Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y anticolagenasa del extracto etanólico de flores de *Annona muricata* L. "guanábana"

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctora en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Sonia Marisol DELGADO CÉSPEDES

ASESOR

Dra. Norma Julia RAMOS CEVALLOS

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Delgado S. Polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y anticolagenasa del extracto etanólico de flores de *Annona muricata* L. "guanábana"- [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2024.

Metadatos complementarios: autor / asesor

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Sonia Marisol Delgado Céspedes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42045552
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9966-1930
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Dra. Norma Julia Ramos Cevallos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25469870
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4361-1330
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Dr. Américo Jorge Castro Luna
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25455526
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Dr. Jose Roger Juarez Eyzaguirre
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10609613
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Oscar Herrera Calderón
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44789288
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos terapéuticos

Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	No aplica
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.056445 Longitud: -77.085994
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2024
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las **16:00 hrs. del 17 de diciembre de 2024** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el: Dr. Américo Jorge Castro Luna e integrado por los siguientes miembros: Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (asesora), Dr. Oscar Herrera Calderón y el Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre, para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"POLIFENOLES, FLAVONOIDES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTICOLAGENASA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE FLORES DE *ANNONA MURICATA* L. "GUANÁBANA",** presentado por la Magíster en Ciencias - mención: Salud **Sonia Marisol Delgado Céspedes.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctora en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

MUY BUENO (18) DIECIOCHO

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Magíster en Ciencias - mención: Salud **Sonia Marisol Delgado Céspedes,** el Grado Académico de **Doctora en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las ..... hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las ..... hrs. del 17 de diciembre del 2024

Dr. Américo Jorge Castro Luna (P. P. D.E.)
Presidente

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P.P. T. C)
Miembro - Asesora

Dr. Oscar Herrera Calderón (P. Asoc. T.C.)
Miembro

Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre
Miembro

Observaciones:

.....

.....

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

LA DIRECTORA DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,

CONSTANCIA

00018-FFB-UPG-2023

Que, mediante procedimiento de la evaluación de originalidad, según Resolución Rectoral N° 007284-R—23 de la escala de valoración de similitud de la tesis intitulada: **Polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y anticolagenasa del extracto etanólico de flores de *Annona muricata* L. "guanábana",** presentado por **Sonia Marisol Delgado Céspedes,** con fecha de recepción 16/02/2023, con fecha de aplicación al programa de similitud el 04/08/2023 con el software utilizado el TURNITIN, con la configuración de exclusión material bibliográfico del índice de similitud, fuentes pequeñas y cadenas menores a 20 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **20%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18 y modificado mediante Resolución Rectoral N° 007284-R—23 de la escala de valoración de similitud.

Lima, 04 de agosto de 2023

UNMSM
Firmado digitalmente por RAMOS CEVALLOS Norma Julia FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.08.2023 14:57:07 -05:00

DRA. NORMA JULIA RAMOS CEVALLOS
DIRECTORA

NJRC/ecj

DEDICATORIA

DEDICATORIA

A Dios y la Santísima Virgen por permitirme cumplir este gran anhelo profesional.

A mis padres Leito Q.E.P.D† y Foshita por darme el mejor ejemplo de vida que guía mi camino personal y profesional.

A mis hermanos Carlos, Miguel, Hugo y César por su apoyo y motivación para concretar esta meta.

A mi familia, en especial a mis sobrinos y ahijados que deben seguir y mejorar el ejemplo de superación de sus abuelitos, sus padres, su tía y madrina.

A mi querida asesora Dra. Norma Ramos y al Dr. Américo Castro por su guía, orientación y apoyo incondicional para llevar a cabo la presente investigación.

Al Mg. Q.F. Nelson Bautista por su valioso aporte en el desarrollo de mi tesis.

SONIA MARISOL

ÍNDICE

RESUMEN
ABSTRACT
RESUMO
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 1
1.1 Objetivos 2
1.1.1 Objetivo general 2
1.1.2 Objetivos específicos 2
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 3
2.1. Antecedentes del problema 3
2.2. Aspectos teóricos 6
2.2.1. Taxonomía *Anona muricata* L. 6
2.2.2. Nombres comunes 6
2.2.3. Descripción botánica 6
2.2.4. Composición química de *Anona muricata L.* 8
2.2.5. Usos medicinales de *Annona muticata L.* 8
2.2.6. Antioxidantes 9
2.2.7. Capacidad antioxidante 9
2.2.8. El colágeno y las colagenasas 10
2.2.9. Capacidad anticolagenasa 10
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA 11
3.1. Tipo y diseño de estudio 11
3.2. Unidad de análisis 11
3.3. Población de estudios 11
3.4. Tamaño de muestra 11
3.5. Técnicas de recolección de datos 11
3.5.1. Recolección procesamiento de muestras 11
3.5.2. Obtención de extracto etanólico de flores de *Annona muricata* L. 11
3.5.3. Detección de los metabolitos secundarios 12
3.5.4. Determinación del contenido de polifenoles 12
3.5.5. Determinación del contenido de flavonoides por formación de complejos con tricloruro de aluminio 13
3.5.6. Determinación de la capacidad antioxidante por método de DPPH 13

3.5.7. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de captación del radical catiónico (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazina-6-sulfonato]) (ABTS.+) 13
3.5.8. Evaluación de la capacitad anticolagenasa 14
3.6. Análisis e interpretación de la información 15
CAPÍTULO IV. RESULTADOS 16
4.1. Detección cualitativa de los metabolitos secundarios 16
4.2. Cuantificación de polifenoles 17
4.3. Cuantificación de flavonoides 18
4.4. Capacidad antioxidante 19
4.5. Capacidad anticolagensa 21
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN 24
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES 29
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31
CAPÍTULO VIII. ANEXOS 36

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Características botánicas de algunas partes vegetales de guanábana 9

Figura 2. Curva de calibración de estándar de ácido gálico 17

Figura 3. Curva de calibración de estándar de quercetina 18

Figura 4. Linealidad del porcentaje de inhibición del radical DPPH según concentración del extracto 19

Figura 5. Porcentaje de inhibición del radical ABTS.+ según concentración del extracto 20

Figura 6. Comparación de los IC50 del extracto etanólico de las flores de Annona muricata L. frente a los radicales DPPH y ABTS 21

Figura 7. Curva de calibración de la capacidad anticolagenasa de de galato de epigalocatequina (EGCG) 22

Figura 8. Porcentaje de inhibición de colagenasa según las concentraciones del extracto etanólico de las flores de Annona muricata L. 23

Figura 9. Comparación de IC_{50} de la capacidad inhibitoria colagenasa de EGCG frente al extracto. 24

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Metabolitos secundarios en el extracto etanólico de la flor de Annona muricata L. 18

Tabla 2. Polifenoles totales en el extracto etanólico de las flores de Annona muricata L. 17

Tabla 3. Flavonoides en el extracto etanólico de las flores de Annona muricata L. 18

Tabla 4. Capacidad antioxidante (% inhibición y IC_{50}) del extracto etanólico de las flores de Annona muricata L. frente al radical DPPH 19

Tabla 5. Capacidad antioxidante (% Inhibición) del extracto etanólico de las flores de Annona muricata L. frente al radical ABTS 20

Tabla 6. Capacidad anticolagenasa (% Inhibición) de galato de epigalocatequina (EGCG) 21

Tabla 7. Capacidad anticolagenasa (% Inhibición) del extracto etanólico de las flores de Annona muricata L. 22

Tabla 8. Comparación de IC_{50} de la capacidad inhibitoria colagenasa de EGCG y el extracto etanólico de las flores de Annona muricata L. 23

RESUMEN

En el presente trabajo nos propusimos investigar y cuantificar la concentración de polifenoles totales y determinar la capacidad antioxidante y anticolagenasa del extracto etanólico de las flores de *Annona muricata L.* (guanábana). Se recolectaron flores en la provincia de Jaén (Cajamarca, Perú). El extracto etanólico fue obtenido por maceración de las flores secas y pulverizadas, seguida de la evaluación cualitativa de los componentes químicos. La cantidad de polifenoles en el extracto se determinó utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu, con ácido gálico como patrón, y los flavonoides se cuantificaron por el método de formación de complejos con tricloruro de aluminio. Para evaluar la capacidad antioxidante se emplearon los métodos de captación del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) y radical catiónico (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazina-6-sulfonato]) (ABTS•+), usando el Trolox como patrón para ambos. Se evaluó la actividad Antienzimática frente a la enzima colagenasa, el estándar fue EGCG y se tomó como referencia el IC50. La marcha fitoquímica fue utilizada para determinar los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto etanólico de las flores de *Annona muricata L.* El total de polifenoles fue de 10,946 ± 0,008 mg EAG/g, mientras que los flavonoides fueron de 63,800 ± 0,0050 mg QE/g. Los IC50 (Concentración Inhibitoria Media) en la evaluación de actividad antioxidante fueron 104,28 µg/mL para el radical DPPH y 73,22 µg/mL para el radical ABTS•+, mientras que el IC50 para la actividad anticolagenasa fue de 285,27 µg/mL. Los resultados obtenidos indican que el extracto etanólico de las flores de *Annona muricata L.* contiene polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante, siendo esta última más eficaz en neutralizar el radical ABTS•+. La capacidad inhibitoria de colagenasa del extracto etanólico fue ligeramente inferior al estándar ECGC.

Palabras clave: *Annona muricata* L., flavonoides, polifenoles, antioxidante, anticolagenasa.

ABSTRACT

In the present study, we investigated and quantified the concentration of total polyphenols and determined the antioxidant and anticollagenase capacities of the ethanolic extract of *Annona muricata L.* (soursop) flowers. Flower samples were collected from the province of Jaén (Cajamarca, Peru). The ethanolic extract was produced by maceration of dried and pulverized flowers, followed by a qualitative evaluation of the chemical components. The number of polyphenols in the ethanolic extract of flowers was determined using the Folin-Ciocalteu technique, with gallic acid as a standard, and flavonoids were quantified by the method of complex formation with aluminum trichloride. DPPH and ABTS+ radical scavenging methods were used to evaluate the antioxidant capacity, using Trolox as the standard. Anticollagenase activity was evaluated against *the Clostridium histolyticum* enzyme, with EGCG as a reference, and the IC_{50} values were compared. The phytochemical study was used to determine the phenolic and flavonoid compounds present in the ethanolic extract of the flowers of *Annona muricata L.* The total polyphenol content was 10.946 ± 0.008 mg EAG/g, whereas the flavonoid content was 63.800 ± 0.0050 mg QE/g. The IC_{50} in the evaluation of antioxidant activity were 104.28 µg/mL for the DPPH radical and 73.22 µg/mL for the ABTS-+ radical, while the IC_{50} for the anticollagenase activity was 285.27 µg/mL. The results obtained indicate that the ethanolic extract of *Annona muricata* L. flowers contains polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity, the latter being more effective in neutralizing the ABTS+ radical. The collagenase-inhibitory capacity of the ethanolic extract was slightly lower than that of the ECGC standard.

Key words: Annona muricata L., flavonoids, polyphenols, antioxidant, anticollagenase.

RESUMO

No presente trabalho propusemos investigar e quantificar a concentração de polifenóis totais e determinar a capacidade antioxidante e anticolagenase do extrato etanólico das flores de *Annona muricata* L. (graviola). As mostras de flores foram coletadas na província de Jaén (Cajamarca, Perú). O extrato etanólico foi produzido pela maceração das flores secas e pulverizadas, seguida da avaliação qualitativa dos componentes químicos. A quantidade de polifenóis no extrato etanólico da flor foi determinada pela técnica de Folin-Ciocalteu, tendo como padrão o ácido gálico, e os flavonoides foram quantificados pelo método de formação do complexo de tricloreto de alumínio. Para avaliar a capacidade antioxidante, foram utilizados os métodos de sequestro de radicais DPPH e ABTS•+, tendo o Trolox como padrão para ambos. A atividade anticolagenase contra a enzima *Clostridium histolyticum* foi avaliada, com EGCG como referência, o IC50 pôde ser contrastado. A marcha fitoquímica foi utilizada para determinar os compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato etanólico de Annona muricata L. Os polifenóis totais foram 10,946 ± 0,008 mg EAG/g, enquanto os flavonóides foram 63,800 ± 0,0050 mg QE/g. Os IC50 (Concentração Inibitória Média) na avaliação da atividade antioxidante foram 104,28 µg/mL para o radical DPPH e 73,22 µg/mL para o radical ABTS•+, enquanto o IC50 para atividade anticolagenase foi de 285,27 µg/mL. Os resultados obtidos indicam que o extrato etanólico das flores de *Annona muricata* L. contém polifenóis, flavonoides e atividade antioxidante, sendo esta última mais eficaz na neutralização do radical ABTS•+. La capacidad inhibitoria de colagenasa del extracto etanólico fue ligeramente inferior al estándar ECGC.

Palavras-chave: *Annona muricata* L., flavonoides, polifenóis, antioxidante, anticolagenase.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las flores de *Annona muricata* L. proveniente del distrito Jaén, provincia de Jaén, departamento de Cajamarca, son una alternativa natural con alta actividad antioxidante. Este recurso, que contiene metabolitos secundarios como flavonoides, polifenoles y alcaloides, ha demostrado ser efectivo en la reducción de radicales libres, lo que ayuda a prevenir el daño celular. Dicho daño celular puede desencadenar una variedad de enfermedades, desde condiciones menores hasta enfermedades más graves como hipertensión y cáncer. Además, factores externos como la radiación ultravioleta (UV) pueden provocar estrés oxidativo en la piel, lo que crea un ambiente propicio para la acción de enzimas como colagenasa y elastasa, las cuales pueden dañar componentes importantes de la matriz extracelular dérmica, promoviendo así el envejecimiento celular. Sin embargo, el uso de propóleo puede ayudar a contrarrestar este efecto negativo al proporcionar una protección antioxidante eficaz.

Como resultado, analizar la cantidad de polifenoles y flavonoides, junto con la capacidad antioxidante y anticolagenasa del extracto etanólico de flores de *Annona muricata* L., proporcionar una opción terapéutica natural alternativa a los medicamentos sintéticos, los extractos se pueden aplicar fácilmente en la piel en forma de geles y cremas.

En tal sentido, en este trabajo también se ha realizado la capacidad inhibitoria de la enzima colagenasa in vitro del extracto etanólico de las flores de la planta *Annona muricata.* Esto podría ser beneficioso para la comunidad al tratar el incremento de enfermedades de la piel y el envejecimiento celular prematuro, lo cual representa una opción terapéutica más accesible y sostenible, con el potencial de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar el contenido de polifenoles y de flavonoides así como la actividad antioxidante y anticolagenasa del extracto etanólico de las flores de *Annona muricata* L.

1.1.2 Objetivos específicos

a) Determinar el contenido total de flavonoides y polifenoles totales en el extracto etanólico de las flores de *Annona muricata* L.

b) Determinar la capacidad antioxidante del extracto, mediante los métodos DPPH y $ABTS^{\bullet+}$.

c) Determinar la actividad anticolagenasa del extracto etanólico de las flores de *Annona muricata* L.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del problema

Las principales causas de morbimortalidad en los seres humanos, a nivel global, es el cáncer. Para su tratamiento se usan varias estrategias, por lo que pueden inducir a reacciones adversas. A manera de prevención se investigan otros mecanismos, poniendo de manifiesto el uso de sustancias antioxidantes que están en diversas fuentes naturales, en particular se encuentran en los vegetales[1].

Sabemos que los recursos vegetales son fuentes significativas de compuestos bioactivos con potenciales usos en el tratamiento y prevención de enfermedades, en particular el cáncer. La especie más estudiada y conocida de este género es *Annona muricata* L, crece en regiones tropicales y subtropicales del continente americano y conocida comúnmente con el nombre de "guanábana", pertenece a la familia de chirimoya y es un árbol perenne con frutos grandes del género Annona[2].

En nuestro país se cultivan en las regiones de Loreto, San Martín, Lambayeque, Cajamarca, Ucayali, La Libertad, Junín, Ica y Lima[3]. Estudios realizados sobre A. muricata L., evidenciaron disímiles propiedades, destacando actividades anticancerígenas, vasodilatadoras, antihiperglucémicas, antimaláricas, hepatoprotectora, antihipertensivas, antiparasitarias, antihiperlipidémicas, antibacteriana y antivirales1. Identificando componentes químicos como acetogeninas, flavonoides, taninos, alcaloides, cumarinas y terpenoides[4]. Últimamente se han investigado diferentes segmentos de la planta; los extractos de hojas han mostrado resultados prometedores de su "actividad antioxidante, anticáncer, antiulceroso y antidiabético; así como su actividad contra α-amilasa, α-glucosidasa y lipasa"[5].

Es menester indicar que las especies reactivas de oxígeno (ERO), generadas a nivel intracelular, son oxidantes que están implicados con mutaciones y daños celulares. Estudios en modelos in vitro de extractos metabólicos acuosos de hojas y semillas de *A. muricata* L", mostraron efectos neutralizantes de ERO con consecuente efecto protector del ADN[6]. Estas evidencias generan expectativas positivas de investigar la capacidad antioxidante de los extractos no solo de las hojas, sino también de otras partes de la planta, siendo uno de estos los extractos etanólicos de las flores. En este

trabajo se ha realizado la cuantificación de los polifenoles, flavonoides; se ha determinado la capacidad "anticolagenasa y antioxidante del extracto etanólico de las flores de *Annona muricata* en muestras procedentes de Jaén" (Cajamarca, Perú).

Por otro lado, el colágeno es la proteína que le proporciona fuerza y soporte a la piel humana dándole elasticidad y resistencia. La reducción del contenido de colágeno en el tejido de la piel está asociado a la actividad de la enzima colagenasa, esta enzima degrada al colágeno generando la degeneración de la piel, lo cual se manifiesta mediante las arrugas y la flacidez[7].

Con el paso del tiempo en la vida de una persona la pérdida de entrecruzamiento del colágeno en la piel aumenta, así que resulta imprescindible implementar tácticas que permitan disminuir el envejecimiento de la piel como resultado de la reducción del colágeno. La inhibición enzimática de la colagenasa es una buena alternativa para minimizar el envejecimiento de la piel[8].

Los extractos se pueden aplicar fácilmente en la piel en forma de geles y cremas. En tal sentido, en este trabajo también se ha determinado la capacidad inhibitoria de la enzima colagenasa in vitro del extracto etanólico de las flores de la planta Annona muricata. La guanábana (*Annona muricata L.*) es una planta que proviene originalmente de la región tropical de América del Sur, pero ha sido llevada a muchos otros países. Alcanza un crecimiento óptimo hasta los 100 metros de altitud y se la clasifica como una planta tropical que no es resistente al frío. Se conocen diversos usos medicinales de esta; los brotes tiernos y las hojas se emplean con fines anticancerígenos; mientras que la corteza como antibacteriano y antiulceroso; por su parte, las hojas se usan como sedativo, antiespasmódico, antimalárico, vasodilatador y antidiabético[9,10]**.**

Como antecedentes del estudio se mencionan los siguientes trabajos:

Nantarat *et al* [11], realizaron la evaluación de la capacidad antioxidante, anticolagenasa y antihialuronidasa del diglucósido de sesaminol aislado de la torta de semillas de sésamo negro. El diglucósido fue aislado mediante la extracción sucesiva con n-hexano, acetato de etilo, etanol y metanol. La actividad antioxidante se determinó mediante el método de DPPH y poder antioxidante reductor férrico (FRAP), y la capacidad anticolagenasa se determinó mediante la reacción enzimática y de

fluorescencia. El IC_{50} de la actividad inhibitoria fue de 0,26 ± 0,01 mg/mL, siendo superior a la vitamina C, el cual fue su estándar.

Angelis *et al.*[12], realizaron la evaluación fitoquímica y actividad inhibidora de tirosinasa, elastasa y colagenasa del extracto hidroalcohólico de las flores de olivo (*Olea europaea* L.). Mediante la UPLC-HRMS/MS del extracto determinaron la presencia de feniletanoides, triterpenoides, flavonoides y secoiridoides. La actividad frente a la colagenasa fue determinada mediante el método espectroflurométrico. De los metabolitos estudiado, los secoiridoides mostraron una actividad anticolagesa importante, sin embargo, la actividad ante la tirosina y elastasa fue casi nula.

Baskar *et al.*[13], en un estudio de capacidad antioxidante de varias especies del género *Annona* mediante los métodos de DPPH y ABTS comprobaron que la actividad antioxidante ejercida por *Annona muricata* fue superior a otras especies como *Annona squamosa* y *Annona reticulata.* Concentración de 500µg/mL, el extracto etanólico, exhibió la mayor actividad de barrido con 90,05% para ABTS, seguido de la eliminación de radicales hidroxilos 85,88% y óxido nítrico 72,60%. No obstante, el mismo extracto mostró una moderada actividad inhibitoria de peroxidación lipídica. Asimismo, el extracto de *A. reticulata* presentó mayor inhibición para el radical DPPH con 89,37% y para el radical superóxido con 80,88%. Por último, el extracto de *A. squamosa* mostró una menor inhibición, salvo para el radical hidroxilo con 79,79%.

Mat Daud *et al.*[14], estudiaron el extracto de hojas de *A. muricata*, el contenido de fenoles, flavonoides y la actividad antioxidante mediante el método de DPPH. Los componentes fenólicos fueron de 47,26 mg GAE / 1g + 0.001 y los flavonoides de 22,12 mg CE / 1g + 0.001. El extracto para DPPH tuvo el porcentaje más alto de actividad de barrido con IC_{50} de 0,243 mg/mL + 0,001 casi comparable a hidroxianisol butilado (BHA) y ácido ascórbico (Vit. C). Los autores concluyeron que las hojas de *A. muricata* contienen importantes propiedades antioxidantes que puede actuar como agente anticancerígeno.

Roduan *et al.*[15] en la determinación del efecto antioxidante de varias fracciones de *Annona muricata* (AM) y la anotación a través de varios ensayos no dieron mucha diferencia en términos de las propiedades oxidativas de la muestra. El nivel de antioxidantes mediante el método ABTS se clasificó de la siguiente manera: AMLM (ext. metanólico de hojas de AM) > AMFA (ext. acuoso de frutas) > AMLD (ext.

diclorometano de hojas) > AMLE (ext. etanólico de hojas) > AMLA (ext. acuoso de hojas) > AMLH (ext. hexano de hojas)> annonacin; mientras que en el ensayo de reducción férrica (FRAP), el nivel de antioxidante se clasifica como AMLM > AMLD > AMLE > AMFA > AMLH > AMLA > anonacina. Además, la eficacia de eliminación de radicales libres por *Annona muricata,* determinada mediante el método de DPPH, se clasificó de la siguiente manera: AMLM > AMFA > AMLD > AMLE > AMLA > AMLH > anonacina. En todos los ensayos utilizados, AMLM mostró el nivel antioxidante más alto con el valor más bajo de concentración efectiva (IC50), lo que indica una eficacia de eliminación de los radicales libres de 50% a una concentración muy baja; esto, debido a que los diversos componentes de los extractos (saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides, entre otros) actúan en sinergia y la concentración de estos varían por la polaridad de los solventes usados.

Justino *et al.*[5]**,** evaluaron la capacidad antioxidante, potencial inhibitorio contra α-amilasa, α-glicosidasa y lipasa de los extractos de n-butanol y acetato de etilo de las hojas de *Anona muricata.* La capacidad antioxidante se evaluó mediante los métodos DPPH, ORAC, FRAP y Fe^{+2}, realizando una comparación con el ácido ascórbico. Los extractos de acetato de etilo y n-butanol mostraron capacidad antioxidante para ORAC 3964 ± 53 y 2707 ± 519 μmol trolox eq g^{-1}, FRAP 705 ± 35 y 289 ± 18 μmol trolox eq $g^{-}1$ y DPPH IC_{50} 4.3 ± 0,7 y 9.3 ± 0,8 μgmL^{-1}, respectivamente. Los autores concluyeron que la importante capacidad antioxidante se debió a la presencia de ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina y kaempferol en ambos extractos.

Yang *et al.*[4] estudiaron las interacciones sinérgicas de los flavonoides y acetogeninas de las hojas de *Anona muricata* en la protección del cáncer de próstata. El efecto del extracto etanólico lo compararon frente a rutina y quercetina 3-glucósido. En una dosis por vía oral de 100 mg/kg de peso corporal de los ratones el extracto etanólico mostró efecto inhibitorio del crecimiento tumoral en aproximadamente 1,2 veces mayor que la de flavonoides en xenoinjertos de tumores de próstata humanos. Los autores concluyeron que el mayor efecto se debe al efecto sinérgico de los fitoquímicos existentes en el extracto de hojas.

Chatatikun *et al.*[16], estudiaron la capacidad antioxidante, antitirosinasa y actividad anticolagenasa en tres extractos de hojas de 14 plantas tailandesas. Realizaron la extracción de las hojas con tres solventes (éter de petróleo, diclorometano y etanol), los compuestos fenólicos fueron determinados mediante el método Folin-Ciocalteu, la

capacidad antioxidante mediante los métodos de DPPH y ABTS y la capacidad inhibitoria frente a la enzima del *Clostridium histolyticum*. El mayor contenido de los compuestos fenólicos fue encontrado en el extracto etanólico; asimismo, fracciones etanólicas de *Annona squamosa* L., *Ardisia elliptica* Thunb y *Senna alata* (L.) Roxb, tuvieron alta capacidad antioxidante e inhibieron significativamente la colagenasa. Los autores concluyeron que los extractos etanólicos de las hojas de tres plantas constituyen un potencial ingrediente para cosméticos antiarrugas y antimanchas.

Madan N y Nanda S[8], evaluaron *in vitro* las capacidades antioxidantes, antielastasas, anticolagenasas y antihialuronidasa del safranal; asimismo, determinaron el factor de protección solar en el fotoenvejecimiento cutáneo. La capacidad antioxidante se determinó mediante el método DPPH, la capacidad inhibitoria frente a las tres enzimas se determinó mediante el método espectrofotométrico. El IC50 frente a DPPH fue de 22,7 µg/mL. Los IC50 para inhibición de elastasa fue de 43,6 µg/mL, para la antihialuronidasa fue de 70 µg/mL y para antiolagenasa fue de 9,4 µg/mL. Los autores concluyeron que el safranal es un buen agente protector, por lo que, se pueden agregar a productos antienvejecimiento a base de vegetales.

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. Taxonomía *Anona muricata* L.

Según el Sistema Integrado de Clasificación de los Angiospermas de Cronquist. (1981), ocupa la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona muricata* L.

2.2.2. Nombres comunes

En Perú se conoce con los nombres de guanábana, huanábano, masasamba, corosol, cachimán y cashacushma; en Brasil con los nombres de araticum,

araticum-do-grande, coracao da-rainha, condessa; en México como takole, pobox, ajpox, cabeza de negro; catuch, chincua, guanábana y guanábano[10].

2.2.3. Descripción botánica

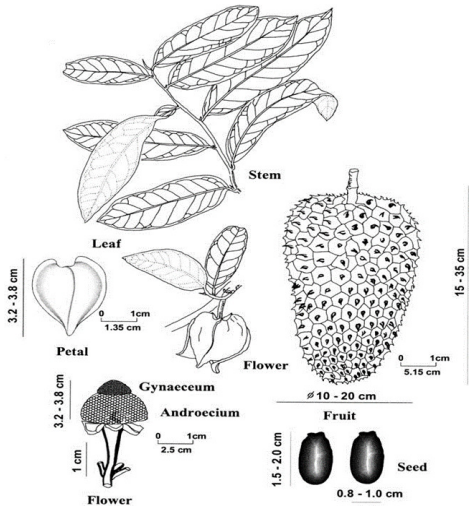
Es un árbol pequeño, delgado y perenne, llega a medir de 4 a 8 m de altura en su etapa de madurez. Es cultivado como una planta ornamental y frutal en las costas de América del Sur. Se encuentra en los linderos occidentales del territorio peruano. Se trata de una especie heliófila, la cual necesita mucha luz solar para sobrevivir; asimismo, prefiere terrenos húmedos con tierra negra y humus, así como también terrenos arenosos y arcillosos; es una especie que se desarrolla mejor en suelos con grandes cantidades de nutrientes.

Es una planta muy ramificada, sus tallos son viejos rollizos de color marrón claro sin lenticelas. Las hojas alternas presentan pecíolos cortos, con forma oblongo-ovada y cilíndrica con una longitud que varía entre 14 y 16 cm, y un ancho que oscila entre 5 y 7 cm., cremoso en las nervaduras principales y secundarias, en la superficie adaxial[10].

Las flores son solitarias, opuestas a las hojas, trímeras, con forma de rueda, y son perfectas, con un tallo redondeado y oscuro, cubierto por una densa capa de pelos simples y transparentes, y tienen un cáliz con tres lóbulos; la longitud de *Annona muricata* L. es mucho más grandes (3,2 a 3,8 cm.) que las de las otras cuatro especies (*A. cherimola* Mill., *A. reticulata* L., *A. senegalensis* Pers., *A. squamosa* L.). Las flores comienzan a abrir temprano en la mañana y la antesis completa dura aproximadamente 6 h, dependiendo del clima. Esta planta tiene una floración bastante constante. Aunque suele polinizarse de forma natural de manera poco eficaz (normalmente por medio de escarabajos) y frecuentemente un pobre cuajado de frutos; por lo tanto, la polinización manual es una práctica importante de gestión de huertos.

El fruto es ovalado, cónico en forma de corazón, que es verde oscuro cuando está inmaduro y un verde ligeramente más claro cuando está maduro. La corteza tiene muchas protuberancias de carpo cortas, carnosas y puntiagudas y es popularmente considerada como "espinosa". La fruta crece durante gran parte del año, pero existen épocas más definidas de acuerdo con la altura. Se distribuyen en regiones tropicales de América Central y del Sur, África

Occidental y el sudeste asiático, preferentemente a altitudes inferiores a 1200 metros sobre el nivel del mar. Se desarrollan en condiciones de temperatura que oscilan entre 25 y 28°C, acompañadas de una humedad relativa que varía entre 60 a 80%. El fruto de guanábana es comestible y se presenta en forma de bayas ovoides. El peso promedio es de 4 kg en algunas naciones, pero en México, Nicaragua y Venezuela, fluctúa entre 0,4 y 1,0 kg. Contienen entre 55-170 semillas lenticulares, negras al estar frescas y marrón claro cuando se secan. Dentro del fruto hay una pulpa blanca, cremosa con aroma particular y gusto dulce amargo[9].



Fuente: *Annona* species (2005)[17]

Figura 1. *Características botánicas de algunas partes vegetales de guanábana*

2.2.4. Composición química de *Anona muricata* L

Más de 212 compuestos bioactivos han sido identificados en *Anona muricata*; las acetogeninas están presentes en mayor cantidad, seguida por alcaloides, compuestos fenólicos, entre otros. Las semillas y las hojas son las principales partes de la planta estudiadas y son los más utilizados en la medicina tradicional. La mayoría los metabolitos secundarios han sido recuperados de extractos orgánicos y algunos extractos acuosos[10].

Los alcaloides se han evidenciado en las hojas, tallos, fruto, corteza y raíz; a los diferentes grupos de alcaloides se debe los efectos antidepresivos, antipalúdico, citotóxico, neurotóxico y estimulante del sistema inmunológico. Las acetogeninas se ha identificado en las semillas, raíz y pulpa; los diferentes grupos de acetogeninas le proporciona el efecto citotóxico, antitumoral,

insecticida, antimicrobiano y antileshmaniasis. La capacidad antioxidante se debe a compuestos fenólicos, destacando el ácido clorogénico y flavonoides; estos compuestos se han detectado en las hojas y la pulpa. Además, de los compuestos mencionados, se han identificado vitaminas A, C y E en las semillas, hojas y pulpa; carotenoides como betacaroteno, alfa tocoferol y licopeno en pulpa, compuestos que le proporcionan capacidad antioxidante[18]. Según las bibliografías consultadas no se ha realizado la identificación de los componentes bioactivos en las flores.

2.2.5. Usos medicinales de *Annona muticata* L

Las hojas, corteza, fruto y semilla de *A. muricata* han sido utilizados con diferentes fines medicinales. Las formas de uso de estas partes son en decocción. En Perú la pulpa del fruto y las hojas se usan en jugos e infusiones por vía oral para en el tratamiento de obesidad, gastritis, dispepsia, diabetes, inflamación, cáncer, espasmos, gripe, febrífugo, antiestrés, próstata, infección e inflamación**.** En Brasil se utilizan las hojas como analgésico en caso de picaduras por serpientes, dolores articulares, reumatismo, neuralgias y reducción de peso, y los frutos como astringente para el tratamiento de diarreas; en Bolivia, la fruta y las hojas se usan por vía oral para los desórdenes renales e hipertensión; en Colombia se usan la fruta y la hojas por vía oral para la fiebre y la inflamación; en Cuba la infusión de las hojas se utiliza para diarreas, como abortivo y tratamiento de resfrío; en Ecuador se usan las hojas por vía local para el tratamiento de reumatismo; en Filipinas, las hojas son utilizadas para tratamiento de caspa y piojos; en Tailandia, las semillas son utilizadas como insecticida; en La India se usan las hojas como febrífugo, supurativo y para el dolor; en Sud África se utiliza la decocción de las hojas por vía oral para como sedante, problemas nasofaríngeos, diarrea, disentería, vermífugo y antídoto[10].

2.2.6. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos capaces de atrapar y neutralizar los radicales libres, como las especies reactivas del oxígeno, estos pueden producir procesos degenerativos de las células del organismo; por lo que, los antioxidantes pueden retrasar, controlar o prevenir el estrés oxidativo. En el organismo muchas enzimas cumplen funciones de neutralización de especies reactivas del

oxígeno y otros oxidantes, siendo estos considerados como antioxidantes endógenos; sin embargo, estas enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) se encuentran en bajas concentraciones y no neutralizan por completo los oxidantes lo que genera inevitablemente el envejecimiento de los tejidos. Frente a esta situación es necesario el uso de antioxidantes exógenos no enzimáticos que se encuentran en los vegetales como la vitamina E, vitamina C, carotenoides, flavonoides y compuestos fenólicos; estos compuestos ayudar a prevenir el envejecimiento y las enfermedades oxidativas[19].

2.2.7. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los compuestos es la medición de la capacidad de neutralización de los radicales libres *in vitro*; es importante porque permite examinar la eficacia de los antioxidantes antes de los estudios *in vivo* y poder emplearlos en la prevención o el tratamiento de enfermedades ligadas al estrés oxidativo. Los métodos utilizando se clasifican en tres categorías: espectrofotometría, técnicas electroquímicas y cromatografía. La primera cubre los métodos como: la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la capacidad antioxidante de radicales hidroxilo (HORAC), el parámetro antioxidante de atrapamiento de radicales peroxilo total (TRAP), el poder antioxidante reductor cúprico (CUPRAC), el poder antioxidante reductor férrico (FRAP), el poder reductor de ferricianuro de potasio (PFRAP), el ensayo de captación de radicales ácido 2,2′-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), el ensayo de eliminación de radicales 2,2-di(4-terc-octilfenil)-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el análisis fluorimétrico. El segundo: voltamperometría, amperometría y biamperometría. El tercero incluye: cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)[19].

2.2.8. El colágeno y las colagenasas

El colágeno es una proteína de tres cadenas polipeptídicas. Constituye el principal elemento de la matriz extracelular como componente estructural del tejido conectivo. Es la proteína relacionada con enfermedades y el envejecimiento de la piel. La degradación de esta proteína se realiza mediante la activación de la enzima colagenasa, pero existe disminución de la síntesis

del colágeno por el estrés oxidativo. Las colagenasas son metaloproteinasas que hidrolizan el colágeno, pero también otras proteínas como: agrecano, elastina, fibronectina, gelatina y laminina. La colagenasa rompe el "enlace X-gly" del colágeno, así como, los péptidos sintéticos que contienen la secuencia "-Pro-X-Gly-Pro", donde X es prácticamente otro aminoácido siempre que el extremo amino esté bloqueado[20].

2.2.9. Capacidad anticolagenasa

La radiación UV-A proveniente del sol penetra la piel, generando cambios en el ADN de las células y las especies reactivas de oxígeno (ERO). Estos cambios estimulan la producción de colagenasa y hialuronidasa provocando el deterioro del colágeno y el ácido hialurónico, lo cual se traduce en el envejecimiento de la piel[8]. El fotoenvejecimiento se puede prevenir utilizando los fitoquímicos como los triterpenos, polifenoles y esteroles. Estos fitoquímicos, presentes en los vegetales, también poseen el potencial de inhibir las enzimas responsables de la degradación de la elastina y el colágeno en la piel[11].

El estudio de la capacidad anticolagenasa, es el estudio de la capacidad de inhibición *in vitro* de ciertos compuestos y extractos vegetales. La colagenasa de *Clostridium histolyticum* tiene la capacidad de degradar la matriz extracelular; por lo que, los estudios *in vitro* se realizan con esta enzima utilizando un péptido sintético. La actividad anticolagenasa se determina en % de inhibición o IC_{50}[21].

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Diseño y tipo de estudio

La investigación tiene alcance Explicativo y de diseño Experimental.

3.2. Unidad de análisis

Las Flores de "*Annona muricata* L. (guanábana) en extracto etanólico"

3.3. Población de estudios

Flores de "*Annona muricata* L. (guanábana)"

3.4. Tamaño de muestra

Se colectaron aproximadamente 5 kg de flores de *Annona muricata* L.

3.5. Técnicas de recolección de datos

3.5.1. Criterios de inclusión

Flores de *Annona muricata* L. procedente del distrito del distrito de Jaén, provincia de Jaén, departamento de Cajamarca-Perú debidamente seleccionado.

3.5.2. Criterios de exclusión

Flores de *Annona muricata* L. procedente de otro distrito, provincia o departamento.

3.6. Parte experimental

3.6.1. Recolección y procesamiento de muestras

Las flores de *Annona muricata* L se colectaron en el distrito de Jaén, provincia de Jaén, departamento de Cajamarca-Perú. Se trabajó con 5 Kg de flores fueron escogidas, lavadas y secadas a 40 ºC en una estufa con aire circulante hasta peso constante. El producto seco se trituró con un molino de cuchillas, del cual se pesó 500 g, almacenándose en frascos de color ámbar a 4 °C hasta el momento del análisis[22]. La clasificación taxonómica de la especie vegetal se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM (Anexo 1).

3.6.2. Obtención de extracto etanólico

El total del polvo de flores de *Annona muricata* obtenido se colocó en un frasco ámbar de vidrio de boca ancha agregándose 4 L de etanol 96º cubriendo el

pulverizado, homogeneizándose mediante agitación y dejándose en maceración durante siete días con agitación manual cada 24 h; después de este tiempo se filtró y concentró en un evaporador rotatorio. Posteriormente, el extracto obtenido, se puso a desecar con aire circulante en una estufa hasta peso constante, obteniéndose un peso de 52 g y posterior almacenado en una estufa a 42 ºC[16].

3.6.3. Detección de los metabolitos secundarios

La detección de los metabolitos secundarios se realizó en el extracto crudo por análisis fitoquímico. Los componentes químicos se detectaron mediante reacciones de coloración y precipitación que permitieron identificar la presencia de: flavonoides con el reactivo de Shinoda, polifenoles con cloruro férrico, gelatina para la detección de taninos, reactivo Borntrager, para la detección de naftaquinonas, antraquinonas y antronas; el reactivo de Lieberman-Burchard para la detección de triterpenoides; Dragendorff, Wagner, Bertrand, Popoff y Mayer para la detección de alcaloides; Baljet para la detección de heterósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas; vainillina/H_2SO_4 para la detección de glicósidos; Salkowsky para terpenoides y saponinas por el índice afrosimétrico[23].

3.6.4. Determinación del contenido de polifenoles

Se pesaron 0,2 g del extracto etanólico seco y se mezclaron con 5 mL de metanol al 70 % en un baño María a 70 °C, agitando constantemente durante 10 minutos. Posteriormente, se enfrió hasta temperatura ambiente, centrifugándose a 400 rpm durante 10 minutos. La cuantificación de polifenoles totales se hizo por el método de Folin-Ciocalteu. El sobrenadante fue recogido en un tubo graduado y llenado hasta alcanzar los 10 mL con una solución de metanol al 70 %. A partir de este volumen se tomó 4 mL y se realizó la dilución con agua hasta 100 mL. Se tomó 100 µL de la dilución, se colocó en tubo de ensayo y agregó 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 0,2 N. Se incorporó 400 µL de carbonato de sodio 7,5 % w/v a la mezcla, la cual fue agitada y dejada reposar durante 60 minutos en un ambiente oscuro. Transcurrido el tiempo, se procedió a medir la absorbancia de la muestra utilizando un espectrofotómetro UV-Vis en 765 nm. El valor de los polifenoles

se determinó mediante la curva de calibración construido con el patrón ácido gálico y se expresó como equivalente de ácido gálico (EAG) en g/100 g de extracto etanólico seco. Para la curva de calibración, el ácido gálico se preparó a concentraciones de 0, 30, 60, 90 y 120 µg/mL y se verificó la linealidad mediante la curva de absorbancia frente a la concentración del patrón[16,24]. El ensayo se realizó por triplicado.

3.6.5. Determinación del contenido de flavonoides

Los flavonoides poseen la característica de ser quelantes y forman el complejo aluminio-flavonoide a condiciones específicas de pH. Se realizó el método según Serrano *et al.*[25], tomando 400 µL de una concentración de extracto de 1,17 mg/mL, se añadió 50 µL de $NaNO_2$ al 5%. Se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 50 µL de $AlCl_3$ 2,5%, se agitó y dejó reposar por 6 min, por último, se agregaron 700 µL de NaOH 1M dejándose reposar por 10 min. Este procedimiento se realizó por triplicado y se leyó a 500 nm en espectrofotómetro. El procedimiento fue repetido para establecer el nivel de quercetina entre los niveles de 5 a 50µg/mL. Los resultados se expresaron en mg QE/g de extracto.

3.6.6. Determinación de la capacidad antioxidante por método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH.)

Se prepararon 3 mL de varias concentraciones de extracto de: 20,83; 41,67; 83,33 y 166,67 µg/mL disueltos en metanol y mezclaron con 1 mL de solución del radical DPPH 0,1 mmol/L, agitándose vigorosamente usando un vórtex, se dejó en reposo por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Para el blanco, se utilizó solo 3 mL de metanol. La absorbancia se midió a 517 nm en un espectrofotómetro. Como referencia se utilizó Trolox. Todas las mediciones se realizaron por tres veces.

Se evaluó la habilidad de captación de radicales DPPH mediante la siguiente expresión:

Porcentaje de inhibición de radical = (1- (Am – Ab) /As) x 100

Donde:

Am es la absorbancia de la muestra

Ab es la absorbancia del blanco

As es la absorbancia del radical.

La capacidad de eliminación de radicales de cada concentración del extracto se realizó gráficamente. Para la determinación de la IC_{50} se hicieron los cálculos de concentración de extracto que inhibe el 50 % del radical (reducir en un 50 % la cantidad inicial de DPPH)[26].

3.6.7. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de captación del radical catiónico (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazina-6-sulfonato]) (ABTS.+)

Se preparó ABTS.+ a partir de ABTS (7 mM) y persulfato potásico (2,45 mM) reaccionando en oscuro a temperatura ambiente durante 16 horas antes de usar. El radical ABTS.+ preparado se diluyó con tampón de fosfato de sodio pH 7,4 hasta una absorbancia de 0,7±0,1 a 754 nm. Se prepararon cuatro concentraciones diferentes (10, 20, 40 y 80 mg/mL). Se añadió 10 µl de cada muestra de extracto a 1 mL de solución ABTS.+ diluida, se mezcló, dejando en reposo 7 minutos y se realizó la lectura de absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro. Se utilizó Trolox como estándar de referencia y los resultados se expresaron como valores de % de inhibición del radical ABTS.+. La IC50 se determinó como la concentración del extracto que inhibe en 50 % del radical. Todos los análisis se realizaron por triplicado[24].

3.6.8. Evaluación de la capacitad anticolagenasa

La actividad inhibidora de colagenasa de extracto etanólico de flores de *Annona muricata* L se determinó mediante el método espectrofométrico. Los extractos se prepararon a 0, 75, 150 y 300 µg/mL en Tween 20 al 20 % en agua destilada, a cada solución del extracto se agregó 0,1 mg/mL de colagenasa de *Clostridium histolyticum* disuelta en $CaCl_2$ 10 mM en tampón de borato 125 mM, pH 7,5. La mezcla se incubó a 37 °C por10 minutos; seguidamente, a cada solución se agregó 190 µL del sustrato N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA, solución de 2,1 mM en buffer Tris-Glicine 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM $CaCl_2$ pH 7,5) y se incubó a 37 °C por 60 minutos. La solución del sustrato se preparó disolviendo en ácido acético 0,5 M, se ajustó el pH 6,7 con NaOH 0,5 M y se diluyó con agua destilada a la concentración de uso. Se agregaron 1-2 gotas de ácido fórmico al 10 % para detener el proceso y, para

leer las absorbancias, se utilizó un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible a una longitud de onda de 348 ηm. El ensayo también se realizó usando galato de epigalocatequina (EGCG) como punto de comparación y referencia. Las concentraciones que se trabajaron con EGCG fueron a 0, 50, 100 y µg/mL. El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática frente a la enzima se calculó mediante la siguiente ecuación:

% Inhibición = [(Acontrol - Amuestra) / Acontrol] x 100

Donde;

Fcontrol es la absorbancia del blanco.

Fmuestra es la absorbancia de la muestra de ensayo.

Tanto para la muestra y el patrón se calculó la IC50 y se realizó la comparación[11].

3.7. Análisis e interpretación de la información

Los datos fueron procesados mediante el programa Excel, luego se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para verificar las diferencias significativas entre las muestras según las concentraciones del extracto etanólico; se realizó el análisis de múltiples rangos mediante Tukey con 0,05 de significancia utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XIX.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Detección cualitativa de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de la flor de *Annona muricata L.*

Tabla 1. Metabolitos secundarios en el extracto etanólico de la flor de *Annona muricata L.*

Reactivos	Metabolito secundario	Resultado
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	++
Shinoda	Flavonoides	++
Gelatina	Taninos	-
Borntrager	Naftaquinonas, antraquinonas y antronas	+
Lieberman-Burchard	Triterpenoides	+
Dragendorff	Alcaloides	-
Wagner	Alcaloides	-
Bertrand	Alcaloides	-
Popoff	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	-
Baljet	Heterósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas	+
Índice afrosimétrico	Saponinas	+
Vainilla/H_2SO_4	Glicósidos	+
Sakowsky	Terpenoides	++

Leyenda: Evidencia alta (+++), evidencia media (++), evidencia baja (+), sin evidencia (-)

En la tabla 1 se muestra que, las reacciones positivas fueron para los compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides, naftaquinonas, antraquinonas y antronas, heterósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas, saponinas y glicósidos, siendo para los tres primeros con mayor intensidad; sin embargo, para taninos, alcaloides la reacción fue negativa.

4.2. Cuantificación de polifenoles

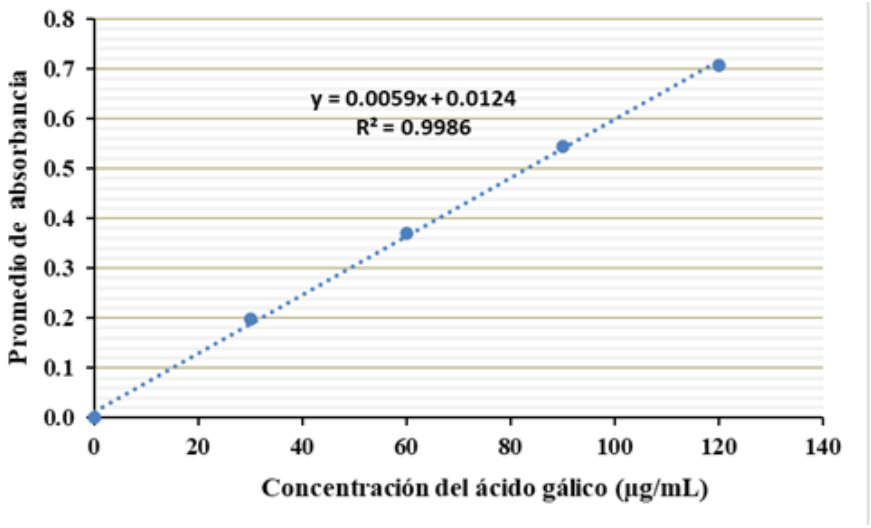


Figura 2. Curva de calibración de estándar de ácido gálico

La figura 2 muestra la linealidad de las concentraciones del ácido gálico (µg/mL) y sus respectivas absorbancias, asimismo, el valor del coeficiente de correlación es muy cercano a 1 (R^2 = 0,9986).

Tabla 2. Polifenoles totales en el extracto

Absorbancia	Concentración polifenoles totales (mg EAG/g de extracto)
0,307	10,946 ± 0,008
0,318	
0,304	

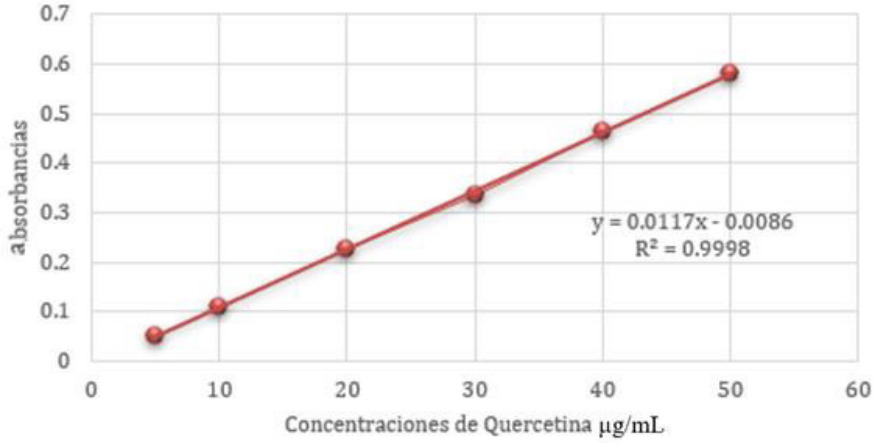


Figura 3. Curva de calibración de estándar de quercetina

Tabla 3. Flavonoides en el extracto etanólico

Absorbancia	Concentración flavonoides (mg QE/g de extracto)
0,2095	63,800 ± 0,0050
0,2069	
0,1999	

4.3. Capacidad antioxidante

Tabla 4. Capacidad antioxidante (Porcentaje de inhibición % y IC_{50}) frente al radical DPPH

Concentración del extracto (µg/mL)	Absorbancia (□±DS)	Porcentaje de inhibición (%)	IC_{50} (µg/mL)
0	0,457±0,001	0	104,28
20,83	0,408±0,002	10,78±0,49 [a]	
14,67	0,353±0,001	22,89±0,27[b]	
83,33	0,263±0,008	42,51±1,81[c]	
166,67	0,104±0,006	77,31±1,22[c]	

Nota: Los resultados de absorbancia y % de inhibición expresan como promedio (□) ±desviación estándar (DS) (n=3)

Se muestra la proporcionalidad de la concentración del extracto etanólico con respecto al porcentaje de inhibición del radical DPPH en las concentraciones trabajadas, asimismo, se

evidencia las diferencias significativas en los porcentajes de inhibición con respecto a las concentraciones del extracto.

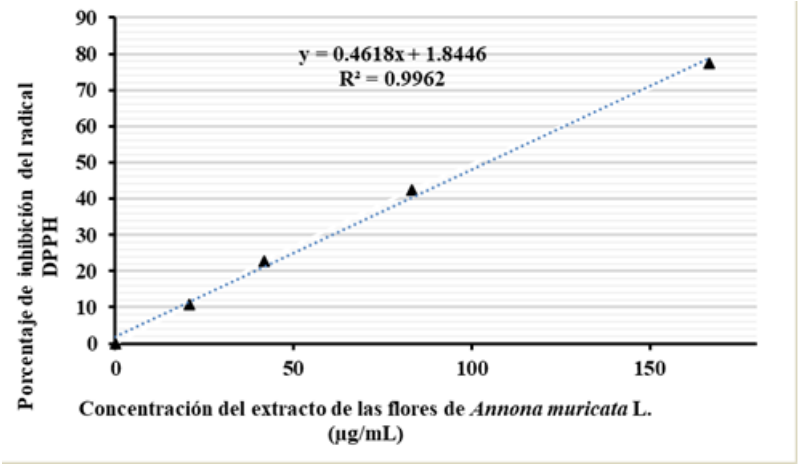


Figura 4. Linealidad del "porcentaje de inhibición (%) del radical DPPH según concentración" del extracto.

La figura evidencia que, el porcentaje de inhibición (%) del sobre radical DPPH presenta una linealidad (R^2 = 0,9962)

Tabla 5. Capacidad antioxidante (Porcentaje de inhibición (%)) frente al radical ABTS

Concentración del extracto (µg/mL)	Absorbancia (□±DS)	Porcentaje de inhibición (%)	IC 50 (µg/mL)
0	0,663±0,005	0	
10	0,616±0,002	7,136±0,3341 [a]	
20	0,576±0,011	13,161±1,177[b]	73,22
40	0,474±0,011	28,573±1,731[c]	
80	0,304±0,009	54,116±1,365[d]	

Nota: Los resultados de absorbancia y % de inhibición expresan como promedio (□) ±desviación estándar (DS) (n=3)

Mostramos la proporcionalidad de la concentración del extracto etanólico con respecto al porcentaje de inhibición del radical $ABTS^{\cdot+}$". El IC_{50} (73,22 µg/mL) del radical $ABTS^{\cdot+}$ es menor a comparación al $IC5_0$ (104,28 µg/mL) frente al radical DPPH (tabla 2). Asimismo, se evidencia las diferencias significativas en los porcentajes de inhibición con respecto a las concentraciones del extracto.

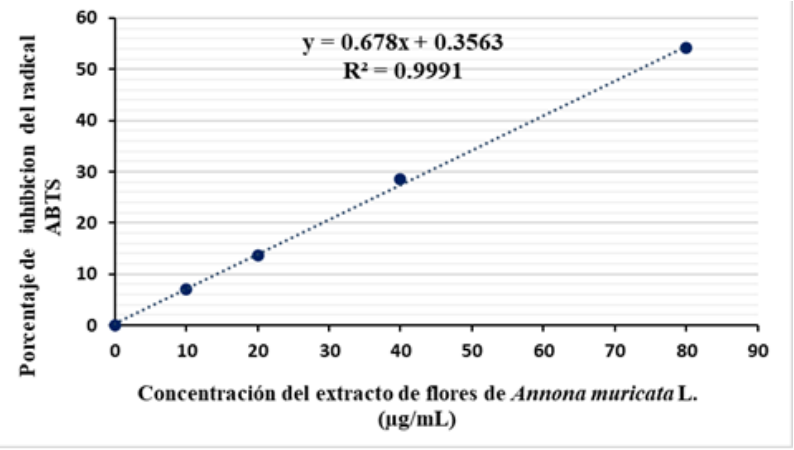


Figura 5. Grado de porcentaje de inhibición (%) del radical ABTS.+ según concentración de la muestra estudiada"

La figura evidencia que, el porcentaje de inhibición (%) del sobre radical ABTS presenta una linealidad (R2 = 0,9991)

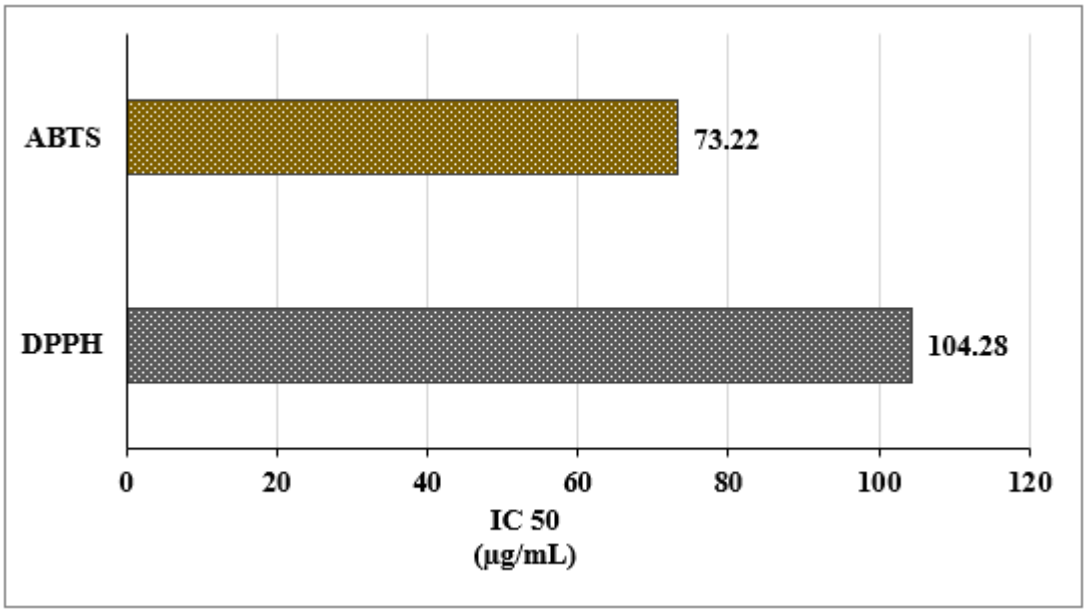


Figura 6. Comparación de los IC50 del extracto frente a los radicales ABTS y DPPH

Se observa que, el IC_{50} del extracto etanólico de las flores de *Annona muricata* L, fue menor para ABTS, muestra la mayor capacidad neutralizante frente a este radical.

4.4. Capacidad anticolagenasa

Tabla 6. Capacidad anticolagenasa (Porcentaje de inhibición(%)) de galato de epigalocatequina (EGCG)

Concentración GECG (µg/mL)	Absorbancia (□±DS)	Porcentaje de inhibición (%)	IC (50µg/mL)
0	0,81±0,01	0	
50	0,69±0,01	14,14±1,76 [a]	198,95
100	0,59±0,01	26,94±1,86[b]	
200	0,41±0,01	50,47±1.49[c]	

Nota: Los resultados de absorbancia y % de inhibición expresan como promedio (□) ±desviación estándar (DS) (n=3)

Los resultados demuestran que, la inhibición (porcentaje) de la colagenasa de EGCG es directamente proporcional, a medida que se duplica la concentración también se duplica el porcentaje de inhibición (%).

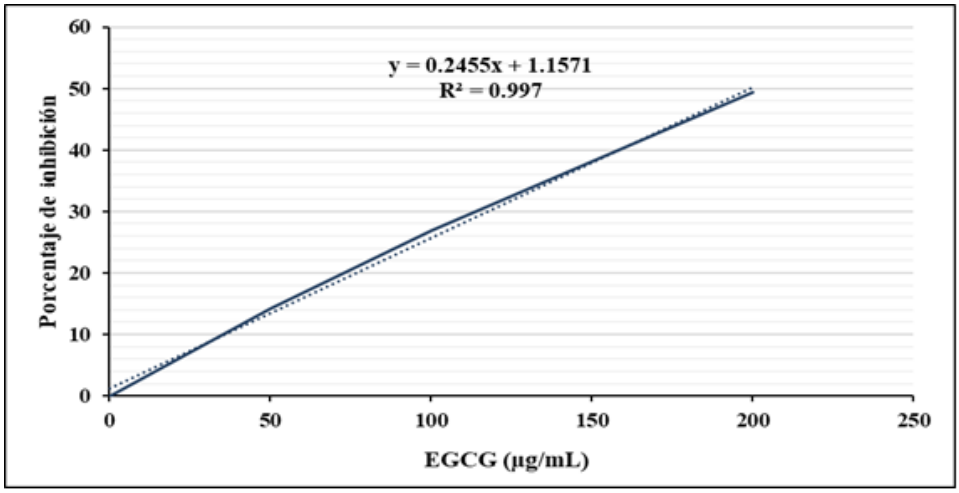


Figura 7. Curva de calibración de la capacidad anticolagenasa de galato de epigalocatequina (EGCG)

La figura evidencia que, el porcentaje de inhibición (%) de la colagenasa presenta una linealidad (R^2 = 0,9970)

Tabla 7. Capacidad anticolagenasa (Porcentaje de inhibición (%)) del extracto etanólico de las flores de *Annona muricata* L

Concentración del extracto (µg/mL)	Absorbancia (□±DS)	Porcentaje de inhibición (%)	IC (50µg/mL)
0	0,80±0,01	0	285,27
75	0,68±0,02	14,80±3,13 [a]	
150	0,58±0,01	27,00±0,60[b]	
300	0,38±0,01	52,13±0.69[c]	

Nota: Los resultados de absorbancia y % de inhibición expresan como promedio (□) ±desviación estándar (DS) (n=3)

En la tabla 7 se muestra la proporcionalidad de concentración del extracto etanólico respecto al porcentaje de inhibición de colagenasa. A medida que se duplica la concentración del extracto etanólico, también se duplica el porcentaje de inhibición (%).

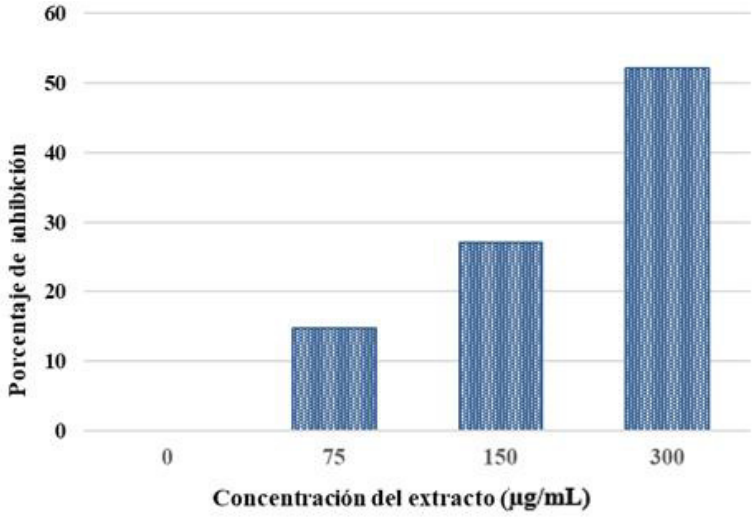


Figura 8. Porcentaje de inhibición (%) de colagenasa según las concentraciones del extracto etanólico de las flores de *Annona muricata* L

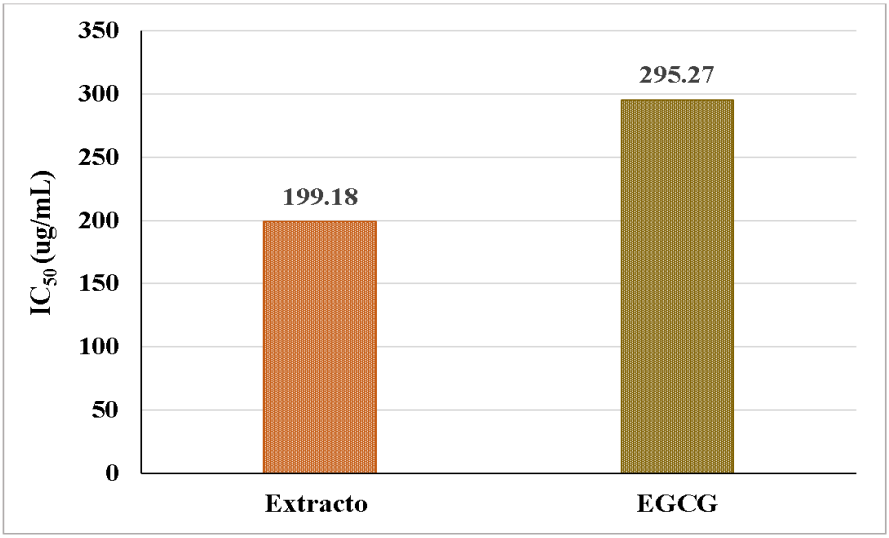


Figura 9. Comparación de IC_{50} de la capacidad inhibitoria colagenasa de EGCG frente al extracto.

Se evidencia que, el IC50 de la muestra analizada es mayor a comparación de EGCG. Muestra que, la capacidad inhibidora de la colagenasa es menor que de EGCG.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En el análisis cualitativo de metabolitos secundarios, las reacciones fueron positivas para compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides, naftaquinonas, antraquinonas y antronas, saponinas y glicósidos; sin embargo, para taninos, alcaloides las reacciones fueron negativas. En la tabla 1 se evidencian niveles importantes de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides; mientras que, para naftaquinonas, antraquinonas y antronas, saponinas y glicósidos los niveles fueron menores. Con respecto a un estudio realizado en un extracto etanólico de las de hojas *Annona muricata* L. [23], los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides fueron superiores; sin embargo, las saponinas y esteroides fueron similares. Cabe destacar que en el trabajo de referencia se detectó alcaloides, pero no terpenoides. Los niveles de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides fueron superiores a los valores reportados en extractos metanólicos de la pulpa, hojas, corteza de raíz y corteza de tallo de *Annona muricata*[26]**;** sin embargo, taninos, saponinas glicósidos tuvieron el mismo resultado positivo (+). En este estudio, en los cuatro extractos metanólicos, se detectó la presencia de alcaloides[23].

Con respecto a un estudio realizado en extracto acuoso de la pulpa de *Annona muricata*, la presencia compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides fueron superiores; sin embargo, las saponinas y esteroides fueron similares; en este trabajo no se detectó alcaloides ni terpenoides. Las diferencias se deben a que en el estudio de referencia trabajaron con extractos metanólicos. La capacidad de extracción de los solventes varía[27].

Los niveles de polifenoles fueron evaluados usando el método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como patrón para la curva de calibración. De acuerdo con la curva de calibración, en la figura 2, la línea de regresión presenta un coeficiente de correlación de 99 % ($R^2 = 0,9986$), con lo cual se determinó el contenido de polifenoles totales (10,946 ± 0,008 mg EAG/g de extracto). Este valor es inferior al contenido en el extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* L. (79,4 ± 6,4 mg EAG/g) realizado con muestras de Sao Paulo, Brasil[5]. Por otro lado, haciendo una comparación con extractos de otra especie, también es inferior al contenido en el extracto metanólico de las flores de *Papaver rhoeas* L. (95,4 ± 2,42 mg EAG/g de extracto)[28], en el cual la extracción se realizó con metanol, pudiendo ser éste el motivo de la diferencia; asimismo, es inferior al contenido de polifenoles del extracto etanólico en las flores de cinco cultivares del género *Malus* manzano silvestre (63,04±0,65 a 183,84±1,64 mg EAG/g de extracto)[29]. Si bien es cierto el contenido de polifenoles es

inferior en comparación a otras partes de la planta y otras especies, no significa necesariamente que tenga menor capacidad antioxidante. A diferencia del estudio de Nam *et al.*[30], los valores de polifenoles encontrados en los extractos de raíz y hoja con metanol al 80% mostraron un valor de 839,69 mg CAE/g.

En su investigación, Valiente Mejía[31], determinó que el extracto metanólico de la hoja de *Annona muricata* contenía una cantidad de polifenoles de 58,74 ± 6,18 mg de catequina eq. /g de muestra seca.

Respecto a la cuantificación de flavonoides, en la figura 3 se muestra la curva de calibración del estándar de quercetina y en la tabla 3 el contenido de flavonoides en el extracto etanólico de flores de *Annona muricata* L. (guanábana) presentando un valor de flavonoides de 63,800 ± 0,0050 (mg QE/g de extracto) valores similares al estudio de Nam *et al.*[30] cuyo valor de flavonoides en el extracto de raíz y hoja fue de 68,52 mg RE/g. Por otro lado, Nguyen *et al.*[32] determinó el contenido total de fenoles y flavonoides del extracto etanólico en hojas los cuales alcanzaron 609,08±5,82 mgGAE/g y 209,52±1,88 mgQE/g, respectivamente.

Patricia Vit *et al.*[33] encontró mayor cantidad de flavonoides y polifenoles en la pulpa de la guanábana, obteniendo un valor de 574,0mg EQ/100g y 941,4mg EAG/100g respectivamente.

Como la tabla 4, el porcentaje de inhibición del radical DPPH aumenta a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico de las flores, demostrando la relación directamente proporcional (R^2 = 0,9962). Este resultado no coincide con un trabajo elaborado con el extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* L, en donde la inhibición del radical DPPH no tuvo relación directa con la concentración del extracto etanólico (R^2 = 0,7852); cabe indicar que este trabajo fue realizado con muestras de Uganda[1]. Sin embargo, si es concordante con un trabajo realizado en Brasil[5]. El IC_{50} para el radical DPPH del extracto etanólico de las flores (104,28 µg/mL) es mayor al valor encontrado en un trabajo en extracto etanólico de las hojas (28,1±4,4 µg/mL)[5], esto muestra que el extracto etanólico de flores tiene menor actividad antioxidante que el extracto etanólico de hojas. Cabe recalcar que el IC_{50} encontrado (104,28 µg/mL) es muy superior al valor encontrado en el extracto etanólico de las hojas (2045,6 µg/mL) y al IC_{50} del extracto etanólico de la pulpa del fruto (724,98± 3.00 µg/mL) con muestras de Uganda[34] según estas comparaciones, tiene mayor capacidad antioxidante que el extracto etanólico de las hojas y la pulpa del fruto. Al comparar los valores derivados con otras especies, la capacidad antioxidante es muy

superior al extracto etanólico de las hojas de *Papaver rhoeas* L. (IC_{50} 3810 µg/mL)[35]; sin embargo, el porte neutralizante del radical DPPH es inferior al extracto etanólico de las flores de *Prunus nume* (IC_{50}: 43,11 ± 3,24 µg/mL) realizado en China[36]. según el método DPPH, fueron más bajos respecto a su actividad antioxidante, siendo sus de IC50 de 244,8 ± 3,2 µg/mL en aceites esenciales de hoja; esto debido a que se utilizó una muestra lipofílica. De igual forma, si se compara con otros órganos de la *Annona muricata*, podemos encontrar resultados diferentes, como es en el estudio de José Torres[37], donde se calculó la actividad antioxidante utilizando el método DPPH para determinar el IC50 de aceites esenciales de semillas, el cual fue de 6938 µg/mL.

Lopes *et al* encontró un valor de IC50 para la actividad antioxidante según el método DPPH de 4,3 ± 0,7 y 9,3 ± 0,8 µgmL−1 respectivamente para las fracciones de acetato de etilo (EtOAc) y n-butanol (BuOH) respectivamente en sus extractos[38]

Según la tabla 5, al aumentar la cantidad de extracto de la parte floral, el porcentaje inhibitorio del radical ABTS.+ también crece, lo que sugiere una relación directamente proporcional (R^2=0,9991); esto evidencia correlación lineal. La inhibición del radical ABTS+ por el extracto etanólico es notable, ya que 80 µg/mL de este neutralizan más del 50 % del radical (54,11 %), que es inferior al porcentaje de neutralización que se ha reportado para el extracto etanólico de las hojas de *Annona* a una concentración de 12 µg/ml[39]. Tomando en consideración la estructura lineal del ensayo, el extracto demostró mayor habilidad para contrarrestar el radical $ABTS^{\cdot+}$. El valor obtenido de IC_{50} de la muestra analizada, respecto al radical $ABTS^{\cdot+}$ fue 74,22 µg/mL, la capacidad antioxidante es superior al valor obtenido en el extracto etanólico de la parte floral de *Prunus mume* (IC_{50}: 169,14± 3,97 µg/mL); cabe indicar que es inferior a la capacidad neutralizante del radical $ABTS^{\cdot+}$ del extracto etanólico de las flores de *Erigeron annuus* (IC_{50}: 20,3 ± 0,4 µg/mL)[40]. El radical $ABTS^{\cdot+}$ es neutralizado por los antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, ambos tipos se puede hallar en un extracto etanólico, pues la generación de oxidantes se dan en medios acuosos y grasos, por lo que el efecto obtenido *in vitro* sobre este radical se acercan más a los efectos *in vivo*[41].

Por otro lado, los estudios en José Torres[37], el cual evaluó la capacidad antioxidante en semillas de *Annona muricata,* según el método ABTS, encontró un valor de IC50 de 8385 µg/mL valor inferior al encontrado en el presente trabajo. En el estudio de De los Santos *et al.*[42] encontró un valor de actividad antioxidante en frutos de *Annona muricata* de 52,4 ± 0,16 mg Ácido ascórbico equivalente por gramo, siendo este un valor moderado de actividad

antioxidante. En algunos estudios, la actividad antioxidante presente en algunas plantas permite tener un efecto antiinflamatorio directo sobre neutrófilos y macrófagos ya que reduce el daño oxidativo y los niveles de algunos marcadores inflamatorios, resultado que puede servir para el desarrollo de nuevas terapias para afecciones inflamatorias[43]. Además, permite a través de estos componentes antioxidantes evitar el daño oxidativo causado por los radicales libres[44,45]. Cuando se inhibe el efecto de los radicales libres a nivel del ADN se ha demostrado que puede evitar o reducir el riesgo de sufrir cáncer[46,47].

Según *Manrique et al.*[48], indicaron que los compuestos que otorgan esta actividad antioxidante anteriormente mencionada son los flavonoles que posee esta planta, como por ejemplo el flavonol robonetina y el flavonol galocatequina.

Según la figura 7, para la capacidad inhibitoria de colagenasa de *Clostridium histolyticum* se encontró una relación directamente proporcional a la concentración del extracto etanólico con el porcentaje de inhibición de la colagenasa ($R^2 = 0.9986$); cuando la cantidad de extracto aumenta, el porcentaje de inhibición también aumenta. El grado de inhibición de la colagenasa de *Annona muricata* L. se comparó con epigalocatequina-3-galato (EGCG); la capacidad inhibitoria se determinó en valores de IC_{50}. El extracto etanólico tuvo un valor de IC50 de 285,27 µg/mL, mientras que el EGCG mostró un valor de IC_{50} de 199,18 µg/Ml. La capacidad del extracto etanólico fue menor a comparación de EGCG. En contraste con otros estudios, es ligeramente inferior al IC_{50} (260 µg/mL) de diglucósido de sesaminol presente en las tortas de semillas de sésamo, pero superior al IC_{50} (440 µg/mL) al de ácido ascórbico[49].

Las alteraciones en el colágeno que están asociadas con las enzimas degradantes del colágeno, la colagenasa tiene un papel importante en el proceso de envejecimiento de la piel. La degradación del colágeno contribuye a las características del envejecimiento de la piel, como la formación de arrugas y la flacidez. Inhibir la acción de la colagenasa contribuye a reducir la reposición de colágeno y evitar el envejecimiento de la piel[50].

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de polifenoles totales en las flores de *Annona muricata* L. obteniéndose un valor de 10,946 ± 0,008 mg EAG/g y de flavonoides de 63,800 ± 0,0050 mg QE/g, aplicados por los métodos de Folin-Ciocalteu, con la formación de complejos con tricloruro de aluminio.

2. Se determinó la capacidad antioxidante del extracto de las flores de *Annona muricata* L. por los métodos DPPH y $ABTS^{\cdot+}$; obteniéndose valores de 104,28 µg/mL del extracto etanólico que neutraliza el 50 % del radical DPPH y 73,22 µg/mL el 50 % del radical $ABTS^{\cdot+}$, de acuerdo con el valor de IC_{50} para el radical $ABTS^{\cdot+}$.

3. Se determinó la actividad anticolagenasa del extracto etanólico frente a la enzima de colagenasa, evidenciándose un valor de IC_{50} de 285, 27 µg/mL, respecto a la capacidad inhibitoria de la colagenasa de *Clostridium histolyticum*, mientras que el EGCG mostró un valor de IC_{50} de 198,95 µg/mL. La capacidad del extracto etanólico fue menor a comparación del patrón EGCG.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gavamukulya Y, Abou-Elella F, Wamunyokoli F, AEl-Shemy H. Phytochemical screening, antioxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2014;7(S1): S355–63.
2. Nawwar M, Ayoub N, Hussein S, Hashim A, El-Sharawy R, Wende K, *et al*. A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. Archives of Pharmacal Research. 2012;35(5):761–7.
3. Vergara Sotomayor A, Páucar Cuba K, Morales Comettant C, Castro Mandujano O, Pizarro Solís P, Díaz Rosado J. Obtención de extractos de hojas de *Annona muricata* L. (guanábana) inducidos por su efecto inhibidor de la corrosión. Revista de la Sociedad Química del Perú. 2018;84(1):119–32.
4. Yang C, Gundala SR, Mukkavilli R, Vangala S, Reid MD, Aneja R. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. Carcinogenesis. 2015;36(6):656–65.
5. Justino AB, Miranda NC, Franco RR, Martins MM, Silva NM da, Espindola FS. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α-amylase, α-glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation, and lipid peroxidation. Biomedicine and Pharmacotherapy [Internet]. 2018;100(November 2017):83–92. Available from: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172
6. Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Hajrezaie M, Karimian H, Abdulla MA, Kadir HA. *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. International Journal of Surgery [Internet]. 2015; 18:110–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2015.03.026
7. Tobin DJ. Introduction to skin aging. Journal of Tissue Viability. 2017 Feb 1;26(1):37–46.
8. Madan K, Nanda S. *In vitro* evaluation of antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase activities of safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. Bioorganic Chemistry. 2018 Apr 1; 77:159–67.
9. Leiva González S. *Annona muricata* L. "guanábana" (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. Arnaldoa. 2018 Apr 30;25(1):127–40.
10. Coria-Téllez A, Montalvo-Gónzalez E, Yahia EM, Obledo-Vázquez EN. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. Vol. 11, Arabian Journal of Chemistry. Elsevier B.V.; 2018. p. 662–91.
11. Nantarat N, Mueller M, Lin WC, Lue SC, Viernstein H, Chansakaow S, *et al*. Sesaminol diglucoside isolated from black sesame seed cake and its antioxidant, anti-collagenase, and anti-hyaluronidase activities. Food Bioscience. 2020 Aug 1;36.
12. Angelis A, Mavros P, Nikolaou PE, Mitakou S, Halabalaki M, Skaltsounis L. Phytochemical analysis of olive flowers' hydroalcoholic extract and *In vit*ro

evaluation of tyrosinase, elastase and collagenase inhibition activity. Fitoterapia. 2020 jun 1;143.
13. Baskar R, Rajeswari V, Kumar S. *In vitro* antioxidant studies in leaves of Annona species. Vol. 45, Indian Journal of Experimental Biology. 2007.
14. Mat Daud NN, Mohamad MN, Ya'akob H, Musa NF. Optimization of soxhlet extraction parameter of *Annona muricata* leaves using Box-Behnken desing (BBD) expert and antioxidant analisys [Internet]. Vol. 77, Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering). 2015. Available from: www.jurnalteknologi.utm.my
15. Md Roduan MR, Hamid RA, Cheah YK, Mohtarrudin N. Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata in vitro*. Journal of Herbal Medicine [Internet]. 2019;15. Available from: https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.04.004
16. Chatatikun M, Chiabchalard A. Thai plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, anti-tyrosinase and anti-collagenase activity. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2017 nov 9;17(1).
17. Pinto AC de Q, Williams JTrevor. Annona species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton; 2005. 263 p.
18. Isabelle M, Lee BL, Lim MT, Koh WP, Huang D, Ong CN. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. Food Chemistry. 2010 nov 1;123(1):77–84.
19. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2021.
20. Thring TSA, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2009 Aug 4;9.
21. Kicel A, Owczarek A, Gralak P, Ciszewski P, Olszewska MA. Polyphenolic profile, antioxidant activity, and pro-inflammatory enzymes inhibition of leaves, flowers, bark, and fruits of *Cotoneaster integerrimus*: A comparative study. Phytochemistry Letters [Internet]. 2019;30(March):349–55. Available from: https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.027
22. Hasmila I, Natsir H, Soekamto NH. Phytochemical analysis and antioxidant activity of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn.). In: Journal of Physics: Conference Series. Institute of Physics Publishing; 2019.
23. Chen GL, Chen SG, Xiao Y, Fu NL. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 30 flowers. Industrial Crops and Products [Internet]. 2018;111(September 2017):430–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.051
24. Serrano Flores, C. A., Villena Chávez, G. K., & Rodríguez Rodríguez, E. F. (2020). Algunos componentes fitoquímicos y actividad antioxidante en representantes de la tribu Mentheae (Lamiaceae) del Perú. Arnaldoa, 27(1), 169–180. https://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27109
25. Bourebaba L, Gilbert-López B, Oukil N, Bedjou F. Phytochemical composition of *Ecballium elaterium* extracts with antioxidant and anti-inflammatory activities:

Comparison among leaves, flowers, and fruits extracts. Arabian Journal of Chemistry. 2020;13(1):3286–300.
26. Agu KC, Okolie PN. Proximate composition, phytochemical analysis, and *in vitro* antioxidant potentials of extracts of *Annona muricata* (Soursop). Food Science and Nutrition. 2017 Sep 1;5(5):1029–36.
27. Adewole S, Ojewole J. Protective effects of Annona muricata linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. Afr J Tradit Complement Altern Med [Internet]. 2010 [cited 2024 Jun 30];6(1). Available from: https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/57071
28. Marsoul A, Ijjaali M, Oumous I, Bennani B, Boukir A. Determination of polyphenol contents in *Papaver rhoeas* L. flowers extracts (soxhlet, maceration), antioxidant and antibacterial evaluation. Materials Today: Proceedings [Internet]. 2020;31: S183–9. Available from: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.082
29. Liu F, Wang M, Wang M. Phenolic compounds and antioxidant activities of flowers, leaves, and fruits of five crabapple cultivars (*Malus Mill*. species). Scientia Horticulturae. 2018;235(November 2017):460–7.
30. Nam JS, Park SY, Jang HL, Rhee YH. Phenolic compounds in different parts of young *Annona muricata* cultivated in Korea and their antioxidant activity. Appl Biol Chem. 2017;60(5):535–43.
31. Mejía RMV. Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales del extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* (L.) "guanábana" [Internet]. Efectividad del ejercicio terapéutico en el Síndrome de Fatiga Crónica: Revisión sistemática. ULADECH; 2016. Available from: http://www.scielo.br/pdf/ean/v13n2/v13n2a08.pdf.
32. Nguyen MT, Nguyen VT, Minh L V., Trieu LH, Cang MH, Bui LB, *et al*. Determination of the phytochemical screening, total polyphenols, flavonoids content, and antioxidant activity of soursop leaves (*Annona muricata* Linn.). IOP Conf Ser Mater Sci Eng. 2020;736(6).
33. Vit P, Santiago B, Pérez-Pérez EM. Chemical composition and antioxidant activity of the pulp, leaves, and seeds of soursop *Annona muricata* L. Interciencia. 2014;39(5):350–3.
34. Gyesi JN, Opoku R, Borquaye LS. Chemical Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activities of the Essential Oils of the Leaves and Fruit Pulp of *Annona muricata* L. (Soursop) from Ghana. Biochem Res Int. 2019;2019.
35. Padmini SMPC, Samarasekera R, Pushpakumara DKNG. Antioxidant capacity and total phenol content of Sri Lankan *Annona muricata* L. Tropical Agricultural Research. 2015;25(2):252.
36. Shi J, Gong J, Liu J, Wu X, Zhang Y. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. LWT - Food Science and Technology [Internet]. 2009;42(2):477–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.09.008
37. Torres Castillo JC. Evaluación de ácidos grasos y actividad antioxidante in vitro del aceite de la semilla de *Annona muricata* (Guanabana) [Internet]. Cybertesis unmsm.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019. Available from: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10829/Torres_cj.pdf?sequence=1&isAllowed=y

38. Saraiva A, Justino A, Franco R, Silva H, Arruda F, Klein S, et al. Polyphenols-rich fraction from Annona muricata Linn. Leaves attenuates oxidative and inflammatory responses in neutrophils, macrophages, and experimental lung injury. Pharmaceutics [Internet]. 2022 [cited 2024 Aug 18];14(6):1182. Available from: https://www.mdpi.com/1999-4923/14/6/1182
39. Nolasco-González Y, García-Magaña M de L, León-Fernández AE, Monribot-Villanueva JL, Guerrero-Analco JA, Montalvo González E. Formulation, and phytochemical analysis of a potentially functional beverage from combining a leaf extract and pulp of Annona muricata (Annonaceae). Acta Bot Mex [Internet]. 2023 [cited 2024 Aug 18]; (130). Available from: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-71512023000100129&script=sci_arttext&tlng=en
40. Zhang L, Xu Q, Li L, Lin L, Yu J, Zhu J, et al. Antioxidant and enzyme-inhibitory activity of extracts from *Erigeron annuus* flower. Industrial Crops and Products. 2020;148(February).
41. Rodríguez OE, Andrade WA, Diaz FE. Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceous) Antioxidant activity of extracts from leaves of Bocconia. Journal of Technology. 2015;14 (2):21–36.
42. De los Santos-Santos MA, Jiménez-Zurita JO, Balois-Morales R, Alia-Tejacal I. EVALUACIÓN DE ALMIDÓN COMO RECUBRIMIENTO COMESTIBLE SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN FRUTOS DE GUANÁBANA (Anonna muricata L.). Rev Fitotec Mex [Internet]. 2020 [cited 2024 Aug 18];43(4):443. Available from: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802020000400443
43. Saraiva AL, Justino AB, Franco RR, Silva HCG, Arruda FDS, Klein SG, et al. Polyphenols-Rich Fraction from *Annona muricata* Linn. Leaves Attenuates Oxidative and Inflammatory Responses in Neutrophils, Macrophages, and Experimental Lung Injury. Pharmaceutics. 2022;14(6).
44. Jiménez VM, Gruschwitz M, Schweiggert RM, Carle R, Esquivel P. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. Food Res Int [Internet]. 2014;65(PA):42–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.051
45. Kalyana Sundaram I, Sarangi DD, Sundararajan V, George S, Sheik Mohideen S. Poly herbal formulation with anti-elastase and antioxidant properties for skin anti-aging. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):1–12.
46. Orak HH, Bahrisefit IS, Sabudak T. Antioxidant activity of extracts of soursop (*Annona muricata* L.) leaves, fruit pulps, peels, and seeds. Polish J Food Nutr Sci. 2019;69(4):359–66.

47. George VC, Kumar DRN, Suresh PK, Kumar RA. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. J Food Sci Technol. 2015;52(4):2328–35.
48. Manrique de la Cuba MF, Gamero-Begazo P, Valencia DE, Barazorda-Ccahuana HL, Gómez B. Theoretical study of the antioxidant capacity of the flavonoids present in the *Annona muricata* (Soursop) leaves. J Mol Model. 2019;25(7).
49. Adefegha SA, Oyeleye SI, Oboh G. Distribution of Phenolic Contents, Antidiabetic Potentials, Antihypertensive Properties, and Antioxidative Effects of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Parts in Vitro. Biochem Res Int. 2015;2015.
50. Kim DO, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chem. 2003;81(3):321-6.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica



JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. Nº 3796
Tel: 017512863 – RPM 963689079

PLANTAS DEL PERÚ - CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- Nº 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL Nº 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, la Magister, **Sonia Marisol Delgado Céspedes,** egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el objetivo investigación científica de las flores de la guanábana, ha solicitado la identificación y certificación botánica de dicha planta; en base a una muestra fértil con flores y frutos ha sido identificada como ***Annona muricata*** **L.** y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Magnoliidae
ORDEN	: Magnoliales
FAMILIA	: Annonaceae
GENERO	: *Annona*
ESPECIE	: *Annona muricata* L.

Nombre vulgar: "guanábana"

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 14 de junio del 2018

José R. Campos de la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

Anexo 2. Material de trabajo y equipos



Flores secas de Guanábana



Molino Estándar Modelo Willey Mill para la pulverización de Flores de Guanábana




Mallas de 4 y 1mm



Equipo de filtración al vacío



Evaporador rotatorio (Rotavapor)





Extracto etanólico de flores para realizar la marcha fitoquímica flores de *Annona muricata* L. (guanábana)







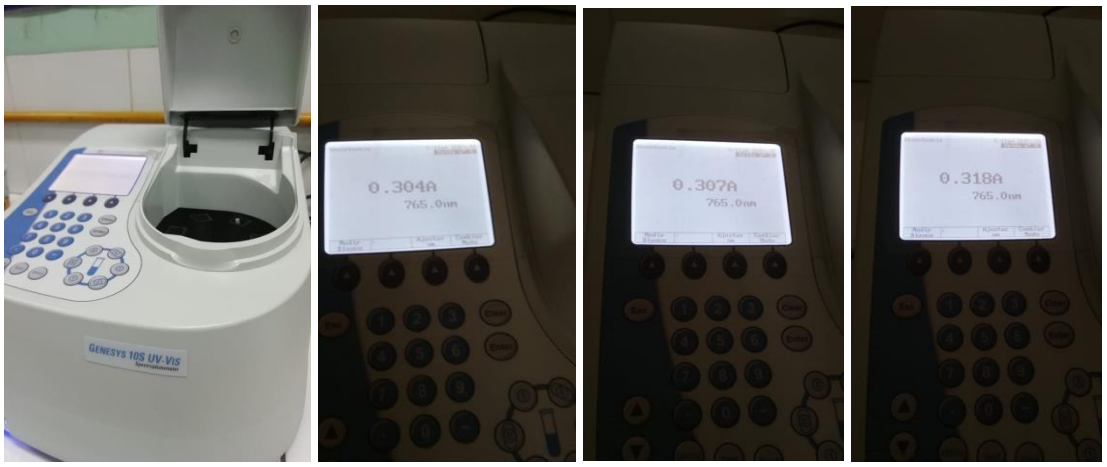








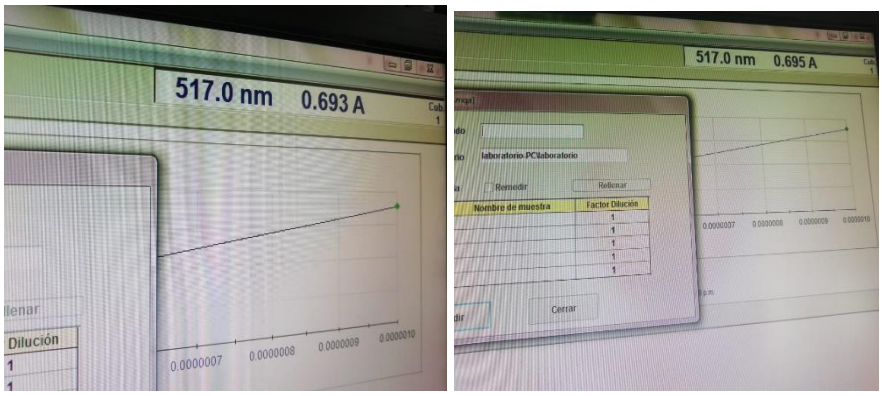
Lectura de la Absorbancia en espectrofotómetro UV-Vis



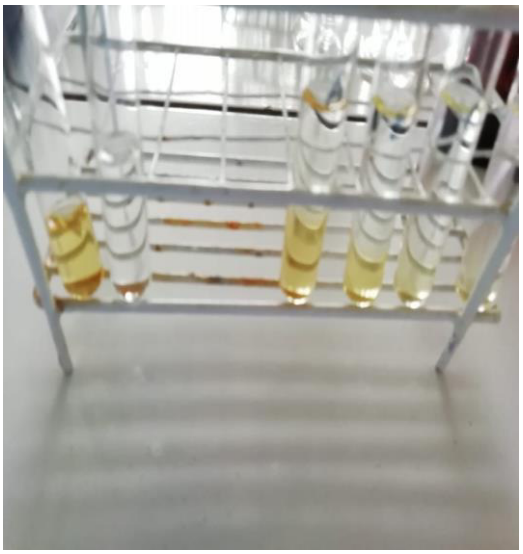
Determinación del contenido de polifenoles.

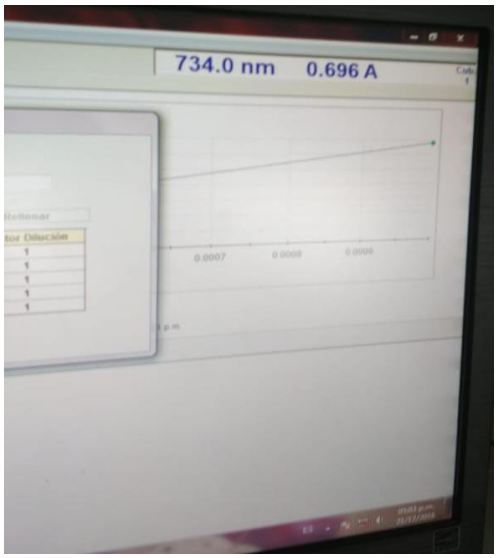


Determinación del contenido de flavonoides

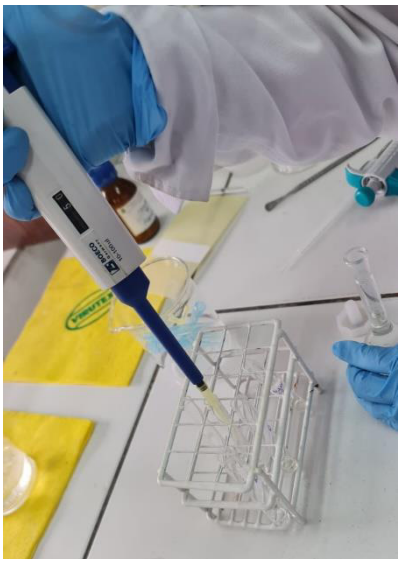


Determinación de la capacidad antioxidante por el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)





Determinación: Capacidad antioxidante por el método del radical catiónico (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazina-6-sulfonato]) $ABTS^{\cdot+}$





Determinación de la actividad anticolagenasa