



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE  
CICLOPÉPTIDOS OBTENIDOS DEL BAGAZO DE LAS SEMILLAS  
DE *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. en C. MA. ROSA GONZÁLEZ TEPALE**

TUTOR

**DR. LINO JOEL REYES TREJO**  
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

DRA. ROSA LUISA SANTILLÁN BACA

CINVESTAV, IPN

DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX.

marzo 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE  
CICLOPÉPTIDOS OBTENIDOS DEL BAGAZO DE LAS SEMILLAS  
DE *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal**

**T E S I S**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. MA. ROSA GONZALEZ TEPALE**

TUTOR: DR. LINO JOEL REYES TREJO  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad Universitaria, CD. MX.

marzo 2019

## CONTENIDO

COMITÉ TUTOR .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIA.....	iii
LUGAR DE TRABAJO .....	iv
ARTÍCULO Y CONGRESO .....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2 ANTECEDENTES .....	3
2.1 Antecedentes de los ciclopéptidos .....	3
2.1.1 Ciclopéptidos como agentes terapéuticos .....	5
2.1.2 Fuentes de los ciclopéptidos .....	6
2.2 Ciclopéptidos en el género <i>Annona</i> .....	8
2.3 <i>Annona purpurea</i> .....	10
2.3.1 Generalidades de la <i>Annona purpurea</i> .....	10
2.3.2 Estudios fitoquímicos de la <i>Annona purpurea</i> .....	11
3 JUSTIFICACIÓN .....	15
4 HIPÓTESIS Y OBJETIVO .....	16
4.1 Hipótesis .....	16
4.2 Objetivo General .....	16
5 DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	17
5.1 Material y equipo .....	17
5.2 Aislamiento de ciclopéptidos .....	19

5.2.1	Obtención del material vegetal .....	19
5.2.2	Extracción por maceración .....	20
5.2.3	Detección de ciclopéptidos por métodos químicos sobre CCD .....	20
5.2.4	Fraccionamiento primario del extracto hidroetanólico por cromatografía en columna abierta.....	22
5.2.5	Cromatografía preparativa en placa de las fracciones C, D y E .....	23
5.3	Purificación de los ciclopéptidos por cromatografía de alta presión.....	24
5.3.1	Purificación por SEC-HPLC de la fracción C-IV y C-V.....	24
5.3.2	Purificación de las fracciones C-V <sub>7</sub> , C-V <sub>8</sub> , C-IV <sub>4</sub> , C-IV <sub>6</sub> por RP-HPLC semipreparativo.....	25
5.3.3	Purificación por RP-HPLC semipreparativa de las fracciones D-V, D-VI y D-VII provenientes de CPP. ....	26
5.3.4	Cristalización de la fracción E-III.....	27
5.4	Análisis espectroscópico de los ciclopéptidos.....	28
5.4.1	Análisis espectroscópico por IR y UV .....	28
5.4.2	Análisis espectroscópico por RMN .....	28
5.4.3	Análisis por espectrometría de masas.....	29
5.5	Configuración absoluta de los aminoácidos.....	30
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.1	Aislamiento y purificación de ciclopéptidos .....	32
6.2	Identificación de los ciclopéptidos .....	33
6.2.1	Ciclopurpuracina (1) .....	33
6.2.1.1	Asignación de los espectros de RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C de los residuos de los aminoácidos de la ciclopurpuracina (1) .....	40
6.2.1.2	Masa exacta y secuencia de los residuos de los aminoácidos de la ciclopurpuracina (1) por espectrometría de masas de alta resolución ....	55

6.2.2	Ciclosenegalina A (2).....	69
6.2.2.1	Asignación de los espectros de RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C de los residuos de los aminoácidos de la ciclosenegalina (2) .....	74
6.2.2.2	Masa exacta y secuencia de los residuos de los aminoácidos de la ciclosenegalina A (2) por espectrometría de masas de alta resolución ..	80
6.2.3	Anomuricata A (3).....	92
6.3	Configuración absoluta de los aminoácidos de la ciclopurpuracina (1) ....	94
7	CONCLUSIONES .....	97
8	PERSPECTIVAS.....	98
9	BIBLIOGRAFÍA .....	99
	ANEXOS .....	xii
	PUBLICACIÓN.....	xxii

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente</b>	Dra. Rosa Luisa Santillán Baca	CINVESTAV, IPN
<b>Vocal</b>	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas	Instituto de Química, UNAM
<b>Vocal</b>	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Andrés Navarrete Castro	Facultad de Química, UNAM
<b>Secretario</b>	Dra. María Isabel Aguilar Laurents	Facultad de Química, UNAM

## **COMITÉ TUTOR**

Dra. Rosa Luisa Santillán Baca	CINVESTAV, IPN
Dra. Martha Patricia García Camacho	Facultad de Química, UNAM

---

**Dr. Lino Joel Reyes Trejo**  
Tutor

---

**M. en C. Ma. Rosa González Tepale**  
Alumna

# AGRADECIMIENTOS

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, por el conocimiento y las herramientas que me dio para mi formación profesional.
- Al consejo **Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el subsidio y la beca otorgada durante mis estudios de doctorado (Becario No. 290840).
- Al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas**.
- A mi asesor, el **Dr. Lino Joel Reyes Trejo**, por las enseñanzas, los consejos y la dirección de este trabajo. Por su increíble paciencia y tolerancia
- A las integrantes de mi comité tutor que semestre a semestre dieron observaciones útiles y puntuales para el desarrollo del proyecto hasta su culminación: Dra. Rosa Luisa Santillán Baca y Dra. Martha Patricia García Camacho.
- A los integrantes del jurado, por su esfuerzo en la revisión de este trabajo escrito y sus apreciables consejos académicos: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Andrés Navarrete Castro, Dra. María Isabel Aguilar Laurents.
- Al **Dr. Benito Reyes Trejo**, por su continua asesoría y guía para el desarrollo de este proyecto y por compartir sus conocimientos.
- A mi amiga **Marlen Mayorga Flores**, que tuve la suerte de conocerla en este proyecto e hizo que este atormentado camino fuera más ligero. También por su colaboración en la purificación de los ciclopeptidos por HPLC y preparación de las muestras para su análisis por RMN y hacerme trabajar horas extras y días festivos.
- Al Dr. Federico del Río Portilla, por sus consejos y colaboración en el desarrollo de este trabajo.
- Al Dr. David Gómez Zepeda, por su interés y ayuda en el análisis de los ciclopeptidos por espectrometría de masas.
- Al Dr. Víctor Javier Zaldívar Machorro por su ayuda en la purificación de las muestras por SEC-HPLC.
- Al Dr. Rubén Alfredo Toscano por el análisis de Rayos-X.

## DEDICATORIA

- Al ser supremo que siempre me acompañó e iluminó y me dio tan bonitas amistades durante mis estudios de posgrado.
- A mi mamá y familia que siempre me apoyan y me enseñan a no rendirme en los momentos difíciles.
- A mis queridos amigos Zenaida Bravo Pérez, Margarita Cantú, Ivanhoe Jiménez y Eduardo Mancilla por su dulce compañía, sonrisas, interminables pláticas y paseos en los primeros años del doctorado.
- A mi maravillosa hermana Elvis que siempre me acompaña y ayuda en esta increíble aventura de mi vida.
- A mi amiga Lili por su amistad y su colaboración en mi trabajo docente.
- Al tabasqueño que hoy está en mi vida y me enseña las bondades de su tierra.

## LUGAR DE TRABAJO

- Laboratorio 208, Departamento de Química Orgánica, División de Estudios de Posgrado, Edificio B, Facultad de Química, UNAM.

Responsable: Dr. Lino Joel Reyes Trejo

- Laboratorio 1 del Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM

Responsable: Dr. José Federico del Rio Portilla

- Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Responsable: Dr. Benito Reyes Trejo

- Laboratorio de Metabolómica y Espectrometría de Masas, CINVESTAV-UGA- LANGEBIO, IPN, Irapuato, Guanajuato.

Responsable: Dr. José Juan Ordaz Ortiz

## ARTÍCULO Y CONGRESO

El trabajo de investigación de esta tesis, aportó las siguientes contribuciones científicas:

- González-Tepale, M.R., Reyes, L., Mayorga-Flores, M., Reyes-Trejo, B., Gómez-Zepeda, D., Del Rio-Portilla, F., Ordaz-Ortiz, J.J., Herbert-Pucheta, J.E. 2018. Cyclopurpuracin, a cyclopeptide from *Annona purpurea* seeds. *Phytochem. Lett.* 23, 164–167.
- Simposio Iberoamericano Multidisciplinario de Ciencias e Ingeniería “Cyclopurpuracin, a new cyclopeptide from *Annona purpurea* seeds”, septiembre 20 de 2017, Pachuca de Soto, Hidalgo, México.

# ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía de capa delgada
CE	Energía de colisión
CD <sub>6</sub> CO	Acetona deuterada
CPP	Cromatografía de placa preparativa
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear (por sus siglas en inglés Correlated Spectroscopy)
Cys	Cisteína
CV	Voltaje del cono
ESI	Ionización por electrospray
Ev	Electronvoltio
δ	Desplazamiento químico
ddd	Doble de doble de doble
d	Doble
DEPT	Aumento sin distorsión por transferencia de polarización (por sus siglas en inglés Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DMSO	Dimetil sulfóxido
FDDA	N <sub>6</sub> -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanilamida
Glu	Glutámico
g	Gramo
Gly	Glicina
Gln	Glutamina
h	Hora
HMBC	Correlación heteronuclear a dos y tres enlaces múltiples <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H (por sus siglas en inglés Heteronuclear Multiple Bond Cherece)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión (por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography)
HSQC	Correlación espectroscópica heteronuclear a un sólo enlace ( <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H) (por sus siglas en inglés Heteronuclear single Quantum Coherence)
Hz	Hertz
His	Histidina
HRESI	Ionización por electrospray de alta resolución
Ile	Isoleucina
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
Knr	Quinurrenina
Met	Metionina
MALDI-TOF	Desorción/ ionización láser asistida por matriz- tiempo de vuelo (por las siglas en inglés de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight)
Mso	Metionina sulfoximina
NOESY	Espectroscopia de efecto Overhauser nuclear (por las siglas en inglés Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
OMet	Oxo metionina
Pro	Prolina
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13

ROESY	Espectroscopia rotatoria de efecto nuclear overhauser (por sus siglas en inglés Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy)
RP-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión por fase reversa
Ser	Serina
SEC-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión por exclusión molecular
TFA	Ácido trifluoracético
Trp	Triptófano
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
TOF	Tiempo de vuelo
TMS	Tetrametil silano
TOCSY	Correlación espectroscópica total ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (por sus siglas en inglés Total Correlated Spectroscopy)
UV	Ultravioleta
Val	Valina

## RESUMEN

Del extracto hidroetanólico de las semillas de *Annona purpurea* Moc. & Senssé ex Dunal recolectada de la región de Las Salinas, Comunidad de Chicomuselo en el Estado de Chiapas, se aislaron tres ciclopéptidos. Dos de los cuales fueron caracterizados por espectrometría de masas de alta resolución y espectroscopia de IR, UV, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , experimentos de RMN como HSQC, HMBC, COSY, ROESY y DEPT, donde uno de ellos resultó ser un nuevo ciclopéptido, el cual fue nombrado como ciclopurpuracina, el segundo ciclopéptido presentó una secuencia de aminoácidos similar al ciclopéptido ciclosenegalina A, reportado previamente en *Annona senegalensis*. Por otro lado, el tercer ciclopéptido se caracterizó por difracción de rayos X, resultando ser el ciclopéptido conocido como anomuricatina A, aislado con anterioridad de semillas de *Annona muricata*.

## ABSTRACT

From the hydroethanolic extract of the *Annona purpurea* Moc. & Senssé ex Dunal seeds collected from Las Salinas region, Chicomuselo Community at State of Chiapas, three cyclopeptides were isolated. Two of the cyclopeptides were characterized by high-resolution mass spectrometry and IR, UV,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, NMR experiments such as HSQC, HMBC, COSY, ROESY and DEPT. One of them turned out to be a new cyclopeptide, which was named cyclopurpuracin. A second cyclopeptide presented an amino acid sequence similar to the one previously reported in *Annona senegalensis* (cyclo-senegalinalin A). The third cyclopeptide was characterized by X-ray diffraction, resulting to be the known cyclopeptide anomuricatin A which is present in *Annona muricata* seeds.

# 1 INTRODUCCIÓN

La familia Anonaceae tiene como característica la de contener sustancias bioactivas de estructuras químicas variadas, en raíz, hojas, corteza, pulpa y semillas. En esta familia se han identificado y reportado alcaloides, flavonoides, acetogeninas y ciclopéptidos. La bioactividad de estos metabolitos está relacionada con sus efectos insecticida, antitumoral, antibacteriano, antimalárico, leishmanicida, propiedades antihelmínticas y actividad citotóxica (Andrés-Agustín *et al*, 2011)

En los últimos años se ha mostrado interés por los ciclopéptidos presentes en las anonáceas. Estos son un grupo especial de péptidos que han sido evaluados por sus actividades biológicas significativas como antimicrobianos, antifúngicos, antibacterianos, antitumorales, entre muchas otras. Ejemplos de fármacos que contienen ciclopéptidos son la gramicidina y bacitracina, que hoy en día constituyen una alternativa a los antibióticos como la penicilina y sulfamidas, ya que actúan como antimicrobianos de amplio espectro (Shinde *et al*, 2013).

Se ha documentado la presencia de ciclopéptidos en los diferentes reinos de la naturaleza; tan sólo en el reino vegetal se han reportado más de 455 ciclopéptidos de 1945 a 2017, principalmente en las familias Caryophyllaceae, Rubiaceae, Compositae, Rhamnaceae y Annonaceae (Tan y Zhou, 2006; Ramalho *et al*, 2018). En las semillas del género *Annona* donde se ubican frutos como la guanábana (*Annona muricata*) y la chirimoya (*Annona cherimola*) pertenecientes a la familia Annonaceae, se han aislado ciclopéptidos como la annomuricata B con

actividad citotóxica en células de carcinoma de ascitis de Erlich y ascitis de Linfoma de Dalton (Dahiya *et al*, 2009). El cherimolaciclopéptido E ha evidenciado tener una actividad antihelmíntica similar al mebendazol (Dahiya *et al*, 2008), también se ha explorado la actividad vasorelajante de ciclopéptidos como la ciclosquamocina B aislada de *Annona squamosa* (Morita, *et al*, 2006).

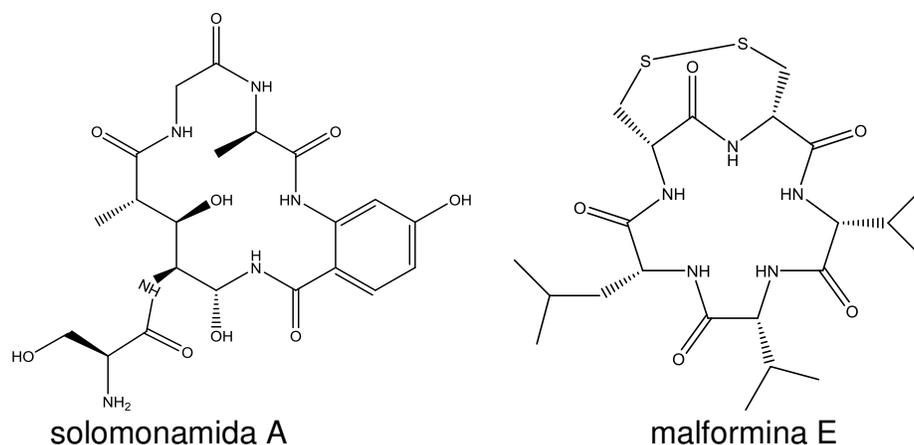
Como se observa, el género *Annona* es una fuente importante de ciclopéptidos y cabe resaltar que nuestro país cuenta con 13 especies de este género, varias de ellas endémicas de México y Centroamérica. Por ejemplo, la *Annona purpurea* es utilizada tradicionalmente para diversos propósitos y ha sido ampliamente explorada en el aislamiento de metabolitos secundarios como acetogeninas (Chávez y Mata, 1998; Chávez y Mata, 1999), alcaloides y flavonoides. Sin embargo, a la fecha no se han publicado estudios de aislamiento de ciclopéptidos presentes en esta planta (Andrés-Agustín *et al*, 2011). Por lo que en este trabajo se planteó como objetivo: aislar y caracterizar los ciclopéptidos que pudieran estar contenidos en las semillas de *Annona purpurea*. La descripción de los ciclopéptidos presentes en las semillas de esta planta contribuirá a ampliar el conocimiento de la química de *Annona purpurea*. La determinación de la composición y estructura de los ciclopéptidos permitirá explorar su relación estructura- actividad, ya que hoy en día continúa vigente la búsqueda de nuevos fármacos con valores mayores de eficiencia y bajo riesgo terapéutico en los seres humanos. Es evidente que el conocimiento de estos metabolitos secundarios coadyuve al entendimiento de la función de los ciclopéptidos en las plantas,

debido a que aún no se sabe con seguridad si actúan como mecanismos de defensa, atracción, reabsorción de nutrientes minerales, entre otros aspectos.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Antecedentes de los ciclopéptidos**

En los últimos años se ha observado un interés creciente por biomoléculas conocidas como péptidos, mismas que presentan una amplia variedad de actividades biológicas o muestran un alto valor nutricional (Shinde *et al*, 2013, Abdalla *et al*, 2018). En términos de estructura y función los péptidos han ganado especial atención, ya que actúan como neurotransmisores, hormonas o como moléculas de señalización en la respuesta inmune (Abdalla *et al*, 2018). Una clase particular de péptidos son los llamados ciclopéptidos recientemente conocidos como orbitidos (Ramalho *et al*, 2018), compuestos cíclicos formados principalmente de L-aminoácidos esenciales, aunque también pueden contener D y L-aminoácidos no proteicos (Tan y Zhou, 2006). Los ciclopéptidos pueden estar constituidos desde 2 hasta 80 aminoácidos, ciclizados a través del enlace peptídico del amino inicial y carbonilo terminal, aunque también se puede ciclizar a través de otros tipos de enlaces no peptídicos como el enlace de disulfuro y enlaces éster (depsipéptidos), Figura 2.1. No sólo pueden estar conformados de un ciclo, sino también más ciclos pueden formar la molécula ciclopeptídica.

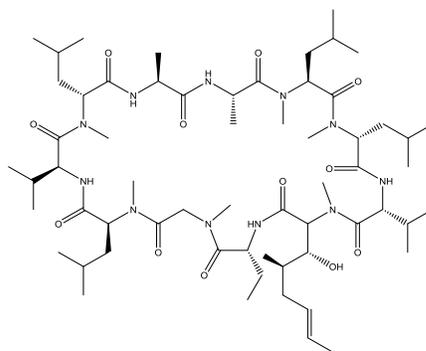


**Figura 2.1** Solomonamida A, ciclopéptido formado de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Malformina E, ciclopéptido constituido de dos anillos, con enlaces peptídicos y de disulfuro.

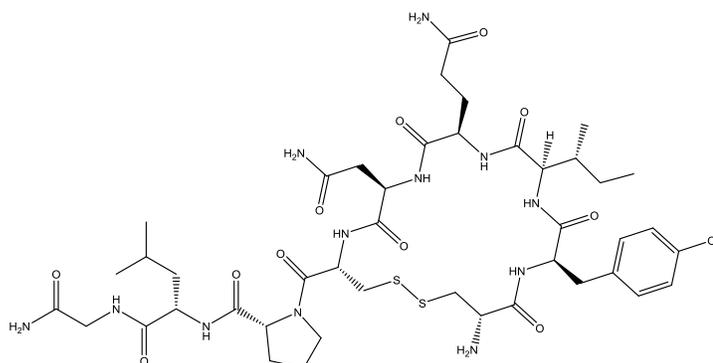
Entre las ventajas que presenta la ciclización de los péptidos respecto a los péptidos lineales es su mayor resistencia a la degradación por exopeptidasas debido a la falta de los extremos amino y carboxilo. Incluso pueden ser resistentes a las endopeptidasas, ya que sus estructuras rígidas son menos susceptibles a la hidrólisis. La ciclación de los péptidos también confiere una estabilidad excepcional en términos de temperatura y pH (Abdalla *et al*, 2018). Cabe destacar que mientras los péptidos lineales son flexibles y necesitan adoptar conformaciones apropiadas para sus receptores, los péptidos cíclicos por el contrario ya pueden tener la conformación necesaria para unirse a un receptor específico y minimizar la entropía conformacional al unirse a las moléculas blanco (Adamska *et al*, 2015). Otra característica interesante de los ciclopéptidos es que pueden adoptar disposiciones en forma de láminas que al apilarse crean conjuntos tubulares huecos sostenidos por enlaces de hidrógeno intermoleculares formando nanotubos o nanopartículas con un gran potencial para una amplia gama de aplicaciones biomédicas.

### **2.1.1 Ciclopéptidos como agentes terapéuticos**

Las características mencionadas anteriormente, como la rigidez estructural, la selectividad del receptor, la estabilidad bioquímica y la eliminación de la carga terminal que aumenta el carácter lipofílico y por lo tanto mejora la permeabilidad hacia la membrana celular, son propiedades que permiten que los ciclopéptidos se proyecten como buenos agentes terapéuticos o estructuras para el diseño de fármacos. Hasta ahora más de 40 ciclopéptidos están en el mercado farmacéutico y aproximadamente en promedio cada año un nuevo ciclopéptido inicia su comercialización (Abdalla *et al*, 2018). Ejemplos de agentes terapéuticos de ciclopéptidos ampliamente utilizados son: los antibióticos ciclosporina A (Figura 2.2), daptomicina y polimixina B; los análogos de la hormona oxitocina (Figura 2.3), octreodina y vasopresina; el inmunosupresor ciclosporina (Shinde *et al*, 2013). Recientemente la oficina de Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos Americanos (FDA) aprobó el ciclopéptido ziconitida aislado del caparazón del caracol *Conus magus*. La zinconida es un analgésico usado para el dolor crónico y severo, que bloquea de forma selectiva los canales de calcio tipo N que controlan la neurotransmisión en muchas sinapsis. Cabe señalar que la mayoría de los ciclopéptidos desarrollados clínicamente se derivan de productos naturales y posteriormente se han sintetizado en el laboratorio (Abdalla *et al*, 2018).



**Figura 2.2** Ciclosporina A, fármaco inmunosupresor aislado del hongo *Tolypocladium inflatum* Gams

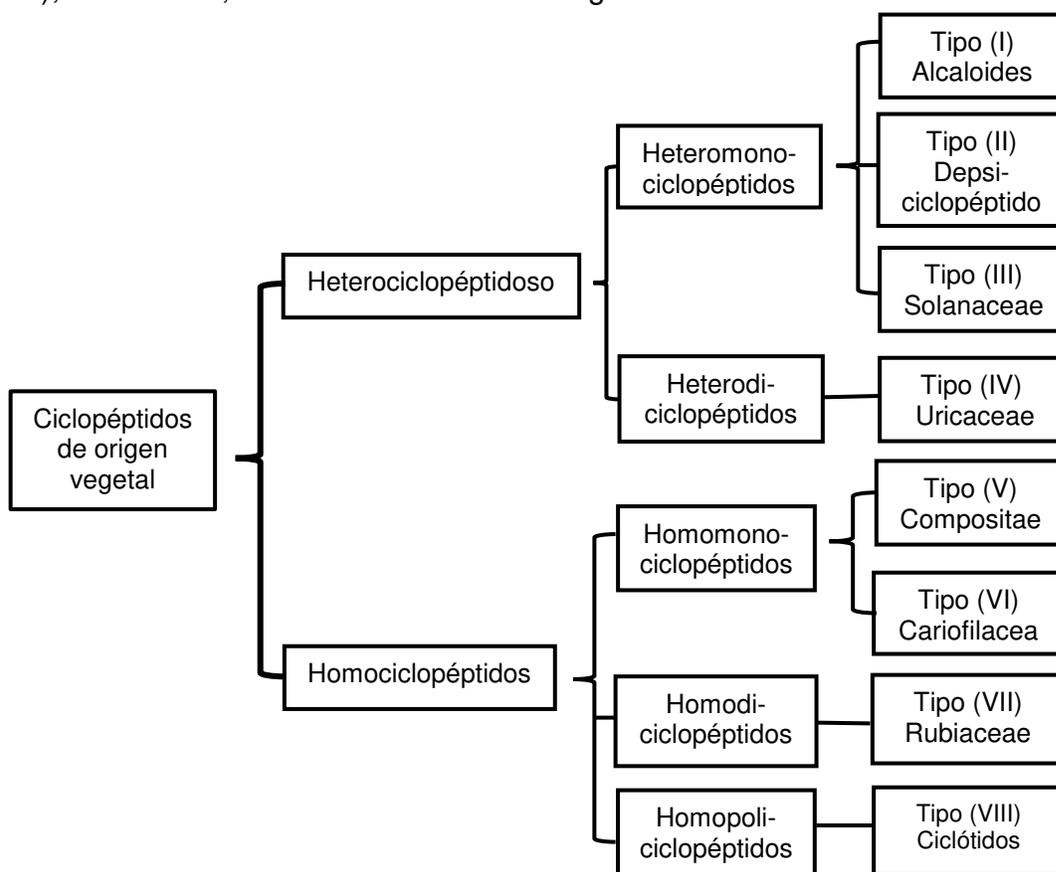


**Figura 2.3** Oxitocina, ciclopéptido de origen animal que actúa como neuromodulador

### 2.1.2 Fuentes de los ciclopéptidos

Los ciclopéptidos se encuentran en diferentes fuentes naturales de origen animal, vegetal, fúngico y bacteriano (Wang y Craik, 2016). En los hongos el ciclopéptido amanita fue de los primeros publicados en 1941. La Ciclosporina y vancomicina son ciclopéptidos de origen bacteriano, mientras que la oxitocina es de origen humano. En el reino vegetal se han documentado hasta ahora más de 455 ciclopéptidos en 26 familias de 65 géneros y 120 especies, en particular en la familia Annonaceae, la cual abarca a una gran cantidad de géneros, entre ellos el género *Annona* donde se ubican frutos como la guanábana (*A. muricata*) y la chirimoya (*A. cherimola*) (Tan y Zhou, 2006, Morita *et al*, 1999; Ramalho *et al*,

2018). Una forma de clasificar a los ciclopéptidos de plantas basada en su composición, estructura química y origen fue propuesta por Tan y Zhou (2006). La primera división está en función de la composición y tipos de enlaces que forman al ciclopéptido: heterociclopéptidos (ciclopéptidos constituidos de residuos de aminoácidos, éteres, compuestos aromáticos, entre otros, unidos por enlaces peptídicos, amida, éster, éter, carbono-carbono) y homociclopéptidos (ciclopéptidos compuestos por residuos de aminoácidos unidos a través del enlace peptídico). La siguiente división se propone en función del número de ciclos que componen a la estructura y finalmente se clasifican de acuerdo a la familia de donde provienen y de las características que tiene el anillo: ciclopéptidos alcaloides (Tipo I), depsiciclopéptidos (Tipo II), ciclopéptidos cariofilaceae (Tipo VI), entre otros, como se ilustra en el Diagrama 2.1.



**Diagrama 2.1** Clasificación de ciclopéptidos en plantas

## 2.2 Ciclopéptidos en el género *Annona*

Las plantas del género *Annona* son una fuente importante de ciclopéptidos. El primero de ellos fue la annomuricata A, aislado de las semillas de *A. muricata* (Li *et al*, 1995), desde entonces hasta la fecha de este género se han descrito 35 ciclopéptidos, principalmente de sus semillas, como se observa en la Tabla 2.1.

A diferencia de los ciclopéptidos descritos de otros reinos, como el fúngico donde es recurrente encontrar ciclopéptidos de mayor complejidad con dobles anillos, N-metilados o la presencia de aminoácidos no proteicos, los ciclopéptidos del género *Annona* están conformados por un sólo ciclo, de tamaño pequeño constituidos de cinco a nueve aminoácidos, con pesos moleculares aproximados de 500 a 1000 Da, donde prevalece al menos un aminoácido de prolina y uno de glicina. En los ciclopéptidos del género *Annona*, que continen prolina, ésta puede adoptar las orientaciones *cis* o *trans* como en el caso de la ciclomontanina A (Chuang *et al*, 2008). Los aminoácidos que componen a los ciclopéptidos de este género, por lo general son de configuración L, usualmente contienen aminoácidos proteicos no polares como la alanina, valina, isoleucina, triptófano, tirosina además de prolina y glicina; un aminoácido proteico modificado recurrente en diez de los treinta y cuatro ciclopéptidos reportados es la oxometionina (OMet) y únicamente en el ciclopéptido ciclomontanina B se ha encontrado un aminoácido de origen no proteico como la quinurrenina (Knr) (Chuang *et al*, 2008).

**Tabla 2.1.** Ciclopéptidos aislados del género *Annona*

Especie/ Origen	Ciclopéptido	Estructura	PM	Referencia
<i>squamosa</i> China	annosquamosina A	ciclo(-Pro-oMet-Thr-Ala-Ile-Val-Gly-Tyr-)	848	Li <i>et al.</i> , 1997 Morita <i>et al.</i> , 1999
<i>squamosa</i> Malasia Taiwan	ciclosquamosina A	ciclo(-Gly-Ser-Phe-Gly-Pro-Val-Pro-)	641	Morita <i>et al.</i> , 1999 Yang <i>et al.</i> , 2008
<i>squamosa</i> Malasia	ciclosquamosina B	ciclo(-Gly-Leu-Met-Gln-Pro-Pro-Ile-Thr-)	837	Morita <i>et al.</i> , 1999 Morita <i>et al.</i> , 2006
	ciclosquamosina C	ciclo(-Gly-Leu-Mso-Gln-Pro-Pro-Ile-Thr-)	853	Morita <i>et al.</i> , 1999
<i>squamosa</i> Taiwan	ciclosquamosina D	ciclo(-Ser-Tyr-Tyr-Pro-Gly-Gly-Val-Leu-)	836	Morita <i>et al.</i> , 1999 Yang <i>et al.</i> , 2008
	ciclosquamosina E	ciclo(-Gly-Gly-Val-Leu-Ser-Tyr-Tyr-Tyr-Pro-)	999	Morita <i>et al.</i> , 1999 Yang <i>et al.</i> , 2008
	ciclosquamosina F	ciclo(-Gly-Ala-Pro-Ala-Leu-Thr-Thr-Tyr-)	774	Morita <i>et al.</i> , 1999
	ciclosquamosina G	ciclo(-Gly-Tyr-Pro-Met-Thr-Ala-Ile-Val-)	832	Morita <i>et al.</i> , 1999
	ciclosquamosina H	ciclo(-Gly-Pro-Thr-Val-Ala-Asp-Leu-)	653	Yang <i>et al.</i> , 2008
	ciclosquamosina I	ciclo(-Thr-Thr-Tyr-Leu-Gly-Ala-Pro-Ala-)	774	
<i>squamosa</i> China / Taiwan	escuamina A	ciclo(-Val-Thr-Gly-Tyr-oMe-Pro-Ile-Ala-)	886	Shi <i>et al.</i> , 1999 Yang <i>et al.</i> , 2008 Min <i>et al.</i> , 2000 Jiang <i>et al.</i> , 2003
	escuamina B (isómero de escuamina A)	isómero: ciclo(-Val-Thr-Gly-Tyr-oMe-Pro-Ile-Ala-)		
	escuamina A (estructuras polimorfos de escuamina A)	polimorfo:ciclo(-Val-Thr-Gly-Tyr-oMe-Pro-Ile-Ala-) 3.5 H <sub>2</sub> O polimorfo:ciclo(-Val-Thr-Gly-Tyr-oMe-Pro-Ile-Ala-) 3.9 H <sub>2</sub> O		
<i>glabra y reticulata</i> China Vietnam	glabrina A	ciclo(-Pro-Gly-Leu-Val-Ile-Try-)	642	Li <i>et al.</i> , 1998 Wélé <i>et al.</i> , 2009
<i>glabra</i> China	glabrina B	ciclo(-Pro-OMet-Val-Ala-Val-Tyr-Gly-Thr)	835	Li <i>et al.</i> , 1998
	glabrina C	ciclo(-Pro-Gly-Tyr-Val-Leu-Ala-Leu-Val)	812	Li <i>et al.</i> , 1999
	glabrina D	ciclo(-Pro-Pro-Val-Tyr-Gly-Pro-Glu)	739	
<i>montana</i> Taiwan	ciclomontanina A	ciclo(-Gly <sup>trans</sup> -Pro-Thr-Trp-Ala-Asn-Leu-)	632	Chuang <i>et al.</i> , 2008
	ciclomontanina B	ciclo(-Gly-Pro-Thr-Kyn-Ala-Asn-Leu)	643	
	ciclomontanina C	ciclo(-Phe-Pro-Pro-Thr-Phe-Asn-His-Val-Asn-)	955	
	ciclomontanina D	ciclo(-Pro-Gly-Leu-Pro-Tyr-Ala-Asn-)	614	
<i>muricata</i> China Senegal	anomuricata A es la misma que anomuricata C	ciclo(-Val-Ser-Ala-Pro-Gly-Phe)	558	Li <i>et al.</i> , 1995 Wélé <i>et al.</i> , 2004
<i>montana</i> Taiwan			558	Chuang <i>et al.</i> , 2008
<i>muricata</i> China	anomuricata B	ciclo(-Pro-Asn-Ala-Trp-Leu-Gly-thr-)	740	Li <i>et al.</i> , 1998
<i>reticulata</i> Vietnam	cicloreticulina A	ciclo(Pro-Gly-Asp-Ile-Ser-Ile-Tyr-Tyr-)	908	Wélé <i>et al.</i> , 2008
	cicloreticulina B	ciclo(Pro-Mso-Tyr-Gly-Thr-Val-Ala-Val-)	834	
	cicloreticulina C	ciclo(-Pro-Gly-Gln-Pro-Pro-Tyr-Val)	738	
<i>cherimola</i> España	cherimolaciclopéptido A	ciclo(-Pro-Gln-Thr-Gly-Met-Leu-Pro-Ile-)	837	Wélé <i>et al.</i> , 2004
	cherimolaciclopéptido B	ciclo(-Pro-Gln-Thr-Gly-Mso-Leu-Pro-Ile-)	853	
	cherimolaciclopéptido C	ciclo(-Pro-Gly-Ala-Ala-Trp-Ile-Pro)	692	Wélé <i>et al.</i> , 2004
	cherimolaciclopéptido D	ciclo(-Pro-Gly-Leu-Asn-Ala-Val-Thr-)	652	Wélé <i>et al.</i> , 2005
	cherimolaciclopéptido E	ciclo(-Pro-Gly-Leu-Gly-Phe-Tyr-)	634	
	cherimolaciclopéptido F	ciclo(-Pro-Gly-Met-Gly-Ile-Tyr-Leu-Pro-Met-)	959	Wélé <i>et al.</i> , 2005
	cherimolaciclopéptido G	ciclo(-Pro-Gly-Ala-Val-Pro-Ile-Tyr-)	768	Wélé <i>et al.</i> , 2006
<i>senegalen sis</i> Senegal	ciclosenegalina A	ciclo(Pro-Gly-Leu-Ser-Ala-Val-Thr-)	625	Wélé <i>et al.</i> , 2002
	ciclosenegalina B	ciclo(-Pro-Gly-Tyr-Val-Tyr-Pro-Pro-Val-)	872	
<i>glauca</i> Senegal	glaucaciclopéptido A	ciclo(-Pro-Gly-Ala-Gly-Val-Val-Leu-)	593	Wélé <i>et al.</i> , 2005
<i>glauca</i> Senegal	glaucaciclopéptido B	ciclo(-Pro-Gly-Met-Gly-Ile/Leu-Tyr-Ile/Leu)	732	Wélé <i>et al.</i> , 2006

Por otro lado, como en muchos productos naturales, su presencia es recurrente y se han descrito ciclopéptidos en diferentes especies del mismo género provenientes de distintos países, un ejemplo es el ciclopéptido glabrina A aislado en: *A. reticulata* de Vietnam (Wéle *et al*, 2008), *A. glabra* de China (Wéle *et al*, 2009) y *A. senegalensis* originaria de Senegal (Wéle *et al*, 2002). El chirimolaciclopéptido B se ha reportado en *A. squamosa* de China (Yang *et al*, 2008) y en *A. chirimola* proveniente de España (Wéle *et al*, 2004), otro ciclopéptido descrito en dos especies es la annomuricata C reportada en *A. montana* de Taiwan y en *A. muricata* de Senegal. La mayoría de los ciclopéptidos aislados en este género son sólidos amorfos, excepto cinco de ellos: annomuricata B, annomuricata A, glabrina A, cicloreticulina B y escuamina A que presentan estructuras cristalinas. También se tienen estructuras polimórficas como la escuamina A (Min *et al*, 2000) donde la diferencia radica en la asociación a moléculas de agua de cristalización, así como la conformación de las cadenas laterales de la metionina, obteniéndose dos polimorfos Ciclo-(Val-Thr-Gly-Tyr-OMet-Pro-Ile-Ala-) 3.5 H<sub>2</sub>O y Ciclo-(Val-Thr-Gly-Tyr-OMet-Pro-Ile-Ala-) 3.9 H<sub>2</sub>O.

## **2.3 *Annona purpurea***

### **2.3.1 Generalidades de la *Annona purpurea***

Las especies del género *Annona* se emplean como fuentes de recursos de alto valor económico, por ejemplo, los frutos se utilizan para preparar dulces, helados y bebidas, mientras que los extractos de las hojas, tallos y semillas se emplean como insecticidas, antiparasitarios, entre otros. Una de las especies endémicas de la zona tropical y subtropical de México y Centro América perteneciente a este género es la *Annona purpurea* Moc. & Senssé ex Dunal, cuyo nombre más común

es cabeza de negro (Veracruz), cabeza de llama (Veracruz y Oaxaca), chack-oop y chincuaya (Yucatán). La *Annona purpurea* es un árbol pequeño cuyas medidas oscilan entre 6 y 10 m de altura (Figura 2.4); presenta un tronco corto, hojas grandes onduladas, flores sésiles, fruto de forma esférica u ovoide que va de 15 cm o más. Sus semillas son abundantes y miden entre 2.5 y 3.0 cm de largo. La pulpa es fragante y agradable al paladar (Andrés-Agustín y Andrés- Hernández, 2011). En México las hojas se utilizan en remedio para la fiebre y la gripe, el extracto de las semillas se emplea como insecticida debido a la toxicidad de estas y el fruto se consume crudo o en jugo como bebida refrescante.

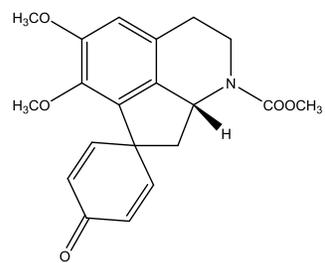


**Figura 2.4** Morfología de la especie *Annona purpurea* (árbol y fruto)

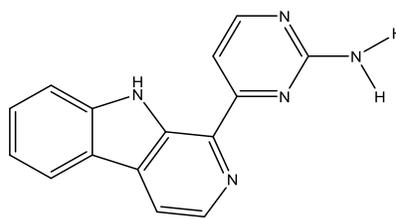
### **2.3.2 Estudios fitoquímicos de la *Annona purpurea***

De *Annona purpurea* se han registrado varias investigaciones previas debido tanto a la variedad de constituyentes químicos, como los usos de esta especie. Sus estudios fitoquímicos involucran a más de 57 compuestos aislados y caracterizados, los cuales incluyen esteroides, terpenoides, alcaloides, isoquinolinas y acetogeninas de diversas partes de la planta (Chang *et al.*, 2000).





Promucasina



Annomontanina

**Figura 2.6** Promucosina y annomontina, alcaloides de *Annona purpurea*

**Tabla 2.2** Metabolitos de *Annona purpurea*

Origen	Extracto	Compuesto	Nombre	Referencia
Panamá (Hojas)	Éter de petróleo y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	acetogeninas bis-THF adyacentes	roliniastatina, butalacina, purpureacina	Cepleanu <i>et al</i> , 1993
		acetogeninas bis-THF no adyacentes	cherimolina, silvaticina	
México (Semillas)	CHCl <sub>3</sub> /MeOH	acetogeninas bis-THF adyacentes	purpurediolina, purpurenina, purpureacina	Chavez y Mata 1998 y 1999
Taiwán (Hojas)	MeOH	alcaloides dehidroporfinas	7-hidroxi-dehidrotalicsimidina, 7-formil-dehidrotalicsimidina, talicsimidina, norpurpureina, N-metilaurotetanina, lirinidina, N-metilasimilobina	Chang <i>et al</i> , 1998
Taiwán (Tallos)	MeOH	alcaloides	promucosina, romucosina F, romucosina G	Chang <i>et al</i> , 2000
		oxoaporfinas	(+)-isocoridina, liscamina, lirioidenina, oxopurpureina, oxoglauca	
		aporfinas	(+)-norpurpureina, (-)-norglauca, (+)-nortalbaicalidina, (+)-talicsimidina, (+)-purpureina, (-)-lirinidina, (+)-apoglaziovina	
		proaporfinas	(+)-steparina	
		morfandienonas	(-)-palidina, (-)-norpalidina, (+)-o-metilflavinantina	
		bencilisoquinolina	(+)-reticulina	
		isoquinolona	talifolina	
		lactama	squamolona	
		acetogenina	purpurenina	
		bencenoides	metilparabeno, ácido isovanílico, ác. vanilino, ác. isovanilino, ác. p-metoxibenzoico	
		esteroides	β-sitosterol, y su β-D-glucósido estigmasterol, y su β-D-glucósido	
Puerto Rico (hojas y ramas)	MeOH	alcaloides aporfínicos	o-metilaterolina, oxopurpureina, glaziovina, stefarina, norpurpureina, purpureina, isocoridina y o-desmetilpurpureina	Sonnet y Jacobson, 1997
México (raíz)	CHCl <sub>3</sub>	alcaloides	pirimidina-β-carbolina y annomontina	Rejón-Orante <i>et al</i> , 2011

### 3 JUSTIFICACIÓN

Existen varios estudios realizados de diferentes partes de *Annona purpurea*, para la obtención de acetogeninas, alcaloides, flavonoides, lípidos, carotenos, polifenoles, entre otros (Chang *et al.*, 2000), sin embargo, hasta el momento en la *A. purpurea* no se han efectuado estudios encaminados a la posibilidad de obtener ciclopéptidos en las semillas. Frente a este panorama los frutos de *A. purpurea* de México, representan un recurso natural para la obtención de estructuras novedosas relacionadas con este tipo moléculas.

## **4 HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

### **4.1 Hipótesis**

Considerando que algunas especies del género *Annona* son fuentes de ciclopéptidos, de potencial interés terapéutico, el estudio químico de la *Annona purpurea* perteneciente a este mismo género permitirá el aislamiento y la determinación estructural de nuevos ciclopéptidos.

### **4.2 Objetivo General**

Aislar y caracterizar estructuralmente los ciclopéptidos contenidos en el bagazo de las semillas de la *Annona purpurea* cultivada en nuestro país proveniente del estado de Chiapas.

## 5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 Material y equipo

Los ciclopéptidos de las semillas procedentes de los frutos de *Annona purpurea* se aislaron y purificaron a través de técnicas de maceración, cromatografía en columna abierta (CCA), cromatografía en placa preparativa (CPP), cromatografía de líquidos por exclusión de tamaño de alta presión (SEC-HPLC, siglas en inglés) y cromatografía de líquidos en fase reversa de alta presión (RP-HPLC, siglas en inglés). La c

aracterización de los ciclopéptidos fue por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida en matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, siglas en inglés) y espectrometría de masas por ionización por electrospray de alta resolución con detección de masas masa por cuadrupolo-tiempo de vuelo (HRESI Q-TOF MS MS, siglas en inglés). Por otro lado, la configuración absoluta de los aminoácidos se obtuvo a través de la hidrólisis del ciclopéptido, el cual se derivatizó con el reactivo quiral Marfey ( $N_{\alpha}$ -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanilamida) una vez hidrolizado y se comparó con los tiempos de retención de los estándares de los aminoácidos D y L derivatizados.

Los diferentes disolventes utilizados para la maceración, CCA, CCD y CPP fueron: hexano, diclorometano ( $CH_2Cl_2$ ), acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH), etanol (EtOH), agua ( $H_2O$ ), grado QP. En CCA se empleó gel de sílice ( $SiO_2$ , Kieselgel 60 H Merck), para CPP se utilizaron placas de sílice de gel 60 F<sub>254</sub> (20 x 20 cm y 2 mm de espesor). El análisis por CCD se llevó a cabo utilizando

cromatofolios de sílice gel Merk 60 F<sub>254</sub> (0.20 mm de espesor), como detector una lámpara de UV spectroline ENF-240C ( $\lambda$  254 nm y 365 nm) y como reveladores disoluciones de ninhidrina en acetona al 1% y Cl<sub>2</sub>/*o*-tolidina al 3% en agua. Los disolventes utilizados para la purificación por RP-HPLC y SEC-HPLC consistieron en acetonitrilo (ACN), MeOH, ácido trifluoroacético (TFA) y H<sub>2</sub>O grado HPLC. El cromatógrafo para SEC-HPLC fue un Äkta avant 25 (General Electric), con detector de UV ( $\lambda$  214 nm, 254 nm, 280 nm), columna Superdex Peptide 10-300 GL de exclusión de tamaño molecular de 100 a 7000 Da. En RP-HPLC se trabajó con un Cromatógrafo de Líquidos Varian® ProStar, detector de UV ( $\lambda$  230 nm y 280 nm), columna Jupiter Proteo de Phenomenex (C8, 90 Å, 250 mm x 4.6 mm), los espectros de IR y UV fueron obtenidos en un equipo Perkin-Elmer FTIR/FIR spectrum 400 por la técnica de reflectancia total atenuada (ATR, siglas en inglés) y un equipo Thermo Scientific NanoDrop Lite respectivamente. Los experimentos de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y bidimensionales se trabajaron a 25 °C en equipos: Agilent 400 MR DD2 y Bruker ASCEND-700, con disolventes de acetona deuterada (CD<sub>6</sub>CO) y DMSO-*d*<sub>6</sub>. El espectro de Rayos X se obtuvo en un difractómetro Bruker Venture con una fuente de radiación monocromática tipo Cu-K $\alpha$  ( $\lambda$ = 1.54178 Å). Para el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF se utilizó un equipo Bruker Microflex con matriz de ácido Sinápico y para en análisis HRESI Q-TOF MS MS se usó espectrometría de movilidad iónica en un equipo Waters Synapt G1 HDMS Q-TOF con ionización por electrospray. El software utilizado para el análisis de los espectros de masas obtenidos del estudio HRESI MS MS fue MassLynx (v 4.1) y los espectros obtenidos de RMN se analizaron con el software de TOPSPIN (3.5) y MestReNova (9.0).

## 5.2 Aislamiento de ciclopéptidos

### 5.2.1 Obtención del material vegetal

Se recolectaron aproximadamente 30 kg de fruta madura de *Annona purpurea* Moc. & Senssé ex Dunal de la región de Las Salinas, Comunidad de Chicomuselo en el estado de Chiapas (Figura 5.1). Un lote fue colectado en octubre del 2011 y otro en octubre del 2016. La recolección estuvo a cargo del C. José Alfredo Ríos Montejo (SENASICA, Cintalapa, Chiapas). De la fruta se obtuvieron las semillas, las cuales fueron lavadas con agua y desinfectadas con hipoclorito de sodio comercial (clorox), posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente a la sombra hasta tener un valor de humedad constante. Los ejemplares de la semilla de *Annona purpurea* fueron depositados en el “Herbario de Plantas Útiles Efraim Hernandez X”, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, México. Una vez seca la semilla, la almendra fue removida de la cáscara por medio de unas pinzas mecánicas, obteniéndose 1.5 kg de almendras, la cual se molió en una licuadora doméstica hasta obtener un tamaño de partícula de malla 200.



**Figura 5.1.**-Fruta de *Annona purpurea* con semillas

### 5.2.2 Extracción por maceración

Las almendras molidas de *A. purpurea* se sometieron a procesos de maceración con disolventes de polaridad creciente con hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, MeOH, EtOH/H<sub>2</sub>O/AcOH (60:40:0.1% de ácido Acético). 1.5 kg de material molido fue colocado en un matraz con 3 L de hexano, se dejó reposar durante tres días. Al término del tiempo el macerado se separó con papel filtro grueso y se eliminó el exceso de hexano en un evaporador rotatorio al vacío. Posteriormente se efectuaron dos maceraciones más, cada una por tres días, siguiendo los pasos anteriores. Una vez terminada la maceración con hexano se dejó secar el bagazo a temperatura ambiente para eliminar el disolvente residual. El bagazo de la semilla se sometió nuevamente a maceración con los otros disolventes de polaridad creciente siguiendo el mismo procedimiento aplicado para el hexano; la cantidad de extracto obtenido de cada maceración se muestran en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1** Peso de los extractos obtenidos por maceración de las semillas de *Annona purpurea*, pruebas químicas y de RMN-<sup>1</sup>H para ciclopéptidos

Extracto	Peso (g)	Revelado Ninhidrina	Revelado Cl <sub>2</sub> / <i>o</i> -tolidina	RMN- <sup>1</sup> H
Hexano	300 g	-	-	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	86 g	-	-	-
AcOEt	54 g	-	+	-
MeOH	46 g	+	+	+
EtOH/H <sub>2</sub> O/AcOH	35 g	+	+	+

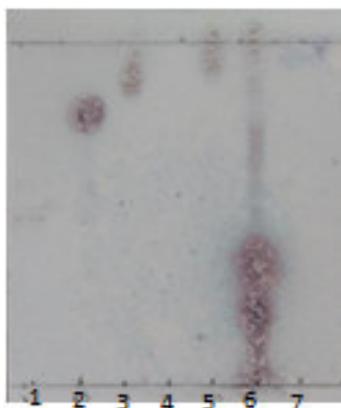
### 5.2.3 Detección de ciclopéptidos por métodos químicos sobre CCD

Se monitorea la presencia de ciclopéptidos y péptidos en todos los extractos de los diferentes macerados por medio de dos pruebas químicas complementarias: ninhidrina y Cl<sub>2</sub>/*o*-tolidina empleando cromatofolios por la técnica de CCD (Welé *et*

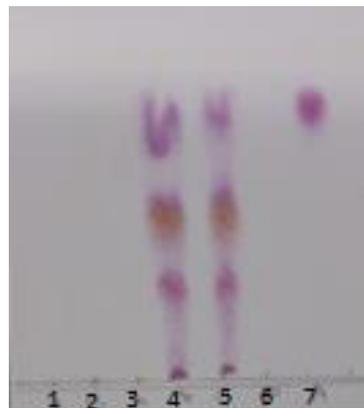
al, 2004). Con la primera prueba se confirma que se tienen muestras ricas en compuestos peptídicos, mientras que con la prueba de *o*-tolidina se descarta si los compuestos peptídicos de la muestra son del tipo ciclopéptidos (Tan y Zhou, 2006). En los cromatofolios se empleó como testigo para ciclopéptidos la 2,5-piperazindiona y como testigo para péptidos lineales el aminoácido de valina.

Se prepararon por duplicado cromatofolios con aplicaciones de los diferentes extractos: hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, MeOH, EtOH/H<sub>2</sub>O/AcOH y las moléculas testigo: valina y el ciclopéptido 2,5-piperazindiona. Los cromatofolios se eluyeron a la par con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:4:1). Un cromatofolio se reveló con una disolución de ninhidrina al 1% en acetona por aspersion, mientras que el otro se colocó en una cámara que contiene un volumen pequeño de hipoclorito comercial (clorox), permitiendo que los vapores de cloro interaccionen con el cromatofolio durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se dejó evaporar por unas horas el exceso de cloro contenido en el cromatofolio (12 a 18 horas aproximadamente). Una vez eliminado el exceso de cloro se procedió a rociar con solución de *o*-tolidina (0.5% en agua y ácido acético glacial). La presencia de manchas moradas en el cromatofolio revelado con *o*-tolidina indicó prueba positiva para ciclopéptido (figura 5.2) y manchas rosas revelado con ninhidrina indicó prueba positiva de péptidos lineales (figura 5.3). Es importante señalar que fue necesario comparar los resultados de los cromatofolios revelados con ninhidrina y *o*-tolidina, eluidos al mismo tiempo, para establecer la presencia de ciclopéptidos. Para evitar falsas interpretaciones, las muestras que dieron reacción positiva a ciclopéptidos a través de las pruebas químicas se analizaron nuevamente pero

ahora por resonancia magnética nuclear de protón, RMN-<sup>1</sup>H, usando como disolvente acetona-*d*<sub>6</sub> (CD<sub>6</sub>CO). En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del extracto se localizaron las señales dobles de los protones característicos del enlace peptídico que se encuentran entre 7 y 10 ppm.



**Figura 5.2** Cromatofolio de los extractos revelados con Cl<sub>2</sub>/*o*-tolidina para ciclopéptidos  
1) valina  
2) 2,5-piperazindiona  
3) Extracto de MeOH  
4) Extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
5) Extracto de AcOEt  
6) Extracto de EtOH/H<sub>2</sub>O/AcOH  
7) Extracto de Hexano  
Eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:4:1)



**Figura 5.3** Cromatofolio de los extractos revelados con ninhidrina para péptidos:  
1) Extracto de Hexano  
2) Extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
3) Extracto de AcOEt  
4) Extracto de MeOH  
5) Extracto de EtOH/H<sub>2</sub>O/AcOH  
6) 2,5-piperazindiona  
7) valina.  
Eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:4:1)

#### 5.2.4 Fraccionamiento primario del extracto hidroetanólico por cromatografía en columna abierta

De los extractos obtenidos de las maceraciones con disolventes de polaridad creciente, el extracto hidroetanólico dio prueba positiva a ciclopéptidos por técnicas químicas y RMN-<sup>1</sup>H. En vista de que el sólido obtenido del extracto hidroetanólico aún contiene azúcares y proteínas que interfieren en el aislamiento de los ciclopéptidos, para eliminar una parte de ellos, se solubilizaron 20 g de este extracto en 50 ml de MeOH al 98%, sabiendo que los azúcares y algunas

proteínas son insolubles en MeOH y los péptidos junto con los ciclopéptidos presentan solubilidad en este disolvente (Tan y Zhou, 2006). El extracto hidroetanólico resolubilizado en MeOH fue sometido a un análisis por CCA usando como fase estacionaria sílica gel malla 60 en una relación 1:30 por cada gramo de muestra. El eluyente utilizado fue CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH con incremento del disolvente polar (MeOH) de 2% en 2% hasta 45%, se utilizó 400 ml de cada mezcla de eluyente (Welé *et al.* 2004). De la columna se obtuvieron un total de 243 fracciones, a las cuales se les efectuaron pruebas químicas con ninhídrica, Cl<sub>2</sub>/*o*-tolidina para localizar las fracciones ricas en ciclopéptidos y patrones similares, las fracciones que dieron prueba positiva a ciclopéptidos se analizaron por RMN-<sup>1</sup>H, empleando acetona-*d*<sub>6</sub> (CD<sub>6</sub>CO). Se obtuvieron 10 grupos de fracciones a los cuales se les denominó como A, B, C, D, E, F, G, H, I, J (ver pesos en Tabla A1 en anexo). En el grupo de fracciones C, D y E se observaron sólidos blancos, los cuales de acuerdo a las pruebas químicas contienen ciclopéptidos.

### **5.2.5 Cromatografía preparativa en placa de las fracciones C, D y E**

Las fracciones reunidas en los grupos C y D ricas en ciclopéptidos obtenidas de la columna aún contenían muchos interferentes, por lo que se sometieron a un proceso de purificación por CPP. Para ello se utilizó una muestra de 100 mg de la fracción C, la cual se diluyó en 300 ml de MeOH y se aplicó en una placa de CPP de sílica gel 20 x 20 cm (2 mm de espesor), se eluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (5.5:4:0.5) y finalmente se reveló con luz UV a 254 nm. De la CPP se obtuvieron 10 bandas nombradas C-I, C-II, C-III, C-IV, C-V y C-X (Tabla 2A de Anexo). De las cuales las fracciones C-IV (0.0198g) y C-V (0.0133g) dieron reacción positiva a

ciclopéptidos, de la misma manera se trató una muestra de la fracción D y E, ver Tabla 2A de Anexo.

### **5.3 Purificación de los ciclopéptidos por cromatografía de alta presión**

#### **5.3.1 Purificación por SEC-HPLC de la fracción C-IV y C-V**

Considerando la prueba positiva a ciclopéptidos y el tamaño de muestra las bandas **C-IV** y **C-V** provenientes de la CPP resultaron adecuadas para el proceso de purificación en cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño molecular (SEC-HPLC, siglas en inglés). Se utilizó un equipo HPLC semipreparativo Äkta avant 25, con detector de UV ( $\lambda$  214 nm, 254 nm, 280 nm), columna Superdex Peptide 10-300 GL. Para la separación se probaron varias fases móviles y flujos, la fase que resultó más adecuada para la separación fue EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1) con un flujo de 0.5 ml/min. Las muestras se disolvieron en EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1), la parte soluble fue sometida a separación por SEC-HPLC. La separación de los componentes de la muestra de la banda **C-V** (0.0133 g) resultó en 11 fracciones denominadas **C-V<sub>1</sub>**, **C-V<sub>2</sub>**, ...**C-V<sub>12</sub>**. Por otro lado, de la banda **C-IV** se obtuvieron 7 fracciones nombradas como **C-IV<sub>1</sub>**,... **C-IV<sub>7</sub>**. Las fracciones recolectadas se liofilizaron para eliminar la fase móvil EtOH/H<sub>2</sub>O, de estas fracciones únicamente las muestras denominadas **C-V<sub>7</sub>**, **C-V<sub>8</sub>**, **C-IV<sub>4</sub>**, **C-IV<sub>6</sub>** fueron positivas a ciclopéptidos en RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>). Se monitoreo la pureza de las fracciones utilizando espectrometría de masas por MALDI-TOF, en cada una de estas fracciones se observó un ion constante de 755 Da y otros iones que indicaban la presencia de impurezas aún presentes en la muestra.

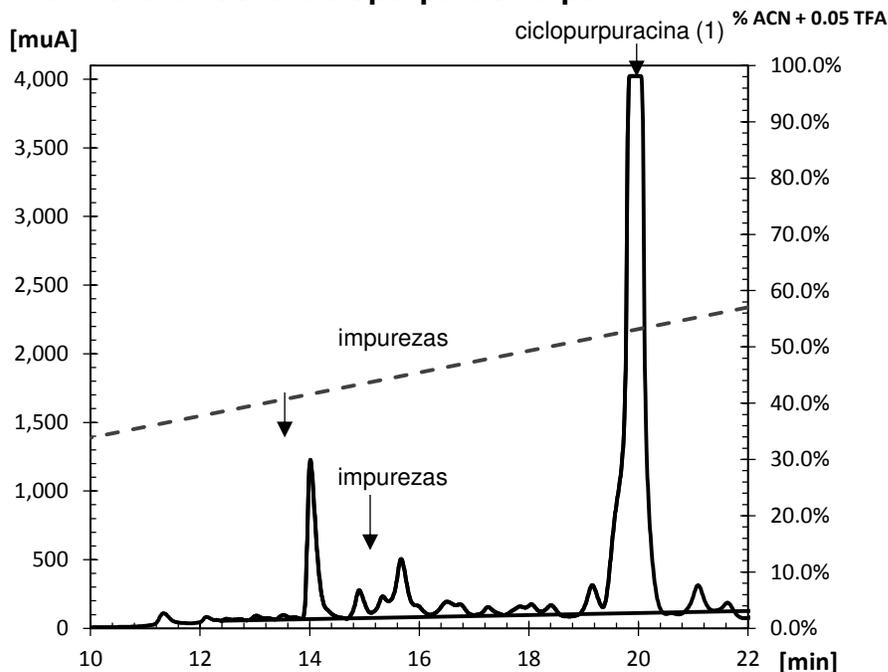
### 5.3.2 Purificación de las fracciones C-V<sub>7</sub>, C-V<sub>8</sub>, C-IV<sub>4</sub>, C-IV<sub>6</sub> por RP-HPLC semipreparativo

Las fracciones C-V<sub>7</sub>, C-V<sub>8</sub>, C-IV<sub>4</sub>, C-IV<sub>6</sub> se sometieron a otro proceso de purificación por cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, siglas en inglés). Las condiciones óptimas de purificación se lograron con una columna Jupiter Proteo C12, 250 x 4,6 mm, 4.0 μm, 90 Å, fase móvil H<sub>2</sub>O (0.05% TFA): ACN (0.05% TFA), gradiente de elución (ver Tabla 5.2) y detector de UV (λ= 215 nm). El cromatograma de separación se presenta en la Figura 5.4, los compuestos presentes en los picos más abundantes se liofilizaron y se analizaron por espectrometría de masas por MALDI-TOF y RMN-<sup>1</sup>H en acetona-*d*<sub>6</sub>. De las purificaciones de estas fracciones se obtuvo el mismo compuesto mayoritario que resultó ser un nuevo ciclopéptido (3.6 mg) al que se nombró como ciclopurpuracina (**1**).

**Tabla 5.2.** Gradientes de elución de RP-HPLC para la purificación del ciclopéptido ciclopurpuracina (**1**)

Tiempo (min)	Gradiente	
	% ACN (0.05 TFA)	% H <sub>2</sub> O (0.05 TFA)
0.00	10.0	90.0
3.00	10.0	90.0
8.00	30.0	70.0
22.00	57.0	43.0
26.00	75.0	25.0
32.00	10.0	90.0

### Purificación de la ciclopurpuracina por RP-HPLC



**Figura 5.4** Cromatograma de la purificación del ciclopéptido ciclopurpuracina (**1**) (755 Da). Por RP-HPLC, columna: Júpiter Proteo C12, 250x4,6 mm 4,0  $\mu$ m 90 Å, presión máxima: 2700 psi, detección: UV-VIS a 225 nm, volumen inyectado: 1,0  $\mu$ L, fase móvil: H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA y ACN + 0.05% TFA, flujo: 1 mL/min.

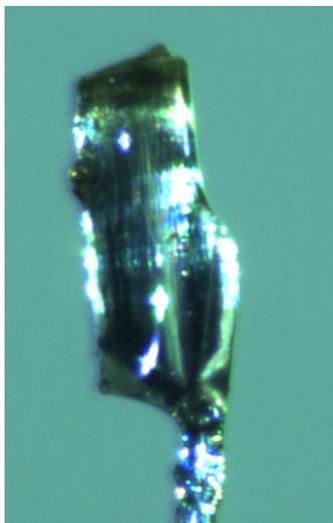
#### 5.3.3 Purificación por RP-HPLC semipreparativa de las fracciones D-V, D-VI y D-VII provenientes de CPP.

Las fracciones D-V, D-VI y D-VII provenientes de CPP no se purificaron por SEC-HPLC y se analizaron directamente por RP-HPLC semipreparativa con las mismas condiciones mencionadas en la sección 5.3.2., cabe mencionar que se requieren múltiples repurificaciones de las fracciones obtenidas por RP-HPLC para lograr la purificación de los ciclopéptidos, si no se pasa por SEC-HPLC. Una vez obtenidos los picos mayoritarios se colectaron las muestras y se liofilizaron y analizaron por espectrometría de masas por MALDI-TOF, en las fracciones se encontró un ion común de 625 Da y por el análisis de RMN-<sup>1</sup>H se confirmó la presencia de un segundo ciclopéptido. De estas fracciones se obtuvo 2.45 mg que

al analizar por RMN correspondió a la ciclosenegalina A (2) aislada previamente en *Annona senegalensis* (Wélé *et al*, 2002)

#### 5.3.4 Cristalización de la fracción E-III

De la fracción E-III proveniente de CPP se obtuvo un sólido blanco que también dio prueba positiva a ciclopéptidos con  $\text{Cl}_2/o$ -tolidina y negativa a ninhídrica, este sólido blanco presentó características de cristales en forma de agujas transparentes (Figura 5.5), por lo que se buscaron condiciones de cristalización para purificar la muestra. Un lote de 1 mg de esta fracción se mantuvo en solución con la mínima cantidad de metanol y acetona dentro de un tubo de RMN, hasta su cristalización. Para la caracterización de los cristales se colectaron datos de difracción de Rayos-X en un equipo Bruker, modelo Smart Apex, equipado con radiación de Cu ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ). Al analizar los datos de Rayos X la muestra correspondió a la anomuricata A (3) reportada en *Annona muricata* por Wu, *et al.* en 2007.



**Figura 5.5** Cristales del ciclopéptido anomuricata A (3)

## **5.4 Análisis espectroscópico de los ciclopéptidos**

### **5.4.1 Análisis espectroscópico por IR y UV**

El espectro de UV fue obtenido en disolución de ciclopurpuracina (**1**) en metanol a una concentración de 1.1 mg/mL en un espectrofotómetro de UV-VIS y el espectro de infrarrojo fue adquirido a partir del ciclopéptido pulverizado y analizado por la técnica de reflectancia total atenuada.

### **5.4.2 Análisis espectroscópico por RMN**

Los estudios de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de las diferentes fracciones ricas en ciclopéptidos se registraron en un equipo Agilent 400 MR DD2 operado a 100 MHz para <sup>13</sup>C y 400 MHz para <sup>1</sup>H, usando como disolvente acetona-*d*<sub>6</sub>. Una vez hecho el estudio de RMN, se evaporó el disolvente y se recuperó la muestra para continuar con su purificación. Después de que las muestras se purificaron por RP-HPLC semipreparativo se analizaron en un equipo Bruker ASCEND-700 (Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA) a 700 MHz para adquirir los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y a 175 MHz para obtener los espectros de RMN-<sup>13</sup>C unidimensionales y bidimensionales. Para estos análisis se usaron diferentes disolventes deuterados como acetona-*d*<sub>6</sub>, H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O 5%), DMSO-*d*<sub>6</sub>, metanol-*d*<sub>4</sub>, así como DMSO-*d*<sub>6</sub> anhidro. El DMSO-*d*<sub>6</sub> fue secado a través de una malla molecular, una vez seco se mezcló con la muestra y se transfirió hacia el tubo de resonancia, este procedimiento se efectuó dentro de una campana de guantes libre de humedad.

De los disolventes utilizados para los estudios de RMN, se encontró que con DMSO-*d*<sub>6</sub> anhidro se obtenían los espectros con mejor resolución. Con este disolvente fue posible observar las interacciones carbono de carbonilo a hidrógeno del amino del enlace peptídico en el espectro HMBC, necesarios para establecer

la conectividad entre los aminoácidos vecinos. Considerando lo anterior, los espectros fueron adquiridos en DMSO- $d_6$  anhidro con las secuencias de pulsos estándar y fases cíclicas para COSY, HSQC, ROESY, TOCSY y HMBC. Los espectros bidimensionales de RMN fueron procesados en el software MestReNova (9.0) y TOPSPIN (3.5).

#### **5.4.3 Análisis por espectrometría de masas**

Las fracciones obtenidas en el proceso de purificación de SEC-HPLC y RP-HPLC se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF para obtener el ion molecular de los ciclopéptido y el grado de pureza de las fracciones. Un microlitro de cada fracción a una concentración aproximada de 100 ng/ml fue diluido con 10  $\mu$ l de una disolución saturada de ácido sinapínico (Sigma- Aldrich) en ACN acuoso al 66% v/v. De la mezcla anterior se tomó un microlitro y se colocó en el portamuestras del instrumento.

Por otro lado, las fracciones que dieron prueba positiva a ciclopéptidos al ser analizadas mediante RMN empleando DMSO- $d_6$  anhidro a 700 MHz se sometieron a RP-HPLC para eliminar el DMSO- $d_6$ . Estas muestras se analizaron en un espectrómetro de masas Synapt HDMS<sup>TM</sup> Q-TOF. 290  $\mu$ g del ciclopéptido (previamente purificado) se suspendieron en 100  $\mu$ L de una mezcla de ACN: H<sub>2</sub>O 1:9 (v/v) + 0.1% de ácido fórmico. Esta disolución (2900 ng/ $\mu$ L) fue diluida a 29 ng/ $\mu$ L usando diferentes mezclas de metanol/H<sub>2</sub>O con ácido fórmico (disolvente de inyección). La mezcla óptima para la ionización del ciclopéptido en el espectrómetro de masas fue: metanol/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) + 0.1% de ácido fórmico. Se empleó el estándar leucina-encefalina a 2 ng/ $\mu$ L como referencia, el cuál fue

inyectado antes y después de inyectar la disolución del ciclopéptido. Esta disolución (29 ng/ $\mu$ L) fue analizada por introducción directa en el espectrómetro a través de una jeringa Hamilton 250  $\mu$ L a un flujo constante de 5  $\mu$ L/min en la fuente de ionización por electrospray. En la celda de movilidad iónica (T-Wave) se optimizó el voltaje del cono (CV) y la energía de colisión (CE) utilizando funciones con diferentes valores en el método MS con una duración de 0.5 min. Obteniéndose las siguientes condiciones de trabajo: ionización por electrospray en modo positivo, capilar 3000 V, voltaje de cono 40 V, extractor 4, temperatura de la fuente 150°C, temperatura de desolvatación 350°C, flujo del gas del cono 20 L/h, flujo del gas de desolvatación 700 L/h, intervalo de masas de 100–1000 Da y calibrado con el péptido leucina-encefalina (100 fmol/ $\mu$ L).

Para el análisis de los espectros de fragmentación MS<sup>2</sup> de los ciclopéptidos se empleó el software MassLynx, mMass y MSconvert para la conversión de archivos RAW a mzXML. La interpretación se realizó a partir de espectros combinados de una adquisición de 0.5 minutos y fueron anotados manualmente con ayuda de las herramientas de mMass para péptidos cíclicos (Niedermeyer *et al*, 2012).

## **5.5 Configuración absoluta de los aminoácidos**

La configuración absoluta de los residuos de aminoácidos del ciclopéptido ciclopurpuracina (**1**) se estableció mediante el método de Marfey usando el reactivo N $\alpha$ -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanilamida (FDAA) (Bhushan y Brückner, 2004). En un vial se colocaron 5  $\mu$ g de ciclopéptido y se adicionaron 100 $\mu$ L de HCL 6 M en atmósfera de nitrógeno. Este vial fue sellado y sometido a

calentamiento a una temperatura de 100°C por 3 h. La hidrólisis total del ciclopéptido fue monitoreada usando espectrometría de masas MALDI-TOF. La muestra hidrolizada fue secada a 40°C por 1 h y tratada con 20 µL de NaHCO<sub>3</sub> 1M y 40 µL del reactivo de Marfey al 1% en acetona a una temperatura de 40 °C durante una hora. Posteriormente, la mezcla se neutralizó con 20 µL HCl 1M, se diluyó con 100 µL de acetonitrilo y se filtró. Un µL del hidrolizado derivatizado se separó por RP-HPLC, empleando una columna C18 y gradiente de elución con H<sub>2</sub>O (0.05% TFA): ACN (0.05% TFA) con detector UV ( $\lambda$  =280 nm), ver tabla 5.3. Para establecer la configuración de los aminoácidos que componen al ciclopéptido se compararon los tiempos de retención del hidrolizado con los estándares D y L de los aminoácidos derivatizados con FDAA.

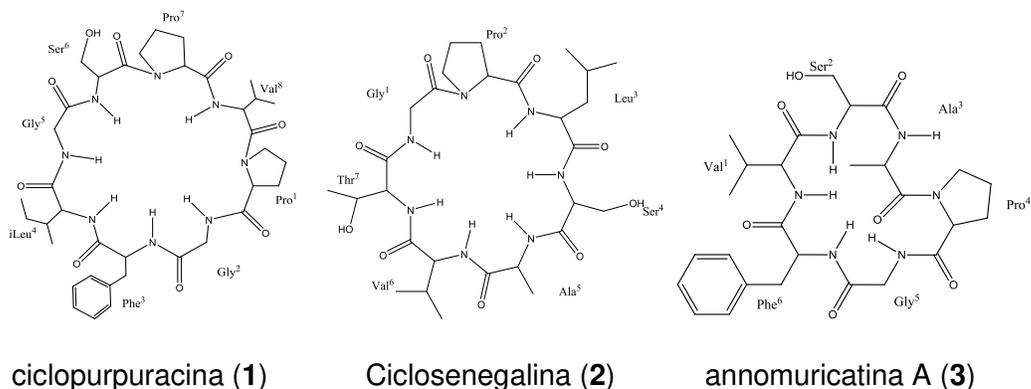
**Tabla 5.3.** Gradientes de elución de RP-HPLC para los aminoácidos derivatizados con reactivo de Marfey.

Tiempo [min]	Gradiente	
	% ACN (0.05 TFA)	% H <sub>2</sub> O (0.05 TFA)
0.00	10.0	90.0
3.00	10.0	90.0
8.00	30.0	70.0
22.00	57.0	43.0
26.00	75.0	25.0
32.00	10.0	90.0

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Aislamiento y purificación de ciclopéptidos

La CCA del extracto EtOH/H<sub>2</sub>O/AcOH de las semillas de *Annona purpurea*, generó diez fracciones nombradas como A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, de las cuales en las fracciones C (0.25 g), D (0.010 g) y E (0.025 g) se aisló un nuevo producto natural tipo ciclopéptido denominado como ciclopurpuracina (**1**), ciclo (-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-ILe<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-), y dos ciclopéptidos conocidos como: Ciclosenegalina (**2**): ciclo (-Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Leu<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-) y anomuricata A (**3**): ciclo (-Val<sup>1</sup>-Ser<sup>2</sup>-Ala<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-), cuyas estructuras se muestran en la Figura 6.1. En la purificación de estos ciclopéptidos se emplearon métodos cromatográficos: columna abierta, CPP, SEC-HPLC y RP-HPLC. La caracterización se hizo por métodos espectroscópicos de IR, UV y RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C y los experimentos COSY, NOESY, ROESY, HSQC y HMBC. La asignación de la secuencia de los aminoácidos que componen a estos ciclopéptidos se complementó por espectrometría de masas MS/MS y para el caso del compuesto **3**, se empleó un estudio de difracción de rayos-X.

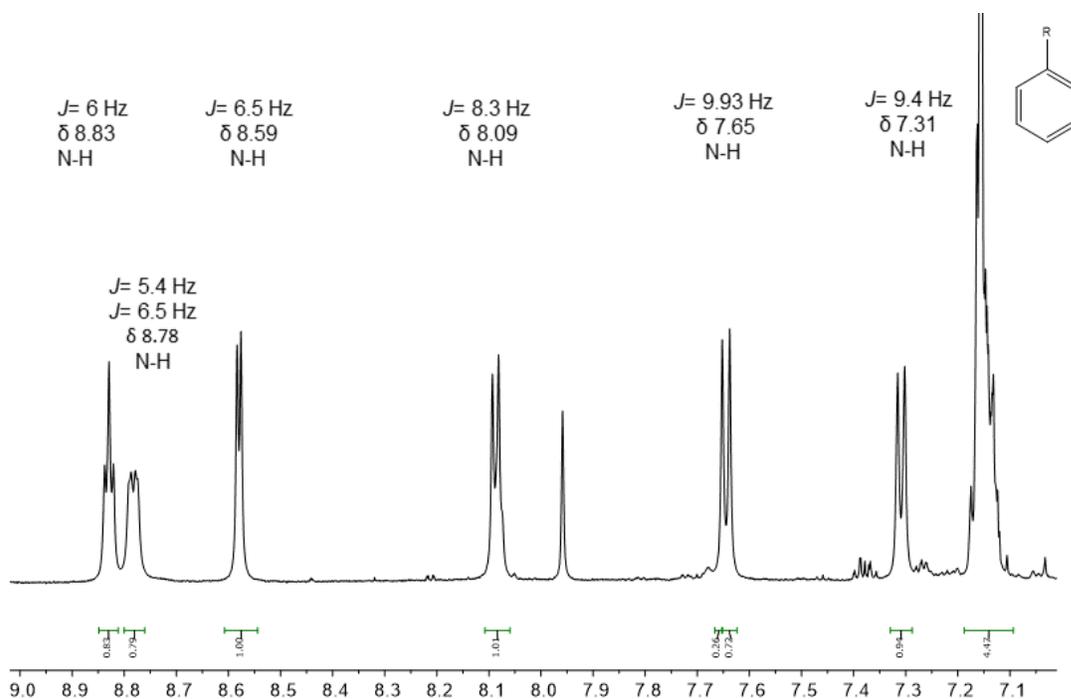


**Figura 6.1.** Estructuras moleculares de los ciclopéptidos aislados e identificados de semillas de frutos de *Annona purpurea*

## 6.2 Identificación de los ciclopéptidos

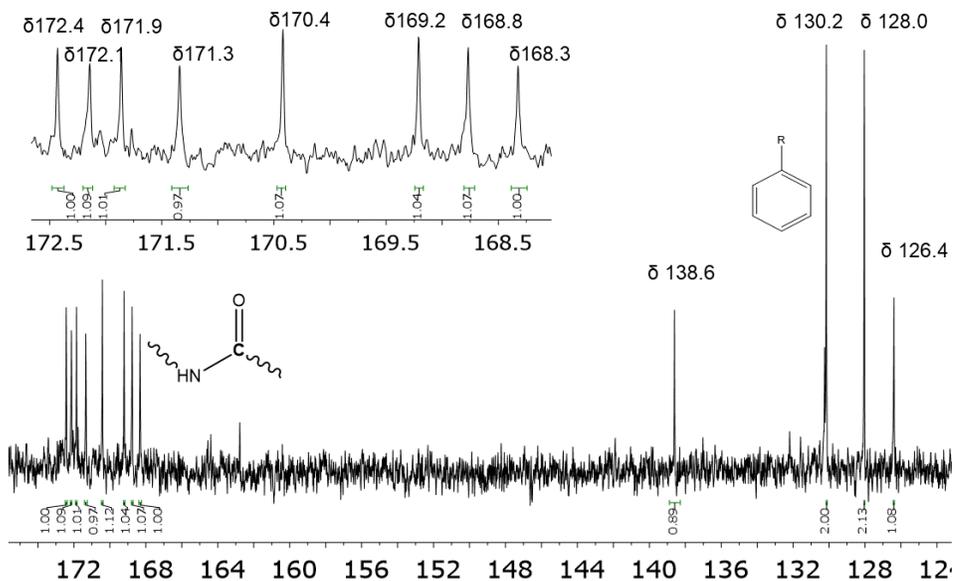
### 6.2.1 Ciclopurpuracina (1)

Del extracto hidroetanólico (EtOH/H<sub>2</sub>O/AcOH) se aisló por métodos cromatográficos (columna abierta, CPP, SEC-HPLC y RP-HPLC) un sólido blanco en forma de polvo que dio prueba positiva con el reactivo de Cl<sub>2</sub>/*o*-tolidina y negativa con la prueba de ninhídrica, indicando que se trataba de un ciclopéptido (Tan y Zhou, 2006). El punto de fusión de este sólido fue de 258-260°C, soluble en H<sub>2</sub>O, MeOH, acetona, ACN y DMSO. Su espectro de UV mostró bandas de absorción a 228 nm y 275 nm que fueron asignados a la presencia de enlace peptídico y de grupos aromáticos (Schwing *et al*, 2011). Por otro lado, en su espectro de infrarrojo se observaron bandas a 3300 cm<sup>-1</sup> y 1632 cm<sup>-1</sup> que corroboran la presencia del grupo amida en esta molécula (Schwing *et al*, 2011). En tanto que en su espectro de masas de alta resolución obtenido por HRESI-TOF MS se identificó un ion pseudo-molecular [M+H]<sup>+</sup> en *m/z* 755.4050 que se asoció a la fórmula molecular C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> correspondiente al peso molecular 754, de esta fórmula se calcularon 15 insaturaciones. Adicionalmente en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 700 MHz determinado en DMSO-*d*<sub>6</sub> (Figura 6.2) se observaron a alta frecuencia entre 8.83 y 7.31 ppm un conjunto de señales dobles y triples asociadas a los protones de tipo N-H de seis grupos amida con valores de constante de acoplamiento (*J*) entre 7 y 9 Hz reforzando estos datos la presencia de un ciclopéptido (Smith *et al*, 1996).



**Figura 6.2** Expansión de 7 a 9 ppm del espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS) de la ciclopurpuracina (**1**)

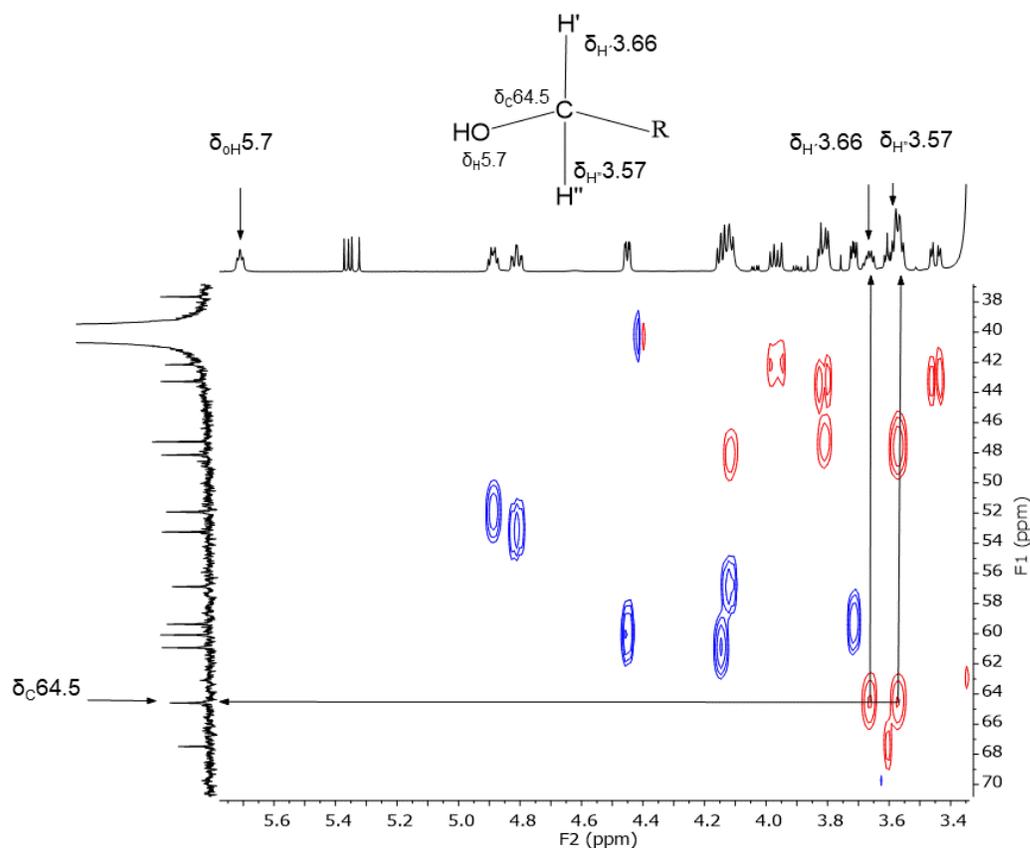
Complementariamente en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (determinado a 175 MHz en DMSO- $d_6$ ) de este ciclopéptido se observaron ocho señales entre 172 y 168 ppm (Figura 6.3) que sugieren la presencia de ocho grupos carbonilo de amida, indicando que este ciclopéptido contenía dos grupos prolina (Welé *et al*, 2004), por diferencia entre los protones de NH de amida y el carbono C=O de amida, y por lo tanto esta sustancia debe contener en total ocho residuos de aminoácidos.



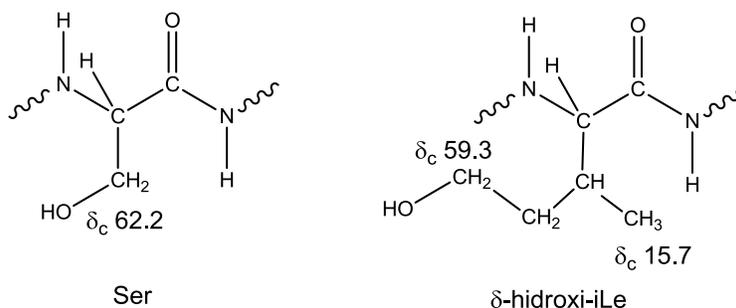
**Figura 6.3** Expansión de 175 a 125 ppm del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS) de la ciclopurpacina (**1**)

Analizando de nuevo la expansión del espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 6.2) de este ciclopéptido se observó una señal entre 7.14 ppm que integra para cinco hidrógenos, misma que fue asignada a un grupo fenilo, la información fue corroborada en su espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  por la presencia de cuatro señales a 138.7, 130.2, 128 y 126.4 ppm y de manera preliminar se puede suponer que éste ciclopéptido contiene un residuo de aminoácido de fenilalanina. Por otro lado, en el espectro de correlación espectroscópica heteronuclear a un enlace ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ) (HSQC, siglas en inglés) (Figura 6.4) determinado en DMSO- $d_6$  se observó una resonancia a 64.5 ppm que correlacionó a un enlace con los protones de un grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) a 3.66 y 3.57 ppm, éste desplazamiento en RMN- $^{13}\text{C}$  presupone que debe ser asignado a un grupo  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{OH}$  y observando la estructura de los aminoácidos serina y  $\delta$ -hidroxi-isoleucina contienen grupos hidroximetileno, sin embargo este aminoácido no-proteico tiene un desplazamiento químico en RMN-

$^{13}\text{C}$  en 59.3 ppm, entonces no es considerado como posibilidad de ser integrado como residuo de aminoácido presente en este ciclopéptido (**1**), Figura 6.5.

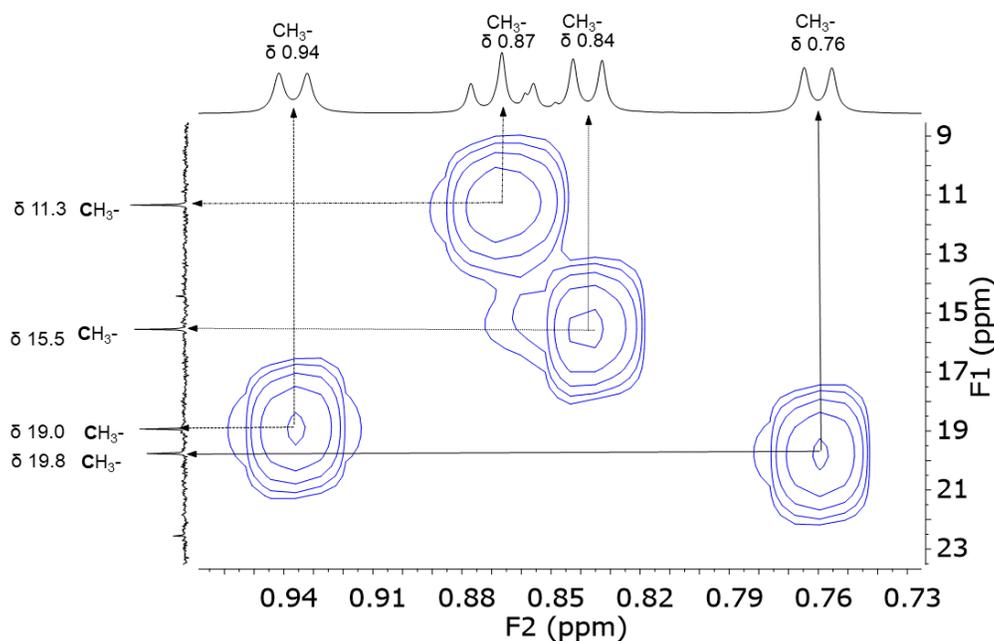


**Figura 6.4** Expansión de 3 a 6 ppm en RMN- $^1\text{H}$  (F2) y de 38 a 70 ppm en RMN- $^{13}\text{C}$  (F1) del espectro HSQC para el residuo serina de la ciclopurpuracina (**1**) en DMSO- $d_6$



**Figura 6.5** Desplazamientos publicados de RMN- $^{13}\text{C}$  de los residuos de aminoácidos que contienen grupos hidroximetileno en la cadena lateral (R) de un ciclopéptido

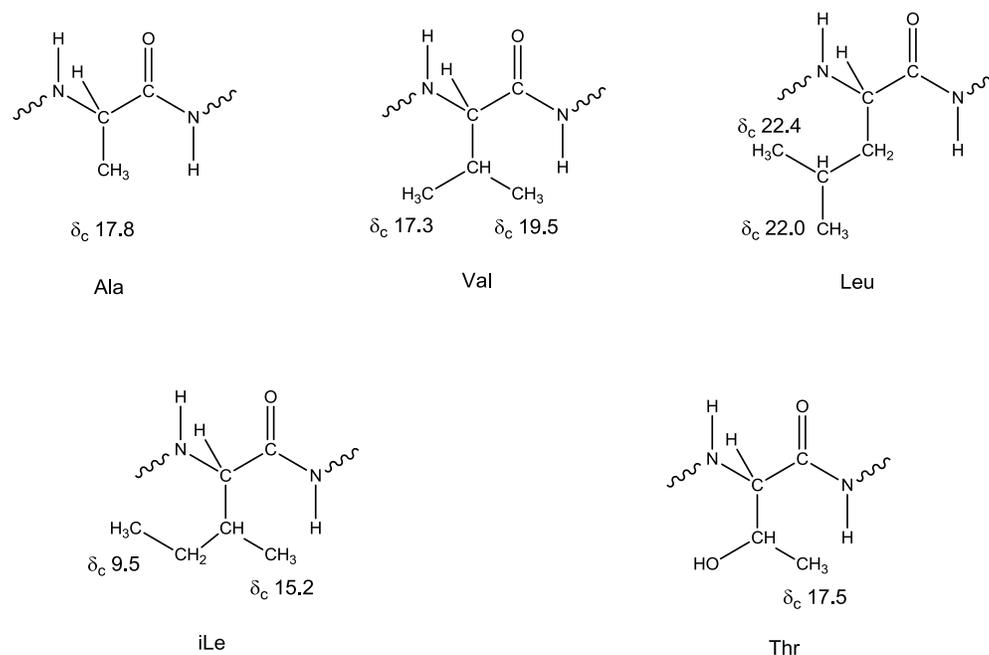
Continuando con el análisis del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la Ciclopurpuracina (1) a baja frecuencia entre 1.0 y 0.7 ppm se observaron un conjunto de señales que se asignaron a cuatro grupos metilo (-CH<sub>3</sub>), donde tres de ellos muestran multiplicidad de señales dobles y una señal triple. En el espectro HSQC se establecieron las correlaciones de las señales de RMN-<sup>1</sup>H de los metilos con sus RMN-<sup>13</sup>C (19.8, 19.0, 15.5 y 11.3 ppm) como se muestra en la expansión del espectro HSQC (Figura 6.6) de este ciclopeptido.



**Figura 6.6** Expansión de 0.7 a 1.0 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y de 9 a 23 ppm en RMN-<sup>13</sup>C (F1) del espectro HSQC de la ciclopurpuracina (1) en DMSO-*d*<sub>6</sub>

En este sentido, al analizar la estructura de los aminoácidos proteicos que contienen grupos metilo se tienen cinco: Ala, Val, Leu, iLe y Thr cuyos desplazamientos promedio de RMN-<sup>13</sup>C se muestran en la Figura 6.7 (Tan y Zhou, 2006). De estos aminoácidos, solamente la isoleucina muestra una señal doble y una señal triple en la zona considerada de metilos en RMN-<sup>1</sup>H, por lo que la

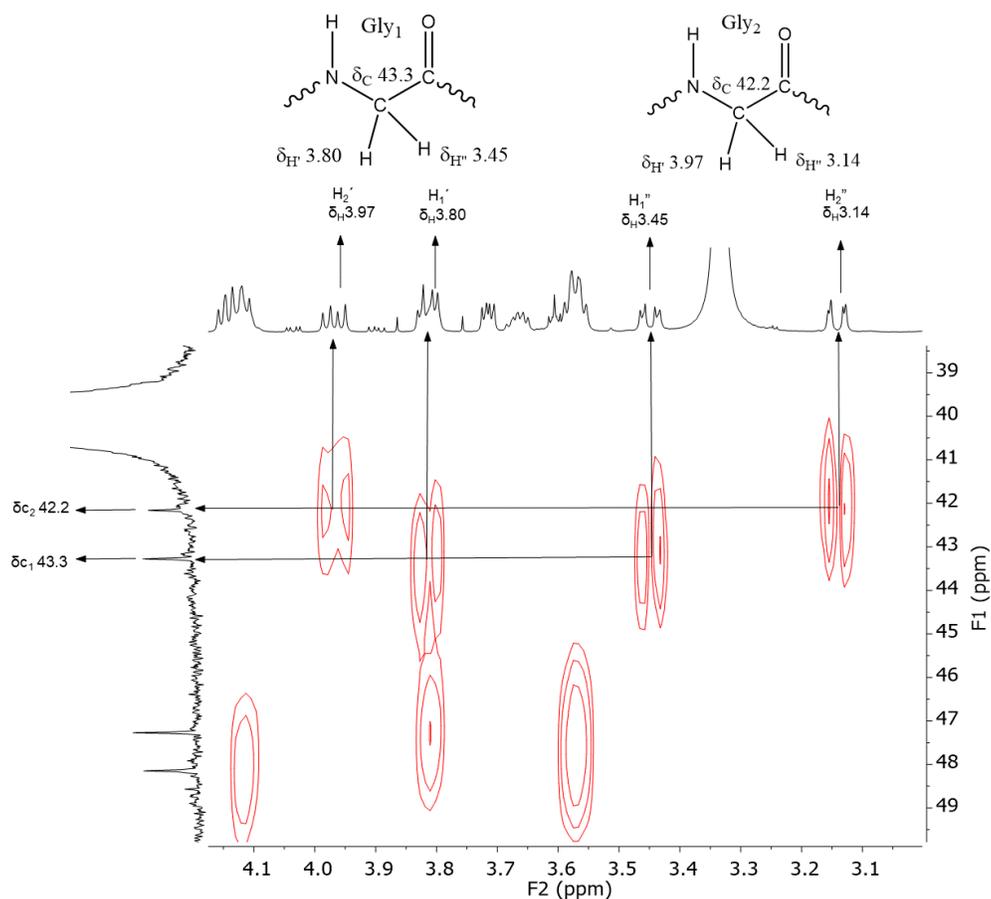
señales de 0.84 ppm y 0.87 ppm se atribuyó al residuo de iLe, además de los desplazamientos de sus carbonos en RMN-<sup>13</sup>C en 15.5 ppm y 11.3 ppm coinciden con los datos publicados para este residuo en ciclopéptidos.



**Figura 6.7** Desplazamientos publicados de RMN-<sup>13</sup>C de los residuos de aminoácidos proteicos que contienen grupos metilo en la cadena lateral (R)

Por otro lado, las dos señales dobles en 0.94 ppm ( $J = 6.7$  Hz) y 0.76 ppm ( $J = 6.5$  Hz) se asignaron a los grupos metilo de un radical de isopropilo ( $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ) presentes en el aminoácido valina, ya que los metilos de una valina se expresan como señales dobles debido a su vecindad al metino (CH) del grupo isopropilo. También se observó que los desplazamientos de RMN-<sup>13</sup>C en 19.0 y 19.8 ppm de dichos metilos son muy próximos a los publicados para valina, confirmando la presencia de dicho residuo. Por último, la presencia de dos residuos de aminoácido de glicina se dedujo al observar una señal doble de dobles y una señal triple (formalmente doble de dobles) en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H en 8.78 y 8.83

ppm (Figura 6.2). Información que fue corroborada por la observación en su espectro HSQC (Figura 6.8) de dos grupos metileno (-CH<sub>2</sub>-) en 43.3 y 42.2 ppm unidos al heteroátomo de nitrógeno.



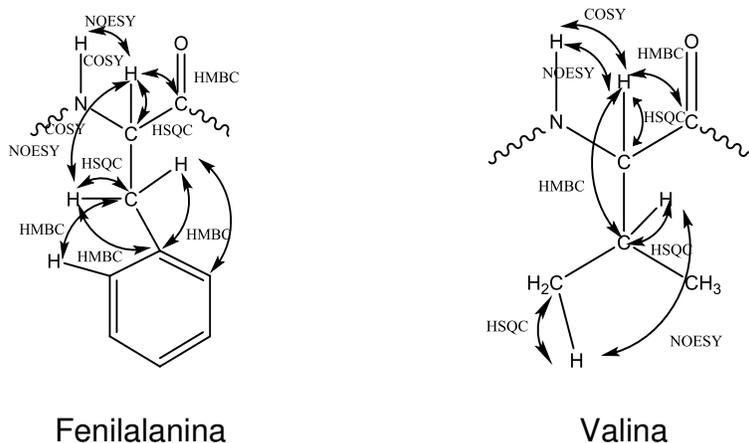
**Figura 6.8** Expansión de 3 a 5 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y de 50 a 39 ppm en RMN-<sup>13</sup>C (F1) del espectro HSQC que corrobora la presencia de los residuos de glicina de la ciclopurpuracina (**1**) en DMSO-*d*<sub>6</sub>

En resumen, hasta este nivel de discusión es posible proponer que el ciclopéptido denominado como ciclopurpuracina (**1**) contiene ocho residuos de aminoácidos, donde dos de ellos son prolinas, dos glicinas, además de fenilalanina, serina, isoleucina y valina. En la siguiente descripción se asignarán todos los desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de cada residuo de

aminoácidos empleando además las correlaciones homonucleares de COSY, NOESY, ROESY y heteronucleares tipo HSQC y HMBC.

### 6.2.1.1 Asignación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los residuos de los aminoácidos de la ciclopurpuracina (1)

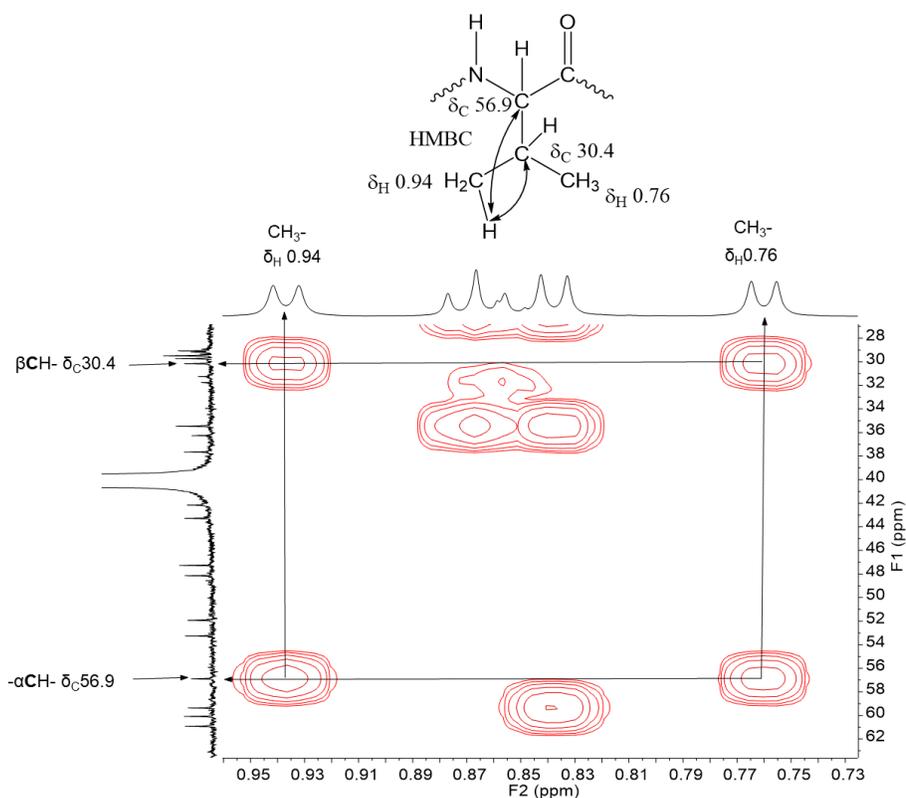
Para efectuar la asignación de los desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de cada aminoácido que componen al ciclopéptido se tomaron en cuenta las correlaciones directas de tipo COSY y HSQC para establecer la vecindad entre hidrógenos y la pertenencia de cada hidrógeno con su carbono correspondiente, también se consideraron las correlaciones a dos y tres enlaces tipo HMBC o través del espacio por sus espectros NOESY para asegurar cada asignación. La estrategia empleada se muestra en la Figura 6.9 como ejemplo para algunos aminoácidos.



**Figura 6.9** Parte de la estrategia empleada para asignar los desplazamientos químicos de los residuos de aminoácidos de la ciclopurpuracina (1)

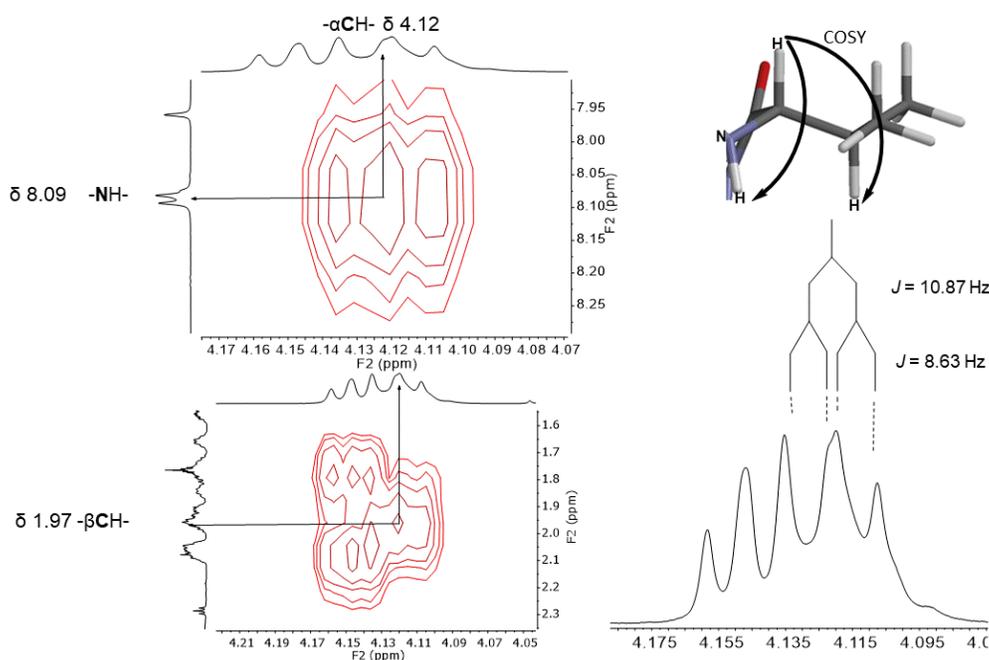
### 6.2.1.1.1 Asignación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del residuo del aminoácido valina

El análisis de la expansión del espectro bidimensional heteronuclear HMBC determinado en DMSO-*d*<sub>6</sub> de la ciclopurpuracina (**1**) muestra picos cruzados de una señal de resonancia de un carbono ( $\alpha$ CH al grupo carbonilo) en 56.9 ppm con los protones de los grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) en 0.76 y 0.94 ppm. De manera análoga en el carbono ubicado en 30.4 ppm ( $\beta$ CH al grupo carbonilo) de la valina se observan picos cruzados también con los protones de ambos grupos metilo (Figura 6.10).



**Figura 6.10** Expansión de 0.73 a 0.95 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y 28 a 62 ppm en RMN-<sup>13</sup>C (F1) del espectro HMBC de la ciclopurpuracina (**1**) en DMSO-*d*<sub>6</sub> para la asignación del residuo valina

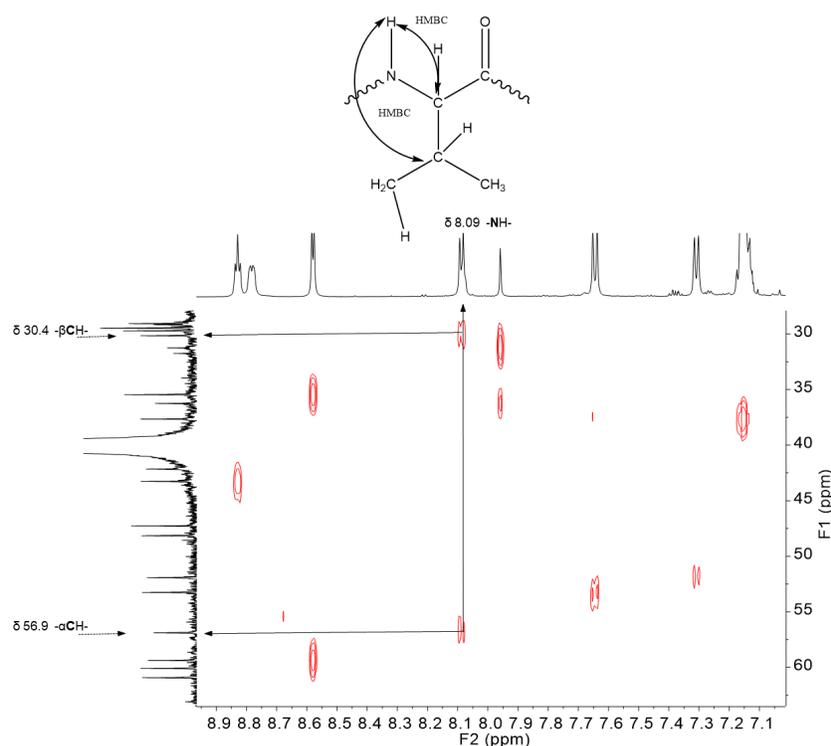
Por otro lado, el desplazamiento del protón en 4.12 ppm  $\alpha$  al grupo carbonilo, muestra una correlación a un enlace con el carbono  $\alpha$ CH en 56.9 ppm en HSQC, mientras que este protón en su espectro unidimensional de RMN- $^1$ H presentó una multiplicidad de doble de dobles con constantes de acoplamiento ( $J$ ) de 10.87 y 8.63 Hz (Figura 6.11). La asignación del NH de la valina se determinó por la correlación COSY que muestra un pico cruzado del protón  $\alpha$ CH (4.12 ppm) con el protón N-H a 8.09 ppm con  $J$  de 8.3 Hz, en este mismo espectro se observó la correlación del protón  $\alpha$ CH (4.12 ppm) con el protón  $\beta$ CH en 1.97 ppm (Figura 6.11).



**Figura 6.11** Expansiones de 4.12 ppm ( $\alpha$ CH) vs 8.09 ppm (NH) de RMN- $^1$ H y 4.12 ppm ( $\alpha$ CH) vs 1.97 ppm ( $\beta$ CH) de RMN- $^1$ H del espectro COSY de la ciclopuracina (**1**) en DMSO- $d_6$  para el residuo valina

A través del espectro HMBC se confirmó la correlación del protón N-H a 8.09 ppm a dos enlaces con el carbono  $\alpha$ CH en 56.9 ppm y a tres enlaces con el

carbono  $\beta$ CH en 30.4ppm (Figura 6.12), confirmando el sistema de valina. Finalmente, el protón en 4.12 muestra un pico cruzado con el carbono del carbonilo a 170.4 ppm en su espectro HMBC.

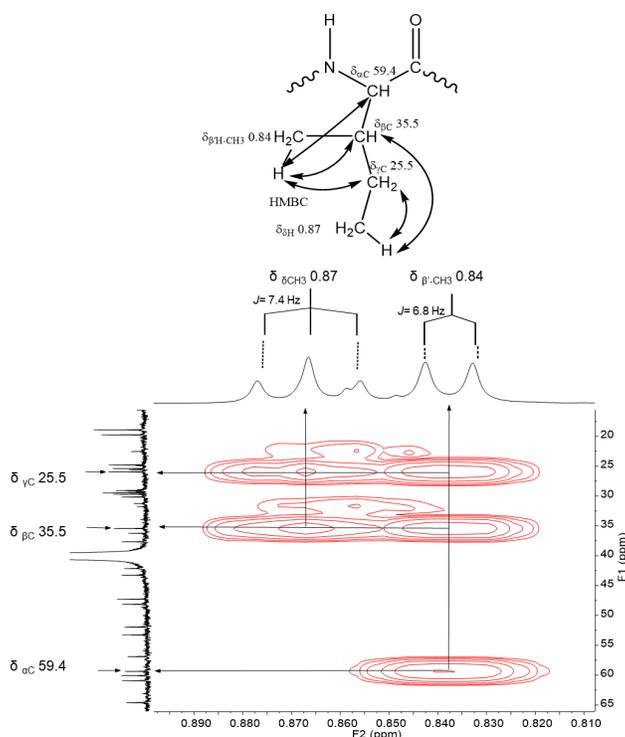


**Figura 6.12** Expansión de 7.1 a 9 ppm en RMN- $^1\text{H}$  (F2) y de 30 a 60 ppm en RMN- $^{13}\text{C}$  (F1) del espectro HMBC de la cicloporpuracina (1) en DMSO- $d_6$  para el residuo valina

#### 6.2.1.1.2 Asignación de los espectros de RMN- $^1\text{H}$ y RMN- $^{13}\text{C}$ del residuo del aminoácido isoleucina

De manera análoga a la asignación del residuo de valina, el residuo de isoleucina se inició por una señal característica de resonancia correspondiente a la señal triple en 0.87 ppm de los protones de un grupo metilo que muestran correlaciones con el carbono del metileno ( $-\text{CH}_2$ ) en 25.9 ppm y el carbono del grupo metino ( $-\text{CH}$ ) en 35.5 ppm en el espectro HMBC (Figura 6.13). De forma

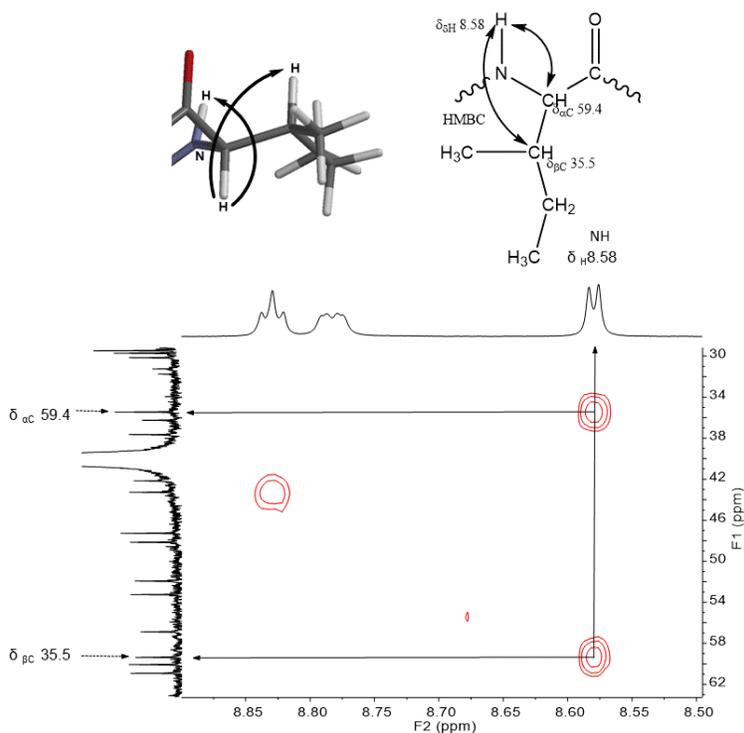
similar la señal doble en 0.84 ppm de los hidrógenos de otro grupo metilo muestran tres picos cruzados, uno con el carbono de metileno (-CH<sub>2</sub>) en 25.5 ppm, otro con el grupo metino (-CH) en 35.5 ppm y a tres enlaces de carbono del grupo αCH en 59.4 ppm en el espectro HMBC (Figura 6.13).



**Figura 6.13** Expansión de 0.82 a 0.89 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y 20 a 65 ppm en RMN-<sup>13</sup>C (F1) del espectro HMBC de la cicloleucina (**1**) en DMSO-*d*<sub>6</sub> para el residuo isoleucina

En el espectro HSQC el carbono en 59.4 ppm presenta correlación con el protón a 3.71 ppm asignado al grupo -αCH-. Al analizar el espectro bidimensional heteronuclear HMBC se observa la correlación del carbono del grupo metino (-CH-) en 35.5 ppm y del carbono del grupo αCH en 59.4 ppm con la señal en 8.58 ppm asignada al protón NH (Figura 6.14). La asignación del NH de la isoleucina se confirmó con el espectro bidimensional homonuclear COSY, donde se observa la correlación del protón a 3.71 ppm del grupo -αCH- con la señal a 8.58 ppm del

NH. Finalmente, en el espectro HMBC de la ciclopurpuracina (**1**) se muestra una correlación a dos enlaces entre el protón del carbono  $\alpha$ CH en 3.71 ppm con la resonancia a 172.4 ppm del carbono del grupo carbonilo.

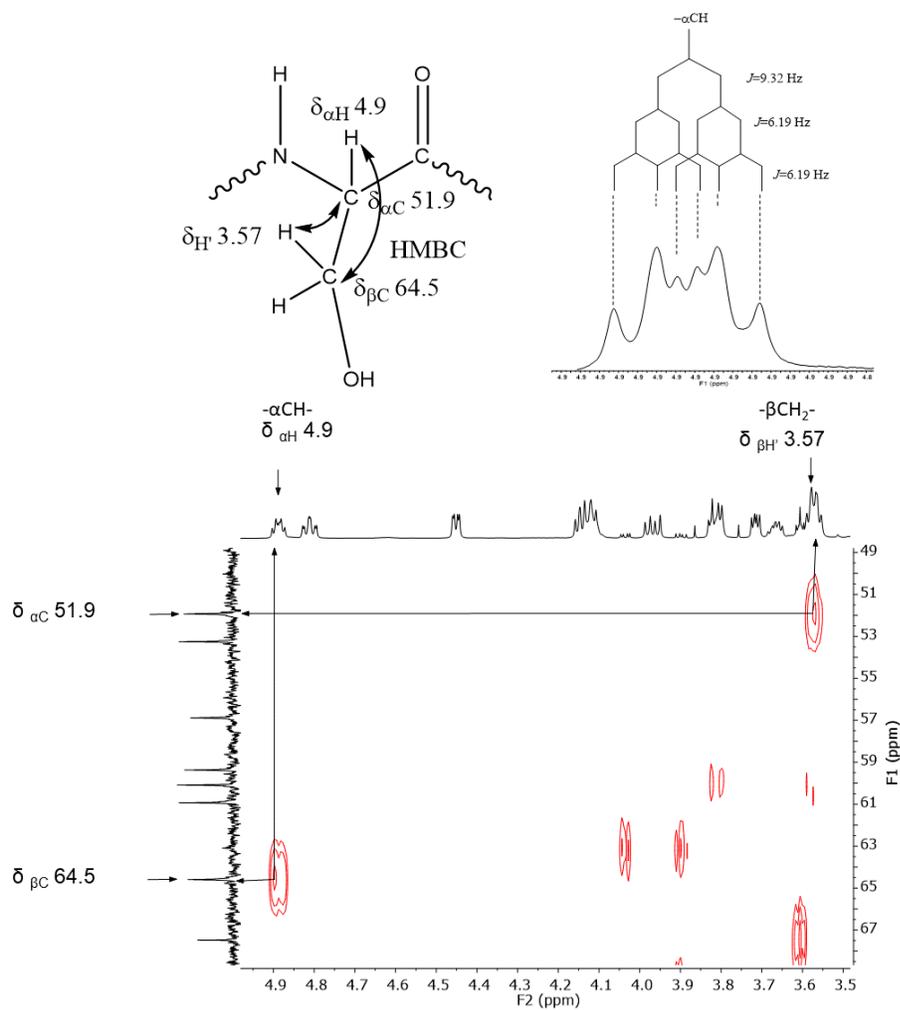


**Figura 6.14** Proyección de la conformación de isoleucina y expansión de 8.5 a 8.8 ppm en RMN- $^1\text{H}$  (F2) y 30 a 62 ppm en RMN- $^{13}\text{C}$  (F1) del espectro HMBC de la ciclopurpuracina (**1**) en DMSO- $d_6$

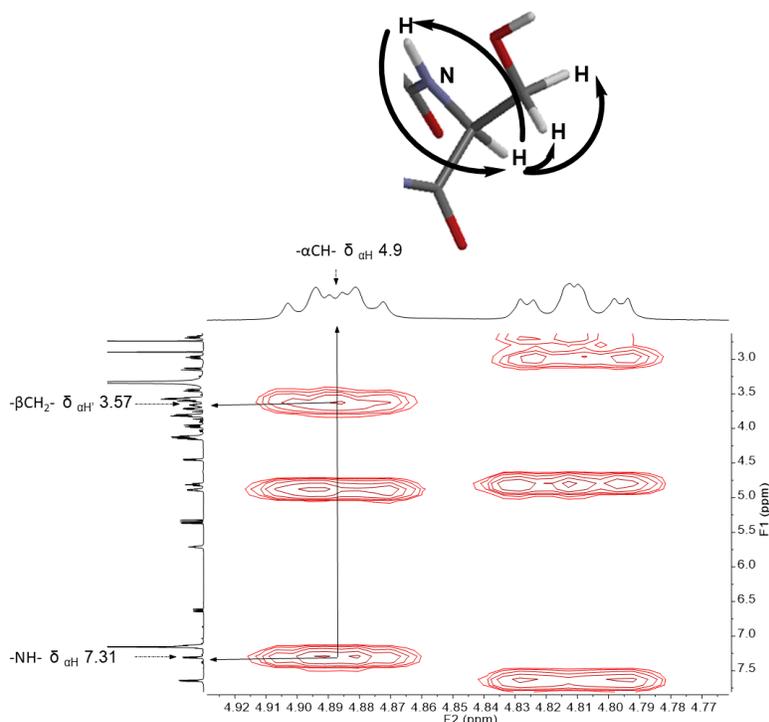
### 6.2.1.1.3 Asignación de los espectros de RMN- $^1\text{H}$ y RMN- $^{13}\text{C}$ del residuo del aminoácido serina

La asignación del residuo de serina inicio con una señal en 5.71 ppm en el espectro HSQC que no muestra correlación con algún carbono, esta señal se atribuyó a un protón de un grupo hidroxilo. En este mismo espectro HSQC de la ciclopurpuracina (**1**) se observó la correlación a un enlace de la señal en 64.5 ppm con dos protones en 3.66 y 3.57 ppm, indicando con ésto la presencia de un grupo

hidroximetileno del residuo de serina (Figura 6.4). La asignación del grupo  $-\alpha\text{CH}$  de la serina se determinó en el espectro HMBC por la correlación del carbono del grupo hidroximetileno con una señal del protón en 4.9 ppm de multiplicidad doble de triple, cuyo carbono a su vez correlaciona con uno de los protones del hidroximetileno en 3.57 ppm (Figura 6.15). El protón a 4.9 ppm correspondiente al grupo  $-\alpha\text{CH}$  de la serina está correlacionado con la señal a 7.31 ppm en su espectro COSY perteneciente al grupo NH del residuo de este aminoácido (Figura 6.16). A través de la correlación HMBC entre el protón a 4.9 ppm del grupo  $-\alpha\text{CH}$  y la señal en 169.2 ppm del carbono se estableció el grupo carbonilo perteneciente a este residuo de serina.



**Figura 6.15** Expansión de 3.5 a 5 ppm en RMN- $^1H$  (F2) y 49 a 67 ppm en RMN- $^{13}C$  (F1) del espectro HMBC de la ciclopurpuracina (**1**) en DMSO- $d_6$  para el residuo serina

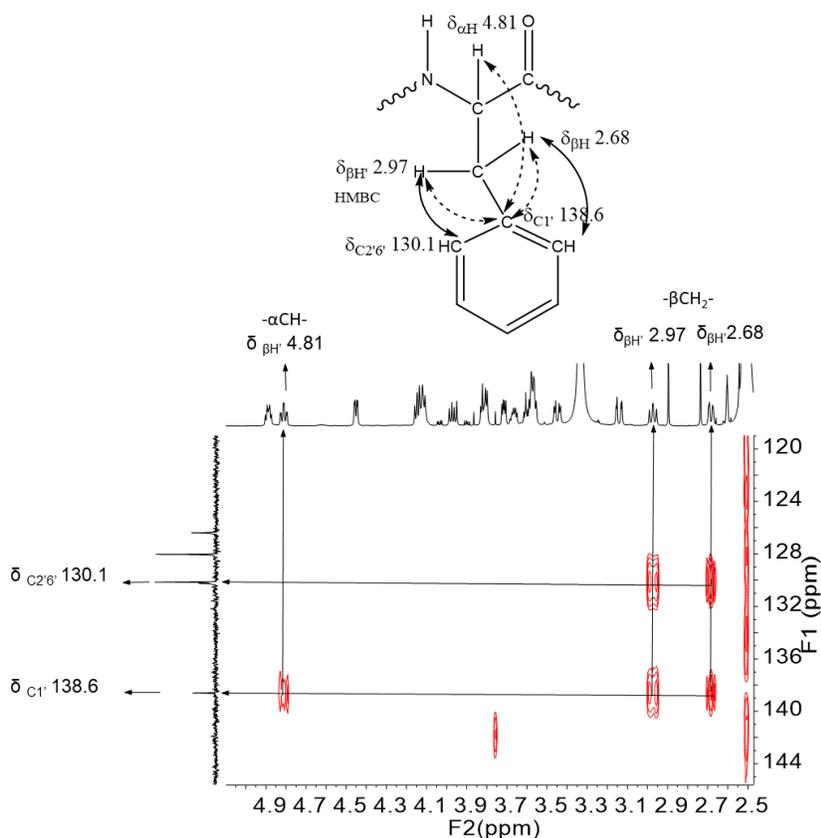


**Figura 6.16** Expansión de 4.7 a 4.9 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y 3 a 7.5 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F1) del espectro COSY de la ciclopurpuracina (**1**) en DMSO-*d*<sub>6</sub> que muestra las correlaciones de la serina

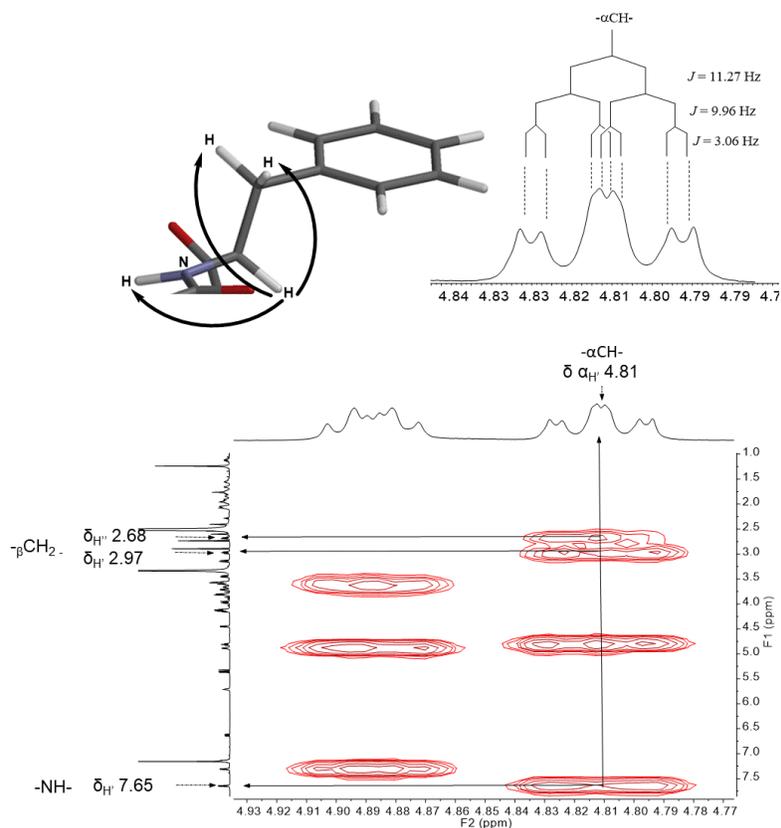
#### 6.2.1.1.4 Asignación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del residuo del aminoácido fenilalanina

La asignación de los desplazamientos químicos del residuo de fenilalanina inicia a partir del carbono aromático *ipso* (C1') en 138.6 ppm que muestra picos cruzados en el espectro HMBC por correlación a dos enlaces con los protones a 2.97 y 2.68 ppm de un grupo metileno -CH<sub>2</sub>- (Figura 6.17). Así mismo la resonancia a 130.1 ppm se asignó a los carbonos *orto* (C-2') de un grupo fenilo por su correlación a tres enlaces con los protones del grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) anterior (Figura 6.17). En el mismo sentido, en el espectro HMBC de la ciclopurpuracina (**1**) también se observa una correlación heteronuclear a tres enlaces del carbono *ipso* (C1') en 138.6 ppm con el protón a 4.81 ppm asignado al

grupo  $-\alpha\text{CH}-$  al carbonilo. En el espectro COSY de este ciclopéptido se observó una correlación vecinal de este último protón con la señal a 7.65 ppm correspondiente al protón del grupo NH (Figura 6.18). Finalmente, la resonancia a 171.9 ppm se asigna al carbono del carbonilo por correlación HMBC a dos enlaces con este mismo protón a 4.81 ppm.



**Figura 6.17** Expansión de 2.5 a 5 ppm en RMN- $^1\text{H}$  (F2) y de 120 a 144ppm en RMN- $^{13}\text{C}$  (F1) del espectro HMBC que muestra las correlaciones a dos y tres enlaces del residuo de fenilalanina en la ciclopuracina (**1**)

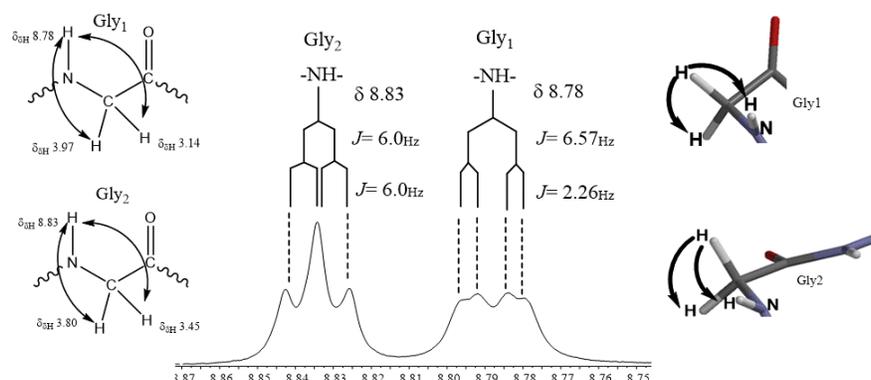


**Figura 6.18** Expansión de 4.7 a 4.9 ppm en RMN- $^1\text{H}$  (F2) y de 3 a 7.5 ppm en RMN- $^1\text{H}$  (F1) del espectro COSY que muestra las correlaciones del protón  $-\alpha\text{CH}-$  con los protones a dos y tres enlaces  $-\text{NH}-$  y  $-\text{CH}_2-$  del residuo de fenilalanina en la ciclopurpuracina (**1**)

#### 6.2.1.1.5 Asignación de los espectros de RMN- $^1\text{H}$ y RMN- $^{13}\text{C}$ de los residuos de los aminoácidos de glicinas

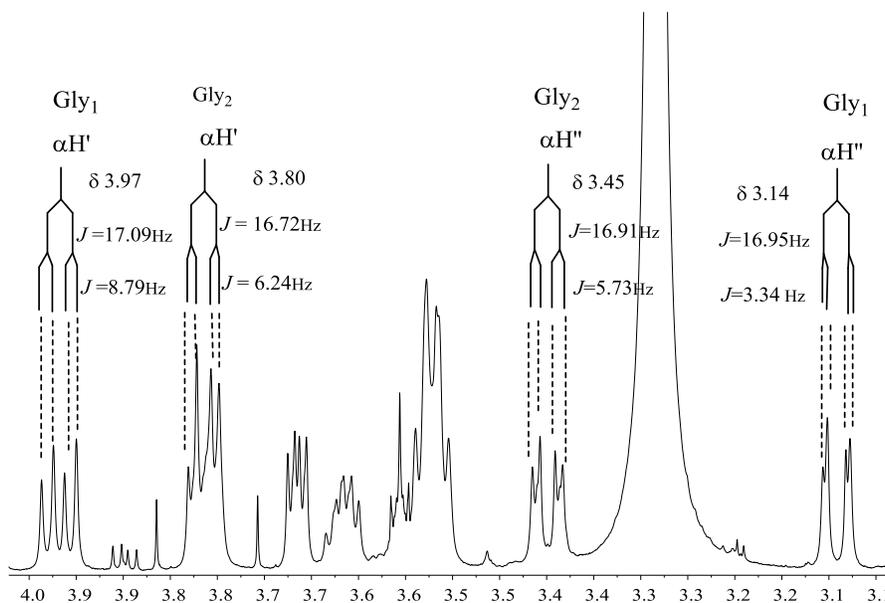
Las señales de los protones tipo  $-\text{NH}-$  en 8.78 y 8.83 ppm en RMN- $^1\text{H}$  con multiplicidad de doble de doble y triple respectivamente indican que tiene de vecino cada NH a un grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) típico de dos grupos glicina donde el protón del NH esta acoplado a los dos hidrógenos diastereotópicos del  $\text{CH}_2$  ( $\text{H}'\alpha$  y  $\text{H}''\alpha$ ) con constantes de acoplamiento vecinal ( $J^\beta$ ) y geminales ( $J^\alpha$ ), Figura 6.19. Con la hipótesis de la presencia de dos glicinas se buscó en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  del ciclopéptido en la zona de  $\text{CH}_2$  (3 a 5 ppm) las señales con multiplicidades

dobles de dobles que expresan cada uno de los protones diastereotópicos del  $-\text{CH}_2-$ . Al examinar esta zona se observaron cuatro grupos de señales dobles de dobles: en 3.97 ppm ( $J^\beta = 17.09$ ,  $J^\alpha = 8.79$  Hz), 3.14 ppm ( $J^\beta = 16.95$ ,  $J^\alpha = 3.34$  Hz), 3.45 ppm ( $J^\beta = 16.8$ ,  $J^\alpha = 5.73$  Hz) y 3.80 ppm ( $J^\beta = 16.72$ ,  $J^\alpha = 6.24$  Hz), lo que indica la posibilidad de tener dos aminoácidos de glicina en el ciclopéptido, es de advertir que los ángulos diedro que forman los enlaces H-N-C-H de ambas glicinas son diferentes por ejemplo en la glicina asignada como Gly 2, dichos ángulos son de valores muy próximos, observándose una señal que en apariencia corresponde a una señal triple pero que en realidad es una señal doble de doble, en tanto que en la asignada como Gly 1 se aprecian ángulos diedros muy diferentes, observándose una señal doble de dobles típica, como se muestra en la Figura 6.19. Cabe resaltar que las constantes de acoplamiento de los protones diastereotópicos de los grupos  $-\text{CH}_2-$  de estas glicinas se ven reflejadas en patrones de acoplamiento en el espectro RMN- $^1\text{H}$  (Figura 6.20).



**Figura 6.19** Expansión del espectro RMN- $^1\text{H}$  de 8.7 a 8.86 ppm para protones tipo N-H de Gly<sub>1</sub> y Gly<sub>2</sub> mostrando las multiplicidades que ayudan a asignar cada unidad de glicina en la ciclopurpúracina (1)

En el espectro HSQC se observó que el carbono en 42.2 ppm tiene correlación con los protones 3.97 ppm y 3.14 ppm antes mencionados de un  $-\text{CH}_2-$  para una glicina y el carbono con 43.3 ppm tiene correlación con los protones en 3.45 ppm y 3.80 ppm que pertenecen a la segunda glicina, Figura anterior 6.8.

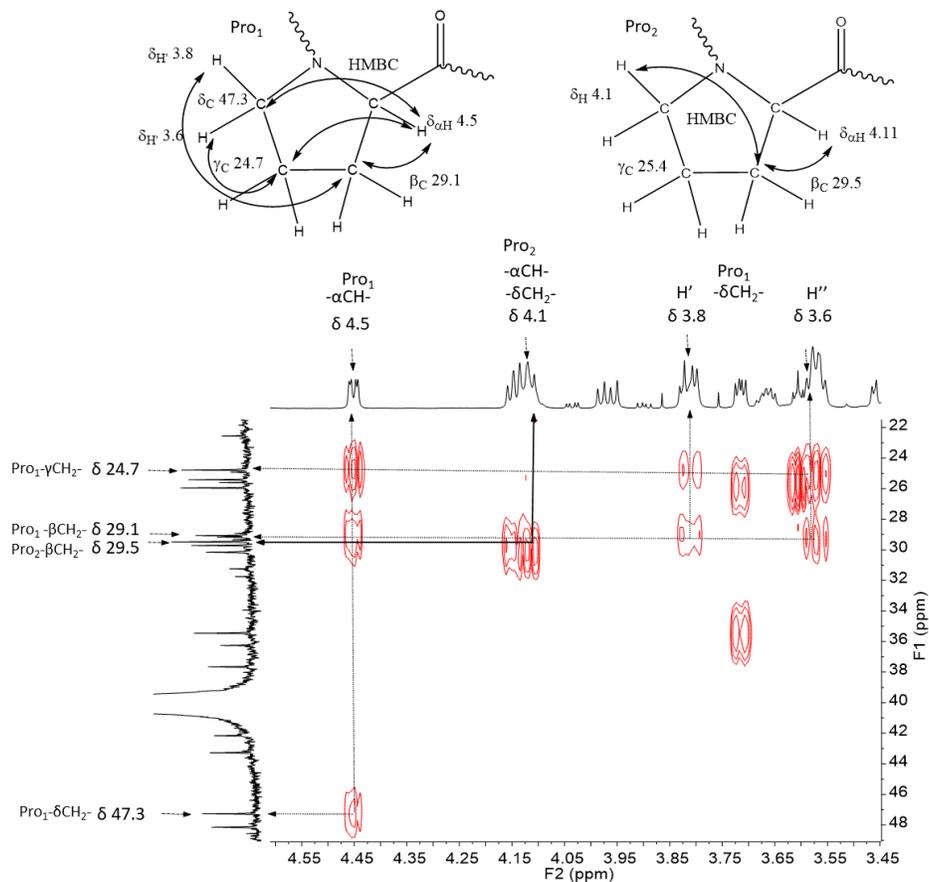


**Figura 6.20** Expansión del espectro RMN- $^1\text{H}$  de 4.0 a 3.0 ppm para protones tipo diastereotópicos de  $-\alpha\text{CH}_2-$  de los grupos glicina en la ciclopurpuracina (**1**)

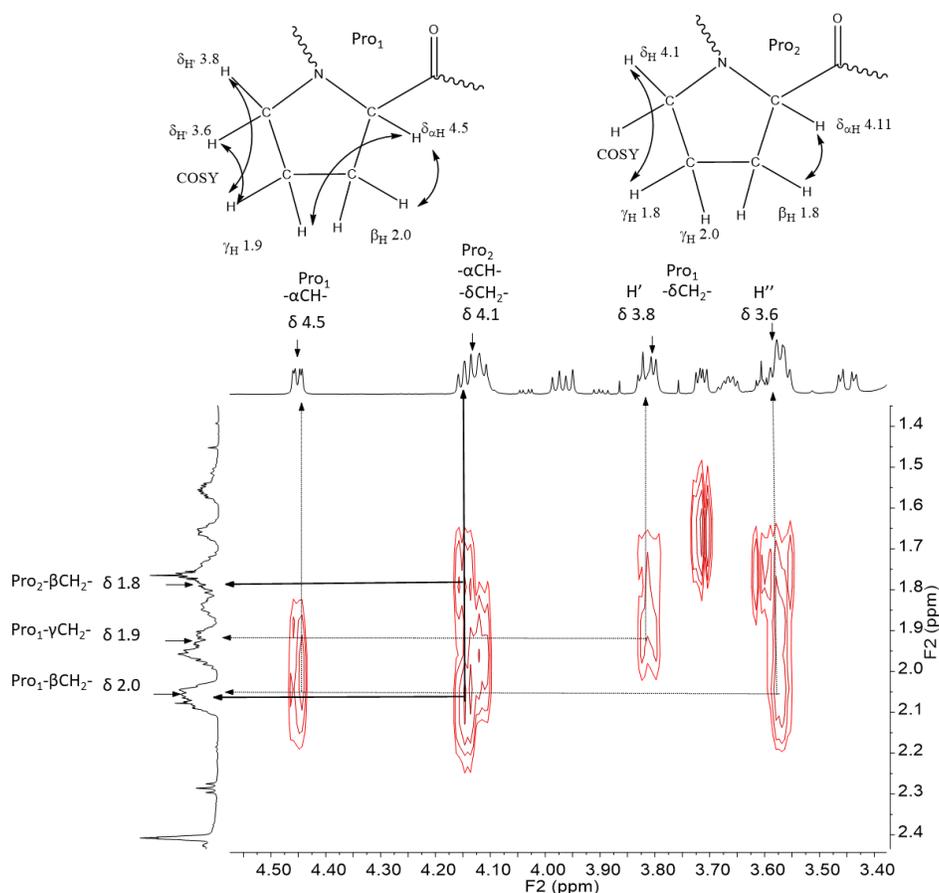
En tanto en el espectro COSY de este ciclopéptido (**1**) se observaron las correlaciones de los NH de cada glicina, donde la señal del protón NH en 8.78 ppm correlaciona con los protones  $\alpha\text{CH}_2$  en 3.97 ppm y 3.14 ppm para la glicina 1 y el protón en 8.83 ppm correlaciona con los protones  $\alpha\text{CH}_2$  en 3.45 ppm y 3.80 ppm para la glicina 2. Finalmente, también en el espectro HMBC se confirmaron las correlaciones de los dos protones  $-\text{NH}-$  con los respectivos carbonos  $\alpha\text{CH}_2$ , 42.2 ppm y 43.3 ppm, así como los grupos carbonilos correspondientes a cada glicina, donde la resonancia de 168.8 ppm se asignó a la glicina 1 y 168.3 ppm a la glicina 2.

#### **6.2.1.1.6 Asignación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los residuos de los aminoácidos de prolinas**

En párrafos anteriores se mencionó que en RMN-<sup>13</sup>C se observaron ocho grupos carbonilo de amida, pero en RMN-<sup>1</sup>H se tienen sólo seis señales de NH deduciéndose que están presentes en el ciclopéptido (**1**) dos residuos de prolina ya que se tiene el grupo carbonilo de amida, pero su amino no contiene hidrógeno, lo que permite que no se observe su resonancia en el espectro de protón. Al observar el espectro HSQC se encontró que se tienen dos grupos metino (-CH-), uno con un punto de cruce en 60.1 ppm en RMN-<sup>13</sup>C con 4.45 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (prolina 1) y otro en 60.9 ppm en RMN-<sup>13</sup>C con 4.15 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (prolina 2) que hasta el momento no han sido asignados; por la posición en que se encuentran estas señales (de 3 a 5 ppm características de metino alfa a carbonilo) y de acuerdo a lo mencionado en párrafos anteriores se presupuso que podría tratarse de los -αCH- de las prolinas. Por otro lado, en el espectro DEPT se observaron dos señales de metilenos (-CH<sub>2</sub>-) con desplazamientos en RMN-<sup>13</sup>C a mayor frecuencia (48.1 ppm y 47.3 ppm) característicos de metilenos enlazados al heteroátomo nitrógeno, asignándose éstos a las prolinas. Mediante los espectros HMBC, COSY y HSQC se asignaron los desplazamientos de los protones y carbonos β, γ, δ pertenecientes a cada prolina, dichos datos se encuentran concentrados en las Figuras 6.21 y 6.22. Por último, en el espectro HMBC se confirmaron las correlaciones de los protones -αCH- en 4.5 ppm de prolina 1 y en 4.11 ppm de prolina 2 con los grupos carbonilos correspondientes a cada prolina, donde la señal de 171.3 ppm se asignó a la prolina 1 y 172.2 ppm a la prolina 2.



**Figura 6.21** Expansión de 3.5 y 4.6 ppm en RMN- $^1\text{H}$  (F2) y 22 a 48 ppm en RMN- $^{13}\text{C}$  (F1) del espectro HMBC que muestra las correlaciones entre los protones  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  de los residuos de prolina 1 (líneas punteadas) y prolina 2 (líneas continuas) con sus respectivos carbonos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  en la ciclopurpuracina (**1**)



**Figura 6.22** Expansión de 3.4 a 4.5 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y de 1.4 a 2.4 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F1) del espectro COSY que muestra las correlaciones entre los protones  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  de los residuos de los aminoácidos de prolina 1 (líneas punteadas) y prolina 2 (líneas continuas) en la ciclopurpuracina (**1**)

### 6.2.1.2 Masa exacta y secuencia de los residuos de los aminoácidos de la ciclopurpuracina (**1**) por espectrometría de masas de alta resolución

Por la información obtenida de los datos de RMN a 700 MHz se sabía que el ciclopéptido estaba constituido por ocho aminoácidos (dos glicinas, dos prolinas, fenilalanina, valina, isoleucina, serina) y que presenta un peso molecular de 754 obtenido por espectrometría de masas MALDI-TOF, sin embargo, hasta ese momento aún resultaba confusa la asignación de la secuencia entre los aminoácidos que componen al ciclopéptido (**1**) por RMN, ya que se tenían

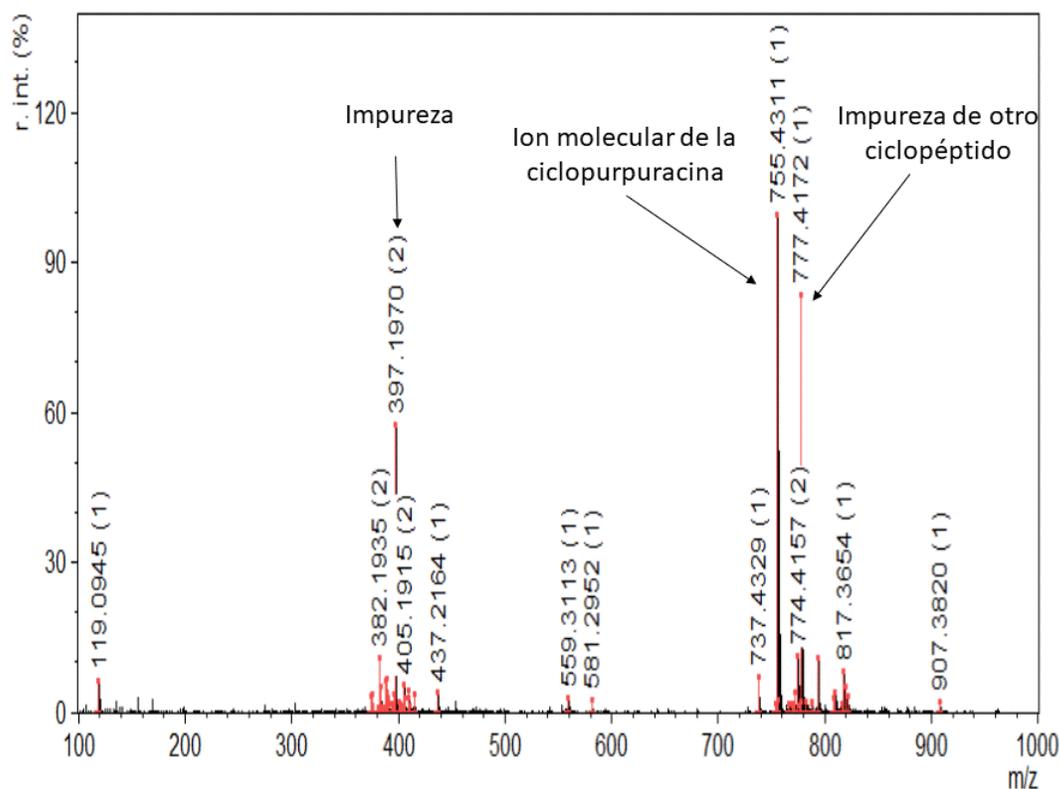
interferencias en el espectro, por lo que se recurrió a espectrometría de masas de alta resolución.

#### **6.2.1.2.1 Espectro (MS)<sup>1</sup> para obtener la masa exacta de la ciclopurpuracina (1)**

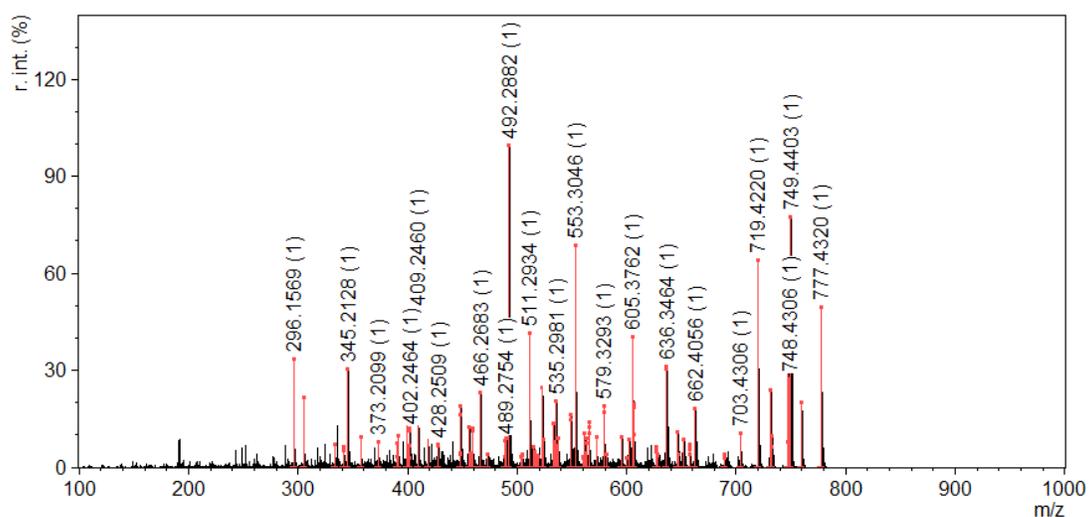
Partiendo de la información aportada en el espectro de masas MS1 obtenido del equipo Ms Synap se observó el pico correspondiente al ion molecular esperado  $[M+H]^+ = 755.4311$  para el ciclopéptido, ciclopurpuracina (1), con fórmula molecular  $C_{37}H_{54}N_8O_9$ ; con un error de 29.7 ppm respecto al  $[M+H]^+$  teórico (755.4087). Sin embargo, se observan también 2 picos de intensidad considerable:  $777.4172^+$  a 83% y  $397.1979^{++}$  a 58% de la intensidad del ion principal ( $755.4311^+$ ) (Figura 6.23). Esto indica una posible contaminación de la muestra, por lo que se obtuvieron espectros de fragmentación de estos dos iones (Figura 6.24 y Figura 6.25) a manera de verificación. El espectro MS2 del ion  $777.4172^+$  presenta diferencias de masa correspondientes con residuos de aminoácidos, lo que indica que podría tratarse de otro ciclopéptido; aunque la secuenciación *de novo* no fue realizada para este ion. Las diferencias de masa entre los fragmentos del ion  $397.197^{++}$  no corresponden con las de residuos de aminoácidos, por lo que puede tratarse de otro tipo de contaminación.

A partir del espectro MS1 calibrado presentado en la Figura 6.23 se obtuvo la masa exacta del ciclopéptido ciclopurpuracina (1):

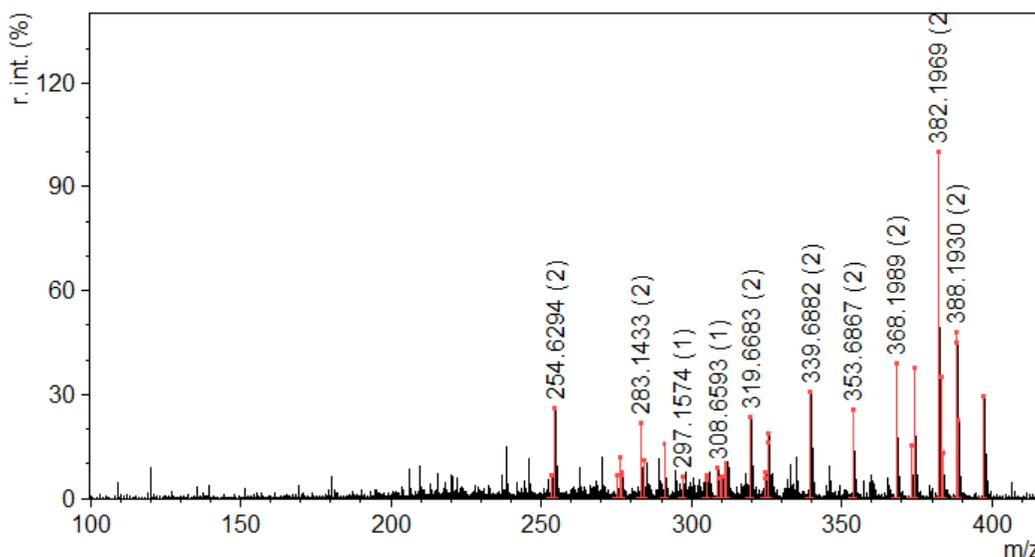
- $[M+H]^+$  teórico = 755.4087
- $[M+H]^+$  detectado = 755.4050 (error = - 5ppm)
- Masa molecular teórica: 754.4014



**Fig. 6.23** Espectro MS1 de ciclopurpuracina (1) a un CV de 40 V. Los números entre paréntesis representan la carga de los iones asignados



**Fig. 6.24** Espectro MS2 del ion padre 777. 41+ a un CV de 40 V y CE de 55 eV. Los números entre paréntesis representan la carga de los iones asignados



**Fig. 6.25** Espectro MS2 del ion padre 397.1970++ a un CV de 25 V y CE de 55eV

#### 6.2.1.2.2 Espectro (MS)<sup>2</sup> del ion 755.40<sup>+</sup> de la ciclopurpuracina (1) y verificación de la secuencia peptídica

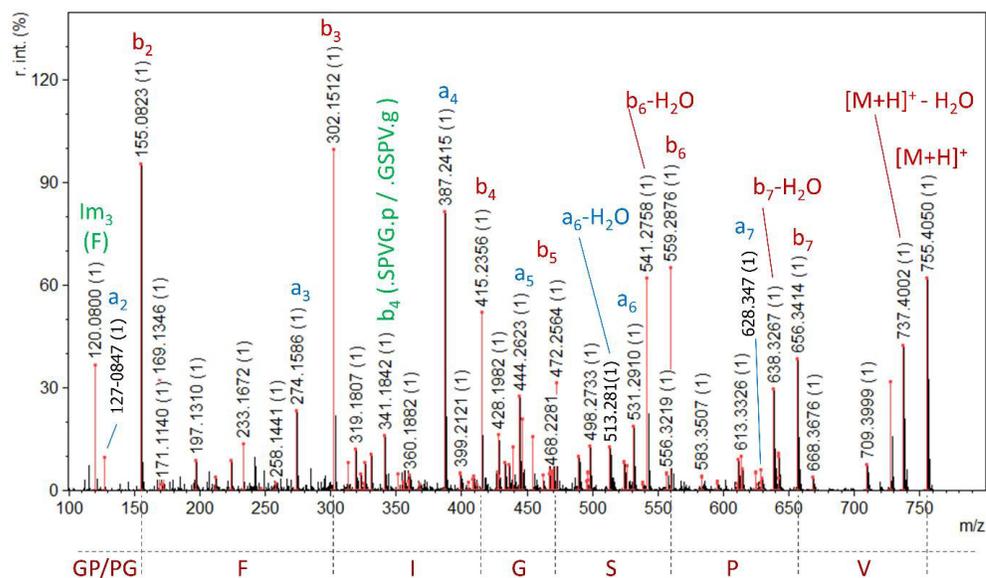
La Fig. 6.26 muestra el espectro de fragmentación (MS)<sup>2</sup> anotado del ion precursor 755.40<sup>+</sup> con los principales iones productos; este corresponde efectivamente con un ciclopéptido. Se encontró que las secuencias más probables para este ciclopéptido (1) puede asignarse en las mostradas en los incisos a y b, siguientes:

- a) Ciclo (-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-)
- b) Ciclo (-Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>- Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-)

El orden de los primeros 2 aminoácidos en el inciso a), como [-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-....] y en el inciso b), como [-Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-....], no pudo ser diferenciado con el espectro de masas obtenido. Aunque se observaron algunos iones que podrían indicar el

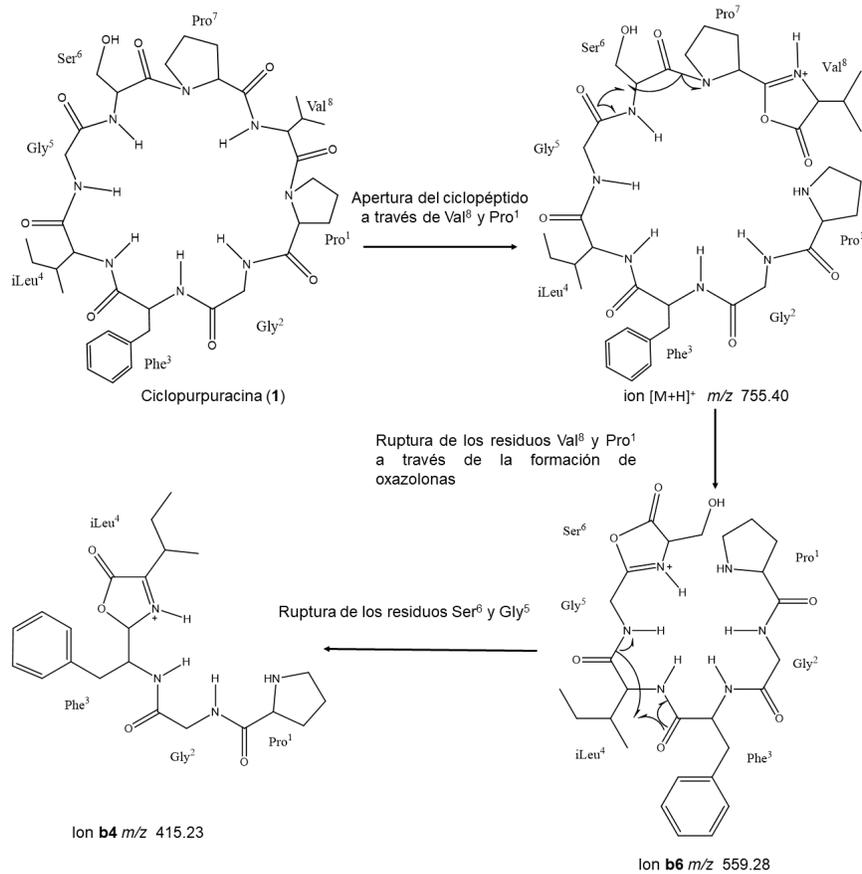
orden -Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-, como el ion b<sub>4</sub> mostrado en verde en la Fig. 6.26 y su ion -H<sub>2</sub>O, estos pueden corresponder a otros iones que no dan indicios en el orden de los dos primeros residuos.

En el espectro (MS)<sup>2</sup> los iones b (señalados en color rojo) corresponden a los iones principales, provenientes de la apertura del ciclopeptido entre Val<sup>8</sup> y Pro<sup>1</sup>, con la ruptura de los residuos de aminoácidos a través de la formación de oxazolonas (Jia *et al.*, 2007).



**Fig. 6.26** Espectro (MS)<sup>2</sup> del ion precursor 755.40+ obtenido a un CV de 40 V y CE de 30 eV. Los números entre paréntesis representan la carga de los iones asignados. Los iones b (en rojo) y a (en azul) corresponden a los iones principales, provenientes de la apertura del ciclopeptido entre Val<sup>8</sup> y Gly<sup>1</sup>. Otros iones importantes se muestran en verde.

A manera de ejemplo de explicación de la presencia de iones para ciclopeptidos, en la Figura. 6.27 se muestra la fragmentación del ciclopeptido (1) y la formación de oxazolonas del ion b<sub>6</sub> y b<sub>4</sub> del espectro (MS)<sup>2</sup>.

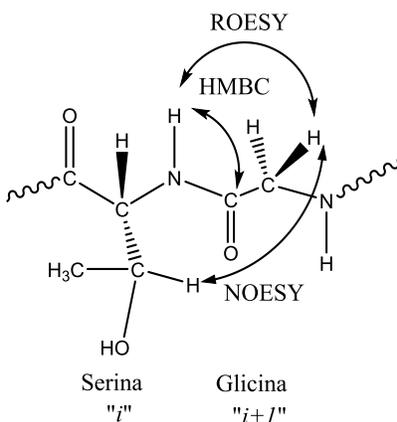


**Figura. 6.27** Ejemplo de la fragmentación del ciclopéptido ciclopurpuracina (1) por formación de oxazolonas, iones b6 y b4, observadas en el espectro de masas (MS)<sup>2</sup>.

### 6.2.1.2.3 Conectividad de los diferentes residuos de los aminoácidos de la ciclopurpuracina (1) usando correlaciones HMBC

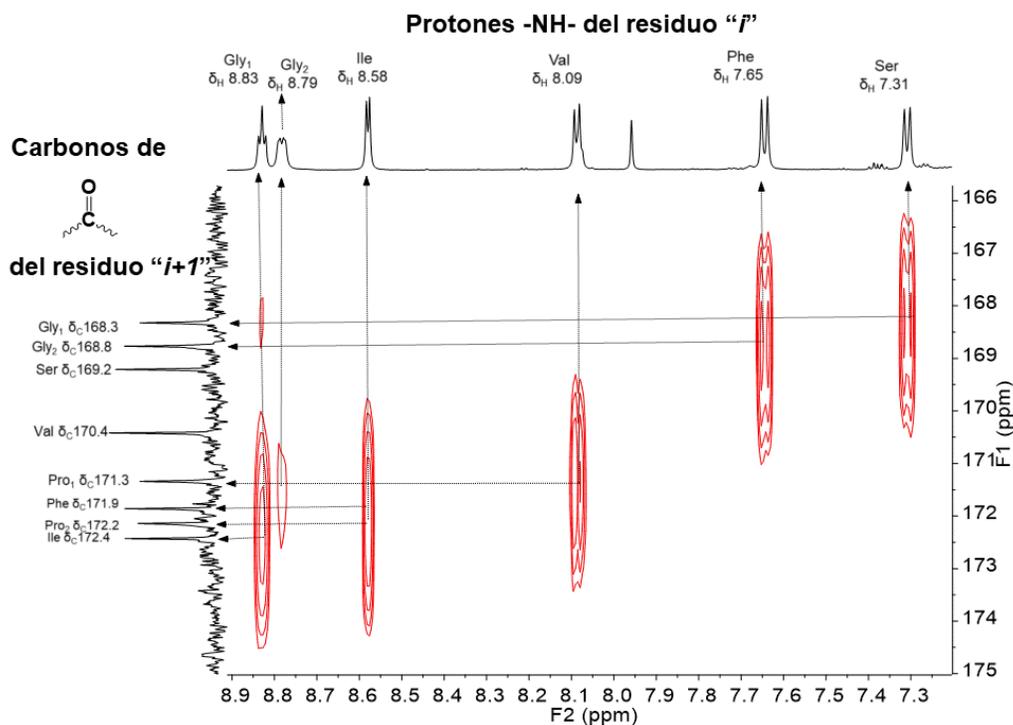
Una vez que se establecieron los desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de cada residuo de aminoácido, para determinar si la conectividad entre estos aminoácidos fue a través de un enlace peptídico (-NH-CO-) se buscaron las correlaciones tipo HMBC a dos enlaces entre el protón NH del residuo “*i*” y el carbono del carbonilo del aminoácido vecino (“*i*+1”). También se consideraron las correlaciones a través del espacio entre los protones NH del residuo “*i*” con los

protones  $\alpha$ CH- del residuo " $i+1$ " en el espectro NOESY y ROESY; la estrategia empleada se muestra en la figura 6.28 como ejemplo de la conectividad entre dos aminoácidos.



**Figura 6.28** Parte de la estrategia empleada para asignar la conectividad entre los residuos de aminoácidos de la ciclopurpuracina (**1**)

En el espectro HMBC se observan cinco correlaciones a dos enlaces entre el protón NH del residuo " $i$ " vs el carbono del carbonilo del aminoácido vecino (" $i+1$ "), Figura 6.29 y resumidos en la Tabla 6.1.

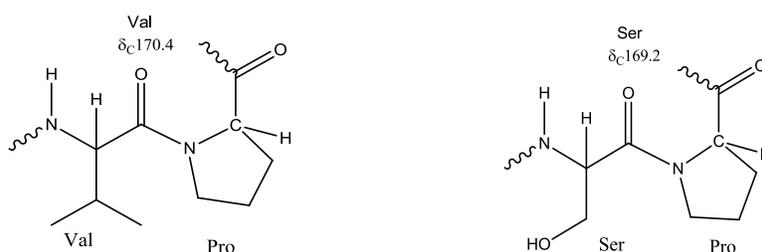


**Figura 6.29** Expansión de 7 a 9 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y 166 a 175 ppm en RMN-<sup>13</sup>C (F1) del espectro HMBC que muestra las correlaciones entre los proton -NH- de los residuos de los aminoácidos "i" con los carbonos del carbonilo del residuo "i+1" en la ciclopurpuracina (**1**)

**Tabla 6.1** Correlaciones observadas en el espectro HMBC a dos y tres enlaces de distancia entre el protón NH del residuo "i" vs el carbono del carbonilo del residuo vecino ("i+1")

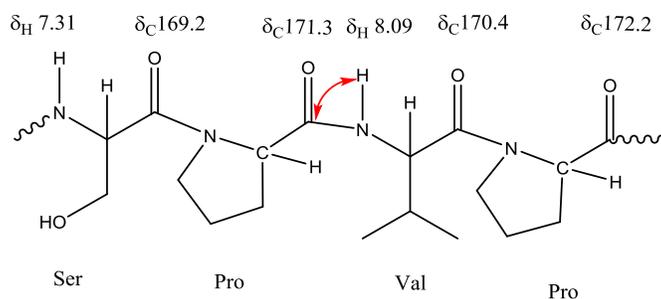
δ <sub>H</sub> del NH- del residuo "i"	HMBC	δ <sub>C</sub> de C=O del residuo "i+1"
8.83 Gly <sup>1</sup>	→	172.4 ILe
8.79 Gly <sup>2</sup>	→	171.9 Phe
8.58 ILe	→	171.9 Phe
8.58 ILe	→	172.2 Pro <sup>2</sup>
8.09 Val	→	171.3 Pro <sup>1</sup>
7.65 Phe	→	168.8 Gly <sup>2</sup>
7.31 Ser	→	168.3 Gly <sup>1</sup>
-----		169.2 Ser
-----		170.4 Val

De los datos de la tabla 6.1 se tiene que el grupo carbonilo en 169.2 ppm de la serina no presenta correlación HMBC con algún NH por lo que se deduce que debe estar conectado a un grupo prolina. Así mismo, el carbonilo en 170.4 ppm de la valina no presenta acoplamiento HMBC con algún NH, por lo tanto, debe estar conectado también a alguna prolina. Lo anterior permite generar dos fragmentos parciales o grupos de dipéptidos como lo muestra la Figura 6.30



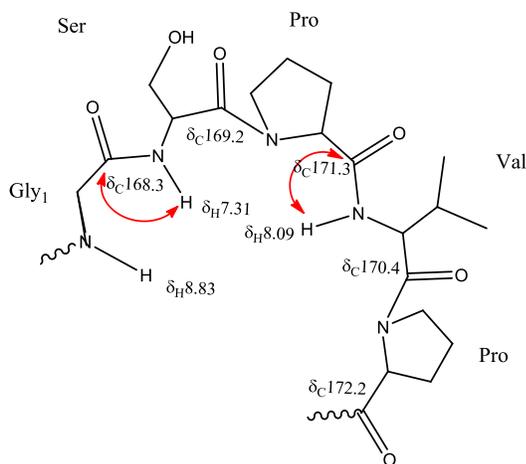
**Figura 6.30** Fragmentos parciales Ser-Pro y Val-Pro deducidos del espectro HMBC en la ciclopurpuracina (**1**)

En el análisis a través del espectro HMBC se observó que el carbonilo 171.3 ppm del residuo de una de las prolinas muestra una correlación a dos enlaces con el protón NH 8.09 ppm de la valina y como se mencionó antes el carbonilo de la valina no presenta acoplamiento HMBC con algún NH lo que indica que está conectada a una prolina, por lo tanto, se deduce que ambas prolinas están conectadas con la valina, como se muestra en la Figura 6.31. De esta forma también se descarta la correlación aparente que se observa en el espectro HMBC del protón NH de la ileucina con el carbono 172.2 ppm de la prolina ocasionado por el ancho de los picos de cruce en el espectro HMBC, Figura 6.29.



**Figura 6.31** Fragmento Ser-Pro-Val-Pro generado por el análisis de su espectro HMBC en la ciclopurpuracina (**1**)

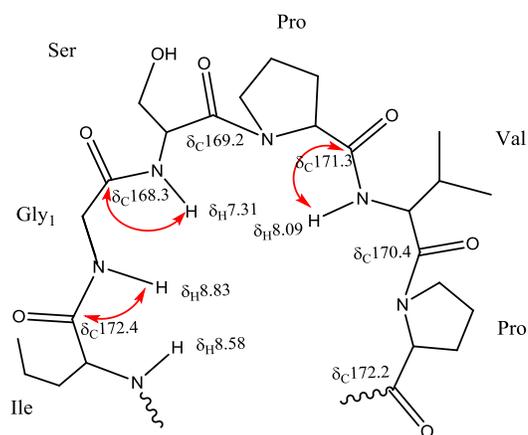
Siguiendo con la conectividad resumida en la tabla 6.1, en el mismo espectro HMBC del ciclopéptido (**1**), se observa un pico cruzado a dos enlaces de la señal en 168.3 ppm del carbono carbonílico de la glicina1 con el protón NH del residuo de serina en 7.31 ppm, resultando ahora un nuevo fragmento parcial de secuencia de aminoácidos -Gly<sup>1</sup>-Ser-Pro-Val-Pro-, como se muestra en la Figura 6.32.



**Figura 6.32** Fragmento -Gly<sup>1</sup>-Ser-Pro-Val-Pro-, generado por el análisis de su espectro HMBC en la ciclopurpuracina (**1**)

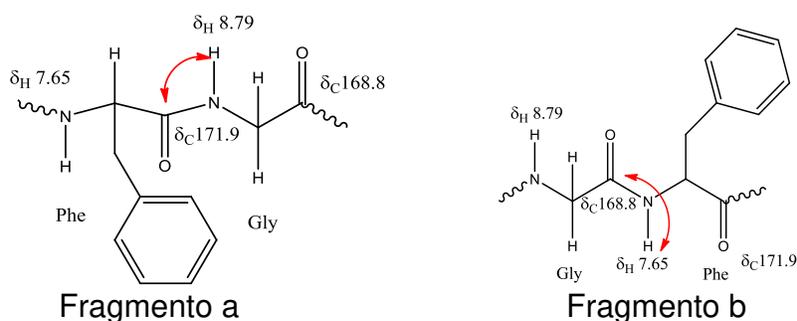
Continuando con el análisis de la secuencia de aminoácidos del ciclopéptido (**1**) el grupo carbonilo de la ileucina 172.4 ppm muestra una correlación a dos enlaces

con el protón NH a 8.83 ppm de la glicina 1 incorporando su conectividad como se muestra en la Figura 6.33.



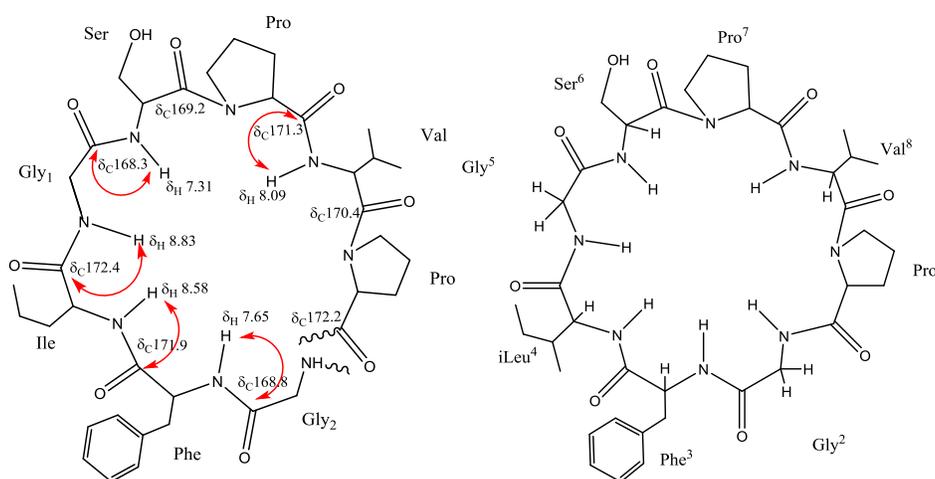
**Figura 6.33** Fragmento Ile-Gly1-Ser-Pro-Val-Pro generado por el análisis de sus espectros HMBC en la ciclopurpuracina (**1**)

Finalmente, en el mismo espectro HMBC se observan correlaciones entre el grupo carbonilo de la fenilalanina, una muy débil entre 171.9 ppm con el protón NH de la segunda glicina en 8.79 ppm. Sin embargo, el espectro HMBC también muestra una fuerte correlación entre el grupo carbonilo a 168.8 ppm de esta glicina con el protón NH de la fenilalanina a 7.65 ppm, obteniéndose dos fragmentos parciales, Figura 6.34.



**Figura 6.34** Fragmentos parciales a: Phe-Gly y b: Gly-Phe generados por el análisis del espectro HMBC en la ciclopurpuracina (**1**)

De los fragmentos anteriores y observando el espectro HMBC se puede deducir una segunda correlación entre el grupo carbonilo de la fenilalanina en 171.9 ppm con el protón NH de la ileucina 8.58 ppm, por lo que en el fragmento Gly-Phe (Figura 6.27 (a) y (b)) el carbonilo de la fenilalanina está conectada hacia la ileucina generándose la siguiente propuesta, Figura 6.35.



Ciclo (-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-) ciclooctapéptido

**Figura 6.35** Fragmento parcial Gly<sub>2</sub>-Phe- Ile-Gly<sub>1</sub>-Ser-Pro-Val-Pro- generado por el análisis de espectros HMBC y estructura correcta deducida de la espectrometría de masas en la ciclopurpuracina (**1**)

Finalmente, la estructura de la figura 6.35 obtenida del análisis por HMBC del ciclo péptido está de acuerdo con la secuencia de la opción A de las dos posibilidades propuestas por espectrometría de masas MS/MS.

A) Ciclo (-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-)

B) Ciclo (-Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>- Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-)

Entonces la secuencia A determinada por el estudio de espectrometría de masas es la que mayor representa la estructura de este ciclopéptido (**1**) cuyo nombre sistemático es Ciclo (-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-ILe<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-)-octapéptido y de acuerdo con su fuente natural se le denominó como ciclopurpuracina (**1**), Figura 6.35. De esta manera, los desplazamientos químicos de todos los átomos de carbono e hidrógeno de los residuos de la ciclopurpuracina (**1**) pudieron ser asignados, y se resumen en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) para la ciclopurpuracina (**1**) en DMSO-*d*<sub>6</sub>

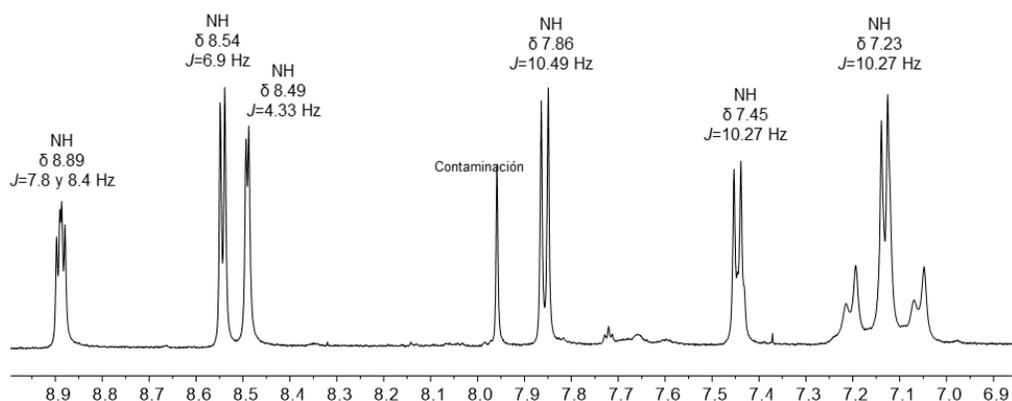
Residuo	Átomo	<sup>1</sup> H (ppm)	<i>J</i> (Hz)	<sup>13</sup> C (ppm)	gHMBC		
Pro <sup>1</sup>	CO			172.2	8.58 Ile		
	H <sub>α</sub> (1H)	4.15	d, 8.0	60.9			
	H <sub>β</sub> (1H)	1.79	m	29.7			
	H <sub>γ</sub> (1H)	2.08	m	29.5			
Gly <sup>2</sup>	H <sub>δ</sub> (2H)	4.10	m	48.1	7.65 Phe <sup>3</sup> 171.9 Phe <sup>3</sup>		
	CO			168.8			
	NH	8.78	dd, 6.5, 5.4				
	H <sub>α</sub> (1H)	3.97	dd, 17.1, 8.8				
Phe <sup>3</sup>	H <sub>α'</sub> (1H)	3.14	dd, 17.0, 3.4	42.2	8.79 Gly <sup>2</sup> 8.58 Ile <sup>4</sup> 168.8 Gly <sup>2</sup>		
	CO			171.9			
	NH	7.65	d, 9.93				
	H <sub>α</sub> (1H)	4.81	ddd, 11.3, 10.0, 3.1	53.3			
	H <sub>β</sub> (1H)	2.97	dd, 13.6, 11.2				
	H <sub>β'</sub> (1H)	2.68	dd, 13.6, 3.0	37.7			
	2'6' (2H)	7.15	m	130.1			
	3'5' (2H)	7.16	m	128.0			
	4' (1H)	7.13	m	126.4			
	1' (1C)			138.6			
	Ile <sup>4</sup>	CO				172.4	8.83 Gly <sup>b</sup> 171.9 Phe <sup>3</sup> 172.2 Pro <sup>1</sup>
		NH (1H)	8.58	d, 5.3			
		H <sub>α</sub> (1H)	3.71	m		59.4	
H <sub>β</sub> (1H)		1.66	ddt, 12.2, 6.5, 3.1	35.5			
H <sub>γ</sub> (1H)		1.12	m	25.5			
H <sub>γ'</sub> (1H)		1.56	m				
β-CH <sub>3</sub> (3H)		0.84	d, 6.8	15.5			
H <sub>δ</sub>		0.87	d, 5.3	11.3			
Gly <sup>b</sup>		CO			168.3	7.31 Ser <sup>6</sup> 172.4 Ile <sup>4</sup>	
		NH	8.83	t, 6.0			
		H <sub>α</sub> (1H)	3.80	br, d, 6.1	43.3		
	H <sub>α'</sub> (1H)	3.45	dd, 16.8, 5.6				
Ser <sup>6</sup>	CO				168.3 Gly <sup>1</sup>		
	NH (1H)	7.31	d, 9.4	51.9			
	H <sub>α</sub> (1H)	4.89	dt, 9.3, 6.2	64.5			
	H <sub>β</sub> (1H)	3.66	ddd, 11.2, 7.7, 5.3				
	H <sub>β'</sub> (1H)	3.57	d, 9.0				
Pro <sup>7</sup>	OH	5.71	t, 6.81		8.09 Val <sup>8</sup>		
	CO			171.3			
	H <sub>α</sub> (1H)	4.45	dd, 8.8, 3.0	60.1			
	H <sub>β</sub> (2H)	1.94	m	29.1			
	H <sub>γ</sub> (1H)	1.90	m	24.8			
	H <sub>γ'</sub> (1H)	1.74	m				
	H <sub>δ</sub> (1H)	3.83	d, 6.4, m	47.3			
	H <sub>δ'</sub> (1H)	3.60	m				
Val <sup>8</sup>	CO			170.4	----- 171.3 Pro <sup>7</sup>		
	NH	8.09	d, 8.3				
	H <sub>α</sub> (1H)	4.12	m	56.9			
	H <sub>β</sub> (1H)	1.97	m	30.2			
	H <sub>γ</sub> (3H)	0.94	d, 6.7	19.0			
	H <sub>γ'</sub> (3H)	0.76	d, 6.5	19.8			

### 6.2.2 Ciclosenegalina A (2)

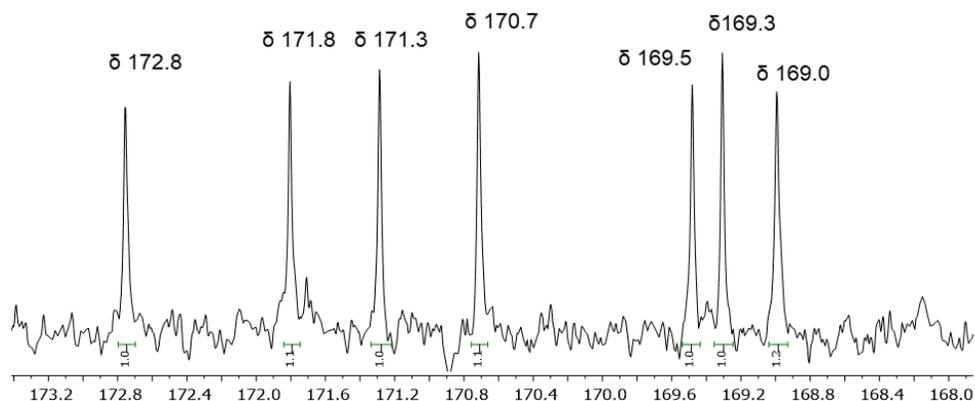
Continuando con la identificación de los compuestos obtenidos del extracto hidroetanólico (EtOH/H<sub>2</sub>O/AcOH), a través de los métodos cromatográficos se obtuvo de la fracción D un sólido blanco que también dio prueba positiva a ciclopéptidos con Cl<sub>2</sub>/O-tolidina y negativa a ninhidrina, dicho sólido fue nombrado como ciclosenegalina A (2). Éste sólido presentó solubilidad en metanol, agua, DMSO y acetona, con un punto de fusión en el intervalo de 280-290°C. Mediante espectroscopia infrarroja se observaron las bandas características del enlace amida (enlace peptídico) 3300 y 1632 cm<sup>-1</sup>. En su espectro de masas de alta resolución por ionización de electrospray (HRESIMS, siglas en inglés) se indicó un ion pseudo-molecular [M+H]<sup>+</sup> en *m/z* de 626.3508 asociado a la fórmula C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>, correspondiente a un peso molecular de 625.7, calculando con esta fórmula nueve insaturaciones.

En el análisis de su espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 700 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub> (Figura 6.36) se observaron seis señales características de los protones tipo NH de amida entre 7 y 9 ppm, mientras que en su espectro RMN-<sup>13</sup>C a 175 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub> se observaron siete grupos carbonilo de amida entre 160 y 170 ppm (Figura 6.37), por lo tanto, se dedujo que este ciclopéptido contenía siete residuos de aminoácidos. Al hacer la diferencia entre protones tipo NH y carbonos del carbonilo de amida se dedujo la presencia de un grupo prolina, debido a que no contiene grupos NH. Con estos datos obtenidos de RMN-<sup>1</sup>H las nueve insaturaciones calculadas a partir de la fórmula C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> obtenida por espectrometría de masas se justifican, ya que siete de ellas se deben a los carbonilos, una insaturación al ciclo de la prolina y otro al ciclo de la cadena

peptídica, sumando en total las nueve insaturaciones calculadas para el ciclopeptido (2).



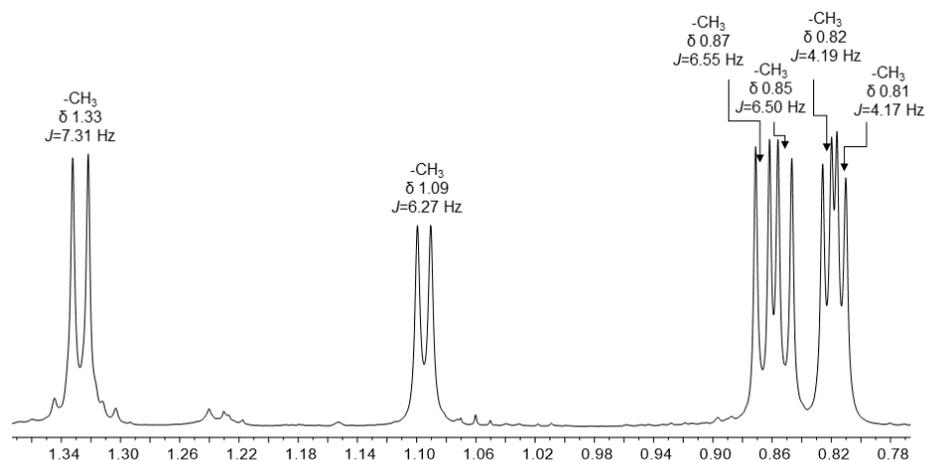
**Figura 6.36** Expansión de la zona de protones tipo NH del enlace peptídico de 7 a 9 ppm del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS) de la ciclosenegalina A (2)



**Figura 6.37** Expansión de la zona de carbonilos del enlace peptídico de 173 a 168 ppm del espectro de RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS) del ciclopeptido ciclosenegalina A (2)

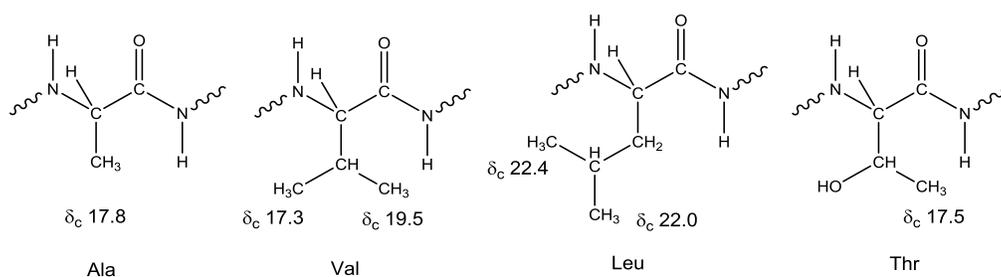
Revisando el espectro de RMN-<sup>1</sup>H a frecuencias bajas, en la zona de metilos se observan un conjunto de seis señales dobles que integran cada una de

ellas para tres protones, cuatro de las señales presentan valores cercanos de  $J=6.5$  Hz y dos cercanas a  $J=4.1$  Hz, Figura 6.38.



**Figura 6.38** Expansión de la zona a frecuencias bajas de 0.8 a 1.3 ppm del espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz en  $\text{DMSO-}d_6$ , TMS) de la ciclosenegalina A (**2**)

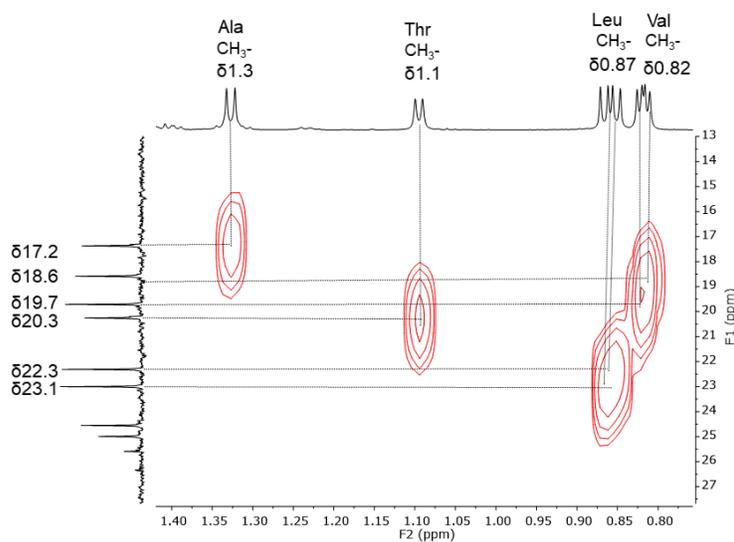
Entre los residuos de aminoácidos proteicos que contienen grupos metilo y que presentan señales dobles debido al metino vecino se encuentran la valina, leucina, alanina y treonina, por lo que las señales dobles de la Figura 6.38 se puede deber a cualquiera de estos residuos, Figura 6.39.



**Figura 6.39** Residuos de aminoácidos proteicos que contienen grupos metilo, que presentan señales dobles debido al metino vecino y desplazamientos promedio de RMN- $^{13}\text{C}$  de los metilos

Al analizar el espectro HSQC se observa que la resonancia en 0.9 ppm de su espectro de RMN- $^1\text{H}$  contiene dos señales dobles ligeramente traslapados de

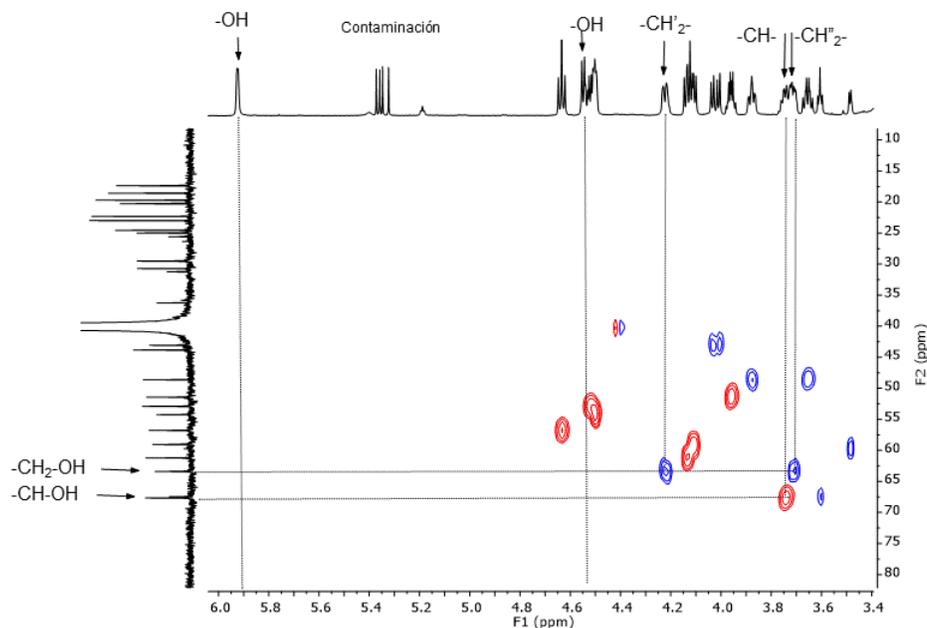
los metilos de un radical de isopropilo cuyos desplazamientos en RMN- $^{13}\text{C}$  son 22.3 y 23.1 ppm, los cuales coinciden con los datos teóricos del radical isopropilo de una leucina en ciclopéptidos (Tan y Zhou, 2006). En tanto que, la señal RMN- $^1\text{H}$  de 0.8 ppm que contiene dos señales dobles traslapadas cuyos carbonos en RMN- $^{13}\text{C}$  son 18.6 y 19.7 ppm se asignaron al radical isopropilo de valina, Figura 6.40.



**Figura 6.40** Expansión de 0.80 a 1.4 ppm en RMN- $^1\text{H}$  (F2) y de 13 a 27 ppm en RMN- $^{13}\text{C}$  (F1) para metilos en el espectro HSQC de la ciclosenegalina A (**2**) en  $\text{DMSO}-d_6$ .

Por otro lado, en el espectro HSQC se observaron dos señales de protón, una señal ancha en 5.96 ppm característica de alcohol y una señal doble en 4.5 ppm que no correlacionan con algún carbono, indicio de residuos de aminoácidos que contienen alcoholes en sus cadenas laterales (Figura 6.41). En este mismo espectro HSQC se tiene un pico de cruce de la señal de 67.68 ppm de un carbono que correlaciona con la señal de protón en 3.74 ppm, la cual es una señal múltiple que integra para un protón de metino (CH), estos desplazamientos presuponen

que la señal de cruce observada en HSQC corresponden a un  $R_2\text{-CH-OH}$  y observando la estructura de los aminoácidos proteicos sólo la treonina contiene un hidroximetino, por lo que, una de las dos señales dobles de  $-\text{CH}_3$  en  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  (1.33 o 1.09 ppm) le corresponde a la treonina.



**Figura 6.41** Expansión de 3.4 a 6 ppm en  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  (F1) y de 10 a 80 ppm en  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$  (F2) del espectro HSQC que muestra los hidroxilos, hidroximetinos y hidroximetilos de treonina y serina en la ciclosenegalina A (**2**) en  $\text{DMSO}-d_6$

Continuando con el análisis, de acuerdo con los datos publicados por Tan y Zou (2006) de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  de los metilos en los residuos de los aminoácidos proteicos en ciclopéptidos, el metilo de alanina es el que presenta el mayor desplazamiento hacia campos más altos en  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  (1.19 ppm) comparados con los metilos de los otros residuos de aminoácidos. Partiendo de estos datos el metilo restante ( $-\text{CH}_3$ ) con señal en  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$  de 17.2 ppm y  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  de 1.33 ppm, que también presenta señal doble debido a que está enlazado a un metino se

asignó al residuo de alanina. También, se dedujo la presencia del residuo de serina debido al grupo hidroxilo en 5.96 ppm de RMN-<sup>1</sup>H y por el carbono con señal en 63.5 ppm en RMN-<sup>13</sup>C, el cual en el espectro HSQC tiene una señal de cruce con dos protones en 4.22 y 3.71 ppm de un metileno, por lo que el grupo está conformado por R-CH<sub>2</sub>-OH, característico de serina (Figura 6.41). Finalmente, se dedujo el residuo de glicina por la señal doble de dobles en el espectro RMN-<sup>1</sup>H en 8.89 ppm (Figura anterior 6.36).

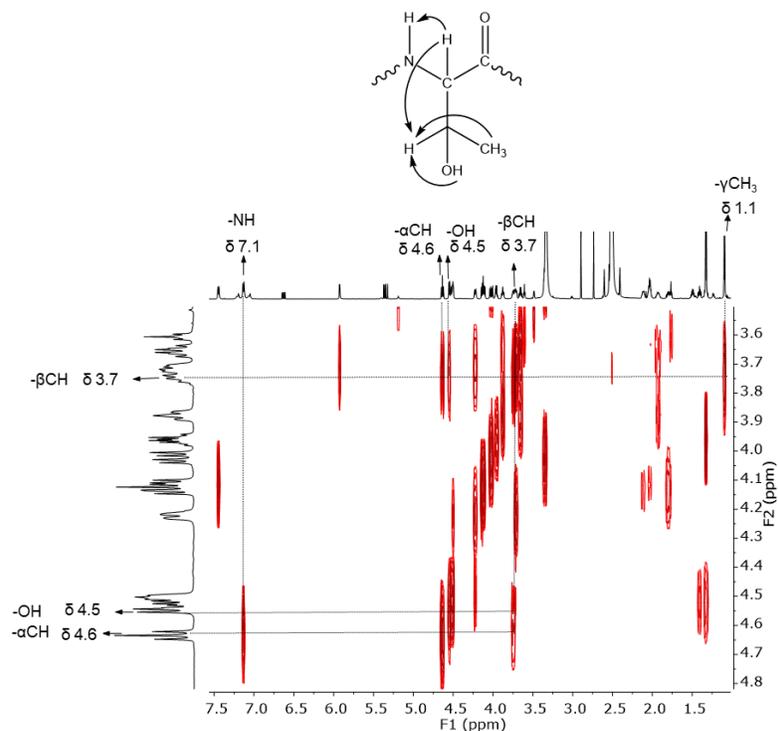
#### **6.2.2.1 Asignación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los residuos de los aminoácidos de la ciclosenegalina (2)**

Este ciclopéptido contiene los residuos de los aminoácidos de leucina, prolina, valina, serina, treonina, glicina y alanina, la asignación de los desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de cada residuo fue con el mismo procedimiento utilizado para la ciclopurpuracina (1), a través de las correlaciones HSQC, COSY y HMBC. En la siguiente sección se describe únicamente la asignación de los residuos de leucina, treonina y alanina, mientras que los datos de desplazamiento de carbonos y protones de los otros residuos se resumen en la tabla 6.3 ya que la forma de asignarlos se mencionó en los párrafos anteriores.

##### **6.2.2.1.1 Asignación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del residuo del aminoácido treonina**

En párrafos anteriores se mencionó que el ciclopéptido (2) contiene un residuo de treonina debido a que en el espectro HSQC se observó un pico de cruce de la

señal de 67.68 ppm de un carbono que correlaciona con la señal de protón en 3.74 ppm, que integra para un protón de metino (CH), el cual se atribuyó a un grupo  $R_2\text{-CH-OH}$  por el desplazamiento que presenta. También, se tiene la señal doble de  $-\text{CH}_3$  en 1.1 ppm que correlaciona con el carbono de 20.3 ppm, dicha señal doble indica que está unido a un grupo metino y por el desplazamiento que presenta su carbono, el metino es el del grupo  $R_2\text{-CH-OH}$  el cual se confirmó por la correlación HMBC a dos enlaces entre el carbono 67.68 ppm del metino y el protón 1.1 ppm del grupo metilo. Este mismo carbono a 67.68 ppm del metino correlaciona a dos enlaces con el protón en 4.63 ppm que integra para un protón y se encuentra en la zona de los protones alfa al carbonilo. El espectro HSQC indica que el carbono en 50.6 ppm tiene un pico de cruce con el protón 4.63 ppm antes mencionado, confirmándose el  $-\alpha\text{CH-}$ . La asignación del OH de la treonina se determinó debido a que en el espectro HSQC se observó una señal doble en 4.5 ppm que integra para un protón y no presenta correlación hacia algún carbono, asignándose a un grupo  $-\text{OH}$ , esta señal en el espectro COSY muestra un pico cruzado con el protón del metino a 3.7 ppm ( $-\beta\text{CH-}$ ) (Figura 6.42), confirmándose el grupo  $R_2\text{-CH-OH}$ . El NH se asignó también por la correlación COSY del protón  $-\alpha\text{CH-}$  en 4.6 ppm con el protón NH a 7.13 ppm. El espectro HMBC confirmó la correlación del protón NH a 7.13 ppm con el carbono en 50.6 ppm del  $-\alpha\text{CH-}$ . El carbonilo de la treonina no se logra determinar de forma definitiva a través del espectro HMBC debido al ancho de las señales del protón  $-\alpha\text{CH-}$  con el carbonilo. Finalmente, el espectro de Correlación Total (TOCSY por sus siglas en inglés) terminó por confirmar el sistema de spin de la treonina, Figura 6.43.

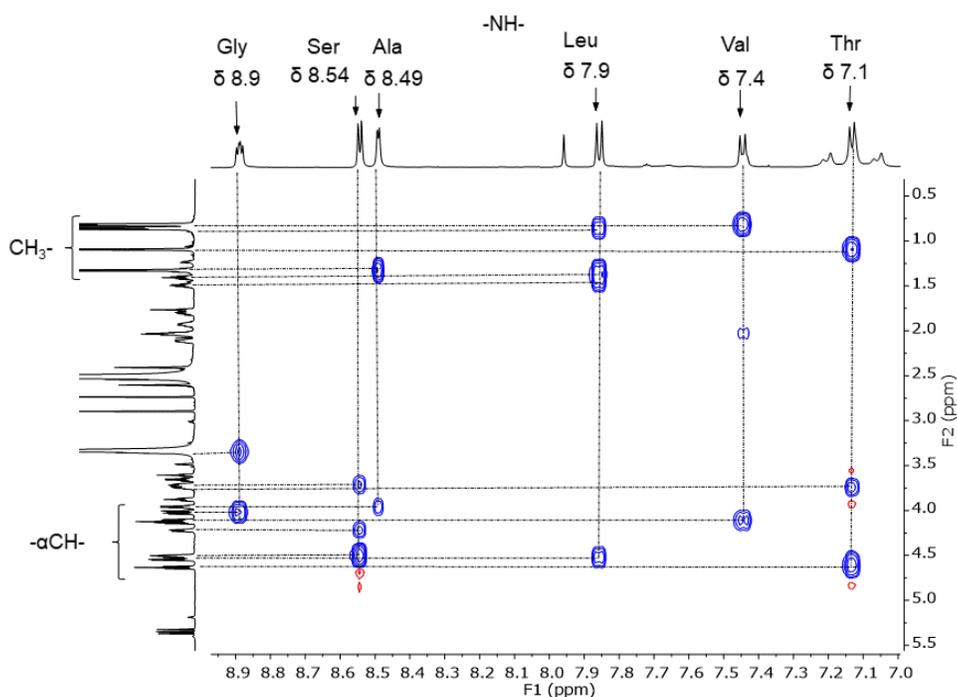


**Figura 6.42** Expansión de 1.5 a 7.5 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F1) y de 3.6 a 4.8 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) del espectro COSY que muestra las correlaciones entre los protones OH, α, β, γ y del residuo de treonina en la ciclosporina A (**2**) en DMSO-*d*<sub>6</sub>

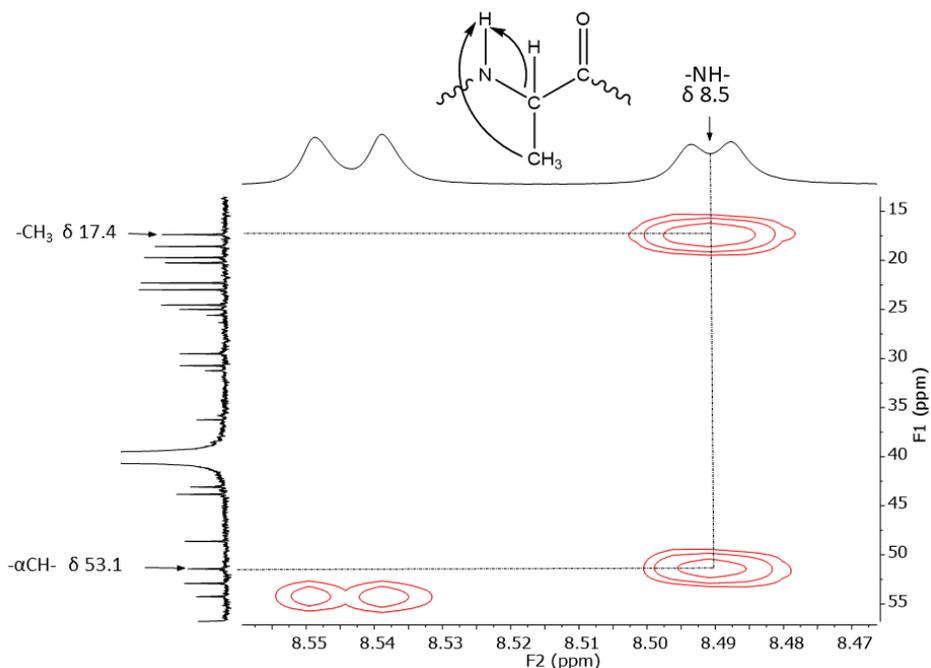
#### 6.2.2.1.2 Asignación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del residuo del aminoácido alanina

La asignación de los desplazamientos del residuo de alanina inicio a través de la señal doble en 1.19 ppm en RMN-<sup>1</sup>H que integra para tres protones, la cual en el espectro HSQC correlaciona con el carbono en 17.3 ppm, por lo que se asignó a un metilo; esta señal doble indica que los protones del metilo tienen de vecino a un metino. En el espectro COSY se observó un pico de cruce de la señal 1.19 ppm con la señal de 4.09 ppm que integra para un protón, esta señal de 4.09 ppm correlaciona con el carbono de 51.3 ppm en el espectro HSQC confirmándose la presencia del metino; debido a los desplazamientos del protón y carbono el metino

fue asignado a un  $-\alpha\text{CH}-$ . A través del espectro HMBC se observó la correlación del carbono a tres y dos enlaces de distancia de 17.3 ( $\text{CH}_3$ ) y 51.3 ppm ( $-\alpha\text{CH}-$ ) con el protón del NH en 8.5 ppm, asignándose al NH de la alanina y también por el espectro HMBC se vio la correlación del protón 4.09 del  $-\alpha\text{CH}-$  con el carbonilo 173.8 ppm a dos enlaces de distancia (Figura 6.44). El espectro de Correlación Total, TOCSY, terminó por confirmar el sistema de spin de protones de alanina, Figura 6.43.



**Figura 6.43** Expansión de 7 a 8.9 ppm en  $\text{RMN}-^1\text{H}$  (F1) y 0.5 a 5.5 ppm en  $\text{RMN}-^1\text{H}$  (F2) de los sistemas de spin de los residuos de los aminoácidos de la cicloenegalina A (**2**) en el espectro TOCSY en  $\text{DMSO}-d_6$

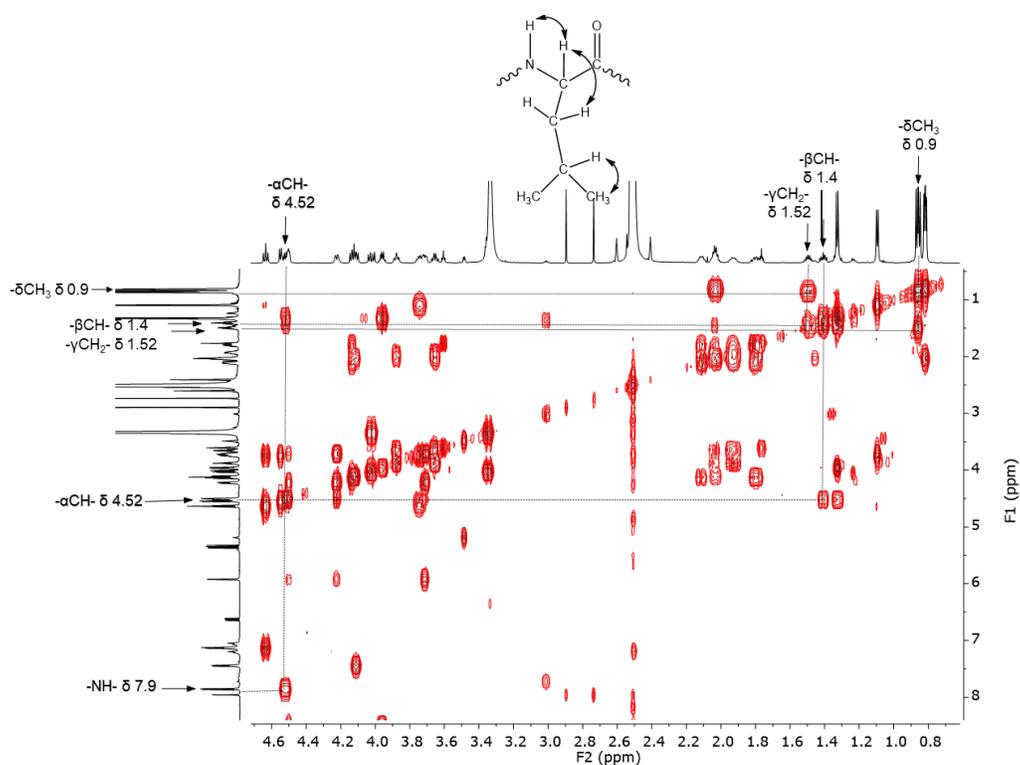


**Figura 6.44** Expansión del espectro HMBC de 8.4 a 8.5 en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y de 15 a 55 ppm en RMN-<sup>13</sup>C (F1) que muestra las correlaciones de los protones del residuo de alanina en la ciclosenegalina A (**2**) en DMSO-*d*<sub>6</sub>

### 6.2.2.1.3 Asignación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del residuo del aminoácido leucina

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observó a baja frecuencia en 0.9 ppm dos señales dobles ligeramente sobrepuestas que integran cada una de ellas para tres protones de metilos; uno de los residuos de aminoácidos proteicos que contiene grupos metilos y que presentan señales dobles es la leucina, por lo que su asignación inicio a través de estos metilos para encontrar el radical isobutilo de la cadena lateral del residuo de leucina. En el espectro HSQC se observó la correlación de las dos señales dobles de los metilos en 0.9 ppm con los carbonos en 22.3 y 23.1 ppm. Por otro lado, las señales dobles de estos metilos (0.9 ppm) indican que tienen de vecino a un grupo metino (-CH-), el cual se observó a través del espectro homonuclear COSY donde estos metilos correlacionan con una señal

múltiple del protón en 1.5 ppm, Figura 6.45. En el espectro HSQC se observó que el protón ubicado en 1.5 ppm correlaciona a un enlace con una señal de carbono en 24.6 ppm, confirmándose el metino (CH). Continuando con la asignación del radical isobutilo, a través del espectro HMBC se observó la correlación a tres enlaces del carbono 23.1 ppm de uno de los metilos con los protones en 1.3 y 1.4 ppm de un metileno (-CH<sub>2</sub>-) con carbono en 43.8 ppm asignado a través del espectro HSQC. A su vez se observó en el espectro COSY que estos protones en 1.3 y 1.4 ppm correlacionan con un protón en 4.5 ppm característico de -αCH- al carbonilo (Figura 6.45), de esta forma se confirmó el radical isobutilo de la leucina.



**Figura 6.45** Expansión de 0.8 a 4.6 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F2) y 1 a 8 ppm en RMN-<sup>1</sup>H (F1) del espectro COSY que muestra las correlaciones de los protones del residuo de leucina en la cicloenegalina A (**2**) en DMSO-*d*<sub>6</sub>

Por otro lado, el grupo amino del residuo de leucina se asignó a través del espectro COSY por el protón en 4.5 ppm del -αCH- al carbonilo que tiene un pico

de cruce con la señal en 7.8 ppm del protón NH; por medio del espectro HSQC se determinó el carbono del  $-\alpha\text{CH}-$  en 52.9 ppm. Finalmente, por el espectro HMBC fue determinado el carbonilo de este residuo, ya que se observa un pico de cruce entre el carbonilo en 171.3 ppm con el protón en 4.5 ppm del  $-\alpha\text{CH}-$  y el protón en 1.4 ppm del metileno ( $-\text{CH}_2-$ ). El espectro de Correlación Total, TOCSY, terminó por confirmar el sistema de spin de la leucina, Figura 6.43.

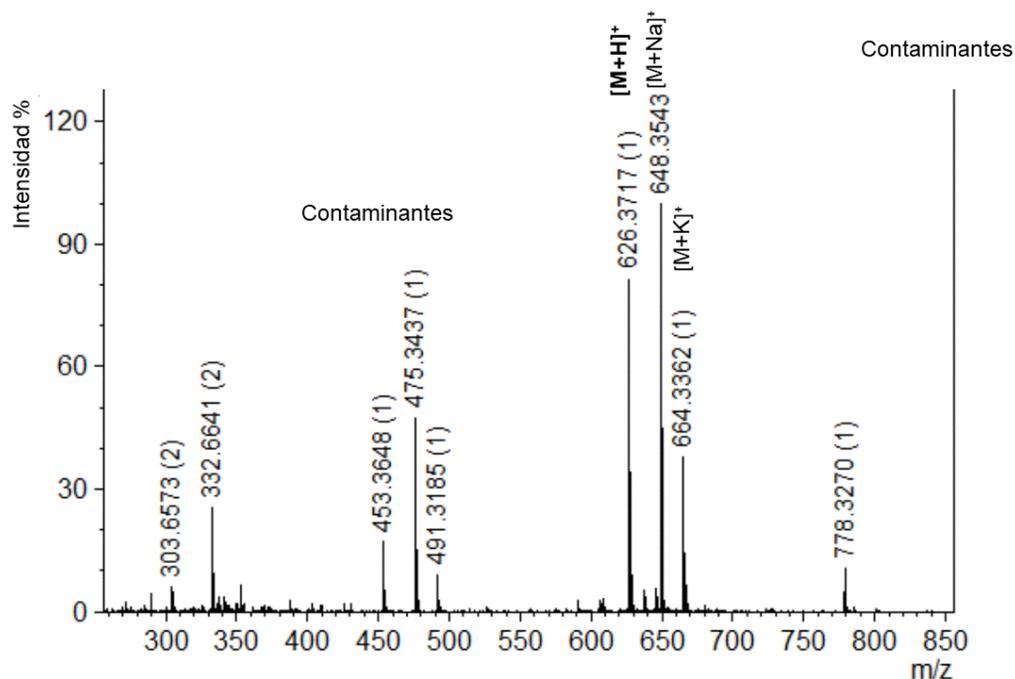
#### **6.2.2.2 Masa exacta y secuencia de los residuos de los aminoácidos de la ciclosenegalina A (2) por espectrometría de masas de alta resolución**

Con el análisis de los espectros de RMN a 700 MHz se dedujo que la composición de la ciclosenegalina A (2) está constituida por siete aminoácidos (prolina, serina, valina, treonina, leucina, glicina y alanina). Debido a que la asignación por RMN de la secuencia entre estos aminoácidos resulta un poco confusa por la baja resolución de los espectros HMBC en la zona de correlación entre protones de  $-\text{NH}_i-$  (7 a 9 ppm) y  $-\text{C}_{i+1}-$  de carbonilo (160 a 170 ppm) se recurrió a la espectrometría de masas de alta resolución, MS-TOF.

##### **6.2.2.2.1 Espectro (MS)<sup>1</sup> para obtener la masa exacta de la ciclosenegalina A (2)**

En el espectro de masas MS1 de la ciclosenegalina A (2) (Figura 6.46) se observó el pico correspondiente al ion molecular esperado para el ciclopéptido (2)  $[\text{M}+\text{H}]^+=626.3717$  de fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_9$ ; con un error de 33 ppm respecto al  $[\text{M}+\text{H}]^+$  teórico de 626.3508 debido a las variaciones en el equipo TOF. Se observan también los iones  $[\text{M}+\text{Na}]^+=648.3543$  y  $[\text{M}+\text{K}]^+=664.3362$ , además de estos iones en el espectro se tienen otros con intensidades relativamente altas,

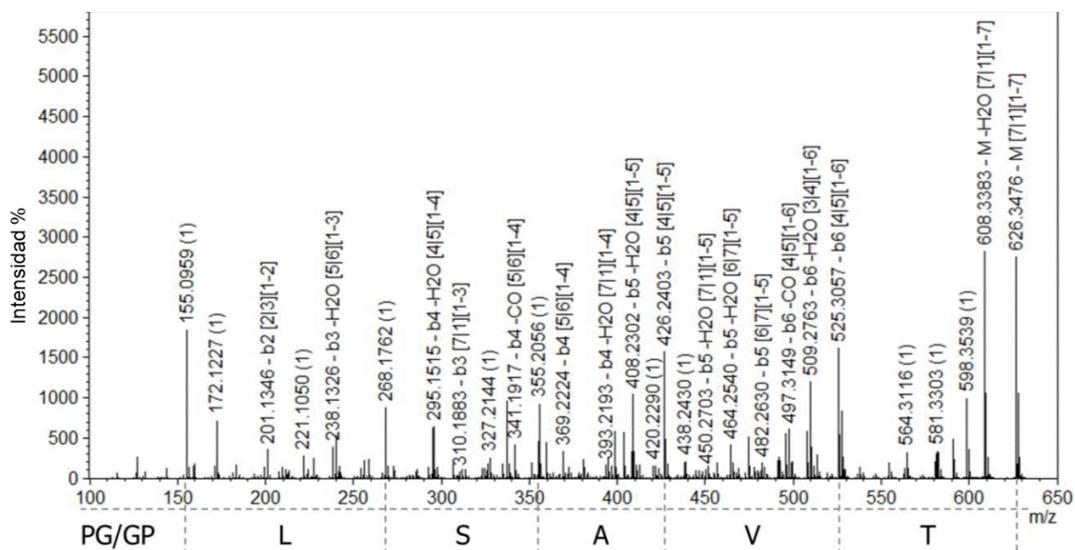
especialmente el ion 475.3437 que no coinciden con fragmentos generados del ciclo péptido, lo que podría indicar una posible contaminación de la muestra.



**Figura 6.46** Espectro MS1 del ciclo péptido cicloenegalina A (2) a un CV de 30 V. Los números entre paréntesis representan la carga de los iones asignados

#### 6.2.2.2.2 Espectro (MS)<sup>2</sup> del ion 755.40<sup>+</sup> de la cicloenegalina A (2) y verificación de la secuencia peptídica

Una vez que se asignó el ion molecular  $[M+H]^+ = 626.3717$  del ciclo péptido (2) se calibró el espectro para tener la masa exacta del ion molecular, el cual fue de  $[M+H]^+ = 626.3476$  con un error de 0.2 ppm respecto al  $[M+H]^+$  teórico de 626.3508 y con una masa molecular monoisotópica de 625.3425. Posteriormente se hizo el patrón de fragmentación MS2 del ion molecular  $[M+H]^+ = 626.3717$ , así como de sus aductos:  $[M+Na]^+ = 648.3543$  y  $[M+K]^+ = 664.3362$ . Sin embargo, la anotación de la secuencia de la cicloenegalina A (2) se realizó únicamente con el ion precursor  $[M+H]^+ = 626.3717$  (Figura 6.47).



**Figura 6.47** Espectro MS2 del ion precursor  $[M+H]^+ = 626.3717$  a un CV de 30 V y Ce 25 eV de la ciclosenegalina A (2). L: leucina, S: serina, A: alanina, V: valina, T: treonina, P: prolina, G: glicina. Los números entre paréntesis representan la carga de los iones asignados.

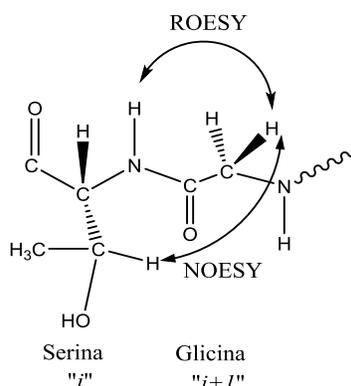
En el espectro MS2 los números entre paréntesis son la carga de los iones asignados, Figura 6.47, los números entre corchetes representan las zonas de corte de los residuos de aminoácidos, la letra b representa los diferentes fragmentos de los residuos del ciclopéptido (2) según la nomenclatura propuesta por Nierdermeyer y Strohmalm para ciclopéptidos, 2012. Al analizar los fragmentos MS2 de la Figura 6.47 éste corresponde efectivamente a un ciclopéptido. Se encontró que la secuencia más probable para éste ciclopéptido es una de las siguientes:

- a) Ciclo (-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Leu<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-)
- b) Ciclo (-Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Leu<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-)

El orden de los dos primeros aminoácidos [-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-/(-Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>)] no se pudo diferenciar con el espectro obtenido.

### 6.2.2.2.3 Conectividad de los diferentes residuos de los aminoácidos de la ciclosenegalina A (2) usando correlaciones HMBC

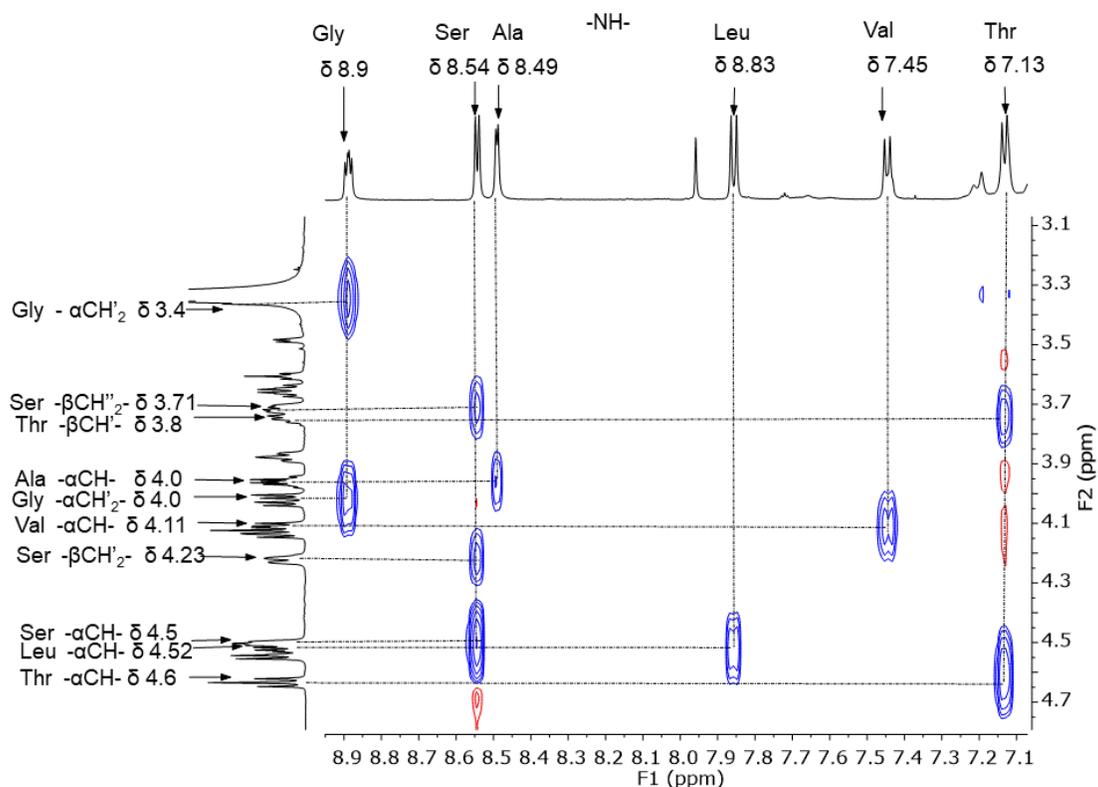
Para confirmar una de las dos propuestas de la secuencia de la ciclosenegalina (2) obtenidas por espectrometría de masas se recurrió a los espectros ROESY. Para éste ciclopéptido no se utilizaron las correlaciones tipo HMBC a dos enlaces de distancia entre el protón  $-NH-$  del residuo "i" y el carbono del carbonilo del aminoácido vecino "i+1" para conectarlos a través del enlace peptídico, debido a que no se pudo asignar con precisión los carbonilos de algunos aminoácidos en el espectro HMBC.



**Figura 6.48** Parte de la estrategia empleada para asignar la conectividad entre los residuos de aminoácidos de la ciclosenegalina A (2)

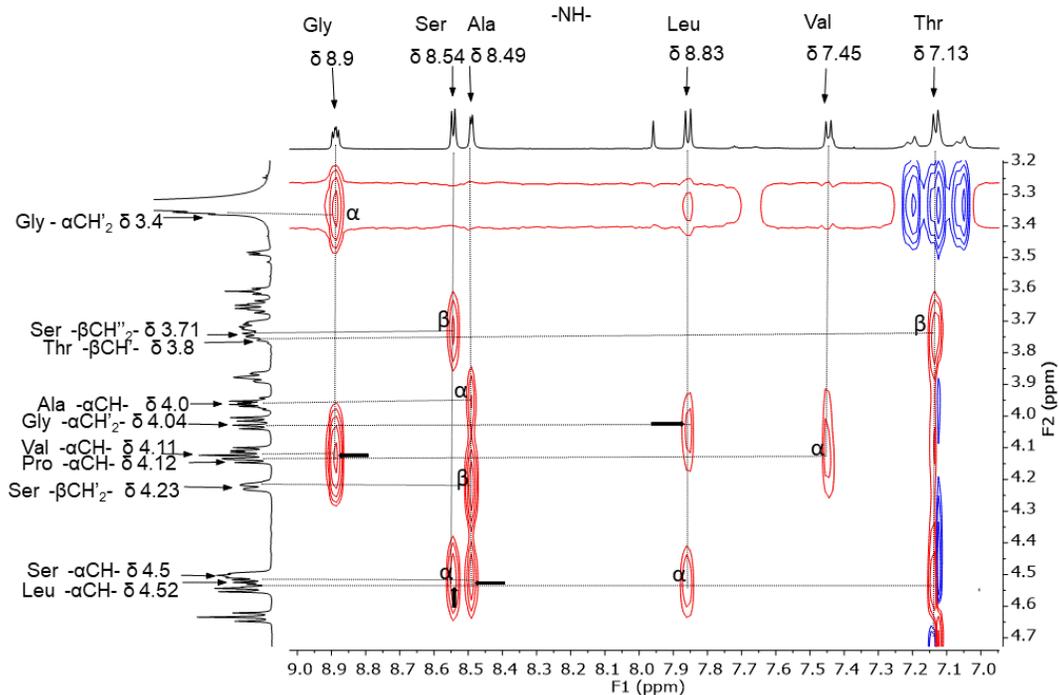
La opción para asignar la secuencia entre los residuos de los aminoácidos en el ciclopéptido fue por medio de las correlaciones dipolares ROESY del protón  $-NH-$  del residuo "i" y los protones  $-\alpha CH-$  del aminoácido vecino "i+1", Figura 6.48. Sin embargo, una de las dificultades para conectar a los residuos a través del espectro ROESY es que en dicho espectro se observan las correlaciones escalares TOCSY, que pueden generar errores en las asignaciones. Para solucionarlo, primero se asignaron los sistemas spin de cada residuo de aminoácido en el espectro TOCSY (Figura 6.49) y se identificaron estas correlaciones dentro del

espectro ROESY, por lo que el resto de señales en el espectro corresponde a las correlaciones dipolares ROESY, Figura 6.50. En la ampliación que se le realizó al espectro ROESY de 7 a 9 ppm en F1 (zona de -NH- del enlace peptídico) y 3 a 5 ppm sobre F2 (desplazamientos típicos de  $-\alpha\text{CH}-$  al carbonilo) se observa un conjunto de once señales, donde seis de ellas pertenecen a las correlaciones escalares TOCSY entre los protones  $-\text{NH}-$  con sus respectivos protones  $-\alpha\text{CH}-$  al carbonilo de cada aminoácido y dos señales de los protones  $\beta$  de los residuos de serina y prolina, en la Figura 6.50 se puede ver la comparación entre ambos espectro TOCSY y ROESY. Las señales restantes en el espectro ROESY pertenecen a las interacciones dipolares entre los protones  $-\text{NH}-$  del residuo "i" con el protón  $-\alpha\text{CH}-$  al carbonilo del aminoácido vecino.



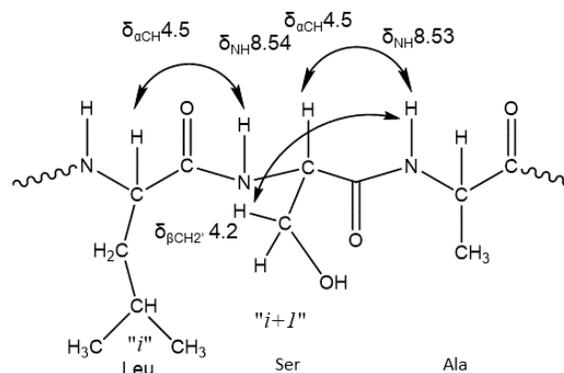
**Figura 6.49** Ampliación de 7.1 a 8.9 ppm en  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  (F1) y 3.1 a 4.7 ppm en  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  (F2) del espectro TOCSY donde se observan las correlaciones de los -

$\alpha$ CH- y  $-\beta$ CH- con los NH de los residuos de los aminoácidos de la ciclosenegalina A (2)



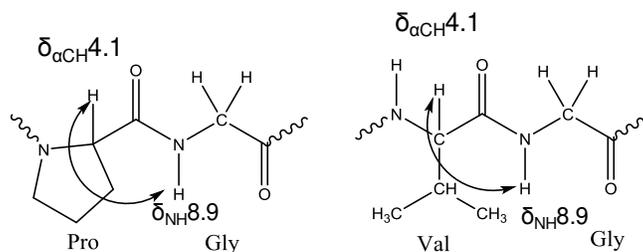
**Figura 6.50** Ampliación de los espectros ROESY a modo de comparación.  $\alpha$  y  $\beta$  indican las correlaciones tipo TOCSY dentro del espectro ROESY y la flecha indica las correlaciones ROESY entre los residuos de la ciclosenegalina A(2)

En el análisis de las señales de la ampliación del espectro ROESY, Figura 6.50, se dedujo que el protón  $-\alpha$ CH- al carbonilo del residuo de leucina (traslapado en 4.51 ppm) presenta un pico de cruce con el protón  $-\text{NH}-$  (8.54 ppm) del residuo de serina; a su vez el protón  $-\alpha$ CH- al carbonilo del residuo de serina, también traslapado en 4.51 ppm, correlaciona con el protón  $-\text{NH}-$  (8.53 ppm) del residuo de alanina, confirmando la secuencia  $-\text{Ser-Ala}-$  por la correlación dipolar que se observa del protón  $-\beta\text{CH}_2'-$  (4.2 ppm) de la serina con el NH de la alanina. Por lo que hasta este momento se tiene el fragmento de  $-\text{Leu-Ser-Ala}$ , Figura 6.51.



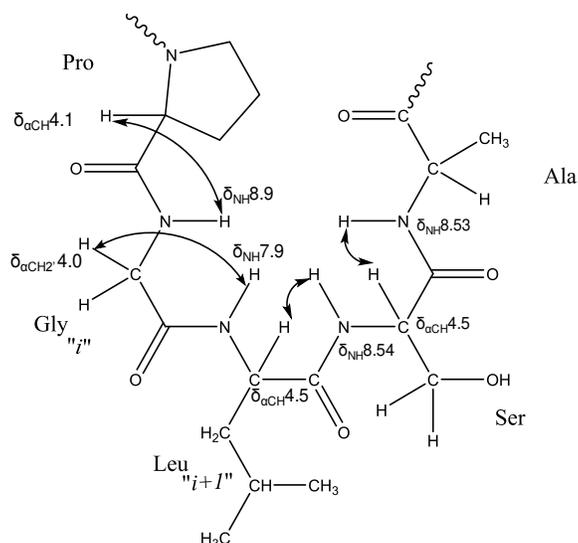
**Figura 6.51** Fragmento -Leu-Ser-Ala- generado por el análisis del espectro ROESY de la ciclosenegalina A (2)

La continuación de la asignación de la secuencia de aminoácidos del lado del residuo de alanina no se pudo seguir por el espectro ROESY ya que no se observaron otros picos de cruce que correlacionen con la alanina. Por otra parte, se observó el espectro ROESY un pico de cruce del protón –NH- (8.9 ppm) de la glicina con 4.1 ppm donde se sobreponen dos señales, una del protón – $\alpha$ CH- del residuo de prolina y la otra es de valina, generándose así dos posibles fragmentos Pro-Gly o Val-Gly, Figura 6.52. La correlación se le asignó a Pro-Gly ya que por lo regular estos dos residuos van juntos para generar el giro en los ciclopéptidos, aunado a que el análisis por espectrometría de masas detectó estos dos residuos juntos, Pro-Gly-.



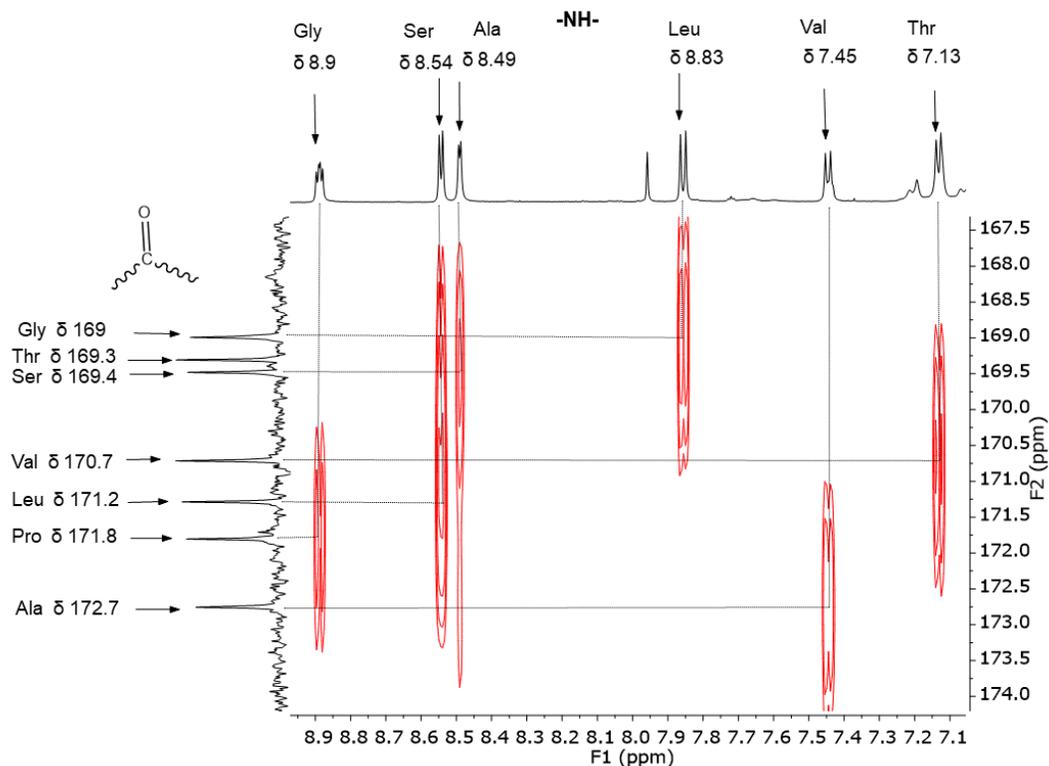
**Figura 6.52** Fragmentos generados -Pro-Gly- y -Val-Gly- por el análisis del espectro ROESY de la ciclosenegalina (2)

Posteriormente, se observó que el protón  $-\alpha\text{CH}_2'$  (en 4 ppm) de la glicina tiene un punto de cruce con el protón  $-\text{NH}-$  (7.9 ppm) de la leucina. Por lo que el fragmento  $-\text{Pro-Gly}-$  va unido al segmento de  $-\text{Leu-Ser-Ala}-$ , obteniendo un fragmento de cinco residuos de aminoácido con la siguiente secuencia  $-\text{Pro-Gly}-\text{Leu-Ser-Ala}-$ , Figura 6.53.



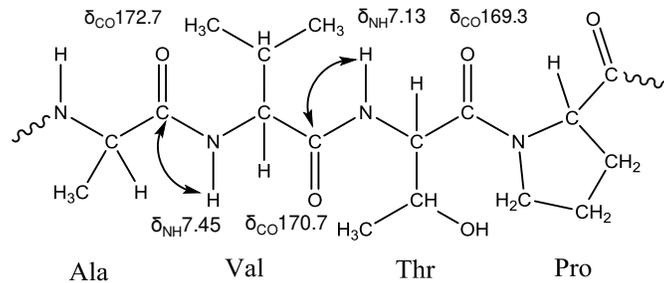
**Figura 6.53** Fragmento generado de  $-\text{Pro-Gly-Leu-Ser-Ala}-$  por el análisis del espectro ROESY de la ciclosenegalina A (2)

La secuencia de los dos últimos residuos valina y treonina no se pudieron asignar a través del espectro ROESY ya que las señales son confusas. Una vez que se tuvo este fragmento del ciclopéptido, se recurrió nuevamente al análisis del HMBC para reasignar los carbonilos de los residuos donde se tenía duda debido al ancho de los picos de cruce en el espectro HMBC, ya que al saber la secuencia entre los cinco residuos ( $-\text{Pro-Gly-Leu-Ser-Ala}-$ ) se dedujo con mayor exactitud la correlación del protón  $-\text{NH}-$  del residuo "i" y el carbonilo  $\text{C}=\text{O}$  del residuo vecino "i+1" en el espectro, Figura 6.54.



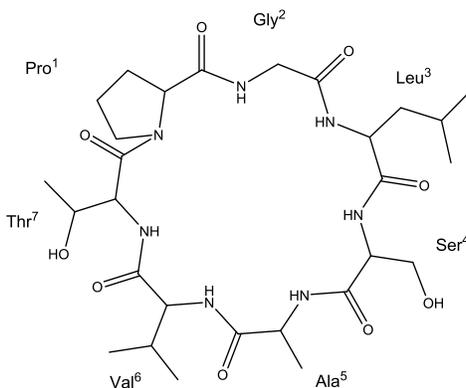
**Figura 6.54** Expansión del espectro HMBC de 7 a 9 ppm en  $\text{RMN-}^1\text{H}$  (F1) y de 167 a 174 ppm en  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$  (F2), de la zona característica de correlaciones entre protones NH y carbono del carbonilo del enlace peptídico de la ciclosenegalina A (2)

En la expansión del espectro HMBC de 7 a 9 ppm y de 167 a 174 ppm, Figura 6.54, se observó la correlación del carbonilo en 172.8 ppm de la alanina con el protón -NH- en 7.4 ppm de la valina y a su vez se tiene que el carbonilo de la valina en 170.8 correlaciona con el protón NH en 7.1 ppm de la treonina. Mientras que el carbonilo C=O en 169.3 ppm de la treonina no presenta correlación con alguna señal de protón NH, lo que significa que está unido a un amino terciario como la prolina, generándose el fragmento de -Ala-Val-Thr-Pro-, Figura 6.55.



**Figura 6.55** Fragmento generado de -Ala-Val-Thr-Pro- a partir del análisis del espectro HMBC de la ciclosenegalina A (**2**)

Incorporando la conectividad de -Ala-Val-Thr-Pro- deducida por las correlaciones HMBC, a la secuencia observada a través del espectro ROESY de Pro-Gly-Leu-Ser-Ala se generó la secuencia peptídica del cicloheptapéptido (**2**) como Ciclo-(Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Leu<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-) heptapéptido, Figura 6.57. Por lo que, los desplazamientos químicos de todos los átomos de carbono e hidrógeno de los residuos de la ciclosenegalina A (**2**) pudieron ser asignados resumiéndose en la Tabla 3. De esta manera la secuencia de la ciclosenegalina A (**2**) está de acuerdo con la secuencia de la opción A de las dos propuestas por espectrometría de masas.



**Figura 6.57.** Ciclopéptido ciclosenegalina A (**2**) generado por el análisis de los espectros ROESY, HMBC y Espectrometría de Masas (MS2)

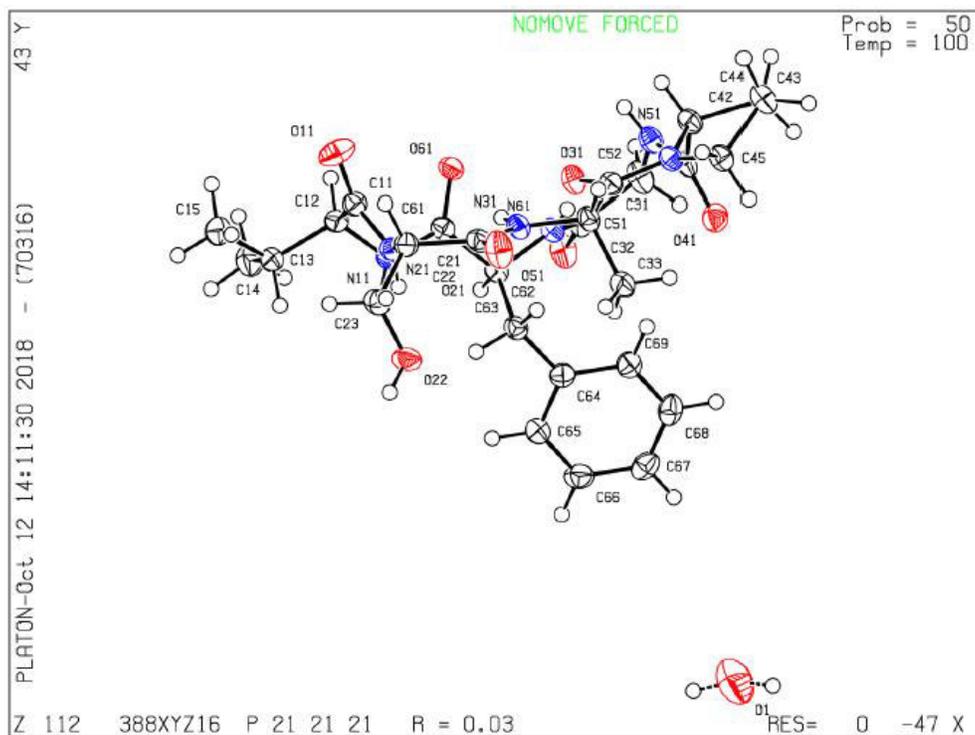
Una vez asignada la secuencia de aminoácidos de la ciclosenegalina A (2) se observó que ésta es la misma que fue descrita previamente por Wele-Bodo (2002) en la *Annona senegalensis*, recolectada en Casamance al sur del Senegal. El hecho de reportar que ambas especies sintetizan el mismo ciclopéptido contribuye al conocimiento de que la producción de ciclopéptidos como metabolitos secundarios en especies del género *Annona* se manifiesta bajo diferentes ambientes.

**Tabla 3.** Datos espectroscópicos de RMN para la ciclosenegalina A (2) en DMSO- $d_6$

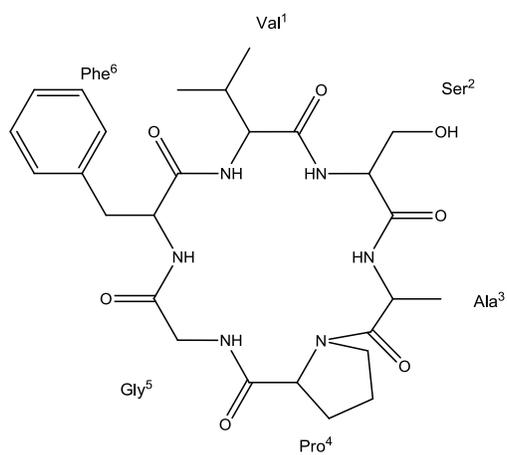
Residuo	Átomo	$^1\text{H}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	gHMBC	ROESY
Pro <sup>1</sup>	CO			171.8	8.9 NH-Gly	
	H $_{\alpha}$ (1H)	4.14	traslapado	61.2		
	H $_{\beta'}$ (1H)	2.1	m	29.5		
	H $_{\beta''}$ (1H)	1.8	m			
	H $_{\gamma'}$ (1H)	1.9	m	25.2		
	H $_{\gamma''}$ (1H)	2.0	m			
	H $_{\delta'}$ (H)	3.9	m	48.7		
H $_{\delta''}$ (H)	3.6	td, 9.89 y 6.75				
Gly <sup>2</sup>	CO			168.9	7.8 NH-Leu	
	NH	8.9	dd7.8 y 4.82			4.14 $_{\alpha}\text{CH-Pro}$
	H $_{\alpha}$ (1H)	3.4	dd, 17.01 y 7.5	43.1		
	H $_{\alpha'}$ (1H)	4.0	d, 4.67			
Leu <sup>3</sup>	CO			171.3	8.54 NH-Ser	
	NH	7.8	d, 10.46			4.0 $_{\alpha}\text{CH}_2^1\text{-Gly}$
	H $_{\alpha}$ (1H)	4.52	m	52.9		
	H $_{\beta}$ (1H)	1.4	m	43.8		
	H $_{\beta'}$ (1H)	1.3	m			
	H $_{\gamma'}$ (1H)	1.5	m	24.6		
	$\gamma^{\prime}\text{CH}_3$ (3H)	0.9	d, 6.55	23.1		
$\delta^{\prime}\text{CH}_3$ (3H)	0.9	6.50	22.3			
Ser <sup>4</sup>	CO			169.5	8.49 NH-Ala	
	NH (1H)	8.54	d, 6.9			4.52 $_{\alpha}\text{CH-Leu}$
	H $_{\alpha}$ (1H)	4.5	m	54.3		
	H $_{\beta}$ (1H)	3.71	m			
	H $_{\beta}$ (1H)	4.23	m	63.5		
OH (1H)	5.92	d, 3.89			7.13 NH-Thr 7.45 NH-Ser	
Ala <sup>5</sup>	CO			172.8	7.45 NH-Val	
	NH	8.49	d, 4.3			4.5 $_{\alpha}\text{CH-Ser}$
	H $_{\alpha}$ (1H)	4.0		51.3		
	$\beta^{\prime}\text{CH}_3$ (1H)	1.3	qd, 7.41 y 4.14	17.5		
Val <sup>8</sup>	CO			170.7	7.13 NH-Thr	
	NH	7.45	d, 10.27			
	H $_{\alpha}$ (1H)	4.11	m, (traslapado)	59.1		
	H $_{\beta}$ (1H)	2.0	m	30.6		
	$\gamma^{\prime}\text{CH}_3$ (3H)	0.8	d, 4.17	19.4		
$\gamma^{\prime}\text{CH}_3$ (3H)	0.81	d, 4.19	18.6			
Thr <sup>7</sup>	CO			169.3		
	NH	7.13	d, 10.23			
	H $_{\alpha}$ (1H)	4.6	t, 9.13, 9.13	50.6		
	H $_{\beta}$ (1H)	3.8	m	67.6		
	OH (H)	4.5	d, 7.45			
$\gamma^{\prime}\text{CH}_3$ (3H)	1.1	d, 6.27	20.3			

### 6.2.3 Anomuricata A (3)

Continuando con la identificación de los compuestos obtenidos del extracto hidroetanólico (EtOH/H<sub>2</sub>O/AcOH), a través de los métodos cromatográficos se obtuvo de la fracción E un sólido blanco que también dio prueba positiva a ciclopéptidos con Cl<sub>2</sub>/O-tolidina y negativa a ninhídrica, indicando la presencia de un ciclopéptido conocido, dicho sólido fue nombrado como anomuricata A (3). Un cantidad de esta fracción se mantuvo en solución con la mínima cantidad de metanol dentro de un tubo de RMN, observando al evaporar lentamente este disolvente un sólido cristalino que fue sometido a un estudio de difracción de Rayos-X (Figura 6.58) mostrando además una molécula de agua de cristalización y con la siguiente secuencia de sus residuos de aminoácidos: ciclo (-Val<sup>1</sup>-Ser<sup>2</sup>-Ala<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-), cuya estructura se muestra en la Figura 6.59, dicho ciclopéptido correspondió con uno que ya había sido previamente aislado y reportado de *Annona muricata* (Wu *et al.*, 2007 ). Los datos de adquisición y propiedades del cristal se muestran en la Tabla 4, donde se puede apreciar que después del procesamiento de los datos de difracción se iteró la fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>, en la misma Figura 6.59 se observa que la estructura cristalina está asociada con un cuarto de molécula de agua de cristalización, lo cual es comparable con los datos publicados para la anomuricata A (3) donde esta fue obtenida y resuelta con una molécula de metanol en su estructura cristalina.



**Figura 6.58** Unidad asimétrica de la anomuricataina A (**3**) obtenida por difracción de Rayos-X



**Figura 6.59** Estructura de la anomuricataina A (**3**)

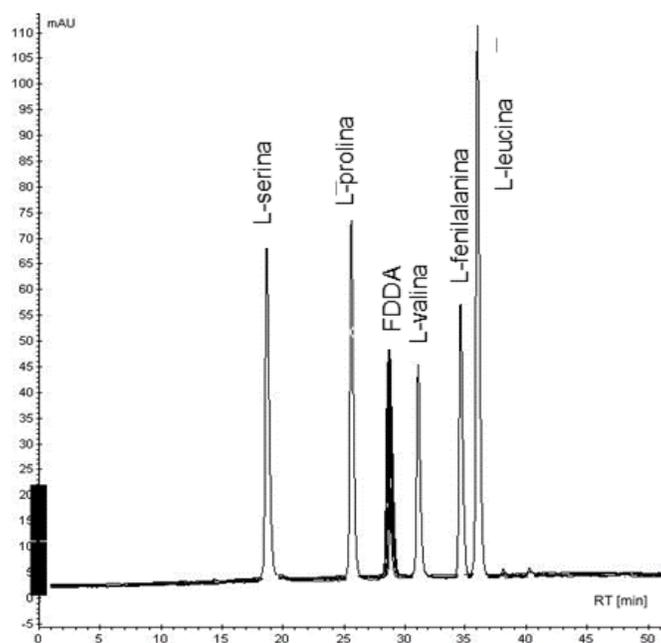
**Tabla 4.-** Datos cristalográficos de la annomuricata A (3)

Formula empírica	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>
Peso fórmula	563.14
Temperatura	100(2)K
Longitud de onda	1.54178
Sistema del cristal	ortorrómbico
Grupos espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Dimensiones unitaria de la celda	a = 8.5780(3) Å α = 90° b = 14.4769(5) Å β = 90° c = 23.5012(9) Å γ = 90°
Volumen	2918.45(18) Å <sup>3</sup>
Z	4
Densidad calculada	1.282 Mg/m <sup>3</sup>
Coefficiente de absorción	0.780 mm <sup>-1</sup>
Tamaño del cristal/ color/ forma	0.366 x 0.120 x 0.112 mm / incoloro /barra
Intervalo de θ	3.586 to 77.797°
Intervalo de índices	-9<=h<=10, -18<=k<=18, -29<=l<=29
Reflexiones colectadas	85791
Reflexiones únicas	6193 [R(int) = 0.0616]
Completado a θ=67.679°	99.7 %
Max. y Min. transmisión	0.751 y 0.5846
Método de afinamiento	Matriz de mínimos cuadrados sobre F <sup>2</sup>
Datos/restricciones / parámetros	6193 / 13 / 397
Índices R final [I>2σ(I)]	R1 = 0.0333, wR2 = 0.0702
Índices R	R1 = 0.0377, wR2 = 0.0723
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.109
Parámetros estructurales absolutos	-0.02(5)
Densidad electrónica residual	0.166 and -0.134 e.Å <sup>-3</sup>

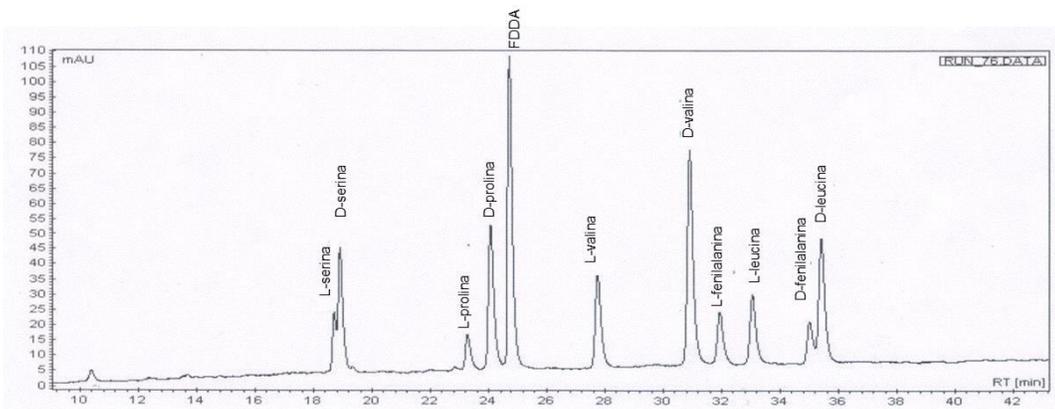
### 6.3 Configuración absoluta de los aminoácidos de la ciclopurpuracina (1)

La configuración absoluta de los residuos de los aminoácidos del ciclopéptido ciclopurpuracina (1) se estableció por medio del método de Marfey usando N<sub>α</sub>-(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanilamida (FDDA). En la Figura 6.60 se presenta el cromatograma de los derivados con FDDA de los residuos de los aminoácidos del hidrolizado del ciclopéptido ciclopurpuracina (1), los cuales fueron comparados con los tiempos de retención de los derivados de los estándares de los isómero D

y L de los aminoácidos Pro, Phe, Ile, Ser y Val, Figura 6.61. Los resultados muestran que los isómeros de los residuos de los aminoácidos presentes tienen configuración L, como se esperaba, ya que es la forma que presentan los aminoácidos comunes presentes en la mayoría de los ciclopéptidos aislados de las semillas de frutos de la familia Annonaceae.



**Figura 6.60** Cromatograma de los derivados del hidrolizado del ciclopéptido ciclopurpuracina (**1**). RP-HPLC, columna: Jupiter Proteo C12, 250x 4,6 mm 4,0  $\mu$ m 90 Å, Detección: UV-VIS a 230 nm, Volumen inyectado: 1,0  $\mu$ L, Fase móvil: H<sub>2</sub>O (0.05% TFA) y ACN (0.05% TFA), Gradiente de elución 10 a 75% ACN en 30 min.



**Figura 6.61** Cromatograma de los derivados de los estándares de los aminoácidos por RP-HPLC. Columna: jupiter Proteo C12, 250x 4,6 mm 4,0  $\mu\text{m}$  90  $\text{\AA}$ , detección: UV-VIS a 230 nm, volumen inyectado: 1,0  $\mu\text{L}$ , fase móvil:  $\text{H}_2\text{O}$  (0.05% TFA) y ACN (0.05% TFA), gradiente de elución 10 a 75% ACN en 30 min.

## 7 CONCLUSIONES

Se realizó un estudio químico de *Annona purpurea* y, por primera vez, se aislaron varios ciclopéptidos de esta especie. En este trabajo se analizó el extracto hidroetanólico (60:40, 0.1% de Ac. Acético) de la semilla de *Annona purpurea* Moc. & Senssé ex Dunal recolectada de la región de Las Salinas, Comunidad de Chicomuselo en el Estado de Chiapas. Se aislaron tres ciclopéptidos: ciclopurpuracina (**1**): ciclo (-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>- Phe<sup>3</sup>- ILe<sup>4</sup>- Gly<sup>5</sup>- Ser<sup>6</sup>- Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-), ciclosenegalina A (**2**): ciclo (-Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Leu<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-) y annomuricata A (**3**): ciclo (-Val<sup>1</sup> -Ser<sup>2</sup>-Ala<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-). Los ciclopéptidos ciclosenegalina A (**2**) y annomuricata A (**3**) ya han sido aislados previamente en las especies *Annona senegal* y *Annona muricata* respectivamente. El ciclopéptido ciclopurpuracina (**1**) resultó ser un nuevo producto natural, cuya elucidación estructural se llevó a cabo empleando técnicas espectroscópicas de RMN 1D y 2D y espectrometría de masas de alta resolución Ms/Ms empleando un software de análisis para ciclopéptidos MassLYnx y nMass. La espectrometría de masas de alta resolución ayudó a corroborar tanto la presencia de los aminoácidos, como la secuencia de los mismos en el ciclopéptido.

## 8 PERSPECTIVAS

Continuar con el estudio químico del extracto hidroetanólico (60:40, 0.1% de Ac. Acético) de la semilla de *Annona purpurea* con el propósito de obtener nuevos ciclopéptidos.

Optimizar las condiciones de aislamiento para obtener mayor cantidad de extracto para efectuar ensayos de actividad antiinflamatoria y antitumorales.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

Abdalla, M.A., McGaw, L.J., 2018. Natural Cyclic Peptides as an Attractive Modality for Therapeutics: A Mini Review. *Molecules* 23, 2080, 1–19.

Adamska, A., Janecka, A., 2015. Endless peptides circular forms in nature. *Curr. Med. Chem.* 22, 352–359. Bhushan, R., Brückner, H., 2004. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. *Amino Acids* 27, 231–247.

Agustín-Andrés, J., Andrés-Hernández L. (2011) *Biología, diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de Annonaceae en México*. Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo, 141pp.

Andrés-Agustín, J., Segura-Ledesma, S.D., 2014. Conservación y uso de los recursos genéticos de *Annonaceae* en México. *Rev. Bras. Frutic.* 36, 118,124.

Bhushan, R., Brückner, H., 2004. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. *Amino Acids* 27, 231–247.

Chang, F.R., Wei, J.L., Teng, C.M., Wu, Y.C., 1998. Two new 7- dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry* 49, 2015–2018.

Chang, F.R., Chen, C.Y., Wu, P.H., Kuo, R.Y., Chang, Y.C., Wu, Y.C., 2000. New alkaloids from *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 63, 746–748.

Chavez, D., Mata, R., 1999. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. *Phytochemistry* 50, 823–828.

Chavez, D., Mata, R., 1998. Purpurediolin and Purpurenin, Two New Cytotoxic Adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona purpurea*. J. Nat. Prod. 61, 580–584.

Chávez, D.; Mata, R., 1999. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea* *Phytochemistry* 50(5):823-8

Ceplead, F., Ohtani, K., Hamburgera, M., Guptab, M.P., Sohb, P., Hostettmanna, K, 1993. Novel Acetogenins from the Leaves of *Annona purpurea*. Helv. Chim. Acta 76, 1379.

Chao-Ming, L., Ning-Hua, T., Hui-Lan, Z., Qing, M., Xiao-Jiang, H., Yi-Neng, H., Jun, Z., 1998. Cyclopeptide from the seeds of *Annona muricata* *Phytochemistry* 48, 555–556.

Chao-Ming, L., Ning-Hua, T., Qing, M., Hui-Lan, Z., Xiao-Jiang, H., Yu, W.V., Jun, Z., 1991. Cyclopeptide from the seed of *Annona Squamosa*. *Phytochemistry* 45, 521–523.

Chuang, P.-H., Hsieh, P.-W., Yang, Y.-L., Hua, K.-F., Chang, F.-R., Shiea, J., Wu, S.-H., Wu, Y.-C., 2008. Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*. J. Nat. Prod. 71, 1365–1370.

Dahiya, R., Maheshwari, M., Yadav, R., 2009. Synthetic and Cytotoxic Activity Studies on Annomuricatin B. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 64, 237–244.

Dahiya, R., (2008). Synthesis, Spectroscopic and Biological Investigation of Cyclic Octapeptide: Cherimolacyclopeptide G. *Turk. J. Chem.* 32, 205–215.

- Jia, C., Qi, W., He, Z., 2007. Cyclization reaction of peptide fragment ions during multistage collisionally activated decomposition: an inducement to lose internal amino-acid residues. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 663–678.
- Jiang, R.-W., Lu, Y., Min, Z.-D., Zheng, Q.-T., 2003. Molecular structure and pseudopolymorphism of squamatin A from *Annona squamosa*. *J. Mol. Struct.* 655, 157–162.
- I-Lan, Z.H., Qing, t. M., Xiao-Jiang, H., Yi-Neng, H.E., 1998. Cyclopeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 48, 555–556.
- Li, C.-M., Tan, N.-H., Zheng, H.-L., Mu, Q., Hao, X.-J., He, Y.-N., Zhou, J., 1999. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. *Phytochemistry* 50, 1047, 1052.
- Li, C.-M., Tan, N.-H., Zheng, H.-L., Mu, Q., Hao, X.-J., He, Y.-N., Zhou, J., 1998. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. *Phytochemistry* 47, 1293–1296.
- Ma, C., Chen, Y., Chen, J., Li, X., Chen, Y., 2017. A Review on *Annona squamosa* L., Phytochemicals and Biological Activities. *Am. J. Chin. Med.* 45, 933-964.
- Morita M., Sato Y., Kobayashi J., 1999. Cyclosquamosins A - G, Cyclic Peptides from the Seeds of *Annona squamosa*. *Tetrahedron* 55, 7509–7518.
- Morita, H., Iizuka, T., Choo, C.-Y., Chan, K.-L., Takeya, K., Kobayashi, J. 'ichi, 2006. Vasorelaxant activity of cyclic peptide, cyclosquamosin B, from *Annona squamosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 4609–4611.
- Niedermeyer, T.H.J., Strohmalm, M., 2012. mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra. *PLoS ONE* 7(9): e44913.

Ramalho, S.D.; Pinto, M.E.F.; Ferreira, D.; Bolzan, V.S. (2018). Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. *Planta Med.*, 84: 558–567.

Rejón-Orantes, J., González-Esquinca, A., de la Mora, M., Roldan Roldan, G., Cortes, D., 2011. Annomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta Med.* 77, 322–327.

Schwing, K., Reyheller, C., Schaly, A., Kubik, S., Gerhards, M., 2011. Structural analysis of an isolated cyclic tetrapeptide and its monohydrate by combined IR/UV spectroscopy. *Chemphyschem* 12, 1981–1988.

Shinde, N.V., Dhake, A.S., Haval, K.P., 2013. Biological Activities of Cyclic Peptides: An Overview. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 4, 142.

Smith, L.J., Bolin, K.A., Schwalbe, H., MacArthur, M.W., Thornton, J.M., Dobson, C.M., 1996. Analysis of main chain torsion angles in proteins: prediction of NMR coupling constants for native and random coil conformations. *J. Mol. Biol.* 255, 494–506.

Sonnet, P.E. y Jacobson, M., 1971. Tumor inhibitors II: Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *J. Pharm. Sci.-US*, 60, 1254-1256.

Tan, N.-H., Zhou, J., 2006. Plant cyclopeptides. *Chem. Rev.* 106, 840–895.

Wang, C.K., Craik, D.J., 2016. Cyclic peptide oral bioavailability: Lessons from the past. *Biopolymers* 106, 901–909.

Wélé, A., Landon, C., Labbé, H., Vovelle, F., Zhang, Y., Bodo, B., 2004. Sequence and solution structure of cherimolacyclopeptides A and B, novel cyclooctapeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Tetrahedron* 60, 405–414.

Wélé, A., Mayer, C., Quentin, D., Zhang, Y., Blond, A., Bodo, B., 2009. 3D-structure of cycloreticulic C and glabrin A, cyclopeptides from the seeds of *Annona reticulata*. *Tetrahedron* 65, 275–281.

Wélé, A., Ndoye, I., Zhang, Y., Brouard, J.-P., Bodo, B., 2005. Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*, *Phytochemistry* 66, 693–696.

Wélé, A., Ndoye, I., Zhang, Y., Brouard, J.-P., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2005. Glaucacyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. *Phytochemistry* 66, 1154–1157.

Wélé, A., Zhang, Y., Brouard, J.-P., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2005. Two cyclopeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 66, 2376–2380.

Wélé, A., Zhang, Y., Caux, C., Brouard, J.-P., Dubost, L., Guette, C., Pousset, J.-L., Badiane, M., Bodo, B., 2002. Isolation and structure of cyclo-senegalins A and B, novel cyclopeptides from the seeds of *Annona senegalensis*. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 2712–2718.

Wélé, A., Zhang, Y., Caux, C., Brouard, J.-P., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2004. Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *C. R. Chim.* 7, 981–988.

Wélé, A., Zhang, Y., Dubost, L., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2006. Cyclic peptides from the seeds of *Annona glauca* and *A. cherimola*. Chem. Pharm. Bull. 54, 690–692.

Wélé, A., Zhang, Y., Dubost, L., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2005. Isolation and characterization of three cyclopeptides from the seeds of *Annona glauca* and *A. cherimola*. Niger J. Nat. Prod. Med. 9, 68–72.

Wélé, A., Zhang, Y., Ndoeye, I., Brouard, J.-P., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2004. A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. J. Nat. Prod. 67, 1577–1579.

Wu, L., Lu, Y., Zheng, Q.-T., Tan, N.-H., Li, C.-M., Zhou, J., 2007. Study on the spatial structure of anomuricatin A, a cyclohexapeptide from the seed of *Annona muricata*. J. Mol. Struct. 827, 145–148.

Wu, P., Wu, M., Xu, L., Xie, H., Wei, X., 2014. Anti-inflammatory cyclopeptides from exocarps of sugar-apples. Food Chem. 152, 23–28.

Yang, Y.-L., Hua, K.-F., Chuang, P.-H., Wu, S.-H., Wu, K.-Y., Chang, F.-R., Wu, Y. C., 2008. New cyclic peptides from the seeds of *Annona squamosa* L. and their anti-inflammatory activities. J. Agric. Food Chem. 56, 386–392.

# ANEXOS

**Tabla A 1.** Fracciones obtenidas de la separación por CCA de la fracción soluble en metanol del extracto hidroetanólico

Fracción /Eluatos	Disolvente/Proporción	Peso (g)	Prueba Química O-Tolidina	Análisis RMN- <sup>1</sup> H
<b>A (1-52)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (100%)	0.053	-	-
<b>B (53-80)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (2-8%)	0.0433	+	-
<b>C (81-103)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (10-14%)	0.250	+	+
<b>D (104-107)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (14-16%)	0.0107	+	+
<b>E (108-113)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (16-20%)	0.027	+	+
<b>F (113-138)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (22-24%)	1.2719	+	-
<b>G (139-158)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (26-28%)	0.0702	-	-
<b>H (158-190)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (30-34%)	0.3039	-	-
<b>I (191-230)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (36-40%)	0.546	-	-
<b>J (231-243)</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (40-45%)	0.565	-	-

**Tabla A 2.** Fracciones obtenidas de la CPP en la fracción C (100 mg de la fracción C, eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH: H<sub>2</sub>O (5.5: 4: 0.5), revelada con luz UV, λ<sub>254nm</sub>)

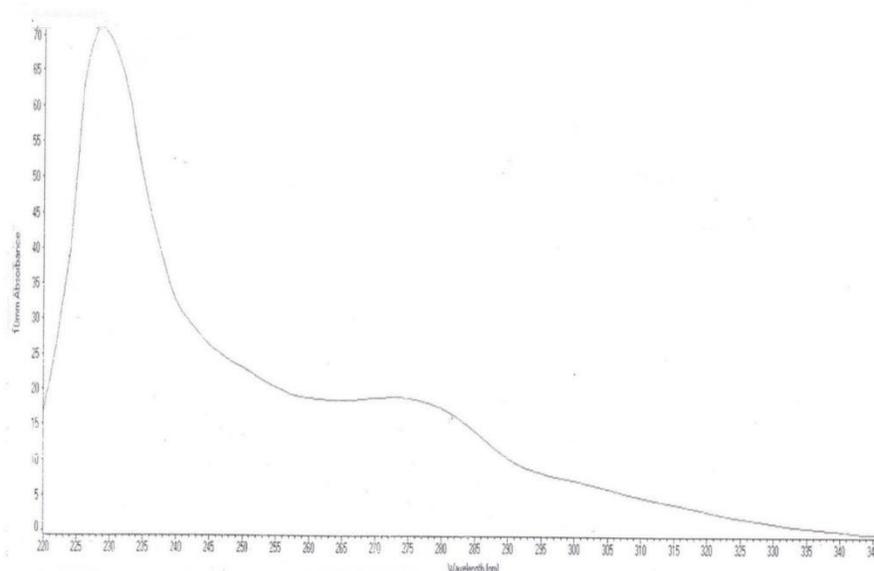
Bandas de TLC (en orden ascendente)	Peso (g)	% en peso	Prueba química Ninhidrina/ Cl <sub>2</sub> / O-tolidina	RMN- <sup>1</sup> H
<b>C-I</b>	0.0084	8.4	-	-
<b>C-II</b>	0.009	9.9	-	-
<b>C-III</b>	0.037	37	-	-
<b>C-IV</b>	0.019	19	+	+
<b>C-V</b>	0.013	13	+	+
<b>C-VI</b>	0.0097	9.7	+	-
<b>C-VII</b>	0.0047	4.7	+	-
<b>C-VIII</b>	0.0036	3.6	-	-
<b>C-VIII</b>	0.005	5	-	-
<b>C-X</b>	----	----	-	-

**Tabla A 3.** Fracciones obtenidas de la CPP del eluato D (100 mg de la fracción D, eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH: H<sub>2</sub>O (5.5: 4: 0.5), revelada con luz UV, λ<sub>254nm</sub>)

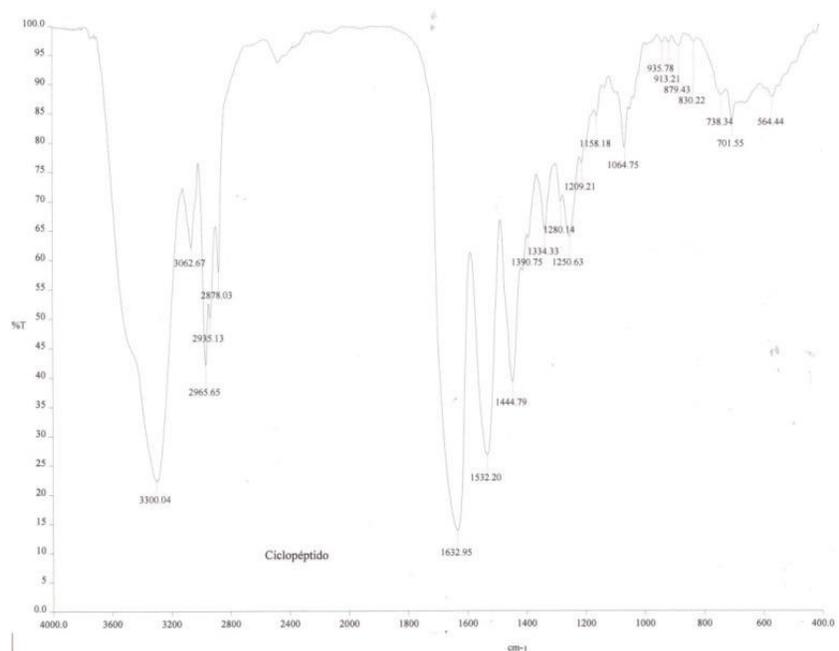
Bandas de TLC (en orden ascendente)	Peso (g)	% en peso	Prueba química Cl <sub>2</sub> / O-tolidina	RMN-1H
D-I	0.0064	6.4	-	-
D-II	0.019	19	-	-
D-III	0.027	27	+	+
D-IV	0.0090	9.	+	+
D-V	0.0103	13	+	-
D-VI	0.0027	2	-	-
D-VII	----	-----	-	-

**Tabla A 4.** Fracciones obtenidas de la CPP del eluato E (100 mg de la fracción E, eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH: H<sub>2</sub>O (5.5: 4: 0.5), revelada con luz UV, λ<sub>254nm</sub>)

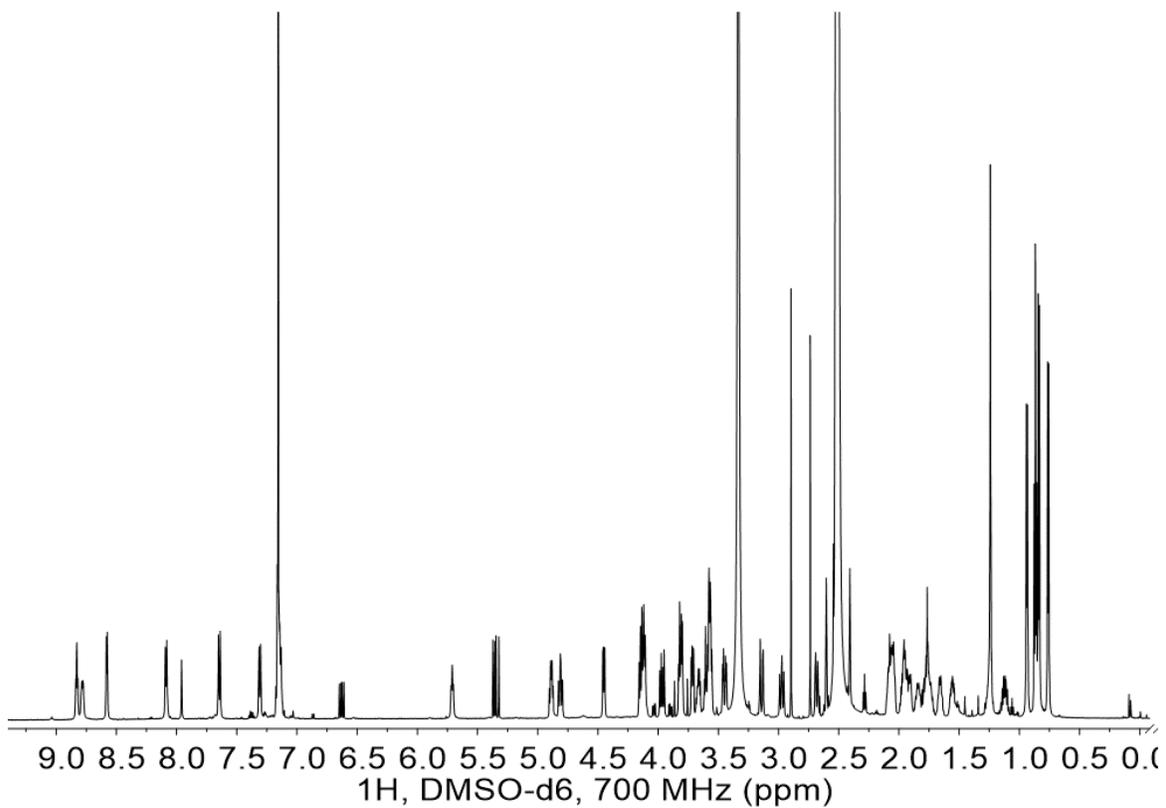
Bandas de TLC (en orden ascendente)	Peso (g)	% en peso	Prueba química Cl <sub>2</sub> / O-tolidina	RMN-1H
E-I	0.0036	3.6	-	-
E-II	0.011	11	-	-
E-III	0.045	45	-	+
E-IV	0.010	10	-	-
E-V	0.014	14	+	+
E-VI	0.0027	2.7	-	-
E-VII	----	-----	-	-



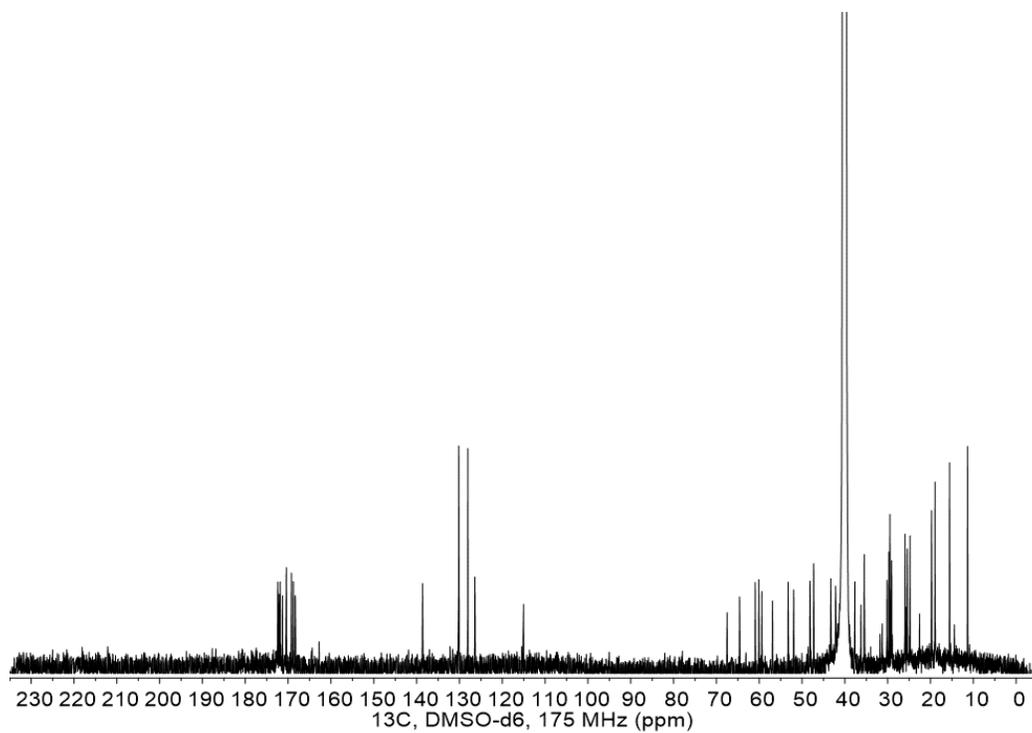
**Figura A1.** Espectro UV de ciclopurpuracina (1)



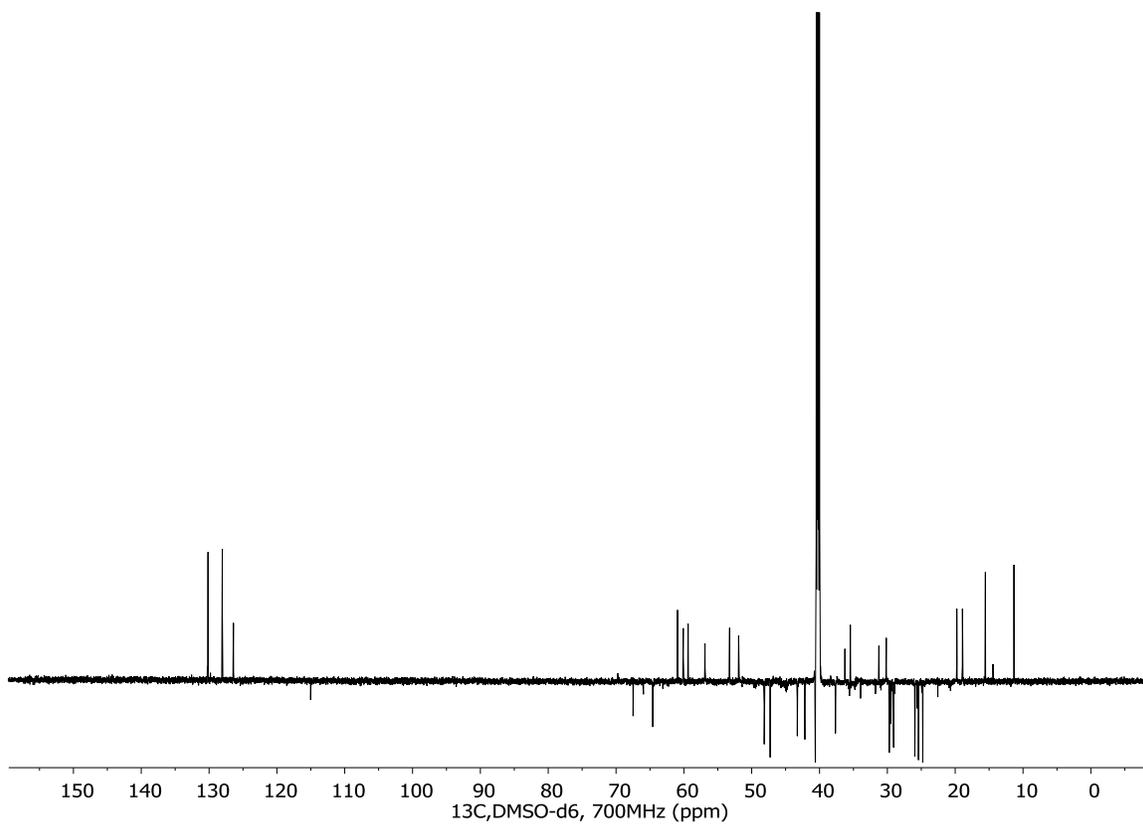
**Figura A2.** Espectro IR de ciclopuracina (1)



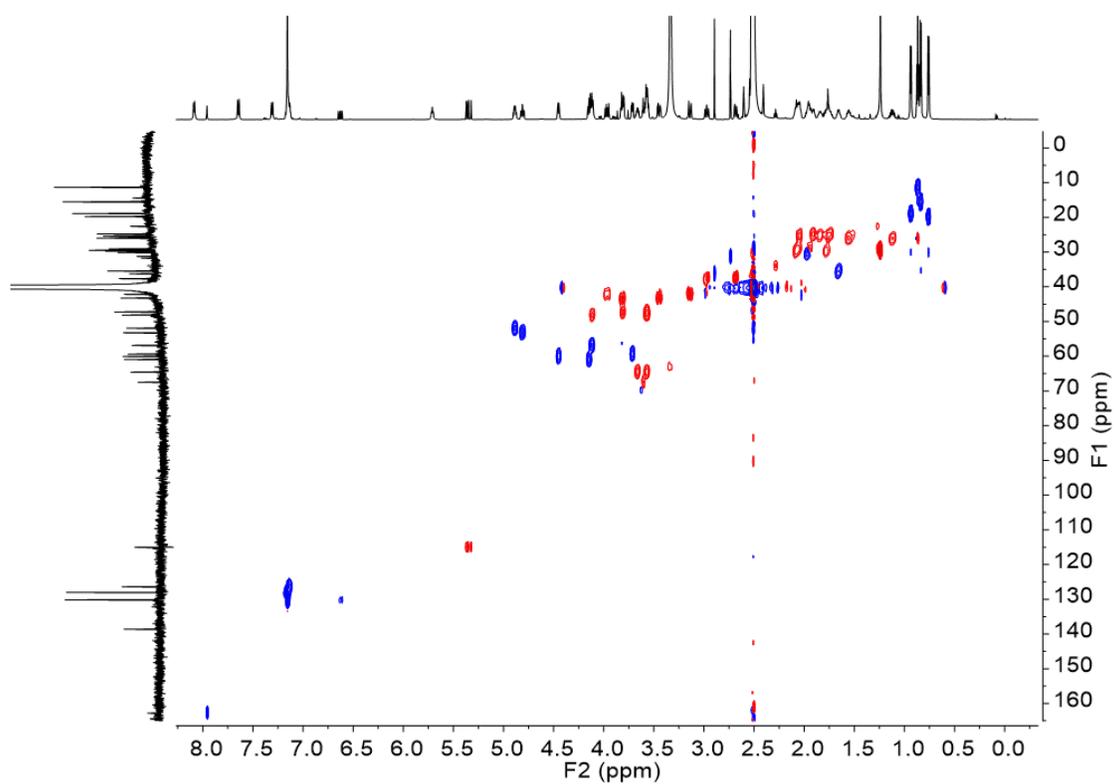
**Figura A3.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de ciclopuracina (1) (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)



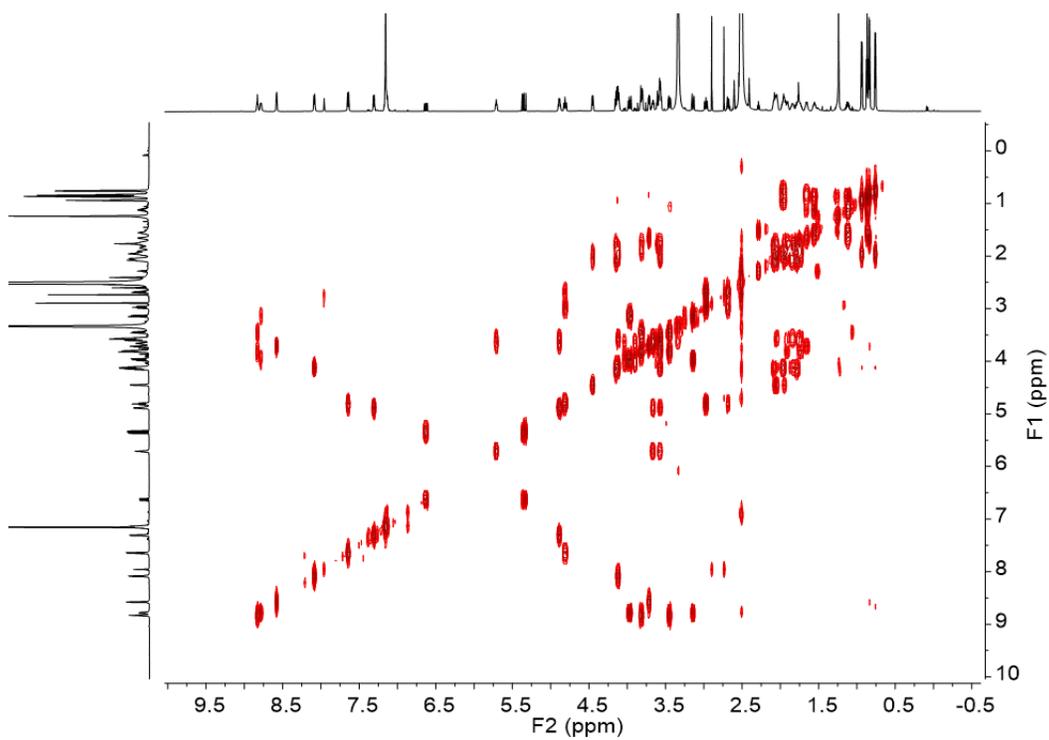
**Figura A4.** Espectro RMN-<sup>13</sup>C de ciclopurpuracina (**1**) (175 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>)



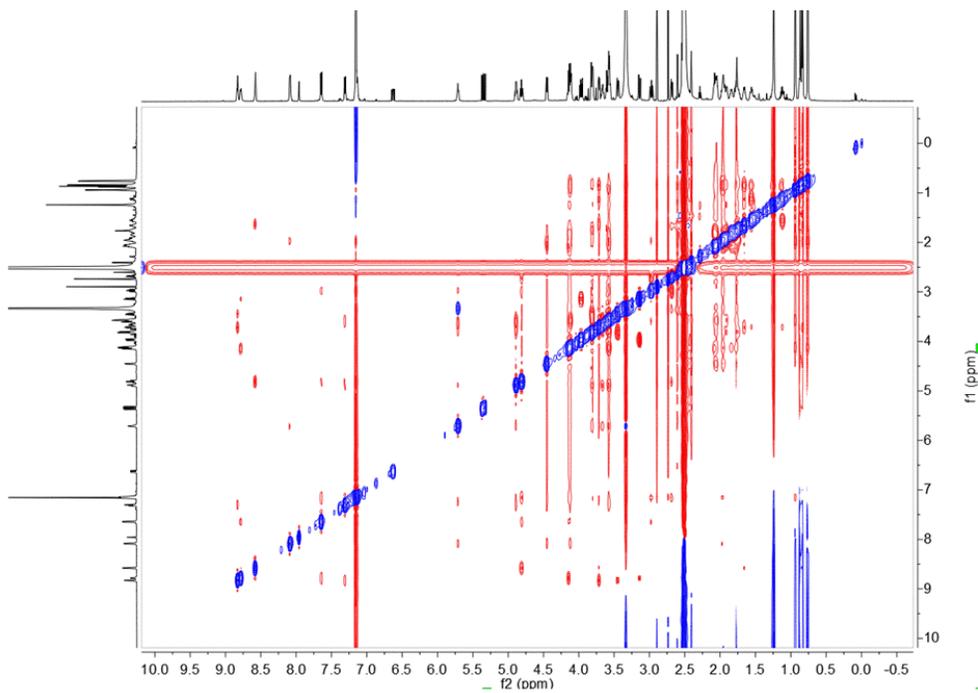
**Figura A5.** Espectro DEPT de ciclopurpuracina (**1**) (175 MHz, DMSO- $d_6$ )



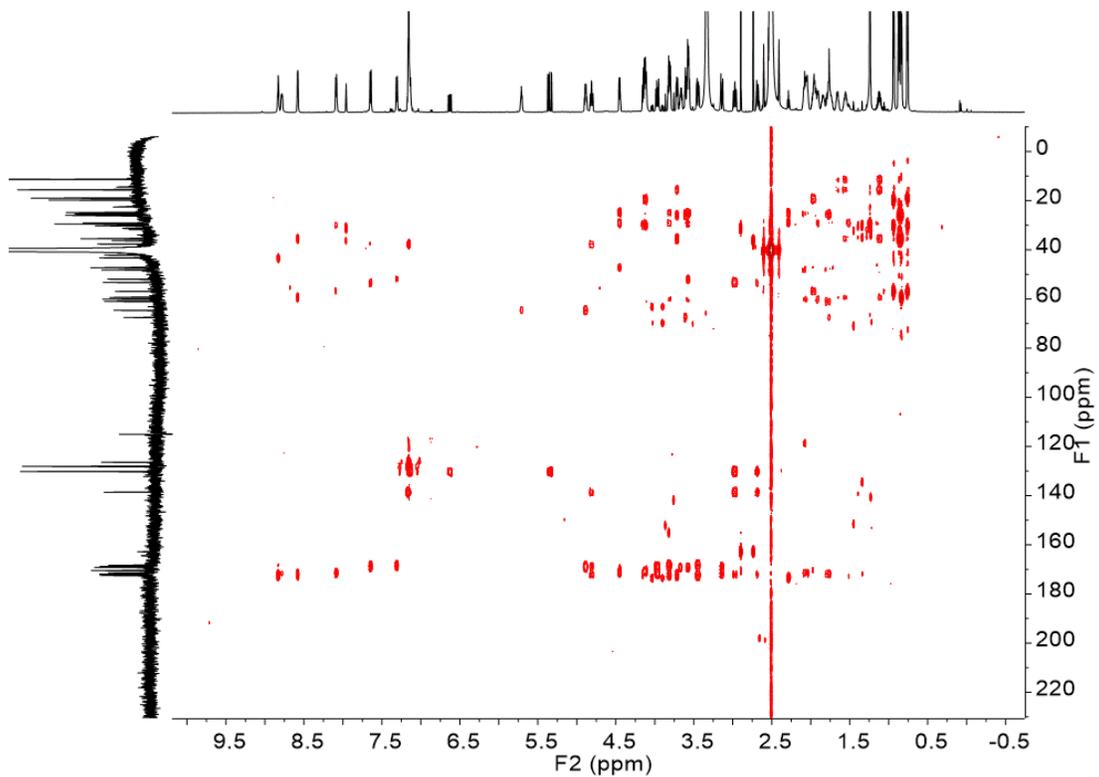
**Figura A6.** Espectro HSQC de ciclopurpuracina (**1**) (700 MHz, DMSO-  $d_6$ )



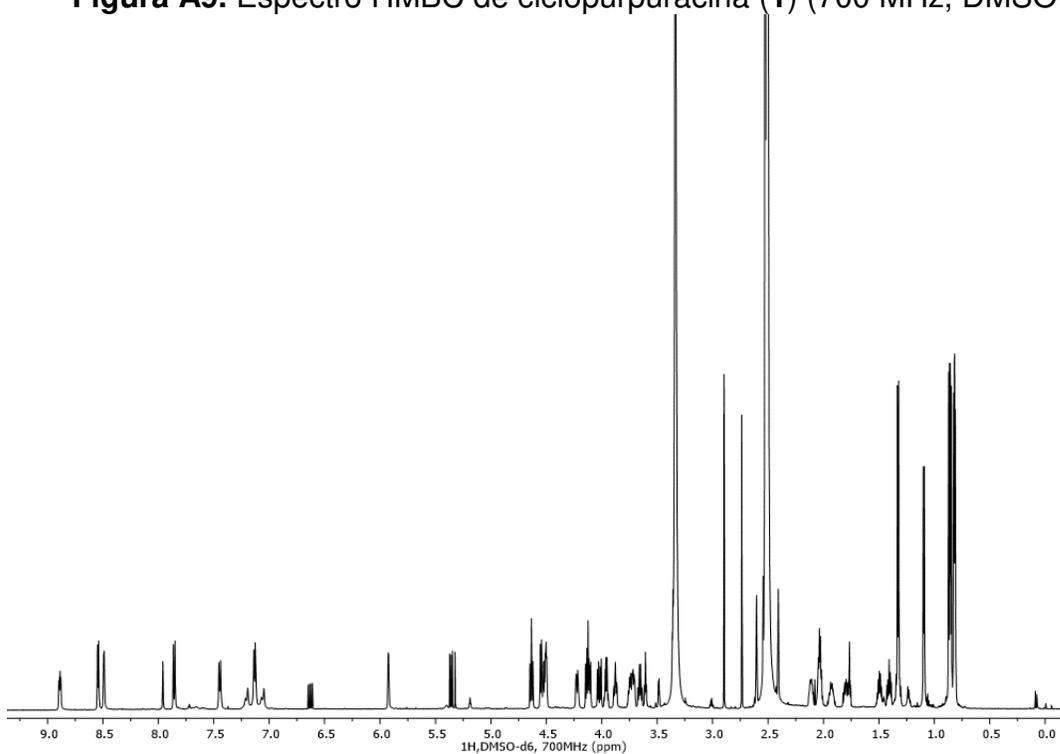
**Figura A7.** Espectro COSY de ciclopurpuracina (**1**) (700 MHz, DMSO- $d_6$ )



**Figura A8.** Espectro ROESY de ciclopurpuracina (**1**) (700 MHz, DMSO- $d_6$ )



**Figura A9.** Espectro HMBC de ciclopurpuracina (**1**) (700 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )



**A10.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  de la cicloenegalina A (**2**)

**Figura**

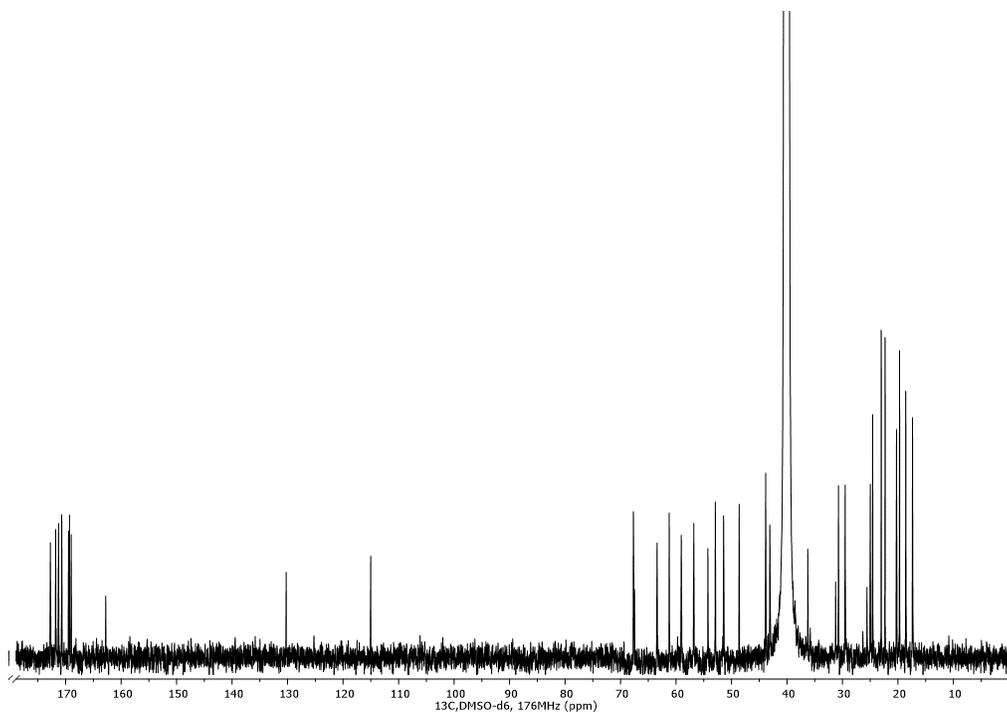


Figura A11. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de la ciclosenegalina A (2)

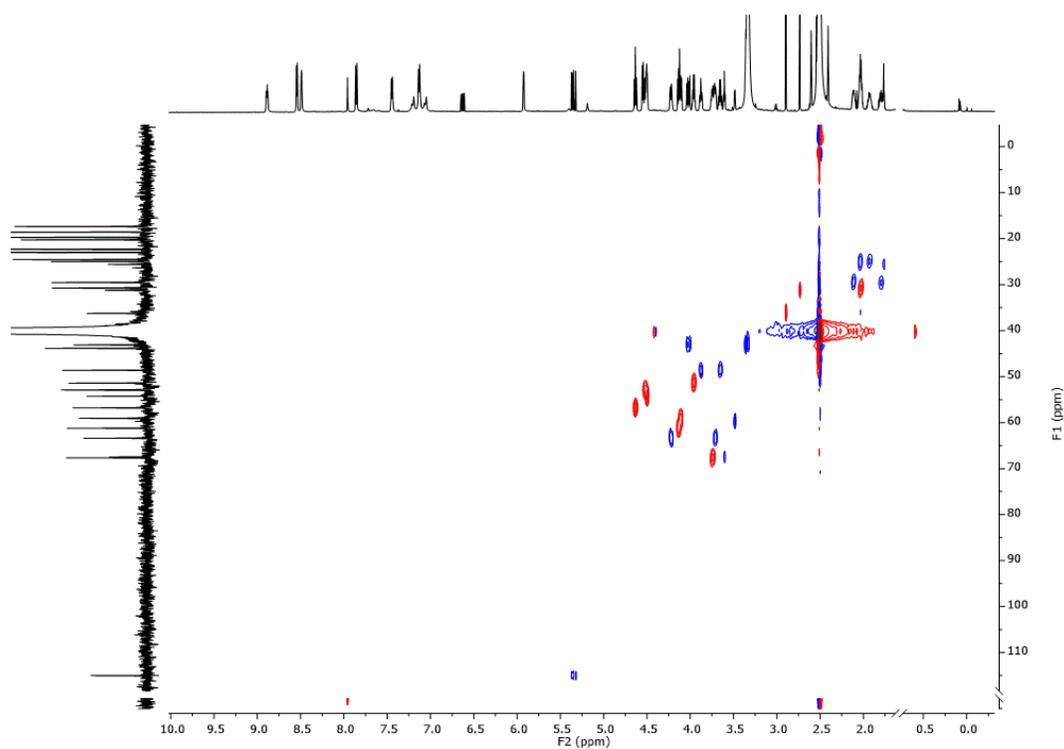


Figura A12. Espectro HSQC de la ciclosenegalina A (2)

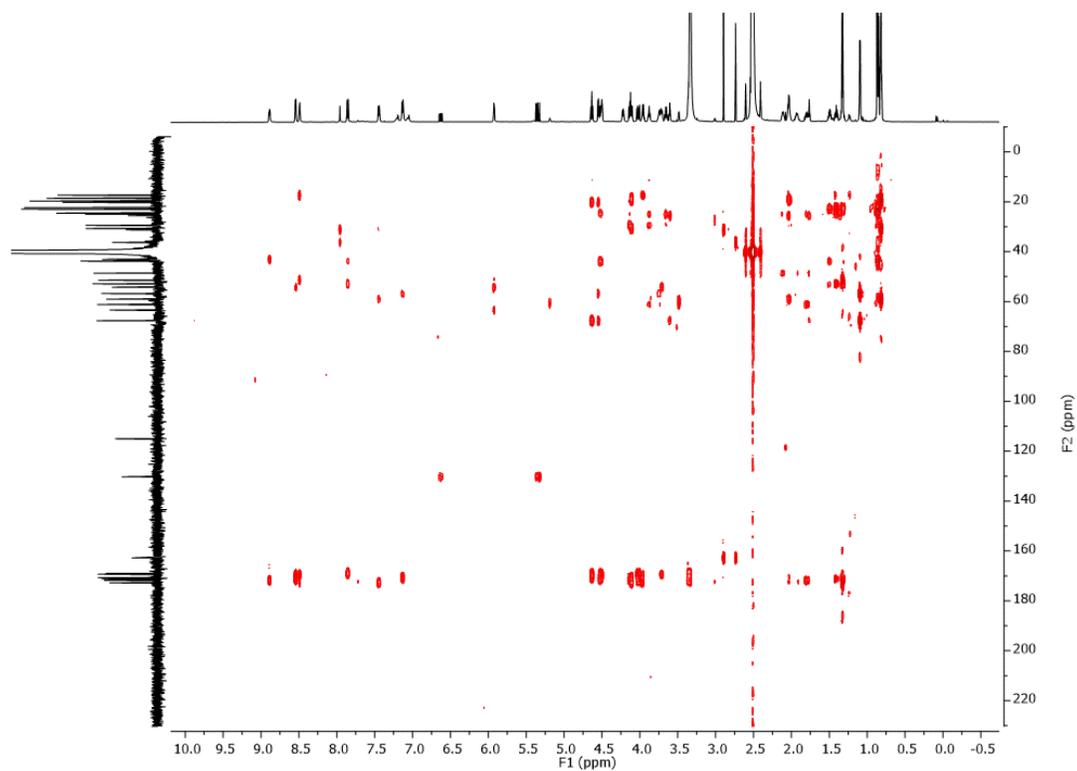


Figura A13. Espectro HMBC de la ciclosenegalina A (2)

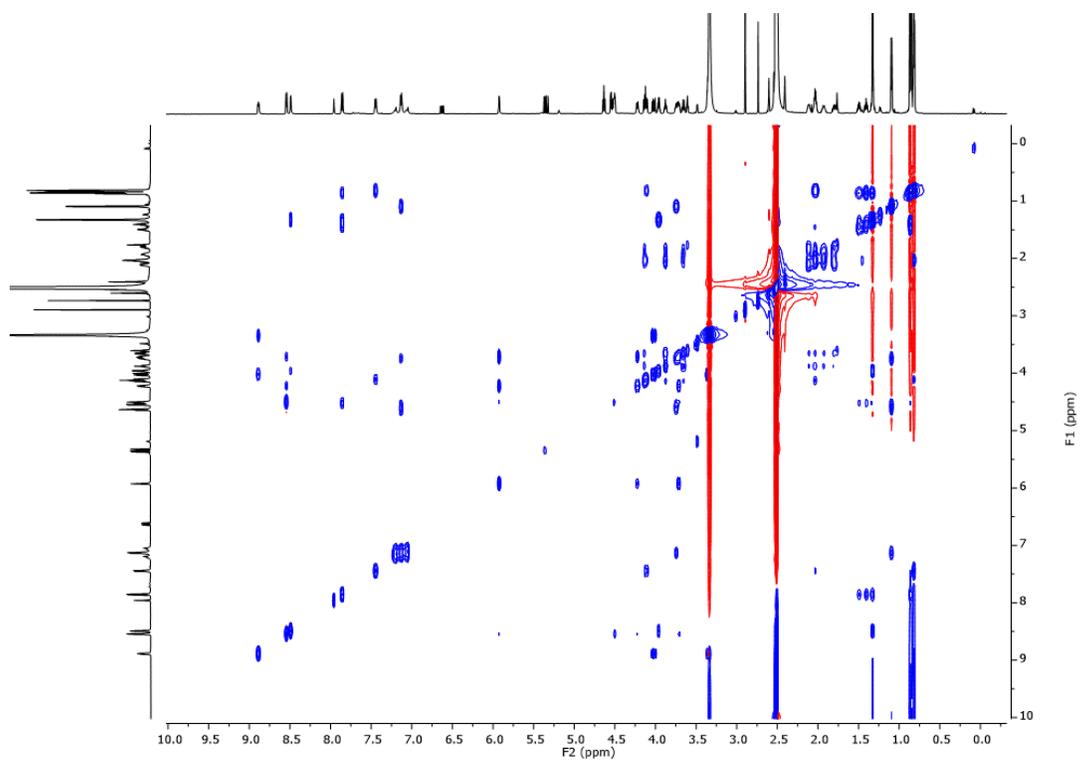
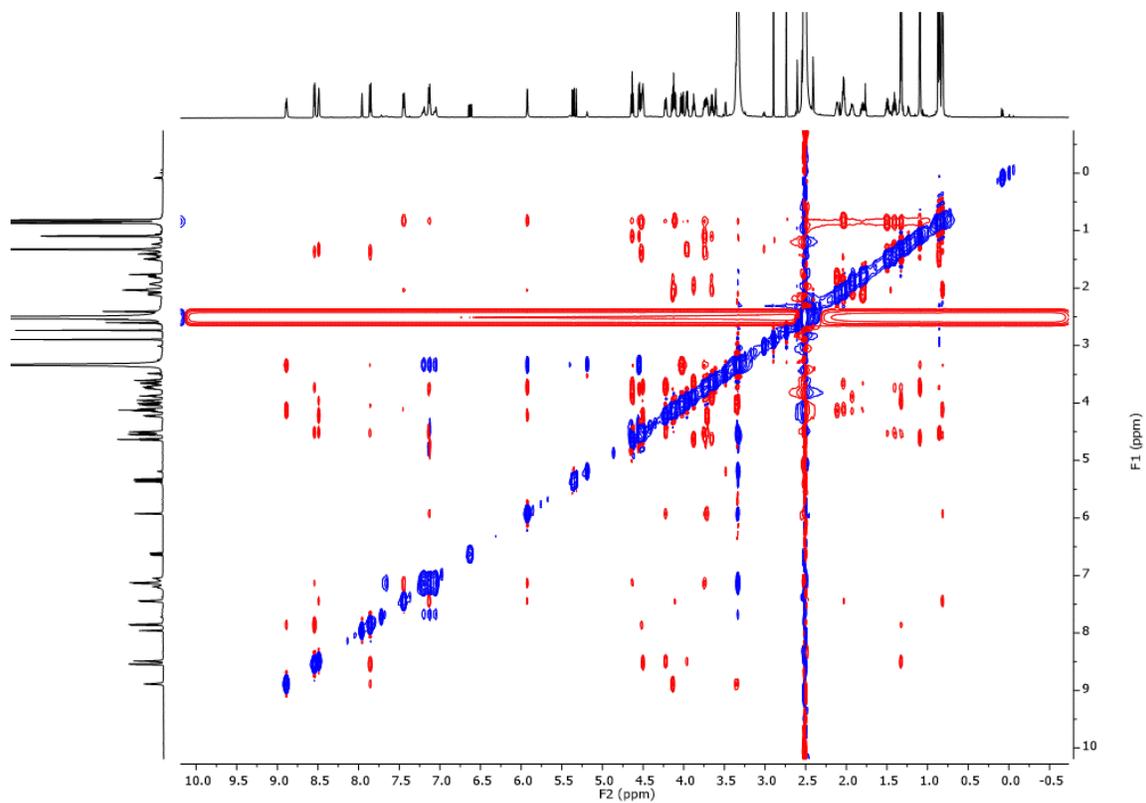


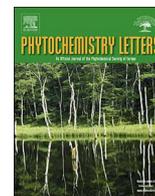
Figura A14. Espectro TOCSY de la ciclosenegalina A (2)



**Figura A15.** Espectro ROESY de la ciclosenegalina A (2)

## **PUBLICACIÓN**

González-Tepale, M.R., Reyes, L., Mayorga-Flores, M., Reyes-Trejo, B., Gómez-Zepeda, D., Rio-Portilla, F., Ordaz-Ortiz, J.J., Herbert-Pucheta, J.E., 2018. Cyclopurpuracin, a cyclopeptide from *Annona purpurea* seeds. *Phytochem. Lett.* 23, 164–167.



## Cyclopurpuracin, a cyclopeptide from *Annona purpurea* seeds

María Rosa González-Tepale<sup>a</sup>, Lino Reyes<sup>a,\*</sup>, Marlen Mayorga-Flores<sup>b</sup>, Benito Reyes-Trejo<sup>c,\*</sup>, David Gómez-Zepeda<sup>d</sup>, Federico del Rio-Portilla<sup>b</sup>, José Juan Ordaz-Ortiz<sup>d</sup>, José Enrique Herbert-Pucheta<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, 04510, México

<sup>b</sup> Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, 04510, México

<sup>c</sup> Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola AP 74 Oficina de Correos Chapingo, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco 56230, Estado de México, México

<sup>d</sup> Laboratorio de Metabolómica y Espectrometría de Masas, LANGE BIO, CINVESTAV, Unidad Irapuato, Km. 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León, 36821, Irapuato Guanajuato, México

<sup>e</sup> Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco Km 38.5, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230, México

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Annona purpurea*  
Seeds  
Chincuya  
Cyclopeptides

### ABSTRACT

From a 60% hydroalcoholic extract of the seeds of *Annona purpurea*, a novel cyclooctapeptide, cyclopurpuracin (1), or cyclo(-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-), has been isolated. The structure of cyclopurpuracin (1) was determined by *de novo* sequencing based on MS/MS spectra and 1D and 2D NMR techniques (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC, COSY and ROESY).

### 1. Introduction

The *Annonaceae* family includes well-known producers of cyclopeptides, including *A. chirimola* (Wélé et al., 2005b), *A. glabra* (Li et al., 1999), *A. montana* (Chuang et al., 2008), *A. muricata* (I-Lan et al., 1998), *A. senegalesis* (Wélé et al., 2002), *A. squamosa* (Morita et al., 1999), *A. reticulata* (Wélé et al., 2008) and *A. glauca* (Wélé et al., 2005a, 2005). The seeds of this family have been the source of many cyclopeptides, such as cherimolacyclopeptide E, glabrin C, cyclo-montanin A, annomuricatin B, cyclo-senegalins A, cyclo-squamosins A–G, cyclo-reticulatin A and glaucacyclopeptide A. In the case of *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Chincuya), several studies have focused on the isolation of alkaloids (Rejón-Orantes et al., 2011), aporphines, oxoaporphines, isoquinolones, benzenoids, morphinandienones, benzylisoquinoline (Chang et al., 1998, 2000) and acetogenins (Ceplead et al., 1993; Chavez and Mata, 1998, 1999). It is important to note that cyclopeptides have not yet been isolated from *Annona purpurea*. In this study, we investigated the natural compounds in the seeds of *A. purpurea* and, for the first time, isolated a new cyclopeptide named cyclopurpuracin (1) through repeated chromatography of a 60% hydroalcoholic extract and further purification using RP-HPLC. We describe the structure elucidation of this cyclopeptide by UV, IR, <sup>1</sup>H NMR,

<sup>13</sup>C NMR, extensive 2D NMR and MS/MS experiments.

### 2. Results and discussion

The 60% hydroalcoholic extract of the seed kernels of *A. purpurea* was chromatographed on a silica gel column, followed by the performance of a preparative TLC and, finally, analysis via RP-HPLC. This procedure yielded a white solid powder. The positive reaction of the powder with a Cl<sub>2</sub>/o-tolidine reagent suggested that the product was a peptide, and the lack of coloration of its TLC spot when treated with ninhydrin confirmed that it was a cyclopeptide (Reindel and Hoppe, 1954; Wélé et al., 2004). The melting point of this compound was 258–260 °C, which was near that already reported for cyclopeptides (Tan and Zou, 2006). The UV spectrum showed absorptions at 228 and 275 nm, wavelengths commonly assigned to peptide bonds and aromatic residues (see Fig. S7) (Schwing et al., 2011), while its IR spectrum displayed bands at 3300 and 1632 cm<sup>-1</sup>, which are typical of amide groups (see Fig. S8) (Schwing et al., 2011). Analysis of the product by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS) identified a pseudo-molecular ion [M + H]<sup>+</sup> at *m/z* 755.4050, corresponding to the molecular formula C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> and a molecular weight of 754, accounting for 15 unsaturations (Sun et al., 2016).

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [linoj@unam.mx](mailto:linoj@unam.mx) (L. Reyes), [benijovi@yahoo.com.mx](mailto:benijovi@yahoo.com.mx) (B. Reyes-Trejo).

<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.12.008>

Received 6 September 2017; Received in revised form 6 December 2017; Accepted 12 December 2017

Available online 22 December 2017

1874-3900/ © 2017 Published by Elsevier Ltd on behalf of Phytochemical Society of Europe.

In contrast, the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the compound recorded in  $\text{DMSO}-d_6$  (**1**) indicated six amide proton signals between 8.83 and 7.31 ppm with  $J$  values ranging from 7 to 9 Hz, which signified the presence of a cyclopeptide (see Fig. S1 for details) (Lang et al., 2008). In addition, the identification of eight amide carbonyl carbons in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum between 172.4 and 168.3 ppm suggested that the peptide contained two proline residues and that the molecule (**1**) contained a total of eight amino acid residues (see Fig. S2). Following the  $^1\text{H}$  NMR spectral analysis, integrated signals between 7.13 and 7.16 ppm were assigned to the five phenylalanine aromatic protons, which was verified by comparison with four signals in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum between 126.4 and 130.1 ppm (Wélé et al., 2005a,2005). At low frequencies in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum at 0.76, 0.84, 0.87 and 0.94 ppm, three doublet signals and one triplet signal was present to signify methyl groups. These signals indicated the presence of valine and isoleucine inside the cyclopeptide, which was confirmed by four  $^{13}\text{C}$  NMR signals between 25 and 11 ppm. At 5.71 ppm in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, a signal with no correlation with any carbon in the HSQC spectrum was observed; thus, this signal was assigned to the hydroxyl group of serine (Morita et al., 1999). Further, at 64.5 ppm in the HSQC spectrum, a cross peak of two protons at 3.66 and 3.57 ppm was shown for a methylene group. The signals present at 42.2 and 43.3 ppm in the HSQC spectrum showing cross peaks with diastereotopic protons at 3.97, 3.14, 3.83 and 3.60 ppm were assigned to two glycine groups (see Fig. S3 for details) (Festa et al., 2011). Finally, the composition of the cyclopeptide was validated by the DEPT spectrum. This spectrum showed nine quaternary carbons, thirteen methines, eleven methylenes and four methyl groups and supported the molecular formula obtained by HRESIMS:  $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_9$ . In summary, this cyclopeptide contains one valine, serine, phenylalanine and isoleucine, two prolines and two glycines (Fig. 1). The connectivity in this cyclopeptide was established by MS/MS and 2D NMR analysis.

The HRESIM analysis of cyclopurpuracin (**1**) revealed an exact mass for the protonated ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$  at  $m/z$  of 755.4050. This ion was then filtered using a quadrupole mass filter and fragmented by CID in the transfer region. The fragmentation spectrum (MS/MS) is shown in Fig. 2 with ion annotations according to the nomenclature proposed by Niedermeyer and Strohm (2012). Although several ions resulted from the sequential fragmentation at different initial cleavage sites (see Table S1 for details), a main ion series allowed *de novo* sequencing ( $b$  ions 656, 559, 472, 415, 302, 155; and  $a$  ions 628, 531, 444, 387, 274, 127). Two possible sequences were obtained from the  $m/z$  differences, A:

cyclo(-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-) and B: cyclo(-Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-), where the order of the first two amino acids (PG/GP) could not be correctly distinguished because of the apparent absence of the  $y$  ions usually observed in cyclic peptides. Indeed, the  $y$  ions from cyclic peptides contain an oxazolone “C-terminus” and not a free carboxylic acid, making them indistinguishable from  $b$  ions (Niedermeyer and Strohm, 2012; Strohm et al., 2010). To discriminate between the cyclopeptide sequences indicated by MS/MS, we used NMR analyses, including HSQC, COSY, ROESY and HMBC.

All of the amino acid spin systems were identified using COSY and ROESY experiments (see Fig. S4 and S5 for details) (Wagner and Akumar, 1981; Wélé et al., 2002, 2005a, 2005b,2004) and the connectivities between the NH protons and carbonyls of each amino acid were assigned through an HMBC experiment. The amino acid sequence was determined from the connectivities between the carbonyl groups of the residues  $i$  with the amide and/or  $\alpha$  protons of residues  $i + 1$  (Fig. 1). Six correlations were observed on the HMBC spectrum (see Fig. S6 for details). It could be seen from the HMBC spectrum that the CO groups of Ser<sup>6</sup> and Val<sup>8</sup> were not correlated with any amide protons, suggesting that these residues were connected to the proline residues (Morita et al., 1999). The CO group of Gly<sup>2</sup> at 168.8 ppm was associated with the NH amide of Phe<sup>3</sup> at 7.65 ppm, the CO of Phe<sup>3</sup> at 171.9 ppm was associated with the NH amide of Ile<sup>4</sup> at 8.58 ppm and the CO of Ile<sup>4</sup> at 172.4 ppm showed a cross peak with the NH of Gly<sup>5</sup> at 8.83 ppm. Furthermore, the CO of Gly<sup>5</sup> at 168.3 ppm interacted with the NH of Ser<sup>6</sup> at 7.31 ppm, and the CO of Ser<sup>6</sup> at 169.2 ppm was not correlated with any amide proton, signifying that these two residues were connected to a Pro<sup>7</sup> residue. Similarly, the CO group of Pro<sup>7</sup> at 171.3 ppm was shown via HMBC to be connected to the NH amide (8.09 ppm) of Val<sup>8</sup>, but the CO group of Val<sup>8</sup> at 170.4 ppm lost the connectivity, indicating that this residue was associated with a Pro<sup>1</sup> residue. A significant cross peak was observed for the CO group of Pro<sup>1</sup> at 172.2 ppm and one of the methylene protons of Gly<sup>2</sup> at 3.14 ppm. This connectivity closed the cyclic structure of the peptides and helped to discriminate between the possible sequences A and B of the cyclopeptide (Fig. 2) proposed by MS/MS. Finally, the amino acid sequence of this new cyclooctapeptide, named cyclopurpuracin (**1**), was confirmed using a combination of mass spectrometry and 2D NMR experiments, resolving that sequence A—cyclo(-Pro<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Ile<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-)—was correct. The *trans* geometry of the proline residues was deduced from the chemical shifts of the  $\gamma$  carbons of Pro<sup>1</sup> at 29.5 ppm and Pro<sup>7</sup> at 24.8 ppm (Wélé et al., 2004). Considering that the vast majority of plant cyclopeptides are composed of L-amino acids, the L-configuration can be assumed for the amino acids present in the cyclopurpuracin reported here (Tan and Zhou, 2006; Tuenter, E. et al., 2017). An exhaustive literature review showed that the configurations of amino acid residues in non-peptide cyclopeptides are only known to adopt the L-form (Pomilio et al., 2006). This could be confirmed in the case of cyclopurpuracin by future experimental evidence.

### 3. Experimental section

#### 3.1. General experimental procedure

The melting point was determined on a Fisher-Johns apparatus and is uncorrected. The IR spectrum was recorded using a Perkin-Elmer FTIR/FIR Spectrum 400. The UV spectral analysis was performed on a Thermo Scientific NanoDrop Lite spectrophotometer. TLC was performed on a pre-coated TLC plate (Merck, silica 60 F- 254) by spraying with chlorine/*o*-tolidine reagent. RP-HPLC separation was carried out on a Pro-Star Varian instrument equipped with a Varian UV detector and a Phenomenex Jupiter C12 column (4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, 3  $\mu\text{m}$ , 9  $\text{Å}$ ). HRESIMS spectra were obtained using a Synapt G1 High-Definition Q-TOF mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) with positive electrospray ionization. The instrument was operated with the following settings: capillary 3000 V, cone voltage 40 V,

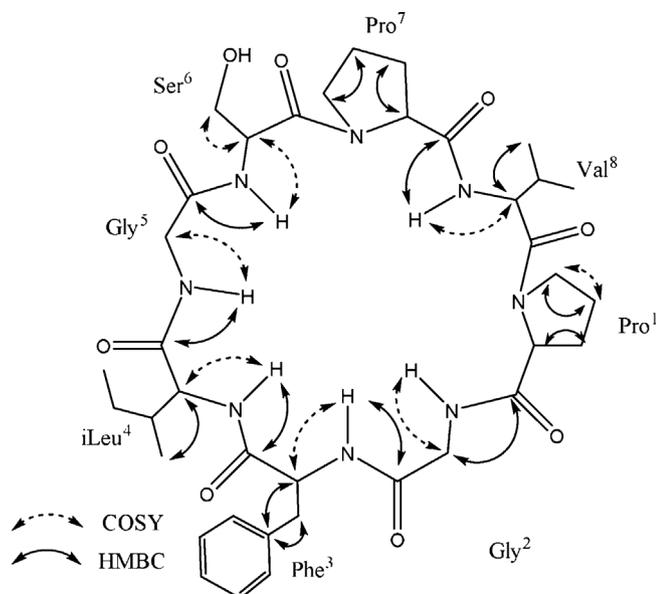


Fig. 1. COSY and HMBC correlation for Cyclopurpuracin (**1**).

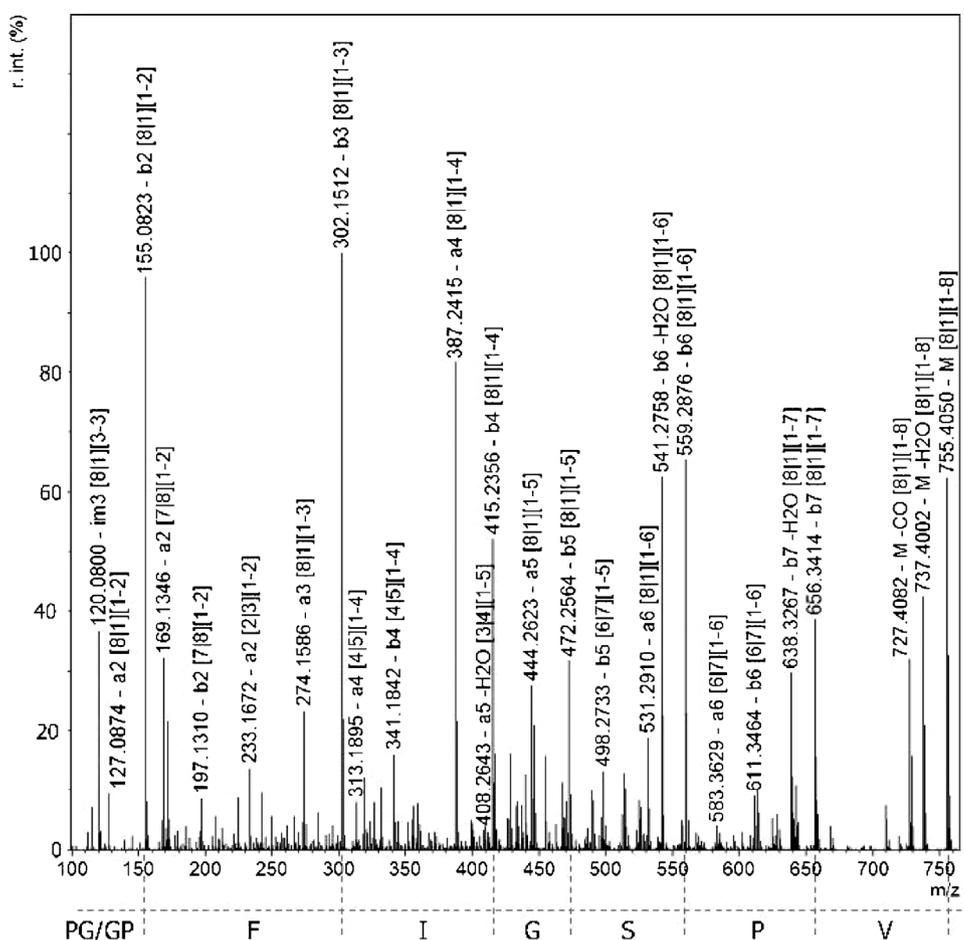


Fig. 2. MS/MS fragmentation spectrum of cyclo-purpuracin (1) [M + H]<sup>+</sup> precursor at m/z of 755.4050.

extractor 4, RF lens, source temperature 150 °C, desolvation temperature 350 °C, cone gas flow 20 L/hr, desolvation gas flow 700 L/h and mass range 100–1000 Da. The Q-TOF mass spectrometer was calibrated according to the manufacturer's directions using leucine-enkephaline (100 fmol/μL). MS data were acquired and processed using MassLynx (v 4.1) software. mMass software (v 5.5.0) (Strohalm et al., 2010) was used for processing MS/MS spectra and as a tool for sequence annotation (Niedermeyer and Strohalm, 2012). The <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker ASCEND-700 (Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA) spectrometer equipped with a Bruker 5 mm TCI CryoProbe at 300 K. All 2D NMR spectra were acquired in DMSO-*d*<sub>6</sub> (99.95%, Sigma-Aldrich), and standard pulse sequences and phase cycling were used for the DQF-COSY, HSQC and HMBC spectra. The NMR data were processed using TOPSPIN (3.5) software.

### 3.2. Plant material

Mature fruits of *Annona purpurea* were collected in the Las Salinas community of Chicomuselo, Chiapas, México in October 2016 and authenticated by Prof. Ernestina Cedillo Portugal from the Biology unit of the Agricultural Preparatory Department at the Autonomous University of Chapingo. A voucher specimen 1–2016 was deposited at the Herbarium “Efraim Hernandez X” at the Autonomous University of Chapingo, Mexico. The seeds were collected and washed with water, then the fresh seeds were protected from light for a month at room temperature. The kernels were then removed from the hulls of the *A. purpurea* seeds (1.5 kg) with a mechanical cracker and ground using a mechanical grinder.

### 3.3. Extraction and isolation

The seed kernels of *A. purpurea* were (1.5 kg) extracted 3 times at room temperature for 3 days with 3 L of solvents, increasing in polarity each time, with the following order: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, MeOH and 60% EtOH (0.1% acetic acid). The organic solvent was removed under reduced pressure, obtaining a final mass of 300 g, 86 g, 54 g, 46 g and 35 g, respectively. The presence of cyclopeptides in each extract was monitored by TLC on silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck) with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (5:4) as the eluent system and detected using Cl<sub>2</sub>/*o*-tolidine reagent and ninhydrin. The hydroalcoholic extract obtained showed a positive reaction with the Cl<sub>2</sub>/*o*-tolidine reagent. Thus, 20 g of this extract was dissolved in MeOH. The soluble fraction was purified by silica gel column chromatography (Kieselgel 60H Merck) and eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mixed with increasing amounts of MeOH, from 2 to 40%. Then, 240 fractions of 25 mL volume were collected and grouped within similar RFs. The fractions from 81 to 96 indicated positive reactions for cyclopeptides, and the fractions (100 mg) were subsequently purified by prep. TLC using silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (20 cm x 20 cm) from Merck was performed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (5:4) as the eluent system to yield 6 mg of a white solid, which was purified on RP-HPLC. 500 microliters of the sample at a concentration of 0.5 mg/mL was injected repetitively into the HPLC system. Separation was accomplished using a Varian® ProStar chromatograph equipped with a semipreparative C12 reverse-phase column (Phenomenex column; 4.6 mm i.d. x 250 mm, 9 Å), eluting with a linear gradient of H<sub>2</sub>O (0.05% TFA v/v) (A) – ACN (0.05% TFA v/v) (B) ranging from 15 to 40% B over 20 min at a flow rate of 1 mL/min at 25°C, and compound detection was performed with UV at 215 nm. The process yielded 2.6 mg of the cyclopeptide cyclo-purpuracin (1).

### 3.4. Cyclopurpuracin (1)

Colorless solid; m.p. 258–260 °C; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$ : 228 and 275 nm, IR (neat)  $\nu_{\text{max}}$ : 3300, 3062, 2965, 1632 and 1532  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 4.15 (1H, d, 8.0, Pro<sup>1</sup>-H $\alpha$ ), 1.79 (2H, m, Pro<sup>1</sup>-H $\beta$ ), 2.08 (2H, m, Pro<sup>1</sup>-H $\gamma$ ), 4.10(2H, m, Pro<sup>1</sup>-H $\delta$ ), 3.97 (1H, dd, 17.1, 8.8, Gly<sup>2</sup>-H $\alpha$ ), 3.14 (1H, dd, 17.0, 3.4 Gly<sup>2</sup>-H $\alpha'$ ), 8.78(1H, dd, 6.5, 5.4 Gly<sup>2</sup>-NH), 4.81 (1H, ddd, 11.3, 10.0, 3.1 Phe<sup>3</sup>-H $\alpha$ ), 2.97 (1H, dd, 13.6, 11.2 Phe<sup>3</sup>-H $\beta$ ), 2.68 (1H, dd, 13.6, 3.0 Phe<sup>3</sup>-H $\beta'$ ), 7.15 (2H, m, Phe<sup>3</sup>-2'6'), 7.16 (2H, m, Phe<sup>3</sup>-3'5'), 7.13 (1H, m, Phe<sup>3</sup>-4'), 7.65 (1H, d, 9.93 Phe<sup>3</sup>-NH), 3.71 (1H, m, Ile<sup>4</sup>-H $\alpha$ ), 1.66 (1H, ddt, 12.2, 6.5, 3.1 Ile<sup>4</sup>-H $\beta$ ), 1.12 (1H, m, Ile<sup>4</sup>-H $\gamma$ ), 1.56 (1H, m, Ile<sup>4</sup>-H $\delta$ ), 0.84 (3H, d, 6.8, Ile<sup>4</sup>-H $\beta'$ -CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, t, 7.4, Ile<sup>4</sup>-H $\delta$ ), 8.58 (1H, d, 5.3, Ile<sup>4</sup>-NH), 3.80 (1H, br, d, 6.1, Gly<sup>5</sup>-H $\alpha$ ), 3.45 (1H, dd, 16.8, 5.6 Gly<sup>5</sup>-H $\alpha'$ ), 8.83(1H, t, 6.0, Gly<sup>5</sup>-NH), 4.89 (1H, dt, 9.3, 6.2, Ser<sup>6</sup>-H $\alpha$ ), 3.66 (1H, ddd, 11.2, 7.7, 5.3, Ser<sup>6</sup>-H $\beta$ ), 3.57 (1H, d, 9.0 Ser<sup>6</sup>-H $\beta'$ ), 5.71 (1H, t, 6.81, Ser<sup>6</sup>-OH), 7.31 (1H, d, 9.4, Ser<sup>6</sup>-NH), 4.45 (1H, dd, 8.8, 3.0, Pro<sup>7</sup>-H $\alpha$ ), 1.94 (2H, m, Pro<sup>7</sup>-H $\beta$ ), 1.90 (H, m, Pro<sup>7</sup>-H $\gamma$ ), 1.74 (H, m, Pro<sup>7</sup>-H $\gamma'$ ), 3.83 (H, d, 6.4, m, Pro<sup>7</sup>-H $\delta$ ), 3.60 (H, m, Pro<sup>7</sup>-H $\delta'$ ), 4.12 (1H, m, Val<sup>8</sup>-H $\alpha$ ), 1.97 (1H, m, Val<sup>8</sup>-H $\beta$ ), 0.94 (3H, d, 6.7, Val<sup>8</sup>-H $\gamma$ ), 0.76 (3H, d, 6.5, Val<sup>8</sup>-H $\gamma'$ ), 8.09 (1H, d, 8.3, Val<sup>8</sup>-NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 172.2 (Pro<sup>1</sup>-CO), 60.9 (Pro<sup>1</sup>-C $\alpha$ ), 29.7 (Pro<sup>1</sup>-C $\beta$ ), 29.5 (Pro<sup>1</sup>-C $\gamma$ ), 48.1 (Pro<sup>1</sup>-C $\delta$ ), 168.8 (Gly<sup>2</sup>-CO), 42.2 (Gly<sup>2</sup>-C $\alpha$ ), 171.9 (Phe<sup>3</sup>-CO), 53.3 (Phe<sup>3</sup>-C $\alpha$ ), 37.7 (Phe<sup>3</sup>-C $\beta$ ), 138.6 (Phe<sup>3</sup>-C1'), 130.1 (Phe<sup>3</sup>-C2'6'), 128.0 (Phe<sup>3</sup>-C3'5'), 126.4 (Phe<sup>3</sup>-C4'), 172.4 (Ile<sup>4</sup>-CO), 59.4 (Ile<sup>4</sup>-C $\alpha$ ), 35.5 (Ile<sup>4</sup>-C $\beta$ ), 25.9 (Ile<sup>4</sup>-C $\gamma$ ), 15.5 (Ile<sup>4</sup>-H $\beta'$ -CH<sub>3</sub>), 11.3 (Ile<sup>4</sup>-H $\delta$ ), 168.3 (Gly<sup>5</sup>-CO), 43.3 (Gly<sup>5</sup>-C $\alpha$ ), 169.2 (Ser<sup>6</sup>-CO), 51.9 (Ser<sup>6</sup>-C $\alpha$ ), 64.5 (Ser<sup>6</sup>-C $\beta$ ), 171.3 (Pro<sup>7</sup>-CO), 60.1 (Pro<sup>7</sup>-C $\alpha$ ), 29.1 (Pro<sup>7</sup>-C $\beta$ ), 24.8 (Pro<sup>7</sup>-C $\gamma$ ), 47.3 (Pro<sup>7</sup>-C $\delta$ ), 170.4 (Val<sup>8</sup>-CO), 56.9 (Val<sup>8</sup>-C $\alpha$ ), 30.2(Val<sup>8</sup>-C $\beta$ ), 19.0 (Val<sup>8</sup>-C $\gamma$ ), 19.8 (Val<sup>8</sup>-CH $\gamma'$ ); ESI-QTOF  $m/z$ : 755 [M + H]<sup>+</sup>; ESI-QTOF MS/MS on  $m/z$  755 [M + H]<sup>+</sup> (ce 30 eV)  $m/z$  (%): 656 (38), 628 (6), 559 (65), 53 (18), 472 (31), 444 (27), 415 (52), 387(81), 302 (100), 274 (23), 155 (95), 127 (9).

### Acknowledgements

This work was supported by CONACyT, with the Mexican government providing a scholarship number 290840 to MRGT and 289035 to MMF. This work was partially supported by a grant from the DGAPA-UNAM (PAPIIT IN207713) to FRP. We thank M. in C. Jose Alfredo Rios Montejo (SENASICA, Cintalapa, Chiapas) for providing the plant material and we acknowledge the LURM at IQ-UNAM, which is funded by CONACyT (Proyect 0224747) and UNAM.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.12.008>.

### References

Ceplead, F., Ohtani, K., Hamburgera, M., Guptab, M.P., Sohb, P., Hostettmanna, K., 1993.

- Novel acetogenins from the leaves of *Annona purpurea*. *Helv. Chim. Acta* 76, 1379.
- Chang, F.R., Wei, J.L., Teng, C.M., Wu, Y.C., 1998. Two new 7-dehydroporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry* 49, 2015–2018.
- Chang, F.R., Chen, C.Y., Wu, P.H., Kuo, R.Y., Chang, Y.C., Wu, Y.C., 2000. New alkaloids from *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 63, 746–748.
- Chavez, D., Mata, R., 1998. Purpurediolin and Purpurenin, two new cytotoxic adjacent Bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 61, 580–584.
- Chavez, D., Mata, R., 1999. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. *Phytochemistry* 50, 823–828.
- Chuang, P.-H., Hsieh, P.-W., Yang, Y.-L., Hua, K.-F., Chang, F.-R., Shiea, J., Wu, S.-H., Wu, Y.-C., 2008. Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*. *J. Nat. Prod.* 71, 1365–1370.
- Festa, C., De Marino, S., Sepe, V., D'Auria, M.V., Bifulco, G., Débitus, C., Bucci, M., Vellecco, V., Zampella, A., 2011. Solomonamides A and B: new anti-inflammatory peptides from *Theonella swinhoei*. *Org. Lett.* 13, 1532–1535.
- I-Lan, Z.H., Qing, t. M., Xiao-Jiang, H., Yi-Neng, H.E., 1998. Cyclopeptide from the seeds of *annona muricata*. *Phytochemistry* 48, 555–556.
- Lang, G., Kalvelage, T., Peters, A., Wiese, J., Imhoff, J.F., 2008. Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *J. Nat. Prod.* 71, 1074–1077.
- Li, C.-M., Tan, N.-H., Zheng, H.-L., Mu, Q., Hao, X.-J., He, Y.-N., Zhou, J., 1999. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. *Phytochemistry* 50, 1047–1052.
- Morita, H., Sato, Y., Kobayashi, J., 1999. Cyclosquamosins A–G, cyclic peptides from the seeds of *Annona squamosa*. *Tetrahedron* 55, 7509–7518.
- Niedermeyer, T.H.J., Strohal, M., 2012. mMass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra. *PLoS One* 7, e44913.
- Pomilio, A.B., Battista, M.E., Vitale, A.A., 2006. Naturally-occurring cyclopeptides: structures and bioactivity. *Curr. Org. Chem.* 10, 2075–2121.
- Reindel, F., Hoppe, W., 1954. Über eine Färbemethode zum anfärben von aminosäuren, peptiden und proteinen auf papier chromatogrammen und papier elektropherogrammen. *Chem. Ber.* 87, 1103–1107.
- Rejón-Orantes, J., González-Esquinca, A., de la Mora, M., Roldan, G., Cortes, D., 2011. Annonontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic like effects in the elevated plus-maze. *Planta Med.* 77, 322–327.
- Schwing, K., Reyheller, C., Schaly, A., Kubik, S., Gerhards, M., 2011. Structural analysis of an isolated cyclic tetrapeptide and its monohydrate by combined IR/UV spectroscopy. *Chemphyschem* 12, 1981–1988.
- Strohal, M., Kavan, D., Novák, P., Havlíček, V., 2010. mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Anal. Chem.* 82, 4648–4651.
- Sun, J., Cheng, W., de Voogd, N.J., Proksch, P., Lin, W., 2016. Styliissatins B–D, cycloheptapeptides from the marine sponge *Styliissa massa*. *Tetrahedron Lett.* 57, 4288–4292.
- Tan, N.-H., Zhou, J., 2006. Plant cyclopeptides. *Chem. Rev.* 106, 840–895.
- Tuenter, E., Foubert, K., Staerk, D., Apers, S., Pieters, L., 2017. Isolation and structure elucidation of cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus nummularia* and *Ziziphus spinachristii* by HPLC-DAD-MS and HPLC-PDA-(HRMS)-SPE-NMR. *Phytochemistry* 138, 163–169.
- Wélé, A., Zhang, Y., Caux, C., Brouard, J.-P., Dubost, L., Guette, C., Pousset, J.-L., Badiane, M., Bodo, B., 2002. Isolation and structure of cycloenegalins A and B, novel cyclopeptides from the seeds of *Annona senegalensis*. *J. Chem. Soc. Perkin 1*, 2712–2718.
- Wélé, A., Zhang, Y., Ndoye, I., Brouard, J.-P., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2004. A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *J. Nat. Prod.* 67, 1577–1579.
- Wélé, A., Ndoye, I., Zhang, Y., Brouard, J.-P., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2005a. Glauca-cyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. *Phytochemistry* 66, 1154–1157.
- Wélé, A., Zhang, Y., Brouard, J.-P., Pousset, J.-L., Bodo, B., 2005b. Two cyclopeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 66, 2376–2380.
- Wélé, A., Mayer, C., Dermigny, Q., Zhang, Y., Blond, A., Bodo, B., 2008. Sequence and three-dimensional structure of cycloreticulins A and B, new cyclooctapeptides from the seeds of *Annona reticulata*. *Tetrahedron* 64, 154–162.