa* L., se evidenció una actividad antibacteriana contra numerosas cepas de referencia como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los constituyentes químicos de las plantas pueden tener diferentes modos de acción contra diferentes tipos de bacterias patógenas. Estos mecanismos

están relacionados con afectaciones a muchos procesos y estructuras vitales de las células, como la interferencia con los fosfolípidos de las membranas citoplasmáticas, que provoca un aumento de la permeabilidad de la misma y la pérdida de los constituyentes celulares; daños en enzimas relacionadas con la producción de energía metabólica y la síntesis de componentes estructurales y la destrucción o inactivación del material genético. En general, se considera que el mecanismo de acción principal son los cambios físicos y químicos que ocurren en la membrana celular, que afecta la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones, los mecanismos de transporte activos y la coagulación de la composición celular (Kotzekidou *et al.*, 2008).

2.4.6. Propiedades antioxidantes de extractos de *Annona muricata* L.

Las plantas medicinales son de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes y la capacidad de eliminar las especies reactivas del oxígeno (ERO), como son el potente radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), el radical peroxilo (ROOH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos compuestos antioxidantes son reactivos ya que tienen un electrón desapareado en su último nivel electrónico (Aluko *et al.*, 2013), por lo que tienden a oxidar numerosos compuestos celulares para estabilizar su estructura química. El ataque de las ERO a macromoléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos de membrana, provoca afectaciones en prácticamente todos los procesos celulares que generan numerosas patologías en humanos y animales (Tripathy *et al.*, 2010; Mohammed y Abbas, 2016).

La actividad antioxidante de diferentes partes de *A. muricata* L. se refirió con anterioridad (Essama *et al.*, 2015). La evaluación antioxidante de la guanábana mediante el método DPPH (radical libre 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), evidenció una mayor actividad en la corteza, en comparación con el tallo y las hojas. En otros estudios se demostró la influencia del órgano de la planta en la producción de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del extracto. Varios trabajos evidenciaron la relación que existe entre la capacidad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos totales. Sustancias

como los flavonoides son donadores ideales de hidrógeno al radical DPPH y por lo tanto buenos antioxidantes (Jayaprakash, 2017).

2.4.7. Propiedades citotóxicas de *Annona muricata* L.

Una de las mayores potencialidades de la guanábana desde el punto de vista médico farmacéutico, es la presencia de compuestos como annonacina, acetogenina y polifenoles, con actividad citotóxica o quimiopreventiva contra el cáncer (Abdullah *et al.*, 2017). Entre los metabolitos más importantes relacionados con esta actividad biológica están las acetogeninas, las cuales evidenciaron ser efectivas contra diferentes tipos de líneas celulares cancerígenas (Wu *et al.*, 1995). En la Tabla 3 se muestran algunos resultados de la actividad citostática de extractos de *A. muricata* L.

Tabla 3. Propiedades anticancerígenas de extractos de *Annona muricata* L.

Compuestos	Efecto citostático	Autor (es)
Acetogeninas	Contra líneas celulares de cáncer de pulmón (A-549).	Wu <i>et al.</i> (1995)
Acetogeninas: cisannonacina, cisannonacina-10-ona, arianacina, javoricina y cisgoniotalamicina	Contra larvas de camarones	Rieser <i>et al.</i> (1996)
Annopentocinas A, B, C, cis- y transannomuricina– D	Líneas celulares de carcinoma de páncreas (PACA-2), pulmón (A-549) y colon (HT-29)	Zeng <i>et al.</i> (1996)
Muricina H	Líneas celulares H460 (cáncer de pulmón)	Quispe <i>et al.</i> (2006)
Alcaloide	Líneas celulares cancerígenas P-388 (leucemia en ratones)	Hidayat <i>et al.</i> (2016)
Extracto de <i>A. muricata</i> L.	Activación de la Caspasa- 3 (proapoptótica) en líneas celulares de cáncer colorectal 205	Abdullah <i>et al.</i> (2017)

Acetogeninas	Células pancreáticas (PACA-2), próstata (PC-3) y pulmón (A-549)	Sun <i>et al.</i> 2014); Consolación <i>et al.</i> (2012)
Extracto etanólico de hoja	Líneas celulares de cáncer de mama MCF-7.	Suherman y Widowati, (2014)
Extracto etanólico de hoja y corteza	Líneas celulares de cáncer de mama MCF-7.	Arun <i>et al.</i> (2015)

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios pertenecientes al Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas, Cuba. En la Figura 5 se muestra el esquema general de trabajo.



Figura 5. Esquema general de trabajo con las diferentes etapas.

3.1. Selección, identificación y caracterización del material vegetal

Para la realización de los experimentos se seleccionaron ejemplares adultos de *Annona muricata* L. presentes en el Jardín Botánico de Matanzas (JBM). La identificación taxonómica de la especie se realizó por especialistas de esta entidad, a partir del análisis de los caracteres morfológicos *in situ* y con muestras presentes en el herbario de dicha entidad. Además, se herborizó un ejemplar y se entregó al herbario "Hermanos León" del JBM (Figura 6). La colecta del material vegetal se realizó en el mes de marzo de 2018 entre 9:00 y

10:00 am. Se seleccionaron hojas de plantas adultas que no presentaban síntomas de enfermedades o ataque de plagas, las cuales se trasladaron hacia el CEBIO para la preparación de los extractos.



Figura 6. Fotografía de un fragmento de rama herborizada de la planta de *Annona muricata* L. utilizada para la identificación de la especie.

3.2. Preparación de los extractos

Las hojas colectadas fueron lavadas con agua destilada para eliminar el polvo y posteriormente se procedió al secado en una estufa (Boxun) a 45°C. Las hojas secas fueron trituradas en un molino eléctrico hasta pulverizar siguiendo la metodología descrita por Niranjana *et al.* en 2013.

Se mezclaron 5 g de polvo de los tallos secos con 100 mL de cada solvente (etanol 90% y agua) en erlenmeyers de 250 mL con tapones de algodón, y se colocaron en agitación sobre una zaranda orbital (HDL® APPARATTUS) a 160

rpm por 24 h. Los extractos se conservados a 4°C para los ensayos fitoquímicos posteriores (García *et al.*, 2016).

El ensayo de actividad antibacteriana se realizó con 100 g de polvo de hoja disueltos en 500 mL de etanol (90%). La mezcla se colocó en agitación (160 rpm) por 24 h, se filtró el sobrenadante y se colectó en un recipiente ámbar. El sólido se volvió a homogenizar 250 mL de etanol al 90% y se colocó en iguales condiciones durante otras 24 h. El sobrenadante se filtró con dos capas de papel de filtro y se adicionó al sobrenadante colectado previamente. El mismo se deshidrató en una estufa a 35°C hasta obtener un sólido seco que fue almacenado para el ensayo de actividad antibacteriana.

3.3. Análisis fitoquímico de los extractos

3.3.1. Análisis cualitativo de los metabolitos secundarios

Para la determinación de los metabolitos secundarios se utilizó la metodología descrita por Chigodi *et al.* (2013):

Prueba para flavonoides: se adicionó 1 mL de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ a 100 mg de extracto y posteriormente se agregó igual volumen de HCL 0,1 mol.L⁻¹. La presencia de un color amarillo en la disolución indicó la presencia de flavonoides.

Prueba para terpenoides: se mezclaron 100 mg de extracto con 1 mL de cloroformo y a continuación se adicionaron 2 mL de H₂SO₄ concentrado. La coloración rojo-pardo en la interfase indicó la presencia de terpenoides.

Prueba para antocianinas: se mezclaron 100 mg de extracto con 3 ml de agua destilada y posteriormente se adicionó 1 mL de HCL 2 mol.L⁻¹ y disolución amoniacal 2 mol.L⁻¹ a 1 mL de la mezcla anterior. La presencia de un color rosado-rojo que se torna azul-violeta indicó la presencia de antocianinas.

Prueba para taninos: se mezclaron 100 mg de cada extracto con 2 mL de agua destilada y la mezcla se calienta en baño María. Posteriormente se filtró y al sobrenadante se adicionaron dos gotas de solución de cloruro férrico al 1%

en metanol (1:1). La presencia de taninos se identificó mediante la formación de un color verde oscuro en la solución.

Prueba para antraquinonas: se mezclaron 200 mg de cada extracto con 3 mL de HCL al 10% y la mezcla se calentó a 100°C durante 3 minutos en baño María. Posteriormente la mezcla se filtró y el sobrenadante se dejó enfriar a temperatura ambiente. Seguidamente se adicionaron igual volumen de CHCl_3 al filtrado y a continuación unas gotas de disolución de amonio al 10% y se volvió a calentar la mezcla. La formación de una coloración rosada indicó la presencia de antraquinonas.

Prueba para glucósido cardiotónico: se mezclaron 200 mg de cada extracto con 5 mL de agua destilada. La mezcla se agitó vigorosamente y luego se filtró. Se tomaron 3 mL del sobrenadante y se adicionaron 2 mL de ácido glacial acético que contiene una gota de disolución de cloruro férrico al 1%. A la mezcla se adicionó cuidadosamente 1 mL de H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo de ensayo. La presencia de desoxiazúcares característicos de los compuestos cardiotónicos, se observó por la formación de un anillo pardo en la interfase junto a un anillo púrpura por debajo.

Prueba para saponinas: se mezclaron 100 mg de cada extracto con 3 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente y posteriormente la mezcla se calentó a 100°C. La formación de espuma o una mezcla cremosa con pequeñas burbujas muestra la presencia de saponinas.

Prueba para flobataninos: se mezclaron 100 mg de cada extracto con 3 mL de agua destilada. La mezcla se agitó y posteriormente se filtró. El sobrenadante se mezcló con una disolución de HCL al 2% y se calentó a 100°C. La presencia de flobataninos se determinó por la formación de un precipitado rojo.

Prueba para esteroides: se mezclaron 100 mg de cada extracto con 3 mL de CHCl_3 y luego se agitó la mezcla. Posteriormente se adicionaron 2 mL de H_2SO_4 concentrado cuidadosamente por los lados del tubo de ensayo. La formación de un color rojo en la capa superior y una coloración verde

fluorescente en la capa de H₂SO₄ indicó la presencia de esteroides en el extracto.

Prueba para cumarinas: se mezclaron 100 mg de cada extracto con 3 mL de agua destilada. La mezcla se agitó y posteriormente se filtró. Se adicionó 1 mL de NaOH al 10% a un mililitro del filtrado. La formación de una coloración amarilla indicó la presencia de cumarinas en la muestra.

El contenido de los metabolitos se determinó de manera cualitativa a través del sistema no paramétrico de cruces (MINSAP, 1997):

Contenido: (+++ = abundante, ++ = moderado, + = bajo, - = ausencia).

3.3.2. Carbohidratos solubles totales

El contenido de carbohidratos en las muestras se determinó colorimétricamente mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), con el uso de la D-glucosa como azúcar patrón. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 490 nm y las concentraciones se expresaron en mg.mL⁻¹ a partir de la curva patrón.

3.3.3. Cuantificación de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método del ácido dinitrosalisílico y se empleó la D-glucosa (Sigma) como azúcar patrón (Miller, 1959). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 456 nm.

3.3.4. Contenido de proteínas solubles totales

El contenido proteico se determinó colorimétricamente mediante el método descrito por Lowry *et al.* (1951), con el uso de albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Los valores de absorbancia se obtuvieron a una longitud de onda de 750 nm y las concentraciones (mg.mL⁻¹) se determinaron mediante la curva patrón.

3.3.5. Cuantificación de fenoles solubles, ligados a pared celular y totales

La extracción de los fenoles solubles se realizó en 10 volúmenes de metanol. Las muestras fueron homogenizadas y centrifugadas a 12 000 rpm. El

precipitado se resuspendió en NaOH 2 mol.L⁻¹ para la extracción de los fenoles ligados a las paredes celulares, neutralizándose en igual volumen de HCl 2 mol.L⁻¹ (Gurr et al., 1992). Para determinar la concentración de fenoles se utilizó el ácido clorogénico (0,05 mol.L⁻¹) como patrón y los valores de absorbancia fueron leídos a una longitud de onda de 725 nm. A partir de los valores obtenidos de concentración de fenoles solubles y ligados a pared se calcularon las concentraciones de fenoles totales.

3.4. Ensayo de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos se evaluó frente a la bacteria Gram positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y las bacterias Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus* sp. Y *Klebsiella pneumoniae*. El ensayo se realizó con el uso del método de difusión en pocillos (Pérez et al., 1990).

Las cepas bacterianas fueron rejuvenecidas previamente sobre medio Agar Cerebro de Corazón a 37°C. Se inoculó el medio Agar Mueller- Hinton con células de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland con el uso de un hisopo estéril. Los pocillos fueron realizados con la ayuda de un horador estéril de 8 mm de diámetro y se les adicionaron 100 µL (200 mg.mL⁻¹) de cada extracto. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C.

Se emplearon para cada cepa bacteriana controles negativo (disolución hidroalcohólica) y positivo (antibióticos cefalexina 50 µg para la Gram + y amikacina 50 µg para las Gram -). La actividad antibacteriana se obtuvo a partir del diámetro de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Se realizaron tres réplicas por cada experimento (Parekh y Chanda, 2006).

3.5. Diseño experimental y análisis estadístico

La determinación cualitativa de los metabolitos secundarios se realizó por triplicado. Las lecturas de absorbancia para las cuantificaciones de carbohidratos totales, azúcares reductores, proteínas solubles totales y compuestos polifenólicos también se realizaron por triplicado.

Los datos fueron procesados con el paquete estadístico Statgraphic plus 5.1 sobre Windows. Se determinó el ajuste a una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett (Sigarroa, 1985). En los casos en que los datos cumplieron los requisitos exigidos se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple y para la comparación de medias se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Para los datos que no cumplieron con estas premisas se realizó la Prueba de Kruskal-Wallis y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Kwels (SNK) para la comparación de medias entre tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización fitoquímica

Los extractos acuosos y etanólicos mostraron la presencia de contenidos notables de flavonoides y terpenos, mientras que no se detectaron antocianinas en ninguno de los extractos analizados (Tabla 4). En el caso de los flavonoides, el etanol resultó ser un mejor solvente que el agua, lo cual puede estar asociado con la diferencia en polaridad entre ambos solventes.

Tabla 4. Evaluación cualitativa de flavonoides, terpenos y antocianinas, en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L.

Metabolitos secundarios	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Terpenos	+	++
Antocianinas	-	-
Flavonoides	+	++

Contenido: +++ = abundante, ++ = moderados, + = bajo, - = ausencia

Los resultados obtenidos están en concordancia con los referidos por Akinseye *et al.* (2016) quienes observaron la presencia de terpenoides y flavonoides en extractos de hoja de *A. muricata* L. Otros autores también determinaron la existencia de ambos compuestos en diferentes extractos de la guanábana (endocarpo y epicarpo del fruto, semilla, hoja y corteza) (Ojezele *et al.*, 2016), frutos (Robert *et al.*, 2018).

La presencia de compuestos flavonoides y terpenos en varios órganos de la planta, debe estar en relación a la funciones biológicas importantes que tienen los mismos para la planta (Mohammed y Abbas, 2016). Otros autores, por el contrario, no observaron la presencia de compuestos terpenoides en extractos de hoja de *A. muricata* L. (Hidayat *et al.*, 2016), lo cual puede estar relacionado con diferentes factores como el momento de la cosecha y la edad fisiológica de la planta.

La presencia de terpenos y flavonoides en de hojas de *Annona muricata* L., sugiere la existencia de diferentes actividades biológicas en los extractos con utilidad en la medicina y en el sector agropecuario. Los flavonoides son potentes antioxidantes solubles e inactivadores de radicales libres, los cuales previenen del daño oxidativo en las células, y presentan una fuerte actividad anticancerígena (Del-Rio *et al.*, 1997; Okwu, 2004). Se reconoce que los flavonoides, los cuales contienen grupos hidroxilos, tienen un efecto regulador de los contenidos de las especies reactivas del oxígeno en la mayoría de las plantas (Usunomena y Paulinus, 2016).

Los flavonoides también inhiben la síntesis de prostaglandinas, por lo cual estos compuestos pueden tener un potencial elevado como agentes antiinflamatorios (Alcaraz y Ferrandiz, 1987; Serafini *et al.*, 2010).

En la Tabla 5 se muestran los resultados de tamizaje fitoquímico para los metabolitos: esteroides, saponinas y taninos. Estos últimos se observaron en cantidades abundantes tanto en el extracto etanólico como en acuoso. Los esteroides fueron detectados también en ambos extractos por en niveles bajos, mientras que las saponinas solo fueron detectadas con el uso de etanol como solvente (Figura 6).

Tabla 5. Evaluación cualitativa de esteroides, saponinas y taninos en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L.

Metabolitos secundarios	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Taninos	+	+
Saponinas	-	+
Glucósidos cardiotónicos	-	-

Contenido: +++ = abundante, ++ = moderados, + = bajo, - = ausencia

La detección de taninos y saponinas en la presente investigación coincide con los resultados obtenidos por varios autores quienes detectaron estos compuestos en extractos diferentes órganos de la guanábana como hojas

(Akinseye *et al.*, 2016), fruto, semilla y hoja (Ojezele *et al.*, 2016), fruto (Mohammed y Abbas, 2016; Robert *et al.*, 2018), lo que indica que son metabolitos constitutivos de diferentes partes de la planta.

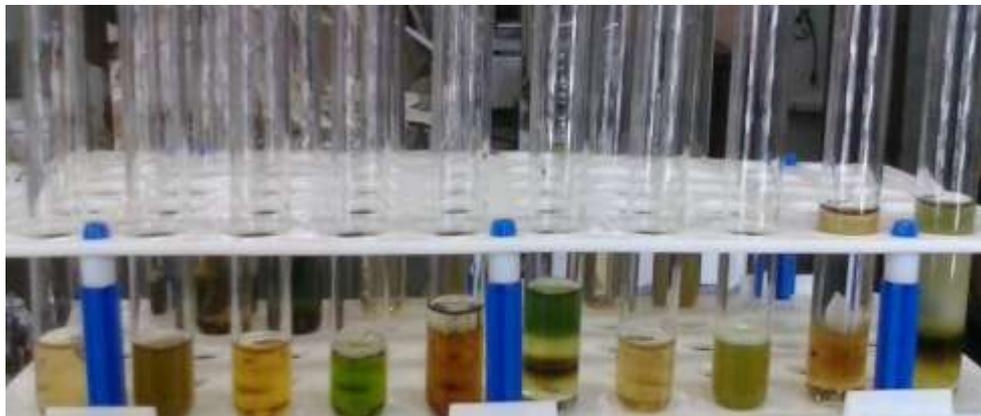


Figura 6. Pruebas cualitativas para la determinación de metabolitos secundarios en extractos acuosos y etanólicos de *Annona muricata* L.

Contrario a los resultados obtenidos en el presente trabajo, Robert *et al.* (2018), Ojezele *et al.* (2016) y Chauhan y Mittu (2014) detectaron la presencia de glucósidos cardiotónicos en extractos de frutos y hojas en *A. muricata* L., respectivamente. Hidayat *et al.* (2016) tampoco detectaron la presencia de saponinas en extractos etanólicos de hojas de guanábana, lo cual pudiera estar relacionado con factores importantes como la interacción genotipo-ambiente, el estadio fisiológico de la planta, el momento de la cosecha y la técnica utilizada para la extracción y detección de dichos compuestos, entre otros (Kaladhar y Apparao, 2014).

La presencia de taninos como componente astringente del extracto de hoja de *Annona muricata* L., indica un uso de esta especie en el tratamiento de desórdenes intestinales como la diarrea y la disentería (Bajai, 2001); así como avala las razones por las cuales la guanábana se considera una planta medicinal con uso en el tratamiento de enfermedades provocadas por patógenos de naturaleza microbiana (Akinseye *et al.*, 2016).

La detección de saponinas en el extracto de hoja de guanábana también puede indicar diferentes propiedades como antibacteriana y antifúngica contra cepas patógenas (Khanna y Kannabiran, 2008), aplicaciones en patologías

cardiovasculares (Moghimpour y Handali, 2015), antiinflamatorias (Patel y Patil, 2012) y anticancerígena, ya que estos compuestos pueden interferir en la replicación del ADN y evitar la proliferación de células cancerosas (Yildirim y Kutlu, 2015).

La evaluación cualitativa de cumarinas, glucósidos cardiotónicos, antraquinonas y flobataninos, en los extractos acuosos y etanólicos de hojas de *A. muricata* L. se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Evaluación cualitativa de cumarinas, glucósidos cardiotónicos, antraquinonas y flobataninos en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L.

Metabolitos secundarios	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Antraquinonas	-	-
Cumarinas	+	++
Esteroides	-	-
Flobataninos	-	-

Contenido: +++ = abundante, ++ = moderados, + = bajo, - = ausencia

Los resultados obtenidos están en correspondencia con los observados por Chauhan y Mittu (2014) en extractos de hoja de *A. muricata* L. También coinciden con otros autores quienes no observaron la presencia de flobataninos y esteroides en los extractos de hoja de guanábana (Akinseye *et al.*, 2016).

Contrario a los resultados observados en la presente investigación, Mohammed y Abbas (2016), Hidayat *et al.* (2016) y Ojezele *et al.* (2016) detectaron la presencia de esteroides en extractos de frutos de esta especie. Chauhan y Mittu (2014) refirieron además la presencia de antraquinonas en extractos de hojas de *A. muricata* L. Esto puede estar relacionado no sólo el genotipo y diferentes factores ambientales, sino también con el tipo de órgano ya distintas estructuras en las plantas puede sintetizar y/o acumular diferentes clases de metabolitos secundarios a niveles detectables.

Las cumarinas detectadas en el extracto etanólico de hojas de la guanábana pueden tener valor farmacológicos, ya que la naturaleza fenólica de estas sustancias le confieren propiedades antibacterianas contra patógenos Gram positivos y Gram negativos (Basile *et al.*, 2009).

4.2. Contenido de metabolitos primarios

4.2.1. Carbohidratos solubles totales y azúcares reductores

La Figura 7 muestra el contenido de carbohidratos solubles totales en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L. En la misma se observa una mayor concentración de carbohidratos totales ($14,71 \text{ mg.mL}^{-1}$) en el extracto etanólico en comparación con el contenido en el extracto acuoso ($8,65 \text{ mg.mL}^{-1}$).

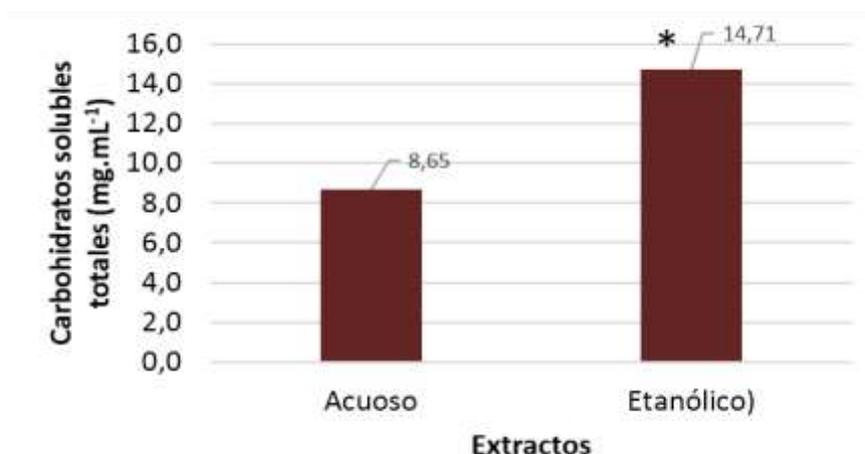


Figura 7. Contenido de carbohidratos solubles totales en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L. *: indica diferencias significativas entre extractos según Prueba Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

La presencia de carbohidratos en extractos de *A. muricata* L. también fue referida por diferentes autores en varios extractos (Chauhan y Mittu, 2014; Florence *et al.*; 2014).

El contenido de azúcares reductores en extractos acuoso y etanólico de hojas de *Annona muricata* L. se muestra en la Figura 8. Los mayores valores

fueron observados con el solvente etanólico ($9,58 \text{ mg.mL}^{-1}$) en comparación con el acuoso ($7,23 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Estos resultados coinciden con Chang *et al.* (2015), los cuales determinaron la presencia de estos compuestos en extractos de *Annona muricata* L. Chithra *et al.* (2016) evidenciaron la presencia de azúcares reductores y carbohidratos solubles totales en *A. muricata* L. y *A. reticulata* L.

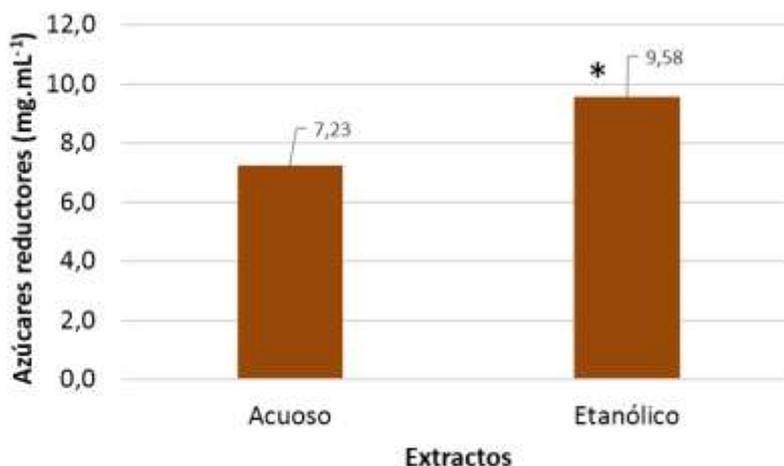


Figura 8. Contenido de azúcares reductores en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L. *: indica diferencias significativas entre extractos según Prueba Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos también están en correspondencia con los referidos por Usunomena y Paulinus (2016) quienes observaron concentraciones altas de estos azúcares (48,33%) en hojas de *Annona muricata* L.

La cuantificación de azúcares reductores en los extractos estudiados, es importante ya que estos compuestos interfieren en la extracción de saponinas, las cuales son de gran interés comercial para la industria farmacéutica (Guerra *et al.*, 2001).

4.2.2. Contenido de proteínas solubles totales

El contenido de proteínas solubles totales se muestra en la Figura 9, donde de manera similar, los mayores valores de estos compuestos se observaron en el extracto etanólico ($14,65 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

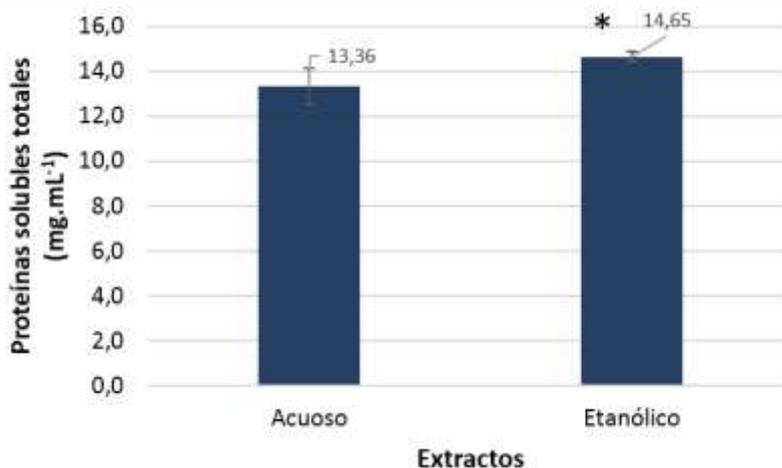


Figura 9. Contenido de proteínas solubles totales en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L. *: indica diferencias significativas entre extractos según Prueba Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

Los resultados están en correspondencia con los referidos por Chauhan y Mittu (2014) quienes determinaron la presencia de proteínas y aminoácidos en extractos acuosos y metanólicos de *A. muricata* L. Chithra *et al.* (2016) también detectaron la presencia de polipéptidos en extractos de *A. muricata* L. y *A. reticulata* L.

Los datos obtenidos para carbohidratos solubles totales, azúcares reductores y proteínas solubles totales, además de contribuir a la caracterización bioquímica de esta especie; son de importancia ya que en muchas comunidades se utiliza la infusión de hojas de guanábana para diferentes enfermedades; por lo cual estos compuestos energéticos pueden ser adicionados por vía oral a la dieta (Doctor y Manuel, 2014).

4.2.3. Contenido de polifenoles

El contenido de fenoles solubles, ligados a pared celular y totales en hojas de *Annona muricata* L. se muestra en la Figura 10. La concentración de los fenoles ligados ($14,37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca) fue superior a los solubles ($10,28 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), mientras que el contenido de fenoles totales fue de $24,65 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ equivalente de ácido clorogénico.

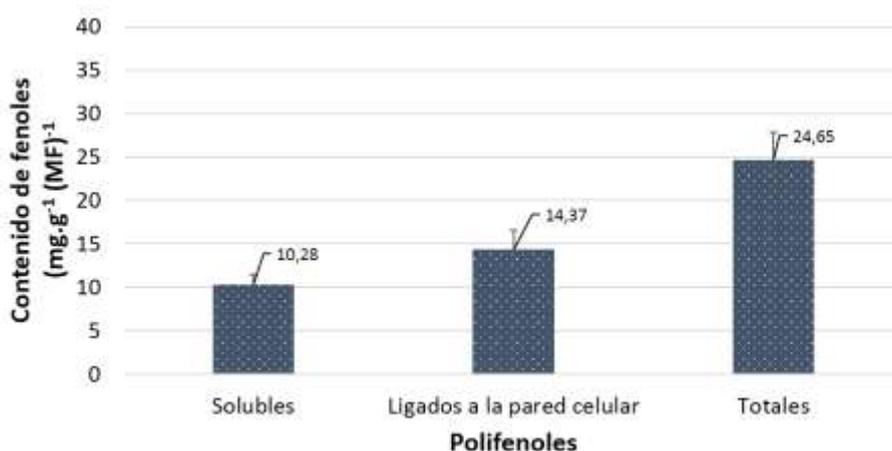


Figura 10. Contenidos de fenoles solubles, ligados a pared y totales en extractos de hojas de *Annona muricata* L. Letras diferentes indican diferencias significativas entre extractos según Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($P < 0,05$).

Los valores obtenidos de compuestos polifenólicos se corresponden con los referidos por otros autores para las hojas de *A. muricata* L.: $23,07 \pm 1,56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca (Pieme *et al.*, 2014); $23,0 \pm 0,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Essama *et al.*, 2015). En estudios similares realizados por Machado de Moraes *et al.* (2016) obtuvieron valores de $100 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ equivalentes de ácido gálico, en hojas de guanábana. Otros autores como Hidayat *et al.* (2016) también determinaron la presencia abundante de estos compuestos en hojas de guanábana.

En estudios similares con *Annona reticulata* L. se refirieron abundantes compuestos polifenólicos; así como una correlación entre la actividad antioxidante de extractos de hoja de esta planta (determinado por el método del 1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y el contenido de fenoles totales (Jamkhande *et al.*,

2016). De igual forma, Shirwaikar *et al.* (2017) observaron un potencial antioxidante en extractos de *A. squamosa* L. con el uso de diferentes modelos, donde los mejores resultados fueron alcanzados con el extracto etanólico (1 mg.mL⁻¹).

En trabajos relacionados con *Annona muricata* L. se determinó una actividad antioxidante que se atribuyó a la presencia de α -tocoferol (12,5 mg/kg) y compuestos fenólicos (Elagbar *et al.*, 2016). Essama *et al.* (2015) determinaron una actividad antioxidante de extractos de *A. muricata*; así como una influencia del órgano de la planta estudiado, sobre el rendimiento de polifenoles totales y la actividad antioxidante del extracto.

Los contenidos notables de polifenoles en las hojas de guanábana sugieren un uso potencial de esta especie en patologías asociadas al estrés oxidativo en humanos y animales, ya que estos compuestos pueden eliminar las especies reactivas del oxígeno altamente reactivas (Uyoh *et al.*, 2013). Estos radicales atacan a macromoléculas importantes como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membranas, lo que afecta el funcionamiento a nivel celular y provoca o exacerba el desarrollo de patologías humanas como la diabetes, el cáncer, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, la artritis, los procesos inflamatorios, las enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento (Tripathy *et al.*, 2010; Ikpeme *et al.*, 2014; Aluko *et al.*, 2015b; Mohammed y Abbas, 2016); así como enfermedades multicausales como la mastitis en animales de interés zootécnico, que disminuyen de manera marcada la calidad de leche y afectan los costos de producción en entidades lecheras de la provincia y del país (Gasque, 2015).

Los compuestos fenólicos, en particular los flavonoides y los taninos tienen actividad inhibitoria de la síntesis de prostaglandinas, por lo cual se consideran buenos agentes antiinflamatorios (Serafini *et al.*, 2010).

George *et al.* (2015) asociaron un efecto protector de extractos de *Annona muricata* L. contra daño a ADN inducido por peróxido de hidrógeno, así como detoxificador de especies reactivas del oxígeno con la actividad de los compuestos fenólicos.

Por otra parte, los compuestos antioxidantes presentes en *A. muricata* L. también pudieran ser utilizados como aditivos en productos de industrias alimentarias o farmacéuticas (Ekaluo *et al.*, 2015a).

4.3. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *A. muricata* L.

La actividad antibacteriana del extracto etanólico se evaluó frente a bacterias Gram positiva y Gram negativa (Tabla 7). El extracto mostró un efecto antibacteriano frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 11,00 mm, frente a *E. coli* (11,4 mm) y frente a *Proteus* sp. (10,2 mm). En el caso de *Klebsiella* sp. no se observó actividad antibacteriana. En todos los casos los controles positivos mostraron un efecto superior al extracto de hoja de guanábana (Figura 11).

La actividad antibacteriana del extracto evaluado frente a las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Proteus* sp. y *Klebsiella* sp. fue en general inferior al control (Cefalecina) y al resultado obtenido frente a *Staphylococcus aureus*. Los valores más altos de inhibición del extracto se observaron frente a la bacteria Gram negativa *Proteus* sp. (8,67 mm). En el caso de *E. coli* la actividad del extracto fue de 5,67 mm de halo de inhibición, mientras que frente a *Klebsiella* sp. el extracto no mostró ningún efecto.

La actividad antibacteriana de extractos de *A. muricata* L. también fue corroborada previamente por otros autores (Solomon-Wisdom *et al.*, 2014). Haro *et al.* (2014) obtuvieron valores de halo de inhibición de 14,7 mm frente a *Staphylococcus aureus*, con extracto etanólico de hoja (200 mg.mL⁻¹) y 13,8 mm frente a *E. coli*, con igual extracto.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* L. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus* sp. y *Klebsiella* sp.

Extractos	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	DZI (mm)	± EE	DZI (mm)	± EE
Amikazina (control +)	19,7 ^a	0,58	-	-
Cefalecina (control +)	-	-	15,0 ^a	0,95
Disolución hidroalcohólica	1,0 ^c	0,33	0,0 ^c	0,00
Extracto <i>A. muricata</i> L.	11,0 ^b	1,64	11,4 ^b	1,25

Extractos	<i>Proteus</i> sp.		<i>Klebsiella</i> sp.	
	DZI (mm)	± EE	DZI (mm)	± EE
Amikazina (control +)	-	-	-	-
Cefalecina (control -)	14,7 ^a	1,45	5,0	0,53
Disolución hidroalcohólica	0,0 ^c	0,00	0,0	0,00
Extracto <i>A. muricata</i> L.	10,2 ^b	0,37	0,0	0,00

DZI: diámetro de la zona de inhibición. Los datos representan medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencia significativa según Prueba de Student Newman-Keuls ($P \leq 0,05$).

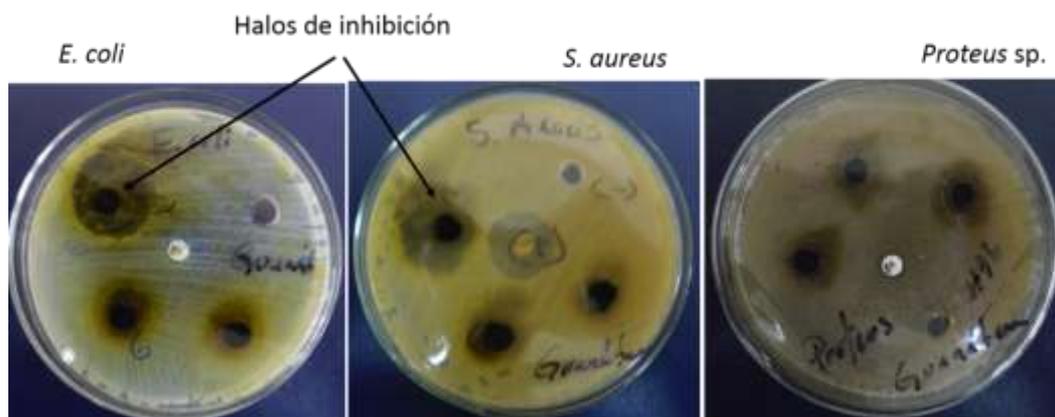


Figura 13. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* L. frente a *E. coli*, *S. aureus* y *Proteus* sp.

El efecto inhibitorio del extracto frente a bacterias Gram + y Gram - está en concordancia con los planteado por Palombo y Semple (2001). Estos autores refirieron que cuando se preparan extractos de plantas con solventes como el etanol y el metanol, es posible observar actividad inhibitoria frente a ambos grupos de bacteria.

De manera similar, en otras especies dentro del género (*A. reticulata* L.) se observó un efecto inhibitorio de extractos de hojas preparados con diferentes disolventes, frente a diferentes bacterias patógenas como *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Sangeetha y Beena, 2017) y contra *Bacillus* sp. y *E. coli* (Chithra *et al.*, 2016). En correspondencia con la presente investigación, los mejores resultados fueron obtenidos con el extracto etanólico frente a bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Proteus vulgaris*).

Otros investigadores, en diferentes especies vegetales, (*Anethum graveolens*, *Leucas aspera*, *Holarrhenaanti dysenterica*), también corroboraron la efectividad de los extractos etanólicos con relación al aumento de la actividad antibacteriana (Jana y Shekhawat, 2010; Preethi *et al.*, 2010).

Contrario a los resultados obtenidos, Chithra *et al.*, (2016) no observaron actividad antibacteriana de extractos de *A. muricata* L. contra cepas de *Proteus* sp.

Los datos obtenidos de actividad antibacteriana muestran una semejanza en cuanto a actividad antibacteriana entre la bacteria Gram + y las Gram -. Estos resultados no concuerdan con otros autores quienes observaron un mejor resultado de los extractos frente a bacterias Gram + que frente a Gram -. Estos investigadores relacionaron esta menor actividad inhibitoria frente a bacterias Gram -, debido a que presentan una mayor complejidad en la pared celular, ya que además de la capa de peptidoglicano se presenta una capa de lipopolisacáridos que puede constituir un obstáculo para la entrada de metabolitos secundarios hidrosolubles hacia el interior de la célula, los cuales son responsables de la acción antibacteriana (Madigan *et al.*, 2015).

El efecto inhibitorio del extracto de hojas de *A. muricata* L. puede estar relacionado con la actividad de los metabolitos secundarios observados, los

cuales pueden tener diferentes mecanismos, asociados con la inhibición del crecimiento microbiano, cambios en las características de la membrana celular, interferencia con ciertos procesos metabólicos en los microorganismos, la modulación de las señales de transducción o las vías de expresión genética (Manson, 2003; Surh, 2003).

Entre los metabolitos secundarios que pudieran estar relacionados con la actividad antibacteriana están los taninos, los compuestos fenólicos y los flavonoides (Ouattara *et al.*, 2011). Las saponinas pudieran también interactuar con las membranas lipídicas para formar poros y afectar las propiedades de solubilidad de la misma (Francis *et al.*, 2002).

Los compuestos flavonoides pueden afectar el crecimiento microbiano por inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos y otros procesos metabólicos (Harborne y Williams, 2000; Singh y Bhat, 2003).

Los taninos por otra parte, tienen propiedades antisépticas ya que pueden inhibir la síntesis de proteínas bacterianas endógenas, así como pueden reaccionar con proteínas o enzimas del microorganismo lo que provoca su inactivación y el bloqueo de rutas metabólicas (Mohamed *et al.*, 2010; Omojate *et al.*, 2014). De igual forma, los taninos pueden interferir con la actividad enzimática de los microorganismos, mediante la quelatación de iones imprescindibles para la función catalítica de estas proteínas (Ojezele *et al.*, 2016).

Los compuestos polifenólicos actúan contra los microbios mediante la inhibición de las enzimas hidrolíticas, u otras interacciones que inactivan las adhesinas microbianas o el transporte mediado por proteínas (Pyla *et al.*, 2010). Numerosos investigadores refirieron el efecto antibacteriano y anfúngico de los compuestos fenólicos y de los flavonoides (Afolayan y Meyer, 1997; Cafarchia *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos indican un uso potencial del extracto etanólico de hojas de *A. muricata* L. para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Harada, 2014) e infecciones del tracto urinario provocadas por bacterias

patógenas tanto en humanos como en animales (Omojate *et al.*, 2014; Kamath *et al.*, 2017, Klimesova *et al.*, 2017; Lozano *et al.*, 2016, Miles y Datta, 2012).

La actividad antibacteriana del extracto de *Annona muricata* L. también posee potencialidades en el control de enfermedades como la mastitis bovina, ya que entre agente causales de esta patología están los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Gasque, 2015).

4.4. Valoración económica-ambiental del uso de los extractos de *Annona muricata* L.

La búsqueda de plantas con principios activos contra microorganismos constituye un tópico importante dentro del campo de la medicina, ya que el uso preocupa a toda la población a nivel mundial (Chigodi *et al.*, 2013).

Annona muricata L. es un árbol tropical de bastante biomasa que pudiera ser utilizado para el tratamiento de enfermedades relacionadas con infecciones bacterianas, inflamatorias y con el estrés oxidativo en general. Patologías como la mastitis bovina afecta a la masa lechera de nuestra provincia y de toda Cuba. La infección de las vacas con diferentes patógenos como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Nocardia asteroides*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Leptospira sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Fusobacterium sp.*; algas como *Prototheca sp.*; hongos, como *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon sp.* y *Candida sp.*, además de levaduras como *Cryptococcus neoformans*, etc. (Gasque, 2015).

La mastitis bovina es la enfermedad infecciosa de mayor importancia económica en la explotación lechera, produce una marcada disminución en la producción de leche y en el valor biológico de este producto. Ejerce un efecto negativo sobre la industria láctea ya que disminuye el valor nutritivo de los productos lácteos, especialmente la concentración de calcio y altera el sabor de la leche (Cariddi, 2013).

La mayoría de los productores lecheros reconocen las pérdidas debidas a los casos clínicos con que se encuentran, los animales que tienen que descartar y las cuentas pagadas por drogas y asistencia veterinaria. Por estas razones, el empleo de productos naturales para el control de esta enfermedad representaría una ventaja económica para cualquier entidad estatal o privada, no sólo si se toma en cuenta la reducción de pérdidas por concepto de calidad de la leche, sino también porque los productos naturales derivados de plantas medicinales como *Annona muricata* L. son fáciles de obtener y baratos de producir. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios de toxicidad y ensayos *in vivo* con extractos en diferentes disolventes, para determinar el efecto de los mismos sobre la mastitis y otras enfermedades.

CONCLUSIONES

- ✓ Se observó la presencia de flavonoides, terpenos, taninos, cumarinas y saponinas en los extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Annona muricata* L., los cuales son de interés en la industria farmacéutica y agropecuaria.
- ✓ Se cuantificó una concentración elevada de compuestos polifenólicos totales en las hojas de *A. muricata* L., que puede inferir una actividad antioxidante elevada y un uso potencial de esta especie en patologías relacionadas con el estrés oxidativo en humanos y animales.
- ✓ La actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. frente a bacterias Gram positiva y Gram negativa, sugiere un uso potencial de la guanábana para el tratamiento de enfermedades provocadas por microorganismos patógenos.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar estudios de toxicidad con extractos de hojas de guanábana.
- ✓ Evaluar la actividad de extractos de *A. muricata* L. contra cepas bacterianas patógenas asociadas a mastitis.
- ✓ Evaluar las potenciales de los extractos de *A. muricata* L. para el control de enfermedades fúngicas en animales y cultivos de interés agrícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, M., Syam, A.F., Meilany, S., Laksono, B., Prabu, O.G., Bekt, H.S., Indrawati, L. y Makmun, D. 2017. The value of caspase-3 after the application of *Annona muricata* Leaf extract in COLO-205 colorectal cancer cell line. *Gastroenterol Research Pract.* 2017:4357165. doi: 10.1155/2017/4357165. Epub 2017 Apr 9
- Abubacker, M.N. y Deepalakshmi, T. 2013. *In vitro* antifungal potentials of bioactive compound methyl ester of hexadecanoic acid isolated from *Annona muricata* Linn. (*Annonaceae*) Leaves. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 10(2): 879-884.
- Adamczyk, B., Kitunen, V. y Smolander, A. 2013. Response of soil C and N transformations to condensed tannins and different organic N condensed tannin complexes. *Appl. Soil Ecol.* 64:163-170.
- Afolayan, A.J. y Meyer, J.J. 1997. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* 57 (3): 177–181.
- Akinseye, O.R., Morayo, A.E. y Olawumi, A.S. 2016. Phytochemical Evaluation of Dry, Wet and Oil of Leaf of *Annona muricata* for Medicinal Activities. *Journal of Pharmacy and Alternative Medicine*. 13: 42-47.
- Alcaraz, M.J. y Ferrandiz, M.L. 1987. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. *J Ethnopharmacol.* 21: 209-229.
- Aluko, B.T., Oloyede, O.I. y Afolayan, A.J. 2013. Polyphenolic contents and free radical scavenging potential of extracts from leaves of *Ocimum americanum* L. *Pak. J. Biol. Sci.*16: 22-30.
- Antoun, M.D., Gerena, L. y Milhus, W.K. 1993. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives. *Int. J. Pharmacol.* 31: 255-258.
- Arun, J.R., Philip, A., Kannanmon, P.P., Nimicha, J. 2015. Screening of anti-cancer and antibacterial activity of methanolic extracts of *Annona muricata* leaf and bark. *Innoriginal International Journal Of Sciences*. 2 (3): 1-4.
- Barriga, R. 1994. Plantas útiles de la Amazonia Peruana. Características, usos y posibilidades. Iquitos: Editor CONCYTEC.
- Basile, A., Sorbo, S., Spadaro, V., Bruno, M., Maggio, A., Faraone, N. y Rosselli, S. 2009. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules*. 14: 939–952.

- Binsack, R., Boersma, B.J., Patel R.P., Kirk, M., White C.R., Darley-Usmar, V., Barnes, S., Zhou, F. y Parks, D.A. 2001. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25: 434-443.
- Bonani, G., Urquiola, A. y Beyra, A. 1987. Botánica plantas superiores. Editorial Pueblo y Educación., Ciudad de la Habana, Cuba, p. 100.
- Bortesi, L. y Fischer, R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33(1):41-52.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333.
- Bush, K. 2004. Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clin. Microbiol. Inf.* 10: 10 - 17.
- Bush, K. y Fisher, J.F. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new lactamase from Gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 65: 455–478.
- Cafarchia, C.N., De Laurentis, M.A., Milillo, V. y Losacco, V. 1999. Antifungal activity of Apulia region Propolis. *Parassitologia.* 41(4):587–590.
- Cariddi, L.N., Montironi, D. 2013. Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* y uno de sus compuestos mayoritarios sobre cepas aisladas de mastitis bovina. *Dominguezia.* 29 (suplemento).
- Chandra, H., Bishnoi, P., Yadav, A., Patni, B., Mishra, A.P. y Nautiyal, A.R. 2017. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials. *A Review.Plant.* 6 (16): 1-11.
- Chang, T.L., Chiang, H.Y., Shen, J.Y., Lin, S.W. y Tsai, P.J. 2015. Phenolic compounds stage an interplay between the ubiquitin–proteasome system and ubiquitin signal autophagic degradation for the ubiquitin based cancer chemoprevention. *J. Funct. Foods* 17:857-871.
- Chauhan, A. y Mittu, B. 2014. Phyto-chemical screening and anti-listerial activity of *Annona Muricata* (L) Leaf extract. *Chromatography Separation Techniques.* 6 (3): 1-4. doi:10.4172/2157-7064.1000269.
- Chigodi, M.O., Samoei, D.K. y Muthangya, M. 2013. Phytochemical screening of *Agave sisalana* Perrine leaves (waste). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology.* 4 (4): 200-204.

- Chithra, K.N., Chinju, S. y Binu, T. 2016. Evaluation of major phytochemical constituents of two edible fruit yielding species of Annonaceae: *Annona muricata* L. and *Annona reticulate* L. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 4(4): 198-202.
- Chukwuka, K.S., Ikheloa, J.O., Okonko, I.O., Moody, J.O. y Mankinde, T.A. 2011. The antimicrobial activities of some medicinal plants on *Escherichia coli* as an agent of diarrhea in livestock. *Advances in Applied Science Research*. 2 (4): 37-48.
- Conabio, 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. In Capital Nat. México. CONABIO, México City.
- Consolación, R.Y., Geneveve. S., Oscar, T.B., Jaw, D.M. y Chang, S.C. 2012. Acetogenins from *Annona muricata*. *Phcog, J*. 4: 32-37.
- Consolación, Y.R., Galian, R.F. y Chien-Chang, S. 2014. Chemical constituents of *Annona muricata*. *Der PharmaChemica*. 6(6):382-387.
- Cotelle, N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery, J., Wallet J.C. y Gaydou, E.M. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med*. 20: 35-43.
- Del-Rio A., Obdulio, B.G., Castillo, J., Martin, F.G. y Orluno, A. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric.Food Chem*. 45:4505-4515.
- de Souza, T.J., Fonseca, A., Ignacio, A.C.R. y Albarello, N. 2015. Antimicrobial activity of *Annona mucosa* (Jacq.) grown *in vivo* and obtained by *in vitro* culture. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46 (3): 785-789.
- Djeussi, D.E., Noumedem, J.A., Seukep, J.A., Fankam, A.G., Voukeng, I.K. y Tankeo, S.B. 2013 Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC. Complement Altern Med*.13: 164.
- Doctor, T.R. y Manuel, J.F. 2014. Phytochemical screening of selected indigenous medicinal plants of Tublay, Benguet Province, Cordillera Administrative Region, Philippines. *International Journal of Scientific and Research Publications*.4 (4): 1-12.
- Dubois, M.K., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem*. 28:350-356.
- Ekaluo, U.B., Ikpeme, E.V., Ekerette, E.E. y Chukwu, C.I. 2015a. *In vitro* Antioxidant and Free Radical Activity of Some Nigerian Medicinal Plants: Bitter

Leaf (*Vernonia amygdalina* L.) and Guava (*Psidium guajava* Del.). *Research Journal of Medicinal Plant*. DOI: 10.3923/rjmp.

Ekaluo, U.B., Ikpeme, E.V., Udensi, O.U., Ekerette, E.E., Usen, S.O. y Usoroh, S.F. 2015b. Comparative in vitro assessment of drumstick (*Moringa oleifera*) and neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts for antioxidant and free radical scavenging activities. *Res. J. Med. Plant*. 9: 24-33.

Elagbar, Z.A., Naik, R.R., Shakya, A.K. y Bardaweel, S.K. 2016. Fatty acids analysis, antioxidant and biological activity of fixed oil of *Annona muricata* L. Seeds. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Chemistry*. Article ID 6948098.

Espinosa, R.R., Inchingolo, R., Alencar, S.M., Rodriguez-Estrada, M.T. y Castro, I.A. 2015. Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. *Food Chem*. 182:95-104.

Essama, R., Nyegue, M.A., Foe, C.N., Silihe, K.K., Bouopda S.P. y Etoa, T. 2015. Antibacterial and antioxidant activities of hydro-ethanol extracts of barks, leaves and stems of *Annona muricata*. *Amer. J. Pharmacolog. Sci*. 3(6): 126-131.

Florence, A.R., Joselin, J., Shynin-Brintha, T.S., Sukumaran, S. y Jeeva, S. 2014. Preliminary phytochemical studies of select members of the family Annonaceae for bioactive constituents. *Bioscience Discovery*. 5(1):85-96.

Franceschi, V.R., Krokene, P., Christiansen, E. y Krekling, T. 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytol*. 167(2):353-376.

Francis, C., George, G., Zohar, K., Harinder, P.S., Makhar, L.M. y Klaus, B. 2002. The biological action of saponins in animal system: a review. *British J. Nutrition*. 88(6): 587-605.

García, Y.H., Rajme, D., Mendoza, J.L. y Campos, T. 2016. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. frente a *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Ciencia y Tecnol. Agrop*. 4 (1): 10-17.

Gasque, R. 2015. Mastitis bovina. Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible en www.produccion-animal.com.ar, consultado el 15 de Junio de 2017.

George, V.C., Kumar, D.N., Suresh, P. y Kumar, R.A. 2015. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. *J Food Sci Technol*. 52(4): 2328-2335.

- Guerra, L.J.O., Nogueiras, C., Delgado, R. y Hernández, O. 2001. Determinación cuantitativa de saponinas y azúcares reductores de *Agave bromelioniana* T. *Revista Cubana de Química*. 13(3): 37-42.
- Gurung, T., Techawongstien, S. y Suriharn, B. 2011. Impact of environments on the accumulation of capsaicinoids in *Capsicum* spp. *Hort. Science* 46(12):1576-1581.
- Gurr, S.I., Mc Pherson, M.I. and Bowles, D.J. 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach*. 3 : 62-69.
- Gyles, C. 2011. The growing problem of antimicrobial resistance. *Can Vet J*. 52(8): 817-20.
- Hall, D.E., Zerbe, P., Jancsik, S., Quesada, A.L., Dullat, H., Madilao, L.L., Yuen, M. y Bohlmann, J. 2013. Evolution of conifer diterpene synthases: diterpene resin acid biosynthesis in lodge pole pine and jack pine involves monofunctional and bifunctional diterpene synthases. *Plant Physiol*. 161(2):600-616.
- Harada, K.; Niina, A.; Shimizu, T.; Mukai, Y.; Kuwajima, K.; Miyamoto, T.; Kataoka, Y. 2014. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Proteus mirabilis* isolates from dogs. *Journal of Medical Microbiology* 63, 1561-1567
- Harborne, J.B. y Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem*.55:481-904.
- Haro, G., Utami, N.P. y Sitompul, E. 2014. Study Of The Antibacterial Activities Of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves. *International Journal of PharmTech Research*. 6 (2): 575-581.
- Heinrich, M., Kuhnt, M. y Wright, C.W. 1992. Parasitological and microbiological evaluation of *Mixe Indian* medicinal plants (México). *J Ethnopharmacol*. 36:81-5.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P. y Ferreira, I.C.F.R. 2015. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem*. 173:501-513.
- Hidayat, S., Sugita, P. y Suparto, I.H. 2016. Active Compound Characterization and Cytotoxic Activity of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves Extract Against Murine Cells Leukemia P-388. *International Journal of Agriculture and Biosciences*. 5(6): 347-351.
- Homoki, J.R., Nemes, A., Fazekas, E., Gyémánt, G., Balogh, P., Gál, F. y Remenyik, J. 2016. Anthocyanin composition antioxidant efficiency and α -

amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.). *Food Chem.* 194:222–229.

Ikpeme, E.V., U.B. Ekaluo, O.U. Udensi and E.E. y Ekerette. 2014. Screening fresh and dried fruits of avocado pear (*Persea Americana*) for antioxidant activities: An alternative for synthetic antioxidant. *J. Life Sci.Res. Discovery.* 1: 19-25.

Iwu, M.W., Duncan, A.R. y Okunji, C.O. 1999. New antimicrobials of plant origin. In *Perspectives on New Crops and New Uses*; Janick, J., Ed.; ASHS Press: Alexandria, VA, USA. pp. 457–462.

Jamkhande, S. and Wattamwar, A. 2016. *Annona reticulata* Linn. Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. *J. Trad. Complement. Med.* 248-257.

Jana, S. y Shekhawat, G.S. 2010. Phytochemical analysis and antibacterial screening of *in vivo* and *in vitro* extracts of Indian medicinal herb: *Anethum graveolens*. *Res J Med Plant.* 4(4):206-212.

Jayaprakash, A. 2017. Phytochemicals, antimicrobial and antioxidant properties of *Annona reticulata* Linn. *Journal of Academia and Industrial Research.* 6 (6): 90-95.

Julsing, M.K., Koulman, A., Woerdenbag, H.J., Quax, W.J. y Kayser, O. 2006. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomol. Eng.* 23(6):265-279.

Kaladhar, D.S.V.G.K. y Apparao, K. 2014. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *Annona reticulata* raw fruit peel extracts. *World J Pharm Pharm. Sci.* 3(11):1226–1234.

Kefeli, V.I., Kalevitch, M.V, (2002). “Natural Growth Inhibitors and Phytohormones in Plant and Environment”. Kluwer Acad. Publ. 1 - 310, 2002.

Kefeli, V.I., Kalevitch, M.V, Borsari, B. (2003). “Phenolic cycle in plants and environment”. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2: 13-18

Khanna, V.G. y Kannabiran, K. 2008. Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 24: 27-37.

Klimesova, M.; Manga, I.; Nejeschlebová, L.; Horáček, J.; Ponížil, A.; Vondrusková, E. 2017 Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cattle, sheep, goat and pig rearing in de Czech Republic. *Acta Vet. Brno.* 86: 3 – 10; <https://doi.org/10.2754/avb201786010003>

Korkina, L. G. y Afanas'ev, I.B. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* 38: 151-163.

Kotzekidou, P., Giannakidis, P. y Boulamatsis, A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against food borne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT - Food Science and Technology.* 41(1):119-127.

Kowsalya, V., Pruthivi, R.B., Josna, E.M., Anusha, N., Vajrai, R. y Brindha, P. 2014. Preliminary phytochemical screening and antibacterial efficacy studies of *Annona squamosa* fruit. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 6 (8): 286-288.

Krinsky, N.I. 1992 Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200: 248-254.

Kumar, D.J. 2017. *Annona muricata*: Cure to Cancer. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 8(5): 306-310.

Kurth, C., Welling, M. y Pohnert, G. 2015. Sulfated phenolic acids from *Dasycladales siphonous* green algae. *Phytochemistry* 117:417-423.

Lans, C.A. 2006. Ethno medicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *J Ethnobiol Ethnomedicine.* 2: 45-55.

Lawal, Z.A., Hamid, A.A., Shehu, A., God'shelp, E., Ajibade, O.S., Zubair, O.A., Ogheneovo, P., Mukadam, A.A. y Adebayo, C.T. 2017. Biochemical Properties, *In-Vitro* Antimicrobial, and Free Radical Scavenging Activities of the Leaves of *Annona muricata*. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 21 (6): 1197-1201.

Lin, J., Michel, L.O. y Zhang, Q. 2002. Cme ABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2124-2131.

Lozano, C.; Gharsa, H.; Ben Slama, K.; Zarazaga, M. y Torres, C. 2016 *Staphylococcus aureus* in animals and food: methicillin resistance, prevalence and population structure. A review in the african continent. *Microorganisms* 4, 12

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. 1951. Protein measurement the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.

Machado de Moraes, I.V., Vasconcelos, P.R., Schmidt, F.L., Marques, K., Zocolo, G.J., de Brito, E.S., Luo, R., Richards, K.M., Tran, K. y Smith, R.E. 2016. UPLC-QTOF-MS and NMR analyses of graviola (*Annona muricata*) leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 26: 174-179.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S; Buckley y Stahl, D.A. 2015. Brock Biology of Microorganism. 14 Ed. Página 74- 81.

Manson, M.M. 2003. Cancer prevention– the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends in Molecular Medicine*. 9: 11–18.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. y Tuñón, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17 (6): 271-278.

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.

Ministerio de Salud Pública (MINSAP). 1997. Guía metodológica para la investigación en plantas medicinales. La Habana: Editorial Pueblo y Educación

Moghimpour, E. y Handali, S. 2015. Saponin: properties, methods of evaluation and applications. *Annual Research & Review in Biology*. 5(3): 207-220.

Mohamed, S.S.H., Hansi, P.D. y Kavitha, T. 2010. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of selected Indian folk medicinal plants. *Int J Pharma Sci. Res.* 1(10):430-434.

Mohammed, M.T. y Abbas, S.I. 2016. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect of Fruit Juice of *Annona muricata* L (Soursop) During Ischemia Reperfusion Injury in Rats. *The Iraqi Postgraduate Medical Journal*. 15 (1): 118-123.

Mollica, A., Stefanucci, A., Feliciani, F., Cacciatore, I., Cornacchia, C., Pinnen, F. 2012. Delivery methods of camptothecin and its hydrosoluble analogue irinotecan for treatment of colorectal cancer. *Curr Drug Deliv.* 9:122-131

Myles, I.A. y Datta, S.K. 2012. *Staphylococcus aureus*: an introduction. *Semin Immunopathol.* March; 34 (2): 181-184. doi: 10.1007/s00281-011-0301-9

Newman, D.J. y Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70:461-477.

Ngo, L.T., Okogun, J.I. y Folk, W.R. 2013. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. *Nat Prod Rep.* 30:584-592.

Niranjan, K., Sathiyaseelan, V. and Jeyaseelan, E.C. 2013. Screening for antimicrobial and phyto chemical properties of different solvents extracts of leafs of *Pongamia pinnata*. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3 (1):1-6.

Njuguna, N.M., Ongarora, D.S. y Chibale, K. 2012. Artemisinin derivatives: a patent review (2006 - present). *Expert Opin Ther. Pat.* 22:1179-1203.

- Ojezele, O.J., Ojezele, M.O. y Adeosun, A.M. 2016. Comparative phytochemistry and antioxidant activities of water and ethanol extract of *Annona muricata* Linn Leaf, seed and fruit. *Advances in Biological Research*. 10 (4): 230-235.
- Okwu, D.E. 2004. Phytochemicals and vitamin content of indigenous species of southeastern Nigeria. *J. Sustain. Agric. Environ*. 6(1): 30-37.
- Olivoto, T., Nardino, M., Carvalho, I.R., Follmann, D.N., Szareski, V.J., Ferrari, M., de Pelegrin, A.J. y de Souza, V.Q. 2017. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 12(2): 71-84.
- Omojate, G.C., Enwa, F.O., Jewo, A.O. y Eze, Ch.O. 2014. Mechanisms of antimicrobial actions of phytochemicals against enteric pathogens – A review. *Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences*. 2(2): 77 – 85.
- Ouattara, L., Koudou, J., Zongo, C., Barro, N., Savadogo, A. y Bassole, I.H.N. 2011. *J Appl Sci*. 11:157-162.
- Oyekachukwu, A.R., Elijah, J.P., Eshu, O.V. y Nwodo, O.F.C. 2017. Anti-inflammatory effects of the chloroform extract of *Annona muricata* Leaves on phospholipase A2 and prostaglandin synthase activities. 8 (4):1-5.
- Palombo, E.A. y Semple, S.J. 2001. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*. 77(2-3):151-157.
- Patel, P.P. y Patil, P.H. 2012. Anti-inflammatory activity of saponin rich fraction isolated from the *Thespesia populnea* (L.) leaves. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 3(4): 1526-1532.
- Pérez, C., Paul, M. and Bazerque, P. 1990. An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *Acta Bio. Med. Exp*. 15: 113- 115.
- Poulton, J.E. 1990. Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol*. 94(2):401-405.
- Prasad, G.J., Amruta, S.W., Ashish, D.K. 2016. Assessment of *Annona reticulata* Linn. leaves fractions for *in vitro* antioxidative effect and antimicrobial potential against standard human pathogenic strains. *Alexandria Med J*. 52: 19-25.
- Preethi, R., Devanathan, VV. y Loganathan, M. 2010. Antimicrobial and antioxidant efficacy of some medicinal plants against food borne pathogens. *Adv. Biol. Res*. 4(2):122-125.
- Pyla, R., Kim, T.J., Silva, J.L. y Jung, Y.S. 2010. Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant. *Int. J Food Microbiol*. 137(2-3):154–60.

- Qi, W.X., Shen, Z., Lin, F., Sun, Y.J., Min, D.L., Tang, L.N., He, A.N. and Yao, Y. 2013. Paclitaxel-based versus docetaxel-based regimens in metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Curr Med Res Opin.* 29:117-125.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* 27(1): 76-89.
- Quispe, A., Zavala, D., Posso, M., Rojas, J. y Vaisberg, A. 2007. Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanábana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *CIME.* 12(1):19-22.
- Rani, D.J., Devi, R.R. y Shri, M.V. 2013. Phytochemical screening and antimicrobial activity of various solvent extracts of *Annona reticulate* leaves. *International Journal of Science Inventions Today.* 2 (5): 347-358.
- Rarassari, M.A. y Maftuch, H.N. 2016. Phytochemicals and antibacterial activities of soursop Leaf (*Annona muricata*) against *Edwardsiella tarda* (*In Vitro*). *J. Life Sci. Biomed.* 6(1): 06-09.
- Rice-Evans, C.A. y Miller, N.J. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* 24:790-795.
- Rieser, M.J., Gu, Z.M., Fang, X.P., Zeng, L., Wood, K.V. y Mc Laughlin, J.L. 1996. Five novel monotetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 59 (2): 100-108.
- Robert, I., Palamberg, R.M., Dulay, R. y Eden, S.D. 2018. Phytochemicals and teratogenic effects of water extracts of rind of select fruits. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences.* 7 (5): 938-952.
- Robil, J.L.M. y Tolentino, V.S. 2015. Histological localization of tannins at different developmental stages of vegetative and reproductive organs in *Medinilla magnifica* (*Melastomataceae*). *Flora – Morphology, Distribution, Funct. Ecol. Plant.* 217:82-89.
- Rodríguez-García, A., Martín, J.A., López, R., Mutke, S., Pinillos, F. y Gil L. 2015. Influence of climate variables on resin yield and secretor structures in tapped *Pinus pinaster* Ait. in central Spain. *Agric. Forest. Meteorol.* 202:83-93.
- Roslida, A.H., Tay, C.E. y Zuraini, A. 2010. Antiinflammatory and anti-nociceptive activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *J Nat Remedies.* 10: 97-104.

- Ruel, J.J., Ayres, M.P., Lorio, J. y Peter, L. 1998. Loblolly pine responds to mechanical wounding with increased resin flow. *Can. J. For. Res.* 28(4): 596-602.
- Rutter, R.A., 1990. Catálogo de plantas útiles de la Amazonia Peruana". Lima: Editor CONCYTEC. Disponible en: <https://www.sil.org/system/files/reapdata/15/20/84/.../ccp22.pdf>.
- Sangeetha, V.S. y Beena, L. 2017. In vitro screening of *Annona reticulata* L. pericarp for antimicrobial activity. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* 8(4): 169-177.
- Serafini, M., Peluso, I. y Ragguzzini, A. 2010. Flavonoids as antiinflammatory agents. *P Nutr Soc.* 69: 273-278.
- Sharma, A., Sharmab, A.K., Chanda, T., Khardiyaa, M. y Agarwal, S. 2013. Preliminary phytochemical screening of fruit peel extracts of *Annona squamosa* Linn. *Current Pharma Research.* 4(1): 1038–1043.
- Shirwaikar, A., Rajendran, K., Dinesh Kumar, C. and Ram Gopal, B. 2017. *In vitro* antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Ind. J. Exp Biol.* 45(9): 123-126.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental.* La Habana. Editorial Pueblo y Educación. 743 p.
- Simon, K., Santhoshkumar, R. y Neethu, S.K. 2016. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of *Annona squamosa* (L.) leaf extracts. *J. Pharmacog. Phytochem.* 5(4): 128-131.
- Singh, B. y Bhat, T.K. 2003. Potential therapeutic application of some anti-nutritional plant secondary metabolites. *J Agric Food Chem.* 51(19):5579-97.
- Singh, D.R., Singh, S. y Banu, S. 2014. Phytochemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of potential underutilized fruit soursop (*Annona muricata* L.) in Bay Islands. *Journal of the Andaman Science Association.* 19 (1): 30-37.
- Sivankalyani, V., Feygenberg, O., Diskin, S., Wright, B. y Alkan, N. N. 2016. Increased anthocyanin and flavonoids in mango fruit peel are associated with cold and pathogen resistance. *Postharv. Biol. Technol.* 111:132–139.
- Skalicka-Woźniak, K., Orhan, I.E., Cordell, G.A., Nabavi, S.M. y Budzyńska, B. 2015. Implication of coumarins towards Central Nervous System disorders. *Pharmacol. Res.* 103:188-203.

- Solomon, W.G.O., Ugoh, S.C. y Mohammed, B. 2014. Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Annona muricata* L. leaf extracts. *American J Bio Chem Pharm Sci.* 2(1):1-7.
- Soriano, I.R., Rilye, I.T., Potter, M.J. y Bowers, W.S. 2004. Phytoecdysteroids: A Novel Defense Against Plant-Parasitic Nematodes. *J. Chem. Ecol.* 30(10): 1885-1899.
- Soumya, P., Choudary, K.A., Lopamudra, D. y Avijeet, J. 2009. Plants in traditional medicinal system-future source of new drugs. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical.* 1(1):1-23.
- Strasburger, E.F., Noll, H., Schimper, A.F.W. 1971. Tratado de Botánica. Barcelona: Marin. P. 582.
- Styers, D., Sheehan, D.J., Hogan, P. y Sahm, D.F. 2006. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann. Clin. Microb. Antimicrob.* Feb 9; 5:2.
- Suherman, S.E. y Widowati, W. 2014. *Annona muricata* leaves have strongest cytotoxic activity against breast cancer cells. *Universa Medicina.* 33 (3): 179-184.
- Sun, S., J, Liu., H, Kadouh., X, Sun. y K, Zhou. 2014. Three new anti-proliferative *annonaceous acetogenins* with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). *Bioorganic Medic Chem Letters.* 24: 2773-2776.
- Sundarrao, K., Burrows, I. y Kuduk, M. 1993. Preliminary screening of anti-bacterial and anti-tumor activities of papuan new guinean active medicinal plants. *Pharmaceutical Biol.* 31: 3-6.
- Surh, Y.J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Natural Reviews in Cancer.* 3: 768–780.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2010. Fifth ed. Sinauer Associates Inc., Massachusetts. *Plant Physiology.*
- Tamilselvan, N., Thirumalai, T., Shamala, P. y David, E. 2014. A review on some poisonous plants and their medicinal values. *Journal of Acute Disease.* 10: 85-89.
- Thakur, A., Singla, R. y Jaitak, V. 2015. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategie mechanism of action and SAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* 101:476-495.

Tripathy, S., D. Pradhan and M. Anjana, 2010. Anti-inflammatory and antiarthritic potential of *Ammania baccifera* Linn. *Int. J. Pharm. Biosci.* 1: 1-7.

Uchegbu, R.I., Ukpai, K.U., Iwu, I.C., y Akalazu, J.N. 2017. Chemical Composition of the Leaf Extract of *Annona muricata* Linn (Soursop) Grown in Eastern Nigeria. *Archives of Current Research International.* 7(1): 1-7.

Usunomena, U. y Paulinus, O.N. 2016. Phytochemical analysis and mineral composition of *Annona muricata* leaves. *International Journal of Research and Current Development.* 1 (1): 7-10.

Uyoh, E.A., Chukwura, P.N., David, I.A. and Bassey, A.C. 2013. Evaluation of antioxidant capacity of two *Ocimum* species consumed locally as spices in Nigeria as a justification for increased domestication. *Am. J. Plant Sci.* 4: 222-230.

Veitch, G.E., Boyer, A. y Ley, S.V. 2008. The Azadirachtin story. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47(49): 9402-9429.

Vijayalingam, T.A., Rajesh, N.V. y Kalpana, R.D. 2016. Antipediculicidal activity of seed extracts of *Annona muricata* Linn. *Annals of Phytomedicine.* 5(1): 122-126.

Vranová, E., Coman, D. y Gruissem, W. 2012. Structure and dynamics of the isoprenoid. *Pathway Network. Mol. Plan.* 5(2):318-333.

Wang, Q., Li, Y. y Sun, F. 2015. Tannins improve dough mixing properties through affecting physicochemical and structural properties of wheat gluten proteins. *Food Res. Int.* 69:64-71.

Widelski, J., Popova, M., Graikou, K., Glowniak, K. y Chinou, I. 2009. Coumarins from *Angelica lucida* L. – Antibacterial Activities. *Molecules.* 14: 2729–2734.

Wikaningtyas, P. y Sukandar, E.Y. 2016. The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 6(1): 16–19.

Wilke, M.S., Lovering, A.L. y Strynadka, N.C.J. 2005. Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 525–533.

Wink, M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* 75(2):225-233.

Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S.I., Corvalán, C., Cho, S.W., Kim, H., Kim, S.G., Kim, S.T., Choe, S. y Kim, J.S. 2015. DNA-free genome editing in plants with

preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33(11): 1162-1164.

World Health Organization (WHO). 2002. Antimicrobial Resistance; Fact Sheet No. 194; WHO: Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng.pdf. Consulta: abril, 2018.

Wright, G.D. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 1451–1470.

Wu, F.E., Zeng, L., Zhao, G.X., Gu, Z.M., Zhang, Y., Schwedler, J.T., McLaughlin, J.L. y Sastrodihardjo, S. 1995. Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 58 (6): 902-908.

Wu, J., Wang, Z., Shi, Z., Zhang, S., Ming, R., Zhu, S., Khan, M.A., Tao, S., Korban, S.S., Wang, H., Chen, N.J., Nishio, T., Xu, X., Cong, L., Qi, K., Huang, X., Wang, Y., Zhao, X., Wu, J., Deng, C., Gou, C., Zhou, W., Yin, H., Qin, G., Sha, Y., Tao, Y., Chen, H., Yang, Y., Song, Y., Zhan, D., Wang, J., Li, L., Dai, M., Gu, C., Wang, Y., Shi, D., Wang, X., Zhang, H., Zeng, L., Zheng, D., Wang, C., Chen, M., Wang, G., Xie, L., Sovero, V., Sha, S., Huang, W., Zhang, S., Zhang, M., Sun, J., Xu, L., Li, Y., Liu, X., Li, Q., Shen, J., Wang, J., Paull, R.E., Bennetzen, J.L., Wang, J. y Zhang, S. 2013. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Genome Res.* 23(2):396-408.

Yildirim, I. y Kutlu, T. 2015. Anticancer agents: saponin and tannin. *International Journal of Biological Chemistry.* 9(6): 332-340.

Zeng, L., Wu, F.E., Oberlies N.H., McLaughlin, J.L. y Sastrodihardjo, S. 1996. "Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*". *J. Nat. Prod.* 59(11):1035-1042.

Zungu, M.M. y Downs, C.T. 2015. Effects of tannins on fruit selection in three southern African frugivorous birds. *Behav. Process.* 111:84-89.

ANEXOS

Anexo 1. Ruta shiquímica para la síntesis de los compuestos fenólicos.

