



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**ATRIBUTOS NUTRICIONALES, NUTRACÉUTICOS Y CITOTÓXICOS
DE TRES ESPECIES DE ANONÁCEAS: GUANÁBANA (*Annona
muricata* L.), CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Mill.) Y CHINCUYA
(*Annona purpurea* Moc. et Sess.)**

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:
CARLOS RAÚL LÓPEZ MARTÍNEZ



APROBADA



Bajo la supervisión de: Dra. **MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS**



Instituto de Horticultura

Chapingo, Estado de México, julio de 2021.

**ATRIBUTOS NUTRICIONALES, NUTRACÉUTICOS Y CITOTÓXICOS DE
TRES ESPECIES DE ANONÁCEAS: GUANÁBANA (*Annona muricata* L.),
CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Mill.) Y CHINCUYA (*Annona purpurea* Moc.
et Sess.)**

Tesis realizada por **CARLOS RAÚL LÓPEZ MARTÍNEZ** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

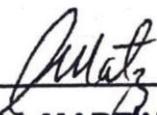
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: _____



DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

ASESOR: _____



DRA. MARÍA TERESA MARTÍNEZ DAMIÁN

ASESOR: _____



DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

ASESOR Y LECTOR EXTERNO: _____



DRA. MARIANA PALMA TENANGO

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	ix
DEDICATORIA.....	xi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xii
RESUMEN GENERAL.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Especies de Anonáceas.....	5
2.1.1. <i>Annona muricata</i> Linn.....	6
2.1.2. <i>Annona cherimola</i> Mill.....	8
2.1.3. <i>Annona purpurea</i> Moc. et Sess.....	10
2.2. Alimentación saludable.....	13
2.3. Nutracéuticos.....	14
2.4. Antioxidantes.....	15
2.5. Actividad antioxidante.....	15
2.6. Compuestos fenólicos.....	16
2.6.1. Flavonoides.....	17
2.7. Ácido ascórbico (Vitamina C).....	18
2.8. Las plantas medicinales.....	20
2.8.1. Extractos vegetales.....	22
2.8.2. Toxicidad de extractos en <i>Artemia salina</i>	22
2.9. Cáncer.....	24
2.10. Proliferación y muerte celular.....	26
2.10.1. Necrosis.....	30
2.10.2. Apoptosis.....	31

2.11. Incidencia del cáncer en el mundo y en México.....	34
2.12. Cáncer de mama	36
2.12.1. Factores de riesgo.....	37
2.12.2. Tratamientos para el cáncer de mama	38
2.13. Literatura citada.....	41
3. CALIDAD NUTRICIONAL Y NUTRACÉUTICA DEL FRUTO DE TRES ESPECIES DE <i>ANNONACEAE</i> : GUANÁBANA, CHIRIMOYA Y CHINCUYA ...	53
3.1. Resumen	53
3.2. Introducción.....	55
3.3. Materiales y métodos.....	56
3.3.1. Recolecta del material vegetal.....	56
3.3.2. Análisis proximal	57
3.3.3. Análisis mineral	57
3.3.4. Obtención de extractos metanólicos.....	57
3.3.5. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales	58
3.3.6. Cuantificación de los flavonoides totales	58
3.3.7. Cuantificación del ácido ascórbico.....	59
3.3.8. Evaluación de la actividad antioxidante	59
3.3.9. Evaluación de la toxicidad de extractos en <i>Artemia Salina</i>	61
3.3.10. Análisis estadístico	61
3.4. Resultados y discusión	62
3.4.1. Análisis proximal	62
3.4.2. Análisis mineral	64
3.4.3. Contenido de nutraceuticos	65
3.4.4. Actividad antioxidante.....	68
3.4.5. Toxicidad de extractos en <i>Artemia Salina</i>	70
3.5. Conclusiones	71
3.6. Literatura citada.....	72

4. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, NECRÓTICA Y APOPTÓTICA DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE <i>Annona muricata</i> , <i>A. cherimola</i> Y <i>A. purpurea</i> EN LA LÍNEA CELULAR TUMORAL MDA-MB-231 DE CÁNCER DE MAMA.....	77
4.1. Resumen	77
4.2. Introducción	79
4.3. Materiales y métodos.....	81
4.3.1. Material vegetal	81
4.3.2. Obtención de extractos metanólicos	82
4.3.3. Cultivo de células tumorales	82
4.3.4. Preparación de extractos para estímulo de células	82
4.3.5. Determinación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta en células tumorales.....	83
4.3.6. Efecto citotóxico a través de la determinación de la actividad de la enzima LDH en sobrenadantes celulares	84
4.3.7. Evaluación de la morfología celular apoptótica por tinción con DAPI mediante microscopía de fluorescencia.....	85
4.3.8. Análisis estadístico	85
4.4. Resultados y discusión	86
4.4.1. Determinación de la proliferación celular en células tumorales.....	86
4.4.2. Determinación de citotoxicidad (necrosis) en células tumorales MDA-MB-231	88
4.4.3. Evaluación de la morfología celular apoptótica en células tumorales.....	90
4.5 Conclusiones	96
4.6. Literatura citada.....	96
5. CONCLUSIONES GENERALES	100
6. APÉNDICES	102
6.1. Figuras no mostradas en el texto.....	102

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición nutrimental de la pulpa de tres especies de Anonáceas.....	62
Cuadro 2. Composición mineral de la pulpa de tres especies de Anonáceas.....	64
Cuadro 3. Contenido de Compuestos fenólicos, Flavonoides y Ácido ascórbico en pulpa de tres especies de Anonáceas.....	66
Cuadro 4. Determinación de la actividad antioxidante en la pulpa de tres especies de Anonáceas por los métodos DPPH y ABTS.....	69
Cuadro 5. Correlación de Pearson entre los compuestos antioxidantes en pulpa de tres especies de Anonáceas.....	69
Cuadro 6. CL ₅₀ de extractos metanólicos de tres especies de Anonáceas.	70
Cuadro 7. Efecto antiproliferativo de extractos metanólicos (pulpa, cáscara, semillas y hojas) de tres especies de Anonáceas en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.....	86
Cuadro 8. Porcentaje de actividad de LDH en células tumorales MDA-MB-231 tratadas con los extractos metanólicos de semillas de Anonáceas.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características de la guanábana (<i>Annona muricata</i> L.).....	7
Figura 2. Características de la chirimoya (<i>Annona cherimola</i> Mill.).....	10
Figura 3. Características de la chincuya (<i>Annona purpurea</i> Moc. et Sess.).....	12
Figura 4. Estructuras químicas de compuestos fenólicos simples.....	16
Figura 5. Estructura básica y tipos de Flavonoides.....	18
Figura 6. Estructura y fórmula química de la vitamina C.....	19
Figura 7. Rasgos distintivos de las células tumorales “ <i>Hallmarks</i> ”.....	27
Figura 8. Clasificación de la muerte celular con base en su función y sus características morfológicas.....	30
Figura 9. Necrosis, muerte celular patológica.....	31
Figura 10. Pasos principales de la apoptosis.....	32
Figura 11. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.....	33
Figura 12. Sitios metastásicos comunes en el cáncer de mama.....	36
Figura 13. Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de semilla de guanábana sobre células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231.....	87
Figura 14. Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de semilla de chirimoya sobre células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231.....	87
Figura 15. Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de semilla de chincuya sobre células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231.....	88
Figura 16. Actividad de LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células MDA-MB-231 tratadas con los extractos metanólicos de semilla de tres especies de Anonáceas.....	89
Figura 17. Micrografías ópticas de células MDA-MB-231 con tinción de núcleos con DAPI y contraste de fases. Control, DMSO y colchicina.....	91

Figura 18. Micrografías ópticas de células MDA-MB-231 con tinción de núcleos con DAPI y contraste de fases. Guanábana, chirimoya y chincuya.....	92
Figura 19. Efecto del extracto metanólico de pulpa de guanábana a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$	102
Figura 20. Efecto del extracto metanólico de cáscara de guanábana a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$	103
Figura 21. Efecto del extracto metanólico de hojas de guanábana a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$	103
Figura 22. Efecto del extracto metanólico de pulpa de chirimoya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$	104
Figura 23. Efecto del extracto metanólico de cáscara de chirimoya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$	104
Figura 24. Efecto del extracto metanólico de hojas de chirimoya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$	105
Figura 25. Efecto del extracto metanólico de pulpa de chincuya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$	105

Figura 26. Efecto del extracto metanólico de cáscara de chincuya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$ 106

Figura 27. Efecto del extracto metanólico de hojas de chincuya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$ 106

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para cursar mis estudios de doctorado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** porque gracias a las oportunidades brindadas he podido realizar una de las metas más grandes en la vida para mi formación profesional, con una investigación que aportará conocimientos en beneficio de estudiantes, investigadores, productores y consumidores.

Al **Instituto de Horticultura** y a todas las personas que forman parte de él, por todo el apoyo para poder culminar esta meta.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, FES Zaragoza)**, especialmente a la Dra. María Luisa Escobar Sánchez y al Dr. Daniel Zavala Mendoza por el apoyo en la fase experimental en células tumorales y por compartir sus conocimientos para el manejo de los equipos y técnicas necesarias para el presente estudio.

Mis asesores

Dra. Ma. del Rosario García Mateos por todo el apoyo brindado, por su asesoría, conocimientos, recursos aportados, pero principalmente por su paciencia y tiempo dedicado a esta investigación.

Dr. Luis Sánchez Sánchez por permitirme trabajar en su laboratorio y por todos los conocimientos, tiempo y recursos dedicados a este proyecto.

Dra. Ma. Teresa Martínez Damián por su asesoramiento, sugerencias, observaciones y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Dra. Mariana Palma Tenango por sus observaciones y sugerencias, así como el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Al Dr. Oscar Mascorro, Angy, Anita y Roger por su apoyo y amabilidad que son de gran ayuda para los procesos administrativos que los alumnos de este posgrado necesitamos.

A mis profesores, por el esfuerzo que hacen para prepararnos de acuerdo a los objetivos del posgrado, cuidando siempre que la enseñanza sea de calidad.

A todo el personal de la universidad Autónoma Chapingo, por las facilidades otorgadas durante mis estudios para concluir con la investigación.

Al señor Darío y a su esposa Verónica por darme siempre todo su apoyo de forma desinteresada, animándome cuando es necesario con consejos para no desistir y poder lograr las metas que me proponga.

A mi madre y hermanos por creer en mí, ya que desde que salí de casa en busca de superación personal, fueron parte de la motivación que se necesita para no rendirse.

A la **M.C. Jessica Santamaría, Ing. Miguel Manzanilla, Sr. Fernando y Sr. Othoniel Salazar** que amablemente me apoyaron con su tiempo y medios para la obtención del material vegetal que se usó en esta investigación.

DEDICATORIA

A mi esposa (**Nic**) e hijos (**Haz y Rafa**)

Por ser las personas más importantes en mi vida, con quienes he formado una familia que amo y aunque no sea perfecta, tratamos siempre de ser felices.

Son ellos quienes me brindan la motivación necesaria para afrontar las adversidades que se presentan día a día y poder superarme con el propósito de crecer como persona y tener un mejor futuro.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Carlos Raúl López Martínez

Fecha de nacimiento: 7 de julio de 1983

Lugar de nacimiento: Netzahualcóyotl, Estado de México

No. Cartilla militar: C-6451470

CURP: LOMC830707HMCPRR06

Cédula profesional: 7444200 (Licenciatura) y 10123987 (Maestría)

Desarrollo académico

Preparatoria Agrícola Chapingo

Ingeniería Agroindustrial

Maestría en Ciencias en Horticultura

RESUMEN GENERAL

Atributos nutricionales, nutracéuticos y citotóxicos de tres especies de Anonáceas: guanábana (*Annona muricata* L.), chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) y chincuya (*Annona purpurea* Moc. et Sess.)

Las especies de la familia *Annonaceae* son apreciadas por sus cualidades alimenticias, medicinales y agroindustriales. Sin embargo, su cultivo no se ha formalizado agrónomica y económicamente en México, debido a que la mayoría de ellas se encuentran en áreas naturales y en huertos de traspatio. En los últimos años el valor de algunas especies se ha incrementado por la identificación de metabolitos bioactivos en hojas, raíz, corteza de tallo, frutos y semillas de importancia nutricional, además de ser empleados en la medicina tradicional, sin embargo, la información que sustenta la efectividad de su uso por sus propiedades nutracéuticas, antioxidantes, medicinales y citotóxicas es limitada. En el presente estudio se evaluaron las características nutricionales, antioxidantes y citotóxicas de guanábana, chirimoya y chincuya. En la pulpa de chirimoya se observaron los valores más altos en las propiedades nutricionales y antioxidantes; destacando en el contenido de proteína cruda y carbohidratos, así como la mayoría de los minerales evaluados (Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn y Mn) en comparación con guanábana y chincuya. Por otro lado de acuerdo a la correlación de Pearson, la actividad antioxidante de estas especies se debe a la presencia de compuestos fenólicos y ácido ascórbico. Comparado con frutos de otras especies de mayor demanda, las especies de Anonáceas representan un potencial de nutrientes y minerales, además de un alto contenido de compuestos antioxidantes que las hacen aptas para el consumo. Los extractos metanólicos de pulpa, cáscara, semillas y hojas presentaron toxicidad en *Artemia salina*, además, los extractos de semilla de las tres especies tuvieron actividad antiproliferativa sobre células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 a concentraciones bajas, que no indujeron a las células a una muerte necrótica. Por lo que más estudios son necesarios para determinar el potencial de estas especies como fuente de compuestos bioactivos que validen algunos de los beneficios terapéuticos que se mencionan en la medicina tradicional.

Palabras clave: *Annonaceae*, nutricionales, antioxidantes, citotóxicas, cáncer.

Tesis de Doctorado en Ciencias, en Horticultura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Carlos Raúl López Martínez

Director de Tesis: Dra. María del Rosario García Mateos

GENERAL ABSTRACT

Nutritional, nutraceutical and cytotoxic attributes of three species of *Annonaceae*: soursop (*Annona muricata* L.), cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and chincuya (*Annona purpurea* Moc. et Sess.).

The species of the *Annonaceae* family are appreciated for their nutritional, medicinal and agro-industrial qualities. However, their cultivation has not been formalized agronomically and economically in Mexico, because most of them are found in natural areas and backyard gardens. In recent years, the value of some species has increased due to the identification of bioactive metabolites in leaves, roots, stem bark, fruits and seeds of nutritional importance, in addition to being used in traditional medicine, however, the information supporting the effectiveness of their use for their nutraceutical, antioxidant, medicinal and cytotoxic properties is limited. In the present study, the nutritional, antioxidant, and cytotoxic characteristics of soursop, cherimoya and chincuya were evaluated. The cherimoya pulp showed the highest values in nutritional and antioxidant properties, especially in crude protein and carbohydrate content, as well as most of the minerals evaluated (Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, and Mn) in comparison with soursop and chincuya. On the other hand, according to Pearson's correlation, the antioxidant activity of these species is due to the presence of phenolic compounds and ascorbic acid. Compared with fruits of other species of higher demand, *Annonaceae* species represent a potential for nutrients and minerals, in addition to a high content of antioxidant compounds that make them suitable for consumption. Methanolic extracts of pulp, peel, seeds and leaves showed toxicity on *Artemia salina*, in addition, seed extracts of the three species had antiproliferative activity on MDA-MB-231 breast cancer tumor cells at low concentrations, which did not induce cells to necrotic death. Therefore, more studies are needed to determine the potential of these species as a source of bioactive compounds to validate some of the therapeutic benefits mentioned in traditional medicine.

Key words: *Annonaceae*, nutritional, antioxidant, cytotoxic, cancer.

Doctoral Thesis in Science, in Horticulture, Fitotecnia Department. Universidad Autonoma Chapingo

Author: Carlos Raúl López Martínez

Advisor: Dr. María del Rosario García Mateos

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Una alimentación saludable favorece el buen estado de salud del consumidor y disminuye el riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con ella (Calañas-Continente, 2005); por lo cual, la dieta es un determinante fundamental para lograr ese estado, ya que se ha demostrado una influencia positiva de una dieta saludable contra las enfermedades crónico degenerativas, como las cardiovasculares, obesidad, diabetes, cáncer, demencias, osteoporosis y malformaciones congénitas, entre otras (Royo Bordonada, 2017). Actualmente las personas muestran una tendencia hacia una dieta más balanceada basada principalmente en el consumo de frutas y hortalizas, complementada con un régimen de actividad física que ayuden en el cuidado de la salud (López Camelo, 2003).

Lo anterior crea la necesidad de obtener información sobre la composición nutricional de los alimentos y compuestos que ayudan a mantener las funciones vitales de los seres humanos en óptimas condiciones (Azcona, 2013). Considerando a los alimentos una fuente de nutrientes (agua, fibra y minerales) y sustancias bioactivas (nutracéuticos y antioxidantes) como lo son los compuestos fenólicos, los flavonoides y la vitamina C, metabolitos que ayudan a la prevención de enfermedades crónico-degenerativas (de Hernández et al., 2012; OMS, 2003).

Algunas especies de frutales representan una fuente nutricional indiscutible, por contener sustancias bioactivas que fortalecen el sistema inmune y otras con importantes funciones terapéuticas. Sin embargo, la falta de estudios sobre sus constituyentes fitoquímicos impide estandarizar su consumo y aportar valor a su producción (Torres-Guevara et al., 2021).

El género *Annona* en México, es uno de los más importantes de la familia *Annonaceae* debido a sus cualidades organolépticas, digestivas y nutritivas, además sus frutos son apreciados por sus propiedades medicinales y agroindustriales (González Vega, 2013). Varios usos medicinales tradicionales han sido documentados para tratar diversos problemas de salud (fiebre, dolor, enfermedades respiratorias, enfermedades de la piel, parásitos, infecciones bacterianas, hipertensión, inflamación, diabetes y cáncer) (Coria-Téllez et al., 2018). Algunos compuestos identificados en estas especies son alcaloides, compuestos fenólicos y acetogeninas que actúan como mecanismos de defensa en las plantas ya que poseen un efecto citotóxico o citostático y características como la selección evolutiva o actividad biológica que las convierten en una fuente inestimable de nuevas sustancias con posible actividad antitumoral (Cendales & Suárez, 2016).

Justificación

En México el cultivo de las especies de la familia *Annonaceae* ha sido poco aprovechado, sin embargo, por la diversidad de usos de algunas especies (alimenticios, terapéuticos, conservación de agroecosistemas e insecticidas) presenta grandes perspectivas como un cultivo alternativo con rentabilidad económica (Hernández et al., 2014a; Hernández-Fuentes et al., 2016). Son pocos los trabajos de investigación sobre la composición nutricional y fitoquímica de estas especies, con excepción de la guanábana y la chirimoya: por otro lado, otras especies son consideradas como productos secundarios o subutilizados, que no han traspasado las fronteras locales o regionales, ni han sido aprovechadas agroindustrialmente (Hernández et al., 2014a; Paternina et al., 2013).

Los estudios realizados hasta el momento en estos frutos son insuficientes para validar cualquier efecto terapéutico y más en el caso de enfermedades complejas y graves. Se han demostrado efectos anticancerígenos de la guanábana, pero no se han estudiado en humanos. Las investigaciones publicadas sobre la actividad anticancerígena han sido realizadas en cultivos

celulares (*in vitro*) y con principios activos extraídos de partes de la planta, principalmente semillas y hojas, lo que limita la posibilidad de que las partes frescas, el fruto en infusiones o sus extractos puedan tener el efecto que se les atribuye (Morón Rodríguez et al., 2010).

La presencia de metabolitos secundarios en plantas de especies de la familia *Annonaceae* se debe a distintos factores como el género y la especie, edad de la planta, las características del suelo y la amplia diversidad de climas donde se distribuyen (Aminimoghadamfarouj et al., 2011; Harborne, 1993).

Hipótesis

Las tres especies estudiadas presentaran diferencias significativas entre los contenidos de los metabolitos evaluados debido principalmente a la variabilidad entre especies, a los sitios de colecta y a las condiciones de desarrollo.

Objetivo general

Evaluar las características nutricionales, nutracéuticas y citotóxicas de tres especies de la familia *Annonaceae* (guanábana de huerto comercial; chirimoya, de huerto de traspatio y chincuya silvestre).

Objetivos particulares

Determinar los atributos nutricionales de la pulpa del fruto de guanábana, chirimoya y chincuya mediante un análisis proximal (humedad, cenizas, proteína cruda, lípidos, fibra cruda y carbohidratos) y mineral (Ca, P, Mg, K, Na, Fe, Zn, Cu, Mn, B).

Determinar el potencial nutracéutico de la pulpa del fruto de las tres especies cuantificando el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico para determinar su actividad antioxidante.

Evaluar la toxicidad de extractos metanólicos de pulpa, cáscara, semillas y hojas de las tres especies de Anonáceas mediante un bioensayo en *Artemia salina*.

Evaluar las propiedades citotóxicas de los extractos metanólicos de las tres especies en células de la línea tumoral MDA-MB-231 de cáncer de mama.

La investigación propuesta, se realizó en dos etapas descritas en los Capítulos 3 y 4 de la presente tesis.

En el **Capítulo 3** se investigaron algunas propiedades químicas de las especies de Anonáceas. Se evaluó la calidad nutricional y antioxidante de la pulpa de los frutos, además se determinó la toxicidad de los extractos metanólicos de la pulpa, cáscara, semillas y hojas de estas especies mediante un bioensayo en *Artemia salina*. Los resultados mostraron que, comparado con frutos de consumo habitual las especies de Anonáceas son una buena fuente de nutrientes y minerales, además de un alto contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico (vitamina C), que les aportan capacidad antioxidante, lo que los hace aptos para ser consumidos en la dieta de las personas, sin embargo, se recomiendan otros estudios que avalen los beneficios terapéuticos que se les atribuyen a estas especies, ya que algunos de los extractos presentaron toxicidad para *Artemia salina*, lo que podría representar un riesgo para los consumidores.

En el **Capítulo 4** se determinó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de extractos metanólicos de pulpa, cáscara, semillas y hojas de guanábana, chirimoya y chincuya sobre células tumorales de cáncer de mama (MDA-231-MB), con la finalidad de evaluar sus propiedades citotóxicas. Las líneas celulares de cáncer se utilizan como modelos experimentales que ayudan probar la eficacia de diferentes extractos o productos usados en terapias, antes de su uso en humanos (Hui et al., 2006). Se encontró que solo los extractos metanólicos de semilla de las tres especies tuvieron actividad antiproliferativa, que no induce a las células una muerte necrótica. Por lo que más estudios son necesarios para determinar el potencial de las semillas como fuente de compuestos anticancerígenos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Especies de Anonáceas

La familia *Annonaceae* se ubica dentro de las plantas más primitivas (Agustín & Ledesma, 2014); constituida por árboles, arbustos, raramente sub-arbustos y trepadoras o lianas (Agustín & Ledesma, 2014; Kessler, 1993). Comprende cerca de 2 500 especies agrupadas entre 130 y 140 géneros, que se distribuyen en las regiones tropicales de América, Asia, Australia y las islas del Pacífico (González Vega, 2013). En el Continente Americano, el género *Annona* spp., se distribuye en las zonas con clima tropical y subtropical y su biodiversidad se ve representada por unas 120 especies, de las aproximadamente 20 se cultivan por su valor económico (de Hernández et al., 2012; González Vega, 2013; Hernández et al., 2014b). En México se encuentran 14 géneros y 63 especies de Anonáceas distribuidas principalmente en regiones tropicales del sureste, localizadas en áreas silvestres, huertos comerciales y huertos de traspatio (Agustín & Ledesma, 2014).

Dentro de la familia *Annonaceae* se encuentran algunos géneros que se caracterizan por la utilidad de sus frutos (Paternina et al., 2013), con mayor demanda comercial como la guanábana (*A. muricata* L.), la chirimoya (*A. cherimola* Mill.), el saramuyo (*A. squamosa* L.), la atemoya (*A. hybrida*), la ilama o papausa (*A. diversifolia* Saff.), la anona colorada o amarilla (*A. reticulata* L.) y la chincuya o cabeza de negro (*A. purpurea* L.) (Agustín & Ledesma, 2014; Hernández et al., 2014a). En México, algunas de estas especies son cultivadas, la guanábana (*A. muricata* L.) en los estados del Golfo (Veracruz y Tabasco) y Pacífico (Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas), la chirimoya (*A. cherimola* Mill.) en los estados del Centro (Estado de México, Guanajuato, Michoacán, Puebla y Morelos) y el anón ó saramuyo, (*A.*

squamosa L.) en el Sureste (Yucatán) (Agustín & Ledesma, 2014; Hernández et al., 2014a; Paternina et al., 2013).

Las especies de mayor producción en México son guanábana (*Annona muricata* L.), chirimoya (*A. cherimola* Mill.) y saramuyo (*A. squamosa* L.) (Agustín & Ledesma, 2014; Hernández et al., 2014b). Para el 2019, la superficie cosechada de guanábana fue de 3 176 ha, con un volumen de producción de 30 790 t y con un rendimiento promedio de 9.6 t ha⁻¹ en los estados de Campeche, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla, Tabasco, Veracruz y Yucatán. En el caso de chirimoya se cosecharon 36 ha, se produjeron 247 t con un rendimiento promedio de 6.86 t ha⁻¹ en los estados de Michoacán y Morelos, finalmente para el caso de saramuyo la superficie cosechada fue de 48 ha, el volumen de producción fue de 431 t con un rendimiento de 8.9 t ha⁻¹ exclusivamente en el estado de Yucatán. Actualmente, el estado de Nayarit es el principal productor de guanábana, con una superficie de 2 205 ha y un volumen de producción de 23 230 t (SIAP, 2019). Chincuya solamente se cultiva en huertos familiares o en traspatios.

2.1.1. *Annona muricata* Linn.

La guanábana *Annona muricata* Linn, también conocida con los nombres de: Catoche, Anona de México, Graviola, Anona de la India, Mole, Soursop (en inglés), etc., es una planta originaria de América, específicamente de la región tropical de Sudamérica; se cultiva desde el nivel del mar hasta los 1 000 m, pero su altitud óptima para el perfecto desarrollo oscila entre 400 y 600 m en regiones cálidas que van desde México hasta Brasil. En la actualidad esta especie se encuentra ampliamente distribuida en Asia y África (Gordillo et al., 2012; Pinzón-García et al., 2016; Reyes Montero et al., 2018; SEPHU, 2010).

Los árboles presentan hojas alternas, enteras y sin estípulas. Flores axiales, solitarias o en fascículos de prefloración valvar. Todos los carpelos fecundados contienen una semilla, generalmente de color negro, y que al secarse se vuelve marrón, característica que sirve para la identificación y descripción del fruto. Si

el óvulo no se fertiliza correctamente, el carpelo correspondiente tiende a no desarrollarse, por lo que el fruto se deforma. El fruto es altamente perecedero, el color varía del verde claro al oscuro, virando a un tono amarillento que indica su grado de madurez (Figura 1). La pulpa del fruto maduro es carnosa, de color blanco, ligeramente ácida, con un pH superior a 4, de sabor dulce y muy aromática (Cardozo et al., 2009; Quispe et al., 2007; SEPHU, 2010).



Figura 1. Características de la guanábana (*Annona muricata* L.). A) Árbol, B) Hojas, C) Flor y D) Fruto. Fuente: Moghadamtousi et al. (2015).

La calidad del fruto de guanábana está condicionada por sus características externas que dependen de la variedad, forma, tamaño y grado de madurez; e internas, determinadas por el contenido de vitaminas, carbohidratos, aminoácidos, minerales y las apreciadas por los sentidos olor, sabor, color y textura de la pulpa (Paternina et al., 2013; Ramírez-Méndez et al., 2012; Sandoval et al., 2014; von Breymann et al., 2013). El fruto es una buena fuente de vitamina C, metabolito que ayuda a mantener la piel y la mucosa en estado saludable, posee efecto antioxidante y es un factor importante en el desarrollo y mantenimiento de huesos, cartílagos y dientes (Gordillo et al., 2012).

Aunque la información sobre la composición química, el valor nutricional, los usos medicinales y toxicología del fruto de guanábana es limitada (Gordillo et al., 2012). Es una de las especies comestibles más importantes comercialmente por su agradable sabor y aroma, así como por sus múltiples usos tanto como fruta fresca y procesada, generalmente es consumida en forma de helados, cremas, dulces, néctares, jugos, yogurt, polvo para agua fresca, licuados y vinos, esto permite un mayor valor agregado al prolongar su vida de anaquel. En los últimos años se ha despertado el interés por sus diversos usos y aplicaciones, principalmente por compañías empacadoras de frutos, embotelladoras de refrescos y en laboratorios farmacéuticos para la extracción de sustancias que puedan tener efectos contra el cáncer. Por lo que existe una gran fortaleza en el aprovechamiento integral de este frutal, comercial, industrial, medicinal, farmacéutico, fitotóxico y alimenticio (Hernández et al., 2014a; Ramírez-Méndez et al., 2012).

2.1.2. *Annona cherimola* Mill.

La chirimoya o chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) es conocida en países, como Perú, Chile, España y México, mientras que en Costa Rica se le da el nombre de anona (Castro, 2007). El nombre chirimoya aparentemente se deriva de “chirimuya” que en Quechua significa “semilla fría”, esto se refiere a la región andina donde se localiza principalmente esta especie, zona relativamente fría comparada con las regiones donde están presentes el resto de las especies de *Annona* (Vanhove, 2008). También en condiciones tropicales se adapta a alturas superiores a los 900 m, con temperaturas no muy altas. Se puede esperar un buen desarrollo en alturas entre 1 500 y 2 500 m en las regiones templadas, con una precipitación no excesiva (Castro, 2007). Esta especie también está presente en áreas naturales o en huertos semi-domesticados (Agustín & Ledesma, 2014). Varias investigaciones señalan que el centro de origen se encuentra en la zona altoandina de Ecuador y Perú, de donde se difundió hacia Centro América, a las Antillas y posteriormente, en el año 1785 llegó hasta Jamaica. En la actualidad *A. cherimola* es una especie comercial con distintos cultivares y variedades en Chile, Bolivia, México, Centroamérica,

Estados Unidos, Antillas, Argentina, África Central, Indochina, Islas Canarias, Madera, Argelia, Egipto, Israel y España, el último país es uno de los mayores productores mundiales de frutos de chirimoya. (Delgado Ortiz, 2005; Gayoso Bazán & Chang Chávez, 2017; Zavala et al., 2009).

El árbol de chirimoya es un árbol pequeño que presenta exuberante follaje, porte erguido y a veces ramificado. El tallo es cilíndrico, de corteza más o menos gruesa, lisa o ligeramente vetada de color verde grisácea. Las hojas sin estípulas son enteras, simples y lisas, de disposición alterna y de forma ovada u ovada-lanceolada. Las flores, son muy aromáticas, hermafroditas, presentan seis pétalos amarillentos jaspeados de púrpura, son poco llamativas, solitarias o en ramilletes de dos o tres, sobre un corto e inclinado pedúnculo inserto en las axilas de las hojas. El fruto de la chirimoya es tipo agregado, es un sincarpio que procede de una sola flor y está formado por la fusión de muchos carpelos. El tamaño y forma depende del número de carpelos fecundados. La casi totalidad de los carpelos contienen una semilla de color negro y consistencia dura. La cáscara es delgada y frágil; su superficie verde oscura, casi lisa, lleva como una red de sombras que denota los límites de cada frutilla (Figura 2). La pulpa es de color blanco, posee una textura carnosa, blanda, cremosa, moderadamente jugosa y aromática, de sabor ligeramente ácido o muy dulce cuando se sobremadura, a veces descrito como una mezcla entre la piña, el mango y la fresa; con numerosas semillas de color desde marrón oscuro a negro (Castro, 2007, Delgado Ortiz, 2005; González Vega, 2013).

La chirimoya es parecida a la guanábana, pero de menor tamaño (SEPHU, 2010) y comercialmente es un cultivo subutilizado. El fruto se consume como fruta fresca o fruta de mesa, en ensaladas de frutas o su pulpa como componente de jugos comerciales de otras frutas. Además de su consumo fresco, también es posible consumirla procesada, en forma de yogur, helados, batidos de leche, flan, jugos y vinos. Algunas empresas latinoamericanas congelan cantidades limitadas de chirimoya que se exportan a los Estados Unidos y a la Unión Europea para ser usadas en la elaboración de postres. Es

un fruto con abundantes azúcares solubles, es fuente de vitaminas (B1, B2, B3 y C) y minerales (hierro, calcio y fósforo) (Castro, 2007, Vanhove, 2008).

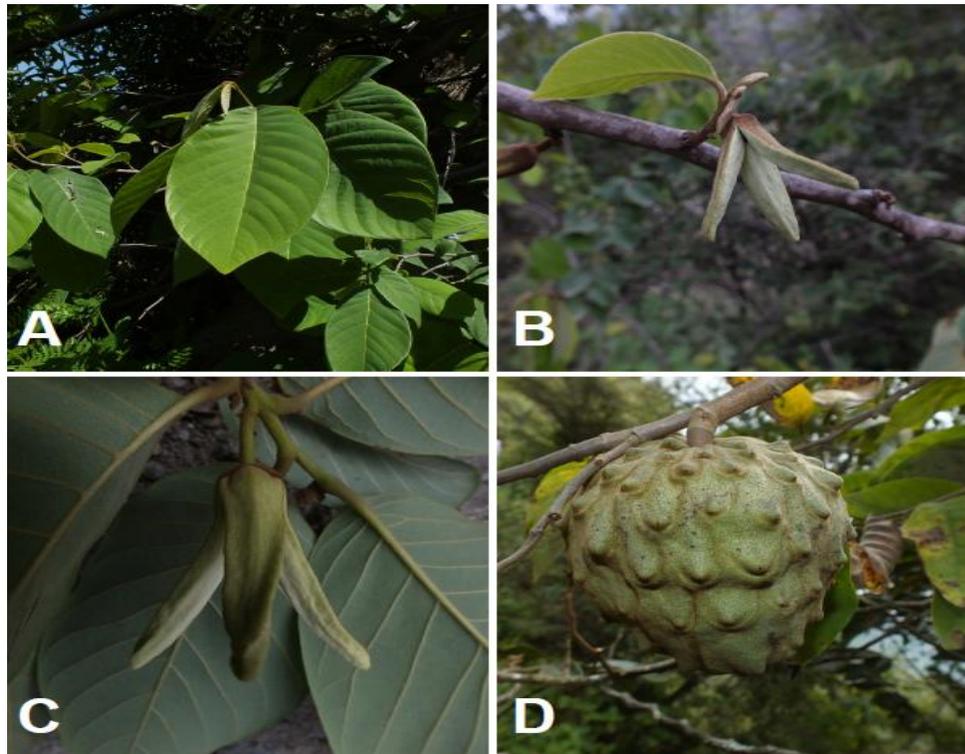


Figura 2. Características de la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). A) Hojas, B) y C) Flor y D) Fruto. Fuente: Gayoso Bazán y Chang Chávez (2017).

Las semillas son residuos del procesamiento industrial, no poseen valor comercial y se consideran un material de desperdicio que contribuye a la contaminación ambiental (Restrepo & Vinasco, 2010; SEPHU, 2010). Sin embargo, las semillas trituradas se pueden usar como bio-insecticidas para la eliminación de piojos y chinches; el manejo debe ser cuidadoso ya que algunos de los alcaloides que contienen las semillas son tóxicos y afectan seriamente los ojos; y las acetogeninas presentes en estas semillas poseen algunas propiedades farmacológicas (Castro, 2007; Vanhove, 2008).

2.1.3. *Annona purpurea* Moc. et Sess.

La *Annona purpurea* Moc. et Sess. (chincuya, sincuya, cabeza de negro o guanacona), es una especie de Anonácea poco conocida, ya que su distribución está restringida del sur de México hasta el norte de América del Sur

(Panamá, Colombia y Venezuela), que tiene un gran potencial, nativa de Mesoamérica, se encuentra de manera silvestre o cultivada (especialmente en huertos caseros); es originaria de América Central y posiblemente del Norte de América del Sur. Es común en tierras bajas costeras del sur de México, Panamá, Colombia y Venezuela (Barbeau, 1984; Luna-Cázares & González-Esquinca, 2015; Morton, 1987; Orellana, 2014; Vidal-Lezama et al., 2019). Crece en sitios abiertos con climas secos a húmedos en altitudes de 0 hasta 1 200 m, con precipitaciones anuales mayores a 2 000 mm y en diversos tipos de suelo. Es parte de la composición florística de los estados de Chiapas, Michoacán, Oaxaca, Jalisco, Veracruz, Yucatán, Campeche, Guerrero y Tabasco (Luna- Cázares & González-Esquinca, 2015).

Árbol o arbusto de 4 a 10 m de altura con copas anchas y extendidas. Hojas simples, alternas deciduas, membranosas con pedicelos de 3 a 5 mm de largo, de ovadas a elíptico ovadas, en su mayor parte de 12 a 30 cm de largo y de 6 a 14 cm de ancho, ápice acuminado, redondeadas en la base, verdes y glabras por el haz y pálidas a moreno velludo aún con la edad, por el envés. Flores extra axilares, solitarias y grandes. Tres pétalos externos de 5 por 2 cm, carnosos y de color rosado. Frutos agregados (sincárpicos), globosos, ampliamente ovoides o esferoides, de 15 a 20 cm de diámetro, completamente tomentoso, con numerosas protuberancias rígidas, piramidales (picos) (Figura 3). Semillas ovoides muy numerosas de color castaño (Luna-Cazáres & González-Esquinca, 2015; Orellana, 2014; Romero-Soler & Cetzal-Ix, 2015).

De acuerdo con Luna-Cazáres y González-Esquinca (2015) la especie se usa como portainjerto en el mejoramiento genético de diversas especies de *Annona* debido al tamaño del fruto, cáscara gruesa, color atractivo de la pulpa y su aroma. Es un árbol de sombra debido a su abundante follaje y la madera se emplea para postes de cercas (Orellana, 2014).

De la chincuya se consume la pulpa fresca de los frutos maduros, la pulpa es fibrosa de color anaranjado, fragante y según algunos con cierto sabor a mango. En ocasiones es insípida, aunque su fruto es comestible, su ingestión

produce diarrea en algunas personas. Se usa como ingrediente principal para elaborar helados, dulces, jugos o bebidas (refrescos). El empleo medicinal de diversas partes de la planta es sumamente variado, en México el jugo de chincuya se usa como remedio para la fiebre y las frialdades, la disentería, diarrea y congestión, así como para aliviar la ictericia (Luna-Cazáres & González-Esquinca, 2015; Orellana, 2014).



Figura 3. Características de la chincuya (*Annona purpurea* Moc. et Sess.). A y C) Fruto inmaduro, B) Flor y D) Fruto maduro. Fuente: Girón y González (2020).

Las plantas de la familia *Annonaceae* han sido reconocidas como una fuente de metabolitos secundarios (compuestos fenólicos, acetogeninas, alcaloides, terpenoides y esteroides) identificados principalmente en las hojas y semillas de estas especies, los cuales son de interés, debido al potencial que poseen para ser aprovechados con fines farmacéuticos (actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, antitumoral, citotóxica y antimalaria) o agrícolas en la conservación de agroecosistemas e insecticidas naturales (Lucio et al., 2015; Lujan-Hidalgo et al., 2015; Pumiputavon et al., 2019). Se ha demostrado que las acetogeninas de la familia *Annonaceae* presentan efecto antiproliferativo sobre

líneas celulares cancerosas que inducen apoptosis en este tipo de células en ensayos *in vitro* e *in vivo*, por lo que en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos, las acetogeninas de esta familia constituyen moléculas relevantes (Schlie-Guzmán et al., 2009).

De acuerdo a lo anterior, la presencia de los metabolitos secundarios justifican las características nutraceuticas, antioxidantes y diversas propiedades medicinales, entre otras, que se le atribuyen a diversas plantas, principalmente a algunas reconocidas desde tiempos ancestrales, como es el caso particular de varias especies de las anonáceas.

2.2. Alimentación saludable

La alimentación saludable constituye uno de los principales factores de promoción y mantenimiento de una buena salud durante toda la vida. La dieta inadecuada es uno de los principales factores de riesgo de aparición de las principales enfermedades no transmisibles, como las cardiovasculares, el cáncer o la diabetes mellitus (García et al., 2016). Por lo que la nutrición en los seres biológicos y en especial en el hombre es una parte imprescindible para su salud física y mental e indispensable para su actividad diaria y su productividad (Birute Guzmán et al., 2009). Debido a ello, en los últimos años, las investigaciones se han centrado en los alimentos ricos en nutraceuticos, antioxidantes naturales, fibras dietéticas, colorantes naturales, minerales y vitaminas, alimentos con bajo contenido de calorías, colesterol y grasas, libres de aditivos sintéticos (El-Samahy et al., 2007). Las frutas conforman un grupo de alimentos necesarios en la dieta humana. Su contenido en agua, fibra, vitaminas y minerales las hacen una fuente de nutrientes necesarios para disfrutar una vida saludable. Entre las frutas tropicales, las especies de la familia *Annonaceae* destacan por su aroma y sabor, y se ha determinado que posee propiedades con efectos beneficiosos a la salud (de Hernández et al., 2012).

Las propiedades nutraceuticas y medicinales de los vegetales principalmente se explican por la presencia de los metabolitos secundarios. Estos son un grupo de

compuestos no esenciales para el desarrollo de la planta, sin embargo, estas sustancias intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente y son los responsables de los efectos terapéuticos de éstas. Presentan propiedades biológicas como la protección y defensa contra depredadores y patógenos, muchos desempeñan funciones ecológicas (atrayentes o repelentes de animales) (Daniel; 2006; Sierra et al., 2018). Estos metabolitos difieren de los metabolitos primarios en que se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada. Se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glucósidos y alcaloides (Pérez-Urria Carril & Avalos, 2009). Los metabolitos primarios difieren de los secundarios porque son indispensables para la vida de los organismos, en particular para las funciones fundamentales de los vegetales. La presencia de metabolitos secundarios en los extractos vegetales justifica las propiedades medicinales y tóxicas de algunas especies (Rivas-Morales et al., 2016).

2.3. Nutraceuticos

Nutraceutico es cualquier sustancia presente en los alimentos o partes de alimento que proporcionan un beneficio específico para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Barberá Mateos y de Sanidad, 2011; Martínez & Atiasarán, 2000). Son sustancias biológicas extraídas de fuentes naturales, que se caracterizan mediante procesos biotecnológicos anti-desnaturalizantes para conservar sus propiedades originales sin haber algún tipo de manipulación química (Birute Guzmán et al., 2009).

Se usan como terapias biológicas no específicas para promover el bienestar, prevenir procesos malignos y controlar síntomas de algunos malestares (Prabu et al., 2012). Existen diversas opciones para la clasificación de los nutraceuticos dependiendo de su naturaleza química, su mecanismo de acción y su origen (Jiménez et al., 2015). El interés por los nutraceuticos surge a partir de estudios epidemiológicos que indican que una dieta específica o un componente de la dieta se asocia con un menor riesgo para una cierta enfermedad (Tapas et al., 2008).

2.4. Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que retrasa o previene la oxidación de un sustrato oxidable (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos de membranas) por la presencia de radicales libres (partículas con un electrón solitario o desapareado) actuando como donador de electrones (agente reductor) y neutralizando a esas partículas sumamente reactivas, a pesar de estar presente el antioxidante en concentraciones más bajas que el sustrato (Mariaca et al., 2016). Estas sustancias en algunos casos pueden revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas (Alomar, 2007) protegiendo a los componentes clave de las células (Badarinath et al., 2010). Por lo tanto, el papel de estas sustancias es clave en la reducción de enfermedades cardiovasculares, de tumores y de enfermedades neurodegenerativas, también actúan potenciando el sistema inmunológico (Batalla, 2007).

La protección contra los radicales libres puede mejorar por el consumo de antioxidantes en la dieta; al respecto, algunas investigaciones han reportado que los alimentos que contienen antioxidantes pueden ser de gran importancia en la prevención de enfermedades como el cáncer (Alam et al., 2013; Pisoschi & Negulescu, 2011). Entre los antioxidantes más importantes en los alimentos se encuentran las vitaminas C y E, los carotenoides, y los flavonoides. Algunos fitoquímicos juegan un papel importante en la salud por su actividad antioxidante, antiinflamatoria y aumento del potencial inmune. Existe una gran variedad de alimentos con diversos antioxidantes, vitamina C y beta-carotenos, cuyo consumo disminuye el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer (Vallejo-Zamudio et al., 2017).

2.5. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante ocurre cuando un metabolito neutraliza cualquier radical libre con uno o más electrones solitarios (desapareados) (Frei, 2012). Es la capacidad de algunas moléculas presentes en los alimentos y sistemas biológicos de eliminar o inhibir radicales libres por reacciones redox (Floegel et al., 2011). Se han desarrollado varios métodos para medir la capacidad

antioxidante total de alimentos, bebidas, dietas, extractos de plantas y antioxidantes comerciales (Alam et al., 2013; Pisoschi y Negulescu, 2011). Entre los más populares se encuentran ensayos que implican la medición de la desaparición del color con los radicales libres DPPH o ABTS generados *in situ* durante el análisis (Kim et al., 2002; Kuskoski et al., 2005). Entre los principales metabolitos con propiedades antioxidantes se encuentran los compuestos fenólicos y los flavonoides, así como diversas vitaminas, entre ellas la vitamina C.

2.6. Compuestos fenólicos

Son metabolitos secundarios presentes en casi todas las plantas, se pueden dividir en grupos de acuerdo a su ruta biosintética y estructura química, tales como ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas, ligninas y flavonoides (Kim et al., 2003; Ross y Kasum, 2002). Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático (Figura 4). Miles de estos compuestos fenólicos se encuentran en las plantas y se clasifican en diferentes tipos de grupos funcionales (Peñarrieta et al., 2014).

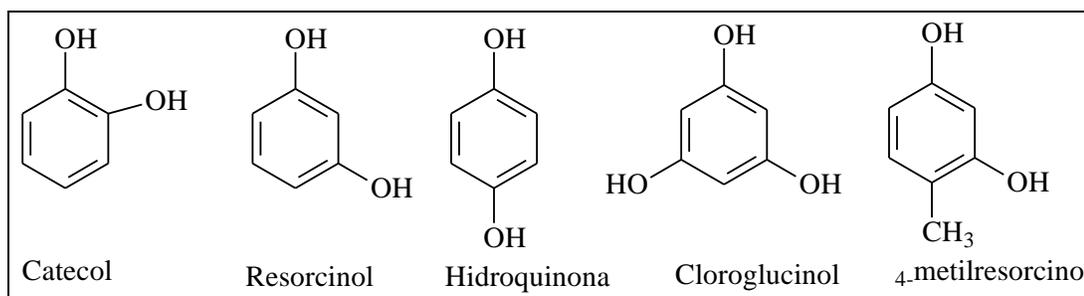


Figura 4. Estructuras químicas de compuestos fenólicos simples. Fuente: Peñarrieta et al. (2014).

Son sustancias cristalinas e incoloras solubles en agua y en disolventes orgánicos que tienen un olor característico (Michalowicz & Duda, 2007). Forman parte de los metabolitos secundarios de las plantas y su principal función es la protección en las células del deterioro y estrés oxidativo, causado por las condiciones del medio ambiente, por el ataque de herbívoros y organismos patógenos (Konczak et al., 2014). Proveen soporte mecánico a la planta, atraen

polinizadores o dispersores de frutos, absorben la radiación ultravioleta y actúan como agentes alelopáticos (Ramawat, 2004).

Son responsables de las características sensoriales de las plantas y alimentos, la astringencia de frutas y hortalizas. Además de las vitaminas y otros metabolitos, los compuestos fenólicos se consideran importantes sustancias antioxidantes en la dieta, generan interés por sus efectos fisiológicos, capaces de fomentar la buena salud y prevenir y aliviar algunas enfermedades en los consumidores (Mazza, 1998; Peñarrieta et al., 2014). Muchos compuestos fenólicos por la alta actividad antioxidante les confieren propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antialérgicas, antiinflamatorias, antimutagénicas, cardioprotectores y acciones vasodilatadoras, esto debido a su capacidad para donar electrones (Ramful et al., 2011; Tapas et al., 2008).

2.6.1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo muy amplio de los compuestos fenólicos, con una variedad de formas estructurales contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico: dos anillos de seis miembros vinculados con una unidad de tres carbonos que puede o no ser parte de un tercer anillo (Figura 5). Estos metabolitos se pueden clasificar en chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas y taninos condensados (Macready et al., 2009; Tapas et al., 2008). Se han identificado casi 8 000 estructuras de flavonoides, muchos de los cuales son responsables de los atractivos colores de las flores, frutas y hojas (Griffiths et al., 2002; Nijveldt et al., 2001). Ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son de gran importancia para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Dentro de la amplia gama de efectos que se les atribuye, destacan su acción venotónica, su efecto antioxidante y su capacidad para inhibir diversos procesos enzimáticos relacionados con el sistema vascular (Luengo, 2002). Son elementos de la parte no energética en la dieta humana. Se encuentran en

vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. En un principio, fueron considerados sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones pro-oxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas; la mayor parte de las investigaciones señalan diversas propiedades y efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, así como su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (Martínez-Flores et al., 2002). Estas sustancias se recomienda consumirlas en el tratamiento de arterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, cataratas y en la afectación del sistema inmunológico; además previenen la fragilidad capilar, disminuyen el colesterol, protegen al hígado y al estómago y presentan actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y analgésica (Frei, 2012; Packer et al., 1999).

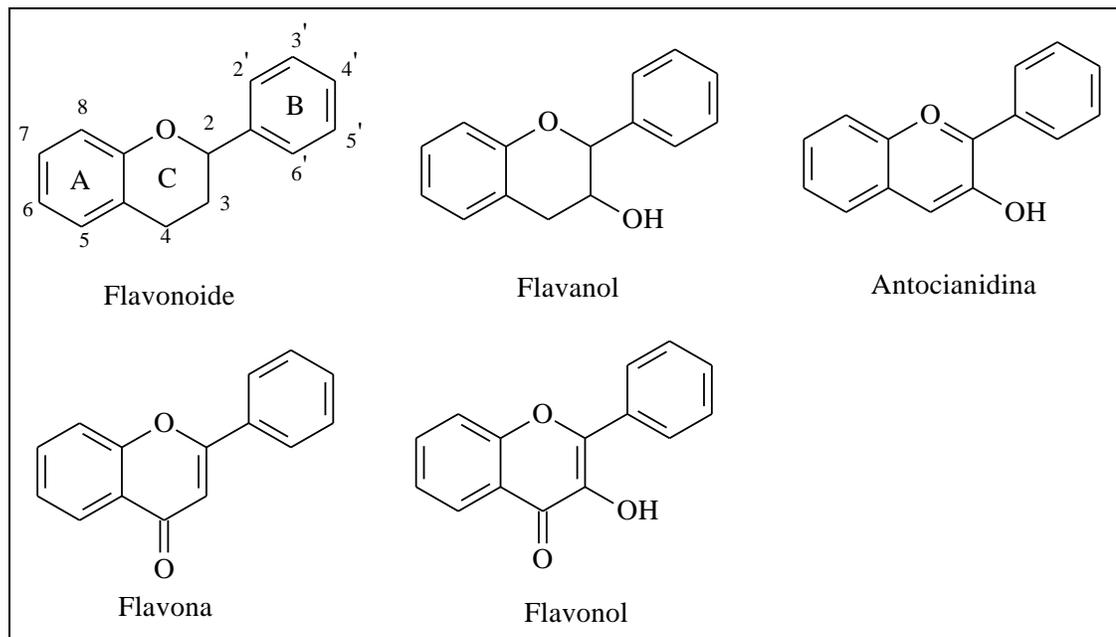


Figura 5. Estructura básica y tipos de Flavonoides. Fuente: Martínez-Flores et al. (2002).

2.7. Ácido ascórbico (Vitamina C)

La vitamina C o ácido ascórbico (AA), es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante hidrosoluble, se sintetiza a partir de la glucosa mediante

una serie de reacciones enzimáticas (Serra & Cafaro, 2007). Químicamente (Figura 6), el ácido ascórbico es una lactona de seis carbonos del ácido 2-ceto-L-glucónico que tiene relación estructural con la glucosa y otras hexosas (Xammar Oro & Donnamaría, 2006). Desde el punto de vista bioquímico, es un polvo cristalino, blanco e inodoro, muy soluble en agua y relativamente insoluble en disolventes orgánicos. En estado seco y protegido de la luz es estable durante períodos de tiempo muy prolongados (Valdés, 2006).

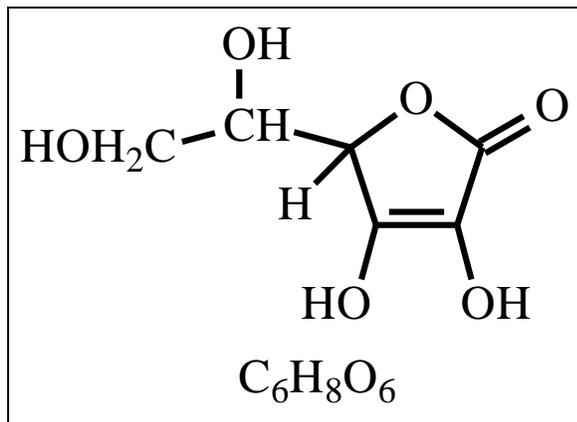


Figura 6. Estructura y fórmula química de la vitamina C. (Ácido ascórbico; Ácido deshidroascórbico). Fuente: Núñez Montoya y Rocha (2020).

Es uno de los principales nutrientes de origen natural y antioxidante en nuestra dieta diaria, tiene efecto anticancerígeno (Kim et al., 2002) y en las membranas celulares reduce la presencia de radicales libres (Klimczak et al., 2007). Interviene en múltiples procesos (formación de hormonas, neurotransmisores, carnitina, conversión del colesterol en ácidos biliares, incremento en la absorción de hierro), además de su fundamental intervención en la síntesis del colágeno (Xammar Oro & Donnamaría, 2006). La mayor parte de los mamíferos y de las plantas sintetizan vitamina C de forma endógena a partir de la glucosa y de la galactosa. Sin embargo, los seres humanos carecen de esta capacidad, al igual que sucede con algunos animales como los primates, la cobaya, los murciélagos frugívoros de la India, el caballo, determinadas especies de peces, algunos insectos y otros invertebrados porque carecen de una enzima denominada gulonolactona oxidasa implicada en la síntesis del mismo (Valdés, 2006). Por lo tanto, los seres humanos dependen de fuentes exógenas de

vitamina C que incluyen frutas y verduras, así como suplementos alimenticios y productos farmacéuticos (Okiei et al., 2009).

Debido a que es un poderoso agente antioxidante, está asociada en la prevención de enfermedades degenerativas (cataratas, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares), además es esencial en la reacción del sistema inmunológico (Xammar Oro & Donnamaría, 2006). La fuente primaria de vitamina C proviene de frutas cítricas, kiwi, guayaba, camu-camu, papaya, melón, fresa, mango, tomate, jugo de naranja, uvas y algunos vegetales como coliflor, brócoli, repollo, berro, espinaca, pimiento y papa. El consumo de cinco piezas de frutas y vegetales proporciona una concentración de más de 200 mg día⁻¹; por lo que el consumo de frutas y verduras representa una recomendación saludable en el entendimiento de los diversos efectos biológicos que proporciona este metabolito (Castillo-Velarde, 2019).

2.8. Las plantas medicinales

Desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales (curativos y preventivos), alimenticios y cosméticos. Actualmente, nuevas especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de sustancias con importante actividad biológica (Ramírez et al., 2007). Un gran porcentaje de la población mundial recurre a sistemas de medicina alternativa (Daniel, 2006), los cuales se basan en la utilización de plantas medicinales, que contienen en cualquiera de sus órganos, sustancias con actividad farmacológica usadas con fines terapéuticos (Kuklinsli, 2003). De acuerdo con la Secretaría de Salud, el 90% de la población mexicana ha optado por alguna de las 4 500 plantas medicinales de México por lo menos una vez en su vida, de las cuales sólo se ha hecho análisis farmacológico al 5% del total de esas plantas (SEMARNAT, 2021).

La medicina tradicional mexicana data de tiempos prehispánicos en la atención primaria de la salud (Villarreal-Ibarra et al., 2015). En la actualidad es reconocida como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, es una parte importante de la cosmovisión de los pueblos indígenas y

representa el conocimiento milenario sobre la madre tierra y el uso de plantas medicinales que los indígenas han resguardado y que tiene un valor incalculable fortaleciendo y preservando su identidad (Jiménez, 2017). La medicina actual enfrenta retos sin precedentes, generados por un lado, por los cambios epidemiológicos y demográficos, y por el otro, el gran costo financiero y social que esto representa.

Es un hecho que los grandes avances tecnológicos permiten mayor precisión diagnóstica y efectividad terapéutica, con una mayor tendencia a la mínima invasión, sin embargo, pese a todo esto, existen riesgos asociados con la atención médica los cuales pueden desencadenar incidentes adversos con consecuencias graves (Moyado, 2017). Organismos internacionales, como la OMS, están enfocándose en la medicina tradicional, pues está creciendo el uso indiscriminado de medicamentos, la automedicación y la resistencia a antibióticos, lo que está convirtiéndose en un problema de salud pública, ya que cada vez son más las cepas resistentes que generan problemas de salud, incluso de manera inter-hospitalaria. Las plantas utilizadas en la medicina tradicional contienen principios activos, los cuales pueden ser una solución para esta problemática, por lo cual es importante identificarlos y determinar si es un compuesto activo o es la mezcla de varios lo que les da estas propiedades (de Loera Carrera & Ruiz, 2020).

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna. Su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo. Estas sustancias se conocen como principios activos, generalmente, son producto del metabolismo secundario de la planta. Los principios activos presentes en los extractos vegetales, tienen propiedades medicinales o preventivas y funcionan incrementando el bienestar y la salud (Salas, 2006). La composición de los extractos varía entre las diferentes especies, en las distintas partes de la planta y según sus estados fenológicos (Ringuelet y Viña, 2013).

2.8.1. Extractos vegetales

Los metabolitos biológicamente activos presentes en los tejidos de plantas, son extraídos mediante disolventes orgánicos de diversa polaridad (alcohol, agua, mezcla de estos u otro disolvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado (Santamaría et al., 2015). En particular, la búsqueda de agentes de origen vegetal contra el cáncer en extractos vegetales inició en la década de 1950, durante el análisis del potencial inhibitorio de los extractos contra proteínas involucradas en la resistencia a la quimioterapia tradicional se encontraron compuestos que corresponden principalmente a derivados fenólicos, terpenoides, acetogeninas y alcaloides (Orrego, 2015). Por ello, obtener compuestos naturales con actividad antineoplásica es una de las prioridades actuales en la lucha contra el cáncer, en todos los países del mundo.

2.8.2. Toxicidad de extractos en *Artemia salina*

Desde tiempos ancestrales las plantas han sido utilizadas para el tratamiento empírico de diversas enfermedades. Varias especies vegetales se han estudiado sistemáticamente con la intención de identificar los principios activos responsables de algunas propiedades biológicas, para proveer drogas o fármacos de origen natural. Al respecto, en años recientes, grupos de investigación se dedican mediante estudios bio-dirigidos a evaluar extractos vegetales y a la elucidación estructural de sus componentes, con el fin de hallar nuevas alternativas terapéuticas frente a estas afecciones. Sin embargo, muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan empíricamente. Las plantas presentan una composición muy variada en su estructura y de ellas son diversos los compuestos bioactivos que manifiestan efecto antitumoral. Por estas razones la búsqueda de agentes antitumorales a partir de plantas continúa siendo una tarea de interés en la obtención de mecanismos novedosos de actividad antitumoral (Colom et al., 2005). Sin embargo, un problema de la fitoterapia popular es la dificultad de llevar un control sobre la dosis y la calidad del producto, lo cual puede propiciar riesgos y daños a la salud. Muchos de los remedios tradicionales son fabricados a partir

de poblaciones silvestres cuyo contenido químico puede variar debido a razones genéticas o ambientales (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010).

Por esta razón, es necesario determinar, además de la evaluación de su acción farmacológica, la toxicidad de las plantas medicinales con la finalidad de contribuir a la quimitaxonomía y al conocimiento entofarmacológico de algunas especies vegetales. La evaluación toxicológica preclínica se realiza rutinariamente en ratones, el elevado costo de pruebas *in vivo*, así como el sufrimiento causado a los animales, ha motivado el reemplazo de este tipo de experimentos por algunos modelos o bioensayos. Por lo cual, el ensayo de letalidad de *Artemia salina* se ha considerado una herramienta útil para la determinación preliminar de toxicidad de extractos de plantas (Fernández-Calienes Valdés et al., 2009).

Los bioensayos con *A. salina* como otros modelos han resultado de gran utilidad y eficacia porque requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten la evaluación rápida de extractos crudos y fracciones, no son onerosos, conduciendo a la identificación de los principios activos y descartando todo lo que no sea de interés. En muchas ocasiones, el factor clave que ha impedido el descubrimiento rápido de nuevos constituyentes bioactivos ha sido el uso insuficiente e inadecuado de la tecnología del bioensayo (Pino Pérez & Jorge Lazo, 2010). Hoy en día muchos de los medicamentos empleados para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer, se han obtenido de especies vegetales. La actividad biológica puede estar en cualquiera de los tejidos de alguna especie (hojas, tallos, raíces, flores o semillas) que sintetizan a fitoquímicos o sustancias químicas llamadas metabolitos o principios activos.

Otros ensayos específicos, como los usados para evaluar la citotoxicidad, son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Con el desarrollo de mejores y nuevas herramientas como son los bioensayos citotóxicos *in vitro*

empleando líneas celulares se realizan con mayor exactitud y rapidez que permiten el aislamiento, identificación o la elucidación estructural de principios activos, o sirven de modelos estructurales para la obtención semi-sintética de nuevos fitofármacos (Ávalos-Soto et al., 2014). Esto ha fomentado el uso de extractos de plantas y sus metabolitos como fuentes alternativas de compuestos activos con actividad anticancerígena que ayuden en su tratamiento.

Las plantas presentan una composición variada en su estructura y de ellas son diversos los compuestos bioactivos que manifiestan efecto antitumoral. Por estas razones la búsqueda de agentes antitumorales a partir de plantas continúa siendo una tarea de interés en la obtención de mecanismos novedosos de actividad antitumoral (Colom et al., 2005). Sin embargo, un problema de la fitoterapia popular es la dificultad de llevar un control sobre la dosis y la calidad del producto, lo cual puede propiciar riesgos y daños a la salud (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010).

2.9. Cáncer

El término cáncer se utiliza como sinónimo del término tumor, cuya derivación original del latín significa aumento de volumen (Kasper & Blengio, 2006). Es una enfermedad provocada por células que se multiplican sin control y pueden migrar e invadir tejidos lejanos, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando una metástasis que en muchas ocasiones es la causa de muerte de los individuos afectados (Sánchez, 2013). Los tumores pueden ser benignos, cuando se encuentran encapsulados, lo que facilita su extracción, sin embargo, cuando éstos son capaces de invadir y diseminarse hasta llegar a la metástasis se convierten en malignos (Hernández Menéndez & Ríos Hernández, 1999). La gran mayoría de los cánceres se origina de una sola célula y se necesitan varias mutaciones acumulativas para que una célula normal adquiera un fenotipo maligno (Becker et al., 2007; Coronel et al., 2019). De acuerdo con el tipo de tejido que afecta, el cáncer puede ser clasificado en diferentes categorías:

- **Carcinomas.** Este tipo de cáncer se origina en la capa epitelial de las células de los órganos o de los tejidos. Representan el 80 a 90 por ciento de todos los tipos de cáncer.
- **Sarcomas.** Se originan en tejidos conectivos y de apoyo incluyendo los músculos, los huesos, el cartílago y la grasa.
- **Mielomas.** Éstos se originan en las células del plasma de la médula.
- **Leucemias.** Son un tipo de cáncer que afectan la producción de glóbulos blancos en la médula.
- **Linfomas.** Éstos son cánceres del sistema linfático, pueden afectar a ganglios linfáticos en sitios específicos como el estómago, el cerebro y los intestinos (Wild, 2014).

Se desconoce el origen del cáncer, pero se sabe que sus causas se pueden deber a varios factores (físicos, químicos y biológicos); la exposición a agentes químicos (contaminación) es uno de los principales factores de riesgo, la edad, el estilo de vida y la exposición a radiaciones constantes son otras causas. Dependiendo de la zona de desarrollo en la actualidad se conocen cerca de 200 tipos de cáncer (Wild, 2014).

Más del 60% de las muertes por cáncer ocurren en pacientes de edad avanzada, por lo que además de un tratamiento óptimo, se debe actuar en la prevención y la detección precoz del proceso tumoral. Los tipos de cáncer que son diagnosticados más frecuentemente en hombres mayores de 65 años son los siguientes:

- próstata,
- pulmón,
- colon-recto,
- vejiga urinaria y
- estómago.

Y en mujeres mayores de 65 años:

- mama,

- colon-recto,
- estómago y
- cuerpo uterino (SEGG, 2018).

2.10. Proliferación y muerte celular

Las células de un organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular. Hay células cuyo período de vida es largo, como las musculares o las neuronas, mientras que la vida de otras es efímera, como algunas células sanguíneas y epiteliales, que se renuevan a partir de sus células progenitoras. El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constante; las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular. Se calcula que el cuerpo humano produce y erradica cada día miles de millones de células (Iracheta, 2007).

El crecimiento, el desarrollo y el mantenimiento de los organismos pluricelulares dependen no sólo de la producción de células, sino también de los mecanismos para destruirlas (Alberts, 2015). La muerte y la proliferación celular se equilibran a lo largo de la vida de los organismos multicelulares. El desarrollo de los animales comienza con la rápida proliferación de las células embrionarias, que luego se diferencian para producir los numerosos tipos de células especializadas que constituyen los tejidos y órganos adultos. Este complejo proceso de desarrollo implica no sólo la proliferación y la diferenciación celular, sino también la muerte celular (Cooper & Hausman, 2009).

La proliferación celular en el cáncer presenta varias propiedades distintivas que la diferencian de la proliferación celular normal. Una propiedad, por supuesto, es la capacidad de formar tumores. Además, las células cancerosas exhiben un número de otras propiedades de crecimiento distintivas que les permiten diferenciarse de las células normales (Becker et al., 2007).

Es posible identificar ciertos rasgos comunes o *Hallmarks* en las células tumorales que permiten entender esta enfermedad y ayudan al desarrollo de nuevas estrategias para su manejo. A medida que las células normales evolucionan a un estado neoplásico (crecimiento anormal y descontrolado), adquieren una sucesión de características biológicas distintivas (Figura 7) durante el desarrollo de múltiples pasos en los tumores humanos (Hanahan & Weinberg, 2011).

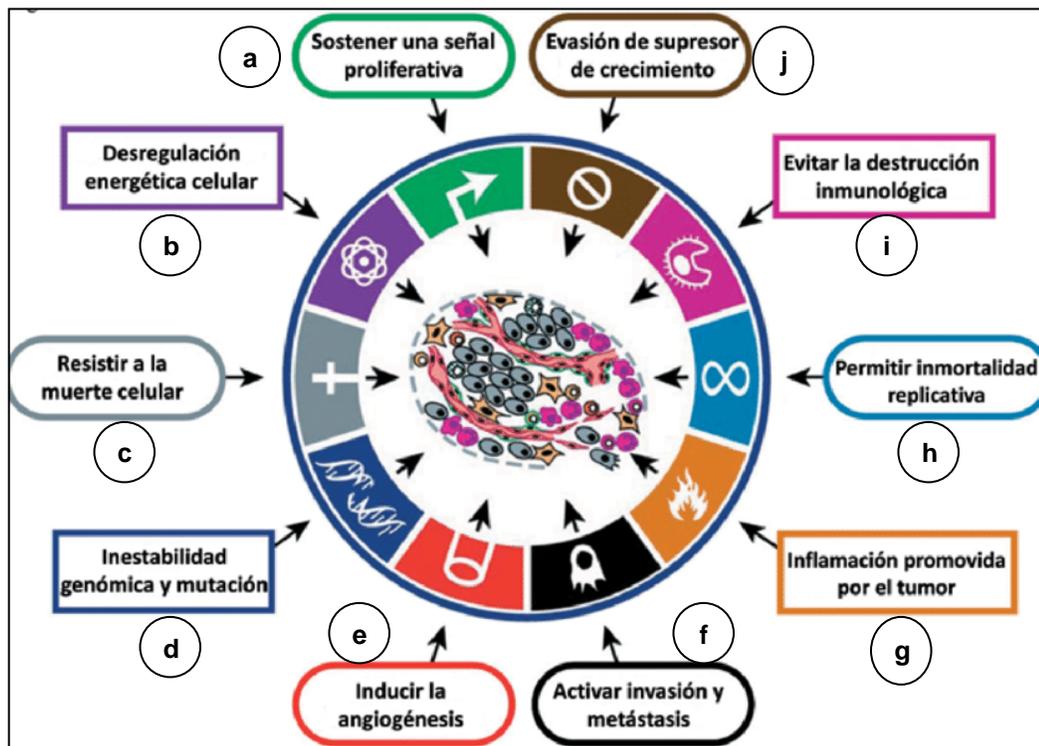


Figura 7. Rasgos distintivos de las células tumorales “*Hallmarks*”. Fuente: Tomado y modificado de Chuluyan et al. (2013).

a) Mantenimiento de la señalización proliferativa. Las células tumorales se duplican aceleradamente ya que su tasa de proliferación es mayor a la del tejido normal de origen, debido a que su ciclo celular y sus puntos de regulación se encuentran desregulados (de Vaca et al., 2018).

b) Desregulación celular energética. En células tumorales, ciertas mutaciones y la presencia de un medio pobre en oxígeno conducen al “*efecto Warburg*” (producción de energía en condiciones anaeróbicas) (Sánchez, 2013).

c) Resistencia a la muerte celular. Las células tumorales desarrollan mecanismos que les permiten evadir la apoptosis causando una falla en la señalización del receptor de muerte (Sánchez, 2013).

d) Inestabilidad y mutación genómica. El cáncer es el resultado de la acumulación de mutaciones en los genes que controlan directamente la proliferación y/o muerte celular. Se ha sugerido que las tasas normales de mutación, junto con la velocidad de expansión clonal, son suficientes para generar una alteración en el proceso normal en los seres humanos e inducir cáncer, pero que es a partir de un mecanismo de evasión en la corrección de estas mutaciones lo que origina a las células tumorales transformadas (de Vaca et al., 2018).

e) Inducción de la angiogénesis. Los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono lo cual se lleva a cabo a través de un conjunto de vasos sanguíneos que permanecen siempre activos y ayudan a sostener los crecimientos neoplásicos en expansión (Hanahan & Weinberg, 2011).

f) Capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis. Algunas células adquieren mutaciones que les permite desarrollar el potencial de invadir el tejido que las rodea y posteriormente continúan con la invasión de vasos sanguíneos o linfáticos (Sánchez, 2013).

g) Inflamación que promueve la formación de tumores. La inflamación puede contribuir a múltiples capacidades distintivas al suministrar moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluidos factores de crecimiento que sostienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores pro-angiogénicos, enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis, y factores inductivos (Hanahan & Weinberg, 2011).

h) Inmortalidad replicativa. Las células tumorales pueden dividirse de manera indefinida en un proceso denominado "Inmortalización" como ocurre en las células germinales reproductivas (Sánchez, 2013).

i) Evasión al sistema inmunológico. Algunas de la células que logran escapar de la eliminación entran a una fase de equilibrio en las que son mantenidas en una dormancia funcional de duración indefinida por el sistema inmune adaptativo, hasta que, producto de la constante presión de selección, o fallas en la inmunidad, emergen clones que no son reconocidos, escapan del control y continúan proliferando (Sánchez, 2013).

j) Evasión de los supresores de crecimiento. La tasa de proliferación aumentada se encuentra favorecida por la evasión de los mecanismos de regulación negativa de la división celular, controlados por los genes supresores de tumor. Estos genes actúan a distintos niveles, limitando el crecimiento tumoral y la proliferación (Sánchez, 2013).

La muerte celular no es un proceso aleatorio, sino que se produce mediante una secuencia programada de acontecimientos moleculares, en la que la célula se destruye sistemáticamente desde dentro y luego es devorada por otras células, sin dejar rastro. En la mayoría de los casos, esta muerte celular programada se produce mediante un proceso denominado apoptosis derivado de la palabra griega que significa "caer" como las hojas de un árbol (Alberts, 2015). En la actualidad se reconoce que la muerte celular puede ser programada o no programada (Figura 8). La muerte celular no programada ocurre generalmente en condiciones de daño físico a los tejidos. En cambio, la muerte celular programada inicia por señales moleculares precisas que llevan a la célula a su muerte. Este tipo de muerte puede ser apoptótica o no apoptótica. La diferencia radica en que en la muerte celular apoptótica se mantiene la integridad de la membrana celular, hay ausencia de inflamación y se activan enzimas con actividad proteolítica. En contraste, la muerte celular no apoptótica se caracteriza por la ruptura de la membrana celular y la liberación de

mediadores inflamatorios y del contenido citoplasmático al medio extracelular (Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020).

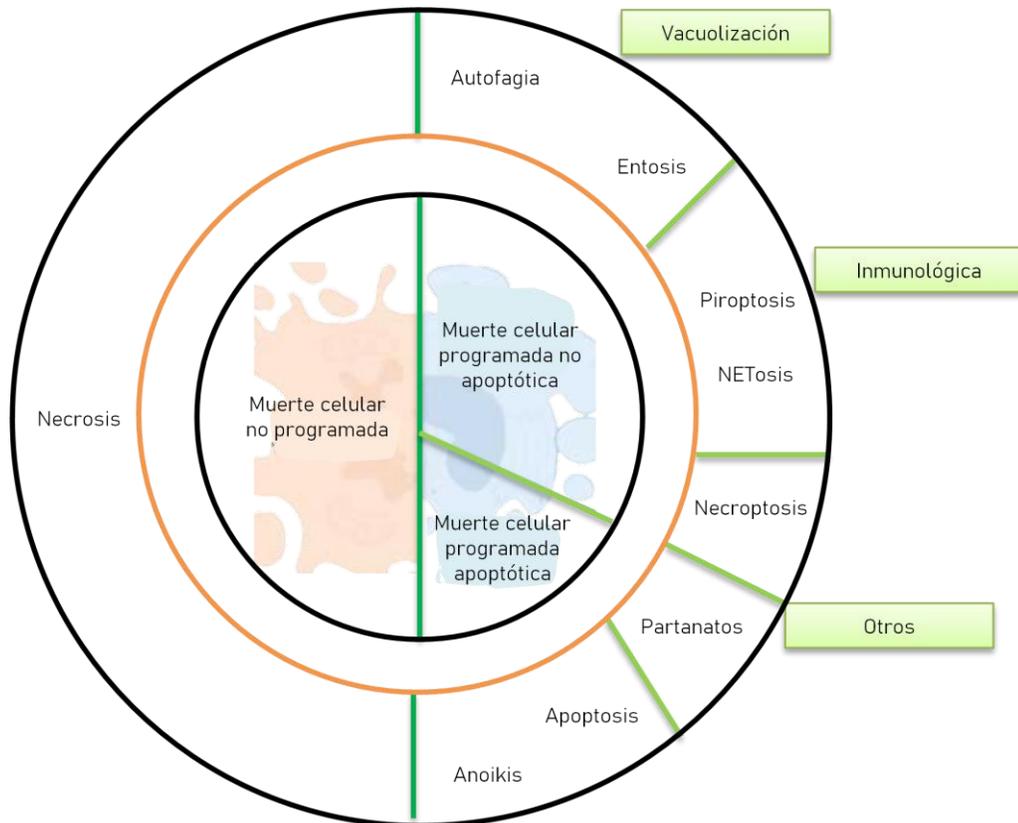


Figura 8. Clasificación de la muerte celular con base en su función y sus características morfológicas. Fuente: Modificado de Cruz-Martín-del-Campo et al. (2020).

Basado en criterios morfológicos y bioquímicos se han definido tres clases de muerte celular: apoptosis, autofagia y necrosis (Agudelo & López, 2010). De ellas, las más importantes son la necrosis y la apoptosis, estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica; siendo la apoptosis la de mayor relevancia por ser un proceso natural a diferencia de la necrosis (Dubin & Stoppani, 2000).

2.10.1. Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte accidental, o no programada, que ocurre cuando factores externos superan las condiciones fisiológicas del tejido y someten a la célula a un estrés excesivo e incontrolable (Cruz-Martín-del-Campo

et al. 2020). Se presenta generalmente en respuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos como hipoxia, hipertermia, hipotermia, infecciones virales líticas y venenos, observándose que ciertos tipos celulares responden a concentraciones farmacológicas de algunos medicamentos (Karp, 2011).

En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular (Figura 9). El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica, lo que desencadena una reacción inflamatoria localizada; los mediadores pueden variar dependiendo del tejido: lipasas, proteasas y endonucleasas (Agudelo & López, 2010).

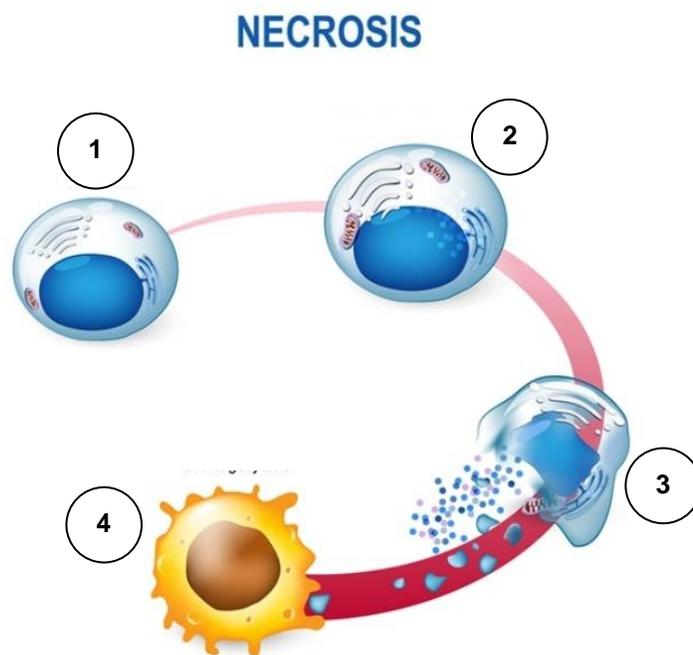


Figura 9. Necrosis, muerte celular patológica. 1. Célula normal, 2. Inflamación de los organelos, 3. Ruptura de la membrana plasmática, 4. Fagocitosis. Fuente: Modificado de Necrosis, (2021).

2.10.2. Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico que juega un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis tisular de los organismos. Es un proceso evolutivamente conservado, se presenta tanto en organismos

unicelulares como multicelulares (Ortega Torres & Ariza Botero, 2012). Es el tipo de muerte celular programada más estudiado debido a que mantiene el balance fisiológico entre la proliferación y la eliminación celular (Cuz-Martín-del-Campo et al., 2020). Es un proceso activo dependiente de energía que comprende la división de la célula por acción de endonucleasas, así como de las proteínas por efecto de proteasas. Desde el punto de vista morfológico, se caracteriza por la condensación de la cromatina y el encogimiento celular (Kerr et al., 1972).

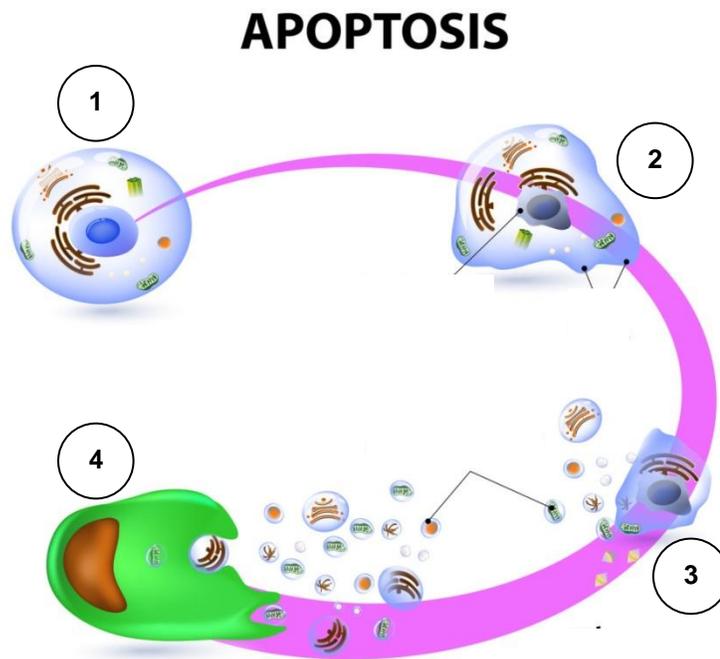


Figura 10. Pasos principales de la apoptosis. 1. Célula iniciando apoptosis, 2. Condensación del núcleo, 3. Ruptura del citoplasma y formación de cuerpos apoptóticos, 4. Fagocitosis. Fuente: Modificado de Apoptosis, (2021).

La célula de cáncer no sólo prolifera más, sino que sobrevive en condiciones adversas porque evade los mecanismos de muerte celular como la apoptosis, que además de estar implicada en el origen y la formación del tumor, también provoca la respuesta a los tratamientos antineoplásicos. A nivel morfológico, se reconoce por su clara disminución de volumen, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos o vesículas que contienen organelos y

material celular; este material es fagocitado por células vecinas o macrófagos (Figura 10), lo que permite que los fragmentos de la célula muerta desaparezcan sin que pasen al exterior, lo que provocaría una respuesta inflamatoria en el organismo (García & Gómez, 2010).

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Se han descrito 11 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos (Machado & Concepción, 2012). Existen dos vías principales por las cuales se da el proceso apoptótico: la vía extrínseca y la vía intrínseca (Figura 11).

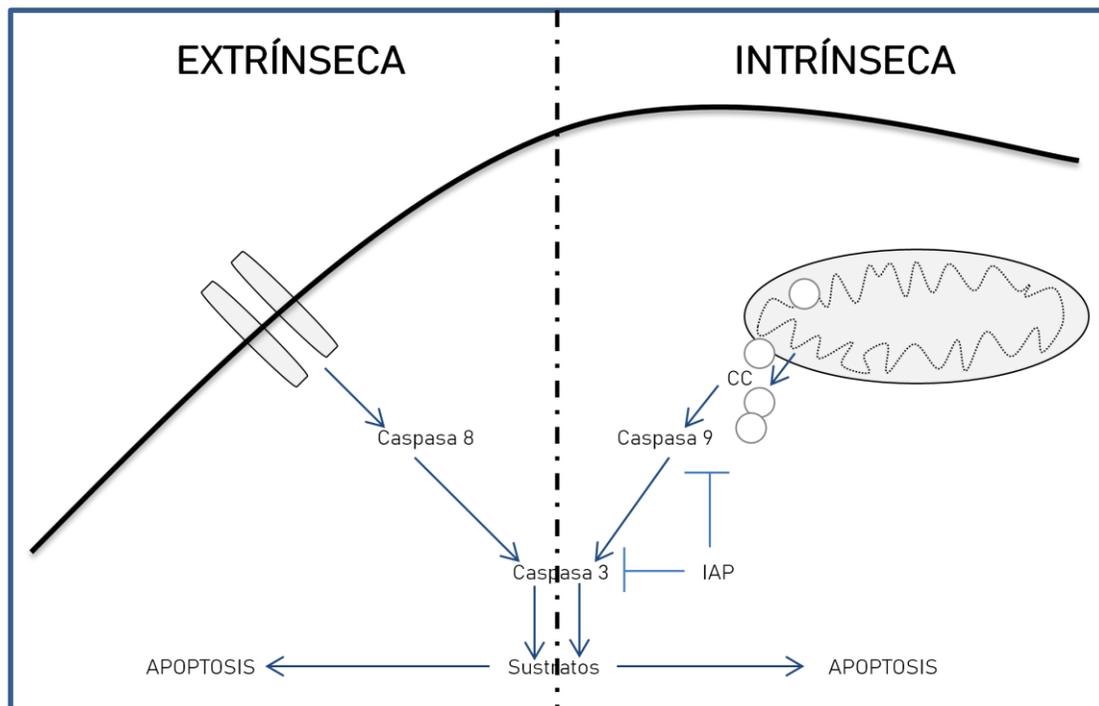


Figura 11. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Fuente: Modificado de García y Gómez (2010).

Vía extrínseca

La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas

características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF). Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores (García & Gómez, 2010; Machado & Concepción, 2012; Pazo Cid & Álvarez Alejandro, 2012).

Vía intrínseca o mitocondrial

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial, activada por la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales (como el citocromo C y la proteína Smac/diablo). Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo C.14,15 El citocromo C, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis. El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis (Machado & Concepción, 2012; Pazo Cid & Álvarez Alejandro, 2012).

2.11. Incidencia del cáncer en el mundo y en México

El cáncer siempre ha afectado a los humanos, aunque durante siglos su impacto relativo fue eclipsado por la muerte prematura por enfermedades infecciosas (Wild et al., 2020), actualmente es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial (Sánchez, 2013), sin embargo, existen grandes diferencias en la mortalidad por cáncer entre países o regiones (Wild, 2014), con un incremento en aquellos con ingresos medios y bajos, atribuible a una aplicación menos óptima de las medidas preventivas y al diagnóstico tardío (Wild et al., 2020).

Según la Organización Mundial de la Salud, en el 2020 los tipos de cáncer que causaron un mayor número de fallecimientos a nivel mundial fueron:

- pulmonar (1.8 millones de defunciones),
- colorrectal (935 000 muertes),
- hepático (830 000 defunciones),
- gástrico (769 000 defunciones) y
- mama (685 000 muertes) (OMS, 2021).

El cáncer es la primera o segunda causa principal de muerte prematura entre los 30 y los 69 años en 134 de 183 países, y ocupa el tercer o cuarto lugar en otros 45 países. De los 15.2 millones de muertes prematuras por enfermedades no transmisibles en todo el mundo en 2016, 4.5 millones (29.8%) se debieron al cáncer (Wild et al., 2020).

En México, durante el 2018 los casos más comunes de cáncer fueron los siguientes:

- mama 14.3%,
- próstata 13.1%,
- colorrectal 7.8%,
- tiroides 6.4%,
- cervicouterino 4.1%,
- pulmón 4.1%,
- estómago 4.0%,
- hígado 3.8% y
- leucemia 3.4% (OPS/OMS, 2020).

Entre enero y agosto de 2020 se registraron 683 823 defunciones, de las cuales 9% se debieron a tumores malignos (60 421). La distribución porcentual por sexo indica que hay más fallecimientos en mujeres (51%) que en hombres (49%) por esta causa, lo que ubica a los tumores malignos como la cuarta causa de muerte para este periodo. Las tasas de defunción antes de los 30 años no superaron las 12 defunciones por cada cien mil habitantes, pero aumenta conforme avanza la edad, alrededor de 1 140 defunciones por cada

cien mil en hombres de 80 años o más y en mujeres se reduce casi a la mitad (674 por cada 100 mil mujeres) (CONAPO, 2018; INEGI, 2021).

2.12. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea causada por la progresiva acumulación de aberraciones genéticas (Ramírez, 2018). Es un proceso oncológico en el que células sanas de la glándula mamaria se degeneran y se transforman en tumorales, proliferando y multiplicándose posteriormente hasta constituir el tumor (de Oncología Médica, 2011). Las células del cáncer de mama pueden diseminarse a través de la sangre o de los vasos linfáticos y llegar a otras partes del cuerpo. Allí pueden adherirse a los tejidos y crecer formando metástasis (Figura 12). Puede aparecer en mujeres y hombres pero más del 99% de los casos ocurre en mujeres (Santaballa Bertrán, 2020).

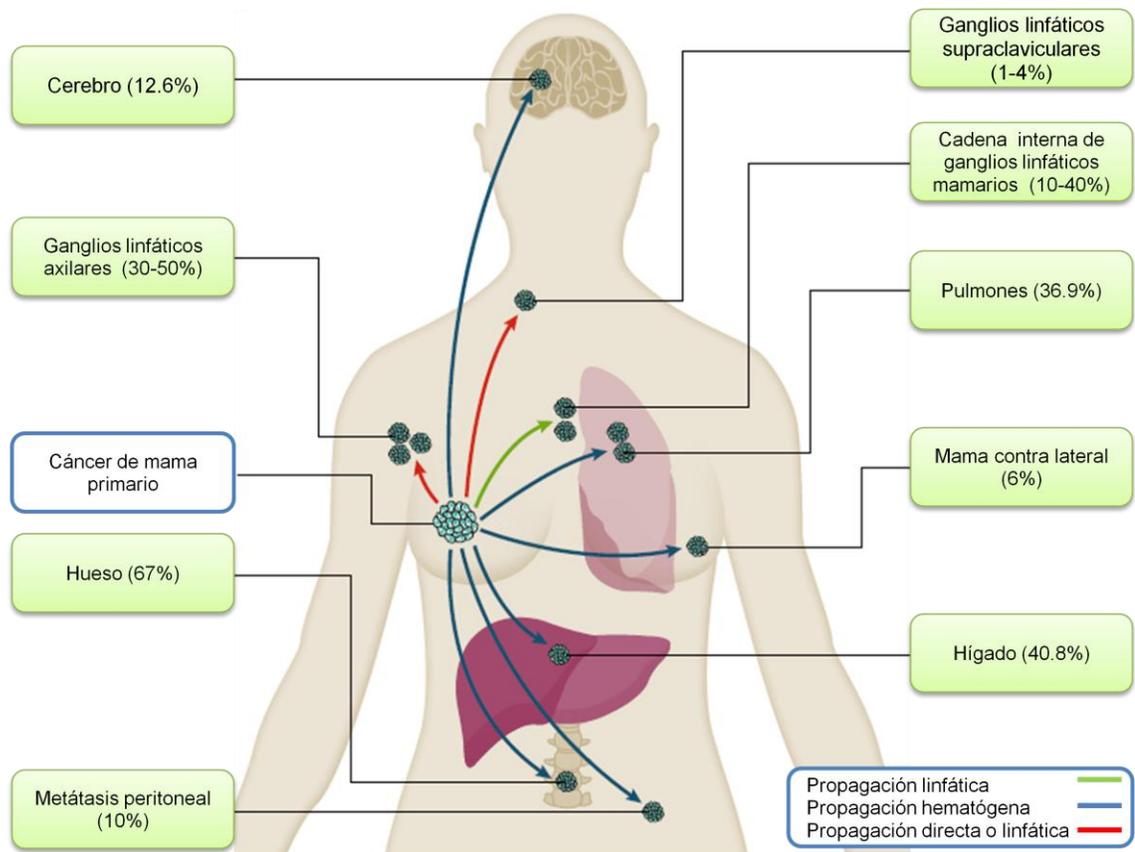


Figura 12. Sitios metastásicos comunes en el cáncer de mama. Fuente: Modificado de Harbeck et al. (2019).

Es una enfermedad con una evolución natural compleja por lo que, a pesar de los avances de la oncología moderna, es la primera causa de muerte en la mujer a nivel mundial, con cerca de 500 mil muertes cada año, de las cuales el 70% ocurre en países en desarrollo. El riesgo de enfermar es superior en las mujeres de países con nivel socioeconómico alto, pero el riesgo de morir es mayor entre las mujeres que habitan países pobres, debido a un menor acceso a los servicios de salud para la detección temprana, tratamiento y control (Cárdenas-Sánchez et al., 2015). En México durante 2017, para la población de 20 años o más, de cada 100 egresos hospitalarios por cáncer, 24 son por el cáncer de mama, lo que lo ubica en la principal causa de egreso hospitalario por tumores malignos. Por sexo, uno de cada 100 hombres y 37 de cada 100 mujeres que egresan por cáncer, es debido a un tumor maligno de mama (INEGI, 2020).

2.12.1. Factores de riesgo

La edad de máxima incidencia está por encima de los 50 años, pero aproximadamente un 10% se diagnostica en mujeres menores de 40 años. La causa o causas que producen un cáncer de mama todavía no están aclaradas, sin embargo, sí se han identificado numerosos factores de riesgo asociados al cáncer de mama (Santaballa Bertrán, 2020).

La edad, los factores reproductivos, los antecedentes personales o familiares de enfermedad mamaria, la predisposición genética y los factores ambientales se han asociado a un mayor riesgo de desarrollo del cáncer de mama (Shah et al., 2014).

- **Edad:** La incidencia aumenta con la edad hasta la menopausia, luego el porcentaje de incremento disminuye aproximadamente en una sexta parte. Ello muestra el papel principal de la actividad ovárica en su etiología.
- **Predisposición genética:** Aproximadamente entre el 20 y el 25% de los pacientes con cáncer de mama tienen antecedentes familiares positivos, pero solo entre el 5 y el 10% de los casos demuestran una herencia

autosómica dominante. Las mutaciones genéticas hereditarias más importantes son BRCA1 y BRCA2. Corresponden al 10 % de los casos.

- **Cáncer familiar:** El riesgo de cáncer de mama de una mujer aumenta si tiene antecedentes familiares de la enfermedad. Comprende el 20 % de los casos.
- **Factores hormonales:** Se relaciona con las hormonas reproductivas femeninas, menarquía precoz, nuliparidad, edad tardía en la primera gestación y menopausia tardía elevan el riesgo; en posmenopáusicas, la obesidad y el tratamiento hormonal sustitutivo.
- **Exposición a hormonas exógenas.** La evidencia sugiere una relación entre el uso de la terapia de reemplazo hormonal (TRH) y el riesgo de cáncer de mama.
- **Proliferaciones benignas:** La hiperplasia ductal aumenta el riesgo en 1.5-2 veces; la atipia ductal o la hiperplasia lobular 4-5 veces.
- **Factores Ambientales:** la exposición a radiaciones. La exposición a la radiación de diversas fuentes, incluido el tratamiento médico y la explosión nuclear, aumenta el riesgo de cáncer de mama.
- **Factores de estilo de vida.** Los factores de riesgo modificables, incluido el consumo excesivo de alcohol, la obesidad y la inactividad física, representan el 21% de todas las muertes por cáncer de mama en todo el mundo (Ramírez, 2018; Shah et al., 2014).

2.12.2. Tratamientos para el cáncer de mama

Actualmente, se conocen más aspectos biológicos y genéticos de las células que originan el cáncer de mama. Este conocimiento permite planificar los tratamientos en función de estas características biológicas, que son responsables de los distintos comportamientos de la enfermedad. Según estas particularidades, podemos conocer la mayor o menor tendencia a la recaída, a la diseminación o a la mayor o menor sensibilidad a diferentes tipos de tratamiento (quimioterapia, hormonoterapia, radioterapia y anticuerpos monoclonales) (de Oncología Médica, 2011).

Los indicios de la existencia de un tumor pueden establecerse en la exploración física cuidadosa, como el crecimiento de los ganglios linfáticos en los linfomas o una tumoración palpable en la mama o algún sitio del tejido blando. También pueden detectarse en estudios de imágenes, como las radiografías, tomografía computarizada, ecografía, tomografía por emisión de positrones o imágenes por resonancia magnética (Kasper & Blengio, 2006).

Las terapias convencionales incluyen tratamientos probados y tratamientos de investigación, para lo cual existe evidencia científica de su eficacia (Jankovic et al., 2004). El objetivo del tratamiento contra el cáncer es erradicarlo. Si no es posible alcanzarlo, el objetivo cambia a la paliación, alivio de síntomas y conservación de la calidad de vida mientras se intenta prolongarla. Cuando la curación es posible, pueden considerarse tratamientos a pesar de los efectos tóxicos graves. Cuando el objetivo clínico es la paliación, la atención es cuidadosa para minimizar la toxicidad de los tratamientos. Es por estas razones que existen diferentes modalidades para la terapia del cáncer (Kasper & Blengio, 2006).

- **Cirugía.** Es uno de los pilares fundamentales del tratamiento de los pacientes oncológicos. Salvo en algunos tumores quimio-curables, la extirpación completa del tumor primario es el paso más importante para conseguir la curación definitiva. Existen diferentes modalidades de cirugía como la diagnóstica, curativa, paliativa, terapéutica, entre otras (Muñoz et al., 2003).
- **Quimioterapia.** Utiliza fármacos (citostáticos) que producen un daño molecular directo que acaba induciendo la apoptosis o muerte celular. La mayoría actúan durante el proceso de división celular aprovechando una mayor tasa de división en las células tumorales que en las células normales. Muchas veces se utilizan combinaciones de fármacos debido a que presentan sinergismo evitando resistencia de las células. Existen diferentes tipos de quimioterapia: con intención curativa, adyuvante y paliativa (Muñoz et al., 2003).

- **Terapia hormonal.** Se basa en el uso de fármacos diseñados específicamente para modificar la homeostasis hormonal. Las hormonas se asemejan bastante al fármaco ideal: su mecanismo de acción es bastante específico, se administran de forma oral, tienen escasos efectos secundarios y son baratos (Muñoz et al., 2003).
- **Inmunoterapia.** Son tratamientos que buscan tener efecto antitumoral, mejorando la respuesta inmunológica del paciente frente al tumor, a diferencia de tratamientos convencionales que tratan de afectar directamente al tumor. Consiste en el uso de fármacos que ayudan al sistema inmunológico de un paciente, reconociendo y destruyendo de manera eficiente las células cancerosas (Reyes et al., 2020).
- **Radioterapia.** Es un tratamiento local cuyo efecto terapéutico se basa en la interacción de la energía, habitualmente fotones, con la materia. El efecto citotóxico de la radiación se debe fundamentalmente a su acción sobre las moléculas de ADN y, en menor medida, por alteración directa de la fundición de la membrana celular y los microtúbulos. Aunque parte del daño sobre el ADN puede deberse a impactos directos de los fotones sobre la doble hélice, el principal mecanismo de lesión se debe a la ionización del medio interno con formación de radicales hidroxilo que roban electrones al ADN (Muñoz et al., 2003).

El abordaje va a depender de la estadificación de la neoplasia según los criterios establecidos. Básicamente se puede dividir en:

- **Enfermedad temprana:** Todos los esfuerzos están enfocados en el objetivo de curación, la mayoría de los tumores son abordados quirúrgicamente.
- **Enfermedad localmente avanzada:** Se da inicialmente una terapia de medicamentos quimioterapéuticos coadyuvantes, con la intención de reducir el volumen tumoral, aumentar las posibilidades de resección, seguida de una intervención quirúrgica.

- **Enfermedad metastásica:** En estos casos todos los esfuerzos están enfocados en el objetivo de la paliación, con la intención de aumentar su probabilidad de sobrevivir, disminuir los síntomas asociados al tumor y mejorar la calidad de vida (Ramírez, 2018).

2.13. Literatura citada

- Agudelo, M. E. R., & López, M. R. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia*, 23(2), 166.
- Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014). Conservación y uso de los recursos genéticos de *Annonaceae* en México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 118-124.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. Garland Science, Taylor and Francis Group. 1342 p.
- Alomar, M. (2007). Antioxidantes: captadores de radicales libres ó sinónimo de salud. Disponible en: <http://www.soarme.com/archivos/1324143195.pdf>
- Aminimoghadamfarouj, N., Nematollahi, A., & Wiart, C. (2011). *Annonaceae*: bio-resource for tomorrow's drug discovery. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(05), 465-476.
- Apoptosis. (mayo del 2021). En Mi Sistema Inmune. <https://www.misistemainmune.es/inmunologia/componentes/apoptosis-o-muerte-celular-programada>
- Ávalos-Soto, J., Treviño-Neávez, J. F., Verde-Star, M., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Moran-Martínez, J., & Morales-Rubio, M. (2014). Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(3), 39-44.
- Azcona, Á. C. (2013). *Manual de nutrición y dietética*. Departamento de Nutrición. M-008157. Madrid.
- Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S. T. V. S. R., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisions, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.
- Barbeau, G. (1984). *Frutas Tropicales en Nicaragua*. Dirección General de Técnicas Agropecuarias. Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria. Ed. Ciencias Sociales. Managua. Nicaragua. 397 p.

- Barberá Mateos, J. M., & de Sanidad, C. D. M. C. (2011). Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Subdirección General de Alimentación. Comunidad Autónoma de Madrid (CAM).
- Batalla, M. V. (2007). Antioxidantes presentes en los alimentos: vitaminas, minerales y suplementos. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 26(10), 79-86.
- Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., & Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula*. Madrid, ES: Pearson Educación.
- Biruete Guzmán, A., Juárez Hernández, E., Sieiro Ortega, E., Romero Viruegas, R., & Silencio Barrita, J. L. (2009). Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de pediatría*, 76(3).
- Calañas-Continente, A. J. (2005). Alimentación saludable basada en la evidencia. *Endocrinología y Nutrición*, 52, 8-24.
- Cárdenas-Sánchez, J., Bargalló-Rocha, E., Erazo-Valle, A., Chacón, A. P., Valero-Castillo, V., & Pérez-Sánchez, V. (2015). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(2), 2-55.
- Cardozo, C. J. M., Gallego, V. R., & Valenzuela, J. R. C. (2009). Uso de rayos X para evaluar la maduración y deterioro de la pulpa en frutos de guanábana (*Annona muricata* L. CV. *Elita*). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4(2), 91-98.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5-14.
- Castillo-Velarde, E. R. (2019). Vitamina C en la salud y en la enfermedad. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 19(4), 95-100.
- Castro, J. (2007). *Cultivo de la anona (Annona cherimola Mill)*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica, 40.
- Cendales, D. R. M., & Suárez, L. E. C. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(3), 124-134.
- Chuluyan, H. E., Sanchez, M. L., Ambrosi, N. G., & Guerrieri, D. (2013). Sistema inmune y daño por inflamación. *Revista Ciencia e Investigación* 63(1), 71-88.
- Colom Loo, Y., Azcue Ferrera, M., Pérez Gil, R. M., Respall Robledo, M., Ruiz García, R., & Quesada Cepero, W. (2005). Actividad antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana frente a la Leucemia Linfocítica P-388. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10(2), 0-0.
- CONAPO. (2018). *Proyecciones de la Población de México y de las Entidades Federativas, 2016-2050*. Consejo Nacional de Población.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The cell: a molecular approach* (Vol. 4). Washington, DC: ASM press.

- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662-691.
- Coronel, A. A. N., Montero, M. D. L. Á. L., Ginés, R. T., Gámez, N. B. S., & Garcell, A. J. B. (2019). Cancer Biology. *Correo Científico Médico de Holguín*, 23(4).
- Cruz-Martín-del-Campo, S. L., González-Espinosa, C., Ruiz-Quiñonez, A. K., & Carranza-Aguilar, C. J. (2020). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*, 15(3), 97-112.
- Daniel, M. (2006). *Medicinal plants: chemistry and properties*. Science publishers.
- de Hernández, R. Á., de Camacaro, M. P., Giménez, A., & Caraballo, E. A. H. (2012). La guanábana: una materia prima saludable para la industria de alimentos y bebidas. *Revista Digital de Investigación y Postgrado*, 2(2), 135-142.
- de Loera Carrera, D. A., & Ruiz, C. D. S. A. (2020). Una herencia ancestral y fuente de conocimiento científico. *Universitarios Potosínos*, 252.
- de Oncología Médica, S. E. (2011). *Hablemos del cáncer de Mama*. Roche.
- de Vaca, R. P. C., Cárdenas-Cárdenas, E., Mondragón-Terán, P., & Solís, A. A. E. V. (2018). Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 22(4), 171-181.
- Delgado-Ortiz, C. E. (2005). *El cultivo de la Chirimoya*. Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola. Asociación Hortofrutícola de Colombia. 16p.
- Dubin, M., & Stoppani, A. O. (2000). Programmed cell death and apoptosis. The role of mitochondria. *Medicina*, 60(3), 375-386.
- El-Samahy, S. K., Abd El-Hady, E. A., Habiba, R. A., & Moussa-Ayoub, T. E. (2007). Cactus pear sheet and pasteurized and sterilized cactus pear juices. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 9, 148-164.
- Fernández-Calienes Valdés, A., Mendiola Martínez, J., Monzote Fidalgo, L., García Parra, M., Sariego Ramos, I., Acuña Rodríguez, D., & Gutiérrez Gaitén, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 254-258.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.

- Frei, B. (Ed.). (2012). *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic Press.
- García, A. M., Velázquez, M. N., & Bernal, A. I. G. (2016). Healthy nutrition. *Acta Médica de Cuba*, 17(1).
- García, M. G., & Gómez, Á. H. (2010). *Manual de oncología*. McGraw-Hill Interamericana.
- Gayoso Bazán, G., & Chang Chávez, L. (2017). *Annona cherimola* Mill. Chirimoya (*Annonaceae*), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa*, 24(2), 619-634.
- Girón, P. M. C., & González, E. A. R. (2020). Las chincuyas, árboles de Chiapas. *CANTERA Gaceta de Divulgación Científica del Instituto de Ciencias Biológicas*, 1(1).
- González Vega, M. E. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Cultivos tropicales*, 34(3), 52-63.
- Gordillo, J. C., Ortiz, D., Larrahondo, J. E., Mejía, M. S., & Pachón, H. (2012). Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2), 111-126.
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., & Smith, B. (2002). Onions—a global benefit to health. *Phytotherapy research*, 16(7), 603-615.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(66).
- Harborne, J. B. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry*. Gulf Professional Publishing.
- Hernández-Fuentes, L. M., Andrés-Agustín, J., Espíndola-Barquera, M. D. C., Castañeda-Vildózola, A., Ballesteros-Patrón, G., & Vera-Sánchez, K. S. (2016). Recursos genéticos de Anonáceas (*Annonaceae*) en México: situación actual y perspectivas. *Agroproductividad*, 9(4).
- Hernández, L. V., Martínez, N. A. V., Moctezuma, H. L., Rocha, D. G. C., & Contreras, R. G. C. (2014a). Propuesta de un plan de desarrollo integral del guanábano (*Annona muricata* L.) en el estado de Veracruz México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPE1), 94-101.
- Hernández, L. V., Moctezuma, H. L., Martínez, N. A. V., Bello, R. R., Rocha, D. G. C., & Contreras, R. G. C. (2014b). La situación de las *Annonaceae* en México: principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPE1), 44-54.

- Hernández Menéndez, M., & Ríos Hernández, M. D. L. A. (1999). Oncogenes y cáncer. *Revista Cubana de Oncología*, 131-139.
- Hui, L., Zheng, Y., Yan, Y., Bargonetti, J., & Foster, D. A. (2006). Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene*, 25(55), 7305-7310.
- INEGI. (2020). *Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer*. Informe. Aguascalientes: Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía; INdEy, G. Report No. 462/20.
- INEGI. (2021). *Estadísticas de mortalidad*. Consulta interactiva de datos. SNIEG. Información de Interés Nacional.
- Iracheta, M. L. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 101, 2-33.
- Jankovic, M., Spinetta, J. J., Gentil Martins, A., Pession, A., Sullivan, M., D'Angio, G. J., & Masera, G. (2004). Non-conventional therapies in childhood cancer: Guidelines for distinguishing non-harmful from harmful therapies: A report of the SIOP Working Committee on Psychosocial Issues in Pediatric Oncology. *Pediatric Blood & Cancer*, 42(1), 106-108.
- Jiménez, S. A. A. (2017). Medicina tradicional. Uno más. *BOLETÍN CONAMED*, (13).
- Jiménez, S. R., Valle, J. S. L., Ocampo, A. U., Pérez, S. C., Hernández, N. P., & Cárdenas, J. S. M. (2015). Consumo de nutracéuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. *Biosalud*, 14(2), 91-103.
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos* (6ª). McGraw Hill Mexico.
- Kasper, D. L., & Blengio Pinto, J. R. (2006). *Harrison: principios de medicina interna*. México: McGraw Hill.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kessler, P. J. A. (1993). *Annonaceae*. Flowering Plants. *Dicotyledons*, 93-129.
- Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food chemistry*, 81(3), 321-326.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713-3717.
- Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., & Gliszczyńska-Świgło, 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(3-4), 313-322.
- Konczak, I., Maillot, F., & Dalar, A. (2014). Phytochemical divergence in 45 accessions of *Terminalia ferdinandiana* (Kakadu plum). *Food chemistry*, 151, 248-256.
- Kuklinski, C. (2003). *Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Farmacognosia. Barcelona: Omega.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutas. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732.
- López Camelo, A. F. (2003). *Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Del campo al mercado*. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO 151.
- Loraine, S., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.
- Lúcio, A. S. S. C., da Silva Almeida, J. R. G., Da-Cunha, E. V. L., Tavares, J. F., & Barbosa Filho, J. M. (2015). Alkaloids of the *Annonaceae*: occurrence and a compilation of their biological activities. *The alkaloids: chemistry and biology*, 74, 233-409.
- Luengo, M. T. L. (2002). Flavonoides. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 21(4), 108-113.
- Luján-Hidalgo, M. C., Pérez-Gómez, L. E., Abud-Archila, M., Meza-Gordillo, R., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Dendooven, L., & Gutiérrez-Miceli, F. A. (2015). Growth, phenolic content and antioxidant activity in Chincuya (*Annona purpurea* Moc & Sesse ex Dunal) cultivated with vermicompost and phosphate rock. *Compost Science & Utilization*, 23(4), 276-283.
- Luna-Cazáres, L. M., & González-Esquínca, A. R. (2015). La chincuya (*Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal): una planta mesoamericana. *Anonáceas*, 229.
- Machado, J. P., & Concepción, A. E. L. (2012). Apoptosis, action mechanism. *Medimay*, 18(2).
- Macready, A. L., Kennedy, O. B., Ellis, J. A., Williams, C. M., Spencer, J. P., & Butler, L. T. (2009). Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes & Nutrition*, 4(4), 227-242.
- Mariaca, C. J., Zapata, M., & Uribe, P. (2016). Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 24(3), 162-173.

- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Martínez, J. A., & Astiasarán, I. (2000). *Alimentos: Composición y propiedades*. McGraw Hill Interamericana de España, SA, 7, 155-168.
- Mazza, G. (1998). *Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado*. Acribia.
- Michałowicz, J., & Duda, W. (2007). Phenols--Sources and Toxicity *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3).
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625-15658.
- Morón Rodríguez, F. J., Morón Pinedo, D., & Nodarse Rodríguez, M. (2010). Valoración de la evidencia científica para recomendar *Annona muricata* L. (guanábana) como tratamiento o prevención del cáncer. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(3), 169-181.
- Morton, J. (1987). *Ilama*. In: Fruits of Warm Climates. F. J. Morton (ed.) Creative Resource Systems. Miami, FL, USA. pp. 83–85.
- Moyado, R. A. M. (2017). La medicina mexicana. Historia. *BOLETÍN CONAMED*, (10).
- Muñoz, A., Mañé, J. M., Viteri, A., & Barceló, R. (2003). Introducción al tratamiento oncológico: indicaciones e intención de los tratamientos. *Gaceta Médica de Bilbao*, 100(4), 133-138.
- Necrosis. (mayo de 2021). En shutterstock. <https://www.shutterstock.com/es/image-vector/necrosis-pathologic-cell-death-injury-which-548498674>
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nuñez Montoya, S. C., & Rocha, M. T. (2020). RACIM: ficha técnica de VITAMINA C. Red Argentina de centros de Información de Medicamentos.
- Okiei, W. O., Ogunlesi, M., Azeez, L., Obakachi, V., Osunsanmi, M., & Nkenchor, G. (2009). The Voltammetric and Titrimetric Determination of Ascorbic Acid Levels in Tropical Fruit Samples. *International Journal of Electrochemical Science* 4, 276–287
- OMS. (2021). Cáncer. *Organización Mundial de la Salud*. Nota descriptiva. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

- OMS., S. D. I. T. (2003). *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas*. OMS (Organización Mundial de la Salud).
- OPS/OMS. (2020). *Perfiles de país sobre cáncer*. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=4-cancer-country-profiles-2020&alias=51536-mexico-cancer-profile-2020&Itemid=270&lang=es
- Orellana, P. A. D. (2014). *Catálogo de frutales nativos de Guatemala*. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola. Gobierno de Guatemala. Ciudad de Guatemala.
- Orrego Escobar, E. F. (2015). Plantas latinoamericanas como fuente de nuevos antineoplásicos, situación actual y nuevas oportunidades contra el cáncer. *Medwave*, 15(3), e6121.
- Ortega Torres, J., & Ariza Botero, M. F. (2012). El mecanismo de muerte celular programada y su importancia en el proceso de maduración de la carne bovina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(23), 83-96.
- Packer, L., Hiramatsu, M., & Yoshikawa, T. (1999). *Antioxidant food supplements in human health*. Elsevier.
- Paternina, G. S. A., Violeth, J. L. B., & Cadavid, M. V. (2013). Determinación física y bromatológica de la guanábana cimarrona (*Annona glabra* L.) del Departamento de Córdoba. *Orinoquia*, 17(2), 159-166.
- Pazo Cid, R. A., & Álvarez Alejandro, M. (2012). Cebollero de Miguel A, Agustín MJ, Martínez Lostao L, Anel Bernal A, et al.. Apoptosis, cáncer Co. *Revista Internacional de Grupos de Investigación en Oncología*, 1, 23-28.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca*, 2(3), 119-145.
- Pino Pérez, O., & Jorge Lazo, F. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1), 34-43.
- Pinzón-García, J. M., Hernández-Fuentes, L. M., Luna-Esquivel, G., Isiordia-Aquino, N., & Ortiz-Catón, M. (2016). Biología y Hábitos de *Gonodonta pyrgo* Cramer1 en *Annona muricata*. *Southwestern Entomologist*, 41(1), 251-258.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106.
- Prabu, S. L., Suriyaprakash, T., Dinesh, K., Suresh, K., & Ragavendran, T. (2012). Nutraceuticals: A review. *Elixir Pharm*, 46, 8372-8377.

- Pumiputavon, K., Chaowasku, T., Saenjurn, C., Osathanunkul, M., Wungsintaweekul, B., Chawansuntati, K., & Wipasa, J. (2019). Cytotoxic and cytostatic effects of four *Annonaceae* plants on human cancer cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 55(9), 723-732.
- Quispe, A., Zavala, D., Posso, M., Rojas, J., & Vaisberg, A. (2007). Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanábana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 12(1), 19-22.
- Ramawat, K. G. (Ed.). (2004). *Biotechnology of medicinal plants: vitalizer and therapeutic*. CRC Press.
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdon, E., & Bahorun, T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, 44(7), 2088-2099.
- Ramírez, L., González, M. L., & Henao, M. D. (2007). Evaluación de la actividad antitumoral de extractos de hojas y tallos de niguito *Monochaetum multiflorum* (bonpl.) naud. (*melastomataceae*). *Scientia et Technica*, 1(37).
- Ramírez-Méndez, R., De Moreno, L. A., Acosta, K., Yamarte, M., & Sandoval, L. (2012). Efecto del escaldado sobre la calidad nutricional de pulpa de Guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(1), 48-57.
- Ramírez, M. E. (2018). Cáncer de mama. *Revista Médica Sinergia*, 2(01), 8-12.
- Restrepo, J., & Vinasco, L. E. (2010). Evaluación fisicoquímica de la fracción lipídica de las semillas de Guanábana (*Annona Muricata*) y la Chirimoya (*Annona cherimola*). *Revista de Ciencias*, 14, 117-124.
- Reyes Montero, J. A., Aceves Navarro, E., Caamal Velázquez, J. H., & Alamilla Magaña, J. C. (2018). Producción de guanábana (*Annona muricata* L.) en alta densidad de plantación, como alternativa para productores con superficies reducidas. *PROCESSED CHAYOTE*.
- Reyes, S. J., González, K. B., Rodríguez, C., Navarrete-Muñoz, C., Salazar, A. P., Villagra, A., & Hepp, M. I. (2020). Actualización general de inmunoterapia en cáncer. *Revista Médica de Chile*, 148(7), 970-982.
- Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience.
- Romero-Soler, K., & Cetzal-Ix, W. I. L. L. I. A. M. (2015). Las especies del género *Annona* (*Annonaceae*) cultivadas de la Península de Yucatán, México. *Herbario CICY*, 7, 147.

- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 19-34.
- Royo Bordonada, M. A. (2017). *Nutrición en salud pública*. Escuela Nacional de Sanidad, Instituto de Salud Carlos III. Madrid.
- Salas, A. (2006). *Estudio fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro*. Universidad Autónoma de Querétaro, Universidad Autónoma de Zacatecas: Querétaro, Zacatecas, México.
- Sánchez, N. C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553-562.
- Sandoval, L., Ettiene, G., Pérez-Pérez, E., Fuenmayor, M., Raga, J., & Silva, N. (2014). Determinación de flavonoides en frutos de *Annona muricata* L. provenientes de plantas diferentes, empleando cromatografía líquida de alta resolución. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ Suplemento*, 1, 785-800.
- Santaballa Bertrán A. (2020). *Cáncer de mama*. Sociedad Española de Oncología Médica. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama>
- Santamaría, C., Martín, A., & Astorga, F. (2015). *Extractos vegetales: aplicación para la reducción del estrés*. Disponible en: <https://nutricionanimal.info/download/0315-ena-WEB.pdf>.
- Schlie-Guzmán, M. A., González-Esquínca, A. R., & Luna-Cazáres, L. M. (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 245-257.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2021). *Plantas medicinales de México*. La botica más surtida del país, enriquecida con la sabiduría de pueblos y comunidades indígenas. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>
- Serra, H. M., & Cafaro, T. A. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(4), 525-532.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Estadísticas de la Producción Agrícola. Disponible en: <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- Shah, R., Rosso, K., & Nathanson, S. D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 283.
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suarez, D. (2018). *Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Uniagraria. 56 p.

- Sociedad Española de Geriátría y Gerontología: SEGG. (2018). Tratado de geriatría para residentes. Madrid.
- Sociedad Española de Productos Húmicos, S. A (SEPHU). (2010). Cultivo de la guanábana-recomendaciones para solucionar problemas de floración, cuajado y aborto de flores. Numero 046, 15p. Recuperado de https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/81972/046---11.05.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089-1099.
- Torres-Guevara, F. A., Yupanqui, M. L. G., & Suárez-Rebaza, L. A. (2021). Sustancias bioactivas y actividad antioxidante de frutales nativos de páramos y bosques de neblina del norte peruano. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 5(4), 124-134.
- Valdés, F. (2006). Vitamina C. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 97(9), 557–568.
- Vallejo-Zamudio, E., Rojas-Velázquez, A., & Torres-Bugarín, O. (2017). Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes. *El Residente*, 12(3), 104-111.
- Vanhove, W. (2008). *Descriptores para Chirimoyo (Annona cherimola Mill.)*. Rome, Italy: Bioversity International.
- Vidal-Lezama, E., Villegas-Monter, Á., Vaquera-Huerta, H., Robledo-Paz, A., & Martínez-Palacios, A. (2019). *Annona purpurea* Moc. & Sesse ex Dunal especie nativa de México, subutilizada. *AGROProductividad*, 12(3), 9-16.
- Villarreal-Ibarra, E. C., Espinoza, I. D. C. L., López, P. A., García-López, E., López, D. J. P., Ortiz-García, C. F., & Cárdenas, M. A. O. (2015). Evaluación etnofarmacológica de plantas con propiedades hipoglucémicas usadas en la medicina tradicional del sureste de México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(2), 99-112.
- von Breymann, J., Chaves, C., & Arias, M. L. (2013). Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangífera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63(1), 53-57.
- Wild, C. (2014). *World cancer report*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wild, C. P., Weiderpass, E., & Stewart, B. W. (2020). *World Cancer Report: Cancer research for cancer prevention*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

- Xammar Oro, J. R. D., & Donnamaría, M. C. (2006). Acción farmacológica, biofísicoquímica y estructura dinámica de la Vitamina C. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25.
- Zavala, F., Fernández, R., Polo, E., & Valderrama, F. (2009). Caracterización isoenzimática de seis poblaciones de *Annona cherimola* Mill. de la Región La Libertad, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 195-202.

3. CALIDAD NUTRICIONAL Y NUTRACÉUTICA DEL FRUTO DE TRES ESPECIES DE ANNONACEAE: GUANÁBANA, CHIRIMOYA Y CHINCUYA

3.1. Resumen

Los frutos de la familia *Annonaceae* son apreciados por sus cualidades organolépticas, digestivas, nutritivas, alimenticias, medicinales y agroindustriales. Aunque existe información sobre el valor nutricional de algunas especies como *A. muricata* (guanábana) y *A. cherimola* (chirimoya), otras destacan por sus propiedades medicinales y toxicidad. Sin embargo, se desconoce el potencial antioxidante y nutracéutico de la mayoría de ellas, como el de *A. purpurea* (chincuya). El objetivo de la investigación fue evaluar la composición nutricional y antioxidante de tres especies de Anonáceas: guanábana, chirimoya y chincuya, así como determinar la toxicidad de extractos metanólicos de pulpa, cáscara, semillas y hojas de estas especies a través de un bioensayo con *Artemia salina*, con la finalidad de contribuir al conocimiento científico de especies con potencial nutracéutico y económico de México. El fruto de chirimoya fue el que presentó la mayor concentración de proteína cruda (1.88%), carbohidratos (20.67%), los valores más altos de minerales (Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn y Mn), compuestos fenólicos (366.27 mg EAG 100 g⁻¹ p.f.) y ácido ascórbico (48.36 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.); de acuerdo a la correlación de Pearson la mayor actividad antioxidante se asocia con el contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico; el fruto de guanábana superó a las dos especies restantes en los niveles de lípidos (0.30%) y flavonoides (10.10 mg EQ 100 g⁻¹ p.f.). Finalmente, chincuya destacó por el mayor contenido de fibra cruda (1.33%). Los extractos de semilla de chirimoya y chincuya resultaron extremadamente tóxicos (CL₅₀ menor a 10 ppm), por otro lado, el extracto de pulpa de guanábana con una CL₅₀=67.5 ppm se clasificó como muy tóxico (CL₅₀ entre 10 y 100 ppm), de acuerdo a los criterios de toxicidad establecidos para *Artemia salina*.

Palabras clave: Anonáceas, compuestos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, DPPH, ABTS, *Artemia salina*, toxicidad.

NUTRITIONAL AND NUTRACEUTICAL QUALITY OF THE FRUIT OF THREE ANNONACEAE SPECIES: SOURSOP, CHERIMOYA AND CHINCUYA

Abstract

Fruits of the *Annonaceae* family are appreciated for their organoleptic, digestive, nutritional, alimentary, medicinal and agro-industrial qualities. Although there is information about the nutritional value of some species such as *A. muricata* (soursop) and *A. cherimola* (cherimoya), others are noted for their medicinal properties and toxicity. However, the antioxidant and nutraceutical potential of most of them, such as that of *A. purpurea* (chincuya), is unknown. The objective of this research was to evaluate the nutritional and antioxidant composition of three species of *Annonaceae*: soursop, cherimoya and chincuya, as well as to determine the toxicity of methanolic extracts of pulp, peel, seeds and leaves of these species through a bioassay with *Artemia salina*, in order to contribute to the scientific knowledge of species with nutraceutical and economic potential in Mexico. The cherimoya fruit presented the highest concentration of crude protein (1.88%), carbohydrates (20.67%), the highest values of minerals (Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn and Mn), phenolic compounds (366.27 mg EAG 100 g⁻¹ F.W.) and ascorbic acid (48.36 mg EAA 100 g⁻¹ F.W.); according to Pearson's correlation, the highest antioxidant activity was associated with the content of phenolic compounds and ascorbic acid; soursop fruit was higher than the other two species in lipid (0.30%) and flavonoid levels (10.10 mg EQ 100 g⁻¹ F.W.). Finally, chincuya was noted for the highest crude fiber content (1.33%). The cherimoya and chincuya seed extracts were extremely toxic (LC₅₀ less than 10 ppm); on the other hand, the soursop pulp extract with an LC₅₀=67.5 ppm was classified as very toxic (LC₅₀ between 10 and 100 ppm), according to the toxicity criteria established for *Artemia salina*.

Keywords: Annonaceae, phenolic compounds, flavonoids, ascorbic acid, DPPH, ABTS, *Artemia salina*, toxicity.

Doctoral Thesis in Science, in Horticulture, Fitotecnia Department. Universidad Autonoma Chapingo

Author: Carlos Raúl López Martínez

Advisor: Dr. María del Rosario García Mateos

3.2. Introducción

Las especies de Anonáceas consideradas como plantas primitivas, son la principal familia del Orden Magnoliales, incluye árboles tropicales, arbustos y trepadoras utilizadas como remedios tradicionales (Aminimoghadamfarouj et al., 2011; Hernández-Fuentes et al., 2016). El género *Annona* es importante dentro de la familia *Annonaceae* debido a sus cualidades organolépticas, digestivas y nutritivas. Los frutos de guanábana (*Annona muricata*), chirimoya (*A. cherimola*) y chincuya (*A. purpurea*) son apreciados por sus propiedades alimenticias, medicinales e industriales (González Vega, 2013). En los últimos años se ha incrementado el valor económico de las especies de Anonáceas en México, destacando al fruto de guanábana, ya que se distribuye en 15 de los 32 estados de la República, convirtiéndose en la especie con mayor área cultivada, volumen y valor de la producción, además de tener demanda en el mercado nacional e internacional, como fruta fresca o procesada (Hernández et al., 2014; Hernández-Fuentes et al., 2016; Pinzón-García et al., 2016). Pero se desconocen las propiedades nutraceuticas y antioxidantes de los frutos de estas especies, principalmente de los frutos de chincuya.

La familia *Annonaceae* se caracteriza por la presencia de sustancias bioactivas de diversa naturaleza química en hojas, raíz, corteza de tallo, frutos y semillas, lo que explica su uso en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades (respiratorias, hipertensión, diabetes y cáncer) (Coria-Téllez et al., 2018; García et al., 2012). Se ha identificado la presencia de diversos fitoquímicos (alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y acetogeninas) en varias especies como *A. muricata*, *A. Squamosa* y *A. purpurea*. Sin embargo, aún existe desconocimiento sobre algunas propiedades que se la atribuyen (anticancerígena, antiinflamatoria, antibacteriana, antimicrobiana y citotóxica) (García et al., 2012; Luján-Hidalgo et al., 2015), que justifiquen su actividad biológica.

Actualmente, se ha incrementado el estudio de plantas con posible actividad anticancerígena, antiviral y citotóxica, entre otras (Aminimoghadamfarouj et al.,

2011; García et al., 2012). Como parte de los estudios de la actividad biológica de algunas plantas con actividad citotóxica, se utilizan bioensayos preliminares de laboratorio como el del crustáceo *Artemia salina*, bioensayo sencillo, económico, fiable y útil para el estudio de la actividad toxicológica y farmacológica de extractos de especies vegetales que sirven como fuentes de principios activos (Maruthanayagam et al., 2013; Meyer et al., 1982).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad nutricional y antioxidante de tres especies de Anonáceas: guanábana (*Annona muricata* L.), chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) y chincuya (*Annona purpurea* Moc. et Sess.), así como determinar la toxicidad de los extractos metanólicos de pulpa, cáscara, semillas y hojas de estas especies mediante un bioensayo en *Artemia salina*, con la finalidad de contribuir en el conocimiento científico de estas especies con potencial nutracéutico y antioxidante en beneficio de la salud del consumidor y en consecuencia generar demanda comercial para el productor.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Recolecta del material vegetal

La adquisición de frutos y hojas de Anonáceas (guanábana, chirimoya y chincuya) se realizó en diferentes estados de la República Mexicana en 2018, lugares identificados con mayor producción. La guanábana (*Annona muricata*) se obtuvo en la localidad Cofradía de Morelos municipio de Tecomán en el estado de Colima (18°53'20"LN 103°50'23"LO) a una altitud de 28 m; la chirimoya (*A. cherimola*) en el municipio de Tlalnepantla en el estado de Morelos (19°00'33"LN 98°59'42"LO) a una altitud de 2 052 m y la chincuya (*A. purpurea*) en la comunidad de Las Salinas municipio de Chicomuselo en el estado de Chiapas (15°45'07"LN 92°16'08"LO) a una altitud de 590 m. El material vegetal se recolectó aleatoriamente libre de enfermedades y sin daños visibles; los frutos en estado de madurez fisiológica. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada; los frutos se despulparon manualmente. Finalmente, la pulpa, la cáscara, las

semillas y las hojas se congelaron a -20 °C para su posterior liofilización en un equipo modelo 7670520 (LABCONCO, Kansas, USA) a -40 °C y 12 Pa, por 24 h. El material deshidratado se almacenó en bolsas herméticas a temperatura ambiente para los siguientes análisis.

3.3.2. Análisis proximal

Se determinó el contenido de humedad, cenizas, proteína cruda, lípidos y fibra cruda en la pulpa de los frutos de acuerdo a la metodología establecida por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (Horwitz, 2002). El contenido de carbohidratos totales se calculó mediante la fórmula: $CT = [100 - (C + PC + L + FC)]$; donde: CT=Carbohidratos totales (%), C=Cenizas (%), PC=Proteína cruda (%), L=Lípidos (%), FC=Fibra cruda (%). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje en peso fresco.

3.3.3. Análisis mineral

En la pulpa de cada fruto, se cuantificó el contenido de Ca, P, Mg, K, Na, Fe, Zn, Cu, Mn y B por la metodología propuesta por Alcántar y Sandoval (1999). 0.25 g de cada muestra liofilizada y molida se procesaron mediante digestión húmeda con 3 mL de H₂SO₄:HNO₃:H₂O₂, en relaciones 2:1:1 (v:v:v) a una temperatura de 190 °C. El extracto resultante se aforó a 25 mL con agua desionizada y se filtró con papel Whatman No. 41. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un equipo de espectrometría de emisión e inducción por plasma (Agilent 725 Series ICP-OES).

3.3.4. Obtención de extractos metanólicos

Se prepararon extractos metanólicos para la evaluación de los compuestos fenólicos y flavonoides con la pulpa liofilizada de cada especie. Se pesó 1 g de muestra y se mezcló con 25 mL de MeOH acuoso a 95% (v/v), posteriormente la mezcla se mantuvo por 20 min en un equipo de ultrasonido (Cole-Palmer, Pasadena, USA) a temperatura ambiente, el sobrenadante se aforó a 25 mL con MeOH acuoso a 80% (v/v). Para determinar actividad antioxidante, se mezclaron 0.4 g de muestra y 10 mL de MeOH acuoso a 80% (v/v), después se

sonicó por 20 min a temperatura ambiente. Los extractos se mantuvieron en refrigeración y oscuridad hasta su análisis.

3.3.5. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales

Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Waterman y Mole (1994). Del extracto previamente preparado con MeOH a 95% (v/v), se tomó una alícuota de 0.5 mL y se mezcló con 10 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) a 10% (p/v), la mezcla se homogenizó con un vortex y se mantuvo en baño maría a 38 °C por 15 min, se tomó 1 mL de esta combinación y se le adicionaron 3 mL de agua destilada más 1 mL de solución Folín-Ciocalteu:agua 1:1 (v:v) homogenizando perfectamente, se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Genesys 10s (Thermoscientific, Florida, USA). El contenido de compuestos fenólicos totales se calculó a partir de una curva estándar de ácido gálico ($y = 0.0002x - 0.0003$; $R^2 = 0.9831$) y el resultado se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de peso fresco (mg EAG 100 g⁻¹ p.f.). Mediante los valores de humedad del análisis proximal se calculó el porcentaje de materia seca y los datos de las muestras liofilizadas se transformaron a peso fresco.

3.3.6. Cuantificación de los flavonoides totales

El contenido de flavonoides se determinó por el método propuesto por Chang et al. (2002). Del primer extracto metanólico se tomaron 0.5 mL y se mezclaron con 1.5 mL de MeOH a 95% (v/v), 0.1 mL de solución de cloruro de aluminio (AlCl_3) a 10% (p/v), 0.1 mL de solución de acetato de potasio (CH_3COOK) 1.0 M y 2.8 mL de agua destilada, la mezcla se homogenizó en un vortex y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Concluido el tiempo se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro Genesys 10s (Thermoscientific, Florida, USA), la cuantificación de flavonoides se realizó a partir de una curva estándar de quercetina ($y = 0.0041x - 0.0003$; $R^2 = 0.9976$) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina por cada 100 g de peso fresco (mg EQ 100 g⁻¹

p.f.); usando los valores de humedad del análisis proximal se calculó el porcentaje de materia seca y los datos de las muestras liofilizadas se transformaron a peso fresco.

3.3.7. Cuantificación del ácido ascórbico

La concentración de ácido ascórbico en la pulpa de los frutos se determinó por el método oficial de la AOAC 967.21 (Horwitz, 2002). 1.0 g de pulpa liofilizada de cada especie se maceró separadamente con 10 mL de ácido metafosfórico 3%-ácido acético 8% ($\text{HPO}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$) (p/v), se filtró con papel Whatman No. 1 y se aforó a un volumen de 10 mL con la misma solución ($\text{HPO}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$). De este extracto se tomaron 2 mL y se mezclaron con 5 mL de $\text{HPO}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$, la mezcla se tituló rápidamente con una solución de 2,6-dicloroindofenol (0.05% p/v), hasta observar un cambio de color a un tono rosa ligero. Por otro lado, se tituló por triplicado un blanco de 2 mL de ácido ascórbico (1 mg mL^{-1}) y 5 mL de $\text{HPO}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$, con 2,6-dicloroindofenol (0.05% p/v) hasta que la solución cambió de color a un tono rosa ligero. El contenido de ácido ascórbico se calculó mediante la siguiente fórmula: $\text{mg ácido ascórbico g}^{-1} = (X-B)(FxE^{-1})(VxA^{-1})$; donde: X=mL promedio de 2,6-dicloroindofenol utilizados para la titulación de la muestra; B=mL promedio de 2,6-dicloroindofenol utilizados para la titulación del blanco; F=mg de ácido ascórbico equivalentes a 1 mL de la solución estándar de 2,6-dicloroindofenol; E=g de muestra; V=volumen inicial de la muestra; A=volumen de la muestra después de la titulación. La concentración de ácido ascórbico se expresó en mg equivalentes de ácido ascórbico por cada 100 g de peso fresco ($\text{mg EAA } 100 \text{ g}^{-1}$ p.f.). Mediante los valores de humedad obtenidos del análisis proximal se calculó el porcentaje de materia seca y los datos de las muestras liofilizadas se transformaron a peso fresco.

3.3.8. Evaluación de la actividad antioxidante

Método DPPH

La actividad antioxidante en la pulpa liofilizada de los frutos se evaluó por el método descrito por Kim; Lee, K.; Lee, H. y Lee, C. (2002). Se preparó una

solución del radical libre DPPH^{•+} (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) a una concentración de 100 µM en metanol acuoso a 80% (v/v) y se midió la absorbancia a 517 nm (A_I = Absorbancia inicial). Se tomó 0.1 mL del extracto metanólico de cada muestra y se mezcló con 2.9 mL de la solución del radical libre DPPH^{•+}. La mezcla se homogenizó con un vortex y se mantuvo en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10s (Thermoscientific, Florida, USA) a 517 nm (A_F = Absorbancia final). El porcentaje de inhibición del DPPH se calculó mediante la fórmula: $\% \text{DPPH}_{\text{inhibido}} = [1-(A_F/A_I)] \times 100$. La actividad antioxidante se determinó a partir de una curva estándar de trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) ($y = 0.0784x + 1.972$; $R^2 = 0.9973$) y se expresó como micro moles equivalentes de trolox por cada 100 g de peso fresco ($\mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$); usando los valores de humedad del análisis proximal se calculó el porcentaje de materia seca y los datos de las muestras liofilizadas se transformaron a peso fresco.

Método ABTS

La actividad antioxidante por el radical ABTS^{•+} se obtuvo por la metodología desarrollada por Re et al. (1999). El radical se generó mediante la reacción de 10 mL de ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) 7 mM con 6.61 mg de persulfato potásico $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, para obtener una concentración final de 2.45 mM. La mezcla se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se tomó 1 mL y se diluyó con etanol absoluto hasta obtener un valor de absorbancia comprendida entre 0.70 ± 0.1 a una longitud de onda de 734 nm. Posteriormente, se mezclaron 1 mL de ABTS^{•+} 7 mM y 10 µL del extracto metanólico de la muestra, la mezcla se incubó en baño maría a 30 °C en oscuridad por 7 min, transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10s (Thermoscientific, Florida, USA) a 734 nm. El porcentaje de inhibición del ABTS^{•+} se obtuvo mediante la fórmula: $\% \text{ABTS}_{\text{inhibido}} = [(A_I - A_F)/A_I] \times 100$; donde: A_I = Absorbancia inicial del radical libre; A_F = Absorbancia final de la reacción del radical libre con la muestra. La actividad antioxidante se calculó con una curva estándar ($y = 0.2154x -$

3.4097; $R^2=0.9958$) a base de trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), los resultados se expresaron como micro moles equivalentes de trolox por cada 100 g de peso fresco ($\mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$); usando los valores de humedad del análisis proximal se calculó el porcentaje de materia seca y los datos de las muestras liofilizadas se transformaron a peso fresco.

3.3.9. Evaluación de la toxicidad de extractos en *Artemia Salina*

Se prepararon extractos metanólicos con el material vegetal liofilizado de cada especie (pulpa, cáscara, semillas y hojas). El extracto metanólico de cada tejido se preparó mediante una extracción con un equipo Soxhlet a 65 °C por 8 h. Cada extracto se concentró al vacío en un rotavapor Büchi R-210 para eliminar el disolvente y obtener el extracto crudo, a cada uno se le determinó el rendimiento. Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La toxicidad de los extractos se evaluó utilizando el modelo biológico de *A. salina* propuesto por Meyer et al. (1982). Para la eclosión de los nauplios se pesaron 20 mg de huevecillos del crustáceo y se incubaron en un medio salino simulado de NaCl (35 g L^{-1}) a 25 °C por 24 h, con oxigenación e iluminación artificial. La prueba se realizó en viales con 5 mL de medio salino y los extractos metanólicos crudos a una concentración de 1 000, 100 y 10 ppm por tejido por especie, a los cuales se agregaron 10 nauplios por vial. Cada ensayo se realizó por triplicado, usando un blanco como referencia. Los viales se mantuvieron con iluminación a 25 °C por 24 h; transcurrido el tiempo se contaron los crustáceos que sobrevivieron y se calculó la Concentración Letal Media (CL_{50}) mediante un análisis Probit.

3.3.10. Análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Los resultados se expresaron con la media y la desviación estándar tomando como base para cada especie tres repeticiones ($n=3$) para el análisis proximal y mineral y cuatro repeticiones ($n=4$) para la cuantificación de los componentes antioxidantes. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey para evaluar las diferencias entre

los frutos a un nivel de significancia ($p \leq 0.05$). Se calculó el coeficiente de correlación de *Pearson* para cada par de variables y poder obtener una perspectiva general entre la capacidad antioxidante y los compuestos antioxidantes presentes en la pulpa de cada fruto. La toxicidad de los extractos metanólicos de pulpa, cáscara, semillas y hojas de cada especie sobre *A. salina*, se evaluó por medio de un análisis *Probit*, en donde se determinó la Concentración Letal Media (CL_{50}) de tres repeticiones ($n=3$). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Statistical Analysis System (SAS, 2000).

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Análisis proximal

La chirimoya presentó la mayor concentración de proteína cruda y carbohidratos entre los frutos de las especies estudiadas (Cuadro 1). Menchú, Méndez, Barrera y Ortega (2012) reportaron valores menores de proteína (1.6%) y carbohidratos (17.7%) en los frutos de esta especie, a los encontrados en la presente investigación. Por otra parte, valores similares de proteína (1.3-1.9%) y carbohidratos (17.6-21.1%) fueron reportados por Albuquerque et al. (2016). González Vega (2013) y el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF, 2018) también encontraron un menor contenido de proteína (1.0 y 1.5%) y una concentración similar de carbohidratos (22.0 y 20.2%) a lo presentado en este estudio. Asimismo, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán encontró en la pulpa de chirimoya un mayor contenido de proteína (2.3%) y una menor concentración de carbohidratos (14.3%) (INCMNSZ, 2015).

Cuadro 1. Composición nutrimental de la pulpa de tres especies de Anonáceas.

Especie	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína cruda (%)	Lípidos (%)	Fibra cruda (%)	Carbohidratos (%)
Guanábana	81.71 ± 0.26 b	0.93 ± 0.01 a	1.48 ± 0.02 b	0.30 ± 0.00 a	1.15 ± 0.02 b	14.42 ± 0.21 b
Chirimoya	75.49 ± 0.04 c	0.56 ± 0.00 c	1.88 ± 0.00 a	0.23 ± 0.00 b	1.16 ± 0.00 a	20.67 ± 0.03 a
Chincuya	85.38 ± 0.00 a	0.63 ± 0.00 b	1.17 ± 0.00 c	0.14 ± 0.00 c	1.33 ± 0.00 c	11.34 ± 0.00 c

Media ± desviación estándar ($n=3$); medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Álvarez (2010) y Menchú et al. (2012) reportaron en guanábana un menor contenido de proteína de 1.0% en ambos estudios y una concentración de carbohidratos (14.6 y 16.8%) similar a lo encontrado en esta investigación. Vit, Santiago y Pérez-Pérez (2014) mostraron un valor menor en proteína (0.3%) para esta especie. Otra investigación reportó una menor concentración de proteína y carbohidratos (0.6 y 6.8%) (ICBF, 2018). Los contenidos de proteína y de carbohidratos en las especies de Anonáceas (Cuadro 1) fueron superiores a lo reportado en frutos de mayor demanda comercial como naranja (0.85 y 9.30%), fresa (0.84 y 5.28%), limón (0.78 y 9.21%) y piña (0.56 y 8.37%), (INCMNSZ, 2015).

La concentración de lípidos en las especies estudiadas, fue superior en guanábana (Cuadro 1), similar a lo reportado por Menchú et al. (2012) y el ICBF (2018) (0.3 y 0.2%), pero menor a los valores encontrados por Álvarez (2010) y Vit et al. (2014) (1.0 y 0.6%). En chirimoya el INCMNSZ (2015), reportó un contenido de lípidos (0.3%) ligeramente superior, sin embargo, otros autores reportaron un contenido menor (0.1%) respecto a los resultados de esta investigación (Albuquerque et al., 2016).

La pulpa de chincuya destacó por la mayor concentración de fibra cruda (Cuadro 1), sin embargo, aún no hay estudios similares en esta especie que ayuden a comparar los resultados de esta investigación. Es importante destacar que el valor de fibra cruda en chincuya superó lo reportado por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en frutos como limón (1.1%), piña (0.4%), naranja y mandarina 0.3% (INCMNSZ, 2018). En el caso de guanábana Álvarez (2010) encontró una concentración menor de fibra (0.7%) comparada con la del presente estudio. La chirimoya presentó una cantidad de fibra menor al intervalo (2.0-5.3 %) reportado por Albuquerque et al. (2016).

Cabe señalar que el consumo de frutas y hortalizas con valores altos en fibra provee beneficios para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas como las afecciones cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer y la

hipertensión arterial, al ser fundamental para el adecuado funcionamiento del intestino (Almeida-Alvarado et al., 2010; Eswaran et al., 2013). De acuerdo con varios estudios, la recomendación diaria de fibra dietética se encuentra entre 21 y 38 g al día dependiendo de algunos factores como la edad y sexo de las personas. Las frutas ocupan el tercer lugar dentro de las principales fuentes dietéticas de fibra después de los cereales y las verduras, aportando de 11 al 26% del total requerido en la dieta, por lo que deben ser consideradas en la alimentación diaria (Meisner et al., 2011).

Las diferencias encontradas en los contenidos nutricionales entre las especies estudiadas, así como los valores reportados en otras investigaciones son difíciles de interpretar, estas variaciones se podrían deber a la variabilidad entre especies, estado de madurez, factores edafoclimáticos del lugar de origen, así como a las técnicas de preparación y análisis (de Castro et al., 2013).

3.4.2. Análisis mineral

La chirimoya destacó de los frutos restantes al presentar los niveles más altos de Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn y Mn (Cuadro 2). Comparando los datos de chirimoya del presente estudio con otras investigaciones, se encontró un contenido similar de Ca (24.0 mg 100 g⁻¹ p.f.), P (47.0 mg 100 g⁻¹ p.f.) y Fe (0.4 mg 100 g⁻¹ p.f.) (González Vega, 2013); el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán reportó valores menores en P (27.0 mg 100 g⁻¹ p.f.) y Na (7.0 mg 100 g⁻¹ p.f.), similares en Mg (17.0 mg 100 g⁻¹ p.f.), Zn (0.16 mg 100 g⁻¹ p.f.), Cu (0.09 mg 100 g⁻¹ p.f.), Mn (0.08 mg 100 g⁻¹ p.f.) y mayores en Ca (60.0 mg 100 g⁻¹ p.f.) y K (287.0 mg 100 g⁻¹ p.f.) (INCMNSZ, 2015).

Cuadro 2. Composición mineral de la pulpa de tres especies de Anonáceas.

Especie	Mineral (mg 100 g ⁻¹ p.f.)									
	Ca	P	Mg	K	Na	Fe	Zn	Cu	Mn	B
Guanábana	20.26 ± 1.52 c	35.81 ± 0.33 b	16.41 ± 0.34 b	281.50 ± 1.38 a	13.63 ± 0.50 c	0.33 ± 0.02 b	0.07 ± 0.00 b	0.06 ± 0.01 a	0.08 ± 0.00 a	0.40 ± 0.01 a
Chirimoya	31.09 ± 1.38 a	43.18 ± 1.32 a	18.17 ± 0.43 a	203.84 ± 6.68 b	19.49 ± 1.00 a	0.46 ± 0.02 a	0.14 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 ab	0.07 ± 0.02 a	0.32 ± 0.02 b
Chincuya	24.16 ± 0.34 b	26.39 ± 0.52 c	17.12 ± 0.10 b	277.73 ± 8.56 a	16.33 ± 1.03 b	0.21 ± 0.00 c	0.07 ± 0.00 b	0.04 ± 0.00 b	0.09 ± 0.00 a	0.22 ± 0.01 c

Media ± desviación estándar (n=3); medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).

Por otro lado, la guanábana presentó la mayor concentración de K y de B respecto a las especies restantes. Ramírez-Méndez, de moreno, Acosta, Yamarte y Sandoval (2012) reportaron en guanábana valores superiores de Mg ($23.8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) y Na ($22.6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$), pero menores en Ca ($14.3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$), P ($28.0 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) y K ($46.3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$). Asimismo, Ramírez y de Delahaye (2011) reportaron valores menores en Ca ($10.7 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) y K ($112.2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) pero una concentración mayor de Fe ($2.3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) con respecto a la presente investigación.

Existen diferencias en la composición mineral entre frutos de mayor demanda y las especies de Anonáceas estudiadas (Cuadro 2), el contenido de Ca, Na, P y Mg superó lo reportado en manzana ($6.0, 1.0, 11.0$ y $5.0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$), piña ($13.0, 1.0, 8.0$ y $12.0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) y fresa ($16.0, 1.0, 24.0$ y $13.0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) (Menchú et al., 2012). Los frutos de guanábana, chirimoya y chincuya son una fuente de alimento rica en K, el mineral más abundante en frutas (Ramírez-Méndez et al., 2012), con valores superiores a lo encontrado en fresa, limón, manzana, naranja y piña ($157.0, 143.0, 107.0, 134.0$ y $159.0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) y menores a lo reportado en plátano ($328.0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) y guayaba ($337.0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$) (ICBF, 2018).

Las frutas y las verduras constituyen un grupo de alimentos saludables para el ser humano por su alto contenido de minerales en la dieta, esenciales para los procesos biológicos ya que desempeñan un papel vital en las funciones metabólicas, el crecimiento normal y desarrollo (Baca-Ibáñez et al., 2016; Rodríguez-Leyton, 2019). Las diferencias observadas entre especies y otros estudios, se pueden deber a las condiciones edafológicas (condiciones del suelo) y climáticas en las que se cultivaron las plantas que influyen sobre la calidad nutricional de los frutos (Ramírez-Méndez et al., 2012; Pérez et al., 2017).

3.4.3. Contenido de nutraceuticos

El análisis de los compuestos antioxidantes mostró diferencias significativas entre las especies estudiadas (Cuadro 3). La pulpa de chirimoya presentó los

valores más altos de compuestos fenólicos y ácido ascórbico, en contraste, el mayor contenido de flavonoides se encontró en la pulpa de guanábana. Aunque el fruto de chincuya no destacó de los demás frutos estudiados, se debe considerar para futuros estudios.

Cuadro 3. Contenido de Compuestos fenólicos, Flavonoides y Ácido ascórbico en pulpa de tres especies de Anonáceas.

Especie	Compuesto fenólicos (mg EAG 100 g ⁻¹ p.f.) ^z	Flavonoides (mg EQ 100 g ⁻¹ p.f.) ^y	Ácido ascórbico (mg EAA •100 g ⁻¹ p.f.) ^x
Guanábana	154.43 ± 8.829 c ^z	10.127 ± 0.933 a	34.81 ± 0.426 b
Chirimoya	366.27 ± 2.934 a	1.840 ± 0.692 c	48.36 ± 0.526 a
Chincuya	181.92 ± 3.120 b	5.350 ± 0.666 b	30.15 ± 0.210 c

^zmg Equivalentes de Ácido Gálico 100 g⁻¹ peso fresco; ^ymg Equivalentes de Quercetina 100 g⁻¹ peso fresco; ^xmg Equivalentes de Ácido Ascórbico 100 g⁻¹ peso fresco; ^zmedia ± desviación estándar (n=4); medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

De acuerdo a los resultados obtenidos en guanábana (Cuadro 3), se encontraron diferencias con otras investigaciones hechas en esta especie. En guanábana un mayor contenido de compuestos fenólicos (6 420 mg EAG 100 g⁻¹ p.f.) y menor concentración de flavonoides (2.1 mg EQ 100 g⁻¹ p.f.) y ácido ascórbico (13.2 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.) fue reportado por Terán-Eraza et al. (2019). Vit et al. (2014), presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos (624.2 mg EAG 100 g⁻¹ p.f.) y flavonoides (480.6 mg EQ 100 g⁻¹ p.f.). Isabelle et al. (2010), reportaron valores más altos en el contenido de compuestos fenólicos (236.0 mg EAG 100 g⁻¹ p.f.), pero menor concentración de ácido ascórbico (15.9 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.). de Hernández, de Camacaro, Giménez y Carballo (2012) y Menchú et al. (2012), presentaron una menor cantidad de ácido ascórbico (21.0 y 28.5 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.). En chirimoya también hubo diferencias con otros estudios presentados. Albuquerque et al. (2016), encontraron un contenido menor de compuestos fenólicos (3.06-12.0 mg EAG 100 g⁻¹ p.f.) y ácido ascórbico (2.13-6.73 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.). También, González Vega (2013) reportó una menor concentración de ácido ascórbico (18.0 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.) y Loizzo et al. (2012) obtuvieron un valor ligeramente mayor de flavonoides (3.8 mg EQ 100 g⁻¹ p.f.) en esta especie. Estas diferencias pueden ser atribuidas a diversos factores, ya que la

composición química depende de variables como: estado fenológico, origen geográfico, condiciones ambientales de crecimiento, variabilidad genética, entre otros (Ramírez et al., 2011).

Zapata, Piedrahita y Rojano (2014), señalaron que las frutas se pueden clasificar de acuerdo al contenido de compuestos fenólicos en tres categorías (alto, intermedio y bajo); dentro del contenido alto (1 192.2 y 1 864.4 mg EAG 100 g⁻¹ p.s.) se encuentran frutos como mora, fresa y guayaba; en la clasificación intermedia (124.7 a 426.7 mg EAG 100 g⁻¹ p.s.) se ubican los frutos de manzana roja, uva, piña y pera; por último están los frutos con contenido bajo (30.5 y 84.8 mg EAG 100 g⁻¹ p.s.) como durazno y plátano, respectivamente. Por lo tanto, tomando en cuenta los valores de humedad del análisis proximal (Cuadro 1) para calcular valores de peso seco, podemos considerar que guanábana, chirimoya y chincuya son frutos con un alto contenido de compuestos fenólicos (844.3, 1 494.3 y 1 244.3 mg EAG 100 g⁻¹ p.s., respectivamente).

Los compuestos fenólicos se encuentran presentes en frutas, hortalizas, raíces y cereales, juegan una serie de funciones metabólicas en las plantas, en el crecimiento y reproducción, y en la protección contra patógenos externos y el estrés, como la radiación UV y los depredadores en las plantas (Peñarrieta et al. 2014). Son de gran importancia debido a que constituyen un grupo de metabolitos secundarios que se consideran antioxidantes naturales importantes en la dieta con múltiples beneficios biológicos para el ser humano, tales como la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas (Moreno et al., 2014). Los flavonoides se encuentran en las plantas y al igual que los compuestos fenólicos, proporcionan resistencia contra la foto-oxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores. El hombre los consume en la dieta ya que están presentes de forma abundante en vegetales, frutas rojas como fresas, zarzamoras, cítricos, chocolate, nueces, vino tinto y en varias plantas medicinales. Poseen una amplia gama de actividades farmacológicas

entre las que destacan sus propiedades antioxidantes, las cuales les confieren capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo relacionado con patologías asociadas al envejecimiento, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Estrada-Reyes et al., 2012). El ácido ascórbico (vitamina C) es un nutriente esencial para la biosíntesis del colágeno y un cofactor en la biosíntesis de las catecolaminas, L-carnitina, colesterol, aminoácidos, y algunas hormonas peptídicas. La falta de vitamina C causa escorbuto, una condición patológica que conduce a la fragilidad de los vasos sanguíneos y daño del tejido conectivo. Está potencialmente implicada en la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares (Grosso et al., 2013). Es un micronutriente al que tradicionalmente se le ha reconocido un poder ante infecciones agudas, resfriados comunes, etc., y cuya efectividad sobre el sistema inmunitario ha sido estudiada (Mauro-Martín & Garicano-Vilar, 2015).

Los frutos estudiados presentaron un contenido de ácido ascórbico similar a lo reportado en limón, naranja y piña (38.5, 49.0 y 35.8 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.), mayor a frutas como manzana y mandarina (5.35 y 29.4 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.) y menor al de fresa y guayaba (79.7 y 223.2 mg EAA 100 g⁻¹ p.f.) (INCMNSZ, 2015). Se puede considerar incluir frutos de Anonáceas dentro de la dieta por su aporte a los requerimientos diarios que se encuentran entre 15 y 120 mg dependiendo de la edad y condición de la persona (Bastías & Cepero, 2016).

3.4.4. Actividad antioxidante

Las sustancias antioxidantes desempeñan una función fundamental en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles debido a que tienen la capacidad de inhibir la oxidación de moléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) evitando que se alteren las funciones celulares, por lo tanto, actúan como protectores contra especies reactivas de oxígeno o radicales libres. Muchos antioxidantes pueden ser sintetizados en el cuerpo u obtenidos a partir de una dieta basada en frutas (Gordillo et al., 2012; López et al., 2012).

Los resultados de la actividad antioxidante y porcentaje de inhibición de los radicales libres (Cuadro 4), muestran que la chirimoya presentó los valores más

altos. De acuerdo con datos publicados por Kuskoski, Asurero, Troncoso, Mancini-Filho y Fett (2005) usando los métodos DPPH y ABTS en guanábana, reportaron menor actividad antioxidante en el método DPPH ($288 \mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1}$ p.f.) que la obtenida en este estudio, por otro lado hay una mayor actividad antioxidante en el método ABTS ($480 \mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1}$ p.f.). Vit et al. (2014) también reportaron una actividad antioxidante en guanábana menor a la encontrada en el presente estudio ($193.4 \mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1}$ p.f.) usando el método ABTS. La actividad antioxidante en pulpa de chirimoya fue mayor a lo reportado por Loizzo et al. (2012) ($440 \mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1}$ p.f.) por el método ABTS.

Cuadro 4. Determinación de la actividad antioxidante en la pulpa de tres especies de Anonáceas por los métodos DPPH y ABTS.

Especie	DPPH		ABTS	
	($\mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1}$ p.f.) ^z	Inhibición (%)	($\mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1}$ p.f.)	Inhibición (%)
Guanábana	$306.49 \pm 4.47 \text{ b}^*$	$60.36 \pm 0.85 \text{ c}$	$345.38 \pm 6.33 \text{ b}$	$77.60 \pm 1.48 \text{ c}$
Chirimoya	$650.55 \pm 0.80 \text{ a}$	$94.45 \pm 0.11 \text{ a}$	$587.58 \pm 0.26 \text{ a}$	$99.43 \pm 0.04 \text{ a}$
Chincuya	$287.04 \pm 5.62 \text{ c}$	$70.38 \pm 1.33 \text{ b}$	$324.73 \pm 1.41 \text{ c}$	$91.87 \pm 0.41 \text{ b}$

^z μM Equivalentes de Trolox 100 g^{-1} p.f.; media \pm desviación estándar (n=4); Medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

El análisis de correlación de Pearson (Cuadro 5) indicó que los compuestos fenólicos y el ácido ascórbico tienen una correlación positiva con la actividad antioxidante, por lo tanto estos metabolitos sinérgicamente se asocian a la actividad antioxidante encontrada en el presente estudio. Sin embargo, la actividad antioxidante en frutas y verduras también se le puede atribuir a la presencia de otro tipo de compuestos como vitamina E, carotenoides, antocianinas y otros compuestos (Gordillo et al., 2012), que no fueron evaluados.

Cuadro 5. Correlación de Pearson entre los compuestos antioxidantes en pulpa de tres especies de Anonáceas.

Correlación	Compuestos Fenólicos	Flavonoides	Ácido Ascórbico	DPPH	ABTS
Compuestos fenólicos	1.0000	-0.8674	0.9306	0.9842*	0.9798*
Flavonoides		1.0000	-0.6395	-0.7726	-0.7577
Ácido ascórbico			1.0000	0.9782*	0.9822*
DPPH				1.0000	0.9993*
ABTS					1.0000

* $p \leq 0.05$

3.4.5. Toxicidad de extractos en *Artemia Salina*

El grado de toxicidad de los extractos metanólicos de la semilla, la cáscara, las hojas y la pulpa de las tres especies se definió en función de la concentración letal media (CL₅₀) en los nauplios de *Artemia salina* (Cuadro 6) considerando las siguientes categorías: extremadamente tóxico, menor a 10 ppm; muy tóxico, entre 10 y 100 ppm; moderadamente tóxico entre 100 y 1 000 ppm y no tóxico mayor a 1 000 ppm (Betancurt et al., 2014). Con base en lo anterior, se consideró al extracto de pulpa de guanábana como muy tóxico, con una CL₅₀ de 67.5 ppm y a los extractos de semilla de chirimoya y chincuya como extremadamente tóxicos con una CL₅₀ de 5 ppm.

Cuadro 6. CL₅₀ de extractos metanólicos de tres especies de Anonáceas.

Especie	Parte analizada	CL₅₀ ppm *
<i>A. muricata</i> (guanábana)	Pulpa	67.5
	Cáscara	786.2
	Semillas	753.4
	Hojas	1003.0
<i>A. cherimola</i> (chirimoya)	Pulpa	609.1
	Cáscara	1199.7
	Semillas	5.0
<i>A. purpurea</i> (chincuya)	Hojas	528.4
	Pulpa	544.5
	Cáscara	110.4
	Semillas	5.0
	Hojas	104.3

*CL₅₀: concentración letal que causa el 50% de mortalidad en la población calculada por el método Probit (n=3).

Son escasas las investigaciones que reportan la toxicidad de extractos de Anonáceas, solamente se encontraron estudios de extractos obtenidos a partir de corteza del tallo de la especie *Annona cherimolioides* con una CL₅₀ menor a 250 ppm, atribuida principalmente a la presencia de alcaloides (García et al., 2012). Fernández-Calienes Valdés et al. (2009), reportaron en el extracto etanólico de *Annona glabra* L. una CL₅₀ mayor a 1 000 ppm. González-Esquinca et al., (2012), encontraron una CL₅₀ entre 409 y más de 1 000 ppm en los extractos etanólico y acuosos de tallos y hojas en tres especies de

Anonáceas, solamente el extracto etanólico de hoja de la especie *Annona diversifolia* presentó toxicidad con una CL_{50} de 52 ppm, estas diferencias podrían deberse y a las variaciones genéticas entre especies y a la mayor polaridad de los disolventes utilizados en la preparación de los extractos. La alta toxicidad mostrada en algunos extractos de las plantas del género *Annona* se ha relacionado con la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, acetogeninas, taninos, quinonas, alcaloides y terpenos que pueden actuar de manera sinérgica en la planta o en diferentes partes de ella, explicando así la diferente toxicidad observada en los extractos (García et al., 2012).

3.5. Conclusiones

La chirimoya destacó de las otras especies estudiadas por tener los valores más altos de proteína cruda, carbohidratos y minerales (Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, Mn), además de un alto contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico (vitamina C), que le aportan mayor capacidad antioxidante; los valores más altos de cenizas, grasa y contenido de flavonoides se encontraron en la pulpa de guanábana; finalmente, la pulpa de chincuya fue superior en la cantidad de fibra cruda al presentar el mayor valor. De manera general se encontró que los frutos de las especies de Anonáceas son una fuente de compuestos nutricionales y antioxidantes lo que podría explicar su alta capacidad para el secuestro de radicales libres. Por lo tanto, los frutos de estas especies podrían destacar por su potencial nutracéutico y ser considerados un alimento funcional. Se consideró al extracto de pulpa de guanábana como muy tóxico, con una CL_{50} de 67.5 ppm y a los extractos de semilla de chirimoya y chincuya como extremadamente tóxicos con una CL_{50} de 5 ppm al ser evaluados mediante el bioensayo en *Artemia salina*. De acuerdo a la información analizada se concluye que las especies de Anonáceas tienen potencial desde varios puntos de vista como nutricional, medicinal y agroindustrial por lo que se recomiendan otros estudios que destaquen las características deseables por productores y consumidores y con ello contribuir al aprovechamiento de algunas especies secundarias con potencial económico en México.

3.6. Literatura citada

- Albuquerque, T. G., Santos, F., Sanches-Silva, A., Oliveira, M. B., Bento, A. C., & Costa, H. S. (2016). Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chemistry*, 193, 187-195, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.044>
- Alcántar, G. G., & Sandoval, V. M. (1999). *Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación*. Publicación especial Núm. 10 de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Colegio de Postgraduados, México. 156 p.
- Almeida-Alvarado, S. L., Aguilar-López, T., & Hervert-Hernández, D. (2014). La fibra y sus beneficios a la salud. *In Anales Venezolanos de Nutrición*, 27(1), 73-76. Fundación Bengoa.
- Álvarez, M. E. G. (2010). La guanábana (*Annona muricata* L.). Propiedades y usos. *Revista CitriFrut*, 27(1).
- Aminimoghadamfarouj, N., Nematollahi, A., & Wiart, C. (2011). *Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(05), 465-476, <https://doi.org/10.1080/10286020.2011.570265>
- Baca-Ibáñez, S. Y., Ríos-Paico, P. E., & Rojas-Naccha, J. C. (2016). Importancia del magnesio en la dieta humana. *Agroindustrial Science*, 5(2), 177-189, <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2015.02.10>
- Bastías, J. M., & Cepero, Y. (2016). La vitamina C como un eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*, 43(1), 81-86, <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182016000100012>
- Betancurt, D. C. P., Barrera, M. G. y Palacios, L. E. C. (2014). Actividad antibacteriana, determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu y toxicidad en *Artemia salina* de la especie vegetal *Bauhinia variegata*. *Hechos Microbiológicos*, 5(2), 69-76. Recuperado a partir de <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/323251>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3).
- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662-691, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- de Castro, G. T. M., Lizaur, A. B. P., Hernández, H. R. G., & Martínez, A. F. G. (2013). *Contenido nutrimental de los alimentos*. In A. Madrazo de la

- Garza (Ed.), *Nutrición y Gastroenterología Pediátrica*, 169-182. Mc Graw Hill Education.
- de Hernández, R. Á., de Camacaro, M. P., Giménez, A., & Caraballo, E. A. H. (2012). La guanábana: una materia prima saludable para la industria de alimentos y bebidas. *Revista Digital de Investigación y Postgrado*, 2(2), 135-142.
- Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., & Araujo-Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el sistema nervioso central. *Salud Mental*, 35(5), 375-384. Disponible en: http://revistasaludmental.mx/index.php/salud_mental/article/view/1493
- Eswaran, S., Muir, J., & Chey, W. D. (2013). Fiber and functional gastrointestinal disorders. *American Journal of Gastroenterology ACG*, 108(5), 718-727, <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.63>
- Fernández-Calienes Valdés, A., Mendiola Martínez, J., Monzote Fidalgo, L., García Parra, M., Sariago Ramos, I., Acuña Rodríguez, D., & Gutiérrez Gaitén, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 254-258.
- García, J. H. G., Ocampo, D. M., Ocampo, R., & Gutiérrez-Cárdenas, P. D. A. (2012). Actividad tóxica de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimolioides* (annonaceae) sobre *Artemia Salina*. *Boletín Científico Museo Historia Natural*, 17-22.
- González-Esquince, A. R., Cazáres, L. M. L., Guzmán, M. A. S., De la Cruz Chacón, I., Hernández, G. L., Breceda, S. F., & Gerardo, P. M. (2012). In vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* larvae (Diptera, Tephritidae). *Interciencia*, 37(4), 284-289. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33922748008>
- González Vega, M. E. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 52-63.
- Gordillo, J. C., Ortiz, D., Larrahondo, J. E., Mejía, M. S., & Pachon, H. (2012). Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2), 111-126. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622734002>
- Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., Masuelli, L., & Gazzolo, D. (2013). Effects of vitamin C on health: a review of evidence. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 18, 1017-1029.
- Hernández-Fuentes, L. M., Andrés-Agustín, J., Espíndola-Barquera, M. D. C., Castañeda-Vildózola, A., Ballesteros-Patrón, G., & Vera-Sánchez, K. S. (2016). Recursos genéticos de Anonáceas (*Annonaceae*) en México:

- situación actual y perspectivas. *Agroproductividad*, 9(4). Recuperado a partir de <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/739>
- Hernández, L. V., Moctezuma, H. L., Martínez, N. A. V., Bello, R. R., Rocha, D. G. C., & Contreras, R. G. C. (2014). La situación de las *annonaceae* en México: principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPE1), 44-54, <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500005>
- Horwitz, W. (2002). *Official methods of analysis of AOAC International*. 17th Ed. American Association of Analytical Chemists, Washington, DC.
- ICBF (Instituto Colombiano de Bienestar Familiar). (2018). Tabla de composición de alimentos. Disponible en: https://www.icbf.gov.co/system/files/tcac_web.pdf
- INCMNSZ (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y nutrición Salvador Zubirán). (2015). Tablas de Composición de Alimentos y Productos Alimenticios Mexicanos. Disponible en: https://www.incmnsz.mx/2019/TABLAS_ALIMENTOS.pdf
- Isabelle, M., Lee, B. L., Lim, M. T., Koh, W. P., Huang, D., & Ong, C. N. (2010). Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chemistry*, 123(1), 77-84, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.002>
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713-3717, <https://doi.org/10.1021/jf020071c>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732, <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., & Menichini, F. (2012). Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 179-184, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.09.002>
- López, A., Fernando, C., Lazarova, Z., Bañuelos, R., & Sánchez, S. (2012). Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM (Impresa)*, 6(1), 48-53.
- Luján-Hidalgo, M. C., Pérez-Gómez, L. E., Abud-Archila, M., Meza-Gordillo, R., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Dendooven, L., & Gutiérrez-Miceli, F. A. (2015). Growth, phenolic content and antioxidant activity in Chincuya (*Annona purpurea* Moc & Sesse ex Dunal) cultivated with vermicompost and

- phosphate rock. *Compost Science & Utilization*, 23(4), 276-283, <https://doi.org/10.1080/1065657X.2015.1046617>
- Maruthanayagam, V., Nagarajan, M., & Sundararaman, M. (2013). Cytotoxicity assessment of cultivable marine cyanobacterial extracts in *Artemia salina* (brine shrimp) larvae and cancer cell lines. *Toxin Reviews*, 32(1), 1-9, <https://doi.org/10.3109/15569543.2012.754772>
- Mauro-Martín, S., & Garicano-Vilar, E. (2015). Papel de la vitamina C y los β -glucanos sobre el sistema inmunitario: revisión. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 19(4), 238-245, <https://dx.doi.org/10.14306/renhyd.19.4.173>
- Meisner, N., Muñoz, K., Restovich, R., Zapata, M. E., Camoletto, S., Torrent, M. C., & Molinas, J. (2011). Fibra alimentaria: Consumo en estudiantes universitarios y asociación con síndrome de intestino irritable. *Invenio: Revista de Investigación Académica*, (26), 91-100. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87717621007>
- Menchú, M. T., Méndez, H., Barrera, M. A. y Ortega, L. (2012). Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica. In *Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica*. Organización Panamericana de la Salud.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(5), 31-34, <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Moreno, E., Ortiz, B. L., & Restrepo, L. P. (2014). Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales. *Revista Colombiana de Química*, 43(3), 41-48, <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n3.53615>
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339682006>
- Pérez, M. C., Bone, E. C., Parra, J. C. P., Rosero, C. C., & Blanco, O. C. (2017). Determinación de componentes nutricionales presentes en las hojas secas de *Annona muricata* L. (guanábana). *Cumbres*, 3(1), 09-16, <https://doi.org/10.48190/cumbres.v3n1a1>
- Pinzón-García, J. M., Hernández-Fuentes, L. M., Luna-Esquivel, G., Isiordia-Aquino, N., & Ortiz-Catón, M. (2016). Biología y Hábitos de *Gonodonta pyrgo* Cramer en *Annona muricata*. *Southwestern Entomologist*, 41(1), 251-258, <https://doi.org/10.3958/059.041.0122>
- Ramírez, A., & de Delahaye, E. P. (2011). Composición química y compuestos bioactivos presentes en pulpas de piña, guayaba y guanábana.

- Interciencia*, 36(1), 71-75. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33917727011>
- Ramírez, R. N., Mora, F. D., Ávila, J. L., Rojas, L. B., Usubillaga, A., Segnini, S., & Carmona, J. (2011). Composición química y actividad larvícida del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de Los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.). *Revista de la Facultad de Farmacia*, 53(2), 2-7.
- Ramírez-Méndez, R., De Moreno, L. A., Acosta, K., Yamarte, M., & Sandoval, L. (2012). Efecto del escaldado sobre la calidad nutricional de pulpa de guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(1), 48-57. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81324433007>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez-Leyton, M. (2019). Desafíos para el consumo de frutas y verduras. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 19(2), 105-112, <http://dx.doi.org/10.25176/RFMH.v19.n2.2077>
- SAS, Institute. 2000. *SAS/STAT. User's Guide. Release 9.1.3* ed. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina. USA.
- Terán-Erazo, B., Alia-Tejacal, I., Balois-Morales, R., Juárez-López, P., López-Guzmán, G. G., Pérez-Arias, G. A., & Núñez-Colín, C. A. (2019). Caracterización física, química y morfológica de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.). *Agrociencia*, 53(7), 1013-1027.
- Vit, P., Santiago, B., & Pérez-Pérez, E. M. (2014). Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*, 39(5), 350-353. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33930879008>
- Waterman, P. G. y Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites (Vol. 83)*. Oxford: Blackwell Scientific.
- Zapata, S., Piedrahita, A. M., & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en nutrición humana*, 16(1), 25-36. Recuperado a partir de <https://revistas.udea.edu.co/index.php/nutricion/article/view/20310>

4. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, NECRÓTICA Y APOPTÓTICA DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Annona muricata*, *A. cherimola* Y *A. purpurea* EN LA LÍNEA CELULAR TUMORAL MDA-MB-231 DE CÁNCER DE MAMA

4.1. Resumen

El cáncer es una enfermedad que surge por alteraciones genéticas y representa uno de los problemas de salud pública más graves en todo el mundo. El costo de los tratamientos convencionales y los efectos secundarios de los fármacos utilizados, repercuten negativamente en la calidad de vida de las personas que lo padecen. Esto ha fomentado el uso de extractos de plantas y sus metabolitos como fuentes alternativas de compuestos activos con actividad anticancerígena para su tratamiento. Es sabido que algunas plantas se han utilizado con fines medicinales y que han sido fuente de sustancias de uso etnofarmacológico, sin embargo, en México solo se ha estudiado al 5% de las plantas medicinales con este fin. La valoración *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer, permite explorar la actividad biológica de extractos en la búsqueda de moléculas con potencial anticancerígeno. Al respecto, las especies de Anonáceas se caracterizan por la presencia de sustancias bioactivas en hojas, raíz, frutos y semillas, en las que se han identificado algunos usos medicinales como la actividad citotóxica y antitumoral. Con los antecedentes descritos, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de extractos metanólicos de pulpa, cáscara, semillas y hojas de *Annona muricata*, *A. cherimola* y *A. purpurea*, en la línea celular tumoral MDA-MB-231 de cáncer de mama. Los resultados obtenidos establecieron que solo los extractos de semillas de las tres especies presentaron actividad antiproliferativa, disminuyendo significativamente el número celular en las concentraciones utilizadas (IC_{50} de 47.76, 26.32 y 12.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Con respecto a la actividad citotóxica (actividad necrótica), los tres extractos metanólicos de semillas no presentaron actividad necrótica de forma significativa, pero indujeron a las células tumorales a una muerte apoptótica, lo que sugiere que estos extractos, tienen actividad antiproliferativa, baja actividad necrótica y son inductores de muerte celular apoptótica.

Palabras clave: Extractos, *Annona*, antiproliferativa, necrosis, apoptosis.

Tesis de Doctorado en Ciencias, en Horticultura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Carlos Raúl López Martínez

Director de Tesis: Dra. María del Rosario García Mateos

ANTIPROLIFERATIVE, NECROTIC AND APOPTOTIC ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACTS FROM *Annona muricata*, *A. cherimola* AND *A. purpurea* IN MDA-MB-231 BREAST TUMOR CELL LINE

Abstract

Cancer is a disease that is caused by genetic alterations and represents one of the most serious public health problems worldwide. The cost of conventional treatments and the secondary effects of the medicines used have a negative impact on the quality of life of the people who suffer from it. This has promoted the use of plant extracts and their metabolites as alternative sources of active compounds with anticancer activity for its treatment. It is known that some plants have been used for medicinal purposes and have been a source of substances for ethnopharmacological use; however, in Mexico only 5% of medicinal plants have been studied for this purpose. The *in vitro* evaluation on cancer cell lines allows exploring the biological activity of extracts in the search for molecules with anticancer potential. In this sense, *Annonaceae* species are characterized by the presence of bioactive substances in leaves, roots, fruits and seeds, in which some medicinal uses have been identified, such as cytotoxic and antitumor activity. With the described antecedents, the objective of the present work was to evaluate the antiproliferative, necrotic and apoptotic activity of methanolic extracts of pulp, peel, seeds and leaves of *Annona muricata*, *A. cherimola* and *A. purpurea*, in the breast cancer tumor cell line MDA-MB-231. The results obtained established that only the seed extracts from the three species presented antiproliferative activity, significantly decreasing cell number at the concentrations used (IC_{50} of 47.76, 26.32 and 12.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). Concerning cytotoxic activity (necrotic activity), the three methanolic seed extracts did not show significant necrotic activity, but induced tumor cells to apoptotic death, suggesting that these extracts have antiproliferative activity, low necrotic activity and are inducers of apoptotic cell death.

Keywords: Extracts, *Annona*, antiproliferative, necrosis, apoptosis.

Doctoral Thesis in Science, in Horticulture, Fitotecnia Department. Universidad Autonoma Chapingo

Author: Carlos Raúl López Martínez

Advisor: Dr. María del Rosario García Mateos

4.2. Introducción

El término cáncer se designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo (OMS, 2021). Es una enfermedad provocada por células que se multiplican sin control y de manera autónoma (Garza Salazar & Juárez Sánchez, 2013); lo que conduce a la formación de agregados llamados tumores que crecen dañando tejidos vecinos, se nutren del organismo y alteran su fisiología (Sánchez, 2013). Los tumores se pueden considerar como benignos o malignos. Los tumores malignos que son capaces de invadir el tejido normal adyacente y propagarse por el cuerpo (metástasis), se les denomina propiamente como cánceres y es su capacidad para invadir y dar lugar a metástasis lo que convierte al cáncer en algo peligroso (Cooper & Hausman, 2007).

Esta enfermedad es uno de los problemas de salud pública más graves en todo el mundo, por lo que surge la necesidad urgente de obtener nuevos fármacos. Esto ha fomentado el uso de extractos de plantas y sus metabolitos como fuentes de compuestos activos (Newman & Cragg, 2016). El interés por estas sustancias naturales es cada vez mayor debido a su potencial como fuentes de compuestos anticancerígenos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 80% de la población mundial depende de las medicinas tradicionales para satisfacer sus necesidades primarias de atención sanitaria. Por lo que la investigación fitoquímica que se ha realizado a partir de la información etnofarmacológica constituye el enfoque eficaz en el descubrimiento de nuevos agentes anti-infecciosos a partir de plantas superiores (Pieme et al., 2014).

Las plantas siguen siendo ampliamente utilizadas con fines medicinales por los pueblos indígenas de México, se ha evaluado la actividad biológica de muchos derivados de plantas y se ha demostrado su importancia medicinal (Alonso-Castro, et al., 2011). Actualmente, nuevas especies de plantas son fuentes de información para el descubrimiento de sustancias con importante actividad biológica de uso etnofarmacológico (Frías Tamayo et al., 2016). De acuerdo con

la Secretaría de Salud, el 90% de la población mexicana ha optado por alguna de las 4 500 plantas medicinales de México por lo menos una vez en su vida, de las cuales sólo se ha hecho análisis farmacológico de las sustancias que contienen al 5% del total de esas plantas (SEMARNAT, 2021).

La familia *Annonaceae* se caracteriza por la presencia de numerosos metabolitos en hojas, raíz, frutos y semillas (García et al., 2014); comprende cerca de 2 500 especies agrupadas entre 130 y 140 géneros distribuidos en las regiones con clima tropical y subtropical. El género *Annona* spp., consta de aproximadamente 120 especies que se caracterizan por el valor económico de sus frutos (González Vega, 2013); la mayoría de ellas se localizan en áreas naturales y otras más se cultivan en huertos comerciales y de traspatio (Agustín & Ledesma, 2014).

Annona muricata es una especie de planta tropical conocida por su fruto comestible que tiene algunos beneficios medicinales, pero también algunos efectos tóxicos. En las regiones tropicales se han identificado usos medicinales tradicionales de *A. muricata* para tratar diversas afecciones como la fiebre, el dolor, las enfermedades respiratorias y cutáneas, los parásitos internos y externos, las infecciones bacterianas, la hipertensión, la inflamación, así como la diabetes y el cáncer. Mediante estudios *in vitro*, los extractos y fitoquímicos de *A. muricata* se han caracterizado como antimicrobianos, antiinflamatorios, antiprotozoarios, antioxidantes, insecticidas, larvicidas y citotóxicos para las células tumorales (Coria-Téllez, 2018). *Annona cherimola*, es apreciada por sus valores medicinales y nutricionales aprovechados por indígenas antes del descubrimiento del Continente Americano. Presenta algunas propiedades como insecticidas, pesticidas, antibacterial, actividad citotóxica y antitumoral. Esta especie también es conocida como planta medicinal y se plantea que el té elaborado a partir de sus hojas es relajante, así como que sus frutos poseen efecto laxante y garantizan beneficios a la digestión (González Vega, 2013). Algunas de sus aplicaciones terapéuticas son para tratar la insuficiencia cardiaca, gastritis y control de obesidad (Gayoso Bazán & Chang Chávez,

2017). El empleo de diversas partes de la planta de *Annona purpurea* en la medicina tradicional es sumamente variado, se usa en algunos malestares como fiebre, dolor de cuerpo, dolor de cabeza y diarrea, así como para controlar la diabetes, bajar la presión arterial y para tratar enfermedades respiratorias. Esta especie posee diversos principios activos, como acetogeninas y alcaloides que son moléculas de particular interés porque presentan actividad insecticida, antimicrobiana, antifúngica, antiparasitaria, citotóxica y antitumoral (Luna-Cazáres & González-Esquinca, 2015). No obstante el uso de estas plantas para tratar los diferentes padecimientos o enfermedades, aún no se ha comprobado científicamente su posible actividad anticancerígena.

La valoración *in vitro* sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos permite explorar la actividad biológica de productos aislados de diferentes fuentes como primer tamizaje en búsqueda de moléculas con potencial actividad anticancerígena (Escobar & Aristizábal, 2010). Las líneas celulares constituyen una de las principales herramientas en la investigación médica y biológica (Allen et al., 2016). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de extractos metanólicos de *Annona muricata*, *A. cherimola* y *A. purpurea*, en la línea celular tumoral MDA-MB-231 de cáncer de mama.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Material vegetal

Frutos y hojas de guanábana (*Annona muricata*), chirimoya (*A. cherimola*) y chincuya (*A. purpurea*), sin daños visibles, fueron colectados aleatoriamente en diferentes estados de la República Mexicana: guanábana en la localidad Cofradía de Morelos municipio de Tecomán en el estado de Colima, chirimoya en el municipio de Tlalnepantla en el estado de Morelos y chincuya en la comunidad de Las Salinas municipio de Chicomuselo en el estado de Chiapas. Las muestras se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada; de los frutos se separó la pulpa, la cáscara y las semillas, todo el material se congeló a -20 °C y se liofilizó en un equipo modelo 7670520

(LABCONCO, Kansas, USA) a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 12 Pa, por 24 h. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

4.3.2. Obtención de extractos metanólicos

El material liofilizado de cada especie se molió con un procesador de alimentos y cada muestra se colocó en un cilindro de papel filtro dentro de la cámara de un extractor Soxhlet. La extracción se hizo manteniendo en recirculación metanol (99.8%) a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 h. Cada extracto se concentró al vacío en un rotavapor Büchi R-210 para obtener el extracto crudo, en una estufa a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ se llevó a sequedad por 24 h y se determinó el rendimiento. Los extractos se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

4.3.3. Cultivo de células tumorales

Las células de la línea tumoral MDA-MB-231 provenientes de cáncer de mama se cultivaron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pyrex, USA), con 10 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*; Microlab, Mex.) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina, con rojo de fenol, al 5% de suero neonato bovino (SNB) previamente desactivado a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. El cultivo se mantuvo en una incubadora (Nuair US Autoflow) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 (dióxido de carbono) y una atmósfera húmeda a saturación. Las células se utilizaron cuando se observó el desarrollo de una saturación entre el 60 y 70% en las cajas Petri.

4.3.4. Preparación de extractos para estímulo de células

Para determinar la cantidad requerida de extracto para disminuir en un 50% la densidad celular (IC_{50}) se realizaron diluciones seriadas, de la siguiente manera: se prepararon soluciones stock con 5 mg de cada extracto solubilizados en 125 μL de Dimetil sulfóxido (DMSO). El DMSO se utilizó en todos los ensayos para comprobar que el efecto en las células era causado por los extractos y no por el vehículo usado para disolverlos. En tubos Eppendorf de 1.5 mL se agregaron 5 μL de cada stock y 995 μL de RPMI-1640, sin rojo de fenol, al 5% de suero neonato bovino (SNB), iniciando a una concentración de $200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ en el primer tubo. Se prepararon 11 tubos Eppendorf de 1.5 mL

adicionales con 500 μL de RPMI-1640 al 5% de SNB cada uno. Del tubo con 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se tomaron 500 μL y se agregaron al segundo obteniendo un volumen de 1 mL, del segundo tubo se tomaron nuevamente 500 μL y se agregaron al siguiente tubo y así sucesivamente hasta obtener un total de 12 diluciones con las concentraciones deseadas (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09 y 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente, se prepararon diluciones puntuales para tener un valor más preciso de la IC_{50} .

4.3.5. Determinación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta en células tumorales

Se sembraron células de la línea tumoral MDA-MB-231 en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 7 000 células por pozo en 100 μL de medio RPMI-1640 al 5% de SNB, cultivadas por 24 h para su adherencia. Posteriormente, se les retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 μL de los extractos metanólicos de las especies de Anonáceas en las concentraciones deseadas, se incubaron por 24 h más a 37 °C. En el control del ensayo se contempló la concentración máxima del vehículo (0.05% DMSO) utilizado en las diluciones preparadas, en el blanco del ensayo solo se cambió el medio RPMI-1640 por medio nuevo.

Transcurridas las 24 h se evaluó el efecto antiproliferativo de los extractos en las células mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta (Kueng et al., 1989). Para esta técnica se retiró completamente el medio de cultivo de las placas y las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% (Sigma Aldrich, USA) en agitación por 15 min; después, se retiró el fijador, las placas se lavaron con agua destilada y se secaron con aire. Se agregaron 50 μL por pozo del colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma Aldrich, USA) en solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM (Sigma Aldrich, USA) pH 6.0 para teñir las células, las placas se mantuvieron en agitación constante por 20 min. Se retiró el cristal violeta a través de lavados con agua destilada hasta retirar el exceso de colorante no asimilado, una vez más las placas se secaron con aire. Se añadieron 100 μL de ácido acético (Sigma Aldrich, USA) al 10% por pozo y se mantuvo en agitación cada placa durante 20 min a temperatura ambiente

para desteñir las células y formar una suspensión homogénea del colorante. Finalmente en un lector de placas de ELISA (Chromate, Awareness Technology Inc.) se tomó la lectura de cada pozo a una absorbancia de 590 nm.

Para calcular la disminución en el número celular (IC_{50}), se graficó el porcentaje de proliferación celular respecto al Control con el programa Microsoft Excel 2010 transformando los datos en porcentaje celular y correlacionándolos con la concentración en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada extracto metanólico. Se realizó una regresión lineal para calcular la reducción del 50% de la población celular (IC_{50}).

4.3.6. Efecto citotóxico a través de la determinación de la actividad de la enzima LDH en sobrenadantes celulares

Se cultivaron células de la línea tumoral MDA-MB-231 en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 7 000 células por pozo con 100 μL de medio RPMI-1640 al 5% de SNB, por 24 h a 37 °C y 5% de CO_2 . Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se trataron con las concentraciones IC_{50} de cada extracto de semilla con medio RPMI-1640 sin rojo de fenol, se incubaron por 24 h más a 37 °C. A las 23 h de haber aplicado el estímulo se agregaron 10 μL de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 15% al control positivo y se incubó una hora más. Cumplidas las 24 h de haber aplicado los estímulos se tomaron 70 μL del sobrenadante de cada pozo y se transfirieron a placas de 96 pozos de fondo cónico, se centrifugaron a 4 000 RPM durante 5 min a una temperatura de 3 °C, se cubrieron con papel aluminio para protegerlas de la luz y se mantuvieron en refrigeración hasta la realización de la prueba.

De las placas de fondo cónico previamente centrifugadas se tomaron 30 μL del sobrenadante y se colocaron en una placa de fondo plano de 96 pozos, se añadió en cada pozo 30 μL del kit para evaluación de LDH (PROMEGA, USA) y la placa se mantuvo en agitación por 15 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. En un lector de placas para ELISA (Chromate, Awareness Technology Inc.) se leyó la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 490 nm, los datos se graficaron con el programa Microsoft Excel 2010, mostrando el porcentaje de actividad de la enzima LDH en el sobrenadante

celular, tomando como referencia al control positivo como un 100% (células tratadas con Tritón X-100).

4.3.7. Evaluación de la morfología celular apoptótica por tinción con DAPI mediante microscopía de fluorescencia

Células de la línea tumoral MDA-MB-231 fueron cultivadas sobre cubreobjetos limpios y estériles en placas de 24 pozos a una densidad de 25 000 células por pozo con un volumen de 200 μL de RPMI-1640 al 5% de SNB durante 24 h a 37 °C y 5% de CO_2 . Transcurrido el tiempo, se trataron las células durante 24 h contemplando las siguientes condiciones: Control (únicamente cambio de medio), Vehículo (DMSO 0.05 $\mu\text{L mL}^{-1}$), Control positivo de muerte apoptótica (Colchicina 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y la concentración IC_{50} de cada extracto de semilla.

Las células adheridas a los cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS filtrado esperando 3 min entre cada lavado. Las células se permearon con Tritón X-100 al 0.2% en PBS a 4 °C (sobre hielo) durante 5 min, nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS. Una vez permeadas las células, se adicionó el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, USA) formando un domo sobre cada cubreobjetos, se dejó incubando en oscuridad por 3 min a temperatura ambiente, después las muestras se lavaron 3 veces con PBS filtrado con una duración de 3 min por lavado y se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (Vector Laboratories, USA). Finalmente las muestras se sellaron con esmalte para uñas, se etiquetaron y se guardaron en oscuridad a -20 °C hasta su observación. Las observaciones de cada preparación se hicieron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 (Nikon, Melville, NY, USA), equipado con una cámara de alta resolución DXM1200F (Nikon, Melville, NY, USA).

4.3.8. Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron procesados con el programa Microsoft Office Excel 2010 para calcular la media y desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey

utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS, 2000) para evaluar las diferencias entre pares de medias con un nivel de significancia $p \leq 0.05$.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Determinación de la proliferación celular en células tumorales

Para determinar si los extractos metanólicos de guanábana, chirimoya y chincuya afectaban el potencial proliferativo de células tumorales de cáncer de mama, cultivos de la línea tumoral MDA-MB-231 fueron tratados con diferentes concentraciones de extractos metanólicos de pulpa, cáscara, semillas y hojas de las tres especies de Anonáceas durante 24 h; el número celular fue evaluado por la técnica de tinción con cristal violeta y se utilizó $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$ de DMSO como vehículo.

Cuadro 7. Efecto antiproliferativo de extractos metanólicos (pulpa, cáscara, semillas y hojas) de tres especies de Anonáceas en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

Especie	Extracto metanólico (Tejido)	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Proliferación celular* (%)
Guanábana	Pulpa	> 100	100.19 ± 3.84 a
	Cáscara	> 100	86.34 ± 6.44 b
	Semillas	47.76	50.00 ± 3.70 a
	Hojas	> 50	68.56 ± 4.68 c
Chirimoya	Pulpa	> 100	76.51 ± 3.45 c
	Cáscara	> 100	113.10 ± 2.33 a
	Semillas	26.32	50.00 ± 5.69 a
	Hojas	> 100	79.02 ± 4.82 a
Chincuya	Pulpa	> 50	95.57 ± 3.00 b
	Cáscara	> 100	89.88 ± 6.02 b
	Semillas	12.39	50.00 ± 5.14 a
	Hojas	> 100	73.89 ± 7.57 b

* Media ± desviación estándar (n=6) de tres ensayos independientes; medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

A pesar de que los extractos provienen de especies del mismo género, la respuesta de las células tumorales es diferente en cuanto a la concentración requerida de extracto para inducir la disminución del 50% en el número celular (IC₅₀) (Cuadro 7, Figuras 19-27). De igual manera se observó que solo los extractos de semilla de las tres especies presentaron actividad antiproliferativa

de manera significativa con una disminución en el número celular, por lo que solo se continuó con la evaluación de estos extractos.

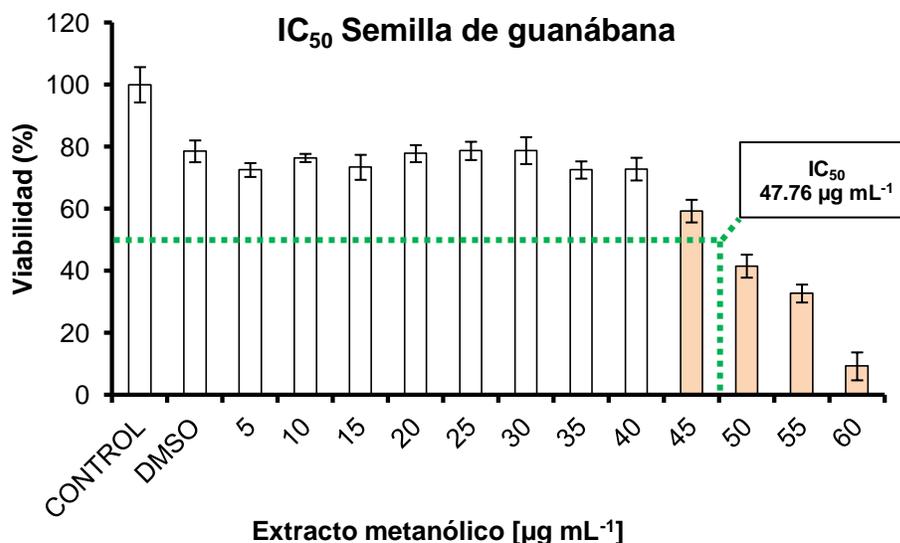


Figura 13. Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de semilla de guanábana sobre células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n=6$); $p \leq 0.05$.

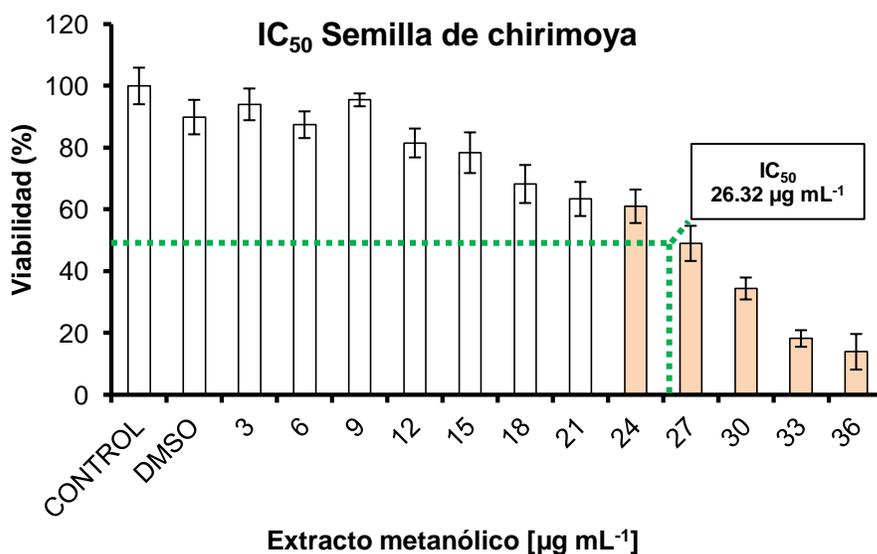


Figura 14. Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de semilla de chirimoya sobre células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n=6$); $p \leq 0.05$.

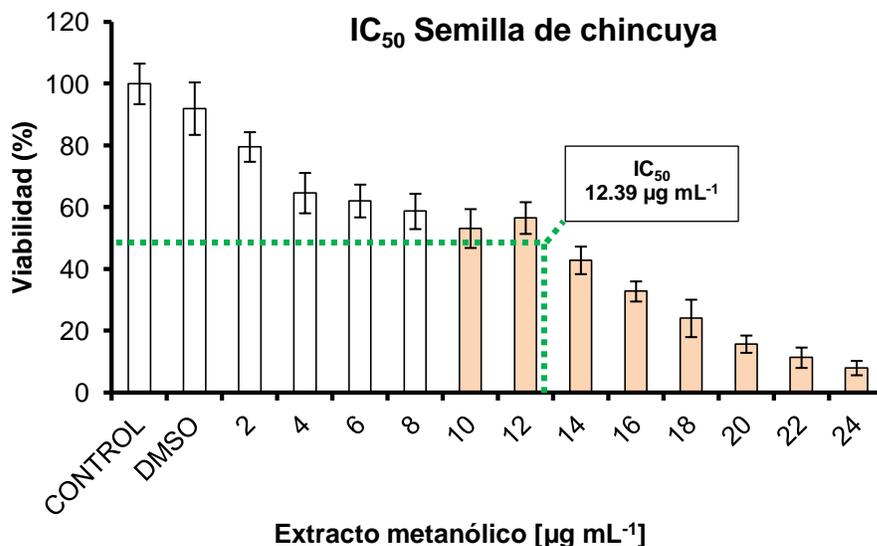


Figura 15. Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de semilla de chincuya sobre células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n=6$); $p \leq 0.05$.

De acuerdo con los resultados observados en las Figuras 13, 14 y 15, se determinó que los extractos metanólicos de las especies de Anonáceas afectaron el potencial proliferativo de la línea celular MDA-MB-231 de manera dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementó la concentración del extracto el número celular disminuyó.

4.4.2. Determinación de citotoxicidad (necrosis) en células tumorales MDA-MB-231

La disminución en el número celular inducida por algún compuesto o extracto se podría deber a una acción citotóxica, que se caracteriza por afectar la integridad de la membrana celular, lo cual es característico de una muerte por necrosis (Agudelo & López, 2010). Para evaluar si los extractos metanólicos de las especies de Anonáceas presentaban actividad citotóxica (necrosis) en las células tumorales de cáncer de mama, cultivos de la línea celular MDA-MB-231 fueron tratados con las concentraciones IC_{50} (47.76, 26.32 y $12.39 \mu\text{g mL}^{-1}$) de los extractos de semilla de guanábana, chirimoya y chincuya, respectivamente,

durante 24 h y se evaluó la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares.

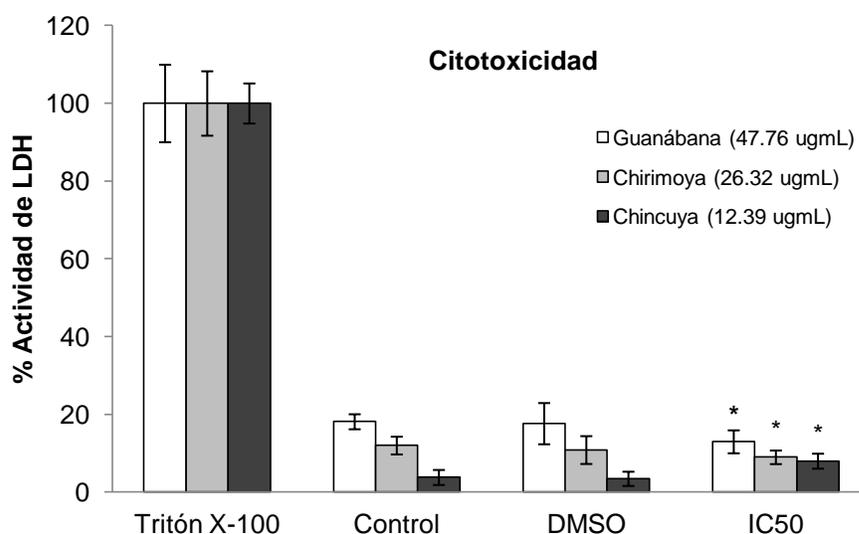


Figura 16. Actividad de LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células MDA-MB-231 tratadas con los extractos metanólicos de semilla de tres especies de Anonáceas. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.

Cuadro 8. Porcentaje de actividad de LDH en células tumorales MDA-MB-231 tratadas con los extractos metanólicos de semillas de Anonáceas.

Especie	Tritón X-100 (%)	Control (%)	DMSO (%)	Extracto de semillas (%)
Guanábana	100 \pm 9.96*	18.14 \pm 1.93	17.65 \pm 5.3	12.98 \pm 2.95
Chirimoya	100 \pm 8.28	12.02 \pm 2.28	10.86 \pm 3.58	9.00 \pm 1.75
Chincuya	100 \pm 5.15	3.81 \pm 1.93	3.46 \pm 1.83	0.23 \pm 1.93

* Media \pm desviación estándar ($n = 6$) de tres ensayos independientes.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 16, Cuadro 8), se observó que los extractos metanólicos de semilla de las tres especies de Anonáceas no presentaron actividad significativa de la enzima LDH en cultivos de células tumorales de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama, lo que sugiere que este tipo de extractos no inducen a las células a una muerte necrótica. Por lo tanto, la actividad antiproliferativa observada en estos extractos se debió a un proceso de muerte diferente a la muerte celular por necrosis.

4.4.3. Evaluación de la morfología celular apoptótica en células tumorales

Cuando las células son inducidas a una muerte apoptótica, presentan algunos cambios en su morfología, como la reducción de sus núcleos, el empaquetado de su contenido citoplasmático, la condensación y fragmentación de la cromatina que se agrupa en varios sectores formando cuerpos apoptóticos. Esto evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte accidental o necrosis. En lugar de hincharse y estallar y, por lo tanto, derramar su contenido intracelular enzimático dañino, hacia el espacio intercelular. De esta manera, pueden ser eficientemente englobadas vía fagocitosis y, consecuentemente, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente (Machado & Concepción, 2012). Para conocer si los extractos metanólicos de semillas de Anonáceas inducían apoptosis en las células tumorales MDA-MB-231. Cultivos de este tipo de células fueron tratadas con la concentración IC_{50} respectiva para cada especie durante 24 h, posteriormente fueron teñidas con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y la morfología celular fue evaluada por microscopía de contraste de fases (Figuras 17 y 18).

Los resultados mostrados en las Figuras 17 y 18, indicaron que los extractos metanólicos de semillas de Anonáceas indujeron en las células tumorales MDA-MB-231 de cáncer de mama un proceso de muerte apoptótica. En el campo claro con iluminación de contraste de fases, se apreció la morfología clásica de las células MDA-MB-231, para las micrografías de las células control y las tratadas con DMSO (vehículo), se observaron células adheridas y extendidas en el piso del plato de cultivo, mostrando forma alargada. Cuando las células se trataron con el inductor de apoptosis colchicina y los extractos metanólicos de Anonáceas, las células se vieron afectadas y su morfología cambió, se observó que redujeron su tamaño, perdieron la adherencia y sus proyecciones citoplasmáticas, en algunas células se observaron alteraciones más avanzadas en forma de cuerpos apoptóticos (flechas negras).

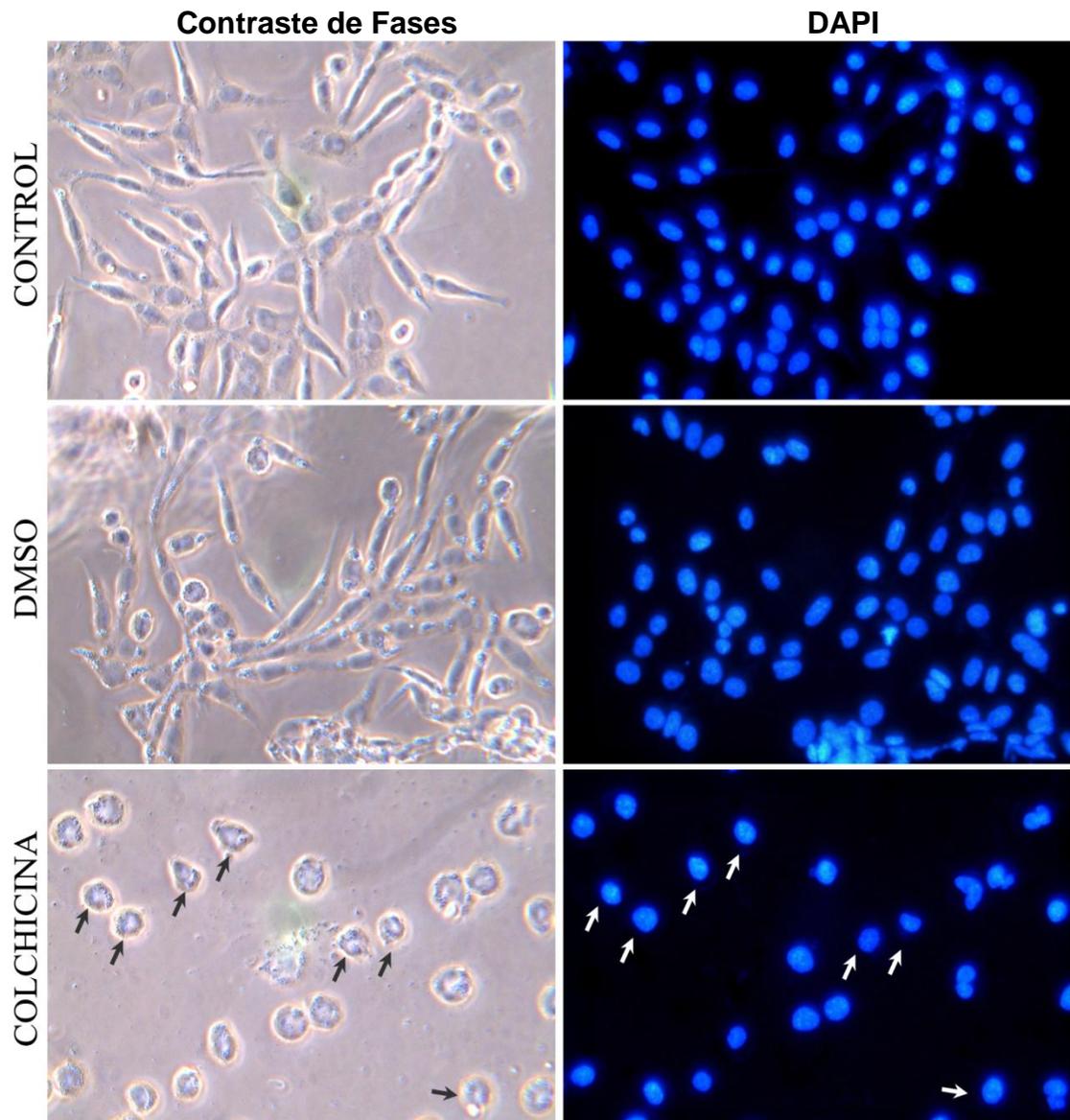


Figura 17. Micrografías ópticas de células MDA-MB-231 con tinción de núcleos con DAPI y contraste de Fases. Control, DMSO y colchicina. Después de ser tratadas con Colchicina se observó la reducción de su tamaño y la formación de cuerpos apoptóticos (flechas negras). También se observaron células en diferentes fases de división, con compactación de la cromatina y del núcleo (flechas blancas). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

La tinción del ADN con el colorante fluorescente DAPI, mostró en las células control y las tratadas con el vehículo (DMSO) la cromatina distribuida en el núcleo celular. Esta tinción también permitió observar aquellas células que están en diferentes fases del proceso de división. En el control positivo para apoptosis inducida con el tratamiento con colchicina, se apreció una

compactación de la cromatina. Este mismo fenómeno y una fuerte compactación del núcleo también fue inducido por los tratamientos con los extractos metanólicos de guanábana, chirimoya y chincuya (flechas blancas), evidenciando morfología correspondiente a la muerte tipo apoptótica.

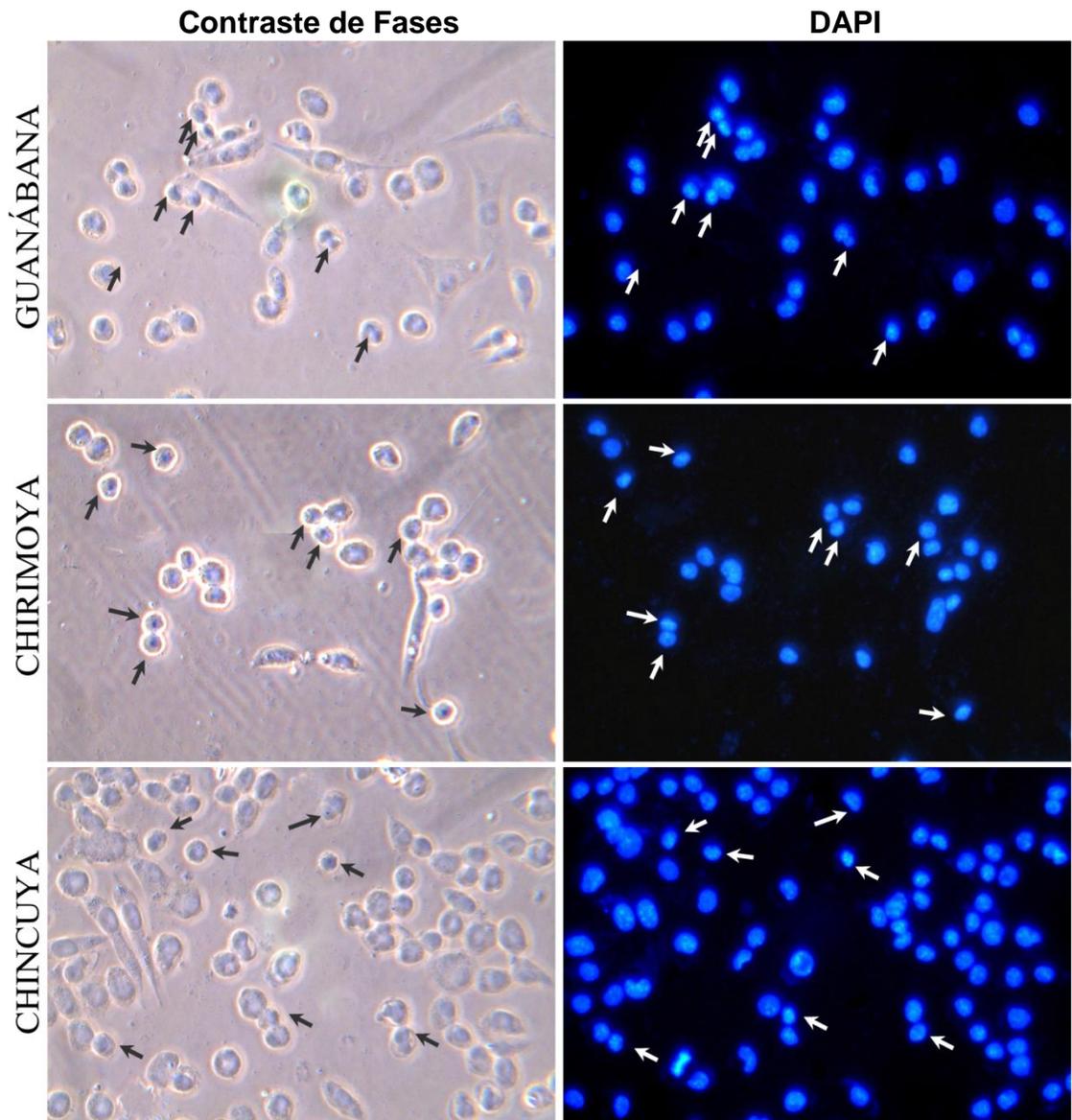


Figura 18. Micrografías ópticas de células MDA-MB-231 con tinción de núcleos con DAPI y contraste de fases. Guanábana, chirimoya y chincuya. Después de ser tratadas con los extractos metanólicos de semillas se observó la reducción de su tamaño y la formación de cuerpos apoptóticos (flechas negras). También se observaron células en diferentes fases de división, con compactación de la cromatina y del núcleo (flechas blancas). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

El cáncer es una enfermedad compleja que surge por alteraciones genéticas que modifican las diversas funciones celulares como proliferación, muerte celular programada y envejecimiento (Soca et al., 2007). El cáncer de mama es un importante problema de salud pública de gran interés e importancia para los médicos de diversas especialidades (Harris et al., 1992). La incidencia de cáncer de mama ha ido en aumento desde 2004, con más de dos millones de casos notificados en todo el mundo en 2018. Alrededor del 80% de todos los casos de pacientes de cáncer de mama tienen una tasa de supervivencia global a 5 años de alrededor del 90% (García-Martínez et al., 2021).

Actualmente, el tratamiento del cáncer con fármacos quimioterapéuticos es muy costoso para la mayoría de pacientes. Por esta razón, es necesario investigar el efecto citotóxico de extractos de plantas a las que se les atribuyen propiedades anticancerígenas, para determinar su potencial como fuente de compuestos antineoplásicos. Los productos naturales han sido la fuente más representativa en la obtención de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer y su enorme contribución se reconoce en el descubrimiento de nuevas moléculas citotóxicas con variados mecanismos de acción (Cendales & Suárez, 2016).

De la familia *Annonaceae* se conocen numerosos metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas diversas: antitumorales, insecticidas, dopaminérgicos, antimaláricos, etc. Esta familia se ha caracterizado especialmente por la presencia de acetogeninas, que son compuestos exclusivos de esta familia y que han resultado ser de gran utilidad terapéutica tanto química como biológicamente (Cortes et al., 2014). Un ejemplo de la utilidad de estas acetogeninas, es la annonicina, que en la célula bloquea el complejo I, que es responsable de convertir NADH a NAD⁺, crea la acumulación de protones a través de la membrana interna mitocondrial, desactivando la habilidad celular para generar ATP mediante una ruta oxidativa, obligando finalmente a la célula a una muerte por apoptosis (Cruz et al., s.f.).

La presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, saponinas y compuestos fenólicos en los extractos de algunas especies de Anonáceas

como *Annona muricata*, son responsables de la actividad antioxidante de la planta, pero también pueden tener responsabilidad en la actividad anticancerígena reportada en estas especies (Pieme et al., 2014). Las hojas de *Annona cherimola* se utilizan en la medicina popular para el tratamiento de diarreas, golpes o torceduras, por su acción antiinflamatoria y debido a su proximidad quimio-taxonomica con otra especie de la familia *Annonaceae*, la guanábana, se les atribuye también actividad contra distintos tipos de cáncer, (Quispe et al., 2009) Los tallos y semillas de *A. cherimola* poseen compuestos tales como alcaloides, terpenoides, flavonoides, ácidos grasos saturados e insaturados, acetogeninas, que han demostrado actividad antitumoral (González Vega, 2013). Diversas partes de la planta de *Annona purpurea*, se han utilizado en la medicina tradicional, debido a que esta especie posee diversos principios activos, como acetogeninas y alcaloides que son moléculas de particular interés por su actividad insecticida, antimicrobiana, antifúngica, antiparasitaria, citotóxica y antitumoral (Luna-Cazáres & González-Esquinca, 2015).

De acuerdo con distintas investigaciones se encontró una alta efectividad de los extractos de algunas especies de Anonáceas para inducir la muerte de células cancerosas. Moghadamtousi, Kadir, Paydar, Rouhollahi, & Karimian (2014), confirmaron que el extracto de acetato de etilo de hojas de *Annona muricata*, induce la liberación de LDH en las células A549 (cáncer de pulmón). Otro estudio hecho por Huamaní, Valdivia, & Oviedo (2016), con el extracto etanólico de hojas de *A. muricata* frente a la línea MCF-7 de cáncer de mama y células mononucleares extraídas de sangre periférica (células normales) que fueron expuestas a diferentes concentraciones del extracto y de 5-FU (fármaco quimioterapéutico: control positivo); reportaron que el extracto es citotóxico para las células tumorales y normales, considerado como no selectivo, sin embargo, únicamente provocó inducción de apoptosis en las células cancerosas; además, fue veinte veces más citotóxico que el control positivo. Haag et al. (2017), determinaron que la actividad antineoplásica de diferentes extractos y fracciones obtenidas de hojas de *Annona cherimola*, en estirpes celulares de

LLC-B, resistentes a terapias habituales, no afectaron significativamente a los linfocitos normales sugiriendo un alto nivel de selectividad y seguridad biológica de los mismos. Hernández-Fuentes et al. (2019), demostraron que las acetogeninas presentes en raíces, hojas y semillas de *A. purpurea* mostraron una importante actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cáncer MSTO-211H, HeLa y HepG2 capaces de provocar la despolarización de la membrana mitocondrial en células enteras, y de inducir la muerte celular mediante apoptosis tardía y necrosis.

El estudio de extractos de especies de la familia *Annonaceae* se puede considerar como una alternativa en la búsqueda de tratamientos para este tipo de enfermedades, beneficiando a las personas que las padecen al reducir los efectos secundarios que provocan las terapias actuales. Los extractos derivados de las plantas, que inhiben significativamente el crecimiento de células neoplásicas ($\geq 50\%$) a bajas concentraciones ($\leq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) son considerados citotóxicos (Mans et al., 2000), por lo que pueden usarse en estudios posteriores contra diferentes cepas de cáncer humano, y de acuerdo a los resultados se pueden llevar a un proceso de purificación para aislar el principio activo (Gomes de Melo et al., 2010). Basado en lo anterior, se dedujo que los extractos metanólicos de semillas de las tres especies de Anonáceas, fueron citotóxicos para las células tumorales MDA-MB-231 de cáncer de mama después de 24 h de tratamiento.

Los resultados obtenidos demostraron que los extractos metanólicos de las especies de Anonáceas (guanábana, chirimoya y chincuya) presentaron actividad antiproliferativa, sin inducir significativamente a una actividad necrótica a las concentraciones de 47.76, 26.32 y 12.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sugiriendo que estos extractos pueden ser utilizados para más estudios en busca de obtener y aislar los componentes activos con propiedades antiproliferativas, citotóxicas e inductoras de apoptosis, con la intención de encontrar un agente de origen natural a partir de estas especies con aplicaciones terapéuticas en la lucha contra el cáncer.

Es importante evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de especies de la familia *Annonaceae* en células no tumorales (linfocitos humanos) con la finalidad de verificar si los extractos tienen un efecto antiproliferativo importante en células normales, para descartar que sean un riesgo de relevancia toxicológica para el sistema inmune al inducir una muerte por apoptosis o necrosis en células de sangre periférica humana de manera significativa que afecten las funciones del organismo.

Se debe considerar que la información disponible sobre el uso de extractos y derivados de las especies de Anonáceas, se basa en investigaciones sobre la actividad anticancerígena en cultivos celulares (*in vitro*) y con principios activos extraídos de partes de la planta, principalmente semillas y hojas, lo que limita la posibilidad de que partes frescas, como el fruto, o sus extractos puedan tener el efecto que se le atribuye (Morón Rodríguez et al., 2010). Por lo tanto, se debe tener precaución en el uso y consumo de estas especies con fines terapéuticos.

4.5 Conclusiones

Los extractos metanólicos de semillas del fruto de guanábana, chirimoya y chincuya disminuyeron 50% el número celular en células tumorales MDA-MB-231 de cáncer de mama a concentraciones de 47.76, 26.32 y 12.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Los extractos metanólicos de semillas de las tres especies de Anonáceas estudiadas no causaron muerte por necrosis en las células tumorales tratadas, pero sí provocaron muerte por apoptosis. Los extractos metanólicos de pulpa, cáscara y hojas de las tres especies de Anonáceas no afectaron el potencial proliferativo de células tumorales MDA-MB-231 provenientes de cáncer de mama.

4.6. Literatura citada

- Agudelo, M. E. R., & López, M. R. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia*, 23(2), Pág-166.
- Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014). Conservación y uso de los recursos genéticos de *Annonaceae* en México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 118-124.

- Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S., & Westermark, B. (2016). Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Science Translational Medicine*, 8(354), 354re3-354re3.
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Domínguez, F., & García-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972.
- Cendales, D. R. M., & Suárez, L. E. C. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(3), 124-134.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The cell: a molecular approach* (Vol. 4). Washington, DC: ASM press.
- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of chemistry*, 11(5), 662-691.
- Cortes, D., Moreno, L., Párraga, J., Galán, A., & Cabedo, N. (2014). Nuevos fármacos inspirados en Anonáceas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPE1), 22-31.
- Cruz, J. L. M., Hernández, R. G., Ramos, B. P. L., Raudales, J. E. R., & Estrada, C. A. R. (s.f.). Usos terapéuticos de la guanábana (*Annona muricata*). *XII Encuentro, Participación de la Mujer en la Ciencia*.
- Escobar, L., & Aristizábal, F. A. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, 17(2), 173-180.
- Frías Tamayo, J., Ramírez Peña, G., de la Paz Lorente, C., Herrero Pacheco, C., & Acosta Campusano, Y. (2016). *Sechium edule* (jacq) sw: potencia fitoterapéutica como agente antibacteriano. *MediSur*, 14(6), 664-670.
- García, J. H. G., Ocampo, D. M., Ocampo, R., & Gutiérrez-Cárdenas, P. D. A. (2012). Actividad tóxica de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimolioides* (annonaceae) sobre *Artemia Salina*. *Boletín Científico Museo Historia Natural*, 17-22.
- Garcia-Martinez, L., Zhang, Y., Nakata, Y., Chan, H. L., & Morey, L. (2021). Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. *Nature communications*, 12(1), 1-14.
- Garza Salazar, J. G., & Juárez Sánchez, P. (2013). *El cáncer*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 183 pp.
- Gayoso Bazán, G., & Chang Chávez, L. (2017). *Annona cherimola* Mill. "chirimoya" (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa*, 24(2), 619-634.

- Gomes de Melo, J., de Sousa Araújo, T. A., e Castro, T. N. D. A., Lyra de Vasconcelos Cabral, D., Do Desterro Rodrigues, M., Carneiro do Nascimento, S., & De Albuquerque, U. P. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, 15(12), 8534-8542.
- González Vega, M. E. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 52-63.
- Haag, G. O., Valle, M. E. D., Scioli Montoto, S., Ruiz, M. E., Rosella, M. A., & Marín, G. H. (2017). Determinación de compuestos polifenólicos, terpénicos y perfil cromatográfico en distintos sistemas de *Annona cherimola* Mill. "chirimoya" (*Annonaceae*). *Revista Científica SAFyT-AMA*, 1.
- Harris, J. R., Lippman, M. E., Veronesi, U., & Willett, W. (1992). Breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 327(5), 319-328.
- Hernández-Fuentes, G. A., García-Argáez, A. N., Peraza Campos, A. L., Delgado-Enciso, I., Muñoz-Valencia, R., Martínez-Martínez, F. J., & Parra-Delgado, H. (2019). Cytotoxic Acetogenins from the Roots of *Annona purpurea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1870.
- Huamaní, P. A. M., Valdivia, B. R. M., & Oviedo, R. D. N. (2016). Efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L. "Guanábana" frente a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. *Investigación, Innovación y Desarrollo*, 17(1), 73.
- Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical biochemistry*, 182(1), 16-19.
- Luna-Cazáres, L. M., & González-Esquínca, A. R. (2015). La chincuya (*Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal): una planta mesoamericana. *Anonáceas*, 229.
- Machado, J. P., & Concepción, A. E. L. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. *Medimay*, 18(2), 138-153.
- Mans, D. R., Da Rocha, A. B., & Schwartzmann, G. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist*, 5(3), 185-198.
- Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Paydar, M., Rouhollahi, E., & Karimian, H. (2014). *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- κ B. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1-13.
- Morón Rodríguez, F. J., Morón Pinedo, D., & Nodarse Rodríguez, M. (2010). Valoración de la evidencia científica para recomendar *Annona muricata* L. (guanábana) como tratamiento o prevención del cáncer. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(3), 169-181.

- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-661.
- OMS. 2021. Cáncer. *Organización Mundial de la Salud*. Nota descriptiva. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Pieme, C. A., Kumar, S. G., Dongmo, M. S., Moukette, B. M., Boyoum, F. F., Ngogang, J. Y., & Saxena, A. K. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1-10.
- Quispe, A., Zavala, D., Rojas, J., Posso, M., & Vaisberg, A. (2006). Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 23(4), 265-269.
- Sánchez, N. C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553-562.
- SAS, Institute. (2000). *SAS/STAT. User's Guide. Release 9.1.3* ed. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina. USA.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2021). *Plantas medicinales de México*. La botica más surtida del país, enriquecida con la sabiduría de pueblos y comunidades indígenas. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>
- Soca, P. E. M., Herrera, A. A., de León, D. P., Márquez, H. S., & Rodríguez, H. P. (2007). El cáncer una enfermedad genética. *Correo Científico Médico de Holguín*, 11(3), 3.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Se observaron diferencias en la concentración de fenoles y flavonoides totales, así como en la actividad antioxidante entre las especies de Anonáceas estudiadas. La pulpa de chirimoya destacó de las otras especies por su contenido de proteína cruda, carbohidratos y minerales evaluados (Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, Mn), también la concentración de los compuestos fenólicos y el ácido ascórbico (vitamina C) fue superior en esta especie. Por otro lado, la actividad antioxidante de estas especies se asoció a la presencia de los compuestos fenólicos y al ácido ascórbico de acuerdo a la correlación de Pearson. Se consideró al extracto de pulpa de guanábana como muy tóxico, con una CL_{50} de 67.5 ppm y a los extractos de semilla de chirimoya y chincuya como extremadamente tóxicos con una CL_{50} de 5 ppm al ser evaluados mediante el bioensayo en *Artemia salina*.

Solo los extractos metanólicos de semillas de guanábana, chirimoya y chincuya presentaron actividad antiproliferativa sobre células de la línea MDA-MB-2321 de cáncer de mama, disminuyendo el número celular en 50% a las concentraciones de 47.76, 26.32 y 12.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A diferencia de los extractos de pulpa, cáscara y hojas que no afectaron el potencial proliferativo en este tipo de células.

Los extractos metanólicos de semillas de las tres especies de Anonáceas estudiadas no causaron muerte por necrosis en las células tumorales tratadas, pero si provocaron muerte por apoptosis, por lo tanto, es necesario realizar más estudios para evaluar el efecto antiproliferativo de este tipo de extractos en células no tumorales (linfocitos humanos) para descartar que sean un riesgo de relevancia toxicológica para el sistema inmune que afecten las funciones del organismo. Además, es necesario evaluar si presentan el mismo efecto en otro

tipo de células tumorales con la intención de estudiar más a detalle los elementos responsables de esta actividad.

Se observaron diferencias en la concentración de fenoles y flavonoides totales, así como en la actividad antioxidante entre las especies de Anonáceas estudiadas. La pulpa de chirimoya destacó de las otras especies por su contenido de proteína cruda, carbohidratos y minerales evaluados (Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, Mn), también la concentración de los compuestos fenólicos y el ácido ascórbico (vitamina C) fue superior en esta especie. Por otro lado, la actividad antioxidante de estas especies se asoció a la presencia de los compuestos fenólicos y al ácido ascórbico de acuerdo a la correlación de Pearson. Se consideró al extracto de pulpa de guanábana como muy tóxico, con una CL_{50} de 67.5 ppm y a los extractos de semilla de chirimoya y chincuya como extremadamente tóxicos con una CL_{50} de 5 ppm al ser evaluados mediante el bioensayo en *Artemia salina*.

6. APÉNDICES

6.1. Figuras no mostradas en el texto

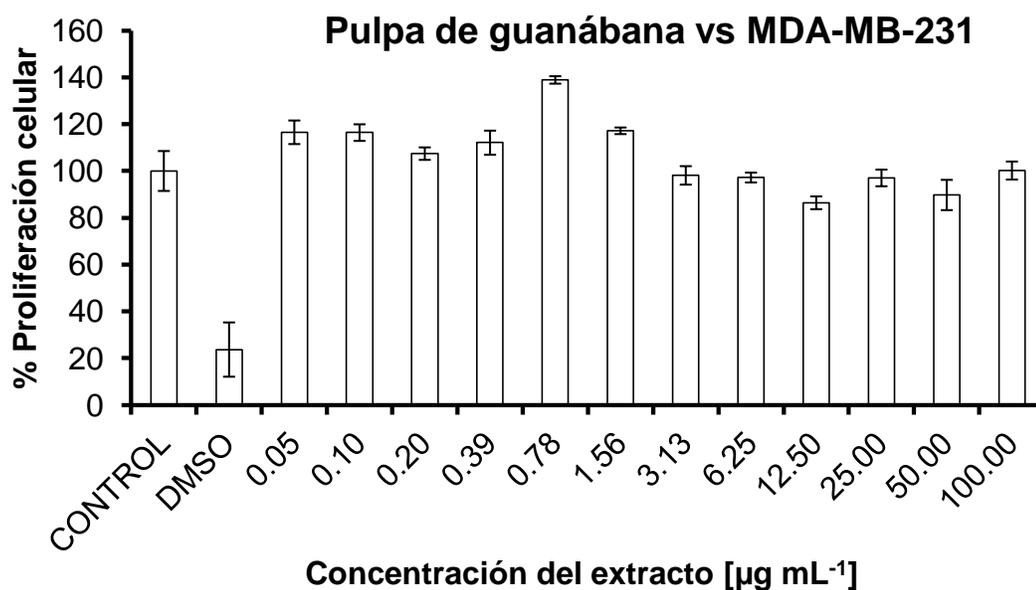


Figura 19. Efecto del extracto metanólico de pulpa de guanábana a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, 5 µL mL⁻¹. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media ± desviación estándar (n = 6); $p \leq 0.05$.

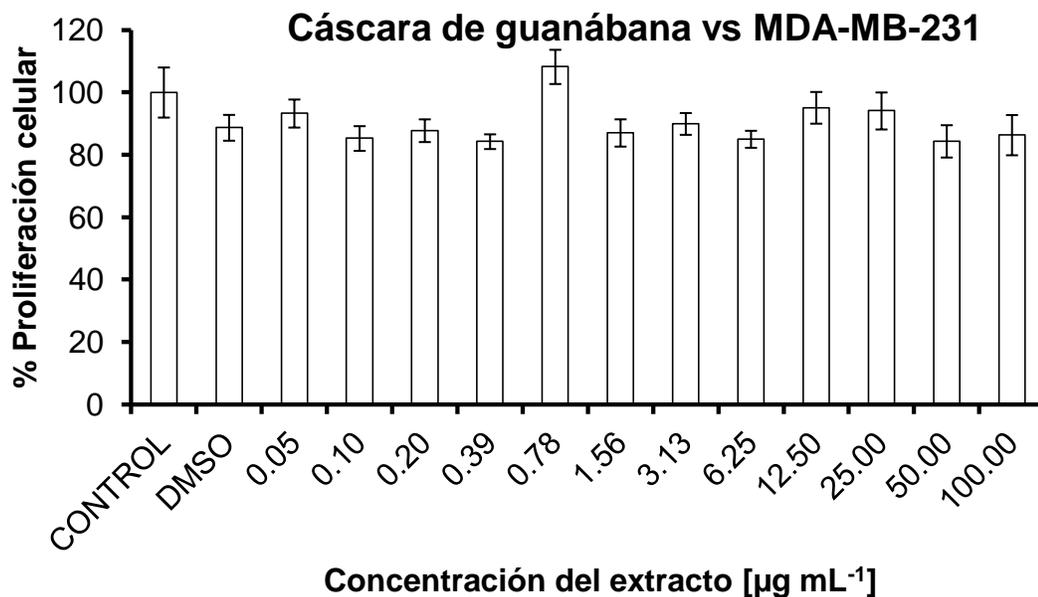


Figura 20. Efecto del extracto metanólico de cáscara de guanábana a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.

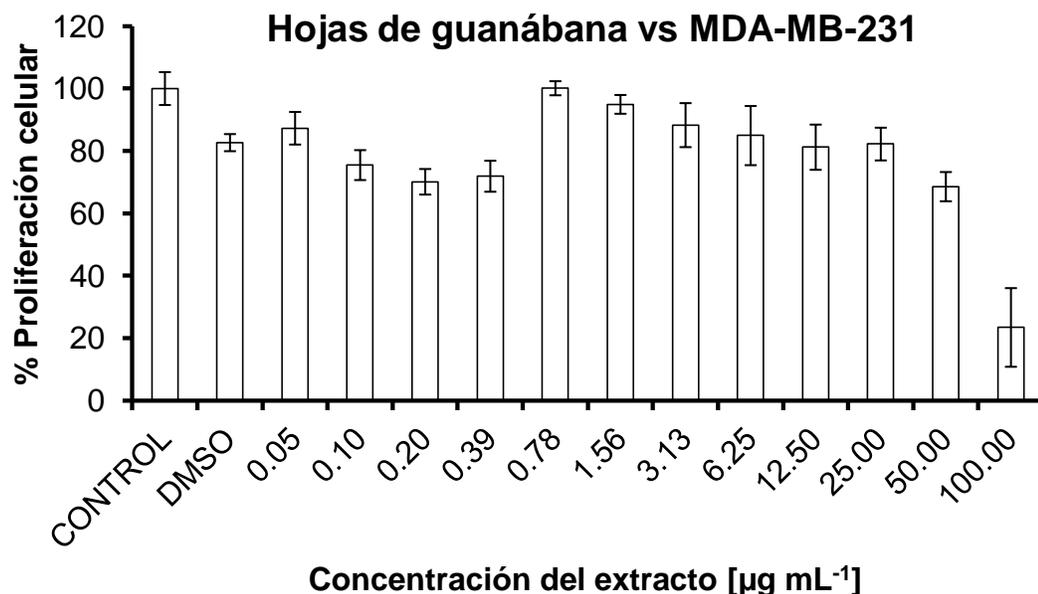


Figura 21. Efecto del extracto metanólico de hojas de guanábana a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.

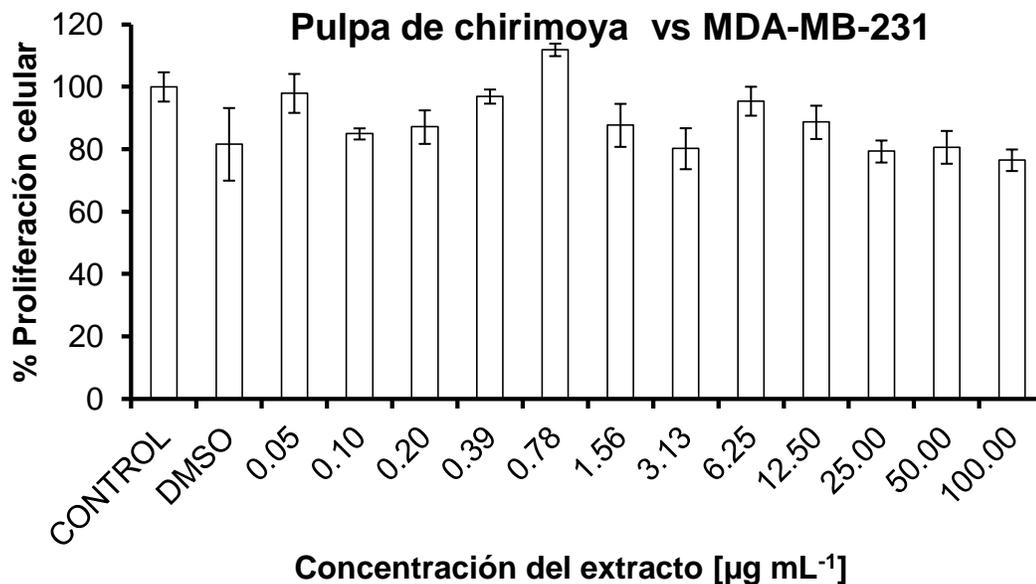


Figura 22. Efecto del extracto metanólico de pulpa de chirimoya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.

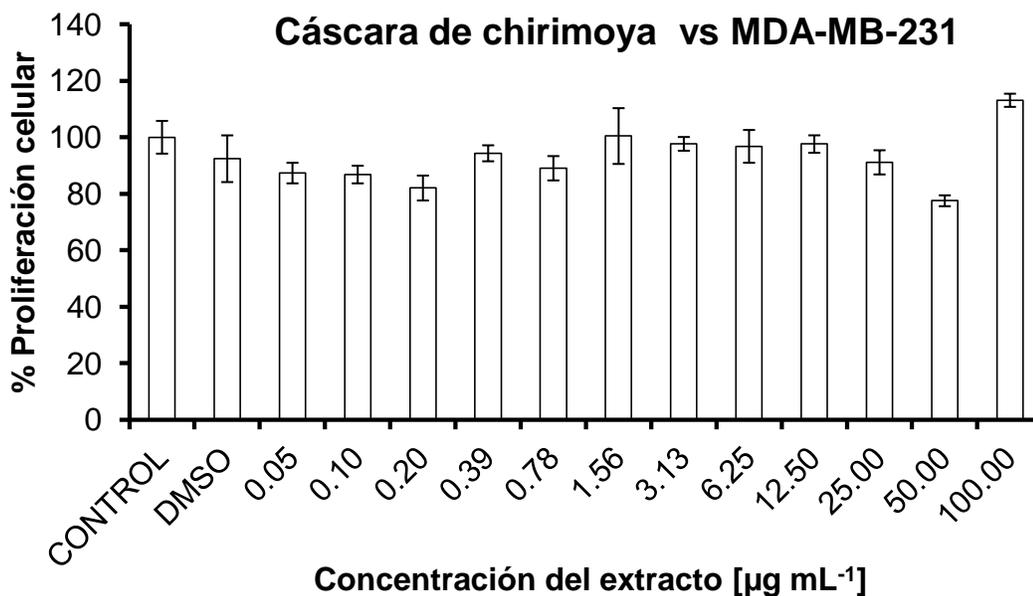


Figura 23. Efecto del extracto metanólico de cáscara de chirimoya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.

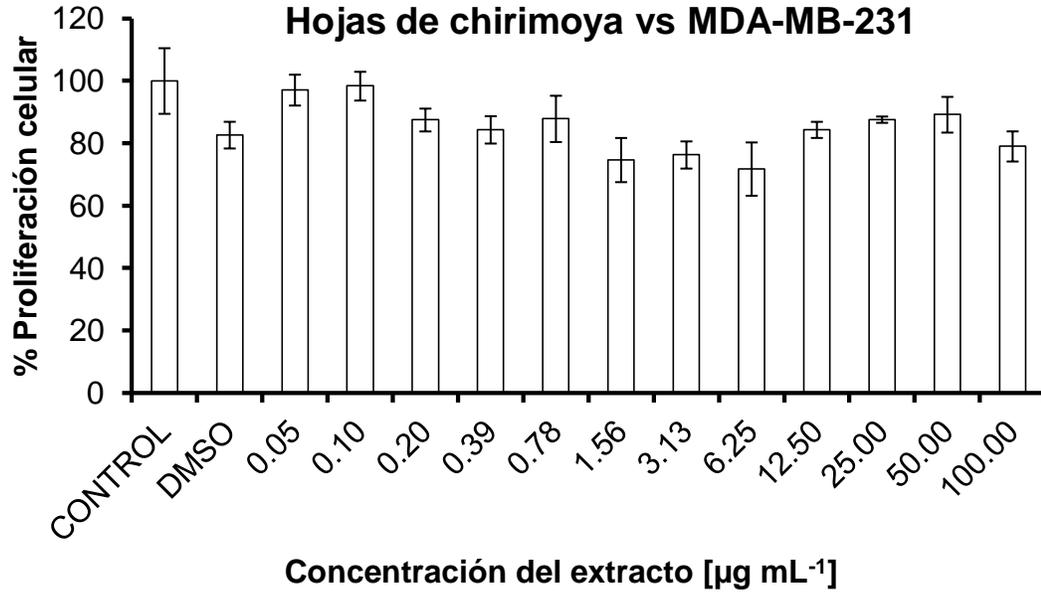


Figura 24. Efecto del extracto metanólico de hojas de chirimoya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.

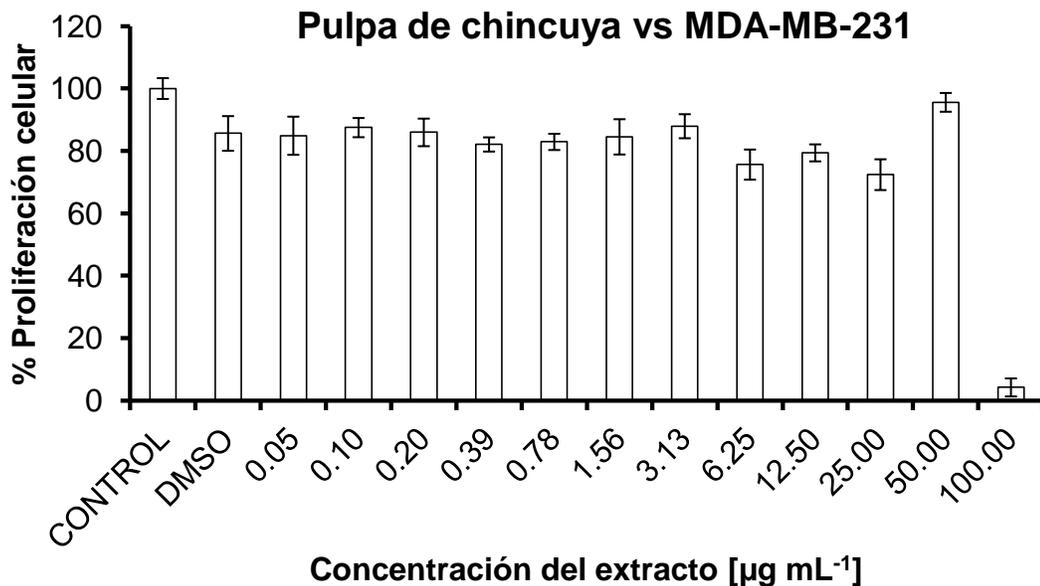


Figura 25. Efecto del extracto metanólico de pulpa de chincuya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.

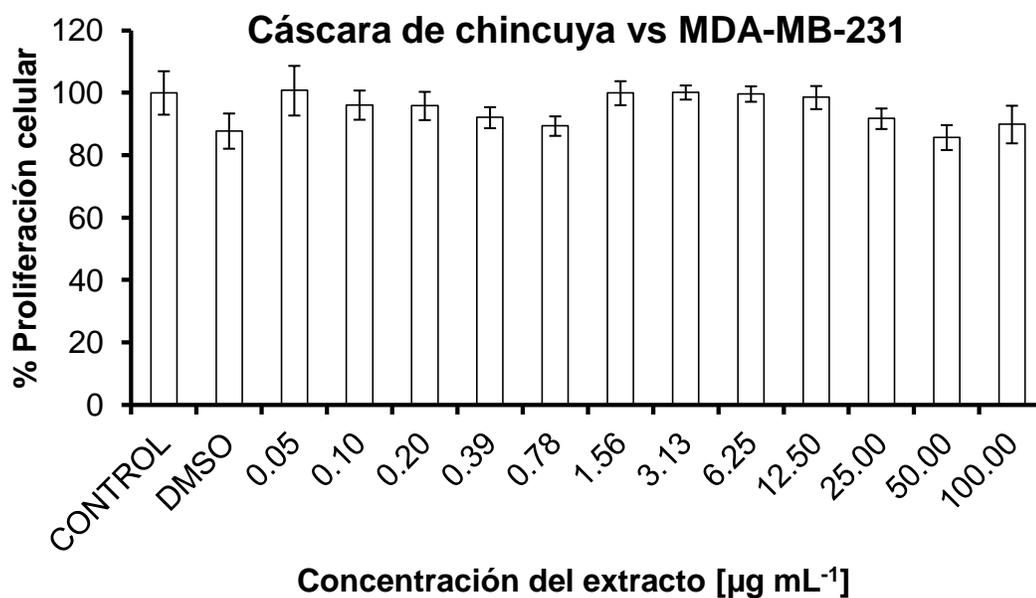


Figura 26. Efecto del extracto metanólico de cáscara de chincuya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.

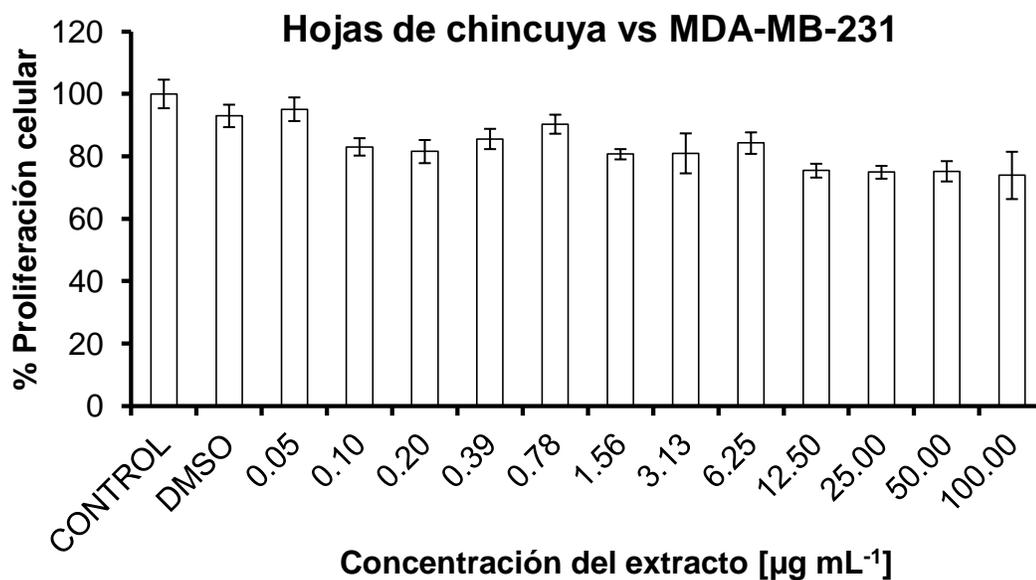


Figura 27. Efecto del extracto metanólico de hojas de chincuya a diferentes concentraciones en células MDA-MB-231; DMSO, $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se reportaron como la media \pm desviación estándar ($n = 6$); $p \leq 0.05$.