

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

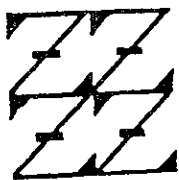
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

Estudio fitoquímico biodirigido
de la actividad citotóxica de
Annona diversifolia Saff.
(Ilama).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
PERALTA MONTERO JESUS

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR: M.C. BENITO REYES TREJO.
ASESOR: D.R. ANDRES NAVARRETE CASTRO.

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

258112

1998



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 está 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

PERALTA MONTERO JESUS

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Estudio fitoquímico biodirigido de la actividad citotóxica de Annona diversifolia Saff. (llama).

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q. PATRICIA DEMAREE NEGRETE
VOCAL	M. en C. BENITO REYES TREJO
SECRETARIO	DR. ANDRES NAVARRETE CASTRO
SUPLENTE	Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARIN
SUPLENTE	Q. MARTHA J. OLIVEROS GARCIA

ATENTAMENTE .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. a, 22 de Octubre de 1997.

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Productos Naturales** del Area de Química del Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Bajo la dirección del **M. en C. Benito Reyes Trejo** y la asesoría del **Dr. Andrés Navarrete Castro**

El presente trabajo no podría haber sido realizado sin la acertada dirección y los invaluable conocimientos compartidos por Benito y Andrés, a quienes agradezco infinitamente

Agradezco especialmente a mis compañeros y amigos del **Laboratorio de Productos Naturales** y la **Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”** por su colaboración en el proyecto y por los gratos momentos compartidos

Finalmente, se agradece al personal técnico académico de la Universidad Autónoma Chapingo, por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera colaboraron en él

Dedicado especialmente:

A mis padres,

*Ma. Jesús y Roberto
a quienes debo todo.*

A mis hermanos,

*por su apoyo para
alcanzar mi objetivo.*

A quienes forjaron mis ideales.

CONTENIDO

Contenido	I
Indice de tablas, figuras y espectros	III
Notaciones	VI
Resumen	VII
1. Introducción	1
2. Fundamento teórico	3
2.1. Las plantas medicinales y la salud en México	3
2.2. Usos tradicionales de la familia <i>Annonaceae</i>	6
2.3. Fitoquímica y actividad biológica de la familia de las <i>Annonaceas</i>	6
2.4. Características químicas de las acetogeninas	12
2.5. Relación estructura-actividad de las acetogeninas	16
2.6. Mecanismo de acción de las acetogeninas	19
2.7. Descripción botánica de <i>Annona diversifolia</i> Saff.	22
2.8. Ensayo con <i>Artemia salina</i> L.	23
3. Planteamiento del problema	26
4. Objetivos	27
4.1. Objetivo general	27
4.2. Objetivos particulares	27

5. Hipótesis de trabajo	28
6. Metodología	29
6.1. Materiales	29
6.2. Métodos fitoquímicos y biológicos	33
6.2.1. Material vegetal	33
6.2.2. Preparación de los extractos	33
6.2.3. Fraccionamiento cromatográfico	34
6.2.4. Fraccionamiento biodirigido	34
6.2.5. Derivados químicos	37
6.2.6. Evaluación de la actividad biológica	38
7. Resultados	40
7.1. Estudio químico	40
7.2. Estudio biológico	44
8. Discusión de resultados	52
8.1. Estudio químico	52
8.2. Actividad biológica	104
9. Conclusiones	106
10. Sugerencias	107
11. Bibliografía	108

Índice de tablas, figuras y espectros.

Tablas.

Tabla 1. Morbilidad de enfermedades publicadas por el sistema nacional de epidemiología de la Secretaría de Salud Pública.	4
Tabla 2. Actividad citotóxica de algunas acetogeninas en líneas celulares de cáncer humano (IC ₅₀ µg/mL).	10
Tabla 3. Actividad antiparasitaria de extractos obtenidos de semillas de <i>Annona muricata</i> y <i>Annona cherimolia</i> (CL ₅₀ µg/mL).	12
Tabla 4. Niveles de ATP en larvas de <i>Plutella xylostella</i> tratadas con acetogeninas y agentes insecticidas.	20
Tabla 5. Inhibición del transporte de electrones en partículas submitocondriales de músculo de <i>Lucila cuprina</i>	20
Tabla 6. Especies del género <i>Annona</i> clasificadas en el mundo.	24
Tabla 7. Actividad citotóxica de algunas acetogeninas en el modelo de <i>Artemia salina</i> L.	25
Tabla 8. Sustancias aisladas del extracto metanólico de <i>Annona diversifolia</i> Saff.	40
Tabla 9. Datos de RMN- ¹ H de la laherradurina y derivados.	42
Tabla 10. Datos de RMN- ¹³ C de la laherradurina y derivados.	43
Tabla 11. Datos espectroscópicos del ácido 15-octadecenoico.	44
Tabla 12. Bioensayo de citotoxicidad de <i>Annona diversifolia</i> Saff. en <i>Artemia salina</i> L.	45
Tabla 13. Bioensayo de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i> L. de las fracciones obtenidas en la separación del extracto de partición de diclorometano de <i>Annona diversifolia</i> Saff.	47
Tabla 14. Citotoxicidad en <i>Artemia salina</i> L. de la laherradurina y derivados químicos.	50
Tabla 15. Comparación de datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de la laherradurina con la sustancia aislada de las F51-53.	77
Tabla 16. Comparación de datos espectrométricos e IR de la laherradurina con la sustancia aislada de las fracciones 51-53.	78
Tabla 17. Configuración relativa de los C-15/C-16 y C-23/C-24 de la laherradurina por comparación de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C.	79
Tabla 18. Datos de RMN- ¹ H de modelos sintéticos acetilados de configuración relativa conocida de acuerdo al modelo de Hoye.	88

Figuras.

Figura 1. Algunos metabolitos secundarios aislados de plantas de la familia de las <i>Annonaceas</i>	8
Figura 1a. Algunos metabolitos secundarios aislados de plantas de la familia de las <i>Annonaceas</i>	9
Figura 2. Estructura base de las acetogeninas.	13
Figura 3. Clasificación de las acetogeninas por la posición y el número de anillos de tetrahidrofurano (THF).	14

Figura 4.	Clasificación de las acetogeninas de acuerdo a las características estructurales de la γ -lactona.	15
Figura 5.	Acetogeninas del subtipo 3, las que presentan un grupo funcional hidroxilo en la posición β - del anillo de la γ -lactona.....	17
Figura 6.	Relación estructura-actividad citotóxica de las acetogeninas.....	18
Figura 7.	Diagrama de flujo del estudio químico y biológico de <i>Annona diversifolia</i> Saff.	35
Figura 8.	Derivado de la hidrólisis de la γ -lactona de la laherradurina.	38
Figura 9.	Estructuras de las sustancias aisladas de <i>Annona diversifolia</i> Saff. en el presente estudio.	41
Figura 10.	Citotoxicidad de los extractos de <i>Annona diversifolia</i> Saff. en el modelo de <i>Artemia salina</i> L.....	46
Figura 11.	Citotoxicidad en <i>Artemia salina</i> L. de las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica de la partición de diclorometano.....	48
Figura 11a.	Citotoxicidad en <i>Artemia salina</i> L. de las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica de la partición de diclorometano.....	49
Figura 12.	Citotoxicidad de la laherradurina y derivados químicos en <i>Artemia salina</i> L.....	51
Figura 13.	Estructura general de los ésteres de tipo triglicérico.....	52
Figura 14.	Datos de RMN- ¹ H de las metil- γ -hidroxi lactonas.....	54
Figura 15.	Posibilidades estructurales propuestas para la sustancia aislada de las F51-53.	58
Figura 16.	Estructuras propuestas para la posición de dos grupos hidroxilo en acetogeninas bis-THF.	62
Figura 17.	Fragmentos de importancia que explican la magnitud molecular de la laherradurina.	63
Figura 18.	Posibilidades de sustitución de los grupos hidroxilo, metilo y R-CH ₂ -, en la γ -lactona.	65
Figura 19.	Trazo parcial del espectro de RMN- ¹ H (Espectro 9) que justifica las posibilidades estructurales f e j.	67
Figura 20.	Trazo parcial del espectro de RMN- ¹ H (Espectro 9) que justifica la sustitución del grupo R-CH ₂ en posición α de la γ -lactona.	68
Figura 21.	Simplificación de la señal mostrada por el H-35 en el espectro de RMN- ¹ H al adicionar D ₂ O.....	70
Figura 22.	Sistema del tipo ABX de los protones del anillo de la γ -lactona.	70
Figura 23.	Estereoquímica de los sustituyentes en el anillo de γ -lactona.....	71
Figura 24.	Posición del grupo hidroxilo en la cadena de alquilo enlazada al anillo de γ -lactona.	74
Figura 25.	Interacción del H-16 con el protón del hidroxilo sustituido en el C-15.....	75
Figura 26.	Laherradurina (I).....	77
Figura 27.	Configuración relativa de los C-15/C-16 y C-23/C-24 de la laherradurina.....	79
Figura 28.	Comparación de datos de RMN- ¹ H del triacetato de la acetogenina aislada de <i>Annona diversifolia</i> Saff. con un sistema bis-THF eritro/trans/treo/trans/treo (C-24→C-15) deducido por el modelo de Hoye.	89
Figura 29.	Hidrólisis del anillo de lactona para formar la sal potásica (KOH/MeOH).....	93
Figura 30.	Subtipos de las acetogeninas identificadas en las fracciones 81-90.	96
Figura 31.	Rupturas y fragmentos generados por la descomposición de la muestra en el espectro de masas.....	100
Figura 32.	Acido 15-octadecenoico.....	102

Espectros.

Espectro 1.	Espectro de RMN- ¹ H (60 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la mezcla de ésteres triglicéricos.....	53
Espectro 2.	Espectro de IR (CHCl ₃) de la laherradura (I).....	55
Espectro 3.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la laherradura (I).....	56
Espectro 4.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la laherradura (I).....	57
Espectro 5.	Espectro de DEPT (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la laherradura (I).....	59
Espectro 6.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ + D ₂ O, TMS) de la laherradura (I).....	60
Espectro 7.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del Triacetato de la laherradura.....	61
Espectro 8.	Espectro de masas por impacto electrónico (EIMS) de la laherradura (I).....	64
Espectro 9.	Espectro de RMN- ¹ H (ampliación 2.6-5.0, 300 MHz, CDCl ₃ + D ₂ O, TMS) de la laherradura (I).....	66
Espectro 10.	Espectro de COSY (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la laherradura (I).....	69
Espectro 11.	Espectro de HETCOR (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la laherradura (I).....	72
Espectro 12.	Espectro de RMN- ¹³ C (ampliación 71-84 ppm, 300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la laherradura (I).....	73
Espectro 13.	Espectro de RMN- ¹³ C (ampliación 15-45 ppm, 300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la laherradura (I).....	76
Espectro 14.	Espectro de IR(CHCl ₃) del triacetato de la laherradura.....	80
Espectro 15.	Espectro de DEPT (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del triacetato de la laherradura.....	82
Espectro 16.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del triacetato de la laherradura.....	83
Espectro 17.	Espectro de RMN- ¹ H (ampliación 0.8-5 ppm, 300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del triacetato de la laherradura.....	84
Espectro 18.	Espectro de RMN- ¹³ C (ampliación 14-83 ppm, 300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del triacetato de la laherradura.....	85
Espectro 19.	Espectro de HETCOR (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del triacetato de la laherradura.....	86
Espectro 20.	Espectro de COSY (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del triacetato de la laherradura.....	87
Espectro 21.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la sal potásica de la laherradura.....	90
Espectro 22.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la sal potásica de la laherradura.....	91
Espectro 23.	Espectro de RMN- ¹³ C (ampliación 14-85, 300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de la sal potásica de la laherradura.....	92
Espectro 24.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ + D ₂ O, TMS) de la sal potásica de la laherradura.....	94
Espectro 25.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) de las fracciones 81-90 (III).....	95
Espectro 26.	Espectro de IR (CDCl ₃) del ácido 15-octadecenoico (II).....	97
Espectro 27.	Espectro de DEPT (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del ácido 15-octadecenoico (II).....	98
Espectro 28.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del ácido 15-octadecenoico (II).....	99
Espectro 29.	Espectro de RMN- ¹ H (ampliación 0.9-5.5, 300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del ácido 15-octadecenoico (II).....	101
Espectro 30.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) del ácido 15-octadecenoico (II).....	103

NOTACIONES.

ATP	trifosfato de adenina.
CCF	cromatografía en capa fina.
d	doblete.
dd	doble de dobles.
CDCl ₃	cloroformo deuterado.
dt	doble de triples.
CHCl ₃	cloroformo.
CH ₂ Cl ₂	diclorometano.
CLAR	cromatografía de líquidos de alta resolución.
CL ₅₀	concentración letal media.
COSY	espectro de correlación espectroscópica bidimensional homonuclear.
DEPT	distorsión reducida por transferencia de polarización.
DL ₅₀	dosis letal media.
D ₂ O	agua deuterada.
EM(IE)	espectrometría de masas por impacto electrónico.
ETS	sistema de transporte de electrones.
HeLa	carcinoma cervical humano.
HETCOR	espectro de correlación heteronuclear.
Ht60	leucemia promielocítica humana.
H ₂ O	agua.
IR	espectroscopía de infrarrojo.
J	constante de acoplamiento.
KB	carcinoma nasofaríngeo humano.
LI	límite inferior.
LS.	límite superior.
mg	miligramos.
MeOH	metanol.
MHz	megaHertz..
mL	mililitro.
msnm	metros sobre el nivel del mar.
NADH	nicotín-adenina deshidrogenasa.
ppm	partes por millón.
RMN- ¹ H	espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
RMN- ¹³ C	espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono.
s	singulete.
t	triplete.
THF	tetrahidrofurano.
TMS	tetrametilsilano.
9PS	leucemia linfocítica
δ	desplazamiento químico.
μg	microgramos.
v _{max}	número de onda donde se observa un máximo de absorbancia.

RESUMEN.

Las plantas de la familia *Annonaceae* desde hace algunos años han sido ampliamente estudiadas por ser fuentes potenciales de sustancias con diversas actividades biológicas, entre las que se incluyen la actividad antineoplásica, antiprotozoaria, antihelmíntica, antimicrobiana, inmunosupresora y antialimentaria, entre otras.

Recientemente los estudios químicos y biológicos de esta familia de plantas han conducido al aislamiento de una serie de sustancias denominadas en forma genérica como acetogeninas, las que presentan citotoxicidad contra *Artemia salina* L., actividad que parece estar relacionada con algunos efectos antitumorales

En este trabajo se realizó el estudio químico de *Annona diversifolia* Saff (Ilama), orientado al aislamiento de sustancias citotóxicas para *Artemia salina* L., permitiendo aislar por primera vez en dicha especie, mediante cromatografías sucesivas y por caracterización mediante datos espectroscópicos, una serie de metabolitos del tipo de los ésteres triglicéricos y al ácido 15-octadecenoico, los que fueron inactivos en el modelo biológico de prueba. Además, se aisló una acetogenina identificada como laherradurina, la que presentó alta toxicidad contra *Artemia salina* L., con una CL_{50} de 0.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Así mismo, el derivado triacetilado de la laherradurina perdió la actividad tóxica de la molécula, mientras que la apertura del anillo de la γ -lactona disminuyó en un 50 % la citotoxicidad de la misma.

La *Annona diversifolia* Saff. (Ilama) es una fuente potencial de sustancias citotóxicas del tipo de las acetogeninas, las que representan un recurso natural de potencial importancia en la búsqueda de sustancias con actividad antineoplásica. Además es la segunda fuente natural de la que han sido aisladas acetogeninas del subtipo 3.

1. Introducción.

En los últimos años la química de los productos naturales ha centrado su atención en la localización e identificación de compuestos con actividad biológica, los que han sido aislados de plantas utilizadas en forma tradicional, adquiriéndose valiosa información química, biológica, taxonómica, médica y agrícola (Evans, 1991).

La búsqueda de nuevos recursos vegetales plantea a la investigación dos tareas primordiales: 1) la realización de inventarios de recursos disponibles y 2) la explotación de aquellos recursos que posean un elevado valor económico, originando perspectivas de uso dentro de los marcos tecnológicos, biológicos y económicos de las sociedades presentes y futuras (Cedillo, 1990)

De esta forma, la investigación de la bioactividad de los recursos naturales debe establecerse de manera interdisciplinaria, basada primordialmente en la etnobotánica, la farmacología y la fitoquímica, dado que estudios unilaterales conducen a resultados sin aplicación práctica (Navarrete, 1992). Estas disciplinas plantean, el estudio de las principales formas de empleo de las plantas por los grupos étnicos, sin pretender el uso irracional de los recursos, sino resolver o proponer mecanismos de solución para problemas esenciales como son la alimentación y la salud del hombre (Cedillo, 1990, Martínez, 1996).

En este sentido toma importancia el estudio fitoquímico y biológico de la familia de las *Annonaceas*, la cual tradicionalmente ha sido utilizada por sus propiedades alimenticias y medicinales, siendo empleada en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, en el tratamiento de enfermedades parasitarias infecciosas como el paludismo,

la amibiasis y en el tratamiento de enfermedades microbianas. Así como, por presentar actividad citotóxica y biocida importante.

El estudio químico de la familia *Annonaceae*, ha conducido al aislamiento de sustancias de diversa naturaleza química, con propiedades biológicas interesantes, lo que en muchos casos justifica el uso tradicional que se ha dado a las mismas; por ello, esta familia de plantas es considerada como una fuente potencial de sustancias con importantes propiedades farmacológicas

Por lo antes expuesto, la investigación química y biológica de *Annona diversifolia* Saff., especie estudiada por primera ocasión en este estudio, tiene por objeto la caracterización de sustancias naturales con actividad biológica potencial, para ello se realizó el estudio biodirigido de la actividad citotóxica empleando el modelo de letalidad en *Artemia salina* L.

2. FUNDAMENTO TEORICO.

2.1. Las plantas medicinales y la salud en México.

El panorama de la salud en México y en general en los llamados países subdesarrollados presenta características alarmantes. Ya no solamente son las enfermedades derivadas de las condiciones de hacinamiento y mala higiene, como lo son las parasitosis y las enfermedades de vías respiratorias, o bien, las derivadas de una alimentación deficiente; hoy en día, estos países afrontan altos índices de enfermedades que en otro tiempo fueron catalogadas como del primer mundo (Tabla 1).

Los casos de pacientes con diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades isquémicas, trastornos cerebro-vasculares, cáncer y muchas otras, aumentan estadísticamente todos los días. La morbilidad de enfermedades publicadas por el Sistema Nacional de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México, no presentó disminución en 1996 con respecto a los casos publicados en el año de 1995; apreciando aumentos del 60 al 80 % en el caso de enfermedades cerebro-vasculares, enfermedades respiratorias, diabetes e hipertensión arterial. Además la morbilidad del cáncer cervico-uterino y la hepatitis viral tipo A, aumentó en más del 100 % (SSA, 1996)

La mortalidad por casos de cáncer se convirtió en México en la segunda causa de muerte desde 1994, constituyendo un problema de salud pública, que presenta una tendencia ascendente, la que de persistir, conducirá a una duplicación de los casos de muerte cada 20 años o menos (SSA, 1996)

TABLA 1. MORBILIDAD DE ENFERMEDADES PUBLICADAS POR EL SISTEMA NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA DE LA SECRETARIA DE SALUD DE MEXICO

ENFERMEDAD	CASOS PUBLICADOS 1995 ¹	CASOS PUBLICADOS 1996 ²	AUMENTO EN EL NUMERO DE CASOS PUBLICADOS (%)
DIABETES	97 506	154 186	58.13
CANCER CERVICO UTERINO	1 757	3 452	96.47
HEPATITIS VIRAL TIPO A	5 510	11 122	101.85
HIPERTENSION ARTERIAL	134 773	239 672	77.83
ENFERMEDADES ISQUEMICAS DEL CORAZON	16 504	28 761	74.27
ENFERMEDADES CEREBRO-VASCULARES	12 472	19 838	59.06
INFECCIONES RESPIRATORIAS	7 111 232	12 531 301	76.22
ENFERMEDADES DIARREICAS	1 966 828	3 329 114	69.26
SIDA	4 296	4 194	-2.4
AMIBIASIS	564 620	945 393	67.44
INFECCIONES INTESTINALES DEBIDAS A OTROS ORGANISMOS Y LAS NO DEFINIDAS	1 277 060	2 196 748	72.02

¹ Total de casos acumulados en la República Mexicana durante 1995² Total de casos acumulados en la República Mexicana durante 1996

La distribución global de estos casos de cáncer -definido como un acelerado crecimiento de células anormales- manifiesta un predominio en el género femenino, en una relación de casi dos a uno; sin embargo, cabe destacar que dicho predominio se establece en función al mayor número de casos de neoplasias malignas en la mujer entre 25 y 59 años, ya que en las edades extremas de la vida, la relación muestra una frecuencia mayor de casos para el sexo masculino (SSA, 1996).

Lo inaccesible a los sistemas de salud pública y los altos costos económicos que significa la utilización de las instituciones privadas, propicia que la población haga uso de recursos tradicionales en la búsqueda de solución a padecimientos como el cáncer. Se ha estimado que aproximadamente dos terceras partes de la población, sin acceso a las instituciones de salud, hace uso de la medicina tradicional basada en el empleo de plantas, cuyo conocimiento se ha transmitido a través del tiempo por los curanderos o médicos tradicionales de generación en generación.

En este contexto, muchas de las sustancias obtenidas de las plantas son una alternativa para el tratamiento de algún tipo de cáncer (Cassady *et al.*, 1990). El taxol, aislado de *Taxus brevifolia* y un derivado químico conocido como taxotere representan antineoplásicos potentes para el tratamiento del cáncer de ovario, tracto gastrointestinal, seno, pulmón y cuello (Choi *et al.*, 1994). Actualmente ambos compuestos son comercializados con el nombre de Paclitaxel y Docetaxel por las compañías farmacéuticas Bristol-Myers Squibb Co y Rhône-Poulenc Rorer, respectivamente (Seki y Furasaki, 1996).

Algunos alcaloides como la vincalécoblastina y la vincristina tienen actividad antineoplásica apreciable en el tratamiento de la leucemia. Así mismo el N-óxido de indicina, aislado de *Heliotropium indicum*, ha demostrado tener actividad biológica en

varios sistemas tumorales de experimentación (Farnsworth, 1992) Las flavonas cirsimaritina, chrysoeriol, hispidulina y chrysin, aisladas de *Eriodictyon californicum*, al inhibir el metabolismo y la activación de agentes carcinogénicos a concentraciones de 10 µg/mL, presentan una opción más en la búsqueda de agentes antineoplásicos de origen natural (Liu *et al.*, 1992).

2.2. Usos tradicionales de las plantas de la familia *Annonaceae*.

Esta familia de plantas posee importancia económica por la comercialización de sus frutos y por la producción de aceites esenciales para la industria de perfumería (Estrada, 1994), además varias especies son empleadas en la medicina tradicional; las infusiones de corteza, hojas o raíces de algunas de ellas han sido utilizadas para aliviar fiebres y en el tratamiento de desordenes intestinales tales como la disentería, diarrea y cólicos, en el tratamiento de la disipela y para aliviar malestares por dislocaciones o torceduras; además se describe su uso como antiprotozoario, antineoplásico y en el tratamiento de la diabetes (Villamar *et al.*, 1994; Saito, 1994)

2.3. Fitoquímica y actividad biológica de la familia de las *Annonaceas*.

La *Annona diversifolia* Saff. (ilama), pertenece a un género que desde hace algunos años ha sido ampliamente estudiado por ser fuente potencial de sustancias naturales que poseen importantes actividades biológicas, tales como. actividad antineoplásica, antiprotozoaria, antihelmíntica, antimicrobiana, inmunosupresora, antialimentaria y actividad insecticida (Cavé *et al.*, 1993).

De acuerdo con la información descrita actualmente en la literatura, no existen estudios fitoquímicos y biológicos previos que refieran a la ilama, con excepción de un

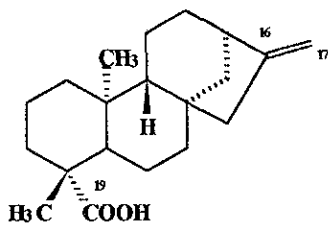
estudio bromatológico (Estrada, 1994). Sin embargo existen estudios químicos y biológicos de otras especies de este género, que ejemplifican su importancia

De *Annona squamosa*, se han aislado compuestos diterpénicos como el ácido kaur-16-en-19-oico 1, el ácido epi-kauran-19-al-17-oico 2 (Figura 1) (Domínguez y Peraza, 1990), el 17-hidroxi-19-kauranal, el kauren-19-ol, el kauren-19-al, el acetato de 19-kaurenil y el 17-acetoxi-19-kauranal y algunos sesquiterpenos como el β -cariofileno (Bohlmann y Rao, 1973) y derivados del mismo (Villamar *et al.*, 1994)

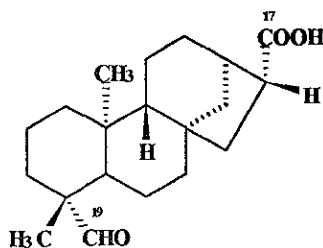
Además de *Annona squamosa* se han identificado sustancias del tipo de los flavonoides como la quercetina 3 (Figura 1) y algunos glicósidos de ésta, los cuales parecen poseer importante actividad farmacológica, justificando el uso en la medicina tradicional (Seetharaman, 1986).

Algunos alcaloides como la anonaina 4, roemerina 5 (Figura 1), norlaurelina, norcoridina, norisocoridina, isocoridina y glaucina (Bhakuni *et al.*, 1972), así como la (-)-xilopina, la (+)-O-metilarmepavina y la lanuginosina también han sido aislados de extractos obtenidos de hojas de *Annona squamosa*, los que han presentado una importante actividad antineoplásica (Bhaumik *et al.*, 1979)

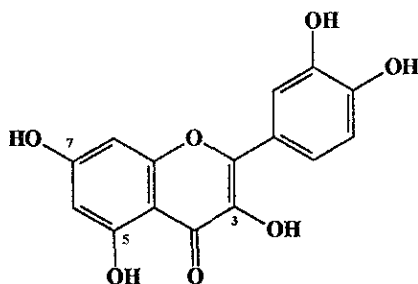
Así mismo, estudios fitoquímicos efectuados a *Annona crassiflora*, han permitido el aislamiento e identificación de acetogeninas como la araticulina, bioactiva *in vitro* contra células tumorales (Santos *et al.*, 1996); las annotemoyina-1 6 y -2 7, (Figura 1) aisladas del extracto metanólico obtenido de las semillas de *Annona atemoya*, han presentado un efecto citotóxico en *Artemia salina* L. (Duret *et al.*, 1996).



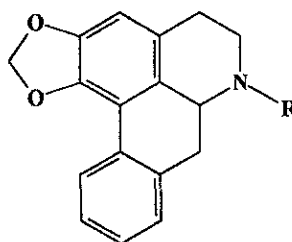
Acido kaur-16-en-19-oico 1



Acido epi-kauran-19-al-17-oico 2

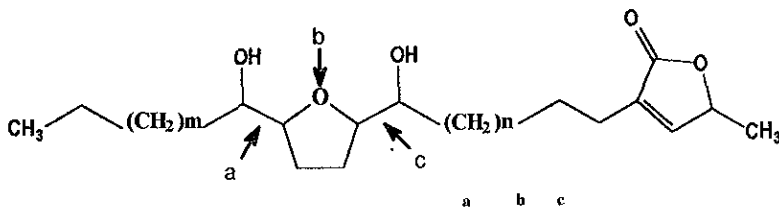


Quercetina 3



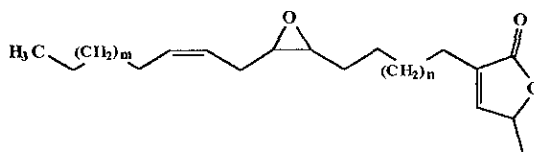
Anonaina R=H 4

Roemerina R=CH₃ 5



Annotemoyina-1 n= 10, m= 6 treo / trans / treo 6

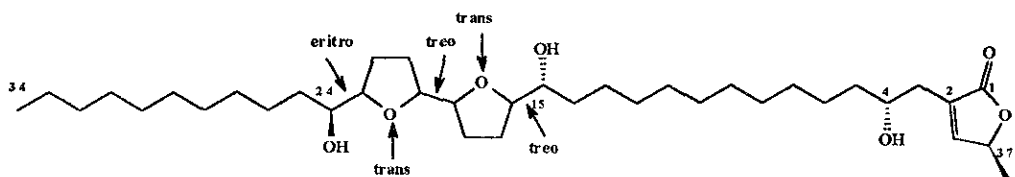
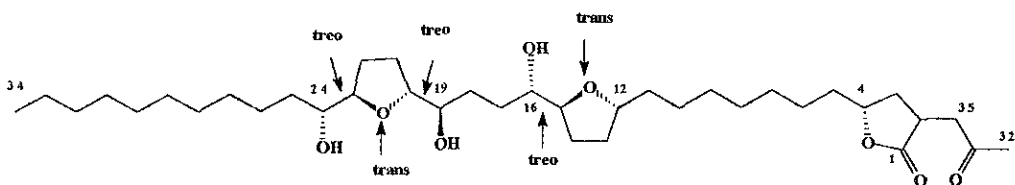
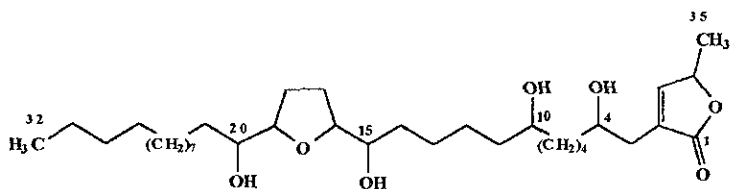
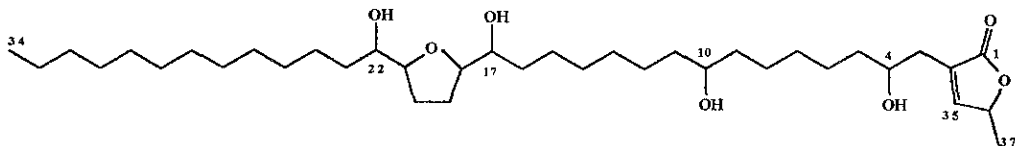
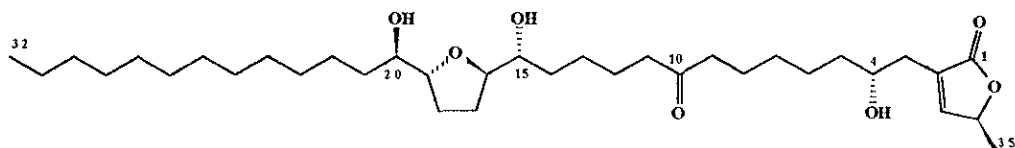
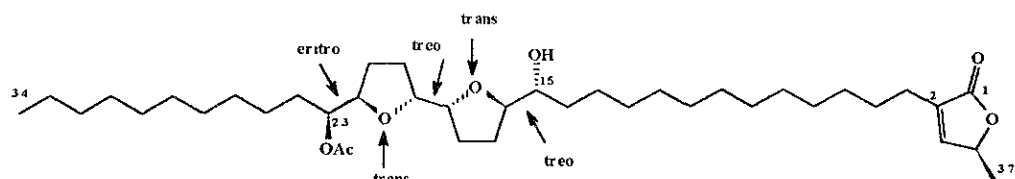
Annotemoyina-2 n= 10, m= 6 treo / trans / eritro 7



Epomurecina A: m= 10, n= 8 8

Epomurecina B: m= 8, n= 10 9

FIGURA 1. ALGUNOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA DE LAS ANNONACEAS.

**Bulatacina 10****Isobulatacina 11****Annonacina 12****Annomontacina 13****Annonacinona 14****Uvaricina 15****FIGURA 1a. ALGUNOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA DE LAS ANNONACEAS.**

Todas las acetogeninas presentan en mayor o menor grado una actividad citotóxica significativa en el crustáceo *Artemia salina* L. y a las líneas celulares tumorales VERO y KB, en el rango de concentración de 10^{-1} a 10^{-12} $\mu\text{g/mL}$ (Cavé *et al.*, 1997).

Las acetogeninas epomurecinas A **8** y B **9** (Figura 1), aisladas de las semillas de *Annona muricata* (Roblot *et al.*, 1993), presentaron actividad tóxica en células tumorales del carcinoma nasofaríngeo humano (9KB) a CL_{50} de 2 y 10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Gu *et al.*, 1995)

De tal forma, en la búsqueda de agentes antineoplásicos, varias especies del género *Annona* juegan un papel de suma importancia al presentar actividad antitumoral en modelos de experimentación (Tabla 2). La bulatacina **10** e isobulatacina **11** (Figura 1a) presentaron actividad a 50 y 400 $\mu\text{g/kg/día}$ en células leucémicas L1210, implantadas en conejo (Cavé *et al.*, 1997). Al implantarse por vía subcutánea células A2780 de carcinoma de ovario humano en conejos, se consigue una inhibición del 68 % en el crecimiento tumoral, a dosis de 0.1 mg/kg/día para la bulatacina **10** (Figura 1a), respecto al 78 % de inhibición obtenido al administrar una dosis de 5 mg/kg/día de cisplatino como referencia (Cavé *et al.*, 1997).

TABLA 2. ACTIVIDAD CITOTOXICA DE ALGUNAS ACETOGENINAS EN LINEAS CELULARES DE CANCER HUMANO (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$)

Acetogeninas	Lineas celulares			
	PC3	MCF7S	SKOV3	HT29
Annonacina	6.1	4	10	>10
Isoannonacina	4.2	1	10	>10
Rolliniastatina	9	2	>10	>10
Squamocina	2	1.7	1.7	3.9

Además, las acetogeninas annonacina **12**, annomontacina **13** y annonacinona **14**, aisladas de *Annona montana* (Figura 1a), resultaron activas al evaluarse en células

leucémicas L1210 y líneas celulares del adenocarcinoma humano MDA-MB231 y MCF7 (Jossang *et al.*, 1991) La uvaricina **15** (aislada de *Uvaria acuminata*) (Figura 1a) presenta actividad antitumoral a 1.4 mg/kg/día en células leucémicas 3PS implantadas en conejo (Cavé *et al.*, 1997).

Sin embargo, una limitante en el empleo de acetogeninas es su estrecho margen de seguridad, en general se ha demostrado que las isoacetogeninas (isorolliniastatina, DL₅₀ 200 mg/kg) son menos tóxicas que las correspondientes acetogeninas (rollinistatina, DL₅₀ 5 mg/kg), pero eventualmente su actividad citotóxica también disminuye, no obstante representan una opción viable en el campo terapéutico de los antineoplásicos (Cavé *et al.*, 1997).

Por otra parte, dentro del amplio espectro de la actividad biológica, los extractos de *Annona muricata* y *Annona cherimolia* presentan actividad antiparasitaria contra *Entamoeba histolytica*, *Trichomona vaginalis* y *Nippostrongylus brasiliensis* (Tabla 3) (Bories *et al.*, 1991). Además ha sido descrita la actividad antipalúdica de algunas acetogeninas frente al agente etiológico *Plasmodium falciparum*. La serie de acetogeninas llamadas ulecinas (aisladas de *Rollinia ulei*) han presentado actividad *in vitro* contra *Leishmania donovani* con un buen índice terapéutico (Cavé *et al.*, 1997) Y algunas otras acetogeninas aisladas de *Annona senegalensis*, presentaron actividad a concentraciones mínimas efectivas en el rango de 25 a 50 µg/mL, ante los parásitos *Leishmania major*, *L. Donovan* y *Trypanosoma brucei* (Sahpaz *et al.*, 1994).

De forma similar, las acetogeninas aisladas de *Annona muricata* y *Annona cherimolia* poseen actividad filaricida contra *Molinema dessetae* (Tabla 3) (Bories *et al.*, 1991).

TABLA 3. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS OBTENIDOS
DE SEMILLAS DE *Annona muricata* y *Annona cherimolia* (CL₅₀ µg/mL)

Sustancia	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Trichomona vaginalis</i>	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>		<i>Molnema dessetae</i>		<i>Artemia salina</i> L.
<i>Annona muricata</i> *	>100	30	D ₁ 20	D ₄ 26	D ₁ 25	D ₇ 6	40
<i>Annona cherimolia</i> *	>100	15	5	3	8	2	20
Metronidazol **	1.25	2.5	-	-	-	-	-
Ivermectina**	-	-	0.8	0.2	1.3	0.27	-

* Extracto metanólico. ** Sustancia de referencia

La actividad antibacteriana y antifúngica ha sido descrita en las especies de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Proteus* y los hongos *Candida* y *Trichophyton* (Cavé *et al.*, 1984; Padmaja *et al.*, 1993). Por otra parte, la actividad como agente biocida ha sido descrita para extractos de las plantas y acetogeninas puras, entre las que se incluyen a la annonina, bulatacina, asimicina, squamacina, goniothalamicina y sylvaticina entre otras, sobre las especies *Aphis gossypii* (500 ppm), *Epilancha varvestis* (50 ppm), larvas del mosquito *Aedes aegypti* (1 ppm) y algunas especies de *Drosophila* (Cavé *et al.*, 1997).

En la actualidad han sido aisladas e identificadas poco más de 160 acetogeninas, todas ellas de tan sólo 25 especies de los géneros *Annona*, *Asimina*, *Goniothalamus*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Xilopia*. Se han estudiado las semillas, las raíces, las hojas y los tallos de estas plantas (Gu *et al.*, 1995). Aproximadamente 90 acetogeninas han sido aisladas del género *Annona* (Zafra-Polo *et al.*, 1996)

2.4. Características químicas de las acetogeninas.

Las acetogeninas son una clase de compuestos químicos relativamente nuevos y que han cobrado gran importancia debido a las actividades farmacológicas que presentan,

se considera que son derivados de la biosíntesis de los ácidos grasos (Cavé *et al.*, 1997).

Las moléculas de las acetogeninas tienen en común factores estructurales tales como: una cadena alquílica de 35 a 37 átomos de carbono, con una γ -lactona terminal, varios grupos funcionales oxigenados (anillos de tetrahydrofurano, epóxidos, hidroxilos, grupos cetónicos) y la posible presencia de dobles enlaces (Figura 2) (Cavé *et al.*, 1993)

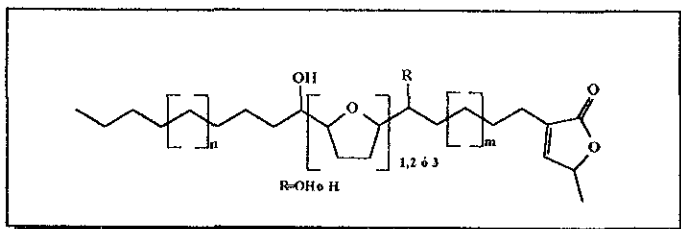


FIGURA 2. ESTRUCTURA BASE DE LAS ACETOGENINAS

Las acetogeninas se han clasificado por el número y la posición de los anillos de tetrahydrofurano en los tipos A a la E, correspondiendo al tipo A un anillo de THF, como la anohexocina **16**, el tipo B presenta dos anillos adyacentes, tal es el caso de la narumicina **17**, el tipo C muestra dos anillos aislados por cuatro átomos de carbono, y cuyo ejemplo es la gigantecina **18**; el tipo D presenta tres anillos de THF adyacentes, como en el caso de la gonicina **19** y por último, el tipo E, es caracterizado por la ausencia de anillos de tetrahydrofurano (diepomuricanina **20**), este último caso se considera como uno de los precursores metabólicos de las acetogeninas (Figura 3) También se clasifican en función de la naturaleza química de la γ -lactona terminal en los subtipos 1a, 1b, 2 y 3 (Figura 4), es decir, el subtipo 1a muestra una metil γ -lactona α,β -insaturada, mientras que el subtipo 1b presenta una metil γ -lactona α,β -

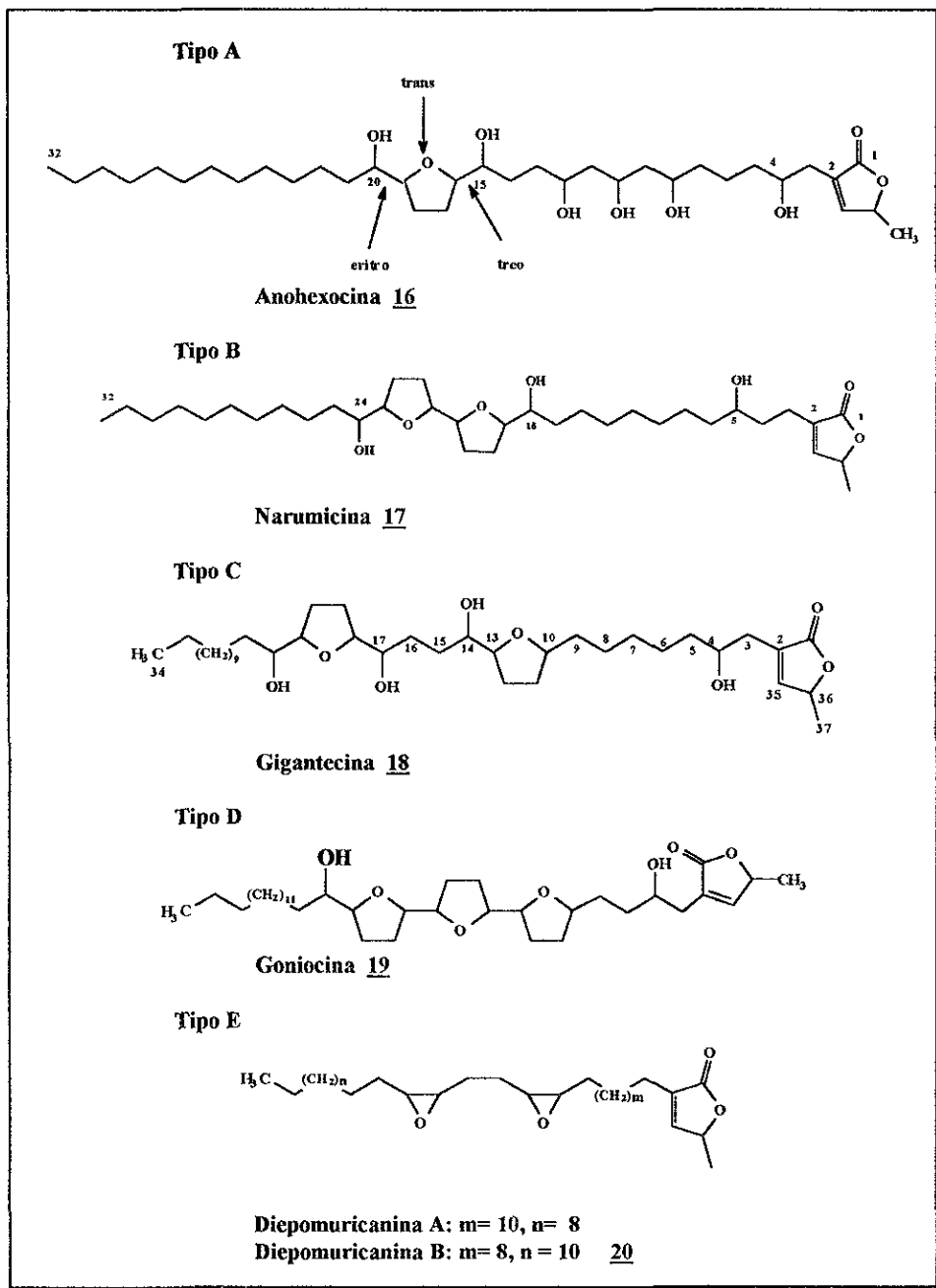


FIGURA 3. CLASIFICACION DE LAS ACETOGENINAS POR LA POSICION Y EL NUMERO DE ANILLOS DE TETRAHIDROFURANO (THF).

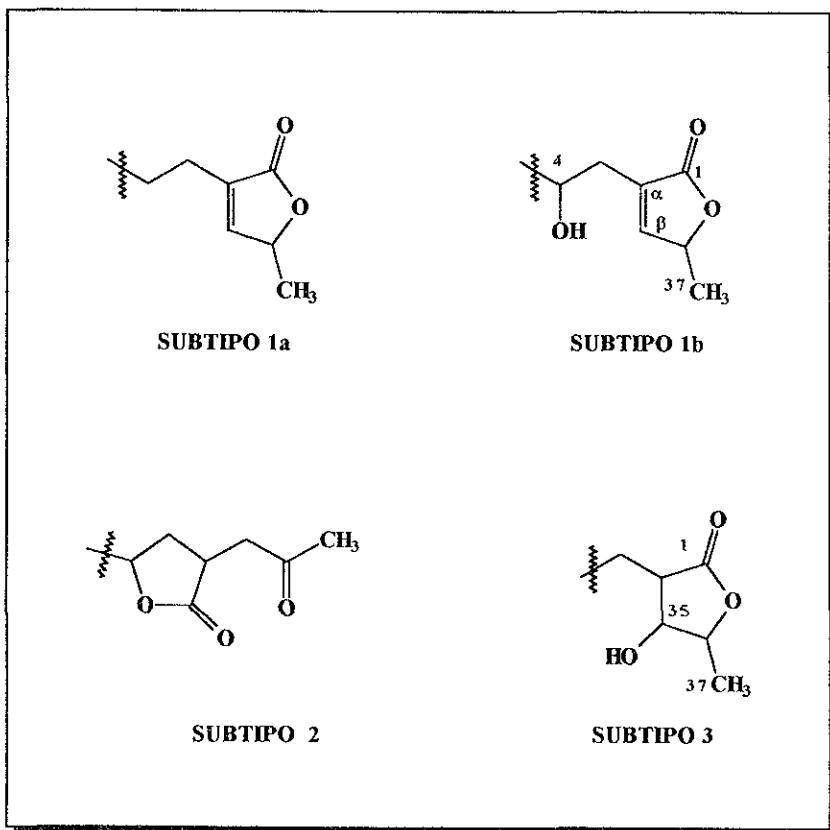


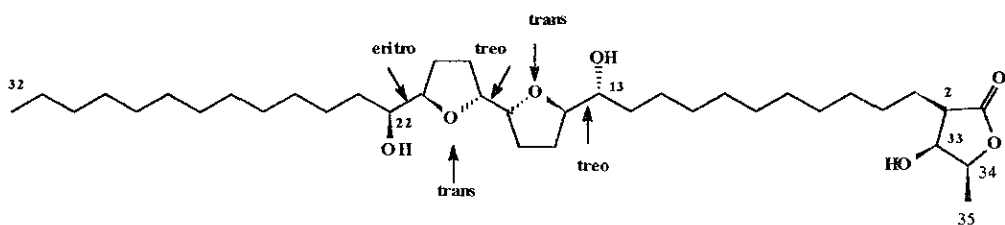
FIGURA 4. CLASIFICACION DE LAS ACETOGENINAS DE ACUERDO A LAS CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LA γ -LACTONA.

insaturada, con un grupo funcional hidroxilo en la posición C-4 de la cadena alquímica, situada en α respecto al anillo de la γ -lactona. El subtipo 2, denominado como metilcetona γ -lactona (isoacetogeninas) ha sido propuesto como un artefacto ocasionado durante los procesos de separación y purificación debido a reordenamientos estructurales (Duret *et al.*, 1994, Rupprecht *et al.*, 1990, Zeng *et al.*, 1996). El subtipo 3, denominado hidroxil-metil γ -lactona, el cual es considerado precursor de las lactonas del subtipo 1, es el grupo de acetogeninas más reducido y actualmente solo se conocen 4 acetogeninas de este tipo: la itrabina **21**, la jeteína **22**, la laherradurina **23** (Cortes *et al.*, 1991) y la otivarina **24** (Figura 5) (Cortes *et al.*, 1993).

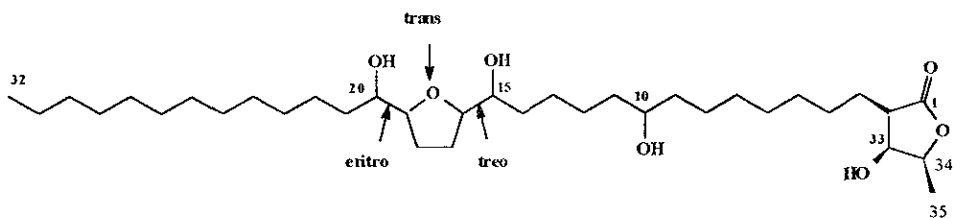
2.5. Relación estructura-actividad de las acetogeninas.

Al evaluar los datos de actividad biológica de las acetogeninas y correlacionarlas con su estructura química, es posible establecer las siguientes consideraciones generales (Figura 6) (Fang *et al.*, 1993)

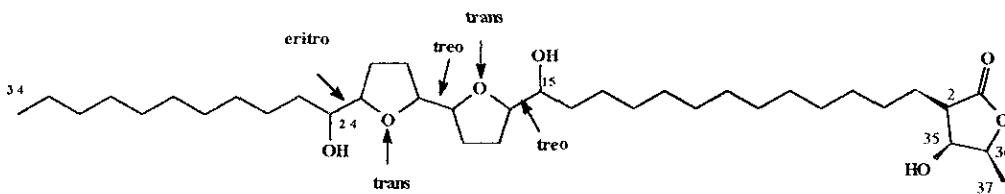
1. En todos los casos las acetogeninas del tipo B son más activas que los tipos A, C y E, en ese mismo orden (Figura 3).
2. La γ -lactona es esencial para la actividad; la reducción del doble enlace en la γ -lactona insaturada reduce la actividad, el tipo A2 (cetolactona) es menos potente que las γ -lactonas α,β -insaturadas.
3. La presencia de grupos hidroxilos en la molécula es básico para presentar actividad. Los grupos hidroxilo en la posición 4, 28 y 32 de la cadena alquímica incrementan la actividad.



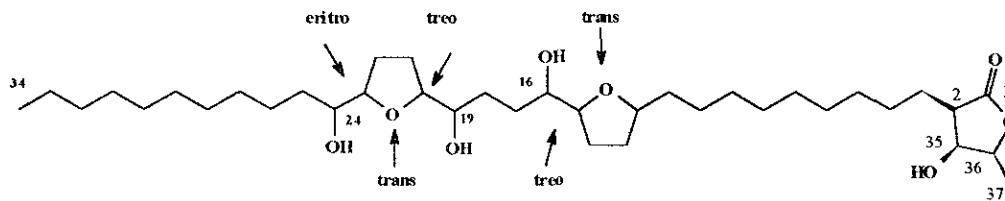
Itrabina 21



Jeteína 22



Laherradurina 23



Otivarina 24

FIGURA 5. ACETOGENINAS DEL SUBTIPO 3, LAS QUE PRESENTAN UN GRUPO FUNCIONAL HIDROXILO EN LA POSICION β - DEL ANILLO DE LA γ -LACTONA.

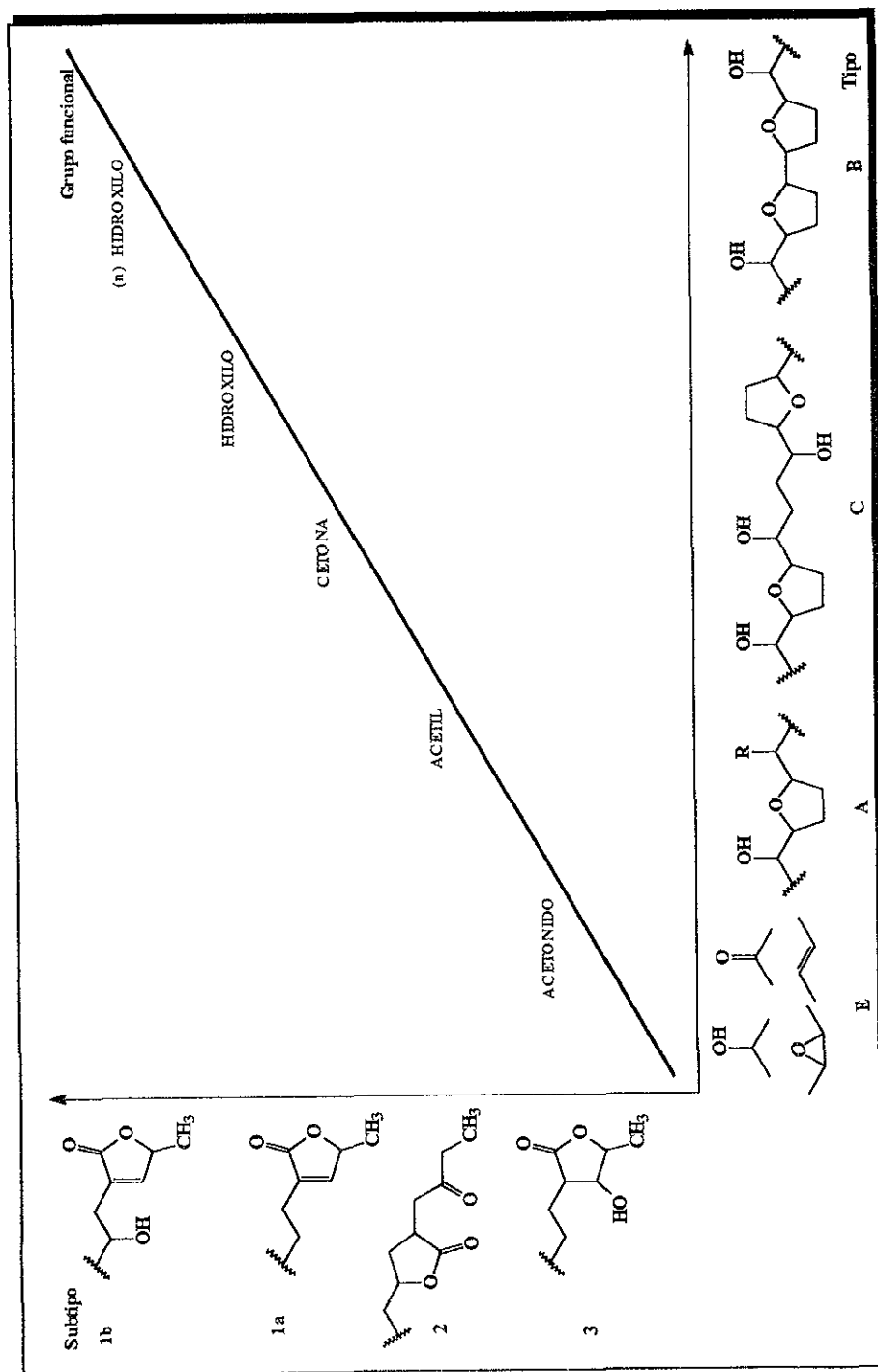


FIGURA 6. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CITOTOXICA DE LAS ACETOGENINAS (Cavé et al., 1997).

4. Compuestos con grupos carbonilo en la cadena alquílica son menos activos que sus análogos hidroxilados, y la reducción de los carbonilos a alcoholes incrementa la actividad
5. La presencia de dobles enlaces y/o hidroxilos vecinales en la cadena alquílica incrementan la actividad
6. Derivados acetónidos de hidroxilos vecinales, derivados de acetato y otras sustituciones de los grupos hidroxilo producen compuestos con actividad menor que sus análogos.

2.6. Mecanismo de acción de las acetogeninas.

El mecanismo de acción postulado para las acetogeninas aisladas de *Annonaceas*, está relacionado con la inhibición de la enzima NADH:ubiquinona oxidoreductasa, enzima esencial en el denominado Complejo I, durante el proceso de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias; interrumpiéndose el transporte de electrones (ETS) y en consecuencia la producción de ATP (Trifosfato de adenosina), provocando la rápida disminución de los niveles de energía en la célula (Gu *et al*, 1995; Zafra-Polo *et al*, 1996).

Londershausen y colaboradores, observaron que larvas de *Plutella xylostella* tratadas con acetogeninas, incrementaban los períodos de letargo, disminuían su movilidad y finalmente morían; presentando una disminución importante en los niveles de ATP, similar al efecto producido por la Antimicina A, un inhibidor del transporte de electrones (ETS), reduciendo los valores hasta en 30% menos de los niveles de ATP del control (Tabla 4) La experimentación directa en preparaciones de enzimas mitocondriales obtenidas de insectos, músculo cardíaco de bovino y células musculares

TABLA 4. NIVELES DE ATP³ EN LARVAS DE *Plutella xylostella* TRATADAS CON ACETOGENINAS Y AGENTES INSECTICIDAS (Gu et al., 1995).

Compuesto	Dosis (ng)	LT ₅₀ ⁴ (horas)	ATP (μmoles/g peso húmedo)
Control	--	--	1.98 ^a
Paration ^c	500	2	2.00 ^b
Ciflutrina ^d	10	2	2.25 ^b
Antimicina ^e	1x10 ⁵	5	1.35 ^b
Squamocina	2x10 ⁵	8	1.45 ^b

^a Promedio (n=19) con una desviación estándar de ± 0.19.

^b Valores derivados de la interpolación, cuyo error puede ser asumido en el rango de las desviaciones estándar del control.

^c Inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa.

^d Efectores de canales de sodio.

^e Inhibidor del sistema de transporte de electrones.

TABLA 5. INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES EN PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES DE MUSCULO DE *Lucila cuprina* (Gu et al., 1995).

Sustancia Inhibidora	IC ₅₀ (nmoles/mg proteína)		
	NADH ubiquinona oxidoreductasa	Succinato-citocromo C-reductasa	α-glicerofosfato citocromo C-reductasa
Squamocina	4-8	>200	>200
Rotenona ^a	20	>200	>200
Antimicina A ^a	--	3-6	3-6
Cianuro ^b	>200	>200	>200

^a Inhibidor del sistema de transporte de electrones.

^b Desacoplador del sistema de transporte de electrones.

³ Trifosfato de adenosina

⁴ Tiempo al cual mueren el 50 % de los organismos de prueba.

de *Lucilia cuprina*, tratadas con squamocina, presentaron inhibición en la enzima NADH-ubiquinona-oxidoreductasa a concentraciones de 4-8 nmoles/mg de proteína, es decir, 60-80 % menos de la concentración requerida por la rotenona, un inhibidor mitocondrial del Complejo I (Tabla 5) (Gu *et al.*, 1995)

La inhibición en el consumo de oxígeno fue reversible por la adición de α -glicerofosfato, y al adicionarse un transportador de electrones artificial (Dihidrocloreto de N,N,N,N'-tetrametil-p-fenilenediamina, TMPD), se restauró el flujo electrónico, haciendo evidente el efecto sobre el Complejo I en la mitocondria (Fang *et al.*, 1993)

La actividad antineoplásica de las acetogeninas en células tumorales resistentes a multifármacos, se explica por la dependencia que existe entre la síntesis de la proteína P-170, cuya función consiste en expulsar a los fármacos antitumorales al espacio extracelular, y la existencia de altos niveles de ATP, los cuales se encuentran disminuidos por la inhibición del Complejo I en la mitocondria (Gu *et al.*, 1995).

Un segundo modo de acción propuesto para las acetogeninas de *Annonaceas*, fue sugerido por Morré y colaboradores, al encontrar que la bulatacina inhibe la actividad de la enzima NADH-oxidasa en células tumorales de leucemia promielocítica humana (HL-60) y carcinoma cervical humano (HeLa), ambos resistentes al tratamiento con adriamicina, pero no inhibe la enzima en las células sanas; atribuyendo el efecto a estímulos debidos a la presencia de hormonas y factores de crecimiento (Gu *et al.*, 1995)

Weinberg y colaboradores, describieron la inhibición de las contracciones del íleon de cobayo por extractos de *Annona crassiflora*, especulando que el efecto era debido a

una disminución en la permeabilidad del ion calcio (Ca^{2+}), el cual requiere energía (ATP) para ser transportado al interior de la célula (Weinberg *et al*, 1993) Posteriormente, se informó la capacidad de algunos modelos sintéticos de acetogeninas, para formar complejos estables con el ion calcio (Ca^{2+}) (Sasaki *et al*, 1994).

2.7. Descripción botánica de *Annona diversifolia* Saff. (Ilama).

La ilama o *Annona diversifolia* Saff, es una planta que pertenece a la familia de las *Annonaceas*, que se conoce también como “papauce” en el estado de México (Estrada, 1994) Es un árbol pequeño, con alturas hasta de 7.5 m, es delgado y su tronco no mide más de 25.4 cm de diámetro, con una corteza gris oscuro, surcada longitudinalmente. Las hojas son elípticas a oblongas, redondeadas en el ápice, delgadas y lisas por arriba y glaucas por debajo. Las flores son solitarias, de color marrón o amarillo-verdoso teñidas de rojo y de 2.5 cm de longitud (Estrada, 1994)

El fruto es ovoide-globoso con protuberancias cortas, su superficie es áspera y el color varía de verde pálido a rosa magenta La pulpa es aromática, blanca o rosada y comestible, posee un sabor dulce ligeramente ácido y suele presentar hasta 60 semillas grandes de color ocre por fruto (Estrada, 1994).

La ilama es originaria de las montañas y laderas de México, Guatemala y El Salvador; crece en altitudes no mayores a los 600 msnm. En México se le puede encontrar en huertas familiares, principalmente en los estados de Colima, Guerrero y el Estado de México, es conocida también como “ilama zapote” o “zapote de vieja”, mientras que

del istmo de Tehuantepec a Centroamérica se le conoce como “papauce” o “anona blanca” (Tabla 6) (Estrada, 1994).

2.8. Ensayo con *Artemia salina* L.

La experimentación en animales de laboratorio constituye una fase fundamental en la investigación previa y cercana al complejo organismo que sufre el padecimiento. Aún cuando las primeras investigaciones se realizaron en perros, gatos y roedores, obteniéndose información importante con respecto a las sustancias evaluadas, factores como dificultad en el manejo, el número de animales insuficiente, así como la emisión de regulaciones sobre la protección a las especies han limitado el uso de estos (Tsusumi y Shibayama, 1995)

Por ello se han desarrollado modelos para demostrar la actividad biológica de las sustancias nuevas. El crustáceo *Artemia salina* L., como modelo de actividad citotóxica fue empleado por Meyer y colaboradores para la evaluación de extractos crudos, fracciones y sustancias puras (Meyer *et al.*, 1982). Este organismo permite el desarrollo de un método rápido, barato y sin grandes requerimientos de equipo. El modelo es reproducible y proporciona resultados confiables con un intervalo de confianza del 95 por ciento (Meyer *et al.*, 1982)

El modelo no es específico para demostrar actividad antitumoral o alguna otra actividad farmacológica, sin embargo, es apreciable que de 24 especies de plantas que presentaron actividad biológica contra células del tumor 9PS, 14 presentaron actividad citotóxica a *Artemia salina* L. (Meyer *et al.*, 1982)

TABLA 6. ESPECIES DEL GENERO *Annona* CLASIFICADAS EN EL MUNDO (Cavé *et al.*, 1997; Ruiz y Morret, 1997).

Especie	Nombre vulgar	Especies presentes en México	
		* Presente.	- Ausente.
<i>Annona atemoya</i>	-	-	
<i>Annona bullata</i>	-	-	
<i>Annona coriacea</i>	-	-	
<i>Annona crassiflora</i>	-	-	
<i>Annona cherimolia</i>	chirimoya	*	
<i>Annona densicoma</i>	-	-	
<i>Annona diversifolia</i>	ilama	*	
<i>Annona excelsa</i> ^A	-	*	
<i>Annona glabra</i> ^B	corcho	*	
<i>Annona glauca</i>	-	-	
<i>Annona globiflora</i> ^C	anona de monte	*	
<i>Annona liebmanniana</i>	-	*	
<i>Annona longiflora</i>	anona silvestre	*	
<i>Annona longipes</i>	-	*	
<i>Annona lutescen</i>	anona amarilla	*	
<i>Annona montana</i>	-	-	
<i>Annona muricata</i>	guanábana	*	
<i>Annona palmeri</i>	anonilla	*	
<i>Annona primigenia</i>	anona cimarrona	*	
<i>Annona purpurea</i> ^D	chinchuya	*	
<i>Annona reticulata</i>	anona colorada	*	
<i>Annona senegalensis</i>	-	-	
<i>Annona scleroderma</i>	chirimuya, poshté	*	
<i>Annona squamosa</i> ^E	saramuyo	*	

^A En este caso y en el de *A. liebmanniana*, se consideran como especies dudosas

^B Sinonimia *A. palustris* L.

^C Sinonimia *A. fruticosa* S.

^D Sinonimia *A. involocrata* B.

^E Sinonimia *A. cinerea* D

Por otra parte, en los estudios realizados con *Annonaceas*, se ha establecido que todas las acetogeninas aisladas e identificadas a la fecha, presentan actividad citotóxica en *Artemia salina* L. (Tabla 7). Por ello, el modelo hasta ahora descrito resulta como el más viable debido a su factibilidad para el rastreo biológico de las sustancias de interés (Cavé *et al.*, 1997).

TABLA 7. ACTIVIDAD CITOTOXICA DE ALGUNAS ACETOGENINAS EN EL MODELO DE *Artemia salina* L. (Cavé *et al.*, 1997; Ricsér *et al.*, 1993).

Acetogenina	CL ₅₀ (µg/mL) <i>Artemia salina</i> L.	Acetogenina	CL ₅₀ (µg/mL) <i>Artemia salina</i> L.
Asimicina	2.5x 10 ⁻¹	Vencenina	6.87x10 ⁻¹
Bulacina	7 0x10 ⁻²	Annonacina	0 3
Gigantetrocina-A	1.3	Annonacin-10-ona	1 4
Gigantetrocina-B	2.6	Isoannonacina	2.3
Longicina	0.11	Parviflorina	8.8x10 ⁻²
Gigantecina	3 4x10 ⁻²	Goniotamicina	0 24

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de plantas medicinales es una práctica ampliamente difundida en la población mexicana, representando una opción en el control y cura de enfermedades, y una descarga para la planeación de políticas de salud pública de los países en desarrollo

No obstante, sólo una minoría de las plantas utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de diversos padecimientos, poseen estudios farmacológicos que compueben los efectos terapéuticos reportados por la medicina tradicional, además carecen de estudios describiendo la composición química y los niveles tóxicos de estos, volviendo poco seguro el uso de las plantas. Por esto, es necesario promover las investigaciones fitoquímicas, farmacológicas, toxicológicas y etnobotánicas que permitan la utilización de los recursos disponibles

Frente a este panorama, el estudio fitoquímico biodirigido de *Annona diversifolia* Saff (ilama), plantea el aislamiento e identificación de sustancias con actividad citotóxica en el modelo de *Artemia salina* L, representando la ilama, un recurso natural antes no estudiado, perteneciente a un género donde han sido aisladas un elevado número de sustancias químicas con actividad antineoplásica, por lo que representa una fuente potencial de sustancias con actividad farmacológica

4. OBJETIVOS.

Los objetivos de este trabajo son:

4.1. Objetivo general.

Realizar el estudio fitoquímico biodirigido de las semillas de *Annona diversifolia* Saff. (Ilama) para aislar e identificar sustancias con actividad citotóxica en el modelo de *Artemia salina* L

4.2. Objetivos particulares.

Los objetivos particulares para este trabajo son:

1. Recopilar la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de *Annona diversifolia* Saff. (ilama)
2. Colectar los frutos de la planta y separar las semillas.
3. Preparar los extractos vegetales de acuerdo a la metodología convencional
4. Evaluar en el modelo de *Artemia salina* L. la actividad biológica citotóxica de los extractos crudos y fracciones
5. Aislar e identificar por sus propiedades físicas y químicas las sustancias presentes en extractos o fracciones activas de *Annona diversifolia* Saff (ilama).
6. Evaluar en el modelo de *Artemia salina* L. la actividad citotóxica de las sustancias puras aisladas y sus derivados químicos.

5. HIPOTESIS DE TRABAJO.

El presente trabajo se realizó a partir de la siguiente hipótesis. El estudio químico dirigido por la actividad letal sobre *Artemia salina* L de los extractos y sustancias de *Annona diversifolia* Saff. (ilama), permitirá aislar sustancias con actividad citotóxica.

6. METODOLOGÍA.

6.1. MATERIALES.

a) Material vegetal.

- Se utilizaron las semillas secas del fruto de *Annona diversifolia* Saff (llama)

b) Material para las extracciones, aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios.

- Cristalería y metal.

- Matraz Erlenmeyer de 50, 100, 500 y 1000 mL,
- columnas de vidrio de diferentes diámetros y longitudes,
- vasos de precipitados de 100, 250, 500 y 1000 mL,
- matraz bola de 250, 500 y 1000 mL 24/40 y 16/32,
- matraz fondo plano 5000 mL,
- probetas 10, 100 y 1000 mL,
- embudos de separación 250, 500 y 1000 mL,
- embudos de vidrio,
- refrigerantes 24/40 y 16/32,
- pipetas graduadas de 0.1, 1.0, 3.0, 5.0 y 10 mL,
- pipetas Pasteur,
- capilares de vidrio,
- frascos viales de 25 mL,
- embudo Buchner de porcelana,
- embudo Hirsch de porcelana,

- placa de toque,
- espátulas de níquel-cromo,
- soportes universales,
- pinzas de tres dedos con nuez y
- anillos de metal de diversos diámetros.

- Sustancias.

- Silica gel para columna (70-230 mallas ASTM, Merck),
- sulfato de sodio anhidro (Baker),
- sulfato cérico amónico (Baker),
- ácido sulfúrico (Baker)
- anhídrido acético (Baker),
- piridina (Baker),
- hidróxido de potasio (Baker),
- ácido fosfomolibdico (Baker) y
- cloruro de calcio (Merck)

- Disolventes ⁵

- Hexano, grado técnico,
- acetato de etilo, grado técnico,
- etanol, reactivo analítico (Baker),
- metanol, grado técnico,
- cloroformo, grado técnico, R.A. y USP (Merck),
- diclorometano, grado técnico,
- éter isopropílico, reactivo analítico y
- acetona, grado técnico

⁵ Los disolventes grado técnico fueron purificados por destilación fraccionada

- Material especial

- Cromatofolios PL de silicagel F₂₅₄ (Merck) y
- cromatofolios AL de silicagel F₂₅₄

- Equipo

- Rotavapor Buchi 461,
- balanza semianalítica OHAUS E 400,
- balanza analítica SAUTER 123,
- lámpara de UV 254/366 nm,
- balanza granataria OHAUS 700-800,
- aparato Fisher Jonhs IL 684,
- espectrofotómetro de IR Perkin-Elmer 1310,
- espectrómetro de masas Hitachi Perkin-Elmer RMU60,
- espectrómetro de RMN Varian-60A, 300A
- placa de calentamiento Lindbert JIB,
- estufa,
- canastilla de calentamiento y
- bomba de aire

c) Material para los bioensayos.

- Cristalería.

- Matraz Erlenmeyer de 50 mL,
- pipetas graduadas de 0.1, 1 0, 5 0 y 10 mL,
- pipetas Pasteur y
- frascos viales de 10 mL

- Material biológico.
 - Quistes deshidratados de *Artemia salina* L.

- Sustancias.
 - Sal de mar (Instant Oceans) y
 - agua destilada

- Equipo.
 - Balanza analítica SAUTER 123,
 - lámpara 60 watts,
 - tina para eclosión y
 - bomba de aire.

6.2. METODOS FITOQUIMICOS Y BIOLÓGICOS.

6.2.1. Material vegetal

El fruto de *Annona diversifolia* Saff (ilama), fue colectado en Tejupilco, Estado de México, en septiembre de 1996. Las semillas fueron separadas de la pulpa del fruto, lavadas y puestas a secar a temperatura ambiente. Una vez secas, fueron molidas y se procedió a la obtención de los extractos. Un ejemplar de la planta fue depositado en el Herbario de plantas útiles Efraim Hernández X de la Universidad Autónoma Chapingo.

6.2.2. Preparación de los extractos.

Las semillas secas y molidas (1.8 kg) se desengrasaron por maceración, por períodos de tres días (3 veces) con 4 litros de hexano, eliminando posteriormente el disolvente por destilación en rotavapor, obteniéndose 372 g de un aceite denso de color amarillo, el que corresponde a una mezcla de metabolitos del tipo de los ésteres triglicéricos, no tóxicos a *Artemia salina* L. El residuo vegetal resultante fue extraído por maceración (3 veces, 72 horas cada una) con 4 litros de metanol, una vez eliminado el disolvente se obtuvo un residuo sólido de color café (130 g), activo en el modelo de *Artemia salina* L.

El extracto fue redisolto en agua y se le efectuaron particiones líquido-líquido con hexano, diclorometano y acetato de etilo, posteriormente los disolventes fueron eliminados empleando un evaporador rotatorio (Figura 7), obteniéndose 9 g, 105 g y 15 g de extractos, respectivamente

6.2.3. Fraccionamiento cromatográfico.

Al evaluarse en el modelo de citotoxicidad de *Artemia salina* L, los residuos obtenidos de las particiones realizadas al extracto metanólico, la partición de diclorometano fue la más activa, procediendo a tomar 50 g en peso seco y fraccionando por cromatografía en columna, eluyendo con CH₂Cl₂-Metanol en proporciones crecientes, obteniéndose 100 fracciones de 150 mL cada una; realizando el seguimiento de la separación empleando placas analíticas, reveladas con luz UV y/o con solución de ácido fosfomolibdico al 5 % en etanol.

6.2.4. Fraccionamiento biodirigido.

Las fracciones obtenidas de la separación de la pCH₂Cl₂-MeOH⁶ fueron evaluadas en el modelo de *Artemia salina* L y aquellas cuya CL₅₀ fue menor a 30 µg/mL fueron resueltas por recromatografías sucesivas en columna de sílica gel, empleando las mezclas benceno-acetona y hexano-acetona en proporciones crecientes como fases eluyentes. Aquellas fracciones con peso menor a 50 miligramos o que presentaban

⁶ Partición de diclorometano realizada al extracto metanólico

- ª 1.8 kg de semillas.
- * Tres días con 4 litros de hexano, 3 veces.
- ** Tres días con 4 litros de metanol, 3 veces.

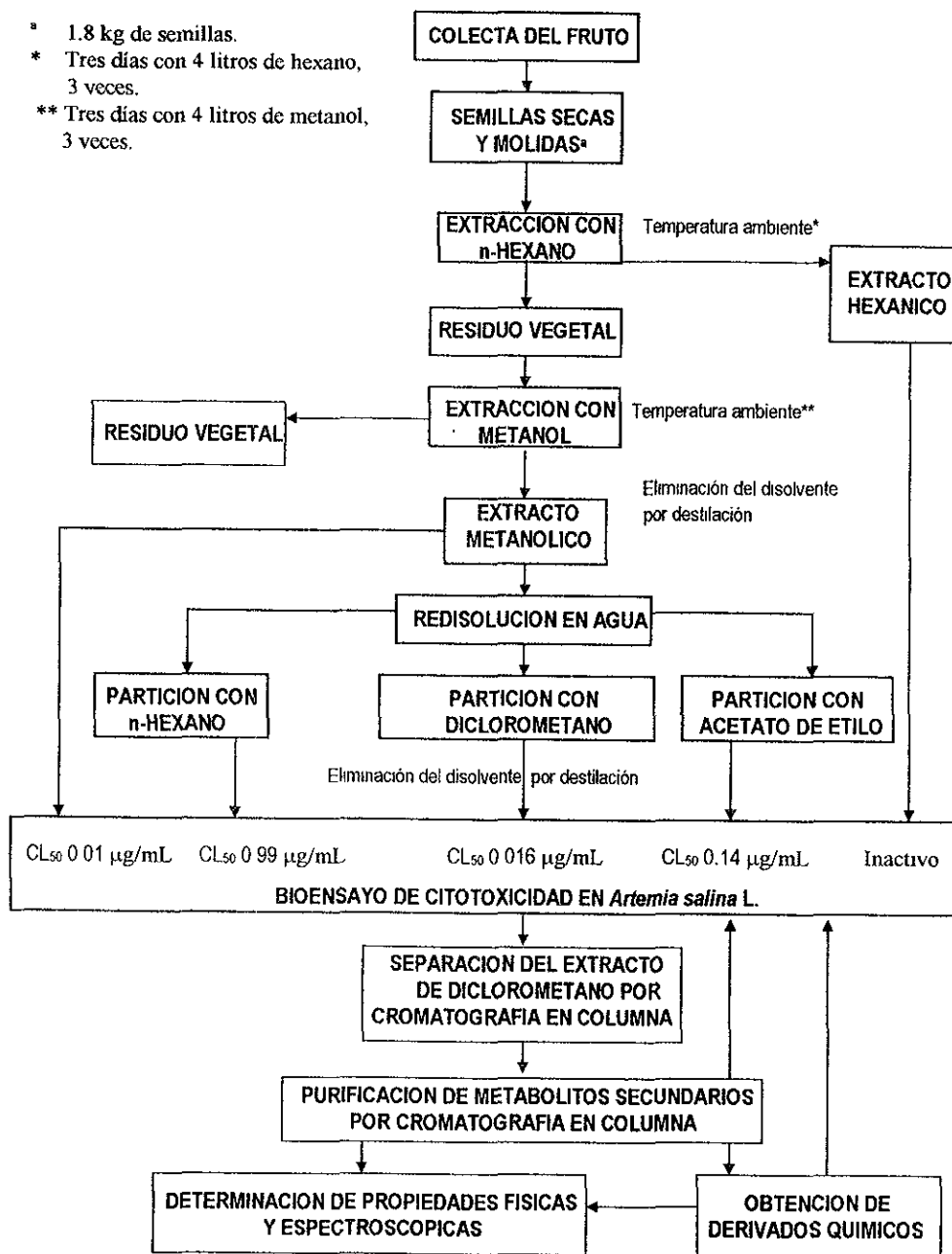


FIGURA 7. DIAGRAMA DE FLUJO DEL ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO DE *Annona diversifolia* Saff. (ilama)

inestabilidad química cuando eran resueltas por cromatografías en capa preparativa o en columna, fueron descartadas para posteriores separaciones.

De las fracciones eluidas con menor polaridad (F 7-9), se aisló una sustancia cristalina, la cual fue purificada por cromatografía en columna. La sustancia fue recristalizada en éter isopropílico y actualmente se encuentra en proceso la elucidación estructural

Las fracciones 51-53 (103 g) de la columna original eluida con la mezcla diclorometano-acetona (9:1), fueron lavadas con éter isopropílico para eliminar el color, resultando en un sólido amarillento (5g) con punto de fusión de 66-69 °C. Por análisis de su espectro de RMN-¹H y por cromatografía en capa fina (CCF) se estableció la presencia de al menos tres acetogeninas del tipo B3 en la mezcla. Posteriormente, las fracciones 51-53, fueron resueltas por recromatografías sucesivas, utilizando la mezcla benceno-acetona (4.1); realizando el seguimiento de la separación en placas analíticas de aluminio impregnadas de sílica gel, reveladas con luz UV y ácido fosfomolibdico al 5 % en etanol. De dichas separaciones, se aisló 1.1 g de un sólido de aspecto blanco, con punto de fusión de 80-82 °C; el que fue caracterizado como una acetogenina del tipo B3, identificada como la laherradurina⁷, de acuerdo a los datos espectroscópicos de RMN-¹H, RMN-¹³C, IR y EMIE de la sustancia y sus derivados

La recromatografía en columna de las fracciones 71-80 (300 mg), eluidas con la mezcla CH₂Cl₂-MeOH (9 1) permitió aislar 70 mg de una sustancia de aspecto graso, con punto de fusión 34-36 °C, cuyos datos espectroscópicos y espectrométricos, al ser comparados con el banco de memoria del espectrómetro de masas, permitieron caracterizarla como un ácido de 18 carbonos, con una insaturación en la posición C-15 de la cadena de alquilo, al que se denominó como el ácido 15-octadecenoico

⁷ Aislada por primera vez de semillas *Annona cherimolia* por Ríos y colaboradores en 1989

Así mismo, por datos de RMN-¹H se estableció la presencia de acetogeninas de los subtipos 1a, 1b y 3 en las fracciones 81-90, inestables cuando se resolvían por cromatografía en capa fina y en columna de sílicagel, por lo que se encuentran en proceso de separación por otras técnicas como CLAR.

6.2.5. Derivados químicos.

a) Obtención del derivado triacetilado de la laherradurina .

Se disolvieron 60 mg de la laherradurina en 0.8 mL de anhídrido acético y 0.8 mL de piridina (Cortes *et al* , 1993) La reacción se efectuó durante 48 horas, a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se adicionó un poco de agua fría. Posteriormente el producto de la reacción fue extraído con acetato de etilo (5 mL, 3 veces) y purificado por cromatografía en columna (sílica gel, benceno-acetona (4/1); rendimiento del 60 por ciento) El producto fue identificado por datos espectroscópicos de RMN-¹H, RMN-¹³C e IR

b) Derivado de la hidrólisis de la γ -lactona.

A temperatura ambiente y con agitación constante 80 mg de la laherradurina, 0.6 mL de metanol y 0.2 mL de hidróxido de potasio 2N, fueron puestos a reaccionar durante 96 h (Figura 8). El producto final con un punto de fusión de 70-72 °C, fue purificado

por cromatografía en columna de silicagel e identificado por datos de RMN-¹H y RMN-¹³C (78 %) (Born *et al.*, 1990).

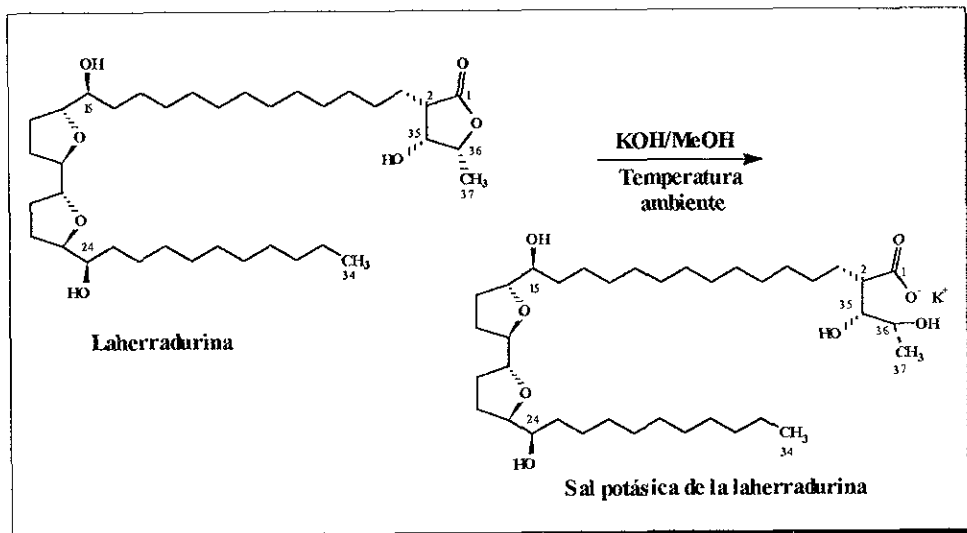


FIGURA 8. DERIVADO DE LA HIDROLISIS DE LA γ -LACTONA DE LA LAHERRADURINA (Born *et al.*, 1990)

6.2.6. Evaluación de la actividad biológica.

Cada extracto, fracción y sustancia pura fue evaluado en el modelo de la *Artemia salina* L. de acuerdo al siguiente procedimiento (Meyer *et al.*, 1982)

a) **Eclosión de los quistes de *Artemia salina* L.** 50 mg de quistes de *Artemia salina* L. fueron depositados en agua de mar artificial, e incubados por 48 horas a temperatura ambiente, situándolos cerca de una lámpara de luz (Meyer *et al.*, 1982) Después de este tiempo las larvas fototrópicas fueron colectadas y empleadas en el bioensayo

b) Preparación de las concentraciones de prueba. Las muestras se prepararon disolviendo 30 mg de extracto, fracción o sustancia pura en 3 mL de acetona, realizándose diluciones de esta solución hasta obtener las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL. En el vial de prueba se depositaron 0.5 mL de cada concentración, efectuando la operación por triplicado para cada nivel de concentración. El disolvente se eliminó por calentamiento en un baño de agua o mediante una corriente de aire seco. El lote control sólo contenía 0.5 mL del disolvente utilizado (Meyer *et al* , 1982)

c) Evaluación de los extractos y sustancias. Posteriormente, se depositaron 10 larvas de *Artemia salina* L. en los viales que contenían cada concentración de prueba, llevando a un volumen total de 5 mL con agua de mar, cuidando de mantener los viales cerca de una fuente de luz (temperatura ambiente). Los organismos muertos se cuantificarán a las 24 horas y se calculó la CL₅₀ mediante un programa de computo que hace uso del análisis de probits (Meyer *et al* ,1982)

7. Resultados.

7.1 Estudio químico.

En el estudio químico de las semillas de *Annona diversifolia* Saff, se lograron aislar de la partición de diclorometano, obtenida del extracto metanólico las sustancias enlistadas a continuación (Tabla 8):

Tabla 8. Sustancias aisladas del extracto metanólico de *Annona diversifolia* Saff.

Sustancia (Figura 9)	Estructura	Fórmula molecular	Peso molecular	Fracción eluida	Masa obtenida (mg)	Punto de fusión (°C)
*	-	-	-	7-9	24 (0.003 %) ^A	132-134
Laherradurma	I	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	624	51-53(80-100)	1100 (0.12 %) ^A	80-82
Acido 15-octadecenoico	II	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	71-80(35-50)	70 (0.008 %) ^A	32-34
**	III	-	-	81-90	-	-

* Sustancia en proceso de elucidación estructural

** Fracciones en proceso de resolución por CLAR

^A Porcentaje obtenido respecto al peso inicial de las semillas.

En la figura 9 se presentan las estructuras de los compuestos aislados de *Annona diversifolia* Saff (ilama)

Por otra parte, del extracto hexánico (372 g) obtenido de las semillas, se aisló una mezcla de metabolitos del tipo de los ésteres triglicéricos (rendimiento del 20.7 %), cuyos datos de RMN-¹H (CDCl₃, 60 MHz) son 0.9, 1.25-1.7, 1.8-2.4, 4.2 y 5.3 ppm

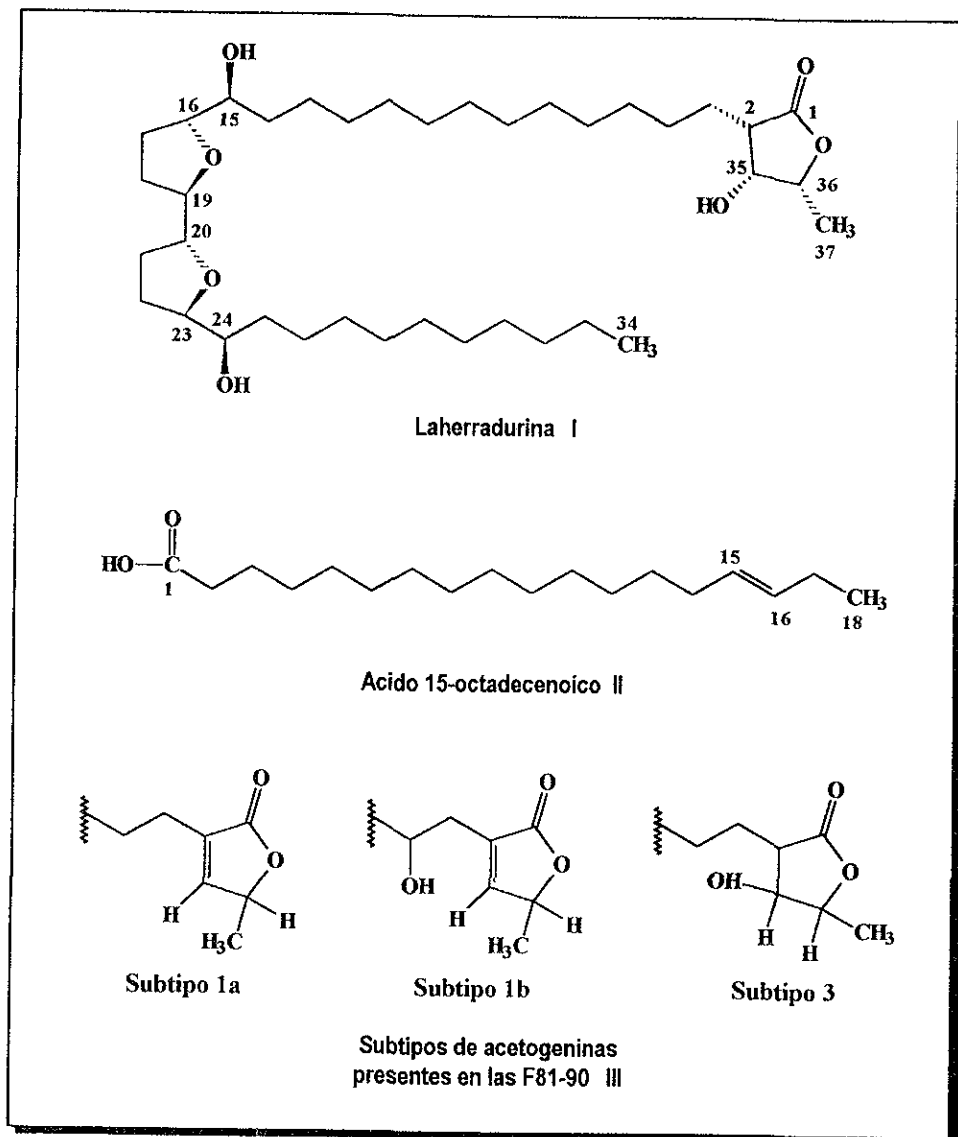


FIGURA 9. ESTRUCTURAS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS DE *Annona diversifolia* Saff. EN EL PRESENTE ESTUDIO.

• **Propiedades espectroscópicas de las sustancias aisladas.**

a. **Laherradurina (I)**, (Figura 9). Las señales presentadas por la laherradurina en IR y EMIE son las siguientes:

IR ν_{\max} CHCl_3 (cm^{-1}): 3590, 2910, 2850, 1765, 1455, 1370, 1360, 1300, 1055, 955, 670.

EM(IE) m/z (%). 435 (4), 417 (3), 399 (6), 383 (3), 365 (44), 347 (27), 313 (100), 295 (55), 285 (20), 267 (14), 241 (13), 223 (4), 205 (5), 141 (14), 97 (22)

En la tabla 9, se presentan las asignaciones de las señales en RMN- ^1H de la laherradurina, el derivado triacetilado y la sal potásica de dicha acetogenina y en la tabla 10, se presenta la asignación de las señales de RMN- ^{13}C para los mismos compuestos.

TABLA 9. Datos de RMN- ^1H de la laherradurina y derivados.
(δ , multiplicidad, J^8)

Hidrógeno	Laherradurina ($\delta, \text{CDCl}_3, 300 \text{ MHz}$)	Triacetato de la laherradurina ($\delta, \text{CDCl}_3, 300 \text{ MHz}$)	Sal potásica de la laherradurina ($\delta, \text{CDCl}_3, 300 \text{ MHz}$)
H-2	2.59(m, 5.6)	2.73	2.8(s)
H-3-14	1.25-1.89(m)	1.25-1.9	1.25-1.85
H-15	3.40	4.92	3.36
H-16	3.87(m)	3.97-3.99	3.92
H-17-18	1.9-2.0(m)	1.9-2.0	1.88-2.0
H-19	3.79-3.80(m)	3.90	3.82
H-20	3.79-3.80(m)	3.90	3.82
H-21-22	1.9-2.0(m)	1.9-2.0	1.88-2.0
H-23	3.87(m)	3.97-3.99	3.91
H-24	3.82	4.917	3.80
H-25-33	1.25-1.89(m)	1.25-1.9	1.25-1.85
H-34	0.88(t, 7)	0.88	0.88
H-35	4.17(dd, 1,5.6)	5.13	4.45
H-36	4.49(qd, 1,7)	4.49	4.45
H-37	1.38(d, 7)	1.4	2.15
-OCOCH ₃	-	2.04(s) 2.06(s) 2.08(s)	-

⁸ Valores de la constante de acoplamiento en Herz (Hz)

Triacetato de la laherradurina IR ν_{\max} CHCl_3 (cm^{-1}): 1760 (C=O, lactona), 1730 (C=O, éster)

TABLA 10. Datos de RMN- ^{13}C de laherradurina y derivados.
(δ , ppm)

Hidrógeno	Laherradurina (CDCl_3 , 300 MHz)	Triacetato de la laherradurina (CDCl_3 , 300 MHz)	Sal potásica de la laherradurina (CDCl_3 , 300 MHz)
C-1	177.6	176.3	182.51
C-2	43.8(d)	41.51	44.17
C-3	23.37(t)	21.20	24.49
C-4-14	22.68-33.27(t)	22.69-31.15	24.50-33.49
C-15	74.16(d)	75.84	76.62
C-16	83.25(d)	80.9-80.49	83.32
C-17-18	29.50-29.73(t)	29.32-29.60	29.38-29.88
C-21-22	29.50-29.73(t)	29.32-29.60	29.38-29.88
C-19	82.24-82.58(d)	81.21-81.64	82.61
C-20	82.24-82.58(d)	81.21-81.64	82.10
C-23	83.25(d)	80.09-80.49	82.89
C-24	71.46(d)	75.22	71.13
C-25	32.41(t)	31.92	32.95
C-26-32	22.68-33.27(t)	22.69-31.15	24.50-33.49
C-33	22.68(t)	20.74	24.49
C-34	14.12(q)	14.1	14.13
C-35	73.71(t)	75.22	74.36
C-36	82.80(t)	80.24	83.32
C-37	18.11(q)	18.03	22.69
-OCOCH ₃	-	170.24(q) 170.65(q) 170.93(q)	-

b. Acido 15-octadecenoico (II). A continuación se presentan los datos de las señales de IR y EMIE para el ácido 15-octadecenoico y en la tabla 11 los datos de RMN-¹H y RMN-¹³C para dicho compuesto

IR ν_{\max} CHCl₃ (cm⁻¹): 3300-2500, 2910, 2850, 1710, 1650, 1455, 1280, 940

EM(IE) (m/z, %): 282(4), 265(6), 264(25), 256(25), 236 (2), 213(23),185(22), 157(19), 149(25), 139(11), 129(47), 125 (22), 111(44), 83(91), 69(87), 60 (72), 57(100), 55(72), 45 (4), 43(61)

TABLA 11. Datos espectroscópicos del ácido 15-octadecenoico. (CDCl₃, 300 MHz)

Hidrógeno	RMN- ¹ H (δ , m, J*)	Carbono	RMN- ¹³ C (δ , m)
H-2	2.35(2H, t, J=7)	C-1	180.0(s)
H-14	2.01(2H, d, t, J=5.6)	C-2	34.09(t)
H-15	5.35(2H, dt, J=5.6, 3)	C-14	29.77(t)
H-16	5.35(2H, dt, J=5.6, 3)	C-15	130.03
H-17	1.53(J= 7)	C-16	129.73
H-18	0.88 (t, J=7)	C-17	31.19(t)
H-3-13	1.25-1.3	C-18	14.11(q)
		C-3-C-13	22.68-29.69(t)

* Constante de acoplamiento en Hz (J).

7.2. Estudio biológico.

La investigación de la citotoxicidad en *Artemia salina* L de los extractos obtenidos de semillas de *Annona diversifolia* Saff (ilama), se presenta en la tabla 12, además, en la figura 10 se muestran las curvas dosis-respuesta de este bioensayo

De la misma manera, para las fracciones del extracto de diclorometano, que resultó ser el más activo, se muestran en la tabla 13 y las curvas dosis-respuesta se presentan en las figuras 11 y 11a

TABLA 12. Bioensayo de citotoxicidad de *Annona diversifolia* Saff. en *Artemia salina* L.

Extracto	Concentración (µg/mL)										CL ₅₀	LI ⁹	LS ¹⁰	
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30				100
Porcentaje de muertes														
Hexánico	NO ACTIVO										-	-	-	
Metanólico	0	15	61	77	94	100	-	-	-	-	-	0.01	6.61 X10 ⁻³	1.61 X10 ⁻²
¹¹ Partición de hexano	0	-	10	-	20	-	43.33	-	76.7	-	100	0.99	0.39	2.52
¹¹ Partición de diclorometano	0	10	53.3	68.2	86.7	100	-	-	-	-	-	0.0159	8.29 X10 ⁻³	3.05 X10 ⁻²
¹¹ Partición de acetato de etilo	0	-	16.7	-	30	-	86.7	-	100	-	-	0.1391	5.72 X10 ⁻²	0.34
¹¹ Partición acuosa	-	-	-	-	0	-	20	-	36.7	-	100	9.14	2.6	32.3

⁹ (LI) Límite inferior al 95 % de confianza

¹⁰ (LS) Límite superior al 95 % de confianza

¹¹ Particiones realizadas al extracto metanólico.

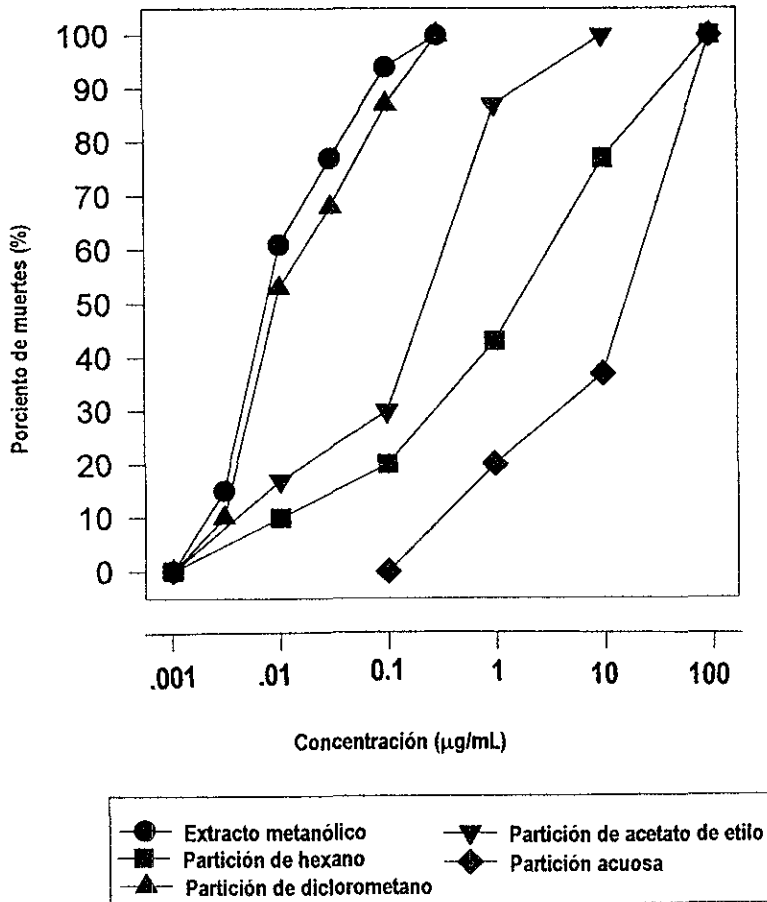


FIGURA 10. CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *Annona diversifolia* Saff. EN EL MODELO DE *Artemia salina* L. El extracto metanólico presentó una CL_{50} de 0.01 µg/mL, mientras que la partición de diclorometano mostró una concentración letal media (CL_{50}) de 0.016 µg/mL, resultando ser las de mayor bioactividad durante el estudio

TABLA 13. Bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* L. de las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica del extracto de partición de diclorometano de *Annona diversifolia* Saff.

Fracciones	Concentración (µg/mL)										CL ₅₀	LI	LS
	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30					
	Porcentaje de muertes												
1-50	No tóxicas												
51-53	-	-	-	0	13	57	100	-	-	-	2.43	1.47	4.01
54	0	3	43	57	77	100	-	-	-	-	0.22	0.14	0.36
55	0	13	33	73	100	-	-	-	-	-	0.14	8.60 x10 ⁻²	0.22
56-60	0	23	53	83	97	100	-	-	-	-	9.39 x10 ⁻²	6.14 x10 ⁻²	0.14
61	0	13	57	77	100	-	-	-	-	-	0.10	6.45 x10 ⁻²	0.16
62	0	7	33	73	100	-	-	-	-	-	0.15	9.55 x10 ⁻²	0.23
63	-	0	43	57	90	100	-	-	-	-	0.19	0.12	0.31
64	0	23	57	90	100	-	-	-	-	-	7.71 x10 ⁻²	4.91 x10 ⁻²	0.121
65-70	-	0	10	23	43	63	77	100	-	-	2.21	1.27	3.84
71-80	-	0	13	50	73	87	100	-	-	-	0.43	0.27	0.68
81-85	-	-	0	7	27	80	100	-	-	-	1.41	0.91	2.19
86-90	-	0	0	7	17	83	100	-	-	-	1.56	1.05	2.32
91-100	-	-	0	13	33	63	83	100	-	-	1.87	1.17	2.99

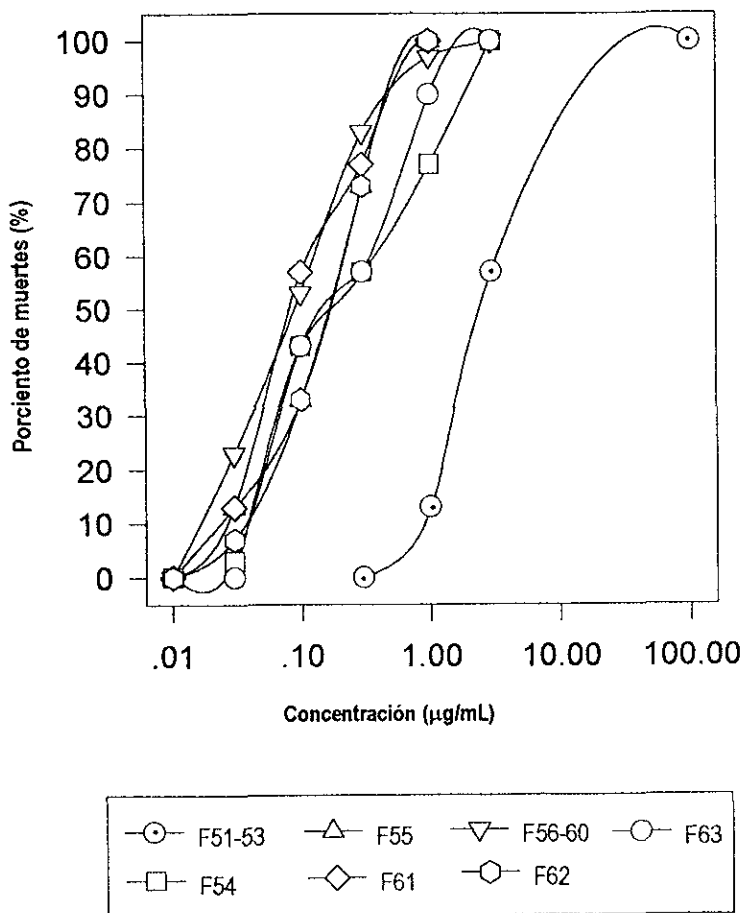


FIGURA 11. CITOTOXICIDAD EN *Artemia salina* L. DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LA PARTICION DE DICLOROMETANO. El rango de CL_{50} de las fracciones aisladas (7.71×10^{-2} µg/mL-2.43. µg/mL), al ser mayor que la CL_{50} del extracto original. Sugiere un posible efecto sinérgista, o bien, la suma de actividades de las sustancias presentes.

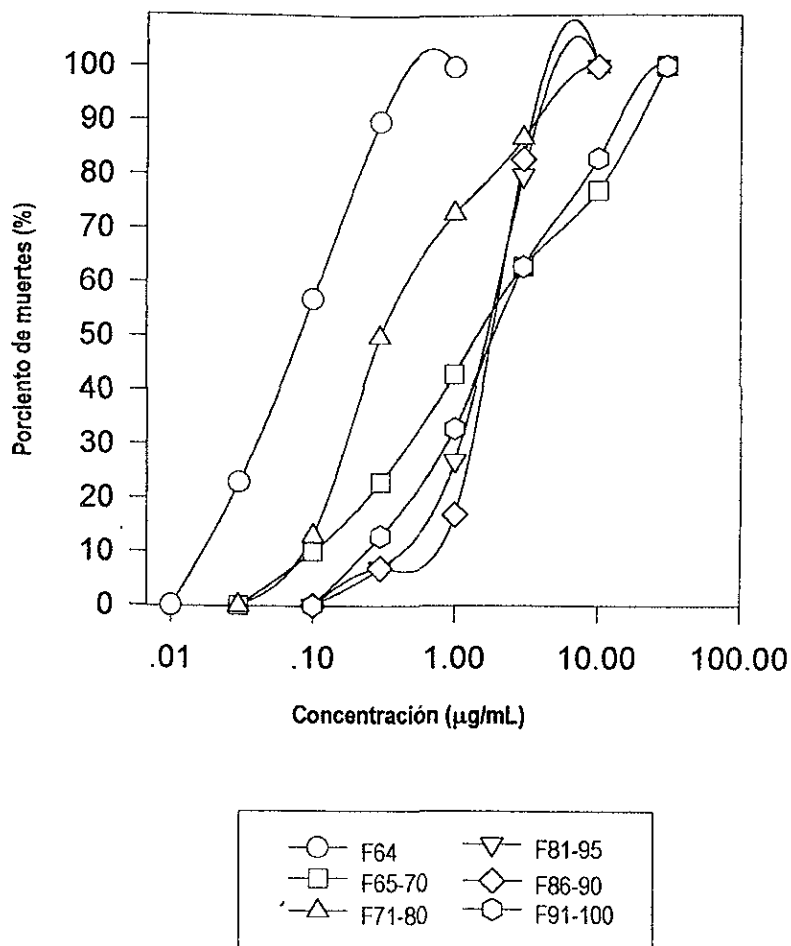


FIGURA 11a. CITOTOXICIDAD EN *Artemia salina* L. DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LA PARTICION DE DICLOROMETANO. El rango de CL₅₀ de las fracciones aisladas (7.71×10^{-2} µg/mL-2.43. µg/mL), al ser mayor que la CL₅₀ del extracto original. Sugiere un posible efecto sinérgista, o bien, la suma de actividades de las sustancias presentes.

El fraccionamiento anterior condujo al aislamiento de la laherradurina como uno de los principios activos del extracto de diclorometano. En la tabla 14, se presentan los datos de toxicidad para *Artemia salina* L. de las fracciones de las cuales se aisló la laherradurina, la toxicidad de la laherradurina misma y de sus derivados; en la figura 12, se presenta la curva dosis-respuesta para esos datos

TABLA 14. Citotoxicidad en *Artemia salina* L. de la laherradurina y derivados químicos.

Sustancia	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)								CL_{50} (ng/mL)	LI	LS
	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100			
Porcentaje de muertes											
F51-53 ¹²	-	-	0	13	57	100	-	-	2.43	1.47	4.01
F51-53R ¹³	-	0	13	63	83	100	-	-	0.88	0.57	1.38
Laherradurina	0	7	33	63	83	100	-	-	0.65	0.41	1.01
Sal potásica de la laherradurina	0	23	33	43	57	67	83	100	1.3	0.69	2.42
Triacetato de la laherradurina	No tóxico								-	-	-

La mezcla de ésteres triglicéricos y el ácido 15-octadecenoico no presentaron actividad citotóxica en *Artemia salina* L.

¹² Fracciones de las cuales fue aislada la laherradurina

¹³ Las F51-53 fueron lavadas con éter isopropílico, resultando en un residuo sólido amarillento.

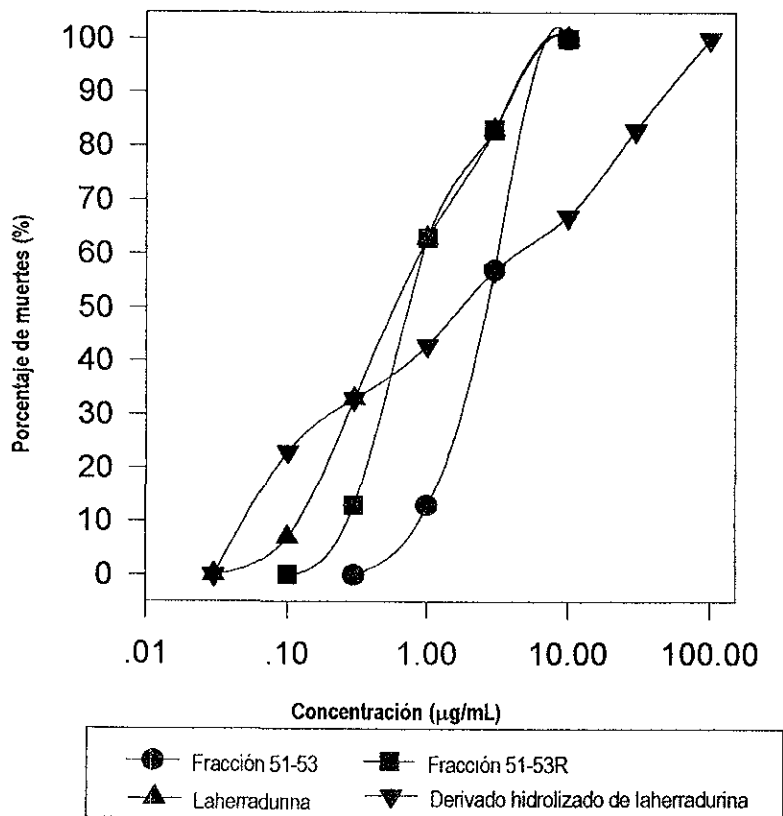


FIGURA 12. CITOTOXICIDAD DE LAHERRADURINA Y DERIVADOS QUIMICOS EN *Artemia salina* L. La citotoxicidad de laherradurina disminuyó en un 50% al hidrolizar la γ -lactona, mientras que la esterificación de los grupos hidroxilo inhibió totalmente la bioactividad de la molécula.

8. DISCUSION DE RESULTADOS.

8.1. ESTUDIO QUIMICO.

• De la extracción con hexano, se aisló un aceite denso, amarillo claro, en cuyo espectro de RMN-¹H, aparece una señal múltiple a δ 5.3, asignada a protones del tipo vinilo, cuya constante de acoplamiento ($J < 1$) supone una disposición espacial de tipo cis. En δ 4.2, se observa una señal múltiple asignada a los protones del tipo metileno unidos a un átomo de oxígeno y al protón de metino del esqueleto de la glicerina. Las señales que se muestran de δ 1.25 a δ 2.4, corresponden a los protones de la cadena alquílica; en tanto que el triplete en δ 0.9 fue asignado a los protones de grupos metilo terminales (Espectro 1).

Con base a los datos espectroscópicos y por comparación con datos publicados en la literatura, se estableció que la naturaleza del aceite, corresponde a una mezcla de ésteres triglicéricos (Joseph-Nathan y Díaz, 1970) (Figura 13)

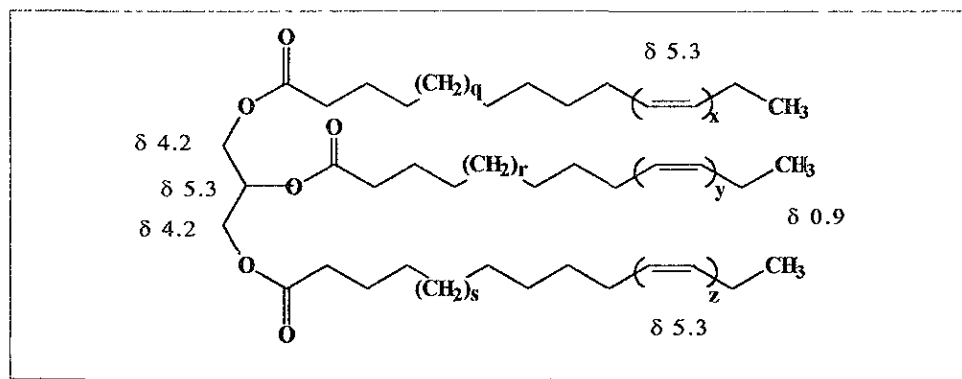
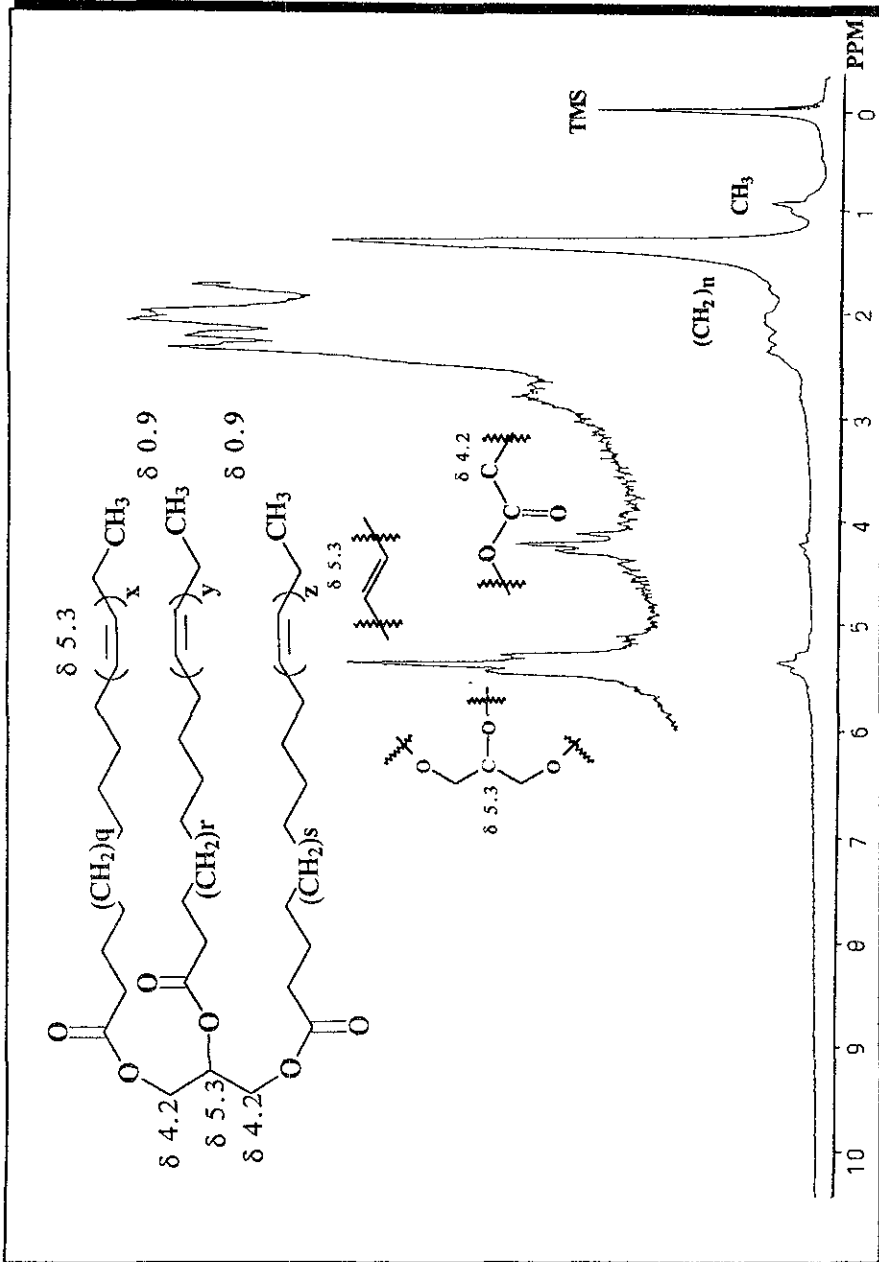


FIGURA 13. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS ESTERES DE TIPO TRIGLICERICO.



Espectro 1. Espectro de RMN-1H (60 MHz, CDCl3, TMS) de la mezcla de ésteres triglicéricos.

• De las fracciones 51-53, de la columna original eluida con diclorometano-acetona (9:1), se observó un compuesto abundante por CCF. Este compuesto fue purificado por recromatografías sucesivas, utilizando benceno-acetona (4:1); obteniéndose un sólido blanco con punto de fusión de 80-82 °C. En el espectro de IR (Espectro 2) se observó una banda de absorción en 3590 cm^{-1} , que indica la presencia de grupos hidroxilo en la molécula, también se observó una vibración en 1765 cm^{-1} que se asignó al grupo carbonilo de la γ -lactona (Silverstein *et al.*, 1991)

En el espectro de RMN- ^1H (Espectro 3) se observan a campo bajo un conjunto de señales en δ 4.49 (1H, qd, $J= 1, 7\text{ Hz}$) y en δ 4.17 (1H, dd, $J= 1, 7\text{ Hz}$), las cuales fueron asignadas a los protones base de oxígeno de la γ -lactona mencionada. Estos datos fueron comparables a los descritos para otras metil- γ -hidroxi lactonas en acetogeninas del subtipo 3, como en los casos de la itrabina y jeteína (Figura 14, Cortes *et al.*, 1991).

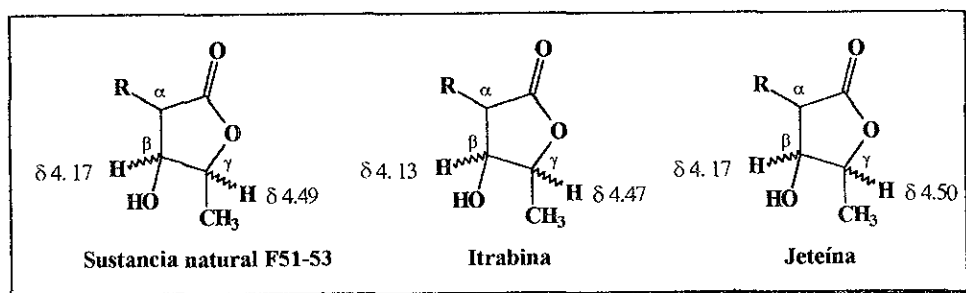
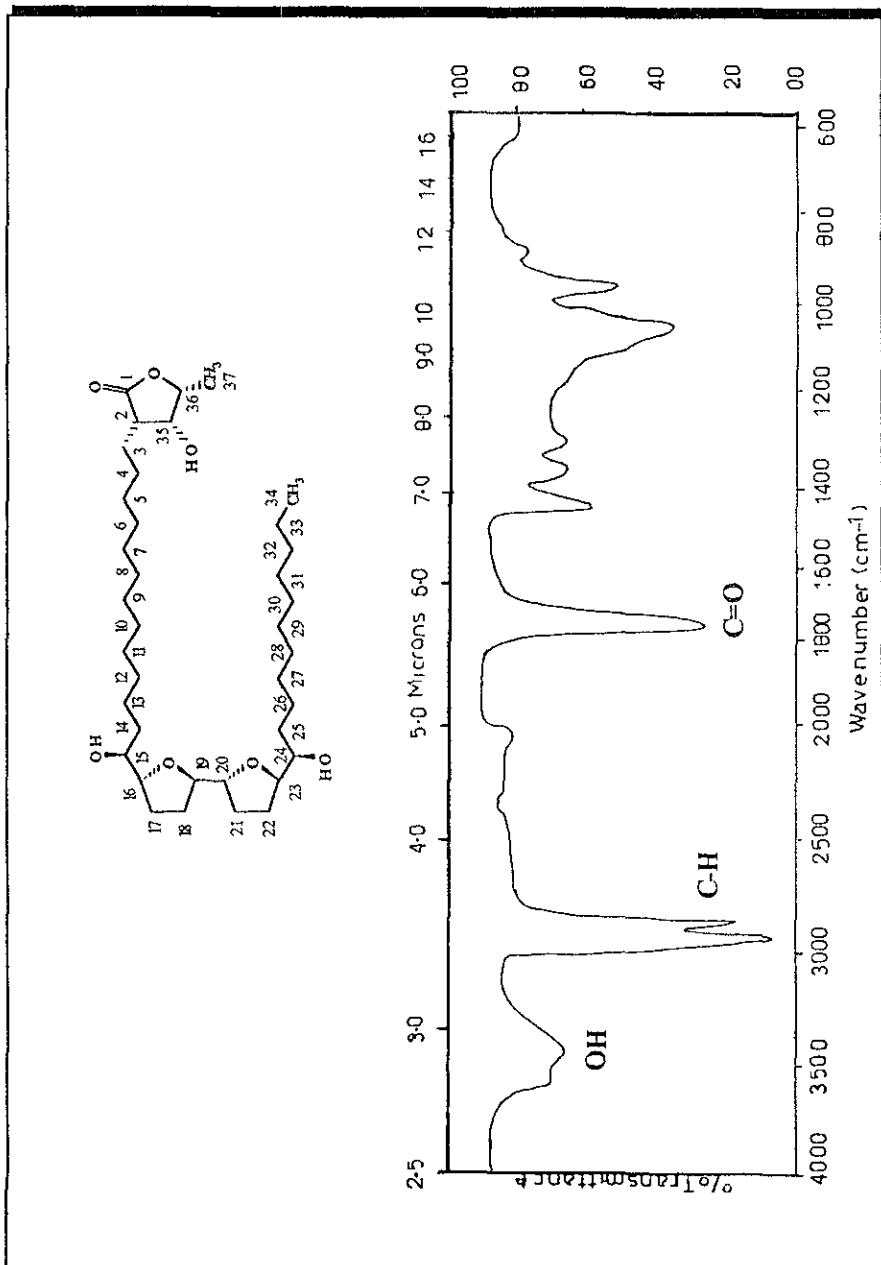
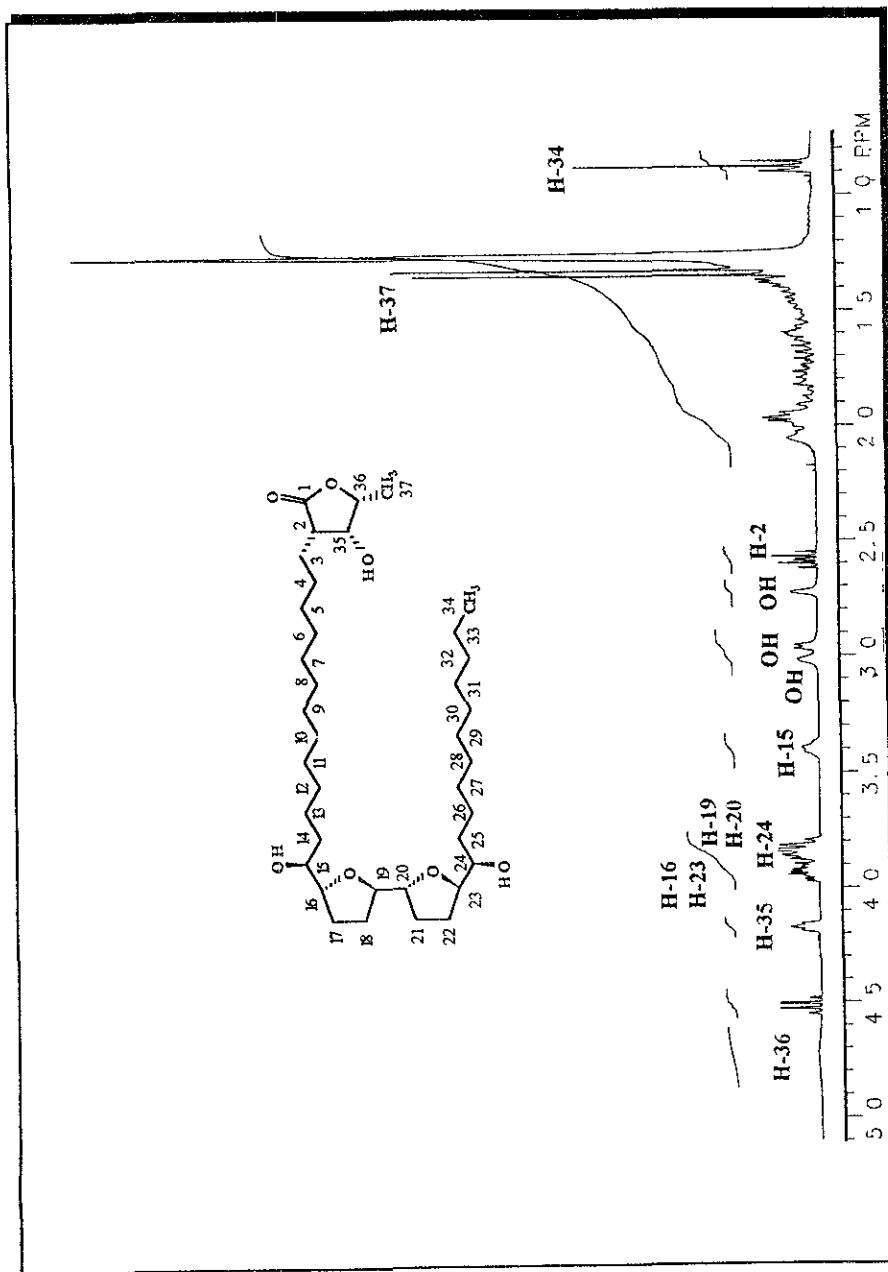


FIGURA 14. DATOS DE RMN- ^1H DE LAS METIL- γ -HIDROXI LACTONAS.

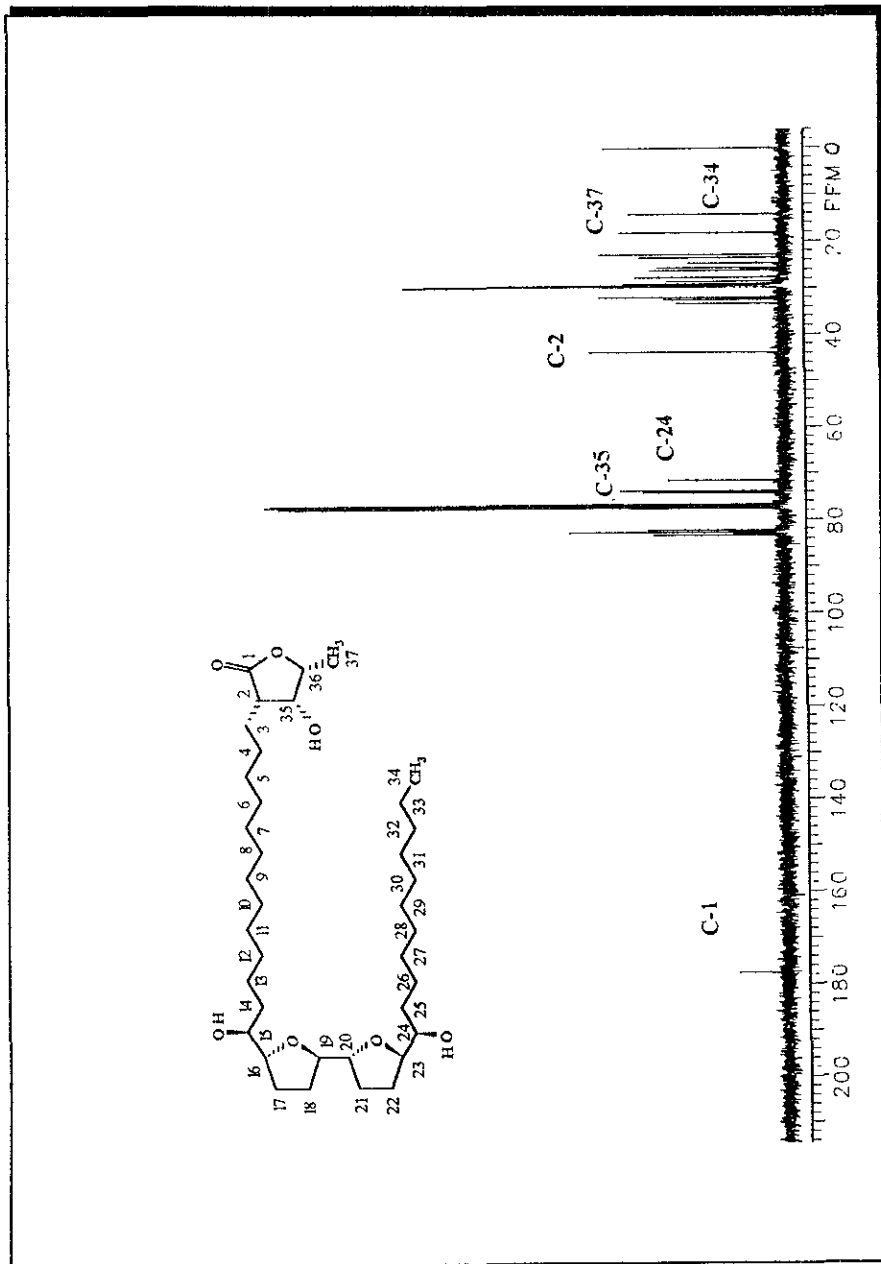
Por otra parte, en el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 4) se observan señales para al menos 30 átomos de carbono, ocho de estas señales se asignaron a carbonos base de oxígeno de tipo CH.



Espectro 2. Espectro de IR (CHCl₃) de la laberradurina (I).



Espectro 3. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la laherraturina (I).



Espectro 4. Espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS) de la laherradura (I).

Así mismo, en el espectro DEPT (Espectro 5) se observan resonancias para dos grupos metilo, 8 metinos y 21 metilenos, 11 de los cuales están claramente resueltos y los 10 restantes sobrepuestos entre δ 29 y δ 30

Por otra parte, se infirió que este compuesto posee al menos 3 grupos hidroxilo, ya que al adicionar una gota de agua pesada al tubo de resonancia, se observó el intercambio de las señales en δ 3.02, δ 2.96 y δ 2.72 (Espectro 6) Estas observaciones fueron cotejadas cuando se hizo reaccionar este compuesto con anhídrido acético en piridina, obteniéndose el derivado triacetilado, ya que en su espectro de RMN- ^1H (Espectro 7) se observan tres señales simples e intensas en δ 2.04, δ 2.06 y δ 2.08.

En consecuencia, de los 8 carbonos base de oxígeno, tres se asignaron a carbonos base de hidroxilo y uno al carbono base de oxígeno de la γ -lactona; restando cuatro carbonos que pueden ser asignados a dos grupos de tetrahidrofurano. Lo anterior se supuso, en base al perfil de los metabolitos secundarios aislados recientemente de otras especies de plantas de la familia *Annonaceae* (Ruprech *et al.*, 1990). En base a los datos anteriores, fueron postuladas las posibilidades estructurales mostradas en la figura 15

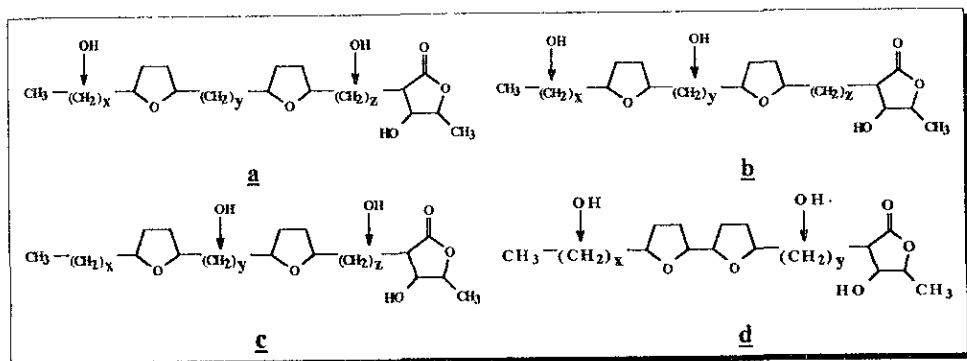
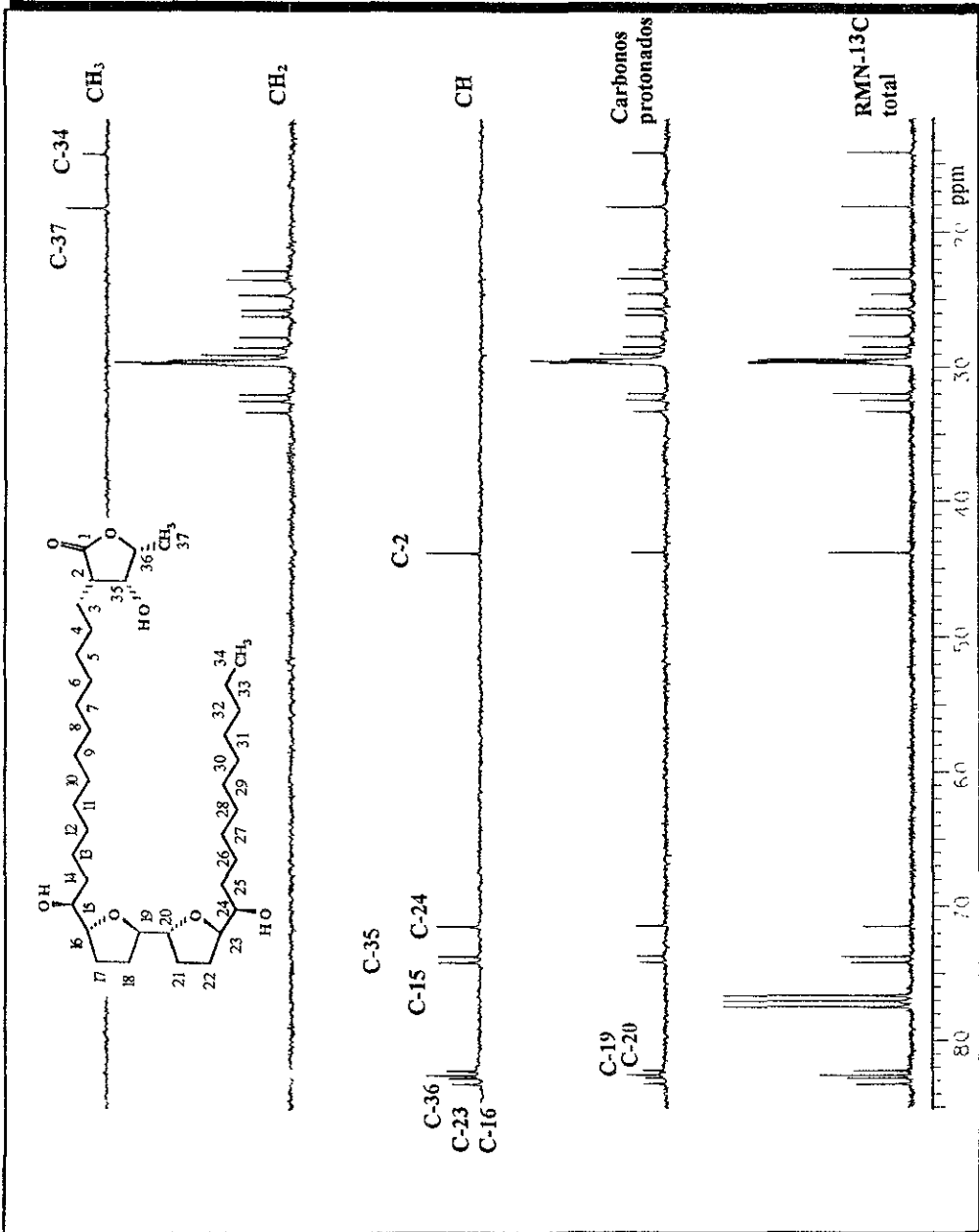
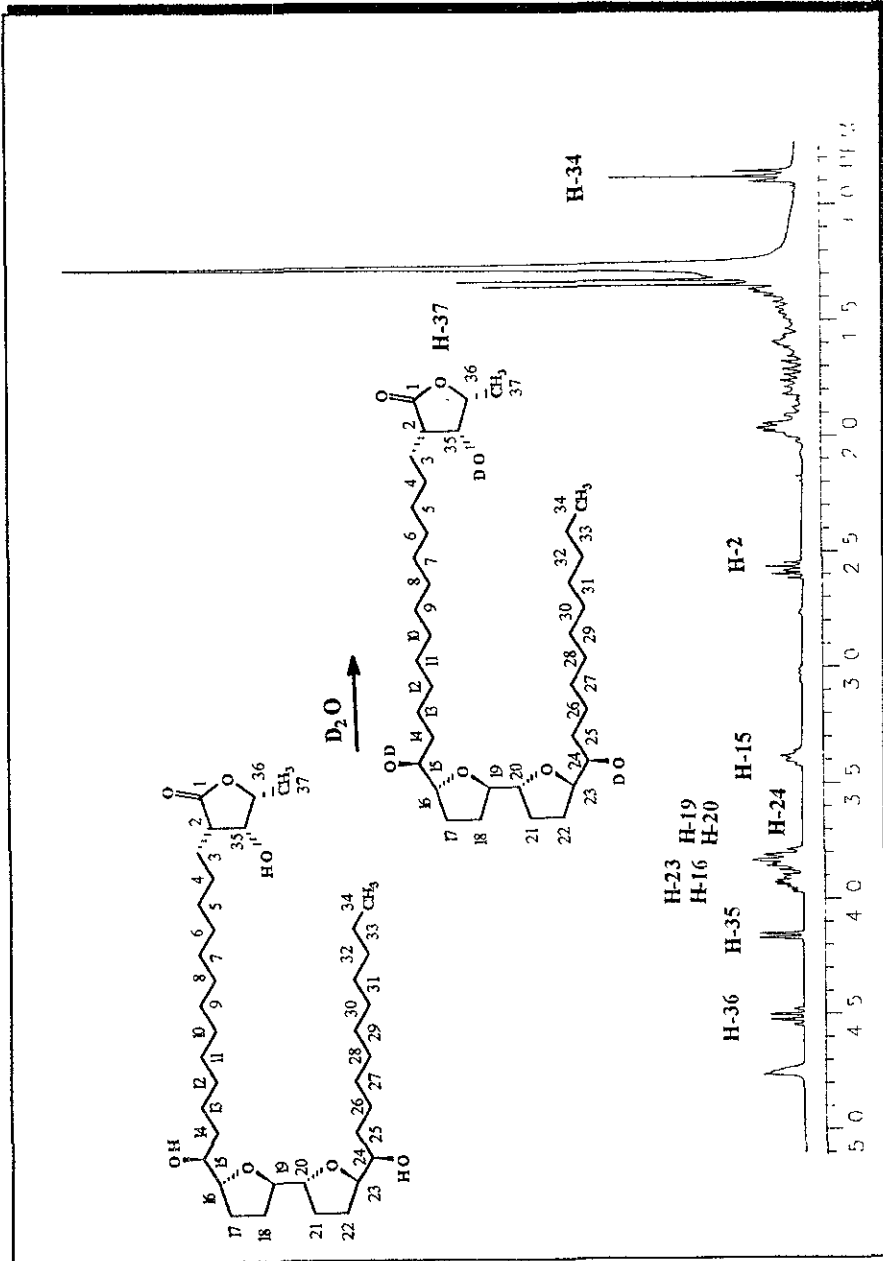


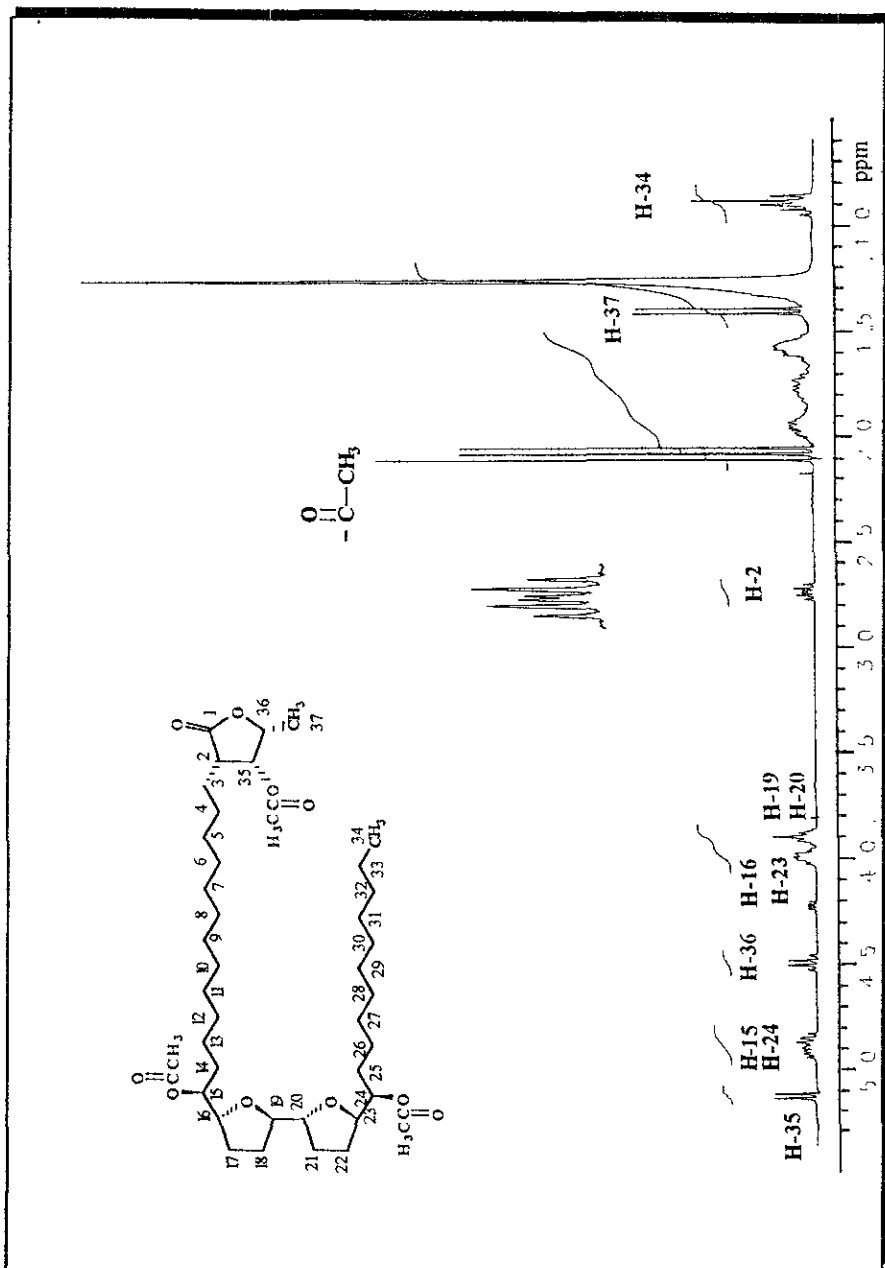
FIGURA 15. POSIBILIDADES ESTRUCTURALES PROPUESTAS PARA LA SUSTANCIA AISLADA DE LAS F51-53.



Espectro 5. Espectro DEPT (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la laherradurina (D).



Espectro 6. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + D₂O, TMS) de la laherradura (I).



Espectro 7. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del triacetato de la laherradurina.

Las estructuras propuestas como a, b y c, representan un tipo de acetogenina que puede distinguirse porque en su espectro de RMN-¹³C y DEPT, se observan tres resonancias entre δ 81- δ 83 y una en aproximadamente a δ 79 (Cavé *et al.*, 1997), tales posibilidades son descartadas, ya que el producto natural en discusión, presenta en el espectro DEPT (Espectro 5) a cuatro metinos base de oxígeno en δ 83.25, δ 82.24, δ 82.58 y δ 83.25. Lo anterior sustenta la posibilidad para una acetogenina con dos grupos de THF adyacentes (Cavé *et al.*, 1997), como en la estructura d. Por lo anterior, es posible generar otro conjunto de estructuras en base a la posición de dos grupos hidroxilo (Figura 16)

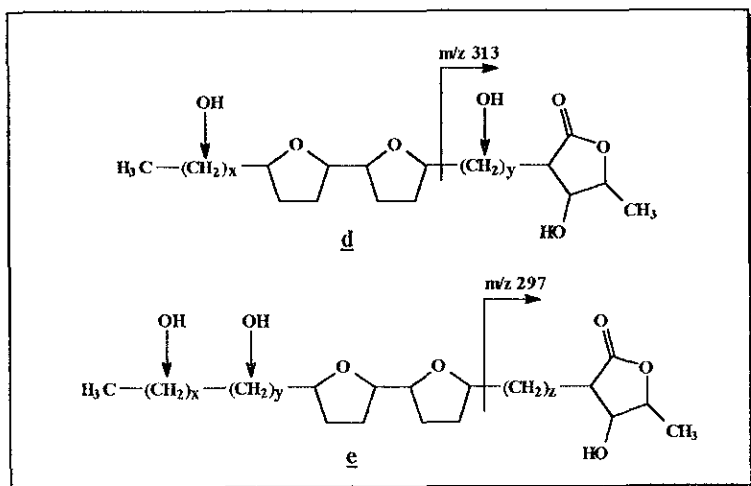


FIGURA 16. ESTRUCTURAS PROPUESTAS PARA LA POSICION DE DOS GRUPOS HIDROXILO EN ACETOGENINAS BIS-THF.

Las posibilidades anteriores fueron descartadas, por el hecho de que las acetogeninas bis-THF muestran un ion molecular abundante y por lo general al pico base, como consecuencia de la ruptura de los dos anillos de THF adyacentes (Cavé *et al.*, 1997). El producto natural mostró un ion molecular en m/z 313 (100 %), siendo congruente con la posibilidad d. Por otra parte, el fragmento m/z 297, no se observó en el

espectro de masas como un pico abundante, descartándose en consecuencia la posibilidad e (Figura 16).

La magnitud molecular de este compuesto pudo ser demostrada por su espectro de masas por impacto electrónico (Espectro 8) y aún cuando ocurrió descomposición térmica en el equipo de masas y no se observó el ion molecular, fue posible observar otros fragmentos que explican tanto la posición de los anillos de THF, como de los grupos hidroxilo en la molécula. La observación del pico base que corresponde al fragmento m/z 313 (100 %), confirma la posición de los anillos de THF entre los C-15 y C-24 (Figura 17)

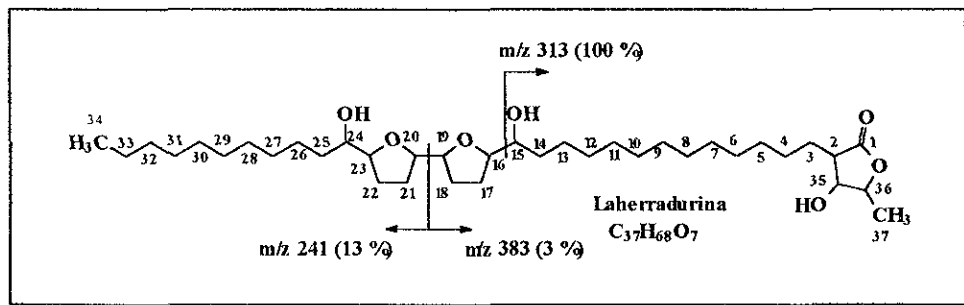
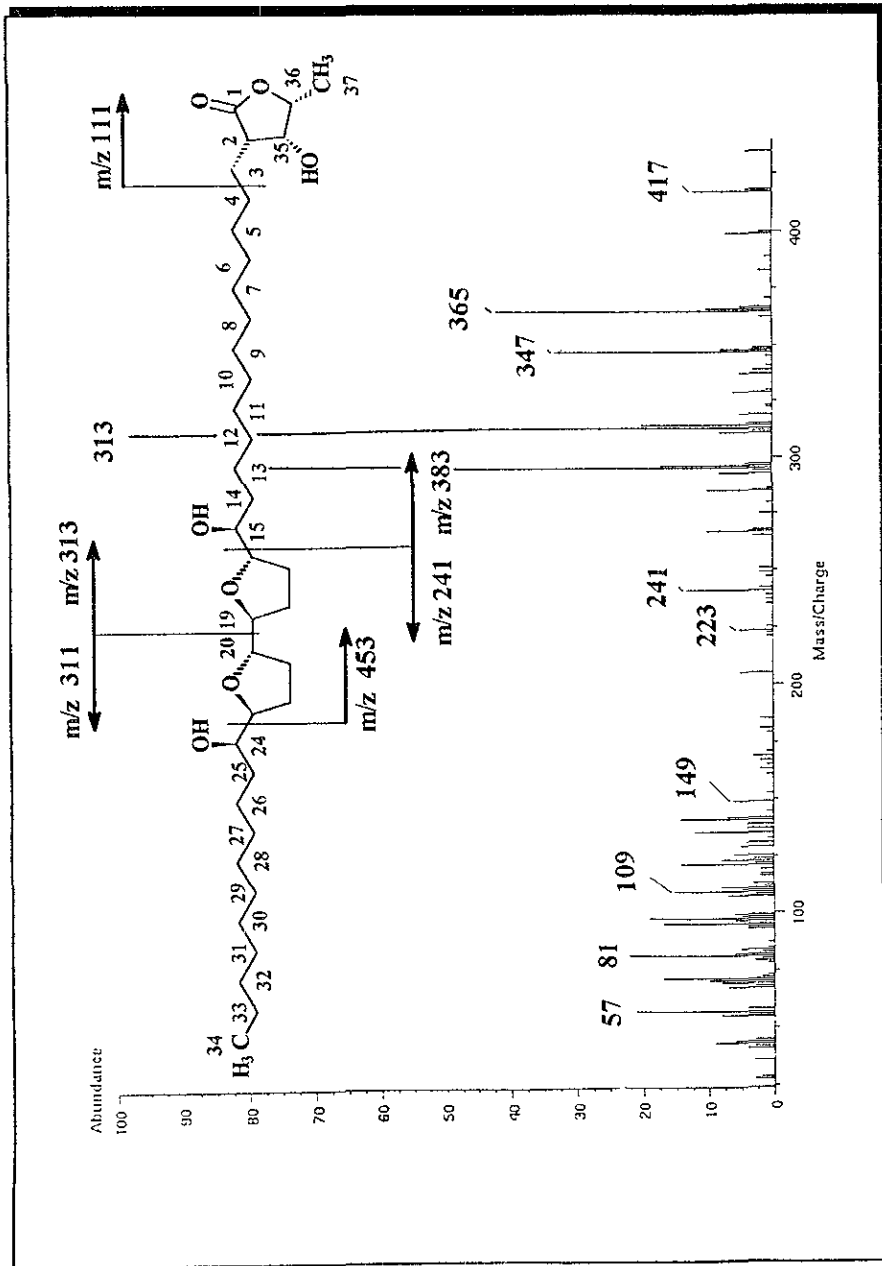


FIGURA 17. FRAGMENTOS DE IMPORTANCIA QUE EXPLICAN LA MAGNITUD MOLECULAR DE LA LAHERRADURINA.

En el mismo espectro de masas se observan los fragmentos m/z 241 (13 %) y m/z 383 (3 %). Estos fragmentos explican la ruptura entre los carbonos C-19 y C-20, lo cual sustenta la magnitud de la molécula, proponiéndose la fórmula molecular $C_{37}H_{66}O_7$ (Cortes *et al.*, 1993)



Espectro 8. Espectro de masas por impacto electrónico (EIMS) de la taberraturina (D).

Estereoquímica de la γ -lactona.

La acetogenina aislada posee una γ -lactona sustituida con grupos hidroxilo (OH), metilo (CH_3) y un fragmento R-CH_2 , los que presentan varias posibilidades de sustitución, como se muestra en la figura 18.

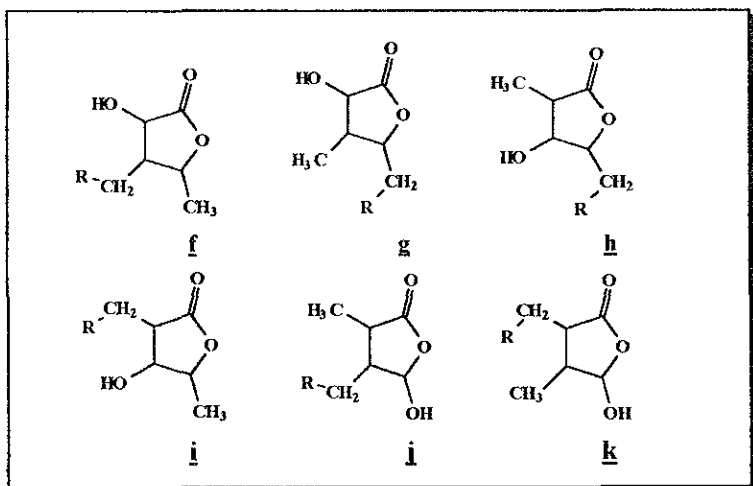
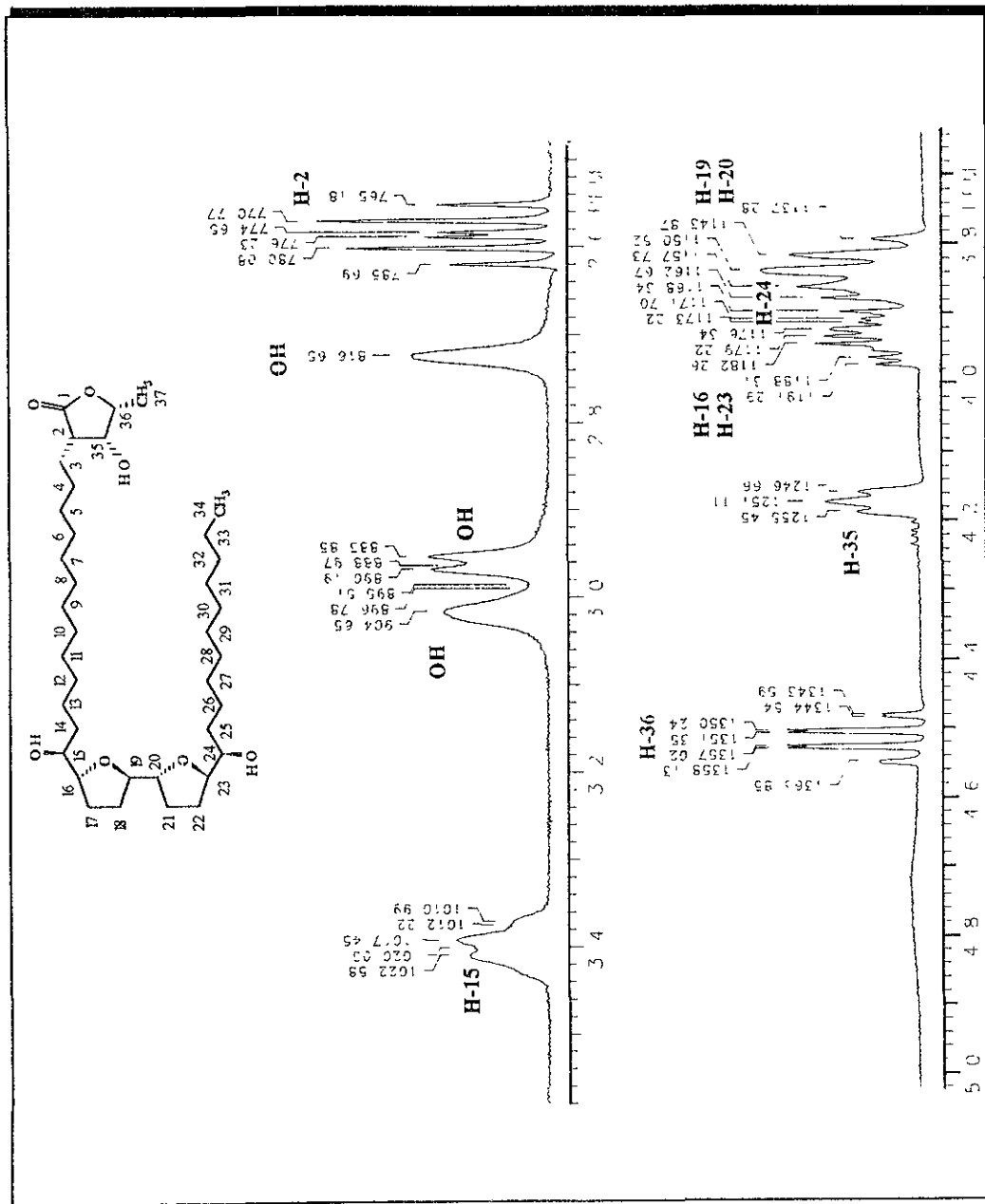


FIGURA 18. POSIBILIDADES DE SUSTITUCION DE LOS GRUPOS HIDROXILO, METILO Y R-CH_2 , EN LA γ -LACTONA.

Las propuestas j y k, son descartadas, ya que se trataría de compuestos poco estables y observarían resonancias en $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ en aproximadamente δ 100, lo cual no se observa en el espectro del producto natural. Las restantes posibilidades de sustitución, f a la i, pueden ser discernidas tanto por los desplazamientos químicos, como por la multiplicidad de las señales de $\text{RMN-}^1\text{H}$ para el protón más desplazado a campo bajo. En dicho espectro (Espectro 9) se observa una señal cuádruple de dobles en δ 4.52 (1H, qd, $J=7, 1$ Hz), esta señal indica que el producto natural posee un protón base de oxígeno y un metilo donde la multiplicidad indica que efectivamente podría tratarse de los sistemas f, g, h e i. Descartándose las posibilidades g y h, ya que en ellas el protón



Espectro 9. Espectro de RMN-¹H (ampliación 2.6-5.0, 300 MHz, CDCl₃, TMS) de la laherradura (I).

base de metilo observaría desplazamientos químicos cercanos a δ 2.0, lo cual no se observa en el espectro de RMN- ^1H , indicando con esto, que el grupo metilo debe encontrarse en la posición γ de la lactona (Figura 19).

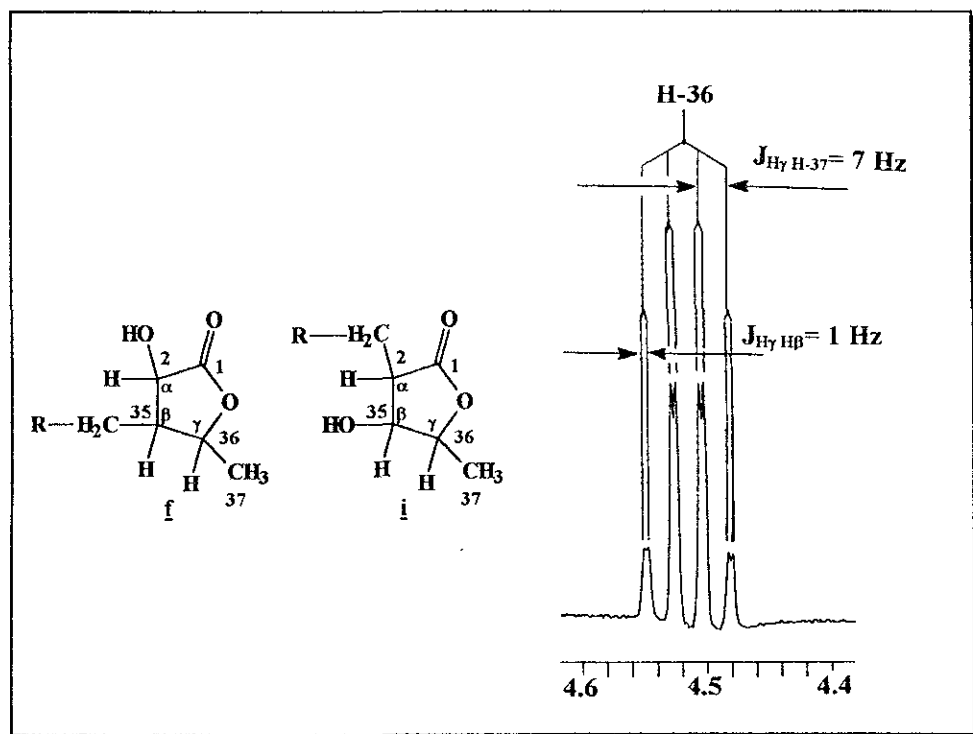


FIGURA 19. TRAZO PARCIAL DEL ESPECTRO DE RMN- ^1H (ESPECTRO 9) QUE JUSTIFICA LAS POSIBILIDADES ESTRUCTURALES \underline{f} e \underline{i} .

Las posibilidades \underline{f} e \underline{i} son discernidas, porque en \underline{f} , se observaría una señal doble de doble de triples en aproximadamente δ 2.0; sin embargo, en el espectro de RMN- ^1H en δ 2.58 (1H, dt, $J = 9.3, 5.59$ Hz) se observa una señal doble de triples. Esta señal es congruente con la ubicación del grupo R-CH $_2$ -, en posición α del anillo de γ -lactona. Por lo tanto, se suprime la posibilidad \underline{f} , sustentando la posibilidad \underline{i} (Figura 20)

Esta observación se encuentra basada por el doble acoplamiento mostrado en el espectro COSY (Espectro 10), con el H_β (H-35) y con un grupo metileno de la cadena

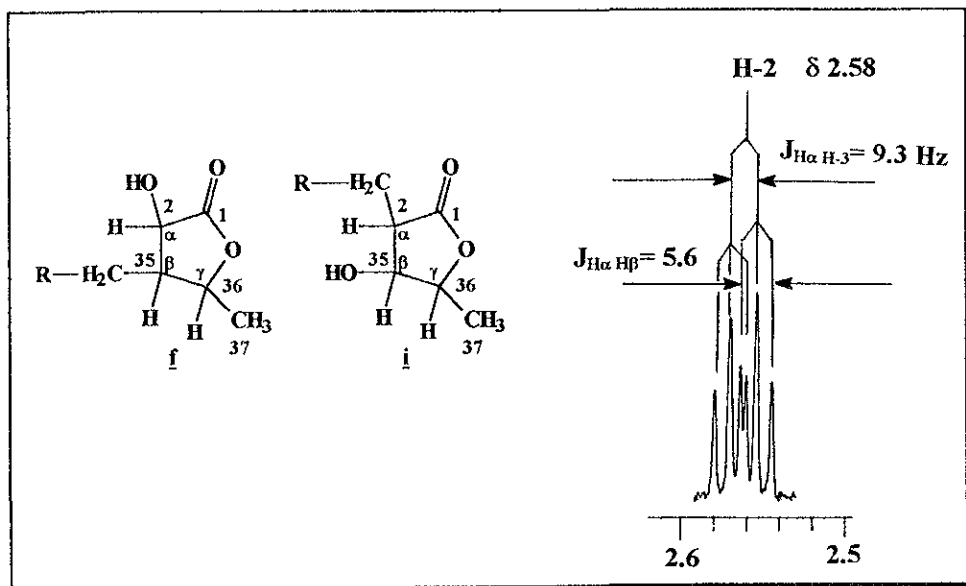
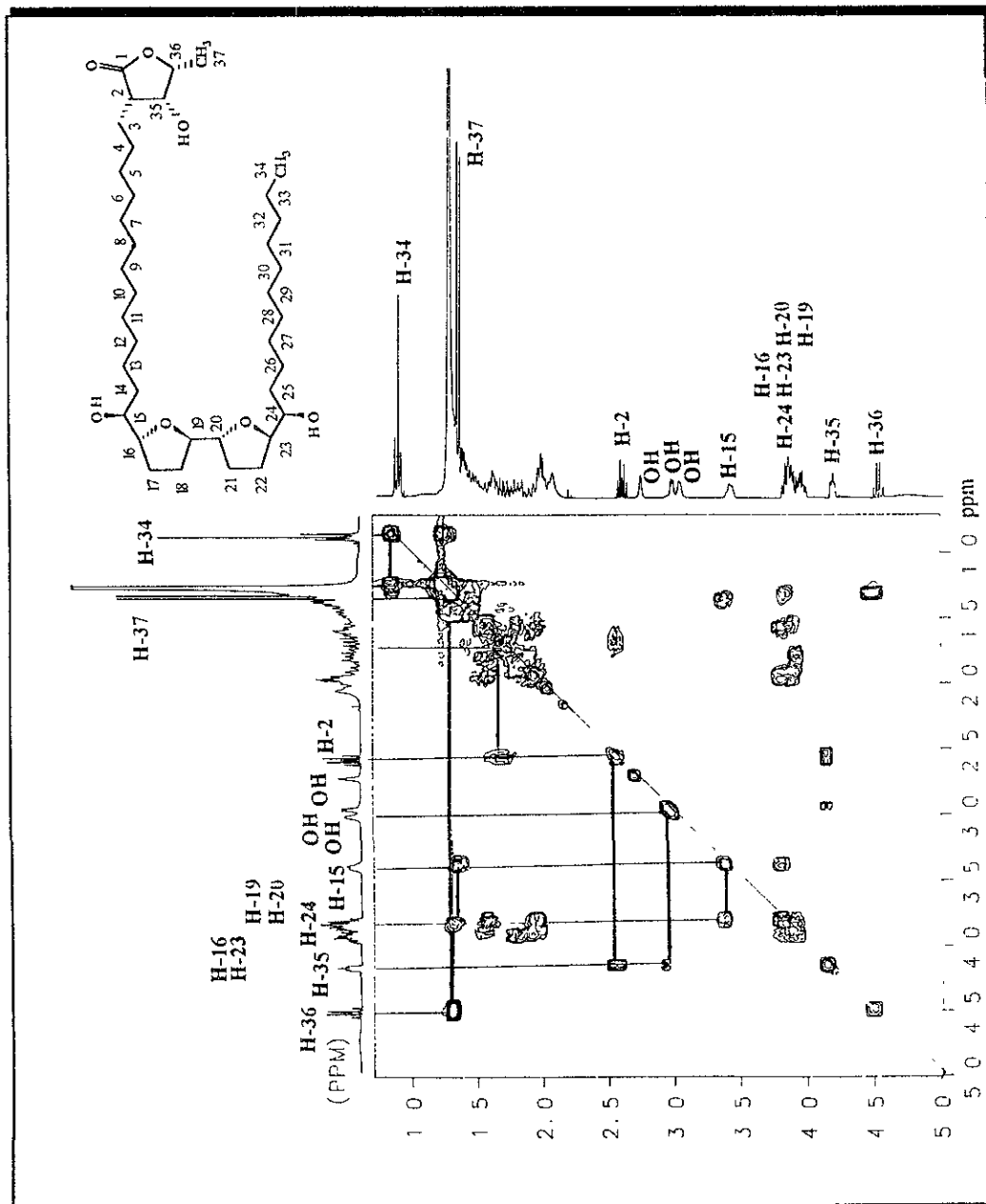


FIGURA 20. TRAZO PARCIAL DEL ESPECTRO DE RMN-¹H (ESPECTRO 9) QUE JUSTIFICA LA SUSTITUCION DEL GRUPO R-CH₂ EN POSICIÓN α DE LA γ-LACTONA.

Finalmente, el protón base de hidroxilo en la γ-lactona, debe estar ubicado en el carbono β, ya que en el mismo espectro de RMN-¹H (Espectro 9) se observa una señal múltiple en δ 4.17 (1H, m). Esta señal se simplifica al adicionar D₂O al tubo de resonancia, mostrando una señal doble de doble (1H, dd, J= 5.6, 1 Hz) (Espectro 6), lo anterior es congruente con lo observado en el espectro COSY (Espectro 10), donde se detecta el acoplamiento del H-35 con el H-2 y con el grupo -OH (Figura 21)



Espectro 10. Espectro COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la laherraduraína (O).

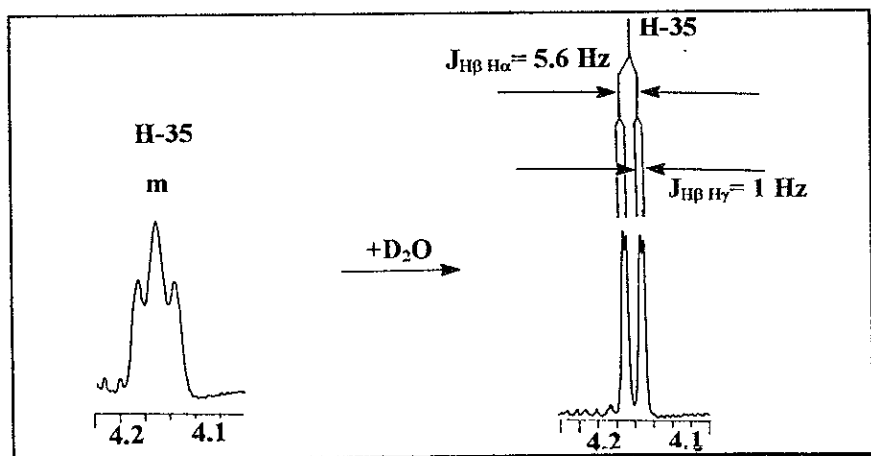


FIGURA 21. SIMPLIFICACION DE LA SEÑAL MOSTRADA POR EL H-35 EN EL ESPECTRO DE RMN-¹H AL ADICIONAR D₂O.

Adicionalmente, por medio del espectro COSY se observa un sistema del tipo ABX, generado en el anillo de la γ -lactona, el cual involucra a tres protones, a partir del H _{β} (H-35) interaccionando con el H _{α} (H-2) y con el H _{γ} (H-36). Tal interacción se aprecia de forma clara en el espectro obtenido por intercambio con D₂O (Figura 22)

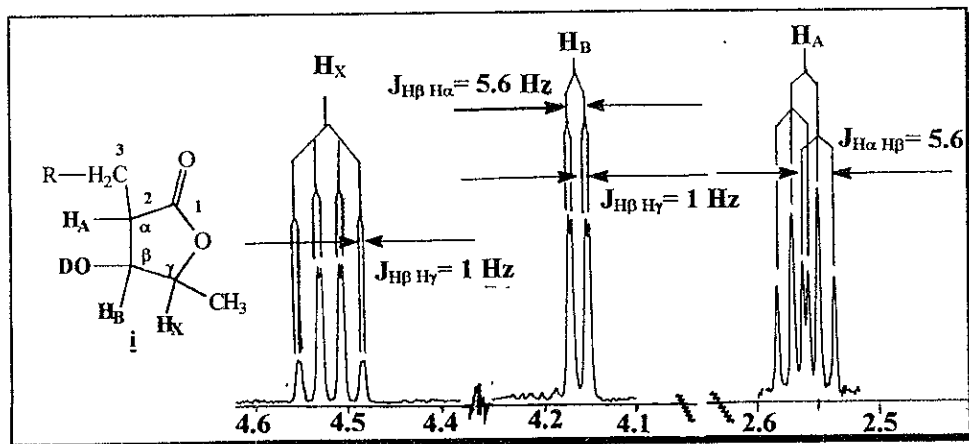


FIGURA 22. SISTEMA DEL TIPO ABX DE LOS PROTONES DEL ANILLO DE LA γ -LACTONA.

Las constantes de acoplamiento entre los protones H α -H β ($J= 5.6$ Hz) y H β -H γ ($J= 1.0$ Hz) del anillo de lactona sugieren una disposición espacial de tipo cis (Espectros 6 y 9, Figura 23).

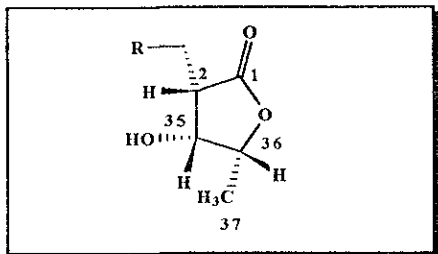
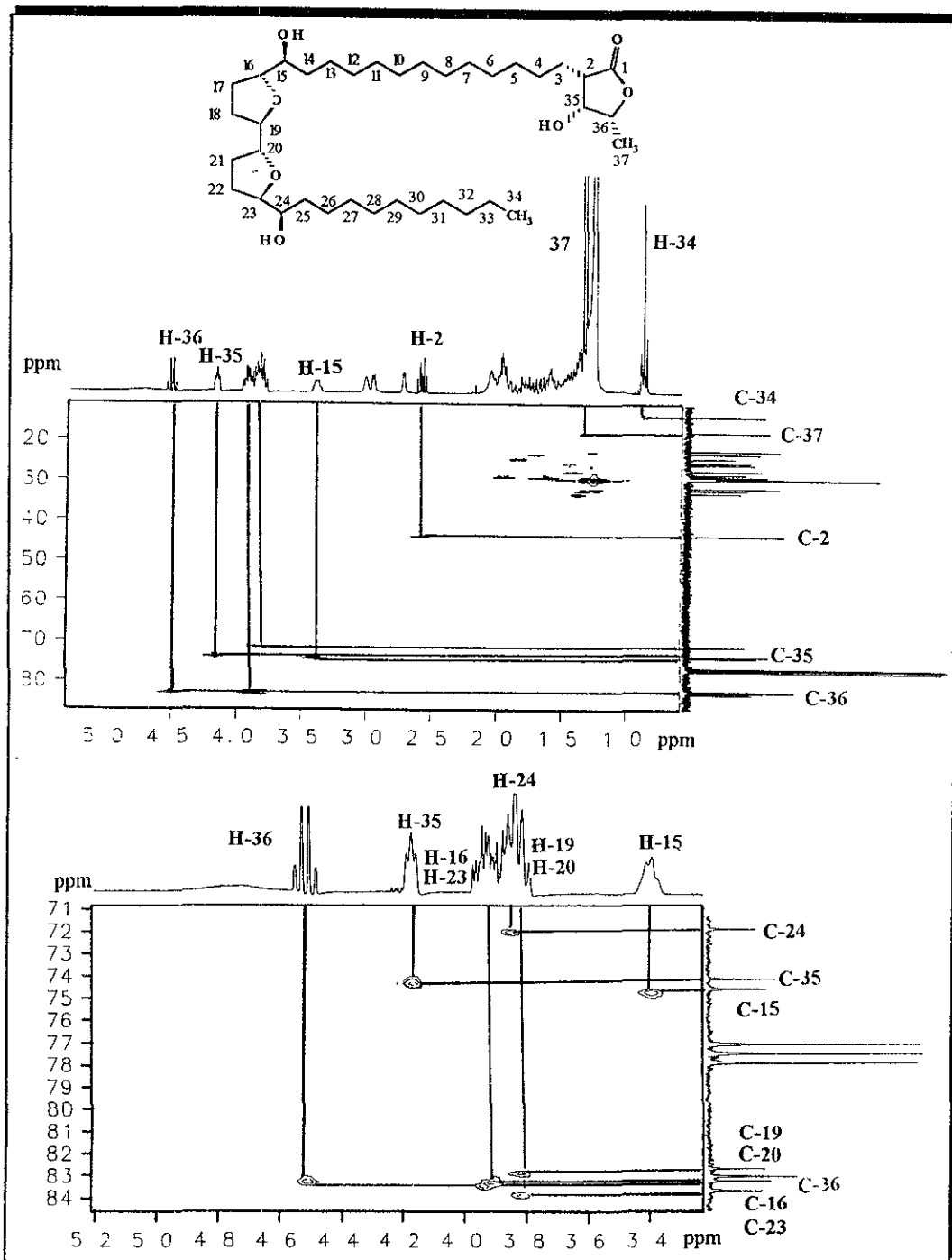


FIGURA 23. ESTEREOQUIMICA DE LOS SUSTITUYENTES EN EL ANILLO DE γ -LACTONA.

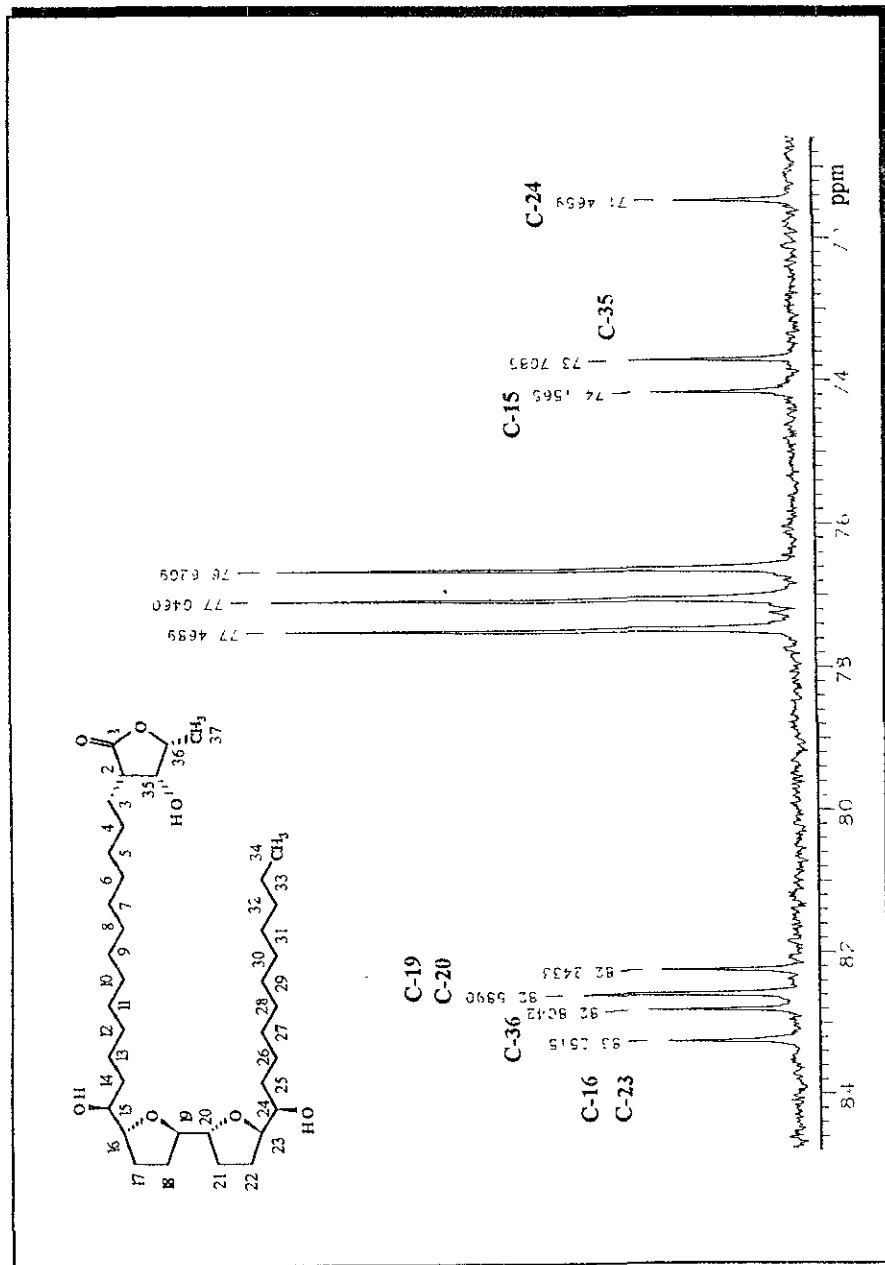
Así mismo, el anillo de la metil- γ -lactona se encuentra enlazado a una cadena alquímica de 13 carbonos (IR 2910-2850 cm^{-1}), tal como lo muestra el fragmento molecular en el espectro de EM(IE) a m/z 313 (100 %). Observándose una serie de señales múltiples en el rango de δ 1.25 a δ 1.89 (RMN- ^1H) y δ 24.52 a δ 28.97 (RMN- ^{13}C), correlaciones asignadas de acuerdo al espectro de HETCOR (Espectro 11)

La señal que resuena a δ 23.27 (RMN- ^{13}C , Espectro 13), es asignada al carbono 3 (C-3) respecto al anillo de la metil- γ -lactona, observando la interacción con el protón H-2 en el espectro COSY (Espectro 10)

Al carbono C-15 se haya enlazado un grupo hidroxilo, lo que se confirma en el espectro de EM(IE) a m/z 295 (55 %), debido a la pérdida de una molécula de H_2O . Así como por el desplazamiento químico a δ 3.40 y δ 74.16 en los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , respectivamente (Espectros 9 y 12, Figura 24).



Espectro 11. Espectro HETCOR (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la laherraduraína (I).



Espectro 12. Espectro de RMN-¹³C (ampliación 71-84 ppm, 300 MHz, CDCl₃, TMS) de la laherradura (D).

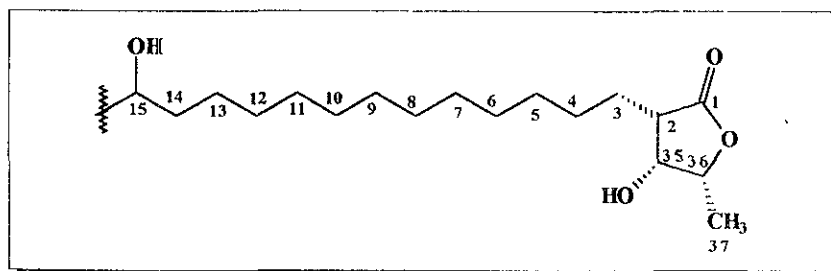


FIGURA 24. POSICION DEL GRUPO HIDROXILO EN LA CADENA DE ALQUILO ENLAZADA AL ANILLO DE LA γ -LACTONA.

Por otra parte, en el espectro de IR se observa una señal ancha en la región de 1055 cm^{-1} (Espectro 2), producida por el alargamiento de los enlaces C-O-C, de los anillos de tetrahydrofurano (THF) presentes en la molécula (Silverstein *et al* , 1991).

Así mismo, en el espectro de RMN^{-13}C se visualizan 4 señales a $\delta 81$ - $\delta 84$ (Espectro 12), lo que sugiere la presencia de 2 anillos de tetrahydrofurano (THF) adyacentes, y se confirma por los fragmentos observados en el EM(IE) a m/z 435(4 %) y 399 (6 %) debido a la pérdida de 2 moléculas de H_2O , característico de las acetogeninas bis-THF (Cavé *et al* , 1997).

Las señales de RMN^{-1}H y RMN^{-13}C de los H-16 y H-23 a $\delta 3.87/83.25$ y $\delta 3.82/83.25$, respectivamente (Espectros 9 y 12), asignados mediante correlación heteronuclear y correlación homonuclear, muestran diferencias entre los protones, sugiriendo sean debido a su disposición espacial; encontrándose el H-16 en disposición alternada antiperiplanar respecto al H-15, produciéndose un desplazamiento a campo bajo por la interacción gauche del grupo polar hidroxilo sobre el H-16 (Figura 25).

Así mismo, los protones H-19 y H-20, se visualizan a δ 3.79-3.80/ δ 82.24-82.58; mientras que los protones H-17/H-18 y H-21/H-22, se observan en δ 1.9-2.0/ δ 29.50-29.73 en los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (Espectro 3, 12 y 13)

Por otra parte, al igual que C-15, en el C-24 se encuentra enlazado un grupo funcional hidroxilo, mostrando resonancia en δ 3.82 (1H, m, H-24) en RMN- ^1H y a δ 71.96 en el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 9 y 12)

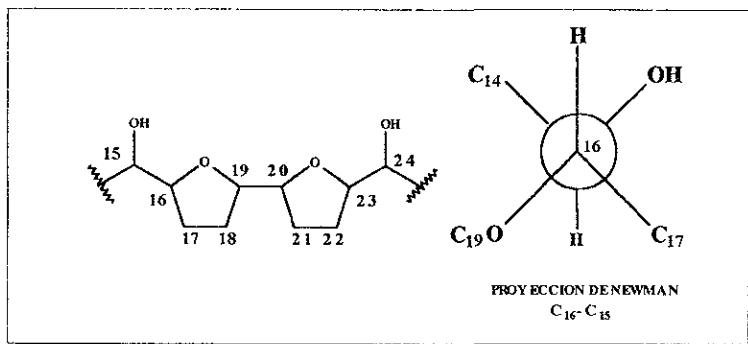
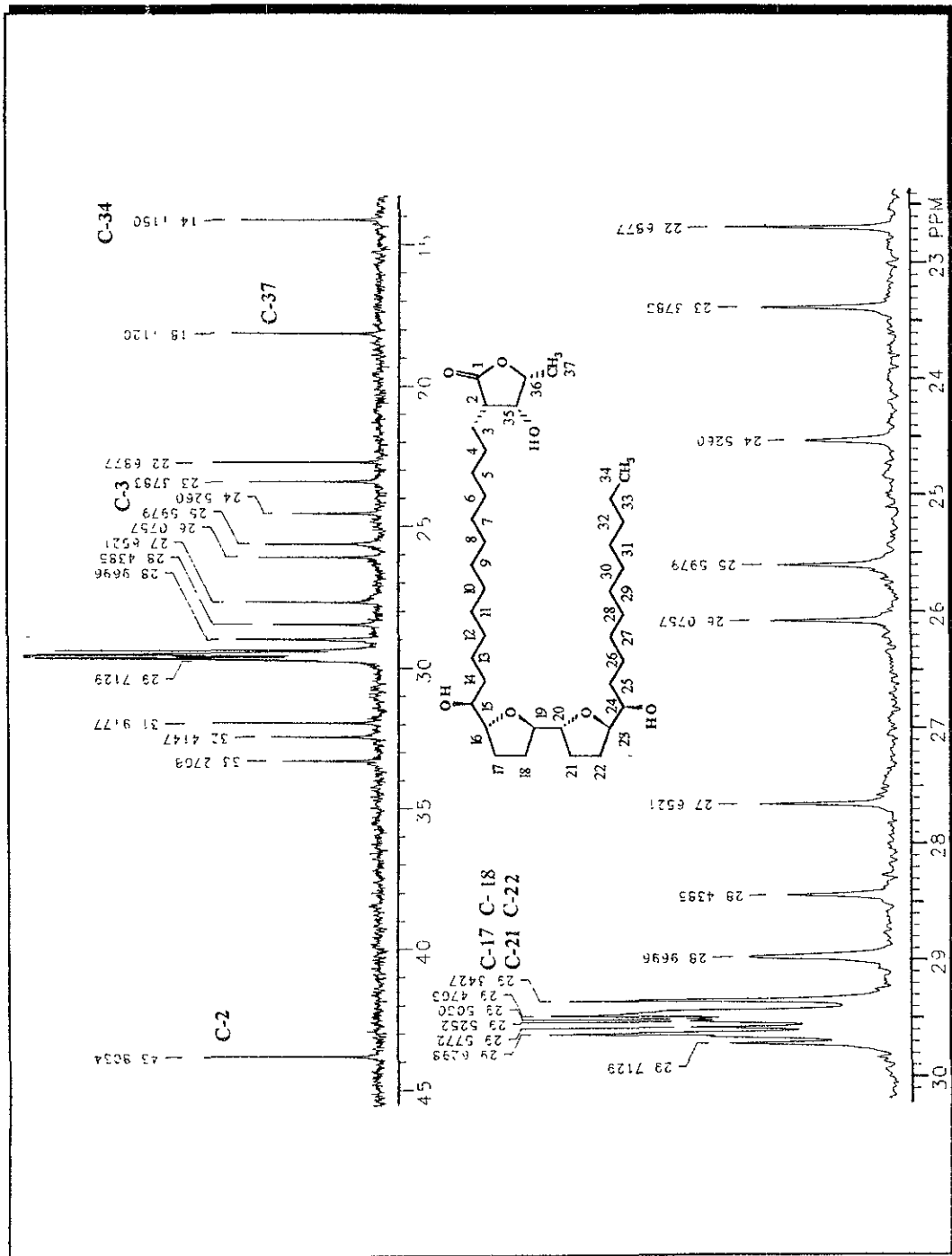


FIGURA 25. INTERACCION DEL H-16 CON EL PROTON DEL HIDROXILO SUSTITUIDO EN EL C-15.

De la misma forma que el C-2, el C-24 está enlazado a una cadena alquílica de 10 átomos de carbono (IR 2910-2850 cm^{-1}), la que presenta una señal múltiple en RMN- ^1H a δ 1.9- δ 2.0 y a δ 24.52- δ 31.91 en el espectro de RMN- ^{13}C . Así mismo, se observa una señal triple en δ 0.9, la que se asignó para el grupo metilo terminal de la cadena de alquilo (3H, t, J= 7 Hz).

Los datos experimentales obtenidos fueron comparados con los que se reportan en la literatura (Tabla 15 y 16), concluyéndose que la sustancia aislada es la laherradurina (Figura 26)



Espectro 13. Espectro de RMN-¹³C (ampliación 15-45 ppm, 300 MHz, CDCl₃, TMS) de la laherradura (II).

TABLA 15. COMPARACIÓN DE DATOS DE RMN-¹H Y RMN-¹³C DE LA LAHERRADURINA CON LA SUSTANCIA AISLADA DE LAS F51-53.

H/C	Sustancia F51-53 (δ ¹ H/ ¹³ C)	Laherradurina ¹⁴ (δ ¹ H/ ¹³ C)
1	177.64	177.2
2	2.59/43.8	2.59/43.74
3	23.37	23.33
4-14	1.25-1.89/22.68-33.27	1.2-1.97/25.58-29.59
15	3.40/74.16	3.40/74.09
16	3.87/83.25	3.87/83.21
17-18 21-22	1.9-2.0/29.50-29.73	1.2-1.97/25.58-29.59
19	3.79-3.80/82.24-82.58	3.78/82.5
20	3.79-3.80/82.24-82.58	3.78/82.79
23	3.87/83.25	3.85/82.34
24	3.82/71.96	3.80/71.38
25-32	1.25-1.89/22.68-33.27	1.2-1.97/25.58-29.59
33	22.68	22.66
34	0.88/14.12	0.87/14.08
35	4.17/73.71	4.16/73.81
36	4.49/82.80	4.49/82.5
37	1.38/18.11	1.38/18.11

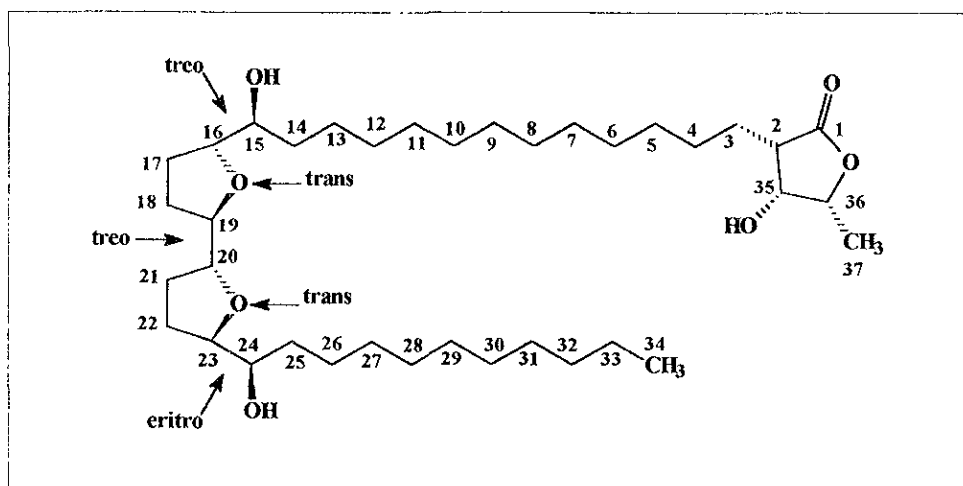


FIGURA 26. Laherradurina (I).

¹⁴ Cortes *et al.*, 1993.

TABLA 16. COMPARACION DE DATOS ESPECTROMETRICOS E IR DE LA LAHERRADURINA CON LA SUSTANCIA AISLADA DE LAS FRACCIONES 51-53.

Sustancia F51-53 EMIE 70 eV m/z (%)	Laherradurina (Ríos <i>et al.</i> , 1989) m/z (%)	Sustancia F51-53 IR ν_{\max} (cm^{-1})	Laherradurina (Ríos <i>et al.</i> , 1989) IR ν_{\max} (cm^{-1})
-	453 (4)	3590	3590
435 (4)	435 (11)	2910	2930
417 (3)	417 (15)	2850	2860
399 (6)	399 (11)	1765	1765
383 (3)	383 (7)	1455	1450
365 (44)	365 (42)	1370	1370
347 (27)	347 (69)	1360	1355
313 (100)	313 (98)	1300	1300
311 (17)	311 (17)	1055	1055
295 (55)	295 (100)	955	955
285 (20)	285 (5)	870	865
267 (14)	267 (10)		
241 (13)	241 (22)		
223 (4)	223 (6)		
205 (5)	203 (5)	EMIE Espectrometría de masas por impacto electrónico	
141 (4)	141 (14)	EMIQ: Espectrometría de masas por ionización química	
97 (22)	-	eV electron volts	
-	Además EMIQ m/z 624	m/z masa/carga	

TABLA 17. CONFIGURACION RELATIVA DE LOS C-15/C-16 Y C-23/C-24 DE LA LAHERRADURINA POR COMPARACIÓN DE DATOS DE RMN-¹H Y RMN-¹³C.

	Modelos sintéticos		Sustancia natural			
	Eritro	Treo	F51-53			
H-1	3.84	3.40	H-15	3.40	H-24	3.82
H-2	3.84	3.79	H-16	3.87	H-23	3.87
C-1	71.83	73.87	C-15	74.16	C-24	71.96
C-2	82.29	82.47	C-16	83.25	C-23	83.25

Finalmente, por comparación de datos de RMN-¹H y RMN-¹³C en el modelo de Born (Cavé *et al.*, 1997), se estableció la configuración relativa de los C-15/C-16 y C-23/C-24, resultando en las configuraciones treo y eritro, respectivamente (Tabla 17, Figura 27), las que confirman la identidad de la sustancia aislada como la laherradurina (I).

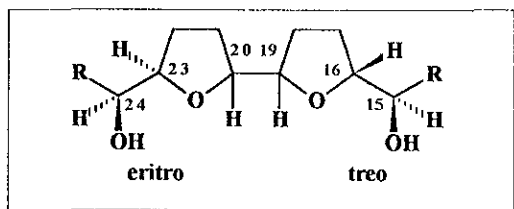
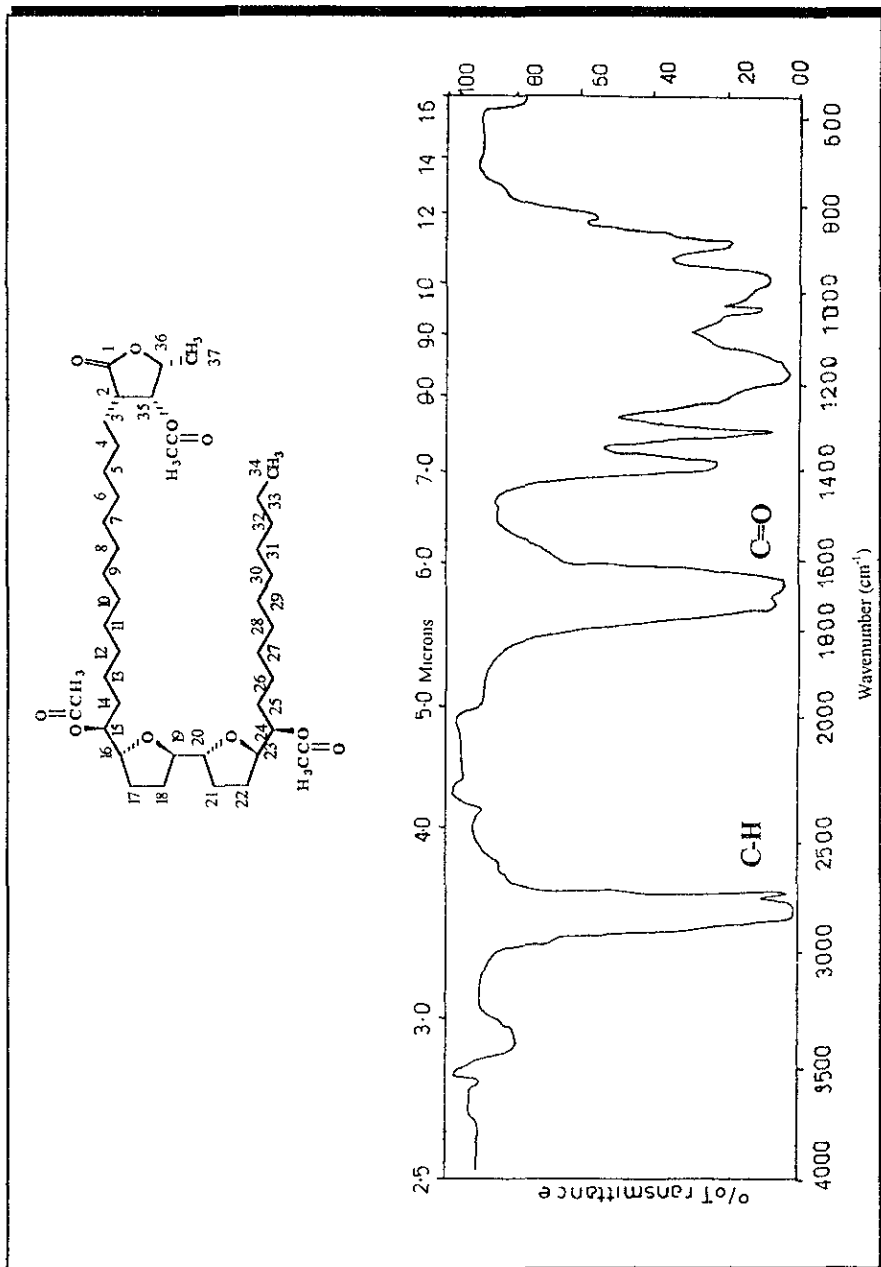


FIGURA 27. CONFIGURACIÓN RELATIVA DE LOS C-15/C-16 Y C-23/C-24 DE LA LAHERRADURINA.

- Triacetato de la laherradurina

Para comprobar la identidad de la laherradurina, se preparó su derivado triacetilado, el cual mostró las siguientes características.

El espectro de IR del derivado triacetilado de la laherradurina mostró una banda a 1760 cm⁻¹ debida al carbonilo de la γ -lactona, mientras que los carbonilos de los grupos acetato presentan vibración en 1730 cm⁻¹ (Espectro 14) (Silverstein *et al.*, 1991)



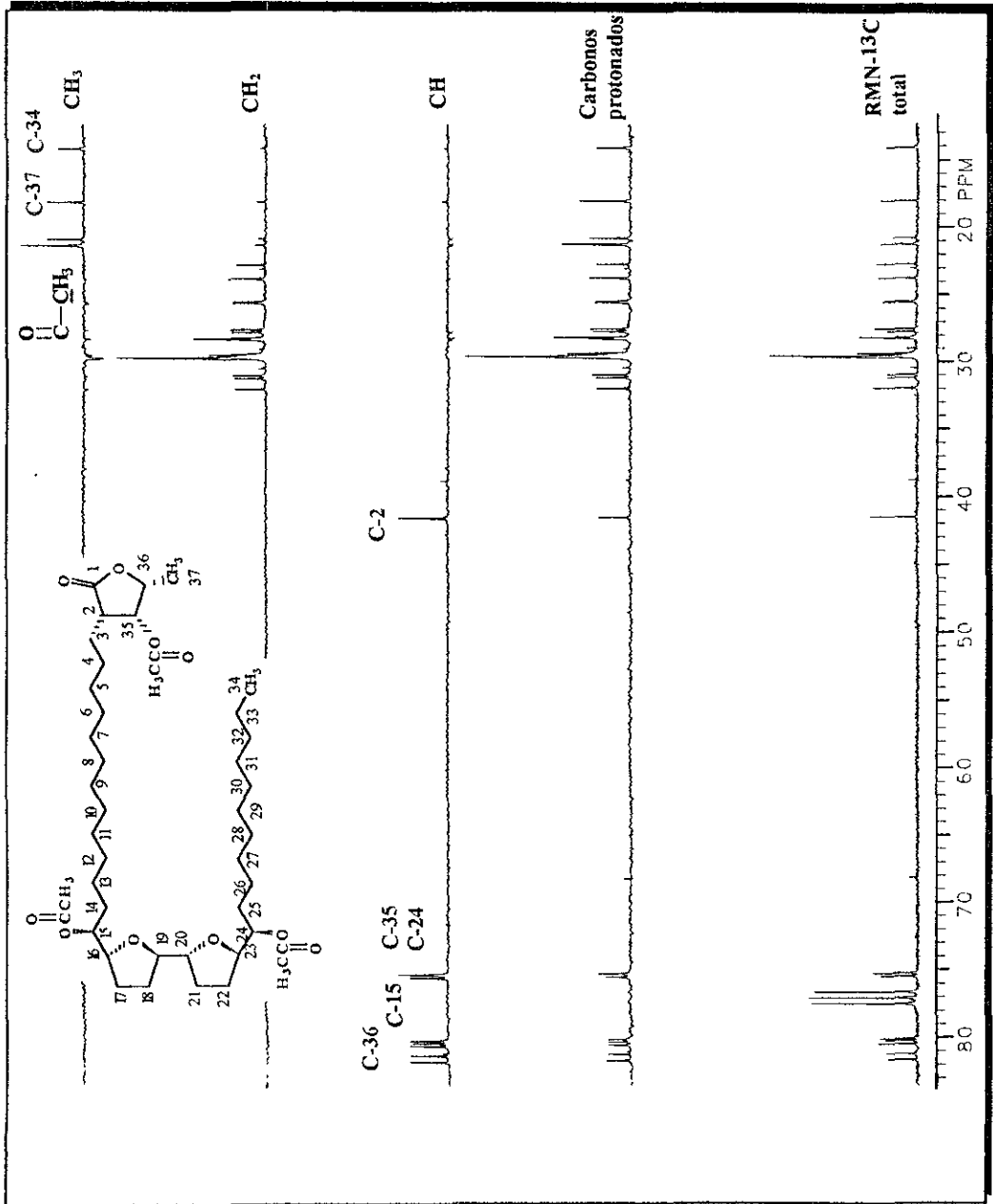
Espectro 14. Espectro de IR (CHCl₃) del triacetato de laherradurina.

Por otra parte, el espectro DEPT muestra la presencia de 5 grupos metilo, 16 metilenos y 9 metinos, debido a la sobreposición de algunas señales (Espectro 15); así como 4 señales a δ 176.3, 170.65, 170.24 y 170.93, para el carbonilo del anillo de la γ -lactona y los carbonilos de los grupos acetato en el RMN- ^{13}C , respectivamente (Espectro 16).

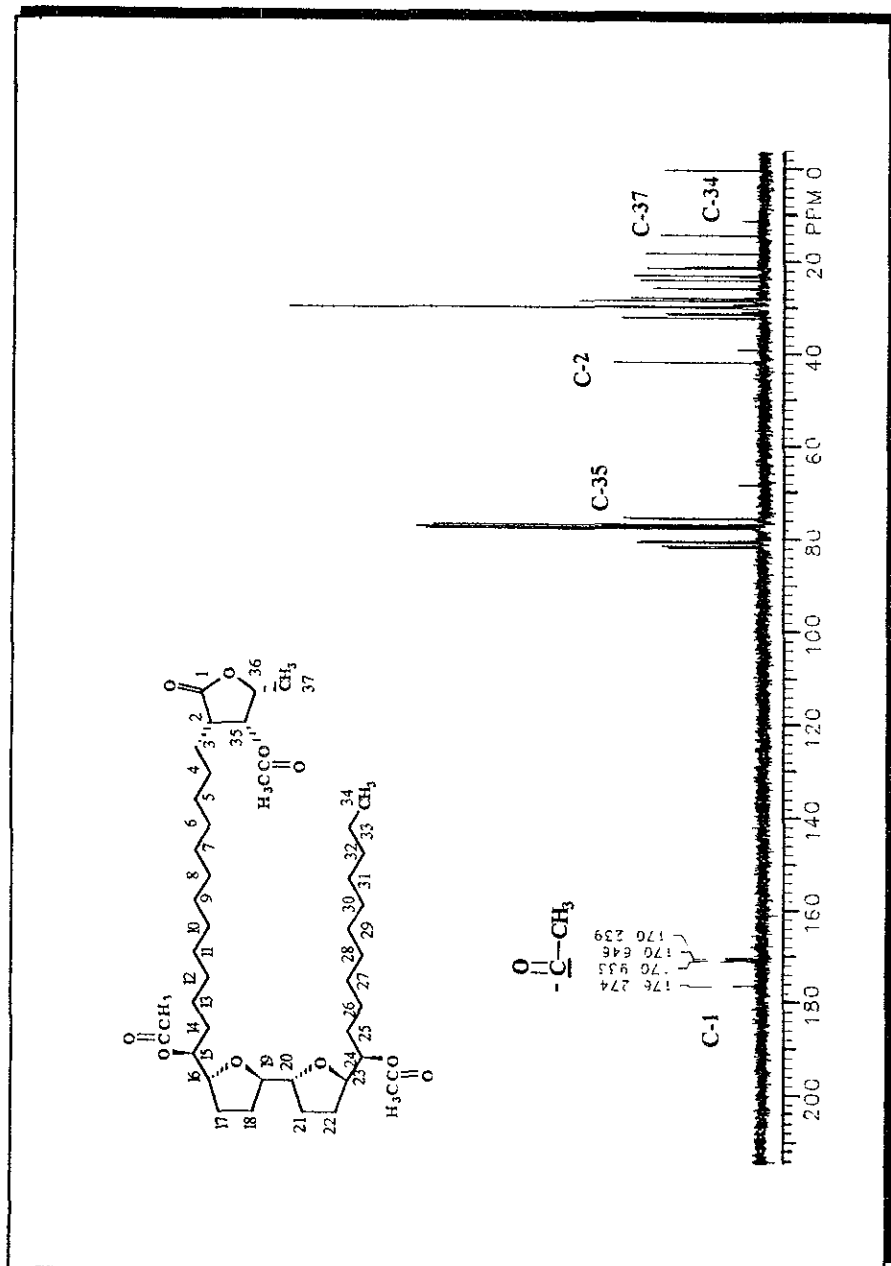
Los protones de la metil- γ -lactona acetilada presentan un sistema del tipo ABX (Espectro 7), donde el H α (H-2) se observa en el espectro de RMN- ^1H a δ 2.73 (1H, m, J= 6.1 Hz), acoplado con el H β (H-35), el cual se haya desplazado a campo bajo por el efecto de desprotección del carbonilo del grupo acetilo, en δ 5.13 (1H, d, J=6.1) Así mismo, el H β esta acoplado al H γ (H-36), el cual se observa como una señal doble de dobles en δ 4.49 (1H, dd, J= 6.1, 6.9), el cual se encuentra acoplado a los protones del grupo metilo (3H, d, J= 6.9) (H-37) y que se observa en el espectro de RMN- ^1H en δ 1.4 (Espectro 7).

Los C α , C β y C γ del anillo de la metil- γ -lactona se observan a δ 41.51, δ 75.22 y δ 80.24, lo cual se muestra en la sección del espectro de RMN- ^{13}C , respectivamente (Espectro 18). Así mismo, el grupo metilo sustituyente en el C γ (C-36), se visualiza a δ 18.03, asignaciones hechas de acuerdo a la correlación heteronuclear y las interacciones protón-protón observadas en los espectros de HETCOR (Espectro 19) y COSY (Espectro 20).

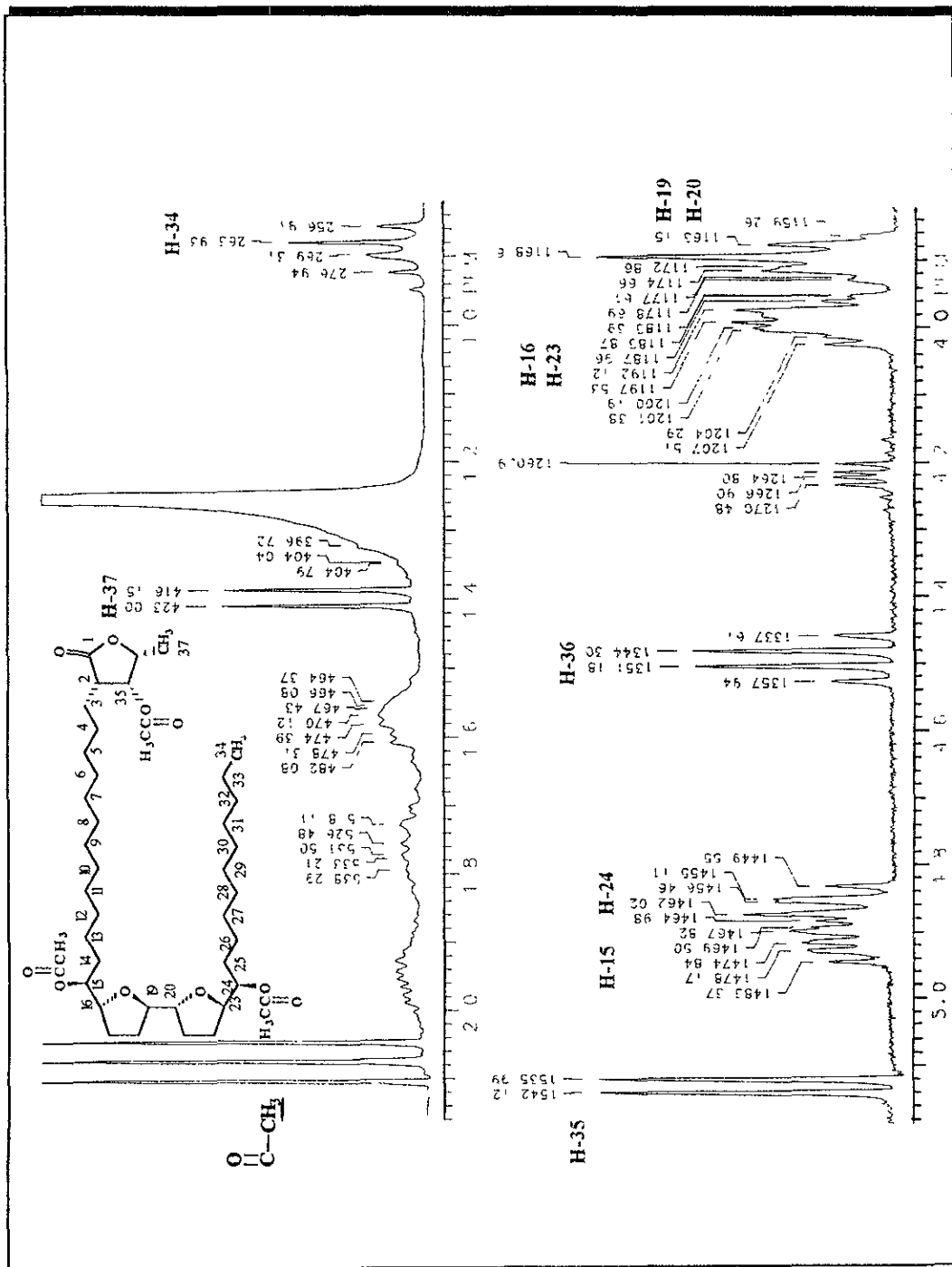
Los H-15 y H-24 muestran cambios en su desplazamiento químico debido a los efectos de desprotección inducidos por el carbonilo del grupo acetilo, desplazándose a campo bajo, presentando señales a δ 4.92/75.84 y 4.86/75.22 (Espectros 17 y 18). El mismo efecto se observó en los protones H-16 y H-23, cuyas señales se encuentran



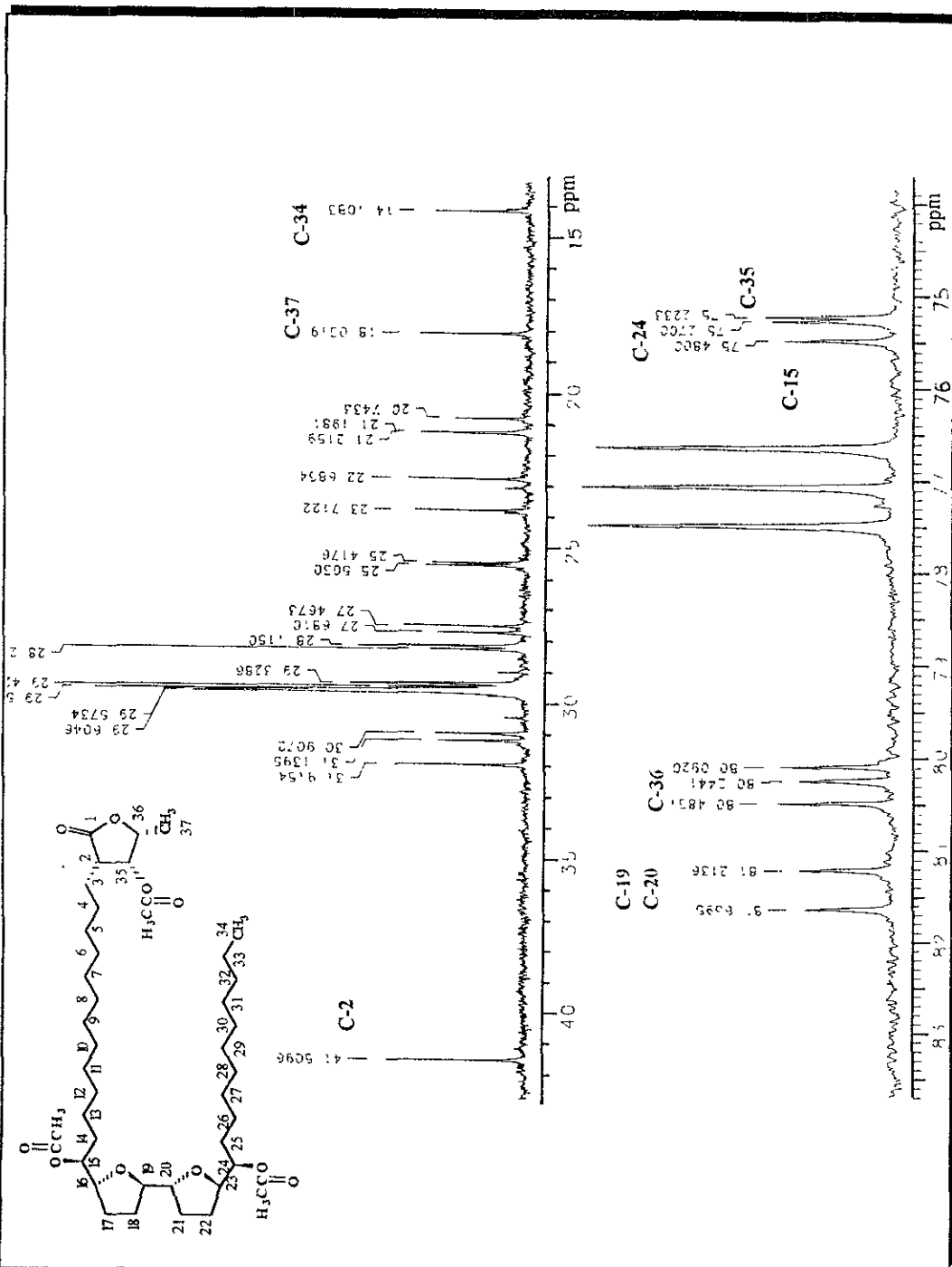
Espectro 15. Espectro DEPT (300 MHz, CDCl₃, TMS) del triacetato de laherradura.



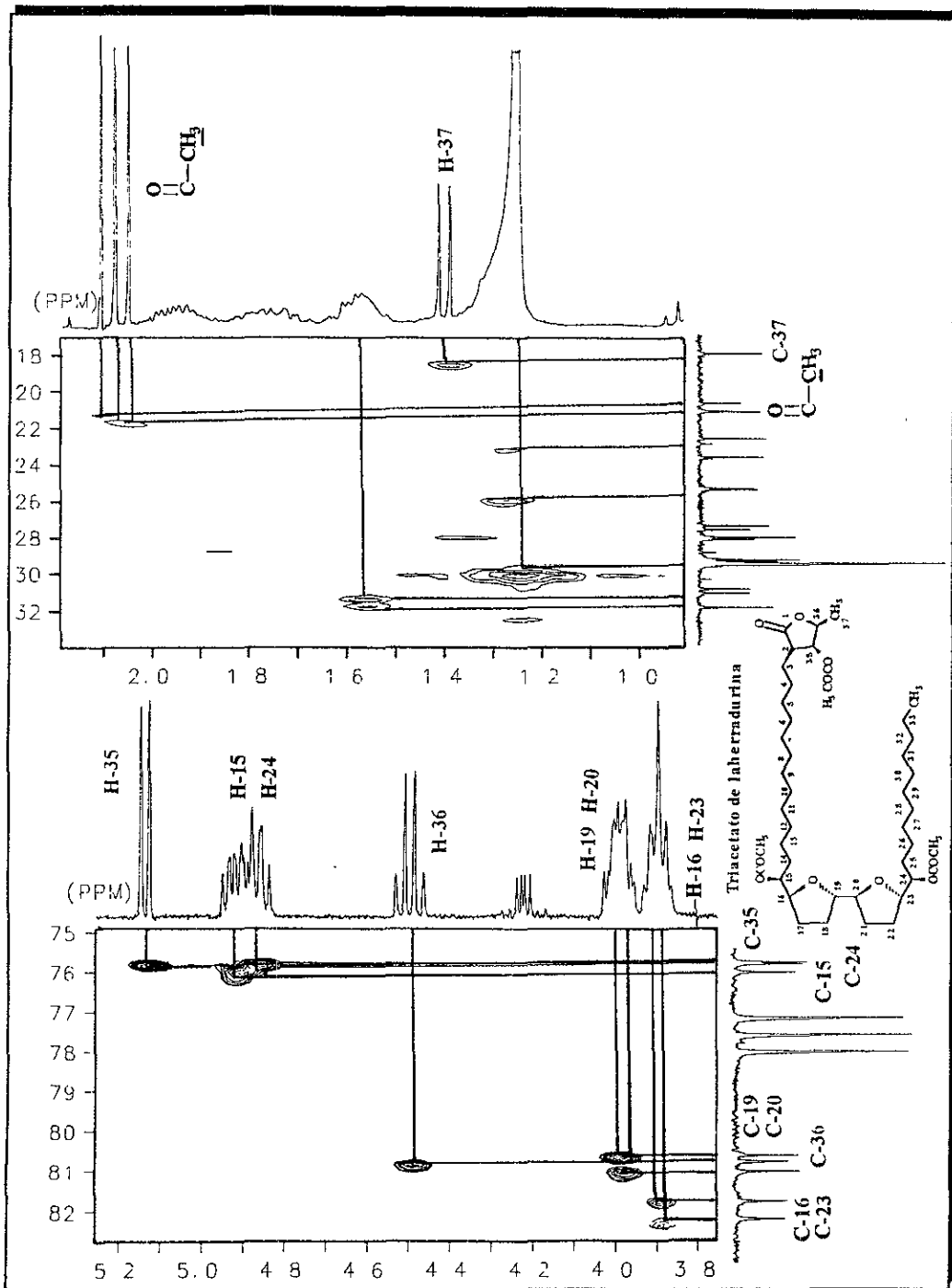
Espectro 16. Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃, TMS) del triacetato de la laherradurina.



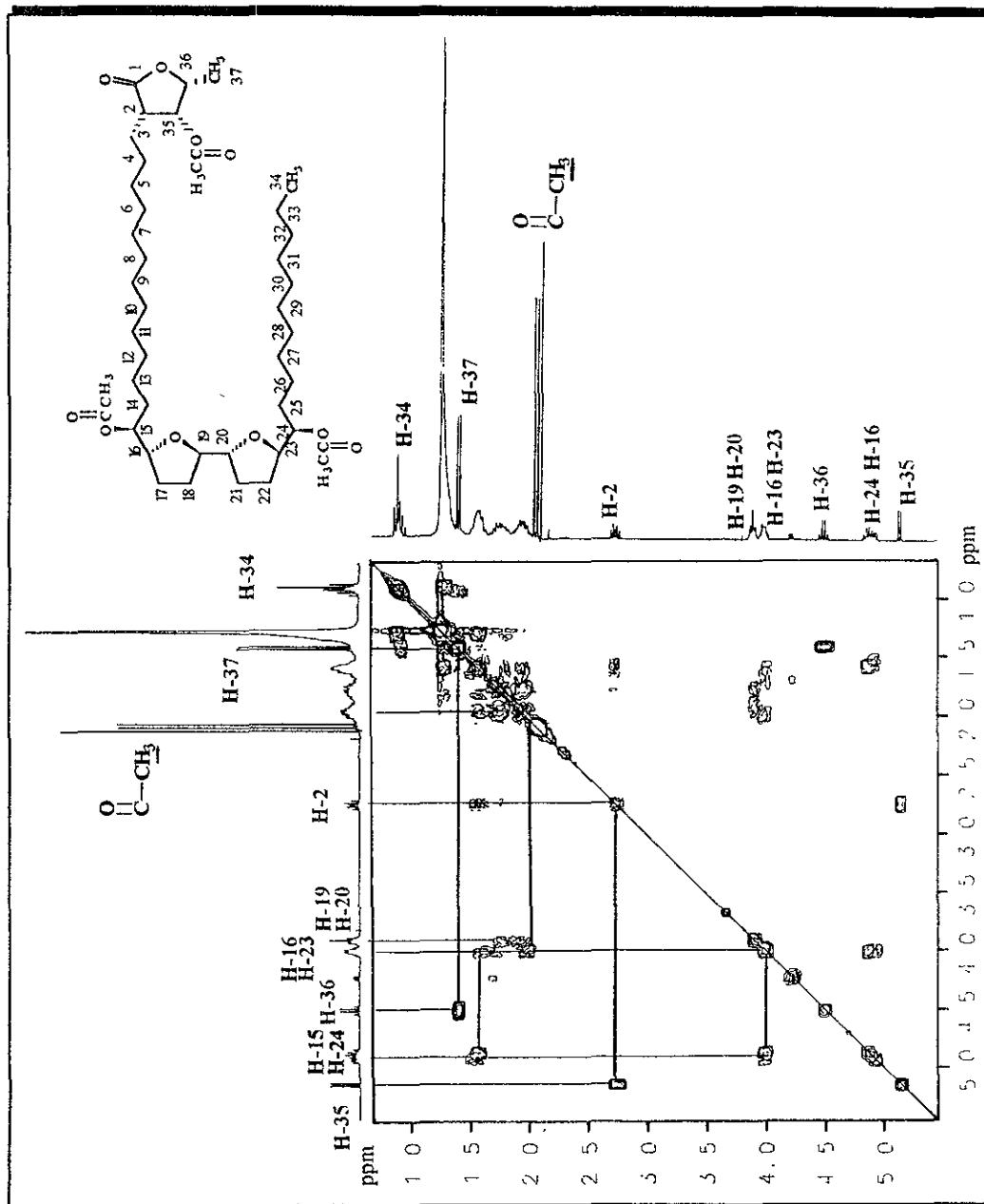
Espectro 17. Espectro de RMN-¹H (ampliación 0.8-5.0 ppm, 300 MHz, CDCl₃, TMS) del triacetato de laherradurina.



Espectro 18. Espectro de RMN-¹³C (ampliación 14-83 ppm, 300 MHz, CDCl₃, TMS) del triacetato de la laherradura.



Espectro 19. Espectro HETCOR (300 MHz, CDCl₃, TMS) del triacetato de la laherradurina.



Espectro 20. Espectro COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) del triacetato de laherradiurina.

desplazadas a campo bajo, mostrando resonancias en δ 3.97- δ 3.99 en el espectro de RMN- ^1H (Espectros 17 y 18).

Los protones metílicos de los grupos acetilo unidos a los C-15, C-24 y C-35, aparecen como señales simples a δ 2.06, δ 2.04 y δ 2.08 en el espectro de RMN- ^1H , respectivamente (Espectro 17).

TABLA 18. DATOS DE RMN- ^1H DE MODELOS SINTETICOS ACETILADOS DE CONFIGURACION RELATIVA CONOCIDA DE ACUERDO AL MODELO DE HOYE (Cavé *et al.*, 1997).

Hidrógeno (H, δ) Configuración relativa	H-24	H-23	H-20	H-19	H-16	H-15
1: eritro/cis/treo/cis/eritro	4.90	3.94	3.81	3.81	3.94	4.90
2: eritro/trans/treo/cis/eritro	4.91	4.01	3.88	3.76	3.93	4.91
3: eritro/trans/treo/trans/eritro	4.91	3.98	3.88	3.88	3.98	4.91
4: eritro/cis/eritro/cis/eritro	4.95	3.91	3.71	3.71	3.91	4.91
5: eritro/trans/eritro/cis/eritro	4.96	3.97	3.81	3.80	3.91	4.91
6: eritro/trans/eritro/trans/eritro	4.92	3.99	3.84	3.84	3.99	4.92
7: treo/cis/treo/cis/treo	4.94	3.93	3.86	3.86	3.93	4.94
8: treo/trans/treo/cis/treo	4.88	4.08	3.93	3.84	3.91	4.88
9: treo/trans/treo/trans/treo	4.85	3.97	3.90	3.90	3.97	4.85
10: treo/cis/eritro/cis/treo	4.84	3.93	3.77	3.77	3.93	4.84
11: treo/trans/eritro/cis/treo	4.85	3.97	3.82	3.82	3.93	4.85
12: treo/trans/eritro/trans/treo	4.84	3.97	3.84	3.84	3.97	4.84

La configuración relativa de la acetogenina aislada se confirmó mediante la comparación de los desplazamientos químicos de RMN- ^1H de los derivados acetilados, preparados por el método de Hoye (Cavé *et al.*, 1997) Para ello, la configuración relativa de la molécula fue deducida a partir de la combinación de las configuraciones 3 y 9 que se listan en la tabla 18 Esta comparación fue congruente con la estereoquímica deducida para un sistema eritro/trans/treo/trans/treo, en dirección de los carbonos C-24 a C-15 (Figura 28) (Cavé *et al.*, 1997).

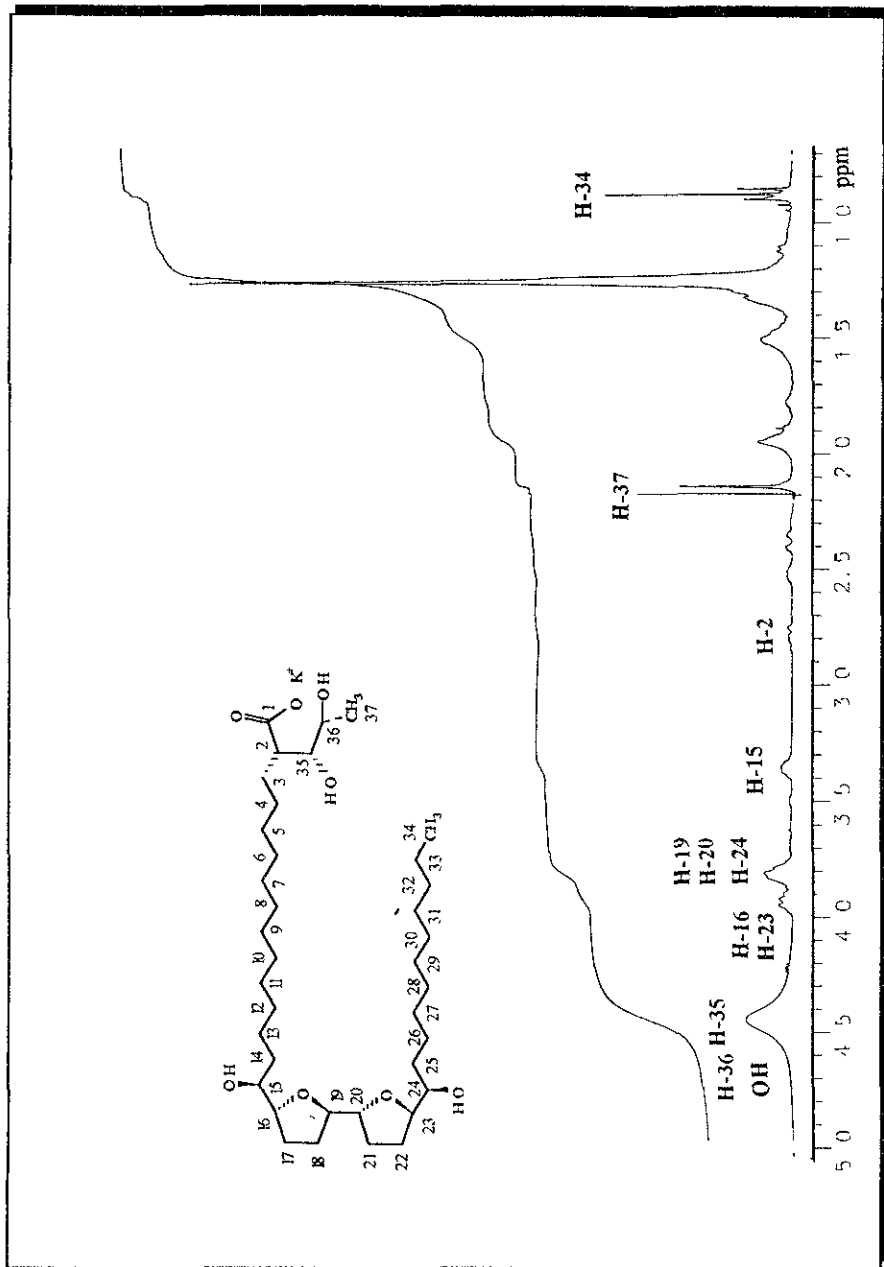
Hidrógeno	H-24	H-23	H-20	H-19	H-16	H-15
RMN- ¹ H (δ), deducido a partir del modelo de Hoye.	4.91	3.98	3.9	3.9	3.97	4.85
RMN- ¹ H (δ), producto natural acetilado.	4.92	4	3.9	3.9	3.97	4.85

FIGURA 28. COMPARACION DE DATOS DE RMN-¹H DEL TRIACETATO DE LA ACETOGENINA AISLADA DE *Annona diversifolia* Saff. CON UN SISTEMA BIS-THF critro/trans/treo/trans/treo (C-24→C-15) DEDUCIDO POR EL MODELO DE HOYE.

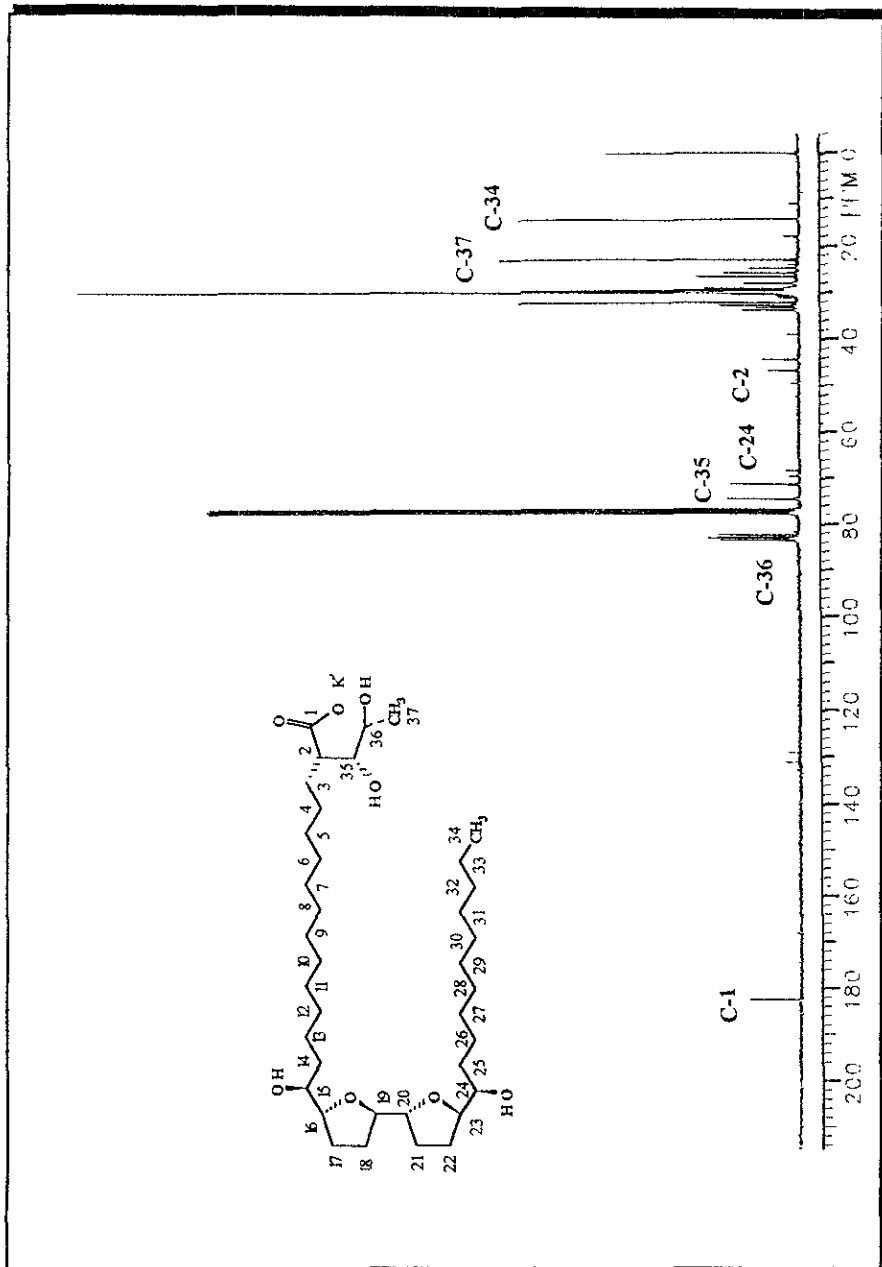
- Sal potásica de la laherradurina.

Con la finalidad de obtener un derivado sólido útil para la difracción de rayos X, se preparó la sal potásica por apertura de la γ -lactona en medio básico, la cual mostró las siguientes características. El espectro de RMN-¹H, muestra el desplazamiento a campo bajo de los protones H-35 y H-36, así mismo se observa un efecto de desprotección en el H-2, observándose como una señal múltiple en δ 2.8. La señal del grupo metilo sustituido en el C-36, se desplaza a campo bajo a δ 2.15 (Espectro 21), observándose como una señal doble.

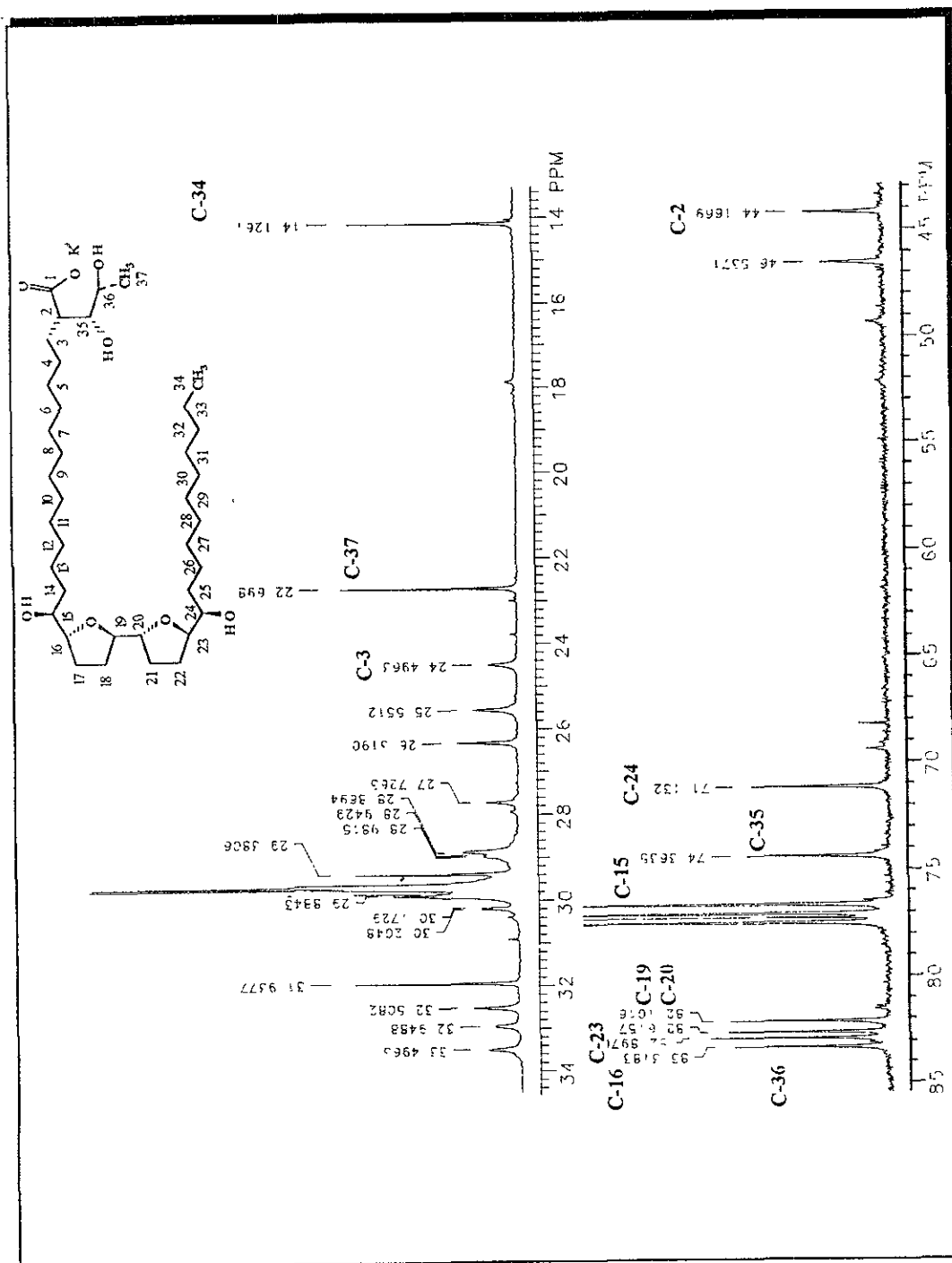
A su vez el espectro de RMN-¹³C muestra 37 señales (Espectros 22 y 23), visualizando al grupo carbonilo del carboxilato en δ 182.51, así mismo los C-2, C-35, C-36 y C-37 muestran señales en el espectro de RMN-¹³C a δ 44.17, δ 74.36, δ 83.22 y δ 22.69, respectivamente (Figura 29)



Espectro 21. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la sal potásica de la laberradurina.



Espectro 22. Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la sal potásica de la laberradurina.



Espectro 23. Espectro de RMN-¹³C (ampliación 14-85 ppm, 300 MHz, CDCl₃, TMS) de la sal potásica de la laherradurina.

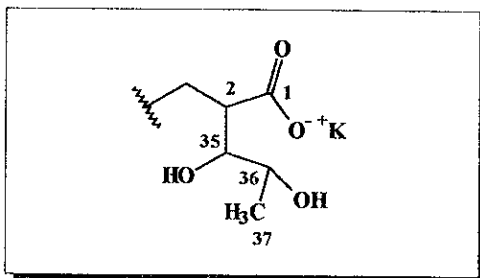
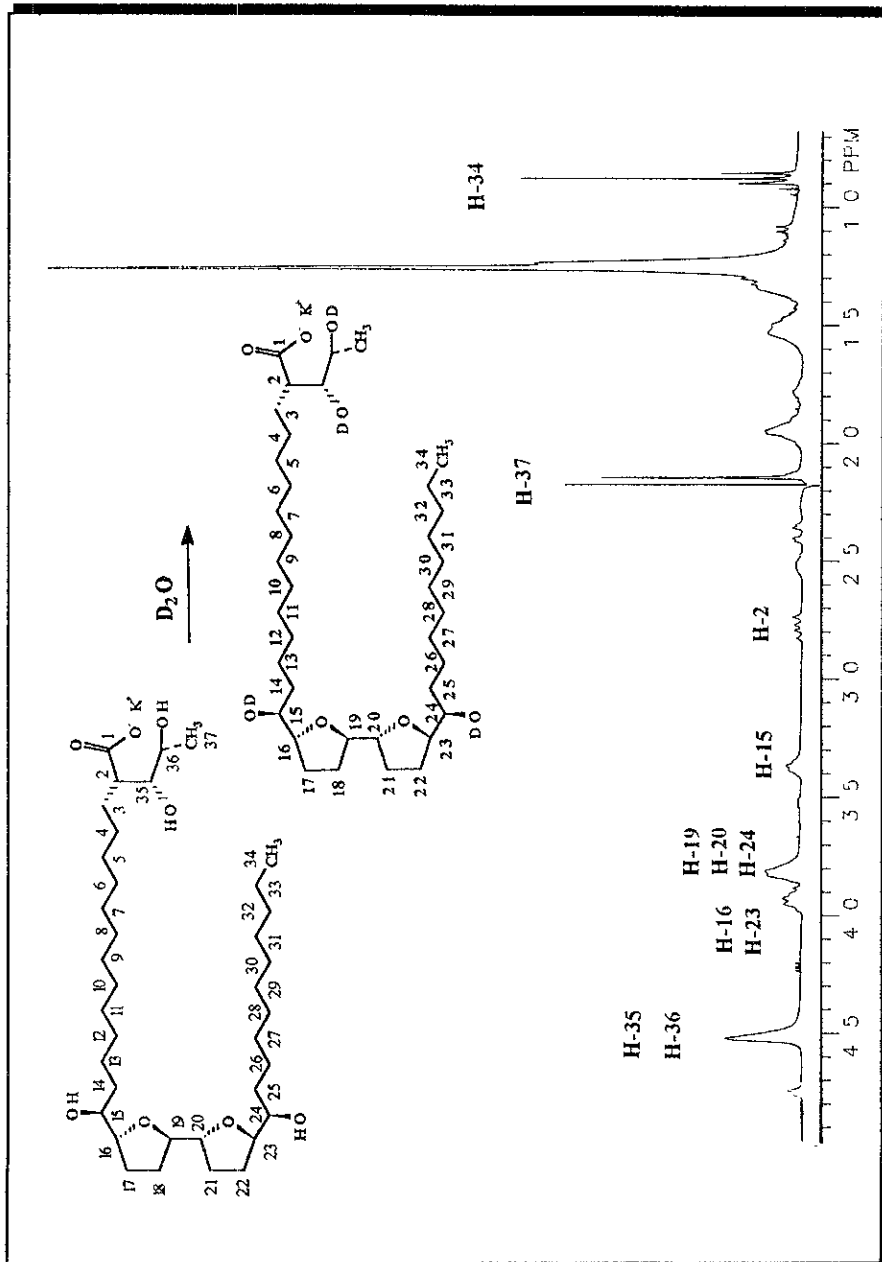


FIGURA 29. HIDROLISIS DEL ANILLO DE LACTONA PARA FORMAR LA SAL POTASICA (KOH/MeOH).

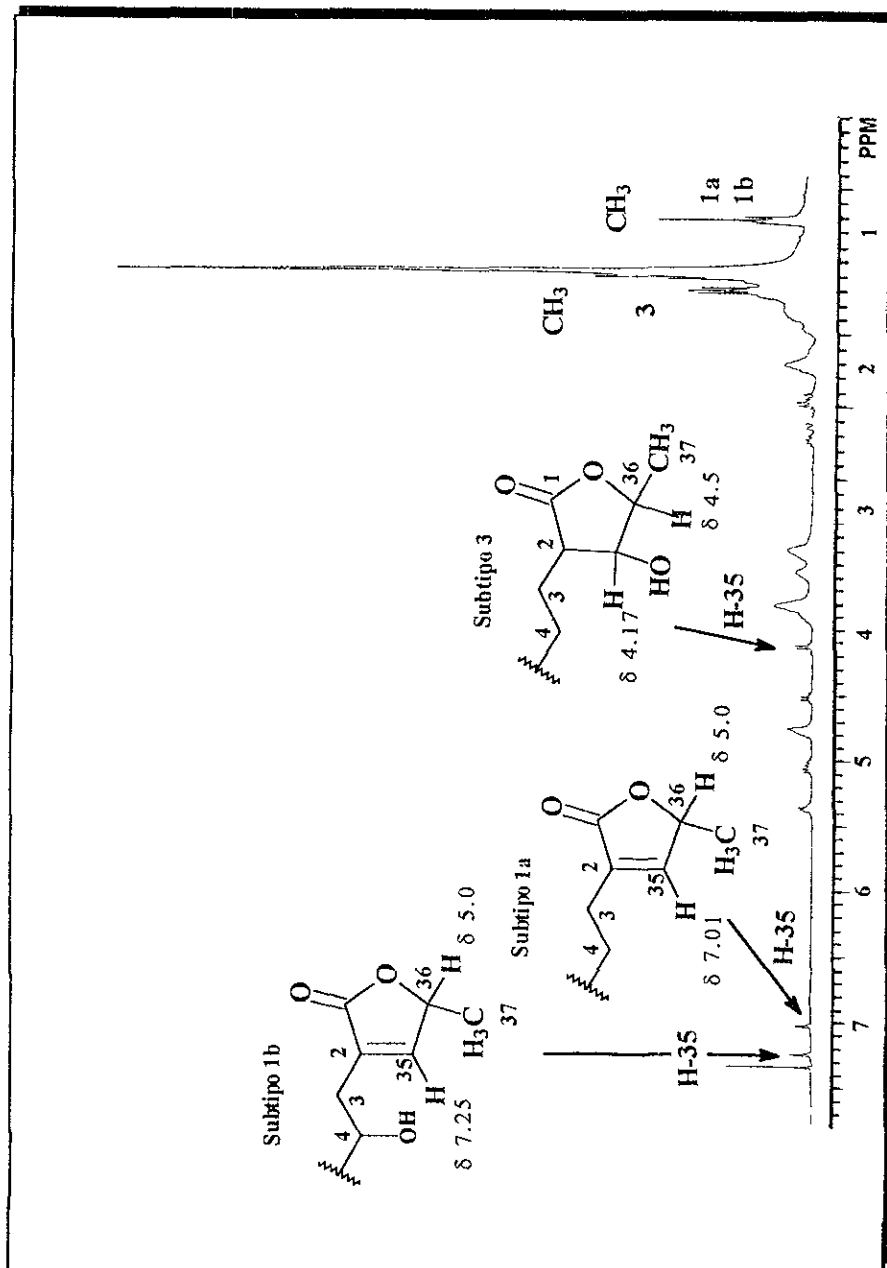
Las señales de protones de los grupos hidroxilo se desplazaron a campo bajo a δ 4.45 en el espectro de RMN- ^1H , sobreponiéndose a la señal de los protones H-35 y H-36, y esto se comprueba cuando se equilibra con D_2O , afinándose la señal mencionada (Espectro 24).

De este compuesto se obtuvieron cristales, pero no fueron adecuados para la difracción con rayos X, siendo necesario contar con mayor cantidad de la laherradura para obtener lotes más grandes del derivado, con el fin de obtener cristales de mejor calidad

Las fracciones 81-90 (III), no pudieron ser separadas por las técnicas convencionales, debido a que descomponían cuando eran resueltas. No obstante, se determinó que consistían en una mezcla de acetogeninas de los subtipos 1a, 1b y 3, por los desplazamientos químicos característicos de estas sustancias en δ 7.25, δ 7.08 y δ 4.5. Así mismo, se observan los sustituyentes hidroxilo (δ 3.5) y las señales típicas de los anillos de THF (δ 3.8-3.9), las cadenas alquílicas (δ 1.3-2.0) y los metilos terminales de la cadena en δ 0.88 y el metilo sustituido en posición γ al anillo de la lactona en δ 1.38 (Espectro 25, Figura 30)



Espectro 24. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + D₂O, TMS) de la sal potásica de la laherradura.



Espectro 25. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de las fracciones 81-90 (III).

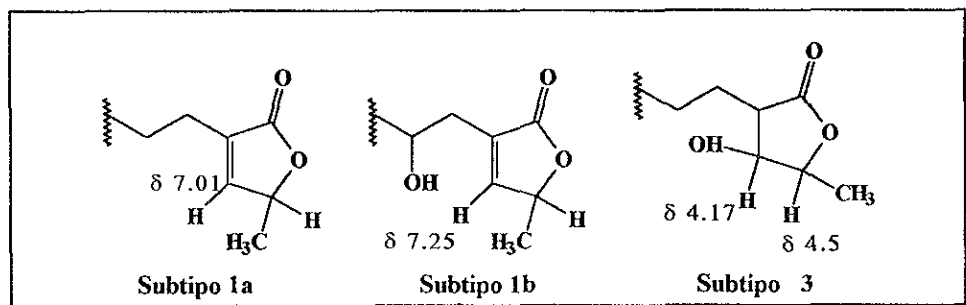


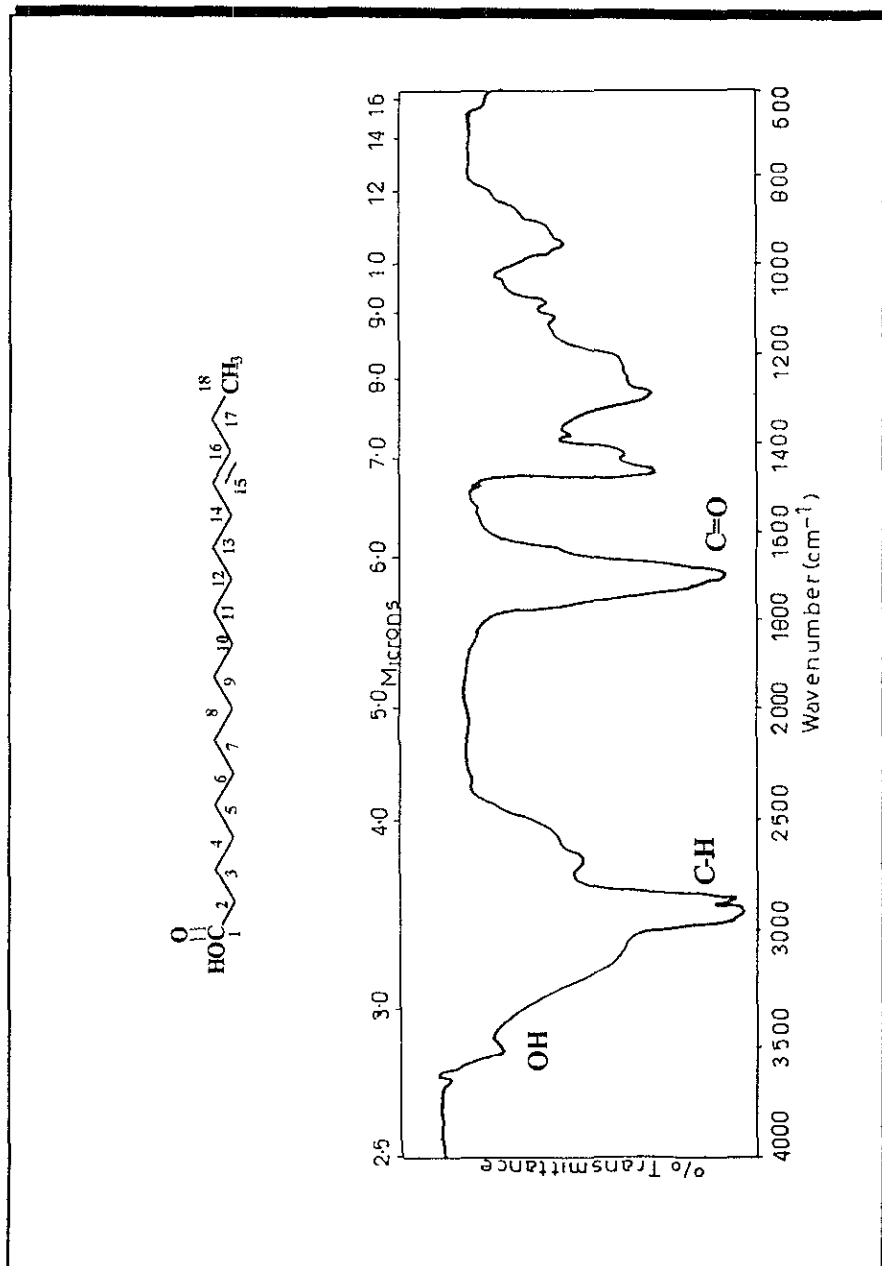
FIGURA 30. SUBTIPOS DE ACETOGENINAS IDENTIFICADAS EN LAS FRACCIONES 81-90.

• De las fracciones [71-80(35-50)]¹⁵, se aisló una sustancia sólida, de aspecto graso, que presentó un ion molecular en el espectro de EM(IE) a m/z 282(4%), para una fórmula molecular $C_{18}H_{34}O_2$, y parece corresponder al ácido 15-octadecenoico (II) sustentado por los siguientes datos.

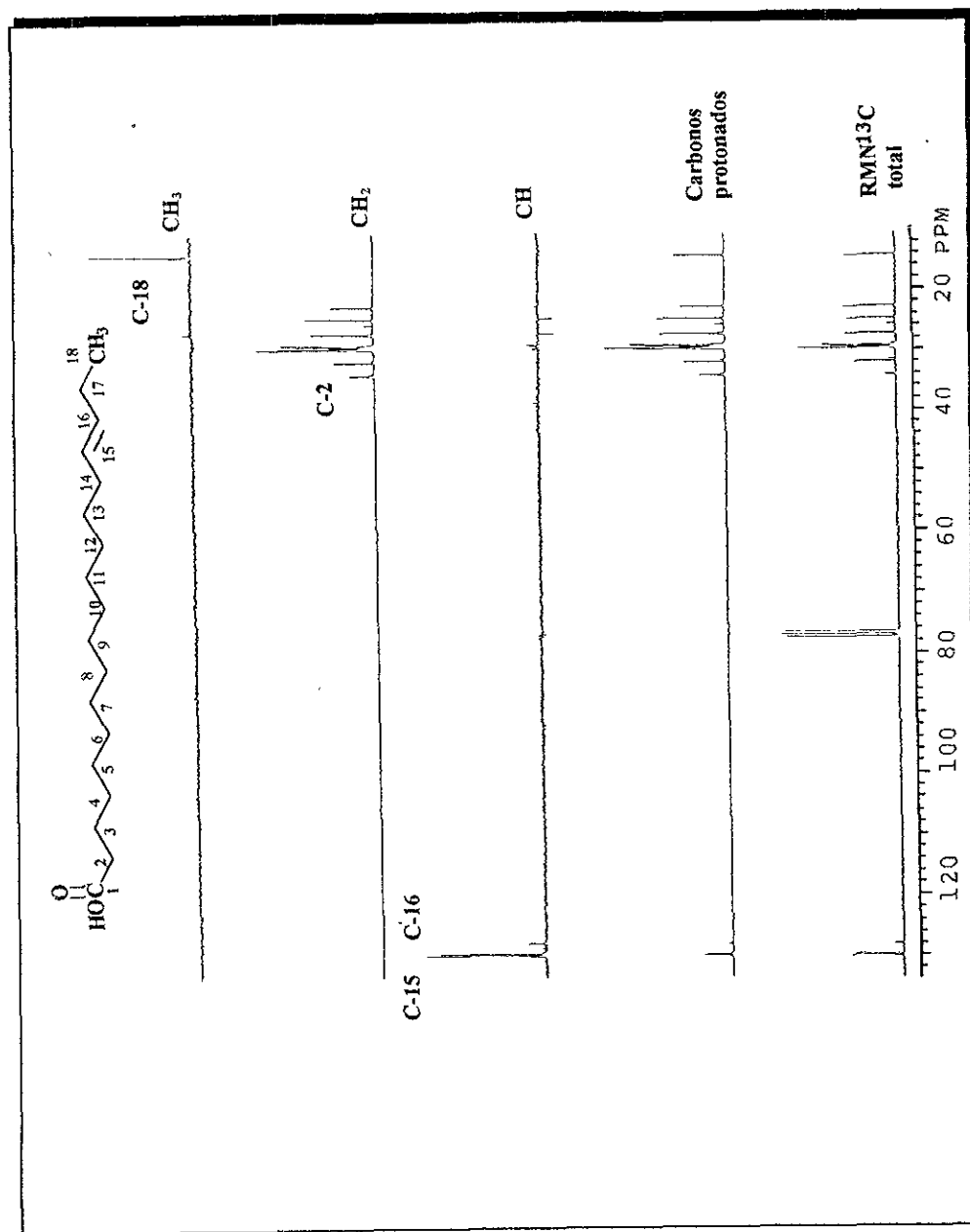
El espectro de IR muestra en $3300-2500\text{ cm}^{-1}$ una señal ancha debido a la presencia de hidroxilo de un grupo ácido, a la que se encuentran sobrepuestas las bandas de alargamiento de los enlaces C-H de la cadena de alquilo, los que presentan vibración en $2850-2910\text{ cm}^{-1}$. Así mismo, en 1710 cm^{-1} se presenta la vibración debida al carbonilo de ácido y una señal sobrepuesta en 1650 cm^{-1} , debido a la presencia de insaturaciones en la molécula (Espectro 26)

Por otra parte, el espectro de DEPT muestra 17 señales, las que corresponden a 1 carbono de grupo metilo, 14 metilenos y 2 carbonos de metinos (Espectro 27), así como un grupo carbonilo a δ 180 en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 28).

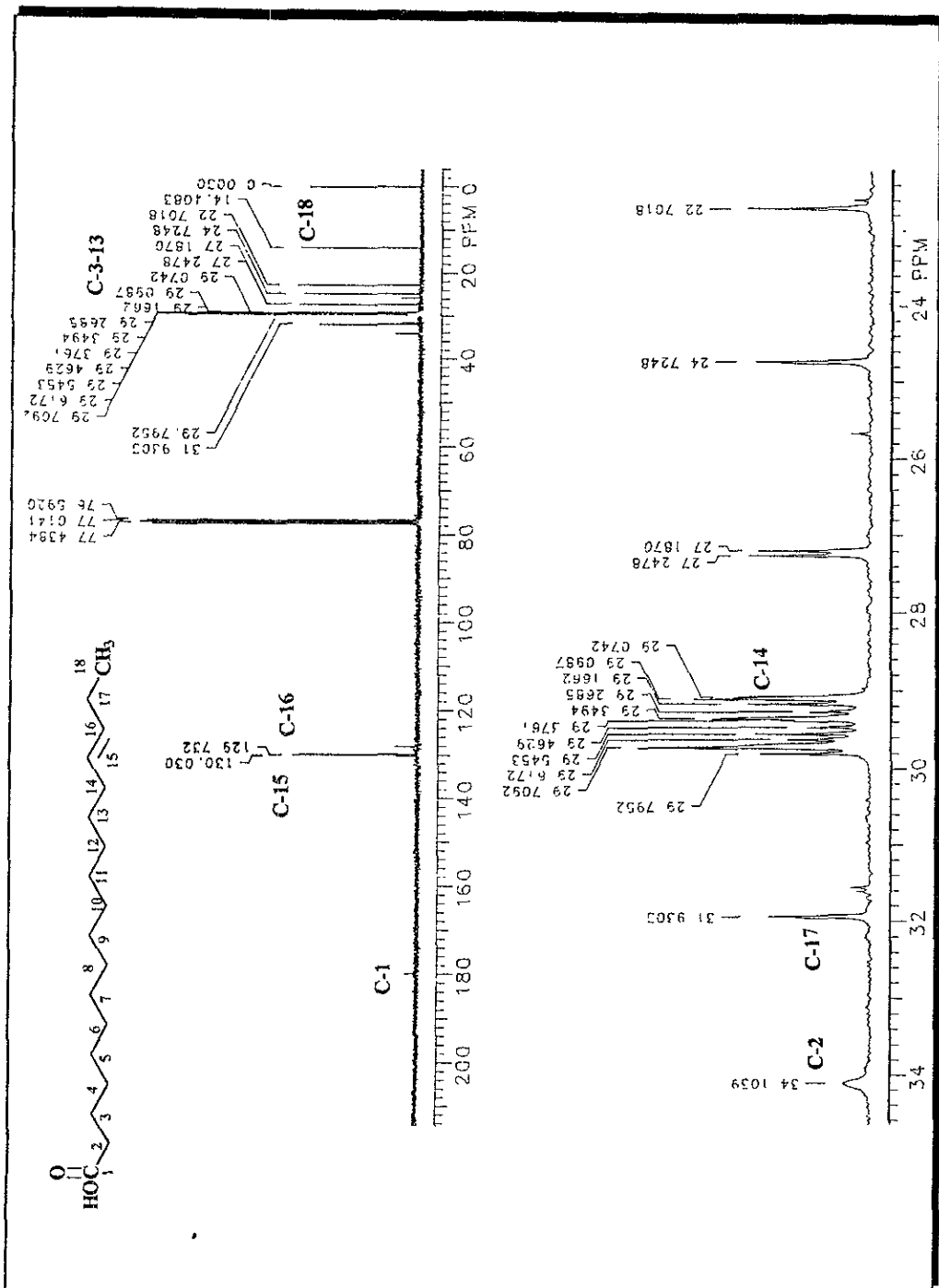
¹⁵ A partir de una primera separación cromatográfica se obtuvieron las F71-80, las que a su vez fueron sometidas a otra recromatografía, obteniéndose el compuesto de interés en las F35-50



Espectro 26. Espectro de IR (CHCl₃) del ácido 15-octadecenoico (II).



Espectro 27. Espectro DEPT (300 MHz, CDCl₃, TMS) del ácido 15-octadecenoico (II).



Espectro 28. Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃, TMS) del ácido 15-octadecenoico (ID).

Además en el espectro de RMN- ^1H a δ 5.35 se observa una señal doble de triples que integra para 2 protones ($J=5.6, 11$ Hz), asignados a los H-15 y H-16 (Espectro 29), cuya constante de acoplamiento sugiere una disposición espacial de tipo trans. La posición de la insaturación se sugiere debido a los fragmentos en el EM(IE) a m/z 265(6), 213(23), 83(91), 69(87) y 55(72), así como a las posibilidades estructurales comparadas con el banco de información incorporado a la memoria del equipo de masas. Algunos fragmentos pueden explicarse por las rupturas lógicas del tipo β al doble enlace y a la pérdida de 17 unidades de masa del -OH del grupo ácido (Figura 31).

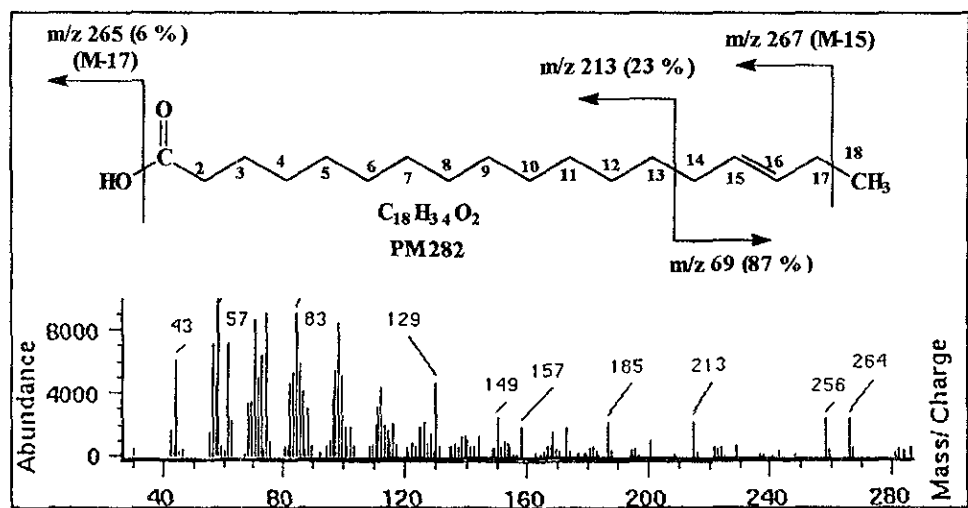
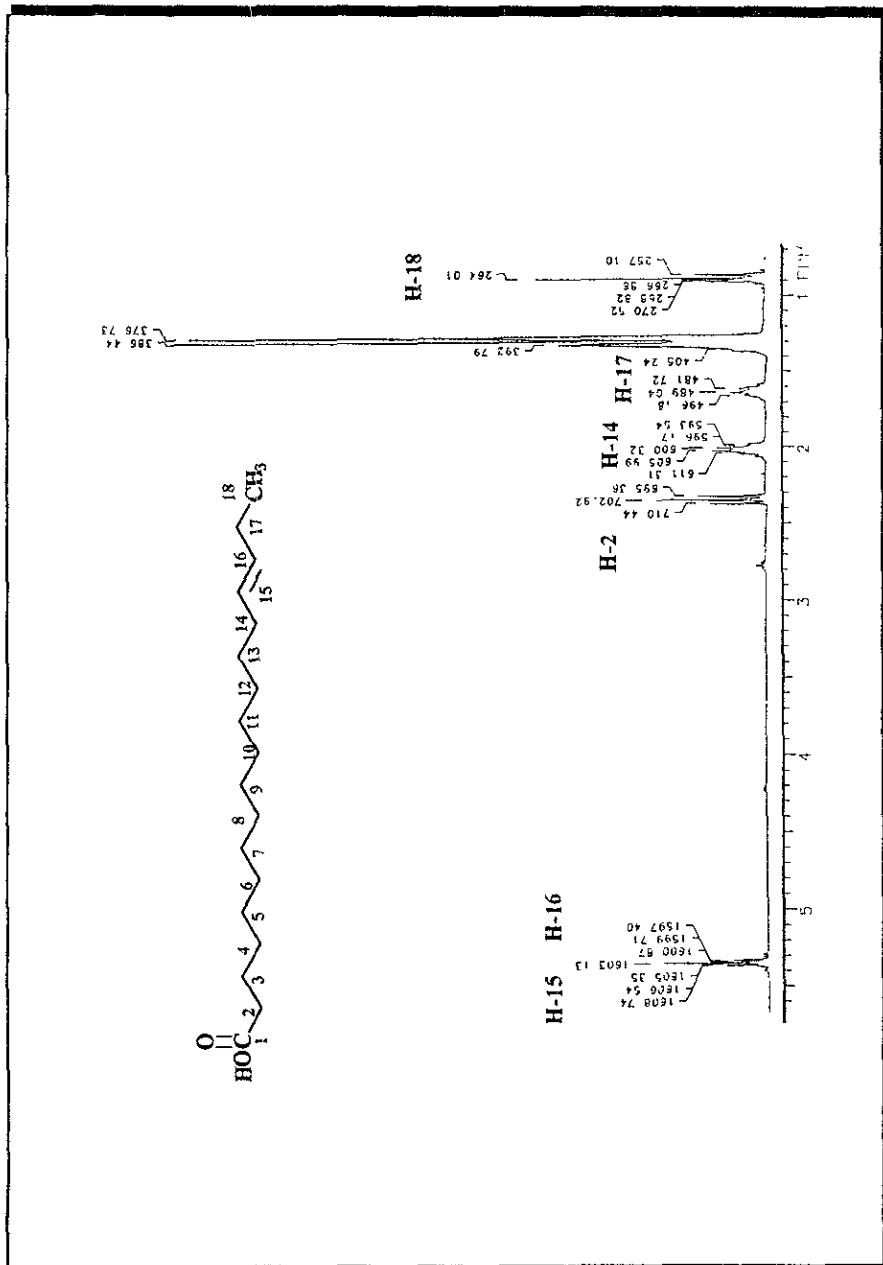


FIGURA 31. RUPTURAS Y FRAGMENTOS GENERADOS POR LA DESCOMPOSICION DE LA MUESTRA EN EL ESPECTRO DE MASAS.

El protón H-2 se observa a δ 2.35 en el espectro de RMN- ^1H , mientras que el H-17 aparece en δ 1.53 ($J= 7$ Hz), acoplado al H-18 (3H), el que corresponde a los protones de un grupo metilo en δ 0.88. El resto de los grupos metileno (CH_2) se detectó entre δ



Espectro 29. Espectro de RMN-¹H (ampliación 0.9-5.5 ppm, 300 MHz, CDCl₃, TMS) del ácido 15-octadecenoico (II).

1.25-1.3, en tanto el H-14 ($J=5.6$ Hz) se observa en δ 2.01 (Espectro 29). El protón del grupo ácido se observa en δ 9.0 en el espectro de RMN- ^1H (Espectro 30)

Los desplazamientos en RMN- ^{13}C en δ C-1/180, C-2/34.09, C-14/29.77, C-15/130, C-16/129.71, C-17/31.19, C-6-20/22.70-29.7 y C-18/14.09 (Espectro 28), fueron asignados por comparación de datos con la literatura (Silverstein *et al.*, 1991) (Figura 32).

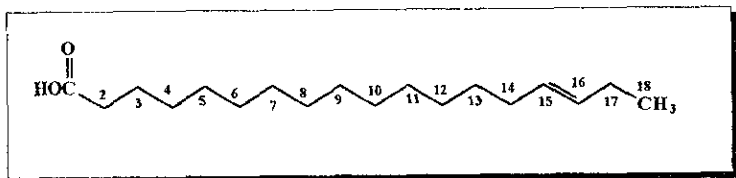
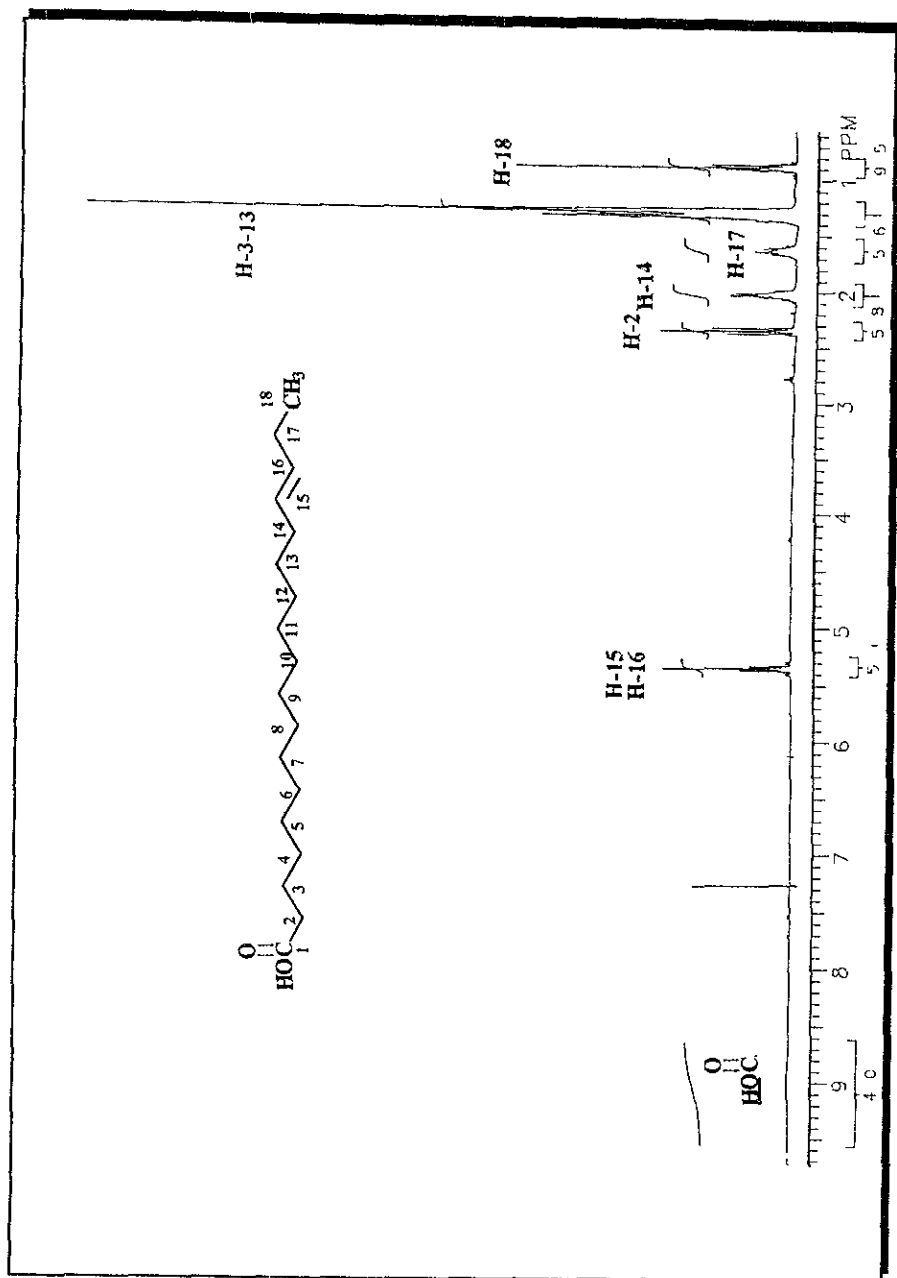


FIGURA 32. Acido 15-octadecenoico (II).



Espectro 30. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) del ácido 15-octadecenoico (II).

8.2. Actividad biológica.

El extracto metanólico de las semillas de *Annona diversifolia* Saff., abundante en sustancias del tipo de las acetogeninas, demostró ser altamente tóxico, al presentar una CL_{50} de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mientras que el extracto hexánico, compuesto mayoritariamente por ésteres triglicéricos no fue activo (Tabla 12, Figura 9).

Las particiones realizadas al extracto metanólico con hexano, diclorometano, acetato de etilo y agua, presentaron valores de concentración letal media (CL_{50}) varias veces más altas en relación al extracto crudo. La partición de diclorometano fue la más tóxica con una CL_{50} de 0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo seleccionada para continuar el estudio biorregulado.

La partición de diclorometano fue separada por recromatografías sucesivas en columna, resolviendo fracciones que presentaron CL_{50} de hasta 7.71×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$, las más tóxicas y de 2.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las menos tóxicas (Tabla 13, Figura 10). Desafortunadamente muchas de ellas presentaron inestabilidad química que se atribuyó a la influencia del calor, la luz y el ambiente oxidante del aire, y en consecuencia se impidió su purificación, identificación y consiguiente reevaluación biológica.

Los valores de la concentración letal media de las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica, altas en relación a la CL_{50} de la partición de diclorometano sugieren un efecto sinérgico entre las sustancias presentes, aumentando la potencia citotóxica en la *Artemia salina* L., o bien, el efecto de dichas fracciones sea el resultado de la suma de actividades de los compuestos en la mezcla.

De las fracciones 51-53, que presentaron una CL_{50} de 2.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fue obtenida una mezcla de acetogeninas del subtipo 3, con una toxicidad a CL_{50} de 0.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De esta mezcla fue aislado el componente mayoritario, una acetogenina del tipo B3 identificada como la laherradurina, que presentó una CL_{50} de 0.65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, concentración letal media 3 veces menor a la concentración letal media de las fracciones iniciales (Tabla 14, Figura 11).

El derivado triacetilado de la laherradurina no presentó actividad citotóxica, lo que indica que son necesarios los grupos hidroxilo para presentar la actividad biológica de la laherradurina. Por otra parte, en la apertura del anillo de la metil- γ -lactona, la actividad citotóxica no desapareció, pero si disminuyó en un 50%, aumentando la CL_{50} a 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 11). Lo cual indicó que es importante el anillo de la γ -lactona para que la actividad citotóxica sea mayor.

Los datos obtenidos confirman los resultados de otras investigaciones en donde se ha establecido la alta toxicidad de las sustancias del tipo acetogenina en el modelo de *Artemia salina* L. y resalta la importancia que tienen los grupos funcionales hidroxilo, fundamentales para presentar citotoxicidad y la relación del anillo de lactona en la misma

9. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se desprenden de este estudio son.

El estudio fitoquímico de *Annona diversifolia* Saff., permitió el aislar del extracto hexánico, una mezcla de metabolitos secundarios del tipo de los ésteres triglicéricos, los que no presentan actividad tóxica en el modelo de *Artemia salina* L.

Así mismo el extracto metanólico presentó una elevada citotoxicidad, a su vez la partición de diclorometano obtenida del mismo, demostró contener abundantemente una serie de acetogeninas altamente tóxicas para *Artemia salina* L. y otros metabolitos secundarios como el ácido 15-octadecenoico.

De tal forma que fue posible el aislar la acetogenina del tipo B3, identificada como la laherradurina, previamente aislada de *Annona cherimolia*, la cual demostró ser altamente tóxica para el crustáceo de prueba.

Por otra parte, la esterificación de los grupos hidroxilo de la laherradurina inhibe la actividad citotóxica totalmente, en tanto la apertura del anillo de la γ -lactona, disminuye en 50 % la toxicidad de la misma

Es importante resaltar que *Annona diversifolia* Saff (Ilama), es la segunda fuente natural de acetogeninas del subtipo 3, ya que anteriormente solo se habían aislado de *Annona cherimolia* (Cortes *et al* , 1993)

Concluyendo, *Annona diversifolia* Saff, representa una fuente de sustancias citotóxicas del tipo de las acetogeninas, las cuales representan un recurso natural de potencial importancia en la búsqueda de sustancias con actividad antitumoral.

10. Sugerencias.

Las fracciones que mostraron inestabilidad química durante su separación y fueron activas en el modelo de citotoxicidad, se recomienda que en posteriores estudios sean resueltas por técnicas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Es conveniente que las sustancias que se aislen de *Annona diversifolia* Saff, sean evaluadas en mezclas tratando de demostrar un posible efecto sinergista en la actividad citotóxica.

Comprobada la presencia de sustancias del tipo acetogenina en la especie estudiada, se sugiere evaluar otras actividades biológicas dentro del amplio espectro de actividades farmacológicas que han sido descritas para la familia de las *Annonaceas*, como la actividad antiparasitaria, antimicrobiana, antineoplásica, inmunosupresora, anticonvulsivante, etc.

Se recomienda aislar una mayor cantidad de la laherradurina con el fin de obtener cristales en la calidad apropiada para la difracción con rayos X, así mismo, preparar una mayor cantidad de la sal potásica, para ser sometida a dicho estudio

11. **Bibliografía.**

- Bhakuni, D. S., Tewari, S. y Dhar, M. M. (1972). **Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*.** *Phytochemistry*. 11. 1819-1822.
- Bhaumik, P. K., Mukherjee, B., Juneau, J. P., Bhacca, N. S. y Mukherjee, R. (1979). **Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*.** *Phytochemistry*. 18. 1584-1586.
- Bohlmann, F. y Rao, N. (1973). **Über die Inhaltsstoffe von *Annona squamosa* L.** *Chem. Ber.* 106. 841-846.
- Bories, C., Loiseau, P., Cortes, D., Myint, S., Hocquemiller, R., Gayral, P., Cavé, A. y Laurens, A. (1991). **Antiparasitic Activity of *Annona muricata* y *Annona cherimolia* Seeds.** *Planta Medica*. 57. 434-436.
- Born, L., Lieb, F., Lorentzen, J.P., Moeschler, H., Nonfon, M., Söllner, R. y Wendisch, D. (1990). **Die relative Konfiguration der aus *Annona squamosa* isolierten Acetogenine Annonin I (Squamycin) und Annonin VI.** *Planta Medica*. 56. 312-316.
- Cassady, J. M., Baird, W. M. y Chang, C-H., (1990). **Natural Products as a Source of Potential Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents.** *Journal of Natural Products*. 53 (1). 23-41.
- Cavé, A., Cortes, D., Figadère, B., Hocquemiller, R., Laprèvote, O., Laurens, A. y Lebceuf, M. (1993). **Recent advances in the acetogenins of the *Annonaceae*.** En Downum, K.

R., Romeo, J. T. y Stafford, H. A. Editores. *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. 27. Plenum Press. USA. 167-202.

Cavé, A., Figadère, B., Laurents, A. y Cortes, D. (1997). **Acetogenins form Annonaceae**. En Herz, W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich, W. y Tamm Ch. Editores. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 70. Springer Wien. New York. 81-288.

Cedillo, P. E. (1990). **Las plantas útiles del Municipio de Tepoztlán, Morelos**. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.

Choi, M.-S., Kwak, S.-S., Liu, J. R., Park, Y.-G., Lee, M.-K. y An N.-H. (1994). **Taxol and Related Compounds in Korean Native Yews (*Taxus cuspidata*)**. *Planta Medica*. 61. 264-266.

Cortes, D., Myint, S., Dupont, B. y Davoust, D., (1993). **Bioactive Acetogenins from Seeds of *Annona cherimolia****. *Phytochemistry*. 32 (6). 1475-1482.

Cortes, D., Myint, S., Leboeuf, M. y Cavé A. (1991). **A New Type of Cytotoxic Acetogenins: The Tetrahydrofuranic β -hidroxy Methyl γ -Lactones¹**. *Tetrahedron Letters*. 32 (43). 6133-6134.

Cortes, D., Rios, J.L., Villar, A. y Valverde, S. (1984). **Cherimoline et dihydrocherimoline: Deux nouvelles γ - lactones bis-tetrahydrofuranniques possédant une activité antimicrobienne**. *Tetrahedron Letters*. 25(30). 3199-3202.

Domínguez, X. A. y Peraza, S. R. (1990). **Aislamiento de kaurenos de la raíz y corteza de saramuyo (*Annona squamosa*)**. *Revista Latinoamericana de Química*. 21(2). 93.

- Duret, P., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cortes, D. y Cavé, A.. (1994). **Isoacetogenins, artifacts issued from translaconization from *Annonaceous* acetogenins.** *Heterocycles*. 39 (2). 741-749.
- Duret, P., Waechter, A.-I., Hocquemiller, R. y Cavé, A. (1996). **Annotemoyin-1 and -2 : Two novel mono-Tetrahydrofuranic γ -lactone acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*.** *Natural Products Letters*. 8. 89-95.
- Estrada, C. A. (1994). **Caracterización de la ilama (*Annona diversifolia* Saff.) En Salitre de Palmerillos, Municipio de Amatepec, Estado de México.** Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Evans, W.C.(1991). **Farmacognosia.** Interamericana. México. 230-305.
- Fang, X-P., Rieser, M.J., Gu, Z-M., Zhao, G-X. y MacLaughlin, J.L. (1993). ***Annonaceous* Acetogenins: An Updated Review.** *Phytochemical Analysis*. 4. 27-48.
- Farnsworth, N. (1992). **Sobre la preparación de extractos de plantas para su evaluación farmacológica.** En Estrada, E. Editor. *Plantas Medicinales de México. Introducción a su estudio*. 3a. UACH. México. 428-51.
- Gu, Z.-M., Zhao, G.-X., Oberlies, N. H., Zeng, L. y McLaughlin. (1995). ***Annonaceous* Acetogenins. Potent Mitochondrial Inhibitors with Diverse Applications.** En Arnason, J. T., Mata, R. y Romeo J. T. Editores. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press. 29. USA. 249-310.
- Jossang, A., Dubaele, B., Cavé, A., Bartoli, M.-H. y Bériel, H. (1991). **Annomontacine: Une nouvelle acétogénine γ -lactone-monotetrahydrofurannique cytotoxique de l'*Annona montana*.** *Journal Natural Products*. 45 (4). 967-971.

- Liu, Y-L., Ho, D. K. y Cassady, J. M. (1992). **Isolation of potential cancer chemopreventive agents from *Eriodictyon californicum***. *Journal of Natural Products*. 55 (3). 357-363.
- Martínez, M.A. (1996). **La etnobotánica y la conservación del patrimonio biológico y cultural de México**. *Herbolaria Universal*. 1(1). 28-30.
- Meyer, B. N., Ferrini N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. y McLaughlin, J. L. (1982). **Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for active plant constituents**. *Planta Medica*. 45. 31-34.
- Joseph-Nathan, P. y Díaz, T.E. (1970). **Introducción a la resonancia magnética nuclear**. *Limusa*. México.
- Navarrete, C.A. (1992). **Evaluación farmacológica de las plantas Medicinales**. Estrada, L.E. Editor. *Plantas Medicinales de México. Introducción a su estudio*. 3a. UACH. México. 255-268.
- Padmaja, V., Thankamany, V. e Hisham, A. (1993). **Antibacterial, antifungal and anthelmintic activities of root barks of *Uvaria hookeri* and *Uvaria narum***. *Journal of Ethnopharmacology*. 40. 181-186.
- Rieser, M.J., Fang, X.-P., Rupprecht, J.K., Hui, Y.-H., Smith, D.L. y McLaughlin, J.L. (1993). **Bioactive Single-Ring Acetogenins from Sedd Extracts of *Annona muricata***. *Planta Medica*. 59. 91-92.
- Ríos, J.L., Cortes, D. y Valverde, S. (1989). **Acetogenins, Aporphinoids, and Azaanthraquinone from *Annona cherimolia* Seeds**. *Planta Medica*. 55. 321-323.

Roblot, F., Laugel, T., Leubceuf, M., Cavé, A. y Laprévote, O. (1993). **Two acetogenins from *Annona muricata* seeds.** *Phytochemistry*. 34(1). 281-285.

Ruiz, E.S. y Morett, L.A. (1997). **Las anonas en el México prehispánico.** Memorias del Congreso Internacional de *Annonaceas*. Universidad Autónoma Chapingo. 169-185.

Rupprecht, J. K., Hui, Y-H. y McLaughlin, J.L. (1990). **Annonaceous acetogenins: A review.** *Journal of Natural Products*. 53(2). 237-278.

Sahpaz, S., Bories, Ch., Louise, P.M., Cortés, D., Hocquemiller, R., Laurens, A. y Cavé, A. (1994). **Cytotoxic and Antiparasitic Activity from *Annona senegalensis* Seeds.** *Planta Medica*. 60. 538-540.

Saito, M.L. (1994). **Alkaloids from *Annona cacans*.** *Fitoterapia*. 55. (1). 87.

Santos, L. P., Boaventura, M., Sun, N.-J., Cassady, J. M. y De Oliveira, A. B. (1996). **Araticulin, a Bis-Tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds.** *Phytochemistry*. 42(3). 705-707.

Sasaki, S., Naito, H., Maruta, K., Kawahara, E. y Maeda, M. (1994). **Novel calcium ionophores: Supramolecular complexation by the hydroxylated-bistetrahydrofuran skeleton of potent antitumor *Annonaceous* Acetogenins.** *Tetrahedron Letters*. 35(20). 3337-3340.

Seki, M. y Furasaki, S. (1996). **An immobilized cell system for Taxol production.** *Journal American Chemical Society*. 116. 41-44.

Seetharaman, T. R. (1986). **Flavonoids from the leaves of *Annona squamosa* y *Polyalthia longifolia*.** *Fitoterapia*. LVII (3). 198-199.

- Silverstein, R., Clayton, G. y Morrill, T. (1991). **Spectrometric identification of organic compounds**. *John Wiley and Sons*. 5a. Singapore.
- S.S.A. (1996). **Epidemiología**. Sistema Unico de Información. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 13(52).
- Tsuzumi, V. y Shibayama, M. (1995). **Los animales de experimentación en la amibiasis**. *Avance y Perspectiva*. 14(3). 88-96.
- Villamar, A. A., Asseleih, C. y Rodarte, M. (1994). **Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana I**. Instituto Nacional Indigenista. México. 149-153.
- Weinberg, M.L.D., Pires, V., Weinberg, J. y Oliveira, A.B.D. (1993). **Inhibition of drug-induced contractions of guinea-pig ileum by *Annona crassiflora* seed extract**. *Journal of Pharmacie and Pharmacology*. 45. 70-72.
- Zafra-Polo, M. C., González, M. C., Estornell, E., Sahpaz, S. y Cortes, D. (1996). **Acetogenins from Annonaceae, Inhibitors of Mitochondrial Complex I**. *Phytochemistry*. 42(2) . 253-271.
- Zeng, L., Ye, Q., Oberlies N. H., Shi, G., Gu, Z.-M., He, K. y McLaughlin, J. L. (1996). **Recent Advances in Annonaceous Acetogenins**. *Natural Product Reports* 13(4). 265-364.

FE DE ERRATA.

Página 64.

En la estructura molecular:

Dice: m/z 241 m/z 383, debe decir: m/z 311 m/z 313.

Dice: m/z 311 m/z 313, debe decir: m/z 241 m/z 383.