

UNIVERSIDAD SAN PEDRO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE FARMACIA Y
BIOQUIMICA



Citotoxicidad del extracto hidroalcoholico de semillas de
***Annona cherimola* Mill “chirimoya” sobre células apicales de**
raíces de *Allium cepa* L.

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Autores:

Flores Alvarado Ludi

Hilario Avalos Merary Cristal

Asesor

Cacha Salazar, Carlos Esteban

(Código ORCID: 0000-0002-3169-5891)

Nuevo Chimbote - Perú

2024

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
PALABRAS CLAVE	iv
CONSTANCIAS DE ORIGINALIDAD	v
TITULO	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	14
Tipo y Diseño de investigación	14
Población - Muestra y Muestreo	15
Técnicas e instrumentos de investigación.....	16
Procesamiento y análisis de la información.....	19
RESULTADOS	20
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características morfológicas de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya”	20
Tabla 2	Características fisicoquímicas del extracto de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya”	21
Tabla 3	Crecimiento en longitud de las raicillas de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla”, bajo el efecto del extracto de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” a diferentes concentraciones	22
Tabla 4	Efecto del extracto de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” sobre la mitosis celular de las raicillas de <i>Allium cepa</i> L.....	24
Tabla 5	Índice Mitótico en las raicillas de <i>Allium cepa</i> sometidas a la acción del extracto de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” a las concentraciones de 21 mg/mL, 10.5 mg/mL, 0.525 mg/mL y el grupo control.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Crecimiento en longitud de las raicillas de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla”, bajo el efecto de concentraciones crecientes del extracto de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya”. En la figura se presenta la CI50 del extracto, la cual es de 18.31 mg/mL.	23
Figura 2	Índice mitótico de las raicillas de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla”, bajo el efecto de concentraciones crecientes del extracto de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya”.	26
Figura 3	Índice de Fase de las raicillas de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla”, bajo el efecto de concentraciones crecientes del extracto de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya”	26

1 Palabras clave:

Tema	Citotoxicidad
Especialidad	Toxicología

Keywords

Theme	Cytotoxicity
Specialty	Toxicology

Línea de investigación

Línea de Investigación	Recursos Naturales Terapéuticos y Fitoquímica
Área	Ciencias Médicas y de Salud
Subárea	Medicina Básica
Disciplina	Farmacología y Farmacia



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

El que suscribe, Vicerrector de Investigación de la Universidad San Pedro:

HACE CONSTAR

Que, de la revisión del trabajo titulado "**Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de semillas de *Annona cherimola* Mill "chirimoya" sobre células apicales de raíces de *Allium cepa* L.**" del (a) estudiante: **HILARIO AVALOS MERARY CRISTAL**, identificado(a) con Código N° **1315200082**, se ha verificado un porcentaje de similitud del **19%**, el cual se encuentra dentro del parámetro establecido por la Universidad San Pedro mediante resolución de Consejo Universitario N° 5037-2019-USP/CU para la obtención de grados y títulos académicos de pre y posgrado, así como proyectos de investigación anual Docente.

Se expide la presente constancia para los fines pertinentes.

Chimbote, 29 de febrero de 2024

UNIVERSIDAD SAN PEDRO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Dr. JAVIER MARTÍNEZ CARRIÓN
VICERRECTOR



NOTA: Este documento carece de valor si no tiene adjunta el reporte del Software TURNITIN.

3 Título

Citotoxicidad del extracto hidroalcoholico de semillas de *Annona cherimola*
Mill “chirimoya” sobre células apicales de raíces de *Allium cepa* L.

4 Resumen

El propósito de nuestra investigación fue determinar la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Annona cherimola* Mill “chirimoya” sobre el meristemo radical de *Allium cepa* L. “cebolla”. Esta investigación es experimental. Se evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico, sobre el crecimiento y diferenciación de las células meristemáticas de las raicillas de cebolla, con el extracto de 2.1 g%, 1.05 g% y 0.525 g%. Las semillas son duras, ovals, negras y de 17 x 12 x 8.2 mm. El extracto fue transparente, amargo, marrón, de olor característico, pH 5.79, IR de 1.5, con 2.5 °Brix y 2.1 gramos/100 mL de concentración. El efecto del extracto es directamente proporcional a su concentración, por esto el crecimiento en longitud fue de 54, 36.9 y 11.9 % para las concentraciones de 21, 10.5 y 5.25 mg/mL respectivamente. El extracto retarda la división celular de las células meristemáticas en forma dosis dependiente de la concentración, resultando mayor inhibición con el extracto de 2.1 mg/mL. El índice mitótico de 40.73 en el grupo control, disminuye hasta 20.67, 31.67 y 33.306 para los extractos de 21, 10.5 y 5.25 mg/mL respectivamente. según el índice de fase, es la telofase la más afectada pues el extracto de 21 mg/mL disminuye de 8.59 a 1.78. Finalmente, no hubo cambios morfológicos y ni pérdida de la integridad celular como respuesta a ninguna de las diferentes concentraciones.

Palabras clave: *Annona cherimola* Mill “Chirimoya”, *Allium cepa* L., Citotóxico.

5 Abstract

The purpose of our research was to determine the cytotoxic activity of the hydroalcoholic extract of the seeds of *Annona cherimola* Mill “cherimoya” on the root meristem of *Allium cepa* L. “onion”. This research is experimental. The effect of the hydroalcoholic extract on the growth and differentiation of meristematic cells of onion rootlets was evaluated with the extract of 2.1 g%, 1.05 g% and 0.525 g%. The seeds are hard, oval, black and 17 x 12 x 8.2 mm. The extract was transparent, bitter, brown, with a characteristic odor, pH 5.79, IR of 1.5, with 2.5 °Brix and 2.1 grams/100 mL concentration. The effect of the extract is directly proportional to its concentration, therefore the growth in length was 54, 36.9 and 11.9% for concentrations of 21, 10.5 and 5.25 mg/mL respectively. The extract delays cell division of meristematic cells in a dose-dependent manner, resulting in greater inhibition with the 2.1 mg/mL extract. The mitotic index of 40.73 in the control group decreases to 20.67, 31.67 and 33.306 for the extracts of 21, 10.5 and 5.25 mg/mL respectively. According to the phase index, telophase is the most affected since the 21 mg/mL extract decreases from 8.59 to 1.78. Finally, there were no morphological changes or loss of cellular integrity in response to any of the different concentrations.

Keywords: *Annona cherimola* Mill “Custard apple”, *Allium cepa* L., Cytotoxic.

6 Introducción

Antecedentes y fundamentación científica

López Martínez (2021), en su investigación en 3 tipos de anona para describir su potencial nutricional, nutracéutico y citotóxico reportan que los extractos metanólicos de semillas del fruto de chirimoya, guanábana y chincuya eliminan el 50% de células malignas en cáncer de mama. También nos comunican que la muerte celular de las células tumorales es por apoptosis y no por necrosis; y que los extractos metanólicos de hojas, cáscara y pulpa no tuvieron efecto en las células tumorales de cáncer mamario.

Balkrishna et al., (2023), en su revisión “Perspicacia contra el cáncer de tres especies de Annona” nos dicen que cada año el cáncer avanza inexorablemente en la vida cotidiana y es motivo de gran preocupación, sobre todo para los científicos de todo el mundo. Afirman que los compuestos naturales presentes en las plantas logran grandes resultados en esta lucha en comparación con la quimioterapia y radioterapia (tóxicas y con efectos secundarios graves). Las especies de Annona, nativas de varios continentes tienen muchas sustancias anticancerígenas. Los autores realizaron una revisión, donde, realizan la comparación de las especies *A. cherimola*, *A. muricata* y *A. squamosa*. Ellos describen la actividad anticancerígena haciendo un análisis exhaustivo de hallazgos y pruebas que sustentan sus efectos antiproliferativos, apoptosis, detención del ciclo celular G1 y citotóxicos. De las 3 especies en estudio *A. muricata* mostró el mayor número de actividades anticancerígenas con IC₅₀ más bajos contra varias líneas celulares de cáncer. Por estos hallazgos, recomiendan realizar estudios más detallados sobre los efectos anticancerígenas de las especies de Annona, ya que podrían resultar más provechosos al descubrir y desarrollar nuevos fármacos anticancerígenos.

Thilagavathi et al., (2022), en su revisión “Compuestos de diverso origen natural contra el cáncer de mama triple negativo: una revisión exhaustiva” destacan que las causas de esta enfermedad son, falta receptores de estrógeno, receptores progesterona y la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2. Este cáncer es la enfermedad heterogénea más agresiva. La tumorigénesis en este tipo de cáncer se debe a la sobreexpresión de genes supresores de tumores. También se asocia con mutaciones en el gen BRCA, el cual está relacionado con el cáncer de mama hereditario. Muchas vías de señalización celular están desreguladas en este tipo de cáncer, aunque la quimioterapia y la inmunoterapia son buenas opciones para su tratamiento, las tasas de respuesta siguen siendo bajas en general. Muchos compuestos derivados de las plantas han mostrado muy buenos efectos inhibitorios del cáncer de mama triple negativo. Los compuestos naturales tienen la gran ventaja de ser menos tóxicos, tener menos efectos secundarios y estar fácilmente disponibles. Los metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides, esteroides y flavonoides en productos naturales los convierten en inhibidores prometedores del cáncer de mama triple negativo. Sus composiciones también ofrecen información vital sobre la acción inhibitoria, lo que podría conducir a nuevas estrategias de lucha contra el cáncer.

Haag, (2021), en su tesis doctoral obtiene extractos y realiza el fraccionamiento de *Annona cherimola* mill. a partir de las hojas, detecta la presencia de polifenoles, terpenoides, esteroides, alcaloides relacionados con la actividad biológica. Destaca la presencia de isoquercetina, rutina, ácido cafeico, ursólico y oleanólico. Determinó la actividad antineoplásica de cada uno de los extractos y fracciones, en estirpes celulares de LLC-B, con resistencia a fármacos oficiales y se seleccionó la infusión de *Annona cherimola* por mostrarse como la más efectiva. Con la infusión se elaboraron liposomas, para luego elaborar nanoliposomas recubiertos con anticuerpos monoclonales y luego evaluar la penetración de nanoliposomas con infusión de *A. cherimola* con/sin anticuerpos monoclonales específicos anti-CD20 en células de LLC-B, las cuales son resistentes a los fármacos habituales. La investigación demostró actividad contra células de LLC-B. En resumen, se llega a la conclusión de que la utilización de nanoliposomas junto con un anticuerpo monoclonal

antiCD20 en la infusión de hojas de "Chirimoya" emerge como una alternativa terapéutica eficiente contra el cáncer, especialmente en el caso de la B-LLC. Además, cuando se combinan con tratamientos convencionales, podrían generar un efecto beneficioso sinérgico, presentando así una estrategia prometedora.

Martínez-Solís et al., (2022), investigaron la actividad antidiabética los efectos toxicológicos de la infusión de hojas de *Annona cherimola* Miller recolectadas en verano. En la medicina tradicional mexicana se utiliza esta planta para el tratamiento de la diabetes. En este trabajo, se investigó los extractos de 1,5 g de polvo de hoja de recolectados en mayo, junio, julio y agosto se evaluaron en ratones con diabetes experimental y la toxicidad subcrónica se evaluó en ratones STID. Los resultados mostraron que la muestra de agosto tuvo la actividad antihiper glucémica más significativa. El análisis de todos los extractos reveló que rutina, narcisina y nicotiflorina eran los principales componentes. Para la toxicidad oral subcrónica, la muestra de agosto no causó mortalidad en ratones STID y el análisis histopatológico reveló una mejora significativa en los cambios asociados con la diabetes en el hígado y los riñones. Estos hallazgos sugieren que las hojas de *Annona cherimola* Miller recolectadas en agosto pueden ser una fuente de flavonoides como la rutina, con potencial antidiabético. Además, estos hallazgos respaldan utilizar *Annona cherimola* Miller en el tratamiento de la diabetes en la medicina tradicional.

En el Perú, Ccorahua Retamozo (2021) llevó a cabo un análisis exhaustivo en su tesis, enfocándose en la determinación de la composición química y bromatológica, así como la fitoquímica de las semillas de *Annona cherimola* (chirimoya) provenientes de la región de Huarochirí en Lima. Las semillas fueron sometidas a un proceso de secado, primero a la sombra y luego en estufa. Una vez secas, fueron molidas y sometidas a un análisis químico proximal, revelando un significativo contenido de grasa del 26.13%, fibras del 18.14%, y proteínas del 14.05%. A partir de este material seco y molido, se obtuvieron extractos hexánicos, diclorometánicos y etanólicos. Estos extractos fueron utilizados para identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en las semillas, revelando la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos esteroidales, quininas, cumarinas, alcaloides y

saponinas. El contenido de fenoles totales se determinó, y los resultados se expresaron en equivalentes de mg de ácido gálico/100 ml. Tras analizar la composición química y fitoquímica de las semillas de chirimoya de la provincia de Huarochirí en Lima, se sugirió iniciar investigaciones destinadas a aislar e identificar los componentes químicos responsables de la actividad antioxidante observada en las semillas de *Annona cherimola*.

Alvarado Mayor & Flores (2022) llevaron a cabo un estudio que examinó los efectos de *Annona muricata*, perteneciente al mismo género que *Annona cherimolla*, en la línea celular de adenocarcinoma gástrico de ratón C-678. Los resultados obtenidos fueron positivos, destacando la ausencia de evidencia previa en células humanas. El enfoque de la investigación fue de tipo experimental in vitro, utilizando un extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* recolectadas en la región de Amazonas. Para evaluar el efecto citotóxico, se aplicaron diferentes concentraciones del extracto a las placas que contenían las líneas celulares, y los datos fueron registrados mediante una ficha de observación, posteriormente extrapolados a GraphPad. En este estudio, se identificaron diversos compuestos, incluyendo carbohidratos reductores, alcaloides, fenoles, taninos, triterpenos y esteroides, saponinas, flavonoides, proteínas, glicósidos cardiotónicos y antocianinas. El contenido total de fenoles se expresó en ácido gálico, evidenciando una presencia significativa de estos metabolitos. Además, se determinó el contenido de flavonoides utilizando quercetina como patrón de referencia. La citotoxicidad de *Annona muricata* se evaluó en la línea celular de adenocarcinoma gástrico, revelando un IC₅₀ de 45.81 µg/mL a las 24 horas y 19.05 µg/mL a las 48 horas. Como conclusión, se estableció que esta planta posee un efecto citotóxico contra la línea celular de adenocarcinoma gástrico.

Marco teórico:

La *Annona cherimola* es un árbol frutal de la familia Annonaceae. Como es una planta ampliamente cultivada en el mundo, su origen aún está en discusión. Una hipótesis postula que se originó en los Andes a 700-2400 m de altitud, mientras que una hipótesis alternativa postula que se originó en América Central fundamentada a la gran cantidad de parientes silvestres. Esta especie se considera originaria del territorio entre Ecuador y Perú. Sin embargo, investigaciones más recientes basadas en análisis

biogeográficos con marcadores SSR respaldan un probable origen mesoamericano de *A. cherimola*. La chirimoya se introdujo en la España continental desde América entre los siglos XVI y XVIII con el primer registro en 1757. Después de eso, la chirimoya probablemente se expandió a otros países europeos. La flor de la chirimoya es hermafrodita con un centro piramidal gineceo compuesto por hasta 300 carpelos fusionados y un androceo helicoidal basal con estambres rodeados por dos verticilos de tres pétalos. la dicogamia floral es la característica más importante de esta especie. Las flores hermafroditas tienen órganos femeninos y masculinos que no maduran simultáneamente impidiendo generalmente la autofecundación en la misma flor. El ciclo de la flor se completa en 2 días. En el primer día, la flor está en preantesis, con los pétalos bien cerrados y pasa al estado femenino hacia el mediodía. Esta fase tiene una duración de 30 horas y en el segundo día la flor cambia de la etapa femenina a la masculina, cuando las anteras dehiscen, alrededor de las 4-5 de la tarde en condiciones mediterráneas. Las flores de chirimoya del mismo genotipo generalmente se abren sincrónicamente y la transferencia de polen entre diferentes flores del mismo genotipo es difícil. Los frutos de *Annona* son carnosos y agregados con varias semillas formadas principalmente por endospermo reticulado y un embrión diminuto. Los frutos de chirimoya son cónicos o en forma de corazón con pulpa blanca dulce y jugosa. La piel puede ser lisa con marcas similares a huellas dactilares o cubierta con protuberancias cónicas o redondeadas. El peso de la fruta de chirimoya esta entre 200 y 700 g y su longitud esta entre 7,5 y 12,5 cm. La pulpa es blanca y subácida y tiene un sabor delicado y fragante, como el de la piña y el plátano. Hay muchas semillas en la fruta. (21 a 41 semillas/fruto), que miden entre 1,5 y 2,0 cm de largo y alrededor de 1,0 cm de ancho. La fruta de chirimoya es sensible al pardeamiento. El oscurecimiento es muy rápido a temperatura ambiente. Debido a la rápida maduración climatérica, los frutos de chirimoya son perecederos. El almacenamiento entre 10-12 °C puede retrasar ligeramente la maduración y en consecuencia la vida útil de estos frutos se prolonga. La pulpa de esta fruta es blanda por lo que el fruto es comestible. Estos frutos no maduran en planta, sino que a los 3-6 días después de ser cosechada. En comparación con otras frutas, la maduración se produce rápidamente en la chirimoya. pues madurará

en 6–7 días a temperatura ambiente. Esta es una de las razones que limitan en gran medida la potencialidad de mercado de esta fruta. Por otro lado, esta fruta, también hoy, encuentra varias aplicaciones en la medicina tradicional gracias a sus propiedades antibacterianas e insecticidas y en la terapia de trastornos digestivos y enfermedades dermatológicas. (Perrone et al., 2022).

Annona cherimola, fruta de postre que se come fresca, pues los frutos de no pueden ser sometidos a procesos térmicos y se requiere refrigeración o congelación para su procesamiento, con adición de antioxidantes para evitar el pardeamiento enzimático. Las semillas de *Annona cherimola* se usan como insecticida de piojos y curar problemas de parásitos en la piel. En las semillas se encuentran las acetogeninas. alcaloides importantes, con actividad antiparasitaria y citotóxica. Las acetogeninas anonáceas son un grupo de poderosos principios activos y se han reportado más de 300 compuestos con diferentes actividades biológicas, como actividades antimicrobianas, antitumorales, cardiotónicas e insecticidas. La fruta baja en colesterol y sodio, rica en fibra, vitamina B6, vitamina C y potasio. El uso tradicional de la chirimoya como antimicrobiano e insecticidas y en el tratamiento del dolor de estómago y las úlceras pancreáticas. La corteza se usa para la diarrea, para el dolor de muelas, la raíz se puede masticar y el decocto de raíz se puede usar como antifebrífugo. El cocimiento de hojas se usa para eliminar gusanos y las hojas se usan para curtir cuero. (Varadharaj & P., 2017)

Las acetogeninas (ACG) presentes en el género *Annona* son uno de los grupos de metabolitos secundarios más interesantes. Son policétidos y se constituyen una clase única de C35 o C37. La uvaricina, aislada en 1982 a partir de las raíces de *Uvaria accuminata* Oliv. por Jolad et al., exhibió una bioactividad excelente en ratones con leucemia linfocítica P-388, a partir de este hecho se viene realizando una amplia investigación de estas sustancias naturales. Estos metabolitos tienen muchas actividades biológicas, sobretodo en sus propiedades anticancerígenas. Hasta ahora se ha demostrado que algunas variaciones en su columna vertebral, incluido su sistema THF, el tipo de lactona terminal, el número y posición de sus hidroxilos y su

estereoquímica son importantes en su actividad biológica. En general, se ha confirmado que los ACG con bis-THF (T-C) adyacente y un anillo de metil γ -lactona α , β insaturado fueron más activos que aquellos con grupos no adyacentes o con el anillo β -hidroxil metil γ -lactona grupo (L-C). Debido a esto, se necesita un mayor estudio de la correlación entre su estructura y su actividad. Otros estudios modernos han profundizado en métodos de formulación novedosos, distintos del codisolvente habitual, para aplicarlos con éxito en la puesta a disposición de las ACG. Entre ellos, las nanopartículas poliméricas (NP) y la síntesis de micelas (SMPM) han arrojado resultados prometedores con respecto a la modulación de la entrega de ACG, su estabilidad y su solubilidad en agua. Como la cantidad de acetogeninas de *Annona cherimola* Mill es baja, un profundo conocimiento de estos requisitos estructurales debe ocasionar el desarrollo de derivados sintéticos y más eficientes. Varios científicos han centrado sus estudios en la síntesis de miméticos y derivados, pero hasta ahora ninguno ha superado los perfiles citotóxicos y antitumorales de los compuestos individuales naturales. No obstante, la sustancia AA005, imitador de la bullatacina, se ha sintetizado a escala de gramos y también sus resultados in vivo son muy buenos. Además, incorporar azúcares en la acetogenina natural abre el camino para aumentar la hidrosolubilidad de estos compuestos, lo cual mejoraría algunas de sus propiedades fisicoquímicas de manera conveniente. A pesar del antiguo y popular consumo de la fruta fresca y otros productos alimenticios derivados de esta planta, se requerirían más estudios para determinar dosis de consumo que sea segura, así como una metodología eficiente de aislamiento y administración que permita el beneficio de un uso médico. (Durán et al., 2021).

El término "tóxico" se refiere a cualquier forma de radiación electromagnética o partículas, así como a sustancias químicas no infecciosas, que no son perjudiciales para los seres humanos y su entorno biológico en condiciones normales. Estas sustancias, que tienen un tamaño menor que el de una pequeña partícula o fibra, pueden generar internamente, entrar en contacto, penetrar o ser absorbidas por organismos vivos. Sin embargo, solo en dosis lo suficientemente altas, estas sustancias pueden causar efectos adversos directos o indirectos en el organismo, que no están claramente relacionados

con la temperatura o diferencias mensurables de potencial eléctrico (Guitart & Giménez, 2012).

La toxicidad se define como la capacidad intrínseca de una sustancia química para generar consecuencias negativas en los organismos vivos. Estas consecuencias abarcan desde el deterioro funcional hasta lesiones patológicas que afectan el correcto funcionamiento del organismo, disminuyendo su capacidad de respuesta ante factores de riesgo o situaciones de estrés. La clasificación de los efectos tóxicos se realiza considerando el tiempo de exposición necesario para que se manifieste el impacto adverso, dividiéndolos en dos categorías: agudos, que se desarrollan rápidamente, y crónicos, que se manifiestan a lo largo de un periodo prolongado. (Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas, 2021).

La Toxicidad Aguda se refiere a los efectos nocivos que se manifiestan después de una única exposición de corta duración, generalmente inferior a 24 horas en estudios con animales de laboratorio. Estos efectos se evalúan determinando la Dosis Letal 50 (DL50) o Concentración Letal 50 (CL50), así como observando efectos irritantes y corrosivos en la piel y los ojos, junto con la posibilidad de sensibilización (Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas, 2021). En este contexto, el parámetro cuantificable del efecto tóxico principal es la mortalidad. La evaluación típica de la toxicidad aguda es exponer grupos de 10 a 20 animales, más un grupo de control, a más o menos 5 dosis diferentes de la sustancia química en prueba. Esta sustancia se administra al inicio del estudio, y los animales se someten a examen diario, registrando los signos clínicos y los síntomas de toxicidad. Después de un período de 14 días, se cuenta el número de animales muertos en cada grupo de dosis y en el grupo de control. Los resultados se analizan estadísticamente en relación con la frecuencia de mortalidad en función de la dosis. (Roldán Reyes, 2016).

La Toxicidad Subcrónica, en contraste con las pruebas de toxicidad aguda, implica administrar en forma repetida la cantidad del compuesto químico a evaluar durante un periodo de 90 días aproximadamente. El propósito de estas pruebas es investigar la toxicidad en órganos, utilizando datos de dosis-efecto para diseñar

pruebas de toxicidad crónica, que incluyen la estimación de un "nivel de efectos adversos no observados" o NOAEL (por sus siglas en inglés). Se evalúan 3 dosis como mínimo: una dosis alta que cause un 10% o menos de mortalidad; 1 dosis baja que no produzca efectos tóxicos; 1 o más dosis intermedias; y 1 grupo control (no expuesto al compuesto químico en ensayo). Es necesario utilizar al menos dos especies, como ratas y perros, con grupos pequeños de 10-20 ratas y de 2-4 perros. Además, se realizan pruebas por separado en machos y hembras, pues el género puede afectar la respuesta del organismo a la sustancia química tóxica. Durante el estudio, se observa minuciosamente a los animales, se toma nota de los signos y síntomas de toxicidad, y se obtienen muestras sanguíneas en intervalos regulares para realizar los análisis. Concluido el periodo de 90 días, los animales que sobrevivieron son sacrificados y se realiza una autopsia, incluyendo el examen microscópico de órganos y tejidos para establecer posibles patologías que se asocien con la exposición al químico en estudio (Roldán Reyes, 2016).

La Toxicidad a Largo Plazo o toxicidad crónica hace referencia a los efectos tóxicos que se observan en animales de experimentación después de la administración sostenida de un xenobiótico durante períodos que oscilan entre 6 meses y 2 años, utilizando al menos 3 dosis diferentes. Esta forma de toxicidad se clasifica como positiva o negativa en función de la presencia o ausencia de los efectos. Entre los efectos considerados a continuación se describen los efectos específicos:

Neurotoxicidad: Toxicidad neuronal, hace alusión a los impactos en el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico y los órganos sensoriales.

Genotoxicidad: Se refiere a cambios en la información genética o en sus elementos relacionados, ocasionados por una sustancia química en niveles de exposición que no son tóxicos de manera evidente. Dentro del ámbito de la genotoxicidad, se incorporan, si están accesibles, los resultados de pruebas que evalúan la capacidad de inducir mutaciones, alteraciones en los cromosomas, pruebas de formación de micronúcleos, análisis de aductos de ADN, y ensayos de cometa, entre otros.

Carcinogenicidad: Hace referencia a la habilidad de un agente para generar una neoplasia o cáncer. (Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas, 2021)

El control de calidad de un extracto derivado de una planta medicinal comprende un conjunto de procedimientos orientados a asegurar la producción uniforme de lotes de dichos productos que cumplan con las normas predefinidas en términos de identidad, pureza, integridad y actividad. Además, estos productos deben satisfacer criterios de estabilidad, los cuales indican la capacidad del producto vegetal para mantener, durante un periodo de tiempo específico, sus propiedades físicas, químicas, etc., dentro de los parámetros establecidos por la normatividad vigente en relación con su pureza, identidad y apariencia física. (G/TBT/N/COL/, 2016)

El bioensayo, se refiere a investigaciones que analizan las respuestas fisiológicas o poblacionales de organismos específicos cuando se exponen a concentraciones o proporciones ascendentes de xenobióticos. Estos estudios posibilitan la evaluación experimental del impacto integral de los agentes químicos presentes en una muestra sobre organismos vivos. (Contero & Felicita, 2006).

Allium test se fundamenta en que los organismos biológicos pueden expresar las alteraciones más sutiles que son respuestas individuales, las que pueden ser fisiológicas, bioquímicas, morfológicas y etológicas. Es en este contexto que los ensayos con plantas vasculares como por ejemplo *Allium cepa*, los que han demostrado tener una significativa potencialidad diagnóstica. Los efectos se determinan al observar el crecimiento de las raicillas, el desarrollo de la mitosis y las mutaciones que pueden sufrir los cromosomas en el ápice de la raíz de *Allium cepa* L. Las traqueofitas actualmente son bastante reconocidas como modelos genéticos muy buenos para evaluar y detectar sustancias potencialmente citotóxicas y genotóxicas. *Allium cepa* permite evaluar daños del ADN, en los cromosomas y en la mitosis. (Muñoz Solarte & Guerrero Pepinosa, 2013) El empleo de la prueba de *Allium cepa* como bioindicador en pruebas de biotoxicidad y genotoxicidad cuenta con reconocimiento global. (López Sardi et al., 2016).

Justificación

Desde una perspectiva teórica, la justificación de esta investigación radica en el hecho de que la información generada y las conclusiones obtenidas se convertirán en una valiosa fuente para investigaciones futuras relacionadas con la citotoxicidad de las semillas de *Annona cherimola* Mill, conocida como "chirimoya", específicamente en células apicales de raíces de *Allium cepa* L.

En términos metodológicos, se destaca la importancia de la investigación, ya que se empleó un instrumento de evaluación confiable y validado, que facilitó la recopilación de información y la sistematización estadística de los valores de citotoxicidad de las semillas de *Annona cherimola* Mill.

Desde un punto de vista social, la relevancia de este estudio se evidencia en la posibilidad de ofrecer a la población una nueva alternativa medicinal. Las plantas medicinales, al contener numerosas sustancias bioactivas, son cada vez más necesarias en la búsqueda de nuevos medicamentos. Este impulso de investigar la citotoxicidad de las semillas de chirimoya se basa en la falta de estudios significativos sobre esta parte específica de la planta, a pesar de la abundancia de investigaciones farmacológicas.

Problema

¿Qué efecto tendrá el extracto hidroalcohólico de semillas de *Annona cherimola* Mill “chirimoya” sobre las células apicales de las raíces de *Allium cepa* L.?

Conceptualización y operacionalización de variables

Definición conceptual	Dimensión	Indicadores	Escala de medición
Extracto hidroalcohólico de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill. Producto obtenido por maceración de semillas de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” en alcohol etílico al 70%. (Duas Rodas, 2020)	Extracto hidroalcohólico de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” en 3 concentraciones diferentes obtenidas por diluciones del extracto inicial.	Extracto 1: Ext. Entero Extracto 2: Dilución 1/2 Extracto 3: Dilución 1/4	Ordinal
Citotoxicidad. Es la capacidad relativa de una sustancia para ocasionar daño al “material genético”, causando efectos biológicos nocivos. (Guitart & Giménez, 2012)	Tamaño de la raíz Aspecto de las raicillas Mitosis	<ul style="list-style-type: none"> • Longitud en cm. • Alteraciones en las fases de la mitosis 	Nominal

Hipótesis

El extracto obtenido por maceración de las semillas de *Annona cherimola* Mill en etanol de 70 | GL tiene actividad citotóxica sobre las células meristemáticas radicales de *Allium cepa* L.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Annona cherimola* Mill “chirimoya” sobre el meristemo radical de *Allium cepa* L.

Objetivos específicos

1. Determinar las características morfológicas de semillas de *Annona cherimola* Mill.
2. Determinar las características organolépticas del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill.
3. Determinar algunas características fisicoquímicas del extracto de las semillas de *Annona cherimola* Mill.
4. Demostrar el efecto del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill a diferentes concentraciones sobre el crecimiento en longitud de las raicillas de *Allium cepa* L.
5. Demostrar el efecto del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill a diferentes concentraciones sobre la mitosis de células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa* L. “cebolla”
6. Analizar los cambios en la morfología y la integridad de las células meristemáticas de *Allium cepa* L., en respuesta a la exposición al extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill a diferentes concentraciones.
7. Comparar los resultados con un grupo de control sin exposición al extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill.

7 Metodología

a) Tipo y Diseño de investigación

Tipo de investigación

Esta investigación es básica, pues los resultados obtenidos contribuyen a incrementar el conocimiento de las variables en estudio (citotoxicidad) aportando información con potencial utilidad para futuros estudios (Rodríguez, 2020, s/p).

Diseño de investigación

Nuestro trabajo se llevó a cabo bajo un diseño experimental, el cual nos permitió verificar los posibles efectos citotóxicos del extracto de las semillas de *Annona cherimola* Mill sobre el meristemo radical de *Allium cepa* L. “cebolla”. Lo que se constituye en la intervención específica, del investigador. Tal y como se ha establecido que, en los estudios experimentales, en este estudio, el investigador manipula las condiciones de investigación. (Méndez González et al., 2013)

Diseño experimental con estímulo creciente:

De acuerdo con Calderón Mestanza & Torres Armas, (2014) trabajaremos con 3 grupos problema (tratamientos del 1-4) y 1 grupo testigo (tratamiento 5), con 3 repeticiones por cada grupo:

Grupos experimentales:

Tratamiento 1: 1 mL de la dilución 1/1000 del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill

Tratamiento 2: 1mL de la dilución 1/100 del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill

Tratamiento 3: 1 mL de la dilución 1/10 del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill

Tratamiento 4: 1 mL del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill

Tratamiento 5: 1 mL de solución salina fisiológica

b) Población, muestra y muestreo

Considerando que la investigación es sobre una propiedad de las semillas de *Annona cherimolla* L., entonces, se puede colegir que todas las plantas de chirimoya del distrito de Simbal en la Provincia de Trujillo, son la población.

Criterios de Inclusión:

- Los frutos de *Annona cherimolla* L. “chirimoya”, serán recolectados en las huertas de la ciudad de Simbal, distrito y provincia de Trujillo, en la región La Libertad.
- Se recolectarán los frutos de *Annona cherimolla* L. “chirimoya” cuyos frutos se observen en buen estado.
- Se recolectarán frutos de *Annona cherimolla* L. “chirimoya” sin signos de afectación por plagas.
- Bulbos de *Allium cepa* L. “cebolla” de tamaño y peso entre 200 y 230 gramos, que estén en buenas **condiciones**.

Criterios de Exclusión:

- Los frutos de *Annona cherimolla* L. “chirimoya” que se observen en mal estado.
- Los frutos de *Annona cherimolla* L. “chirimoya” que se encuentren fuera de la zona de recolección.
- Bulbos de *Allium cepa* L. “cebolla” que no se hallen de tamaño y peso entre 200 y 230 gramos, que estén en malas condiciones.

Muestra

La muestra alude a un pequeño subgrupo de la población, los que fueron escogidos por una característica en particular como puede ser el sexo, edad, localidad, patología, situación económica, etc., los que además deben de estar en una cantidad adecuada para que permita la confiabilidad del instrumento (Hernández, et al., 2014).

Muestra 1:

Un total de 15 frutos maduros *Annona cherimola* Mill “chirimoya”, en buenas condiciones, de las cuales se extraerán las semillas a utilizar en el presente estudio.

Muestra 2:

Un total de 60 bulbos de *Allium cepa* L. “cebolla” de tamaño y peso entre 200 y 230 gramos, que estén en buenas condiciones.

Técnica de muestreo

Para realizar un adecuado muestreo se debe de tener en cuenta el tipo probabilístico y el no probabilístico, de ambos se destaca el primero ya que cualquier individuo que forme parte de la población seleccionada tiene las mismas posibilidades de ser escogido para integrar la muestra (Kinnear y Taylor, 1998).

c) Técnicas e instrumentos de investigación:**Procesamiento del material vegetal:**

Siguiendo las pautas publicadas por (Ruiz Reyes et al., 2018) se trabajará de la siguiente manera:

Recolección del espécimen vegetal

Se recolectarán 60 frutos de *Annona cherimola* Mill del distrito de Simbal, provincia de Trujillo, región La Libertad. Los frutos serán seleccionados considerando su apariencia visual (pintones, intactas, libres de desechos orgánicos e inorgánicos, libre de plagas).

Identificación

Un ejemplar de las partes más importantes de la planta se llevará al Herbarium Truxillense (HUT) para su identificación.

Lavado y desinfección

- Los frutos serán lavados con agua potable a chorro para eliminar suciedad

externa.

- Los frutos fueron sumergidos en una solución desinfectante de hipoclorito de sodio.
- Se enjuagarán con abundante agua destilada.

Secado y almacenamiento del fruto

El exceso de agua procedente del enjuague sobre los frutos será retirado con papel absorbente en primer lugar, para luego ser colocadas sobre papel kraft sobre una mesa para secado a temperatura ambiente durante 48 horas y finalmente ser sometidas a una temperatura de 37 °C en estufa de convección durante 4 horas.

Procesado de la materia prima vegetal (*Annona cherimola* Mill)

- Una vez que los frutos estén maduros se procederá a extraer las semillas
- Las semillas serán lavadas con abundante agua corriente
- Las semillas serán llevadas a secado por 24 horas en estufa de convección y a 40 °C.
- Una vez secas las semillas, se extrajeron los cotiledones y las cubiertas.
- Ambas partes fueron colocadas en recipientes por separado y llevadas a secado a la estufa de convección a 50 °C por 24 horas.
- Concluido el secado de las muestras, estas fueron sometidas a molienda.

Obtención del extracto hidroalcohólico

Se realizará siguiendo a Kuklinski, C. (2003).

- Se pesaron 100 g de muestra (por separado) y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL.
- Se realizó la humectación con 100 mL. de alcohol etílico al 70 % v/v. durante 24 horas, tapando el recipiente con papel aluminio.
- Se adicionó 1000 mL. de alcohol etílico al 70 % v/v.
- Se llevó a cabo la extracción mediante maceración por 15 días.
- Se filtró al vacío (papel de filtro de tránsito lento) para eliminar sustancias en suspensión.
- Cuando fue necesario se completó llevando a un volumen de 1 L.

- Se almacenó en frasco ámbar en refrigeración hasta el momento de su utilización.

Test de Allium

El procedimiento se realizó bajo las indicaciones de lo publicado por (Fernández et al., 2021).

12 bulbos de cebolla con un peso alrededor de 100 gr cada uno.

Los bulbos deben estar libres de las catáfilas secas.

También se removieron las raíces, cortándolas al ras de manera uniforme en todo el disco germinativo.

El bulbo de cada cebolla se colocó sobre la boca de un vaso de vidrio, sostenido por mondadientes.

En los 12 vasos se colocaron 150 ml de agua mineral.

En cada vaso se colocará cada una de los bulbos de cebolla, de tal manera que el disco germinativo de las cebollas quede cubierto en su totalidad.

Se evitará que los bulbos estén en contacto directo con la luz solar.

El agua se cambiará cada 24 horas durante un periodo de 72 horas.

Terminado el periodo de acondicionamiento cada grupo problema de 3 bulbos fue expuesto al extracto hidroalcohólico a las concentraciones de 5.25 mg/mL, 10.5 mg/mL y 21 mg/mL, preparadas previamente.

El grupo control positivo fue expuesto a la solución de colchicina.

El grupo control negativo fue dejado en agua mineral.

El tiempo de exposición fue de 4 días.

Concluido el periodo de exposición se procedió a medir la longitud de las raíces de cada uno de los bulbos sujetos a experimentación (Para realizar la medida se utilizó un vernier)

El efecto de la inhibición de crecimiento se calculará al restar la longitud de las raíces control y de las raíces expuestas al extracto a diferentes concentraciones, cuyo valor será multiplicado por 100 y dividido entre la longitud de las raíces control.

El preparado y coloración de los ápices radiculares se realizará de acuerdo a la técnica de Fiskesjö (Ver anexo 1).

Posteriormente cada ápice coloreado se colocará sobre una lámina portaobjetos, adicionando una gota de gelatina glicerinada y cubriéndose con una laminilla. Luego se realizará el aplastamiento del tejido y se sellarán los bordes de la laminilla empleando un barniz de uñas sin color. Para la observación de los preparados citológicos se utilizará un microscopio óptico a 400 y 1000 aumentos.

La citotoxicidad se evaluó estimando los valores del índice mitótico (IM) e índice de las fases (IF), mediante las siguientes formulas:

$$\% \text{ IM} = \frac{\text{Sumatoria de las células en mitosis}}{\text{Total de células en mitosis}} \times 100$$
$$\% \text{ IF} = \frac{\text{Cantidad de células en una fase mitótica}}{\text{Total de células en mitosis}} \times 100$$

La genotoxicidad se evaluó por la presencia de aberraciones celulares (puentes cromosómicos, células binucleadas, entre otros).

d) Procesamiento y análisis de la información

Los resultados serán organizados en tablas y figuras para mayor comprensión de los mismos. El análisis estadístico se realizará empleando los programas Microsoft Office Excel® 2013 y Minitab® 18 para Windows® versión 8. Se calcularán promedios y desviación estándar (DS) para los índices mitóticos, de fases y porcentaje de inhibición, comparándose mediante el análisis de varianza y la prueba de Tukey.

8 Resultados

Tabla 1

Características morfológicas de las semillas de Annona cherimola Mill “chirimoya”

Características	Semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill
Longitud	17.05 mm \pm 1.57196
altura	8.2 mm \pm 1.1050
ancho	12 mm \pm 1.7471
color	Negro
Textura	Duro
Forma	Oval o cónica

En la tabla 1 observamos el registro de los resultados del análisis morfológico de las semillas de *Annona cherimola* Mill. De estos resultados se establece que las semillas son de un tamaño regular cuyas dimensiones son de 17.05 x 12 x 8.2 mm, en nuestra muestra las semillas son de color negro, duras y de forma oval o cónica

Tabla 2

Características fisicoquímicas del extracto de semillas de Annona cherimola Mill “chirimoya”

Prueba	Resultado
Sabor	Amargo
Color	Marrón
Olor	Característico
Aspecto	Transparente
pH	5.79 ± 0.0450925
Brix	2.5 ± 0.25166115
IR	1.5 ± 0.1
Solidos solubles (g%)	2.1 ± 0.1

La tabla 2 muestra las características organolépticas, y físico químicas del extracto de semillas *Annona cherimola* Mill. El extracto es de color marrón, transparente, amargo y con olor a chirimoya. También se muestran los promedios de cada una de las pruebas físicas que nos permiten caracterizar el extracto, de esta manera tenemos que el extracto es ligeramente ácido (pH 5.79), Es un extracto con un valor de grados Brix de 2.5, un IR de 1.5 y una concentración de 2.1 g%.

Tabla 3

Longitud de las raicillas de Allium cepa L., bajo el efecto del extracto de semillas de Annona cherimola Mill a diferentes concentraciones.

Muestra	Longitud (cm)	Inhibición (%)
Extracto al 2.1 g% (21 mg/mL)	1.93 + 0.29728658	54
Extracto al 1.05 g% (10.5 mg/mL)	2.65 + 0.1814691	36.9
Extracto al 0.525 g% (5.25 mg/mL)	3.70 + 0.23705569	11.9
Agua mineral (Control)	4.20 + 0.46049698	0

La tabla 3 muestra los promedios de las longitudes alcanzadas por las raicillas de *Allium cepa* L. “cebolla”, por acción del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill a las concentraciones de 2.1, 1.05 y 0.525 gramos por 100 mL. tal y como se puede observar las raicillas de *Allium cepa* L. “cebolla”, ralentizan su crecimiento en forma directamente proporcional a la concentración del extracto.

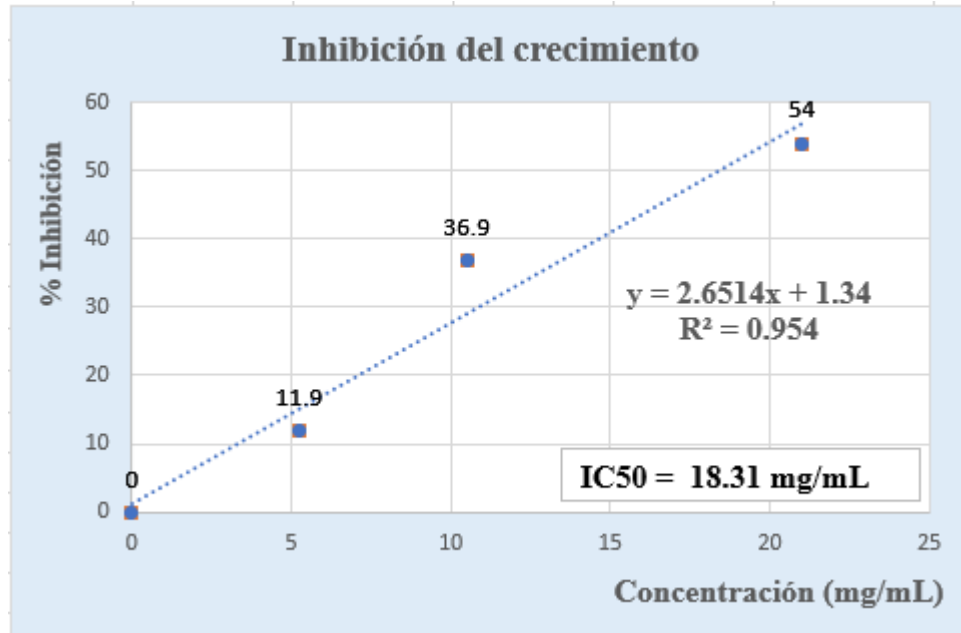


Figura 1. Crecimiento de las raicillas de *Allium cepa* L., bajo el efecto de concentraciones crecientes del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill “chirimoya”.

En la figura se presenta la CI50 del extracto, la cual es de 18.31 mg/mL.

Tabla 4

Actividad del extracto de semillas de Annona cherimola Mill sobre la mitosis en raicillas de Allium cepa L.

Muestra	Anafase X (%)	Metafase X (%)	Profase X (%)	Telofase X (%)	Interface X (%)	Total
Grupo 2.1 g % (21 mg/mL)	1.5	3.033	15.77	0.367	79.33	100
Grupo 1.05 g % (10.5 mg/mL)	2.93	3.7	22.47	2.57	68.333	100
Grupo 0.525 g % (5.25 mg/mL)	3.57	2.133	25.47	2.133	66.7	100
Control Agua mineral	3.53	5.93	27.77	3.5	59.27	100

En la tabla 4 se muestran los resultados de la prueba de *Allium cepa* con el extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill. En la tabla se observa que dicho extracto afecta la mitosis en general y de manera particular a cada una de las fases de la mitosis. Esta actividad depresora de la mitosis es dependiente de la dosis, lo que se deduce por el aumento del porcentaje de células en mitosis, directamente proporcional a la concentración del extracto.

Tabla 5

Índice Mitótico en las raicillas de Allium cepa sometidas a la acción del extracto de semillas de Annona cherimola Mill a las concentraciones de 21 mg/mL, 10.5 mg/mL, 0.525 mg/mL y el grupo control

Muestra	Índice mitótico (%)	Índice de fase (%)			
		Anafase	Metafase	Profase	Telofase
Grupo 2.1 g % (21 mg/mL)	20.67	7.26	14.67	76.29	1.78
Grupo 1.05 g % (10.5 mg/mL)	31.67	9.25	11.68	70.95	8.15
Grupo 0.525 g % (5.25 mg/mL)	33.306	10.72	6.4	76.47	6.4
Control Agua mineral	40.73	8.67	14.56	68.18	8.59

En la tabla 5 se consignan los resultados obtenidos al realizar el test de *Allium cepa* con el extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill. En la tabla se presentan el índice mitótico promedio para los 4 grupos; y el índice mitótico para cada Fase del ciclo celular, para los 3 grupos problema y para el grupo control. Los resultados de la tabla muestran claramente los cambios en cada fase del ciclo celular, originado por el extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill.

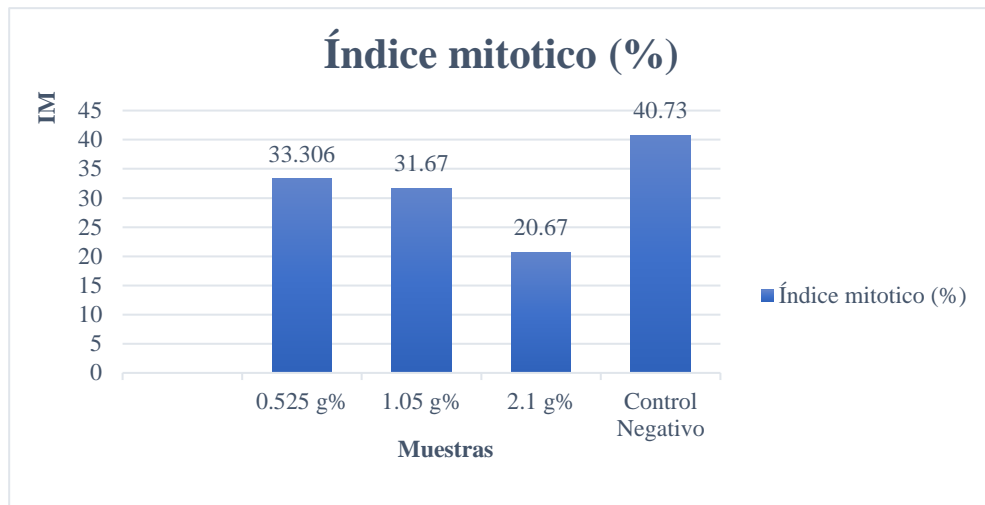


Figura 2. Índice mitótico de las raicillas de *Allium cepa* L. “cebolla”, bajo el efecto de concentraciones crecientes del extracto hidroalcoholico de las semillas de *Annona cherimola* Mill “chirimoya”.

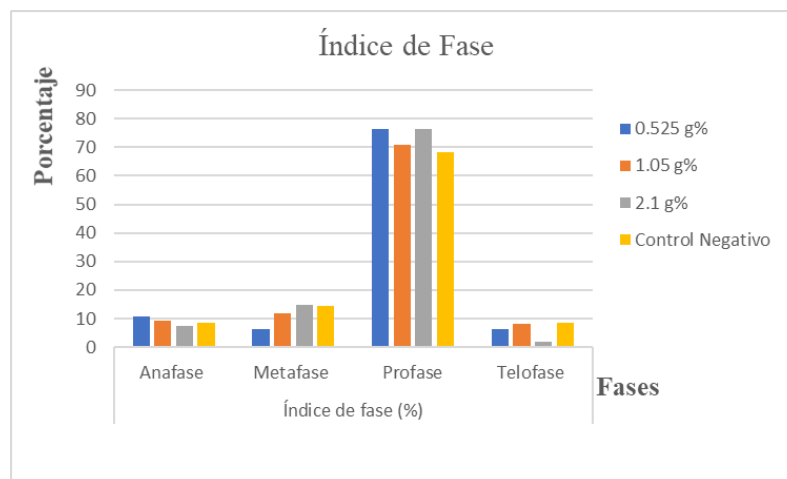


Figura 3. Índice de Fase de las raicillas de *Allium cepa* L. “cebolla”, bajo el efecto de concentraciones crecientes del extracto hidroalcoholico de las semillas de *Annona cherimola* Mill “chirimoya”.

9 Análisis y discusión

Esta investigación nos propusimos estudiar la acción citotóxica de los compuestos químicos presentes en las semillas de *Annona cherimola*, hecho que apoyaría su potencial aplicación en la investigación biomédica.

Como ya se expuso en el marco teórico de la presente investigación, la chirimoya contiene una variedad de compuestos bioactivos, siendo los acetogeninas anonáceas los más destacados en términos de actividad citotóxica. Estas acetogeninas son derivados lipídicos que han demostrado poseer propiedades anticancerígenas, actuando selectivamente sobre las células tumorales sin afectar significativamente a las células normales. Este hecho ha despertado el interés de los investigadores, ya que podría representar una alternativa prometedora a los tratamientos convencionales contra el cáncer, pues, ya hemos mencionado que las acetogeninas anonáceas presentes en *Annona cherimola* pueden interferir con diversos procesos celulares en las células cancerosas. Se ha observado que inhiben la actividad de la enzima complejo I mitocondrial, en consecuencia, se produce una baja en la producción de ATP y, por ende, en la inducción de apoptosis en las células cancerosas. Además, se ha sugerido que estas acetogeninas pueden interferir con la regulación del ciclo celular, bloqueando la proliferación descontrolada de células tumorales.

En la tabla 1 de nuestra investigación, reportamos las características morfológicas de las semillas de *Annona cherimola*. En nuestra investigación se trabajó con las semillas de frutos maduros de la especie en estudio, las cuales tienen unas dimensiones promedio de 17 x 8.2 x 12 mm de largo, alto y ancho respectivamente, pues provienen de unos frutos bastante grandes. Además, son semillas duras, de color negro y de forma oval o conica. Todas estas características son comunes para esta fruta, lo que coincide con la descripción en el portal de <https://www.frutas-hortalizas.com/Frutas/Presentacion-Chirimoya.html>

Para evaluar la citotoxicidad de las semillas del fruto de *Annona cherimola*, se llevó a cabo la extracción de compuestos bioactivos utilizando como solvente etanol de 70 ° GL. El extracto hidroalcoholico obtenido se sometió a unas pruebas mínimas de calidad, cuyos valores para cada una de las pruebas se muestran en la tabla 2. En

esta tabla se reporta que el extracto obtenido es de color marrón, de sabor amargo, transparente y de olor característico. En promedio el pH del extracto es de 5.79, con un IR (Índice de Refracción) de 1.5, un contenido de sólidos solubles disueltos en una solución acuosa de 2.5 y una concentración de sólidos solubles de 2.1 g %. De esta manera y de acuerdo al proyecto de decreto G/TBT/N/COL/, del 2016 que en su página 7 especifica que cualquiera materia prima, antes de ser usada, deberá aprobar un estricto control de calidad, con lo cual se elimina una posible falsificación o alteración y garantice su identidad. Este control de calidad comprende, entre otros, las características organolépticas y las características fisicoquímicas. En nuestra investigación estas características han sido plenamente establecidas para el extracto sujeto a estudio.

En la tabla 3 se muestra cómo afecta el extracto hidroalcohólico de *Annona cherimola* al crecimiento de las raicillas de *Allium cepa*. Estos resultados muestran que después de transcurridas 96 horas, el promedio de crecimiento en el grupo control es de 4.20 centímetros y desde luego que la inhibición de crecimiento en longitud es 0. En cuanto a los resultados de los grupos problema enfrentados a concentraciones de extracto de 21, 10.5 y 5.25 mg/mL, el promedio del efecto sobre el crecimiento en longitud de las raicillas es de 1.93, 2.65 y 3.7 centímetros, los cuales desde ya se muestran menores que el promedio del grupo control y son dependientes de la concentración del extracto, es decir a mayor concentración de extracto mayor inhibición del crecimiento, lo que también se muestra en la tabla 3, en donde se observa que el porcentaje promedio de inhibición es de 54 %, 36.9% y 11.9 % para las concentraciones de extracto de 21 mg/mL, 10.5 mg/mL y 5.25 mg/mL. Como resultado de la prueba de inhibición del crecimiento, se encontró que la CE50 de EHACH era de aproximadamente 18.31 mg/mL como se presenta en la Tabla 3 y Figura 1. Estos resultados muestran claramente el efecto inhibitorio de las sustancias presentes en extracto de las semillas de *Annona cherimola* sobre el crecimiento de las raicillas de *Allium cepa*. Adicionalmente, según Alvarado Mayor & Flores, (2022), esta evaluación adquiere una gran relevancia porque es una prueba in vivo, en esta prueba las raíces se desarrollan en contacto directo con las sustancias de interés, posibilitando la ocurrencia de posibles daños en el ADN. Esto podría sugerir una conexión con la

exposición humana a dichas sustancias, ya que los cromosomas tanto de plantas como de animales muestran similitudes morfológicas y parecen reaccionar de manera análoga a la exposición a agentes mutagénicos, al igual que los mamíferos y otros eucariotas. Es bien conocido que la hidratación de un bulbo de *Allium cepa* estimula el crecimiento celular, facilitando así el desarrollo de las raíces del bulbo de cebolla. No obstante, cuando las células meristemáticas se exponen a sustancias tóxicas, sea cual sea su naturaleza (orgánicas o inorgánicas), la división celular puede inhibirse, lo que resulta en la ralentización del proceso de mitosis o incluso en la destrucción de las células. Estas alteraciones impiden el crecimiento normal de la raíz y, por ende, impiden también su elongación.

En primer lugar, se determinaron la totalidad de células que se encuentran en mitosis y en qué fase se encuentran. Estos resultados se presentan en la tabla 4, en donde el total de células contadas para cada grupo se considera el 100 % y a partir de allí se calcula el porcentaje de células en cada fase. En dicha tabla se puede observar que el porcentaje de células en interfase es mayor (79.33 %) en comparación con el 59.27 % de células en interfase del grupo control. Esto claramente demuestra que el extracto de semillas de *Annona cherimola* afecta la división celular retardándola o prolongando la duración de la interfase. Además, este efecto es dependiente de la dosis pues a mayor dosis encontramos más células en interfase 79.33 %, 68.333 % y 66.7 % para las concentraciones de 21, 10.5 y 5.05 mg/mL respectivamente. En la tabla 4 se observa el mismo comportamiento de la división celular en cada una de las fases, donde claramente se puede observar que cuando la concentración del extracto disminuye, la división celular en cada una de las fases se acerca a los valores obtenidos cuando la división celular se realiza en agua pura.

Las raíces tratadas con el extracto de semillas de *Annona cherimola* sufrieron una disminución considerable en la proliferación celular en los grupo problema, con relación al grupo control, resultando en un índice mitótico e índice de fase menor (Tabla 5 y Figuras 2 y 3). En la tabla 5 podemos observar que el índice mitótico del grupo problema cuya concentración es de 21 mg/mL es de 20.67 %, lo que es aproximadamente una reducción del 50 % con respecto al índice mitótico del grupo control de 40.73 %. Esta reducción en el porcentaje del índice mitótico es dependiente

de la concentración del extracto, pues a mayor concentración menor porcentaje del índice mitótico. En cuanto al índice de fase podemos observar que las fases que son mayormente inhibidas son la profase y la telofase con una inhibición por el extracto al 21 mg/mL de 76.29 % y 1.78 % frente al 68.18 % y el 8.59 % del grupo control. Sobre estos cambios, de acuerdo con Haag, (2021), un índice de fases disminuido se correlaciona con el hecho que el ciclo celular se retrasa; pero no se detiene, antes de entrar a la fase M, hecho que puede acontecer al final de G2 o en cuando el ciclo pasa de G2 a M. Esto se puede ocurrir debido a la importante reducción de la cantidad de células en mitosis (50 % aproximadamente). Sin embargo, la fase M no está bloqueada pues encontramos la metafase y el anafase sin alteración aparente y telofase si muestra una inhibición significativa. Estos datos se repiten para los otros grupos experimentales, observándose un ligero bloqueo de la proliferación celular y por lo tanto del crecimiento radicular.

Finalmente, podemos decir que en este estudio el grupo control que solo recibió agua mineral se comportó tal y como se esperaba con un crecimiento normal de las raíces de *Allium cepa*, una división celular regular y un progreso normal a través de las fases del ciclo celular. Con respecto a los grupos problema encontramos que a bajas concentraciones de extracto 5.25 mg/mL se producen ligeros cambios morfológicos, pero el crecimiento y la división celular; y que puede haber una leve respuesta adaptativa a la presencia del extracto, pero sin impacto significativo en la viabilidad celular. Concentraciones Intermedias de Extracto 10.5 mg/mL muestran un aumento en la inhibición del crecimiento de las raicillas y posible alteración en la morfología celular, observándose signos de estrés celular, como la detención de la mitosis. Altas Concentraciones de Extracto 21 mg/mL existe marcada inhibición del crecimiento de las raíces y una posible destrucción de células y disminución significativa en la viabilidad celular, con probables cambios notables en la morfología celular, como la presencia de células deformes o con características anómalas (Thilagavathi et al., 2022).

10 Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones:

1. Las semillas de *Annona cherimola* Mill. son estructuras duras, ovales o cónicas, de color negro, de 17 x 12 x 8.2 mm de largo, ancho y altura.
2. El extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill. es un producto líquido transparente, amargo, marrón y de olor característico. Este extracto tiene un pH ligeramente ácido de 5.79, un IR de 1.5, una cantidad de sólidos disueltos en el extracto de 2.5 °Brix (sobre todo azúcares) y una concentración de 2.1 gramos/100 mL de extracto.
3. El efecto del extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill es directamente proporcional a su concentración, sobre el crecimiento en longitud de las raíces de *Allium cepa* L. “cebolla”. La disminución del crecimiento en longitud fue de 54, 36.9 y 11.9 % para las concentraciones de 21, 10.5 y 5.25 mg/mL respectivamente, después de 4 días de tratamiento.
4. El extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill a diferentes concentraciones retarda la división celular de las células meristemáticas radicales de *Allium cepa* L. “cebolla” en forma dosis dependiente de la concentración del extracto. La inhibición de la mitosis fue mayor con el extracto de 21 mg/mL, con un porcentaje de células de 1.5, 3.033, 15.77 y 0.367 en anafase, metafase, profase y telofase; y las células en interfase alcanzan 79.33 %.
5. El extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill a diferentes concentraciones disminuye el índice mitótico de 40.73 en el grupo control, hasta 20.67, 31.67 y 33.306 para los extractos de 21, 10.5 y 5.25 mg/mL respectivamente. De acuerdo con el índice de fase determinados, es la telofase la más afectada pues el extracto de 21 mg/mL disminuye el índice de fase de la telofase, de 8.59 s 1.78.
6. No se detectaron cambios morfológicos y tampoco se detectó pérdida de la integridad celular en los meristemas radicales de *Allium cepa* L., en respuesta a la exposición al extracto de semillas de *Annona cherimola* Mill a diferentes concentraciones.

Recomendaciones:

1. Realizar una investigación mucho más exhaustiva de las semillas de la planta en estudio, pues, el potencial beneficio e impacto en la salud de las personas que sufre de diabetes y otras enfermedades crónico-degenerativas es muy grande.
2. Una institución como la Universidad san pedro debería invertir en el desarrollo de un producto de este tipo nutracéutico y ponerlo a disposición de la gran cantidad de personas afectadas por enfermedades que cursan con alteración de la división celular.

11 Referencias bibliográficas

- Alvarado Mayor, P. N., & Flores, A. B. (2022). *Efecto citotóxico de la Annona muricata frente a la línea celular de adenocarcinoma gástrico* (Tesis). Universidad Científica del Sur, Lima, Lima.
- Balkrishna, A., Dabhade, N. R., Singh, A., & Arya, V. (2023). Anticancer acumens of three Annona species: A Proportional Review. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1(1), 121. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04306-5>
- Calderon Mestanza, J., & Torres Armas, E. (2014). Efecto del extracto acuoso de la Ocimum basilicum L. (albahaca) en el crecimiento bacteriano de Escherichia coli. *Revista Eciperu*, 10(2), 38. <https://doi.org/10.33017/reveciperu2013.0018/>
- Ccorahua Retamozo, L. G. (2021). *Determinación Químico Bromatológica Y Fitoquímica De Las Semillas De Annona cherimola (chirimoya) que crece en La Provincia De Huarochirí - Lima* (Tesis). Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”, Ica.
- Contero, R., & Felicita, O. (2006). Utilización de bioensayos para la determinación de contaminación en agua de riego en la cuenca del río Granobles. *La Granja*, 4(1), 38. <https://doi.org/10.17163/lgr.n4.2005.05>
- Durán, A. G., Gutiérrez, M. T., Mejías, F. J., Molinillo, J. M., & Macías, F. A. (2021). An overview of the chemical characteristics, bioactivity and achievements

regarding the therapeutic usage of acetogenins from *Annona Cherimola* Mill.
Molecules, 26(10), 2926. <https://doi.org/10.3390/molecules26102926>

G/TBT/N/COL/, Ministerio de salud y protección social, Proyecto de Decreto Supremo
"Por el cual se reglamentan los regímenes de registros sanitarios, de vigilancia
y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos. 2 (2016).
Colombia; Ministerio de salud y protección social.

Guitart, R., & Giménez, N. (2012). ¿Qué es un «tóxico»? Una propuesta de
definición. *Medicina Clínica*, 138(3), 127-132.
<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2011.02.002>

Haag, G. O. (2021). Obtención de extractos y fracciones bioactivas de “Chirimoya”,
Annona Cherimola Mill. (Annonaceae). Determinación de parámetros
físicoquímicos, cromatográficos y actividad con nanopartículas
biodegradables con anticuerpos monoclonales en su superficie (Penetran
células de Llc-B) como una nueva posibilidad terapéutica (Tesis).
Universidad Nacional de la Plata, La Plata.

Hernández, R., Fernández, C y Baptista, M. (2014). Metodología de la investigación
sexta edición. México D.F, México: McGRAW –HILL.

Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas. (2021). *Tóxico* (p. 20). Costa
Rica: Universidad Nacional de Costa Rica.

Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias
medicamentosas de origen natural* (1a. ed., 1a. reimp.). Barcelona: Omega.

Kinnear, C y Taylor, R. (1998). Investigación de mercados. México. Mc. Graaw Hill.

- López Martínez, C. (2021). *Atributos nutricionales, nutracéuticos y citotóxicos de tres especies de anonáceas: Guanábana (Annona muricata L.), Chirimoya (Annona cherimola Mill.) y Chincuya (Annona purpurea Moc. et Sess.)* (Tesis). Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo.
- Lopez Sardi, E., García, B., Larroudé, V., Picicelli, R., Reynoso, C., & Ramírez Martínez, E. (2016). Uso de Allium Cepa test como indicador de eficacia para el tratamiento de efluentes. *Ciencia Y Tecnología*, *1*(16), 81. <https://doi.org/10.18682/cyt.v1i16.558>
- Martínez Fernández, J. (2017). *Genotoxicidad in vitro de hojas de Datura stramonium L. "chamico". Ayacucho, 2016* (Licenciatura). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Martínez-Solís, J., Calzada, F., Barbosa, E., & Gutiérrez-Meza, J. M. (2022). Antidiabetic and toxicological effects of the tea infusion of summer collection from Annona Cherimola Miller leaves. *Plants*, *11*(23), 3224. <https://doi.org/10.3390/plants11233224>
- Méndez González, L., Mendoza Gonzáles, F., Vértix Félix, K., & Acevedo Alemán, J. (2013). Metodología de la investigación para estudiantes de odontología (1st ed., p. 41). Plaza y Valdés S. A. de C. V.
- Muñoz Solarte, D., & Guerrero Pepinosa, N. (2013). Allium test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de Allium cepa. *Memorias*, *11*(19), 84. Retrieved 16 September 2021, from <http://file:///C:/Users/GDATA/Downloads/alliumtestarticulo.pdf>.
- Nasir, B., Baig, M., Majid, M., Ali, S., Khan, M., Kazmi, S., & Haq, I. (2020).

- Preclinical anticancer studies on the ethyl acetate leaf extracts of *Datura stramonium* and *Datura innoxia*. *BMC Complementary Medicine And Therapies*, 20(1), 1,2. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02975-8>
- Perrone, A., Yousefi, S., Salami, A., Papini, A., & Martinelli, F. (2022). Botanical, genetic, phytochemical and pharmaceutical aspects of *Annona Cherimola* Mill. *Scientia Horticulturae*, 296(1), 110896. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110896>
- Ruiz Reyes, S., Venegas Casanova, E., Valdiviezo Campos, J., Ocaña Ventura, J., & Tadeo Horna, M. (2018). Características farmacognósticas y cuantificación espectrofotométrica de antocianinas totales del fruto de *Prunus serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh (Rosaceae) “capulí”. *Arnaldoa*, 25(3), 64,65. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.253.25309>
- Sharma, M., Dhaliwal, I., Rana, K., Delta, A., & Kaushik, P. (2021). Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of *Datura* Species—A Review. *Antioxidants*, 10(8), 1291. <https://doi.org/10.3390/antiox10081291>
- Thilagavathi, R., Priyanka, S., Kannan, M., Prakash, M., & Selvam, C. (2022). Compounds from diverse natural origin against triple-negative breast cancer: A comprehensive review. *Chemical Biology & Drug Design*, 101(1), 218. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14172>
- Varadharaj, V., & P., A. (2017). Phytochemical and pharmacological potential of *Annona* species: A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(7), 68. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i7.18073>

Agradecimientos

A Dios por habernos dado las fuerzas para poder lograr este tan apreciado
anhelo.

A nuestros padres por sus consejos y ejemplo de perseverancia durante toda
nuestra vida

A nuestros compañeros y profesores por su apoyo incondicional.

Gracias.

12 Anexos

Anexo 1

Autorización de la institución donde se va a realizar la recolección de los datos



SOLUCIONES NATURALES AL NATURAL S.R.L.

JR. JOSE SABOGAL NRO. 313 URB. PALERMO – TRUJILLO
TRUJILLO- LA LIBERTAD

RUC 20601408288 - TELEFONO 360453

AUTORIZACION DE USO DE AMBIENTES Y EQUIPO

En atención a la solicitud verbal sobre la prestación de ambiente y equipos de Laboratorio, por parte del Srta. **LUDI FLORES ALVARADO**, identificada con DNI 75818892, con código 1315100080 y la Srta. **MERARY CRISTAL HILARIO AVALOS** identificada con DNI 46254820, con código 1315200082, alumnas del Programa académico de Farmacia y Bioquímica de la Universidad San Pedro, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, las cuales para culminar su carrera universitaria debe desarrollar un trabajo de investigación que se constituirá en su Tesis de Pregrado.

En representación de la empresa y conociendo que la Universidad san Pedro terminó sus actividades en la ciudad de Trujillo, es nuestra voluntad ceder en forma gratuita nuestro ambiente y equipo, para que las antes mencionadas señoritas realicen las actividades pertinentes a su trabajo de investigación, bajo la dirección de su asesor el Q.F. **Mg. Carlos Esteban Cacha Salazar**, dejando constancia que ellas traerán reactivos y otros insumos que necesiten para el desarrollo de su investigación que lleva por título “**Citotoxicidad del extracto hidroalcoholico de semillas de Annona cherimola Mill “chirimoya” sobre células apicales de raíces de Allium cepa L.**”.

Se otorga el presente documento a solicitud de la alumna, para los fines que estime conveniente
Trujillo, 10 de Octubre del 2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carlos Naval Sopan Benaute', written over a horizontal line.

Carlos Naval Sopan Benaute
Gerente

Anexo 2

Ficha de recolección de datos (instrumento)

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS SEMILLAS

DIMENSIONES DE LAS SEMILLAS			
SEMILLA	LONGITUD	ALTO	ANCHO
1	16	7	14
2	17	8	12
3	14	8	11
4	15	7	10
5	15	7	12
6	18	9	13
7	17	8	12
8	17	9	11
9	15	7	14
10	16	7	10
11	18	8	11
12	18	9	10
13	16	10	10
14	17	11	15
15	19	9	10
16	18	8	14
17	19	9	13
18	20	7	14
19	18	8	14
20	18	8	10

CARACTERES ORGANOLEPTICOS DEL EXTRACTO

Prueba	Resultados		
Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
Color	marrón	marrón	marrón
Olor	Característico	Característico	Característico
Aspecto	Transparente	Transparente	Transparente

PRUEBAS FISICAS DEL EXTRACTO

Prueba	Resultados		
pH	5.84	5.75	5.79
Brix	2.5	2.8	2.3
IR	1.4	1.6	1.5
Solidos solubles	2.1	2.2	2

Anexo 3

Matriz de consistencia

Problema	Variables	Objetivos	Hipótesis	Metodología
¿Qué efecto tendrá el extracto hidroalcohólico de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” sobre las células apicales de las raíces de <i>Allium cepa</i> L.?	VI: extracto hidroalcohólico de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” VD1: Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya”	Objetivo general: ¿Determinar la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” sobre las células meristemáticas radicales de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla”? Objetivos específicos: 1. Determinar las características morfológicas de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill. 2. Determinar las características organolépticas del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill. 3. Determinar algunas características físicoquímicas del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill. 4. Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” a diferentes concentraciones sobre el crecimiento en	El extracto hidroalcohólico de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” tiene actividad citotóxica sobre las células meristemáticas radicales de <i>Allium cepa</i> L.	Tipo de Investigación: Básica Diseño de investigación: Cuasi experimental Muestra: Muestra biológica 1: Frutos maduros de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” Muestra biológica 2: Bulbos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) Metodología: 1. Obtener el extracto de semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” 2. Evaluación de la citotoxicidad

		<p>longitud de las células meristemáticas radicales de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla”</p> <p>5. Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” a diferentes concentraciones sobre la división celular de las células meristemáticas radicales de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla”</p> <p>6. Analizar los cambios en la morfología y la integridad celular de las células meristemáticas radicales de <i>Allium cepa</i> L. “cebolla”, en respuesta a la exposición al extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya” a diferentes concentraciones.</p> <p>7. Comparar los resultados con un grupo de control sin exposición al extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill “chirimoya”.</p>		
--	--	--	--	--

Anexo 4

Base de datos

CRECIMIENTO EN LONGITUD DE LAS RAICES

N° RAIZ	MUESTRA (EXTRACTO)			CONTROL NEGATIVO
	2.1 g%	1.05 g%	0.525 g%	Agua mineral
1	1.8	2.5	3.6	4.8
2	2	2.9	3.6	4.2
3	2.3	2.9	3.6	4.5
4	1.8	2.4	3.3	3.9
5	1.5	2.9	3.5	4.8
6	1.7	2.4	4	3.9
7	1.9	2.3	3.8	3.2
8	1.7	2.6	4	4.6
9	2	2.5	3.5	4.4
10	1.5	2.7	3.4	4.5
11	1.6	2.6	4	4.1
12	1.6	2.6	3.5	3.7
13	1.8	2.9	3.5	3.8
14	1.9	2.5	3.6	3.7
15	2.1	2.5	3.6	3.8
16	2.5	2.8	3.4	4.5
17	2.2	2.8	3.4	4.4
18	1.8	2.5	4.2	4.3
19	2.3	2.9	3.6	4.2
20	1.9	2.9	3.8	4.3
21	2	2.7	3.9	4.4
22	2.1	2.8	4	3.5
23	2.5	2.8	4.1	3.7
24	2.6	2.7	4	4.8
25	1.6	2.7	3.8	4.8
26	1.8	2.7	3.6	5.1
27	1.8	2.6	3.6	4.6
28	1.6	2.5	3.6	4.1
29	1.9	2.5	3.8	3.8
30	2.1	2.4	3.8	3.7

CICLO CELULAR DEL GRUPO CONTROL

Grupo control	Fase	Cantidad
Muestra 1	Interfase	902
	Anafase	11
	Metafase	12
	Profase	80
	Telofase	19
Muestra 2	Interfase	915
	Anafase	12
	Metafase	15
	Profase	75
	Telofase	15
Muestra 3	Interfase	890
	Anafase	13
	Metafase	15
	Profase	78
	Telofase	16

CICLO CELULAR DEL GRUPO PROBLEMA 2.1 g%

Grupo problema (2.1 g%)	Fase	Cantidad
Muestra 1	Interfase	985
	Anafase	1
	Metafase	3
	Profase	15
	Telofase	1
Muestra 2	Interfase	995
	Anafase	2
	Metafase	7
	Profase	17
	Telofase	1
Muestra 3	Interfase	990
	Anafase	1
	Metafase	5
	Profase	18
	Telofase	0

CICLO CELULAR DEL GRUPO PROBLEMA 1.05 g%

Grupo problema (1.05 %)	Fase	Cantidad
Muestra 1	Interfase	995
	Anafase	2
	Metafase	8
	Profase	19
	Telofase	1
Muestra 2	Interfase	998
	Anafase	2
	Metafase	8
	Profase	20
	Telofase	1
Muestra 3	Interfase	992
	Anafase	2
	Metafase	9
	Profase	21
	Telofase	1

CICLO CELULAR DEL GRUPO PROBLEMA 0.525 g%

Grupo problema (0.525 %)	Fase	Cantidad
Muestra 1	Interfase	1002
	Anafase	10
	Metafase	13
	Profase	79
	Telofase	2
Muestra 2	Interfase	996
	Anafase	9
	Metafase	14
	Profase	77
	Telofase	2
Muestra 3	Interfase	990
	Anafase	9
	Metafase	17
	Profase	80
	Telofase	1

Anexo 5

Formato de publicación en Repositorio



REPOSITORIO INSTITUCIONAL DIGITAL

FORMULARIO DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN DE DOCUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

1 Información del Autor			
Hilario Ávalos Merary Cristal		46254820	Whb_14_02@hotmail.com
Apellidos y Nombres		DNI	Correo Electrónico
2 Tipo de Documento de Investigación			
<input checked="" type="checkbox"/>	Tesis	<input type="checkbox"/>	Trabajo de Suficiencia Profesional
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Trabajo Académico
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Trabajo de Investigación
3 Grado Académico o Título Profesional ¹			
<input type="checkbox"/>	Bachiller	<input checked="" type="checkbox"/>	Título Profesional
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Título Segunda Especialidad
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Maestría
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Doctorado
4 Título del Documento de Investigación			
Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de semillas de Annona cherimola Mill "chirimoya" sobre células apicales de raíces de Allium cepa L.			
5 Programa Académico			
Farmacia y Bioquímica			
6 Tipo de Acceso al Documento			
<input checked="" type="checkbox"/>	Abierto o Público * (info:eu-repo/semantics/openAccess)		<input type="checkbox"/>
			Acceso restringido * (info:eu-repo/semantics/restrictedAccess) (*)
(*) En caso de restringido sustentar motivo			

A. Originalidad del Archivo Digital

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador y forma parte del proceso que conduce a obtener el grado académico o título profesional.

B. Otorgamiento de una licencia CREATIVE COMMONS ⁵

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Institucional Digital, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento. ⁶



Lugar	Día	Mes	Año
Chimbote	16	10	2025


Firma

46254820 _____

Importante

- Según Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU-CD. Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar Grados Académicos y Títulos Profesionales. Art. 8, inciso 2.2.
- Ley N° 30035. Ley que regula el Repositorio Institucional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto y D.S. 006-2015-PCM.
- Si el autor eligió el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad San Pedro una licencia no exclusiva, para que se pueda hacer arreglos de forma en la obra y difundir en el Repositorio Institucional Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.
- En caso de que el autor elija la segunda opción, únicamente se publicará los datos del autor y resumen de la obra, de acuerdo a la directiva N° 004-2016-CONCYTEC-DEG (Números 5.2 y 6.7) que norma el funcionamiento del Repositorio Institucional Digital.
- Las licencias Creative Commons (CC) es una organización internacional sin fines de lucro que pone a disposición de los autores un conjunto de licencias flexibles y de herramientas tecnológicas que facilitan la difusión de información, recursos educativos, obras artísticas y científicas, entre otros. Estas licencias también garantizan que el autor obtenga el crédito por su obra.
- Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales -RENATI "Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, inclusive no los registrados en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA".

Nota. - En caso de falsedad en los datos, se procederá de acuerdo a ley (Ley 27444, art. 32, núm. 32.3).

Anexo 6

Reporte de similitud

Citotoxicidad del extracto hidroalcoholico de semillas de Annona cherimola Mill "chirimoya" sobre células apicales de raíces de Allium cepa L.

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.usanpedro.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	erp.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	2%
4	1library.co Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unica.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	www.scribd.com Fuente de Internet	1%
7	repositorio.uniautonoma.edu.co Fuente de Internet	1%
8	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	1%