

Evaluación antibacteriana de la semilla de la *Annona cherimola* (Chirimoya) a 3827 metros de altitud.

Resumen

El análisis de las propiedades antimicrobianas de la semilla de *Annona cherimola* (Chirimoya) se realizará en el Laboratorio de Farmacología y Terapéutica Veterinaria ubicada en el Hospital Veterinario Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Ciudad de Puno a 3827 metros de altitud, la recolección de semillas será del consumo de la fruta por los habitantes de la Ciudad. Estas muestras serán sometidas al lavado y luego secado por un tiempo de cinco días procediéndose al molido y a la extracción etanólica, clorofórmica y luego a un preparado hidroetanólico e hidrocloroformico. Las pruebas antimicrobiales serán mediante el método microbiológico mediante preparaciones de discos de sensibilidad con los preparados indicados. Mediante la observación de los halos de inhibición bacteriana se determinará la actividad antimicrobiana de las semillas en estudio frente a bacterias Gram (-) o (+). Se tomará en cuenta la concentración de los preparados que permiten la visualización de los halos inhibitorios. El análisis estadístico se tomará en cuenta medidas de tendencia central y dispersión, así como un diseño completamente al azar conducido mediante factoriales y contrastando las medias por la prueba múltiple de Tukey ($\alpha=0.01$).

Palabras claves: Semilla de *Annona cherimola*, acción antibacteriana, halos de inhibición, preparado hidroetanólico, preparado hidrocloroformico.

Justificación.

Los antibióticos y quimioterápicos antiinfecciosos en la práctica de la clínica infecciosa han perdido trascendencia en el aspecto curativo de enfermedades infecciosas de los seres vivos que son descritos por las evidencias demostradas en el ámbito hospitalario o la práctica privada médica, surgiendo la resistencia bacteriana que prima en la actualidad ocurriendo tasas elevadas de morbimortalidad a nivel mundial.

Los antibióticos modernos o de última generación establecieron protocolos de tratamiento que en la mayoría de los casos fracasaron por un mal manejo en la práctica de su uso adicionado la participación de la bacteria que se acostumbró rápidamente a la nueva molécula antiinfecciosa produciéndose diversos mecanismos para la resistencia bacteriana causal de varias pérdidas de antimicrobianos que dejaron de utilizarse. El caos de la falta de este tipo de medicamentos y la presencia cada vez más creciente de cepas microbianas resistentes es un problema que hay que resolver,

El grave problema descrito líneas arriba, propone la innovación y descubrimiento de sustancias que efectivamente eliminen cepas bacterianas resistentes mediante nuevas conformaciones químicas que pueden ser extraídas de diferentes elementos que existen en el planeta como en la antigüedad mediante los preparados Hipocráticos que aun en la actualidad se siguen utilizando en diferentes especialidades, una forma de solución.

Una forma de colaborar en la solución de este gran problema de salud es la investigación con elementos naturales de donde se puedan extraer aquellos elementos que vayan a conformar

una acción antimicrobiana y pensamos que el estudio de las semillas de la *Annona cherimola* (Chirimoya) podría ser un granito de arena de la inmensidad de investigaciones se estén desarrollando en el mundo para solucionar el gran problema de la resistencia bacteriana. Se apertura preguntas frente al estudio ¿Los elementos componentes de la semilla de la *Annona cherimola* tendrán eficacia antibacteriana?; ¿Las concentraciones de los preparados de la semilla de la *Annona cherimola* tendrán la eficacia antibacteriana in vitro?; ¿La eficacia de semilla de *Annona cherimola* será igual para bacterias Gram (-) y (+)?

Antecedentes.

Chirimoya (*Annona cherimola*).

La chirimoya es una fruta caracterizada por su gran contenido en glucosa, que en su división sistemática pertenece al reino vegetal:

Reino: Vegetal

Subreino: Embriophyta

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Orden: *Ranales*

Suborden: Magnoliales

Familia: *Annonaceae*

Subfamilia: *Annonoideae*

Género: *Annona*

Especie: *Annona cherimola* Miller. (Castro, 2007)

La siguiente clasificación sistemática se determina de estudios realizados sobre esta fruta (Popenoe, et al., 1989). Existen diferentes especies como *Annona muricata* L., *Annona squamosa* L., *Annona reticulata* L., y el híbrido interespecífico Atemoya (*A. cherimola* x *A. squamosa*) (Manica et al., 2003).

La especie *Annona cherimola* Miller es la que predomina en los andes peruanos (Flores, 2013). Las semillas germinan fácilmente, el nombre en si proviene del idioma quechua donde chiri, significa frio y muya significa semillas siendo una fruta bastante consumida por los habitantes de los andes peruanos (Calzada, 1993). Algunas investigaciones realizadas sobre esta fruta determinaron que en la época de los Incas trascendió en importancia su consumo (Gardiazabal, Rosenberg, 1993).

Composición química de la *Annona cherimola*.

Por diferentes trabajos de análisis se determinó que, por cada 100 gr de chirimoya cruda, en su parte comestible la composición nutricional encontrada es (Pamplona, 2004):

Tabla 1: Composición nutricional de la chirimoya por 100g de pulpa.

Valor nutricional (100 g)	
Componentes	Contenido
Agua	75.7 g
Energía	94.0 kcal
Proteínas	1.30 g
Carbohidratos	21.6 g
Fibra	2.40 g
Vitamina A	1.00 ug ER
Vitamina B1	0.100 mg
Vitamina B2	0.110 mg
Niacina	1.30 mg EN
Vitamina B6	0.200 mg EN
Folatos	14.0 ug
Vitamina C	9.00 mg
Calcio	23.0 mg
Fósforo	40.0 mg
Hierro	0.500 mg
Grasa total	0.400 g
Grasa saturada	-
Colesterol	-
Sodio	5.00 mg

Fuente: Pamplona 2004.

Semillas de chirimoya.

Las semillas de la chirimoya son de forma aplastada y alargada, su color varía de negro a marrón, aproximadamente 1 cm de grosor, una longitud entre 1.5 y 2.5 cm. (Napoleón, 2004).

Composición de las semillas de chirimoya.

Dentro la composición de la semilla de la chirimoya se observar baja cantidad de agua, que permite el proceso de extracción de aceite, cuyo valor aproximado es de 8 % de humedad para su extracción y conservación. La fibra es el componente con mayor valor porcentual siendo este de 34,262 %, porque las semillas de chirimoya se encuentran envueltas por una capa celulósica, seguido de los carbohidratos con 25.372 % y 23.564 % de grasas (Nonalaya y Marcañaupa, 2017).

Tabla 2: Composición proximal de las semillas chirimoya por 100g de pulpa.

Componente	Contenido en base seca
Humedad	-
Ceniza	2.024 g
Proteína	14.778 g
Grasas	23.564 g
Fibra	34.262 g
Carbohidratos	25.372 g

Fuente: Nonalaya y Marcañaupa, 2017.

Uso de las semillas de chirimoya.

A parte del uso para nuevas plantaciones den el campo de la medicina es factible su uso aun sin mucha difusión, semillas molidas mezcladas con grasa sirve para el tratamiento de trastornos parasitarios de la piel, así también el molido de 1 o 2 semillas mezcladas con leche o agua se comporta como un potente catártico y emético.

En el campo oncológico también a demostrado tener actividad lo cual se evidencia con estudios con extractos se observó actividad antitumoral efectiva contra cáncer de mama, leucemia mieloide crónica y cuello uterino, que fue comparado con quimioterapicos anticancerígenos como el 5-fluorouracilo y cisplatino, con la ventaja de que el daño es mucho menor a las células normales (Quispe, 2009).

Grasas y aceites

Estos elementos son sustancias que tienen origen vegetal o animal, que dentro sus estructuras son esteres triglicéridos, conformados por glicerol y ácidos grasos (Trevejo y Maury, 2002).

Todos los frutos y semillas contienen aceite, sólo los oleaginosos se utilizan para elaborar aceite industrial. Los aceites vegetales son una mezcla de triglicéridos 95 %, ácidos grasos libres 5 %, ceras, de esterole y otros componentes minoritarios (Rodríguez, 2010).

Composición química de la *Annona cherimola*.

Los diferentes elementos químicos que se encuentran en la fruta indistintamente se ubican en sus hojas, tallos, semilla este último es que interesa a la presente investigación. Es una descripción en base a la referencia del autor que lo estudio más profundamente.

Flavonas: aisladas en un total de dos elementos como la *hesperidina* que se ubica en la piel y semilla, así como la *neoeriocitrina* que solamente se encuentra en la semilla (García-Salas et al, 2015).

Flavonoles; encontrados en un numero de once compuestos y que solamente uno se encuentra en la semilla la *rutina* ubicada en la piel, semilla y hojas (Díaz-de-Cerio et al.2018, Mannino et al. 2020).

Flavan-3-ol; encontrados tres compuestos de los cuales solamente dos se encuentran en las semillas de la chirimoya como la *catequina*, ubicada en la pulpa, piel y semilla y la *epicatequina* ubicada en pulpa, piel, hoja y semilla (Díaz de Cerio et al. 2018).

Procianidinas; Identificado dímeros de *procianidinas* tipo A, B, trímeros tipo B y tetrámeros tipo B de la piel; (b) dímeros, trímeros y tetrámeros de *procianidinas* tipo B de la pulpa; y (c) dímeros, trímeros de *procianidinas* tipo B de la semilla (García-Salas, et al. 2015).

Esteroides; aislados 15 compuestos encontrándose tres en la semilla del fruto, *campesterol*, *estigmastanol* (García-Salas et al.2016). *Estigmasterol* (Chung Yi et al. 1999, Mannino et al. 2020)

Triterpenos; se aislaron dos compuestos ambos se encuentran en la semilla y otras partes del fruto siendo estas el *lanosterol* y el *24-metilencicloartanol* (García-Salas, et al. 2016).

Actividad antibacteriana del aceite vegetal (AV) de la semilla de *Annona muricata* y *A. cherimola*. La actividad antibacteriana se determinó mediante microdilución en placa. Los AV presentaron actividad antibacteriana leve (900 µL/mL) en cinco cepas ATCC, pero no en bacterias multirresistentes; estos AV podrían utilizarse en la industria alimenticia o cosmética, gracias a su capacidad antioxidante, no citotóxica y levemente antibacteriana (España et al. 2023).

Hipótesis.

El extracto etanolico y clorofórmico de las semillas de la *Annona cherimola* (chirimoya) tiene acción antibacteriana sobre bacterias gram (-) y (+) a 3827 metros de altitud.

El extracto etanolico y clorofórmico de las semillas de la *Annona cherimola* (chirimoya) no tiene acción antibacteriana sobre bacterias gram (-) y (+) a 3827 metros de altitud.

Objetivo general.

Evaluar la acción antibacteriana de los extractos etanolico y clorofórmico de la *Annona cherimola* in vitro a 3827 metros de altitud.

Objetivos específicos.

Determinar las concentraciones del preparado de etanolico y clorofórmico de la *Annona cherimola* a 3827 metros de altitud.

Determinar el tamaño de halo antimicrobial del preparado etanolico y clorofórmico de la *Annona cherimola* in vitro a 3827 metros de altitud.

Determinar las especies microbianas que son sensibles al preparado etanolico y clorofórmico de la *Annona cherimola* a 3827 metros de altitud.

Metodología de la investigación.

Material de Estudio:

De los microorganismos

Serán aislados de los pacientes con infecciones bacterianas, mediante métodos de recolección microbiológicos, con material estéril, directamente de los lugares de infección, procedentes de la Ciudad de Puno, determinándose la especie microbiana Gram (+) y (-) por el laboratorio de Microbiología de la Facultad.

De los extractos.

Annona cherimola (Chirimoya) Preparados hidroetanólico al 2 %, preparado hídrico (clorofórmico) al 2 %.

De los fármacos.

Discos de sensibilidad de: cefotaxima, eritromicina, azitromicina, Ciprofloxacina.

Metodología

Extracto etanolico y clorofórmico.

- Se estudiará la *Annona cherimola miller*, chirimoya que se consume en la ciudad de Puno; la recolección de la semilla se realizará en forma sistemática del consumo diario de la fruta.
- Se lleva a lavado la semilla con agua abundante, eliminando todo indicio de pulpa y glucosa en la superficie de las semillas.
- Se procede al secado en estufa a 45° C en estufa por un tiempo de 6 horas.
- Las semillas serán trituradas y luego pasadas por un molino eléctrico hasta lograr el estado de polvo compacto.
- En un Becker se procede a juntar el polvo compacto con alcohol etílico absoluto y cloroformo, llevándose al homogeneizador por un tiempo de 6 horas.
- Protegido por cubierta oscura se lleva a la maceración por cuatro días no es necesario temperaturas bajas.
- Se filtra el extracto conservándose la parte líquida coleccionándola y será llevada a estufa por 24 – 48 horas hasta completar el resecamiento.
- Se pesa el contenido seco de los extractos y se procede al preparado hidroetanólico e hidrocloreformico con sus respectivas concentraciones.
- Mediante el uso de los preparados se preparan los discos de sensibilidad en diferentes concentraciones que servirán para las pruebas de acción antibacteriana.
- Estos discos de sensibilidad se colocan en las placas Petri preparadas con medio de cultivo y las colonias de bacterias, llevadas a la estufa por 24 horas a una temperatura de 37°C.
- A las 24 horas se extraen las placas Petri y se medirán los tamaños de los halos producidos.

Validación de los resultados con otros antibióticos.

- Se preparan placas Petri con el medio de cultivo y las mismas cepas microbianas utilizadas en la prueba con los preparados, y se aplican los discos de sensibilización de los antibióticos indicados (n = 4).
- Se colocarán en la estufa a una temperatura de 37° C., y por un tiempo de 24 horas.
- Los resultados obtenidos serán sometidos a observación y medición de los tamaños de halos.
- Estos resultados serán comparados con los resultados de las semillas de la *Annona cherimola miller*.

Curva de calibración

- Mediante el método Microbiológico de Difusión en placa se elaborará la curva de calibración.
- Se elaborarán los discos de sensibilidad del preparado hidroetanolico e hidrocloreformico de la *Annona cherimola miller*, a diferentes concentraciones de 2, 1, 0.5, 0.25 0.13, 0.06, 0.03 g/mL.
- Estos discos de sensibilidad serán colocados en el medio de cultivo idóneo previa siembra del microorganismo sensible.
- Se llevan a la estufa a temperatura de 36° C por el tiempo de 24 horas.
- De acuerdo a los resultados se medirán los halos en mm, mediante la regla de Vernier. Con estos datos se elaborará la curva de calibración por regresión logarítmica: $Y = a + b \log X$.

Concentración de los tamaños de halo de los preparados de la *Annona cherimola miller*

- Mediante el uso de la curva de calibración se determinarán las concentraciones de los tamaños de halo de los preparados de la *Annona cherimola miller* (Zavaleta 2021).
- Mediante el uso de la calculadora científica *fx-3600P* se procede al cálculo de las concentraciones de los halos medidos en mm.

Análisis estadístico.

Para la interpretación de los resultados se utilizará medidas de tendencia central (promedios) y de dispersión (desviación estándar, valores extremos, y coeficiente de variabilidad).

Para el análisis de las variables de respuesta (1 *Annona cherimola miller* x 2 preparados x 4 antibióticos) se utilizará el diseño completamente al azar, con 25 repeticiones por tratamiento.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_1 + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Variable respuesta.

μ = Media poblacional.

α_1 = Efecto de iesimo tratamiento (tres dosis y testigo)

ε_{ij} = Error experimental.

Si hubiera diferencia estadística entre tratamientos, se realizará una prueba múltiple de significancia de Takey – Krammer (≤ 0.05).

Referencias.

- Popenoe, H., et al., Lost crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Report of an ad hoc committee on Technology Innovation Board Science and Technology for International Development, National Research Council. National Academy Press, Washington DC, U.S.A. (1989).
- Manica, L., et al., Frutas Annonáceas: ata ou pinha, atemóia, cherimólia e graviola. Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre-RS: Editora Cinco Continentes (2003).
- Calzada, J. 143 *Frutales nativos*. Perú: UNALM.
<http://www.lamolina.edu.pe/agronomia/dhorticultura/html/cursos/archivos/AG-3020%20FRT.pdf> (1993).
- Gardiazabal, F. y Rosenberg, G., El cultivo del chirimoyo. Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso, Chile. (1993).
- QUISPE-MAURICIO, Angel et al. Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. *Acta méd. peruana* [online]. 2009, vol.26, n.3 [citado 2022-12-24], pp.156-161. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000300003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1728-5917.
- Flores, D. (2013). *Cultivo de chirimoyo. Manual práctico para productores*. (1era ed.). Editorial Swisscontact.
- Napoleón, J. (2004). *Guía técnica del cultivo de la anona*. (1era ed.). Santa Tecla. Editorial IICA.
- Nonalaya, K. y Marcañaupa, J. (2017). *Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de semilla de chirimoya (Annona cherimola) y guanabana (Annona muricata)* [tesis de pregrado, Universidad Nacional del Centro del Perú]. Repositorio Institucional digital UNCP. <http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/4375/Nonalaya%20C-%20Marca%C3%Blau%20D.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pamplona, J. *El poder medicinal de los alimentos*. (1era ed.). Editorial Safeliz (2004).
- Rodríguez, J. *Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible*. Recuperado el 06 de septiembre de 2019, de <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/9403> (2010).
- Trevejo, E. y Maury, M. Extracción y caracterización del aceite de *Poraqueiba sericea* Tulasne (UMARÍ). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 2 (2), 1-18. Recuperado el 07 de noviembre de 2019, de <https://docplayer.es/11144789-Extraccion-y-caracterizacion-del-aceite-de-poraqueiba-sericea-tulasne-umari.html> (2002).
- García-Salas, p., Gómez-Caravaca, A.M., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, a. "Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS", *FRIN*, 78(2015), pp. 246–257 (2015).
- García-Salas, P., Verardo, V., Gori, A., Caboni, M.F., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. "Determination of lipid composition of the two principal *Cherimoya* cultivars grown in Andalusian region", *LWT - Food Science Technology*, 65, pp. 390–397 (2016).
- Díaz-De-Cerio, E., Aguilera-Saez, L.M., Gómez-Caravaca, A.M., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., Fernández, I. y Arráez-Román, D. "Characterization of bioactive compounds of *Annona cherimola* L. leaves using a combined approach based on HPLC-ESI-TOF-MS and NMR", *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 410(15), pp. 3607–3619 (2018).
- Chung Yi, C., Fang Rong, C., Che Ming, T. y Yang Chang, W. "Cheritamine, a new N-fatty acyl

tryptamine and other constituents from the stems of *Annona cherimola*", Journal Chinese Chemistry Society. 46(1), pp. 77–86 (1999).

Mannino, G., Gentile, C., Porcu, A., Agliassa, C., Cradonna, F. y Margherita Berteà, C. "Chemical profile and biological activity of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and Atemoya (*Annona atemoya*) leaves", *Molecules*, 25(11), 2612 (2020).

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>

Uso de los resultados y contribuciones del proyecto.

Demostrar que las semillas de la *Annona cherimola miller* tiene actividad antibacteriana a 3827 metros de altitud con los preparados hidroetanólico e hidrocloroformico para su utilización en infecciones con bacterias Gram (+) y (-) en el humano y las explotaciones ganaderas del altiplano.

Impactos en Ciencia y Tecnología.

La actividad antibacteriana de las semillas de la chirimoya será un impacto sobre la resistencia bacteriana y su uso con preparados farmacológicos estables de este elemento natural será un aporte a la ciencia y la tecnología en la búsqueda de nuevas sustancias antiinfecciosas.

Impactos económicos

La búsqueda de nuevos antiinfecciosos naturales permiten que los costos de tratamiento sean más bajos que con antibióticos clásicos, así como también la recuperación de los pacientes tratados con esta forma natural de antibacteriano determinara en cortos tiempos por ser nueva sustancia que aún no está supeditada a la resistencia bacteriana.

Impactos sociales

Como una sustancia antibacteriana redundara en el bienestar de los individuos que tienen problemas de salud infecciosa, lo que trascenderá en la comunidad entera humana y de animales.

Impactos ambientales

El uso de las semillas de la *Annona cherimola miller* no tendrá trascendencia en el daño al medio ambiente por ser sustancia natural.

Recursos necesarios.

Laboratorio de Farmacología y Terapéutica FMVZ.

Materiales y equipos.

Materiales de bioprotección.

- Mandil verde
- Gorra y cubre bocas
- Guantes descartables

Materiales de toma de muestras microbiológicas.

- Guantes estériles.
- Jeringas hipodérmicas estériles.
- Iodopovidona o alcohol yodado.
- Alcohol de 70%.
- Frascos de boca ancha para la recolección de las muestras.
- Frascos de vacutainer estériles.

Materiales de identificación

- Plumones indelebles
- Stickers.

Material de pesado

- Balanza analítica.
- Balanza de precisión.

Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Hornilla eléctrica
- Centrifuga eléctrica
- Compresora de aire
- Campana de flujo laminar
- Estufa
- Refrigeradora
- Regla de Vernier.

Material de laboratorio.

- Medio de cultivo agar Mc conkey.
- Discos de sensibilidad
- Pinza simple
- Lápiz
- Tips de 1 mL
- Tips de 20 μ L
- Anza de platino
- Mechero Bunsen
- Gradilla para tubos de ensayo
- Pipeta automática de 20 μ L
- Pipeta automática de 1 mL
- Placas Petri
- Viales

Otros

- Lapicero
- Reloj
- Linterna

- Libreta de campo
- Calculadora Fx 3600.
- Cámara fotográfica.

Localización del proyecto.

Laboratorio de Farmacología y terapéutica localizado en el Hospital Veterinario de la Ciudad Universitaria ubicado a 3827 metros de altitud.

Cronograma de actividades.

Actividad	Trimestres											
Preparación de reactivos y medios.	x	x										
Preparación de los extractos de <i>Annona cherimola</i> .		x	x									
Pruebas preliminares de laboratorio.			x									
Inicio del experimento				x	x	x						
Observación y recolección de datos							x	x	x			
Análisis e interpretación de datos											x	
Elaboración del artículo científico.											x	x

Presupuesto.

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Carga personal	Unidad	500.00	2	1000.00
Material fungible de laboratorio	Juegos	2800.00	1	3200.00
Procesamientos de datos	Unidad	240.00	1	260.00
Bibliografía/internet	Unidad	360.00	1	360.00
Material de escritorio	Unidades	100.00	1	100.00
Publicación de artículo científico	Unidad	100.00	1	100.00
TOTAL				5,020.00

C. U. Enero del 2023.