



## Antioxidant capacity, antitopoisomerase activity and secondary metabolites in ex-tracts os Cherimoya pulp (*Annona cherimola* Mill)

## Capacidad antioxidante, actividad antitopoisomerasa e identificación de metabolitos secundarios en extractos de pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill)

Razura-Carmona, F. F.<sup>1</sup>, Montalvo-González, E.<sup>1</sup>, Ramírez-Mares, M. V.<sup>2</sup>, Bueno-Durán, A. Y.<sup>3</sup>, Sáyago-Ayerdi, S. G.<sup>1</sup>, Zamora-Gasga, V. M., Sánchez-Burgos, J. A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico #2595. Lagos del Country. 63175. Tepic, Nayarit, México. <sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Morelia, Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica, Ave. Tecnológico 1500, Col. Lomas de Santiaguillo, 58120 Morelia. <sup>3</sup>Unidad Académica de Ciencias Químicas Biológicas y Farmacéutica, Universidad Autónoma de Nayarit, Ciudad de la Cultura Amado Nervo s/n, C.P. 63190, Tepic, Nayarit, México.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Razura-Carmona, F. F., Montalvo-González, E., Ramírez-Mares, M. V., Bueno-Durán, A. Y., Sáyago-Ayerdi, S. G., Zamora-Gasga, V. M., Sánchez-Burgos, J. A. (2021). Antioxidant capacity, antitopoisomerase activity and secondary metabolites in extracts os Cherimoya pulp (*Annona cherimola* Mill). *Revista Bio Ciencias* 8, e1165. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.08.e1165>



### ABSTRACT

Annonaceae, like *Annona cherimola* Mill., are recognized by alternative medicine for their therapeutic properties, but little is known about the compounds that can provide such activity. Because the edible portion of this fruit is the pulp, in this work the antioxidant capacity was evaluated through an organic aqueous extraction and the antitopoisomerase activity in ethanol (ME) and ethyl acetate (MA) extracts of cherimoya pulp lyophilized, finally the active extract was characterized by gas chromatography coupled to masses (GC/MS). The cherimoya pulp showed a concentration of total soluble phenols (TSP) of 145.5713 mg GAE/g, in the ABTS<sup>•+</sup> assay (128.6991 µg TE/g) and the FRAP assay (43.7257 mM TE/g). We proved that MA extract inhibits the clonal expansion of a mutant of *Saccharomyces*

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: May 22<sup>th</sup> 2021.

Accepted/Aceptado: September 07<sup>th</sup> 2021.

Available on line/Publicado: September 16<sup>th</sup> 2021.

### RESUMEN

Las Annonaceae, como *Annona cherimola* Mill., son reconocidas por la medicina alternativa por sus propiedades terapéuticas, pero se sabe poco acerca de los compuestos que pueden proporcionar tal actividad. Debido a que la porción comestible de esta fruta es la pulpa, en este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante mediante una extracción acuosa orgánica y la actividad antitopoisomerasa en extractos de etanol (ME) y acetato de etilo (MA) de pulpa de chirimoya liofilizada, finalmente el extracto activo se caracterizó por cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS). La pulpa de chirimoya mostró una concentración de fenoles solubles totales (TSP) de 145.5713 mg GAE/g, en el ensayo ABTS<sup>•+</sup> (128.6991 µg TE/g) y el ensayo FRAP (43.7257 mM TE/g). Demostramos que el extracto de MA inhibe la expansión clonal de un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* por inhibición de la topoisomerasa I (22 %). La caracterización del extracto de MA por GC/MS reveló la presencia de dos diterpenos de la familia de los Kaurenos (kauran-15-ol y kauran-16-ol) y ácido gúmférico, que han demostrado actividad

#### \*Corresponding Author:

Jorge Alberto Sánchez-Burgos. Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico No. 2595. Lagos del Country. 63175. Tepic, Nayarit, México. E-mail.: [jsanchezb@ittec.edu.mx](mailto:jsanchezb@ittec.edu.mx)

*cerevisiae* by inhibition of topoisomerase I (22 %). The characterization of the MA extract by GC/MS revealed the presence of two diterpenes of the family of Kaurenes (kauran-15-ol and kauran-16-ol) and gummiferolic acid, which have demonstrated antiproliferative activity through the inhibition of topoisomerases in other studies. In this way, it was possible to elucidate a probable mechanism through which the pulp of this fruit has a healthy effect due to its antioxidant capacity and the presence of secondary metabolites with the capacity of inhibit the topoisomerase I activity.

---

### KEY WORDS

---

Cherimoya pulp, antioxidant capacity, antitopoisomerase activity, secondary metabolites

---

### Introduction

Fruits are considered an excellent source of nutrients that correlate with a healthy state. Therefore, the study of exotic and tropical fruits and their possible beneficial effects for the health of the human being is an area of wide interest (Pierson *et al.*, 2012). *Annona* contains a significant amount of phenolic compounds (Gupta-Elera *et al.*, 2011), these compounds are antioxidants and can help to prevent diseases related to oxidative stress, cancer, atherosclerosis and neurodegenerative diseases (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Likewise, traditional medicine indicates that the fruit of custard apple (*Annona cherimola* M.) has medicinal properties that are attributed to compounds present in the pulp and that have been little studied (Gonçalves-Albuquerque *et al.*, 2016; Grossberger, 1999). This fruit naturally grows from Central to South America, its pulp is used for fresh consumption or production of juices, milkshakes or ice cream; its commercial distribution has been increasing due to its organoleptic properties (Vega-González, 2013). Nutritionally it is a fruit with high content of water, carbohydrates, proteins, low lipid content, and other compounds (Barreca *et al.*, 2011) and other compounds with potential beneficial health effects have been identified, such as cherimoline, cherimonaine, kaurans, lignans, amides, acetogenins, lactamamide, purines, steroids, alkaloids, p-quinone, benzenoids and polyamine (Vega-González, 2013). Several assays are used to assess whether a compound can exert an effect on the modulation of biochemical events related to carcinogenesis, one of

antiproliferativa mediante la inhibición de topoisomerasas en otros estudios. De esta forma, se dilucida un probable mecanismo a través del cual la pulpa de esta fruta tiene un efecto saludable debido a su capacidad antioxidante y la presencia de metabolitos secundarios con capacidad de inhibir la actividad de la topoisomerasa I.

---

### PALABRAS CLAVE

---

Pulpa de chirimoya, capacidad antioxidante, actividad antitopoisomerasa, metabolitos secundarios.

---

### Introducción

Las frutas se consideran una excelente fuente de nutrientes que se correlacionan con un estado saludable. Por tanto, el estudio de frutas exóticas y tropicales y sus posibles efectos beneficiosos para la salud del ser humano es un área de amplio interés (Pierson *et al.*, 2012). *Annona* contiene una cantidad significativa de compuestos fenólicos (Gupta-Elera *et al.*, 2011), Estos compuestos son antioxidantes y pueden ayudar a prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, el cáncer, la aterosclerosis y las enfermedades neurodegenerativas (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Asimismo, la medicina tradicional indica que el fruto de la chirimoya (*Annona cherimola* M.) tiene propiedades medicinales que se atribuyen a compuestos presentes en la pulpa y que han sido poco estudiadas (Gonçalves-Albuquerque *et al.*, 2016; Grossberger, 1999). Esta fruta crece naturalmente de Centro a Sur América, su pulpa se utiliza para consumo fresco o producción de jugos, batidos o helados; su distribución comercial ha ido en aumento debido a sus propiedades organolépticas (Vega-González, 2013). Nutricionalmente es una fruta con alto contenido en agua, carbohidratos, proteínas, bajo contenido en lípidos y otros compuestos (Barreca *et al.*, 2011) y se han identificado otros compuestos con posibles efectos beneficiosos para la salud, como la cherimolina, la cherimonaina, los kauranos, los lignanos, las amidas, las acetogeninas, la lactamamida, las purinas, los esteroides, los alcaloides, la p-quinona, los benzenoides y las poliaminas (Vega-González, 2013). Se utilizan varios ensayos para evaluar si un compuesto puede ejercer un efecto sobre la modulación de eventos bioquímicos relacionados con la carcinogénesis, uno de los cuales es la inhibición de las topoisomerasas (Bertozzi *et al.*, 2014; Ramírez-Mares *et al.*, 2010; Jang *et al.*,

which is inhibition of topoisomerases (Bertozzi *et al.*, 2014; Ramírez-Mares *et al.*, 2010). Topoisomerases are enzymes that catalyze the relaxation of DNA supercoiling during the cell replication process, so they are considered a target for the development of cancer treatments (Jang *et al.*, 2019). Assays based on *Saccharomyces cerevisiae* models with a modification in the gene that codes for DNA repair (Mata *ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ISE2 rad52 :: LEU2*), allows evaluating extracts and compounds with potential antitopoisomerase activity (Nitiss, J. & Wang, 1988). This work aimed to evaluate the antioxidant capacity and the antitopoisomerase activity of chirimoya pulp, besides identify secondary metabolites that may be associated with these biological activities.

## Material and Methods

### Vegetal Material

Fresh 'Concha lisa' chirimoya cultivated in the community of Tumbiscatio, Michoacan, Mexico (latitude: 18.535890, longitude: -102.365482) harvested in October in the horticultural maturity stage ( $18.20 \pm 1.10$  °Bx) was used. The fruit was washed, disinfected, pulped, and mixed manually; the pulp was lyophilized, homogenized, screened (500  $\mu\text{m}$ ), packed and stored in airtight bags for further analysis.

### Reagents

Medium YPD (yeast extract, peptone and dextrose) and YPDA (yeast extract, peptone, dextrose and agar) (Difco, Sparks, MD). Methanol, sulfuric acid, acetone, acetic acid (reagent grade, Merck >99.4 %), ethyl acetate (reagent grade and HPLC, Merck), camptothecin (CPT), amsacrine (AMS), dimethylsulphoxide (DMSO-Hybr-Max), gallic acid, sodium carbonate, Folin-Ciocalteu reagent, sodium phosphate (monobasic and dibasic), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid (ATBS<sup>+</sup>), potassium persulfate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), sodium acetate, ferric chloride, 2,4,6-tris (2-pyridyl) -S-triazine (TPTZ) and adenine hemisulfate (Sigma Chemical, St. Louis, MO).

### Biological Material

Genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains donated by Dr. John Nitiss of St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, were used. The

2019). Ensayos basados en modelos de *Saccharomyces cerevisiae* con una modificación en el gen que codifica la reparación del ADN (Mata *ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ISE2 rad52 :: LEU2*), permite evaluar extractos y compuestos con potencial actividad antitopoisomerasa (Nitiss, J. L. & Nitiss, K. C. 2001; Nitiss, J. & Wang, 1988). Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad antioxidante y la actividad antitopoisomerasa de la pulpa de chirimoya, además de identificar metabolitos secundarios que puedan estar asociados con estas actividades biológicas.

## Material y Métodos

### Material Vegetal

Se utilizó chirimoya fresca 'Concha lisa' cultivada en la comunidad de Tumbiscatio, Michoacán, México (latitud: 18.535890, longitud: -102.365482) cosechada en octubre en la etapa de madurez hortícola ( $18.20 \pm 1.10$  °Bx). La fruta fue lavada, desinfectada, despulpada y mezclada manualmente; la pulpa se liofilizó, homogeneizó, tamizó (500  $\mu\text{m}$ ), empaquetó y almacenó en bolsas herméticas para su posterior análisis.

### Reactivos

Medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa), YPDA (extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar) (Difco, Sparks, MD). Metanol, ácido sulfúrico, acetona, ácido acético (grado reactivo), acetato de etilo (grado reactivo y HPLC, Merck), camptotecina (CPT), amsacrina (AMS), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido gálico, carbonato de sodio, reactivo de Folin-Ciocalteu, fosfato de sodio (monobásico y dibásico), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ATBS<sup>+</sup>), persulfato de potasio, 6-hidroxi-2, Ácido 5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), acetato de sodio, cloruro férrico, 2,4,6-tris (2-piridil) -S-triazina (TPTZ) y hemisulfato de adenina (Sigma Chemical, St. Louis, MO).

### Material Biológico

Se utilizaron cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificadas donadas por el Dr. John Nitiss del St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee. La cepa JN362 posee exacerbado los mecanismos de reparación del ADN (Genotipo: Mata *ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ISE2*); JN394 tiene deficiencia en la reparación del ADN y la permeabilidad a los fármacos (Genotipo: Mata *ura3-52 leu2 trp1 his7*

JN362a strain has exacerbated DNA repair mechanisms (Genotype: Mat $\alpha$  ura3–52 leu2 trp1 his7 ade1–2 ISE2); JN394 has deficiency in DNA repair and drug permeability (Genotype: Mat $\alpha$  ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ISE2 rad52 :: LEU2), these mutations increase the sensitivity of these cells to drugs and JN394<sub>t-1</sub> that is isogenic to JN394 strain with disruption in the top1 gene, the absence of this gene decreases the toxicity to topoisomerase I drugs (Genotype: Mat  $\alpha$  ura3–52 leu2 trp1 his7 ade1–2 ISE2 rad52:TRP1  $\Delta$  top1 :: LEU2) (Nitiss, J. L. & Nitiss, K. C., 2001; Nitiss, J. & Wang, 1988).

#### Phenolics extraction

20 mL of acidified methanol (methanol: water: HCl 2N; 49.6:49.6:0.8 v/v) was added to 500 mg of lyophilized pulp, this mixture was stirred at room temperature for 1 h. Subsequently, it was subjected to centrifugation (3000 rpm/10 min at 4 °C) and the supernatant was collected in a 25 mL flask. The residue of the first extraction was extracted with 20 mL of a mixture of acetone: water (70:30, v/v) this mixture was stirred at room temperature for 1 h and it was subjected to centrifugation (3000 rpm/10 min at 4 °C), the supernatant was collected in the flask mentioned above. The supernatants obtained from the two extractions were combined and brought to 50 mL with the addition of the acetone-water (50:50, v/v) (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). This mixture was used for the determination of total soluble phenols (TSP) and antioxidant capacity (AOCA) using ABTS and FRAP tests.

#### Total soluble phenols determination

The content of TSP in the extracts was determined according to the assay with the Folin-Ciocalteu reagent (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011). In brief, 250  $\mu$ L of methanol/acetone extract was taken in triplicate and mixed with 1000  $\mu$ L of a sodium carbonate solution (75 g/L) and 1250  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent (100 mL/L). The obtained solution was incubated at 50 °C/15 min in darkness. After the incubation time, the tubes were allowed to cool to room temperature and 270 mL of this mixture per well were placed in a 96-well microplate. The absorbance of the reaction product was measured at 750 nm using a multiple detection microplate reader (Biotek, Synergy HT, Winooski VT, USA), Gen5 software. The results were expressed in gallic acid equivalents per gram dry extract weight (mg GAE/g dry extract wt), using as reference a standard curve ( $y = 5.1394x + 0.073$ ,  $R^2 = 0.9971$ ) of gallic acid (0–0.2 mg/mL).

ade1-2 ISE2 rad52 :: LEU2), estas mutaciones aumentan la sensibilidad de estas células a los fármacos y JN394<sub>t-1</sub> es isogénico a la cepa JN394 con alteración en el gen top1, la ausencia de este gen disminuye la toxicidad de los fármacos de topoisomerasa I (Genotipo: Mat  $\alpha$  ura3–52 leu2 trp1 his7 ade1–2 ISE2 rad52:TRP1  $\Delta$  top1 :: LEU2) (Nitiss, J. L. & Nitiss, K. C., 2001; Nitiss, J. & Wang, 1988).

#### Extracción Fenólica

Se añadieron 20 ml de metanol acidificado (metanol: agua: HCl 2N; 49,6: 49,6: 0,8 v / v) a 500 mg de pulpa liofilizada, esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se sometió a centrifugación (3000 rpm/10 min a 4 °C) y se recogió el sobrenadante en un matraz de 25 mL. El residuo de la primera extracción se extrajo con 20 mL de una mezcla de acetona: agua (70:30, v/v) esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se sometió a centrifugación (3000 rpm/10 min a 4 °C), se recogió el sobrenadante en el matraz mencionado anteriormente. Los sobrenadantes obtenidos de las dos extracciones se combinaron y se llevaron a 50 mL con la adición de acetona-agua (50:50, v/v) (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Esta mezcla se utilizó para la determinación de fenoles solubles totales (TSP) y capacidad antioxidante (AOCA) mediante pruebas ABTS y FRAP.

#### Determinación Fenoles Solubles Totales

El contenido de TSP en los extractos se determinó según el ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011). Se tomaron por triplicado 250  $\mu$ L de extracto de metanol / acetona y se mezclaron con 1000  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio (75 g/L) y 1250  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (100 mL/L). La solución obtenida se incubó a 50 °C / 15 min en oscuridad. Después del tiempo de incubación, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron 270 mL de esta mezcla por pocillo en una microplaca de 96 pocillos. La absorbancia del producto de reacción se midió a 750 nm usando un lector de microplacas de detección múltiple (Biotek, Synergy HT, Winooski VT, EE. UU.), software Gen5. Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico por gramo de peso de extracto seco (mg GAE / g de extracto seco), utilizando como referencia una curva estándar ( $y = 5.1394x + 0.073$ ,  $R^2 = 0.9971$ ) de ácido gálico (0-0.2 mg/mL).

#### Determinación de la capacidad antioxidante Capacidad de captación de radicales: ABTS\*

El ensayo ABTS evalúa la capacidad de los compuestos hidrófilos y lipófilos presentes en los extractos

### Antioxidant capacity determination

#### Radical scavenging capacity: ABTS•<sup>+</sup>

The ABTS test assesses the ability of hydrophilic and lipophilic compounds present in the extracts to neutralize the ABTS•<sup>+</sup> radical (2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Re *et al.*, 1999). ABTS•<sup>+</sup> cation radicals are produced by the reaction between 7 mM of the ABTS reagent and 2.45 mM of potassium persulfate dissolved in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The solution was stored in total darkness at room temperature for 12 h before use. Subsequently, the solution was diluted in the phosphate buffer, until an absorbance of  $0.7 \pm 0.01$  was obtained at a wavelength of 734 nm. The anti-radical activity was evaluated by measuring the decrease in absorbance of the mixture of 20  $\mu$ L of the extract with 255  $\mu$ L of the ABTS reagent at a temperature of 30 °C for a time of 7 min, at a length of 734 nm using a microplate reader (Biotek, Synergy HT, Winooski VT, USA), software Gen5A. The result was derived from the standard curve ( $y = 0.1566x - 0.1709$ ,  $R^2 = 0.9999$ ) of Trolox (37.5-600  $\mu$ M) and expressed as Trolox equivalents per gram of dry extract weight ( $\mu$ M ET/g dry extract wt).

#### Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP reaction is based on the reduction of the ferric tripyridyltriazine complex ( $Fe^{3+} - TPTZ$ ) to the ferrous complex ( $Fe^{2+} - TPTZ$ ) by an antioxidant in an acid medium. This reaction produces a bluish color change that is monitored by measuring the absorbance at 595 nm for 30 min (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011). From a mixture of acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine solution (TPTZ) (10 mM TPTZ in 40 mM HCl), and a  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  solution (20 mM), previously incubated at 37 °C. 24  $\mu$ L of the extract were taken and allowed to react for 30 min with 180  $\mu$ L of the incubated mixture. After the reaction time, absorbance measurements were made at 595 nm using a multiple detection microplate reader (Biotek, Synergy HT, Winooski VT, USA), software Gen5. The increase observed in absorbance is due to the reduction of  $Fe^{3+}$  by antioxidants and the subsequent formation of a colorful TPTA- $Fe^{2+}$  complex. The results were expressed as Trolox equivalents per gram of dry extract weight (mM ET/g dry extract wt) using as reference a standard curve ( $y = 2.9685x + 0.3039$ ,  $R^2 = 0.9995$ ) of Trolox (0.00813 - 0.13 mM).

#### Antitopoisomerase Activity (ATAC)

##### Extracts

To evaluate the antitopoisomerase activity, two different extracts were prepared from the lyophilized pulp:

para neutralizar el radical ABTS•<sup>+</sup> (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (Re *et al.*, 1999). Los radicales catiónicos ABTS•<sup>+</sup> se producen por reacción entre 7 mM del reactivo ABTS y 2.45 mM de persulfato potásico disuelto en tampón fosfato (0.1 M, pH 7.4). La solución se almacenó en oscuridad total a temperatura ambiente durante 12 h antes de su uso. Posteriormente, la solución se diluyó en el tampón fosfato, hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.01$  a una longitud de onda de 734 nm. La actividad antirradicalar se evaluó midiendo la disminución de absorbancia de la mezcla de 20  $\mu$ L del extracto con 255  $\mu$ L del reactivo ABTS a una temperatura de 30 °C durante un tiempo de 7 min, a una longitud de 734 nm utilizando un lector de microplacas (Biotek, Synergy HT, Winooski VT, EE. UU.), software Gen5A. El resultado se derivó de la curva estándar ( $y = 0.1566x - 0.1709$ ,  $R^2 = 0.9999$ ) de Trolox (37.5-600  $\mu$ M) y se expresó como equivalentes de Trolox por gramo de peso de extracto seco ( $\mu$ M ET/g peso de extracto seco).

#### Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

La reacción FRAP se basa en la reducción del complejo de tripiridiltriazina férrica ( $Fe^{3+} - TPTZ$ ) al complejo ferroso ( $Fe^{2+} - TPTZ$ ) por un medio antioxidante y ácido. Esta reacción produce un cambio de color azulado que se controla midiendo la absorbancia a 595 nm durante 30 min. (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011). A partir de una mezcla de tampón de acetato (0.3 M, pH 3.6), solución de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (TPTZ 10 mM en HCl 40mM) y una solución de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (20 mM), incubado previamente a 37 °C. Se tomaron 24  $\mu$ L del extracto y se dejaron reaccionar durante 30 min con 180  $\mu$ L de la mezcla incubada. Después del tiempo de reacción, se realizaron mediciones de absorbancia a 595 nm utilizando un lector de microplacas de detección múltiple (Biotek, Synergy HT, Winooski VT, EE. UU.), Software Gen5. El aumento observado en la absorbancia se debe a la reducción de  $Fe^{3+}$  por parte de los antioxidantes y la posterior formación de un colorido complejo TPTA- $Fe^{2+}$ . Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox (ET)/g de peso de extracto seco (mM ET/g de extracto seco de peso) usando como referencia una curva estándar ( $y = 2.9685x + 0.3039$ ,  $R^2 = 0.9995$ ) de Trolox (0.00813 - 0.13 mM).

#### Actividad Antitopoisomerasa (ATAC)

##### Extracto

Para evaluar la actividad antitopoisomerasa, se prepararon dos extractos diferentes a partir de la pulpa liofilizada: con metanol (ME) y con acetato de etilo (MA). Se

with methanol (ME) and with ethyl acetate (MA). ME was prepared from 5 g of lyophilized sample to which 20 mL of methanol was added and homogenized for 15 min at 9000 rpm using an Ultraturrax®, subsequently centrifuged for 10 min at 1000 × g and 4 °C. The supernatant was recovered, concentrated in a rota-evaporator, weighed, and stored in vials for later use. MA was prepared from the methanol extraction residue to which 20 mL of ethyl acetate was added and the same procedure used in methanol extraction was repeated. The lyophilized pulp without extraction was called ML. To perform the antitopoisomerase assay, 1 mg of the respective sample (MA, ME, or ML) was taken and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to obtain a concentration of 1 mg/mL.

#### Antitopoisomerase activity assay

Antitopoisomerase activity was evaluated according to Nitiss, J. L. & Nitiss, K. C. (2001) using the mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*: JN362a, JN394, JN394<sub>t-1</sub>. Previously, the cells were incubated in a YPD medium at 30 °C for 18 h in orbital incubation. Logarithmic phase cells were adjusted to a concentration of 2 × 10<sup>6</sup> cells/mL of medium (MaxQ4450, Thermo Scientific). The treatments consisted of a volume of 3 mL of medium with 6 × 10<sup>6</sup> cells and 50 µL of the extract or control and were incubated at 30 °C for 24 h in an orbital incubator (MaxQ4450, Thermo Scientific). DMSO (1.66 %) was used as a negative control, while CPT (50 µg/mL) a topoisomerase I inhibitor and AMS (100 µg/mL) a topoisomerase II inhibitor were positive controls. After the incubation time, an aliquot of 100 µL of each treatment was transferred and inoculated in Petri dishes containing YPDA solidified with 1.75 % Bacto Agar. The plates were incubated at 30 °C for 48 h. The antitopoisomerase activity was calculated by comparing the number of colonies counted in each treatment plate and the negative control (DMSO) that was considered as 100 % growth. All experiments were repeated three times, and the means and population standard deviations were calculated for each of the data.

#### Identification by gas chromatography/mass spectroscopy (GS/MS) of the metabolites in the extracts of the antitopoisomerase assay

1 mg of MA, ME or ML was resuspended in 2 mL of ethyl acetate and placed in vials for subsequent injection in the mass-coupled gas chromatograph (Agilent 5977 A mass selective detector coupled to an Agilent 7890DB gas chromatograph). The analysis was performed according to the procedure described by Santos *et al.* (2016). The

preparó ME a partir de 5 g de muestra liofilizada a la que se le adicionaron 20 mL de metanol y se homogeneizó durante 15 min a 9000 rpm utilizando un Ultraturrax®, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 1000 × g y 4 °C. El sobrenadante se recuperó, se concentró en un rotavapor, se pesó y se almacenó en viales para su uso posterior. Se preparó MA a partir del residuo de extracción con metanol al que se le añadieron 20 mL de acetato de etilo y se repitió el mismo procedimiento utilizado en la extracción con metanol. La pulpa liofilizada sin extracción se denominó ML. Para realizar el ensayo de antitopoisomerasa, se tomó 1 mg de la muestra respectiva (MA, ME o ML) y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 1 mg/mL.

#### Ensayo de evaluación de actividad antitopoisomerasa

La actividad antitopoisomerasa se evaluó de acuerdo con Nitiss, J. L. & Nitiss, K. C. (2001) usando las cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*: JN362a, JN394, JN394<sub>t-1</sub>. Previamente, las células se incubaron en un medio YPD a 30 °C durante 18 h en incubación orbital. Las células de la fase logarítmica se ajustaron a una concentración de 2 × 10<sup>6</sup> células/mL de medio (MaxQ4450, Thermo Scientific). Los tratamientos consistieron en un volumen de 3 mL de medio con 6 × 10<sup>6</sup> células y 50 µL del extracto o control y se incubaron a 30 °C durante 24 h en una incubadora orbital (MaxQ4450, Thermo Scientific). Se utilizó DMSO (1.66 %) como control negativo, mientras que CPT (50 µg/mL) un inhibidor de la topoisomerasa I y AMS (100 µg/mL) un inhibidor de la topoisomerasa II fueron controles positivos. Después del tiempo de incubación, se transfirió una alícuota de 100 µL de cada tratamiento y se inoculó en placas de Petri que contenían YPDA solidificado con Bacto Agar al 1.75 %. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h. La actividad antitopoisomerasa se calculó comparando el número de colonias contadas en cada placa de tratamiento y el control negativo (DMSO) que se consideró como un crecimiento del 100 %. Todos los experimentos se repitieron tres veces y se calcularon las medias y las desviaciones estándar de la población para cada uno de los datos.

#### Identificación por cromatografía de gases/espectroscopia de masas (GS/MS) de los metabolitos en los extractos del ensayo de antitopoisomerasa

Se resuspendió 1 mg de MA, ME o ML en 2 mL de acetato de etilo y se colocó en viales para su posterior inyección en el cromatógrafo de gases acoplado a masas (detector selectivo de masas Agilent 5977 A acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent 7890DB). El análisis se realizó según el procedimiento descrito por Santos *et al.*

following conditions were used: the electronic impact energy was 70 eV; capture rate of 1 scan s<sup>-1</sup>; ionization source temperature: 230 °C; m/z range: 30-300. The column used was an HP-5ms Ultra Inert capillary (30 m x 0.250 mm diameter, 0.25 µm internal film) (Agilent Technologies®) and Helium as a carrier gas (1 mL/min) was used. The chromatographic conditions were initial temperature: 100 °C for 2 min; temperature gradient: 10 °C min<sup>-1</sup>, final temperature: 200 °C for 2 min; temperature gradient: 5 °C min<sup>-1</sup>, final temperature: 290 °C for 5 min; temperature gradient: 5 °C min<sup>-1</sup>, final temperature: 310 °C for 1 min; injector temperature: 250 °C, auxiliary temperature: 300 °C, and splitless mode. For the identification of the compounds present in the extracts (MA, ME, or ML), integration of all the peaks present was made and compared with the NIST library, version 2016.

#### Statistics analysis

Data was obtained by three independent experiments and each sample was evaluated in triplicate (n = 9). The results were expressed as mean and standard deviation.

## Results and Discussion

#### Total soluble phenols and antioxidant capacity of cherimoya pulp

TSP content and AOCA of the custard apple pulp are presented in Table 1, the concentration of TSP obtained was 145.57 mg GAE/g dry extract wt, while in the capacity to stabilize the ABTS•<sup>+</sup> radical a value of 128.70 µM TE/g dry extract wt, was obtained, and the

al. (2016) con modificaciones. Se utilizaron las siguientes condiciones: la energía del impacto electrónico fue de 70 eV; tasa de captura de 1 escaneo s<sup>-1</sup>; temperatura de la fuente de ionización: 230 °C; rango m/z: 30-300. La columna utilizada fue un capilar Ultra Inerte HP-5ms (30 m x 0.250 mm de diámetro, película interna de 0.25 µm) (Agilent Technologies®) y se utilizó helio como gas portador (1 mL/min). Las condiciones cromatográficas fueron temperatura inicial: 100 °C durante 2 min; gradiente de temperatura: 10 °C min<sup>-1</sup>, temperatura final: 200 °C durante 2 min; gradiente de temperatura: 5 °C min<sup>-1</sup>, temperatura final: 290 °C durante 5 min; gradiente de temperatura: 5 °C min<sup>-1</sup>, temperatura final: 310 °C durante 1 min; temperatura del inyector: 250 °C, temperatura auxiliar: 300 °C y modo splitless. Para la identificación de los compuestos presentes en los extractos (MA, ME o ML) se realizó la integración de todos los picos presentes y se comparó con la librería NIST, versión 2016.

#### Análisis estadístico

Los datos se obtuvieron mediante tres experimentos independientes y cada muestra se evaluó por triplicado (n = 9). Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar.

## Resultados y Discusion

#### Fenoles solubles totales y capacidad antioxidante de pulpa de chirimoya

El contenido de TSP y AOCA de la pulpa de chirimoya se presentan en la Tabla 1, la concentración de TSP obtenida fue de 145.57 mg GAE/g de extracto seco, mientras que en la capacidad de estabilizar el radical ABTS•<sup>+</sup> un valor de 128.70 µM TE/g seco se obtuvo el peso del extracto, y la capacidad

**Table 1.**  
**Total soluble phenols concentration (TSP) and antioxidant capacity (FRAP and ABTS) in cherimoya pulp.<sup>1</sup>**

**Tabla 1.**  
**Concentración de fenoles solubles totales (TSP) y capacidad antioxidante (FRAP and ABTS) en pulpa de chirimoya.<sup>1</sup>**

Antioxidant capacity	
TSP (mg GAE/g dry extract wt)	145.57 ± 1.99
ABTS (µM TE/g dry extract wt)	128.70 ± 2.57
FRAP (mM TE/g dry extract wt)	43.73 ± 3.07

<sup>1</sup>Values represent the average of three replicates ± deviation standard (DS).

<sup>1</sup>Los valores son representados por la media de tres replicas ± desviación estándar (DS).

ability to reducing iron ions (FRAP) was 43.73 mM TE/g dry extract wt.

The content of TSP obtained was 10 orders of magnitude higher compared to those reported in cherimoya pulp, which on average is 12.08 mg GAE/g (Loizzo *et al.*, 2012) radical scavenging activity (by DPPH and ABTS tests; however, reports show concentrations approximately 3-4 times higher in samples obtained from crops from the Madeira region (Portugal) (Gonçalves-Albuquerque *et al.*, 2016). Variability in the concentration of bioactive compounds is affected by extrinsic factors of the fruit (Loizzo *et al.*, 2012) radical scavenging activity (by DPPH and ABTS tests. Regardless of variability, 114 compounds in the cherimoya pulp of phenolic nature have been identified, mainly flavonoids (O- and C-glycosylated), derivatives and 24 other phytochemicals such as anthocyanins and kaurans (Spinola *et al.*, 2015).

Some studies reported values between 237.02 µg ET/g to fresh pulp and 109 mM ET/g dry pulp, these match with the results in this work (128.70 µM ET/g dry extract) to antiradical activity (Da Silva *et al.*, 2014). The potential reduction of the ABTS<sup>•+</sup> radical is caused by the presence of phenolic compounds (Barreca *et al.*, 2011) and other bioactive of the plant matrix. Other studies have identified kaurans, alkaloids, lignans, amides, acetogenins, lactams, amides, purines, sterols, tocopherols, phospholipids, flavonoids, tannins, phytosterols, lutein, β-cryptoxanthin, β-carotene and vitamin C, among others to which have been attributed the property to neutralize free radicals and other health benefits (Gonçalves-Albuquerque *et al.*, 2016).

The obtained FRAP result (43.73 mM ET/g) was higher than the one reported for the ripe pulp of cherimoya (0.44-0.6 mM ET/g) (Barreca *et al.*, 2011). The variations of the AOCA evaluated by both FRAP and ABTS<sup>•+</sup> can be attributed to the profile of phenolic compounds (PC) present in the pulp of the fruit since some of these compounds can form chelates; however, PC due to their chemical structure may have greater affinity for neutralizing free radicals, that could explain the difference observed in ABTS and FRAP when we comparing the findings of this study with other studies. Has been reported that the dominant PC already identified in cherimoya pulp are procyanidins, proanthocyanidins and flavonols (flavan-3-ol) whose variety of hydroxyl groups, gives them a greater ability to scavenger free radicals (Rodríguez-Roque *et al.*, 2015).

para reducir los iones de hierro (FRAP) fue de 43.73 mM de TE/g de peso del extracto seco.

El contenido de TSP obtenido fue 10 órdenes de magnitud superior a los reportados en la pulpa de chirimoya, que en promedio es de 12.08 mg GAE/g (Loizzo *et al.*, 2012) radical scavenging activity (by DPPH and ABTS tests; sin embargo, los informes muestran concentraciones aproximadamente 3-4 veces más altas en muestras obtenidas de cultivos de la región de Madeira (Portugal) (Gonçalves-Albuquerque *et al.*, 2016). La variabilidad en la concentración de compuestos bioactivos se ve afectada por factores extrínsecos de la fruta (Loizzo *et al.*, 2012) radical scavenging activity (by DPPH and ABTS tests. Independientemente de la variabilidad, se han identificado 114 compuestos en la pulpa de chirimoya de naturaleza fenólica, principalmente flavonoides (O- y C-glicosilados), derivados y otros 24 fitoquímicos como antocianinas y kauranos (Spinola *et al.*, 2015).

Algunos estudios informaron valores entre 237.02 µg ET/g para pulpa fresca y 109 mM ET/g pulpa seca, estos coinciden con los resultados de este trabajo (128.70 µM ET/g extracto seco) para actividad antiradical (Da Silva *et al.*, 2014). La posible reducción del radical ABTS<sup>•+</sup> está provocada por la presencia de compuestos fenólicos (Barreca *et al.*, 2011) y otros bioactivos de la matriz vegetal. Otros estudios han identificado kauranos, alcaloides, lignanos, amidas, acetogeninas, lactamas, amidas, purinas, esteroides, tocoferoles, fosfolípidos, flavonoides, taninos, fitoesteroides, luteína, β-criptoxantina, β-caroteno y vitamina C, entre otros a los que se han atribuido la propiedad de neutralizar los radicales libres y otros beneficios para la salud (Gonçalves-Albuquerque *et al.*, 2016).

El resultado obtenido de FRAP (43.73 mM ET/g) fue superior al reportado para la pulpa madura de chirimoya (0.44-0.6 mM ET/g) (Barreca *et al.*, 2011). Las variaciones de la AOCA evaluadas tanto por FRAP como por ABTS<sup>•+</sup> se pueden atribuir al perfil de compuestos fenólicos (CF) presentes en la pulpa del fruto ya que algunos de estos compuestos pueden formar quelatos; sin embargo, el CF por su estructura química puede tener mayor afinidad por neutralizar radicales libres, lo que podría explicar la diferencia observada en ABTS y FRAP cuando comparamos los hallazgos de este estudio con otros estudios. Se ha informado que los CF dominantes ya identificados en la pulpa de chirimoya son las procianidinas, proantocianidinas y flavonoles (flavan-3-ol) cuya variedad de grupos hidroxilo, les confiere una mayor capacidad de captación de radicales libres (Rodríguez-Roque *et al.*, 2015).

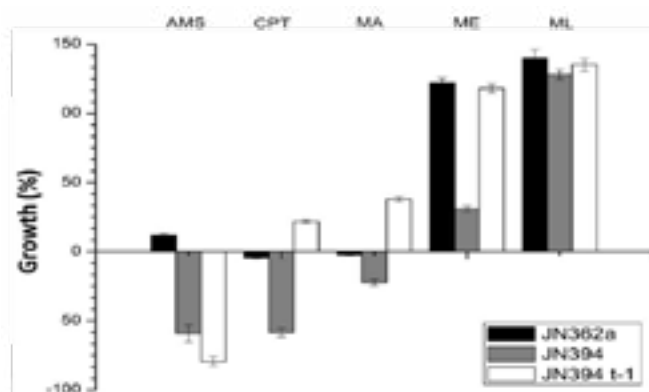


### Antitopoisomerasa activity

Biological activity expressed in the antitopoisomerase assay for the cherimoya extracts and controls is shown in Figure 1, where the percentage of inhibition of the strain is expressed with negative values and the growth with positive values. It was observed that CPT, AMS, and MA showed inhibition,  $58.30 \pm 3.0$ ,  $59.02 \pm 6.2$  and  $22.05 \pm 2.4$  % in JN394, respectively. ML and ME presented growth with values of  $128 \pm 3.6$  and  $31 \pm 2.0$  %, respectively. CPT is a Topoisomerase 1 (TOP1) selective inhibitor and AMS is a Topoisomerase 2 (TOP2) selective inhibitor, both are used as positive controls for the inhibition of JN394. Regarding the strain JN362a, inhibition of  $4.35 \pm 0.5$  and  $2.12 \pm 0.4$  % was presented for CPT and MA, respectively; while growth of  $12 \pm 1.3$ ,  $122 \pm 3.4$  and  $140 \pm 6.1$  % was observed with AMS, ML and ME, respectively. This strain presents exacerbated DNA repair mechanisms, which makes it resistant to selective inhibitors and compounds with potential antitopoisomerase activity (Nitiss, J. & Wang, 1988). The combination of these results (Inhibition in JN394

### Actividad Antitopoisomerasa

La actividad biológica expresada en el ensayo de antitopoisomerasa para los extractos y controles de chirimoya se muestra en la Figura 1, donde el porcentaje de inhibición de la cepa se expresa con valores negativos y el crecimiento con valores positivos. Se observó que CPT, AMS y MA mostraron inhibición,  $58.30 \pm 3.0$ ,  $59.02 \pm 6.2$  y  $22.05 \pm 2.4$  % en JN394, respectivamente. ML y ME presentaron crecimientos con valores de  $128 \pm 3.6$  y  $31 \pm 2.0$  %, respectivamente. CPT es un inhibidor selectivo de la topoisomerasa 1 (TOP1) y AMS es un inhibidor selectivo de la topoisomerasa 2 (TOP2), ambos se utilizan como controles positivos para la inhibición de JN394. Con respecto a la cepa JN362a, se presentó inhibición de  $4.35 \pm 0.5$  y  $2.12 \pm 0.4$  % para CPT y MA, respectivamente; mientras que se observó un crecimiento de  $12 \pm 1.3$ ,  $122 \pm 3.4$  y  $140 \pm 6.1$  % con AMS, ML y ME, respectivamente. Esta cepa presenta mecanismos de reparación del ADN exacerbados, lo que la hace resistente a inhibidores selectivos y compuestos con potencial actividad antitopoisomerasa (Nitiss, J. & Wang, 1988). La combinación de estos resultados (inhibición en JN394 y crecimiento en JN362a) indica actividad antitopoisomerasa.



**Figure 1.** Expresses the percentage growth of *Saccharomyces cerevisiae* mutant strains treated with extracts of cherimoya pulp. Values represent the average of three replicates  $\pm$  standard deviation (SD). Positive values indicate growth and negative values indicate growth inhibition compared to the negative control (DMSO). ML: Lyophilized sample ME: ethanol extract, MA: acetate extract, CPT: Camptothecin, TOP1 positive control, AMS: amsacrine TOP2 positive control and DMSO: dimethylsulfoxide, negative control used for growth calculation (DMSO 100 % growth).

**Figura 1.** Porcentaje de crecimiento de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas con extractos de pulpa de chirimoya. Los valores representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar (DE). Los valores positivos indican crecimiento y los valores negativos indican inhibición del crecimiento en comparación con el control negativo (DMSO). ML: muestra liofilizada ME: extracto de etanol, MA: extracto de acetato, CPT: camptotecina, control positivo TOP1, AMS: control positivo amsacrina TOP2 y DMSO: dimetilsulfoxido, control negativo utilizado para el cálculo del crecimiento (DMSO 100 % de crecimiento).

and growth in JN362a) indicates antitopoisomerase activity. Only MA presented antitopoisomerase activity, ME and ML no affected the growth, because in both strains (JN394 and JN362a) growth rate was above the value of the negative control (DMSO), which could be attributed to the presence of some carbohydrates in the samples due to, the broad spectrum polarity used in the extraction allows the dissociation of the OH groups present in the sample and the solvent (Gonçalves-Albuquerque *et al.*, 2016), which can be used by yeasts for their growth. The results against strain JN394<sub>t-1</sub> (Figure 1) show that CPT and MA didn't inhibit their growth ( $38 \pm 1.8$  and  $22 \pm 1.1$  %, respectively), while AMS presented an inhibition of  $79.02 \pm 3.3$  %; ML and ME showed growth of  $135 \pm 4.5$  and  $118 \pm 3.2$  %, respectively. These results indicate that compounds present in the MA extract have selective activity against TOP1. Only AMS presented a 79.02 % inhibition against this strain, which is isogenic with JN394, with disruption of the gene that encodes TOP1. This absence of gene results in decreased cytotoxicity of drugs with antitopoisomerase I activity (Nitiss, J. L. & Nitiss, K. C., 2001). AMS is a selective inhibitor of TOP2 and therefore is the only positive control that has inhibition against this strain. The results mean that the MA extract has compounds with antitopoisomerase 1 activity. CPT is a natural TOP1 inhibitor (Hsiangl *et al.*, 1985; Sheng *et al.*, 2016), it acts by binding to a transient covalent complex TOP1-DNA, which leads to an accumulation of strands of DNA, this leads to replication being inhibited, and ultimately results in cell death (Hevener *et al.*, 2018; Sheng *et al.*, 2016). The crystalline X-ray structure of the human TOP1-DNA complex bound with CPT reveals that its flat junction is sandwiched between the DNA base pairs at the single strand cleavage site with the E-ring C20 hydroxyl oxygen and the atom of ring B nitrogen that form hydrogen-bonding interactions with Asp533 and Arg364, respectively. Due to, selective inhibition of TOP1, CPT has proven to be an excellent antitumor compound. Another kind of natural source compounds that have shown selective activity similar to CPT are gibberellins (Leet *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2014). Studies in HT29 cells (colon cancer) suggest that custard cherimoya juice had a great chemoprotective activity, through the activation of glutathione peroxidase. These results are encouraging and reflect the possible health benefits of consuming custard apple pulp and its potential as a functional food (Barreca *et al.*, 2011).

Solo MA presentó actividad antitopoisomerasa, ME y ML no afectaron el crecimiento, debido a que en ambas cepas (JN394 y JN362a) la tasa de crecimiento estuvo por encima del valor del control negativo (DMSO), lo que podría atribuirse a la presencia de algunos carbohidratos en las muestras, debido a que, la polaridad de amplio espectro utilizada en la extracción permite la disociación de los grupos OH presentes en la muestra y el solvente (Gonçalves-Albuquerque *et al.*, 2016), que pueden ser utilizadas por las levaduras para su crecimiento. Los resultados contra la cepa JN394<sub>t-1</sub> (Figura 1) muestran que CPT y MA no inhibieron su crecimiento ( $38 \pm 1.8$  y  $22 \pm 1.1$  %, respectivamente), mientras que AMS presentó una inhibición de  $79.02 \pm 3.3$  %; ML y ME mostraron un crecimiento de  $135 \pm 4.5$  y  $118 \pm 3.2$  %, respectivamente. Estos resultados indican que los compuestos presentes en el extracto de MA tienen actividad selectiva contra TOP1. Solo AMS presentó una inhibición del 79.02 % frente a esta cepa, que es isogénica con JN394, con interrupción del gen que codifica TOP1. Esta ausencia de gen da como resultado una disminución de la citotoxicidad de los fármacos con actividad antitopoisomerasa I (Nitiss, J. L. & Nitiss, K. C., 2001). AMS es un inhibidor selectivo de TOP2 y, por lo tanto, es el único control positivo que tiene inhibición contra esta cepa. Los resultados significan que el extracto de MA tiene compuestos con actividad antitopoisomerasa 1 (TOP1). CPT es un inhibidor natural de TOP1 (Hsiangl *et al.*, 1985; Sheng *et al.*, 2016), Actúa uniéndose a un complejo covalente transitorio TOP1-ADN, lo que conduce a una acumulación de hebras de ADN, esto conduce a la inhibición de la replicación y, en última instancia, da como resultado la muerte celular (Hevener *et al.*, 2018; Sheng *et al.*, 2016). La estructura cristalina por rayos X del complejo de ADN TOP1 humano unido con CPT revela que su unión plana está intercalada entre los pares de bases de ADN en el sitio de escisión de una sola hebra con el oxígeno del hidroxilo C20 del anillo E y el átomo de nitrógeno del anillo B que forman interacciones de enlace de hidrógeno con Asp533 y Arg364, respectivamente. Debido a la inhibición selectiva de TOP1, CPT ha demostrado ser un excelente compuesto antitumoral. Otro tipo de compuestos de origen natural que han mostrado una actividad selectiva similar a la CPT son las giberelinas (Leet *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2014). Los estudios en células HT29 (cáncer de colon) sugieren que el jugo de chirimoya natilla tiene una gran actividad quimioprotectora, a través de la activación de la enzima glutatión peroxidasa. Estos resultados son alentadores y reflejan los posibles beneficios para la salud de consumir pulpa de chirimoya y su potencial como alimento funcional (Barreca *et al.*, 2011).

### Gas chromatography/mass spectrometry

Table 2 shows the percentages of total area (% TA) of the compounds identified in the MA sample, the one that resulted with antitopoisomerase I activity. The compounds detected (Figure 2) were kauran-15-ol, kauran-16-ol, Isopimara-7,15-dien-3 one and gummiferolic acid, with a percentage TA of 3.29, 62.73, 18.54 and 15.44, respectively. From these compounds, the one with the highest abundance was kauran-16-ol. Kaurans are secondary metabolites present in fruits of wild nature and have been demonstrated that have low cytotoxicity in human tumor cell lines. Has been reported that these diterpenoids contribute to the anti-inflammatory process by activating phagocytes, which are related to cellular defense. Besides, a reduction in liver damage in rats under a diet rich in diterpenic compounds, was reported (Wan *et al.*, 2016). Kauran-15-ol and kauran-16-ol, are part of the synthesis of gibberellins, and are associated with the seed formation stage in fruits (Pearce *et al.*, 1994). Moreover, gibberellins have been studied as potential TOP1 inhibitors at concentrations below 100 µg/mL (Sheng *et al.*, 2016), this is consistent with the activity shown in the MA sample, that at a total extract concentration of 1 mg/mL, an inhibition of 22.05 % of the activity of the TOP1 was achieved. They have been identified in the fresh pulp of cherimoya ((4α) kaur-16 en-18oic acid) (Santos *et al.*, 2016). This type of metabolites have also been linked to the prevention of chronic non-communicable diseases, including cancer, cardiovascular diseases, osteoporosis and immune disorders (Simopoulos, 2008) and have excessive amounts of omega-6 fatty acids compared with the diet on which human beings evolved and their genetic patterns were established. Excessive amounts of omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA). The presence of gummiferolic acid in cherimoya has not been reported and there few studies with this compound but is a diterpene which may exerts biological activity.

### Cromatografía de gases/ espectrometría de masas

La Tabla 2 muestra los porcentajes de área total (% TA) de los compuestos identificados en la muestra MA, la que resultó con actividad antitopoisomerasa I. Los compuestos detectados (Figura 2) fueron kauran-15-ol, kauran-16-ol, Isopimara-7,15-dien-3 one y ácido gumíferólico, con un % de TA de 3.29, 62.73, 18.54 y 15.44, respectivamente. De estos compuestos, el de mayor abundancia fue kauran-16-ol. Los kauranos son metabolitos secundarios presentes en frutos de naturaleza silvestre y se ha demostrado que tienen baja citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Se ha informado que estos diterpenoides contribuyen al proceso antiinflamatorio activando fagocitos, que están relacionados con la defensa celular. Además, se informó una reducción del daño hepático en ratas con una dieta rica en compuestos diterpénicos (Wan *et al.*, 2016). Kauran-15-ol y kauran-16-ol, son parte de la síntesis de giberelinas y están asociados con la etapa de formación de semillas en frutos (Pearce *et al.*, 1994). Además, las giberelinas se han estudiado como posibles inhibidores de TOP1 en concentraciones inferiores a 100 µg/mL (Sheng *et al.*, 2016), esto es consistente con la actividad mostrada en la muestra MA, que a una concentración de extracto total de 1 mg/mL, se logró una inhibición del 22.05 % de la actividad del TOP1. Se han identificado en la pulpa fresca de chirimoya (ácido (4α) kaur-16 en-18oico) (Santos *et al.*, 2016). Este tipo de metabolitos también se ha relacionado con la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis y los trastornos inmunológicos (Simopoulos, 2008).

**Table 2.**  
**Metabolites identified by GC/MS**

**Tabla 2.**  
**Metabolitos identificados por GC/MS**

Signal number	Compound	RT (min)	%TA
1	Kauran-15-ol	16.64	3.29
2	Kauran-16-ol	19.78	62.73
3	Isopimara-7,15-dien-3 one	20.22	18.54
4	Gummiferolic acid	21.66	15.44

RT: Retention time. %TA: total area percentage.

RT: Tiempo de retención. %TA: porcentaje de área total.

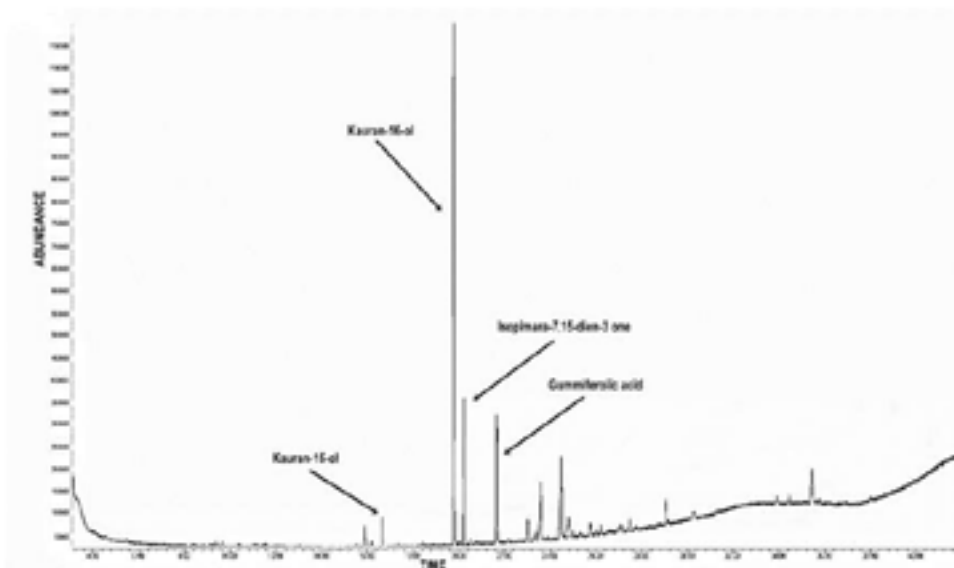


Figure 2. GC/MS chromatogram of MA sample. Y-axis: abundance (arbitrary units AU), X-axis: retention time. Compounds identified according to NIST 2016 library.

Figura 2. GC/MS cromatograma de la muestra MA. Eje Y: abundancia (unidades arbitrarias AU), eje X: tiempo de retención. Compuestos identificados de acuerdo con la biblioteca NIST 2016.

## Conclusions

Results show that cherimoya 'concha lisa' smooth shell from Michoacán, is a rich source of antioxidants, and the extraction with ethyl acetate (MA) proved to have antitopoisomerase I activity compounds. In MA, three diterpenes were identified, two from the family of kaurans (Kauran-15-ol and Kauran-16-ol) and gummiferolic acid, which are associated with the TOP1 inhibition; Therefore, consuming this fruit could contribute to improving human health, due to the presence of bioactive secondary metabolites, moreover, the pulp is a potentially rich source of functional ingredients for the food industry.

## Funding

This research was funded by TecNM, grant number 5857.16-P.

## Acknowledgments

Francisco Fabián Razura-Carmona acknowledges CONACYT for financial support, México for a grant (Registration number: 787023).

## Conclusiones

Los resultados muestran que la cáscara lisa de la chirimoya 'concha lisa' de Michoacán, es una fuente rica en antioxidantes, y la extracción con acetato de etilo (MA) demostró tener compuestos de actividad antitopoisomerasa I. En MA, se identificaron tres diterpenos, dos de la familia de los kauranos (Kauran-15-ol y Kauran-16-ol) y ácido gumiferólico, que están asociados con la inhibición de TOP1; Por lo que, el consumo de esta fruta podría contribuir a mejorar la salud humana, debido a la presencia de metabolitos secundarios bioactivos, además, la pulpa es una fuente potencialmente rica en ingredientes funcionales para la industria alimentaria

## Financiamiento

Esta investigación fue financiada por TecNM, subvención número 5857.16-P.

## Agradecimientos

Francisco Fabián Razura-Carmona agradece a CONACYT por el apoyo financiero, México por una subvención (Número de registro: 787023).

## References

- Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2011). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 163–173. <https://doi.org/10.1021/jf103434u>
- Barreca, D., Laganà, G., Ficarra, S., Tellone, E., Leuzzi, U., Galtieri, A., & Bellocco, E. (2011). Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). *Food Research International*, 44(7), 2302–2310. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.031>
- Bertozzi, D., Marinello, J., Manzo, S. G., Fornari, F., Gramantieri, L., & Capranico, G. (2014). The natural inhibitor of DNA topoisomerase I, camptothecin, modulates HIF-1 $\alpha$  activity by changing miR expression patterns in human cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(1), 239–248. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0729>
- Da Silva, L. M., De Figueiredo, E. A., Pontes Silva, N. M., Pinto Vieira, I. G., De Figueiredo, R. W., Montenegro Brasil, I., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143(1), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>
- Gonçalves Albuquerque, T., Santos, F., Sanches-silva, A., Oliveira, M. B., Bento, A. C., & Costa, H. S. (2016). Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products : Potential health benefits. *Food Chemistry*, 193(1), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.044>
- Grossberger, D. (1999). The california cherimoya industry. *International Society for Horticultural Science*, 497, 119–130. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.497.6>
- Gupta-Elera, G., Garrett, A. R., Martinez, A., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2011). The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. *Food Research International*, 44(7), 2205–2209. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.038>
- Hevener, K. E., Verstak, T. A., Lutat, K. E., Riggsbee, D. L., & Mooney, J. W. (2018). Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(6), 844–861. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.07.008>
- Hsiangl, Y., Hertzberg, R., Hechtj, S., & Lius, F. (1985). Camptothecin Induces Protein-linked DNA Breaks via Mammalian DNA Topoisomerase I \*. *Journal of Biological Chemistry*, 260(27), 14873–14858. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38654-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38654-4)
- Jang, Y., Son, H., Lee, S. W., Hwang, H., Seung-Ryoung, J., W. Byl, J. A., Osheroff, N., & Lee, S. (2019). Selection of DNA Cleavage Sites by Topoisomerase II Results from Enzyme-Induced Flexibility of DNA. *Cell Chemical Biology*, 26(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.12.003>
- Leet, J. E., Schroeder, D. R., Langley, D. R., Colson, K. L., Huang, S., Klohr, S. E., Lee, M. S., Golik, J., Hofstead, S. J., & Matson, J. A. (1993). Chemistry and Structure Elucidation of the Kedarcidin Chromophore. *Journal of the American Chemical Society*, 115, 8432–8443. <https://doi.org/10.1021/ja00071a062>
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., & Menichini, F. (2012). Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.09.002>
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625–15658. <https://doi.org/10.3390/ijms160715625>
- Nitiss, J. L., & Nitiss, K. C. (2001). Yeast Systems for Demonstrating the Targets of Anti-Topoisomerase II Agents. *DNA Topoisomerase Protocols*, 95(1), 315–328. <https://doi.org/10.1385/1-59259-057-8:315>
- Nitiss, J., & Wang, J. C. (1988). DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(20), 7501–7505. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.20.7501>
- Pearce, D. W., Koshioka, M., & Pharis, R. P. (1994). Chromatography of gibberellins. *Journal of Chromatography A*, 658(1), 91–122. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85210-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85210-3)
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction,

- measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- Pierson, J. T., Dietzgen, R. G., Shaw, P. N., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R., & Gidley, M. J. (2012). Major Australian tropical fruits biodiversity: Bioactive compounds and their bioactivities. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(3), 357–387. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100441>
- Ramírez-Mares, M. V., Sánchez-Burgos, J. A., & Hernández-Carlos, B. (2010). Antioxidant, Antimicrobial and Antitopoisomerase Screening of the Stem Bark Extracts of *Ardisia compressa*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(4), 307–313. <https://doi.org/10.3923/pjn.2010.307.313>
- Re, R., Pellegrini, N., Pannala, A., Min, Y., & Rice-Evans, A. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decoloration Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.020>
- Santos, S. A. O., Vilela, C., Camacho, J. F., Cordeiro, N., Gouveia, M., Freire, C. S. R., & Silvestre, A. J. D. (2016). Profiling of lipophilic and phenolic phytochemicals of four cultivars from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Food Chemistry*, 211, 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.123>
- Sheng, C., Miao, Z., & Zhang, W. (2016). Topoisomerase I Inhibitors Derived from Natural Products: Structure-Activity Relationships and Antitumor Potency. *Studies in Natural Products Chemistry*, 47, 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63603-4.00001-2>
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 233(6), 674–688. <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 173, 14–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.163>
- Vega-González, E. M. (2013). Revisión bibliográfica CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Miller), Frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 52–63.
- Wan, J., Liu, M., Jiang, H. Y., Yang, J., Du, X., Li, X. N., Wei-Guang, W., Li, Y., Jian-Xin, J., & Han-Dong, S. (2016). Bioactive ent-kaurane diterpenoids from *Isodon serra*. *Phytochemistry*, 130, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.05.014>
- Yang, R., Chen, J. B., Xiao, C. F., Liu, Z. C., Gao, A. C., Yan, S. J., Zhang, J. H., Zhang, H. B., & Lin, J. (2014). Inclusion complex of GA-13316 with  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, characterization, molecular modeling, and in vitro evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 111, 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.021>