



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA

**EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE
EXTRACTOS RICOS EN CICLOPÉPTIDOS OBTENIDOS
DE *Annona diversifolia***

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

ULISES MURRIETA DIONICIO



APROBADA



Bajo supervisión de: DR. BENITO REYES TREJO



Chapingo, Estado de México, septiembre de 2020.

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS RICOS
EN CICLOPÉPTIDOS OBTENIDOS DE *Annona diversifolia*

Tesis realizada por **ULISES MURRIETA DIONICIO** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS



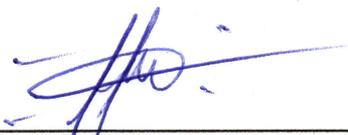
DIRECTOR:

DR. BENITO REYES TREJO



ASESOR:

DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ



ASESOR:

DR. HOLBER ZULETA PRADA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE APÉNDICES	x
ABREVIATURAS USADAS	xii
AGRADECIMIENTOS.....	xiii
DEDICATORIAS	xiv
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xvi
RESUMEN GENERAL.....	xvii
GENERAL ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Annonaceae.....	3
2.2 <i>Annona diversifolia</i>	5
2.3 Composición proximal de fruto y semilla de <i>Annona diversifolia</i>	6
2.4 Ciclopéptidos	6
2.5 Fuentes de ciclopéptidos	7
2.6 Clasificación de los Ciclopéptidos en Plantas.....	11
2.7 Ciclopéptidos en <i>Annonaceae</i>	12
2.8 Radicales libres	15
2.9 Antioxidantes definición	16
2.10 Clasificación de los Antioxidantes.....	16
2.11 Antioxidantes sintéticos	18

2.12	Mecanismos de acción de los antioxidantes.....	19
2.13	Métodos para la detección de actividad antioxidante	20
2.14	Métodos de eliminación de radicales/ERO	20
2.15	Ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC)	20
2.16	Métodos basados en el potencial redox.....	22
2.17	Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)	22
2.18	Literatura citada	24
3.	EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS RICOS EN CICLOPÉPTIDOS OBTENIDOS DE <i>Annona diversifolia</i>	34
3.1	Introducción	34
3.2	Materiales y Métodos.....	36
3.2.1	Material Vegetal	36
3.2.2	Caracterización morfológica de las semillas	36
3.2.3	Obtención de extractos	36
3.2.4	Detección de ciclopéptidos por cromatografía	37
3.2.5	Evaluación de la capacidad antioxidante	38
3.2.6	Contenido de Fenoles Totales	39
3.2.7	Contenido de Flavonoides.....	39
3.2.8	Contenido de Proteínas Totales.....	40
3.2.9	Separación de extractos por Cromatografía en Columna (CC).....	40
3.2.10	Análisis espectroscópico por RMN.....	41
3.2.11	Análisis estadístico.....	41
3.3	Resultados y discusión	41

3.3.1	Caracterización morfológica de las semillas	41
3.3.2	Obtención de extractos	43
3.3.3	Detección de ciclopéptidos por cromatografía	43
3.3.4	Evaluación de la capacidad antioxidante	46
3.3.5	Contenido de Fenoles Totales	49
3.3.6	Contenido de Flavonoides.....	50
3.3.7	Contenido de Proteínas Totales.....	52
3.3.8	Correlación de fenoles y flavonoides totales con capacidad antioxidante.....	53
3.3.9	Evaluación de la capacidad antioxidante de FA.....	56
3.3.10	Análisis espectroscópico por RMN.....	58
3.4	Conclusiones	67
3.5	Literatura citada	68
4.	APÉNDICES.....	77

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies del género <i>Annona</i> y su distribución en México.....	4
Cuadro 2. Ciclopéptidos aislados del género <i>Annona</i>	13
Cuadro 3. Principales ensayos de eliminación de radicales y ERO.....	21
Cuadro 4. Principales ensayos de potencial redox.	23
Cuadro 5. Caracterización morfológica semillas de <i>A. diversifolia</i>	42
Cuadro 6. Rendimientos de extractos de semillas de <i>A. diversifolia</i> obtenido con diferentes disolventes.	43
Cuadro 7. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos ricos en ciclopéptidos de <i>A. diversifolia</i> mediante los ensayos ABTS y FRAP.....	49
Cuadro 8. Resultados de diferentes ensayos en extractos de semillas de <i>A. diversifolia</i>	50
Cuadro 9. Coeficientes de Correlación de Pearson (R) de diferentes parámetros y la capacidad antioxidante de extractos de <i>A. diversifolia</i>	54
Cuadro 10. Evaluación de la capacidad antioxidante de las FA del extracto Metanol.	57
Cuadro 11. Evaluación de la capacidad antioxidante de las FA del extracto Etanol.....	57
Cuadro 12. Evaluación de la capacidad antioxidante de las FA del extracto Etanol/H ₂ O/AcOH.	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Facalostatina 13 ciclopéptido aislado de <i>Phakellia fusca</i> (esponja marina) (Li et al., 2003).....	8
Figura 2. Ciclopurpuracina aislada de <i>A. purpurea</i> (González-Tepale et al., 2018).....	9
Figura 3. Verrucamida A, aislada de <i>Myrothecium verrucaria</i> (Zou et al., 2011).	10
Figura 4. Termoactinoamida A, ciclopéptido aislado de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> (Teta et al., 2017).	11
Figura 5. Clasificación de los ciclopéptidos en plantas (Tan y Zhou, 2006).....	12
Figura 6. Reacciones que conducen a la formación de ERO. Tomado de Carochó & Ferreira, (2013).....	15
Figura 7. Clasificación de los antioxidantes separados en diferentes clases. Las palabras en rojo representan antioxidantes de origen endógeno. Adaptado de Carochó & Ferreira, (2013) y Shahidi & Ambigaipalan, (2015).	17
Figura 8. Decoloración del catión radical ABTS en presencia de un antioxidante. Tomado de Huang et al., (2005).	21
Figura 9. Representación de la reducción del complejo Fe ³⁺ a Fe ²⁺ . Tomado de Huang et al., (2005).	23
Figura 10. Semillas de <i>A. diversifolia</i>	42
Figura 11. Cromatofolios de extractos de <i>A. diversifolia</i> revelados con ninhidrina para la detección de péptidos: 1) Extracto hexánico, 2) Extracto de CH ₂ Cl ₂ , 3) Extracto de AcOEt, 4) Extracto de acetona, 5) Extracto de metanol, 6) Extracto de etanol, 7) Extracto de EtOH/H ₂ O/AcOH, 8) Valina.	44
Figura 12. Cromatofolios de extractos de <i>A. diversifolia</i> revelados con Cl ₂ /o-tolidina para la detección de ciclopéptidos: 1) Extracto hexánico, 2) Extracto de	

CH ₂ Cl ₂ , 3) Extracto de AcOEt, 4) Extracto de acetona, 5) Extracto de metanol, 6) Extracto de etanol, 7) Extracto de EtOH/H ₂ O/AcOH, 8) 2,5-piperazindiona. 45	
Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN- ¹ H, 400 MHz, acetona-d ₆ -D ₂ O 10 %, TMS) de la FA 6-8, extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i>	59
Figura 14. Representación general de un péptido.	59
Figura 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN- ¹³ C, 400 MHz, acetona-d ₆ -D ₂ O 10 %, TMS) de la FA 6-8, extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i>	60
Figura 16. Espectro APT de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN- ¹³ C, 400 MHz, acetona-d ₆ -D ₂ O 10 %, TMS) de la FA 6-8, extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i>	61
Figura 17. Expansión de 45 a 105 ppm del espectro APT de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN- ¹³ C, 400 MHz, acetona-d ₆ -D ₂ O 10 %, TMS) de la FA 6-8, extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i>	61
Figura 18. Estructuras parciales A y B, que conducen a la identificación de disacáridos como la sacarosa por la presencia de señales en 104 y 92 ppm en el espectro APT de la fracción FA 6-8.	62
Figura 19. Expansión de 0.5 a 5.5 ppm en RMN- ¹ H (F2) y de 10 a 100 ppm en RMN- ¹³ C (F1) del espectro HSQC (en acetona-d ₆ -D ₂ O 10 %) de la Sacarosa, extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i>	63
Figura 20. Expansión de 5.1 a 5.6 ppm en RMN- ¹ H (F2) y de 80 a 110 ppm en RMN- ¹³ C (F1) del espectro HSQC (en acetona-d ₆ -D ₂ O 10 %) de la α-D-glucosa enlazada a la D-fructosa, extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i>	63
Figura 21. Expansión de 3.3 a 4.3 ppm en RMN- ¹ H (F2) y de 68 a 85 ppm en RMN- ¹³ C (F1) del espectro HSQC (en acetona-d ₆ -D ₂ O 10 %) de la sacarosa, extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i>	64

Figura 22. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C . 100 MHz, D_2O , TMS) de la sacarosa.....	64
Figura 23. Estructura de la sacarosa como componente mayoritario encontrado en la fracción FA 6-8 del extracto etanólico de semillas de <i>A. diversifolia</i>	65
Figura 24. Expansión de 0.5 a 5.5 ppm en RMN- ^1H (F2) y de 10 a 100 ppm en RMN- ^{13}C (F1) del espectro HSQC (en acetona- d_6 - D_2O 10 %) de la FA 6-8, extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i>	66

LISTA DE APÉNDICES

Figura A 1. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto Metanol de <i>A. diversifolia</i> revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	77
Figura A 2. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto Metanol de <i>A. diversifolia</i> revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	77
Figura A 3. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto Etanol de <i>A. diversifolia</i> revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.	78
Figura A 4. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto Etanol de <i>A. diversifolia</i> revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	78
Figura A 5. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto EtOH/H ₂ O/AcOH de <i>A. diversifolia</i> revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	79
Figura A 6. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto EtOH/H ₂ O/AcOH de <i>A. diversifolia</i> revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	79
Figura A 7. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto Metanol de <i>A. diversifolia</i> revelados con Cl ₂ /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	80
Figura A 8. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto Metanol de <i>A. diversifolia</i> revelados con Cl ₂ /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	80

Figura A 9. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto Etanol de <i>A. diversifolia</i> revelados con Cl ₂ /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	81
Figura A 10. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto Etanol de <i>A. diversifolia</i> revelados con Cl ₂ /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	81
Figura A 11. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto EtOH/H ₂ O/AcOH de <i>A. diversifolia</i> revelados con Cl ₂ /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	82
Figura A 12.. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto EtOH/H ₂ O/AcOH de <i>A. diversifolia</i> revelados con Cl ₂ /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.....	82
Cuadro A 1. Fracciones obtenidas de la separación por CC del extracto Metanol.....	83
Cuadro A 2. Fracciones obtenidas de la separación por CC del extracto Etanol.	83
Cuadro A 3. Cuadro A3. Fracciones obtenidas de la separación por CC del extracto Etanol/H ₂ O/AcOH.....	84

ABREVIATURAS USADAS

ABST: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

APT: Prueba de protones adjuntos

BSA: Albúmina de suero bovino

CA: Capacidad antioxidante

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EQ: Equivalentes de quercetina

ET: Equivalentes de Trolox

FA: Fracciones activas

FRAP: Poder antioxidante reductor férrico

HSQC: Correlación heteronuclear de un único cuanto

RMN: Resonancia magnética nuclear

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi alma mater, por darme la oportunidad de realizar mi maestría en esta misma casa de estudios.

Al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por formar parte de la 17^a generación de maestría y los conocimientos adquiridos.

Al Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola, por todas las facilidades otorgadas y la confianza para el uso de materiales y equipos.

Al Dr. Benito Reyes Trejo, por la dirección y asesoría en este proyecto, por todas las facilidades otorgadas y la confianza de trabajar con usted.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez, por su apoyo desde la Licenciatura y recomendación para la realización de este proyecto. Así mismo, por toda su asesoría y atenciones durante mi fase de laboratorio. Porque siempre tuvo un momento para resolver una duda.

Al Dr. Holber Zuleta Prada, por todas las atenciones que surgieron en este proyecto, por sus valiosas recomendaciones en el laboratorio y por las anécdotas que siempre tenía para compartir.

A la M.C. Guillermina Hernández Rodríguez, por su valiosa asesoría y capacitación en los ensayos de actividad antioxidante. Gracias por cada duda resuelta, tiempo, y paciencia que tuvo conmigo.

A la M.C. Magali Anabel Cañarejo Antamba, por su valiosa asesoría en los demás ensayos. Gracias por cada minuto, que incluso detuvo sus propios experimentos con tal de ayudarme y resolver mis dudas. Gracias por sus importantes recomendaciones y los consejos que compartió conmigo. Eternamente agradecido.

DEDICATORIAS

A mis padres por todo el cariño y los consejos brindados. Gracias por creer en mí y apoyarme en otra meta más.

A Lulú Cruz Zambrano por todo su apoyo cuando lo necesite, por todos los consejos que compartimos, por los buenos y malos momentos que nos tocó vivir en los últimos dos años. Y por traer a este mundo a mi sobrina favorita.

Al Dr. Vicente López Bautista y su familia por todas las atenciones y apoyo brindado. Eternamente agradecido por todo lo que hicieron por mí.

A la Sra. Imelda Blanco Espino, por el cariño y porque siempre alentó mis ánimos con sus pláticas amenas. Gracias por cada postre y afecto que tuvo conmigo. Siempre la recordaré. Etermanente en deuda con usted. Que la vida, la bendiga mucho.

A mis amigos de la Preparatoria Agrícola Generación 2016-2019 que conocí antes de iniciar mi proyecto de maestría, y que solicitaron amablemente se colocarán sus nombres: Charly Toledo Alegría, Josué Ariel Salvador Domingo, Josué Tomás Zárate Hernández, Luis Rivera Benítez, Raúl Paniagua Cabrera, Rouse Rebollar Garay, Javier García Barrios, y Yael López Nieto. Gracias por su amistad, y los buenos momentos de los que me hicieron partícipe. A todos les deseo lo mejor en sus carreras que apenas comienzan. Con menciones especiales:

A Josué Ariel, agradezco todo el apoyo y la confianza que tuviste conmigo. Te deseo el mejor de los éxitos.

A Nayeli Martínez Rojas, una gran amiga. Agradecido por tu fiel compañía. La vida me quitó lo que no necesitaba y al mismo tiempo me recompensó con tu amistad.

A Rousse, una maravillosa, única, y encantadora persona. Agradezco a la vida por haberte conocido. Gracias por escucharme cuando lo necesité. Eres alegría e inspiración.

A Yael, una persona culta y con firmes convicciones. Lo que comenzó como una broma tuya, se hizo verdad. Éxito en lo que te propongas.

A Anthony, compañero de la maestría. Mi buen amigo, compartimos mucho en tan poco tiempo, deseo que nuestros sueños y objetivos nos reúnan nuevamente en el futuro.

A los compañeros del Laboratorio de Productos Naturales: Néstor, Karla, Anselmo, Paola, y Adela con quienes compartí horas de trabajo.

A Estela Méndez Sainos, deseo que vuelvas a ser la “matada” que alguna vez conocí. Éxito en tu nueva etapa. Mi admiración eterna.

A Grupo Innovación Universitaria por permitirme ser asesor de quien en su momento necesitó ayuda.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre:	Ulises Murrieta Dionicio
Fecha de nacimiento:	09 de diciembre de 1993
Lugar de nacimiento:	Jalacingo, Veracruz
No. Cartilla militar:	D-3927602
CURP:	MUDU931209HVZRNL03
Profesión:	Ingeniero Agroindustrial
Cedula profesional:	11225672

Desarrollo académico

Bachillerato:	Preparatoria Agrícola- UACH
Licenciatura:	Ingeniería Agroindustrial

RESUMEN GENERAL

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS RICOS EN CICLOPÉPTIDOS OBTENIDOS DE *Annona diversifolia*

De la familia Annonaceae han sido aislados ciclopéptidos, mismos que poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, anticancerígenas, antivirales entre otros. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de ciclopéptidos en fracciones activas (FA) obtenidas de semillas de *Annona diversifolia* y evaluar la capacidad antioxidante (CA) de las fracciones enriquecidas en ciclopéptidos. Primero, se obtuvieron extractos mediante maceración utilizando disolventes de polaridad creciente. Posteriormente, los extractos se sometieron a una prueba química para la detección de ciclopéptidos mediante cromatografía en capa delgada usando como revelador Cl_2/o -tolidina. Los extractos que mostraron una respuesta positiva se les evaluó su capacidad antioxidante mediante los ensayos FRAP y ABTS, se determinó también su contenido de fenoles totales, flavonoides, y proteínas totales. Consecutivamente dichos extractos se sometieron a separación por cromatografía en columna. Las fracciones obtenidas se monitorearon con la misma prueba química para ciclopéptidos. Las fracciones con respuesta positiva se les evaluó su CA con los ensayos ya mencionados. Finalmente, las fracciones fueron analizadas por estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para determinar la presencia de ciclopéptidos. El extracto de metanol mostró la mayor CA, que presentó los valores de $201.88 \pm 4.93 \mu\text{mol ET g}^{-1}$, y $96.56 \pm 0.72 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ para ABTS y FRAP respectivamente. Se encontró una correlación positiva entre la CA de los extractos analizados con el contenido de fenoles totales. Por otra parte, los valores más altos de CA en las fracciones analizadas fueron superiores a la CA del extracto crudo de etanol. La FA, F6-8 del extracto etanólico mostró en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , desplazamientos químicos asociados a grupos carbonilo y amida presentes en péptidos y/o ciclopéptidos. Las fracciones de *A. diversifolia* enriquecidas en ciclopéptidos mostraron un alta CA en comparación a extractos de otras especies del género *Annona*.

Palabras clave: *Annona diversifolia*, capacidad antioxidante, ciclopéptidos, RMN.

GENERAL ABSTRACT

EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF EXTRACTS RICH IN CYCLOPEPTIDES OBTAINED FROM *Annona diversifolia*

Cyclopeptides from Annonaceae family which have several properties such as antimicrobial, antifungal, anticancer, and antiviral, among others have been isolated. The objective of this work was to determine the presence of cyclopeptides in active fractions (AF) obtained from *Annona diversifolia* seeds and to evaluate the antioxidant capacity (AC) of fractions enriched in cyclopeptides. First, extracts were obtained by maceration using solvents of increasing polarity. Subsequently, the extracts underwent a chemical test for the detection of cyclopeptides by thin-layer chromatography using Cl_2/o -tolidine as a developer. Extracts that developed a positive response were evaluated for their antioxidant capacity through FRAP and ABTS assays, and their content of total phenols, flavonoids, and total proteins was also determined. Consecutively these extracts underwent a separation by column chromatography. The fractions obtained were monitored with the same chemical test for cyclopeptides. AC was evaluated in the positive response fractions with the before mentioned tests. Finally, fractions were analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) studies to confirm the presence of cyclopeptides. The methanol extract showed the highest AC, which presented the values of $201.88 \pm 4.93 \mu\text{mol ET g}^{-1}$, and $96.56 \pm 0.72 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ for ABTS and FRAP, respectively. A positive correlation was found between the AC of the analyzed extracts with the total phenol content. On the other hand, the highest AC values in the analyzed fractions were higher than the AC of the crude ethanol extract. The AF, F6-8 from the ethanolic extract showed in its ^1H and ^{13}C NMR spectra, chemical displacements associated with carbonyl group of amide groups present in peptides and/or cyclopeptides. *A. diversifolia* fractions enriched in cyclopeptides showed high AC compared to extracts from other species of the genus *Annona*.

Keywords: *Annona diversifolia*, antioxidant capacity, cyclopeptides, NMR.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los metabolitos secundarios obtenidos de fuentes naturales como hongos, bacterias, animales marinos y plantas han sido aprovechados desde tiempos antiguos como medicamentos. En la actualidad, muchos de estos compuestos constituyen plataformas orientadas al diseño de fármacos (Oueis et al., 2017). Las actividades biológicas que presentan estos compuestos han producido múltiples estudios y ensayos. Sin embargo, se conoce menos del 10 % de la biodiversidad mundial y muchos metabolitos esperan ser descubiertos teniendo como desafíos importantes el acceder a esa diversidad química natural (Cragg y Newman, 2005). Los ciclopéptidos son metabolitos secundarios que se definen como cadenas peptídicas formadas por enlaces amida en una secuencia circular entre aminoácidos de carácter proteico o no proteico (Abdalla y McGaw, 2018). El carácter cíclico de estos compuestos les confiere una mayor resistencia a la hidrólisis por exopeptidasas esto debido a la falta de grupos terminales amino y carboxilo. Así mismo presentan resistencia a endopeptidasas por su estructura rígida y menos flexible que su contraparte lineal (Joo, 2012). Los ciclopéptidos aislados de fuentes naturales han destacado recientemente por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antivirales y otras más (Abdalla y McGaw, 2018). Por tanto, la mayoría de los ciclopéptidos obtenidos de extractos naturales se han encaminado a aplicaciones en la industria farmacéutica y agrícola como parte de los ingredientes activos en la formulación de sus productos (Blanco, 2019). Dentro del reino vegetal destacan familias como la de las anonáceas como fuentes importantes para la obtención de estos compuestos biológicos. Recientemente se aisló un nuevo ciclopéptido a partir del bagazo de las semillas de *Annona purpurea* una especie nativa de México (González-Tepale et al., 2018). Así mismo otra especie originaria que carece de estudios de

aislamiento de ciclopéptidos como un aprovechamiento de sus semillas es *Annona diversifolia*. En México la explotación de semillas de *Annona diversifolia* es prácticamente nula, catalogándose como un producto de desecho de la porción comestible del fruto. Evidencias documentadas indican la posibilidad de obtener metabolitos secundarios importantes a partir de extractos de semillas de la familia de las anonáceas. Por lo tanto, es probable conseguir fracciones enriquecidas en ciclopéptidos con alguna propiedad de interés biológico. El propósito de este trabajo fue obtener fracciones enriquecidas en ciclopéptidos utilizando disolventes de diferente polaridad, técnicas cromatográficas y detección por RMN para evaluar su potencial capacidad antioxidante.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Annonaceae

La familia Annonaceae comprende 2 440 especies (Rainer & Chatrou, 2020), 15 tribus y 106 géneros (Chatrou et al., 2018). De esta familia se reconocen cuatro subfamilias: Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonide y Malmeoideae siendo estas dos últimas donde se localizan la mayoría de las especies (Chatrou et al., 2012). Las Anonáceas tienen una distribución pantropical y son un importante elemento ecológico de las regiones tropicales (Couvreur et al., 2011). En México, de acuerdo con diagnósticos del año 2010, la familia Annonaceae está representada por 14 géneros y 63 especies, entre las que destacan por su importancia económica: *Annona muricata* L. (guanábana), *Annona cherimola* Mill. (chirimolla), *Annona squamosa* L. (saramuyo), *Annona diversifolia* (ilama o papausa), *Annona reticulata* L. (anona colorada o amarilla) y *Annona purpurea* L. (chincuya o cabeza de negro) (Andrés-Agustín y Andrés-Hernández, 2011). En el caso de las anonáceas mexicanas existen alrededor de 14 especies propias de Mesoamérica y en especial de nuestro país, por ejemplo, *Annona purpurea* es exclusiva de México y Centroamérica (Agustín et al., 2011). Las especies del género *Annona* se distribuyen principalmente en los estados del centro, Golfo de México y Pacífico. Las regiones como la Huasteca y la Península de Yucatán concentran el mayor número de especies de este género (Hernández-Fuentes et al., 2016). De la familia de las Anonáceas únicamente cuatro géneros *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina* generan frutos comestibles (Chatrou et al 1999). Siendo *Annona* L. el género con mayor número de especies con 15 además de contemplar una cruce entre *A. cherimola* y *A. squamosa*. La distribución en México de estas especies se enlistan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Especies del género *Annona* y su distribución en México

Género	Especies	Distribución (Estados)
<i>Annona</i>	<i>A. Globiflora</i>	Ver., Hgo., Chis., Tamps., Gto.
	<i>A. Testudínea</i>	Chis.
	<i>A. Cherimola</i>	Ver., Mich., Chis., Oax., Mor., Pue., Qro Jal., Gto., Méx.
	<i>A. Longiflora</i>	Jal., Ver.
	<i>A. macrophyllata</i>	Ver., Camp.
	<i>A. Primigenia</i>	Camp., Q. Roo., Yuc.
	<i>A. Reticulata</i>	Yuc., Jal., Mich., Pue., Q. Roo., Nay., Tab.
	<i>A. Glabra</i>	Ver., Q. Roo., Yuc., Camp., Tab., Jal., Oax., Nay., Gro.
	<i>A. Pupurea</i>	Ver., Mich., Chis., Yuc., Jal.
	<i>A. diversifolia</i>	Mich., Gro., Yuc., Ver., Méx.
	<i>A. Lutescens</i>	Pue.
	<i>A. Longipes</i>	Ver.
	<i>A. scleroderma</i>	Chis,
	<i>A. muricata</i>	Ver., Chis., Tab., Yuc., Col., Gro., Q Roo., Nay., Mich.
<i>A. Squamosa</i>	Yuc., Mich., Q. Roo., Camp., Ver., Oax., Jal., Nay.	

Fuente: Andrés-Agustín y Segura-Ledesma (2014).

A pesar de poseer una variada diversidad de especies en México, solamente: *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. squamosa*, *A. reticulata*. *A. purpurea* y *A. divesifolia* son de carácter comercial en mercados locales o regionales. Y únicamente las primeras tres se cultivan para propósitos comerciales; *A. cherimola* (en Estado de México, Guanajuato, Michoacán, Puebla y Morelos), *A. squamosa* (en la Península de Yucatán), y *A. muricata* (Veracruz, Tabasco, y Pacífico) (Hernández-Fuentes et al., 2016). Por otro lado, plantas de la familia de las Annonaceas son conocidas por ser fuentes de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, farmacológicas y con alto potencial insecticida contra las plagas de insectos y vectores. Además, se han identificado compuestos como: las acetogeninas, algunos terpenoides y alcaloides derivados de isoquinolinas, éstas últimas de elevada toxicidad a dosis bajas. Estas propiedades, han despertado el interés en investigaciones para producir nuevas moléculas con ese potencial (Costa et al., 2017; Soares et al., 2015).

2.2 *Annona diversifolia*

Las plantas de la familia anonácea son consideradas como cultivos económicamente importantes en muchas regiones del planeta (Liaw et al., 2008). *Annona diversifolia* Saff., es un árbol conocido como ilama, ilama zapote, ilamazapotl (náhuatl), izlama, hilama, papausa, papauce y zapote de vieja (Ruiz y Morett, 1997). *A. diversifolia* aporta un fruto nativo del sureste de México, Guatemala y Salvador y es considerada una de las más importantes frutas subtropicales localizadas en lugares de clima cálido. En cuanto a sus características, el árbol puede alcanzar hasta los 8.5 m de altura. El tronco generalmente mide alrededor de 25 cm de espesor, a menudo forma ramificaciones desde el suelo hasta formar 3 a 6 tallos principales. Actualmente, la producción de *A. diversifolia*, se obtiene naturalmente sin ningún tipo de manejo agronómico, se limita a huertos familiares con plantas cultivadas de semillas que son, por lo tanto, genéticamente heterogéneas. La producción de frutos empieza entre los 3 y 5 años con un promedio de 26 frutas/árbol/año (Estrada y Marroquín-Andrade, 1994; Moreno-Velázquez et al., 2008), cada fruto tiene un rendimiento de 40 semillas (Calderón y Stanley, 1994). A partir de la información etnobotánica se estima que los árboles producen frutos por más de 60 años. El fruto tiene forma ovalada y los especímenes más grandes tienen un peso entre 500 y 900 g (Julián-Loeza et al., 2011). Este árbol frutal, que se aprecia muy bien en su lugar de origen, ha sido plantado casi exclusivamente por comunidades indígenas. En particular el fruto de *A. diversifolia* mide aproximadamente 12 cm de largo y su pulpa dulce es de color blanco, rosa o rojizo con un típico aroma. Su sabor, según la mayoría de las personas, es más agradable que el de la chirimoya (*Annona cherimola*). Las hojas de esta planta son utilizadas por los pueblos indígenas por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Ruiz y Morett, 1997). En un trabajo anterior, también fue demostrado que una sustancia conocida como palmitona, aislada del extracto alcohólico de las hojas de *A. diversifolia*, resultó con actividad anticonvulsivante

y depresora del sistema nervioso central (González-Trujano et al., 2006). Además, las acetogeninas, conocidas como laherradurina y cherimolina-2, se aislaron de las semillas de *A. diversifolia*, mismas que mostraron actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* en células HeLa y SW-480 (Schlie-Guzmán et al., 2009).

2.3 Composición proximal de fruto y semilla de *Annona diversifolia*

A. diversifolia es una fuente importante de fibra, azúcares, potasio, zinc y componentes biológicamente activos con actividad antioxidante, como los flavonoides (Julián-Loeza et al., 2011). El análisis bromatológico de las semillas de *A. diversifolia* mostró que contiene 15.4 % de proteína cruda, 25.03 % de carbohidratos, 27.43 % de aceite, 2.18 % de cenizas y 62.58 % de fibra cruda (Marroquín-Andrade et al., 2011). Finalmente, el aprovechamiento del aceite no-comestible obtenido de las semillas de *A. diversifolia*, condujo a la obtención de un biodiesel amigable con el medio ambiente (Reyes-Trejo et al., 2014).

2.4 Ciclopéptidos

Una clase particular de péptidos son los llamados ciclopéptidos, compuestos cíclicos formados principalmente de L-aminoácidos, aunque también pueden contener D y L-aminoácidos no proteicos (Tan y Zhou, 2006). Este tipo de péptidos, presentan diversas actividades biológicas como: antimicrobiana, antifúngica, antibacteriana, antitumoral, anti-VIH, sedante, inmunosupresoras, entre otras (Shinde et al., 2013). Por otra parte, su estructura cíclica resulta atractiva por que tiene una mayor estabilidad *in vivo* y resistencia a la degradación enzimática con respecto a los péptidos lineales o proteínas (Shinde et al., 2013). La estructura de un ciclopéptido reduce la libertad de conformación con respecto a una secuencia lineal y permite que las cadenas laterales tengan una orientación bien definida (Gentilucci et al., 2016). Por estas razones, los ciclopéptidos han surgido como bloques de construcción útiles para

el diseño de nuevos fármacos a partir de diferentes fuentes (Craik et al., 2013; Jiang et al., 2008; Pomilio et al., 2006; Tan y Zhou, 2006).

2.5 Fuentes de ciclopéptidos

Los ciclopéptidos o péptidos cíclicos de origen natural, pueden generarse de distintas fuentes como: animal, vegetal, bacteriano o fúngico (Craik y Allewell, 2012).

El primer ciclopéptido descubierto en animales fue un octadecapéptido que se expresa en leucocitos de macacos Rhesus (Selsted, 2004). Los animales de las profundidades del mar (como las esponjas marinas) también producen ciclopéptidos con ácidos carboxílicos ópticamente activos como el aminoalquiltiazol y como la aminoalquiloxazolina. Se considera su formación a partir de péptidos de cisteína o treonina (Schmidt, 1986). Li et al., (2003) aislaron un nuevo ciclopéptido, la facalistatina 13 de la esponja marina *Phakellia fusca* que mostró citotoxicidad contra líneas celulares de hepatoma humano BEL-7404 (Figura 1).

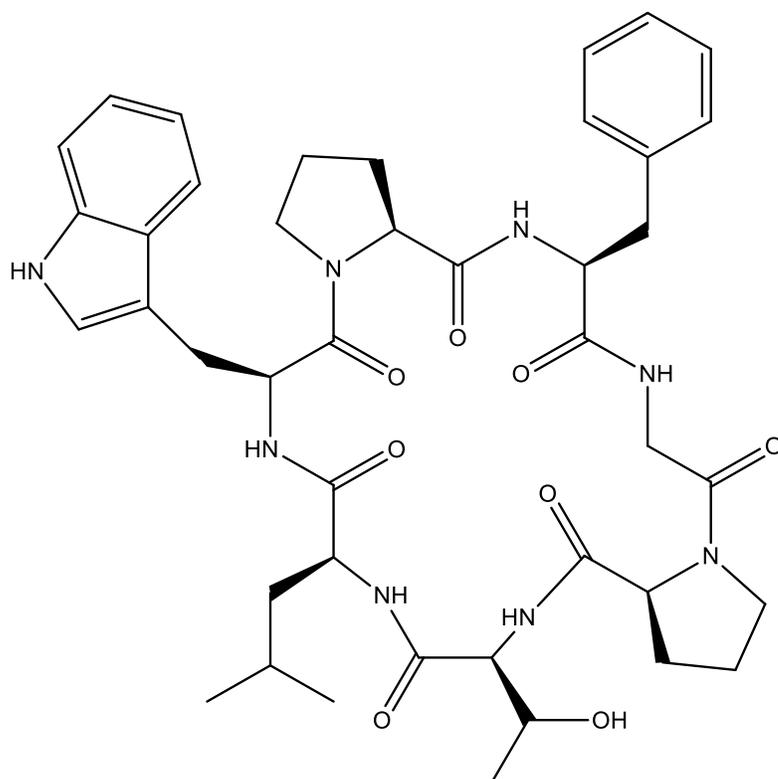


Figura 1. Facalostatina 13 ciclopéptido aislado de *Phakellia fusca* (esponja marina) (Li et al., 2003).

Los ciclopéptidos se han encontrado principalmente en plantas de las siguientes familias: Annonaceae, Caryophyllaceae, Linaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae; y también se encuentran en plantas de Araliaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Labiatae, Olacaceae, Rutaceae, Esquizandraceae, Solanaceae, y Violaceae (Matsumoto et al., 2001). En un estudio reciente, se reportó el aislamiento de varios ciclopéptidos a partir de anonáceas. Este, involucra el aprovechamiento del bagazo de las semillas de *A. purpurea* a partir del cual se obtuvo la ciclopurpuracina (Figura 2) (González-Tepale et al., 2018).

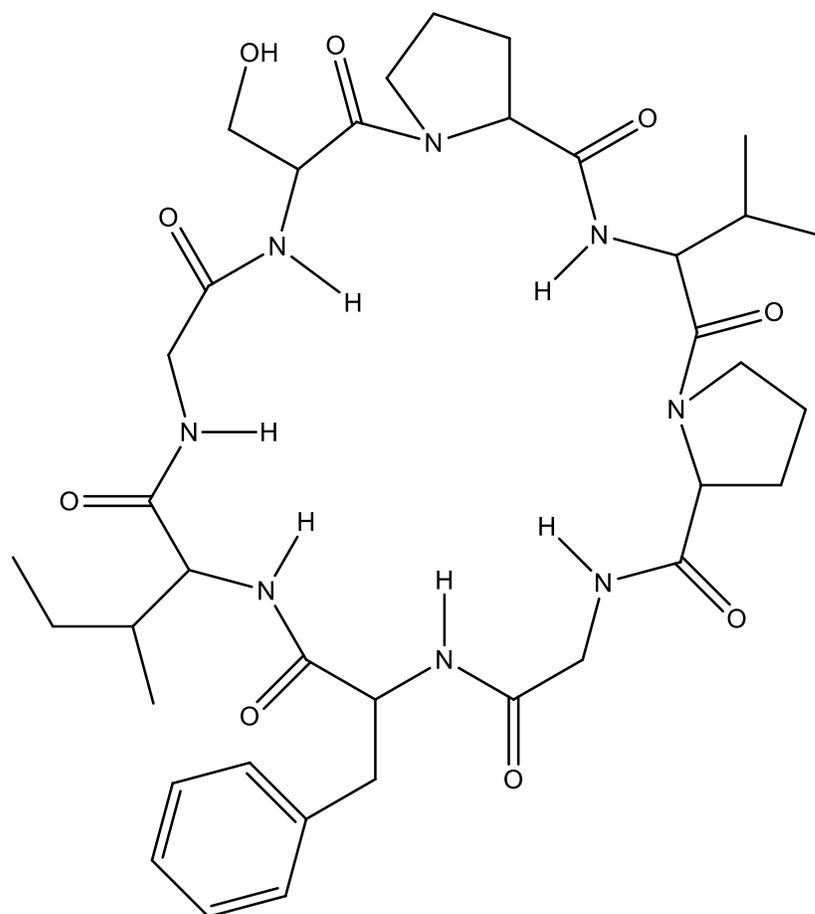


Figura 2. Ciclopurpuracina aislada de *A. purpurea* (González-Tepale et al., 2018).

Asimismo, una gran variedad de péptidos es producida por hongos, la mayoría de ellos conocidos por sus propiedades bioactivas y usos terapéuticos. Los hongos patógenos producen una amplia variedad de metabolitos tóxicos, que varían desde compuestos de bajo peso molecular de metabolismo secundario a péptidos cíclicos complejos y enzimas proteolíticas. Estos hongos patógenos son reguladores naturales de las poblaciones de insectos (Charnley, 2003). Este control ocurre por infección de los insectos en las etapas donde no se alimentan, como huevos o pupas y las etapas adultas, por invasión y crecimiento en las piezas bucales ocasionando daños fisiológicos y la muerte del insecto (Charney, 1989; Hajek & St. Leyer, 1994). Paralelamente, la producción de metabolitos secundarios de bajo peso molecular, péptidos cíclicos complejos (destruxinas, enniatinas), y enzimas proteolíticas cumplen funciones como: toxicidad para el huésped, inmunosupresoras para ayudar al

hongo a vencer las defensas del huésped, y antibióticas para suprimir a otros organismos saprófitos en el cadáver post mortem (Charnley, 2003). Zou et al., (2011) aislaron cuatro nuevos ciclopéptidos de un ascomiceto *Myrothecium verrucaria*. La Figura 3 muestra la estructura de la verrucamida A, uno de cuatro compuestos aislados en el estudio, además de ello se reporta que dichos compuestos mostraron actividad antimicrobiana contra la bacteria *Staphylococcus aureus*.

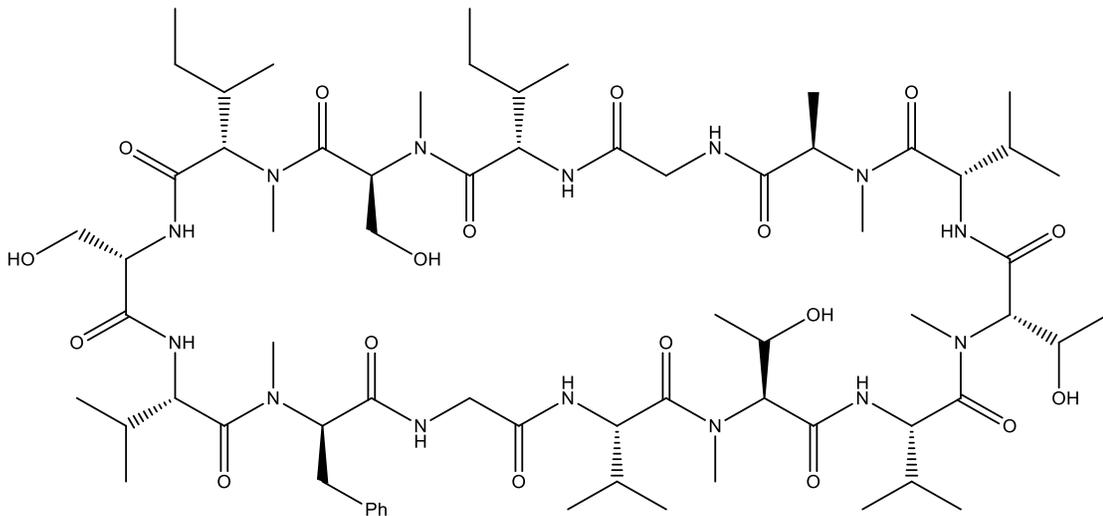


Figura 3. Verrucamida A, aislada de *Myrothecium verrucaria* (Zou et al., 2011).

Los ciclopéptidos pueden ser de origen bacteriano, destacándose microorganismos como las cianobacterias, las cuales son conocidas por su producción de péptidos cíclicos y depsipéptidos cíclicos (Sainis et al., 2010). Los depsipéptidos son ciclopéptidos en los que al menos un grupo amida se reemplaza por un enlace éster debido a la presencia de un ácido carboxílico hidroxilado. Exhiben actividades biológicas como: antimicrobianos, antivirales, insecticidas, antipalúdicos, antitumorales, e inhibidores de enzimas (Wang et al., 2018). Los ciclopéptidos bacterianos pueden tener dos orígenes: ribosómico como el caso de las microviridinas encontradas en cepas del género *Microcystis* (Velásquez & Donk, 2011; Ziemert et al., 2008), o en su mayoría un origen a partir de sintetasas no ribosomales (SNRB) (Finking & Marahiel, 2004; Strieker et al., 2010). Pese a que los ciclopéptidos de origen cianobacteriano, incluyendo las microcistinas y las nodularinas se consideran peligrosos a la salud humana

Con respecto a los esqueletos se dividen en heterociclopéptidos y homociclopéptidos. Los primeros son ciclopéptidos formados a partir de varios compuestos como residuos de aminoácidos, compuestos aromáticos, ésteres, unidos por enlaces peptídicos, amida, éster, éter, o carbono-carbono. Los segundos son ciclopéptidos compuestos de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. La segunda división se basa en el número de anillos que componen su estructura (mono, di, o policiclos). La tercera división se basa en el origen o familia del cual provienen.

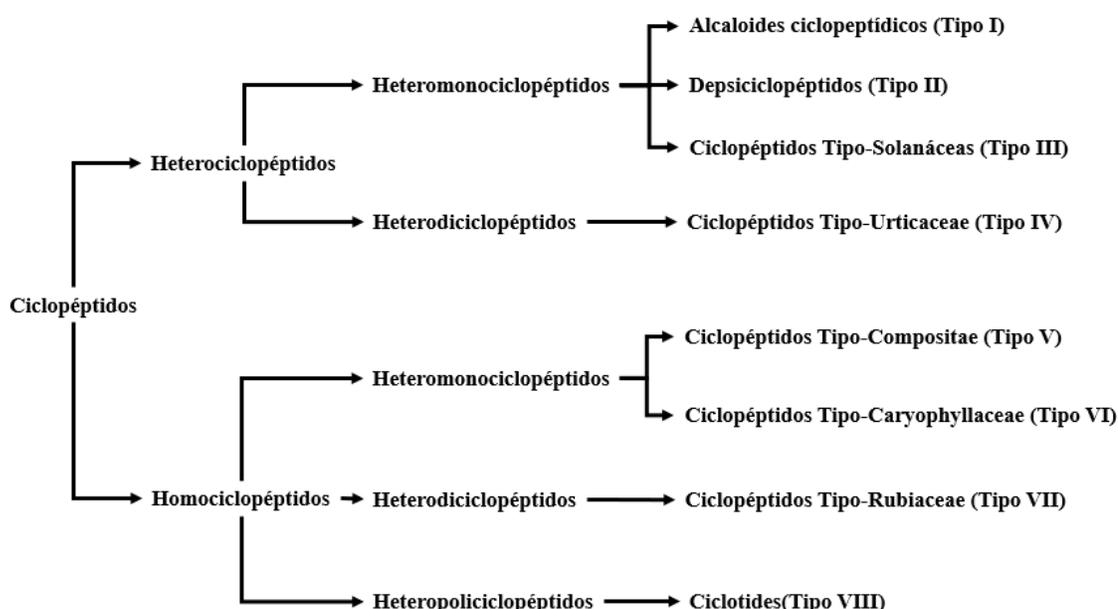


Figura 5. Clasificación de los ciclopéptidos en plantas (Tan y Zhou, 2006).

2.7 Ciclopéptidos en *Annonaceae*

El primer ciclopéptido aislado a partir de semillas de la familia de las anonáceas fue la anomuricata A de *A. muricata* (Li et al., 1995). Desde entonces se han aislado 36 compuestos de esta naturaleza a partir de otras especies de esta familia (Cuadro 2) el más reciente fue ciclopurpuracina aislada a partir del bagazo de semillas de *A. purpurea* (González-Tepale et al., 2018).

Cuadro 2. Ciclopéptidos aislados del género *Annona*

Especie	País	Ciclopéptido	Referencia
<i>A. squamosa</i>	China	annosquamosina A	(Chao-Ming et al., 1997)
	Malasia	ciclosquamosina A	(Morita et al., 1999)
	Taiwán	ciclosquamosina A	(Morita et al., 1999)
	Malasia	ciclosquamosina B	(Yang et al., 2008)
	Malasia	ciclosquamosina C	(Morita et al., 1999)
	Taiwan	ciclosquamosina D	(Morita et al., 2006)
	Taiwan	ciclosquamosina E	(Morita et al., 1999)
	Taiwan	ciclosquamosina F	(Yang et al., 2008)
	Taiwan	ciclosquamosina G	(Morita et al., 1999)
	Taiwan	ciclosquamosina H	(Morita et al., 1999)
	Taiwan	ciclosquamosina I	(Yang et al., 2008)
<i>A. graba</i>	Taiwan/China	escuamina A	(Shi et al., 1999)
		escuamina B	(Yang et al., 2008)
<i>A. reticulata</i>	China	glabrina A	(Li et al., 1998)
	China	glabrina B	(Li et al., 1998)
	China	glabrina C	(Li et al., 1999)
	China	glabrina D	(Li et al., 1999)
<i>A. reticulata</i>	Vietnam	glabrina A	(Wélé et al., 2009)
<i>A. reticulata</i>	Vietnam	cicloreticulina A	(Wélé et al., 2008)
	Vietnam	cicloreticulina B	(Wélé et al., 2008)

			2008)
	Vietnam	cicloreticulina C	(Wélé et al., 2009)
<i>A. montana</i>	Taiwan	ciclomontanina A	(Chuang et al., 2008)
	Taiwan	ciclomontanina B	(Chuang et al., 2008)
	Taiwan	ciclomontanina C	(Chuang et al., 2008)
	Taiwan	ciclomontanina D	(Chuang et al., 2008)
<i>A. montana</i>	Taiwan	anomuricata A	(Chuang et al., 2008)
<i>A. muricata</i>	China	anomuricata A	(Li et al., 1995)
	Senegal	anomuricata C	(Wélé et al., 2004a)
<i>A. muricata</i>	China	anomuricata B	(Li et al., 1998)
<i>A. cherimola</i>	España	cherimolaciclopéptido A	(Wélé et al., 2004b)
	España	cherimolaciclopéptido B	(Wélé et al., 2004b)
	España	cherimolaciclopéptido C	(Wélé et al., 2004c)
	España	cherimolaciclopéptido D	(Wélé et al., 2005a)
	España	cherimolaciclopéptido E	(Wélé et al., 2005b)
	España	cherimolaciclopéptido F	(Wélé et al., 2005b)
	España	cherimolaciclopéptido G	(Wélé et al., 2006)
<i>A. senegalensis</i>	Senegal	ciclosenegalina A	(Wélé et al., 2002)
	Senegal	ciclosenegalina B	(Wélé et al., 2002)
<i>A. glauca</i>	Senegal	glaucaciclopéptido A	(Wélé et al., 2005c)
	Senegal	glaucaciclopéptido B	(Wélé et al., 2006)
<i>A. purpurea</i>	México	Ciclopurpuracina	(González-Tepale et al., 2018)

2.8 Radicales libres

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con electrones no apareados altamente inestables y activos frente a reacciones químicas con otras moléculas. Las más comunes, provienen principalmente de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, generando así especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN) y especies reactivas de azufre (ERA). Las ERO incluyen radicales libres tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO) y otras especies como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), ácido hipocloroso (HClO) y peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Las ERN provienen del NO al reaccionar con $O_2^{\cdot-}$, para formar $ONOO^{\cdot}$. Las ERA se forman a partir de las reacciones de ERO con tioles (Lü et al., 2010). Las reacciones que conducen a la formación de ERO se muestran en la siguiente Figura 6.

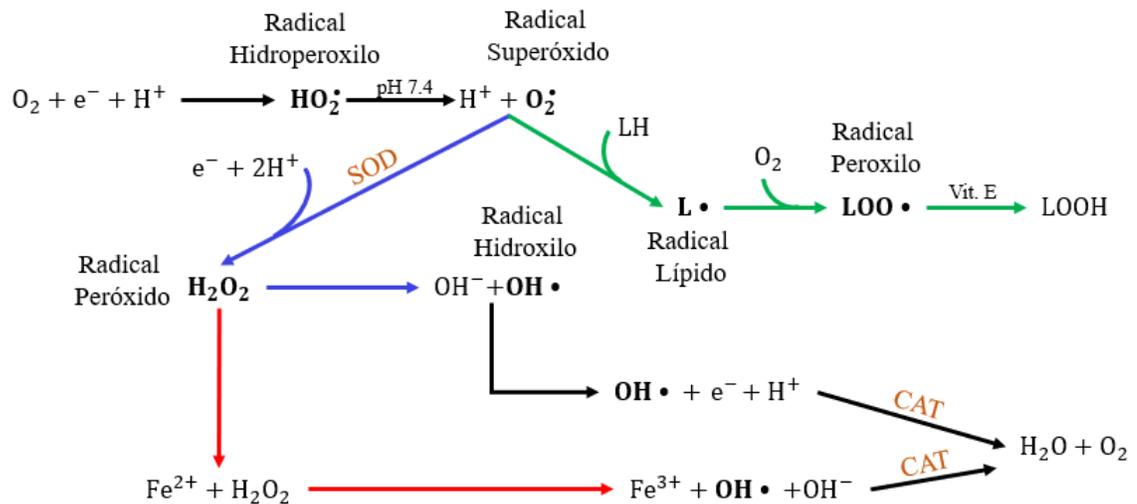


Figura 6. Reacciones que conducen a la formación de ERO. Tomado de Carochó & Rerreira, (2013).

El radical hidroperoxilo se disocia a un pH 7 para formar el anión superóxido. Este anión es el que interactúa con otras moléculas para generar las ERO a través de enzimas o por metales catalizadores. El ion superóxido se puede convertir a peróxido de hidrógeno por medio de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en la reacción conocida como Haber-Weiss (en color azul) hasta tener

como productos finales agua por medio de la catalasa (CAT). La reacción en verde simboliza la peroxidación lipídica. Otro mecanismo que puede ocurrir en la formación de ERO es la reacción de Fenton, que involucra la reacción de peróxido de hidrógeno con un catalizador metálico como el Fe^{2+} generando así el radical hidroxilo (reacción en rojo) (Flora, 2009). La producción de ERO, ERN y ERA, se han relacionado con muchas enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares, trastornos renales, hepáticos, hipertensión, artritis reumatoide, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, auto deficiencias inmunitarias, inflamación, trastornos degenerativos asociados con el envejecimiento, diabetes, cataratas, obesidad, autismo, Alzheimer, Parkinson, vasculitis, glomerulonefritis, lupus erimatoso, úlceras gástricas, hemocromatosis, preclampsia, entre otros (Lobo et al., 2010; Lü et al., 2010; Rahman, 2007; Singh et al., 2010).

2.9 Antioxidantes definición

Halliwell (2007) define a los antioxidantes “como cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula objetivo”. Anteriormente este mismo autor definía a un antioxidante como: “cualquier sustancia que, estando presente en bajas concentraciones en comparación con aquellas de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato”. Refiriendo como sustrato oxidable aquellas moléculas orgánicas encontradas *in vivo* (Halliwell & Gutteridge, 1995). Khlebnikov et al., (2007) por su parte definen a los antioxidantes como “cualquier sustancia que elimina directamente ERO o que actúa indirectamente para regular las defensas antioxidantes o inhibir la producción de ERO”.

2.10 Clasificación de los Antioxidantes

Los antioxidantes pueden clasificarse por su origen en sintéticos o naturales (Figura 7).

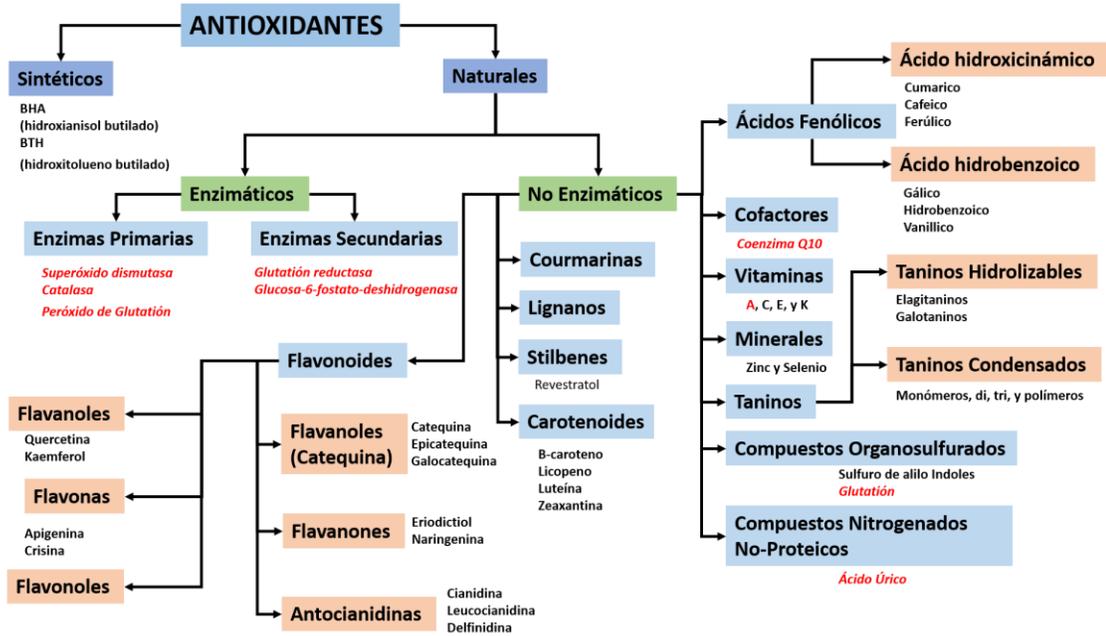


Figura 7. Clasificación de los antioxidantes separados en diferentes clases. Las palabras en rojo representan antioxidantes de origen endógeno. Adaptado de Carocho & Ferreira, (2013) y Shahidi & Ambigaipalan, (2015).

Los antioxidantes naturales a su vez se dividen en dos clases, aquellos de origen enzimático y no enzimático. Los primeros tienen otra subdivisión como defensas enzimáticas primarias o secundarias en el organismo. Los antioxidantes no enzimáticos por su parte como las vitaminas (A), cofactores Q10, compuestos nitrogenados (ácido úrico) y péptidos (glutatión) tienen un carácter endógeno. Sin embargo, este sistema endógeno de antioxidantes no es suficiente para el organismo por lo que necesita de la ingesta de otros tipos de antioxidantes para mantener a su nivel mínimo la presencia de radicales libres (Pietta, 2000). Por ello, los compuestos como Minerales, Vitaminas (C, E), Carotenoides, Ácidos Fenólicos y Flavonoides tienen un carácter exógeno al provenir de dietas alimenticias ricas en ellos (Carocho & Ferreira, 2013). La Vitamina C o ácido ascórbico elimina radicales como el anión radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el oxígeno singlete, y el óxido de nitrógeno reactivo (Barros et al., 2011). Los minerales más importantes son el selenio y el zinc. El primero puede encontrarse en su forma organometálica como selenocisteína y selenometionina que, aunque no actúa de manera directa sobre radicales libres es necesario para enzimas

antioxidantes como la glutatión peroxidasa que no tendría efecto sin su presencia (Tabassum et al., 2010). Los carotenoides absorben y liberan energía del oxígeno singlete. Esto ocurre mientras los carotenoides tengan enlaces dobles conjugados. Los únicos radicales libres que destruyen completamente son los radicales peroxilo (Paiva & Russell, 1999). Los ácidos fenólicos tienen actividad antioxidante como quelantes y eliminando radicales libres como hidroxilo, peroxilo, aniones superóxido y peroxinitritos. Derivan de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. Del grupo de los hidroxibenzoicos está el ácido galico precursor de muchos taninos mientras que del lado de los hidroxinámicos resalta el ácido cinámico (Krimmel et al., 2010; Terpinc et al., 2011). Los flavonoides son un grupo diverso de compuestos como flavanoles, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas y flavonas. Todos estos compuestos comparten un mismo esqueleto de difenilpropano ($C_6C_3C_6$). Sus propiedades antioxidantes se basan en la presencia de grupos hidroxilos que pueden actuar como agentes reductores, donando hidrógenos, como eliminadores de oxígeno singlete, o eliminando radicales superóxidos. Algunos flavonoides que destacan por su importancia son la catequina, galato de catequina, quercetina y kaempferol (Carocho & Ferreira, 2013; Procházková et al., 2011; Rice-Evans et al., 1996).

2.11 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos se agregan deliberadamente para la prevención de la oxidación y degradación de los alimentos, como lo ácidos grasos. Por ello se han utilizado durante los últimos 60 años por la industria alimentaria durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos que contienen gran cantidad de lípidos para prevenir o retrasar su oxidación (Carocho & Ferreira, 2013; Saad et al., 2007). También se han utilizado como estándares de medición de la actividad antioxidante para comparar el efecto de los antioxidantes de origen natural en su incorporación a matrices alimentarias (Carocho & Ferreira, 2013). Carocho & Ferreira (2013) informan los principales antioxidantes sintéticos y más ampliamente utilizados, así como sus aplicaciones en los alimentos.

Los prooxidantes son sustancias que inciden en el estrés oxidativo, por medio de la formación de radicales libres o al inhibir los sistemas de los antioxidantes (Puglia & Powell, 1984). Los radicales libres en esencia se consideran dentro de este concepto de prooxidantes, sin embargo, los antioxidantes también pueden manifestar un comportamiento prooxidante (Carocho & Ferreira, 2013). Un ejemplo es la Vitamina C. un antioxidante ampliamente conocido pero que puede llegar a convertirse en un prooxidante cuando se combina con hierro y cobre reduciendo el Fe^{3+} a Fe^{2+} y el Cu^{3+} a Cu^{2+} (Duarte & Lunec, 2005). Otro ejemplo es el α -tocoferol que puede convertirse en un prooxidante en altas concentraciones debido a que si no existe suficiente ácido ascórbico para su regeneración, cuando reacciona es altamente reactivo y promueve la autooxidación del ácido linoleico (Cillard et al., 1980). Los carotenoides manifiestan un comportamiento similar de autooxidación cuando se exponen a elevadas concentraciones de radicales hidroxilos (Young & Lowe, 2001). Los ácidos fenólicos y flavonoides también llegan a convertirse en prooxidantes bajo ciertas condiciones (Yordi et al., 2012).

2.12 Mecanismos de acción de los antioxidantes

Los antioxidantes actúan de varias maneras como: inhiben las reacciones de oxidación de radicales libres (actuando como oxidantes preventivos), por ejemplo, al inhibir la formación de radicales libres de lípidos, interrumpen la reacción en la cadena de autooxidación; como extintores de oxígeno singlete; como agentes reductores que convierten los hidroperóxidos en productos estables; por medio de sinergia con otros antioxidantes; como agentes reductores que convierten los prooxidantes metálicos (provenientes de cobre y hierro) en productos más estables; y como inhibidores de las enzimas lipoxigenasas (Darmanyan et al., 1998; Hiem et al., 2002; Kancheva, 2009; Min & Boff, 2002; Pokorný, 2007).

2.13 Métodos para la detección de actividad antioxidante

Existen numerosos ensayos para medir la actividad antioxidante; estos pueden clasificarse en dos categorías. Métodos de eliminación de radicales/ERO y métodos basados en el potencial redox.

2.14 Métodos de eliminación de radicales/ERO

Dependiendo de las reacciones involucradas, los ensayos de este grupo se subdividen en dos mecanismos, los basados en transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y los basados en la transferencia de electrones individuales (TEI) (Shahidi & Zhong, 2015). Los ensayos basados en TAH miden la capacidad de un antioxidante para extinguir los radicales mediante la donación de átomos de hidrógeno, por su parte los ensayos basados en TEI detectan la capacidad de un potencial antioxidante para transferir electrones para reducir compuestos incluidos metales, carbonilos y radicales (Shahidi & Zhong, 2005). El Cuadro 3 presenta los principales ensayos basados en eliminación de radicales/ERO.

2.15 Ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC)

Este ensayo fue desarrollado por Miller et al., (1993). El ensayo mide la capacidad para eliminar el catión radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), un cromóforo verde-azul con una absorción máxima a 734 nm que va disminuyendo su intensidad al ser neutralizado por antioxidantes ya sea por reacción directa por medio de donación de electrones o por eliminación de radicales. La Figura 8 representa la reacción principal involucrada en este ensayo.

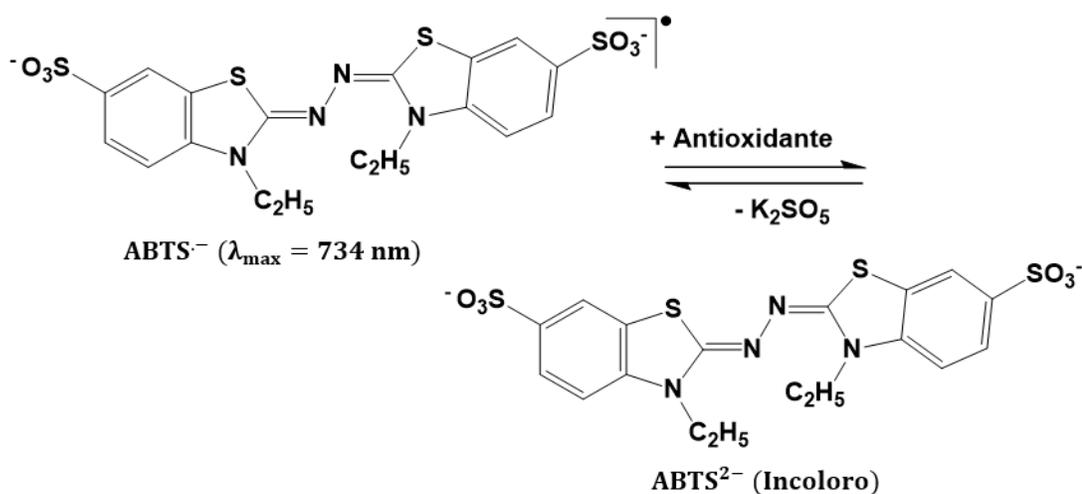


Figura 8. Decoloración del catión radical ABTS en presencia de un antioxidante. Tomado de Huang et al., (2005).

El grado de decoloración del cromóforo verde-azul está en función de la duración de la reacción, la actividad del propio antioxidante, y la concentración de la muestra objetivo. Los resultados se reportan como equivalentes de Trolox (Shahidi & Zhong, 2015). Este ensayo se ha utilizado para evaluar la actividad antioxidante total de sustancias puras, fluidos corporales y materiales vegetales. Así mismo a otros ensayos de eliminación de radicales puede ser adaptado y automatizado a microplacas y técnicas de inyección de flujo (Milardovic et al., 2007).

Cuadro 3. Principales ensayos de eliminación de radicales y ERO.

Nombre	Mecanismo	Oxidante	Detección	Referencia
ORAC	TAH	Radical peroxilo	Fluorometría	(Prior et al., 2005)
Quimio luminiscencia	TAH	Peróxido de hidrogeno	Fluorometría	(Papadopoulos et al., 2003)
DPPH	TEI	Radical DPPH	Espectrofotometría	(Blois, 1958)
TEAC	TEI	Catión	Espectrofotometría	(Miller et al.,

Radical
ABTS

1993)

Fuente: Shahidi & Zhong, (2015).

2.16 Métodos basados en el potencial redox

Los antioxidantes se conocen por su capacidad de donación de electrones para eliminar radicales o ERO. Sin embargo, también destacan por su poder de reducción de elementos de valencias altas a estados de valencia más bajos. Este potencial redox funciona como un indicador de su eficacia antioxidante, se mide por medio de la reducción de varios iones metálicos como el hierro, cobre, cromo, cerio entre otros. El mecanismo que funciona en estos ensayos es por medio de TEI (Cuadro 4) (Shahidi & Zhong, 2015).

2.17 Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

Este ensayo se basa en la reducción del complejo Fe^{3+} de la tripiridiltriazina $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ al complejo Fe^{2+} de color azul intenso de $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$ (Figura 9) por la reacción con antioxidantes en un medio ácido. La actividad antioxidante se determina por un aumento en la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm, los resultados son expresados como equivalentes de Fe^{2+} micromolar o en función del estándar de referencia (Antolovich et al., 2002). Las condiciones de un pH ácido (pH 3.6) son necesarias para mantener la solubilidad del hierro y aún más importante estimular la transferencia de electrones, aumentando así el potencial redox (Hegerman et al., 1998). El ensayo FRAP se ha empleado para medir el poder redox en plasma, y también para evaluar la actividad antioxidante en otros sustratos biológicos, alimentos y extractos de plantas (Shahidi & Zhong, 2015).

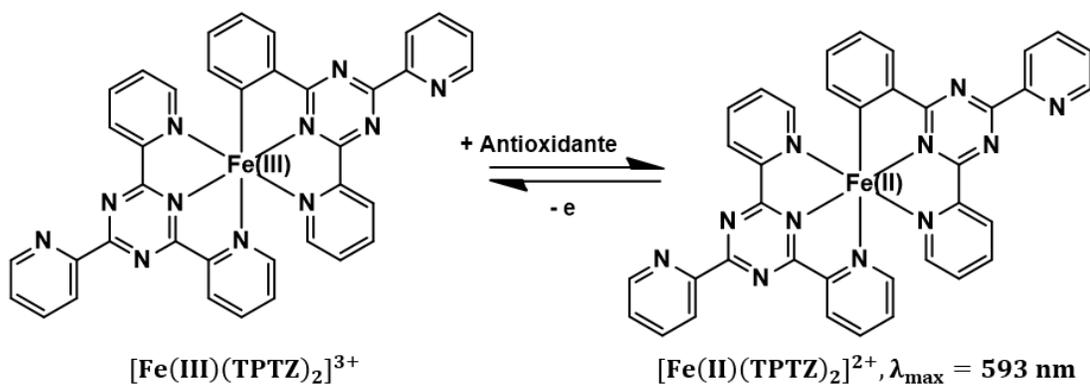


Figura 9. Representación de la reducción del complejo Fe^{3+} a Fe^{2+} . Tomado de Huang et al., (2005).

Cuadro 4. Principales ensayos de potencial redox.

Nombre	Mecanismo	Oxidante	Detección	Referencia
FRAP	TEI	Fe^{3+}	Espectrofotometría	(Molina-Díaz et al., 1998)
CUPRAC	TEI	Cu^{2+}	Espectrofotometría	(Apak et al., 2004)
Ag^+ reductor	TEI	Ag^+	Resonancia de plasmones	(Özyürek et al., 2012)
Au^{3+} reductor	TEI	Au^{3+}	Voltametría cíclica	(Andreu-Navarro et al., 2011)
CERAC	TEI	Ce^{4+}	Espectrofotometría	(Ozyurt et al., 2010)
CROMAC	TEI	Cr^{6+}	Espectrofotometría	(Işık et al., 2013)

Fuente: Shahidi & Zhong, (2015).

2.18 Literatura citada

- Andrés-Agustín, J. & Segura-Ledesma, S. D. (2014). Conservación y uso de los recursos genéticos de Annonaceae en México. *Rev. Bras. Frutic*, 36, 118-124.
- Andrés-Agustín, J. y Andrés-Hernández, L. (2011). Biología, diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de Annonaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 49.
- Andreu-Navarro, A., Fernández-Romero, J. M., & Gómez-Hens, A. (2011). Determination of antioxidant additives in foodstuffs by direct measurement of gold nanoparticle formation using resonance light scattering detection. *Analytica Chimica Acta*, 695(1-2), 11-17.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Astill, B. D., Fassett, D. W., & Roudabush, R. L. (1959). The metabolism of 2: 4: 5-trihydroxybutyrophenone in the rat and dog. *Biochemical Journal*, 72(3), 451.
- Barros, A. I., Nunes, F. M., Gonçalves, B., Bennett, R. N., & Silva, A. P. (2011). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*, 128(1), 165-172.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Botterweck, A. A. M., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., & Van den Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*, 38(7), 599-605
- Branen, A. L. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52(2), 59.
- Calderón, S., Stanley, P.C., (1944). Flora Salvadoreña. Lista preliminar de las plantas de El Salvador. ES. *Imprenta Nacional Edición, San Salvador*, El Salvador, pp. 109.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.

- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021.
- Chao-Ming, L., Ning-Hua, T., Qing, M., Hui-Lan, Z., Xiao-Jiang, H., Yu, W., & Jun, Z. (1997). Cyclopeptide from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, 45(3), 521-523.
- Charnley, A. K. (1989). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *The Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Cambridge University, London, 85-125.
- Charnley, A. K. (2003). Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 40, 241-321.
- Chatrou, L. W. (1999, March). The Annonaceae and the Annonaceae project: a brief overview of the state of affairs. In *First International Symposium on Cherimoya 497* (pp. 43-58).
- Chatrou, L. W., Pirie, M. D., Erkens, R. H., Couvreur, T. L., Neubig, K. M., Abbott, J. R., ... & Chase, M. W. (2012). A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1), 5-40.
- Chatrou, L. W., Turner, I. M., Klitgaard, B. B., Maas, P. J., & Utteridge, T. M. (2018). A linear sequence to facilitate curation of herbarium specimens of Annonaceae. *Kew Bulletin*, 73(3), 39.
- Chen, Q. X., Ke, L. N., Song, K. K., Huang, H., & Liu, X. D. (2004). Inhibitory effects of hexylresorcinol and dodecylresorcinol on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *The Protein Journal*, 23(2), 135-141.
- Chuang, P. H., Hsieh, P. W., Yang, Y. L., Hua, K. F., Chang, F. R., Shiea, J., ... & Wu, Y. C. (2008). Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1365-1370.
- Cillard, J., Cillard, P., Cormier, M., Girre, L., (1980). α -Tocopherol prooxidants effect in aqueous media: increased autoxidation rate of linoleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 57, 252-255.
- Costa, M. S., Santana, A. E., Oliveira, L. L., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2017). Toxicity of squamocin on *aedes aegypti* larvae, its predators, and human cells. *Pest Management Science*, 73(3), 636-640. doi:10.1002/ps.4350.
- Couvreur, T. L., Pirie, M. D., Chatrou, L. W., Saunders, R. M., Su, Y. C., Richardson, J. E., & Erkens, R. H. (2011). Early evolutionary history of the flowering plant family Annonaceae: steady diversification and boreotropical geodispersal. *Journal of Biogeography*, 38(4), 664-680.

- Craik, D. J., & Allewell, N. M. (2012). Thematic minireview series on circular proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26999-27000.
- Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., & Price, D. (2013). The future of peptide-based drugs. *Chemical Biology & Drug Design*, 81(1), 136-147.
- Darmanyan, A. P., Gregory, D. D., Guo, Y., Jenks, W. S., Burel, L., Eloy, D., & Jardon, P. (1998). Quenching of singlet oxygen by oxygen- and sulfur-centered radicals: evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 120(2), 396-403.
- Duarte, T. L., & Lunec, J. (2005). When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research*, 39(7), 671-686.
- Estrada, C.A., Marroquín-Andrade, L.M., (1994). Caracterización de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) en Salitre de Palmerillos, Amatepec, México. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 38,197–200.
- Evan, A. P., & Gardner Jr, K. D. (1979). Nephron obstruction in nordihydroguaiaretic acid-induced renal cystic disease. *Kidney International*, 15(1), 7-19.
- Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 453-488.
- Flora, S. J. (2009). Structural, chemical, and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4), 191-206.
- Gentilucci, L., Gallo, F., Meloni, F., Mastandrea, M., Del Secco, B., & De Marco, R. (2016). Controlling cyclopeptide backbone conformation with β/α -Hybrid Peptide–Heterocycle scaffolds. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016(19), 3243-3251. doi:10.1002/ejoc.201600448.
- Gharavi, N., & El-Kadi, A. O. (2005). tert-Butylhydroquinone is a novel aryl hydrocarbon receptor ligand. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(3), 365-372.
- González-Tepale, M.R.; Reyes, L.; Mayorga-Flores, M.; Reyes-Trejo, B.; Gómez-Zepeda, D.; Del Rio-Portilla, F.; Ordaz-Ortiz, J.; Herbert-Pucheta, J.E. (2018) Cyclopurpuracin, a cyclopeptide from *Annona purpurea* seeds. *Phytochemistry Letters*. 23, 164-167.
- González-Trujano, M.E., Martínez, A.L., Reyes-Ramírez, A., Reyes-Trejo, B., Navarrete, A., (2006). Palmitone isolated from *Annona diversifolia* Saff. Induces anxiolytic like effect in mice. *Planta Med.* 72, 703–707.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887-1892.

- Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, 39(1), 293-322.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147-1150.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(1), 125-126.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Hernández-Fuentes, L. M., Andrés-Agustín, J., Espíndola-Barquera, M. D. C., Castañeda-Vildózola, A., Ballesteros-Patrón, G., & Vera-Sánchez, K. S. (2016). Recursos genéticos de anonáceas (annonaceae) en México: situación actual y perspectivas. *Agroproductividad*, 9(4).
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Işık, E., Şahin, S., & Demir, C. (2013). Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111, 119-124.
- Jiang, S., Li, Z., Ding, K., & Roller, P. P. (2008). Recent progress of synthetic studies to peptide and peptidomimetic cyclization. *Current Organic Chemistry*, 12(17), 1502-1542.
- Julián-Loeza, A.P., Santos-Sánchez, N.F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B.S., Salas-Coronado, R. (2011). Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Ind. Crops Prod.* 34, 1262–1268.
- Kancheva, V. D. (2009). Phenolic antioxidants—radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(11), 1072-1089.
- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., & Quinn, M. T. (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749-1770.
- Krimmel, B., Swoboda, F., Solar, S., & Reznicek, G. (2010). OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic-and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products—a gamma radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(12), 1247-1254.
- Kubo, I., Xiao, P., & Fujita, K. I. (2001). Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(3), 347-350.

- Li, C. M.- Tan, N. H., Zheng, H. L., Mu, Q., Hao, X. J., He, Y. N., & Zhou, J. (1998). Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. *Phytochemistry*, *47*, 1293-1296.
- Li, C. M., Tan, N. H., Zheng, H. L., Mu, Q., Hao, X. J., He, Y. N., & Zhou, J. (1999). Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. *Phytochemistry*, *50*(6), 1047-1052.
- Li, C., Tan, N., Lu, Y., Liang, H., Mu, Q., Zheng, H., ... & Zhou, J. (1995). Annonuricatin A, a new cyclopeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Acta Botanica Yunnanica*, *17*(4), 459-462.
- Li, W. L., Yi, Y. H., Wu, H. M., Xu, Q. Z., Tang, H. F., Zhou, D. Z., ... & Wang, Z. H. (2003). Isolation and structure of the cytotoxic cycloheptapeptide phakellistatin 13. *Journal of Natural Products*, *66*(1), 146-148.
- Liaw, C.C.; Yang, Y.L.; Chen, M.; Chang, F.R.; Chen, S.L.; Wu, S.H.; Wu, Y.C. (2008). Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* as cytotoxic agents and calcium ion chelators. *J.Nat.Prod.* *71*, 764–771.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118-126.
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*(4), 840-860.
- Marroquín-Andrade, L., Cuevas-Sánchez, J.A., Guerra-Ramírez, D., Reyes, L., Reyes-Chumacero, A., Reyes-Trejo, B. (2011). Proximate composition, mineral nutrient and fatty acids of the seed of ilama, *Annona diversifolia* Saff. *Sci. Res. Essays* *6*, 3089–3093.
- Matsumoto, T., Shishido, A., Morita, H., Itokawa, H., & Takeya, K. (2001). Cyclolinopeptides F–I, cyclic peptides from linseed. *Phytochemistry*, *57*(2), 251-260. doi:10.1016/S0031-9422(00)00442-8.
- Milardovic, S., Kereković, I., & Rumenjak, V. (2007). A flow injection biamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bienzymatically produced ABTS+. *Food Chemistry*, *105*(4), 1688-1694.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, *84*(4), 407-412.
- Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *1*(2), 58-72.

- Molina-Díaz, A., Ortega-Carmona, I., & Pascual-Reguera, M. I. (1998). Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta*, *47*(3), 531-536.
- Moreno-Velázquez, D., Saucedo-Veloz, C., Arévalo-Galarza, L., Peña-Valdivia, B., Soto-Hernández, M., Cruz-Lagunas, B. (2008). Cambios bioquímicos, biofísicos y fisiológicos durante el desarrollo del fruto de ilama (*Annona diversifolia* Saff.). *Agrociencia* *42*, 407-414.
- Morita, H., Iizuka, T., Choo, C. Y., Chan, K. L., Takeya, K., & Kobayashi, J. I. (2006). Vasorelaxant activity of cyclic peptide, cyclosquamosin B, from *Annona squamosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *16*(17), 4609-4611.
- Morita, H., Sato, Y., & Kobayashi, J. I. (1999). Cyclosquamosins A–G, cyclic peptides from the seeds of *Annona squamosa*. *Tetrahedron*, *55*(24), 7509-7518.
- Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., & Apak, R. (2012). Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *Analytical Chemistry*, *84*(18), 8052-8059.
- Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2010). Modified cerium (IV)-based antioxidant capacity (CERAC) assay with selectivity over citric acid and simple sugars. *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*(3), 282-288.
- Paiva, S. A., & Russell, R. M. (1999). β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, *18*(5), 426-433.
- Papadopoulos, K., Triantis, T., Yannakopoulou, E., Nikokavoura, A., & Dimotikali, D. (2003). Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oils using chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, *494*(1-2), 41-47.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63*(7), 1035-1042.
- Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better—and safer—than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, *109*(6), 629-642.
- Pomilio, A. B., Battista, M. E., & Vitale, A. A. (2006). Naturally-occurring cyclopeptides: structures and bioactivity. *Current Organic Chemistry*, *10*(16), 2075-2121.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4290-4302.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, *82*(4), 513-523.

- Puglia, C.D., Powell, S.R., (1984). Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environ. Health Persp.* 57, 307–311.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.
- Rainer H. & Chatrou L.W. (eds) (2020). AnnonBase: Annonaceae GSD (version Jan 2014). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2020-02-24 (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van, Penev L.). Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. *Species 2000: Naturalis*, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.
- Reyes-Trejo, B.; Guerra-Ramírez, D.; Zuleta-Prada, H.; Cuevas-Sánchez, J.A.; Reyes, L.; Reyes-Chumacero, A.; Rodríguez-Salazar, J. (2014). *Annona diversifolia* seed oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Industrial Crops and Products*, 52, 400-404.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Ruiz, S.E., Morett, A.L., (1997). The Annonaceous in the Prehispanic México. In: Proceedings of an International Congress held at Chapingo, Estado de México, México: *Memories of The International Congress of Annonaceous*, pp. 169–186.
- Saad, B., Sing, Y. Y., Nawi, M. A., Hashim, N., Ali, A. S. M., Saleh, M. I., ... & Ahmad, K. (2007). Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*, 105(1), 389-394.
- Sainis, I., Fokas, D., Vareli, K., Tzakos, A., Kounnis, V., & Briasoulis, E. (2010). Cyanobacterial Cyclopeptides as Lead Compounds to Novel Targeted Cancer Drugs. *Marine Drugs*, 8(3), 629–657. doi:10.3390/md8030629.
- Schlie-Guzmán, M. A., García-Carrancá, A., & González-Esquinca, A. R. (2009). In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* saff. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(8), 1128-1133.
- Schmidt, U. (1986). Synthesis of cyclopeptides from plants, fungi, and sea animals. *Pure and Applied Chemistry*, 58(2), 295-304.
- Selsted, M. E. (2004). θ -Defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated α -defensins. *Current Protein and Peptide Science*, 5(5), 365-371.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.

- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Shi, JX, Wu, HM, He, FH, Inoue, K. y Min, ZD (1999). Squamin-A, nuevo ciclopéptido de *Annona squamosa*. *Chinese Chemical Letters*, 10 (4), 299-302.
- Shinde, N.V.; Dhake, A. S.; Haval H. P. (2013). Biological Activities of Cyclic Peptides: An Overview *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(3), 142.
- Singh, P. P., Chandra, A., Mahdi, F., Roy, A., & Sharma, P. (2010). Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25(3), 225-243.
- Soares, D. G., Andreazza, A. C., & Salvador, M. (2003). Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1077-1080.
- Soares, E. R., Silva, F. M. A., Almeida, R. A., Lima, B. R., Silva Filho, F. A., Barison, A., . . . Souza, A. D. L. (2015). Direct infusion ESI-IT-MSⁿ alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma maas* (annonaceae). *Phytochemical Analysis*, 26(5), 339-345. doi:10.1002/pca.2568.
- Strieker, M., Tanović, A., & Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2), 234-240.
- Tabassum, A., Bristow, R. G., & Venkateswaran, V. (2010). Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing? *Cancer Treatment Reviews*, 36(3), 230-234.
- Tan, N. H.; Zhou, J. (2006). Plant Cyclopeptides. *Chem. Reviews*, 106(3), 840-895.
- Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrich, N. P., & Abramovič, H. (2011). Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry*, 128(1), 62-69.
- Teta, R., Marteinsson, V. T., Longeon, A., Klonowski, A. M., Groben, R., Bourguet-Kondracki, M. L., ... & Mangoni, A. (2017). Thermoactinoamide A, an Antibiotic Lipophilic Cyclopeptide from the Icelandic Thermophilic Bacterium *Thermoactinomyces vulgaris*. *Journal of Natural Products*, 80(9), 2530-2535.
- Velásquez, J. E., & van der Donk, W. A. (2011). Genome mining for ribosomally synthesized natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(1), 11-21.

- Wang, X., Gong, X., Li, P., Lai, D., & Zhou, L. (2018). Structural diversity and biological activities of cyclic depsipeptides from fungi. *Molecules*, 23(1), 169.
- Wélé, A., Landon, C., Labbé, H., Vovelle, F., Zhang, Y., & Bodo, B. (2004b). Sequence and solution structure of cherimolacyclopeptides A and B, novel cyclooctapeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Tetrahedron*, 60(2), 405-414.
- Wélé, A., Mayer, C., Dermigny, Q., Zhang, Y., Blond, A., & Bodo, B. (2008). Sequence and three-dimensional structure of cycloreticulins A and B, new cyclooctapeptides from the seeds of *Annona reticulata*. *Tetrahedron*, 64(1), 154-162.
- Wélé, A., Mayer, C., Quentin, D., Zhang, Y., Blond, A., & Bodo, B. (2009). 3D-structure of cycloreticulin C and glabrin A, cyclopeptides from the seeds of *Annona reticulata*. *Tetrahedron*, 65(1), 275-281.
- Wélé, A., Ndoye, I., Zhang, Y., Brouard, J. P., & Bodo, B. (2005a). Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*, 66(6), 693-696.
- Wélé, A., Ndoye, I., Zhang, Y., Brouard, J. P., Pousset, J. L., & Bodo, B. (2005c). Glaucacyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. *Phytochemistry*, 66(10), 1154-1157.
- Wélé, A., Zhang, Y., Brouard, J. P., Pousset, J. L., & Bodo, B. (2005b). Two cyclopeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*, 66(19), 2376-2380.
- Wélé, A., Zhang, Y., Caux, C., Brouard, J. P., Dubost, L., Guette, C., ... & Bodo, B. (2002). Isolation and structure of cycloenegalins A and B, novel cyclopeptides from the seeds of *Annona senegalensis*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (23), 2712-2718.
- Wélé, A., Zhang, Y., Caux, C., Brouard, J. P., Pousset, J. L., & Bodo, B. (2004a). Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 981-988.
- Wélé, A., Zhang, Y., Caux, C., Brouard, J. P., Pousset, J. L., & Bodo, B. (2004c). Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 981-988.
- Wele, A., Zhang, Y., Dubost, L., Pousset, J. L., & Bodo, B. (2006). Cyclic peptides from the seeds of *Annona glauca* and *A. cherimola*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(5), 690-692.
- Yang, Y. L., Hua, K. F., Chuang, P. H., Wu, S. H., Wu, K. Y., Chang, F. R., & Wu, Y. C. (2008). New cyclic peptides from the seeds of *Annona squamosa* L. and their anti-inflammatory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 386-392.

- Yordi, E. G., Pérez, E. M., Matos, M. J., & Villares, E. U. (2012). Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. *Nutrition, Well-being and Health*, 2, 23-48.
- Young, A. J., & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 20-27.
- Ziemert, N., Ishida, K., Liaimer, A., Hertweck, C., & Dittmann, E. (2008). Ribosomal synthesis of tricyclic depsipeptides in bloom-forming cyanobacteria. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(40), 7756-7759.
- Zou, X., Niu, S., Ren, J., Li, E., Liu, X., & Che, Y. (2011). Verrucamides A–D, antibacterial cyclopeptides from *Myrothecium verrucaria*. *Journal of Natural Products*, 74(5), 1111-1116.

3. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS RICOS EN CICLOPÉPTIDOS OBTENIDOS DE *Annona diversifolia*

3.1 Introducción

Los ciclopéptidos se biosintetizan en las plantas superiores, pertenecientes a las familias Annonaceae, Astaraceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Labiatae, Linaceae, Olacaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae, Rutaceae (Pomillo et al., 2006). Se ha demostrado que estos compuestos tienen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antibacteriales, antitumorales, sedantes, inmunopresoras entre otras (Pomillo et al., 2006; Shinde et al., 2013). Desde un punto de vista estructural, la forma cíclica de estos péptidos resulta atractiva en comparación con los péptidos de estructura lineal o las mismas proteínas, debido a su carácter hidrofóbico e hidrofílico (Tan & Zhou, 2006) y porque son más resistentes a la degradación enzimática (Shinde et al., 2013). En las plantas de la familia Anonaceae se han identificado ciclopéptidos en frutos de *Annona muricata* (guanábana) y *Annona chirimola* (chirimoya) (Tan y Zhou, 2006). En México la familia de las anonáceas está representada por 14 géneros y 62 especies (Andrés-Agustín, 2011). Estudios realizados por Agustín-Andrés (2011) mencionan la existencia de 14 especies exclusivas de Mesoamérica, entre las cuales se encuentra la *Annona purpurea*, a partir del bagazo de la semilla de esta especie se aisló e identificó el ciclopéptido ciclopurpuracina (González-Tepale et al., 2018). Por otro lado, del extracto alcohólico de las hojas *A. diversifolia* se aisló una sustancia con actividad anticonvulsiónante y depresora del sistema nervioso central (SNC) conocida como palmitona (González-Trujano et al., 2006). Otros compuestos como laherradurina y cherimolina-2, también se aislaron de las semillas de *A. diversifolia*, de las que se demostró que presentaban actividad antiproliferativa *in vitro* en células HeLa y SW-480 (Schlie-Guzmán et al., 2009).

De acuerdo con diversos estudios se ha documentado que los radicales libres son responsables de causar enfermedades cardiovasculares, trastornos neuronales, Alzheimer, Parkinson, deterioro cognitivo leve, enfermedades del hígado, envejecimiento, aterosclerosis y cancer (Alam et al., 2013). Para contrarrestar estas enfermedades se han utilizado extractos vegetales con potencial terapéutico en el mantenimiento de la salud humana justificado por la presencia de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante y sus efectos benéficos (Singh et al., 2016). Los metabolitos secundarios que destacan por su actividad antioxidante son principalmente compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y taninos), compuestos de nitrógeno (alcaloides, aminoácidos, péptidos, aminas y derivados de clorofila), carotenoides tocoferoles y ácido ascórbico (Hassimotto et al., 2009). En años recientes los antioxidantes de origen natural provenientes de plantas como el ácido ascórbico (vitamina C), el α -Tocoferol (vitamina E), la glutatona, los carotenoides, y flavonoides, han sido utilizados en diferentes áreas de la industria farmacéutica, alimenticia y en el área médica (Karre et al., 2013). Estos compuestos, presentan una actividad comparable con antioxidantes sintéticos como el 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT) y el 2-terbutil-hidroxianisol (BHA), los cuales, sin embargo, pese a sus propiedades antioxidantes presentan la desventaja de tener efectos tóxicos (Koheil et al., 2011). Frente a este panorama las anonáceas en México, representan un recurso natural importante para la obtención de compuestos con potencial antioxidante. Hasta el momento sólo se ha desarrollado un estudio encaminado a la posibilidad de obtener ciclopéptidos de las semillas de anonáceas mexicanas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue demostrar el potencial antioxidante de extractos polares de semillas de *A. diversifolia* enriquecidos en ciclopéptidos. Finalmente, las semillas podrían ser una fuente rica de compuestos con actividad biológica, lo cual sería una razón para conservar y propagar este recurso natural.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Material Vegetal

Los frutos de *Annona diversifolia* fueron adquiridos en el mercado municipal de Tejupilco (coordenadas geográficas: 18° 53' 58" N y 100° 09' 01" O), Estado de México, en septiembre de 2019. Se consideraron frutos en estado de madurez fisiológica. Las semillas de los frutos fueron separadas manualmente de la pulpa, se lavaron con agua corriente para eliminar restos de mucilago o pulpa, y se secaron a temperatura ambiente por una semana para reducir su contenido de humedad. Se eliminaron aquellas semillas que presentaran daños fisiológicos o daños provocados por insectos.

3.2.2 Caracterización morfológica de las semillas

Las semillas de *A. diversifolia* fueron caracterizadas morfológicamente, midiendo las dimensiones (largo, ancho y grosor) de 30 semillas. Para ello se usó un verneir digital marca Steren, paralelamente, las semillas se pesaron individualmente empleando una balanza analítica marca Ohaus, posteriormente de cada semilla fue separado el endospermo (almendra) de su endocarpio (cáscara) con ayuda de unas pinzas mecánicas, dichas almendras fueron caracterizadas, como se describió para las semillas completas.

3.2.3 Obtención de extractos

Las almendras (2 kg) de *A. diversifolia*, fueron molidas en un procesador de alimentos marca NutriBullet para hacer más eficiente el proceso de maceración. Se prepararon extractos polaridad creciente: hexano, cloruro de metileno acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, y finalmente con una mezcla etanol/agua/ácido acético. Se comenzó con la adición de 3 L de hexano al material vegetal molido y se dejó reposar durante 3 días, transcurrido ese tiempo se separó el hexano del bagazo por filtración y se recuperó este disolvente por evaporación a vacío utilizando un rotavapor (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza), el disolvente recuperado se incorporó nuevamente a las semillas molidas (bagazo), así se mantuvo durante otros tres días, pasado ese lapso de tiempo se filtró y evaporó el disolvente, esta operación se repitió por una tercera

vez para finalmente obtener un extracto hexánico aceitoso y un residuo vegetal, el cual se extrajo sucesivamente, siguiendo el procedimiento mencionado, con cloruro de metileno (CH_2Cl_2), acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, y finalmente con una mezcla etanol/agua (1:1, v/v) adicionada con ácido acético al 0.1 %. De esta manera se obtuvieron extractos de diferente polaridad.

3.2.4 Detección de ciclopéptidos por cromatografía

Cada uno de los extractos obtenidos fue analizado por cromatografía en capa delgada para la detección de péptidos y ciclopéptidos, utilizando los reactivos ninhidrina y *o*-tolidina, respectivamente. Se prepararon cromatofolios con aplicaciones de cada uno de los diferentes extractos obtenidos: hexano, cloruro de metileno, acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, y etanol-agua-ácido acético y como testigos se utilizaron el aminoácido valina y el ciclopéptido 2,5-piperazindiona. Para la detección de péptidos y ciclopéptidos respectivamente. Primeramente, se realizó la detección de aminoácidos libres y péptidos lineales mediante la aplicación de muestras de cada uno de los extractos y el testigo en cromatofolios analíticos de silicagel, los cuales fueron eluidos con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:4:1). Después de eluir y evaporar la mezcla, se asperjaron con una disolución de ninhidrina al 1 % en acetona, posteriormente se revelaron las placas aplicando aire caliente por un minuto, donde una coloración rosa-violeta indicó presencia positiva para péptidos. En el caso de la detección de ciclopéptidos se usó otro cromatofolio en el que se colocaron nuevamente los extractos y el testigo 2,5-piperazindiona, dicha placa también se eluyó en la mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ y adicionalmente se colocó en una cámara que contenía un volumen pequeño de hipoclorito comercial (Cloralex), permitiendo de esta manera que los vapores de cloro interaccionaran con la placa por 20 minutos. Finalizado este proceso, se dejó evaporar el exceso de cloro por un periodo de 12-16 horas. Trascurrido este tiempo se roció con una solución de *o*-tolidina (0.5 % en agua y ácido acético glacial). La presencia de manchas con una tonalidad azul-morada en la placa revelada indicó presencia positiva para ciclopéptidos.

3.2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante

Los extractos metanólico, etanólico e hidroetanólico de semillas de *A. diversifolia* con presencia de ciclopéptidos fueron redisueltos en metanol al 80 % para la evaluación de la capacidad antioxidante por los ensayos ABTS y FRAP.

Ensayo ABTS

El ensayo de ABTS se llevó a cabo aplicando el método descrito por Re et al., (1999) adaptado a microplacas. La disolución stock del radical ABTS^{•+} fue preparada mezclando 10 mL de solución ABTS^{•+} (7.4 mM) con 10 mL de persulfato de potasio (2.6 mM) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 16 horas en un lugar oscuro. La disolución stock del radical ABTS^{•+} fue diluida con metanol puro y se verificó en un lector de microplacas que la absorbancia estuviera en un rango de 0.7 – 1.2. El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos colocando 20 μ L de muestra a probar y 180 μ L de la disolución ABTS^{•+} (diluida) en cada pozo. Como blanco se utilizaron 200 μ L de la dilución ABTS^{•+} (diluida). La disminución de la absorbancia se registró después de 10 minutos de incubación en un cuarto oscuro y se leyó en un lector de microplacas a 734 nm. La actividad antioxidante de las muestras fue determinada en base a una curva de calibración de Trolox en un rango de concentración entre 49.94 – 599.30 μ M. Con base en la ecuación obtenida se determinó los mg de muestra equivalentes a Trolox para capturar el radical ABTS. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo FRAP

La capacidad antioxidante por el ensayo FRAP se evaluó de acuerdo con el método descrito por Benzie y Strain (1996), adaptado a microplacas. Para la preparación del reactivo FRAP se prepararon las siguientes disoluciones: buffer de acetatos (300 mM, pH = 3.6), 2,4,6 Tripiridil-s triazina (TPTZ) (10 mM) en ácido clorhídrico (40 mM) y FeCl₃6H₂O (20 mM). Las tres disoluciones se

mezclaron en una proporción 10:1:1 (v/v/v). En cada pozo de una microplaca de 96, se colocaron 20 μL de muestra, 180 μL del reactivo FRAP, y 60 μL de agua destilada. Como blanco se utilizaron 260 μL del reactivo FRAP. La mezcla de reacción se incubó protegida de la luz (10 min), posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a 595 nm después de 30 segundos de agitación. La actividad antioxidante de las muestras fue determinada con base en una curva de calibración de Trolox con un rango de concentraciones de 49.94 – 599.30 μM . Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.2.6 Contenido de Fenoles Totales

El contenido de Fenoles Totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) con algunas modificaciones. Se preparó una disolución de Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v) y una disolución de carbonato de sodio al 20 % (p/v). El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 25 μL de extracto, 125 μL de agua destilada, 20 μL de dilución Folin-Ciocalteu y 30 μL de la dilución de carbonato de sodio al 20 %. Como blanco se utilizaron 150 μL de agua destilada y las cantidades de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio mencionadas. Después de 30 minutos de reacción se leyó la absorbancia a 760 nm. El contenido de fenoles de los extractos fue determinado con base en una curva de calibración de ácido gálico en rango de concentraciones de 10 – 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG g^{-1}).

3.2.7 Contenido de Flavonoides

El contenido de flavonoides totales fue determinado por el método propuesto por Chang et al., (2002). En un tubo falcon se mezclaron 0.5 mL de muestra (diluida en metanol al 80 %), 4.3 mL de agua destilada, 0.1 mL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10 % y 0.1 mL de acetato de potasio 1 M. La mezcla se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Posteriormente se

transfirieron 200 μL de cada tubo falcon a los pozos de una microplaca para medir las absorbancias a 415 nm. Como blanco se utilizaron 0.5 mL de metanol al 80 %. El contenido de flavonoides totales de los extractos fue determinado con base en una curva de calibración de quercetina en un rango de concentraciones de 0.5 – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra en base seca (mg EQ g^{-1}). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.2.8 Contenido de Proteínas Totales

El contenido de proteínas totales se determinó por el método de Bradford (1976). En un tubo eppendorf se colocaron 50 μL de extracto (diluído en agua destilada) y 950 μL del reactivo Bradford. La mezcla se agitó en vórtex (un minuto, 2 000 rpm). Una alícuota de la mezcla de reacción (200 μL) de cada extracto fue transferida a una microplaca de 96 pozos y se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 595 nm. El contenido de proteína total de los extractos fue determinado en base a una curva de calibración con albumina de suero bovino (BSA) en un rango de concentraciones de 100 – 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de BSA por gramo de muestra en base seca (mg EBSA g^{-1}). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.2.9 Separación de extractos por Cromatografía en Columna (CC)

Cada uno de los extractos (metanólico, etanólico e hidroetanólico), que por cromatografía en capa delgada mostraron prueba positiva para ciclopéptidos, se sometieron a separación por cromatografía en columna. Como fase estacionaria se usó sílica gel 60 (malla 70 – 230 ATSM, Merck®, Alemania), en una relación 1:30 p/p (extracto/ gel de sílice). La fase móvil consistió en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ con incrementos del disolvente más polar (MeOH) de 3 % en 3 % hasta llegar a un 50 %, después los incrementos de polaridad fueron de 10 % en 10 %, se utilizaron dos volúmenes de cambio de 600 mL (Wélé et al., 2004). Las fracciones obtenidas de la columna se concentraron a presión reducida en un rotavapor (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza). Cada fracción concentrada se

monitoreó por cromatografía en capa delgada utilizando las pruebas químicas de ninhidrina y Cl_2/o -tolidina para identificar las fracciones ricas en péptidos y ciclopéptidos, respectivamente. Las fracciones con patrones de coloración o RF similares se reunieron nuevamente y se determinó su potencial capacidad antioxidante mediante los ensayos ABTS y FRAP descritos anteriormente.

3.2.10 Análisis espectroscópico por RMN

Las FA que dieron una respuesta positiva a las pruebas químicas con *o*-tolidina para ciclopéptidos, se les hicieron estudios de RMN. Las FA se analizaron en un Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) marca Agilent DD2 a 400 MHz. Los espectros de RMN- 1H se determinaron a 400 MHz y los de RMN ^{13}C se midieron a 100 MHz, empleando acetona- d_6 adicionada con dos gotas de H_2O/D_2O (90:10) y Tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Así mismo, se determinaron espectros HSQC y APT.

3.2.11 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (diseño completamente al azar con tres repeticiones), para cada ensayo de capacidad antioxidante, fenoles totales, flavonoides y contenido de proteínas con el objetivo de identificar diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en los tratamientos. Se empleó la prueba de comparación de medias de Tukey. Se calcularon coeficientes de correlación de Pearson (R) para identificar la contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE. UU).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Caracterización morfológica de las semillas

Las semillas son de color café ocre y de forma cilíndrica (Figura 10) con dimensiones de 1.80 ± 0.11 , 0.87 ± 0.05 , 0.61 ± 0.08 cm en largo, ancho y grosor respectivamente (Cuadro 5). El peso que se registró para las semillas completas fue de 1.35 ± 0.16 g. Se presentan además las características de las

almendras de *A. diversifolia* una vez retirada la testa, teniendo un rendimiento aproximado de 63 % en almendra respecto del total de la semilla.

Cuadro 5. Caracterización morfológica semillas de *A. diversifolia*.

	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)	Peso (g)
Semilla	1.80 ± 0.11	0.87 ± 0.05	0.61 ± 0.08	1.35 ± 0.16
Almendra	1.50 ± 0.13	0.60 ± 0.07	0.49 ± 0.08	0.86 ± 0.12

Los resultados son promedios ± DE (n = 30). Fuente: Elaboración propia.



Figura 10. Semillas de *A. diversifolia*.

Lim (2012) en su revisión publicó valores de 2 y 1 cm para las dimensiones (largo, ancho respectivamente) de semillas de *A. diversifolia*, además de un rango de 25–80 semillas por fruto. Por su parte Marroquín-Andrade et al., (2011) reportan un peso de 1.43 y 0.93 g por semilla y almendra respectivamente, un rendimiento del 65 % en almendra, similar a lo registrado en este trabajo. En el estudio de Marroquín-Andrade et al., (2011) se realizó además una caracterización morfológica de las semillas de *A. diversifolia*, reportando valores de 2.26 y 1.32 cm para semillas y 1.85 y 0.93 cm para las almendras. Las variaciones que se presentan en estos estudios se pueden atribuir a la variabilidad de tamaños en los frutos de esta especie donde se manejan rangos en su peso desde los 500 g hasta los 900 g por fruto (Duke & duCellier, 1993; Julián-Loeza et al., 2011). Eshra et al., (2019) en una caracterización morfológica de semillas de *A. squamosa* reportaron

dimensiones (longitud, ancho y grosor) de 1.51, 0.70 y 0.51 cm para las semillas completas y 1.14, 0.55 y 0.46 cm respectivamente para las almendras. Sin embargo, pese a que las semillas de *A. squamosa* son más pequeñas tienen un mayor rendimiento (79 %) en almendra (0.209 g de almendra/ 0.264 g de semilla) respecto a los resultados presentados para *A. diversifolia*.

3.3.2 Obtención de extractos

Los rendimientos de los extractos obtenidos con cada uno de los disolventes utilizados se presentan en el Cuadro 6. Se aprecia un elevado contenido de aceite producto de la maceración con hexano representando un 20.17 % respecto del peso inicial de las almendras. Rendimiento cercano a lo que reporta Marroquín-Andrade *et al.*, (2011) en el análisis proximal con un 27.43 g de aceite por cada 100 g de materia seca de semilla de *A. diversifolia*.

Cuadro 6. Rendimientos de extractos de semillas de *A. diversifolia* obtenido con diferentes disolventes.

Disolvente	Rendimiento (%)
Hexano	20.17
Cloruro de metileno	21.96
Acetato de etilo	2.17
Acetona	0.86
Metanol	1.16
Etanol	0.30
Etanol-Agua-Ácido Acético	3.66

Los valores son cantidades finales en % por cada disolvente utilizado.

3.3.3 Detección de ciclopéptidos por cromatografía

Una vez obtenidos los extractos se llevó a cabo un monitoreo con dos pruebas químicas complementarias: ninhidrina y Cl₂/o-tolidina para detectar la presencia de péptidos lineales (aminoácidos libres) y ciclopéptidos respectivamente. De acuerdo con lo reportado en Wélé *et al.*, (2004). Para la prueba de detección de péptidos de carácter lineal, utilizando ninhidrina y valina como revelador y muestra de referencia, respectivamente. En la Figura 11 se aprecian manchas

con coloración violeta para los extractos de metanol, etanol, y la mezcla EtOH/H₂O/AcOH. Siegfried Ruhemann descubrió en 1910 que la reacción entre los grupos amino primarios y la ninhidrina, dan como resultado la formación de un cromóforo púrpura, conocido como colorante púrpura de Ruhemann (RP). El primer paso en la reacción implica el desplazamiento de un grupo OH de la ninhidrina por el grupo NH₂ de un aminoácido seguido de una descarboxilación y una hidrólisis. La reacción, además del RP genera como productos CO₂ y un aldehído (RCHO). Otros cromóforos que pueden presentarse tienen una coloración amarilla para el caso de aminoácidos como prolina (Friedman, 2004).

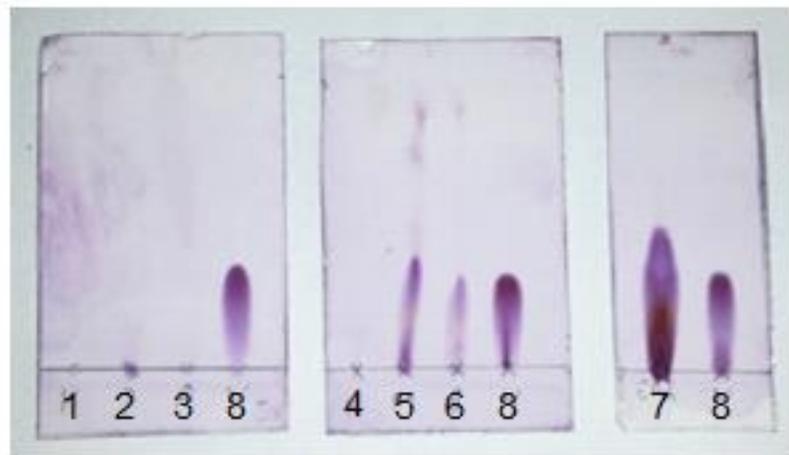


Figura 11. Cromatofolios de extractos de *A. diversifolia* revelados con ninhidrina para la detección de péptidos: 1) Extracto hexánico, 2) Extracto de CH₂Cl₂, 3) Extracto de AcOEt, 4) Extracto de acetona, 5) Extracto de metanol, 6) Extracto de etanol, 7) Extracto de EtOH/H₂O/AcOH, 8) Valina.

Los resultados para la detección de ciclopéptidos (Figura 12) dieron prueba positiva para los extractos de metanol, etanol, y la mezcla EtOH/H₂O/AcOH presentando manchas de coloración purpura grisáceo, misma que presentó el ciclopéptido 2,5-piperazindiona que se utilizó como testigo después de revelarse con la solución de Cl₂/*o*-tolidina.

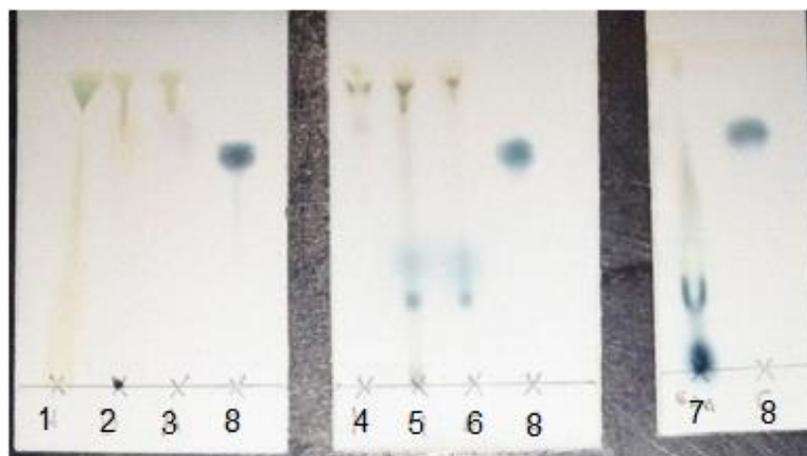


Figura 12. Cromatofolios de extractos de *A. diversifolia* revelados con Cl_2/o -tolidina para la detección de ciclopéptidos: 1) Extracto hexánico, 2) Extracto de CH_2Cl_2 , 3) Extracto de AcOEt, 4) Extracto de acetona, 5) Extracto de metanol, 6) Extracto de etanol, 7) Extracto de EtOH/H₂O/AcOH, 8) 2,5-piperazindiona.

Debido a que el grupo amino (NH o NH_2) en los ciclopéptidos no se encuentra libre, no puede reaccionar con el reactivo de ninhidrina. Por ello otros reactivos como la Cl_2/o -tolidina se han utilizado para detectar ciclopéptidos en plantas (Tan & Zhou, 2006). Compuestos con enlaces peptídicos bloqueados pueden detectarse por su conversión en *N*-cloro-compuestos seguidos de una reacción con *o*-tolidina (Allen, 1981). Por lo tanto, esta reacción de Cl_2/o -tolidina se resume en dos etapas primero una halogenación del compuesto y después la reacción del producto halogenado con la *o*-tolidina (Isaaq & Barr, 1977). Se sabe que la *o*-tolidina reacciona con compuestos clorados para dar un color azul (Reindel & Hoppe, 1954). El color producido puede ser función de a) la cantidad de cloro que reacciona con la base, b) la concentración del punto de la muestra (cantidad por área), c) la concentración del reactivo, y d) la finalización de la reacción (Isaaq & Barr, 1977). Esta metodología de revelado con reactivos como Cl_2/o -tolidina ha sido utilizada en el monitoreo para la identificación de nuevos ciclopéptidos de *A. cherimola* (Wélé et al., 2004). Otros estudios de separación y purificación de ciclopéptidos en *J. mahafalensis* también utilizaron esta técnica de monitoreo (Baraguey et al., 2000; Baraguey et al., 2001).

3.3.4 Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de los extractos con presencia positiva para ciclopéptidos se evaluó mediante los ensayos ABTS y FRAP. El ensayo ABTS mide la capacidad de un antioxidante para eliminar el catión radical ABTS^{•+}, un cromóforo verde-azul con una absorción máxima a una longitud de onda de 734 nm, cuya intensidad disminuye al ser neutralizado (Shahidi & Zhong, 2015). El ensayo FRAP se basa en la reducción del complejo Fe³⁺ de la tripiridiltriazina Fe (TPTZ)³⁺ al complejo Fe²⁺ de color azul intenso de Fe (TPTZ)²⁺ por la reacción con antioxidantes en un medio ácido (Antolovich et al., 2002). En el Cuadro 7, se observa que los valores de CA de los extractos de diferente polaridad muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). El extracto de metanólico presentó la CA más alta, tanto por el ensayo ABTS como por FRAP. En la pulpa de *A. diversilofia* se evaluó la CA por el ensayo ABTS y se encontró un valor inferior ($6.74 \mu\text{mol ET g}^{-1}$) a cualquiera de los reportados para los extractos de las semillas en este trabajo (Moo-Huchin et al., 2014), cabe mencionar que este valor se determinó en base húmeda. Otros estudios de la CA, evaluada por el ensayo ABTS, de extractos de diferente polaridad de semillas de anonáceas, mostraron los siguientes resultados: extractos hidrometanólicos de *A. coriacea*, ($159.36 \mu\text{mol ET g}^{-1}$) y *A. sylvatica* ($135.50 \mu\text{mol ET g}^{-1}$) (Benites et al., 2015), extractos metanol-acetona-agua de *A. crassiflora*, ($190.54 \mu\text{mol ET g}^{-1}$) (Prado et al., 2020), y extractos acuosos de *A. muricata*, ($83.00 \mu\text{mol ET g}^{-1}$) (Adefegha et al., 2015). Por otro lado, Orak et al., (2019) documentaron que el extracto metanólico, obtenido a partir de semillas de *A. muricata*, también mostró la mayor capacidad antioxidante, por el ensayo ABTS, con un valor de $905 \mu\text{mol ET g}^{-1}$, cabe resaltar que dicha tendencia también fue observada en el ensayo FRAP, sin embargo, se utilizó una curva de calibración diferente, por lo que sus unidades no son comparables a nuestro estudio. Si bien se han publicado más estudios para evaluar la CA por los ensayos ABTS y FRAP en extractos obtenidos a partir de semillas de anonáceas, las unidades en que se reportan dichos resultados difieren debido a que existen varias formas para reportar resultados, tales como, porcentaje de

inhibición de la oxidación, eficacia antirradical, concentración eficiente, equivalentes de Trolox, equivalentes de tocoferol, entre otros (Karakaya & Simsek, 2011, Passos et al., 2010; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006). La falta de estandarización para los ensayos generan diferencias en los resultados y limita las comparaciones entre diferentes muestras pues existen distintos valores de capacidad antioxidante para un mismo extracto o muestra (da Silva & Jorge, 2014). En general la CA en extractos de semillas de anonáceas es mayor en extractos más polares (Bhardwaj et al., 2014; Nguyen et al., 2020; Vikas et al., 2017; Volobuff et al., 2019). Los estudios de Benites et al., (2015), demuestran que bajo las mismas condiciones de estudio en *A. coriacea* y *A. sylvatica* la CA de semillas fue superior al obtenido en pulpa. Por el contrario, Prado et al., (2020) demostraron que hay mejores resultados en la cascara respecto de extractos de semillas de *A. crassiflora* aun utilizando los mismos disolventes de extracción. La cáscara, de *A. muricata* presentó una CA más alta que sus semillas y pulpa (Adefegha et al., 2015). En otro estudio se encontró que los valores de CA, aplicando el ensayo FRAP, fueron más altos, respecto a extractos etanólicos, para los extractos metanólicos de pulpa de *A. cherimola* (Barreca et al., 2011). Esta tendencia fue la misma que presentó nuestro estudio, por lo que los extractos se pueden ordenar de forma decreciente de acuerdo con su CA: metanol > etanol > Etanol-Agua-Ácido Acético. La actividad antioxidante en semillas de anonáceas también se ha documentado ampliamente aplicando el ensayo DPPH (Albuquerque et al., 2016; Benites et al., 2015; Kothari et al., 2012; Mariod et al., 2012; Menezes et al., 2019; Nwaneri-Chidozie et al., 2016; Padro et al., 2020; Roesler et al., 2007; Volobuff et al., 2019; Zahid et al., 2018). Sin embargo, los estudios realizados por Almeida et al., (2011) y Moo-Huchin et al., (2014), compararon los ensayos DPPH y ABTS, donde coinciden que existen subestimaciones del ensayo DPPH respecto del ABTS. Lo anterior puede explicarse considerando que para el ensayo DPPH las absorbancias se miden a 515 nm; a esta longitud los compuestos coloreados, como antocianinas y carotenoides presentes en la muestra, tienen un espectro que se superpone al del DPPH, y por tanto

interfiere con las mediciones (Arnao, 2000). Una segunda razón tiene que ver con los mecanismos de reacción del DPPH y los eliminadores de los radicales, que están influenciados por las estructuras de los antioxidantes, moléculas pequeñas tienen una mejor accesibilidad al centro activo del radical y por ende una mayor actividad antioxidante en este ensayo (Prior & Schaich, 2005). Una tercera razón sería explicada por los mecanismos de reacción reversibles del DPPH con ciertos compuestos fenólicos como el eugenol y sus derivados, lo que da como resultado valores más bajos de la CA (Bondet et al., 1997). Por otro lado, el ensayo ABTS, ofrece ventajas en términos del tiempo de reacción con los extractos, es más rápido (seis minutos) con respecto al DPPH (30 min). Además, el ABTS puede solubilizarse en medios acuosos y no polares, por lo que es posible evaluar la CA en muestras hidrofílicas y lipofílicas (Almeida et al., 2011). Debido a que la actividad antioxidante en los alimentos está determinada por una mezcla de diferentes compuestos antioxidantes con diferentes mecanismos de reacción, así como sinergias entre los mismos, es de suma utilidad la combinación de varios ensayos para determinar la capacidad antioxidante (Frankel & Meyer, 2000; Pérez-Jiménez et al., 2008; Novaes et al., 2019). Si bien cada método sólo proporciona una estimación de la CA, que está sujeta además a las condiciones de estos y de los reactivos, la combinación de varios ensayos permite la identificación de variaciones en las respuestas entre compuestos y extractos (Vasco et al., 2008). Los ensayos antioxidantes son de gran relevancia ya que son una evaluación preliminar de los efectos benéficos de las muestras o extractos, que permiten el análisis o comparaciones sobre los procesos oxidativos o inhibitorios de otros extractos o compuestos (Volobuff et al., 2019).

Cuadro 7. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos ricos en ciclopéptidos de *A. diversifolia* mediante los ensayos ABTS y FRAP.

Extracto	ABTS ($\mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$)
Metanol	201.88 \pm 4.93 a ^z	96.56 \pm 0.72 a
Etanol	128.61 \pm 7.75 b	77.58 \pm 2.69 b
Etanol-Agua-Ácido Acético	13.53 \pm 0.04 c	8.01 \pm 0.05 c

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (DMS, $p < 0.05$) (n=3)
Fuente: Elaboración propia

3.3.5 Contenido de Fenoles Totales

En el estudio de Julián-Loeza et al., (2011) se reportan los contenidos de fenoles y flavonoides totales para pulpa de tres variedades de frutos de *A. diversifolia*. Para el ensayo de fenoles los valores se encontraron en el intervalo de 1.29 – 1.70 mg EAG g⁻¹, mientras que el contenido de flavonoides se reportó en un rango de 1.07 – 1.52 mg EC g⁻¹. Como se observa en el Cuadro 8 el extracto metanólico de las semillas de *A. diversifolia*, contiene la mayor concentración de compuestos fenólicos 19.16 mg EAG g⁻¹. En otros estudios, los extractos etanólicos de semillas de cuatro variedades de *A. cherimolla*, se encontraron concentraciones de compuestos fenólicos más bajas (0.033 – 0.041 mg EAG g⁻¹) (Albuquerque et al., 2016), y los extractos hidrometanólicos de semillas de *A. muricata*, 8.19 mg EAG g⁻¹ (Menezes et al., 2019) son también inferiores. Sin embargo, son concentraciones bajas si se comparan con las encontradas en extractos etanólicos de semillas de *A. crassiflora*, 136.98 mg EAG g⁻¹ (Roesler et al., 2007), extractos metanólicos de semillas *A. squamosa*, 75.6 mg EAG g⁻¹ (Mariod et al., 2012), extractos metanol-acetona de semillas de *A. crassiflora*, 97.74 mg EAG g⁻¹ (Prado et al., 2020) extractos hidrometanólicos de semillas de *A. coriácea*, 147.08 mg EAG g⁻¹ y *A. sylvatica*, 58.10 mg EAG g⁻¹ (Benites et al., 2015). Un estudio más en *A. crassiflora* pero con extractos hidrometanólicos de semillas, se reporta un contenido fenólico de 32.04 mg EAG g⁻¹ (Menezes et al., 2019). De acuerdo con Do et al., (2014) y Nguyen et al., (2020), el contenido de fenoles totales en una misma especie se

ve afectado por el tipo de disolvente de extracción. Otro aspecto relevante es el método utilizado para la obtención de extractos. En un estudio en semillas de *A. squamosa* se compararon varios métodos de extracción y su efecto en el contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante. Siendo el método Soxhlet el que demostró ser el mejor en términos de eficiencia de extracción y extracción de compuestos fenólicos (Kothari et al., 2012). Los principales compuestos fenólicos encontrados en semillas de anonáceas son principalmente quercetina, catequina, epicatequina, *p*-coumarica, rutina, vainillina y ácidos orgánicos como ácido cafeico, clorogénico, férrico, ferúlico, gálico *p*-cumarico, vanílico y, siríngico obtenidos principalmente por estudios de HPLC (Mariod et al., 2012; Menezes et al., 2019; Prado et al., 2020).

Cuadro 8. Resultados de diferentes ensayos en extractos de semillas de *A. diversifolia*.

Extractos	Fenoles Totales (mg EAG g⁻¹_{bs})	Flavonoides (mg EC g⁻¹_{bs})	Proteínas Totales (mg BSA g⁻¹_{bs})
Metanol	19.16 ± 1.13 a ^z	1.56 ± 0.05 b	14.98 ± 0.75 b
Etanol	16.17 ± 0.55 b	9.37 ± 0.22 a	24.00 ± 0.23 a
Etanol-Agua- Ácido Acético	9.48 ± 0.18 c	1.00 ± 0.02 c	0.62 ± 0.06 c

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (DMS, *p*<0.05) (n=3). Fuente: Elaboración propia.

3.3.6 Contenido de Flavonoides

En lo que respecta al contenido de flavonoides si bien se tiene un estudio en pulpa de frutos de *A. diversifolia*, no existen antecedentes reportados en semillas para esta especie. Los resultados (Cuadro 8) muestran que el mayor contenido de flavonoides se encontró en el extracto etanólico, 9.37 mg EQ g⁻¹ y el menor, en el extracto hidroetanólico. En semillas de *A. squamosa* se evaluaron el contenido de flavonoides de cinco extractos (Hexano, Acetona, Cloroformo-Metanol, Etanol, Agua) donde la menor cantidad de flavonoides se encontró en el extracto acuoso (5.72 mg EQ g⁻¹), y la mayor cantidad en el extracto etanólico (42.44 mg EQ g⁻¹), si bien esta tendencia coincide con los resultados de nuestro estudio el mayor rendimiento de flavonoides en relación

al contenido de fenoles totales (29.95 mg EAG g⁻¹) se obtuvo utilizando acetona como disolvente de extracción (32.66 mg EQ g⁻¹) (Kothari & Seshadri, 2010). En otros estudios, la evaluación del contenido de flavonoides en semillas de anonáceas utilizando como referencia la quercetina, se encontró una concentración de 0.85 mg EQ g⁻¹ en extractos acuosos de semillas de *A. muricata*, (Adefegha et al., 2015). Este dato es inferior al valor más bajo encontrado en este trabajo para extracto hidroetanólico (1.00 mg EQ g⁻¹). Si bien en el estudio de Adefegha et al., (2015) también se evaluaron extractos acuosos de pulpa y pericarpio de *A. muricata* su contenido de flavonoides e incluso de fenoles totales es muy bajo en comparación a otras especies de anonáceas y reafirma que la cantidad de flavonoides presente en extractos acuosos tiende a ser menor respecto a otro tipo de disolvente utilizado. Por otra parte, el contenido de flavonoides en extractos hidrometanólicos de semillas de *A. coriácea*, 131.18 mg EQ g⁻¹ y *A. sylvatica*, 58.10 mg EQ g⁻¹ (Benites et al., 2015), fueron más altos a los encontrados en este estudio. Kothari et al., (2012) demostraron que el método de extracción utilizado también tiene una influencia en el contenido de flavonoides donde se reportan un rango de 2.55 – 13.10 mg EQ g⁻¹ para extractos acuosos y 2.83–45.84 mg EQ g⁻¹ para extractos metanolicos de semillas de *A. squamosa*. Si bien ya se mencionaron los estudios realizados en *A. squamosa* por Mariod et al., (2012), en *A. cherimolla* por Albuquerque et al., (2016) y en *A. crassiflora* por Prado et al., (2020), éstos utilizan otros flavonoides como rutina, catequina y epiquercetina para su curva de calibración además de que los valores que encontraron son muy bajos en comparación a los que se obtienen utilizando quercetina como referencia. Lo anterior, pone en evidencia las variaciones del contenido de flavonoides en las semillas de las anonáceas. Los estudios por HPLC para la identificación de flavonoides presentes en semillas de *A. crassiflora* marcan un mayor contenido de quercetina en comparación al contenido de catequina sin embargo esta tendencia se invierte en *A. muricata* (Menezes et al., 2019; Prado et al., 2020).

3.3.7 Contenido de Proteínas Totales

El método de Bradford para la determinación de proteínas se ha convertido en uno de los métodos colorimétricos más utilizados, debido a su velocidad de análisis, alta sensibilidad y linealidad (Bradford, 1976). El ensayo se basa en las interacciones entre residuos de aminoácidos básicos como la arginina, lisina e histidina y en menor grado, los residuos aromáticos como triptófano, fenilalanina y tirosina, con el colorante azul brillante G-250 de Coomassie (CBB) (Compton & Jones, 1985). En medio ácido, el colorante es rojo en su estado protonado (catión). El colorante en su forma de anión no está presente libremente en el pH del reactivo, pero se genera en presencia de proteínas (Jones et al., 1989). Mediante una serie de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas se forma un complejo proteína-colorante. El colorante se estabiliza en su forma aniónica que absorbe intensamente la luz a una longitud de 595 nm (Compton & Jones, 1985; Congdon et al., 1993; de Moreno et al., 1986). El colorante se une a macromoléculas con grupos funcionales reactivos específicos y no reacciona con aminoácidos libres, ni polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 6-10 péptidos) u otras moléculas que contengan nitrógeno o proteínas (Compton & Jones, 1985). Los resultados (Cuadro 8) muestran que el mayor contenido de proteína se obtuvo en el extracto etanólico (24.00 mg g⁻¹) seguido del metanólico y en menor medida el extracto hidroetanólico (0.62 mg g⁻¹). El contenido de proteína en el extracto etanólico fue más alto, respecto a las concentraciones encontradas por Martínez-Maldonado et al., (2015) en semillas de *A. squamosa* (9.92 mg g⁻¹). Similares contenidos de proteína se encontraron también en semillas de *A. squamosa*, en los estudios de Shukry et al., (2019) (10.59 mg g⁻¹), y Ranganatha et al., (2019) (8.75 mg g⁻¹). Sin embargo, son valores muy inferiores si se comparan con los resultados de análisis proximales realizados también en *A. squamosa* (44.3– 200.1 mg g⁻¹) (Abdualrahman et al., 2019; Eshra et al., 2019; Hassan et al., 2008; Mariod et al., 2010), en semillas de *A. crassiflora* (163.3 mg g⁻¹) (Caramori et al., 2004), en *A. cherimolla* (295.3 mg g⁻¹) (Branco et al., 2015), en *A. muricata* (187.6 mg g⁻¹) (Torres et al., 2013), y en *A. diversifolia* (154 – 187.6 mg g⁻¹) (Marroquín-Andrade et al., 2011; Torres

et al., 2013). Si bien el método Bradford ofrece una cuantificación del contenido de proteínas relacionándolo con un estándar de albumina de suero bovina (para producir una curva de absorbancia vs concentración de proteína en muestra) la suposición de la sensibilidad del ensayo o respuesta no siempre es correcta, ya que hay variabilidad entre una u otra proteína produciendo subestimaciones o sobrestimaciones además de interferencias por otros factores a considerar como detergentes iónicos y no iónicos, proteínas glicosiladas, y metiladas (Brady & Macnaughtan, 2015; Noble & Bailey, 2009). Las variaciones o interferencias en el ensayo Bradford se pueden atribuir a tres grandes aspectos: 1) La relación de los aminoácidos específicos presentes en la proteína. Las proteínas con un mayor porcentaje de residuos de arginina y lisina dan valores más altos de absorbancia que una muestra con la misma concentración de proteína, pero con menor porcentaje de residuos básicos de arginina o lisina (Brady & Macnaughtan, 2015). 2) Las concentraciones superiores a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ – $1\ 000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de proteínas están por fuera de la linealidad del método (Lozzi et al., 2008) y se comienzan a generar datos erróneos. 3) Las interferencias se pueden deber a la presencia de compuestos como el dodecil sulfato de sodio, flavonoides, anfolitos, buffers básicos, e hidróxido de sodio, los cuales modifican los valores de absorbancia del reactivo y por ende cambian la respuesta del colorante cuando reacciona con la muestra de proteína (Compton & Jones 1985; Godshall, 1983; Kruger, 1994, Lucarini & Kilikian, 1999; Spector, 1978).

3.3.8 Correlación de fenoles y flavonoides totales con capacidad antioxidante

Los coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) con el contenido de fenoles, flavonoides y proteínas totales se presentan en el Cuadro 9. La capacidad antioxidante evaluada con los ensayos ABTS y FRAP presenta una alta correlación positiva ($R = 0.981$ y $R = 0.982$, $p < 0.05$, respectivamente) con el contenido de fenoles totales. Por otra parte, no hubo una correlación significativa entre el contenido de flavonoides con la actividad antioxidante medida con ambos ensayos. Esto sugiere que además de los

flavonoides otro tipo de compuestos fenólicos podría contribuir a la CA en semillas de *A. diversifolia*. En diferentes estudios de anonáceas se ha encontrado una correlación alta entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante (Adefegha et al., 2015; Bharwaj et al., 2014; Moo-Huchin et al., 2014; Nguyen et al., 2020; Orak et al., 2019; Prado et al., 2020; Vikas et al., 2017; Volobuff et al., 2019), mientras que otros autores no encontraron correlación con el contenido de flavonoides totales como en nuestro estudio (Moo-Huchin et al., 2014).

Cuadro 9. Coeficientes de Correlación de Pearson (R) de diferentes parámetros y la capacidad antioxidante de extractos de *A. diversifolia*.

Parámetros	Coeficiente de Correlación (R)	
	ABTS	FRAP
FRAP	0.981	
Fenoles Totales	0.979	0.982
Flavonoides Totales	0.186	0.369
Proteínas	0.703	0.826

Fuente: Elaboración propia.

En el estudio de Benites et al., (2015) se reportan contenidos de fenoles totales en las dos especies de *A. coriacea* y *A. sylvatica* superiores a nuestro estudio en *A. diversifolia*, sin embargo la capacidad antioxidante medida por el ensayo ABTS es superior a la medida en Benites et al., (2015) lo que sugiere la presencia de compuestos fenólicos con una potente capacidad antioxidante en *A. diversifolia*, respecto a los que se pudieran encontrar en las dos especies antes mencionadas, o bien efectos sinérgicos con otros compuestos. Este comportamiento de bajo contenido de fenoles, pero con una alta actividad antioxidante ha sido documentado por Vasco et al., (2008) en diferentes frutos tropicales de Ecuador. Extractos metanólicos y etanólicos obtenidos a partir de la pulpa de frutos de *A. cherimola* resultaron ser poderosos eliminadores de radicales libres. La capacidad reductora, así como una actividad antioxidante primaria se atribuye a grupos hidroxilo relacionados a estructuras fenólicas presentes en dichos extractos (Barreca et al., 2011). Sin embargo, en un

estudio de extractos de semillas de *A. squamosa*, utilizando disolventes de diferente polaridad, no se encontró una correlación entre el contenido de flavonoides o compuestos fenólicos, respecto a la CA. Por tanto, la actividad antioxidante presente en dichos extractos se le atribuye a diversos fitoquímicos que pertenecen a diferentes grupos de metabolitos secundarios y varían ampliamente en sus propiedades químicas (Kothari & Seshadri, 2010). De acuerdo algunos estudios, la distribución del contenido fenólico en la cáscara de las anonáceas es superior al encontrado en pulpa, y semillas (Adefegha et al., 2015), lo anterior podría explicarse, considerando que la cascara está expuesta a factores ambientales que provocan estrés, tal y como los rayos ultravioletas de la luz solar (Soumaya et al., 2013). Dichos factores generan una síntesis intensa de compuestos fenólicos para disminuir el estrés oxidativo (Chanwitheesuk et al., 2005). Por otro lado, las diferencias en CA de los extractos obtenidos con disolventes de diferente polaridad, está relacionada con el carácter hidrofóbico o hidrofílico en los compuestos fenólicos de las muestras de análisis (Chavan et al., 2012; Fontana et al., 1998). En nuestro estudio la mayor capacidad antioxidante se encontró en el extracto metanólico, se ha documentado que el metanol puede extraer la mayoría de los compuestos polares que están asociados con las propiedades antioxidantes (Do et al., 2014). Si bien se han descrito a los compuestos fenólicos como excelentes donadores de electrones debido a que sus grupos hidroxilo contribuyen a la reducción de radicales libres y estimulan, en la célula, la producción de moléculas endógenas (Nguyen et al., 2020), también existen otros compuestos como tocoferoles, carotenoides, azúcares reductores y terpenos, que podrían contribuir o tener efectos sinérgicos a dicha propiedad (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Por otro lado, las correlaciones positivas moderadas ($R = 0.703$, y $R = 0.826$ $p < 0.05$) entre los ensayos ABTS y FRAP respectivamente, respecto al contenido de proteínas totales en los extractos, se pueden atribuir a la capacidad para eliminar ERO, radicales libres, quelación de metales, reducción de hidroperóxidos, entre otras. Las proteínas difieren de otros antioxidantes

alimentarios ya que pueden actuar multifuncionalmente. Los mecanismos que actúan en la actividad antioxidante de las proteínas dependen de la composición de aminoácidos que las conforman. Los aminoácidos más reactivos son aquellos que contienen en su cadena lateral azufre (metionina y cisteína), cadenas aromáticas (triptófano, tirosina y fenilalanina), y cadenas con el grupo imidazol (histidina) (Elias et al., 2008). Si bien el método de Bradford se basó en interacciones con aminoácidos específicos como algunos de los ya antes mencionados. La actividad antioxidante de esos residuos está limitada a la estructura de la proteína, debido a que algunos pueden localizarse dentro de la parte del núcleo y ser inaccesibles para las moléculas oxidantes y por tanto mostrar una actividad moderada (Elias et al., 2008). Caso contrario en péptidos obtenidos de hidrólisis de proteínas donde se ve aumentada la exposición de los aminoácidos y por consecuencia aumenta su capacidad de eliminar radicales libres y quelación de metales.

3.3.9 Evaluación de la capacidad antioxidante de FA

Los extractos que dieron una prueba positiva para la presencia de ciclopéptidos fueron sometidos a una separación primaria por cromatografía en columna. Se obtuvieron 20 grupos de fracciones por extracto (Cuadros A1-A3 en apéndices). Las fracciones obtenidas y que dieron prueba positiva en el monitoreo para ciclopéptidos fueron reunidas por afinidad de patrones de coloración (Figuras A1-A12 en apéndices) y/o RF similares, los resultados de la evaluación de su capacidad antioxidante se reportan en los Cuadros 10-12 para cada extracto. En lo que respecta al fraccionamiento del extracto metanólico, las FA 9-11 tuvieron la mayor capacidad antioxidante (262.83 y $103.71 \mu\text{mol ET g}^{-1}$), en ambos ensayos. Las FA (11-13) en el extracto etanólico fueron las de mayor actividad antioxidante (260.24 y $140.74 \mu\text{mol ET g}^{-1}$) en los dos ensayos. En los extractos indicados anteriormente se mantiene la tendencia de los valores más bajos en actividad antioxidante para las FA en la última sección 16-20. Sin embargo, este comportamiento se invierte totalmente en el extracto hidrometanólico ya que fue en estas FA que se encontraron los mejores resultados de capacidad antioxidante en el extracto (156.19 y $118.66 \mu\text{mol ET}$

g⁻¹) no obstante, son valores inferiores a los encontrados en los máximos de los dos extractos metanólico y etanólico. Se resalta que las FA con los valores más altos en capacidad antioxidante son superiores al valor encontrado en el extracto original, antes de su fraccionamiento (Cuadro 7). Para el caso de los extractos etanólico e hidroetanólico cualquier FA analizada superó a los valores de capacidad antioxidante del extracto que provenían.

Cuadro 10. Evaluación de la capacidad antioxidante de las FA del extracto Metanol.

FA	ABTS ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ muestra)	FRAP ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ muestra)
6-7	158.59 \pm 0.62 c ^Z	41.79 \pm 0.43 c
8	47.01 \pm 0.15 e	14.13 \pm 0.48 e
9-11	262.83 \pm 0.86 a	103.71 \pm 0.96 a
12-15	193.03 \pm 0.53 b	85.36 \pm 0.42 b
16-20	62.96 \pm 0.78 d	27.92 \pm 0.74 d

^Z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (DMS, $p < 0.05$) (n=3).
Fuente: Elaboración propia

Cuadro 11. Evaluación de la capacidad antioxidante de las FA del extracto Etanol.

FA	ABTS ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ muestra)	FRAP ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ muestra)
6-8	236.82 \pm 0.27 b ^Z	132.93 \pm 0.93 b
9-10	215.84 \pm 0.55 c	125.24 \pm 0.90 c
11-13	260.24 \pm 1.34 a	140.74 \pm 0.82 a
16-20	130.40 \pm 1.71 d	74.74 \pm 0.63 d

^Z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (DMS, $p < 0.05$) (n=3).
Fuente: Elaboración propia

Cuadro 12. Evaluación de la capacidad antioxidante de las FA del extracto Etanol/H₂O/AcOH.

FA	ABTS ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ muestra)	FRAP ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ muestra)
5-6	48.56 \pm 0.40 d ^Z	12.75 \pm 0.07 d
7-11	71.67 \pm 0.72 c	57.44 \pm 0.60 c
12-15	122.67 \pm 0.97 b	94.53 \pm 0.75 b
16-20	156.19 \pm 0.85 a	118.66 \pm 0.99 a

^Z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (DMS, $p < 0.05$) (n=3).
Fuente: Elaboración propia.

Estudios de capacidad antioxidante en corteza de *A. senegalensis* obtuvieron también valores más altos en el ensayo FRAP de fracciones (obtenidas con hexano, acetato de etilo y metanol) comparadas con el extracto crudo obtenido directamente de la corteza. No obstante, para el caso del ensayo ABTS los valores obtenidos en las fracciones con acetato y metanol fueron más bajos que en el extracto crudo. Aunque de manera general todas las fracciones presentaron una mejor actividad antioxidante comparadas con el estándar (ácido ascórbico). La actividad antioxidante en dicho estudio, se le atribuyeron a la presencia de compuestos bioactivos como flavonoides, fenólicos, esteroides, y taninos. Sin embargo, se plantea la necesidad de determinar los compuestos responsables de dicha actividad (Omeke et al., 2019). Por otra parte, el fraccionamiento bio-dirigido de Volobuff et al., (2019) del extracto metanólico más potente (pulpa) de *A. cacasans* se obtuvo un compuesto (acetogenina) que mostró mayor actividad antioxidante en el ensayo ABTS que la fracción de acetato de etilo del que provenía. Por el contrario, estudios realizados, en hojas de *A. muricata* determinaron la CA de varias fracciones y de un compuesto aislado (annonacina), encontrando en dicho compuesto la menor CA, en comparación a las fracciones (Roduan et al., 2019). Lo anterior se explicaría a un efecto sinérgico de compuestos como glucósidos, terpenoides, esteroides, alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides y polifenoles aún presentes en los extractos/fracciones (Gerge et al., 2012; Ningsih et al., 2016; Yang et al., 2015).

3.3.10 Análisis espectroscópico por RMN

De las FA que fueron analizadas, la FA 6-8 aportó información importante deducida a partir del espectro de RMN-¹H, mostrado en la Figura 13, donde se observa un conjunto de señales de baja intensidad en la región 7.0 – 9.0 ppm que probablemente pertenezcan a los hidrógenos de los grupos amida (RCO-NH-R') de enlaces peptídicos que forman péptidos y/o ciclopéptidos, representados de manera general en la Figura 14 (Tan y Zhou, 2006). Así mismo, en la región de 10 – 22 ppm del espectro RMN-¹³C mostrado en la Figura 15, se corroboran las señales que podrían relacionar a la presencia de

grupos metilo ($-\text{CH}_3$) con los posibles residuos de aminoácidos presentes en cantidades minoritarias en esta fracción.

Por otro lado, las señales que se localizan en la región entre 60 – 105 ppm del espectro de RMN- ^{13}C , aportan evidencia de la presencia de al menos un disacárido en la muestra FA 6-8 analizada, y muchas de las señales observadas pudieran ser como las publicadas para la sacarosa (Jones et al., 1979).

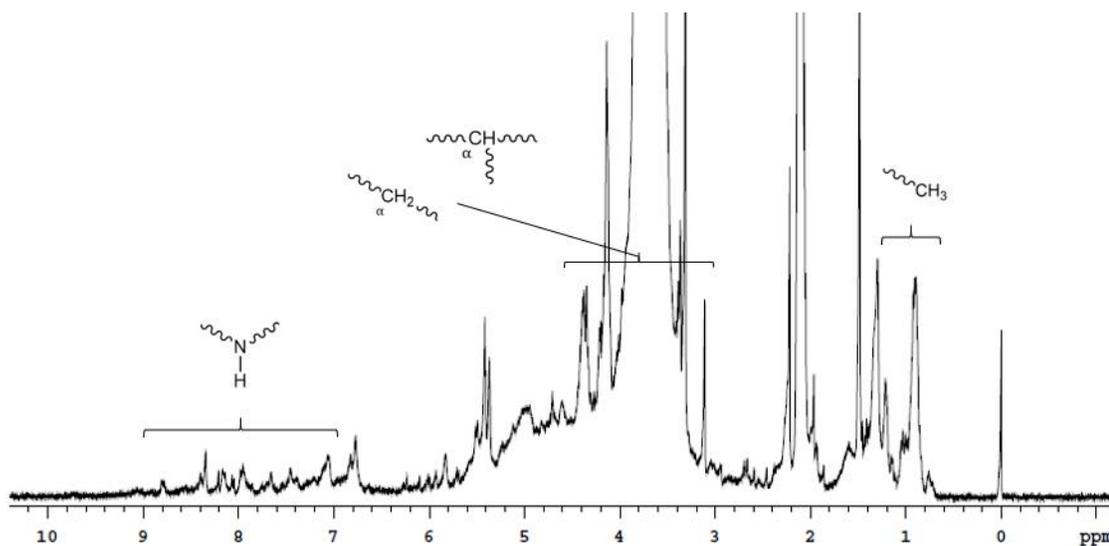


Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN- ^1H , 400 MHz, acetona- d_6 - D_2O 10 %, TMS) de la FA 6-8, extracto etanólico de *A. diversifolia*.

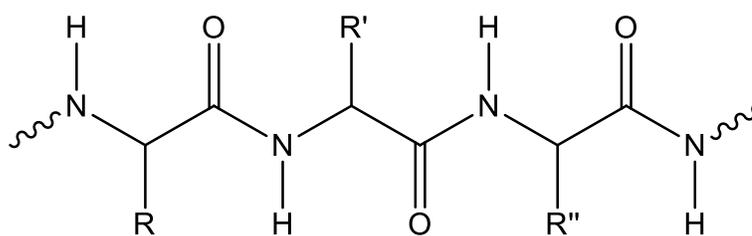


Figura 14. Representación general de un péptido.

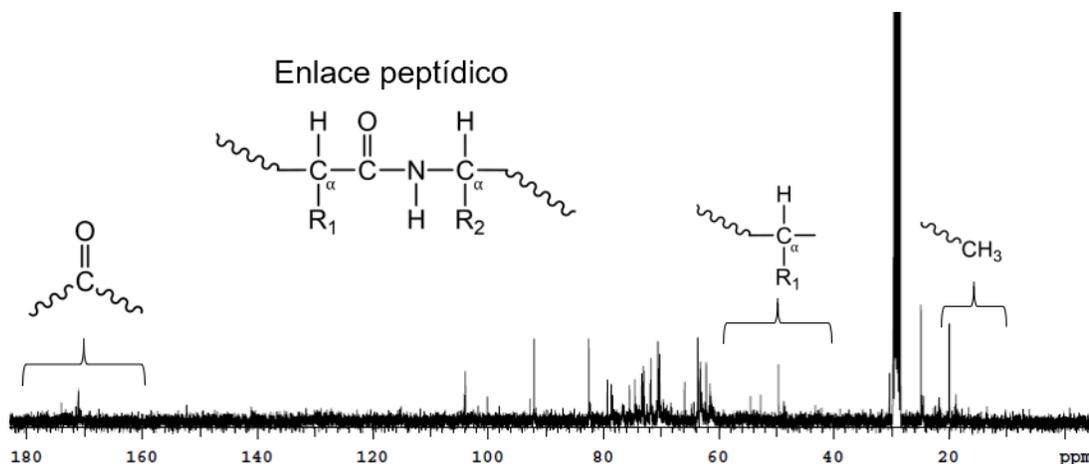


Figura 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN-¹³C, 400 MHz, acetona-d₆-D₂O 10 %, TMS) de la FA 6-8, extracto etanólico de *A. diversifolia*.

Continuando con el análisis, para corroborar la presencia de la sacarosa, en la fracción FA 6-8, en el espectro APT mostrado en la Figura 16 se pueden diferenciar señales para carbonos de grupo metileno (-CH₂) y cuaternarios (C) que muestran señales positivas (hacia arriba) de carbonos metilo (-CH₃) y metino (-CH) que generan señales negativas (hacia abajo). En este sentido, las señales que aparecen en la región 60 – 105 ppm (Figura 17), corroboran la presencia en abundancia de la sacarosa, presente en la FA 6-8 estudiada. En dicho espectro de APT (RMN-¹³C), se detecta una señal a frecuencia alta en 103.9 ppm asignable a un carbono cuaternario como el mostrado por el carbono C2' de la sacarosa, en tanto que la señal hacia abajo en 92.0 ppm correspondería al C1 de un grupo CH anomérico, como las estructuras parciales A y B de la Figura 18, mostrando las señales típicas de disacáridos. Para continuar, este mismo espectro APT exhibe señales positivas (hacia arriba) entre 61.5 – 64.0 ppm que se relacionan con tres grupos hidroximetileno (CH₂OH), presentes en este disacárido. Y el resto de las señales negativas (hacia abajo) (δ_c 70.5, δ_c 71.9, δ_c 72.9, δ_c 73.1, δ_c 74.5, δ_c 78.6, y δ_c 82.5), corresponderían a los cinco grupos -CHOH y dos grupos R-CHOR) restantes.

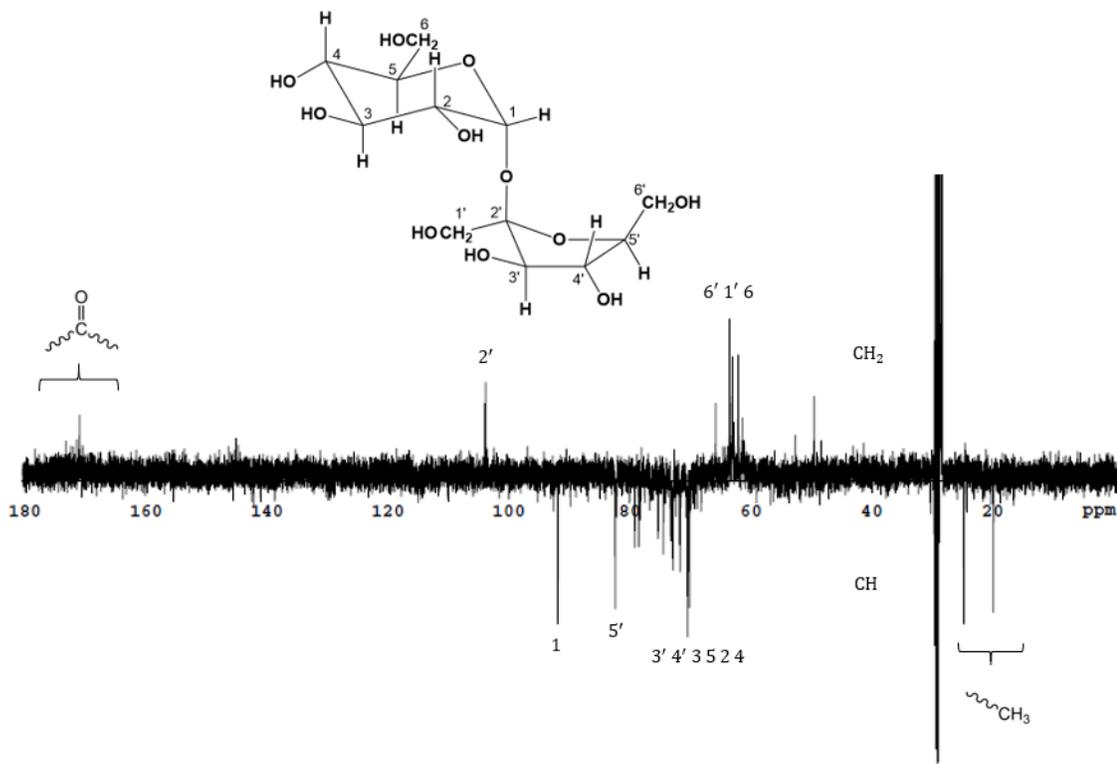


Figura 16. Espectro APT de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN-¹³C, 400 MHz, acetona-d₆-D₂O 10 %, TMS) de la FA 6-8, extracto etanólico de *A. diversifolia*.

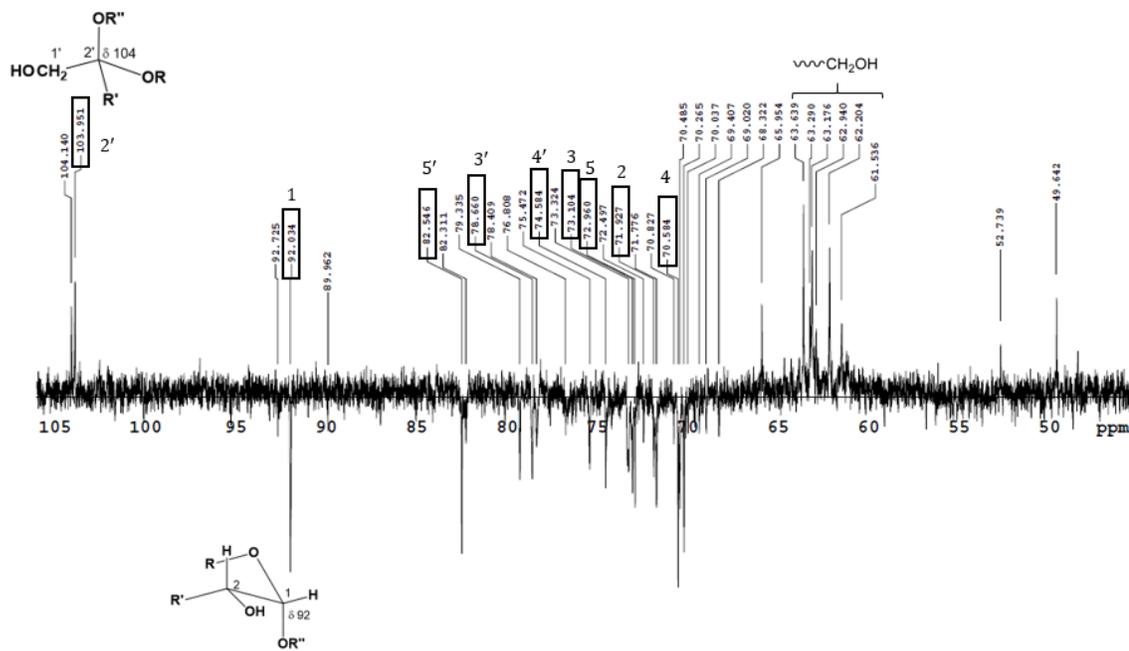


Figura 17. Expansión de 45 a 105 ppm del espectro APT de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN-¹³C, 400 MHz, acetona-d₆-D₂O 10 %, TMS) de la FA 6-8, extracto etanólico de *A. diversifolia*.

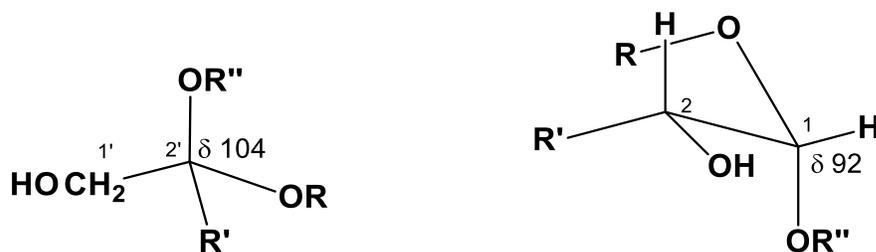


Figura 18. Estructuras parciales A y B, que conducen a la identificación de disacáridos como la sacarosa por la presencia de señales en 104 y 92 ppm en el espectro APT de la fracción FA 6-8.

Finalmente, en el espectro HSQC (Simpson, 2008), de esta fracción FA 6-8 mostrado en la Figura 19, exhibe correlaciones heteronucleares carbono-hidrógeno a un enlace (RC-H). En la Figura 20 se presenta una expansión del espectro HSQC, se observaron señales en 5.34 ppm (hidrógeno anomérico) con 92.0 ppm (C1) de la α -D-glucosa enlazada a la D-fructosa. El resto de las señales que guardan correlaciones tipo HSQC entre 60 y 83 ppm (Figura 21) del trazo vertical (RMN- ^{13}C) y las del trazo horizontal en el intervalo de 3.2 a 4.2 ppm (RMN- ^1H), corresponden al patrón observado para el publicado para la sacarosa, para corroborar las asignaciones anteriores, se hicieron comparaciones de estos espectros de RMN de la fracción FA 6-8 con los espectros de RMN de una muestra auténtica de nuestro banco de datos, específicamente el espectro de RMN- ^{13}C de la sacarosa determinado en D_2O , mismo que se presenta en la Figura 22, quedando plenamente identificada a la sacarosa como el componente mayoritario en esta fracción (Schulze-Sünninghausen et al., 2017), cuya estructura se muestra en la Figura 23.

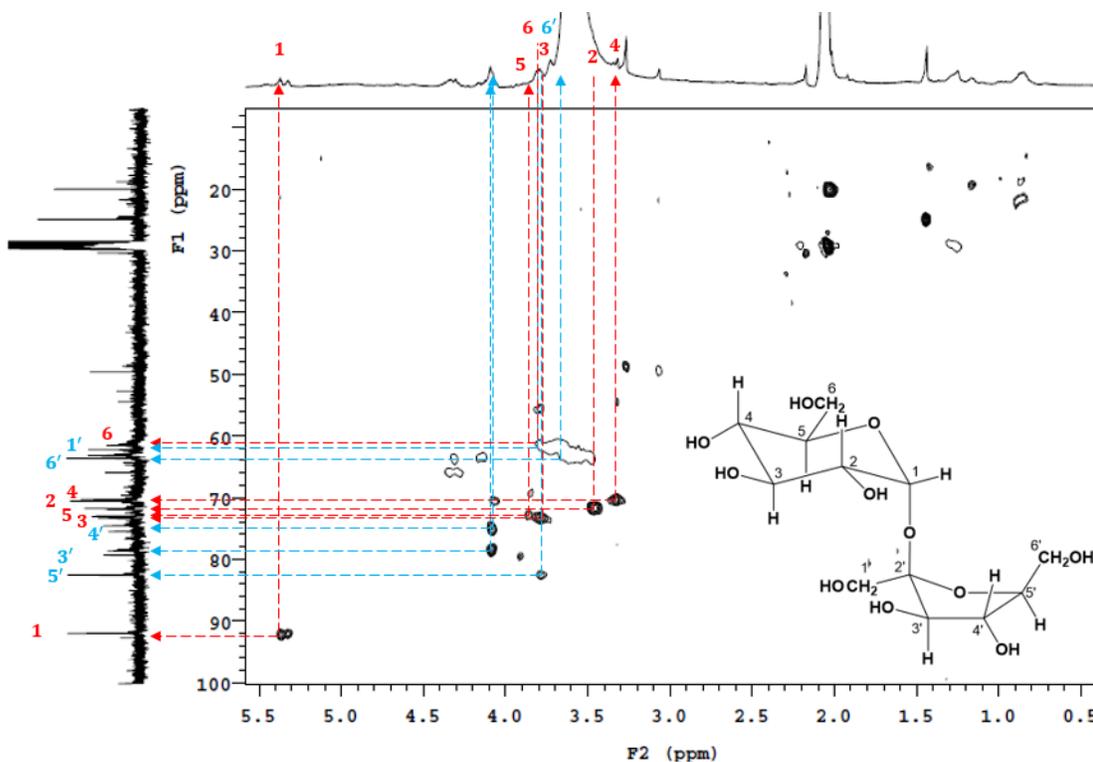


Figura 19. Expansión de 0.5 a 5.5 ppm en RMN-¹H (F2) y de 10 a 100 ppm en RMN-¹³C (F1) del espectro HSQC (en acetona-d₆-D₂O 10 %) de la Sacarosa, extracto etanólico de *A. diversifolia*.

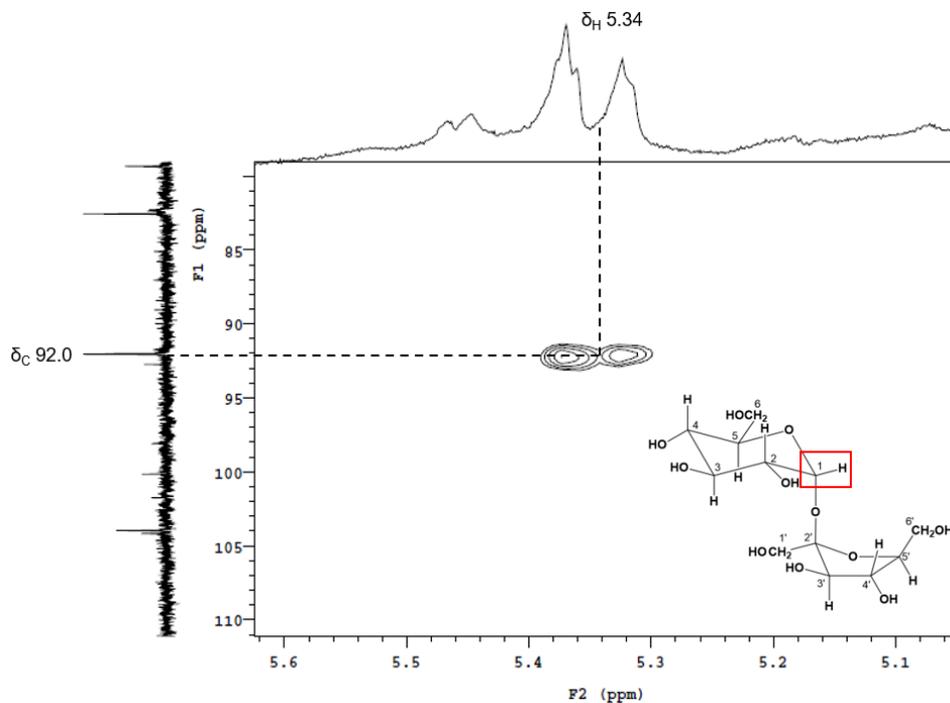


Figura 20. Expansión de 5.1 a 5.6 ppm en RMN-¹H (F2) y de 80 a 110 ppm en RMN-¹³C (F1) del espectro HSQC (en acetona-d₆-D₂O 10 %) de la α-D-glucosa enlazada a la D-fructosa, extracto etanólico de *A. diversifolia*.

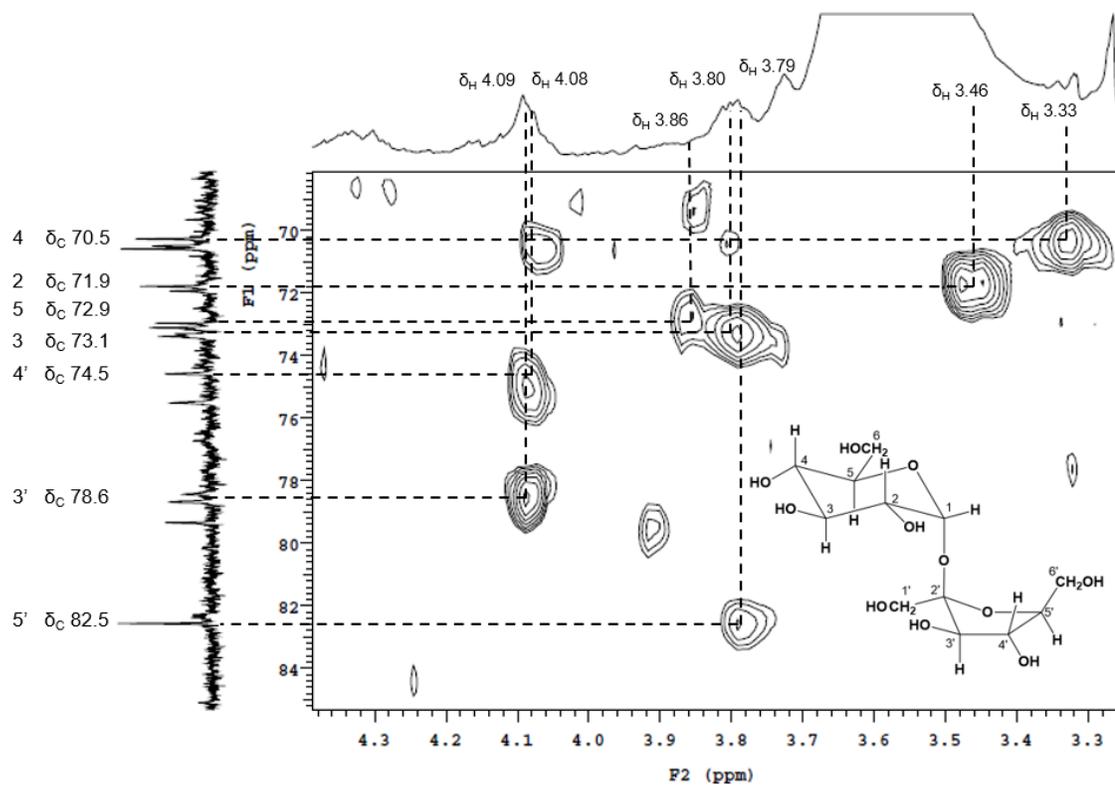


Figura 21. Expansión de 3.3 a 4.3 ppm en RMN-¹H (F2) y de 68 a 85 ppm en RMN-¹³C (F1) del espectro HSQC (en acetona-d₆-D₂O 10 %) de la sacarosa, extracto etanólico de *A. diversifolia*.

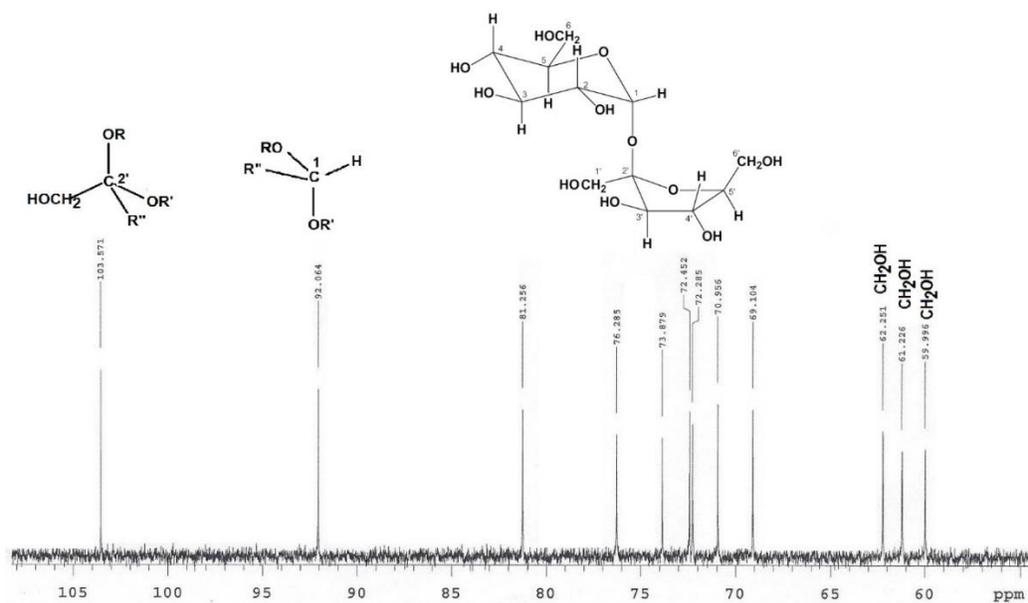


Figura 22. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C (RMN-¹³C. 100 MHz, D₂O, TMS) de la sacarosa.

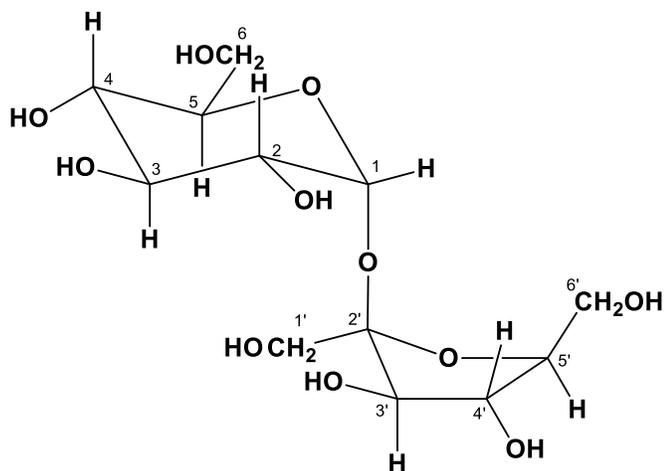


Figura 23. Estructura de la sacarosa como componente mayoritario encontrado en la fracción FA 6-8 del extracto etanólico de semillas de *A. diversifolia*.

Por otro lado, las pequeñas trazas de ciclopéptidos observadas, se corroboran como se estableció anteriormente por la presencia de un conjunto de señales positivas (hacia arriba) entre 160 y 180 ppm para carbonos de grupo carbonilo de amida (R-CONHR), en el mismo espectro APT (Silverstein et al, 2005), (Figura 16). En tanto que, las pocas señales positivas y negativas entre 40 – 60 ppm corrobora a los carbonos α al grupo carbonilo (C=O) de tipo -CH₂ para Gly, y -CH para el resto de los aminoácidos) al grupo carbonilo. En la región de 20 – 40 ppm se localizarían mayoritariamente el resto de los carbonos metino y metileno. Las señales negativas que se localizan entre 10 y 22 ppm corresponderían a carbonos metilo (-CH₃) presentes en aminoácidos como, por ejemplo: Ala, Ile, Leu, Thr, o Val.

Por otra parte, en la expansión del espectro de correlación espectroscópica heteronuclear a un enlace mostrado en la Figura 24, se observaron resonancias en la región 10 – 22 ppm que correlacionaron a un enlace con los hidrógenos de la región 1.5 – 0.5 ppm, se presupone que correspondan a grupos metilo (-CH₃). Si bien en el espectro HSQC se hace evidente una mezcla aun con otros compuestos y además de la superposición de resonancias, se podría hacer un análisis preliminar. La resonancia en 18.8 ppm para RMN-¹³C se correlaciona con la señal en 0.87 ppm para RMN-¹H, la treonina es el aminoácido que podría ser el responsable de estas señales (δ_c 17.5, δ_H 0.98), además se presenta una

señal en δ_C 65.9 y δ_H 4.28 ppm que corresponde al carbono β de dicho aminoácido (δ_C 66.7, δ_H 3.95). Por otra parte, entre 0.8 y 0.9 ppm se presenta una superposición aparentemente de dos señales (δ_H 0.85, δ_H 0.89) que correlacionan a los carbonos a δ_C 21.8 y δ_C 22.4; señales que se relacionarían a grupos metilo presentes en el aminoácido leucina (δ_H 0.77, δ_C 22 y δ_H 0.85, δ_C 22.4). Las resonancias en δ_H 1.16, δ_C 19.2 y δ_H 1.42, δ_C 16.6 se correlacionan a grupos metilo similares a los que presentan en la valina (δ_H 0.82, δ_C 19.5 y δ_H 0.95, δ_C 17.3). La asignación de señales en la región en 30 – 32 ppm para RMN- ^{13}C y 2.0 – 2.4ppm para RMN- 1H se dificulta al no tener plena certeza del tipo de carbonos presentes (-CH y -CH $_2$ según el espectro ATP), además de presentarse una superposición espectral en esa zona y no tener claridad de la multiplicidad en los protones, ni es posible establecer cierto tipo de conectividad entre estos aminoácidos hasta que se tenga una muestra suficientemente pura y abundante para efectuarle más estudios.

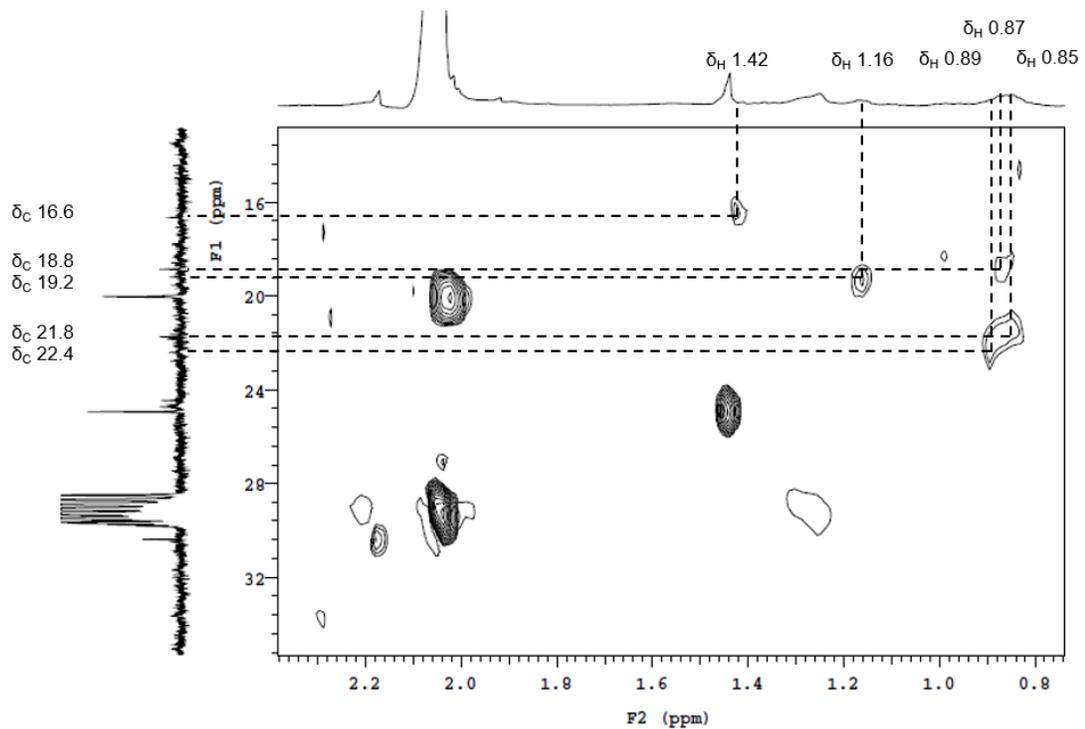


Figura 24. Expansión de 0.5 a 5.5 ppm en RMN- 1H (F2) y de 10 a 100 ppm en RMN- ^{13}C (F1) del espectro HSQC (en acetona- d_6 - D_2O 10 %) de la FA 6-8, extracto etanólico de *A. diversifolia*.

3.4 Conclusiones

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos más polares de semillas de *A. diversifolia* comparados con otras semillas del mismo género. Se encontraron correlaciones positivas entre el contenido de fenoles totales y contenido de proteínas totales con la capacidad antioxidante de los extractos.

Así mismo se documenta el contenido de flavonoides totales no reportado aún en semillas de *A. diversifolia*.

La mayoría de las fracciones agrupadas con presencia de ciclopéptidos detectadas por CCD, mostraron una mayor actividad antioxidante que el extracto crudo del que provenían.

Se logró identificar en una fracción grupos funcionales pertenecientes a enlaces peptídicos, a pesar de detectar una presencia notable de sacarosa en la fracción; esto es bastante lógico debido al alto contenido de este disacárido en las fracciones más polares de extractos de frutos como en nuestro caso. Los grupos funcionales peptídicos (amido), se podrían relacionar con las conformaciones estructurales de péptidos y/o ciclopéptidos.

La detección de sacarosa en las fracciones con capacidad antioxidante podría promover efectos sinérgicos responsables de esta propiedad. Por lo que, es necesario realizar más estudios encaminados al aislamiento y purificación para lograr una evaluación directa de actividades biológicas de ciclopéptidos obtenidos de *Annona diversifolia*.

3.5 Literatura citada

- Abdalla, M. A., & McGaw, L. J. (2018). Natural cyclic peptides as an attractive modality for therapeutics: a mini review. *Molecules*, 23(8), 2080.
- Abdualrahman, M. A. Y., Ma, H., Zhou, C., Yagoub, A. E. A., Ali, A. O., Tahir, H. E., & Wali, A. (2019). Postharvest physicochemical properties of the pulp and seed oil from *Annona squamosa* L. (Gishta) fruit grown in Darfur region, Sudan. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 4514-4521. doi: 10.1016/j.arabjc.2016.07.008.
- Adefegha, S. A., Oyeleye, S. I., & Oboh, G. (2015). Distribution of phenolic contents, antidiabetic potentials, antihypertensive properties, and antioxidative effects of soursop (*Annona muricata* L.) fruit parts in vitro. *Biochemistry Research International*, 2015, 347673. doi:10.1155/2015/347673.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Albuquerque, T. G., Santos, F., Sanches-Silva, A., Oliveira, M. B., Bento, A. C., & Costa, H. S. (2016). Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chemistry*, 193, 187-195. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.044.
- Allen, G. (1981). Methods for the detection of peptides. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 9, 135-160.
- Almeida, M. M. B., de Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., do Prado, G. M., de Carvalho Magalhães, C. E., Maia, G. A., & de Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155-2159. doi: 10.1016/j.foodres.2011.03.051.
- Andrés-Agustín, J. (2011) Diversidad de géneros y especies de Annonaceae en México: Estudios recientes. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, UNICACH. pp 79-92.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 419-421.
- Baraguey, C., Blond, A., Cavelier, F., Pousset, J. L., Bodo, B., & Auvin-Guette, C. (2001). Isolation, structure, and synthesis of mahafacyclin B, a cyclic heptapeptide from the latex of *Jatropha mahafalensis*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (17), 2098-2103.

- Baraguey, C., Blond, A., Correia, I., Pousset, J. L., Bodo, B., & Auvin-Guette, C. (2000). Mahafacyclin A, a cyclic heptapeptide from *Jatropha mahafalensis* exhibiting β -bulge conformation. *Tetrahedron Letters*, 41(3), 325-329.
- Barreca, D., Laganà, G., Ficarra, S., Tellone, E., Leuzzi, U., Galtieri, A., & Bellocco, E. (2011). Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). *Food Research International*, 44(7), 2302-2310. doi: 10.1016/j.foodres.2011.02.031.
- 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. (2015). Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 685-691.
- Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.
- Bhardwaj, A., Satpathy, G., & Gupta, R. K. (2014). Preliminary screening of nutraceutical potential of *Annona squamosa*, an underutilized exotic fruit of India and its use as a valuable source in functional foods. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(2).
- Blanco, M. J. (2019). Building upon nature's framework: overview of key strategies toward increasing drug-like properties of natural product cyclopeptides and macrocycles. In *Cyclic Peptide Design* (pp. 203-233). Humana, New York, NY.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. L. W. T. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH^{*} Free Radical Method. *Food Science and Technology-Zurich*, 30, 609-615.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brady, P. N., & Macnaughtan, M. A. (2015). Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. *Analytical Biochemistry*, 491, 43-51. doi:10.1016/j.ab.2015.08.027.
- Branco, P. C., Dionísio, A. M., Torrado, I., Carvalheiro, F., Castilho, P. C., & Duarte, L. C. (2015). Autohydrolysis of *Annona cherimola* Mill. seeds: Optimization, modeling, and products characterization. *Biochemical Engineering Journal*, 104, 2-9. doi: 10.1016/j.bej.2015.06.006.

- Caramori, S. S., Lima, C. S., & Fernandes, K. F. (2004). Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(2), 253-259.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3).
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*, 92(3), 491-497.
- Chavan, J. J., Jagtap, U. B., Gaikwad, N. B., Dixit, G. B., & Bapat, V. A. (2012). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of Saptarangi (*Salacia chinensis* L.) fruit pulp. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(4), 409-413.
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 369-374.
- Congdon, R. W., Muth, G. W., & Splittgerber, A. G. (1993). The binding interaction of Coomassie blue with proteins. *Analytical Biochemistry*, 213(2), 407-413.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and applied chemistry*, 77(1), 7-24.
- da Silva, A. C., & Jorge, N. (2014). Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. *Food Research International*, 66, 493-500. doi: 10.1016/j.foodres.2014.10.025.
- de Moreno, M. R., Smith, J. F., & Smith, R. V. (1986). Mechanism studies of Coomassie blue and silver staining of proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(9), 907-911.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296-302.
- Duke, A.T., duCellier, J.L., 1993. CRC Handbook of Alternative Cash Crops. Annonaceae. *CRC Press Inc.*, FL, USA, pp. 33–46.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 430-441.
- Eshra, D. H., Shehata, A. R., Ahmed, A. N. A., & Saber, J. I. (2019). Physicochemical Properties of the Seed Kernels and the Oil of Custard Apple (*Annona squamosa* L.). *International Journal of Food Science and Biotechnology*, 4(4), 87. doi: 10.11648/j.ijfsb.20190404.12.

- Fontana, J. D., Passos, M., Baron, M., Nosedá, M., Lanças, F. M., Cappelaro, E., ... & Maul, A. A. (1998). Selective polarity-and adsorption-guided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 67-76). Humana Press, Totowa, NJ.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
- Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385-406. doi:10.1021/jf030490p.
- George, V. C., Kumar, D. R., Rajkumar, V., Suresh, P. K., & Kumar, R. A. (2012). Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona muricata* Linn. in normal and immortalized human cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(2), 699-704.
- Godshall, M. A. (1983). Interference of plant polysaccharides and tannin in the Coomassie Blue G250 test for protein. *Journal of Food Science*, 48(4), 1346-1347.
- González-Tepale, M. R., Reyes, L., Mayorga-Flores, M., Reyes-Trejo, B., Gómez-Zepeda, D., del Rio-Portilla, F., ... & Herbert-Pucheta, J. E. (2018). Cyclopurpuracin, a cyclopeptide from *Annona purpurea* seeds. *Phytochemistry Letters*, 23, 164-167.
- Gonzalez-Trujano, M. E., Martínez, A. L., Reyes-Ramírez, A., Reyes-Trejo, B., & Navarrete, A. (2006). Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Medica*, 72(08), 703-707.
- Hassan, L. G., Muhammad, M. U., Umar, K. J., & Sokoto, A. M. (2008). Comparative study on the proximate and mineral contents of the seed and pulp of sugar apple (*Annona squamosa*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 16(2), 179-182.
- Hassimotto, N. M. A., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2009). Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 394-396.
- Issaq, H. J., & Barr, E. W. (1977). Detection reagent for adenine, guanine, uracil, cytosine and their alkylated bases, nucleotides, and nucleosides on thin-layer plates. *Journal of Chromatography A*, 132(1), 121-127.
- Jones, A. J., Hanisch, P., & McPhail, A. K. (1979). Sucrose: an assignment of the ¹³C NMR parameters by selective decoupling. *Australian Journal of Chemistry*, 32(12), 2763-2766.

- Jones, C. G., Hare, J. D., & Compton, S. J. (1989). Measuring plant protein with the Bradford assay. *Journal of Chemical Ecology*, 15(3), 979-992.
- Joo, S. H. (2012). Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools. *Biomolecules & therapeutics*, 20(1), 19.
- Julián-Loaeza, A. P., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B. S., & Salas-Coronado, R. (2011). Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1262-1268.
- Karakaya, S., & Şimşek, Ş. (2011). Changes in total polar compounds, peroxide value, total phenols, and antioxidant activity of various oils used in deep fat frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(9), 1361-1366.
- Karre, L., Lopez, K., & Getty, K. J. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94(2), 220-227.
- Koheil, M. A., Hussein, M. A., Othman, S. M., & El-Haddad, A. (2011). Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Moringa peregrina* seeds. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(2), 49-61.
- Kothari, V., & Seshadri, S. (2010). Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. *Nutrition & Food Science*. doi: 10.1108/00346651011062050.
- Kothari, V., Gupta, A., & Naraniwal, M. (2012). Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. *Journal of Natural Remedies*, 12(2), 162-173.
- Kruger, N. J. (1994). For Protein Quantitation. *Basic Protein and Peptide Protocols*, 32, 3.
- Lim, T. K. (2012). *Annona diversifolia*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (pp. 176-179). Springer, Dordrecht.
- Lozzi, I., Pucci, A., Pantani, O. L., D'Acqui, L. P., & Calamai, L. (2008). Interferences of suspended clay fraction in protein quantitation by several determination methods. *Analytical Biochemistry*, 376(1), 108-114.
- Lucarini, A. C., & Kilikian, B. V. (1999). Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnology Techniques*, 13(2), 149-154.
- Mariod, A. A., Abdelwahab, S. I., Elkheir, S., Ahmed, Y. M., Fauzi, P. N. M., & Chuen, C. S. (2012). Antioxidant activity of different parts from *Annona squamosa*, and *Catunaregam nilotica* methanolic extract. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 11(3), 249-258.
- Mariod, A. A., Elkheir, S., Ahmed, Y. M., & Matthäus, B. (2010). *Annona squamosa* and *Catunaregam nilotica* seeds, the effect of the extraction method on the oil composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(7), 763-769. doi: 10.1007/s11746-010-1548-3.

- Marroquín-Andrade, L., Cuevas-Sánchez, J. A., Guerra Ramírez, D., Reyes, L., Reyes-Chumacero, A., & Reyes-Trejo, B. (2011). Proximate composition, mineral nutrient, and fatty acids of the seed of ilama, *Annona diversifolia* Saff. *Scientific Research and Essays*, 6(14), 3089-3093.
- Martinez-Maldonado, F. E., Miranda-Lasprilla, D., Magnitskiy, S., & Melgarejo, L. M. (2015). Germination, protein contents and soluble carbohydrates during storage of sugar apple seeds (*Annona squamosa* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88(1). doi:10.5073/jabfq.2015.088.044.
- Menezes, E. G. T., Oliveira, E. R., Carvalho, G. R., Guimaraes, I. C., & Queiroz, F. (2019). Assessment of chemical, nutritional, and bioactive properties of *Annona crassiflora* and *Annona muricata* wastes. *Food Science and Technology*, (AHEAD. doi: 10.1590/fst.22918.
- Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas, María de Lourdes Vargas y, . . . Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds, and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508-515. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.013.
- Nguyen, V. T., Nguyen, M. T., Tran, Q. T., Thinh, P. V., Bui, L. M., Le, T. H. N., ... & Linh, H. T. K. (2020). Effect of extraction solvent on total polyphenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of soursop seeds (*Annona muricata* L.). *MS&E*, 736(2), 022063. doi:10.1088/1757-899X/736/2/022063.
- Ningsih, D. R., Zufahair, Z., & Kartika, D. (2016). Identification of secondary metabolites compounds and antibacterial activities on the extract of soursop leaf. *Molekul*, 11(1), 101-111.
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. In *Methods in enzymology* (Vol. 463, pp. 73-95). Academic Press.
- Novaes, P., Torres, P. B., Cornu, T. A., de Carvalho Lopes, J., Ferreira, M. J. P., & dos Santos, D. Y. A. C. (2019). Comparing antioxidant activities of flavonols from *Annona coriacea* by four approaches. *South African Journal of Botany*, 123, 253-258. doi: 10.1016/j.sajb.2019.03.011.
- Nwaneri-Chidozie, V. O., Idoko, V. O., & James, A. (2016). Assessment of Antioxidant Activity of Ethanol and n-Hexane Seed Extracts of *Annona muricata* in Rats. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 9(4).
- Omeke, C. P., Udodeme, H. O., Nwafor, F. I., & Ezugwu, C. O. (2019). Antioxidant and Hepatoprotective Properties from the Extract and Fractions of *Annona senegalensis* Pers (Annonaceae) Stem Bark Grown in Nigeria. *European Journal of Medicinal Plants*, 1-13. doi: 10.9734/ejmp/2019/v28i430138.
- Orak, H. H., Bahrisefit, I. S., Sabudak, T. (2019). Antioxidant Activity of Extracts of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves, Fruit Pulps, Peels, and

- Seeds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 359-366. doi:10.31883/pjfns/112654.
- Oueis, E., Brunello Nardone, P., Jaspars, M., Westwood, N. J., & Naismith, J. H. (2017). Synthesis of hybrid cyclopeptides through enzymatic macrocyclization. *ChemistryOpen*, 6(1), 11.
- Passos, C. P., Silva, R. M., Da Silva, F. A., Coimbra, M. A., & Silva, C. M. (2010). Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chemical Engineering Journal*, 160(2), 634-640.
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39(7), 791-800.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285.
- Pomillio, A. B., Battista, M. E., & Vitale, A. A. (2006). Naturally-occurring cyclopeptides: structures and bioactivity. *Current Organic Chemistry*, 10(16), 2075-2121.
- Prado, L. G., Arruda, H. S., Peixoto Araujo, N. M., de Oliveira Braga, Lucia Elaine, Banzato, T. P., Pereira, G. A., . . . Pastore, G. M. (2020). Antioxidant, antiproliferative and healing properties of Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) peel and seed. *Food Research International*, 133, 109168. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109168.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. doi: 10.1021/jf0502698.
- Ranganatha, K. S., Sahoo, L., Venugopal, A., & Nadimpalli, S. K. (2019). Purification, biochemical and biophysical characterization of a zinc dependent α -mannosidase isoform III from Custard Apple (*Annona squamosa*) seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 1044-1055. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.135.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reindel, F., & Hoppe, W. (1954). Über eine färbemethode zum anfärben von aminosäuren, peptiden und proteinen auf papierchromatogrammen und papierelektropherogrammen. *Chemische Berichte*, 87(8), 1103-1107.

- Roduan, M. R. M., Hamid, R. A., Cheah, Y. K., & Mohtarrudin, N. (2019). Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* in vitro. *Journal of Herbal Medicine*, *15*, 100219.
- Roesler, R., Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., & Pastore, G. (2007). Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, *104*(3), 1048-1054. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.017.
- Schlie-Guzmán, M. A., García-Carrancá, A., & González-Esquinca, A. R. (2009). In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *23*(8), 1128-1133.
- Schulze-Sünninghausen, D., Becker, J., Koos, M. R., & Luy, B. (2017). Improvements, extensions, and practical aspects of rapid ASAP-HSQC and ALSOFAST-HSQC pulse sequences for studying small molecules at natural abundance. *Journal of Magnetic Resonance*, *281*, 151-161.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages, and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820-897.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *18*, 757-781.
- Shinde, N. V., Dhake, A. S., & Haval, K. P. (2013). Biological activities of cyclic peptides: an overview. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, *4*, 142-158.
- Shukry, W. M., Galilah, D. A., Elrazek, A. A., & Shapana, H. A. (2019). Mineral Composition, Nutritional Properties, Vitamins, and Bioactive Compounds in *Annona squamosa* L. Grown at Different Sites of Egypt.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemble, D.J. (2005) *Spectrometric Identification of Organic Compounds* 7th edition, John Wiley and Sons, Inc. United States of America
- Simpson, J.H. (2008) *Organic Structure Determination Using 2-D NMR Spectroscopy*; Elsevier. Academic Press: Amsterdam, The Netherlands.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2016). Bioactive compounds in banana and their associated health benefits—A review. *Food Chemistry*, *206*, 1-11.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.
- Soumaya, K., Chaouachi, F., Ksouri, R., & El Gazzah, M. (2013). Polyphenolic composition in different organs of Tunisia populations of *Cynara cardunculus* L. and their antioxidant activity. *J Food Nutr Res*, *1*, 1-6.

- Spector, T. (1978). Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation: a simple and linear spectrophotometric assay for ≤ 0.5 to 50 μg of protein. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 142-146.
- Tan, N. H., & Zhou, J. (2006). Plant cyclopeptides. *Chemical reviews*, 106(3), 840-895.
- Torres, L. G., Carpinteyro-Urban, S., & Corzo-Rios, L. J. (2013). Use of *Annona diversifolia* and *A. muricata* seeds as source of natural coagulant-flocculant aids for the treatment of wastewaters. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 1(2), 16-22.
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food chemistry*, 111(4), 816-823. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.054.
- Vikas, B., Akhil, B. S., Remani, P., & Sujathan, K. (2017). Free radical scavenging properties of *Annona squamosa*. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(10), 2725. doi:10.22034/apjcp.2017.18.10.2725.
- Volobuff, C. R. F., Pederiva, M. M. C., Benites, R. S. R., Lima, C. J., Argandoña, E. J. S., Cardoso, C. A. L., ... & Formagio, A. S. N. (2019). Bioguided Fractionation, and Antioxidant, Antiproliferative, and Anti-Inflammatory Activity of *Annona cacans* Warm. *Journal of Medicinal Food*, 22(10), 1078-1086. doi: 10.1089/jmf.2018.0198.
- Wélé, A., Landon, C., Labbé, H., Vovelle, F., Zhang, Y., & Bodo, B. (2004). Sequence and solution structure of cherimolacyclopeptides A and B, novel cyclooctapeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Tetrahedron*, 60(2), 405-414. doi: 10.1016/j.tet.2003.11.026.
- Wélé, A., Zhang, Y., Ndoye, I., Brouard, J. P., Pousset, J. L., & Bodo, B. (2004). A Cytotoxic Cyclic Heptapeptide from the Seeds of *Annona cherimola*. *Journal of Natural Products*, 67(9), 1577-1579.
- Yang, C., Gundala, S. R., Mukkavilli, R., Vangala, S., Reid, M. D., & Aneja, R. (2015). Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis*, 36(6), 656-665.
- Zahid, M., Arif, M., Rahman, M. A., Singh, K., & Mujahid, M. (2018). Solvent Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of *Annona squamosa* L. Seeds for Determination of Bioactives, Fatty Acid/Fatty Oil Composition, and Antioxidant Activity. *Journal of Dietary Supplements*, 15(5), 613-623. doi:10.1080/19390211.2017.1366388.

4. APÉNDICES

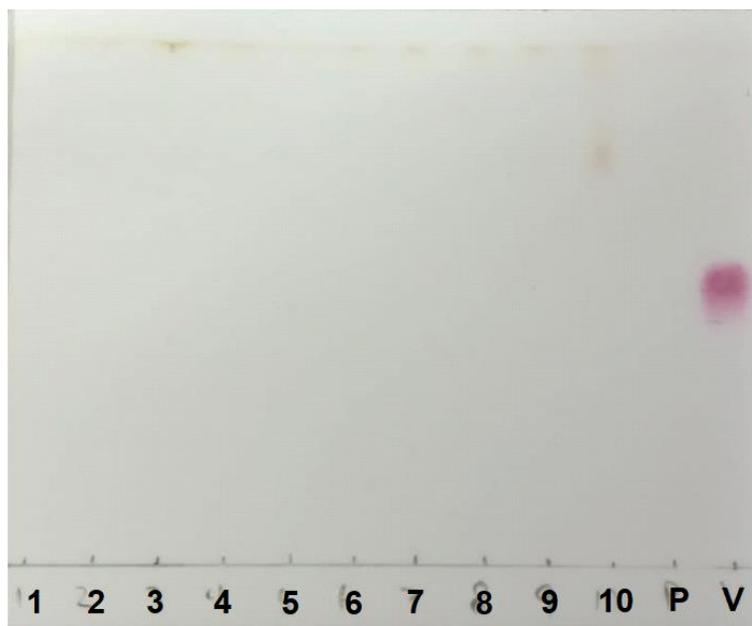


Figura A 1. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto Metanol de *A. diversifolia* revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

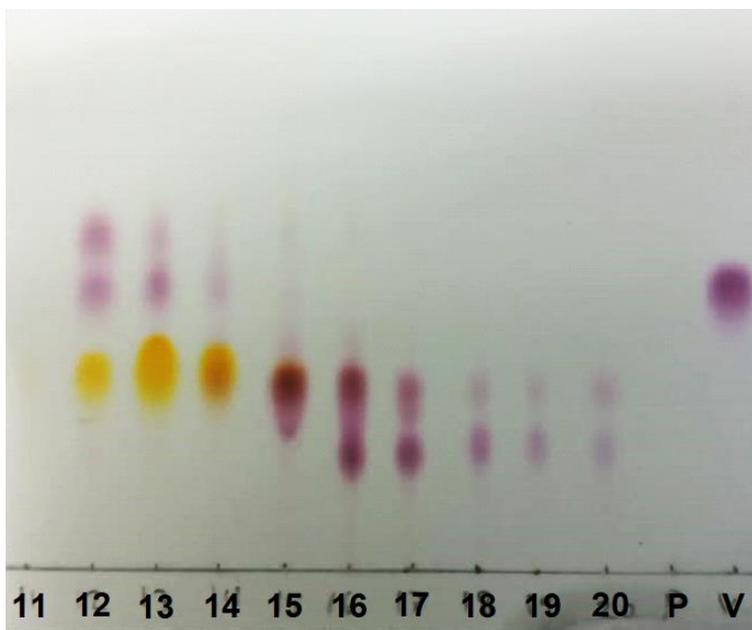


Figura A 2. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto Metanol de *A. diversifolia* revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

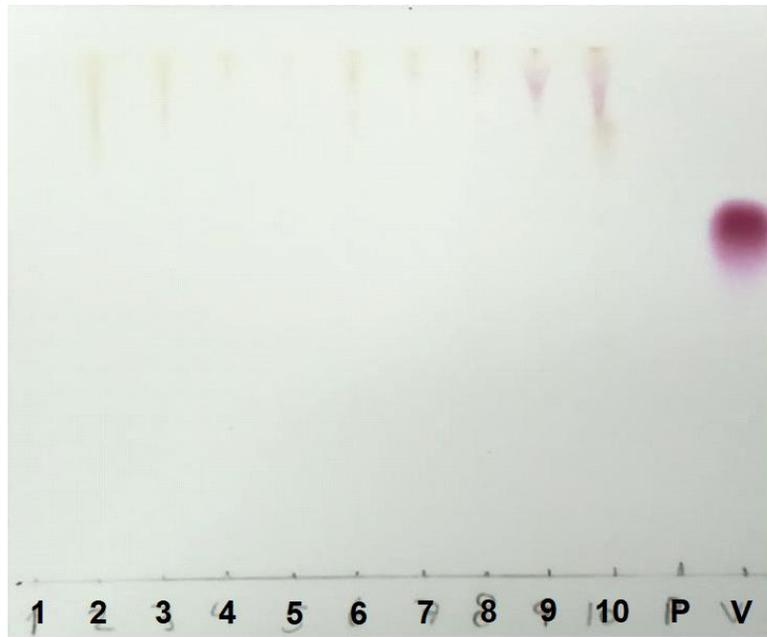


Figura A 3. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto Etanol de *A. diversifolia* revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

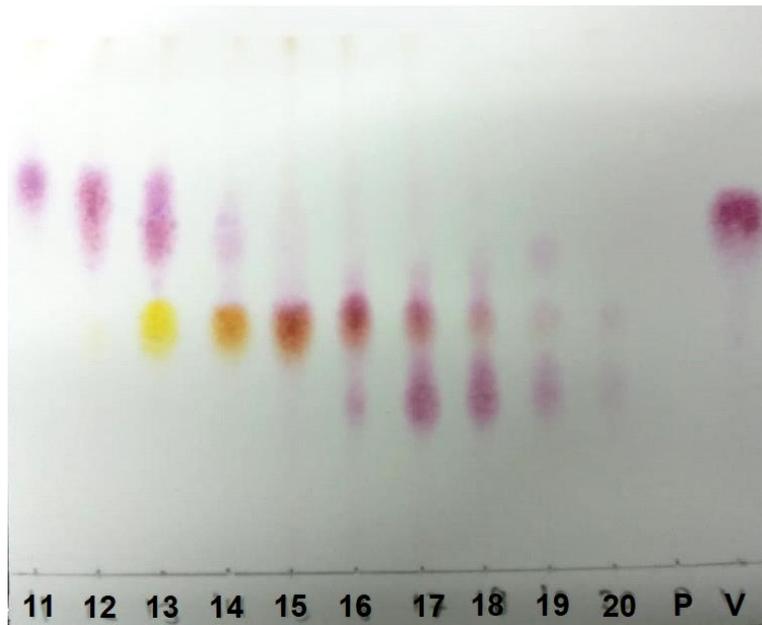


Figura A 4. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto Etanol de *A. diversifolia* revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

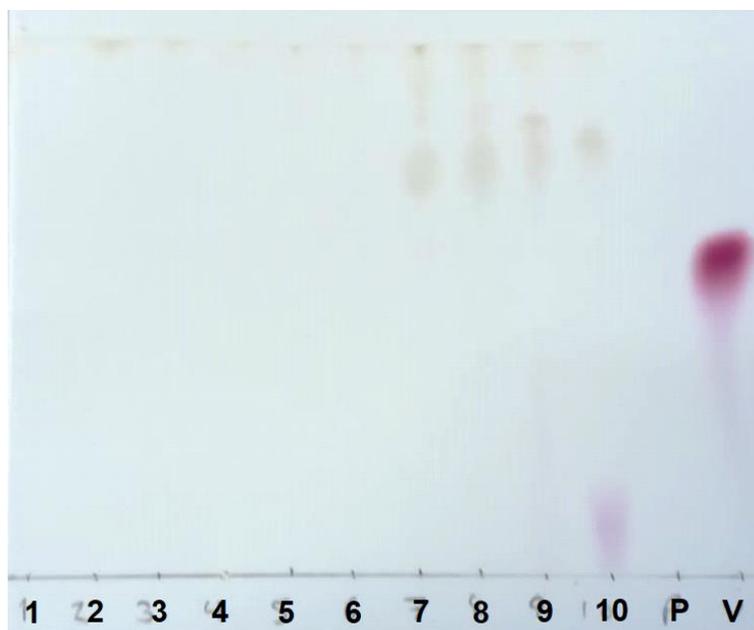


Figura A 5. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto EtOH/H₂O/AcOH de *A. diversifolia* revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

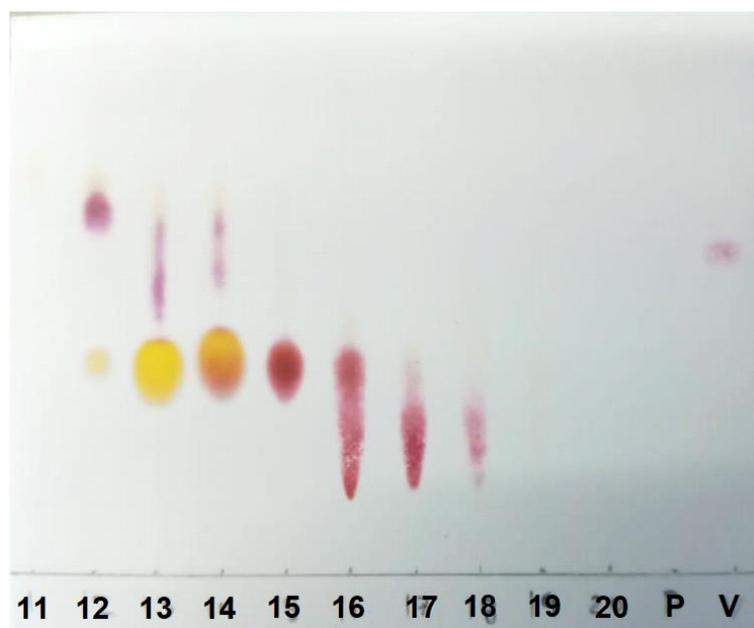


Figura A 6. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto EtOH/H₂O/AcOH de *A. diversifolia* revelados con ninhidrina para la detección de péptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

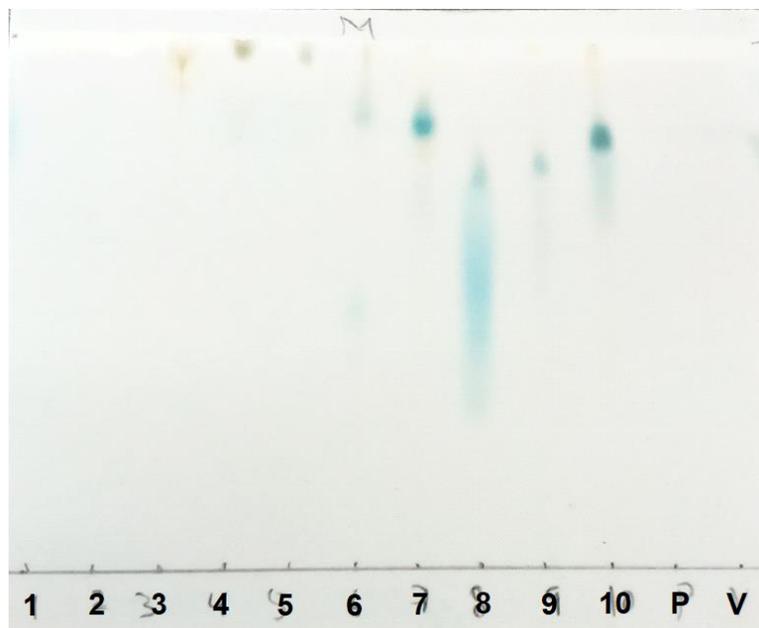


Figura A 7. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto Metanol de *A. diversifolia* revelados con Cl_2 /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

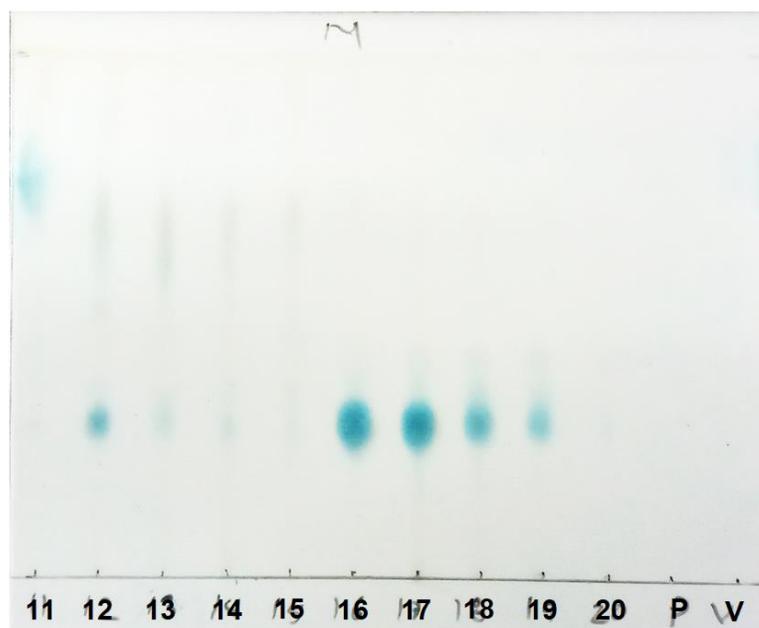


Figura A 8. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto Metanol de *A. diversifolia* revelados con Cl_2 /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

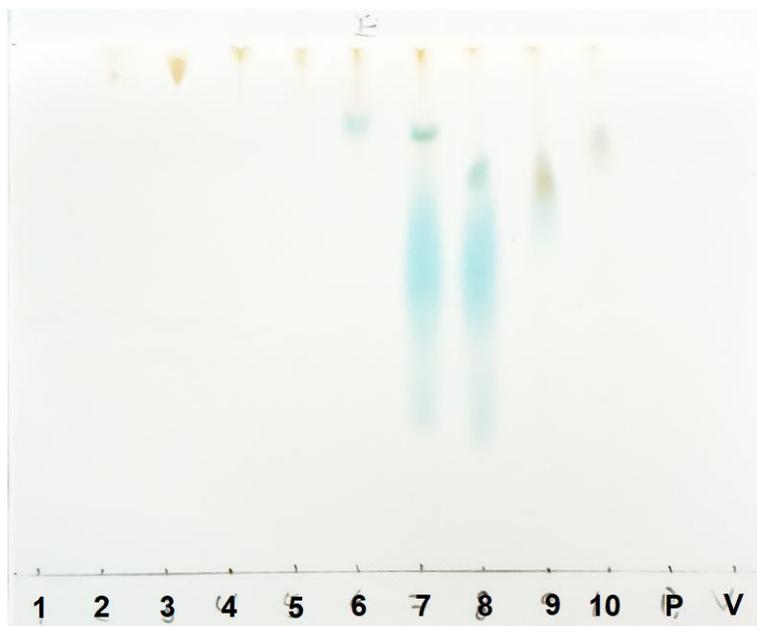


Figura A 9. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto Etanol de *A. diversifolia* revelados con Cl_2/o -tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

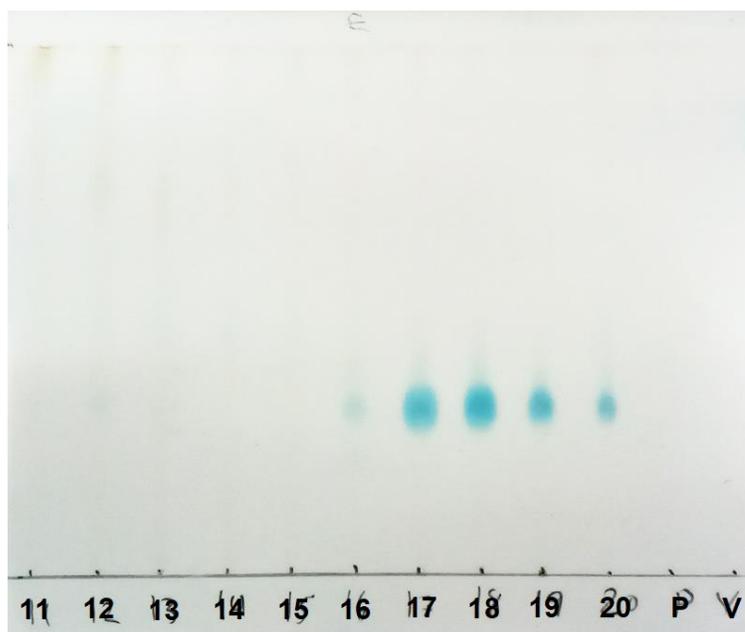


Figura A 10. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto Etanol de *A. diversifolia* revelados con Cl_2/o -tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

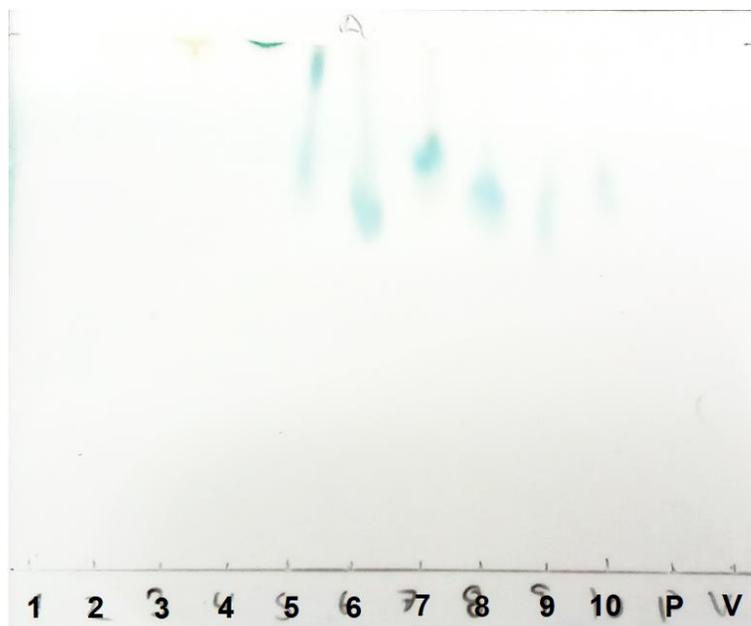


Figura A 11. Cromatofolios de las fracciones 1-10, obtenidas por CC del extracto EtOH/H₂O/AcOH de *A. diversifolia* revelados con Cl₂ /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

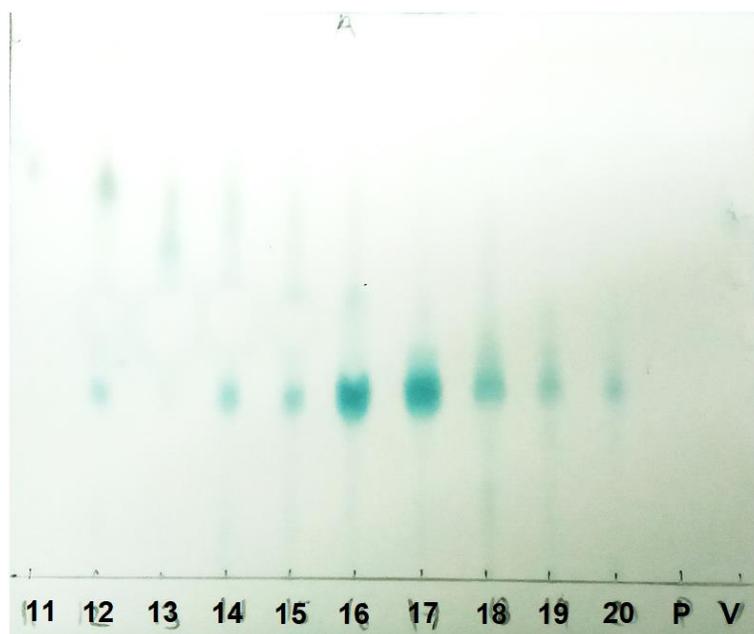


Figura A 12.. Cromatofolios de las fracciones 11-20, obtenidas por CC del extracto EtOH/H₂O/AcOH de *A. diversifolia* revelados con Cl₂ /o-tolidina para el monitoreo de ciclopéptidos. V: valina. P: 2,5-piperazindiona.

Cuadro A 1. Fracciones obtenidas de la separación por CC del extracto Metanol.

Fracción	Disolvente/proporción (%)	Peso (g)	Prueba Química (Ninhidrina)	Prueba Química (O-tolidina)
1	CH ₂ Cl ₂ (100)	0.0241	–	–
2	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(97 – 3)	0.0081	–	–
3	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(93 – 7)	0.0913	–	–
4	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(90 – 10)	0.0287	–	–
5	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(87 – 13)	0.0423	–	–
6	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(83 – 17)	0.0660	–	+
7	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(80 – 20)	0.1206	–	+
8	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(77 – 23)	0.3244	–	+
9	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(73 – 27)	0.4221	–	+
10	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(70 – 30)	0.5185	–	+
11	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(67 – 33)	0.3563	–	+
12	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(63 – 37)	0.1848	+	+
13	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(60 – 40)	0.2629	+	+
14	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(57 – 43)	0.2470	+	+
15	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(50 – 50)	0.2426	+	+
16	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(40 – 60)	0.2924	+	+
17	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(30 – 70)	0.2286	+	+
18	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(20 – 80)	0.0100	+	+
19	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(10 – 90)	0.0067	+	+
20	MeOH(100)	0.1785	+	+

Cuadro A 2. Fracciones obtenidas de la separación por CC del extracto Etanol.

Fracción	Disolvente/proporción (%)	Peso (g)	Prueba Química (Ninhidrina)	Prueba Química (O-tolidina)
1	CH ₂ Cl ₂ (100)	0.0508	–	–
2	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(97 – 3)	0.0657	–	–
3	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(93 – 7)	0.2066	–	–
4	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(90 – 10)	0.0344	–	–
5	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(87 – 13)	0.0588	–	–
6	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(83 – 17)	0.1074	–	+
7	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(80 – 20)	0.1565	–	+
8	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(77 – 23)	0.2565	–	+
9	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(73 – 27)	0.3045	+	+
10	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(70 – 30)	0.2672	+	+
11	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(67 – 33)	0.2911	+	+
12	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(63 – 37)	0.3134	+	+
13	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(60 – 40)	0.4299	+	+
14	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(57 – 43)	0.3387	+	–
15	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(50 – 50)	0.1921	+	–
16	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(40 – 60)	0.1294	+	+
17	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(30 – 70)	0.1012	+	+
18	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(20 – 80)	0.0569	+	+
19	CH ₂ Cl ₂ – MeOH(10 – 90)	0.0159	+	+

20	MeOH(100)	0.0307	+	+
----	-----------	--------	---	---

Cuadro A 3. Cuadro A3. Fracciones obtenidas de la separación por CC del extracto Etanol/H₂O/AcOH.

Fracción	Disolvente/proporción (%)	Peso (g)	Prueba Química (Ninhidrina)	Prueba Química (O-tolidina)
1	CH ₂ Cl ₂ (100)	0.0123	-	-
2	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(97 - 3)	0.0150	-	-
3	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(93 - 7)	0.0349	-	-
4	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(90 - 10)	0.0250	-	-
5	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(87 - 13)	0.3606	-	+
6	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(83 - 17)	0.4367	-	+
7	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(80 - 20)	0.2069	-	+
8	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(77 - 23)	0.4751	-	+
9	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(73 - 27)	0.5912	-	+
10	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(70 - 30)	0.6391	+	+
11	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(67 - 33)	0.6630	-	+
12	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(63 - 37)	0.5985	+	+
13	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(60 - 40)	0.5743	+	+
14	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(57 - 43)	0.4018	+	+
15	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(50 - 50)	0.3676	+	+
16	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(40 - 60)	0.4148	+	+
17	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(30 - 70)	0.3151	+	+
18	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(20 - 80)	0.1545	+	+
19	CH ₂ Cl ₂ - MeOH(10 - 90)	0.1474	-	+
20	MeOH(100)	0.0332	-	+