



Antibacterial, antifungal, antioxidant and toxic effect of fractionated extracts from Soursop pulp.

Efecto antibacteriano, antifúngico, antioxidante y tóxico de extractos fraccionados de pulpa de Guanábana.

León-Fernández, A. E.¹, Martínez-Cárdenas, L.³, Zepeda-Vallejo, L. G.²,
Arteaga-Garibay, R. I.⁴, Gutiérrez-Martínez, P.¹, Montalvo-González, E.^{1*}

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Tepic,
Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tepic, Nayarit, México;

²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Ciudad de México, México;

³Universidad Autónoma de Nayarit, Secretaría de Investigación y Posgrado, Tepic, Nayarit, México;

⁴Laboratorios de Recursos Genéticos Microbianos CNRG-INIFAP, Tepatitlán, Jalisco, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: León-Fernández, A. E., Martínez, L., Zepeda-Vallejo, L. G., Arteaga-Garibay, R. I., Gutiérrez-Martínez, P., Montalvo-González, E. (2019). Antibacterial, antifungal, antioxidant and toxic effect of fractionated extracts from Soursop pulp. *Revista Bio Ciencias* 6, e400. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e400>



ABSTRACT

In this study was evaluated the antibacterial (*Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis*), antifungal (*Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer*), toxic and antioxidant activities of 15 fractionated extracts from three fractions (F1, F2 and F3) of the samples: fresh pulp, pulp stored for 3, 6 and 12 months at -20 °C and heat-treated pulp (70 °C, 30 min) of soursop (*Annona muricata* L.). F3 fractions of all treatments were more effective as antibacterial, antifungal and antioxidant. The F3 fraction from fresh pulp had the most antibacterial activity against *Enterobacter aerogenes* and *Salmonella* Typhimurium (18 and 20 mm of inhibitory halo, respectively); likewise, against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* with 59 % and 38 % of inhibition and also it presented the highest antioxidant activity. In contrast,

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: November 15th 2017.

Accepted/Aceptado: April 18th 2018.

Available on line/Publicado: March 25th 2019.

RESUMEN

En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana (*Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*), antifúngica (*Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*), tóxica y antioxidante de 15 extractos fraccionados, obtenidos a partir de tres fracciones (F1, F2 y F3) de cada una de las siguientes muestras: pulpa fresca, pulpa congelada almacenada durante 3, 6 y 12 meses y pulpa tratada térmicamente (70 °C, 30 min) de guanábana (*Annona muricata* L.). Las fracciones F3 de todos los tratamientos fueron más efectivas como antibacterianas, antifúngicas y antioxidante; sin embargo, la fracción F3 de pulpa fresca, tuvo la mayor actividad antimicrobiana contra *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella* Typhimurium (18 y 20 mm de halo de inhibición, respectivamente); así mismo contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* con 59 % y 38 % de inhibición, además presentó la más alta actividad antioxidante (79 %). En contraste, la mayor toxicidad (2.60-2.84 µg/mL) fue obtenida en la fracción F1 de la pulpa fresca y pulpa almacenada a -20 °C por 3 meses. En conclusión, los extractos de pulpa de guanábana pueden ser una alternativa para el desarrollo de

*Corresponding Author:

Efigenia Montalvo-González, Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Tepic, Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Av. Tecnológico 2595, Lagos del Country. 63175, Tepic, Nayarit, México. Phone: +52(311) 211 9400. E-mail: efimontalvo@gmail.com

the highest toxicity (2.60-2.84 µg/mL) was found in F1 fractions from fresh pulp and pulp stored at -20 °C for 3 months. In conclusion, the extracts from soursop pulp may be an alternative for the development of antibacterial organic products, as pre-treatment for biological control of postharvest diseases and they can be studied, by their high toxicity from the pharmaceutic point of view.

KEY WORDS

Annona muricata L.; biological activities; extracts; soursop fruit.

Introduction

The phytochemical content of *Annona muricata* L. (*A. muricata*), is related with its pharmacological and toxicological evaluation; therefore, the measuring of antioxidant, antibacterial, antifungal and toxic properties from pulp give to us, its potential as functional, nutraceutical or toxicological food. Several antioxidant screenings have been conducted with *A. muricata* crude extracts from pulp, leaf and seed. Coria-Téllez *et al.* (2018) compiled studies on the antioxidant activity of *A. muricata* concluding that its antioxidants have gained interest due to their protective effect against oxygen-derived free radicals involved in the development of many diseases.

On the other hand, it has been reported that *A. muricata* crude extracts from leaves, peel, seed and stem, have antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Different kind of bacteria such as: *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *S. Thyphimurium* and *K. pneumonia* have been inhibited by *A. muricata* extracts (Solomon-Wisdom *et al.*, 2014; Radji *et al.*, 2015; Roger *et al.*, 2015; Coria-Téllez *et al.*, 2018). Antimicrobial bioactivity of *A. muricata* extracts is attributed to flavonoids, steroids and alkaloids. The mechanism of action is probably due to a synergism of these compounds (Radji *et al.*, 2015). Microbial infections produce approximately 15 million deaths per year worldwide, with 70 % of deaths caused by bacterial infections (Essama *et al.*, 2016). Unfortunately, some bacteria have developed resistance to antibiotics (extrinsic resistance) (Sanchez-Maldonado *et al.*, 2017). Therefore, the study of new antimicrobial agents can be address to global public health threats due to the high

productos orgánicos antibacteriales, como pre-tratamiento para el control biológico de enfermedades poscosecha y pueden ser estudiados, por su toxicidad, desde el punto de vista farmacéutico.

PALABRAS CLAVE

Annona muricata L.; actividad biológica; extractos; pulpa de guanábana.

Introducción

El contenido fitoquímico de *Annona muricata* L. (*A. muricata*) está relacionado con su evaluación farmacológica y toxicológica; por lo tanto, la medición de las propiedades antioxidante, antibacterial, antifúngica, y tóxicas de la pulpa nos indica, su potencial como alimento funcional, nutraceutico o toxicológico. Se han realizado varios análisis antioxidantes con extractos crudos a partir de pulpa, hoja y semilla de *A. muricata*. Coria-Téllez *et al.* (2018) compilaron estudios sobre la actividad antioxidante de *A. muricata* y concluyeron que sus antioxidantes han ganado interés debido a su efecto protector contra los radicales libres derivados del oxígeno que participan en el desarrollo de muchas enfermedades.

Por otro lado, ha sido reportado que los extractos crudos a partir de hojas, cáscara, semilla y tallo de *A. muricata*, tienen actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas. Diferentes tipos de bacterias como: *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *S. Thyphimurium* y *K. pneumonia* han sido inhibidas por extractos de *A. muricata* (Solomon-Wisdom *et al.*, 2014; Radji *et al.*, 2015; Roger *et al.*, 2015; Coria-Téllez *et al.*, 2018). La bioactividad antimicrobiana de los extractos de *A. muricata* es atribuido a los flavonoides, esteroides y alcaloides. El mecanismo de acción probablemente se deba a la sinergia de estos compuestos (Radji *et al.*, 2015). Las infecciones microbianas producen aproximadamente 15 millones de muertes por año en todo el mundo, con el 70 % de las muertes causadas por infecciones bacterianas (Essama *et al.*, 2016). Desafortunadamente, algunas bacterias han desarrollado resistencia a antibióticos (resistencia extrínseca) (Sanchez-Maldonado *et al.*, 2017). Por lo tanto, el estudio de los nuevos agentes antimicrobianos puede ser dirigidos a las amenazas mundiales para la salud pública debido a la alta resistencia de los patógenos a los antimicrobianos y a la falta de desarrollo de nuevos antimicrobianos (Reis *et al.*, 2015).

resistance of pathogens to antimicrobials and the lack of development of new antimicrobials (Reis et al., 2015). In the same way, fungal infections have been increasing in the last years, due to the resistance of phytopathogens to fungicides, which has a significant impact on the economy due to the post-harvest losses caused by various fungi (Yang & Jiang, 2015). In the last decade, there is a great interest in the study of natural compounds as substitutes for synthetic fungicides and a large number of *in vitro* studies has demonstrated that the antifungal effects of plant extracts reduce the incidence of post-harvest pathogens (Ramos-Guerrero et al., 2018). The scientific studies on the antifungal effect of *A. muricata* extracts are scarce; however, Bautista-Baños et al. (2000a, 2000b, 2002) reported that *A. cherimola*, *A. muricata* and *A. reticulata* crude extracts from leaf and stem, had antifungal activity *in vitro* against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer*. The authors concluded that the bioactive compounds present in *Annonaceae* crude extracts had a fungicidal potential.

It has been reported that aqueous extracts and isolated acetogenins from leaves or soursop pulp caused neurodegeneration or atypical Parkinsonism (Potts et al., 2012). However, Arthur et al. (2011) reported that doses greater than 5 mg/g of aqueous extract might cause kidney damage, unlike the 1mg/g dose that showed hypoglycemic and hyperlipidemia properties. The most toxic extracts that have been reported are methanol extracts of pericarp, fruit pulp or seed (Boyom et al., 2011). Therefore, more studies on the toxic effect in soursop pulp are required.

The biological activities reported in *A. muricata* are using crude extracts from leaf, stem, peel and seed. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antioxidant, bactericidal, fungicidal and toxic effects of fractioned extracts obtained from fresh soursop pulp and pulp stored at different storage conditions.

Materials and Methods

Plant material

The soursop fruits (*Annona muricata* L.) were harvested in physiological maturity (light green skin, separate spines and firmness), of a uniform size, in orchards located in the community of "El Tonino"

Del mismo modo, las infecciones por hongos han aumentado en los últimos años, debido a la resistencia de los fitopatógenos a los fungicidas, el cual tiene un impacto significativo en la economía debido a las pérdidas postcosecha causadas por varios hongos (Yang & Jiang, 2015). En la última década, hay un gran interés en el estudio de los compuestos naturales como sustitutos de fungicidas sintéticos y un gran número de estudios *in vitro* ha demostrado que los efectos antifúngicos de los extractos de plantas reducen la incidencia de patógenos postcosecha (Ramos-Guerrero et al., 2018). Los estudios científicos sobre el efecto antifúngico de extractos de *A. muricata* son escasos; sin embargo, Bautista-Baños et al. (2000a, 2000b, 2002) reportaron que los extractos crudos de hojas y tallo de *A. cherimola*, *A. muricata* y *A. reticulata*, tuvieron actividad antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*. Los autores concluyeron que los compuestos bioactivos presentes en los extractos crudos de *Annonaceae* tenían un potencial fungicida.

Ha sido reportado que los extractos acuosos y acetogeninas aisladas de las hojas o la pulpa de guanábana causaron neurodegeneración o parkinsonismo atípico (Potts et al., 2012). Sin embargo, Arthur et al. (2011) reportó que dosis más altas de 5 mg/g de extracto acuoso podrían causar daño renal, a diferencia de la dosis de 1 mg/g que mostraba propiedades de hipoglucemia e hiperlipidemia. Los extractos más tóxicos que se han reportado son extractos metanólicos de pericarpio, pulpa de fruta o semilla (Boyom et al., 2011). Por lo tanto, se requieren más estudios sobre el efecto tóxico en la pulpa de guanábana.

Las actividades biológicas reportadas en *A. muricata* son utilizando extractos crudos de hojas, tallos, cáscaras y semillas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos antioxidantes, bactericidas, fungicidas y tóxicos de extractos fraccionados obtenidos de pulpa de guanábana fresca y pulpa almacenada en diferentes condiciones de almacenamiento.

Material y Métodos

Material vegetal

Los frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) fueron recolectados en madurez fisiológica (cáscara verde clara, espinas separadas y firme), de un tamaño uniforme en huertos ubicados en la comunidad de "El Tonino" Compostela, Nayarit, México. Los frutos fueron madurados a 25 °C y 80-90 % de humedad relativa. Las frutas fueron peladas y dessemilladas. La pulpa se usó en los análisis como sigue: pulpa fresca (PF), pulpa almacenada a -20 °C por 3 meses

Compostela, Nayarit, Mexico. The fruits were ripened at 25 °C and 80-90% of relative humidity. The fruits were peeled and seeded and the pulp was used in the analysis as follows: fresh pulp (PF), pulp stored at -20 °C for 3 months (PC3), 6 months (PC6) and 12 months (PC12) and pulp treated at 70 °C for 1 h and 345.23 kPa under vacuum pressure (PT). All samples were freeze-dried at -50 °C and 0.12 mbar using a freeze dryer LABCONCO equipment (Model 77522020, Kansas, Misuri, USA).

Preparation of crude extracts

The lyophilized sample (300 g) from each treatment (PF, PC3, PC6, PC12 and PT) was mixed with 600 mL of chloroform; then the mixture was treated with 3 cycles (1 cycle for 1 h) at a constant frequency (42 kHz) on an ultrasonic equipment (Cole-Palmer8891, Illinois, USA). The extracts were filtered and the solvent evaporated to dryness in a Yamato rotary evaporator (RE300, Santa Clara, California, USA) (León-Fernández *et al.*, 2017a).

Fractionation of crude extracts

The dry crude extract from each treatment (PF, PC3, PC6, PC12 and PT) was eluted through a chromatographic column (6.4 x 57.0 cm, 80 g SiO₂ 60 mesh), with CHCl₃/MeOH (chloroform/methanol). Three fractions of 200 mL of each treatment were obtained in a ratio chloroform:methanol of 95:5, 90:10 and 85:15 v/v. Each fraction (F) was evaporated to dryness in a rotary evaporator, obtaining in total 15 fractions: PF-F1, PF-F2 and PF-F3 for PF sample; PC3-F1, PC3-F2 and PC3-F3 for PC3 sample; PC6-F1, PC6-F2 and PC6-F3 for PC6 sample; PC12-F1, PC12-F2 and PC12-F3 for PC12 sample; PT-F1, PT-F2 and PT-F3 for PT sample.

Bactericidal activity

Salmonella Typhimurium CCM 5445 (*S. enterica subs enteric Bioserotipo Typhimurium*), *Enterobacter aerogenes* CCM 7797 (*E. aerogenes*), *Enterococcus faecalis* CCM 2541 (*E. faecalis*) and *Bacillus subtilis* ATCC 663 strains were donated by the Public Health State Laboratory of Tepic Nayarit, Mexico. The bactericidal effect of the fractions was evaluated using the protocol of Bauer *et al.* (1966), with some modifications. The strains were re-growth into nutritive agar and incubated at 37 °C for 24 h. The bacterial suspensions were inoculated in a tube with saline-solution (0.1 %). These suspensions were

(PC3), 6 meses (PC6) y 12 meses (PC12) y pulpa tratada a 70 °C durante 1 hora y 345.23 kPa bajo presión de vacío (PT). Todas las muestras se liofilizaron a -50 °C y 0.12 mbar utilizando un equipo de liofilización LABCONCO (Modelo 77522020, Kansas, Misuri, EE. UU.).

Preparación de extractos crudos

Las muestra liofilizada (300 g) de cada tratamiento (PF, PC3, PC6, PC12 y PT) fue mezclada con 600 mL de cloroformo; luego, la mezcla fue tratada con 3 ciclos (1 ciclo durante 1 h) a una frecuencia constante (42 kHz) en un equipo ultrasónico (Cole-Palmer8891, Illinois, EE. UU.). Los extractos se filtraron y el disolvente se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio Yamato (RE300, Santa Clara, California, EE. UU.) (León-Fernández *et al.*, 2017a).

Fraccionamiento de extractos crudos

El extracto crudo seco de cada tratamiento (PF, PC3, PC6, PC12 y PT) fue eluido a través de una columna cromatográfica (6.4 x 57.0 cm, 80 g de malla SiO₂ 60), con CHCl₃/MeOH (cloroformo/metanol). Se obtuvieron tres fracciones de 200 mL de cada tratamiento en una proporción de cloroformo: metanol de 95: 5, 90:10 y 85:15 v/v. Cada fracción (F) se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio, obteniendo en total 15 fracciones: PF-F1, PF-F2 y PF-F3 para la muestra de PF; PC3-F1, PC3-F2 y PC3-F3 para muestra de PC3; PC6-F1, PC6-F2 y PC6-F3 para muestra de PC6; PC12-F1, PC12-F2 y PC12-F3 para muestra de PC12; PT-F1, PT-F2 y PT-F3 para muestra de PT.

Actividad bactericida

Las cepas de *Salmonella Typhimurium* CCM 5445 (*S. enterica subs enteric Bioserotipo Typhimurium*), *Enterobacter aerogenes* CCM 7797 (*E. aerogenes*), *Enterococcus faecalis* CCM 2541 (*E. faecalis*) y *Bacillus subtilis* ATCC 663, fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tepic, Nayarit, México. El efecto bactericida de las fracciones se evaluó utilizando el protocolo de Bauer *et al.* (1966), con algunas modificaciones. Las cepas fueron re-sembradas en agar nutritivo y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las suspensiones bacterianas se inocularon en un tubo con solución salina (0.1 %). Estas suspensiones fueron comparadas con el patrón de turbidez McFarland 0.5 % que corresponde a una suspensión homogénea de 1.5x10⁸ CFU/mL. Se colocaron discos estériles (5 mm) sobre agar base de sangre. Las fracciones (2 mg) se redisolviéron en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, se colocaron

compared with the turbidity pattern McFarland 0.5 % that correspond to homogenous suspension of 1.5×10^8 CFU/mL. Sterile disks (5 mm) were put on blood base agar. The fractions (2 mg) were re-dissolved in 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO). Then, 20 μ L of each fraction (2 mg/mL) were placed on a sterile disk. The same microliters of ciprofloxacin antibiotic (2 mg/mL) were used as positive control and DMSO as negative control. All the treatments were incubated at 37 °C for 24 h. The diameter of inhibitory halo (mm) was measured after the incubation time.

Antifungal activity

Rhizopus stolonifer and *Colletotrichum gloeosporioides* were isolated from soursop fruit and donated by the National Center for Genetic Resources (CNRG, Tepatitlán, Jalisco, México) and by The Laboratory of Biotechnology of Instituto Tecnológico de Tepic (Tepic Nayarit, Mexico), respectively. The strains were re-growth in PDA agar 28 °C for 72 h. The fractions (5 mg) were re-dissolved in 1 mL of DMSO. After, each fraction was incorporated into Petri dishes. Mycelial inhibition was expressed as the percentage of inhibition of radial growth relative to the positive control (ketoconazole, 5 mg/mL). A disc agar (5 mm) containing the respective pathogen was placed at the center of each dish. Each of them was incubated for four days for *Rhizopus stolonifer* and seven days for *Colletotrichum gloeosporioides* at 28 °C. At the end of incubation period, radial growth of the cultures was measured. The negative control was DMSO (1 mL). Three replicate dishes were used for each treatment (Bautista-Baños et al., 2002).

Antioxidant activity (AOX)

The 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay was performed using the method reported by Prior et al. (2005). The DPPH radical (5 mM) was dissolved in methanol at a concentration of 190 mM and kept in the dark. Each fraction was re-suspended methanol (1 mg/mL). Re-suspended fractions (250 μ L) were mixed with 1.5 mL of DPPH and as a blank was used methanol. The mixtures were incubated for 5 min and absorbance at 517 nm was measured. The results were expressed as the percentage of inhibition (%).

The 2,2-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging assay was performed using

20 μ L de cada fracción (2 mg/mL) sobre un disco estéril. Los mismos microlitros de antibiótico de ciprofloxacina (2 mg/mL) se utilizaron como control positivo y DMSO como control negativo. Todos los tratamientos se incubaron a 37 °C durante 24 h. El diámetro del halo inhibitorio (mm) se midió después del tiempo de incubación.

Actividad antifúngica

Rhizopus stolonifer y *Colletotrichum gloeosporioides* fueron aislados del fruto de guanábana y donados por el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG, Tepatitlán, Jalisco, México) y por el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Tepic (Tepic Nayarit, México), respectivamente. Las cepas fueron re-sebradas en agar PDA a 28 °C durante 72 h. Las fracciones (5 mg) se re-disolvieron en 1 mL de DMSO. Después, cada fracción se incorporó en placas de Petri. La inhibición micelial se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento radial en relación con el control positivo (ketoconazol, 5 mg/mL). Se colocó un disco de agar (5 mm) que contenía el patógeno respectivo en el centro de cada placa. Cada una de ellas se incubó durante cuatro días para *Rhizopus stolonifer* y siete días para *Colletotrichum gloeosporioides* a 28 °C. Al final del período de incubación, se midió el crecimiento radial de los cultivos. El control negativo fue DMSO (1 mL). Se utilizaron tres réplicas para cada tratamiento (Bautista-Baños et al., 2002).

Actividad antioxidante (AOX)

El ensayo del atrapamiento del radical 1,1'-difencil-2-picrilhidrazilo (DPPH) se realizó utilizando el método descrito por Prior et al. (2005). El radical DPPH (5 mM) se disolvió en metanol a una concentración de 190 mM y se mantuvo en la oscuridad. Cada fracción se resuspendió en metanol (1 mg/mL). Las fracciones resuspendidas (250 μ L) se mezclaron con 1.5 mL de DPPH y como blanco se usó metanol. Las mezclas se incubaron durante 5 min y se midió la absorbancia a 517 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (%).

El ensayo de atrapamiento del radical ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) se realizó utilizando el método descrito por Re et al. (1999). El radical ABTS (7 mM) se disolvió en persulfato de potasio (2.42 mM) y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 14 h. La solución se ajustó con una solución tampón de fosfato, pH 7.0 a una absorbancia de 0.7 (\pm 0.02) a 734 nm. Las fracciones resuspendidas (250 μ L) se agregaron a 1.5 mL de solución ABTS, para ser incubadas en la oscuridad

the method described by Re *et al.* (1999). The ABTS radical (7 mM) was dissolved in potassium persulfate (2.42 mM) and kept in the dark at room temperature for 14 h. The solution was adjusted with phosphate buffer solution 7.0 pH to an absorbance of 0.7 (\pm 0.02) at 734 nm. The re-suspended fractions (250 μ L) were added to 1.5 mL ABTS solution, to be incubated in the dark for 7 min and as a blank was used methanol. The absorbance at 734 nm was measured and antioxidant activity was reported as the percentage of inhibition (%).

Toxicity determination

The toxicity test was performed using early stages of *Artemia salina* (Barbosa *et al.*, 2009). *Artemia* (10 *Artemia* organism in each treatment) with 3 weeks of growth, were conserved and analyzed in saline water (25 mg/L). The fractions were re-suspended in 1 mL of DMSO. The *Artemia* were exposed to different concentrations (5, 10, 20, 25, 50, 100 and 150 μ g/mL) of each fraction, at 28 °C in darkness. *Artemia* with 1 mL of DMSO was used as negative control. The toxicity was determined after 24 h of exposition. The number of survivors was counted and dead *Artemia* were considered whether they did not present internal or external movements during 1 min of observation. The average lethal concentration (LC_{50}) was calculated using a PROBIT regression (Software SAS System v.9.0. North Carolina, USA).

Statistical analysis

All data were analyzed using an ANOVA and LSD means tests (α = 0.05), under a completely randomized factorial design 3x5 (three fractions x five treatments) with three replicates. The STATISTICA software was used (v.8 StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA). All assays and analysis were performed in triplicate.

Results and Discussion

Bactericidal activity of fractions from fresh, stored at -20 °C and heat-treated soursop pulp is shown in Table 1. There was a significant effect ($p < 0.05$) of the treatments in bactericidal activity. Although, the positive control had the highest antibacterial activity, a significant antibacterial activity bactericidal from fractions was observed. *E. aerogenes* was mostly inhibited by the PF-F3 and PC6-F3 fractions, with the highest inhibitory halo of 17.55 to 20.25 mm, followed by the PC6-F1 and PT-

durante 7 min y como blanco se usó metanol. Se midió la absorbancia a 734 nm y la actividad antioxidante fue reportada como el porcentaje de inhibición (%).

Determinación de toxicidad

La prueba de toxicidad se realizó utilizando etapas iniciales de *Artemia salina* (Barbosa *et al.*, 2009). *Artemia* (10 organismos de *Artemia* en cada tratamiento) con 3 semanas de crecimiento, se conservaron y analizaron en agua salina (25 mg/L). Las fracciones se resuspendieron en 1 mL de DMSO. Las *Artemias* se expusieron a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 25, 50, 100 y 150 μ g/mL) de cada fracción, a 28 °C en la oscuridad. Se utilizaron *Artemias* con 1 mL de DMSO como control negativo. La toxicidad se determinó después de 24 h de exposición. Se contó el número de sobrevivientes y se consideró *Artemia* muerta, si no presentaron movimientos internos o externos durante 1 minuto de observación. La concentración letal media (CL_{50}) se calculó utilizando una regresión PROBIT (Software SAS System v.9.0. North Carolina, EE. UU.).

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron usando un ANOVA y pruebas de medias LSD (α = 0.05), bajo un diseño factorial completamente aleatorizado 3x5 (tres fracciones x cinco tratamientos) con tres réplicas. El STATISTICA software fue usado (v.8 StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Todos los análisis fueron hechos por triplicado.

Resultados y Discusión

La actividad bactericida de las fracciones de pulpa fresca, almacenadas a -20°C y la pulpa tratada térmicamente se muestra en la Tabla 1. Hubo un efecto significativo ($p < 0.05$) de los tratamientos en la actividad bactericida. Aunque, el control positivo tuvo la mayor actividad antibacteriana, se observó una actividad antibacteriana significativa de las fracciones. *E. aerogenes* fue mayormente inhibido por las fracciones PF-F3 y PC6-F3, con el mayor halo inhibitorio de 17.55 a 20.25 mm, seguido de las fracciones de PC6-F1 y PT-F1 (17.50 y 18.25 mm). Por otro lado, *S. Typhimurium* se inhibió principalmente con el PT-F3 con un halo inhibitorio de 20 mm. Además, *B. subtilis* y *E. faecalis* tratados con cualquiera de las fracciones tuvieron un halo inhibitorio entre 10.75 y 14.25 mm, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos.

Probablemente, los compuestos extraídos en las fracciones F1 fueron principalmente alcaloides, acetogeninas, ácidos

Table 1.

Bactericidal activity (mm of inhibitory halo) of fractions from soursop fresh pulp (PF-F1, PF-F2, PF-F3), pulp stored for 3 (PC3-F1, PC3-F2, PC3-F3), 6 (PC6-F1, PC6-F2, PC6-F3) and 12 (PC12-F1, PC12-F2, PC12-F3) months at -20 °C and heat-treated pulp (PT-F1, PT-F2, PT-F3) on gram positive and gram negative bacteria.

Tabla 1.

Actividad bactericida (mm de halo inhibitorio) de fracciones de pulpa fresca de guanábana (PF-F1, PF-F2, PF-F3), pulpa almacenada por 3 (PC3-F1, PC3-F2, PC3-F3), 6 (PC6-F1, PC6-F2, PC6-F3) y 12 meses (PC12-F1, PC12-F2, PC12-F3) a -20 °C y pulpa tratada térmicamente (PT-F1, PT-F2, PT-F3) sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas.

| Fraction | Diameter of inhibitory halo (mm) | | | |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>Salmonella typhimurium</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| PF-F1 | 8.50 ± 1.91c | 11.50 ± 1.00a | 10.75 ± 0.96a | 9.25 ± 2.75b |
| PC3-F1 | 13.25 ± 2.65a | 12.00 ± 2.94a | 11.75 ± 2.87a | 13.75 ± 1.89a |
| PC6-F1 | 17.50 ± 1.29b | 12.75 ± 2.22a | 12.00 ± 0.82a | 12.00 ± 1.41a |
| PC12-F1 | 13.25 ± 2.36a | 14.75 ± 2.50a | 10.75 ± 1.89a | 13.25 ± 1.89a |
| PT-F1 | 18.25 ± 1.50b | 14.50 ± 2.38a | 11.25 ± 1.50a | 11.00 ± 1.63b |
| Positive control | 31.44 ± 2.48c | 33.5 ± 1.15b | 19.38 ± 2.05b | 34.38 ± 1.70c |
| PF-F2 | 12.50 ± 1.73ab | 11.50 ± 2.52a | 11.25 ± 2.63a | 12.00 ± 1.41ab |
| PC3-F2 | 13.50 ± 2.38ab | 13.50 ± 1.91a | 13.50 ± 2.89a | 11.00 ± 1.41a |
| PC6-F2 | 13.25 ± 2.63ab | 13.50 ± 2.38a | 13.50 ± 2.38a | 14.00 ± 3.37ab |
| PC12-F2 | 10.50 ± 2.38a | 12.75 ± 1.26a | 13.50 ± 1.50 | 12.50 ± 2.08ab |
| PT-F2 | 12.50 ± 2.99b | 13.75 ± 0.96a | 13.75 ± 1.26a | 14.25 ± 1.26b |
| Positive control | 30.13 ± 2.28c | 34.13 ± 1.65b | 20.38 ± 3.24b | 34.63 ± 2.60b |
| PF-F3 | 17.75 ± 1.71b | 15.75 ± 1.71c | 11.50 ± 0.58a | 11.00 ± 0.82ab |
| PC3-F3 | 13.25 ± 2.22a | 12.25 ± 1.89a | 13.25 ± 2.63a | 11.00 ± 2.83ab |
| PC6-F3 | 20.25 ± 2.06b | 18.50 ± 3.11b | 13.25 ± 1.26a | 11.75 ± 2.36b |
| PC12-F3 | 14.25 ± 2.06a | 12.75 ± 0.50a | 11.38 ± 1.70a | 10.50 ± 1.29ab |
| PT-F3 | 13.50 ± 1.91a | 20.00 ± 0.01b | 12.50 ± 2.89a | 8.50 ± 0.58 a |
| Positive control | 28.25 ± 2.20c | 32.25 ± 4.44d | 11.50 ± 0.58a | 32.75 ± 1.32c |

Data are means ± standard deviation of three determinations by triplicate (n=9). Different letters in each file indicate significant statistical differences between treatments ($\alpha = 0.05$). PC = Positive control.

Los datos son medias ± desviación estándar de tres determinaciones por triplicado (n=9). Letras diferentes en cada archivo indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$). PC=Control positivo.

F1 fractions (17.50 and 18.25 mm). On the other hand, *S. Typhimurium* was mostly inhibited with the PT-F3 with an inhibitory halo of 20 mm. Also, *B. subtilis* and *E. faecalis* treated with either of fractions had an inhibitory halo between 10.75 and 14.25 mm, without significant differences ($p > 0.05$) among treatments.

grasos y terpenoides debido a su naturaleza apolar (Coria-Téllez et al., 2018). Sin embargo, en las fracciones F2 y F3, además de los compuestos mencionados anteriormente, los polifenoles y otros antioxidantes como la vitamina C pueden ser extraídos cuando la polaridad aumenta con el metanol (Park et al., 2010; Sulaiman et al., 2011);

Probably, the extracted compounds in the F1 fractions were mainly alkaloids, acetogenins, fatty acids and terpenoids due to its apolar nature (Coria-Téllez *et al.*, 2018). Nevertheless, in F2 and F3 fractions, besides of the compounds mentioned above, polyphenols and other antioxidants such as vitamin C could be extracted when the polarity increase with the methanol (Park *et al.*, 2010; Sulaiman *et al.*, 2011); thus, F3 fractions had the highest antibacterial activity, but this was according to each bacteria. The gram-negative bacteria were mostly affected with F3 fractions due to the fact gram-negative bacteria have two lipid membranes and a thin cell wall of peptidoglycan, while gram-positive bacteria have only one lipid membrane, but the peptidoglycan wall is thicker, also there is presence of teichoic acids, which cause an intrinsic resistance (Chopra *et al.*, 2001).

The bioactive compounds with microbicide activity in soursop extracts are acetogenins, alkaloids, terpenes, saponins, flavonoids and other antioxidants (Vieira *et al.*, 2010; Raybaudi *et al.*, 2015; Coria-Téllez *et al.*, 2018). Although, there is not studies of the effect of soursop extracts on *E. aerogenes* and *E. faecalis*; saponins, steroids and triterpenes of other plant organic extracts are responsible to inhibit *E. aerogenes* (Reis *et al.*, 2015). Moreover, Solomon-Winsdom *et al.* (2014) and Roger *et al.* (2015), reported that methanol and ethanol-based soursop extracts can inhibit *S. typhimurim* and *Bacillus subtilis* bacteria.

The antibacterial mechanism can be related to alkaloids, these compounds have the ability to bind with DNA of microorganisms and inhibit RNA synthesis (Roger *et al.*, 2015). Alkaloids have shown antimicrobial activity by glycosidase inhibition (Mohanty *et al.*, 2008). On the other hand, it has been reported that flavonoids act by inhibiting both cytoplasmic membrane function and DNA synthesis, such as quercetin that binds to DNA subunits and inhibits the enzyme ATPase activity. Phenyl-phenol was reported to bind to the membrane proteins, or hydrogens of vital proteins such as microbial enzymes, to inhibit and change their functions (Radji *et al.*, 2015). Similarly, the mechanism of action of the acetogenins is the inhibition of the cell respiratory chain (Lannuzel *et al.*, 2003).

The storage of pulp at -20 °C did not degraded the compounds with antibacterial activity, because fractions from PC samples had equal bactericidal activity than PF

por lo tanto, las fracciones F3 tuvieron la mas alta actividad antibacteriana, pero esto fue de acuerdo con cada bacteria. Las bacterias gram negativas fueron afectadas principalmente con fracciones F3 debido a que las bacterias gram-negativas tienen dos membranas lipídicas y una pared celular delgada de peptidoglicano, mientras que las bacterias gram-positivas tienen solo una membrana lipídica, pero la pared de peptidoglicano más gruesa, además cuenta con presencia de ácidos teicoicos, que causan una resistencia intrínseca (Chopra *et al.*, 2001).

Los compuestos bioactivos con actividad microbiciida en extractos de guanábana son acetogeninas, alcaloides, terpenos, saponinas, flavonoides y otros antioxidantes (Vieira *et al.*, 2010; Raybaudi *et al.*, 2015; Coria-Téllez *et al.*, 2018). Aunque, no hay estudios sobre el efecto de los extractos de guanábana sobre *E. aerogenes* y *E. faecalis*; saponinas, esteroides y triterpenes, de otros extractos orgánicos de plantas son responsables de inhibir a *E. aerogenes* (Reis *et al.*, 2015). Por otra parte, Solomon-Winsdom *et al.* (2014) y Roger *et al.* (2015), informaron que extractos de guanábana a base de metanol y etanol, pueden inhibir las bacterias *S. typhimurim* y *Bacillus subtilis*.

El mecanismo antibacterial puede estar relacionado con los alcaloides, estos compuestos tienen la capacidad de unirse con el DNA de los microorganismos e inhibir la síntesis de RNA (Roger *et al.*, 2015). Los alcaloides han mostrado actividad antimicrobiana por inhibición de la glicosidasa (Mohanty *et al.*, 2008). Por otro lado, ha sido reportado que los flavonoides actúan inhibiendo tanto la función de la membrana citoplasmática como la síntesis de DNA, tal como la quercetina que se une a las subunidades de DNA e inhibe la actividad de la enzima ATPasa. Fue reportado que el fenil-fenol se une a proteínas membranales, o hidrógenos de proteínas vitales como las enzimas microbianas, para inhibir y cambiar sus funciones (Radji *et al.*, 2015). De manera similar, el mecanismo de acción de las acetogeninas es la inhibición de la cadena respiratoria celular (Lannuzel *et al.*, 2003).

El almacenamiento de pulpa a -20 °C no degradó los compuestos con actividad antibacteriana, porque las fracciones de las muestras PC tuvieron una actividad bactericida igual que las muestras PF. La inhibición de *S. Typhimurium* aumentó con el tratamiento térmico de la pulpa de guanábana. Los compuestos bioactivos más termoestables son acetogeninas, alcaloides y saponinas (Biesalski *et al.*, 2007; García-Aguirre *et al.*, 2008). Es posible que estos compuestos fueran concentrados durante el proceso térmico de la pulpa de guanábana.

Table 2.

Antifungal activity (% inhibition of mycelial growth) of fractions from soursop fresh pulp (PF-F1, PF-F2, PF-F3), pulp stored for 3 (PC3-F1, PC3-F2, PC3-F3), 6 (PC6-F1, PC6-F2, PC6-F3) and 12 (PC12-F1, PC12-F2, PC12-F3) months at -20 °C and heat-treated pulp (PT-F1, PT-F2, PT-F3) on *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tabla 2. Actividad antifúngica (% de inhibición del crecimiento micelial) de las fracciones de pulpa fresca de guanábana (PF-F1, PF-F2, PF-F3), pulpa almacenada por 3 (PC3-F1, PC3-F2, PC3-F3), 6 (PC6-F1, PC6-F2, PC6-F3) y 12 meses (PC12-F1, PC12-F2, PC12-F3) a -20 °C y pulpa tratada térmicamente (PT-F1, PT-F2, PT-F3) sobre *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

| Fractions | Percentage of inhibition % | |
|------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> |
| PF-F1 | NI | 32.29 ± 4.42c |
| PC3-F1 | NI | 22.28 ± 0.77b |
| PC6-F1 | NI | 24.48 ± 2.21b |
| PC12-F1 | NI | 14.13 ± 1.54a |
| PT-F1 | NI | 10.00 ± 2.83a |
| Positive control | NI | 16.00 ± 3.35b |
| PF-F2 | NI | 19.79 ± 4.42ab |
| PC3-F2 | NI | 24.46 ± 2.31b |
| PC6-F2 | NI | 15.48 ± 1.68ac |
| PC12-F2 | NI | 22.00 ± 2.83ab |
| PT-F2 | NI | 11.00 ± 1.41c |
| Positive control | NI | 15.67 ± 2.33b |
| PF-F3 | 36.54 ± 2.72d | 59.90 ± 0.74c |
| PC3-F3 | 27.50 ± 3.54c | 32.61 ± 3.07b |
| PC6-F3 | 10.63 ± 0.88a | 36.98 ± 3.68b |
| PC12-F3 | 10.00 ± 0.00a | 25.93 ± 0.00a |
| PT-F3 | 1.19 ± 1.68b | 21.00 ± 1.41a |
| Positive control | 11.93 ± 5.50c | 15.45 ± 1.89c |

Data are means ± standard deviation of three determinations by triplicate (n=9). Different letters in each file indicate significant statistical differences between treatments ($\alpha = 0.05$). NI = Not inhibited

Los datos son medias ± desviación estándar de tres determinaciones por triplicado (n = 9). Letras diferentes en cada archivo indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$). NI = No inhibido.

sample. The inhibition of *S. Typhimurium* increased with the thermal treatment of soursop pulp. The bioactive compounds most thermostable are acetogenins, alkaloids and saponins (Biesalski et al., 2007; García-Aguirre et al., 2008). It is possible that these compounds were concentrated during the thermal process of soursop pulp.

La Tabla 2 muestra que solo las fracciones F3 causaron la inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer* y fue mayor que el efecto causado por las fracciones PC. La mayor inhibición del crecimiento micelial se observó con el tratamiento con PF-F3 (36.54 %). El tiempo de almacenamiento a -20 °C y el tratamiento térmico de la pulpa de guanábana provocaron una disminución en

Table 2, shows that only the F3 fractions caused inhibition of mycelial growth of *R. stolonifer* and it was higher than the effect caused by the PC fractions. The highest inhibition of mycelial growth was observed with PF-F3 treatment (36.54 %). The time of storage at -20 °C and thermal treatment of soursop pulp caused a decrease in the percentage of inhibition of mycelial growth in PC3-F3, PC6-F3, PC12-F3 and PT-F3 (27.50, 10.63, 10.0 and 1.19 %, respectively). Otherwise, the inhibition of mycelial growth of *C. gloeosporioides* was observed by all fractions and in the same way, the time of storage at -20 °C and thermal treated pulp decreased the antifungal activity of fractions, because PC12 and PT fractions had the lowest inhibition of mycelial growth in this pathogen. In contrast, PF-F3 fraction showed the highest inhibition of mycelial growth (59.90 %).

There is not literature available regarding the antifungal activity on the inhibition of *R. stolonifer* and *C. gloeosporioides* using soursop pulp extracts. However, studies on the effect of foliar and stem extracts of anonaceous was found. Bautista-Baños *et al.* (2000a and 2000b), demonstrated that leaf extracts of *Annona reticulata* and *Annona cherimola* had an inhibitory effect on *Rhizopus* mycelial growth; nonetheless, the sporulation was completely deterred. Bautista-Baños *et al.* (2002) found that leaf and stem extracts caused partial inhibition of mycelial growth, sporulation and germination on *C. gloeosporioides*. In the same way, the effect of three extracts (ethanolic, acetic and aqueous) of *Annona squamosa* pulp on *Aspergillus niger* was reported to have an inhibitory halo of 21, 15 and 17 mm, respectively (Vijayalakshmi & Nithiya, 2015).

The fungistatic or fungicidal effect of anonaceous extracts is related to the presence of alkaloids, saponins, polypeptides, terpenes, essential oils and polyphenols (Deressa *et al.*, 2015; Perumal *et al.*, 2016) and they have a wide spectrum of action (Coria-Téllez *et al.*, 2018). Therefore, it is highly probable that polyphenols, alkaloids and acetogenins are present in the fractions due to the solvents used. Yang & Jiang (2015) reported that there is a dose-dependent in polyphenolic concentration to inhibit mycelial growth and spore germination of *R. stolonifer*. The polyphenols caused morphological changes on the hyphae such as irregularly swollen appearance, increasing branching, wrinkles, entwining, collapse and breakage, while in the spores treated with tea polyphenols was observed swelling of germ tube tips, exfoliation of the surface layer and disorganization of cell organelles. The authors concluded that the mechanism of action of polyphenols might be attributed

el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en PC3-F3, PC6-F3, PC12-F3 y PT-F3 (27.50, 10.63, 10.0 y 1.19 %, respectivamente). Por otra parte, la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* se observó en todas las fracciones y, de la misma manera, el tiempo de almacenamiento a -20 °C y la pulpa tratada térmicamente disminuyó la actividad antifúngica de las fracciones, ya que las fracciones de PC12 y PT tuvieron la inhibición más baja del crecimiento micelial en este patógeno. Por el contrario, la fracción de PF-F3 mostró la mayor inhibición del crecimiento del micelio (59.90 %).

No existe literatura disponible que reporte la actividad antifúngica en la inhibición de *R. stolonifer* y *C. gloeosporioides* utilizando extractos de pulpa de guanábana. Sin embargo, se encontraron estudios sobre el efecto de extractos foliares y de tallo de anonáceas. Bautista-Baños *et al.* (2000a y 2000b), demostraron que los extractos de hojas de *Annona reticulata* y *Annona cherimola* tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del micelio de *Rhizopus*; no obstante, la esporulación fue completamente disuadida. Bautista-Baños *et al.* (2002) encontraron que los extractos de hojas y tallos causaron una inhibición parcial del crecimiento micelial, de la esporulación y la germinación de *C. gloeosporioides*. De la misma manera, se reportó que el efecto de tres extractos (etanólicos, acéticos y acuosos) de pulpa de *Annona squamosa* sobre *Aspergillus niger* tuvo un halo inhibitorio de 21, 15 y 17 mm, respectivamente (Vijayalakshmi & Nithiya, 2015).

El efecto fungistático o fungicida de los extractos de anonáceas está relacionado con la presencia de alcaloides, saponinas, polipéptidos, terpenos, aceites esenciales y polifenoles (Deressa *et al.*, 2015; Perumal *et al.*, 2016) y tienen un amplio espectro de acción (Coria-Téllez *et al.*, 2018). Por lo tanto, es altamente probable que contenga polifenoles, alcaloides y acetogeninas en las fracciones debido a los solventes utilizados. Yang & Jiang (2015) reportaron que existe una dosis dependiente de la concentración polifenólica para inhibir el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *R. stolonifer*. Los polifenoles causaron cambios morfológicos en las hifas, como una apariencia hinchada irregular, aumento de la ramificación, arrugamiento, entrelazamientos, colapso y rotura, mientras que en las esporas tratadas con polifenoles del té, se observó hinchazón de las puntas del tubo germinal, exfoliación de la capa superficial y desorganización de orgánulos celulares. Los autores concluyeron que el mecanismo de acción de los polifenoles podría atribuirse al daño directo del micelio y la inducción indirecta de esporas

to the direct damage of the mycelium and spore indirect induction of defensive enzyme activities. The mechanism of action of acetogenins is the inhibition of enzymes such as NADH-ubiquinone oxidoreductase and NADH-ubiquinone oxidase (Morré *et al.*, 1994). The fungi and yeasts are organisms with enzymes NADH-ubiquinone-6-oxidoreductase type II, or NADH dehydrogenases. The effect of acetogenins on *Saccharomyces cerevisiae* was evaluated, and they caused altered morphogenesis affecting the pathways related to the biosynthesis of chitin (Seo *et al.*, 2000; Domínguez-Martínez *et al.*, 2011). Thus, it is probably that these compounds also cause the synthesis of defensive enzymes and/or inhibition of respiratory enzymes.

No significant effect of fractions ($p>0.05$) was observed on the percentage of inhibition of DPPH radical values (Figure 1A). The DPPH radical is principally neutralized by the hydrogen donation of the antioxidants (Floegel *et al.*, 2011). The high scavenging of DPPH radical is mostly associated with the concentration of hydrophilic compounds (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Due to the type and polarity of solvents used during the fractionation of soursop pulp, the extracted compounds were principally hydrophobic; therefore, differences of AOX with DPPH assay were not observed among treatments. León-Fernández *et al.* (2017a, 2017b) found a low content of polyphenols, and a high qualitative presence of acetogenins in chloroform crude extracts and a fraction from soursop pulp; as well as a low AOX with DPPH assay. The low AOX by the DPPH assay (45-65 % inhibition) was reported in chloroform fraction and isolated acetogenins from *Annona cornifolia* seed extract (Lima *et al.*, 2010).

Regarding to the ABTS assay (Figure 1B) the PF-F1 and PC3-F1 fractions had the highest AOX (40.9-43 %) than the other F1 fractions. In the F2 fractions, a similar result was observed with a 22.96 to 38.22 % of AOX; while in PF-F3 a 79.58 %, followed by PC3-F3 (61.27 %), PC6-F3 (47.09 %), PC12-F3 (46.73 %) and PT-F3 (37.47 %) was recorded. The fractions from fresh pulp might have a higher content of antioxidants than fractions from pulp stored at -20 °C or thermal treated. The highest AOX of F3 fractions was probably caused by ratio 85:15 (v/v) chloroform: methanol; considering that in F3 fractions might exist hydrophilic and hydrophobic compounds, therefore there was a greater AOX (Lima *et al.*, 2010).

de actividades de enzimas defensivas. El mecanismo de acción de las acetogeninas es la inhibición de enzimas como la NADH-ubiquinona óxido reductasa y NADH-ubiquinona oxidasa (Morré *et al.*, 1994). Los hongos y las levaduras son organismos con enzimas NADH-ubiquinona-6-oxidoreductasa tipo II, o NADH deshidrogenasas. Se evaluó el efecto de las acetogeninas sobre *Saccharomyces cerevisiae*, éstas causaron una morfogénesis alterada que afectó las vías relacionadas con la biosíntesis de quitina (Seo *et al.*, 2000; Domínguez-Martínez *et al.*, 2011). Por lo que, es probable que estos compuestos también causen la síntesis de enzimas defensivas y/o la inhibición de las enzimas respiratorias.

No se observó un efecto significativo de las fracciones ($p>0.05$) sobre el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (Figura 1A). El radical DPPH se neutraliza principalmente mediante la donación de hidrógeno de los antioxidantes (Floegel *et al.*, 2011). El alto secuestro del radical DPPH se asocia principalmente con la concentración de compuestos hidrófilos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Debido al tipo y la polaridad de los disolventes utilizados durante el fraccionamiento de la pulpa de guanábana, los compuestos extraídos fueron principalmente hidrófobos; por lo tanto, las diferencias de AOX con el ensayo DPPH no se observaron entre los tratamientos. León-Fernández *et al.* (2017a, 2017b) encontraron un bajo contenido de polifenoles y una alta presencia cualitativa de acetogeninas en extractos crudos de cloroformo y una fracción de pulpa de guanábana; así como un bajo AOX con el ensayo DPPH. El bajo AOX mediante el ensayo DPPH (45-65 % de inhibición) fue reportada en la fracción de cloroformo y acetogeninas aisladas del extracto de semilla de *Annona cornifolia* (Lima *et al.*, 2010).

Con respecto al ensayo ABTS (Figura 1B), las fracciones PF-F1 y PC3-F1 tuvieron la AOX más alta (40.9-43 %) que las otras fracciones F1. En las fracciones F2, se observó un resultado similar con un 22.96 a 38.22 % de AOX; mientras que en PF-F3 se registró un 79.58 %, seguido de PC3-F3 (61.27 %), PC6-F3 (47.09 %), PC12-F3 (46.73 %) y PT-F3 (37.47 %). Las fracciones de la pulpa fresca pueden tener un mayor contenido de antioxidantes que las fracciones de la pulpa almacenada a -20 °C o tratadas térmicamente. La AOX más alta de las fracciones de F3 probablemente fue causado por la relación 85:15 (v/v) de cloroformo: metanol; considerando que en las fracciones F3 podrían existir compuestos hidrófilos e hidrófobos, por lo tanto, hubo un mayor AOX (Lima *et al.*, 2010).

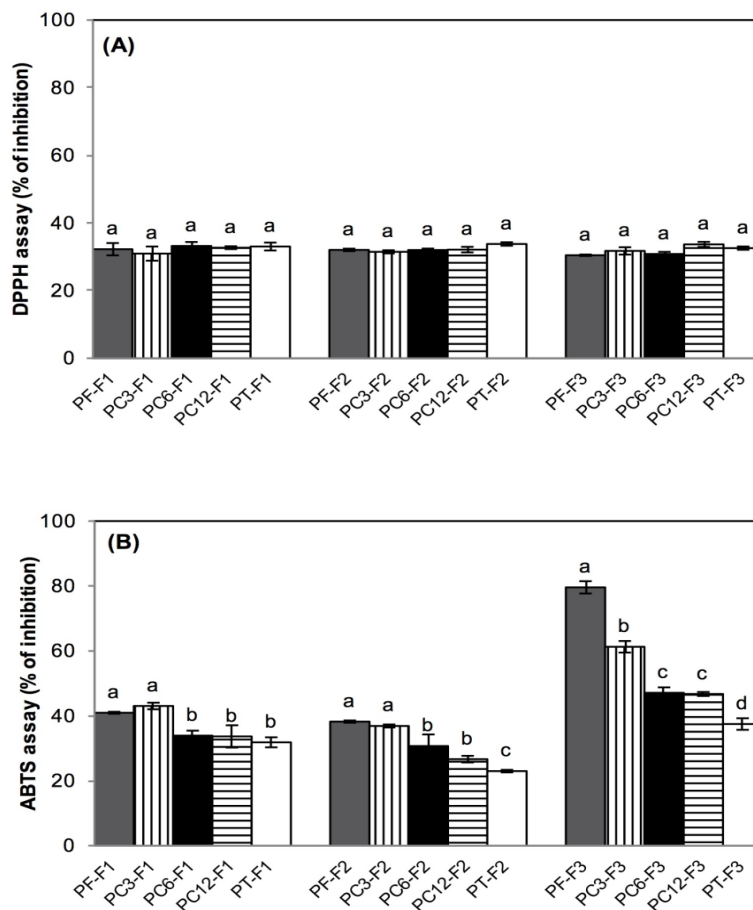


Figure 1

Figure 1. Antioxidant activity (% inhibition) by DPPH assay (A) and ABTS assay (B) of fractions from pulp stored for 3 (PC3-F1, PC3-F2, PC3-F3), 6 (PC6-F1, PC6-F2, PC6-F3) and 12 (PC12-F1, PC12-F2, PC12-F3) months at -20 °C and heat-treated pulp (PT-F1, PT-F2, PT-F3). Data are means \pm standard deviation of three determinations by triplicate (n=9). Different letters in each bar indicate significant statistical differences between treatments ($\alpha = 0.05$).

Figura 1. Actividad antioxidante (% de inhibición) mediante el ensayo DPPH (A) y ABTS (B) de las fracciones de la pulpa almacenada para 3 (PC3-F1, PC3-F2, PC3-F3), 6 (PC6-F1, PC6-F2, PC6-F3) y 12 meses (PC12-F1, PC12-F2, PC12-F3) a -20 °C y pulpa tratada térmicamente (PT-F1, PT-F2, PT-F3). Los datos son medias \pm desviación estándar de tres determinaciones por triplicado (n=9). Las diferentes letras en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

The ABTS radical by hydrophilic and hydrophobic compounds can be neutralized (Floegel *et al.*, 2011). León-Fernández *et al.* (2017b) reported a greater antioxidant activity by ABTS assay in a chloroform crude extract and fraction from soursop pulp. The antioxidant activity in organic samples is probably due to the presence of flavonoids with low polarity, which can

El radical ABTS por compuestos hidrófilos e hidrófobos se puede neutralizar (Floegel *et al.*, 2011). León-Fernández *et al.* (2017b) informaron una mayor actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS en un extracto crudo de cloroformo y fracción de pulpa de guanábana. La actividad antioxidante en muestras orgánicas se debe probablemente a la presencia de flavonoides con baja polaridad, que pueden extraerse

be extracted with chloroform, dichloromethane, diethyl ether or ethyl acetate (Sulaiman *et al.*, 2011). It has been demonstrated that polyphenols may act via multiple mechanisms of radical-scavenging activity such as metal scavengers, transferring electrons or donating hydrogen ions. The high molecular weight phenolics (tannins) have more ability to quench free radicals such as ABTS^{•+} and DPPH[•] (Pérez-González *et al.*, 2012; Paz *et al.*, 2015); while, AOX through acetogenins may be related to the α , β -unsaturated lactone ring moiety, similar to the *in vitro* mechanism of action of ascorbic acid, in which allylic hydrogens are involved. Acetogenins should act in the same way since they also possess allylic hydrogens as well as the stabilization via electron delocalization in the α β -unsaturated lactone ring moiety. A piece of evidence to support these observations is ascorbate, which naturally occurs in plants and contains hydroxyl groups attached to a saturated lactone ring. This compound exhibited very little scavenging activity towards free radicals (Lima *et al.*, 2010).

In the Table 3 is observed that the PF-F1, PC3-F1, PF-F2 and PC-F2 fractions had the lower LC_{50} (2.60-3.18 $\mu\text{g/mL}$), followed by PC6-F1, PC12-F1, PT-F1, PC6-F2, PC12-F2 and PT-F2 fractions (4.57-7.04 $\mu\text{g/mL}$). The F3 fraction from fresh pulp showed the highest LC_{50} (32.76 $\mu\text{g/mL}$), followed of PC3-F3 (17.45 $\mu\text{g/mL}$), PC6, PC12 and PT (13.38-14.13 $\mu\text{g/mL}$) without significant differences among them ($p > 0.05$). The storage at -20 °C and thermal treatment of soursop pulp may affect the chemical structure of some bioactive compounds, which could cause a decrease in toxicity.

It has been reported the toxicity of aqueous and ethanolic crude extracts from *Annonaceae* leaf and stem. The leaf and stem aqueous extracts had a LC_{50} of 1000 and 865 $\mu\text{g/mL}$, respectively; while leaf and stem ethanolic extracts showed a LC_{50} of 831 and 200 $\mu\text{g/mL}$, respectively (González-Esquinca *et al.*, 2012). Vila-Nova *et al.* (2013), determined the toxicity of acetogenins isolated from soursop leaves (annonancinone and corosolone) on early stages of *Artemia salina*. They reported high activities of 7.09 and 17.05 $\mu\text{g/mL}$, concluding that the acetogenins isolated possess higher cytotoxic activity than extracts. The toxicity of fractions might be related to the presence of acetogenins due to the extraction solvents (León-Fernández *et al.*, 2017a).

con cloroformo, diclorometano, dietil éter o acetato de etilo (Sulaiman *et al.*, 2011). Se ha demostrado que los polifenoles pueden actuar a través de múltiples mecanismos de actividad de atrapamiento de radicales, como la quelación de metales, la transferencia de electrones o la donación de iones de hidrógeno. Los fenólicos de alto peso molecular (taninos) tienen más capacidad para quelar los radicales libres, como ABTS^{•+} y DPPH[•] (Paz *et al.*, 2015; Pérez-González *et al.*, 2012); mientras que, la AOX a través de las acetogeninas puede estar relacionado con el anillo lactónico α , β -insaturado, similar al mecanismo de acción *in vitro* del ácido ascórbico, en el que participan hidrógenos alílicos. Las acetogeninas podrían actuar de la misma manera, ya que también poseen hidrógenos alílicos, así como la estabilización a través de la deslocalización de electrones en el resto del anillo de lactónico α - β -insaturado. Una evidencia para respaldar estas observaciones es el ascorbato, que ocurre naturalmente en las plantas y contiene grupos hidroxilo unidos a un anillo de lactona saturada. Este compuesto exhibió muy poca actividad de captación de radicales libres (Lima *et al.*, 2010).

En la Tabla 3 se observa que las fracciones PF-F1, PC3-F1, PF-F2 y PC-F2 tuvieron la menor CL_{50} (2.60-3.18 $\mu\text{g/mL}$), seguidas de PC6-F1, PC12-F1, PT-F1, PC6-F2, PC12-F2 y PT-F2 (4.57-7.04 $\mu\text{g/mL}$). La fracción F3 de pulpa fresca mostró la mayor CL_{50} (32.76 $\mu\text{g/mL}$), seguida de PC3-F3 (17.45 $\mu\text{g/mL}$), PC6, PC12 y PT (13.38-14.13 $\mu\text{g/mL}$) sin diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). El almacenamiento a -20 °C y el tratamiento térmico de la pulpa de guanábana pueden afectar la estructura química de algunos compuestos bioactivos, lo que podría causar una disminución de la toxicidad.

Se ha reportado la toxicidad de extractos crudos acuosos y etanólicos de hojas y tallos de *Annonaceae*. Los extractos acuosos de la hoja y el tallo tuvieron un CL_{50} de 1000 y 865 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; mientras que los extractos etanólicos de hojas y tallos mostraron un CL_{50} de 831 y 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (González-Esquinca *et al.*, 2012). Vila-Nova *et al.* (2013), determinaron la toxicidad de acetogeninas aisladas de hojas de guanábano (annonancinona y corosolona) sobre *Artemia salina* en etapas tempranas de crecimiento; Ellos reportaron altas actividades de 7.09 y 17.05 $\mu\text{g/mL}$, concluyendo que las acetogeninas aisladas poseen mayor actividad citotóxica que los extractos. La toxicidad de las fracciones podría estar relacionada con la presencia de acetogeninas debido a los solventes de extracción (León-Fernández *et al.*, 2017a).

Conclusion

The present study demonstrated that some fractions from soursop pulp showed antibacterial activity and antifungal activity. In addition, the antioxidant activity and toxicity of all fractions were registered, although the results depended of each treatment. The data support that the use of extracts from soursop pulp may be considered for the development of products in herbal medicine as pre-treatment in the biological control of postharvest diseases. Nevertheless, further studies need to be performed, either aiming at the isolation of compounds in the search for new antimicrobials or antifungals or evaluating the safety and efficacy of fractions from soursop pulp for a possible pharmaceutical use.

Acknowledgments

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por Coca-Cola Company y CONACYT, para la realización de este Proyecto.

References

- Arthur, F.K., Woode, E., Terlabi, E. and Larbie, C. (2011). Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. *European Journal of Experimental Biology* 1(4): 115-124. <http://ir.knust.edu.gh/bitstream/123456789/10965/1/EJEB-2011-1-4-115-124.pdf>
- Barbosa, T. P., Junior, C. G., Silva, F. P., Lopes, H. M., Figueiredo, L. R., Sousa, S. C. and Vasconcellos, M. L. (2009). Improved synthesis of seven aromatic Baylis–Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach and *Leishmania chagasi*. *European Journal of medicinal chemistry* 44(4): 1726-1730. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448204>.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45(4), 493-496. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707>
- Bautista-Baños, S., Barrera Necha, L. L., Bravo Luna, L. and Bermúdez-Torres, K. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1): 8-12. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220102>.
- Bautista-Baños, S., Hernández López, M. and Barrera Necha, L. L. (2000a). Antifungal screening of plants of the state of Morelos, México against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(1): 36-41. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61218105>.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Diaz-Pérez, J. C. and Cano-Ochoa, C. F. (2000b). Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of 'ciruela' fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology* 20(1): 99-106. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521400001095>
- Biesalski, H. K., & Grimm, P. (2000). *Nutrición: texto y atlas*. 1th Ed. Stuttgart, Alemania, Panamericana.

Conclusión

El presente estudio demostró que algunas fracciones de la pulpa de guanábana mostraron actividad antibacteriana y actividad antifúngica. Además, se registró la actividad antioxidante y la toxicidad de todas las fracciones, aunque los resultados dependieron de cada tratamiento. Los datos soportan que el uso de extractos de pulpa de guanábana puede considerarse para el desarrollo de productos en medicina herbal como un tratamiento previo en el control biológico de enfermedades postcosecha. Sin embargo, es necesario realizar más estudios, ya sea para aislar los compuestos en la búsqueda de nuevos antimicrobianos o antifúngicos o para evaluar la seguridad y eficacia de las fracciones de la pulpa de guanábana para un posible uso farmacéutico.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por Coca-Cola Company y CONACYT.

- Boyom, F.F., Fokou, P.V., Yamthe, L.R., Mfopa, A.N., Kemgne, E.M., Mbacham, W.F., Tsamo, E., Zollo, P.H., Gut, J. and Rosenthal, P.J. (2011). Potent antiplasmodial extract from Cameroonian Annonaceae. *Journal Ethnopharmacology* 134(3): 717-724. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111000213>.
- Chopra I & Greenwood D. (2001). Antibacterial agents: basis of action. Nature Publishing Group, John Wiley and Sons. 1-8 pp.
- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M. and Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry* 11: 662-691. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- Deressa, T., Lemessa, F. and Wakjira, M. (2015). Antifungal activity of some invasive alien plant leaf extracts against mango (*Mangifera indica*) anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *International Journal of Pest Management* 61(2): 99-105. <https://doi.org/10.1080/09670874.2015.1016135>
- Domínguez-Martínez, V., Andrade-Domínguez, A., Trejo-Hernández, A., Coria-Gil, N. and Martínez-Vázquez, M. (2011). Las acetogeninas, ¿Más que inhibidores del transporte electrónico? In: González-Esquinca AR, Luna-Cazáres LM, Gutiérrez-Jiménez J, Schile-Guzmán MA, Vidal-López DG (editores). Anonáceas plantas antiguas, estudios recientes. UNICACH 1ra Edición, Chiapas México. p. 485-95.
- Essama, S. R., Nyegue, M. A., Foe, C. N., Silihe, K. K., Tamo, S. B. and Etoa, F. X. (2016). Antibacterial and antioxidant activities of hydro-ethanol extracts of barks, leaves and stems of *Annona muricata*. *American Journal of Pharmaceutical Sciences* 3(6): 126-131. <http://pubs.sciepub.com/ajps/3/6/1/index.html>
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. and Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(7): 1043-1048. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088915751100038X>
- García-Aguirre, K. K., Zepeda-Vallejo, L. G., Ramón-Gallegos, E., Álvarez-González, I. and Madrigal-Bujaidar, E. (2008). Genotoxic and cytotoxic effects produced by acetogenins obtained from *Annona cherimolia* Mill. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(12): 2346-2349. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043225>
- González-Esquinca, A. R., Luna Cazáres, L. M., Schlie Guzmán, M. A., Chacón C, I. D. L. C., Laguna Hernández, G., Flores Breceda, S. and Montoya Gerardo, P. (2012). In Vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* larvae (Diptera, Tephritidae). *Interciencia* 37(4): 284-289. https://www.researchgate.net/publication/230779059_In_Vitro_Larvicidal_evaluation_of_Annona_muricata_A_diversifolia_and_A_lutescens_extract_against_Anastrepha_ludens_Larvae_Diptera_Tephritidae
- Lannuzel, A., Michel, P. P., Höglinger, G. U., Champy, P., Jousset, A., Medja, F. and Hocquemiller, R. (2003). The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience* 121(2): 287-296. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00441-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00441-X)
- León-Fernández, A. E., Obledo-Vazquez, E. N., Vivar-Vera, M. D. L. A., Sáyago-Ayerdi, S. G. and Montalvo-Gonzalez, E. (2017a). Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 39: 1-8. <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v39nspe/0100-2945-rbf-39-Spe-e-358.pdf>
- León-Fernández, A. E., Sáyago-Ayerdi, S. G., Velázquez-Estrada, R. M., Zepeda-Vallejo, L. G., Yahia, E. and Montalvo-González, E. (2017b). In vitro antioxidant capacity of crude extracts and acetogenin fraction of soursop fruit pulp. *Pharmaceutica Analytica Acta* 8(6): 1-7. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000550>
- Lima, L. A. S., Pimenta, L. P. and Boaventura, M. A. D. (2010). Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry* 122(4): 1129-1138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.100>
- Mohanty, S., Hollinshead, J., Jones, L., Jones, P. W., Thomas, D., Watson, A. A. and Gray, A. I. (2008). *Annona muricata* (Graviola): Toxic or therapeutic. *Natural Product Communications* 3(1): 31-33. <https://strathprints.strath.ac.uk/19802/>
- Morré, D. J., de Cabo, R., Farley, C., Oberlies, N. H. and McLaughlin, J. L. (1994). Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sciences* 56(5): 343-348. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.472.3886&rep=rep1&type=pdf>
- Park, K. A., Lee, H. J. and Hong, I. K. (2010). Solubility prediction of bioantioxidants for functional solvent by group contribution method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16(3): 490-495. <https://doi.org/10.1016/j>

- [jiec.2010.01.060](#)
- Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M. F., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Gomes, A. M. and Delerue-Matos, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry* 172(1): 462-468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.102>
- Pérez-González, A., Rebollar-Zepeda, A. M., León-Carmona, J. R. and Galano, A. (2012). Reactivity indexes and OH bond dissociation energies of a large series of polyphenols: Implications for their free radical scavenging activity. *Journal of the Mexican Chemical Society* 56(3): 241-249. <http://www.jmcs.org.mx/index.php/jmcs/article/view/285>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I. and Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International* 41 (3): 274-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- Perumal, A. B., Sellamuthu, P. S., Nambiar, R. B. and Sadiku, E. R. (2016). Antifungal activity of five different essential oils in vapour phase for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae* in vitro and on mango. *International Journal of Food Science and Technology* 51(2): 411-418. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12991>
- Potts, L. F., Luzzio, F. A., Smith, S. C., Hetman, M., Champy, P. and Litvan, I. (2012). Annonacin in *Asimina triloba* fruit: Implication for neurotoxicity. *Neurotoxicology* 33(1): 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.10.009>
- Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4290-4302. https://faculty.missouri.edu/~glaserr/3700s14/Antioxidant-Capacity_jf0502698.pdf
- Radji, M., Kurniati, M. and Kiranasari, A. (2015). Comparative antimycobacterial activity of some Indonesian medicinal plants against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5(1): 19-22. http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1407_pdf.pdf
- Raybaudi-Massilia, R., Suárez, A. I., Arvelo, F., Sojo, F., Mosqueda-Melgar, J., Zambrano, A. and Calderón-Gabaldón, M. I. (2015). An analysis in-vitro of the cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activity of aqueous and alcoholic extracts of *Annona muricata* L. seed and pulp. *British Journal of Applied Science & Technology* 5(4): 333-341. http://www.journalrepository.org/media/journals/BJAST_5/2014/Nov/Raybaudi542014BJAST13587_1.pdf
- Ramos-Guerrero, A., González-Estrada, R. R., Hanako-Rosas, G., Bautista-Baños, S., Acevedo-Hernández, G., Tiznado-Hernández, M. E. and Gutiérrez-Martínez, P. (2018). Use of inductors in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop fruits: in vitro tests. *Food Science and Biotechnology* (in press). 27(3): 755-763 <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-018-0305-5>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10): 1231-1237. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381194>
- Reis, L. F. D., Cerdeira, C. D., Paula, B. F., Silva, J. J. D., Coelho, L. F., Silva, M. A. and Alves-Da-Silva, G. (2015). Chemical characterization and evaluation of antibacterial, antifungal, antimycobacterial, and cytotoxic activities of *Talinum paniculatum*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57(5): 397-405. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500005>
- Roger, T., Pierre-Marie, M., Igor, V. K. and Patrick, V. D. (2015). Phytochemical screening and antibacterial activity of medicinal plants used to treat typhoid fever in Bamboutos division, West Cameroon. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5(6):34-49. <https://pdfs.semanticscholar.org/c9b4/92bee65324d83a1e26d7eccab7c1e33b2270.pdf>
- Sanchez-Maldonado, A. F., Aslam, M., Service, C., Narváez-Bravo, C., Avery, B. P., Johnson, R. and Jones, T. H. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from two pork processing plants in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology* 241: 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.004>
- Seo, B. B., Wang, J., Flotte, T. R., Yagi, T. and Matsuno-Yagi, A. (2000). Use of the NADH-Quinone Oxidoreductase (ND1) Gene of *Saccharomyces cerevisiae* as a Possible Cure for Complex I Defects in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry* 275(48): 37774-37778. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982813>
- Solomon-Wisdom, G. O., Ugoh, S. C. and Mohammed, B. (2014). Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Annona muricata* L leaf extract. *American Journal of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences* 2(1): 1-7. http://www.ajbcps.com/AJBCPS_Vol.%202.%20No.%201.%20January%202014/Phytochemical%20

[Screening.pdf](#)

- Sulaiman, S. F., Sajak, A. A. B., Ooi, K. L. and Seow, E. M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(4-5): 506-515. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.020>
- Vieira, G. H. F., Mourão, J. A., Ângelo, Â. M., Costa, R. A. and Vieira, R. H. S. D. F. (2010). Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52(3): 129-132. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602021>
- Vijayalakshmi S.L.R. & Nithiya T. (2015). Antimicrobial activity of fruit extract of *Annona squamosa* L. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(5): 1257-67.
- Vila-Nova, N. S., de Moraes, S. M., Falcão, M. J. C., Alcantara, T. T. N., Ferreira, P. A. T., Cavalcanti, E. S. B. and Wilson, M. (2013). Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Experimental parasitology* 133(3): 334-338. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23232251>
- Yang, X. & Jiang, X. (2015). Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters* 37(7): 1463-1472. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003094>