



Universidad Tecnológica de la Mixteca

División de Estudios de Posgrado

Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Actividad antioxidante *in vitro* y caracterización química de las semillas de *Annona diversifolia* Safford

Tesis para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Presenta:

I.I.A. Dora Jhanina Rodríguez Fernández

Directora de Tesis:

Dra. Norma Francenia Santos Sánchez

Huajuapán de León, Oaxaca, México. Marzo del 2018

Esta Tesis se realizó en los Laboratorios de Productos Naturales y Alimentos, de la división de estudios de Posgrado de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), bajo la dirección de la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez y con apoyo de una beca de manutención, número 326422, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Parte de este trabajo se presentó como cartel en el 1^{er} Foro de Productos Naturales y Control de Plagas llevado a cabo en la Universidad Tecnológica de la Mixteca el día 4 de diciembre del 2015.

Parte del presente trabajo se presentó como cartel en la 12^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales del 18 al 20 de mayo del 2016 en la ciudad de Xalapa, Veracruz, México.

Esta tesis contribuyó a la redacción de un capítulo de libro intitulado “Biological activities of plants extracts from genus *Annona*”, Santos-Sánchez N., Salas-Coronado R., Hernández-Carlos B., Pérez-Herrera A., Rodríguez-Fernández D. J. en el libro “Antioxidants in Nutrition and Diet” editorial Intech, 2018, ISBN 978-953-51-6161-5

DEDICATORIAS

A Dios, por su providencia infinita, su protección y amor constante.

A mi madre, la profesora Loyola Fernández Tapia, por su dirección, amor y ejemplo. Te amo madre hermosa.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su providencia y dirección en este escalón logrado.

A mi madre, la profesora Loyola Fernández Tapia, mis hermanos, Marco Rodríguez Fernández y Giovana Rodríguez Fernández. A mi tío, el Dr. Joselito Fernández Tapia y a mi familia materna por todo su apoyo y consejos.

A la Dra. Norma F. Santos Sánchez y al Dr. Raúl Salas Coronado, por su dirección y apoyo para el término del presente proyecto.

Dra. Beatriz Hernández Carlos, aprendí mucho de Ud. Muchas gracias.

A: Dra. Flor García Pérez, Dr. Jaime Dorantes Jiménez, M. C. Alma Y. Salazar Gavoea, Dr. Rogelio Valadez Blanco, por compartir sus conocimientos o consejos.

A mis amistades que aprecio: Dra. Mayra Herrera Martínez, Fredy Gutiérrez Escriba, M.C. Joseoziel Llaguno Guilberto, Timoteo Bautista, I.A. Mónica Morales, Gerson Picoy Chiclla, Verónica Ramírez, por la amistad en todo momento.

Agradezco al Núcleo Académico Básico de la Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos de la Universidad de la Mixteca México, por la formación académica impartida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo invaluable para realizar mis estudios de posgrado en este precioso país, otorgándome la beca de manutención, con número (CVU/Becario): 571478/326422 y al proyecto de ciencia básica 239371.

A la Dra. Angelina Flores Parra del departamento de Química del Cinvestav, por el espectro de masa obtenido.

A mi Comité Tutorial: Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, Dr. Raúl Salas Coronado, Dra. Beatriz Hernández Carlos, Dra. Mirna Patricia Santiago y Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco, por las orientaciones, dirección y paciencia durante mi aprendizaje.

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la cuantificación de los fenoles totales (FT), flavonoides totales (FVT) y se evaluó la actividad antioxidante (AA), expresada como IC_{50} usando el radical DPPH• y el poder antioxidante expresado como reducción férrica (FRAP) de extractos de semillas de tres variedades de *A. diversifolia*. El contenido de FT en el extracto metanólico se encontró en el intervalo de 613.82 ± 5.46 a 652.72 ± 7.68 mg EAG/100 g de masa húmeda (mh) de semilla. El contenido de FVT, en un intervalo de 19.40 ± 1.05 a 23.90 ± 0.61 mg EC/100 g de mh de semilla. La IC_{50} se encontró en un intervalo de 397.87 ± 8.76 a 444.71 ± 4.81 μ g/mL. Mientras que el poder reductor, en un intervalo de 78.00 ± 0.26 a 88.58 ± 2.72 μ moles Fe (II)/g de extracto. El análisis de correlación lineal de Pearson mostró una correlación excelente inversa entre el contenido de FVT y el IC_{50} ($r = -0.927$, $p < 0.05$), una correlación moderada inversa entre FVT y FRAP ($r = -0.781$, $p < 0.05$), lo que sugiere que los flavonoides son los responsables principales de la AA, expresada con el IC_{50} y en menor grado del poder reductor de los extractos de las semillas de *A. diversifolia*. Se llevó a cabo un fraccionamiento de los extractos metanólicos utilizando extracciones líquido-líquido en orden creciente de polaridad con hexano (C_6H_{14}), diclorometano (CH_2Cl_2) y acetato de etilo (AcOEt), respectivamente. En la fracción de C_6H_{14} se determinó que el compuesto más abundante es la trioleína, mientras que a partir de la fracción de CH_2Cl_2 , después de un proceso de purificación en cromatografía de columna, se aisló y caracterizó una acetogenina.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Antecedentes	14
1.2. Hipótesis	15
1.3. Objetivos	15
1.4. Originalidad e Importancia del estudio	16
2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS	18
2.1. Aspectos generales de los compuestos fenólicos	18
2.1.1. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos	18
2.2. Compuestos fenólicos y AA de las semillas de las anonáceas	20
2.2.1. <i>Annona diversifolia</i> Saff.	22
2.3. Métodos colorimétricos empleados para cuantificar FT, FVT y AA	25
2.3.1 Cuantificación de fenoles totales (FT)	26
2.3.2 Cuantificación de flavonoides totales (FVT)	27
2.3.3. Cuantificación de la AA con el DPPH•	28
2.3.4. Poder antioxidante expresado como reducción férrica (FRAP)	29
2.4. Caracterización química de las semillas del género <i>Annona</i>	31
2.4.1 Ácidos grasos (AGs) y derivados de las semillas del género <i>Annona</i>	32
2.4.2 Acetogeninas (ACGs) presentes en semillas del género <i>Annona</i>	32
2.4.3 Espectroscopía de Infrarrojo (IR)	35
2.4.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	38
2.4.4.1 RMN uni- y bidimensional de AGs y derivados	39
3. METODOLOGÍA.....	44
3.1. Estándares, reactivos y disolventes	44
3.2. Equipos y material en general	45
3.3. Preparación de la muestra	45
3.4. Extracción sólido-líquido (ESL)	46
3.5. Extracción líquido-líquido (ELL)	47
3.6. ESL para las cuantificaciones	47
3.7. Extracción en fase sólida (EFS)	48
3.8. Cuantificación de fenoles totales (FT)	48
3.9. Cuantificación de flavonoides totales (FVT)	50
3.10. Cuantificación de la actividad antioxidante (AA)	52
3.10.1 Actividad antioxidante frente al radical libre DPPH•	52
3.10.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)	54

3.11 Purificación del extracto de CH ₂ Cl ₂ de <i>A. diversifolia</i> variedad rosa	56
3.12 Caracterización química	57
3.12.1 Método de la espectroscopía infrarroja	57
3.12.2 Método de RMN de ¹ H y ¹³ C	57
3.13 Análisis estadístico	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1 Extracción sólido-líquido de las semillas	59
4.2 Cuantificación de fenoles totales (FT)	60
4.2.1 FT de los extractos metanólicos de las semillas	60
4.2.2 FT de las fracciones orgánicas de la variedad rosa mexicano	62
4.3 Cuantificación de flavonoides totales (FVT)	63
4.3.1 FVT en los extractos metanólicos de las semillas	63
4.3.2 FVT de la fracción de AcOEt de la variedad rosa mexicano	65
4.4 Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> y correlaciones con FT y FVT	65
4.4.1 Evaluación de la AA frente al radical DPPH•	65
4.4.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)	66
4.5 Características espectroscópicas de IR y de RMN de los compuestos aislados y caracterizados	69
4.5.1 Espectroscopía IR del TAG trioleína	69
4.5.2 Espectroscopía RMN de ¹ H de TAGs	72
4.5.3 Elucidación estructural de una nueva acetogenina	75
5. CONCLUSIONES.....	81
6. PERSPECTIVAS	82
7. REFERENCIAS	83
8. APÉNDICES.....	95
9. ANEXOS	101

LISTA DE APÉNDICES

	Página
Apéndice 1. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales por el método del reactivo de Folin-Ciocalteu.	95
Apéndice 2. Curva de calibración de catequina para la cuantificación de flavonoides totales utilizando AlCl ₃ .	96
Apéndice 3. Curva de calibración de ácido gálico para la evaluación de la actividad antioxidante (IC ₅₀) usando el radical DPPH•.	96
Apéndice 4. Curva de calibración de BHT para la evaluación de la actividad antioxidante (IC ₅₀) usando el radical DPPH•.	97
Apéndice 5. Curva de calibración de ácido ascórbico para la evaluación de la actividad antioxidante (IC ₅₀) usando el radical DPPH•.	97
Apéndice 6. IC ₅₀ de los extractos metanólicos de las semillas de <i>A. diversifolia</i> Saff. de tres variedades por el método del radical DPPH•.	98
Apéndice 7. Curva de calibración de FeSO ₄ .7H ₂ O para la cuantificación del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).	99
Apéndice 8. Porcentaje de la extracción líquido-líquido de las semillas de <i>A. diversifolia</i> Saff. de la variedad blanca, rosa, rosa mexicano.	100

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Ácidos grasos (AGs) y derivados caracterizados de las semillas del género <i>Annona</i> .	101
Anexo 2. Principales acetogeninas (ACGs) caracterizadas de las semillas del género <i>Annona</i> .	104
Anexo 3. Bandas de absorción (BA) de IR para AGs y ACGs.	111
Anexo 4. ACGs presentes en las semillas del género <i>Annona</i> .	113

LISTA DE ILUSTRACIONES

	Página
Ilustración 1. Características estructurales de los flavonoides para su AA ^[14] .	19
Ilustración 2. <i>Annona diversifolia</i> Saff.	23
Ilustración 3. Tres variedades de <i>Annona diversifolia</i> Saff.	24
Ilustración 4. Reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocateu ^[28] .	26
Ilustración 5. Formación del complejo flavonoide-Al ³⁺ ^[29] .	27
Ilustración 6. Reducción del DPPH' por los antioxidantes ^[33] .	29
Ilustración 7. Reacción redox para el ensayo FRAP	30
^[28] . Ilustración 8. Valor de <i>J</i> (Hz) en alquenos ^[65] .	41
Ilustración 9. Ácido (<i>Z</i>)-2'-hidroxi-1'-oleoil propiónico (21).	42
Ilustración 10. Tipos de lactonas presentes en la estructura química de acetogeninas.	43
Ilustración 11. Espectro de infrarrojo de la fracción de C ₆ H ₁₄ de las semillas de <i>A. diversifolia</i> , variedad blanca.	71
Ilustración 12. Espectro RMN ¹ H del extracto de C ₆ H ₁₄ de las semillas de <i>A. diversifolia</i> , variedad rosa.	74
Ilustración 13. Estructura general de una acetogenina.	75
Ilustración 14. Fragmento de lactona con la asignación de estereoquímica de los tres carbonos estereogénicos y δ de RMN de ¹³ C.	77
Ilustración 15. Asignación de los δ de RMN de ¹³ C y ¹ H para los CH del grupo THF y de la cola de la acetogenina.	78
Ilustración 16. Estructura de la acetogenina asilada desde la fracción de CH ₂ Cl ₂ del extracto metanólico de semillas de <i>A. diversifolia</i> .	79

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. FT y FVT de extractos de semillas del género <i>Annona</i> .	21
Tabla 2. FT, FVT y AA de la pulpa de <i>A. diversifolia</i> Saff.	25
Tabla 3. Principales AGs y derivados de las semillas del género <i>Annona</i> .	34
Tabla 4. Bandas de absorción (BA) de IR para ácidos grasos (AGs) y derivados de las semillas del género <i>Annona</i> .	37
Tabla 5. Señales principales de RMN ¹ H de aceites comestibles ^[63] .	40
Tabla 6. Señales de RMN de ¹ H y ¹³ C (δ , ppm) (300 MHz, CDCl ₃) de (21) ^[42] .	42
Tabla 7. Extracción sólido-líquido de las semillas de <i>A. diversifolia</i> comparado con otras especies del género <i>Annona</i> .	60
Tabla 8. FT de las semillas de <i>A. diversifolia</i> de tres variedades, y de otras especies de <i>Annona</i> .	62
Tabla 9. FVT de las semillas de <i>A. diversifolia</i> de tres variedades, y de otras especies de <i>Annona</i> .	64
Tabla 10. Actividad antioxidante por el método del DPPH* (IC ₅₀) y FRAP de extractos de las semillas de <i>A. diversifolia</i> de tres variedades, comparado con otras especies del género <i>Annona</i> .	67
Tabla 11. Bandas de absorción (BA) de IR de la trioleína (Tri), trielaidina (Trie) ^[76] y de la fracción de C ₆ H ₁₄ de las semillas de <i>A. diversifolia</i> variedad blanca.	70
Tabla 12. Asignaciones para el espectro de RMN de ¹ H del extracto C ₆ H ₁₄ de las semillas de <i>A. diversifolia</i> Saff. variedad rosa.	73
Tabla 13. Datos de RMN de la nueva acetogenina obtenidos a partir de experimentos uni- y bi-dimensionales (¹ H, ¹³ C y DEPT) y (HSQC y HMBC).	80

ABREVIATURAS

A.	<i>Annona</i>
AA	Actividad antioxidante
AG	Ácido gálico
AGs	Ácidos grasos
ACGs	Acetogeninas
AR	Alta resolución
BAR	Bombardeo con átomos rápidos
CC	Cromatografía en columna
CG	Cromatografía de gases
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
COSY	Espectroscopía de correlación
DEPT	Realce sin distorsión por transferencia de polarización
DIF	Detector de ionización de flama
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
EEC	Equivalentes de epicatequina
EFS	Extracción en fase sólida
EQ	Equivalentes de quercetina
EM	Espectrometría de masa
ET	Equivalentes de trolox
FC	Folin-Ciocalteu
FT	Fenoles totales
FVT	Flavonoides totales
HMBC	Espectroscopía de correlación heteronuclear de enlace múltiple
HSQC	Espectroscopía de correlación cuántica heteronuclear simple
IE	Ionización por impacto de electrones
IES	Ionización por electroespray
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
IQ	Ionización química
IQPA	Ionización química a presión atmosférica
mh	masa húmeda
ms	masa seca
TDV	Tiempo de vuelo
TF	Transformada de Fourier
<i>r</i>	Coefficiente de correlación de Pearson
<i>r</i> ²	Coefficiente de determinación
Saff.	William Edwin Safford
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La familia Annonaceae es importante desde el punto de vista comercial en prácticamente todo el mundo [1]. Esta familia tiene especies con frutos que se caracterizan por su contenido importante de compuestos fenólicos. Existen reportes en la literatura del contenido de fenoles totales (FT), flavonoides totales (FVT) y de la actividad antioxidante (AA) de frutos del género *Annona*. Tal es el caso del estudio de extractos etanólicos de las semillas y pulpa de frutos de *A. crassiflora* Mart. (marolo o araticum), que es un frutal que crece en la región de Cerrado en Brasil [2]. Los autores reportaron una concentración de FT de semillas de 9455.73 ± 569.80 mg EAG/100 g masa húmeda (mh). Mientras que en la pulpa la concentración de FT fue de 652.65 ± 118.14 mg EAG/100 g mh. La AA de las semillas, expresada como la actividad antirradical frente al radical DPPH^{*} a través del parámetro IC₅₀, fue de 45.11 ± 1.65 µg/mL de extracto en mh.

Julián-Loeza *et al.* (2011) [3], cuantificaron antioxidantes fenólicos en extractos etanólicos de la pulpa de frutos de *A. diversifolia* Saff. (papausa o ilama). Los frutos estudiados correspondieron a las variedades blanca, rosa y rosa mexicano y presentaron un contenido de FT de 170.16 ± 4.44 , 129.27 ± 1.32 y $170.88 \pm$

2.19, mg EAG/100 g mh, respectivamente. Sin embargo, antes de la realización del presente proyecto, no habían reportes sobre el contenido de FT y la AA en las semillas de *A. diversifolia*. Es por ello que en el presente trabajo se cuantificó la concentración de FT [3], FVT [4] y la AA del extracto metanólico de las semillas de las tres variedades de *A. diversifolia* Saff. por dos métodos [3, 5, 6, 7]. También, se identificaron dos compuestos de las semillas de *A. diversifolia* Saff. utilizando datos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , e infrarrojo (IR); así como espectrometría de masa (EM).

1.2. Hipótesis

La IC_{50} y el poder reductor de las semillas de *A. diversifolia* Saff. está relacionada con el contenido de fenoles totales y de flavonoides totales presentes en el extracto metanólico.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Cuantificar fenoles totales, flavonoides totales y la AA de extractos metanólicos de semillas de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano de *A. diversifolia* Saff. y caracterizar espectroscópicamente sus metabolitos principales.

1.3.2. Objetivos particulares

1. Cuantificar el contenido de FT y de FVT en extractos metanólicos de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano de las semillas de *A. diversifolia* Saff.
2. Cuantificar la IC₅₀ y el poder antioxidante expresado como reducción férrica (FRAP) en los extractos metanólicos de semillas de las tres variedades de *A. diversifolia* Saff.
3. Caracterizar espectroscópica y espectrométricamente los metabolitos principales de semillas de *A. diversifolia* Saff.

1.4. Originalidad e importancia del estudio

Hasta la fecha en la literatura especializada no existen estudios de la cuantificación de compuestos fenólicos y evaluación de la AA de las tres variedades de semillas de *A. diversifolia* Saff. Los reportes en la literatura se refieren a la cuantificación de FT, FVT, y la evaluación de la AA por el método de reducción del DPPH• en extractos etanólicos de la pulpa de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano de *A. diversifolia* Saff. [3]. En relación al estudio químico de estas semillas, se ha descrito la presencia de los ácidos: Palmítico (**4**), estéarico (**6**) [8], ácido (*E*)-15-octadecenoico (**14**) [9], oleico (**15**), y linoleico (**17**), analizados por CG [8], así como las acetogeninas rolliniastatina-2 (**52**) [10], cherimolina-2 (**76**) [11] y laherradurina (**78**) [9, 11], que fueron caracterizadas por RMN ¹H y ¹³C, IR, EM-IE [9], así como RMN ¹H y ¹³C, IR, EM-IQ [11].

La cuantificación de extractos con AA es relevante por su aplicación potencial como moléculas reductoras en la industria farmacéutica o química en general. Es por ello en el presente estudio se realizó la cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos de semillas de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano de *A. diversifolia* Safford. Además se cuantificó su AA por dos métodos espectrofotométricos.

2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

2.1. Aspectos generales de los compuestos fenólicos

En esta sección se describirán aspectos generales del contenido de fenoles totales (FT), flavonoides totales (FVT) y actividad antioxidante (AA) de las semillas del género *Annona*; así como los métodos espectroscópicos empleados para su cuantificación. Finalmente, se presentan algunos compuestos químicos aislados de semillas de frutos del género *Annona*.

2.1.1. Actividad antioxidante (AA) de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se clasifican de diversas maneras, ya sea por el número de carbonos presentes en la molécula, el grado de distribución en las plantas, por compuestos fenólicos comunes y poco comunes [12], así como solubles en agua (ácidos fenólicos simples, fenilpropanoides, flavonoides, quinonas) e insolubles en agua (taninos condensados, ligninas, ácidos hidroxicinámicos unidos a la pared celular) [13].

Existen estudios que relacionan la estructura química de los compuestos fenólicos con su AA. En general, esta actividad se caracteriza por los aspectos siguientes [14]:

- ✓ Su reactividad como agente donador de electrones o hidrógeno.

La capacidad del radical antioxidante resultante, para deslocalizar y estabilizar un electrón desapareado.

✓ La capacidad para atrapar o quelar metales de transición.

En el caso de los flavonoides, su estructura química favorece la actividad reductora de los radicales libres (Ilustración 1). Este arreglo estructural, conduce a una AA importante debido a: La sustitución *meta*-5,7-dihidroxi en el anillo A, la sustitución *orto*-3',4'-dihidroxi en el anillo B, el doble enlace 2,3 conjugado con el grupo C=O [14,15], y el hidroxilo de la posición 3 del anillo C, que permiten la deslocalización electrónica [14]. Además, la presencia del grupo catecol en el anillo B, permite donar un hidrógeno fácilmente para estabilizar especies radicalarias [14,15]. La sustitución *orto*-3',4'-dihidroxi en el anillo B y el C=O e hidroxilo en el carbono 3 o el C=O e hidroxilo del carbono 5 del anillo C, de los flavonoles [14] favorecen la quelación de iones metálicos.

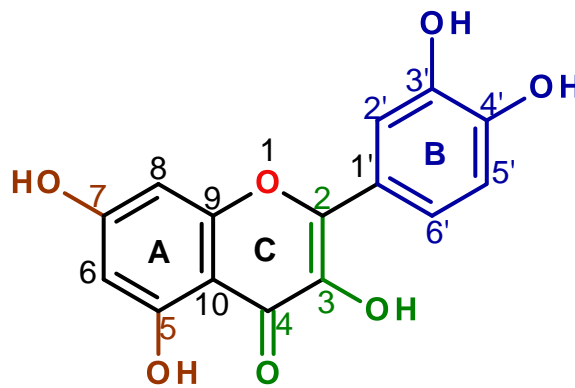


Ilustración 1. Características estructurales de flavonoides para su AA [14].

2.2. Compuestos fenólicos y AA de las semillas de las anonáceas

Las especies de la familia Annonaceae son árboles y arbustos tropicales que se encuentran divididos en 130 géneros y constituyen 2,300 especies [16]. Sólo las especies de los géneros *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina* producen frutos comestibles. El género *Annona* tiene más de 100 especies y cinco de ellas destacan comercialmente: *A. cherimola* Mill. (chirimoya del Perú), *A. squamosa* L. (saramuya y azteca), *A. muricata* L. (guanábana), *A. reticulata* L. (corazón) y la híbrida *A. x atemoya* Mabb. (atemoya), proveniente de *A. squamosa* y *A. cherimola*. Sus frutos tienen un sabor dulce-ácido y una consistencia tipo flan [17]. En los frutos del género *Annona* se ha estudiado el contenido de fenoles y su AA tanto en pulpa, como en semilla y cáscara. De acuerdo a reportes en la literatura, las semillas de los frutos de este género contienen compuestos fenólicos, los cuales se cuantifican como FT y FVT. En la Tabla 1 se puede apreciar la influencia de factores, tales como la especie, tipo de cultivo, grado de madurez del fruto y polaridad del disolvente extractor, sobre el contenido de compuestos fenólicos en el género *Annona*. Así mismo, se muestra el efecto de dichos factores sobre la AA, medida con el método del radical DPPH•. La polaridad de los disolventes influye en la extracción de los compuestos fenólicos y por lo tanto en la AA. Siendo los disolventes orgánicos más polares, tales como el MeOH y EtOH, que se utilizan con mayor frecuencia, los que favorecen un mayor contenido de FT (Tabla 1).

Tabla 1. FT, FVT e IC₅₀ de extractos de semillas del género *Annona*.

Especie	Origen	Extracto	FT (mg EAG/100 g de muestra mh)	FVT	IC ₅₀ (µg/mL)	Referencia
<i>A. cherimola</i> Mill.	Portugal	EtOH	^A 4.16 ± 0.02	^A 3.06 ± 0.02 ^e	^A 3190 ± 80	[18]
			^B 3.61 ± 0.02	^B 4.62 ± 0.02 ^e	^B 3220 ± 80	
			^C 3.35 ± 0.01	^C 6.75 ± 0.05 ^e	^C 4240 ± 310	
<i>A. squamosa</i> L.	Hong Kong	MeOH	300 ± 10.0 ^a	nr	nr	[19]
	Sudán	MeOH	*75.6 ^b	*27.6 ^f	15.63 ± 0.2	[20]
<i>A. muricata</i> L.	Venezuela	EtOH	451.4 ± 9.7 ^c	309.2 ± 3.3 ^g	-	[21]
		MeOH	280.8 ± 4.6 ^c	159.8 ± 1.4 ^g	-	
<i>A. sylvatica</i> A. St.-Hil.	Brasil	H ₂ O-MeOH	58.10 ± 1.45 ^d	51.11 ± 2.30 ^h	724.14 ± 17.79	[22]
<i>A. coriacea</i> Mart.	Brasil	H ₂ O-MeOH	147.08 ± 4.20 ^d	131.18 ± 2.31 ^h	330.55 ± 2.34	
<i>A. crassiflora</i> Mart.	Brasil	EtOH	^D 9455.73 ± 569.80	nr	^D 45.11 ± 1.65	[2]
			^E 6489.60 ± 400.42		^E 106.23 ± 3.57	
		H ₂ O	^D 2006.01 ± 108.14	nr	^D 604.87 ± 21.69	
			^E 960.99 ± 93.37		^E 1678 ± 25.86	
<i>A. cornifolia</i> A. St.-Hil.	Brasil	EtOH	nr	nr	33.9 ± 6.26	[23]

Para FT, se usó el Reactivo de Folin-Ciocalteu. FVT, se usó AlCl₃. Provenientes de los cultivos A Mateus II. B Madeira. C Perry Vidal. masa húmeda (mh). D Frutos poco maduros. E Frutos muy maduros. a mg EAG/100 g de muestra en masa seca (ms). b g EAG/kg de extracto vegetal. * desviación estándar (DE) expresada gráficamente. *DE no descrita. c mg EAG/100 g de fruto fresco (ff). d mg EAG/g extracto. e mg EEC/100 g de muestra en mh. nr: No reportado. f mg ER/100 g de extracto. g mg EQ/100 g de ff. h mg EQ/g extracto. EAG: Equivalentes de ácido gálico. EEC: Equivalentes de epicatequina. EQ: Equivalentes de quercetina. ER: Equivalentes de rutina.

Los valores de FT reportados para las semillas del género *Annona*, poseen un contenido desde 4.16 ± 0.02 [18] hasta 9455.73 ± 569.80 mg EAG/100 g mh [2] para *A. cherimola* Mill. y *A. crassiflora* Mart., respectivamente.

A pesar de que existe una relación directa entre la concentración de FT y la AA de extractos ricos en compuestos fenólicos, también existen reportes que señalan correlaciones débiles. Por ejemplo, Roesler *et al.* (2006), encontraron una asociación fuerte ($r^2 = 0.821$) entre contenido de FT y la AA (con el radical DPPH*) de las semillas de *A. crassiflora* Mart. [2]. Mientras que, De Olivera *et al.* (2012) encontraron una asociación moderada ($r^2 = 0.46$) entre el contenido de FT y la AA en los extractos de *Herissantia crispa* L., conduciendo a los autores a sugerir que compuestos no fenólicos presentes en el extracto estudiado también contribuyen a la AA de esa especie [24]. Una correlación moderada o débil sugiere que los fenoles no son los contribuyentes únicos a la AA del extracto del fruto estudiado. En los extractos pueden estar presentes otros tipos de compuestos, tales como los carotenos, los cuales también contribuyen a la AA del fruto [25].

2.2.1. *Annona diversifolia* Saff.

Esta especie es del suroeste de la costa de México y de América Central; en México, crece hasta los 610 msnm. Es un árbol que puede alcanzar hasta 8.5 m de altura, y el grosor de su tronco puede medir 25 cm aproximadamente (Ilustración 2). Cada árbol produce un promedio de 50 frutos anualmente. Los frutos, tienen forma ovalada, con pulpa color blanca, rosa o rojiza (rosa

mexicano) y pesan entre 500 y 1,000 g (Ilustración 3). El fruto de *A. diversifolia* puede contener hasta 40 semillas.



Ilustración 2. Árbol, fruto y semillas de *Annona diversifolia* Saff.

Por otro lado, el contenido promedio de aceite reportado para estas semillas es de hasta $27.43 \pm 0.18\%$, sobresaliendo el ácido oleico (C18:1) (70.42%) [8]. Las semillas de *A. diversifolia* se han evaluado como fuente de biodiesel [26] y también son una fuente de acetogeninas. Las acetogeninas son moléculas importantes debido a que presentan actividad antiproliferativa (*in vitro* e *in vivo*) sobre células cancerígenas HeLa y SW-480 [11].

Luna-Cazares *et al.* (2010) obtuvieron la acetogenina rolliniastatina-2, a partir del extracto hexánico de las semillas de *A. diversifolia*. En ese estudio evaluaron la actividad antibacteriana de la rolliniastatina-2 [10]. Los investigadores encontraron que las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, y *Pseudomonas aeruginosa* fueron sensibles a la rolliniastatina-2 (en un 28, 30 y

40%, respectivamente a 2 mg/mL); mientras que los esferoplastos de *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *E. coli*, mostraron una susceptibilidad alta a la misma (55, 57, 58%, respectivamente, a 1 ng/mL). Peralta-Montero *et al.* (1997) reportaron citotoxicidad en *Artemia salina* L. de la acetogenina laherradurina, aislada de la fracción de CH₂Cl₂ de las semillas de *A. diversifolia*. La mejor concentración citotóxica (100% de muertes) fue de 10 µg/mL [9].



Ilustración 3. Tres variedades de *Annona diversifolia* Saff.

Por otra parte, Moo-Huchin *et al.* (2014) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos en la pulpa de esta especie de *Annona*, el contenido de FT fue de 246.29 ± 62.06 mg EAG/100 g en mh, y los FVT mostraron un valor de 230.53 ± 3.57 mg EQ/100 g en mh. Los frutos estudiados fueron obtenidos del estado de Yucatán, México [27]. También determinaron la capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC), utilizando el radical DPPH*, encontrando para la pulpa de este fruto un valor de 357.83 ± 16.97 µM ET/100 g de mh (Tabla 2). Por otro lado, Julián-Loeza *et al.* (2011) encontraron que la AA, expresada como el

IC₅₀ de la pulpa del fruto de esta *Annona*, presenta una correlación inversa alta entre FT y AA ($r = -1.000$), un comportamiento similar para la correlación entre contenido de FVT y AA ($r = -0.969$) [3].

Tabla 2. FT, FVT y AA de la pulpa de *A. diversifolia* Saff. [3]

Variedad	Extracto	FT (mg EAG/ 100 g en mh)	FVT (mg EC/ 100 g en mh)	AA (IC ₅₀ , µg/mL)
Blanca	FT de	170.16 ± 4.44 ^a	152.04 ± 5.39 ^a	1714.99 ± 61.82 ^a
Rosa	EtOH/	129.27 ± 1.32 ^b	107.41 ± 5.15 ^b	1998.19 ± 63.14 ^b
rosa mexicano	FVT de MeOH	170.88 ± 2.19 ^a	142.56 ± 2.55 ^a	1701.07 ± 47.42 ^a
nr	MeOH [27]	246.29 ± 62.06	30.53 ± 3.57 ^A	357.83 ± 16.97 ^B

nr, no reportada. Para FT, se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para FVT se usó el AlCl₃. AA, por el método del DPPH*. EC: Equivalentes de catequina. EAG: Equivalentes de ácido gálico. Letras mayúsculas a, b, c diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), por el método de rangos múltiples de Duncan. A mg EQ/100 g en mh EQ: Equivalentes de quercetina. B µM ET/100 g en mh. ET: Equivalentes trolox.

2.3. Métodos colorimétricos empleados para cuantificar FT, FVT y AA

Para la cuantificación de FT y FVT se utilizan métodos espectrofotométricos, que consisten en la formación de complejos coloridos, para medir los máximos de absorbancia dependientes de la concentración del complejo en la disolución. El método más empleado para la cuantificación de FT es el que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C). Mientras que para la cuantificación de FVT, se usa el AlCl₃ de manera general, para formar un complejo flavonoide-aluminio. En la cuantificación de la AA se utiliza el potencial de los fenoles, o compuestos reductores presentes en los extractos o muestras, para reducir radicales libres o metales. Los métodos más empleados para cuantificar AA son la reducción del

radical DPPH•, del catión radical ABTS⁺•, el poder antioxidante expresado como reducción férrica (FRAP), la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC), entre otros. A continuación se describirán brevemente los métodos que se emplearon en el presente trabajo.

2.3.1 Cuantificación de fenoles totales (FT)

Inicialmente el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) fue generado en 1927 a partir de reactivos químicos usados para el análisis de tirosina. Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por parte del molibdotungstato, componente del reactivo F-C, generando un complejo de color azul con una absorbancia máxima a una longitud de onda (λ) en el intervalo de 745 a 760 nm (Ilustración 4). Se han descrito algunas limitaciones de esta reacción química como su lentitud a pH bajo y la carencia de especificidad [28]. Generalmente se utiliza una curva de ácido gálico como estándar para expresar el contenido de FT presentes en la muestra; y se reporta como mg equivalentes de ácido gálico (EAG), u otro fenol, contenidos en masa de muestra o extracto.

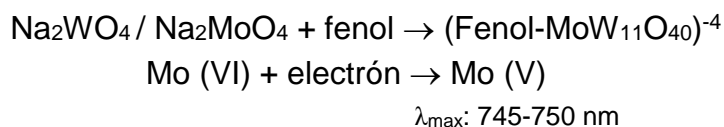


Ilustración 4. Reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) [28].

2.3.2 Cuantificación de flavonoides totales (FVT)

Los flavonoides con estructuras sustituidas con grupos hidroxilos en los carbonos 3' y 4' pueden mostrar un color rojizo al reaccionar con el sistema $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ (Ilustración 5) [29]. El ion Al^{3+} reacciona con los carbonilos de las posiciones 3' y 4' del flavonoide, productos de la oxidación previa, y en presencia de una base fuerte (NaOH) genera un quelato de ion aluminio de color rojo, el complejo flavonoide- Al^{3+} (Ilustración 5).

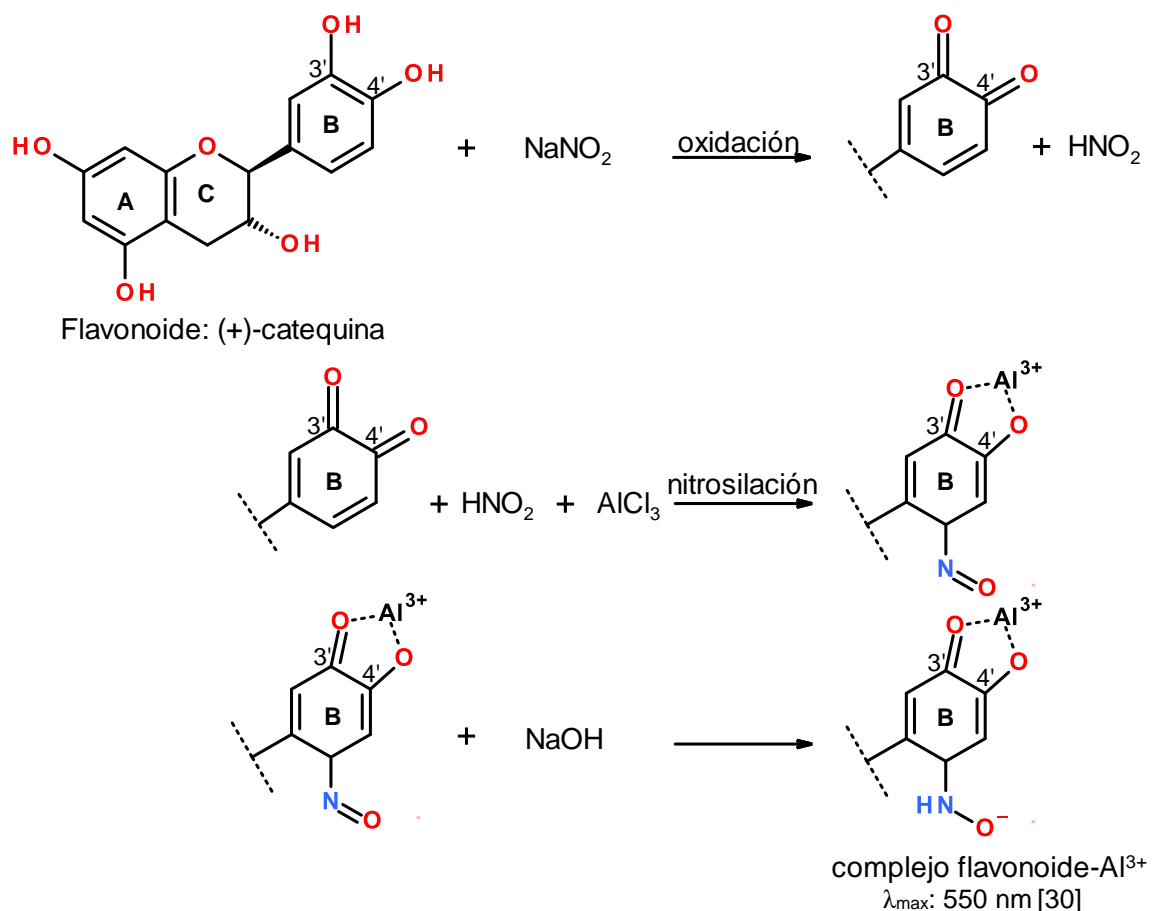


Ilustración 5. Formación del complejo flavonoide- Al^{3+} [29].

Dado que los flavonoides presentan dos bandas de absorción particulares, en la región UV-Visible: La banda benzoil (del anillo aromático A), con un máximo de absorbancia entre 240-285 nm y la banda cinamoil (del anillo aromático B), con un máximo de absorbancia entre 300-550 nm [30], la absorbancia de este complejo de color rojo, medido a una longitud de onda máximo (λ) de 550 nm, se relaciona con la concentración de FVT a través de la ecuación de una curva de calibración de un estándar. La curva de calibración se construye con algún flavonoide tal como catequina, quercetina, rutina, entre otros.

2.3.3. Cuantificación de la AA con el DPPH•

Este ensayo fue descrito por primera vez por Blois en 1958, luego diversos investigadores lo han modificado para utilizarlo [31]. El radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), es un radical libre relativamente estable, que tiene un electrón desapareado en el átomo de nitrógeno puente [32]. El método de cuantificación de la AA se basa en la capacidad que tienen los componentes antioxidantes para reducir el DPPH• [31]. Esta reacción óxido-reducción genera una disminución de la intensidad del color púrpura inicial del DPPH• (Ilustración 6). La neutralización del DPPH• puede ocurrir por reducción directa, vía la transferencia de un electrón o por la neutralización del radical, por la donación de un átomo de hidrógeno. Un factor determinante en esta reacción es la accesibilidad estérica de las moléculas para reaccionar con el DPPH•. Es por ello que las moléculas más pequeñas, que tienen mayor acceso al sitio donde se localiza el radical, son las que tienen valores de capacidad antioxidante más altos generalmente [28]. Asimismo, la exposición a la luz, contenido de oxígeno,

pH del medio de reacción y el tipo de disolvente disminuyen la absorbancia del DPPH• [33]. La disminución de la intensidad del color inicial del radical se puede monitorear a través del decremento de la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. La medición de la absorbancia se realiza después de hacer reaccionar el radical DPPH• con los componentes antioxidantes a evaluar. Posteriormente, se puede obtener una relación proporcional de la concentración del DPPH• con la cantidad de antioxidante [28]. Una forma de expresar la AA de los compuestos fenólicos es a través de la concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀), que se define como la concentración necesaria de un compuesto experimental para obtener el 50% de respuesta inhibitoria *in vitro* [34].

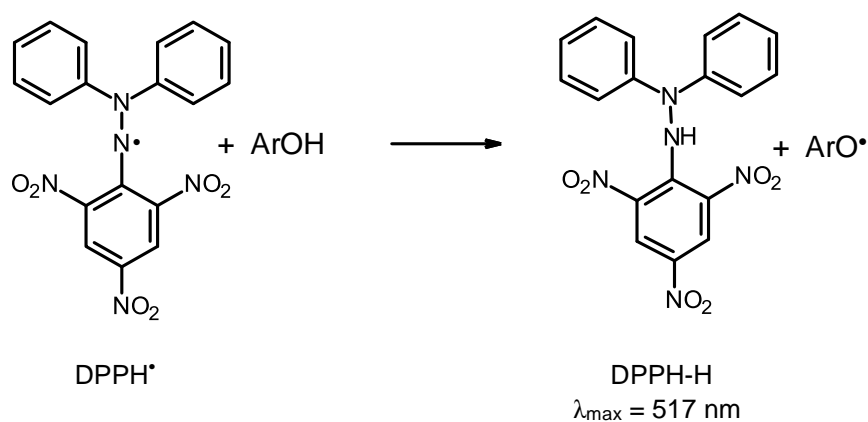


Ilustración 6. Reducción del DPPH• por antioxidantes [33].

2.3.4. Poder antioxidante expresado como reducción férrica (FRAP)

El poder antioxidante expresado como reducción férrica (FRAP), inicialmente fue desarrollado por Benzie y Strain para medir la capacidad reductora en el plasma sanguíneo; sin embargo, hoy en día se ha adaptado para usarse en el área de

alimentos y extractos de plantas. Esta técnica se fundamenta en la reducción del complejo 2,4,6-tripiridil-s-triazina férrica [TPTZ-Fe (III)] a su forma ferrosa [TPTZ-Fe (II)] que es un complejo de color azul intenso, con una absorción máxima a una longitud de onda de 593 nm [35]. El pH del medio de reacción es de 3.6 para asegurar la solubilidad del hierro. Las reacciones a pH bajo disminuyen el potencial de ionización que dirige la transferencia de electrones, y aumenta el potencial redox que da inicio al mecanismo principal de la reacción [28] (Ilustración 7).

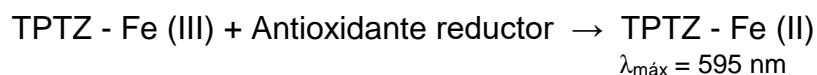
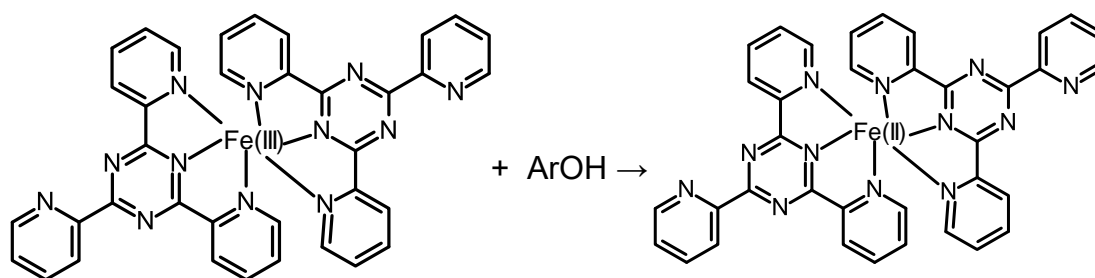


Ilustración 7. Reacción redox para el ensayo FRAP [28].

El cambio de color se monitorea midiendo la variación de la absorbancia del complejo azul en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 593 nm. De este modo se relaciona directamente esta variación del color con el poder reductor del antioxidante donador del electrón y la concentración del complejo TPTZ-Fe (II).

2.4. Caracterización química de las semillas del género *Annona*

Las semillas del género *Annona* poseen compuestos con propiedades bioactivas [2, 10, 19], los cuales se han caracterizado por EM acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) o de gases (CG), RMN de ^1H y ^{13}C e IR.

A partir de semillas de *A. squamosa* L. (anón, saramuyo) se han identificado y cuantificado por CLAR con detector de arreglo de diodos, los compuestos fenólicos: Ácidos gálico, clorogénico, siríngico, ferúlico, *p*-cumárico [20], así como el flavonol quercetina [36]. También se han descrito sobre la cuantificación de diterpenoides [37], ácidos grasos y acetogeninas. Estos dos últimos se resumen en la Tabla 3 y Anexo 2.

De las semillas de *A. crassiflora* Mart. (araticum) se han caracterizado los ácidos cafeico, cafeoiltartárico; así como rutina, xantoxilina, un éster de glucosa del ácido cafeico por EM-IES-C-TDV [38] y la acetogenina araticulina (69) [39].

De *A. cherimola* Mill., con EM-CLAR, se caracterizaron y cuantificaron: fenoles glicosilados, procianidinas, catequina, epicatequina, rutina y hesperidina [40]. Además de ácidos grasos saturados e insaturados y acetogeninas (Tabla 3 y Anexo 2).

A partir de *A. muricata* L. (guanábana), una fruta comercializada a nivel mundial, se caracterizaron AGs saturados e insaturados y ACGs por EM-IE, EM-BAR, IR, RMN de ^1H y ^{13}C [41], expuestos en la Tabla 3 y Anexo 2, respectivamente.

En el presente proyecto de investigación, se realizó el estudio químico de la fracción hexánica y de CH_2Cl_2 de las semillas de *A. diversifolia* Saff.

2.4.1 Ácidos grasos (AGs) y derivados de las semillas del género *Annona*

A partir de las semillas de *A. squamosa* L. (India) se identificaron el ácido (*Z*)-2'-hidroxi-1'-oleoilpropiónico (**21**) y el 1'-palmitoil-glicerol (**22**), datos de EM-IES, IR, RMN de ^1H y ^{13}C [42]. Mientras que en semillas de *A. diversifolia* Saff. se ha descrito el ácido (*E*)-15-octadecenoico (**14**) [9] (Tabla 3). La estructura química de los ácidos grasos (AGs) y acetogeninas (ACGs) de las semillas del género *Annona* se muestra en los Anexos 1 y 2, respectivamente.

2.4.2 Acetogeninas (ACGs) presentes en semillas del género *Annona*

La elucidación estructural de ACGs de las semillas del género *Annona*, consiste en el análisis de espectros de masa para determinar la fórmula molecular exacta, seguida por estudios de fragmentación por ionización electrónica (IE) o ionización por electrospray (IES) para determinar la posición de los grupos funcionales en la cadena alquílica. Un procedimiento utilizado comúnmente para la elucidación de la estereoquímica relativa de los centros estereogénicos de las ACGs, es el análisis cuidadoso de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C ; mientras que para la elucidación de la estereoquímica absoluta, un método útil es el análisis de los desplazamientos químicos de RMN de los ésteres diastereoisoméricos de Mosher [43].

A partir de extractos etanólicos de *A. squamosa* L. (China) se aislaron, caracterizaron y cuantificaron las ACGs 12,15-*cis*-esquamostatina-A y bullatacina o rolliniastatina-2 (**52**) en concentraciones de 7.98 ± 2.42 mg/g y 256.18 ± 13.61 mg/g, respectivamente, identificadas como componentes principales del extracto de las semillas [44]. También murisolina-B (**28**), motrilina

(67) [45], uvariamicina II-III (31-33), tres ACGs nuevas annosquaminas A-C (36-38), solamina (39), annotemoyina-1 (40), cuya configuración relativa de los anillos de THF fueron determinados por comparación de datos de RMN con estructuras modelo [46]. De *A. muricata* L. se ha reportado ACGs tales como annonacinona (26) y corossolona (30) aisladas del extracto metanol-acuoso acidificado (10% de H₃PO₄) [47]. Del extracto etanólico de las semillas de *A. cornifolia* A. St.-Hil. (Brasil) se aisló la 9-hidroxfolianina (54), que se caracteriza por tener una AA fuerte con el método de reducción del DPPH• (IC₅₀ de 1.23 ± 0.21 µg/mL), demostrando mejor AA que el antioxidante comercial BHT (16.36 ± 3.63 µg/mL) y similar al del ácido ascórbico (1.62 ± 0.35 µg/mL) [23, 48].

De las semillas de *A. diversifolia* Saff. se han aislado y caracterizado a rolliniastatina-2 (52) [10], cherimolina-2 (76) y laherradurina (78) [9], Anexo 2 (Grupo IV, VI y VII) y Anexo 4.e. Estas moléculas a través de bioensayos, demostraron poseer diferentes actividades biológicas diferentes tales como: Inhibidores del crecimiento celular [49, 11], citotoxicidad [9], efecto antialimentario e insecticida [50].

Tabla 3. Principales AGs y derivados de las semillas del género *Annona*.

Especie Origen/ Extracto	Método de caracterización	Ácidos grasos y/o derivados
<i>A. cherimola</i> Mill. [51] España/ (C ₂ H ₅) ₂ O	CG	Ác. láurico (1), Ác. mirístico (2), Ác. pentadecanoico (3), Ác. heptadecanoico (5), Ác. esteárico (6), Ác. araquídico (8), Ác. behénico (9), Ác. lignocérico (10), Ác. (Z)-10-heptadecenoico (13), Ác. oleico (15), Ác. (Z)-11-octadecenoico (16), Ác. linoleico (17), Ác. α-linolénico (18), Ác. γ-linolénico (19)
<i>A. cherimola</i> Mill. [52] Portugal/ C ₆ H ₁₄	CG-EM	Ác. palmítico (4), (6), (15-17)
	CLAR-IQPA-EM	DAG: L-Ln, L-L, Ln-L, O-L, L-L, E-L TAG: L-Ln-L, L-L-L, O-Ln-L, L-O-L, P-L-L, O-L-L, O-L-O, O-O-L, L-L-E.
	RMN ¹³ C	1,3-DAG, 1,2-DAG
<i>A. diversifolia</i> Saff. [9] México/ C ₆ H ₁₄	RMN ¹ H y ¹³ C, IR, EM-IE	Ác. (E)-15-octadecenoico (14), éster triglicérico
<i>A. muricata</i> L. [53] Jordania/ C ₆ H ₁₄ y C ₄ H ₁₀ O	CG-DIF, IR	(2), (4-6), (8-10), Ác. (Z)-10-pentadecenoico (11), Ác. pamitoleico (12), (13), (15), (17), (18), Ác. gondoico (20)
<i>A. squamosa</i> L. [37] Brasil	CG-EM	(1-2), (4), (6), (8), (9), (12), (15), (17), (18), (20)
<i>A. squamosa</i> L. [45] China/ éter de petróleo	RMN	(5), (6), Ác. nonadecanoico (7)
<i>A. squamosa</i> L. [42] India/ C ₆ H ₁₄	EM-IES, IR, RMN ¹ H y ¹³ C	Ác. (Z)-2'-hidroxi-1'-oleilpropiónico (21), 1'-palmitoil-glicerol (22)

L: Linoleico. Ln: Linolénico. O: Oleico. P: Palmítico. E: Esteárico. DAG: Diacilglicéridos. TAG: Triacilglicéridos.

2.4.3 Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

La espectroscopía de IR se basa en la interacción de un campo electromagnético oscilante con una molécula [54], la cual tendrá absorción de luz infrarroja. Si su momento dipolar eléctrico varía durante la vibración molecular, esto constituye la regla de selección para la espectroscopía de IR. Este momento dipolar variará con la expansión y contracción del enlace molecular [55]. En el espectro electromagnético la región IR medio (4000 - 400 cm^{-1}) es la principal en espectroscopía vibracional para identificar moléculas orgánicas y obtener información estructural para su caracterización. Un espectro de IR expresa la medida de la absorbancia de la radiación infrarroja incidente sobre la muestra a una energía particular [56]. Las frecuencias de las bandas de absorción del espectro IR son proporcionales a la diferencia de energía entre los estados vibracional fundamental y vibracional excitado de la molécula [57], los cuales proveen información específica de los grupos funcionales que posee.

Una de las técnicas de IR más utilizadas actualmente es la reflectancia total atenuada (ATR), esta técnica es versátil y no destructiva, cuyo procedimiento consiste en poner en contacto la muestra con el elemento de reflexión interna y habiendo ajustado el ángulo de incidencia, la radiación incidente experimentará múltiples reflexiones internas, dando lugar a la absorción de una fracción de la radiación por parte de la muestra y a una atenuación del haz reflejado. Para ello, el ERI debe tener un índice de refracción alto, tal como el ZnSe, TlBr-TlI y Ge [54]. Además, dado que la fracción del haz incidente reflejado es mayor, si aumenta el ángulo de incidencia; este debe ser mayor que el ángulo crítico, para lograr una reflexión interna total [58].

2.4.3.1 Bandas de absorción de IR de ácidos grasos (AGs) de semillas del género *Annona*

Branco *et al.* (2009) reportaron las bandas de absorción características de los grupos funcionales para el aceite de las semillas de *A. squamosa* L. Una banda de absorción débil a 3474 cm^{-1} , representa el sobretono de las vibraciones de tensión del grupo C=O. Mientras que las bandas de absorción a 3008 , 1653 y 917 cm^{-1} , representan las vibraciones de tensión del C-H, C=C y deformación (fuera de plano) del C=C, respectivamente. Esto indica la presencia de AGs insaturados con estereoquímica *Z* en el aceite de las semillas de *A. squamosa* L. Los autores caracterizaron y cuantificaron, por CG-EM, el contenido de AGs saturados e insaturados del aceite de las semillas referidas, obteniendo el contenido mayor para el ácido oleico (C18:1) 38.58%, seguido del ácido linoleico (C18:2) 35.97%, mientras que el ácido linolénico (C18:3) se encontró en menor cantidad (1.31%) [52]. Por otra parte, Elagbar *et al.* (2016) reportaron las bandas de absorción de IR para el aceite de las semillas de *A. muricata* L. Las bandas de absorción se encontraron en 1736 , 1711 cm^{-1} (C=O de ésteres), 1292 cm^{-1} (C-CO-C), 1097 cm^{-1} (O-CH₂-C), 951 cm^{-1} (vibración de flexión de aleteo del CH₂) y 725 cm^{-1} (vibración flexión de balanceo del CH₂). Adicionalmente se encontraron en 2918 cm^{-1} y 2851 cm^{-1} las bandas de absorción de las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica del CH₂, respectivamente [53], las bandas de absorción descritas de las diversas especies de *Annona*, se resumen en la Tabla 4. Además, los autores cuantificaron por CG-DIF, los AGs del aceite. AGs saturados representaron el 23.16%, y los más abundantes fueron el palmítico (19.10%) y el esteárico (3.30%). Mientras que los monoinsaturados

representaron el 40.77%, donde el ácido oleico (39.0%) y palmitoleico (1.36%) fueron los más abundantes [53].

Tabla 4. Bandas de absorción (BA) de IR para ácidos grasos (AGs) y derivados de las semillas del género *Annona*.

Grupo funcional	Modo de vibración	BA (cm ⁻¹)	AGs, derivado aislado o muestra
O-H (de ácido)	ν	3466	
=C-H (de alqueno)	ν	3007	
C-H (de cadena alifática)	ν	2918	ácido (<i>Z</i>)-2'-hidroxi-1'-oleilpropiónico (21) de <i>A. squamosa</i> [42]
C=O (de éster)		1739	
C=O (de ácido)		1647	
C-O (de éster)	ν	1118	
C=C (insaturación)	ν	1464	
Sobretono (de ν C=O)			
		3474	
=C-H (de alqueno)	ν	3008	aceite de <i>A. cherimola</i> [52]
C=C (insaturación)	ν	1653	
C=C (insaturación)	<i>oop</i>	917	
CH ₂	$\delta\rho$	725	
CH ₂	$\delta\omega$	951	
O-CH ₂ -C		1097	aceite de <i>A. muricata</i> [53]
C-CO-O		1292	
C=O (de éster)		1711, 1736	
C-H (de metileno)	ν_s	2851	
C-H (de metileno)	ν_{as}	2918	
O-H (de ácido)	ν	3300-2500	
C-H (de cadena de alquilo)	ν	2910-2850	ácido 15-octadecenoico (14) de <i>A. diversifolia</i> [9]
C=O (de ácido)		1710	
C=C (insaturación)	ν	1650	

ν : Tensión (stretch). ν_s : Tensión simétrica. ν_{as} : Tensión asimétrica δ : Flexión (bending). ρ : Balanceo (rocking). ω : Aleteo (waving). *oop*: Fuera del plano (out of plane).

Tariq *et al.* (2011) reportaron bandas de absorción IR para los ésteres de AGs.

En el espectro IR medio, los ésteres tienen dos bandas de absorción fuertes, la

de tensión C=O en un intervalo de 1750 a 1730 cm^{-1} y la de tensión axial C-O (antisimétrica y simétrica) en un intervalo de 1300 a 1000 cm^{-1} . Mientras, que las vibraciones de tensión de CH_3 , CH_2 , CH aparecen en los intervalos de 2980 a 2950 cm^{-1} , 2950 a 2850 cm^{-1} y 3050 a 3000 cm^{-1} , respectivamente. Por otro lado, las vibraciones de flexión de balanceo (ρCH_2) aparecen de 1475 a 1350, 1350 a 1150 y en 722 cm^{-1} [59].

2.4.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Es un método espectroscópico de absorción, no destructivo, que a través del análisis del espectro obtenido provee información detallada acerca de la estructura y dinámica molecular de los núcleos magnéticamente activos (número de espín diferente de cero). Ejemplo de núcleos activos en RMN, son ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P , entre otros.

La RMN estudia la estructura molecular midiendo la interacción de un campo electromagnético de radiofrecuencia oscilante con un conjunto de núcleos. Un núcleo con número atómico o número de masa impar tiene un espín nuclear que puede ser observado por un espectrómetro de RMN. El movimiento giratorio de la carga del protón genera un campo magnético (momento magnético). Por otro lado, el sistema interno (electrones y núcleo) se comporta como una brújula de agujas microscópicas que al colocarlos en un campo magnético fuerte externo, altamente homogéneo, estas brújulas delgadas se orientan en dirección del campo magnético sólo en pocas maneras. La orientación del espín nuclear está en función del nivel de energía del núcleo [60]. Si se alinea en sentido contrario,

es un estado de energía más alta y se le conoce como espín β y si se alinea en el mismo sentido, el estado energético es de menor energía, llamado espín α . Luego, un núcleo que está alineado en sentido del campo magnético puede absorber energía y pasar un nivel energético β y estar alineado en sentido contrario al campo. Por lo tanto, el fenómeno de resonancia sucede cuando un núcleo está dentro de un campo electromagnético y se le suministra la radiación de radiofrecuencia adecuada y produce un cambio de espín. Así mismo la energía que absorbe es detectada por el espectrómetro de RMN [61].

Por otra parte, los elementos que constituyen a un espectrómetro de RMN son: Un magneto solenoide superconductor, un transmisor de radiofrecuencia y amplificador de energía para generar un campo magnético, una sonda (un espiral metálico alrededor de la muestra) para producir un campo magnético perpendicular al campo externo y para recibir las señales de RMN, un sistema de recepción de radiofrecuencia y una computadora para procesar los datos [62].

2.4.4.1 RMN uni- y bidimensional de AGs y derivados

A continuación se describen las características espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C de los AGs y derivados de semillas. Un espectro de RMN de ^1H aceites vegetales, tiene 10 señales principales (Tabla 5). La asignación de las señales ha sido propuesto por Guillén *et al.* (2003) [63]. Así mismo, los AGs pueden estar conformando a los triacilgliceroles (TAGs), los cuales están formados por unidades saturadas e insaturadas.

Tabla 5. Señales principales de RMN ¹H de aceites comestibles [63].

Nº	δ (ppm)	Protón	Ejemplo de AGs o derivados
1	0.83-0.93	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Metilo de cadenas hidrocarbonadas
2	0.945,0.970	-CH ₃	Metilo de ácido linoléico
3	1.22-1.42	-OCO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	Metilenos de ácido linoléico, linoléico
		-CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -	Metilenos de todas las cadenas acil
4	1.52-1.72	-OCO-CH ₂ -CH ₂ -	Metilenos de estearina, trioleína
5	1.94-2.14	-CH=CH-CH ₂ -	Metilenos de ácido oleico, linoléico
6	2.23-2.36	-OCO-CH ₂ -	Metilenos unidos a carbonilos en tristearina, trioleína
7	2.70-2.84	=HC-CH ₂ -CH=	Metilenos unidos a fragmentos de insaturados de ácido linoléico, linoléico
8	4.10-4.32	R-OCO-CH ₂ - (del C ₁ y C ₃ del glicerol)	Metilenos del fragmento de glicerol
9	5.20-5.26	R-OCO-CH< (del C ₂ del glicerol)	Metino del fragmento de glicerol
10	5.26-5.40	-CH=CH-	Metinos de fragmentos insaturados

Los AGs insaturados presentan en su estructura varios tipos de hidrógenos con diferentes características espectroscópicas: a) *Hidrógenos vinílicos* (C=C-H), estos tienen un desplazamiento químico (δ) en el intervalo de 4.5 a 6.5 ppm, debido a la desprotección por la anisotropía del doble enlace adyacente. Estos hidrógenos, pueden ser utilizados para encontrar la relación entre ésteres saturados e insaturados [64]. b) *Hidrógenos alílicos* (C=C-CH), tienen un intervalo de δ de 1.6 a 2.6 ppm [65]. c) *Hidrógenos bis-alílicos* (=HC-CH₂-CH=), que se utilizan para diferenciar la naturaleza de los compuestos insaturados.

Finalmente, d) *Hidrógeno del segundo carbono del glicerol (R-OCO-CH<)*, el cual podría utilizarse para cuantificar la relación de ésteres saturados e insaturados, pues existe uno por cada molécula de TAGs [64], los desplazamientos químicos, se muestran en la Tabla 5.

Otra característica importante es la constante de acoplamiento de los hidrógenos vecinos de las insaturaciones (J , en Hz), cuyo valor depende de diversos factores, entre ellos la disposición espacial de dichos hidrógenos. Pavia *et al.* (2010), presentan intervalos de J , para los alquenos, tanto para los que presentan estereoquímica Z , como para los de estereoquímica E , Ilustración 8.

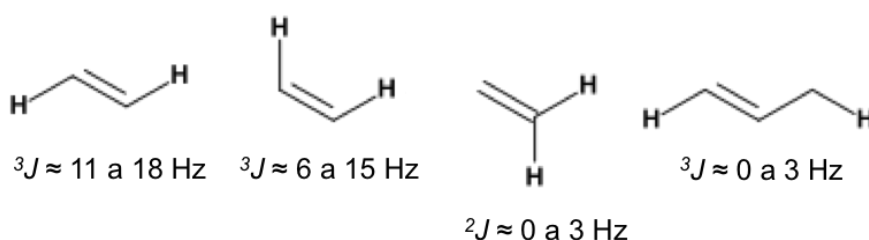


Ilustración 8. Valor de J (Hz) en alquenos [65].

Respecto a los compuestos caracterizados de las semillas del género *Annona*, Chandrababu *et al.* (2012) caracterizaron el ácido (Z)-2'-hidroxi-1'-oleoilpropiónico (**21**) Anexo 1 (Grupo III) y un derivado de AGs (**22**). En la Tabla 6 se presentan los datos espectroscópicos de RMN de ${}^1\text{H}$ y ${}^{13}\text{C}$ de **21**. Los protones vinílicos (H9 y H10) en el compuesto **21** presentan un acoplamiento vecinal con una ${}^3J = 5.4 \text{ Hz}$, esto es un indicativo de una geometría Z (Ilustración 9). Por otra parte el experimento DEPT, el cual permite diferenciar carbonos de

CH, CH₂ y CH₃, permitió identificar 15 grupos de metilenos, 3 grupos de metinos, 2 carbonos cuaternarios (grupos carbonilos) y un metilo (Tabla 6). Así mismo, el análisis de experimentos de RMN en 2D (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC y HMBC) junto con RMN en 1D, revelaron la presencia del ácido oleico, donde el doble enlace está en la posición del C9. También este ácido forma un éster con el ácido glicérico. Las señales con δ de 4.29 y 5.28 ppm pertenecen al H3' y H2' del ácido glicérico, respectivamente según las correlaciones de los experimentos COSY y HMBC [42].

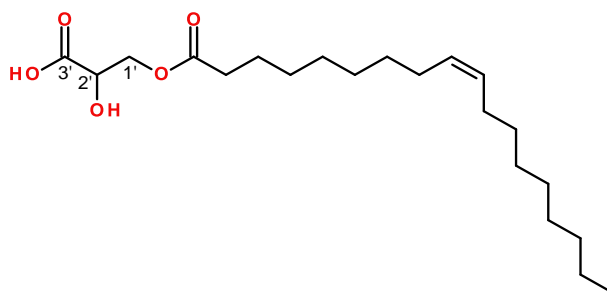


Ilustración 9. Ácido (*Z*)-2'-hidroxi-1'-oleoilpropiónico (**21**).

Tabla 6. Señales de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) y ¹³C (δ , ppm) de (**21**) [42].

N° C	1	2	3	4	5	6	7
¹ H	-	2.31 (m)	1.63 (t)	1.28 (m)	1.28 (m)	1.28 (m)	1.28 (m)
¹³ C	173.71	34.42	25.25	29.51	29.72	29.92	30.16
M (DEPT)	-C-	CH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₂
N° C	8	9	10	11	12	13	14
¹ H	2.01 (m)	5.35 (t)	5.35 (t)	2.01 (m)	1.28 (m)	1.28 (m)	1.28 (m)
¹³ C	27.61	130.40	130.09	27.56	30.09	29.87	29.67
M (DEPT)	CH ₂	CH	CH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₂
N° C	15	16	17	18	1'	2'	3'
¹ H	1.28 (m)	1.28 (m)	1.28 (m)	0.85 (t)	-	5.28 (m)	4.29 (t)
¹³ C	29.57	32.30	23.08	14.50	173.26	69.27	62.49
M (DEPT)	CH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₃	-C-	CH	CH ₂

M = Multiplicidad; m = múltiple; t = triple.

2.4.4.2 RMN uni- y bidimensional de ACGs

Las técnicas de RMN uni- y bidimensionales se han utilizado exitosamente en modelos sintéticos con estereoquímica relativa conocida. La estereoquímica relativa de ACGs con grupos tetrahidrofuranos (THF) *bis*-adyacentes, *bis*-no adyacentes y *mono*-THF se resuelven comparando desplazamientos químicos de RMN de ^1H y los valores de las constantes de acoplamiento [66]. Los THF se localizan en la parte intermedia de la estructura de la acetogenina. Lorenzo *et al.* (2006) establecieron una serie de reglas empíricas basadas en RMN de ^{13}C para determinar la estereoquímica relativa de fragmentos de dihidrofuranonas (sub-tipo 1a y 1b) y γ -lactonas (sub-tipo 2 y 3) (Ilustración 10) [67]. Estos fragmentos se encuentran en uno de los extremos de la estructura de una acetogenina.

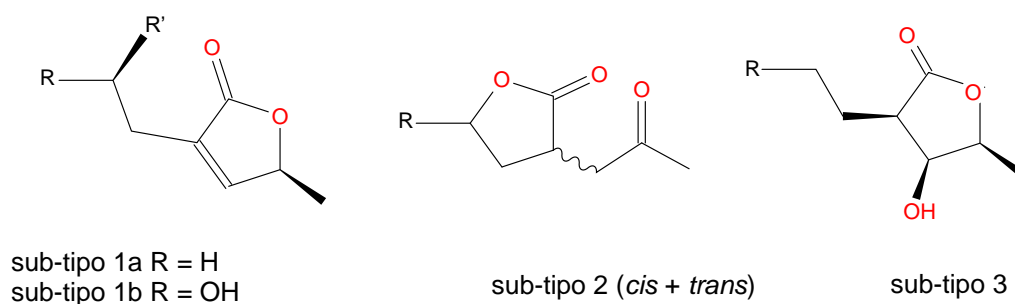


Ilustración 10. Tipos de lactonas presentes en la estructura química de acetogeninas.

En el Anexo 2 se muestran las ACGs más representativas aisladas de las semillas de frutos del género *Annona*.

3. METODOLOGÍA

3.1. Estándares, reactivos y disolventes

FeCl₃•6H₂O (97%), FeSO₄•7H₂O (99.5%), TPTZ (≥99%), KBr, reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M, (+)-catequina hidratada (96%), ácido gálico monohidratado (98.0%), 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BHT) (99.0%), radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), gel de sílice 240-400 mallas, placas CCD, cartuchos de 6 mL para EFS (supelclean ENVI-18, Supelco), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Inc. NaOAc•3H₂O (99.75%), HCl 37.65%, NaOH (99%), NaNO₂ (97%), Na₂SO₄ anhidro (99.8%) se obtuvieron de J.T. Baker. EtOH (99.5%), MeOH (99.8%), C₆H₁₄ (98.5%), CH₂Cl₂ (99.9%), AcOEt (99.5%) y ácido ascórbico fueron suministrados de Reaso^{MR}. AlCl₃•6H₂O (99.4%), AcOH glacial (99.9%), Na₂CO₃ (99.6%) se obtuvieron de Fermont. Cloroformo deuterado (CDCl₃) con pureza de deuterio de 99.96% + 0.03 % v/v de TMS fue adquirido de Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Se usaron microplacas de poliestireno claro de 96 pozos de fondo plano (Costar®, Corning Incorporated). Todos los disolventes usados para las extracciones y separaciones cromatográficas, incluyendo el agua, fueron destilados previamente antes de usarse.

3.2. Equipos y material en general

Balanza analítica (BL210S, Sartorius), lector de microplacas (Synergy HTX y ELx808, Biotek Instruments, Inc.), baño asistido con ultrasonido (SB-3200DTN, Scientz), agitador de vórtice (vortex 3, IKA®), rotavapores (RV 10 basic, IKA®; R-3, Buchi y Laborota 4000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG), bombas de vacío (V-700, Buchy, MZ 2C y MD 4 NT, Vacuubrand GmbH & Co. KG), molino de tornillo sin fin (Estrella), molino ciclónico (Cyclotec™ 1093, FOSS), recirculador de agua (ECO10 SEV), centrífuga (IEC HN SII, International Equipment Company), congelador (FUM 17DRBRWH, General Electric Appliance Park), lámpara de luz ultravioleta con longitudes de onda de 254 y 365 nm (Spectroline), compresor de aire de 3HP y 50 L (CA-3HP, Industrias TAMER S. A. de C.V.), estufa de convección (T0HD433, Técnica científica S. A.), parrillas de calentamiento (C-MAG HS 4 y C-MAG HS 10, IKA®), espectrómetro (FT-ATR Alpha Platinum, Bruker Optics Inc.) con detector DTGS, espectrómetro de RMN de 400 MHz (Avance III 400, Bruker), espectrómetro de masa de alta resolución LD/MCD con analizador TOF (1100 series, Agilent Technologies, del departamento de Química del CINVESTAV, Zacatenco).

3.3. Preparación de la muestra

Un total de 13 kg de frutos de *A. diversifolia* Saff. de la variedad blanca, rosa, rosa mexicano se compraron en los mercados locales de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México en el año 2013. Los frutos maduros seleccionados fueron aquellos que se encontraban en buen estado, libres de plagas. Las muestras se transportaron al laboratorio de productos naturales y alimentos de UTM, en cajas

de madera, cuyo ambiente fue aire acondicionado para ayudar a conservar los frutos.

Después se separaron las semillas manualmente de sus respectivos frutos, se pesaron, se secaron sobre papel periódico a temperatura ambiente. Las semillas enteras se molieron en un molino de tornillo sin fin, posteriormente en un molino ciclónico. Los polvos se pasaron por un tamiz de acero inoxidable número 16. Las semillas molidas se almacenaron a -20°C en frascos opacos, para protegerlas de la luz y evitar reacciones químicas activadas por la luz.

3.4. Extracción sólido-líquido (ESL)

Para la ESL se pesaron 100 g de semillas tamizadas de *A. diversifolia* Saff. de cada variedad (blanca, rosa y rosa mexicano) por separado y se mezclaron con MeOH (5 x 500 mL). Se realizó la ESL asistida con ultrasonido (15 min, 25°C). Pasado este tiempo se filtró la fase orgánica a través de algodón y se recuperó el filtrado, las fases orgánicas se combinaron. Posteriormente se removió el MeOH a 37-38°C a presión reducida en un rotavapor. El extracto crudo metanólico libre de disolvente se pesó para obtener el porcentaje de rendimiento y se almacenó a temperatura de refrigeración (2-6°C) hasta su uso posterior. Las mediciones se realizaron por triplicado y se expresaron como la media \pm desviación estándar. Este extracto se utilizó para las extracciones líquido-líquido (sección 3.5).

3.5. Extracción líquido-líquido (ELL)

Para realizar la ELL del extracto crudo metanólico de cada variedad se emplearon los disolventes C_6H_{14} , CH_2Cl_2 y AcOEt en orden creciente de polaridad. El extracto crudo metanólico libre de disolvente (1 g) se suspendió en agua (4.4 mL) y se realizaron extracciones con C_6H_{14} , CH_2Cl_2 , AcOEt. El número de extracciones fue de 4 o 6, dependiendo del disolvente extractor (6, 4, 4: C_6H_{14} , CH_2Cl_2 , AcOEt, respectivamente). El volumen de disolvente orgánico empleado por extracción fue el doble del volumen de agua. Las fases orgánicas obtenidas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron a través de algodón. El disolvente orgánico se removió a $40^\circ C$ a presión reducida en un rotavapor. Posteriormente, se midieron las masas de los extractos obtenidos correspondientes para obtener el rendimiento, expresado como la media de tres réplicas \pm desviación estándar. De esta manera se obtuvieron las fracciones de C_6H_{14} , CH_2Cl_2 y AcOEt. A las tres fracciones se les cuantificó el contenido de FT (sección **3.8**); mientras que a la fracción de AcOEt también se le cuantificó el contenido de FVT (sección **3.9**).

3.6. ESL para las cuantificaciones espectroscópicas

Se pesaron de 0.25 a 1.5 g de semillas molidas y tamizadas, se mezclaron con MeOH (1:5, m/v) para las cuantificaciones espectroscópicas. El tamaño de la muestra fue seleccionada para realizar la ESL en un tiempo corto y así realizar las cuantificaciones espectroscópicas. Se realizó una ESL asistida por ultrasonido durante 15 min a $25^\circ C$, el extracto obtenido se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, la extracción se repitió cinco veces. Los sobrenadantes se

filtraron a través de algodón, se combinaron y se evaporaron a 37-38°C a presión reducida. La etapa de centrifugación sólo se incluyó cuando se requería cuantificar FVT. El extracto metanólico obtenido se utilizó para la extracción en fase sólida (sección 3.7), la cuantificación de FT (sección 3.8) y para la evaluación de la actividad antioxidante (AA) (sección 3.10).

3.7. Extracción en fase sólida (EFS)

Para la EFS, un cartucho con sorbente C₁₈ fue acondicionado con 5 mL de MeOH. Posteriormente se preparó una disolución de extracto metanólico, 24.33 mg/mL en MeOH. 2.05 mL de la disolución del extracto metanólico se adicionaron al cartucho y se eluyeron con 7 mL de MeOH, AcOEt, CH₂Cl₂ y C₆H₁₄ de manera consecutiva, a un caudal de 0.24 mL/min. Cada eluato se colectó y se le retiró el disolvente en un rotavapor a 37-38°C y presión reducida. Al residuo del eluato MeOH, llamado extracto metanólico tratado, se le cuantificó el contenido de FVT (sección 3.9).

3.8. Cuantificación de fenoles totales (FT)

El contenido de FT se determinó por el método colorimétrico usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) descrito por Julián-Loaeza *et al.* (2011) [3], con ligeras modificaciones. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 40 µL de una alícuota de extracto metanólico o fracción de C₆H₁₄, CH₂Cl₂, AcOEt, o estándar y se mezclaron con 40 µL del reactivo de F-C (0.1 M). La microplaca se colocó en un lector de microplacas y se dejó en reposo por 3 min a temperatura ambiente, se agitó a velocidad lenta por 15 s y se adicionaron 40 µL Na₂CO₃ (0.5%, p/v).

La mezcla se calentó a 40°C por 30 min, se realizó una agitación orbital rápida (425 ciclos por minuto) por 1 min y se midió la absorbancia a $\lambda = 750$ nm. Para el blanco de la muestra, o del estándar, se colocó agua destilada en lugar del reactivo de F-C. El estándar de menor concentración se usó como blanco del estándar. Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración con ácido gálico. El contenido de FT en los extractos se obtuvo a partir de la ecuación de la curva de la calibración y se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg EAG/g de extracto) y por 100 g de muestra en masa húmeda (mg EAG/100 g en mh). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron como la media \pm desviación estándar.

Las disoluciones y estándares empleados se detallan a continuación:

- a) Disolución patrón de ácido gálico de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se pesó 1 mg de ácido gálico monohidratado y se aforó a un volumen de 10 mL con EtOH (90%, v/v).
- b) Estándares de ácido gálico de 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De la disolución patrón de ácido gálico, se obtuvieron los estándares de 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- c) Disolución de Na_2CO_3 (0.5%, p/v). Se pesaron 50 mg de Na_2CO_3 , se aforó a un volumen de 10 mL con agua destilada.
- d) Disolución del reactivo de F-C (0.1 M). Se midieron 0.5 mL de disolución del reactivo de F-C 2 M, se aforó a un volumen de 10 mL con agua destilada (en ausencia de luz).
- e) Disolución del extracto metanólico y fracciones de las semillas. Se realizaron disoluciones de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la variedad blanca, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las variedades rosa y rosa mexicano, 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la fracción de C_6H_{14} , 600

$\mu\text{g/mL}$ para CH_2Cl_2 y $400 \mu\text{g/mL}$ para AcOEt. Los disolventes fueron destilados y desgasificados antes de su uso.

3.9. Cuantificación de flavonoides totales (FVT)

El contenido de FVT se determinó de acuerdo a la metodología reportada por Julián-Loaeza *et al.* (2011) con ligeras modificaciones usando un espectrofotómetro de lector de microplacas [3]. Una mezcla de 1 mL de alícuota de extracto metanólico tratado o fracción de AcOEt y 1 mL de NaNO_2 al 5% (p/v), contenidas en tubos ámbar, se mezclaron por 5 min en un agitador de vórtice. En los pozos de una microplaca se adicionaron $50 \mu\text{L}$ de la mezcla anterior con $50 \mu\text{L}$ de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3%, p/v). Posteriormente, se realizó una agitación lineal en el lector de microplacas a velocidad media durante 1 min. A continuación, se agregaron $50 \mu\text{L}$ de NaOH 1 M y nuevamente se agitó 1 min en las mismas condiciones. Se midió la absorbancia a una $\lambda = 490 \text{ nm}$ a temperatura ambiente. Para el blanco de la muestra o del estándar se colocó agua destilada en lugar de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. El estándar de mayor concentración se usó como blanco del estándar. El contenido de FVT en los extractos se obtuvo a partir de la ecuación de la curva de calibración, usando (+)-catequina como estándar a concentraciones en el intervalo de 10 a $50 \mu\text{g/mL}$. El contenido de FVT se expresó en miligramos equivalentes de catequina/100 g de muestra en masa húmeda (mg EC/100 g en mh) para los extractos metanólicos y miligramos equivalentes de catequina/g de fracción (mg EC/g de fracción) para las fracciones. Las mediciones se realizaron por triplicado y se expresaron como la

media \pm desviación estándar. Las disoluciones y estándares empleados se detallan a continuación:

- a) Disolución patrón de catequina de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 10 mg de (+)-catequina hidratada se pesaron y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, posteriormente el matraz se aforó con MeOH (en ausencia de luz).
- b) Estándares de catequina de 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se prepararon a partir de la disolución patrón de catequina.
- c) Disolución de NaNO_2 (1.5%, p/v). 375 mg de NaNO_2 se pesaron y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL, posteriormente el matraz se aforó con agua.
- d) Disolución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3%, p/v). 300 mg de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se pesaron y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, posteriormente el matraz se aforó con agua.
- e) Disolución de NaOH (1 N). 1 g de NaOH se pesó y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, posteriormente el matraz se aforó con agua.
- f) Disoluciones de extracto metanólico y fracción AcOEt. Para la variedad blanca se prepararon disoluciones de 5120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para las variedades rosa y rosa mexicano se prepararon disoluciones de 5480 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para la fracción de AcOEt de la variedad rosa mexicano se preparó una disolución de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los disolventes fueron destilados y desgasificados para su uso, excepto el agua, que fue bidestilada.

3.10. Cuantificación de la actividad antioxidante (AA)

A cada extracto metanólico de las tres variedades de semillas, se le cuantificó la AA por los métodos del radical DPPH[•] y poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).

3.10.1 Actividad antioxidante frente al radical DPPH[•]

La AA con el radical DPPH[•] se determinó de acuerdo a la técnica reportada por Julián-Loeza *et al.* (2011) [3]. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 70 µL de una alícuota de extracto metanólico o control y se mezcló con 70 µL de una disolución metanólica de DPPH[•] (0.004%, p/v) en ausencia de luz. La microplaca con la mezcla se colocó en el lector de microplacas y se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Pasado este tiempo, se agitó a 493 ciclos por minuto (cpm) durante 1 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm.

Los blancos del DPPH[•], extractos se prepararon con MeOH en lugar de la disolución DPPH[•] (0.004%, p/v). El blanco del control se preparó con el control de menor concentración.

La AA se expresó con el parámetro IC₅₀, la concentración necesaria de extracto o control para inhibir *in vitro* el 50% de la concentración inicial del DPPH[•]. Para ello, se graficó el % de inhibición del DPPH[•] en función de la concentración de extracto o control. El % de inhibición se calculó a través de la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de Inhibición del DPPH}^{\bullet} = [(A_{\text{DPPH}^{\bullet}} - A_{\text{EXT}}) / A_{\text{DPPH}^{\bullet}}] \times 100$$

Donde $A_{DPPH\cdot}$ es la absorbancia del DPPH \cdot y A_{EXT} es la absorbancia del extracto o control. El parámetro IC_{50} , se expresó en $\mu\text{g/mL}$ de extracto en masa húmeda ($\mu\text{g/mL}$ de extracto en mh). Las mediciones se realizaron por triplicado y se expresaron como la media \pm desviación estándar. Las disoluciones y controles empleados se indican a continuación:

- a) Disolución de DPPH \cdot (0.004%, p/v). Primero, se preparó una disolución patrón de DPPH \cdot (0.1%, p/v). Se pesaron 0.01 g de DPPH \cdot y se aforó a un volumen de 10 mL con MeOH (en ausencia de luz). A partir de la disolución patrón se obtuvo la disolución de DPPH \cdot 0.004% (p/v).
- b) Controles de ácido gálico de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 $\mu\text{g/mL}$. Primero, se obtuvo una disolución patrón de 100 ppm de ácido gálico, preparada con 1 mg de ácido gálico disuelto en EtOH (90%, v/v) hasta alcanzar un volumen de 10 mL en un matraz volumétrico. A partir de esa disolución se obtuvieron los controles de ácido gálico.
- c) Controles de BHT de 15, 20, 25, 30, 35 ppm. Primero, se preparó una disolución patrón de 200 ppm de BHT a partir de 2 $\mu\text{g/mL}$ de BHT disueltos en EtOH (90%, p/v) hasta alcanzar un volumen de 10 mL en un matraz volumétrico. Los controles de BHT se prepararon con la disolución patrón.
- d) Controles de ácido ascórbico de 4, 6, 8, 10, 12 $\mu\text{g/mL}$. Primero, se preparó una disolución patrón de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico a partir de 1 mg de ácido ascórbico disuelto en MeOH hasta alcanzar un volumen de 10 mL. Los controles de ácido ascórbico se prepararon con la disolución patrón.

e) Disoluciones de extracto metanólico. Se prepararon disoluciones de 100 a 700 $\mu\text{g/mL}$ para la variedad blanca, y de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ para las variedades rosa y rosa mexicano.

Los disolventes fueron destilados y desgasificados antes de su uso.

3.10.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

El método del FRAP, mide el cambio de absorbancia de una muestra generado por la reducción del complejo TPTZ-Fe (III) a TPTZ-Fe (II) efectuada por las sustancias antioxidantes presentes en los extractos o controles. El FRAP se determinó según lo descrito por Benzie *et al.* (1999), Guorong *et al.* (2009), Alothman *et al.* (2009) [5, 6, 7]. En una microplaca de 96 pozos, se mezclaron 25 μL de alícuota (extracto metanólico, control o estándar) con 100 μL del reactivo FRAP. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 min, luego se agitó a 493 cpm durante 15 s en el lector de microplacas y se midió su absorbancia a una $\lambda = 630 \text{ nm}$.

La disolución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que se usó como blanco, se preparó con agua en lugar del reactivo FRAP, y fue el de mayor concentración.

El valor FRAP, es la relación entre la absorbancia de la muestra y la pendiente de la curva del estándar de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El valor FRAP se expresó como $\mu\text{moles de Fe (II)/g de extracto metanólico en masa húmeda}$ ($\mu\text{moles Fe (II)/g de extracto en mh}$). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron como la media \pm desviación estándar. Las disoluciones y estándares empleados fueron los siguientes:

- a) Estándares de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 100, 200, 300, 400 y 500 μM . Primero, se preparó una disolución patrón 1000 μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a partir de 14 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos en agua bidestilada y desgasificada hasta alcanzar un volumen de 50 mL en un matraz volumétrico. Esta disolución se utilizó para preparar los estándares de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- b) Disolución de TPTZ (30 mM). En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 0.234 g de TPTZ y 15 mL de agua, posteriormente se adicionaron 0.25 mL de HCl concentrado y se aforó con agua.
- c) Disolución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (60 mM). En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 0.405 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se agregó agua hasta el aforo.
- d) Buffer de acetato (400 mM) a un pH de 3.39. En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron se colocaron 0.35 g de $\text{AcONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ con 2.13 mL de AcOH glacial, y se agregó agua bidestilada y desgasificada hasta el aforo.
- e) Reactivo FRAP. Se preparó una mezcla compuesta de la disolución de TPTZ, disolución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y buffer de AcONa en una relación 1:1:10 (v/v/v). La mezcla se preparó unos minutos antes de la cuantificación.
- f) Disoluciones de extracto metanólico de las semillas. Se prepararon disoluciones de 2570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la variedad blanca, 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la variedad rosa y 2640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la variedad rosa mexicano.

El agua usada fue bidestilada y desgasificada, y el resto de disolventes fueron destilados.

3.11 Purificación del extracto de CH₂Cl₂ de *A. diversifolia* variedad rosa

La fracción de CH₂Cl₂ obtenida del extracto crudo metanólico de las semillas de *A. diversifolia* de la variedad rosa se purificó por cromatografía de columna *flash*.

La fase estacionaria fue gel de sílice fino y se acondicionó con hexano. La fracción de CH₂Cl₂ (1.169 g disueltos en una mínima cantidad de CHCl₃: acetona, 1:1) se eluyó con los disolventes siguientes: 200 mL de hexano:AcOEt (90:10),

200 mL de hexano:AcOEt (85:15),

200 mL de hexano:AcOEt (70:30),

200 mL de hexano:AcOEt (60:40),

200 mL de hexano:AcOEt (55:45),

200 mL de hexano:AcOEt (50:50),

200 mL de hexano:AcOEt (45:55),

200 mL de hexano:AcOEt (40:60),

200 mL de hexano:AcOEt (35:75),

200 mL de hexano:AcOEt (30:70),

200 mL de hexano:AcOEt (20:80),

200 mL de hexano:AcOEt (10:90),

200 mL de hexano:AcOEt (35:75),

400 mL de AcOEt,

400 mL de MeOH para lavar la fase estacionaria.

Las fracciones eluídas se recolectaron en volúmenes de aproximadamente 20 mL y fueron monitoreadas por cromatografía en cada delgada (CCD) con luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm). Se combinaron aquellas fracciones que presentaron

similitud en la CCD, y se evaporaron en el rotavapor al vacío. La acetogenina aislada eluyó con la mezcla hexano:AcOEt 10:90, se obtuvo como un sólido blanco (42 mg, 3.6% de la fracción de CH₂Cl₂), con un punto de fusión de 52-54°C.

3.12 Caracterización química

Una vez obtenidos los compuestos con la pureza deseada de las semillas de *A. diversifolia* Saff., se adquirieron sus datos espectroscópicos de RMN ¹H y ¹³C e IR; así como los datos de espectrometría de masa. Esto se realizó en el Laboratorio de Principios Bioactivos del laboratorio de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, y el espectro de masa de alta resolución, en el laboratorio del departamento de Química del CINVESTAV, Zacatenco.

3.12.1 Método de la espectroscopía infrarroja

La muestra se colocó en el portamuestra, previamente limpio, del espectrofotómetro y se obtuvo el espectro de IR correspondiente con 24 scans. La ventana espectral fue de 4000 - 400 cm⁻¹ y la resolución de 4.0 cm⁻¹.

3.12.2 Método de RMN de ¹H y ¹³C

La muestra a analizar se disolvió (35-45 mg) en CDCl₃, 0.5 mL de la disolución se adicionaron a un tubo para RMN. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm.

3.13 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se expresaron como media \pm desviación estándar y fueron realizadas por triplicado. Los datos de FT, FVT, AA y FRAP se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, usando el programa de análisis estadístico StatPlus (versión 6.0). La Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey se utilizó para determinar las diferencias entre grupos de medias. Un valor de $p < 0.05$, se consideró estadísticamente significativo. También se llevaron a cabo correlaciones lineales por el método de Pearson.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados de la cuantificación de fenoles totales (FT), flavonoides totales (FVT), actividad antioxidante (AA) frente al radical DPPH^{*} y poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) de los extractos metanólicos de las semillas de *A. diversifolia* Saff. de tres variedades (blanca, rosa y rosa mexicano). También se determinaron los FT de las fracciones de C₆H₁₄, CH₂Cl₂ y AcOEt, así como FVT de la fracción de AcOEt de la variedad rosa mexicano. Finalmente, se describen los resultados espectroscópicos de IR, RMN de ¹H y ¹³C de los compuestos identificados y caracterizados. Así como los datos de espectrometría de masa de alta resolución.

4.1 Extracción sólido-líquido de las semillas

Los porcentajes de extracción con metanol de las tres variedades de semillas de *A. diversifolia* se reportan en la Tabla 7. La extracción se encuentra en un intervalo de 10.64 ± 0.11 a 12.24 ± 0.04%. La variedad rosa, que presentó diferencia estadística ($p < 0.05$) mostró además el rendimiento de extracción mayor, 12.24 ± 0.04%. Estos porcentajes son cercanos a los reportados para los extractos hidrometanólicos de las semillas de *A. sylvatica* (8.7%) y *A. coriacea* (14.5%) [22], así como para el extracto etanólico de *A. cornifolia* 14.12% [23]. El rendimiento de la extracción depende del disolvente utilizado y el método de

extracción [68]. La variación en el rendimiento de los extractos, se atribuye a las polaridades de los diferentes componentes presentes en los frutos [69].

Tabla 7. Extracción sólido-líquido de las semillas de *A. diversifolia*, comparada con otras especies de *Annona*.

Especie	Extracciones sólido-líquido		
	Técnica/Disolvente	Tiempo	% de extracción
<i>diversifolia</i> variedad blanca	EAU/MeOH	15 min	10.81 ± 0.15 ^a
<i>diversifolia</i> variedad rosa	EAU/MeOH	15 min	12.24 ± 0.04 ^b
<i>diversifolia</i> variedad rosa mexicano	EAU/MeOH	15 min	10.64 ± 0.11 ^a
<i>A. sylvatica</i> [22]	Maceración/MeOH:H ₂ O (4:1)	nd	8.7*
<i>A. cornifolia</i> [23]	Percolación/ EtOH	50 h	14.12*
<i>A. coriacea</i> [22]	Maceración/MeOH:H ₂ O (4:1)	nd	14.5*

Los valores son la media de tres mediciones ± desviación estándar. EAU, Extracción asistida con ultrasonido. a-b Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la DHS de Tukey. *no reportaron desviaciones estándar. nd, no descrito.

4.2 Cuantificación de fenoles totales (FT)

4.2.1 FT de los extractos metanólicos de las semillas

El contenido de compuestos fenólicos de las semillas de *A. diversifolia* se encontró en un intervalo de 613.82 ± 5.46 a 652.72 ± 7.68 mg EAG/100 g de material vegetal en mh (Tabla 8). El contenido más alto de FT se presentó en las variedades rosa mexicano y rosa, las cuales en contenido de FT fueron estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Es conocido que el contenido de FT, varía con la especie, variedad, condiciones edafológicas, etapa de madurez

fisiológica, órgano considerado [70], así como el grado de maduración del fruto [2]. Previamente, Benites *et al.* (2015) reportaron un contenido de FT de 58.10 ± 1.45 mg EAG/g extracto metanólico acuoso de las semillas de *A. sylvatica* A. St.-Hil. (Brasil) [22], este valor es cercano al encontrado en *A. diversifolia* Saff. variedad rosa (60.66 ± 0.71 mg EAG/g extracto). En otro estudio, Albuquerque *et al.* (2014), obtuvieron un contenido de FT de 4.16 ± 0.02 mg EAG/100 g de mh del extracto etanólico de las semillas de *A. cherimola* Mill. (Portugal) [18]. Por otra parte, Roesler *et al.* (2006) reportaron un contenido de FT de 9455.73 ± 569.80 mg EAG/100 g del extracto etanólico de las semillas de *A. crassiflora* Mart. (Brasil) [2] (Tabla 8). En consecuencia, las semillas de las tres variedades de *A. diversifolia* Saff., presentan un contenido de FT cercano a las semillas de *A. sylvatica* A. St.-Hil., superior a las semillas de *A. cherimola* Mill. y bastante menor que el reportado para semillas de *A. crassiflora* Mart. Por otro lado, Roesler *et al.* (2006) también cuantificaron el contenido de FT para la pulpa del mismo fruto (652.65 ± 118.14 mg EAG/100 g de mh, el cual fue menor al encontrado en sus semillas [2]. Una tendencia similar se encontró para *A. diversifolia* Saff., cuyos valores se encuentran entre 170.88 ± 2.19 [3] y 442.55 ± 7.68 en mg EAG/100 g de mh para la pulpa y semillas, respectivamente.

Tabla 8. FT de las semillas de *A. diversifolia* de tres variedades, y de otras especies de *Annona*.

Especie, variedad	Extracto	FT (mg EAG/100 g mh)	FT (mg EAG/g extracto MeOH)
<i>A. diversifolia</i> , blanca	MeOH	613.82 ± 5.46 ^a	53.47 ± 0.48
<i>A. diversifolia</i> , rosa	MeOH	623.61 ± 19.41 ^{ab}	60.66 ± 1.89
<i>A. diversifolia</i> , rosa mexicano	MeOH	652.72 ± 7.68 ^b	60.66 ± 0.71
<i>A. diversifolia</i> , rosa mexicano	* C ₆ H ₁₄	24.00 ± 0.60 ^c	2.23 ± 0.06
<i>A. diversifolia</i> , rosa mexicano	* CH ₂ Cl ₂	216.77 ± 2.18 ^d	20.15 ± 0.20
<i>A. diversifolia</i> , rosa mexicano	* AcOEt	19.13 ± 0.54 ^e	1.78 ± 0.05
<i>A. cherimola</i> ^[18]	EtOH	^B 4.16 ± 0.02	nd
		^C 3.61 ± 0.02	
		^D 3.35 ± 0.01	
<i>A. sylvatica</i> ^[22]	MeOH-H ₂ O	nd	58.10 ± 1.45
<i>A. coriacea</i> ^[22]	MeOH-H ₂ O	nd	147.08 ± 4.2
<i>A. crassiflora</i> ^[2]	^A EtOH	9455.73 ± 569.80	nd

Los valores son la media de tres mediciones ± desviación estándar. EAG, equivalentes de ácido gálico. mh, masa húmeda. *Fracción de la extracción líquido-líquido. a-f Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la DHS de Tukey. A Extracto proveniente de frutos poco maduros. B, C, D provenientes de los cultivos Mateus II, Madeira y Perry Vidal, respectivamente. nd, no descrito.

4.2.2 FT de las fracciones orgánicas de la variedad rosa mexicano

Debido a que el extracto metanólico de las semillas de *A. diversifolia* de la variedad rosa mexicano presentó el mayor contenido de FT por el método de reactivo de F-C, este extracto libre de disolvente se fraccionó mediante extracción líquido-líquido con C₆H₁₄, CH₂Cl₂ y AcOEt, en orden de polaridad creciente. Los porcentajes de extracción obtenidos fueron de 18.51, 55.70 y 3.86%, respectivamente. El contenido de FT de las fracciones se encontró en un

intervalo de 19.13 ± 0.54 a 216.77 ± 2.18 mg EAG/100 g mh (Tabla 8). Estadísticamente, los resultados del contenido de FT mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) la cual se puede atribuir a la afinidad de los compuestos reductores por el disolvente en función de su polaridad. La tendencia del contenido de FT, disminuyó en el siguiente orden: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 > \text{C}_6\text{H}_{14} > \text{AcOEt}$. Se sabe que la solubilidad de los compuestos fenólicos depende principalmente de la composición química de la planta y de la polaridad de los disolventes utilizados para la extracción [71].

Los disolventes como el CH_2Cl_2 , tienen una polaridad intermedia y solubilizan a solutos con una polaridad relativa similar. Por otra parte, disolventes no polares tal como el C_6H_{14} disuelven principalmente compuestos apolares, como los lípidos y algunas acetogeninas. Cabe hacer mención que en extractos de C_6H_{14} se ha reportado la presencia del ácido oléico [52], compuesto que pueden reaccionar e interferir con el reactivo F-C [28].

4.3 Cuantificación de flavonoides totales (FVT)

4.3.1 FVT en los extractos metanólicos de las semillas

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más grandes dentro de los compuestos fenólicos y pueden actuar como inhibidores de radicales libres. El contenido de FVT de las semillas de *A. diversifolia* Saff. de las tres variedades examinadas se encontró en el intervalo de 19.40 ± 1.05 a 23.90 ± 0.61 mg EC/100 g de mh (Tabla 9). De las tres variedades, la variedad rosa presentó el mayor contenido de estas moléculas antioxidantes.

Albuquerque *et al.* (2014), reportaron valores de 3.06 ± 0.02 y 6.75 ± 0.05 mg equivalentes de epicatequina/100 g de mh, para el extracto etanólico de semillas de *A. cherimola* Mill. de Portugal, cultivo Mateus II y Perry Vidal, respectivamente [18]. Julián-Loeza *et al.* (2011) reportaron un contenido de FVT para las pulpas de los frutos de *A. diversifolia* Saff. variedades blanca, rosa y rosa mexicano de 152.04 ± 5.39 , 107.41 ± 5.15 y 142.56 ± 2.55 mg equivalentes de catequina (EC)/100 g de mh, respectivamente [3]. Estos valores son superiores a los encontrados para las semillas del mismo fruto (Tabla 9).

Tabla 9. FVT de las semillas de *A. diversifolia* de tres variedades y de otras especies de *Annona*.

Especie, variedad	Extracto	FVT (mg EC/100 g de mh)	FVT (mg EC/g extracto MeOH)*	FVT/FT
<i>A. diversifolia</i> , blanca	MeOH	22.51 ± 0.92^a	6.60 ± 0.27	0.04
<i>A. diversifolia</i> , rosa	MeOH	23.90 ± 0.61^a	6.54 ± 0.17	0.04
<i>A. diversifolia</i> , rosa mexicano	MeOH	19.40 ± 1.05^b	5.31 ± 0.29	0.03
<i>A. diversifolia</i> , rosa mexicano	AcOEt	4.26 ± 0.22	30.19 ± 1.56	0.22
	EtOH	$^A3.06 \pm 0.02$	nr	0.74
<i>A. cherimola</i> ^[18]	EtOH	$^B4.62 \pm 0.02$	nr	1.28
	EtOH	$^C6.75 \pm 0.05$	nr	2.02

Los valores son la media de tres mediciones \pm desviación estándar. EC, equivalentes de catequina. *Proveniente de la extracción líquido-líquido. a, b Letras minúsculas diferentes en la misma columna, representan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la DHS de Tukey. A, B, C, FVT en equivalentes de epicatequina para los cultivos Mateus II, Madeira y Perry Vidal, respectivamente. nr, no realizado. *Extracto tratado.

4.3.2 FVT de la fracción de AcOEt de la variedad rosa mexicano

Por otro lado, la fracción de AcOEt de las semillas de la variedad rosa mexicano, presentó un contenido de FVT de 30.19 ± 1.56 mg EC/g de extracto. Esta fracción mostró la mejor relación de FVT/FT (Tabla 9), y que puede ser asociada a la polaridad y solubilidad de los compuestos fenólicos simples y del tipo flavonoide en AcOEt.

4.4 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* y correlaciones con FT y FVT

4.4.1 Evaluación de la AA frente al radical DPPH^{*}

El método del DPPH^{*} se utiliza ampliamente para evaluar la AA de diferentes alimentos, extractos de plantas o compuestos puros por medio de la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀). Entre menor sea el valor de la IC₅₀, mayor será la AA del extracto o compuesto evaluado. Este método, se utilizó para evaluar la AA del extracto metanólico de las semillas de tres variedades de *A. diversifolia* Saff. (Tabla 10). Los resultados del presente estudio muestran que las semillas de la variedad rosa presentaron la IC₅₀ menor (397.87 ± 8.76 µg/mL), y por lo tanto la mayor AA.

Alburquerque *et al.* (2014) reportaron un intervalo de IC₅₀ de 3190 ± 80 µg/mL a 4240 ± 310 µg/mL para extractos etanólicos de semillas de *A. cherimola* Mill., de tres cultivos diferentes [18]. Los IC₅₀ obtenidos en el presente estudio (416.36 ± 9.01 , 397.87 ± 8.76 y 444.71 ± 4.81 µg/mL), son menores respecto a los reportados para *A. cherimola* Mill. Por lo tanto, las semillas de *A. diversifolia* Saff. tienen una mejor AA que las semillas de *A. cherimola* y *A. sylvatica* (724.14

$\pm 17.79 \mu\text{g/mL}$) [22] medida por este método. Las IC_{50} de los extractos de las semillas de *A. diversifolia* son cercanos a los extractos de las semillas de *A. coriacea* ($330.55 \pm 2.34 \mu\text{g/mL}$) y mayores a los de *A. cormifolia* ($33.9 \pm 6.26 \mu\text{g/mL}$) [23] y *A. crassiflora* ($45.11 \pm 1.65 \mu\text{g/mL}$). Al comparar los valores de IC_{50} de los extractos de semillas *A. diversifolia* con los de la pulpa, reportados por Julián-Loeza *et al.* (2011), $1701.07 \pm 47.42 \mu\text{g/mL}$ a $1998.19 \pm 63.14 \mu\text{g/mL}$ de tres variedades (blanca, rosa y rosa mexicano, respectivamente) [3]; se encontró que las semillas tienen una mayor AA que la pulpa. Una tendencia similar fue encontrada por Roesler *et al.* (2006) para los extractos etanólicos de las semillas ($31.14 \pm 0.86 \mu\text{g/mL}$) y pulpa ($148.82 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$) de frutos ligeramente maduros de *A. crassiflora* Mart. [2].

El ácido gálico, ácido ascórbico y BHT, fueron utilizados en este trabajo como controles para evaluar la AA (Tabla 10); mostraron valores de IC_{50} 1.23 ± 0.01 , 4.77 ± 0.16 y 18.44 ± 0.55 , respectivamente que son similares a los reportados en la literatura [3, 38, 72].

4.4.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

El ensayo FRAP mide la capacidad antioxidante, donando un electrón, de los extractos de frutos, por su habilidad para reducir el complejo TPTZ-Fe (III) a su forma ferrosa TPTZ-Fe (II) del reactivo FRAP. Tal como se indica en la Tabla 10, el valor FRAP encontrado en las semillas de las tres variedades de *A. diversifolia* fue 78.00 ± 0.26 hasta $88.58 \pm 2.72 \mu\text{moles Fe (II)/g}$ de extracto. La variedad rosa mexicano tuvo el mejor poder antioxidante de reducción del Fe (III), y fue estadísticamente diferente de las otras dos variedades estudiadas, fue 8.8 veces

menor que el BHT ($777.54 \pm 12.90 \mu\text{moles Fe (II)/g}$) [73]. Loizzo *et al.* (2012), reportaron valores para la pulpa y cáscara de *A. cherimola* de 68.3 ± 3.5 y $52.8 \pm 2.6 \mu\text{M Fe (II)/g}$ de extracto, respectivamente [75].

Tabla 10. Actividad antioxidante por el método del DPPH* (IC_{50}) y FRAP de semillas de *A. diversifolia* de tres variedades, y de otras especies del género *Annona*.

Especie, variedad	Extracto	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP ($\mu\text{moles Fe (II)/g}$ de extracto o control)
<i>A. diversifolia</i> , blanca		416.36 ± 9.01^a	78.00 ± 0.26^a
<i>A. diversifolia</i> , rosa	MeOH	397.87 ± 8.76^a	80.91 ± 0.71^a
<i>A. diversifolia</i> , rosa mexicano		444.71 ± 4.81^b	88.58 ± 2.72^b
<i>A. cherimola</i> ^[18]	EtOH	^A 3190 ± 80	nd
		^B 3220 ± 80	
		^C 4240 ± 310	
<i>A. coriacea</i> ^[22]	MeOH-H ₂ O	330.55 ± 2.34	nd
<i>A. sylvatica</i> ^[22]	MeOH-H ₂ O	724.14 ± 17.79	nd
<i>A. crassiflora</i> ^[2]	EtOH	^D 45.11 ± 1.65	nd
		^E 106.23 ± 3.57	
		^D 604.87 ± 21.69	
	H ₂ O	^E 1678 ± 25.86	
ácido gálico*	-	1.23 ± 0.01	
ácido ascórbico*	-	4.77 ± 0.16	11254.38 ± 1.54 ^[73]
BHT*	-	18.44 ± 0.55	777.54 ± 12.90 ^[73]
		16.72 ± 1.87 ^[22]	

Los valores son la media de tres mediciones \pm desviación estándar. *Controles del ensayo. a,b,c Letras minúsculas diferentes en la misma columna presentan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). A, B, C provenientes de los cultivos Mateus, Madeira y Perry Vidal, respectivamente. D Frutos poco maduros. E Frutos muy maduros. nd, no descrito.

El cálculo de las correlaciones lineales de Pearson entre FT, FVT, IC₅₀ y FRAP permitieron identificar una correlación negativa fuerte entre el contenido de FVT y el IC₅₀ ($r = -0.927$, $p < 0.05$), así como una correlación negativa moderada entre FVT y FRAP ($r = -0.781$, $p < 0.05$). La correlación de FVT y el IC₅₀ es cercana a la encontrada por Julián-Loaeza *et al.* (2011) para la pulpa ($r = -0.969$, $p < 0.05$) del mismo fruto [3], esto sugiere que los FVT son responsables principales de la AA expresada con el IC₅₀ de los extractos de las semillas de *A. diversifolia* y en menor grado del poder reductor. Así mismo, hubo correlaciones positivas moderadas entre FT y el IC₅₀ ($r = 0.716$, $p < 0.05$), FT y FRAP ($r = 0.878$, $p < 0.05$). Lo cual parece indicar que los compuestos fenólicos, diferentes a los flavonoides contribuyen mejor al poder reductor. Esto se sugiere también por la correlación negativa moderada entre FT y FVT ($r = -0.727$, $p < 0.05$). Una correlación moderada entre compuestos fenólicos diferentes a los flavonoides y AA, podría revelar la presencia de otros compuestos reductores y abundantes en los extractos. Estos compuestos posiblemente fueron las acetogeninas, compuestos que presentan una fuerte AA frente al DPPH• [23].

Adicionalmente, en los extractos de las semillas de *A. diversifolia* también se encuentran triacilgliceroles derivados de ácidos grasos insaturados, tal como el ácido oleico, en concentraciones altas (72%) (sección 4.5.2). Estos compuestos también contribuyen a la AA, por ejemplo, en las semillas de *A. crassiflora* Mart., el contenido de fitoesteroles y la composición de ácidos grasos estuvo relacionada con su AA medida con el radical DPPH• ($r = 0.960$, $p < 0.05$) [74].

4.5 Características espectroscópicas de IR y de RMN de los compuestos aislados y caracterizados

A partir de la fracción de C₆H₁₄ del extracto metanólico se logró identificar un triacilglicerol mediante técnicas espectroscópicas de IR y RMN. Mientras que a partir de la fracción de CH₂Cl₂ de la variedad rosa y después de una purificación en cromatografía en columna se aisló una acetogenina nueva. A continuación se describen los datos y la descripción de la asignación de las estructuras.

4.5.1 Espectroscopía IR del TAG trioleína

El espectro infrarrojo del extracto hexánico, obtenido del crudo metanólico, de la variedad blanca (Ilustración 11) presentó bandas de absorción semejantes a la trioleína, según lo reportado por Christy *et al.* (2009). Las bandas de absorción de IR están descritas en la Tabla 11 [76], las cuales son similares a las descritas para extractos no polares de otras especies del género *Annona*. Por ejemplo, las bandas en 2923 y 2853 cm⁻¹, propias de las tensiones asimétrica y simétrica del -C-H (-CH₂), se presentan en regiones próximas a las observadas en el espectro de IR de las semillas de *A. squamosa* (2956, 2918 cm⁻¹) [42], *A. muricata* (2918, 2851 cm⁻¹) [53] y *A. diversifolia* previamente reportada (2910, 2851 cm⁻¹) [9]. La banda de 1743 cm⁻¹ corresponde al modo vibracional de tensión del -C=O (éster) [42, 53]. También se observa la banda a 1462 cm⁻¹, descrita para la tensión del C=C en las semillas de *A. squamosa* [42]. Finalmente, la banda a 737 cm⁻¹ del modo vibracional flexión (balanceo) de los (CH₂)_n, reportado para las semillas de *A. muricata* (725 cm⁻¹) [53]. Los datos mostrados en la Tabla 11, también permitieron descartar la presencia de fragmentos de ácidos grasos *E*.

Tabla 11. Bandas de absorción (BA) de IR de la trioleína (Tri), trielaidina (Trie) ^[76] y de la fracción de C₆H₁₄ de las semillas de *A. diversifolia* variedad blanca.

Grupo funcional y modo de vibración	BA de Tri y Trie (cm⁻¹)	BA Fracción de C₆H₁₄ (cm⁻¹)
Tensión =CH <i>E</i>	3025	No observado
Tensión =CH <i>Z</i>	3004	3000
Tensión asimétrica CH (CH ₃)	2953	2952
Tensión asimétrica CH (-CH ₂ -)	2924	2923
Tensión simétrica CH (-CH ₂ -)	2854	2853
Resonancia Fermi -C=O (éster)	1746	1743
Tensión -C=C- <i>Z</i>	1653	1660
Flexión CH (-CH ₂ -, CH ₃)	1465	1462
Flexión simétrica CH (CH ₃)	1377	1377
Flexión, tensión (-CH ₂ -, -C-O)	1238	1238
Flexión, tensión (-CH ₂ -, -C-O)	1161	1161
Tensión -C-O	1118, 1097	1108
Tensión =CH <i>E</i> para Trie	967	No observado
Flexión (-CH ₂ -) _n	-	737

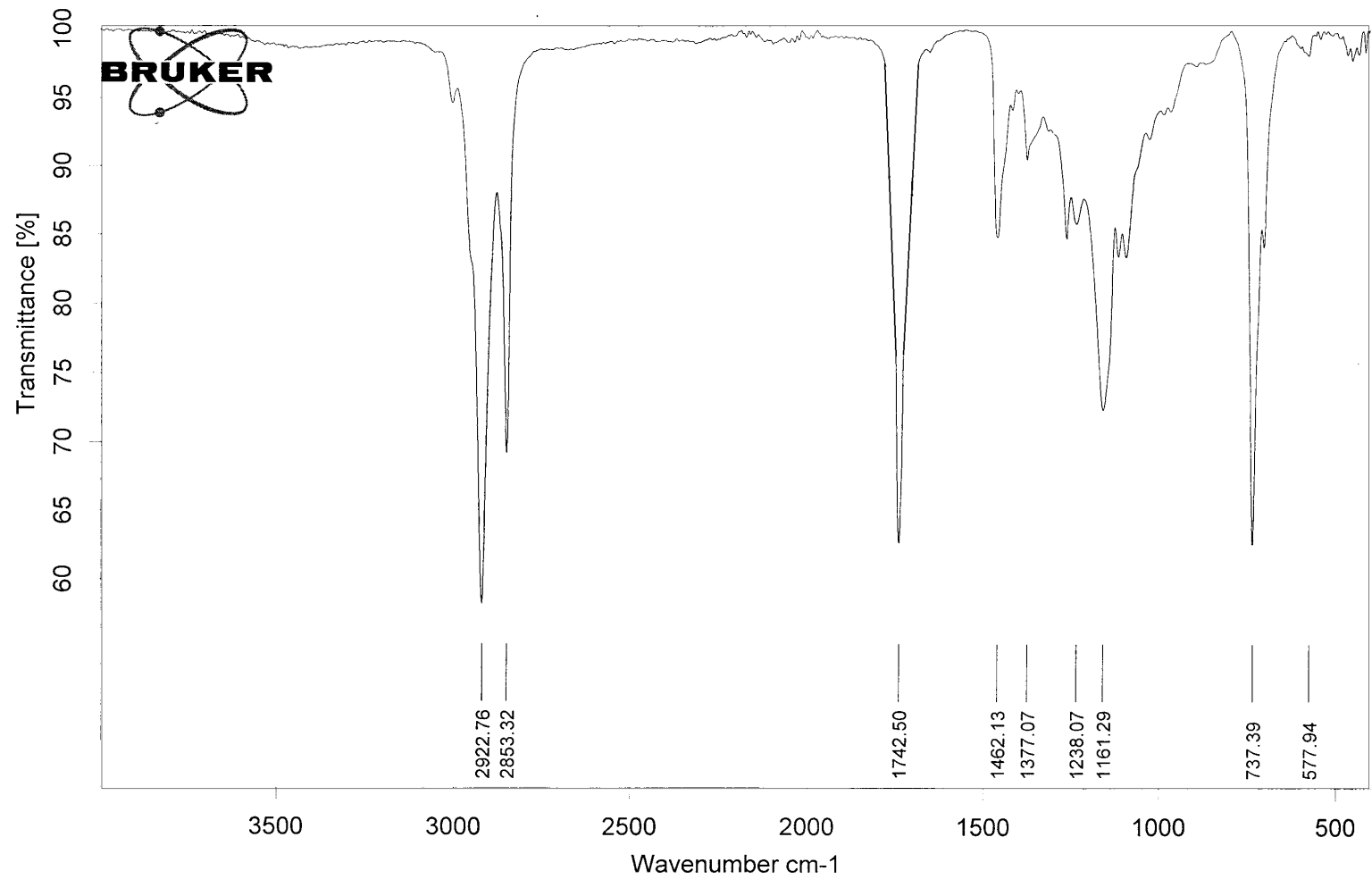


Ilustración 11. Espectro de infrarrojo de la fracción de C₆H₁₄ de las semillas de *A. diversifolia*, variedad blanca.

4.5.2 Espectroscopía RMN de ^1H de TAGs

La ilustración 12, muestra el espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la fracción de C_6H_{14} de la variedad rosa. El espectro presenta desplazamientos químicos característicos de un acilglicerol (Tabla 12). Las regiones del espectro de RMN de ^1H , exhibieron cuatro regiones diferentes, indicando cuatro tipos de protones: Protón de metilo (0.89-0.90 ppm), protones metilénicos (1.22-2.84 ppm), protones del fragmento de glicerol (4.10-5.26 ppm) y protones olefínicos (5.26-5.40 ppm).

La fracción de C_6H_{14} se caracterizó por espectroscopía de RMN de ^1H (Ilustración 12). Se calcularon las integrales de los grupos responsables de las señales de RMN. Para ello, se tomó como base, a la integral (4.39) correspondiente a la suma de los protones del $\text{R-OCO-CH}_<$, del glicerol y olefínicos localizados en el intervalo de desplazamiento químico de 5.26 a 5.39 ppm [63]. La señal del $\text{R-OCO-CH}_<$, es un quintuple debido a que tiene de vecinos a dos CH_2 . La multiplicidad está de acuerdo con la regla $n+1$, "*si hay n protones equivalentes en los átomos adyacentes, estos separarán la señal en $n+1$ picos*" [77]. Asumiendo que el TAG mayoritario presente en la fracción de C_6H_{14} es trioleína, un glicerol sustituido con tres grupos oleicos, el valor de la integral (4.39) corresponde a siete protones, seis olefínicos y uno del $\text{R-OCO-CH}_<$ del glicerol. Finalmente, debido a que existe una relación directa entre integrales de los distintos protones mostrados en el espectro, se usaron estas integrales para proponer la estructura química del TAG mayoritario (Tabla 12). Al establecer una relación entre los protones esperados para los metilos (9H) y los

protones de metilos obtenidos para la integral ajustada (12.5H), se determinó que el porcentaje de trioleina presente en la fracción de C₆H₁₄ es de 9/12.5*100 = 72%. Cabe hacer mención que en la fracción también existe la presencia de un TAG derivado de ácido linoleico, esto se afirma debido a la presencia de un desplazamiento químico a 2.77 ppm característico de CH₂ *bis*-alílicos (Ilustración 12). Los desplazamientos químicos de ¹H mostrados en la Tabla 12 concuerdan con la estructura de trioleina.

Tabla 12. Asignaciones para el espectro de RMN de ¹H de la fracción de C₆H₁₄ de las semillas de *A. diversifolia* Saff. variedad rosa.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Protón	Integral	Integral ajustada
0.89	-CH ₃ (ta, $J = 6.7$ Hz)	7.81	12.5
1.25	-OCO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ - (m) -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ - (m)	44.93	71.6
1.61	-OCO-CH ₂ -CH ₂ - (m)	5.31	8.5
1.99	-CH=CH-CH ₂ (m)	6.83	10.9
2.29	-OCO-CH ₂ - (m)	3.98	6.3
4.14	R-OCO-CH ₂ - (dd, $J = 6.0, 11.9$ Hz)	1.44	2.3
4.32	R-OCO-CH ₂ - (dd, $J = 4.2, 11.9$ Hz)	1.00	1.59
5.26	R-OCO-CH< (q)	4.39	7
5.39	-CH=CH- (m)		

RMN ¹H a 400 MHz en CDCl₃. ta = triple ancho; m = múltiple; dd = doble de dobles; q = quintuple.

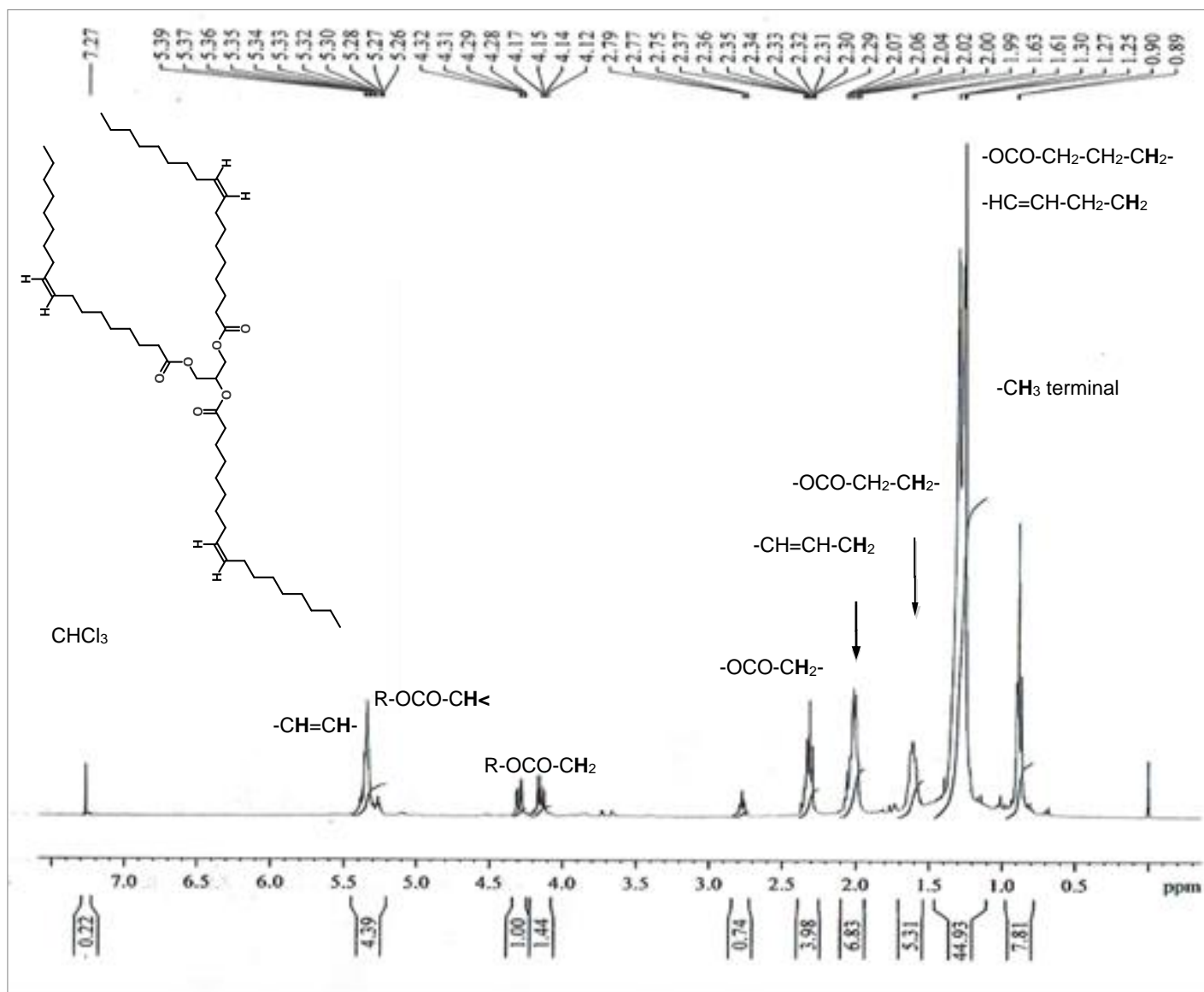


Ilustración 12. Espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de la fracción de C_6H_{14} de las semillas de *A. diversifolia*, variedad rosa.

4.5.3 Elucidación estructural de una nueva acetogenina

La acetogenina se aisló a partir de la fracción de CH₂Cl₂ del crudo metanólico de la variedad rosa de *A. diversifolia* que se sometió a una cromatografía flash, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.11.

La estructura de una acetogenina está constituida por cuatro fragmentos generales, el primero es una γ -lactona, el cual está unido a un segundo fragmento que se denomina espaciador y es una cadena hidrocarbonada. Este fragmento se une a un tercer fragmento denominado *núcleo*, constituido generalmente de uno a tres tetrahidrofuranos que pueden ser adyacentes o no. Finalmente, este fragmento se une a una cadena hidrocarbonada la cual es denominada *cola* (Ilustración 13). La lactona, el espaciador y la cola pueden llegar a contener grupos hidroxilo e insaturaciones.

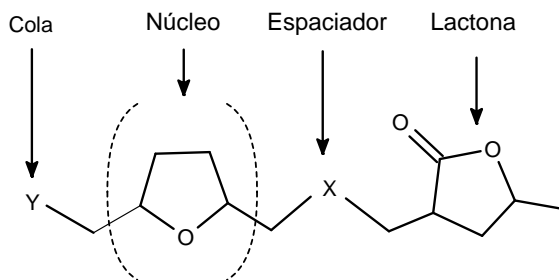


Ilustración 13. Estructura general de una acetogenina.

La asignación de estructura en este trabajo se inició con la recopilación y correlación de datos espectroscópicos de RMN uni- y bidimensionales de ¹H y ¹³C. Un experimento DEPT, permitió establecer los grupos CH, CH₂ y CH₃ en la estructura de la acetogenina que junto con los desplazamientos químicos

condujo a la construcción de las columnas denominadas grupo que indican los grupos funcionales de la acetogenina, así como los desplazamientos químicos de ^{13}C de la Tabla 13. Posteriormente, con un experimento de HSQC se realizó la correlación a un enlace entre ^1H y ^{13}C , para obtener la asignación de los datos de RMN de ^1H . La cuarta columna se construyó con las correlaciones a dos y tres enlaces entre ^1H y ^{13}C a partir del espectro de HMBC. Después se procedió a identificar el tipo de lactona presente en la estructura. Cabe recordar que existen cuatro tipos de lactonas (sub-tipo 1a y 1b, que son lactonas α,β -insaturadas) y γ -lactonas (sub-tipo 2 y 3, lactonas saturadas) (Ilustración 10). Los datos de RMN de ^{13}C a 100 MHz descartaron la presencia de lactonas sub-tipo 1a y 1b, debido a la ausencia de dobles enlaces conjugados con grupos carbonilos. Esto deja solamente dos opciones y para resolverlo se procedió a revisar los grupos de señales característicos. Se sugiere un sustituyente metilo en el C-36 (C- γ), es decir existe una γ -metil- γ -lactona por el δ de RMN de ^1H a 4.52 ppm (1H, qd, $J = 6.7, 0$ Hz), así como por las correlaciones con el H- β (H-35) y H-37 (CH₃) de la γ -lactona (Tabla 13). Además se sugiere un sustituyente OH en el C-35, por el δ a 4.16 ppm (1H, dd, $J = 5.2, 0$ Hz) y por las correlaciones con el H- γ (H-36), H-37 y H-2. Por lo tanto, es una γ -metil- β -hidroxi γ -lactona perteneciente al sub-tipo 3. Así mismo, las constantes de acoplamiento entre los H- α y H- β ($J = 5.2$ Hz) y H- β y H- γ ($J = 0$ Hz) de la γ -lactona sugiere una disposición espacial *cis* y *trans* (Ilustración 14), respectivamente considerando lo descrito por Lorenzo *et al.* (2006).

Por otro lado, se considera que el espaciador está unido al C-2 de la lactona por el δ a 2.58 (1H, dt, $J = 9.4, 5.2$ Hz). Lorenzo *et al.* (2006) reportaron una serie de reglas empíricas que son de gran utilidad para poder hacer la asignación inequívoca de la estructura del fragmento de lactona [67]. Los δ de RMN de ^{13}C son indispensables para poder determinar la estructura y configuración relativa de los centros estereogénicos en la estructura de la lactona. En la Ilustración 14 se muestra el fragmento de la lactona con la asignación de los δ de RMN de ^{13}C , basada en los datos reportados por Lorenzo *et al.* (2006). Posteriormente se procedió a determinar el número de tetrahidrofuranos (THF) presentes en el núcleo de la acetogenina. Los δ de RMN de ^{13}C a 79.4 y 81.8 ppm con sus respectivos desplazamientos de ^1H a 3.90 y 3.82 ppm permitieron establecer la presencia de un solo grupo THF. El espaciador y la cola con los datos de RMN de ^1H y ^{13}C , así como lo descrito para la grabanina [78].

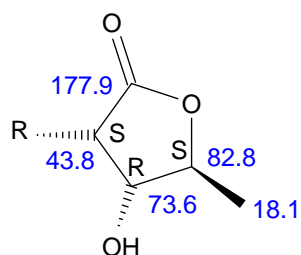


Ilustración 14. Fragmento de lactona con la asignación de estereoquímica de los tres carbonos estereogénicos y δ de RMN de ^{13}C .

Los datos de RMN confirman que el grupo espaciador que une a la lactona con el THF está constituido de nueve CH_2 , de acuerdo a las señales de ^{13}C en el intervalo de δ 22.7 a 29.8 ppm y sus desplazamientos en ^1H de δ 1.28 a 1.34

ppm. Mientras que la cola tiene tres grupos CHOH (RMN de ^{13}C 73.9, 74.2, 74.5 ppm, desplazamientos químicos característicos de carbonos sp^3 unidos a oxígeno. También se observó el desplazamiento químico de ^1H vinílicos (HC=CH) en 5.36 y 5.38 ppm con una $J = 6.2$ Hz asignados a los H-23 y H-24, lo cual sugiere una configuración *Z*.

En la Ilustración 15 se presenta el grupo THF y la porción de cola que contiene a los grupos CHOH y HC=CH. Es importante mencionar que los valores son muy similares a los reportados para la glabranina, Anexo II (Grupo III), acetogenina con un fragmento similar [78].

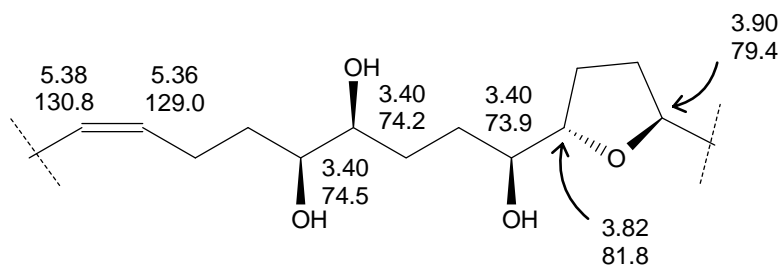


Ilustración 15. Asignación de los δ de RMN de ^{13}C y ^1H para los CH del grupo THF y de la cola de la acetogenina.

La espectrometría de masa de alta resolución mostró el ion molecular protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ con una $m/z = 625.5036$ ($\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{O}_7 + \text{H}^+$ m/z calculada de 625.5037). Así como también se encontró el ion $[\text{M} + \text{Na}]^+$ con una $m/z = 647.4852$ ($\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{O}_7 + \text{Na}$ m/z calculada de 647.4863), y el ion $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ con una $m/z = 1271.9812$ ($\text{C}_{74}\text{H}_{136}\text{O}_{14} + \text{Na}$ m/z calculada de 1271.9827). La estructura propuesta para la acetogenina se presenta en la Ilustración 16.

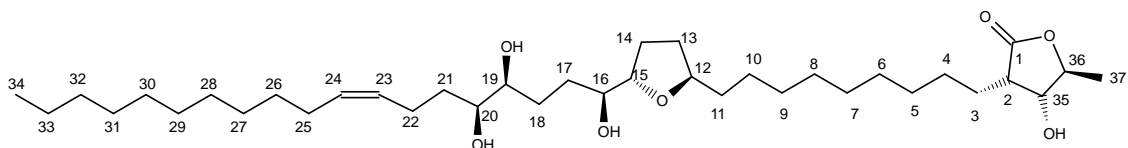


Ilustración 16. Estructura de la acetogenina aislada desde la fracción CH_2Cl_2 del extracto metanólico de semillas de *A. diversifolia*.

Para determinar si el compuesto es nuevo, se llevó a cabo una revisión exhaustiva en la literatura, sin embargo, no encontramos reportes relacionados con este compuesto hasta la fecha.

Tabla 13. Datos de RMN obtenidos a partir de experimentos uni- y bi-dimensionales (^1H , ^{13}C y DEPT) y (HSQC y HMBC) de la nueva acetogenina.

Grupo	RMN de ^{13}C (ppm)	RMN de ^1H (ppm)	Correlaciones C- H a dos y tres enlaces
C=O	177.9	-	4.52 y 4.16
CH=	130.8	5.38	2.03
CH=	129.0	5.36	2.03
CHOC	82.8	4.52 (qd, $J = 6.7, 0$ Hz)	4.16 y 1.33
CHOH	81.8	3.82 (m)	-
CHOH	79.4	3.90 (m)	-
CHOH	74.5	3.40 (m)	1.30
CHOH	74.2	3.40 (m)	-
CHOH	73.9	3.40 (m)	-
CHOH	73.6	4.16 (dd, $J = 5.2, 0$ Hz)	4.52, 1.33 y 2.58
CH	43.8	2.58 (dt, $J = 5.2, 9.4$ Hz)	-
CH ₂	35.5	1.58 (m)	-
CH ₂	33.3	1.52, 1.38 (m)	-
CH ₂	32.4	1.24 (m)	-
CH ₂	31.9	1.25 (m)	0.88
CH ₂	29.8-29.3	1.74-1.24 (m)	2.03
CH ₂	29.0	1.65 (s ancho)	-
CH ₂	28.4	1.98 (s ancho)	-
CH ₂	27.6	1.43 (m)	-
CH ₂	27.3	2.03 (q ancho $J = 6.5$ Hz)	5.38
CH ₂	26.1	1.29 (s ancho)	-
CH ₂	23.5	1.30 (m)	-
CH ₂	23.3	1.30 (m)	5.36
CH ₂	22.7	1.28 (m)	0.88
CH ₃	18.1	1.33 (d, $J = 6.9$ Hz)	4.16
CH ₃	14.1	0.88 (t, $J = 6.7$ Hz)	-

RMN ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 . s = simple; d = doble; t = triple. q = cuádruple. m = múltiple; dd = doble de dobles; dt = doble de triples.

5. CONCLUSIONES

Los extractos de MeOH tienen un contenido moderado de compuestos fenólicos al compararlo con las semillas de *A. cherimola* y *A. crassiflora*.

La IC₅₀ del DPPH• de las semillas de las tres variedades de *A. diversifolia* presentó valores intermedios, respecto a valores reportados en la literatura para diversas *Annonas*.

El contenido de FVT presentó una excelente correlación con la IC₅₀ y una moderada correlación con el poder reductor de los extractos metanólicos de semillas de *A. diversifolia* Saff. Por lo que la actividad antioxidante medida por el método del DPPH• se asocia con el contenido de FVT principalmente.

Los extractos de las semillas de *A. diversifolia* son una fuente importante de acetogeninas y triacilglicérols. En el presente trabajo se lograron aislar e identificar a la trioleína, un triacilglicérol presente en la fracción hexánica y a una acetogenina en la fracción de diclorometano. La acetogenina aislada contiene en su estructura un núcleo de tetrahidrofurano y una γ -lactona sub-tipo 3 que de acuerdo a la revisión de la literatura es un nuevo compuesto.

6. PERSPECTIVAS

Para continuar con el estudio de las semillas de *Annona diversifolia* Saff., aprovechando su actividad antioxidante y la presencia de acetogeninas se propone lo siguiente:

Determinar la configuración absoluta de la nueva acetogenina aislada, acetilar a la acetogenina para corroborar los hidroxilos presentes en la molécula y tratar de formar monocristales.

Realizar una purificación exhaustiva de las acetogeninas presentes en las tres variedades de *A. diversifolia*.

Extraer, purificar y elucidar la estructura química de los compuestos antioxidantes presentes en la fracción de AcOEt. Estas últimas provenientes de extractos metanólicos de tres las variedades de semillas de *A. diversifolia*.

7. REFERENCIAS

- 1 Liang, C. C.; Yang, Y. L.; Chen, M.; Chang, F. R.; Chen, S. L.; Wu, S. H.; Wu, Y. C. Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* as cytotoxic agents. *Journal of Natural Products*. **2008**, *71*, 764-771.
- 2 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.
- 3 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* Saff. fruits. *Industrial Crops and Products*. **2011**, *34*, 1262-1268.
- 4 Lee, K. W.; Kim, Y. J.; Lee, H. J.; Lee, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2003**, *51*, 25, 7292-7295.
- 5 Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. **1999**, *299*, 15-23.
- 6 Guorong, D.; Mingjun, L.; Fengwang, M.; Dong, L. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*. **2009**, *113*, 2, 557-562.
- 7 Alothman, M.; Bhat, R.; Karim, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. **2009**, *115*, 3, 785-788.

- 8 Marroquín-Andrade, L.; Cuevas-Sánchez, J. A.; Guerra-Ramírez, D.; Reyes, L.; Reyes-Chumacero, A.; Reyes-Trejo, B. Proximate composition, mineral nutrient and fatty acids of the seed of ilama, *Annona diversifolia* Saff. *Scientific Research and Essays*. **2011**, 6, 14, 3089-3093.
- 9 Peralta-Montero, J. Estudio fitoquímico biodirigido de la actividad citotóxica de *Annona diversifolia* Saff. (ilama). Tesis de licenciatura de la Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", Universidad Nacional Autónoma de México, México. **1997**.
- 10 Luna-Cazares, L. M.; Gonzalez-Esquinca, A. R. Susceptibility of complete bacteria and spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to rolliniastatin-2. *Natural Products Reserch*. **2010**, 24, 12, 1139-1145.
- 11 Schlie-Guzmán, M. A.; García-Carrancá, A.; González-Esquinca, A. R. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytotherapy Research*. **2009**, 23, 8, 1128-1133.
- 12 Vermerris, W.; Nicholson, R. *Phenolic Compound Biochemistry*. Netherlands: Springer Science+Business Media B. V. **2008**.
- 13 Rispaill, N.; Morris, P.; Webb, K. Phenolic compounds: extraction and analysis. In A. Márquez (Ed.), *Lotus Japonicus Handbook*, Berlin: Springer, **2005**.
- 14 Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Reviews: Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. **1997**, 2, 4, 152-159.
- 15 Williams, R. J.; Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*. **2004**, 36, 7, 838-849.
- 16 Seffrin, R.; Shikano, I.; Akhtar, Y.; Isman, M. B. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*. **2010**, 29, 1, 20-24.

- 17 Pareek, S.; Yahia, E. M.; Pareek, O. P.; Kaushik, R. A. Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International*. **2011**, *44*, 7, 1741-1751.
- 18 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.
- 19 Huang, W-Y.; Cai, Y-Z.; Corke, H.; Sun, M. Survey of antioxidant capacity and nutritional quality of selected edible and medicinal fruit plants in Hong Kong. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2010**, *23*, 6, 510-517.
- 20 Mariod, A. A.; Abdelwahab, S. I.; Elkheir, S.; Ahmed, Y. M.; Fauzi, P. N. M.; Chuen, C. S. Antioxidant activity of different parts from *Annona squamosa*, and *Catunaregam nilotica* methanolic extract. *Acta Scientiarum Polonorum: Technologia Alimentaria*. **2012**, *11*, 3, 249-257.
- 21 Vit, P.; Santiago, B.; Pérez-Pérez, E. M. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*. **2014**, *39*, 5, 350-353.
- 22 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.
- 23 Lima, L. A. R. S.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*. **2010**, *122*, 4, 1129-1138.
- 24 De Oliveira, A. M. F.; Pinheiro, L. S.; Pereira, C. K. S.; Matias, W. N.; Gomes, R. A.; Chaves, O. S.; De Souza, M. De F. V.; De Almeida, R. N.; De Assis, T. S. Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. *Antioxidants*. **2012**, *1*, 1, 33-43.
- 25 Sulaiman, S. F.; Yusoff, N. A. M.; Eldeen, I. M.; Seow, E. M.; Sajak, A. A. B.; Supriatno; Ooi, K. L. Correlation between total phenolic and mineral contents

- with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa sp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*. **2011**, *24*, 1-10.
- 26 Reyes-Trejo, B.; Guerra-Ramírez, D.; Zuleta-Prada, H.; Cuevas-Sánchez, J. A.; Reyes, L.; Reyes-Chumacero, A.; Rodríguez-Salazar, J. A. *Annona diversifolia* seed oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Industrial Crops and Products*. **2014**, *52*, 400-404.
- 27 Moo-Huchin, V. M.; Estrada-Mota, I.; Estrada-León, R.; Cuevas-Glory, L.; Ortiz-Vázquez, E.; Vargas y Vargas, M. D.; 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.
- 28 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.
- 29 Zhu, H.; Wang, Y.; Liu, Y.; Xia, Y.; Tang, T. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytic Methods*. **2010**, *3*, 2, 90-97.
- 30 Martínez-Cruz, N. Del S.; Arévalo-Niño, K.; Verde-Star, M. J.; Rivas-Morales, C.; Oranday-Cárdenas, A.; Núñez-González, M. A.; Morales-Rubio, M. E. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltld (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **2011**, *42*, 4, 66-71.
- 31 Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*. **2011**, *89*, 3, 217-233.
- 32 Eklund, P. C.; Langvik, O. K.; Warna, J. P.; Salmi, T. O.; Willfor, S. M.; Sjöholm, R. E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2005**, *3*, 18, 3336-3347.

- 33 Ozcelik, B.; Lee, J. H.; Min, D. B. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*. **2003**, *68*, 2, 487-490.
- 34 Lyles, R. H.; Poindexter, C.; Evans, A.; Brown, M.; Cooper, C. R. Nonlinear model-based estimates of IC₅₀ for studies involving continuous therapeutic dose-response data. *Contemporary Clinical Trials*. **2008**, *29*, 878-886.
- 35 Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. **1996**, *239*, 1, 70-76.
- 36 Panda, S.; Kar, A. *Annona squamosa* seed extract in the regulation of hyperthyroidism and lipid-peroxidation in mice: Possible involvement of quercetina. *Phytomedicine*. **2007**, *14*, 12, 799-805.
- 37 Andrade, E. H. A.; Zoghbi, Maria das Graças, B.; Maia, J. G. S.; Fabricius, H.; Marx, F. Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2001**, *14*, 2, 227-232.
- 38 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*, 3, 1048-1054.
- 39 Santos, L. P.; Boaventura, M. A. D.; Sun, N. J.; Cassady, J. M.; De Oliveira, A. B. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. *Phytochemistry*. **1996**, *42*, 3, 705-707.
- 40 García-Salas, P.; Gómez-Caravaca, A. M.; Morales-Soto, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*. **2015**, *78*, 246-257.
- 41 Li, D. Y.; Yu, J. G.; Zhu, J. X.; Yu, D. L.; Luo, X. Z.; Sun, L.; Yang, S. L. Annonaceous acetogenins of the seeds from *Annona muricata*. *Journal of Asian Natural Products Research*. **2001**, *3*, 4, 267-276.

- 42 Chandrababu, N. R.; Niranjana, K. A.; Komuraiah, B.; Satya, S. K. V. N.; Ramakrishna, K. V. S.; Laxman, N. V.; Sistla, R. Fatty acids derivatives from seeds of *Annona squamosa* Linn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **2012**, *4*, 10, 4558-4561.
- 43 Chih-Chuang, L.; Fang-Rong, C.; Shu-Li, C.; Chin-Chung, W.; Kuo-Hsiung, L.; Yang-Chang, W. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**, *13*, 4767-4776.
- 44 Chen, Y.; Xu, S.; Chen, J.; Wang, Y.; Xu, H.; Fan, N.; Li, X. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. **2012**, *142*, 2, 462-466.
- 45 Li, X.; Chen, X. L.; Chen, J. W.; Sun, D. D. Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Chemistry of Natural Compounds*. **2010**, *46*, 1, 101-105.
- 46 Chen, Y.; Chen, J.; Li, X. Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry Letters*. **2012**, *5*, 1, 33-36.
- 47 Vila-Nova, N. S.; Maia de Morais, S.; Cajazeiras-Falcão, M. J.; Andrade Machado, Leal-Beviláqua, C. M.; Sousa-Costa, I. R.; Pompeu de Sousa-Brasil, N. V. G.; Franco de Andrade-Júnior, H. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **2011**, *44*, 5, 567-571.
- 48 Lima, L. A. R. S.; Johann, S.; Cisalpino, P. S.; Pimenta, L. P. S. Boaventura, M. A. D. Antifungal activity of 9-hydroxy-folianin and sucrose octaacetate from the seeds of *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). *Food Research International*. **2011**, *44*, 7, 2283-2288.
- 49 Pettit, G. R.; Riesen, R.; Leet, J. E.; Polonsky, J.; Smith, C. R.; Schmidt, J. M.; Dufresne, C.; Schaufelberger, D.; Moretti, C. Isolation and structure of

- Rolliniastatin 2: A new cell growth inhibitory acetogenin from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles*. **1989**, 28, 1, 213-217.
- 50 Álvarez Colom, O.; Neske, A.; Popich, S.; Bardón, A. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*. **2007**, 80, 1, 63-67.
- 51 García-Salas, P.; Verardo, V.; Gori, A.; Caboni, M. F.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Determination of lipid composition of the two principal cherimoya cultivars grown in Andalusian Region. *LWT-Food Science and Technology*. **2016**, 65, 390-397.
- 52 Branco, P. C.; Castilho, P. C.; Rosa, M. F.; Ferreira, J. Characterization of *Annona cherimola* Mill. seed oil from Madeira island: A possible biodiesel feedstock. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2010**, 87, 4, 429-436.
- 53 Elagbar, Z. A.; Naik, R. R.; Shakya, A. K.; Bardaweel, S. K. Fatty acids analysis, antioxidant and biological activity of fixed oil of *Annona muricata* L. seeds. *Journal of Chemistry*. **2016**, dx.doi.org/10.1155/2016/6948098.
- 54 Gremlich, H. U.; AG, N.; Basel; Switzerland. Infrared and Raman Spectroscopy. In H. Günzler and A. Williams (Eds.), *Handbook of Analytical Techniques*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, **2001**.
- 55 Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, **2004**.
- 56 Dufour, E. Principles of Infrared Spectroscopy. In D. W. Sun (Ed.), *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, USA: Elsevier Inc., **2009**.
- 57 Schrader, B. General survey of vibrational spectroscopy. B. Schrader (Ed.), In *Infrared and Raman spectroscopy: Methods and applications*, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, **1995**.
- 58 Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principios de análisis instrumental* (6^a ed.), México: Cengage Learning, Inc., **2007**.
- 59 Tariq, M.; Ali, S.; Ahmad, F.; Ahmad, M.; Zafar, M.; Khalid, N.; Khan, M. A.

- Identification, FT-IR, NMR (^1H and ^{13}C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil. *Fuel Processing Technology*. **2011**, 92, 3, 336-341.
- 60 Meusinger, R.; Chippendale, A. M.; Fairhurst, S. A. Nuclear Magnetic Resonance and Electron Spin Resonance Spectroscopy. In H. Günzler & A. Williams (Eds.), *Handbook of Analytical Techniques*. **2001**, 509-557. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- 61 Wade, L. G. Jr. *Química orgánica*, 5th ed., Madrid: Pearson Educación, S. A., **2004**.
- 62 McGregor, M. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In F. A. Settle (Ed.), *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, New Jersey: Prentice-Hall, Inc., **1997**.
- 63 Guillén, M. D.; Ruiz, A. Edible oils: discrimination by ^1H Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2003**, 83, 338-346.
- 64 Salinero, C.; Feás, X.; Mansilla, J. P.; Seijas, J. A.; Vázquez-Tato, M. P.; Vela, P.; Sainz, M. J. ^1H -Nuclear Magnetic Resonance analysis of the triacylglyceride composition of cold-pressed oil from *Camellia japonica*. *Molecules*. **2012**, 17, 6716-6727.
- 65 Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. *Introduction to Spectroscopy*, 4th ed., USA: Cengage Learning, **2009**.
- 66 Fang, X. P.; Rieser, M. J.; Gu, G. X.; McLaughlin, J. L. Annonaceous acetogenins: An updated review. *Phytochemical Analysis*. **1993**, 4, 27-49.
- 67 Lorenzo, M.; Brito, I.; Cueto, M.; D'Cross, L.; Darias, J. ^{13}C NMR-based empirical rules to determine the configuration of fatty acid butanolides. Novel γ -dilactones from *Pterogorgia* spp. *Organic Letters*. **2006**, 8, 5001-5004.
- 68 Goli, A. H.; Barzegar, M.; Sahari, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*. **2004**, 92, 521-525.
- 69 Jayaprakasha, G. K.; Singh, R. P.; Sakariah, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food*

- Chemistry*. **2001**, 73, 285-290.
- 70 Carbone, K.; Giannini, B.; Picchi, V.; Lo Scalzo, R.; Cecchini, F. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chemistry*. **2011**, 127, 493-500.
- 71 Hayouni, E. A.; Abedrabba, M.; Bouix, M.; Hamdi, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*. **2007**, 105, 1126-1134.
- 72 Seephonkai, P.; Samchai, S.; Thongsom, A.; Sunaart, S.; Kiemsanmuang, B.; Chakuton, K. DPPH radical scavenging activity and total phenolics of *phellinus* mushroom extracts collected from Northeast of Thailand. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **2011**, 9, 6, 441-445.
- 73 Guo, D. J.; Cheng, H. L.; Chan, S. W.; Yu, P. H. F. Antioxidative activities and the total phenolic contents of tonic Chinese medicinal herbs. *Inflammopharmacology*. **2008**, 16, 201-207.
- 74 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.
- 75 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.
- 76 Christy, A. A.; Xu, Z.; Harrington, P. De B. Thermal degradation and isomerisation kinetics of triolein studied by infrared spectrometry and GC-MS combined with chemometrics. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2009**, 158, 1, 22-31.
- 77 Solomons, T. W. G. *Química orgánica*, 2nd ed., México: Limusa, S.A. De C.V. **2000**.
- 78 Gallardo, T.; Aragón, R.; Tormo, J.; Blázquez, M. A.; Zafra-Polo, M. C.;

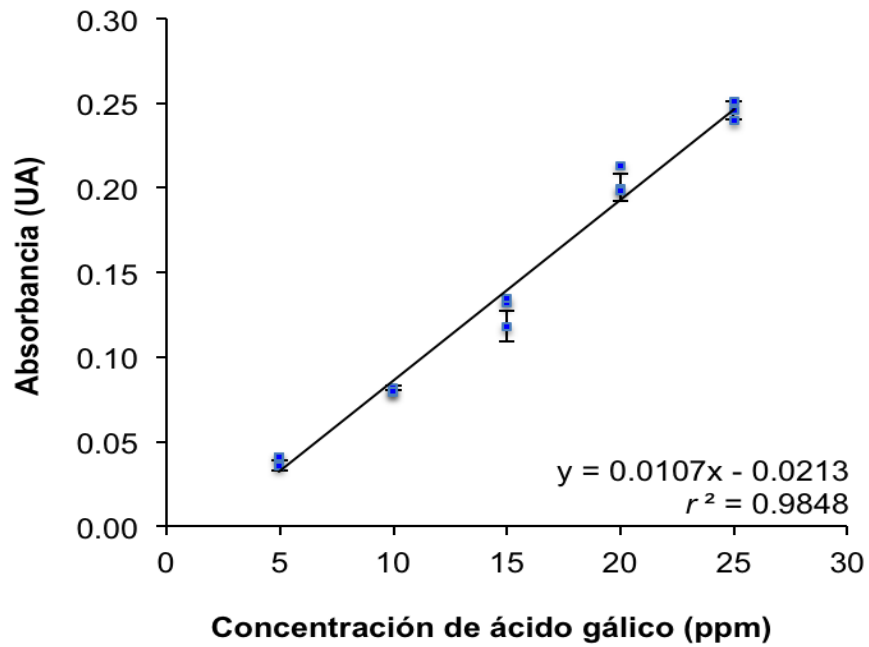
- Cortes, D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. *Phytochemistry*. **1998**, 47, 5, 811-816.
- 79 Oasa, M.; Hattori, Y.; Konno, H.; Makabe, H. Synthesis of annonacin isolated from *Annona densicoma*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2010**, 74, 6, 1274-1275.
- 80 Duret, P.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. Annonisin, a bis-tetrahydrofuran acetogenin from *Annona atemoya* seeds. *Phytochemistry*. **1997**, 45, 7, 1423-1426.
- 81 Da C. Alves, T.; Gonçalves, M. R. S.; Correia, F. C. S.; da Silva, V. C.; de Sousa Jr., P. T.; de Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; Dall'Oglio, E. L. New acetogenins from the seeds of *Annona coriacea*. *Helvetica Chimica Acta*. **2014**, 97, 11, 1469-1474.
- 82 Ragasa, C. Y.; Soriano, G.; Torres, O. B.; Don, M. J.; Shen, C. C. Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy Journal*. **2012**, 4, 32, 32-37.
- 83 Bajin ba Ndob, I.; Champy, P.; Gleye, C.; Lewin, G.; Akendengué, B. Annonaceous acetogenins: Precursors from the seeds of *annona squamosa*. *Phytochemistry Letters*. **2009**, 2, 2, 72-76.
- 84 Hisham, A.; Pieters, L. A. C.; Claeys, M.; Esmans, E.; Dommissé, R.; Vlietinck, A. J. Uvariamicin-I, II and III: Three novel acetogenins from *Uvaria narum*. *Tetrahedron Letters*. **1990**, 31, 32, 4649-4652.
- 85 Chen, Y.; Chen, J.; Li, X. Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry Letters*. **2012**, 5, 1, 33-36.
- 86 Gleye, C.; Laurens, A.; Hocquemiller, R.; Faucheur, N.; Serani, L.; Laprévote, O. Mass spectrometry and structure elucidation of 15-palmitoyl- and 15-oleylsolamin, the first known fatty acid esters of acetogenins from *Annona muricata* L. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **1998**, 12, 16, 1051-1056.

- 87 Sinha, S. C.; Keinan, E. Total synthesis of naturally occurring acetogenins: Solamin and reticulatacin. *Journal of the American Chemical Society*. **1993**, *115*, 11, 4891-4892.
- 88 Yuan, F.; Bai, G.; Chen, Y.; Miao, Y.; Chen, J.; Li, X. Structure-activity relationships of diverse ACGs against multidrug resistant human lung cancer cell line A549/Taxol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2015**, *25*, 4, 787-790.
- 89 Li, De-Yu; Yu, Jing-Guang; Zhu, Jiu-Xiang; Yu, Dong-Lei; Luo, Xiu-Zhen; Sun, Lan; Yang, Shi-Lin. Annonaceous acetogenins of the seeds from *Annona muricata*. *Journal of Asian Natural Products Research*. **2001**, *3*, 4, 267-276.
- 90 Duret, P.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. Annonisin, a bis-tetrahydrofuran acetogenin from *Annona atemoya* seeds. *Phytochemistry*. **1997**, *45*, 7, 1423-1426.
- 91 Waechter, A.; Hocquemiller, R.; Laurens, A.; Cavé, A. Glaucanetin and 10-hydroxy-glaucanetin, two new acetogenins from *Annona glauca*. *Natural Product Letters*. **1997**, *10*, 3, 205-212.
- 92 Duret, P.; Waechter, A. I.; Figadère, B.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Piérard, C.; Pérès, M. Assignment of absolute configuration of the α,β -unsaturated γ -methyl- γ -lactone of the annonaceous acetogenins by a simple enzymatic method. *Tetrahedron Letters*. **1996**, *37*, 39, 7043-7046.
- 93 Nakamaru-Ogiso, E.; Han, H.; Matsuno-Yagi, A.; Keinan, E.; Sinha, S. C.; Yagi, T.; Ohnishi, T. The ND2 subunit is labeled by a photoaffinity analogue of asimicin, a potent complex I inhibitor. *FEBS Letters*. **2010**, *584*, 5, 883-888.
- 94 Duret, P.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. Bulladecin and atemotetrolin, two bis-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona atemoya* seeds. *Phytochemistry*, **1998**, *48*, 3, 499-506.
- 95 Gleye, C.; Rafidiarison, N.; Duret, P.; Laurens, A.; Hocquemiller, R. Robustocin, a new acetogenin from the seeds of *Annona muricata*. *Natural Product Letters*. **2000**, *14*, 4, 239-245.

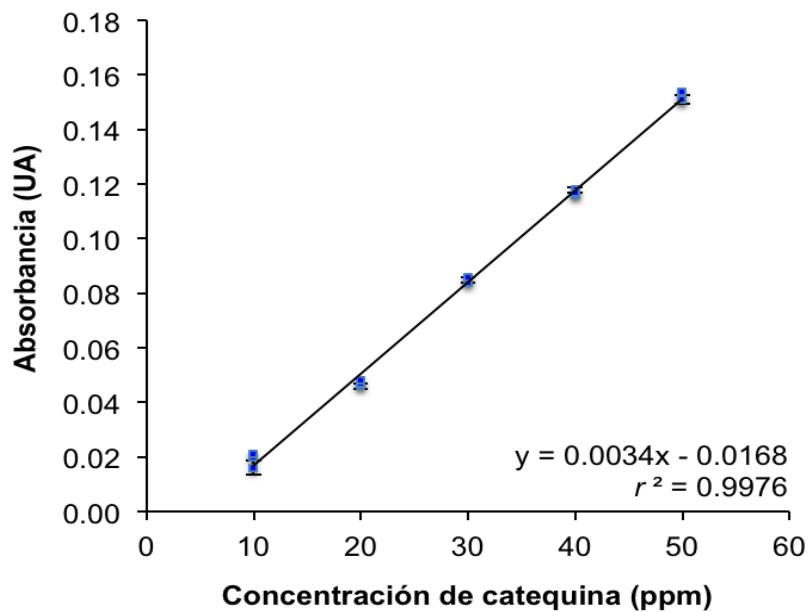
- 96 Estornell, E., Tormo, J. R., Cortes, D. Cherimolin-1, new selective inhibitor of the first energy-coupling site of the NADH: Ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1997**, *240*, 1, 234-238.
- 97 Silverstein, R. M.; Kiemle, D. J.; Webster, F. X. *Spectrometric identification of organic compounds*, 7th ed., USA: John Wiley & Sons, Inc., **2005**.
- 98 Mi-Hee, W.; Soon-Ok, C.; Dal-Hwan, K. *cis*-Annonacin and (2,4)-*cis*- and *trans*-Isoannonacins: Cytotoxic monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona cherimolia*. *Archives of Pharmacal Research*. **1999**, *22*, 5, 524-528.
- 99 Ma, Y.; Huang, H. Characterisation and comparison of phenols, flavonoids and isoflavones of soymilk and their correlations with antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*. **2014**, *49*, 2290-2298.

8. APÉNDICES

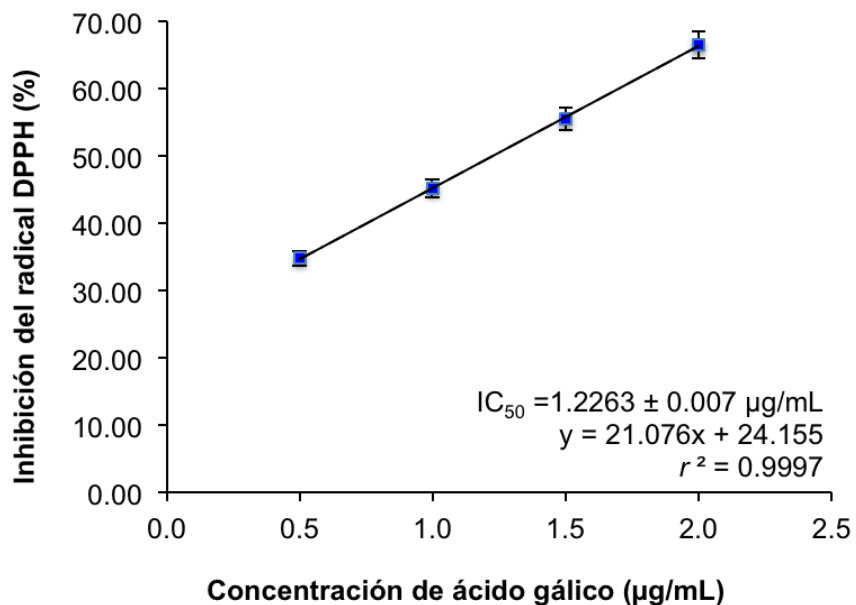
Apéndice 1. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales por el método del reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C).



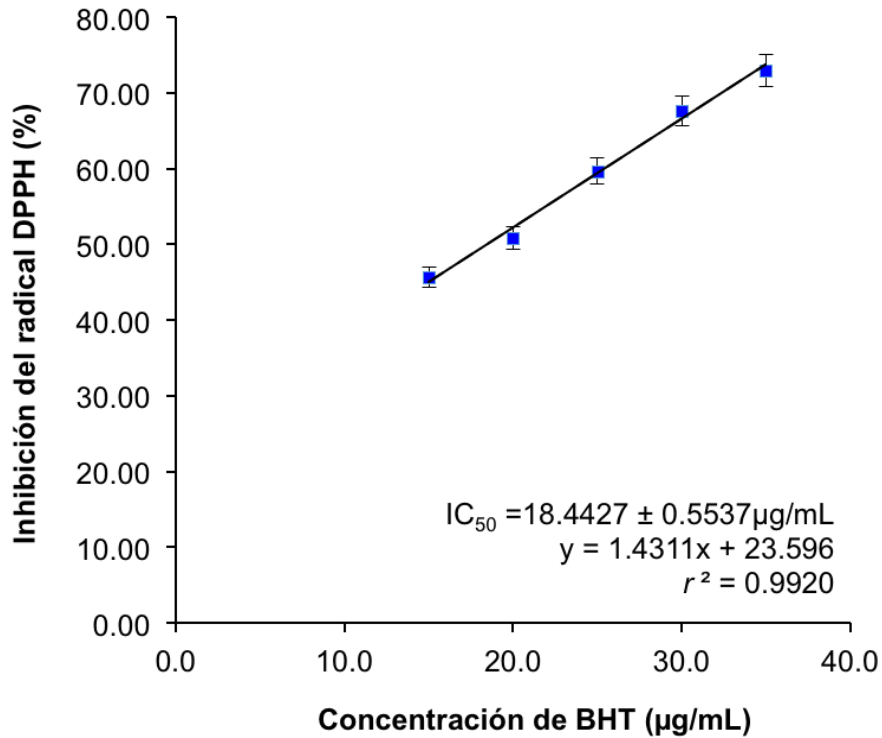
Apéndice 2. Curva de calibración de catequina para la cuantificación de flavonoides totales utilizando $AlCl_3$.



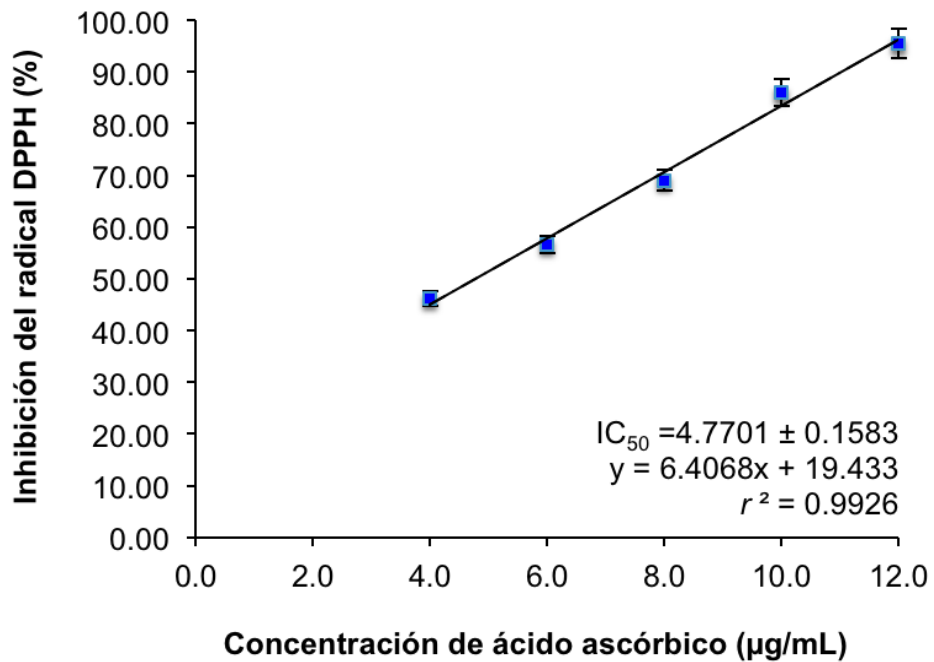
Apéndice 3. Curva de calibración de ácido gálico para la evaluación de la actividad antioxidante (IC_{50}) usando el radical DPPH*.



Apéndice 4. Curva de calibración de BHT para la evaluación de la actividad antioxidante (IC_{50}) usando el radical DPPH*.

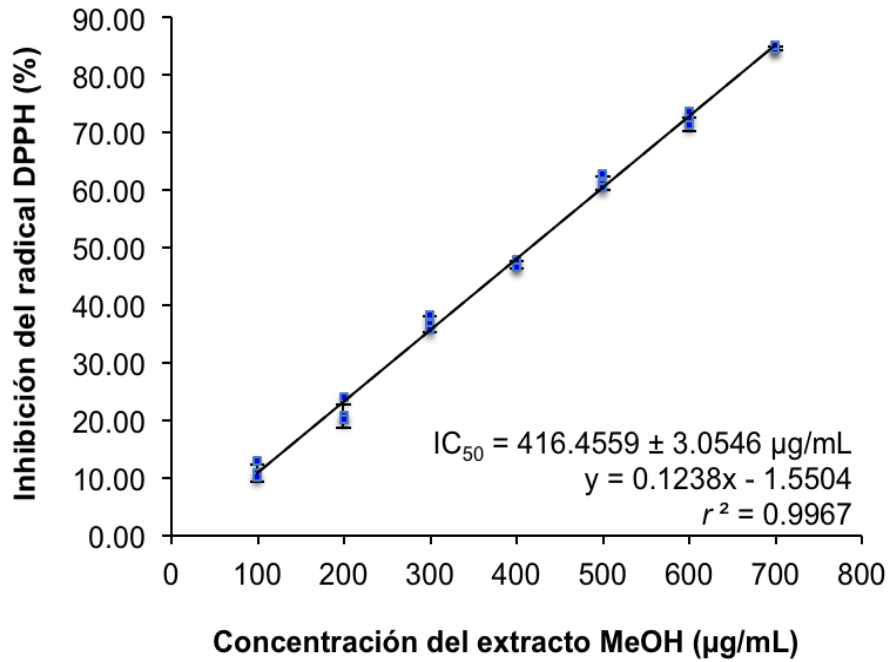


Apéndice 5. Curva de calibración de ácido ascórbico para la evaluación de la actividad antioxidante (IC_{50}) usando el radical DPPH*.

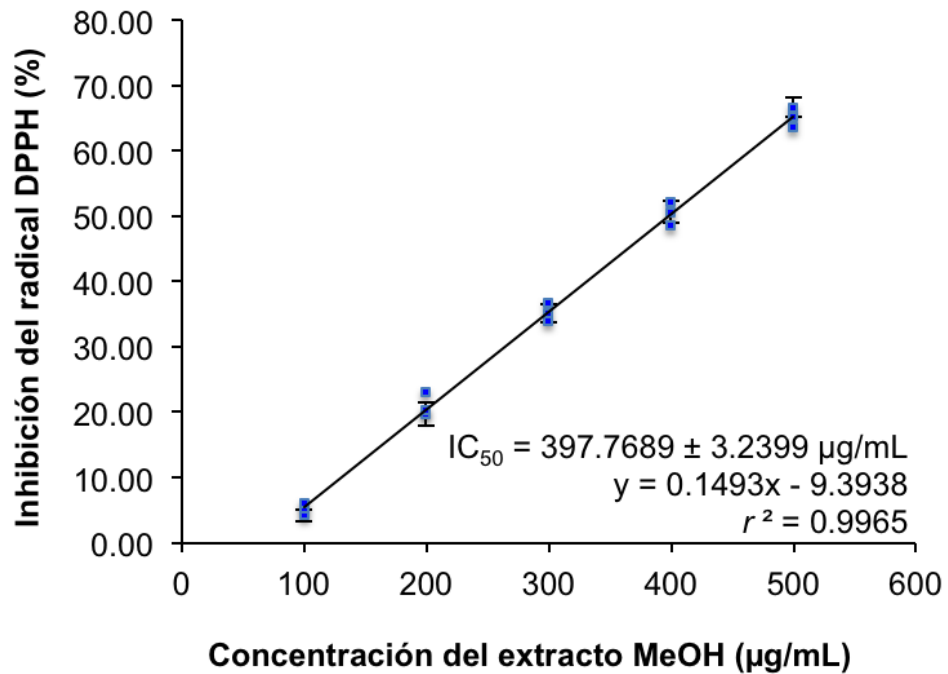


Apéndice 6. IC₅₀ de los extractos metanólicos de las semillas de *A. diversifolia* Saff. de tres variedades por el método del radical DPPH*.

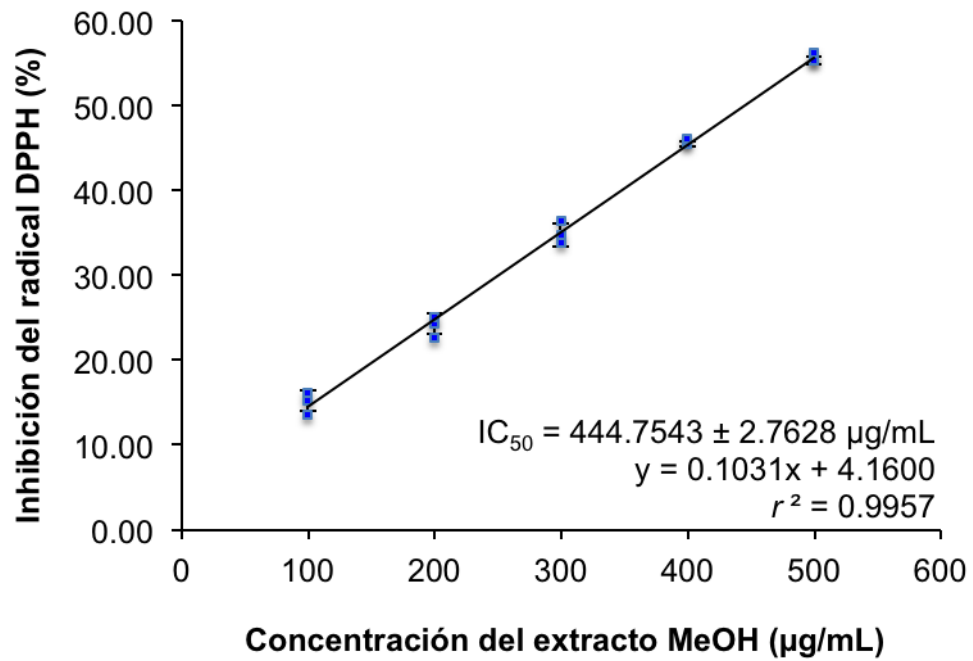
a) variedad blanca



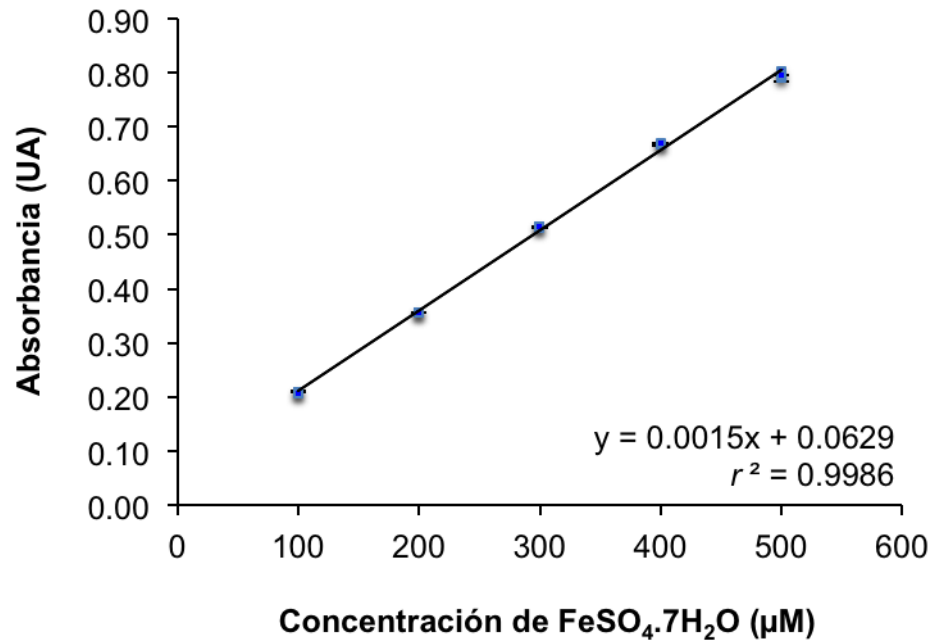
b) variedad rosa



c) variedad rosa mexicano



Apéndice 7. Curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para la cuantificación del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).



Apéndice 8. Porcentaje de la extracción líquido-líquido de las semillas de *A. diversifolia* Saff. de la variedad blanca, rosa, rosa mexicano.

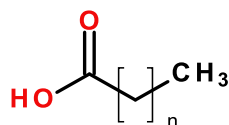
Variedad	Extracción líquido - líquido	
	Disolvente	Porcentaje de extracción (%)
Blanca	C ₆ H ₁₄	6.74
	CH ₂ Cl ₂	46.90
	AcOEt	1.85
Rosa	C ₆ H ₁₄	24.65 ± 2.46
	CH ₂ Cl ₂	40.83 ± 4.07
	AcOEt	1.44 ± 0.08
Rosa mexicano	C ₆ H ₁₄	18.51
	CH ₂ Cl ₂	55.70
	AcOEt	3.86

Los valores son la media de tres mediciones, excepto para las variedades blanca y rosa mexicano, que provienen de una medición.

9. ANEXOS

Anexo 1. Ácidos grasos (AGs) y derivados caracterizados de las semillas del género *Annona*.

Grupo I: AGs saturados



n: 10, C12:0 ácido láurico (1)

n: 13, C15:0 ácido pentadecanoico (3)

n: 15, C17:0 ácido heptadecanoico (5)

n: 17, C19:0 ácido nonadecanoico (7)

n: 20, C22:0 ácido behénico (9)

n: 12, C14:0 ácido mirístico (2)

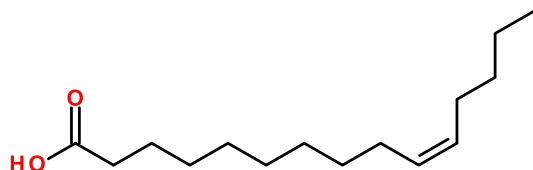
n: 14, C16:0 ácido palmítico (4)

n: 16, C18:0 ácido esteárico (6)

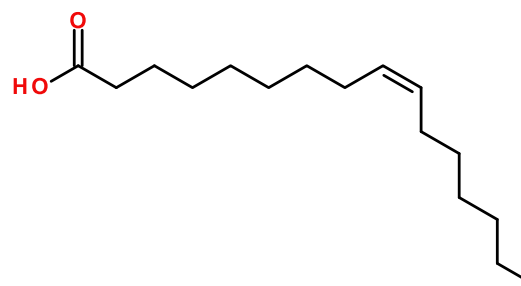
n: 18, C20:0 ácido araquídico (8)

n: 22, C24:0 ácido lignocérico (10)

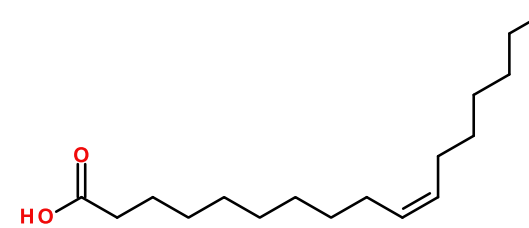
Grupo II: AGs insaturados



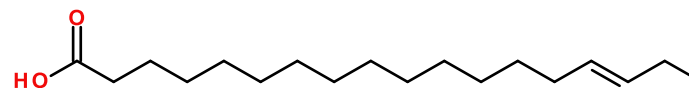
ácido (Z)-10-pentadecenoico (11)



ácido (Z)-9-hexadecenoico
o ácido palmitoleico (12)

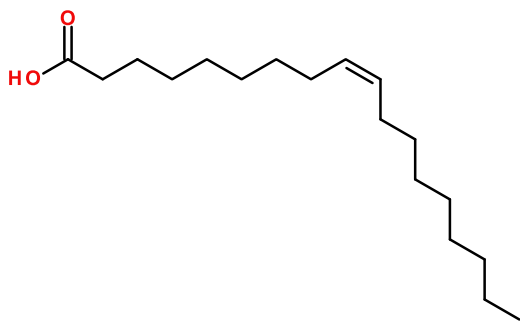


ácido (Z)-10-heptadecenoico (13)

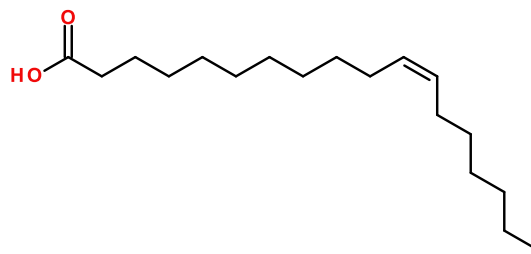


ácido (E)-15-octadecenoico (14)

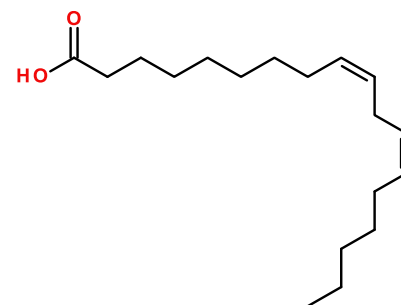
Continuación del Grupo II: AGs insaturados



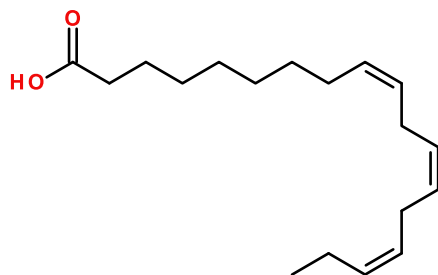
ácido (Z)-9-octadecenoico
o ácido oleico (**15**)



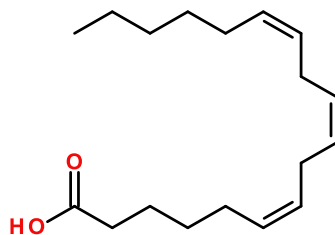
ácido (Z)-11-octadecenoico
o ácido *cis*-vaccénico (**16**)



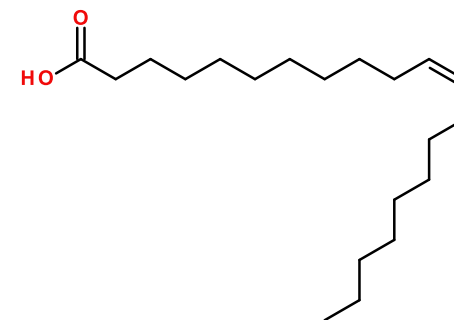
ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico
o ácido linoleico (**17**)



ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico
o ácido α -linolénico (**18**)

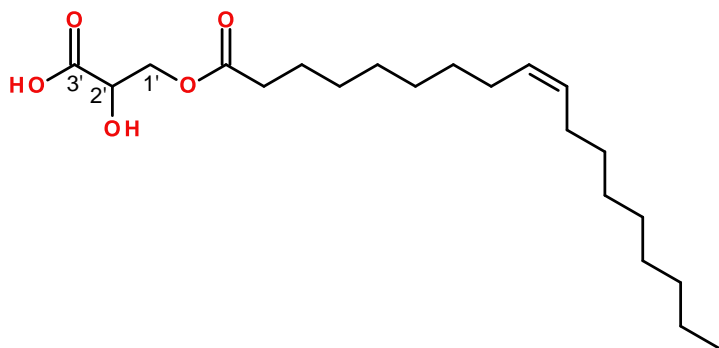


ácido (Z,Z,Z)-6,9,12-octadecatrienoico
o ácido γ -linolénico (**19**)

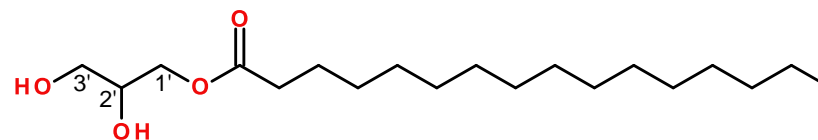


ácido (Z)-11-eicosenoico
o ácido gondoico (**20**)

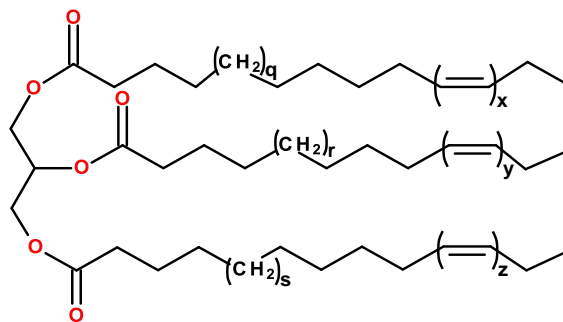
Grupo III: Algunos derivados de AGs



ácido (Z)-2'-hidroxi-1'-oleoil propiónico (21)



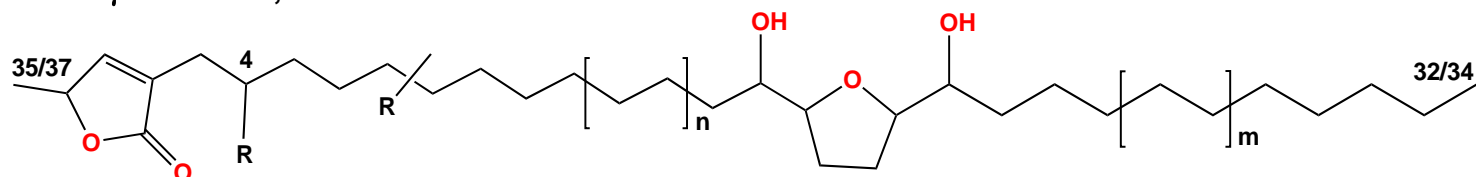
1'-palmitoil-glicerol (22)



éster tipo triglicérico

Anexo 2. Principales acetogeninas (ACGs) caracterizadas de las semillas del género *Annona*.

Grupo I: ACGs γ -lactona α,α' -dihidroxiladas mono-THF

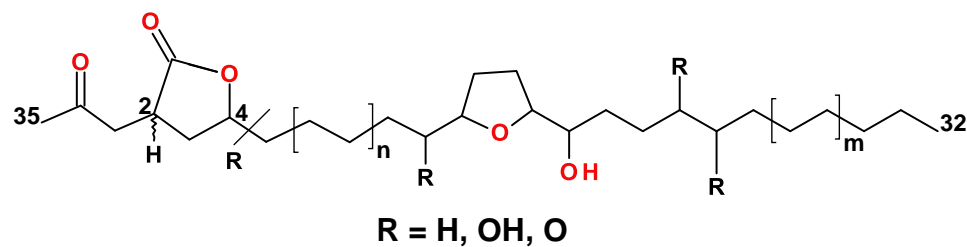


R = H u OH

Acetogenina	Posición del OH	Configuración relativa del THF ^a	Fórmula molecular	Referencia
annonacina (23)	4, 10, 15, 20	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	[79, 80]
coriapentocina-A (24)	4, 10, 12, 17, 22	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	[81]
coriapentocina-B (25)	4, 6, 12, 17, 22	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	[81]
annonacinona (26) (CO, 10)	4, 15, 20	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	[78]
annoreticuina (27) (CO,9)	4, 15, 20	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	[82]
murisolina-B (28)	9, 15, 20	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	[45]
corossolina (29)	10, 15, 20	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	[78]
corossolona (30) (CO, 10)	15, 20	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	[78]
uvariamicina-I (31)	15, 20	th/ t/ th	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	[83, 84]
uvariamicina-II (32)	17, 22	th/ t/ th	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	[84, 85]
uvariamicina-III (33)	19, 24	th/ t/ th	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	[84, 85]
15-palmitoilsolamina (34)	15-palmitico, 20	nr	C ₅₁ H ₉₄ O ₆	[86]
15-oleilsolamina (35)	15-oleico, 20	nr	C ₅₃ H ₉₆ O ₆	[86]
annosquamina-A (36)	9, 14	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	[85]
annosquamina-B (37)	11, 15	er/ t/ er	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	[85]
annosquamina-C (38)	9, 14	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	[85]
solamina (39)	15, 20	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	[85, 87]
annotemoyina-1 (40)	17, 22	th/ t/ th	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	[85, 88]

a: th:Threo. t: trans. nr: No reportada por los autores

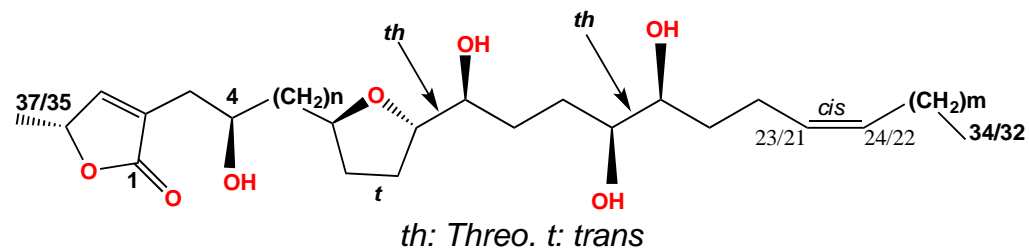
Grupo II: ACGs mono-THF



Acetogenina		Posición del OH	Configuración relativa del THF ^a	Fórmula molecular	Referencia
2,4- <i>cis</i> -gigantetrocinona (41)	(C ₂ -C ₄ , <i>c</i> y C ₁₇ -C ₁₈ , <i>th</i>)	14, 17, 18	<i>th/t</i>	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	[89]
2,4- <i>trans</i> -gigantetrocinona (42)	(C ₂ -C ₄ , <i>c</i> y C ₁₇ -C ₁₈ , <i>th</i>)	14, 17, 18	<i>th/t</i>	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	
2,4- <i>trans</i> -isoannonacina (43)	(C ₂ -C ₄ , <i>t</i>)	10, 15, 20	<i>th/t/th</i>	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	
2,4- <i>trans</i> -isoannonacin-10-ona (44)	(C ₂ -C ₄ , <i>t</i>) (CO, 10)	15, 20	<i>th/t/th</i>	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	

a: *th*: Threo. *t*: trans. *c*: cis.

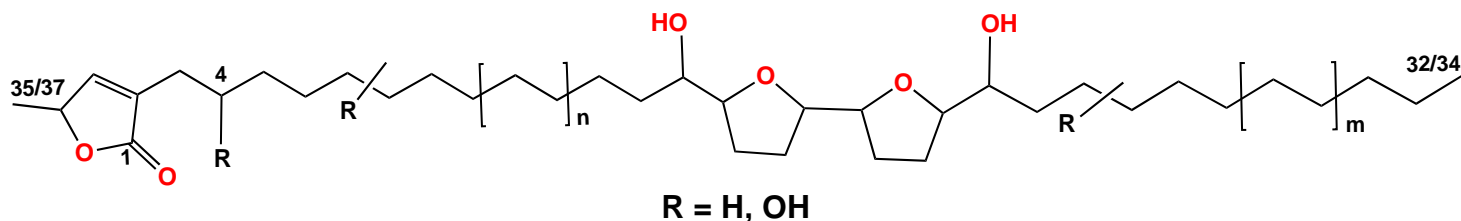
Grupo III: ACGs γ -lactona α -monohidroxiladas *mono*-THF



Acetogenina		n	m	Fórmula molecular	Referencia
glabranina (45)	(C ₂₃ = C ₂₄)	7	9	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	[78]
muricatetrocina-B (46)	(sin =)	7	7	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	[78]
gigantetronenina (47)	(C ₂₃ = C ₂₄)	5	11	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	[78]
gigantetrocina-A (48)	(sin =)	5	9	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	[78, 89]
gigantetrocina-B (49)	(sin =)	5	9	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	[89]

=: Doble enlace.

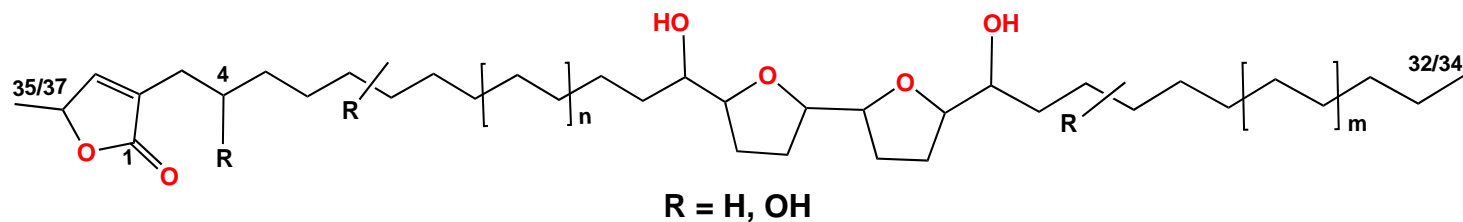
Grupo IV: ACGs γ -lactona α,α' -dihidroxiladas *bis*-THF adyacentes



Acetogenina	Posición del OH	Configuración relativa del THF ^a	Fórmula molecular	Referencia
molvizarina (50)	4, 13, 22	<i>th/ t/ th/ t/ er</i>	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	[90, 91]
parviflorina (51)	4, 13, 22	<i>th/ t/ th/ t/ th</i>	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	
rolliniastatina-2 (52) (o bullatacina)	4, 15, 24	<i>th/ t/ th/ t/ er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	[11, 92]
asimicina (53)	4, 15, 24	<i>th/ t/ th/ t/ th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	[90, 93]
9-hidroxi-folianina (54)	9, 12, 21	<i>th/ t/ th/ t/ er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	[23]
atemotetrolina (55)	15, 24, 28, 29	<i>th/ t/ th/ t/ er-th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	[94]
bullacina (56)	6, 13, 22	<i>nr</i>	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	[81]
folianina-A (57)	12, 21	<i>th/ t/ th/ t/ er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	
folianina-B (58)	12, 21	<i>th/ c/ th/ c/ th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	
4-desoxilongimicina-B (59)	11, 20	<i>th/ t/ th/ t/ th</i>	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	
esquamocina-L (60)	15, 24	<i>th/ t/ th/ t/ er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	
esquamocina-M (61)	15, 24	<i>th/ t/ th/ t/ th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	[23]
annonfolina (62)	9, 11, 26	<i>er/ t/ th/ t/ th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	
Isolongimicina-B (63)	4, 11, 20	<i>th/ t/ th/ c/ er</i>	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	
cornifolina (64)	7, 17, 26	<i>th/ t/ th/ t/ er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	
annotacina (65)	8, 13, 22	<i>th/ t/ th/ c/ er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	
10-hidroxi-asimicina (66)	4, 10, 15, 24	<i>th/ t/ th/ t/ th</i>	C ₃₇ H ₆₇ O ₈	[91]

a: *th*: Threo. *er*: erythro. *t*: trans. *c*: cis. *nr*: No reportada por los autores.

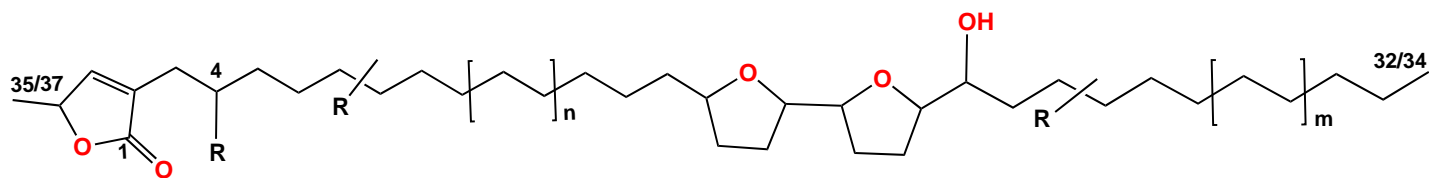
Continuación del Grupo IV: ACGs γ -lactona α,α' -dihidroxiladas *bis*-THF adyacentes



Acetogenina	Posición del OH	Configuración relativa del THF ^a	Fórmula molecular	Referencia
glaucanetina (67)	4, 13, 22	<i>th/t/th/t/th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	[91]
10-hidroxi-glaucanetina (68)	4, 10, 13, 22	<i>th/t/th/t/th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	[91]
araticulina (69)	4, 12, 15, 24	<i>th/t/th/t/th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	[39]
annoglauca (70)	4, 10, 15, 24	<i>th/t/th/t/er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	[91]
motrilina (71)	15, 24, 29	<i>th/t/th/t/er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	[90, 92]
uvarigrandina-A (72)	5, 15, 24	<i>th/t/th</i>	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	[88]

a: *th*: Threo. *er*: erythro. *t*: trans.

Grupo V: ACGs γ -lactona α -monohidroxiladas *bis*-THF adyacentes

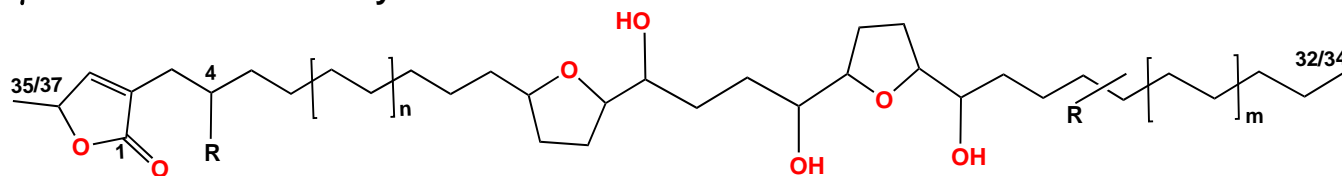


R = H, OH

Acetogenina	Posición del OH	Configuración relativa del THF ^a	Fórmula molecular	Referencia
bulladecina (73)	4, 20, 23, 24	<i>t/ th/ t/ th-er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	[94]
robustocina (74)	18	<i>t/ th/ c/ th</i>	C ₃₅ H ₆₂ O ₅	[95]

a: *th*: threo. *er*: erythro. *t*: trans. *c*: cis.

Grupo VI: ACGs γ -lactona *bis*-THF no adyacentes

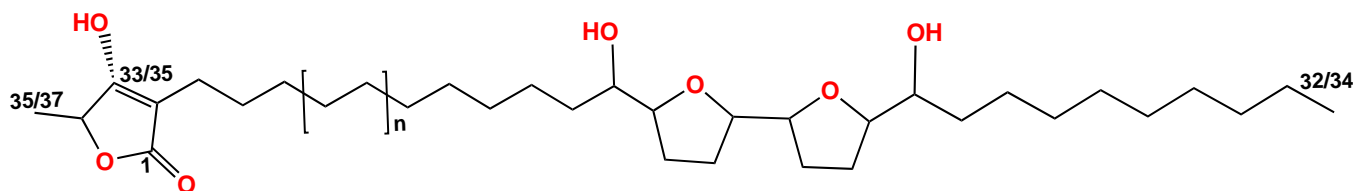


R = H u OH

Acetogenina	Posición del OH	Configuración relativa del THF ^a	Fórmula molecular	Referencia
cherimolina-1 (75)	4, 16, 19, 24	<i>t/ th-th/ t/ er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	[90, 96]
cherimolina-2 (76)	4, 16, 19, 24	<i>t/ th-th/ t/ th</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	[90, 96]
almunequina (77)	16, 19, 24, 28	<i>t/ th-th/ t/ er</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	[94]

a: *th*: Threo. *er*: erythro. *t*: trans.

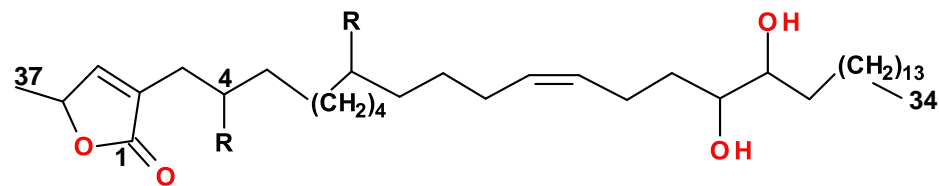
Grupo VII: ACGs β -hidroxi- γ -metil γ -lactona *bis*-THF adyacentes



Acetogenina	Posición del OH	Configuración relativa del THF ^a	Fórmula molecular	Referencia
laherradurina (78)	15, 24, 35	<i>th / t / th / t / er</i>	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	[10]
itrabina (79)	13, 22, 33	<i>th / t / th / t / er</i>	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	[78]

a: *th*: Threo. *er*: erythro. *t*: trans.



Grupo VIII: ACGs γ -lactona sin THF



Acetogenina	Posición del OH	Configuración relativa ^a	Fórmula molecular	Referencia
muricatenol (80)	(C ₁₄ = C ₁₅ , c)	4, 10, 18, 19	<i>th</i> (C ₁₈ -C ₁₉)	C ₃₇ H ₆₈ O ₆ [89]

a: *th*: Threo

Anexo 3. Bandas de absorción (BA) de IR para AGs y ACGs.

Modo vibracional	BA (cm ⁻¹)	Intensidad	Referencia
ν_{as} C-H(<i>sp</i> ³ CH ₃)	2962	-	
ν_s C-H(<i>sp</i> ³ CH ₃)	2872	-	
ν_{as} C-H(<i>sp</i> ³ CH ₂)	2926	-	
ν_s C-H(<i>sp</i> ³ CH ₂)	2853	-	
ν_s C-H(<i>sp</i> ³ CH)	2890	vw	[97, 65]
δ_s CH ₃	1375	m	
δ_{as} CH ₃	1450	m	
$\bar{\delta}_s$ CH ₂ (tijereo)	1465	m	
ρ CH ₂	720	-	
τ, ω CH ₂	1350-1150	w	
ν C-H(<i>sp</i> ³ C _n H _{2n+2})	3000-2840	-	
ν C=C	1680-1600	m-w	
ν C-H(<i>sp</i> ² CH, =C-H)	3100-3000	m	
δ_{oop} C-H(=C-H)	1000-650	s	
ν C=O(RCOOH)	1725-1700	s	
ν C-O(RCOOH)	1300-1000	m	[65]
ν OH(RCOOH)	3400-2400	m, vb	
ν C=O(RCOOR')	1750-1730	s	
C=O(C=COOR', en cjb con α, β C=C)	1740-1715	-	
C=C(C=COOR', en cjb con α, β C=C)	1640-1625	-	
ν C-O(RCOOR') 2 bandas	1300-1100	vs y vb	
ν C=O(γ -lactona saturada)	1795-1760	-	
ν C=O ()	1800	-	[97]
ν C=O ()	1750	-	

ν : Tensión. ν_{as} : Tensión (stretch) asimétrica. ν_s : Tensión simétrica. δ_s : Flexión (bending) simétrica. δ_{as} : Flexión asimétrica. $\bar{\delta}_s$: Tijereo (scissoring). ρ : Balanceo (rocking). T : Torsión (twisting). ω : Aleteo (waving). *oop*: Fuera del plano (out of plane). *s*: Fuerte (strong). *m*: Mediano (medium). *w*: Débil (Weak). *b*: Ancho (broad). *v*: Muy (Very). *cjb*: Conjugación.

Anexo 4. ACGs presentes en las semillas del género *Annona*.

Aislamiento (aspectos generales)	Método de caracterización	AGs y/o derivados	Origen y referencia
4.a A. atemoya Mabb.			
atemotetrolina (55) y bulladecina (73): EO, MeOH/ ELL, C ₆ H ₁₄ : H ₂ O/ Ext F _{MeOH-H₂O} , CH ₂ Cl ₂ / CF E _{SCH₂Cl₂} , C ₆ H ₅ -CH ₃ : AcOEt: EtOH/ CLAR, MeOH: H ₂ O	EM-BAR, EM- IQ, IR, RMN ¹ H y ¹³ C	atemotetrolina (55); bulladecina (73); cherimolina-2 (76); <i>almunequina</i> (77); etc.	Australia [94]
4.b A. cherimola Mill.			
EO, EtOH (95%)/ ELL ₁ , CH ₂ Cl ₂ : H ₂ O/ ELL ₂ F _{CH₂Cl₂} , H ₂ O (10 %) en MeOH y C ₆ H ₁₄ / CC ₁ F _{H₂O} (10 %) en MeOH, C ₆ H ₁₄ : CHCl ₃ : MeOH/ CC ₂ fra ₁₂ , C ₆ H ₁₄ : CHCl ₃ : MeOH/ CLAR, CH ₃ CN (85%) en H ₂ O	UV, EM-BAR, IR, RMN ¹ H	<i>cis</i> -annonacina; y mezcla de 2,4- <i>cis</i> -isoannonacina y 2, 4- <i>trans</i> - isoannonacina (43)	Korea [98]
4.c A. coriacea Mart.			
coriapentocina-A (24): EO, C ₆ H ₁₄ / ELL, MeOH: H ₂ O/ CC ₁ F _{MeOH} , CHCl ₃ : MeOH/ CC ₂ fra ₂₇₋₃₁ , C ₆ H ₁₄ : CHCl ₃ : AcOEt: MeOH/ Lv fra ₃₀ (ppt), con MeOH	EM-CL-IES, EM-IES-AR, IR, RMN ¹ H y ¹³ C	coriapentocina-A (24); coriapentocina-B (25); bullacina (56)	Brasil [81]
4.d A. cornifolia A. St.-Hil.			
9-hidroxi-folianina (54): EO, EtOH/ D, MeOH: H ₂ O/ Ext sucesivas, C ₆ H ₁₄ y CHCl ₃ / CC ₁ E _{C₆H₁₄} , C ₆ H ₁₄ : CH ₂ Cl ₂ : AcOEt: MeOH: H ₂ O/ CC ₂ grupo de Fs 6, CH ₂ Cl ₂ : AcOEt: MeOH/ CLAR- FR: MeCN: H ₂ O	EM-IES-C-TDV, IR-TF, RMN ¹ H y ¹³ C	rolliniastatina-2 (52); asimicina (53); 9-hidroxi-folianina (54); folianina-A (57); folianina-B (58), 4-desoxilongimicina-B (59); esquamocina-L (60); esquamocina-M (61); annonfolina (62); Isolongimicina-B (63); cornifolina (64); annotacina (65)	Brasil [23]

Leyenda al final de este Anexo 4.

Continuación Anexo 4. ACGs presentes en las semillas del género *Annona*.

Aislamiento (aspectos generales)	Método de caracterización	AGs y/o derivados	Origen y referencia
4.e <i>A. diversifolia</i> Saff.			
rolliniastatina-2 (52): EO, C ₆ H ₁₄ / CC ₁ ppt C ₆ H ₁₄ , C ₆ H ₁₄ : AcOEt y AcOEt: MeOH/ CC ₂ fra S5, C ₆ H ₁₄ : AcOEt y AcOEt: MeOH/ ReCr _{ppt} S53, AcOEt	no descrito EM-IQ, IR, RMN ¹ H y ¹³ C [11]	rolliniastatina-2 (52) cherimolina-2 (76); laherradurina (78)	México [10] México, (76) [11] (78) [9, 11]
4.f <i>A. glabra</i> L.			
ACGs se aislaron de ppt _(a) y E-CH ₂ Cl ₂ (c): EO, Pet/ CC _{ppt (a)} , CH ₂ Cl ₂ : AcOEt: MeOH/ CLAR-FR-smpr. EO, EtOH de SD/ ELL, CH ₂ Cl ₂ : H ₂ O/ CC _{E-CH₂Cl₂ (b)} , CH ₂ Cl ₂ : AcOEt: Me ₂ CO/ CLAR- FR-smpr.	CLAR, CLAR, EM-IE BAR, EM-IE, RMN de ¹ H y ¹³ C	annonacina (23); annonacinona (26); corossolina (29); corossolona (30); glabranina (45); muricatetrocina-B (46); gigantetronenina (47); gigantetrocina-A (48); molvizarina (50); parviflorina (51); laherradurina (78); itrabina (79)	Colombia [78]
4.g <i>A. glauca</i> Schum. & Thonn.			
molvizarina (50); parviflorina (51); glaucanetina (67): EO, MeOH/ D, H ₂ O/ ELL, C ₆ H ₁₄ / Ext F _{H₂O} - MeOH, CH ₂ Cl ₂ / CF _{E-CH₂Cl₂} / CC _{fra} , CH ₂ Cl ₂ : AcOEt: MeOH/ CLAR	UV, EM-IQ, EM-IE, IR, RMN de ¹ H y ¹³ C	molvizarina (50); parviflorina (51); 10-hidroxi-asimicina (66); glaucanetina (67); 10-hidroxi-glaucanetina (68); annoglauca (70)	Senegal [91]

Leyenda al final de este Anexo 4.

Continuación Anexo 4. ACGs presentes en las semillas del género *Annona*.

Aislamiento (aspectos generales)	Método de caracterización	AGs y/o derivados	Origen y referencia
4.h <i>A. muricata</i> L.			
	UV, EM-ISL, IR, RMN de ¹ H y ¹³ C	15-palmitoilsolamina (34); 15-oleilsolamina (35)	Brasil [86]
	UV, EM-IQ-AR, EM-IE, EM-IQ, IR, RMN de ¹ H y ¹³ C	robustocina (74)	Brasil [95]
15-palmitoilsolamina (34), 15-oleilsolamina (35): EO, MeOH/ ELL, C ₆ H ₁₄ : H ₂ O/ CC ₁ E-C ₆ H ₁₄ C ₆ H ₁₄ : AcOEt/CE fra 8 CH ₂ Cl ₂ : MeOH/ CC ₂ , C ₆ H ₁₄ : CH ₂ Cl ₂ : iPrOH y CE/ CLAR-FR-Smpr	RMN de ¹ H y ¹³ C	annoreticulín-9-ona (26)	Filipinas [82]
	EM-IE-AR, EM- BAR-Ar, IR, RMN de ¹ H y ¹³ C	2,4- <i>cis</i> -gigantetrocinona (41); 2,4- <i>trans</i> -gigantetrocinona (42); 2,4- <i>trans</i> -isoannonacina (43); 2,4- <i>trans</i> -isoannonacín-10- ona (44); gigantetronenina (47); gigantetrocinona-A (48); gigantetrocinona-B (49); muricatenol (80)	China [89]
4.i <i>A. squamosa</i> L.			
Excepto (28): EO, EtOH (95%) del E- Pet/ S, H ₂ O y ELL, CHCl ₃ : <i>n</i> -BuOH/ CC _E -CHCl ₃ y <i>n</i> -BuOH, Pet: AcOEt y AcOEt: MeOH	EM-ESI, RMN de ¹ H y ¹³ C	murisolina-B (28); bullatacina (52); motrilina (67); uvarigrandina-A (72); esquamocina; esquamina A	China [45]

EO: Extracto original. Ext: Extracción. E: Extracto. SD: Semilla desengrasada. Es: Extracto soluble. D: Disolución. S: Suspensión. ELL: Extracción líquido-líquido. F: Fase. Fs: fracciones. CC: Cromatografía en columna. C: Cromatografía. Pr: Preparativa. CF: Cromatografía flash. CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución. FR: Fase reversa. Smpr: Semipreparativa. fra: Fracción. Lv: Lavado. Rec: Recristalización. Cr: Cristalización. Recr: Recristalización. ΔT°: Cambio de temperatura. OM: Otro método. Pet: Petróleo. EPet: Éter de petróleo. *t*: *trans*. *c*: *cis*. ppt: Precipitado. =: Enlace doble.