

Artículo Original / Original Article

Actividad biológica de los aceites de semillas de *Annona muricata* y *A. cherimola*

[Biological activity of *Annona muricata* and *A. cherimola* seed oils]Orfa A. España¹, Andrés F. Ortiz², Soany Eraso³, Andrés M. Hurtado³ y Jaqueline Mena¹¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia²Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia³Departamento de Procesos Industriales, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

Reviewed by:
Patricia Landázuri
Universidad del Quindío
Colombia

Luigi Milella
Basilicata University
Italy

Correspondence:
Orfa A. ESPAÑA:
alespa1412@udenar.edu.co

Section Biological activity

Received: 21 September 2021
Accepted: 14 February 2022
Accepted corrected: 8 April 2022
Published: 30 May 2023

Citation:
España OA, Ortiz AF, Eraso S,
Hurtado AM, Mena J
Actividad biológica de los aceites de semillas de
Annona muricata y *A. cherimola*
Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat
22 (3): 360 - 376 (2023).
<https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.3.27>

Abstract: Vegetable extracts have become important raw materials for food, pharmaceutical and cosmetic industries because of their biological potential. The objective of this study was to assess the biological activity of vegetable oils (VOs) extracted from *Annona muricata* and *A. cherimola*. Antibacterial activity was determined by plaque microdilution. The assessment of hemolytic inhibition and morphological alterations was performed in erythrocyte cultures by spectrophotometry and microscopy, respectively. Neutrophils were used to analyze both cytotoxicity by the trypan blue exclusion method and the effect on gelatinase granule release (MMP9) via zymography. Whereas VOs showed a mild antibacterial activity (900 µL/mL) on five ATCC bacterial strains, they had no effect on multi-resistant bacteria. In addition, VOs inhibited hydrogen peroxide induced hemolysis and did not cause erythrocyte cell abnormalities. Cytotoxicity was not detected in neutrophils and VOs were able to stimulate MMP9 release. These results support their potential use by the food and cosmetic industries due to their antioxidant, non-cytotoxic, and slight antibacterial capacities

Keywords: Annonaceae; Vegetable oils; Biological potential; Antibacterial activity; Supercritical fluids

Resumen: Los extractos vegetales adquieren importancia en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, por su potencial biológico. El objetivo de este estudio fue evaluar actividad biológica de los Aceites Vegetales (AV) de semillas de *Annona muricata* y *A. cherimola*. La actividad antibacteriana se determinó mediante microdilución en placa; en cultivo de eritrocitos se evaluó inhibición hemolítica por espectrofotometría y alteraciones morfológicas por recuento microscópico; en neutrófilos se evaluó citotoxicidad por método de exclusión con azul de tripán, y el efecto sobre liberación de gránulos de gelatinasa (MMP9) mediante zimografía. Los AV presentaron actividad antibacteriana leve (900 µL/mL) en cinco cepas ATCC, pero no en bacterias multirresistentes; inhibieron la hemólisis inducida por peróxido de hidrogeno; no generaron deformaciones eritrocitarias; no se evidenció citotoxicidad en neutrófilos y estimularon la liberación de MMP9. Los resultados podrían sustentar el uso potencial de estos AV en la industria alimenticia o cosmética, gracias a su capacidad antioxidante, no citotóxica y levemente antibacteriana.

Palabras clave: Anonáceas; Aceites vegetales; Potencial biológico; Actividad antibacteriana; Fluidos supercríticos

INTRODUCCIÓN

Las plantas son un recurso valioso en los sistemas de salud en los países en desarrollo, varias se han utilizado ancestralmente en diferentes culturas para tratar diversas enfermedades (Villarreal-Ibarra *et al.*, 2014). La población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención básica de salud y gran parte de los tratamientos caseros implican el uso de extractos de plantas o sus principios activos (de Mera *et al.*, 2019). Gran parte de la bioprospección se ha centrado en la búsqueda de compuestos con alguna actividad biológica (Torres y Velho, 2009), así el caso de la familia de las anonáceas, frutas exóticas cultivadas en las regiones tropicales, con aproximadamente 70 especies entre las que se encuentran *Annona muricata* (guanábana) y *A. cherimola* (chirimoya), frutas utilizadas en la elaboración de jugos, mermeladas y dulces, entre otros, su uso genera una considerable cantidad de residuos como cascaras y semillas, las cuales normalmente son eliminadas en el relleno sanitario y en ocasiones utilizadas como abono orgánico (Ordoñez-Santos *et al.*, 2014).

Muchos de los análisis que se realizan con los extractos, están enfocados en determinar su capacidad antimicrobiana, antioxidante o antiinflamatoria, en busca de mitigar graves problemas de salud pública como la resistencia a antibióticos o la prevención de enfermedades crónicas (Shrestha y Dhillon, 2006). El uso de extractos vegetales se ve favorecida por su bajo costo y los escasos efectos colaterales comparados con los generados por el uso de antibióticos o medicamentos convencionales (Hyldgaard *et al.*, 2012). En relación a la actividad antibacteriana la capacidad inhibitoria de extractos vegetales se evalúa tanto en especies Gram negativas como Gram Positivas, aun cuando las primeras presentan mayor resistencia a los antibióticos (Breijyeh *et al.*, 2020). En cuanto a la actividad antiinflamatoria varios estudios toman como modelo a los neutrófilos ya que son las primeras células de respuesta ante procesos infecciosos o inflamatorios y hacen parte de la inmunidad innata modulando la inmunidad adquirida (Mócsai, 2013; Soehnlein *et al.*, 2017), los aspectos evaluados incluyen la liberación de sus gránulos terciarios como los de mieloperoxidasa, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la formación de trampas de ADN (NET's), activación de vías de señalización y gelatinasas entre ellas la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9), una enzima que puede estimular la angiogénesis en células tumorales, facilitando su proliferación y metástasis hacia otros órganos

(Mayadas *et al.*, 2014; Soehnlein *et al.*, 2017). La disfunción del neutrófilo desencadena la inflamación crónica observada en varias enfermedades como la aterosclerosis, enfermedades autoinmunes, alergias y anafilaxia, adicionalmente, participa en la fisiopatología del asma, diabetes Mellitus tipo I, Lupus Eritematoso Sistémico, aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares y cáncer (Carmona-Rivera *et al.*, 2015; Vandooren *et al.*, 2017).

Existen reportes del potencial antibacteriano de diferentes compuestos de extractos vegetales de *A. muricata* (León-Fernández *et al.*, 2019), y de *A. squamosa* (Pinto *et al.*, 2017). Estudios realizados en *A. cherimola* han demostrado que las semillas de esta planta posee acetogeninas responsables de actividad citotóxica, pesticida, antitumoral y antiparasitaria (Castro *et al.*, 2010), se han encontrado efectos inhibitorios de la degranulación por parte de *A. squamosa*, (Yeh *et al.*, 2005). Extractos de hojas, tallos, raíces y semillas de *A. muricata* y *A. cherimola* han presentado efectos prometedores sobre mediadores inflamatorios a través de la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX), la reducción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 1 β y 6 (IL-1 β , IL-6) y óxido nítrico (ON) (Coria-Téllez *et al.*, 2018; Quílez *et al.*, 2018). Se ha determinado capacidad antioxidante de los aceites vegetales (AV) de las semillas de estas plantas, que se asocia a su contenido de vitamina E y compuestos fenólicos (Pantoja-Chamorro *et al.*, 2017). Sin embargo, actualmente, no se conocen estudios que evalúen los efectos estos (AV), sobre bacterias Gram positivas o negativas de interés, su potencial citotóxico, citoprotector o de regulación de algunas funciones del neutrófilo.

El objetivo de este estudio fue evaluar el poder biológico relacionado con la actividad antibacteriana, citotóxica, inhibición hemolítica, determinación de anormalidades morfológicas de eritrocitos y liberación de gránulos de MMP9 de neutrófilos de los AV de semillas de *Annona muricata* (guanábana) y *A. cherimola* (chirimoya), con el fin de determinar su potencial uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental cuantitativo.

Selección y preparación del material vegetal

Las semillas de *A. muricata* fueron suministradas por la empresa Industria de Productos Agroindustriales de Nariño (INPADENA) y las semillas de *A. cherimola* del proveedor "Más fruta" ubicados en la ciudad de San Juan de Pasto (Nariño - Colombia). Se

sometieron a un proceso de segregación, lavado y secado en un horno BINDER Modelo FD 23 Classic Line (USA), 60°C durante 8 horas (Cerón *et al.*, 2012). Posteriormente se redujo su tamaño de partícula en un molino de martillos (HSIAO LIN MACHINE modelo 61060), se determinó el tamaño promedio de partícula de acuerdo a los parámetros establecidos en la NTC 2441 de 1996 con ayuda de la tamizadora modelo (PS-35 serie 1182) y tamices (10-80, A.S.T.M.E.) (Dorado *et al.*, 2016).

Extracción del Aceite de semillas

La extracción del AV se realizó mediante la técnica de Fluidos Supercríticos (FSC) en un equipo SFE-500 (Waters, EEUU), 200 g de cada semilla molida se sometieron a las condiciones óptimas de extracción: de presión 381 bar y temperatura 50°C, flujo de CO₂ constante de 30 g/min y tiempo de extracción de 150 min. Se obtuvo una relación de 22,5 g CO₂/g semilla (Cerón *et al.*, 2016). Los AV obtenidos se filtraron a través de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm de poro, se envasó 1 mL en tubos ependorff estériles color ámbar y se conservaron a 4°C hasta la utilización.

Caracterización de los AV

El análisis de esteroides y tocoferoles se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS), marca Shimadzu QP2010S (Shimadzu Scientific Corporation, Kyoto, Japón), equipado con una columna SHXRI-5MS (Shimadzu), detector selectivo de masas QP2010S (*full scan*) a 70 eV y un inyector *splitless* a una temperatura de 270°C, con fase móvil de Helio UAP a un flujo de 1,0 mL/min. Para el análisis, se tomó 300 µL de cada AV, diluidos en diclorometano grado HPLC. Las soluciones resultantes se agitaron en vortex por 30 segundos y se adicionó sulfato de sodio anhidro para su inyección en el GC-MS. La identificación tentativa de los compuestos de interés se realizó por comparación de los espectros de masas obtenidos con aquellos de las bases de datos NIST y WILEY. Por otra parte, la cuantificación se realizó mediante el

método del estándar interno utilizando como patrón una solución de colesterol 50 ppm (Dorado *et al.*, 2016).

El análisis de ácidos grasos se realizó en el mismo equipo GC-MS, equipado con una columna DB-WAX (JyW Scientific), con un detector selectivo de masas QP2010S (*full scan*) a 70 eV, y un inyector *Split*, temperatura de 280°C, con fase móvil de Helio UAP a un flujo de 1,0 mL/min. La preparación y análisis de los ácidos grasos presentes en los AV se realizó a partir de ésteres metílicos correspondientes. Para el análisis se tomaron 0,2 mL de AV, se sometieron a derivatización empleando como reactivo 5 mL de una solución de HCl/metanol al 5% v/v. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos derivatizados fueron extraídos con 2 mL n-hexano grado HPLC. Finalmente se adicionó sulfato anhidro para la inyección de las muestras en el Cromatógrafo de Gases/Espectrómetro de Masas. La identificación de los compuestos de interés se realizó por comparación de los espectros de masas, empleando la base de datos NIST y WILEY, la cuantificación se realizó por porcentaje relativo de área (Dorado *et al.*, 2016).

Determinación de actividad antibacteriana

Se adquirieron cepas de referencia American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), se activaron, se realizaron pruebas bioquímicas, se cultivó en medios selectivos para la verificación de las cepas y se mantuvieron en agar infusión cerebro-corazón (BHI) a 4°C. De igual manera se analizaron bacterias multirresistentes donadas por la Clínica Profesionales de la Salud - Proinsalud S.A. (Pasto, Nariño) (Tabla No. 1). El inóculo de cada microorganismo se realizó una suspensión equivalente a 5×10^5 del patrón 0.5 de McFarland (1×10^7 UFC/mL), para su análisis se utilizó dentro de los 15 minutos siguientes a su preparación (CLSI, 2012).

Tabla N° 1
Cepas bacterianas con multirresistencia

Cepas bacterianas	Antibióticos
<i>S. aureus</i>	Amoxicilina/ácido Clavulanato, Ampicilina/Sulbactam, Ampicilina, Cefazolina, Oxacilina y Penicilina
<i>P. aeruginosa</i>	Aztreonam, Cefepima, Imipenem, Meropenem y Piperacilina/tazobactam
<i>E. coli</i>	Ácido Nalidixico, Ampicilina, Aztreonam y a las Cefalosporinas (productora de Betalactamasa de Amplio Espectro)

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se aplicó la técnica de microdilución en caldo en placa de microelisa en policubetas de 96 pocillos estériles y de fondo plano, con capacidad de 100 μL (CLSI, 2012), las diluciones realizadas directamente en cada pozo fueron equivalentes a 250, 500, 750 y 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Una vez preparadas las placas se taparon y agitaron a 350 rpm durante 1 min (Compact Digital Microplate Shaker, Thermo Scientific, EEUU) para permitir la homogenización, posteriormente se llevaron a incubar a 37°C durante 22 horas (Zampini *et al.*, 2007). Se realizaron controles de inóculo, de medio de cultivo (Caldo Mueller Hilton- MH + Solvente), de los AV (*A. muricata* y *A. cherimola*), de solvente (Tween 20), incluyendo un control positivo con Gentamicina 1mg/mL (CLSI, 2012). La lectura de la prueba se realizó adicionando a cada pocillo 10 μL del reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) 1 mg/mL (Chem Cruz Biotechnology, Inc), el viraje a color púrpura indicó viabilidad de los microorganismos bacterianos, mientras que el color amarillo intenso o tenue indicó inhibición bacteriana (Mojica *et al.*, 2015). Las pruebas se realizaron por triplicado.

Determinación de Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Esta prueba no hace parte de la rutina de la microbiología clínica, sin embargo, se utiliza en pruebas de investigación para identificar nuevos bactericidas (Cantón *et al.*, 2000). Se realizó sembrando en superficie 10 μL de las diluciones de AV (*A. muricata* y *A. cherimola*) de los pocillos en agar MH, se incubaron a 37°C durante 22 horas. La interpretación de la CMB es la menor dilución de cada AV capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano en placa de Petri (Ramírez y Castaño, 2009).

Determinación de actividad hemolítica en eritrocitos

La obtención de eritrocitos se realizó por el Método de Boyum (1968), acorde a las modificaciones sugeridas por Durán *et al.* (2013), mediante gradiente de densidades con Ficoll-Hypaque (Hystopaque-1077 Sigma). Posterior a la centrifugación inicial se obtuvo la capa que contenía los eritrocitos, se manejó delicadamente y a temperatura ambiente para evitar la hemólisis. Se lavaron dos veces con HBSS pH 7,4, 1 mL de la capa de eritrocitos se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.

Se evaluó la inhibición de la hemólisis inducida por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), según el

método de Durán *et al.* (2013). Se realizaron suspensiones que contenían 1×10^5 eritrocitos/mL, diluidos en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 las cuales contenían 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AV de *A. muricata* y *A. cherimola*, se dejó actuar los aceites por espacio de 5 min en agitación constante, posteriormente se adicionó H_2O_2 al 5% (v/v), se incubaron a 37°C en agitación constante por 30 min. Se llevó a centrifugar a 1200 g, durante 6 min a temperatura ambiente, se leyó la hemoglobina liberada en el sobrenadante de cada muestra en espectrofotómetro (Thermo Scientific Megafuge, Reino Unido) a 540 nm, frente al blanco de PBS pH 7,4.

Determinación de alteración morfológica eritrocitaria

Se realizó de acuerdo al protocolo empleado por Durán *et al.*, (2013), a una suspensión de eritrocitos en HBSS pH 7,4 equivalente a 1×10^5 células/mL, se adicionó cada AV la cantidad necesaria para lograr concentraciones finales de 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, se incubaron a 37°C durante 1 hora en agitación constante y preservados de la luz. Al cabo de este tiempo se recuperó 50 μL de eritrocitos en suspensión, se fijaron sobre un portaobjetos con glutaraldehído al 0,2% y se realizó el recuento verificando las anomalías morfológicas relacionadas con equinocitosis y estomatocitosis en diferentes campos hasta completar 500 células. Como control positivo se utilizó una suspensión de eritrocitos con H_2O_2 al 30% y el control negativo únicamente contenía una suspensión de eritrocitos en HBSS pH 7,4. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Aislamiento de neutrófilos

Se consideraron donantes de ambos sexos, mayores de 18 años y menores de 40 años que no presentasen ninguna enfermedad que comprometiera el sistema inmunológico, no fumadores y no tener antecedentes de procesos hemorrágicos (Hidalgo *et al.*, 2015). Una vez firmado el consentimiento se procedió a extraer 5 mL de sangre total en tubos con (agar citrato-dextrosa) ADC (Corréa, 2019).

La obtención de neutrófilos se realizó por el Método de Gradiente de Percoll según protocolo de Hidalgo *et al.* (2015), verificando en cada extracción que se presente un porcentaje superior a 95% de pureza y viabilidad, evaluadas con el método de tinción de Wright y coloración con azul de tripan respectivamente, mantenidos en Sales Equilibradas de Hans (HBSS).

Determinación de citotoxicidad en cultivo de neutrófilos

Para cada ensayo se trabajó con 1×10^6 neutrófilos/500 μL de HBSS + Ca^{+2} y se mantuvieron en cultivo a 37°C . Como control positivo se utilizó H_2O_2 5%, y como control negativo se mantuvo los neutrófilos en HBSS + Ca^{+2} . De cada aceite vegetal se evaluó las diluciones 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Se

mantuvieron en cultivo por 3 horas determinando el porcentaje de viabilidad absoluta mediante el método de exclusión por azul de tripán, realizando conteo en hematocitómetro cada hora durante 3 horas (Durán et al., 2013). Los resultados se calcularon y graficaron verificando su ajuste a la distribución lineal a lo largo del tiempo.

$$\% \text{Viabilidad} = \frac{\text{No. De células teñidas}}{\text{Total de células contadas}} \times 100 \quad (\text{Durán et al., 2013})$$

Participación en la regulación de liberación de MMP9 de neutrófilos

Se trabajó con 1×10^6 Polimorfonucleares (PMN) / 500 μL de HBSS Ca^{2+} a 37°C . Para el control negativo se incubaron en el medio base y para el control positivo con lipopolisacárido (LPS) $5\mu\text{g}/\text{mL}$, por 15 min (Tang, 2016). Después de realizar un ensayo de curvas de tiempo y concentración se determinó que el tiempo óptimo de estímulo fue de 15 minutos y se trabajó con diluciones de 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AV. Posterior al estímulo se sometió a centrifugación por 6 minutos a 600 g, se recuperó 300 μL de sobrenadante y se conservó en tubos ependorff ámbar a -20°C hasta su uso (Mena et al., 2016). Posteriormente se realizó un ensayo de zimografía en un gel de poliacrilamida al 7,5% en condiciones desnaturalizantes, con un contenido de gelatina del 0.2% para determinar la liberación de MMP9, para cada ensayo se utilizaron 15 μL de sobrenadante. Después del proceso de lavado, activación enzimática y tinción, los geles se escanearon y la actividad gelatinolítica se determinó como Unidades Arbitrarias de Densitometría (UAD) con base en las bandas blancas observadas en el gel con el software ImageJ® (Mena et al., 2016).

Análisis estadístico

Para determinar CMI y CMB se usó un diseño experimental de tipo factorial 2×5 , con tres replicas cada uno. Los factores fueron dos AV de semillas: *A. muricata* y *A. cherimola* y cinco cepas bacterianas: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Las medidas de CMI de los extractos analizados se muestran como la media \pm SEM. Las diferencias fueron evaluadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Dunnett. Para todos los análisis el nivel de significancia establecido fue $\alpha < 0,05$. La CMB resulta de la observación de ausencia de crecimiento en la menor concentración de los AV.

Los ensayos de actividad antihemolítica, alteración morfológica y citotoxicidad se realizaron con 4 diluciones de cada uno de los aceites por triplicado, la inhibición de hemólisis y citotoxicidad se determinaron en comparación con el control positivo (H_2O_2 al 5%) y las anomalías eritrocitarias como el porcentaje de deformaciones observadas en los hematíes frente al control negativo. Los resultados se muestran en gráficos de barras (media \pm SEM) de tres experimentos independientes analizados mediante ANOVA de dos vías, el nivel de significancia fue $\alpha < 0,05$.

Para la evaluar la participación de los AV en la regulación de liberación de MMP9 se realizaron ensayos por triplicado, se verificó su desviación estándar y de acuerdo a ello se determinó la variabilidad de ensayos con ANOVA y prueba de medias de Dunnett ($\alpha < 0,05$).

Todos los análisis se realizaron con GraphPad 8.0 licenciado.

Consideraciones éticas

El estudio contó con aprobación del comité de ética de investigación de la Universidad de Nariño. Dentro del macroproyecto “Actividad antibacteriana y citotóxica *in vitro* de aceites vegetales de semillas de frutas tropicales y andinas” de la convocatoria docente 2018. Todos los cultivos, ensayos de actividad antibacteriana, muestras de sangre y todas las pruebas de laboratorio realizadas con estas se descartaron de acuerdo a los protocolos de bioseguridad (OMS, 2005).

RESULTADOS

Caracterización de los aceites de semillas

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis de componentes de los AV. El escualeno, γ -Tocoferol y el campesterol se encuentran en bajas concentraciones en el AV de *A. cherimola* y están ausentes en el AV de *A. muricata*. Con relación a los

tocoferoles únicamente en el aceite de *A. cherimola* se encuentra γ -Tocoferol en muy baja concentración (0,21 mg/mL) al igual que el campesterol (0,26 mg/mL). Los fitosteroles como estigmasterol y β -sitosterol, se encuentran en mayor cantidad, este último supera aproximadamente 1 mg/mL. En cuanto a los ácidos grasos, el principal ácido graso monoinsaturado encontrado en los AV de las semillas fue el ácido oleico con porcentajes relativos de 34,36 y 39,45% en *A. muricata* y *A. cherimola* respectivamente. El ácido graso linoleico se encontró

también en alto porcentaje con valores de 30,70% en *A. muricata* y 30,18% en *A. cherimola*. Entre los ácidos saturados el palmítico presentó concentraciones significativas en los dos AV de 26,80 y 20,82% a diferencia de la concentración del ácido esteárico 4,23 y 7,82% para *A. muricata* y *A. cherimola*, en su orden. Otros ácidos grasos identificados fueron: ácido palmitoleico, el ácido linolénico y el eicosenoico en concentraciones inferiores al 1% (*A. muricata* 0,45 y *A. cherimola* 0,49%).

Tabla N° 2

Caracterización de aceites de semillas de Anonáceas

Compuesto	<i>A. muricata</i> (mg/mL)	<i>A. cherimola</i> (mg/mL)
Esteroles y tocoferoles		
Escualeno	-	0,21
γ - Tocoferol	-	0,21
Campesterol	-	0,26
Estigmasterol	0,72	0,59
β Sitosterol	0,66	1,08
Ácidos grasos	% Relativo	% Relativo
Palmítico	26,80	20,82
Esteárico	4,23	7,82
Oleico	34,36	39,45
Linoleico	30,70	30,18
Linolénico	1,30	1,02
Eicosenoico	0,45	0,49
Palmitoleico	2,17	0,17

**Análisis de muestras por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC-MS).
Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño**

Determinación de la CMI y CMB

La CMI es la concentración del AV de semillas capaz de inhibir el crecimiento visible de la cepa bacteriana (color amarillo pálido) en prueba MTT. En la tabla 3 se observa que en la mayoría de los AV se requiere 900 μ L/mL para inhibir el crecimiento de las cinco bacterias analizadas, únicamente el AV de semilla de *A. cherimola* presenta para *E. faecalis* una CMI de 250 μ L/mL.

Después de 22 horas de incubación de la micro placa de Elisa se sembró en placa 10 μ L de aquellos pozos en los cuales no se evidenció turbidez (Ramírez y Castaño, 2009), una vez incubadas durante 24 horas se identificó las cajas en las cuales no se presentó crecimiento bacteriano determinando que la CMB para los AV de *A. muricata* y *A. cherimola* fue de 900 μ L/mL, incluyendo el AV de semilla de *A. cherimola* frente *E. faecalis* mientras

que el AV de *A. Muricata* no produjo inhibición (Tabla N° 3).

En las pruebas realizadas con las cepas bacterianas de origen hospitalario, multirresistentes a antibióticos convencionales, no se presentó actividad antibacteriana de los AV de semillas de *A. muricata* y *A. cherimola*

Inhibición hemolítica

En la Figura N° 1 se observa que los AV de *A. muricata* y *A. cherimola* mostraron inhibición de hemólisis en los eritrocitos inducida por H₂O₂, observándose que para el caso de *A. muricata* inhibieron la inducción de hemólisis en 44,14%; 38,96%; 44,74% y 48,81% en las concentraciones 25, 50, 75 y 100 μ L/mL respectivamente, con el AV de *A. cherimola* se obtuvieron resultados de inhibición de 45,57%; 46,45%; 51,7% y 48,98%

respectivamente en las mismas concentraciones. Es decir, el AV de *A. cherimola* presentó mayor

inhibición hemolítica frente al AV de *A. muricata*.

Tabla N° 3
Actividad antibacteriana de Anonáceas (CMI/CMB)

AV	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
<i>A. muricata</i>	900/900	900/900	900/900	900/900	900/NI
<i>A. cherimola</i>	900/900	900/900	900/900	900/900	250/900

CMI/CMB: Concentración mínima inhibitoria/concentración mínima bactericida de AV de semilla de *A. muricata* y *A. cherimola* frente a cepas bacterianas analizadas. NI: no se observó inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado

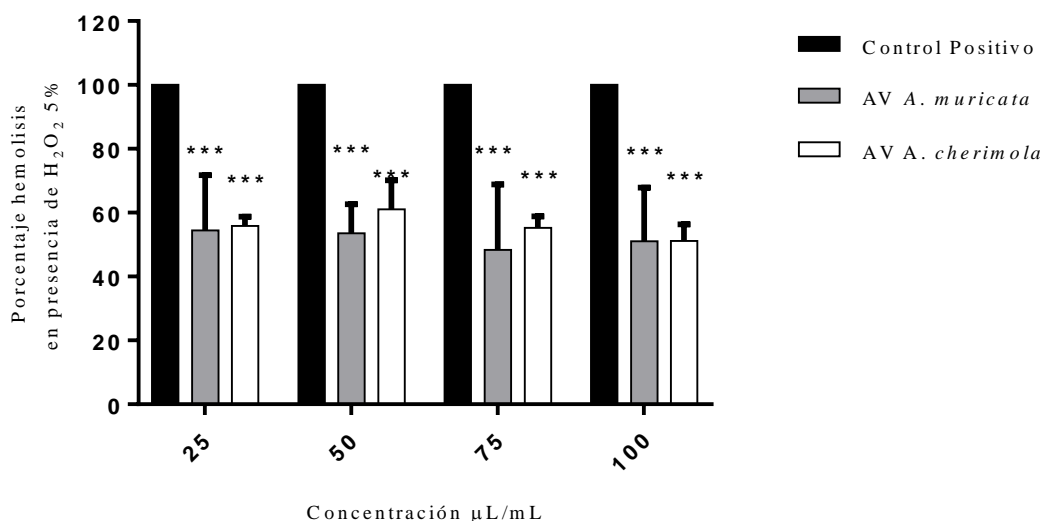


Figura N° 1

Porcentaje de inhibición de hemolisis por AV de semillas de *A. muricata* y *A. cherimola*. Los porcentajes de disminución de hemolisis oscilan entre 38,96 – 48,81% (*A. cherimola*) y 45,57 – 51,69% (*A. muricata*).

ANOVA de dos Vías y test de Dunnet en comparación con el control positivo (H₂O₂ al 5%) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética ± SEM, n=3, * p<0,001**

Alteración morfológica eritrocitaria

Los resultados de la anomalía morfológica de equinocitos en los eritrocitos frente a los AV de semillas de *A. muricata* y *A. cherimola* se observan en la Figura N° 2A. Los porcentajes obtenidos con relación al control positivo fueron bajos con AV de *A. muricata* 1,89; 3,13; 3,06; 2,53% y con *A.*

cherimola 1,89; 3,60; 25,02 y 42,33%, en las concentraciones de 25, 50, 75, 90 µL/mL (Figura N° 2B). El AV de semillas de *A. cherimola* en las diluciones 75 y 90 µL/mL (25,02 y 42,33% respectivamente), generaron una mayor equinocitosis en los eritrocitos tratados con este aceite.

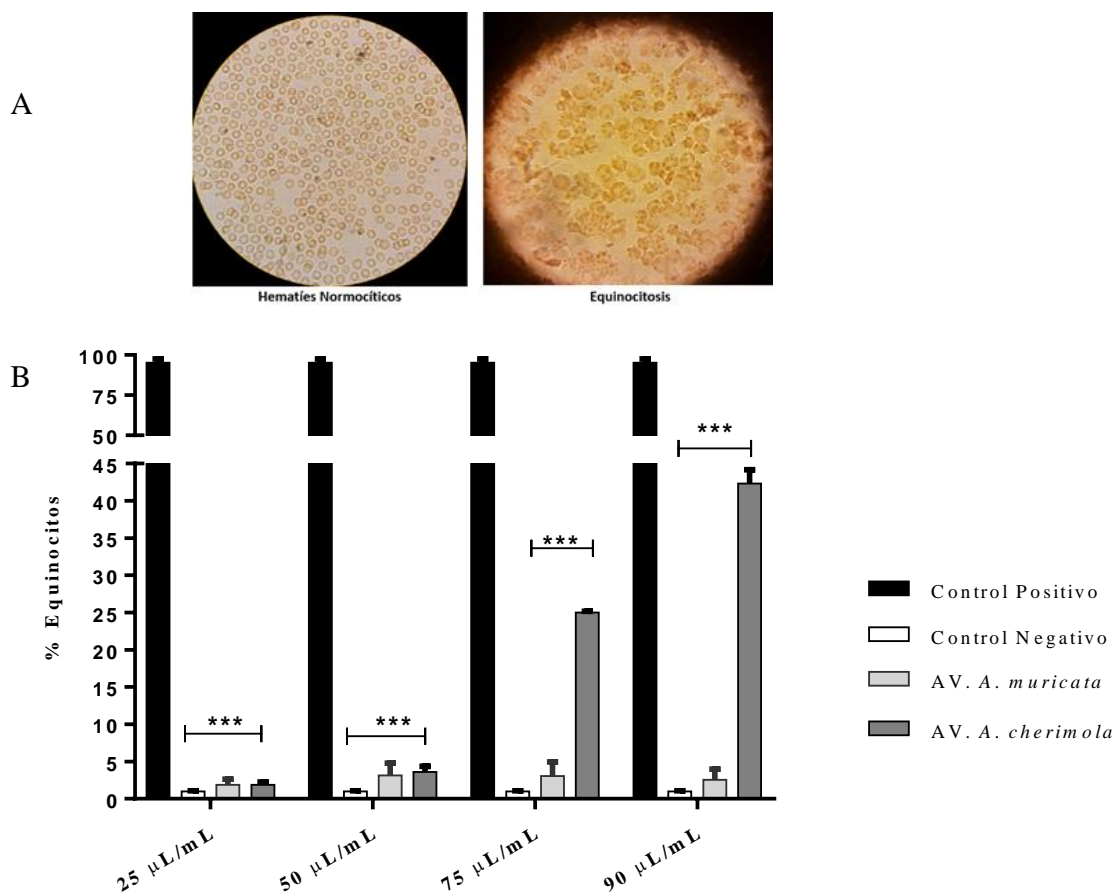


Figura N° 2

Alteraciones morfológicas eritrocitarias evaluadas con el tratamiento de los dos AV. A. Observación microscópica (100X) se observan alteraciones morfológicas eritrocitarias inducidas por H₂O₂ vs. Normales. B. Porcentaje de equinocitos observados frente al control positivo. Las barras representan resultados de tres experimentos independientes (media ± SEM). Se presentaron diferencias estadísticas significativas con análisis de Dunnett entre las deformaciones presentadas en los eritrocitos el control positivo con respecto a los tratados con los AV de semillas de: *A. muricata*, *A. cherimola* *** $p < 0,0001$

Ausencia de citotoxicidad en neutrófilos

Los resultados del análisis de toxicidad de los AV de semillas de *A. muricata* y *A. cherimola* sobre cultivo de PMN se observan en la Figura N° 3. En los tratamientos con las diferentes concentraciones AV se mantuvo una viabilidad superior al 80%, similar a la del control positivo. En ambos casos se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,0001$) con respecto al control con peróxido de hidrogeno (Figura N° 3A y Figura N° 3B).

Participación en la regulación de la liberación de MMP9 en PMN

En el panel superior de las gráficas de la Figura N° 4

se identifica el corte del gel representativo, donde se señala la banda correspondiente a pro-MMP9 que fue analizada. Para el caso del AV de *A. cherimola*, se observó un incremento significativo en la liberación de MMP9 con todas las diluciones de trabajo (Figura N° 4A). Mientras que en el caso de *A. muricata* los resultados presentaron distribución normal y por ello el test de Friedman, si bien se aprecia un incremento en la liberación de MMP9 con respecto al control negativo este solo es significativo en el tratamiento con la dilución 20µL/mL ($p = 0,0227$) (Figura N° 4B).

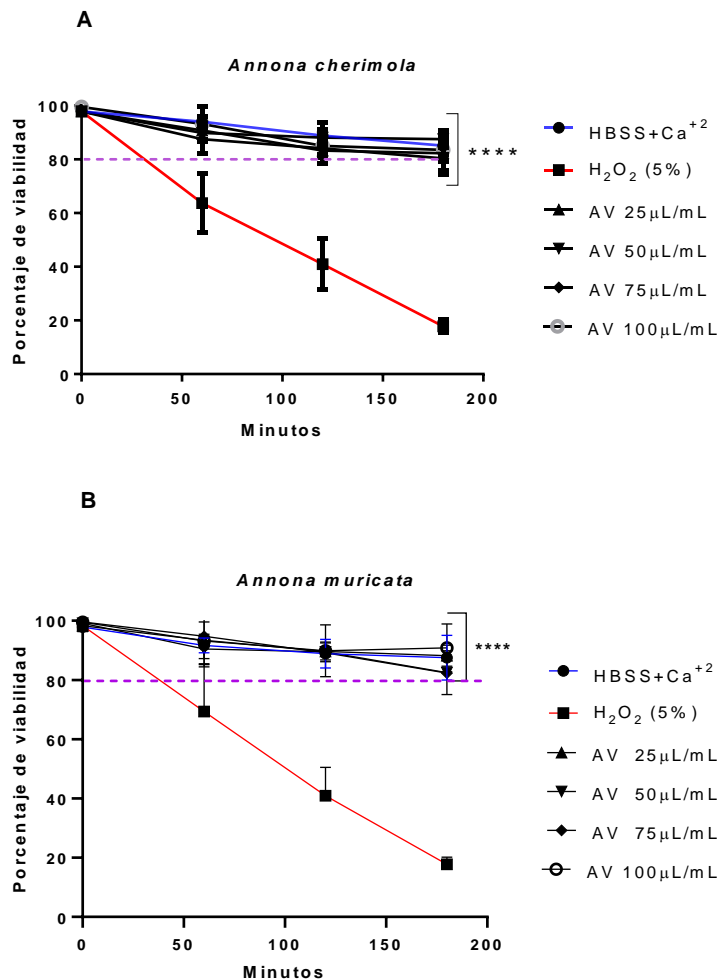


Figura N° 3

Citotoxicidad encontrada con el tratamiento de los dos AV en cultivo de PMN humanos. A. Resultado de evaluación con diferentes concentraciones de AV de *A. cherimola*. B. Resultado de evaluación con diferentes concentraciones de AV de *A. muricata*. Cada punto del gráfico representa tres experimentos independientes (media ± SEM). Se presentaron diferencias estadísticas significativas con análisis de Dunnett entre la viabilidad presentada por las PMN en el control positivo (H₂O₂) respecto a los tratados con los AV de semillas de: *A. muricata*, *A. cherimola* ****p*<0,0001

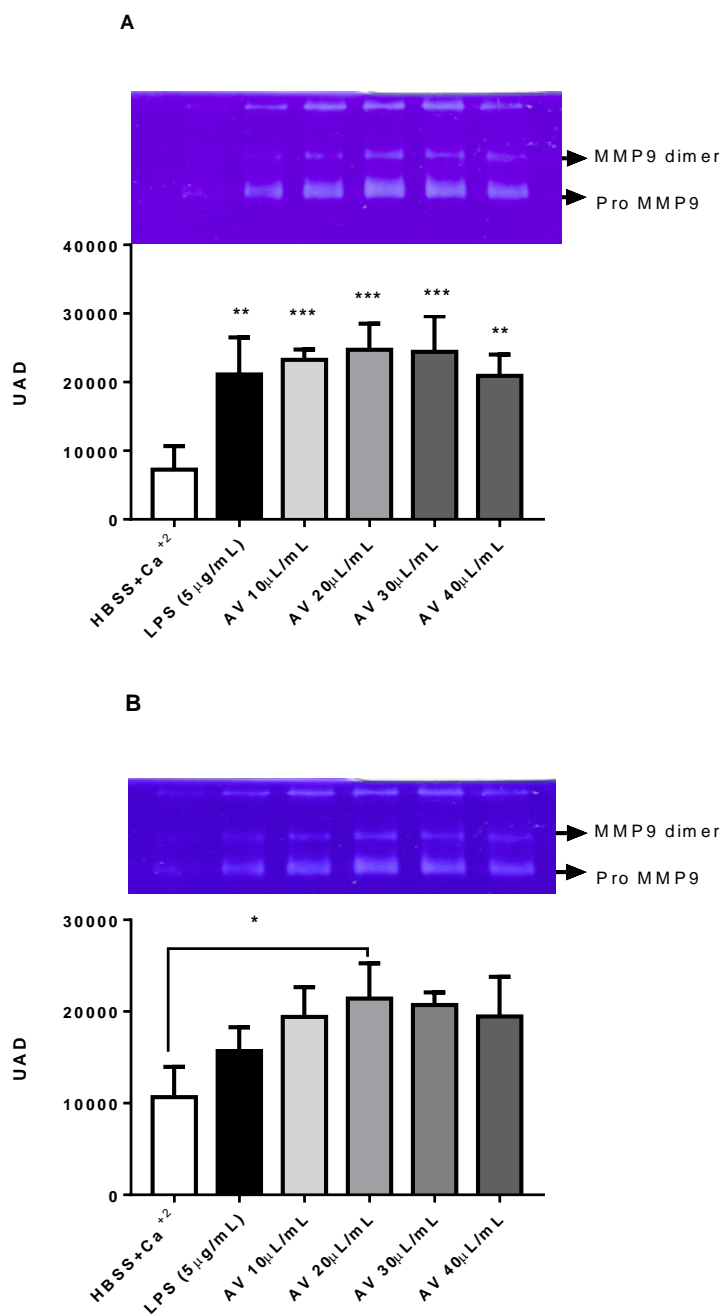


Figura N° 4

Participación de AV de *A. cherimola* y *A. muricata* en el incremento de la liberación de MMP9 en PMN humanos. A. Liberación de gránulos de gelatinasa inducida por diferentes diluciones de AV de *A. cherimola* después de 15 minutos de estímulo. Cada barra representa la media aritmética ± SEM resultado de 3 ensayos independientes obteniéndose un incremento de la liberación de gránulos de MMP9 con todas las diluciones, comparado con el control tratado con vehículo de acuerdo con el test de Dunnett, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. B Liberación de gránulos de gelatinasa inducida por diferentes concentraciones de AV de *A. muricata*. Cada una representa la media aritmética ± SEM de 5 ensayos independientes se encontró diferencias significativas con respecto al control positivo (* $p = 0,0227$) mediante test de Friedman.

UAD= unidades arbitrarias de densitometría

DISCUSIÓN

Los aceites vegetales son mezclas complejas de compuestos orgánicos fuente de energía, que se obtienen a partir de semillas u otras partes de las plantas, pertenecen a los macronutrientes de los lípidos, formados principalmente por triglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y otros constituyentes minoritarios como tocoferoles y esteroides (Bueno Ferrer, 2012; Pantoja-Chamorro *et al.*, 2017).

El rendimiento y la calidad de los extractos se ve afectada por la técnica de extracción (Cerón *et al.*, 2012; Pantoja-Chamorro *et al.*, 2017). La utilización de solventes orgánicos y/o cosolventes afectan la calidad del producto, su rendimiento o aceleran procesos oxidativos que pueden conllevar al deterioro de sus compuestos (Londoño *et al.*, 2012). La extracción por FSC y CO₂ es una tecnología emergente de extracción limpia, ofrece la ventaja de obtener aceites puros, libres de residuos de disolventes, amigable con el medio ambiente (Ceron *et al.*, 2012).

Los tocoferoles y esteroides se identificaron en bajas concentraciones. Solo en *A. cherimola* se identificó escualeno, γ - tocoferol y campesterol; el escualeno (0,21 mg/mL) el cual se ha considerado una barrera protectora para la piel como emoliente, hidratante y actividad antitumoral (de Frutos, 2008; Huang *et al.*, 2009), γ -tocoferol (0,21 mg/mL), es un compuesto relacionado con actividad antioxidante, anticancerígeno, previene enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad (Tang y Tsao, 2017). Los fitosteroides como β -sitosterol, y el estigmasterol, se encuentran en ambos AV y en una concentración mayor (Tabla N° 2), la importancia de estos radica en que no son sintetizados por el hombre por lo que deben ser ingeridos en la dieta, el β -sitosterol presenta beneficios como reductor del colesterol sérico y por consiguiente disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, adicionalmente se le atribuyen funciones de inmunoregulación y actividad antiinflamatoria en pacientes con hiperplasia prostática benigna (Rodríguez *et al.*, 2005).

En los AV de *A. muricata* y *A. cherimola* se identificó la presencia de ácidos grasos insaturados y saturados como: el ácido oleico, un ácido omega 9 (ω -9), al cual se atribuye gran variedad de propiedades benéficas para la salud, como antiinflamatorio, antibacteriano e inmunomodulador, disminuyendo el riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Medeiros *et al.*, 2018). En segundo lugar, se encontró en alto

porcentaje el ácido linoleico, un ácido graso esencial de la serie omega 6 (ω -6) que el organismo no puede sintetizar, aunque existen reportes de su efecto pro-inflamatorio es considerado como antiobesogénico, anticancerígeno, antiaterosclerótico (den Hartigh, 2019) y también se ha evidenciado su actividad antibacteriana (Njateng *et al.*, 2017), principalmente sobre bacterias Gram positivas (Jang *et al.*, 2016). En relación a ácidos saturados, en ambos AV el ácido palmítico presentó valores de concentración más altos en comparación con ácido esteárico. Ivanova *et al.* (2017), reportaron estos dos ácidos en la epicutícula de las alas de los insectos y determinaron que son los responsables de la actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, sugiriendo su utilización como revestimientos bactericidas naturales. Los demás ácidos grasos se presentan concentraciones bajas, pero se han reportado para ellos diferentes beneficios como: el ácido palmitoleico omega-7 (ω -7), beneficioso para la hidratación de la piel y las mucosas, aumenta el colesterol de alta densidad (HDL) (Frigolet y Gutiérrez-Aguilar, 2017); el ácido linoléico omega-3 (ω -3), presenta actividad antibacteriana y antifúngica (Jalalvand *et al.*, 2019). La presencia de la diversidad de componentes y la variabilidad de sus concentraciones pueden explicar los efectos biológicos particulares determinados en este estudio para cada uno de los AV evaluados.

Actividad biológica

Los dos AV de estas Annonáceas estudiadas, presentan actividad antimicrobiana en las cinco cepas ATCC evaluadas (Tabla N° 3), coincidiendo con estudios que han evaluado extractos de plantas de esta misma familia, por ejemplo el extracto metanólico de hojas de *A. squamosa* demostró una significativa actividad antibacteriana contra *K. pneumoniae* (Pinto *et al.*, 2017); extractos obtenidos a partir de material vegetal seco de *A. diversifolia* y *A. purpurea* presentaron actividad inhibitoria contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2008), extractos hidro-fenólicos de pulpa de *A. muricata* presentaron actividad bacteriostática baja sobre *E. faecalis* (León-Fernández *et al.*, 2019). Sin embargo, los AV de semillas de *A. muricata* y *A. cherimola* no presentaron actividad antibacteriana sobre las tres cepas multirresistentes utilizadas en este estudio coincidiendo con el estudio de Liya y Siddique (2018), en el cual, extractos etanólicos de *Carica papaya* reportaron actividad sobre cepas ATCC y no mostraron ninguna zona de inhibición

contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae* cepas donadas por un centro hospitalario en Bangladesh. Lo anterior se puede explicar porque la CMB para las cinco cepas ATCC analizadas fue de 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para ambos AV, evidenciando que estos no son candidatos para ser utilizados a nivel farmacéutico como sustancias eficaces que permitan combatir procesos infecciosos ya que se deberían utilizar concentraciones muy altas para tal fin.

En este trabajo se utilizaron los AV totales de cada semilla, cada uno de los cuales se representa como una mezcla compleja de diferentes compuestos, los ensayos realizados no permiten confirmar que la presencia de cualquiera de sus compuestos de manera individual sea el causante de la actividad antibacteriana. El efecto observado es producto de la acción sinérgica de todos los compuestos del AV (Merah *et al.*, 2020). Con el fin de establecer el aporte de cada compuesto a la actividad evaluada, se pueden realizar pruebas complementarias como la técnica de bioautografía por cromatografía de capa, para identificar el compuesto implicado en el proceso inhibitorio (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2018).

La incidencia de bacterias Gram negativas multidrogasistentes (MDR) se ha incrementado especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI), generando un aumento en la mortalidad de los pacientes por la resistencia a los antibióticos tradicionales, varios de estos casos asociados a un inapropiado tratamiento antimicrobiano (Paramythiotou y Routsis, 2016). Este tipo de bacterias para ser controladas, requieren la acción de fármacos cada vez más fuertes, una mayor concentración o la combinación entre ellos; la multiresistencia bacteriana genera que las infecciones sean cada vez más complicadas y las opciones de tratamiento más limitadas (Al-Gethamy *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados de este estudio descartan la posibilidad de utilizar los AV de *A. cherimola* y *A. muricata* como potenciales antibacterianos en la industria farmacéutica; un uso alternativo de estos, gracias a su actividad antibacteriana y antioxidante es en la industria cosmética como emulsionantes, humectantes y conservadores de productos (Poljšak *et al.*, 2020); de igual manera, se puede evaluar su uso en alimentos, bien sea como conservantes, emulsionantes o mejoradores de textura, aportando compuestos de alto valor nutricional (Nadeem y Imran, 2016).

En relación a los resultados observados en células eucarióticas, Barreca *et al.* (2011), describieron un efecto citoprotector del AV de *A. cherimola* al estimular linfocitos humanos, y

adicionalmente otros estudios describen un potencial efecto hepatoprotector ante modelos de hepatotoxicidad inducida por acetaminofén (Subramanya *et al.*, 2018). En este estudio se encontró una viabilidad superior al 80% para ambos AV luego de 3 horas de incubación, sin observarse diferencias significativas respecto al control negativo, lo cual permite determinar que los AV no presentan efectos citotóxicos sobre los neutrófilos humanos.

La presencia de los AV de semillas en las concentraciones utilizadas confirió resistencia a la actividad oxidante de peróxido de hidrógeno sobre eritrocitos, previniendo hasta en un 48% su hemólisis en las concentraciones más elevadas de AV, posiblemente al recubrirlos. Esto puede atribuirse a la afinidad de los compuestos de los AV con la membrana celular, lo que hace que sean menos sensibles a la acción lítica en soluciones de peróxido de hidrógeno (Durán *et al.*, 2013). La evidencia de la actividad protectora de los AV de semillas de frutas, unido al potencial antioxidante reportado por Dorado *et al.* (2016), en aceites de semillas de *A. muricata* (método de captación del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo: DPPH), son un indicio de que estos aceites poseen la capacidad de contrarrestar *in vitro* los efectos de un oxidante fuerte como es el peróxido de hidrógeno sobre hematíes (Samet *et al.*, 2019), los cuales presentan una importante capacidad antioxidante y son candidatos para uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Los porcentajes de alteraciones morfológicas producidas por AV de *A. muricata* fueron bajos para las cuatro concentraciones, a diferencia del AV de *A. cherimola* con porcentajes de deformación eritrocitaria del 42,33% en la concentración de 90 $\mu\text{L}/\text{mL}$, similar al reporte de Durán *et al.* (2013), quienes obtuvieron una equinocitosis entre el 50 y 70% en concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, con extractos de *M. indica* y *P. guajava*. Los cambios observados en la morfología de los glóbulos rojos pueden atribuirse a la integración en la membrana celular de los compuestos del AV, ácidos grasos principalmente, los que actúan sobre la permeabilidad o incrementando la relación superficie/volumen (de Isla *et al.*, 2013). De igual manera, puede atribuirse este daño a la presencia de tocoferoles, los cuales se integran a la región hidrofílica de la membrana celular de los eritrocitos, induciendo a la equinocitosis (Suwalsky, 2008; Cyboran *et al.*, 2012). La protección a las alteraciones morfológicas del AV de *A. muricata* puede ser atribuida a la presencia de ácido linoleico, oleico y esteárico, al igual que su actividad

antioxidante contribuye a reducir la acción de los radicales libres (Cyboran *et al.*, 2012).

Yeh *et al.* (2005), describieron un efecto inhibidor del *ent-kaurano* derivado del tallo de *A. squamosa* sobre algunas funciones inflamatorias del neutrófilo, entre ellas la liberación de gránulos de elastasa, correspondientes a los gránulos primarios que son los últimos en secretarse ante una reacción inflamatoria. Este efecto se pudo observar debido a una inhibición en la movilización del calcio del citoplasma, el cual es un factor esencial para el transporte y secreción de vesículas a nivel celular. Otros autores también mencionan efectos antiinflamatorios de los extractos de hojas, raíces, tallos y semillas de *A. muricata* evidenciados en una disminución de la actividad de la NADPH oxidasa, movilización del calcio, disminución de citocinas proinflamatorias y prostaglandinas (Coria-Télez *et al.*, 2018; Quílez *et al.*, 2018). Sin embargo, en esta investigación se observó un aumento en la liberación de gránulos de MMP9 en los neutrófilos estimulados con todas las diluciones de trabajo de AV de *A. cherimola* y la dilución de AV de 0,02 ($p=0,0441$) de *A. muricata* sugiriendo su potencial pro inflamatorio, asociado probablemente a la presencia de ácido linoleico, esteárico y palmítico (Harvey *et al.*, 2010, Mena *et al.*, 2016, Sano *et al.* 2020), sin embargo, también podría asociarse a un posible efecto *priming* sobre estas células. El *priming* se considera un estado de pre-activación que permite a los neutrófilos responder de forma temprana ante los estímulos generados por patógenos, ocasionando cambios fenotípicos como la trans migración y quimiotaxis, NETosis, fagocitosis, liberación de gránulos, producción de EROs y apoptosis (Miralda *et al.*, 2017). Además, la liberación de gránulos en los neutrófilos preactivados se presenta principalmente para los gránulos cuaternarios y terciarios, evitando que se liberen los gránulos más citotóxicos encontrados en los primarios y secundarios (Miralda, 2017). Para poder verificar si los AV están produciendo un efecto *priming* es necesario realizar estudios de verificación de producción de ERO's y

activación de vías de señalización entre otros (Mayadas *et al.*, 2014; Soehnlein *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos aportan en el conocimiento del potencial biológico de estas semillas que normalmente son descartadas como desechos, contribuyendo así a su uso sustentable mediante la búsqueda de alternativas que permitan utilizarlas como materia prima para generación de nuevos productos y disminuya su impacto ambiental, acorde con los postulados de la economía circular que promueve la optimización de recursos, reducción de consumo de materia prima y aprovechamiento de residuos (Fidelis *et al.*, 2019).

CONCLUSIÓN

Los AV de semillas *A. muricata* y *A. cherimola* presentan actividad bactericida leve sobre cepas ATCC de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis*, sin embargo, no inhibieron cepas multirresistentes. No son citotóxicos en células blancas humanas ni causan hemólisis en hematíes humanos. El AV de *A. muricata* no induce la equinocitosis, pero el AV de *A. cherimola* lo hace en concentraciones superiores a 75 $\mu\text{L/mL}$. Los AV estudiados, podrían causar un efecto *priming* sobre los neutrófilos humanos, generando una respuesta temprana y eficaz ante una infección. Estos resultados contribuyen al conocimiento de las propiedades biológicas de estos AV, lo cual podría sustentar su uso potencial en la industria alimenticia o cosmética gracias a su capacidad antioxidante, no citotóxica y levemente antibacteriana. Identificar este valor biológico agregado para aceites vegetales extraídos de las semillas que generalmente son descartadas como residuo agroindustrial del procesamiento de frutas, contribuyen a disminuir el impacto ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados presentados hacen parte del proyecto 1617 que fue financiado por el Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño, mediante convocatoria Docente de investigación 2018.

REFERENCIAS

- Al-Gethamy MM, Faidah HS, Adetunji HA, Haseeb A, Ashgar SS, Mohammed TK, Mohammed AH, Khurram M, Hassali MA. 2017. Risk factors associated with multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections at a tertiary care hospital in Makkah, Saudi Arabia—a matched case–control study. **J Int Med Res** 45: 1181 - 1189. <https://doi.org/10.1177/0300060517706284>
- Álvarez-Sánchez D, Hurtado-Benavides A, Chaves-Morillo D, Andrade-Díaz D. 2018. Actividad biocida del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK (Verbenaceae) sobre *Rhizoctonia solani*: *in vitro*. **Rev Colomb Cienc Hortic** 12: 668 - 676. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i3.7801>

- Barreca D, Lagana G, Ficarra S, Tellone E, Leuzzi U, Galtieri A, Bellocco E. 2011. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill.(Annonaceae). **Food Res Int** 44: 230. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.031>
- Boyum A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Inv Suppl** 77 - 89.
- Brejijeh Z, Jubeh B, Karaman R. 2020. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules** 25: 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Bueno Ferrer C. 2012. **Bio-compuestos termoplásticos basados en aceites vegetales**. Tesis, Universidad de Alicante, España.
- Cantón R, García JE, Gómez L, Martínez L, Rodríguez C, Vila J, García JA. 2000. **Procedimientos en microbiología clínica**. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos en recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <https://www.seimc.org>
- Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, Kaplan MJ. 2015. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. **Ann Rheum Dis** 74: 1417 - 1424. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204837>
- Castro L, Alzate M, Guerrero GE. 2010. Estudio preliminar de la bioactividad de extractos de semillas de *Annona cherimolia* de la familia Annonaceae. **Sci Tech** 1: 326 - 330. <https://doi.org/10.22517/23447214.1859>
- Cerón AF, Osorio O, Hurtado A. 2012. Identificación de ácidos grasos presentes en el aceite extraído a partir de semillas de guanábana (*Annona muricata*). **Rev Cienc Agric** 29: 81 - 87.
- Cerón L, Hurtado A, Ayala A. 2016. Efecto de la presión y la temperatura de extracción con CO₂ supercrítico sobre el rendimiento y composición de aceite de semillas de guayaba (*Psidium guajava*). **Inf Tecnol** 27: 249 - 258. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600025>
- CLSI. 2012. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. CLSI (NCCLS).
- Coria-Téllez AV, Montalvo-González E, Yahia EM, Obledo-Vázquez EN. 2018. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arab J Chem** 11: 662 - 691. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- Corrêa JA. 2019. **Garantía de calidad en el laboratorio clínico**. Rio de Janeiro. Brasil.
- Cyboran S, Oszmiański J, Kleszczyńska H. 2012. Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane. **Cell Mol Biol** 17: 77. <https://doi.org/10.2478/s11658-011-0038-4>
- de Frutos LV. 2008. **Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales**. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- de Isla NG, Valverde JR, Rasia RJ, Stoltz JF, Riquelme BD. 2013. Análisis de la resistencia osmótica de glóbulos rojos humanos incubados con anticuerpos monoclonales anti-GPA. **Anales Afa** 14: 268 - 270.
- de Mera AG, Linares-Perea E, Martos F, Montoya-Quino J, Rodríguez-Zegarra C, Torres-Marquina I. 2019. Distribución bioclimática de plantas medicinales y sus principios activos en el departamento de Cajamarca (Perú). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 18: 130 - 143. <https://doi.org/10.37360/blacpma.19.18.2.10>
- den Hartigh LJ. 2019. Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: A review of pre-clinical and human trials with current perspectives. **Nutrients** 11: 370. <https://doi.org/10.3390/nu11020370>
- Dorado DJ, Hurtado-Benavides AM, Martínez-Correa HA. 2016. Extracción con CO₂ supercrítico de aceite de semillas de guanábana (*Annona muricata*): cinética, perfil de ácidos grasos y esteroides. **Inf Tecnol** 27: 37 - 48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500005>
- Durán M, Montero P, Marrugo Y. 2013. Extractos metanólicos de corteza de guayaba (*Psidium guajava* L.) y mango (*Mangifera indica* L.): efecto citotóxico, antihemolítico y en la morfología de membrana de eritrocitos. **Actual Divulg Cientif** 16: 327 - 334.
- Fidelis M, de Moura C, Kabbas Junior T, Pap N, Mattila P, Mäkinen S, Putnik P, Bursać Kovačević D, Tian Y, Yang B, Granato D. 2019. Fruit seeds as sources of bioactive compounds: sustainable production of high value-added ingredients from by-products within circular economy. **Molecules** 24: 3854.

- <https://doi.org/10.3390/molecules24213854>
Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. 2017. The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease. **Adv Nutr** 8: 173S - 181S. <https://doi.org/10.3945/an.115.011130>
- Harvey KA, Walker CL, Pavlina TM, Xu Z, Zaloga GP, Siddiqui RA. 2010 Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth. **Clin Nutr** 29: 492 - 500. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.10.008>
- Hidalgo MA, Carretta MD, Teuber SE, Zárate C, Cárcamo L, Concha II, Burgos R. 2015. FMLP-induced IL-8 release is dependent on NADPH oxidase in human neutrophils. **J Immunol Res** 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/120348>
- Huang ZR, Lin YK, Fang JY. 2009. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. **Molecules** 14: 540 - 554. <https://doi.org/10.3390/molecules14010540>
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiol** 3: 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Ivanova EP, Nguyen SH, Guo Y, Baulin VA, Webb HK, Truong VK, Wandiyanto JV, Garvey CJ, Mahon PJ, Mainwaring DE, Crawford RJ. 2017. Bactericidal activity of self-assembled palmitic and stearic fatty acid crystals on highly ordered pyrolytic graphite. **Acta Biomater** 59: 148 - 157. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.004>
- Jalalvand AR, Zhaleh M, Goorani S, Zangeneh MM, Seydi N, Zangeneh A, Moradi R. 2019. Chemical characterization and antioxidant, cytotoxic, antibacterial, and antifungal properties of ethanolic extract of *Allium saralicum* RM Fritsch leaves rich in linolenic acid, methyl ester. **J Photochem Photobiol B Biol** 192: 103 - 112. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.01.017>
- Jang H, Makita Y, Jung K, Ishizaka S, Karasawa K, Oida K, Takai M, Matsuda H, Tanaka A. 2016. Linoleic acid salt with ultrapure soft water as an antibacterial combination against dermato pathogenic *Staphylococcus* spp. **J Appl Microbiol** 120: 280 - 288. <https://doi.org/10.1111/jam.13012>
- León-Fernández AE, Martínez-Cárdenas L, Zepeda-Vallejo LG, Arteaga-Garibay RI, Gutiérrez-Martínez P y Montalvo-González E. 2019. Antibacterial, antifungal, antioxidant and toxic effect of fractioned extracts from Soursop pulp. **Revbio** 6. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e400>
- Liya SJ, Siddique R. 2018. Determination of antimicrobial activity of some commercial fruit (apple, papaya, lemon and strawberry) against bacteria causing urinary tract infection. **Euro J Immunol** 8: 95 - 99. <https://doi.org/10.1556/1886.2018.00014>
- Londoño P, Mieres-Pitre A, Hernández CE. 2012. Extracción y caracterización del aceite crudo de la almendra de duazno *Prunus persica*. **Avanc Cienc Ing** 3: 37 - 46.
- Luna-Cazáres LM, González-Esquínca AR. 2008. Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia* Safford y *Annona purpurea* Mociño & Sessé ex Dunal. **Polibotanica** 25: 120 - 125.
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. 2014. The multifaceted functions of neutrophils. **Ann Rev Pathol Mech Dis** 9: 181 - 218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
- Medeiros-de-Moraes IM, Gonçalves-de-Albuquerque CF, Kurz AR, Oliveira FMDJ, Abreu VHPD, Torres RC, Carvalho VF, Estado V, Bozza PT, Sperandio M, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. 2018. Omega-9 oleic acid, the main compound of olive oil, mitigates inflammation during experimental sepsis. **Oxid Med Cell Longev** 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6053492>
- Mena SJ, Manosalva C, Carretta MD, Teuber S, Olmo I, Burgos RA, Hidalgo MA. 2016. Differential free fatty acid receptor-1 (FFAR1/GPR40) signalling is associated with gene expression or gelatinase granule release in bovine neutrophils. **Innate Immun** 22: 479 - 489. <https://doi.org/10.1177/1753425916656765>
- Merah O, Sayed-Ahmad B, Talou T, Saad Z, Cerny M, Grivot S, Evon P, Hijazi A. 2020. Biochemical composition of cumin seeds, and biorefining study. **Biomoleculas** 10: 1054. <https://doi.org/10.3390/biom10071054>
- Miralda I, Uriarte SM, McLeish KR. 2017. Multiple phenotypic changes define neutrophil priming. **Front Cell Infect Microbiol** 7: 217. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00217>
- Mócsai A. 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **J Exp Med** 210: 1283 - 1299. <https://doi.org/10.1084/jem.20122220>
- Mojica DN, Ramírez-Rueda RY, Espitia MI. 2015. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. **Salud Soc Uptc** 2: 27 - 32.

- Nadeem M, Imran M. 2016. Promising features of *Moringa oleifera* oil: recent updates and perspectives. **Lipids Health Dis** 15: 212. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0379-0>
- Njateng GSS, Du Z, Gatsing D, Mouokeu RS, Liu Y, Zang HX, Gu J, Luo X, Kuate JR. 2017. Antibacterial and antioxidant properties of crude extract, fractions and compounds from the stem bark of *Polyscias fulva* Hiern (Araliaceae). **BMC Complement Altern Med** 17: 1 - 8. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1572-z>
- OMS. 2005. **Manual de Bioseguridad en el Laboratorio**. World Health Organization. Ginebra. Suiza.
- Ordoñez-Santos LE, Hurtado Aguilar P, Ríos Solarte OD, Arias Jaramillo ME. 2014. Concentración de carotenoides totales en residuos de frutas tropicales. **P + L** 9: 91 - 98.
- Pantoja-Chamorro A, Hurtado-Benavides A, Martínez-Correa H. 2017. Caracterización de aceite de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims.) procedentes de residuos agroindustriales obtenido con CO₂ supercrítico. **Acta Agron** 66: 178 - 185. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n2.57786>
- Paramythiotou E, Routsis. 2016. Association between infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria and mortality in critically ill patients. **World J Crit Care Med** 5: 111. <https://doi.org/10.5492%2Fwjccm.v5.i2.111>
- Pinto NCC, Campos LM, Evangelista ACS, Lemos AS, Silva TP, Melo RC, Lourenço CC, Salvador MJ, Apolônio ACM, Scio E, Fabri RL. 2017. Antimicrobial *Annona muricata* L.(soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Ind Crops Prod** 107: 332 - 340. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.054>
- Poljšak N, Kreft S, Kočevar Glavač N. 2020. Vegetable butters and oils in skin wound healing: Scientific evidence for new opportunities in dermatology. **Phytother Res** 34: 254 - 269. <https://doi.org/10.1002/ptr.6524>
- Quílez AM, Fernández-Arche MA, García-Giménez MD, De la Puerta R. 2018. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. **J Ethnopharmacol** 225: 244 - 270. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.014>
- Ramírez LS, Castaño DM. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. **Scientia et Technica** 15: 263 - 268.
- Rodríguez MP, Delgado BG, Llamas BRH. 2005. Fitosteroles y patentes: Sus aplicaciones en la industria farmacéutica. **Revista CENIC** 36.
- Samet AV, Shevchenko OG, Rusak VV, Chartov EM, Myshlyavtsev AB, Rusanov DA, Semenova MN, Semenov VV. 2019. Antioxidant activity of natural allylpolyalkoxybenzene plant essential oil constituents. **J Nat Prod** 82: 1451 - 1458. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00878>
- Sano M, Shimazaki S, Kaneko Y, Karasawa T, Takahashi M, Ohkuchi A, Takahashi H, Kurosawa A, Torii Y, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. 2020. Palmitic acid activates NLRP3 inflammasome and induces placental inflammation during pregnancy in mice. **J Reprod Dev** 66: 241 - 248. <https://doi.org/10.1262/jrd.2020-007>
- Shrestha PM, Dhillon SS. 2006. Diversity and traditional knowledge concerning wild food species in a locally managed forest in Nepal. **Agrofor Syst** 66: 55 - 63
- Soehnlein OS, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. 2017. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nat Rev Immunol** 17: 248 - 261. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.10>
- Subramanya SB, Venkataraman B, Meeran MFN, Goyal SN, Patil CR, Ojha S. 2018. Therapeutic potential of plants and plant derived phytochemicals against acetaminophen-induced liver injury. **Int J Mol Sci** 19: 3776. <https://doi.org/10.3390/ijms19123776>
- Suwalsky M, Vargas P, Avello M, Villena F, Sotomayor CP. 2008. Human erythrocytes are affected *in vitro* by flavonoids of *Aristolelia chilensis* (Maqui) leaves. **Int J Pharm** 363: 85 - 90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.005>
- Tang FS, Van Ly D, Spann K, Reading PC, Burgess JK, Hartl D, Baines KJ, Oliver BG. 2016. Differential neutrophil activation in viral infections: Enhanced TLR-7/8-mediated CXCL8 release in asthma. **Respirology** 21: 172 - 179. <https://doi.org/10.1111/resp.12657>
- Tang Y, Tsao R. 2017. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. **Mol Nutr Food Res** 61: 1600767. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600767>
- Torres OD, Velho L. 2009. Capacidades científicas y tecnológicas de Colombia para adelantar prácticas de bioprospección. **Revista CTS** 4: 55 - 68.
- Vandooren J, Knoops S, Aldinucci Buzzo JL, Boon L, Martens E, Opendakker G, Kolaczowska E. 2017.

Differential inhibition of activity, activation and gene expression of MMP-9 in THP-1 cells by azithromycin and minocycline versus bortezomib: A comparative study. **Plos One** 12: e0174853.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174853>

Villarreal-Ibarra EC, García-López E, López PA, Palma-López DJ, Lagunes-Espinoza LDC, Ortiz-García CF, Oranday-Cárdenas A. 2014. Plantas útiles en la medicina tradicional de Malpasito-Huimanguillo, Tabasco, México. **Polibotánica** 37: 109 - 134.

Yeh SH, Chang FR, Wu YC, Yang YL, Zhuo SK, Hwang TL. 2005. An anti-inflammatory ent-Kaurane from the stems of *Annona squamosa* that inhibits various human neutrophil functions. **Planta Med** 71: 904 - 909.

<https://doi.org/10.1055/s-2005-871234>