

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**Evaluación de la Actividad Antiviral y Antioxidante de los
Extractos de Hojas de Guanábana (*Annona muricata* L)**



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Lizbeth Alicia López Arcadia

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Lizbeth Alicia López Arcadia**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.

Dra. Norma Patricia Silva Beltrán
Directora de Tesis

Dr. Mario Hiram Uriarte Montoya
Secretario

Dr. Saúl Ruíz Cruz
Vocal

Dr. David Octavio Corona Martínez
Suplente

DEDICATORIA

A mis padres

Dedicó la presente tesis, por todo su amor, sacrificio, esfuerzo y por enseñarme a creer en mí, éste triunfo es suyo papás. Gracias por motivarme a ser la mejor versión de mí misma, por enseñarme valores y por brindarme la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera. Ustedes siempre serán mis modelos a seguir, mis héroes, los amo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por brindarme la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera (Químico Biólogo Clínico) y a cada uno de mis maestros por ser parte de mi formación académica.

Gracias a mi directora de tesis, la Dra. Norma Patricia Silva por permitirme formar parte de éste proyecto, por su confianza, apoyo y dedicación, gracias por compartirme su amor por la investigación, éste logro no sería posible sin usted.

A mis sínodos, Dr. Hiram Uriarte, Dr. Saúl Ruíz y el Dr. David Corona, gracias por contribuir en la elaboración del presente trabajo, por su apoyo y cada una de sus observaciones (tanto en mis seminarios como en el escrito), gracias por ser parte de mi formación académica. Un agradecimiento especial al Dr. Saúl Ruíz por permitirme trabajar en las instalaciones del Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental (CIIBAA) de ITSON y llevar a cabo la presente investigación.

A mi mamá Sandra, de aquí hasta el cielo, gracias por tanto amor, por cada consejo y por cada sonrisa, especialmente por las mañanas, ya que de ti tomaba el valor para salir de la casa e ir a la universidad, siendo que las lecciones más importantes de mi vida ya me las estabas enseñando en casa “amor incondicional, fe en Dios y a no rendirme nunca”. Siempre serás mi mayor inspiración.

A mi papá Raúl, en el momento más difícil de nuestras vidas me hiciste sentir que mi único deber era seguir estudiando, gracias por eso papá. Gracias por hacerte cargo de todo (especialmente en los días malos), por todo el amor, por tus cuidados y desvelos, porque sé que si me llegara a perder en otro país irías por mí y me traerías de vuelta “broma familiar”, por no dejarme dar de baja ninguna clase, y por hacerme esa regla improvisada con diversos tamaños de hexágonos (simulando los anillos aromáticos de química orgánica) y porque siempre estas intentando darnos lecciones de vida. De una u otra forma siempre me has enseñado a no rendirme, así que nuevamente gracias papá, eres mi héroe.

A mi hermano Gabriel, gracias por siempre estar cantando, riendo, gritando y haciéndome reaccionar (ya sea para hacerme reír o enojar), gracias por estar a mi lado en cada momento, por ser mi apoyo y parte de mi motivación. Gracias por tu espíritu noble, serio, alegre, y por tu fuerza de voluntad, también eres mi héroe.

A mi familia, gracias por todo su amor, apoyo y esfuerzo, infinitamente gracias, son personas increíbles! Un agradecimiento especial a mi abuela Alicia y a mi tía Gaby porque a pesar de la distancia, hacen todo lo posible por estar aquí, ya sea visitándonos, con un mensaje o una llamada, gracias por todo su amor, apoyo y cuidados.

A mi novio Abraham, gracias por haber llegado a mi vida justo en el momento en el que nada parecía tener sentido (solo nosotros entendemos la inmensidad que se esconde detrás de ese “gracias”). Gracias por estar a mi lado en cada momento, por tu amor, tus cuidados, por tu apoyo e infinita paciencia, prácticamente detuviste mi caída libre. Gracias por ser mi amigo incondicional y por ayudarme a encontrar la paz necesaria para concentrarme en clases y aprobar mis exámenes.

A mis compañeros de universidad, gracias por cada momento que compartimos juntos (especialmente por cada hora infinita de clases), gracias por compartir sus guías de estudio conmigo (aprobé varias materias gracias a ustedes) y por su apoyo y motivación en cada proyecto y examen imposible. Un agradecimiento especial a Mei-Li porque por ti la escuela y CIIBAA, se volvieron unos de mis lugares favoritos (excepto cuando faltabas), sin ti este proyecto no habría sido lo mismo, muchas gracias Mei-Li.

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos	13
REVISIÓN DE LITERATURA	14
Biología de <i>Annona muricata</i> L	14
Distribución Nacional de la Guanábana.....	14
Sustancias Fitoquímicas presentes en <i>A. muricata</i> L	15
Métodos de Obtención de Extractos.....	16
Estrés Oxidativo	17
Antioxidantes.....	18
Eritrocitos: Modelo Celular Utilizado para Evaluar la Actividad Antioxidante	20
Bacteriófagos: Modelo Celular Utilizado para Evaluar la Actividad Antiviral	21
METODOLOGÍA	23
Material Vegetal	23
Preparación del Extracto Etanólico Acidificado.....	23
Preparación del Extracto Acuoso.	24
Evaluación de la Actividad Antioxidante	25
Método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo).	25

Método ABTS [2,2'- azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6- ácido sulfónico)]	25
Evaluación del Efecto Protector Sobre Eritrocitos Humanos	26
Evaluación de la Actividad Antiviral	27
Propagación de la Célula Hospedera.....	27
Propagación del Bacteriófago	28
Cuantificación del Bacteriófago.....	28
Ensayo Antiviral	29
Análisis Estadístico	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Evaluación de la Actividad Antioxidante.	30
Capacidad Antioxidante de los Extractos Mediante el Método DPPH.	30
Capacidad Antioxidante de los Extractos Mediante el Método ABTS.....	32
Evaluación del Efecto Protector de los Extractos Sobre Eritrocitos Humanos.....	35
Evaluación de la Actividad Antiviral	37
CONCLUSIONES.....	43
RECOMENDACIONES.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE TABLAS

Figura		Pagina
1.	Sustancias fotoquímicas presentes en hojas de guanábana	16
2	Capacidad antioxidante detectada en hojas de guanábana de diferentes orígenes	19

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Distribución potencial de la guanábana (<i>A. muricata</i> L) en México	15
2.	Modelo ilustrativo de estrés oxidativo en la membrana del eritrocito	21
3	Bacteriófago Av08	22
4.	Hojas secas de <i>A. muricata</i> L	23
5.	Extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana	24
6.	Extracto acuoso de hojas de guanábana	24
7.	Radical DPPH antes y después de su neutralización con el extracto evaluado	25
8.	Radical ABTS antes y después de su neutralización con el extracto evaluado	26
9.	Ensayo antihemolítico	27
10.	Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante	31
11.	Capacidad antioxidante de extractos de hojas de guanábana (<i>A. muricata</i> L) evaluada mediante el método DPPH	32
12.	Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante	33
13.	Capacidad antioxidante de extractos de hojas de guanábana (<i>A. muricata</i> L) evaluada mediante el método ABTS	34
14.	Capacidad antioxidante de extractos de hojas de guanábana (<i>A. muricata</i> L) evaluada mediante el efecto protector sobre eritrocitos humanos	36
15.	Capacidad antiviral del extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana, para la concentración 0.25 mg/mL	38
16.	Control PBS	39
17.	Capacidad antiviral del extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana, para la concentración 0.5 mg/mL	40
18.	Capacidad antiviral del extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana, para la concentración 1 mg/mL	41

RESUMEN

La guanábana (*Annona muricata* L.), es un árbol perenne cultivado en México. Sus hojas han sido utilizadas en medicina tradicional por los pueblos indígenas por sus capacidades antitumorales, antiparasitarias y anti-diarreicas (Solís-Fuentes y col., 2010). Una de las propiedades que ha sido ampliamente estudiada es la antioxidante; sin embargo, no se han reportado investigaciones que evalúen dicha propiedad sobre eritrocitos humanos. Otra de las propiedades que ha sido atribuida a las hojas de guanábana es la antimicrobiana, no obstante, los estudios antivirales que han sido reportados son escasos y ninguno de ellos describe sus efectos sobre virus entéricos patógenos para el humano. En la presente investigación se efectuaron estudios antioxidantes *in vitro*, para los extractos acuosos y etanólicos acidificados de hojas de guanábana, mediante los métodos DPPH, ABTS, y mediante el análisis de la capacidad protectora sobre eritrocitos humanos utilizados como modelo celular. También se evaluó la actividad antiviral del extracto etanólico acidificado, al confrontarlo con el bacteriófago Av08, que es un modelo comparable con virus entéricos. En este ensayo las concentraciones evaluadas fueron 0.25, 0.50 y 1 mg/mL. Los extractos acuosos mostraron valores de capacidad antioxidante de 1.141 ± 0.009 y 17.726 ± 0.736 mmol equivalente trolox/gramos de extracto (mmol ET/ge) para DPPH y ABTS respectivamente. Por el contrario, los extractos etanólicos acidificados presentaron mayor capacidad antioxidante con un valor de 23.290 ± 0.103 y 24.735 ± 0.490 mmol ET/ge para DPPH y ABTS, respectivamente, mientras que la inhibición de hemólisis fue de un 33 % y 52% para el extracto acuoso y el extracto etanólico acidificado, respectivamente. En el estudio antiviral, únicamente se evaluó el extracto etanólico acidificado debido a que mostró mayor actividad antioxidante. Los valores de reducción viral fueron de 4 a 9 Log₁₀ UFP/mL en tiempos de contacto de 15 a 360 minutos, mostrando total inhibición del bacteriófago Av08 al tiempo de 360 min. Se observó una relación directa entre las concentraciones de los extractos y la capacidad antiviral. Por lo tanto, las hojas de guanábana podrían ser una opción en el tratamiento del estrés oxidativo y en la reducción de infecciones enterovirales.

INTRODUCCIÓN

La historia del hombre está estrechamente ligada con las plantas medicinales y aromáticas. Antes de conocer el fuego y domesticar a los animales, su subsistencia dependía en gran parte de su interacción con éstas y sus frutos, proporcionándole alimentos y medicinas para prevenir y curar diversas enfermedades (Tavares y col., 2008; Fretes, 2010). Gradualmente el hombre fue generando conocimientos sobre las virtudes curativas de las plantas transmitiéndolos de generación a generación, sentando las bases de la medicina tradicional.

En México, la medicina tradicional constituye uno de los principales recursos terapéuticos debido principalmente a la idea generalizada de que el consumo de ciertas sustancias, presentes en las plantas previene diversas enfermedades degenerativas (Dorman y col., 2004). Sin embargo, el porcentaje de especies que han sido analizadas científicamente es muy escaso, por lo que es necesario profundizar sobre el tema para generar no solo grandes listados de plantas con información etnobotánica, sino bancos de datos con investigaciones actualizadas sobre diversos aspectos fitoquímicos, farmacológicos y toxicológicos, para en un futuro inmediato producir fitomedicamentos formulados a partir de extractos vegetales debidamente regularizados, que puedan garantizar la prevención y el alivio de las enfermedades (Osuna y col., 2005; Jasso de Rodríguez y col., 2011).

Además de la producción de compuestos como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, clorofilas e intermediarios metabólicos, las plantas medicinales elaboran otros metabolitos “secundarios” que son sustancias que no parecen participar directamente en su crecimiento o desarrollo, pero que intervienen en las interacciones ecológicas entre las plantas y el ambiente (González y col., 2002). Algunos ejemplos de estos metabolitos son: materiales cerosos, pigmentos, polifenoles, flavonoides, taninos, lignanos, compuestos esteroidales, además de compuestos que intervienen en los mecanismos de defensa contra sus depredadores como los alcaloides y lecitinas, entre otros, dichas sustancias han presentado propiedades benéficas hacia la salud humana, eliminando bacterias, hongos, parásitos y virus e incluso neutralizando diversos radicales libre (Rendón y col., 2001). En este último caso, estos metabolitos actúan como donadores de protones o electrones y de esta manera previenen o retrasan el desarrollo de enfermedades degenerativas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, entre otras (Marwah y col., 2007).

Dentro de las especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana se encuentra *Annona muricata* L, que es un pequeño árbol perenne miembro de la familia *Annonaceae*. Las especies de ésta familia además de elaborar polifenoles, flavonoides y

alcaloides, se han reportado como productoras mayoritarias de acetogeninas, un tipo especial de metabolitos secundarios derivados de ácido grasos de cadena larga (Andrade y col., 2006). Las acetogeninas son sustancias que se han reportado con propiedades anticancerígenas, antibacterianas y antivirales. (Mata y col., 1998). Así mismo, diversos estudios farmacológicos han demostrado que *A. muricata* L posee propiedades antidiabéticas y antioxidantes, previniendo enfermedades degenerativas como el cáncer (Adewole y Ojewole, 2009; Adeyemi y col., 2009). En lugares como África, Nigeria y América del Sur, las semillas y hojas de la especie *Annona*, son utilizadas para tratar diversos tipos de cáncer (Watt y Breyer, 1962; Adewole y Ojewole, 2009; Mishra y col., 2013).

En México, las hojas de *A. muricata* L son utilizadas en la medicina tradicional para tratar afecciones gastrointestinales y en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades degenerativas. Sin embargo, se desconoce el alcance específico de sus propiedades, por lo que la presente investigación pretende estudiar las propiedades biológicas de las hojas de *A. muricata* L con el propósito de aportar información sobre sus actividades antivirales, debido a que las enfermedades diarreicas en México ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad en la población menor de cinco años de edad, siendo las enfermedades enterovirales (gastroenteritis), la segunda causa de muerte (OMS, 2011). Así como también aportar información sobre el alcance de sus propiedades antioxidantes a nivel celular, debido a que el daño oxidativo ha sido relacionado con al menos 100 enfermedades humanas (McKee, y McKee, 2009). Además su investigación contribuiría en el área de la etnobotánica debido a que no se han informado estudios antioxidantes que evalúen el efecto que tienen las hojas de guanábana sobre eritrocitos humanos y tampoco existen investigaciones que evidencien la capacidad antiviral de las hojas de guanábana sobre enterovirus, lo que elevaría su valor medicinal y comercial.

Con base a lo anterior, esta investigación pretende continuar estudiando las propiedades biológicas de las hojas de *Annona muricata* L, evaluándola con el propósito de generar nuevos conocimientos de esta planta, para así contribuir con la comunidad científica en la búsqueda de sustancias que eliminen virus entéricos y disminuyan efectos oxidantes en las células humanas

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad antiviral y antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos acidificados de hojas de guanábana (*A. muricata* L).

Objetivos Específicos

1. Obtener extractos de hojas de guanábana (*A. muricata* L) a partir de extracciones etanólicas acidificadas y acuosas.
2. Determinar la actividad antioxidante de los extractos mediante los ensayos *in vitro*, DPPH, ABTS y mediante el análisis de la capacidad protectora sobre eritrocitos humanos.
3. Determinar la actividad antiviral del extracto que muestre mayor actividad antioxidante, utilizando bacteriófagos Av08 como modelo enteroviral.

REVISIÓN DE LITERATURA

Biología de *Annona muricata* L

A. muricata L es miembro de la familia *Annonaceae*, es un pequeño árbol perenne ampliamente cultivado en los países tropicales (Baskar y col., 2007). Éste mide entre 4 y 9 metros de altura y tiende a crecer de forma erecta, su ramificación es baja y tupida (Pinto y col., 2005).

Produce frutos conocidos comúnmente como “graviola” o “guanábana”, los cuales son ovados, espinosos, de color verde oscuro con un peso promedio de 4 kg y una longitud de 40 cm (León, 2000). Tiene entre 127 y 170 semillas dispersas en toda la pulpa, la cual es blanca, algodonosa y fibrosa. Las semillas de color negro son tóxicas, su tamaño varía entre 1 y 2 cm de longitud y pesan alrededor de 0.33 a 0.59 g (Pinto y col., 2005).

Los tallos del árbol son redondos, rugosos y no pubescentes de color café oscuro. Sus hojas tienen peciolo cortos y son ovada-oblongas a cilíndricas, de 14 a 16 cm de longitud y de 5 a 7 cm de ancho y sus flores miden de 3.2 a 3.8 cm de longitud (León, 2000).

Distribución Nacional de la Guanábana

En el interior de la República Mexicana se distribuye en áreas de clima cálido, en zonas costeras de Veracruz, Tabasco, Quintana Roo, Nayarit, Colima, Michoacán, Oaxaca, Guerrero, Yucatán y Chiapas. En particular destaca el municipio de Compostela, Nayarit en la zona costera donde la guanábana es más abundante en forma de plantaciones comerciales de árboles provenientes de semilla. Así mismo, el municipio de Tecomán, Colima destacan las plantaciones comerciales en la zona limítrofe con Michoacán, y también la zona central de Veracruz, según la distribución del Mapa de la figura 1 y los estudios de campo realizados en el año 2010 (Hernández y col., 2013).

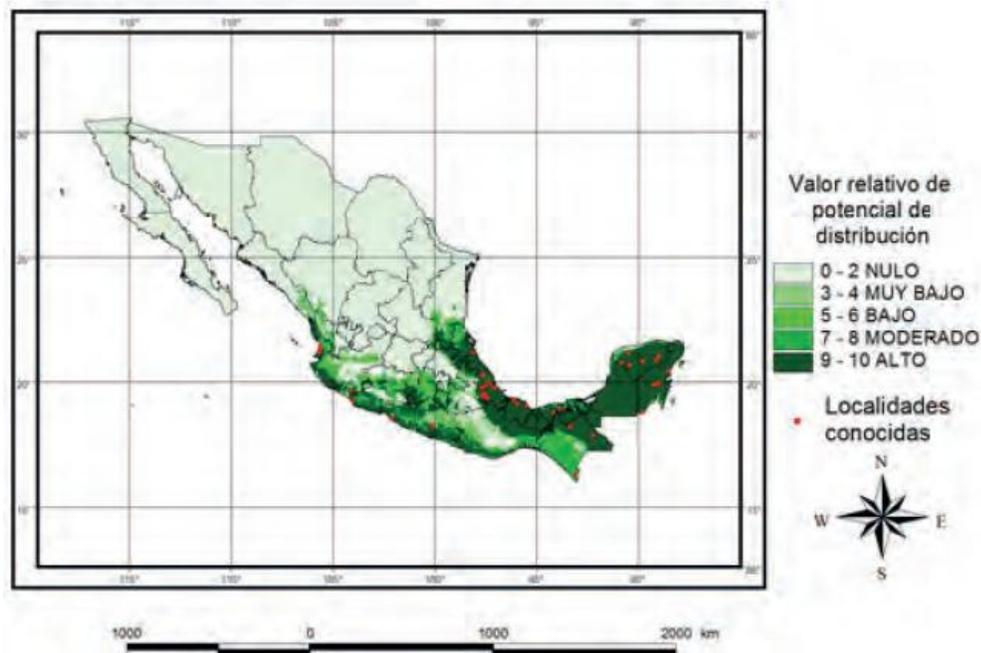


Figura 1. Distribución potencial de la guanábana (*A. muricata* L) en México.

Fuente: Hernández y col., 2013

Sustancias Fitoquímicas Presentes en *A. muricata* L

Las especies de la familia *Annonaceae*, han sido reportadas con un gran número de compuestos químicos, entre ellos están los flavonoides, alcaloides y acetogeninas. Los flavonoides y alcaloides han presentado propiedades antioxidantes y antimicrobianas, mientras que las acetogeninas han presentado propiedades anticancerígenas. Debido a lo anterior, la corteza, hojas y raíces de algunas especies de *Annona* se han utilizado tradicionalmente en el tratamiento de diversas afecciones intestinales, e incluso como antiparasitario, también se han utilizado en el tratamiento del cáncer. En este ámbito, la industria farmacéutica ha encontrado aplicaciones de las sustancias fitoquímicas presentes en las diversas especies de *Annona*, dentro de ellas podemos mencionar aplicaciones antifúngicas, bacteriostáticas, entre otras. (I.C.U.C., 2002).

Por otro lado, *A. muricata* L es una de las especies de *Annona* de mayor cultivo en México. Nayarit figura como uno de los principales productores (produciendo 14,365.20 toneladas anuales) (SAGARPA, 2006), dicha producción representa una oportunidad única de aprovechamiento para la obtención de estas sustancias bioactivas que pueden ofrecer nuevas

alternativas para mejorar o mantener su salud, debido a que diversos estudios en guanábana han demostrado la presencia de estos componentes antioxidantes (Andrade y col., 2006; Correa., 2012). La tabla 1 muestra algunas de las sustancias bioactivas detectadas en hojas de guanábana y son comparadas con otras sustancias con alto poder antioxidante.

Tabla 1. Sustancias fotoquímicas presentes en hojas de guanábana.

Componente	cantidades	Comparación
Ácido gálico	48.6 ± 1.5 mg/100 g	Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i>) nd
Ácidos clorogénicos	Ácidos cafealquínico (CQA)	Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i>)
	3-CQA 3.6 ± 0.1 mg/100 g	Ácidos cafealquínico (CQA)
	4-CQA 0.5 ± 0.1 mg/100 g	3-CQA nd
	5-CQA 3.3 ± 0.2 mg/100 g	4-CQA nd
	Ácidos feruloilquinico (FQA)	5-CQA 4.0 ± 0.2 mg/100 g
	3-FQA trazas	Ácidos feruloilquinico (FQA)
	4-FQA nd	3-FQA nd
	5-FQA nd	4-FQA nd
	Ácidos dicafeoilquinico (diCQA)	5-FQA nd
	3,4-diCQA trazas	Ácidos dicafeoilquinico (diCQA)
	3,5-diCQA nd	3,4-diCQA trazas
4,5-diCQA nd	3,5-diCQA trazas	
		4,5-diCQA trazas

nd = no detectado

Fuente: Correa y col., 2012

Métodos de Obtención de Extractos

Los extractos consisten en la fracción no volátil de los metabolitos biológicamente activos presentes en las plantas, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción. Entre los procesos extractivos de los diferentes fitoquímicos se encuentran los procesos extractivos convencionales, como los de arrastre por infusión-cocción y los de extracción por maceración con disolventes. En el primero se utiliza agua hirviendo sobre la matriz fresca o seca, se deja reposar durante un tiempo y se filtra. En la extracción por

maceración se utilizan disolventes como alcoholes, hidrocarburos, ésteres, entre otros, los cuales son utilizados para penetrar la matriz de la planta y disolver las sustancias bioactivas, que se filtran, evaporan y concentran a baja temperatura (con rotavapor) para la completa eliminación del solvente y la obtención del extracto (Camel, 2000).

Por otra parte, el uso de disolventes como método de extracción en plantas, influye significativamente en el arrastre de los compuestos activos que actúan en la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos. Dentro de las propiedades ideales de un disolvente se encuentran las siguientes: poseer capacidad de disolver rápidamente todos los principios activos y la menor cantidad de materia inerte, además debe tener un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminar el solvente rápidamente (Costa y col., 2012).

Estrés Oxidativo

En bioquímica se considera oxidación a “todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación) y reducción donde se captan electrones o se pierden oxígenos o se gana un hidrógeno” (Chang R. 2010). Estos procesos, conocidos bioquímicamente como reacciones de óxido-reducción, son imprescindibles para los seres vivos, ya que obtienen energía a partir de ellos. El oxígeno es necesario para la vida, sin embargo, puede ser también fuente de enfermedades a través de una producción incontrolada de las especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuales dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, entre otras). Las ERO se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía, especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco, entre otras (Roche y Romero, 1997; Veiga y col., 1997). De las ERO inorgánicas las más importantes son el oxígeno molecular O_2 , el radical-anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^\cdot) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Veiga y col., 1997). Cuando se acumulan grandes cantidades de ERO, se altera el equilibrio químico celular, produciendo el llamado estrés oxidativo (Elejalde, 2001). Es importante mencionar que no existen métodos estandarizados para medir el estatus de estrés oxidativo en humanos, ninguno de los llamados biomarcadores del estrés oxidativo consiguen

de forma aislada una valoración precisa y definitiva del estrés oxidativo que pueda ser directamente aplicado a la clínica humana (Pryor y Godber, 1991; Pryor, 2000).

Antioxidantes

El cuerpo humano durante sus procesos metabólicos y durante el estrés que mantiene ante diversos factores externos produce ERO, que se generan por diversos sistemas enzimáticos a través del consumo de oxígeno, es decir, al respirar (Dina y col., 2009). En pequeñas cantidades, éstas ERO pueden ser benéficas como transductores de señales y reguladores del crecimiento (Hancock y col., 2001). Sin embargo, durante el estrés oxidativo, grandes cantidades de estas ERO pueden favorecer algunas condiciones de enfermedades humanas tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (Bagchi y col., 2000). En este sentido, los antioxidantes que son sustancias que controlan o previenen estos procesos, son muy necesarios.

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, captando radicales libres (primarios) o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres (secundarios) (Floegel y col., 2011). Existen sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar los radicales libres generados en los procesos redox celulares, dentro de ellos se encuentra la catalasa de los peroxisomas, la superóxido dismutasa, entre otros. También existe una gran variedad de antioxidantes no enzimáticos, capaces de eliminar directamente los radicales libres y algunos ejemplos de ellos son la vitamina C y vitamina E. Así mismo, Las proteasas celulares son otro ejemplo ya que eliminan las proteínas alteradas por la oxidación, que son a su vez fuente generadora de más ERO (Elejalde, 2001).

Los mecanismos antioxidantes son muy diversos, sin embargo, todos coinciden en que dicho mecanismo inicia cuando la reacción de oxidación produce radicales libres y da origen a una reacción en cadena que daña las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones, quitando intermedios del radical libre e inhibiendo otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores (Burneo, 2009). Por lo tanto, se requieren constantemente ciertas cantidades de antioxidantes exógenos para mantener un nivel adecuado de especies ERO en el cuerpo humano (Atmani y col., 2009; Egan y col., 2001; Krishnaiah y col., 2011 y Wang y col., 2011; Franzini y col., 2012). En este sentido, los estudios epidemiológicos han sugerido que el consumo de antioxidantes

naturales, prevalentes en las plantas, puede disminuir los efectos negativos de las ERO (Isabelle y col., 2010), mediante la reducción de los radicales libres (Floegel y col., 2011). Esta protección ha sido en parte atribuida a la presencia de vitaminas, flavonoides, antocianinas y otros compuestos fenólicos (Klimczak y col., 2007). Diversos estudios en hoja de guanábana de diferentes orígenes han mostrado capacidad antioxidante, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Capacidad antioxidante detectada en hojas de guanábana de diferentes orígenes.

País	Ensayo	Resultado	Comparación
India	DPPH	70 µg/mL IC50	Anona blanca 65 µg/mL IC50 Annona colorada 80 µg/mL IC50
	ABTS	305 µg/mL IC50	Anona blanca 300 µg/mL IC50 Annona colorada 260 µg/mL IC50
	Peroxidación lipídica	455 µg/mL IC50	Anona blanca 480 µg/mL IC50 Annona colorada 315 µg/mL IC50
	Seguimiento al radical óxido nítrico	350 µg/mL IC50	Anona blanca 370 µg/mL IC50 Annona colorada 225 µg/mL IC50
	Seguimiento al radical hidroxilo	155 µg/mL IC50	Anona blanca 300 µg/mL IC50 Annona colorada 215 µg/mL IC50
Brasil	DPPH	221.52 ± 16.12 µg/mL IC50	Catingueira (<i>Poincianella pyramidalis</i>) 42.95 ± 1.77 µg/mL IC50

Fuente: Correa y col., 2012

Eritrocitos: Modelo Celular Utilizado para Evaluar la Actividad Antioxidante

Los eritrocitos o glóbulos rojos se producen en la médula ósea y se liberan hacia la circulación periférica, donde tienen una vida media de alrededor de 120 días (Rodak, 2005). Éstos son utilizados como un modelo celular *in vitro* en la investigación del daño oxidativo, puesto que permiten analizar los efectos de las ERO y el potencial antioxidante de diversos compuestos, debido a que los eritrocitos están particularmente expuestos al estrés oxidativo. Adicionalmente los eritrocitos se consideran un buen modelo, debido a que son transportadores de oxígeno, tienen un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, proteínas en sus membranas y una elevada concentración de hemoglobina intracelular, que le permiten actuar como promotores de procesos oxidativos (Tedesco y col., 2000; Ugartondo y col., 2006).

Los eritrocitos son un tipo de muestra fácil de obtener y de preparar y representan un modelo celular muy simple (no contienen ni núcleo ni orgánulos); además a pesar de que les falta la maquinaria de síntesis proteica y que son menos especializadas que muchas otras células, sus membranas desarrollan suficientes funciones en común con ellas, como el transporte activo, pasivo, la producción de gradientes iónicos y eléctricos, para ser consideradas representativas de las membranas plasmáticas celulares en general (Suwalsky y col., 2008).

La membrana celular del eritrocito es una barrera de difusión que protege el interior de la célula, por lo que su estructura y función son susceptibles a sufrir alteraciones debido a la interacción con agentes extraños. Además por su composición molecular es el principal blanco fisiológico del ataque de las ERO (Suwalsky y col., 2008), sufriendo una serie de alteraciones (peroxidación lipídica, fragmentación y degradación de proteínas y hemólisis) como se observa en la figura 2.

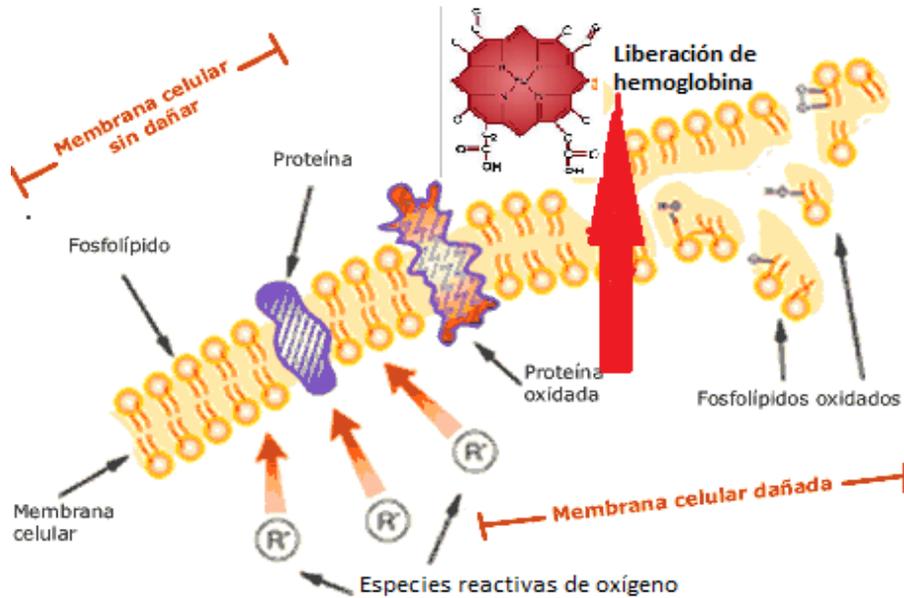


Figura 2. Modelo ilustrativo de estrés oxidativo en la membrana del eritrocito

Fuente: Adaptación de Murray. (2009).

Bacteriófagos: Modelo Celular Utilizado para Evaluar la Actividad Antiviral

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y lisan bacterias (Pansri y col., 2009). Su genoma, puede componerse de ADN o ARN de cadena doble o de cadena sencilla, es protegido por una cubierta de proteínas estructurales denominada cápside (Vispo y Puchades, 2001). Esta estructura puede ser icosaédrica, helicoidal o filamentosa (Clark y March, 2006) y sus proteínas estructurales pueden además proveer al fago de: cuello, cola, fibras caudales, laminas basales y/o espículas (Mathur y col., 2003). Los fagos son considerados “la forma de vida más abundante y ubicua en la tierra” (Sergei y Konstantin, 2008), por lo que pueden ser aislados de diversos entornos, tales como, aguas residuales (Fiorentin y col., 2004), el suelo (Ashelford y col., 2003), los alimentos (Kennedy y col., 1986; Hsu y col., 2002), el esputo, la saliva (Bachrach y col., 2003) y el sistema gastrointestinal.

Los bacteriófagos se replican mediante dos ciclos: El primer ciclo es el denominado lítico lo llevan a cabo los fagos virulentos, en donde se da un reconocimiento de los receptores de la bacteria por los contra receptores del fago, originando una adsorción del fago a la célula huésped, seguido de la penetración del ácido nucleico fágico a la bacteria y el desarrollo

intracelular de los componentes fágicos para la liberación de progenie viral mediante lisis celular, causada por enzimas líticas denominadas endolisinas, las cuales son codificadas por el genoma fágico durante la última fase del ciclo lítico para degradar el péptidoglicano de la bacteria (Hermoso y col., 2007).

El segundo es el denominado ciclo lisogénico, desarrollado por los fagos temperados y comprende prácticamente los mismos pasos que el lítico, pero después de la penetración el ácido nucleico del fago se inserta en el cromosoma bacteriano y se replica como si fuera un gen más de la bacteria por una o varias generaciones sin mayores consecuencias metabólicas para las bacterias, no obstante en éste ciclo, el fago tras un proceso de daño grave al material genético de la bacteria, puede salir del cromosoma bacteriano y llevar a cabo un ciclo lítico; este es un modo de infección latente y ocurre con baja frecuencia (Mathur y col., 2003).

Los bacteriófagos, por sus propiedades líticas, representan un modelo sencillo, rápido, barato, sensible, altamente específico y comparable con modelos de virus patógenos para el humano (Morales y col., 2002), por lo que bacteriófagos como el Av08 resulta una opción para determinar la capacidad antiviral del extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana.

El fago es miembro de la familia *Myoviridae*, que se compone de DNA de doble cadena. Los fagos de la familia *Myoviridae* se han aislado con frecuencia de las heces frescas de mamíferos y están asociados con el efecto lítico en *E. coli* y *Salmonella* (López- Cuevas y col., 2011). El fago Av08 tiene una longitud de 231 ± 7 nm, una cabeza alargada isométrica de 93 ± 3 nm por 118 ± 1 nm, y una cola rígida y contráctil de 106 ± 3 nm de longitud y de alrededor de 18 nm de diámetro (figura 3).

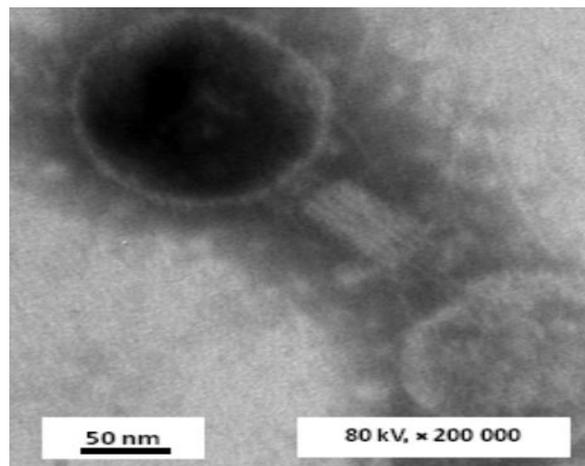


Figura 3. Bacteriófago Av08.

Fuente: López-Cuevas y col., 2011

MÉTODOLOGÍA

Material Vegetal

Las hojas de *A. muricata* L, seleccionadas para este estudio se obtuvieron de huertos establecidos en San Blas, Nayarit, México durante el mes de Enero del año 2015 (figura 4). Las hojas fueron secadas a 45 °C por 24 h en un horno Blinder, modelo ED 115, pulverizadas y tamizadas en un tamiz con poros de 2 mm de diámetro.



Figura 4. Hojas secas de *A. muricata* L

Preparación del Extracto Etanólico Acidificado

El extracto se preparó añadiendo 10 g de polvo de *A. muricata* L a 150 mL de una solución extractora compuesta de etanol 90% y ácido acético al 10%, en una relación (9:1). Se maceró por medio de una agitación constante y en completa oscuridad por 72 h. Se realizó un filtrado al vacío utilizando papel Whatman No. 1 y se concentró en un rotavapor (Yamato RE301-Japón). El extracto obtenido fue almacenado en refrigeración hasta su posterior análisis (figura 5).



Figura 5. Extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana.

Preparación del Extracto Acuoso.

Para la obtención del extracto acuoso, 10 g del polvo de hojas de guanábana se hirvieron durante 5 minutos en 150 mL de agua. El extracto se filtró al vacío en papel Whatman No. 1 y se concentró en rotavapor (figura 6). El extracto se conservó en refrigeración hasta su análisis.



Figura 6. Extracto acuoso de hojas de guanábana

Evaluación de la Actividad Antioxidante

Método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo).

Se midió la capacidad antioxidante de los extractos utilizando el radical DPPH según Moein y Moein (2010), con algunas modificaciones. Una alícuota de 280 μL de la disolución del radical DPPH (0.025 mg/mL en metanol) fue mezclada con 20 μL del extracto a evaluar y se dejó reposar por 30 minutos en completa oscuridad y se monitoreó la desaparición de color como se observa en la figura 7. La absorbancia fue leída a 490 nm en un lector de microplacas utilizando un espectrofotómetro un lector de microplacas BioRad iMark, Chicago, IL, USA. La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de Trolox (análogo de la vitamina E). Los resultados fueron expresados como μmol equivalente Trolox/g de extracto ($\mu\text{mol ET/g}$).



Figura 7. Radical DPPH antes y después de su neutralización con el extracto evaluado.

Método ABTS [2,2'- azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]

Se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Re y col. (1999), con algunas modificaciones. El radical ABTS se preparó al mezclar 19 mg en 5 mL de agua destilada. También fue preparada 1 mL de una solución de persulfato de potasio (37.8 mg/mL). Se tomaron 88 μL de la

solución de persulfato y se añadieron a la solución del radical, dicha mezcla se dejó reposar por 12-16 horas a temperatura ambiente. De ésta solución incubada se tomaron 500 μL y fueron diluidos en 30 mL de etanol para posteriormente ajustar la absorbancia a 0.7 ± 0.02 en un lector de microplacas a 750 nm. Finalmente fueron colocados 295 μL del radical y 5 μL del extracto evaluado (figura 8). La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de Trolox y los resultados fueron expresados como μmol equivalente Trolox/g de extracto ($\mu\text{mol ET/ge}$).

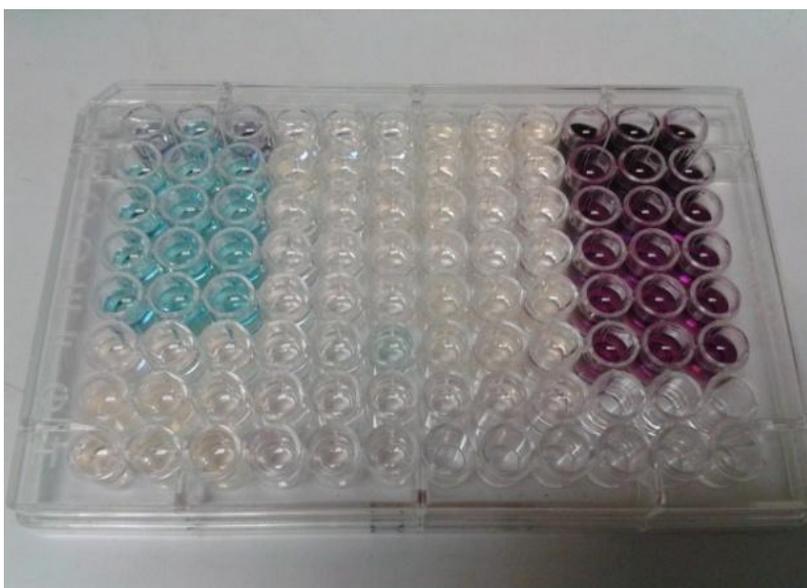


Figura 8. Radical ABTS antes y después de su neutralización con el extracto evaluado.

Evaluación del Efecto Protector Sobre Eritrocitos Humanos

La hemólisis fue inducida por el radical AAPH [2-2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro] de acuerdo a la metodología de Lu y col. (2010), con algunas modificaciones. Los eritrocitos fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) con un valor de pH de 7.4. Una vez lavados, se preparó una suspensión de eritrocitos humanos al 5% en PBS. Para el ensayo fue preparada una solución, en un tubo eppendorf, de 50 μL de la suspensión de eritrocitos, 50 μL del extracto evaluado y 200 μL del radical AAPH, la cual se incubó a 37°C en baño maría con agitación (30 rpm) durante 3 horas.

Una mezcla de reacción similar se preparó sin extracto como control (figura 9). Terminada la incubación se le agregó 1 mL de PBS y se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, la absorbancia se midió a 540nm en un lector de microplacas BioRad iMark, Chicago, IL, USA. El resultado fue expresado en porcentaje de inhibición, la cual fue calculada mediante la fórmula: $[(\text{Abs Control} - \text{Abs Final}) / \text{Abs Control} * 100]$.

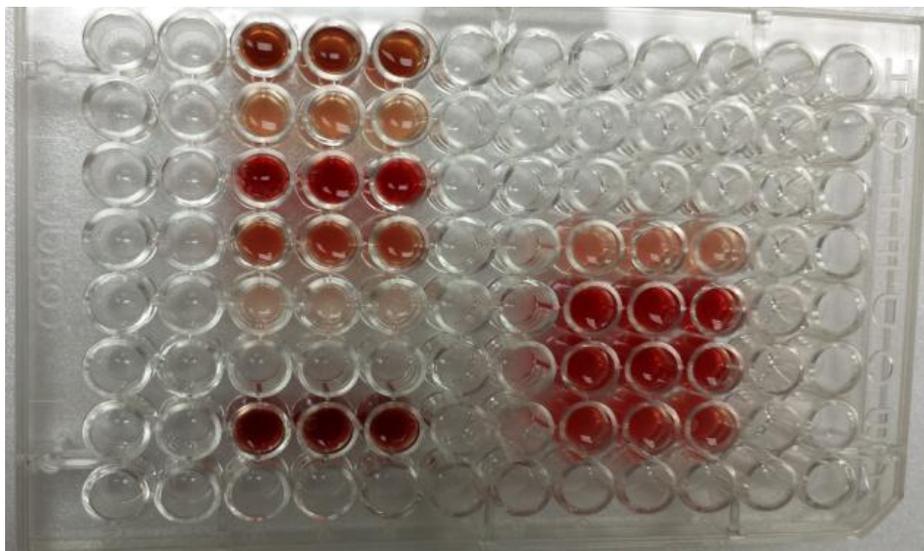


Figura 9. Ensayo antihemolítico

Evaluación de la Actividad Antiviral

Propagación de la Célula Hospedera.

Se utilizó la bacteria *E. coli* O157 como célula hospedera. La cepa fue obtenidas del cepario del laboratorio de microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y de Desarrollo (CIAD) unidad Culiacán. Para su propagación, ésta, fue inoculada en Caldo de Soya Tripticasa (TSB) durante 24 horas a 36°C.

Propagación del Bacteriófago

El bacteriófago se obtuvo de la colección viral del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria de el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), en Culiacán. Para su propagación se mezcló 100 µL de la solución purificada del bacteriófago con 1 mL de la bacteria *E. coli* O157 en un tubo que contenía 3 mL de TSB-agarosa al 0.4%, creando una suspensión de bacteria-bacteriófago. Dicha suspensión de bacteria-bacteriófago se vertió sobre cajas Petri con 10 mL de Agar de Soya Trypticase (TSA) sólido. Las cajas fueron incubadas durante 18-24 horas a 37 °C. Después de la incubación se les añadieron 6 mL de solución amortiguadora denominada buffer SM (MgSO₄·7H₂O 8 mM, NaCl 100 mM, gelatina porcino 0.002% p/v) y se agitaron por oscilación durante dos horas. La capa suave de la superficie se recuperó por remoción con un asa bacteriológica y el eluido resultante se depositó en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó a 10,000 revoluciones por minuto durante 15 minutos a 4 °C con el objetivo de eliminar los detritus de la célula hospedera. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa (Whatman, USA) con poros de 0.45 µm de diámetro, el filtrado se centrifugó a 10,000 RPM durante 2 horas a 4 °C, obteniéndose una pastilla la cual se conservó en buffer SM (Goodridge y col., 2003).

Cuantificación del Bacteriófago

Para la cuantificación del bacteriófago se hicieron diluciones decimales del colifago en buffer PBS. Se tomaron 50 µL del fago diluido, 500 µL de bacteria *E. coli* O157 y se colocaron en 1.5 mL de TSB-agarosa. La mezcla se vertió en la caja Petri con TSA correspondiente a la dilución. Se incubó a 37 °C durante 24 h, transcurrido el tiempo se procedió a leer las placas contando las UFP (Unidades Formadoras de Placa). Para su cuantificación se utilizó la siguiente fórmula:

$$UFP = \frac{\bar{X} (\# \text{ placas}) (10^{-10})}{0.1 \text{ ml}}$$

Ensayo Antiviral

Se evaluaron los efectos antivirales del extracto etanólico acidificado contra bacteriófagos Av08 (ADN). El extracto se disolvió en agua destilada previamente esterilizada y se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa con poros de 0.45 micras de diámetro para garantizar su esterilidad. Las concentraciones ensayadas fueron 0.25, 0.50 y 1 mg/mL respectivamente, cada concentración fue evaluada por duplicado. Una alícuota de 100 μ L del fago se confrontó con 3 mL del extracto. Se evaluaron 5 tiempos de contacto: 0, 15, 30, 60 y 360 min. Cada tiempo de reacción fue neutralizada de acuerdo con De Siqueira. (1996) y SCFI. (1999).

Posteriormente, se realizaron las siguientes diluciones decimales de la reacción 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10} en buffer de fosfatos (PBS) con neutralizante. En tubos que contenían 3 mL de TSB-agarosa 0.4% (en estado líquido y a una temperatura de 55 °C), se añadieron 50 μ L de cada dilución y 500 μ L de la célula hospedera. Las mezclas se agitaron suavemente y se depositaron en placas Petri con TSA. Las placas Petri se incubaron a 37° C durante 24 h y se midió la UFP/mL para cada muestra. Los efectos sobre Av08 se determinaron por separado. Para garantizar los resultados antivirales obtenidos por el extracto se incluyó un control, que consistía en 100 μ L del bacteriófago con 1 mL de la bacteria *E. coli* O157 y 3 mL de PBS 0.1M.

Análisis estadístico

Para obtener información cuantitativa de la capacidad antioxidante de los extractos, se realizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones con un nivel de significancia de $P < 0.05$ utilizando el software Statgraphic para V.4.0 Windows® y se realizó una comparación de los datos mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey para observar las diferencias significativas.

El análisis estadístico utilizado para evaluar la supervivencia del bacteriófago Av08 fue al azar considerando dos factores: la concentración del extracto (0.25, 0.50 y 1 mg/mL respectivamente) y el tiempo de contacto con el fago (0, 15, 30, 60 y 360 minutos). La reducción viral se expresó como título de fago \log_{10} . Los tratamientos se llevaron a cabo por duplicado con dos repeticiones cada una. Se utilizó Statgraphic para V.4.0 Windows® para realizar el ANOVA y $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la Actividad Antioxidante.

Los métodos *in vitro* que evalúan la actividad antioxidante son muy diversos, estos procedimientos utilizan una acelerada oxidación involucrando un iniciador llamado fuente generadora de radicales, que en un sistema de prueba asume que la oxidación es inhibida en por la captura de dichos radicales; por tanto, estos métodos se enfocan en monitorear la capacidad de los extractos para la captura de radicales libres o la inhibición de su formación (Antolovich y col., 2002). Este es el principio de los métodos utilizados en la presente investigación, donde la actividad antioxidante fue evaluada mediante tres ensayos *in vitro*, DPPH, ABTS y mediante el análisis del efecto protector de los extractos sobre eritrocitos humanos sometidos a estrés oxidativo por el radical AAPH.

Los ensayos DPPH y ABTS fueron seleccionados debido a que han sido utilizados ampliamente para determinar el potencial antioxidante de numerosos extractos de plantas y productos naturales. En esta investigación estos resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), que es un antioxidante sintético de referencia, hidrosoluble, análogo a la vitamina E y se usa como estándar comparativo de su actividad antioxidante respecto a la de los compuestos presentes en las muestras (Proteggente y col., 2002; Kuskoski y col., 2005; Lako y col., 2007; Márquez, 2009; Floegel y col., 2011). Por otro lado, el análisis del efecto protector sobre eritrocitos humanos, fue seleccionado debido a que determina la actividad antioxidante de los extractos sobre membranas biológicas, con el objetivo de que los resultados sean más representativos del efecto de estos compuestos sobre el ser humano, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de hemólisis.

Capacidad Antioxidante de los Extractos Mediante el Método DPPH.

Este método mide la captación del radical DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo), por parte de una estructura antioxidante. Este radical estable presenta en disolución un color violeta oscuro. Una vez mezclado el radical y la sustancia antioxidante, la disminución de la coloración será directamente proporcional a la concentración del antioxidante. La coloración se monitorea por la disminución en la absorbancia a 490 nm. En consecuencia, la desaparición del DPPH

en efecto la capacidad antioxidante se ve influenciada por la polaridad de los solventes utilizados, ya que ciertas sustancias bioactivas son más afines a ciertos solventes.

En otro estudio, realizado por Kuskoski y col. (2005), también utilizaron el método *in vitro* de inhibición del radical DPPH, con el fin de evaluar la actividad antioxidante de la pulpa congelada de guanábana, dicha investigación evaluó dos tiempos de medida, 30 y 60 minutos. Los resultados mostraron valores de inhibición del radical 2.88 ± 0.32 y 4.5 ± 0.9 $\mu\text{mol ET/g}$ de peso muestra, respectivamente.

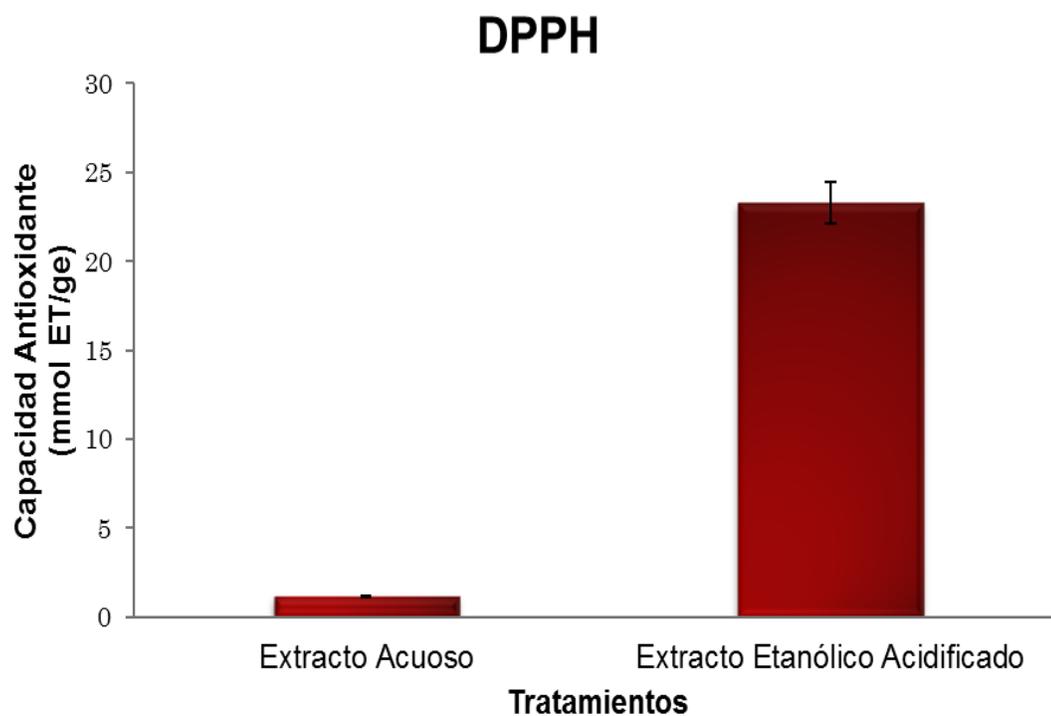


Figura 11. Capacidad Antioxidante de extractos (acuoso y etanólico acidificado) de hojas de guanábana (*A. muricata* L) evaluada mediante el método DPPH.

Capacidad Antioxidante de los Extractos Mediante el Método ABTS.

El método ABTS evalúa sustancias antioxidantes hidrosolubles y liposolubles; estas sustancias donan uno o más electrones para reducir el radical catión ABTS generado previamente por la

oxidación del ABTS mediante la adición de persulfato de sodio (Miller y col., 1993) (figura 12). El radical presenta un color verde-azul en solución y cuando reacciona con los sustratos antioxidantes el color se desvanece. Este efecto se monitorea espectrofotométricamente a 750 nm, y la diferencia de absorbancia determina el número de captación de radical libre ABTS, por lo tanto, la capacidad antioxidante de los extractos.

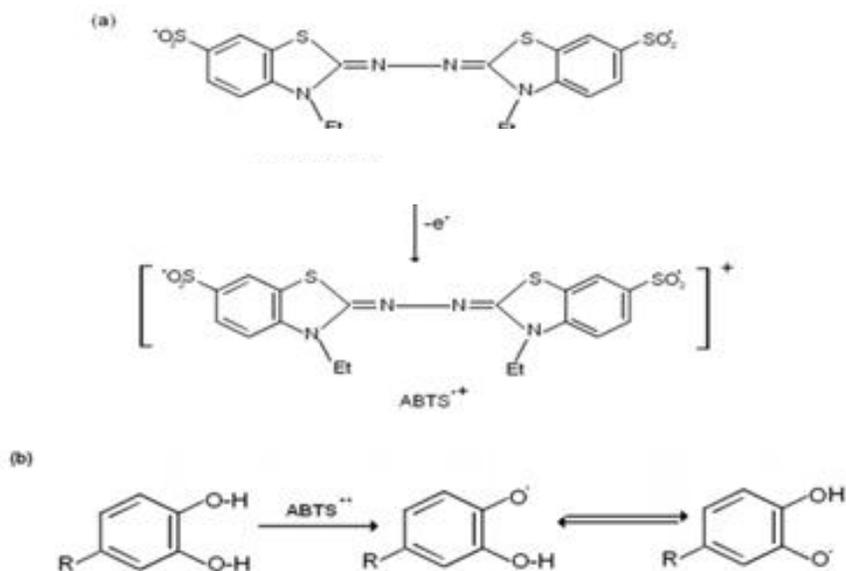


Figura 12. Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante

Fuente: Friaa y Brault, 2006

En la figura 13 se muestra la actividad antioxidante de los extractos de hojas de guanábana, medida por el ensayo ABTS. Se puede observar que el extracto etanólico acidificado presentó mayor capacidad para neutralizar al radical ABTS debido a que se obtuvo un valor de inhibición de 24.735 ± 0.490 mmol ET/ge. Por el contrario, el extracto acuoso presentó menor capacidad antioxidante ya que se obtuvo un valor de inhibición de 17.726 ± 0.736 mmol ET/ge. Apreciándose diferencias significativas entre los tratamientos. Los

resultados obtenidos muestran que los solventes menos polares poseen mayor capacidad para disolver sustancias bioactivas antioxidantes presentes en las hojas de guanábana.

En un estudio realizado por Rodríguez y col. (2007), se utilizó el método ABTS para evaluar la actividad antioxidante del vino de guanábana donde se obtuvo un valor de 2.57 mmoles Trolox/L. De manera similar, Lako y col. (2007), evaluaron la capacidad antioxidante de la pulpa de guanábana mediante el mismo método y se obtuvieron un valor de 287.67 μmol Trolox/100 g de pulpa fresca. En ambos casos los resultados de capacidad antioxidante, son inferiores a los encontrados en el presente estudio. Esto posiblemente sea debido a que los métodos empleados para la obtención de los extractos son diferentes, variando tanto en concentraciones analizadas como en los solventes utilizados en las extracciones y posiblemente también se deba a la polaridad de las sustancias antioxidantes de las fracciones estudiadas. Cabe destacar que el resultado obtenido en el presente estudio es reportado por gramo de extracto y no por gramo de muestra de planta, lo cual implica una mayor concentración de sustancias activas en la muestra.

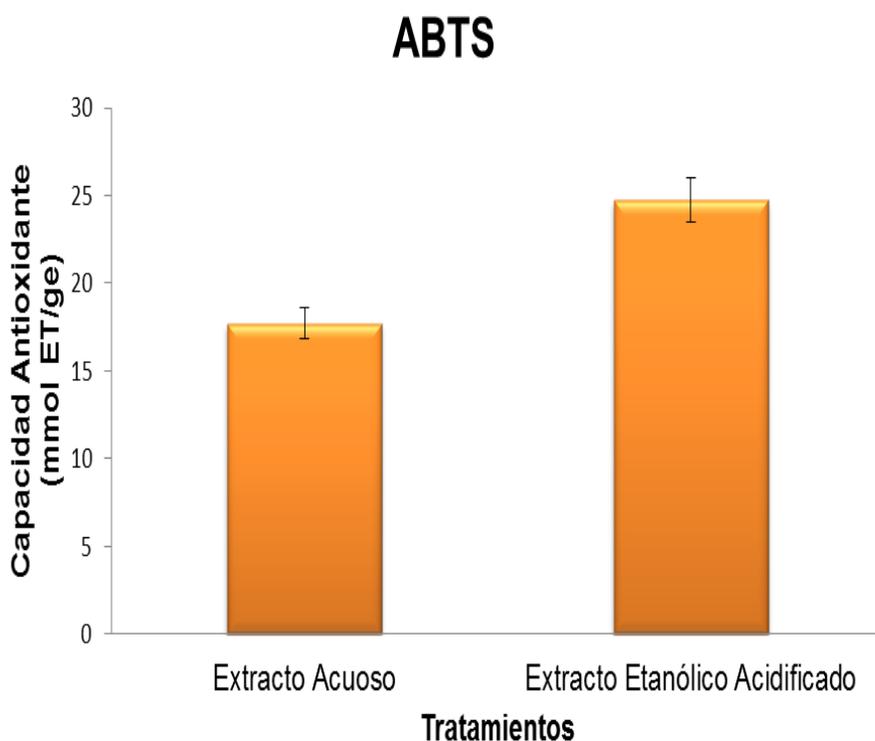


Figura 13. Capacidad Antioxidante de extractos (acuoso y etanólico acidificado) de hojas de guanábana (*A. muricata* L) evaluada mediante el método ABTS

Por otro lado, se observa que los resultados obtenidos mediante el método ABTS son mayores a los reportados en el ensayo DPPH. Probablemente esto se deba a que el ensayo DPPH determina únicamente los compuestos antioxidantes que actúan mediante un sistema lipofílico, mientras que el método ABTS determina compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica (Fogliano y col., 1999; Re y col., 1999; Arnao, 2000; Antolovich y col., 2002). Lo cual nos permite inferir que nuestros extractos presentan sustancias bioactivas con ambas naturalezas químicas.

Evaluación del Efecto Protector de los Extractos Sobre Eritrocitos Humanos.

El presente ensayo evaluó la actividad antioxidante de los extractos *in vitro*, utilizando eritrocitos humanos como modelo celular. Los glóbulos rojos son sometidos a estrés oxidativo mediante el radical AAPH el cual origina radicales peroxilo, que inducen la oxidación de los lípidos y proteínas de membrana, produciendo hemólisis (Tsai y col., 2014). Las sustancias antioxidantes presentes en los extractos donan uno o más electrones para neutralizar el radical AAPH inhibiendo la hemólisis. Las sustancias antioxidantes son medidas espectrofotométricamente a 540 nm y por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de inhibición de hemólisis.

La figura 14 muestra la actividad protectora de los extractos de hojas de guanábana sobre eritrocitos humanos. Se observó que el extracto etanólico acidificado presentó mayor capacidad protectora sobre eritrocitos ya que se obtuvo un valor de 52% de inhibición de hemólisis. Por el contrario, el extracto acuoso mostró tener menor capacidad protectora debido a que se obtuvo un valor de inhibición de hemólisis del 33%. Estos resultados muestran que la mezcla entre el etanol y el ácido acético aumento la capacidad de hidrolizar enlaces, favoreciendo la disponibilidad de compuestos antioxidantes. Previas investigaciones realizadas por Ramírez y Delahaye. (2011), han mostrado que la guanábana posee una alta concentración compuestos fenólicos, por lo que dichas sustancias podrían ser las responsables del efecto antihemolítico, ya que éstas no solo estabilizan radicales libres, sino que también incrementan la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo (Ajila y Prasada, 2008).

Los resultados antihemolíticos que se observaron en los extractos de hojas de guanábana son similares a los estudios realizados por Cyboran y col. (2012), quienes analizaron los cambios inducidos por extractos de hojas de grosella, fresa y manzana, en membranas biológicas, utilizando eritrocitos de cerdo como modelo celular, y donde se

demonstró que las sustancias polifenólicas, presentes en los extractos, tienen un efecto positivo en los eritrocitos, ya que éstas, interactúan con la capa externa de la membrana lipídica, permeando la parte hidrófila, donde causan cambios en la disposición de empaquetamiento de las cabezas polares de los lípidos, volviéndola más elástica y resistente a los cambios de la presión osmótica y por lo tanto a los daños causados por el estrés oxidativo.

En un estudio, realizado por Tedesco y colaboradores en el año 2000, donde se evaluó el efecto protector de los polifenoles presentes en extractos de vinos de guanábana sobre eritrocitos humanos sometidos a estrés oxidativo por H_2O_2 , se reportó un 25% de inhibición de hemólisis. Los autores concluyeron que existe una correlación entre el contenido de polifenoles y los efectos antioxidantes.

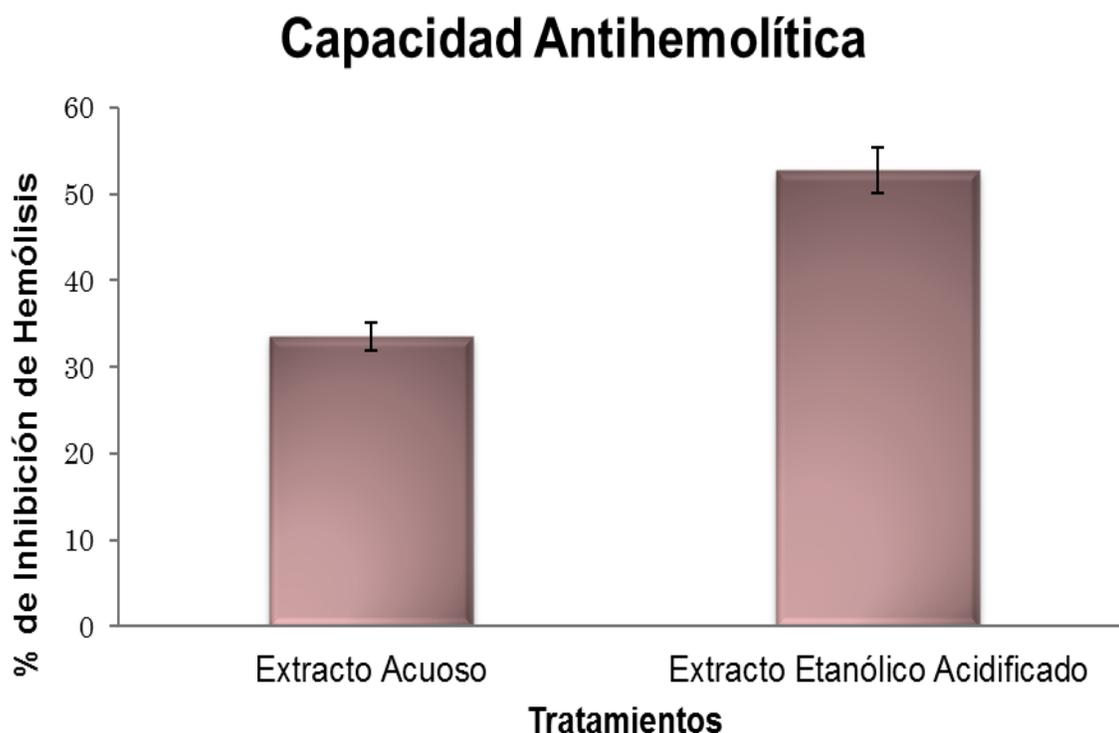


Figura 14. Capacidad Antioxidante de extractos (acuoso y etanólico acidificado) de hojas de guanábana (*A. muricata* L) evaluada mediante el efecto protector sobre eritrocitos humanos.

En otro estudio similar, realizado por Duran y col. (2013), donde fue evaluado el efecto antihemolítico de extractos metanólicos de corteza de mango y guayaba, sobre eritrocitos de origen humano sometidos a estrés oxidativo por el radical H_2O_2 , reportaron inhibiciones de 52% y 63%, para extractos de mango y guayaba respectivamente. Los valores son mayores a los reportados en el presente estudio, a excepción del extracto de mango, que comparado con el extracto etanólico-acidificado de hojas de guanábana, mostró tener menor actividad antioxidante. Los autores concluyeron que las inhibiciones de sus extractos podrían deberse a la interacción de compuestos fitoquímicos, como flavonoides, aislados de la corteza de mango y guayaba, dichas sustancias se han detectado en guanábana y podrían estar relacionadas con las inhibiciones mostradas por los sustratos evaluados en el presente estudio, ya que se ha reportado que la actividad antioxidante influenciada por los flavonoides, podría estar relacionada con la protección de membranas celulares, debido a que interrumpen la interacción de los componentes fosfolípidos e inhiben su oxidación, por lo que protegen a las mismas de daños causados por moléculas oxidantes (García-Bacallao y col., 2001).

Evaluación de la Actividad Antiviral

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antiviral. En los ensayos *in vitro* el uso de las propiedades líticas de los bacteriófagos representa un modelo sencillo, rápido, barato, sensible, altamente específico y comparable con modelos de virus humanos (Maillard y col., 1993; Maillard y col., 1995). En la presente investigación la actividad antiviral del extracto fue evaluada *in vitro* mediante el uso del fago Av08 como modelo viral. Únicamente se evaluó el extracto etanólico acidificado debido a que mostró la mayor capacidad antioxidante. Se utilizaron tres concentraciones 0.25, 0.50 y 1 mg/mL respectivamente y cinco tiempos de contacto (0, 15, 30, 60 y 360 min). Las reducciones logarítmicas se pueden observar en las figuras 15, 17 y 18, las cuales fueron expresadas en Log_{10} UFP/mL. Todas las reducciones logarítmicas se compararon con el control absoluto que se muestra en la figura 16. Este control consistió en la presencia del bacteriófago disuelto en solución PBSy se consideró la concentración inicial con la que iniciaba cada uno de los tratamientos.

Actividad Antiviral

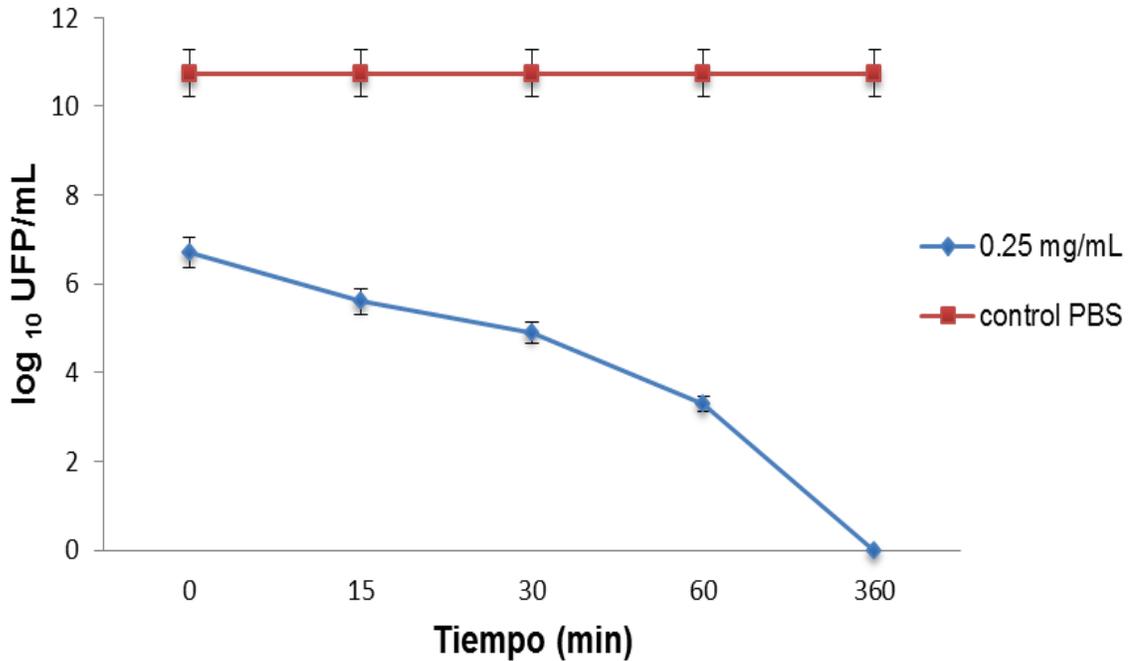


Figura 15. Capacidad antiviral del extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana, para la concentración 0.25mg/mL

La figura 15 muestra la actividad antiviral del extracto a una concentración de 0.25 mg/mL. Se observó que durante el primer tiempo de contacto (0 min) se obtuvo una reducción de 4 log₁₀ UFP/mL, durante los siguientes dos tiempos de contacto (15 y 30 min) se obtuvieron reducciones de 5 log₁₀ UFP/mL, se observó que la actividad antiviral del extracto fue mayor durante el cuarto tiempo de contacto (60 min) arrojando valores de reducción de 7 log₁₀ UFP/mL y para el último tiempo de contacto (360 min) la reducción del colifago Av08, fue total. La condición control Av08 en PBS que se muestra en la figura 16, no mostró reducción significativa en el título viral durante los 360 minutos.

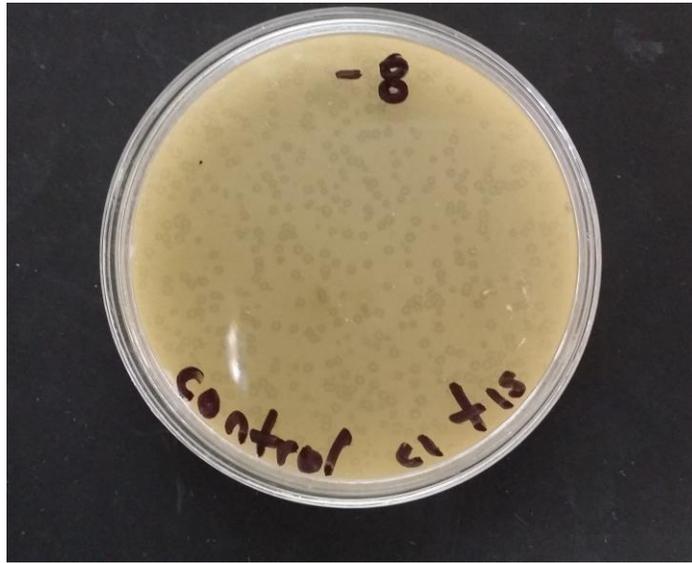


Figura 16. Control PBS al tiempo de 360 minutos.

La figura 17 muestra la actividad antiviral del extracto a una concentración de 0.5 mg/mL, se observa que durante el primer tiempo de contacto (0 min) el fago Avo8 se redujo 4 \log_{10} UFP/mL, durante el segundo y tercer tiempo de contacto (15 y 30 minutos) se obtuvieron reducciones de 5 y 6 en una escala logarítmica de UFP/mL respectivamente, mientras que durante los siguientes dos tiempos de contacto (60 y 360 min) se obtuvieron reducciones totales del colifago. La condición control Av08 en PBS no mostro reducción significativa en el título de más de 360 minutos

La figura 18 muestra la actividad antiviral del extracto a una concentración de 1 mg/mL, se observa que durante el primer tiempo de contacto (0 min) se obtuvo una reducción del fago, por el orden de 6 \log_{10} UFP/mL, durante el segundo tiempo de contacto (15 min), esta reducción fue de hasta 5 \log_{10} UFP/mL, mientras que para el tercer tiempo de contacto (30 min) se obtuvo una reducción de un valor de 7 \log_{10} UFP/mL, en los siguientes dos tiempos de contacto (60 y 360 min) se obtuvieron reducciones totales del colifago.

Actividad Antiviral

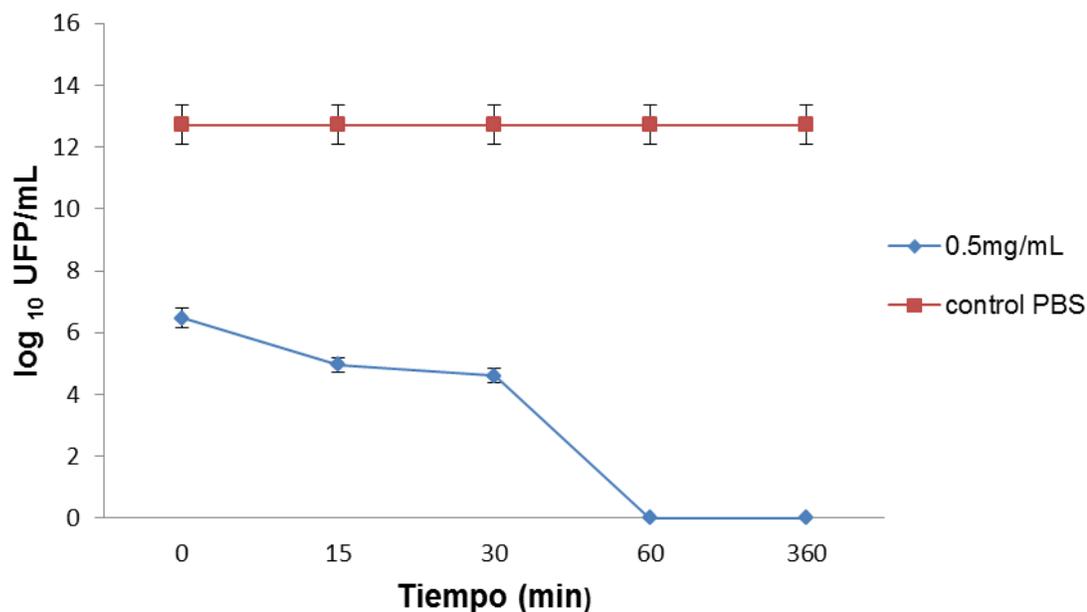


Figura 17. Capacidad antiviral del extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana, para la concentración 0.5 mg/mL evaluada a los 0, 15, 30, 60 y 360 minutos.

Estos resultados muestran que los extractos de hoja de guanábana presentan actividad antiviral sobre el bacteriófago Av08. López-Cuevas y col. (2011), previamente aislaron el bacteriófago Av08 de las heces de aves de corral. Algunos estudios han demostrado que los bacteriófagos aislados de aves de corral son parte de la microbiota del medio ambiente, lo que demuestra la ocurrencia natural de fagos en el tracto intestinal (Atterbury et al. 2003). Lo que permite utilizar a estos fagos como modelos enterovirales. Así mismo, diversas investigaciones han utilizado a los bacteriófagos como modelos en estudios antimicrobianos (Davis y col., 2012).

Por otro lado, los resultados indican que los extractos etanólicos acidificados de hojas de guanábana mostraron ser capaces de inhibir completamente al bacteriófago Av08 a los 60 minutos desde la concentración de 0.50 mg/mL. Así mismo, se observó que la replicación viral fue de una manera dosis-dependiente, ya que al aumentar la concentración y tiempo de contacto la inhibición del virus aumentó. Resultados similares fueron reportados por Davis y col. (2012), quienes estudiaron el efecto de antimicrobianos sobre el bacteriófago MS2 y observaron que al aumentar el peso molecular de las sustancias evaluadas los niveles virales disminuían.

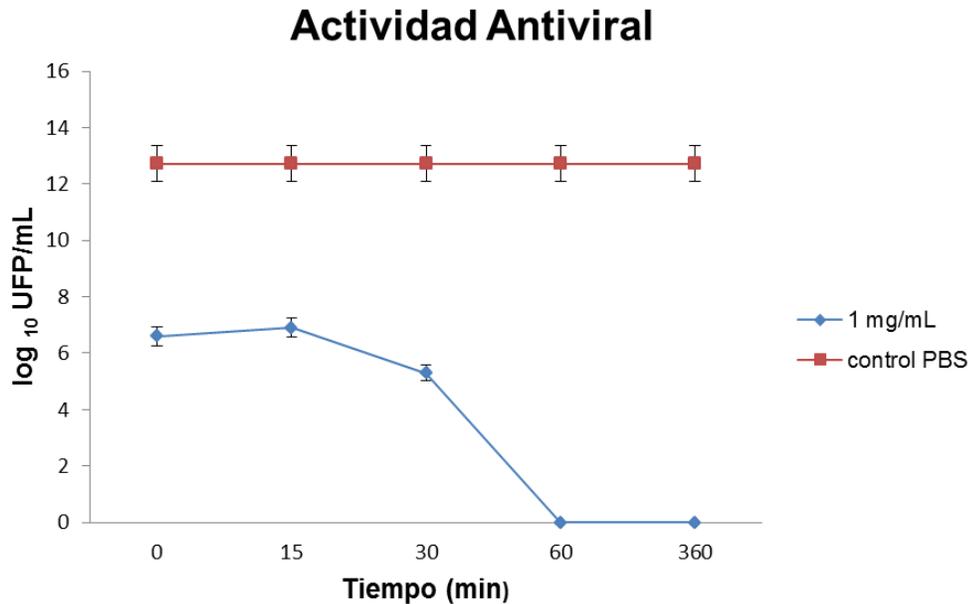


Figura 18. Capacidad antiviral del extracto etanólico acidificado de hojas de guanábana, para la concentración 1 mg/mL evaluada a los 0, 15, 30, 60 y 360 min.

Los resultados de esta investigación también muestran una actividad antiviral importante en los primeros tiempos de contacto, para las concentraciones evaluadas. En consecuencia, la actividad antiviral en la concentración de 1 mg/mL, responde a una rápida inhibición de la replicación viral del colifago. Estos resultados son similares a los reportados por Su y col. (2010), quienes observaron una rápida reducción del bacteriófago ϕ X-174 (DNA) en los primeros tiempos de incubación con jugo de arándano. Este fenómeno sugiere que el extracto de guanábana podría actuar de forma temprana en la replicación viral.

Estudios previos en productos de guanábana también han mostrado efectos antivirales, por ejemplo Padma y col. (1998), evaluaron el efecto antiviral del extracto etanólico del fruto de *A. muricata* L, sobre el virus del Herpes simple tipo 1 en células Vero y observaron inhibición total del virus a una concentración de 1 mg/mL. Los autores concluyeron que la actividad antiviral demostrada podría deberse a la naturaleza cruda del extracto, es decir, a las sustancias fitoquímicas que se encuentran presentes en *A. muricata* L, como acetogeninas, campesterol, citrulina, ácidos hidroxicinámicos, β -caroteno, β -sitosterol y resinas (Waizel, 2012).

Así como también, flavonoides (Ramírez y Pacheco de Delahaye, 2011). De igual manera, estudios realizados por Betancur-Galvis y col. (1999), encontraron potencial antiviral de los extractos metanólicos de *A. muricata* L y *A. cherimolia*, sobre el virus del Herpes simple tipo 2, en células HEp-2.

Por otra parte, investigaciones recientes por Astirin y col. (2013), mostraron que diversos extractos de hojas de *A. muricata* L, pueden inducir apoptosis en células cancerosas originadas por el virus del papiloma humano (VPH), y observaron que el extracto a base de acetato de etilo presentó la mayor actividad citotóxica con un valor de 131.89% y 11.37%, para las concentraciones de 2000 y 15.625 µg/mL respectivamente. Los autores concluyeron que dicha actividad podría deberse a las acetogeninas, ya que éstas han presentado efectos citotóxicos, antioxidantes, insecticidas, antidiabéticas y antivirales inhibiendo la replicación del VIH (Wu y col., 1996; Kaleem y col., 2006). Las acetogeninas, son fitoquímicos que previamente se han aislado de las hojas de *A. muricata* L y poseen actividad antiviral (Arroyo y col., 2005). Por lo tanto, estas sustancias podrían estar implicadas en la actividad antiviral de los extractos de hojas de guanábana analizados en la presente investigación.

CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos y etanólicos acidificados de *A. muricata* L poseen actividad antioxidante y este último, presentó la mayor capacidad para neutralizar los radicales DPPH y ABTS.
- Los extractos etanólicos acidificados y acuosos, presentaron una buena actividad anti hemolítica, contra la hemólisis inducida por el radical AAPH.
- El extracto etanólico acidificado presentó capacidad de eliminación del enterovirus Av08.
- La concentración y el tiempo de contacto del extracto con el virus fueron factores que influyeron en la inhibición del enterovirus Av08, observándose un patrón dosis-dependiente.
- Los resultados obtenidos de extractos de hoja de guanábana, indican que podrían ser una opción alternativa para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, y para la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por el estrés oxidativo.

RECOMENDACIONES

- Debido a que se demostró que los extractos de hojas de guanábana presentan actividad inhibitoria en virus tipo ADN, como el Av08, se recomienda continuar un estudio para determinar si los extractos poseen actividad ante los virus tipo ARN, como rotavirus, que es uno de los padecimientos que generan problemas de salud pública.
- Se recomienda aislar y caracterizar las sustancias fitoquímicas presentes en las hojas de *A. muricata* L, estudiar sus mecanismos de acción y conocer la forma en la que interactúan con otras moléculas, especialmente aquellas que componen la materia viva.
- También se recomienda promover el aprovechamiento de las hojas de guanábana, dando a conocer la capacidad antioxidante que contiene y su actividad biológica contra enterovirus tipo DNA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adewole SO, Ojewole JA. 2009. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (*Annonaceae*) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, (6): 30–41.
2. Adeyemi DO, Komolafe OA, Adewole OS, Obuotor EM, Adenowo TK. 2009. Anti-hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, (1):62–69.
3. Ajila C, Prasada Rao U. 2008. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food Chemistry and Toxicology*, (1):303-309.
4. Alam MdN, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md. 2012. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, (21):143-152.
5. Andrade DA, Atzin J, Domínguez-Martínez VG. 2006. Acetogeninas en idioblastos de semilla de guanábana (*Annona muricata*). *Memorias del XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*. Guanajuato, México.
6. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, (127):183-198.
7. Arnao MB. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Science and Technology*, (11): 419-421.
8. Arroyo AJ, Prashad GM, Vásquez B Y, Li PE, Tomás CG. 2005. Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y de Salud Pública*, (4):247-253.
9. Ashelford KE, Day MJ, Fry JC. 2003. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied Environmental Microbiology*, (1): 285–289.
10. Astirin OP, Artanti A N, Fitria MS, Perwitasari EA, Prayitno A. 2013. *Annona muricata* Linn Leaf Induce Apoptosis in Cancer Cause Virus. *Journal of Cancer Therapy*, (4): 1244-1250.
11. Atmani D, Chaheer N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D. 2009. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, (112): 303–309.

12. Bachrach G, Leizerovici-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. 2003. Bacteriophage isolation from human saliva. *Letter Applied of Microbiology*, (1): 50–53.
13. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das D K, Ray SD, Kuszynski CA. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, (148): 187–197.
14. Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. 2007. *In vitro* antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, (45):480–485.
15. Betancur-Galvis L A, Saez J, Granados H, Salazar A, Ossa JE. 1999. Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, (4): 531-535.
16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenchaff Technologie*, (22): 25-30.
17. Burneo Palacios ZL. 2009. “Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del ecuador: Tesis de licenciatura. Loja Ecuador. Universidad técnica Particular de Loja. Escuela de Ingeniería Química.
18. Camel V. 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, (4): 229-248.
19. Chang R. 2010. Química 10^a ed. Mc Graw-Hill-Interamericana. 1083 p.
20. Clark J, March J. 2006. Bacteriophages and Biotechnology: Vaccines, gene therapy and antibacterial. *Trends in Biotechnology*, (5):212-218.
21. Correa GJ, Larra JE, Sánchez M, Pachón H. 2012. Actividad antioxidante de (*Annona muricata* L). Una revisión bibliográfica. *Boletín Latinoamericano del Caribe de plantas Medicinales y Aromática*, (2): 111-126.
22. Costa P, Goncalves S, Valentao P, Andrade P, Coelho N, Romano A. 2012. *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, (3): 1253-1260.
23. Cyboran S, Oszmianski J, Kleszczynska H. 2012. Interaction between plat polyphenols and the erythrocyte membrane. *Celular y Molecular Biology letters*, (17): 77-88.
24. Davis R, Zivanovic S, D'Souza DH, Davidson PM. 2012. Effectiveness of chitosan on the inactivation of enteric viral surrogates. *Food and Microbiology*, (1): 57-62.
25. De Siqueira R, Dodd C, Rees C. 2006. Evaluation of the natural virucidal activity of teas for use in the phage amplification assay. *International Journal of Food Microbiology*, (111): 259-262.

26. Dina A, Nassima C, Meriem B, Karima A, Hakima L, Hania B. 2009. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, (112): 303–309.
27. Dorman HJD, Hiltunen R. 2004. Fe (III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food chemistry*, (88):193-199.
28. Durán M, Montero P, Marrugo Y. 2013. Extractos Metanólicos de Corteza de Guayaba (*Psidium guajava* L.) y Mango (*Mangifera indica* L.): Efecto Citotóxico, Antihemolítico y en la Morfología de Membrana de Eritrocitos. U.D.C.A. *Actualidad & Divulgación Científica*, (2): 327-334.
29. Egan BM, Greene EL, Goodfriend TL. 2001. Insulin resistance and cardiovascular disease. *American Journal of Hypertension*, (6): 116–125.
30. Elejalde Guerra JI. 2001. “Revisión en conjunto, Estés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes”. *Anales de Medicina Interna*, (6): 326-335.
31. Fiorentin L, Vieira ND, Barioni Júnior W, Barros S. 2004. *In vitro* characterization and in vivo properties of *Salmonella* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. *Brazilian Journal Poultry Science*, (2): 121–128.
32. Floegel A, Kimb D, Chung S, Koo SI, Chun OK. 2011. “Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods”. *Journal of Food Composition and Analysis*, (24): 1043–1048.
33. Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, (47): 1035-1040.
34. Franzini L, Ardigò D, Valtueña S, Pellegrini N, Del Rio D, Bianchi MA, Scazzina F, Piatti PM, Brighenti F, Zavaroni I. 2012. Food selection based on high total antioxidant capacity improves endothelial function in a low cardiovascular risk population. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, (1): 50–57.
35. Fretes F. 2010. Plantas medicinales y aromáticas una alternativa de producción comercial. Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). 7 p.
36. Friaa O, Brault D. 2006. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox and the free radical DPPH[•] in semi-aqueous solution. *Organic & Biomolecule Chemistry*, (4):2417- 2423.

37. Garcia Bacallao L, García Gómez LV, Rojo Dominguez DM, Sánchez García E. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana de investigaciones Biomédicas*, (3):231-235.
38. González CA, Guadaño A, Inés C, Martínez R, Cortes D. 2002. Or Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibits. *Zeitschrift für NaturforschungC*, (57): 1028-34.
39. Goodridge L, Gallaccio A, Griffiths MW. 2003. Morphological, Host Range, and Genetic Characterization of Two Coliphages. *Applied and environmental microbiology*, (9): 5364–5371.
40. Hancock J, Desikan R, Neill S. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochemical Society Transactions*, (29): 345–350.
41. Hermoso J, García J, García P. 2007. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*, (10):461-467.
42. Hernández, F. L. M., R. Gómez J. y J. Andrés A. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. 87 p.
43. Hsu FC, Shieh CYS, Sobsey MD. 2002. Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *Journal Food Protection*, (65): 93–99.
44. [I.C.U.C.] International Center for Underutilized Crops. 2002. Fruits for the Future. University of Southampton. Factsheet No.5. *Annona*.
45. Isabelle M, Lee BL, Lim MT, Koh W, Huang D, Ong CN. 2010. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chemistry*, (123): 77 – 84.
46. Jasso de Rodriguez D, Rodriguez-Garcia R, Hernandez-Castillo F, Aguilar-Gonzales C, Sáenz-Galindo A, Villareal-Quintanilla J, Moreno Z. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, (34): 960– 96.
47. Kaleem M, Asif M, Ahmed QU, Bano B. 2006. Anti- diabetic and Antioxidant Activity of *Annona squamosa* Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Singapore Medicine Journal*, (8): 670- 675.
48. Kennedy JE, Wei CI, Oblinger JL. 1986. Distribution of coliphages in various foods. *Journal of Food Protection*, (49). 944–951.
49. Klimczak I, Malecka M, Szlachta M, Gliszczynska A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, Vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, (20): 313–322.

50. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, (3): 217–233.
51. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini- Filho J, Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, (4): 726–732.
52. Lako J, Trenerry VC, Wahlqvist M, Wattanapenpaiboon N, Sotheeswaran S, Premier R. 2007. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, (101): 1727-1741.
53. León J. 2000. *Botánica de Los Cultivos Tropicales*. Editorial IICA. San José, Costa Rica. 445 p.
54. López- Cuevas O, Castro-del-Campo N, León- Félix J, González-Robles A, Chaidez C. 2011. Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157:H7. *Canadian Journal Microbiology*, (57): 1042-1051.
55. Lu J, Jin Y, Liu G, Zhu N, Gui M, Yu A, Li X. 2010. Flavonoids from the leaves of *Actinidia Kolomikta*. *Chemical National Compounds*, (2): 205-208.
56. Maillard JY, Beggs T, Day M, Hudson R, Russell A. 1993. Effect of biocides on *Pseudomonas aeruginosa* phage F116. *Letter Applied to Bacteriology*, (17): 167-170.
57. Maillard JY, Beggs T, Day M, Hudson R, Russell A. 1995. The effect of biocides on the transduction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by F116 bacteriophage. *Letter Applied to Bacteriology*, (21): 215-218.
58. Márquez CJ. 2009. Caracterización fisiológica, físicoquímica, reológica, nutracéutica, estructural y sensorial de la guanábana (*Annona muricata* L. cv. Elita). Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia.
59. Marwah RG, Fatope MO, Mahrooqi RA, Varma GB, Abadi HA, Khamis S, Burtamani-Al. 2007 Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry*, (101):465-470.
60. Mata R, Macias M, Rojas S, Lotina-Hensen B, Toscano R, Anaya A. 1998. Phytotoxic compounds from *Esebeckia yaxhoob*. *Phytochemistry*, (49):441
61. Mathur M, Vidhani S, Mehndiratta P. 2003. Bacteriophage Therapy: An alternative to convencional antibiotics. *Journal API*, (51):593-596.
62. McKee T, McKee J. 2009. *Bioquímica, las bases moleculares de la vida*. 4ta edición. Mc Graw Hill. 769 p.

63. Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V, Milner. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in pre-mature neonates. *Clinical Science*, (84): 407–412.
64. Mishra S, Ahmad S, Kumar N, Sharma BK. 2013. *Annona muricata* (The cancer killer): a review. *The Global Journal of Pharmaceutical Research*, (2): 1613–1618.
65. Moein S, Moein MR. 2010. Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Medicinal Plants*, (7): 517-521.
66. Morales N, Marquina M, Pernía T, Buitrago D, Corao G, Sosa M, Araujo L. 2002. Comparación de la actividad antiviral de polifenoles presentes en las frutas; mora (*Rubus fruticosus* B.), Grapefruit (*Citrus paradisi* M.) y fresa (*Fragaria vesca* L.). *Revista de la Facultad de Farmacia*, (44): 43-46.
67. Murray, R. K. (2009). Red & white blood cells. In Harper's Illustrated Biochemistry. McGraw-Hill.
68. OMS. 2005. Página de la Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa, Medicina tradicional; Nota descriptiva N°. 134. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/index.html> [Consultado junio 5 2013].
69. OMS. 2011. Centro de prensa: enfermedades cardiovasculares. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/> [Consultado junio 13, 2011].
70. Osuna L, Tapia M, Aguilar A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. 1era edición. Universidad de Barcelona. 80 p.
71. Padma P, Pramod NP, Thyagarajan SP, Khosa RL. 1998. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. *Journal of Ethnopharmacology*, (61): 81-83
72. Pansri P, Jaruseranee N, Rangnoi K, Kristensen P, Yamabhai M. 2009. A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnology*, (6): 1–16.
73. Pinto A C, Cordeiro R, De Andrade M, Ferreira H, De Filgueiras A, Alves E, Kinpara I. 2005. *Annona* species, Internacional Centre for Underutilised Crops (ICUC). University of Southampton, UK 263 p.
74. Proteggente AR, Sekher A, Paganga G, Van de Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, (36): 217 – 233.

75. Pryor WA, Godber SS. 1991. Non invasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, (10): 177-84
76. Pryor WA. 2000. Forum on oxidative stress status (OSS) and its measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, (29):29-387
77. Ramírez A, Pacheco de Delahaye E. 2011. Composición química y compuestos bioactivos presentes en pulpas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, (36): 71-75.
78. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, (9): 1231-1237.
79. Rendón B, Rebollar S, Caballero J, Martínez MA. 2001. *Plantas, Cultura y Sociedad: Estudio Sobre la Relación Entre Seres Humanos y Plantas en los Árboles del Siglo XXI*. 1era edición. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F. 317 P
80. Roche E, Romero-Alvira D. 1997. Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. I) Especies activas del oxígeno. *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología*. ENE Ediciones, (55): 55-88.
81. Rodak. 2005. *Hematología*. 2a ed. Panamericana. 838 p.
82. Rodríguez J, Valdés O, Queris O. 2007. Actividad antioxidante de vinos elaborados con frutas tropicales. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, (17): 66 - 68.
83. [SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación FIDA / UNOPS. 2006. Estudio del mercado regional e internacional de plantas medicinales e insumos para fitoterápicos.
84. [SCFI] NMX-BB-040-SCFI. 1999. General methods for analysis-antimicrobial activity. México: Norma Oficial Mexicana, Secretaria de economía, Diario Oficial de la Federación.
85. Sergei N, Konstantin S. 2008. The elusive object of Desire: Interactions of bacteriophages and their host. *Current Opinion in Microbiology*, (2):86-93.
86. Solís-Fuentes JA, Amador C, Hernández M. 2010. Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de "almendra" de guanábana (*Annona muricata*, L). *Grasas y Aceites*, (61): 58 – 66.
87. Su X, Howell AB, D'Souza DH. 2010. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates—A time dependence study *in vitro*. *Food and Microbiology*, 27(8): 985-991.

88. Suwalsky M, Vargas P, Avello M, Villena F, Sotomayor CP. 2008. Human erythrocytes are affected *in vitro* by flavonoids of *Aristotelia chilensis* (Maqui) leaves. *International Journal of. Pharmaceutic*, (1): 85-90.
89. Tavares L, Santos M, Viccini L, Moreira J, Miller R, Franco O. 2008. Review: Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*, (29): 1842-1851.
90. Tedesco I, Russo M, Russo P, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A, Faruolo C, Moio, L, Palumbo R. 2000. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, (11):114–119.
91. Tsai Y, Hsu H, Chen Z, Wang Y, Huang S, Chen H, Wang C, Wang S, Chang C, Houng J. 2014. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities of extracts from different parts of farmed and wild *Glossogyne tenuifolia*. *Industrial Crops and Products*, (57):98-105.
92. Ugartondo V, Mitjans M, Lozano C, Torres JL, Vinardell MP. 2006. Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant epicatechin conjugates obtained from grape. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, (18): 6945-6950.
93. Veiga E, Aguilar JA, Clavo B, Llanes L. 1997. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos*, (22): 201-216.
94. Vispo N, Puchades Y. 2001. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, (18):135-147.
95. Vit P, Santiago B, Pérez-Pérez E. 2014. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*, (39): 350-353.
96. Waizel J. 2012. *Las plantas y su uso antitumoral*. 1era edición. México, DF. Instituto Politécnico Nacional. 321p.
97. Wang S, Melnyk JP, Tsao R, Marcone MF. 2011. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, (1): 14–22.
98. Watt J, Breyer-Brandwijk M. 1962. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*, 2nd edit. E & S Livingstone Ltd, Edinburgh, London.1457 p.
99. Wu YC, Hung YC, Chang FR, Cosentino M, Wang HK, Lee KH. 1996. "Identification of ent-16 beta, 17-Dihydroxykauran-19-oic Acid as an Anti-HIV Principle and Isolation of the New Diterpenoids *Annosquamosins* A and B from *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*, (6): 635-671.