



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD**

FRUTICULTURA

COMPUESTOS CON VALOR NUTRICIONAL Y NUTRACÉUTICO EN FRUTOS DE ILAMA (*Annona diversifolia* Saff.) EN MADUREZ DE CONSUMO

DONAJI SIERRA ZURITA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

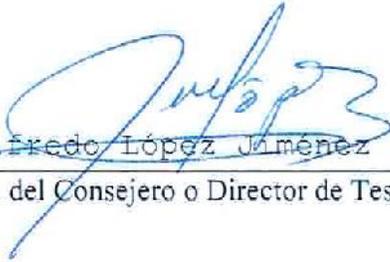
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Donají Sierra Zurita, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Alfredo López Jiménez, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Compuestos con Valor Nutricional y Nutraceutico en Frutos de Ilama (Annona diversifolia Saff.) en Madurez de Consumo

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 27 de Noviembre de 2018



Firma del
Alumno (a)



Dr. Alfredo López Jiménez

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **COMPUESTOS CON VALOR NUTRICIONAL Y NUTRACEÚTICO EN FRUTOS DE ILAMA (*Annona diversifolia* Saff.) EN MADUREZ DE CONSUMO** realizada por la alumna **Donaji Sierra Zurita** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA**

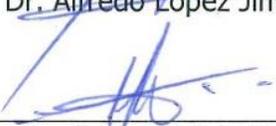
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Alfredo Lopez Jimenez

ASESOR



Dr. Holber Zuleta Prada

ASESOR



Dr. Crescenciano Saucedo Veloz

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2019

COMPUESTOS CON VALOR NUTRICIONAL Y NUTRACÉUTICO EN FRUTOS DE ILAMA (*Annona diversifolia* Saff.) EN MADUREZ DE CONSUMO

Donaji Sierra Zurita, M. en C.
Coelgio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La ilama (*Annona diversifolia* Saff.) es un frutal tropical exótico que se produce de forma silvestre originario de México y Centroamérica, produce frutos de diferentes colores de pulpa blanca, rosa y morada. Estos frutos se comercializan en mercados locales y regionales de las zonas productoras. Sin embargo, debido a sus características organolépticas se considera un cultivo con alto potencial de comercialización. Se colectaron frutos pulpa blanca y rosa en Cocula, Guerrero, los cuales fueron evaluados por sus propiedades biofísicas, porcentaje de mesocarpio, exocarpio y semillas; y pérdida de peso. También se cuantificaron las propiedades bioquímicas, que consistieron en la composición mineral, acidez titulable, SST y pérdida de vitamina C. Se prepararon extractos de la pulpa y se separaron por CC y las fracciones fueron monitoreadas por CCD, las fracciones de interés se estudiaron por técnicas espectroscópicas UV-visivle, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ y EM. Las propiedades antioxidantes de la pulpa y cáscara, fueron determinadas mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides totales y la capacidad antioxidante por los ensayos DPPH, FRAP y ABTS. Los resultados de la evaluación de las propiedades biofísicas no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). El macroelemento mayoritario en mesocarpio y exocarpio fue el K (8.5 a 12.52 $\text{mg g}^{-1}_{\text{bs}}$) y el microelemento mayoritario fue el Fe (34.73 a 45.00 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{bs}}$). El exocarpio de los frutos presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales 31.86-39.40 $\text{mg EAG g}^{-1}_{\text{bh}}$ y 16.71-17.63 $\text{mg EC g}^{-1}_{\text{bh}}$ respectivamente y capacidad antioxidante por los ensayos DPPH, ABTS y FRAP (416.51-482.83, 59.35-62.14 Y 259.62-284.34 $\mu\text{mol ET g}^{-1}_{\text{bh}}$). Del extracto metanólico y cloruro de metileno se aislaron e identificaron: (+) Catequina, una mezcla de β -sitoesterol, estigmasterol y campesterol, ácidos grasos y glucósidos. Los resultados muestran que los frutos de ilama contiene una diversidad de compuestos benéficos para la salud.

Palabras clave: *Annona diversifolia*, composición mineral, Fitoquímica, propiedades nutraceuticas.

COMPOUNDS WITH NUTRITIONAL AND NUTRACEUTICAL VALUE IN FRUIT OF ILAMA (*Annona diversifolia* Saff.) IN MATURITY OF CONSUMPTION

Donaji Sierra Zurita, M. en C.
Coelgio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Ilama (*Annona diversifolia* Saff.) is an exotic tropical fruit, collected in its native form, in Mexico and Central America, produces fruits with different pulp colors (white, pink and purple). These fruits are commercialized in local and regional markets of the producer zone. Nevertheless, due to its organoleptic characteristics is considered a culture with high marketing potential. White and pink pulp color fruits were collected in Cocula Gerrero which were evaluated in its bio-fiscal properties, percentage of mesocarp, exocarp, seeds and weight loss. Biochemical properties were quantified also, they consisted in the analysis of mineral composition, tritable acidity, SST and vitamin C loss. Pulp extracts were prepared and separated by column chromatography (CC), the fractions were monitored by (TLC), the fraction of interest were analyzed by spectroscopic technics of UV/Vis, IR, H-NMR, C13-NMR and ME. The antioxidant properties of the pulp and shell, were determinate by the quantification of total phenols and flavonoids and the antioxidant capacity by the assays DPPH, FRAP and ABTS. The bio-fiscal properties results did not show significant differences ($p < 0.05$). Potassium K (8.5 a 12.52 $\text{mg g}^{-1}_{\text{bs}}$) was the major macro-element and Iron Fe (34.73 a 45.00 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{bs}}$) was the major micro-element. The exocarp presented the highest content of total phenols and flavonoids 31.86-39.40 $\text{mg EAG g}^{-1}_{\text{bh}}$ and 16.71-17.63 $\text{mg EC g}^{-1}_{\text{bh}}$ respectively and the antioxidant capacity for the assays DPPH, ABTS y FRAP (416.51-482.83, 59.35-62.14 and 259.62-284.34 $\mu\text{mol ET g}^{-1}_{\text{bh}}$). From the methanol extract and methylene chloride it was isolated and identified: (+) Catechin and a mixture of β -sitosterol, stigmasterol y campesterol, fatty acids and glucosides. The results show that the Ilama's fruits contain a diversity of beneficial components for the health.

Key words: *Annona diversifolia*, mineral composition, photochemistry, nutraceutical properties

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, y en particular al Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad Fruticultura por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios y ampliar mis conocimientos.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico otorgado con la beca estudios de posgrado y tesis, sin su ayuda no habría podido terminar.

Al Dr. Alfredo López Jiménez por su disponibilidad en la dirección de este trabajo, además del apoyo brindado, por sus valiosas sugerencias en la investigación y la confianza para cumplir con los objetivos planteados.

Al Dr. Crescenciano Saucedo Veloz por sus conocimientos y participación en esta investigación, por todas las atenciones y facilidades otorgadas durante mi formación académica y trabajo de investigación.

Al Dr. Holber Zuleta Prada, por la disponibilidad para llevar a cabo esta investigación, por compartir sus valiosos conocimientos y dedicación, pero sobre todo por su valiosa amistad y motivarme a seguir adelante.

Al MC. David Jaén Contreras, por la disponibilidad en la revisión de este trabajo, por su valiosa ayuda en el laboratorio y su apreciable amistad.

Al laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola por el apoyo brindado y confianza para usar sus equipos, en especial Dra. Diana Guerra Ramírez y Dr. Benito Reyes Trejo.

Al Dr. Daniel Canseco y Dr. Jose Enrique Herbert Pucheta del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF) por sus apreciables aportaciones para la parte espectroscópica.

Al Dr. Marco Antonio Otero Sánchez por su disposición y ayuda para conseguir el material vegetal.

A mis compañeros del laboratorio de Productos Naturales (Martín, Sergio, Sebas y Néstor) por hacer de mi estancia un ambiente amigable.

A mis amigos y compañeros por todos los momentos que compartimos juntos y brindarme su valiosa amistad.

DEDICATORIAS

A mis padres (Erasto, Lucina y Ana Luisa) porque me han impulsado a seguir siempre adelante, su apoyo incondicional y confianza depositada en mí.

A mis hermanos (Juan, Carlos, Dzahui, Mali y Rafa) con quienes he compartido los dichosos momentos de mi vida, por todos los momentos de alegría y cariño.

A mi abuelita, que aunque ya no está físicamente siempre la llevó en mi corazón.

*A Esli por ser la razón principal de mi esfuerzo y superación, por todos los momentos que hemos compartido juntos, tu apoyo en cada momento y tu
confianza.*

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
1.2. Hipótesis.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Origen y distribución.....	4
2.2. Características del árbol.....	4
2.3. Fenología	7
2.4. Características y usos del fruto	7
2.5. Fitoquímica del género <i>Annona</i>	10
2.5.1. Fitoquímica de <i>Annona diversifolia</i> Saff	15
CAPÍTULO I. ANÁLISIS NUTRIMENTAL EN ILAMA (<i>Annona diversifolia</i> Saff): SUELO, HOJAS Y FRUTO.....	18
1.1 Resumen.....	18
1.2 Abstract	19
1.3 Introducción	20
1.4 Materiales y métodos	21
1.4.1 Material vegetal y sitio de colecta	21
1.4.2 Análisis de suelo.....	22
1.4.3 Análisis foliar	22
1.5 Resultados y discusión	24
1.5.1 Características químicas del suelo	24
1.5.2 Análisis nutrimental en hojas	27
1.5.3 Análisis nutrimental en fruto.....	30
1.6 Conclusiones	34
CAPÍTULO II. CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS Y BIOQUÍMICAS DE FRUTOS DE ILAMA (<i>Annona diversifolia</i> Saff), PULPA BLANCA Y ROSA.....	35
2.1 Resumen.....	35

2.2 Abstract	36
2.3 Introducción	37
2.4 Materiales y métodos	38
2.4.1 Material vegetal.....	38
2.4.2 Proporción de pulpa y cáscara	38
2.4.3 Pérdida de peso del fruto	38
2.4.4 Sólidos solubles totales y acidez titulable.....	39
2.4.5 Vitamina C	40
2.4.6 Análisis estadístico.....	40
2.5 Resultados y discusión	40
2.5.1 Proporción de pulpa y cáscara.....	40
2.5.2 Pérdida de peso.....	41
2.5.3 Sólidos solubles y acidez titulable	42
2.5.4 Vitamina C	44
2.6 Conclusiones	45
CAPITULO III. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS DE PULPA DE ILAMA (<i>Annona diversifolia</i> Saff)	46
3.1 Resumen.....	46
3.2 Abstract	47
3.3 Introducción	48
3.4 Materiales y métodos	49
3.4.1 Material vegetal.....	49
3.4.2 Reactivos y disolventes	50
3.4.3 Preparación del extracto de diclorometano.....	50
3.4.4 Preparación del extracto metanólico	50
3.4.5 Separación y purificación de metabolitos secundarios.....	51
3.4.6 Análisis por cromatografía en capa delgada.....	53
3.4.7 Separación por cromatografía flash preparativa automática.....	53
3.4.8 Análisis espectroscópico de los productos aislados	53
3.5 Resultados y discusión	53
3.5.1 Aislamiento y purificación de compuestos.....	53
3.5.2 Análisis espectroscópico y elucidación estructural de compuestos	54
3.5.2.1 Catequina (1)	54

3.5.2.2 Estigmasterol y Campesterol (2)	59
3.5.2.3 β -sitoesterol (3).....	62
3.5.2.4 Ergosterol (estructura cristalina) (4).....	64
3.5.2.4 Ácidos grasos (5)	67
3.6 Conclusiones	69
CAPÍTULO IV. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE ILAMA (<i>Annona diversifolia</i>) EN PULPA Y CÁSCARA	70
4.1 Resumen.....	70
4.2 Abstract	71
4.3 Introducción	72
4.4 Materiales y métodos	74
4.4.1 Material vegetal.....	74
4.4.2 Actividad antioxidante	74
4.4.3 Análisis estadístico	77
4.5 Resultados y discusión	78
4.5.1 Fenoles totales.....	78
4.5.2 Capacidad antioxidante	81
4.6 Conclusiones	82
CONCLUSIONES GENERALES	83
LITERATURA CITADA	84
ANEXOS	102

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Alcaloides descritos para algunas especies de <i>Annona</i>	14
Cuadro 2. Fertilidad del suelo en sitios con genotipos de ilama, cuyos frutos son de pulpa blanca, rosa y morada, en la localidad de el Machito de las Flores, Iguala, Guerrero.....	26
Cuadro 3. Concentración nutrimental en hojas de tres genotipos de ilama (<i>Annona diversifolia</i> Saff), diferenciados por su color de pulpa colectados en el sitio.	29
Cuadro 4. Concentración nutrimental en el exocarpio, mesocarpio y total de frutos de ilama (<i>Annona diversifolia</i> Saff) pulpa blanca y rosa, en estado de madurez comercial colectados en el sitio.	33
Cuadro 5. Proporción cáscara/pulpa/semillas, con base a peso del fruto.....	41
Cuadro 6. Pérdida de peso del fruto de ilama durante tres días de almacenamiento a 21 °C.....	42
Cuadro 7. Contenido de sólidos solubles totales en frutos de pulpa blanca y rosa durante tres días de almacenamiento a 21 °C.....	43
Cuadro 8. Acidez titulable (% ácido cítrico) en frutos de pulpa blanca y rosa durante tres días de almacenamiento a 21 °C.....	44
Cuadro 9. Pérdida de vitamina C (mg 100 g ⁻¹) del fruto de ilama durante tres días de almacenamiento a 21 °C.....	45
Cuadro 10. Datos de RMN 13C (100 MHz), para el compuesto 1 (F23-25).....	58
Cuadro 11. Desplazamiento químico (δ) y asignación de las principales señales de resonancia en el espectro de ¹ H RMN de la mezcla DOSI-F-6.....	69
Cuadro 12. Fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante en frutos de ilama por el color de pulpa y tejido.	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>Annona diversifolia</i> Saff, Municipio de Iguala, Guerrero. Fotografía del autor.....	5
Figura 2. Hojas (A), flor (B), fruto rosa (izquierda) y blanco (derecha) (C) y semillas (D) de <i>Annona diversifolia</i> Saff. Fotografía del autor.	6
Figura 3. Estructura química de squamocina.....	11
Figura 4. Estructura química de anonaina (a) y liriodenina (b).	12
Figura 5. Estructura de palmitona.	16
Figura 6. Ruta de obtención del extracto de diclorometano de <i>A. diversifolia</i>	50
Figura 7. Obtención del extracto metanólico de <i>A. diversifolia</i>	51
Figura 8. CCD del compuesto 1.....	55
Figura 9. Espectro de infrarrojo del compuesto 1.	55
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H del compuesto 1.	56
Figura 11. Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto 1.....	57
Figura 12. Estructura propuesta para el compuesto 1.....	59
Figura 13. CCD de la mezcla estigmasterol y campesterol.	59
Figura 14. Cromatograma de gases del sólido F25-36-C5.	60
Figura 15. Espectro de masas del estigmasterol.	61
Figura 16. Espectro de masas del campesterol.....	62
Figura 17. Espectro de infrarrojo del compuesto β-sitosterol.	63
Figura 18. Espectro de masas del β-sitosterol.....	64
Figura 19. Microscopia de los cristales de Ergosterol.	65
Figura 20. a) Estructura del Ergosterol, b) Proyección de los puentes de hidrógeno entre el agua y las moléculas del ergosterol, c) Proyección de la unidad mínima de celda unitaria del espectro de Difracción por Rayos X.	66
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H del compuesto F-6.	68
Figura 22. Espectro de RMN de ¹ H del aceite de oliva.	68
Figura 23. Proporción de contenido total de fenoles (CTF) y flavonoides totales (FT) en frutos de <i>A. diversifolia</i> por el color de pulpa y tejido.....	80
Figura 24. Comparaciones del contenido equivalente a TROLOX en frutos de ilama por el color de pulpa y tejido.	81

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCF	Cromatografía de columna flash
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfoxido
EM	Espectrometría de Masas
FTIR	Espectroscopía Infrarroja transformada de Fourier
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
ppm	Partes por millón; de desplazamiento químico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
(δ)	Desplazamiento químico

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La búsqueda de alimentos que, además de proporcionar nutrientes para el organismo aporten beneficios para la salud, presentan actualmente un importante incremento. Los frutos exóticos son un claro ejemplo, por lo que se han investigado sus posibles beneficios a la salud, así como fomentar su consumo. *Annona diversifolia* (ilama) es un árbol que se encuentra distribuido de forma silvestre en las orillas de los caminos o como cercas vivientes. Es autóctono de México conocido comúnmente como “ilama”, “ilama zapote”, “ilamazapotl” y “zapote de vieja” (Ruiz y Morett, 1997), se encuentra en los estados de Guerrero, Michoacán, Edo de México, Chiapas, Morelos Colima, Oaxaca y Yucatán.

La ilama produce un fruto muy apreciado por su pulpa comestible de textura suave y sabor agridulce; además de poseer un alto contenido de nutrientes, fitoquímicos y antioxidantes. Los frutos tienen alto potencial de comercialización debido a sus atributos antes mencionados y a la diversidad de colores de pulpa. Se consumen principalmente como fruta fresca, pero también se utilizan en productos semiprocesados y procesados; se comercializan en los mercados locales entre los meses de septiembre y octubre.

Una de las características de este fruto es que se cosecha una vez que se encuentra agrietado de la cáscara en la zona periduncular. Los frutos de esta especie se consideran una fuente de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y actividad antiradical (Julian-Loaeza *et al.*, 2011).

De la familia *Annonácea* se conocen numerosos metabolitos secundarios activos (MSA) con propiedades farmacológicas diversas: antitumorales, insecticidas, dopaminérgicos, antimaláricos, etc (Cortes *et al.*, 2014). Los compuestos bioactivos que predominan son acetogeninas seguidas de alcaloides, compuestos fenólicos y otros; también se han encontrado aceites esenciales y esteroides. La mayoría de los compuestos fitoquímicos se han identificado a partir de extractos orgánicos a partir de hojas, semillas y ramas que son los principales órganos de la planta que más se han estudiado, debido a que son los más utilizados en la medicina tradicional.

El creciente reconocimiento del valor nutricional de la ilama destaca la importancia de esta fruta como un complemento en la dieta alimentaria, así como para su aplicación en la industria. Estudios farmacológicos previos en extractos de hojas han reportado sus actividades ansiolíticas, antinociceptivas y anticonvulsivas, atribuidas a un metabolito activo no polar identificado como palmitona (González-Trujano *et al.*, 2006)

Dado que la composición nutricional y fitoquímica dependen del origen geográfico o las condiciones climáticas, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el contenido de los principales compuestos químicos con valor nutricional y nutraceútico de frutos de ilama con dos colores de pulpa y en estado de madurez comercial provenientes de plantas desarrolladas en el municipio de Cocula, Guerrero. y comparar los resultados con estudios previos en otras regiones.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Determinar el contenido de los principales compuestos químicos con valor nutricional y nutracéutico en frutos de ilama (*Annona diversifolia* Saff) cosechados en madurez de consumo.

1.1.2. Objetivos específicos

- 1). Conocer la composición de nutrientes en frutos de pulpa blanca y rosa.
- 2). Evaluar las características biofísicas, bioquímicas y fisiológicas en frutos de pulpa blanca y rosa en madurez de consumo.
- 3). Caracterizar los compuestos aislados de los extractos de ilama en frutos de pulpa blanca mediante técnicas espectroscópicas (UV-visivle, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR y EM).
- 4). Determinar las propiedades antioxidantes de frutos de pulpa blanca y rosa mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides totales y la capacidad antioxidante por los ensayos DPPH, FRAP y ABTS.

1.2. Hipótesis

H1: La concentración nutrimental, en frutos de pulpa blanca y rosa son similares.

H2: Las propiedades biofísicas y bioquímicas en frutos de pulpa blanca y rosa son similares.

H3: El contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante en frutos de *A. diversifolia* son similares en pulpa blanca y rosa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución

La mayoría de las especies del género *Annona* provienen de América del Sur y América Central; la región suroeste de México y Guatemala es el origen de la ilama (*A. diversifolia*) (Pinto *et al.*, 2005; Ferreira y Pinto, 2005; Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011). Es una especie subcaducifolia que desarrolla en regiones calurosas con alternancia de estación seca y húmeda (Morton, 1987; León, 1989). En México, se encuentra distribuida en regiones de trópico seco de Guerrero, Michoacán, Edo de México, Chiapas, Morelos Colima, Oaxaca y Yucatán, en altitudes de 250 a 1000 msnm (Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011). Se le conoce con nombres comunes como: ilama o “ilamatzápotl” en el Estado de México, “papausa” o “papause” en Chiapas; “ilama” o “ilama de Tehuantepec” en Oaxaca, y “cabeza de ilama” o “cabeza de negro” en Veracruz (Mahdeem, 1992).

La ilama o papausa está distribuida, principalmente, en forma silvestre y establecida en orillas de caminos y en menor grado en huertos de traspatio con plantas cultivadas a partir de semillas (Estrada y Marroquín-Andrade, 1995; Moreno-Velázquez *et al.*, 2008; Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011).

2.2. Características del árbol

Los árboles de ilama, son por lo general de porte bajo, con raíces pivotantes y ramificaciones desde la base del tallo, con una altura promedio de 4 metros, aun cuando pueden ser más altos (Figura 1). Además se caracterizan por tener un eje central dominante y ramificaciones desde la base (Ballesteros *et al.*, 2010).



Figura 1. Árbol de *Annona diversifolia* Saff, Municipio de Iguala, Guerrero. Fotografía del autor.

La raíz es de tipo pivotante, la cual permite a la planta una buena fijación a suelos con condiciones de marginalidad, aún en aquellos que presentan un alto grado de pedregrosidad, volviéndose por lo tanto plantas menos exigentes en cuanto a suelos, que otros cultivos comerciales (Napoleón-Irigoyen, 2004).

Presenta hojas elípticas a oblanceoladas, de 8 cm a 16 cm de largo, con el ápice redondeado (Figura 2a). En la base de las ramas jóvenes o de los pedúnculos florales hay brácteas circulares en forma de hojas de esta especie. Las flores salen del crecimiento nuevo, solitarias o en grupos de dos a tres; los pétalos externos, de color marrón, miden de 2.5 a 3 cm de largo (Figura 2b) (Andrés y Andrés, 2011).

En general, los frutos de *A. diversifolia* son ovoides elipsoidales, con la base hundida y los carpelos sobresalientes, aunque algunos más lisos; en el ápice de estos hay una protuberancia pequeña o “melón” como en ciertas chirimoyas (Figura 2c) (Andrés y Andrés, 2011). Se clasifican como frutos carnosos compuestos por múltiples bayas fusionadas asociadas a brácteas y axis floral, similar al de la

guanábana (*Annona muricata*) (Salunkhe, D. K. *et al.* 2000) y contiene numerosas semillas. La cáscara es gruesa y coriácea, de color verde a rojo cenizo, con apariencia polvosa, al igual que la parte inferior de las hojas (Napoleón-Irigoyen, 2004).

Las semillas son de forma cilíndrica alargada, con una longitud aproximada, que oscila de 1.5 a 2.5 cm, el grosor es de aproximadamente 1 cm. La semillas están cubiertas por una testa dura, poseen textura lisa, color café y brillante (Figura 2d) (Napoleón-Irigoyen, 2004).

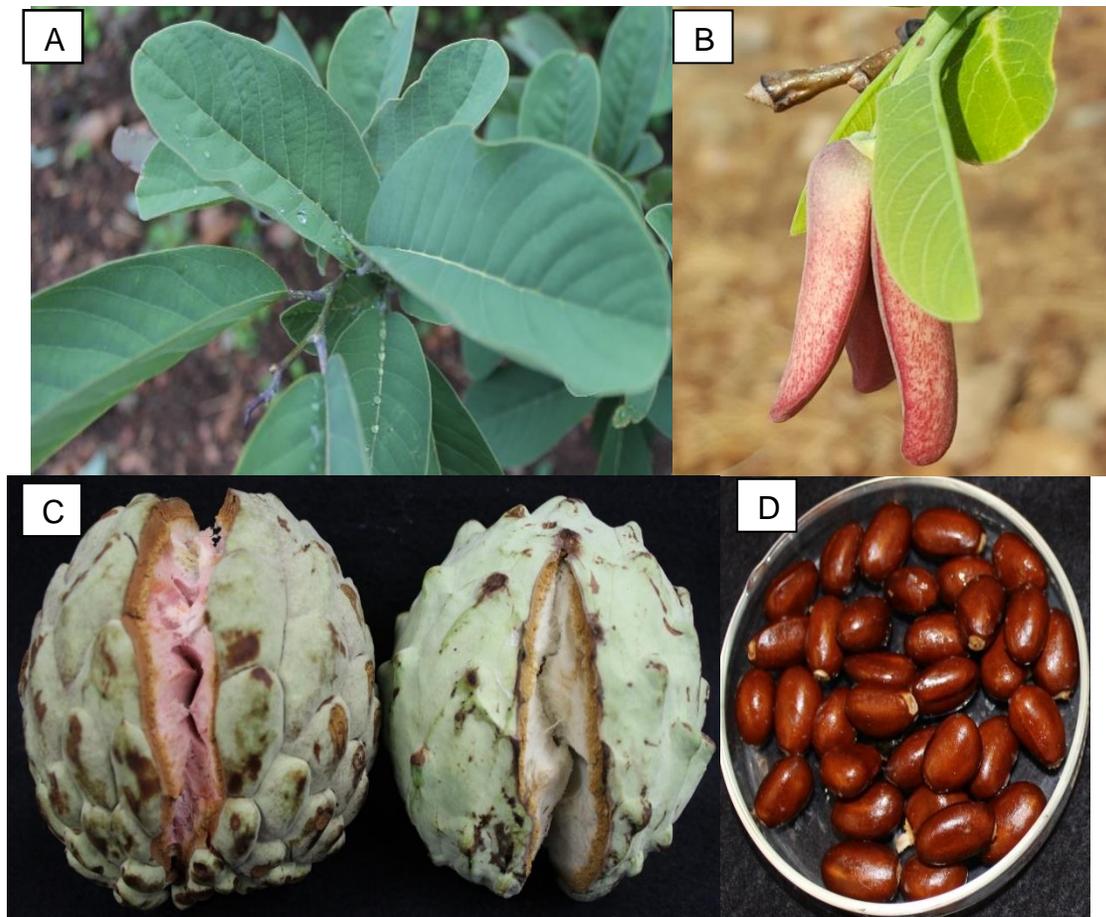


Figura 2. Hojas (A), flor (B), fruto rosa (izquierda) y blanco (derecha) (C) y semillas (D) de *Annona diversifolia* Saff. Fotografía del autor.

2.3. Fenología

La ilama es una especie sub-caducifolia con un ciclo de crecimiento anual discontinuo que comprende una etapa de crecimiento activo (crecimiento vegetativo, floración y fructificación) y otra etapa de letargo. La primera etapa coincide con la época de lluvias, con una mayor humedad ambiental y con altas temperaturas; mientras que la segunda etapa tiene lugar, en forma coincidente con la disminución de la humedad del suelo, así como con la temperatura (Otero-Sánchez, 2005).

2.4. Características y usos del fruto

El fruto de ilama tiene una longitud promedio de 12 centímetros (Napoleón-Irigoyen, 2004), son de pulpa color rosa, blanca (Figura 2c) (Pennington, 1968) y morada. Los frutos son cosechados una vez al año, cuando ocurre el agrietamiento de la base del pedúnculo, lo que de acuerdo con los productores coincide con la madurez de consumo (Moreno-Velázquez *et al.*, 2008; Julian-Loaeza *et al.*, 2011). De acuerdo con Cruz-Pineda (2002) el análisis bromatológico indica la siguiente composición:

Humedad	79.6 %
Proteínas	1.31 %
Grasa	0.01 %
Ceniza	1.26 %
Fibra cruda	0.97 %
Fósforo	300 ppm

Según Moreno-Velázquez (2006) durante el desarrollo de los frutos de ilama detectó concentraciones de etileno hasta los 99 días después de anthesis (DDA), al momento de la cosecha de 227.36 y 83.20 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ pulpa blanca y rosa, respectivamente. Asimismo Moreno-Velázquez (2006) determinó la producción de

etileno en tres estados de madurez encontrando tasas de producción de etileno elevadas de 402.3 a 515.2 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ en los frutos de pulpa blanca y concentraciones de 543 a 1260.4 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ en pulpa rosa a los 71, 85 y 99 DDA situando así a estos frutos en el grupo de alta producción de etileno con más de 100 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$.

La intensidad respiratoria en los frutos de ilama varía durante el desarrollo del fruto con producción de 117.6 y 127.7 mL de $\text{CO}_2 \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ en la fase I de su crecimiento, de 86.5 y 78.7 a los 78 DDA; y 91.1 76 mL de $\text{CO}_2 \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ a los 99 DDA (Moreno-Velázquez, 2006). Según Pareek *et al.* (2011) estos frutos pueden experimentar daño por frío y la temperatura mínima que resisten varía entre 7 y 15 °C en función de la especie,

La pulpa es suave y tiene un sabor agradable (Julian-Loeza *et al.*, 2011), presenta un aroma típico y su sabor puede variar de simple a dulce (Napoleón-Irigoyen, 2004). El fruto de ilama o papausa desarrolla peso entre 500 y 900 g y un promedio de 70 semillas por fruto (Cruz-Pineda, 2002). La pulpa, puede alcanzar hasta 50 % del peso de fruto, ostenta sabor y consistencia agradable al paladar (Moreno-Velázquez *et al.*, 2008; Julián-Loeza *et al.*, 2011).

Varios estudios han demostrado la alta correlación entre el consumo de frutas en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades (Park *et al.*, 2011). Además de agradable sabor y aroma las frutas exóticas son una fuente importante de compuestos bioactivos en la dieta humana, los más comunes son las vitaminas (C y E), carotenoides, compuestos fenólicos y fibra dietética (Cárdenas *et al.*, 2016). Por otra parte, el consumo de frutas exóticas está aumentando en los mercados nacionales e internacionales debido al creciente reconocimiento de su valor nutricional.

Los frutales de la familia *Annonaceae* son ricos en calorías, vitaminas y minerales, y están catalogados dentro de las frutas tropicales más deliciosas (Ballesteros *et al.*, 2010). En general, las annonas se consumen como frutas frescas, pero también se utilizan ampliamente en productos semiprocesados y procesados, especialmente

postres (bebidas, bases para helados, dulces, gelatinas, jaleas, entre otros). A medida que la demanda mundial de sabores exóticos y alimentos saludables se expande, es probable que el uso de frutas también se expanda (Cordeiro *et al.*, 2004). Estos frutos se caracterizan por su sabor y sus componentes nutritivos. Su valor alimenticio varía, pero la mayoría son abundantes en carbohidratos, proteínas, calcio, fósforo, hierro, tiamina, niacina y riboflavina, y algunos en magnesio, ácido ascórbico y caroteno (Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011).

Las frutas de *Annona* contienen una cantidad considerable de compuestos polifenólicos (Roesler *et al.*, 2006). Estos compuestos son antioxidantes y ayudan a prevenir enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer, la aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas (Steinmetz y Potter, 1996; La Vecchia *et al.*, 2001; Zibadi *et al.*, 2007). En el cuerpo, los radicales libres se derivan de dos fuentes: fuentes endógenas, por ejemplo el metabolismo de los nutrientes y el proceso de envejecimiento y las fuentes exógenas, ejemplo contaminación del aire ó ambientales y radiación solar (Lachance *et al.*, 2001).

Se han definido una serie de parámetros, como polifenoles totales, flavonoides totales, actividad de eliminación de radicales, capacidad antioxidante y actividad quelante de Fe^{2+} , para caracterizar la actividad antioxidante. Varios de estos parámetros se han determinado en algunas frutas, incluidos los miembros del género *Annona*; p.ej. *A. muricata* (Hassimotto *et al.*, 2005), *A. squamosa* (Yan *et al.*, 2006), *A. diversifolia* (Julián Loaeza *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que las especies de *Annona*, son en general una fuente rica de diferentes minerales importantes como K, Ca, Na, Cu, Fe y Mg (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Los frutos de *Annona diversifolia* son considerados una fuente importante de fibra, azúcares, potasio, zinc, y compuestos bioactivos con actividad antioxidante, tales como flavonoides (Julian-Loaeza *et al.*, 2011). Por lo que se sugiere que el consumo regular de frutos de *Annona diversifolia* puede ayudar a proporcionar nutrientes y elementos esenciales para el cuerpo humano.

Los frutos de ilama son de importancia económica, principalmente para las comunidades marginadas de Tierra Caliente en los Estados de Michoacán y Guerrero ya que cuando es temporada de cosecha (septiembre y octubre), algunas personas se dedican a su recolección para comercializarlas en los mercados regionales, además del autoconsumo (Ballesteros *et al.*, 2008).

Las plantas de la familia *Annonaceae* además de su consumo como frutas frescas (Cordeiro *et al.*, 2005) también se utilizan en la medicina tradicional (Egydio *et al.*, 2017). Algunas especies de *Annona* se emplean para el tratamiento de diferentes enfermedades, se ha demostrado que las hojas de estas plantas poseen propiedades analgésicas, anticonvulsivas y tranquilizantes (Carballo *et al.*, 2010; Gozález-Trujano *et al.*, 2006). Se han estudiado tres especies de este género en investigaciones preclínicas, *Annona chirimolla*, *Annona diversifolia* y *Annona purpúrea* Moc. & Sessé ex Dunal (López-Ruvalcava & Estrada-Camarena, 2016). Los frutos de chirimoya han sido utilizados como antimicrobianos e insecticidas y como tratamiento para trastornos digestivos y enfermedades de la piel (Amoo *et al.*, 2008).

2.5. Fitoquímica del género *Annona*

Varios estudios han caracterizado la actividad farmacológica de estas plantas debido a sus compuestos bioactivos (principalmente acetogeninas, flavonoides y alcaloides) los cuales se encuentran en las raíces, las hojas, la corteza, las semillas y la fruta. Dado su efecto citotóxico, algunos de estos compuestos son agentes potenciales contra el cáncer (Chang *et al.*, 1993; Cortés *et al.*, 1993). Se han descrito otras actividades para plantas pertenecientes a este género, como: cardiotónicos (Wagner *et al.*, 1980), insecticida (Sookvanichsilp *et al.*, 1994), antiparasitario (Pimenta *et al.*, 2003), anticonvulsivantes (N'Gouemo *et al.*, 1997; González-Trujano *et al.*, 1998, 2001, 2006) y actividad ansiolítica (López-Ruvalcava *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha destacado su potencial biotecnológico dado que poseen compuestos con actividad antitumoral, antihelmíntica, antimalaria, antiprotozoaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica e inmunodepresiva, asociadas a compuestos de interés entre los que destacan los alcaloides benzilisoquinolínicos y las acetogeninas (González-Esquinca *et al.*, 2011).

Las acetogeninas son metabolitos secundarios derivados de los ácidos grasos en la ruta de los policétidos (Moghadamtousi *et al.*, 2015), se caracterizan por presentar una cadena de 32 o 34 átomos de Carbono con varias funciones oxigenadas y una γ -lactona terminal (Zeng *et al.*, 1996; Cabedo *et al.*, 2011). Su origen biogenético es similar al de los ácidos grasos. En los últimos años, se ha llevado a cabo una serie de estudios que han permitido postular la forma en que las ACG interaccionan con el complejo I (Cabedo *et al.*, 2011). Para conocer mejor que parte de la molécula interacciona con dicho complejo, la estructura de la ACG se ha dividido en cuatro zonas: a) dominio lactónico terminal, b) dominio espaciador (cadena hidrocarbonada entre lactona y los anillos THF), c) dominio polioxigenado (sistema THF), y d) dominio hidrofóbico terminal (Figura 3).

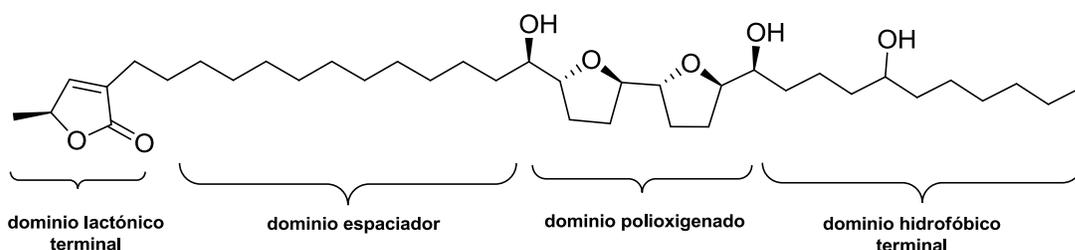


Figura 3. Estructura química de squamocina.

Las ACG exhiben una amplia gama de propiedades biológicas, como agentes terapéuticos contra el cáncer debido a sus efectos citotóxicos (Chang *et al.*, 1993; Cortés *et al.*, 1993), además de propiedades pesticidas, antiparasitarias, antimicrobianas e inmunosupresoras (Bermejo *et al.*, 2005). Las primeras

acetogeninas aisladas del género *Annona* fueron en *atemoya*, *A. coriacea*, *A. Crassiflora*, *A. glauca*, *Asimonia longifolia* y *Uvaria tonkinesis* (Zeng *et al.*, 1996).

Los flavonoides presentes en semillas, raíces, corteza, tallos y frutos son posibles agentes quimiopreventivos, dada la evidencia de que disminuyen la incidencia de tumores (Cordeiro *et al.*, 2004).

Esta familia es considerada una fuente rica de alcaloides de isoquinolina, particularmente aporfínicos (Rabêlo *et al.*, 2014) como anonaina y lirioidenina (Figura 4) (Bermejo *et al.*, 2005) siendo esta última el más abundante (De la Cruz *et al.*, 2011). De la Cruz *et al.*, (2011) estudiaron la producción de lirioidenina y encontraron que la biosíntesis ocurre durante las etapas imbibición, germinación etapa de plántula concluyendo así que este alcaloide está asociado con los procesos de desarrollo en *A. diversifolia*. La diversidad estructural de los alcaloides de isoquinolina es tan amplia como el rango de sus actividades biológicas. Pueden usarse como antimicrobianos (Simeón *et al.*, 1990), citotóxicos (Wu *et al.*, 1993), antitumorales (Sonnet y Jacobson, 1971), antiprotozoarios (Tempone *et al.*, 2005), antiviral (Montanha *et al.*, 1995) además de muchas otras aplicaciones, como actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (Abbasoglu *et al.*, 1991; Paulo *et al.*, 1992; Rinaldi *et al.*, 2017).

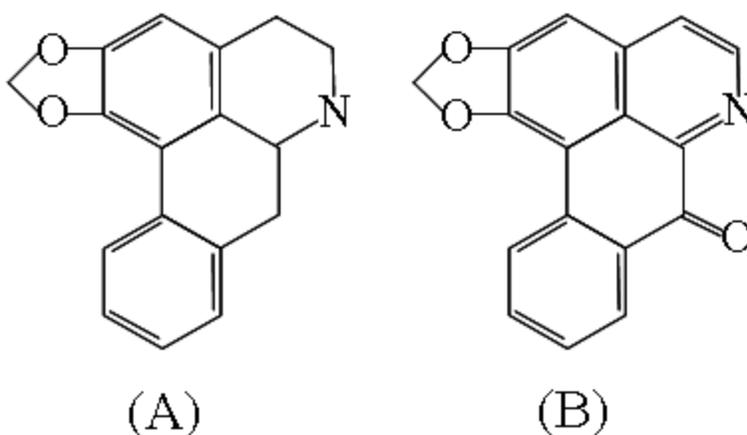


Figura 4. Estructura química de anonaina (a) y lirioidenina (b).

Existe una gran cantidad de alcaloides que se han identificado en diferentes partes de plantas del género *Annona*, incluyendo frutos, hojas, ramas, tallos, cortezas, raíces y semillas. Se han reportado 70 alcaloides de 20 especies con alguna actividad biológica. La mayoría de ellos son derivados de bencilisoquinolinas, sin embargo se ha observado una amplia variación en la composición de alcaloides de especies de *Annona* a través de las partes de las plantas, las semillas y las raíces son fuentes importantes de alcaloides poco comunes en este género (Egydio *et al.*, 2017). En el Cuadro 1 se presentan algunos alcaloides presentes en especies del género *Annona*.

Cuadro 1. Alcaloides descritos para algunas especies de *Annona*.

Especie	Parte	Alcaloide	Referencia
<i>A. cherimola</i> Mill.	Hojas	anonaine liriodenine nornuciferine 1,2-dimethoxy-5,6,6a,7-tetrahydro-4h-dibenzoquinoline-3,8,9,10-tetraol	Rabêlo <i>et al.</i> , 2015
	Raíces	corytenchine isocoreximine	Martínez <i>et al.</i> , 2005
<i>A. diversifolia</i> Saff.	Embriones, radículas y raíces en etapa de desarrollo	liriodenine	Da Cruz <i>et al.</i> , 2011 De la Cruz <i>et al.</i> , 2012
	Semillas	liriodenine	Campos <i>et al.</i> , 2008
<i>A. muricata</i> L.	Hojas	anonaine annonamine asimilobine coclaurine isoboldine isolaureline liriodenine N-methylcoclaurine norcorydine O-dimethylcoclaurine O-methylcoclaurine remerine xylopine	Vendramin <i>et al.</i> , 2013 De Castro <i>et al.</i> , 2016 Fofana <i>et al.</i> , 2013 Coria <i>et al.</i> , 2016
<i>A. reticulata</i> L.	Hojas	lanuginosine liriodenine lysicamine	Nakano <i>et al.</i> , 2011
<i>A. squamosa</i> L.	Hojas	annonaine corydine lanuginosine liriodenine lysicamine N-methylcoclaurine oxophoebine O-methylarmepavine reticuline roemerine	Magadula <i>et al.</i> , 2009 Vendramin <i>et al.</i> , 2013 Dholvitayakhun <i>et al.</i> , 2013 Nakano <i>et al.</i> , 2013 Baskar <i>et al.</i> , 2007 Lebrini <i>et al.</i> , 2010
	Ramillas	anomuricine isocorydine lanuginosine N-methylcorydaldine O-methylarmepavine	Vila <i>et al.</i> , 2003 Soni <i>et al.</i> , 2012
	Corteza	N-nitrosoxylopine norlaureline roemerolidine	Rabêlo <i>et al.</i> , 2015

Fuente: Bermejo *et al.*, 2017.

Una gran diversidad de metabolitos secundarios se han aislado de diferentes especies del género *Annona*, entre los cuales destacan la presencia de acetogeninas, diterpenos y flavonoides aislados de corteza, hojas, frutos y semillas de *Annonaceae* (Leboeuf *et al.*, 1980; Santos *et al.*, 2000). Los cuales están relacionados con las actividades biológicas descritas para esta familia, como antiprotozoario (Tempone *et al.*, 2005) o citotóxico (Mahmound *et al.*, 2011). Sin embargo, una de las características más importantes de las *Annonaceae* es la presencia de alcaloides (Cavé A., 1985), principalmente bencilisoquinolinas. Esta clase de alcaloides es la segunda más abundante encontrada en el género *Annona* (Egydio *et al.*, 2017).

Rinaldi *et al.*, (2017) aislaron en extractos de tallos de *A. hypoglauca* cuatro alcaloides aporfínicos: isoboldina, nornuciferina, anonaina y actinodafina. Además mostraron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, y un efecto letal contra cáncer de mama y colon.

Annona muricata se le han atribuido una amplia gama de actividades etnomedicinales como anticancerígenas, anticonvulsivas, antiartríticas, antiparasitarias, antimalaria, hepatoprotectoras y antidiabéticas. Los estudios fitoquímicos revelan que las acetogeninas son los principales constituyentes de esta especie (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Otros estudios en diferentes partes de la planta de *Annona muricata* han demostrado la presencia de varios compuestos entre los que destacan alcaloides, flavonoles triglicósidos, megastigmanos, compuestos fenólicos, ciclopéptidos, y aceites esenciales (Moghadamtousi *et al.*, 2015).

2.5.1. Fitoquímica de *Annona diversifolia* Saff

Las hojas de *A. diversifolia* se emplean como anticonvulsionantes y analgésicos, así como también como un agente antiinflamatorio en la medicina tradicional mexicana (Estrada, 1985; 1994). Las propiedades anticonvulsivas de esta especie se han demostrado en estudios previos (González-Trujano *et al.*, 1998, 2001, 2006).

Diversos compuestos químicos se han aislado de distintas partes de la planta de *A. diversifolia*, palmitona, β -sitosterol, β -cariofileno, β -selinene, α -cubebeno y linalool. De los cuales β -sitosterol ha demostrado actividad ansiolítica o antidepresiva en modelos animales (Chattopadhyay *et al.*, 2003), mientras que la palmitona posee efectos antinociceptivos, anticonvulsivos o antioxidantes (González-Trujano *et al.*, 2006a; López-Ruvalcava *et al.*, 2006).

Schlie-Guzmán *et al.* (2009) aislaron dos acetogeninas la herradurina y cherimolina de las semillas de *A. diversifolia* y evaluaron su actividad citotóxica en cultivos celulares, demostrando así su efecto antitumoral.

En estudios previos se ha demostrado la actividad anticonvulsiva y antidepresiva en el sistema nervioso central (SNC) del extracto etanólico de hojas de *A. diversifolia* (González-Trujano *et al.*, 1988). González-Trujano *et al.* (2001) aislaron e identificaron a la palmitona (Figura 5) demostrando que el único compuesto activo anticonvulsivo del extracto etanólico de las hojas de *A. diversifolia*. Siendo el primer ejemplo de una cetona alifática con propiedades anticonvulsivas que podría representar un nuevo fármaco antiepiléptico de origen natural.

La palmitona es un metabolito secundario de origen policetídeo previamente aislado de *Corynebacterium diphtheriae* (Pudles, 1954) y varias fuentes como *Lindera umbellata* (Hayashi y Komae, 1971), *Neolitsea sericea* (Komae y Hayashi, 1971) y *Annona squamosa* (Behari y Sharma, 1971), entre otras.

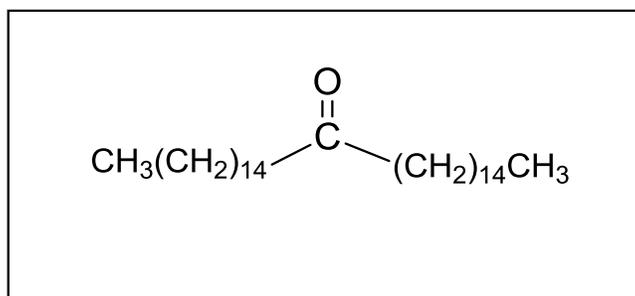


Figura 5. Estructura de palmitona.

Las plantas del género *Annona* son una buena fuente para la extracción de compuestos con varias actividades farmacológicas, incluido el SNC. El extracto

etanólico de hojas *A. diversifolia* (Carballo *et al.*, 2010). González-Trujano *et al.* (2006a) demostraron que la palmitona de *A. diversifolia* además de poseer propiedades antiepilépticas también tiene efectos ansiolíticos.

La palmitona produjo una respuesta antinociceptiva, por lo que se evidencia que *A. diversifolia* posee actividad antinociceptiva, dando soporte a su uso tradicional para el tratamiento del dolor espasmódico y artrítico (Carballo *et al.*, 2010).

En *Annona diversifolia* se han aislado de raíces y semillas un alcaloide liriodenina, el cual ha demostrado bioactividad como antioxidante (Costa *et al.*, 2013), antimicrobiano (Costa *et al.*, 2013), antifúngico (da Cruz *et al.*, 2011) y efecto antiproliferativo de células T infectadas con HTLV-1 (Nakano *et al.*, 2013).

CAPÍTULO I. ANÁLISIS NUTRIMENTAL EN ILAMA (*Annona diversifolia* Saff): SUELO, HOJAS Y FRUTO

1.1 Resumen

Annona diversifolia es una anonácea originaria de México y Centroamérica, es de las mejores frutas de los trópicos bajos y secos (Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011). En el presente estudio se realizó en árboles de ilama de tres colores de pulpa, se hicieron análisis de suelo y foliar para determinar las características químicas del suelo y el estado nutricional de los árboles. Así mismo en frutos de pulpa color blanca y rosa se realizó un análisis mineral en estado de madurez de consumo. Se obtuvieron muestras de suelo de 0 a 30 cm, las cuales se les determinó la composición química (pH, CE, MO, P, K, Ca, Mg, Na, N, Fe, Cu, Zn, Mn y B). Las muestras foliares se les determinó el estado nutricional (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B). La composición mineral consistió en la determinación de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B. El objetivo fue comparar aspectos nutricionales entre los diferentes genotipos. El contenido de materia orgánica fue alto y el pH neutro en las tres muestras. Los valores nutricionales químicos en los macroelementos en las tres muestras se observaron comportamientos similares, deficiencias en potasio y excesos de calcio y nitrógeno. En cuanto a los microelementos estos fueron variables en las tres muestras de muy altos a moderadamente bajos. Los valores del análisis foliar en la concentración de macroelementos fueron adecuados, deficientes y altos. Los microelementos fueron adecuados y deficientes en las tres muestras de tejido. La composición mineral de los frutos de *Annona diversifolia* el macroelemento que se encontró en mayor proporción fue el potasio tanto en exocarpio como mesocarpio con valores de 8.53 – 12.52 mg g⁻¹ 13.92 – 14.12 mg g⁻¹ respectivamente en frutos color pulpa blanca y rosa. En los microelementos el mineral encontrado en mayor proporción fué el hierro en exocarpio y mesocarpio con valores de 45.31 – 55.41 mg kg⁻¹ y 34.73 – 45.00 mg kg⁻¹ en los dos colores de pulpa.

Palabras clave: Contenido nutricional, macroelementos, microelementos,

1.2 Abstract

Annona diversifolia is an ananacea from Mexico and central America, is one of the best fruits from the dry and low tropics (Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011). The present work was done in ilama's trees of three colors of pulp, analysis of soil and foliar were done for determinate the chemical characteristic of the soil and the nutrimental state of the trees. Likewise, mineral analysis in the state of consume maturity was done in the fruits of white and pink pulp. Samples of soil were taken from 0 to 30 cm, from which were determinate the chemical composition (pH, CE, MO, P, K, Ca, Mg, Na, Nt, Fe, Cu, Zn, Mn and B). Nutrimental state was determinate for foliar samples (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn and B). The mineral composition consisted to measure; N, P, K, Ca, Mg Fe, Cu, Zn, Mn and B. The purpose was to compare nutritional aspects among the different genotypes. The amount of organic material was high and neutral pH in the three samples. The chemical nutrimental values in macroelements behaved similarly for the three samples, differences in potassium and excess of calcium and nitrogen. For the microelements, these were variables in the three samples from very high to moderately low. The foliar analysis values in macroelements concentration, were adequate, deficient and high. The microelements were adequate and deficient for each of the three tissue samples. For the mineral composition of the fruit of *Annona diversifolia* potassium was found in high concentration in exocarp as in mesocarp with values from 8.53 – 12.52 mg g⁻¹ 13.92 – 14.12 mg g⁻¹ respectively in fruit of white and pink pulp. The highest concentration in microelements was for iron in exocarp and mesocarp with values 45.31 – 55.41 mg kg⁻¹ and 34.73 – 45.00 mg kg⁻¹ in both pulp color.

Key words: Nutrimental content, macroelements, microelements.

1.3 Introducción

En México existen muchas regiones tropicales donde se distribuyen las especies de las Annonaceas (Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011). Esta familia ha sido poco explorada, la cual tiene potencial para ampliar sus usos como cultivos alternativos a frutales que han perdido rentabilidad. (Hernández-Fuentes *et al.*, 2016).

Algunas especies de anonas (*A. cherimola*, *A. muricata*, *A. squamosa*) son las que se han sometido a cultivo comercial en México y en otras partes del mundo con prácticas agronómicas tales como germinación de semillas, injertación, podas, polinización artificial, fertilización química y orgánica, riegos, control de plagas y enfermedades (Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011).

La nutrición de los árboles de ilama es uno de los factores más importante para aumentar la productividad y al mismo tiempo mejorar la calidad de los frutos. Sin embargo en las zonas productoras del país no se realiza esta práctica, produciéndose de forma silvestre.

Existen pocos trabajos de investigación sobre la nutrición de las Annonaceas. Vidal-Hernández *et al.* (2014), en Veracruz, México encontró que las plantas de guanábana que de la composición química del suelo, donde se encontró que los macroelementos estuvieron muy altos; N: 2.1 %; P: 1.3 %; K: 18.1 %; Ca: 51.5 % y Mg: 57.0 %. Y el contenido de los microelementos fueron adecuados Fe: 17.7 mg kg⁻¹; Cu: 1.4 mg kg⁻¹; Zn: 2.1 mg kg⁻¹ y Mn: 19.7 mg kg⁻¹. Estos mismos autores realizaron análisis foliar donde obtuvieron concentraciones de macroelemento adecuadas; N: 1.74 %; P: 0.02 %; K: 1.59 %; Ca: 2.62 % y Mg: 0.020 % y concentraciones de microelementos deficientes; Cu: 2.6 mg kg⁻¹ y altos en Fe: 149 mg kg⁻¹; Mn: 57.5 mg kg⁻¹ adecuados y altos en Zinc: 381 mg kg⁻¹. Por su parte Otero-Sánchez (2005) realizó un análisis foliar en árboles de ilama, donde pudo detectar concentraciones de macroelementos como N: 12 a 24.3 mg g⁻¹_{ps}; P: 0.53 a 1.17 mg g⁻¹_{ps}; K: 7.34 a 11.76 mg g⁻¹_{ps}; Ca: 7.34 a 11.76 mg g⁻¹_{ps}; Mg: 2.1 a 3.8 mg g⁻¹_{ps} y microelementos como Mn: 65 a 143 µg g⁻¹ Zn: 14.3 a 21.7 µg g⁻¹ y B: 39 a 44 µg g⁻¹. En dicho trabajo no se determinó los elementos Fe y Cu como en el actual trabajo.

En cuanto a la composición nutrimental se tienen poca información sobre la composición mineral en frutos de ilama Julian-Loaeza et al. (2011) reportaron la composición nutrimental en pulpa de frutos de *A. diversifolia* de Chiapas. El estudio incluyó los tres colores de pulpa; y fue determinada la concentración de Ca, Mg, Na, K y Zn, encontrando valores de 0.86 – 22.93, 8.0 – 14.01, 2.15 – 3.18, 335 – 335.95 y 0.10 – 0.15 mg 100g⁻¹ respectivamente. Estudios más completos sobre la composición nutrimental se han realizado en otras especies por ejemplo: en mesocarpio de frutos de atemoya se han determinado Ca, Na, K, Fe, Zn, Cu, Pb y Cd (Dos Santos et al., 2016) y en *A. muricata* L. minerales como: K, Na, Fe, Mn, Cu, Zn, Ca y Mg tanto mesocarpio como en exocarpio (Hernández et al., 2018).

El objetivo de este estudio fue determinar la concentración nutrimental en muestras de suelo, hojas y frutos de *Annona diversifolia* colectados en el Machito de las Flores, Cocula, Guerrero, y determinar si existe diferencias entre los genotipos utilizados.

1.4 Materiales y métodos

El estudio se realizó a partir de julio de 2017 con la colecta de suelo y hojas, mientras que los frutos se obtuvieron en octubre del mismo año.

1.4.1 Material vegetal y sitio de colecta

Se estudiaron tres variedades de ilama diferenciadas por el color de pulpa de sus frutos, blanca, rosa y morada, las cuales son cultivadas en traspatio en la comunidad de el Machito de las Flores, Municipio de Cocula, Estado de Guerrero, ubicado geográficamente a una altitud de 630 m y coordenadas 18° 20' N y 99° 28' O. La temperatura media anual es de 25.7 °C, con precipitación de 132.1 mm, humedad relativa de 65.7 % y humedad de suelo de 0.2 % (Estación Meteorológica 2017-2018, CEP-CSAEGRO).

1.4.2 Análisis de suelo

Para conocer el medio químico del suelo donde se cultivan las tres variedades de ilama seleccionadas se colectaron tres muestras suelo en la zona de goteo de los árboles a una profundidad de 0 a 30 cm, y se trajeron al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. La preparación de las muestras consistió en: secado, molido y tamizado del suelo para el análisis de fertilidad, se determinó: pH por potenciometría (relación suelo-agua 1:2), conductividad eléctrica (C. E.), materia orgánica por combustión húmeda por el método Walkley y Black (Jackson, 1976). La concentración de N se determinó por el método Kjeldahl. La determinación de fósforo fue por el método Olsen (CSTPA, 1980). Para las bases intercambiables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+) se empleó acetato de amonio 1N, pH 7.0 para su extracción; Ca y Mg se determinó por espectroscopía de absorción atómica, K y Na por emisión atómica. En cuanto a los micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu) se utilizó DTPA (ácido del dietilen-triamino-pentaacético) para su extracción y se determinó por espectroscopía por absorción atómica. La cuantificación de boro fue con una solución de Azometina-h.

1.4.3 Análisis foliar

El análisis foliar se realizó en las tres variedades, para ello se realizó un muestreo hojas en los cuatro puntos cardinales, en cada punto cardinal se seleccionaron 10 hojas adultas de la parte media del brote del año. Una vez colectadas fueron transportadas en refrigeración al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo La preparación previa al análisis consistió en lavar con agua destilada las hojas posteriormente fueron secadas utilizando una estufa de convección (Imperial V Mechanical and gravity convention ovens Dubuque Iowa, EUA) por 72 h a 70 °C, enseguida se molieron en un molino de acero inoxidable (General Electric Modelo AC 160, EUA).

Para la determinación de N se pesaron muestras de 0.1 g de tejido seco y se colocaron en tubos de digestión, se sometieron a digestión húmeda agregando 3 mL de una mezcla de ácido sulfúrico:salicílico ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$) más catalizadores y combustión a 400 °C durante 3 h. Para los elementos P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn

y B se tomaron muestras de 0.5 g de tejido seco adicionándoles una mezcla de ácidos nítrico:perclórico ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$) (4:2, v/v). Después de la digestión, las muestras se aforaron a 25 mL con agua desionizada y se filtraron. La concentración de N se determinó por el método micro-Kjeldahl. Para la determinación de los demás elementos se realizó por espectrometría de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES Varian 725ES, Australia).

1.4.4 Análisis de fruto

Para la determinación de la concentración nutrimental del fruto, se analizaron solamente frutos de pulpa blanca y rosa ya que no hubo suficientes frutos de pulpa morada para los análisis proyectados. Los frutos se cosecharon en estado de madurez comercial, cuando ocurre el agrietamiento de los mismos. El análisis se realizó en tres frutos para cada color de pulpa; de cada uno de estos se separó la cáscara (exocarpio) y pulpa (mesocarpio) y se secaron utilizando una estufa de convección (Imperial V Mechanical and gravity convention ovens Dubuque Iowa, EUA) 72 h a 70°C, posteriormente se molieron en un molino de acero inoxidable (General Electric Modelo AC 160, EUA).

Se tomaron muestras de 0.25 g de tejido seco en tubos de digestión, se sometieron a digestión húmeda adicionando 2 mL de una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HClO}_4$ y 1 mL de H_2O_2 a 400 °C durante 3 h. Después de la digestión, las muestras se aforaron a 25 mL con agua desionizada y se filtró. La concentración de N se determinó por el método micro-Kjeldahl. El resto de los elementos se determinó mediante un equipo de espectrometría de emisión atómica de inducción de plasma acoplado (ICP-OES Varian 725ES, Australia).

1.4.5 Análisis estadístico

Los análisis foliar y nutrimental en frutos se realizaron por triplicado usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias empleando la prueba Tukey con un nivel de confiabilidad $p \leq 0.05$. El análisis de los datos se realizó con el paquete

estadístico Statgraphics versión plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

1.5 Resultados y discusión

1.5.1 Características químicas del suelo

La química del suelo representa una conexión esencial entre las consideraciones sobre la fertilidad, comprende aspectos de la química de soluciones y de la química de fase sólidas (minerales) (Thompson y Troeh, 1988). Un análisis de suelo es una guía que describe la disponibilidad de nutrientes y el potencial de absorción por un cultivo.

Para interpretar los atributos químicos evaluados se usó la información propuesta por Castellanos *et al.* (2000). Los suelos de la región de los tres colores de pulpa son neutros (6.9 a 7.2) (Cuadro 1) de acuerdo a la NOM- 021-SEMARNAT-2000, la neutralidad es una condición adecuada para la asimilación de los nutrientes y para el desarrollo de las plantas. Los valores de C.E. son <2 en las tres variedades, es decir con efectos despreciables de la salinidad según la NOM- 021-SEMARNAT-2000. El contenido de materia orgánica se encuentra en un intervalo de 7.1 (suelo para el genotipo con frutos de pulpa blanca) a 9.9 % (suelo del genotipo con frutos de pulpa morada) el cual es muy alto en los tres casos. El nivel de fósforo en el suelo para el genotipo cuyos frutos son de pulpa blanca (14 ppm) es moderadamente bajo, el rosa (16 ppm) es medio y el morado (24 ppm) es moderadamente alto. El potasio en los tres casos es muy bajo (<100 ppm), las deficiencias de potasio son tan comunes que se considera uno de los tres principales elementos fertilizantes (Thompson y Troeh, 1988).

El contenido de calcio en suelo es moderadamente (>4500 ppm) para los tres tipos de pulpa, mientras que los contenidos de magnesio para los tres colores de pulpa estuvo en un intervalo de medio, encontrándose en un rango de 200 a 400 ppm y los contenidos de sodio en las tres muestras fueron muy bajos.

El contenido de nitrógeno presente en las tres muestras de suelo fue muy alto (>0.25) de acuerdo a la NOM- 021-SEMARNAT-2000. El hierro en el color morado y rosa (10 ppm) es medio y para el caso del blanco (13 ppm) es moderadamente alto. El contenido de cobre en los tres casos es alto (1.8 a 2.5 ppm). El zinc es moderadamente bajo para el blanco (1.2 ppm) y el rosa (1.0 ppm) y para el morado es moderadamente alto (3.8 ppm). El manganeso en el morado es moderadamente alto (22 ppm) y para el blanco y rosa es alto (30 y 27 ppm). Y el boro para el blanco y rosa (0.6 ppm) es bajo y para el morado (1.5 ppm) es moderadamente alto.

Cuadro 2. Fertilidad del suelo en sitios con genotipos de ilama, cuyos frutos son de pulpa blanca, rosa y morada, en la localidad de el Machito de las Flores, Iguala, Guerrero.

Suelo/Varietalidad de pulpa	pH	CE	M.O.	P	K	Ca	Mg	Na	N	Fe	Cu	Zn	Mn	B
	1:2 H ₂ O	(dS m ⁻¹)	(%)	(ppm)			%			ppm				
Blanca	6.9 (Ne)	0.8 (MuB)	7.1 (MA)	14 (MoB)	0.9 (MuB)	10740 (MA)	226 (M)	0.2 (MuB)	0.5 (MuA)	13 (MA)	2.3 (A)	1.2 (MoB)	30 (A)	0.6 (B)
Rosa	7.2 (Ne)	0.3 (MuB)	8.0 (MA)	16 (M)	1.0 (MuB)	11780 (MA)	287 (M)	0.2 (MuB)	0.4 (MuA)	10 (M)	2.5 (A)	1.0 (MoB)	27 (A)	0.6 (B)
Morada	7.0 (Ne)	0.5 (MuB)	9.9 (MA)	24 (MA)	3.3 (MuB)	10 680 (MA)	321.6 (M)	0.6 (MuB)	0.5 (MuA)	10 (M)	2.1 (A)	3.8 (MA)	22 (MA)	1.5 (MA)

Ne = neutro; MuB = muy bajo; B = bajo; MoB = moderadamente bajo; M = moderado; A = alto y MA = moderadamente alto.

1.5.2 Análisis nutrimental en hojas

En el Cuadro 2 se muestran los promedios de concentración nutrimental en hojas de los tres genotipos de ilama, donde se observa contenidos de nitrógeno entre 23.0 y 28.0 mg g⁻¹_{ps} sin diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Otero-Sánchez (2005) encontró valores de 12.0 a 24.3 mg g⁻¹_{ps} en ilama. Los valores críticos para atemoya en Australia (Paul & Duarte, 2011) una de las annonáceas se encuentra en un rango de 25 a 30 mg g⁻¹, lo cual indica que los resultados encontrados se encuentran dentro del rango.

El intervalo de concentración de fósforo fue de 1.1 a 1.5 mg g⁻¹_{ps} no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), resultaron altos al compararlos con los valores de Otero-Sánchez (2005), quien menciona valores de 0.53 a 1.17 mg g⁻¹_{ps}. Los resultados indican que este elemento se detectó en cantidades bajas respecto a los valores críticos para atemoya (1.6 a 2.0 mg g⁻¹) (Paul & Duarte, 2011).

Las concentraciones de potasio variaron de 1.5 y 4.1 mg g⁻¹_{ps} con diferencia significativa ($p \leq 0.05$), siendo el color rosa y morada los superiores, y se consideran bajas de acuerdo a Otero-Sánchez (2005). Los valores en ilama fluctúan entre 7.34 - 11.76 mg g⁻¹_{ps}, así mismo las cantidades de potasio fueron inferiores a los valores críticos para atemoya (10.0 a 15.0 mg g⁻¹) (Paul & Duarte, 2011). Los árboles analizados muestran una asimilación baja de potasio, este debido a la falta de fertilización.

El intervalo de concentración de calcio fue de 14.0 - 18 mg g⁻¹_{ps} sin diferencia significativa, mientras que Otero-Sánchez (2005) reporta valores de 7.34 - 11.76 mg g⁻¹_{ps}. Los valores críticos para atemoya son de 6 - 10 mg g⁻¹ (Paul & Duarte, 2011). Por lo que se puede decir que la concentración de calcio es superior al rango aceptable, y se tiene un exceso de calcio en los tres genotipos. El calcio es un elemento estructural en la planta ya que constituye la lámina media, las paredes y membranas de la célula y, además, participa en la división y extensión celular (Díaz *et al.*, 2007).

La concentración de magnesio se encontró entre 2.0 y 2.4 mg g⁻¹_{ps} sin diferencia significativa entre los diferentes colores de pulpa, Otero-Sánchez (2005) reportó valores de 2.1 a 3.8 mg g⁻¹_{ps}, mientras que los valores críticos para atemoya (Paul & Duarte, 2011) son de 3.5 - 5 mg g⁻¹, por lo que hay una deficiencia de este nutrimento.

El intervalo de concentración de hierro fue de 59.9 y 79.7 mg kg⁻¹_{ps} sin diferencia significativa, estos valores se encuentran dentro de los valores críticos para atemoya (50 - 70 mg Kg⁻¹) (Paul & Duarte, 2011), siendo la de color morada (79.66 mg kg⁻¹) la que es superior a los valores críticos.

El intervalo de concentración de cobre es de 5.9 y 8.8 mg kg⁻¹_{ps} sin diferencia significativa, siendo inferiores a los valores críticos en atemoya (10 - 20 mg Kg⁻¹) (Paul & Duarte, 2011).

La concentración de zinc se encontró entre 12.7 y 14.6 mg kg⁻¹_{ps}, sin diferencia significativa, lo anterior contrasta en los valores superiores reportados por Otero-Sánchez (2005) (14.3 - 21.7 mg g⁻¹_{ps}) en la misma especie. Las concentraciones de este elemento son bajas de acuerdo a los críticos para atemoya (15 - 30 mg Kg⁻¹) (Paul & Duarte, 2011). Estas deficiencias se pueden deber a que el zinc es fácilmente lixiviable, sobre todo en suelo permeables (Mendez *et al.*, 2008).

Los valores de manganeso se encontraron entre 10.1 y 14.1 mg kg⁻¹_{ps} sin diferencia significativa, estas concentraciones denotan deficiencias de acuerdo a Otero-Sánchez (2005) (65 a 143 mg g⁻¹_{ps}) y a los valores críticos para atemoya (30 - 90 mg Kg⁻¹) (Paul & Duarte, 2011).

La concentración de boro osciló entre los valores 24.3 y 28.8 mg kg⁻¹_{ps}, Otero-Sánchez (2005) encontró valores superiores (39 a 44 mg g⁻¹_{ps}) a los de este trabajo, mientras que los datos obtenidos se encuentran dentro de los valores críticos para atemoya (15 - 40 mg Kg⁻¹) (Paul & Duarte, 2011).

Cuadro 3. Concentración nutrimental en hojas de tres genotipos de ilama (*Annona diversifolia* Saff), diferenciados por su color de pulpa colectados en el sitio.

Frutos de pulpa	mg g ⁻¹					mg kg ⁻¹				
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
Blanca	25.9 a	1.2 ab	1.5 b	14.0 a	2.0 a	59.9 a	5.9 a	14.6 a	10.1 a	24.4 a
Rosa	23.0 a	1.1 a	3.2 a^y	18.0 a	2.4 a	62.6 a	6.1 a	13.6 a	11.0 a	24.3 a
Morada	28.0 a	1.45 b	4.1 a^y	15.0 a	2.0 a	79.7 a	8.8 a	12.7 a	14.1 a	28.8 a
CV (%)	14.3	17.4	41.8	16.4	17.1	20.1	26.9	16.6	21.8	16.1
DMS	8.5	0.4	1.2	5.3	0.9	28.6	3.6	6.1	5.2	10.2

Promedios (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, $p < 0.05$).

1.5.3 Análisis nutrimental en fruto

Los minerales son vitales para el mantenimiento de la salud del cuerpo humano. Estos minerales se requieren en nuestra dieta en grandes cantidades (> 100 mg/día) se conocen como macro-elementos y los que se requieren en pequeñas cantidades (<100 mg/día) se conocen como micro-elementos. Los macro-elementos incluyen Na, K, Ca, Mg y P tienen múltiples funciones dentro del cuerpo, tales como la iniciación para producción de hormonas y la aceleración de los procesos metabólicos. Los micro-elementos como Fe, I₂, Cu, Zn, Cr y Mn interactúan con vitaminas y macro elementos para mejorar sus efectos en el cuerpo. Sin embargo, la presencia de estos elementos por encima de los niveles permisibles puede causar varias consecuencias (Lugwisha *et al.*, 2016).

En el Cuadro 3 se presentan los valores de concentración nutrimental en frutos de dos genotipos de ilama (blanco y rosa) en mesocarpio y exocarpio en madurez de consumo, donde se observa que el potasio es el macro-elemento que se encontró más abundante seguido del nitrógeno.

El contenido de nitrógeno en mesocarpio fue de $8.2 \text{ mg g}^{-1}_{ps}$ y $4.8 \text{ mg g}^{-1}_{ps}$, siendo estadísticamente diferente, sobresaliendo la pulpa blanca. En cuanto al fósforo se encontró en un rango de $1.1 \text{ mg g}^{-1}_{ps}$ en los dos colores de pulpa, estos valores son superiores a los reportados por Cruz-pineda (2002) reporta que el contenido de fósforo en ilama del estado de Guerrero es de 0.3 mg g^{-1} .

El potasio es el mineral más abundante de los macro-elementos en pulpa, se encontró en un rango de 8.5 y $12.5 \text{ mg g}^{-1}_{ps}$ sin diferencia significativa, los valores reportados por Julián-Loeza *et al.* (2011) en frutos de *A. diversifolia* fueron de 3.47 (blanca) y 3.35 (rosa) mg g^{-1}_{pf} desarrollados en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, estos valores son inferiores a los encontrados en este trabajo, esta diferencia tal vez se deba a que los frutos analizados no fueron cultivados en el mismo lugar y las condiciones de cultivo son determinantes para la absorción de este mineral. Valores similares a este trabajo fueron encontrados en saramuyo ($8.73 \text{ mg g}^{-1}_{pf}$) desarrollados en Tanzania (Lugwisha *et al.*, 2016). A nivel funcional el potasio tiene

un papel en la fotosíntesis y en el metabolismo de los carbohidratos de las plantas (Hernández *et al.*, 2018).

El calcio en pulpa fue de 1.2 (blanca) y 1.7 (rosa) $\text{mg g}^{-1}_{\text{ps}}$ sin diferencia significativa. Julián-Loeza *et al.* (2011) reporta valores muy bajos de calcio en la misma especie 2.2 $\text{mg g}^{-1}_{\text{pf}}$ en pulpa rosa y 0.0086 $\text{mg g}^{-1}_{\text{pf}}$ en pulpa blanca. Este comportamiento se justifica debido a las altas concentraciones de este mineral en el suelo.

En cuanto al contenido de magnesio en pulpa se observaron diferencias significativas entre los dos colores, el mayor contenido se encontró en la blanca con 0.6 $\text{mg g}^{-1}_{\text{ps}}$ y en menor contenido en la rosa con 0.4 $\text{mg g}^{-1}_{\text{ps}}$, Julián-Loeza *et al.* (2011) encontró menores concentraciones de este mineral en la misma especie 0.082 $\text{mg g}^{-1}_{\text{pf}}$ (blanca) y 0.027 $\text{mg g}^{-1}_{\text{pf}}$.

El hierro fue el microelemento encontrado en menor cantidad en pulpa, la blanca fue la que tenía más 45.0 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ y la rosa la de menor contenido 34.7 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$, sin embargo no hubo diferencia significativa. Estas cantidades de hierro son mayores a las encontradas en saramuyo, con valores de 7.7 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{pf}}$ (Abdualrahman *et al.*, 2016) y 12.7 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{pf}}$ (Lugwisha *et al.*, 2016). La variación de los niveles de estos minerales podría deberse a diferencias en los niveles de los elementos presentes en el suelo y las diferentes tasas de absorción de estos elementos por las plantas, que a su vez está influenciada por el pH del suelo, las interacciones con coloidales del suelo, actividad microbiana y condiciones físicas del suelo como la aireación, compactación, temperatura, humedad y contenido de materia orgánica (Henríquez *et al.*, 2010). El hierro es un elemento esencial para casi todos los organismos vivos ya que participa en una amplia variedad de procesos metabólicos, como el transporte de oxígeno, la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y el transporte de electrones. Sin embargo, en cantidades excesivas, puede causar daño tisular (Abbaspour, *et al.*, 2014).

El contenido de cobre en pulpa fue de 1.1 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ en la blanca y 0.3 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{pf}}$ para la rosa sin diferencias significativas, el valor en pulpa blanca es mayor mientras que en pulpa rosa valores similares se encontraron en saramuyo 2.9 $\text{mg kg}^{-1}_{\text{pf}}$ (Abdualrahman *et al.*, 2016). En cuanto al zinc el contenido en pulpa fue de 6.9 mg

$\text{kg}^{-1}_{\text{ps}}$ en blanca y $2.2 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ en la rosa, sin diferencias significativas. Julián-Loeza *et al.* (2011) encontró concentraciones más bajas se encontraron el ilama $1.3 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{pf}}$ en pulpa blanca y $1.5 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{pf}}$ en pulpa rosa. Estas diferencias se pueden atribuir al origen de la fruta, debido a que los árboles tienen diferente manejo de nutrición. En saramuyo se han reportado valores de $3.7 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{pf}}$ (Abdualrahman *et al.*, 2016) y $5.1 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{pf}}$ (Lugwisha *et al.*, 2016), destacando que la pulpa blanca de ilama tiene mayor contenido de este mineral en comparación a los reportados. Cabe mencionar que este mineral es esencial para el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas Julián-Loeza *et al.* (2011).

La concentración de manganeso fue de $1.3 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ en pulpa blanca mientras que en la pulpa rosa fue de $0.6 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ sin diferencia significativa. El boro es el segundo micro-elemento que se encontró en mayor proporción en pulpa blanca fue de $8.4 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ y en pulpa rosa fue $7.3 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ sin diferencia significativa, Otero-Sánchez (2005) encontró valores superiores en pulpa de frutos agrietados de ilama 44.9 mg kg^{-1} , lo anterior podría significar que los frutos estudiados presentan deficiencia de dicho mineral.

Se ha establecido que los minerales en los frutos se encuentran en bajas concentraciones; sin embargo, ejercen un papel fisiológico muy importante en el desarrollo y crecimiento de los mismos (Hernández *et al.*, 2018). El contenido mineral de las frutas suele variar considerablemente con respecto al área en donde se ha cultivado; el calcio, es un elemento que se encuentra en los tejidos vegetales participando en varios procesos fisiológicos (Ramírez-Méndez *et al.*, 2012). Aunque las frutas no son ricas en minerales, el más abundante en ellas es el potasio (León-Méndez *et al.*, 2016), lo cual coincide con los resultados de este trabajo (Cuadro 4).

Las variaciones en el contenido de estos minerales probablemente se debiera a las condiciones agroclimáticas de la zona donde se encontraban las plantaciones, a la fisiología de la planta estudiada, a su estado de madurez, a las prácticas agrícolas y factores ecológicas (Hernández *et al.*, 2018; Fernández *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Concentración nutrimental en el exocarpio, mesocarpio y total de frutos de ilama (*Annona diversifolia* Saff) pulpa blanca y rosa, en estado de madurez comercial colectados en el sitio.

Frutos de pulpa	mg g ⁻¹					mg kg ⁻¹				
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
Exocarpio										
Blanca	7.8 a	1.6 a	13.9 a	1.7 a	0.9 a	45.3 a	3.6 a	9.4 a	1.3 a^y	9.4 a
Rosa	9.3 a	1.6 a	14.1 a	2.2 a	0.8 a	55.4 a	2.12 a	5.2 a	0.2 b	9.9 a
CV (%)	47.1	10.2	5.1	23.9	9.9	19.8	48.3	43.7	81.8	12.6
DMS	10.0	0.4	1.8	0.9	0.2	21.0	2.9	5.6	0.3	3.0
Mesocarpio										
Blanca	8.2 a^y	1.1 a	8.5 a	1.2 a	0.6 a^y	45.0 a	1.1 a	6.9 a	1.3 a	8.4 a
Rosa	4.8 b	1.1 a	12.5 a	1.7 a	0.4 b	34.7 a	0.3 a	2.2 a	0.6 a	7.3 a
CV (%)	35.0	20.7	34.7	28.5	27.6	18.5	105.9	69.7	61.2	19.4
DMS	3.3	0.6	7.4	0.8	0.2	15.0	1.4	4.7	2.1	3.5
Total										
Blanca	16.0 a	2.7 a	22.4 a	2.9 a	1.6 a	90.3 a	4.6 a	16.2 a^y	2.6 a^y	17.8 a
Rosa	14.1 a	2.7 a	26.6 a	3.9 a	1.2 a	90.1 a	2.4 a	7.4 b	0.8 b	17.1 a
CV (%)	44.0	24.9	25.3	29.0	28.8	22.9	87.8	56.7	69.4	18.6
DMS	4.4	0.4	3.9	0.5	0.2	14.9	1.9	3.3	0.4	2.2

Promedios (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, p<0.05).

1.6 Conclusiones

Las muestras de suelo analizadas de los diferentes genotipos presentaron valores de P, K, Ca, Mg, Na y N que fluctúan entre muy bajos y moderadamente altos. Las concentraciones de los microelementos (Fe, Cu, Zn, Mn y B) oscilaron de moderadamente bajas a moderadamente altas.

Las concentraciones de N, Ca, Fe y B, analizadas en las hojas de ilama, se detectaron en cantidades normales de acuerdo a los valores críticos; sin embargo, las concentraciones de P, K, Mg, Cu, Zn y Mn resultaron deficientes. Las deficiencias de K y Zn concuerdan con los bajos niveles de estos mismos elementos en el suelo.

Se determinó la composición nutrimental en pulpa y cáscara de los frutos de ilama en madurez de consumo. De los macroelementos N, P, K, Ca y Mg, el nivel más alto fue de K, es decir 8.53 - 14.12 mg g⁻¹_{ps}. Y de los microelementos Fe, Cu, Zn, Mn y B, la concentración más alta fue de Fe, con valores de 34.73 - 55.41 mg kg⁻¹_{ps}.

CAPÍTULO II. CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS Y BIOQUÍMICAS DE FRUTOS DE ILAMA (*Annona diversifolia* Saff), PULPA BLANCA Y ROSA

2.1 Resumen

Los frutos de *Annona diversifolia* se cosechan una vez al año, y se consumen cuando la cáscara en la base del pedúnculo se abre y parte de la pulpa se expone al ambiente. Los frutos se consumen principalmente en fresco y tienen un sabor agradable al paladar. El objetivo del trabajo fue evaluar las características biofísicas y bioquímicas en frutos de ilama en madurez de consumo almacenados a temperatura ambiente (21 °C). Se colectaron frutos de pulpa blanca y pulpa rosa a los cuales se les evaluó las variables de pérdidas de peso, proporción cáscara/pulpa, sólidos solubles totales, acidez titulable y vitamina C. La pérdida de peso fue de 3.52 y 3.53 %, sin diferencia entre los dos tipos de pulpa. Tampoco hubo diferencia en la proporción cáscara/pulpa, cuyos valores fueron 48.34 y 43.48 % para los frutos de pulpa blanca, 43.47 y 49.02 % en frutos pulpa rosa. Sin embargo, el contenido de sólidos solubles totales al finalizar la evaluación varió entre 21.14 y 19.47 °Bx, fue mayor en la pulpa blanca. El contenido de ácido cítrico no mostró diferencia entre los dos colores de pulpa, al finalizar el valor para ambas fue de 0.40 %. El contenido de vitamina C fue de 21.65 y 22.23 mg 100 g⁻¹, respectivamente, sin diferencia entre los dos colores de pulpa. Los frutos de ilama pulpa blanca y rosa no mostraron diferencias significativas en cuanto a las variables evaluadas durante su almacenamiento.

Palabras clave: *Annona diversifolia*, frutos de ilama, características biofísicas, bioquímicas.

2.2 Abstract

Fruits of *Annona diversifolia* were cultivated ones a year and are consumed when the skin opens from the footstalk and part of the pulp is exposed to the ambient. The fruits are consumed mainly in fresh and they have a good taste for the palate. The purpose of this work, was to evaluate the biophysics and biochemical characteristics in fruits of ilama, in consume maturity, stored at room temperature (21 °C). Collected fruits of white and pink pulp, were evaluated in the variables of; loss of weigh, skin/pulp proportion, total soil soluble, tritable acidity and vitamin C. Loss of weigh was from 3.52 and 3.53 %, without differences in both colors. Neither there were differences in the skin/pulp proportion whose values were 48.34 and 43.48 % for the white pulp fruits, 43.47 and 49.02 % for the pink one. Nevertheless, the amount of total soil soluble at the end of the evaluation was between 21.14 and 19.47 °BX, higher for white pulp fruits. citric acid did not show differences between both colors of pulp, the ending values for both of pulps was 0.40 %. The content of vitamin C, was 21.65 y 22.23 mg 100 g⁻¹ respectively without differences between both colors of pulp. Ilama's fruits of white and pink pulp did not show significance differences the evaluated variables during the stored.

Key words: *Annona diversifolia*, ilama fruits, biophysical, biochemical characteristics.

2.3 Introducción

Las plantas pertenecientes a la familia *Annonaceae* son conocidas desde tiempo por su interés económico de sus (proporcionan frutos comestibles y aceites esenciales) como por su utilización en medicina tradicional y popular (pesticidas y antiparasitarias) (Cabedo *et al.*, 2011)

El valor económico de las anonáceas está relacionado principalmente por el uso alimenticio de sus frutos dulces y de alto valor nutritivo, además de ser atractivos, exóticos y fuente importante de carbohidratos, minerales y vitaminas (Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011). También se puede separar la pulpa, en particular la de guanábana, y congelarla o utilizarla en fresco para elaborar helados, paletas, licores, mermeladas o jugos. Los frutos de las anonas son altamente frágiles y se requiere de cuidados extremos desde la cosecha y el manejo postcosecha, pues el manejo inadecuado afecta y reduce la calidad del producto (Andrés Agustín y Andrés Hernández 2011). El sistema postcosecha de estas frutas aún no está desarrollado adecuadamente, y por lo tanto, varios problemas de manejo siguen siendo comunes. El ablandamiento rápido de las frutas después de la cosecha, especialmente durante el transporte y la comercialización, es un problema importante. Las Annonas son frutas climatéricas, generalmente caracterizadas por una alta respiración y producción de etileno, y son sensibles al frío. Los frutos de las Annonas son relativamente suaves y deben manipularse con cuidado para minimizar los hematomas (Pareek *et al.*, 2011).

La recolección de los frutos *A. diversifolia* debe hacerse de forma manual, para no dañarlos. El índice de cosecha de la ilama es cuando el fruto empieza a abrirse en la base del pedúnculo, de lo contrario, el fruto no alcanza su madurez de consumo. Un árbol en producción puede tener rendimientos entre 30 a 60 frutos por año (Cruz-Pineda, 2003).

A. diversifolia presenta una diversidad de colores de pulpa, que puede ser: púrpura, rosada cremosa y blanca. La cáscara, presenta diferentes texturas de lisas a rugosas; según la forma del fruto, se encuentran de forma acorazonada, cónicas,

ovaladas y redondas (Napoleón-Irigoyen, 2004). Los frutos son especiales por su delicioso sabor y por su alto valor nutricional. Su valor alimenticio es importante por poseer carbohidratos, proteínas, calcio, fósforo, hierro, tiamina, niacina y riboflavina (Cruz-Pineda, 2003). Sin embargo tiene buen potencial para procesamiento agroindustrial, por ejemplo en El Salvador se han desarrollado trabajos encaminados al manejo postcosecha y procesamiento obteniendo cuatro opciones: almacenamiento de fruta fresca (eliminando hongos y bacterias a partir de una disolución clorada), pulpa refrigerada, pulpa esterilizada y mermelada (Napoleón-Irigoyen, 2004).

El objetivo de este estudio fue evaluar las características biofísicas y bioquímicas de frutos de ilama colectados en el Machito de las Flores, Cocula, Guerrero, para determinar si existe diferencias entre los genotipos de pulpa blanca y rosa.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Material vegetal

Los frutos fueron colectados en octubre 2017, se colectaron frutos de pulpa blanca y rosa en estado de madurez comercial (una vez que el fruto estaba agrietado, lo cual coincide con el índice de cosecha de los productores). Los frutos se transportaron al laboratorio de postcosecha del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y se almacenaron a temperatura ambiente (21 °C) para su posterior evaluación.

2.4.2 Proporción de pulpa y cáscara

Se tomó el peso de cada fruto entero y enseguida se separó y pesó la pulpa, la cáscara y las semillas; con estos datos se calculó el porcentaje respecto al peso del fruto entero. Adicionalmente se contó el número de semillas por fruto.

2.4.3 Pérdida de peso del fruto

Se registró el peso individual de cinco frutos de cada uno de los genotipos en una balanza electrónica (ALSEP modelo EY-2200 A, Tokyo, Japón) al día 1, 2 y 3 de

almacenamiento a temperatura ambiente (21 °C). Los datos se registraron en porcentaje.

$$P\acute{e}rdida\ de\ peso\ (\%) = \frac{(Peso\ inicial - Peso\ final)}{Peso\ inicial} * 100 \dots (1)$$

2.4.4 Sólidos solubles totales y acidez titulable

Los sólidos solubles totales (SST) y la acidez titulable (AT) se determinaron en la pulpa de los dos genotipos al día 1, 2 y 3 de almacenamiento a temperatura ambiente.

La determinación de sólidos solubles totales se realizó con el método de la AOAC (1990), se tomó una muestra de la pulpa (sin dilución) y se cuantificó con un refractómetro digital ATAGO PR-100 con escala de 0-32 % (Honcho, Itabashi-Ku, Tokyo, Japón). Los sólidos solubles totales se expresaron en grados Brix (°Bx).

Para la determinación de acidez titulable se utilizó el método de la AOAC (1990), se pesaron 10 g de pulpa y se mezclaron en 50 mL de agua destilada, se filtró el extracto y se tomó una alícuota de 5 mL depositándolos en un vaso de precipitado, posteriormente se agregaron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.01 N. El porcentaje de acidez se calculó, con base en el ácido cítrico, con la siguiente ecuación (2):

$$\% \text{ de acidez} = \frac{(mL \text{ de NaOH gastados})(N \text{ de NaOH})(Meq)(VT)(100)}{(Alicuota)(Peso \text{ de muestra})} \dots (2)$$

Donde:

VT= volumen total (mL de agua destilada más los gramos de muestra después de mezclarse).

Meq. de ácido cítrico= miliequivalentes del ácido cítrico = 0.064

N de NaOH= Normalidad de la solución NaOH utilizado para titular = 0.01N

2.4.5 Vitamina C

Se determinó la pérdida de vitamina C en pulpa de los dos genotipos al día 1, 2 y 3 de almacenamiento mediante el método colorimétrico del 2,6-diclorofenol-indofenol (A.O.A.C., No. 967.21, 1990). Se pesaron 3 g de pulpa y se homogenizó con 30 mL de ácido oxálico (0.5 %). De la mezcla se tomó una alícuota de 5 mL y se tituló con solución de Tillman (2,6-diclorofenol indofenol al 0.02 %, Merck) hasta obtener una coloración rosa permanente por 1 minuto. Los resultados se reportaron en mg de ácido ascórbico 100 g⁻¹ de pulpa.

La curva de calibración del ácido ascórbico se preparó en un rango de concentración de 0.02 a 0.07 µL mL⁻¹, la ecuación obtenida de la curva se utilizó para determinar la concentración de ácido ascórbico en la muestra.

2.4.6 Análisis estadístico

Los análisis de pérdida de peso y proporción pulpa y cáscara se realizaron con cinco repeticiones; y para SST, AT y vitamina C se realizaron por triplicado usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos de los análisis en fruto se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias empleando la prueba Tukey con un nivel de confiabilidad $p \leq 0.05$. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico Statgraphics versión plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

2.5 Resultados y discusión

2.5.1 Proporción de pulpa y cáscara

Los resultados indican que no hubo diferencias significativas entre los frutos de pulpa blanca y rosa (Cuadro 5) los frutos de pulpa blanca y pulpa rosa. En cuanto al porcentaje de pulpa se obtuvieron valores de 43.48 y 49.02 % para pulpa blanca y rosa, respectivamente, no presentaron diferencias significativas, estos valores son similares a los que reporta Moreno-Velázquez (2006) en frutos colectados en el

Estado de Guerrero, México encontrando 38.67 y 41.71 % en pulpa blanca y rosa respectivamente. En cuanto a la cáscara los valores fueron 48.34 y 43.47 % en blanca y rosa, sin diferencias significativas, Moreno-Velázquez (2006) encontró valores menores en pulpa blanca (38.67 %), pero en pulpa rosa el valor es similar al de este trabajo (41.71 %). El porcentaje de semillas fue de 8.18 y 7.51 % en pulpa blanca y rosa sin diferencias significativas y el número de semillas en pulpa blanca fue de 39.40 % y en rosa 33.80 % sin diferencias significativas Cruz-Pineda (2002) reporta que un fruto de ilama tiene un promedio de 70 semillas por fruto.

Cuadro 5. Proporción cáscara/pulpa/semillas, con base a peso del fruto.

Frutos de pulpa	%			
	Pulpa	Cáscara	Semillas	No. Semillas
Blanca	43.5 a	48.3 a	8.2 a	39.4 a
Rosa	49.0 a	43.5 a	7.5 a	33.8 a
CV (%)	13.1	13.2	30.0	39.2
DMS	8.2	8.5	3.6	21.7

Promedios (n=5). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, $p < 0.05$).

2.5.2 Pérdida de peso

En el Cuadro 6 se presentan los porcentajes de pérdida de peso durante tres días de almacenamiento. Los frutos de pulpa blanca al tercer día de almacenamiento registraron una pérdida de peso de 3.52 %, mientras que los de pulpa rosa la pérdida fue de 3.53 %. Durante los tres días ambos colores de pulpa presentaron valores similares, sin diferencia significativa. Así mismo, Valle-Guadarrama *et al.* (2012) encontraron valores similares en frutos de esta especie en estado de madurez similar, de aproximadamente 5 % al tercer día de almacenamiento en condiciones de medio ambiente, mientras que al noveno día de evaluación la pérdida fue de casi el 20 %.

Cuadro 6. Pérdida de peso del fruto de ilama durante tres días de almacenamiento a 21 °C.

Frutos de pulpa	Días de almacenamiento		
	1	2	3
Blanca	1.0 a	2.4 a	3.5 a
Rosa	1.0 a	2.5 a	3.5 a
CV (%)	23.2	21.3	20.4
DMS	0.4	0.9	1.2

Promedios (n=5). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, $p < 0.05$).

2.5.3 Sólidos solubles y acidez titulable

En el Cuadro 7 se presentan resultados del contenido de sólidos solubles totales en la pulpa de color blanca y rosa. Se observa que al día 1 y día 2 los valores para ambos tipos de pulpa son similares sin diferencia significativa. Sin embargo, al día 3 las diferencias fueron significativas, sobresaliendo los frutos de pulpa blanca (21.14 °Bx). En tales frutos también se encontró que del día 1 al día 2 hubo un incremento de sólidos solubles totales de 21.66 a 24.50 °Bx, esto podría deberse a una maduración acelerada (Yamashita *et al.*, 2002) en los frutos de ilama debido a sus mayores tasas de respiración; sin embargo al día 3 hay una disminución a 21.14 °Bx. En el caso de los frutos de pulpa rosa el incremento al día 2 es insignificante de 22.10 a 22.73 °Bx y para el día 3 su contenido es de 19.47 °Bx. Moreno-Velázquez (2006) reporta datos de frutos de ilama en madurez comercial pulpa blanca de 18.55 y 13.20 °Bx en pulpa rosa al día 3 de almacenamiento, mientras que Valle-Guadarrama *et al.* (2012) el contenido de sólidos solubles fue de 17.4 °Bx en frutos de Cd. Altamirano, Guerrero, México. Moo-Huchin *et al.* (2012) en frutos de la misma especie del estado de Yucatán en estado de madurez comercial encontraron 19.38 ± 0.40 °Bx, en comparación con los datos obtenidos en este trabajo son menores. Esta diferencia muestra el efecto que pueden tener las

condiciones ambientales o la heterogeneidad que puede encontrarse en la especie (Valle-Guadarrama *et al.*, 2012).

Cuadro 7. Contenido de sólidos solubles totales en frutos de pulpa blanca y rosa durante tres días de almacenamiento a 21 °C.

Frutos de pulpa	°Bx		
	Días de almacenamiento		
	1	2	3
Blanca	21.7 a	24.5 a	21.1 a ^y
Rosa	22.1 a	22.7 a	19.5 b
CV (%)	10.1	7.7	6.1
DMS	5.5	3.9	1.7

Promedios (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, $p < 0.05$).

En el Cuadro 8 se presentan los valores de acidez titulable, en ambas pulpas se observó que el contenido de ácido cítrico disminuyó al tercer día de su almacenamiento, el contenido de acidez fue de 0.4 % en ambos casos. Estos porcentajes son mayores a los valores de 0.16 y 0.17 % reportados Julián-Loeaza *et al.* (2011) para frutos pulpa blanca y rosa desarrollados en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Moreno-Velázquez *et al.* (2008) reportó valores superiores 0.57 y 0.58 % al tercer día de almacenamiento, mientras que Valle-Guadarrama *et al.* (2012) reporta valores de entre 0.18 y 0.22 % para un estado de madurez semejante al noveno día de almacenamiento. Se observó al inicio del almacenamiento un aumento de la acidez, esto se puede atribuir a la producción de ácidos orgánicos durante la maduración (Pareek *et al.*, 2011) seguido de un descenso como ocurre en la mayoría de los frutos durante el almacenamiento (Yamashita *et al.*, 2002). El contenido de acidez en *A. diversifolia* se encuentra dentro de los valores promedio reportados en otras especies de *Annona*; por ejemplo, *A. cherimola*, *A. squamosa* y atemoya que contiene de 0.4 - 0.7 % (Pareek *et al.*, 2011).

Cuadro 8. Acidez titulable (% ácido cítrico) en frutos de pulpa blanca y rosa durante

Frutos de pulpa	% Días de almacenamiento		
	1	2	3
Blanca	0.6 a	0.5 a	0.4 a
Rosa	0.5 a	0.5 a	0.4 a
CV (%)	19.3	10.9	14.4
DMS	0.2	0.1	0.1

tres días de almacenamiento a 21 °C.

Promedios (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, $p < 0.05$).

2.5.4 Vitamina C

En el Cuadro 9 se muestran los valores de vitamina C (expresados en miligramos de ácido ascórbico/100 g de peso fresco) durante cuatro días de almacenamiento, se pudo apreciar que en ambas pulpas no se encontró diferencia ($p < 0.05$). Los frutos tuvieron entre 35.04 y 29.22 mg 100 g⁻¹ al día 1 y para día 3 el contenido de vitamina C estuvo entre 22.2 y 22.8 mg 100 g⁻¹, los valores encontrados en estos frutos fueron similares a lo reportado por Moo-Huchin *et al.* (2012) (26.98 ± 2.46 mg 100 g⁻¹) en frutos de Yucatán. En otros estudios se han reportado valores inferiores Moreno-Velázquez *et al.*, (2008) en frutos cosechados en madurez comercial reportó valores de 8.2 y 8.6 mg 100 g⁻¹ pulpa blanca y rosa respectivamente, Julián-Loaeza *et al.* (2011) en frutos de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas encontró contenidos de 2.38 ± 0.18 y 1.64 ± 0.10 mg 100 g⁻¹ en pulpa blanca y rosa. En frutos de *A. cherimola*, *A. squamosa* y atemoya en estado de madurez comercial se han encontrado valores de 45 - 69 mg 100 g⁻¹ (Pareek *et al.*, 2011).

Cuadro 9. Pérdida de vitamina C ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) del fruto de ilama durante tres días de almacenamiento a $21 \text{ }^\circ\text{C}$.

Color de pulpa	Días de almacenamiento		
	1	2	3
Blanca	35.0 a	33.9 a	22.2 a
Rosa	29.2 a	28.0 a	22.8 a
CV (%)	12.2	15.8	5.8
DMS	5.8	9.4	3.2

Promedios ($n=3$). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, $p<0.05$).

2.6 Conclusiones

Los frutos de pulpa color blanca y rosa presentaron características similares durante su almacenamiento en cuanto a sus propiedades biofísicas de proporción cáscara, pulpa, semillas y pérdida de peso, así mismo, sus propiedades bioquímicas (acidez titulable y vitamina C), pero si presentaron cambios en el contenido de sólidos solubles totales.

CAPITULO III. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS DE PULPA DE ILAMA (*Annona diversifolia* Saff)

3.1 Resumen

El presente trabajo consistió en el aislamiento y caracterización de algunos metabolitos secundarios del extracto de acetato de etilo y diclorometano de la pulpa color blanca de *Annona diversifolia*. Las diversas propiedades nutraceuticas y farmacológicas que posee, convierten a esta especie en una valiosa fuente de estudio para la obtención de compuestos bioactivos. Hasta hoy, los estudios fitoquímicos son más frecuentes en partes aéreas y raíces. En vista de lo anterior, se planteó realizar el estudio fitoquímico de la pulpa. El trabajo inició con la preparación del extracto metanólico, el cual se obtuvo mediante extracciones sucesivas con metanol como disolvente a temperatura ambiente, a partir del material sólido liofilizado. Posteriormente, a partir del extracto metanólico se hicieron particiones para obtener los extractos de acetato de etilo y diclorometano. Inicialmente, se realizó la separación de los compuestos del extracto de diclorometano y de acetato de etilo por cromatografía en columna, usando disolventes y mezclas de estos con polaridad variable: diclorometano, acetato de etilo y metanol. Los productos obtenidos corresponden a tres compuestos diferentes de los cuales se logró aislar la (+) catequina, una mezcla de fitoesteros y ácidos grasos. La purificación de estos se efectuó mediante cromatografía en columna a gravedad y flash, simultáneamente con cromatografía en columna flash preparativa automatizada. Para la identificación de los compuestos aislados, se usaron por técnicas espectroscópicas de ^1H RMN, ^{13}C RMN, DEPT, HMBC, HSQC, IR y EM.

Palabras clave: Fitoquímica, *Annona diversifolia*, (+) Catequina, fitosteros, ácidos grasos.

3.2 Abstract

The present work consisted in the isolation and characterization of some secondary metabolites from the ethyl acetate and methylene chloride extracts from white pulp of *Annona diversifolia*. The various nutraceutical and pharmacological properties that it possesses, convert this specie in a valuable source of studio for obtaining bio-active compounds. So far as today, the phytochemical studies are more frequent in aerial parts and roots. Thus, it was planned to do the phytochemical study of the pulp. The work starts with the preparation of the methanol extract, which was obtained by successive extractions with methanol from the lyophilized solid material, at room temperature. From this methanol extracts, partitions were done with ethyl acetate and methylene chloride. Initially, it was realized the separation of the compounds from methylene chloride and ethyl acetate extracts by column chromatography using mixtures of solvents (methylene chloride, ethyl acetate and methanol) in several and increasing polarities. The products obtained correspond to three different compounds from which (+) catechin was isolated and a mixture of phytosterols and fatty acids. Their purification was done by gravity and flash column chromatography, simultaneously with flash automated preparative column. For the identification, of the isolated compounds, spectroscopic technics of $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ DEPT, HMBC, HSQC, IR y EM were used.

Key words: phitochemistry, *Annona diversifolia*, (+) catechin, phytosterols, fatty acids.

3.3 Introducción

Las especies de *Annona*, han sido utilizadas como medicina natural para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, por pueblos nativos de diversas culturas. Existe un gran número de estudios sobre las actividades farmacológicas de este género en la literatura (Quílez *et al.*, 2018). Se han utilizado diferentes partes de la especie, sin embargo las hojas y las semillas tienen usos muy bien establecidos, incluyendo aplicaciones contra: parásitos, procesos inflamatorios, diabetes y cáncer, (Mishra *et al.*, 2013), (Roduan *et al.*, 2018). Las especies que comandan un gran número de estudios son: *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. cherimola*, *A. senegalensis*, *A. Montana*, *A. glabra*, *A. crassiflora*, *A. reticulata*, y *A. coriacea*. Derivados de estos estudios, se han identificado muchos metabolitos secundarios activos (MSA), los cuales juegan un papel importante en el descubrimiento de nuevos medicamentos (Cortés *et al.*, 2014).

Una de las clases principales de MSA aislados en *Annonaceae*, son las acetogeninas (ACGs) investigadas exhaustivamente por sus efectos antitumorales. Las acetogeninas también exhiben efectos inmunosupresores, pesticidas, antiprotozoales, antimicrobianos, antipalúdicos, antihelmínticos y antivirales. Además tienen aplicaciones exitosas y productos comerciales para el tratamiento del herpes bucal y el tratamiento infestaciones de piojos de la cabeza, pulgas y garrapatas.

Por otro lado, también se han aislado alcaloides de tipo isoquinolina. Estos MSA se les ha encontrado actividades biológicas como: antioxidante, antidepresivo, antiepiléptico, antimicrobiano, antiplasmodial, antiproliferativo, antibacteriano, antifúngico, antiulceras, ansiolítico, citotóxico, inmunoestimulante y larvicida (Egydio *et al.*, 2017).

Adicionalmente, el género *Annona* contiene compuestos con diversas actividades farmacológicas, incluidas las que actúan sobre el sistema nervioso central (Carballo *et al.*, 2010). Carballo *et al.*, (2010) demostraron que el extracto etanólico de hojas de *Annona diversifolia* posee actividad antinociceptiva, dando soporte a su uso en la medicina tradicional para el tratamiento del dolor espasmódico y artrítico. Se ha

comprobado que esta familia contiene compuestos lipofílicos con actividades biológicas, siendo el componente principal el β -sitosterol, otros esteroides encontrados son el estigmasterol y campesterol (Santos *et al.*, 2016).

En *Annona diversifolia*, estudios previos en extractos crudos han demostrado la amplia variedad de compuestos presentes; la detección por cromatografía de capa delgada (CCD) ha revelado la presencia de terpenos, flavonoides y alcaloides. Así mismo se han encontrado ácidos grasos saturados e insaturados, como el oleico, linoleico, palmitoleico, palmítico y esteárico (González-Trujano *et al.*, 2001; Julián-Loeza *et al.*, 2011)

Los estudios fitoquímicos en *Annona diversifolia* se han hecho principalmente en semillas, hojas, raíces y partes aéreas en general. Sin embargo, estudios fitoquímicos en la pulpa de esta especie son poco comunes. Por lo anterior el enfoque de este estudio consistió en aislar compuestos, purificar e identificar compuestos de los extractos obtenidos a partir de pulpa de ilama con el objetivo de encontrar compuestos nuevos de interés. Lo que constituye una fuente constante de inspiración para químicos, farmacólogos y para todos los investigadores interesados en el descubrimiento de una nueva familia de medicamentos (Cortés *et al.*, 2014).

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Material vegetal

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Productos Naturales, del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, utilizando el genotipo de pulpa blanca, en estado de madurez comercial. Las semillas y cáscara fueron removidas, enseguida la pulpa (1.9 kg) se congeló para liofilizarla (-50 °C con una presión de 15×10^{-3} mBar, por 48 h) posteriormente en un equipo (Labconco 7751000, Kansas, EUA) obteniendo una masa final de 431.3 g.

3.4.2 Reactivos y disolventes

Los disolventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y acetona, se destilaron por los métodos convencionales reportados por Armarego (2017). Los reactivos químicos, como el ácido fosfomolibdico, y el nitrato cérico fueron obtenidos de Sigma Aldrich y la mayoría fueron utilizados sin purificación adicional.

3.4.3 Preparación del extracto de diclorometano

La pulpa liofilizada se le adicionó CH_2Cl_2 y se dejó macerar durante tres días, enseguida se decantó y filtró el diclorometano para su evaporación en un evaporador rotatorio (Büchi R-3, Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a $35\text{ }^\circ\text{C}$ y alto vacío, esto se repitió cuatro veces para finalmente obtener 0.861 g del extracto de diclorometano (Figura 6).

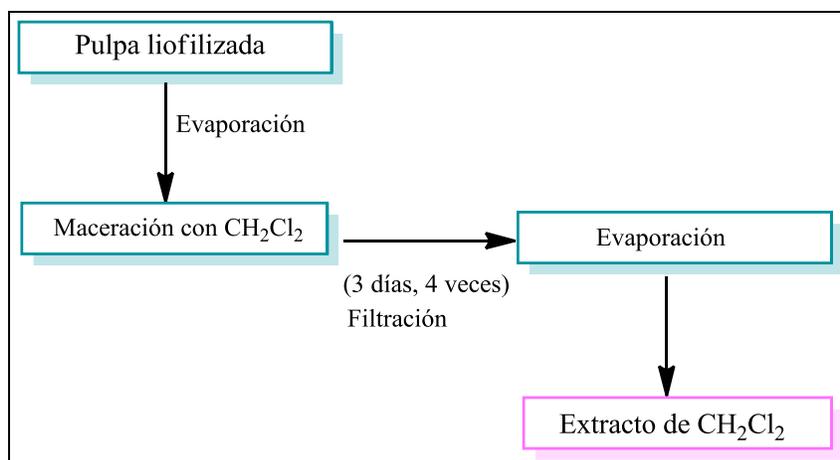


Figura 6. Ruta de obtención del extracto de diclorometano de *A. diversifolia*.

3.4.4 Preparación del extracto metanólico

El residuo sólido remanente, libre de disolvente se le hizo una segunda extracción por maceración con MeOH durante tres días, enseguida se decantó y filtró el MeOH, para su evaporación en un evaporador rotatorio al vacío, esto se repitió cuatro veces para finalmente obtener el extracto metanólico.

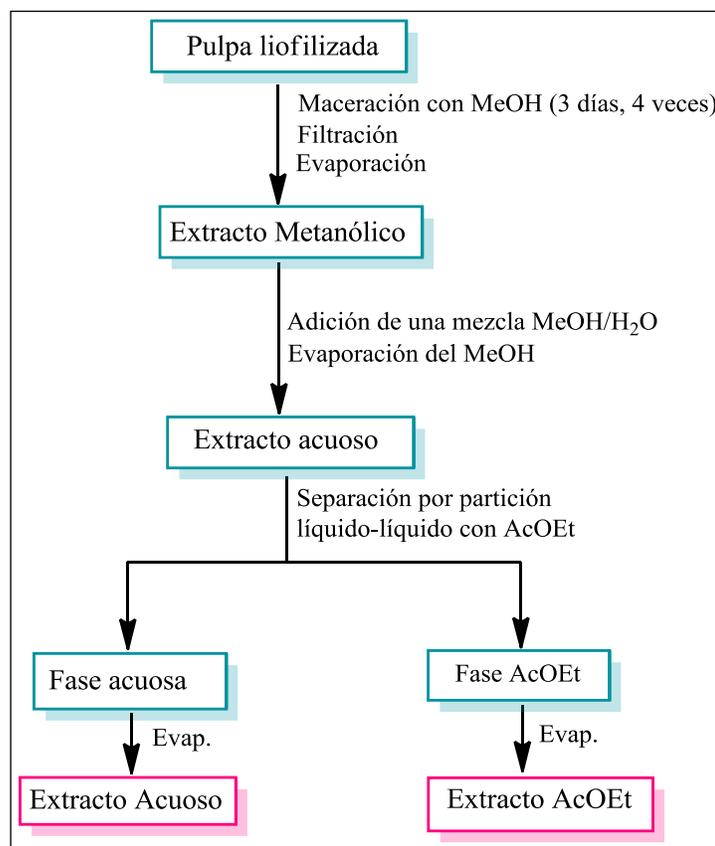


Figura 7. Obtención del extracto metanólico de *A. diversifolia*.

El extracto metanólico crudo y seco, se diluyó nuevamente con una mezcla MeOH–H₂O (1:2 v/v). Seguidamente se evaporó el MeOH para obtener una fase acuosa del extracto. Al extracto acuoso se le hizo una separación por partición liquido-liquido con acetato de etilo, obteniéndose de la separación anterior una fase acuosa y una de AcOEt. Se recuperó cada fase para ser evaporados en un evaporador rotatorio al vacío, esta misma operación se repitió cuatro veces, obteniéndose 3 g del extracto de acetato de etilo y 50 g de extracto acuoso (Figura 7).

3.4.5 Separación y purificación de metabolitos secundarios

Se empleó la cromatografía en columna (CC) para la separación de los compuestos del extracto de CH₂Cl₂ y de acetato de etilo empleando gel de sílice 60 (0.040-0.0630 mm, malla 230-400 ASTM) y Sephadex® LH-20 (tamaño de poro 25 a 100 μ)

como fase estacionaria. El procedimiento empleado para la preparación y desarrollo de CC para cada extracto es el siguiente:

Preabsorción del extracto de CH_2Cl_2 :

1. El extracto CH_2Cl_2 (0.86 g) se diluyó en diclorometano.
2. La mezcla se homogenizó y posteriormente se evaporó el disolvente en un rotavapor a presión reducida, dejando el extracto seco e impregnado en su totalidad en la sílice.
3. El extracto pre-absorbido se pulverizó en un mortero para obtener partículas finas.

Montaje de la columna cromatográfica:

1. La columna de vidrio se empacó aproximadamente hasta la mitad con sílice pre-absorbida en CH_2Cl_2 aproximadamente en una relación 1:2 p/v (sílice: solvente).
2. Se agregó el extracto impregnado en sílice a la columna.
3. Se empezó la elución, colectando fracciones de 25 mL, usando como eluyente inicial CH_2Cl_2 y posteriormente se aumentó la polaridad para incrementar el gradiente con mezclas CH_2Cl_2 -MeOH hasta llegar a 100 % MeOH.
4. El monitoreo de las fracciones se desarrolló por CCD, cuando ya no se observaba la separación de compuestos, se aumentaba progresivamente la polaridad.

Preparación de la CC para el extracto de acetato de etilo:

1. La columna de vidrio se empacó con 40 g de Sephadex[®] LH-20 y se pre-absorbió con la mezcla MeOH- CH_2Cl_2 en una relación 1:1 v/v.
2. Se agregó el extracto de acetato de etilo (3 g) diluido en MeOH a la columna.
3. Se empezó la elución, colectando fracciones de 15 mL, usando como eluyente una mezcla MeOH- CH_2Cl_2 (1:1 v/v).
4. El monitoreo de las fracciones se desarrolló por CCD, cuando ya no se observaba la separación de compuestos, se aumentaba progresivamente la polaridad.

3.4.6 Análisis por cromatografía en capa delgada

La observación de la composición de las fracciones se realizó por CCD, en cromatoplasmas de gel de sílice 60-F₂₅₄ (Merck). El revelado físico de las cromatoplasmas se hizo con luz ultravioleta en una lámpara de UV Mineral Light y el revelado químico se llevó a cabo empleando ácido fosfomolibdico o disolución de nitrato cérico amoniacal, seguido por el calentamiento de las cromatoplasmas.

3.4.7 Separación por cromatografía flash preparativa automática

La cromatografía en columna automática flash para purificación de los compuestos se llevó a cabo en un cromatógrafo HPLC de fase preparativa: Isolera™ One Biotage® con colector de fracción única y detector UV-VIS de doble longitud de onda, acoplada a un detector de masas Isolera™ Dalton-Nanolink marca Biotage®.

3.4.8 Análisis espectroscópico de los productos aislados

Los espectros de RMN ¹H y ¹³C se determinaron mediante un equipo a 600 MHz Ascend marca Bruker y un 400 MR DD2 Agilent usando CDCl₃, CD₃OD y DMSO como disolvente, y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El (δ) está dado en ppm y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz (Hz). Los espectros de infrarrojo se tomaron en un equipo FTIR Cary 630 (Agilent Technologies, EUA). Los espectros de masas (EM) fueron determinados en un detector selectivo de masas de baja resolución por la técnica de impacto electrónico (IE) (Agilent Technologies modelo 5977A MSD) con un Cuadrupole simple modelo 5977A MSD, EUA) se utilizó una columna HP-5MS UI. La difracción de Rayos X se realizó por el método de Rayos X monocristal en un equipo tipo ESP-E-001 marca Bruker en el Laboratorio Nacional (LANISAF).

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Aislamiento y purificación de compuestos

El estudio inicio, con el tratamiento del extracto de acetato de etilo, el cual se fraccionó mediante cromatografía por columna a gravedad empacada con

Sephadex® LH-20 como fase estacionaria. Las fracciones colectadas, se dejaron evaporar, cada una de ellas y se evaluó el perfil cromatográfico por CCD en cromatoplasmas de gel de sílice 60. De las fracciones de interés que fueron analizadas, se aislaron y purificaron por cromatografía de columna flash (CCF) los compuestos siguientes: de las fracciones 26-30 eluidas con MeOH:Cl₂CH₂ (1:1), se obtuvo la catequina (1), como un sólido color blanco, de la fracción 4 - 7 eluidas con la misma mezcla se obtuvieron los esteroides (estigmasterol y campesterol) (2). De manera similar, el tratamiento por CC del extracto de Cl₂CH₂, presentó en las fracciones 7 - 12 de la columna el aislamiento del sólido blanco β-sitosterol (3).

3.5.2 Análisis espectroscópico y elucidación estructural de compuestos

3.5.2.1 Catequina (1)

El compuesto (1) (Figura 11) reportado en este trabajo se identificó por el análisis de los datos obtenidos en los espectros de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C. Complementando con los datos espectroscópicos de DEPT, COSY HMBC, HSQC y EM. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono (¹H y ¹³C) se determinaron usando CD₃OH y Dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente.

El aislamiento de este compuesto (1) se observó por CCD, el compuesto se extrajo en mezclas de disolventes a alta polaridad, lo que indica que este posee grupos funcionales como hidroxilos que otorgan alta polaridad al compuesto. La pureza se verificó igualmente en la placa de cromatografía, la cual se observa una mancha compacta y no se detectan mezclas de ella por lo que se puede afirmar, que corresponde a un solo compuesto (Figura 8).

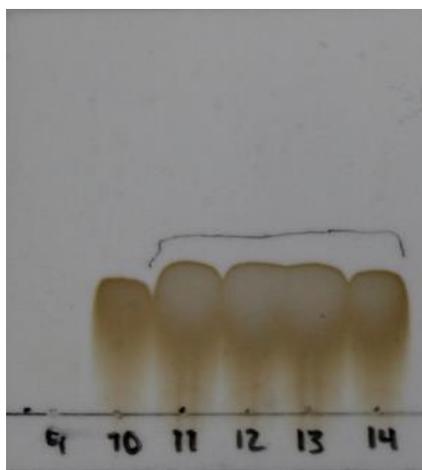


Figura 8. CCD del compuesto 1.

El espectro IR del compuesto (1) (Figura 9) muestra dos señales en 3452 cm^{-1} , las cuales corresponden a los estiramientos O-H de alcoholes que no presentan puente de hidrógeno, como lo es el caso de los fenoles o alcoholes en estado sólido, además de señales a 3167 y 2931 cm^{-1} , correspondientes a los estiramientos C-H de sistemas aromáticos y CH_3 y CH_2 respectivamente. Se descarta la presencia de grupos funcionales como C=O. Las señales descritas son las más relevantes para este espectro.

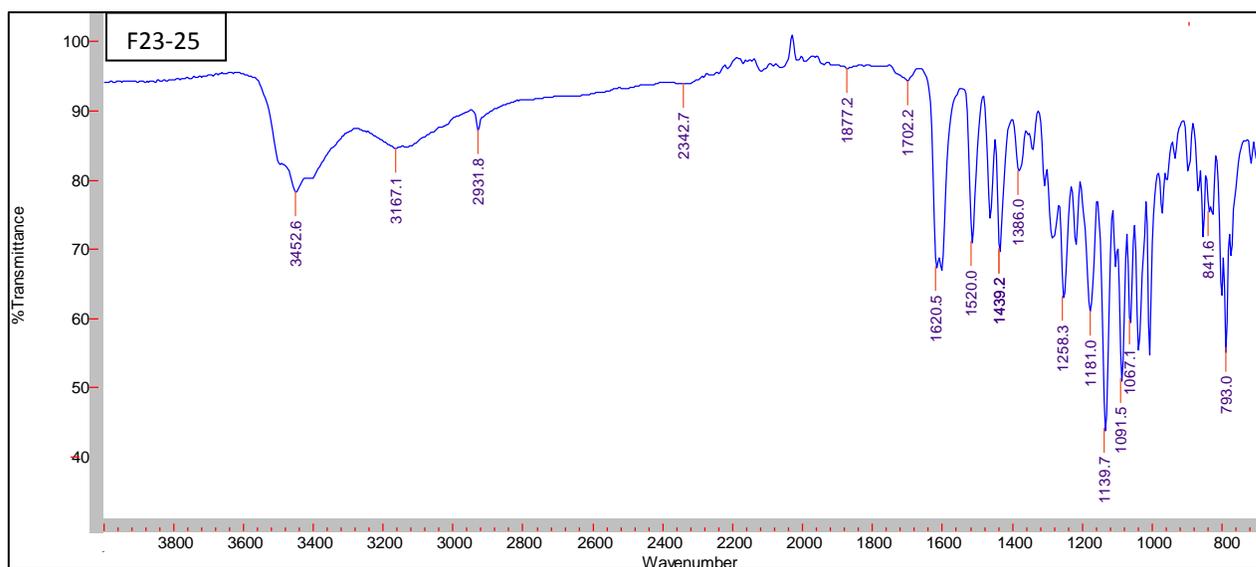


Figura 9. Espectro de infrarrojo del compuesto 1.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 10) muestra un total de 13 tipos de señales a diferentes desplazamientos, un grupo de señales importantes aparece en: δ 9.09, 8.88, 8.78 y 8.70 ppm, cada señal integra para 1 hidrógeno, las cuales se podrían asignar por los desplazamientos a campo bajo como hidrógenos de fenol. Otro grupo de señales a δ 6.68, 6.66, 5.89, 5.72, 4.79 y 4.65 ppm corresponden a desplazamientos característicos de protones sobre anillos aromáticos, además de hidrógenos de alcohol en base a carbono alifático. Una señal interesante aparece a δ 4.01 ppm, esta señal corresponde a un hidrógeno sobre carbono unido a un grupo hidroxilo, finalmente un par entre δ 2.70-2.66 ppm (1H, ddd, $J = 8.0, 6.3, 4.7$ Hz) y δ 2.50-2.47 ppm (1H, ddd, $J = 8.0, 6.3, 4.7$ Hz) corresponden a un par de hidrógenos unidos a un mismo carbono (diastereotópico), acoplados a otro hidrogeno vecinal, el desplazamiento sugiere hidrógenos del tipo bencílico.

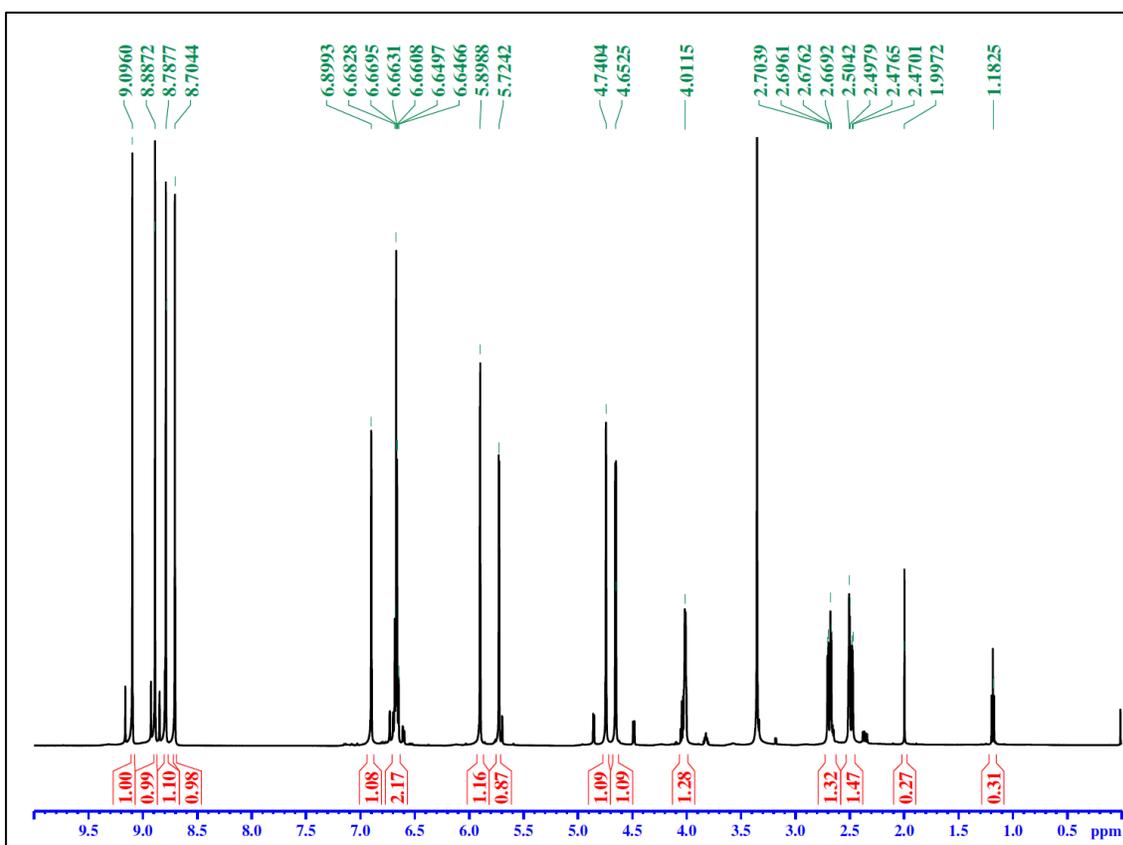


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 1.

Los espectros de RMN ^{13}C tomado en DMSO deuterado (Figura 11) presentan 12 señales distinguibles, sin embargo un análisis más detallado muestra un total de 15 señales, ya que algunas aparecen como un grupo con desplazamientos similares, la asignación de los carbonos se hizo por el análisis detallado de los experimentos bidimensionales, principalmente el HSQC.

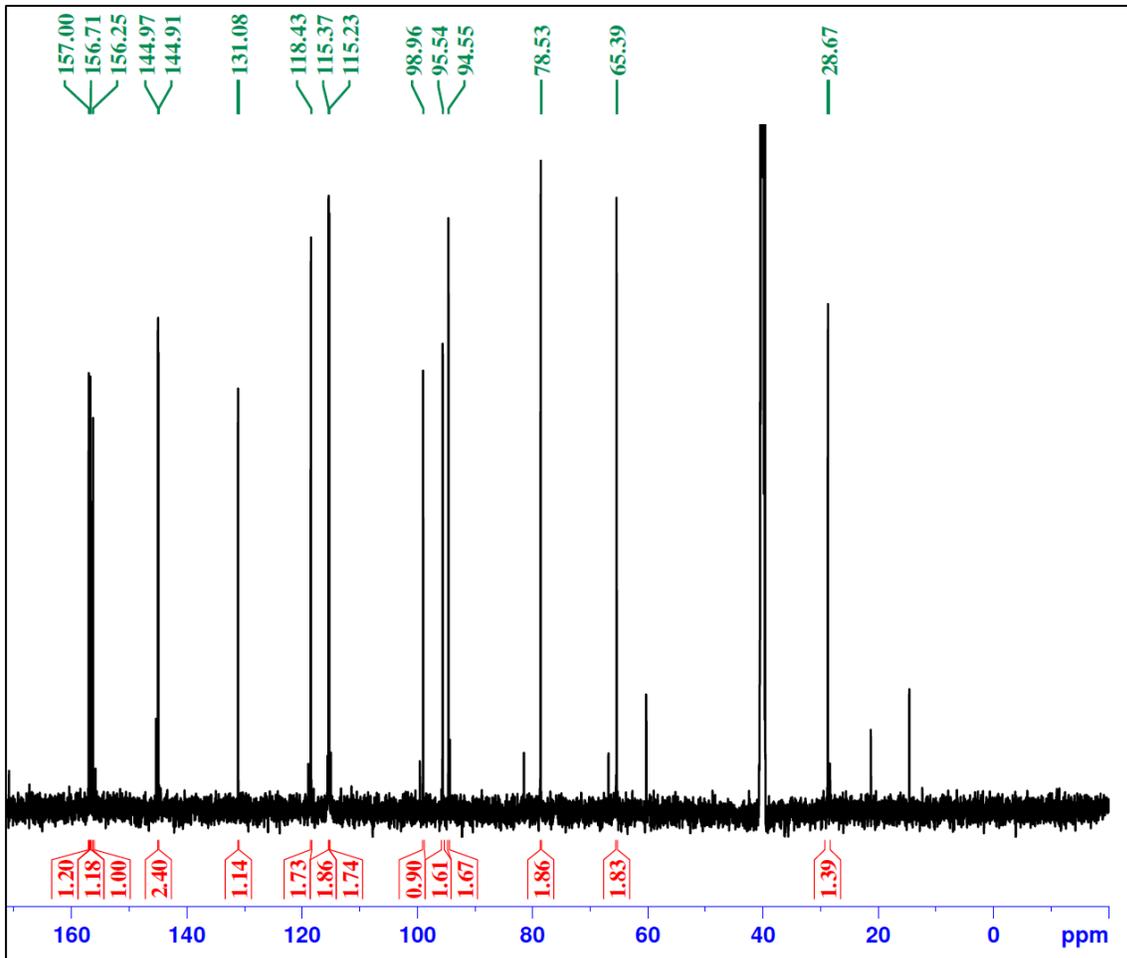


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 1.

Adicionalmente se comparó su desplazamiento para la estructura propuesta con un reporte de los desplazamiento para la (+) catequina (Cuadro 10), finalmente la diferencia es mínima en los desplazamientos, cabe señalar que son pocos reportes de los desplazamientos químicos de protón y de carbono para la (+) catequina en

Dimetilsulfóxido deuterado, es más común encontrar tablas de desplazamientos cuando los espectros fueron tomados en metanol deuterado (CD₃OH) o acetona deuterada (CD₃COCD₃). Mediante este análisis se comprueba que la fórmula molecular del compuesto es C₁₅H₁₄O₆. Para confirmar la asignación de los átomos de carbono e hidrógeno se realizó un análisis detallado por experimentos Bidimensionales (Anexos).

Cuadro 10. Datos de RMN 13C (100 MHz), para el compuesto 1 (F23-25).

	F23-25	Reportado ^a
No	δ (C)	δ (C)
1	157	157.4
2	156.71	157.1
3	156.25	156.7
4	144.97	145.4
5	144.91	145.4
6	131.08	131.5
7	118.43	118.8
8	115.37	115.9
9	115.23	115.7
10	98.96	99,4
11	95.54	96.0
12	94.55	95.0
13	78.53	79.1
14	65.39	65.7
15	28.67	29.1

^a Cren-Olivé, C. *et al.*/ *Tetrahedron Letters* 43 (2002) 4545–4549.

Con los anteriores datos no cabe duda que el compuesto 1 corresponde a la estructura de la Catequina, Figura 12.

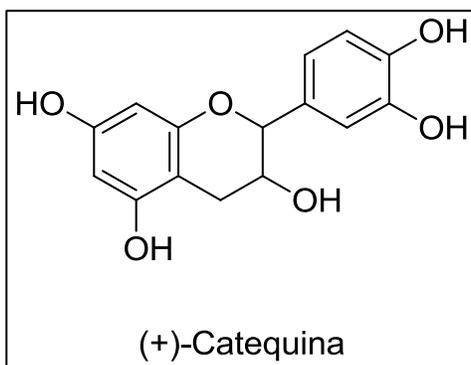


Figura 12. Estructura propuesta para el compuesto 1.

3.5.2.2 Estigmasterol y Campesterol (2)

De las fracciones 6-9 (97:3 CH₂Cl₂:AcOEt) de la columna sephadex del extracto de acetato de etilo, se hizo una separación cromatográfica que permitió el aislamiento de una mezcla solida de color blanco en las fracciones 25-36, en la mezcla de elución CH₂Cl₂:AcOEt 97:3. Como se observa en la CCD (Figura 13) la mezcla denominada F25-36-C5, corresponde principalmente a dos compuestos que se obtuvieron por filtración.

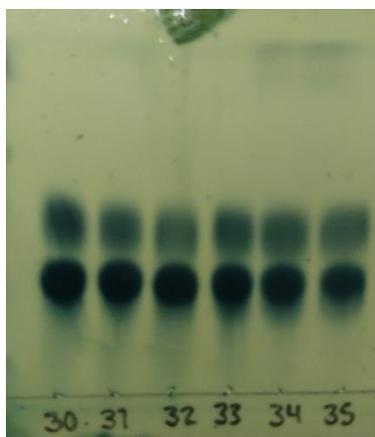


Figura 13. CCD de la mezcla estigmasterol y campesterol.

La mezcla sólida, se le realizó una separación por cromatografía de gases y se analizó por espectrometría de masas, en un equipo acoplado de CG-EM. El cromatograma de gases obtenido para esta mezcla sólida (F25-36-C5), permitió observar una mezcla de compuestos (Figura 14). Sin embargo el análisis de los espectros de masas de los picos más representativos en el cronograma permitió identificar principalmente 2 compuestos.

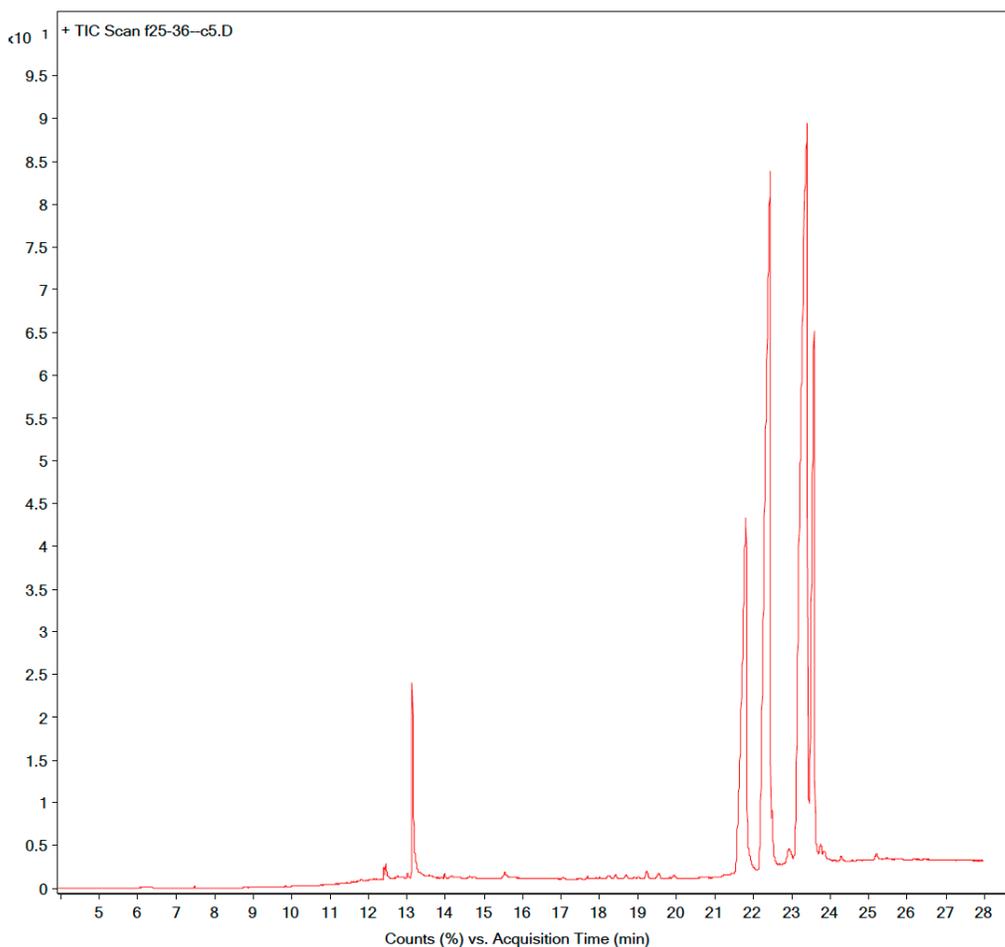


Figura 14. Cromatograma de gases del sólido F25-36-C5.

Una búsqueda de cada uno de los picos a diferente tiempo de retención, arrojó principalmente los espectros de masas de dos compuestos para esta mezcla sólida. Se comparó con la biblioteca de compuestos del NIST (por sus siglas en

inglés, *National Institute of Standards and Technology*), por medio del Software Mass-Hunter del cromatógrafo de gases de Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios Agroalimentarios y Forestales (LANISAF), en donde se tomaron las muestras. Uno de los compuestos encontrados corresponde al estigmasterol (Figura 15), El espectro muestra una señal correspondiente al ión molecular 412 (m/z) y los fragmentos abundantes característicos de su estructura.

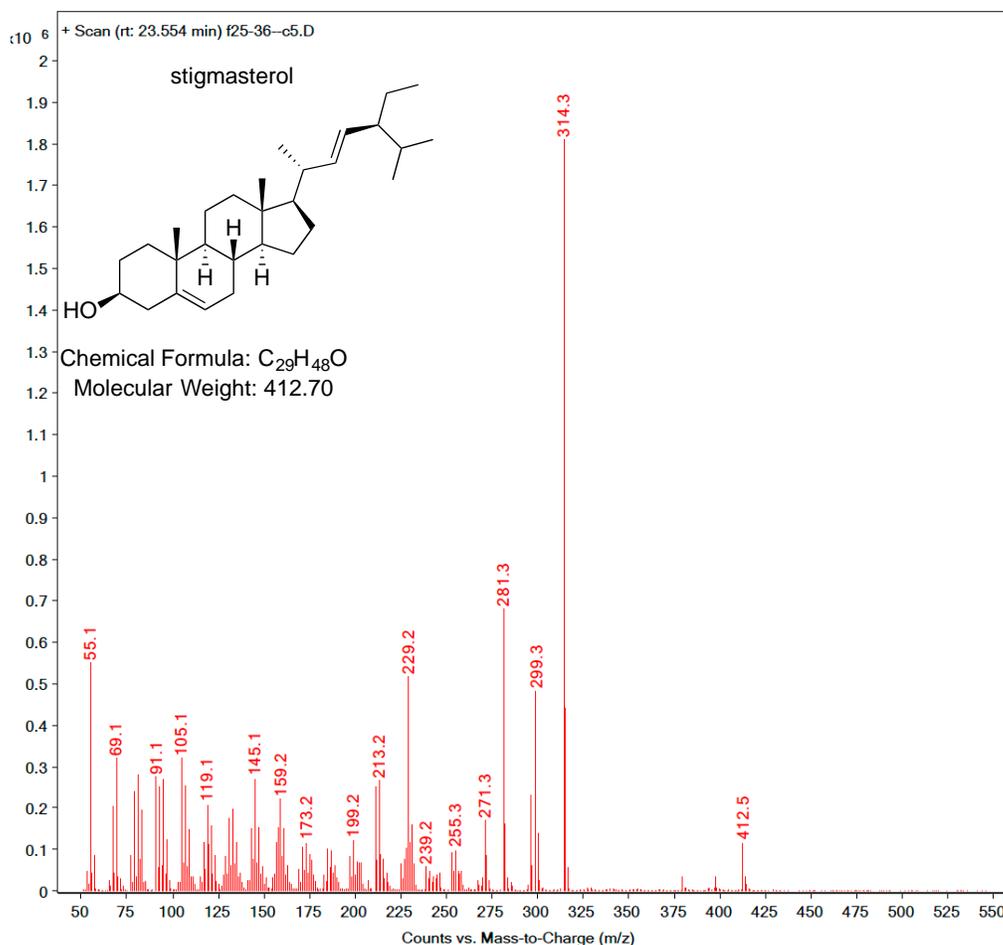


Figura 15. Espectro de masas del estigmasterol.

De la misma manera, se logró identificar el esteroles campesterol con un ion molecular de 400 (m/z) y su patrón de fragmentación característico (Figura 16).

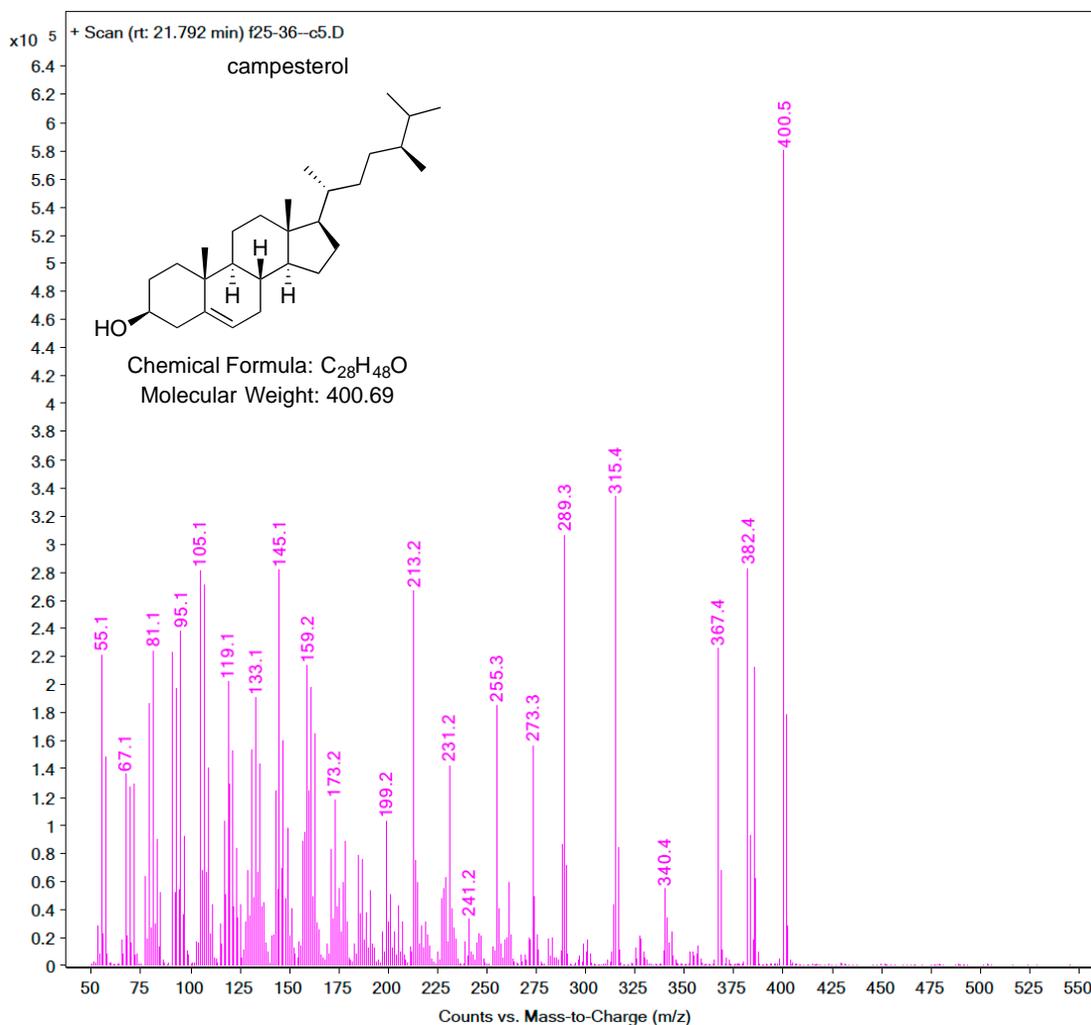


Figura 16. Espectro de masas del campesterol.

3.5.2.3 β -sitoesterol (3)

De las fracciones 7-12 (100% CH₂Cl₂) de la columna del extracto de cloruro de metileno, se hizo una segunda purificación, obteniéndose un sólido blanco cristalino en las fracciones 27-45, con una elución de 100 % CH₂Cl₂, cuyo R_f fue de: 0.30. El sólido se comparó mediante CCD con una muestra auténtica de (Sigma-Aldrich). La presencia de la estructura también se corroboró mediante el análisis espectroscópico de IR (ATR) (Figura 17).

El espectro de IR (ATR) Figura 14, muestra una banda ancha entre 3425.9-3315.7 cm^{-1} correspondiente al grupo hidroxilo (O-H), las bandas de 2935 y 2867.3 cm^{-1} corresponden a los estiramientos C-H de CH_3 , CH_2 , CH. A 1668.7 cm^{-1} se observa la señal del estiramiento C=C del doble enlace, la señal a 1055.5 cm^{-1} correspondiente a la vibración C-C.

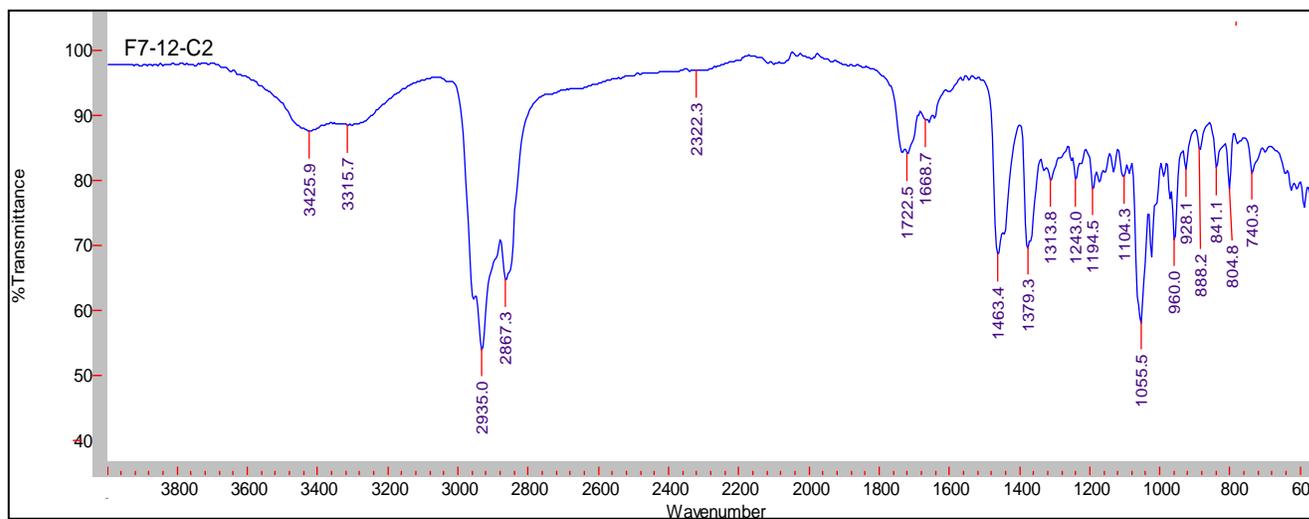


Figura 17. Espectro de infrarrojo del compuesto β -sitosterol.

Finalmente, en otras fracciones de la columna se obtuvo más de este compuesto, el cual se identificó por cromatografía de gases y de masas CG-EM con ion molecular de 414 (m/z) correspondiente al β -sitosterol, este compuesto es muy común en los extractos menos polares de la mayoría de las plantas. El espectro de masas corresponde a este compuesto y a sus patrones de fragmentación característico (Figura 18).

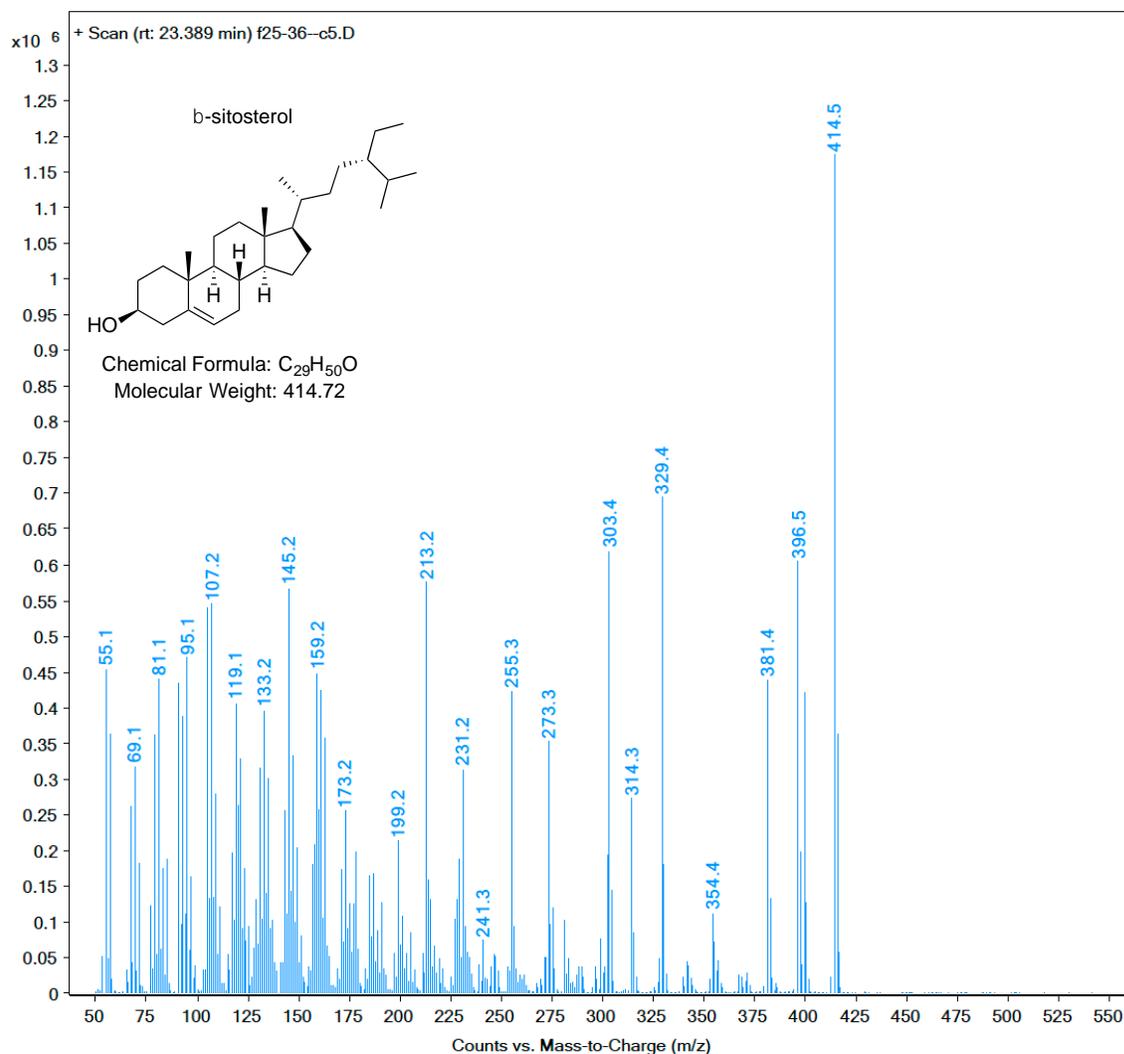


Figura 18. Espectro de masas del β -sitosterol.

3.5.2.4 Ergosterol (estructura cristalina) (4)

Del extracto crudo de diclorometano, se observó la formación de un sólido cristalino, el cual se decantó y se filtró para obtener unos cristales interesantes. Los cristales

se observaron más detalladamente con un microscopio convencional y las estructuras fueron candidatas para realizar un experimento de difracción por rayos X (Figura 19).

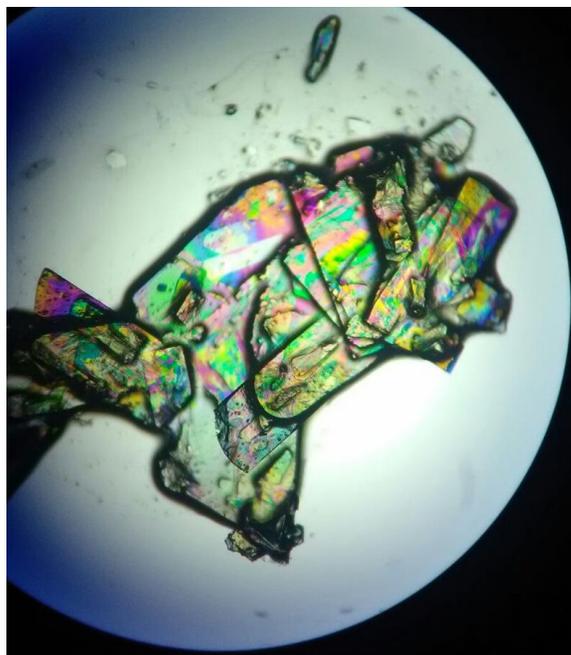


Figura 19. Microscopia de los cristales de Ergosterol.

El espectro de difracción de rayos X, proporcionó un resultado interesante, primero se confirma la estructura del ergosterol (Figura 20 a) y adicionalmente se observó la cristalización como un dímero que contiene un doble puente de hidrógeno con una molécula de agua (Figura 20b y 20c). Lo anterior ocurre en la celda unitaria de la red cristalina. Este resultado es atractivo, ya que puede ser explotado para estudios fisicoquímicos del tipo: de dinámica molecular y distancias de enlace de la estructura cristalina como insumo para futuros modelos de acción biológica de este fitosterol.

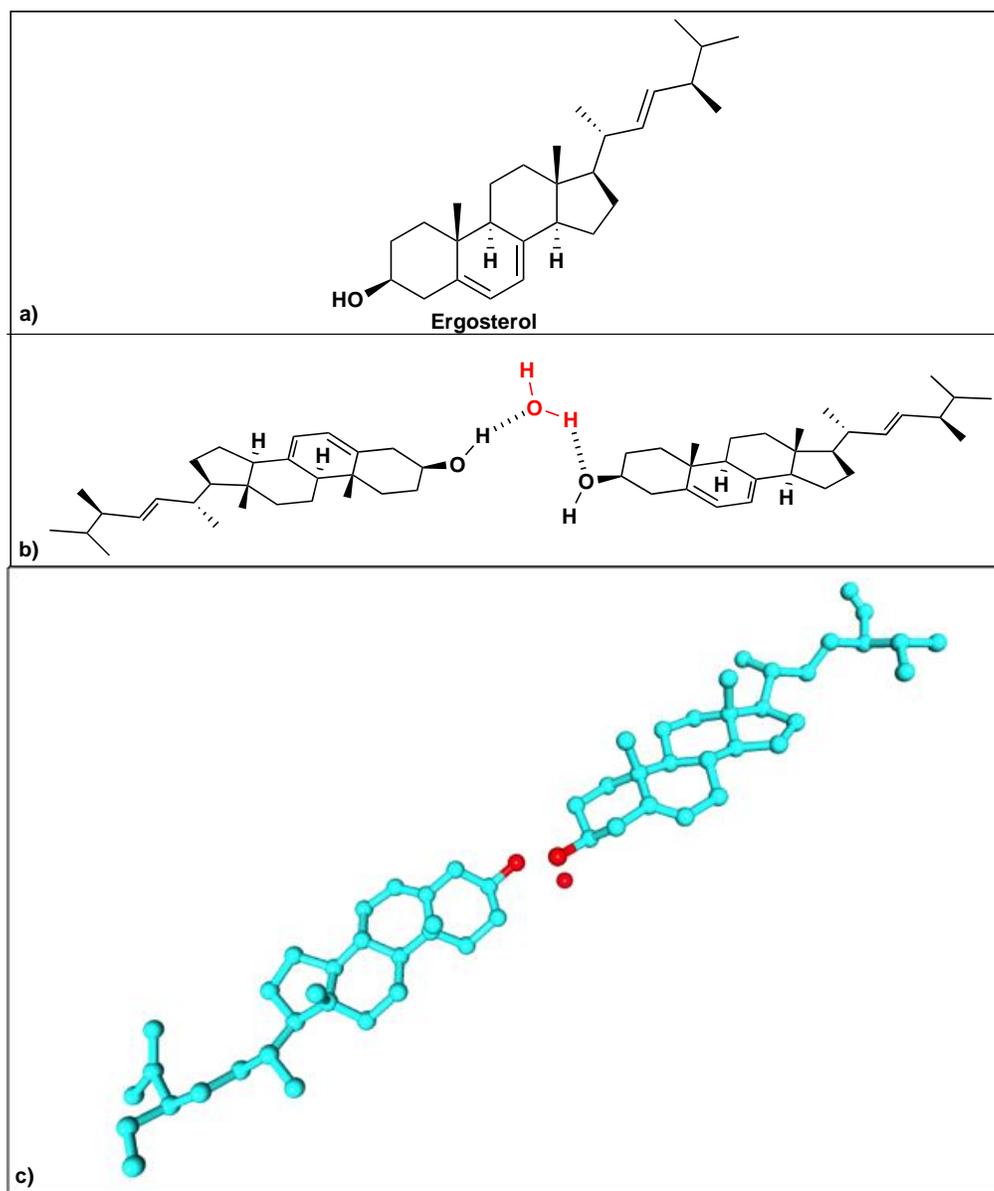


Figura 20. a) Estructura del Ergosterol, b) Proyección de los puentes de hidrógeno entre el agua y las moléculas del ergosterol, c) Proyección de la unidad mínima de celda unitaria del espectro de Difracción por Rayos X.

3.5.2.4 Ácidos grasos (5)

En casi todas las fracciones se encontró la presencia de una mezcla oleosa translúcida denominada DOSI-F-6. La mezcla se aisló por medio de la CC, el aceite obtenido fue analizado por espectroscopia de RMN. El espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H del compuesto DOSI-F-6 (Figura 21), presenta 10 señales con intensidades significativas, estas señales son características a las que presentan los hidrógenos de los principales componentes en los óleos, o en los triglicéridos. Una comparación con datos reportados en la literatura (Mallamace *et al.*, 2018) demuestra la existencia de las señales características de los aceites vegetales (Figura 22). Como puede observarse en el Cuadro 11, los desplazamientos para los diferentes tipos de hidrógenos característicos en las mezclas oleosas de los ácidos insaturados, palmítico, oleico y linolénico, presentes en el aceite de oliva coinciden con las señales encontradas en la mezcla DOSI-F-6.

Es importante señalar que los aceites vegetales, presentan diferentes proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados, como ácido palmítico, ácido oleico (omega-9), ácido linoléico (omega-6) y linolénico (omega-3), de manera que las señales resultantes son consecuencia de la sobreposición de protones, formando diferentes desplazamientos químicos y presentan tamaños distintos dependiendo de la proporción de ácidos grasos.

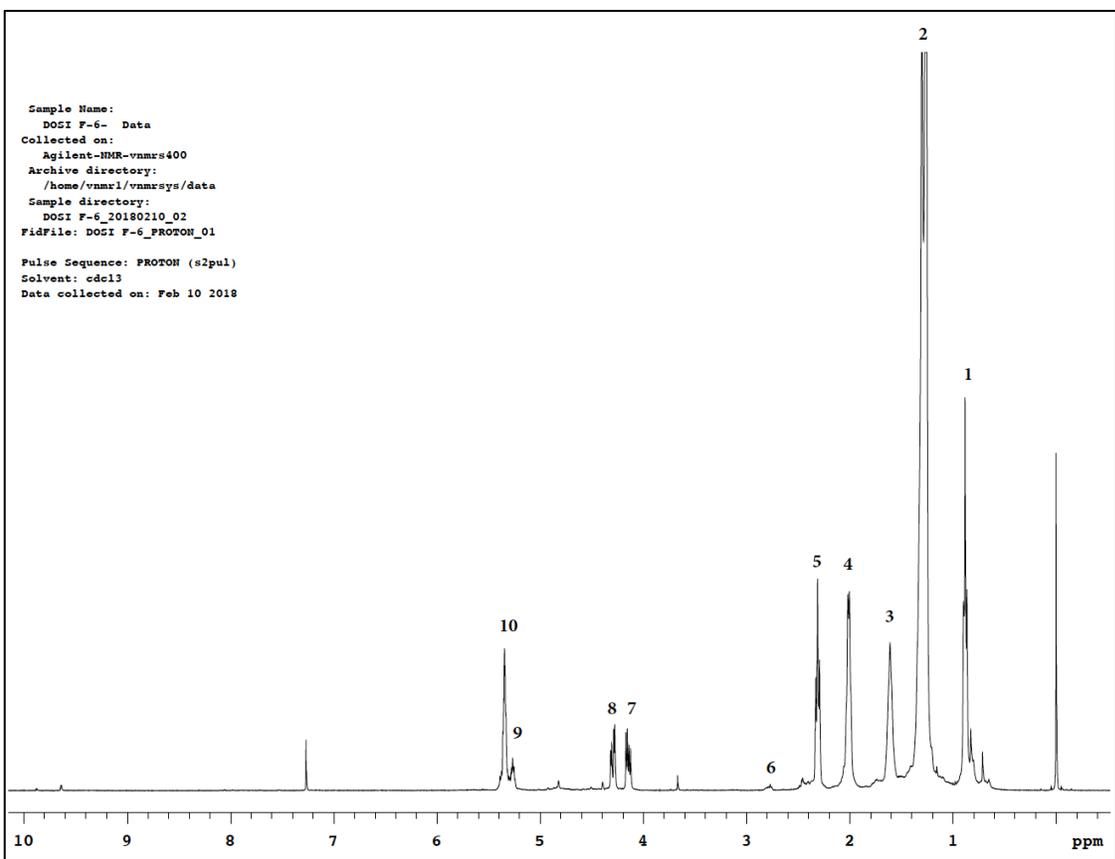


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H del compuesto F-6.

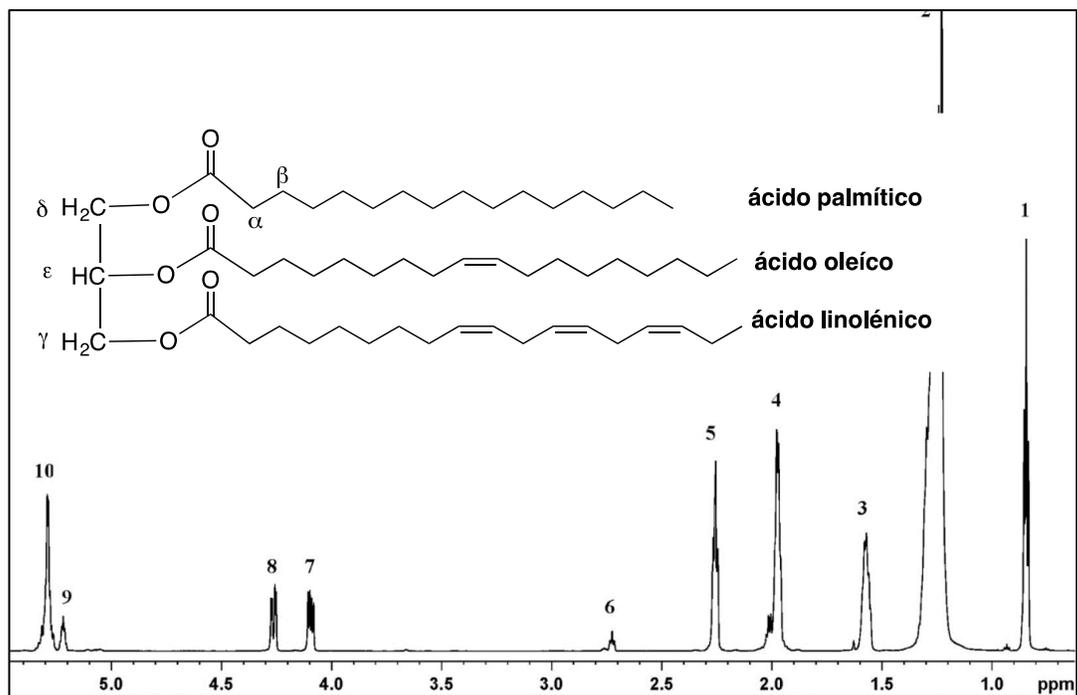


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H del aceite de oliva.

Cuadro 11. Desplazamiento químico (δ) y asignación de las principales señales de resonancia en el espectro de ^1H RMN de la mezcla DOSI-F-6.

Señal	(δ) ppm DOSI-F-6	(δ) ppm Literatura ^a	Protón (H)	Grupo funcional
1	0.85-0.90	0.9	$-\text{CH}_3$	Protones metílicos en el extremo de todas las cadenas del grupo acilo
2	1.24-1.36	1.3	$-(\text{CH}_2)_n-$	Hidrógenos metilénicos de ácidos grasos de triacilglicerol
3	1.54-1.60	1.6	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Hidrógenos β -carboxílicos
4	1.99-2.06	2.0	$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$	Hidrógenos alílicos externos
5	2.28-2.33	2.3	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$	Hidrógenos α -carboxílicos
6	2.74-2.78	2.8	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	Hidrógenos alílicos internos
7	4.11-4.16	4.1	$-\text{CH}_2\text{OCOR}-$	Hidrógenos δ metílicos del glicerol
8	4.26-4.30	4.3	$-\text{CH}_2\text{OCOR}-$	Hidrógenos γ metílicos del glicerol
9	5.32-5.34	5.3	$-\text{CHOCOR}$	Hidrógenos ϵ metílicos del glicerol
10	5.32-5.38	5.4	$-\text{CH}=\text{CH}-$	Hidrógenos olefínicos

^a.. D. Mallamace et al. / *Physica A* 499 (2018) 20–27

3.6 Conclusiones

Derivado del estudio fitoquímico de los extractos de acetato de etilo y diclorometano, partición del metanólico de la pulpa (blanca) de ilama, se lograron aislar y purificar completamente dos compuestos. De acuerdo a la análisis de los datos espectroscópicos obtenidos en los espectros, se encontró que las estructuras químicas de los compuestos corresponden a: (+) catequina y β -sitosterol. Además se obtuvo una mezcla sólida en los cuales se pudo determinar por CG-EM la presencia de estigmasterol y campesterol como componentes principales. Por otro lado se determinó por espectroscopia por difracción de Rayos X la estructura del ergosterol como un dímero anclado por una molécula de agua. Finalmente se corrobora la presencia de ácidos grasos, compuestos muy comunes en este tipo de sustratos alimenticios. Aunque muchos compuestos diversos se han reportado en la fitoquímica de annonaceas, es la primera vez que se reporta el aislamiento de (+) catequina de la pulpa en el extracto de acetato de etilo de la especie.

CAPÍTULO IV. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE ILAMA (*Annona diversifolia*) EN PULPA Y CÁSCARA

4.1 Resumen

Actualmente existe interés en la investigación de frutos silvestres para identificar sus propiedades nutraceuticas y aplicaciones potenciales para la salud humana, además de fomentar su consumo y producción. Los frutos de *Annona diversifolia*, conocidos como ilama han sido poco estudiados, no obstante, se asume que poseen compuestos antioxidantes con actividad biológica. El objetivo del presente estudio fue evaluar las propiedades antioxidantes *in vitro* en la pulpa y cáscara de dos genotipos de frutos de ilama, pulpa rosa y blanca, provenientes del estado de Guerrero. Las propiedades antioxidantes de las cáscaras de *Annona diversifolia*, así como sus respectivas pulpas, fueron determinadas cuantificando su contenido de fenoles y flavonoides totales y .la capacidad antioxidante por los ensayos ABTS, DPPH y FRAP. De acuerdo con los resultados, no se observaron diferencias significativas en el contenido fenólico de las cáscaras de ambos frutos y fue superior al 70% respecto al encontrado en las pulpas (8.51 ± 1.09 y 8.65 ± 1.49 mg EAG g^{-1}). Por otro lado, en las pulpas se encontró un mayor porcentaje de flavonoides (44.7-52.4%) en relación al contenido fenólico. Finalmente, las cáscaras de ilama mostraron una mayor capacidad antioxidante, acorde con su mayor contenido fenólico. Los tres ensayos probados para medir capacidad antioxidante, mostraron la misma tendencia tanto en cáscara como en pulpa y los valores más altos correspondieron al ensayo del radical libre DPPH. Por lo tanto, se concluye que la cáscara de ambos tipos de frutos es una fuente de antioxidantes con potencial de uso en la industria alimentaria o farmacéutica, asimismo se confirma que la pulpa de estos frutos es una fuente de antioxidantes naturales benéficos para la salud de los consumidores.

Palabras clave: *Annona diversifolia*, frutos de ilama, fenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante.

4.2 Abstract

Recently, there exist interest in the researches related to wild fruits, for identify their nutraceutical properties and potential applications for the human health, additionally to foment their production and consume. Fruits of *Annona diversifolia* known as ilama, have been scarcely studied, however, it is assumed that they contain biologically active antioxidant. The purpose of the present study was to evaluate the antioxidant properties *in vivo* in pulp and skin of two genotype of ilama, pink and white pulp, coming from Guerrero state. The antioxidant properties in skin and pulp of *Annona diversifolia* were measured through the quantification of total phenols and flavonoids and the antioxidant capacity by ABTS, DPPH and FRAP assays. According to the results obtained, there were not observed significant differences of the phenolic content, between the skins of both genotype and they were 70% higher with respect to their pulps (8.51 ± 1.09 and 8.65 ± 1.49 mg EAG g^{-1}). On the other side, it was found higher percentage of flavonoids in pulps (44.7-52.4%) compared to the phenolic content. Finally, the skin of ilama showed higher antioxidant capacity, according to their higher phenolic content. Three of the intended assays to measure the antioxidant capacity, showed the same tendency in skin and pulp and the higher values were for the free radicals assays DPPH. Thus, is concluded that the skin of both genotype is a source of antioxidants with potential uses in foods and pharmaceutical industry, moreover, is confirmed that the pulps of both genotype are source of natural antioxidants beneficial for the consumer health.

Key words: *Annona diversifolia*, ilama fruits, total phenols, total flavonoids, antioxidant capacity.

4.3 Introducción

Las frutas y vegetales son una fuente rica de metabolitos secundarios o compuestos bioactivos. Estos componentes son importantes debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Patil *et al.*, 2009).

Los antioxidantes, son compuestos capaces de retrasar o inhibir los procesos de oxidación que se producen bajo la influencia del oxígeno atmosférico o por las especies reactivas de oxígeno, por lo tanto, este tipo de compuestos están involucrados en el mecanismo de defensa del organismo contra las patologías asociadas al ataque por radicales libres, de esta manera reducen el estrés oxidativo en las células y son útiles en el tratamiento de muchas enfermedades humanas como el cáncer, afecciones cardiovasculares, y procesos inflamatorios, deficiencias cardíacas y diabetes (Krishnaiah *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2009; Picoshi *et al.*, 2002). Los antioxidantes más comunes en las frutas son los compuestos fenólicos, las vitaminas A, B, C, E y los carotenoides; estos últimos en menor proporción (Lim *et al.*, 2007). El consumo de frutas y verduras se ha asociado con la reducción de enfermedades crónicas como diabetes, enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cáncer (Sun *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos como los flavonoides, ácidos fenólicos y taninos representan un grupo de sustancias comunes en las plantas, caracterizados estructuralmente por la presencia de una o más unidades de fenol, dentro de este grupo los flavonoides son la clase más abundante y estudiada (Lima *et al.*, 2014) y tienen diversos efectos biológicos, como antiinflamatorios, anticancerígenos y antiateroscleróticos estos atribuidos a su actividad antioxidante (Chung *et al.*, 1998).

Estudios realizados en anonáceas han proporcionado información sobre la presencia de compuestos con actividad antioxidante en cáscara y semilla, siendo las semillas la principal fuente de antioxidantes (Roesler *et al.*, 2007). El contenido promedio de fenoles totales en la pulpa de *Annona diversifolia* es de 100 mg EAG 100 g⁻¹ (Vasco *et al.*, 2008).

A pesar de que existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante, es importante disponer de una metodología reproducible y rápida. Si bien, cada método tiene sus propias bondades y desventajas, se ha encontrado que los más comunes y confiables son los métodos ABTS y DPPH; estos han sido modificados y mejorados en los últimos años (Krishnaiah *et al.*, 2011). El ensayo de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es una de las pruebas antioxidantes más ampliamente utilizadas para muestras de plantas. El DPPH es un radical libre estable que reacciona con compuestos que pueden donar un átomo de hidrógeno (Krishnaiah *et al.*, 2011). El ensayo ABTS también se utiliza para determinar la capacidad antioxidante (captación de radicales libres), y tiene la ventaja de ser uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y coherentes. Además, el ABTS presenta importantes ventajas; muestra varios máximos de absorción y un amplio espectro de solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica (Kuskoski *et al.*, 2005).

El objetivo de este estudio fue determinar las propiedades nutraceuticas, *in vitro*, en pulpa y cáscara y pulpa de dos genotipos de frutos de *Annona diversifolia* colectados en El Machito de las Flores, Municipio de Cocula, Guerrero, para establecer la existencia de diferencias entre los genotipos de pulpa blanca y rosa, respecto a su potencial nutraceutico.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Material vegetal

Los frutos de pulpa blanca y rosa de *A. diversifolia* fueron colectados en estado de madurez comercial en octubre de 2017, en el Machito de las Flores, Municipio de Cocula, Estado de Guerrero, ubicado geográficamente a una altitud de 630 m y coordenadas 18° 20' N y 99° 28' O. La pulpa y cáscara fueron liofilizados durante 48 h (-50 °C, 15 x 10⁻³ mBar) en un equipo Labconco 7751000, Kansas, EUA.

4.4.2 Actividad antioxidante

Preparación de extractos

A partir de cáscara y pulpa liofilizada se prepararon los extractos de acuerdo con la metodología de Hernández-Rodríguez et al., (2016). Cada muestra se mezcló con metanol al 80% en proporción 0.1:10 y 0.2:10 (p/V) de cáscara y pulpa, respectivamente. El pH se ajustó a 3.0 con ácido clorhídrico HCl al 10 %. Posteriormente, la extracción se hizo por agitación (5 min, a 3000 rpm) en vortéx, (Vortéx synergy, WVR International), sonicación por 15 min (Ultrasonic Cleaner 8890, Cole Parmer), y agitación en incubadora (30 min, 30 °C) (Orbital Prendo INO-650 M). Finalmente, los extractos fueron centrifugados (1277 g, 15 min) (SOLBAT J-600, México). Los sobrenadantes fueron recuperados y aforados a 10 mL con el disolvente empleado para la extracción, se colocaron en frascos ámbar y se refrigeraron (-21 °C) para el análisis posterior de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante. Cada muestra se procesó por triplicado.

Los extractos se diluyeron a una concentración adecuada de acuerdo con cada una de las pruebas aplicadas (CFT, FT, DPPH, ABTS, FRAP), de tal manera que se obtuviesen datos dentro del intervalo de cada una de las curvas de calibración. Además, se realizó una corrección de los resultados obtenidos con respecto al contenido de humedad para ser comparables respecto a la literatura.

Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales (CFT) fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) adaptado a microplacas. Se utilizó una microplaca de 96 pozos para llevar a cabo la reacción, en cada pozo se colocaron: el extracto con la dilución adecuada (25 μL), agua destilada (125 μL), reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:10) (20 μL) y Na_2CO_3 al 20 % (30 μL). La mezcla de reacción se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos en ausencia de luz, la absorbancia frente al blanco fue medida a 765 nm en un lector de microplacas multidetector con inyectores Synergy® HT equipado con el software Gen5 de análisis de datos (Biotek Instruments Inc., Winoosky, VT, USA). La curva de calibración del ácido gálico se preparó en un rango de concentraciones de 0.001 a 0.01 mg mL^{-1} , la ecuación obtenida de la curva fue utilizada para determinar la concentración de fenoles totales en la muestra. Las lecturas de absorbancia se hicieron por cuadruplicado. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base húmeda ($\text{mg EAG g}_{\text{bh}}^{-1}$).

Determinación de flavonoides

Los flavonoides totales (FT) fueron determinados de acuerdo al procedimiento de Kubola & Siriamornpun (2011) adaptado a microplacas. Una alícuota de extracto (0.5 mL) se mezcló con 2.5 mL de agua destilada y NaNO_2 al 5 % (0.15 mL), después de 5 min, se agregó 0.3 mL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 %). La mezcla se dejó reposar durante 5 min y enseguida se agregó 1 mL de NaOH (5 %); las muestras fueron agitadas en vortex (3,000 rpm, 3 min). Finalmente se transfirieron 200 μL de cada muestra a los pozos de la microplaca y se midió la absorbancia a 510 nm. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado. El intervalo de la curva de calibración de catequina fue de 0 a 130.18 μM . La ecuación obtenida de la curva de calibración de catequina fue utilizada para determinar la concentración de flavonoides totales en las muestras. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra en base húmeda ($\text{mg EC g}_{\text{bh}}^{-1}$).

Ensayo ABTS

El ensayo ABTS descrito por Re *et al.* (1999), adaptado a microplacas se utilizó para medir la capacidad antioxidante en extractos de frutos de *A. diversifolia*. El radical libre ABTS^{•+} se generó por la reacción de ABTS (7.4 mM) con persulfato de sodio (2.6 mM) en proporción 1:1. Esta disolución se dejó reposar durante 16 h y finalmente fue diluida para obtener una absorbancia entre 0.7 y 1.2 nm, para lo cual se tomaron 600 µL y se aforaron a 10 mL con metanol al 80%. En los pozos de la microplaca se mezclaron 20 µL de muestra y 180 µL de la disolución ABTS^{•+}. Como control; se usó la disolución ABTS^{•+} (200 µL). La microplaca se agitó y la mezcla de reacción se dejó reposar durante 10 min protegida de la luz. La disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción se midió a 734 nm. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado. La ecuación obtenida de la curva de calibración de Trolox fue utilizada para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. El intervalo de concentraciones de la curva de calibración de Trolox fue de 4.99 a 59.93 µM. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo 57 de muestra en base húmeda (µmol ET g_{bh}⁻¹).

Ensayo DPPH

La capacidad de atrapamiento de radicales libres se midió utilizando el ensayo DPPH descrito por Cheng *et al.* (2006) adaptado a microplacas. En los pozos de la microplaca se mezclaron 200 µL de una serie de diluciones de los extractos a diferentes concentraciones y 50 µL de disolución de DPPH (0.099 mM). Como blanco; se usó metanol al 80 % (250 µL) y como control una mezcla de metanol al 80 % (200 µL) y DPPH 0.099 mM (50 µL). La curva estándar de Trolox se preparó en el intervalo de una concentraciones de 3.99 y 47.94 µM. La microplaca fue agitada y conservada en oscuridad durante 30 min y la absorbancia se midió a 515 nm. El porcentaje de DPPH degradado fue determinado de acuerdo a la siguiente ecuación (3):

$$\% \text{ DPPH degradado} = 1 - \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3)$$

Donde $A_{muestra}$, A_{blanco} , $A_{control}$ representa la absorbancia del antioxidante de referencia o de la muestra, blanco y el control.

Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base húmeda ($\mu\text{mol ET g}_{bh}^{-1}$). El intervalo de la curva de calibración de Trolox fue de 3.99 a 47.94 μM . El porcentaje de reducción del DPPH fue graficado contra las concentraciones de las muestras y la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) fue calculada de la ecuación de regresión obtenida. Las determinaciones fueron llevadas a cabo por cuadruplicado.

Ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)

La capacidad antioxidante por el ensayo FRAP se evaluó de acuerdo con el procedimiento descrito por Benzie & Strain (1996) adaptado a microplacas.. El reactivo FRAP se preparó en el momento de su uso mezclando buffer de acetatos (300 mM, pH 3.6), disolución de TPTZ 10mM en HCl 40 mM y disolución de cloruro de fierro (III) 20 mM, en una proporción de 10:1:1, respectivamente. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 20 μL de extracto 180 μL de la disolución FRAP y 60 μL de agua destilada, como blanco se utilizó una mezcla de disolución FRAP (200 μL) y agua destilada (60 μL). Después de 30 segundos se midió la absorbancia a 595 nm. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado. El intervalo de la curva de calibración de Trolox fue de 3.84 a 46.10 μM . La ecuación obtenida de la curva de calibración de Trolox fue utilizada para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base húmeda ($\mu\text{mol ET g}_{bh}^{-1}$).

4.4.3 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos de fenoles totales, y flavonoides, así como para la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias empleando la prueba Tukey con un

nivel de confiabilidad $p \leq 0.05$. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico Statgraphics versión plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Fenoles totales

Los compuestos fenólicos encontrados en frutas y verduras han demostrado interés debido a su alto potencial como agentes antioxidantes (Moo-Huchin *et al.*, 2014). En el Cuadro 12 se muestran los resultados de fenoles y flavonoides totales, así como de la capacidad antioxidante de pulpa y cáscara de los frutos de *A. diversifolia*. Como se puede observar existen diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre la pulpa y la cáscara, no obstante, la cáscara presentó el mayor contenido de fenoles totales en ambos tipos de pulpa (31.86 ± 2.51 mg EAG g^{-1}_{bh}), no exhibiendo diferencias significativas entre ellas. Este resultado coincide con trabajos en los cuales los subproductos de las frutas, como la cáscara, suelen contener mayor contenido de compuestos bioactivos que la parte comestible (Can-Cauich *et al.*, 2017). Moo-Huchin *et al.* (2014) reportó menor CFT en pulpa de ilama provenientes de Yucatán en madurez comercial (2.46 mg EAG g^{-1}_{bh}), al igual que Julián-Loaeza *et al.* (2011) en frutos provenientes de Chiapas 1.70 mg EAG g^{-1}_{bh} (pulpa blanca) y 1.29 mg EAG g^{-1}_{bh} (pulpa rosa). El CFT de los frutos evaluados en este estudio fueron superiores a los valores reportados por Almeida *et al.* (2011) en frutos de saramuyo (*Annona squamosa*) (0.81 mg EAG g^{-1}_{bh}) y guanábana (*Annona muricata*) (0.54 mg EAG g^{-1}_{bh}) provenientes de Brasil.

Como se puede observar a pesar de ser la misma especie existe variación en el contenido de compuestos fenólicos, esto podría deberse a factores ambientales, dependiendo la región, y a las diferentes cantidades extraídas de compuestos fenólicos (Nam *et al.*, 2017). Los compuestos fenólicos son considerados los principales fitoquímicos responsables de la actividad antioxidante (George *et al.*, 2014).

Cuadro 12. Fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante en frutos de ilama por el color de pulpa y tejido.

Tejido	Color de pulpa	Fenoles totales (mg EAG g ⁻¹ _{bh})	Flavonoides (mg EC g ⁻¹ _{bh})	DPPH (μmol ET g ⁻¹ _{bh})	ABTS (μmol ET g ⁻¹ _{bh})	FRAP (μmol ET g ⁻¹ _{bh})	Cl ₅₀ (mg mL ⁻¹ _{bh})
Cáscara	Blanca	31.86 a ± 2.51	16.71 a ± 1.67	482.83 a ± 31.55	62.14 a ± 2.92	259.62 a ± 52.02	0.08 a ± 0.01
	Rosa	39.40 a ± 5.35	17.63 a ± 1.58	416.51 a ± 78.07	59.35 a ± 1.20	284.34 a ± 35.92	0.07 a ± 0.01
Pulpa	Blanca	8.51 b ± 1.09	3.60 b ± 0.65	82.86 b ± 11.38	17.82 b ± 1.87	61.95 b ± 6.98	0.02 b ± 0.0
	Rosa	8.65 b ± 1.49	3.12 b ± 0.55	77.55 b ± 12.05	15.88 b ± 2.31	70.46 b ± 12.42	0.02 b ± 0.0

Promedios (n=3) ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, p<0.05).

Los flavonoides son el grupo más común y ampliamente distribuido de los compuestos fenólicos vegetales, que se producen en todas las partes de la planta, particularmente en las células vegetales fotosintetizadoras. Se ha demostrado que muchos flavonoides tienen actividad antioxidante y capacidad para prevenir enfermedades coronarias y anticancerígena (Yao *et al.*, 2004). En este estudio, los flavonoides también se encontraron en mayor proporción en la cáscara de los frutos de ambos colores de pulpa (Figura 23).

El contenido de FT en la pulpa fue mayor al reportado por Moo-Huchin *et al.* (2014) en pulpa de ilama en madurez de consumo (2.30 mg EC g⁻¹_{bh}). De igual manera fue mayor al reportado por Julián-Loeza *et al.* (2011) en frutos de ilama de Chiapas (1.52 mg EC g⁻¹_{bh} en pulpa blanca y 1.07 mg EC g⁻¹_{bh} en pulpa rosa).

Las variaciones en el contenido de fenoles totales y flavonoides totales en comparación con otros resultados pueden deberse a factores como: el grado de madurez de los frutos, diferencias genéticas y a las condiciones ambientales durante el desarrollo del fruto (Zadernowski, Naczka, & Nesterowicz, 2005).

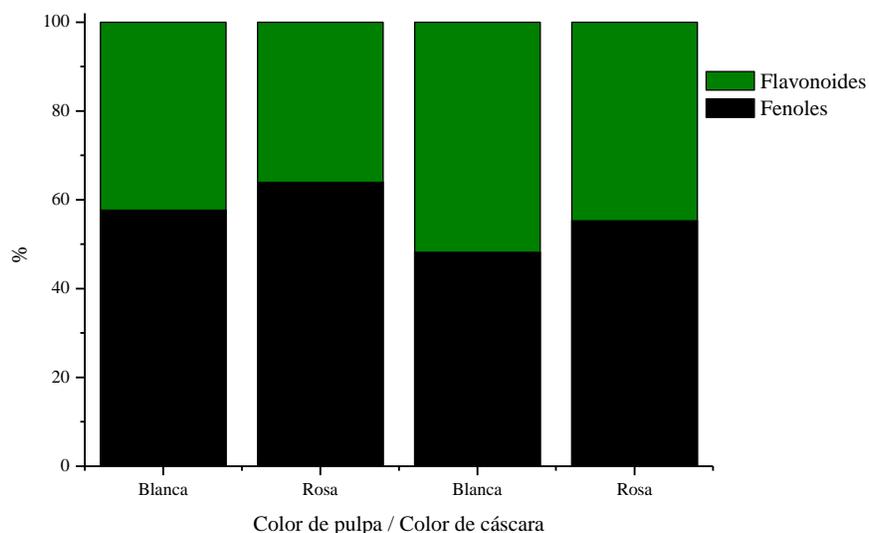


Figura 23. Proporción de contenido total de fenoles (CTF) y flavonoides totales (FT) en frutos de *A. diversifolia* por el color de pulpa y tejido.

4.5.2 Capacidad antioxidante

En el presente estudio se emplearon tres ensayos diferentes (ABTS, DPPH y FRAP) para evaluar la capacidad antioxidante en frutos de *A. diversifolia*. De acuerdo al Cuadro 11 la cáscara fue estadísticamente superior que la pulpa, además, de que se observa una tendencia mayor para DPPH>FRAP>ABTS (Figura 24). La capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS en pulpa fue de 15.88 ± 2.31 a $17.82 \pm 1.87 \mu\text{mol ET g}^{-1}\text{bh}$, estos valores fueron superiores respecto a lo reportado por Moo-Huchin *et al.* (2014) ($6.74 \mu\text{mol ET g}^{-1}\text{bh}$) en frutos de la misma especie.

Por otro lado, la capacidad antioxidante de los frutos evaluados con el ensayo DPPH fue mayor en los de pulpa color blanca. Los resultados obtenidos en pulpa (77.55 ± 12.05 y $82.86 \pm 11.38 \mu\text{mol ET g}^{-1}\text{bh}$) fueron superiores a lo reportado por Moo-Huchin *et al.* (2014) ($3.57 \mu\text{mol ET g}^{-1}\text{bh}$) en frutos de ilama, y a los valores reportados por Almeida *et al.*, (2011) para saramuyo ($6.21 \pm 0.62 \mu\text{mol ET g}^{-1}\text{bh}$) y guanábana ($6.09 \pm 0.13 \mu\text{mol ET g}^{-1}\text{bh}$).

En cuanto a los valores encontrados para el ensayo FRAP estuvieron en un rango de 61.95 ± 6.98 a $70.46 \pm 12.42 \mu\text{mol ET g}^{-1}\text{bh}$.

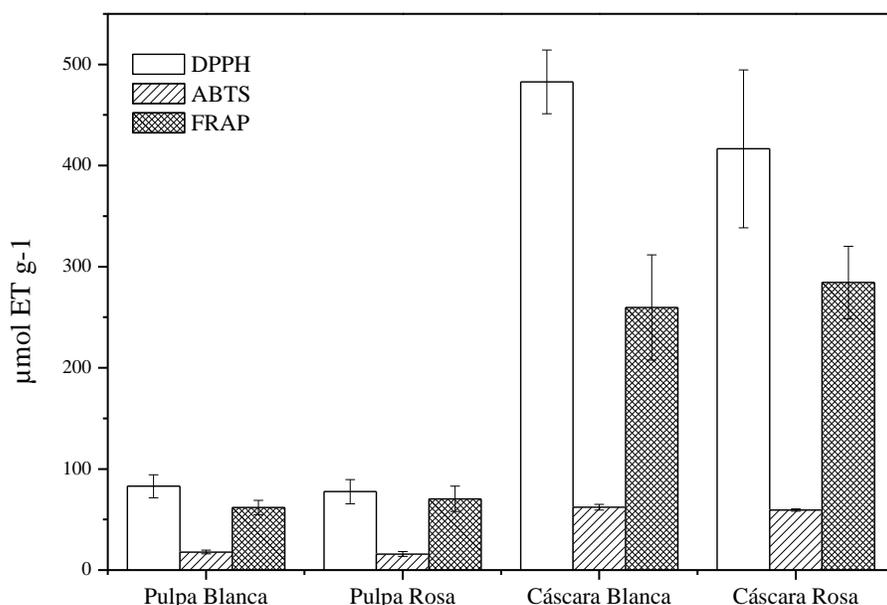


Figura 24. Comparaciones del contenido equivalente a TROLOX en frutos de ilama por el color de pulpa y tejido.

Otro parámetro determinado por el ensayo DPPH fue la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) que representa la concentración necesaria de extracto para inhibir al 50% la actividad del radical DPPH (Cuadro 12). El DPPH es un radical libre estable ampliamente utilizado para evaluar la capacidad de los extractos en su acción como eliminadores de radicales libre o donadores de hidrógeno, y para evaluar la actividad antioxidante de una matriz alimentaria (Loizzo *et al.*, 2012). Un bajo valor indica una mayor capacidad antioxidante. La cáscara de ambos colores de pulpa fueron las de mejor IC₅₀ (0.02 ± 0.0 mg mL⁻¹), seguido de la pulpa (0.08 ± 0.0 mg mL⁻¹) por su parte, Julián-Loaeza *et al.* (2011) estudiaron la capacidad antioxidante en frutos de ilama obteniendo valores superiores a los de este estudio (1.71 y 1.99 mg mL⁻¹) en pulpa blanca y pulpa rosa, respectivamente.

4.6 Conclusiones

Los frutos de *Annona diversifolia* contienen cantidades apreciables de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante, más en cáscaras que en la pulpa, sin importar el color de la pulpa. Con esto; se demuestra que la cáscara de ilama se puede considerar una fuente valiosa de compuestos fenólicos con actividad antiradicalaria y por lo tanto posee un alto potencial de uso, para la prevención de enfermedades causadas por el estrés oxidativo.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se realizó un análisis detallado de la composición nutrimental, la determinación de actividad antioxidante, además de un estudio fitoquímico parcial de los frutos de dos colores de pulpa de *A. diversifolia*. Particularmente, la constitución del mesocarpio de los frutos de ilama, contiene una gran variedad de compuestos minerales esenciales para el organismo humano. En cuanto al estudio fitoquímico; se identificó por primera vez la (+) catequina, además de esteroides, ácidos grasos y glucósidos. En general, el mesocarpio de ilama contiene compuestos lipófilos y fenólicos. La confirmación de una alta capacidad antioxidante en los frutos de ilama, exaltan a esta especie como para su empleo como ingredientes con valor agregado en la industria farmacéutica y de alimentos. Estos resultados apoyan el uso de esta fruta exótica como una fuente rica de componentes que promuevan la salud, con capacidad de prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, aunado a incentivar contribuciones para conservar la biodiversidad y promover el desarrollo y explotación de las frutas exóticas de México.

LITERATURA CITADA

- Abbasoglu, U., Sener, B., Gunay, Y., Temizer, H. (1991). Antimicrobial activity of some isoquinoline alkaloids. *Archiv. der Pharm.* 324, 379–380.
- Abbaspour, N., Hurrell, R. and Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences.* 19(2): p. 164-174.
- Abdualrahman, M. A. Y., Ma, H., Zhou, C., Yagoub, A. E. A., Ali, A. O., Tahir, H. E., & Wali, A. (2016). Postharvest physicochemical properties of the pulp and seed oil from *Annona squamosa* L. (Gishta) fruit grown in Darfur region, Sudan. *Arabian Journal of Chemistry.* doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.07.008.
- Almeida, M. M. B., de Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., do Prado, G. M., de Carvalho Magalhães, C. E., Maia, G. A., & de Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155-2159. 10.1016/j.foodres.2011.03.051.
- Amoo, I.A., Emenike, A.E., Akpambang, V.O.E. (2008). Compositional evaluation of *Annona cherimoya* (custard apple) fruit. *Trends in Applied Sciences Research* 2, 216–220.
- Andrés Agustín J. & Hernández L. A. (2011). Biología, diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de *Annonaceae* en México. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 141 p.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of AOAC. International. Fruits and Fruit Products. Washington, USA. pp: 829-830.
- Asare, G.A., Afriyie, D., Doku, D., Mahmood, S.A., Rahman, H., Ngala, R.A., Abuti, H., Doku, D., Mahmood, S.A., Rahman, H. (2015). Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. on the prostate, BPH-1 cells, and some target genes. *Integrative cancer therapies*, 14(1), 65-74.

- Ballesteros Patrón G., Zavala Hernández F. y Rodríguez Paez L. A. (2008). Manual Técnico sobre el cultivo de llama. ITCA. Ciudad Altamirano, Gro.
- Ballesteros Patrón G., Rodríguez Páez L. A, de la Paz R. J., Urieta Pérez M., Zavala Hernández F., Ballesteros Nova N y Martínez Soriano J. P. (2010). Diversidad en las ilamas (*Annona diversifolia* Saff.) de la tierra caliente del Balsas, México. Instituto tecnológico de Cd. Altamirano.
- Barbalho, M., Goulart, S.A., Vasques, R.M., Farinazzi-Machado, F., De Souza, M., Dos Santos Bueno, C., Patricia, Guiguer, E.L., Araujo, A.C., Groppo, M. (2012a). *Annona* sp: Plants with multiple applications as alternative medicine- A Review. *Current Bioactive Compounds*, 8(3), 277-286.
- Barbalho, S.M., Soares de Souza Mda, S., dos Santos Bueno, P.C., Guiguer, E.L., Farinazzi-Machado, F.M., Araújo, A.C., Meneguim, C.O., Pascoal Silveira, E., de Souza Oliveira,N., da Silva, B.C., Barbosa Sda, S., Mendes, C.G., Gonçalves, P.R. (2012b). *Annona montana* fruit and leaves improve the glycemic and lipid profiles of Wistar rats. *Journal of medicinal food*, 15(10), 917-922.
- Baskar, R., Rajeswari, V., & Kumar, T. S. (2007). In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*; 45: 480-485.
- Behari J, Sharma RK. (1986) Isolation of 16-hentriacontanone, alcohols and sterols from the leaves of *Annona squamosa*. *Journal of the Indian Chemical Society*; 63: 255-6.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70–76. doi.org/10.1006/abio.1996.0292.
- Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, E. E., Cortes, D. (2005). Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat. Prod. Rep.* 22, 269–303.

- Bories C, Loiseau P, Cortes D, Myint SH, Hocquemiller R, Gayral P, *et al.* (1991). Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimola* seeds. *Planta Med*; 57:434–6.
- Cabedo, N.; Moreno, L.; López, S.; Paloma, M.; Párraga, J.; Cortes, D. (2011). Las anonáceas: fuente de inspiración para la obtención de nuevos medicamentos. En: González Esquinca, A. R.; Luna-Cazás, L. M.; Gutiérrez Jiménez, J.; Schlie Guzmán, M. A.; Vidal-López, D. G (coord). 2011. Anonáceas plantas antiguas, estudios recientes. Colección Jaguar UNICACH. México. Pp. 37-61.
- Campos, F. R., Batista, R. L., Batista, C. L., Costa, E. V., Barison, A., dos Santos, A. G., & Pinheiro, M. L. B. (2008). Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(10), 804-806.
- Can-Cauich, C. A., Sauri-Duch, E., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., Gonzalez-Aguilar, G. A., Cuevas-Glory, L. F., ... & Moo-Huchin, V. M. (2017). Tropical fruit peel powders as functional ingredients: Evaluation of their bioactive compounds and antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 37, 501-506.
- 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. 10.1016/j.pbb.2009.11.017.
- Cárdenas Baquero, G. D., Arrazola Paternina, G., & Villalba Cadavid, M. (2016). Frutas tropicales: fuente de compuestos bioactivos naturales en la industria de alimentos. *Ingenium*, 17(33).
- Castellanos, J. Z., Uvalle-Bueno, J. X., & Aguilar-Santelises, A. (2000). Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas agrícolas, plantas y ECP. 2ª edición. Instituto de capacitación para la productividad agrícola.

- Cavé A. Annonaceae alkaloids. In Phillipson JD, Roberts MF, Zenk MH, editors. The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. Berlin: Springer-Verlag. 1985; 79-101.
- Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, S. C., Bhadra, R., & Mandal, A. B. (2003). CNS activity of the methanol extract of *Mallotus peltatus* (Geist) Muell Arg. leaf: an ethnomedicine of Onge. *Journal of ethnopharmacology*, 85(1), 99-105. doi:10.1016/S0378-8741(02)00379-3.
- Chávez P. E. M., L. Marroquín A., E. Cedillo P., E. Cervera B. 1999. Estudio Etnobotánico de Ilima (*Annona diversifolia* Saff.) en Tejupilco, Estado de México. In: II Congreso Internacional de Anonáceas. L. Marroquín, M. Perez, M. Martínez (eds). Tuxtla Gutierrez, Chiapas. Octubre 26, 27 y 28. México. pp:118-124.
- Chang F. R., Wu Y. C. and Duh C. Y. (1993). Studies on the Acetogenins of Formosan Annonaceous Plants, II. Cytotoxic Acetogenins from *Annona reticulata*. *Journal of Natural Products*, 56 (10): 1688-1694.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7429-7436. doi:10.1021/jf0611668.
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(6), 421-464.
- Cordeiro M. C. R., A. C. de Q. Pinto and S. R. M. de Andrade, *et al.* (2004). Uses. In: *Annona* Species. J T Williams, R W Smith, A Hughes, N Haq, C R Clement (eds). International Centre for Underutilized Crops. University of Southampton, UK. pp:39-45.
- Cordeiro M. C. R., de Q. Pinto, A. C., de Andrade, S. R. M. (2005). Uses. In: Williams, J. T., Smith, R. W., Hughes, A., Haq, N., Clement, C. R. (Eds.), *Annona*

- species. International Centre for Underutilized Crops. University of Southampton, UK, pp. 39–45.
- Coria-Tellez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2016). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Cortés D., Myint S. H., Dupont B. and Davoust D. (1993). Bioactive Acetogenins from Seeds of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*, 32 (6):1475-1482.
- Costa, E. V., da Cruz, P. E. O., de Lourenço, C. C., de Souza Moraes, V. R., de Lima Nogueira, P. C., & Salvador, M. J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). *Natural product research*, 27(11), 1002-1006.
- Cren-Olivé, C., Wieruszkeski, J. M., Maes, E., & Rolando, C. (2002). Catechin and epicatechin deprotonation followed by ¹³C NMR. *Tetrahedron Letters*, 43(25), 4545-4549.
- Cruz Pineda E. (2002). Cultivo de Anona. Boletín Técnico No. 7. Centro de Tecnología agropecuaria y forestal (CENTA). El Salvador.
- Cruz Pineda, E. (2003). Guía técnica: cultivo de la anona. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, San Salvador (El Salvador) Ministerio de Agricultura y Ganadería, San Salvador (El Salvador).
- CSTPA. (1980). Handbook on Reference Methods for Soil Testing (Revised Edition). Council Soil Testing and Plant Analysis. Athens, Georgia, USA. 247 p.
- Da Cruz, P. E. O., Costa, E. V., Moraes, V. R. D. S., Nogueira, P. C. D. L., Vendramin, M. E., Barison, A., & Prata, A. P. D. N. (2011). Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4), 872.

- De Castro Rodrigues, C. M. S., Dutra, L. M., Barison, A., Costa, E. V., & da Silva Almeida, J. R. G. (2016). Isoquinoline alkaloids from the leaves of *Annona leptopetala* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 69, 222-225.
- De la Cruz Chacón, I., & González-Esquinca, A. R. (2012). Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural product research*, 26(1), 42-49.
- 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 für Naturforschung C*, 66(7-8), 377-384.
- Dholvitayakhun, A., Trachoo, N., Sakee, U., & Cushnie, T. P. (2013). Potential applications for *Annona squamosa* leaf extract in the treatment and prevention of foodborne bacterial disease. *Natural product communications*, 8(3), 385-388.
- Díaz, A., Cayón, G., & Mira, J. J. (2007). Metabolismo del calcio y su relación con la “mancha de madurez” del fruto de banano. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 280-287.
- Dos Santos, W., M. Sauthier, D. Cavalcante, C. Venevides, F. Dias y D. Santos. (2016). Mineral composition, nutritional properties, total phenolics and flavonoids compounds of the atemoya fruit (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.) and evaluation using multivariate analysis techniques. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88(3):1243-1252.
- Egydio-Brandão, Anary Priscila Monteiro, Novaes Paula y Santos, Déborah Yara Alves Cursino. (2017) Alkaloids from *Annona*: Review from 2005 to 2016. *JSM Biochemistry & Molecular Biology* 4(3): 1031.
- Esquinca-Gonzáles, Cazáres, L., Jiménez, G., Guzmán, S., López, V., & Guadalupecoord, D. (2011). Anonáceas plantas antiguas, estudios recientes (No. 583.115 A5).

- Estrada E L. (1985) .Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martinez. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia.
- Estrada C. A. (1994). Caracterización de la llama (*Annona diversifolia* Saff.) en Salitre Palmerillos, Mpio. de Amatepec. Edo. De Mexico. Tesis Profesional, Departamento de Fitotecnia-UACH. Chapingo. Mexico.
- Estrada, C.A. y L.M. Marroquín-Andrade. (1995). Caracterización de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) en Salitre de Palmerillos, Amatepec, México. Proc. Interamer. Soc. Trop.Hort. 38: 197–200.
- Fernández, V., Sulbarán, B., de Rodríguez, G. O., Nava, R., Delgado, J., Berradre, M., & Peña, J. (2007). Contenido mineral de la guanábana (*Annona muricata*) cultivada en el occidente de Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41(1).
- Ferreira F. R. y A. C. de Q. Pinto. (2005). Genetic resources. In: *Annona Species*. J T Williams, R W Smith, A Hughes, N Haq, C R Clement (eds). International Centre for Underutilised Crops. University of Southampton, UK. pp:46-52.
- Fofana, S., Ziyayev, R., Diallo, S. K., Camara, M., & Aripova, S. F. (2013). Alkaloids of *Annona senegalensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 3(49), 587-588.
- George, V.C., Kumar, D.R., Suresh, P.K., Kumar, R.A., 2014. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. *J. Food Sci. Technol.* 52 (4), 2328–2335.
- 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: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(8), 600-602.
- González-Trujano M. E., Navarrete A., Reyes B., Cedillo E. Hong E. (2001). Anticonvulsant Properties and Bio-Guided Isolation of Palmitone from Leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Med* 67: 136-141.

- González-Trujano ME, Tapia E, López-Meraz 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*; 47:1810–1817.
- Gonzalez-Trujano, M. E., Martínez, A. L., Reyes-Ramírez, A., Reyes-Trejo, B., & Navarrete, A. (2006a). Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta medica*, 72(08), 703-707.
- Hassimotto, N. M. A., Genovese, M. I. & Lajolo, F.M. (2005). Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(8), 2928–2935. doi: 10.1021/jf047894h.
- Hayashi N, Komae H. (1971). Isolation and identification of palmitone from the leaves of Lauraceae plants (*Cinnamomum camphora* Sieb., *Neolitsea sericea* Koidz, *Lindera umbellata* Thumb.). *Journal of the Indian Chemical Society*; 48: 288.
- Henríquez C., Sergio, A., Italo, C., Tania, V., Manuel, A., Lorena, C., Ricardo, S. and Hernán, S., (2010). Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissues of five apple cultivars grown in Chile. *Chilean J. Agric. Res.* 70. p. 523-536.
- Hernández, C., Guerrero, R., Bracho, B., y Perez, E. (2018). Evaluación del contenido de azúcares y perfil mineral en diferentes estadios de crecimiento del fruto de guanábana. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 35(2), 202-222.
- Hernández-Rodríguez, G., Espinosa-Solares, T., Hernández-Eugenio, G., Villa-García, M., Reyes-Trejo, B., & Guerra-Ramírez, D. (2016). Influence of polar solutions on the extraction of phenolic compounds from capulín fruits (*Prunus serotina*). *Journal of the Mexican Chemical Society*, 60(2), 73-78.
- Jackson, M. (1976). *Análisis Químico de Suelos*. Omega, Barcelona. 662 p.

- Julián-Loaeza A. P., N. F. Santos-Sánchez, R. Valadez-Blanco, B. S. Sánchez-Guzmán & R. Salas-Coronado. (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.
- Komae H, Hayashi N. (1971). Palmitone and phytosterols from *Neolitesea seriacea*. *Phytochemistry*, 10: 53 – 4.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), 217-233. doi: 10.1016/j.fbp.2010.04.008.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127(3), 1138-1145. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.115.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732.
- La Vecchia, C., Altieri, A., Tavani, A. (2001). Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *European Journal of Nutrition* 40, 261–627.
- Lachance, P.A., Nakat, Z., Jeong, W. (2001). Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* 17, 835–838.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumilk, P.K., Mukherjee, R. (1980). The phytochemistry of the *Annonaceae*. *Phytochemistry* 21, 2783–2813. doi.org/10.1016/0031-9422(80)85046-1.
- Lebrini, M., Robert, F., & Roos, C. (2010). Inhibition effect of alkaloids extract from *Annona squamosa* plant on the corrosion of C38 steel in normal hydrochloric

acid medium. *International Journal of Electrochemical Science*, 5(11), 1698-1712.

León Méndez, G., Granados Conde, C., Fortich, O., y del Rosario, M. (2016). Caracterización de la pulpa de *Annona Muricata* L. cultivada en el Norte del Departamento de Bolívar-Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1-9.

Lim, Y. Y., Lim, T. T., & Tee, J. J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food chemistry*, 103(3), 1003-1008. doi:10.1016/j.foodchem.2006.08.038.

Lima, G. P. P., Vianello, F., Corrêa, C. R., Campos, R. A. D. S., & Borguini, M. G. (2014). Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food and Nutrition sciences*, 1065-1082. doi.org/10.4236/fns.2014.511117.

Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., & Menichini, F. (2012). Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill.(cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 179-184. doi:10.1016/j.jfca.2011.09.002.

López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G., & Martínez-Vázquez, M. (2006). Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life sciences*, 78(7), 730-737. doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.078.

López-Rubalcava, C., & Estrada-Camarena, E. (2016). Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *Journal of ethnopharmacology*, 186, 377-391. doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.053.

Lugwisha, E.H., Fabian, C., Othman, O.C. (2016). Postharvest changes in physicochemical properties and Levels of some inorganic elements in sugar

- apple (*Annona squamosa* L.) fruits of Coast Region, Tanzania. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 4, 41–48. doi: 10.11648/j.jfns.20160403.11.
- Magadula, J. J., Innocent, E., & Otieno, J. N. (2009). Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(9), 674-680.
- Mahdeem H. (1992) *Annonas*. In: *Cultivos Marginados (otra perspectiva de 1942)*. B. Hernández., León. (eds.). Producción y protección vegetal No. 26. FAO. Roma, Italia. pp:83-90.
- Mahmoud, T. S., Marques, M. R., Pessoa, C. D. Ó., Lotufo, L. V., Magalhães, H. I., Moraes, M. O. D., & Oliveira, J. E. D. (2011). In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(3), 456-464.
- Mallamace, D., Longo, S., & Corsaro, C. (2018). Proton NMR study of extra Virgin Olive Oil with temperature: Freezing and melting kinetics. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 499, 20-27.
- Martínez-Vázquez, M., Diana, G., Estrada-Reyes, R., González-Lugo, N. M., Apan, T. R., & Heinze, G. (2005). Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 733-736.
- Méndez-García, T., Palacios-Mayorga, S., & Rodríguez-Domínguez, L. (2008). Análisis de suelo, foliar y de calidad del agua para el cultivo del aguacatero. *Terra Latinoamericana*, 26(1), 75-84.
- Mishra, S., Ahmad, S., Kumar, N., Sharma, B.K. (2013). *Annona muricata* (the cancer killer): a review. *Glob J Pharma Res*, 2(1), 1613-1618.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (*Annonaceae*): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15625-15658. doi:10.3390/ijms160715625.

- Montanha, J.A., Amoros, M., Boustie, J., Girre, L. (1995). Anti-herpes virus activity of aporphine alkaloids. *Planta Med.* 61, 416–424.
- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 166, 17-22. doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.013.
- Moreno-Velázquez, D. (2006). Crecimiento, maduración y oscurecimiento de frutos de ilama (*Annona diversifolia* Saff.). Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, Texcoco, edo de México, 96 p.
- Moreno-Velázquez, D., Saucedo-Veloz, C., Arévalo-Galarza, L., Peña-Valdivia, .B., Soto-Hernández, M., Cruz-Lagunas, B. (2008). cambios bioquímicos, biofísicos y fisiológicos durante el desarrollo del fruto de ilama (*Annona diversifolia* Saff.). *Agrociencia* 42, 407–414.
- Morton F. J. (1987) Fruits of warm climates. Ed. Media Incorporated. Miami Florida. USA. pp: 83-85.
- Nakano, D., Ishitsuka, K., Kamikawa, M., Matsuda, M., Tsuchihashi, R., Okawa, M., & Kinjo, J. (2013). Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukemia/lymphoma (III). *Journal of natural medicines*, 67(4), 894-903.
- Nakano, D., Ishitsuka, K., Hatsuse, T., Tsuchihashi, R., Okawa, M., Okabe, H. & Kinjo, J. (2011). Screening of promising chemotherapeutic candidates against human adult T-cell leukemia/lymphoma from plants: active principles from *Physalis pruinosa* and structure–activity relationships with withanolides. *Journal of natural medicines*, 65(3-4), 559-567.
- Nam, J. S., Park, S. Y., Jang, H. L., & Rhee, Y. H. (2017). Phenolic compounds in different parts of young *Annona muricata* cultivated in Korea and their antioxidant activity. *Applied Biological Chemistry*, 60(5), 535-543.

- Napoleón Irigoyen, J. (2004). Guía técnica del cultivo de la anona (No. IICA-F01 45). Ministerio de Agricultura y Ganadería, San Salvador (El Salvador) Programa Nacional de Frutas de El Salvador, San Salvador (El Salvador) IICA, San Salvador (El Salvador).
- N'gouemo, P., Koudogbo, B., Tchivounda, H. P., Akono-Nguema, C., & Etoua, M. M. (1997). Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Medical and Scientific Research on Plants and Plant Products*, 11(3), 243-245.
- NOM, N. O. M. (2002). 021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación, Martes, 31.
- Oliveira, B. H., Sant'Ana, A. E. G., & Bastos, D. Z. (2002). Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(6), 368-371.
- Otero-Sánchez, M. A. (2005). Fenología, fisiología y producción de ilama (*Annona diversifolia* Saff.). Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, Texcoco, Edo. de México, 196 p.
- Padma, P., Chansouria, J. P. N., & Khosa, R. L. (1998). Effect of some indigenous drugs on cold immobilization stress induced gastric ulcer. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(2), 127-128.
- Pareek, S., Yahia, E. M., Pareek, O. P., & Kaushik, R. A. (2011). Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International*, 44(7), 1741-1751. 10.1016/j.foodres.2011.02.016.
- Park, Y.-S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Suhaj, M., Cvikrova` , M., Martincova` , O., Weisz, M., Gorinstein, S. (2011). Comparison of the content of bioactive compounds and the level of antioxidant activity in different

- kiwi fruit cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 963-970. doi:10.1016/j.jfca.2010.08.010.
- Patil, B. S., Jayaprakasha, G. K., Chidambara Murthy, K. N., & Vikram, A. (2009). Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8142-8160. doi: 10.1021/jf9000132.
- Paull, R. E., & Duarte, O. (2011). Tropical fruits. 2nd edición, Vol. 1. CABI. Pág. 123-152.
- Paulo, M.Q., Barbosa-Filho, J.M., Lima, E.O., Maia, R.F., Barbosa, R.C.B.B.C., Kaplan, M.A.C. (1992). Antimicrobial activity of benzilisoquinoline alkaloids from *Annonasalzmanii* D.C. *Journal of ethnopharmacology*. 36, 36–41.
- Pinto, A.C.Q., Cordeiro, M.C.R., de Andrade, S.R.M., Ferreira, F.R., Filgueiras, H.A.C., Alves, R.E., y Kinpara D. L. (2005). *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southhampton, Southamton, UK.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106. doi:10.4172/2161-1009.1000106.
- Pudles J, Lederer S. (1954). Sur L´Isolement et a Constitution Chimique de L´Acide Coryno-mycolénique et de Deux Cétones des Lipides du Bacille diphtérique. *Bulletin de la Societé de Chimique Biologique*; 36: 759-77.
- Quílez, A., Fernández-Arche, M., García-Giménez, M., & Puerta, R. D. (2018). Potential therapeutic applications of the genus *Annona* : Local and traditional uses and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 244-270. doi:10.1016/j.jep.2018.06.014.

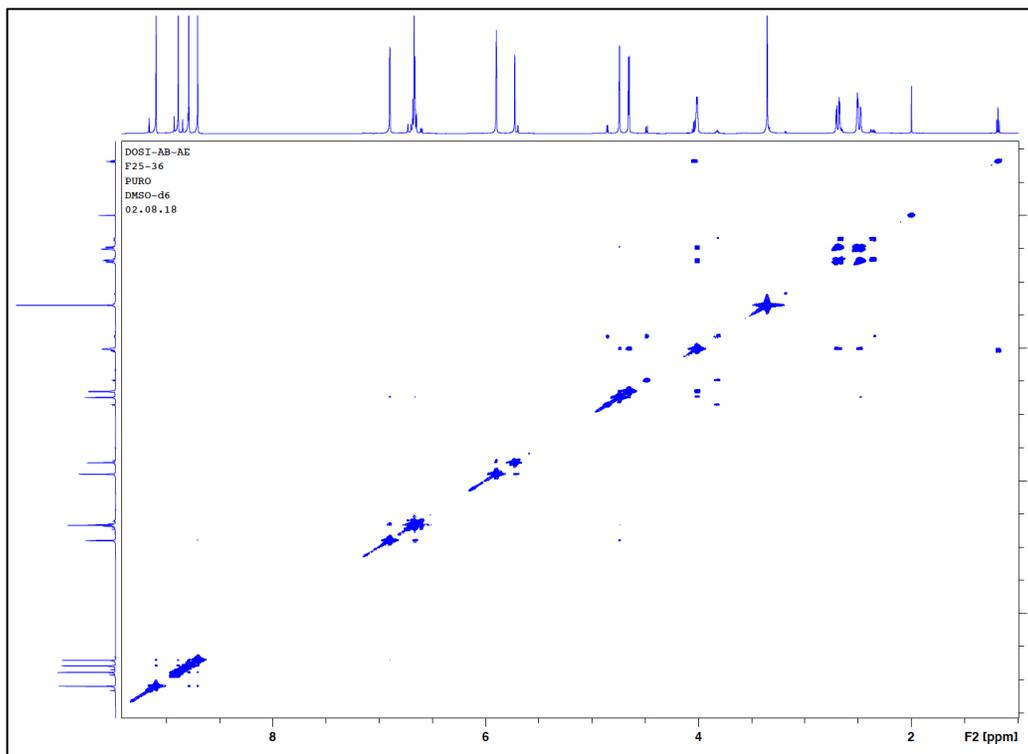
- R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rabêlo, S.V., Araújo, C.S., Costa, V.C.O., Tavares, J.F., Silva, M.S., Barbosa-Filho, J.M., Almeida, J.R.G.S. (2014). Occurrence of alkaloids in species of the genus *Annona* L. (Annonaceae): a review. *Nutraceuticals and Functional Foods: Natural Remedy*, vol. 1. 1 ed. Nova Science Publishers, New York, United States, pp. 41–60.
- Rabêlo, S. V., Costa, E. V., Barison, A., Dutra, L. M., Nunes, X. P., Tomaz, J. C., & Almeida, J. R. (2015). Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimolax Annona squamosa*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(4), 419-421.
- Ramírez-Méndez, R., Arenas De Moreno, L., Acosta, K., Yamarte, M., & Sandoval, L. (2012). Efecto del escaldado sobre la calidad nutricional de pulpa de Guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(1).
- Rinaldi, M. V., Díaz, I. E., Suffredini, I. B., & Moreno, P. R. (2017). Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(1), 77-83. doi:10.1016/j.bjp.2016.08.006.
- Roduan, M. R., Hamid, R. A., Cheah, Y. K., & Mohtarrudin, N. (2018). Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* in vitro. *Journal of Herbal Medicine*. doi:10.1016/j.hermed.2018.04.004
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Pastore, G. (2006). Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *Journal Food Science* 71, C102–C107.
- Roesler, R., Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., & Pastore, G. (2007). Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104(3), 1048-1054. doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.017.

- Salunke, D. K., Bolin, R. H., Reddy, R. N. (2000). Storage, processing, and nutritional quality of fruits and vegetables. Editorial CRC Press, 2a ed. USA.
- Santos, D. Y. A. C., & Salatino, M. L. F. (2000). Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, 55(6), 567-573.
- Santos, S. A., Vilela, C., Camacho, J. F., Cordeiro, N., Gouveia, M., Freire, C. S., & Silvestre, A. J. (2016). Profiling of lipophilic and phenolic phytochemicals of four cultivars from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Food chemistry*, 211, 845-852.
- Schlie-Guzmán, M. A., García-Carrancá, A., & González-Esquinca, A. R. (2009). In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *annona diversifolia* saff. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(8), 1128-1133.
- Simeón, S., Ríos, J.L., Villar, A. (1990). Antimicrobial activity of *Annona cherimolia* stem bark alkaloids. *Pharmazie* 45, 442–443.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3), 144-158.
- Soni, V. K., Yadav, D. K., Bano, N., Dixit, P., Pathak, M., Maurya, R., ... & Misra-Bhattacharya, S. (2012). N-methyl-6, 7-dimethoxyisoquinolone in *Annona squamosa* twigs is the major immune modifier to elicit polarized Th1 immune response in BALB/c mice. *Fitoterapia*, 83(1), 110-116.
- Sonnet, P.E., Jacobson, M. (1971). Tumor inhibitors II: cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of pharmaceutical sciences*. Sci. 60, 1254–1256.
- Sookvanichsilp, N., Gritsanapan, W., Somanabandhu, A. O., Lekcharoen, K., & Tiangkrop, P. (1994). Toxicity testing of organic solvent extracts from *Annona squamosa*: Effects on rabbit eyes and ear skin. *Phytotherapy Research*, 8(6), 365-368

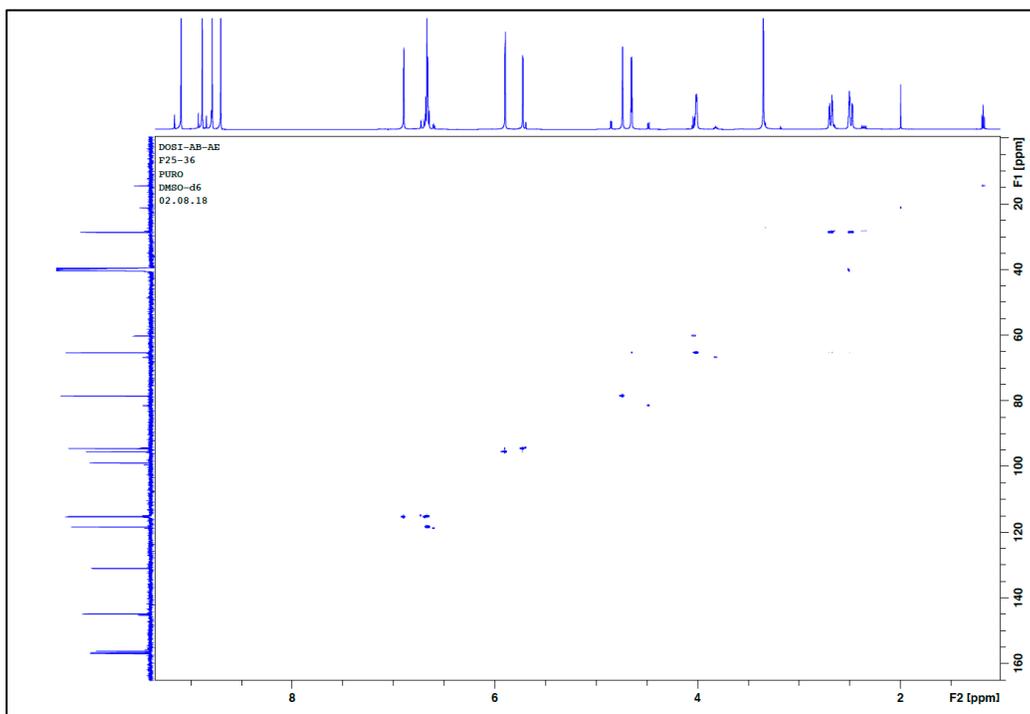
- Steinmetz, K.A. y Potter, J.D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal American Diet Association* 96, 1027–1039.
- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(25), 7449-7454. doi: 10.1021/jf0207530.
- Tempone, A.G., Borborema, S.E.T., Andrade, H.F.J., Amorim Gualda, N.C., Yogi, A., Carvalho, C.S., Bachiega, D., Lupo, F.N., Bonotto, S.V., Fischer, D.C.H., (2005). Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* 12, 382–390.
- Thompson, L. M., & Troeh, F. R. (1988). Los suelos y su fertilidad. Editorial Reverté. 4ta edición. Pág. 199-228.
- Valle-Guadarrama, S., Ruiz-Sánchez, X. G., Saucedo-Veloz, C., Gómez-Cruz, A., & Marroquín-Andrade, L. M. (2012). Comportamiento postcosecha de frutos de ilama (*Annona diversifolia*) en madurez comestible almacenados en atmósfera modificada. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(SPE5), 75-81.
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food chemistry*, 111(4), 816-823.
- Vendramin, M. E., Costa, E. V., dos Santos, É. P., Pinheiro, M. L. B., Barison, A., & Campos, F. R. (2013). Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 49, 152-155.
- Vidal-Hernández, L., Lopez Moctezuma, H., Vidal Martinez, N. A., Ruiz Bello, R., Castillo Rocha, D. G., & Chiquito Contreras, R. G. (2014). The situation of annonaceae in México: major pests, diseases and their control. *Revista brasileira de fruticultura*, 36(1), 44-53.
- Villar, R., Calleja, J.M., Morales, C., Cáceres, A. (1997). Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiagregant activity. *Phytotherapy Research*. 11, 441–445.

- Vila Verde, G. M., Paula, J. R., & Caneiro, D. M. (2003). Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 64-66.
- Wagner H, Blatt S, Zgainski EM. Plant drug analysis. (1996). A Thin Layer Chromatography. Berlin: Springer-Verlag.
- Wu, Y.C., Chang, G.Y., Duh, C.Y., Wang, S.K. (1993). Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *Phytochemistry* 33, 497–500.
- Yamashita, F., Miglioranza, L. H. D. S., & Miranda, L. D. A. (2002). Effects of packaging and temperature on postharvest of atemoya. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(3), 658-660.
- Yan, L.Y., Teng, L.T., Jhi, T.J. (2006). Antioxidant properties of guava fruit: comparison with some local fruits. *Sunway Academy Journal* 3, 9–20.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*, 59(3), 113-122.
- Zadernowski, R., Naczek, M., & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2118-2124.
- Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N. H., Shi, G., Gu, Z. M., He, K., & McLaughlin, J. L. (1996). Recent advances in annonaceous acetogenins. *Natural Product Reports*, 13(4), 275-306.
- Zibadi, S., Farid, R., Moriguchi, S., Lu, Y., Foo, L.Y., Tehrani, P.M., Ulreich, J.B., Watson, R.R. (2007). Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. *Nutrition Research* 27, 408–416.

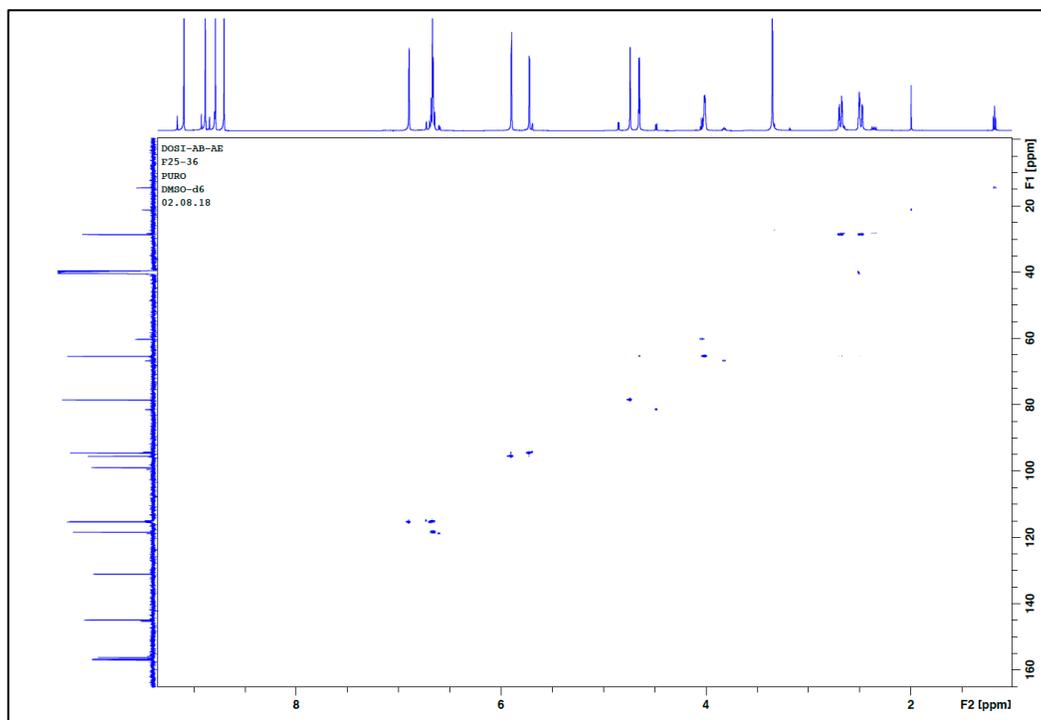
ANEXOS



Anexo 1. Espectro COSY de la (+) Catequina en DMSO.



Anexo 2. Espectro HSQC de la (+) Catequina en DMSO.



Anexo 3. Espectro HMBC de la (+) Catequina en DMSO.