



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

**POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE
CICLOPÉPTIDOS BIOACTIVOS DE *Annona diversifolia* Saff.**

TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

ULISES MURRIETA DIONICIO

Bajo la supervisión de: BENITO REYES TREJO, DR.



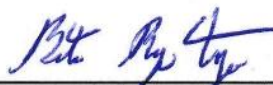
Chapingo, Estado de México, junio de 2025

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE
CICLOPÉPTIDOS BIOACTIVOS DE *Annona diversifolia* Saff.**

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:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR:



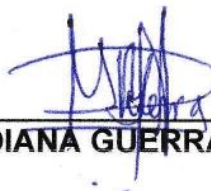
DR. BENITO REYES TREJO

ASESOR:



DR. HÓLBER ZULETA PRADA

ASESOR:



DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ

LECTOR EXTERNO:



DRA. ALMA LETICIA SAUCEDO YAÑEZ

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE APÉNDICES	viii
ABREVIATURAS USADAS	x
AGRADECIMIENTOS	xi
DEDICATORIAS	xii
DATOS BIOGRÁFICOS	xiii
RESUMEN GENERAL	xiv
GENERAL ABSTRACT	xv
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Objetivo General.....	2
1.2 Objetivos específicos.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Organización de la tesis.....	3
1.5 Literatura Citada.....	4
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1 Género <i>Annona</i>	7
2.2 <i>Annona diversifolia</i> Saff.....	7
2.3 Composición proximal de semillas de <i>A. diversifolia</i> Saff.....	8
2.4 Propiedades farmacológicas y ensayos en <i>A. diversifolia</i> Saff.....	8
2.4.1 Actividad depresora	8
2.4.2 Actividad antiepiléptica	9
2.4.3 Actividad antiansiolítica	9
2.4.4 Actividad anticonvulsiva	9
2.4.5 Actividad antiproliferativa.....	10
2.4.6 Actividad antibacteriana.....	10
2.4.7 Actividad antinociceptiva.....	10
2.4.8 Actividad antimicrobiana	11

2.4.9	Actividad antioxidante	11
2.4.10	Actividad insecticida.....	12
2.4.11	Actividad antihiper glucémica.....	12
2.4.12	Actividad anticancerígena.....	13
2.5	Metabolitos aislados de <i>A. diversifolia</i> Saff.....	14
2.6	Ciclopéptidos	18
2.7	Clasificación de ciclopéptidos	18
2.7.1	Ciclopéptidos derivados de PawS.....	18
2.7.2	Ciclótidos	19
2.7.3	Orbítidos	19
2.8	Ciclopéptidos obtenidos en el género <i>Annona</i>	20
2.9	Literatura citada.....	22
3	ANTIPROTOZOAL ACTIVITY AGAINST <i>Entamoeba histolytica</i> AND <i>Giardia lamblia</i> OF CYCLOPEPTIDES ISOLATED FROM <i>Annona diversifolia</i> Saff.....	25
3.1	Abstract	25
3.2	Introduction	26
3.3	Materials and methods	28
3.3.1	General experimental procedure.....	28
3.3.2	Vegetal material	28
3.3.3	Extraction and isolation.....	29
3.3.4	NMR spectroscopy.....	31
3.3.5	Mass spectrometry	31
3.3.6	Antiprotozoal tests.....	31
3.3.7	Molecular docking studies.....	32
3.3.8	<i>In silico</i> physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological properties.....	33
3.4	Results and discussion	33
3.4.1	Cherimolacyclopeptide D.....	33
3.4.2	Squamin D.....	36
3.4.3	Squamin C.....	40
3.4.4	Antiprotozoal activity	40
3.4.5	Chemoinformatic analysis of cherimolacyclopeptide D	42

3.4.6	Molecular coupling studies of cherimolacyclopeptide D and fidalrestat on aldose reductase	44
3.4.7	Molecular coupling studies of cherimolacyclopeptide D and metronidazole on ferredoxin pyruvate oxidoreductase (PFOR).....	46
3.5	Conclusions.....	48
3.6	Acknowledgments	48
3.7	References	48
4	PAPAUCINA UN NUEVO CICLOHEPTAPÉPTIDO OBTENIDO DE SEMILLAS DE <i>Annona diversifolia</i> Saff.....	52
4.1	Resumen.....	52
4.2	Introducción	53
4.3	Materiales y métodos	55
4.3.1	Procedimiento Experimental General	55
4.3.2	Material Vegetal	56
4.3.3	Obtención de extractos	56
4.3.4	Aislamiento y purificación	57
4.3.5	Espectroscopia de RMN	58
4.3.6	Espectrometría de masas	59
4.4	Resultados y discusión	59
4.4.1	Elucidación estructural.....	59
4.5	Conclusiones	62
4.6	Agradecimientos	62
4.7	Literatura Citada.....	63
5	CONCLUSIONES GENERALES	67
6	APÉNDICES	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición proximal de semillas de <i>A. diversifolia</i> Saff (g 100 g ⁻¹ de materia seca).	8
Cuadro 2. Metabolitos secundarios encontrados en <i>A. diversifolia</i> Saff.	15
Cuadro 2. Metabolitos secundarios encontrados en <i>A. diversifolia</i> Saff (continuación).	16
Cuadro 2. Metabolitos secundarios encontrados en <i>A. diversifolia</i> Saff (continuación).	17
Cuadro 3. Ciclopéptidos y bioactividades recientemente obtenidas de semillas del género <i>Annona</i>	21
Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR (700 MHz) data of cherimolacyclopeptide D (1) (in pyridine- <i>d</i> ₅).	35
Table 5. ¹ H and ¹³ C NMR data for squamins D (2) and C (3) in acetone- <i>d</i> ₆	37
Table 5. ¹ H and ¹³ C NMR data for squamins D (2) and C (3) in acetone- <i>d</i> ₆ (continued).	38
Table 6. <i>In vitro</i> antiprotozoal activity of extracts, fractions, and pure compounds.	41
Table 6. <i>In vitro</i> antiprotozoal activity of extracts, fractions, and pure compounds (continued).	42
Table 7. Expected physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological properties for cherimolacyclopeptide D (1).	43
Table 7. Expected physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological properties for cherimolacyclopeptide D (1) (continued).	44
Table 8. Binding energy and interactions of cherimolacyclopeptide D and fidalrestat ligands on the enzyme aldose reductase.	45
Table 9. Binding energy and interactions of cherimolacyclopeptide D and metronidazole ligands on the PFOR enzyme.	47
Cuadro 10. Datos de RMN de ¹ H y ¹³ C de papaucina (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 298 K).	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de <i>A. diversifolia</i> Saff.	8
Figura 2. Estructura de SFTI-1 derivado de PawS. Número de acceso PDB: 1JBL. Tomado de Chekan et al., (2024).....	19
Figura 3. Estructura del ciclótido kalata B1. Número de acceso PDB: 1NB1. Tomado de Chekan et al., (2024).	19
Figura 4. Estructura del orbítido [1-7-NαC]-crocaorbs A1 (Queiroz et al., 2024).	20
Figura 5. Escuaminas C-F obtenidos de semillas de <i>A. globiflora</i>	20
Figure 6. Structure of cherimolacyclopeptide D (1) isolated from <i>A. diversifolia</i> Saff.	36
Figure 7. Structures of squamins D (2) and C (3) isolated from <i>A. diversifolia</i> Saff.	38
Figure 8. Results of molecular coupling of the enzyme aldose reductase. (A) Interaction of the fidalrestat and its position at the attachment site; (B) interaction of cherimolacyclopeptide D and its position at the binding site.	46
Figure 9. Results of molecular coupling of the enzyme pyruvate ferredoxin oxidoreductase. (A) Interaction of metronidazole and its position at the binding site; (B) interaction of cherimolacyclopeptide D and its position at the binding site.	47
Figura 10. Estructura de papaucina (4).	62

LISTA DE APÉNDICES

Figura S1. Espectro de RMN- ¹ H de cherimolaciclopéptido D (1) en piridina- <i>d</i> ₅ a 298 K, 700 MHz.	68
Figura S2. Espectro de RMN- ¹³ C de cherimolaciclopéptido D (1) a piridina- <i>d</i> ₅ 298 K, 175 MHz.	68
Figura S3. Espectro HSQC de cherimolaciclopéptido D (1) en piridina- <i>d</i> ₅ a 298 K, 700 MHz.	69
Figura S4. Espectro COSY de cherimolaciclopéptido D (1) en piridina- <i>d</i> ₅ a 298 K, 700 MHz.	70
Figura S5. Espectro TOCSY de cherimolaciclopéptido D (1) en piridina- <i>d</i> ₅ a 298 K, 700 MHz.	71
Figura S6. Espectro HMBC de cherimolaciclopéptido D (1) en piridina- <i>d</i> ₅ a 298 K, 700 MHz.	72
Figura S7. Espectro de masas MALDI-TOF del cherimolaciclopéptido D (1) con m/z: de 675 [M+Na] ⁺	73
Figura S8. Espectro de FT-IR-ATR del cherimolaciclopéptido D (1).	73
Figura S9. Espectro de NMR- ¹ H de escuamina D (2) en acetona- <i>d</i> ₆ a 298 K, 700 MHz.	74
Figura S10. Espectro de NMR- ¹ H de escuamina D (2) en CD ₃ OD a 298 K, 400 MHz.	74
Figura S11. Espectro de NMR- ¹³ C de escuamina D (2) en acetona- <i>d</i> ₆ a 298 K, 175 MHz.	75
Figura S12. Espectro HSQC de escuamina D (2) en acetona- <i>d</i> ₆ a 298 K, 700 MHz.	75
Figura S13. Espectro COSY de escuamina D (2) en acetona- <i>d</i> ₆ a 298 K, 700 MHz.	76
Figura S14. Espectro TOCSY de escuamina D (2) en acetona- <i>d</i> ₆ a 298 K, 700 MHz.	77
Figura S15. Espectro HMBC de escuamina D (2) en acetona- <i>d</i> ₆ a 298 K, 700 MHz.	78
Figura S16. Espectro de masas MALDI-TOF de escuamina D (2) con m/z: de 843 [M+Na] ⁺	79
Figura S17. Espectro de NMR- ¹ H de escuamina C (3) en acetona- <i>d</i> ₆ a 298 K, 700 MHz.	80
Figura S18. Espectro de NMR- ¹ H de escuamina C (3) en CD ₃ OD a 298 K, 400 MHz.	80
Figura S19. Espectro de NMR- ¹³ C de escuamina C (3) en acetona- <i>d</i> ₆ a 298 K, 175 MHz.	81

Figura S20. Espectro HSQC de escuamina C (3) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.	81
Figura S21. Espectro COSY de escuamina C (3) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.	82
Figura S22. Espectro TOCSY de escuamina C (3) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.	83
Figura S23. Espectro HMBC de escuamina C (3) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.	84
Figura S24. Espectro de masas MALDI-TOF de escuamina C (3) con m/z: de 843 $[M+Na]^+$	85
Figura S25. Espectro de masas MALDI-TOF de papaucina (4) con m/z: de 697 $[M+H]^+$	86
Figura S26. Espectro de FT-IR-ART de papaucina (4).	86
Figura S27. Espectro de RMN- 1H de papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.	87
Figura S28. Espectro de RMN- ^{13}C de papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 175 MHz.	87
Figura S29. Espectro HSQC de papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.	88
Figura S30. Espectro COSY de papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.	89
Figura S31. Espectro TOCSY de papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.	90
Figura S32. Expansión del espectro TOCSY de 0.5 a 9.0 ppm en RMN- 1H (F1) y de 6.8 a 8.9 ppm en RMN- 1H (F2) de los sistemas spin de los residuos de los aminoácidos de la papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.	91
Figura S33. Espectro HMBC de papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.	92
Figura S34. Expansión del espectro HMBC de 166 a 174 ppm en RMN- ^{13}C (F1) y de 6.9 a 8.8 ppm en RMN- 1H (F2) que muestra las correlaciones entre los -NH- de los residuos de los aminoácidos “ i ” con los carbonos del carbonilo del residuo “ $i + 1$ ” de la papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.	93

ABREVIATURAS USADAS

SNC	Sistema Nervioso Central
GABA	Ácido γ -aminobutírico
CI ₅₀	Concentración Inhibidora media
DE ₅₀	Dosis Efectiva media
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EC	Equivalentes de catequina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
HSQC	Correlación espectroscópica heteronuclear a un sólo enlace (¹ H- ¹³ C) (Heteronuclear Single Quantum Coherence, por sus siglas en inglés)
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear (Correlated Spectroscopy, por sus siglas en inglés)
TOCSY	Correlación espectroscópica total ¹ H- ¹ H (Total Correlated Spectroscopy, por sus siglas en inglés)
HMBC	Correlación heteronuclear a dos y tres enlaces ¹ H- ¹³ C (Heteronuclear Multiple Bond Cherenche, por sus siglas en inglés)
MALDI-TOF	Desorción-ionización láser asistida por matriz- tiempo de vuelo (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight por sus siglas en inglés)

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), antes llamado Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo otorgado con una beca No. 790573.

A la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria.

A la Dirección General de Investigación, Posgrado y Servicio, por los apoyos otorgados en los proyectos 20031-C-90, 21097-C-90, 22087-C-90, 23050-C-90 y 24221-c-90.

Al personal del Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de la Preparatoria Agrícola-UACH.

Al personal del Laboratorio de Biomacromoléculas 1 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Benito Reyes Trejo, Dr. Holber Zuleta Prada, Dra. Diana Guerra Ramírez y Dra. Alma Saucedo Yañez, por la confianza, asesoría y dirección en este proyecto.

Al Dr. Federico del Río Portilla por todo el apoyo y facilidades otorgadas durante la estancia de investigación.

A mis compañeros de la séptima generación del DCA.

A Anahí, Anahí-Tochi, Areli-Tochi, Ángel, Athenea, Benjamín, Brayan, Carlos, Guillermo, Lupita, Néstor, Erick, Esmeralda, Pamela, Paola, Sayuri y Sebastián: Gracias por cada consejo, por sus opiniones, por los momentos compartidos y por todo el tiempo que vivimos juntos, tanto en el laboratorio como fuera de él.

A Alan, David, Emily, Fátima, Gio, Héctor, Miguel, Monse, Natalia, Sayuri y Simón: Gracias por todas sus atenciones durante mi estancia de investigación. Pero, sobre todo, gracias por su amistad, hospitalidad y por hacerme parte de sus logros a lo largo de estos años.

DEDICATORIAS

A mis padres, por su total e incondicional apoyo.

A Lulú, por ser esa presencia especial en mi vida, con cariño y alegría.

A Nay, por tu amistad sincera y tu compañía siempre reconfortante.

A Natalia, por tu cálida amistad, tu pasión y tu entrega en el trabajo. Pero, sobre todo, por recordarme que las cosas se hacen con amor.

Al Dr. Vicente y su familia, por todas las atenciones y apoyo brindado.

A mis amigos y amigas que me han apoyado y animado a continuar. Su presencia ha sido fundamental.

Y a todas las demás personas que, de una u otra forma, han contribuido a moldear mi camino.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos Personales

Nombre:	Ulises Murrieta Dionicio
Fecha de Nacimiento:	09 de diciembre de 1993
Lugar de Nacimiento:	Jalacingo, Veracruz, México
No. Cartilla Militar:	D-3927602
CURP:	MUDU931209HVZRNL03
Profesión:	Ingeniero Agroindustrial
Cédula Profesional:	11225672

Desarrollo Académico

Bachillerato:	Preparatoria Agrícola-UACH
Licenciatura	Ingeniería Agroindustrial-UACH
Maestría	Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

RESUMEN GENERAL

Aislamiento y caracterización estructural de ciclopéptidos bioactivos de *Annona diversifolia* Saff.

A partir de las semillas de *Annona diversifolia* Saff., se han aislado compuestos bioactivos como acetogeninas, flavonoides, y terpenoides. Sin embargo, hay pocos estudios fitoquímicos encaminados a la obtención de ciclopéptidos. El objetivo de este trabajo fue aislar y elucidar estructuras ciclopeptídicas mediante técnicas cromatográficas, espectroscópicas y de espectrometría de masas a fin de evaluar actividades biológicas. Los extractos de semillas de *A. diversifolia* Saff., se obtuvieron utilizando disolventes de menor a mayor polaridad, posteriormente se emplearon sistemas de extracción líquido-líquido, seguido de purificaciones por cromatografía en columnas. Las fracciones con perfiles cromatográficos similares se llevaron a sistemas de purificación flash, seguido de sistemas de extracción en fase sólida (SPE) y purificación por HPLC. Las fracciones enriquecidas con ciclopéptidos obtenidas a partir de un extracto hidroetanólico, así como un compuesto puro se sometieron a ensayos *in vitro* y a modelo molecular *in silico* de la actividad antiprotozoaria. A partir de la partición butanólica del extracto hidroalcohólico, se obtuvieron tres compuestos conocidos de naturaleza ciclopeptídica; un cicloheptapéptido el cherimolaciclopéptido D (**1**), dos octapéptidos las escuaminas D (**2**) y C (**3**) y un nuevo cicloheptapéptido, al que se le denominó papaucina (**4**). La actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* fue significativa para el compuesto (**1**) con valores de $CI_{50} = 3.49$ y $5.39 \mu g mL^{-1}$, respectivamente. Así mismo, los estudios *in silico* revelaron afinidad por las enzimas aldosa reductasa y la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR). La actividad antiprotozoaria del cherimolaciclopéptido D se describe por primera vez en este trabajo. Se concluye que *A. diversifolia* Saff., es una fuente para la obtención de nuevas estructuras ciclopeptídicas, así como de aquellas conocidas, pero con bioactividades por investigar.

Palabras clave: actividad antiprotozoaria, cherimolaciclopéptido D, orbítidos, escuaminas, semillas

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: M.C. Ulises Murrieta Dionicio

Director de Tesis: Dr. Benito Reyes Trejo

GENERAL ABSTRACT

Isolation and Structural Characterization of Bioactive Cyclopeptides from *Annona diversifolia* Saff.

Bioactive compounds such as acetogenins, flavonoids, and terpenoids have been isolated from seeds of *Annona diversifolia* Saff. However, there are few phytochemical studies aimed at obtaining cyclopeptides. The aim of this work was to isolate and elucidate the structures of cyclopeptides using chromatographic, spectroscopic, and mass spectrometric techniques, in order to evaluate their biological activities. Extracts were obtained from the seeds of *A. diversifolia* Saff., using solvents from lower to higher polarity. These were followed by liquid-liquid extraction systems were used, followed by purifications through column chromatography. Fractions with similar chromatographic profiles were further purified using flash chromatography, solid-phase extraction (SPE) systems and HPLC purification. Cyclopeptide-enriched fractions obtained from a hydroethanolic extract, as well as a pure compound were subjected to *in vitro* assays and *in silico* molecular modeling to assess antiprotozoal activity. From the butanolic partition of the hydroalcoholic extract, three known cyclopeptidic compounds were isolated; one cyclo-heptapeptide, cherimolacyclopeptide D (**1**); two cyclo-octapeptides, squamins D (**2**) and squamin C (**3**); and a new cyclo-heptapeptide, which was named papaucine (**4**). The antiprotozoal activity against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* was significant for compound (**1**), with CI_{50} values of 3.49 and 5.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. *In silico* studies also revealed binding affinity for aldose reductase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFOR) enzymes. This is the first report describing the antiprotozoal activity of cherimolacyclopeptide D. It is concluded that *A. diversifolia* Saff., is a promising source for obtaining new cyclopeptide structures, including known compounds with bioactivities to be investigated.

Keywords: antiprotozoal activity, cherimolacyclopeptide D, orbitides, squamins, seeds

Doctoral thesis in Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Author: M.C. Ulises Murrieta Dionicio

Thesis director: Dr. Benito Reyes Trejo

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Annona diversifolia Saff es un árbol nativo de México conocido popularmente con los nombres de “ilama”, o “papauce” y cuyos frutos son utilizados como alimento (Valdés et al., 2020). En la medicina tradicional mexicana las hojas de esta planta han sido utilizadas por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Ruiz & Moret, 1997). *A. diversifolia* Saff., ha sido objeto de estudio por presentar propiedades farmacológicas de gran importancia como: actividad depresora del SNC (González-Trujano et al., 1998), actividad antiepiléptica (González-Trujano et al., 2001), actividad antiansiolítica (González-Trujano et al., 2006), actividad anticonvulsiva (Gonzalez-Trujano et al., 2006), actividad antiproliferativa (Schlie.Guzmán et al., 2009), actividad antibacteriana (Luna-Cazares et al., 2010), actividad antinociceptiva (Carballo et al., 2010), actividad antimicrobiana (De la Cruz-Chacón et al., 2011), actividad antioxidante (Julián-Loaeza et al., 2011), actividad antihiper glucémica (Brindis et al., 2013; Calzada et al., 2019; Valdés et al., 2020), actividad antilinfoma (Ramírez-Santos et al., 2022) y actividad citotóxica (Ramírez-Santos et al., 2024). Por su parte, los estudios fitoquímicos en esta especie han conducido a la obtención y aislamiento de metabolitos secundarios con aplicaciones farmacológicas como la palmitona (Gonzalez-Trujano et al., 2001), laherradurina, cherimolina-2 (Schlie-Guzmán et al., 2009), rolliniastatina-2 (Luna-Cazares et al., 2010), liriodenina (De la Cruz-Chacón et al., 2011), rutina, isoquercitrina (Brindis et al., 2013), farsenol, (Calzada et al., 2019), farsenal (Valdés et al., 2020), acetato de farnesilo, fitol, y geranilgeraniol (Ramírez-Santos et al., 2022).

Los ciclopéptidos son compuestos cíclicos formados principalmente por enlaces peptídicos entre aminoácidos de carácter proteico o no proteico (Wang et al., 2017). Se producen en especies de plantas superiores como las familias: Annonaceae, Astaraceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae,

Labiatae, Linaceae, Olacaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae, y Rutaceae (Pomillo et al., 2006). Los ciclopéptidos son de gran interés debido a sus bio-actividades entre las que se incluyen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antibacteriales, antitumorales, sedantes, como inmunopresores entre otras (Shinde et al., 2013). Las actividades biológicas asociadas a este tipo de compuestos pueden verse afectadas por mutaciones o sustituciones de aminoácidos en su estructura, la presencia o ausencia de metilaciones en los grupos amida, la isomería óptica de algunos residuos de aminoácidos, así como el grado de flexibilidad en la cadena principal ejercen influencia sobre la disponibilidad biológica como potenciales fármacos debido a su capacidad de atravesar membranas celulares (Kobchikova et al., 2021). Por tanto, las variaciones en las propiedades estructurales y dinámicas moleculares de los ciclopéptidos son de gran interés, ya que, adicional a su capacidad de atravesar membranas celulares pueden desempeñar funciones como vehículos de transporte para ingreso al interior celular de otras moléculas que, por sí solas, no podrían (Efimov et al., 2020). La naturaleza química (carácter cíclico) de estos péptidos, resulta relevante, ya que confiere una mayor resistencia a la degradación enzimática a comparación de péptidos de estructura lineal o proteínas similares (Shinde et al., 2013). En el reino vegetal se han documentado estudios sobre la presencia de ciclopéptidos en la familia de las Anonáceas, destacando aquellos realizados en semillas de *A. muricata* (guanábana) (Fisher et al., 2020), así como recientemente en anonas nativas de México los trabajos en *A. scleroderma* (Cen-Pacheco et al., 2019) y en *A. globiflora* (Sosa-Rueda et al., 2022). Sin embargo, las semillas de *A. diversifolia* Saff., no han sido explotadas en cuanto a estudios fitoquímicos encaminados a la obtención de compuestos de naturaleza ciclopeptídica con potenciales actividades biológicas.

1.1 Objetivo General

- Elucidar y modelar estructuras de ciclopéptidos obtenidos de semillas de *Annona diversifolia* Saff., mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), para evaluar sus potenciales actividades biológicas.

1.2 Objetivos específicos

- Diseñar una metodología de extracción y aislamiento de ciclopéptidos, utilizando sistemas cromatográficos en fase normal y fase reversa para incrementar el grado de pureza de este tipo de compuestos.
- Deducir estructuras de ciclopéptidos mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (EM) para elucidar su composición química.
- Evaluar la actividad antiprotozoaria de fracciones enriquecidas en ciclopéptidos y de compuestos puros mediante ensayos *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* para medir su potencial bioactivo.

1.3 Hipótesis

El consumo del fruto de *A. diversifolia*, genera residuos sin aprovechamiento ni utilidad, tales como cáscaras y semillas. A partir de *A. diversifolia* Saff., se han estudiado diferentes partes de la planta, de las cuales se han obtenido metabolitos secundarios como acetogeninas, alcaloides, flavonoides, o terpenoides compuestos con un alto valor y aplicabilidad en industrias como la alimenticia y farmacéutica. El presente trabajo obtendrá nuevos compuestos ciclopeptídicos presentes en las semillas de *A. diversifolia* mediante la aplicación de técnicas de extracción, aislamiento, purificación y elucidación estructural. Lo que permitirá evaluar sus potenciales bioactividades.

1.4 Organización de la tesis

La presente investigación se divide en cuatro capítulos. El primero consiste de una introducción general. El segundo capítulo presenta una revisión de literatura, abarcando aspectos generales de *A. diversifolia* Saff., seguido de una investigación sobre los ensayos y propiedades farmacológicas realizadas en esta especie, así como los metabolitos secundarios encontrados en *A. diversifolia* Saff., resultados de estudios fitoquímicos bio-dirigidos. Finalmente, este capítulo expone una clasificación de ciclopéptidos y una actualización hasta la fecha del número y diversidad estructural de ciclopéptidos reportados en el género *Annona*.

El capítulo tres describe los resultados del trabajo publicado en la revista *Molecules* con el título “Antiprotozoal Activity Against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* of Cyclopeptides Isolated from *Annona diversifolia* Saff” DOI: 10.3390/molecules29235636. Noviembre 2024, que consisten en el aislamiento, purificación, y elucidación estructural de tres ciclopeptidos, obtenidos partir del extracto hidroetanólico de semillas de *A. diversifolia* Saff.: el cicloheptapéptido cherimolaciclopéptido D (**1**), y dos ciclooctapéptidos denominados escuaminas D (**2**) y C (**3**). Las fracciones enriquecidas en ciclopeptidos y del compuesto (**1**) puro fueron evaluadas contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.

El capítulo cuatro detalla el aislamiento, purificación y elucidación de un nuevo ciclopeptido, obtenido de las fracciones enriquecidas en ciclopeptidos (previamente no exploradas) del extracto hidroalcohólico de semillas de *A. diversifolia* Saff. La estructura de un nuevo cicloheptapéptido, al cual se le denominó papaucina (**4**), fue establecida mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

1.5 Literatura Citada

- Brindis, F., González-Trujano, M. E., González-Andrade, M., Aguirre-Hernández, E., & Villalobos-Molina, R. (2013). Aqueous Extract of *Annona macrophyllata*: A Potential α -Glucosidase Inhibitor. *Biomed Research International*, 2013, 6. doi:10.1155/2013/591313
- Calzada, F., Vaides, M., Garcia-Hernandez, N., Velázquez, C., Barbosa, E., Bustos-Brito, C., Quijano, L., Pina-Jimenez, E., & Mendieta-Wejebe, J. E. (2019). Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona diversifolia* Safford. and farnesol on normal and alloxan-induced diabetic mice. *Pharmacognosy Magazine*, 15(62), 5-11. doi:10.4103/pm.pm_582_18
- Carballo, A. I., Martínez, A. L., González-Trujano, M. E., Pellicer, F., Ventura-Martínez, R., Díaz-Reval, M. I., & López-Muñoz, F. J. (2010). Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 95(1), 6-12. doi:10.1016/j.pbb.2009.11.017
- Cen-Pacheco, F., Valerio-Alfaro, G., Santos-Luna, D., & Fernández, J. J. (2019). Sclerin, a new cytotoxic cyclonapeptide from *Annona scleroderma*. *Molecules*, 24(3), 554.
- De la Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A. R., Fefer, P. G., & Garcia, L. F. J. (2011). Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*.

Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences, 66(7-8), 377-384.

- Efimov, S. V., Dubinin, M. V., Kobchikova, P. P., Zgadzay, Y. O., Khodov, I. A., Belosludtsev, K. N., & Klochkov, V. V. (2020). Comparison of cyclosporin variants B–E based on their structural properties and activity in mitochondrial membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(4), 1054-1060.
- Fisher, M. F., Zhang, J., Berkowitz, O., Whelan, J., & Mylne, J. S. (2020). Cyclic peptides in seed of *Annona muricata* are ribosomally synthesized. *Journal of Natural Products*, 83(4), 1167-1173.
- González-Trujano, 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(8), 703-707. doi:10.1055/s-2006-931598
- González-Trujano, M. E., Navarrete, A., Reyes, B., & Hong, E. (1998). Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research*, 12(8), 600-602. doi:10.1002/(sici)1099-1573(199812)12:8<600::Aid-ptr363>3.0.Co;2-n
- González-Trujano, M. E., Navarrete, A., Reyes, B., Cedillo-Portugal, E., & Hong, E. (2001). Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Medica*, 67(2), 136-141. doi:10.1055/s-2001-11504
- González-Trujano, M. E., Tapia, E., López-Merez, L., Navarrete, A., Reyes-Ramírez, A., & Martínez, A. (2006). Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity.: A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia*, 47(11), 1810-1817. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00827.x
- 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. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1262-1268. doi:10.1016/j.indcrop.2010.06.012
- Kobchikova, P. P., Efimov, S. V., Khodov, I. A., & Klochkov, V. V. (2021). Features of spatial structures of cyclosporins D, E and G revealed by NMR and MD simulations. *Journal of Molecular Liquids*, 336, 116244.
- Luna-Cazares, L. M., & Gonzalez-Esquinca, A. R. (2010). Susceptibility of complete bacteria and spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to rolliniastatin-2. *Natural Product Research*, 24(12), 1139-1145. doi:10.1080/14786410902836644
- Pomillio, A. B., Battista, M. E., & Vitale, A. A. (2006). Naturally-occurring cyclopeptides: structures and bioactivity. *Current Organic Chemistry*, 10(16), 2075-2121.
- Ramírez-Santos, J., Calzada, F., Mendieta-Wejebe, J. E., Ordoñez-Razo, R. M., Martinez-Casares, R. M., & Valdes, M. (2022). Understanding the Antilymphoma Activity of *Annona macrophyllata* Donn and Its Acyclic

- Terpenoids: *In Vivo*, *In Vitro*, and *In Silico* Studies. *Molecules*, 27(20), 21. doi:10.3390/molecules27207123.
- Ramírez-Santos, J., Calzada, F., Ordoñez-Razo, R. M., Mendieta-Wejebe, J. E., Velázquez-Domínguez, J. A., Argüello-García, R., Velázquez, C., & Barbosa, E. (2024). *In Vivo*, *In Vitro* and *In Silico* Anticancer Activity of Ilima Leaves: An Edible and Medicinal Plant in Mexico. *Molecules*, 29(9), 19. doi:10.3390/molecules29091956
- 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.
- Schlie-Guzmán, M. A., García-Carrancá, A., & González-Esquínca, A. R. (2009). *In Vitro* and *In Vivo* Antiproliferative Activity of Laherradurin and Cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytotherapy Research*, 23(8), 1128-1133. doi:10.1002/ptr.2760
- 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.
- Sosa-Rueda, J., Domínguez-Meléndez, V., Ortiz-Celiseo, A., López-Fentanes, F. C., Cuadrado, C., Fernández, J. J., Hernández Daranas, A., & Cen-Pacheco, F. (2022). Squamins C–F, four cyclopeptides from the seeds of *Annona globiflora*. *Phytochemistry*, 194, 112839.
- Tan, N. H., & Zhou, J. (2006). Plant cyclopeptides. *Chemical reviews*, 106(3), 840-895.
- Valdés, M., Calzada, F., Mendieta-Wejebe, J. E., Merlín-Lucas, V., Velázquez, C., & Barbosa, E. (2020). Antihyperglycemic Effects of *Annona diversifolia* Safford and Its Acyclic Terpenoids: α -Glucosidase and Selective SGLT1 Inhibitors. *Molecules*, 25(15), 17. doi:10.3390/molecules25153361
- Wang, X., Lin, M., Xu, D., Lai, D., & Zhou, L. (2017). Structural diversity and biological activities of fungal cyclic peptides, excluding cyclodipeptides. *Molecules*, 22(12), 2069.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Género *Annona*

Annona es el segundo género más grande de plantas perteneciente a la familia de las Annonaceae, cuenta con aproximadamente 166 especies entre arbustos y árboles (Dahiya & Dahiya, 2021). En México, se han documentado 20 especies de este género, dentro de las que destacan, por su origen y grado de domesticación *A. muricata*, *A. cherimola* (especies no-nativas), *A. globiflora*, *A. longiflora* (especies endémicas), *A. squamosa*, y *A. diversifolia* Saff (especies nativas), por mencionar algunas (Escobedo-López et al., 2019). La mayoría de ellas se cultivan en traspatios o en áreas destinadas al pastoreo. Con respecto a los frutos, estos se cosechan acorde a su estacionalidad y se destinan a comercios locales, por lo que su valor económico se encuentra infravalorado por su lejanía de comercios urbanos (De La Cruz Chacon et al., 2016).

2.2 *Annona diversifolia* Saff

A. diversifolia Saff es un árbol nativo de México conocido popularmente con los nombres de “ilama”, o “papauce”, cuyos frutos son utilizados como alimento (Valdés et al., 2020). El fruto tiene forma ovoide, aproximadamente 15 cm de largo y puede pesar hasta 1 kg. La cáscara varía en una gama de colores que van desde el verde pálido hasta el rosa oscuro. La pulpa es blanca y/o rosa. La producción de semillas por fruta es de 25 a 80 unidades (Lim, 2012). Las semillas (Figura 1) tienen dimensiones de 2.26 cm x 1.32 cm, con forma cilíndrica y color café (Marroquín-Andrade et al., 2011).



Figura 1. Semillas de *A. diversifolia* Saff.

2.3 Composición proximal de semillas de *A. diversifolia* Saff

La composición proximal de las semillas de *A. diversifolia* Saff., dividida en las secciones de endospermo y endocarpio, se presenta en el Cuadro 1 (Marroquín-Andrade et al., 2011).

Cuadro 1. Composición proximal de semillas de *A. diversifolia* Saff (g 100 g⁻¹ de materia seca).

Parámetro	Endospermo	Endocarpio
Humedad	9.61 ± 0.33 ^a	7.85 ± 0.26
Cenizas	2.18 ± 0.17	0.86 ± 0.14
Proteína Cruda	15.40 ± 0.17	Despreciable
Aceite	27.43 ± 0.18	1.60 ± 0.11
Fibra Cruda	62.58 ± 0.25	83.22 ± 0.15
Carbohidratos ^b	25.03 ± 0.23	6.37 ± 0.21

^a medias de análisis por triplicado ± desviación estándar. ^b Calculado por diferencia.

2.4 Propiedades farmacológicas y ensayos en *A. diversifolia* Saff

2.4.1 Actividad depresora

Los primeros estudios relacionados con las propiedades farmacológicas de extractos obtenidos a partir de *A. diversifolia* Saff. comenzaron con evaluaciones

sobre el sistema nervioso central (SNC). En el trabajo de González-Trujano et al., (1998) se realizó una investigación sobre el efecto neurofarmacológico de extractos etanólicos obtenidos a partir de hojas de *A. diversifolia* Saff. Los extractos etanólicos fueron administrados en dosis de 200 – 1 600 mg kg⁻¹, los resultados mostraron una disminución en los tiempos de respuesta en los ensayos de “rota-rod” (cilindro rodante) y “swimming” (prueba de nado).

2.4.2 Actividad antiepiléptica

El segundo trabajo realizado por González-Trujano et al., (2001) sobre hojas de *A. diversifolia* Saff., se centró en un estudio bio-dirigido sobre el fraccionamiento de extractos etanólicos obtenidos a partir de hojas. La palmitona (16-hentriacontanona) fue el metabolito aislado en este estudio. La palmitona promovió la mayor actividad antiepiléptica (DE₅₀ = 1.85 mg kg⁻¹) en comparación a los fármacos de control como pentilentetrazol (PTZ) (DE₅₀ = 59.6 mg kg⁻¹), etosuximida (DE₅₀ = 59.6 mg kg⁻¹), valproato de sodio (DE₅₀ = 63 mg kg⁻¹) y el carbamato (DE₅₀ > 300 mg kg⁻¹), siendo solo menos potente al diazepam (DE₅₀ = 0.48 mg kg⁻¹). El mecanismo propuesto hasta ese entonces consistía en una acción sobre el sistema inhibitorio GABAérgico.

2.4.3 Actividad antiansiolítica

Las investigaciones posteriores de González-Trujano et al., (2006) realizadas sobre el aislamiento de la palmitona y su aplicación en diferentes actividades biológicas, condujeron a la evaluación de su actividad antiansiolítica empleando ratones como modelos biológicos. Los resultados arrojaron dosis efectivas de DE₅₀ = 0.79 mg kg⁻¹, con intervalos de confianza entre 0.23 a 2.68 mg kg⁻¹.

2.4.4 Actividad anticonvulsiva

La continuación de los trabajos de Gonzalez-Trujano et al., (2006) llevó a la exploración de otras propiedades como la bioactividad anticonvulsiva de extractos etanólicos, así como del metabolito palmitona mediante análisis conductual electroencefalográfico en ratas. Los resultados no mostraron un efecto sedante-hipnótico, la relevancia radicó en la reducción en el número y

severidad de las convulsiones inducidas por penicilina, tanto con la administración del extracto etanólico obtenido a partir de hojas (dosis de 30 mg kg⁻¹) como de la palmitona obtenida a partir de dicho extracto (dosis 10 mg kg⁻¹).

2.4.5 Actividad antiproliferativa

El primer trabajo enfocado en la obtención de metabolitos secundarios a partir de semillas de *A. diversifolia* Saff., fue realizado por Schlie.Guzmán et al., (2009). El estudio fitoquímico arrojó como resultado la obtención de dos acetogeninas llamadas laherradurina y cherimolina-2. Ambas acetogeninas inhibieron la proliferación de células HeLa y SW-480 en ensayos *in vitro* respecto el fármaco doxorrubicina (CI₅₀ = 0.1 µg mL⁻¹ y 5.0 µg mL⁻¹ respectivamente). La laherradurina exhibió una mayor actividad, con una CI₅₀ = 0.01 µg mL⁻¹ para ambos tipos de células. Por otra parte, la cherimolina-2 tuvo valores de CI₅₀ = 0.05 µg mL⁻¹ y 0.015 µg mL⁻¹ para células HeLa y SW-480 respectivamente.

2.4.6 Actividad antibacteriana

Un segundo estudio realizado en semillas de *A. diversifolia* Saff., fue el descrito por Luna-Cazares et al., (2010). En dicha investigación se logró el aislamiento y elucidación de una acetogenina llamada rolliniastatina-2. Se evaluó la inhibición de bacterias completas y esferoplastos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella typhi*. Las bacterias completas fueron susceptibles a la rolliniastatina-2 en un porcentaje de inhibición del 28-40 % a una concentración de 2 mg mL⁻¹ mientras que los esferoplastos fue de 55-58 % de inhibición a 1 ng mL⁻¹. La *P. aeruginosa* fue la bacteria más susceptible a la acetogenina, mientras que *E. coli* en su estado de esferoplasto fue el microorganismo de mayor susceptibilidad a la exposición de rolloniastatina-2.

2.4.7 Actividad antinociceptiva

Carballo et al., (2010) evaluaron las propiedades antinociceptivas de extractos etanólicos (hojas) mediante pruebas de retorcimiento en ratones obteniendo valores superiores de DE₅₀ = 15.35 mg kg⁻¹ en comparación con el fármaco de control, tramadol (DE = 12.42 mg kg⁻¹). Por su parte, el estudio bio-dirigido de

este extracto condujo a la obtención de dos fracciones activas, una de hexano y otra de acetona, en ambas fracciones se detectó la presencia de palmitona. La evaluación de la actividad antinociceptiva del compuesto puro arrojó un valor de $DE_{50} = 19.57 \text{ mg kg}^{-1}$. Los resultados respaldaron el uso de *A. diversifolia* en la medicina tradicional como un agente para el tratamiento del dolores espasmódicos y artríticos.

2.4.8 Actividad antimicrobiana

De la Cruz-Chacón et al., (2011) informaron en su trabajo sobre el aislamiento y elucidación de un alcaloide llamado liriodenina, obtenido de las raíces de *A. diversifolia* Saff. También se menciona el papel de la liriodenina como un elemento de defensa antimicrobiano en el desarrollo de *A. diversifolia*. La liriodenina inhibió el crecimiento de *Aspergillus glaucus* (CMI = $27.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y *Rhizopus stonifer* (CMI = $55.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos hongos responsables del deterioro de las semillas.

2.4.9 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante en pulpa de tres variedades (blanca, rosa, y rosa oscuro) de *A. diversifolia* Saff., fue informada en el trabajo de Julián-Loaeza et al., (2011). La capacidad de eliminación de radicales libres se determinó mediante el ensayo DPPH. Para ello, se evaluaron extractos etanólicos obtenidos de la pulpa de esas tres variedades. Los resultados mostraron la mayor actividad antioxidante en la variedad rosa, con una $CI_{50} = 1\,998.19 \mu\text{g mL}^{-1}$. Además, en dicho estudio se informa por primera vez el contenido de flavonoides totales en pulpa en frutos del género *Annona*, en un rango de 107.41 a 152.04 mg EC 100 g⁻¹. Sin embargo, aún se desconoce las estructuras químicas de los flavonoides presentes en dichas pulpas. Se propone, por tanto, un trabajo adicional que permita una caracterización completa para las propiedades funcionales de esta especie y sección comestible.

2.4.10 Actividad insecticida

Las investigaciones sobre la aplicación de extractos etanólicos, además de la incorporación de extractos acuosos obtenidos de tallos y hojas, se llevaron a cabo en el trabajo de González-Esquinca et al., (2012). El objetivo fue determinar el efecto de estos extractos sobre larvas de *Anastrepha ludens*, mejor conocida como mosca de la fruta. Los resultados mostraron tasas de mortalidad variables, que oscilaron entre 68.3 y el 89.3 % después de 74 h de exposición. Siendo el extracto etanólico de tallo de *A. diversifolia* Saff., el que presentó la mayor tasa de mortalidad, a una concentración de 1 mg mL⁻¹.

2.4.11 Actividad antihiper glucémica

La investigación de Brindis et al., (2013) tuvo como objetivo la evaluación del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *A. diversifolia* Saff., en la inhibición de la α -glucosidasa, así como la tolerancia a sacarosa en ratas. Los resultados arrojaron una $CI_{50} = 1.18$ mg mL⁻¹ para la actividad de la α -glucosidasa. Por su parte, el efecto antihiper glucémico estuvo asociado con una disminución en los niveles de glucosa en sangre posprandial en ratas a dosis de 100, 300 y 500 mg kg⁻¹ a través del tiempo. Un análisis cromatográfico mediante HPLC permitió la identificación de dos flavonoides: rutina e isoquercitrina así como de trazas de astragalina/isoquercitrina. Los resultados evidenciados proporcionan un respaldo científico del uso tradicional de las hojas de ilama en el tratamiento de la diabetes.

La actividad anti-hiper glucémica continuó con los trabajos de Calzada et al., (2019). Quienes evaluaron las propiedades anti-hiper glucémicas de extractos etanólicos, fracciones y un compuesto puro obtenidos a partir de hojas de *A. diversifolia* Saff. La fracción de CHCl₃ a una dosis de 200 mg kg⁻¹ fue la que mostró la mayor actividad respecto a un fraccionamiento del extracto etanólico. La purificación de dicha fracción de CHCl₃ llevó a la obtención de un alcohol sesquiterpénico acíclico; el farnesol. Los resultados indicaron que a dosis de 50 mg kg⁻¹ y tiempos de 4 h después de la administración del tratamiento, el compuesto puro aislado mostró la mayor actividad antihiper glucémica respecto

al fármaco acarbosa y con niveles similares a la glibenclamida y ligeramente menor que la canagliflozina.

En el trabajo de Valdés et al., (2020) se continuaron los estudios encaminados a la obtención de nuevos compuestos con actividad antihiper glucémica a partir de los extractos etanólicos de hojas de *A. diversifolia* Saff. La investigación fitoquímica reveló un producto adicional llamado farsenal, en adición al farsenol previamente encontrado ya en la fracción clorofórmica del extracto etanólico. La investigación involucró un estudio bio-dirigido mediante el uso del extracto etanólico, un fraccionamiento primario en fracciones de cloroformo, acetato de etilo y la fase acuosa, seguido de un fraccionamiento secundario de la fracción más activa (la del cloroformo). Finalmente, se obtuvieron dos compuestos puros: farsenal y farsenol. El objetivo fue evaluar su potencial de inhibición de la α -glucosidasa mediante ensayos como la tolerancia oral a sacarosa, lactosa e hidrólisis intestinal de sacarosa. Asimismo, se determinó la inhibición de la proteína SGLT-1 mediante ensayos como tolerancia oral a la glucosa, absorción intestinal de glucosa y excreción urinaria de glucosa. Como resultados, las concentraciones efectivas para la hidrólisis intestinal fueron del orden de $CE_{50} = 565, 662, 590, 590$ y $802 \mu M$ respectivamente. La absorción intestinal de glucosa mostró valores de $CE_{50} = 1\ 059, 783, 539, 1\ 211$ y $327 \mu M$ respectivamente. Los resultados sugieren un posible mecanismo de acción por parte de los metabolitos secundarios (farsenal y farsenol). Los hallazgos en este tipo de investigaciones respaldan el uso de extractos obtenidos de hojas de *A. diversifolia* Saff como agentes fitoterapéuticos en la regulación de los niveles de glucosa en sangre.

2.4.12 Actividad anticancerígena

Los trabajos recientes relacionados con actividad antitumoral de Ramírez-Santos et al., (2022) involucraron estudios *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, de tres terpenoides de carácter acíclico obtenidos de hojas de *A. diversifolia*. Mediante cromatografía de gases y métodos espectroscópicos, se identificaron tres terpenoides en el extracto de éter de petróleo obtenido de las hojas: farnesilo, fitol y geranilgeraniol. Posteriormente, se evaluó su potencial antitumoral en ratones Balb/c a los cuales

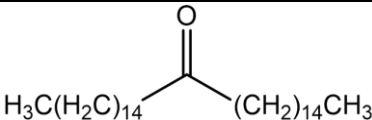
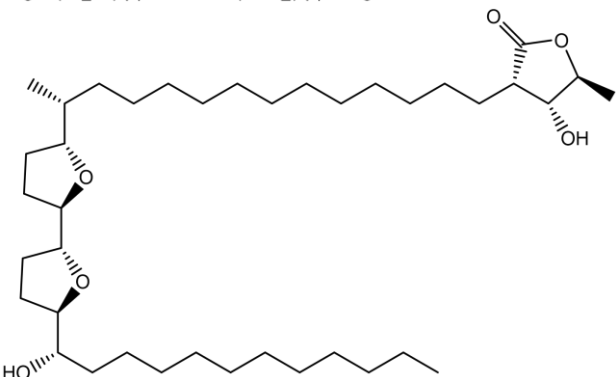
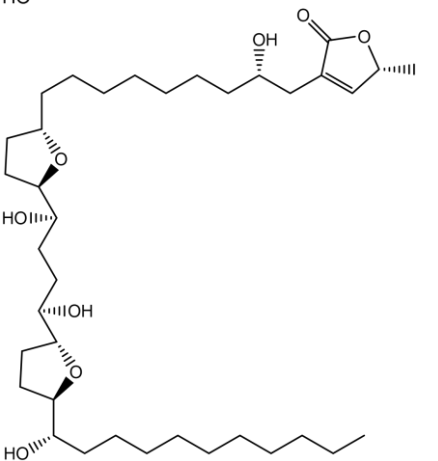
se les inocularon células tumorales U-937. Los valores de citotoxicidad contra células U-937 mostraron dosis letales más altas para los tres terpenoides, cuyos valores fueron 1.41, 3.03 y 5.82 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (farsenilo, fitol y geranilgeraniol respectivamente). Los resultados de la actividad antilinfoma de estos compuestos fueron $\text{DE}_{50} = 5.89, 6.71 \text{ y } 7.22 \text{ mg kg}^{-1}$ en hembras y $\text{DE}_{50} = 5.09, 5.83 \text{ y } 6.98 \text{ mg kg}^{-1}$ en machos. Finalmente, los estudios de acoplamiento molecular a la enzima 3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A reductasa sugieren una unión de los terpenoides a ciertos aminoácidos del sitio catalítico. Los resultados concluyen en el potencial uso de estos tres terpenoides como agentes anticancerígenos.

En el último trabajo de Ramírez-Santos et al., (2024) se reportó la actividad citotóxica mediante citometría de flujo de los tres terpenoides previamente descritos (farsenilo, fitol y geranilgeraniol en 2022), con el objetivo de determinar el tipo de muerte celular y la producción de ROS. Complementariamente, se realizaron análisis en los ganglios linfáticos y estudios de acoplamiento molecular con tres proteínas Bcl-2, Mcl-1 y VEGFR-2 las cuales están relacionadas con el cáncer. Los resultados mostraron que, para los tres terpenoides, la muerte celular inducida fue por apoptosis tardía y necrosis. En cuanto a la producción de ROS, se observó un aumento significativo en el caso del fitol y el geranilgeraniol. Finalmente, en los estudios de acoplamiento molecular, el geranilgeraniol mostró mayor afinidad por las proteínas Bcl-2 y VEGFR-2, mientras que la mejor afinidad de la Mcl-1 se obtuvo con el acetato de farnesilo. Los resultados respaldan el potencial anticancerígeno de estos tres terpenoides, específicamente en el tratamiento del linfoma no Hodgkin.

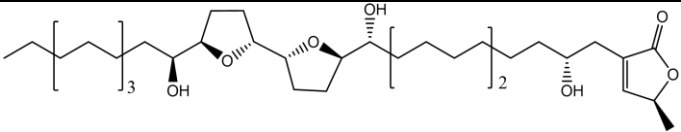
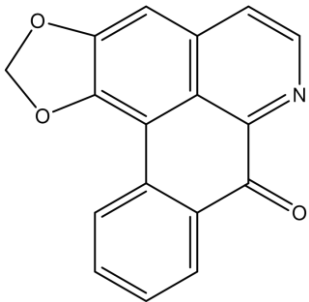
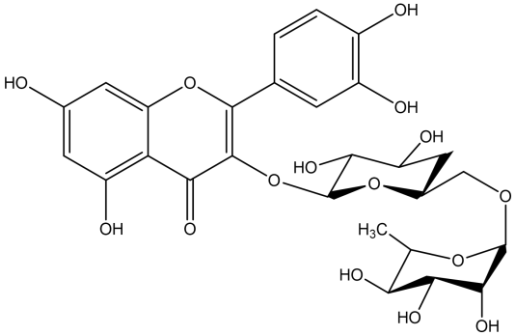
2.5 Metabolitos aislados de *A. diversifolia* Saff

El Cuadro 2 presenta un resumen de las estructuras químicas de los metabolitos secundarios obtenidos de *A. diversifolia* Saff., resultado de estudios fitoquímicos.

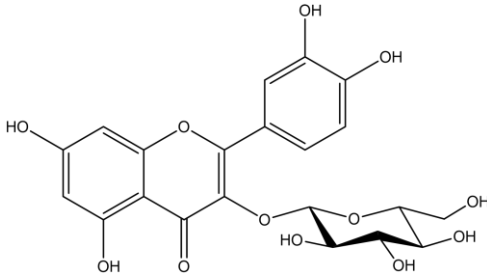
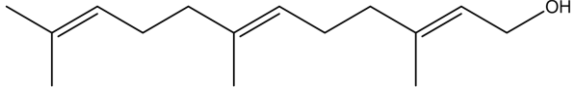
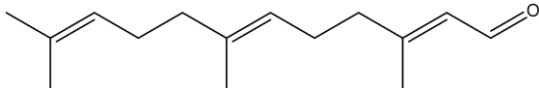
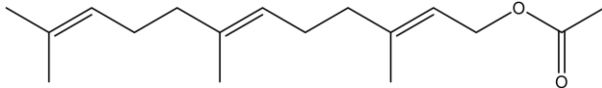
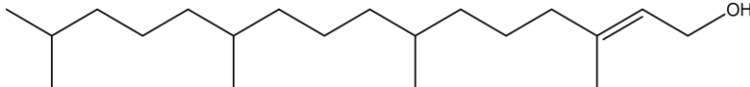
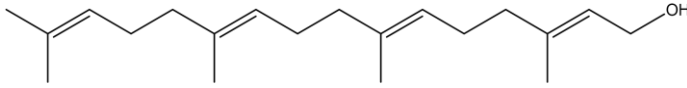
Cuadro 2. Metabolitos secundarios encontrados en *A. diversifolia* Saff.

Compuestos	Estructura	Parte Vegetal	Referencia
palmitona		Hojas	(Gonzalez-Trujano et al., 2001)
laherradurina		Semillas	(Schilie-Guzmán et al., 2009)
cherimolina-2		Semillas	(Schilie-Guzmán et al., 2009)

Cuadro 2. Metabolitos secundarios encontrados en *A. diversifolia* Saff (continuación).

Compuestos	Estructura	Parte Vegetal	Referencia
rolliniastatina-2		Semillas	(Luna-Cazares et al., 2010)
liriodenina		Raíz	(De la Cruz-Chacón et al., 2011)
rutina		Hojas	(Brindis et al., 2013)

Cuadro 2. Metabolitos secundarios encontrados en *A. diversifolia* Saff (continuación).

Compuestos	Estructura	Parte Vegetal	Referencia
isoquercitrina		Hojas	(Brindis et al., 2013)
farsenol		Hojas	(Calzada et al., 2019)
farsenal		Hojas	(Valdés et al., 2020)
acetato de farnesilo		Hojas	(Ramírez-Santos et al., 2022)
fitol		Hojas	(Ramírez-Santos et al., 2022)
geranilgeraniol		Hojas	(Ramírez-Santos et al., 2022)

2.6 Ciclopéptidos

Los ciclopéptidos son secuencias de cadenas cíclicas formadas por residuos de aminoácidos, de origen proteico o no proteico. Poseen propiedades superiores en comparación con sus partes lineales, como mayor estabilidad, afinidad por los sitios de unión, selectividad, y menor toxicidad. Desempeñan funciones de importancia en la industria farmacéutica y clínica. Entre sus aplicaciones destacan su potencial como anticancerígenos, antiinflamatorios, antivirales, entre otras (Jiang et al., 2024).

2.7 Clasificación de ciclopéptidos

Las investigaciones recientes, especialmente en el campo de los péptidos cíclicos de origen vegetal, han propuesto una clasificación en tres bloques principales: los péptidos derivados de PawS, los ciclótidos y los orbítidos (Daly & Wilson, 2021).

2.7.1 Ciclopéptidos derivados de PawS

Los ciclopéptidos tipo PawS son compuestos ciclados de cabeza a cola, con la presencia de un solo enlace disulfuro (Figura 2). Están conformados por entre 12 a 18 residuos de aminoácidos. Predominantemente, en sus cadenas se destaca la presencia de prolina. Además, estos ciclopéptidos se caracterizan por la unión de una Gly N-terminal y una Asp C-terminal en su secuencia de anillo (Chekan et al., 2024). El primer ciclopéptido de esta característica fue descubierto en 1999, a partir de las semillas del girasol, y se identificó como inhibidor de tripsina en dicha semilla (SFTI).

considerados aminoácidos clave en su mecanismo de macrociclización (Chekan et al., 2024).

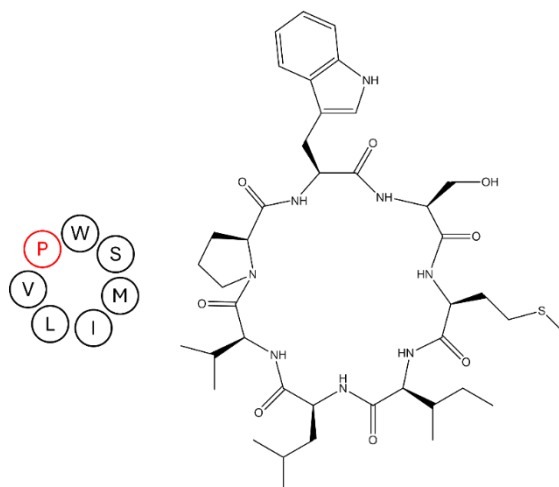


Figura 4. Estructura del orbíto [1-7-NaC]-crocaorbs A1 (Queiroz et al., 2024).

2.8 Ciclopéptidos obtenidos en el género *Annona*

En la revisión de Dahiya & Dahiya (2021) se presenta un compendio de 40 diferentes ciclopéptidos obtenidos del género *Annona*, así como las actividades biológicas a las que fueron objeto de estudio y evaluación. La revisión abarca desde el primer ciclopéptido encontrado en *A. muricata* por Chaoming et al., (1995), hasta el año 2019, con el descubrimiento de la esclerina en *A. escleroderma*, por Cen-Pacheco et al., (2019). A esta revisión se suma la incorporación de cuatro nuevos ciclooctapéptidos (Figura 5) hallados en *A. globiflora*, por Sosa-Rueda et al., (2022).

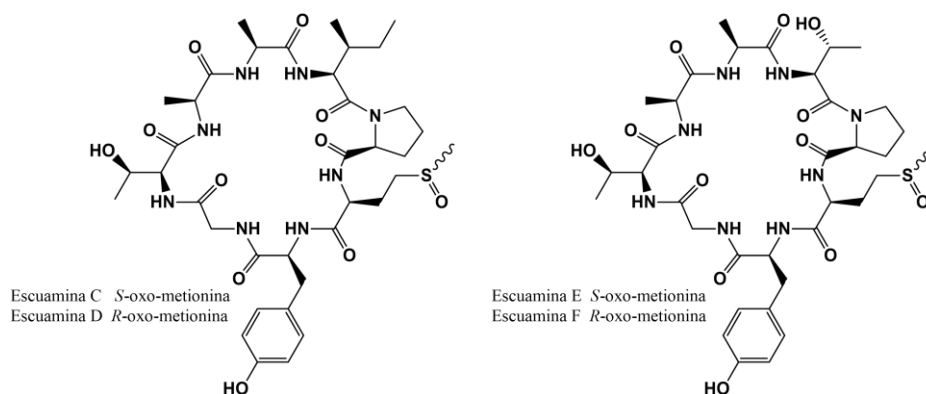


Figura 5. Escuaminas C-F obtenidos de semillas de *A. globiflora*.

El Cuadro 3 presenta, a continuación, una actualización de los dos últimos trabajos publicados relacionados con las bioactividades de ciclopéptidos recientemente descubiertos en el género *Annona*.

Cuadro 3. Ciclopéptidos y bioactividades recientemente obtenidas de semillas del género *Annona*

Ciclopéptido	Especie	Bioactividad	Fuente
Esclerina	<i>A. esclerodermia</i>	Actividad citotóxica	Cen-Pacheco et al., (2019)
Ciclosenegalina A		contra la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145	
Escuaminas C – F	<i>A. globiflora</i>	Actividad antiamoeboides	Rodríguez-Expósito et al., (2021)

Los resultados de Cen-Pacheco et al., (2019) indican que ambos ciclopéptidos son capaces de inhibir la proliferación celular del cáncer de próstata humano a concentraciones en el rango de microgramos. En particular, la esclerina muestra actividad citotóxica moderada contra DU-145, un modelo de cáncer de próstata humano, con un valor de CI_{50} de 27.3 μ M. Además, se encontró que este nonapéptido cíclico era más citotóxico que el cicloheptapéptido ciclosenegalina A (CI_{50} = 54.9 μ M), lo que podría deberse a la presencia de un residuo de aminoácido no natural, el ácido *L*-2,4-diaminobutírico (Dab), en la estructura de la esclerina. Este residuo es raro en metabolitos naturales, especialmente en polipéptidos cíclicos.

Las escuaminas C–F, ciclooctapéptidos identificados en *A. globifolia*, revelaron en un estudio previo ser una excelente opción para el diseño de nuevos medicamentos contra infecciones causadas por amebas, como la queratitis por *Acanthamoeba*. Esto se debe a su baja toxicidad y a su actividad significativa contra las etapas de trofozoíto y quiste de *Acanthamoeba*, particularmente *A. castellanii* Neff. Los ciclooctapéptidos recién descubiertos podrían ser candidatos

en la búsqueda de compuestos terapéuticos contra estos protozoos (Rodríguez-Expósito et al., 2021).

2.9 Literatura citada

- Brindis, F., González-Trujano, M. E., González-Andrade, M., Aguirre-Hernández, E., & Villalobos-Molina, R. (2013). Aqueous Extract of *Annona macrophyllata*: A Potential α -Glucosidase Inhibitor. *Biomed Research International*, 2013, 6. doi:10.1155/2013/591313.
- Calzada, F., Vaides, M., Garcia-Hernandez, N., Velázquez, C., Barbosa, E., Bustos-Brito, C., Quijano, L., Pina-Jimenez, E., & Mendieta-Wejebe, J. E. (2019). Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona diversifolia* Safford. and farnesol on normal and alloxan-induced diabetic mice. *Pharmacognosy Magazine*, 15(62), 5-11. doi:10.4103/pm.pm_582_18.
- Carballo, A. I., Martínez, A. L., González-Trujano, M. E., Pellicer, F., Ventura-Martínez, R., Díaz-Reval, M. I., & López-Muñoz, F. J. (2010). Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 95(1), 6-12. doi:10.1016/j.pbb.2009.11.017.
- Cen-Pacheco, F., Valerio-Alfaro, G., Santos-Luna, D., & Fernández, J. J. (2019). Sclerin, a New Cytotoxic Cyclonapeptide from *Annona scleroderma*. *Molecules*, 24(3), 8. doi:10.3390/molecules24030554.
- Chaoming, L., Ninghua, T., Yuping, L., Huiling, L., Qing, M., Huilan, Z., Xiaojang, H., & Jun, Z. (1995). Annomuricatin A, a new cyclopeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Acta Botanica Yunnanica*, 17(4), 459-462.
- Chekan, J. R., Mydy, L. S., Pasquale, M. A., & Kersten, R. D. (2024). Plant peptides - redefining an area of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. *Natural Product Reports*, 41(7), 1020-1059. doi:10.1039/d3np00042g.
- Dahiya, R., & Dahiya, S. (2021). Natural bioeffective cyclooligopeptides from plant seeds of *Annona* genus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 214, 20. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113221.
- Daly, N. L., & Wilson, D. T. (2021). Plant derived cyclic peptides. *Biochemical Society Transactions*, 49(3), 1279-1285. doi:10.1042/bst20200881.
- De la Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A. R., Fefer, P. G., & Garcia, L. F. J. (2011). Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences*, 66(7-8), 377-384.
- De La Cruz Chacon, I., Castro Moreno, M., Luna Cazares, L. M., & Gonzalez Esquinca, A. R. (2016). La familia Annonaceae Juss. en México.
- Escobedo-López, D., Campos-Rojas, E., Rubén Rodríguez-Núñez, J., Alia-Tejagal, I., & Núñez-Colín, C. A. (2019). Priority areas to collect germplasm of *Annona* (Annonaceae) in Mexico based on diversity and species richness indices. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(2), 401-413. doi:10.1007/s10722-018-0718-2.
- González-Esquinca, A. R., Luna-Cazáres, L. M., Guzmán, M. A. S., Chacon, I. D., Hernández, G. L., Breceda, S. F., & Gerardo, P. M. (2012). *In vitro* larvicidal

- evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* larvae (diptera, tephritidae). *Interciencia*, 37(4), 284-289.
- González-Trujano, 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(8), 703-707. doi:10.1055/s-2006-931598.
- González-Trujano, M. E., Navarrete, A., Reyes, B., Cedillo-Portugal, E., & Hong, E. (2001). Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Medica*, 67(2), 136-141. doi:10.1055/s-2001-11504.
- González-Trujano, M. E., Navarrete, A., Reyes, B., & Hong, E. (1998). Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research*, 12(8), 600-602. doi:10.1002/(sici)1099-1573(199812)12:8<600::Aid-ptr363>3.0.Co;2-n.
- González-Trujano, M. E., Tapia, E., López-Merez, L., Navarrete, A., Reyes-Ramírez, A., & Martínez, A. (2006). Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity.: A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia*, 47(11), 1810-1817. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00827.x.
- Jiang, X. Q., Gao, L., Li, Z. L., Shen, Y., & Lin, Z. H. (2024). Development and Challenges of Cyclic Peptides for Immunomodulation. *Current Protein & Peptide Science*, 25(5), 353-375. doi:10.2174/0113892037272528231030074158.
- 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. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1262-1268. doi:10.1016/j.indcrop.2010.06.012.
- Lim, T.K. (2012) *Annona diversifolia*. In: Lim, T.K., Ed., *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plant*, 1st Edition, Springer, Dordrecht, 176-179.
- Luna-Cazares, L. M., & Gonzalez-Esquinca, A. R. (2010). Susceptibility of complete bacteria and spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to rolliniastatin-2. *Natural Product Research*, 24(12), 1139-1145. doi:10.1080/14786410902836644.
- Marroquín-Andrade, L., Cuevas-Sánchez, J. A., Ramírez, D. G., 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.
- Ramírez-Santos, J., Calzada, F., Mendieta-Wejebe, J. E., Ordoñez-Razo, R. M., Martinez-Casares, R. M., & Valdes, M. (2022). Understanding the Antilymphoma Activity of *Annona macrophyllata* Donn and Its Acyclic Terpenoids: *In Vivo*, *In Vitro*, and *In Silico* Studies. *Molecules*, 27(20), 21. doi:10.3390/molecules27207123.
- Ramírez-Santos, J., Calzada, F., Ordoñez-Razo, R. M., Mendieta-Wejebe, J. E., Velázquez-Domínguez, J. A., Argüello-García, R., Velázquez, C., &

- Barbosa, E. (2024). *In Vivo*, *In Vitro* and *In Silico* Anticancer Activity of Ilima Leaves: An Edible and Medicinal Plant in Mexico. *Molecules*, 29(9), 19. doi:10.3390/molecules29091956.
- Rodríguez-Expósito, R. L., Sosa-Rueda, J., Reyes-Batlle, M., Sifaoui, I., Cen-Pacheco, F., Hernández Daranas A., Díaz-Marrero, A. R., Piñero, J. E., Fernández, J. J., & Lorenzo-Morales, J. (2021). Antiamoeboid activity of squamins C-F, cyclooctapeptides from *Annona globiflora*. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance*, 17, 67-79. doi:10.1016/j.ijpddr.2021.08.003.
- 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*, 23(8), 1128-1133. doi:10.1002/ptr.2760.
- Sosa-Rueda, J., Domínguez-Meléndez, V., Ortiz-Celiseo, A., López-Fentanes, F. C., Cuadrado, C., Fernández, J. J., Hernández Daranas, A., & Cen-Pacheco, F. (2022). Squamins C-F, four cyclopeptides from the seeds of *Annona globiflora*. *Phytochemistry*, 194, 7. doi:10.1016/j.phytochem.2021.112839.
- Valdés, M., Calzada, F., Mendieta-Wejebe, J. E., Merlín-Lucas, V., Velázquez, C., & Barbosa, E. (2020). Antihyperglycemic Effects of *Annona diversifolia* Safford and Its Acyclic Terpenoids: α -Glucosidase and Selective SGLT1 Inhibitors. *Molecules*, 25(15), 17. doi:10.3390/molecules25153361.

3 ANTIPROTOZOAL ACTIVITY AGAINST *Entamoeba hystolitica* AND *Giardia lamblia* OF CYCLOPEPTIDES ISOLATED FROM *Annona diversifolia* Saff

3.1 Abstract

Diseases caused by intestinal parasites such as protozoa represent a worldwide problem mainly for developing countries. From morbidity in different groups of people to cases of mortality in children and/or immunocompromised patients. In addition to the above, there is growing resistance to the drugs used in the treatment of these diseases, as well as undesirable side effects in patients. Therefore, there is an interest in the search for new alternatives for the base and/or development of new drugs with antiparasitic activities without harmful effects. In this sense, natural products offer to be a diverse source of compounds with biological activities. In this work, we describe the isolation and elucidation by 1D and 2D NMR spectroscopy of three cyclopeptides obtained from seeds of *A. diversifolia* Saff.; cherimolacyclopeptide D (**1**), squamin D (**2**), and squamin C (**3**). The fractions enriched in cyclopeptides, as well as a pure compound (**1**), showed antiprotozoal activity against *E. hystolitica* Schaudinn and *Giardia lamblia* Kunstler *in vitro* assays, with values of $IC_{50} = 3.49$ and $5.39 \mu g mL^{-1}$, respectively. The molecular docking study revealed that **1** has a strong interaction with targets used, including aldose reductase and PFOR enzymes. The antiprotozoal activity of cherimolacyclopeptide D is reported for the first time in this study.

Keywords: cherimolacyclopeptide D, squamins C and D, cyclopeptides, NMR, molecular docking, antiprotozoal activity, *Entamoeba hystolitica*, *Giardia lamblia*

Doctoral thesis in Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Author: M.C. Ulises Murrieta Dionicio

Thesis director: Dr. Benito Reyes Trejo

Article published in: *Molecules*, 29(23), 5636. DOI: 10.3390/molecules29235636.

Authors: Ulises Murrieta-Dionicio, Fernando Calzada, Elizabeth Barbosa, Miguel Valdés, Benito Reyes-Trejo, Holber Zuleta Prada, Diana Guerra-Ramírez, y Federico del Río-Portilla.

3.2 Introduction

Intestinal protozoa are responsible for more than one billion intestinal parasitic diseases globally [1]. Due to its level of incidence, amebiasis caused by the protozoan *Entamoeba histolytica* Schaudinn [2] stands out in importance. Another important case is giardiasis caused by *Giardia lamblia* Kunstler, which causes alterations in intestinal permeability, the microbiota, and the immune system [3]. This contributes to a public health problem such as gastrointestinal diseases, which during the last decade have represented the second cause of morbidity in Mexico [4].

Current therapies are based on the use of synthetic drugs such as nitroimidazoles and/or benzimidazoles, as well as their derivatives [5]. However, these medications can cause undesirable side effects such as nausea, vomiting, abdominal pain, and diarrhea in treated patients [6]. Therefore, there is a need in the search for new bioactive compounds as antiparasitic agents with fewer or no adverse effects. In these contexts, medicinal plants may be an important source of compounds with potential therapeutic effects [7].

Annona diversifolia Saff. (*Annona macrophyllata* Donn), popularly known as “ilama, papauce, lamazapotl, anona blanca, or cherimoya”, is used in Mexican traditional medicine to treat cancer, inflammation, pain, and diabetes mellitus, as well as analgesics. The fruit of this Annonaceae is used as food. Its hexanic and ethanol extracts obtained from the leaves and seeds have been reported with several biological activities such as antinociceptive, anticonvulsant, antimicrobial, antifungal, antitumor, antihyperglycemic, and inhibitor of the α -glucosidase enzyme. From *A. diversifolia* have been isolated acetogenins, flavonoids, alkaloids, and terpenoids. Among the terpenoids isolated by bioassay-guided fractionation were antitumor compounds, geranylgeraniol, farnesyl acetate, and phytol. However, so far there are no scientific studies supporting its potential antiprotozoal activity against *E. histolytica* and *G. lamblia*. In this sense, other species of the genus are known to have those properties, including *Annona cherimola*, *A. muricata*, and *A. squamosa* [8].

Alternative therapies based on the use of organic extracts from medicinal plants have been documented with potential amoebicidal and giardicidal effects [9,10,11,12,13,14]. Recent bio-directed studies on some of these extracts have resulted in the obtaining of natural products such as some flavonoids as kaempferol ($CI_{50} = 7.9$ and $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) [15] or epicatechin ($CI_{50} = 1.9$ and $1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$) [11] with relevant antiprotozoal activities against *E. histolytica* and *G. lamblia*, respectively.

An interesting case study is cyclopeptides. Cyclopeptides are peptides of ribosomal origin of cyclic character bound from head to tail that lack disulfide bonds. Structurally, between 5 and 16 amino acid residues are formed. Within their sequence, the dominant presence of glycines and prolines as key amino acids in their macrocyclization mechanism stands out [16]. Cyclopeptides can function as antibiotics, toxins, ion-transport regulators, protein-binding inhibitors, enzyme inhibitors, and immunosuppressants [17]. Also, it has been reported their cytotoxic, anticancer, anti-inflammatory, insecticidal, acaricidal, and antiparasitic activities [17,18,19,20]. Recent studies in the genus *Annona* achieved the isolation and elucidation of four new cyclooctapeptides (squamins C-F) with antiamoebic activity from seeds of *A. globiflora*. Squamins D and F revealed greater antiamoebic activity ($CI_{50} = 18.3$ and $18.0 \mu\text{M}$) compared to the trophozoite stage in *Acanthamoeba castellanii* Neff strains. The highest sensitivity is associated with the *R* conformers of the *S*-oxo-methionine residue [21]. On the other hand, studies on synthetic sulfur derivatives of fexinidazole such as fexinidazole sulfoxide and fexinidazole sulfone also resulted in greater anti-giardial and antiamoebic activity compared to the parent drug [22]. The above evidence would point to an important effect on protozoa such as *G. lamblia* and *E. histolytica* by cyclopeptides with sulfur amino acid residues. However, it is necessary to explain a possible mechanism of action such as that which occurs in the pharmacological activation of metronidazole by enzymes such as pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR) present in the metabolism of anaerobic protozoa [23]. For this purpose, molecular coupling studies are used to confirm the affinity between drugs and enzymes [24].

Therefore, the present work describes the isolation and structural elucidation of cyclopeptides obtained from seeds of *A. diversifolia* Saff. and their evaluation with in silico and in vitro assays of the antiprotozoal activity.

3.3 Materials and methods

3.3.1 General experimental procedure

IR spectra were obtained in a Cary 630 FTIR spectrometer (Agilent®, Santa Clara, CA, USA). Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel plates 60 F₂₅₄ (Merck®, Darmstadt, Germany) developed with Cl₂/o-tolidine reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The RP-HPLC separation was performed in a Waters HPLC system (Milford, MA, USA) equipped with a 2535 quaternary pump, connected to a 2707 autosampler, and two PDA 2998 and ELSD 2424 detectors. Data acquisition and processing were performed with Empower 3 (Waters) software. The columns used were C18 Gemini-NX particle size of 5 µm (4.6 mm i.d. × 250 mm and 10.0 mm i.d. × 250 mm for analytical and semi-preparatory experiments, respectively, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The ¹H and ¹³C NMR spectra were acquired in a Bruker ASCEND-700 spectrometer (Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA) equipped with a Bruker 5 mm TCI CryoProbe probe at 300 K. The 1D and 2D NMR spectra were acquired in acetone-*d*₆, CD₃OD, or pyridine-*d*₅ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 298 K. Pulse sequences and phase cycles were used for the COSY, HSQC, and HMBC spectra. NMR data were processed using MestReNova 15.0.1 software (Mestrelab Research SL, San Diego, CA, USA).

3.3.2 Vegetal material

The fruits of *A. diversifolia* Saff. were acquired in the municipal market of Plaza de Gallos, Tejupilco, State of Mexico (18°51'05" N and 100°14'38" W), in October 2019. Fruits harvested with ripeness for consumption were selected according to the cracking of the peel in the peri-peduncular zone. The fruit was botanically authenticated, and a specimen (Voucher 36509) was deposited at the Herbarium Jorge Espinosa Salas of the Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

3.3.3 Extraction and isolation

The seeds were manually separated from the fruit and washed with running water in order to remove traces of mucilage and/or pulp. They were then dried at room temperature for two weeks. Seeds that rot or cause insect damage were removed. The almonds (endosperm) were separated from the coriaceous endocarp with the help of mechanical tweezers and then ground in a food processor (NutriBullet®, NBR-0804B, Los Angeles, CA, USA). The almonds of *A. diversifolia* Saff. (2.0 kg) were macerated at room temperature ($3 \times 4 \text{ L} \times 3 \text{ days}$) with solvents from lowest to highest polarity, in the following order: hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc, acetone, EtOH, MeOH, and an EtOH- H_2O mixture (1:1 v/v, 0.1% acetic acid) [34]. The solvents were removed in each maceration by reduced pressure evaporation using a Rotavapor R-300 rotary evaporator (Büchi®, Meierseggstrasse, Flawil, Switzerland) and reused in the following maceration, finally obtaining seven extracts: hexane (403 g), CH_2Cl_2 (439 g), EtOAc (43 g), acetone (17 g), EtOH (6 g), MeOH (23 g), and EtOH- H_2O (73 g).

The presence of cyclopeptides in each extract was monitored by TLC on 60 F₂₅₄ silica gel plates (Merck®, Darmstad, Germany) with CH_2Cl_2 -MeOH (85:15) as the elution system and as the Cl_2/o -tolidine developer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) [35]. The hydroethanolic extract showed a positive reaction with the Cl_2/o -tolidine developer for the detection of cyclopeptides, so it underwent a purification process.

A total of 42.41 g of hydroethanolic extract was taken and dissolved in 100% MeOH. The soluble fraction (SF-MeOH; 31.32 g) was concentrated at reduced pressure using a Rotavapor R-300 rotary evaporator (Büchi®, Meierseggstrasse, Flawil, Switzerland). Subsequently, the fraction was solubilized into 500 mL of H_2O and subjected to a series of successive liquid-liquid extractions using the solvents Hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc, and BuOH ($3 \times 0.5 \text{ L}$, 1:1) [36]. From the BuOH partition, a viscous brown residue (2.39 g) was obtained. The residue was analyzed using a Biotage Isolera™ one ultrafast chromatography (C1) system (Biotage, Uppsala, Sweden) equipped with a Biotage® SNAP ULTRA C18 30 g reversed-phase cartridge (A = H_2O , B = ACN; 0% B 7 VC, 0–10% B 5 VC, 10–

15% B 7 VC, 15–20% B 7 VC, 20–100% B 5 VC, 100% B 4VC) [37]. A total of 86 fractions were obtained, which were concentrated and monitored with the reaction of Cl_2/o -tolidine in TLC. The group of fractions C1-F:49–69 (303.0 mg) was positive for the reaction with Cl_2/o -tolidine, so it was purified with column chromatography (C2) with Kieselgel 60H silica gel (Merck®, Darmstadt, Germany), with a CH_2Cl_2 -MeOH elution system with increments of 5% in 5% to 20% MeOH. Next, 62 fractions of 25 mL were collected, concentrated and monitored with TLC, and finally grouped with similar RFs. The C2-F:25–33 fractions (159.4 mg) tested positive for the chemical reaction of cyclopeptides (Cl_2/o -tolidine). The C2-F:25–33 gather was dissolved in 100% H_2O and subsequently purified in a solid-phase extraction (SPE) (C3) system. A J.T. Baker® BAKER SPE-12GTM vacuum manifold (Phillipsburg, NJ, USA) was used. It was equipped with STRATA-X® PRO reversed-phase polymer cartridges, 500 mg 6 mL^{-1} (Phenomenex®, Torrance, CA, USA).

The cartridges were pre-conditioned with 6 mL of ACN followed by 6 mL of H_2O . After loading the sample, the cartridges were washed three times with H_2O -ACN gradients (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, and 0:100, v/v) with 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) [38]. A total of 15 subfractions were obtained. The C3-SPE: IV subfraction (26.7 mg) was finally taken to high-performance liquid chromatography (HPLC) equipment. For the separation and/or purification of analytes contained in the sample, a semi-preparative liquid chromatography was used where 500 μL of F:25-33-SPE:IV sample was repeatedly injected at a concentration of 15 mg mL^{-1} into a Waters HPLC equipment with a linear elution gradient of H_2O (A; 0.05 % TFA v/v)-ACN (B; 0.05% TFA v/v) starting from 20 to 35% of B for 30 min at a flow rate of 4.6 mL min^{-1} at $25\text{ }^\circ\text{C}$. The detection of the compound was performed with UV monitoring at lengths of 200, 220, and 280 nm [39]. The process produced three cyclopeptides called cherimolacyclopeptide D (1), squamin C (2), and D (3). Structural elucidation of the isolated compounds was performed by one- and two-dimensional NMR spectroscopy and matrix-assisted laser ionization/desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF).

3.3.4 NMR spectroscopy

The purified compounds were dissolved in 0.6 mL of acetone- d_6 , CD₃OD, or pyridine- d_5 . Tetramethylsilane (TMS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as an internal reference. Dissolved samples were transferred to 5 mm Norrell® Sample Vault Series™ glass tubes (Norrell, Inc., Morganton, NC, USA). NMR experiments were performed on a Bruker ASCEND-700 spectrometer. One-dimensional spectra of ¹H-, ¹³C- NMR and two-dimensional spectra of HSQC, HMBC ($J = 10$ Hz), TOCSY (80 ms, mixing time), and NOESY (300 ms, mixing time) were acquired.

3.3.5 Mass spectrometry

The molecular mass of the purified cyclopeptides was obtained by MALDI-TOF experiments on a Bruker Daltonics Microflex LT (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). For its study, 100 nmol of each cyclopeptide was mixed with 3 μ L of a matrix (a supersaturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in ACN 65% in H₂O added with TFA at 0.05% v/v). Of this mixture, 1 μ L was taken and placed on the MALDI plate for analysis. Data were acquired in a m/z range of 0–1000 Da. The searchlight mode of operation was used by acquiring 200 rounds [40].

3.3.6 Antiprotozoal tests

Entamoeba histolytica strain HM1-IMSS used in all experiments was grown axenically at 37 °C in TYI-S-33 medium supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum. In the case of *Giardia lamblia*, strain WB was grown in TYI-S-33 modified medium supplemented with 10% calf serum, bovine bile, and penicillin-streptomycin (0.1%, Gibco). When the logarithmic phase of growth was reached, the trophozoites were detached from the medium and used. Antibiotics were omitted during experimental assays. *In vitro* susceptibility tests were performed using *E. histolytica* (6×10^3) or *G. lamblia* (5×10^4) trophozoites that were incubated for 48 h at 37 °C in the presence of different concentrations (1.25–200 μ g mL⁻¹) of the crude extract, fraction, or pure compounds in DMSO at 2%. Each test included metronidazole as a standard amoebicidal and giardicidal drug, a

control (culture medium plus trophozoites and DMSO), and a blank (culture medium). After incubation, the trophozoites were detached by chilling, and 50 μ L samples of each tube were subcultured in a fresh medium for another 48 h. The final number of parasites was determined with a hemocytometer. Then, data were analyzed using probit analysis. The percentage of trophozoites surviving was calculated by comparison with the growth in the control group. The plot of probit against log concentration was made, the best straight line was determined by regression analysis, and the IC₅₀ values were calculated. The regression coefficient, its level of significance ($p < 0.05$ indicates a significant difference between groups), and correlation coefficient were calculated, and 95% confidence interval (CI) values were determined. Results were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA, USA) software. Performing one-way ANOVA and performing multiple comparison tests using Bonferroni's test.

3.3.7 Molecular docking studies

The chemical structure of the ligand's metronidazole (CID: 445070) and fidarestat (CID: 160024) were retrieved from the PubChem chemical library (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, accessed 15 July 2024), optimized, and subjected to energy and geometric minimization using Avogadro V1.2.0 [41,42] software. The objective of the study was pyruvate ferredoxin oxidoreductase (crystal structure of the pyruvate intermediate free radical: ferredoxin oxidoreductase, RCSB, PDB ID: 1KEK) and aldose reductase (structure of the aldose reductase of *Giardia lamblia*, RCSB, PDB ID: 3KRB). They were retrieved from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>, accessed 15 July 2024). In the case of PFOR, all water molecules not necessary for catalytic activity were removed, and thiamine ions and di-phosphate were maintained while preserving the catalytic activity of the enzyme. As for aldose reductase, all water molecules were removed, as well as ions and small molecules, and the cofactor nicotinamide was retained to preserve the protein.

In both proteins, all polar hydrogen atoms were added, ionized in a basic environment (pH = 7.4), and assigned Gasteiger charges. The output topologies

calculated from the previous steps were used as input files for the coupling simulations.

The molecular coupling experiments were carried out using Autodock 4.2 software [42]. The search parameters were as follows: A grid-based procedure was used to generate the affinity maps by delimiting a grid box of $126 \times 126 \times 126$ Å³ at each spatial coordinate, with a spacing between the points of the grid of 0.375 Å. Lamarck's genetic algorithm was used as a scoring function with a random initial population of 100 individuals and a maximum number of energy assessments of 1×10^7 cycles. The analysis of interactions in the enzyme/inhibitor complex was visualized with the PyMOL software (The PyMOL Molecular Graphics System, Ver 2.0, Schrödinger, LLC, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA).

The validation of the molecular coupling was carried out by recoupling the cocrystallized ligand into the proteins (PFOR and aldose reductase). The lowest energy pose of the cocrystallized ligand was superimposed and observed if it maintained the same bond position. The RMSD was calculated, and a reliable range of 2 Å was obtained.

3.3.8 *In silico* physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological properties

To determine the physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological properties, the SwissADME [43], admetSAR [44], and PROTOX [45] servers were used. The cherimolacyclopeptide D was drawn in the ChemDraw® software V22.0.0.22, and then the SMILES code was obtained, and this code was used in all servers to predict the properties.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Cherimolacyclopeptide D

Compound **1**. This compound was obtained as an amorphous white powder; IR λ_{max} cm⁻¹ 3304 and 1652 (see **Figure S8**). NMR data of ¹H and ¹³C (pyridine-*d*₅) (see **Table 4**). MALDI-TOF, *m/z*: 675 [M + Na]⁺ (see **Figure S7**). From the spectroscopy and spectrometry analysis, a calculation was made for a molecular formula of C₂₉H₄₈N₈O₉ corresponding to a molecular weight of 652, with 10

degrees of unsaturation [25]. In the ^1H -NMR spectrum (see **Figure S1** for details), in the range of 8.23–10.36 ppm, six signals corresponding to amide-bonded -NH protons are observed. In addition, two signals at 8.59 and 9.44 ppm correspond to syn and anti-protons of an Asn residue. On the other hand, in the ^{13}C -NMR spectrum (see **Figure S2** for details) in the region of 169.4–174.7 ppm, signals from eight carbonyl groups are shown. From the HSQC, COSY, and TOCSY spectra (see **Figures S3–S5** for details), spin systems corresponding to seven residues of Pro¹, Gly², Leu³, Asn⁴, Ala⁵, Val⁶, and Thr⁷ were assigned (**Figure 6**). The amino acid sequence was determined with the HMBC spectrum ($J = 10$ Hz) by correlations between the amide proton (-NH) of amino acid i and the carbon of the carbonyl group of amino acid $i + 1$. From the HMBC spectrum, six correlations could be assigned between the C=O groups and the -NH groups of amino acid residues. The C=O group at 172.5 ppm of Pro¹ correlates with the -NH group at 10.37 ppm of Gly². The C=O group at 169.4 ppm of the Gly² correlates with the -NH group at 8.71 ppm of the Leu³, the C=O at 172.3 ppm of Leu³ correlates with the -NH group at 9.15 ppm of the Asn⁴, the C=O at 171.9 ppm of the Asn⁴ with the -NH at 9.21 ppm of the Ala⁵, the C=O at 173.0 ppm of the Ala⁵ with the -NH at 8.50 ppm of the Val⁶, the C=O at 171.5 ppm of the Val⁶ with the -NH at 8.23 ppm of the Thr⁷. On the other hand, the C=O group at 170.1 ppm of Thr⁷ does not show a correlation with any -NH group in the HMBC spectrum. It follows that this residue is connected to the Pro¹ residue, thus closing in this manner the cycle (see **Figure S6** for details) [26]. The assignment of the second group C=O at 174.7 ppm of the Asn is correlated with the anti at 9.44 ppm and syn at 8.59 ppm protons of the -NH₂ group. The trans geometry of the Pro was deduced by the γC signal at 24.6 ppm [27]. Finally, based on NMR data and a comparison with literature data, the structure of compound **1** was elucidated as the heptapeptide known as cherimolacyclopeptide D (**1**) [28].

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR (700 MHz) data of cherimolacyclopeptide D (**1**) (in pyridine- d_5).

Aminoácid	Position	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J in Hz)
Pro ¹	CO	172.5	
	αCH	61.6	4.42, dd (9.0, 7.2)
	βCH_2	29.4	1.93, m
			2.01, m
	γCH_2	24.6	1.34, q (10.3)
Gly ²			1.71, dp (10.1, 3.4)
	δCH_2	48.4	3.62, td (9.7, 6.8)
			4.01, m
	CO	169.4	
Leu ³	NH		10.36, dd (8.4, 4.5)
	αCH_2	43.6	3.84, dd (17.0, 4.4)
			4.78, dd (17.0, 8.3)
	CO	172.2	
	NH		8.71, d (10.22)
	αCH	54.1	5.40, m
	βCH_2	44.3	1.76, ddd (13.1, 8.7, 6.8)
			1.89, t (6.9)
	γCH	24.8	1.92, m
Asn ⁴	δCH_3	22.2	0.88, d (6.5)
	$\delta'\text{CH}_3$	22.3	0.90, d (6.3)
	CO	171.9	
	NH		9.15, d (5.2)
	αCH	51.2	5.06, td (4.8, 2.9)
	βCH_2	35.8	3.76, m
			3.92, dd (16.2, 4.8)
	NH		8.59, s
	NH		9.44, s
Ala ⁵	CO	174.7	
	CO	173.0	
	NH		9.21, d (3.7)
	αCH	52.9	4.62, dp (7.5, 3.6)
	βCH_3	17.4	1.49, d (7.4)
Val ⁶	CO	171.5	
	NH		8.49, d (10.3)
	αCH	59.0	5.20, dd (10.4, 6.1)
	βCH_2	30.8	2.79, sextete (6.5)
	γCH_3	18.1	1.08, d (6.9)
	$\gamma'\text{CH}_3$	19.5	1.08, d (6.9)
Thr ⁷	CO	170.1	
	NH		8.23, d (9.5)
	αCH	57.5	5.32, t (9.3)
	βCH	68.1	4.45, dq (8.9, 6.2)
	γCH_3	20.0	1.57, d (6.2)

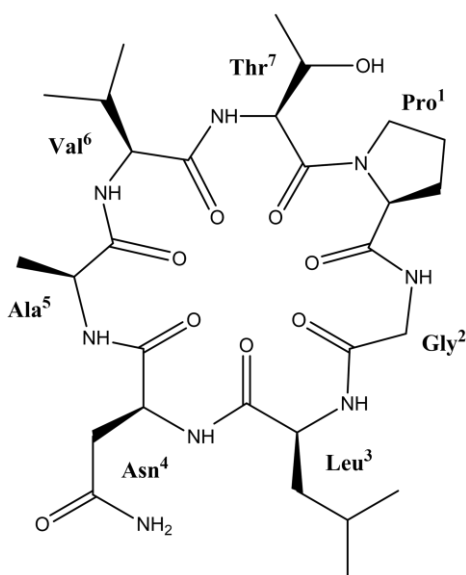


Figure 6. Structure of cherimolacyclopeptide D (**1**) isolated from *A. diversifolia* Saff.

3.4.2 Squamin D

Compound **2**. This cyclopeptide was obtained as an amorphous white powder. NMR data of ^1H and ^{13}C (acetone- d_6) (see **Table 5**). MALDI-TOF, m/z : 843 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (see **Figure S16**). From NMR spectra and mass spectrometry, a molecular formula of $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}$ corresponding to a molecular weight of 820 with 14 degrees of unsaturation was determined. In the ^1H -NMR spectrum (see **Figure S9** for details), in the range of 7.08–9.23 ppm, seven characteristic signals for protons of the amide NH type are appreciated. Additionally, in the displacement at 7.30 ppm, there is an integration for two -NH-type protons corresponding to two amino acid residues. From the ^{13}C -NMR spectrum in the region of 169.3–175.8 ppm, eight signals are located for carbons of the carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$) of peptide bonds (see **Figure S11** for details). From the number of shifts located in the ^{13}C -NMR spectrum, the structure of an octapeptide is suggested (**Figure 7**). The ^1H - ^1H assignments of the COSY, TOCSY, and ^1H - ^{13}C spectra of the HSQC spectrum (see **Figures S12–S14** for details) resulted in the presence of eight amino acid residues, corresponding to the residues of Pro⁴, Met(O)⁵, Tyr⁶, Gly⁷, Thr⁸, Ala¹, Ala², and Ile³ (**Figure 7**). The Pro⁴ unit was identified by the connections of H- α

(δ_{H} 4.88, m) with $\text{H}_{2-\beta}$ (δ_{H} 1.88/2.27 m/m); in sequence, the union was made with $\text{H}_{2-\gamma}$ (δ_{H} 2.27, m) and the latter to $\text{H}_{2-\delta}$ (δ_{H} 3.54/3.71).

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data for squamins D (**2**) and C (**3**) in acetone- d_6 .

Aminoacid	Position	Squamin D (2)		Squamin C (3)	
		δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)
Ala ¹	CO	172.6		172.6	
	NH		7.89, d (3.9)		7.91, d (3.8)
	αCH	52.0	4.01, dt (7.4, 3.7)	52.0	4.01, qd (7.4, 3.8)
Ala ²	βCH_3	15.8	1.41, d (7.4)	15.8	1.41, d (7.4)
	CO	172.8		172.8	
	NH		7.30, d (10.0)		7.29, d (3.8)
	αCH	50.7	4.20, t (7.2)	50.7	4.20, t (7.2)
Ile ³	βCH_3	17.1	1.35, d (7.4)	17.1	1.35, d (7.4)
	CO	171.8		171.9	
	NH		7.08, d (9.7)		7.09, d (9.6)
	αCH	54.8	4.37, t (10.0)	54.9	4.36, t (10.0)
	βCH	35.9	1.99, m	35.9	2.01, m
Pro ⁴	γCH_2	23.8	1.01, ddd (13.7, 9.8, 7.4) 1.44, m	23.7	0.99, m 1.44, m
	δCH_3	10.7	0.84, t (7.5)	10.7	0.83, t (7.5)
	ϵCH_3	16.7	0.72, d (6.6)	17.4	0.77, d (6.6)
	CO	175.8		175.7	
	αCH	63.1	4.88, m	63.1	4.89, m
	βCH_2	29.4	1.88, m 2.27, m	29.5	1.86, dtd (12.3, 9.4, 6.9) 2.27, ddt (12.3, 7.9, 5.2)
	γCH_2	24.6	2.00, m 3.54, dd (6.1, 3.8)	24.6	1.99, m 3.56, m
	δCH_2	47.4	3.71, dt (10.0, 7.6)	47.4	3.68, m
	CO	170.9		170.9	
	NH		9.23, d (3.9)		9.06, d (4.2)
Met(O) ⁵	αCH	55.1	4.05, dt (8.3, 4.2)	55.1	4.06, dt (8.7, 4.4)
	βCH_2	24.3	2.39, dddd (15.6, 9.7, 4.2, 3.2) 2.78, m	23.1	2.19, m 2.74, ddd (14.5, 8.4, 4.0)
	γCH_2	48.7	2.94, ddd (14.4, 9.6, 3.3)	48.0	2.99, ddd (14.7, 7.9, 4.0)
	δCH_3	36.9	2.65, s	35.8	2.45, s

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data for squamins D (**2**) and C (**3**) in acetone- d_6 (continued).

Aminoacid	Position	Squamin D (2)		Squamin C (3)	
		δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)
Tyr ⁶	CO	171.8		171.8	
	NH		8.00, d (10.0)		8.01, d (10.0)
	αCH	52.1	4.91, m	52.2	4.90, dd (9.5, 2.5)
			2.82, d (3.7)		2.83, m
	βCH_2	35.9	3.63, d (15.8, 3.0)	35.9	3.63, dd (15.8, 3.1)
	γC	129.2		129.2	
	$\delta\text{CH}/\theta\text{CH}$	114.9	6.74, d (8.6)	114.9	6.76, d (8.6)
	$\epsilon\text{CH}/\eta\text{CH}$	128.9	7.05, d (8.6)	129.0	7.07, d (8.6)
	ζC	155.6		155.7	
	CO	169.3		169.3	
Gly ⁷	NH		8.14, t (6.3)		8.09, t (6.2)
			3.52, m		3.52, dd (16.8, 5.9)
	αCH_2	43.4	4.16, dd (16.8, 6.7)	43.4	4.17, dd (16.7, 6.7)
	CO	170.9		170.9	
Thr ⁸	NH		7.30, d (10.0)		7.30, d (6.8)
	αCH	55.6	4.96, dd (10.0, 3.0)	55.6	4.96, dd (10.0, 3.0)
	βCH	69.7	4.63, m	69.7	4.63, m
	γCH_3	19.1	1.12, d (6.3)	19.1	1.12, d (6.3)

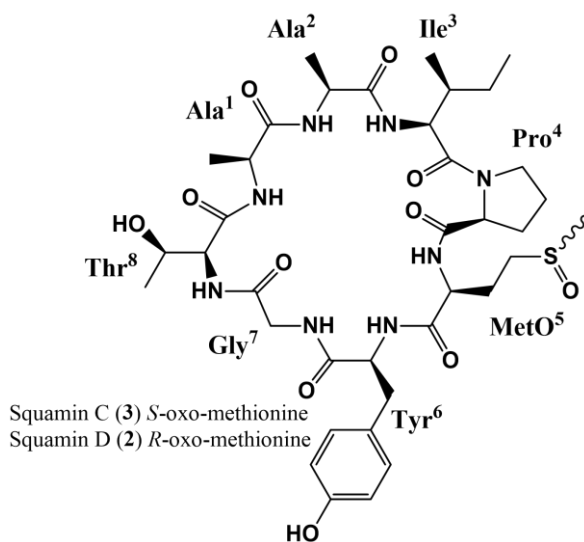


Figure 7. Structures of squamins D (**2**) and C (**3**) isolated from *A. diversifolia* Saff.

With the help of the HMBC spectrum, the assignments for Met(O)⁵ began with H- α (δ_H 4.05, dt, J = 8.3, 4.2 Hz) bound to H₂- β (δ_H 2.39) and sequentially to H₂- γ (δ_H 2.78/2.94). On the other hand, the single methyl group H₃- δ (δ_H 2.65, s) being displaced by a sulfoxide group was assigned by correlation with γ C (δ_C 48.7). For the Tyr⁸ residue, we began with the identification of the spin system corresponding to the disubstituted aromatic ring through the interconnections of the systems H- δ /H- θ (δ_H 6.74, d, J = 8.6 Hz) and H- ϵ /H- η (δ_H 7.05, d, J = 8.6 Hz). On the other hand, the spin system of H- α (δ_H 4.91, m) joined H₂- β (δ_H 2.82/3.63). The interconnection of these two spin systems was carried out with the correlation between H₂- β (δ_H 2.82/3.63) and γ C (δ_C 129.2). Gly was determined with the ¹H-¹H couplings between H₂- α geminal protons (δ_H 3.52/4.16, m/dd, J = 16.8, 6.7 Hz). The Thr assignment began with H- α (δ_H 4.96, dd, J = 10.0, 3.0 Hz) bound to H- β (δ_H 4.63, m) and sequentially bound to methyl H₃- γ (δ_H 1.12, d, J = 6.3 Hz). In the case of Ala¹ and Ala², the assignments were made with the connections of the methyl groups H₃- β (δ_H 1.41, d, J = 7.4 Hz and δ_H 1.35, d, J = 7.4 Hz, respectively) to the H- α (δ_H 4.01 dt, J = 7.4, 3.7 Hz and δ_H 4.20 t, J = 7.2 Hz, respectively). On the other hand, the Ile residue was assigned starting with the methyl group H₃- δ (δ_H 0.84 t, J = 7.5 Hz) joined to H₂- γ (δ_H 1.01/1.44), the next connection was established to H- β (δ_H 1.99), and this in turn with two more connections, to a methyl group H₃- ϵ (δ_H 0.72 d, J = 6.6 Hz) and to H- α (δ_H 4.37, t, J = 10.0 Hz). The sequence of these amino acids was performed with the HMBC spectrum (J = 10 Hz). Seven correlations were assigned between the carbonyl groups C=O of the *i* amino acids and the -NH of each amino acid *i* + 1. The C=O group at 175.8 ppm of the Pro⁴ correlates with the -NH group at 9.23 ppm of the Met(O)⁵, the C=O at 170.9 ppm of the Met(O)⁵ with the -NH at 8.00 ppm of the Tyr⁶, the C=O at 171.8 ppm of the Tyr⁶ with the -NH at 8.14 ppm of the Gly⁷, the C=O at 169.3 ppm of the Gly⁷ with the -NH at 7.30 ppm of the Thr⁸, the C=O at 170.9 ppm of the Thr⁸ with the -NH at 7.89 ppm of the Ala¹, the C=O at 172.6 ppm of the Ala¹ with the -NH (at 7.30 ppm) of the Ala², the C=O at 172.8 ppm of the Ala² with the -NH at 7.08 ppm of the Ile³. In the case of the C=O group of Ile³, it has no correlation with any -NH group in the HMBC spectrum, so it can be deduced that the peptide bond

binding occurs with the Pro⁴ residue, thus closing the connectivity of the cyclopeptide (see **Figure S15** for details). On the other hand, the stereochemistry of *trans*-Pro⁴ was deduced by γ C shifts at 24.6 ppm [27]. Finally, based on NMR spectroscopy and comparison with literature data, the structure of compound **2** was elucidated as the octapeptide squamin D (**2**) [29].

3.4.3 Squamin C

Compound 3. This compound was obtained as an amorphous white powder. The molecular formula obtained for C₃₇H₅₆N₈O₁₁S matched the same as that determined for compound **2**. NMR data for ¹H and ¹³C (acetone-*d*₆) are presented in **Table 5**. The assignment of signals and correlations was performed with experiments ¹H-¹H of the COSY and TOCSY spectra and ¹H-¹³C of the HSQC and HMBC spectra (see **Figures S20–S23** for details), as the description made for compound **2**, establishing a similar structure (**Figure 7**). The variations in the displacements of both compounds (**2** and **3**) are minimal. However, there is a marked distinction in the signals for the methyl H_{3-δ} (δ _H 2.65, s) of compound **2** versus H_{3-δ} (δ _H 2.45, s) for compound **3** (see **Figures S9 and S17** for details), both displaced by the presence of a sulfoxide group in the Met(O) residue. In this sense, the determination of the Met-*R*-(O) and Met-*S*-(O) configurations for compounds **2** and **3** was confirmed by a comparison of the ¹H-NMR data shown in **Figures S10 and S18** with those data reported in the literature [29]. The oxidation of the residue from Met to Met (O) generates the introduction of a stereogenic center in the sulfur atom. This implies the formation of two stable diastereomers, Met-*R*-(O) and Met-*S*-(O), since high activation energies are required for there to be an inversion [30]. Finally, based on NMR spectroscopy and comparison with literature data, the structure of compound **3** was deduced as the octapeptide squamin C (**3**), diastereomer of squamin D (**2**) [29].

3.4.4 Antiprotozoal activity

Based on a general separation procedure for cyclopeptides [27,28,29], a cyclopeptide mixture was obtained by macerating of the seeds with solvents from lowest to highest polarity, in the following order: hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, acetone,

EtOH, MeOH, and an EtOH-H₂O mixture. Among these, only the extract E-EtOH-H₂O resulted positive to cyclopeptides presence; therefore, it was suspended with MeOH to obtain a soluble fraction (SF-MeOH) and residue. As the SF-MeOH fraction showed antiprotozoal activity against both protozoans and was positive to the cyclopeptides test, it was fractionated into fractions of different polarity by organic solvent extractions with hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, and BuOH. All fractions were tested for the cyclopeptides presence and antiprotozoal activity. As the P-BuOH-EM soluble fraction resulted positive to the cyclopeptides test and antiprotozoal activity, it was purified by HPLC to give three cyclodipeptides: cherimolacyclopeptide D (**1**), squamin D (**2**), and squamin C (**3**). All extracts and fractions different from E-EtOH-H₂O, SF-MeOH, and P-BuOH-EM were discarded because they resulted in negative cyclopeptide presence and showed weak activity against both protozoa [10,11].

The antiprotozoal activity of cyclopeptides **1** and the mixture of **2** and **3** was tested on *E. hystolitica* Schaudinn and *Giardia lamblia* Kunstler. Of these, cherimolacyclopeptide D was the most potent compound against both protozoa, with IC₅₀ values of 5.39 µg mL⁻¹ for *G. lamblia* and 3.49 µg mL⁻¹ for *Entamoeba hystolitica*. The mixture of **2** and **3** showed selectivity on *Entamoeba hystolitica* (Table 6). To our knowledge, this is the first report of antiamebic and anti-giardial properties of compounds cherimolacyclopeptide D (**1**), squamin D (**2**), and squamin C (**3**). Also, this is the first bioassay-guided work to obtain the antiprotozoal compounds of the seeds of *A. diversifolia*. All compounds were less active than the metronidazole drug used as a positive control [10,11].

Table 6. *In vitro* antiprotozoal activity of extracts, fractions, and pure compounds.

Extract/Partition/Fraction/Compound	IC ₅₀ µg mL ⁻¹ (CI) ^a	
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba hystolitica</i>
E-EtOH-H ₂ O	213.01 (213.41 - 212.60)	67.90 (68.31 – 67.48)
E-MeOH	58.23 (58.27 - 58.19)	49.90 (49.19 – 48.85)

^a Results are expressed as a mean (n = 6), CI, 95 % confidence intervals, and correlation coefficient > 0.900.

Table 6. *In vitro* antiprotozoal activity of extracts, fractions, and pure compounds (continued).

Extract/Partition/Fraction/Compound	IC ₅₀ µg mL ⁻¹ (CI) ^a	
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
E-EtOH	46.10 (46.12 - 46.08)	58.30 (58.42 – 58.17)
P-BuOH-EM	20.99 (21.01 - 20.97)	34.77 (34.91 – 34.64)
FE-Cherimolacyclopeptide D	53.08 (53.13 - 53.04)	0.82 (0.85 – 0.80)
FE-Squamin C (3) + Squamin D (2)	52.93 (52.96 - 52.89)	8.68 (8.71 – 8.64)
Cherimolacyclopeptide D (1)	5.39 (5.40 - 52.38)	3.49 (3.50 – 3.48)

^a Results are expressed as a mean (n = 6), CI, 95 % confidence intervals, and correlation coefficient > 0.900.

3.4.5 Chemoinformatic analysis of cherimolacyclopeptide D

Chemoinformatics analysis for the development of new drugs is essential throughout the development process. Various computer tools are used to predict physicochemical and other properties in order to determine whether a molecule is a candidate for developing a new drug. In this sense, we analyzed *in silico* the physicochemical, pharmacokinetic (ADME), and toxicological properties of cherimolacyclopeptide D (**Table 7**). In agreement with the informatics results, these suggest that cherimolacyclopeptide D may not be cytotoxic, carcinogenic, or mutagenic. In addition, it does not cause hepatotoxicity, neurotoxicity, or cardiotoxicity. Also, the metabolism values indicated that it is a substrate of CYP3A4. On the other hand, it has poor oral absorption and it is not too lipophilic; therefore, it is not a good candidate as an oral drug of systemic action in humans. In contrast, it may be of utility as a drug of local intestinal action like albendazole, for example, in the treatment of diarrhea and dysentery caused by *G. lamblia* and *E. histolytica*, respectively. It also resulted in potential nephrotoxicity, immunotoxicity, and respiratory toxicity. It is classified in class IV and may be fatal for ingestion. In relation to toxic effects, it has been reported that subtle modifications in the chemical structure of cyclopeptides may lead to important changes in the biological activity and toxicity. Considering that

cherimolacyclopeptide D exhibited important antiprotozoal activity against *E. histolytica* and *G. lamblia* but several toxic effects, it is an excellent candidate to make changes in its chemical structure and obtain the best activity free of toxic effects [31,32].

Table 7. Expected physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological properties for cherimolacyclopeptide D (1).

Smiles	<chem>O=C1N[C@@H]([C@@H](O)C)C(N2[C@@H](C)CC2)C(NCC(N[C@@H](CC(C)C)C(N[C@@H](C)C(N)=O)C(N[C@@H](C)C(N[C@@H]1C(C)C)=O)=O)=O)=O</chem>		
Physicochemical properties			
Molecular formula	C29H48N8O9	Druglikeness	
Molecular weight	652.74 g/mol	Lipinsky	No, 3 violations
TPSA	258.23 Å	Ghose	No, 4 violations
Lipophilicity (LogP)	-2.09	Veber	No, 1 violations
Water solubility (LogS)	-3.50	Egan	No, 1 violations
Solubility class	Soluble	Muegge	No, 1 violations
Number of rotating links	6		
Number of H-bond donors	9		
Number of H-bond acceptors	8		
Pharmacokinetics properties			
Absortion		Metabolism	
Gastrointestinal absorption	Low	CYP2C9 substrate	No
Hematoencephalic barrier	No	CYP2D6 substrate	No
Caco-2 permeability	Low	CYP3A4 substrate	Yes
p-glicoprotein substrate	Yes	CYP2C9 inhibitor	No
p-glicoprotein inhibitor	No	CYP2D6 inhibitor	No
Log Kp (skin permeation)	-11.11	CYP3A4 inhibitor	No
Distribution		CYP1A2 inhibitor	No
Mitochondrial	Yes	CYP2C19 inhibitor	No
Plasma protein binding	Low		

Predictions were obtained from the SwissADME, admetSAR, and PROTOX web servers.* Toxicity classes are defined according to the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). LD₅₀ is expressed in mg/kg. Class I: fatal by ingestion (LD₅₀ ≤ 5). Class II: fatal by ingestion (5 < LD₅₀ ≤ 50). Class III: fatal by ingestion (50 < LD₅₀ ≤ 300). Class IV: fatal by ingestion (300 < LD₅₀ ≤ 2000). Class V: fatal by ingestion (2000 < LD₅₀ ≤ 5000). Class VI: fatal by ingestion (LD₅₀ > 5000).

Table 7. Expected physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological properties for cherimolacyclopeptide D (**1**) (continued).

Smiles	<chem>O=C1N[C@@H]([C@@H](O)C)C(N2[C@@H](C)CC2)C(NCC(N[C@@H](CC(C)C)C(N[C@@H](C)C(N)=O)C(N[C@@H](C)C(N[C@H]1C(C)C)=O)=O)=O)=O)=O</chem>			
Toxicity				
Hepatotoxicity	Inactive	Carcinogenicity	Inactive	
Neurotoxicity	Inactive	Immunotoxicity	Active	
Nephrotoxicity	Active	Mutagenicity	Inactive	
Respiratory toxicity	Activity	Citotoxicity	Inactive	
Cardiotoxicity	Inactive			
Predicted acute toxicity in rats (LD ₅₀)		2.8604 mol/kg		
Predicted human LD ₅₀		2000 mg/kg		
Expected toxicity class*		IV		

Predictions were obtained from the SwissADME, admetSAR, and PROTOX web servers.* Toxicity classes are defined according to the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). LD₅₀ is expressed in mg/kg. Class I: fatal by ingestion (LD₅₀ ≤ 5). Class II: fatal by ingestion (5 < LD₅₀ ≤ 50). Class III: fatal by ingestion (50 < LD₅₀ ≤ 300). Class IV: fatal by ingestion (300 < LD₅₀ ≤ 2000). Class V: fatal by ingestion (2000 < LD₅₀ ≤ 5000). Class VI: fatal by ingestion (LD₅₀ > 5000).

3.4.6 Molecular coupling studies of cherimolacyclopeptide D and fidalrestat on aldose reductase

In order to determine the possible mechanism of action of cherimolacyclopeptide D, a molecular coupling was carried out using the enzyme aldose reductase as a target; this enzyme has been reported as a potential target in protozoa such as *E. histolytica* and *G. lamblia*.

Molecular coupling analysis showed that cherimolacyclopeptide D (**1**) has an affinity for the enzyme aldose reductase with ΔG values of $-5.94 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, showed ten polar interactions with amino acid residues Gln13 (3.3 Å) and Trp307 (2.7 Å), and six nonpolar interactions. With respect to fidalrestat, an aldose reductase inhibitor, it showed affinity values of $-6.29 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, with polar interactions on Trp307 (3.3 Å) and Cys301 (2.4 Å), and eight nonpolar interactions (**Table 8**).

Analysis of the 3D binding model suggests that the ligands of cherimolacyclopeptide D have the same binding pocket, and their position is similar to that of fidalrestat (**Figure 8**). It is important to note that the amino acid

portions 303–311 are important for the activity of aldose reductase. Although the ΔG values obtained from cherimolacyclopeptide D were lower than those of fidalrestat, we do not rule out the possible inhibition of aldose reductase. In this sense, it has been reported that ΔG values lower than the threshold of ≤ 5.0 Kcal-mol⁻¹ suggest that the compound forms a stable binding conformation with the target protein [33]. The ΔG between cherimolacyclopeptide D and aldose reductase was lower than the threshold, suggesting that it could easily form a stable binding conformation. This result supports the idea that cherimolacyclopeptide D could inhibit aldose reductase and its therapeutic potential for the treatment of diarrhea and dysentery caused by *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*, respectively.

Table 8. Binding energy and interactions of cherimolacyclopeptide D and fidalrestat ligands on the enzyme aldose reductase.

Ligand	Aldose reductase				
	ΔG (kcal-mol ⁻¹)	Ki	H-BR	NPI	RMSD
Cherimolacyclopeptide D	-5.94	43.93 μ M	Gln13, Trp307	Trp12, Gln13, Val39, Phe118, Tyr210, Phe306	-
Fidalrestat	-6.29	24.63 μ M	Trp307, Cys301	Trp12, Val39, Tyr40, Trp73, Trp105, Phe118, Tyr210, Phe306	1.8

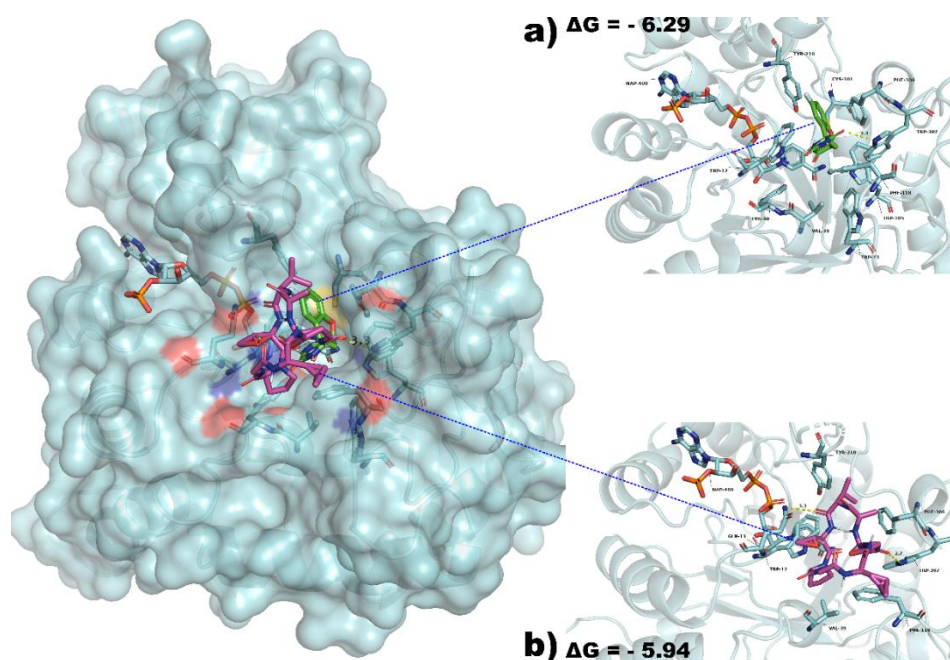


Figure 8. Results of molecular coupling of the enzyme aldose reductase. (A) Interaction of the fidalrestat and its position at the attachment site; (B) interaction of cherimolacyclopeptide D and its position at the binding site.

3.4.7 Molecular coupling studies of cherimolacyclopeptide D and metronidazole on ferredoxin pyruvate oxidoreductase (PFOR)

The other molecular coupling study was conducted using the pyruvate enzyme ferredoxin oxidoreductase (PFOR) with metronidazole as the control ligand.

The analysis of the molecular coupling results showed that cherimolacyclopeptide D has the best free binding energy (ΔG) values of -8.2 Kcal-mol $^{-1}$, with three polar interactions Thr31 (2.5 Å), Asn996 (3.4 Å), Lys458 (1.8 Å), and six nonpolar interactions with PFOR amino acid residues; this score was higher than that of the PFOR inhibitor metronidazole. The latter showed ΔG values of -3.28 Kcal-mol $^{-1}$, with only one polar interaction with Tyr455 (2.4 Å) and six nonpolar interactions (**Table 9**). Analysis of in silico interactions, calculated ΔG values, and 3D conformation of the binding site suggest that cherimolacyclopeptide D has a better affinity for PFOR than metronidazole at the same binding position (**Figure 9**).

Table 9. Binding energy and interactions of cherimolacyclopeptide D and metronidazole ligands on the PFOR enzyme.

Ligand	Piruvate Ferredoxin Oxidoreductase				
	ΔG (kcal- mol ⁻¹)	Ki	H-BR	NPI	RMSD
Cherimolacyclopeptide D	-8.2	968.8 9 nM	Thr31, Asn996 , Lys458	Phe174, His178, Lys435, Tyr455	-
Metronidazole	-3.28	3.91 nM	Tyr455	Phe174, His178, Lys435, Tyr452, Phe453, Val431	1.99

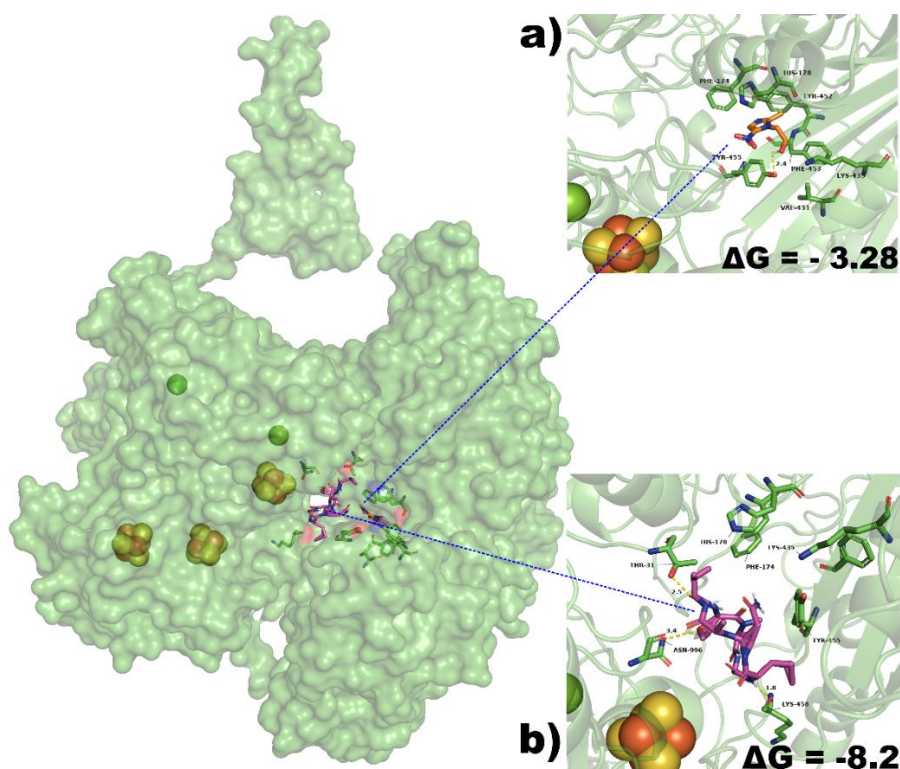


Figure 9. Results of molecular coupling of the enzyme pyruvate ferredoxin oxidoreductase. (A) Interaction of metronidazole and its position at the binding site; (B) interaction of cherimolacyclopeptide D and its position at the binding site.

3.5 Conclusions

The present phytochemical research on seeds of *A. diversifolia* Saff. achieved the isolation and structural elution of three cyclopeptides. Fractions enriched in cyclopeptides as well as a pure compound (**1**) (cherimolacyclopeptide D) showed antiprotozoal activity against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. The results in silico and molecular docking are consistent with those presented *in vitro*. Compound (**1**) may be a candidate as a potential antiamebic agent.

3.6 Acknowledgments

To the Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT, México) for the support granted with a grant No. 790573 to U.M.-D., to the Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma Chapingo (México), and to the University Laboratory of Nuclear Magnetic Resonance of the National Autonomous University of Mexico (LURMN-UNAM).

3.7 References

1. Ahmed, M. Intestinal Parasitic Infections in 2023. *Gastroenterol. Res.* **2023**, *16*, 127–140.
2. Quintanilla-Licea, R.; Vargas-Villarreal, J.; Verde-Star, M.J.; Rivas-Galindo, V.M.; Torres-Hernández, A.D. Antiprotozoal Activity Against *Entamoeba histolytica* of Flavonoids Isolated from *Lippia graveolens* Kunth. *Molecules*, **2020**, *25*, 2464.
3. Klimczak, S.; Packi, K.; Rudek, A.; Wenclewska, S.; Kurowski, M.; Kurczabinska, D.; Sliwinska, A. The Influence of the Protozoan *Giardia lamblia* on the Modulation of the Immune System and Alterations in Host Glucose and Lipid Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8627.
4. Calzada, F.; Merlin-Lucas, V.I.; Valdes, M.; Solares-Pascasio, J.I.; Garcia-Hernandez, N.; Pina-Jimenez, E.; Velazquez, C.; Barbosa, E.; Yepez-Mulia, L.; Ordoñez-Razo, R.M. Secondary metabolites and biological properties of *Annona muricata*. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.* **2020**, *30*, 305–311.
5. Santos, H.L.C.; Rebello, K.M. An Overview of Mucosa-Associated Protozoa: Challenges in Chemotherapy and Future Perspectives. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 860442.
6. Ayinde, O.; Ross, J.D.C. The frequency and duration of side-effects associated with the use of oral metronidazole; A prospective study of VITA trial participants. *Int. J. STD Aids.* **2023**, *34*, 897–902.
7. Yin, Z.; Zhang, W.; Feng, F.; Zhang, Y.; Kang, W. α -glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci. Hum. Wellness.* **2014**, *3*, 139–142.

8. Ramirez-Santos, J.; Calzada, F.; Ordoñez-Razo, R.M.; Mendieta-Wejebe, J.E.; Velazquez-Dominguez, J.A.; Argüello-Garcia, R.; Velazquez, C.; Barbosa, E. *In vivo*, *in vitro* and *in silico* anticancer activity of ilama leaves: An edible and medicinal plant in México. *Molecules*. **2024**, *29*, 1956.
9. Al-Megrin, W.A. *In vivo* study of pomegranate *Punica granatum* peel extract efficacy against *Giardia lamblia* in infected experimental mice. *Asian Pac. Trop. Biomed.* **2017**, *7*, 59–63.
10. Calzada, F.; Bautista, E. Plants used for the treatment of diarrhoea from Mexican flora with amoebicidal and giadicidal activity, and their phytochemical constituents. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *253*, 112676.
11. Calzada, F.; Juárez, T.; García-Hernández, N.; Valdes, M.; Avila, O.; Mulia, L.Y.; Velázquez, C. Antiprotozoal, Antibacterial and Antidiarrheal Properties from the Flowers of *Chiranthodendron pentadactylon* and Isolated Flavonoids. *Pharmacogn. Mag.* **2017**, *13*, 240–244.
12. Camacho-Corona, M.D.; García, A.; Mata-Cárdenas, B.D.; Garza-González, E.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A.; Rojas-Molina, I.; Bah, M.; Sánchez, M.A.Z.; Gutiérrez, S.P. Screening for antibacterial and antiprotozoal activities of crude extracts derived from mexican medicinal plants. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2015**, *12*, 104–112.
13. Pérez-González, M.Z.; Gutiérrez-Rebolledo, G.A.; Yépez-Mulia, L.; Rojas-Tomé, I.S.; Luna-Herrera, J.; Jiménez-Arellanes, M.A. Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidioscolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *89*, 89–97.
14. Shah, R.S.; Ravat, J.; Momin, M.A.; Mukne, A.P. Antidiarrheal activity of aqueous extract of leaves of *Euphorbia hirta* L. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* **2021**, *9*, 716–729.
15. Calzada, F.; Correa-Basurto, J.; Barbosa, E.; Mendez-Luna, D.; Yépez-Mulia, L. Antiprotozoal Constituents from *Annona cherimola* Miller, a Plant Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Diarrhea and Dysentery. *Pharmacogn. Mag.* **2017**, *13*, 148–152.
16. Chekan, J.R.; Mydy, L.S.; Pasquale, M.A.; Kersten, R.D. Plant peptides—Redefining an area of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. *Nat. Prod. Rep.* **2024**, *41*, 1020–1059.
17. Pomilio, A.B.; Battista, M.E.; Vitale, A.A. Naturally-occurring cyclopeptides: Structures and bioactivity. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 2075–2121.
18. Sukmarini, L. Natural bioactive cyclopeptides from microbes as promising anticancer drug leads: A mini-review. *Indonesian J. Pharm.* **2021**, *32*, 291–303.
19. Schilling, N.A.; Berscheid, A.; Schumacher, J.; Saur, J.S.; Konnerth, M.C.; Wirtz, S.N.; Beltrán-Beleña, J.M.; Zipperer, A.; Krismer, B.; Peschel, A.; Kalbacher, H.; Brötz-Oesterhelt, H.; Steinem, C.; Ground, S. Synthetic Lugdunin Analogues Reveal Essential Structural Motifs for Antimicrobial Action and Proton Translocation Capability. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2019**, *58*, 9234–9238.

20. Ribeiro, R.; Costa, L.; Pinto, E.; Sousa, E.; Fernandes, C.; Fernandez, J. Therapeutic Potential of Marine-Derived Cyclic Peptides as Antiparasitic Agents. *Mar. Drugs*. **2023**, *21*, 609.
21. Rodríguez-Expósito, R.L.; Sosa-Rueda, J.; Reyes-Batlle, M.; Sifaoui, I.; Cen-Pacheco, F.; Daranas, A.H.; Díaz-Marrero, A.R.; Piñero, J.E.; Fernández, J.J.; Lorenzo-Morales, J. Antiamoeboid activity of squamins C-F, cyclooctapeptides from *Annona globiflora*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2021**, *17*, 67–79.
22. Escrig, J.I.; Miyamoto, Y.; Aznar, A.D.; Eckmann, L.; Debnath, A. Antigiardial and antiamebic activities of fexinidazole and its metabolites: New drug leads for giardiasis and amebiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2024**, *68*, e0073123.
23. Duwor, S.; Brites, D.; Mäser, P. Phylogenetic Analysis of Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase, a Redox Enzyme Involved in the Pharmacological Activation of Nitro-Based Prodrugs in Bacteria and Protozoa. *Biology*. **2024**, *13*, 178.
24. Juárez-Saldivar, A.; Barbosa-Cabrera, E.; Lara-Ramírez, E.E.; Paz-González, A.D.; Martínez-Vázquez, A.V.; Bocanegra-García, V.; Palos, I.; Campillo, N.E.; Rivera, G. Virtual Screening of FDA-Approved Drugs Against Triose Phosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Identifies Inhibitors of Their Trophozoite Growth Phase. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5943.
25. Long, J.Y.; Chen, Y.Q.; Chen, W.H.; Wang, J.F.; Zhou, X.F.; Yang, B.; Liu, Y.H. Cyclic Peptides from the Soft Coral-Derived Fungus *Aspergillus sclerotiorum* SCSIO 41031. *Mar. Drugs*. **2021**, *19*, 701.
26. Cychon, C.; Schmidt, G.; Köck, M. Sequencing of cyclic peptides by NMR and MS techniques demonstrated on stylissamides A-F. *Phytochem. Rev.* **2013**, *12*, 495–505.
27. Tan, N.H.; Zhou, J. Plant cyclopeptides. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 840–895.
28. Wélé, A.; Ndoye, I.; Zhang, Y.J.; Brouard, J.P.; Bodo, B. Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. **2005**, *66*, 693–696.
29. Sosa-Rueda, J.; Domínguez-Meléndez, V.; Ortiz-Celiseo, A.; López-Fentanes, F.C.; Cuadrado, C.; Fernández, J.J.; Daranas, A.H.; Cen-Pacheco, F. Squamins C-F, four cyclopeptides from the seeds of *Annona globiflora*. *Phytochemistry*. **2022**, *194*, 112839.
30. Achilli, C.; Ciana, A.; Minetti, G. The discovery of methionine sulfoxide reductase enzymes: An historical account and future perspectives. *Biofactors*. **2015**, *41*, 135–152.
31. Kobchikova, P.P.; Efimov, S.V.; Khodov, I.A.; Klochkov, V.V. Features of spatial structures of cyclosporins D, E, and G revealed by NMR and MD simulations. *J. Mol. Liq.* **2021**, *336*, 116244.
32. Efimov, S.V.; Dubinin, M.V.; Kobchikova, P.P.; Zgadzay, Y.O.; Khodov, I.A.; Belosludtsev, K.N.; Klochkov, V.V. Comparison of cyclosporin variants B-E based on their structural properties and activity in mitochondrial membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *526*, 1054–1060.

33. Zeng, J.; Luo, Q.; Wang, X.; Xie, W.; Dong, S.; Fu, H.; Liu, T. Network pharmacology- and molecular docking-based investigation of the therapeutic potential and mechanism of daucosterol against multiple myeloma. *Transl. Cancer Res.* **2023**, *12*, 1006–1020.
34. González-Tepale, M.R.; Reyes, L.; Mayorga-Flores, M.; Reyes-Trejo, B.; Gómez-Zepeda, D.; del Rio-Portilla, F.; Ordaz-Ortiz, J.J.; Herbert-Pucheta, J.E. Cyclopurpuracin, a cyclopeptide from *Annona purpurea* seeds. *Phytochem. Lett.* **2018**, *23*, 164–167.
35. Greig, C.G.; Leaback, D.H. Use of chlorine in the detection of compounds on paper chromatograms. *Nature.* **1960**, *188*, 310–311.
36. Chuang, P.H.; Hsieh, P.W.; Yang, Y.L.; Hua, K.F.; Chang, F.R.; Shiea, J.; Wu, S.H.; Wu, Y.C. Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1365–1370.
37. Choub, V.; Maung, C.E.H.; Won, S.J.; Moon, J.H.; Kim, K.Y.; Han, Y.S.; Cho, J.Y.; Ahn, Y.S. Antifungal Activity of Cyclic Tetrapeptide from *Bacillus velezensis* CE 100 against Plant Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pathogens.* **2021**, *10*, 209.
38. Fisher, M.F.; Zhang, J.J.; Berkowitz, O.; Whelan, J.; Mylne, J.S. Cyclic Peptides in Seed of *Annona muricata* Are Ribosomally Synthesized. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 1167–1173.
39. Rivera-Chávez, J.; Zacatenco-Abarca, J.; Morales-Jiménez, J.; Martínez-Aviña, B.; Hernández-Ortega, S.; Aguilar-Ramírez, E. Cuautepestalin, a 7,8-Dihydrochromene-Oxoisochromane Adduct Bearing a Hexacyclic Scaffold from *Pestalotiopsis* sp. IQ-011. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3558–3562.
40. Mayorga-Flores, M.; Chantome, A.; Melchor-Meneses, C.M.; Domingo, I.; Titau-Delgado, G.A.; Galindo-Murillo, R.; Vandier, C.; del Rio-Portilla, F. Novel Blocker of Onco SK3 Channels Derived from Scorpion Toxin Tamapin and Active against Migration of Cancer Cells. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 1627–1633.
41. Hanwell, M.D.; Curtis, D.E.; Lonie, D.C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G.R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 17.
42. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
43. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
44. Cheng, F.X.; Li, W.H.; Zhou, Y.D.; Shen, J.; Wu, Z.R.; Liu, G.X.; Lee, P.W.; Tang, Y. AdmetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3099–3105.
45. Banerjee, P.; Kemmler, E.; Dunkel, M.; Preissner, R. ProTox 3.0: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res.* **2024**, *52*, W513–W520.

4 PAPAUCINA UN NUEVO CICLOHEPTAPÉPTIDO OBTENIDO DE SEMILLAS DE *Annona diversifolia* Saff

4.1 Resumen

El extracto hidroetanólico obtenido de las semillas de frutos de *Annona diversifolia* Saff (Annonaceae) fue analizado para obtener los ciclopéptidos conocidos como cherimolaciclopéptido D (**1**), y las escuaminas D (**2**) y C (**3**), junto con un nuevo ciclopéptido nombrado como papaucina (**4**) o ciclo(-Pro¹-Val²-Ile³-Thr⁴-Asn⁵-Leu⁶-Gly⁷-). Sus estructuras moleculares fueron determinadas mediante técnicas espectroscópicas de RMN 1D y 2D (¹H, ¹³C, HSQC, COSY, HMBC, y TOCSY) y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Palabras clave: *Annona diversifolia* Saff., ciclopéptidos, orbitadas, RMN.

Abstract

The hydroethanolic extract from seeds of *Annona diversifolia* fruits (Annonaceae) afforded the known cyclopeptides called cherimolacyclopeptide D (**1**), the squamins D (**2**) y C (**3**), together with a new cyclopeptide named as papaucin (**4**) or cyclo(-Pro¹-Val²-Ile³-Thr⁴-Asn⁵-Leu⁶-Gly⁷-). Their structures were determined by 1D and 2D NMR spectroscopic techniques (¹H, ¹³C, HSQC, COSY, HMBC, and TOCSY) and MALDI-TOF mass spectrometry.

Key words: *Annona diversifolia* Saff., cyclopeptides, orbitides, NMR.

4.2 Introducción

Annona es el segundo género más grande de plantas perteneciente a la familia de las Annonaceas, con alrededor de 166 especies, incluyendo arbustos y árboles (Dahiya & Dahiya, 2021). En México, se han documentado 20 especies de este género, entre las que destacan, por su origen y grado de domesticación *A. muricata*, *A. cherimola* (especies no-nativas), *A. globliflora*, *A. longiflora* (especies endémicas), *A. squamosa*, y *A. diversifolia* Saff (especies nativas) por mencionar algunas (Escobedo-López et al., 2019). La mayoría de ellas se cultivan en traspatios o en áreas destinadas al pastoreo. En cuanto a los frutos estos se cosechan acorde a su temporada estacional y se destinan a comercios locales por lo que su valor económico se encuentra infravalorado por su lejanía de comercios urbanos (De la Cruz-Chacón et al., 2016). Junto con su valor comercial, existe evidencia del uso de extractos y/o infusiones elaboradas a partir de cortezas, hojas, raíces, tallos, semillas, y pulpa dentro de la medicina tradicional para el tratamiento de algunos padecimientos (Coria-Téllez et al., 2018). Por ello resulta importante contar con una justificación científica que respalde estas aplicaciones, con potenciales usos industriales y/o farmacéuticos (Anaya-Esparza et al., 2020). La mayoría de los beneficios para la salud reportados se atribuyen a la presencia de compuestos bioactivos, entre los que destacan acetogeninas, alcaloides, antocianinas, aminoácidos, aceites esenciales, compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas, minerales y ciclopéptidos (Bhardwaj et al., 2020). Respecto a la obtención de estos compuestos, existen dos enfoques principales: la detección de compuestos puros y el fraccionamiento mediante ensayos bio-dirigidos (De-Qiang et al., 2016). Ambos métodos emplean técnicas de purificación para eliminar sustancias no activas o contaminantes. Los métodos más utilizados para la purificación de productos naturales son: partición líquido-líquido (LLP), extracción en fase sólida (SPE), cromatografía en columna (CC), cromatografía en columna flash (FCC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y, cromatografía a contracorriente (CCC) (Aznar & Rai, 2020). Una vez obtenido un compuesto puro, es necesario realizar la elucidación estructural para comprender su

comportamiento a nivel molecular. La estructura se determina mediante técnicas espectroscópicas como la Resonancia Magnética Nuclear (NMR), la Cristalografía de Rayos X, la Espectrometría de Masas (MS), o el Dicroísmo Circular (CD) (Kallenborn et al., 2021).

Los péptidos cíclicos son compuestos formados por residuos de aminoácidos proteicos y no proteicos unidos mediante enlaces peptídicos (Wang et al., 2017). Se han aislado de diversas fuentes como: algas (Zhang et al., 2016), bacterias (Zolfaghariyan et al., 2023), esponjas (Ortiz-Celiseo et al., 2023), hongos (Kessler et al., 2020) y plantas (Bajpai et al., 2023). En lo que respecta a ciclopéptidos de origen vegetal sintetizados ribosomalmente, se han propuesto tres clases: ciclótidos, péptidos derivados de Inhibidor-1 de tripsina de girasol (SFTI-1) y orbitidos. Los ciclótidos son ciclopéptidos formados por aproximadamente 30 aminoácidos, con tres enlaces disulfuro originados en seis residuos de cisteínas. En cambio, los péptidos derivados de SFTI, también llamados péptidos derivados de PawS (PDP) tienen una conformación estructural que varía entre 6-14 aminoácidos y poseen un solo enlace disulfuro (Daly & Wilson, 2021).

Los ciclopéptidos (orbitidos) son péptidos cíclicos obtenidos de fuentes vegetales, conformados por 5 a 12 residuos de aminoácidos que carecen de enlaces disulfuro (Yuan et al., 2022). Debido a su tamaño y diversidad de grupos funcionales (-OH, -NH, SH, y -NH₂), poseen una gran área de contacto, lo que les confiere una alta selectividad, y amplio potencial para formar enlaces de hidrógeno traduciéndose en una fuerte afinidad de unión con otras moléculas (Gang et al., 2018).

Los estudios en especies del género *Annona* principalmente en semillas, han demostrado la presencia de ciclopéptidos con una gran diversidad de tamaños y modificaciones, que incluyen bioactividades como antiproliferativos contra células tumorales KB (IC₅₀ = 0.52 µM) (Wele et al., 2006), antimicrobianos contra *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum audouinii* (CMI = 6 µg mL⁻¹) (Dahiya et al., 2009), antihelmínticos contra *Megascoplex konkanensis*, *Pontoscotex corethruses* y *Eudrilus eugeniae* (CMI = 2 mg mL⁻¹) (Dahiya & Singh, 2017), y citotóxicos contra líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145) y

cervicouterino (HeLa) ($IC_{50} = 8.8 - 18.1 \mu M$ y $10.9 - 24.7 \mu M$ respectivamente) (Sosa-Rueda et al., 2022). Debido a estas bio-actividades, los ciclopéptidos derivados de semillas de este género resultan ser atractivos para el proceso de elaboración e innovación en el desarrollo de fármacos (Dahiya et al., 2021). En México, el presente trabajo se enfoca en el aprovechamiento de *A. diversifolia* Saff conocida local y popularmente como “ilama” o “papauce” (Valdés et al., 2020). Dicha especie (nativa en México), no cuenta con estudios fitoquímicos encaminados a la obtención de ciclopéptidos a partir sus fracciones no comestibles, como las semillas, que actualmente se encuentran subutilizadas y son consideradas residuos. Como resultado de un trabajo previo en *A. diversifolia* Saff., se obtuvieron los ciclopéptidos conocidos como cherimolaciclopéptido D (**1**), y las escuaminas D (**2**) y C (**3**) (Murrieta-Dionicio et al., 2024). El objetivo de este trabajo fue obtener nuevos ciclopéptidos a partir del análisis cromatográfico de los extractos orgánicos de semillas de *A. diversifolia* Saff., mediante técnicas cromatográficas y análisis con Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la elucidación de sus estructuras ciclopeptídicas.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Procedimiento Experimental General

Los espectros IR se obtuvieron en un espectrómetro FTIR Cary 630 (Agilent®, Santa Clara, CA, E.U.A.). La cromatografía en capa delgada (CCF) se realizó en placas de gel de sílice 60 F-254 (Merck®, Darmstadt, Alemania) reveladas con reactivo de Cl_2/o -tolidina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.). La separación por RP-HPLC se realizó en un sistema Waters HPLC (Milford, MA, E.U.A) equipado con una bomba cuaternaria 2535, conectado a un automuesteador 2707, y dos detectores PDA 2998 y ELSD 2424. La adquisición y procesamiento de datos se realizaron con el software Empower 3 (Waters). Las columnas utilizadas fueron C18 Gemini-NX tamaño de partícula de $5 \mu m$ ($4.6 mm d.i. \times 250 mm$, y $10.0 mm d.i. \times 250 mm$, para experimentos analíticos y semi-preparativos respectivamente Phenomenex, Torrance, CA, E.U.A). Los espectros de RMN de 1H y ^{13}C fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker ASCEND-700 (Bruker BioSpin, Billerica, MA, E.U.A.) equipado con una sonda Bruker 5 mm TCI

CryoProbe a 300 K. Los espectros de RMN en 1D y 2D fueron adquiridos en acetona- d_6 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) a 298 K, se utilizaron secuencias de pulso y ciclos de fase para los espectros COSY, HSQC, y HMBC. Los datos de RMN se procesaron usando el software MestReNova 15.0.1 (Mestrelab Research SL, San Diego CA, E.U.A.).

4.3.2 Material Vegetal

Los frutos de *A. diversifolia* Saff., se adquirieron en el mercado municipal de Tejupilco, Estado de México (18° 53' 58" N y 100° 09' 01" O), en octubre de 2021. Se seleccionaron frutos cosechados con madurez de consumo, determinada por el agrietamiento de la cáscara en la zona peri-peduncular. Algunos frutos fueron recolectados en octubre de 2021 en la localidad de Plaza de Gallos, Tejupilco, Estado de México, México (18° 51' 05" N y 100° 14' 38" W). Los especímenes (36509) fueron certificados por botánicos de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y depositados en el Herbario-Hortorio "Jorge Espinosa Salas" de la misma universidad.

4.3.3 Obtención de extractos

Las semillas se separaron manualmente del fruto y se lavaron con agua corriente para eliminar restos de mucilago y/o pulpa. Luego, se secaron a temperatura ambiente por dos semanas. Se descartaron aquellas semillas con pudriciones o daños por insectos. Las almendras (endospermo) se separaron del endocarpio coriáceo con pinzas mecánicas y se molieron en un procesador de alimentos (NutriBullet®, NBR-0804B, Los Ángeles, CA, E.U.A.). Las almendras de *A. diversifolia* Saff. (5.0 kg) fueron maceradas a temperatura ambiente (3 × 4 L × 3 días) con disolventes de menor a mayor polaridad: hexano, metanol (MeOH), y una mezcla etanol y agua (EtOH-H₂O, 1:1 v/v, 0.1 % ácido acético). En cada etapa los disolventes se removieron por evaporación a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio Rotavapor R-300 (Büchi®, Meierseggstrasse, Flawil, Suiza) y se reutilizaron en la siguiente maceración, obteniéndose finalmente tres extractos.

La presencia de ciclopéptidos en cada extracto fue monitoreada mediante CCF en placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck®, Darmstad, Alemania), empleando CH₂Cl₂-MeOH (85:15) como sistema de elución y revelado con Cl₂/*o*-tolidina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) (Greig & Leaback, 1960). El extracto hidroetanólico mostró una reacción positiva con el revelador de Cl₂/*o*-tolidina para la detección de ciclopéptidos. Por lo que fue sometido a un proceso de purificación exhaustiva.

4.3.4 Aislamiento y purificación

Se tomaron 115.23 g de extracto hidroetanólico y se disolvieron en MeOH al 100 %. La fracción soluble (49.04 g) se concentró a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio Rotavapor R-300 (Büchi®, Meierseggstrasse, Flawil, Suiza). Posteriormente, la fracción se solubilizó en 500 mL de H₂O y se sometió a una serie de extracciones líquido-líquido sucesivas, empleando los disolventes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt, y BuOH (3 × 0.5 L, 1:1) (Chuang et al., 2008). A partir de la partición de BuOH se obtuvo un residuo viscoso de color café (5.07 g). Este residuo se llevó a un sistema de cromatografía ultrarrápida (C1) Biotage Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suecia), equipado con un cartucho fase reversa Biotage® SNAP ULTRA C18 30 g (A = H₂O, B = ACN; 0 % B 7 VC, 0-10 % B 5 VC, 10-15 % B 7 VC, 15-20 % B 7 VC, 20-100 % B 5 VC, 100 % B 4VC) (Choub et al., 2021). Se obtuvieron un total de 93 fracciones, las cuales se concentraron y se monitorearon mediante la reacción de Cl₂/*o*-tolidina en CCF. El reunido de las fracciones C1-F:53-72 (913.0 mg) resultó positivo a la reacción con Cl₂/*o*-tolidina, por lo que se llevó a una purificación por técnicas cromatográficas descritas previamente que condujeron en la obtención de los ciclopéptidos **1**, **2**, y **3**. Por otra parte, el reunido de las fracciones C1-F:73-78 (445.1 mg) resultó positivo a la reacción con Cl₂/*o*-tolidina, por lo que se llevó a una purificación con cromatografía en columna (C2) con gel de sílice Kieselgel 60H (Merck®, Darmstadt, Alemania), empleando un sistema de elución de CH₂Cl₂-MeOH con incrementos de 5 % en 5 % hasta 20 % de MeOH. Se colectaron 54 fracciones de 15 mL, que se concentraron y monitorearon con CCF, agrupando aquellas con

RFs similares. Las fracciones de la C1-F:73-78-C2-F:20-38 (213.9 mg) que mostraron reacción positiva para ciclopéptidos (Cl_2/o -tolidina), se disolvieron (reunido C2-F:20-38) en H_2O al 100 % y se sometieron a un proceso de purificación en un sistema de extracción en fase sólida (SPE) (C3). Para ello, se utilizó un colector de vacío J.T. Baker® BAKER SPE-12G™ (Phillipsburg, NJ, E.U.A), equipado con cartuchos poliméricos en fase reversa STRATA®-X PRO, 500 mg 6 mL^{-1} (Phenomenex®, Torrance, CA, E.U.A). Los cartuchos se pre-acondicionaron con 6 mL de acetonitrilo (ACN), seguidos de 6 mL de H_2O . La muestra se cargó en los cartuchos, que luego se lavaron tres veces con gradientes de H_2O -ACN en las proporciones (100:0, 90:10, 80:20, 70:30 y 0:100, v/v), con ácido trifluoroacético al 0.05 % (Fisher et al., 2020). Se obtuvieron 15 sub-fracciones. La sub-fracción C3-SPE:IV-VI (44.9 mg) se llevó finalmente a un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) semi-preparativo. Para la separación y/o purificación, se inyectaron repetidamente 500 μL de muestra F:20-38-SPE:IV-VI, con una concentración de 15 mg mL^{-1} en un equipo Waters HPLC, con un gradiente de elución lineal de H_2O (A; 0.05 % TFA v/v) - ACN (B; 0.05 % TFA v/v) iniciando de 20 % de B y aumentando hasta 35 % de B en 30 min, a un flujo de 4.6 mL min^{-1} a 25°C . La detección del compuesto se realizó mediante monitoreo UV a longitudes de onda de 200, 220 y 280 nm (Rivera-Chávez et al., 2019). Este proceso permitió obtener un nuevo ciclopéptido al que se denominó papaucina (**4**). La elucidación estructural del compuesto aislado se realizó mediante espectroscopía de RMN 1D y 2D y espectrometría de masas de tiempo de vuelo por ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF).

4.3.5 Espectroscopia de RMN

Los compuestos purificados se disolvieron en 0.6 mL de $\text{DMSO-}d_6$. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A) como referencia interna. Las muestras disueltas se transfirieron a tubos de vidrio Norrell® Sample Vault Series™ de 5 mm. (Norell, Inc., Morganton, NC, USA). Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la

Universidad Autónoma Chapingo, utilizando un espectrómetro Agilent DD2 400 MHz (Santa Clara, CA, E.U.A.). Aquellas muestras que exhibieron señales para grupos -NH entre 6.0 y 10.0 ppm, se analizaron posteriormente en un espectrómetro Bruker ASCEND-700, ubicado en el Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Química de la UNAM. Se adquirieron espectros unidimensionales de ^1H , ^{13}C y así como espectros bidimensionales de HSQC, HMBC ($J = 4$ y 10 Hz), TOCSY (80 ms, tiempo de mezclado), y NOESY (300 ms, tiempo de mezclado).

4.3.6 Espectrometría de masas

La masa molecular de los ciclopéptidos purificados se obtuvo mediante experimentos MALDI-TOF, realizados en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la UNAM, utilizando un equipo Bruker Daltonics Microflex LT (Bruker Daltonics, Billerica, MA, E.U.A.). Para su estudio se mezclaron 100 nmol de cada ciclopéptido con 3 μL de una matriz (solución sobresaturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en ACN al 65 % en H_2O adicionada con TFA al 0.05 % v/v). De esta mezcla se tomó 1 μL y se colocó sobre la placa MALDI para su análisis. Los datos se adquirieron en un rango de m/z de 0-1000 Da. El modo de operación del reflector se usó adquiriendo 200 disparos (Mayorga-Flores et al., 2020).

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Elucidación estructural

Compuesto **4**. Este compuesto se obtuvo como un polvo blanco amorfo. La espectroscopía IR mostró bandas en λ_{max} cm^{-1} : 3316 y 1658 (ver Figura S26). Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C se presentan en el Cuadro 10. La espectrometría MALDI-TOF, mostró un m/z : 697 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (ver Figura S25). A partir del análisis de espectroscopía y espectrometría, se realizó un cálculo que sugiere una fórmula molecular de $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_9$, correspondiente a un peso molecular de 694, y 10 grados de insaturación (Long et al., 2021). En el espectro de RMN- ^1H (ver Figura S27 para detalles), en el rango de 6.80-8.80 ppm se observan seis señales correspondientes a protones tipo -NH de enlaces amida. Además, se identificaron

dos señales en 6.89 y 7.25 ppm que corresponden a protones *syn* y *anti* respectivamente, de un residuo de Asn. Por otra parte, en el espectro de RMN-¹³C (ver Figura S28 para detalles) en la región de 168.2-171.8ppm se muestran señales de ocho grupos carbonilos. A partir de los espectros HSQC, COSY y TOCSY (ver Figuras S29-32 para detalles), se asignaron los sistemas spin correspondientes a siete residuos: Pro¹, Val², Ile³, Thr⁴, Asn⁵, Leu⁶, y Gly⁷ (Figura 10). La secuencia de aminoácidos se determinó con el espectro HMBC ($J = 10$ Hz), mediante correlaciones entre el protón amida (-NH) del aminoácido i y el carbono del grupo carbonilo del aminoácido siguiente ($i + 1$). A partir del espectro HMBC se pudieron asignar cinco correlaciones entre los grupos C=O y los grupos -NH de los residuos de aminoácidos. Particularmente, el grupo C=O (a 170.9 ppm) de la Pro¹ correlaciona con el grupo -NH (a 8.75 ppm) de la Gly⁷. El grupo C=O (a 168.4 ppm) de la Gly⁷ correlaciona con el grupo -NH (a 8.11 ppm) de la Leu⁶, el C=O (170.2) de Leu⁶ con el α H (a 4.36 ppm) de la Asn⁵, el C=O (a 170.7 ppm) de la Asn⁵ con el -NH (a 8.17 ppm) de Thr⁴, el C=O (a 170.4 ppm) de la Thr⁴ con el -NH (a 8.10 ppm) de la Ile³; y el C=O (a 170.2 ppm) de la Ile³ con el -NH (a 7.34 ppm) de la Val². Por otro lado, el grupo C=O (a 169.1 ppm) de la Val² no mostró correlación con ningún grupo -NH en el espectro HMBC. No obstante, se observan correlaciones entre el grupo C=O (a 169.1 ppm) de la Val² con los protones α H (a 4.01 ppm) y δ H (a 3.62 ppm) de la Pro¹. Por lo que se deduce que dicho residuo se conecta al residuo de Pro¹, cerrando así el ciclo (ver Figuras S33 y S34 para detalles) (Cychon et al., 2013). La asignación del segundo grupo C=O (a 171.5 ppm) de la Asn, tiene correlación a los protones *anti* (a 7.25 ppm) y *syn* (a 6.89 pmm) del grupo -NH₂. La geometría *trans* de la Pro fue confirmada por la señal del C _{γ} a 24.2 ppm (Tan & Zhou, 2006). Finalmente, basados en los datos de RMN y en comparación con datos de literatura, la estructura del Compuesto **4** fue elucidada como un nuevo cicloheptapéptido, al cual se denominó papaucina (**4**).

Cuadro 10. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de papaucina (**4**) (DMSO- d_6 , 298 K).

Aminoácido	Posición	δ_c	δ_H , mult. (J en Hz)
Pro ¹	CO	170.9	
	αCH	60.8	4.01, dd, (6.8, 9.5)
	βCH_2	28.9	1.72, m
			2.02, m
	γCH_2	24.2	1.80, dtd (2.3, 5.8, 15.4)
			1.95, ddt, (3.3, 6.7, 9.4)
Val ²	δCH_2	47.6	3.54, td (6.7, 9.9)
			3.62, m
	CO	169.1	
	NH		7.34, d (9.9)
	αCH	54.4	4.39, m
	βCH	36.3	1.74, m
Ile ³	γCH_3	10.4	0.69, t (7.4)
	$\gamma'\text{CH}_3$	14.7	0.72, d (6.7)
	CO	170.2	
	NH		8.10, br
	αCH	61.0	3.61, dd (3.7, 5.9)
	βCH_2	23.4	1.35, m
Thr ⁴	γCH	28.7	1.87, pent (6.7)
	δCH_3	18.2	0.86, dd (2.4, 6.9)
	$\delta'\text{CH}_3$	18.6	0.86, dd (2.4, 6.9)
	CO	170.4	
	NH		8.17, d (7.0)
	αCH	56.2	4.43, dd (3.5, 7.0)
Asn ⁵	βCH	67.1	4.37, d (2.4)
	γCH_3	18.3	1.01, d (6.3)
	CO	170.7	
	NH		7.86, br
	αCH	51.0	4.36, m
	βCH_2	36.8	2.48, dd (3.7, 15.5)
Leu ⁶			2.69, dd (9.9, 15.3)
	NH		6.89, s
	NH		7.25, s
	CO	171.5	
	CO	170.2	
	NH		8.11, d (7.5)
Gly ⁷	αCH	53.1	4.50, dt (7.6, 10.5)
	βCH_2	43.3	1.26, dd (6.1, 8.4)
			1.40, m
	γCH	24.0	1.39, d (6.3)
	δCH_3	21.9	0.77, d (6.3)
	$\delta'\text{CH}_3$	21.9	0.80, d (6.3)
	CO	168.4	
	NH		8.75, dd (8.1, 4.6)
	αCH_2	42.3	3.26, d (4.6)
			3.96, dd (17.2, 8.1)

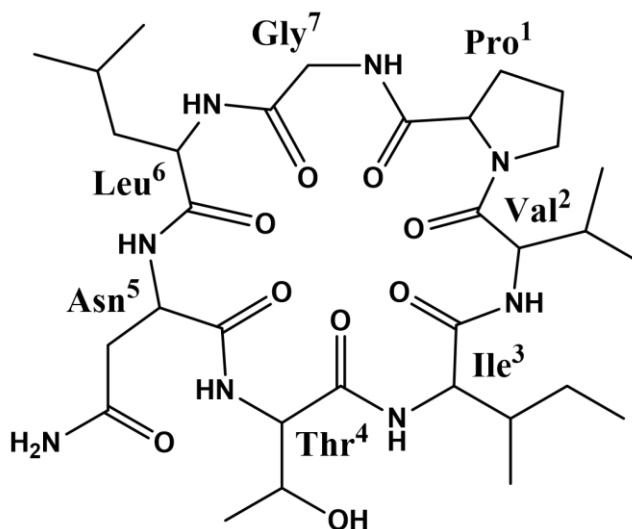


Figura 10. Estructura de papaucina (4).

4.5 Conclusiones

En conclusión, se obtuvo un nuevo ciclopéptido a partir del extracto hidroetanólico de semillas de *A. diversifolia* Saff. El compuesto **4** fue elucidado como un heptapéptido al cual se le denominó papaucina. La elucidación de la molécula se realizó mediante herramientas de espectroscopia y espectrometría de masas. La presencia de la papaucina refuerza el potencial de *A. diversifolia* Saff., para la obtención de compuestos de naturaleza peptídica aún no descubiertos aún en el género *Annona*. Aunque, se logró aislar un nuevo ciclopéptido, se recomienda continuar investigaciones adicionales que permitan la exploración de fracciones no incluidas en este estudio, así como realizar evaluaciones de pruebas biológicas.

Declaración de intereses contrapuestos

No existe ninguna declaración de intereses en la presentación de este manuscrito.

4.6 Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), antes llamado Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo otorgado con una beca No. 790573. A la Dirección

General de Investigación, Posgrado y Servicio (DGIPyS) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), por los apoyos otorgados en los proyectos 20031-C-90, 21097-C-90, 22087-C-90, 23050-C-90 y 24221-c-90. Al Laboratorio de Productos Naturales de la UACH. Al Laboratorio de Biomacromoléculas 1 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Nacional Autónoma de México (LURMN-UNAM).

4.7 Literatura Citada

- Anaya-Esparza, L. M., de Lourdes Garcia-Magana, M., Domínguez-Ávila, J. A., Yahia, E. M., Salazar-López, N. J., González-Aguilar, G. A., & Montalvo-González, E. (2020). Annonas: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. *Food Research International*, 138, 109775.
- Aznar, R., & Rai, D. K. (2020). Purification Techniques and Isolation for Enrichment of Bioactive Phytochemicals and Spices from Herbs. Herbs, Spices and Medicinal Plants: Processing, Health Benefits and Safety.
- Bajpai, A., Jackson, M. A., Huang, Y. H., Yap, K., Du, Q., Chau, T. C. Y., Craik, D. J., & Gilding, E. K. (2023). Nematicidal Activity of Cyclotides: Toxicity Against *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Natural Products*, 86(5), 1222-1229.
- Bhardwaj, R., Pareek, S., Sagar, N. A., & Vyas, N. (2020). Bioactive compounds of annona. In *Bioactive compounds in underutilized fruits and nuts* (pp. 37-62). Springer, Cham.
- Choub, V., Maung, C. E. H., Won, S. J., Moon, J. H., Kim, K. Y., Han, Y. S., Cho, J. Y., & Ahn, Y. S. (2021). Antifungal activity of cyclic tetrapeptide from *Bacillus velezensis* CE 100 against plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pathogens*, 10(2), 209.
- Chuang, P. H., Hsieh, P. W., Yang, Y. L., Hua, K. F., Chang, F. R., Shiea, J., Wu, S. H., & Wu, Y. C. (2008). Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1365-1370.
- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662-691.
- Cychon, C., Schmidt, G., & Köck, M. (2013). Sequencing of cyclic peptides by NMR and MS techniques demonstrated on stylissamides A–F. *Phytochemistry reviews*, 12, 495-505.

- Dahiya, R., & Dahiya, S. (2021). Natural bioeffective cyclooligopeptides from plant seeds of *Annona* genus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 214, 113221.
- Dahiya, R., & Singh, S. (2017). Synthesis, characterization, and biological activity studies on fanlizhicyclopeptide A. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 16(3), 1176.
- Dahiya, R., Dahiya, S., Shrivastava, J., Fuloria, N. K., Gautam, H., Mourya, R., & Fuloria, S. (2021). Natural cyclic polypeptides as vital phytochemical constituents from seeds of selected medicinal plants. *Archiv der Pharmazie*, 354(4), 2000446.
- Dahiya, R., Maheshwari, M., & Yadav, R. (2009). Synthetic and cytotoxic and antimicrobial activity studies on annomuricin B. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 64(2), 237-244.
- Daly, N. L., & Wilson, D. T. (2021). Plant derived cyclic peptides. *Biochemical Society Transactions*, 49(3), 1279-1285.
- De La Cruz Chacon, I., Castro Moreno, M., Luna Cazares, L. M., & Gonzalez Esquinca, A. R. (2016). La familia Annonaceae Juss. en México.
- De-Qiang, L., Zhao, J., Wu, D., & Shao-Ping, L. (2016). Discovery of active components in herbs using chromatographic separation coupled with online bioassay. *Journal of Chromatography B*, 1021, 81-90.
- Escobedo-López, D., Campos-Rojas, E., Rubén Rodríguez-Núñez, J., Alia-Tejagal, I., & Núñez-Colín, C. A. (2019). Priority areas to collect germplasm of *Annona* (Annonaceae) in Mexico based on diversity and species richness indices. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(2), 401-413.
- Fisher, M. F., Zhang, J., Berkowitz, O., Whelan, J., & Mylne, J. S. (2020). Cyclic peptides in seed of *Annona muricata* are ribosomally synthesized. *Journal of Natural Products*, 83(4), 1167-1173.
- Gang, D., Kim, D. W., & Park, H. S. (2018). Cyclic peptides: Promising scaffolds for biopharmaceuticals. *Genes*, 9(11), 557.
- Greig, C. G., & Leaback, D. H. (1960). Use of chlorine in the detection of compounds on paper chromatograms. *Nature*, 188(4747), 310-311.
- Kallenborn, R., Hühnerfuss, H., Aboul-Enein, H. Y., Ali, I., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H., ... & Ali, I. (2021). Other Methods for the Elucidation of Molecular Structures and Mechanistic Details of Enantiomers. *Chiral Environmental Pollutants: Analytical Methods, Environmental Implications and Toxicology*, 89-96.
- Kessler, S. C., Zhang, X., McDonald, M. C., Gilchrist, C. L., Lin, Z., Rightmyer, A., ... & Chooi, Y. H. (2020). Victorin, the host-selective cyclic peptide toxin from the oat pathogen *Cochliobolus victoriae*, is ribosomally encoded. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(39), 24243-24250.

- Long, J., Chen, Y., Chen, W., Wang, J., Zhou, X., Yang, B., & Liu, Y. (2021). Cyclic peptides from the soft coral-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* SCSIO 41031. *Marine Drugs*, 19(12), 701.
- Tan, N. H., & Zhou, J. (2006). Plant cyclopeptides. *Chemical reviews*, 106(3), 840-895.
- Mayorga-Flores, M., Chantôme, A., Melchor-Meneses, C. M., Domingo, I., Titau-Delgado, G. A., Galindo-Murillo, R., ... & del Río-Portilla, F. (2020). Novel blocker of onco SK3 channels derived from scorpion toxin tamapin and active against migration of cancer cells. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(8), 1627-1633.
- Murrieta-Dionicio, U.; Calzada, F.; Barbosa, E.; Valdés, M.; Reyes-Trejo, B.; Zuleta-Prada, H.; Guerra-Ramírez, D.; del Río-Portilla, F. Antiprotozoal Activity Against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* of Cyclopeptides Isolated from *Annona diversifolia* Saff. *Molecules* 2024, 29, 5636.
- Ortiz-Celiseo, A., Valerio-Alfaro, G., Sosa-Rueda, J., López-Fentanes, F. C., Domínguez-Meléndez, V., & Cen-Pacheco, F. (2022). Ectyoplasin, a novel cytotoxic cyclic peptide from *Ectyoplasia ferox* sponge. *Natural Product Research*, 36(15), 3957-3964.
- Rivera-Chávez, J., Zacatenco-Abarca, J., Morales-Jiménez, J., Martínez-Avina, B., Hernández-Ortega, S., & Aguilar-Ramírez, E. (2019). Cuautepestalorin, a 7, 8-dihydrochromene–oxoisochromane adduct bearing a hexacyclic scaffold from *Pestalotiopsis* sp. IQ-011. *Organic letters*, 21(10), 3558-3562.
- Sosa-Rueda, J., Domínguez-Meléndez, V., Ortiz-Celiseo, A., López-Fentanes, F. C., Cuadrado, C., Fernández, J. J., Hernández Daranas, A., & Cen-Pacheco, F. (2022). Squamins C–F, four cyclopeptides from the seeds of *Annona globiflora*. *Phytochemistry*, 194, 112839.
- Valdés, M., Calzada, F., Mendieta-Wejebe, J. E., Merlín-Lucas, V., Velázquez, C., & Barbosa, E. (2020). Antihyperglycemic effects of *Annona diversifolia* Safford and its acyclic terpenoids: α -glucosidase and selective SGLT1 inhibitors. *Molecules*, 25(15), 3361.
- Wélé, A., Ndoeye, I., Zhang, Y., Brouard, J. P., & Bodo, B. (2005). Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*, 66(6), 693-696.
- Wang, X., Lin, M., Xu, D., Lai, D., & Zhou, L. (2017). Structural diversity and biological activities of fungal cyclic peptides, excluding cyclodipeptides. *Molecules*, 22(12), 2069.
- Yuan, H., Luo, Z., Ban, Z., Reiter, R. J., Ma, Q., Liang, Z., Yang, M., Li, X., & Li, L. (2022). Bioactive peptides of plant origin: distribution, functionality, and evidence of benefits in food and health. *Food & Function*, 13(6), 3133-3158.

- Zhang, P., Li, X., & Wang, B. G. (2016). Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi: Chemical diversity and biological activity. *Planta Medica*, 82(09/10), 832-842.
- Zolfaghariyan, S., Shakeri, A., Asili, J., Tarighi, S., Grün, P., Shi, Y. M., Bode, H. B., & Karimi, J. (2023). Cyclic Depsipeptides and Linear Peptides With Cytotoxic and Antiphytopathogenic Activities From Symbiotic Bacteria of *Xenorhabdus* (Enterobacteriales: Morganellaceae) Genus. *Annals of the Entomological Society of America*, 116(2), 114-124.

5 CONCLUSIONES GENERALES

A partir del fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de las semillas de *A. diversifolia* Saff., se diseñó e implementó una metodología para la extracción y aislamiento de ciclopéptido, lo que condujo a la obtención de tres estructuras ciclopéptidicas, a saber: el heptapéptido cherimolaciclopéptido D (**1**), y dos octapéptidos, las escuaminas D (**2**) y C (**3**). Las fracciones enriquecidas en ciclopéptidos (**2** y **3**) y el compuesto puro (**1**) se sometieron a ensayos *in vitro* e *in silico* para evaluar su actividad antiprotozoaria. El cherimolaciclopéptido D (**1**) resultó con la mayor actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* y *G. lamblia*. Así mismo, se construyó y elucidó una nueva estructura ciclopéptidica a partir de la partición de butanol del extracto hidroalcohólico de *A. diversifolia* Saff., perteneciente a un heptapéptido al cual se le denominó papaucina (**4**). Finalmente, se recomienda explorar la fitoquímica de la partición con acetato de etilo del mismo extracto hidroalcohólico, ya que preliminarmente se observaron señales correspondientes a ciclopéptidos diferentes a los descritos en este trabajo.

6 APÉNDICES

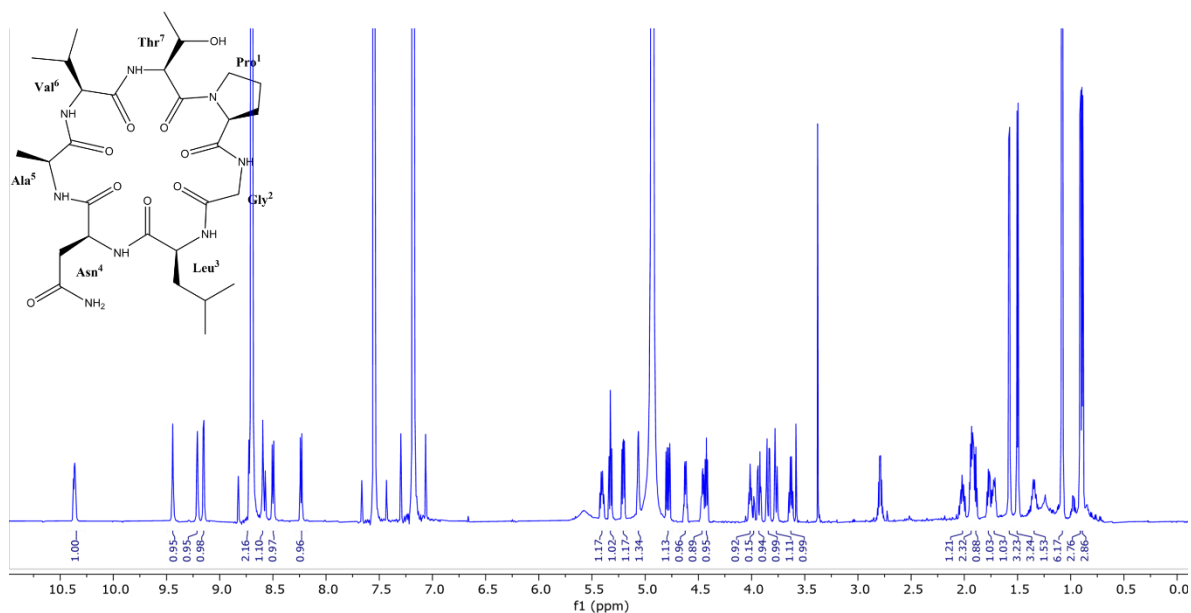


Figura S1. Espectro de RMN- ^1H de cherimolaciclopéptido D (**1**) en piridina- d_5 a 298 K, 700 MHz.

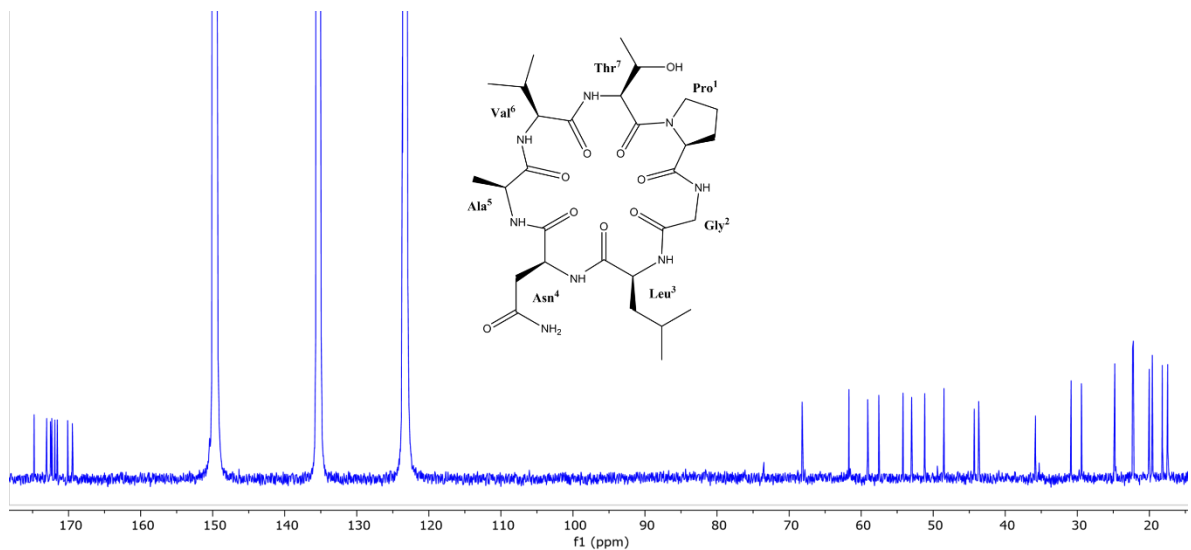


Figura S2. Espectro de RMN- ^{13}C de cherimolaciclopéptido D (**1**) a piridina- d_5 298 K, 175 MHz.

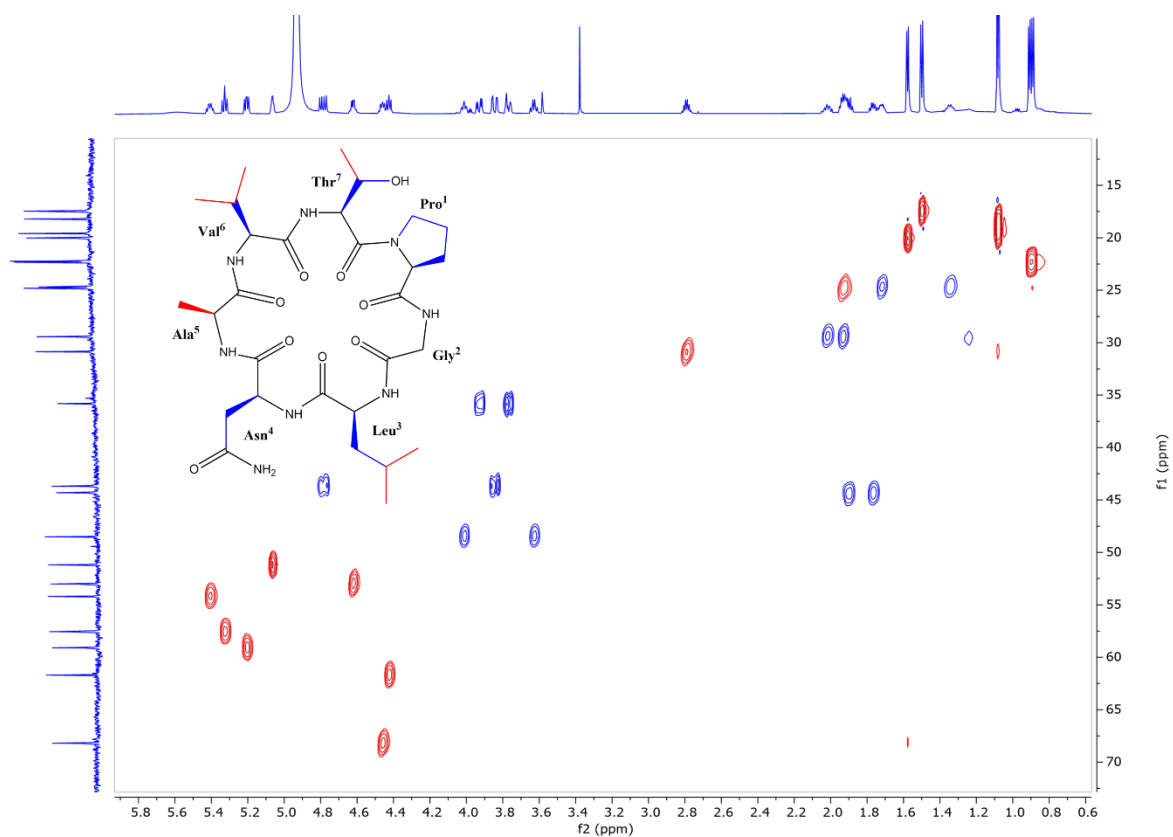


Figura S3. Espectro HSQC de cherimolaciclopéptido D (**1**) en piridina- d_5 a 298 K, 700 MHz.

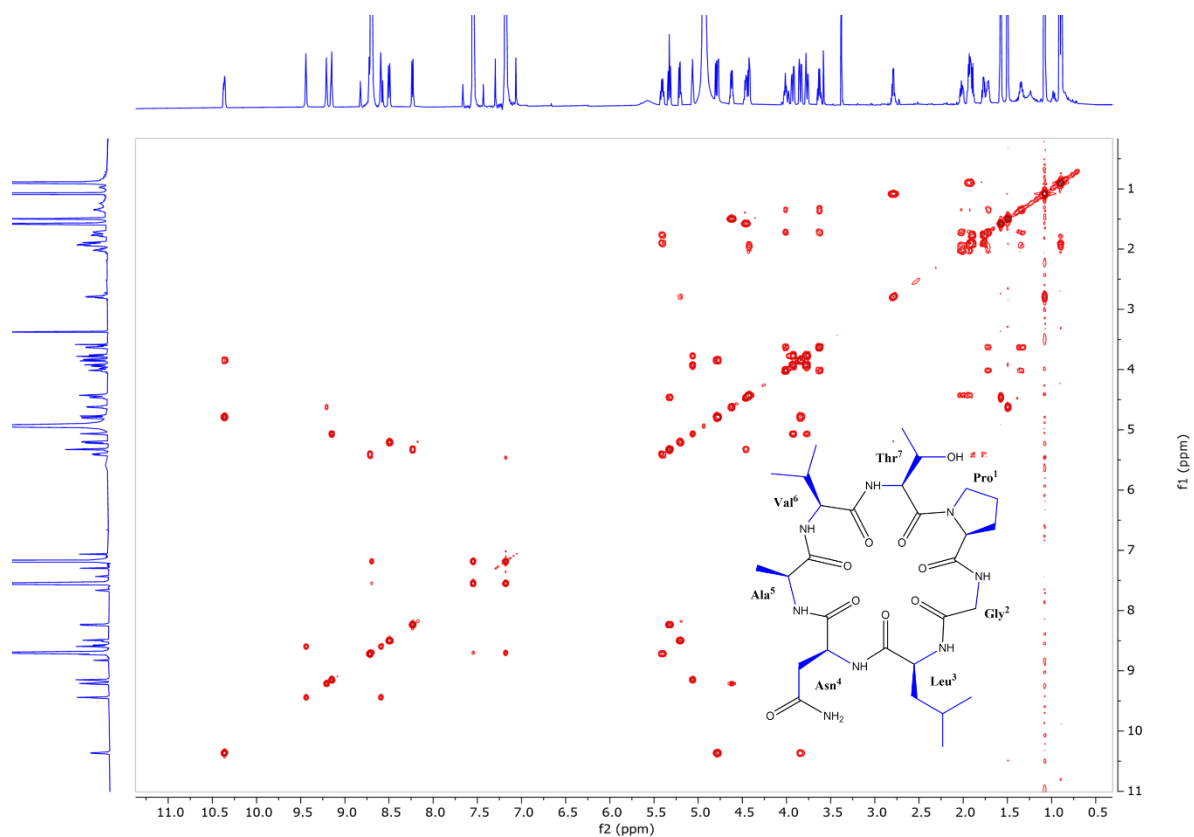


Figura S4. Espectro COSY de cherimolaciclopéptido D (**1**) en piridina- d_5 a 298 K, 700 MHz.

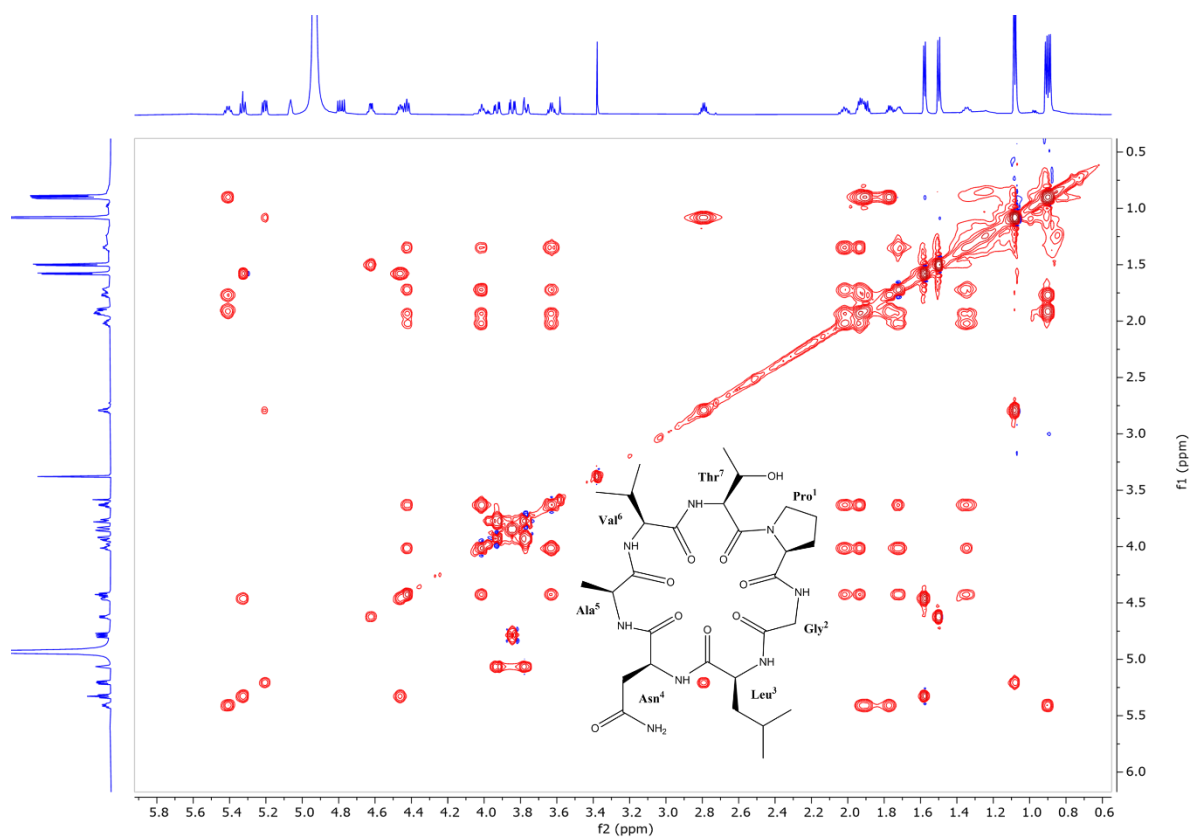


Figura S5. Espectro TOCSY de cherimolaciclopéptido D (**1**) en piridina-*d*₅ a 298 K, 700 MHz.

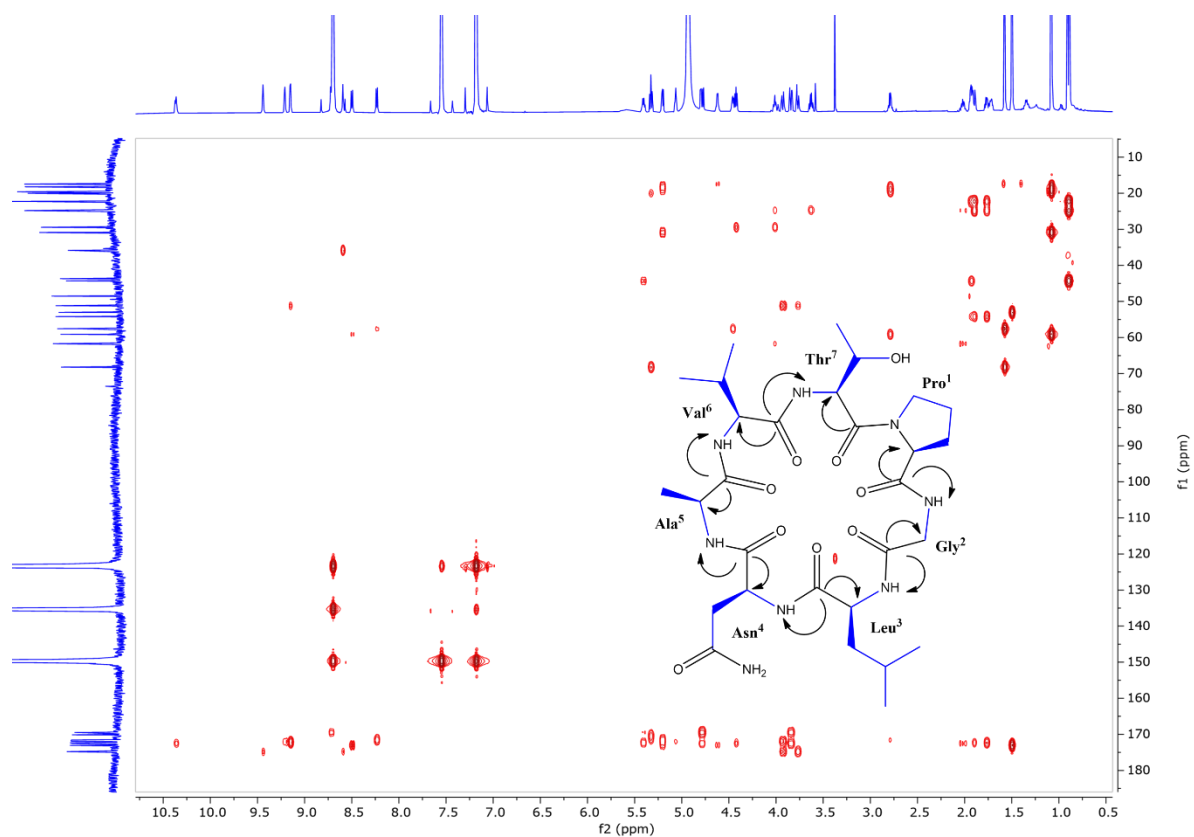


Figura S6. Espectro HMBC de cherimolaciclopéptido D (**1**) en piridina- d_5 a 298 K, 700 MHz.

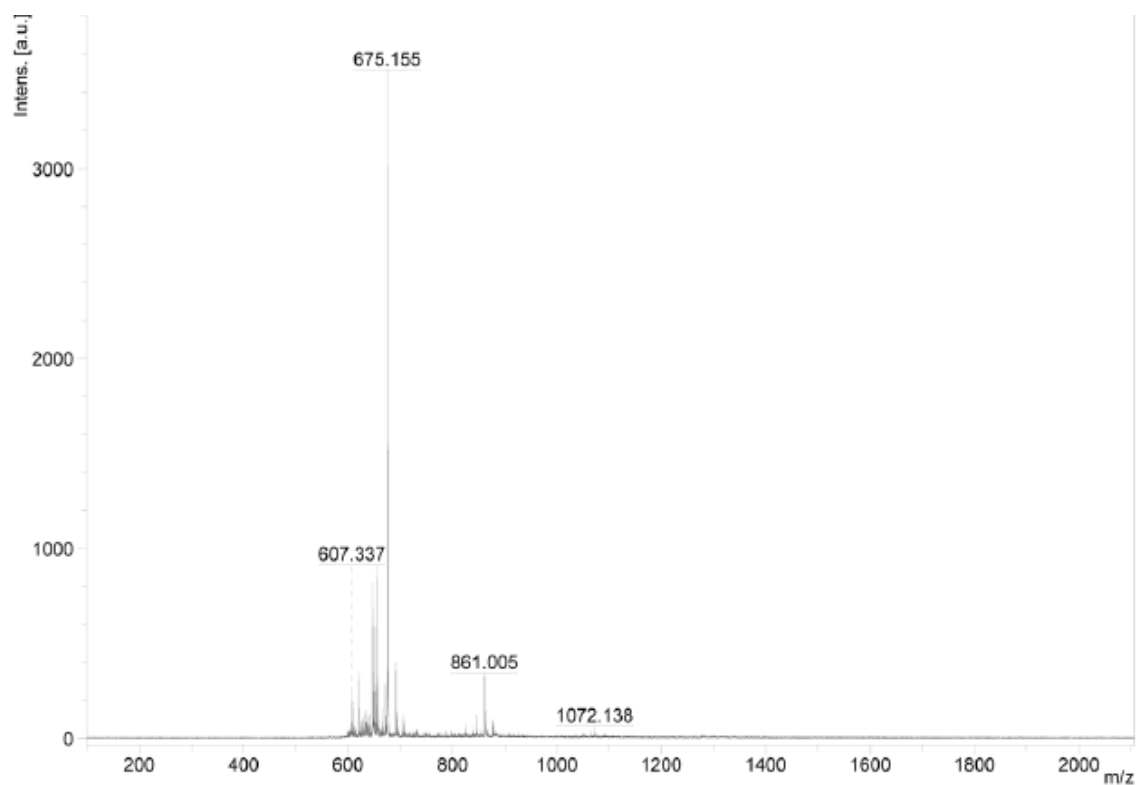


Figura S7. Espectro de masas MALDI-TOF del cherimolaciclopéptido D (**1**) con m/z: de 675 $[M+Na]^+$.

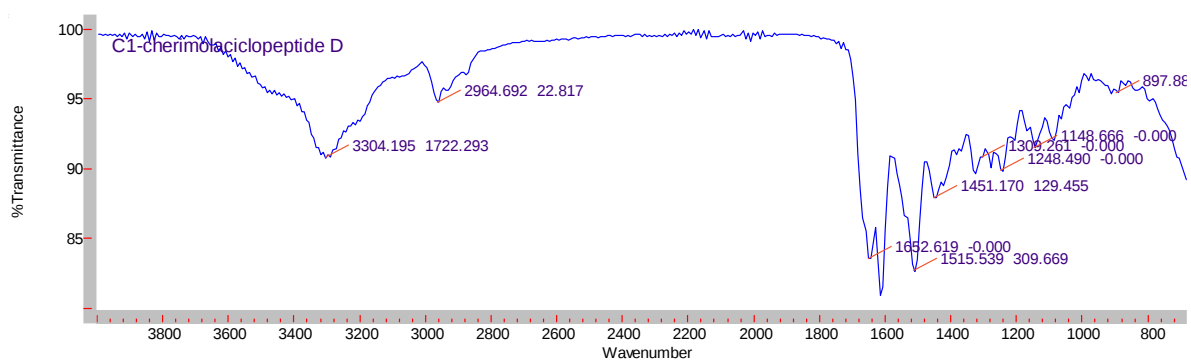


Figura S8. Espectro de FT-IR-ATR del cherimolaciclopéptido D (**1**).

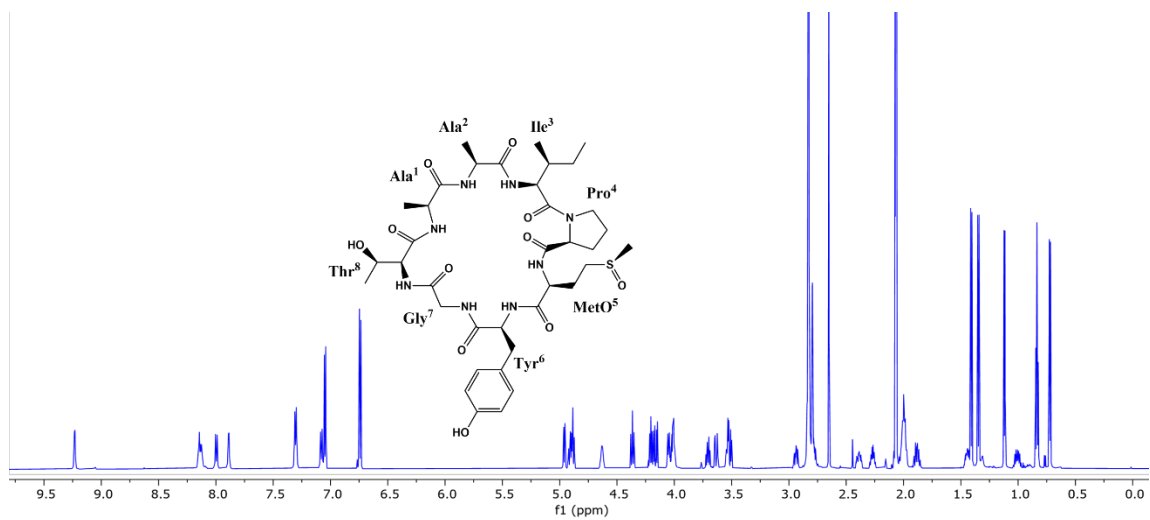


Figura S9. Espectro de NMR-¹H de escumina D (**2**) en acetona-*d*₆ a 298 K, 700 MHz.

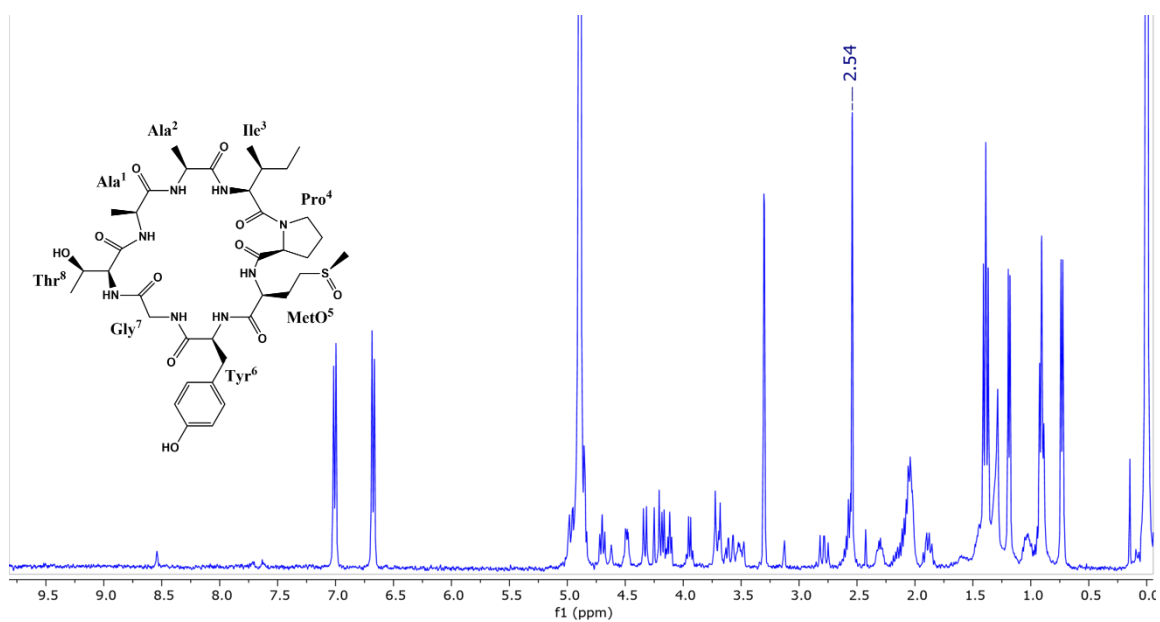


Figura S10. Espectro de NMR-¹H de escumina D (**2**) en CD₃OD a 298 K, 400 MHz.

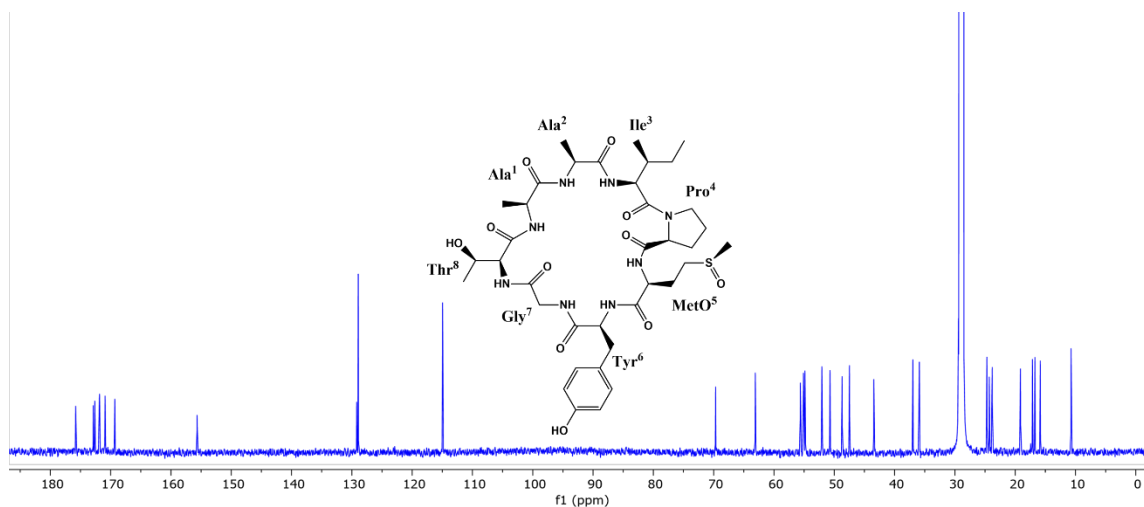


Figura S11. Espectro de NMR- ^{13}C de escumina D (**2**) en acetona- d_6 a 298 K, 175 MHz.

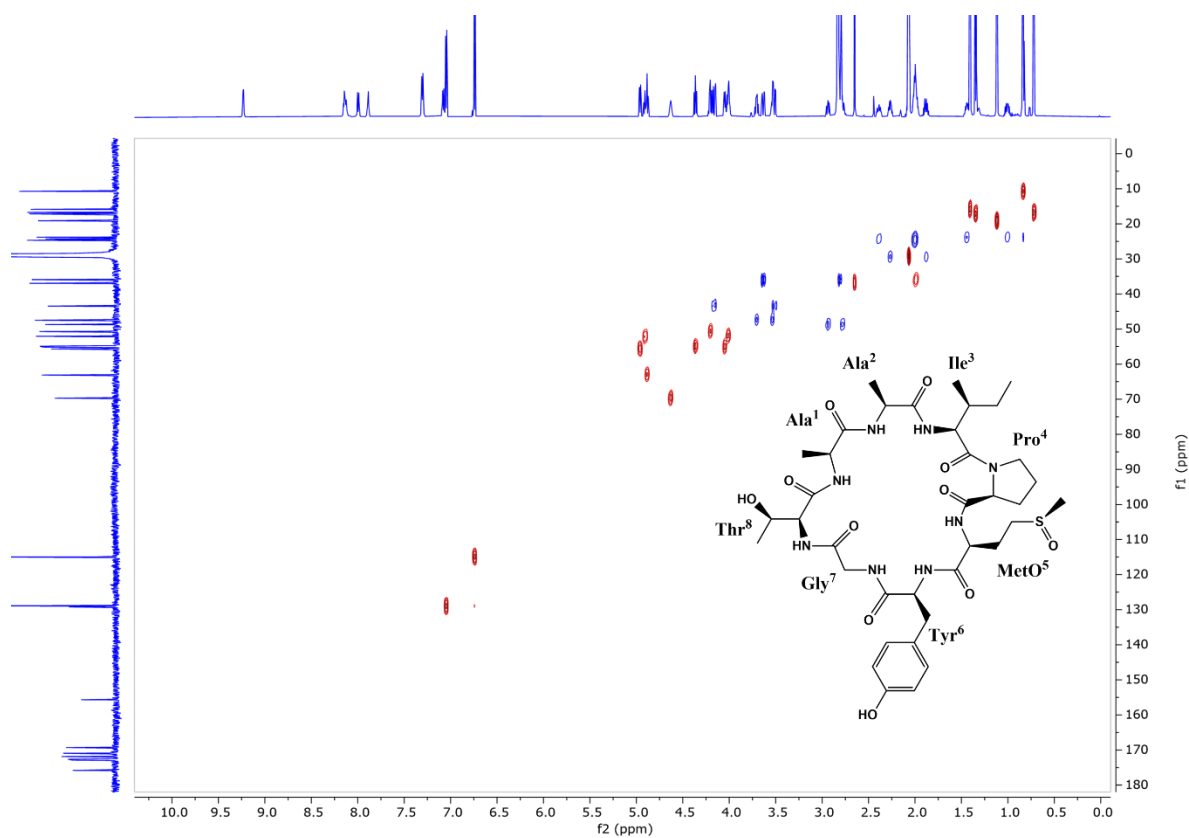


Figura S12. Espectro HSQC de escumina D (**2**) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.

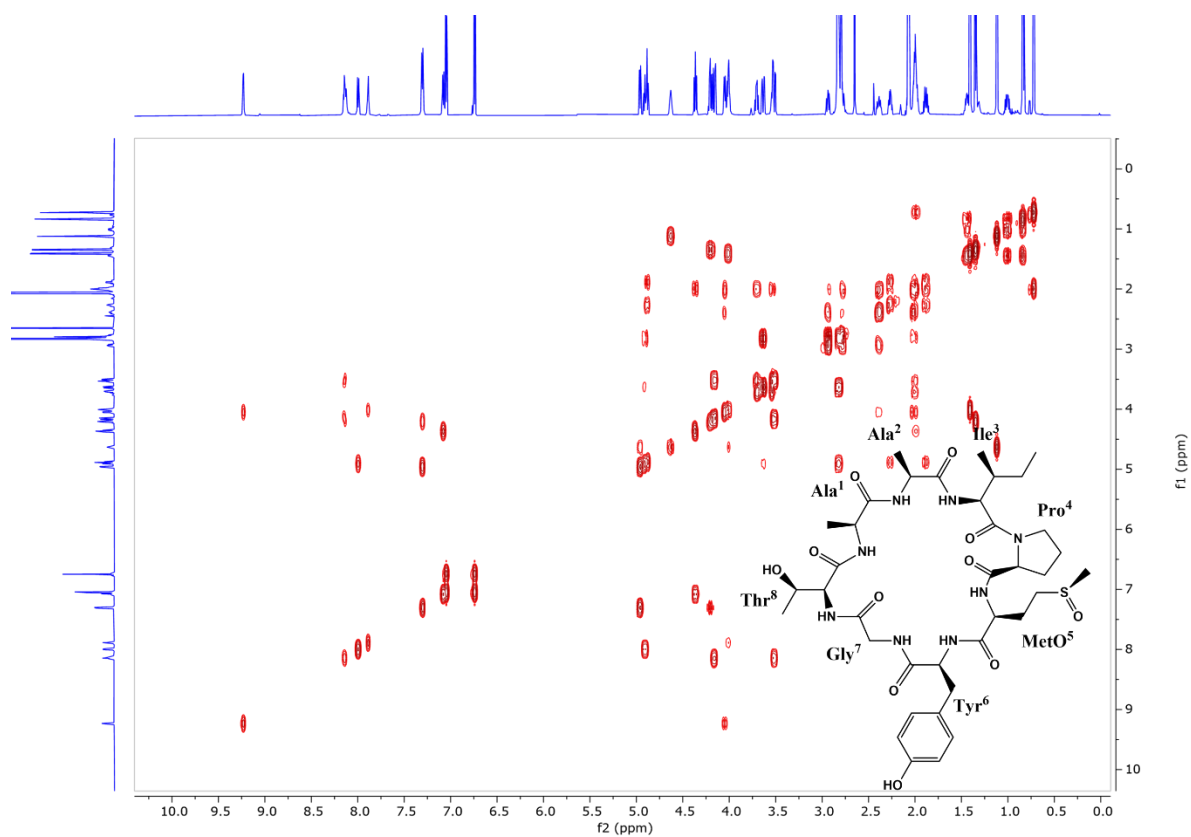


Figura S13. Espectro COSY de escumina D (**2**) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.

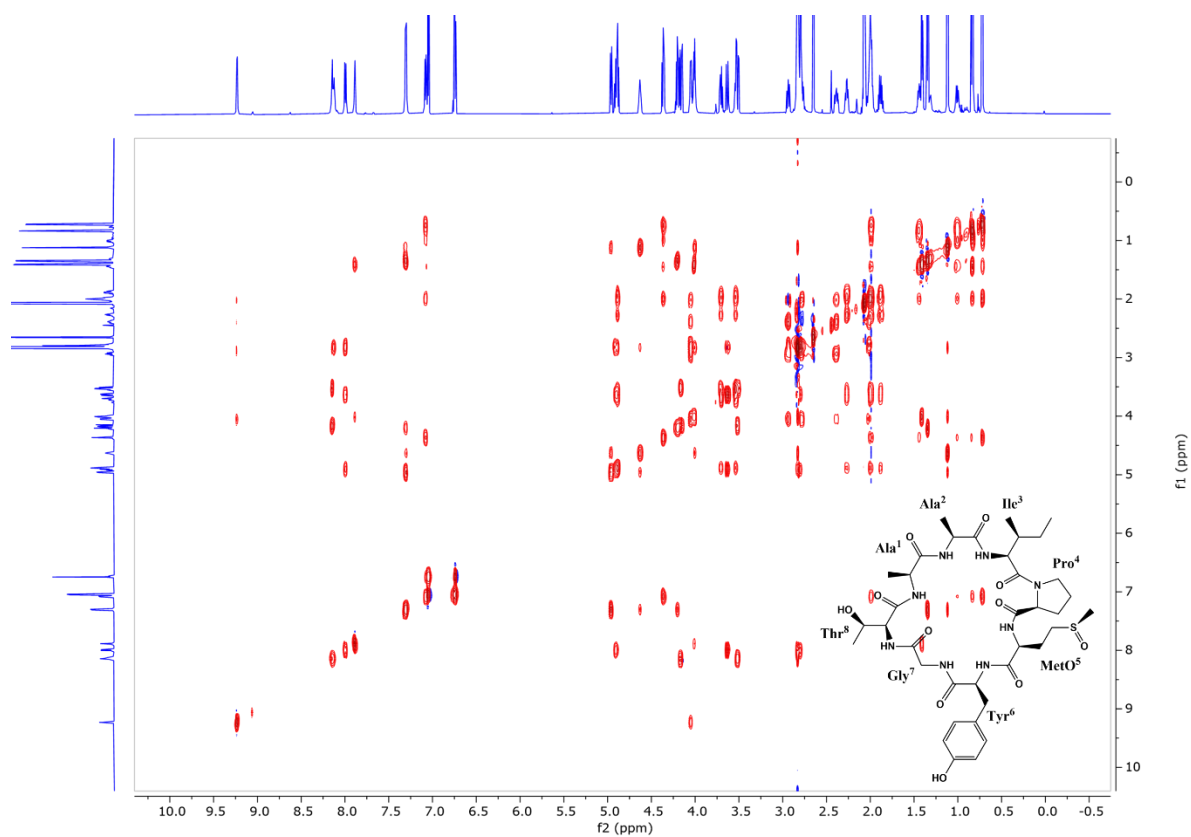


Figura S14. Espectro TOCSY de escumina D (**2**) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.

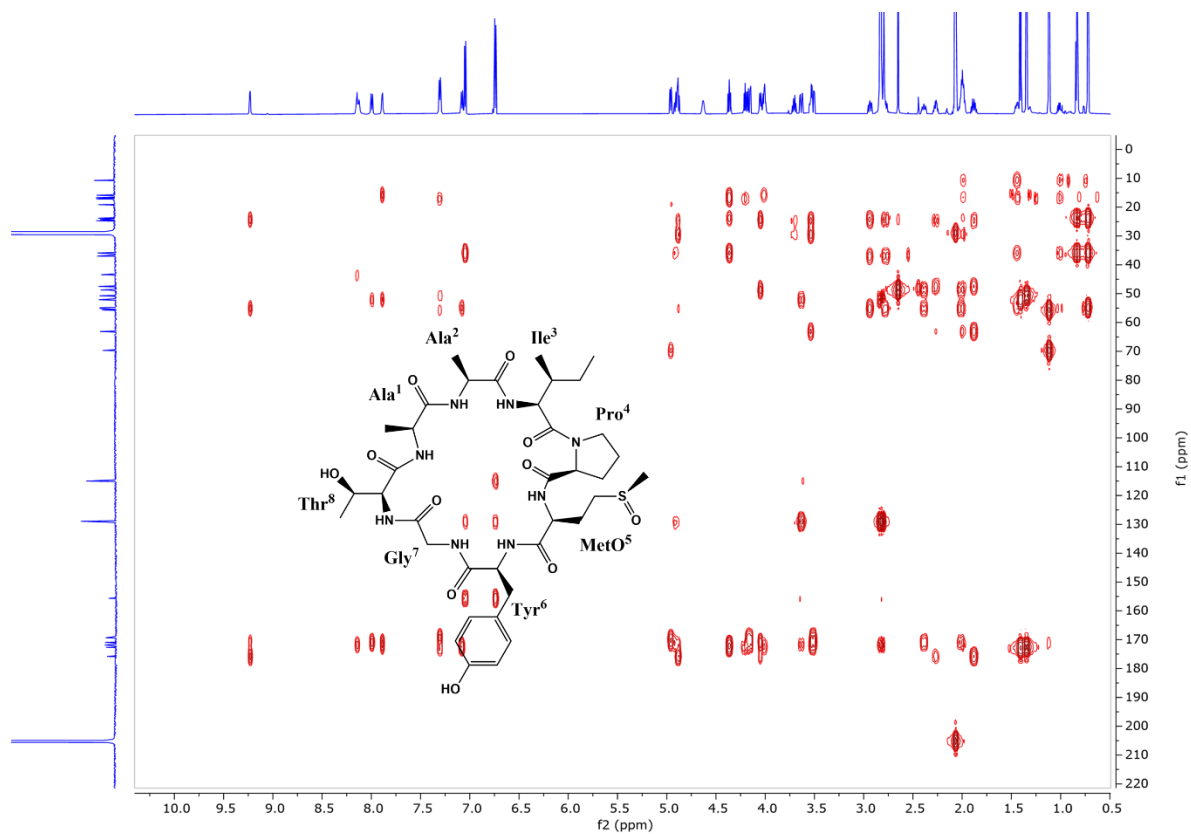


Figura S15. Espectro HMBC de escumina D (**2**) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.

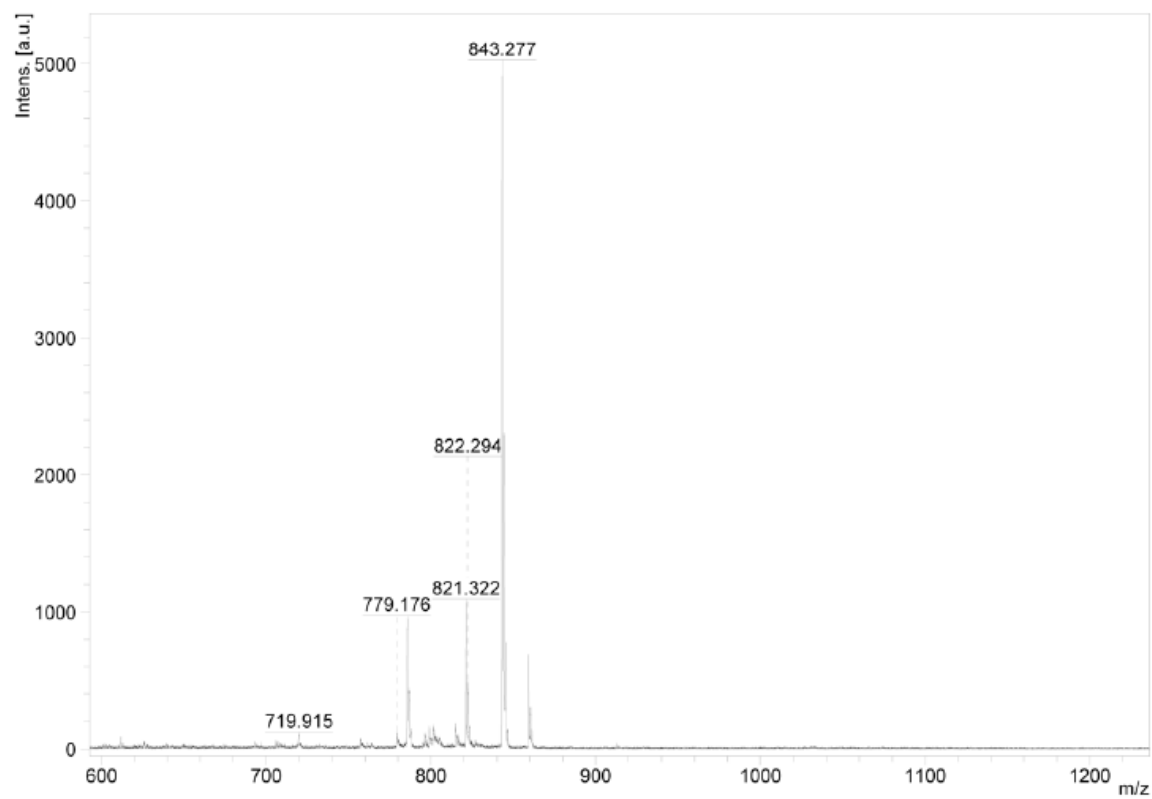


Figura S16. Espectro de masas MALDI-TOF de escuamina D (**2**) con m/z: de 843 $[M+Na]^+$.

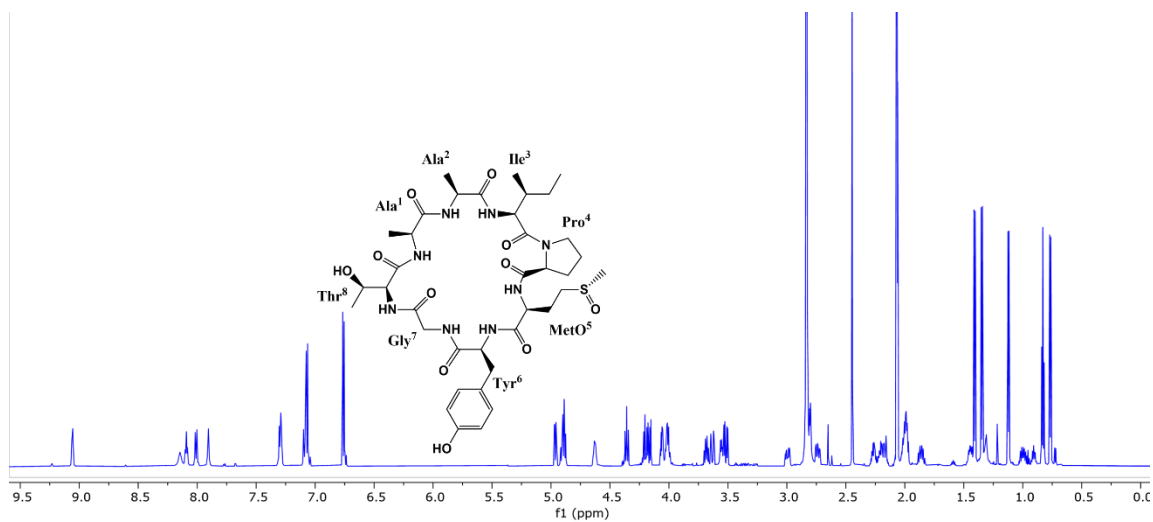


Figura S17. Espectro de NMR- ^1H de escumina C (**3**) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.

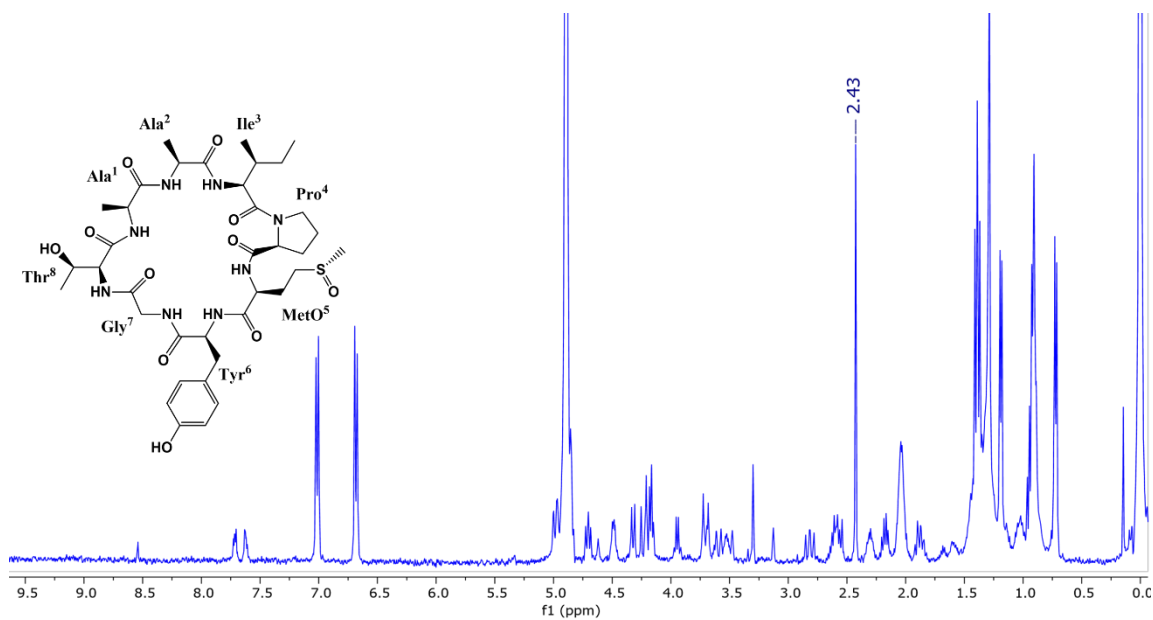


Figura S18. Espectro de NMR- ^1H de escumina C (**3**) en CD_3OD a 298 K, 400 MHz

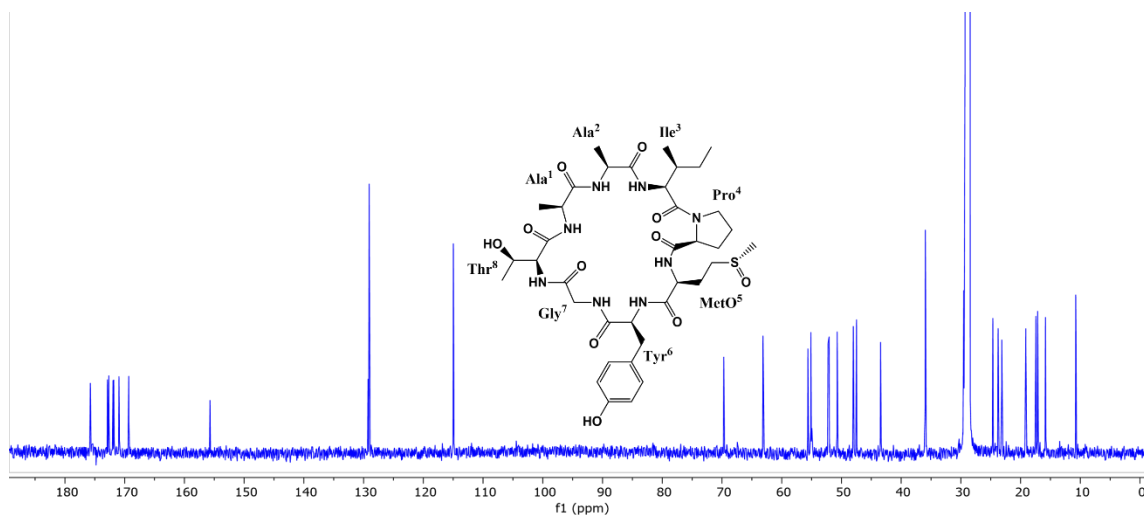


Figura S19. Espectro de NMR- ^{13}C de escumina C (**3**) en acetona- d_6 a 298 K, 175 MHz.

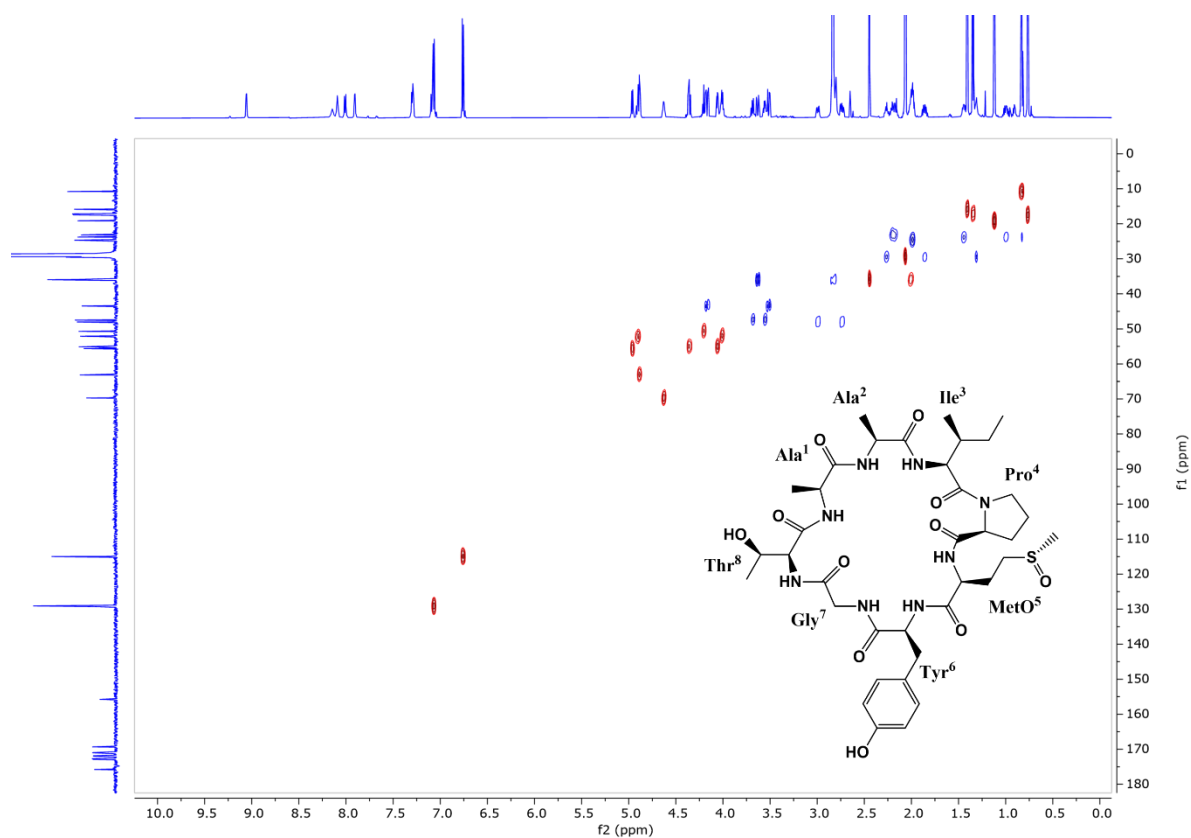


Figura S20. Espectro HSQC de escumina C (**3**) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.

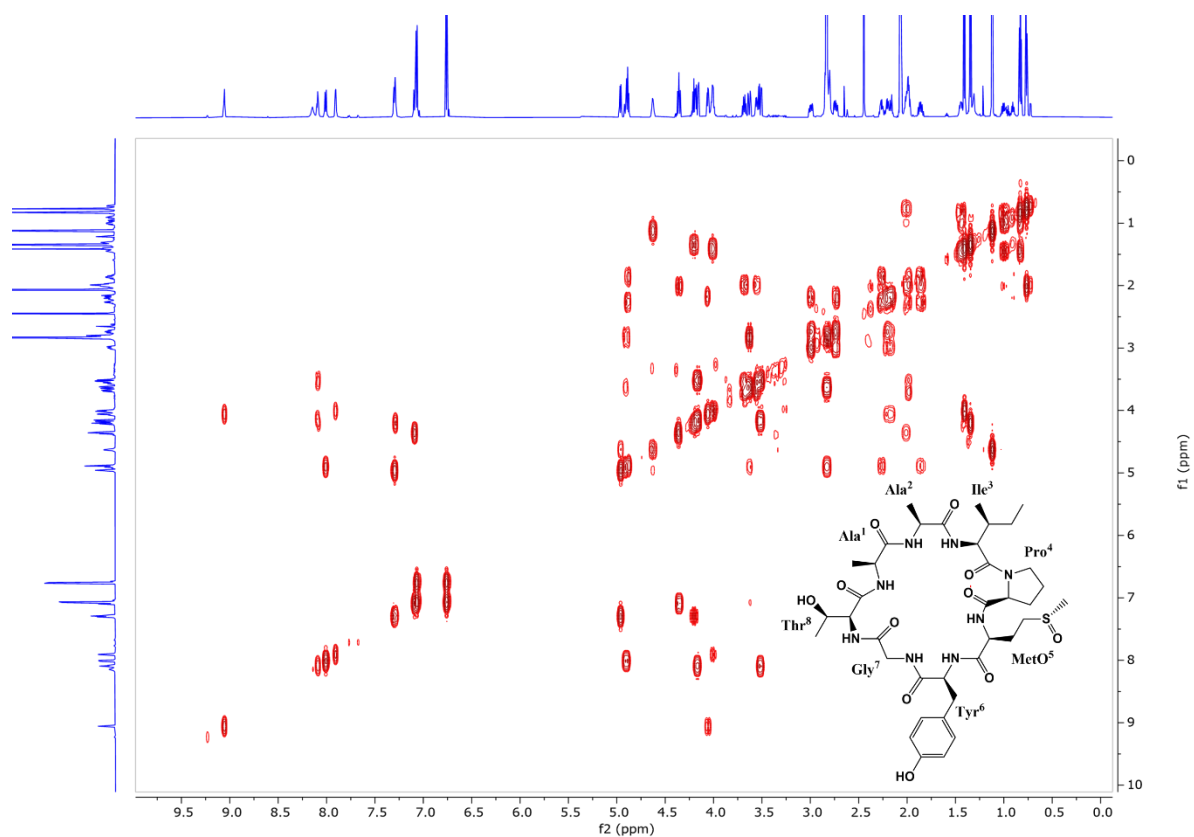


Figura S21. Espectro COSY de escumina C (**3**) en acetona-*d*₆ a 298 K, 700 MHz.

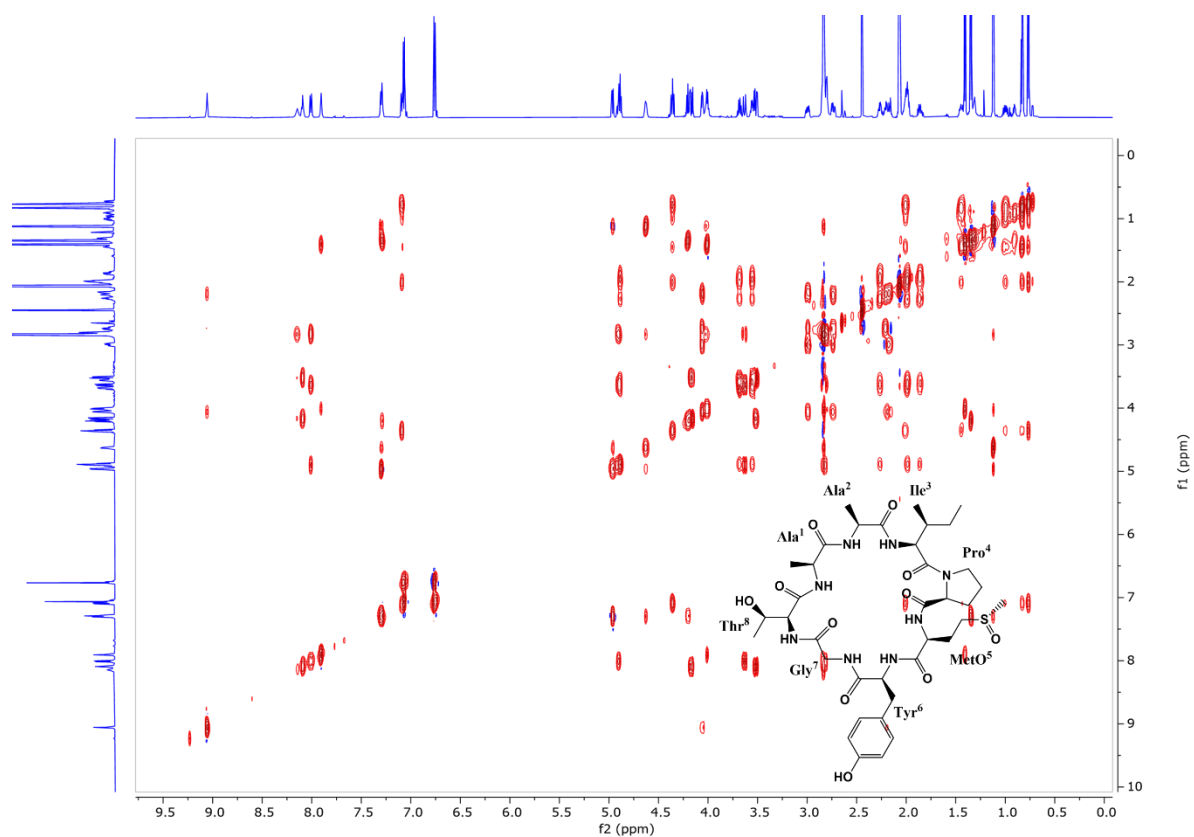


Figura S22. Espectro TOCSY de escumina C (**3**) en acetona- d_6 a 298 K, 700 MHz.

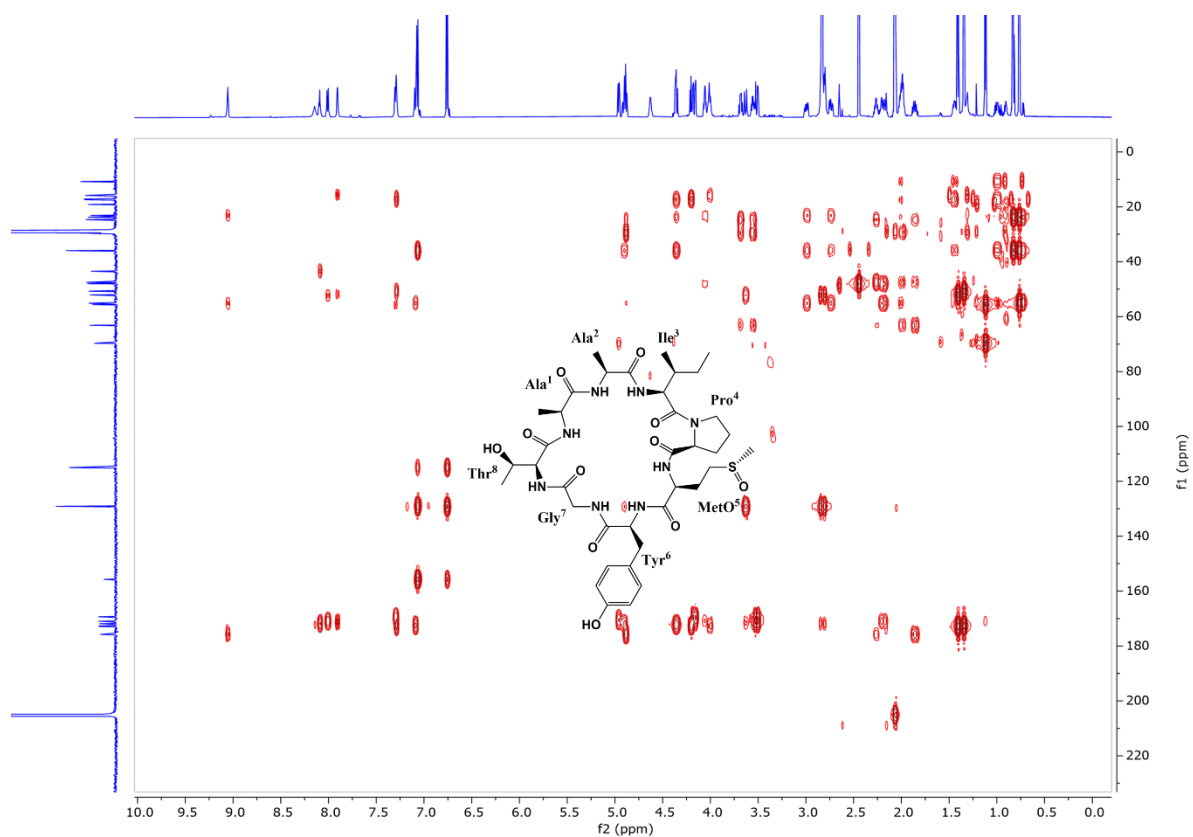


Figura S23. Espectro HMBC de escumina C (**3**) en acetona-*d*₆ a 298 K, 700 MHz.

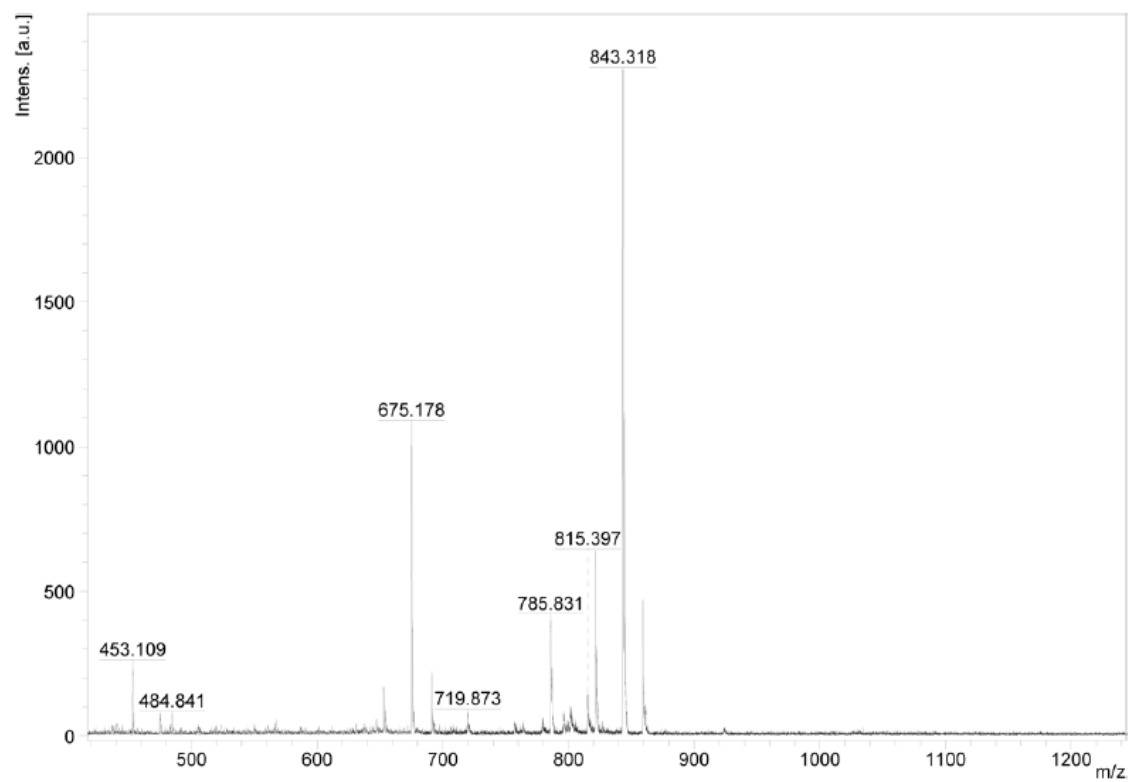


Figura S24. Espectro de masas MALDI-TOF de escuamina C (**3**) con m/z: de 843 $[M+Na]^+$.

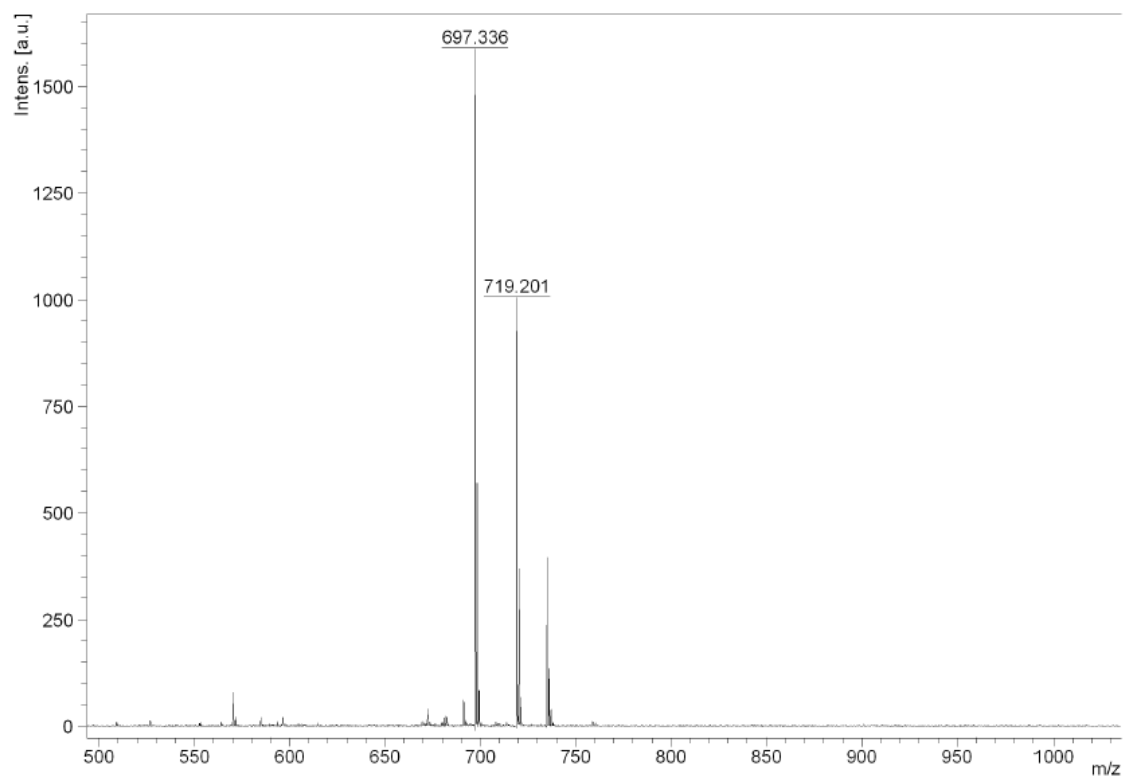


Figura S25. Espectro de masas MALDI-TOF de papaucina (**4**) con m/z: de 697 $[M+H]^+$.

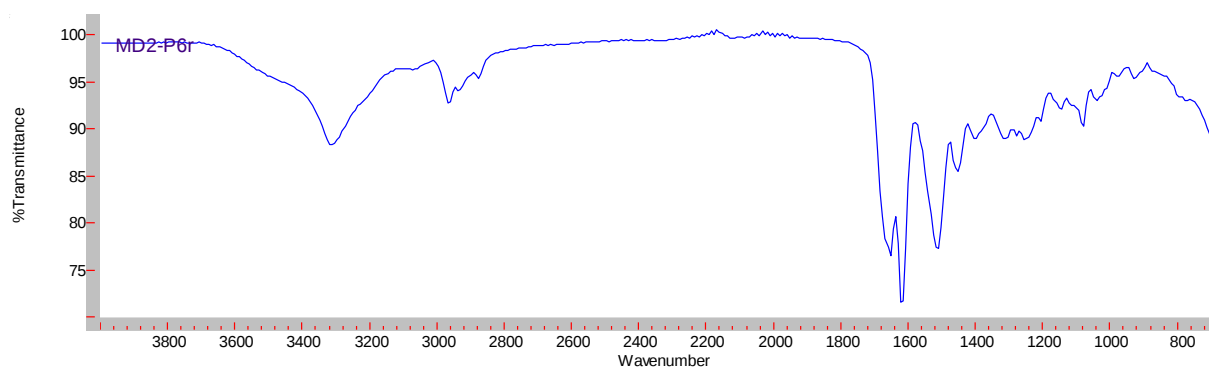


Figura S26. Espectro de FT-IR-ART de papaucina (**4**).

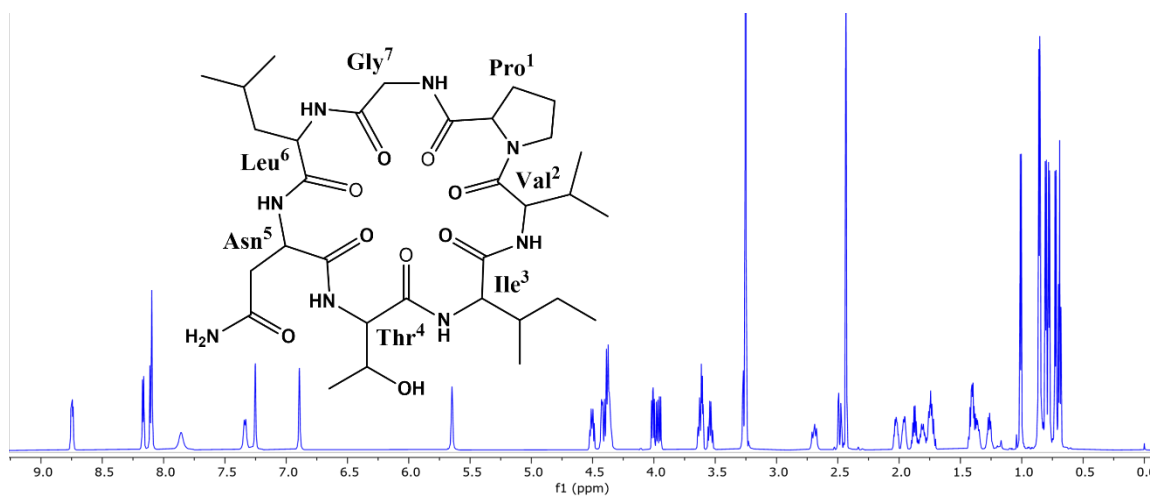


Figura S27. Espectro de RMN- ^1H de papaucina (**4**) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.

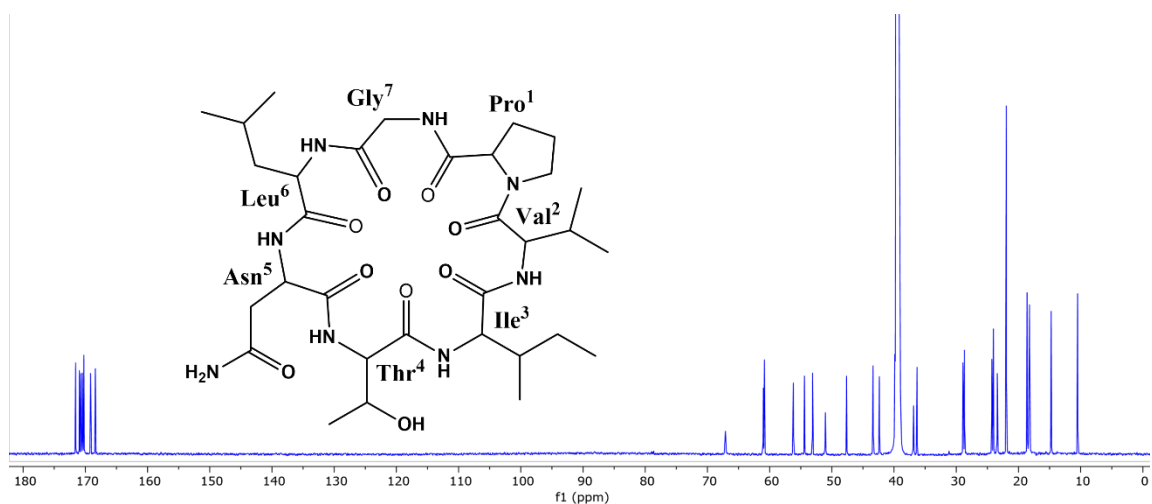


Figura S28. Espectro de RMN- ^{13}C de papaucina (**4**) en DMSO- d_6 a 298 K, 175 MHz.

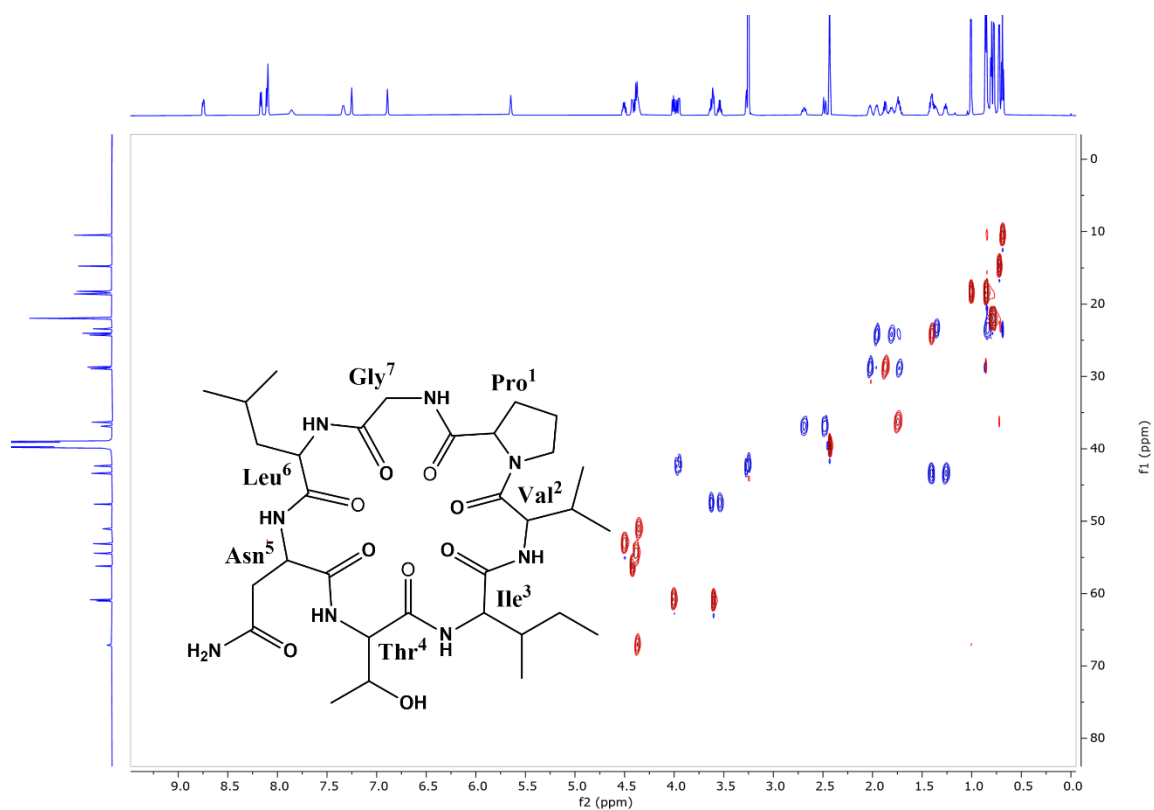


Figura S29. Espectro HSQC de papaucina (**4**) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.

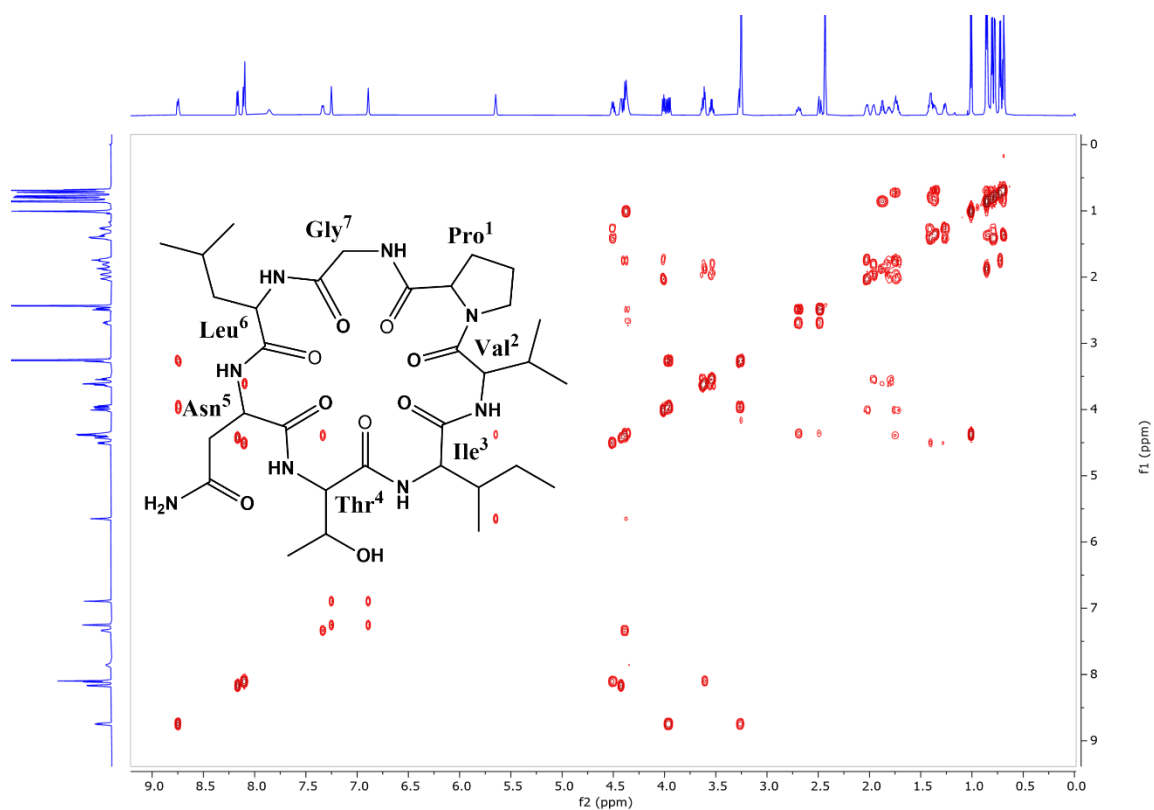


Figura S30. Espectro COSY de papaucina (**4**) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.

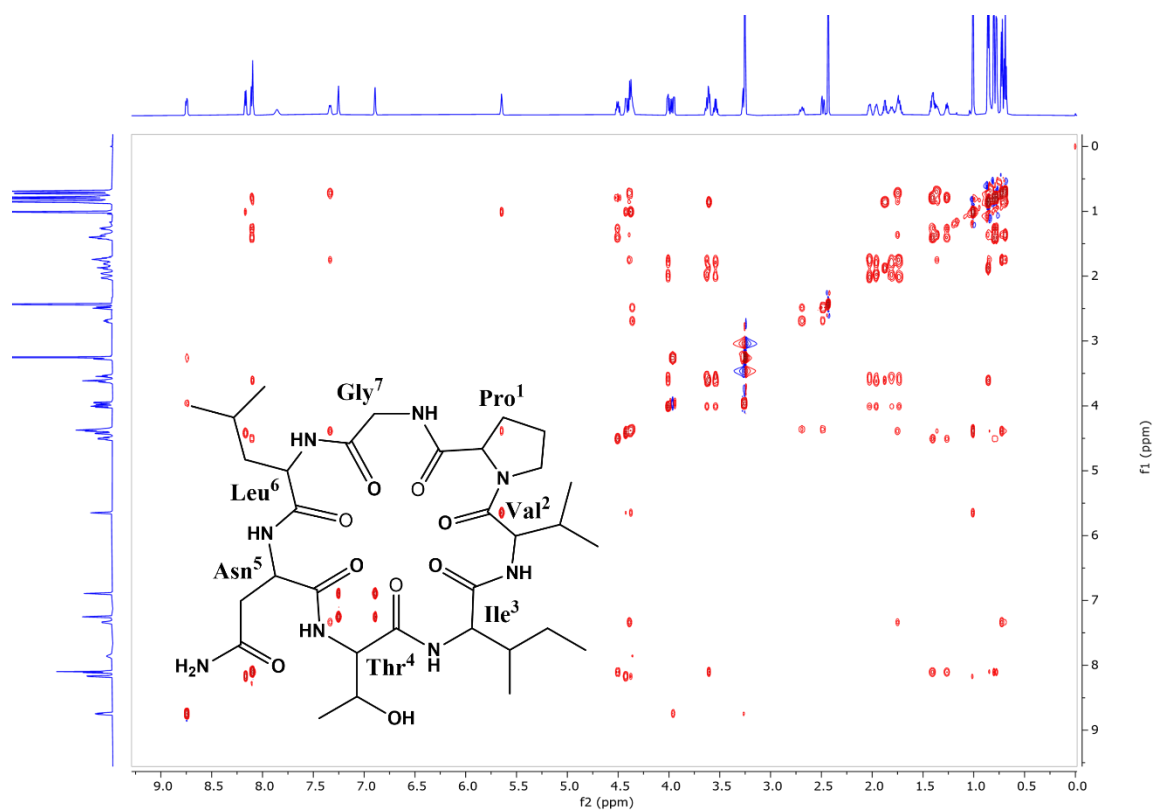


Figura S31. Espectro TOCSY de papaucina (**4**) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.

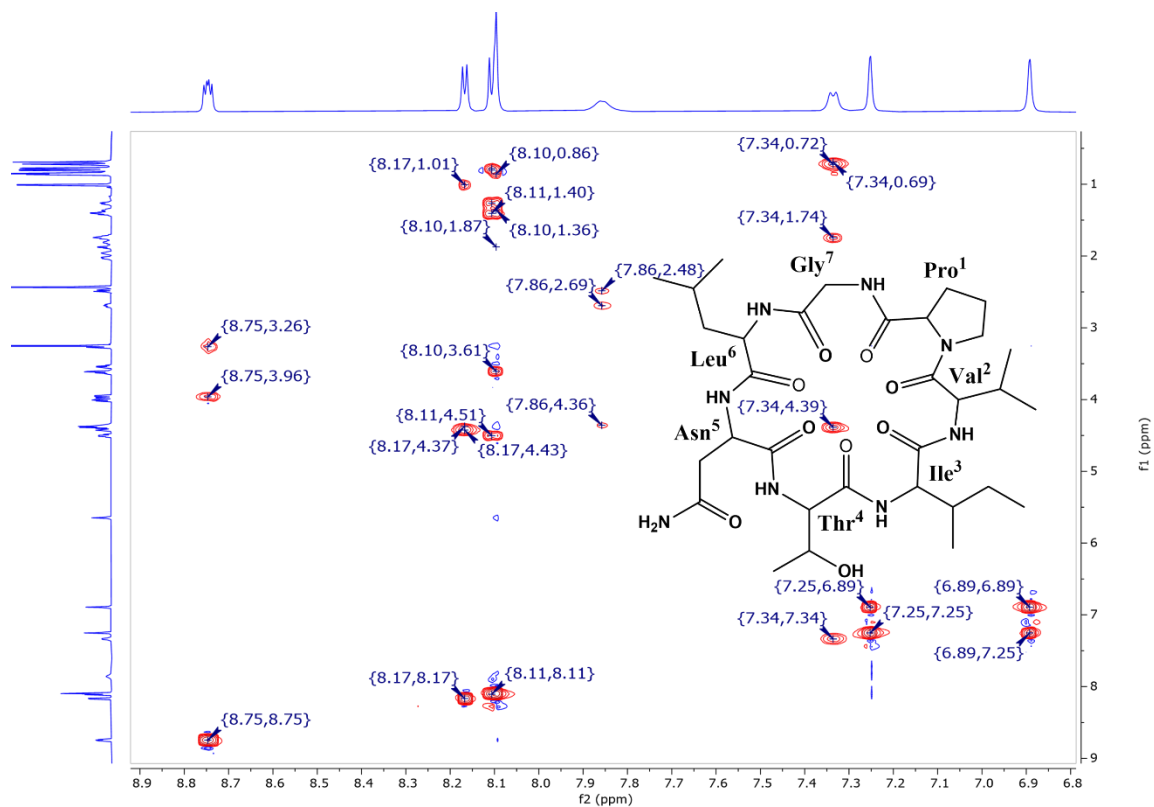


Figura S32. Expansión del espectro TOCSY de 0.5 a 9.0 ppm en RMN-¹H (F1) y de 6.8 a 8.9 ppm en RMN-¹H (F2) de los sistemas spin de los residuos de los aminoácidos de la papaucina (**4**) en DMSO-*d*₆ a 298 K, 700 MHz.

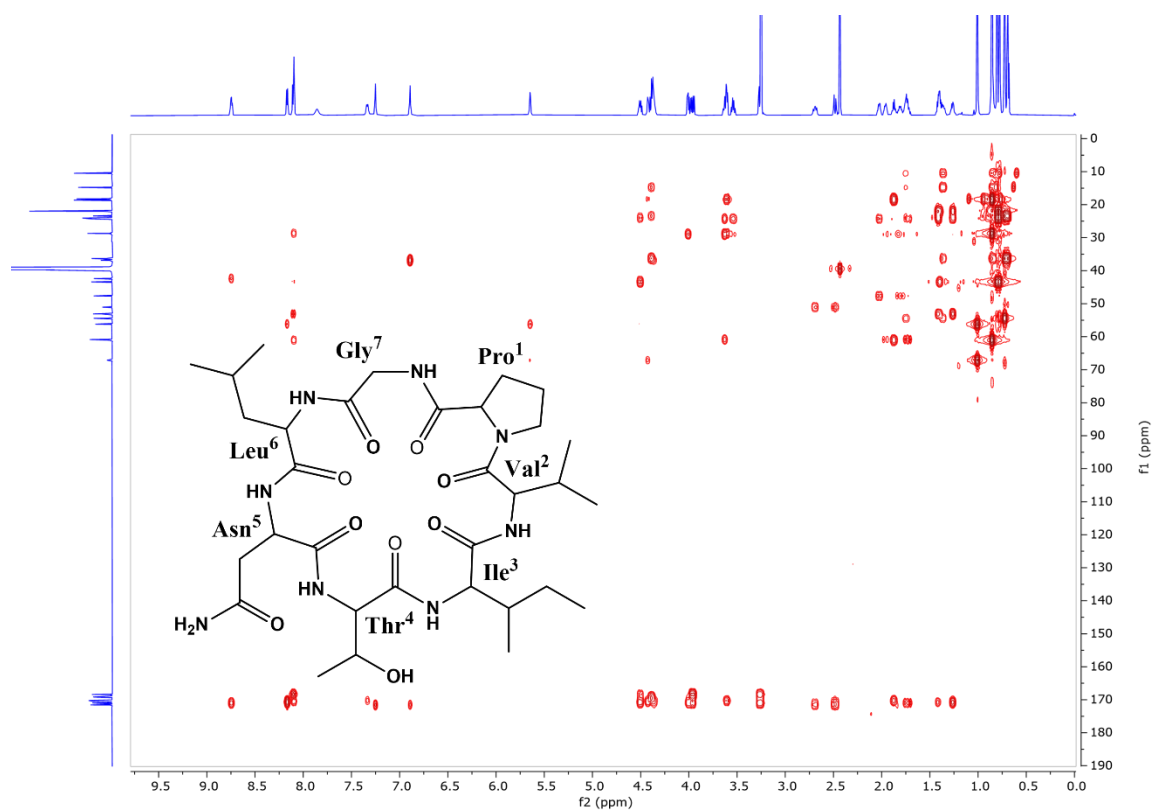


Figura S33. Espectro HMBC de papaucina (4) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz.

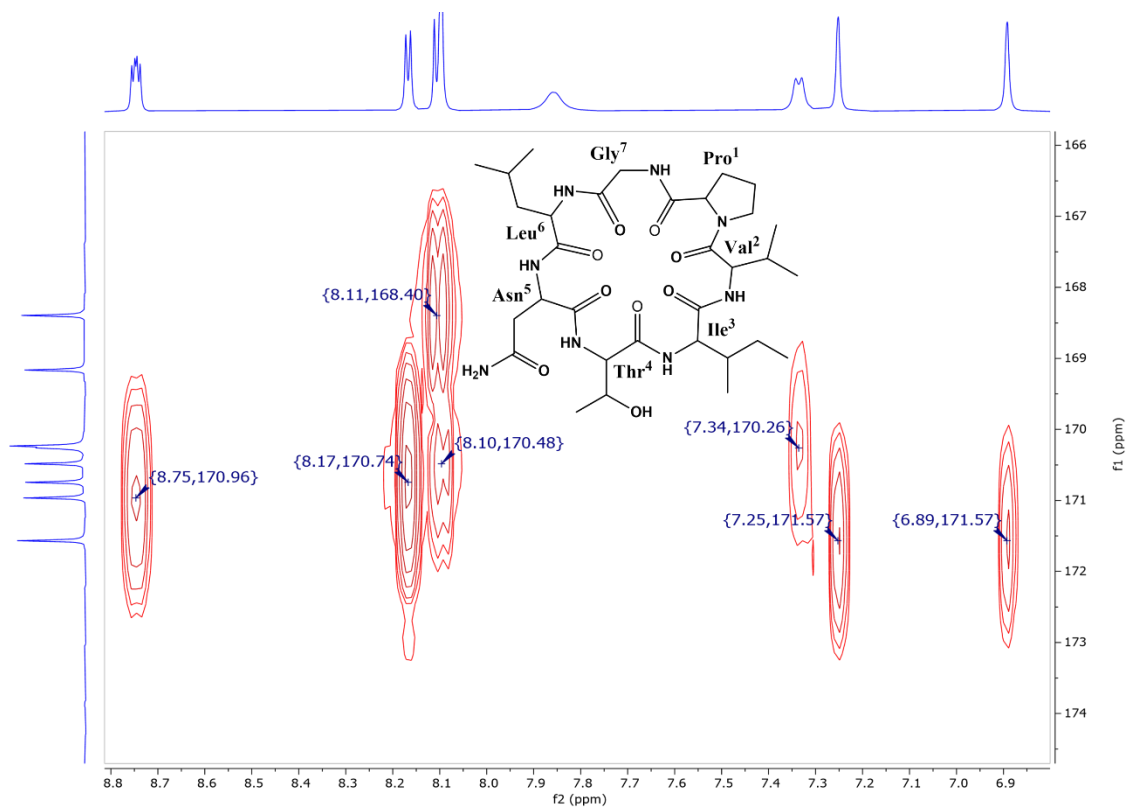


Figura S34. Expansión del espectro HMBC de 166 a 174 ppm en RMN- ^{13}C (F1) y de 6.9 a 8.8 ppm en RMN- ^1H (F2) que muestra las correlaciones entre los $-\text{NH}-$ de los residuos de los aminoácidos “ i ” con los carbonos del carbonilo del residuo “ $i + 1$ ” de la papaucina (**4**) en DMSO- d_6 a 298 K, 700 MHz