

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Acetogeninas y alcaloides en semillas y
primeras etapas del desarrollo de *Annona
purpurea*.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

María del Carmen Girón Pérez



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Febrero, 2022



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

**Acetogeninas y alcaloides en semillas y
primeras etapas del desarrollo de *Annona
purpurea*.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

María del Carmen Girón Pérez

Directora

Dra. Alma Rosa González Esquinca.

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal,
Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH.

Asesor

Dr. Iván de la Cruz Chacón.

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal,
Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH.



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Febrero, 2022.



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Fecha: 15 de febrero de 2022

C. María del Carmen Girón Pérez

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Acetogeninas y alcaloides en semillas y primeras etapas del desarrollo de *Annona purpurea*.

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Dra. Christian Anabi Riley Saldaña

M. en C. Ana Guadalupe Rocha Loredo

Dra. Alma Rosa González Esquinca

Firmas:

[Firma]
[Firma]
[Firma]

Ccp. Expediente

Institucionales

Agradecimientos institucionales

A mi casa de estudios, la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, por los espacios y áreas de aprendizaje brindados durante la carrera.

Al instituto de Ciencias Biológicas y a mis profesores, por tan bella experiencia durante mi formación: Tantos ecosistemas explorados y analizados desde distintas lentes.

A la Mtra. Ana Guadalupe Rocha Loredo y la Dra. Christian Anabí Riley, por su revisión y valiosos comentarios en este trabajo.

Al Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, con especial cariño:

A la Dra. Alma Rosa González Esquinca, catedrática ejemplar y directora de esta hermosa aventura química del metabolismo secundario y la fisiología vegetal, de quién aprendí tanto profesionalmente. Gracias por ser guía clave e impulsarme en mi carrera científica y por los espacios brindados.

Al Dr. Iván De la Cruz Chacón por sus cátedras y asesoría en esta investigación, por su apoyo constante, ejemplo y motivación en muchas experiencias durante la licenciatura.

A la Dra. Lorena Luna, Dra. Marisol Castro, y Dra. Claudia Durán por cada una de sus atenciones durante mi paso por el laboratorio y ser ejemplo de grandes mujeres de ciencia.

Al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Chiapas, por su interés en mi trabajo de investigación, siendo beneficiada en el programa “Convocatoria Beca Tesis Licenciatura 2021” que otorga el Gobierno del Estado de Chiapas.

Dedicatoria

“Si tan sólo pudiera desenredar esto apenas un poco más y así estar un poco más cercana a la respuesta, entonces, entonces iría a mi sepulcro como una mujer feliz”.

– *Hipatia (Ágora-2009).*

♥ A mi familia

A mis abuelitas Elena y Lucia, a mi abuelito Francisco, por su tanto amor incondicional y su apoyo de siempre, sin la excepción en este trabajo.

A mis padres, Profra. Carmelita Pérez y Mtro. Pedro Girón, por su amor, su constante apoyo en todos mis sueños, sus consejos, ejemplo de superación, tenacidad y humildad.

A mis hermanos, Francisco, Juan Carlos y Pedro, por nuestros sueños de la infancia, aventuras cumplidas y por cumplir, por su amor.

A mis tías, tíos, primas y primos por sus cuidados y ejemplo de superación profesional, esfuerzo, humildad y honradez. A mis sobrinos.

♥ A mis amigos

A mis amigos de antaño, de la infancia, tantas memorias que mantengo con cariño: Moisés Lescieur, Ángel Ruíz, Ale Paz, Víctor, Laura, Mica, Angie, Ceci y Mar. A mi familia foránea Norma, Yareth, Ingrid, Dani; a mis amigos del Instituto de Ciencias Biológicas en especial a Blanca, Viri, Juan Castillo, Arlen, Rey, Rodrigo Carral. Es muy difícil escribir una lista exacta de tanta gente que ha sido parte de este caminar, gracias por hacer más liviano el viaje.

♥ A ti, Dios

Que a través de la biología misma me enseñes y que me has traído hasta aquí con las personas indicadas siempre en el ejercicio correcto, cuidar, respetar y amar a la vida.

INDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| RESUMEN | X |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO | 3 |
| 2.1. FAMILIA ANNONACEAE | 3 |
| 2.1.1. Generalidades | 3 |
| 2.1.2. Descripción botánica | 4 |
| 2.2. GÉNERO <i>ANNONA</i> | 5 |
| 2.2.1. Generalidades | 5 |
| 2.2.2. Descripción botánica | 5 |
| 2.3. <i>ANNONA PURPUREA</i> (MOC., & SESSÉ. EX. DUNAL) | 6 |
| 2.3.1. Clasificación taxonómica | 6 |
| 2.3.2. Descripción botánica | 7 |
| 2.3.3. Distribución y hábitat de la especie | 9 |
| 2.3.4. Nombres vernáculos | 9 |
| 2.4. DESARROLLO DE LA SEMILLA Y ETAPAS TEMPRANAS | 10 |
| 2.4.1. Semilla, descripción y desarrollo | 11 |
| 2.4.2. Imbibición y germinación | 13 |
| 2.4.3. Crecimiento vegetativo | 15 |
| 2.5. METABOLISMO SECUNDARIO | 16 |
| 2.5.1. Fitoquímica de la familia Annonaceae | 16 |
| 2.5.2. Acetogeninas de Anonáceas | 17 |
| 2.5.3. Alcaloides | 19 |
| 2.5.4. Actividad biológica | 22 |
| III. ANTECEDENTES | 25 |
| 3.1. ACETOGENINAS Y ALCALOIDES EN <i>ANNONA PURPUREA</i> | 25 |
| 3.2. ACETOGENINAS Y ALCALOIDES EN ETAPAS TEMPRANAS EN EL GÉNERO <i>ANNONA</i> | 30 |
| IV. ZONA DE RECOLECTA | 32 |
| V. OBJETIVOS | 34 |
| VI. MÉTODO | 35 |
| 6.1. DISEÑO | 35 |
| 6.2. RECOLECTA DE FRUTOS | 37 |
| 6.3. PREPARACIÓN Y SEPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 6.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS | 38 |
| 6.5. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS Y METANÓLICOS | 41 |
| 6.5.1. Rendimiento..... | 41 |
| 6.5.2. Prueba de Kedde | 41 |
| 6.5.3. Perfiles cromatográficos | 42 |
| 6.5.4. Análisis estadístico..... | 45 |
| VII. RESULTADOS | 46 |
| 7.1. ACERCA DE LAS SEMILLAS Y LA GERMINACIÓN DE <i>ANNONA PURPUREA</i>..... | 46 |
| 7.2. RENDIMIENTOS DE LAS EXTRACCIONES HEXÁNICAS Y METANÓLICAS | 47 |
| 7.3. PRESENCIA DE ACETOGENINAS CON LACTONAS INSATURADAS | 48 |
| 7.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ÓRGANOS Y TEJIDOS DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO | 50 |
| 7.4.1. Perfil químico de compuestos de los extractos hexánicos por órgano o tejido. | 52 |
| 7.4.2. Perfil químico de compuestos de los extractos metanólicos por órganos o tejidos | 56 |
| 7.5. ANÁLISIS DE LA QUÍMIODIVERSIDAD DEL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>ANONNA PURPUREA</i>..... | 62 |
| 7.5.1. Índice de diversidad de Margalef | 62 |
| 7.5.2. Índice de similitud de Jaccard (IJ) | 63 |
| VIII. DISCUSIÓN..... | 65 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 70 |
| X. RECOMENDACIONES..... | 70 |
| XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES..... | 71 |
| XII. ANEXOS | 78 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Clasificación de alcaloides. | 20 |
| Cuadro 2. Acetogeninas aisladas de <i>Annona purpurea</i> . | 27 |
| Cuadro 3. Alcaloides reportados en <i>Annona purpurea</i> . | 27 |
| Cuadro 4. Etapas y fases del desarrollo a estudiar en <i>Annona purpurea</i> . | 35 |
| Cuadro 5. Rendimientos de extractos de los tejidos y organos. | 48 |
| Cuadro 6. Rendimientos del precipitado hexánico. | 48 |
| Cuadro 7. Presencia de acetogeninas en extractos hexánicos. | 50 |
| Cuadro 8. Análisis de diversidad Margalef de cromatografías hexánicas. | 62 |
| Cuadro 9. Análisis de diversidad Margalef de cromatografías metanólicas. | 63 |
| Cuadro 10. Índice de similitud de Jaccard de la diversidad de CCF hexánicas | 64 |
| Cuadro 11. Índice de similitud de Jaccard de la diversidad de CCF metanólicas | 64 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Árbol de <i>Annona purpurea</i> , hojas y flores. | 8 |
| Figura 2. Frutos de <i>Annona purpurea</i> y semilla germinando. | 8 |
| Figura 3. Etapas en el desarrollo temprano vegetal. | 10 |
| Figura 4. Estructura de semillas de <i>Annona purpurea</i> . | 11 |
| Figura 5. Embriogénesis de dicotiledóneas. | 13 |
| Figura 6. Plántula madura y órganos presentes. | 15 |
| Figura 7. Estructura química de una Acetogenina (ACG). | 17 |
| Figura 8. Disposición de anillos de acetogeninas. | 18 |
| Figura 9. Clasificación estructural de Alcaloides de Anonáceas. | 21 |
| Figura 10. Mapa de Cintalapa, Chiapas. | 33 |
| Figura 11. Diseño general. | 36 |
| Figura 12. Equipo Soxhlet. | 39 |
| Figura 13. Rotaevaporador. | 39 |
| Figura 14. Técnica de reflujo continuo directo. | 40 |
| Figura 15. Estructura general de las cromatografías utilizadas | 43 |
| Figura 16. Câmara cromatográfica. | 44 |
| Figura 17. Desarrollo temprano de <i>Annona purpurea</i> . | 46 |
| Figura 18. Perfil de CCF de extractos hexánicos. | 51 |
| Figura 19. Perfil de CCF de extractos metanólicos. | 51 |
| Figura 20. Cromatografía del extracto hexánico de las testas. | 52 |
| Figura 21. Cromatografía de extractos hexánicos de los endospermos. | 52 |
| Figura 22. Cromatografía de extractos hexánicos de los embriones. | 53 |
| Figura 23. Primera Cromatografía de extractos hexánicos de raíces. | 53 |
| Figura 24. Segunda Cromatografía de extractos hexánicos de raíces. | 54 |
| Figura 25. Primera Cromatografía de extractos hexánicos del tallo. | 54 |
| Figura 26. Segunda Cromatografía de extractos hexánicos del tallo. | 55 |
| Figura 27. Primera Cromatografía extractos hexánicos de cotiledones y hojas. | 55 |
| Figura 28. Segunda Cromatografía de extractos hexánicos de cotiledones y hojas. | 56 |

| | |
|--|----|
| Figura 29. Primera Cromatografía de extractos metanólicos de las testas. | 56 |
| Figura 30. Segunda Cromatografía de extractos metanólicos de las testas. | 57 |
| Figura. 31. Primera Cromatografía del extracto metanólico del endospermo. | 57 |
| Figura. 32. Segunda Cromatografía del extracto metanólico del endospermo. | 58 |
| Figura 33. Cromatografía de extractos metanólicos del embrión. | 58 |
| Figura 34. Primer Cromatografía de los extractos metanólicos de la raíz. | 59 |
| Figura 35. Primer Cromatografía extractos metanólicos de raíz (dragendorff). | 59 |
| Figura 36. Segunda Cromatografía de extractos metanólicos de la raíz. | 59 |
| Figura 37. Primera Cromatografía de extractos metanólicos de tallo. | 60 |
| Figura 38. Primera Cromatografía de extractos metanólicos de tallo (dragendorff) | 60 |
| Figura 39. Segunda Cromatografía de extractos metanólicos del tallo. | 61 |
| Figura 40. Cromatografía de extractos metanólicos de cotiledones y hoja. | 61 |

RESUMEN

Las plantas biosintetizan metabolitos secundarios (MS) implicados en los mecanismos de defensa dadas sus propiedades biológicas, diversidad y abundancia química. En la familia Annonaceae se han descubierto dos tipos frecuentes de MS, las acetogeninas (ACG) y los alcaloides, ambos con amplia actividad biológica.

Annona purpurea es una anonácea tropical que se distribuye en México y particularmente en el estado de Chiapas. Es un árbol caducifolio del que se han aislado y detectado ACG y alcaloides en sus raíces, tallos, hojas y semillas. Lo que evidencia un metabolismo secundario activo en varias etapas de su ciclo de vida. Algunos antecedentes han dado indicios de la presencia de estas moléculas en las etapas de plántulas, sin embargo, los trabajos sistemáticos de seguimiento detallado de su presencia en esta fase ontogénica crítica son escasos. Con el propósito de conocer la relevancia del metabolismo secundario en el desarrollo temprano de *A. purpurea*, en esta investigación se documenta dicho proceso. Se monitoreó mediante técnicas químicas la presencia de acetogeninas y alcaloides desde que el embrión está latente en la semilla hasta que se transforma en un organismo autodependiente, este crecimiento y desarrollo se segmentó en cuatro etapas: semilla madura, semilla en imbibición, semillas-plántulas con emergencia radicular y plántulas con desarrollo foliar. Se encontró que la ruta de biosíntesis de las ACG es constante en todo el desarrollo temprano de la planta y aparentemente de mayor diversificación química, mientras que la de los alcaloides se biosintetizan a partir de la emergencia radicular. Con lo descubierto y la información previa de estas moléculas, se puede intuir que estos metabolitos están vinculados a estrategias de defensa con implicaciones ecológicas en la supervivencia de la plántula. Se deduce también que la planta emplea inicialmente los materiales de reserva en la semilla para alimentar al embrión y proveerle de posibles metabolitos secundarios de defensa. En un segundo momento la fotosíntesis sustenta la aparición de metabolitos nitrogenados que reforzarían la protección a la plántula.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas biosintetizan metabolitos secundarios (MS) que representan un ejemplo del proceso evolutivo en curso (Galbis-Pérez, 2004), en el ecosistema participan protegiendo de la herbivoría y contra las infecciones causadas por patógenos microbianos, también actúan como atrayentes de polinizadores, dispersadores de semillas y como agentes en la competencia planta-planta (Taiz y Zeiger, 2006). Los MS se consideran una fuente importante de la diversidad química con la que se contribuye al conocimiento y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Cortés *et al.*, 2014). En general, se encuentran en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas (Taiz y Zeiger, 2006). De la familia Annonaceae se sabe que se biosintetizan principalmente dos tipos de metabolitos secundarios: alcaloides isoquinolínicos y las “acetogeninas de anonáceas” (ACG), estas últimas descubiertas en los años 80 (Cortés *et al.*, 2014). Ambas, con propiedades farmacológicas diversas: antitumorales, insecticidas, dopaminérgicas, antimaláricas etc. (Cortés *et al.*, 2014). Algunas especies de la familia son ampliamente utilizadas como alimento, en la medicina tradicional y con menor frecuencia, de forma artesanal, también para la construcción, como forraje, leña, ornato y sombra (Andrés-Agustín y Segura-Ledesma, 2014). Por todo lo anterior, esta familia de plantas es ecológica y económicamente importante.

Annona purpurea Moc. & Sessé ex Dunal se usa en la medicina tradicional mexicana, se emplea para bajar la fiebre y el dolor de cuerpo, para infecciones de la piel, para el control de la diabetes y enfermedades respiratorias, como cardiotónico, contra la malaria y otros parásitos. De acuerdo a la enfermedad se emplea cierto tejido, las semillas se usan contra parásitos intestinales; hojas y tallos para los riñones; la corteza y la raíz como antiespasmódicas o para bajar la presión arterial y como sedativa; las hojas y el jugo del fruto como remedio para fiebres y la corteza, contra la disentería (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2015). De acuerdo a estudios de laboratorio, se ha logrado detectar la presencia de ACG y alcaloides en algunos de estos órganos y tejidos vegetales, sin embargo, es escasa la documentación sobre el momento de su biosíntesis durante las etapas de

desarrollo temprano, desconociéndose también cuál es la relación de estos metabolitos con sus funciones biológicas, fisiológicas y/o ecológicas, por ello, con el fin de conocer la relación de estos MS con la planta madre, con el material de reserva o con la fotosíntesis, en este trabajo se evalúa la presencia de ACG y alcaloides en los distintos tejidos y órganos que se presentan en semillas y durante las primeras etapas del desarrollo vegetativo de *A. purpurea*; además aporta datos para el manejo sustentable de la especie y sobre la expresión del metabolismo secundario de acetogeninas y alcaloides de Annonaceae.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. FAMILIA ANNONACEAE

2.1.1. Generalidades

La familia Annonaceae, palabra que deriva del latín y da acepción a “la cosecha anual” (Napoleón-Irigoyen, 2004), comprende un grupo de plantas constituido por árboles, arbustos y bejucos (Fero-Meñe, 2013), que a su vez forman parte de plantas primitivas de las angiospermas (González-Esquinca *et al.*, 2011). Se considera miembro del orden Magnoliales (Chatrou *et al.*, 2012) y está relacionada de forma directa con las familias Magnoliaceae, Degeneriaceae, Myristicaceae, Eupomatiaceae y Canellaceae (Kelly, 2000). Su reproducción puede ser autógama, entomófila o cantarófila (Chatrou, 2012 tomado de Martínez-Velarde, 2015).

Se han registrado aproximadamente 135 géneros y 2 500 especies (González *et al.*, 2011), los géneros con mayor número de especies son *Guatteria* (250), *Uvaria* (175), *Xylopia* (160), *Polyalthia* (150) y *Annona* (120) (Vargas, 2002). En México se han localizado 12 géneros y 60 especies, de los cuales Chiapas alberga 9 géneros y 37 especies (De la Cruz-Chacón *et al.*, 2016), es decir, México representa el 10 % y Chiapas 3 % en la diversidad de Annonaceae. En el mundo, la distribución de esta familia abarca regiones pantropicales (Chatrou *et al.*, 2012) dentro de las llamadas Selvas tropicales (Martínez-Velarde, 2015) y otras en las Selvas Bajas Caducifolias (Hernández-Morales, 2017).

Es una familia fácil de reconocer aún en estado joven así como maduro por su follaje aromático y dístico y por sus frutos, si bien del total de especies descritas, alrededor de 300 a 400 especies producen frutos que corresponden a 35 géneros (Napoleón-Irigoyen, 2004); las especies que actualmente se cultivan en forma comercial en México son *Annona cherimola* y *A. muricata*, la primera en el Estado de México, Guanajuato, Michoacán y Morelos; y la segunda en Veracruz, Tabasco, Nayarit, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. (Hernández-Fuentes *et al.*, 2016). En las zonas de distribución, se observan en áreas verdes como parques y también en los hogares como árboles de sombra (Leboeuf *et al.*, 1982 citados en Alfaro-Romero, 2005).

Las especies de la familia Annonaceae han sido usadas como alimento y también en la medicina tradicional (Fall *et al.*, 2003). Poseen un metabolismo activo y especializado, con rutas biosintéticas privilegiadas para producir alcaloides y acetogeninas (Riley-Saldaña *et al.*, 2017), sin embargo, en muchas de las especies, no se conoce la relación de estos metabolitos secundarios con sus etapas de desarrollo vegetativo.

2.1.2. Descripción botánica

La familia Annonaceae, está representada por árboles, arbustos, subárbustos y bejucos (Fero-Meñe, 2013) es aromática, con una corteza externa lisa que se desprende en tiras al jalarla, en tanto que la corteza interna se observa finamente reticulada, sin látex (Mori-Vargas y Reategui-Sunci6n, 2012). Sus hojas deciduas o persistentes (Kelly, 2000) son alternas y/o dísticas, simples, sin estípulas, con pecíolos cortos o subsésiles, de coriácea a membranáceas, envés en ocasiones glauco y nervadura pinnada; indumento por lo general de pelos simples a veces de pelos estrellados y de pelos escamoso-peltados (Fero-Meñe, 2013).

Sus fragantes flores son axilares, a veces pueden presentar inflorescencias cimosas o flores solitarias, dichas flores son bisexuales y rara vez unisexuales, hipóginas, actinomorfas; comúnmente, tres sépalos libres (rara vez connatos) (Kelly, 2000; Fero-Meñe, 2013), dispuestos de forma imbricada. Se observan seis pétalos dispuestos en dos verticilos y a veces se observan tres pétalos internos de apariencia rudimentaria, también imbricados. Numerosos estambres en forma de espiral y que se disponen libres y son de filamentos cortos, conectivo expandido y truncado arriba de las tecas, también presentan anteras bitecas, tetraspongiadas, extrorsas o latrorsas (rara vez introrsas), deshiscencia longitudinal; el gineceo es apocárpico, los carpelos son numerosos, poseen un óvulo o más, basales o marginales (Kelly, 2000).

Los frutos se describen sincárpicos, pseudosincárpicos o apocárpicos, pueden ser sésiles o estipitados de forma globulosa y elipsoide, oblonga, cilíndrica

o fusiforme, albergan a las semillas, su pericarpio es liso; el fruto es tuberculado, muricado o espinoso, verruculoso y acanalado (Koek-Norman *et al.*, 1990 en Fero-Meñe, 2013). Las semillas presentan un pericarpio liso (Koek-Norman *et al.*, 1990 en Fero-Meñe, 2013), pueden ser ariladas o no (Kelly, 2000) y poseen endospermo ruminado (Fero-Meñe, 2013).

2.2. GÉNERO *ANNONA*

2.2.1. Generalidades

El género *Annona* descrito por Linneo en 1753 comprende un número amplio de plantas de la familia Annonaceae. Su nombre proviene del latín (similar al nombre de la familia Annonaceae), “Cosecha anual”; constituido por árboles y arbustos que generalmente se desarrollan en clima tropical (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas SNICS, 2017) y son económicamente importantes porque algunas especies del género *Annona* producen frutos agradables al paladar humano.

Del género *Annona* se han descrito 295 especies de las cuales, solo son aceptadas 166 (Plat List, 2013).

2.2.2. Descripción botánica

Las plantas de este género son árboles o arbustos, algunos de ellos producen frutos comestibles tales como la chirimoya, la guanábana, el saramuyo, la chincuya y la papausa (Alfaro-Romero, 2005). En las plantas de este género se puede observar pubescencia simple o con pelos estrellados, flores usualmente perfectas, a veces solitarias o en inflorescencias pero con pocas flores, con terminales opuestas a las hojas, y más o menos pegadas a las ramas y la apariencia intermodal; poseen 3 sépalos pequeños y valvados; 6 pétalos libres o connados en la base, biseriados, los internos, a veces rudimentarios o ausentes, los exteriores carnosos, valvados, completamente cóncavos o solo en la base conniventes, los interiores imbricados o valvados; estambres numerosos, extrosos, el conectivo forma un disco dilatado,

truncado, pocas veces atenuado–apiculado o semiorbicular; carpelos numerosos y frecuentemente connados, los óvulos solitarios, basales y erectos; frutos carnosos, con carpelos concretos (González-Esquinca, 2001).

2.3. *ANNONA PURPUREA* (MOC., & SESSÉ. EX. DUNAL)

2.3.1. Clasificación taxonómica

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: ANGIOSPERMAS

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: MAGNOLIALES

FAMILIA: ANNONACEAE

GÉNERO: *Annona*.

ESPECIE: *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal.

(Global Biodiversity Information Facility, 2021).

2.3.2. Descripción botánica

Es un árbol caducifolio, su altura es de 4 a 10m y el diámetro de hasta 23 cm; su copa amplia y extendida con ramas largas, horizontales y pardas. La corteza es lisa, pardo claro a pardo grisácea y muy fibrosa (Salazar y Soihet, 2001).

Las hojas (Figura 1) son simples, alternas y también dísticas. Su tamaño es de 12 a 30cm de largo y de 6 a 14cm de ancho, su forma es obovadas o elíptico-obovadas; el ápice es agudo y corto, la base redondeada, y presenta pubescencia ferruginosa. Los pecíolos alcanzan medidas de 0.3 a 0.8mm de largo (Salazar y Soihet, 2001).

Flores (Figura 1) se observan solitarias, el cáliz mide de 1 a 2cm de largo, con tres lóbulos triangulares-ovados y acuminados en el exterior; la corola se acompaña de seis pétalos, los tres externos miden aproximadamente 5cm de largo y 2cm de ancho, ovado-lanceolados gruesos y rígidos, y los tres internos son más pequeños de 2.5cm de largo aproximadamente y son elíptico-oblongos y más delgados. En las flores se observan estambres numerosos y pequeños (Salazar y Soihet, 2001).

Frutos (Figura 2) son sincárpicos, globosos y esferoides, y su tamaño varía de 15 a 20cm de diámetro con numerosas protuberancias rígidas y piramidales, acanaladas sobre la parte ventral y usualmente terminan en un gancho recurvado (Salazar y Soihet, 2001).

En cuestiones madereras, la madera es pesada, su peso específico promedio es de 0.57g/cm³. En condiciones secas, presenta un color amarillo grisáceo. Posee grano recto a levemente entrecruzado, textura y lustre medianos. Es fácil de trabajar y preservar, su secado es moderado. Se utiliza para construcción en general tanto en implementos agrícolas como cajas y pulpa para papel (Salazar y Soihet, 2001).

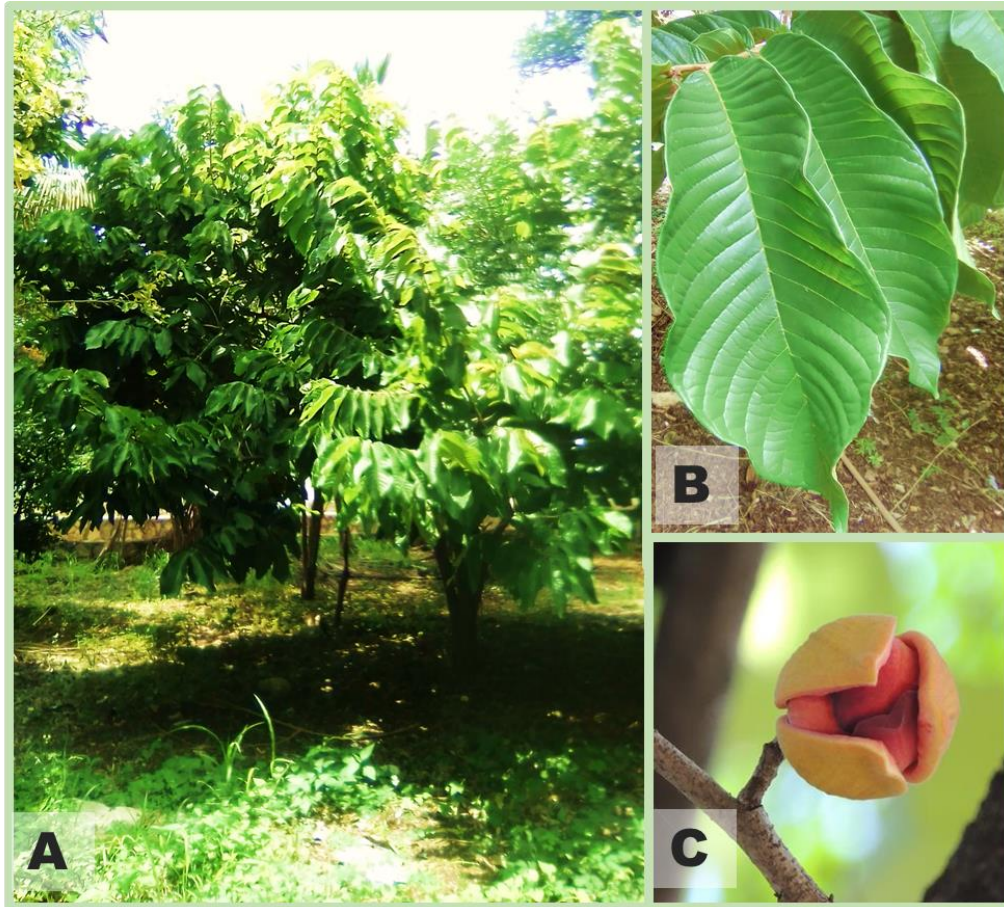


Figura 1. Árbol de *Annona purpurea*, hojas y flores.



Figura 2. Frutos de *Annona purpurea* y semillas germinando.

2.3.3 Distribución y hábitat de la especie

Se distribuye desde el sur de Florida en Estados Unidos hasta América Central y esta distribución se extiende en las partes tropicales y subtropicales de América del Sur, en altitudes variables de 0 a 700 msnm, donde existan precipitaciones anuales superiores a 200mm. Se desarrolla en elevaciones bajo-medianas con climas secos o húmedos. Su adaptación al suelo es amplia, aunque no tolera suelos anegados (Salazar y Soihet, 2001). Esta especie es cosmopolita, por ello su rango edáfico es mayor, en México se distribuye en los estados de Michoacán, Estado de México, Veracruz, Morelos, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Quintana Roo, Yucatán y Campeche (Vidal-Hernández *et al.*, 2014).

2.3.4 Nombres vernáculos

Annona purpurea recibe 66 nombres comunes en 13 países, en Belice es conocida como Cowsap y soncoya; en Colombia como gallina gorda, guanacóna, guanábano pun, guanábana cabezona, guanábana cimarrona, guanábana de cabeza negra, guanábana de monte, guanábana matimbá, guanábana ñeca, guanabanilla, la cabezona, matimba y morocotó; en Costa Rica se le conoce como soncoya(o), toreta, gallina gorda y zoncoya; en El Salvador se refieren a ella como cincuya, anona(o), sincuya(o), soncoya y suncuya; en Nicaragua la llaman por chincuya suncuya, sincolla, soncoya mientras que en Panamá como guanabano toreta, guanábana toreta; en Puerto Rico como Soncoya y cabeza de negro; en Venezuela se conoce como castiquire, catiquire, maniré, manirote, manirroto, taniré, piragua, tucuria, tiragua; en Estados Unidos de América como soncoyo y cabeza de negro; en Francia como Atier, tête de négre; en Guatemala, anona sincuya, chincuya, cabeza de muerto, cincuya, sencuya, suncuyo, sencolla y maticuy; en Honduras como soncoya, soncuya; y en México la hallamos como ahate, anona morada, catuch y catucho (Jalisco) además de cabeza de negro (Jalisco y Veracruz) así como zapote ilama (Veracruz) y cabeza de ilama (Veracruz y Oaxaca), pero también chincua, papanaca, ilama de Tehuantepec, toreta (Oaxaca), y en Chiapas se designa comúnmente como chincuya (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2015).

2.4. DESARROLLO DE LA SEMILLA Y ETAPAS TEMPRANAS

El ovario de una flor se transforma en fruto, en el que se albergan a las semillas hasta que estas alcanzan su madurez, protegiéndolas y facilitando su dispersión (Agustí, 2013). Las semillas liberadas del esporofito materno en estado latente, finalmente germinan y forman una plántula (Agustí, 2013). Las etapas tempranas, comprenden las fases de semilla a plántula.

Para la formación de una plántula ocurren múltiples procesos biológicos y bioquímicos, que inician a partir de una semilla madura. El desarrollo del embrión se pausa una vez que la semilla madura y se dispersa, y continúa cuando se inicia la germinación de la semilla, que depende de factores internos y externos; los factores externos o ambientales son: agua, oxígeno y temperatura y algunas veces exposición lumínica (Raven *et al.*, 1992). La embriogénesis y maduración de la semilla son un proceso clave para lograr las fases de desarrollo temprano: imbibición, germinación y desarrollo vegetativo o plántula (figura 3).

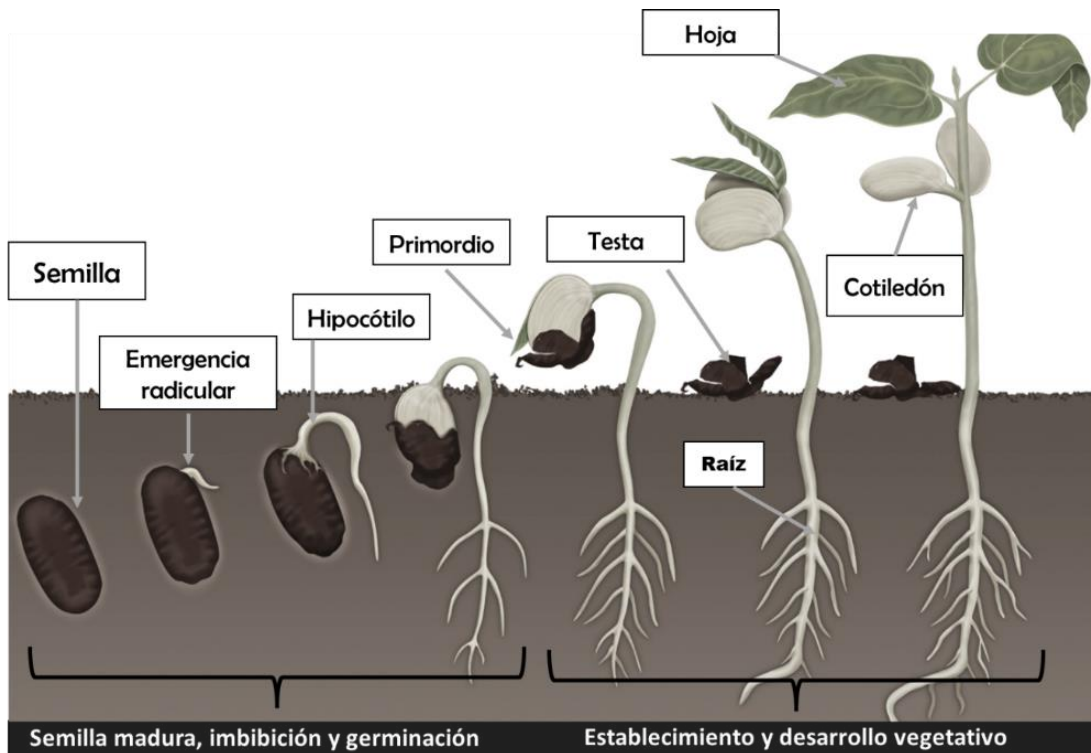


Figura 3. Etapas en el desarrollo temprano vegetal. Adaptado de ©Encyclopedia Britannica, 2021.

En el desarrollo temprano existen dos procesos básicos: crecimiento y diferenciación. El desarrollo o morfogénesis es un conjunto de cambios graduales y progresivos en tamaño (crecimiento), estructura y función (diferenciación) que hace posible la transformación de un cigoto en una planta completa (Segura, 2013).

2.4.1. Semilla, descripción y desarrollo

La semilla es el óvulo fecundado, transformado y maduro (Courtis, 2013), es la precursora de la siguiente generación en la vida de una planta (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación [(FAO), 1985] pues es el órgano de dispersión y perpetuación de las angiospermas (Matilla, 2013). Se forma mediante la embriogénesis cigótica que comprende cambios morfológicos, de estructura y expresión génica que incluye la formación del cigoto y la maduración del embrión (Matilla, 2013). La semilla consta de tres partes (Figura 4): el embrión, la parte que crecerá para formar la nueva planta; el endospermo, el material de reserva utilizada por la plántula para nutrirse hasta desarrollar hojas (FAO, 1985) y la testa o cubierta seminal, que emergen de los tegumentos del óvulo, su función puede ser química o mecánica regulando el flujo de agua y oxígeno para la germinación (Kelly *et al.*, 1992 citado por Moreno *et al.*, 2006).

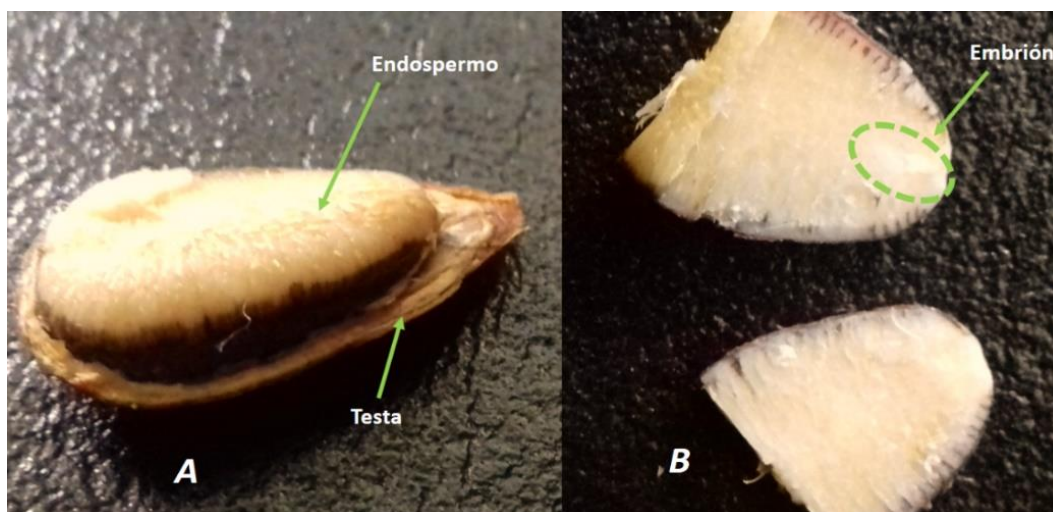


Figura 4. Estructura de semilla de *Annona purpurea*: Testa, endospermo y embrión. A) Endospermo expuesto B) Corte transversal del endospermo donde se aprecia el embrión.

Durante el desarrollo de las semillas se lleva a cabo la histodiferenciación, expansión, maduración y desecación (Matilla, 2013), que tienen inicio con la doble fecundación durante el ciclo de reproducción de las angiospermas y sucede luego de la interacción entre los gametos femenino (saco embrionario) y masculino (grano de polen), tras la fecundación, un gameto se forma con los núcleos polares dando origen a una célula triploide ($3n$) que se desarrolla en un tejido nutritivo llamado endospermo (Curtis *et al.*, 2008), en este periodo también, se observa un crecimiento unidireccional y después, el cigoto se divide transversalmente y asimétricamente, esto origina a la célula apical y que, tras sucesivas divisiones, da origen al embrión y otra célula alargada llamada célula basal que da origen al suspensor que actúa para transportar nutrientes desde el tejido materno hacia el embrión (Figura 5), sin descartar compuestos producidos por el propio suspensor; al inicio de la desecación de la semilla el suspensor se degenera y desaparece la conexión con la planta madre, función que adoptan los tejidos de reserva, endospermo y cotiledones (Matilla, 2013).

Los cotiledones son una parte del embrión. Durante el desarrollo, una serie de materiales de reserva se encuentra en los cotiledones y el endospermo, de los cuales se alimentan la plántula hasta que adquiere competencia fotosintética (Matilla, 2013). Es importante mencionar que existen varias formas de clasificar a las semillas, una de ellas es mediante el número de cotiledones presentes, las dicotiledóneas como el caso de las anonas y las monocotiledóneas.

El embrión de las dicotiledóneas se desarrolla como resultado de una serie de pasos y divisiones celulares, se reconocen en tres estadios, llamados etapa globular, corazón y torpedo (Courtis, 2013) nombrados así debido a la forma que adoptan (Figura 5). En las monocotiledóneas, el embrión no tiene fase de forma de corazón ya que sólo forma un cotiledón, es así que adquiere una forma cilíndrica hasta desarrollarse y llegar a la etapa torpedo (Raven *et al.*, 1992).

Durante la desecación, la semilla entra en un periodo llamado dormancia y puede adquirir diferentes formas de dormición, que es un proceso de enorme importancia en la supervivencia de la misma. Durante este periodo la semilla

mantiene su viabilidad a costa de una actividad metabólica basal (Raven *et al.*, 1992).

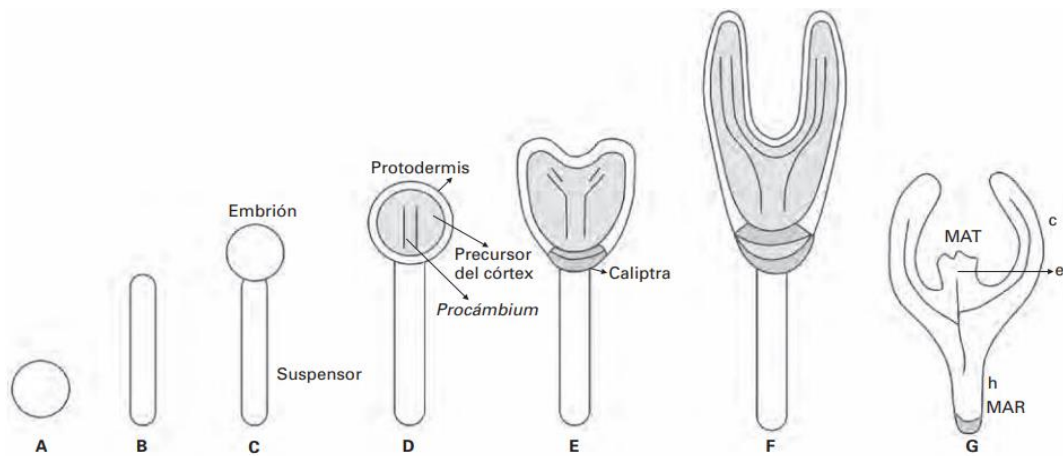


Figura 5. Embriogénesis en dicotiledóneas. A. Zigoto. B. Proembrión lineal. C. Embrión. D. Histogénesis (etapa globular): Protodermis, procámbium central y tejidos fundamentales subepidérmicos, también la formación de los meristemos apicales del tallo y raíz. E. Organogénesis inicial (etapa de corazón). F. Desarrollo del embrión (torpedo). G. Embrión maduro, MAT, meristemo apical del tallo; e, epicótilo; c, cotiledones; h, hipocótilo; MAR, meristemo apical de la raíz. Tomado de Segura, 2008.

2.4.2. Imbibición y germinación

La mayoría de las semillas poseen pequeños porcentajes de agua, normalmente contienen de cinco a 10% de su peso total en agua (Raven *et al.*, 1992). Así, la germinación no es posible hasta que la semilla entre en imbibición, es decir embeba el agua necesaria para reactivar sus actividades metabólicas, cuando se activan enzimas presentes en la semilla, y también, la biosíntesis de otras nuevas para la digestión y la utilización de las reservas alimenticias (Raven *et al.*, 1992).

Durante las primeras fases de la germinación, la respiración puede ser anaerobia, pero en el momento en que se rompe la cubierta seminal, pasa a ser aeróbica. Cuando se produce la germinación, la primera estructura que emerge es la radícula o raíz embrionaria; esta ayuda a que la plántula en desarrollo se fije al suelo y comience a absorber agua. Con el tiempo, esta primera raíz, desarrolla ramificaciones o raíces laterales y a su vez estas raíces pueden dar lugar a raíces

laterales adicionales, así formar un sistema radicular muy ramificado (Raven *et al.*,1992).

Existen dos casos generales de germinación tomando en cuenta la posición de los cotiledones, epigea e hipógea. El primer caso ocurre cuando los cotiledones son transportados por encima del nivel del suelo y el segundo caso, los cotiledones permanecen en el suelo en donde finalmente se descomponen (Raven *et al.*,1992).

La temperatura es un factor importante para la germinación, el margen mínimo es de 0 a 5°C, con un máximo de 45° a 48°C, aunque existe un intervalo que incluye de 25 a 30°C (Raven *et al.*,1992).

Otro factor por la que las semillas no germinan, es la latencia. Las causas más comunes de la latencia en semillas son la inmadurez fisiológica del embrión y la impermeabilidad de la cubierta seminal al agua y en ocasiones, al oxígeno. Algunas semillas fisiológicamente inmaduras aún después de la dispersión, antes de germinar, pasan por la postmaduración (una serie compleja de cambios enzimáticos y bioquímicos), la que se induce durante las temperaturas bajas del invierno, esto con el fin de prevenir la germinación durante las inclemencias invernales, en las cuales no podría sobrevivir. La latencia es vital para la supervivencia de la planta, es un método para asegurar que cuando se produzca la germinación, las condiciones sean favorables para el crecimiento de la plántula (Raven *et al.*,1992). Por lo anterior, otro factor muy importante a considerar durante la germinación es la viabilidad que se refiere a la progresiva pérdida de su capacidad de germinar, es decir, su longevidad (Pérez-García y Pilla-Villamil, 2001). Por ello, otra forma de clasificar semillas es entre, ortodoxas y recalcitrantes. El primer grupo, son semillas que admiten ser desecadas hasta con cinco a 10% de contenido de humedad; el segundo grupo, son semillas que pierden rápidamente su viabilidad al ser desecadas, pues necesitan un contenido de humedad entre 12 a 30% (Pérez-García y Pilla-Villamil, 2001).

2.4.3 Crecimiento vegetativo

Durante la germinación y el posterior desarrollo de la plántula, los nutrientes que están en el material de reserva o en los cotiledones, son digeridos y transportados a las partes de la plántula en crecimiento; durante este periodo, los cotiledones disminuyen gradualmente de tamaño, se debilitan, se marchitan y eventualmente la plántula se establece (Raven *et al.*,1992).

Las primeras hojas fotosintéticas o primordio foliar (Figura 3), constituyen una estructura rudimentaria pronta a desarrollar actividad meristemática, para su maduración, ocurren procesos como expansión y el crecimiento intercalar, es decir divisiones celulares y aumento de tamaño de las células. El tiempo que transcurre entre la germinación de la semilla y el establecimiento de la plántula como organismo autótrofo, es uno de los periodos más decisivos en la vida de la planta; al crecimiento de los sistemas radicular y caulinar se le denomina crecimiento vegetativo (Raven *et al.*,1992). Los órganos vegetativos principales son raíz, tallo y hoja (Figura 6) que a su vez se conforman por tres sistemas de tejidos: la epidermis, la capa protectora que cubre el cuerpo primario de la planta y la peridermis, tejido protector que sustituye a la epidermis cuando este se engrosa; el sistema vascular con dos tipos de tejidos conductores, el xilema y floema; y el sistema fundamental, parénquima, colénquima y esclerénquima (Segura, 2013).

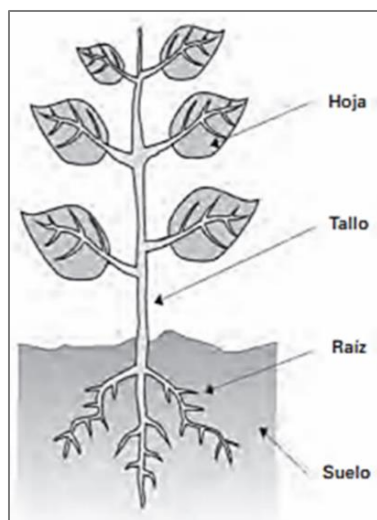


Figura 6. Plántula madura y órganos presentes. De Sanchez-Díaz y Aguirreola, 2013.

2.5. METABOLISMO SECUNDARIO

Las plantas son organismos autótrofos y además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, ellas poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, denominados metabolitos secundarios (MS) o metabolitos especializados y sus precursores cuya biosíntesis proviene del metabolismo primario del carbono (Ávalos-García y Pérez-Urria Carril, 2009).

Los MS son fundamentales para las plantas ya que desempeñan funciones ecológicas específicas durante su ciclo biológico, son moléculas que se involucran en la adaptación y evolución de las mismas. Las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensas para afrontar los efectos del estrés tanto biótico como abiótico, su plasticidad fenotípica y también la presión de selección que provoca una constante lucha química (Rioja-Soto, 2020), es así que algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas, por ejemplo pigmentos que son los responsables de dar color a flores y frutos, también son esenciales en la reproducción, atrayendo a insectos polinizadores o dispersores de semillas; otros tienen función protectora ante depredadores actuando como repelentes, así como mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos (Ávalos-García y Pérez-Urria Carril, 2009). Los MS tienen diversos usos y aplicaciones representando un importante valor medicinal y económico, para la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (*idem*).

2.5.1. Fitoquímica de la familia Annonaceae

Las especies de Annonaceae se caracterizan por su metabolismo secundario referido principalmente a la biosíntesis de moléculas como las acetogeninas, que son biosintetizadas de forma restringida por esta familia y los alcaloides de origen bencilisoquinolinico (abundantes en especies del antiguo complejo Ranaleano), además de encontrarse aceites esenciales y terpenos (González-Esquinca, 2016). Se cree que la presencia de estas moléculas se relaciona con el desarrollo fenológico de las plantas y/o con el establecimiento de mecanismos de respuesta a

las interacciones con factores bióticos y abióticos (González-Esquinca, 2016). Por lo anterior, se ha reportado la toxicidad de especies de *Annona* y algunos usos medicinales, y entre los metabolitos secundarios que confieren estas propiedades están mencionados alcaloides y acetogeninas (González-Esquinca, 2016).

2.5.2. Acetogeninas de Anonáceas

Las Acetogeninas de Anonáceas son un grupo de moléculas, la primera que se reportó en 1982 por Jolad y colaboradores (Cavé *et al.*, 1997), fue la uvaricina (Alali *et al.*, 1999).

Estructuralmente, la mayoría de las acetogeninas (Figura 7) poseen una cadena alifática compuesta por 35 a 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuranicos (THF), los cuales pueden ser o no adyacentes (Schlie-Guzmán *et al.*, 2009), también pueden contener varias funciones oxigenadas como hidroxilo, cetonas o epóxidos (Bermejo *et al.*, 2005). En alguno de sus extremos pueden presentar un anillo lactónico metil sustituido, α o β insaturado, en ocasiones saturado o rearrreglado como cetolactona (Schlie-Guzmán *et al.*, 2009), así como dobles enlaces en la cadena alifática, con anillos epoxidos o tetrahidropirano (THP) y lineales también (Bermejo *et al.*, 2005). Hasta 2004, se identificaron 420 acetogeninas (ACG), de 51 especies en 13 géneros (Bermejo *et al.*, 2005).

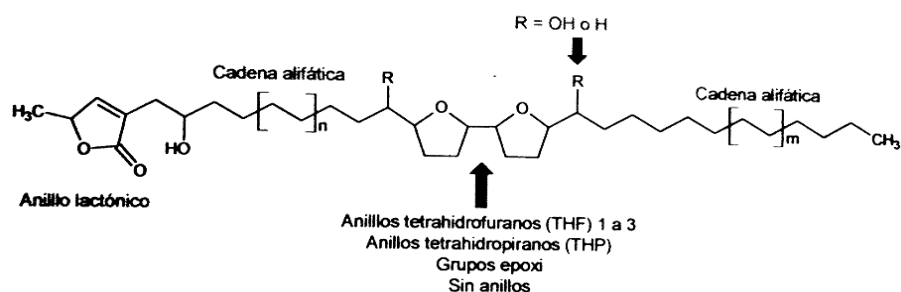


Figura 7. Estructura química de una Acetogenina . Tomado de González y De la Cruz, 2020

Hasta el momento la biosíntesis de ACG no ha sido descrita, pero parecen derivar de la ruta de los policétidos, mientras que los anillos THF, THP y epóxidos podrían surgir de la epoxidación y ciclación de dobles enlaces (Schlie-Guzmán *et al.*, 2009) y las ACG lineales no saturadas deriven de ácidos grasos como el laceroico y el geodoico (Schlie-Guzmán *et al.*, 2009).

2.5.2.1. Clasificación de Acetogeninas

Las acetogeninas de Annonaceae se han caracterizado basándose en la naturaleza de sus grupos funcionales presentes, la clasificación se realiza siguiendo los mismos criterios y basado en las características estructurales (Figura 8), en los que encontramos al sistema tipo THF y THP α -hidroxilado; al tipo de anillos epoxy y al tipo de anillos γ -lactonas.

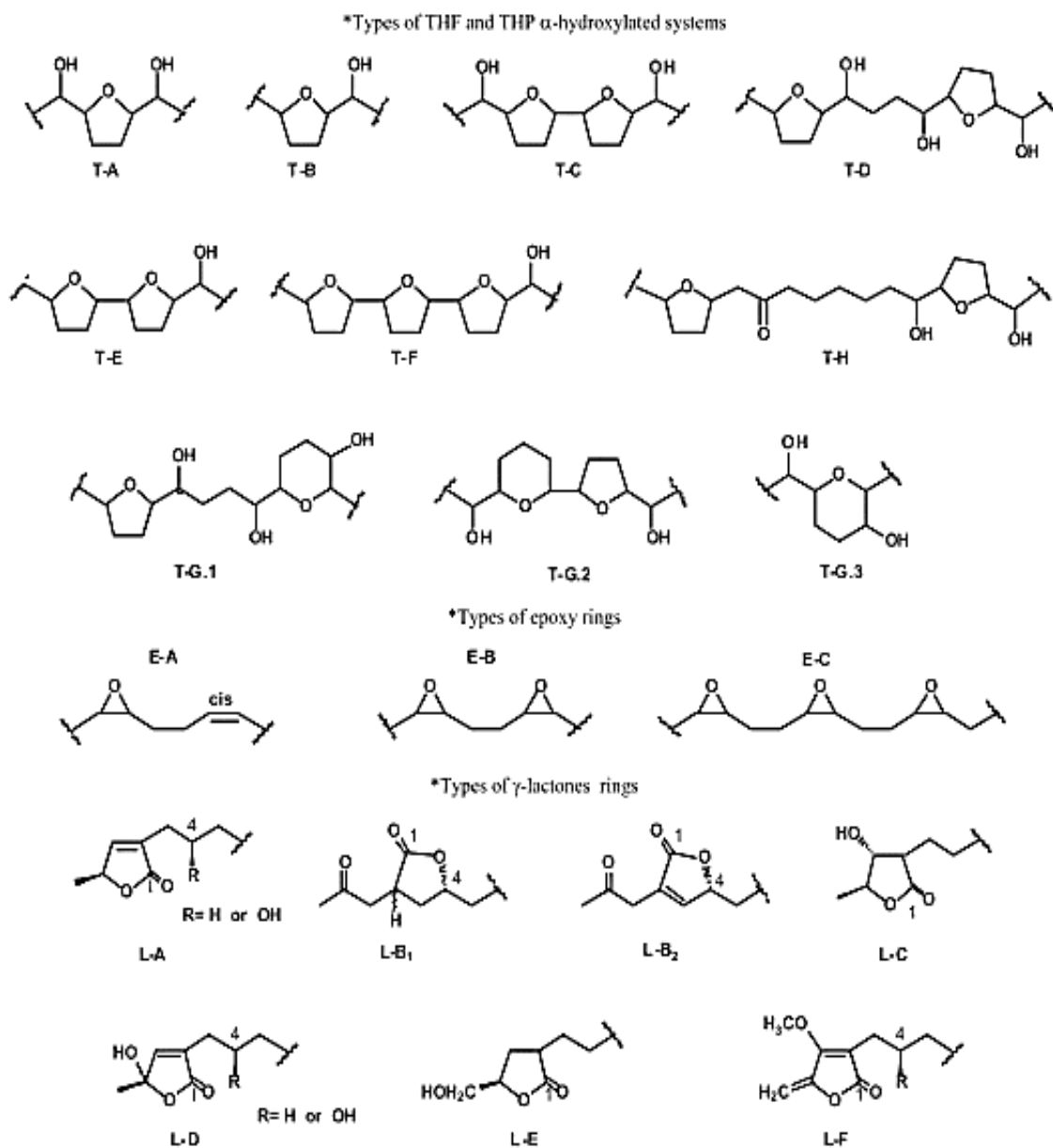


Figura 8. Disposición de anillos de acetogeninas: Tetrahydrofurano (THF), tetrahidropirano (THP), Epoxy y γ -lactonas. Tomado de Bermejo, 2005.

2.5.3. Alcaloides

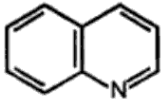
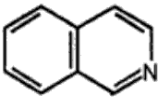
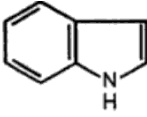
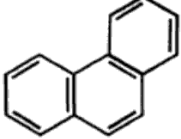
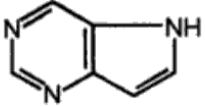
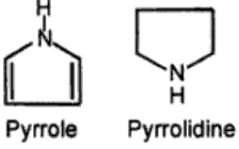
Los alcaloides, empleados por vez primera por el farmacéutico alemán Carl Meissner (Henning, 2013), son productos naturales muy heterogéneos, forman parte del grupo de moléculas vegetales secundarias más representativo, numeroso y diverso, por lo que es difícil definirlos de forma general y precisa, sin embargo, sus características comunes son: presencia de moléculas orgánicas más o menos complejas, de carácter básico ya que presentan entre uno o más átomos de nitrógeno formando parte de un heterociclo, se biosintetizan de aminoácidos o derivados inmediatos; son sustancias que presentan cierta toxicidad y finalmente, su presencia está asociada a determinados grupos taxonómicos.

Es importante mencionar que existen una variedad de compuestos secundarios que, aunque no cumplen todas las características mencionadas, se incluyen en este amplio grupo de compuestos naturales (Piñol *et al.*, 2013).

2.5.3.1. Clasificación de alcaloides

Existen varios enfoques para la clasificación de alcaloides, incluidos los químicos, taxonómicos, biológicos y biosintéticos, comúnmente se clasifican de acuerdo a la base de su estructura química (cuadro 1) (Funayama y Cordell, 2015).

Cuadro 1. Clasificación de alcaloides

| Estructura básica | Tipo de alcaloide | Ejemplos |
|---|-------------------|--|
| $ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \qquad \\ \text{N} - \text{CH}_3 \quad \text{CH}_2 \\ \qquad \\ \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{CH}_2 \end{array} $ | Tropano | Atropina, cocaína, hioscina, hiosciamina. |
|  | Quinolina | Quinina, quinidina, cinconina, cinconidina. |
|  | Isoquinolina | Papaverina, narcotina, emetina, berberina. |
|  | Indol | Estricnina, brucina, serpentina, ergometrina, reserpina. |
|  | Fenantreno | Morfina, codeína, tebaína. |
|  | Purina | Cafeína, teobromina |
|  <p>Pyrrole Pyrrolidine</p> | Pirrol | Nicotina, trigonelina. |

Reducido de Gokhale *et al.*, 2009.

2.5.3.2. Alcaloides en Anonáceas

Otro método para clasificar alcaloides es mediante su origen natural, es decir, organizarlos según una familia o género de plantas, con frecuencia este enfoque también sigue un origen biosintético o biogenético común (Funayama y Cordell, 2015). En la familia Annonaceae destaca la presencia de alcaloides isoquinolínicos, más específicamente bencilisoquinolínicos (Cavé *et al.*, 1989); cuya biosíntesis ocurre a partir de dos moléculas de tirosina a través de la dopamina, este proceso inicia con la enzima (S)-norcoclaurina sintasa, catalizando la síntesis de S-norcoclaurina, molécula precursora de alcaloides bencilisoquinolínicos (Hernández-Morales, 2017); aunque puede presentarse variaciones como bencilisoquinolínico, protoberberínico y dímeros bis-bencilisoquinoleinas (Hernández-Morales, 2017).

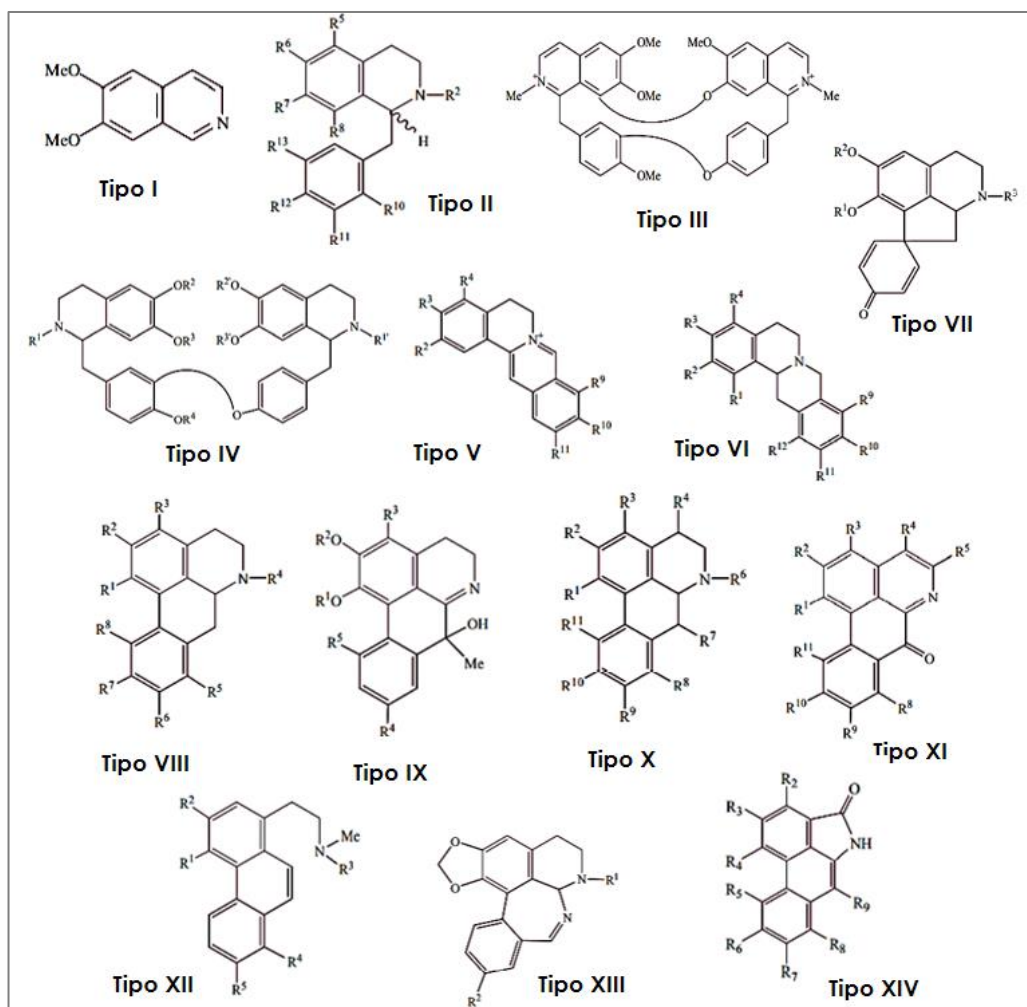


Figura 9. Clasificación estructural de alcaloides de Anonáceas, de Lucio, 2015.

Hasta 2012, se han reportado 934 alcaloides de Annonaceae, en general se ordenan de la siguiente forma: Isoquinolinas simples, isoquinolonas y fenetilamonio (tipo I); benciltetrahydroisoquinolinas, seco-bencilisoquinolinas y bencilisoquinolinas (tipo II); bisbencilisoquinolinas (tipo III); bisbenciltetrahydroisoquinolinas (tipo IV); protoberberinas (tipo V); tetrahydroprotoberberinas (tipo VI); proaporfinas (tipo VII); aporfinoides (tipo VIII); deshidroaporfinas (tipo IX); aporfinas 4 o 7 sustituidas (tipo X); oxoaporfinas (tipo XI); fenantrenos (tipo XII); alcaloides de tipo isoquinolina misceláneos (tipo XIII) y alcaloides sin isoquinolina (tipo XIV) (Lucio, 2015).

2.5.4. Actividad biológica

Los estudios químicos en la familia Annonaceae se han intensificado, debido a la biosíntesis de acetogeninas y alcaloides de origen bencilisoquinolinico, moléculas con alto potencial medicinal (González-Esquinca *et al.*, 2014) y de importancia ecológica, mismas que tienen actividad biológica positiva ante distintos casos.

Actividad antiparasitaria

La acción de acetogeninas extraídas de semillas de *Xylopia aromatica* y aplicadas contra *Tripanosoma cruzi* demuestra mayor eficacia que el medicamento convencional utilizado, Benznidazol® (Tenorio-Vergara *et al.*, 2006), así también, acción leishmanicida, pues la presencia de acetogeninas probablemente inhibe el notorio movimiento del agente infeccioso (Hernández *et al.*, 2005).

Actividad insecticida

Moléculas de la familia Annonaceae parecen ser competentes, pues las acetogeninas squamocina y annonacina extraídas de las semillas de *A. muricata* y *A. squamosa* tienen efectos insecticidas, squamocina inhibe el crecimiento en algunos insectos como *Myzus persicae*, *Drosophila melanogaster* y *Tribolium castaneum*; mientras que annonacina inhibe el crecimiento de *Aedes aegyptii*, *Rhodnius pallescens* y *Rhodnius prolixus*, además tienen acción repelente para *Periplaneta americana* (Castillo-Sánchez *et al.*, 2010). También otras acetogeninas como rolliniastatina-2, squamocina y laherradurina obtenidas de semillas de *Annona*

cherimolia muestran actividad insecticida frente a *Leptinotarsa decemlineata* (Cortés *et al.*, 2014).

Actividad antimicrobiana

Los extractos acuosos de *Annona lutescens*, tienen actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas, entre ellas *Salmonella Typhi*, *Shigella flexneri*; *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram positiva (Luna-Cazáres *et al.*, 1999) y *Escherichia coli*, la cual es inhibida de manera dosis dependiente con extractos acuosos de hojas de *A. lutescens* (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2016). Otro caso, es el estudio del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (Guanábana) en donde se determinó la presencia de alcaloides, entre otros; durante la evaluación, a través de la susceptibilidad *in vitro* y teniendo como control Clorhexidina (0.12%), demuestra que los halos de inhibición frente a las cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* son menores con el extracto en comparación al antibacteriano mencionado (Guillén-Fernández y Chávez, 2011).

Actividad antifúngica

Con la evaluación de extractos hexánicos y metanólicos de *Sapranthus microcarpus* (Annonaceae) se sabe que estos inhiben, de forma particular, a *Aspergillus glaucus*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Colletotrichum acutatum* var. *Florinae*, *Fusarium oxysporum* F. Sp. *lycopersici*, *curvularia lunata* y *Rhizopus stolonifer*, donde *F. oxysporum* y *Curvularia lunata* son los más sensibles. Los extractos alcaloidales mostraron mayor efectividad, la liriodenina tiene actividad ante todos los fitopatógenos con las concentraciones bajas (De la Cruz-Chacón *et al.*, 2019).

Actividad anticancerígena

Las acetogeninas de la familia Annonaceae son moléculas que han demostrado actividad antiproliferativa en las líneas cancerígenas, ya que inhiben el complejo I mitocondrial; hasta ahora, se cree que, debido a la rápida proliferación de las células cancerosas, éstas requieren de niveles altos de energía, por lo que pudieran ser más sensibles a su descenso y presentar cambios fisiológicos importantes (Schlie-Guzmán *et al.*, 2009). *Annona muricata* que ha mostrado resultados positivos, pues en el porcentaje de crecimiento de las células tumorales H460 es mucho menor al

emplear muricina H en comparación a 5-fluorouracilo (medicamento para matar células de crecimiento rápido como las anormales); para ambas el efecto varía proporcionalmente a su concentración, sin embargo, el más efectivo es muricina H (Quispe *et al.*, 2006). También, los extractos etanólicos de las hojas de *A. muricata*, especialmente las fracciones de acetato de etilo e hidroalcolicos presentan actividad citotóxica frente a células tumorales, estas fracciones poseen mayor contenido de metabolitos secundarios: flavonoides, taninos y alcaloides, lo que sugiere que estén relacionados con la actividad biológica encontrada (Dueñas-Cely, 2019).

III. ANTECEDENTES

3.1. ACETOGENINAS Y ALCALOIDES EN *ANNONA PURPUREA*

En Chiapas se ha observado la presencia de *Annona purpurea*, se ha recolectado en los municipios de Tuxtla Gutiérrez, San Fernando y Cintalapa (González-Esquinca, 2001) y de acuerdo a los registros de ejemplares del herbario Eizi Matuda del Instituto de Ciencias Biológicas-UNICACH, también se distribuye en los municipios de Chicoasén, Jiquipilas, Ocozocoautla y Las Rosas.

González-Esquinca (1996) realizó una investigación de las anonas medicinales en Chiapas: I. Alcaloides, que consistió en una revisión sistemática de los metabolitos secundarios aislados de cinco especies del género *Annona* entre ellas, *Annona purpurea*. Se reportan alcaloides en las especies mencionadas; Con excepción de *A. purpurea*, también se reportan aceites y ácidos grasos.

Barrios-Aranda *et al.*, (2012) evaluaron el efecto ixodicida *in vitro* de los extractos de semillas de *Annona purpurea*, *A. reticulata* y *A. muricata* aplicada en la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, afirman la presencia de acetogeninas monotetrahidrofuránicas y bistetrahidrofuránicas con actividad citotóxica.

Ordaz-Díaz (2017) estudió la actividad antioxidante, antifúngica y caracterización de metabolitos de las semillas de *Annona purpurea*, el extracto metanólico presenta actividad antirradical ante DPPH, el extracto hexánico crudo inhibe el crecimiento micelial y, al igual que el extracto CH₂CL₂, presenta acción antifúngica, también, se logró la caracterización de la acetogenina esquamocina C en las semillas de *A. purpurea*.

Hernández-Morales (2017) realizó un estudio sobre los cambios en el perfil alcaloidal debido a factores ambientales y fisiológicos con plantas juveniles y adultas de *Annona purpurea*. Encontró alcaloides con dos estructuras distintas, bencilisoquinolinas e índoles que tienen vías de biosíntesis independientes, y que los alcaloides encontrados en plantas jóvenes como en adultas de *A. purpurea*,

aumentan durante el periodo de estiaje. El alcaloide annomontina solo se detecta en árboles adultos. Cabe destacar que el perfil alcaloidal varía en época de secas.

González-Tepale *et al* (2018) lograron extraer ciclopurpuracina, una molécula novedosa con fórmula molecular: $C_{37}H_{54}N_8O_9$, desde un extracto hidroalcohólico al 60% de las semillas de *A. purpurea*. El polipéptido en cuestión contiene una valina, serina, fenilalanina e isoleucina, dos prolinas y dos glicinas.

Hernández-Fuentes *et al.*, (2019) en el trabajo titulado Acetogeninas citotóxicas de las raíces de *A. purpurea*, a través de la evaluación del extracto diclorometano (DCM) encontraron cinco nuevas acetogeninas denominadas Annopurpuricinas. Estas moléculas son de tipo adyacente bis-THF (tetrahidrofurano) α -monohidroxilado y adyacente bis-THF α,α' - dihidroxilado; la molécula cinco, pertenece a un sistema bis-epóxido. Los compuestos del uno al cuatro, mostraron actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas; el compuesto 1 destaca con la capacidad de inhibir la NADH deshidrogenasa, provocando despolarización de la membrana mitocondrial induciendo muerte celular a través de apoptosis tardía y necrosis.

Por lo anterior, se reportan las acetogeninas y alcaloides aislados de *Annona purpurea*, el tejido del cual fueron aisladas y el autor que las menciona en su trabajo (cuadro 2 y 3).

Cuadro 2. Acetogeninas aisladas de *Annona purpurea*

| Tipo | Tejido | Fuente |
|----------------------|----------------|--|
| esquamocina C | Semilla | Ordaz-Díaz, 2017 |
| Purpureacina 1 | Hojas | Cepleanu et al., 1993 |
| Purpureacina 2 | Hojas | Cepleanu et al., 1993; Cavé <i>et al.</i> , 1997 |
| Rolliniastatina | Hojas | Cepleanu et al., 1993; Cavé <i>et al.</i> , 1997 |
| Bullatacina | Hojas | Cepleanu et al., 1993 |
| Cherimolina | Hojas | Cepleanu et al., 1993 |
| Sylvaticina | Hojas | Cepleanu et al., 1993; Cavé <i>et al.</i> , 1997 |
| Purpurediolina | Semilla | Chávez y Mata, 1998 |
| Purpurenina | Semilla | Chávez y Mata, 1998 |
| Bullatacina | Semilla; Hojas | Chávez y Mata, 1998; Cavé <i>et al.</i> , 1997 |
| Squamocina (annonin) | Semilla | Chávez y Mata, 1998 |
| Annoglaucina | Semilla | Chávez y Mata, 1998 |
| Xylomatenina | Semilla | Chávez y Mata, 1998 |
| Ciclopurpuracina | Semilla | González-Tepale <i>et al.</i> , 2018 |
| Annopurpuricina | Raíces | Hernandez-Fuentes <i>et al.</i> , 2019 |
| Annonacina A | Semilla | Chávez y Mata, 1998 |

Cuadro 3. Alcaloides reportados de *Annona purpurea*

| Tipo | Tejido | Fuente |
|--------------------------------|-------------------------|---|
| Annomontina | Raíces (adulto) | Leboeuf <i>et al.</i> , 1982 |
| Apoglaziovina | Tallos (?) | Chang <i>et al.</i> , 2000; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| Cassamedina | Toda la planta (adulto) | Knölker, 2015 |
| Dehidrolirinidina | Hojas (?) | Chang <i>et al.</i> , 1998; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| 7-formil-dehidrothalicsimidina | Hojas (adulto) | Binage <i>et al.</i> , 2004; Knölker, 2015. |
| 7-hidroxi-dehidroglaucina | Hojas (adulto) | Chang <i>et al.</i> , 1998; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| Glaziovina | Toda la planta (adulto) | Sonnet & Jacobson, 1971; Leboeuf <i>et al.</i> , 1982; Chang <i>et al.</i> , 1998; Binage <i>et al.</i> , 2004; Becker, 2012; Knölker, 2015 |

| | | |
|-----------------------|--------------------------------|---|
| Glaucina | Tallos y Raices (adulto) | Sonnet & Jacobson, 1971; Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> , 2004; Knölker, 2015. |
| Iso-coridina | Toda la planta (adulto)/tallos | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> , 2004.;Knölker,2015. |
| Lirinidina | Hoja (adulto) y Tallo | Sonnet & Jacobson, 1971; Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> , 2004; Knölker, 2015. |
| Liriodenina | Corteza (adulto) y Tallo | Chang <i>et al.</i> , 2000; Becker, 2012; Binage <i>et al.</i> ,2004; Kölker, 2015 |
| Lisicamina | Corteza (adulto) y Tallo | Chang <i>et al.</i> ,2000, Binage <i>et al.</i> ,200; Knölker. 2015 |
| Metil-latherolina | ? | Sonnet & jacobson, 1971 |
| N-formil-purpureina | Hojas | Chang <i>et al.</i> ,1998; Binage <i>et al.</i> ,2004; Buckingham <i>et al.</i> ,2010 |
| N-metil-asimilobina | Hojas | Chang <i>et al.</i> ,1998; Knölker, 2015 |
| N-metil-laurotetanina | Hojas | Chang <i>et al.</i> ,1998; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| N-metil-ilobina | Hojas | Chang <i>et al.</i> ,1998; Binage <i>et al.</i> , 2005 |
| Norpurpureina | Tallo y hojas | Binage <i>et al.</i> ,2004;Buckingham <i>et al.</i> , 2010; Knölker, 2015. |
| Norglaucina | Tallos | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> ,2004 |
| Norpallidina | Tallos | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> ,2005 |
| Northalbaicalidina | Tallos | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> ,2006 |
| O-metilatherolina | Toda la planta (adulto) | Leboeuf <i>et al.</i> , 1982; Knölker, 2015 |
| O-Dimetilpurpureina | ? | Leboeuf <i>et al.</i> ,1982 |
| O-methylflavinantina | Tallo | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> ,2004 |
| Oxoglaucina | Corteza (adulto) y hojas | Leboeuf <i>et al.</i> , 1982; Chang <i>et al.</i> , 1998; Chang <i>et al.</i> , 2000; Binage <i>et al.</i> , 2004;Buckingham <i>et al.</i> , 2010 |
| Oxopurpureina | Toda la planta y hojas | Leboeuf <i>et al.</i> ,1982;Chang <i>et al.</i> ,1998; Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> , 2004; Knölker, 2015. |
| Oxonuciferina | Hojas | Chang <i>et al.</i> ,1998; Binage <i>et al.</i> , 2004. |
| Papaverina | Corteza (adulto) y Tallo | Chang <i>et al.</i> ,1998; Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> ,2004; Becker, 2012 |

| | | |
|-----------------|-----------------|---|
| Pallidina | Tallo | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| Predicentrina | Hojas | Chang <i>et al.</i> , 1998; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| Promucosina | Tallo | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| Purpureina | Toda la planta | Leboeuf <i>et al.</i> ,1982; Knölker,2015 |
| Reticulina | Tallo | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| Rumucosina F | tallos (adulto) | Chang <i>et ad.</i> ,2000; Binage <i>et ad.</i> , 2004 |
| Rumucosina G | tallos (adulto) | Chang <i>et ad.</i> ,2000; Binage <i>et ad.</i> , 2004; Knölker, 2015 |
| Stepharina | Tallo | Sonnet & Jacobson, 1971; Leboeuf <i>et al.</i> , 1982; Chang <i>et al.</i> , 2000; Binage <i>et al.</i> , 2004. |
| Thalbaicalidina | Tallo y hojas | Chang <i>et al.</i> , 1998; Binage <i>et al.</i> , 2004; Buckingham <i>et al.</i> ,2010 |
| Thalicsimidina | Tallo y hojas | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> ,2004; Buckingham <i>et al.</i> ,2010; Knölker, 2015 |
| Thalicpureina | Hojas | Chang <i>et al.</i> ,1998; Binage <i>et al.</i> , 2004; Buckingham <i>et al.</i> , 2010 |
| Thalifolina | Tallo | Chang <i>et al.</i> ,2000; Binage <i>et al.</i> , 2004 |
| Thalimicrinona | Hojas | Binage <i>et al.</i> , 2004 |

Documentado por Hernández-Morales, 2017.

3.2. ACETOGENINAS Y ALCALOIDES EN ETAPAS TEMPRANAS EN EL GÉNERO *ANNONA*

Farrera-Villanueva (2000) en su reporte de residencia profesional denominado acetogeninas y alcaloides durante la germinación y las primeras etapas de desarrollo de *Annona purpurea*, determinó acetogeninas y alcaloides en algunas etapas tempranas, como semillas con y sin imbibición, 10 días de germinación y plántula, también la variación de estos metabolitos presentada durante su desarrollo y el efecto del ácido gilberélico obteniendo mayor rendimiento de acetogeninas en el endospermo seguido del embrión encontradas en todos los órganos y los alcaloides únicamente se reportaron en etapa de plántula. Sin embargo, a diferencia de nuestro trabajo, buscan si el uso de hormonas es un factor de producción, mientras que en esta investigación también nos enfocamos en la búsqueda órgano específica de ausencia-presencia de ACG por tejido durante más etapas puntuales del desarrollo así como el momento de la biosíntesis y presentamos procesos germinativos.

Alfaro-Romero (2005) en su estudio de la producción de acetogeninas y alcaloides durante la germinación y primeras etapas del desarrollo del *Annona lutescens* Saff, demuestra la presencia de dos acetogeninas, laherradurina y D (no identificada) en diferentes tejidos y órganos de *Annona lutescens* durante las etapas tempranas; en esta especie la biosíntesis de acetogeninas fue detectada durante la etapa de plántula con primordio foliar. Sobre los alcaloides, algunos estudios demostraron la presencia de la liriodenina y oxopurpureina en distintos tejidos y órganos, dichos alcaloides inician su biosíntesis durante la germinación cuando la raíz tiene 1cm de longitud. Las acetogeninas y los alcaloides estudiados no provienen de la planta madre, ya que no están presentes en semillas recién colectadas y tienen relación con la fisiología de la planta.

García-Aguirre (2009) aisló y caracterizó ACG que se obtienen de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata* La investigación incluye la evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. En el caso de *A. cherimolia* Mill se determinaron tres acetogeninas tetrahidroxiladas monotetrahidrofuránicas

denominadas en este trabajo como 1F1, 2F2 Y 2F3. De *A. muricata* se aisló una acetogenina tetrahidroxilada monotetrahidrofuránica.

De la Cruz-Chacón y González-Esquinca (2016) en su artículo Desarrollo temprano y defensas químicas de *Annona macrophyllata* Donn. Smith. (Annonaceae), señalan que los alcaloides constituyen recursos de defensa durante el desarrollo temprano de la especie; no encuentran alcaloides en las semillas secas, sino avanzada la imbibición y aumentan en las etapas de emergencia radicular, se observan dominancias temporales en los distintos tejidos. Se encontraron cinco tipos de alcaloides y tres se lograron identificar que son comunes en la familia: liriodenina, lisicamina y atherospermidina, algunos de ellos con alta actividad antifúngica.

González-Esquinca (2016) en Annonaceae: relevancia biológica de sus atributos químicos establece algunas relaciones entre el desarrollo temprano de *A. macrophyllata*, *A. lutescens*, *A. muricata* y *A. purpurea* y los alcaloides que producen, entre lo más significativo se encontró a grandes rasgos, que estas moléculas no se biosintetizan durante la organogénesis de las semillas; la biosíntesis de ellas inicia muy tempranamente durante la germinación y el perfil químico se enriquece en cada órgano a medida que la plántula completa su desarrollo. También se conoció que algunos alcaloides solo dependen de la movilización de reservas acumuladas en las semillas y que otros, sin embargo, solo se biosintetizan cuando la plántula se vuelve fotosintética; que las semillas asignan parte de su material de reserva para la producción de sustancias antimicrobianas y que implica una estrategia de sobrevivencia de la especie. En cuanto a las acetogeninas, éstas se biosintetizan durante la organogénesis de las semillas, además de que están presentes en varias partes de la planta y su concentración varía durante el desarrollo.

IV. ZONA DE RECOLECTA

Los frutos, se recolectaron en diversas zonas del municipio de Cintalapa, el municipio se encuentra en el extremo Oeste del Estado de Chiapas, situado entre las coordenadas 16° 39'N y 93° 44'W con una altitud de 540msnm (INAFED, S.F.) y presenta las siguientes características:

Clima: El clima predominante es semicálido subhúmedo, en la cabecera municipal la temperatura media anual es de 24.5°C con una precipitación pluvial de 800 milímetros anuales (INAFED, S.F.). Sin embargo, también se encuentran presente otros climas: Cálido húmedo, cálido subhúmedo, semicálido húmedo, semicálido subhúmedo. Se registran dos periodos de temperaturas donde la primera destaca por presentar mínimas, y en el segundo periodo además de las mínimas, también se registran las temperaturas altas (Figura 10). El primer periodo es de mayo a octubre donde los rangos de temperaturas mínimas son entre 12, 15, 18 y 21°C, y el siguiente ocurre en noviembre y abril con una temperatura mínima de hasta 9°C, sin embargo, en este mismo periodo se registran fechas en donde la temperatura alcanzan máximas que no bajan de 21°C. En tanto a la precipitación, de mayo a octubre la media va en un rango total de 800mm a 2300mm, en los meses de noviembre a abril, son de 50mm a 1200mm (Honorable Ayuntamiento Municipal Cintalapa, 2016).

Vegetación: La cobertura vegetal existente en el municipio es (Figura 10): Bosque de pino-encino, Bosque de encino-pino, Bosque de encino, Bosque de pino, Bosque de pino secundario, Bosque de pino-encino secundario, Agricultura de temporal, Agricultura de riego, Pastizal inducido, Pastizal cultivado, Selva baja caducifolia, Selva baja caducifolia secundaria, Selva alta perennifolia, Selva alta perennifolia secundaria, Selva mediana subperennifolia, Selva mediana subperennifolia secundaria, Selva mediana subcaducifolia secundaria, Sabana y Sabanoide (Honorable Ayuntamiento Municipal Cintalapa, 2016)

Edafología: Los tipos de suelos hasta ahora analizados son Leptosol, Regosol, Cambisol, Luvisol, Umbrisol, Vertisol, Phaeozem, Nitisol, Ruvisol, Alisol y Acrisol (Honorable Ayuntamiento Municipal Cintalapa, 2016).

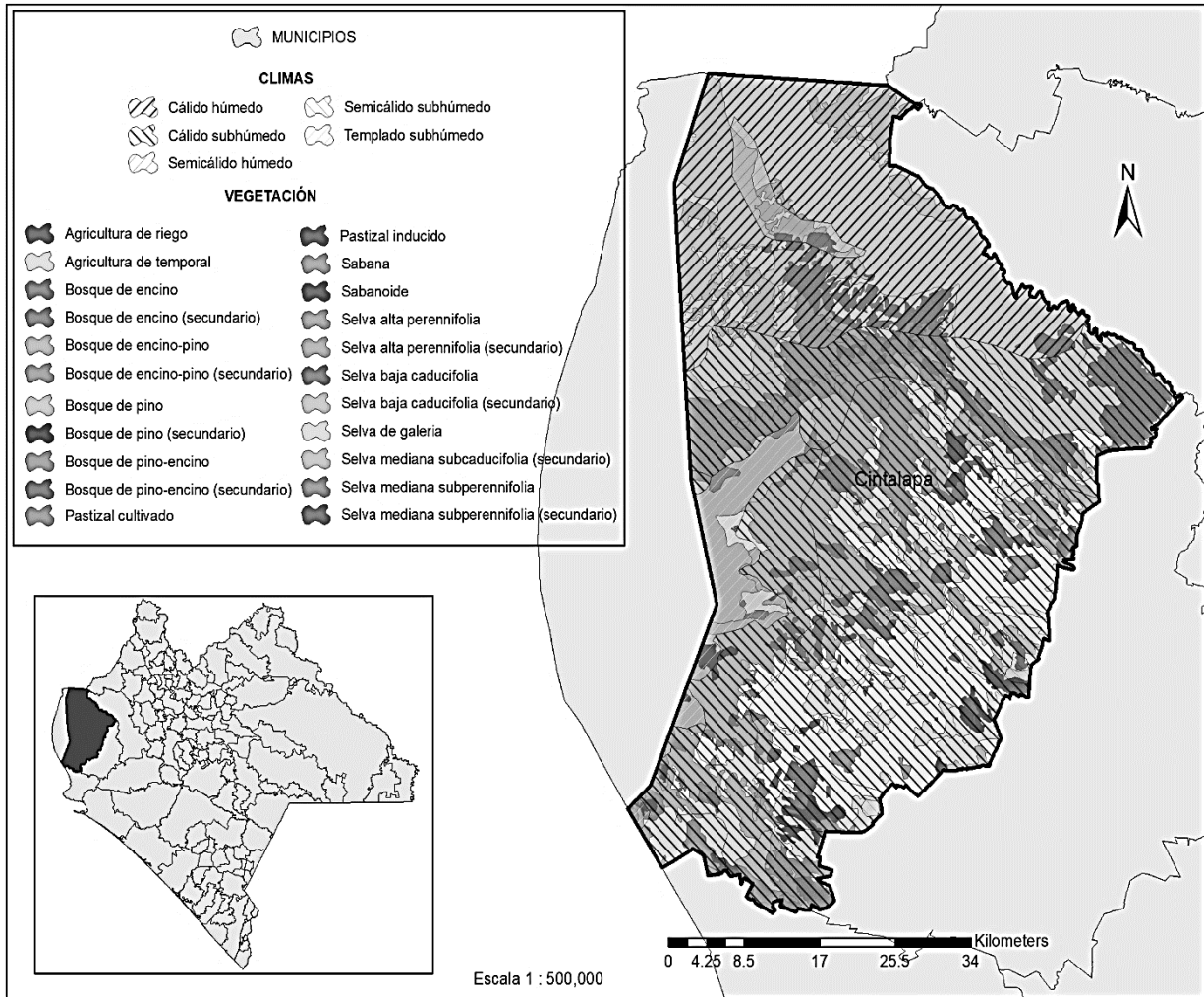


Figura 10. Mapa de Cintalapa, Chiapas en donde se resaltan los remanentes de vegetación y tipos de clima propios del lugar. Realizó: Castro-Pérez, G. 2021.

V. OBJETIVOS

General

Demostrar la presencia y variación de acetogeninas y alcaloides durante las primeras etapas de desarrollo de *Annona purpurea*.

Específicos

Ubicar el estado de desarrollo en que inicia la biosíntesis de acetogeninas y alcaloides

Determinar en qué tejidos en las semillas u órganos se encuentran las acetogeninas y alcaloides.

Determinar si la concentración de alcaloides y acetogeninas es órgano ó tejido-específica y si está relacionada con alguna etapa de desarrollo.

VI. MÉTODO

6.1. DISEÑO

Para determinar la presencia y la relación órgano-tejido específica que guardan las acetogeninas y alcaloides en semillas y también en las primeras etapas de desarrollo de *Annona purpurea*, se realizó un trabajo que conllevó a 6 etapas: recolecta de frutos, obtención de semillas, germinación y separación de tejidos y/u órganos de acuerdo a las diferentes etapas (Cuadro 4), obtención de extractos y análisis cromatográficos.

Con previo estudio de las estructuras botánicas, se reconoció la especie en el campo y se recolectaron frutos para obtener 5 000 semillas, mismas que se pusieron a secar a la sombra a temperatura ambiente. 2 500 semillas, se pusieron a germinar para obtener las etapas de desarrollo de emergencia radicular hasta plántulas, de las cuales, se requirieron entre 30 a 35 ejemplares por fase (cuadro 4). Las plántulas se sembraron en el sustrato de dónde se recolectaron los frutos. Para las etapas de semilla seca, imbibición y germinación se utilizaron entre 100 a 150 semillas por fase de desarrollo. Una vez obtenida la etapa deseada, se separaron los tejidos y se obtuvieron extractos hexánicos y metanólicos.

Cuadro 4. Etapas y fases del desarrollo temprano de *A. purpurea*

| Etapas | Fase de desarrollo | Tejidos u órganos |
|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| Semilla seca | Semillas sin imbibición | Testa, endospermo y embrión. |
| Imbibición | Semillas con 1 día de imbibición. | Testa, endospermo y embrión. |
| | Semillas con 2 días de imbibición | Testa, endospermo y embrión. |
| | Semillas con 5 días de imbibición | Testa, endospermo y embrión. |
| | Semillas con 10 días de imbibición. | Testa, endospermo y embrión. |
| Emergencia Radicular | Semillas con 1 a 2cm de radícula | Testa, endospermo, cotiledones, tallo y radícula. |
| | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Testa, endospermo, cotiledones, tallo y radícula. |
| | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Testa, endospermo, cotiledones, tallo y radícula. |
| Desarrollo de la plántula | Plántulas con primordio foliar | Testa, endospermo, cotiledones, tallo, raíz y primordio. |
| | Plántulas con 2 y 4 hojas. | Raíz, tallo y hoja. |
| | Plántulas con 6 hojas. | Raíz, tallo y hoja. |

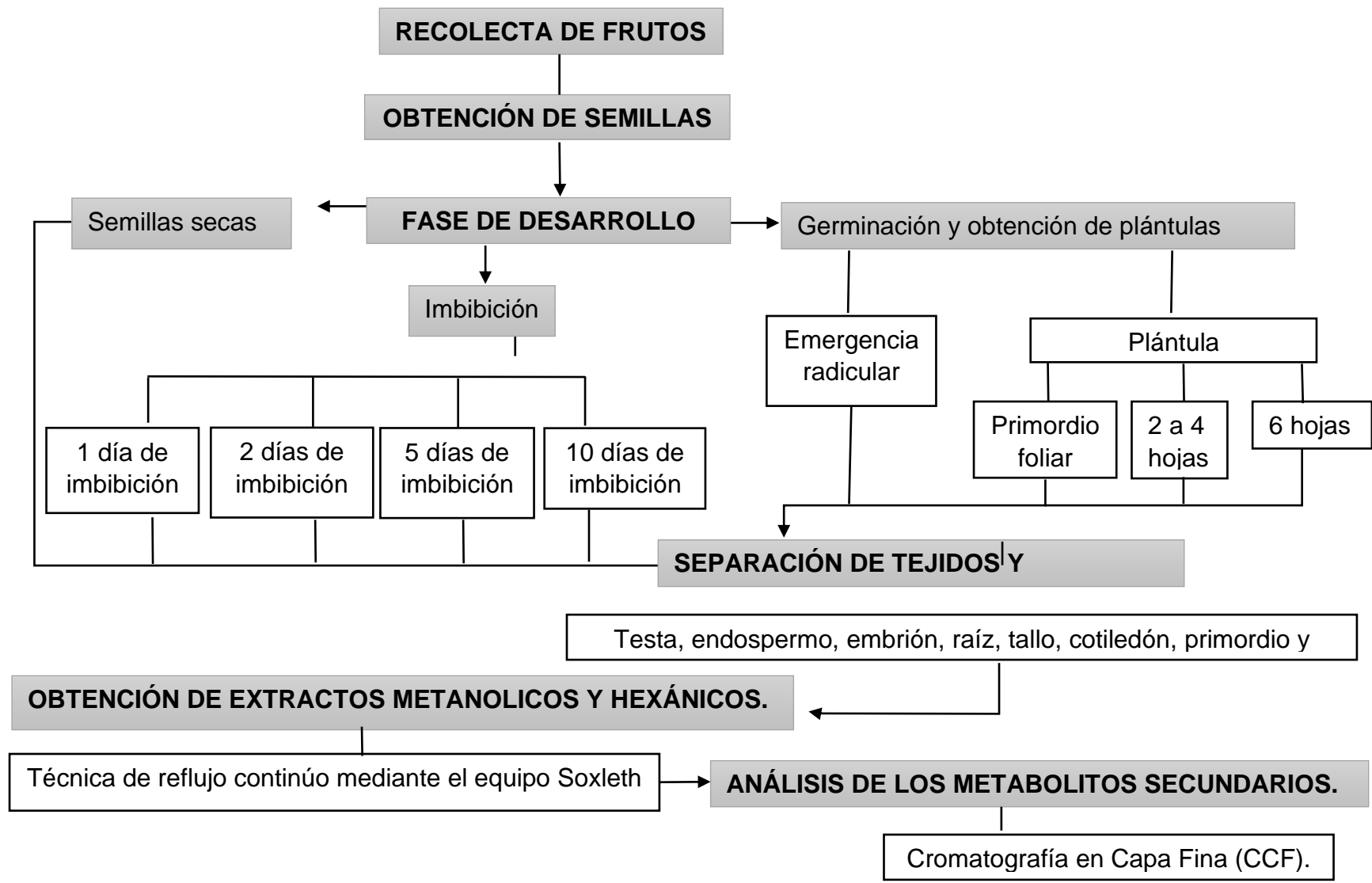


Figura 11. Diseño general.

6.2. RECOLECTA DE FRUTOS

Se ubicó la zona de recolecta en Cintalapa, Chiapas, con coordenadas 16° 39'N y 93° 44'W. Se investigaron las fechas de fructificación que comienza entre octubre-noviembre (Hernández-Morales, 2017) para coleccionarlas cuando estos ya estuvieran maduros y así tener mejor calidad fisiológica en las semillas (Sánchez-González y González, 2007). También se estudiaron las estructuras morfológicas de la especie *Annona purpurea* en el herbario Eizi Matuda de la UNICACH, para su reconocimiento en campo.

6.3. PREPARACIÓN Y SEPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Los frutos recolectados de la especie *A. purpurea* contienen múltiples semillas que fueron extraídas, para ello se procedió a abrir el fruto y separar las semillas de la pulpa que la envuelve y se secaron a la sombra a temperatura ambiente. Se contabilizaron la cantidad de semillas obtenidas por fruto y se almacenaron en bolsas de papel estraza.

Para conocer el estado fisiológico de la semilla, se sometió a prueba de viabilidad que ya ha sido implementada en semillas de otras especies del género, como en *A. cherimola* y *A. squamosa* (Gimenez *et al.*, 2014), con base en ello, se adaptó la técnica que consistió en dejar reposar 100 semillas tomadas al azar (que representan estadísticamente a la población colectada) y se sumergieron en un litro de agua destilada por 24 horas manteniendo un sistema de oxigenación. Luego de ello, a estas se les realizó un corte transversal con la finalidad de exponer al embrión ante la solución de cloruro de fenil tetrazolio (TTC) (ver anexo 1), para esto se realizó una solución de 5 g de TTC en 100ml de agua destilada. Los resultados se observan a partir de ciertas horas en donde el embrión se visualiza con coloración roja, que indica actividad respiratoria mitocondrial (Gimenez *et al.*, 2014), y de acuerdo al número de embriones teñidos, se consideró el porcentaje de viabilidad.

Para las etapas de semilla seca únicamente se procedió separando el tejido de 250 semillas (testa, endospermo y embrión), mientras que para las etapas de imbibición se utilizaron la misma cantidad de semillas de acuerdo a los días

correspondientes y utilizamos giberelinas, ya que éstas semillas aún presentaban latencia, no así en la germinación.

En *A. purpurea*, el tiempo de latencia es de 7 meses (Irigoyen, 2004 en Vidal-Lezama *et al.*, 2015b); para la germinación se utilizó la técnica llamada comúnmente “entre papel” (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO and Africa seeds, 2019), que consiste en colocar sobre un trozo de papel estraza semillas de forma idónea para absorción de agua (en el caso de *Annona purpurea* con vista hacia abajo) implementando rollos de papel estraza húmedos, los cuales se encapsulan con el uso de dos botes transparentes de 1L para ser sellados con el fin de mejorar la humedad. Se utilizó la temperatura de 25°C a 30°C; se monitoreó y se cambió el papel estraza tres veces por semana. Para las plántulas se utilizó el suelo de donde se recolectaron los frutos. Las plantas, se dejaron desarrollar de acuerdo a la etapa deseada, se separaron los tejidos y órganos, según correspondió (cuadro 4).

6.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Acetogeninas: Para obtener acetogeninas se realizaron extractos hexánicos para cada uno de los tejidos y órganos, para ello se empleó la técnica Soxhlet (Figura 12), un método de reflujo continuo (Casado-Sánchez *et al* 2012) aceptado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (Rodríguez, 2008).

Para cada extracción de tejido u órgano, se realizaron tres repeticiones cada una de ocho horas. Los intervalos interrumpidos luego de cada ocho horas, fueron para eliminar el solvente por rotaevaporación (Figura 13) para evaporar el exceso de disolvente (Casado-Sánchez *et al.*, 2012), y así obtener la concentración del extracto además, de esta forma se reutiliza el solvente para el siguiente ciclo del mismo tejido; durante el proceso de rotaevaporación la temperatura fue de 50°C a 150 RPM: El extracto obtenido, se almacenó en frascos pequeños previamente pesados y etiquetados, ahí es donde se terminaban de concentrar a temperatura ambiente.



Figura 12. Equipo Soxhlet: Consta de una parrilla de calentamiento, matraz bola, un sifón o extractor por donde se coloca la muestra, y el refrigerante (donde ocurre la condensación).



Figura 13. Rotaevaporador, consiste en una cámara refrigerante y cavidad de vacío, un motor que controla RPM, un área para matraz, calentador en baño María y regulador de temperatura.

Debido al tamaño y peso de algunos tejidos y órganos, se obtuvo menor cantidad de gramos, insuficientes para trabajarse con el equipo Soxhlet, pero suficientes para obtener muestra. A esos casos, como lo fueron los embriones, los cotiledones, primordio foliar y algunas raíces, se implementó la técnica de reflujo continuo directo (Figura 14), el cual se diferencia del primero en que el tejido se coloca dentro del matraz junto con el solvente. Al ser poco tejido, únicamente se realizó una repetición de ocho horas, se rotaevaporó para eliminar el exceso de solvente, y el resto se dejó evaporar a temperatura ambiente dentro de un frasco previamente pesado y etiquetado.



Figura 14. Técnica de reflujo continuo directo

Alcaloides: Luego de la extracción hexánica, se dejó secar el tejido para luego comenzar la extracción alcaloidal, mediante el uso de metanol. Se realizó el mismo procedimiento en el equipo Soxhlet por ocho horas con tres repeticiones, en las que cada ciclo es interrumpido para realizar rotaevaporación y así eliminar el exceso de disolvente, lo obtenido también se colocó en frascos previamente pesados y etiquetados en donde se terminaron de concentrar.

6.5. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS Y METANÓLICOS

6.5.1. Rendimiento

Para ambos extractos, se determinó el rendimiento. Los cálculos del rendimiento real se expresan porcentualmente (Daub y Seese, 2005), para ello es necesario que la muestra estuviera completamente seca. Las muestras se pesaron en una balanza analítica y mediante un cálculo, se obtiene la porción vegetal obtenida:

$$\text{rendimiento \%} = (\text{Peso del extracto en seco}) (100\%) / \text{Peso del tejido.}$$

6.5.2. Prueba de Kedde

Para determinar la presencia de acetogeninas se implementó la técnica de Kedde en los extractos hexánicos, un reactivo empleado para la identificación de acetogeninas de Anonáceas, ya que este puede identificar lactonas insaturadas (Flores-Amaya y Rodríguez-Lemus, 2017) y algunas presentan esta condición química estructural (Figura 7).

El reactivo se compone de dos soluciones, el reactivo A) Ácido 3,5 dinitrobenzoico 2% disuelto en metanol y, B) hidróxido de potasio 5.7% disuelto en agua destilada. Ambas soluciones se mezclan en el momento de realizar el revelado.

En este método, se cuantificó cada muestra hexánica llevándolas a una concentración de 0.0025g en 100 μ l de acetato de etilo; de estas concentraciones, y ayudándonos de un tubo capilar se tomaron 20 μ l, se colocaron una por una sobre un disco de papel filtro (diámetro de 2.1cm), sin esperar mucho tiempo, estos discos se sumergieron en 5ml de reactivo de Kedde.

A los resultados se les pudo analizar estableciendo un rango de tonalidades de rojo a rosa (ver anexo II): cuando una prueba es positiva, puede teñirse en varias tonalidades que van de intensas a pálidas, por ello se estableció dicho rango, que

permiten valorar a las muestras positivas y compararlas entre mayor o menor presencia de moléculas con lactonas insaturadas (cuadro 7).

El extracto agregado a cada disco corresponde a:

$$(25\mu\text{g}/\mu\text{l}) (20\mu\text{l}) = 500\mu\text{g por disco.}$$

6.5.3. Perfiles cromatográficos

6.5.3.1. Concentración del extracto

En una balanza analítica se pesaron 10 mg de muestra en seco y se mezclaron en 100 μl acetato de etilo (AcOEt) dentro de un tubo previamente pesado y etiquetado. Una vez estandarizadas las concentraciones se realizaron las cromatografías. Algunos extractos no se disolvían a temperatura ambiente, por lo que se procedía a implementar un poco de calor, con el fin de disolverlos completamente.

6.5.3.2. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se empleó como fase estacionaria placas cromatográficas de sílica gel de la marca Sigma, en tanto que la fase móvil, varió de acuerdo a la polaridad de cada caso. Para valorar la separación de componentes, se obtiene el R_f , una constante única para cada compuesto; este valor puede ser utilizado para identificación, pero no como criterio único ya que varios compuestos pueden tener el mismo R_f con determinada mezcla de disolventes (Lamarque *et al.*, 2008).

Por lo anterior, se establecieron medidas para las placas cromatográficas (Figura 15); el largo de cada una fue de 5cm; el espacio para la migración de las moléculas es de 3.5cm (distancia A en la Figura 15), considerando esto, se estableció una línea de origen (donde se colocaron las muestras o punto de aplicación) y una línea que delimita el frente del solvente (donde finaliza el corrimiento). Por último, de acuerdo a las muestras a analizar sobre cada placa cromatográfica, se establecieron puntos de aplicación por muestra, y entre ellas una

distancia de 0.5cm. Se analizaron las muestras de acuerdo a los tejidos que pertenecían al mismo tipo, tomando como variable las fases de desarrollo. Por ejemplo: En una misma placa, se analizaron todos los tejidos embrionarios hexánicos, lo mismo para los extractos metanólicos.

Previamente cuantificadas las disoluciones a analizar, con una micropipeta electrónica se tomaron 3µl de cada muestra y se colocaron en el punto de aplicación señalado sobre una línea de origen. Para que la gota del punto de aplicación no fuera tan grande, se agregó 1ul de la muestra tres veces en el mismo sitio.

Dentro de una cámara para cromatografía (Figura 16) se agregó la fase móvil a utilizar, se colocó la placa cromatográfica ligeramente inclinada en una de las paredes y se tapó la parte superior de la cámara. La placa se retira justo cuando el solvente llega al extremo de la placa (Figura 15).

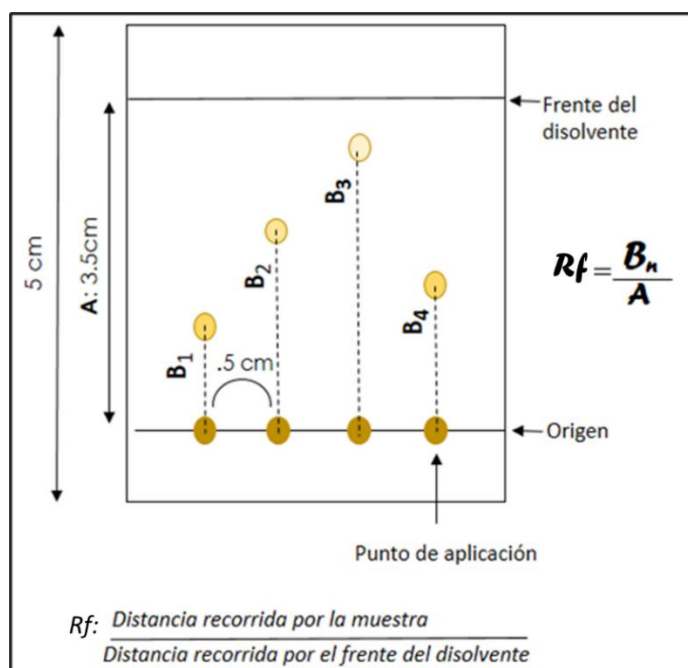


Figura 15. Estructura general de las cromatografías en capa fina utilizadas, incluyendo medidas generales.



Figura 16. Cámara cromatográfica, aquí se corren muestras de la placa cromatografía con la fase móvil.

6.5.3.3. Reveladores cromatográficos

Para poder visualizar la separación y el comportamiento de los componentes de la muestra analizada en la cromatografía, se utilizó el revelador de sulfato sérico, para compuestos orgánicos que incluyen algunas acetogeninas, mientras que se empleó el reactivo de Dragendorff como revelador de alcaloides; ambos reactivos han sido empleados en investigaciones anteriores del metabolismo de la familia Annonaceae. Por lo tanto, se realizaron dos placas cromatográficas idénticas de cada serie de muestras, una para revelar con el reactivo de Dragendorff y otra con sulfato sérico. Todas las placas cromatográficas, fueron observadas en una cámara de luz ultravioleta a longitudes de onda de 254nm y 365nm para detectar la fluorescencia y el perfil cromatográfico de los compuestos. Con el fin de saber sobre el comportamiento de las acetogeninas en las placas cromatográficas de sílica gel, se realizó una prueba de cromatografía en papel filtro, la cual se reveló con la técnica de reactivo de Kedde.

El Test de Dragendorff o Reactivo de Dragendorff, está compuesto por tetrayodo bismuto de potasio y puede indicar cualitativamente la presencia de alcaloides (Cuca-Suárez y Macías-Villamizar, 2016), cuando hay presencia de alcaloides se observan manchas de color naranja que no se desvanecen aún 24 horas después (Huayhua-Carlos y Moya-Torres, 2018)

6.5.4. Análisis estadístico.

Los Rf son datos que nos permitieron realizar el índice de diversidad de Margalef para cromatografía, y el índice de similitud de Jaccard para compararlas entre cromatografías. Por ello, para el análisis estadístico se implementó el uso del programa estadístico Past versión 4.07, un programa de uso libre creado para la comunidad científica.

VII. RESULTADOS

7.1. ACERCA DE LAS SEMILLAS Y LA GERMINACIÓN DE *ANNONA PURPUREA*

La cantidad de semillas obtenidas fue de 5 324, provenientes de 44 frutos con diámetros de 15cm a 20cm, con un promedio de 121 semillas por fruto. Cabe destacar que, se encontró un aproximado de 7 semillas vanas por fruto. Por otro lado, la viabilidad fue de 80% durante los meses de recolecta. La semilla presenta una morfología de tipo basal y se estructura por testa, endospermo y embrión, de este último, se desarrollan los tallos observándolos rojizos durante la etapa juvenil y la raíz es axonomorfa o pivotante (Figura 17). Una vez germinada la semilla, el proceso de establecimiento de la plántula es un periodo rápido que ocurre de 10 a 12 días, durante este periodo se observa progresivamente el desprendimiento total de la testa junto con los restos de los tejidos de reserva (Figura 15 C y D).

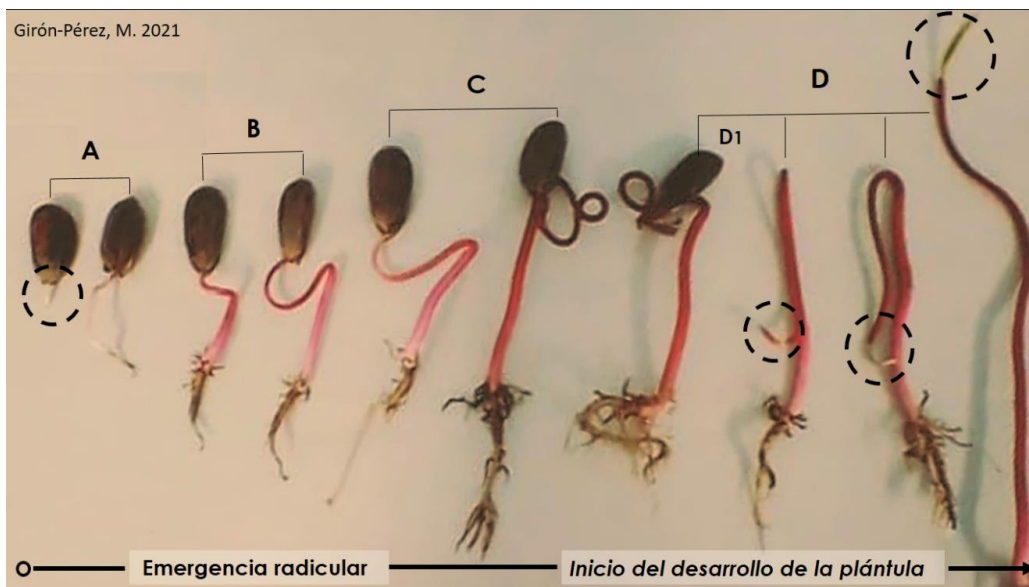


Figura 17.- Desarrollo temprano de *Annona purpurea*: 1) Emergencia radicular o germinación: **A**= Semilla con raíz de 1 a 2 cm; **B**= Semilla con raíz de 3 a 5 cm; **C**= Semilla con raíz de 6 a 10cm; 2) Inicio del desarrollo de la plántula o desarrollo vegetativo: **D**= comprende la “etapa de plántula con primordio foliar”, **D1**= momento en que el primordio se desprende del tejido de reserva.

7.2. RENDIMIENTOS DE LAS EXTRACCIONES HEXÁNICAS Y METANÓLICAS

Para detectar la presencia de alcaloides y acetogeninas se obtuvieron extractos hexánicos y metanólicos, entre ambos, un total de 84 extractos, encontrando que existe variación entre ellos y las etapas de desarrollo, es pertinente aclarar que el presente es un trabajo exploratorio sin inferencias estadísticas, pero que permite describir las variaciones entre tejidos durante las etapas de desarrollo. En la mayoría de los tejidos de las distintas etapas, el rendimiento de metabolitos obtenido con metanol fue mayor que los obtenidos con hexano, con la excepción de los endospermos y embriones. El extracto metanólico con mayor rendimiento se obtuvo durante la etapa que corresponde a la “plántula con 2 a 4 hojas”, con un 44.42% en hojas; en los hexánicos, el mayor rendimiento fue el de endospermo con 10 días de imbibición, seguido del embrión con 1 día de imbibición, presentando 55.15% y 46.63% correspondientemente. En algunos casos, llama la atención la relación que guardan los tejidos del mismo tipo y su rendimiento final, pues, sin importar la etapa de desarrollo, se mantienen en rangos cercanos, tal es el caso del rendimiento hexánico en testas y embriones; y también, embriones metanólicos. Por otra parte, en general los tejidos no guardan una relación proporcional entre sus rendimientos hexánicos y metanólicos, un ejemplo lo representan los tejidos con mayor rendimiento resaltados en **negrita** (cuadro 5), Los rangos de rendimientos varían de 0.12% a 55%.

Durante las extracciones hexánicas del endospermo, se obtuvo en cada etapa de estudio un precipitado. La proporción de este varía después de los 10 días de imbibición, alcanzando su rendimiento máximo en la etapa de “raíz de 3 a 5 cm” con 21.47% (cuadro 6).

Cuadro 5. Rendimiento de extractos de tejidos y órganos de etapas tempranas de *Annona purpurea*.

| Extracto hexánico (%) | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|----------------------|--------------|---------------|-------------|--------------|------------|
| Etapas | Sin imb. | Imbibición | | | | Emergencia radicular | | | Plántula | | |
| Fases | 0 días | 1 día | 2 días | 5 días | 10 días | Raíz 1 a 2cm | Raíz 3 a 5cm | Raíz 6 a 10cm | Primordio | De 2-4 Hojas | De 6 Hojas |
| Testa | 0.2 | 0.23 | 0.25 | 0.36 | 0.12 | 0.61 | 1.07 | 0.86 | 0.21 | | |
| Endospermo | 39.43 | 37.83 | 50.59 | 44.71 | 55.15 | 39.84 | 21.46 | 32.74 | 15.73 | | |
| Embrión | 41.92 | 46.63 | 34.13 | 30.39 | 42.1 | | | | | | |
| Tallo | 0.72 | 0.39 | 1.22 | 5.29 | 2.45 | 2.2 | | | | | |
| Raíz | 0.96 | 0.69 | 0.85 | 3.2 | 2.48 | 1.51 | | | | | |
| Hojas | | | | | | | | | 10.2 | 4.37 | 3.81 |
| Cotiledón | | | | | | 1.55 | 5.08 | 2.18 | 1.55 | | |
| Extracto metanólico (%) | | | | | | | | | | | |
| Etapas | Sin imb. | Imbibición | | | | Emergencia radicular | | | Plántula | | |
| Fases | 0 días | 1 día | 2 días | 5 días | 10 días | Raíz 1 a 2cm | Raíz 3 a 5cm | Raíz 6 a 10cm | Primordio | De 2-4 Hojas | De 6 Hojas |
| Testa | 4.7 | 1.08 | 1.47 | 1.35 | 1.5 | 3.52 | 3.95 | 1.07 | 3.93 | | |
| Endospermo | 5.82 | 6.29 | 7.94 | 7.13 | 6.82 | 17.47 | 23.66 | 23.87 | 25.7 | | |
| Embrión | 11.96 | 11.57 | 17.57 | 9.67 | 14.83 | | | | | | |
| Tallo | 24.54 | 22.27 | 7.78 | 21.33 | 11.32 | 11.16 | | | | | |
| Raíz | 22.3 | 21.18 | 13.42 | 31.53 | 12.25 | 17.32 | | | | | |
| Hojas | | | | | | | | | 25.28 | 44.42 | 32.22 |
| Cotiledón | | | | | | 35.12 | 26.74 | 28.76 | 26.71 | | |

Cuadro 6. Rendimiento de precipitados obtenidos de extracción hexánica de endospermos.

| Rendimiento del precipitado hexánico del endospermo (%) | | | | | | | | | | | |
|---|----------|------------|--------|--------|---------|----------------------|--------------|---------------|-----------|--------------|------------|
| Etapas | Sin imb. | Imbibición | | | | Emergencia radicular | | | Plántula | | |
| Fases | 0 días | 1 día | 2 días | 5 días | 10 días | Raíz 1 a 2cm | Raíz 3 a 5cm | Raíz 6 a 10cm | Primordio | De 2-4 Hojas | De 6 Hojas |
| Endospermo | 1.9 | 2.3 | 2.45 | 2.69 | 2.9 | 0.95 | 21.46 | 0.63 | 6.06 | | |

7.3. PRESENCIA DE ACETOGENINAS CON LACTONAS INSATURADAS

Se detectó la presencia de acetogeninas en casi todos los órganos exceptuando hojas, esto varió de acuerdo a la etapa y fase de desarrollo. Las ACG se observaron durante todo el desarrollo en embriones y tallos, incrementándose en estos últimos de forma progresiva. Las reacciones más intensas fueron las de los endospermos y

los tallos maduros. En las semillas sin imbibir las acetogeninas están en todos sus tejidos y órganos, destacando que es dónde se observó al embrión con mayor intensidad de reacción (cuadro 7).

Durante la prueba Kedde, fue posible establecer un rango de intensidad de reacción relativa para los resultados positivos que a continuación se presentan (cuadro 7).

Los resultados indican que hay presencia de acetogeninas con lactonas insaturadas en todos los embriones y endospermos, sin embargo, en algunos extractos la intensidad es mayor. En el endospermo, se observan las mayores intensidades de reacción; así también, una mayor reacción en el tejido embrionario que pertenece a la etapa de semilla sin imbibir. Se observa la presencia de ACG en la testa de la semilla sin imbibición, sin embargo, esta intensidad corresponde a un rosa tenue (Anexo II).

Las acetogeninas también fueron detectadas en las testas que corresponden a las etapas de "semillas con raíces de 2 a 5 cm" y "semillas con raíces de 6 a 10 cm" y en los primordios foliares.

En las extracciones realizadas a los cotiledones, se notó una reacción con coloración pálida y poco intensa en tres de los cuatro etapas, la extracción que no se tiñó se ubica en fase de emergencia radicular en la etapa "semilla con raíz de 6 a 10cm". Por otra parte, en cuanto a las raíces, solo la etapa de "plántulas con 2 a 4 hojas" presenta una reacción muy marcada al teñirse de rojo.

No todos los extractos del tallo tuvieron reacción, y los que sí, se observaron en distintas intensidades progresivas. En las etapas más jóvenes de la emergencia radicular, los tallos presentaron menos intensidad y aunque no se detectó coloración en las siguientes etapas, las reacciones reaparecieron en los tallos de las plantas con hojas fotosintéticas, presentando coloraciones progresivas que van de rojo tenue a rojo. Sin embargo, los únicos órganos que no presentaron reacción positiva son las hojas, ni en el primordio foliar ni en las hojas fotosintéticas.

Cuadro 7. Presencia de acetogeninas en extractos hexánicos durante el desarrollo temprano de *Annona purpurea*.

| Fases de estudio del desarrollo temprano | Tejidos u Órganos: intensidad relativa de acetogeninas insaturadas | | | | | | |
|--|--|-------|------------|-----------|------|-------|-------|
| | Embrión | Testa | Endospermo | Cotiledón | Raiz | Tallo | Hojas |
| Semilla sin Imbibir | 3 | 2 | 5 | | | | |
| Semilla con Imb. de 1 día. | 2 | 0 | 5 | | | | |
| Semilla con Imb. de 2 día. | 2 | 0 | 5 | | | | |
| Semilla con Imb. de 5 día. | 1 | 0 | 5 | | | | |
| Semilla con imb. de 10 día. | 1 | 0 | 5 | | | | |
| Planta con Raíz de 1 a 2cm | | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | |
| Planta con Raíz de 3 a 5cm | | 2 | 4 | 0 | 0 | 2 | |
| Planta con Raíz 6 a 10cm | | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | |
| Primordio foliar | | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Plantas con 2 a 4 hojas. | | | | | 5 | 4 | 0 |
| Plantas con 6 a 10 hojas. | | | | | 0 | 5 | 0 |

Cada número en la casilla corresponde a una intensidad de reacción, las casillas vacías se refieren a que no existe ese tejido en la etapa. 0= No hay reacción. 1= Pálido 2= Rosa Tenue 3= Rosa 4= Rojo tenue 5= Rojo.

7.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ÓRGANOS Y TEJIDOS DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO

Mediante Cromatografías en Capa Fina (CCF) se logró tener una idea tanto de la diversidad como de los cambios relativos que ocurren durante las fases de desarrollo (Figura 18 y 19). Se observó que algunas moléculas detectadas en extractos hexánicos fueron recurrentes en los cotiledones, el primordio foliar y las hojas; así también, los valores de R_f señalaron la presencia de tres R_f iguales en el endospermo y en el tallo (Figura 18).

En los extractos metanólicos, se observó que prevalece la siempre presencia de una molécula de menor polaridad; también, que las hojas no fotosintéticas y las fotosintéticas, son diferentes, aunque comparten algunas moléculas del mismo Rf. Por último, el tallo y los cotiledones presentan 2 moléculas similares. (Figura 19).

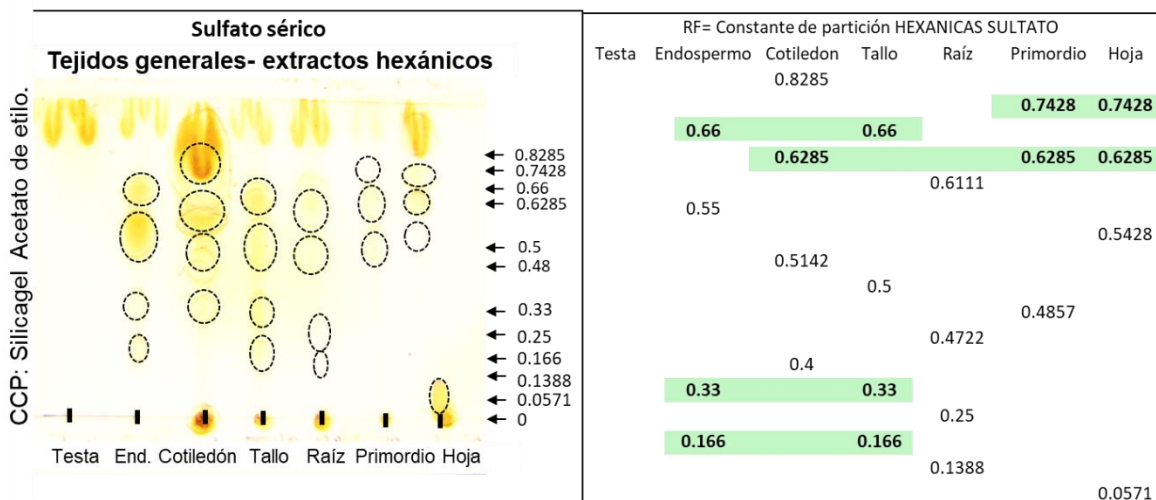


Figura 18. Perfil de CCF de extractos hexánicos de tejidos obtenidos durante las etapas tempranas *A. purpurea*: **Testa, Endospermo, Cotiledón, Tallo, Raíz, Primordio, Hoja**. En la tabla se presentan las constantes de partición (Rf), algunos compuestos se observan de forma constante en los tejidos.

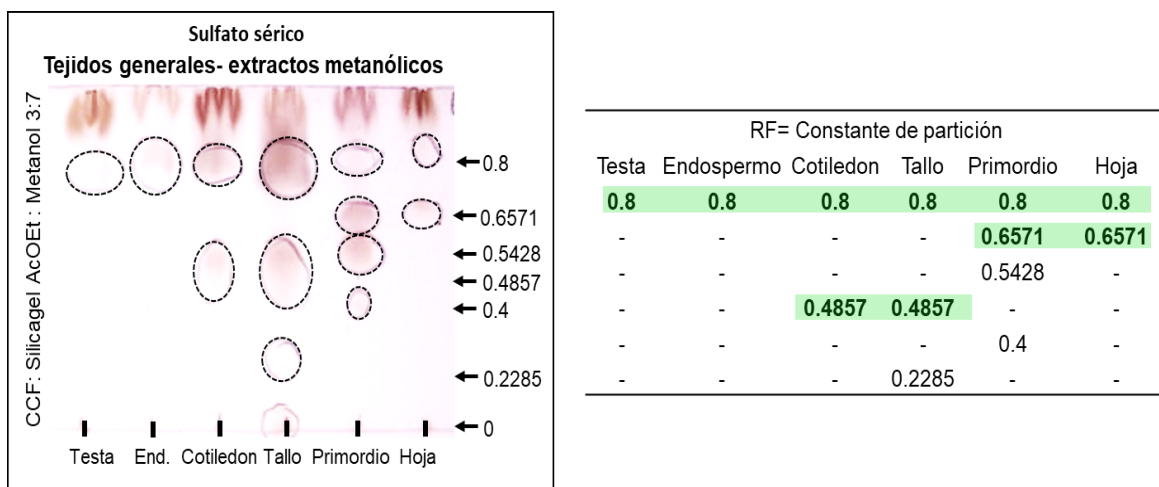


Figura 19. Perfil de CCF de extractos metanólicos **Testa, Endospermo, Cotiledón, Tallo, Primordio, Hoja** de *A. purpurea*. Se presenta una tabla comparativa de las constantes de partición (Rf).

7.4.1. Perfil químico de compuestos de los extractos hexánicos por órgano o tejido.

Testa

Durante las etapas de semilla seca e imbibición las moléculas presentes se observaron constantes, la variación del perfil químico comienza con la emergencia radicular, donde se observaron nuevas constantes de partición (Rf). No se detectó la acetogenina laherradurina.

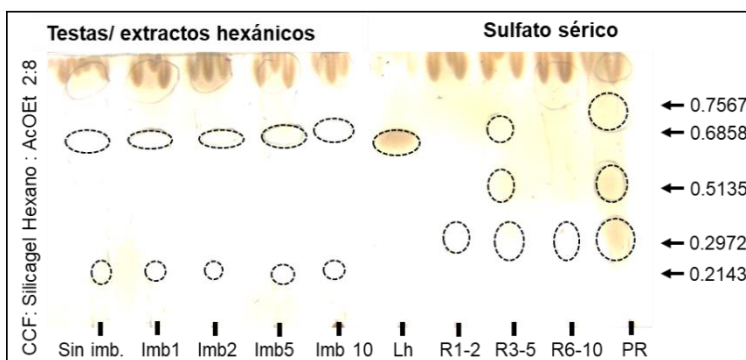


Figura 20. Cromatografía en Capa Fina (CCF) del extracto hexánico de las testas, desde las etapas de semilla seca a primordio foliar. Lh: Laherradurina.

Endospermo

La composición de los extractos, es muy basta; se detectaron cuatro compuestos bien definidos por el Rf, los cuales permanecen constantes durante el desarrollo de cada etapa, tanto en las semillas con y sin imbibición como en emergencia radicular y plántula. No hay presencia de laherradurina (Figura 21).

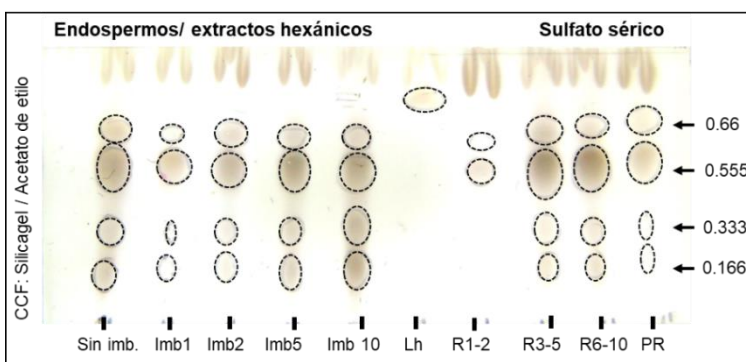


Figura 21. Cromatografía en Capa Fina (CCF) de extractos hexánicos del endospermo de las etapas tempranas de *A. purpurea*. Lh: Laherradurina.

Embrión

Con los extractos de este órgano (Figura 22), se observaron algunas moléculas polares y también moléculas poco polares constantes durante las etapas con y sin imbibición de la semilla.

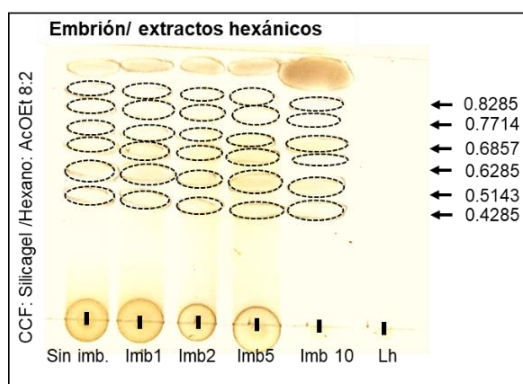


Figura 22. Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los extractos hexánicos del embrión.

Raíz

Los extractos hexánicos de la raíz, se analizaron mediante dos fases móviles distintas. En la primera (Figura 23) se observaron más compuestos durante la etapa de plántula; también, un compuesto que se presenta desde la emergencia radicular hasta plántula. En la segunda cromatografía (Figura 24), el aumento de la polaridad, permitió visualizar que, aunque en menor cantidad la primera raíz de la emergencia, presentó dos moléculas, una de ellas presente hasta plántula; y se observó similitud entre las etapas "plántulas con raíces de 6 a 10cm" con "plántulas con primordio foliar".

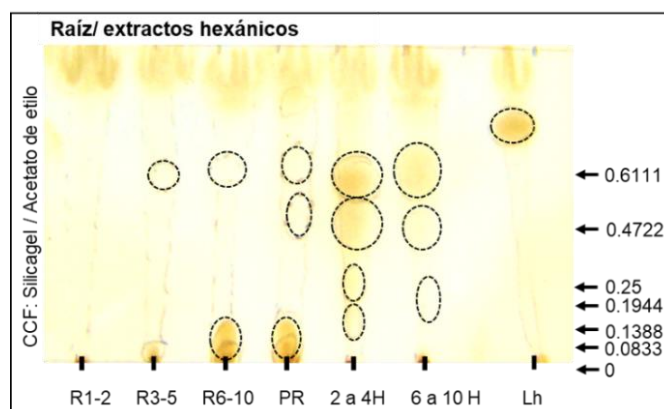


Figura 23. Primera Cromatografía en Capa Fina de los extractos hexánicos de las raíces de las etapas tempranas de *Annona purpurea*. Lh: Laherradurina.

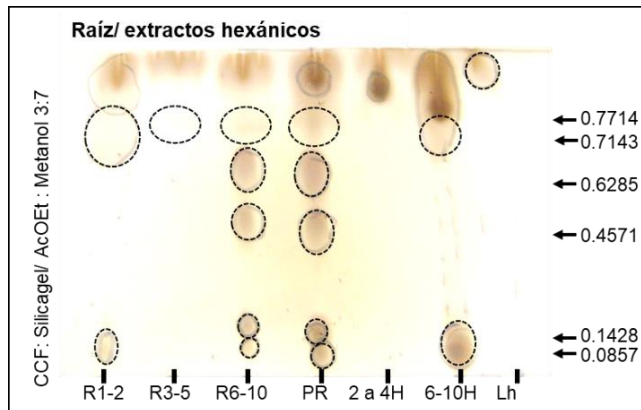


Figura 24. Segunda cromatografía en Capa Fina (CCF) de extractos hexánicos de raíces de las etapas tempranas de *Annona purpurea*. Lh: Laherradurina.

Tallo

En el primer caso (Figura 25), se observó un perfil químico que prevalece y se diversifica; los tallos de la etapa de emergencia radicular mantienen su perfil, es durante la etapa de plántula donde se diversifica. Se observó más diversidad en la etapa de primordio foliar; en las posteriores fases de la plántula, el perfil se mantuvo. En la cromatografía dos (Figura 26), se reafirma lo antes dicho, la composición es constante hasta la etapa “plántula con primordio foliar” donde el perfil químico cambia, sin embargo, entre mayor desarrollo, más concentración se observó.

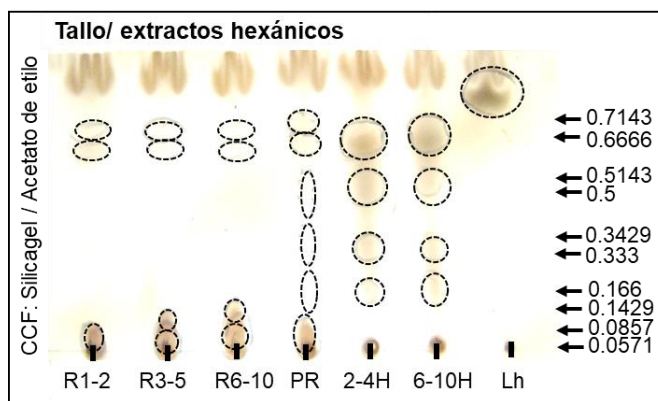


Figura 25. Primera Cromatografía en Capa Fina de extractos hexánicos del tallo de las etapas tempranas de *Annona purpurea*. Lr: Laherradurina.

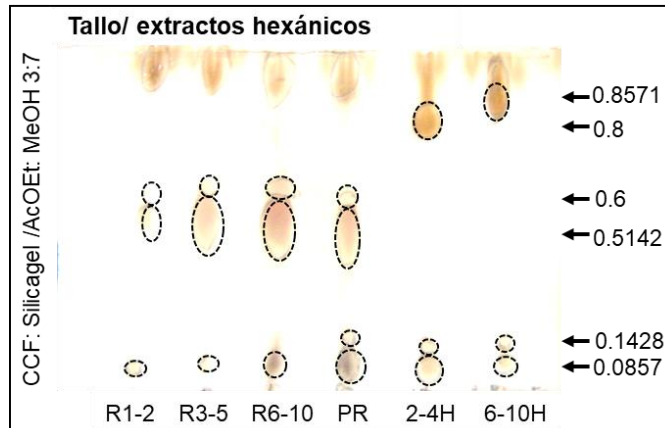


Figura 26. Segunda Cromatografía en Capa Fina de extractos hexánicos del Tallo de las etapas tempranas de *Annona purpurea*. Lr: Laherradurina.

Cotiledónes-Hojas:

En la primera cromatografía (Figura 27), se notó que el primordio foliar y las hojas, son diferentes, solo se observó la presencia de una común. Los cotiledones mantienen un perfil diverso en donde dos moléculas prevalecen en todos los tejidos cotiledonarios, los más diversos son la etapa de “semilla con 1 a 2cm de radícula” y los cotiledones del primordio foliar. Las plántulas con hojas fotosintéticas mantienen un perfil idéntico entre ellas. En la cromatografía dos (Figura 28), se observan las moléculas más polares visiblemente similares, sin embargo, los Rf indican que no lo son; en los cotiledones de emergencia radicular el perfil se mantiene, así también en plántulas con hojas fotosintéticas.

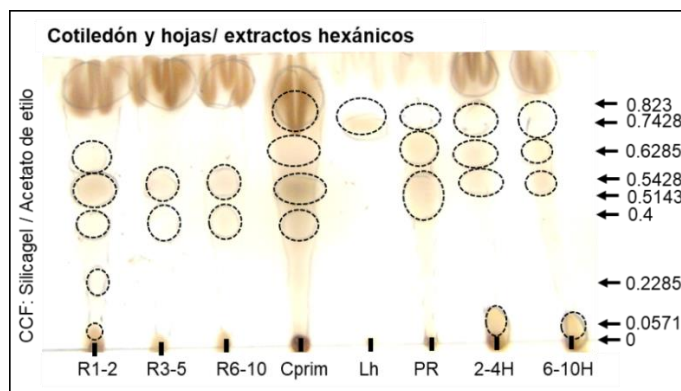


Figura 27. Primera Cromatografía en Capa Fina (CCF) de extractos hexánicos de los Cotiledones y hojas de las etapas tempranas de *Annona purpurea*. Lh: Laherradurina.

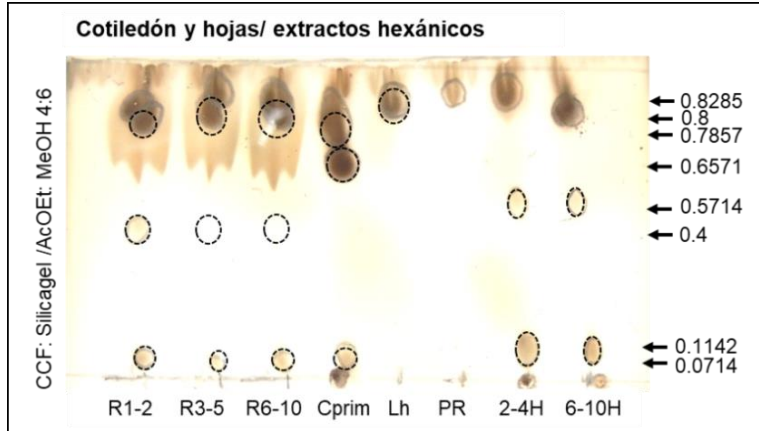


Figura 28. Segunda Cromatografía en Capa Fina (CCF) de extractos hexánicos de los Cotiledones y hojas de las etapas tempranas de *Annona purpurea*. Lh: Laherradurina.

7.4.2. Perfil químico de compuestos de los extractos metanólicos por órganos o tejidos

Testa

Se realizaron dos fases móviles, en la primera se observó (Figura 29) el comportamiento de dos moléculas poco polares de forma continua durante todas las etapas. También, se observó la presencia de mayor concentración durante las etapas de semillas sin y con imbibición, estas etapas mencionadas, poseen un perfil químico idéntico. Para poder visualizar las moléculas más polares, se realizó la segunda CCF (Figura 30), en donde se observó un perfil químico completamente continuo en todas las etapas excepto en etapa de semillas sin imbibir.

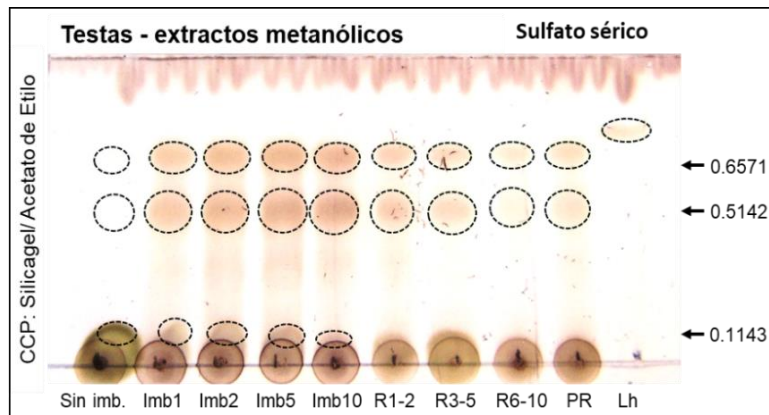


Figura 29. Primera Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los extractos metanólicos de las Testas de *Annona purpurea* durante las primeras etapas del desarrollo temprano. Lh: Laherradurina.

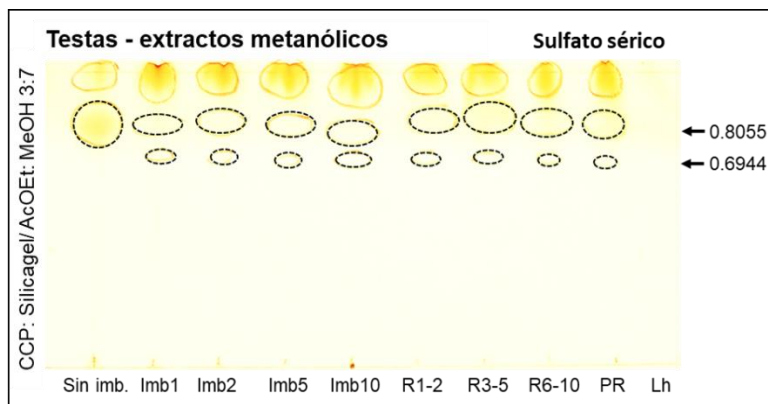


Figura 30. Segunda Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los extractos metanólicos de las Testas de *Annona purpurea* durante las primeras etapas del desarrollo temprano. Lh: Laherradurina.

Endospermo

En la primera CCF se observaron moléculas continuas durante todas las etapas del desarrollo, sin embargo, conforme se da el desarrollo algunas van desapareciendo mientras que otras se conservan: las semillas sin imbibición e imbibición de 1 día, presentaron un perfil diferente al de las demás en comparación con las etapas más maduras donde el perfil químico es menos diverso (Figura 31), no así en la segunda cromatografía (Figura 32), donde se visualizó que las etapas más maduras son las más diversas y que éstas se mantienen una vez iniciada la emergencia radicular, además se preserva una molécula inicial.

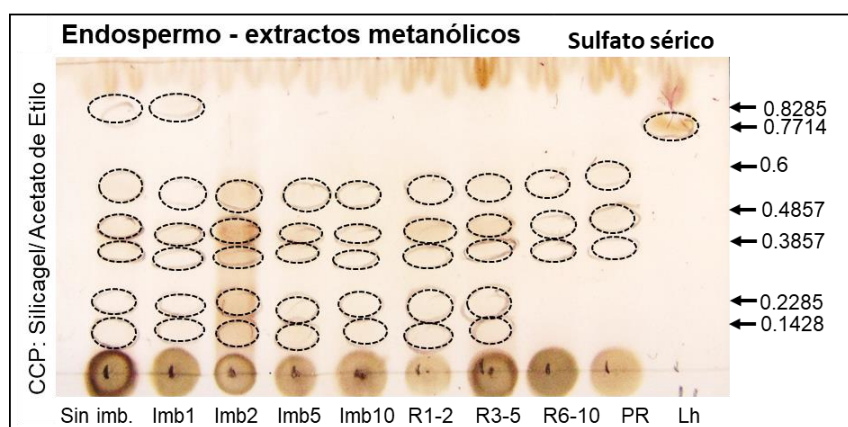


Figura. 31. Primera Cromatografía en Capa Fina (CCF) del extracto metanólico del endospermo de *Annona purpurea* durante las etapas del desarrollo temprano. Lh: Laherradurina.

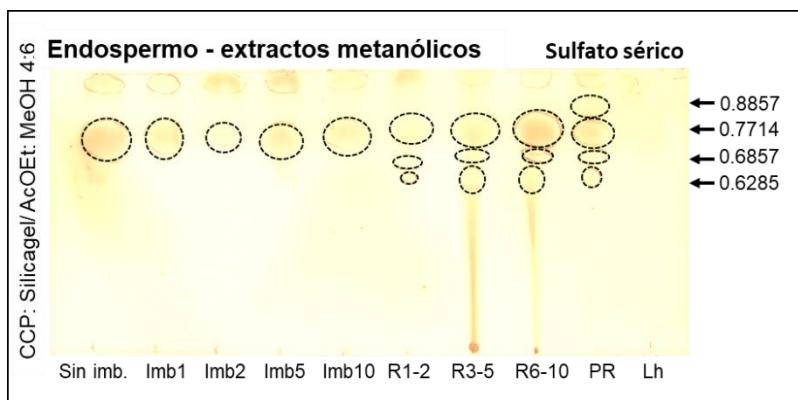


Figura. 32. Segunda Cromatografía en Capa Fina (CCF) del extracto metanólico del endospermo de *Annona purpurea* durante las etapas del desarrollo temprano. Lh: Laherradurina.

Embrión

Se observaron moléculas poco polares que fueron constantes durante el desarrollo de las etapas tempranas en las que está presente. No se detectó presencia de laherradurina (Figura 33).

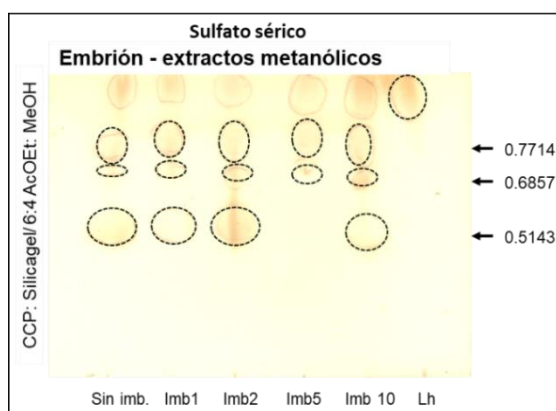


Figura 33. Cromatografía en capa Fina (CCF) del extracto metanólico del embrión. Lh: Laherradurina.

Raíz

El perfil químico en la primera CCF (Figura 34) demuestra que muchas de las moléculas iniciales se conservan durante todo el desarrollo temprano, dos de ellas se identificaron como alcaloides de las cuales existió más concentración al inicio de la emergencia radicular y en hojas (Figura 35). El perfil con mayor cantidad de compuestos se encuentra en la etapa de plántula con hojas fotosintéticas (Figura 32). En la segunda cromatografía (Figura 36) se logró observar el comportamiento

de moléculas más polares, los componentes químicos del extracto varían entre sí, la etapa de “Plántula con 6 a 10 hojas” es la más diversa.

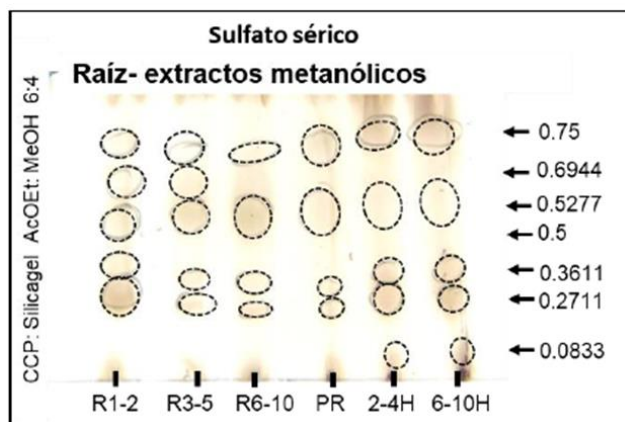


Figura 34. Primer CCF de los extractos metanólicos de la Raíz, etapas tempranas de *Annona purpurea*.

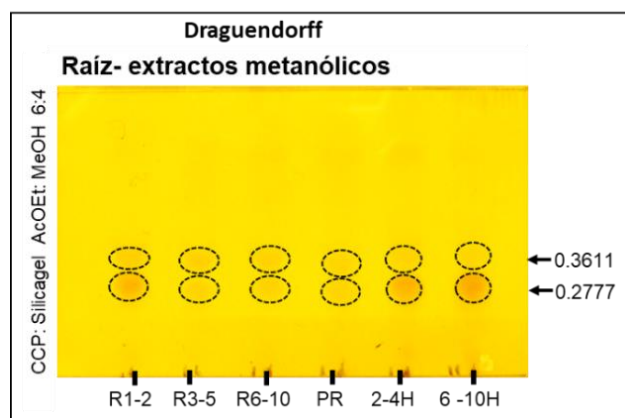


Figura 35. Primera CCF de los extractos metanólicos de la Raíz, etapas tempranas de *Annona purpurea*.

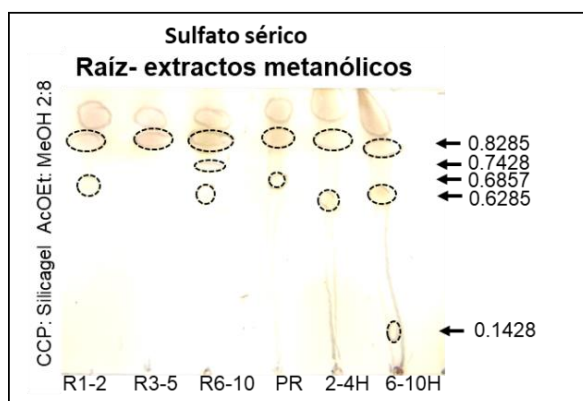


Figura 36. Segunda CCF de los extractos metanólicos de la Raíz, etapas tempranas de *Annona purpurea*.

Tallo

En la primera CCF (Figura 37), se observó que algunas moléculas existentes desde la etapa de emergencia radicular hasta plántulas, se conservaron. Solo durante la etapa de emergencia radicular hasta la fase de plántula con primordio foliar se detectó la presencia de un alcaloide (Figura 38); aunque en los tallos de las fases de hojas se encontraron Rf similares a dicho alcaloide, estos no se revelaron con Dragendorff, por tanto, el tallo de las plántulas con hojas no presenta alcaloides o quizá en cantidades menores, pero su perfil químico si se diversifica en comparación a las demás etapas. En la segunda CCF (Figura 39), se observó que el perfil químico prevalece durante el desarrollo y en las hojas fotosintéticas, algunas desaparecen.

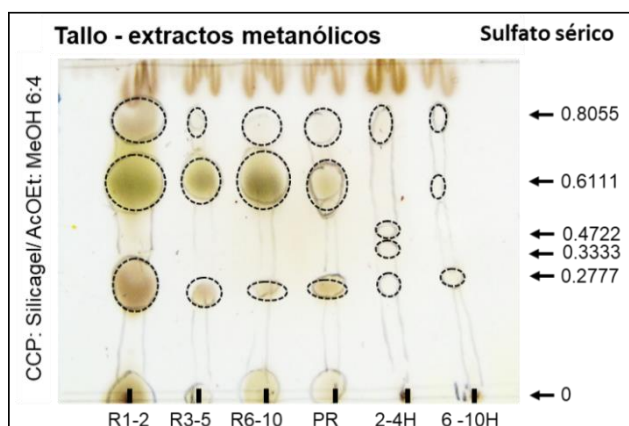


Figura 37. Primera CCF de los extractos metanólicos del tallo de *Annona purpurea* durante las primeras etapas de desarrollo.

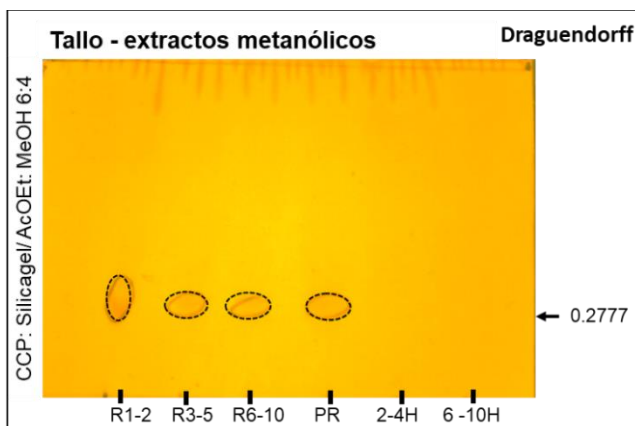


Figura 38. Primera CCF de los extractos metanólicos del tallo durante las etapas tempranas de *Annona purpurea* revelado con el reactivo de Dragendorff.

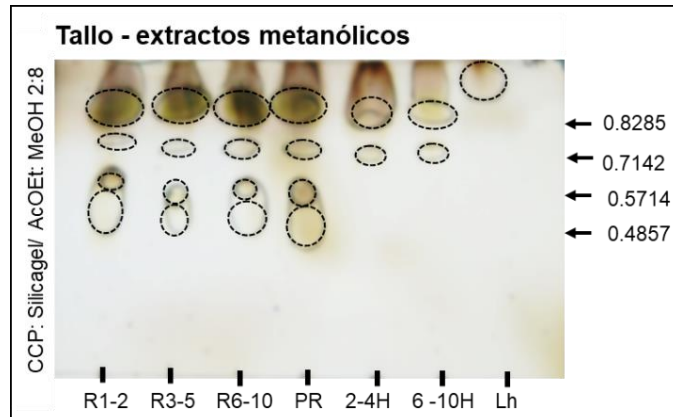


Figura 39. Segunda CCF de los extractos metanólicos del tallo obtenidos durante las etapas tempranas de *Annona purpurea* revelado con el reactivo de Dragendorff.

Cotiledónes-Hojas

Algunas moléculas son constantes tanto en los extractos cotiledonarios como en hojas, y también que, en la etapa de plántulas, hay mayor diversidad pues aparecen nuevas moléculas (Figura 40).

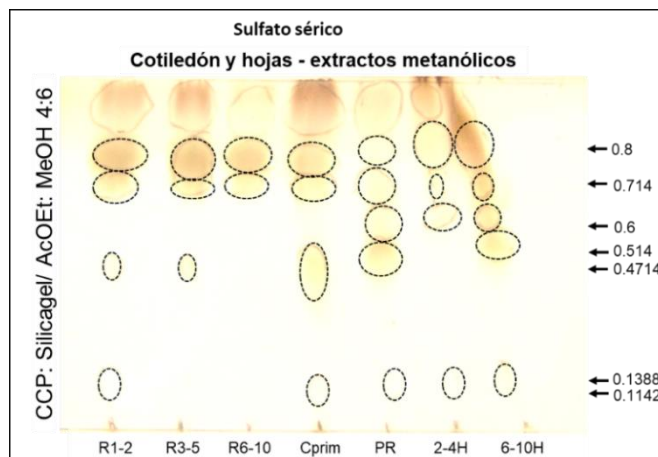


Figura 40. CCF de los extractos metanólicos de los cotiledones, primordio foliar y hoja obtenidos durante las etapas tempranas de *Annona purpurea* revelado con sulfato sérico.

7.5. ANÁLISIS DE LA QUÍMIODIVERSIDAD DEL DESARROLLO TEMPRANO DE *ANONNA PURPUREA*

7.5.1. Índice de diversidad de Margalef

Los índices de diversidad Margalef (cuadro 8 y 9), fueron más altos en los extractos hexánicos, en los extractos de embriones, y los de menor diversidad son las testas; para los metanólicos, la mayor diversidad se calculó en los endospermos y las raíces, mientras que la menor diversidad en los embriones.

Cuadro 8. Análisis de diversidad Margalef de los compuestos de cromatografías hexánicas.

| Fases de desarrollo | Testa | Endospermo | Embrión | Cotiledón | Hoja | Tallo | Raíz |
|------------------------------------|-------|------------|---------|-----------|------|-------|------|
| Semillas sin imbibición | 1.443 | 2.164 | 3.083 | - | - | - | - |
| Semillas con imbibición de 1 día | 1.443 | 2.164 | 3.083 | - | - | - | - |
| Semillas con imbibición de 2 días | 1.443 | 2.164 | 3.083 | - | - | - | - |
| Semillas con imbibición de 5 días | 1.443 | 2.164 | 3.083 | - | - | - | - |
| Semillas con imbibición de 10 días | 1.443 | 2.164 | 3.083 | - | - | - | - |
| Semillas con raíz de 1-2cm | 0 | 1.443 | - | 3.083 | - | 2.49 | 1.44 |
| Semillas con raíz de 3-5cm | 1.82 | 2.164 | - | 2.164 | - | 2.79 | 1.44 |
| Semillas con raíz de 6-10cm | 1.443 | 2.164 | - | 2.164 | - | 2.79 | 2.16 |
| Plántula con primordio foliar | 1.82 | 2.164 | - | 2.791 | 2.16 | 3.37 | 2.49 |
| Plántula con 2 a 4 hojas | - | - | - | - | 2.49 | 2.79 | 2.49 |
| Plántula con 6 a 10 hojas | - | - | - | - | 2.49 | 2.79 | 2.16 |

Cuadro 9. Análisis de diversidad Margalef de los compuestos de cromatografías metanólicas.

| Fases de desarrollo | Testa | Endospermo | Embrión | Cotiledón | Hoja | Tallo | Raiz |
|------------------------------------|-------|------------|---------|-----------|-------|-------|-------|
| Semillas sin imbibición | 2.164 | 3.083 | 1.82 | - | - | - | - |
| Semillas con imbibición de 1 día | 2.485 | 3.083 | 1.82 | - | - | - | - |
| Semillas con imbibición de 2 días | 2.485 | 2.791 | 1.82 | - | - | - | - |
| Semillas con imbibición de 5 días | 2.485 | 2.791 | 1.443 | - | - | - | - |
| Semillas con imbibición de 10 días | 2.485 | 2.791 | 1.82 | - | - | - | - |
| Semillas con raíz de 1-2cm | 2.164 | 3.083 | - | 2.164 | - | 2.485 | 2.791 |
| Semillas con raíz de 3-5cm | 2.164 | 3.083 | - | 1.82 | - | 2.485 | 2.791 |
| Semillas con raíz de 6-10cm | 2.164 | 2.485 | - | 1.443 | - | 2.485 | 2.485 |
| Plántula con primordio foliar | 2.164 | 2.485 | - | 2.164 | 2.485 | 2.485 | 2.485 |
| Plántula con 2 a 4 hojas | - | - | - | - | 2.164 | 2.485 | 2.791 |
| Plántula con 6 a 10 hojas | - | - | - | - | 2.485 | 2.164 | 3.083 |

7.5.2. Índice de similitud de Jaccard (IJ)

En los análisis de similitud de la diversidad del perfil químico de las cromatografías en capa fina (CCF) pertenecientes de los extractos hexánicos, se observó que las raíces y los tallos son totalmente similares y lo son parcialmente con los cotiledones y hojas; en seguida las testas con los endospermos presentan un buen porcentaje de similitud entre ellos, de los cuales, con los embriones comparten similitud de forma parcial (entre un 50% ó más).

En los índices de similitud de los extractos metanólicos, se observa total similitud entre las testas con los endospermos, así también entre los tallos con las raíces; en una comparación entre ambos pares mencionados, la similitud es baja. Embrión es parcialmente similar con las testas y los endospermos; los cotiledones y hojas son más similares a los tallos y raíces, y nada parecidos a los embriones.

En general, la similitud entre el perfil químico de los extractos hexánicos con los metanólicos es aparentemente, igual, pues en ambas, los más similares son testa con endospermo y tallos con raíces. Los embriones se relacionan únicamente con el primer par, los cotiledones y hojas con el segundo par. Aparentemente esta similitud los agrupa en sus tejidos como organismo, es decir, semillas (testa, endospermo y embrión) y plántulas (tallos, raíces, cotiledón y hoja).

Cuadro 10. Índice de similitud de Jaccard entre la diversidad de CCF hexánicas.

| | Testa | Endospermo | Embrión | Cotiledón | Hoja | Tallo | Raíz |
|------------|-------|------------|---------|-----------|-------|-------|-------|
| Testa | 1 | 0.89 | 0.625 | 0.34 | 0.1 | 0.273 | 0.273 |
| Endospermo | 0.89 | 1 | 0.56 | 0.45 | 0.091 | 0.37 | 0.37 |
| Embrión | 0.625 | 0.56 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cotiledón | 0.34 | 0.45 | 0 | 1 | 0.17 | 0.67 | 0.67 |
| Hoja | 0.1 | 0.091 | 0 | 0.17 | 1 | 0.5 | 0.5 |
| Tallo | 0.273 | 0.37 | 0 | 0.67 | 0.5 | 1 | 1 |
| Raíz | 0.273 | 0.37 | 0 | 0.67 | 0.5 | 1 | 1 |

Cuadro 11. Índice de similitud de Jaccard entre la diversidad de CCF metanólicas.

| Índice de similitud de extractos metanólicos | | | | | | | |
|--|-------|------------|---------|-----------|-------|-------|------|
| | Testa | Endospermo | Embrión | Cotiledón | Hoja | Tallo | Raíz |
| Testa | 1 | 1 | 0.56 | 0.45 | 0.091 | 0.37 | 0.37 |
| Endospermo | 1 | 1 | 0.56 | 0.45 | 0.091 | 0.37 | 0.37 |
| Embrión | 0.56 | 0.56 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cotiledón | 0.45 | 0.45 | 0 | 1 | 0.17 | 0.67 | 0.67 |
| Hoja | 0.091 | 0.091 | 0 | 0.17 | 1 | 0.5 | 0.5 |
| Tallo | 0.37 | 0.37 | 0 | 0.67 | 0.5 | 1 | 1 |
| Raíz | 0.37 | 0.37 | 0 | 0.67 | 0.5 | 1 | 1 |

VIII. DISCUSIÓN

Durante el seguimiento de las etapas de desarrollo, se pudo constatar que las semillas de esta especie tienen una germinación epigea criptocotiledonar (Vogel, 1980) como otras anonas (De la Cruz-Chacón, 2012), por lo que es común que restos de las semillas permanezcan adheridas a los tallos hasta que la planta se vuelve fotosintética, es decir, la testa y las hojas cotiledonarias perduran adheridas a la planta en tanto se consume el endospermo. Por ello, las testas y el endospermo se analizaron incluso en la etapa de plantas con primordio foliar.

Para aproximarse al tipo de metabolitos presentes durante el desarrollo en los distintos órganos se realizaron extracciones con hexano y metanol, disolventes de diferente polaridad. Los resultados de este trabajo indican que las extracciones que tienen mayor rendimiento son las que se realizaron con metanol, por lo que en los tejidos analizados existe mayor cantidad de moléculas polares, basándonos en el principio químico de “que las moléculas se disuelven en disolventes de polaridad similar” (Thornton-Morrison y Neilson-Boyd, 1990). En endospermos y embriones abundan principalmente moléculas poco polares.

De lo anterior, mediante los sistemas de eluyentes elegidos y tomando en cuenta al índice de similitud de Jaccard (Badii *et al.*, 2008) (Figura 18), se logró destacar la similitud de los tallos con raíces, testas con endospermos y cotiledones con hojas (cuadros 10 y 11). Esto, probablemente está relacionado con el origen ontogénico de la semilla en las que son células distintas las que dan origen al endospermo y al embrión (Curtis *et al.*, 2008).

Al mismo tiempo, se observaron compuestos que una vez biosintetizados se conservan en los tejidos durante el desarrollo temprano, como los encontrados en el endospermo y en el tallo (Figura 21 y 25).

El seguimiento de metabolitos se realizó por órganos, durante todas las fases de desarrollo. Al parecer en ambos tipos de extractos los perfiles de las testas, embriones, cotiledones no varía durante todo el proceso de imbibición, transformándose solo cuando la raíz empieza a emerger, aun cuando la imbibición

es un proceso en la que la semilla reactiva sus actividades metabólicas (Raven *et al.*, 1992) para luego germinar. Cuando se ha establecido la fase de plántulas, los metabolitos encontrados en las hojas no varían entre cada etapa, no obstante que las hojas comienzan su actividad meristemática y fotosintética desde que son primordios (Raven *et al.*, 1992). Los tallos se parecen durante las etapas de la emergencia radicular, y se diversifican a partir de la presencia de órganos fotosintéticos, de manera similar las raíces conforme avanza el desarrollo, ambos tejidos adquieren funciones como fijación al suelo, soporte, absorción y transporte de agua y nutrientes (Raven *et al.*, 1992), si bien, los metabolitos secundarios se ven implicados en muchas funciones ecológicas (Taíz y Zeiger, 2006) y esto explicaría su diversidad. En términos generales de todo lo anterior se pueden separar la producción de metabolitos secundarios por lo parecido de sus perfiles en tres etapas: imbibición, desarrollo de radículas y etapa fotosintética, lo que coincide con etapas cruciales en el establecimiento de la plántula en su ambiente.

En la búsqueda de la expresión temprana del metabolismo secundario referido a acetogeninas y alcaloides, este trabajo documenta que las acetogeninas encontradas en las semillas recién recolectadas y durante el desarrollo de los tejidos embrionarios, al ser analizadas bajo condiciones de rompimiento de la latencia (Alfaro-Romero, 2005; De la Cruz-Chacón, 2012; De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2016) y en este caso, semillas sin latencia, su presencia no está determinada por este estado fisiológico, sino que están presentes en todas las etapas. Algunos autores señalan que la deficiencia en la germinación de *A. purpurea* está relacionada con la producción del ácido giberélico (Gómez-Castañeda *et al.*, 2003), por lo que esta hormona puede emplearse sin problemas en los estudios de acetogeninas, obteniendo al mismo tiempo mayor porcentaje de germinación y mejor desarrollo de la plántula (Gómez-Castañeda *et al.*, 2003).

La presencia de las acetogeninas puede tener implicaciones ecológicas durante la dormancia relacionadas con la toxicidad que poseen (Quispe *et al.*, 2009; Barrios-Aranda, 2012; Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2015), recordando que los MS tienen funciones ecológicas para la supervivencia de las especies vegetales (Taiz y Zeiger, 2006). La dormancia en esta especie dura un periodo largo, durante

el cual las semillas son susceptibles del ataque de bacterias, hongos y herbívoros y en el que la semilla mantiene su viabilidad debido a una actividad metabólica basal (Raven *et al.*, 1992), durante todo este proceso los compuestos observados en los perfiles cromatográficos de testas, endospermo y embriones no varían entre los mismos tejidos y las etapas estudiadas, y los referidos a las acetogeninas tampoco, siendo su presencia más notoria en el endospermo que rodea al embrión; también están presentes durante los mecanismos de reactivación de los procesos metabólicos que ocurren cuando la semilla entra en imbibición (Raven *et al.*, 1992), detectándolas también en el tejido embrionario, resultante de la fertilización de la ovocélula (Vargas-Rojas, 2011) y que por tal, es el portador del ADN del que se formará la planta. En la testa es escasa la presencia de ACG (cuadro 7), considerando que las testas tienen funciones químicas o mecánicas en el flujo de agua y oxígeno (Kelly *et al.*, 1992 citado por Moreno *et al.*, 2006), se puede decir que las acetogeninas no están directamente implicadas con estas funciones y sí probablemente, debido a su toxicidad frente a diferentes organismos (Barrios-Aranda *et al.*, 2012; Ordaz-Díaz, 2017), con la protección del embrión.

En cuanto a la etapa de emergencia radicular, etapa en la que comienza el desarrollo de la plántula sustentado primeramente en las reservas energéticas del endospermo o cotiledones (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2016), se observa la presencia de ACG en los tejidos cotiledonarios y tallos, estos tejidos funcionan como material de reserva hasta que la plántula adquiere competencia fotosintética (Matilla, 2013), en tanto que el tallo, tiene dos funciones principales, conducción y soporte (Raven *et al.*, 1992). Estas moléculas no están presentes en la radícula, pero sí en la raíz, cuya función es la de absorción de agua y minerales del suelo, anclaje y reserva (Morales-Vargas, 2014). De acuerdo a esto, estas moléculas presentes durante la emergencia radicular, el desarrollo y establecimiento, quizá como un mecanismo de defensa temprano. Por otra parte, las acetogeninas, aunque se encontraron en los cotiledones no están presentes en el primordio foliar ni en las hojas de plántulas.

En *Annona purpurea*, la producción de acetogeninas no heredadas por la planta madre (aquellas que están en las semillas recién recolectadas), inicia durante

las etapas más tempranas, presentándose desde la etapa con radícula o primera raíz y se mantiene en algunos tejidos, tanto durante como después del establecimiento de la planta. En la planta madura, se han encontrado acetogeninas en hojas y semillas tales como anoglaucina, escuamosina, motrilina, purpurediolina, purpureacina 1 y 2, purpurenina, purpuracena 1 y 2, roliniastatina-1, roliniastatina-2, chermilina, silvaticina y xilomatenina (Cepleanu *et al* 1993; Cavé *et al* 1997; Chávez y Mata, 1998).

Los precipitados obtenidos de los endospermos a partir de extracciones hexánicas, tienen un papel importante en esta investigación, ya que, es aquí donde se encontraron acetogeninas con lactonas insaturadas con la mayor intensidad (rojo intenso) según la prueba de Kedde; la presencia de acetogeninas es un rasgo común y al parecer universal en la familia Annonaceae (González-Esquinca, 2016 así también en el género *Annona* y en las semillas de *Annona purpurea* (Cavé *et al.*,1997; Ordaz-Díaz, 2017), lo interesante es que este tejido es de los principales y más abundantes portadores de acetogeninas de lactonas insaturadas; tejido encargado de la nutrición del embrión para formar un organismo autótrofo, por lo que estas moléculas de gran actividad biológica como antibacteriana y antifúngica (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2008; Ordaz-Díaz, 2017), pueden estar implicadas en la protección de esta especie.

En cuanto a los alcaloides, en el género *Annona*, algunos alcaloides han sido detectados en individuos adultos (Leboeut *et al.*, 1982; Knolker, 2015) y plántulas con capacidad fotosintética (Hernández-Morales, 2017) pero no en semillas, por lo que al parecer no son un aporte de la planta madre y deben biosintetizarse durante la germinación o desarrollo de la plántula (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2016). De lo anterior, durante las etapas tempranas de *A. purpurea*, se detectaron alcaloides únicamente en tallos y raíces; las raíces presentan dos alcaloides durante las etapas de emergencia radicular y de plántula (Figura 35), mientras que en los tallos sólo se detectó un alcaloide desde la emergencia radicular hasta la etapa de primordio foliar (Figura 38); otras investigaciones del desarrollo temprano en el género *Annona* dicen que la producción de alcaloides inicia entre la imbibición y emergencia radicular, pero que la producción aumenta sustancialmente en la

emergencia radicular y el desarrollo de la plántula (Alfaro-Romero, 2005; De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2016); resultados con los que se coincide (Figura 35, 38 y cuadro 9), pues se observa mayor producción en la etapa de plántulas. Estos metabolitos se encuentran en diferentes órganos y en distinto tiempo, en otras especies del género, son frecuentes en endospermos, cotiledones, hojas y raíces (Alfaro-Romero, 2005; De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2016), lo que puede señalarse como parte de un mecanismo de defensa metabólico como es el caso de las radículas de *A. diversifolia* (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2012). En investigaciones del desarrollo temprano en el género, se reportan los alcaloides Liriodenina, Lisicamina, Atherospermidina y Oxopurpureina (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2012), en el estado juvenil de *Annona purpurea* se han reportado Glaucina, Iso-coridina, Papaverina, Rhoeadina y Thalimicrinina en raíces, tallos y hoja, aunque la presencia de algunos alcaloides de los mencionados varía fenológicamente (Hernández-Morales, 2017).

En cuanto a la diversidad de los perfiles químicos, los compuestos encontrados en los extractos metanólicos el endospermo y en los hexánicos el embrión, son los tejidos más diversos. En general, la diversidad se mantiene de 0 a 3.083, donde de acuerdo a la diversidad de Margalef, 0 es igual a 1 molécula presente por tejido, por lo cual no hay diversidad, como lo es el caso de la testa en semillas con raíz de 1 a 2 cm de los extractos hexánicos (Figura 20 y cuadro 8). Basados en esta diversidad, los más similares son testa y endospermo, así como tallo y raíz (cuadro 11 y 10).

IX. CONCLUSIONES

- La biosíntesis de acetogeninas con lactonas insaturadas y alcaloides no es simultánea. Las acetogeninas pueden biosintetizarse a partir de recursos de la planta madre, o durante el desarrollo inicial; mientras que la biosíntesis o presencia de alcaloides inicia con el desarrollo de las radículas.
- Las acetogeninas se encuentran en todas las etapas, pero en diferentes tejidos y órganos. Son abundantes en los endospermos y disminuyen conforme la planta se hace autótrofa, están presentes en los embriones y en el posterior desarrollo de cotiledones y tallo. En las raíces, se encuentran cuando la plántula presenta entre 2 a 4 hojas. En las semillas están en todos los tejidos testa, endospermo y embrión.
- Se biosintetizan dos tipos de alcaloides durante las etapas tempranas de *Annona purpurea* en raíces y uno en tallos, ambos casos a partir de la emergencia radicular.
- La presencia de ACG y alcaloides, es órgano-específica y se vincula a ciertos momentos durante el desarrollo temprano de *Annona purpurea*.
- Dado los antecedentes de acetogeninas y alcaloides reportados en *Annona purpurea* aunado a la presencia documentada en este estudio se puede intuir que la inversión de recursos metabólicos para la producción de ambos tipos de MS está vinculada a estrategias de defensa con implicaciones ecológicas en la supervivencia

X. RECOMENDACIONES

- Es conveniente continuar con los estudios del metabolismo secundario durante las etapas tempranas en las diferentes especies del mismo género.
- Determinar los tipos de acetogeninas y alcaloides presentes en las etapas tempranas del desarrollo de *Annona purpurea*.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Agustí, M. 2013. Crecimiento y maduración del fruto. En: Azcon-Bieto y Talon. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. Ed. UBE. Barcelona, España. Pp. 519.
- Alfaro-Romero, T.J., 2005. Producción de Acetogeninas y Alcaloides durante la germinación y primeras etapas del desarrollo de *Annona lutescens* Satf. (Annonaceae). Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla, Gtz., Chiapas.
- Alali F.Q.; Liu X-X, M. y Laughlin J.L. 1999. Annonaceus acetogenins: Recent progress. *Journal Of Natural Products*. 62(3):504- 540.
- Andrés-Agustín, J. y Segura-Ledesma, S. 2014. Conservación y uso de los recursos genéticos de Annonaceae en México. *Brasileira de Fruticultura*. 1 (36): 118-124.
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria Carril, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*. 2(3): 119-145.
- Barrios-Aranda, A.L. 2012. Evaluación del efecto ixodicida *in vitro* de los extractos de semillas de *Annona purpurea*, *A. reticulata* y *A. muricata*, aplicados en la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Badii, M.H.; Landeros, J. y Cerna, E. 2008. Patrones de asociación de especies y sustentabilidad. *International journal of Good conscience*. 3(1): 632-660
- Bermejo, A.; Figadére, B.; Zafra-Polo, M.C.; Barrachina, I.; Estornell, E. y Cortes, D. 2005. Acetogeninas from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanism of action. *Natural Products Reports*. 22(3):269-303.
- Casado-Sánchez, E.; Durán-Barquero, P.; Miró-Arias, T. y Paredes-De la Sal, A.J. 2012. Operaciones básicas de laboratorio. Paraninfo. España. Pp. 170-186.
- Castillo-Sánchez, L.E.; Jiménez-Osornio, J.J. y Delgado-Herrera, M.A. 2010. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 12:445-462.
- Cavé, A.; Figadére, B.; Laurens, A. y Cortes, D. 1997. Acetogenins from Annonaceae. En: Herz, W.; Kirby, G.W.; Moore, R.E.; Seglich, W. y Tamm, C (Eds.). Progress in the chemistry of Organic Natural Products. Springer-Verlag. Wien. 70: 81-288.
- Cortes, D.; Moreno, L.; Párraga, J. y Cabedo, N. 2014. Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. *Brasileira de fruticultura*. 1(36): 22-31.
- Courtis, A.C. 2013. Germinación de semillas, cátedra de Fisiología Vegetal. Guía de estudios. FACENA. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

- Cuca-Suarez, L.E. y Villamizar-Macías, V.E. 2016. Metabolitos secundarios presentes en algunas plantas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Curtis, H.; Barnes, N.S., Schnek, A. y Massarini, A. 2008. Biología 7va Edición. Panamericana. Madrid, España.
- Chatrou, L.W.; Pirie, M.D.; Erkens, R.H.; Couvreur, T.L.; Neubig, K.M.; Abbott, J.R.; Mols, B.J.; Maas, J.W.; Saunders, R.M. y Chase, M.W. 2012. Una nueva clasificación de subfamilia y tribu de la familia de plantas con flores pantropicales Annonaceae informada por filogenética molecular. *Botanica Journal of the Linnean Society*. 169: 5-40.
- Daub, W. y Seese, W.S. 2005. Química, Octava Edición. Pearson prentice Hall. México, Pp, 296.
- De la Cruz-Chacón, I. 2012. Alcaloides bencilisoquinólicos y su relación órgano-específica en las primeras fases de desarrollo de *Annona diversifolia* Safford. Tesis de Doctorado. Universidad Autonoma de México (UNAM). Mexico, D.F.
- De la Cruz-Chacón, I. y González-Esquinca, A.R. 2012. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Nature producto research*. 26(1): 42-49
- De la Cruz-Chacón, I. y González-Esquinca, A.R. 2016. Desarrollo temprano y defensas químicas en *Annona macrophyllata* Donn. Smith. (Annonaceae). *Lacandonia*. 10(2): 83-94.
- De la Cruz-Chacón, I.; López-Fernández, N.Y.; Riley-Saldaña, C.A.; Castro-Moreno, M. y González-Esquinca, A.R. 2019. Antigungal activity in vitro of *Sapranthus microcarpus* (Annonaceae) against phytopathogens. *Acta Botanica Mexicana*. 126:1-9.
- Dueñas-Cely, D.P. 2019. Estudio fotoquímico y evaluación de la Actividad Citotóxica de un extracto de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) frente a las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Fall D, Badiane M, Ba D, Loiseau P, Bories C, Gleye C, Laurens A, Hocquemiller R. 2003. Antiparasitic effect of Senegalese Annonaceae used in traditional medicine. *Dakar Med*. 48(2): 112-6.
- Farrera- Villanueva, S.B. 2000. Reporte residencial: Acetogeninas y alcaloides durante la germinación y las primeras etapas de desarrollo de *Annona purpurea*. Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gtz., Chiapas.
- Fero-Meñe, M. 2013. Magnoliidae, Nymphaeidae y Ranunculidae de Guinea ecuatorial y revision taxonómica del género *Neostenanthera* exell (Annonaceae). Tesis de doctorado. Universidad complutense de Madrid. Madrid, España.
- Funayama, S. y Cordell, G. 2015. Alkaloids: a treasury of poisons and medicines. Academic Press. London. Pp. 2- 5.

- Flores-Amaya, K.C. y Rodriguez-Lemus, B.L. 2017. Analisis fitoquimico preliminar de los extractos organicos de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae*, *Zinowiewia integerrima* de la familia Celastraceae pertenecientes a la flora salvadoreña. Tesis de licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, Centro América.
- Galbis-Pérez, J.A. 2004. Panorama actual de la fotoquímica farmacéutica 2ª edición. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Madrid, España.
- García-Aguirre, K.K. 2009. Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politecnico Nacional (IPN). México, D.F.
- González-Esquinca, A.R. 1996. Las Annonas medicinales de Chiapas. Investigación Ciencias y Artes en Chiapas. ICACH. Vol. 1. Núm 2 :1-9.
- González Esquinca, AR. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae). Análisis fotoquímico de tres especies del estado de Chiapas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- González- Esquinca, A., Luna-Cazáres, L., Gutiérrez- Jiménez, J., Schline-Guzmán, A. y Vidal-López, D. 2011. Anonáceas: Plantas antiguas, estudios recientes. Jaguar. Unicach. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- González-Esquinca, A.R.; De la Cruz-Chacón, I.; Castro-Moreno, M.; Orozco-Castillo, J.A. y Riley-Saldaña, C.A. 2014. Alkaloids and Acetogenins in Annonaceae development, Biological considerations. *Brasileira de fruticulture*. 36:1-16.
- González-Esquinca, A.R. 2016. *Annonaceae*: Relevancia biológica de sus atributos químicos. *Lacandonia*. 2(10):71-72.
- González-Tepale, M.R.; Reyes, L.; Mayorga-Flores, M.; Reyes-Trejo, B.; Gómez-Zepeda, D.; Rio-Portilla, F.; Ordaz-Ortiz, J.J. y Herbert-Pucheta. 2018. Cyclopurpuracin, a cyclopeptide from *Annona purpurea* sedes. *Phytochemistry*. 23: 164-167.
- Gimenez, J.I.; Ferreira, G.; Cavariani, C. 2014. Tetrazolium test for assessment of seed viability of atemoya (*Annona cherimola* Mili. X *A. squamosa* L.). *Journal of Seed Science*. 36(3): 357-361.
- Guillén-Fernández, E. y Chávez-De Rebisso, M. 2011. Antibacterial activity in vitro of the extract etanólico of *Annona murica* L. (Graviola) on streptococcus mutans and lactobacillus. *Veritas*. 13(1): 111-116.
- Gutiérrez-Jiménez, J.; Santiago-Vázquez, U.A. y Luna-Cazarez, L.M. 2016. Evaluación de extractos acuosos de *Annona lutescens* Safford (Annonaceae) contra *Escherichia coli* Escherich, 1885 (Enterobacteriaceae).

- Global Biodiversity Information Facility (GBIF). *Annona purpurea*. https://www.gbif.org/species/search?via=data.gbif.org&dataset_key=d7ddd4f4-2cf0-4f39-9b2a-bb099caae36c&q=Annona%20purpurea. Consultado el 22-02-2021.
- Henning, C. 2013. Compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides. En: Ringuelet, J.A. y Viña, S. (Coord.). Productos Naturales Vegetales. La Universidad de La Plata. Buenos Aires, Argentina. Pp. 18-61.
- Hernández, C.J.; Tenorio, V.J.; Rojas, C.M. y Vallejo, G.A. 2005. Evaluación de la actividad Leishmanicida de los extractos etanólicos de *Rollinia rufinervis* sobre *Leishmania chagasi*. *Facultad de Química Farmacéutica*. 12(2): 37-43.
- Hernández-Fuentes, L.M.; Andrés-Agustín, J.; Espíndola-Barquera, M.D.C.; Castañeda-Vildózola, A.; Ballesteros-Patrón, G. y Vera-Sánchez, K.S. 2016. Recursos genéticos de Anonáceas (Annonaceae) en México: Situación actual y perspectivas. *Agroproductividad* 9(4): 3-8.
- Hernández-Morales, J.F. 2017. Factores ambientales y fisiológicos que afectan el perfil alcaloidal de *Annona purpurea*. Mociño y Sesse ex Dunal, durante el estiaje. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla, Gtz., Chiapas.
- Hernández-Fuentes, G.A.; García-Argáez, A.N.; Peraza-Campos, A.L.; Delgado-Enciso, I.; Muñoz-Valencia, R.; Martínez-Martínez, F.J.; Toninello, A.; Gómez-Sandoval, Z.; Mojica-Sánchez, J.P.; Dalla-Via, L. y Parra-Delgado, H. 2019. Cytotoxic Acetogenins from the roots of *Annona purpurea*. *Molecular sciences*. 20(8): 1-24.
- Honorable Ayuntamiento Municipal Cintalapa. 2016. Perfil Sociodemográfico Cintalapa. Gobierno del Estado de Chiapas. Chiapas, México.
- Huayhua-Carlos, M.L.; Moya-Torres, G. 2018. Extracción, purificación y caracterización fisicoquímica de los compuestos volátiles del *Tecoma fulva* (araquipensis). Tesis licenciatura. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Facultad de Ciencias Naturales y Formales. Arequipa, Perú.
- INAFED. Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México Estado Chiapas. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM07chiapas/municipios/07017a.html>. Tomado y consultado. 10/09/2021
- Kelly, L.M. 2000. Annonaceae Juss. En Flora del valle Tehuacán- Cuaicatlán Vol. 31. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Lamarque, A.; Zygadlo, J.; Labuckas, D.; López, L.; Torres, M.; Maestri, D. 2008. Cromatografías. En: Lamarque, A. y Maestri, D. (). Fundamentos teórico-prácticos de Química Orgánica. Encuentro. Argentina. Pp. 55-59.
- Lucio, A. 2015. Alcaloides de Annonacea: ocurrencia y recopilación de sus actividades biológicas y evaluación fitoquímica y biológica de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). Tesis posgrado. Universidad Federal Da Paraiba. Centro de Ciencias Da Saúde. *João Pessoa, Brasil*.

- Luna-Cazáres, L.M.; Marínez-Santiago, M.G. De la Cruz-Chacón, I. y González-Esquinca, A.R. 1999. Inhibición de cepas bacterianas por extractos Acuosos de *Annona lutescens* Saff. En: Memorias de II congreso Internacional de Anonáceas. Tuxtla Gutierrez, Chiapas. México. Pp. 89.
- Luna- Cazáres, L.M; Gonzáles- Esquinca, A.R. 2015. La chincuya (*Annona purpurea* Moc. & Sessé Ex. Dunal): Una planta mesoamericana. En: Vidal-Lezama, E.; Vidal-Martínez, N.A. y Vidal-Hernández, L. (Eds.) Anonáceas. Plantas antiguas. Estudios recientes. Parte 2. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. De México. Pp. 229-256.
- Martínez-Velarde, M.F. 2015. Revisión Taxonómica de Annonaceae Juss. Del estado de Guerrero. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de México. Ciudad de México, Edo. Mex.
- Matilla, A.J. 2013. Desarrollo y germinación de las semillas. En: Azcon-Bieto y Talon. Fundamentos de fisiología vegetal. Ed. UBE. Barcelona, España. Pp. 537.
- Moreno, F.; Plaza, G.A. y Magnitskiy, S.V. 2006. Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agronomía colombiana*. 24(2): 290-295.
- Mori-Vargas, T.J. y Reátegui-Sunció, R.M. 2012. Evaluación florística y taxonómica en un bosque de arena blanca en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana (RNAM), Lotero, Perú". Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos, Perú.
- Napoleón- Irigoyen, J. 2004. Guía técnica del cultivo de la Anonálica. Santa Tecla, El Salvador.
- Ordaz-Díaz, E. 2017. Actividad antioxidante, antifúngica y caracterización de metabolitos de las semillas de *Annona purpurea*. Tesis de Maestría. Universidad Tecnológica de la Mixteca. División de Estudios de Posgrado. Oaxaca, México.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO). 1985. Procesamiento de semillas de cereales y leguminosas de grano. Italia, Roma.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO y AfricaSeeds. 2019. Materiales para capacitación en semillas – Modulo 3: Control de calidad y certificación de semillas. Roma.
- Pérez-García, F. y Pilla-Villamil, J.M. 2001. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España.
- Piñol, M.T.; Palazón, J. y Cusidó, R.M. 2013. Introducción al metabolismo secundario. En: Azcon-Bieto y Talon (Eds). Fundamentos de fisiología vegetal. Ed. UBE. Barcelona, España. Pp. 323-348.

- Plant List. 2013. Annonaceae. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Annona>. Consultado el 27-09-2019.
- Quispe, M.A.; Zavala, C.D.; Rojas, C.J.; Posso, R.M. y Vaisberg, W.A. 2006. Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (Acetogenina de *Annona muricata*) em cultivos celulares de câncer de pulmón. *Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 23(4): 265-269.
- Raven, P.H.; Evert, R.F. y Eichhorn, S.E. 1992. Biología de las plantas. Reverté. Barcelona, España.
- Rioja-Soto, T.C. 2020. Los metabolitos secundarios de las plantas y potencial uso en el manejo de plagas agrícolas en agroecosistemas desérticos. *Idesia*.1(38): 3-5.
- Riley-Saldaña, C.A.; Cruz-Ortega, M.R.; Martínez Vázquez, M.; De la Cruz-Chacón, I.; Castro-Moreno, M.; González-Esquinca, A.R. 2017. Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Zeitschrift fuer Naturforschung*. 72 (11-12): 497–506.
- Rodríguez, C.M.P. 2008. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de Triclosán y Parabenes, aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Tesis doctoral. Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Química, Universidad de Santiago Compostela.
- Salazar, R. y Soihet, C. 2001. Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina. Turrialba, Costa Rica.
- Sánchez-González, A. y González, M. 2007. Técnicas de recolecta de plantas y herborización. En: Contreras-Ramos, A.; Cuevas, C.; Goyenechea, I. y Iturbe, U. (Eds). La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. Pp. 123-133.
- Segura, J. 2013. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En: Azcon-Bieto y Talon. Fundamentos de fisiología vegetal. Ed. UBE. Barcelona, España. Pp. 351-376.
- Schile-Guzmán, M.A.; González-Esquinca, A.R. y Luna-Cazáres, L.M. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en lines celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8(4): 245-247.
- SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). 2017. Recursos Fitogeneticos. www.gob.mx/snics. Consultado el 27-05-2019.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal (volumen II). Ed. Universidad Jaume. Los Angeles, California. Pag. 534.
- Tenorio-Vergara, J.L.; Hernández-Carvajal, J.E.; Adolfo-Vallejo, G. y Dairo-Ramos, J. 2006. Actividad tripanomicida en el *Tripanosoma cruzi* del extracto etanólico de las semillas de la *Xylopia aromatica*. *Cubana de farmacia*. 40(3).

- Vargas, W. 2002. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes Centrales. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.
- Vidal-Hernández, L.; López-Moctezuma, H.; Vidal-Martínez, N.A.; Ruiz-Bello, R.; Castillo-Rocha, D.G. y Chiquito-Contreras, R.G. 2014. La situación de las Annonaceae en México: Principales plagas, enfermedades y su control. *Basileira de Fruticultura*. 36: 44-54.
- Vidal-Lezama, E.; Sáenz-Pérez, C.A.; Curiel-Rodríguez, A.; Segura-Ledesma, S.D.; Cueva-Sánchez, J.A.; Campos-Rojas, E. 2015. Propagación sexual de cinco especies de Anonáceas. Una breve revisión. En: Vidal-Lezama, E.; Vidal-Martínez, N.A. y Vidal-Hernández, L. (Eds). Anonáceas. Plantas antiguas. Estudios recientes. Parte 2. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. De México. Pp. 73-121.
- Vogel, E.F. 1980. Seedlings of dicotyledons: structure, development, types: descriptions of 150 woody malaysian taxa. Centre for Agricultura Publishing and Documentation. Wageningen.

XII. ANEXOS

I. Prueba de viabilidad en Tetrazolio (TTC)








Fotografía de semillas de *Annona purpurea* cortadas transversalmente con la finalidad de exponer al embrión durante la prueba de viabilidad con Tetrazolio (TTC).

II. Prueba de Kedde









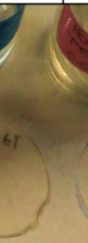
PRUEBA DE KEDDES ENDOSPERMO HEXANICO DE *Annona purpurea*.

| Semilla seca | Imbibición 1 | Imbibición 2 | Imbibición 5 | Imbibición 10 | Raíz 1-2cm | Raíz 3-5cm | Raíz 6-10cm | Primordio f. |
|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|------------|------------|-------------|--------------|
| | | | | | | | | |
| +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | ++ | ++++ | ++ | +++ |





PRUEBA KEDDES EMBRIÓN EXT. HEXANICO DE *A. purpurea*.

| Semilla seca | Imbibición 1 | Imbibición 2 | Imbibición 5 | Imbibición 10 |
|---|---|---|---|---|
|  |  |  |  |  |
| +++ | ++ | ++ | + | + |







PRUEBA DE KEDDE EN TESTA EXTRACTO HEXANICO

| Semilla seca | Imbibición 1 | Imbibición 2 | Imbibición 5 | Imbibición 10 | Raíz 1-2cm | Raíz 3-5cm | Raíz 6-10cm | Primordio f. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ++ | - | - | - | - | - | ++ | + | ++ |







PRUEBA KEDDE EN COTILEDON EXT. HEXANICO

| Raíz 1-2cm | Raíz 3-5cm | Raíz 6-10cm | Primordio |
|---|---|---|---|
|  |  |  |  |
| + | - | + | + |


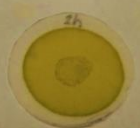

PRUEBA DE KEDDE EN RAICES EXTRACTO HEXANICO

| Raíz 1-2cm | Raíz 3-5cm | Raíz 6-10cm | Primordio f. | 2 a 4 hojas | 6 hojas |
|---|---|---|---|---|---|
|  |  |  |  |  |  |
| - | - | - | - | +++++ | - |

PRUEBA DE KEDDE EN TALLOS EXTRACTO HEXANICO

| Raíz 1-2cm | Raíz 3-5cm | Raíz 6-10cm | Primordio f. | 2-4 Hojas | 6 hojas |
|---|---|---|--|---|---|
|  |  |  |  |  |  |
| ++ | ++ | - | - | ++++ | +++++ |

PRUEBA KEDDE HOJAS/EXT. HEXANICO

| Primordio | 2-4 hojas | 6 hojas |
|--|--|--|
|  |  |  |
| - | - | - |

III. Constantes de partición (Rf):

Constantes de partición (Rf) en las cromatografías en capa fina de la testa:

| TESTA EXTRACTO HEXANICO | | | | SILICA GEL/ HEXANO: AcOEt 2:8 | | | SULFATO SÉRICO | |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Semilla sin Imbibir | Semilla con imbibición 1 día | Semilla con imbibición 2 días | Semilla con imbibición 5 días | Semilla con imbibición 10 días | Semilla con 1 a 2cm de radícula | Semilla con 3 a 5cm de radícula | Semilla con 6 a 10cm de radícula | Plantula primordio |
| - | - | - | - | - | - | - | - | 0.7567 |
| - | - | - | - | - | - | 0.6891 | - | - |
| 0.6858 | 0.6858 | 0.6858 | 0.6858 | 0.6858 | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | 0.5135 | - | 0.5135 |
| - | - | - | - | - | 0.2972 | 0.2972 | 0.2972 | 0.2972 |
| 0.2143 | 0.2143 | 0.2143 | 0.2143 | 0.2143 | - | - | - | - |

| TESTA EXTRACTOS METANOLICOS | | | | SILICA GEL/ ACETATO DE ETILO | | | SULFATO SÉRICO | |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Semilla sin Imbibir | Semilla con imbibición 1 día | Semilla con imbibición 2 días | Semilla con imbibición 5 días | Semilla con imbibición 10 días | Semilla con 1 a 2cm de radícula | Semilla con 3 a 5cm de radícula | Semilla con 6 a 10cm de radícula | Plantula con primordio |
| 0.6571 | 0.6571 | 0.6571 | 0.6571 | 0.6571 | 0.6571 | 0.6571 | 0.6571 | 0.6571 |
| 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 |
| 0.1143 | 0.1143 | 0.1143 | 0.1143 | 0.1143 | - | - | - | - |

| TESTA EXTRACTOS METANOLICOS | | | | SILICA GEL/ AcOEt: METANOL 3:7 | | | SULFATO SÉRICO | |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Semilla sin Imbibir | Semilla con imbibición 1 día | Semilla con imbibición 2 días | Semilla con imbibición 5 días | Semilla con imbibición 10 días | Semilla con 1 a 2cm de radícula | Semilla con 3 a 5cm de radícula | Semilla con 6 a 10cm de radícula | Plantula con primordio |
| 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 |
| - | 0.6944 | 0.6944 | 0.6944 | 0.6944 | 0.6944 | 0.6944 | 0.6944 | 0.6944 |

Constantes de partición (Rf) de las cromatografías en capa fina de endospermo:

| ENDOSPERMO EXTRACTO HEXANICO | | | | SILICA GEL/ ACETATO DE ETILO | | | SULFATO SÉRICO | |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Semilla sin Imbibir | Semilla con imbibición 1 día | Semilla con imbibición 2 días | Semilla con imbibición 5 días | Semilla con imbibición 10 días | Semilla con 1 a 2cm de radícula | Semilla con 3 a 5cm de radícula | Semilla con 6 a 10cm de radícula | Plantula con primordio |
| 0.66 | 0.66 | 0.66 | 0.66 | 0.66 | 0.66 | 0.66 | 0.66 | 0.66 |
| 0.555 | 0.555 | 0.555 | 0.555 | 0.555 | 0.555 | 0.555 | 0.555 | 0.555 |
| 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | - | 0.333 | 0.333 | 0.333 |
| 0.166 | 0.166 | 0.166 | 0.166 | 0.166 | - | 0.166 | 0.166 | 0.166 |

| ENDOSPERMO EXTRACTO METANOLICO | | | | | SILICA GEL/AcOEt | | SULFATO SÉRICO | |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Semilla sin Imbibir | Semilla con imbibición 1 día | Semilla con imbibición 2 días | Semilla con imbibición 5 días | Semilla con imbibición 10 días | Semilla con 1 a 2cm de radícula | Semilla con 3 a 5cm de radícula | Semilla con 6 a 10cm de radícula | Plantula con primordio |
| 0.8285 | 0.8285 | - | - | - | - | - | - | - |
| 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 |
| 0.3857 | 0.3857 | 0.3857 | 0.3857 | 0.3857 | 0.3857 | 0.3857 | 0.3857 | 0.3857 |
| 0.2285 | 0.2285 | 0.2285 | 0.2285 | 0.2285 | 0.2285 | 0.2285 | - | - |
| 0.1428 | 0.1428 | 0.1428 | 0.1428 | 0.1428 | 0.1428 | 0.1428 | - | - |

| ENDOSPERMO EXTRACTO METANOLICO | | | | | SILICA GEL/AcOEt: MeOH 4:6 | | S. SÉRICO | |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Semilla sin Imbibir | Semilla con imbibición 1 día | Semilla con imbibición 2 días | Semilla con imbibición 5 días | Semilla con imbibición 10 días | Semilla con 1 a 2cm de radícula | Semilla con 3 a 5cm de radícula | Semilla con 6 a 10cm de radícula | Plantula con primordio |
| - | - | - | - | - | - | - | - | 0.8857 |
| 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 |
| - | - | - | - | - | 0.6857 | 0.6857 | 0.6857 | 0.6857 |
| - | - | - | - | - | 0.6285 | 0.6285 | 0.6285 | 0.6285 |

Constantes de partición (Rf) de las cromatografías en capa fina de embrión:

| EMBRIÓN EXTRACTO HEXÁNICO | | SILICA GEL/ HEXANO:AcOEt 8:2 | | SULFATO SÉRICO |
|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Semilla sin imbibir | Semilla con imbibición 1 día | Semilla con imbibición 2 días | Semilla con imbibición 5 días | Semilla con imbibición 10 días |
| 0.9143 | 0.9143 | 0.9143 | 0.9143 | 0.9143 |
| 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 |
| 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 |
| 0.6857 | 0.6857 | 0.6857 | 0.6857 | 0.6857 |
| 0.6285 | 0.6285 | 0.6285 | 0.6285 | 0.6285 |
| 0.5143 | 0.5143 | 0.5143 | 0.5143 | 0.5143 |
| 0.4285 | 0.4285 | 0.4285 | 0.4285 | 0.4285 |

| EMBRIÓN EXTRACTO METANÓLICO | | SILICA GEL/AcOEt:MeOH 6:4 | | SULFATO SÉRICO |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Semilla sin imbibir | Semilla con imbibición 1 día | Semilla con imbibición 2 días | Semilla con imbibición 5 días | Semilla con imbibición 10 días |
| 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 |
| 0.6857 | 0.6857 | 0.6857 | 0.6857 | 0.6857 |
| 0.5143 | 0.5143 | 0.5143 | - | 0.5143 |

Constantes de partición (Rf) de las cromatografías en capa fina de raíz:

| RAÍZ EXTRACTO HEXANICO | | SILICA GEL/ ACETATO DE ETILO | | | SULFATO SÉRICO |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| - | 0.6111 | 0.6111 | 0.6111 | 0.6111 | 0.6111 |
| - | - | - | 0.4722 | 0.4722 | 0.4722 |
| - | - | - | - | 0.25 | - |
| - | - | - | - | - | 0.1944 |
| - | - | - | - | 0.1388 | - |
| - | - | 0.0833 | 0.0833 | - | - |

| RAÍZ EXTRACTO HEXANICO | | SILICA GEL/AcOEt: MeOH 3:7 | | | SULFATO SÉRICO |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| - | 0.7714 | 0.7714 | 0.7714 | - | - |
| 0.7143 | - | - | - | - | 0.7143 |
| - | - | 0.6285 | 0.6285 | - | - |
| - | - | 0.4571 | 0.4571 | - | - |
| - | - | 0.1428 | 0.1428 | - | 0.1428 |
| 0.0857 | - | 0.0857 | 0.0857 | - | - |

| RAÍZ EXTRACTO METANOLICO | | SILICA GEL/AcOEt: MeOH 6:4 | | SULFATO SÉRICO | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| 0.75 | 0.75 | - | 0.75 | 0.75 | 0.75 |
| - | - | 0.7222 | - | - | - |
| 0.6944 | 0.6944 | - | - | - | - |
| - | 0.5277 | 0.5277 | 0.5277 | 0.5277 | 0.5277 |
| 0.5 | - | - | - | - | - |
| 0.3611 | 0.3611 | 0.3611 | 0.3611 | 0.3611 | 0.3611 |
| 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 |
| - | - | - | - | 0.0833 | 0.0833 |

| RAÍZ EXTRACTO METANOLICO | | SILICA GEL/AcOEt: MeOH 6:4 | | DRAGENDORFF | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| 0.3611 | 0.3611 | 0.3611 | 0.3611 | 0.3611 | 0.3611 |
| 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 |

| RAÍZ EXTRACTO METANOLICO | | SILICA GEL/AcOEt:MeOH 2:8 | | SULFATO SÉRICO | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 |
| - | - | 0.7428 | - | - | - |
| - | - | - | 0.6857 | - | - |
| 0.6285 | - | 0.6285 | - | 0.6285 | 0.6285 |
| - | - | - | - | - | 0.1428 |

Constantes de partición (Rf) de las cromatografías en capa fina de tallo:

| TALLO EXTRACTO HEXANICO | | SILICA GEL/ACETATO DE ETILO | | SULFATO SERICO | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| 0.7143 | 0.7143 | 0.7143 | 0.7143 | - | - |
| - | - | - | - | 0.6666 | 0.6666 |
| 0.6429 | 0.6429 | 0.6429 | 0.6429 | - | - |
| - | - | - | 0.5143 | - | - |
| - | - | - | - | 0.5 | 0.5 |
| - | - | - | 0.3429 | - | - |
| - | - | - | - | 0.3333 | 0.3333 |
| - | - | - | 0.1714 | - | - |
| - | - | - | - | 0.166 | 0.166 |
| - | - | 0.1429 | - | - | - |
| - | 0.0857 | - | 0.0857 | - | - |
| - | - | 0.0714 | - | - | - |
| 0.0571 | 0.0571 | - | - | - | - |

| TALLO EXTRACTO HEXANICO | | SILICA GEL/ AcOEt: MeOH 3:7 | | SULFATO SÉRICO | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| - | - | - | - | - | 0.8571 |
| - | - | - | - | 0.8 | - |
| 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | - | - |
| 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 | 0.5142 | - | - |
| - | - | - | 0.1428 | 0.1428 | 0.1428 |
| 0.0857 | 0.0857 | 0.0857 | 0.0857 | 0.0857 | 0.0857 |

| TALLO EXTRACTO METANÓLICO | | SILICA GEL/AcOEt: MeOH 6:4 | | SULFATO SÉRICO | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 | 0.8055 |
| 0.6111 | 0.6111 | 0.6111 | 0.6111 | - | 0.6111 |
| - | - | - | - | 0.4722 | - |
| - | - | - | - | 0.3333 | - |
| 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 |

| TALLO EXTRACTO METANÓLICO | | SILICA GEL/AcOEt: MeOH 6:4 | | DRAGENDORFF | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 | 0.2777 |

| TALLO EXTRACTO METANÓLICO | | SILICA GEL/AcOEt: MeOH 2:8 | | | SULFATO SÉRICO | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|--|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas | |
| 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | 0.8285 | |
| 0.7142 | 0.7142 | 0.7142 | 0.7142 | 0.7142 | 0.7142 | |
| 0.5714 | 0.5714 | 0.5714 | 0.5714 | - | - | |
| 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 | 0.4857 | - | - | |

Constantes de partición (Rf) de las cromatografías en capa fina de cotiledón, primordio y hojas:

| COTILEDÓN-HOJAS EXTRACTO HEXÁNICO | | | SILICA GEL/AcOEt | | SULFATO SÉRICO | |
|--|--|---|--|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Cotiledón de plantula con raíz de 1 a 2 cm | Cotiledón de plantula con raíz de 3 a 5 cm | Cotiledón de plantula con raíz de 6 a 10 cm | Cotiledón de plantula con primordio foliar | Primordio foliar | Hojas de plantula con 2 a 4 hojas | Hojas de plantula con 6 a 10 hojas |
| - | - | - | 0.823 | - | - | - |
| - | - | - | - | 0.7428 | 0.7428 | 0.7428 |
| 0.6285 | - | - | 0.6285 | 0.6285 | 0.6285 | 0.6285 |
| - | - | - | - | - | 0.5428 | 0.5428 |
| 0.5143 | 0.5143 | 0.5143 | 0.5142 | - | - | - |
| - | - | - | - | 0.4857 | - | - |
| 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | - | - | - |
| 0.2285 | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | 0.0571 | 0.0571 |
| 0.0428 | - | - | - | - | - | - |

| COTILEDÓN-HOJAS EXTRACTO HEXÁNICO | | | SILICA GEL/AcOEt:MeOH 4:6 | | SULFATO SÉRICO | |
|--|--|---|--|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Cotiledón de plantula con raíz de 1 a 2 cm | Cotiledón de plantula con raíz de 3 a 5 cm | Cotiledón de plantula con raíz de 6 a 10 cm | Cotiledón de plantula con primordio foliar | Primordio foliar | Hojas de plantula con 2 a 4 hojas | Hojas de plantula con 6 a 10 hojas |
| - | 0.8285 | 0.8285 | - | - | - | - |
| 0.8 | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | 0.7857 | - | - | - |
| - | - | - | 0.6571 | - | - | - |
| - | - | - | - | - | 0.5714 | 0.5714 |
| 0.4 | 0.4 | 0.4 | - | - | - | - |
| - | - | - | - | - | 0.1142 | 0.1142 |
| 0.0714 | 0.0714 | 0.0714 | 0.0714 | - | - | - |

| COTILEDÓN-HOJAS EXT. METANÓLICO | | | SILICA GEL/AcOEt:MeOH 4:6 | | SULFATO SÉRICO | |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Semillas con 1 a 2cm de radícula | Semillas con 3 a 5cm de radícula | Semillas con 6 a 10cm de radícula | Cotiledón del primordio foliar | Plantulas con primordio foliar | Plantulas con 2 a 4 hojas | Plantulas con 6 a 10 hojas |
| 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| 0.7142 | 0.7142 | 0.7142 | 0.7142 | 0.7142 | 0.714 | 0.714 |
| - | - | - | - | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| - | - | - | - | 0.5142 | - | 0.514 |
| 0.4714 | 0.4714 | - | 0.4714 | - | - | - |
| - | - | - | - | - | 0.1388 | 0.1388 |
| 0.1142 | - | - | 0.1142 | 0.1142 | - | - |