



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

“Exploración del efecto del consumo de dietas adicionadas con
harina de pulpa de guanábana (*Annona muricata L.*) sobre el
crecimiento de la rata Wistar”

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

P.L. Nutric. Erika Cuellar Sánchez

No. cuenta: 318950

Bajo la Dirección de: Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Co-Directora: Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez
Profesora Investigadora del Área Académica de
Nutrición, UA EH



Pachuca, Hgo., Septiembre de 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**



De acuerdo con el artículo 40 del Reglamento de Titulación vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Exploración del efecto del consumo de dietas adicionadas con harina de pulpa de guanábana (*Annona muricata L.*) sobre el crecimiento de la rata Wistar"

Que para obtener el Título de Licenciada de Nutrición sustenta la Pasante

C. Erika Cuellar Sánchez

**ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 25 de agosto de 2020
"Amor, Orden y Progreso"**

PRESIDENTE:	DR. MARCOS M. GALVÁN GARCÍA
SECRETARIO:	DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ
PRIMER VOCAL:	DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO
SEGUNDO VOCAL:	DRA. EMMA GLORIA RAMOS RAMÍREZ
TERCER VOCAL:	DRA. DIANA PATRICIA OLIVO RAMÍREZ
PRIMER SUPLENTE:	DRA. QUINATZIN YADIRA ZAFRA ROJAS
SEGUNDO SUPLENTE:	DR. MARCO A. GONZALEZ UNZAGA

Handwritten signatures in blue ink over horizontal lines, corresponding to the names listed in the table. The signatures are: a large scribble for Marcos M. Galván García, a scribble for Guadalupe López Rodríguez, a scribble for Nelly del Socorro Cruz Cansino, a signature for Emma Gloria Ramos Ramírez, a signature for Diana Patricia Olivo Ramírez, a signature for Quinatzin Yadira Zafra Rojas, and a signature for Marco A. Gonzalez Unzaga.

DEDICATORIAS

El presente trabajo lo dedico a Dios, por darme la capacidad, fortaleza y valentía para hacer este sueño realidad. Gracias a él he logrado concluir mi carrera.

Con amor y cariño a mis padres Cristina y Guillermo por haberme dado la oportunidad de estar en este mundo quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi soporte incondicional en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me ha presentado, sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad.

Gracias por ser mis pilares fundamentales en mi formación como profesional, por sus consejos, su amor, paciencia y su apoyo para lograr lo que ahora soy, gracias por enseñarme que puedo vencer todos los obstáculos que se me presenten en la vida.

A mi familia en general, por haberme brindado su apoyo incondicional, compartiendo conmigo buenos y malos momentos.

Eríka Cuellar Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a mi Directora de tesis, la Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez, por brindarme su tiempo, paciencia, sus valiosos conocimientos y su constante apoyo y orientación durante todo el tiempo del desarrollo de la investigación, por permitir desarrollarme profesionalmente haciendo uso de sus instalaciones y equipos para la ejecución del presente estudio, llevado a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

A la Biol. Pilar Méndez Castrejón, por su apoyo técnico en el montaje de técnicas y en la asesoría de las determinaciones bromatológicas y químicas empleadas.

De igual manera mis agradecimientos a mi Co-Directora la Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez, por su generosidad y apoyo incondicional durante todo este proceso, quien con su dirección, sus valiosos conocimientos, enseñanzas, compañía, consejos y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

A todo el comité de la evaluación de tesis, gracias por todas las atenciones e información brindada a lo largo de esta indagación.

Muchas gracias y que Dios los bendiga.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS.....	iii
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Marco teórico	3
3.1 Generalidades del crecimiento	3
3.2 Factores que influyen en el crecimiento.....	3
3.2.1 Factores genéticos.....	3
3.2.2 Factores hormonales.....	4
3.2.3 Factores ambientales	5
3.2.3.1 La nutrición en el crecimiento.....	5
3.3 Importancia del consumo de proteína en el crecimiento.....	6
3.4 Familia Annonacea y Guanábana (<i>Annona muricata</i> Linn): Descripción botánica, adaptación y propagación	7
3.5 Composición química en pulpa de guanábana	11
3.6 Usos medicinales de <i>Annona muricata</i> L.....	12
4. Problema de investigación	13
5. Justificación.....	14
6. Objetivos	15
6.1 Objetivo general	15
6.2 Objetivos específicos	15
7. Diseño metodológico.....	16
7.1 Tipo de estudio.....	16
7.2 Adquisición y Acondicionamiento de materia prima	18
7.3 Caracterización del análisis químico proximal.....	19
7.3.1 Extracto etéreo	19
7.3.2 Humedad en muestra desengrasada	20
7.3.3 Cenizas en muestra desengrasada.....	21
7.3.4 Fibra cruda en muestra desengrasada.....	21
7.3.5 Nitrógeno total y proteína cruda en muestra desengrasada.....	22
7.3.6 Carbohidratos totales	23

7.4	Evaluación del efecto en el crecimiento	24
7.4.1	Animales de experimentación, condiciones de alojamiento y cuestiones éticas.....	24
7.4.2	Elaboración de dietas.....	25
7.4.3	Prueba piloto	26
7.4.4	Prueba definitiva.....	27
7.4.5	Registros de peso, consumos y excretas.....	28
7.4.6	Disección y medición de fémur.....	28
7.4.7	Determinación enzimática de indicadores bioquímicos.....	28
7.5	Análisis estadístico.....	29
8.	Resultados y discusión.....	30
8.1	Análisis químico proximal de la materia prima.....	30
8.2	Evaluación del efecto en el crecimiento.....	31
8.2.1	Ensayo piloto	31
8.2.2	Observaciones clínicas y macroscópicas.....	31
8.3	Prueba definitiva	34
8.3.1	Ganancia de peso corporal en ratas	34
8.4	Crecimiento del fémur.....	38
8.5	Ingesta de alimento y agua y cuantificación de excretas en 24 h.....	40
8.5.1	Consumo calórico promedio.....	40
8.5.2	Consumo de agua	42
8.5.3	Cantidad de heces	43
8.5.4	Cantidad de orina	46
8.6	Observaciones macroscópicas	47
8.7	Determinación de indicadores bioquímicos	48
8.7.1	Determinación de glucosa.....	48
8.7.2	Determinación de triacilglicéridos.....	50
8.7.3	Determinación de colesterol total	52
8.7.4	Determinación de ácido úrico.....	53
9.	Conclusiones.....	55
10.	Recomendaciones.....	56
11.	Referencias bibliográficas	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estados productores de guanábana en México: superficie sembrada y producción.....	9
Tabla 2. Composición química por cada 100 gramos de pulpa de guanábana	11
Tabla 3. Composición de las dietas proporcionadas g/100 g de dieta	26
Tabla 4. AQP en pulpa de guanábana en 100 g.....	30
Tabla 5. Pesos corporales promedios (g) por día experimental durante la prueba piloto.....	32
Tabla 6. Peso promedio (g) de los animales por semana	35
Tabla 7. Longitud (cm) de fémur de pata trasera derecha de ratas Wistar	39
Tabla 8. Consumo promedio en Kilocalorías/24 h de ratas colocadas en jaulas metabólicas.	41
Tabla 9. Consumo promedio de agua en mL/24 h de ratas colocadas en jaulas metabólicas.	42
Tabla 10. Excreción de heces (g) durante 24 h en jaulas metabólicas.....	44
Tabla 11. Excreción de orina (mL) durante 24 h en jaulas metabólicas.....	46
Tabla 12. Concentración de glucosa en suero (mg/dL)	49
Tabla 13. Concentración de triglicéridos en suero (mg/dL).....	50
Tabla 14. Concentración de colesterol total en suero (mg/dL).....	52
Tabla 15. Concentración de ácido úrico en orina (mg/24 h).....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la familia Annonaceae.....	8
Figura 2. Características del fruto.....	10
Figura 3. Diseño metodológico de la investigación.....	17
Figura 4. Frutos de guanábana posterior a su lavado.	18
Figura 5. Aparato de extracción Soxhlet.....	20
Figura 6. Equipo Kjeldahl.....	23
Figura 7. Colocación de ratas en jaulas de acero inoxidable (A) y jaulas metabólicas (B).	24
Figura 8. Necrosis observada en esófago, estómago e intestino delgado	33
Figura 9. Restos de alimento en comederos de ratas.	36
Figura 10. Incremento en peso en ratas Wistar durante el periodo experimental.....	37
Figura 11. Fotografías representativas de sujetos experimentales.	38
Figura 12. Representación de la medición de la longitud del fémur de un sujeto experimental con un vernier.	38
Figura 13. Fotografías representativas de las heces obtenidas en la semana 4, de una rata de cada grupo experimental.....	45
Figura 14. Retraso en el vaciamiento gástrico de ratas Wistar en la semana 4.	46

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
ALS	Subunidad lábil ácida MMM LO USAS 2 VECES...
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AQP	Análisis químico proximal
GAOAC	Grupo dieta AOAC
GGB	Grupo dieta guanábana-AOAC
GGBL	Grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica
GSTD	Grupo dieta estándar (LabDiet 5008)
HC	Hormona de crecimiento
HLHC	Hormona liberadora de Hormona de Crecimiento
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina I
Kcal	Kilocalorías
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno

1. Resumen

Introducción: La guanábana es un fruto exótico consumido ancestralmente por pueblos indígenas de Sudamérica, se ha considerado fuente de macro y micronutrientes y con propiedades terapéuticas. No obstante, sus efectos sobre el crecimiento no han sido estudiados. **Objetivo:** Explorar el efecto del consumo de dietas adicionadas con harina de pulpa de guanábana (*Annona muricata* L.) sobre el crecimiento de la rata Wistar. **Metodología:** Se realizó un análisis químico proximal de la harina de pulpa guanábana; con base en sus resultados, se formularon 2 dietas problema para la exploración de los efectos de su consumo sobre el crecimiento corporal. Se tuvieron 4 grupos experimentales (GSTD= grupo dieta estándar LabDiet 5008; GAOAC= grupo dieta AOAC; GGB= grupo dieta guanábana-AOAC; GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica). De inicio, se llevó a cabo una prueba piloto (10 días) para descartar daños de toxicidad y posteriormente se realizó la prueba definitiva (28 días). Previamente, los animales cursaron con un periodo de adaptación (6 días) a las condiciones de alojamiento y a la presentación del alimento. Diariamente la dieta fue proporcionada al 10 % de su peso y el agua *ad libitum*, registrando peso corporal y observación clínica del estado general de los animales. En la semana 2 y 4 del estudio final se obtuvieron huesos femorales, muestras de sangre y de orina, en 3 individuos de cada grupo. Se determinó glucosa, triacilglicéridos, colesterol y ácido úrico. El efecto de las dietas ensayadas, sobre las diferentes variables se analizó mediante un ANOVA de una vía utilizando un análisis post hoc de Tukey considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. **Resultados:** En la prueba piloto, en los grupos de guanábana, se observó toxicidad notoria con signos y síntomas clínicos visibles (fatiga, pérdida de peso, dolor abdominal, retraso en el crecimiento) además de una evidente necrosis intestinal, observada post mortem. Al término de la prueba definitiva, el GSTD presentó significativamente la mayor ganancia de peso en comparación con los grupos de guanábana (130.60 ± 15.72 g vs GGB 86.26 ± 9.10 g y vs GGB-L 80.80 ± 8.20 g). No hubo diferencias entre la longitud en fémur en los grupos GSTD y GAOAC (2.80 ± 0.03 cm vs 2.74 ± 0.03 cm) pero sí entre los grupos de guanábana quienes mostraron las menores longitudes de fémur (GGB 2.44 ± 0.02 cm, GGB-L 2.39 ± 0.00). La exploración anatómica post mórtem mostró gran cantidad de alimento en los estómagos de los roedores de los grupos de guanábana, indicativo un posible retraso en el vaciamiento gástrico. **Conclusiones:** El uso de harina de guanábana escaldada como fuente de proteína y de nutrientes tiene efectos negativos sobre la ganancia de peso y el crecimiento femoral en ratas Wistar macho.

Palabras clave: Crecimiento, *Annona muricata* L., pulpa de guanábana, ganancia de peso, longitud fémur.

2. Abstract

Introduction: Soursop is an exotic fruit consumed ancestrally by indigenous peoples of South America, it has been considered a source of macro and micronutrients and with therapeutic properties. However, its effects on growth have not been studied.

Objective. To explore the effect of the consumption of diets added with soursop pulp flour (*Annona muricata L.*) on the growth of the Wistar rat. **Methodology:** A proximal chemical analysis of soursop pulp flour was performed; based on their results, 2 problem diets were formulated for exploring the effects of their consumption on body growth. There were 4 experimental groups (GSTD = LabDiet 5008 standard diet group; GAOAC = AOAC diet group; GGB = guanabana-AOAC diet group; GGB-L = guanabana-AOAC-lipid diet group). Initially, a pilot test was carried out (10 days) to rule out toxicity damage and later the definitive test was carried out (28 days). Previously, the animals were carried out with a period of adaptation (6 days) to the conditions of accommodation and to the presentation of the food. Diet was provided daily at 10% of their weight and water ad libitum, recording body weight and clinical observation of the general state of the animals. In week 2 and 4 of the final study, femoral bones, blood and urine samples were obtained in 3 individuals in each group. Glucose, triacylglycerides, cholesterol and uric acid were determined. The effect of the diets tested on the different variables was analyzed by a one-way ANOVA using a Tukey post hoc analysis, considering a value of $p < 0.05$ as statistically significant.

Results: Results. In the pilot test, in the guanabana groups, marked toxicity was observed with visible clinical signs and symptoms (fatigue, weight loss, abdominal pain, growth retardation) in addition to an evident intestinal necrosis, observed post mortem. At the end of the definitive test, the GSTD presented significantly the highest weight gain compared to the soursop groups (130.60 ± 15.72 g vs GGB 86.26 ± 9.10 g and vs GGB-L 80.80 ± 8.20 g). There were no differences between the femur length in the GSTD and GAOAC groups (2.80 ± 0.03 cm vs 2.74 ± 0.03 cm) but there were differences between the soursop groups who showed the shortest femur lengths (GGB 2.44 ± 0.02 cm, GGB-L 2.39 ± 0.00). The postmortem anatomical examination showed a large amount of food in the stomachs of the rodents from the guanábana groups, indicative of a possible delay in gastric emptying.

Conclusions: The use of scalded soursop flour as a source of protein and nutrients present has negative effects on weight gain and femoral growth in male Wistar rats.

Key words: Growth, *Annona muricata L.*, soursop pulp, weight gain, femur length.

3. Marco teórico

3.1 Generalidades del crecimiento

El crecimiento humano es un proceso fisiológico complejo que comienza con la vida fetal (concepción) y se completa con la fusión epifisaria y metafisaria de los huesos largos al final de la pubertad (Thomis & Towne, 2006). El diccionario de Oxford English define el crecimiento como "un aumento en el tamaño y la cantidad de algo", con respecto al cuerpo humano, este es un proceso dinámico con cambios somáticos en la estatura y en la composición corporal que implican hiperplasia celular (aumento en el número de células), hipertrofia (aumento en el tamaño celular) y apoptosis (muerte celular programada) (Wei & Gregory, 2009).

El crecimiento se manifiesta con un aumento de la masa corporal y un crecimiento lineal; ambos son indicadores esenciales en la salud básica del ser humano, sin embargo, llegan a variar con la edad y el sexo.

El crecimiento lineal es un proceso gradual que lleva lugar en la estructura esquelética, donde los condrocitos en la placa de crecimiento del cartílago proliferan, se agrandan y se osifican. Está influenciado por diversos factores que varían dependiendo de la etapa del desarrollo en que lleve lugar: prenatal, infancia, niñez o primera infancia y adolescencia (Rosenbloom, 2007; Ergun-Longmire & Wajnrajch, 2018).

3.2 Factores que influyen en el crecimiento

El crecimiento y el desarrollo son construcciones multifactoriales influenciados por una serie de factores destacando los genéticos, hormonales y ambientales, por lo que para lograr un crecimiento óptimo se necesita de la armonía de estos (Wei & Gregory, 2009; Thomis & Towne, 2006).

3.2.1 Factores genéticos

Los factores genéticos desempeñan un papel importante en la transmisión de las características físicas y sociales que se dan de los padres a los hijos. Se han identificado diversos genes que son necesarios para el crecimiento normal y la función de la glándula pituitaria en general, que controlan el eje del factor de crecimiento similar

a la hormona de crecimiento/insulina en particular (Ergun-Longmire & Wajnrajch, 2018).

Los genes más importantes en el crecimiento son: HESX1, PITX2, LHX3, LHX4, PROP1, GHI2, HESX1, SOX3 y receptor GHRH (Rosenbloom, 2007).

Sin embargo, se ha demostrado que las mutaciones de estos genes pueden afectar negativamente la producción o la acción de las distintas hormonas hipofisarias como la HC (hormona de crecimiento), las hormonas tiroideas y las hormonas sexuales desencadenando un crecimiento anormal en humanos (Ergun-Longmire & Wajnrajch, 2018; Wei & Gregory, 2009, Rosenbloom, 2007).

3.2.2 Factores hormonales

Existen diversas hormonas, como la hormona de crecimiento (HC), la hormona tiroidea, las hormonas sexuales (testosterona y estrógeno), las gonadotropicas hipofisarias (estimulantes de las glándulas sexuales), entre otras (Rosenbloom, 2007). Sin embargo, la HC es la de mayor importancia ya que se encuentra involucrada en el aumento del sistema óseo y en la composición corporal, la cual aumenta progresivamente desde la infancia y alcanza su punto máximo durante el crecimiento acelerado que ocurre en la pubertad (Wei & Gregory, 2009).

La estructura cerebral encargada de regular este proceso es el hipotálamo, el cual indica, vía la hormona liberadora de la HC, a la glándula pituitaria o adenohipófisis (Wei & Gregory, 2009) el momento en el que se debe de excretar la HC. Dicha hormona estimula al hígado y a otros tejidos que sirven para generar el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) el cual circula hasta el torrente sanguíneo con el fin de llegar a las células del cartílago y así estimular la proliferación de condrocitos, lo que resulta en un incremento en la longitud de los huesos. De igual manera, el IGF-I es capaz de estimular la diferenciación y la proliferación de mioblastos, generando la formación de proteínas en los músculos (Popii, & Baumann, 2004; Welniak & Murphy, 2003). Principalmente el incremento ocurre en los huesos largos de las piernas, lo que hace que los niños ganen estatura. No obstante, este proceso se ve acompañado de otros factores fisiológicos como el sueño, el ejercicio y la dieta (Van Vught *et al.*, 2013).

Las anomalías adquiridas que afectan la HC varían desde daños a la región hipotalámica de la hipófisis, traumatismos, tumores, infecciones, enfermedades autoinmunes o radiación, por lo que su supresión de este proceso desencadena desnutrición (Rosenbloom, 2007).

3.2.3 Factores ambientales

Dentro de los factores ambientales que impactan sobre el crecimiento, se incluyen la nutrición, los factores psicológicos, el estado socioeconómico, la actividad física y el clima.

3.2.3.1 La nutrición en el crecimiento

Es conocida la importancia de una nutrición adecuada en cantidad como en calidad, para un crecimiento normal. Se requiere un suministro adecuado de alimentos que al ser ingeridos en la cantidad y proporción armónica, aportan nutrientes (agua, carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas como la C, D, K, y minerales como el zinc, el magnesio, el yodo, el calcio y el fósforo, etc), que permiten la formación y mantenimiento de los tejidos el correcto funcionamiento de los órganos y la provisión de energía necesaria para la vida y para el crecimiento corporal (Ávila et al., 2012). Por tanto, la nutrición juega un papel fundamental en el crecimiento óseo y muscular del cuerpo humano, ya que aproximadamente durante los 16 primeros años de vida, tiene específicas necesidades nutricionales las cuales son paralelas a períodos de aceleración y desaceleración del crecimiento corporal. Durante la infancia y los primeros años escolares existe un crecimiento rápido, haciendo que las necesidades nutricionales sean altas, mientras que durante el resto de la edad escolar hasta antes de la adolescencia no avanza en el mismo ritmo y tienden a ser menores. Los primeros años de vida constituyen el período de mayor velocidad de crecimiento de estatura. En estos períodos de rápido crecimiento, un déficit nutricional se traduce en una mayor pérdida de centímetros en la talla final del sujeto. No sucede lo mismo con una desnutrición que se produce en períodos posteriores en que la velocidad de crecimiento es menor (Prentice *et al.*, 2006).

Aunque la relación entre la dieta y la salud ósea y muscular está bien establecida (Bonjour *et al.*, 2009), el crecimiento puede verse influido por otros factores ambientales como el nivel socioeconómico o factores emocionales. Por ejemplo: en comparación con un nivel socioeconómico alto, resulta, en su mayoría, en una mejor nutrición, mejor cuidado infantil y mejores servicios médicos y sociales. Por otra parte, la privación psicosocial o cualquier otra situación que genere estrés agudo en un sujeto en crecimiento, provoca supresión de la hormona de crecimiento y por tanto, un retraso en el crecimiento (Rocha *et al.*, 2016).

Además de estos elementos, la proteína parece ser particularmente importante en el crecimiento, donde se requiere en la construcción y mantenimiento de todas las células del cuerpo de igual forma es necesaria para promover la síntesis en la hormona de crecimiento (Moro & Covino, 2018).

3.3 Importancia del consumo de proteína en el crecimiento

Se ha demostrado que la desnutrición calórico proteica severa del lactante produce una detención del crecimiento, que constituiría un mecanismo de defensa para subsistir a una menor ingesta de nutrientes, pero dejando como secuela una menor talla, que explicaría la menor estatura promedio poblacional de las personas que viven en países en desarrollo donde la desnutrición por deficiencia energética es prevalente Muzzo B, Santiago (2003).

El crecimiento que se produce rápidamente durante la infancia y la adolescencia se encuentra asociado a una ingesta adecuada de proteína la cual es necesaria para desarrollar el alargamiento óseo, ya que constituye cerca del 50% del volumen del hueso y aproximadamente un tercio de su masa para la acumulación de masa muscular (Hoppe *et al.*, 2004; Masarwi *et al.*, 2016; Shams-White *et al.*, 2017).

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células, presentan diversas funciones dentro del organismo como el papel catalítico (enzimas), la motilidad corporal (actina, miosina), su papel mecánico (elastina, colágeno), de transporte y almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas) (Gil *et al.*, 2005) etc. Estas macromoléculas se encuentran formadas por 20 aminoácidos, sin embargo, el cuerpo humano solo puede producir 11,

los otros 9, denominados aminoácidos esenciales, deben ser provistos por los alimentos. Se ha sugerido que ciertos aminoácidos, como la arginina y la lisina, pueden inducir la liberación de distintas hormonas conduciendo así a un crecimiento acelerado (Van Vught *et al.*, 2013).

Uno de los mecanismos sugeridos que asocia la ingesta de proteínas con la regulación del crecimiento es que estas macromoléculas estimulan la liberación del factor de crecimiento similar a la insulina I (IFG-1) y otras hormonas de crecimiento, lo que da como resultado un crecimiento acelerado, aumentando la masa muscular y a su vez la masa grasa (Voortman *et al.*, 2016; Socha, *et al.*, 2011; Braun *et al.*, 2016).

En las poblaciones donde existe escasez de alimentos, el consumo disminuido en la ingesta de proteína llega a ocasionar desnutrición. Esta escasez impacta en la talla y peso de los niños, quienes son consecuentemente más bajos y ligeros que en las poblaciones con suministros adecuados o abundantes de alimentos. Otras consecuencias de la ingesta baja de proteínas en la salud de la población incluyen: fatiga, falta de concentración, crecimiento lento, dolor en huesos y articulaciones, retraso en la cicatrización de heridas, disminución de la respuesta inmune entre otras (Campbell *et al.*, 2017; Tretyak, 2007).

3.4 Familia Annonacea y Guanábana (*Annona muricata* Linn): Descripción botánica, adaptación y propagación

La importancia de la nutrición en el crecimiento corporal y en el mantenimiento de la salud es innegable, pues para llevar a cabo un crecimiento óptimo se necesita del aporte de macro y micronutrientes, sin embargo, es importante considerar las diferentes alternativas que ayuden en este proceso, el estudio de frutos no convencionales es un tema de gran importancia, ya que a partir de ellos se pueden tener diversos nutrientes que influyan positivamente en el crecimiento, la guanábana es un fruto exótico que ha sido utilizado históricamente por pueblos indígenas por ser fuente de macro y micronutrientes; el consumo de guanábana en diversas poblaciones de Perú, proviene del conocimiento ancestral y la información que se tiene respecto a su valor nutritivo (Leiva *et al.* 2018).

La guanábana (*Annona muricata* L.) pertenece a la familia *Annonaceae*, las cuales constan aproximadamente de 135 a 140 géneros con unas 2300 especies las cuales se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales (Lúcio *et al.*, 2015; Ortiz-Rodríguez *et al.*, 2015; Chatrou *et al.*, 2018) como se muestra en la Figura 1 (área en color rojo).



Figura 1. Distribución geográfica de la familia Annonaceae.
Fuente: García Aguirre, 2009.

En México están descritos 14 géneros con aproximadamente 63 especies identificadas (García, 2009), de los cuales solo 4 géneros producen frutos comestibles: *Annona*, *Rollinea*, *Uvaria* y *Asimina* (Cruz *et al.*, 2016).

Dentro del género *Annona* de 8 a 10 especies tienen importancia frutícola, siendo en México las de mayor importancia económica y potencial agronómico: guanábana (*A. muricata* L.), chirimoya (*A. cherimola*), ilama o papausa (*A. diversifolia* Saff.), anona colorada o amarilla (*A. reticulata* L.) y chincuya o cabeza de negro (*A. purpurea* L.), anono (*A. reticulata*) y saramuyo (*A. squamosa* L.) (García Aguirre, 2009). De estas solo la guanábana y chirimoya se cultivan actualmente con fines comerciales, el resto se encuentra en traspatios o en la vegetación natural (Hernández, 2013).

La guanábana es considerada como una fruta exótica; debido a su agradable sabor subácido, pulpa aromática y jugosa, se ha convertido en materia prima para la elaboración de purés, jugos, mermeladas, helados, jaleas, barras de fruta y hojuelas (Abbo *et al.*, 2006; Neta *et al.*, 2018). Es conocida de diferentes maneras como: guanábano o graviola, chirimoya brasilera, masasamba, carasol, cachimán, huana-huana, sirsak, zapote agrio, papaya, paw-paw y *soursop*, en inglés (Morón *et al.*, 2010;

Zorofchian Moghadamtousi *et al.*, 2015; Toghueo, 2019). Es originaria de América y África tropical, fue distribuida por los españoles en los trópicos por lo que hoy en día es posible encontrarla en el oeste de la India, en Norte y Sudamérica, en Islas del Pacífico y en el Sureste de Asia. El cultivo de la guanábana es marcadamente estacional ya que florece de diciembre-abril y los frutos maduran de marzo a mayo-junio. Su óptimo desarrollo se da en altitudes menores a 1,200 m, con temperatura media entre 25 y 28 °C y con una humedad relativa entre 60 y 80 %. (Gavamukulya *et al.*, 2014; Morón *et al.*, 2010).

En América Central, México es el mayor productor y consumidor de guanábana de acuerdo con Jiménez-Zurita *et al.*, (2017). De acuerdo con lo reportado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2018), 3,693.19 hectáreas produjeron un estimado de 29,228.46 toneladas anuales siendo los principales estados productores Nayarit, Michoacán, Colima, Guerrero, Veracruz, Puebla, Tabasco, Jalisco y Campeche (Tabla 1).

Tabla 1. Estados productores de guanábana en México: superficie sembrada y producción

Entidad federativa	Superficie sembrada (ha)	Producción (t)
Nayarit	2,532.44	21,860.02
Michoacán	422	2,395.80
Colima	385.75	2,933.31
Guerrero	179	1,070.66
Veracruz	73.50	511.06
Puebla	67.50	259.96
Tabasco	13	82.86
Jalisco	12	69.27
Campeche	8	45.52
Total	3,693.19	29,228.46

Fuente: Elaboración propia con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018.

Los árboles de *Annona muricata L.* son semicaducifolios y alcanzan de 3 a 8 m de altura. Sus hojas son oblongo-elípticas a oblongo obovadas de 6 a 12 cm de largo por 2.5 a 5 cm de ancho. Su tronco es ramificado muy cerca de su base, las ramas son

cilíndricas, arrugadas, ásperas, de color café rojizo y con numerosas lenticelas. La corteza es de color castaño más o menos lisa y rosada (Figura 2A-B). Sus flores son solitarias a lo largo del tallo, con 3 sépalos, ovados, con menos de 5 mm de largo y con 6 pétalos (Figura 2C) (Moghadamtousi *et al.*, 2015).

La fruta es más o menos ovalada, de 20 a 25 cm de largo por 10 a 12 cm de diámetro, curvada, carnosa, con un peso de 0.4-1 kg y cubierta por una cáscara de color verde a ligeramente verde amarillento, de la que sobresalen espinas suaves, alargadas, curvadas y carnosas, que se desprenden fácilmente cuando la fruta está madura (Figura 2D) (Ojeda de Rodríguez *et al.*, 2007).

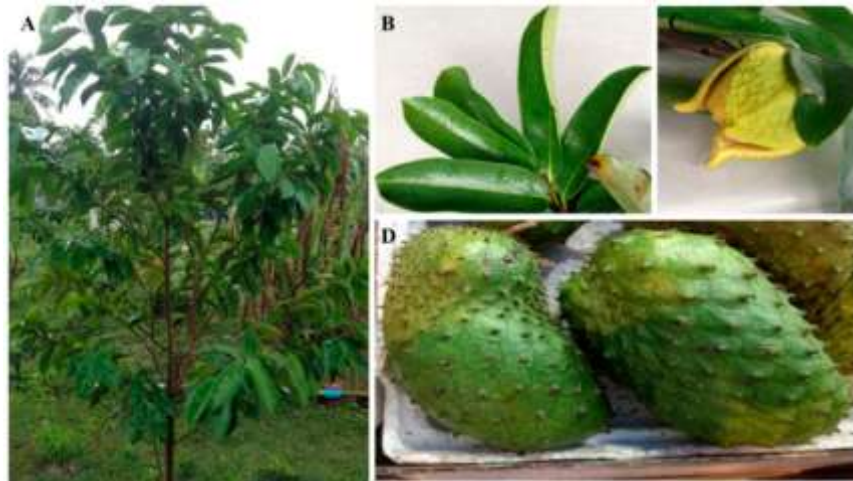


Figura 2. Características del fruto Guanábana (A) Árbol; (B) Aspecto de las hojas; (C) Flor; (D) Fruto.
Fuente: Moghadamtousi *et al.*, 2015.

Su pulpa es aromática, blanca algodonosa y jugosa, la cual recubre a sus numerosas semillas (de 55-170 semillas por fruto), éstas son ovoides y aplanadas, de 15 a 20 mm de largo por 10 mm de ancho, con testa oscura y brillante (Moghadamtousi *et al.*, 2015).

3.5 Composición química en pulpa de guanábana

La composición química del fruto varía según las técnicas de cultivo, procesamiento, madurez y almacenamiento (Dauchet *et al.*, 2009), no obstante, la pulpa se destaca por ser una de las frutas con mayor contenido vitamínico, especialmente vitamina C. Además, posee minerales como sodio, calcio, magnesio, potasio, fósforo y hierro, presenta bajo contenido de lípidos y buen aporte de fibra dietética y agua, lo que la hace un fruto con bajo aporte calórico (León-Méndez *et al.*, 2016). En la Tabla 2 se muestra la composición química en 100 gramos de pulpa fresca de guanábana.

Tabla 2. Composición química por cada 100 gramos de pulpa de guanábana

	Unidad	Por cada 100 g de pulpa
Energía	Kcal	63 ¹
Agua	g	78.2 a 82.0 ²
Proteína	g	0.6 a 1.2 ²
Lípidos	g	0.2 a 0.3 ²
Carbohidratos	g	14.9 ¹
Fibra	g	1.6 a 3.2 ²
Pectinas	g	0.4 a 0.9 ²
Cenizas	g	0.6 ²
Minerales		
Calcio	mg	14 ¹
Cobre	mg	0.13 ¹
Fósforo	mg	28 ¹
Hierro	mg	0.5 ¹
Magnesio	mg	20 ¹
Potasio	mg	278 ²
Sodio	mg	14 ¹
Zinc	mg	0.34 ¹
Vitaminas		
Tiamina (B1)	mg	0.07 ¹
Riboflavina (B2)	mg	0.05 ¹
Niacina (B3)	mg	1.28 ¹
Piridoxina (B6)	mg	0.06 ¹
Ácido ascórbico (C)	mg	22-25 ²
Ac. Pantoténico (B5)	mg	0.9 ²

Fuente:

¹ Instituto Nacional de Nutrición (INN), 2001

² Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (I.C.M.S.F.), 2004.

3.6 Usos medicinales de *Annona muricata* L.

Annona muricata o guanábana tiene una larga historia de uso en la medicina herbal en las zonas tropicales de América del Sur y del Norte, así como en África occidental. Se ha reportado que las diferentes partes del fruto y del árbol ya sean hojas, semillas, raíces y corteza del árbol son utilizados para fines medicinales (Yang *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2017).

La pulpa de la guanábana es usada para combatir la diarrea, la disentería, problemas intestinales, dolor artrítico, neuralgia, fiebre, malaria, parásitos, reumatismo, uretritis entre otras. En cuanto a las hojas, estas son usadas en forma de decocción o cocidas para tratar cistitis, dolores de cabeza, abscesos, problemas hepáticos, artritis, neuralgia, reumatismo, diabetes, insomnio, catarro, antiflogístico y antiespasmódico. La corteza del tallo es utilizada para aliviar el estrés, diabetes, sedante, antihipertensivo, antiespasmódico, astringente, insecticida, para tratar la tos, el dolor y las enfermedades de la piel (Bradie & Schauss, 2010; Loannis *et al.*, 2016; Sousa, 2010; TDRG, 2002).

Las semillas trituradas se cree que tienen actividades antihelmínticas contra gusanos y parásitos externos e internos. La flor se emplea contra el catarro, mientras que se cree que la corteza de la raíz presenta actividades antiflogísticas y antihelmínticas (Adewole, 2009; Frausin *et al.*, 2014).

Los múltiples usos de *A. muricata* en la medicina natural han sido validados a través de la investigación científica. En las diferentes partes del fruto y árbol se han reportado compuestos bioactivos con propiedades hipoglucémicas, hipolipidémicas, hipotensivas, antiinflamatorias entre otras propiedades farmacológicas y bioquímicas debido a su poder antioxidante (Ojewole, 2005; TDRG, 2002; Gavamukulya *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Adefegha *et al.*, 2015).

La pulpa de guanábana ha demostrado presentar diferentes antioxidantes, como los polifenoles, flavonoides, alcaloides, carotenoides, terpenoides, alcaloides, esteroides, saponinas, entre otros, los cuales pueden ayudar a proteger los daños celulares del estrés oxidativo y reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Adefegha *et al.* 2015; Adewole & Ojewole, 2009; Edeoga *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2014).

4. Problema de investigación

A nivel mundial, se estima que 151 millones de niños se ven afectados por el retardo en el crecimiento (Tessema *et al.*, 2018), el cual se encuentra influenciado por una serie de factores destacando los genéticos, hormonales y ambientales, dentro de los cuales la nutrición llega a jugar un papel fundamental por ser indispensable para desarrollar los procesos de desarrollo óseo y muscular (Wei & Gregory, 2009; Thomis & Towne, 2006).

El desequilibrio en la ingesta de macro y micronutrientes desencadena desnutrición resultando en un problema de salud pública que aqueja a la humanidad (Tessema *et al.*, 2018). Por tanto, combatirlo es uno de los mayores desafíos sanitarios a escala mundial, no obstante, es indispensable contar con alimentos de calidad que sean capaces de aportar los nutrientes necesarios para generar un crecimiento adecuado (Rytter *et al.*, 2017). Diversos estudios han caracterizado a la guanábana como un fruto con macro y micronutrientes así como con diversos compuestos bioactivos que posibilitan su potencial para contribuir positivamente la salud (Yang *et al.*, 2015; Adefegha *et al.*, 2015; Loannis *et al.*, 2016), sin embargo, su efecto sobre la ganancia de peso, el crecimiento femoral e indicadores bioquímicos no han sido estudiados. Por lo que es necesario realizar ensayos experimentales para probar su seguridad mediante pruebas nutricionales en modelos animales que verifiquen su efecto nutricional sobre el crecimiento. Por lo anterior, la pregunta de investigación de este trabajo es:

¿Las dietas formuladas con harina de pulpa de guanábana tienen efectos positivos sobre la ganancia de peso y el crecimiento femoral de ratas Wistar?

5. Justificación

El estudio de frutos no convencionales es un tema de investigación de gran importancia, ya que a partir de ellos se pueden tener diversos materiales que aporten beneficios en los consumidores. La mayoría de estos frutos han sido poco estudiados a profundidad, por lo que algunos no son aprovechados adecuadamente. Un ejemplo son estos frutos es la guanábana (*Annona muricata L.*) y México es uno de los principales productores.

Diversos autores han reportado un alto valor nutritivo en la guanábana debido al contenido de carbohidratos, proteína, fibra dietética, grasa, minerales, vitaminas, así como diversos antioxidantes los cuales se aprovechan en diversas funciones del organismo. Por lo que dichos nutrientes complementados con otras fuentes pueden prometer diversos beneficios en las diferentes etapas de la vida destacando el crecimiento en la infancia y adolescencia.

Aún con esta evidencia, hasta el momento no se cuenta con estudios que evalúen los efectos del consumo de pulpa deshidratada sobre el crecimiento en peso y longitud e indicadores bioquímicos, pues la mayoría de los estudios se centran en extractos de semillas, cáscara y hojas del fruto aplicados a diversas patologías.

Por lo anterior, es justificable realizar un ensayo experimental en ratas Wistar alimentadas con dietas suplementadas con harina de pulpa de guanábana, para evaluar su posible efecto en el crecimiento, mediante la medición de la ganancia de peso y el incremento en la longitud en hueso femoral.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Explorar el efecto del consumo de dietas adicionadas con harina de pulpa de guanábana (*Annona muricata L.*) sobre el crecimiento de la rata Wistar.

6.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar químicamente la harina de pulpa de guanábana para establecer la formulación de las dietas problema.
- 2) Realizar un estudio experimental piloto para verificar la inocuidad de las dietas.
- 3) Cuantificar el incremento de peso corporal y el crecimiento de fémur en ratas para evaluar los efectos del consumo de dietas a base de harina de pulpa de guanábana sobre estos indicadores.
- 4) Determinar el efecto del consumo de las dietas (estándar (LabDiet 5008); AOAC; guanábana-AOAC; guanábana-AOAC-lipídica) sobre el consumo de energía y de agua, la excreción de heces, la glicemia y lipemia de los sujetos de estudio.

7. Diseño metodológico

7.1 Tipo de estudio

En la Figura 3 se presenta el diagrama general de la metodología empleada para el estudio, el cual consistió en 2 fases. En la primera (1) se realizó una caracterización químico proximal a la harina de guanábana. En la segunda fase (2) se realizó, en ratas Wistar, un estudio experimental longitudinal que abarcó una prueba piloto de 10 días de duración y una prueba definitiva, con duración de 50 días aproximadamente.

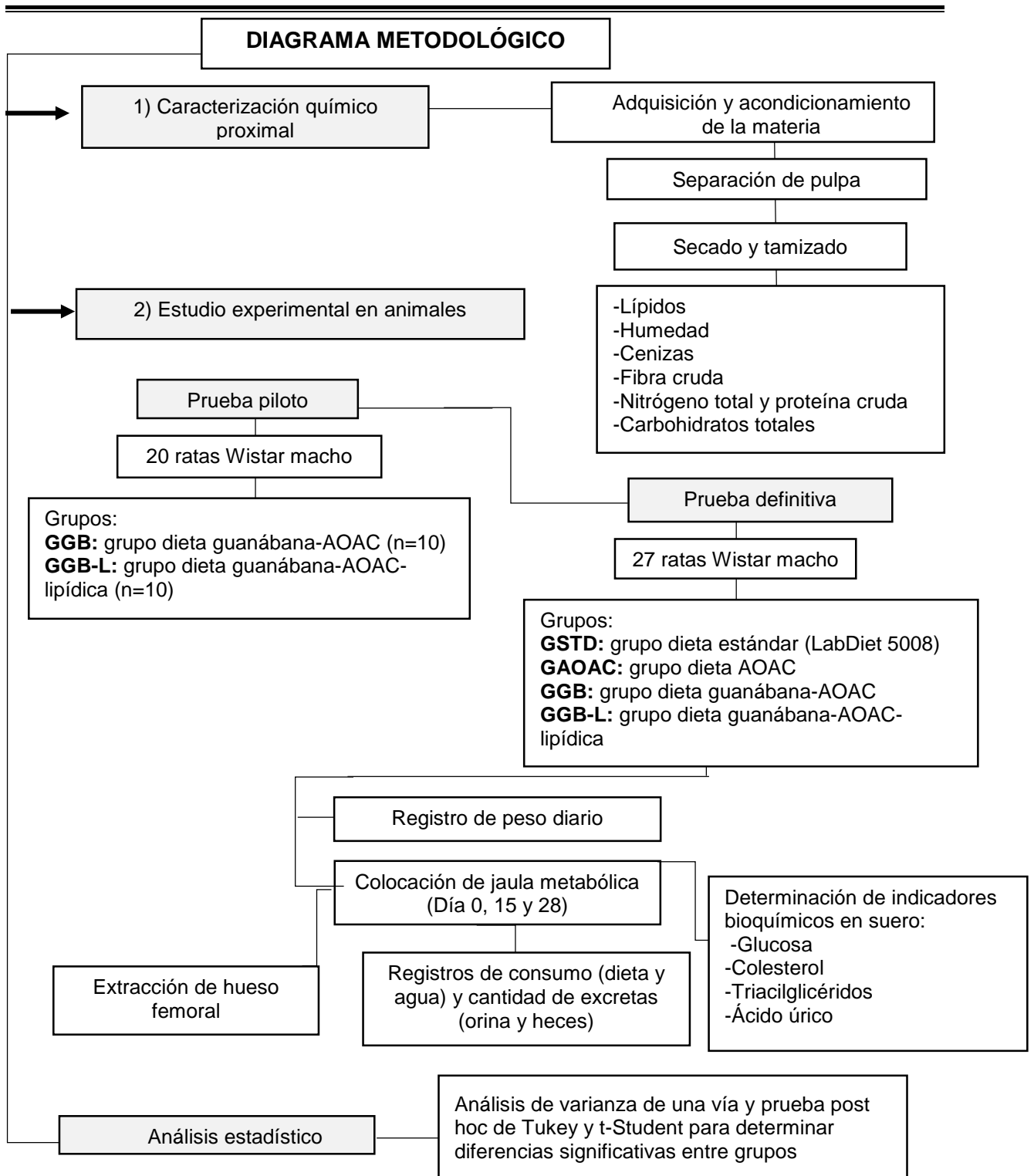


Figura 3. Diseño metodológico de la investigación

7.2 Adquisición y Acondicionamiento de materia prima

Para la caracterización del análisis químico proximal (AQP) y la formulación de dietas de la prueba piloto y de la prueba definitiva, se utilizaron frutos de guanábana (*Annona muricata L.*) los cuales fueron adquiridos en un mercado local de la Ciudad de México. Se eligieron aquellos frutos grandes, de forma característica, con un estado de madurez hortícola, firmes, libres de daños físicos (magulladuras o cortes) y de plagas o patógenos (Ávila *et al.*, 2012). Los frutos fueron transportados al laboratorio de Alimentos Funcionales y Toxicología de Alimentos en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, se enjuagaron al chorro del agua, posteriormente con agua destilada y finalmente se secaron con papel absorbente (Figura 4).



Figura 4. Frutos de guanábana posterior a su lavado.

Las guanábanas se pesaron en una balanza granataria (Luzeren® México), posteriormente fueron escaldadas a 70 °C por 20 minutos (Ramírez-Méndez *et al.*, 2012) y colocadas en condiciones de refrigeración (4 °C) dentro de bolsas de plástico herméticas (Ziploc®, SC Johnson) hasta su procesamiento; el tiempo de permanencia en refrigeración no fue mayor a tres días. La pulpa se separó manualmente de las semillas y de la cáscara y se colocó dentro de un extractor comercial (Standard, Turmix®, México). La pulpa recuperada después de la extracción, se colocó en charolas de plástico y se secó a 50 °C en estufa de tiro forzado (Thermolab Scientific

Equipments, Maharashtra India) aproximadamente 24 h. La pulpa seca fue molida en licuadora, refinada en mortero de porcelana y tamizada utilizando una malla del no. 30 para un tamaño de partícula de 0.595 mm. La harina de pulpa de guanábana obtenida se colocó en frascos de vidrio color ámbar perfectamente sellados y se almacenó en refrigeración hasta su uso.

7.3 Caracterización del análisis químico proximal

Para llevar a cabo esta caracterización del análisis químico proximal (AQP) se trabajó con 9 frutos a los que se les realizó el acondicionamiento explicado en la sección anterior. Cada fruto, se analizó por triplicado. Se emplearon métodos oficiales de análisis “Association of Official Analytical Chemists” por sus siglas en inglés AOAC (1995) para llevar a cabo las determinaciones de extracto etéreo (lípidos), humedad, cenizas, fibra cruda, proteína y carbohidratos por diferencia; al final los datos se convirtieron a base fresca. Los equipos con los que se trabajó fue con una estufa (Boekel Scientific, E.U), aparato de extracción Soxhlet (compuesto por condensador tipo Allihn y matraz de fondo plano), parrilla de 6 bases (Lab line multi unit extraction heater) y de una base (LabTech, E.U), mufla (Hobersal, Barcelona España), equipo Kjeldahl: digestor con extracciones de vapor, tubos y destilador (FOSS Tecator, Suecia), estufa (Thermolab Scientific Equipments, Maharashtra India), para el pesaje de los materiales se utilizó una balanza analítica Sauter (Alemania).

7.3.1 Extracto etéreo

Se utilizó el método de la AOAC 7.062 para la extracción de sustancias lipídicas. Se pesaron 2 gramos de muestra deshidratada y se transfirieron a un papel filtro de poro fino, posteriormente se colocó dentro del aparato de extracción Soxhlet y se conectaron los matraces de fondo plano (llevados previamente a peso constante con 3-4 perlas de ebullición) con el condensador para así agregar éter de petróleo por el extremo superior del refrigerante en cantidad suficiente (alrededor de 80 ml). Se hizo circular el agua por el condensador y se llevó a reflujo por 12 horas a una velocidad de 2-3 gotas por segundo. Pasado el tiempo de reflujo, se comprobó que la muestra no tuviera residuos de lípidos, se suspendió el calentamiento y se recuperó el éter de petróleo (Figura 5).

Los matraces se llevaron a peso constante (90°C) en estufa y se colocaron dentro de un desecador por 1 h para finalmente pesarlos.



Figura 5. Aparato de extracción Soxhlet

Se calculó el extracto etéreo conforme a la siguiente fórmula:

$$\% EE = \frac{B - A}{M} \times 100 \quad \text{Fórmula 1}$$

Donde:

EE%: Porcentaje de extracto etéreo

A: matraz a peso constante (g)

B: matraz con extracto etéreo (g)

M: peso inicial muestra (2 g)

7.3.2 Humedad en muestra desengrasada

Para esta determinación se empleó el método 14.003 del A.O.A.C., se usó una muestra libre de lípidos, la cual fue referida en el texto como muestra desengrasada, obtenida en la determinación anterior. En crisoles a peso constante, se agregaron 500 mg de muestra, se registró peso y se realizó una deshidratación en estufa a 50 °C por 12 horas, posteriormente se llevaron a peso constante a una temperatura 90 °C-100 °C en estufa durante 24 h. Finalmente se colocaron en un desecador durante 1 hora y se registraron los pesos. Se calculó el porcentaje de humedad:

$$\% H = \frac{PI - PF}{PI - PC} \times 100 \quad \text{Fórmula 2}$$

Donde:

%H: Porcentaje de humedad

PI: Peso de crisol con muestra fresca (g)

PF: Peso final del crisol con muestra seca (g)

PC: Peso de crisol sin muestra (g)

7.3.3 Cenizas en muestra desengrasada

El material mineral se cuantificó (método 14.063 AOAC) utilizando las muestras obtenidas en la determinación de humedad. Los crisoles se precalcinaron a fuego directo utilizando un mechero bunsen hasta que no desprendieron humo. Posteriormente se calcinaron en mufla a 600 °C por 3 horas, para después descender la temperatura a 100 °C y colocarlas en un desecador por una hora y finalmente pesarlas. Se calculó el porcentaje de cenizas:

$$\% C = \frac{B - A}{M} \times 100 \quad \text{Fórmula 3}$$

Donde:

%C: Porcentaje de cenizas

A: Peso del crisol vacío a peso constante (g)

B: Peso final del crisol con cenizas (g)

M: Peso de muestra seca determinada en humedad (peso de crisol con muestra seca-crisol a peso constante)

7.3.4 Fibra cruda en muestra desengrasada

Esta determinación se realizó de acuerdo con el método 7.068, de la AOAC. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 500 mg de muestra seca, se adicionaron 0.5 g de ácido tricloroacético, 1.25 mL de ácido nítrico concentrado y 17.5 mL de ácido acético al 70%. Se llevó a un sistema de reflujo utilizando un condensador el cual se conectó con el matraz y se llevó a calentamiento por 30 minutos, moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas a las paredes. Posteriormente, el producto obtenido se filtró por medio de vacío utilizando crisoles Gooch (a peso constante), se lavó el residuo con agua destilada caliente hasta que se eliminó por

completo el ácido acético. Los crisoles Gooch fueron llevados a estufa a 90° C por 12 h, se colocaron en desecador (1 h) y se pesaron. Posteriormente los crisoles fueron llevados a mufla por 3 h a 600 °C, descendiendo la temperatura a 100 °C se sacaron y se colocaron dentro del desecador (1 h) para finalmente pesarlos. El porcentaje de fibra cruda se cuantificó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% FC = \frac{(Pr - Pc) - (Pf - Pc)}{M} \times 100$$

Fórmula 4

Donde:

% FC = Porcentaje de fibra cruda

Pr = Peso inicial del crisol Gooch con muestra desengrasada (g)

Pf = Peso final de crisol Gooch con cenizas a peso constante (g)

Pc = Peso del crisol Gooch a peso constante (g)

M = Peso de la muestra desengrasada

7.3.5 Nitrógeno total y proteína cruda en muestra desengrasada

Para la cuantificación de nitrógeno total se utilizó el método Kjeldahl (1883) descrito por el AOAC 42.014 (1995). En tubos microkjeldahl se agregaron 2 gramos de mezcla catalizadora (K₂SO₄) y 2.5 mL de ácido sulfúrico para obtener un blanco. Para las muestras se adicionaron en otros tubos 40 mg de muestra seca desengrasada con mezcla catalizadora (K₂SO₄) y ácido sulfúrico (2.5 mL). Los tubos fueron colocados dentro del digestor con extracciones de vapor y se llevó a ebullición por 2 horas hasta que la mezcla clarificó, posteriormente los tubos se dejaron enfriar (figura 6A).

El residuo obtenido se llevó al equipo de destilación por arrastre de vapor, colectando entre 75-100 mL (Figura 6B), posteriormente se tituló con HCl 0.01 N hasta que se observó un vire de color azul claro a transparente.

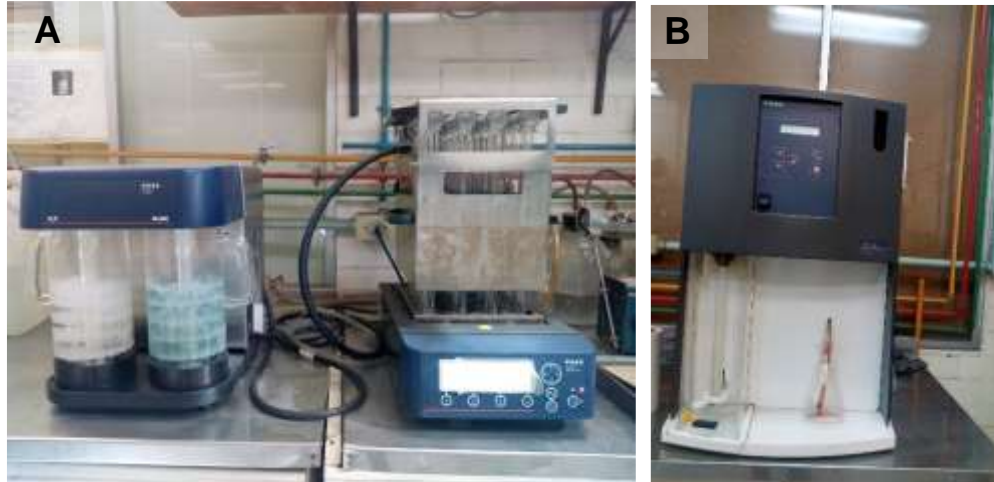


Figura 6. Equipo Kjeldahl
(A) Digestor; (B) Destilador.

Se calculó nitrógeno total:

$$\% N = \frac{(V_2 - V_1)(eqN) N}{M} \times 100 \quad \text{Fórmula 5}$$

Donde:

% N = Porcentaje de nitrógeno total

V_1 = Volumen de HCl gastado en titular el blanco (ml)

V_2 = Volumen de HCl gastado en titular la muestra (ml)

eqN = 14.007

N = Normalidad de HCl (0.01 N)

M = Peso de la muestra (40 mg)

Para conocer el valor de proteína cruda a partir del contenido de nitrógeno total se utilizó el factor 6.5 utilizado para frutos de esta naturaleza (NMX-F-068-S-1988).

Se calculó proteína cruda:

$$\% PC = (\% N)(f) \quad \text{Fórmula 6}$$

Donde:

% PC. = Porcentaje de proteína cruda

% N = Porcentaje de nitrógeno total

F= Factor de conversión (6.5)

7.3.6 Carbohidratos totales

Los carbohidratos se estimaron por diferencia respecto a las determinaciones anteriores (León-Méndez *et al.*, 2016) como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Carbohidratos totales} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ ceniza} + \% \text{ Fibra})$$

Fórmula 7

7.4 Evaluación del efecto en el crecimiento

7.4.1 Animales de experimentación, condiciones de alojamiento y cuestiones éticas

El estudio se llevó a cabo en ratas Wistar macho sanas (45-55 g, 21 días de edad). Todos los procedimientos se realizaron en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-CINVESTAV). Los animales fueron alojados individualmente en jaulas colgantes de experimentación con rejillas al piso para evitar coprofagia, todo esto bajo condiciones controladas (temperatura 22 ± 1 °C, ciclos de luz-oscuridad de 12 h c/u y humedad relativa 40-70 %) (Figura 7A). En el momento que señala el protocolo experimental los animales fueron alojados en jaulas metabólicas por 24 hrs (Figura 7B).

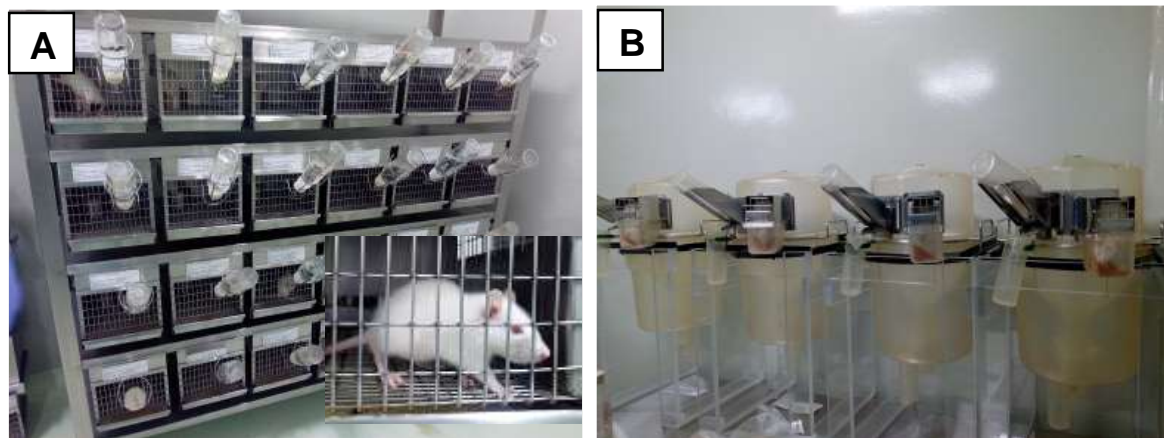


Figura 7. Colocación de ratas en jaulas de acero inoxidable (A) y jaulas metabólicas (B).

El protocolo experimental se ejecutó con base en lo establecido por la NOM-069-ZOO-1999 y bajo la autorización por la Comisión de ética designada por la UPEAL, no obstante, dicha carta de aceptación no se encuentra anexada debido a la inaccesibilidad derivados de la suspensión de labores por la contingencia de salud.

Durante la experimentación se realizó la observación clínica diaria y se evaluó el estado general de los animales. Se prestó particular atención a la aparición de diarrea, cambios en piel y pelaje, así como cualquier alteración de los sistemas respiratorio y circulatorio, de igual forma se analizó el patrón de comportamiento, temblores, convulsiones, salivación y sueño (National Research Council, 2011).

7.4.2 Elaboración de dietas

Se utilizaron 4 dietas las cuales fueron proporcionadas a los roedores en forma de harina: dieta Estándar, dieta AOAC (1992), dieta Guanábana-AOAC y dieta Guanábana-AOAC lipídica.

Como dieta estándar se utilizó Lab-Diet 5008 ®, (USA, comercial) la cual fue molida en licuadora (Oster, E.U.) y refinada en mortero, para posteriormente tamizarla en una malla del no. 30 para un tamaño de partícula de 0.595 mm. Las demás dietas fueron elaboradas semanalmente en el laboratorio y de manera artesanal. Se almacenaron a 4°C dentro de frascos ámbar con el fin de evitar enranciamiento y contaminación ambiental. La dieta AOAC se formuló de acuerdo con la metodología AOAC (1992). La dieta Guanábana-AOAC contenía 50% de dieta AOAC y 50% de harina de guanábana, mientras que la dieta guanábana-AOAC lipídica contenía 41.67 % de dieta AOAC, 41.67% de harina de guanábana y 16.66 % extra de lípidos (aceite de maíz de la marca Mazola). Todas las dietas elaboradas fueron ajustadas al 100% del requerimiento diario de vitaminas y minerales, para lo cual se usó una mezcla de vitaminas y mezcla de minerales de la marca Teklad Test Diets® (USA). En la Tabla 3 se presenta la composición de las dietas y su contenido de energía.

Tabla 3. Composición de las dietas proporcionadas g/100 g de dieta

Componentes	Estándar	AOAC	Guanábana	
			-AOAC	Guanábana-AOAC lipídica
Proteína	23	10	10	8.4
Lípidos	6.5	8	8	23.3
Carbohidratos	58.5	75	75	62.5
Fibra	4.0	1	1	.84
Minerales	6.8	5	5	4.16
Vitaminas	NR	1	1	.83
Kcal/g	3.84	4.12	4.12	4.9

NR: no reportado

7.4.3 Prueba piloto

Para descartar la posibilidad de que las dietas guanábana-AOAC y guanábana-AOAC lipídica no presentaran algún daño o toxicidad en los individuos, se realizó esta prueba en la que se evaluaron 10 ratas por dieta. La preparación de la materia prima para la elaboración de las dietas, se describe en el apartado 8.2 de esta sección, sin embargo, cabe destacar que para esta prueba el proceso de escaldado en los frutos no se realizó. Previo a la exposición de las dietas, los animales cursaron un periodo de adaptación a las condiciones de alojamiento y al tipo de presentación del alimento, proporcionándolo en forma de harina (alimento Lab Diet 5008) *ad libitum*, el cual tuvo una duración de 6 días.

Posterior al periodo de adaptación, los animales se seleccionaron y se dividieron de manera aleatoria en 2 grupos de 10 integrantes: grupo dieta guanábana-AOAC (GGB) y grupo dieta guanábana-AOAC lipídica (GGB-L); se alojaron en jaulas colgantes de acero inoxidable. Los animales fueron pesados diariamente en una balanza granataria (Ohaus, U.S.A.). Se les proporcionó la cantidad de alimento (g) correspondiente al 10% de su peso corporal y agua *ad libitum*. La duración de la prueba fue de 10 días donde los animales fueron observados para descartar signos clínicos o conductuales de enfermedad. Cuando estos signos fueron evidentes, los animales fueron sacrificados por sobredosis de Ketamina y Xilacina (PISA) administrada por vía intramuscular de

acuerdo a los protocolos establecidos por la NOM-069-ZOO-1999. Posteriormente los órganos se examinaron de manera macroscópica, especialmente los de la cavidad abdominal.

7.4.4 Prueba definitiva

Para este estudio se utilizaron 27 ratas Wistar macho (45-55 g, 21 días de edad), bajo las condiciones de alojamiento y del periodo de adaptación ya descritas en el apartado 7.5.1 de esta sección. El experimento tuvo una duración de 28 días los cuales fueron precedidos de 6 días de adaptación. Culminado el periodo de adaptación, se seleccionaron de manera aleatoria tres ratas y se colocaron en jaulas metabólicas por 24 horas suministrando alimento estándar en una cantidad equivalente (10% de su peso corporal) y agua (*ad libitum*). Al término de las 24 horas los animales fueron pesados y se registraron los consumos de alimento y agua y la cantidad de excretas (orina y heces). Posteriormente se dejaron en ayunas por 6 horas proporcionando únicamente agua *ad libitum*. Los animales fueron anestesiados administrando intramuscularmente una mezcla de Ketamina-Xilacina (50 mg/kg: 6 mg/kg), posteriormente fueron exanguinados por punción cardiaca con el fin de obtener muestras sanguíneas para llevar a cabo las determinaciones bioquímicas (glucosa, triacilglicéridos, colesterol total y ácido úrico). Inmediatamente se realizaron observaciones macroscópicas en todos los órganos de la cavidad abdominal para verificar la integridad de los órganos. Adicionalmente, se obtuvieron huesos femorales de ambas patas traseras. Posteriormente se formaron aleatoriamente 4 grupos experimentales de seis individuos cada grupo:

GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008)

GAOAC= grupo dieta AOAC

GGB= grupo dieta guanábana-AOAC

GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica

Los animales fueron pesados diariamente con balanza granataria (Ohaus, US.A.) para poder administrar el alimento de acuerdo al 10% del peso corporal y agua *ad libitum*. En la semana 2 y al finalizar la experimentación (semana 4) tres individuos de cada grupo fueron seleccionados al azar y colocados en jaulas metabólicas por 24 horas,

llevando a cabo todo el procedimiento que se indicó anteriormente (registro de consumos, y excretas, obtención de muestras sanguíneas y huesos femorales).

7.4.5 Registros de peso, consumos y excretas

Desde el inicio de la experimentación se tomó un registro diario de los pesos corporales de cada rata con la finalidad de observar cambios en la ganancia o pérdida de peso de los animales en los diferentes grupos.

La determinación del consumo de dietas y la cantidad de las excretas (heces), se realizó cuando los animales fueron colocados en jaulas metabólicas lo que permitió recolectar la dieta no consumida (calculado de esta manera el consumo real de alimento en gramos) así como las heces. El pesaje se realizó en una báscula granataria (Luzeren ®, México). El volumen de orina y consumo de agua se registró recuperando los frascos provenientes de las jaulas los cuales se encontraban previamente graduados (mL).

7.4.6 Disección y medición de fémur

Los fémures (izquierdo y derecho) de las patas traseras fueron obtenidos cada vez que los animales fueron colocados en jaulas metabólicas con la finalidad de verificar el crecimiento de los animales, la disección se realizó a través de cirugía de cuchillas, cortando entre la cabeza del fémur y el acetábulo del ilion y el isquion. Posteriormente se separó la pata trasera retirando los huesos de la fíbula, la tibia y el tarso. Obtenidos los fémures se eliminó todo el tejido adherido al hueso. Se secaron a temperatura ambiente y se midió en cada fémur la longitud desde la cabeza del fémur hasta el cóndilo, usando un Vernier (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Japón).

7.4.7 Determinación enzimática de indicadores bioquímicos

La obtención de sangre y orina para el análisis de los indicadores bioquímicos de los animales se realizó después de la exanguinación por punción cardiaca. Las muestras, procesadas el mismo día de la toma, fueron colocadas en tubos para centrífuga (15 mL/16 x 100 mm) y puestas en una centrífuga universal 320R (Hettich Zentrifugen, Medellín Colombia), a una velocidad de 3500 rpm (10 min) para obtener el suero; las

muestras de orina se centrifugaron a 2500 rpm (7 min) con el fin de retirar la mayor cantidad sólidos. Para dichas determinaciones bioquímicas se utilizaron kits comerciales de Spinreact siguiendo las indicaciones metodológicas del fabricante, en suero se cuantificó: glucosa (referencia de kit 1001201), triacilglicéridos (referencia de kit 1001310) y colesterol total (referencia de kit 1001092), mientras que en orina se determinó ácido úrico (referencia de kit 41001).

7.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa Minitab (para Windows, versión 17.0, Chicago, USA); para la representación de gráficos se utilizó SigmaPlot versión 14 para Windows (San José, CA, USA). Los resultados de cada determinación del AQP y de las demás determinaciones, se presentaron como medias \pm desviación estándar. Para evaluar el efecto de las distintas dietas ensayadas, sobre las variables: peso corporal, consumo de alimento y agua, cantidad de excretas e indicadores bioquímicos, se utilizó un ANOVA de una vía utilizando un análisis post hoc de Tukey y para evaluar las diferencias de longitud de fémur se utilizó una prueba t-Student, considerando para todas las variables un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

8. Resultados y discusión

8.1 Análisis químico proximal de la materia prima

La pulpa de guanábana (Tabla 4) reportó mayoritariamente un alto contenido de carbohidratos (70.84 ± 2.24 %), de acuerdo con Badui (2006) menciona que la concentración puede llegar a ser muy variable ya que la fruta con un grado de madurez alto contiene más azúcar pues los hidratos de carbono complejos (almidones) se descomponen en hidratos más simples conforme aumenta la maduración. En cuanto a humedad el resultado obtenido fue de 14.80 ± 0.57 %, diversos autores (Céspedes & Cary, 1998; Degnon *et al.*, 2013) refieren que el contenido de humedad depende de las condiciones ambientales y de cultivo a las que ha estado sometido el fruto, siendo que un alto contenido de agua alienta al crecimiento microbiano y por ende su deterioro. En cuanto a la composición de lípidos, Sharma *et al.* (2016) refieren que la mayoría de frutos contienen cantidades insignificantes de este macronutriente; acorde lo obtenido (0.53 ± 0.07 %) se comprobó que este fue muy bajo. Finalmente en proteína se obtuvo un contenido de 5.99 ± 1.26 %, fibra cruda de 5.06 ± 0.44 % y cenizas de 2.76 ± 0.43 %. Pérez-Grana (2013), Caballero & Paredes (2017) mencionan que las variaciones en los componentes (humedad, proteínas carbohidratos, lípidos y cenizas) dependen de las condiciones climáticas, la variedad, el grado de maduración y las operaciones agrícolas. Por tanto, la pulpa de guanábana presentó como componentes mayoritarios carbohidratos (70.84 ± 2.24 %) agua (14.80 ± 0.57 %), seguido de proteína (5.99 ± 1.26 %) y fibra cruda (5.06 ± 0.44 %) siendo los más escasos lípidos (0.53 ± 0.07 %) y cenizas (2.76 ± 0.43 %).

Tabla 4. AQP en pulpa de guanábana en 100 g.

Componentes	Base seca
Humedad (agua)	14.80 ± 0.57
Lípidos (extracto etéreo)	0.53 ± 0.07
Proteína	5.99 ± 1.26
Carbohidratos (por dif.)	70.84 ± 2.24
Fibra cruda	5.06 ± 0.44
Cenizas	2.76 ± 0.43

8.2 Evaluación del efecto en el crecimiento

8.2.1 Ensayo piloto

Como se mencionó en la parte metodológica, la prueba piloto solo se realizó para los grupos que recibieron alimento a base de harina de guanábana, es decir, el GGB y el GGB-L. Por otra parte, cabe recordar, tal como se indica en la metodología, que, para la elaboración de las dietas proporcionadas, los frutos no fueron escaldados.

8.2.2 Observaciones clínicas y macroscópicas

Durante la ejecución de la prueba se observó que las ratas pertenecientes al GGB y GGB-L, manifestaron un estrés significativo el cual fue aumentando con el paso de los días: los animales se mostraron encorvados, aislados y agresivos, de igual manera se notó un consumo disminuido en agua y alimento por parte de ambos grupos, sin embargo, ninguno de estos mostró caída de pelo.

El peso corporal de los animales disminuyó de forma drástica (Tabla 5), presentándose la pérdida desde el inicio de la prueba: del día 1 al 2 disminuyó cerca del 11.7% en GGB y 15.27% en GGB-L.

Tabla 5. Pesos corporales promedios (g) por día experimental durante la prueba piloto

Día	Grupo	
	GGB	GGB-L
1	55.7 ± 3.89 n=10	57.42 ± 3.09 n=10
2	49.15 ± 4.03 n=10	48.65 ± 4.06 n=10
3	45.7 ± 4.52 n=10	46.02 ± 4.15 n=10
4	40.89 ± 5.22 n=10	44.88 ± 3.57 n=10
5	40.31 ± 4.46 n=7	42.31 ± 3.56 n=10
6	40.7 ± 5.46 n=4	42.46 ± 2.86 n=8
7	40.67 ± 5.21 n=4	44.67 ± 3.11 n=8
8	43.85 ± 6.43 n=2	45.51 ± 3.36 n=8
9	45.5 ± 5.66 n=2	45.21 ± 3.35 n=8

n=número de animales

GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-Lipídica

Día a día el peso corporal de los sujetos de ambos grupos continuó disminuyendo siendo más alta la pérdida en el GGB. En el quinto día se presentó la muerte de una rata proveniente del GGB. Después de realizar la incisión para la exposición del sistema digestivo se observó necrosis en esófago, estómago y en los intestinos principalmente en el intestino delgado en la porción del duodeno y yeyuno, lugar donde se tiene la mayor absorción de los nutrientes (Jang *et al.*, 2018). Al día subsecuente (día 6) sobrevino la muerte de una rata más del grupo GGB y de 2 sujetos del GGB-L. En todos los casos mortales se observó necrosis en esófago, estómago e intestino delgado. Conforme avanzaron los días, los animales de ambos grupos fueron muriendo, observando el efecto tóxico letal más evidentemente en el GGB (Figura 8), lo cual probablemente se debió a que este grupo recibió en su dieta, una mayor

proporción de harina de guanábana en comparación con la dieta del grupo GGB-L (50% vs 41.67%, respectivamente).



Figura 8. Necrosis observada en esófago, estómago e intestino delgado
Sujetos experimentales en el día 5 (GGB) y 6 (GGB-L) de la prueba piloto.
GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-
Lipídica

El tiempo contemplado para la prueba era de 10 días, no obstante, por cuestiones éticas (NOM-062-ZOO-1999), los animales fueron sacrificados en el noveno día para evitar prolongar el sufrimiento del animal. Las observaciones de la prueba piloto denotan un innegable efecto tóxico de la harina de guanábana que recibieron los animales en su alimento. Degnon *et al.* (2013) reportaron en pulpa fresca de guanábana compuestos antinutricionales como oxalatos (6.57 %) y fitatos (2.78 %), sin embargo, mencionaron que dichos valores se encontraban por debajo del nivel tóxico. Por otra parte, Lombor *et al.* en el 2014 informaron contenidos bajos de fitatos, taninos, cianuros y oxalatos en harina de pulpa de guanábana (secada en horno a 50° C). De igual manera Saripalli & Dixit (2016) mencionaron en extractos de pulpa presencia de fitatos (0.17 mg/mL), saponinas (0.97 mg/mL), alcaloides (0.24 g/5 g) y oxalatos (68.8 mg/mL), sin embargo, mencionan que estas bajas concentraciones parecen ser seguras al consumo. No obstante, los autores refieren la necesidad de establecer investigaciones adicionales por un periodo prolongado para comprobar que

no exista un efecto tóxico en el consumidor. Este efecto tóxico fue observado en esta prueba.

Se ha reportado que un alto consumo de los fitatos y taninos provocan la deficiencia de varios micronutrientes ya que forman complejos con proteínas, polisacáridos, vitaminas y minerales como el hierro y zinc, haciendo que estos no sean biológicamente disponibles para la absorción y utilización humana. El ácido oxálico y el ácido fítico (fitatos) pueden presentarse como sales solubles de potasio y sodio o como sales insolubles de calcio, magnesio o hierro o bien como una combinación de sales solubles e insolubles formando quelatos fuertes con calcio e inhibiendo de igual manera la absorción de estos minerales esenciales (Essack *et al.*, 2017; Olawoye *et al.*, 2017; Akwaowo, *et al.*, 2000). La evidencia mostrada en esta prueba indica que el consumo de harina de guanábana no escaldada produce toxicidad notoria con signos y síntomas clínicos característicos (fatiga, pérdida de peso, dolor abdominal, retraso en el crecimiento y alteraciones en la coagulación) (Cameán & Repetto, 2006; Sotelo *et al.*, 2009) y una evidente necrosis en esófago, estómago e intestino delgado. Debido a limitaciones técnicas del laboratorio no se realizó una necropsia más descriptiva de los animales por lo que se desconoce la causa de sus muertes. Como potencialidades de este estudio sería la identificación de los compuestos químicos antinutricionales presentes en la harina de guanábana y probar su toxicidad *in vitro*.

8.3 Prueba definitiva

En este estudio, para la elaboración de la harina, se realizó un escaldado del fruto tal y como se indica en la metodología, con el fin de inactivar los compuestos antinutricionales.

8.3.1 Ganancia de peso corporal en ratas

Durante los 28 días de experimentación, se evaluó el crecimiento en las ratas Wistar mediante su pesaje diario, los resultados (Tabla 6) promedios mostraron que, de la toma inicial a la semana 1, los animales del GSTD incrementaron de peso mientras que los grupos restantes disminuyeron el peso promedio, debido probablemente a que se encontraban adaptándose a la presentación de la dieta (harina). En la semana 2 no

se presentaron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre los grupos, sin embargo, de esa semana a la tercera el incremento fue más notorio en los animales del GSTD y el GAOAC, aunque no hubo diferencias significativas entre ellos.

Al finalizar la experimentación (semana 4) el GSTD mostró de manera significativa el mayor peso corporal (130.60 ± 15.72 g) respecto a los demás grupos ($p < 0.05$) quienes entre ellos, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 6. Peso promedio (g) de los animales por semana

Grupo	Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
GSTD	56.87 ± 2.83^b	57.62 ± 5.74^b	73.02 ± 9.58^a	99.61 ± 15.84^a	130.60 ± 15.72^a
GAOAC	55.93 ± 5.15^b	54.04 ± 6.94^b	66.29 ± 7.45^a	86.12 ± 10.35^{ab}	101.01 ± 10.69^b
GGB	64.17 ± 4.81^a	60.82 ± 6.13^{ab}	65.65 ± 8.62^a	76.90 ± 9.02^{ab}	86.26 ± 9.10^b
GGB-L	66.93 ± 4.90^a	65.73 ± 4.68^a	69.76 ± 3.76^a	74.86 ± 6.90^b	80.80 ± 8.20^b

Los valores se representan como media \pm DE. Las letras diferentes como superíndices dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0.05$), mientras que letras iguales, indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$)

GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica

Cossio Bolaños (2013) valoró el crecimiento en percentiles en función a la edad cronológica en ratas Wistar macho administrando alimento y agua *ad libitum*, conforme a los días de vida que tenían los roedores al final de la experimentación (56 días) de este estudio, el autor refiere que el peso saludable tuvo que ser aproximadamente de 263.3 gramos, siendo que un peso de 210.10 gramos en esa edad se interpreta como desnutrición y/o delgadez. Al comparar los resultados con este estudio, se observó que todos los pesos en todos los grupos se encontraron por debajo de lo que refiere el autor, sin embargo, cabe considerar que la administración del alimento en este estudio fue al 10 % de su peso y no *ad libitum*.

Por otra parte, Barbalho *et al.* 2012 realizaron un estudio en el cual administraron jugo de hoja de guanábana *ad libitum* y jugo de pulpa (0.5 ml por la mañana y 0.05 mL por la tarde) a ratas Wistar macho adultas con un peso aproximado de 250 g. Los autores reportan que al finalizar la experimentación (40 días), las ratas suministradas con jugos de hoja y pulpa de guanábana, presentaron ganancias de peso significativamente

menores en comparación con la del grupo control (agua *ad libitum*). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación donde se vio que, aunque existió una ganancia de peso en los grupos tratados con guanábana, esta ganancia fue significativamente menor a la ganancia observada en los animales del GSTD. Durante la observación se percibió una menor ingesta de dieta por parte de los animales pertenecientes a los grupos de guanábana ya que se notaron restos de alimento en los comederos (Figura 9).

De acuerdo con Martínez *et al.* (2006) las variables que llegan a determinar la cantidad de alimento que consumen los animales son: el tipo de alimento, el contenido calórico, el sabor, el olor o la textura, por lo que las dietas proporcionadas de guanábana pudieron presentar algún desequilibrio en estas variables. Por otra parte, cabe considerar que las desviaciones estándar fueron muy grandes.



Figura 9. Restos de alimento en comederos de ratas.

Se aprecia que ambos grupos con dietas con base de harina de guanábana no consumieron la totalidad del alimento suministrado.

GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica

Para una mejor percepción de los resultados anteriores, se presentaron curvas de crecimiento (Figura 10) donde se observa que efectivamente existe un aumento de peso lineal especialmente en el GSTD así como en el GAOAC, cabe mencionar que el alimento que consumieron los roedores del GSTD, es usado especialmente para el crecimiento de animales, lo que reflejaría la mayor ganancia de peso, sin embargo, los grupos GGB y GGB-L el crecimiento se presentó de forma más lenta. Lacerda *et al.*

(2006) mencionan que el retraso en el crecimiento existe principalmente cuando se presenta deficiencias nutricionales de energía, proteína y nutrientes, así como las malas prácticas en la preparación de alimentos, alimentos no aptos a las necesidades, los entornos, la genética e infecciones, lo que provoca la menor absorción de nutrientes en el intestino.

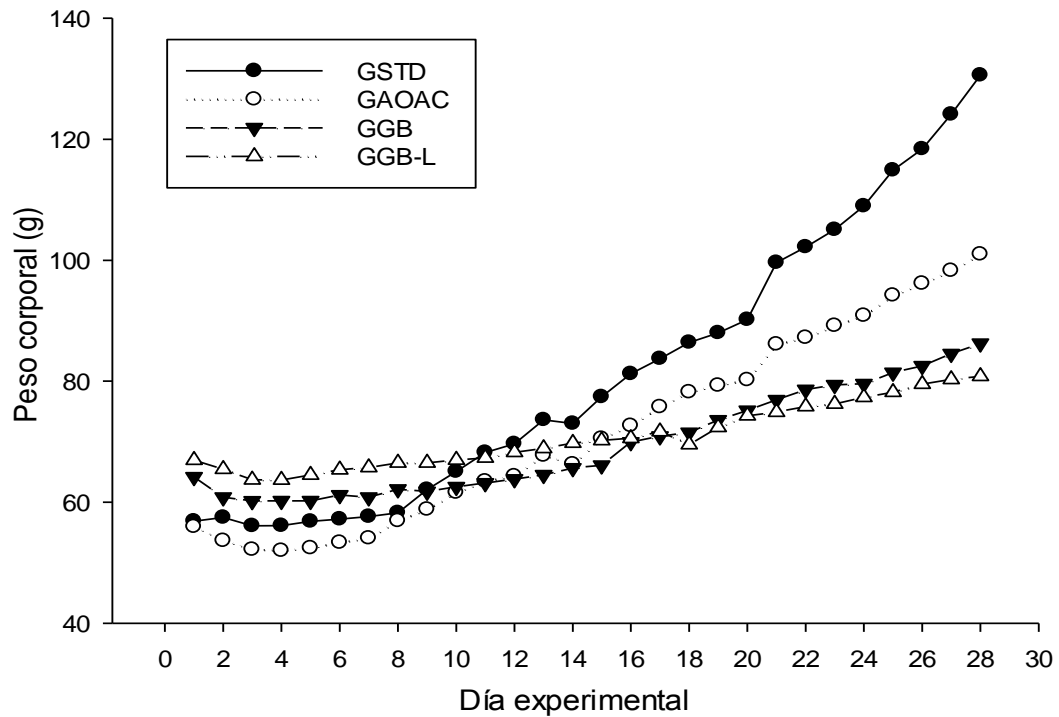


Figura 10. Incremento en peso en ratas Wistar durante el periodo experimental. GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica

Asimismo, las diferencias en el peso de los animales fueron fácilmente perceptibles mediante la observación física (Figura 11).



Figura 11. Fotografías representativas de sujetos experimentales. Dieta estándar LabDiet 5008 (GSTD) y grupo dieta guanábana-AOAC (GGB) al término de la semana 4. Como se puede apreciar, la rata del GSTD es visiblemente más grande y pesada que la del grupo GGB.

8.4 Crecimiento del fémur

La medición en la longitud de cada fémur (Figura 12) permitió evaluar el crecimiento lineal de las ratas Wistar. La medición fue realizada en ambas patas traseras, sin embargo, solo se presentan los datos de la pata derecha ya que no se observaron diferencias entre estas cuando se realizó una prueba t-Student ($p > 0.05$).



Figura 12. Representación de la medición de la longitud del fémur de un sujeto experimental con un vernier.

De acuerdo con la Tabla 7, la longitud inicial del fémur, al final del periodo de adaptación fue de 2.16 ± 0.05 cm (promedio de la longitud de 3 sujetos), al finalizar la semana 2, los animales del GSTD presentaron la mayor longitud femoral (2.59 ± 0.03 cm) no mostrando diferencias estadísticas ($p > 0.05$) respecto al GAOAC (2.58 ± 0.02 cm) pero sí respecto a los dos grupos de guanábana. La menor longitud se observó

en el GGB-L, la cual fue significativamente menor respecto a todos los grupos; al comparar la longitud promedio del fémur del GGBL con el valor inicial (2.16 ± 0.05 cm) solo incrementó 4.1 %, mientras que los grupos restantes incrementaron 19.9 % (GSTD), 19.4 % (GAOAC) y 10.1 % (GGB) respectivamente.

Tabla 7. Longitud (cm) de fémur de pata trasera derecha de ratas Wistar

Grupo	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		2.59 ± 0.03^a	2.80 ± 0.03^a
GAOAC	2.16 ± 0.05	2.58 ± 0.02^a	2.74 ± 0.03^a
GGB		2.38 ± 0.03^b	2.44 ± 0.02^b
GGB-L		2.25 ± 0.03^c	2.39 ± 0.00^b

Los valores se representan como media \pm DE. Las letras diferentes como superíndices dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0.05$), mientras que letras iguales, indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$). GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica

En la toma final (semana 4) las menores longitudes se presentaron en ambos grupos de guanábana, las cuales fueron significativamente menores a los GSTD y GAOAC. Al contrastar estos resultados con la ganancia de peso, efectivamente los grupos de guanábana, quienes presentaron menor crecimiento también mostraron el menor incremento de peso corporal. El GAOAC no arrojó diferencias estadísticas en la longitud de fémur respecto al GSTD (2.80 ± 0.03 vs 2.74 ± 0.03 cm, $p > 0.05$). Sin embargo, en ganancia de peso, el GSTD fue estadísticamente mayor respecto al GAOAC (130.60 ± 15.72 g vs 101.01 ± 10.69 g, $p < 0.05$). Para explicar estos resultados se debe considerar que el consumo de proteína en la dieta es de gran importancia para el crecimiento y el mantenimiento de los huesos pues interviene en el metabolismo óseo a través de la presencia de aminoácidos (principalmente leucina que acelera la síntesis) y las vías de señalización de la insulina-1 (IGF-1) responsables de la formación de la masa ósea en el crecimiento muscular y longitudinal del hueso (Bonjour, 2011; Dolan & Sale, 2018). Por lo anterior, podría inferirse que la proteína proporcionada en el alimento del GAOAC (10 %) fue aprovechada adecuadamente para el crecimiento de los huesos, pero no para un aumento de peso respecto al GSTD, quienes recibieron el 23 % de proteína en su dieta.

En cuanto a las diferencias observadas con los grupos de guanábana respecto al GAOAC, aunque ambos tenían contenidos similares de proteína, los grupos de guanábana presentaron un menor crecimiento óseo, posiblemente debido al consumo insuficiente de proteína propiamente de la dieta, así como a la disponibilidad de los aminoácidos presentes en guanábana. Al realizar la búsqueda bibliográfica se encontró que en pulpa de guanábana, solo se ha reportado la presencia de algunos aminoácidos: lisina, metionina y triptófano (Reyes *et al.*, 2009), sin embargo, no se refiere de la presencia de otros aminoácidos esenciales como leucina, isoleucina, valina, treonina etc., los cuales son necesarios en el crecimiento óseo y muscular siendo esta otra posible explicación al menor crecimiento por parte de estos grupos. En concreto, se pudo observar que una dieta formulada con base en la AOAC no afectó en los animales experimentales el crecimiento del fémur pero sí disminuye la ganancia de peso respecto a una dieta estándar, mientras que un consumo de dietas con harina de guanábana provocó un crecimiento desacelerado en la longitud de fémur y en ganancia de peso. Díaz-Reséndiz *et al.* (2009) refieren que la incidencia en el retraso del crecimiento existe principalmente cuando se presenta deficiencias nutricionales de energía, proteína, así como el tipo de alimento administrado, el contenido calórico, el sabor, el olor o la textura, el entorno, las malas prácticas en la preparación de las dietas, entre otros.

8.5 Ingesta de alimento y agua y cuantificación de excretas en 24 h

Los registros del consumo de alimento y agua, así como la cantidad de excretas producidas (heces y orina) se obtuvieron cuando los animales fueron colocados en jaulas metabólicas.

8.5.1 Consumo calórico promedio

Para la administración de las dietas, el alimento fue proporcionado al 10 % del peso del animal, para la comparación se utilizó el consumo total de Kilocorías (Kcal), el cual se obtuvo multiplicando los gramos consumidos por el contenido energético en gramo respectivo de cada dieta, los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Consumo promedio en Kilocalorías/24 h de ratas colocadas en jaulas metabólicas.

Grupo	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		28.67 ± 4.21 ^a	50.56 ± 7.89 ^a
GAOAC	22.96 ± 0.48	26.78 ± 1.65 ^{ab}	39.55 ± 4.53 ^a
GGB		17.17 ± 2.27 ^c	20.87 ± 2.27 ^b
GGB-L		21.56 ± 1.77 ^{bc}	19.93 ± 0.57 ^b

Los valores se representan como media ± DE. Las letras diferentes como superíndices dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0.05$), mientras que letras iguales, indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$). GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica

Al término del periodo de adaptación, los animales tuvieron un consumo de 22.96 ± 0.48 Kcal/día observando que para la semana 2 se presentó una disminución en la cantidad de energía por ambos grupos de guanábana. En esa semana los roedores con el mayor consumo energético fueron los del GSTD el cual no mostró diferencias estadísticas ($p > 0.05$) respecto al GAOAC (28.67 ± 4.21 Kcal/día vs 26.78 ± 1.65 Kcal/día) mientras que el GGB presentó el menor consumo energético (17.17 ± 2.27 Kcal). Para la semana 4, ambos grupos de guanábana presentaron un consumo significativamente menor (GGB 20.87 ± 2.27 Kcal; GGB-L 19.93 ± 0.57 Kcal) respecto al GSTD (50.56 ± 7.89 kcal) y GAOAC (39.55 ± 4.53 kcal).

Al comparar los resultados obtenidos en esta sección de ingesta energética, con la ganancia de peso y el crecimiento en fémur se pudo verificar que los animales del GBB y del GGB-L no aumentaron de peso debido posiblemente al consumo limitado de energía que ingirieron, siendo más evidente en el GGB-L. Por su parte, los animales pertenecientes al GSTD, que mostraron la mayor ingesta energética, reportan también, la mayor ganancia de peso y la mayor longitud femoral. Respecto al GAOAC a pesar de no mostrar diferencias estadísticas en el consumo calórico respecto al GSTD presentó un buen crecimiento en fémur similar pero no en peso respecto a este grupo estándar.

Martínez *et al.* (2006) mencionan que un aumento de peso corporal es relativamente proporcional a un aumento en el consumo de dietas altamente palatables o con niveles elevados en el contenido lipídico, sin embargo, esto no concuerda con los resultados

ya que los animales pertenecientes al grupo con el mayor contenido lipídico (GGB-L) presentaron la menor ingesta. De acuerdo con Díaz-Reséndiz *et al.* (2009) mencionan que la cantidad de alimento que los organismos consumen está determinada por características propias de la alimento, como su textura, color, tamaño, sabor, olor o temperatura. Por otra parte, Toth & Gardiner (2000) mencionan que, cuando se altera la composición de una dieta, los animales pueden reducir o incrementar su ingesta de alimentos dependiendo de la palatabilidad y la accesibilidad, por lo tanto, al observar el consumo de alimento en GGB y GGB-L, podemos proponer que esta disminución se debió a una menor palatabilidad del alimento suministrado.

8.5.2 Consumo de agua

En cuanto al consumo de agua (Tabla 9), el valor inicial fue de 15.66 ± 0.58 mL al día, sin embargo, para la semana 2 los grupos de guanábana presentaron una disminución de aproximadamente un 40% respecto a esta ingesta inicial. En esta semana el GSTD presentó el mayor consumo (19.33 ± 6.03 mL) no mostrando diferencias estadísticas ($p > 0.05$) respecto al GAOAC y al GBB, no obstante, la menor ingesta se presentó en el GGB-L (7.66 ± 2.52 mL). Al final de la experimentación (semana 4), el menor consumo ocurrió en ambos grupos de guanábana (GGB 9.0 ± 2.0 mL; GGB-L 9.33 ± 2.08 mL) mientras que el mayor consumo ocurrió en el GSTD y el GAOAC.

Tabla 9. Consumo promedio de agua en mL/24 h de ratas colocadas en jaulas metabólicas.

Grupo	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		19.33 ± 6.03^a	38.33 ± 5.77^a
GAOAC	15.66 ± 0.58	16.33 ± 5.80^{ab}	30 ± 9.17^a
GGB		9.66 ± 2.52^{ab}	9.0 ± 2.0^b
GGB-L		7.66 ± 2.52^b	9.33 ± 2.08^b

Los valores se representan como media \pm DE. Las letras diferentes como superíndices dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0.05$), mientras que letras iguales, indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$). GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica.

La Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos, United States Environmental Protection Agency (1998) refiere que la recomendación en la ingesta de agua en ratas Wistar macho sanas debe ser de 147 mL/ Kg de peso de animal. Es justificable comparar los resultados obtenidos con la referencia ya que les fue proporcionada el agua *ad libitum*. Para dicha comparación se consideraron los pesos promedios de cada grupo, observándose que en la semana 2 los animales del GGB tuvieron una ingesta dentro de lo esperado, mientras que el GSTD y GAOAC ingirieron agua por encima de lo esperado, en tanto que el GBB-L estuvo por debajo de referido. En la semana 4 nuevamente el consumo del GSTD y GAOAC se encontró por encima de la referencia mientras que la ingesta de los grupos de guanábana estuvo por debajo de lo mencionado por dicha agencia.

Un consumo de agua es de vital importancia ya que es el principal componente del organismo pues representa en promedio un 60% del peso, participa en los procesos de digestión de los nutrientes, así como en la absorción puesto que forma parte de las secreciones digestivas (saliva, jugos gástricos, pancreáticos e intestinales). De igual forma, participa en el transporte de nutrientes hasta la célula y también como el vehículo de los productos de desecho como el sudor, respiración, orina y heces (Ascencio, 2012; Palacios *et al.*, 2010). Como se expuso anteriormente, un buen aporte de agua es indispensable para desarrollar las funciones fisiológicas, al relacionar esto con los resultados de este estudio se puede argumentar que los grupos GSTD y GAOAC, cuyo consumo de agua fue aparentemente mayor, consumieron este líquido vital en función de sus necesidades fisiológicas y optimizando sus funciones nutritivas lo cual contribuyó a una mejor asimilación de nutrientes. En los grupos a base de guanábana, que presentaron el menor consumo de agua, posiblemente la asimilación de nutrientes proporcionados en sus dietas fue afectada por el bajo estado de hidratación de los individuos condicionado a su vez, posiblemente por el mismo consumo de la harina.

8.5.3 Cantidad de heces

Respecto a la cantidad de heces (Tabla 10), se puede observar que, en la segunda semana, los animales pertenecientes a los grupos de guanábana no mostraron

diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$) siendo los grupos con la menor cantidad en heces respecto al resto de los grupos (GGB 0.73 ± 0.25 g; GGB-L 0.96 ± 0.25). El GSTD excretó la mayor cantidad de heces (2.86 ± 0.15 g) entre los grupos. Al compararlo respecto al valor inicial de 1.26 ± 0.31 g (final del periodo de acondicionamiento) se observó que la cantidad excretada disminuyó en un 42 % para el GGB mientras que el GGB-L también disminuyó en un 23.8 %.

Tabla 10. Excreción de heces (g) durante 24 h en jaulas metabólicas.

Grupos	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		2.86 ± 0.15^a	5.93 ± 0.93^a
GAOAC	1.26 ± 0.31	1.73 ± 0.21^b	2.16 ± 0.93^b
GGB		0.73 ± 0.25^c	0.9 ± 0.17^c
GGB-L		0.96 ± 0.25^c	0.83 ± 0.15^c

Los valores se representan como media \pm DE. Las letras diferentes como superíndices dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0.05$), mientras que letras iguales, indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$). GSTD= grupo a base de LabDiet 5008, GAOAC= grupo en base AOAC, GGB= grupo guanábana-AOAC, GGB-L= grupo guanábana-AOAC-lipídica.

Por el contrario, en los GSTD y GAOAC la cantidad excretada aumentó. Para la toma final (semana 4), nuevamente el GSTD reportó la mayor cantidad de heces, mientras que los grupos de guanábana fueron los que mostraron los menores valores.

Durante la experimentación, se observó que las excretas del GSTD y GAOAC mostraron buen color y aspecto físico (esponjosas, blandas y lisas), no obstante, las heces de las ratas provenientes de ambos grupos de guanábana, fueron pequeñas, muy compactas y escasas, como se muestra en la Figura 13.

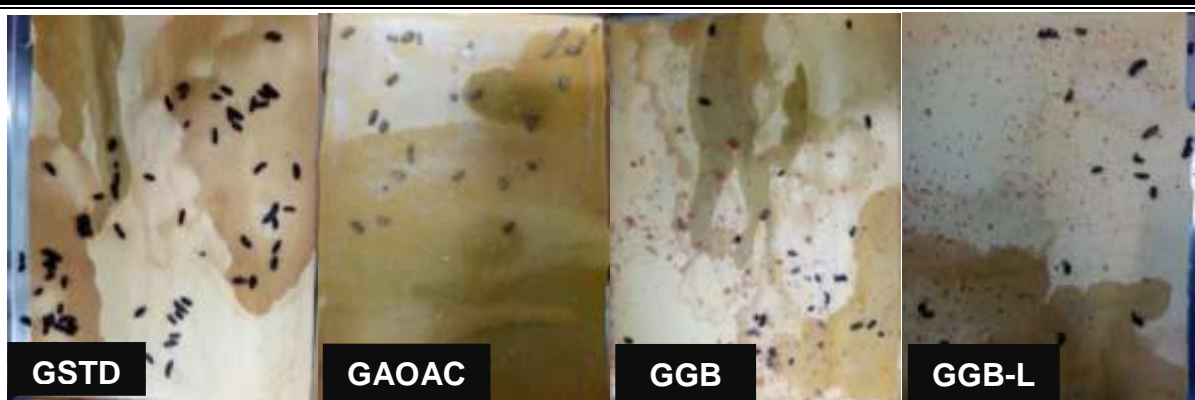


Figura 13. Fotografías representativas de las heces obtenidas en la semana 4, de una rata de cada grupo experimental
GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica.

De acuerdo con la escala de Bristol (Martínez & Azevedo, 2012), las heces del GGB y GGB-L se encontraron dentro del tipo 1 interpretándose con un posible estreñimiento por constipación y/o tránsito lento, en tanto que el GSTD y GAOAC mostraron heces normales con clasificación tipo 3, expresándose como heces en perfecto estado con tránsito regular.

Con base en lo anterior, se puede proponer que la pulpa seca de guanábana, disminuye la cantidad de excretas provocando estreñimiento especialmente si es adicionada con lípidos. Una causa probable de esta propuesta sería un consumo disminuido de alimento y agua en comparación al GSTD y GAOAC, provocado por un tránsito intestinal lento o por un retardo en el vaciamiento del estómago. Esta última afirmación se basa en la observación de que, en la exploración macroscópica final, los estómagos se encontraban visiblemente llenos aun cuando estos tenían más de 6 horas de ayuno (Figura 14).

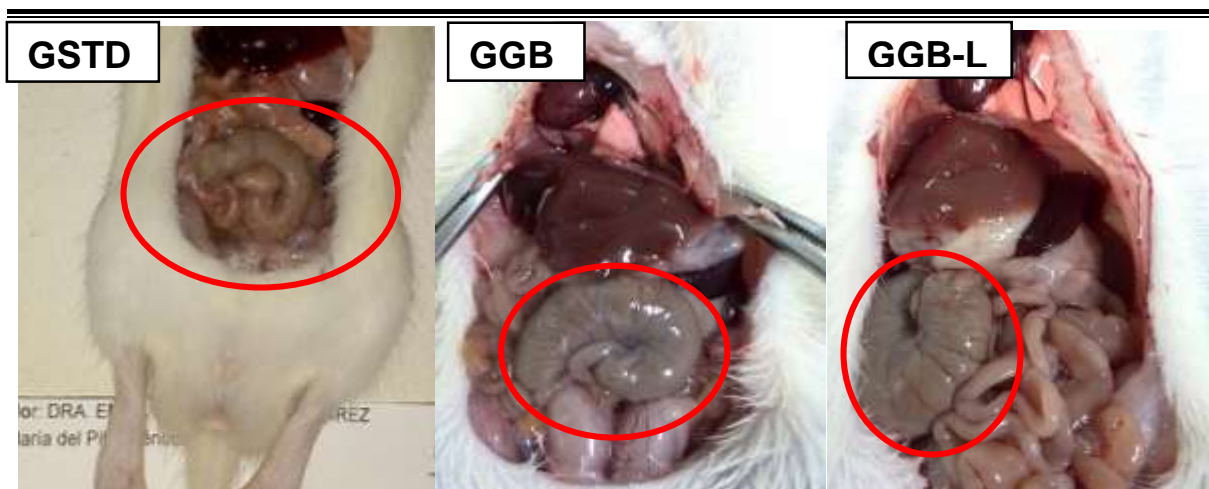


Figura 14. Retraso en el vaciamiento gástrico de ratas Wistar en la semana 4. GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica.

8.5.4 Cantidad de orina

En cuanto al volumen de orina (Tabla 11), los datos muestran que en la semana 2, el GSTD y GAOAC no mostraron diferencias estadísticas entre ellos ($p > 0.05$) presentando el mayor volumen de orina, en tanto que ambos grupos de guanábana la cantidad excretada fue significativamente más baja en comparación con las del GSTD y GAOAC.

Tabla 11. Excreción de orina (mL) durante 24 h en jaulas metabólicas

Grupos	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		12.33 ± 0.58 ^a	19.33 ± 5.03 ^a
GAOAC	11.66 ± 2.08	9.0 ± 1.0 ^a	14.66 ± 6.66 ^{ab}
GGB		3.66 ± 2.08 ^b	7.66 ± 0.58 ^b
GGB-L		3.0 ± 1.0 ^b	4.33 ± 0.58 ^b

Los valores se representan como media ± DE. Las letras diferentes como superíndices dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0.05$), mientras que letras iguales, indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$). GSTD= grupo a base de LabDiet 5008, GAOAC= grupo en base AOAC, GGB= grupo guanábana-AOAC, GGB-L= grupo guanábana-AOAC-lipídica.

Al término de la experimentación (semana 4) el GAOAC no mostró diferencias estadísticas ($p > 0.05$) respecto a los demás grupos, siendo el GSTD el que presentó el

mayor volumen de orina (19.33 ± 5.03 mL) mientras que las menores cantidades lo tuvieron los grupos de guanábana los cuales a su vez fueron significativamente menores respecto al GSTD.

Al comparar estos resultados con la ingesta de agua se puede argumentar, que el consumo de agua fue proporcional a la cantidad de orina excretada ya que los grupos de guanábana fueron los que mostraron la menor ingesta y, por ende, la menor cantidad de orina, mientras que el mayor consumo y excreta se presentó en el GSTD. Bolant Hernández *et al.* (1990) refieren que en una rata sana Wistar macho, el volumen de orina/24 h debe ser de 15 mL/100 g de peso corporal. Al relacionar los promedios de peso y los volúmenes de orina obtenidos, se observó que en la semana 2, los grupos de guanábana se encontraron por debajo de lo esperado, el GAOAC se aproximó mientras que el volumen del GSTD rebasó la cantidad que se menciona en la referencia. En la semana 4, el volumen de orina del GSTD fue similar a los datos de referencia mientras que en los demás grupos (GAOAC, GGB, GGB-L), el volumen de la orina estuvo por debajo de los valores de referencia esperados.

8.6 Observaciones macroscópicas

Durante la extracción de sangre, se realizó la observación de los órganos internos de los animales con el fin de verificar que estos no presentaran daños o necrosis, como sucedió en la prueba piloto. No se distinguieron signos de necrosis en las observaciones realizadas en la semana 2 y 4 de la experimentación, sin embargo, se observó gran cantidad de alimento en los estómagos de los roedores de los grupos de guanábana (GGB y GGB-L) en comparación con el GSTD, lo cual sugiere un posible retraso en el vaciamiento gástrico por parte de estos grupos mostrado anteriormente en la Figura 14. El retraso en el vaciamiento o gastroparesia es una alteración que disminuye o detiene el paso de los alimentos del estómago al intestino delgado, se piensa que algunas de las causas son: diabetes mellitus, úlceras gástricas, acalasia, trastornos neurológicos e infección gástrica, lo que resulta en un daño al nervio vago el cual no manda la señal para que se realice la motilidad gástrica, los síntomas más comunes son pérdida de peso, falta de apetito, sensación de saciedad, hinchazón abdominal y deshidratación (Camilleri *et al.*, 2018).

Con base en lo anterior y en las observaciones registradas, se puede proponer que las ratas de los grupos GGB y GGB-L no consumieron de forma completa el alimento, debido a la sensación de saciedad que generó el retardo en el vaciamiento gástrico, lo que contribuyó, entre otros factores, a la lenta ganancia de peso corporal y al retardo en el crecimiento observado al medir la longitud del fémur.

En la bibliografía, no se encontró ningún ensayo similar al realizado en este estudio ni en ninguna otra fracción de la guanábana, por lo que resulta de interés investigar el efecto a largo plazo del consumo de la harina de pulpa de este fruto, sobre el sistema gastrointestinal, la ingesta alimentaria y en general en la salud de un individuo experimental. Asimismo, antes de realizar la prueba definitiva podría realizarse un estudio químico exhaustivo a la harina de pulpa de guanábana para identificar posibles compuestos tóxicos o antinutricionales.

8.7 Determinación de indicadores bioquímicos

8.7.1 Determinación de glucosa

Los resultados obtenidos en la concentración de glucosa sérica (Tabla 12), mostraron que en la semana 2, los grupos de guanábana presentaron una glucemia significativamente mayor ($p < 0.05$) respecto al GSTD, mientras que el GAOAC no mostró diferencias estadísticas entre los grupos. Al comparar los promedios en esa semana respecto a la concentración inicial (62.57 ± 20.69 mg/dL) se observó que todos los grupos incrementaron su glicemia siendo más notorio en los grupos de guanábana, en un 230% aproximadamente.

Al final de la experimentación (semana 4), ambos grupos de guanábana presentaron un valor significativamente mayor ($p < 0.05$) respecto al GSTD y GAOAC.

Tabla 12. Concentración de glucosa en suero (mg/dL)

Grupo	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		70.52 ± 14.92 ^b	73.43 ± 10.70 ^b
GAOAC	62.57 ±	117.06 ± 52.67 ^{ab}	99.24 ± 60.72 ^b
GGB	20.69	210.34 ± 24.18 ^a	215.88 ± 22.99 ^a
GGB-L		213.21 ± 43.57 ^a	189.26 ± 11.13 ^a
Valor de referencia		70-125 mg/dL (Duffee y Vaughn, 2014)	

Los valores se representan como media ± DE. Las letras diferentes como superíndices dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0.05$), mientras que letras iguales, indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$). GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica.

De acuerdo con Duffee & Vaughn (2014) los parámetros de glucosa en una rata Wistar sana deben oscilar de 70-125 mg/dL. Al comparar esta referencia con los resultados obtenidos, se puede observar que los grupos de guanábana mostraron valores glicémicos de casi el doble, mientras que la glicemia del GSTD y GAOAC está dentro de los parámetros establecidos.

La hiperglucemia observada en este estudio, en las ratas de los grupos GGB y GGB-L contrasta con lo encontrado en la literatura. Diferentes estudios (Adeyemi *et al.*, 2008; Florence *et al.*, 2014, Adewole & Ojewole, 2008) reportaron una disminución en las concentraciones de glucosa en ratas Wistar con diabetes inducida por estreptozotocina, después de administrar 100 mg/kg de extractos acuosos o metanólicos de hojas del árbol de guanábana por un periodo de 6-8 semanas, mencionando que dicho efecto positivo es atribuido principalmente a los flavonoides y polifenoles contenidos en los extractos. A pesar de no establecer los mecanismos exactos, refieren que esto es debido al poder antioxidante que estos compuestos presentan ya que son capaces de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se llegan a formar cuando existen concentraciones altas de glucosa en sangre, evitando así la generación del estrés oxidativo (Adewole & Ojewole, 2008). La aparente discrepancia observada en los efectos sobre la glicemia en el presente ensayo y otros reportes radica en que el efecto hipoglicemiante reportado en la literatura fue ensayado con extractos acuosos mientras que este en este estudio se usó pulpa seca, por lo que es probable que los antioxidantes a los que les es atribuido el efecto hipoglicemiante,

hayan sufrido una degradación por el proceso de secado en horno realizado en este ensayo. Aunque en la pulpa de guanábana seca ya han sido reportados flavonoides y polifenoles (Neta *et al.*, 2018), la metodología de secado empleada y la utilizada en este estudio difieren en temperatura y tiempo de secado, siendo considerablemente más dañina para compuestos bioactivos la empleada en este experimento. Se requieren de más estudios que evalúen el efecto en pulpa seca sobre la glicemia por un tiempo prolongado. Asimismo, se propone aislar los compuestos presentes para proponer mecanismos responsables del efecto hiperglicemiante observado en los grupos que recibieron alimento con base en harina seca de guanábana.

8.7.2 Determinación de triacilglicéridos

En la Tabla 13 se presenta la concentración sérica de triacilglicéridos de los diferentes grupos. Al comparar los resultados, se observó que en la semana 2 el GGB-L fue estadísticamente menor al GSTD y GAOAC, mientras que el GGB no mostró diferencias estadísticas ($p>0.05$) entre los grupos. Para la semana 4, las concentraciones de todos los grupos no mostraron diferencias estadísticas. Al comparar los promedios respecto al concentración inicial (62.00 ± 9.40 mg/dl) se observó que todos los grupos disminuyeron la concentración sérica de triacilglicéridos a excepción del GGB-L el cual aumentó un 7.9 %.

Tabla 13. Concentración de triglicéridos en suero (mg/dL).

Grupo	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		45.78 ± 10.03^a	52.59 ± 7.72^a
GAOAC		$54.39 \pm 8.56^{a'}$	59.21 ± 24.02^a
GGB	62.00 ± 9.40	36.51 ± 4.86^{ab}	43.77 ± 9.40^a
GGB-L		23.30 ± 0.62^b	66.92 ± 4.74^a

Valores de referencia 30-90 mg/dL (Duffee y Vaughn, 2014)

Los valores se representan como media \pm DE. Las letras diferentes como superíndices dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p<0.05$), mientras que letras iguales, indican que no existe diferencia significativa ($p>0.05$). GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica.

De acuerdo con Duffee y Vaughn (2014), los valores de referencia en una rata sana deben ser de 30-90 mg/dL, los cuales en todos los grupos al final de la semana 4, se encontraron dentro de los valores normales.

Barbalho *et al.* en el 2012 observaron en ratas Wistar macho adultas una disminución significativa en las concentraciones de triacilglicéridos al administrar 0.5 mL de jugo de guanábana por la mañana y 0.5 mL por la tarde, esto en comparación con un grupo que consumió agua destilada por un periodo de 40 días. Por otra parte, Sasso *et al.* (2019) observaron que una suplementación de extractos acuosos de hojas (100 mg/kg y 150 mg/kg) de *Annona muricata* L. administrada por sonda oral en ratones obesos C57BL/6, condujo a una disminución en las concentraciones de triacilglicéridos.

A pesar de que ningún estudio indica el mecanismo de acción sobre el metabolismo lipídico, se han indicado que los compuestos bioactivos reportados en *Annona muricata*, principalmente los compuestos fenólicos son los responsables de modificar el metabolismo de los lípidos mediante su actividad antioxidante ya que actúan como agentes reductores cediendo electrones a RL interrumpiendo así el estrés oxidativo, lo que sugiere efectos positivos al organismo. Por otra parte, se ha reportado que los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes antiobesogénicos debido a que son capaces de inhibir la lipasa pancreática la cual juega un papel fundamental en la digestión de lípidos dietarios para su posterior absorción en el intestino delgado, por lo que su inhibición desencadena una biodisponibilidad incompleta de triacilglicéridos, haciendo que estos no aumenten en las concentraciones sanguíneas (Moreno, 2016). Los resultados concuerdan con los estudios ya que al final de la experimentación los grupos no mostraron diferencias estadísticas, incluso cuando el GGB-L consumió una dieta elevada en 20% del contenido de lípidos. De igual manera, como se menciona en la determinación de glucosa, los compuestos fenólicos ya han sido reportados en materia seca, a pesar de ello el efecto puede ser variable debido a la biodisponibilidad en el organismo (Delgado, 2015). Baskar, *et al.* (2007) evaluaron el potencial antioxidante de guanábana donde concluyeron que los efectos antioxidantes más fuertes se presentan *in vitro*, lo que podría aumentar el rango de efectos terapéuticos de esta especie y no en estudios *in vivo* como lo fue en este ensayo.

En vista de estos hallazgos, se sugiere realizar más estudios que puedan comprobar los efectos de la harina de pulpa seca de guanábana en este parámetro bioquímico, esto para garantizar la efectividad del beneficio de este fruto, asimismo, es necesario identificar los compuestos bioactivos presentes (si es que los hubiera) para sí establecer dosis seguras de su consumo.

8.7.3 Determinación de colesterol total

Los resultados obtenidos en la concentración de colesterol total (mg/dL) en suero (Tabla 14) muestran que en la semana 2, no se presentaron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre los grupos. Sin embargo, en la toma final (semana 4) el GGB-L presentó una concentración significativamente mayor ($p < 0.05$) respecto al GSTD, mientras que el GGB no mostró diferencias estadísticas respecto al GAOAC.

Tabla 14. Concentración de colesterol total en suero (mg/dL).

Grupo	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		70.02 ± 19.39 ^a	79.79 ± 2.32 ^c
GAOAC	61.60 ± 1.24	88.86 ± 10.98 ^a	92.06 ± 3.59 ^{bc}
GGB		90.86 ± 18.55 ^a	111.26 ± 9.64 ^b
GGB-L		104.71 ± 9.95 ^a	139.45 ± 13.78 ^a
Valor de referencia	42-90 mg/dL (Duffee y Vaughn, 2014)		

Los valores se dan como media ± DE. a y b dentro de la columna significa que las medias con letras diferentes difieren significativamente en $p < 0.05$, mientras que las medias con las mismas letras no difieren significativamente. GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica.

Al comparar los promedios finales con la concentración inicial (61.60 ± 1.24 mg/dL) se observó que todos los grupos aumentaron las concentraciones séricas de colesterol siendo más notorio en los grupos de guanábana (GGB: 80.61 %, GGB-L 226.37 %). Al cotejar con los valores de referencia (42-90 mg/dL), solo el GSTD se encontró dentro del rango establecido, mientras que el GAOAC se ubicó en el límite superior; únicamente los grupos a base de guanábana mostraron un nivel más alto de colesterol en suero.

Como ya se mencionó, no existen reportes en la literatura de ensayos como el realizado en este estudio, únicamente se ha publicado sobre los efectos de extractos frescos en forma de jugos, por lo que no es posible realizar comparaciones. Por ejemplo, Jimoh *et al.* (2018) observaron un efecto hipocolesterolémico en conejos adultos al administrar 0.55 ml/kg de jugo de guanábana fresco durante 8 semanas, atribuyendo tal efecto al alto contenido de polifenoles totales. Asimismo, Barbalho *et al.* en el 2012 mostraron una disminución en las concentraciones de colesterol en ratas adultas Wistar al administrar jugo de guanábana *ad libitum* en comparación con un grupo que consumió agua destilada atribuyendo tal efecto a los compuestos bioactivos como taninos y polifenoles.

En este estudio no se evaluó la presencia de polifenoles o de otros compuestos bioactivos, sin embargo, es posible que estos compuestos estuvieran degradados debido al tratamiento de secado realizado.

8.7.4 Determinación de ácido úrico

Se determinó la cantidad de ácido úrico en la orina colectada de jaulas metabólicas (Tabla 15); al comparar los resultados se observó que en la semana 2, la cantidad de ácido úrico excretada en orina fue estadísticamente ($p < 0.05$) menor en el GGB-L respecto al GSTD y GAOAC, mientras que el valor en el GGB no arrojó diferencias respecto al GGB-L y al GAOAC. Al término del periodo de experimentación (semana 4) los valores de ácido úrico en los grupos de guanábana fueron estadísticamente menores ($p < 0.05$) en comparación al GSTD y GAOAC.

Respecto a la concentración inicial obtenida (3.45 mg/24 h) se observó que, en esta última toma, los grupos de guanábana disminuyeron la excreción de ácido úrico aproximadamente en un 24.9 % (GGB) y 37.39 % (GGB-L), mientras que en el GSTD aumentó en un 68.9 % y el GAOAC 38.2 %. Por otra parte, los valores promedio de todos los grupos (final de la experimentación) se encontraron dentro de los parámetros de referencia (1.8 - 5.6 mg/24 h) establecidos por Duffee & Vaughn (2014) a excepción del GSTD el cual se encontró ligeramente arriba del límite superior de referencia.

Tabla 15. Concentración de ácido úrico en orina (mg/24 h).

Grupo	Valor basal	Semana 2	Semana 4
GSTD		6.44 ± 1.81 ^a	5.83 ± 0.54 ^a
GAOAC		5.33 ± 0.47 ^{ab}	4.77 ± 0.84 ^a
GGB	3.45 ± 1.43	2.19 ± 1.83 ^{bc}	2.59 ± 0.45 ^b
GGB-L		1.36 ± 0.41 ^c	2.16 ± 0.12 ^b

Valor de referencia 1.8 - 5.6 mg/24 h (Duffee y Vaughn, 2014)

Los valores se dan como media ± DE. a y b dentro de la columna significa que las medias con letras diferentes difieren significativamente en $p < 0.05$, mientras que las medias con las mismas letras no difieren significativamente. GSTD= grupo dieta estándar (LabDiet 5008), GAOAC= grupo dieta AOAC, GGB= grupo dieta guanábana-AOAC, GGB-L= grupo dieta guanábana-AOAC-lipídica.

Al revisar bibliografía, no se encontró algún estudio similar en el cual se evaluara el efecto de alguna fracción del fruto sobre la concentración de dicho analito en orina. Sin embargo, Alvarez-Lario & Alonso-Valdivielso (2014) mencionan que el consumo de alimentos ricos en purinas especialmente en productos cárnicos (incluyendo vísceras y extractos cárnicos) y todo tipo de pescados ocasionan aumento en las concentraciones de ácido úrico lo que explicaría el aumento en las concentraciones del GSTD ya que los componentes de este tipo de dieta son a base de harina de carnes así como de pescado pues es una dieta especialmente para el crecimiento de los animales, mientras que la composición de las dietas del GAOAC, GGB y GGB-L contuvieron un menor porcentaje de proteína las cuales fueron elaboradas con la proteína caseína.

9. Conclusiones

De acuerdo con el Análisis Químico Proximal realizado, la harina de pulpa de guanábana presenta como componentes mayoritarios carbohidratos (70.84 ± 2.24 %) y agua (14.80 ± 0.57 %), mientras que los contenidos más escasos fueron proteína (5.99 ± 1.26 %), fibra cruda (5.06 ± 0.44 %), lípidos (0.53 ± 0.07 %) y cenizas (2.76 ± 0.43 %).

La prueba piloto verificó que, la harina seca de guanábana sin escaldar carece de inocuidad, debido a que su consumo por las ratas Wistar produjo un efecto tóxico que las condujo a la muerte, posiblemente debido a la presencia de compuestos antinutricionales.

Las ratas Wistar macho que consumieron dietas a base de harina de guanábana escaldada, presentaron una disminución en el incremento en peso y longitud femoral en comparación con las ratas alimentadas con una dieta estándar.

Los grupos de animales que consumieron dietas a base de guanábana presentaron los menores consumos de energía y de agua así como una menor excreción de heces respecto a los GSTD y GAOAC.

Las dietas a base de guanábana conducen a un posible retraso en el vaciamiento gástrico y a mayores concentraciones séricas de glucosa y colesterol.

Por lo anterior, el uso de esta harina sin escaldar de no será recomendado para la elaboración de dietas de animales debido a la toxicidad letal que induce. Por su parte, el uso de harina de guanábana escaldada tampoco se recomendará como fuente de proteína y de nutrientes, debido a los efectos negativos sobre la ganancia de peso, el crecimiento femoral, la glucosa y el colesterol séricos y el vaciamiento gástrico observados en los sujetos que la consumieron en este experimento.

10.Recomendaciones

Con base en los hallazgos reportados en la prueba piloto, se sugiere realizar la identificación de los compuestos químicos antinutricionales presentes en pulpa de guanábana sin escaldar y probar su actividad toxicológica frente a estudios *in vitro*.

Por otra parte, se sugiere la necesidad de realizar nuevos estudios que lleven a cabo la identificación de compuestos bioactivos presentes en la harina de guanábana y establecer las dosis seguras para su consumo.

Asimismo, se recomienda considerar para las futuras formulaciones en las dietas el porcentaje de proteína y aminoácidos para los animales de la experimentación.

11. Referencias bibliográficas

- Abbo, E. S., Olurin, T., & Odeyemi, G. (2006). Studies on the storage stability of soursop (*Annona muricata* L.) Juice. *African Journal of Biotechnology*, 5(19), 1808-1809.
- Adefegha, S. A., Oyeleye, S. I., & Oboh, G. (2015). Distribution of Phenolic Contents, Antidiabetic Potentials, Antihypertensive Properties, and Antioxidative Effects of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Parts In Vitro. *Biochemistry Research International*, 6(17), 1-8.
- Adewole, S. O., & Ojewole, J. A. O. (2008). Protective Effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 5(2), 20–31.
- Adewole, S. O., & Ojewole, J. A. O. (2009). Protective Effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 6(1), 30–41.
- Adeyemi, D. O., Komolafe, O. A., Adewole, O. S., Obuotor, E. M., & Adenowo, T. K. (2008). Anti Hyperglycemic Activities of *Annona muricata* (Linn). *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 6(1), 62–69.
- Akwaowo, E. U., Ndon, B. A., & Etuk, E. U. (2000). Minerals and antinutrients in fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook f.). *Food Chemistry*, 70(2), 235-240.
- Alvarez-Lario, B., & Alonso-Valdivielso J.L. (2014). Hiperuricemia y gota: el papel de la dieta. *Nutrición Hospitalaria*, 29(4), 760-770.
- AOAC. 1995. Oficial methods of analysis. 14th Ed. Association of Official Analytical Chemists. William Horwitz. Washington D.C, U. S. A. Association of Analytical Chemists
- 14.003 (1995) de la AOAC (Humedad)
14.006 (1995) de la AOAC (Cenizas)
42.014 (1995) de la AOAC (Nitrógeno total)
7.62 (1995) de la AOAC (Extracto etéreo)
- Ascencio, C. (2012). Ingreso y utilización de los alimentos en el sistema digestivo, Fisiología de la nutrición. D.F. México: Mc Graw Hill.
- Ávila, R., Pérez, M., Giménez, A., Hernández, E. (2012). La guanábana: Una materia prima saludable para la industria de alimentos y bebidas. *REDIP. UNEXPO. VRB. Venezuela*, 2(2), 134-42.

-
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. (4a ed.). Estado de México, México: Pearson Educación.
- Barbalho, S. M., Soares de Souza, M. da S., Bueno, P. C. dos S., Guiguer, É. L., Farinazzi-Machado, F. M. V., Araújo, A. C., ... Gonçalves, P. R. (2012). Annona montana Fruit and Leaves Improve the Glycemic and Lipid Profiles of Wistar Rats. *Journal of Medicinal Food*, 15(10), 917–922.
- Baskar, R., Rajeswari, V., & Kumar T. S. (2007). In vitro antioxidant studies in leaves of Annona species. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(3), 480–485.
- Beluska-Turkan, K., Korczak, R., Hartell, B., Moskal, K., Maukonen, J., Alexander, D. E., Salem, N., Harkness, L., Ayad, W., Szaro, J., Zhang, K., & Siriwardhana, N. (2019). Nutritional Gaps and Supplementation in the First 1000 Days. *Nutrients*, 11(12), 2891.
- Bidlingmaier, M., & Strasburger, C. J. (2010). Growth hormone. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 195, 187–200.
- Bier, D. M. (2008). Growth in the first two years of life. *Nestle Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme*, 61, 135–144.
- Bolant Hernández, B., Calvo Bermúdez, M. A., Cejalvo Lapeña, D., Gimeno Forner, L., Gimeno Forner, D., & Uoris Carsí, U. (1990). Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata. Parte 2. *Research In Surgery*, 1(4), 12-19.
- Bonjour, J. P., Gueguen L., Palacios, C., Shearer, M.J., Weaver, C.M. (2009). Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. *British Journal of Nutrition*, 101(11), 1581–1596.
- Bonjour, J. P. (2011). Protein Intake and Bone Health. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 81(23), 134–142.
- Bradie, N., & Schauss, A. G. (2010). Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, Nutritional Value, Medicinal Uses, and Toxicology. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*, 621-643.
- Braun, K. V., Erler, N. S., Kiefte-de Jong, J. C., Jaddoe, V. W., van den Hooven, E. H., Franco, O. H., & Voortman, T. (2016). Dietary Intake of Protein in Early Childhood Is Associated with Growth Trajectories between 1 and 9 Years of Age. *The Journal of Nutrition*, 146(11), 2361–2367.
- Caballero, E., & Paredes, L. N. (2017). Formulación y evaluación de néctar a base de guanábana (*Annona muricata*) y quinua (*Chenopodium quinoa*) edulcorada con stevia (*Stevia rebaudiana*). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional del Santa Facultad de Ingeniería. Perú.

-
- Cameán, A. M., & Repetto, M. (2006). Principales mecanismos de absorción de tóxicos presentes en los alimentos. *Toxicología alimentaria*. Madrid, España: Editorial Díaz de Santos.
- Camilleri, M., Chedid, V., Ford, A. C., Haruma, K., Horowitz, M., Jones, K. L., Low, P. A., Park, S. Y., Parkman, H. P., & Stanghellini, V. (2018). Gastroparesis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 41.
- Campbell, K. J., Abbott, G., Zheng, M., & McNaughton, S. A. (2017). *Early Life Protein Intake: Food Sources, Correlates, and Tracking across the First 5 Years of Life*. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 117(8), 1188–1197.
- Céspedes, S., & Cary, A. (1998). Liofilización, determinación del contenido de vitamina C y yodo e índice de consumo de dos variedades de sancayo (*Corryocactus brevistylus* y *puquiensis*). Tesis de Licenciada en Nutrición Humana. Universidad Nacional de san Agustín. Arequipa-Perú.
- Chang, R. F. (2001). "Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*." *Journal of Natural Products*, 64(7), 925-931.
- Chatrou, L. W., Turner, I. M., Klitgaard, B. B., Maas, P. J. M., & Utteridge, T. M. A. (2018). A linear sequence to facilitate curation of herbarium specimens of Annonaceae. *Kew Bulletin*, 73(3), 39.
- Cruz, I., Castro-Moreno, M., Luna-Cázares, L.M., & González-Esquinca, A. R. (2016). La familia *Annonaceae* Juss. En México. *Lacandonia*, 10 (2), 71-82.
- Dauchet, L., Amouyel, P., & Dallongeville, J., (2009). Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Nature Reviews Cardiology*, 6(9), 599–608.
- Degnon, R. G., Adjou, E. S., Noudogbessi, J-P., Metome G., Boko, F., Dahouenon-Ahoussi, E., Soumanou, M., & Sohounhloue D.C.K. (2013). Investigation on nutritional potential of soursop (*Annona muricata* L.) from Benin for its use as food supplement against protein-energy deficiency. *International Journal of Biosciences*, 2(6), 135-144.
- Delgado, L. (2015). Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de flavonoides. *Caenorhabditis elegans* y líneas celulares como sistemas modelo. Tesis de doctorado. Facultad de farmacia. Universidad de salamanca. México.
- Determinación de proteínas. Foods. Determination of proteins. NMX-F-068-S-1988. NORMA Mexicana. Dirección general de normas. Dirección: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-068-S-1980.PDF>
- Díaz-Reséndiz, F., Franco-Paredes, K., Moreno, A., López-Espinoza, A., & Aguilera Cervantes, V. G. (2009). Effects of Environmental Variables on Eating Behavior in Rats: A Conceptual and Historical Review. *Universitas Psychologica*, 8(2), 519-532.

-
- Dolan, E., & Sale, C. (2019). Protein and bone health across the lifespan. *Proceedings of the Nutrition Society*, 78(1), 45–55.
- Duffee, N. PhD, & Vaughn, A. PhD. (2014). *Laboratory Animal Data* (2^a ed.). USA: American Association for Laboratory Animal Science, 61-65.
- Edeoga H. O., Okwu D. E., & Mbaebie B. O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plant. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 685–688.
- Ergun-Longmire, B., & Wajnrajch, M. P. (2018). Growth and Growth Disorders. (Eds.), *Endotext*. MDTtext.com, Inc.
- Essack, H., Odhav, B., Mellem, J. J., Essack, H., Odhav, B., & Mellem, J. J. (2017). Screening of traditional South African leafy vegetables for specific anti-nutritional factors before and after processing. *Food Science and Technology*, 37(3), 462–471.
- Fernández, A. E. L., Obledo-Vázquez, E. N., Vivar-Vera, M. D. L. A., Ayerdi, S. G. S., & Montalvo-González, E. (2017). 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.
- Fernández, V., Sulvarán, B., Ojeda de Rodríguez, G., Nava R., Delgado, J., Berradre, M., & Peña, J. (2007). Contenido Mineral de la Guanábana (*Annona Muricata*) cultivada en el occidente de Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Bilógicas*, 41(1), 86-95.
- Florence, N. T., Benoit, M. Z., Jonas, K., Alexandra, T., Désiré, D. D. P., Pierre, K., & Théophile, D. (2014). Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 784–790.
- Frausin, G., Souza Lima, R. B., Hidalgo, A.F., Maas, P., & Pohlit, A. M. (2014). Plants of the Annonaceae traditionally used as antimalarials: a review. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1), 315-336.
- García Aguirre, K. K. (2009). Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., & AEI-Shemy H. (2014). Phytochemical screening, anti-oxidant activity and *in vitro* anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7S1, S355–S363.

Gil, A., Fontana, L., — Sánchez De Medina, F. (2005). Tratado de nutrición. Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Madrid: Acción Médica.

Hernández, L. M. (2013). *Red mexicana de anonáceas: conservación, potenciación y uso de los recursos genéticos*. Recuperado el 30 de Junio de 2019, de: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3964>

Hoppe, C., Rovenna Udam, T., Lauritzen, L., Mølgaard, C., Juul, A., & Fleischer Michaelsen, K. (2004). Animal protein intake, serum insulin-like growth factor I, and growth in healthy 2.5-y-old Danish children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(2), 447–452.

I.C.M.S.F. (2004). Métodos Oficiales de la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para Alimentos. Edic. VII. EE.UU.

Instituto Nacional de Nutrición (INN). (2001) Tabla de Composición de Alimentos. Publicación N° 54. Serie Cuadernos Azules. Instituto Nacional de Nutrición. Caracas, Venezuela. 97 pp.

Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A. J., Morscher, R. J., Lee, G., Liu, W., Tesz, G. J., Birnbaum, M. J., & Rabinowitz, J. D. (2018). The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell metabolism*, 27(2), 351-361.

Jiménez V. M., Gruschwitz M., Schweiggert R. M., Carle R., Esquivel P. (2014) Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International*, 65,42–46.

Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alía-Tejacal, I., Juárez-López, P., Sumaya-Martínez, M. T. & Bello-Lara, J. E. (2017). Tópicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(5), 1155-1167.

Jimoh, O. A., Ayedun, E. S., Oyelade, W. A., Oloruntola, O. D., Daramola, O. T., Ayodele, S. O. & Omoniyi, I. S. (2018). Protective effect of soursop (*Annona muricata* Linn.) juice on oxidative stress in heat stressed rabbits. *Journal of Animal Science and Technology*, 60, 28.

Lacerda, E.M.A., Accioly, E., Faria, I.G., Costa, V.M. (2006). Práticas de Nutrição Pediátrica. São Paulo: Editora Atheneu, 250.

Leiva, S., Gayoso, G., & Chang Chávez, L. (2018). *Annona muricata* L. “guanábana” (*Annonaceae*), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa*, 25(1), 127–140.

-
- León-Méndez, G., Granados-Conde., C. & Osorio-Fortich M. R. (2016). Caracterización de la pulpa de *Annona Muricata* L. cultivada en el Norte del Departamento de Bolívar – Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1-9.
- Loannis, P., Anastasis, S., & Andreas, Y. (2016). Graviola: A Systematic Review on Its Anticancer Properties. *American Journal of Cancer Prevention*, 3(6), 128–131.
- Lombor, T. T., Olaitan, I. N., & Ede, R. A. (2014). Proximate Composition, Antinutrient Content and Functional Properties of Soursop Flour as Influenced by Oven and Freeze Drying Methods. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 2(2), 106–110.
- Lúcio, A., Almeida, J. R. G. da S., da-Cunha, E. V. L., Tavares, J. F., & Barbosa Filho, J. M. (2015). Chapter Five - Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 74, 233–409. Academic Press.
- Martínez, A. G., López-Espinoza, A. & Martínez, H. (2006). Efectos de modificar el contenido energético del agua sobre el peso corporal, consumo de agua, alimento y calorías en ratas. *Universitas Psychologica*, 5(2), 361–370.
- Martinez, A. P., & Azevedo, G. R. de. (2012). The Bristol Stool Form Scale: Its translation to Portuguese, cultural adaptation and validation. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 20(3), 583–589.
- Masarwi, M., Gabet, Y., Dolkart, O., Brosh, T., Shamir, R., Phillip, M., & Gat-Yablonski, G. (2016). Skeletal effect of casein and whey protein intake during catch-up growth in young male Sprague–Dawley rats. *British Journal of Nutrition*, 116(1), 59–69.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625–15658.
- Moreno, E. N. (2016). Evaluación de los compuestos fenólicos de mango (*Mangifera indica* L.) ‘ataulfo’ como inhibidores de la lipasa pancreática y su mecanismo de inhibición. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. México.
- Moro, C., & Covino, J. (2018). Nutrition and growth: Assessing the impact of regional nutritional intake on childhood development and metacarpal parameters. *Anatomy & Cell Biology*, 51(1), 31–40.
- Morón, F., Morón, D., & Nodarse M. (2010). Valoración de la evidencia científica para recomendar *Annona muricata* L. (guanábana) como tratamiento o prevención del cáncer. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales*, 15(3), 169-181.

-
- Muzzo B, S. (2003). Normal and abnormal growth of the child and the adolescent. *Revista chilena de nutrición*, 30(2), 92–100.
- National Research Council. (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nel, E. (2018). Severe acute malnutrition. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 21(3), 195–199.
- Neta, M. T. S., de Jesus, M. S., da Silva, J. L. A., Araujo, H. C. S., Sandes, R. D. D., Shanmugam, S. & Narain, N. (2018). Effect of spray drying on bioactive and volatile compounds in soursop (*Annona muricata*) fruit pulp. *Food Research International*, 124, 70–77.
- NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación. Dirección: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>
- Ojeda de Rodríguez, G., Coronado J., Nava R., Sulbarán, B., Araujo, D., y Cabrera, L. (2007). Caracterización fisicoquímica de la pulpa de la guanábana (*Annona muricata*) cultivada en el occidente de Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41,151–160.
- Ojeda, G., Coronado, J., Nava, R., Sulbarán, B., Araujo, D. & Cabrera, L. (2007). Caracterización físicoquímica de la pulpa de la guanábana (*Annona muricata*) cultivada en el occidente de Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41(2), 151-60.
- Ojewole, J. A. O. (2005). Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 13–19.
- Olawoye, B. T., Gbadamosi, S. O. & Yildiz, F. (2017). Effect of different treatments on in vitro protein digestibility, antinutrients, antioxidant properties and mineral composition of *Amaranthus viridis* seed. *Journal of Cogent Food & Agriculture*, 3(1).
- OMS. (2004). Organización mundial de la salud. Recuperado el 28 de Agosto de 2019, de estrategia mundial sobre régimen alimentario actividad física y salud: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/>
- Onimawo, I. A. (2002). Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of sour sop (*Annona muricata*). *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 57(2), 165–171.
- Ortiz-Rodriguez, A., Sosa, V., & Ruiz-Sánchez, E. (2015). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Instituto de Biología. UNAM. Pátzcuaro, Michoacán, 1-3.

Oxford. *Growth noun—Definition, pictures, pronunciation and usage notes | Oxford Advanced Learner's Dictionary at OxfordLearnersDictionaries.com.* (s/f). Recuperado el 1 de Enero de 2020, de <https://www.oxfordlearnersdictionaries.com/definition/english/growth>

Palacios, N., Polanco, I., & Álvarez, J. (2010). Hidratación en los estados de salud y enfermedad. Tratado de nutrición (2a ed). Madrid: Médica Panamericana.

Pérez-Grana, R. (2013). Exactitud de las tablas de composición de alimentos en la determinación de nutrientes. *Sanidad Militar*, 69(2), 102–111.

Popii, V., & Baumann, G. (2004). Laboratory measurement of growth hormone. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 350(1–2), 1–16.

Prentice, A., Schoenmakers, I., Laskey, M. A., de Bono, S., Ginty, F., & Goldberg, G. R. (2006). Symposium on 'Nutrition and health in children and adolescents' Session 1: Nutrition in growth and development. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 65(4), 348–360.

Rady, I., Bloch, M. B., Chamcheu, R.-C. N., Banang Mbeumi, S., Anwar, M. R., Mohamed, H., Babatunde, A. S., Kuate, J.-R., Noubissi, F. K., El Sayed, K. A., Whitfield, G. K., & Chamcheu, J. C. (2018). Anticancer Properties of Graviola (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-39.

Ramírez, A., & E. Pacheco. (2009). Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 34(4), 293-298.

Ramírez-Méndez, R., Arenas de Moreno, L., Acosta, K., Yamarte, M. & Snadoval, L. (2012). Efecto del escaldado sobre calidad nutricional de pulpa de guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(1):48-57.

Reyes, M., Gómez-Sánchez, P. I., Espinoza, C., Bravo, F., & Ganoza, L. (2009). Tabla Peruana de composición de Alimentos. Instituto Nacional de salud (INS) (8^{va} ed). Lima: Ministerio de Salud, 24.

Rocha, K., de Souza Morais, R. L., Teixeira, R. A., & Pinto, P. A. F. (2016). Growth and development and their environmental and biological determinants. *Jornal De Pediatria*, 92(3), 241–250.

Rosenbloom, A. L. (2007). Physiology of Growth. *Annales Nestlé (English Ed.)*, 65(3), 97–108.

Rytter, M. J., Michaelsen, K. F., Friis, H., & Christensen, V. B. (2017). Acute malnutrition in children. *Ugeskrift for Laeger*, 179(20), 42-54.

-
- Saripalli, H. R., & Dixit, P. K. (2016). Screening of antinutrients in leaves, fruit pulp and seeds of Gishta (*Annona* spp.) of Ethiopia, North East Africa. *IRA-International Journal of Applied Sciences*, 4, 471-481.
- Sasso, S., Sampaio e Souza, P. C., Santana, L. F., Cardoso, C. A. L., Alves, F. M., Portugal, L. C., de Faria, B. B., da Silva, A. F., Motta-Castro, A. R. C., Soares, L. S., Bandeira, L. M., Guimarães, R. de C. A. & Freitas, K. de C. (2019). Use of an Extract of *Annona muricata* Linn to Prevent High-Fat Diet Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice. *Nutrients*, 11(7), 1509.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2018). Recuperado el 27 de Julio de 2019 de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Shams-White, M. M., Chung, M., Du, M., Fu, Z., Insogna, K. L., Karlsen, M. C., LeBoff, M. S., Shapses, S. A., Sackey, J., Wallace, T. C., & Weaver, C. M. (2017). Dietary protein and bone health: A systematic review and meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(6), 1528–1543.
- Sharma, S. P., Chung, H. J., Kim, H. J., & Hong, S. T. (2016). Paradoxical Effects of Fruit on Obesity. *Nutrients*, 8(10), 633.
- Socha, P., Grote, V., Gruszfeld, D., Janas, R., Demmelmair, H., Closa-Monasterolo, R., Subías, J. E., Scaglioni, S., Verduci, E., Dain, E., Langhendries, J.-P., Perrin, E., & Koletzko, B. (2011). Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: Data from a randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(6), 1776-1784.
- Solis, J., Amador, C., Hernández, M., & Durán de Bazúa, M. (2010). Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de “almendra” de guanábana (*Annona muricata* L.). *Grasas y aceites*. 61(1).
- Sotelo, A., González-Osnaya, L., Sánchez-Chinchillas, A., & Trejo, A. (2009). Role of oxate, phytate, tannins and cooking on iron bioavailability from foods commonly consumed in Mexico. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 29–39.
- Sousa, O. V., Vieira, G. D.-V., de Jesus R. G. de Pinho, J., Yamamoto, C. H., & Alves, M. S. (2010). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(5), 2067–2078.
- Spinreact México – Lab Center de México S.A. de C.V. Información de productos. (2008). Recuperado el 12 de Diciembre de 2019 de: www.spinreact.com.mx.

Technical Data Report on Graviola (TDRG). (2002). (*Annona muricata*). Sage Press, Inc, 1-54.

Tessema, M., Gunaratna, N. S., Brouwer, I. D., Donato, K., Cohen, J. L., McConnell, M., Belachew, T., Belayneh, D., & De Groot, H. (2018). Associations among High-Quality Protein and Energy Intake, Serum Transthyretin, Serum Amino Acids and Linear Growth of Children in Ethiopia. *Nutrients*, 10(11), 1776.

Thomis, M. A., & Towne, B. (2006). *Genetic Determinants of Prepubertal and Pubertal Growth and Development*. *Food and Nutrition Bulletin*, 27(5), 257–278.

Toghueo, R. M. K., Kemgne, E. A. M., Eke, P., Kanko, M. I. M., Dize, D., Sahal, D., & Boyom, F. F. (2019). Antiplasmodial potential and GC-MS fingerprint of endophytic fungal extracts derived from Cameroonian *Annona muricata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 235, 111–121.

Toth, L. A., & Gardiner, T. W. (2000). Food and water restriction protocols: Physiological and behavioral considerations. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 39(6), 9–17.

Tretyak. (2007). Influence of nutrition on growth processes in russians and tatars adolescent boys. Intensive course in biological anthropology, *EAA Summer School eBook 1*, 165-168.

United States Environmental Protection Agency. (1998). Recommendations For And Documentation Of Biological Values For Use In Risk Assessment. Washington, DC, EPA/600/6-87/008

UPEAL-CINVESTAV. (s/f). Recuperado el 4 de Junio de 2019 de: <https://administracion.cinvestav.mx/Secretar%C3%ADadePlaneaci%C3%B3n/Coordinaci%C3%B3ndeServiciosdeApoyo/Coordinaci%C3%B3nGeneraldeServiciosExperimentales/UPEAL.aspx>.

Van Berleere, M., & Dauchet, L. (2017). *Frutas, Verduras y Salud. Dietas vegetarianas y vegetales en la salud y la prevención de enfermedades*, 215–248.

Van de Kamer, J. H., Van Ginkel, L. (1952). Rapid determination of crude in cereals. *Cereal Chemistry*, 29, 239-251.

Van Vught, A. J. A. H., Dagnelie, P. C., Arts, I. C. W., Froberg, K., Andersen, L. B., El-Naaman, B., Bugge, A., Nielsen, B. M., & Heitman, B. L. (2013). Dietary arginine and linear growth: The Copenhagen School Child Intervention Study. *The British Journal of Nutrition*, 109(6), 1031–1039.

-
- Vit, P., Santiago, B. y Pérez-Pérez, E. M. (2014). Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Revista Interciencia*, 5(39), 350-353.
- Voortman, T., Braun, K. V. E., Kiefte-de Jong, J. C., Jaddoe, V. W. V., Franco, O. H., & van den Hooven, E. H. (2016). *Protein intake in early childhood and body composition at the age of 6 years: The Generation R Study. International Journal of Obesity*, 40(6), 1018–1025.
- Wei, C., & Gregory, J. W. (2009). *Physiology of normal growth. Paediatrics and Child Health*, 19(5), 236–240.
- Welniak, L. A., & Murphy, W. J. (2003). Growth hormone. *The Cytokine Handbook*, 103–113.
- Yang, C., Gundala, S. R., Mukkavilli, R., Vangala, S., Reid, M. D., & Aneja, R. (2015). Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola (Annona muricata)* leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis*, 36(6), 656–665.
- Zorofchian Moghadamtousi, S., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Mohd Ali, H., & Abdul Kadir, H. (2015). *Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. International Journal of Molecular*, 16(7): 15625-15658.