

# UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA



## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

### MAESTRÍA EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS

## **Actividad antioxidante, antifúngica y caracterización de metabolitos de las semillas de *Annona purpurea***

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**M. en C.: Productos Naturales y Alimentos**

Presenta:

**Q.F.B. Eunice Ordaz Díaz**

**Directora de Tesis:**

Dra. Norma Francenia Santos Sánchez

**Codirectora de Tesis:**

Dra. Beatriz Hernández Carlos

**Heroica Ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca, México. Marzo 2017**

Este trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Productos Naturales y Alimentos, pertenecientes a la división de estudios de posgrado de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, bajo la dirección de la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez y la codirección de la Dra. Beatriz Hernández Carlos. La alumna agradece la beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de becario 571594.

Parte de este trabajo se presentó en la 12<sup>a</sup> Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales en la modalidad de cartel, organizado por la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales A. C. (AMIPRONAT) en Xalapa, Veracruz, México, celebrada del 18 al 20 de mayo del 2016.

## **DEDICATORIA**

A Dios por acompañarme y darme la fuerza para superar todos mis obstáculos y retos.

A mis padres Edith y Francisco, por su cariño y apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y de mis estudios.

A mi hermano Azuri, por impulsarme siempre a ser mejor en todas los aspectos y al ejemplo de dedicación que me ha dado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por el apoyo y amor incondicional que me han brindado.

A mi directora de Tesis la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez y codirectora Dra. Beatriz Hernández Carlos, por dirigirme en este trabajo y por los conocimientos que me han transferido.

A mis revisores de Tesis, Dr. Raúl Salas Coronado, Dra. Edith González Mondragón, Dr. Lemuel Pérez Picaso, por los consejos y correcciones que le realizaron a mi trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el programa de maestría.

A mis compañeros Don Heri, Elisa, Mag, Don Frank y Abimael, por su amistad y por acompañarme en estos dos años.

A mis amigos de la UTM, Sandra, Yair, Zaira y César por su amistad y compañerismo.

A mis amigos Yésica (veci), Benito (bodoque), Joseoziel, Héctor (abuelita), Yunuen y Mayra (las chiquitas), Jorge, Dr. Corrales y Dr. Julián (Los artesanales). Por su amistad y apoyo durante mi estancia en la UTM.

Y a todos los que de alguna u otra forma han hecho posible la realización de este trabajo.

## RESUMEN

Se cuantificó la actividad antioxidante (AA), el contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides totales (FVT), así como la actividad antifúngica (AAF) *in vitro* contra *Fusarium solani* de extractos orgánicos de las semillas de *Annona purpurea*. El extracto metanólico presentó actividad antirradicalar con el ensayo de reducción del DPPH<sup>\*</sup>,  $IC_{50} = 82.7 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ , y esta actividad se correlaciona fuertemente con la actividad quelante correspondiente,  $IC_{50} = 4408.9 \pm 68.6 \mu\text{g/mL}$ , ( $r = 0.99$ ). El contenido de FT del extracto metanólico desengrasado fue de  $233.8 \pm 10.3 \text{ mg EAG/100 g}$  de muestra húmeda (mh), empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. La concentración de FVT fue de  $216.5 \pm 24.9 \text{ mg EC}$  y  $874.4 \pm 84.0 \text{ mg EQ/100 g mh}$  usando  $\text{AlCl}_3$ . El extracto de hexano crudo presentó  $14.6 \pm 2.0\%$  de inhibición sobre el crecimiento micelial a una concentración de  $20 \mu\text{L/disco}$ , y una concentración mínima inhibitoria fungicida de  $6.2 \mu\text{L/mL}$  contra *F. solani*. El extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  rico en acetogeninas relativamente polares, no presentó actividad antifúngica contra *F. solani*. Se caracterizaron el 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol del extracto hexánico, y la acetogenina esquamocina C del extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de las semillas de *A. purpurea* empleando métodos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones, infrarrojo y espectrometría de masa de alta resolución.

## ÍNDICE

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Resumen  | vi            |
| Abreviaturas   | ix            |
| Lista de tablas  | x             |
| Lista de figuras   | xii           |
| 1. Introducción  | 1             |
| 1.1. Planteamiento del problema  | 2             |
| 1.2. Hipótesis   | 3             |
| 1.3. Objetivos   | 3             |
| 1.3.1 Objetivo general   | 3             |
| 1.3.2 Objetivos específicos  | 3             |
| 1.4. Metas   | 4             |
| 1.5. Importancia del estudio   | 5             |
| 1.6. Delimitación del estudio  | 5             |
| 2. Marco teórico   | 7             |
| 2.1. Generalidades de <i>Annona purpurea</i>   | 7             |
| 2.2. Métodos de extracción   | 9             |
| 2.3. Cuantificación de la actividad antioxidante (AA), del contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides totales (FVT) | 10            |
| 2.3.1 Ensayo de reducción del DPPH <sup>•</sup>  | 10            |
| 2.3.2 Ensayo de actividad quelante   | 12            |
| 2.3.3 Ensayo para cuantificar el contenido de FT empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu                                | 14            |
| 2.3.4 Ensayo para cuantificar el contenido FVT empleando el reactivo AlCl <sub>3</sub>                                   | 14            |
| 2.4. Actividad antioxidante (AA) de los frutos de <i>Annona</i>  | 16            |
| 2.5. Actividad antifúngica (AAF) <i>in vitro</i> de extractos de frutos de <i>Annona</i>                                 | 20            |
| 2.6. Compuestos químicos caracterizados en el género <i>Annona</i>   | 22            |
| 2.7. Separaciones cromatográficas  | 26            |
| 2.7.1 Cromatografía en capa fina (CCF)   | 27            |
| 2.7.2 Cromatografía <i>flash</i>   | 27            |
| 2.7.3 Cromatografía en placa preparativa   | 28            |
| 2.8. Métodos espectroscópicos para la elucidación de metabolitos   | 28            |
| 2.8.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)   | 29            |
| 2.8.2 Infrarrojo (IR)  | 32            |
| 2.8.3 Espectrometría de masa (EM)  | 33            |
| 3. Metodología   | 34            |
| 3.1. Reactivos, medios de cultivo y disolventes  | 34            |
| 3.2. Equipos y materiales  | 35            |
| 3.3. Obtención de la muestra   | 38            |
| 3.4. Preparación de la muestra   | 38            |
| 3.5. Obtención de extractos metanólicos de las semillas de <i>A. purpurea</i>  | 39            |
| 3.6. Extracción líquido-líquido  | 41            |
| 3.7. Actividad antioxidante (AA)   | 42            |
| 3.7.1 Ensayo con el radical DPPH <sup>•</sup> , actividad antirradicalar (IC <sub>50</sub> )                             | 42            |
| 3.7.1.1 Cinética de eficiencia antirradicalar (AE)   | 44            |
| 3.7.2 Ensayo de actividad quelante   | 44            |
| 3.8. Contenido de fenoles totales (FT)   | 46            |
| 3.9. Contenido de flavonoides totales (FVT)  | 47            |
| 3.10. Actividad antifúngica (AAF)  | 48            |

|  |    |
|--|----|
| 3.10.1 Actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de <i>F. solani</i>                               | 49 |
| 3.10.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI)  | 50 |
| 3.11. Cromatografía  | 51 |
| 3.12. Caracterización química  | 55 |
| 3.12.1 RMN   | 55 |
| 3.12.2 IR  | 55 |
| 3.12.3 EM  | 56 |
| 3.13. Análisis estadístico   | 56 |
| 4. Resultados y discusión  | 57 |
| 4.1. Obtención de los extractos de las semillas de <i>A. purpurea</i>  | 57 |
| 4.2. Evaluación de la AA y cuantificación de FT y FVT en los extractos de las semillas de <i>A. purpurea</i> | 60 |
| 4.3. Evaluación de la AAF de los extractos de las semillas de <i>A. purpurea</i>                             | 65 |
| 4.4. Purificación del extracto hexánico-a de las semillas de <i>A. purpurea</i>                              | 69 |
| 4.5. Aislamiento y caracterización del triacilglicerol 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol        | 70 |
| 4.6. Purificación del extracto metanólico remanente  | 78 |
| 4.7. Purificación del extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>  | 78 |
| 4.8. Aislamiento y caracterización de la acetogenina esquamocina C   | 79 |
| 5. Conclusiones  | 86 |
| 6. Perspectivas  | 87 |
| 7. Referencias   | 88 |
| 8. Apéndices   | 94 |

## ABREVIATURAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| $\mu\text{mol}$        | Micromol  |
| $\lambda_{\text{máx}}$ | Longitud de onda de absorción máxima  |
| AA                     | Actividad antioxidante  |
| AAF                    | Actividad antifúngica   |
| AO                     | Antioxidante  |
| ATR                    | Reflexión total atenuada  |
| BHA                    | Butilhidroxianisol  |
| BHT                    | Butilhidroxitolueno   |
| DMSO                   | Dimetilsulfóxido  |
| DPPH <sup>•</sup>      | Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo   |
| AE                     | Eficiencia antirradicalar   |
| EAG                    | Equivalentes de ácido gálico  |
| EC                     | Equivalente de catequina  |
| EDTA                   | Ácido etilendiaminotetraacético   |
| EECC                   | Capacidad quelante equivalente de EDTA  |
| EM                     | Espectrometría de masa  |
| FT                     | Fenoles totales   |
| FVT                    | Flavonoides totales   |
| IC <sub>50</sub>       | Concentración que disminuye en un 50% la concentración inicial de DPPH <sup>•</sup> o de EDTA |
| IR                     | Infrarrojo  |
| mM                     | Milimolar   |
| nm                     | Nanómetro   |
| PDA                    | Agar dextrosa y papa  |
| RMN                    | Resonancia Magnética Nuclear  |
| CCF                    | Cromatografía en capa fina  |
| p/v                    | Peso sobre volumen  |

## LISTA DE TABLAS

|          |  | Página |
|----------|--|--------|
| Tabla 1  | Actividad antirradical con DPPH <sup>*</sup> (IC <sub>50</sub> ), contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides totales (FVT) en especies de <i>Annona</i> . | 18     |
| Tabla 2  | Actividad antifúngica (AAF) <i>in vitro</i> de semillas de <i>A. squamosa</i> contra <i>Aspergillus</i> .  | 20     |
| Tabla 3  | Actividad antifúngica (AAF) <i>in vitro</i> de las hojas de <i>A. squamosa</i> .   | 21     |
| Tabla 4  | Porcentaje de extracción de aceites y de los ácidos grasos mayoritarios en semillas del género <i>Annona</i> .   | 22     |
| Tabla 5  | Desplazamientos químicos $\delta$ (ppm) y constantes de acoplamiento $J$ (Hz) de RMN de <sup>1</sup> H de interés para este trabajo.                           | 30     |
| Tabla 6  | Desplazamientos químicos $\delta$ (ppm) de RMN de <sup>13</sup> C de interés para este trabajo.  | 31     |
| Tabla 7  | Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) en IR de grupos funcionales representativos.  | 32     |
| Tabla 8  | Cromatografía en columna <i>flash</i> y rendimiento de las fracciones del extracto hexánico-a obtenido por extracción sólido-líquido.                          | 52     |
| Tabla 9  | Cromatografía en columna <i>flash</i> y rendimiento de las fracciones del extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> obtenido por extracción líquido-líquido. | 53     |
| Tabla 10 | Porcentajes de extracción sólido-líquido y líquido-líquido de las semillas de <i>A. purpurea</i> .   | 58     |
| Tabla 11 | Actividad antioxidante (AA) por el ensayo de reducción de DPPH <sup>*</sup> y actividad quelante de las semillas de <i>A. purpurea</i> .                       | 63     |
| Tabla 12 | Contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides totales (FVT) en las semillas de <i>A. purpurea</i> .  | 64     |
| Tabla 13 | Coefficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los ensayos de AA para <i>A. purpurea</i> .  | 65     |
| Tabla 14 | Concentración de los extractos y porcentaje de inhibición sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium solani</i> .  | 67     |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabla 15 | Desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ a 400 MHz y $^{13}\text{C}$ a 100 MHz, de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol en $\text{CDCl}_3$ . | 72 |
| Tabla 16 | Desplazamientos químicos de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz y $^{13}\text{C}$ a 100 MHz de esquamocina C en $\text{CDCl}_3$ .                            | 81 |

## LISTA DE FIGURAS

|           |  | <b>Página</b> |
|-----------|--|---------------|
| Figura 1  | Características morfológicas del (a) fruto, (b) carpelos, (c) pulpa y (d) semillas de <i>A. purpurea</i> .   | 8             |
| Figura 2  | Reducción de DPPH <sup>•</sup> (1) a DPPHH (2).  | 11            |
| Figura 3  | Formación del complejo colorido Fe <sup>2+</sup> – ferrocina (4).  | 13            |
| Figura 4  | Reacción entre compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu.  | 14            |
| Figura 5  | Formación del complejo colorido Al <sup>3+</sup> – flavonoide (10).  | 15            |
| Figura 6  | Ácidos y derivados hidroxicinámicos caracterizados a partir del género <i>Annona</i> .   | 23            |
| Figura 7  | Quercetina y rutina caracterizados de <i>A. crassiflora</i> .  | 24            |
| Figura 8  | Estructuras generales de las acetogeninas aisladas en el género <i>Annona</i> .  | 25            |
| Figura 9  | Acetogeninas bis-tetrahidrofurano aisladas de las semillas de <i>Annona purpurea</i> .   | 26            |
| Figura 10 | Diagrama general de la metodología.  | 37            |
| Figura 11 | Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz en CDCl <sub>3</sub> de extractos de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (a) con extracción líquido-líquido y (b) con extracción sólido-líquido de las semillas de <i>A. purpurea</i> . | 60            |
| Figura 12 | Porcentaje de inhibición de extractos de semillas de <i>A. purpurea</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium solani</i> .  | 67            |
| Figura 13 | Crecimiento micelial de <i>F. solani</i> a la dilución 1:0 de los tratamientos (a) DMSO, (b) azoxistrobina y (c) extracto hexánico-a de <i>A. purpurea</i> .   | 68            |
| Figura 14 | Espectro de RMN de <sup>1</sup> H en CDCl <sub>3</sub> a 400 MHz de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol aislado de las semillas de <i>A. purpurea</i> .   | 74            |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 15 | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ en $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol aislado de las semillas de <i>A. purpurea</i> . | 75 |
| Figura 16 | Espectro de ATR-FT-IR de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol aislado de las semillas de <i>A. purpurea</i> .   | 76 |
| Figura 17 | Espectro de masa de alta resolución de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol aislado de las semillas de <i>A. purpurea</i> .                             | 77 |
| Figura 18 | Espectro de RMN de $^1\text{H}$ en $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz de esquamocina C aislada de las semillas de <i>A. purpurea</i> .                                     | 82 |
| Figura 19 | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ en $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz de esquamocina C aislada de las semillas de <i>A. purpurea</i> .                                  | 83 |
| Figura 20 | Espectro de ATR-FT-IR de esquamocina C aislada de las semillas de <i>A. purpurea</i> .  | 84 |
| Figura 21 | Espectro de masa de alta resolución de esquamocina C aislada de las semillas de <i>A. purpurea</i> .  | 85 |

## 1. INTRODUCCIÓN

La fuente más importante de compuestos bioactivos como vitaminas y metabolitos secundarios, son los frutos y vegetales, por lo que es de interés el estudio químico de sus extractos (raíz, tallo, hojas, flores y fruto) para determinar los metabolitos responsables de las actividades biológicas. Particularmente, en el género *Annona* la mayoría de los estudios químicos están enfocados en la pulpa, debido a que los frutos de este género son comestibles. Sin embargo, extractos orgánicos y acuosos así como compuestos obtenidos de las semillas de este género han mostrado diferentes actividades biológicas *in vitro*. Los extractos de las semillas de *A. purpurea* obtenidos con metanol (MeOH), etanol (EtOH), agua (H<sub>2</sub>O) y una mezcla de cloroformo:MeOH (CHCl<sub>3</sub>: MeOH, en una proporción 1:1), presentaron actividad citotóxica *in vitro* contra líneas celulares tumorales <sup>1</sup>, y los extractos obtenidos con H<sub>2</sub>O y MeOH, presentaron actividad antiprotozoaria *in vitro* <sup>2</sup>. La actividad antioxidante (AA) en las semillas del género *Annona*, se puede atribuir a compuestos fenólicos que se han caracterizado en esta parte del fruto <sup>3</sup>. Mientras que la actividad antifúngica (AAF) *in vitro* la han presentado las acetogeninas, por ejemplo, annotemoyina-1 y annotemoyina-2, aisladas del extracto obtenido con cloruro de metileno (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) de las semillas de *A. squamosa*, mostrando una AAF *in vitro* mayor que el fármaco comercial nistatina contra *Aspergillus flavus* <sup>4</sup>. Estos datos establecen la importancia del estudio de la AA y AAF *in vitro* de los extractos orgánicos de semillas de *A. purpurea*. A la fecha no se han reportado estudios sobre la actividad antioxidante AA y AAF *in vitro* de extractos de las semillas de *A. purpurea*.

Por lo anterior en este trabajo se cuantificó la AA del extracto metanólico de las semillas de *A. purpurea* mediante el ensayo de reducción del DPPH<sup>•</sup> (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo) así como la actividad quelante empleando como ligante a la ferrocina. Se determinó el

contenido de fenoles totales (FT) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, y el contenido de flavonoides totales (FVT) con el reactivo de  $\text{AlCl}_3$ . Se evaluó la AAF *in vitro* de los extractos orgánicos obtenidos de las semillas de *A. purpurea* frente al hongo *Fusarium solani* midiendo la actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial y la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se realizó la elucidación de las estructuras químicas de los metabolitos presentes en algunos extractos obtenidos de estas semillas. Las técnicas espectroscópicas que se emplearon para la caracterización química en el presente trabajo fueron: Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones, Infrarrojo (IR), y Espectrometría de Masa (EM) de alta resolución.

La información obtenida de esta investigación puede ser la base para efectuar estudios posteriores para el aprovechamiento de las semillas de *A. purpurea*.

### **1.1. Planteamiento del problema**

El uso de compuestos antioxidantes (AO) sintéticos, como butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) en la industria alimenticia, es controversial por los efectos tóxicos mostrados a ciertas concentraciones en animales de experimentación. Esta toxicidad se ha detectado en pulmones de ratones, ocasionando muerte hemorrágica y hepatotoxicidad en ratas, así como nefrotoxicidad en ratones y ratas<sup>5</sup>. Por otra parte, se conoce que algunos hongos pueden presentar fenómenos de resistencia a compuestos antifúngicos<sup>6</sup>, específicamente el hongo *Fusarium solani*, que es patógeno para cultivos tales como el jitomate, chile, papa y otros cultivos de solanáceas, muestra esta resistencia. Este fenómeno de resistencia puede llegar a representar un problema crítico en el área de agricultura. Por lo anterior es importante la búsqueda y evaluación de compuestos con AA y AAF desde fuentes naturales. Los estudios cuantitativos de AA de las semillas de especies del género *Annona* muestran la presencia de

compuestos fenólicos con AA<sup>7, 8</sup> y además los extractos y compuestos de las semillas de *A. squamosa* mostraron AAF<sup>4</sup>.

Dada la importancia que actualmente han tomado los AO y antifúngicos de origen natural, es relevante el estudio de las semillas de *A. purpurea* para determinar si es una fuente de compuestos AO y compuestos con AAF *in vitro*. Los resultados obtenidos pueden ser la base para futuras investigaciones que determinen sus posibles aplicaciones.

## 1.2. Hipótesis

La actividad antirradicalar del extracto metanólico de las semillas de *Annona purpurea* se relaciona con el contenido de fenoles y flavonoides totales, y los extractos de las semillas de *Annona purpurea* presentan actividad antifúngica *in vitro* contra el hongo *Fusarium solani*.

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante y antifúngica *in vitro* de los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea* y caracterizar la estructura química de compuestos presentes en dichos extractos.

### 1.3.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea* con los ensayos de reducción del DPPH<sup>•</sup>, actividad quelante, el contenido de FT y FVT.

2. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos orgánicos de semillas de *A. purpurea* contra *Fusarium solani* cuantificando la actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial y la CMI.
3. Caracterizar compuestos orgánicos presentes en los extractos de las semillas de *A. purpurea* mediante los métodos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones, IR, y por EM de alta resolución.

#### 1.4. Metas

- Realizar extracciones sólido-líquido y líquido-líquido de las semillas de *A. purpurea* con disolventes de diferente polaridad para obtener las fracciones correspondientes.
- Obtener los valores de  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{TIC}_{50}$ , AE con el ensayo de DPPH $^{\bullet}$  y la  $\text{IC}_{50}$ , índice EECC y el porcentaje de quelación con el ensayo de actividad quelante de los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea*.
- Obtener el contenido de FT en mg EAG usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, el contenido de FVT en mg EC y EQ usando  $\text{AlCl}_3$  y expresar los resultados por g de extracto, por 100 g muestra húmeda y seca, de las semillas de *A. purpurea*.
- Realizar correlaciones de Pearson entre los valores de AA – FT y AA – FVT.
- Determinar la actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial y la CMI de los extractos orgánicos de semillas de *A. purpurea* contra el hongo *F. solani*.
- Realizar la separación y purificación por cromatografía *flash* de compuestos de los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea*.

- Caracterizar la estructura química de compuestos presentes en los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea* mediante el análisis de los datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones, IR y EM de alta resolución.

### 1.5. Importancia del estudio

Los frutos de especies del género *Annona* como *A. cherimola*, *A. crassiflora*, *A. diversifolia*, y *A. squamosa* contienen compuestos con AA en pulpa y semilla. Además los extractos orgánicos de semillas y hojas de *A. squamosa* han demostrado AAF *in vitro* contra hongos de diferentes géneros. Hasta la fecha no se ha realizado la cuantificación de la AA y AAF *in vitro* en las semillas de *A. purpurea*, por lo que en este trabajo se cuantificó la AA por métodos espectroscópicos, y se determinó la AAF *in vitro* de los extractos orgánicos obtenidos de las semillas de *A. purpurea* contra el hongo *F. solani*. Existen pocos reportes de la caracterización de los metabolitos presentes en las semillas de *A. purpurea*, por lo que también se caracterizaron las estructuras químicas de metabolitos presentes en las semillas de esta especie.

### 1.6. Delimitación del estudio

En este trabajo el objeto de estudio fueron las semillas de *Annona purpurea*, que hasta la fecha no han sido estudiadas como fuentes de compuestos con actividad antioxidante y antifúngica. La muestra fue comprada en el municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México en el año 2014.

Los extractos orgánicos evaluados de las semillas de *A. purpurea* se obtuvieron mediante extracciones sólido-líquido asistidas por ultrasonido usando hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt y MeOH

en orden ascendente de polaridad. Mientras que para las extracciones líquido-líquido del crudo metanólico se emplearon hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt.

Para la cuantificación de la AA se realizaron los ensayos de reducción del radical libre DPPH<sup>•</sup> (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo), así como la determinación de la actividad quelante empleando como ligante a la ferrocina. Para determinar el contenido de FT se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu, y para el contenido de FVT se empleó AlCl<sub>3</sub>. La AAF *in vitro* se realizó midiendo la actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial y la CMI de los extractos de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y metanólicos contra el hongo *F. solani*.

Para la purificación de los compuestos presentes en los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea*, se utilizó cromatografía en columna *flash*, cromatografía en placa preparativa y cristalización. Mientras que para la identificación de los compuestos aislados se emplearon las técnicas de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en una y dos dimensiones, IR y EM de alta resolución.

## 2. MARCO TEÓRICO

En esta sección se describen las características generales de *Annona purpurea*, el fundamento teórico de la técnica de extracción sólido-líquido empleada en este trabajo y los métodos espectroscópicos cuantitativos para la determinación de la actividad antioxidante (AA). También se menciona los reportes descritos en la literatura de la AA y actividad antifúngica (AAF) *in vitro* de especies del género *Annona*, los ácidos grasos y acetogéninas caracterizados en las semillas, y compuestos del tipo fenólico aislados de este género, así como los métodos espectroscópicos de caracterización química empleados comúnmente en la elucidación estructural.

### 2.1. Generalidades de *Annona purpurea*

El género *Annona* pertenece a la familia de las Anonáceas y comprende alrededor de 120 especies de clima tropical y subtropical, principalmente de América<sup>9</sup>. La planta *A. purpurea*, a quien también se le conoce como sincuya, es originaria de México y Centroamérica. Su fruto es ovoide a esférico, mide de 10 a 18 cm de ancho y está cubierto de un tomento amarillo rojizo, Figura 1 (a), tiene carpelos con prominencias piramidales muy desarrolladas, hasta de dos cm de largo, con los ápices curvos hacia la base de la fruta, Figura 1 (b). La pulpa es fibrosa, con sabor a mango, con una coloración entre amarilla a anaranjada y con aroma frutal, Figura 1 (c). Las semillas son elípticas, de color café claro, miden de 2.5 a 3 cm de largo, Figura 1 (d)<sup>10</sup>.



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 1.** Características morfológicas del (a) fruto, (b) carpelos, (c) pulpa y (d) semillas de *A. purpurea*

El jugo de la fruta se utiliza como un remedio para la fiebre, y la decocción de la corteza interior se prescribe en los casos de disentería y edema <sup>11</sup>. Respecto a los estudios de composición química se describe que del extracto metanólico de las hojas de *A. purpurea* se han aislado flavonoides, esteroides y alcaloides, estos últimos con actividad antiplaquetaria <sup>11</sup>. Mientras que del extracto de las semillas, obtenido con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1), se aislaron acetogeninas, que mostraron efecto citotóxico contra líneas celulares tumorales <sup>1</sup>. Hasta la fecha no se ha descrito la AA y AAF *in vitro* de las semillas de esta especie, así como tampoco se ha reportado el contenido de fenoles totales (FT) y el contenido de flavonoides totales (FVT).

## 2.2. Métodos de extracción

Los extractos obtenidos de fuentes naturales, como plantas, con disolventes de diferente polaridad y métodos de extracción diversos contienen una composición química heterogénea. La composición de estos extractos depende en gran medida, del origen de la muestra, del método de extracción y del disolvente usado.

Los métodos de extracción convencionales, como por ejemplo Soxhlet o maceración, requieren tiempo de extracción relativamente prolongado y una cantidad grande de disolvente. Los métodos de extracción como la extracción asistida por ultrasonido, la extracción con fluidos supercríticos o la extracción asistida por microondas, son cada vez más comunes debido a que mejoran la calidad del extracto, reducen el tiempo de extracción y el consumo de disolvente<sup>12</sup> comparados con los sistemas convencionales de extracción<sup>13</sup>.

En el presente trabajo se utilizó la extracción asistida por ultrasonido para obtener extracciones en un tiempo relativamente corto, reproducibles y minimizando el consumo de disolventes para disminuir el impacto al medio ambiente.

En la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido las ondas de ultrasonido se producen en un campo ultrasónico (18-100 kHz) que forma microcavitaciones en el líquido que rodea el material vegetal. Las microcavitaciones causan la ruptura mecánica de la pared celular liberando los compuestos bioactivos y el calentamiento del líquido aumenta su difusión<sup>14</sup>. El rendimiento de esta extracción está directamente relacionado a las burbujas de cavitación formadas dentro del disolvente las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido. La formación de las burbujas de cavitación está influenciada por la frecuencia e intensidad de ultrasonido, tiempo de sonicación, propiedades físicas del disolvente como su tensión superficial, viscosidad y la presencia de gas o partículas sólidas<sup>13</sup>. La técnica de extracción

asistida por ultrasonido se empleó en este trabajo para obtener los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea*.

### 2.3. Cuantificación de la actividad antioxidante (AA), del contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides totales (FVT)

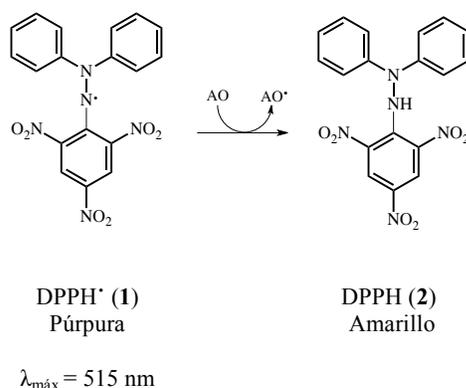
Se conocen varios métodos colorimétricos para la cuantificación espectroscópica de la AA de extractos o compuestos puros. Los ensayos que se realizaron en este trabajo para cuantificar la AA fueron: Reducción del radical DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y actividad quelante empleando ferrocina. Así también se determinó el contenido de FT con el reactivo de Folin-Ciocalteu, y el contenido de FVT con el reactivo de AlCl<sub>3</sub>. Por lo que a continuación se describe brevemente el fundamento de cada uno de los métodos empleados.

**2.3.1 Ensayo de reducción de DPPH•.** Este ensayo se utiliza frecuentemente para cuantificar la AA en extractos de plantas o de alimentos <sup>15</sup>. El radical DPPH• (**1**) es relativamente estable, y es comercialmente viable, el color que presenta es púrpura intenso. La AA se cuantifica midiendo la disminución de la absorbancia por la pérdida de color púrpura de **1** al reaccionar con los antioxidantes (AO), la medición de la disminución del valor de la absorbancia se realiza a una longitud de onda de absorción máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de 515 nm, <sup>16</sup> Figura 2. El porcentaje de inhibición (% inhibición) de **1** para las muestras a evaluar se calcula con la Ecuación 1.

$$\% \text{ inhibición} = \left[ \frac{(A_{\text{DPPH}\cdot} - A_{\text{Extr}})}{A_{\text{DPPH}\cdot}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $A_{\text{DPPH}\cdot}$  es la absorbancia de **1**, y  $A_{\text{Extr}}$  es la absorbancia del extracto <sup>7</sup>.

En este ensayo se determina la  $IC_{50}$  que se define, en este ensayo, como la concentración del compuesto, o extracto a evaluar, que provoca una disminución del 50% de la concentración inicial (0.004%) de **1**. De tal forma que  $IC_{50}$  bajas indican que la muestra evaluada tiene un capacidad alta para neutralizar el radical DPPH $\cdot$ .



**Figura 2.** Reducción de DPPH $\cdot$  (**1**) a DPPH (**2**)<sup>15, 16</sup>.

La mayoría de los compuestos reaccionan lentamente con **1** debido a los efectos estéricos, solubilidad y coeficiente de partición así como la energía de disociación de enlace y el potencial de ionización<sup>16</sup>. Esto hace importante la determinación del tiempo  $T_{IC50}$  en el que se alcanza el equilibrio con una concentración del extracto o de la sustancia a evaluar igual a la  $IC_{50}$ <sup>17</sup>. Con el  $IC_{50}$  y  $T_{IC50}$  se puede determinar la eficiencia antirradicalar (AE) con la Ecuación 2. Con este valor se puede caracterizar el comportamiento de un compuesto como antioxidante de acuerdo a la clasificación reportada en la literatura  $AE \leq 1 \times 10^{-3}$ , baja;  $1 \times 10^{-3} < AE \leq 5 \times 10^{-3}$ , media;  $5 \times 10^{-3} < AE \leq 10 \times 10^{-3}$ , alta y  $AE > 10 \times 10^{-3}$ , muy alta<sup>18</sup>. Por ejemplo el valor de AE de la rutina,  $0.2 \times 10^{-3} \text{ kg de DPPH}^{\cdot}/\text{g de extracto} \cdot \text{min}$ , es clasificado como una AE baja, mientras que el ácido gálico con una AE de  $11.4 \times 10^{-3} \text{ kg de DPPH}^{\cdot}/(\text{g de extracto} \cdot \text{min})$  es clasificado como una AE muy alta<sup>19</sup>.

$$AE = \frac{1}{IC_{50} \times T_{IC50}} \quad \text{Ecuación 2}$$

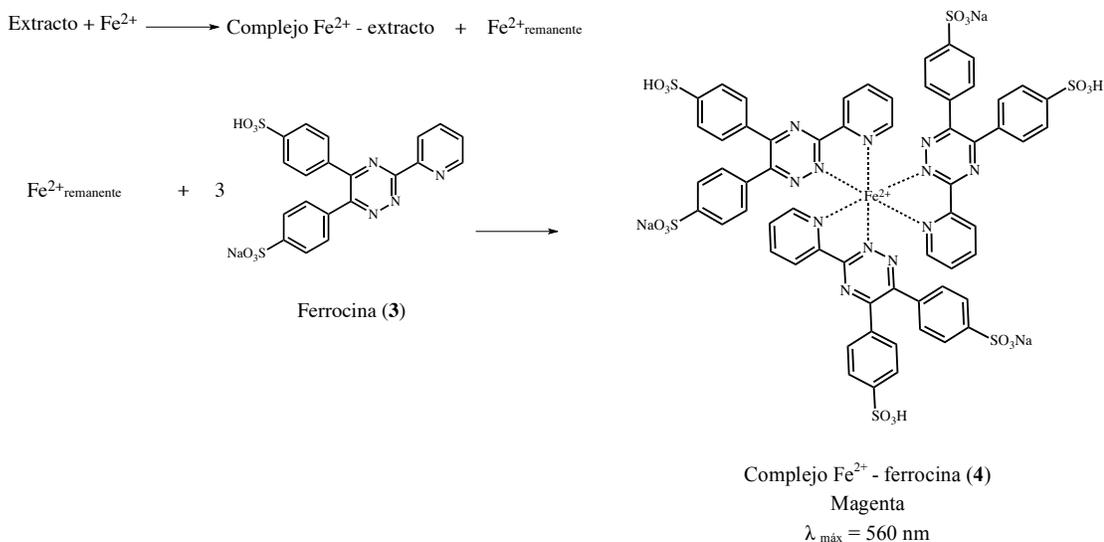
donde la  $IC_{50}$  es la concentración que provoca una disminución del 50% de la concentración inicial del radical DPPH $\cdot$ , y  $T_{IC50}$  es el tiempo en el que se alcanza el equilibrio con una concentración del extracto, o compuesto a evaluar, igual a la  $IC_{50}$ .

**2.3.2 Ensayo de actividad quelante.** Este ensayo determina si la muestra a evaluar tiene la capacidad de quelar al ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ). En la primera parte del ensayo se mezcla el extracto, o el estándar, con  $FeCl_2$  o  $FeSO_4$  a una determinada concentración y se deja reaccionar a temperatura ambiente, si el extracto tiene la capacidad de quelar esta mezcla produce una cantidad de complejos de  $Fe^{2+}$  con los compuestos del extracto o del estándar. Posteriormente se agrega ferrocina (**3**), que reacciona con el ion ferroso remanente que no reaccionó con los compuestos del extracto, o del estándar, formando el complejo estable de color magenta (**4**)<sup>20</sup>, Figura 3. Este complejo **4** se cuantifica midiendo la absorbancia a una  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de 560 nm.

El % de actividad quelante del extracto sobre  $Fe^{2+}$  se calcula con la Ecuación 3<sup>20, 21</sup>.

$$\% \text{ Efecto quelante} = \left[ \frac{(A_0 - A_{\text{Extr}})}{A_0} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde  $A_0$  es la absorbancia del control (sin el extracto o estándar) y  $A_{\text{Extr}}$  es la absorbancia con la presencia del extracto o estándar.



**Figura 3.** Formación del complejo colorido Fe<sup>2+</sup> – ferrocina (4) <sup>21</sup>.

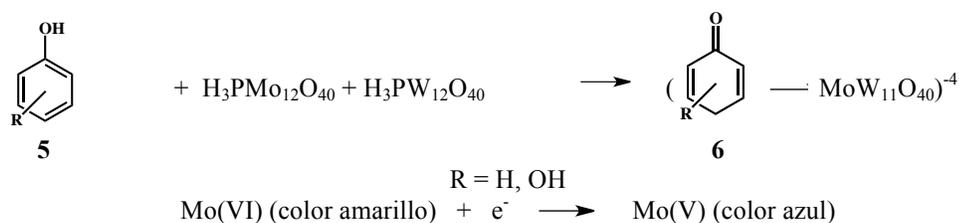
El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es uno de los compuestos quelantes comúnmente utilizados como estándar, con el que se realiza una curva de calibración para obtener su pendiente correspondiente. Esta pendiente se emplea para determinar la capacidad quelante equivalente de EDTA (EECC) de la muestra a evaluar que se expresa como equivalentes de EDTA (EE)/100 g de muestra <sup>21</sup>. Para calcular EECC se emplea la Ecuación 4.

$$EECC = \frac{m_{\text{Ext}}}{m_o} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde  $m_{\text{Ext}}$  es la pendiente de la curva de la muestra y  $m_o$  es la pendiente de la curva del estándar EDTA.

La IC<sub>50</sub> también es usado para cuantificar la actividad quelante <sup>17</sup> que se define, en este ensayo, como la concentración que provoca una disminución del 50% de la concentración de Fe<sup>2+</sup> inicial. Un valor de la IC<sub>50</sub> bajo indica una AA potente, cabe aclarar que este valor también depende de la concentración de Fe<sup>2+</sup> que se utilice.

**2.3.3 Ensayo para cuantificar el contenido de FT empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu.** Este método es simple, sensible y es uno de los más utilizados para determinar el contenido de FT en alimentos y extractos vegetales. Consiste en la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu, que contiene sales de molibdeno y tungsteno de color amarillo, con compuestos fenólicos. La reacción óxido-reducción desarrolla un complejo de color azul cuya absorbancia se mide entre una longitud de onda de 745-760 nm. La reacción es lenta a pH ácido por lo que se agrega  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para obtener un pH básico. Una mejora de este ensayo introducida por Singleton y Rossi, fue el uso de un heteropolianion fosfórico de molibdeno y tungsteno que oxida los fenoles (**5**) con mayor especificidad para formar quinonas (**6**)<sup>16</sup>. La reacción de este ensayo se muestra en la Figura 4.

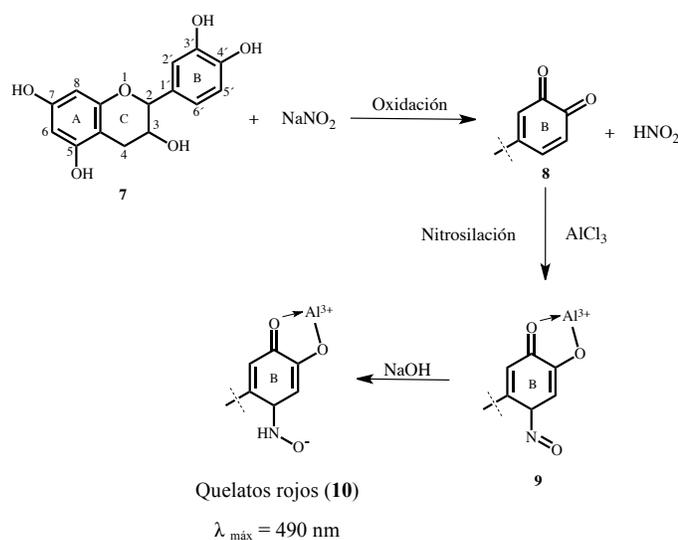


**Figura 4.** Reacción entre compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu<sup>16</sup>.

El ácido gálico se utiliza como estándar, generalmente, para la construcción de la curva de calibración. Los resultados del contenido de FT en la muestra se expresan en miligramos (mg) equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra o de extracto<sup>16</sup>.

**2.3.4 Ensayo para cuantificar el contenido FVT empleando el reactivo  $\text{AlCl}_3$ .** Los flavonoides son un subgrupo importante perteneciente a los compuestos fenólicos, a menudo están hidroxilados en los carbonos 3, 5, 7, 3' y 4', Figura 5. Estos compuestos tienen la característica de ser agentes quelantes<sup>22, 23</sup>. En la literatura se describen dos métodos generales para cuantificar el contenido de FVT, estos emplean  $\text{AlCl}_3$  o el ácido bórico, respectivamente. El primer método es el más utilizado para cuantificar estos compuestos en

extractos de plantas o alimentos. El fundamento de este método consiste primeramente en oxidar a los grupos hidroxilo de los carbonos 3' y 4' del anillo B de los flavonoides (**8**) con  $\text{NaNO}_2$ . Posteriormente el  $\text{HNO}_2$  generado, en presencia de  $\text{AlCl}_3$ , nitrosila al carbono 6' del anillo B y el catión aluminio se enlaza con el oxígeno del carbono 4' (**9**), Figura 5. Finalmente, se agrega  $\text{NaOH}$  y se forman complejos color rojo (**10**), cuya absorbancia se mide a una  $\lambda_{\text{máx}}$  de 490 nm. El estándar que se utiliza generalmente para la curva de calibración es catequina, aunque también se utilizan epicatequina o quercetina. La concentración de FVT en la muestra se obtiene empleando la ecuación de la curva obtenida por regresión lineal del estándar elegido. El contenido de FVT se expresa como mg equivalentes de catequina (EC) o el estándar elegido/100 g de muestra<sup>24, 25, 26</sup>.



**Figura 5.** Formación del complejo colorido  $\text{Al}^{3+}$  – flavonoide (**10**)<sup>24</sup>.

Los ensayos descritos anteriormente se usan comúnmente para determinar AA, FT y FVT en alimentos y extractos vegetales, lo que hizo posible una comparación de los datos obtenidos en este trabajo con los datos reportados para otras especies del género *Annona*.

#### 2.4. Actividad antioxidante (AA) de los frutos de *Annona*

La AA de los frutos del género *Annona* se ha estudiado en cáscara, pulpa y semilla de diferentes especies de anonas; los resultados obtenidos con los ensayos colorimétricos se describen a continuación.

Los resultados descritos para el ensayo de reducción del DPPH<sup>\*</sup>, la cuantificación de FT y FVT, se resumen en la Tabla 1, donde se observa que la parte del fruto que más se ha estudiado es la pulpa. La actividad quelante hasta la fecha solo se ha determinado en la pulpa y cáscara de *A. cherimola* y las IC<sub>50</sub> correspondientes obtenidos fueron  $115.8 \pm 3.5$  y  $79.6 \pm 2.2$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente<sup>20</sup>. Con este ensayo la AA mayor en esta anona la presentó la cáscara y ambos extractos fueron menos eficientes comparados con el EDTA el cual presenta una IC<sub>50</sub> de  $1.30 \pm 0.05$   $\mu\text{g/mL}$ <sup>20</sup>.

A partir de los datos de la Tabla 1 se puede observar que la AA de frutos del género *Annona* depende de factores como especie, estado de madurez, variedad, porción del fruto y condiciones ambientales de la región donde se cultivan las anonas. Hasta la fecha se ha determinado la IC<sub>50</sub> con el ensayo de reducción del DPPH<sup>\*</sup> en las semillas de *A. cherimola*, *A. coriacea*, *A. crassiflora* y *A. sylvatica*. *A. crassiflora* tuvo la menor IC<sub>50</sub> ( $31.14 \pm 0.85$   $\mu\text{g/mL}$ ) lo que sugiere una AA mayor que el resto.

En cuanto al contenido de FT reportado en las semillas de este género, las semillas del fruto ligeramente maduro de *A. crassiflora* mostró un contenido de FT mayor que el encontrado en la pulpa y la cáscara de esta especie. Esto sugiere que el contenido de FT puede ser mayor en las semillas dependiendo del estado de madurez del fruto en *A. crassiflora*. También se puede notar que el contenido de FT depende del disolvente utilizado para la extracción, como se observa en los valores reportados de las semillas de *A. squamosa*, Tabla 1. Para la *A. cherimola* y *A. muricata* el contenido de FT fue cuantificado en materia fresca, el contenido mayor de FT

para *A. cherimola* se encontró en la cáscara y para *A. muricata* en la pulpa, siendo las semillas las de menor contenido de FT para estas dos especies. Los datos anteriores permiten observar que la parte del fruto con el mayor contenido de FT varía de acuerdo a la especie estudiada, Tabla 1. Cabe mencionar que el contenido de FT se ha determinado en las hojas de *A. purpurea* cultivada a concentraciones diferentes de vermicomposta y fósforo. Los valores encontrados varían entre  $74 \pm 39$  y  $226 \pm 24$  mg EAG/g de materia seca<sup>27</sup>. Hasta la fecha no se ha reportado el contenido de FT en las semillas de *A. purpurea*.

Los flavonoides tienen gran importancia biológica y química. Las actividades biológicas más representativas descritas para estos compuestos son: anticancerígenos, antiinflamatorios, antibióticos e inhibidores de la proliferación celular<sup>28</sup>. Por lo que además de determinar el contenido de FT también se suele determinar el contenido de FVT. Las especies de *Annona* en las que se ha determinado el contenido de estos compuestos se muestran en la Tabla 1.

Para el caso de *A. cherimola* se estudiaron las tres partes del fruto: cáscara, pulpa y semilla, el contenido de FVT, al igual que los FT, se encuentra en mayor cantidad en la cáscara. En la literatura hasta la fecha existen menos reportes del contenido de FVT comparado con el de FT correspondiente para esta especie. Por otra parte, las semillas y la cáscara de frutos del género *Annona* se han estudiado poco. Debido a la importancia biológica de los flavonoides, es relevante la cuantificación del contenido de FVT en semillas de *A. purpurea*.

También, resulta de interés cuantificar la AA de las semillas de este género ya que los estudios de algunas de sus especies demuestran la presencia de compuestos fenólicos con AA incluso mayor que en la pulpa y cáscara del fruto<sup>7</sup>. Los datos antes descritos se compararon con los datos que se obtuvieron de los ensayos realizados al extracto metanólico de las semillas de *A. purpurea* en este trabajo.

**Tabla 1.** Actividad antirradical con DPPH' (IC<sub>50</sub>), contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides totales (FVT) en especies de *Annona*.

| Especie                | Parte del fruto | Observaciones del fruto | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL) | FT<br>(mg EAG/100 g)        | FVT<br>(mg EC/100 g)        | País                     |                          |
|------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>A. crassiflora</i>  | Cáscara         | Muy maduro              | 54.64 ± 1.04                | 11,142 ± 857 <sup>a</sup>   | n.m.                        | Brasil <sup>7, g</sup>   |                          |
|                        |                 | Ligeramente maduro      | 48.82 ± 2.93                | 9,072 ± 499 <sup>a</sup>    | n.m.                        |                          |                          |
|                        | Pulpa           | Muy maduro              | 1,204.22 ± 27.43            | 3,108 ± 123 <sup>a</sup>    | n.m.                        |                          |                          |
|                        |                 | Ligeramente maduro      | 148.82 ± 0.97               | 2,030 ± 352 <sup>a</sup>    | n.m.                        |                          |                          |
|                        |                 | C. en Minas Gerais      | n.m.                        | 739.37 ± 7.92 <sup>b</sup>  | n.m.                        |                          | Brasil <sup>29, f</sup>  |
|                        | Semillas        | Muy maduro              | 62.40 ± 1.11                | 11,048 ± 605 <sup>a</sup>   | n.m.                        |                          | Brasil <sup>7, g</sup>   |
| Ligeramente maduro     |                 | 31.14 ± 0.85            | 13,698 ± 756 <sup>a</sup>   | n.m.                        |                             |                          |                          |
| <i>A. cherimola</i>    | Cáscara         | Cultivado en Funchal    | 333 ± 0.0                   | 18.5 ± 0.10 <sup>b</sup>    | 33.0 ± 0.04 <sup>h</sup>    | Portugal <sup>8, g</sup> |                          |
|                        |                 | C. en Madeira           | 180 ± 0.0                   | 19.5 ± 0.13 <sup>b</sup>    | 44.7 ± 0.10 <sup>h</sup>    |                          |                          |
|                        |                 | C. en Mateus II         | 230 ± 0.0                   | 19.6 ± 0.15 <sup>b</sup>    | 41.9 ± 0.05 <sup>h</sup>    |                          |                          |
|                        |                 | C. en Perry Vidal       | 370 ± 10                    | 17.0 ± 0.12 <sup>b</sup>    | 36.7 ± 0.04 <sup>h</sup>    |                          |                          |
|                        |                 | C. en Calabria          | 57.7 ± 1.9                  | 14.6 ± 1.1 <sup>d</sup>     | 8.2 ± 1.2 <sup>i</sup>      |                          | Italia <sup>20, g</sup>  |
|                        | Pulpa           | C. en Funchal           | 4,520 ± 10                  | 3.06 ± 0.03 <sup>b</sup>    | 1.31 ± 0.02 <sup>h</sup>    | Portugal <sup>8, g</sup> |                          |
|                        |                 | C. en Madeira           | 970 ± 10                    | 12.0 ± 0.04 <sup>b</sup>    | 15.0 ± 0.01 <sup>h</sup>    |                          |                          |
|                        |                 | C. en Mateus II         | 3,450 ± 10                  | 4.31 ± 0.02 <sup>b</sup>    | 3.19 ± 0.01 <sup>h</sup>    |                          |                          |
|                        |                 | C. en Perry Vidal       | 4,590 ± 60                  | 3.43 ± 0.03 <sup>b</sup>    | 1.33 ± 0.01 <sup>h</sup>    |                          |                          |
|                        |                 | C. en Calabria          | 72.2 ± 1.2                  | 12.6 ± 0.8 <sup>d</sup>     | 3.8 ± 0.6 <sup>i</sup>      |                          | Italia <sup>20, g</sup>  |
|                        |                 | n.m.                    | n.m.                        | 5.79 ± 0.54 <sup>c, f</sup> | 3.51 ± 0.31 <sup>f, j</sup> |                          | Italia <sup>25</sup>     |
|                        | Semillas        | n.m.                    | n.m.                        | 6.83 ± 0.42 <sup>c, g</sup> | 5.72 ± 0.26 <sup>g, j</sup> | Ecuador <sup>30, f</sup> |                          |
|                        |                 | n.m.                    | 1,087 ± 236 <sup>e</sup>    | 323 ± 83 <sup>a</sup>       | n.m.                        |                          |                          |
|                        |                 | C. en Madeira           | 3,190 ± 80                  | 3.61 ± 0.02 <sup>b</sup>    | 4.62 ± 0.02 <sup>h</sup>    |                          | Portugal <sup>8, g</sup> |
|                        |                 | C. en Mateus II         | 3,220 ± 80                  | 4.16 ± 0.02 <sup>b</sup>    | 3.06 ± 0.02 <sup>h</sup>    |                          |                          |
| C. en Perry Vidal      |                 | 4,240 ± 310             | 3.35 ± 0.01 <sup>b</sup>    | 6.75 ± 0.05 <sup>h</sup>    |                             |                          |                          |
| <i>A. diversifolia</i> | Pulpa           | Variedad blanca         | 1,714.99 ± 61.82            | 170.16 ± 4.44 <sup>b</sup>  | 152.04 ± 5.39 <sup>k</sup>  | México <sup>26, g</sup>  |                          |
|                        |                 | Variedad rosa           | 1,998.19 ± 63.14            | 129.27 ± 1.32 <sup>b</sup>  | 107.41 ± 5.15 <sup>k</sup>  |                          |                          |
|                        |                 | Variedad rosa mexicano  | 1,701.07 ± 47.42            | 170.88 ± 2.19 <sup>b</sup>  | 142.56 ± 2.55 <sup>k</sup>  |                          |                          |
|                        | n.m.            | n.m.                    | 246.29 ± 17.04 <sup>b</sup> | 230.53 ± 3.57 <sup>i</sup>  | México <sup>31, f</sup>     |                          |                          |
| <i>A. squamosa</i>     | Pulpa           | n.m.                    | 135.2                       | n.m.                        | n.m.                        | India <sup>32, f</sup>   |                          |
|                        |                 | Ceará                   | n.m.                        | 81.7 ± 4.0 <sup>b</sup>     | n.m.                        | Brasil <sup>33, f</sup>  |                          |
|                        | Semilla         | EtOH 50%                | n.m.                        | 171.58 ± 7.31 <sup>l</sup>  | 42.44 ± 1.13 <sup>m</sup>   | India <sup>34</sup>      |                          |
|                        |                 | Hexano                  | n.m.                        | 24.45 ± 1.32 <sup>l</sup>   | 9.86 ± 0.22 <sup>m</sup>    |                          |                          |
|                        |                 | Acetona                 | n.m.                        | 29.95 ± 3.11 <sup>l</sup>   | 32.66 ± 8.13 <sup>m</sup>   |                          |                          |

IC<sub>50</sub> = concentración del extracto necesaria para disminuir un 50% la concentración inicial del DPPH'. n.m. = no medido. EAG = equivalentes de ácido gálico. EC = equivalentes de catequina. EQ = equivalentes de quercetina. a. En mg EAG/100 g de materia seca. b. En mg EAG/100 g de materia fresca. c. En µM EAG/µL de extracto. d. En mg equivalentes de ácido clorogénico/100 g de materia fresca. e. En g de muestra (materia seca)/g DPPH'. f. Extracto metanólico. g. Extracto etanólico. h. En equivalentes de epicatequina/100 g de materia fresca. i. EQ/100 g de materia fresca. j. Expresado en µM EC/µL de extracto. k. mg EC/100 g de materia fresca. l. mg EAG/ g de extracto. m. mg EQ/ g de extracto. n. mg EAG/ g de materia fresca.

**Tabla 1.** Continuación.

| Especie              | Parte del fruto | Observaciones del fruto       | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL) | FT<br>(mg EAG/100 g)        | FVT<br>(mg EC/100 g)       | País                      |                         |
|----------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>A. squamosa</i>   | Semilla         | CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1) | n.m.                        | 242.82 ± 5.08 <sup>l</sup>  | 23.15 ± 0.33 <sup>m</sup>  | India <sup>34</sup>       |                         |
|                      |                 | H <sub>2</sub> O              | n.m.                        | 208.70 ± 2.09 <sup>l</sup>  | 5.72 ± 0.38 <sup>m</sup>   |                           |                         |
|                      |                 | MeOH 80%                      | Inmaduro                    | n.m.                        | 534.0 <sup>n</sup>         | n.m.                      | Indonesia <sup>35</sup> |
|                      |                 |                               | Maduro                      | n.m.                        | 85.3 <sup>n</sup>          | n.m.                      |                         |
|                      |                 | Acetona 50%                   | Inmaduro                    | n.m.                        | 522.4 <sup>n</sup>         | n.m.                      |                         |
|                      |                 |                               | Maduro                      | n.m.                        | 159.1 <sup>n</sup>         | n.m.                      |                         |
|                      |                 | H <sub>2</sub> O              | Inmaduro                    | n.m.                        | 411.6 <sup>n</sup>         | n.m.                      |                         |
|                      |                 |                               | hirviendo                   | n.m.                        | 354.0 <sup>n</sup>         | n.m.                      |                         |
| EtOH 50%             | Inmaduro        | n.m.                          | 802.8 <sup>n</sup>          | n.m.                        |                            |                           |                         |
|                      | Maduro          | n.m.                          | 383.2 <sup>n</sup>          | n.m.                        |                            |                           |                         |
| <i>A. muricata</i>   | Cáscara         | H <sub>2</sub> O              | 870 ± 10                    | 560.21 ± 6.22 <sup>b</sup>  | n.m.                       | Nigeria <sup>36</sup>     |                         |
|                      |                 | Sao Paulo                     | n.m.                        | 281.00 ± 5.40 <sup>b</sup>  | n.m.                       | Brasil <sup>29,f</sup>    |                         |
|                      |                 | Ceará                         | n.m.                        | 54.8 ± 2.7 <sup>b</sup>     | n.m.                       | Brasil <sup>33,f</sup>    |                         |
|                      | Pulpa           |                               | n.m.                        | 84.3 ± 5.8 <sup>b</sup>     | n.m.                       | Brasil <sup>37,g</sup>    |                         |
|                      |                 |                               | n.m.                        | 624.2 ± 11.8 <sup>f</sup>   | 480.6 ± 2.5 <sup>f</sup>   | Venezuela <sup>38,b</sup> |                         |
|                      |                 |                               | n.m.                        | 941.4 ± 5.2 <sup>g</sup>    | 574.0 ± 5.9 <sup>g</sup>   |                           |                         |
|                      |                 | H <sub>2</sub> O              | 2240 ± 70                   | 430.29 ± 10.61 <sup>b</sup> | n.m.                       | Nigeria <sup>36</sup>     |                         |
|                      | Semilla         | H <sub>2</sub> O              | 5440 ± 40                   | 50.51 ± 3.21 <sup>b</sup>   | n.m.                       | Venezuela <sup>38,b</sup> |                         |
|                      |                 |                               | n.m.                        | 280.8 ± 4.6 <sup>f</sup>    | 159.8 ± 1.4 <sup>f,ñ</sup> |                           |                         |
|                      |                 |                               | n.m.                        | 451.4 ± 9.7 <sup>g</sup>    | 309.2 ± 3.3 <sup>g,ñ</sup> |                           |                         |
| <i>A. reticulata</i> | Pulpa           |                               | n.m.                        | 358.25 ± 17.04 <sup>b</sup> | 418.24 ± 3.73 <sup>i</sup> | México <sup>31, f</sup>   |                         |
| <i>A. coriacea</i>   | Pulpa           |                               | 822.19 ± 13.89              | 57.67 ± 1.16 <sup>l</sup>   | 24.38 ± 2.45 <sup>m</sup>  | Brasil <sup>39</sup>      |                         |
|                      | Semilla         | MeOH:H <sub>2</sub> O (8:2)   | 330.55 ± 2.34               | 147.08 ± 4.2 <sup>l</sup>   | 131.18 ± 2.31 <sup>m</sup> |                           |                         |
| <i>A. sylvatica</i>  | Pulpa           |                               | 695.61 ± 6.67               | 13.64 ± 2.18 <sup>l</sup>   | 13.74 ± 2.18 <sup>m</sup>  |                           |                         |
|                      | Semilla         |                               | 724.14 ± 17.79              | 58.10 ± 1.45 <sup>l</sup>   | 51.11 ± 2.30 <sup>m</sup>  |                           |                         |

IC<sub>50</sub> = concentración del extracto necesaria para disminuir un 50% la concentración inicial del DPPH. n.m. = no medido. EAG = equivalentes de ácido gálico. EC = equivalentes de catequina. EQ = equivalentes de quercetina. a. En mg EAG/100 g de materia seca. b. En mg EAG/100 g de materia fresca. c. En µM EAG/µL de extracto. d. En mg equivalentes de ácido clorogénico/100 g de materia fresca. e. En g de muestra (materia seca)/g DPPH. f. Extracto metanólico. g. Extracto etanólico. h. En equivalentes de epicatequina/100 g de materia fresca. i. EQ/100 g de materia fresca. j. Expresado en µM EC/µL de extracto. k. mg EC/100 g de materia fresca. l. mg EAG/ g de extracto. m. mg EQ/ g de extracto. n. mg EAG/ g de materia fresca. ñ. mg EQ/100 g de materia fresca.

## 2.5. Actividad antifúngica (AAF) *in vitro* de extractos de frutos de *Annona*

En la actualidad el uso inadecuado de antifúngicos para controlar organismos patógenos ya sea para el ser humano o para las plantas de importancia agrícola ha provocado resistencia así como daño ambiental. Una posible alternativa para minimizar este daño es el uso de fungicidas provenientes de fuentes naturales. La AAF *in vitro* en el género *Annona* se ha estudiado en los extractos y compuestos aislados de las semillas y hojas de *A. squamosa*. Los extractos de éter de petróleo, CHCl<sub>3</sub> y EtOH de semillas de *A. squamosa*, así como las acetogeninas annotemoyina-1 y annotemoyina-2, acetogeninas con un anillo de tetrahydrofurano (THF) –mono-THF, aisladas del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y la esquamocina, acetogenina con dos anillos de THF, bis-THF, aislada del extracto de éter de petróleo, fueron probadas contra *Aspergillus flavus*, *A. niger* y *A. fumigatus*, hongos oportunistas que provocan aspergilosis en humanos y moho negro en vegetales<sup>4</sup>. Los resultados de AAF de los extractos y compuestos activos se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Actividad antifúngica (AAF) *in vitro* de semillas de *A. squamosa* contra *Aspergillus*<sup>4</sup>.

| <i>Aspergillus</i>  | Diámetro de la zona de inhibición (mm) |                  |                                   |              |
|---------------------|--|------------------|-----------------------------------|--------------|
|                     | Extracto<br>CHCl <sub>3</sub>          | Extracto<br>EtOH | Annotemoyina-1<br>+Annotemoyina-2 | Nistatina    |
|                     | 200 µg/disco                           | 200 µg/disco     | 200 µg/disco                      | 200 µg/disco |
| <i>A. flavus</i>    | 6                                      | 7                | 13                                | 8            |
| <i>A. fumigatus</i> | 6                                      | 6                | 10                                | 25           |
| <i>A. niger</i>     | 7                                      | 5                | 18                                | 28           |

El extracto de éter de petróleo, y la acetogenina bis-THF esquamocina no presentaron AAF contra los hongos probados. Las acetogeninas mono-THF, annotemoyina-1 y annotemoyina-2, mostraron la AAF *in vitro* mayor que los extractos de CHCl<sub>3</sub> y EtOH contra las tres especies de *Aspergillus*. Es importante resaltar que estas acetogeninas presentaron una AAF *in vitro* mayor, medida por la zona de inhibición, que el antifúngico comercial nistatina contra *A. flavus*<sup>4</sup>. Otro

estudio de la AAF *in vitro* de *A. squamosa* se reportó en el 2015<sup>40</sup>. Los autores utilizaron hongos que pueden causar enfermedades como dermatofitosis, aspergilosis y candidiasis, así como hongos fitopatógenos que atacan cultivos de interés comercial. Los extractos obtenidos con CHCl<sub>3</sub>, MeOH y H<sub>2</sub>O de las hojas de *A. squamosa* se probaron contra cinco cepas: *Microsporium canis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata* y *Fusarium solani* con el método de difusión en placa, y se obtuvo el porcentaje de inhibición, los resultados se muestran en la Tabla 3. Este estudio revela que los extractos de las hojas de *A. squamosa* poseen AAF *in vitro* de manera dependiente de la dosis contra las cinco cepas de hongos evaluadas a las concentraciones de 1 y 2 mg/mL. Los extractos de CHCl<sub>3</sub> y MeOH mostraron AAF mayor contra *C. albicans*, *A. alternata* y *F. solani*, mientras que los extractos de MeOH y H<sub>2</sub>O mostraron una AAF mayor que el extracto de CHCl<sub>3</sub> contra *M. canis*. Así también, todos los extractos ensayados mostraron AAF similar contra *A. niger*<sup>40</sup>.

**Tabla 3.** Actividad antifúngica (AAF) *in vitro* de las hojas de *A. squamosa*<sup>40</sup>.

| Hongo                       | Porcentaje de inhibición (%) |         |               |         |                           |         |
|-----------------------------|------------------------------|---------|---------------|---------|---------------------------|---------|
|                             | Extracto CHCl <sub>3</sub>   |         | Extracto MeOH |         | Extracto H <sub>2</sub> O |         |
|                             | 1 mg/mL                      | 2 mg/mL | 1 mg/mL       | 2 mg/mL | 1 mg/mL                   | 2 mg/mL |
| <i>Microsporium canis</i>   | 22.06                        | 41.18   | 66.18         | 72.06   | 52.94                     | 67.65   |
| <i>Aspergillus niger</i>    | 25.86                        | 77.59   | 31.08         | 81.03   | 22.41                     | 84.84   |
| <i>Candida albicans</i>     | 27.69                        | 64.62   | 43.08         | 70.77   | 9.23                      | 33.85   |
| <i>Alternaria alternata</i> | 79.10                        | 83.58   | 34.33         | 74.63   | 20.90                     | 43.28   |
| <i>Fusarium solani</i>      | 91.67                        | 108.33  | 60.42         | 97.92   | 33.33                     | 64.58   |

Los datos antes mencionados establecen la importancia del estudio de AAF *in vitro* de los extractos obtenidos de las semillas de *A. purpurea* los cuales se evaluaron en este trabajo contra el hongo *F. solani* que es un hongo de importancia agrícola en Oaxaca y en general en México.

## 2.6. Compuestos químicos caracterizados en el género *Annona*

De las semillas del género *Annona* se han caracterizado compuestos como ácidos grasos saturados e insaturados, compuestos fenólicos, acetogeninas, tocoferoles y fitoesteroles.

Los ácidos grasos mayoritarios presentes en las semillas del género *Annona* son los ácidos grasos saturados palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), y los ácidos grasos insaturados oleico (C18:1) y linoleico (C18:2)<sup>41, 42, 43, 44</sup>. Los porcentajes de extracción de los aceites (fracción no polar) de las semillas y los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios presentes en estos aceites se enlistan en la Tabla 4.

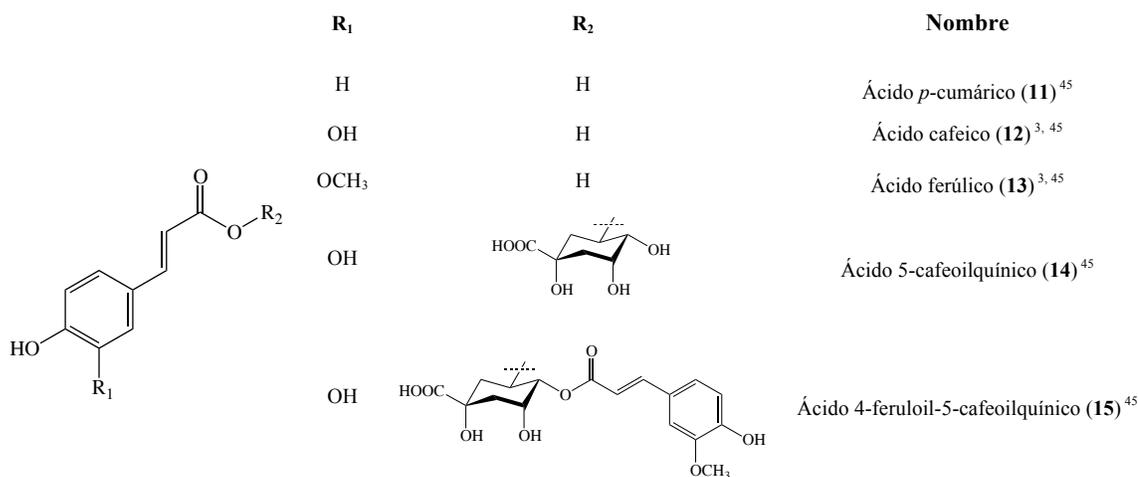
**Tabla 4.** Porcentaje de extracción de aceites y de los ácidos grasos mayoritarios en semillas del género *Annona*.

| <i>Annona</i>                       | % de extracción | % Ácidos grasos saturados |                 | % Ácidos grasos insaturados |                 |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
|                                     |                 | Palmítico C16:0           | Esteárico C18:0 | Oleico C18:1                | Linoleico C18:2 |
| <i>crassiflora</i> <sup>44,a</sup>  | 28.84           | 18.07 ± 0.13              | 11.02 ± 0.04    | 49.75 ± 0.08                | 16.29 ± 0.02    |
| <i>diversifolia</i> <sup>42,b</sup> | n.d.            | 13.27*                    | 5.22*           | 65.97*                      | 15.54*          |
| <i>lutescens</i> <sup>42,b</sup>    | n.d.            | 17.88*                    | 7.42*           | 41.65*                      | 33.05*          |
| <i>muricata</i> <sup>41,b</sup>     | 40 ± 0.82       | 20.41 ± 1.58              | 4.13 ± 0.29     | 41.29 ± 0.53                | 30.85 ± 0.34    |
| <i>purpurea</i> <sup>42</sup>       | n.d.            | 26.38*                    | 3.70*           | 43.67*                      | 26.25*          |
| <i>squamosa</i> <sup>43,a</sup>     | 28.03 ± 0.5     | 15.77*                    | 7.96*           | 50.79*                      | 25.49*          |

a. Porcentaje en semillas frescas. b. Porcentaje en semilla seca. n.d. = no determinado. \* no proporciona desviación estándar.

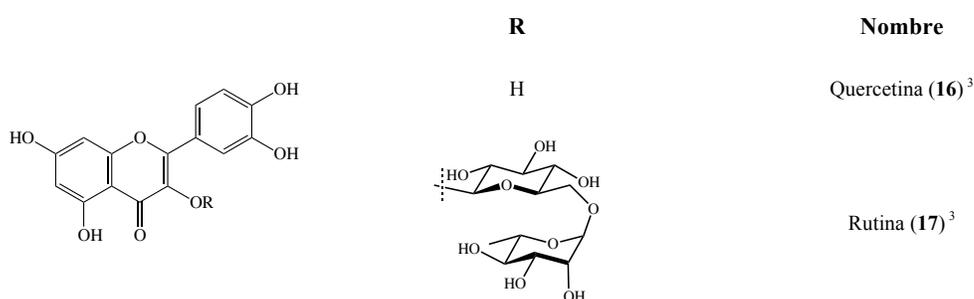
Se observa que el porcentaje de extracción de las semillas de *A. crassiflora* (empleando una mezcla de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ , 2:1:0.8) y *A. squamosa* (empleando éter de petróleo) son similares, alrededor del 28%<sup>43, 44</sup>, mientras que el porcentaje de extracción de las semillas de *A. muricata* (empleando éter de petróleo) es mayor (40%), esto puede deberse a que en esta última la extracción se llevó a cabo en semillas secas<sup>41</sup>. Con estos antecedentes se espera que el porcentaje de extracción de las semillas de *A. purpurea* sea similar a lo reportado en las especies del género *Annona*.

Por otra parte, en extractos metanólicos y etanólicos del fruto de *A. muricata* y *A. crassiflora* se han caracterizado compuestos fenólicos. Tal es el caso de los ácidos hidroxicinámicos como el *p*-cumárico (**11**), cafeico (**12**), ferúlico (**13**), y los derivados 5-cafeoilquínico (**14**), y 4-feruloil-5-cafeoilquínico (**15**), Figura 6<sup>45</sup>. Estos compuestos se aislaron del extracto metanólico de la pulpa de *A. muricata* y se analizaron por HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con trampa de iones, con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Para identificar los compuestos se eligieron los picos de mayor intensidad, productos de una primera fragmentación, y se sometieron a fragmentaciones posteriores (MS/MS). El patrón de fragmentación se comparó con lo reportado en la literatura para asignar el compuesto.



**Figura 6.** Ácidos y derivados hidroxicinámicos caracterizados a partir del género *Annona*<sup>3, 45</sup>.

Del extracto etanólico de la semilla y cáscara de *A. crassiflora*, se encontraron los ácidos hidroxicinámicos **12** y **13**, Figura 6, y el glicosilflavonol rutina (**17**), Figura 7. Además, del extracto de la semilla de *A. crassiflora* se identificó el flavonol quercetina (**16**), Figura 7<sup>3</sup>. Para la identificación se utilizó un espectrómetro de masa con analizador de tiempo de vuelo (MQ-TOF). La ionización fue por electrospray (ESI) en modo positivo y negativo. El análisis de los iones individuales en los espectros de masa se realizó por experimentos ESI-MS/MS.

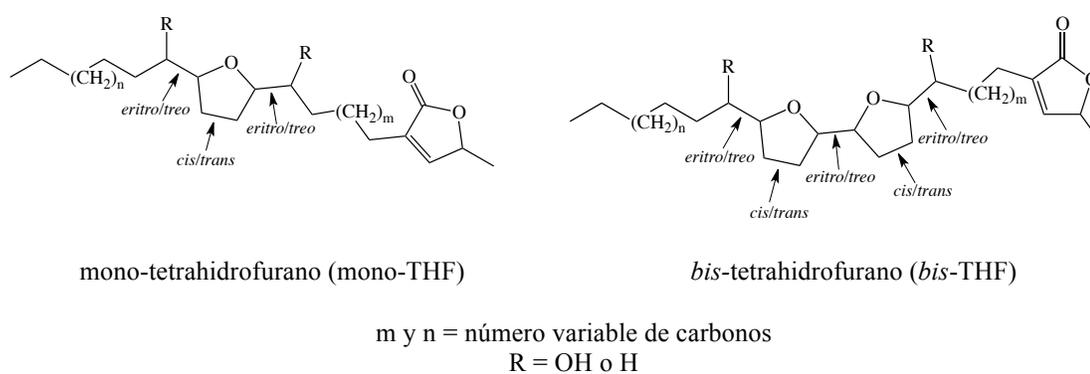


**Figura 7.** Quercetina y rutina caracterizados de *A. crassiflora*<sup>3</sup>.

De acuerdo a los estudios descritos en la literatura hasta el momento sobre el aislamiento de compuestos fenólicos del género *Annona*, se puede deducir que los compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico de las semillas de *A. purpurea* puedan ser flavonoides del tipo flavonol, y también es posible que contengan derivados de ácidos hidroxicinámicos.

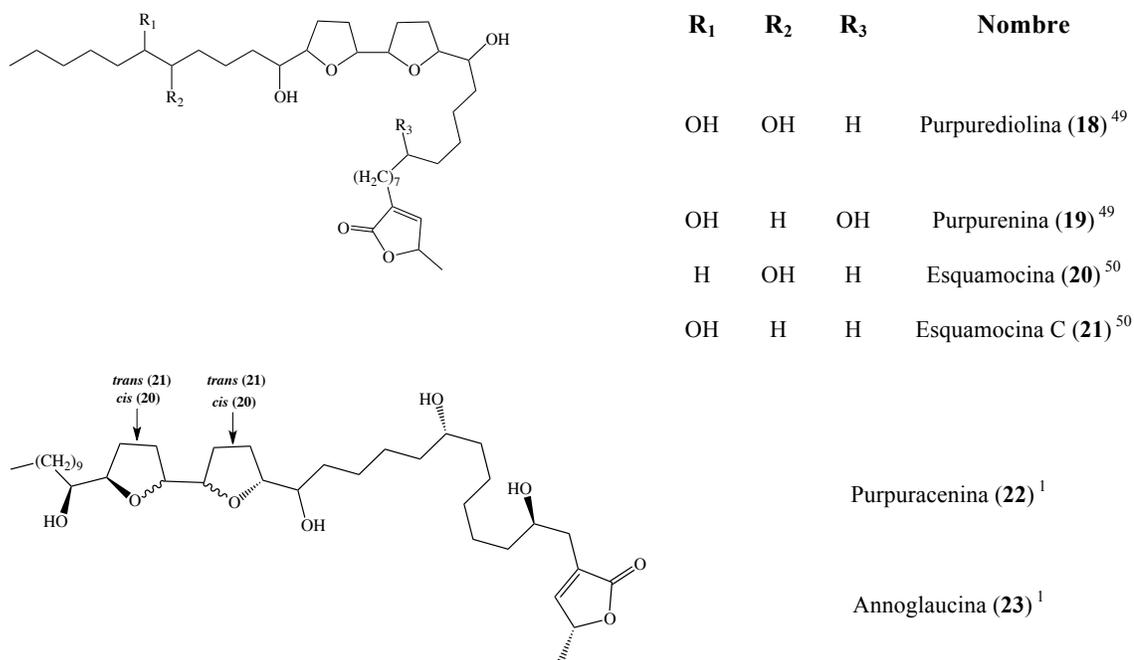
Por otra parte, las acetogeninas son un grupo de compuestos representativos aislados de la familia de las Anonáceas. Son compuestos de 35 a 37 átomos de carbonos derivados de ácidos grasos. Usualmente se caracterizan por cadenas largas hidrocarbonadas hidroxiladas, con un número variable de anillos de tetrahydrofurano (THF) y la porción terminal está constituida de una lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada<sup>46</sup>. Aunque también pueden encontrarse epóxidos en las estructuras de estos metabolitos. En las semillas de *A. atemoya*, *A. cornifolia*, *A. glabra*, *A. muricata*, *A.*

*purpurea* y *A. squamosa*, se han caracterizado acetogeninas del tipo mono-tetrahidrofurano (mono-THF) y/o *bis*-tetrahidrofurano (*bis*-THF). Las estructuras generales de estas acetogeninas se muestran en la Figura 8. Una de las configuraciones relativas más comunes para los sistemas *bis*-THF  $\alpha, \alpha'$ -dihidroxilados es *treo/trans/treo/trans/eritro*<sup>47</sup>. Para determinar la estereoquímica de las acetogeninas se emplean la metodología de ésteres de Mosher, difracción de rayos-X e incluso síntesis orgánica<sup>48</sup>.



**Figura 8.** Estructuras generales de algunas acetogeninas aisladas en el género *Annona*.

De las semillas de *Annona purpurea* se aislaron acetogeninas *bis*-tetrahidrofurano (*bis*-THF) que se muestran en la Figura 9. Los métodos para la elucidación estructural involucraron la examinación de los datos de resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, espectroscopía de infrarrojo (IR), así como el análisis de los datos de fragmentación de los iones obtenidos por espectrometría de masa (EM).



**Figura 9.** Acetogeninas *bis*-tetrahydrofurano aisladas de las semillas de *Annona purpurea*<sup>1, 49, 50</sup>.

## 2.7. Separaciones cromatográficas

La cromatografía es una técnica de separación que se basa en la diferencia de distribución que existe entre dos o más componentes de una mezcla entre las fases estacionaria y móvil. Cada componente de la mezcla tiene un tiempo de retención distinto que permite la separación de cada componente.

Es común que antes de colocar la muestra a la columna se realicen extracciones líquido-líquido, en fase sólida o de intercambio iónico, dependiendo de la complejidad de la muestra, de su naturaleza química y cantidad. Esto se realiza con la finalidad de que la cromatografía sea más eficiente. Las técnicas cromatográficas que se utilizaron en este trabajo fueron la cromatografía en capa fina (CCF), la cromatografía *flash* y la cromatografía en placa preparativa, por lo que se describen brevemente.

**2.7.1 Cromatografía en capa fina (CCF).** Se emplea una capa plana y relativamente delgada de un material que a la vez es el soporte (fase estacionaria), que recubre una superficie de metal, vidrio o plástico. La aplicación manual de la muestra se realiza por contacto entre la placa y un capilar que contiene la muestra. La fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad permitiendo la separación de los compuestos.

La CCF sirve de guía para el desarrollo de las condiciones para realizar separaciones por cromatografía de líquidos en columna y cromatografía en placa preparativa, para el monitoreo de reacciones químicas, para determinar la pureza de los compuestos de forma cualitativa y para observar los componentes que están presentes en una muestra<sup>51</sup>.

Los compuestos no se observan a simple vista generalmente en la placa cromatográfica por lo que se utiliza luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  y  $365$  nm) o reactivos reveladores, como por ejemplo yodo, que reacciona con los componentes orgánicos de las fracciones produciendo manchas con tonos amarillos-marrón. Una de las desventajas del yodo como revelador es que al volatilizarse las manchas desaparecen por lo que es necesario se marquen una vez reveladas. Otro reactivo revelador utilizado comúnmente es el ácido sulfúrico, que produce manchas de diferente color hasta llegar a coloraciones negras por la oxidación de los compuestos orgánicos.

Por otra parte, si el objetivo es buscar sustancias con características determinadas, existen reveladores más específicos, como es el caso del reactivo de Kedde (ácido 3,5-dinitrobenzoico al 2% en EtOH o MeOH al 90% y KOH 1 M en EtOH) que se ha utilizado para identificar butirolactonas insaturadas<sup>52</sup>.

**2.7.2 Cromatografía *flash*.** Es una técnica que implica la aplicación de presión positiva para el desplazamiento de la fase móvil. Para proporcionar la presión positiva sobre la columna *flash*, se utiliza un gas, normalmente aire comprimido o nitrógeno, para empujar a la fase móvil a través de la columna *flash* con una presión entre 1 y 2 atm. Esta presión es necesaria debido al

flujo restringido de la fase móvil causada por el tamaño de partícula de la fase estacionaria<sup>53</sup>. La fase estacionaria más utilizada en este tipo de cromatografía es gel de sílice, y el tamaño de partícula es generalmente de 40 – 63  $\mu\text{m}$  (malla 230 – 400).

La elección del eluyente o fase móvil, normalmente una mezcla de disolventes de diferente polaridad, se determina previamente realizando CCF para usar la mezcla más adecuada para una buena separación de los compuestos de la muestra de interés. Así también las fracciones que se obtienen de la separación por cromatografía *flash* se monitorean por CCF. Los componentes de las fracciones se observan con luz ultravioleta, o con algún reactivo revelador, con ayuda de estos reveladores se combinan las fracciones que sean similares.

**2.7.3 Cromatografía en placa preparativa.** Esta técnica funciona de manera análoga a la CCF, excepto que la capa del soporte es de un grosor mayor (0.5 a 2 mm) que el de la CCF (0.25 mm), lo cual permite la aplicación de una cantidad de muestra mayor. Los soportes pueden ser polares o de fase reversa.

Después de eluir la placa preparativa se marcan las manchas de cada compuesto reveladas por luz ultravioleta y se raspan con una espátula, posteriormente se extraen del polvo de la fase estacionaria con un disolvente adecuado. Una vez disueltos los compuestos, se filtran para retirar la fase estacionaria, y de esta forma obtener los compuestos puros o enriquecidos.

## **2.8. Métodos espectroscópicos para la elucidación de metabolitos**

Para elucidar la estructura química de los compuestos aislados, se analizan los datos de RMN, IR y EM correspondientes. El análisis de la información conjunta que proporcionan estos métodos y la comparación con la bibliografía, permite la asignación de estructura.

**2.8.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).** Este método espectroscópico se utiliza para la caracterización y elucidación estructural de moléculas orgánicas, organometálicas y bioquímicas. Esto es posible debido a la propiedad que tienen algunos núcleos atómicos de absorber radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia al ser colocados en un campo magnético intenso, externo y altamente homogéneo. La longitud de onda de radiofrecuencia absorbida depende del entorno químico y magnético de estos núcleos.

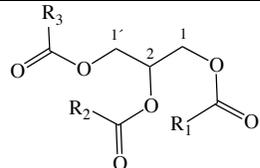
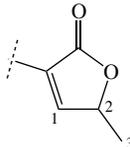
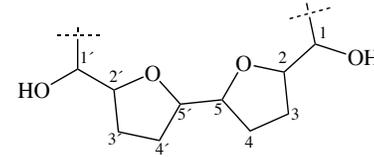
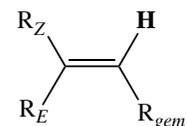
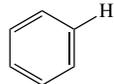
Los núcleos observables más comunes en RMN son el hidrógeno (RMN de  $^1\text{H}$ ) y el carbono 13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ). Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  muestran una serie de picos o señales de absorción con diferentes desplazamientos ( $\delta$ , en ppm), que representan a los protones con distintos ambientes químicos y magnéticos en una molécula, cada área de absorción (integral) es proporcional al número de protones que representa.

Otro parámetro importante que se obtiene del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  es la constante de acoplamiento ( $J$ ), que raramente excede de 20 Hz, este valor proporciona información sobre los protones adyacentes. El valor de  $J$  es la diferencia de frecuencia en Hz entre los picos que componen una señal múltiple, este valor es independiente del campo magnético aplicado<sup>54</sup>.

Con base en los compuestos ya caracterizados en el género *Annona*, triglicéridos, acetogeninas y fenoles, entre otros, los desplazamientos de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ , ppm) esperados para los compuestos aislados y sus constantes de acoplamiento (Hz) se muestran en la Tabla 5<sup>54</sup>.

Por otra parte, la RMN de  $^{13}\text{C}$  proporciona información acerca del esqueleto de las moléculas. En la Tabla 6 se muestran algunos desplazamientos químicos esperados para el  $^{13}\text{C}$  con base en los compuestos aislados en el género *Annona*.

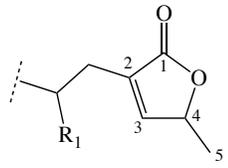
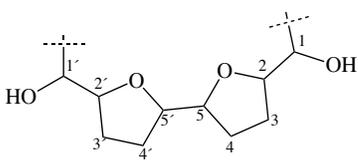
**Tabla 5.** Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm) y constantes de acoplamiento  $J$  (Hz) de RMN de  $^1\text{H}$  de interés para este trabajo<sup>51, 54</sup>

| Tipo de protón  | $\delta$ (ppm)   | Constante de acoplamiento $J$ (Hz) |
|---|--|------------------------------------|
|    | 1 y 1'   | (dd) $J = 4.3 - 6.0$ y 11.9        |
|   | 2  | q, $J = 5.1$                       |
| CH = CH - CH <sub>2</sub> - CH = CH   | 2.70 - 2.84  | t, $J = 6.5$                       |
|    | 1  | d, $J = 1.5$                       |
|   | 2  | cd, $J = 1.7, 6.8 - 7.1$           |
|   | 3  | d, $J = 6.3 - 7.1$                 |
|    | 1 y 1'   | m                                  |
|   | 2, 2', 5 y 5'  | 3.82 - 3.96                        |
|   | 3, 3', 4 y 4'  | 1.77 - 1.85                        |
|   | $5.25 + Z_{gem} + Z_Z + Z_E$   |                                    |
|   | $\delta_{\text{H}} = \text{COOH}_{gem}, \text{H}_E, \text{Ar}_Z = 6.62$  | 12 - 18 (E)                        |
|   | $\delta_{\text{H}} = \text{COOH}_{gem}, \text{H}_Z, \text{Ar}_E = 6.15$  | 6 - 12 (Z)                         |
|   | $\delta_{\text{H}} = \text{CH}_2_{gem}, \text{H}_Z, \text{CH}_2_E = 5.4$ |                                    |
|  |  | orto - 6 - 10                      |
|   |  | meta - 1 - 3                       |
|   |  | para - 0 - 1                       |
| COOH  | 10.5 - 13.0  | -                                  |
| CH - OH   | 3.8  | 4 - 10                             |
| CH - C(=O)OH  | 2.4 - 2.6  | -                                  |

dd = doble de dobles. d = doble. t = triple. cd = cuádruple de dobles. q = quintuple. m = múltiple.

Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , de igual manera que los de  $^1\text{H}$ , muestran picos o señales de absorción a diferentes desplazamientos químicos, el número de señales indica cuántas clases distintas de carbonos tiene un compuesto, sin embargo, algunos aspectos difieren de un espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

**Tabla 6.** Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm) de RMN de  $^{13}\text{C}$  de interés para este trabajo<sup>54, 50</sup>

| Tipo de carbono   | $\delta$ (ppm) |               |               |
|---|----------------|---------------|---------------|
|   | $\text{R}_1$   |               |               |
|   | H              | OH            |               |
|  | 1              | 173.8 – 174.6 |               |
|   | 2              | 134.3 – 134.4 | 131.1 – 131.2 |
|   | 3              | 148.8 – 149.0 | 151.7 – 151.8 |
|   | 4              | 77.3 – 77.9   |               |
|   | 5              | 19.0 – 19.3   |               |
|  | 1 y 1'         | 71.4 – 74.1   |               |
|   | 2 y 2'         | 82.8 – 83.3   |               |
|   | 3 y 3'         | 24.6 – 28.4   |               |
|   | 4 y 4'         | 28.9          |               |
|   | 5 y 5'         | 81.7 – 82.5   |               |
| Aromático C = C   | 110 – 160      |               |               |
| Alqueno C = C   | 110 – 140      |               |               |
| C – OH  | 45 – 80        |               |               |
| C – O – C   | 46 – 82        |               |               |
| Ácido C = O   | 170 – 180      |               |               |
| CO <sub>2</sub> R   | 170 – 173      |               |               |

Los picos de absorción en un espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no presentan multiplicidad con otros núcleos de  $^{13}\text{C}$  por su abundancia isotópica natural (1.1%). Sin embargo,  $^{13}\text{C}$  se acopla a núcleos de  $^1\text{H}$ , por lo que los experimentos de  $^{13}\text{C}$  desacoplado se realizan activando un desacoplador de hidrógeno.

Los picos de absorción de  $^{13}\text{C}$  están distribuidos en un intervalo de desplazamiento químico mayor (0 a 200 ppm para compuestos orgánicos) en comparación con el intervalo para  $^1\text{H}$  (0 a 15 ppm).

También es necesario considerar que se necesita mayor cantidad de muestra y tiempos prolongados para obtener el espectro de  $^{13}\text{C}$  ya que de manera natural este núcleo es menos

abundante (1.1%) que el núcleo de  $^1\text{H}$  (>99%)<sup>54</sup>. Las muestras a analizar deben tener un grado de pureza superior al 95% para asignar estructura química, sobre todo si las muestras tienen estructuras complejas.

**2.8.2 Infrarrojo (IR).** Este método espectroscópico permite identificar grupos funcionales presentes en la molécula, así como también puede ser utilizada para fines cuantitativos. La espectroscopía de reflexión en el infrarrojo ha encontrado varias aplicaciones, particularmente en el caso de muestras sólidas difíciles de manipular.

La reflexión de la radiación es de cuatro tipos: reflexión especular, reflexión difusa, reflexión interna y reflexión total atenuada (ATR). Una de las ventajas de los espectros ATR es que la muestra necesita una preparación mínima o nula antes de su análisis<sup>51</sup>. Conociendo las estructuras de los compuestos aislados en el género *Annona*, se enlistan los números de onda de grupos funcionales representativos en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) en IR de grupos funcionales representativos<sup>51</sup>.

| Grupo funcional                      | Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Características de la banda                          |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| C – H                                | 2926 – 2853                         | Intensidad fuerte                                    |
| O – H                                | 3600 – 3200                         | Intensidad fuerte y banda ancha                      |
| Benceno<br>sustituido en C1, C3 y C4 | 1400 – 1600                         | Varias bandas en esta región, de intensidad variable |
| C = C en benceno                     | 1680 – 1610                         | Intensidad media                                     |
| C = C en alqueno                     | 1662 – 1626<br>730 – 665            | Intensidad variable<br>Intensidad fuerte             |
| C = O                                | 1760 – 1690                         | Intensidad fuerte                                    |
| C – O                                | 1300 – 1050                         | Intensidad fuerte                                    |

**2.8.3 Espectrometría de masa (EM).** En el espectrómetro de masa las moléculas se ionizan al ser bombardeadas por un haz de electrones de alta energía, y se registra el resultado como un espectro de iones fragmento positivos o negativos (dependiendo del modo de ionización) los cuales son separados de acuerdo a la relación masa/carga ( $m/z$ ) correspondiente. Se pueden tener espectros de alta o baja resolución dependiendo de la separación de los iones. Los espectrómetros de alta resolución son aquellos que pueden separar y detectar iones que tienen  $m/z$  muy similares, proporcionando valores de  $m/z$  con 3 o más cifras decimales, lo que permite establecer la fórmula molecular con precisión mayor. El cálculo de las masas monoisotópicas de los iones que se proponen en este trabajo, se realizaron con MoIE-Molecular Mass Calculator v2.02.

Con este método se obtiene generalmente la masa monoisotópica del compuesto que se está elucidando y su patrón de fragmentación lo que permite reconstruir la molécula original<sup>54</sup>. Esta técnica es destructiva, sin embargo, se necesitan cantidades pequeñas de muestra (mg o  $\mu\text{g}$ ) para realizar el experimento<sup>54</sup>.

El análisis de los datos espectroscópicos obtenidos de los métodos de RMN, IR y EM son complementarios para realizar una elucidación correcta de estructuras de compuestos orgánicos. El método que proporciona más información es la RMN, y los datos de IR y EM corroboran la información.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Reactivos, medios de cultivo y disolventes

Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH<sup>•</sup>), sal monosódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-*p,p'*-disulfónico (ferrocina) con pureza 97%, ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico) monohidratado con pureza de +98% A.C.S., 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[[[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroxi-6-({[(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi}metil)oxan-2-il]oxi}-4*H*-cromen-4-ona (rutina) con pureza de  $\geq 94\%$  (HPLC), tween 80, dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) con pureza  $\geq 99.9\%$ , gel de sílice (grado 9385, Merck malla, 230-400, 60 Å) y ácido 3,5-dinitrobenzoico con pureza de 99%, de la marca Sigma-Aldrich. Reactivo de Folin-Ciocalteu y (2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2*H*-croman-3,5,7-triol ((+)-catequina) hidratada con pureza  $\geq 96\%$ , de la marca Fluka. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) A.C.S, sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) A.C.S, ácido fosfomolibdico hidratado (H<sub>3</sub>[P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>]•H<sub>2</sub>O), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) con pureza de 98% de la marca J. T. Baker. Cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) reactivo analítico y carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) anhidro A.C.S. fueron de la marca Fermont. Nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>) reactivo analítico de la marca Productos Químicos Monterrey. (*R*)-3,4-dihidroxi-5-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)furan-2(5*H*)-ona (ácido ascórbico) fue de la marca REASOL. Agar dextrosa y papa (PDA) de la marca DIBICO. Azoxistrobina de la marca Amistar. *Fusarium solani* se adquirió de la Colección Nacional de Cultivos Celulares y Microbianos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) con número de control CDBB-H-1407. Agua pasada por ósmosis, hexano, cloruro de metileno (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetona y acetato de etilo (AcOEt) de la marca REASOL. Etanol (EtOH), Metanol (MeOH) A.C.S. de la marca Reactivos

Química MEYER y de la marca HYCEL. Todos los disolventes se destilaron y desgasificaron antes de usarse.

Cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) con pureza de deuterio de 99.8% + 0.03 % v/v de TMS y metanol deuterado (MeOD) con pureza de deuterio de 99.8 % + 0.05% v/v de TMS de la marca Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

### **3.2. Equipos y materiales**

Balanza analítica modelo PA214 marca OHAUS, parrilla de agitación y calentamiento modelo CIMAREC marca Barnstead/Thermolyne, parrilla de agitación y calentamiento modelo C-MAG HS 4 y vórtex modelo V 3 S001 marca IKA, baño ultrasonicador modelo SB-3200DTN marca SCIENTZ, microcentrífuga modelo Mini-10K marca AOSHENG, centrífuga modelo IEC HN-SII marca International Equipment Company, cabina de bioseguridad purificador clase II delta series marca LABCONCO, molino ciclónico modelo Cyclotec 1093 marca FOSS, lámpara de luz ultravioleta modelo ENF-260C marca Spectroline, congelador modelo FUM17DRBRWH marca General Electric, refrigerador marca Acros, estufa modelo TOH433 marca CecCSA, rotavapor y bomba de vacío de diafragma V-700 marca BÜCHI, rotavapor modelo Laborota 4000-efficient marca Heidolph, rotavapor modelo RV 10 B S99 marca IKA, recirculador de agua modelo ECO marca SEV, campana de extracción de humos modelo CH-180 marca Prendo, equipo de punto de fusión marca SEV, lector de microplacas modelo Synergy HTX marca BioTek, espectrómetro de resonancia magnética nuclear modelo Ascend™ 400 marca Bruker, espectrofotómetro de IR Platinum-ATR Alpha marca Bruker, espectrómetro de masa de alta resolución Agilent Technologies 1100 series en modo positivo ESI-APCI (Departamento de Química del CINVESTAV-Zacatenco). Malla número 25 de acero inoxidable marca MATEX, micropipeta de 8 vías de 30-300  $\mu\text{L}$  marca Accumax, micropipeta 100-1000  $\mu\text{L}$  marca LABMATE, microplacas Costar de media área (fondo plano, no estériles de poliestireno con

capacidad de 330  $\mu\text{L}$ ), placas cromatográficas para cromatografía en capa fina con matriz de gel de sílice marca Sigma-Aldrich, placas cromatográficas para placa preparativa con matriz de sílice 60 F254, y de 1 mm de espesor marca Merck, cartucho C18 marca Burdick & Jackson de 100 mg, y material de cristalería en general.

El diagrama siguiente muestra la metodología general que se llevó a cabo en este trabajo, Figura 10. En este diagrama se observan de manera esquemática la obtención de los diferentes extractos orgánicos, los ensayos realizados para determinar su AA y AAF, el fraccionamiento del extracto metanólico con el uso de disolventes con diferente polaridad, la purificación posterior de las fracciones, así como la cristalización y elucidación de los compuestos de los extractos orgánicos.

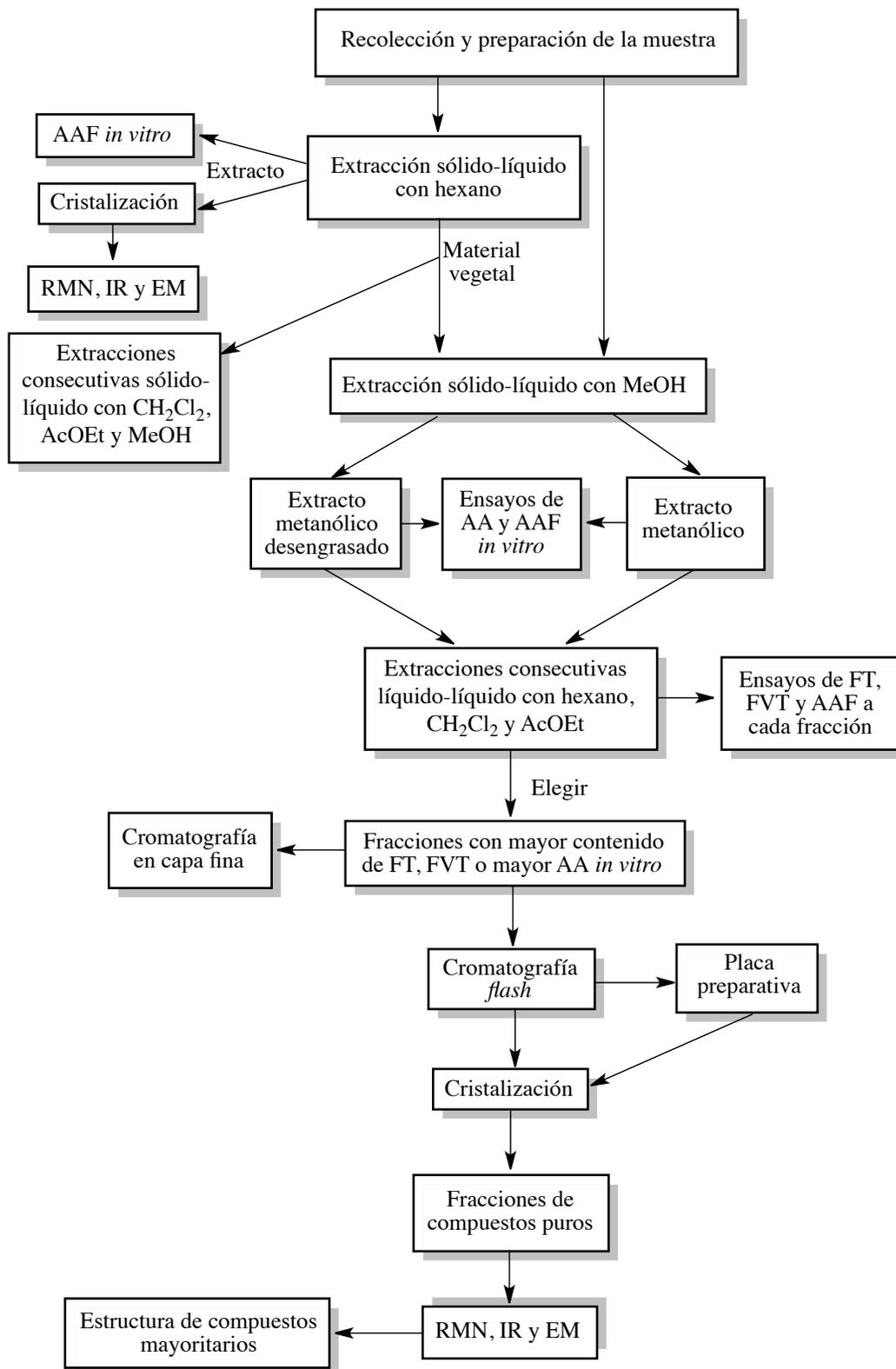


Figura 10. Diagrama general de la metodología empleada.

### 3.3. Obtención de la muestra

En el mes de octubre del 2014 se compraron los frutos de *A. purpurea* en el mercado Juan Sabinos en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Los frutos fueron transportados en aire acondicionado hasta los laboratorios de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM). En el laboratorio se procedió a la separación manual de las semillas de los frutos.

### 3.4. Preparación de la muestra

Las semillas después de ser separadas manualmente de la pulpa, se pesaron y se retiró el exceso de humedad en bandejas a temperatura ambiente en el mes de octubre.

Se determinó el porcentaje de humedad de las semillas utilizando la metodología establecida por la AOAC 930.15<sup>55</sup>. Se pesaron de 3 a 5 g de semilla y se colocaron en crisoles (llevados a peso constante previamente). Se mantuvieron a 120 °C durante 5 horas y posteriormente se cuantificó la masa de las semillas secas. La humedad se determinó con la Ecuación 5.

$$\% \text{ de humedad} = \left( \frac{\text{g mh} - \text{g ms}}{\text{g ms}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

donde:

g mh = gramos de masa húmeda.

g ms = gramos de masa seca

Posteriormente se redujo el tamaño de partícula de las semillas húmedas en un molino de tornillo sin fin, y en un molino ciclónico. Las semillas molidas, se tamizaron en una malla número 25, y se almacenaron a -20 °C en frascos opacos en un congelador, para protegerlas de la luz y evitar reacciones químicas activadas por la luz.

### 3.5. Obtención de extractos metanólicos de las semillas de *A. purpurea*

Se obtuvieron tres tipos de extracto metanólico a partir de la semilla molida y tamizada de *A. purpurea* por extracción sólido-líquido: un extracto *metanólico*, un extracto *metanólico desengrasado* y un extracto *metanólico remanente*.

Para realizar los ensayos de AA se necesitó aproximadamente 0.1 g de los tres tipos de extracto metanólico. Estos extractos orgánicos se obtuvieron con la siguiente metodología.

Para el extracto *metanólico* se pesó 1 g de semilla molida y tamizada de *A. purpurea* contenido en un tubo tipo Falcon de 50 mL y se le agregaron 5 mL de MeOH. La mezcla se homogenizó mediante agitación manual por 3 minutos y se realizó la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz durante 15 minutos a  $25 \pm 2$  °C. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. Posteriormente se filtró a través de algodón para remover los sólidos del extracto y al algodón se le realizaron lavados con el disolvente para recuperar el extracto retenido en el algodón, luego de recuperar el filtrado se removió el disolvente orgánico a 40 °C a presión reducida en un evaporador rotatorio. Esta extracción se repitió cuatro veces más siguiendo la misma metodología.

Para el extracto *metanólico desengrasado* se realizó primeramente una extracción sólido-líquido con hexano para desengrasar la muestra y después una extracción sólido-líquido con MeOH, las dos extracciones fueron realizadas con la metodología antes mencionada.

Para obtener el extracto *metanólico remanente* se realizaron extracciones sólido-líquido consecutivas con hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt y MeOH, la metodología con la que se realizaron las extracciones fue la antes mencionada con una modificación en el tiempo de extracción, que disminuyó a 10 minutos y la cantidad de semilla molida y tamizada fue de 5 g.

A estos extractos metanólicos se les determinó la AA por los ensayos de reducción del DPPH' (sección 3.7.1) y actividad quelante (sección 3.7.2), el contenido de FT (sección 3.8) y contenido de FVT (sección 3.9). También a estos extractos se les determinó la AAF *in vitro* contra *F. solani* (sección 3.10).

Para realizar el fraccionamiento de los extractos *metanólico* y *metanólico desengrasado* de las semillas de *A. purpurea* se necesitó mayor cantidad de estos dos extractos, por lo que se siguió la metodología siguiente.

El extracto *metanólico* se obtuvo a partir de 100 g de semillas molidas y tamizadas, las cuales se combinaron con 500 mL de MeOH destilado. Posteriormente, la mezcla se homogenizó mediante agitación manual por 3 minutos y se realizó la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz durante 15 minutos a 25 °C. Pasado este tiempo, la mezcla se dejó reposar durante 20 minutos y posteriormente se filtró a través de algodón para remover los sólidos del extracto y al algodón se le realizaron lavados con el disolvente para recuperar el extracto retenido en el algodón.

El filtrado se evaporó a 40 °C a presión reducida en un evaporador rotatorio. Esta extracción se repitió cuatro veces más siguiendo la misma metodología. Los extractos orgánicos se combinaron para la obtención del extracto metanólico. La masa del extracto libre de disolvente se determinó en cada extracción y se registró el rendimiento global de extracción.

El extracto *metanólico desengrasado* se obtuvo a partir de un material vegetal que previamente se extrajo con hexano para desengrasar la muestra. Esta extracción se llevó a cabo de manera similar a la extracción con metanol, previamente descrita. Una vez desengrasada la muestra se procedió a hacer la extracción sólido-líquido con MeOH utilizando las mismas condiciones de extracción. Al extracto *metanólico* y *metanólico desengrasado* se les realizó las

extracciones líquido-líquido para obtener las diferentes fracciones con base a su polaridad (sección 3.6).

### 3.6. Extracción líquido-líquido

Para fraccionar el extracto *metanólico* y el *metanólico desengrasado*, se procedió a realizar extracciones líquido-líquido con hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt de manera consecutiva.

Primeramente, el extracto metanólico o metanólico desengrasado (10.0 g aproximadamente) se suspendió en 60 mL de agua destilada, después se realizó la extracción líquido-líquido con 120 mL de hexano (en el caso del extracto metanólico desengrasado se realizó para separar algunos compuestos no polares que no se extrajeron en la extracción sólido-líquido con hexano). La mezcla se agitó vigorosamente ocho veces durante 5 segundos en un embudo de separación y se dejó reposar media hora para permitir la separación de fases. La fase orgánica se retiró del embudo de separación y a la fase acuosa se le realizaron cinco extracciones más con hexano empleando el mismo procedimiento.

Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se filtraron a través de un embudo provisto de algodón. La fase orgánica se evaporó en un rotavapor a 40 °C y a presión reducida. Se registró la masa de la fracción obtenida para calcular el rendimiento de extracción. La fase acuosa remanente de la extracción con hexano se sometió a extracciones sucesivas líquido-líquido, usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt, respectivamente.

En la extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a la fase acuosa se le añadieron 40 mL más de agua destilada y 160 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , los pasos sucesivos fueron los mismos que en el caso de la extracción con hexano. Para la extracción con AcOEt a la fase acuosa se le añadieron 160 mL de AcOEt y la mezcla se agitó vigorosamente diez veces durante 5 segundos, los pasos sucesivos fueron los mismos que en las extracciones anteriores. A las fracciones de hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt se les

determinó el contenido de FT (sección 3.8), contenido de FVT (sección 3.9) y AAF *in vitro* contra *F. solani* (sección 3.10).

### 3.7. Actividad antioxidante (AA)

La metodología de los ensayos para determinar la AA del extracto metanólico de las semillas de *A. purpurea* se describen a continuación. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

**3.7.1 Ensayo con el radical DPPH<sup>•</sup>, actividad antirradicalar (IC<sub>50</sub>).** Este ensayo se realizó según lo descrito en la literatura por Julián-Loeza *et al.* (2011)<sup>26</sup>. *Preparación de disolución: stock DPPH<sup>•</sup> al 0.1% (p/v):* 10 mg de DPPH<sup>•</sup> se pesaron y disolvieron en MeOH hasta alcanzar un volumen de 10 mL, en ausencia de luz. A partir de esta disolución se preparó una disolución de DPPH<sup>•</sup> al 0.004%, 0.4 mL se midieron de la disolución anterior y se llevaron a un volumen de 10 mL con MeOH, esta disolución se resguardó de la luz y se dejó en refrigeración entre las mediciones.

El ácido gálico, rutina y ácido ascórbico fueron usados como controles. *Preparación de disoluciones:* **Disolución de ácido gálico de 100 µg/mL:** 1 mg de ácido gálico se pesó y disolvió en MeOH al 90%, posteriormente, se llevó a un volumen de 10 mL. De esta disolución se prepararon disoluciones a concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 µg/mL. **Disolución de rutina de 200 µg/mL:** 2 mg de rutina hidratada se pesaron y disolvieron en MeOH hasta alcanzar un volumen de 10 mL. De esta disolución se prepararon disoluciones a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL. **Disolución de Ácido ascórbico de 100 µg/mL:** 1 mg de ácido ascórbico se pesó y se llevó a un volumen de 10 mL con H<sub>2</sub>O destilada. De esta disolución se prepararon disoluciones a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL.

*Cuantificación.* A 70  $\mu\text{L}$  del extracto (MeOH, 140-220; MeOH desengrasado, 120-200; MeOH remanente, 40-115  $\mu\text{g/mL}$ ) o del control se le agregaron 70  $\mu\text{L}$  de DPPH $\cdot$  al 0.004% en una microplaca, la mezcla se mantuvo en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz y posteriormente se agitó con velocidad media por 1 minuto en el lector de microplacas. Finalmente las absorbancias del extracto o del control se leyeron a 515 nm.

Para medir la absorbancia de DPPH $\cdot$  para el control de ácido gálico y rutina, se empleó la mezcla de la disolución de DPPH $\cdot$  al 0.004% y MeOH. El control de ácido ascórbico se preparó con la mezcla de la disolución de DPPH $\cdot$  al 0.004% y H $_2$ O destilada. Para el blanco de los extractos y de los controles se usó la mezcla de la dilución de mayor concentración y MeOH o H $_2$ O destilada, dependiendo del control utilizado.

La actividad antirradicalar se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó usando la Ecuación 1. Se graficaron las concentraciones del extracto, o de los controles empleados, contra el porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ inhibición} = \left[ \frac{(A_{\text{DPPH}\cdot} - A_{\text{Extr}})}{A_{\text{DPPH}\cdot}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

$A_{\text{DPPH}\cdot}$  = Absorbancia de DPPH $\cdot$

$A_{\text{Extr}}$  = Absorbancia del extracto o del control

A partir de las ecuaciones obtenidas de las curvas de los controles, Apéndice A, y de los extractos, Apéndice B, se determinó las IC $_{50}$  correspondientes, que se reportó como  $\mu\text{g}$  de extracto o control/mL.

**3.7.1.1 Cinética de eficiencia antirradicalar (AE).** Las disoluciones que se emplearon en este ensayo fueron las mismas que las utilizadas para la cuantificación de la actividad antirradicalar.

*Cuantificación.* La cuantificación se realizó según lo descrito en la literatura por Julián-Loeza *et al.* (2011)<sup>26</sup>. Este método se adaptó a un lector de microplacas. A 70  $\mu\text{L}$  del extracto o del control, a la  $\text{IC}_{50}$  antes calculada (MeOH, 197.5; MeOH desengrasado, 151.3  $\mu\text{g/mL}$ ) se le adicionaron 70  $\mu\text{L}$  de DPPH $\cdot$  0.004% en una microplaca, la mezcla se agitó 15 segundos a velocidad media y posteriormente se midió la absorbancia cada minuto por 60 minutos a 515 nm, a temperatura ambiente, en ausencia de luz, en el lector de microplacas.

El porcentaje de DPPH $\cdot$  remanente se graficó contra el tiempo para obtener gráficamente el tiempo requerido para alcanzar el estado de equilibrio de la reacción con la  $\text{IC}_{50}$ , este punto es denominado  $\text{T}_{\text{IC}_{50}}$ , Apéndice C. Con los valores de  $\text{IC}_{50}$  y  $\text{T}_{\text{IC}_{50}}$  se calculó el valor de la eficiencia antirradicalar (AE o *antiradical efficient*) expresada como  $\text{kg de DPPH}\cdot/(\text{g de antioxidante}\cdot\text{min})$  (Gramza *et al.*, 2005)<sup>18</sup>, de acuerdo a la Ecuación 2:

$$\text{AE} = \frac{1}{\text{IC}_{50} \times \text{T}_{\text{IC}_{50}}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Para medir la absorbancia de DPPH $\cdot$ , se empleó la mezcla de la disolución de DPPH $\cdot$  al 0.004% y MeOH. Para el blanco de los extractos y de los controles se empleó la mezcla del extracto o control y MeOH.

**3.7.2 Ensayo de actividad quelante.** Este ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito en la literatura por Canabady-Rochelle, *et al.* (2015)<sup>21</sup> adaptándose a un lector de microplacas. *Preparación de disoluciones:* **FeSO $_4$   $\cdot$  7H $_2$ O 0.5 mM:** 14 mg de FeSO $_4$   $\cdot$  7H $_2$ O se pesaron y disolvieron en H $_2$ O destilada hasta alcanzar un volumen de 100 mL. **Ferrocina 2.5 mM:** 61.6 mg de ferrocina se pesaron y disolvieron en H $_2$ O destilada hasta alcanzar un volumen de 50 mL.

**Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 150 µg/mL:** 15 mg de EDTA se pesaron y se llevaron a un volumen de 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada. A partir de esta disolución se prepararon 10 mL de disoluciones a concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL. Las diluciones de llevaron a cabo con H<sub>2</sub>O destilada.

*Cuantificación:* En una microplaca se mezclaron 80 µL de las disoluciones de: EDTA (para la curva de calibración), extracto (995-10020 µg/mL, para la curva del MeOH remanente), H<sub>2</sub>O (como control) o disolución más concentrada (como blanco); con 30 µL de la disolución de FeSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0.5 mM. Posteriormente, la mezcla se llevó a agitación por 15 segundos a temperatura de 37 °C en el lector de microplacas, después se adicionaron a 30 µL de la disolución de ferrocina, excepto para el blanco para el cual se adicionó H<sub>2</sub>O, y se dejó reposar en el lector por 10 min a 37 °C. Finalmente, la mezcla se agitó por 15 segundos y se leyó la absorbancia a 560 nm.

El % de efecto quelante calculado con la Ecuación 3, se graficó contra las correspondientes concentraciones de EDTA y del extracto, Apéndice D.

$$\% \text{ Efecto quelante} = \left[ \frac{(A_0 - A_{\text{Extr}})}{A_0} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde:

A<sub>0</sub> = Absorbancia del control

A<sub>Extr</sub> = Absorbancia del extracto o del EDTA.

Con las ecuaciones de las gráficas del EDTA y del extracto, obtenidas por regresión lineal, se calculó la IC<sub>50</sub> del EDTA y del extracto, el cual se reportó como µg de extracto o EDTA/mL. Utilizando la gráfica de EDTA se extrapoló el % de efecto quelante del extracto para obtener la

concentración del extracto equivalente a EDTA. El resultado se expresó como equivalentes de EDTA/ g de extracto, 100 g de muestra húmeda y seca.

Para calcular el índice EECC se utilizaron las pendientes de las gráficas del extracto ( $m_{Ext}$ ) y del EDTA ( $m_o$ ) empleando la Ecuación 4:

$$EECC = \frac{m_{Ext}}{m_o} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde:

$m_{Ext}$  = Pendiente de la gráfica del extracto.

$m_o$  = Pendiente de la gráfica del EDTA.

### 3.8. Contenido de fenoles totales (FT)

Este ensayo se realizó según lo descrito en la literatura por Julián-Loeza *et al.* (2011)<sup>26</sup>. *Preparación de disoluciones. EtOH acuoso al 90% (v/v):* 90 mL de EtOH se mezclaron con 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada. **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.5% (p/v):** 50 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se pesaron y disolvieron en H<sub>2</sub>O destilada hasta alcanzar un volumen de 10 mL. **Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M:** 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M se midieron en ausencia de luz, y se llevaron a un volumen de 10 mL con H<sub>2</sub>O destilada. **Disolución de ácido gálico de 100 µg/mL:** 1 mg de ácido gálico se pesó y disolvió en EtOH al 90% hasta alcanzar un volumen de 10 mL. De esta disolución se prepararon disoluciones a concentraciones de 4, 6, 8, 10 y 12 µg/mL. Las diluciones se llevaron a cabo con EtOH al 90%.

*Cuantificación.* La cuantificación se realizó modificando ligeramente el método colorimétrico que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu (Julián-Loeza *et al.*, 2011)<sup>26</sup>. 40 µL de extracto (MeOH desengrasado, 200; MeOH remanente, 330; AcOEt, 50 µg/mL) o del ácido gálico se mezclaron con 40 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M en una microplaca. La

mezcla se dejó en reposo por 3 minutos a temperatura ambiente en el lector de microplacas y posteriormente se agitó por 15 segundos a baja velocidad. Pasado este tiempo, a la mezcla anterior se le adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 0.5% que se incorporaron mediante succión (tres veces) con la micropipeta multicanal. La mezcla se dejó reposar 30 minutos a 40  $^\circ\text{C}$  y se agitó por 1 minuto a velocidad media en el lector de microplacas. Finalmente la absorbancia se leyó a 750 nm.

Al blanco del extracto o del ácido gálico (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se le adicionó  $\text{H}_2\text{O}$  destilada en lugar del reactivo de Folin-Ciocalteu. A partir del gráfico de las concentraciones del ácido gálico contra las absorbancias obtenidas y una regresión lineal, se obtuvo una curva de calibración, Apéndice E. A partir de la ecuación de la recta se obtuvo el contenido de FT expresados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g de extracto, 100 g de semilla húmeda y seca.

### 3.9. Contenido de flavonoides totales (FVT)

Este ensayo se realizó según lo descrito por Julián-Loeza et al. (2011)<sup>26</sup>. *Preparación de las disoluciones.*  **$\text{NaNO}_2$  al 1.5% (p/v):** 375 mg de  $\text{NaNO}_2$  se pesaron y disolvieron en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, posteriormente se llevaron a un volumen de 25 mL.  **$\text{AlCl}_3$  al 3% (p/v):** 300 mg de  $\text{AlCl}_3$  se pesaron y disolvieron en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta alcanzar un volumen de 10 mL.  **$\text{NaOH}$  1 N:** 400 mg de  $\text{NaOH}$  se pesaron y disolvieron en  $\text{H}_2\text{O}$  hasta alcanzar un volumen de 10 mL. **Disolución de catequina 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :** 10 mg de (+)-catequina se pesaron y disolvieron en  $\text{MeOH}$  hasta alcanzar un volumen de 10 mL, en ausencia de luz. De esta disolución se prepararon disoluciones a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **Disolución de quercetina 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :** 10 mg de quercetina se pesaron y disolvieron en  $\text{MeOH}$  hasta alcanzar un volumen de 10 mL, en ausencia de luz. A partir de esta disolución se prepararon disoluciones a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

*Cuantificación.* Se mezclaron en un vial ambar, 1 mL del extracto (MeOH remanente, 260; MeOH tratado 300; AcOEt, 110 µg/mL) o del estándar, con 1 mL de NaNO<sub>2</sub> al 1.5%. La mezcla se agitó por 5 minutos en un vórtex a temperatura ambiente en ausencia de luz. De esta mezcla se midieron 50 µL y se colocaron en una microplaca. A esta mezcla se le agregaron 50 µL de AlCl<sub>3</sub> al 3% y se agitó por 1 minuto a temperatura ambiente y velocidad media en el lector de microplacas. Pasado este tiempo a la mezcla anterior se le adicionaron 50 µL de NaOH 1 N que se incorporaron mediante succión (tres veces) con la micropipeta multicanal. Posteriormente la mezcla se agitó por un minuto a temperatura ambiente y velocidad media en el lector de microplacas. Finalmente, la absorbancia se leyó a 490 nm.

Al blanco de la muestra o del estándar (dilución más concentrada) se le adicionó H<sub>2</sub>O destilada en lugar del reactivo de AlCl<sub>3</sub>. Para las curvas de calibración se utilizó catequina y quercetina como estándares, Apéndice F. A partir de las ecuaciones obtenidas por regresión lineal de las gráficas de los estándares, se obtuvo el contenido de FVT expresados como mg equivalentes de catequina (EC) o quercetina (EQ)/ g de extracto, 100 g de muestra húmeda y seca.

### **3.10. Actividad antifúngica (AAF)**

La AAF de los extractos de las semillas de *A. pupurea* contra *F. solani* se determinó según lo descrito por Lira-De León *et al.* (2014)<sup>56</sup> siguiendo la metodología que se describe a continuación.

*Preparación de disoluciones y medio de cultivo.* **Medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA).** 39 g de agar papa dextrosa se pesaron y disolvieron en 1000 mL de agua pasada por ósmosis inversa, la mezcla se dejó reposar por 15 minutos y posteriormente se llevó a ebullición por 1 minuto con agitación constante. Pasado este tiempo se esterilizó a 121 °C y 1 atm de

presión durante 20 minutos. El medio de cultivo se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45 °C aproximadamente, posteriormente se transfirió a placas Petri en un ambiente estéril. **Tween 80 al 0.2%**. 200 µL de tween 80 se midieron y llevaron a un volumen de 100 mL con agua pasada por ósmosis inversa, finalmente la disolución se esterilizó a 121 °C y 1 atm de presión durante 20 minutos.

**3.10.1 Actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de *F. solani*.** Para evaluar esta actividad se emplearon placas Petri de 9 cm de diámetro, con medio PDA. Los extractos (MeOH, 248.4; MeOH desengrasado, 209.5; MeOH remanente, 284.4 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 197.4 µg/mL) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), excepto los extractos hexánicos (líquidos). En cada placa con medio PDA se colocó un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de *F. solani* de 12 días de crecimiento y se le agregaron 20 µL de cada tratamiento (DMSO, extracto, azoxistrobina) a tres diluciones 1:0, 1:10 y 1:100 utilizando como disolvente tween 80 al 0.2%, previamente preparados. Cada uno de los tratamientos consistió de tres repeticiones, realizándose el experimento por triplicado. El testigo positivo fue azoxistrobina, un antifúngico comercial, y el negativo DMSO. Las placas Petri se incubaron a temperatura ambiente durante siete días en posición invertida.

El porcentaje de crecimiento se determinó de acuerdo a la Ecuación 6:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[ \frac{(CMT - CMTr)}{CMT} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

donde:

CMT = Crecimiento micelial del testigo negativo.

CMTr = Crecimiento micelial del tratamiento.

El crecimiento se determinó a través del área de crecimiento, la cual se calculó de las placas escaneadas (con una escala en centímetros) y usando el programa Image J. Las mediciones se realizaron en las placas Petri con menor interferencia de crecimiento de las esporas fuera del disco, y se expresó como % de inhibición de la media de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

**3.10.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI).** Para determinar el efecto de los extractos sobre la formación de conidios de *F. solani* se utilizaron placas Petri con medio PDA totalmente colonizadas por el hongo de 20 días de crecimiento.

El contenido de las placas se colocó en un vaso de precipitados estéril realizando tres enjuagues con agua destilada estéril con tween 80 al 0.2% con ayuda de una varilla acodada estéril. La disolución resultante de conidios se filtró a través de una gasa estéril, posteriormente se determinó la cantidad de conidios en una cámara de Neubauer, para obtener una concentración final de  $1 \times 10^4$  conidios por mL.

Los tratamientos se prepararon de acuerdo a la concentración máxima que se utilizó en el ensayo de actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial.

200  $\mu$ L de cada tratamiento (MeOH, 248.4; MeOH desengrasado, 209.5; MeOH remanente, 284.4  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 197.4  $\mu\text{g/mL}$ ) disuelto en DMSO (con excepción de los extractos hexánicos) se mezclaron con 1.8 mL de agua estéril con tween 80 al 0.2% en un tubo de ensayo, para obtener una concentración de X  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de la primera concentración, se prepararon 9 tubos con 1 mL de agua estéril con tween 80 al 0.2% y se realizaron diluciones seriadas. A cada tubo con 1 mL de muestra diluida se le agregó 1 mL del inóculo ( $1 \times 10^4$  conidios), quedando diluciones a la mitad. Finalmente los tubos de ensayo se colocaron en contenedores manteniéndolos en agitación a 150 rpm y a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C durante 7 días. Como control negativo se utilizó el DMSO y como control positivo, se utilizó el antifúngico comercial azoxistrobina.

La CMI fue la concentración a la que no se observó crecimiento en el tubo. Posteriormente se tomó 1 mL de los tubos donde no se observó crecimiento y se inocularon en placas Petri con medio PDA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante siete días en posición invertida. Se observó el crecimiento en las placas Petri para determinar la actividad fungistática o fungicida de los extractos probados. Este ensayo se realizó por triplicado.

### 3.11. Cromatografía

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizó como fase estacionaria gel de sílice en una placa o cromatofolio de 2.5 x 5 cm. Mezclas de diferentes disolventes se probaron como fase móvil, los disolventes utilizados fueron: hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, acetona, MeOH y EtOH. Las mezclas seleccionadas fueron aquellas que permitieron una separación apropiada de los componentes del extracto.

Los extractos hexánicos se examinaron por CCF con la mezcla de hexano:CHCl<sub>3</sub> (1:1), Apéndice I, el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se examinó por CCF con mezclas de hexano:AcOEt (9:1, 7:3, 1:1 y 4:6) Apéndice J. Los compuestos se observaron al exponer la placa a una lámpara de luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  y  $365$  nm), o al revelar con yodo, ácido fosfomolibdico, ácido sulfúrico al 5% en H<sub>2</sub>O o el reactivo de Kedde (ácido 3,5-dinitrobenzoico al 2% en EtOH al 90% y KOH 1 M en EtOH)<sup>52</sup>.

De los extractos hexánicos se obtuvo un sólido blanco por cristalización a temperatura ambiente, el cual se denominó Hx1, con un rendimiento de 0.3% con respecto al extracto hexánico y 0.05% con respecto a 100 g de semilla húmeda de *A. purpurea*. Se caracterizó la estructura de Hx1 con RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en una y dos dimensiones, IR y EM de alta resolución. Los extractos orgánicos de hexano-a (obtenido de la extracción sólido-líquido), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

(obtenido por extracción líquido-líquido) y metanólico remanente se purificaron utilizando cromatografía en columna *flash* en gel de sílice (20.5 x 3.8 cm) Merck, malla 230-400, 60 Å.

1.0322 g de extracto hexánico-a se pesaron y disolvieron en 600 µL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, posteriormente, con una pipeta Pasteur, se transfirieron a una columna *flash*. Las proporciones y volúmenes de los disolventes empleados en esta columna, así como el rendimiento de cada fracción del extracto hexánico-a se enlistan en la Tabla 8. A las fracciones obtenidas de esta columna *flash* se les realizó CCF para combinar aquellas que resultaran similares (por similitud cromatográfica) y posteriormente se cristalizaron a temperatura ambiente y/o se llevaron a los ensayos de AAF.

**Tabla 8.** Cromatografía en columna *flash* y rendimiento de las fracciones del extracto hexánico-a obtenido por extracción sólido-líquido.

| Disolventes                     | Proporción | Volumen (mL) | Masa de la fracción (mg) | Rendimiento % |
|---------------------------------|------------|--------------|--------------------------|---------------|
| Hexano                          | -          | 200          | 431.4                    | 41.8          |
|                                 | 9:1        | 100          | 11.7                     | 1.1           |
|                                 | 8:2        | 100          | 6 x 10 <sup>-4</sup>     | 0.1           |
|                                 | 6:4        | 100          | 6 x 10 <sup>-4</sup>     | 0.1           |
|                                 | 1:1        | 100          | 2 x 10 <sup>-4</sup>     | 0.0           |
|                                 | 3:7        | 100          | 3 x 10 <sup>-4</sup>     | 0.0           |
|                                 | 1:9        | 100          | 5 x 10 <sup>-4</sup>     | 0.1           |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | -          | 100          | 7 x 10 <sup>-4</sup>     | 0.1           |
|                                 | 9:1        | 100          | 6.5                      | 0.7           |
|                                 | 8:2        | 100          | 20.9                     | 2.0           |
|                                 | 7:3        | 100          | 4.7                      | 0.5           |
|                                 | 1:1        | 100          | 8.9                      | 0.7           |
| AcOEt                           | -          | 250          | 1.7                      | 0.2           |
| MeOH                            | -          | 200          | 22.9                     | 2.2           |

Para la cromatografía en columna *flash* en gel de sílice del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (obtenido por extracción líquido-líquido) se utilizaron 0.8983 g del extracto disueltos en 2 mL de CHCl<sub>3</sub>, y se colocaron en la columna *flash* con una pipeta Pasteur. Para llevar a cabo la elución se utilizaron los disolventes hexano, AcOEt, y MeOH, así como mezclas de ellos. Las proporciones de cada disolvente, el volumen y el rendimiento de cada fracción se enlistan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Cromatografía en columna *flash* y rendimiento de las fracciones del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtenido por extracción líquido-líquido.

| Disolventes  | Proporción | Volumen (mL) | Masa de la fracción (mg)         | Rendimiento %                  |
|--------------|------------|--------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Hexano:AcOEt | 9:1        | 100          | 14.0                             | 1.6                            |
|              | 7:3        | 100          | 21.0                             | 2.3                            |
|              | 1:1        | 300          | 52.2                             | 5.8                            |
|              | 4:6        | 400          | 45.0                             | 5.0                            |
|              | 3:7        | 100          | (1) 15.4<br>(2) 22.8             | (1) 1.71<br>(2) 2.5            |
|              | 2:8        | 200          | 20.2                             | 2.2                            |
|              | 1:9        | 300          | (1) 10.7<br>(2) 49.4<br>(3) 10.4 | (1) 1.19<br>(2) 5.5<br>(3) 1.1 |
| AcOEt        | -          | 300          | (1) 52.1<br>(2) 70.5             | (1) 5.6<br>(2) 7.8             |
| AcOEt:MeOH   | 9:1        | 200          | 159.8                            | 17.8                           |
|              | 8:2        | 200          | 33.2                             | 3.7                            |
|              | 1:1        | 100          | 118.0                            | 13.1                           |
| MeOH         | -          | 300          | 25.2                             | 2.8                            |

A las fracciones obtenidas de esta columna *flash* se les realizó CCF para combinar aquellas que resultaran similares (por similitud cromatográfica). Por último se cristalizaron en mezclas de AcOEt:acetona.

A partir de la cristalización se obtuvieron 4.5 mg de un polvo blanco de las fracciones de 1:9 (2) hexano:AcOEt y AcOEt (2) que se le denominó  $C_{CH1}$ . Así también se obtuvieron 30.6 mg de las fracciones 2:8 y 1:9 (3) hexano:AcOEt, y por CCF se observaron 4 compuestos, entre ellos se observó uno con el perfil cromatográfico similar a  $C_{CH1}$ , por lo que se realizó una placa preparativa para obtener la suficiente cantidad de  $C_{CH1}$  para realizar los experimentos de caracterización química.

Para realizar la placa preparativa se utilizaron placas de gel de sílice de 20 x 20 cm con un espesor de 1 mm con base de vidrio. Los 30.6 mg de las fracciones denominadas 2:8 y 1:9 (3) hexano:AcOEt se disolvieron en 600  $\mu$ L  $CHCl_3$  posteriormente se aplicó la muestra a lo ancho de la placa con ayuda de un capilar. Después, la placa se colocó en una cámara de cromatografía que contenía la fase móvil  $CHCl_3$ :AcOEt:MeOH (77:19:4). La placa se retiró de la cámara cuando los disolventes ascendieron prácticamente al extremo opuesto de la placa y se secó a temperatura ambiente. La placa se examinó con una lámpara de luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  y 365 nm), y se observaron seis bandas  $B_{CH1} - B_{CH6}$ , dichas bandas se marcaron con un lápiz.

Una vez localizadas y marcadas las bandas, se rasparon de la placa, uno a uno, con la ayuda de una espátula y posteriormente cada raspado (compuesto con la fase estacionaria) se colocó en un matraz Erlenmeyer, y se agregaron 20 mL de MeOH. El sobrenadante se filtró a través de filtro del # 1 para remover los restos de la fase estacionaria. Al raspado se le realizaron cuatro lavados con 20 mL de MeOH. Por último, el disolvente del filtrado se removió a 40 °C a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Los porcentajes de rendimiento de cada compuesto fueron:  $B_{CH1}$  3.6%,  $B_{CH2}$  8.2%,  $B_{CH3}$  9.8%,  $B_{CH4}$  18.3%,  $B_{CH5}$  7.5% y  $B_{CH6}$  0.3%. Una vez obtenidos los diferentes compuestos, se realizaron CCF donde se observó que  $B_{CH4}$  era similar a  $C_{CH1}$  por lo que se combinaron, obteniendo 10.9 mg, y su rendimiento fue de 1.21% con respecto al extracto de  $CH_2Cl_2$  y 0.4%

por 100 g de semilla húmeda de *A. purpurea*. El compuesto puro se analizó por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones, IR y EM de alta resolución.

### 3.12. Caracterización química

La caracterización de los compuestos puros o extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea* se realizó mediante el análisis e interpretación de los datos de RMN de líquidos en una y dos dimensiones, de IR y de espectrometría de masa de alta resolución.

**3.12.1 RMN.** Los tubos de resonancia que se emplearon para contener la muestra fueron de 5 mm de diámetro. La obtención de los espectros de RMN se realizaron para  $^1\text{H}$  a 400.17 MHz con una ventana espectral de 0 – 16 ppm, 64 escaneos y el programa de pulsos zg30, y para  $^{13}\text{C}$  a 100.63 MHz, una ventana espectral de 0 – 238 ppm, 8000 – 15000 escaneos y el programa de pulsos zgpg30. Los experimentos de 2D fueron gHMBC, 64 escaneos con el programa de pulsos hmbcgp1ndqf, gHSQC, 64 escaneos con el programa de pulsos hsqcetgpsi2 y DEPT 10000 escaneos y el programa de pulsos dept90 y dept135. La temperatura de la sonda fue de 19 °C. En los espectros bidimensionales heteronucleares F1 se designó al  $^{13}\text{C}$  y F2 al  $^1\text{H}$ . Los compuestos se disolvieron en  $\text{CDCl}_3$ , que presenta una señal simple en 7.27 ppm para RMN de  $^1\text{H}$  y una señal triple en 77.0 ppm en RMN de  $^{13}\text{C}$ . La concentración de las muestras de extractos hexánicos en  $\text{CDCl}_3$  fue de aproximadamente 70 mg/mL. Mientras que para la obtención de los espectros del triacilglicerol, 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol, la concentración fue de 4 mg/mL. La concentración para la acetogenina esquamocina C fue de 20 mg/mL. Los espectros fueron procesados con el programa TopSpin 3.5pl6.

**3.12.2 IR.** El espectrofotómetro utilizado tiene un cristal de diamante soldado con carburo de tungsteno. Para la obtención del espectro de ATR-FT-IR, se colocó la cantidad necesaria de muestra para cubrir totalmente el portamuestras del equipo y se obtuvieron los espectros con los

tiempos estándares del equipo, 24 escaneos, excepto para la acetogenina esquamocina C que fueron de 120 escaneos. La ventana espectral fue de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , resolución de  $4 \times 10^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y se guardaron como unidades de absorbancia. Se obtuvieron espectros de haz único de las muestras sobre un fondo de aire usando las mismas condiciones instrumentales. Las muestras a las que se les obtuvo el espectro de ATR-FT-IR fueron: Extractos hexánicos, triacilglicerol, 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol y esquamocina C.

**3.12.3 EM.** La obtención de los espectros de masa de alta resolución se realizaron en el espectrómetro de masa Agilent 1100 series en modo positivo con ionización por electrospray (ESI). Estos experimentos se realizaron en el departamento de Química del CINVESTAV-Zacatenco.

### **3.13. Análisis estadístico**

De los ensayos de AA se obtuvieron las medias de al menos tres mediciones, las desviaciones estándares y coeficientes de variación de las mediciones fueron obtenidas con el programa Excel Microsoft. Se realizaron correlaciones de Pearson entre  $IC_{50}$ , obtenida del ensayo de reducción del DPPH\*, actividad quelante, así como los contenidos de FT y FVT para identificar posibles correlaciones entre las variables mencionadas. La matriz de estas correlaciones se muestra en el Apéndice G. Este análisis permitió conocer si las variables se correlacionaron de manera positiva, negativa o si no existía correlación entre ellas. Para el tratamiento de estos datos se utilizó el programa Stat Plus. A los datos obtenidos de  $IC_{50}$ , FT y FVT se les realizó un análisis de varianza (Anova) de una vía completo con variable de grupo y una prueba de comparación de medias (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ) con el programa Stat Plus, para determinar si las medias en cada ensayo de los diferentes extractos eran estadísticamente diferentes. La matriz de esta prueba se muestra en el Apéndice H.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se muestran los rendimientos de las extracciones sólido-líquido y líquido-líquido, los resultados obtenidos de los ensayos de reducción del DPPH' y actividad quelante, así como también los resultados obtenidos de los ensayos de FT, FVT y AAF *in vitro* de los extractos de las semillas de *A. purpurea*. También se presenta el análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , ATR-FT-IR y espectros de masa de los compuestos aislados de los extractos de las semillas de *A. purpurea*.

### 4.1. Obtención de los extractos de las semillas de *A. purpurea*

La proporción promedio de semillas en el fruto de *A. purpurea* fue de 28.5% con respecto al peso total del fruto y la humedad de las semillas fue de  $10.27 \pm 0.20$  g/100 g de semilla, esta humedad es similar a lo reportado para las semillas de este género; *A. muricata*<sup>41</sup> 7.7 % y *A. squamosa*<sup>43</sup> 6.5 %.

Con la finalidad de tener las condiciones adecuadas para un mayor rendimiento de extracción de los compuestos de interés, se realizaron extracciones sólido-líquido a las semillas y extracciones líquido-líquido al extracto metanólico crudo y al metanólico desengrasado con los disolventes hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt en polaridad ascendente. Los porcentajes de extracción sólido-líquido y líquido-líquido obtenidos se muestran en la Tabla 10.

La fracción con hexano presentó el porcentaje mayor de extracción respecto al resto de las fracciones en ambos tipos de extracción. Esto se debe a la naturaleza de la muestra ya que de acuerdo a lo reportado en la literatura sobre este género, las semillas contienen entre  $28.03 \pm 0.50$  y  $40.00 \pm 0.82$  % de aceite<sup>41, 43</sup>. En general, el extracto metanólico crudo fue el segundo más abundante usando el método de extracción sólido-líquido.

Con respecto a las extracciones sólido-líquido y líquido-líquido realizadas, los extractos con mayor rendimiento fueron los obtenidos con hexano y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A estos extractos se les realizó una CCF para determinar si el tipo de extracción influía en su perfil cromatográfico y para elegir la fase móvil adecuada para su posterior purificación.

**Tabla 10.** Porcentajes de extracción sólido-líquido y líquido-líquido de las semillas de *A. purpurea*.

| Disolvente               | Porcentaje de extracción (%) |                 |                        |
|--------------------------|------------------------------|-----------------|------------------------|
|                          | Sólido-líquido               | Líquido-líquido |                        |
|                          |                              | Ext. MeOH       | Ext. MeOH desengrasado |
| MeOH                     | 12.8 ± 0.3                   | -               | -                      |
| MeOH <sup>a</sup>        | 7.8 ± 0.3                    | -               | -                      |
| Hexano                   | 25.3 ± 0.3                   | 4.1 ± 0.5       | 1.3 ± 0.2              |
| $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ | 2.7 ± 0.1                    | 3.2 ± 0.4       | 2.4 ± 0.1              |
| AcOEt                    | 0.3 ± 0.0                    | 0.3 ± 0.0       | 0.2 ± 0.0              |
| MeOH <sup>b</sup>        | 3.4 ± 0.1                    | -               | -                      |

Promedio de tres mediciones ± desviación estándar. a. Extracción a las semillas molidas desengrasadas (extracción previa con hexano). b. Extracción a las semillas molidas a las que se les realizaron previamente extracciones consecutivas con hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt.

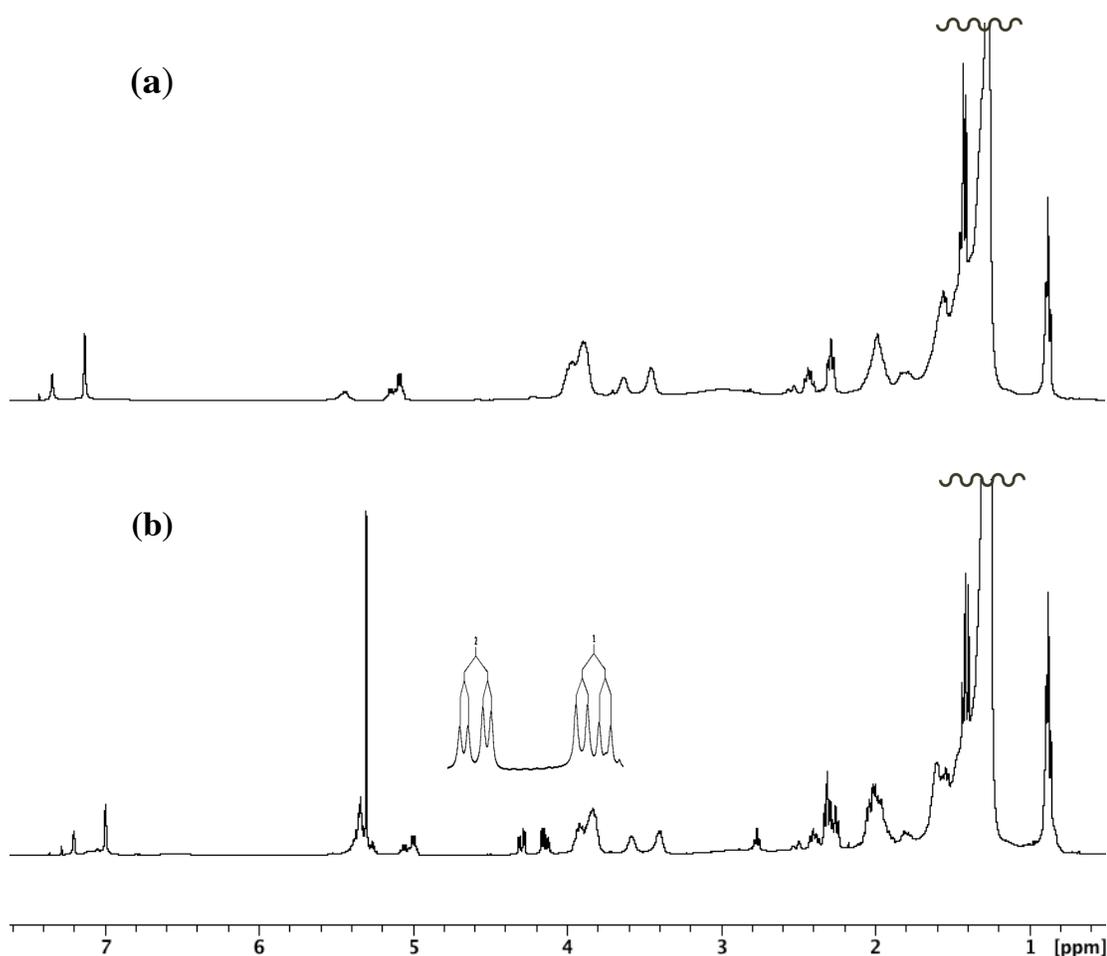
Los perfiles mostrados en CCF del extracto hexánico de ambos tipos de extracción (extracción sólido-líquido y líquido-líquido) fueron muy similares, con una fase móvil de hexano: $\text{CHCl}_3$  (1:1), Apéndice I. Por otra parte, el perfil del extracto obtenido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sólido-líquido mostró en CCF seis compuestos, cinco compuestos ( $R_f$  de 0.18, 0.29, 0.49, 0.66 y 0.75) con una fase móvil de hexano:AcOEt (2:3) y un compuesto ( $R_f$  de 0.47) con una fase móvil de hexano:AcOEt (9:1). Mientras que el extracto obtenido mediante la extracción líquido-

líquido del extracto metanólico y metanólico desengrasado mostraron cinco compuestos ( $R_f$  de 0.18, 0.29, 0.49, 0.66 y 0.75) con una fase móvil de hexano:AcOEt (2:3), Apéndice J.

Se obtuvieron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  e IR, de los extractos hexánicos obtenidos de las semillas de *A. purpurea*, en los cuales se observó que ambos métodos de extracción, sólido-líquido y líquido-líquido, eran similares, Apéndice K y M. Encontrándose principalmente triacilglicerol derivados del ácido oleico y palmítico.

Con respecto a los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se puede observar la presencia de acetogeninas con ambos tipos de extracción. Sin embargo, en la extracción sólido-líquido se observa la presencia de triacilglicerol por las señales en  $\delta$  4.29 y 4.14 ppm con un patrón de multiplicidad doble de dobles (dd,  $J = 5.1, 11.9$  Hz) y una señal quintuple en  $\delta$  5.26 ppm (q,  $J = 5.1$  Hz), Figura 11 y 11b. Por los datos anteriores se puede asumir que el compuesto con un  $R_f$  de 0.47 (hexano:AcOEt, 9:1) en el extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtenido por extracción sólido-líquido, es un triacilglicerol. Lo anterior sugiere también que el tipo de extracción (sólido-líquido y líquido-líquido) con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  influye en el tipo de compuestos obtenidos, siendo la extracción líquido-líquido la más adecuada para el aislamiento de acetogeninas relativamente polares desde semillas de *A. purpurea*.

Con base en los porcentajes de rendimiento de los extractos orgánicos de polaridad intermedia y relativamente polares, el método de extracción sólido-líquido se sugiere como el adecuado para obtener los mayores rendimientos de estos extractos para su posterior purificación, pero esto dependerá de los compuestos de interés que se requieran obtener. En este trabajo se pretendió aislar algunos de los compuestos presentes en los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea*.



**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (a) con extracción líquido-líquido y (b) con extracción sólido-líquido de las semillas de *A. purpurea*.

#### 4.2. Evaluación de la AA y cuantificación de FT y FVT en los extractos de las semillas de *A. purpurea*

La AA medida por el ensayo de reducción del DPPH $^\bullet$  y actividad quelante de los extractos metanólicos de las semillas de *A. purpurea* se muestran en la Tabla 11, y el contenido de FT y FVT de los extractos metanólicos y de AcOEt, en la Tabla 12. La  $\text{IC}_{50}$  por el ensayo de reducción del DPPH $^\bullet$  del extracto metanólico fue de  $197.5 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$ , este valor es menor a los reportados para las semillas de *A. coriacea*,  $330.55 \pm 2.34 \mu\text{g/mL}$ , *A. sylvatica*,  $724.14 \pm 17.79$

$\mu\text{g/mL}$ <sup>39</sup> y *A. cherimola* que varía entre  $3,190 \pm 80$  y  $4,240 \pm 310 \mu\text{g/mL}$ <sup>8</sup>, por lo que se puede mencionar que las semillas de *A. purpurea* tienen una AA mayor que las semillas de *A. coriacea*, *sylvatica* y *cherimola* por el ensayo de reducción del DPPH\*.

De los tres extractos metanólicos obtenidos de las semillas de *A. purpurea*, el extracto metanólico remanente presentó la actividad antirradicalar mayor con una  $\text{IC}_{50}$  de  $82.7 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ . Esto sugiere que los compuestos polares reductores están en mayor concentración en el extracto metanólico remanente que en los extractos metanólico y metanólico desengrasado.

La cinética de inhibición del DPPH\* se realizó para obtener la eficiencia antirradicalar (AE) de los extractos metanólico y metanólico desengrasado de las semillas de *A. purpurea*, los resultados fueron  $18.8 \pm 0.2 \times 10^{-7}$  y  $3.1 \pm 0.2 \times 10^{-6}$  kg de DPPH\*/g de ext•min respectivamente. Estos resultados muestran que los dos extractos tuvieron una actividad antirradicalar baja de acuerdo a la clasificación reportada en la literatura  $\text{AE} \leq 1 \times 10^{-3}$ , baja;  $1 \times 10^{-3} < \text{AE} \leq 5 \times 10^{-3}$ , media;  $5 \times 10^{-3} < \text{AE} \leq 10 \times 10^{-3}$ , alta y  $\text{AE} > 10 \times 10^{-3}$ , muy alta<sup>18</sup>.

La  $\text{IC}_{50}$  del extracto metanólico remanente por el ensayo de actividad quelante fue de  $4,408.9 \pm 68.6 \mu\text{g/mL}$ , este valor es mayor a lo reportado para la pulpa y cáscara de *A. cherimola*,  $115.8 \pm 3.5$  y  $79.6 \pm 2.2 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente<sup>20</sup>, lo que indica que los compuestos presentes en el extracto metanólico remanente de las semillas de *A. purpurea*, tienen una actividad quelante menor o están en menor concentración que en los extractos de la pulpa y cáscara de *A. cherimola*.

El contenido de FT y FVT se reportó en este trabajo con base en los g de extracto, en 100 g de materia fresca y en 100 g de materia seca, para el análisis comparativo con lo descrito en la literatura. El contenido de FT del extracto metanólico desengrasado fue de  $233.8 \pm 10.3$  mg EAG/100 g de muestra húmeda y  $33.8 \pm 1.5$  mg EAG/g de extracto, Tabla 12. Estos valores fueron mayores que lo descrito para las semillas de *A. cherimola*  $3.35 \pm 0.01 - 4.16 \pm 0.02$  mg

EAG/100 g de muestra fresca<sup>8</sup>, e intermedio con respecto a *A. muricata*  $50.51 \pm 3.21 - 451.4 \pm 9.7$  mg EAG/100 g de materia fresca<sup>38</sup> y *A. squamosa*  $24.45 \pm 1.32 - 242.82 \pm 5.08$  mg EAG/g de extracto<sup>34</sup>.

El contenido de FVT del extracto metanólico desengrasado fue de  $216.5 \pm 24.9$  mg EC/100 g de muestra húmeda y  $126.3 \pm 15.9$  mg EQ/g de extracto, valores intermedios con respecto a los reportados para las semillas de *A. muricata*,  $159.8 \pm 1.4$  y  $309.2 \pm 3.3$  mg EC/100 g de materia fresca<sup>38</sup>. Este contenido encontrado en las semillas de *A. purpurea* ( $126.3 \pm 15.9$  mg EQ/g de extracto) es similar a lo reportado en las semillas de *A. coriacea*  $131.18 \pm 2.31$  mg EQ/g de extracto<sup>39</sup> y mayores a los reportados para las semillas de *A. sylvatica*<sup>39</sup> y *A. squamosa*<sup>34</sup>,  $51.11 \pm 2.30$  y  $42.44 \pm 1.13$  mg EQ/g de extracto, respectivamente.

De los extractos orgánicos de las semillas de *A. purpurea* el de mayor contenido de FT y FVT fue el metanólico remanente con  $85.0 \pm 2.7$  mg EAG/100 g y  $140.0 \pm 0.0$  mg EC/100 g de muestra húmeda, respectivamente.

Se realizó la prueba estadística de comparación de medias empleando la prueba de Tukey para cada ensayo (IC<sub>50</sub>, FT y FVT). Esta prueba indicó que las medias de los diferentes ensayos fueron estadísticamente diferentes, y únicamente las medias del contenido de FVT de los extractos AcOEt fueron estadísticamente iguales, Tabla 12, Apéndice H.

Con los datos obtenidos de los ensayos de AA (IC<sub>50</sub>, FT y FVT) del extracto metanólico desengrasado y remanente, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ), que son una medida de la relación lineal de dos variables aleatorias cuantitativas. En la Tabla 13 y Apéndice G se muestran los coeficientes de correlación entre los ensayos de AA con un nivel de significancia  $p < 0.05$ .

**Tabla 11.** Actividad antioxidante (AA) por el ensayo de reducción de DPPH<sup>•</sup> y actividad quelante de las semillas de *A. purpurea*.

|                                  | Ensayo de reducción del DPPH <sup>•</sup> |                            |   | Actividad quelante          |                              |                        |   |                                       |
|----------------------------------|---|----------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|------------------------|---|---------------------------------------|
|                                  | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL)               | T <sub>IC50</sub><br>(min) | AE<br>(kg de DPPH <sup>•</sup> /g<br>de ext•min)                                | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL) | EECC<br>(mg EE/100 g)        | mg EE/g<br>de extracto | mg EE/<br>100 g<br>de muestra<br>húmeda | mg EE/<br>100 g<br>de muestra<br>seca |
| Extracto metanólico              | 197.5 ± 1.9a                              | 53.7 ± 0.6                 | 18.8 ± 0.2 x 10 <sup>-7</sup>   | -                           | -                            | -                      | -                                       | -                                     |
| Extracto metanólico desengrasado | 151.3 ± 0.6b                              | 42.3 ± 3.9                 | 3.1 ± 0.2 x 10 <sup>-6</sup>  | -                           | -                            | 33.0 ± 0.9             | 228.2 ± 6.4a                            | 254.3 ± 7.1                           |
| Extracto metanólico remanente    | 82.7 ± 1.3c                               | -                          | -   | 4,408.9 ± 68.6              | 4.5 ± 0.2 x 10 <sup>-3</sup> | 8.8 ± 0.0              | 26.5 ± 0.0b                             | 29.5 ± 0.0                            |
| Ácido ascórbico *                | 5.0 ± 0.1                                 | -                          | 2.6 x 10 <sup>-3</sup><br>(Sánchez-Moreno, Larrauri,<br>& Saura-Calixto, 1998)  | -                           | -                            | -                      | -                                       | -                                     |
| Ácido gálico *                   | 1.4 ± 0.0                                 | -                          | 11.4 x 10 <sup>-3</sup><br>(Sánchez-Moreno, Larrauri,<br>& Saura-Calixto, 1998) | -                           | -                            | -                      | -                                       | -                                     |
| Rutina *                         | 8.0 ± 0.3                                 | -                          | 0.2 x 10 <sup>-3</sup><br>(Sánchez-Moreno, Larrauri,<br>& Saura-Calixto, 1998)  | -                           | -                            | -                      | -                                       | -                                     |
| EDTA                             | -   | -                          | -   | 34.2 ± 0.3                  | -                            | -                      | -                                       | -                                     |

Promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Valores con letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa por la prueba de Tukey HSD ( $p < 0.05$ ). \* Controles. IC<sub>50</sub> = concentración del extracto necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial del DPPH<sup>•</sup> o EDTA. T<sub>IC50</sub> = tiempo en alcanzar el equilibrio a la concentración de la IC<sub>50</sub>. AE = eficiencia antirradicalar. EECC = Capacidad quelante equivalente de EDTA. EE = Equivalentes de EDTA.

**Tabla 12.** Contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides totales (FVT) en las semillas de *A. purpurea*.

| Extracto                                  | FT                   |                             |                           | FVT                         |   |   |
|---|----------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---|---|
|   | mg EAG/g de extracto | mg EAG/100 g muestra húmeda | mg EAG/100 g muestra seca | mg EC/g mg EQ/g de extracto | mg EC/100 g mg EQ/100 g de muestra húmeda | mg EC/100 g mg EQ/100 g de muestra seca |
| Metanólico desengrasado                   | 33.8 ± 1.5a          | 233.8 ± 10.3                | 260.6 ± 11.5              | 31.3 ± 2.7<br>126.3 ± 12.1  | 216.5 ± 19.0<br>874.4 ± 84.0              | 241.3 ± 21.1a<br>974.5 ± 93.7           |
| Metanólico remanente                      | 24.6 ± 0.8b          | 85.0 ± 2.7                  | 94.8 ± 3.0                | 40.4 ± 0.0<br>163.2 ± 0.0   | 140.0 ± 0.0<br>565.0 ± 0.0                | 156.1 ± 0.0b<br>629.6 ± 0.0             |
| AcOEt (del crudo de MeOH)                 | 2.8 ± 0.1c           | 37.2 ± 1.1                  | 41.5 ± 1.2                | 176.7 ± 3.4<br>745.0 ± 15.0 | 37.1 ± 0.7<br>156.6 ± 3.1                 | 41.4 ± 0.8c<br>174.5 ± 3.5              |
| AcOEt (del extracto de MeOH desengrasado) | 1.9 ± 0.1d           | 15.2 ± 0.6                  | 16.9 ± 0.7                | 141.5 ± 3.4<br>249.3 ± 6.3  | 19.1 ± 0.5<br>33.7 ± 0.9                  | 21.3 ± 0.5c<br>37.5 ± 0.9               |

Promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Valores con letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa por la prueba de Tukey HSD ( $p < 0.05$ ). EAG = equivalentes de ácido gálico. EC = equivalentes de catequina. EQ = equivalentes de quercetina. AcOEt = Acetato de etilo.

**Tabla 13.** Coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los ensayos de AA para *A. purpurea*.

|   | IC <sub>50</sub><br>(DPPH') | IC <sub>50</sub><br>(Actividad<br>quelante) | FT   | FVT  |
|---|-----------------------------|---|------|------|
| IC <sub>50</sub><br>(DPPH')                 | 1.00                        |   |      |      |
| IC <sub>50</sub><br>(Actividad<br>quelante) | 0.99                        | 1.00  |      |      |
| FT  | 0.99                        | 0.99  | 1.00 |      |
| FVT   | 0.96                        | 0.96  | 0.96 | 1.00 |

Basándose en los valores de correlación, se puede sugerir que los ensayos de reducción del DPPH' y actividad quelante tienen una correlación directamente proporcional fuerte entre ellos ( $r = 0.99$ ). Así como también para el contenido de FT y FVT ( $r = 0.96$ ), este coeficiente de correlación sugiere que en las semillas de *A. purpurea* el contenido de FT aumenta a medida que aumenta el correspondiente de FVT.

La correlación entre la AA medida como IC<sub>50</sub> fue directamente proporcional al contenido de FT y FVT, lo que sugiere que esta actividad reductora no solo se debe a los compuestos fenólicos, también se puede atribuir a otros compuestos como las acetogeninas o ácidos grasos insaturados, que están presentes en las semillas de este género<sup>44</sup>.

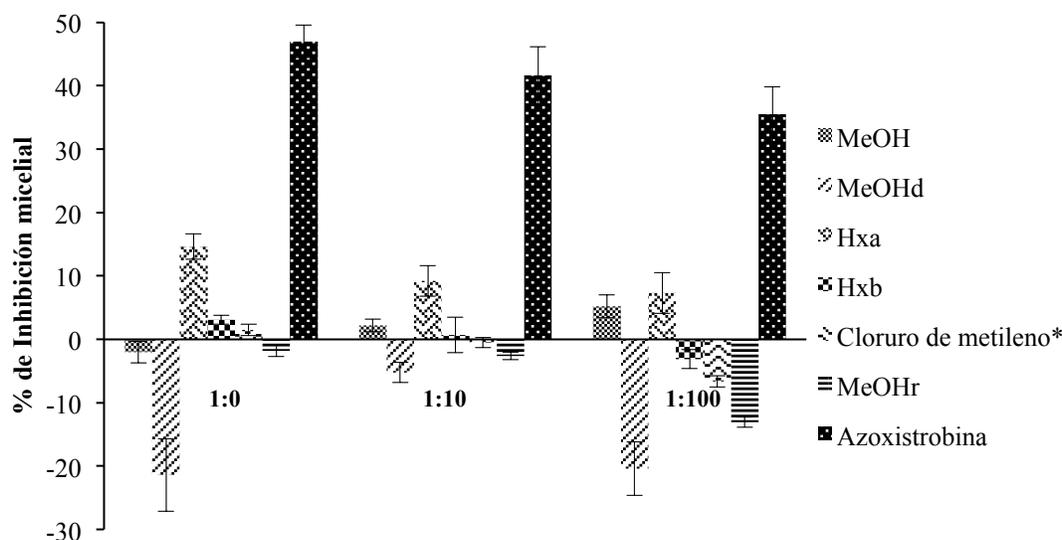
#### 4.3. Evaluación de la AAF de los extractos de las semillas de *A. purpurea*

En relación a la actividad antifúngica (AAF) *in vitro* de los extractos de las semillas de *A. purpurea* contra el hongo *F. solani*, con el ensayo de actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial, se probaron los extractos metanólico, metanólico desengrasado, metanólico remanente, hexánico-a (obtenido por extracción sólido-líquido), hexánico-b (obtenido por extracción

líquido-líquido del extracto metanólico), y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtenido por extracción líquido-líquido. La cantidad con la que se contaba de estos extractos fue suficiente para realizar los ensayos por triplicado.

Se probaron tres diluciones diferentes de los extractos en DMSO (1:0, 1:10 y 1:100). Los extractos hexánicos para la primera dilución (1:0) no fueron disueltos en DMSO debido al estado físico de los extractos (líquido), por lo que se aplicaron directamente 20  $\mu\text{L}$  de estos extractos en el disco con el hongo. La concentración inicial (dilución 1:0) de los demás extractos fue: metanólico, 248.4 mg/mL; metanólico desengrasado, 209.5 mg/mL;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 197.4 mg/mL y metanólico remanente, 286.4 mg/mL. La azoxistrobina se utilizó como control positivo con una concentración de 61.9 mg/mL (dilución 1:0). Los resultados de la actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de *F. solani* se muestran en la Figura 12 y en la Tabla 14.

Solo los extractos hexánicos tuvieron un porcentaje de inhibición dependiente de la dosis sobre el crecimiento micelial del hongo *F. solani*, y el extracto metanólico presentó inhibición del crecimiento en las diluciones 1:10 y 1:100 por lo que este extracto presentó un comportamiento independiente de la dosis. En los extractos metanólico desengrasado,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y metanólico remanente se observó un aumento del crecimiento micelial del hongo con respecto al control negativo (DMSO) lo que se refleja en un porcentaje de inhibición negativo mostrado en la Figura 12 y Tabla 14. Posiblemente debido a que los compuestos presentes en estos extractos promovieron el crecimiento de *F. solani*.



MeOH = Extracto metanólico. MeOHd = Extracto metanólico desengrasado. Hxa = Extracto hexánico sólido-líquido. Hxb = Extracto hexánico líquido-líquido. Cloruro de metileno\* = Extracto líquido-líquido. MeOHR = Extracto metanólico remanente.

**Figura 12.** Porcentaje de inhibición de extractos de semillas de *A. purpurea* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium solani*.

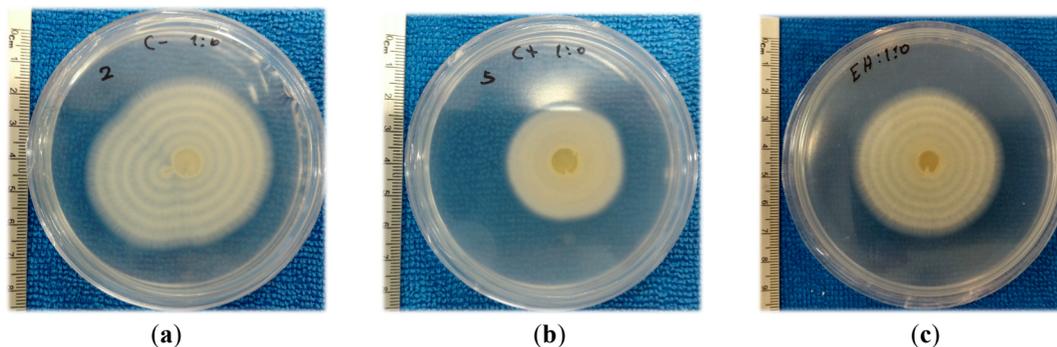
El extracto hexánico-a tuvo un mayor porcentaje de inhibición ( $14.6 \pm 2.0$ ,  $9.2 \pm 2.4$  y  $7.3 \pm 3.2$  %) en las tres diluciones empleadas, que el extracto hexánico-b ( $3.1 \pm 0.7$ ,  $0.7 \pm 2.8$  y  $-3.1 \pm 1.5$  %) en las tres diluciones, este comportamiento fue dependiente de la dosis.

**Tabla 14.** Concentración de los extractos y porcentaje de inhibición sobre el crecimiento micelial de *Fusarium solani*.

| Dilución | Porcentaje de Inhibición (%) |   |                                   |                                   |   |   |                              |
|----------|------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|---|---|------------------------------|
|          | Metanólico<br>248.4<br>mg/mL | Metanólico<br>desengrasado<br>209.5 mg/mL | Hexánico <sup>a</sup><br>20 µL/mL | Hexánico <sup>b</sup><br>20 µL/mL | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub><br>197.4<br>mg/mL | Metanólico<br>remanente<br>286.4<br>mg/mL | Azoxistrobina*<br>61.9 mg/mL |
| 1:0      | -2 ± 1.7                     | -21.4 ± 5.7                               | 14.6 ± 2.0                        | 3.1 ± 0.7                         | 1.5 ± 0.9   | -1.8 ± 0.9                                | 47 ± 2.6                     |
| 1:10     | 2.2 ± 1.0                    | -5.2 ± 1.6                                | 9.2 ± 2.4                         | 0.7 ± 2.8                         | -0.5 ± 0.8  | -2.6 ± 0.6                                | 41 ± 4.5                     |
| 1:100    | 5.2 ± 1.8                    | -20.4 ± 4.2                               | 7.3 ± 3.2                         | -3.1 ± 1.5                        | -6.6 ± 0.9  | -13.1 ± 0.8                               | 35.5 ± 4.3                   |

a. Obtenido por extracción sólido-líquido. b. Obtenido por extracción líquido-líquido. \* Control positivo.

En la Figura 13 se muestra el crecimiento micelial del hongo *F. solani* con el control negativo que fue (a) DMSO, el control positivo (b) azoxistrobina y (c) extracto hexánico-a con la dilución 1:0 en cada tratamiento.



**Figura 13.** Crecimiento micelial de *F. solani* a la dilución 1:0 de los tratamientos (a) DMSO, (b) azoxistrobina y (c) extracto hexánico-a de *A. purpurea*.

Por lo anterior, se puede observar que el método de extracción con este disolvente influye en el tipo de compuestos extraídos, siendo los compuestos con % de inhibición mayor del crecimiento micelial, los obtenidos por extracción sólido-líquido con hexano. En comparación con la azoxistrobina, un antifúngico comercial, el porcentaje de inhibición del extracto hexánico-a fue menor en las tres concentraciones.

Para la AAF *in vitro* contra el hongo *F. solani*, con el ensayo de CMI, se probaron los mismos extractos orgánicos con las concentraciones iniciales antes mencionadas. El extracto hexánico-a (obtenido por extracción sólido-líquido), fue el único que presentó actividad sobre la formación de conidios con una concentración mínima inhibitoria de 6.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y esta actividad fue fungicida. Es importante mencionar que la azoxistrobina, antifúngico comercial que se utilizó como control positivo, no presentó actividad sobre la formación de conidios con una concentración de 30.9 mg/mL.

Se ha reportado que algunos extractos y compuestos aislados de las semillas del género *Annona* tienen AAF *in vitro*. Los compuestos que se han reportado con esta actividad son acetogeninas principalmente, sin embargo, en los ensayos realizados al extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de las semillas de *A. purpurea*, no se observó esta actividad contra *F. solani*. Lo anterior puede atribuirse a que las acetogeninas relativamente polares que se encuentran en este extracto no tienen actividad antifúngica contra *F. solani* y/o que los demás compuestos en este extracto, generen una actividad antagonista con las acetogeninas. Sin embargo, el extracto hexánico-a (obtenido por extracción sólido-líquido) de las semillas de *A. purpurea* presentó actividad contra el crecimiento micelial y contra los conidios del hongo *F. solani*. La reacción positiva del reactivo de Kedde en el extracto hexánico-a sugiere que esta actividad se debe a acetogeninas menos polares que las presentes en el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, o a otros compuestos en este extracto.

#### **4.4. Purificación del extracto hexánico-a de las semillas de *A. purpurea***

El extracto hexánico-a se purificó por columna *flash* en gel de sílice y como fase móvil hexano seguido de mezclas de hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aumentando la polaridad hasta llegar a 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, posteriormente mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt, aumentando la polaridad hasta llegar a 100% de AcOEt y finalmente MeOH. Se obtuvieron 14 fracciones. La fracción de la columna *flash* obtenida con hexano fue la de mayor rendimiento (41.8%). De esta fracción de hexano se obtuvo el espectro de RMN de <sup>1</sup>H, que mostró la presencia de triacilglicerol derivados del ácido oleico y palmítico, Apéndice L. Así también esta fracción fue probada con el ensayo de CMI la cual no tuvo actividad. Estos resultados sugieren que los triacilglicerol presentes en este extracto no presentan AAF contra los conidios de *F. solani*.

En la etapa de purificación se aislaron compuestos en los extractos hexánico-a y hexánico-b por cristalización, así como de los extractos metanólico remanente y de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por columna *flash*, y posterior purificación por placa preparativa y cristalización. Estos extractos fueron

elegidos por su mayor porcentaje de rendimiento o por los resultados obtenidos por los diferentes ensayos de AA y AAF.

#### **4.5. Aislamiento y caracterización del triacilglicerol 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol**

A partir de los extractos obtenidos con hexano de las semillas de *A. purpurea* se aisló por cristalización a temperatura ambiente, un sólido blanco denominado Hx1 (p.f.= 43 – 45 °C), su rendimiento fue de 0.3% con respecto al extracto hexánico y 0.05% con respecto a 100 g de semilla húmeda de *A. purpurea*.

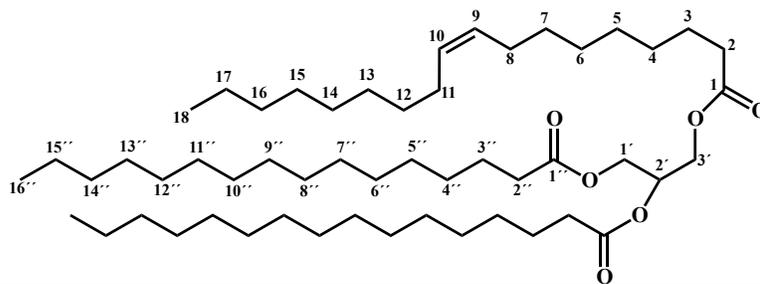
De Hx1 se obtuvieron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz), Figura 14, RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz), Figura 15, gHMBC y gHSQC en  $\text{CDCl}_3$ , así como el espectro de ATR-FT-IR, Figura 16, y el espectro de masa de alta resolución, Figura 17. El análisis de los datos obtenidos de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , ATR-FT-IR y espectrometría de masa de alta resolución se discuten a continuación.

Los desplazamientos de cada señal para protón y carbono se presentan en la Tabla 15. Las dos señales doble de dobles de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\delta$  4.29 ppm (2H, dd,  $J = 5.1$  Hz, 11.9 Hz, H-1') y  $\delta$  4.14 ppm (2H, dd,  $J = 5.1$ , 11.9 Hz, H-3') corresponden a dos metilenos base de oxígeno. Además se observó una señal quintuple en  $\delta$  5.26 ppm (1H, q,  $J = 5.1$  Hz, H-2') que se asignó a un metino. Estas señales corresponden a la porción del glicerol. En RMN de  $^{13}\text{C}$  se observaron dos señales en  $\delta$  173.3 y 172.9 ppm (C-1 y 1'') correspondientes a los carbonos carbonílicos que esterifican la porción del glicerol. En el espectro de IR se observan las bandas de absorción en 1742 y 1071  $\text{cm}^{-1}$  que se deben a las vibraciones de estrechamiento-alargamiento de C = O y C – O, respectivamente. Estas señales en RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , y las correspondientes bandas de absorción en el espectro de IR sugieren que el compuesto es un triacilglicerol.

La señal múltiple observada de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\delta$  5.28 – 5.37 ppm (2H, m, H-9 y H-10) y las señales de RMN de  $^{13}\text{C}$  en  $\delta$  130.0 y 130.2 ppm se deben a la presencia de un doble enlace C=C por lo que uno de los ácidos grasos del triacilglicerol contiene una insaturación. La banda de absorción correspondiente a este grupo funcional se observa en el espectro de IR en  $2953\text{ cm}^{-1}$  que se debe a las vibraciones de estrechamiento-alargamiento del enlace C – H de un alqueno, y la banda de absorción en  $1653\text{ cm}^{-1}$  se asigna a un alqueno *Z*-disustituido.

Para la porción alifática se observaron en RMN de  $^1\text{H}$  dos señales triples en  $\delta$  2.31 y 2.32 ppm (6H, t,  $J = 7.5\text{ Hz}$ ), correspondientes a tres metilenos en posición  $\alpha$  a carbonos carbonílicos. Las señales múltiples en  $\delta$  1.98 – 2.06 ppm (4H, m) se asignaron a dos metilenos vecinos al doble enlace, mientras que la señal múltiple entre  $\delta$  1.57 – 1.62 ppm (10H, m) que integra para diez hidrógenos, se asignó a cinco metilenos, en posición  $\beta$  a los carbonos carbonílicos y al doble enlace. Las señales más protegidas de metilenos se encontraron entre  $\delta$  1.25 – 1.30 ppm (64H, m) correspondiente a 32 metilenos. Este número de metilenos sugiere la presencia de dos ácidos grasos saturados, ácido palmítico, así como un ácido insaturado, ácido oleico, esterificando al glicerol. Además se observó una señal triple de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\delta$  0.88 ppm (9H, t,  $J = 6.8\text{ Hz}$ ) correspondiente a tres grupos metilo. En RMN de  $^{13}\text{C}$  los desplazamientos de los metilenos de la porción alifática se asignaron entre  $\delta$  22.0 y 34.0 ppm, Tabla 15. En el espectro de IR, también se observaron las bandas de absorción en  $2916$  y  $2849\text{ cm}^{-1}$  que se deben a las vibraciones de estrechamiento-alargamiento, simétrico y asimétrico, respectivamente, del enlace C – H de los metilos y metilenos. Además se observó la banda en  $724\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones sobre el plano de los metilenos en una cadena lineal de cuatro o más átomos de carbono.

**Tabla 15.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz, de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol en  $\text{CDCl}_3$ .



| Número de Carbono                           | $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) | $J$ (Hz)            | Integral | $\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) |
|---|-----------------------------|---------------------|----------|--------------------------------|
| *1'   | 4.29                        | dd, $J = 5.1, 11.9$ | 2        |                                |
| *3'   | 4.14                        | dd, $J = 5.1, 11.9$ | 2        | 62.1                           |
| 2'  | 5.26                        | q, $J = 5.1$        | 1        | 68.8                           |
| 1   | -                           | -                   | -        | 173.3                          |
| 1''   | -                           | -                   | -        | 172.9                          |
| 2   | 2.32                        | t, $J = 7.5$        | 6        |                                |
| 2''   | 2.31                        | t, $J = 7.5$        | 6        | 34.0                           |
| 3, 3'', 7 y 12                              | 1.57 – 1.62                 | m                   | 10       |                                |
| 4 – 6, 13 – 17 y 4'' – 15''                 | 1.25 – 1.30                 | m                   | 64       | 22 – 30                        |
| *9 y *10                                    | 5.28 – 5.37                 | m                   | 2        | 130.0, 130.2                   |
| 8 y 11                                      | 1.98 – 2.06                 | m                   | 4        | 32.0                           |
| 18 y 16''                                   | 0.88                        | t, $J = 6.8$        | 9        | 14.2                           |
| $\text{CH}_2 - \text{CO}_2\text{H}^*$       | -                           | -                   | -        | 173.3                          |
| $= \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} =^*$ | 2.77                        | t, $J = 6.5$        | 0.93     | 127.9                          |

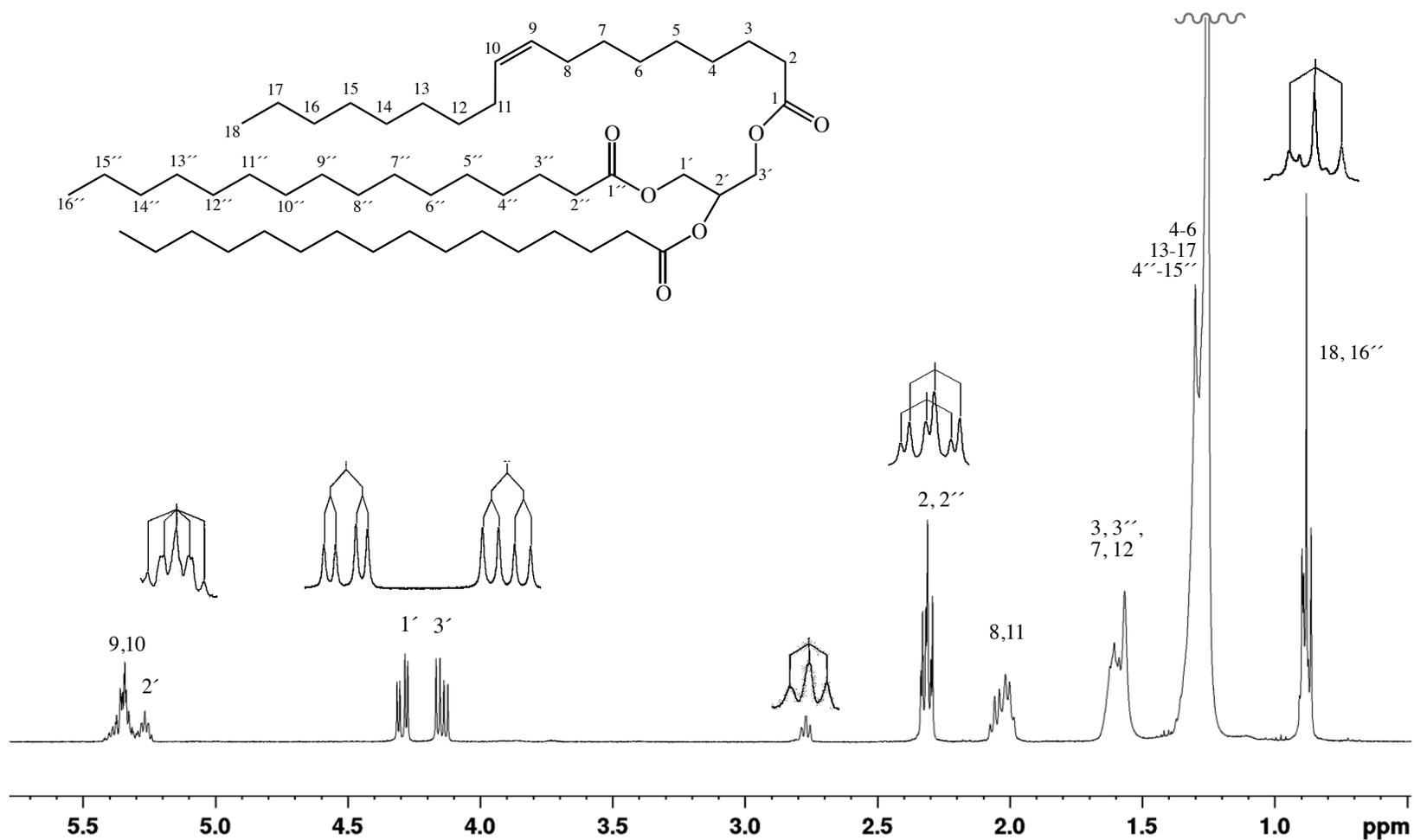
dd = doble de dobles. t = triple. q = quintuple. m = múltiple. \*Pueden estar intercambiados. \*Señales correspondientes a 15% de ácido linolénico en la muestra.

Por otra parte las dos señales observadas en RMN de  $^{13}\text{C}$  en  $\delta$  172.9 ppm y una señal en  $\delta$  173.3 ppm sugiere una esterificación asimétrica en el glicerol. El punto de fusión de Hx1 (p.f.) fue de 43 – 45 °C. Por los datos anteriores de RMN de  $^1\text{H}$  y de RMN de  $^{13}\text{C}$  y el punto de fusión

se determinó que Hx1 era 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol, también denominado OPP.

Posteriormente se analizó el patrón de fragmentación de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol en el espectro de masa de alta resolución, se observó el ion molecular  $[M+H]^+ = 833.7568$   $m/z$ , mientras que la  $m/z$  de la masa monoisotópica calculada  $[M+H]^+$  de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol ( $C_{53}H_{100}O_6$ ) es de 833.7592. En la Figura 17 se presenta el espectro de masa de alta resolución y los iones fragmento propuestos en este trabajo para el 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol.

Por otra parte en RMN de  $^1H$  la señal triple en  $\delta$  2.77 ppm (t,  $J = 6.5$  Hz) correspondiente a protones doblemente alílicos, sugiere que hay metilenos doblemente alílicos, que no forman parte del triacilglicerol. Además, se observaron las señales correspondientes para hidrógenos vinílicos ( $\delta$  5.28 – 5.37 ppm). Por el análisis de las integrales de las señales de RMN de  $^1H$  se encontró que las señales de los metilenos doblemente alílicos corresponden al ácido linolénico. Este se encuentra en mezcla con el 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol en un 15%.



**Figura 14.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol aislado de las semillas de *A. purpurea*.

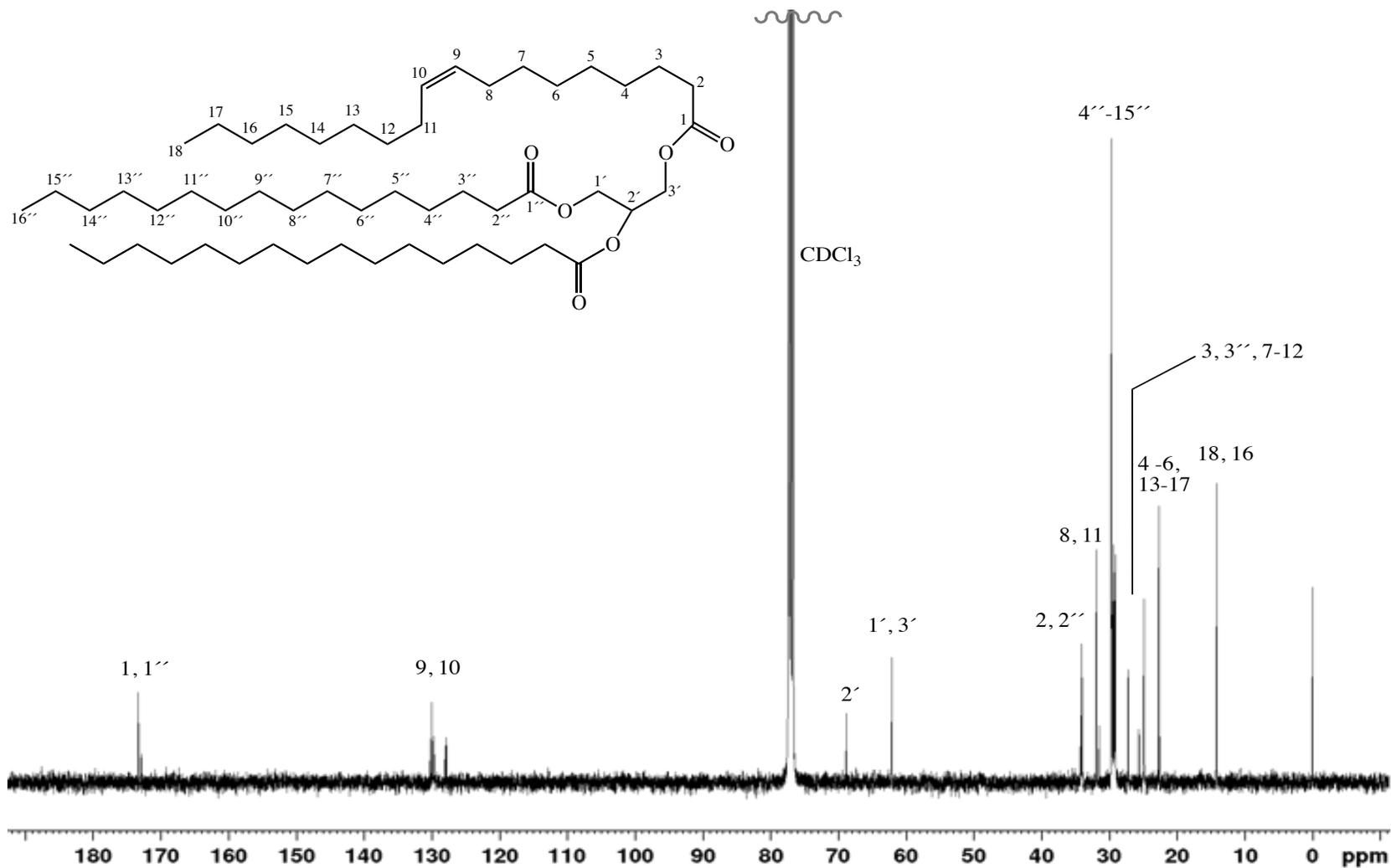


Figura 15. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C en CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol aislado de las semillas de *A. purpurea*.

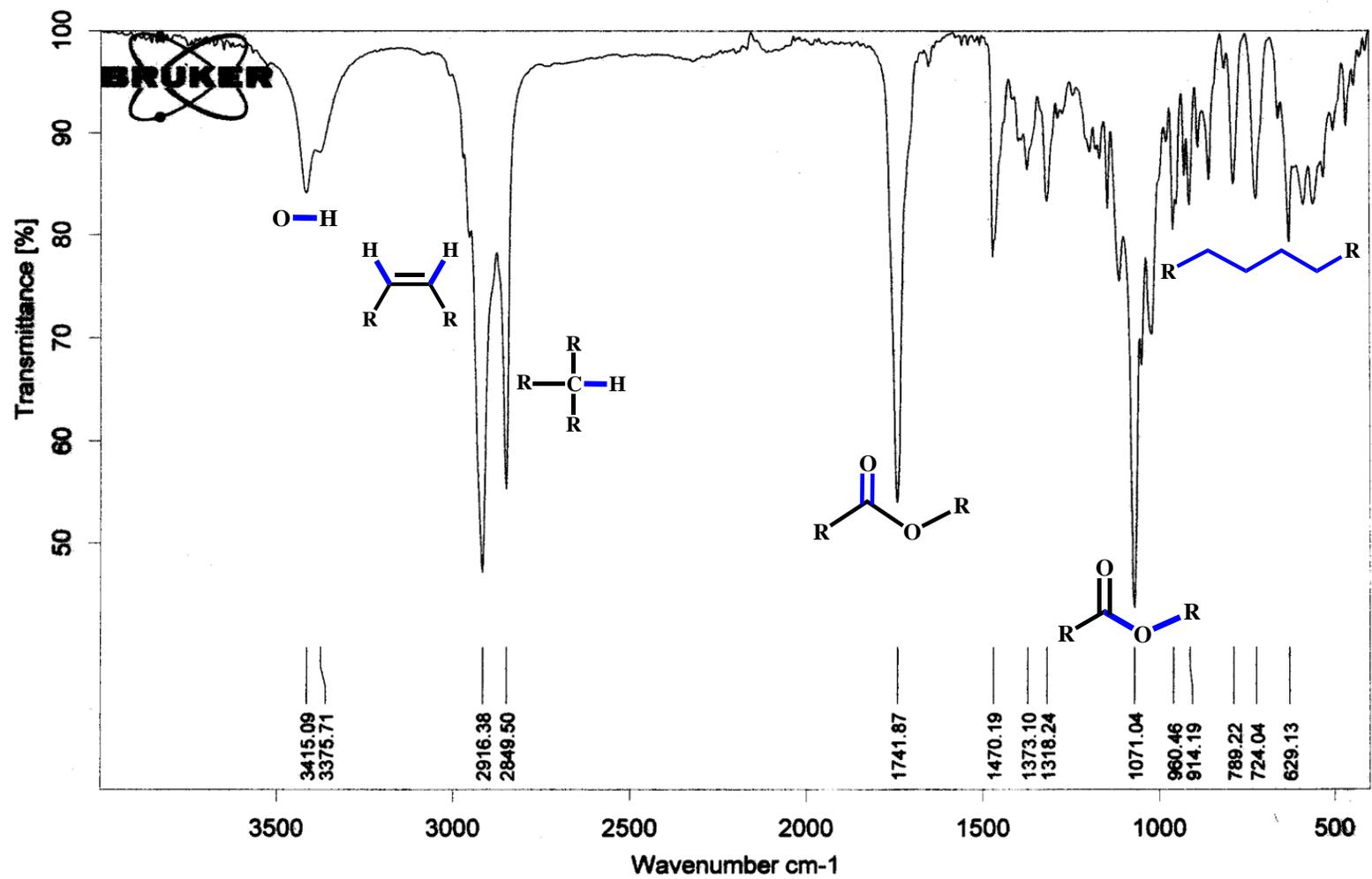


Figura 16. Espectro de ATR-FT-IR de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol aislado de las semillas de *A. purpurea*.

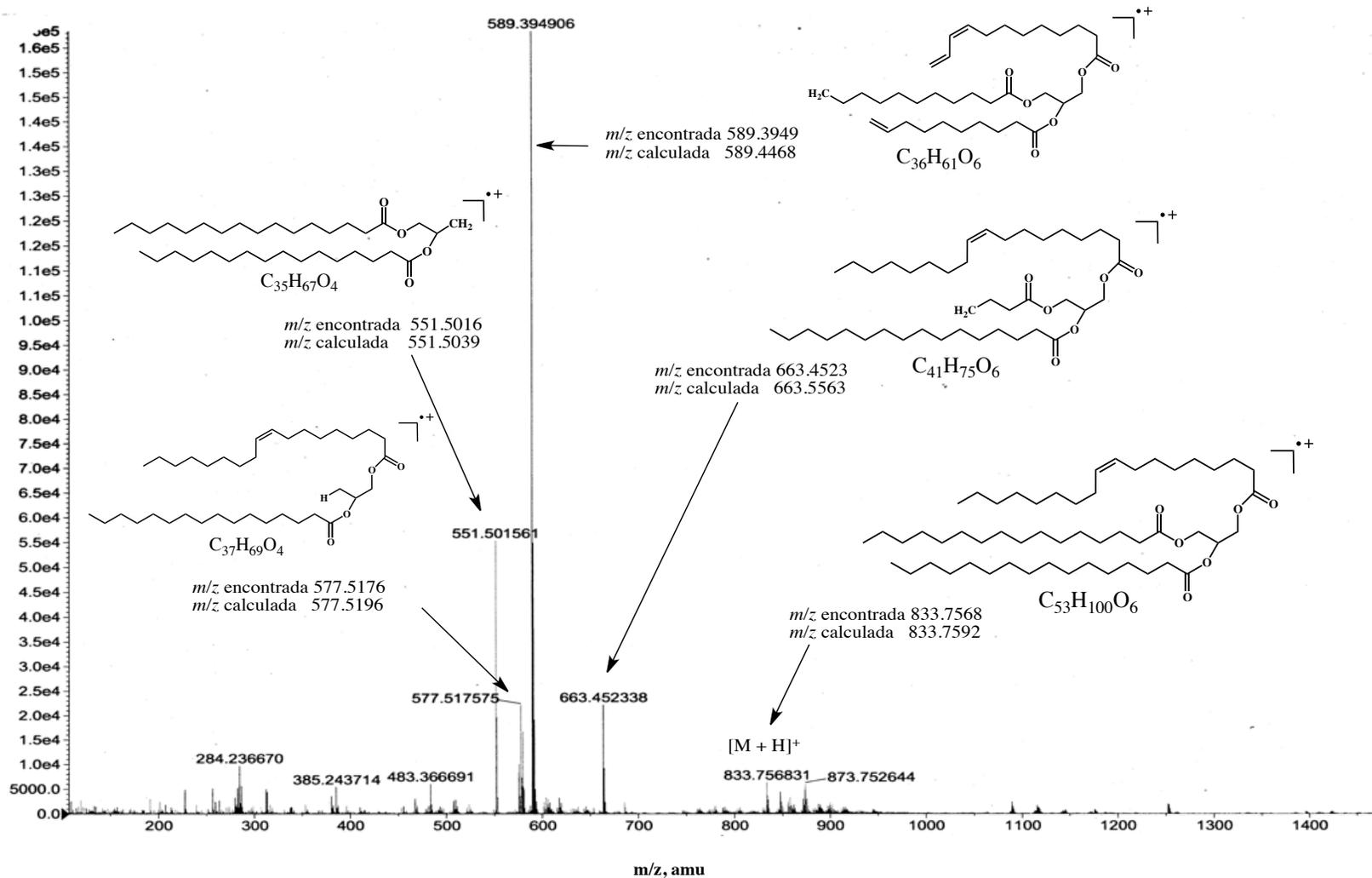


Figura 17. Espectro de masa de alta resolución de 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoyl)glicerol aislado de las semillas de *A. purpurea*.

#### 4.6. Purificación del extracto metanólico remanente

Para la purificación del extracto metanólico remanente primeramente se disolvió aproximadamente 1 g del extracto metanólico remanente en metanol y se separó la parte soluble por centrifugación. La fracción soluble tuvo un rendimiento superior al 90%, esta fracción se disolvió completamente en aproximadamente 3 mL de MeOH y se colocó en la columna. Se utilizó una columna *flash* de gel de sílice y como fase móvil hexano seguido de mezclas de hexano:AcOEt aumentando la polaridad hasta llegar a 100% AcOEt, posteriormente mezclas de AcOEt:MeOH, aumentando la polaridad hasta llegar a 100% de MeOH y finalmente acetona. Se obtuvieron 30 fracciones que se sometieron a cristalización con mezclas de acetona:MeOH. De la fracción AcOEt:MeOH (93:7) se aisló un polvo blanco con un rendimiento de 2.3% con respecto al extracto metanólico remanente y 0.1% por 100 g de semilla húmeda. El punto de fusión de este compuesto fue de 140 – 142 °C, de este polvo se obtuvo el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y el espectro de masa de alta resolución, con la información recabada de estos experimentos se determinó que este compuesto era glucosa.

#### 4.7. Purificación del extracto de $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Para la purificación del extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se pesaron 0.8983 g del extracto, se disolvió en 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  y se colocó en la columna. Se utilizó una columna *flash* de gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexano:AcOEt aumentando la polaridad hasta llegar a 100% AcOEt, posteriormente mezclas de AcOEt:MeOH, aumentando la polaridad hasta llegar a 100% de MeOH y finalmente acetona. Se obtuvieron 15 fracciones las cuales se sometieron a cristalización con mezclas de hexano:AcOEt. Las fracciones obtenidas con las mezclas de hexano:AcOEt 2:8 y 1:9 (3) mostraron 4 compuestos en CCF por lo que se les realizó una placa preparativa. Se colocaron en la placa preparativa 30.6 mg de dichas fracciones y se eluyó con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt:MeOH (77:19:4). Se identificaron seis bandas con una  $\lambda = 254$  y

365 nm, una vez separados los compuestos de la fase estacionaria, se cristalizaron a temperatura ambiente con mezclas de hexano:AcOEt.

#### 4.8. Aislamiento y caracterización de la acetogenina esquamocina C

De las fracciones de hexano:AcOEt, AcOEt 1:9 (1 y 2) por recristalización, y de la placa preparativa se obtuvo un polvo blanco denominado C<sub>CH1</sub>, con un rendimiento de 1.2% con respecto al extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 0.4% por 100 g de semilla húmeda. El punto de fusión de este compuesto fue de 52 – 53 °C y fue positivo a la reacción del reactivo de Kedde lo que sugiere la presencia de una  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

De C<sub>CH1</sub> se obtuvieron los espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, gHMBC, gHSQC, COSY y DEPTq, así como también el espectro de masa de alta resolución. Con el análisis de la información recabada de estos experimentos y la comparación con lo reportado en la literatura Sahai *et. al.* (1994)<sup>50</sup>, se determinó que el compuesto era esquamocina C, una acetogenina *bis* – THF aislada de las semillas de *A. squamosa*. En las Figuras 18 y 19 se muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) y de <sup>13</sup>C (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> de la esquamocina C y en la Tabla 16 se muestra la asignación de los desplazamientos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

Las señales de RMN de <sup>13</sup>C en  $\delta$  83.3 (C-16), 82.3 (C-19), 82.6 (C-20) y 82.8 ppm (C-23) corresponden a metinos enlazados a oxígeno en los anillos de THF, estos valores se correlacionan en el espectro de gHSQC con señales múltiples en  $\delta$  3.82 – 3.96 ppm que integran para cinco hidrógenos en RMN de <sup>1</sup>H que indican la fracción *bis*-THF<sup>50</sup>. En el espectro de IR, Figura 20, se observó la banda de absorción en 1048 cm<sup>-1</sup> que se debe a las vibraciones de estrechamiento de C – O de los anillos de THF. Los  $\delta$  74.2 (C-15), 71.8 (C-29) 71.3 ppm (C-24) se asignaron a los carbonos con grupos hidroxilos y la banda de absorción en el espectro de IR en 3368 cm<sup>-1</sup> corresponde a las vibraciones de estrechamiento del O – H que corrobora la presencia de este grupo funcional.

Las señales de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\delta$  7.00 ppm de un hidrógeno vinílico (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-35),  $\delta$  5.01 ppm de un hidrógeno alílico (1H, cd,  $J = 1.5, 6.8$  Hz H-36) y  $\delta$  1.42 ppm de un metilo (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-37), y los correspondientes desplazamientos de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\delta$  en 148.9 (C-35), 77.5 (C-36) y 19.2 ppm (C-37), además de las señales en  $\delta$  174.0 (C-1) y  $\delta$  134.3 ppm (C-2), indican la presencia de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada<sup>50</sup>. En el espectro de IR, Figura 20, se observan las bandas de absorción para los grupos funcionales de esta  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, la banda de absorción observada en  $3077\text{ cm}^{-1}$  se debe a las vibraciones de estrechamiento-alargamiento del enlace C – H de un alqueno y la banda de absorción en  $1650\text{ cm}^{-1}$  se refiere a un alqueno *Z*-disustituido. Las dos bandas de absorción en  $1742$  y  $1048\text{ cm}^{-1}$  se deben a las vibraciones de estrechamiento de C = O y C – O, respectivamente. Además, se observaron las bandas de absorción en  $2915$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  que se deben a las vibraciones de estrechamiento-alargamiento, simétrico y asimétrico respectivamente, del enlace C – H de los metilenos y la banda de absorción en  $716\text{ cm}^{-1}$  resulta de las vibraciones sobre el plano de metilenos en una cadena lineal de cuatro o más átomos de carbono. La estructura de la porción alifática de la acetogenina esquamocina C se determinó mediante la integración del área de las señales obtenidas del espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

En el espectro de masa de alta resolución se observó la señal del ion molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de una  $m/z$  de 623.4881 ( $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$ ) mientras que la  $m/z$  de la masa monoisotópica calculada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  es de 623.4881. En la Figura 21 se presenta el espectro de masa de alta resolución y los iones fragmento de la esquamocina C, se observaron tres pérdidas de  $\text{H}_2\text{O}$  lo que sugiere la presencia de tres grupos hidroxilo ( $m/z = 605.4771, 587.4671, 569.4558$ ). Posteriormente la ruptura entre los carbonos 19 y 20 del anillo de *bis*-THF con posterior pérdida de  $\text{H}_2\text{O}$ , forma un ion fragmento de  $m/z$  331.2212.

**Tabla 16.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz de esquamocina C en  $\text{CDCl}_3$ .

| Número de Carbono | $\delta ^1\text{H}$ (ppm) | Multiplicidad $J$ (Hz) | Integral | $\delta ^{13}\text{C}$ (ppm) Sahai <i>et. al.</i> (1994)* | $\delta ^{13}\text{C}$ (ppm) |
|-------------------|---------------------------|------------------------|----------|---|------------------------------|
| 1                 | -                         | -                      | -        | 173.9   | 174.0                        |
| 2                 | -                         | -                      | -        | 134.4   | 134.3                        |
| 3                 | 2.27                      | t, $J = 7.7$           | 2        | 25.2  | 25.2                         |
| 4                 |                           |                        |          | 27.4  | 27.4                         |
| 5                 |                           |                        |          | 29.2  | 29.2                         |
| 6 – 12            |                           |                        |          | 29 – 30   | 29 – 30                      |
| 27                | 1.24 – 1.35               | m                      | 28       | 25.7  | 25.7                         |
| 26                |                           |                        |          | 26.1  | 26.1                         |
| 31                |                           |                        |          | 25.3  | 25.4                         |
| 33                |                           |                        |          | 22.6  | 22.7                         |
| 13                |                           |                        |          | 25.7  | 25.7                         |
| 14                |                           |                        |          | 33.4  | 33.3                         |
| 25                |                           |                        |          | 32.4  | 32.3                         |
| 28                | 1.48 – 1.66               | m                      | 10       | 37.5  | 37.5                         |
| 30                |                           |                        |          | 37.3  | 37.3                         |
| 32                |                           |                        |          | 31.9  | 31.9                         |
| 15                | 3.42                      | m                      | 1        | 74.1  | 74.2                         |
| 17                |                           |                        |          | 28.4  | 28.4                         |
| 18 y 21           | 1.82 – 2.05               | m                      | 8        | 28.9  | 29.0                         |
| 22                |                           |                        |          | 24.6  | 24.6                         |
| 16                |                           |                        |          | 83.3  | 83.3                         |
| 19                |                           |                        |          | 82.2  | 82.3                         |
| 20                | 3.82 – 3.96               | m                      | 5        | 82.5  | 82.6                         |
| 23                |                           |                        |          | 82.8  | 82.8                         |
| 24                |                           |                        |          | 71.4  | 71.3                         |
| 29                | 3.60                      | m                      | 1        | 71.9  | 71.8                         |
| 34                | 0.90                      | t, $J = 6.8$           | 3        | 14.0  | 14.1                         |
| 35                | 7.00                      | d, $J = 1.6$           | 1        | 148.8   | 148.9                        |
| 36                | 5.01                      | cd, $J = 1.6$ y $6.8$  | 1        | 77.4  | 77.5                         |
| 37                | 1.42                      | d, $J = 6.8$           | 3        | 19.2  | 19.2                         |

d = doble. t = triple. cd = cuádruple de dobles. m = múltiple. \* RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$ .

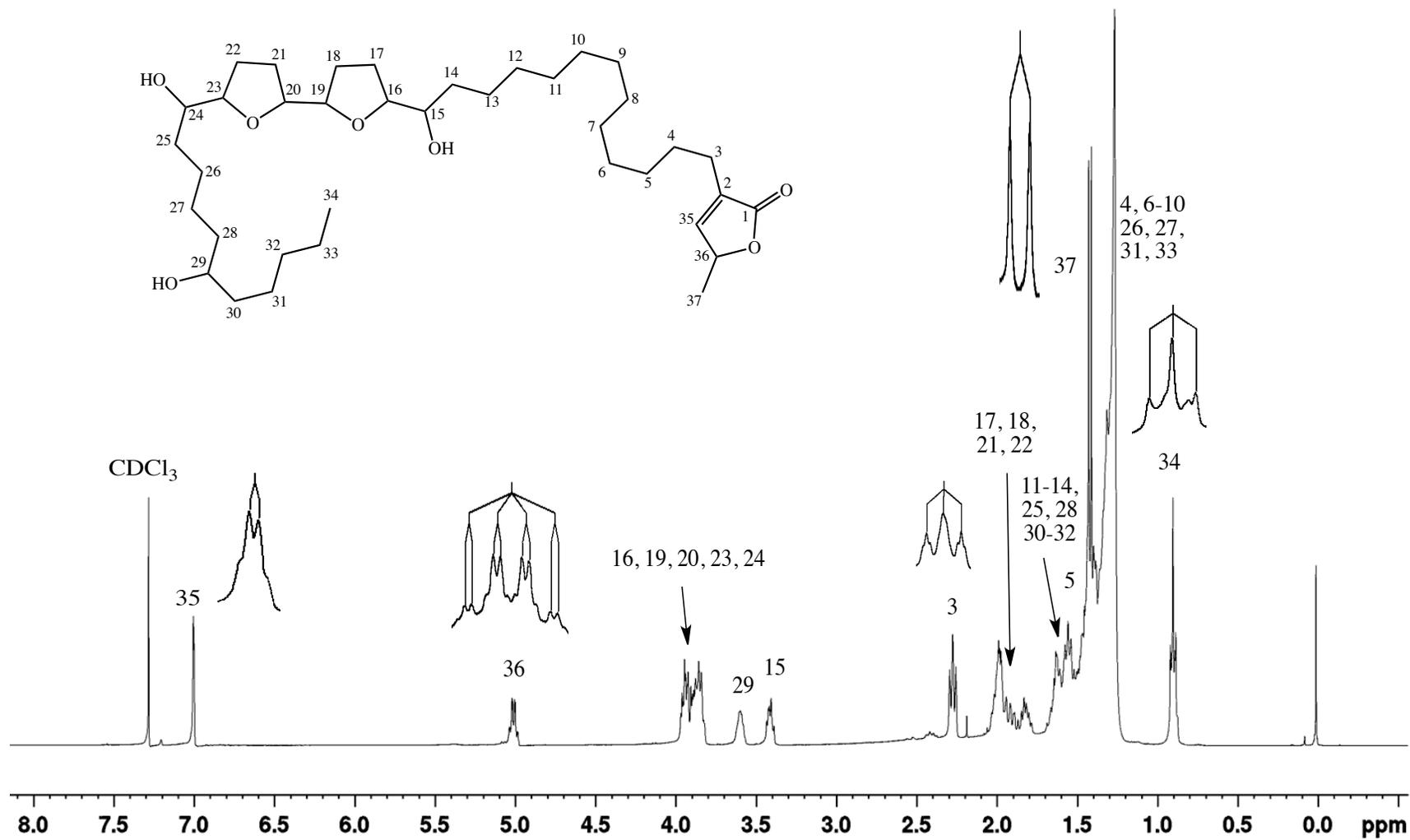


Figura 18. Espectro de RMN de  $^1H$  en  $CDCl_3$  a 400 MHz de esquamocina C aislada de las semillas de *A. purpurea*.

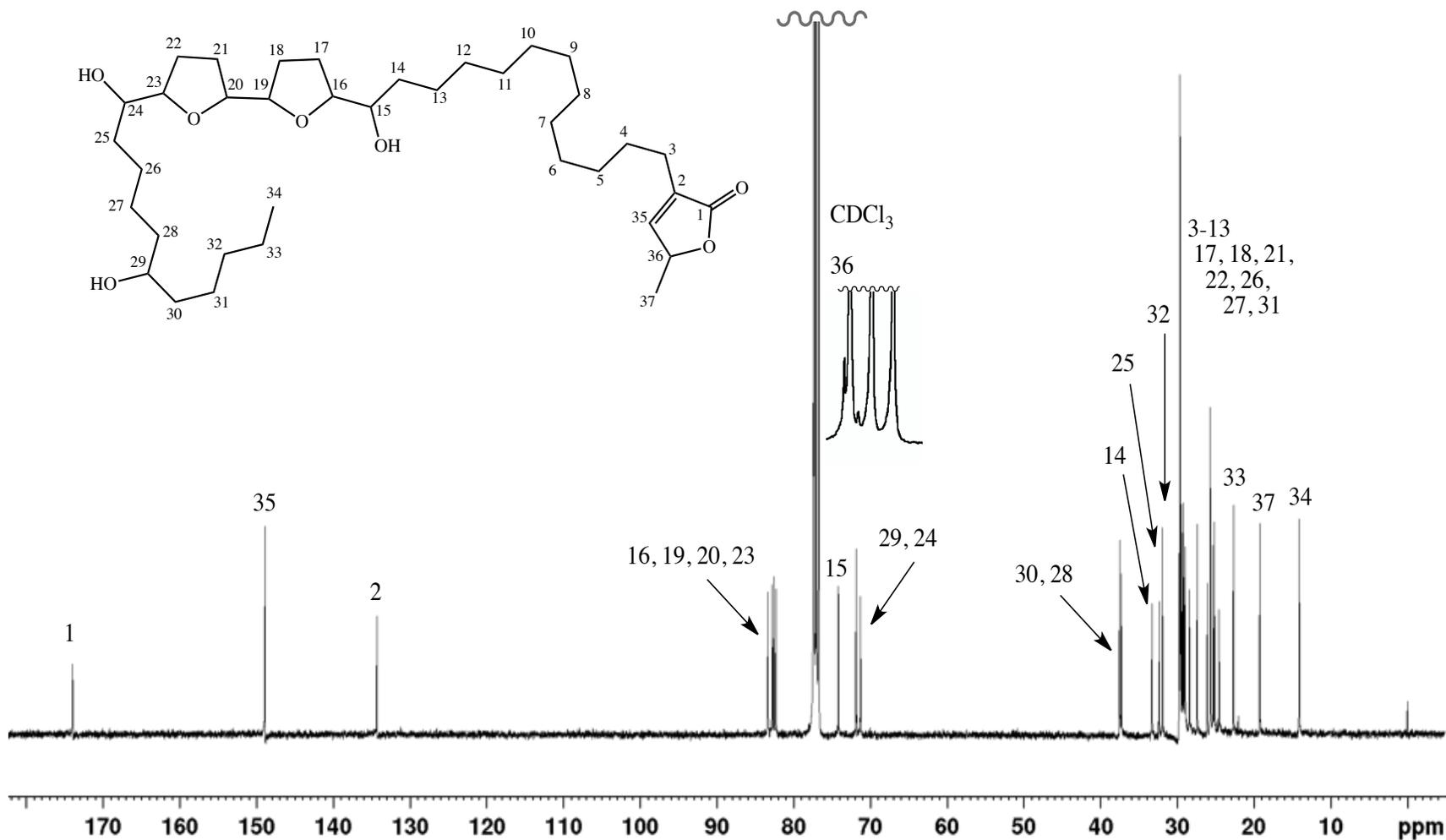


Figura 19. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz de esquamocina C aislada de las semillas de *A. purpurea*.

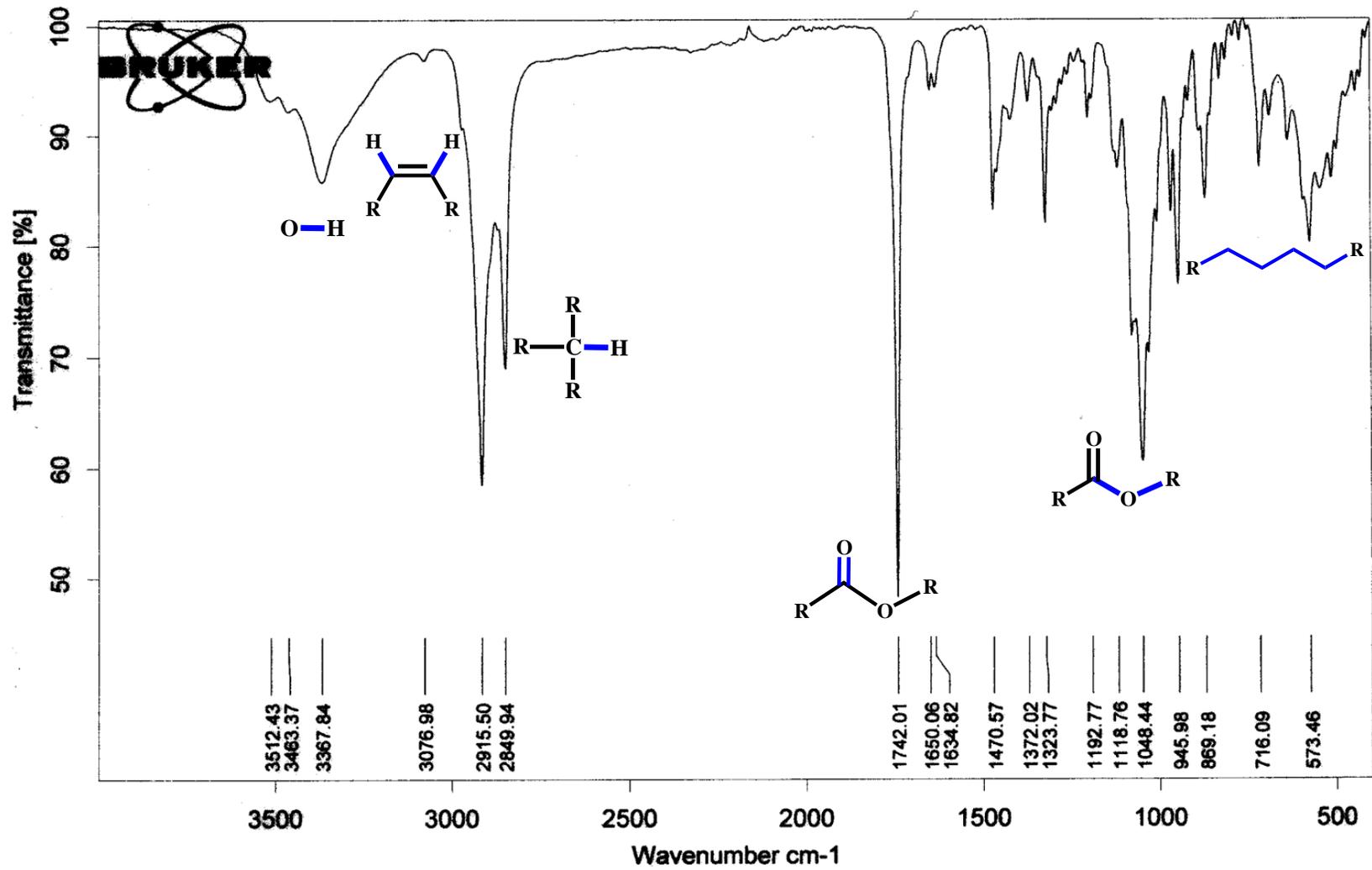


Figura 20. Espectro de ATR-FT-IR de esquamocina C aislada de las semillas de *A. purpurea*.

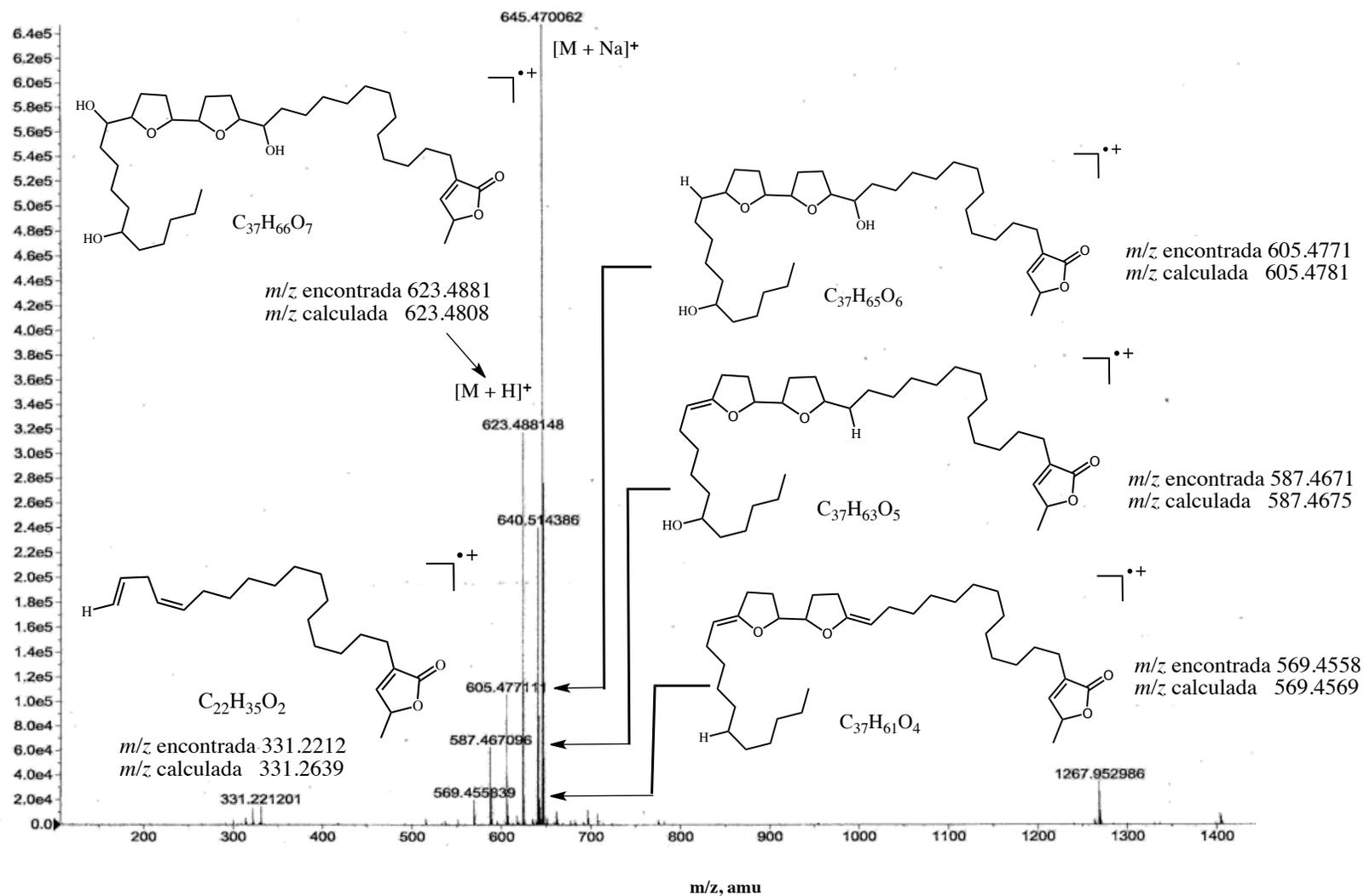


Figura 21. Espectro de masa de alta resolución de esquamocina C aislada de las semillas de *A. purpurea*.

## 5. CONCLUSIONES

El extracto metanólico de las semillas de *A. purpurea* presentó una actividad antirradicalar importante con el ensayo de reducción del DPPH<sup>\*</sup>, ocupando el segundo lugar de mayor actividad, con este ensayo, respecto a los extractos de las semillas de las cinco especies de *Annona* reportadas hasta la fecha.

Este es el primer reporte de la actividad quelante, utilizando como ligante a la ferrocina, de las semillas del género *Annona*

Todos los ensayos realizados en este trabajo tuvieron correlaciones positivas entre sí. La correlación mayor la presentó la IC<sub>50</sub> determinada por el ensayo de reducción del DPPH<sup>\*</sup> y la determinada por el método de actividad quelante ( $r = 0.99$ ). la prueba de comparación de medias (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ) determinó que el contenido de FVT de los extractos obtenidos con AcOEt del crudo metanólico y del extracto metanólico desengrasado son estadísticamente iguales.

La extracción líquido-líquido con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a partir del extracto metanólico resulto ser la más adecuada para extraer las acetogeninas medianamente polares de las semillas de *A. purpurea*.

El extracto de hexano crudo presentó  $14.6 \pm 2.0\%$  de inhibición sobre el crecimiento micelial a una concentración de 20  $\mu\text{L}/\text{disco}$  y una concentración mínima inhibitoria fungicida de 6.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  contra *F. solani*.

Este es el primer reporte de la asignación completa del triacilglicerol 1,2-dihexadecanoil-3-(octadec-9-enoil)glicerol con RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C.

## 6. PERSPECTIVAS

Determinar la actividad antirradicalar con el ensayo de reducción del DPPH<sup>•</sup> al extracto de AcOEt de las semillas de *A. purpurea* ya que fue el segundo extracto con mayor contenido de FT y FVT.

Caracterizar los compuestos presentes en el extracto de AcOEt de las semillas de *A. purpurea*.

Caracterizar los compuestos presentes en el extracto hexánico obtenido por extracción sólido-líquido de las semillas de *A. purpurea*. y probar su actividad antifúngica contra *F. solani*.

Caracterizar las acetogeninas presentes en el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y evaluar otras actividades como, citotóxica, neurotóxica, nematocida, antitumoral y antifúngica.

## 7. REFERENCIAS

1. Chávez, D.; Mata, R. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*. **1999**, *50*, 823-828.
2. Camacho, M. d. R.; Phillipson, J. D.; Croft, S. L.; Solis, P. N.; Marshall, S. J.; Ghazanfar, S. A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. **2003**, *89*, 185-191.
3. Roesler, R.; Catharino, R. R.; Malta, L. G.; Eberlin, M. N.; Pastore, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2007**, *104*, 1048-1054.
4. Muklesur-Rahman, M.; Parvin, S.; Ekramul-Haque, M.; Ekramul-Islam, M.; Mosaddik, M. A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Fitoterapia*. **2005**, *76*, 484-489.
5. Reed, M.; Fujiwara, H.; Thompson, D. C. Comparative metabolism, covalent binding and toxicity of BHT congeners in rat liver slices. *Chemico-Biological Interactions*. **2001**, *138*, 155-170.
6. Zabka, M.; Pavela, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*. **2013**, *93*, 1051-1056.
7. Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Pastore, G. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *Journal of Food Science*. **2006**, *71*:2, 102-107.
8. Albuquerque, T. G.; Santos, F.; Sanches-Silva, A.; Oliveira, M. B.; Bento, A. C.; Costa, H. S. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: potential health benefits. *Food Chemistry*. **2016**, *193*, 187-195.
9. Vidal-Hernández, L.; López-Moctezuma, H.; Vidal-Martínez, N. A.; Ruiz-Bello, R.; Castillo-Rocha, D. G.; Chiquito-Contreras, R. G. La situación de las Annonaceae en México: principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*. **2014**, *36*:1, 44-54.

10. León, J. Botánica de los cultivos tropicales. (2nd ed.). Servicio editorial IICA: San José, Costa Rica, 1987.
11. Chang, F.-R.; Wei, J.-L.; Teng, C.-M.; Y.-C., W. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*. **1998**, *49*:7, 2015-2018.
12. Oniszczyk, A.; Podgórski, R. Influence of different extraction methods on the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* inflorescence. *Industrial Crops and Products*. **2015**, *76*, 509-514.
13. Cheok, C. Y.; Chin, N. L.; Yusof, Y. A.; Talib, R. A.; Law, C. L. Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extraction from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments. *Industrial Crops and Products*. **2013**, *50*, 1-7.
14. Jawade, N. R.; Chavan, A. R. Ultrasonic-assisted extraction of aloin from *Aloe vera* gel. *Procedia Engineering*. **2013**, *51*, 487-493.
15. Stratil, P.; Klejdus, B.; Kubán, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*:3, 607-616.
16. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*:10, 4290-4302.
17. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Moyá, M. L.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. **2007**, *71*, 230-235.
18. Gramza, A.; Pawlak-Lemanska, K.; Korczak, J.; Wasowicz, E.; Rudzinska, M. Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*. **2005**, *14*:6, 861-867.
19. Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Science of Food and Agriculture*. **1998**, *76*, 270-276.
20. Loizzo, M. R.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Menichini, F.; Mastellone, V.; Avallone, L.; Menichini, F. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2012**, *25*, 179-184.

21. Canabady-Rochelle, L. L. S.; Harscoat-Schiavo, C.; Kessler, V.; Aymes, A.; Fournier, F.; Girardet, J.-M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry*. **2015**, *183*, 129-135.
22. Heim, K. E.; R., T. A.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2002**, *13*, 572-584.
23. Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. **2006**, *1112*, 31-63.
24. Zhu, H.; Wang, Y.; Liu, Y.; Xia, Y.; Tang, T. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleraca* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods*. **2010**, *3*, 90-97.
25. Barreca, D.; Laganà, G.; Ficarra, S.; Tellone, E.; Leuzzi, U.; Galtieri, A.; Bellocco, E. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). *Food Research International*. **2011**, *44*, 2302-2310.
26. Julián-Loeza, A. P.; Santos-Sánchez, N. F.; Valadez-Blanco, R.; Sánchez-Guzmán, B. S.; Salas-Coronado, R. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*. **2011**, *34*, 1262-1268.
27. Luján-Hidalgo, M. C.; Pérez-Gomez, L. E.; Abud-Archila, M.; Meza-Gordillo, R.; Ruiz-Valdiviezo, V. M.; Dendooven, L.; Gutiérrez-Miceli, F. A. Growth, phenolic content and antioxidant activity in chincuya (*Annona purpurea* Moc & Sesse ex Dunal) cultivated with vermicompost and phosphate rock. *Compost Science & Utilization*. **2015**, *23*, 276-283.
28. Karabin, M.; Hudcova, T.; Jelinek, L.; Dostalek, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*. **2015**, *33*, 1063-1090.
29. Rios de Souza, V.; Pimenta-Pareira, P. A.; Queiroz, F.; Vilela-Borges, S.; Souza Carneiro, J. d. D. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*. **2012**, *134*, 381-386.
30. Vasco, C.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. **2008**, *111*, 816-823.
31. Moo-Huchin, V. M.; Estrada-Mota, I.; Estrada-León, R.; Cuevas-Glory, L.; Ortiz-Vázquez, E.; Vargas y Vargas, M. d. L.; Betancur-Ancona, D.; Sauri-Duch, E. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*. **2014**, *152*, 508-515.

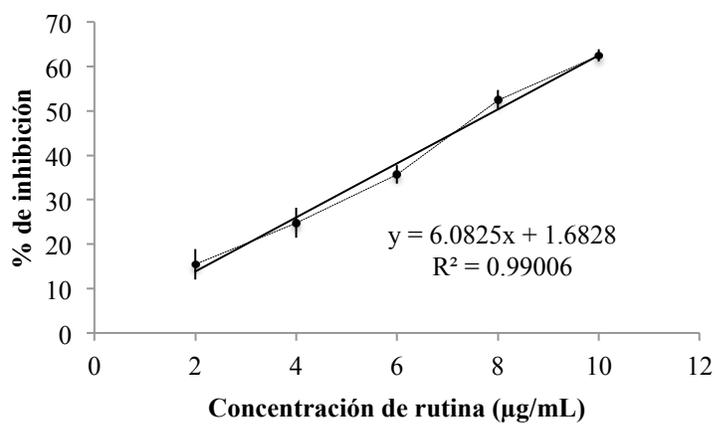
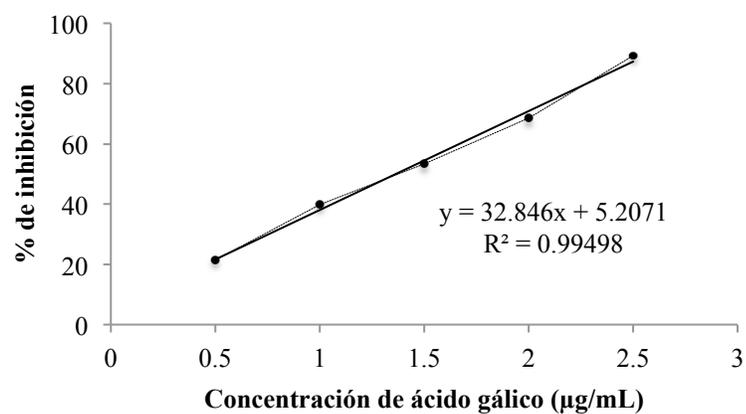
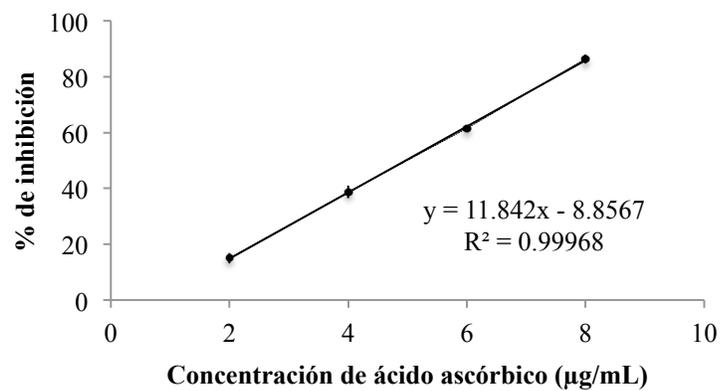
32. Nandhakumar, E.; Indumathi, P. In vitro antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. **2013**, 6:3, 142-148.
33. Beserra-Almeida, M. M.; Machado de Sousa, P. H.; Campos-Arriaga, Â. M.; Matias do Prado, G.; Carvalho-Magalhães, C. E.; Arraes-Maia, G.; Gomes de Lemos, T. L. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*. **2011**, 44, 2155-2159.
34. Kothari, V.; Seshadri, S. Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. *Nutrition & Food Science*. **2010**, 40:4, 403-408.
35. Kadarani, D. K.; Setyadjit; Seno, D. S. H.; Sukasih, E. Total phenol and antioxidant from seed and peel of ripe and unripe of Indonesian sugar apple (*Annona squamosa* L.) extracted with various solvents. *IOSR Journal Of Pharmacy*. **2015**, 5:10, 20-25.
36. Adefegha, S. A.; Oyeleye, S. I.; Oboh, G. Distribution of phenolic contents, antidiabetic potentials, antihypertensive properties, and antioxidative effects of soursop (*Annona muricata* L.) Fruit parts in vitro. *Biochemistry Research International*. **2015**, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/347673>.
37. Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*. **2005**, 25:4, 726-732.
38. Vit, P.; Santiago, B.; Perez-Perez, E. M. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*. **2014**, 39:5, 350-352.
39. Benites, R. S. R.; Formagio, A. S. N.; Argandoña, E. J. S.; Volobuff, C. R. F.; Trevizan, L. N. F.; Vieira, M. C.; Silva, M. S. Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Brazilian Journal of Biology*. **2015**, 75:3, 685-691.
40. Kalidindi, N.; Thimmaiah, N. V.; Jagadeessh, N. V.; Nanddeep, R.; Swetha, S.; Kalidindi, B. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*. **2015**, 23, 795-802.
41. Kimbonguila, A.; Nzikou, J. M.; Matos, L.; Loumouamou, B.; Ndangui, C. B.; Pambou-Tobi, N. P. G.; Abena, A. A.; Silou, T.; Scher, J.; Desobry, S. Proximate composition and physicochemical properties on the seeds and oil of *Annona muricata* grown in Congo-Brazzaville. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*. **2010**, 2:1, 13-18.

42. Pérez-Amador, M. C.; González Esquinca, A.; García Argáez, A.; Bratoeff, E.; Labastida, C. Oil composition and flavonoid profiles of the seeds of three *Annona* species. *International Journal of Experimental Botany*. **1997**, *61*, 77-80.
43. Lokhande, A. R.; Patil, V. S.; Wani, K. S. Study of diethanolamide from custard appleseed oil (*Annona squamosa* L). *International Journal of Engineering Research & Technology*. **2013**, *2*:9, 448-452.
44. Luzia, D. M. M.; Jorge, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. Seeds. *Industrial Crops and Products*. **2013**, *42*, 231-235.
45. Jiménez, V. M.; Gruschwitz, M.; Schweiggert, R. M.; Carle, R.; Esquivel, P. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International*. **2014**, *65*, 42-46.
46. Liu, X.-X.; Alali, F. Q.; Hopp, D. C.; Rogers, L. L.; Pilarinou, E.; McLaughlin, J. L. Glabracins A and B, two new acetogenins from *Annona glabra*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **1998**, *6*, 959-965.
47. Zafra-Polo, M. C.; González, M. C.; Estornell, E.; Sahpaz, S.; Cortes, D. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*. **1996**, *42*, 253-271.
48. Zeng, L.; Ye, Q.; Oberlies, N. H.; Shi, G.; Gu, Z.-H.; He, K.; McLaughlin, J. L. Recent advances in Annonaceous acetogenins. *Natural Product Reports*. **1996**, *13*, 275-306.
49. Chávez, D.; Mata, R. Purpurediolin and purpurenin, two new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*. **1998**, *61*:5, 580-584.
50. Sahai, M.; Singh, S.; Singh, M.; Gupta, Y. K.; Akashi, S.; Yuji, R.; Hirayama, K.; Asaki, H.; Araya, H.; Hara, N.; Eguchi, T.; Kakinuma, K.; Fujimoto, Y. Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Adjacent bis-tetrahydrofuranic acetogenins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1994**, *42*:6, 1163-1174.
51. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Principios de análisis instrumental. (5th ed.). McGraw-Hill/Interamericana de España: Madrid, 2001.
52. Melot, A.; Fall, D.; Gleye, C.; Champy, P. Apolar annonaceous acetogenins from the fruit pulp of *Annona muricata*. *Molecules*. **2009**, *14*, 4387-4395.
53. Dane-Ganesh, D.; Raka, K. C.; Honde, B. S.; Bhawal, G. S.; Tajane, P. J. Review on flash chromatography. *International Journal of Pharmacy Review & Research*. **2013**, *3*:1, 45-49.

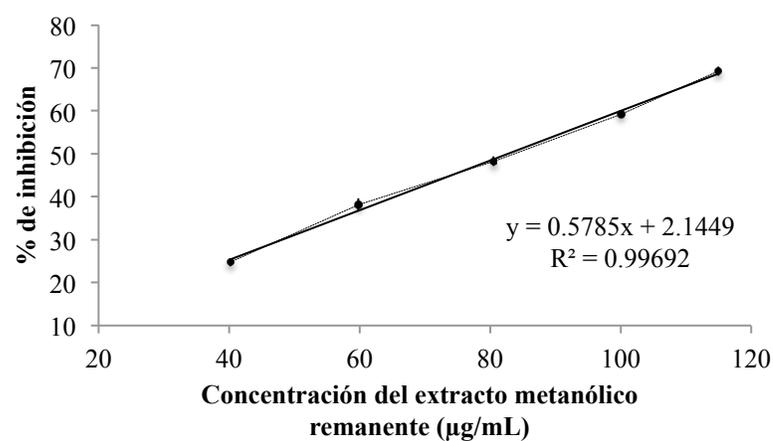
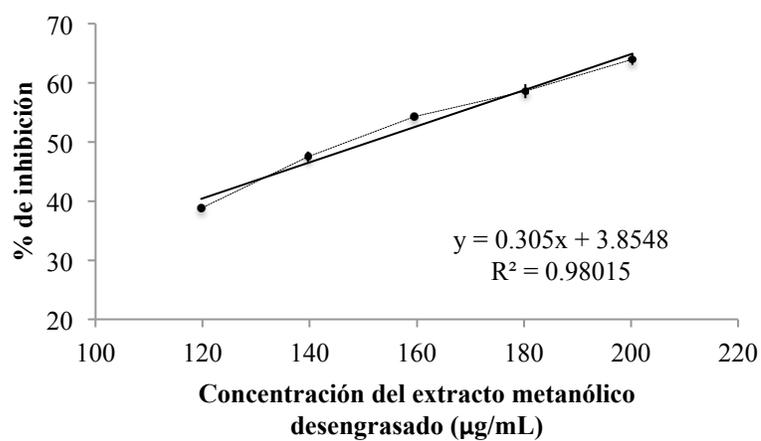
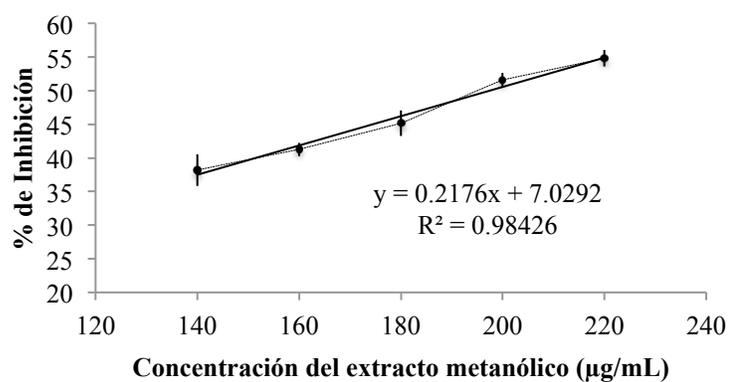
54. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. (7th ed.). Jhon Wiley & Sons, Inc: United States of America, 2005.
55. Horwitz, W. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (13th ed.). Washington, DC, 1980.
56. Lira-De León, K. I.; Ramírez-Mares, M. V.; Sánchez-López, V.; Ramírez-Lepe, M.; Salas-Coronado, R.; Santos-Sánchez, N. F.; Valadez-Blanco, R.; Hernández-Carlos, B. Effect of crude plant extracts from some Oaxaca flora on two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain. *Frontiers in Microbiology*. **2014**, *5*, doi: 10.3389/fmicb.2014.00383.

## 8. APÉNDICES

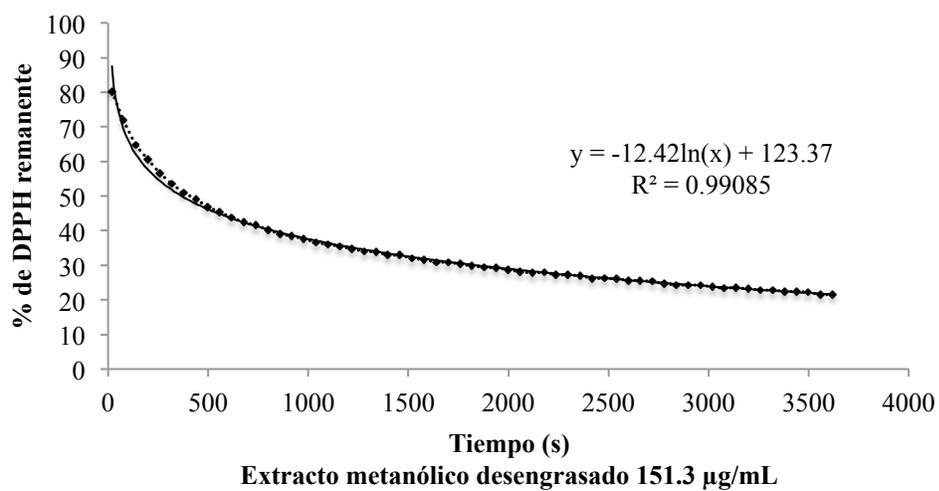
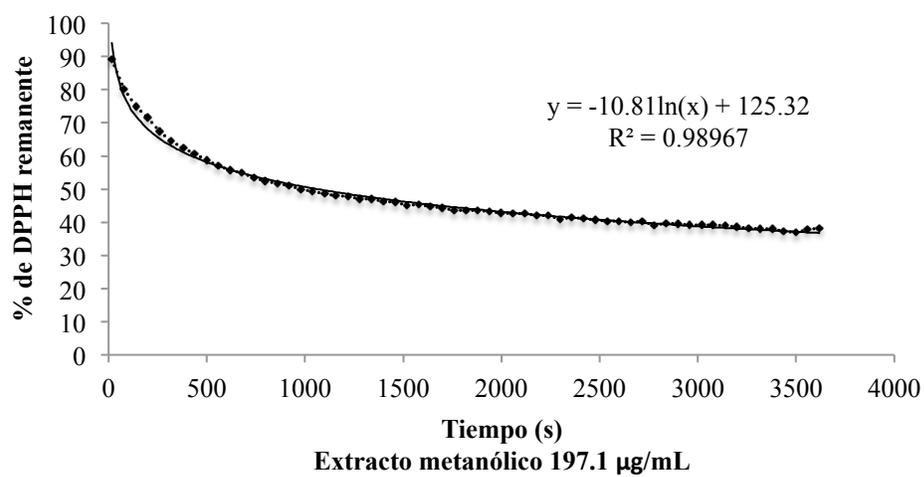
**Apéndice A.** Curvas para el cálculo del IC<sub>50</sub> por el ensayo de DPPH<sup>•</sup> de los controles ácido ascórbico, ácido gálico y rutina.



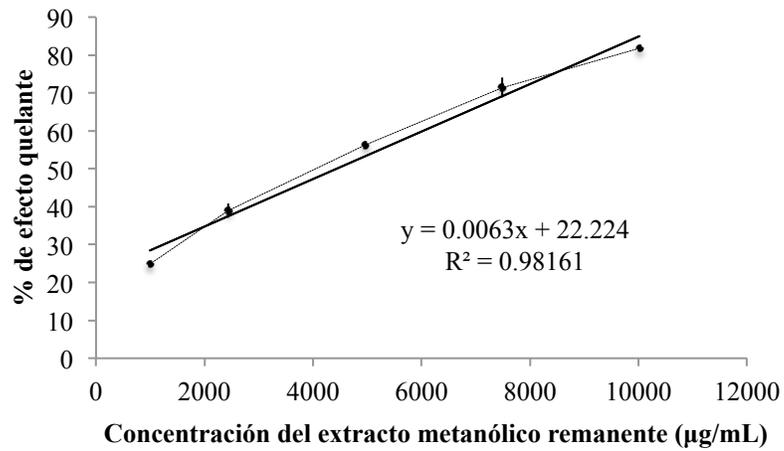
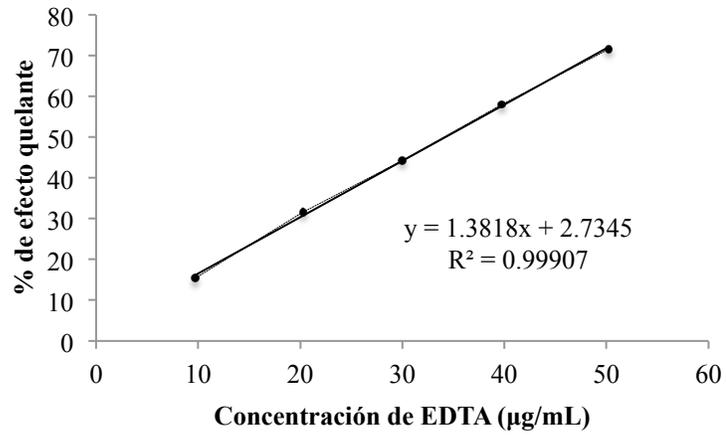
**Apéndice B.** Curvas para el cálculo del IC<sub>50</sub> por el ensayo de DPPH' de los extractos metanólico, metanólico desengrasado y metanólico remanente, respectivamente.



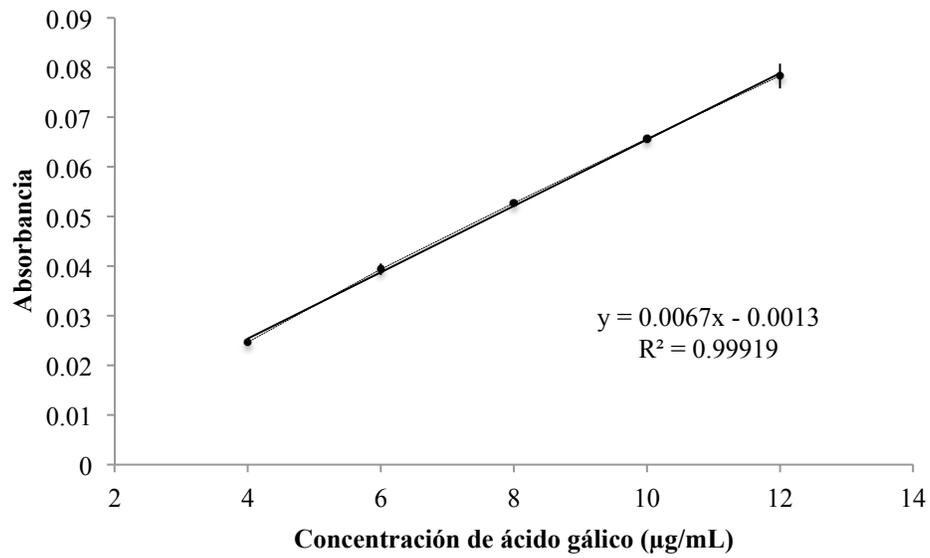
**Apéndice C.** Curvas de las cinéticas del extracto metanólico y metanólico desengrasado para el calculo de los  $T_{IC50}$ .



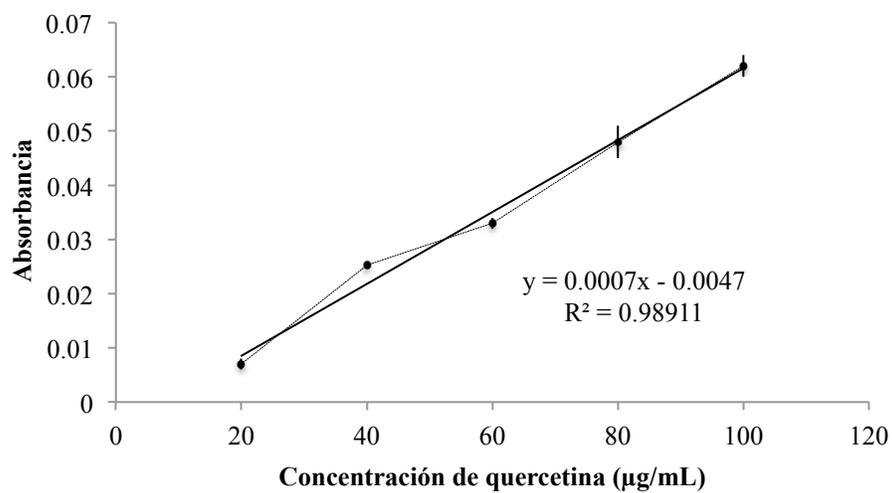
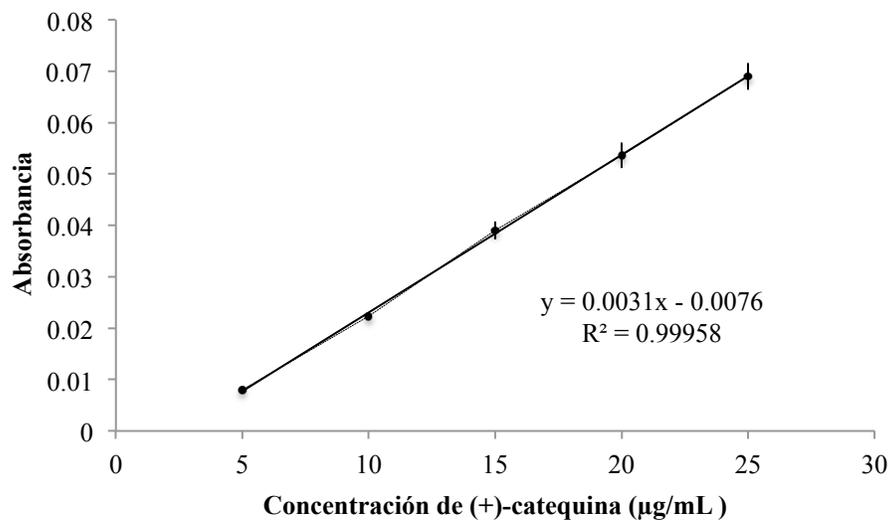
**Apéndice D.** Curva de calibración de EDTA y del extracto metanólico remanente por el ensayo de actividad quelante.



**Apéndice E.** Curva de calibración de ácido gálico para el ensayo de FT con el reactivo de Folin-Ciocalteu.



**Apéndice F.** Curvas de calibración de (+)-catequina y quercetina para el ensayo de FVT con el reactivo de  $\text{AlCl}_3$ .



**Apéndice G.** Matriz de correlación de Pearson para los ensayos de DPPH', actividad quelante, FT y FVT.

|   |                | <b>IC<sub>50</sub><br/>(DPPH')</b> | <b>FT</b>       | <b>FVT</b>      | <b>IC<sub>50</sub><br/>(Actividad<br/>quelante)</b> |
|---|----------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|---|
| <b>IC<sub>50</sub><br/>(DPPH')</b>                  | <i>r</i>       | <b>1.000000</b>                    |                 |                 |   |
|   | <b>FT</b>      | <b>0.995737</b>                    | <b>1.000000</b> |                 |   |
|   | Valor <i>p</i> | 0.000027                           |                 |                 |   |
|   | H0 (5%)        | rechazado                          |                 |                 |   |
| <b>FVT</b>  | <i>r</i>       | <b>0.960682</b>                    | <b>0.958032</b> | <b>1.000000</b> |   |
|   | Valor <i>p</i> | 0.002288                           | 0.002605        |                 |   |
|   | H0 (5%)        | rechazado                          | rechazado       |                 |   |
| <b>IC<sub>50</sub><br/>(Actividad<br/>quelante)</b> | <i>r</i>       | <b>0.999726</b>                    | <b>0.996303</b> | <b>0.961851</b> | <b>1.000000</b>                                     |
|   | Valor <i>p</i> | 1.126891x10 <sup>-7</sup>          | 0.000020        | 0.002155        |   |
|   | H0 (5%)        | rechazado                          | rechazado       | rechazado       |   |

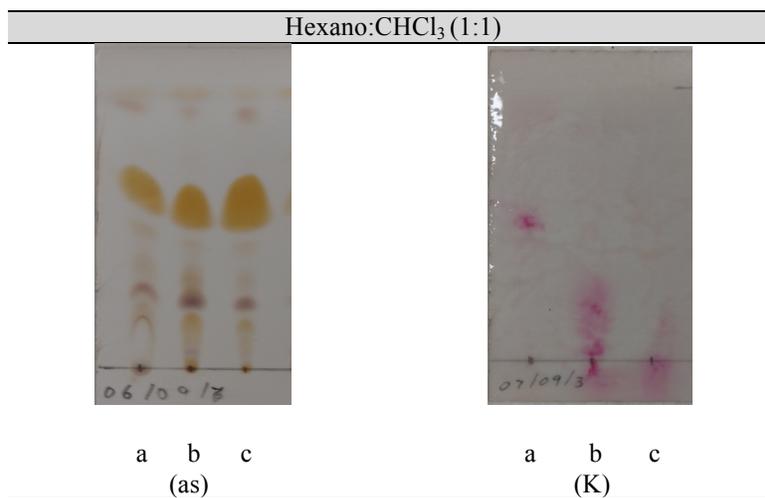
H<sub>0</sub>: No existe correlación entre las variables,  $r = 0$ .

H<sub>1</sub>: Existe correlación entre las variables,  $r \neq 0$ .

**Apéndice H.** Matriz de la prueba de comparación de medias Tukey para los ensayos de DPPH\*, actividad quelante (A.Q.), FT y FVT.

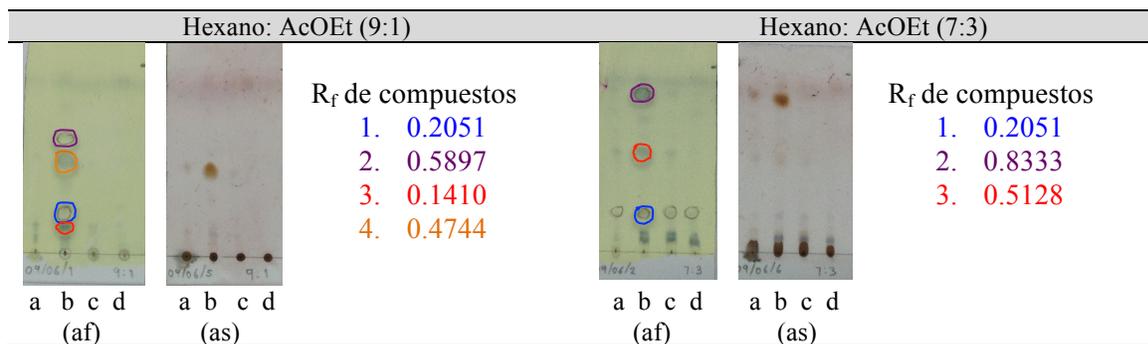
| Ensayo | Grupos                                       | Diferencia  | Estadístico de la prueba | nivel <i>p</i>             | Significancia |
|--------|--|-------------|--------------------------|----------------------------|---------------|
| DPPH*  | MeOH vs MeOH desengrasado                    | 48.358285   | 60.562982                | 0.000129                   | <i>Sí</i>     |
|        | MeOH vs MeOH remanente                       | 116.918399  | 146.426344               | 0.000129                   | <i>Sí</i>     |
|        | MeOH desengrasado vs MeOH remanente          | 68.560114   | 85.863362                | 0.000129                   | <i>Sí</i>     |
| FT     | AcOEt-MeOH desengrasado vs MeOH desengrasado | -243.643743 | 49.831357                | 0.000000                   | <i>Sí</i>     |
|        | AcOEt-MeOH desengrasado vs MeOH remanente    | -77.821628  | 15.916507                | 1.974894x10 <sup>-8</sup>  | <i>Sí</i>     |
|        | AcOEt-MeOH desengrasado vs AcOEt-MeOH        | -24.528361  | 5.016675                 | 0.000524                   | <i>Sí</i>     |
|        | MeOH desengrasado vs MeOH remanente          | 165.822114  | 33.914850                | 1.174816x10 <sup>-11</sup> | <i>Sí</i>     |
|        | MeOH desengrasado vs AcOEt-MeOH              | 219.115382  | 44.814682                | 0.000000                   | <i>Sí</i>     |
|        | MeOH remanente vs AcOEt-MeOH                 | 53.293268   | 10.899832                | 7.177285x10 <sup>-7</sup>  | <i>Sí</i>     |
| FVT    | AcOEt-MeOH desengrasado vs MeOH desengrasado | -219.972694 | 35.992150                | 0.000074                   | <i>Sí</i>     |
|        | AcOEt-MeOH desengrasado vs MeOH remanente    | -134.741222 | 22.046492                | 0.000074                   | <i>Sí</i>     |
|        | AcOEt-MeOH desengrasado vs AcOEt-MeOH        | -20.080317  | 3.285561                 | 0.171619                   | <i>No</i>     |
|        | MeOH desengrasado vs MeOH remanente          | 85.231472   | 13.945658                | 0.000095                   | <i>Sí</i>     |
|        | MeOH desengrasado vs AcOEt-MeOH              | 199.892377  | 32.706589                | 0.000074                   | <i>Sí</i>     |
|        | MeOH remanente vs AcOEt-MeOH                 | 114.660905  | 18.760931                | 0.000074                   | <i>Sí</i>     |
| A.Q.   | MeOH desengrasado vs MeOH remanente          | 210.173411  | 712.866132               | 0.000244                   | <i>Sí</i>     |

**Apéndice I.** Perfiles cromatográficos de los extractos de hexano revelados con ácido sulfúrico al 5% (as) y con el reactivo de Kedde (K).

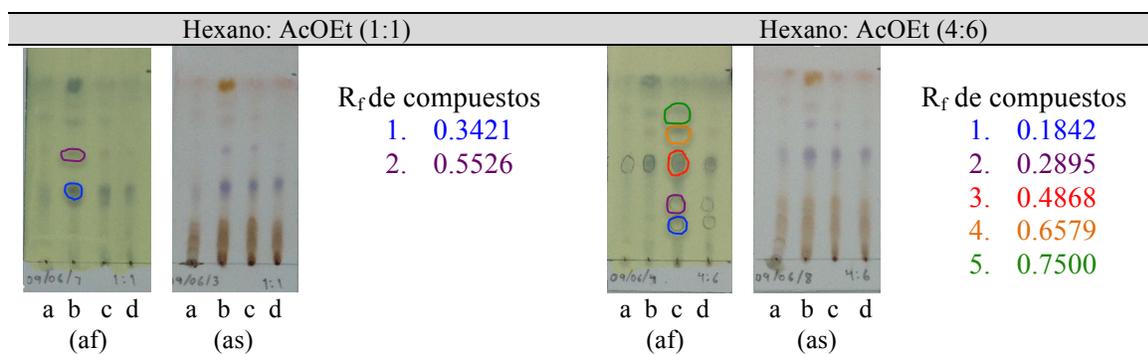


a. Extracto de hexano líquido-líquido obtenido del extracto metanólico desengrasado.  
b. Extracto líquido-líquido de hexano obtenido del extracto metanólico. c. Extracto sólido-líquido de hexano.

**Apéndice J.** Perfiles cromatográficos de los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  revelados con ácido fosfomolibdico (af) y ácido sulfúrico al 5% (as).

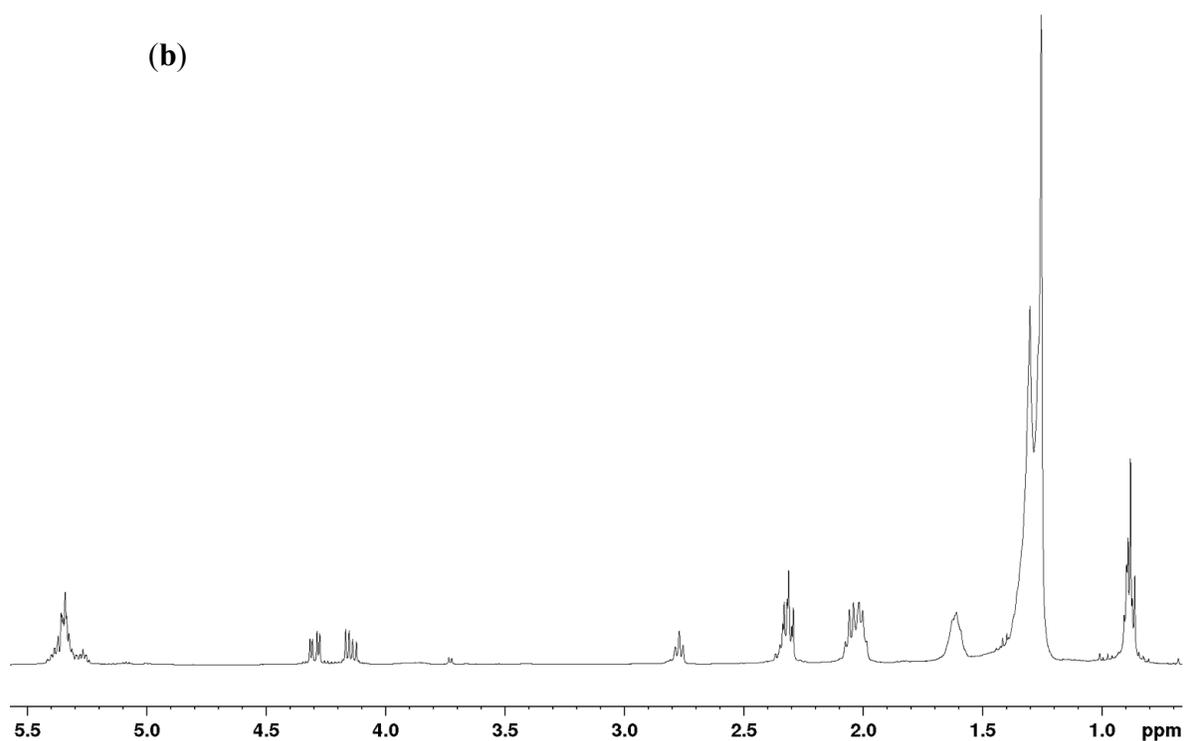
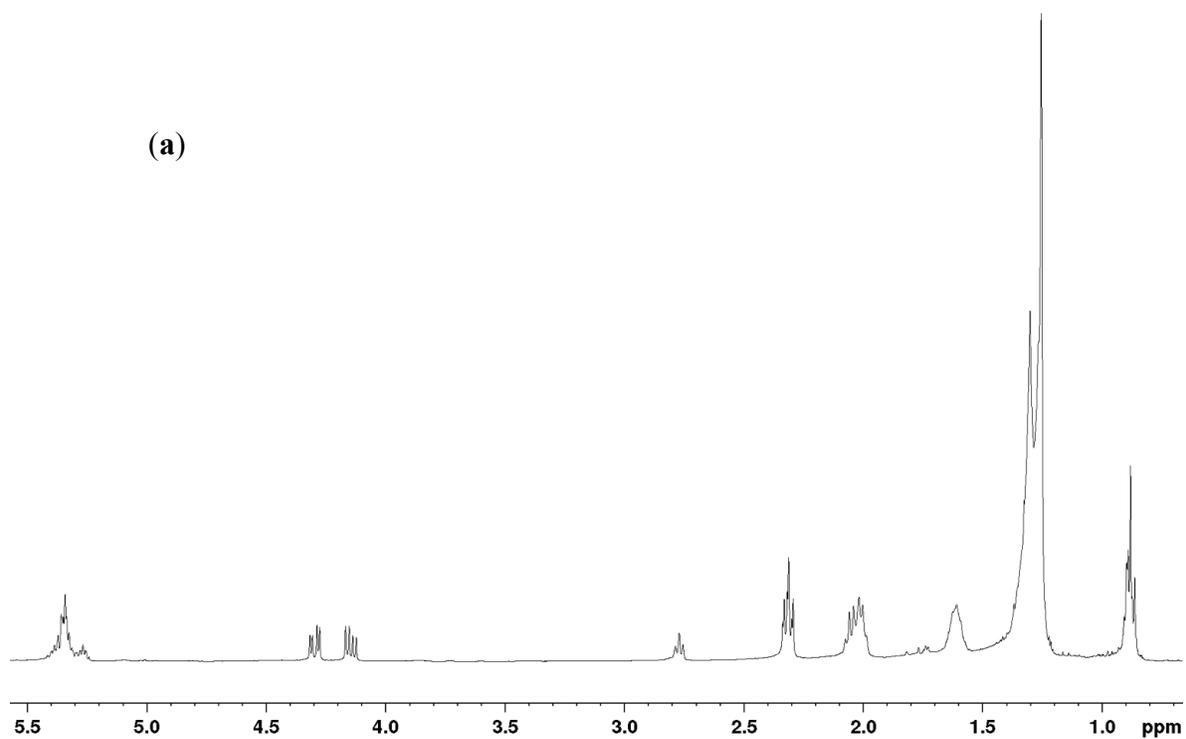


a. Referencia extracto metanólico desengrasado. b. Extracto sólido-líquido de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . c. Extracto líquido-líquido de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtenido del extracto metanólico. d. Extracto líquido-líquido de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtenido del extracto metanólico desengrasado.

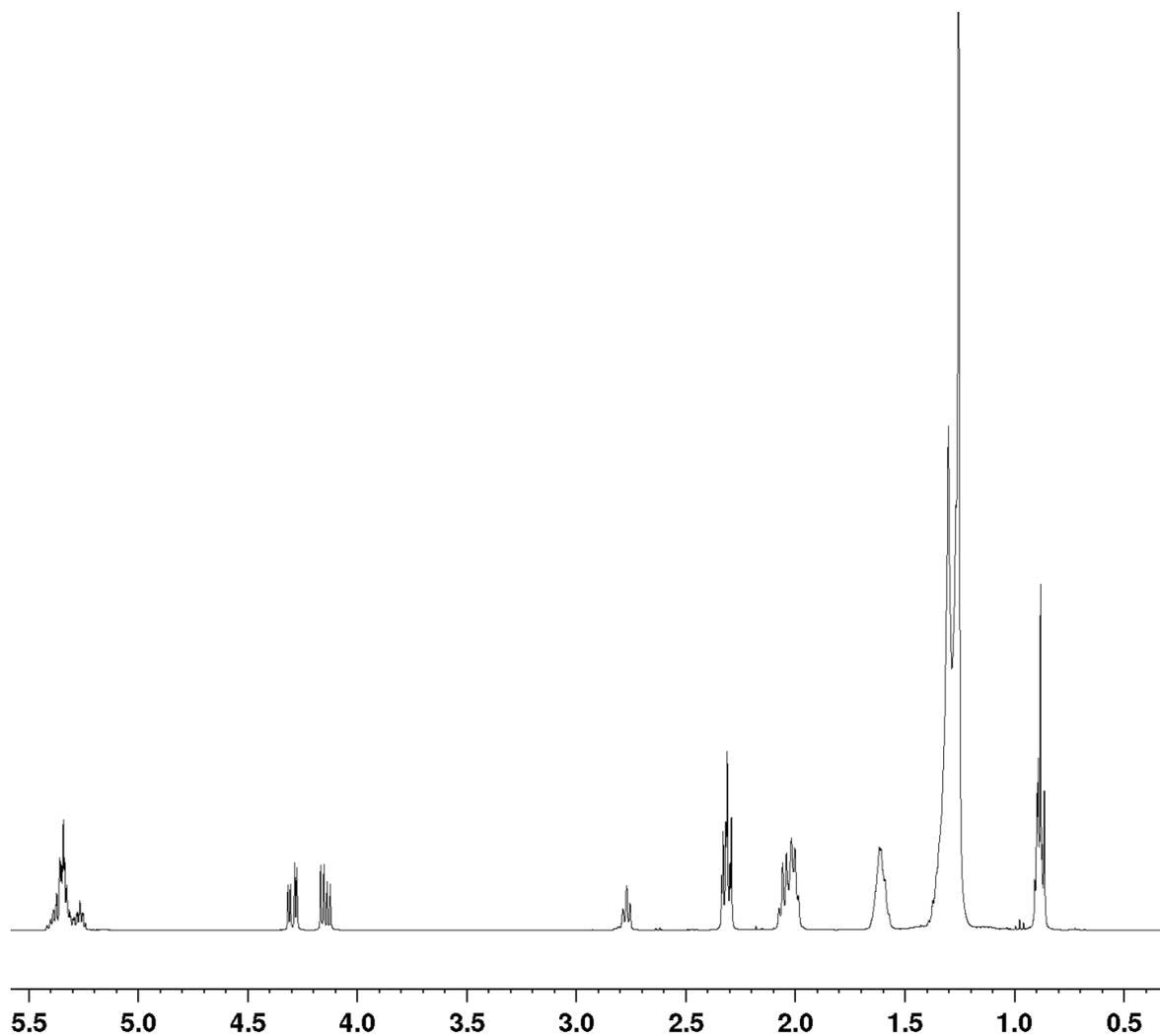


a. Referencia extracto metanólico desengrasado. b. Extracto sólido-líquido de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . c. Extracto líquido-líquido de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtenido del extracto metanólico. d. Extracto líquido-líquido de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtenido del extracto metanólico desengrasado.

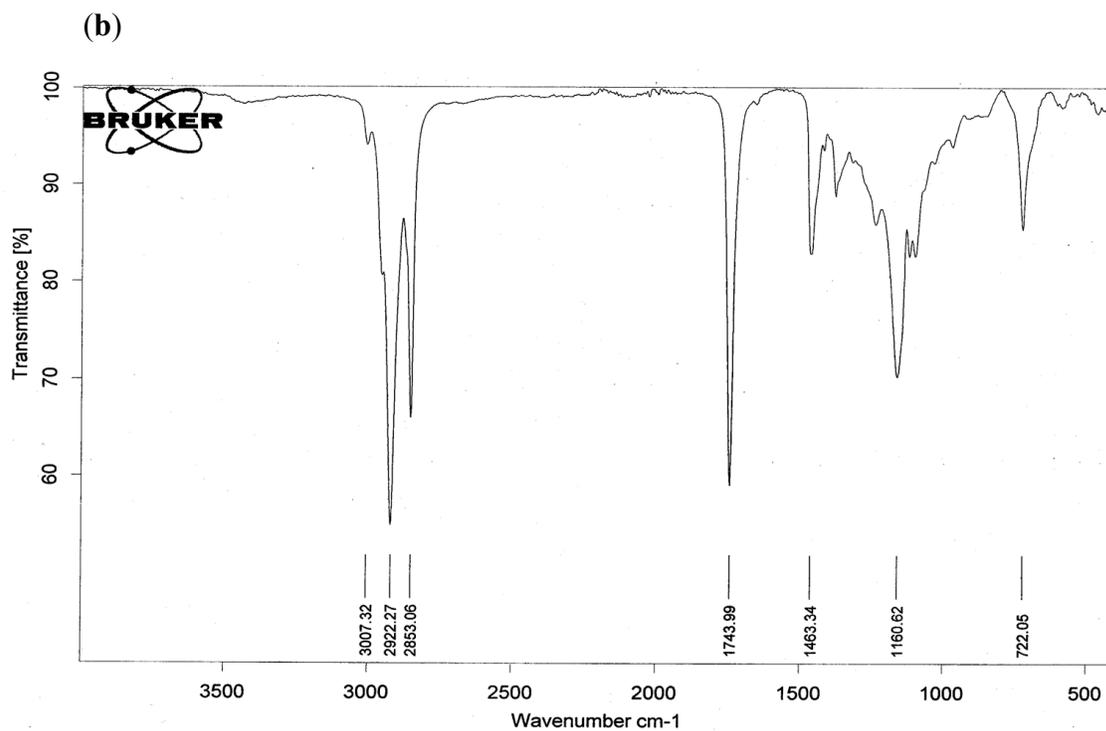
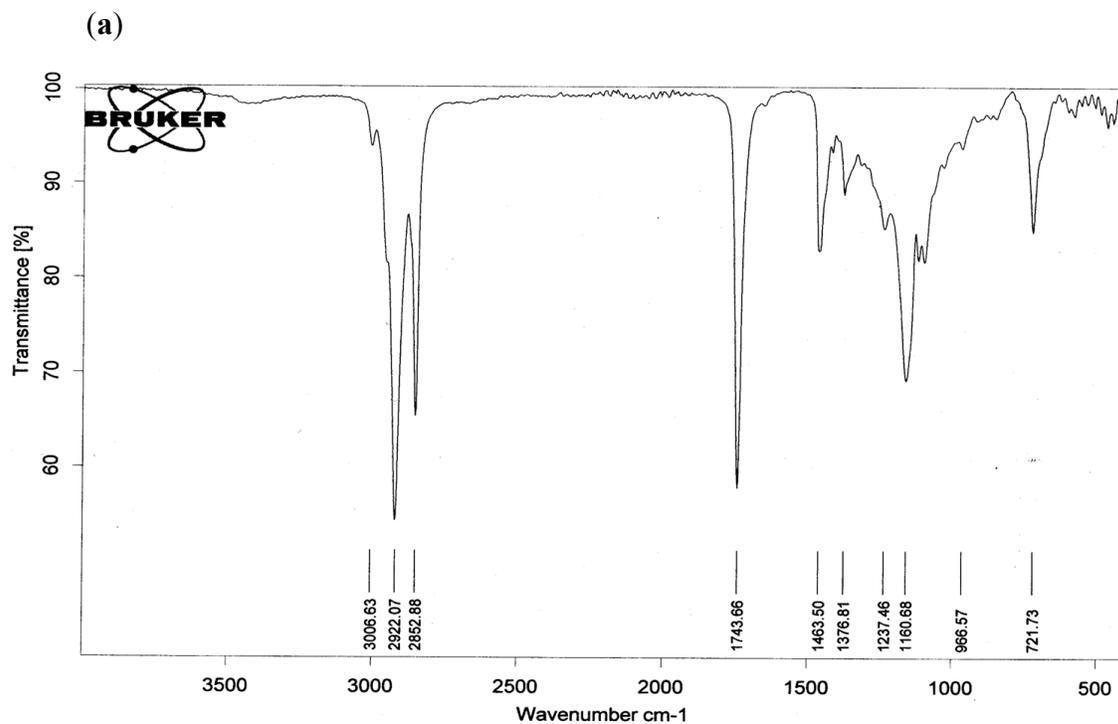
**Apéndice K.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de **(a)** extracto hexánico-a (obtenido de la extracción sólido-líquido) y **(b)** hexánico-b (obtenido de la extracción líquido-líquido) de semillas de *A. purpurea*.



**Apéndice L.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de la fracción de hexano de la columna del extracto hexánico-a de semillas de *A. purpurea*.



**Apéndice M.** Espectros ATR-FT-IR del (a) extracto hexánico-a (obtenido de la extracción sólido-líquido) y (b) hexánico-b (obtenido de la extracción líquido-líquido).



ortogan la presente

# Constancia

Eunice Ordaz-Díaz, Norma Francenia Santos-Sánchez

a:

Por la presentación del cartel titulado:

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE *Annona purpurea*

En la 12ª Reunion Internacional de Investigación en Productos naturales, celebrada en la ciudad de Xalapa, Veracruz los días 18, 19 y 20 de Mayo del 2016.



**12ª** Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales  
Homenajeado Xalapa, Veracruz 2016

**Dr. Miguel Ángel Domínguez Ortiz**

Dra. Noemí Waksman de Torres  
Presidenta AMIPRONAT



Dra. Mariabel Vázquez Hernández  
Coordinadora de la unidad SARA

Dr. Alberto Sánchez Medina  
Coordinador del Comité Organizador

**Amipronat**  
Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales

**SARA**  
Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica



Universidad Veracruzana