

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

Actividad antifúngica de extractos
alcaloidales de *Annona
macrophyllata* Donn. Sm.

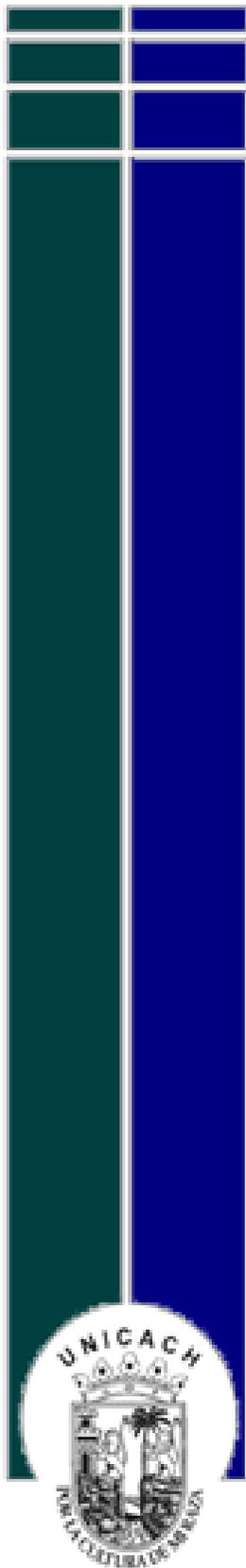
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA
INNIMEII LÓPEZ MORÁN



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre de 2022



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

Actividad antifúngica de extractos
alcaloidales de *Annona
macrophyllata* Donn. Sm.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

INNIMEII LÓPEZ MORÁN

Director

Dr. Iván de la Cruz Chacón

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal
Instituto de Ciencia Biológicas-UNICACH

Asesoras

Dra. Christian Anabí Riley Saldaña

Dra. Alma Rosa González Esquina

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal.
Instituto de Ciencia Biológicas-UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre de 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: 8 de noviembre de 2022

C. Inimeii López Morán

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

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

Actividad antifúngica de extractos alcaloides de *Annona macrophyllata* Donn. Sm.

En la modalidad de: Testis 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. Marisol Castro Moreno

Mtra. Érika Cecilia Pérez Ovando

Dr. Iván de la Cruz Chacón

Firmas:

Ccp. Expediente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las y los docentes del **Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH** que me enseñaron y formaron como biólogo en esta maravillosa carrera, sin duda, fue una gran aventura.

Al laboratorio de **Fisiología y Química Vegetal**, todos muy atentos y comprensivos. Muchas gracias por todo y por adoptarme en estos últimos años.

A mi **comité sinodal**: Dra. Marisol Castro Moreno, M. en C. Erika Cecilia Pérez Ovando y Dr. Iván de la Cruz Chacón, agradezco el tiempo y disponibilidad por la revisión de mi tesis. ¡**GRACIAS!**

A mis **asesoras de tesis**: Dra. Christian Anabí Riley Saldaña y Dra. Alma Rosa González Esquinca, muchas gracias por el apoyo y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al **Dr. Iván de la Cruz Chacón**, estoy completamente agradecido con usted, gracias por su atención, amistad, paciencia y dedicación, nunca lo olvidaré, ¡aún sigo sorprendido con el rotaevaporador!

A **mis padres y hermana** : Muchas gracias por apoyarme en todito, nunca me dejaron solo y yo nunca los dejaré solos. SIN USTEDES, ESTO NO SERÍA POSIBLE.

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a toda mi familia desde el cerro del portillo hasta el istmo de Tehuantepec, Oaxaca; en especial a mis padres y hermana.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
2.1	<i>Annona macrophyllata</i> donn sm.	3
2.1.1	Descripción botánica según (Martínez Velarde, 2015)	4
2.1.2	Descripción fenológica.....	5
2.1.3	Distribución	6
2.2.1	Alcaloides de la familia Annonaceae.....	8
2.2.2	Alcaloides derivados de triptofano (indólicos).....	10
2.2.3	Actividad biológica de los alcaloides de la familia Annonaceae.....	10
2.3	Hongos Fitopatógenos de estudio.	12
2.3.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	12
2.3.2	<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn.....	14
2.3.3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	16
2.3.4	<i>Aspergillus glaucus</i> . (L.) Link.....	18
III.	ANTECEDENTES.....	20
3.1	Actividad antifúngica de Anonáceas	20
3.2	Estudios sobre la influencia del ambiente en la producción de alcaloides	21
3.3	Estudios antifúngicos de <i>Annona macrophyllata</i>	21
IV.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	23
4.1	Objetivo general.....	23
4.2	Objetivos particulares	23
4.3	Hipotesis	23
V.	ZONA DE RECOLECTA.....	24
VI.	MÉTODOS	26
6.1	Extractos alcaloidales de <i>Annona macrophyllata</i>	26
6.2	Perfil de riqueza y abundancia de alcaloides de extractos alcaloidales	27
6.3	Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos alcaloidales.....	27
6.5	Análisis Estadísticos	29
VII.	RESULTADOS	30
VIII.	DISCUSION	44
8.1	Rendimiento de extractos de alcaloides.....	44
8.2	Actividad antifúngica de extractos alcaloidales.....	45
8.3	Relevancia de la quimiodiversidad de los extractos alcaloidales de las raíces de <i>A. macrophyllata</i>	47
IX.	CONCLUSIONES	49
X.	RECOMENDACIONES.....	51
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

XII. ANEXOS.....	63
Anexo 1. Índice de actividad antifúngica comparada en la familia Annonaceae.....	63
Anexo 2. Cartel científico del XII congreso nacional de micología	64
Anexo 3. constancia del congreso nacional XII de micología	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos morfológicos de <i>Annona macrophyllata</i> . Imagen tomada de (Tovilla-Sánchez,2019).....	5
Figura 2. Distribución de <i>Annona macrophyllata</i> en México	6
Figura 3. Tipos de alcaloides bencilisoquinolínicos	9
Figura 4. Alcaloides derivados de triptófano (indólicos)	10
Figura 5. morfología de colonia de estructura asexual de <i>Fusarium oxysporum</i> schtdl en medio PDA. Obtenido de <i>Pinus spp.</i> con síntomas de pudrición de raíz. imagen obtenida de (Robles-Yerena et. al, 2016)	14
Figura 6. Morfología de <i>curvularia lunata</i> . a) Colonia en agar harina maíz . Imagen tomada de (DGSV-CNRF, 2020)......	15
Figura 7. (a) Síntomas de antracosis en el fruto de papaya; b) <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> en medio PDA, c) Espora de <i>colletotrichum gloeosporiodes</i> (c). Imagen tomada de (Landro- Valenzuela ,2016).	17
Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas de <i>C. gloeosporioides</i> . Imagen tomada de (Velázquez-Silva <i>et al.</i> , 2018)......	17
Figura 9. Morfología de <i>Aspergillus glaucus</i> (MycoBank, 2021) y colonia de <i>Apergillus glaucus</i> en medio PDA	19
Figura 10. Delimitación geográfica de la zona de recolecta.	25
Figura 11. Organización general de las actividades experimentales	26
Figura 12. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de raíces de <i>Annona macrophyllata</i>	31
Figura 13. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de raíces de <i>Annona macrophyllata</i> sobre A) <i>Fusarium oxysporum</i> , B) <i>Curvularia lunata</i> , C) <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> D) <i>Aspergillus glaucus</i> . Se indica el valor promedio de cinco repeticiones más el error estándar y con letras la separación de promedios mediante la prueba de Mann-Whinthey con $p < 0.05$	32
Figura 14. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de tallos de <i>Annona macrophyllata</i>	33
Figura 15. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de tallos de <i>Annona macrophyllata</i> sobre A) <i>Fusarium oxysporum</i> , B) <i>Curvularia lunata</i> , C) <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> . Se indica el valor promedio de cinco repeticiones más el error estándar y con letras la separación de promedios. Mediante la prueba de Mann-Whinthey con $p < 0.05$	34
Figura 16. Análisis cromatográfico de los extractos alcaloidales de <i>Annona macrophyllata</i> recolectados durante un ciclo anual.....	37
Figura 17. Cromatogramas de extractos alcaloides de raíces <i>Annona macrophyllata</i> . obtenido por técnica de cromatografía de gases- masas (GC/MS)	39
Figura 18. Estructuras orgánicas de alcaloides de <i>Annona macrophyllata</i>	40
Figura 19. Regresión bivariada sobre el potencial de inhibición y el Índice de Margalef. A) <i>Fusarium oxysporum</i> , B) <i>Curvularia lunata</i> y c) <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> . Se indica el valor de R así como la regresión lineal mediante graficas.	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Alcaloides mas abundantes en la familia <i>Annonaceae</i> de acuerdo a (Lucio <i>et al.</i> , 2015)	9
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de los hongos fitopatógenos de estudio (MycoBank, 2021).	12
Cuadro 3 Temporada de lluvia y seca de <i>Annona macrophyllata</i> en la selva baja caducifolia del sitio de estudio (De la Cruz Chacón <i>et al.</i> , 2019).	25
Cuadro 4. Rendimiento de extractos alcaloidales de <i>Annona macrophyllata</i>	30
Cuadro 5. Actividad antifúngica de extractos alcaloides de <i>Annona macrophyllata</i> agrupados por estacionalidad.....	35
Cuadro 6. GC/MS identificación de alcaloides de raíces de <i>Annona macrophyllata</i>	40
Cuadro 7. Presencia y ausencia de alcaloides durante un ciclo anual de raíces de <i>Annona macrophyllata</i>	41
Cuadro 8 .Indices de diversidad α de alcaloides durante un ciclo anual	42
Cuadro 9. Indice de diversidad β Whittaker de alcaloides durante un ciclo anual.....	42

RESUMEN

Annona macrophyllata produce metabolitos secundarios antifúngicos, es una anonácea que se distribuye en los bosques secos tropicales del suroeste de México, en el estado de Chiapas. Los cambios característicos drásticos entre estaciones de estiaje y lluvia en los bosques secos tropicales, sugieren implicaciones ecológicas adicionales para la producción de metabolitos secundarios, por lo que este estudio tuvo la finalidad, de determinar la potencia o actividad antifúngica de extractos alcaloidales de *A. macrophyllata* obtenidos bimensualmente durante un ciclo estacional.

El estudio fitoquímico consistió en dos actividades generales: 1) la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos alcaloidales de raíces, tallos y hojas mediante el método de inhibición micelial a 250 ug.mL^{-1} contra *Aspergillus glaucus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum*, 2) El análisis del perfil químico de alcaloides del tejido mas activo por cromatografía de capa fina (CCF) y de gases masas (GM-MS).

Los extractos de alcaloides de *A. macrophyllata* presentaron actividad antifúngica contra los cuatro hongos de manera variada. Los extractos de las raíces fueron los mas potentes, en particular, sobre el crecimiento de *Curvularia lunata* (92.7% de inhibición) y *Fusarium oxysporum* (92.6%), en ambos fitopatógenos los extractos de la temporada de lluvias son mas potentes que los de la temporada de estiaje, especificamente, el extracto de octubre es el más potente para inhibir a tres fitopatógenos y el de abril lo es para inhibir a *A. glaucus*.

Los extractos alcaloidales de tallos inhibieron a tres de cuatro fitopatógenos: *F. oxysporum*, *C. lunata* fueron los mas sensibles (81 y 87% respectivamente), en tanto que *C. gloeosporioides* fue el mas resistente (40% de inhibición micelial). El extracto de diciembre es el mas potente y el de febrero es el menos activo.

Se detectaron 13 alcaloides en los extractos de raíces, seis se lograron identificar, de ellos anonaina es la molécula característica durante todo el año.

Finalmente se determinó que el número de alcaloides de las raíces no influye en la actividad antifúngica, por lo que; la potencia debe estar asociada a una molécula en particular.

Palabras clave: alcaloides, metabolitos secundarios, fitopatógenos, Anonáceas

I. INTRODUCCIÓN

Los Bosques Secos Tropicales (BST) son uno de los tipos de vegetación que constituye el Estado de Chiapas, son también conocidos como Bosques Tropicales Caducifolios o Selvas Bajas Caducifolias (Breedlove, 1981; Rocha-Loredo *et al.*, 2010). En los BST es marcada la alternancia de las estaciones de lluvia y estiaje que condiciona los patrones fenológicos de las plantas y varios de sus aspectos fisiológicos (González-Esquinca *et al.*, 2016), entre ellos su metabolismo secundario.

El metabolismo secundario interviene en varias relaciones entre la planta y su ambiente, y por ende es sensible a los factores bióticos y abióticos, lo que conduce a que la planta produzca proporciones variables de metabolitos secundarios entre los tejidos y durante sus fases de desarrollo (González-Esquinca *et al.*, 2014; Stevenson *et al.*, 2017).

En los BST de Chiapas habitan numerosas familias de plantas, entre ellas, la Familia Annonaceae (González-Esquinca *et al.*, 2016). Chiapas alberga 9 géneros y 37 especies de ese grupo botánico, de ellas nueve son endémicas (De la Cruz Chacón *et al.*, 2016), la mayoría son silvestres y otras semicultivadas (Miranda, 2015). De las anonáceas se han aislado numerosos metabolitos secundarios con propiedades antitumorales, insecticidas, antimicrobianas y antimaláricas. Estas moléculas bioactivas son de diversa naturaleza química y pueden estar en uno o más tejidos de la planta. Son especialmente abundantes y típicos los “alcaloides isoquinoleínicos” y las “acetogeninas de anonáceas” (García *et al.*, 2012, Cortes *et al.*, 2014.).

Annona macrophyllata Donn. Sm. (*Annona diversifolia*) es una anonácea frutícola conocida como papausa o ilama que ha sido estudiada desde el ámbito fitoquímico, de ella se han aislado alcaloides y acetogeninas que exhiben propiedades antimicrobianas y antitumorales (Schlie *et al.*, 2009; De-la-Cruz *et al.*, 2011), además se comercializa en mercados locales por que el sabor de su fruto es considerado muy agradable (Miranda, 2015). Se distribuye en diferentes regiones de Chiapas (Tovilla, 2019), incluyendo el bosque seco tropical.

Particularmente se sabe que extractos orgánicos y de alcaloides de *A. macrophyllata* inhiben el crecimiento micelial de varios hongos fitopatógenos, entre ellos *Aspergillus glaucus* y *Colletotrichum gloeosporioides* (De la Cruz et al, 2011; De la Cruz et al, 2020).

Se infiere que los cambios drásticos entre las estaciones de sequía y de lluvia en el BST que habita *A. macrophyllata* inducen cambios fenológicos y fisiológicos, incluyendo su metabolismo secundario (González-Esquinca et al. 2014).

Por lo tanto, el entorno del BST brinda la oportunidad de analizar el efecto de la estacionalidad sobre el contenido de alcaloides de *A. macrophyllata* modulando el tipo, número y abundancia de alcaloides que pueden repercutir en la amplitud y potencia de su actividad biológica. Este estudio tuvo como finalidad, determinar el espectro y potencia de la actividad antifúngica de extractos alcaloidales de *Annona macrophyllata* recolectados periódicamente en un ciclo anual en un BTS de Chiapas.

Los resultados podrán ser una base fitoquímica para intentar establecer el momento en el cual la actividad antifúngica es mayor y si esto está relacionado a un mayor número de alcaloides o a alcaloides particulares.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Annona macrophyllata* donn sm.

Annona macrophyllata pertenece a la familia Annonaceae, una agrupación de angiospermas de distribución pantropical, situada taxonómicamente en el orden Magnoliales, junto con las familias Myristicaceae, Magnoliaceae, Degeneriaceae, Eupomatiaceae e Himantandraceae (Mass *et al.*, 2011; Chatrou *etal.*, 2012 citado por De la Cruz Chacón *et al.*, 2016).

Esta especie tiene como sinonimia a *Annona diversifolia* Saff (Trópicos, 2021), es comúnmente llamada como papausa, papauce o ilama, sus frutos se comercializan debido a su agradable sabor, la pulpa puede alcanzar hasta el 50% del volumen del fruto (Julián-Loeza *et al.*, 2011; Valle-Guadarrama *et al.*, 2012). Las comunidades campesinas e indígenas de la selva Zoque del estado de Chiapas utilizan las hojas y el fruto de las papausas hirviéndolas para contrarrestar la epilepsia (Orantes-García, 2018).

La especie fue descrita en 1910 por John Donnell Smith y tiene la siguiente clasificación taxonómica actual según el Missouri Botanical Garden (Trópicos, 2015)

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Magnolianaes Takht.

Orden: Magnoliales Bromhead

Familia: Annonaceae Juss.

Género: *Annona* L.

Especie: *Annona macrophyllata* Donn.Sm

2.1.1 Descripción botánica según (Martínez Velarde, 2015)

Donn. Sm., Bot. Gaz. 49(6): 453. 1910. Tipo: Guatemala: in praecipite prope Fiscal, C.E. Deam 6191 (Holotipo: US; isotipos: US, US00930553!, MICH, MICH1115372!). *Annona diversifolia* Saff., Science s.n. 33: 471. 1911. Tipo: Mexico: Colima, E. Palmer 60 (Holotipo: S, S07 - 13374!).

Árbol de 4 a 5 m de alto. **Tallos** y ramas lenticelados, reticulados, glabrescentes a glabros. **Hojas** con pecíolo de 5 a 22 mm de largo, café claro amarillento, fuertemente articulado en la base, estrechamente acanalado en el haz: láminas elípticas, ovadas u obovadas, orbiculares cuando jóvenes, 2 a 17.5 cm de largo, 2 a 7.3 cm de ancho, ápice redondeado a agudo, base obtusa o cuneada, membranáceas, vena media impresa en el haz y fuertemente prominente en el envés, envés glauco, 10 a 13 venas secundarias por lado, glabras. **Flores** solitarias, terminales o axilares, pedicelo péndulo, 36 a 43 mm de largo, esparcidamente pubescente hacia la base, pardo o negro; sépalos connados en la base, rojizos, 3 a 4 mm de largo, deltoides a ampliamente ovados, ápice agudo, base truncada, carnosos y rugosos, densamente pubescentes hacia el ápice con tricomas largos y erectos, superficie adaxial pubescente; pétalos 6; pétalos externos rosado oscuros, conspicuos, oblongo-lanceolados, ligeramente triquetos, 14 a 34 mm de largo, 6 a 9 mm de ancho, ápice agudo a redondeado, base truncada, cóncava en el interior, carnosos, densamente pubescentes hacia la base, esparcidamente hacia el ápice; pétalos internos rudimentarios, oscuros, ovados, 2 mm de largo; estambres 3 a 3.5 mm de largo, filamentos 0.8 a 1 mm de largo, ligeramente aplanados, conectivo prolongándose en el ápice, capitado, ligeramente aplanado, corto pubescente; tecas 1 a 1.3 mm de largo; carpelos fusionados en la base, elipsoidales a botuliformes. **Frutos** globosos a ampliamente ovoides, 36 a 52 mm de largo, 24 mm de ancho, glabrescentes, superficie ligeramente rugosa, ápice de los carpelos libres, formando protuberancias subcónicas redondeadas adpresos (Martínez Velarde, 2015) (figura1).

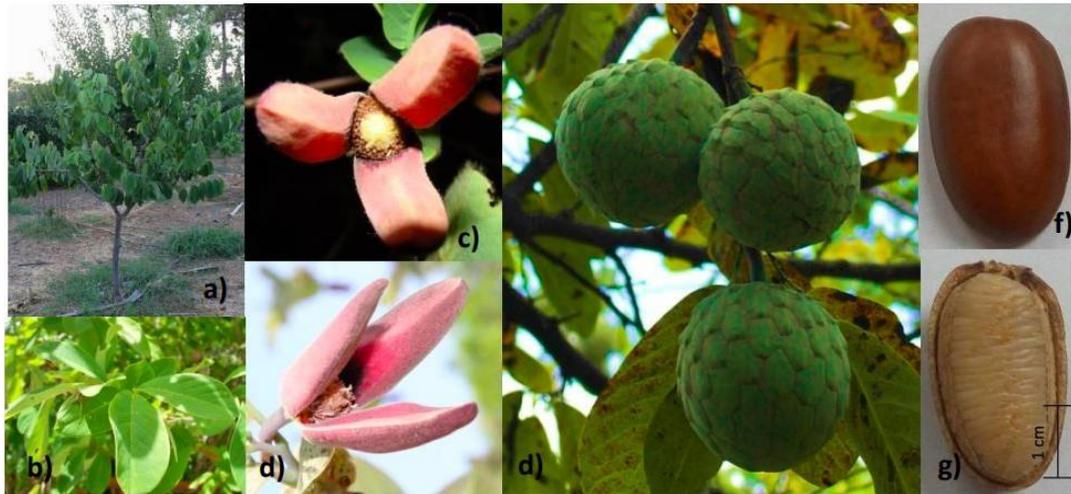


Figura 1. Aspectos morfológicos de *Annona macrophyllata*. Imagen tomada de (Tovilla-Sánchez,2019)

2.1.2 Descripción fenológica.

Annona macrophyllata es una especie subcaducifolia con una etapa de crecimiento activo y otra etapa de letargo. El letargo se establece gradualmente conforme disminuyen la humedad del suelo y la temperatura ambiental; los árboles de esta especie, no se defolian completamente, quedando algunas hojas activas (Sánchez-Otero *et al.*, 2015). La foliación está fenológicamente relacionada con la estación de lluvias (González-Esquinca *et al.*, 2016) y esta controlada por la fluctuación de temperatura y la disponibilidad del agua, con un mayor crecimiento en la temporada de lluvias (mayo-septiembre). Mientras que la época de menor actividad vegetativa se relaciona con la disminución de temperatura y humedad del suelo (Sánchez-Otero *et al.*, 2006; Sánchez-Otero *et al.*, 2015; González-Esquinca *et al.*, 2016). Al principio de la temporada de seca, en la selvas bajas caducifolias de Chiapas, sucede la senescencia de este árbol que se caracteriza por la pérdida de turgencia de la hoja, una clorosis gradual hasta el momento de la caída, y el comienzo de la latencia en los brotes de las hojas. Los árboles pierden más del 50% de hojas durante febrero, y a principios de marzo, sólo conservan el 10% de sus hojas senescentes, finalmente, durante las últimas semanas de marzo y abril, los árboles se quedan sin hojas. Las hojas y las flores se desarrollan simultáneamente durante la nueva temporada de lluvias (González-Esquinca *et al.*, 2016).

2.1.3 Distribución

A. macroprophyllata se ha reportado en México en los estados de Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Quintana Roo, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (figura 2)(De la Cruz Chacón *et al.*,2016). En Chiapas, de acuerdo con registros del herbario de “Eizi Matuda” del Instituto de Ciencias Biológicas y el herbario del Instituto de Historia Natural y Ecología (CHIP), se ha encontrado en los municipios de San Lucas, San Fernando, Chiapa de Corzo, Tuxtla Gutiérrez (Copoya), Villa Corzo, Jiquipilas, Villa Flores, Acapetahua, Tuxtla Chico, Tapachula y Chiacoasén (Tovilla-Sánchez, 2019).



Figura 2. Distribución de *Annona macroprophyllata* en México

2.2 Alcaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios considerados por su estructura y origen biosintético como compuestos nitrogenados, al que pertenecen también los glicósidos cianogénicos, aminoácidos no proteicos, glucosinolatos y betalainas (González-Esquinca *et al.*, 2016).

Se definen tradicionalmente como moléculas orgánicas alcalinas con por lo menos un átomo de nitrógeno, son muy comunes en las plantas y se presentan como sales de los ácidos orgánicos: ácido acético, ácido oxálico y ácido tartárico, en la savia celular de las plantas (Fester, 2010).

Estas moléculas están entre los mayores grupos de metabolitos secundarios, son diversos en términos de estructura y vías biosintéticas, incluyendo más de 20,000 moléculas (Yang y Stöckigt 2010; Matsuura y Fett-Neto, 2015). La mayoría se derivan de los aminoácidos comunes: fenilalanina/tirosina, triptófano, ornitina, lisina, histidina o ácido antranílico, sin embargo, existen alcaloides que no se derivan de aminoácidos, por lo que adquieren el nitrógeno por transaminaciones de núcleo derivados de terpenoides, esteroides o del ácido shikímico.

La distribución de alcaloides es restringida, sólo en el 20-30% de las plantas se ha reportado su presencia, con mayor frecuencia en plantas dicotiledóneas y relativamente en unas pocas monocotiledóneas y gimnospermas (Fester 2010, Mithofer y Boland, 2012; Wink, 2016;).

Fueron descubiertos por primera vez con el aislamiento de la nacortina del opio en 1803 por Dersone (Fester, 2010). Se encuentran entre las drogas más importantes (Matsuura y Fett-Neto, 2015). De hecho, el aislamiento del alcaloide morfina por Friedrich Wilhelm Serturmer en 1806 se considera el inicio "formal" del estudio del metabolismo secundario de las plantas (Hartmann, 2007). Son importantes en la agricultura ya que son usados por su actividad insecticida, fungicidas y fitotoxicas. (Wink, 2010).

2.2.1 Alcaloides de la familia Annonaceae

Las anonáceas producen alcaloides de estructura bencilisoquinolínica e indólica provenientes de los aminoácidos tirosina y triptófano respectivamente (González-Esquinca *et al.*, 2014).

Los estudios que se han realizado para la familia Annonaceae han sido sistematizados por Leboeuf (1982) Saito (1995) y Lucio y cols (2015), reportando 934 alcaloides estudiados en 254 plantas. Los precursores para la biosíntesis de alcaloides de esta familia se pueden dividir en dos: 1) L-tirosina y L-fenilalanina para los alcaloides (bencilisoquinolínicos ABI) y 2) el triptófano para los alcaloides indólicos (Lucio *et al.*, 2015).

Alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI)

Son los alcaloides más diversos y numerosos de la familia Annonaceae, biogenéticamente están emparentados con la morfina de la papaveráceas (De la Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015). Este grupo de alcaloides se caracteriza por la presencia de un anillo isoquinolínico y otro bencílico (González-Esquinca, 2005).

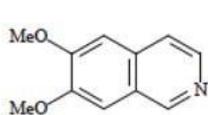
Los ABI comprenden a las aporfinas, oxoaporfinas, porteberberinas, fenatrenos y bis-bencilisoquinolínicos. (Leboeuf *et al.*, 1982; De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015). González-Esquinca (2005) menciona que la diversidad estructural de las aporfinas incluyen a: aporfinas *sensu stricto*, aporfinas 4,7-oxosustituidas, 7,7-dimetilaporfinas, 7-hidroxi-7metilaporfinas, dehidroaporfinas, aporfinas 4-oxo sustituidas y 4,5-dioxoaporfinas.

Se han reportado más recientemente a las azafluorenonas como ABI limitados a la familia Annonaceae, las cuales se supone podrían originarse a partir de oxoaporfinas (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015).

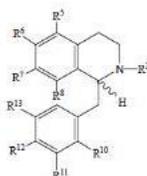
Las isoquinolinas, aporfinas *sensu stricto*, benciltetrahydroisoquinolinas, bisbenciltetrahydroisoquinolinas, fenatrenos y oxoaporfinas son las más abundantes en la familia Annonaceae (Cuadro 1 y Figura 3), destacando particularmente al alcaloide anonaína (aporfina) reportada en 57 especies de 26 géneros (Lucio *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Alcaloides mas abundantes en la familia *Annonaceae* de acuerdo a (Lucio *et al.*, 2015)

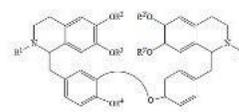
Tipo de alcaloide	Alcaloides totales	Alcaloide representativo	Géneros en los que se han aislado
Isoquinolinas	18	Corydaldina	<i>Annona</i> ,
Aporfinas <i>sensu strictu</i>	180	Anonaína	<i>Cardiopetalum</i> ,
Benciltetrahydroisoquinolinas	26	Reticulina, anomuricina yanomurina	<i>Cleistopholis</i> , <i>Crematosperma</i> <i>Guatteria</i> , <i>Isolona</i> , <i>Monodora</i> ,
Bis-Benziltetrahydroisoquinolinas	24	Flebicina	<i>Phaeanthus</i> , <i>Polyalthia</i> ,
Tetrahidroprotoberinas	30	Schefferina y aequalina.	<i>Pseudoxandra</i> , <i>Uvaria</i> y
Fenantrenos	19	Argentenina, Aterosperminina	<i>Xylopia</i>
Oxoaporfinas	68	Liriodenina	



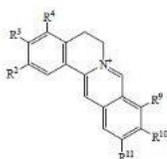
Isoquinolinas



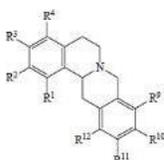
benciltetrahydroisoquinolinas



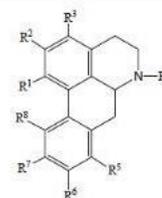
Bisbenzilisquinolinas



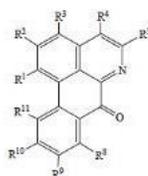
Protoberinas



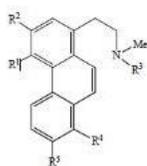
tetrahidroprotoberinas



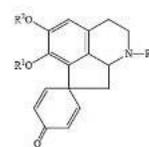
aporfinas *sensu stricto*



Oxoaporfinas



Fenantrenos



Proaporfinas

\$c£

Figura 3. Tipos de alcaloides bencilisoquinolínicos

2.2.2 Alcaloides derivados de triptofano (indólicos)

Estos alcaloides incluyen a los indólicos simples, indólicos-sesquiterpenos y los caulindoles; han sido encontradas en los géneros *Annonidium*, *Asteranthe*, *Greenwayodendron*, *Hexalobus*, *Isolona*, *Monodora*, *Polyalthia* y *Uvaria* (De laCruz-Chacón y González Esquinca, 2015). Entre los indólicos simples se encuentra el 3,6 Bis(γ , γ -dimetil)-indol (figura 4), considerado el principal alcaloide en la corteza de *Uvarian elliotiana*. Para los indólicos- sesquiterpenos se presentan alcaloides producidos por el género *Polyalthia* como: polialteno; polialtenol; isopoliatenol, neopoliatenol, poliveolina, poliavolensina, poliavolensinol y poliavolensinona (Lucio *et al.*, 2015).

La sampangina y la 3-metaxisampagina (figura 4) se consideran como los primeros reportes de la concurrencia de los alcaloides de tipo coprina en una especie de *Duguetia* (Lucio *et al.*, 2015).

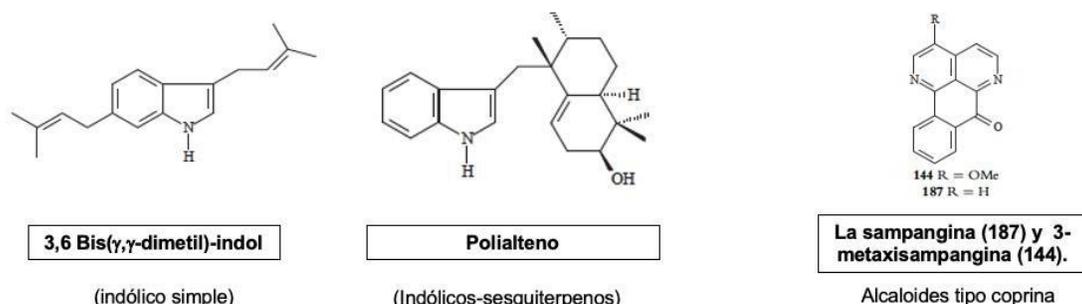


Figura 4. Alcaloides derivados de triptófano (indólicos)

2.2.3 Actividad biológica de los alcaloides de la familia Annonaceae

Los alcaloides son reservorios de nitrógeno y pueden actuar como sustancias alelopáticas o como disuasorios alimentarios, además de tener actividad fisiológica marcada en animales (González-Esquinca, 2005). Varios alcaloides de las anonáceas poseen actividades insecticidas, anticancerígenas y antibacterianas (De la Cruz Chacón *et al.*, 2020).

Particularmente se ha observado la actividad inhibitoria en células cancerosas de pulmón, hígado y mama (Wu *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2005). Esta actividad se debe a que algunos alcaloides inhiben la acción de la enzima

topoisomerasa II, que esta implicada en la replicación del ADN (Li *et al.*, 2009). Particularmente, el alcaloide liriodenina presenta actividad sobre la línea cancerosa MCF-7 con mayor potencia que el fármaco anticancerígeno comercial doxorubicina; lo interesante es que a concentraciones de 1 mg. mL⁻¹, el alcaloide presenta una adecuada especificidad hacia las células cancerígenas sin comprometer excesivamente a las normales, por lo que es un candidato importante para el desarrollo de nuevos fármacos (Schlie-Guzmán *et al.*, 2016)

En relación a su actividad sobre fitopatógenos, se ha documentado que cerca de 23 alcaloides de la familia llegan a inhibir a 13 hongos (*Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*); esta potente actividad inhibitoria *in vitro* se exhibe a concentraciones menores a 1 µg·mL⁻¹, como la demostrada por el 3- dimetilalilindol, 3-metoxisampangina, 6-metoxicleistofolina y la cleistofolina (Chong, 2020).

Los alcaloides antifúngicos de anonáceas más comunes son la liriodenina (oxoaporfina) presente en 50 géneros y más de 200 especies. Liriodenina es capaz de inhibir a 24 fitopatógenos de los cuales son, 20 hongos, 2 bacterias y 2 protistas (De la Cruz Chacón y González Esquinca, 2015).

Se sabe poco sobre las partes de la planta en la que se biosintetiza este alcaloide, aunque se cree que su biosíntesis comienza durante las primeras etapas de desarrollo en el endospermo y las radículas de las semillas (De la Cruz Chacón y González Esquinca, 2012 ; González Esquinca, 2005; De la Cruz Chacón y González Esquinca, 2015). Es probable que la liriodenina sea un mecanismo de defensa temprana en *Annona macrophyllata* y en otras especies; debido a que, esta involucrada en respuestas de planta contra fitopatógenos, además, es uno de los alcaloides más abundante en las anonáceas (De la Cruz Chacón *et al.* 2011).

2.3 Hongos Fitopatógenos de estudio.

Los hongos seleccionados para determinar la potencia antifúngica de los extractos alcaloidales de *Annona macrophylla* pertenecen al phylum Ascomycota pero a diferentes familias (cuadro 2). Todos son considerados fitopatógenos, varios de ellos de cultivos comerciales.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de los hongos fitopatógenos de estudio (Mycobank, 2021).

Filo	<i>Ascomycota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Azcomycota</i>	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>pezizomycotina</i>	<i>Pezizomycotina</i>	<i>Pezizomycota</i>	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>sordariomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>
Subclase	<i>Hypocreomycetidae</i>	<i>Pleosporomycetidae</i>	<i>Hypocreomycetidae</i>	<i>Eurotiomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Glomerellales</i>	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Nectriaceae</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Glomerellaceae</i>	<i>Aspergillaceae</i>
Género	<i>Fusarium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltldl.	<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	<i>Aspergillus glaucus</i> (L.) Link.

2.3.1 *Fusarium oxysporum*

El género *Fusarium* contiene especies con distribución mundial, catalogados desde hace mucho tiempo como importantes fitopatógenos vegetales. La especie más común, *F. oxysporum*, causa la enfermedad de la marchitez vascular en una amplia variedad de cultivos de importancia económica (Roncero *et al.*, 2003). La infección de este hongo se da a través de las raíces de las plantas (Tjamos y Beckam, 1989; Li *et al.*, 2017). *F. oxysporum* es una especie anamórfica que incluye cepas patógenas y no patógenas, la fase asexual es la estructura dominante de la población de *F. oxysporum* (Gordón y Matyn 1997).

El proceso de infección por *Fusarium oxysporum* se puede dividir en: 1) reconocimiento de la raíz, 2) fijación y colonización de la superficie de la raíz, 3) penetración y colonización de la corteza de la raíz y proliferación de hifas dentro de los vasos del xilema. Los síntomas de infección inicialmente se manifiestan con un aclaramiento de las venas y epinastia foliar, seguidos de atrofia, coloración amarillenta de las hojas inferiores, marchitez progresiva, defoliación y, finalmente, muerte de la planta. El tejido vascular se vuelve marrón, lo que es claramente visible en las secciones transversales del tallo. Algunas formas especiales no son principalmente patógenos vasculares, pero causan pudrición de la raíz (figura 5), y del pie o del bulbo (Di piero *et al.*, 2003; Michielse y Rep, 2009).

Snyder & Hanse, (1940) mencionan que al estudiar y describir esta especie de hongo, es necesario que sus formas se distingue de otras, ya que cada una de ellas se limita a ciertas plantas y cada una puede diseminarse independientemente de las de las otras; por lo que, de acuerdo a los aspectos de sus cultivos, la morfología y la fisiología, clasificaron a esta especie en 25 formas especiales, por ejemplo: *Fusarium oxysporum f.sp. melonis*, hongo del melón (*Cucumis melo L.*); *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, hongo del jitomate (*Solanum lycopersicum*) y *Fusarium oxysporum f.sp. Nicotianae*, hongo del tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Cuando se cultiva, *Fusarium oxysporum* produce inicialmente un micelio incoloro o amarillo pálido que se vuelve rosa o púrpura con el tiempo (Di piero *et al.*, 2003). Existen distintos medios que permiten que *Fusarium oxysporum* crezca, entre ellos, agar papa dextrosa (PDA) (figura 5), agar Sabouraud, agar Clavel (CLA), agar de Spezieller Nährstoff-farmer (SNA) y agar avena. Los agares PDA y Sabouraud permiten observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) difusible al medio, mientras que; el agar CLA, permite observar el desarrollo de cadenas de microconidios y morfología en detalle de macroconidios (Tapa y Amaro, 2014).

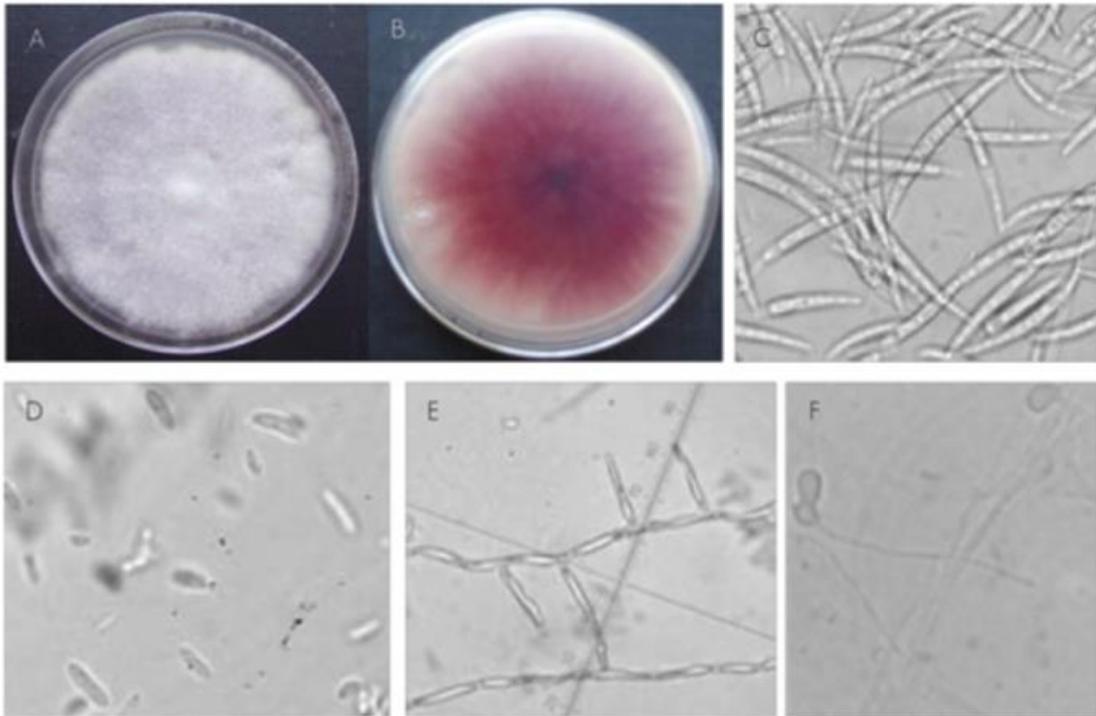


Figura 5. morfología de colonia de estructura asexual de *Fusarium oxysporum* schtdl en medio PDA. Obtenido de *Pinus spp.* con síntomas de pudrición de raíz. imagen obtenida de (Robles-Yerena et. al, 2016)

2.3.2 *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn

Curvularia lunata es un hongo fitopatógeno, una de las especies causantes de la mancha foliar en plantas monocotiledóneas (Pitt y Hocking, 2012; Zhang, 2019), principalmente el maíz (*Zea mays*), que se ha convertido en una seria amenaza para la producción de este cultivo (Zhang, 2019; Gao *et al.*, 2019); además se ha presentado infecciones en arroz (*Oryza sativa*) (Estrada y Sandoval, 2004), jitomate (*Solanum lycopersicum*) (AbdElfatah,2021), jengibre (*Zingiber officinale*) (Sinha *et al.*, 1987), cebada (*Hordeum vulgare*) (Kumar y Sing, 2002) y pitaya roja (*Hylocereus undatus*) (Martul *et al.*, 2009). Recientemente se reportó el primer informe de *Curvularia lunata* como responsable de la podredumbre pos-cosecha del plátano (Khan y Javaid, 2020). Este hongo causa daños en hojas, tallos, flores y semillas, que abarcan desde

pequeñas manchas hasta lesiones de mayor tamaño (Khazada et al., 1991; Jin, 1991; Anónimo, 1999 citado en DGSV-CNRF, 2020). También se ha reportado infección en humanos por este hongo, presentando inicialmente abscesos profundos en tejidos blandos seguido de úlceras en ojos y piernas (Wind y Polack 1970; Rohwedder et. al, 1979).

Curvularia lunata crece en medio agar PDA y agar harina maíz, desarrolla colonias de coloración café oscuro a negro con bordes hialinos (Mew y Misra, 1994; (DGSV-CNRF, 2020) (Figura 6). Al aislar los microorganismos de la planta enferma en un medio de cultivo, se puede identificar esta especie por sus características morfológicas micro- o macroscópicamente (Khan y Javaid, 2020)



Figura 6. Morfología de *curvularia lunata*. a) Colonia en agar harina maíz . Imagen tomada de (DGSV-CNRF, 2020).

2.3.3 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

Los hongos fitopatógenos del género *Colletotrichum* causan pudriciones en las frutas de la pre y/o pos cosecha (llamada como antracnosis) (figura 7), es considerado uno de los fitopatógenos más importantes, debido a que, infecta aproximadamente a 1000 especies de plantas (Pauling *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012).

El nombre *Colletotrichum gloeosporioides* fue propuesto por primera vez por Penzing (1882), basado en *Vermicularia gloeosporioides*, cuyo espécimen tipo fue recolectado especies de *Citrus* en Italia (Weir *et al.*, 2012). Este fitopatógeno incluye al *C. gloeosporioides* como anamorfo imperfecto (estado asexual) mientras que, a *Glomerella cingulata* como un teleomorfo (sexual perfecto). El estado teleomorfo es conocido por su capacidad de causar enfermedades graves (Ayay kumar, 2014; Cannon *et al.*, 2012). Durante el proceso de infección *C. gloeosporioides* forma estructuras especializadas como conidios, acervos, setas y apresorios que varían dependiendo interacción huésped-patógeno (Canon *et al.*, 2012).

Este fitopatógeno presenta un modo de infección hemibiotrófico en el que ambas fases, biotrófica y necrotrófica, ocurren secuencialmente. Los síntomas iniciales de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* se describen como manchas redondas a ovaladas, empapadas de agua y hundidas, que se desarrollan a medida que la enfermedad progresa y finalmente conducen a la necrosis del tejido o a la muerte (Ayay kumar , 2014). Este patógeno es inactivo en la estación seca y cambia a estados activos cuando se encuentra en condiciones ambientales favorables (Sharma y Kulshrestha, 2015).

Colletotrichum gloeosporioides crece y esporula en diferentes medios de cultivo: agar papa dextrosa, agar frijol lima, agar extracto de malta y agar harina de avena (figura 7 y figura 8). de forma óptima a una temperatura de 25-28 °C y pH de 5.8-6.5 (Sharma y Kulshrestha, 2015)

Este fitopatógeno infecta a la toronja (*Citrus aurantium*) (Cruz-Lagunas *et al.*, 2020), guanábana (*Annona muricata*) (Álvarez *et al.*, 2004), litchi (*Litchi chinensis*) (Martínez-Bolaños, 2015), aguacate (Roíguez *et al.*, 2020), guayaba (*Psidium guajava*)(Amusa *et. al*, 2015), pitahaya (*Hylocereus undatus*) (Ma *et. al*, 2014) y a la papaya (*Carica papaya*)(Landerro-Valenzuela, 2016).

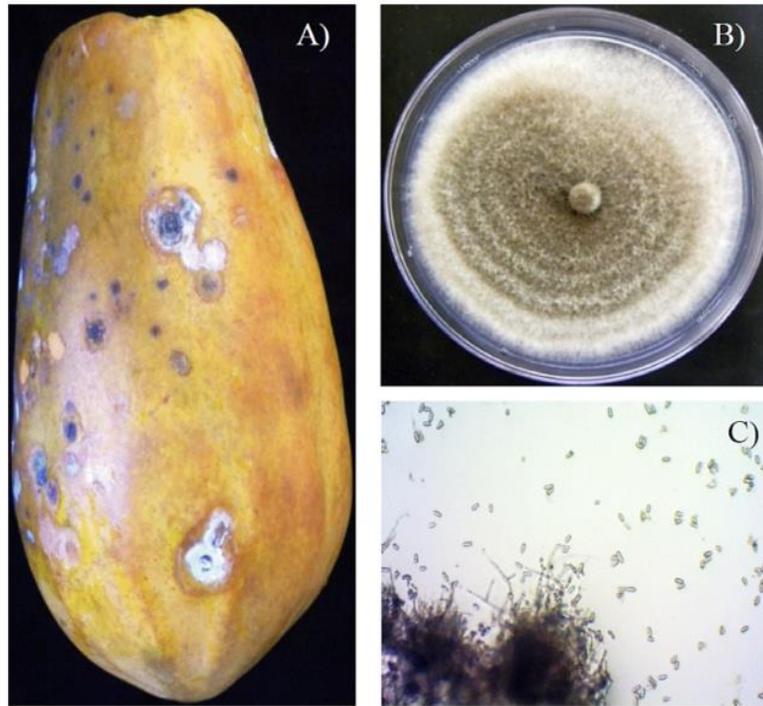


Figura 7. (a) Síntomas de antracosis en el fruto de papaya; b) *Colletotrichum gloeosporioides* en medio PDA, c) Espora de *colletotrichum gloeosporioides* (c). Imagen tomada de (Landerro- Valenzuela ,2016).



Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas de *C. gloeosporioides*. Imagen tomada de (Velázquez-Silva *et al.*, 2018).

2.3.4 *Aspergillus glaucus*. (L.) Link

Los fitopatógenos del *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos, desempeñan papeles importantes en la degradación de materia orgánica. Habitan naturalmente en el suelo y habitualmente su reproducción es por medio de conidios cuya germinación da origen a las hifas (Padrón *et al.*, 2013).

Aspergillus glaucus puede crecer en granos de baja humedad y es uno de los principales hongos responsables de pérdidas agrícolas, además son causantes de la enfermedad conocida como *mildiu*. Se pueden utilizar como hongo de alerta temprana para el almacenamiento de granos (Zhai,2015; Fleurat, 2017; Yúan *et. al*, 2020;). Una de las propiedades que caracteriza a las especies de *Aspergillus* es su capacidad para producir micotóxicas, en este caso, aflatoxinas (Padrón *et al.*, 2013).

Los medios de cultivo recomendados como estándar para *Aspergillus* incluyen agar autolizado de levadura Czapek (CYA) y agar extracto de malta (MEA, Oxoid). Para la observación más amplia de caracteres, es útil utilizar medios adicionales como: agar de Czapek (CZ), 20% de sacarosa CYA (CY20S), 20% de sacarosa MEA (MEA20S), extracto de levadura y agar de sacarosa (YES), diclorán 18% de glicerol. agar (DG18), agar avena (OA) y agar creatina sacarosa (CREA) (Samson, 2014). Para *Aspergillus glaucus* se ha reportado creciendo en medio PDA (Yúan *et al.*, 2020)(figura 9).

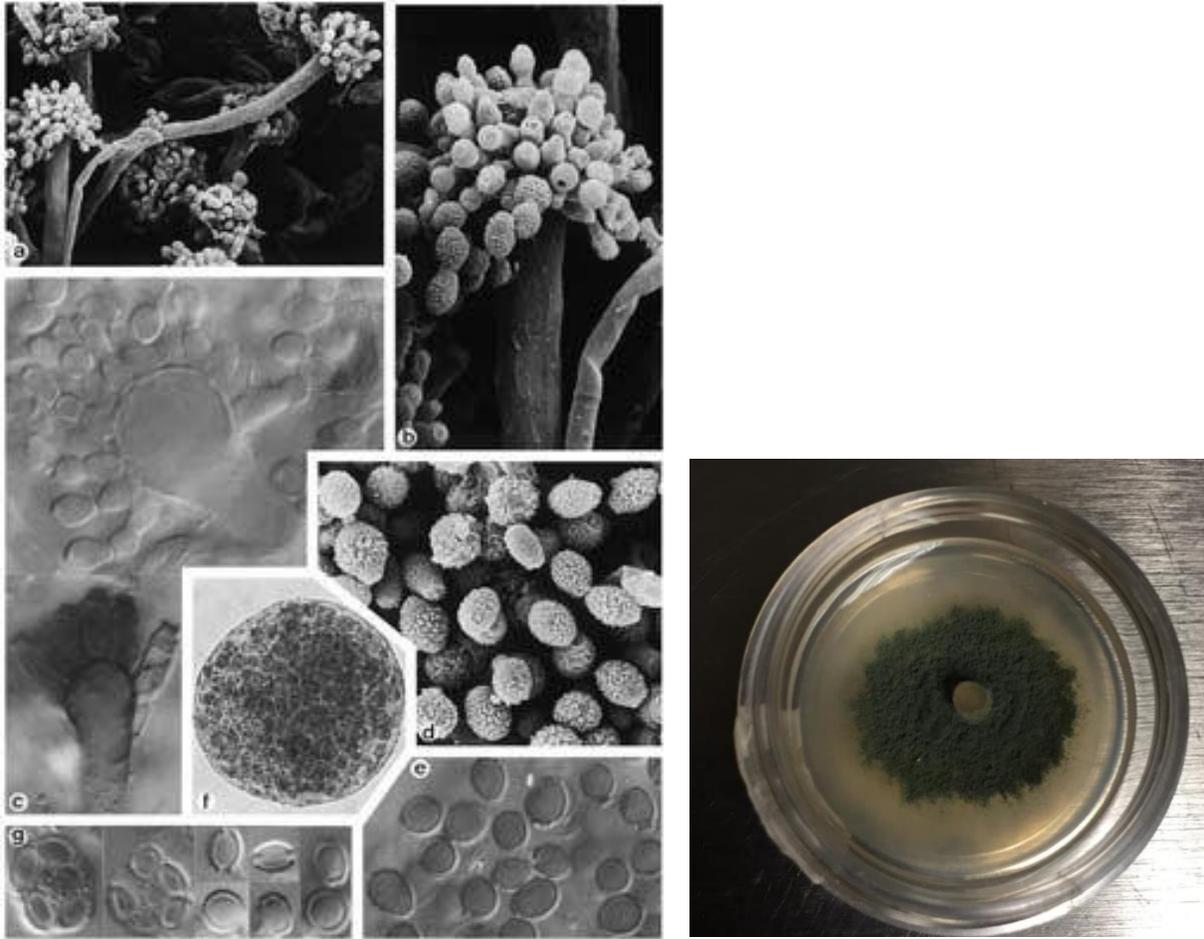


Figura 9. Morfología de *Aspergillus glaucus* (Mycobank, 2021) y colonia de *Apergillus glaucus* en medio PDA

III. ANTECEDENTES

3.1 Actividad antifúngica de Anonáceas

Existen estudios que documentan la actividad de por lo menos 25 especies de anonáceas, De la Cruz Chacón y González Esquinca (2015) en una revisión mencionan que el género más estudiado es *Annona* con siete especies y que la actividad ha sido determinada en 39 especies de hongos fitopatógenos, sobresaliendo en número los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* *Colletorichum*. Los estudios recopilados incluyeron reportes de la evaluación con moléculas, extractos orgánicos y acuosos de diferentes partes vegetales.

Particularmente hay varios trabajos que documentan la actividad antifúngica de extractos alcaloidales de especies del género *Annona* contra fitopatógenos de interés agrícola como: *Aspergillus glaucus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Moniliophthora roreri*, *Rhizopus stolonifer*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2011; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2013; De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019; Chong, 2019)

Por ejemplo, De-la-Cruz-Chacón *et al.*, (2019) reportaron actividad antifúngica de los extractos alcaloidales de *Sapranthus microcarpus* contra los fitopatógenos, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Curvularia lunata*. Estos extractos llegaron a inhibir por completo a *F. oxysporum f. sp lycopersici*, fitopatógeno del jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Chong (2020) encontró que en las raíces, tallos y hojas de *Sapranthus campechianus* (Annonaceae) también hay alcaloides que inhiben el crecimiento de hongos. Las raíces tuvieron más compuestos e inhibieron con más potencia. De los tres hongos estudiados (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum*), *F. oxysporum* fue el más afectado. Hay tres moléculas candidatas para seguir estudiando. Una de ellas fue capaz de inhibir a los hongos en condiciones de laboratorio e *in planta* de jitomate. Las concentraciones utilizadas para las pruebas *in vitro* fueron de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.2 Estudios sobre la influencia del ambiente en la producción de alcaloides

Castro-Moreno *et al.*, (2013) determinaron la influencia de los cambios estacionales en la acumulación del alcaloide liriodenina, observaron la variación mensual del contenido de liriodenina en raíces, tallos y hojas de árboles maduros y jóvenes. El análisis de árboles jóvenes y maduros mostró un aumento significativo en la concentración del alcaloide en las raíces durante la estación seca, que coincidió con la senescencia de las hojas. También se produjo una disminución significativa al comienzo de la temporada de lluvias (el período de crecimiento de las hojas).

De-la-Cruz-Chacón *et al.*, (2019) aportaron datos sobre la variación del contenido y número de alcaloides de *Annona purpurea* durante un ciclo anual y su potencial inhibitorio contra tres hongos fitopatógenos (*C. lunata*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum f. sp lycopersici*). Este estudio indicó que el contenido de alcaloides fue mayor en plena estación de seca. También se produjeron altos rendimientos durante la floración. El efecto inhibitorio más fuerte se obtuvo de los extractos de la raíz durante el último mes de la estación seca.

Chong (2020) indicó que *Sapranthus campechianus* produce sus alcaloides antifúngicos de forma diferente durante el año, señalando en qué momento se produce una mayor cantidad de extractos alcaloidales, o en qué periodo hay mayor número de moléculas o una producción más alta de alcaloides particulares.

3.3 Estudios antifúngicos de *Annona macroprophyllata*.

De-la-Cruz-Chacón *et al.*, (2011) investigaron el papel del alcaloide liriodenina en la defensa antimicrobiana durante las primeras etapas de desarrollo de *Annona macroprophyllata*. Los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus glaucus* responsables del deterioro de las semillas fueron aislados durante la imbibición, y su sensibilidad al alcaloide aislado y a extractos alcaloidales se determinó mediante ensayos de difusión, macrodilución e inhibición metabólica. Los extractos de alcaloides fueron obtenidos a partir de embriones, radículas y raíces de semillas germinadas o plántulas. La presencia de liriodenina en los extractos se cuantificó mediante cromatografía líquida

de alto rendimiento. La liriodenina y los extractos alcaloides inhibieron ambos hongos y hubo una relación positiva entre la actividad de los extractos y la cantidad de liriodenina contenida en ellos.

De-la-Cruz-Chacón *et al.*, (2013) evaluaron la actividad inhibitoria de cuatro especies de Anonáceas: *Annona diversifolia*, *A. lutescens*, *Sapranthus campechianus* y *S. microcarpus* contra los hongos *Aspergillus glaucus*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*. Los extractos hexánicos y metanólicos de tallos y hojas se evaluaron *in vitro* a 250 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mediante el método de inhibición del crecimiento micelial. Los resultados señalan que los extractos metanólicos del tallo de *A. diversifolia* y *A. lutescens* fueron los mas activos, inhibiendo a *A. glaucus* y *R. stolonifer*.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo general

Determinar si la potencia y espectro de actividad antifúngica de los extractos alcaloidales de *Annona macropophyllata* varia en un ciclo estacional

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar la actividad de extractos alcaloidales contra los hongos fitopatógenos: *Aspergillus glaucus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum*
- Determinar si la estacionalidad afecta la potencia y el espectro de la actividad antifúngica de los extractos alcaloides de hojas, tallos y raíces
- Relacionar el perfil químico de los extractos alcaloidales con su actividad antifúngica.

4.3 Hipotesis

Los cambios estacionales del Bosque Seco Tropical afectará la biosíntesis de alcaloides de *Annona macropophyllata*, por lo que sus extractos alcaloidales tendrán un perfil cuantita- y cualitativo diferente y por ende una actividad antifúngica diferente en espectro y potencia.

V. ZONA DE RECOLECTA

Los extractos alcaloidales fueron obtenidos de un estudio de mayor aliento denominado "Importancia de las estaciones y de la fenología en la producción de alcaloides. El caso Anonas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Secretaría de Educación Pública. CONACYT-Ciencia Básica" y del cual esta tesis forma parte. Por lo que, aun cuando todo el procedimiento para su obtención no forma parte del método, se describe las condiciones en las que las muestras vegetales fueron obtenidas para contextualizar su origen.

La zona de estudio se ubica en la localidad de Julián Grajales en el municipio de Chiapa de Corzo, Chiapas, ubicado a su vez en la región fisiográfica de la Depresión Central de Chiapas. Esta región ocupa aproximadamente el 12% del territorio chiapaneco, se ubica al centro del estado. Es una extensa zona semi plana bordeada por la Sierra Madre de Chiapas, la Altiplanicie Central y las Montañas del Norte (Mulleried,1957). En el municipio de Chiapa de corzo predomina la Bosque Seco Tropical y generalmente el uso del suelo es agropecuario (INEGI 2014).

El clima de la región es cálido y subhúmedo con lluvias de verano (AW1) y dos estaciones que se caracterizan por ser una estación de sequía (octubre-mayo) y una estación lluviosa (junio-octubre) (García 1988). Los datos del clima durante treinta años (1980-2010) indican que durante el año la temperatura media anual es de 23° C, en diciembre se presentan las temperaturas bajas con 20°C y en mayo las mas calientes con 26°C máximo; las precipitaciones con un promedio anual de 407 mm y la precipitación es casi nula en enero (52 mm) (CONAGUA, 2014, Cuadro 3.).

Para la recolecta de material vegetal se localizaron 10 árboles adultos en la localidad de Julián Grajales a lo largo de la carretera 157 estatal, todos los ejemplares formaban parte de huertos de terrenos baldíos (Figura 10). La zona de recolecta esta comprendida entre 16°28'793''W 92°57'767''N y los 16°28'766''W y 92°57'594''N.

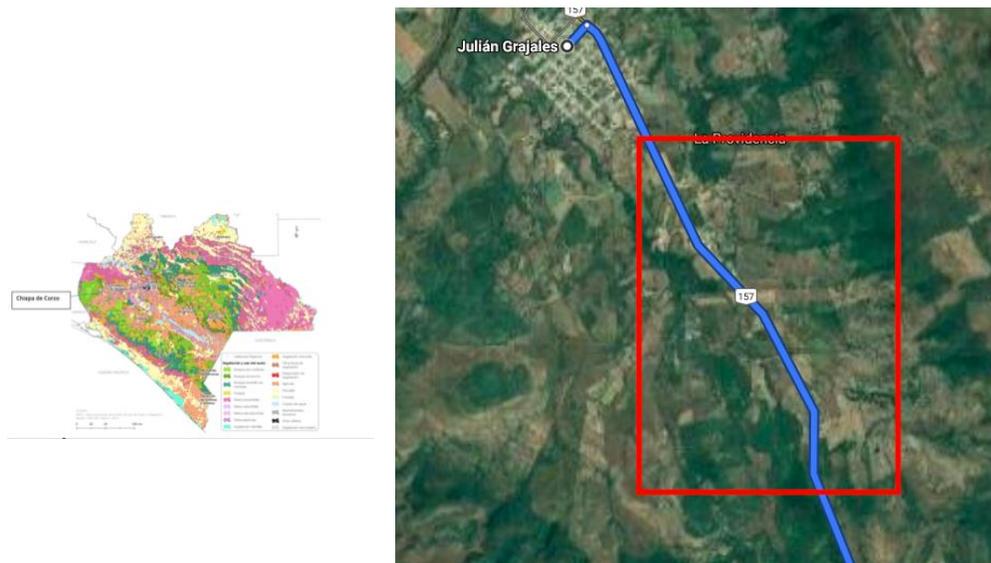


Figura 10. Delimitación geográfica de la zona de recolecta.

Cuadro 3 Temporada de lluvia y seca de *Annona macrophylla* en la selva baja caducifolia del sitio de estudio (De la Cruz Chacón et al., 2019).

Estacionalidad	Temporada de seca						Temporada de lluvia					
	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
tiempo de collección												
Precipitación mensual (mm)	9.5	1.8	0.1	0	0.2	4.5	91.4	213	71.6	165	265	41.2
Precipitación máxima (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
precipitación mínima	1.8	1.7	0.1	0	0.2	3.9	48.4	51.7	20.4	40.4	106	24.7
temperatura media (°C)	22.8	22	22.4	24.3	24.8	27.6	26.2	24.8	24.3	24.6	24.3	26.9
Temperatura máxima (°C)	25.6	23.7	25.6	27.1	30.8	33.7	31.5	26.9	26.3	26.5	26.3	28.1
temperatura mínima (°C)	18.1	19.6	18.1	20.3	18.8	23.5	19.9	22.5	22.8	23	21.7	23.2

VI. MÉTODOS

El estudio fitoquímico de *Annona macrophyllata* consistió en dos actividades generales 1) La determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos alcaloidales de raíces, tallos y hojas 2) El análisis del perfil de riqueza y abundancia de alcaloides de los extractos por cromatografía (Figura 11).

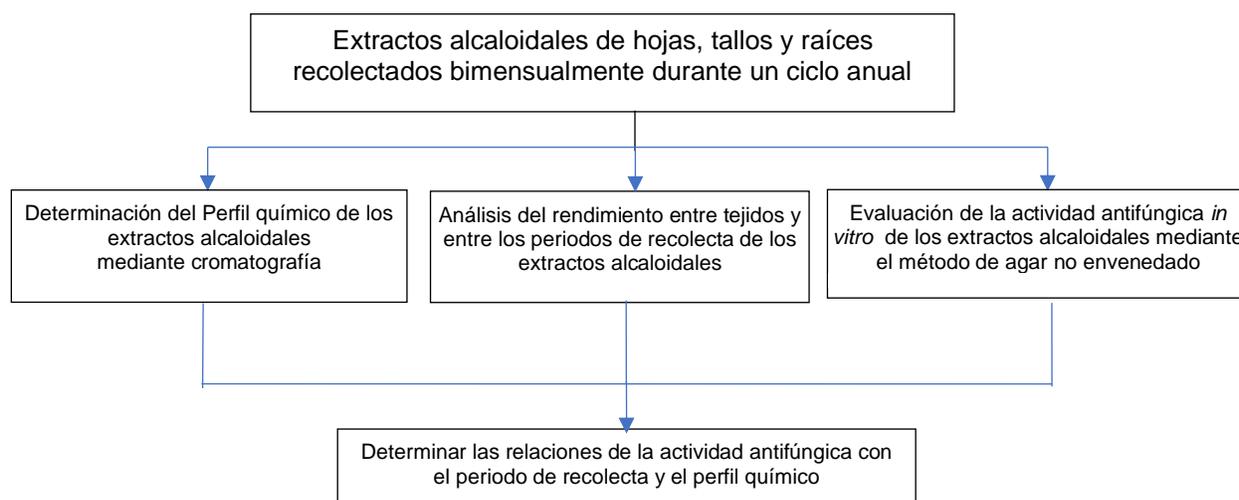


Figura 11. Organización general de las actividades experimentales

6.1 Extractos alcaloidales de *Annona macrophyllata*

Los extractos se obtuvieron del Laboratorio de fisiología y química vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH previamente extraídos del Proyecto CONACYT antes mencionado. Estos comprenden de extractos de recolectas bimestrales de un ciclo anual en la localidad de Julián Grajales municipio de Chiapa de Corzo, Chiapas de hojas, tallos y raíces de diez árboles adultos de *Annona macrophyllata*.

6.2 Perfil de riqueza y abundancia de alcaloides de extractos alcaloidales

El análisis del perfil químico de los **alcaloides** se realizó por cromatografía en capa fina en placas de sílica gel GF50 de 5x7 cm (grosor de capa de 200 µm con partículas de 5 µm) con indicador de fluorescencia; se utilizó como fase móvil una mezcla de cloroformo: metanol, 9:1. Se aplicaron 15 µL de cada extracto disueltos a 10 mg·mL⁻¹. Se utilizó el reactivo de Dragendorff como revelador específico para alcaloides (Svendsen y Verpoorte, 1983), manchas de colores rojas, naranjas, marrones o pardas-rojizas se consideraron positivos a la presencia de alcaloides (Chong, 2020). Los extractos de los diez árboles fueron reunidos para el análisis cromatográfico y comparación de las seis recolectas.

El número de compuestos en los extractos se asoció al número de manchas positivas al reactivo de Dragendorff. Para situar cada mancha se calculó la distancia recorrida por cada compuesto o factor de retención (fR o Rf en inglés) con respecto a la distancia recorrida por la fase móvil (7 cm), esta es una constante de partición cromatográfica que permite comparar en igualdad de condiciones el número de compuestos en cada extracto. Se utilizó al alcaloide liriodenina como compuesto de referencia, dada su frecuencia en los extractos de anonáceas.

$$Rf = \frac{\text{distancia del compuesto}}{\text{distancia de la fase móvil}}$$

6.3 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos alcaloidales

La actividad antifúngica de los extractos alcaloidales se evaluaron contra los hongos *Aspergillus glaucus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillum niger*, *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum* mediante el método de inhibición micelial en agar papa dextrosa papa (PDA por sus siglas en inglés) a una única concentración de 250 µg·mL⁻¹.

Los extractos disolvieron con MeOH sin sobrepasar el 2.5% de volumen del agar. Para ello se mezcló el PDA con el extracto alcaloidal y después de 48 horas de esterilidad, se colocaron discos del micelio de cada hongo en el centro de las cajas Petri con agar. Se registró la actividad antifúngica cada 24 horas hasta que el medio testigo cubrió la superficie. Todas las evaluaciones se realizaron por quintuplicado utilizando un testigo negativo de PDA con MeOH.

La actividad antifúngica se calculó mediante la fórmula Pandey *et al.*, (1982)

$$\% \text{ de inhibición} = \left| \frac{(D_c - D_t)}{D_c} \right| \times 100$$

Donde: D_c = diámetro del crecimiento en el medio sin extracto y D_t = diámetro del crecimiento en el medio con extracto o fungicida estándar.

6.4 Identificación de alcaloides en los extractos

Para la identificación de las moléculas en los extractos alcaloidales se analizaron las muestras de cada árbol ($n=10$) de acuerdo a las condiciones citadas por Chong (2020). Para ello alícuotas de 1 μL de los extractos disueltos en metanol a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (split a 1:20) fueron analizados en un cromatografo Claurus 600 acoplado a un espectro de masas SQ 650 (Perkin Elmer®). La columna capilar Elite-1 de Perkin Elmer® (32 m x 0.32 mm y 0.25 mm de grosor de película) fue empleada como fase estacionaria. Se utilizó Helio como gas acarreador a un flujo de 1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Las condiciones de la temperatura de la columna consistieron inicialmente de 150 °C por 1 min, con un incremento de 10°C min^{-1} hasta 280 °C y mantenida a esa temperatura por 16 min. La temperatura del inyector fue de 300 °C. La fragmentación de masas se recolectó a 70 ev con 2.89 $\text{scans}\cdot\text{s}^{-1}$ y los fragmentos fueron detectados de 50 a 500 Da, la temperatura de la fuente de iones y la del cuadrupolo fue de 270 °C.

La identidad de los compuestos se confirmó por la concordancia de los espectros de masas con los de la base de datos del NIST (National Institute of Standards and Technology) y con referencias bibliográficas.

Para conocer la diferencia en la riqueza (número de alcaloides) y abundancia (proporción relativa concentration), una vez realizado el perfil cromatográfico, se calcularon y adecuaron los índices de Margalef, Shannon–Wiener y Simpson. (Rocha-Ramírez, 2013; Velázquez-Velázquez *et al.*, 2008). Las adecuaciones consistieron en considerar a los compuestos como especies y el área de cada pico cromatográfico en el cromatograma como la abundancia de las moléculas. Estos índices se calcularon mediante el programa estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2001).

6.5 Análisis Estadísticos

Para el análisis de los rendimientos de extractos alcaloidales, se realizaron comparaciones entre las seis recolectas bimensuales (n=10), que permitió conocer el tejido con mayor rendimiento. Del mismo modo para determinar la potencia de un extracto particular, inicialmente se comparó su potencia sobre los cuatro fitopatógenos y posteriormente cuando el rendimiento lo permitió se realizaron comparaciones entre los tres tejidos (n=5).

También se realizó un análisis de regresión lineal entre el índice de Margaleff y la potencia antifúngica para determinar si ante un mayor quimiodiversidad existe una mayor potencia antifúngica.

Todas las evaluaciones se analizaron estadísticamente mediante análisis no paramétricos de Kruskal-walis y comparaciones múltiples al 95 % de confiabilidad, realizados mediante el programa estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2001)

VII. RESULTADOS

7.1 Producción de extractos alcaloidales de *Annona macrophyllata* durante un ciclo estacional.

Como se mencionó anteriormente, los extractos evaluados biológicamente procedieron de un proyecto más general. El análisis estadístico de los rendimientos de extracción durante el ciclo de recolectas bimensuales permite indicar que la cantidad de alcaloides es diferente entre los tejidos de *A. macrophyllata* y en el tiempo (Cuadro 4), las raíces de forma general tienen mayor volumen de alcaloides (394-761 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MV), entre 1-2 veces más que los tallos (147-397 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y hasta quince veces más que las hojas (20-110 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). En junio no hubo hojas suficientes en los árboles para realizar la obtención de extractos alcaloidales (Cuadro 4).

Hay momentos que en los tejidos acumulan más alcaloides, para las raíces y tallos es un periodo que abarcó de febrero a abril. Para las hojas, octubre representa el momento con mayor número de alcaloides, aunque con cantidades mínimas.

Agrupando los meses de lluvia (junio-agosto-octubre) y los de estiaje (diciembre-febrero-abril), en promedio hay mayor cantidad de alcaloides en el periodo de estiaje que en el de lluvias en las raíces (648 vs 441 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $t=3.6567$, $p=0.0021$) y en los tallos (299 vs 187 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $t=2.6912$, $p=0.0161$), algo que no sucede en las hojas ($p>0.05$).

Cuadro 4. Rendimiento de extractos alcaloidales de *Annona macrophyllata*.

Tejido	Rendimiento de extractos alcaloidales ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MV)*						Análisis estadístico
	Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre	
Hoja	40.1 \pm 13.0 Cbc	20.3 \pm 15.1 Cbc	0.0** Cd	19.9 \pm 9.4 Bc	109.5 \pm 60.1 Ba	50.8 \pm 9.8 Cb	P= 0.01 X ² = 9.8
Tallo	319.5 \pm 53.5 Ba	396.7 \pm 84.1 Ba	179.3 \pm 45.1 Bc	185.7 \pm 61.1 Bc	146.7 \pm 60.8 Bbc	238.2 \pm 46.4 Bab	P= 0.08 X ² = 9.63
Raíz	689.4 \pm 79.9 Aa	760.6 \pm 94.9 Aa	518.4 \pm 99.6 Aab	410.6 \pm 79.6 Ab	394.1 \pm 96.8 Ab	493.1 \pm 56.5 Aab	P= 0.0069 X ² = 15.93
Análisis estadístico	P= 0.007; X ² = 9.8	P=0.0001; X ² =17.57	P=0.001; X ² =8.01	P=0.006; X ² = 7.4	P= 0.012; X ² = 7.31	P= 0.008; X ² =9.6	

*Rendimiento expresado en microgramos por gramo de material vegetal. Las letras en minúsculas representa diferencias entre los meses en un tejido (filas) y las mayúsculas coparaciones diferencias entre los tejidos en un mes (mayúsculas), mediante una separación de Mann-Whitney al 95% después del análisis de Kruskal Wallis que se indica en el cuadro.

** Material vegetal insuficiente para extraer alcaloides

7.2 Actividad antifúngica de *A. macrophyllata*

Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de raíces.

Los extractos alcaloidales de raíces tuvieron la capacidad de inhibir a *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Colletotricum gloeosporoides* y *Aspergillus glaucus* con potencia variable (figura 12 y 13). Los fitopatógenos más sensibles a las moléculas de las raíces fueron *F. oxysporum* y *C. lunata* con inhibiciones de hasta 92.6% y 92.7% respectivamente. En tanto que *C. gloeosporoides* y *A. glaucus* presentaron más resistencia, con tan solo el 40 y 55% de inhibición (figura 13).

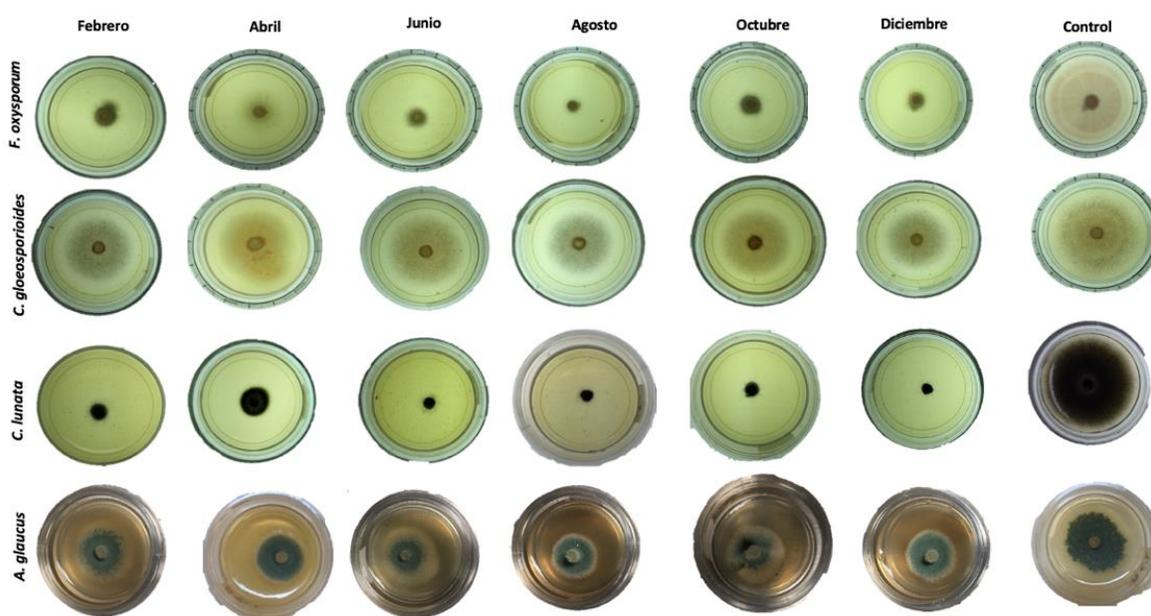


Figura 12. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de raíces de *Annona macrophyllata*.

La potencia antifúngica de los extractos mostraron fluctuaciones temporales con coincidencias y diferencias entre los fitopatógenos, para *F. oxysporum* el extracto de octubre fue el más potente (92.6%), mientras que la menor actividad la demostró el extracto de abril (52.6% de inhibición). Para *C. lunata* varios extractos mostraron potencias cercanas al 90% de inhibición, entre ellos el de octubre fue el más potente (92.7%) y el de abril fue el menos potente (68.1%). Para *C. gloeosporoides* consecuentemente, el extracto de abril también fue el menos potente (9.7%), mientras

que, los otros cinco extractos tuvieron potencias moderadas (30-38.7%). Por lo contrario, para *Aspergillus glaucus* los extractos de febrero (40%) y junio (43%) provocaron las menores inhibiciones y los de abril, agosto y diciembre (50.1-54.3%) las inhibiciones más potentes (Figuras 12 y 13).

Es decir, mientras que, el extracto de octubre es relevante para inhibir a tres de los cuatros fitopatógenos, el de abril lo es para inhibir a *A. glaucus* pero con poca actividad para los otros hongos.

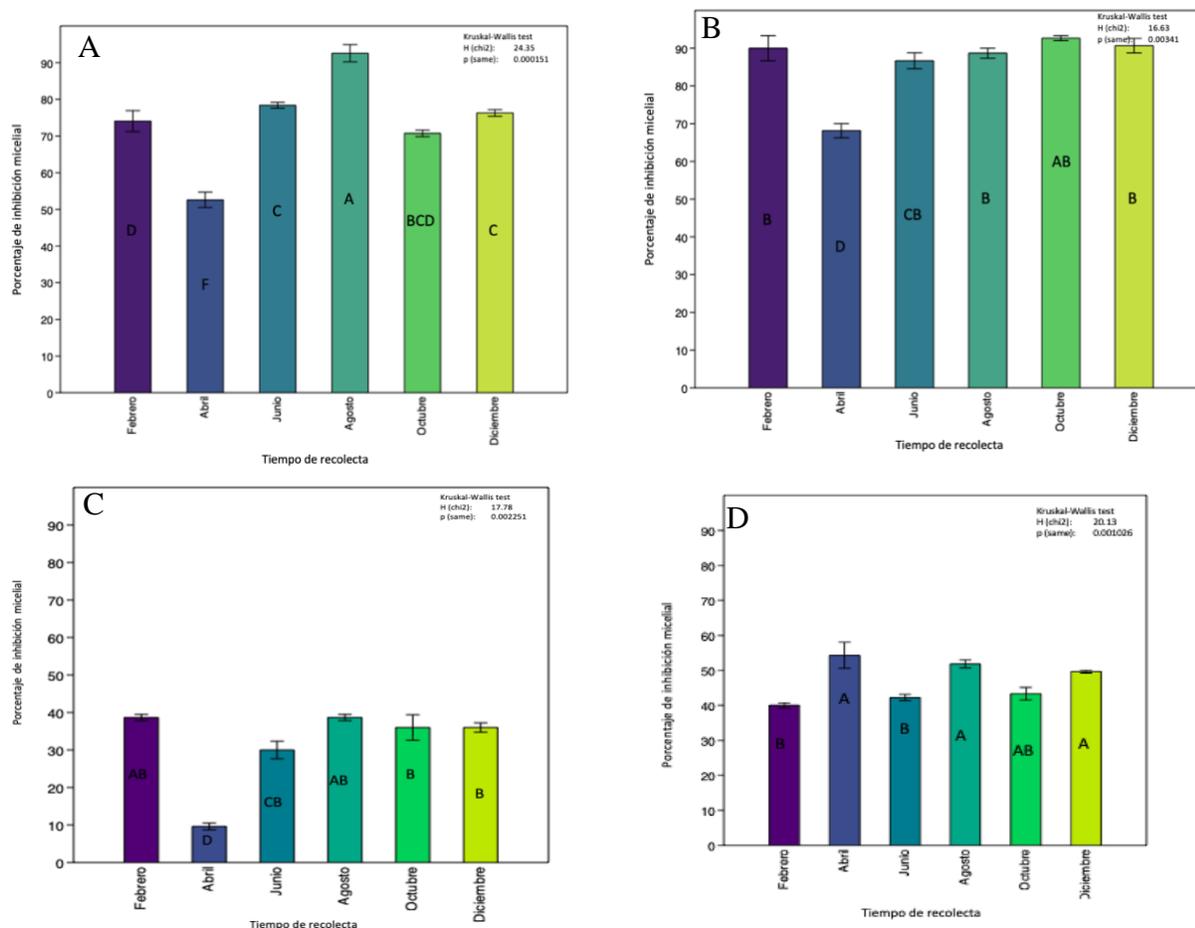


Figura 13. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de raíces de *Annona macropropyllata* sobre A) *Fusarium oxysporum*, B) *Curvularia lunata*, C) *Colletorichum gloeosporoides* D) *Aspergillus glaucus*. Se indica el valor promedio de cinco repeticiones más el error estándar y con letras la separación de promedios mediante la prueba de Mann-Whitney con $p < 0.05$.

Actividad antifúngica de extractos de tallos

Los extractos alcaloidales de tallos inhibieron a *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata* y *Colletotrichum gloeosporioides* pero con potencia variable (Figuras 14 y 15). *F. oxysporum*, *C. lunata* fueron los más sensibles a los alcaloides presentando inhibiciones de hasta 81 y 87% respectivamente, en tanto que, *C. gloeosporioides* fue el más resistente (40% de inhibición micelial).

La sensibilidad que presentaron los fitopatógenos dependió del tiempo de recolecta de los extractos; *F. oxysporum* fue más susceptible al extracto de diciembre con inhibición de 80.6% y más resistente al de febrero (6.7%) y con sensibilidad media (23-49.6 %) a los extractos de abril, junio, agosto y octubre. *C. lunata* fue más sensible a los extractos de junio y agosto (86-87% de inhibición), seguido de los de abril y diciembre (83-84%), ante los extractos de febrero y agosto presentó mas resistencia y su crecimiento micelial solo fue inhbido en una proporción de 20 a 7%. Para *C. gloeosporioides* el extracto de octubre (16.3%) tuvo baja potencia y el de diciembre fue el más activo (37%) (Figuras 14 y 15).

De ello se deduce que el extracto de diciembre es el más relevante al mostrar buena potencia inhibitoria contra los hongos y el de febrero es de poco interés antifúngico dada su baja potencia contra los tres fitopatógenos.

Aspergillus glaucus no fue evaluado porque la cantidad de extractos no fueron suficientes para ello. El mismo motivo imposibilitó una evaluación sistemática de los extractos de las hojas.

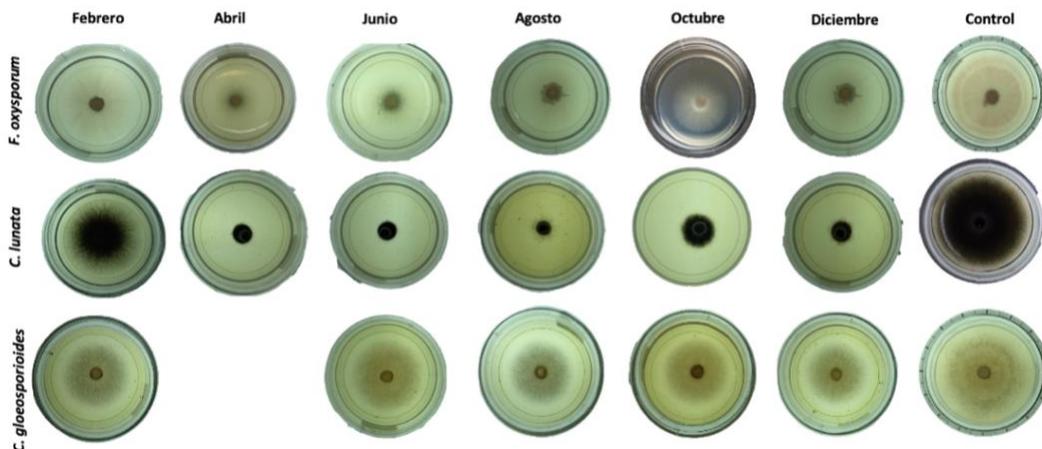


Figura 14. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de tallos de *Annona macrophyllata*.

A

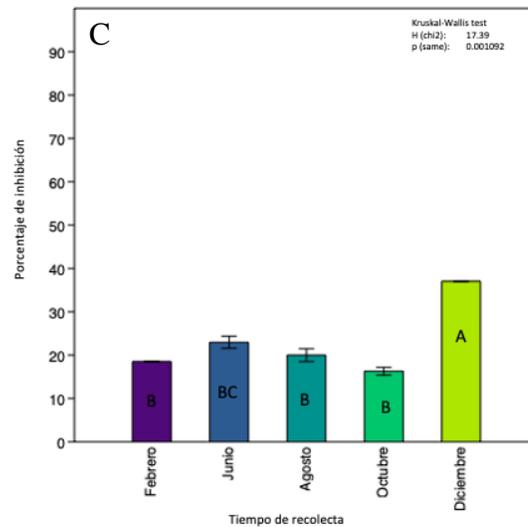
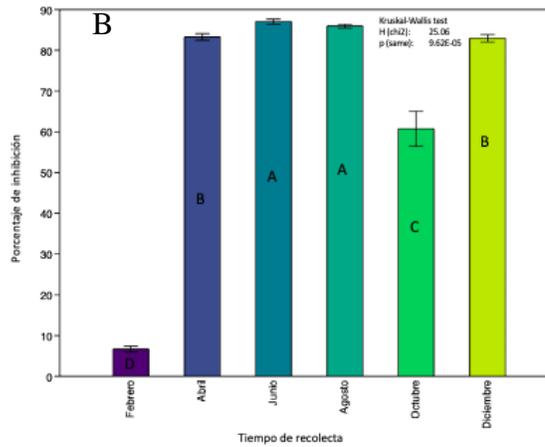
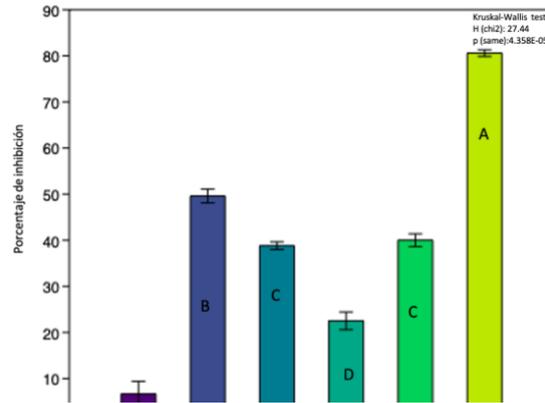


Figura 15. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales de tallos de *Annona macropropyllata* sobre A) *Fusarium oxysporum*, B) *Curvularia lunata*, C) *Colletorichum gloeosporoides*. Se indica el valor promedio de cinco repeticiones más el error estándar y con letras la separación de promedios. Mediante la prueba de Mann-Whitney con $p < 0.05$.

Asociaciones estacionales de la actividad antifúngica

Para determinar si la estacionalidad influye en la actividad antifúngica se reunieron la actividad de los extractos recolectados en los meses de lluvia (junio-agosto-octubre) y los de estiaje (diciembre-febrero-abril) y se compararon como dos grupos generales.

Se detectaron efectos de la estacionalidad en la actividad de los extractos de las raíces sobre *F. oxysporum* y *C. lunata*, en ambos fitopatógenos los extractos de la temporada de lluvias son fueron más potentes que los de la temporada de estiaje. Sobre *C. lunata* la diferencia es ligera pero significativa (6%) y sobre *F. oxysporum* el margen (13%) es más amplio (Cuadro 5).

Para los extractos alcaloidales de tallos, la actividad fueron los de la temporada de sequía son más potentes que los de lluvia con diferencia de 8%.

Cuadro 5. Actividad antifúngica de extractos alcaloides de *Annona macrophyllata* agrupados por estacionalidad.

		Actividad antifúngica de extractos alcaloidales							
		<i>Aspergillus glaucus</i>		<i>Colletorichum gloeosporoides</i>		<i>Curvularia lunata</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
		Sequia	Lluvia	Sequia	Lluvia	Sequia	Lluvia	Sequia	Lluvia
Raíces		47.98 ± 7.67 A	45.79 ± 5.26 A	28.1 ± 13.7 A	34.9 ± 6.3 A	82.3 ± 11.1 B	89.3 ± 4.0 A	67.7 ± 11.9 B	80.6 ± 9.8 A
		t= 0.908; p=0.372		t= 1.742; p=0.092		t= 2.320; p=0.0278		t= 3.233; p=0.0031	
	Tallos			27.8 ± 10.9 A	19.8 ± 3.9 A	57.65 ± 37.3 A	77.9 ± 13.6 A	40.6 ± 8.1 A	36.4 ± 3.9 A
			t= 2.6444; p=0.0145		t= 1.9717; p=0.0586		t= 0.4715; p=0.6409		

7.3 Análisis de composición química de los extractos alcaloidales de *Annona macrophyllata*. (propuesta de esta sección como la segunda 7.2)

Análisis por cromatografía de capa fina (CCF)

Los extractos alcaloidales de raíces, tallos y hojas de *Annona macrophyllata* mostraron reacción positiva al reactivo Dragendorff en CCF, originando manchas de color rojo o marrón con tonos claros u oscuros que fueron consideradas como alcaloides (figura 16), con ello se evidenciaron alcaloides diferentes y comunes entre los extractos y entre los tejidos.

En los extractos de raíces se detectaron hasta seis manchas coloridas (alcaloides) con reacción positiva (Rf: 0.72, 0.32, 0.30, 0.12, 0.1 y 0), en el extracto de diciembre se detectaron hasta cinco posibles alcaloides, solo el segundo de menor polaridad no se detectó (Rf: 0.1), en tanto que en los otros extractos no estuvo presente el compuesto con Rf 0.32. Se puede señalar entonces que hay cuatro alcaloides comunes a los extractos (Rf: 0.72, 0.30, 0.12 y 0) y un alcaloide exclusivo a las raíces (Rf: 0.32). Las manchas comunes se observaron con áreas diferentes, que indicarían proporciones variables entre los extractos (Fig. 16).

En los extractos de tallo se detectaron cinco manchas de alcaloides entre todas las recolectas (Rf: 0, 0.09, 0.25, 0.4, 0.75), solo el extracto de diciembre las presentó todas. De manera particular, el alcaloide con Rf 0.75 es el compuesto con presencia más extendida, se detectó en abril, junio, agosto y diciembre, aunque con área diferente. Los compuestos con Rf 0.4 y 0.21 coinciden con el anterior en agosto y diciembre. Mientras que, el alcaloide con Rf 0.09 es exclusivo del extracto de diciembre.

En hojas se detectó el menor número de manchas positivas a alcaloides, solo tres reacciones de menor intensidad (Rf: 0.71, 0.12 y 0), todas particulares a un solo extracto.

Pareciera que hay algunas manchas que son comunes entre los extractos de todos los tejidos, el más evidente de ellos es un alcaloide cercano a la referencia utilizada, la liriodenina, un alcaloide de mediana polaridad que presenta un Rf de 0.7 en las condiciones de elución cromatográfica de este estudio.

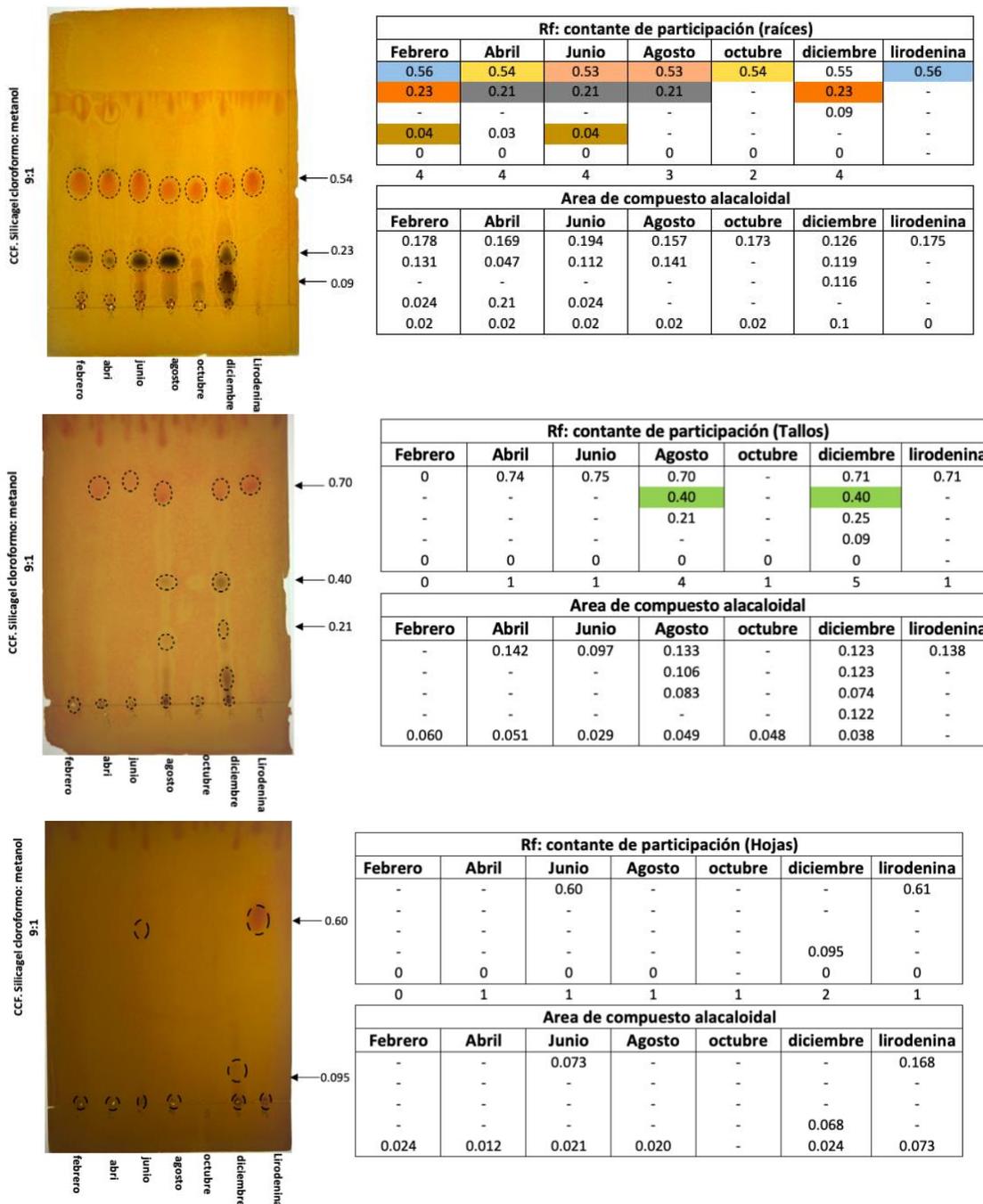


Figura 16. Análisis cromatográfico de los extractos alcaloidales de *Annona macrophyllata* recolectados durante un ciclo anual.

Las placas cromatográficas muestran manchas rojas o de color marrón, que son el resultado de la interacción positiva de alcaloides al reactivo de Dragendoff. Las constantes de partición (Rf) representan la posición de una mancha-compuesto sobre la placa de silicagel con respecto a la longitud de la cromatografía. En los cuadros se exponen las constantes de partición y el área de los compuestos en cm^2 . Los colores indican similitud de compuestos en al menos dos meses.

Identificación de alcaloides por cromatografía de gases-masas de los extractos alcaloides de las raíces que mostraron la mayor potencia.

Los extractos alcaloidales de raíces de *Annona macrophyllata* mostraron la mayor potencia antifúngica y los máximos rendimientos, por ello fueron seleccionados para un análisis de composición química mediante cromatografía de gases acoplado a fraccionamiento de masas (GC-MS).

El análisis por GC-MS permitió identificar 13 picos que corresponden a compuestos que se mantuvieron constantes en todas las repeticiones de los extractos, no necesariamente en todos los tejidos. Siete de ellos no fueron identificados hasta molécula individual dado que la probabilidad de coincidencia en la base de datos de la biblioteca NIST® del cromatógrafo era menor a 95% o eran inconsistentes, todos ellos presentaron considerable abundancia en ciertos meses (Cuadro 6 y 7 y figura 18).

Los seis alcaloides identificados se enlistan en el (Cuadro 6) y se ordenaron por su tiempo de retención, por el número de registro ante el Chemical Abstracts Service (CAS), su nombre común aceptado por la Union Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, siglas en inglés) y su patrón fragmentación en masas obtenidos y comprados ante el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, siglas en inglés).

La intermitencia de moléculas particulares en un ciclo anual mostró la diferencia química que existe entre los extractos de cada mes, evidenciado anteriormente de forma sencilla en las cromatografías de capa fina (Cuadro 7).

Los extractos con más alcaloides fueron los de abril y octubre. Consecuentemente junio fue el extracto de menor número de alcaloides registrados. Algunos alcaloides tienen áreas de abundancias cromatográficas temporales muy pronunciados. Anonaina es un alcaloide presente en todo el año. La papaverina fue el único alcaloide para el extracto de octubre, asimilobina para los de abril y de octubre a diciembre, roemerina estuvo presente de abril a agosto, lirinidina de febrero a abril, y reticulina de octubre a diciembre (Cuadro 7).

La abundancia relativa de los cromatogramas señala que los dos alcaloides más predominantes de raíces fueron anonaina de febrero a agosto y reticulina de octubre a diciembre (Figura 17)

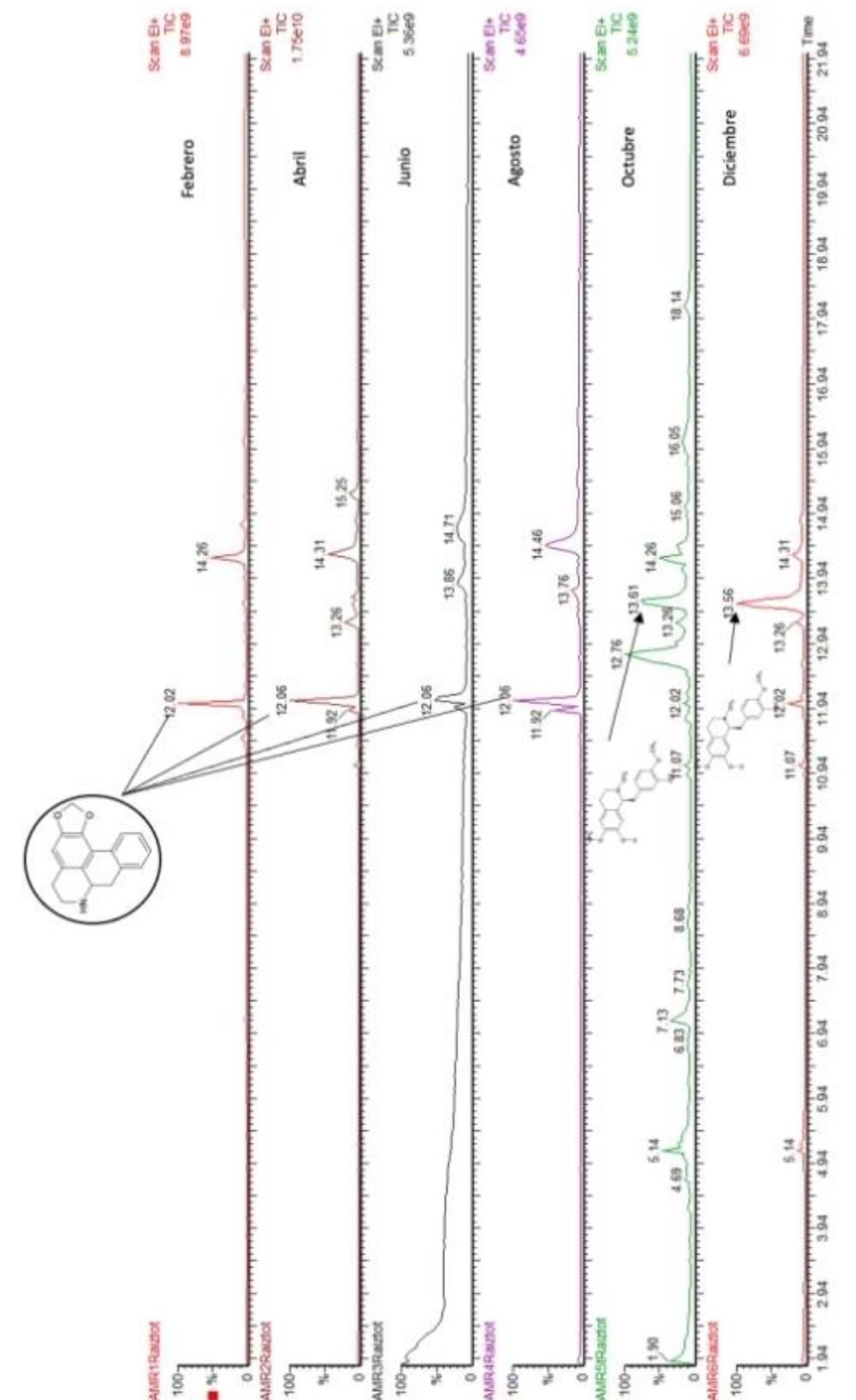


Figura 17. Cromatogramas de extractos alcaloides de raíces *Annona macrophyllata*, obtenido por técnica de cromatografía de gases- masas (GC/MS).

Cuadro 6. GC/MS identificación de alcaloides de raíces de *Annona macrophyllata*

CAS	TR:min	Nombre	GC/MS fragmentación	MS de referencia
	7.13		73(100), 60(85.60), 55(80.23)	NIST(15)
	10.91		280(100) 281(69)266(55)250(40)	NIST(15)
6871-21-2	11.07	Asimilobina	266(100), 267(64.44), 252(22.58)	NIST(15)
54383-28-7	11.37	Lirinidina	280(100),281(61.05), 266(20.679),250(19.88)	NIST(15)
548-08-3	11.92	Roemerina	278(100), 279(59.91), 236(44.81), 178(24.99)	NIST(15)
1862-41-5	12.06	Anonaina	264(100), 265(50.01), 206(21.94)	NIST(15)
	12.76		192(100), 177(35.21), 193(17.96)	NIST(15)
	13.26		192(100), 297(48.78), 268(32.82)	NIST(15)
485-19-8	13.61	Reticulina	192(100), 177(35.88), 192(7.97)	NIST(15)
	13.76		293(100),292(56.02), 251(62.63)	NIST(15)
	14.26	Papaverina	338(100), 339(85.91)324(49.70), 308(47.75),	NIST(15)
	14.31		263(100), 102(41.61), 204(25.47)	NIST(15)
	15.25		277(100), 276(26.85), 278(19.37)	NIST(15)

*Alcaloides no identificados. NIST: National Institute of Standards and Technology.

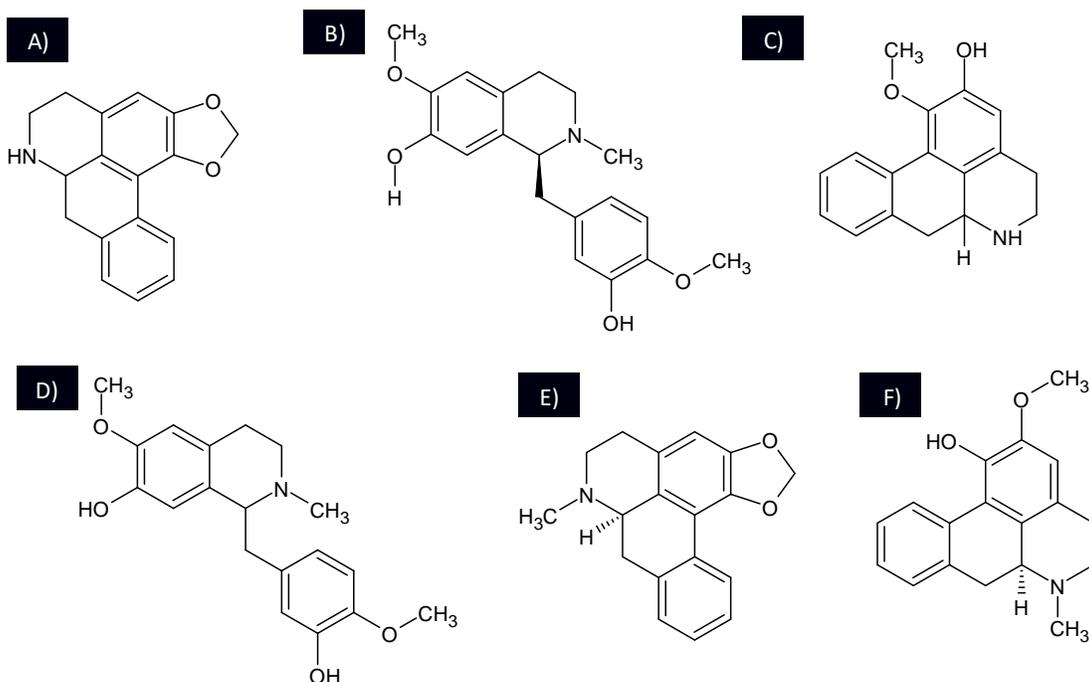


Figura 18. Estructuras orgánicas de alcaloides de *Annona macrophyllata*.

A) Anonaina, B) Reticulina, C) Asimilobina, D) Papaverina, E) Roemerina, F) Lirinidina.

Cuadro 7. Presencia y ausencia de alcaloides durante un ciclo anual de raíces de *Annona macrophyllata*

TR:min	Nombre	Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre
7.13		0	0	0	0	1406540672	0
10.91		0	0	0	0	299381408	0
11.07	Asimilobina	0	1093850240	0	0	467150112	624302016
11.37	Lirinidina	464457344	583953920	0	0	0	0
11.92	Roemerina	0	2270922496	659741824	2293506048	0	0
12.06	Anonaina	8827704320	17393563648	2393506048	4475499520	463782880	1631313024
12.76		0	0	0	0	4675086848	0
13.26		0	3444397824	0	0	733774784	0
13.61	Reticulina	0	0	0	0	3350027776	6332769792
13.76		0	0	0	459142300	0	0
14.26	Papaverina	0	0	0	0	1999044608	0
14.31		4523552256	7527332864	0	2258416806	0	990330240
15.25		0	2270922496	0	0	0	0

Se indica la ausencia y presencia de alcaloides para cada, así como la abundancia relativa de cada molécula.

Quimiodiversidad de alcaloides en raíces.

Los índices de diversidad α de Simpson, Shannon y Margalef adaptados para señalar la quimiodiversidad, resumen la riqueza y abundancia de alcaloides a un número en cada recolecta durante el año. Los extractos de octubre presentaron la quimiodiversidad de alcaloides más alta con los tres índices calculados (Cuadro 8).

Los valores de la diversidad β mediante el índice de Whittaker permitieron identificar que extractos mostraron mayor parecido químico a partir de valores de disimilitud, los extractos más parecidos en su diversidad química fueron los de agosto-junio (0.3333), agosto-febrero (0.4287) y febrero-diciembre (0.4287), y los menos parecidos son los de junio-abril (0.7778) y los de junio-diciembre (0.6667) (cuadro 9).

Cuadro 8 .Indices de diversidad α de alcaloides durante un ciclo anual

Indices de diversidad	Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre
Simpson_1-D	0.4837	0.6801	0.3399	0.6607	0.777	0.5195
Shannon_H	0.7665	1.444	0.5235	1.187	1.715	0.9892
Margalef	0.2766	0.7364	0.1749	0.4378	0.9727	0.4371

Se indican los índices de diversidad Simpson (Valores cerca de 1 mayor diversidad, Valores más cerca a cero menos diversos), Shannon (valores superiores a 3 diversidad alta, valores entre 2 y 3 diversidad en equilibrio, menores de 2 poca diversidad), MARGALEF (valores inferiores a 2 zonas de baja diversidad, valores superiores a 5 son indicativos de alta diversidad)

Cuadro 9. Indice de diversidad β Whittaker de alcaloides durante un ciclo anual.

	Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre
Febrero	0	0.6	0.6	0.42857	0.45455	0.42857
Abril	0.6	0	0.77778	0.63636	0.6	0.63636
Junio	0.6	0.77778	0	0.33333	0.8	0.66667
Agosto	0.42857	0.63636	0.33333	0	0.5	0.5
Octubre	0.45455	0.6	0.8	0.5	0	0.5
Diciembre	0.42857	0.63636	0.66667	0.5	0.5	0

Se indica los valores de diversidad beta, valores cercanos a 0, indican mayor similitud de diversidad entre meses.

Finalmente, se determinaron la relación entre la quimiodiversidad y la actividad antifúngica que presentaron los extractos alcaloidales de las raíces, mediante análisis de regresión bivariada utilizando los índices de diversidad de Margalef de los extractos de cada mes y el porcentaje de inhibición para cada hongo (*F. oxysporum*, *C. gloeosporoides*, *C. lunta* y *A. glaucus*). Para todos los fitopatógenos se encontraron regresiones lineales negativas, ello indica que el potencial antifúngico de los extractos alcaloides de las raíces de *Annona macrophylla* no dependen de la diversidad de alcaloides (Figura 19).

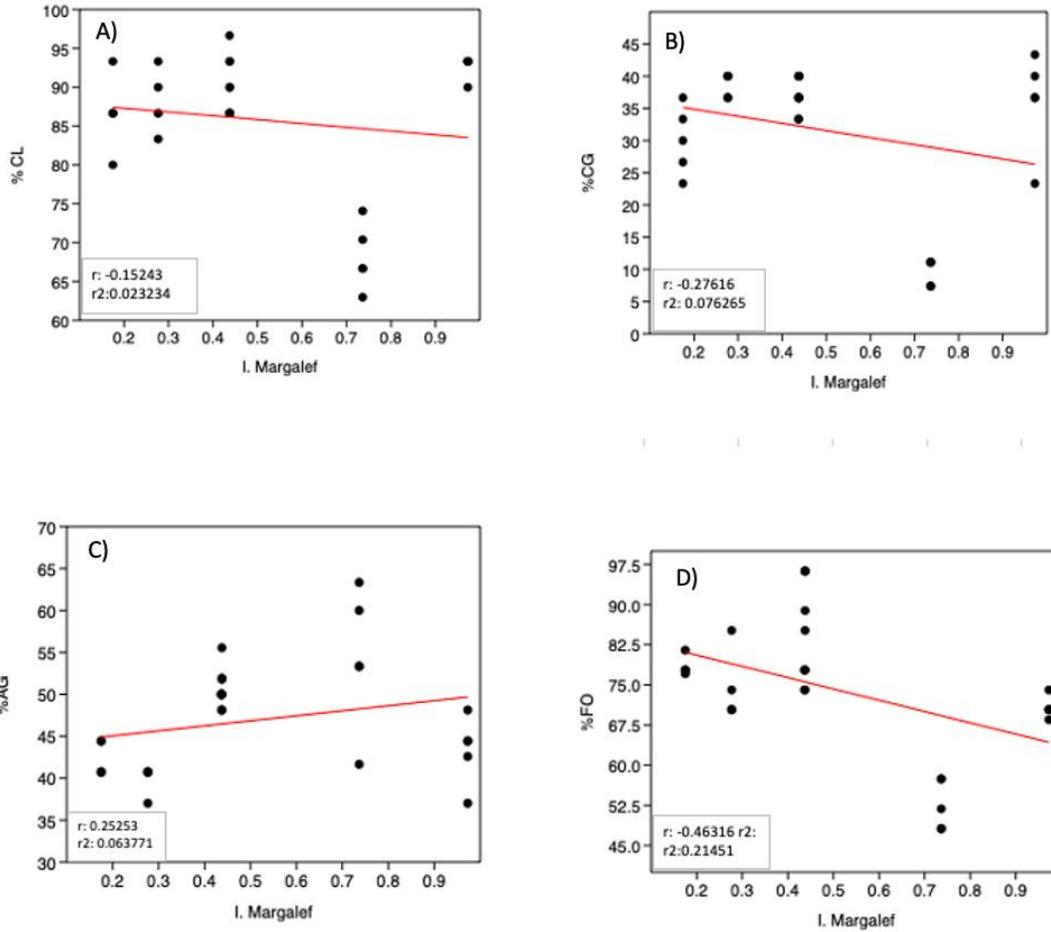


Figura 19. Regresión bivariada sobre el potencial de inhibición y el Índice de Margalef. A) *Fusarium oxysporum*, B) *Curvularia lunata* y c) *Colletorichum gloeosporoides*. Se indica el valor de R así como la regresión lineal mediante graficas.

VIII. DISCUSION

8.1 Rendimiento de extractos de alcaloides

En las anonáceas es frecuente encontrar que las cortezas de las raíces sean los tejidos donde mayor cantidad de alcaloides se detectan (De-la-Cruz-Chacón *et al.*; 2019; Chong, 2020; Ovíle *et al.*, 2021). En este estudio se determinó que las cortezas de las raíces de *Annona macrophyllata* también fueron los tejidos con mayor proporción de alcaloides, acumulando hasta 0.761 mg de alcaloides por gramo de tejido, muy semejante al rendimiento de las raíces de plántulas de la misma especie (0.778 mg por gramo de raíces) o casi dos veces menos que las raíces de árboles adultos (1.7 mg por gramo), aunque no del mismo sitio de recolecta (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2012), un factor relevante a considerar, ello indicaría que la especie muestra una variabilidad en la producción de estos metabolitos secundarios nitrogenados.

En otras anonáceas como en *Annona purpurea* y *Sapranthus campechianus* se detectaron cantidades cercanas a las producidas por *A. macrophyllata* (de 0.859 hasta 1.1 mg de alcaloides por gramo) en un seguimiento anual parecido al de este estudio (De-la-Cruz-Chacón, 2019, Chong, 2020). La abundancia de alcaloides en las cortezas de las raíces conduce a hipotetizar que estos tejidos son posiblemente sitios de almacenamiento de nitrógeno en forma de moléculas secundarias especializadas, o que las anonáceas defienden químicamente estos tejidos con moléculas nitrogenadas bioactivas, dado que se sabe que algunos alcaloides están involucrados en la inhibición de hongos fitopatógenos (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2016).

Por su parte, los extractos de las cortezas de tallos y hojas tuvieron una menor cantidad de alcaloides (0.396 y 0.091 mg g⁻¹ respectivamente). Esto evidenciaría que los tallos, pero principalmente las hojas, son tejidos de bajo almacenamiento alcaloidal en la planta. Otra especie del mismo género, *A. purpurea*, también produce en raíces proporciones de hasta 2 y 1.5 veces más altas que en hojas y tallos (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019). Es probable que los bajos rendimientos de alcaloides de hojas en esta y otras anonáceas este relacionado a una estrategia fenológica y metabólica de la planta, varias anonáceas incluyendo *A. macrophyllata* son caducifolios, en

particular, los árboles de *A. macrophyllata* son caducifolios durante la temporada de estiaje de la selva baja caducifolia donde habitan, perdiendo todas sus hojas al final de ese periodo (González-Esquinca *et al.*, 2016), por lo que producir metabolitos tan elaborados en tejidos transitorios no sería “óptimo” metabólicamente (Sweetlove y Fernie, 2013).

La variación en la producción de alcaloides en anonáceas puede ser atribuidas a factores abióticos (Sousa *et al.*, 2019; Honório *et al.*, 2021; Corrêa *et al.*, 2022). *Annona lutescens*, *A. purpurea* y *Annona crassiflora* aumentaron el contenido de alcaloides en raíces ante el estrés hídrico estacional o modulado (Castro-Moreno *et al.*, 2013; De-la-Cruz *et al.*, 2019; Honório *et al.*, 2021) y disminuyeron la cantidad de alcaloides ante el estrés por inundación (Honório *et al.*, 2021). En tanto que *A. macrophyllata* y *Annona sylvatica* incrementaron la producción de alcaloides en cultivos hidropónicos (Orozco-catillo *et al.*, 2016) en respuesta a condiciones precisas de nitrógeno (30 mM de NO₃⁺ y NH₄⁺ respectivamente) (Orozco-Castillo *et al.*, 2016; Corrêa *et al.*, 2022).

8.2 Actividad antifúngica de extractos alcaloidales.

Los extractos de las anonáceas presentan actividades anticancerígenas, antibacterianas y antifúngicas (Lucio *et al.*, 2015; Moghadamtousi *et al.* 2015; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2020). Entre las actividades menos reportadas se encuentran las antifúngicas sobre fitopatógenos, las que hay sobresalen en número sobre los fitopatógenos del género *Fusarium*, *Aspergillus* y *Colletotrichum* (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015). Los estudios de la actividad sobre fitopatógenos de extractos alcaloidales o de alcaloides de anonáceas es aún incipiente e incluyen a la especie de estudio, a *Annona purpurea*, *Annona muricata*, *Sapranthus microcarpus* y *Sapranthus campechianus* (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2011; De la Cruz Chacón *et al.*, 2019; Chong, 2019, Riley-Saldaña *et al.*, 2022).

La actividad antifúngica de los extractos alcaloidales a 250 ug.mL⁻¹ de *A. macrophyllata* en este estudio fue detectada durante todo el año con potencia variable. Los extractos mas potentes fueron los de las raíces sobre *Curvularia lunata*

(92.7%, IAC 370) y *Fusarium oxysporum* (92.6%, IAC 370), en tanto que *Colletotrichum gloeosporioides* fue más resistente (38.7%, IAC 155).

Los índices de actividad antifúngica comparada (IAC =[% de inhibición/ug.mL⁻¹]) colocarían a *A. macrophyllata* como una de las anonáceas con extractos alcaloidales más potentes (Anexo1), por ejemplo, superior a *A. purpurea* cuyos extractos alcaloidales a la misma concentración (250 ug mL⁻¹) inhibieron a *F. oxysporum* (57%, IAC 229), y *C. lunata* (61% IAC245) (De-la-cruz-Chacón *et al.*, 2019); y a *Sapranthus microcarpus* cuyo extractos inhibieron a *F. oxysporum* (90%, IAC 180), *C. gloeosporioides* (60%, IAC146) y *Curvularia lunata* (76 %) IAC 152) con concentraciones (500 mg.mL⁻¹) dos veces mayor (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019) y más altos aun que *Sapranthus campechianus* sobre *F. oxysporum* (67%, IAC 134) y *C. lunata* (63%, IAC 126) (Chong,2020).

Los extractos alcaloidales de tallos *A. macrophyllata* fueron menos potentes que las raíces, con actividad sobre *Curvularia lunata* (87%, IAC 348), *Fusarium oxysporum* (80.6%, IAC 322) y *Colletotrichum gloeosporioides* (37%, IAC148), pero más potentes que los alcaloides de raíces, tallos y hojas de *A.purpurea* (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019), *S. microcarpus* (De-la-Cruz-Chacón *et al.*,2019) y *S. campechianus* (Chong, 2020).

Otros tipos de extractos no alcaloidales o no exclusivos de alcaloides de anonáceas han sido evaluados contra los hongos estudiados, destacan los extractos metanólicos, hexánicos y cloroformicos (Anexo 1), estos extractos tuvieron actividades (IAC) menores a los alcaloidales de este estudio, a excepción del extracto cloroformico de *A.muricata* hasta hoy extracto es el más potente reportado de las anonáceas esta familia con un IAC de 2350 contra *C. gloesporoides* a 10 ug.mL⁻¹ (Jhonny *et al.*, 2005).

En particular, es la primera vez que se reporta la actividad de extractos alcaloidales de anonáceas sobre *Aspergillus glaucus* de 54 % (IAC de 217), un moho que causa el deterioro de varias semillas (podredumbre), inhibiendo su germinación y generando moléculas (aflatoxinas) que suelen ser muy tóxicas para el humano durante la infestación (Sinavimo, 2022). Existen reportes sobre la actividad de extractos metanólicos y hexánicos de *S. campechianus*, *S.microcarpus*, *A. lutescens* y *A.*

macrophyllata (IAC de 26 a 160) a 500 mg. mL⁻¹; demostrando que la actividad aquí determinada es más alta con una concentración menor.

Debido a la actividad que desarrollaron los extractos alcaloidales contra hongos fitopatógenos, se puede considerar a los alcaloides como el grupo de metabolitos secundarios más activos de las anonáceas para inhibir fitopatógenos (Jhonny *et al.*, 2005; Abdel-Ghany *et al.*, 2015; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2020; Chong, 2020; Pripdeevech y Chukeatirote, 2011; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2011; Srivasrava y Yadav, 2008; Bussaman *et al.*, 2012; Lalitha *et al.*, 2011).

8.3 Relevancia de la quimiodiversidad de los extractos alcaloidales de las raíces de *A. macrophyllata*

En las anonáceas se han aislado cerca de 950 alcaloides, la más reciente revisión reporta cerca de 254 plantas estudiadas (Lucio *et al.*, 2015), entre los que destacan los bencilisoquinolínicos (ABI) por su abundancia. En este trabajo el perfil químico de la raíces de *A. macrophyllata* durante todo el año consistió de 13 alcaloides, seis de ellos fueron identificados hasta molécula, todos son ABI, dos ABI simples (reticulina y papaverina) y cuatro aporfinas (asimilobina, lirinidina, romerina, y anonaina) (Cuadro 6), varias de ellas han reportado en otras especies del género *Annona*, *Anomianthus* y *Artabotrys*, quizá la anonaina es el alcaloide de las anonáceas más frecuentemente encontrado (Li *et al.*, 2013), se ha reportado en 57 especies de 26 géneros, en tanto que de los ABI simples, la reticulina es la molécula más frecuente (Lucio *et al.*, 2015); contrario a ellos la papaverina, es un alcaloide raro en las anonáceas reportado solamente en raíces y tallos de *A. purpurea* (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019).

Para *A. macrophyllata* existe reportes de alcaloides identificados (liriodenina, aterospermidina y lisicamina) en raíces, tallos y hojas, ninguno de ellos fueron detectados en este estudio; aunque no queda claro el hecho de la ausencia de la liriodenina, dado que es un alcaloide constantemente reportado en la especie y en la CCF es clara su presencia. Algunos químicos reconocidos en el aislamiento de alcaloides señalan que hay una interconversión entre anonaina y liriodenina bajo ciertas condiciones de luz y disolventes como el metanol (Diego Cortés, comunicación personal), lo que pudiera explicar la ausencia de liriodenina y la presencia de anonaina,

dado que los extractos para el análisis cromatográfico fueron disueltos en metanol. También existe la posibilidad de que esté en concentraciones muy altas y el espectrómetro de masas se sature de las señales electrónicas y omita su presencia para dar paso a la detección de los otros alcaloides (Wei *et al.*, 2020), la resolución de ello, es algo fuera del alcance biológico de este trabajo.

Lucio *et al.*, 2015 mencionan que de los 934 alcaloides de anonáceas reportados, alrededor de 100 alcaloides han sido evaluados biológicamente, 23 de ellos contra fitopatógenos (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015). Algunos alcaloides identificados en este trabajo tiene antecedentes para inhibir hongos y bacterias, la anonaina y reticulina ha presentado fuertes actividades contra *Trichophyton rubrum* y *Microsporum gypseum* a $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Paulo, *et al.*, 1992), y contra *Candida albicans* y *C. parapsilosis*, ambas con MIC de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Costa *et al.*, 2013). La papaverina se ha señalado con actividades antivirales contra la influenza y paramixovirus (Aggarwal, 2020), sin embargo, salvo la liriodenina no detectada pero presente en la especie, ningún alcaloide identificado en este trabajo se ha reportado con actividad contra fitopatógenos.

La variación en el perfil químico de los extractos alcaloidales de las raíces de *A. macrophyllata* puede ser explicado por los factores bióticos y abióticos que ocurren durante el año en el sitio de estudio de especies que pertenece a la Selva Baja Caducifolia, por ejemplo se ha visto que el estrés hídrico en la temporada de sequía parece ser el factor que induce una mayor número de alcaloides o una cantidad más alta de alguno de ellos (Castro-Moreno, 2013; González-Esquinca *et al.*, 2016; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019). Ello significa que la regulación para la biosíntesis de cada alcaloide es particular, por ejemplo, la anonaina es un alcaloide que se presentó durante todo el año, pero con abundancias distintas mientras que papaverina solo fue detectada una vez; algo similar se reportó en las raíces de *A. purpurea* con annomontina y reticulina, la primera estuvo presente durante todo el año y la segunda solo en dos momentos (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019).

IX. CONCLUSIONES

Annona macrophyllata presenta actividad antifúngica y produce alcaloides durante todo el año con variabilidad en su potencia inhibitoria.

- Las raíces de forma general tienen mayor volumen de alcaloides, entre uno y dos veces más que los tallos y hasta quince veces más que las hojas con mayor cantidad de alcaloides en el periodo de estiaje que en el de lluvias.
- Los extractos alcaloidales de raíces son los tejidos más potentes contra los cuatro hongos probados; los hongos más sensibles son *F. oxysporum* y *C. lunata* mientras que *C. gloeosporioides* y *A. glaucus* los más resistentes. El extracto de octubre es relevante para inhibir a tres de los cuatros fitopatógenos, el de abril lo es para inhibir a *A. glaucus*.
- Este es el primer reporte de inhibición de extractos de alcaloides de anonáceas sobre *Aspergillus glaucus*.
- Los extractos de tallos de diciembre mostraron buena potencia inhibitoria contra *F. oxysporum*, *C. lunata* y *C. gloeosporioides*, el extracto de febrero fue el más bajo potencial antifúngico.
- Los extractos de raíces de temporada de lluvias son más potentes que los de la temporada de estiaje para *F. oxysporum* y *C. lunata*.
- Los extractos con más alcaloides fueron los de abril y octubre; y los de junio el de menor número de alcaloides.
- En los extractos de raíces, anonaina es un alcaloide constante en el año, papaverina es un alcaloide esporádico, asimilobina, romeriana, lirinidina y reticulina son alcaloides de presencia intermitente

- Los alcaloides predominantes de los extractos de raíces fueron anonaina de febrero a agosto y reticulina de octubre a diciembre.
- La potencia antifúngica de los extractos alcaloides de las raíces de *Annona macrophylla* no dependen de la diversidad de alcaloides, si no de alguna molécula en particular, se puede inferir a la anonaina como molécula responsable y su variación en abundancia pudiera explicar la variación en la potencia antifúngica de los extractos.

X. RECOMENDACIONES

- Se recomienda proseguir con los estudios de actividad antifúngica con los extractos de las raíces en los meses de mayor actividad y con los fitopatógenos más sensibles para evaluar si la actividad *in vitro* también sucede en modelos *in vivo*.
- Realizar trabajos de aislamiento para determinar que moléculas son las responsables de tal actividad.
- Dilucidar el perfil químico de los extractos de tallos para conocer si hay moléculas comunes entre raíces y tallos, lo que permitiría usar tallos para el aislamiento de moléculas antifúngicas.
- Realizar estudios con *Annona macrophyllata* en otros sitios para determinar si el hábitat afecta la producción de alcaloides y por ende su potencia antifúngica.
- Resolver la situación del porque no fue detectada la liriodenina.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbdElfatah, H. A. S., Sallam, N. M., Mohamed, M. S., & Bagy, H. M. K. 2021. *Curvularia lunata* as new causal pathogen of tomato early blight disease in Egypt. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 3001-3006.
- Ajay Kumar, G. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides*: biology, pathogenicity and management in India. *J Plant Physiol Pathol*, 2, 2.
- Álvarez, E., Ospina, C. A., Mejía De Los Ríos, J. F., & Llano, G. A. 2004. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. *Journal of Phytopathology*, 149(11-12), 629-633.
- Anaya, A. L., Cruz-Ortega, R., & Waller, G. R. 2006. Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Front Biosci*, 11(Suppl 1), 2354.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal (No. 581.1). McGraw-Hill Interamericana.
- Baerheim-Svendsen, A., Verpoorte, R., 1983. Chromatography of Alkaloids: Gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Elsevier Science & Technology*.
- Brechú-Franco, A. E., Laguna-Hernández, G., De la Cruz-Chacón, I., & González-Esquinca, A. R. 2016. In situ histochemical localisation of alkaloids and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. seeds during germination. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 60(1).
- Breedlove, D. E. 1981. Flora of Chiapas. Part 1. Introduction to the Flora of Chiapas. California Academy of Sciences.
- Castro-Moreno, M., Tinoco-Ojangurén, C. L., del Rocio Cruz-Ortega, M., & González-Esquinca, A. R. 2013. Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). *Journal of plant research*, 126(4), 529-537.
- Castro, L., Alzate, M., & Guerrero, G. E. 2010. Estudio preliminar de la bioactividad de extractos de semillas de *Annona cherimolia* de la familia Annonaceae. *Scientia et Technica*, 16(44), 326-330.

- Chang, H. C., Chang, F. R., Wu, Y. C., & Lai, Y. H. 2004. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 20(8), 365-371.
- Chatrou, L. W., Pirie, M. D., Erkens, R. H., Couvreur, T. L., Neubig, K. M., Abbott, J. R., ... & Chase, M. W. 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1), 5-40.
- Chong E. A. 2020. Alcaloides antifúngicos de *Sapranthus campechianus* (Kunth) Standl.: Un recurso natural de la biodiversidad chiapaneca. (Tesis de maestría) Universidad de Ciencia y Artes de Chiapas.
- Corrêa, P. L. C., De-la-Cruz-Chacón, I., Sousa, M. C., Vieira, M. A. R., Campos, F. G., Marques, M. O. M., ... & Ferreira, G. 2022. Effect of Nitrogen Sources on Photosynthesis and Biosynthesis of Alkaloids and Leaf Volatile Compounds in *Annona sylvatica* A. St.-Hil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(1), 956-970.
- Cortes, D., Moreno, L., Párraga, J., Galán, A., & Cabedo, N. 2014. Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPE1), 22-31.
- Costa, E. V., da Cruz, P. E. O., de Lourenço, C. C., de Souza Moraes, V. R., de Lima Nogueira, P. C., & Salvador, M. J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC.(Annonaceae). *Natural product research*, 27(11), 1002-1006.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- De-la-Cruz-Chacón I., González-Esquinca A. R., Fefer P. G. & Garcia L. F. J. 2011. Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 66(7-8): 377-384.
- De-la-Cruz-Chacón, I., & González-Esquinca, A. R. 2012. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural product research*, 26(1), 42- 49.
- De-la-Cruz-Chacón, I.; Riley-Saldaña, C. A.; López-Fernández, N.; Chong-Rodríguez, A.; González-Esquinca, A. R. 2013. *Actividad antifúngica de cuatro especies de anonáceas*. Memorias del V international Congress & Brazilian Meeting about Annonaceae: from gene to exportation. Sao Paulo, Brasil. Pp. 223.

- De-La-Cruz-Chacón, I. y A. R. González-Esquinca. 2015. *Actividad de anonáceas sobre hongos fitopatógenos*. En: Da silva-Almeida, J. R. G.; Oliveira-Júnior, R. G.; De Oliveira, A. P. (org.). *Annonaceae: tópicos seleccionados*. CRV. Brasil. 397-398 pp.
- De- La- Cruz- Chacon, I., Castro Moreno, M., Luna Cazares, L. M., & González Esquinca, A. R. 2016. La familia Annonaceae Juss. en México. *Revista lacandonia*, 10(10), 73-84.
- De-La-Cruz-Chacon, I., & Gonzalez-Esquinca, A. R. 2016. *Desarrollo temprano y defensas químicas de Annona macrophyllata Donn. Smith. (Annonaceae)-Revista LACANDONIA*, 10 (2): 83-94.
- De-la-Cruz-Chacón, I., López-Fernández, N. Y., Riley-Saldaña, C. A., Moreno, M. C., & Esquinca, A. R. G. 2019. Antifungal activity in vitro of *Sapranthus microcarpus* (Annonaceae) against phytopathogens. *Acta Botanica Mexicana*, 126, 5.
- De-la-Cruz-Chacón, I.; Riley-Saldaña, C. A.; López-Fernández, N.; Chong-Rodríguez, A.; González-Esquinca, A.R. 2020. Estudios de la actividad antifúngica de anonáceas de la selva baja caducifolia de Chiapas. Anonáceas. Plantas antiguas. Estudios recientes. Parte 3. Pp.114
- Delgoda, R., y Murray, J. E. 2017. Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. In *Pharmacognosy* pp. 93-100. Academic Press
- De- la - Cruz- Chacón, I., Riley- Saldaña, C. A., Arrollo - Gómez, S., San Cristóbal-Domínguez, T. J., Castro-Moreno, M., & González-Esquinca, A. R. 2019. Spatio-Temporal Variation of Alkaloids in *Annona purpurea* and the Associated Influence on Their Antifungal Activity. *Chemistry & biodiversity*, 16(2), e1800284.
- Del-Carmen-Rejón-Orantes, J., González-Esquinca, A. R., de la Mora, M. P., Roldan, G. R., & Cortes, D. 2011. Annonomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta medica*, 77(04), 322-327.
- Etse, J. T., & Waterman, P. G. 1986. Alkaloids and an acetylenic lactone from the stem bark of *Sapranthus palanga*. *Phytochemistry*, 25(8), 1903-1905.
- Farrera Sarmiento, O. 2011. Aspectos etnobotánicos de anonáceas en Chiapas. En: González-Esquinca A. R.; Luna-Cazares, L. M.; Gutiérrez-Jiménez J.; Schlie-Guzmán M. A.; y Vidal-López D. G. *Anonáceas plantas antiguas, estudios recientes*, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

- Fester, K. 2010. Plant alkaloids. eLS.
- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). México D.F.: Offset Larios.
- García, A. Á., & Carril, E. P. U. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- García, J. H. G., Ocampo, D. M., Ocampo, R., & Gutiérrez-Cárdenas, P. D. A. (2012). Actividad tóxica de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimolioides* (annonaceae) sobre *Artemia Salina*. *Biol. Cient. Mus. Hist. Nat*, 17-22.
- González-Esquinca, A. R. 2005. La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Ciencia y tecnología en la frontera*. 3: 41-52
- Gonzalez Esquinca, A. R., y Castro Moreno, M. 2008. Papel ecológico de los metabolitos secundarios. *Revista LACANDONIA*.
- González-Esquinca, A. R. 2013. Actividad antifúngica de cuatro especies de anonáceas. Memorias del V international Congress & camp; Brazilian Meeting about Annonaceae: from gene to exportation. Sao Paulo, Brasil. Pp. 223
- González-Esquinca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., & Riley-Saldaña, C. A. 2014. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 01-16.
- González-Esquinca, A. R., De-la-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., & Riley-Saldaña, C. A. 2016. Phenological strategies of *Annona* species from the tropical deciduous forest of Chiapas, Mexico. *Botanical Sciences*, 94(3), 531-541.
- Hartmann, T. 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.
- Hernández Fuentes, L. M., Montalvo González, E., García Magaña, M. D. L., Anaya Esparza, L. M., Nolasco González, Y., Villagrán, Z., ... & Morelos Flores, D. A. 2021. Current Situation and Perspectives of Fruit Annonaceae in Mexico: Biological and Agronomic Importance and Bioactive Properties. *Plants*, 11(1), 7.

- Honório, A. B. M., De-la-Cruz-Chacón, I., Martínez-Vázquez, M., da Silva, M. R., Campos, F. G., Martin, B. C., ... & Ferreira, G. 2021. Impact of Drought and Flooding on Alkaloid Production in *Annona crassiflora* Mart. *Horticulturae*, 7(10), 414.
- Hsieh, T. J., Liu, T. Z., Chern, C. L., Tsao, D. A., Lu, F. J., Syu, Y. H., ... & Chen, C. H. 2005. Liriodenine inhibits the proliferation of human hepatoma cell lines by blocking cell cycle progression and nitric oxide-mediated activation of p53 expression. *Food and chemical toxicology*, 43(7), 1117-1126.
- Hoyos Roldán, A. F., Mora Páez, G. A., & Gómez Barrera, M. 2018. Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad biológica del extracto etanólico de las semillas de la guanábana (*annona muricata* L.) *agroecología*.
- INEGI (2014) Datos vectoriales de carta de uso de suelo y vegetación escala 1:250 000, Serie V.
- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Julián-Loeza, A. P., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B. S., & Salas-Coronado, R. 2011. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1262-1268.
- Kessler, A., & Kalske, A. 2018. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 115-138
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A., & Aguado Rodríguez, G. J. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1189-1198.
- Leboeuf M., Cavé A., Bhaumik P. K., Mukherjee B. & Mukherjee R. 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*. 2(12): 2783-2813.
- Li, C., Yang, J., Li, W., Sun, J., & Peng, M. 2017. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish. *Plant Disease*, 101(12), 2073-2078.
- Li, H. T., Wu, H. M., Chen, H. L., Liu, C. M., & Chen, C. Y. 2013. The pharmacological activities of (-)-anonaine. *Molecules*, 18(7), 8257-8263.
- Liu, Y. C., Chen, Z. F., Liu, L. M., Peng, Y., Hong, X., Yang, B., ... & Orvig, C. 2009. Divalent later transition metal complexes of the traditional chinese medicine

- (TCM) liriodenine: coordination chemistry, cytotoxicity and DNA binding studies. *Dalton Transactions*, (48), 10813-10823.
- Loyola-Vargas, V. M., Sánchez-Iturbe, P., Canto-Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L. C., Galaz-Ávalos, R. M., & Moreno-Valenzuela, O. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1), 67-94.
- Lucio, C. A. S. S.; da Silva-Almeida, J. R. G.; Da-Cunha, E. V. L.; Tavares, J. F.; Barbosa-Filho, J. M. 2015. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a compilation of their biological activities. In: Knolker, H.J. The alkaloids volumen 74. *Elsevier*. Pp. 233-409.
- Ma, W. J., Yang, X., Wang, X. R., Zeng, Y. S., Liao, M. D., Chen, C. J., ... & Jia, D. M. 2014. First report of anthracnose disease on young stems of Bawanghua (*Hylocereus undatus*) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in China. *Plant disease*, 98(7), 991-991.
- Maas, P. J., Westra, L. Y. T., Rainer, H., Lobao, A. Q., & Erkens, R. H. 2011. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. *Nordic Journal of Botany*, 29(3), 257-356.
- Martínez-Bolaños, M., Téliz-Ortíz, D., Mora-Aguilera, A., Valdovinos-Ponce, G., Nieto-Ángel, D., García-Pérez, E., & Sánchez-López, V. 2015. Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del fruto de litchi (*Litchi chinensis* Soon.) en Oaxaca, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(2), 140-155.
- Martínez-Velarde M.F. 2015. Revisión taxonómica de Annonaceae juss. Del estado de Guerrero, México. (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México.
- Masratul-Hawa, M.; Saleh, B.; Latiffah, Z. 2009. First report of *Curvularia lunata* on Red-Fleshed Dragon Fruit (*Hylocereus poyrhizus*) in Malaysia. *The American Phytopathological Society*. 93 (9): 971
- Matsuura, H. N., & Fett-Neto, A. G. 2015. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. *Plant toxins*, 2(7), 1-15.
- Mew, T. W. and J. K. Misra. 1994. A manual of rice seed health testing. IRRI. Filipinas.
- Michielse, C. B., & Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 10(3), 311-324.

- Miranda, F. 2015. La vegetación de Chiapas. UNICACH (Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas).
- Mithöfer, A., & Boland, W. 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology*, 63, 431-450.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15625-15658.
- Mongkol, R., Piapukiew, J., & Chavasiri, W. 2016. Chemical constituents from *Melodorum fruticosum* Lour. Flowers against plant pathogenic fungi. *Agriculture and Natural Resources*, 50(4), 270-275.
- Mulleried, F. K. G. 1957. La geología de Chiapas. Gobierno Constitucional de estado del estado de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez. Chiapas.
- Mycobank. 2021. Fungal Databases, Nomenclature and species banks <http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx> (consulta: 25 octubre de 2021)
- Naczk, M., & Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Orantes-García, C., Moreno-Moreno, R. A., Caballero-Roque, A., & Farrera-Sarmiento, O. 2018. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de comunidades campesinas e indígenas de la Selva Zoque, Chiapas, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 17(5), 503-521.
- Orozco-Castillo, J. A., Cruz-Ortega, R., Martínez-Vázquez, M., & González-Esquinca, A. R. 2016. Aporphine alkaloid contents increase with moderate nitrogen supply in *Annona diversifolia* Saff.(Annonaceae) seedlings during diurnal periods. *Natural Product Research*, 30(19), 2209-2214.
- Otero-Sánchez, M. A., Becerril-Román, A. E., Castillo-Morales, A., Michel-Aceves, A. C., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., & Rebolledo-Martínez, A. 2006. Producción de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) en el trópico seco de Guerrero, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2), 137-143.
- Otero-Sánchez, M. A., Ruiz-Posadas, L. M., Becerril-Román, A. E., Tijerina-Chávez, L., Engleman, E. M., & Castillo-Morales, A. 2005. Crecimiento, relaciones hídricas e intercambio gaseoso de plantas jóvenes de ilama (*Annona*

- diversifolia Saff.) en condiciones de estrés hídrico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(1), 59-65.
- Otero-Sánchez, M. A., Ruiz-Posadas, L. M., Becerril-Román, A. E., Michel-Aceves, A. C., Barrios-Ayala, A., & Ariza-Flores, R. 2015. Fenología Y Fisiología de ilama (*Annona diversifolia* Saf.). *AGRO*, 249.
- Ovile Mimi, C., De-la-Cruz-Chacón, I., Caixeta Sousa, M., Aparecida Ribeiro Vieira, M., Ortiz Mayo Marques, M., Ferreira, G., & Silvia Fernandes Boaro, C. (2021). Chemophenetics as a tool for distinguishing morphotypes of *annona emarginata* (schltdl.) H. Rainer. *Chemistry & Biodiversity*, 18(10), e2100544.
- Padrón, H. Y. M., Delgado, S. H., Méndez, C. A. R., & Carrillo, G. V. 2013. El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista mexicana de fito patología*, 31(2), 126-146.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. 2015. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*, 44(1), 33-43.
- Pichersky E. and E. Lewinsohn. 2011. Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual Review Plant Biology*. 62: 549-66.
- Porras-Loaiza, A. P., & López-Malo, A. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-134.
- Robles Yerena, L., Leyva Mir, S. G., Cruz Gómez, A., Camacho Tapia, M., Nieto Ángel, D., & Tovar Pedraza, J. M. 2016. *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(36), 25-36.
- Rocha-Loredo, A. G., Ramírez-Marcial, N., & González-Espinosa, M. 2010. Riqueza y diversidad de árboles del bosque tropical caducifolio en la Depresión Central de Chiapas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 87, 89-103.
- Rodríguez, A. T., Dávila, J. F. R., Siclán, M. L. S., Vildózola, Á. C., Zamora, F. I. M., & Díaz, A. V. L. 2020. Distribución espacial de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en aguacate en el Estado de México, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 72-81.
- Rohwedder, J. J., Simmons, J. L., Colfer, H., & Gatmaitan, B. 1979. Disseminated *Curvularia lunata* infection in a football player. *Archives of internal medicine*, 139(8), 940-941.

- Roncero, M. I. G., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., Maceira, F. I. G., Madrid, M. P., Caracuel, Z., ... & Di Pietro, A. 2003. Fusarium as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2), 87- 98.
- Saito, M. L. 1995. Revisão da fitoquímica de Annonaceae Jussieu. Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE).
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ... & Frisvad, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.
- Schatz, G., Maas, P., Maas-Van de Kamer, H., Westra, L., & Wieringa, J. 2018. Revision of the Neotropical genus *Sapranthus* (Annonaceae). *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 63(1), 54-66.
- Schlie Guzman, M. A., Burguete Argueta, N. A., & Gonzalez Esquinca, A. R. 2016. Actividad inhibitoria de la liriodenina en la linea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7. *Revista LACANDONIA*, 10(2)
- Schlie-Guzmán, M. A., García - Carrancá, A., & González -Esquinca, A. R. 2009. In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin - 2 of *annona diversifolia* saff. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(8), 1128-1133.
- Sharma, M., & Kulshrestha, S. 2015. *Colletotrichum gloeosporioides*: an anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12(2), 1233-1246.
- Sinavimo, Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas. 2022. *Aspergillus glaucus*. <https://www.sinavimo.gob.ar/plaga/aspergillus-glaucus>. Consultado el 27 de septiembre del 2022.
- Singh, S., Das, T., Awasthi, M., Pandey, V. P., Pandey, B., & Dwivedi, U. N. 2016. DNA topoisomerase-directed anticancerous alkaloids: ADMET-based screening, molecular docking, and dynamics simulation. *Biotechnology and applied biochemistry*, 63(1), 125-137.
- Sinha, SK, Singh, V., Nimaichand, S. y Sinha, RKP 1987. *Curvularia lunata* en jengibre (*Zingiber officinale* Rosc.), Un nuevo registro de hospedante de Bihar. *Revista india de patología vegetal* , 5 (2).
- Snyder, W. C., & Hansen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27(2), 64-67.

- Sousa, M. C., Bronzatto, A. C., Gonzalez-Esquinca, A. R., Campos, F. G., Dalanhol, S. J., Boaro, C. S. F., ... & Ferreira, G. 2019. The production of alkaloids in *Annona cacans* seedlings is affected by the application of GA4+ 7+ 6-Benzyladenine. *Biochemical Systematics and Ecology*, 84, 47-51.
- Stevenson, P. C., Nicolson, S. W., & Wright, G. A. 2017. Plant secondary metabolites in nectar: Impacts on pollinators and ecological functions. *Functional Ecology*, 31(1), 65-75.
- Sweetlove LJ, Fernie AR. 2013. The spatial organization of metabolism within the plant cell. *Annual Review of Plant Biology* 64: 723–746
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2006. Plant physiology. 4th edition. Sinauer Associates. USA.
- Tapia, C., & Amaro, J. 2014. Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86.
- The Plant List. 2016. Published on the Internet. <http://www.theplantlist.org> (accessed 19th January 2015).
- Theis, N., & Lerchau, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3), S93-S102.
- Tjamos, E. C., & Beckman, C. H. (Eds.). 2013. Vascular wilt diseases of plants: basic studies and control. *Springer Science & Business Media*. (28)
- Tovilla U. F. (2019) *Factores edafoclimáticos altitudinales como moduladores de la producción de aceites y acetogeninas en semillas de Annona macrophyllata*. (Tesis de licenciatura) Universidad de Ciencia y Artes de Chiapas.
- Tropicos Missouri Botanical Garden. 2021. Publicado en Internet. <http://tropicos.org>, (consultado el 8 de Septiembre de 2021).
- Valle-Guadarrama, S., Ruiz-Sánchez, X. G., Saucedo-Veloz, C., Gómez-Cruz, A., & Marroquín-Andrade, L. M. 2012. Comportamiento postcosecha de frutos de ilama (*Annona diversifolia*) en madurez comestible almacenados en atmósfera modificada. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(SPE5), 75-81.
- Velázquez-Silva, A., García-Díaz, S. E., Robles-Yerena, L., Nava-Díaz, C., & Nieto-Ángel, D. 2018. Primer reporte del género *Colletotrichum* spp. en frutos de

- pimienta gorda (*Pimenta dioica*) en Veracruz, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(2), 342-355.
- Wei, A. A. J., Joshi, A., Chen, Y., & McIndoe, J. S. 2020. Strategies for avoiding saturation effects in ESI-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 450, 116306.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73, 115-180.
- Whittaker, R. H., & Feeny, P. P. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171(3973), 757-770.
- Wind, CA y Polack, FM 1970. Queratotoxicosis por *Curvularia lunata*. *Archivos de Oftalmología*, 84 (5), 694-696.
- Wink, M. 2006. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. *Advances in Phytomedicine*, 3, 251-268.
- Wink, M. 2010. Introduction In: Annual plant reviews volumen 39: Functions and Biotechnology of plant secondary metabolites. 2nd edition. Wiley-Blackwell. Sigapore. Pp. 1-16.
- Wink, M. 2016. Evolution of Secondary Plant Metabolism. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
- Wu, Y. C., Duh, C. Y., Wang, S. K., Chen, K. S., & Yang, T. H. 1990. Two new natural azafluorene alkaloids and a cytotoxic aporphine alkaloid from *Polyalthia longifolia*. *Journal of natural products*, 53(5), 1327-1331.
- Yang, L., & Stöckigt, J. 2010. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. *Natural product reports*, 27(10), 1469-1479
- Yuan, W., Tian, P., Lyu, A., Lyu, Y., Zhang, W., Wei, S., & Hu, Y. 2020. Anti-fungal properties of Puroindoline A against *Aspergillus glaucus*. *Grain & Oil Science and Technology*, 3(1), 1-8.
- Zhai, H. C., Zhang, S. B., Huang, S. X., & Cai, J. P. 2015. Prevention of toxigenic fungal growth in stored grains by carbon dioxide detection. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4), 596-603.
- Zhang, D., Wang, F., Zhao, J., Sun, J., Fu, D., Liu, K., ... & Xue, C. 2019. Virulence, molecular diversity, and mating type of *Curvularia lunata* in China. *Plant disease*, 103(7), 1728-1737

XII. ANEXOS

Anexo 1. Índice de actividad antifúngica comparada en la familia Annonaceae

IAC	Especie	Familia	Tejido	Extracto	Fitopatógeno	% de inhibición	Referencia	concentración
2350	<i>A. murica</i>	Annonaceae	Hoja	CHCl3	<i>C.gloeosporioides</i>	24	1	0.01
486	<i>D. chinensis</i>	Annonaceae	Tallo	CH2Cl3	<i>C.lunata</i>	97	2	0.2
370	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloide	<i>C.lunata</i>	92.7	...	0.25
370	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloidal	<i>F.oxysporum</i>	92.6	...	0.25
348	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Tallo	Alcaloide	<i>C.lunata</i>	87	...	0.25
322	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Tallo	Alcaloide	<i>F.oxysporum</i>	80.6	...	0.25
254	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloide	<i>C.gloeosporioides</i>	63.5	3	0.25
245	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloide	<i>C.lunata</i>	61.3	3	0.25
229	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloide	<i>F.oxysporum</i>	57.4	3	0.25
217	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloide	<i>A.glaucus</i>	54.3	...	0.25
188	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Raíz	alcaloide	<i>A.glaucus</i>	47	4	0.25
180	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Raíz	alcaloides	<i>F.oxysporum</i>	90	4	0.5
174.8	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Tallo	Alcaloide	<i>C.lunata</i>	43.7	3	0.25
174	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Hoja	Alcaloide	<i>C.lunata</i>	43.5	3	0.25
160	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Tallo	MeOH	<i>A.glaucus</i>	80	5	0.5
156	<i>A. lutescens</i>	Annonaceae	Tallo	MeOH	<i>A.glaucus</i>	78	5	0.5
154.8	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloides	<i>C.gloeosporioides</i>	38.7	...	0.25
152	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloide	<i>C.lunata</i>	76	4	0.5
148	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Hoja	Alcaloide	<i>C.gloeosporioides</i>	37	3	0.25
148	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Tallo	Alcaloides	<i>C.gloeosporioides</i>	37	...	0.25
146	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloides	<i>C.gloeosporioides</i>	73	4	0.5
144	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Tallo	alcaloides	<i>F. oxysporum</i>	72	6	0.5
134	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Raíz	alcaloides	<i>F.oxysporum</i>	67	6	0.5
130.4	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Tallo	Alcaloide	<i>C.gloeosporioides</i>	32.6	3	0.25
126	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Tallo	Alcaloide	<i>C.lunata</i>	63	6	0.5
126	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Raíz	Alcaloide	<i>C.lunata</i>	63	6	0.5
120	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Tallo	MeOH	<i>C.gloeosporioides</i>	60	5	0.5
120	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Hoja	MeOH	<i>A.glaucus</i>	60	5	0.5
120	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Tallo	MeOH	<i>A.glaucus</i>	60	5	0.5
110	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Hoja	MeOH	<i>C.gloeosporioides</i>	55	5	0.5
100	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Hoja	MeOH	<i>A.glaucus</i>	50	5	0.5
100	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Tallo	Hex	<i>A.glaucus</i>	50	5	0.5
99.2	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Hoja	Alcaloide	<i>F.oxysporum</i>	24.8	3	0.25
92	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Hoja	alcaloide	<i>A.glaucus</i>	46	4	0.5
90	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Tallo	MeOH	<i>C.gloeosporioides</i>	45	5	0.5
86	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Tallo	alcaloide	<i>A.glaucus</i>	43	4	0.5
80	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Hoja	Hex	<i>C.gloeosporioides</i>	40	5	0.5
80	<i>A. lutescens</i>	Annonaceae	Hoja	MeOH	<i>A.glaucus</i>	40	5	0.5
76	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Raíz	MeOH	<i>A.glaucus</i>	38	5	0.5
71.2	<i>A. purpurea</i>	Annonaceae	Tallo	Alcaloide	<i>F.oxysporum</i>	17.8	3	0.25
70	<i>A. lutescens</i>	Annonaceae	Tallo	MeOH	<i>C.gloeosporioides</i>	35	5	0.5
66	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Hoja	Alcaloides	<i>C.gloeosporioides</i>	33	6	0.5
60	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Tallo	Hex	<i>A.glaucus</i>	30	4	0.5
50	<i>A. lutescens</i>	Annonaceae	Hoja	MeOH	<i>C.gloeosporioides</i>	25	5	0.5
40	<i>A. lutescens</i>	Annonaceae	Hoja	Hex	<i>C.gloeosporioides</i>	20	5	0.5
40	<i>A. lutescens</i>	Annonaceae	Tallo	Hex	<i>C.gloeosporioides</i>	20	5	0.5
40	<i>S. campechianus</i>	Annonaceae	Tallo	Hex	<i>C.gloeosporioides</i>	20	5	0.5
40	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Raíz	Hex	<i>A.glaucus</i>	10	4	0.25
38	<i>M. fruticosum</i>	Annonaceae	Flores	A. esencial	<i>C.gloeosporioides</i>	38	7	1
36	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Hoja	MeOH	<i>A.glaucus</i>	18	4	0.5
30	<i>Annona macrophylla</i>	Annonaceae	Tallo	Hex	<i>C.gloeosporioides</i>	15	5	0.5
28	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Hoja	Hex	<i>A.glaucus</i>	14	4	0.5
26	<i>S. microcarpus</i>	Annonaceae	Tallo	MeOH	<i>A.glaucus</i>	13	4	0.5
24	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	hoja	MeOH	<i>C.gloeosporioides</i>	12	5	0.5
2.5	<i>A. macrophyllata</i>	Annonaceae	Hoja	Hexánicos	<i>F.oxysporum</i>	50	8	20
1	<i>A. squamosa</i>	Annonaceae	Hoja	MeOH	<i>F.oxysporum</i>	56	9	50
0.8	<i>P. suberosa</i>	Annonaceae	Hoja	Etanólico	<i>F.oxysporum</i>	42	10	50
0.7	<i>A. squamosa</i>	Annonaceae	Hoja	CHCl3	<i>C.gloeosporioides</i>	35	11	5000
0.2	<i>P. longifolia</i>	Annonaceae	Hoja	H2O	<i>C.gloeosporioides</i>	85	12	500

Referencias: 1) Jhonny *et al.*,2005; 2) Abdel Ghany *et al.*, 2015;3) De-la-Cruz-Chacón *et al.*,2019;4) De-la-Cruz-Chacón *et al.*,2019; 5) De-la-Cruz-Chacón *et al.*,2020;6) Chong,2020;7) Pripdeevech y Chukeatirote,2010;8) De-la-Cruz-Chacón *et al.*,2013;9)Dang *et al.*,2011;10)Srivastava y Yadav,2008; 11) Bussaman *et al.*,2012;12)Lalitha *et al.*,2011.

Anexo 2. Cartel científico del XII congreso nacional de micología

Capacidad antifúngica de *Annona macrophyllata* sobre hongos fitopatógenos de relevancia agronómica.



López Morán Innimeii, Riley Saldaña Christian Anabí, Castro Moreno Marisol, González Esquinca Alma Rosa, De la Cruz Chacón Iván.

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas Libramiento Norte-Poniente No. 1150, Colonia Lajas Maciel, CP. 29035, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas México al064116101@unicach.mx, ivan.cruz@unicach.mx, aesquinca@unicach.mx

INTRODUCCION

Las anonáceas presentan actividades anticancerígenas, antibacterianas y antifúngicas mediante la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios entre las actividades menos reportadas se encuentran las antifúngicas^{1,2,3}. Se ha documentado que cerca de 23 alcaloides de Anonáceas llegan inhibir a 13 hongos de los géneros *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Mucor* y *Rhizopus*.⁴

OBJETIVO

Determinar la potencia actividad antifúngica de los extractos alcaloidales de *Annona macrophyllata* durante una etapa anual.

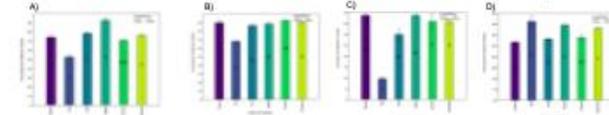
METODO

- 1) La determinación de la actividad antifúngica in vitro de extractos alcaloidales de raíces y tallos y 2) El análisis del perfil de riqueza y abundancia de alcaloides de raíces.



RESULTADOS

Potencial antifúngico de extractos alcaloidales de raíces de *A. macrophyllata*, alcaloides encontrados y su relación durante un año. Los extractos alcaloidales fueron evaluados mediante el método de agar envenenado a concentraciones de 250 mg/mL.

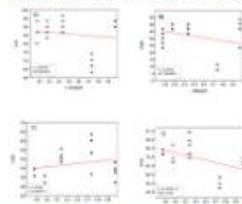


Actividad antifúngica sobre: A) *Aspergillus niger*, B) *Botryodiplodia*, C) *Cladosporium gloeosporioides* y D) *Aspergillus glaucus*. Se indica el valor promedio de cinco repeticiones en el error estándar y se incluye la ecuación de regresión. Mostrar la prueba de Mann-Whitney con p < 0.05.

Presencia y Ausencia de alcaloides durante un ciclo anual de raíces de *Annona macrophyllata*.

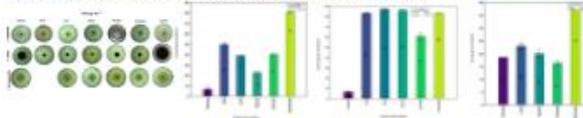
Alcaloide	11/01	02/02	03/03	04/04	05/05	06/06	07/07	08/08	09/09	10/10	11/11	12/12
7.23 CAS 30027-01-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.31 CAS 3151-85-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.07 Anonacina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.07 Linalina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.07 Ruscogenina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.08 Anonacina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.78 CAS 86180-20-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.26 Anilina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.51 Ruscogenina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.76 CAS 86180-20-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.26 Propargilina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.31 CAS 30016-15-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.08 CAS 30016-15-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Correlación de regresión multivariante entre el índice de biodiversidad Margalef y la actividad antifúngica



Regresión lineal sobre el potencial de inhibición y el índice de Margalef. A) *Aspergillus niger*, B) *Botryodiplodia* y C) *Cladosporium gloeosporioides*. Se indica el valor de R en cada la regresión lineal mediante grafías.

Potencial antifúngico de extractos alcaloidales de tallos de *A. macrophyllata* durante un año. Los extractos alcaloidales fueron evaluados mediante el método de agar envenenado a concentraciones de 250 mg/mL.



CONCLUSIONES

Annona macrophyllata produce alcaloides durante todo el año en raíces.

Los extractos alcaloidales de raíces están dentro de los más potentes contra *A. glaucus*, *F. oxysporu*, *C. gloeosporioides* y *C. lunata* de familia anonaceae.

La diversidad de alcaloides no es proporcional a % de inhibición micelial, por lo que algún alcaloide puede ser el responsable de la gran potencia antifúngica que esta planta presenta.

LITERATURA CITADA

- 1) González Esquinca AR. Contribución al estudio fitoquímico de Annonáceas de Chiapas. Tesis de Doctorado. UNAM. México. 2011 pp.
- 2) De la Cruz Chacón I, González Esquinca AR. 2015. Natural Product Research 34 (1): 180-188.



Anexo 3. constancia del congreso nacional XII de micología



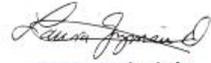


LA SOCIEDAD MEXICANA DE MICOLOGÍA
Y
EL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE
LA UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
OTORGAN LA PRESENTE

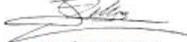
Constancia

A:
**López Morán Innimeii, Riley Saldaña Christian Anabí, Castro Moreno Marisol
González Esquinca Alma Rosa, De la Cruz Chacón Iván**
Por participar con el cartel:
**Capacidad antifúngica de *Annona macrophyllata* sobre hongos
fitopatógenos de relevancia agronómica**
En el marco del XIII Congreso Nacional de Micología,
celebrado del 17 al 21 de octubre de 2022 en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas.




Dra. Laura Guzmán Dávalos
Presidente de la Sociedad Mexicana de Micología


Mtro. Ricardo Hernández Sánchez
Director del ICBIOL-UNICACH


Dr. Felipe Ruan Soto
Presidente del Comité de Organización Local



