



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

**ACTIVIDAD DE LAS ACETOGENINAS
ROLLINIASTATINA-2 y LAHERRADURINA SOBRE
BACTERIAS y EL COMPLEJO I BACTERIANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LORENA MERCEDES LUNA CAZÁRES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA

CODIRECTORA: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

MÉXICO, D. F.

Septiembre, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



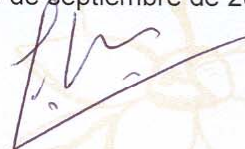
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de junio de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **LUNA CAZÁRES LORENA MERCEDES** con número de cuenta **504008711** con la tesis titulada: **“Actividad de las acetogeninas rolliniastatina-2 y laherradurina sobre bacterias y el complejo I bacteriano”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA**.

Presidente:	DR. MARIANO MARTINEZ VAZQUEZ
Vocal:	DRA. PATRICIA GUEVARA FÉFER
Vocal:	DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
Vocal:	DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Secretario:	DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA
Suplente:	DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente	DRA. ALICIA ENRIQUETA BRECHU FRANCO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F. a 30 de septiembre de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo brindado para la realización de este estudio.

Al Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) por el otorgamiento de la beca para estudios de posgrado.

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) por el apoyo otorgado para realizar los estudios de posgrado.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Chiapas (COCyTECH) por el otorgamiento de la beca para la redacción de la tesis.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

Dra. Alma Rosa González Esquinca

Dra. Patricia Guevara Fefer

Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Rubén, Lorenita y Rubén Leonel por todo el amor, apoyo y paciencia infinita a lo largo de estos años.

A mis padres: Marina Cazáres Peralta de Luna y Natividad Luna Bonilla por su amor y enseñanzas.

A mis hermanas Eunice y Karen, a mi pequeña sobrina Andrea, por el amor y apoyo brindado, les agradezco el haberme acompañado en esta travesía académica.

A mis tíos T. Leonel Cazáres Peralta y Michael Wasula quienes han estado apoyándome siempre.

A la Dra. Alma Rosa González Esquinca, por guiar esta tesis, su apoyo incondicional, las enseñanzas y experiencias invaluable, así como por la amistad y el cariño compartido a lo largo de los años.

A la Dra. Patricia Guevara Fefer y Dra. Alicia E. Brechú Franco por las sugerencias y su apoyo de principio a fin durante este largo camino.

Al Ing. Iván de la Cruz Chacón y a la Biól. Christian A. Riley Saldaña por su invaluable ayuda.

A los miembros del Jurado de Examen de Grado por sus sugerencias para mejorar el escrito final: Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Dr. José Guillermo Avila Acevedo y Dr. Luis Felipe Jiménez García.

INDICE

RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Género <i>Annona</i> (Annonaceae)	4
2.1.1. Origen y Distribución	4
2.1.2. Uso tradicional	7
2.1.3. Compuestos aislados del género	7
2.2. <i>Annona diversifolia</i> Safford	12
2.2.1. Descripción botánica	12
2.2.2. Distribución	13
2.2.3. Usos de la papaya en la medicina tradicional	15
2.2.4. Actividad biológica de extractos y compuestos	15
2.3. Acetogeninas	17
2.3.1. Tipos de ACG	17
2.3.2. Actividad biológica	20
2.3.3. Relación Estructura–Actividad (REA)	26
2.3.4. Características de las acetogeninas utilizadas en los ensayos	37
2.4. Bacterias	48
2.4.1. Cadena respiratoria en bacterias	51
2.4.2. Bacterias empleadas en los ensayos	58
2.4.3. Actividad de las ACG sobre bacterias	68
2.5. El Complejo I	72
2.5.1. Inhibidores de la cadena respiratoria	81
III. JUSTIFICACION y OBJETIVOS	86
IV. METODOS	88
4.1. Material vegetal	88
4.2. Aislamiento y purificación de acetogeninas	89
4.3. Evaluación de la toxicidad de las acetogeninas	90
4.4. Susceptibilidad de las bacterias a rolliniastatina-2 y laherradura	91
4.4.1. Bacterias utilizadas	91
4.4.2. Preparación de las acetogeninas	91
4.4.3. Efecto de rolliniastatina-2 y laherradura sobre el crecimiento de las bacterias	91
4.5. Susceptibilidad de bacterias libres de pared	93
4.5.1. Obtención de esferoplastos y protoplastos	93
4.5.2. Efecto de las acetogeninas sobre esferoplastos y protoplastos bacterianos	93
4.6. Actividad de las acetogeninas sobre el complejo I	96
4.6.1. Preparación de membranas bacterianas	96
4.6.2. Cuantificación de proteínas	96

4.6.3. Preparación de las ACG	96
4.6.4. Determinación de la actividad enzimática	97
V. RESULTADOS y ANALISIS DE RESULTADOS	99
5.1. Evaluación de la toxicidad de las acetogeninas	99
5.2. Susceptibilidad de las bacterias frente a rolliniastatina-2 y laherradurina	101
5.2.1. Ensayo a las 18 h utilizando concentraciones en µg/mL	101
5.2.1.1. Bacterias Gramnegativas	102
5.2.1.1.1. Rolliniastatina-2	102
5.2.1.1.2. Laherradurina	103
5.2.1.2. Bacterias Grampositivas	104
5.2.1.2.1. Rolliniastatina-2	104
5.2.1.2.2. Laherradurina	105
5.2.1.3. Análisis de resultados	106
5.2.1.4. Conclusiones	109
5.2.2. Ensayo durante 7 h utilizando concentraciones en ng/mL	110
5.2.2.1. Bacterias Gramnegativas expuestas a rolliniastatina-2 durante 7 h	111
5.2.2.1.1. <i>E. coli</i>	111
5.2.2.1.2. <i>P. aeruginosa</i>	112
5.2.2.1.3. <i>S. Typhi</i>	113
5.2.2.2. Bacterias Gramnegativas expuestas a laherradurina durante 7 h	114
5.2.2.2.1. <i>E. coli</i>	114
5.2.2.2.2. <i>P. aeruginosa</i>	115
5.2.2.2.3. <i>S. Typhi</i>	116
5.2.2.3. Bacterias Grampositivas expuestas a rolliniastatina-2 durante 7 h	117
5.2.2.3.1. <i>B. subtilis</i>	117
5.2.2.3.2. <i>S. aureus</i>	118
5.2.2.3.3. <i>S. epidermidis</i>	119
5.2.2.4. Bacterias Grampositivas expuestas a laherradurina durante 7 h	120
5.2.2.4.1. <i>B. subtilis</i>	120
5.2.2.4.2. <i>S. aureus</i>	121
5.2.2.4.3. <i>S. epidermidis</i>	122
5.2.2.5. Inhibición del crecimiento a la séptima hora	123
5.2.2.6. Análisis de resultados	125
5.2.2.7. Conclusiones	126
5.3. Susceptibilidad de las bacterias libres de pared	128
5.3.1. Efecto de las ACG en esferoplastos de bacterias Gramnegativas	128
5.3.2. Efecto de las ACG en protoplastos de bacterias Grampositivas	132
5.3.3. Análisis de resultados	135
5.3.4. Conclusiones	137
5.4. Efecto de las acetogeninas sobre el complejo I	138
5.4.1. <i>E. coli</i>	139
5.4.2. <i>S. Typhi</i>	140
5.4.3. Análisis de resultados	142
5.4.4. Conclusiones	143
VI. CONCLUSIONES	145
VII. LITERATURA CITADA	1488
VIII. ANEXOS	199
Anexo 1. Comparación de rolliniastatina-2 <i>vs.</i> todas las bacterias	199

Anexo 2. Comparación de laherradurina <i>vrs.</i> todas las bacterias	202
Anexo 3. Actividad de laherradurina y rolliniastatina-2 <i>vrs.</i> bacterias Gramnegativas	204
Anexo 4. Actividad de laherradurina y rolliniastatina-2 <i>vrs.</i> bacterias Grampositivas	206
Anexo 5. Actividad de laherradurina y rolliniastatina-2 <i>vrs.</i> cada bacteria	208
Anexo 6. Actividad de rolliniastatina-2 y laherradurina <i>vrs.</i> seis bacterias	209
Anexo 7. Comparación entre la actividad de rolliniastatina-2 y laherradurina <i>vrs.</i> bacterias Gramnegativas y Grampositivas	212
Anexo 8. Ensayo utilizando concentraciones en ng/mL (7 horas)	215
Anexo 9. Susceptibilidad de bacterias libres de pared	216
Anexo 10. Contraste de la susceptibilidad entre bacterias libres de pared y bacterias completas: Rolliniastatina-2 y laherradurina	217

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Especies de <i>Annona</i> en el estado de Chiapas registradas en diferentes herbarios	6
2. Acetogeninas aisladas del género <i>Annona</i> (hasta 2009)	10
3. Acción biológica de algunas acetogeninas	23
4. Acción biológica de rolliniastatina-2	39
5. Actividad biológica de laherradurina	45
6. Semejanzas en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y bacterial	54
7. Acetogeninas con actividad sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas	69
8. Características de la NADH:ubiquinona oxido-reductasa bacteriana	79
9. Algunos inhibidores de la cadena de transporte de electrones	81
10. Nanomoles de las ACG utilizadas en los ensayos con <i>Artemia salina</i>	99
11. Concentración letal media de rolliniastatina-2 y laherradurina frente a <i>Artemia salina</i> a 24 horas de exposición	99
12. Conversión de µg/mL de ACG a nmol/mL	101
13. Conversión de ng/mL de rolliniastatina-2 y laherradurina a nmol/mL	110
14. Actividad inhibitoria (%) de las ACG sobre bacterias Gramnegativas	123
15. Actividad inhibitoria (%) de las ACG sobre bacterias Grampositivas	124
16. Efecto de la rolliniastatina-2 y laherradurina sobre el complejo I de <i>E. coli</i>	139
17. Efecto de la rolliniastatina-2 y laherradurina sobre el complejo I de <i>S. Typhi</i>	140
18. Valores de la CI ₅₀ obtenidos en el ensayo de inhibición de rolliniastatina-2, laherradurina y rotenona sobre el complejo I bacteriano	142

INDICE DE FIGURAS

Figura

1. <i>A. diversifolia</i> Saff.	13
2. Estructura química general de una acetogenina de Annonaceae	17
3. Isoannonacina	18
4. Diepomuracina B	18
5. Montecristina	18
6. Rollimembrina	18
7. Trilobalicina	18
8. Goniocina	19
9. Piranicina	19
10. Tipos de lactona de las acetogeninas	19
11. Representación esquemática de un modelo de unión de la ACG con el complejo I	36
12. Estructura química de la rolliniastatina-2	38
13. Estructura química de laherradurina	45
14. Cubierta de una bacteria Grampositiva	48
15. Cubierta de una bacteria Gramnegativa	49

16. Esquemas del transporte de electrones	51
17. Esquema de la CoQ	53
18. Donadores y aceptores de electrones de <i>E. coli</i>	55
19. Transporte de electrones en una bacteria aeróbica (<i>E. coli</i>) y mitocondria	55
20. Cadena respiratoria general y de varias bacterias	56
21. Propuesta de cadena respiratoria en <i>Staphylococcus</i>	57
22. <i>Escherichia coli</i>	59
23. Microfotografía de un frotis de <i>P. aeruginosa</i>	60
24. <i>Salmonella</i> Typhi	62
25. <i>Bacillus subtilis</i>	63
26. Microfotografía electrónica de <i>S. aureus</i>	66
27. Comparación entre el complejo I mitocondrial y bacteriano por reconstrucción electromicroscópica	73
28. Representación esquemática del complejo I de <i>E. coli</i>	74
29. Fotomicrografía electrónica del complejo I de <i>E. coli</i>	75
30. Esquema del complejo I señalando el posible sitio de unión con el inhibidor	82
31. Preparación de bacterias libres de pared	95

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica

1. Efecto inhibitorio de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento de bacterias Gramnegativas	102
2. Efecto inhibitorio de laherradurina sobre el crecimiento de bacterias Gramnegativas	103
3. Efecto inhibitorio de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento de bacterias Grampositivas	104
4. Efecto inhibitorio de laherradurina sobre el crecimiento de bacterias Grampositivas	105
5. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de <i>E. coli</i>	111
6. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de <i>P. aeruginosa</i>	112
7. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de <i>S. Typhi</i>	113
8. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de <i>E. coli</i>	114
9. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de <i>P. aeruginosa</i>	115
10. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de <i>S. Typhi</i>	116
11. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de <i>B. subtilis</i>	117
12. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de <i>S. aureus</i>	118
13. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de <i>S. epidermidis</i>	119
14. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de <i>B. subtilis</i>	120
15. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de <i>S. aureus</i>	121
16. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional	

de <i>S. epidermidis</i>	122
17. Efecto de las acetogeninas en esferoplastos de <i>E. coli</i>	129
18. Efecto de las acetogeninas en esferoplastos de <i>P. aeruginosa</i>	130
19. Efecto de las acetogeninas en esferoplastos de <i>S. Typhi</i>	131
20. Efecto de las acetogeninas en protoplastos de <i>B. subtilis</i>	132
21. Efecto de las acetogeninas en protoplastos de <i>S. aureus</i>	133
22. Efecto de las acetogeninas en protoplastos de <i>S. epidermidis</i>	134
23. Actividad de las acetogeninas sobre el complejo I de <i>E. coli</i>	141
24. Actividad de rolliniastatina-2 y laherradurina sobre el complejo I de <i>S. Typhi</i>	141

INDICE DE MAPAS

Mapa

1. Distribución del género <i>Annona</i> en México	5
2. Especies del género <i>Annona</i> en Chiapas	6
3. Distribución de <i>A. diversifolia</i> en México	14
4. Distribución de <i>A. diversifolia</i> en Chiapas	14
5. Ubicación geográfica de la Delegación de Copoya, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	88

RESUMEN

Los estudios de actividad biológica de las acetogeninas de anonáceas (ACG) se han enfocado mayoritariamente en las pruebas de toxicidad en células cancerosas de distintos tipos, en pocos trabajos se ha determinado su acción antibacteriana y todavía más escasas son las investigaciones sobre la actividad de las ACG en bacterias sin pared celular (esferoplastos y protoplastos) y el complejo I de la cadena respiratoria de bacterias.

En esta investigación se evaluó la toxicidad de rolliniastatina-2 y laherradurina aisladas de las semillas de *Annona diversifolia* sobre: 1) *Artemia salina*; 2) el crecimiento de bacterias Gramnegativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Typhi*; y bacterias Grampositivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; 3) esferoplastos y protoplastos obtenidos de estas bacterias y 4) el complejo I de *E. coli* y *S. Typhi*.

Los resultados mostraron que ambas ACG tuvieron un efecto citotóxico sobre *A. salina*, la rolliniastatina-2 tuvo una CL_{50} de 0.489514 nmol/mL y laherradurina de 0.014976 nmol/mL. Ambas ACG inhibieron el crecimiento de las bacterias, las Gramnegativas fueron más sensibles a rolliniastatina-2 (28-40%) comparadas con las Grampositivas (7 a 30%) a una concentración de 3.21 nmol/mL. Laherradurina mostró un efecto menos inhibitorio sobre las bacterias Gramnegativas (19-33% con 3.20 nmol/mL) y Grampositivas (19-22% con 3.20 y 12.82 nmol/mL).

Cuando las bacterias se expusieron a diferentes concentraciones de ambas ACG y tiempo de crecimiento de siete horas, el efecto inhibitorio de ambos compuestos se incrementó. *E. coli* fue más sensible a la herradurina y *S. Typhi* a rolliniastatina-2 (>50%) con 0.00160 nmol/mL. Por el contrario, las bacterias Grampositivas fueron menos inhibidas por ambas ACG en todas las concentraciones.

Los esferoplastos de las bacterias Gramnegativas fueron más susceptibles a las ACG, laherradurina y rolliniastatina-2 (57.63 a 68.18% y 57.21 a 65.77% respectivamente). Los protoplastos de las bacterias Grampositivas, tal como sucedió con las bacterias Grampositivas completas fueron menos sensibles a las dos ACG. Mientras que los protoplastos de *S. aureus* fueron inhibidos en un 70.16% con laherradurina. Los mayores valores inhibitorios se obtuvieron con la menor concentración empleada (0.00160 nmol/mL).

Laherradurina frente al complejo I de *E. coli* y *S. Typhi* presentó valores de CI_{50} de 0.0025 y 0.0129 nmol/mL y rolliniastatina-2 una CI_{50} de 0.0096 y 0.0133 nmol/mL respectivamente.

En conclusión las bacterias Gramnegativas completas y sus esferoplastos fueron más susceptibles a laherradurina (0.00160 nmol/mL). Estos resultados sugieren que la pared celular tiene un papel importante, actuando como una barrera contra estos compuestos. Por otro lado, el complejo I de *E. coli* fue más sensible que el de *S. Typhi* a ambas ACG. Aunque laherradurina fue más activa sobre el complejo I de *E. coli*.

El efecto inhibitorio de ambas ACG puede estar relacionado con el anillo lactónico y con el tipo de bacteria empleada.

ABSTRACT

The studies of the biological activity of annonaceous acetogenins (ACG) have been focused mainly on toxicity tests with many types of cancerous cells. Few studies have been conducted on their antibacterial activity and even less using bacteria with no cell wall (spheroplasts and protoplasts), and on complex I of respiratory chain.

This study describes the toxicity effect of rolliniastatin-2 and laherradurin, isolated from *Annona diversifolia* seeds, on 1) *Artemia salina*; 2) the growth of Gramnegative bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Typhi* and Grampositive bacteria: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*; 3) spheroplasts and protoplasts obtained from these bacteria; and 4) the complex I of *E. coli* and *S. Typhi*.

Results showed that both ACG had cytotoxic effect on *A. salina*; rolliniastatina-2 had a LC_{50} value of 0.489514 nmol/mL and laherradurin of 0.014976 nmol/mL. Both ACG inhibited bacterial growth, Gram-negative bacteria were the most sensitive with rolliniastatin-2 (28-40 % inhibition), compared to Grampositive that was less inhibited (7 to 30%) at 3.21 nmol/mL. Laherradurin showed less inhibitory effect, Gramnegatives (19-33 % at 3.20 nmol/mL) and Grampositives (10-22% at 3.20 and 12.82 nmol/mL).

When bacteria were exposed to different concentrations of both ACG and let them grow for 7 hours, the inhibitory effect of both compounds increased. *E. coli* growth was the most sensitive for laherradurin and *S. Typhi* for rolliniastatin-2, (>50%) with 0.00160 nmol/mL. On the contrary, Grampositive bacteria were less inhibited by both ACG at all concentrations.

Gramnegative bacteria-spheroplasts were more susceptible to ACG, laherradurin and rolliniastatin-2 (57.63 to 57.21 to 68.10% and 65.77% respectively). Grampositive bacteria-protoplasts, as whole bacteria were the least susceptible to both ACG. However, *S. aureus* protoplasts was inhibited (70. 16%) with laherradurin. The highest inhibition was obtained with the lowest concentration used (0.00160 nmol/mL).

Laherradurin against complex I of *E. coli* and *S. Typhi* presented IC_{50} values of 0.0025 and 0.0129 nmol/mL respectively and rolliniastatin-2 at IC_{50} of 0.0096 and 0.0133 nmol/mL respectively.

In conclusion, whole Gramnegative bacteria and their spheroplasts were the most susceptible to laherradurin (0.00160 nmol/mL). This result suggests that cell wall plays an important role, acting as a barrier against these compounds. On the other hand, the complex I of *E. coli* was most sensitive than that of *S. Typhi* to both ACG, being laherradurin the most inhibitory for *E. coli* complex I.

A last consideration is that although both ACG are active, the differential effect on the inhibition may be related with the bacterial type and the lactone ring.

I. INTRODUCCION

Hasta 1980 las especies de la familia Annonaceae habían sido estudiadas de manera casi sistemática por su contenido de alcaloides, pero desde el aislamiento de la uvaricina en 1982 por Jolad *et al.* el interés se centró en la presencia de compuestos de origen policétido llamados: acetogeninas de anonáceas (ACG).

Hasta el momento se han caracterizado y aislado más de 400 ACG de 16 géneros de la familia, cuyas especies se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Cavé *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005).

La estructura de estos compuestos consiste de una cadena alifática de 32 o 34 átomos de carbono con una γ -lactona insaturada o saturada en uno de los extremos. Además pueden presentar funciones oxigenadas tales como hidroxilos, cetonas y epóxidos. Generalmente tienen anillos tetrahidrofuranos (THF) o anillos tetrahidropiranos (THP) así como dobles o triples enlaces (Bermejo *et al.*, 2005).

Tradicionalmente las ACG se han agrupado en ocho tipos según los grupos funcionales presentes en la molécula y el anillo lactónico (Cavé *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005). Es posible que conforme se aislen otras acetogeninas aumentarán los subtipos debido al aislamiento de nuevas moléculas y a la reconsideración de su estereoquímica relativa.

Hasta el momento los resultados de diferentes bioensayos con ACG indican actividad biológica frente a insectos (González-Coloma *et al.*, 2002; Alvarez Colom *et al.*, 2007), levaduras y hongos (Cepleanu *et al.*, 1993; Padmaja *et al.*, 1993), parásitos (Raynaud *et al.*, 2004; Rakotomanga *et al.*, 2004), bacterias (Padjma *et al.*, 1995; Rahmann *et al.*, 2005) y líneas celulares cancerosas y tumorales (Yuan *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005).

En particular, la actividad citotóxica encontrada en algunas de las ACG como la rolliniastatina-1, rolliniastatina-2 (bullatacina), escuamosina, solamina y laherradurina (Tormo *et al.*, 1999b; Tormo *et al.*, 2001) se ha relacionado con la capacidad que tienen estas acetogeninas de inhibir a la enzima NADH-ubiquinona óxido-reductasa (NADH deshidrogenasa también llamada complejo I) localizada en la membrana interna de la mitocondria, de forma similar a como lo hacen los inhibidores clásicos como la rotenona y la piericidina A (Guadaño *et al.*, 2000). Incluso con acetogeninas modificadas se ha señalado la inhibición de los complejos I y III (Duval *et al.*, 2005). Sin embargo, el estudio de la actividad de las ACG en el complejo I bacteriano, o en otras de las enzimas de la cadena respiratoria bacteriana es escaso.

No obstante una abundante literatura acerca de la actividad de las ACG la relación entre la estructura y la actividad desplegada por estos compuestos ha sido poco estudiada en mitocondrias completas (Landolt *et al.*, 1995; Alfonso *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2003). La mayoría de las investigaciones se han realizado en líneas celulares cancerosas (Fall *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2008), en partículas submitocondriales de corazón de bovino (Tormo *et al.*, 1999a, Abe *et al.*, 2008) y de membranas liposomales (Shimada *et al.*, 1998a, b). Al parecer la mayor actividad de las ACG está relacionada con los anillos THF, la lactona y la longitud del espaciador (Miyoshi *et al.*, 1998; Takada *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2008); aunque Konno *et al.* (2004) y Abe *et al.* (2004) señalan que la presencia de grupos hidroxilo flanqueando a los anillos son un factor estructural esencial para la actividad.

Pese a las investigaciones realizadas no existe certeza sobre cuál o cuáles son las partes más importantes de la molécula que le confieren su actividad inhibitoria.

Los ensayos para determinar la actividad frente a bacterias se han realizado mayormente con extractos (Padjama *et al.*, 1993; Faizi *et al.*, 2003; Shokeen *et al.*,

2005; Takahashi *et al.*, 2006), mezclas de acetogeninas obtenidas de diversas estructuras botánicas (Padjama *et al.*, 1993; Jumana *et al.*, 2000) y con algunas ACG aisladas (Padjama *et al.*, 1993; Rhamann *et al.*, 2005).

Con estos antecedentes, en la presente investigación se evaluó la actividad inhibitoria de la rolliniastatina-2 y la herradura en función del tipo de pared celular de bacterias Gramnegativas y Grampositivas y del anillo lactónico de los compuestos. Así mismo se determinó su acción inhibitoria sobre el complejo I de membranas de *Escherichia coli* y *S. Typhi*.

II. ANTECEDENTES

2.1. Género *Annona* (Annonaceae)

La familia Annonaceae es la más grande y diversa dentro de las angiospermas primitivas (Magnolididae), pertenece al complejo Ranaleano cuyos miembros presentan características arcaicas (Hutchinson, 1964; Takhatajan en Leboeuf *et al.*, 1982). Está constituida por algunas especies frutales y son productoras de aceites esenciales (León, 1968).

Con cerca de 135 géneros y más de 2500 especies alrededor del mundo, la familia está formada por plantas que incluyen árboles, arbustos y enredaderas de maderas y hojas aromáticas, todas ellas de origen tropical y subtropical (Standley y Steyermark, 1949; Chatrou *et al.*, 2004).

En América tropical la familia está representada por 40 géneros y alrededor de 900 especies. Uno de los géneros con gran cantidad de especies es *Annona* con 150 especies, de las cuales 110 se encuentran en América (Takhjantan, 1969; Chatrou *et al.*, 2004).

Villaseñor (2004) señala que en México existen 14 géneros de Annonaceae, uno de ellos endémico (*Tridimeris*) siendo el más abundante *Annona* con 16 especies.

2.1.1. Origen y Distribución

Posiblemente *Annona* proceda de antecesores de Laurasia de clima subtropical, los que posteriormente penetraron a Sur América (Rzedowski, 1998); para Chiapas, Ramírez y Ceballos-Ferriz (2000) reportan hojas fósiles procedentes del Mioceno.

La mayoría de las especies del género son originarias de América y fueron cultivadas desde la época prehispánica por los grupos étnicos que habitaron Mesoamérica, los Valles Interandinos, la Amazonía y otros lugares (Mahdeem, 1992).

Según Fries (1937) y Kelly (2000) la mayoría de las especies de este género se localizan en América tropical y subtropical, desde el sur de Florida, México hasta América del Sur, excepto Argentina y Uruguay, así como en las Antillas, son pocas las especies en África (ocho) y Madagascar. En diversos países de América como México, Guatemala, El Salvador y Brasil se encuentran algunas especies silvestres (Cruz y Deras, 2000; Orellana Polanco y Martínez Tambito, 2002).

En México se localizan en 22 estados (Martínez, 1979; Kelly, 2000; Cabrera Cano *et al.*, 2004; Monroy-Ortíz y Monroy, 2006) (Mapa 1), esta distribución geográfica es semejante a la del área que según Kirchoff (1943) ocupaba Mesoamérica en el siglo XVI (entre el centro y sur de México y el norte de Centro América).



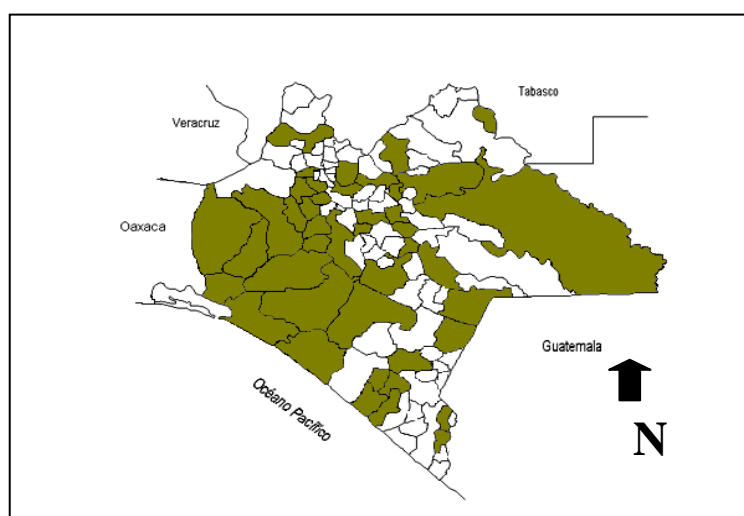
Mapa 1. Distribución del género *Annona* en México.

Para Chiapas están documentadas 14 de las 16 especies del género reportadas para México por Villaseñor (2004), dicha información está documentada en los registros de los herbarios MEXU de la Universidad Nacional Autónoma de México, XAL del Instituto de Ecología de Xalapa, MO del Jardín Botánico de Missouri, consultados a través de las bases de datos de la Red Mundial de Biodiversidad (REMIB, 2008); así como en los herbarios CHIP del Instituto de Historia Natural y Ecología, y HEM de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (Cuadro 1). Estas representan el 87.5% del total reportado para México y el 12.7% del total reportado para el continente Americano.

Cuadro 1. Especies del género *Annona* del estado de Chiapas registradas en diferentes herbarios

<i>Annona cherimola</i> Mill.	<i>Annona macrophyllata</i> Donn. Sm.	<i>Annona reticulata</i> L.
<i>Annona diversifolia</i> Saff.	<i>Annona muricata</i> L.	<i>Annona scleroderma</i> Saff.
<i>Annona globiflora</i> Schtdl.	<i>Annona pittieri</i> Donn. Sm.	<i>Annona spraguei</i> Saff.
<i>Annona holosericea</i> Saff.	<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	<i>Annona squamosa</i> L.
<i>Annona lutescens</i> Saff.	<i>Annona primigenia</i> Standl. & Steyerm.	

De acuerdo a los registros de los herbarios CHIP y HEM de Chiapas, se localizan en 46 municipios (Mapa 2), la vegetación de los lugares donde crecen son: bosque tropical caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio; con condiciones edafoclimáticas muy diferentes y en altitudes que de 0 a 1500 msnm.



Mapa 2. Especies del género *Annona* en Chiapas.

2.1.2. Uso tradicional

Los frutos son consumidos desde la época prehispánica como se señala en diversas fuentes históricas del siglo XVI, entre ellas la de Francisco Hernández (1959), Joseph de Acosta (1940) y Gonzalo Fernández de Oviedo (1950), en las que diversas especies de este género son señaladas como “anona”. Asimismo, desde esa época también se indica su empleo medicinal.

Especies como *A. cherimola*, *A. muricata*, *A. squamosa* son económicamente valiosas por sus frutos comestibles y adicionalmente se emplean en la medicina tradicional. Por ejemplo, las hojas de *A. squamosa* se usan para el tratamiento de diarrea, fiebre, resfriado y diabetes (Waizel y Waizel, 2005; Gupta *et al.*, 2005), así como las raíces de *A. muricata* para la diabetes y como antiespasmódico y la corteza contra diarrea y disentería (Bridg, 2000). Por otro lado, una especie que no se distingue por sus frutos comestibles pero si por su uso etnobotánico como remedio contra la tos y la diabetes es la *A. purpurea*, adicionalmente también se ha informado de la utilización de una infusión preparada con las hojas de esta especie como cardiotónico y antimalárico (Gupta, 2004).

2.1.3. Compuestos aislados del género

La diversidad de los metabolitos secundarios está por lo común asociada con diferentes *taxa*, particularizándose en familias, o entre géneros y especies. Así por ejemplo se conoce que la mayoría de las especies de la familia Compositae sintetizan lactonas sesquiterpénicas. También se asocian a estados específicos del desarrollo de las plantas. Desde el punto de vista biológico, entre otras funciones se cree que intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas, que interrelacionan con el ambiente en fenómenos de alelopatía (Anaya, 2003) y que participan en la fijación de nitrógeno. En general se ignora su importancia en el metabolismo de la planta.

La investigación bibliográfica retrospectiva acerca de las 150 especies clasificadas en el género *Annona* indica que se han investigado desde el punto de vista químico 30, con relación a las ACG entre las más estudiadas están *A. muricata*, *A. cherimola* y *A. squamosa*, especies de las que se han aislado más de estos compuestos (Cuadro 2).

Estos trabajos han permitido el aislamiento y la caracterización de diversos metabolitos, lo que ha demostrado que estas plantas son fuente de una amplia variedad de metabolitos secundarios, ya que se han aislado y caracterizado: **ácidos grasos** (Pérez Amador *et al.*, 1997; Ocampo *et al.*, 2007); **aceites esenciales** (Fekam *et al.*, 1996; González Esquinca, 2001; Khallouki *et al.*, 2002; Ríos *et al.*, 2003; Samie *et al.*, 2005; Chavan *et al.*, 2006; Kouninki *et al.*, 2007); **amidas** (Cheng *et al.*, 1998); **compuestos cianogénicos** (Thomsen y Brimer, 1997); **ciclopeptidos** (Li *et al.*, 1997; Wéle *et al.*, 2004a, b; Wéle *et al.*, 2005a, b; Yang *et al.*, 2008; Wéle *et al.*, 2008); **terpenos** (Eshiet *et al.*, 1971; Padmaja *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2004; Joy y Remani, *et al.*, 2008); **esteroles** (Cortes, 1979); **esteroides** (Chang *et al.*, 1998a) y **flavonoides** (Chang *et al.*, 1998a; Kotkar *et al.*, 2001; Vega *et al.*, 2004; Vega *et al.*, 2007; Potchoo *et al.*, 2008).

Gran parte de los reportes de investigación están enfocados al aislamiento de alcaloides y acetogeninas.

Los **alcaloides** aporfínicos, en el género *Annona* parecen ser una constante, éstos se encuentran en *A. bullata*, *A. sclerophylla*, *A. elliptica* y *A. cristalensis* (Sandoval López *et al.*, 1986; 2002), *Annona purpurea* (Chang *et al.*, 1998b); del fruto de *Annona muricata* se han obtenido anonaína, norruciferina y asimilobina (Harast *et al.*, 1997) y de *Annona cherimolia*: roemerina, lirirodenina, anonaína y dehidroemerina (Chulia *et al.*, 1995), por citar algunos.

Además se han caracterizado alcaloides de tipo bencilisoquinolínicos, proaporfinas, oxoaporfinas, fenatrenos, berberinas y tetrahidroprotoberberinas aislados de *A. cherimola*, *A. diversifolia*, *A. lutescens*, *A. montana*, *A. purpurea*, *A. salzmanii*, *A. senegalensis*, *A. reticulata*, *A. sclerophylla* y *A. spinescens* (Saad *et al.*, 1991; Paulo *et al.*, 1992; Queiroz *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1998a, b; Chang *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; González Esquinca, 2001; Sandoval López *et al.*, 2002; Pérez Amador *et al.*, 2004; Martínez Vázquez *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2008).

La primera publicación en la que se sistematizan las ACG en función de su estructura fue la de Ruppercht *et al.* (1990) que reportaron 31 aisladas de seis géneros, entre ellos *Annona* con cinco especies; Zafra-Polo *et al.* (1996) sistematizaron 128 de seis géneros incluyendo *Annona* con 13 especies; en 1997 Cavé *et al.* reportaron 242 moléculas de siete géneros y 14 especies del género *Annona*; en 1999 Alali *et al.* señalaron el mismo número de géneros y especies de *Annona*, pero las ACG provenientes de especies de *Annona* aumentaron a 320 y la última sistematización fue realizada en 2005 por Bermejo *et al.* con 417 ACG provenientes de 12 géneros y 20 especies.

Desde el aislamiento de la uvaricina, la primera ACG, en 1982, se han identificado más de 400 de 51 especies agrupadas en 16 géneros de la familia Annonaceae: *Annona*, *Anomianthus*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Dasymaschalon*, *Disepalum*, *Goniothalamus*, *Miliusa*, *Ophrypetalum*, *Polyalthia*, *Porcelia*, *Rollinia*, *Saccopetalum*, *Unonopsis*, *Uvaria* y *Xylopia* (Rupprecht *et al.*, 1990; Zafra-Polo *et al.*, 1996; Cavé *et al.*, 1997; Zafra-Polo *et al.*, 1998; Alali *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Orru *et al.*, 2003; Araya, 2004; Bermejo *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Makabe *et al.*, 2008). Estos datos indican el interés de diversos grupos de investigación por las ACG.

Adicionalmente, la revisión de la literatura para este trabajo incluyó ACG de otras dos especies del género *Annona* (*A. cornifolia* y *A. diversifolia*) lo que incrementó el número de especies a 22 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Acetogeninas aisladas del género *Annona* (hasta 2009)

Especie	Parte estudiada	Número de ACG aisladas	Referencia bibliográfica
<i>Annona atemoya</i>	Raíces, Semillas	4, 46	Cavé <i>et al.</i> , 1997; Chang <i>et al.</i> , 1999
<i>Annona bullata</i>	Corteza, Corteza de tallo	34, 2	Hui <i>et al.</i> , 1989; Cavé <i>et al.</i> , 1997; Alali <i>et al.</i> , 1999; Bermejo <i>et al.</i> , 2005
<i>Annona cherimola</i>	Tallos, Raíces, Semillas	2, 6, 35	Duret <i>et al.</i> , 1994; Cavé <i>et al.</i> , 1997; Cheng <i>et al.</i> , 1999; Woo <i>et al.</i> , 1999; Kim <i>et al.</i> , 2001; Bermejo <i>et al.</i> , 2005; Alvarez Colom <i>et al.</i> , 2007
<i>Annona coriacea</i>	Tallos, Raíces, Semillas	8, 1	You <i>et al.</i> , 1994; Meneses da Silva <i>et al.</i> , 1996; Cavé <i>et al.</i> , 1997
<i>A. cornifolia</i>	Semillas	4	Alves Rodrigues <i>et al.</i> , 2009
<i>Annona crassiflora</i>	Semillas	1	Santos <i>et al.</i> , 1996
<i>Annona densicoma</i>	Corteza, Corteza de tallo, Semillas	4, 7, 2	McCloud <i>et al.</i> , 1987; Xu y Chang, 1989; Cavé <i>et al.</i> , 1997; Bermejo <i>et al.</i> , 2005
<i>Annona dioica</i>	Raíces	2	Vega <i>et al.</i> , 2004
<i>Annona diversifolia</i>	Semillas	1	Reyes Trejo, 1997
<i>Annona glabra</i>	Hojas, Corteza, Semillas	13, 2, 22	Cavé <i>et al.</i> , 1997; Gallardo <i>et al.</i> , 1998a; Liu <i>et al.</i> , 1999; Bermejo <i>et al.</i> , 2005; Yang y Li, 2008
<i>Annona glauca</i>	Raíces, Semillas	2, 14	Cavé <i>et al.</i> , 1997; Waechter <i>et al.</i> , 1997; Waechter <i>et al.</i> , 1998
<i>Annona jahnii</i>	Rama	3	Colman-Saizarbitoria <i>et al.</i> , 1998; Bermejo <i>et al.</i> , 2005

<i>Annona montana</i>	Hojas, Cogollos, Raíces, frutos, Semillas	20, 1, 9, 4, 17	Wu <i>et al.</i> , 1995; Cavé <i>et al.</i> , 1997; Mootoo <i>et al.</i> , 2000; Bermejo <i>et al.</i> , 2005; Liaw <i>et al.</i> , 2005 ; Alvarez-Colom <i>et al.</i> , 2009
<i>Annona muricata</i>	Hojas, Corteza de tallo, Raíces, Pericarpio, Semillas	36, 4, 24, 2, 75	Rieser <i>et al.</i> , 1991; Myint <i>et al.</i> , 1991; Laprêvotte <i>et al.</i> , 1992; Wu <i>et al.</i> , 1995a, b; Zeng <i>et al.</i> , 1996; Rieser <i>et al.</i> , 1996; Cavé <i>et al.</i> , 1997; Waechter <i>et al.</i> , 1998; Gleye <i>et al.</i> , 1998; Gleye <i>et al.</i> , 2000; Liaw <i>et al.</i> , 2002; Chang <i>et al.</i> , 2003; Makabe, 2007
<i>Annona nutans</i>	Corteza de raíz	6	Gleye <i>et al.</i> , 2000; Bermejo <i>et al.</i> , 2005
<i>Annona purpurea</i>	Hojas, Corteza, Semillas	7, 1, 9	Cepleanu <i>et al.</i> , 1993; Cavé <i>et al.</i> , 1997; Chávez y Mata, 1998; Chávez y Mata, 1999; Bermejo <i>et al.</i> , 2005
<i>Annona reticulata</i>	Hojas, Corteza, Corteza de tallo, Semillas	7, 2, 4, 22	Saad <i>et al.</i> , 1991; Cavé <i>et al.</i> , 1997; Chang <i>et al.</i> , 1998c; Duval <i>et al.</i> , 2005; Bermejo <i>et al.</i> , 2005
<i>Annona salzmanii</i>	Raíces	5	Queiroz <i>et al.</i> , 1999; Queiroz <i>et al.</i> , 2003
<i>Annona senegalensis</i>	Tallos, Semillas	3, 10	Li <i>et al.</i> , 1990; Sahpaz <i>et al.</i> , 1994; Cavé <i>et al.</i> , 1997
<i>Annona spinescens</i>	Semillas	12	Queiroz <i>et al.</i> , 1999; Bermejo <i>et al.</i> , 2005
<i>Annona aff. spraguei</i>	Semillas	4	Gallardo <i>et al.</i> , 1998b; Angulo <i>et al.</i> , 2002; Bermejo <i>et al.</i> , 2005; Chahboune <i>et al.</i> , 2006
<i>Annona squamosa</i>	Corteza, Corteza de tallo, Semillas	6, 20, 50	Li <i>et al.</i> , 1990; Cavé <i>et al.</i> , 1997; Hoop <i>et al.</i> , 1997; Xi <i>et al.</i> , 2003; Araya, 2004; Yu <i>et al.</i> , 2005

Las ACG se han aislado de todas las partes de la planta, con excepción de las flores.

2.2. *Annona diversifolia* Safford

Es una especie frutícola y medicinal, distribuida en el sur de México, Guatemala y El Salvador (Popenoe, 1920; Standley y Steyermark, 1946), sus frutos son considerados como los más finos de entre todos los frutos producidos por las anonas (Ochse *et al.*, 1986).

2.2.1. Descripción botánica

Los individuos de esta especie son árboles pequeños, de ramas glaucas, completamente glabras, hojas de 4-6 cm de ancho con pecíolos de 8-18 mm de largo, redondeadas o subacutadas en el ápice, acutadas o redondeadas en la base, glabras por abajo; las hojas inferiores a los brotes florales orbiculares y cordado-ceñidas de 2-4 cm de longitud; flores solitarias, pedicelos adelgazados, glabros, recurvados o pendulosos, de 3-5 cm de longitud, minuciosamente bracteolada debajo de la mitad, sépalos redondeados a triangulares, ferruginoso-pilosos arriba, 2-3 mm de longitud; 3 pétalos exteriores linear-oblongos, obtusos, minuciosamente pubescentes por fuera, 2.5 cm de longitud, cerca de 6 cm de ancho en la base, los 3 pétalos internos rudimentarios. Los frutos ampliamente ovoides, tomentosos, generalmente de 13-15 cm de longitud y 12-15 cm de ancho, cubiertos con protuberancias ligeramente redondeadas, semillas oblongo-ovoides de 2 cm de largo, 1 cm de ancho (Standley y Steyermark, 1946) (Figura 1).



Figura 1. *A. diversifolia* Saff. A, rama con flores; B, flores; C, frutos; D, semillas (Fotos: Mtro. Alejandro Martínez Mena).

2.2.2. Distribución

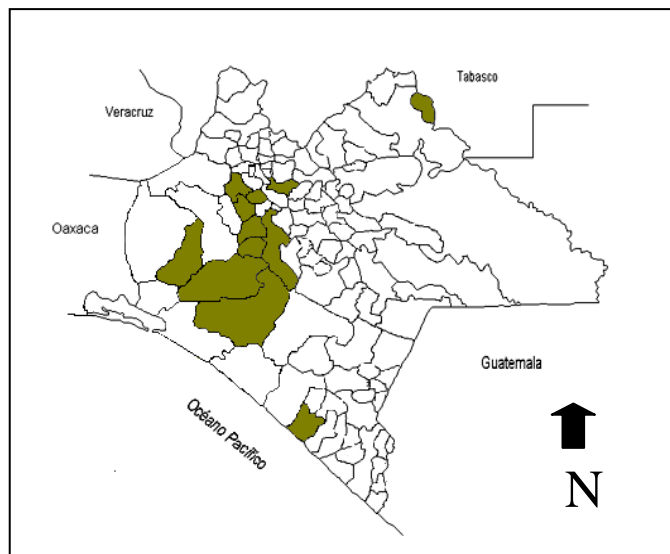
Se encuentra en los bosques tropicales caducifolios, perennifolios y subperennifolios en forma silvestre, incluso en las laderas montañosas, al pie de monte de las cordilleras costeras. También es fomentada como cerca viva y tolerada o cultivada en los huertos familiares de México, El Salvador y Guatemala (Mahdeem, 1992; Cruz y Deras, 2000; Orellana Polanco y Martínez Tambito, 2002; Irigoyen, 2004; Monroy y Monroy, 2006). De manera natural no crece más allá de los 610 msnm, aunque Morton (1987) y Mahdeem (1992) reportaron su crecimiento hasta los 1524 msnm y 1800 msnm respectivamente.

La base de datos del herbario XAL consultada a través de la REMIB (2008) reporta recolectas de esta especie en el Estado de México, Guerrero, Michoacán, Veracruz y Yucatán; Popenoe (1920) la ubica en Chiapas, Colima, Guerrero y Oaxaca; Monroy y Monroy (2006) en Morelos (Mapa 3).



Mapa 3. Distribución de *A. diversifolia* en México.

En Chiapas se encuentra en la Depresión Central y en la Costa (Miranda, 1998). Los registros de los herbarios de Chiapas: CHIP del Instituto de Historia Natural y Ecología y HEM de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas señalan su localización en 12 municipios (Mapa 4). En los registros de los herbarios (consulta hasta el 27 de febrero de 2008) no aparece recolectada en Tapachula, pero Popenoe (1920) señala que era abundante en ese lugar, ahora se puede encontrar en los patios de muchas de las casas de la localidad.



Mapa 4. Distribución de *A. diversifolia* en Chiapas.

Esta especie recibe 20 nombres comunes, en Chiapas se conoce con cuatro, en El Salvador con seis y en Guatemala con cinco (Popenoe, 1920; Guzmán, 1975; Martínez, 1979; Avilán y Leal, 1984; Morton, 1987; Rivas *et al.*, 2003; Irigoyen; 2004). Entre los más empleados están ilama, papausa y anona blanca.

2.2.3. Usos de la papausa en la medicina tradicional

A. diversifolia se emplea de diferentes maneras, por ejemplo en El Salvador, Guatemala y México, el fruto verde se utiliza como remedio antidiarreico (Guzmán, 1975); las hojas frescas en la frente para el dolor de cabeza y calentura, como antiinflamatorio, analgésico, para tratar afecciones de la piel y granos, la neurosis, la menopausia y dolores musculares (González-Trujano *et al.*, 1998; Irigoyen, 2004; MARN, 2006); los cogollos para el catarro y como sudorífico (Rivas *et al.*, 2003) y la corteza a manera de vendas para luxaciones, dislocaciones y fracturas de huesos (Rivas *et al.*, 2003). Las semillas pulverizadas se emplean como insecticida y repelente así como para matar piojos y chinches (Guzmán, 1975; Olaya, 1991). En Chiapas se emplean las hojas para quitar la inflamación, el sangrado de la nariz, la pasmazón de la nariz (congestión nasal crónica) y el dolor de cabeza ocasionado por la “cruda” (malestar ocasionado por la ingestión excesiva de alcohol) (Ríos Alegría, 2006).

2.2.4. Actividad biológica de extractos y compuestos

Con extractos obtenidos de diversas partes de la planta se ha investigado el efecto sobre el sistema nervioso central en ratones (González-Trujano *et al.*, 1998), la actividad insecticida sobre *Culex quinquefasciatus* (Reyes Trejo *et al.*, 1997; Luna Cazárez *et al.*, 2003) y la actividad sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas (Riley, 2007).

Por otro lado, estudios químicos de esta especie han permitido el aislamiento de alcaloides y aceites esenciales (González Esquinca, 2001); ácidos grasos y triglicéridos de las semillas (Pérez Amador *et al.*, 1997); acetogeninas (Reyes Trejo *et al.*, 1997, 1999; de la Cruz, 2001); estigmasterol, sacarosa y el ácido 15-octadecenoico de las semillas (Reyes Trejo *et al.*, 1999).

De las hojas se aisló la palmitona compuesto con el que se han realizado diversos estudios farmacológicos, en uno de ellos se justifica el uso tradicional para tratar la epilepsia (González-Trujano *et al.*, 2006a), ensayos de comportamiento en ratones sugieren un efecto ansiolítico cuyo perfil farmacológico es diferente al de las benzodiazepinas (González-Trujano *et al.*, 2006b), también se demostró que es un potente antiepiléptico a una $ED_{50}=1.85$ mg/kg, sólo cuatro veces menos potente que el diazepam ($ED_{50}=0.48$) mg/kg), por lo que el perfil farmacológico de la palmitona sugiere que este compuesto podría actuar sobre el sistema inhibitorio GABA-érgico (González-Trujano *et al.*, 2001).

La *A. diversifolia* ha sido estudiada desde diferentes enfoques, por ejemplo, se conoce la composición química del fruto (Cruz y Deras, 2000), el efecto del ácido giberélico en la germinación de las semillas (Campbell y Popenoe, 1968; González Esquinca *et al.*, 1997). Así mismo se ha realizado la caracterización fenológica de una población de ilama en el estado de Guerrero (Zavala *et al.*, 1997a), el análisis morfológico de yemas diferenciadas (Zavala *et al.*, 1997b), el estudio arqueobotánico que considera a la ilama como una de las cinco anonas más conocidas en México desde la época prehispánica (Ruíz y Morett, 1997) y dos estudios etnobotánicos en los estados de México y Morelos (Chávez-Primitivo *et al.*, 1999; Garduño-Pizaña y Monroy, 2003).

2.3. Acetogeninas

Se forman de la ruta del acetato-malonato y están consideradas dentro del grupo de los policétidos que junto con los ácidos grasos son los principales compuestos originados a partir del acetyl-CoA.

Se caracterizan por una cadena alifática larga de 32 a 34 átomos de carbono teniendo en uno de sus extremos un anillo γ -lactona saturado o insaturado. Asimismo, la cadena puede tener uno, dos o tres anillos tetrahidrofuranos (THF), algunos sustituyentes oxigenados como hidroxilos, cetonas y epóxidos, así como dobles o triples enlaces (Figura 2). También en menor proporción se han descrito algunas con anillo tetrahidropirano (THP) y sin anillo THF (Bermejo *et al.*, 2005).

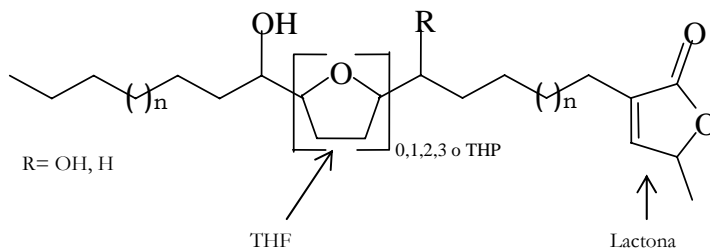


Figura 2. Estructura química general de una acetogenina de Annonaceae.

2.3.1. Tipos de ACG

En cuanto a su clasificación Bermejo *et al.* (2005) las agrupan en 13 tipos: lineales (con una o dos γ -lactonas), epoxi-ACG (mono, di o tri epóxido), mono-THF, bis-THF adyacentes, bis-THF no adyacentes, mono-THP, tri-THF, THF-THP adyacentes y THF-THP no adyacentes, todas ellas divididas en 22 grupos.

Las aisladas de *Annona* están incluidas prácticamente en todos ellos, excepto en cinco: 1) mono-THF sin -OH en el C4, 2) bis-THF con dos hidroxilos flanqueando los anillos y un -OH en el C4 y otro en el C5, 3) Tri-THF, 4) no

adyacente THF-THP y 5) adyacente THF-THP. Las estructuras de algunas ACG se presentan en las Figuras 3 a 9.

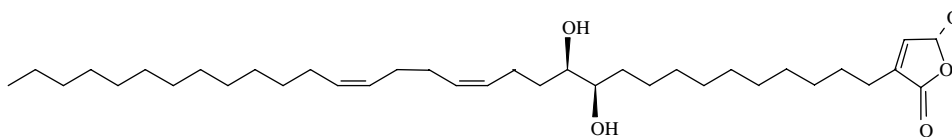


Figura 3. Isoanonnacina, aislada de la corteza del tallo de *A. densicoma* (Xu *et al.*, 1989)

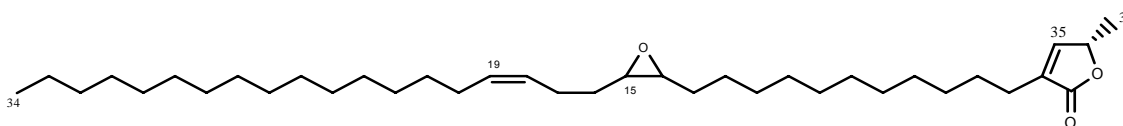


Figura 4. Diepomuracina B, aislada de la raíz de *A. muricata* (Bermejo *et al.*, 2005)

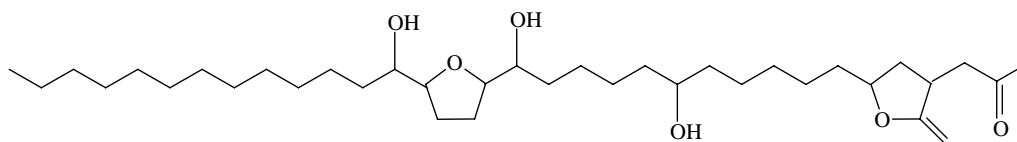


Figura 5. Montecristina, aislada de la raíz de *A. muricata* (Alali *et al.*, 1999)

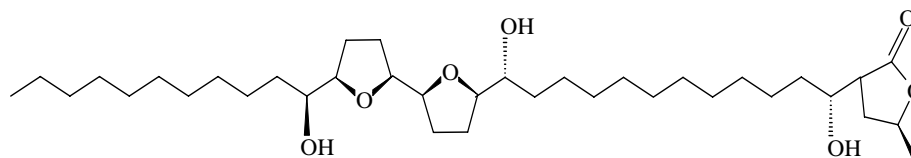


Figura 6. Rollimembrina, aislada de las semillas de *Rollinia membranacea* (Alali *et al.*, 1999)

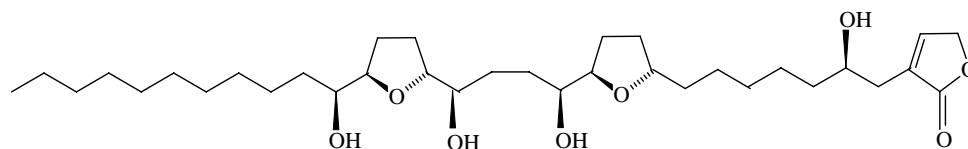


Figura 7. Trilobalicina, aislada de la corteza de *Asimina triloba* (Zha *et al.*, en Alali *et al.*, 1999)

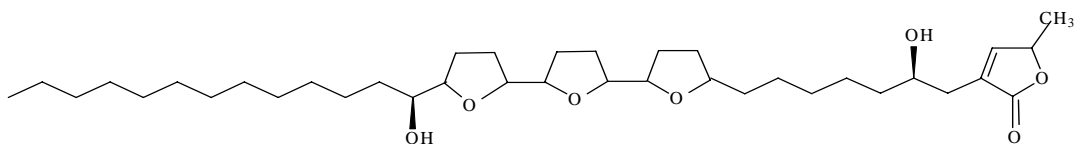


Figura 8. Gonicina, aislada de la corteza del tallo de *Goniiothalamus giganteus* (Gu *et al.*, en Cavé *et al.*, 1997)

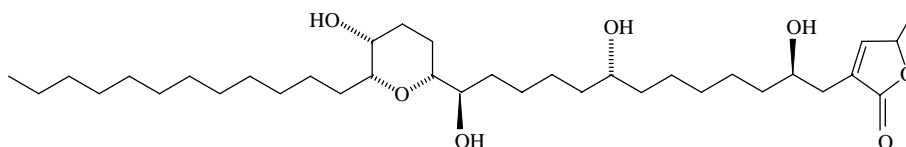


Figura 9. Piranicina, con anillo THP aislada de la corteza de *G. giganteus* (Alali *et al.*, 1999)

Atendiendo al tipo de lactona terminal Alali *et al.* (1999) las dividen en tres subtipos: γ -lactona insaturada, γ -lactona sustituida y cetolactona saturada. En 2005, Bermejo *et al.* reportaron tres nuevos tipos de lactonas: α -acetoni- α,β - γ -insaturada, β -metoxi- γ -metileno- α,β -insaturada- γ -butirolactona y γ -hidroximetil- γ -lactona saturada (Figura 10).

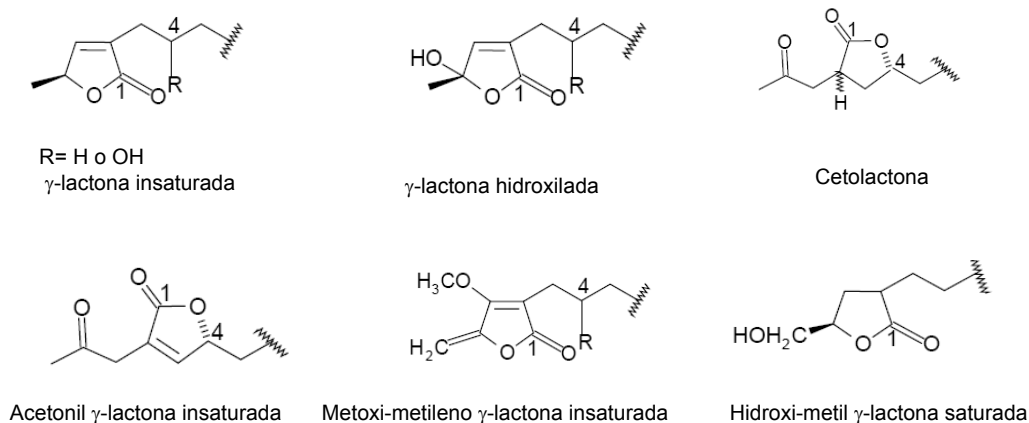


Figura 10. Tipos de lactona de las acetogeninas.

Las ACG tienen una marcada diversidad estructural, comparten esqueletos de carbono similares con variación en la configuración absoluta y relativa de varias de las funciones oxigenadas. Sinha *et al.* (1999b) y Han *et al.* (2004) también indican que la estructura que aparece en más del 40% de las ACG que muestran

una alta actividad antitumoral es un fragmento de 10 carbonos que contiene dos anillos THF adyacentes flanqueados por dos grupos hidroxilo. Las ACG encontradas son lineales (40), epoxi-ACG (16), mono-THF (206), bis-THF adyacentes y no adyacentes (146), tri-THF (1) y tetrahidropirano (8).

Los anillos de las ACG pueden estar en posición *cis* o *trans*, lo que indica la forma en que se cerró el anillo THF, la estereoquímica del sistema de anillos deriva de las representaciones tipo Fisher y están acotadas a la posición de los grupos hidroxilo de la eritrosa (*eritro*) y la tetrosa (*treo*).

La estereoquímica al parecer tiene influencia en la potencia relativa y la especificidad biológica. Se ha observado que la estereoquímica alrededor de los anillos marca una notable diferencia en la actividad citotóxica de los compuestos, Chávez y Mata (1999) indican con relación a las ACG bis-THF adyacentes que cuando son *treo/cis/treo/cis/eritro* actúan selectivamente en ciertas líneas celulares y cuando son *treo/trans/treo/trans/eritro* inhiben otras.

La clasificación de las acetogeninas está en continua modificación debido al aislamiento de nuevas moléculas que difieren de algún modo de los patrones ya establecidos y a la reconsideración de su estereoquímica relativa.

2.3.2. Actividad biológica

Son bioactivas y presentan un rango amplio de actividades tales como citotóxica frente a diversas líneas celulares (Kim *et al.*, 2001a; Quispe *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2006; Liaw *et al.*, 2008), antitumoral (Chahboune *et al.*, 2006), antiparasitaria (Waechter *et al.*, 1998; Février *et al.*, 1999; Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001; Raynaud-Le Grandic *et al.*, 2004), insecticida (Guadaño *et al.*, 2000; González-Coloma *et al.*, 2002; Alvarez Colom *et al.*, 2007), antimalarial (Rakotomanga, *et al.*,

2004), antifúngica (Cepleanu *et al.*, 1993; Padmaja *et al.*, 1993) y antibacteriana (Jumana *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2005).

La mayor atención se centra en la actividad anticancerosa, ya que diversas ACG se encuentran entre los agentes citotóxicos más potentes que se conocen hoy en día, por ejemplo la trilobacina y la asimincina muestran valores de dosis eficaz media (DE₅₀) menores a 10⁻¹² mg/mL en varias líneas de células tumorales humanas (incluyendo a las multidroga resistentes), superiores al taxol (un diterpeno aislado de la corteza del tallo de *Taxus brevifolia* que actualmente es el agente anticanceroso de mayor uso) (Oberlies *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

Esta potente citotoxicidad se ha relacionado con la inhibición de la NADH:ubiquinona óxido-reductasa y/o de la NADH oxidasa de la membrana citoplásmica (Rodier *et al.*, 2000), que disminuyen la producción de ATP reportándose también la apoptosis (muerte celular programada) (Sinha *et al.*, 1999b).

Muchas ACG son más potentes que los insecticidas normales, así por ejemplo: la asimicina, la parviflorina, la silvaticina, la bullatacina, la anomontacina y la gigantetrocina A, son superiores a la sipermetrina (de origen piretroico), al clorpirifos (de origen fosforado), a la hidrametilnona (con base en la amidinohidrazaona), el propoxur y el bendiocarb (con estructuras químicas basadas en el carbamato) (Alali *et al.*, 1999).

En reportes previos (He *et al.*, 1997) empleando un ensayo de contacto señalan que las ACG bis-THF adyacente con tres grupos –OH son insecticidas potentes contra el mosquito de la fiebre amarilla. Guadaño *et al.* (2000) indican que escuamocina fue tóxica sobre adultos de *Leptinotarsa decemlineata*

(Coleóptera) y *Myzus persicae* (Homóptera), adicionalmente escuamosina disminuyó la reproducción de *M. persicae*.

También se ha analizado el efecto tóxico y antialimentario de nueve ACG (50 µg/g de dieta) aisladas de *A. cherimola* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) encontrando que sólo escuamocina mata al 100% de larvas a la dosis empleada, la acción tóxica más importante fue en las pupas, ya que todas las ACG ensayadas producen más del 80% de mortalidad; aunque no tuvieron efecto antialimentario (Alvarez Colom *et al.*, 2007).

Evidencias bibliográficas señalan las propiedades antiparasitarias de algunas ACG, tales como la actividad significativa de senegalina, escuamocina y molvizarina de *A. senegalensis*, que poseen una actividad significativa *in vitro* contra *Leishmania donovani*, *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei* en un rango de 25 a 50 µg/mL en la primera hora de exposición, aunque senegalina demostró una mayor efectividad contra *T. brucei* (50 µg/ml) (Sahpaz *et al.*, 1994). ACG similares, aisladas de *A. muricata* y *A. cherimolia* poseen actividad filaricida contra *Molinema deseeate* (Cavé *et al.*, 1997).

Hasta el momento, las evidencias experimentales señalan la acción de las ACG sobre el transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, con acción específica sobre la NADH:ubiquinona óxido-reductasa (NADH deshidrogenasa, también llamada Complejo I), de forma similar a como lo hacen los inhibidores clásicos como la rotenona y la piericidina A (Londershausen *et al.*, 1991; Degli Esposti *et al.*, 1994; Tormo *et al.*, 1999a; Guadaño *et al.*, 2000; Tormo *et al.*, 2001; Tormo *et al.*, 2003; Tormo *et al.*, 2005; Chahboune *et al.*, 2006). También se ha determinado que inhiben a la NADH oxidasa de células cancerosas y de mitocondrias (Morré *et al.*, 1995; Tomo *et al.*, 1999b; Xu *et al.*, 2003; Barrachina *et al.*, 2004). Las ACG son potentes en concentraciones micromolares, por lo que se han descrito como unos de los inhibidores con mayor actividad sobre

el transporte de electrones en mamíferos (Tormo *et al.*, 1999b; Miyoshi *et al.*, 2005; Barrachina *et al.*, 2007).

Es pertinente aclarar que los ensayos se han realizado tanto en líneas celulares cancerosas como no cancerosas, así como en mitocondrias de bovino, insecto, pollo y ratón, células de mesencéfalo (Landolt *et al.*, 1995; Oberlies *et al.*, 1995; Alfonso *et al.*, 1996; Lannuzel *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003) y partículas submitocondriales de bovino (PSM) (Estornell *et al.*, 1997; Tormo *et al.*, 1999c; Motoyama *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2003). En insectos se ha determinado la acción de estas moléculas en adultos y larvas (Londershausen *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1993; Guadaño *et al.*, 2000). También se ha detectado que inducen apoptosis en células cancerosas (Zhu *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2003). En el cuadro 3 se ejemplifican algunas de las actividades señaladas.

Además, Guadaño *et al.* (2000) evaluaron la mutagenicidad de la escuamocina (bis-THF adyacente) y de annonacina (mono-THF) en concentración de 1000 µg/placa sobre *Salmonella Typhimurium* cepas TA98, TA 100 y TA 102, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas, los resultados no muestran un efecto mutagénico/tóxico.

Cuadro 3. Acción biológica de algunas ACG

Acetogeninas	Modelo biológico	Acción	Referencia bibliográfica
Purpureacina-1 Purpureacina-2	<i>Candida albicans</i>	Antifúngica	Cepleanu <i>et al.</i> , 1993
Escuamocina Rolliniastatina-1 Otivarina	PSM de bovino	Inhibe el complejo I	Degli <i>et al.</i> , 1994
Molvizarina Asimicina Annonacina Gigantriocina A y B	Línea celular cancerosa Mitocondria de rata Tumor de agallas	Inhibe el complejo I	Landolt <i>et al.</i> , 1995

Asimicina Trilobacina Annonacina Isoannonacina	Línea celular murina Línea celular cancerosa	Inhibe el crecimiento celular	Oberlies <i>et al.</i> , 1995
Asimicina	Insecto <i>Malacosoma americanum</i> Hongos en plantas de <i>Prunus serotina</i> Línea celular cancerosa	Inhibe el complejo I	Johnson <i>et al.</i> , 1996
Cherimolina-1	PSM de bovino	Inhibe el complejo I con el ensayo de NADH oxidasa	Estornell <i>et al.</i> , 1997
Goniotrionona Piramicina Pirogonicina	Línea celular cancerosa Mosquito de la fiebre amarilla <i>Artemia salina</i>	Inhibe el complejo I con el ensayo de NADH oxidasa Citotóxica Tóxica	Alali <i>et al.</i> , 1998
Membrarollina Rollimembrina Rolliniastatina-1 Membranacina	PSM de bovino	Inhibe el complejo I con el ensayo de la NADH oxidasa	González <i>et al.</i> , 1998
Annoglaucina Purpuracina	Línea celular cancerosa <i>Artemia salina</i>	Citotóxica Tóxica	Chávez y Mata, 1999
Rolliniastatina-1 Escuamocina-2 y derivados sintéticos	Línea celular cancerosa	Inhibe la proliferación celular	Duret <i>et al.</i> , 1999
Rolliniastatina-1 Silvaticina Escuamosina Rollidecina B	Larvas de <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. donovani</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i>	Leismanicida Tripanomicida	Février <i>et al.</i> , 1999
Annonacina Annonacinona Corossolina Corossolona Murisolina Solamina	PSM de bovino	Inhibe el complejo I con los ensayos de NADH:DB oxido-reductasa y NADH oxidasa	Tormo <i>et al.</i> , 1999b
Corossolina Rolliniastatina-1	PSM de bovino	Inhibe el complejo I con los ensayos de NADH:DB oxido-reductasa y NADH oxidasa	Tormo <i>et al.</i> , 1999c
Escuamocina	Línea celular cancerosa	Inhibe proliferación celular	Raynaud <i>et al.</i> , 1999

		Altera ciclo celular	
Escuamocina Annonacina-2	Insectos: larvas de <i>Spodoptera littoralis</i> y adultos de <i>L. decemlineata</i> S. Typhimurium TA98, TA100 y TA102	Inhibe el complejo I Citotóxica No mutagénica	Guadaño <i>et al.</i> , 2000
Escuamocina Mucocina modificada	Mitocondria de bovino y Complejo I aislado	Inhibe el complejo I	Arndt <i>et al.</i> , 2001
Annonacina Escuamocina Rolliniastatina-1	Insectos adultos de <i>S. littoralis</i> Epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> Línea celular cancerosa	Inhibe la NADH oxidasa	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
Escuamocina	Línea celular cancerosa	Inhibe proliferación celular Induce apoptosis	Zhu <i>et al.</i> , 2002
Annonacina	Neuronas de embriones de rata	Reduce la actividad del complejo I e Induce la muerte de neuronas dopaminérgicas	Lannuzel <i>et al.</i> , 2003
Goniotrionina Piracina Piragonicina	Línea celular cancerosa	Apoptosis Inducción de BAX Citotóxica	Yuan <i>et al.</i> , 2003
Escuamocina C	Mitocondrias de hígado de pollo	Inhibe la NADH oxidasa	Xu <i>et al.</i> , 2003 <i>et al.</i>
Tucumanina	PSM de bovino	Inhibe el complejo I	Barrachina <i>et al.</i> , 2004
Muricina H	1-Línea celular de cáncer de pulmón de células grandes H460 2-Fibroblastos normales de ratón 3T3 (línea control)	Citotóxica diferencial	Quispe <i>et al.</i> , 2006
Escuadiolina A Escuadiolina B Escuafosacina B	Línea celular cancerosa	Citotóxica	Liaw <i>et al.</i> , 2008

Posiblemente las ACG más estudiadas en diversos modelos biológicos debido a la potencia que poseen, son rolliniastatina-1, rolliniastatina-2, escuamocina y asimicina, asimismo, los ensayos biológicos se han orientado

hacia el efecto sobre líneas celulares cancerosas en la búsqueda de nuevos fármacos y de compuestos con actividad insecticida.

2.3.3. Relación Estructura–Actividad (REA)

Debido a la diversidad estructural de las ACG, se ha buscado la parte de la molécula que les confiere mayor o menor actividad sobre el complejo I de la cadena respiratoria tanto en células normales como cancerosas, realizando modificaciones estructurales y sintetizado algunos de estos compuestos, incluso se han encontrado algunas ACG derivadas más potentes que las ACG naturales (Tormo *et al.*, 2003).

a) Estudios en líneas celulares tumorales

Entre los estudios relacionados con el número y posición de anillos THF se encuentra el de Oberlies *et al.* (1995), para determinar el poder inhibitorio en ensayos de difusión en gel de 10 ACG (dos mono-THF, dos bis-THF no adyacentes y seis bis-THF adyacentes) sobre líneas celulares cancerosas murinas de páncreas (PO3), linfoma de células B (P388) y mamario resistente a la adriamicina (M17/adr); con las líneas humanas de colon (H8) y de pulmón (H125). La concentración empleada fue de 2.50 µg/disco, marcando como referencia que cada 6.5 mm equivalía a 200 unidades de inhibición. Todas las ACG inhibieron la proliferación de las líneas celulares con valores de 50 a 825 unidades, en particular la bullatacina (bis-THF) fue más potente sobre la línea PO3 (825 unidades) seguida de la P388 (750 unidades), M17/Adr (760 unidades) y H8/H125 (775 unidades). Las ACG fueron más potentes que el agente antineoplásico adriamicina excepto bullatacinona (0.25 µg/disco), 30-hidroxi-bullatacinona (2.5 µg/disco) y annonacina (2.5 µg/disco) cuyo efecto fue ligeramente menor al del control, encontrando que las de dos anillos THF son ligeramente más inhibitorias que las de un anillo THF y las que tienen anillos bis-THF adyacentes son los más potentes aunque sólo ligeramente más que las bis-THF no adyacentes. Aunque estos autores determinaron la potencia inhibitoria en µg/mL no consideraron el

peso molecular de las ACG y el control positivo, por lo que no pueden afirmar que las ACG ensayadas son más potentes que el control.

Con el fin de relacionar la potencia con la estructura molecular de las acetogeninas (configuración de los centros esterogénicos, longitud de la cadena, insaturaciones, cetonas y anillo THF) Cavé *et al.*, (1997) evaluaron la actividad citotóxica de la ACG muricatacina (mono-THF, lactona saturada) y 18 derivados sintetizados [cuatro cetonas butirolactónicas; dos treo (4S, 5S) 5-hidroxi-4-alcanólido; uno eritro (4S, 5S) 5-hidroxi-4-heptadecanolido (+); dos 4S o 5S 5-hidroxi-4-pentanolido (+) y (-); tres treo butenólidos; tres 5-hidroxi-4-alcanolidosracémicos y tres *eritro/trans/treo* y *treo/trans/treo*] sobre las líneas celulares KB (carcinoma epidermoide humano) y VERO (células de riñón de mono africano verde), encontrando que la citotoxicidad depende de la longitud de la cadena, muricatacina es más activa (con $R=C_{12}H_{25}$) sobre KB (CE_{50} 5 $\mu\text{g/mL}$) y VERO (CE_{50} 11 $\mu\text{g/mL}$), mientras que una cadena corta ($R=C_2 H_5$ a $C_{10} H_{21}$ y $R=CH_2OH$) y una lactona saturada disminuyen drásticamente la actividad sobre ambos tipos celulares ($CE_{50} >100 \mu\text{g/mL}$) sin embargo, una cadena de 13 C no incrementó la actividad citotóxica. La insaturación de la lactona mejoró la actividad de los compuestos con cadena corta ($R=C_2 H_5$ y $C_7 H_{15}$) al tener la misma concentración efectiva media que la muricatacina en ambas líneas celulares, casi el mismo efecto se encontró con el compuesto al que se le insertó una función cetona. La adición de un anillo THF no modifica la actividad siempre y cuando no se reduzca el tamaño de la cadena que une a la lactona y los anillos THF (espaciador). Además los enantiómeros de la muricatacina [(+) y (-)] tienen la misma actividad sobre ambas líneas celulares. Este estudio determinó que la longitud del espaciador es crucial para la actividad.

Se prepararon 16 ACG análogas a las que se les reemplazó el anillo bis-THF por bis-éter etilénico y además en el anillo de la cetolactona se incorporaron cadenas laterales lipofílicas diferentes ($n-C_{10}H_{21}$, fenilo, $p\text{-MeOC}_6\text{H}_4$,

p-CF₃C₆H₄, 2-naftilo, Bu₂N, Oct₂N, *N*-piperidinil y 3-*O*-colesteril). La actividad desplegada por las análogas sobre células de leucemia L1210 fue comparada con la de bullatacina, annonacina y bullatacinona. Los valores de la CI₅₀ de los compuestos análogos resultaron ser mayores a los de bullatacinona (CI₅₀ 0.016 μM) y mucho más a los de bullatacina (CI₅₀ 0.0004 μM), pero se pueden señalar varias tendencias: no se observan diferencias significativas para las análogas con cadenas similares, por ejemplo, los de cadena *n*-C₁₀H₂₁ presentan una CI₅₀ de 3.5 y 1 μM. En general los resultados de las análogas presentan una potencia menor que las ACG naturales, lo que indica que la lactona terminal confiere una potencia limitada en contraste con los anillos THF, los que se modificaron en las análogas por un bis-éter etilén glicol. Esto parece apoyar la hipótesis de Shimada *et al.* (1998b) que señalan que la ACG debe adoptar una conformación de “U” con los anillos THF interaccionando con la membrana interna mitocondrial (Rodier *et al.*, 2000).

En años recientes a partir de la solamina (ACG mono THF) se sintetizaron cinco moléculas híbridas con heterociclos nitrogenados en lugar de la cetolactona insaturada. Se determinó su actividad antiproliferativa en 39 líneas celulares cancerosas humanas. Los valores de inhibición media del crecimiento (IC₅₀) en todas las líneas para cada uno de los compuestos modificados estuvieron entre 31 y 71 μM mientras que el de solamina en 76 μM, resultando que los valores de IC₅₀ de los híbridos fueron mayores de los obtenidos con solamina; los resultados sugieren que la lactona puede ser reemplazada con heterociclos nitrogenados sin afectar su potencia inhibitoria (Kojima *et al.*, 2008), lo que ya había señalado Rodier *et al.* (2000).

b) Estudios en mitocondrias completas

Con la finalidad de determinar la REA Landolt *et al.*, (1995) midieron la disminución del consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado de rata expuestas a diez ACG bis-adyacentes (bullatacina, 10-hidroxi-4-dioxibullatacina, bullatacina,

30-hidroxi-4-deoxibullatacina, bullatacinona, 30-hidroxi-bullatacinona, 31-hidroxi-bullatacinona, asimicina, 4-dioxi-asimicina y trilobacina), cuatro bis-no adyacentes (bullatalicina, bullatalicinona, bullatanocina, bullatanocinona) y seis mono THF (annonacina, isoannonacina, cis-annonacina-10-uno, annomontacina, gigantetrocina A, gigantetrocina B) con diferentes arreglos moleculares como lactonas insaturadas y saturadas, grupos hidroxilo en el C-4 o flanqueando los anillos THF. Los ensayos a una concentración de 10 μ L presentaron valores de CI_{50} de 15-800 nM/mg de proteína. Las ACG THF bis-adyacentes 4-hidroxi como la asimicina y la bullatacina (CI_{50} 32 y 71 nM/mg de proteína) son más activas que las tipo 4-dioxi como la 4-dioxibullatacina (CI_{50} 810 nM/mg de proteína); las THF no-adyacentes tuvieron una CI_{50} de 30 a 120 nM/mg de proteína, de ellas la bullatacinona que posee una cetolactona es la menos activa (120 nM/mg de proteína) de este grupo. De los tres tipos de ACG evaluadas las mono-THF fueron las menos activas presentando una CI_{50} de 170 a 480 nM/mg de proteína, la de mayor potencia en este grupo fue la cis-annonacina-10-uno (CI_{50} de 170 nM/mg de proteína); la cetolactona isoannonacina tuvo una mayor actividad que la annonacina con una γ -lactona- α,β -insaturada (CI_{50} de 220 y 480 nM/mg de proteína respectivamente). Las acetogeninas bis-THF adyacentes o bis-THF no adyacentes, presentan una potencia mayor, que disminuye cuando se elimina el OH en el C4.

La potencia inhibitoria debida al número y posición de anillos THF también fue confirmada por Alfonso *et al.* (1996) en mitocondrias de hígado de rata con la evaluación del consumo de oxígeno de cinco ACG bis-THF adyacentes y una no adyacente, una THF-THP no adyacente y siete mono-THF usando como control la bullatacina (una de las ACG mas potentes); el rango de las CI_{50} fue de 0.58-45.87 μ mol/mg de proteína. Las más activas fueron las bis-THF adyacentes como asiminacina, trilobina y bullatacina (CI_{50} 0.58, 0.85 y 1.00 μ mol/mg de proteína respectivamente) mientras que la no-adyacente presentó la menor actividad de este grupo (CI_{50} 28.40 μ mol/mg de proteína), la mucosina (THF-THP no adyacente) fue 14 veces más potente (CI_{50} 1.94 μ mol/mg de proteína) que la bis-

THF adyacente motrilina. Entre las mono THF también hubo diferencias encontrando como más potente a la longifolicina (Mono-THF con tres grupos hidroxilo) (CI_{50} 3.22 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína), la gigantetroneninona con un doble enlace en la cadena alquílica tuvo una CI_{50} 4.90 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína, mientras que annomuricina A y annomuricina B fueron las menos inhibitoras de consumo de oxígeno de todas las ACG ensayadas (CI_{50} 41.32 y 45.87 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína respectivamente).

Alfonso *et al.* (1996) coincide con Landolt *et al.* (1995) en que las ACG bis-THF adyacentes tienen mayor actividad que las mono-THF, pero Alfonso *et al.* (1996) precisan la importancia en las no adyacentes de la distancia entre los dos anillos THF, ya que más de cuatro carbonos reducen la potencia como una mono THF y que las ACG con cetolactona saturada provocan una menor inhibición que las que poseen lactona insaturada.

c) Estudios con PSM de corazón de bovino

Otro tipo de estudios llevados a cabo para entender la REA son los que miden la actividad de las ACG sobre enzimas de la cadena respiratoria, González *et al.* (1998), evaluaron la potencia inhibitoria sobre el transporte de electrones de cuatro ACG [membrarollina (espaciador de 8 C), rollimembrina (espaciador de 8 C), membranacina (espaciador de 10 C) y rolliniastatina-1 (espaciador de 10 C)] con configuración relativa *treo/cis/treo/cis/eritro* bis-THF y diferentes longitudes del espaciador entre el anillo THF y la lactona, con el ensayo de la NADH oxidasa, enzima que no solo mide la inhibición del complejo I sino los complejos I, III y IV de manera integral. Los resultados señalaron que membrarollina (CI_{50} 0.29 nM) y rollimembrina (CI_{50} 0.34 nM) son inhibidores más potentes de la NADH oxidasa que membranacina (CI_{50} 0.59 nM) y rolliniastatina-1 (CI_{50} 0.59 nM). Mostraron evidencias de la importancia del tamaño de la cadena alquílica al señalar que una cadena corta entre el anillo de la γ -lactona y el anillo THF aumenta el potencial

inhibitorio, y de que la posición del grupo hidroxilo en el C-4 afecta la interacción de la ACG con esta enzima.

d) Estudios con ACG modificadas

La modificación de la estructura molecular de las ACG ha permitido también acercarse a la importancia en la REA de la γ -lactona, el espaciador y los grupos hidroxilo. Takada *et al.* (2000) obtuvieron ocho compuestos semejantes a la rolliniastatina-2 (bullatacina) modificando el tamaño del espaciador (de 13 a 16 C), la lactona (sin H, lactona sustituida y cambio de lactona) y los grupos hidroxilo (eliminación de OH del C4, cambio de uno de los que flanquean la molécula por COCH₃), pero todos bis-THF adyacentes y diepomuricanina (con dos epóxidos), determinaron sobre PSM de corazón de bovino su acción inhibitoria midiendo la CI₅₀ sobre la NADH oxidasa y NADH-Q₁ óxido-reductasa. La inhibición media (I₅₀) de la NAD oxidasa con bullatacina fue la mayor (1.2 nM) incluso que el control piericidina A (2.3 nM) y de los compuestos análogos a la bullatacina (1.2 a 260 nM) la diepomuricanina fue la menos activa (2,800 nM). La importancia del OH en la lactona se evidenció con un compuesto sintético que desplegó la misma actividad que la bullatacina. El grupo de Takada estableció que: 1) la γ -lactona no es crucial para la potencia del inhibidor; 2) la presencia de grupos hidroxilo flanqueando los anillos THF son favorables más no esenciales en la potencia de la actividad, para afirmar esto acetilaron un OH lo que disminuyó la potencia inhibitoria; 3) al parecer el espaciador es el factor estructural más importante en la potencia, con un tamaño óptimo de 13 átomos de carbono, lo que le da flexibilidad a la estructura; 4) adicionalmente, la γ -lactona y los anillos THF actúan de forma cooperativa sobre el complejo I debido a que se genera una alta polaridad alrededor de los THF. El análisis de estos experimentos los llevó a señalar la importancia de la conformación no lineal del espaciador para su interacción con el complejo I (Takada *et al.*, 2000).

Otros experimentos como el de Tormo *et al.* (2001) tuvieron la finalidad de determinar si la γ -lactona es determinante para la actividad de las ACG. Se fundamentaron en dos modelos: rolliniastatina-1 (bis-adyacente THF) y cherimolina-1 (bis-THF no adyacente), ambas con una cetolactona insaturada y un OH en el C-4, asumiendo que la modificación de la γ -lactona, alteraría la inhibición del complejo I mitocondrial; los ensayos se llevaron a cabo con la NADH oxidasa y NADH:decilubiquinona óxido-reductasa en PSM de corazón de bovino. Además emplearon las ACG laherradurina e itrabina cuya γ -lactona es saturada. Señalaron que todas las isoacetogeninas derivadas de rolliniastatina-1 tienen más potencia que ésta, mientras que con la cherimolina-1 sólo tres fueron más potentes y que la de mayor potencia inhibitoria fue laherradurina. Encontraron también que γ -lactonas derivadas actúan de forma similar al más potente inhibidor del complejo I, por tanto concluyeron que el tipo de la lactona no es determinante en la actividad biológica pero si la longitud del espaciador.

También se ha elucidado el papel de la cadena alquílica hidrofóbica de las ACG en su acción inhibitoria, para ello Motoyama *et al.* (2002) sintetizaron dos ACG parecidas a la bullatacina, una sin cadena alquílica y otra con cadena alquílica corta empleando la inhibición del Complejo I a través del ensayo de la NADH oxidasa usando partículas PSM de corazón de bovino. Al comparar la actividad con la bullatacina (CI_{50} 0.6 nM), la ACG sin cadena alquílica tuvo una CI_{50} 3.1 nM y la de cadena alquílica corta de CI_{50} 0.9 nM, valor muy cercano al de la bullatacina. Concluyen que la presencia de la cadena alquílica es preferible para la actividad más no esencial.

Un modelo de estudio para determinar tanto la importancia de la lactona como de la longitud del espaciador se ha fundamentado en ACG mono THF (que pueden minimizar la importancia de los anillos THF), Tormo *et al.* (2003). modificaron la lactona de la annonacina y annonacinona (sustituyéndola por un grupo quinona o por ácido carboxílico) y la longitud de la cadena alquílica

analizando su efecto inhibitorio sobre el complejo I de PSM de corazón de bovino utilizando los ensayos de la NADH oxidasa y NADH:decilubiquinona óxido-reductasa. De annonacina se prepararon cinco ACG (CI_{50} 1.9 a 21.8 nM) y de annonacinona tres (CI_{50} de 0.7 a >150 nM). Aunque se ha reportado que las ACG mono-THF son menos potentes que los compuestos que poseen anillos bis-THF adyacentes y no-adyacentes, los resultados obtenidos de este estudio mostraron que todos los compuestos probados pueden bloquear la transferencia de electrones en concentraciones nanomolares (nM) con una CI_{50} similar a rotenona, excepto uno de los modificados de annonacinona, aunado a ello algunos de los compuestos modificados fueron más efectivos para inhibir la NADH:decilubiquinona óxido-reductasa que la rotenona.

La presencia de los grupos hidroxilo flanqueando los anillos de las ACG bis-THF es común en estas moléculas por lo que también se ha investigado su importancia para la actividad. Abe *et al.* (2004) obtuvieron tres ACG análogas a bullatacina sustituyendo los grupos hidroxilo que flanquean a los anillos por H y eliminaron el grupo hidroxilo del C4. Con el ensayo de la NADH oxidasa sobre PSM de corazón de bovino, la CI_{50} de la bullatacina sin -OH en el espaciador fue de 0.75 nM, a las que se les sustituyó sólo un hidroxilo de los que flanquean los anillos presentaron una potencia inhibitoria de 3.1 y 2.7 nM y de 85 nM a la que se le sustituyeron los dos. Fue evidente que la modificación de los grupos hidroxilo disminuye drásticamente la potencia.

Considerando que los anillos THF son esenciales para la actividad inhibitoria se sintetizó una acetogenina análoga a cohibina A (ACG lineal con dos grupos hidroxilo y cetolactona), con cuatro grupos hidroxilo. La inhibición del complejo I se determinó en PSM de corazón de bovino con el ensayo de la NAD oxidasa usando bullatacina como control de la potencia. La CI_{50} de bullatacina en esta investigación fue de 0.8 nM mientras que la de dihidroxi-cohibina A fue de 20 nM. Lo que indica que la sustitución de los anillos THF por de grupos hidroxilo

mantiene a la molécula con actividad, pero no tan potente como la de bullatacina (Konno *et al.*, 2004).

Con el fin de conocer el papel de la lactona se realizó la síntesis de ACG semejantes a la bullatacina, a las que se les eliminó la lactona, los resultados indican que excepto por el importante papel que tiene el espacio alquílico de 13 átomos de carbono, el otro factor crucial para la potencia de las ACG incluye la conformación de éstas en la membrana, por lo que se señala que la γ -lactona y los anillos THF actúan de manera conjunta sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Hamada *et al.*, 2004).

Con relación a los anillos THF y los grupos hidroxilo (-OH) que los flanquean, diversos reportes de investigación, coinciden en señalar que las ACG bis-adyacentes seguidas de las no adyacentes son más activas que las mono-THF sobre el complejo I mitocondrial, y que la presencia de grupos -OH flanqueando los anillos es favorable para la actividad, más no esencial.

No obstante todas las investigaciones no hay claridad acerca de cuál o cuáles son las partes más importantes de la molécula que le confiere(n) su potencia como inhibidores, sin embargo hay coincidencia en tres características: el anillo THF, el anillo terminal γ -lactona y el número de carbonos entre ellos ("espaciador") que al parecer el "ideal" es de 13 carbonos (Takada *et al.*, 2000; Hamada *et al.*, 2004; Miyoshi, 2005; Abe *et al.*, 2008).

A continuación se destacan algunas conclusiones referidas a la REA de acetogeninas naturales y sintéticas:

- a) Las bis-THF adyacentes y las no adyacentes son más activas que las mono-THF.
- b) Las bis-THF adyacentes son las más potentes de la familia; las bis-THF no adyacentes son en general superiores a las mono-THF, las cuales son más potentes que las que no poseen anillo(s) THF.

- c) Los anillos bis-THF adyacentes no son esenciales para la actividad ya que los mono-THF también exhiben potente actividad.
- d) Al parecer la mayor actividad está en relación con los anillos THF presentes en la estructura.
- e) Los anillos THF y la lactona actúan de manera cooperativa sobre la enzima y que la longitud óptima del espaciador es de 13 átomos de carbono.
- f) Los compuestos con anillos THF y THP son igualmente activos.
- g) Un espacio de 13 carbonos entre los anillos THF y la lactona es muy importante para la potencia de su actividad.
- h) La estereoquímica de los anillos no es esencial para la potencia.
- i) La α , β -insaturada- γ -lactona al final de la cadena es crucial para la actividad que despliegan.
- j) Las ACG con C-35 son más potentes que las de C-37.
- k) El espacio entre un -OH flanqueando al anillo THF y la lactona, es crítico para la potencia y selectividad de las ACG, por ejemplo un espacio de C-13 en las mono y bis-THF es óptimo para la actividad.
- l) La posición del grupo -OH en los C-4 y C-10 son esenciales para su actividad.
- m) La cadena alquílica no es un factor estructural requerido para la inhibición.

Todavía es más escaso el conocimiento acerca de cómo estos compuestos interactúan con la membrana, así Shimada *et al.* (1998a; b) trabajaron en la elucidación de la conformación que adquieren las ACG con anillos THF: mono, bis-adyacentes y bis-no adyacentes sobre “membranas” liposomales y señalaron que los anillos pueden aumentar la bioactividad de la molécula restringiendo la ubicación, localización y orientación de la lactona; ellos propusieron un modelo de conformación activa (en forma de U) en el que los anillos THF flanqueados por grupos hidroxilo accionan como un ancla hidrofílica en la superficie de la membrana interna mitocondrial y la cadena alquílica como un ancla hidrofóbica, y que sólo la lactona interactúa directamente con el sitio activo del complejo I por difusión lateral en la membrana mitocondrial interna, además y dado que los

anillos de THF se encuentran cerca del centro de la molécula y el anillo de lactona es el extremo terminal en una larga cadena alquílica, es posible que las ACG tipo asimicina puedan adoptar una conformación de hoz o de “U”, en función de la longitud de la cadena alquílica entre el THF y la lactona. Asimismo esta propuesta del rol crucial de la lactona es consistente con el hecho de que las ACG naturales más potentes poseen una γ -lactona- α,β -insaturada como rolliniastatina-2 (bullatacina).

Además, se ha tratado de caracterizar el sitio de unión del inhibidor al complejo I y determinar la función dinámica de la cadena de C entre el o los anillos THF y el anillo lactónico; Abe *et al.* (2008) observaron que una disminución en la flexibilidad de la cadena espaciadora es adversa para la acción de las mono-THF mientras que para las bis-THF no, sugirieron que aún cuando se acorta el número de C a las bis-THF uno de los dos anillos es capaz de trabajar como un pseudoespaciador. Estas propuestas son el resultado de ACG a las que les modificó el tamaño del espaciador (Figura 11).

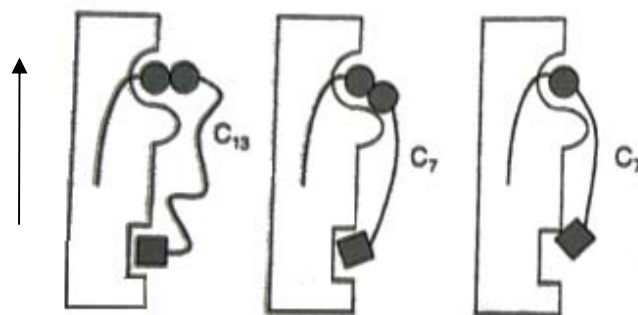


Figura 11. Representación esquemática de un modelo de unión de la ACG al complejo I. Se puede observar que cuando la ACG exhibe su efecto, el anillo THF hidroxilado y el anillo lactónico se unen simultáneamente en dos sitios (Modificado de Abe *et al.*, 2008).

Con relación a la conformación de la molécula, se realizó una simulación de la dinámica molecular de ACG tipo guanacona (*treo/trans/treo/trans/eritro*), específicamente de la diacetil-guanacona (DAG obtenida por semisíntesis) en una bicapa lipídica totalmente hidratada de 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) empleando el programa AMBER y un tiempo de simulación de 10 ns. El estudio mostró que los puentes de hidrógeno son críticos para que la

molécula adquiera una conformación particular, caracterizada por presentar forma de “L”, en la cual los anillos THF se comportan como “anclas hidrofílicas” en los lípidos de la membrana. De manera que los anillos THF pueden mejorar la actividad de la DAG restringiendo la ubicación, conformación y orientación de la lactona, la que ha sido señalada como parte esencial para la actividad (Barrachina *et al.*, 2007).

Aunque diversos grupos de investigación como el de McLaughlin, Miyoshi y Cavé sugieren que el o los anillos THF se localizan en la membrana interna mitocondrial y que la lactona interactúa con el sitio de la membrana, también han demostrado que la sustitución de la lactona por o con otro tipo de compuestos en ACG análogas solo disminuyen la potencia inhibidora con relación a las ACG naturales, el grupo de Miyoshi reporta que el espaciador es indispensable para la actividad; hasta hoy sigue sin haber claridad sobre si es una parte de la molécula la que confiere la actividad, o si, independientemente del tipo de ACG, la molécula como un todo ejerce la actividad.

2.3.4. Características de las acetogeninas utilizadas en los ensayos

La rolliniastatina-2 ($C_{37}H_{66}O_7$) y laherradurina ($C_{37}H_{68}O_7$) fueron aisladas a partir de semillas de *A. diversifolia*, ambas presentan un núcleo estructural bis-THF adyacente, de configuración relativa *treo/trans/treo/trans/eritro*, con tres grupos –OH; rolliniastatina-2 en los C4, C15, C24 y laherradurina en los C4, C15, C35; las diferencias en las estructuras se basan en la posición de uno de los hidroxilos presentes en cada molécula y en el tipo de lactona. La primera tiene una lactona insaturada y la segunda β -hidroxi metil γ -lactona saturada, al ser ambas del tipo bis-THF adyacente, se ubican entre las más potentes en cuanto a su actividad biológica.

2.3.4.1. Rolliniastatina-2

Previamente ha sido aislada de tres géneros de la familia Annonaceae: *Rollinia* (Pettit *et al.*, 1989), *Asimina* (Zhao *et al.*, 1992) y *Annona*, de este último se ha aislado de semilla, corteza y raíz de: *A. bullata* (Hui *et al.*, 1989), *A. squamosa* (Li *et al.*, 1990; Born *et al.*, 1990), *A. reticulata* (Hisham *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1998c), *A. cherimolia* (Duret *et al.*, 1994; Cortes *et al.*, 1993b), *A. senegalensis* (Sahpaz *et al.*, 1996), *A. glauca* (Etcheverry *et al.*, 1995) y *A. diversifolia* (Reyes-Trejo *et al.*, 1999).

Cavé *et al.* (1997) señalan que esta ACG es igual a: bullatacina y 4-hidroxi-25-desoxirolliniacina.

Rolliniastatina-2 (Figura 12) es una de las acetogeninas más potentes en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial según las investigaciones realizadas sobre mitocondrias de insectos, de bovino, de pollo y ratón, y sobre partículas submitocondriales (PSM) de corazón de bovino (Londershausen *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1994; Tormo *et al.*, 2003; Miyoshi, 2005).

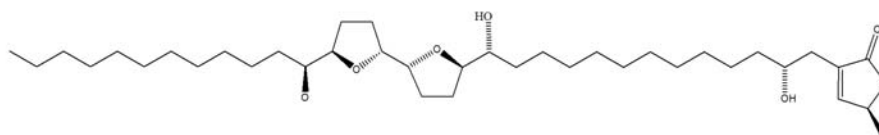


Figura 12. Estructura química de rolliniastatina-2.

Además se han realizado ensayos antitumorales en ratones atímicos como el de Ahmadsahib *et al.* (1993) del que concluyeron que la rolliniastatina-2 inhibe el tumor en un 67% a una dosis de 50 µg/kg/día en 10 días de experimento. Además, tiene efecto sobre *Leishmania major* con una concentración efectiva mínima (CEM) de 200 µg/mL a las 24 h de exposición (Saphaz *et al.*, 1994b), en *Artemia salina* con $DE_{50} > 1.59 \times 10^{-3}$ (Landolt *et al.*, 1995); presenta una dosis efectiva media (DE_{50}) de 0.1×10^{-8} µM frente a la línea celular tumoral SW480 multidroga-resistente (González-Coloma *et al.* 2002); Chih *et al.* (2001) señalaron

que sobre células de hepatocarcinoma humano 2.2.15 una posible forma de actividad es la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis y Chiu *et al.* (2003) demuestran la presencia de apoptosis de forma tiempo y concentración-dependientes en concentraciones de 10^{-3} a $1.0 \mu\text{M}$ y que el cambio apoptótico más significativo aparece a las 16 horas. También notaron una disminución tiempo y concentración dependientes de los niveles intracelulares de AMP cíclico y GMP cíclico, por lo que sugirieron que la disminución de los niveles de AMP y GMP cíclicos pueden jugar un papel crucial en la inducción de la apoptosis por rolliniastatina-2 en las células ensayadas (Cuadro 4).

El efecto que esta ACG presenta sobre diversos modelos biológicos en concentraciones muy bajas, justifican el hecho de ser señalada como una de las más potentes inhibidoras del complejo I, aún más potente que rotenona, el clásico inhibidor del complejo I mitocondrial.

Cuadro 4. Acción biológica de rolliniastatina-2

Modelo biológico	Tipo de ensayo	Efecto	Referencia bibliográfica
Artemia salina (BST)	Toxicidad	CL ₅₀ $1.59 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$	Meyer <i>et al.</i> , 1982
		CL ₅₀ $0.00159 \mu\text{g/mL}$	Rupprecht <i>et al.</i> , 1990
		75% de mortalidad a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$	Londerhausen <i>et al.</i> , 1991
		DE ₅₀ $1.59 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$	Gu <i>et al.</i> , 1995
		$1.59 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$	Johnson <i>et al.</i> , 1996
		$1.6 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$	He <i>et al.</i> , 1997
Complejo I aislado			
Mitocondria de corazón de bovino	Inhibir CoQ ₁ óxido-reductasa	Cl ₅₀ $0.35 \pm 0.1 \text{ nM}$	Ahammadsahib <i>et al.</i> , 1993
Insectos			
1- <i>Aphis gossypii</i> 2- <i>Aedes aegypti</i> (larvas) 3- <i>Diabrotica undecimpunctata</i> 4- <i>Tetranychus urticae</i>	Insecticida	1-80% de mortalidad a 1 ppm 2-80% de mortalidad a 10 ppm 3-80% de mortalidad a 24 ppm 4-20% de mortalidad a 10 ppm	Rupprecht <i>et al.</i> , 1990

		ppm	
1- <i>Aedes aegypti</i> (larvas) 2- <i>Locusta migratoria</i> (larvas)	Larvicida	1- 65% de mortalidad a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 2- 90% de mortalidad a 50 $\mu\text{g g}^{-1}$	Londerhausen <i>et al.</i> , 1991
Larvas del mosquito de la fiebre amarilla	Larvicida	CL ₅₀ 0.10 mg/mL	He <i>et al.</i> , 1997
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Antialimentario	CE ₅₀ 2.3 $\mu\text{g/cm}^2$	Guadaño <i>et al.</i> , 2000
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (adulto), <i>Spodoptera littoralis</i> (larvas) y <i>M. persicae</i> (adulto)	Antialimentario	Efecto solo en <i>L. decemlineata</i> : CE ₅₀ 2.3 $\mu\text{g/cm}^2$	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
<i>Spodoptera littoralis</i> (larvas)	Antialimentario	56.2% con relación al control	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
<i>Spodoptera littoralis</i> (larvas)	Antialimentario	29.7% con relación al control	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
Líneas celulares			
Leucemia linfocítica P-388	Citotoxicidad	DE ₅₀ 2.3x10 ⁻⁴ $\mu\text{g/mL}$	Pettit <i>et al.</i> , 1989
1-Carcinoma nasofaríngeo humano (9KB) 2-Carcinoma humano de pulmón (A546) 3-Carcinoma humano de mama (MCF-7) 4-Adenocarcinoma humano de colon (HT-29)	Citotoxicidad	1-DE ₅₀ 6.2x10 ⁻¹⁴ $\mu\text{g/mL}$ 2-DE ₅₀ 1.25x10 ⁻¹³ $\mu\text{g/mL}$ 3-DE>10 $\mu\text{g/mL}$ 4-DE ₅₀ 10 ⁻¹² $\mu\text{g/mL}$	Rupprecht <i>et al.</i> , 1990
1-Células derivadas de ovario de pupa de <i>S. frugiperda</i> 2- Células derivadas de ovario de pupa de <i>S. frugiperda</i>	1- Citotoxicidad 2-Inhibición de la respiración	1-Cl ₅₀ 0.5 nM (3.1x10 ⁴ $\mu\text{g/mL}$) 2- Cl ₅₀ 1.2 nM (Concentración que reduce el consumo de oxígeno en un 50%)	Ahammadsahib <i>et al.</i> , 1993
<i>In vivo</i> en ratones implantados con leucemia murina L1210	Sobrevivencia	38% de vida a 50 $\mu\text{g/Kg/día}$	Ahammadsahib <i>et al.</i> , 1993
De tumor epitelial de ovario humano:	1, 2, 3 y 4- Citotoxicidad 5- Sobrevivencia	1-ED ₅₀ 10 ⁻⁷ $\mu\text{g/mL}$ para OC-194 a 72 h	Holschneider <i>et al.</i> , 1994

1-OC-194, 2-OC-222, 3-OVCAR-3 resistente a ciplastina, 4-A-2780 <i>In vivo</i> en ratón C3HeB/FeJ 5-MOT (teratocarcinoma de ovario murino)	relativa	2 y 4- Sensibles 3-ED ₅₀ 4 µg/mL para OVCAR-3 resistente a ciplastina a 72 horas 5- No muestra efecto sobre MOT	
1- Células de riñón de mono verde africano (VERO) 2- Carcinoma epidermoide humano (KB)	Citotoxicidad	1- CL ₅₀ 3x10 ⁻² µg/mL 2- CL ₅₀ 3x10 ⁻⁵ µg/mL	Saphaz <i>et al.</i> , 1994b
1-Carcinoma humano de pulmón (A-549) 2-Carcinoma de mama (MCF-7) 3-Carcinoma de colon (HT-29)	Antitumoral	1- DE ₅₀ 1.25x10 ⁻¹³ 2- DE ₅₀ >10 3- DE ₅₀ 1.0x10 ⁻¹²	Zhao <i>et al.</i> , 1994
1-Cáncer de pulmón (A-549) 2- Carcinoma de mama (MCF-7) 3- Adenocarcinoma de colon (HT-29) 4-Carcinoma humano de riñón (A-498) 5-Adenocarcinoma humano de próstata (PC-3) 6-Carcinoma humano pancreático (MIA PaCa-2)	Citotoxicidad	1- DE ₅₀ <1.00x10 ⁻⁸ µg/mL 2- DE ₅₀ <1.00x10 ⁻⁸ µg/mL 3- DE ₅₀ 1.06 µg/mL 4- DE ₅₀ <1.00x10 ⁻⁸ µg/mL 5- DE ₅₀ 1.62x10 ⁻² µg/mL 6- DE ₅₀ <1.00x10 ⁻⁸ µg/mL	Gu <i>et al.</i> , 1995
1- Linfoma P388 2- Pancreático PO3 3- Ovárico resistente M17/A 4- Colon H8 5- Pulmón HI25 6-Células no cancerosas I18	Inhibición del crecimiento celular	1- 750 Unidades de inhibición (UI) 2- 800 UI 3- 750 UI 4 y 5- 750UI 6- 750 UI 200 unidades de inhibición= 6.5 mm	Oberlies <i>et al.</i> , 1995
1-Carcinoma uterino	Inhibición de la NADH oxidasa	1-DE ₅₀ 5-10 nM	Morré <i>et al.</i> , 1995

humano (He-La) 2-Leucemia promielocítica humana resistente a adriamicina (HL-60)		2-DE ₅₀ 1 µM	
1-Carcinoma humano de mama (MCF-7) 2- Carcinoma humano de colon (HT-29) 3- Carcinoma humano de pulmón (A-549)	Citotoxicidad	1-DE ₅₀ >10 µg/mL 2-DE ₅₀ 1.0x10 ⁻¹² µg/mL 3-DE ₅₀ 1.25x10 ⁻¹³ µg/mL	Johnson <i>et al.</i> , 1996
1-Carcinoma humano de pulmón (A-549) 2-Carcinoma humano de mama (MCF-7) 3-Adenocarcinoma humano de colon (HT-29) 4-Carcinoma humano renal (A-498) 5-Adenocarcinoma de próstata humana (PC-3) 6-Carcinoma pancreático humano	Citotoxicidad	1-DE ₅₀ 2.44x10 ⁻⁶ µg/mL 2-DE ₅₀ 6.96x10 ⁻¹ µg/mL 3-DE ₅₀ 1 µg/MI 4-DE ₅₀ 4.85x10 ⁻⁵ µg/mL 5-DE ₅₀ <10 ⁻⁹ µg/mL 6-DE ₅₀ <10 ⁻⁹ µg/mL	Hopp <i>et al.</i> , 1997
1-Adenocarcinoma humano de mama multidrogaresistentes (MCF-7/Adr) 2-Adenocarcinoma humano de mama tipo "salvaje" (MCF-7/wt)	Citotoxicidad	1-Inhíbe el crecimiento dosis-respuesta lineal en un rango de 1 µ/mL a 1x10 ⁻⁴ µg/mL 2-Inhíbe el 50%, fue más citostática que citotóxica a 1 µ/mL	Oberlies <i>et al.</i> , 1997
Líneas celulares tumorales: 1- A-549 cáncer pulmón 2- HT-29 Cáncer colon humano	1 y 2- Citotoxicidad 3-Inhibición del complejo I	1-DE ₅₀ 1.25 E-13 µ/mL 2-DE ₅₀ E-12	Tormo <i>et al.</i> , 1999b
Leucemia L1210	Citotoxicidad	CI ₅₀ 0.0004 µM	Rodier <i>et al.</i> , 2000
Células de hepatocarcinoma humano 2.2.15	Citotoxicidad	DE ₅₀ 7.8 ±2.5 nM (1 día de exposición). Dosis y tiempo dependientes	Chih <i>et al.</i> , 2001
1- Células de ovario de	Citotoxicidad	1-0.03% con relación al	González-Coloma <i>et al.</i> ,

Sf9 2- Células de ovario de hamster (CHO) 3-Carcinoma de colon humano (SW480 MDR) 4-SkMe128 5-He La		control 2-DE ₅₀ 1.51 µM 3-DE ₅₀ 0.1 x 10 ⁻⁸ µM 4-DE ₅₀ 0.09 µM 5-DE ₅₀ 4.74 µM	2002
1-Células de hepatocarcinoma humano 2.2.15	1- Apoptosis 2- Disminución del nivel de AMPc	1- Apoptosis 72±5.5% a 1.0 µM a las 16 h 2-9.5±3.2% con relación al control a 0.1 µM a las 6 h	Chiu <i>et al.</i> , 2003
1-Leucemia promielocítica humana (HL-60) 2- Línea K562	Inhibición del crecimiento con concentraciones de a) 100, b) 10 y c) 1 µM	1-a) CI ₅₀ 73% 1-b) CI ₅₀ 7% 1-c) CI ₅₀ 0% 2-a) CI ₅₀ 53% 2-b) CI ₅₀ 39% 2-c) CI ₅₀ 27%	Hu <i>et al.</i> , 2006
Membrana citoplásmica			
1- <i>Paracoccus denitrificans</i> 2- <i>Thermus thermophilus</i>	Inhibición del complejo I	Sensibles a 100 nM	Schuler <i>et al.</i> , 1999
Mitocondrias			
1- Mitocondria de músculo de vuelo de <i>Locusta migratoria</i> 2- Mitocondria de músculo de corazón de bovino 3- Mitocondria de células de <i>Neurospora crassa</i>	Inhibición del consumo de oxígeno	1-CI ₅₀ 0.8 (± 0.2) µM 2-CI ₅₀ < 0.1 µM 3-CI ₅₀ < 0.1 µM	Londerhausen <i>et al.</i> , 1991
1-Mitocondria de hígado de ratón 2-Mitocondria de <i>Manduca sexta</i>	Inhibición de la respiración mitocondrial	1-CI ₅₀ 9.5±0.5 nM 2-CI ₅₀ 11.0±1.0 nM	Ahammadsahib <i>et al.</i> , 1993
Mitocondria de hígado de rata	Inhibición del consumo de oxígeno	CI ₅₀ 71 nM/mg de proteína	Landolt <i>et al.</i> , 1995
Mitocondria de hígado de rata Usaron 10 µL de c/ACG en rangos de 15 nM a 150 nM	Inhibición del consumo de oxígeno	CI ₅₀ 1.00 µmol/mg de proteína	Alfonso <i>et al.</i> , 1996
Mitocondria de bovino	Inhibición del complejo I	I ₅₀ 0.06 nmol/mg de proteína	Degli Esposti, 1998

Parásitos			
1- <i>Leishmania major</i> (promastigotes) 2- <i>Leishmania donovani</i> 3- <i>T. brucei</i>	Antiparasitario	1-CEM 200 µg/mL (24 y 96 h) 2-CEM >200 µg/mL (24 y 96 h) 3-CEM >200 µg/mL (1h) y 50 µg/mL (24 h) CEM: concentración efectiva mínima	Saphaz <i>et al.</i> , 1994a
<i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigotes)	Inhibición del crecimiento	DE ₅₀ 163.72 µM	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
Partículas submitocondriales			
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I	CI ₅₀ 1.5 nmol/mg en 1 nM de complejo I	Degli Esposti <i>et al.</i> , 1994
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I: 1-NADH oxidasa 2-NADH:ubiquinona óxido-reductasa medida como decilubiquinona	1-CI ₅₀ 0.51±0.02 nM 2-CI ₅₀ 0.61±0.04 nM	Estornell <i>et al.</i> , 1997
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I: 1-NADH oxidasa 2-NADH:ubiquinona óxido-reductasa medida como decilubiquinona	1-CI ₅₀ 0.51±0.02 nM 2-CI ₅₀ 0.61±0.04 nM	Tormo <i>et al.</i> , 1999b
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I: 1-NADH:decilubiquinona óxido-reductasa en concentración de 2.5 a 0.5 nM 2-NADH oxidasa en concentración de 1.5 a 0.25 nM	1-CI ₅₀ 0.61± 0.004 nM 2-CI ₅₀ 0.51± 0.003 nM	Tormo <i>et al.</i> , 1999c
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I empleando el ensayo de NADH oxidasa	CI ₅₀ 0.6 nM	Gallardo <i>et al.</i> , 2000
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I empleando el ensayo de la NADH oxidasa	I ₅₀ 2.3± 0.1 nM	Kuwabara <i>et al.</i> , 2000
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I empleando el ensayo de la NADH oxidasa	I ₅₀ 1.2± 0.2 nM	Takada <i>et al.</i> , 2002
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I usando el ensayo de la NADH oxidasa	CI ₅₀ 0.9±0.04 nM	Hamada <i>et al.</i> , 2004
Corazón de bovino	Inhibición del complejo por el ensayo de la NADH oxidasa	CI ₅₀ 0.51±0.03 nM	Barrachina <i>et al.</i> , 2004
Tumor de agallas			
Crecido en discos de	Inhibición del crecimiento	53 % inhibición	Rupprecht <i>et al.</i> , 1990;

papa			McLaughlin, 1991
------	--	--	------------------

2.3.4.2. Laherradurina

Hasta hoy esta ACG sólo se ha aislado de semillas de tres especies del género *Annona*: *A. cherimolia* (Ríos *et al.*, 1989; Cortes *et al.*, 1993b; Sahpaz *et al.*, 1996), *A. diversifolia* (Reyes *et al.*, 1997) y *A. glabra* (Gallardo *et al.*, 1998b) (Figura 13).

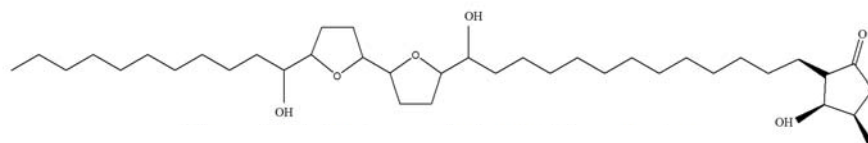


Figura 13. Estructura química de laherradurina.

Este tipo de ACG es poco común debido a que la γ -lactona es saturada, de hecho en la literatura especializada sólo se reportan cinco de este tipo laherradurina, tucumanina, jeteina, otivarina e itrabina, aisladas de *A. cherimola*. Las dos primeras son bis-THF adyacentes, tienen el mismo número y posición de los grupos hidroxilo (15, 24 y 35) pero difieren en la estereoisomería, laherradurina es *treo/trans/treo/trans/eritro* y tucumanina *treo/trans/treo/trans/treo*.

Cortes *et al.* (1993) y en 1998 Warmerdam *et al.* realizaron la revisión de la estructura de la lactona, Barrachina *et al.* (2004) señalan que este compuesto actúa como un inhibidor del Complejo I mitocondrial (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad biológica de laherradurina

Modelo biológico	Tipo de ensayo	Efecto	Referencia bibliográfica
Líneas celulares			
1-Células de ovario de Sf9	Citotoxicidad	1-0.57% con relación al control	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
2-Células de ovario de		2-DE ₅₀ 8.42 μ M	

hamster (CHO) 3-Carcinoma de colon humano (SW480 MDR) 4-SkMe128 5-Carcinoma humano de cervix (He-La)		3-DE ₅₀ 0.64 x 10 ⁻⁶ μM 4-DE ₅₀ 0.14 μM 5-DE ₅₀ 0.74 μM	
1-Carcinoma humano de cervix (He-La) 2-Adenocarcinoma colon-rectal (SW-480)	Antiproliferativo	1-CI ₅₀ 0.015 μg/mL 2- CI ₅₀ 0.015 μg/mL	Schlie <i>et al.</i> , 2009
Insectos			
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (adultos), <i>Spodoptera littoralis</i> (larvas) y <i>M. persicae</i> (adultos)	Antialimentario	1-Efecto solo <i>L. decemlineata</i> = 86% con relación al de control	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
<i>Spodoptera littoralis</i> (larvas)	Antialimentario	86% con relación al control	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
<i>Spodoptera littoralis</i> (larvas)	Pérdida de biomasa	78% con relación al control	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
In vivo			
1-Ratones atímicos inoculados con He-La 2-Ratones atímicos inoculados con SW-480	Disminución del tamaño del tumor	1-64% 2-60%	Schlie <i>et al.</i> , 2009
Parásitos			
<i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigotes)	Tripanocida	DE ₅₀ >100 μM	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
Partículas submitocondriales			
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I usando los ensayos: 1-NADH oxidasa 2-NADH:decilubiquinona óxido-reductasa	1-CI ₅₀ 0.18± 0.02 nM 2-CI ₅₀ 0.29±0.01 nM	Tormo <i>et al.</i> , 2001
Corazón de bovino	Inhibición del complejo I por el ensayo de la NADH oxidasa	CI ₅₀ 0.18±0.02 nM	Barrachina <i>et al.</i> , 2004

Los modelos biológicos usados para evaluar a estas ACG son muy variados, pero los valores de actividad más bajos se obtienen con las PSM de

corazón de bovino, ello posiblemente se debe a que la membrana queda totalmente expuesta al compuesto y por tanto la medición de la actividad del complejo I es directa.

La revisión bibliográfica realizada indica que rollinistatina-2 es una de las ACG más ensayadas en diversos modelos biológicos, a diferencia de laherradurina que ha sido mucho menos investigada. La mayoría de los ensayos se han realizado en líneas celulares cancerosas (incluyendo multidroga-resistentes y normales), con rolliniastatina-2 se han probado 37 y seis frente a laherradurina. Los datos señalan el efecto selectivo de las ACG sobre las células cancerosas, efecto demostrado ampliamente por muchos investigadores.

No es posible comparar con exactitud los valores obtenidos con las dos ACG en los ensayos con líneas celulares, ya que las condiciones de los ensayos realizados tienen muchas variantes así como los resultados reportados pues unos están en porcentajes de inhibición y otros en DE_{50} , CI_{50} , CL_{50} o I_{50} . Sin embargo González-Coloma *et al.* (2002) señalaron que en células He-La la rolliniastatina-2 presentó una DE_{50} de 4.74 μ M y la laherradurina de 0.74 μ M.

Con relación a las PSM de corazón de bovino, se han empleado mayormente los ensayos de la NADH:ubiquinona óxido-reductasa y NADH oxidasa, resultando más sensible el segundo ensayo ya que los valores de la CI_{50} son ligeramente menores. Rolliniastatina-2 con el primer ensayo ha mostrado valores de 0.61 nM y para el segundo de 0.51 a 2.3 nM y con laherradurina el valor del ensayo de la NADH:ubiquinona óxido-reductasa es de 0.29 nM y con la NADH oxidasa de 0.18 nM.

Al parecer, de las dos ACG, posiblemente la más potente es laherradurina, ya que con el ensayo de la NADH oxidasa muestra valores de CI_{50} 0.18 nM (Tormo *et al.*, 2001; Barrachina *et al.*, 2004) mientras que rolliniastatina-2 con el mismo ensayo presenta una CI_{50} 0.51 nM (Estornell *et al.*, 1997; Tormo *et al.*, 1999c; Barrachina *et al.*, 2004).

2.4. Bacterias

Las bacterias son organismos cosmopolitas, microscópicos y unicelulares, algunas tienen flagelos y otras carecen de ellos, por lo que pueden (desplazarse o no) ser móviles o inmóviles. Las células individuales pueden tener diferentes formas y capacidad de agruparse. Pueden ser aerobias, anaerobias o facultativas, son heterótrofas u autótrofas con distintos tipos de reproducción. Son procariontes, con una “cubierta” constituida por paredes celulares, membranas y frecuentemente cápsulas de secreción (Parés y Juárez, 1997; Gutiérrez y Jiménez, 2006). La tinción diferencial de Gram las divide en Grampositivas y Gramnegativas.

Las bacterias Grampositivas se tiñen con el colorante cristal violeta de la tinción de Gram. Poseen una capa gruesa de peptidoglucano unida de manera covalente a ácidos teicoicos que forman la pared, la membrana citoplásmica en lugar de lipopolisacáridos tiene ácidos lipoteicoicos asociados a la mureína (McKee y McKee, 2003) (Figura 14).

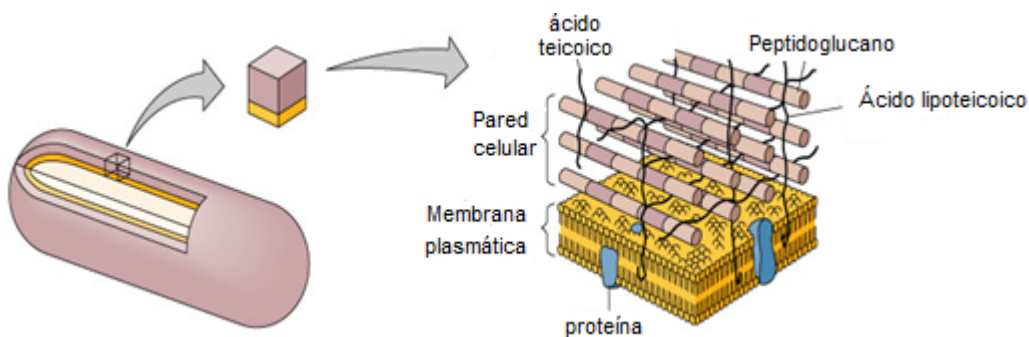


Figura 14. Cubierta de una bacteria Grampositiva (Modificado de McKee y McKee, 2003)

Las bacterias Gramnegativas no se tiñen con el colorante cristal violeta de la prueba de Gram. Tienen una estructura compleja formada por tres capas morfológicas diferentes, están rodeadas por una membrana externa asimétrica que contiene fosfolípidos en su monocapa interna y lipopolisacáridos (LPS) y porinas en su monocapa externa. Presentan una membrana interna separada por

una fina capa de peptidoglucano denominada pared (que es diez veces más delgada que en las Grampositivas). Cada una de estas láminas tiene diferente morfología y estructura, y contienen proteínas que juegan un papel esencial para la célula (Osborn *et al.*, 1972; Minahi-Tehrani *et al.*, 2002; Tefsen *et al.*, 2005) (Figura 15).

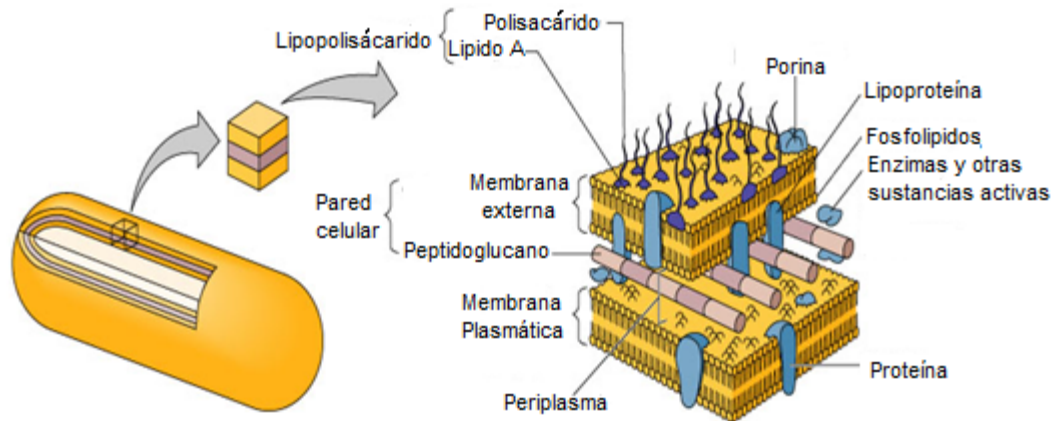


Figura 15. Cubierta de una bacteria Gramnegativa (Modificado de McKee y McKee, 2003)

Entre la membrana interna y externa se localiza el espacio periplásmico, que contiene peptidoglucano, un polímero que proporciona rigidez y mantiene la morfología de las bacterias. La membrana externa se ancla al peptidoglucano a través de su región proteica, se ha sugerido que esta unión podría participar en el mantenimiento del espacio periplásmico.

En ambos tipos bacterianos las envolturas externas restringen el acceso a la membrana citoplásmica, éstas pueden ser eliminadas por agentes como antibióticos que interfieren con la biosíntesis del peptidoglucano, o por enzimas líticas que las degradan, como la lisozima, que se emplea en la experimentación *in vitro* (Stevens *et al.*, 1991).

En las especies bacterianas Grampositivas, la capa de peptidoglucano de la pared puede ser removida por tratamientos con enzimas o antibióticos y el resultado es una estructura osmoticamente sensible, la que es referida como **protoplasto** (Corner y Marquis, 1969; Costerton *et al.*, 1977).

Las bacterias Gramnegativas tienen una membrana externa adicional que es la barrera más importante de permeabilidad. Son más resistentes a la acción de la lisozima y son convertidas en formas osmoticamente sensibles sólo si al realizar el procedimiento se emplean otros agentes, entre ellos el ácido diamino-tetraacético (EDTA) (Corner y Marquis, 1969).

La eliminación de la pared generalmente se realiza por un tratamiento que combina lisozima y EDTA. Los iones quelantes del EDTA inician la degradación en el exterior de la pared liberando lipopolisacáridos y permitiendo la acción de la lisozima que degrada la matriz del peptidoglucano del periplasma. Se producen formas esferoidales que quedan rodeadas de la membrana citoplásmica, lo que las hace bastante frágiles y por tanto susceptibles a sufrir lisis por lo que se mantienen en una solución amortiguadora que contenga sacarosa para prevenir la ruptura (Corner y Marquis, 1969; Sullivan *et al.*, 2005). Cuando la capa de peptidoglucano ha sido degradada, la estructura esférica formada es llamada **esferoplasto**.

Tanto protoplastos como esferoplastos en condiciones isotónicas permanecen con forma esferoidal, teniendo como única barrera exterior la membrana plasmática.

La membrana citoplásmica bacteriana es similar a la de las células eucariotas, está implicada en casi todos los aspectos del crecimiento y metabolismo de la bacteria, y es la principal barrera osmótica de la célula. Por lo que protoplastos y esferoplastos son empleados comúnmente para determinar mecanismos de acción de sustancias diversas, sobre enzimas de la membrana citoplásmica, acumulación de metabolitos y purificación de enzimas (Birdsell y

Cota-Robles, 1967; Owen y Kaback, 1979; Minahi-Tehrani *et al.*, 2002; Codling *et al.*, 2003).

2.4.1. Cadena respiratoria en bacterias

El resorte energético fundamental en las células aeróbicas es la oxidación enzimática de moléculas de combustible por el oxígeno molecular (respiración) para su entendimiento está dividida en glucólisis, ciclo de Krebs y cadena respiratoria. En eucariontes se lleva a cabo en mitocondrias, en tanto que en procariontes en las membranas citoplásmicas (Figura 16) (Lodish *et al.*, 2003).

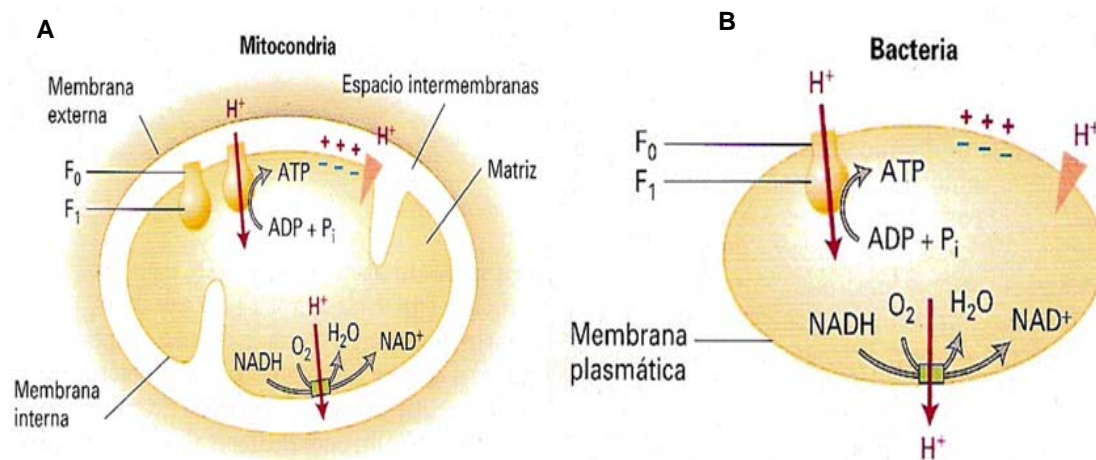


Figura 16. Esquemas del transporte de electrones. A, mitocondria; B, bacteria (Lodish *et al.*, 2003)

Durante la respiración se liberan electrones del NADH y del FADH₂ generados en la glucólisis y el ciclo de Krebs, que al final son transferidos al O₂ para formar H₂O (Lodish *et al.*, 2003).

En particular, la cadena respiratoria está constituida por un complicado sistema de transportadores de electrones que son dirigidos desde el sustrato reductor hasta el oxígeno con el que se combinan al final para formar agua (Parés y Juárez, 1997; Lodish *et al.*, 2003).

La cadena respiratoria que siempre está ubicada en una membrana, se encuentra tanto en organismos eucariotas como procariotas, específicamente en las membranas de mitocondrias, cloroplastos y en la citoplásmica de las bacterias o en las invaginaciones de la misma; el sistema de transporte electrónico mitocondrial es bastante uniforme, a diferencia del bacteriano que presenta una gran diversidad, pero no por ello es menos eficiente (Parés y Juárez, 1997).

La transferencia de electrones mitocondrial se realiza en la membrana interna, la que es poco permeable a otros cationes y aniones. El movimiento de los electrones del NADH y el FADH₂ hacia el O₂, se produce a través de una serie de transportadores electrónicos (cadena de transporte de electrones), un grupo de complejos proteicos o complejos enzimáticos respiratorios, cada uno de los cuales tiene múltiples proteínas. Los electrones se transportan por medio de la coenzima Q (CoQ o Ubiquinona; llamada así por su ubicuidad en organismos respiratorios) desde los complejos I (NADH: coenzima Q óxido-reductasa) y II (Succinato-coenzima Q óxido-reductasa) hasta el complejo III (Coenzima Q-citocromo c óxido-reductasa) y desde el complejo III hasta el complejo IV (Citocromo c oxidasa) por la proteína periférica de la membrana Citocromo c que es un transportador electrónico móvil al igual que la ubiquinona (Alberts *et al.*, 2006; Voet *et al.*, 2006) (Cuadro 6). Los citocromos son proteínas transportadoras monoelectrónicas cuyos centros activos son los grupos prostéticos hemo que contienen hierro.

Los cuatro complejos multiproteicos con grupos prostéticos (flavinas, hemo, centros hierro-azufre y cobre) (Cuadro 6), se extienden de un lado al otro de la membrana mitocondrial interna (Lodish *et al.*, 2003).

La coenzima Q (CoQ), denominada también ubiquinona, liposoluble, es el único transportador de electrones que no tiene un grupo prostético unido a una proteína, es móvil en la membrana y conecta los complejos I y II, además de aceptar electrones liberados por ambos complejos. Es un transportador de

protones y electrones. La forma de quinona oxidada de la CoQ puede aceptar un solo electrón y dos protones para generar la forma reducida, la dihidroquinona. Tanto la CoQ como su forma reducida CoQH_2 son solubles en los fosfolípidos y se difunden dentro de la membrana mitocondrial interna (Figura 17) (Lodish *et al.*, 2003).

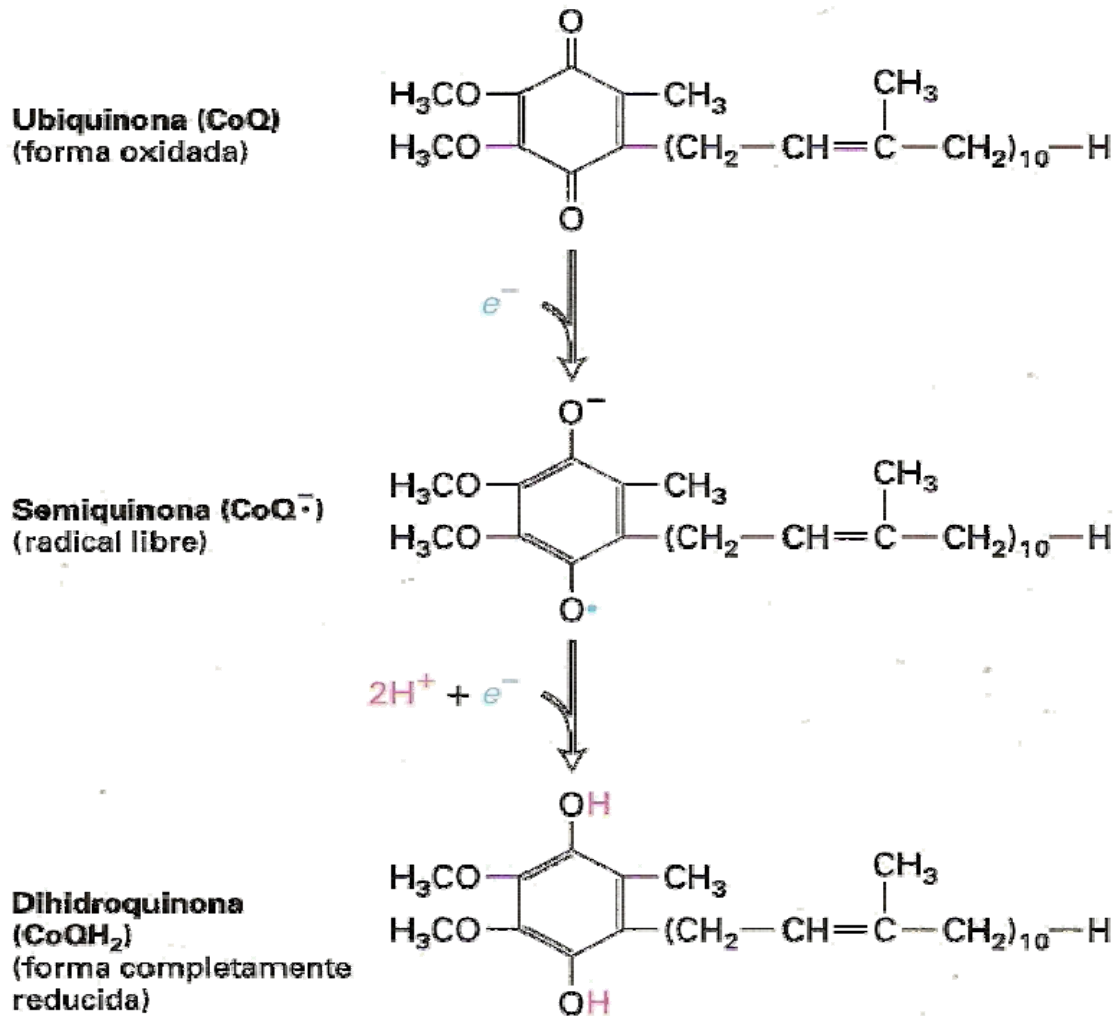


Figura 17. Estructura de la CoQ. Se señala su capacidad de transportar protones y electrones (Lodish *et al.*, 2003).

Las bacterias tienen una cadena respiratoria que es bastante similar a la de las mitocondrias (Cuadro 6), lo que no es sorprendente ya que una de las teorías evolutivas indica la factibilidad de que los ancestros de las bacterias aeróbicas

dieron lugar a las mitocondrias. Los transportadores también están inmersos en la membrana plasmática, y los protones se bombean desde el citosol hacia el exterior de la membrana citoplásmica. Los protones retroceden hacia el interior de la célula mediante una ATP sintetasa, cuyo componente catalítico está orientado a lo largo del citosol. Este es el ordenamiento esperado si las bacterias y las mitocondrias están relacionadas evolutivamente (Voet *et al.*, 2006).

Cuadro 6. Semejanzas en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y bacteriana

Complejo enzimático	Grupos prostéticos ¹	
	Mitocondria	<i>E. coli</i>
Mitocondria/Bacteria		
Complejo I: NADH:ubiquinona óxido-reductasa (NADH-CoQ reductasa o NADH deshidrogenasa)	FMN Centros hierro-azufre	FMN Centros hierro-azufre
Complejo II: Succinato:ubiquinona óxido-reductasa (Succinato-CoQ reductasa)	FAD Centros hierro-azufre Hemo ² b ₅₆₀	FAD Hemo b Cit b ₅₅₆
Complejo III: Ubiquinona:citocromo c óxido-reductasa (Complejo b-c ₁)	Hemo ² b _L (b ₅₆₆) Hemo b _H (b ₅₆₂) Hemo c ₁ Centros hierro-azufre	Cit b ₁
Citocromo c	Hemo ² c	
Complejo IV: Citocromo c oxidasa (Citocromo oxidasa)	Hemo ² a Hemo a ₃ Cu _a ⁺ , Cu _b ⁺	Cit a ₂ Cit o
Literatura consultada	Huang <i>et al.</i> , 2005; Lodish <i>et al.</i> , 2006; Voet <i>et al.</i> , 2006; Alberts <i>et al.</i> , 2006	Kita <i>et al.</i> , 1989; Parés y Juárez, 1997; Voet <i>et al.</i> , 2006

¹No se incluye la Coenzima Q, un transportador de electrones que no está unido permanentemente a un complejo proteico.

²Los grupos prostéticos Hemo de los citocromos aceptan y liberan un electrón por vez.

La oxidación de la CoQH₂ es universal en los organismos aeróbicos, en las bacterias aeróbicas, la CoQ es el punto de recolección de electrones extraídos por deshidrogenasas específicas para una amplia variedad de sustratos (Figura 18) (Moat *et al.*, 2002).

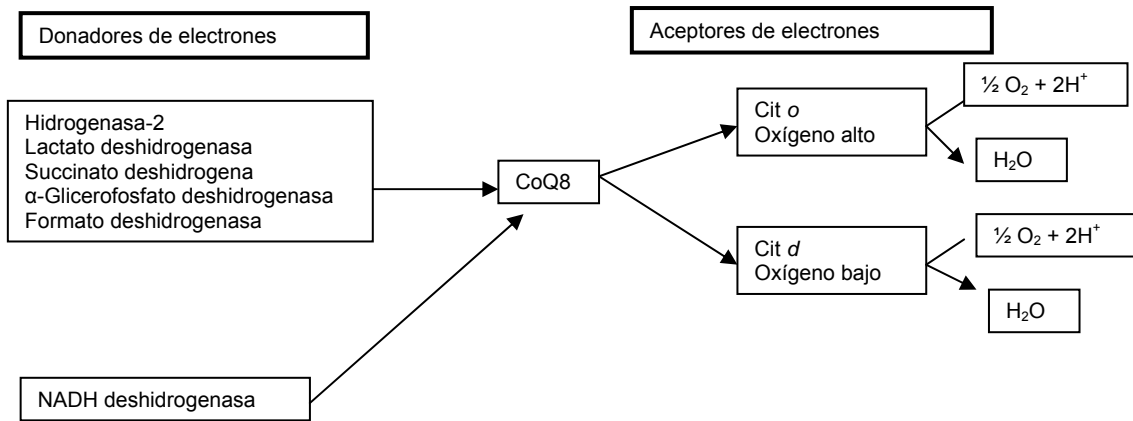


Figura 18. Donadores y aceptores de electrones para *E. coli* (Moat *et al.*, 2002).

En las bacterias, así como en las mitocondrias, los electrones fluyen desde la CoQ a los complejos III y IV antes de alcanzar el O_2 . En algunas especies, dos complejos proteicos (análogos a los mitocondriales III y IV) llevan a cabo este proceso. En otras especies, incluida *E. coli* un solo tipo de enzima, quinol oxidasa, utiliza los electrones donados por la CoQ para reducir el O_2 (Figura 19) (Voet *et al.*, 2006).

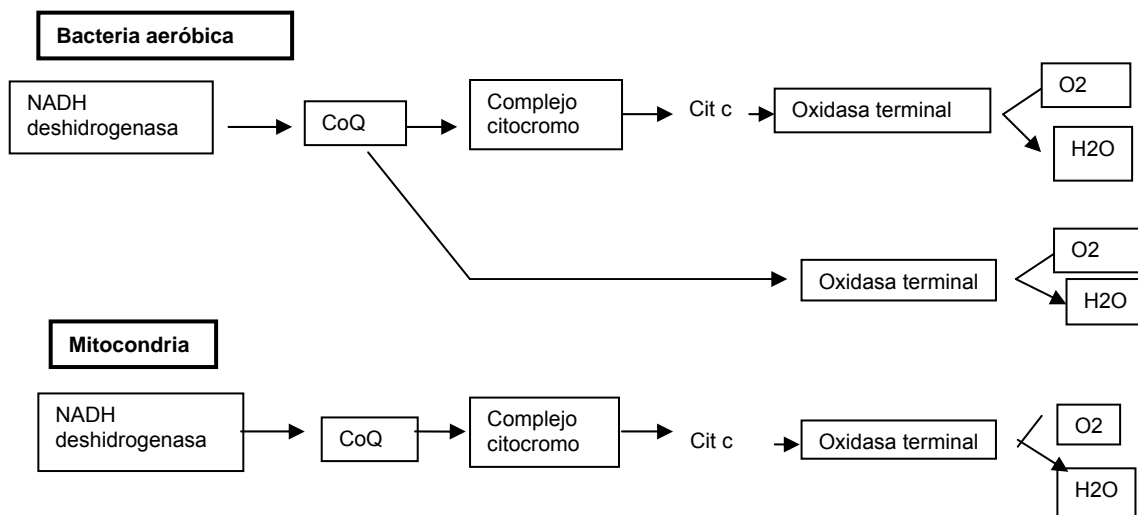


Figura 19. Transporte de electrones en una bacteria aeróbica (*E. coli*) y en mitocondria (Voet *et al.*, 2006).

En la Figura 20 se esquematiza la cadena respiratoria bacteriana general y las de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, cuyas diferencias se refieren a los citocromos.

La cadena respiratoria de membranas bacterianas consiste de una deshidrogenasa primaria, coenzima Q, citocromos *b*, *c*, *o* y *a* (Harold, 1972; Haraguchi *et al.*, 1998).

Según el tipo de bacterias hay distintas quinonas en la cadena de transporte de electrones, que generalmente son portadores intermediarios entre las flavoproteínas (FMN y FAD) y los citocromos (proteínas hemínicas) (Parés y Juárez, 1997). Las especies del género *Bacillus* poseen menaquinonas (MK) y la mayoría tienen siete unidades isoprenoides (MK-7), por ejemplo *B. subtilis* de acuerdo a Hagerhall *et al.* (1992); *B. acidocaldarius* es la excepción pues posee MK-9 (Slepeck y Hemphill, 2006), a diferencia de los *Staphylococcus* que poseen MK-2 (Götz *et al.*, 2002).

Cadena respiratoria general

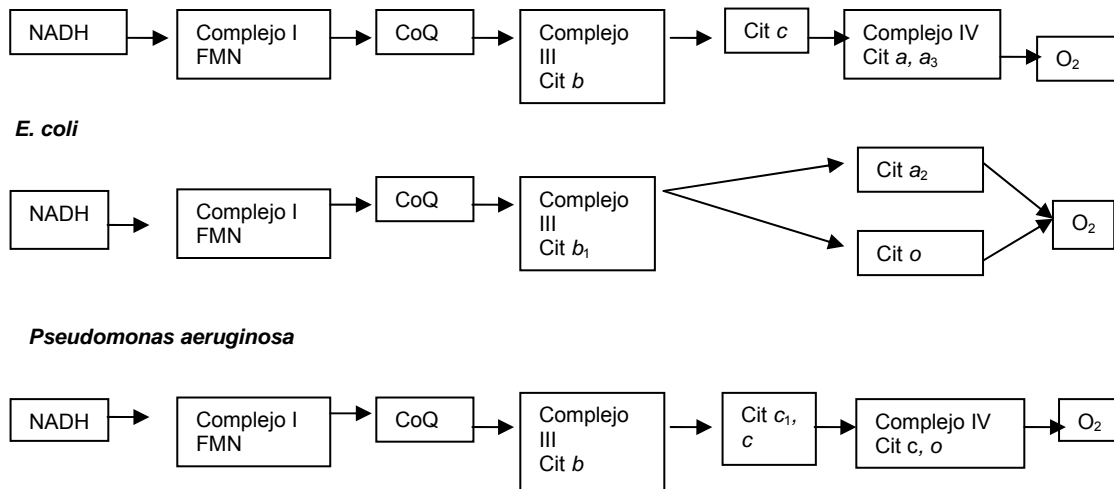


Figura 20. Cadena respiratoria general y de varias bacterias (Haraguchi *et al.*, 1998).

En las Enterobacteriaceae cuando el nivel de oxígeno es alto, funciona una cadena respiratoria formada por complejo I, ubiquinona, citocromos *b* y citocromo oxidasa. El oxígeno accesible puede disminuir debido al rápido crecimiento dando

lugar a la actividad del citocromo *a* y del citocromo *d* que actúa como oxidasa terminal, al mismo tiempo se sintetiza menaquinona (Parés y Juárez, 1997).

En las bacterias el transporte de electrones está menos elucidado que en las mitocondrias. La cadena transportadora de electrones más conocida es la de *E. coli*, aunque diferentes organismos y aún *E. coli* bajo diferentes condiciones (en presencia o ausencia de oxígeno) empleará una variedad de sustratos y aceptores terminales de electrones. Por lo tanto, los sistemas respiratorios en bacterias pueden visualizarse como una deshidrogenasa ramificada y sitios de oxidación terminal (Moat *et al.*, 2002).

La cadena de transporte de electrones de *E. coli* tiene componentes hemo (citocromos), centros hierro-azufre, flavoproteínas (FMN, FAD) y quinolonas, éstos son acarreadores móviles tipo lanzadera entre los grandes complejos deshidrogenasa y oxidasa. La quinona que predomina es la ubiquinona-8 que funciona en la respiración aeróbica aunque la cadena respiratoria anaeróbica puede requerir menaquinona-8 (Moat *et al.*, 2002).

El transporte de electrones de *Staphylococcus aureus* está compuesto de citocromo *b*₁, citocromo *a* y citocromo oxidasa *o* y menaquinona (vitamina K₂) cuando crece en condiciones aeróbicas (Frerman y White, 1967), Götz *et al.*, 2006 para la misma bacteria y otros *Staphylococcus* proponen la siguiente cadena respiratoria (Figura 21).

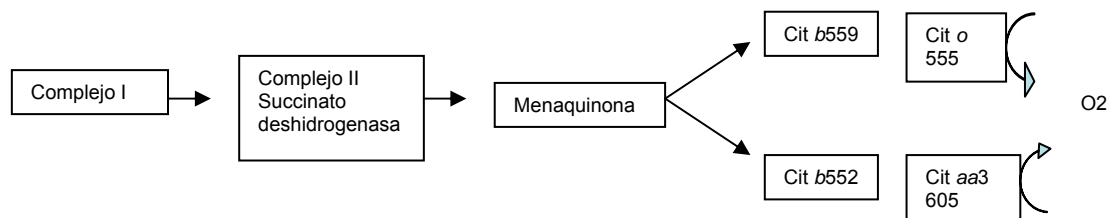


Figura 21. Propuesta de cadena respiratoria en *Staphylococcus* (Götz *et al.*, 2006).

Al comparar los componentes de las cadenas respiratorias de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* es posible observar que el complejo I está presente en todas, al igual que en la mitocondria. Sin embargo, el complejo I bacteriano difiere del mitocondrial (ver capítulo correspondiente).

2.4.2. Bacterias empleadas en los ensayos

- ***Escherichia coli***

Phylum Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

La describió por primera vez Theodor Escherich en 1885 como bacteria coli común, más tarde fue rebautizada como *E. coli*, durante muchos años se consideró como un comensal del intestino grueso. Esta bacteria es la cabeza de la familia Enterobacteriae, bacterias entéricas (Todar, 2008).

Son bacilos Gramnegativos, miden 0.5 x 1-3 μm , aerobias o anaerobios facultativos que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, con flagelos peritricos y en condiciones anaeróbicas realizan fermentación y producen varios ácidos y gas como productos finales, y como aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria pueden utilizar NO_3 , NO_2 o fumarato. Esto le permite que se adapte a los hábitat intestinal (anaerobiosis) y extraintestinal (aeróbico o anaeróbico) (Todar, 2008) (Figura 22).



Figura 22. *Escherichia coli*. Microfotografía de en un microscopio de contraste de fases, 1000X de aumento (Todar, 2008).

E. coli puede responder a señales ambientales como productos químicos, pH, temperatura y osmolaridad entre otros, de diversas maneras, lo que es notable considerando que es un organismo unicelular. Por ejemplo, puede sentir la presencia o ausencia de productos químicos y gases en su medioambiente y nadar hacia o lejos de ellos o puede dejar de nadar y crecer fimbrias que pueden atacar a una célula o adherirse a un receptor de superficie celular (Todar, 2008).

También en respuesta a cambios de temperatura y osmolaridad puede variar el diámetro de poro de su membrana externa (porinas) para dar cabida a grandes moléculas (nutrientes) o para excluir sustancias inhibitorias. Con estos complejos mecanismos de regulación metabólica la bacteria puede sobrevivir en ambientes de contenido químico y sintetizar enzimas que metabolicen a cualquiera de estos compuestos. La membrana citoplásmica de esta bacteria posee más de 200 tipos de proteínas de las que cerca de 60 pueden estar involucradas en funciones de transporte (Poole, 1993; Todar, 2008).

Su habitat es el colon de organismos de sangre caliente (mamíferos y aves), humanos (Souza *et al.*, 1999) e insectos (Welch, 2006), sin embargo, pueden encontrarse en otras partes del tracto digestivo, la sangre y el tracto urogenital (Schlager *et al.*, 2002; Kaper *et al.*, 2004). Está incluida en el grupo de las bacterias causantes de enfermedades gástricas y pueden ser responsables de diarreas y de enfermedades que llegan a ser muy graves, como la colitis hemorrágica y el síndrome urémico (Donnenberg y Kaper, 1992) ya que algunos

clones pueden adquirir factores de virulencia que contribuyen a su carácter patogénico, a la fecha se reconocen a *E. coli* uropatógena, *E. coli* causante de meningitis y *E. coli* diarrogénica (Kaper *et al.*, 2004).

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Reino: Bacteria

Phylum Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomona*

Especie: *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria Gramnegativa, aerobia, con forma de bacilo que mide de 0.5 a 0.8 x 1.5 a 3 μm . Casi todas las cepas son móviles por un único flagelo polar (Todar, 2008). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C pero puede crecer hasta temperaturas de 42°C (Figura 23) (Todar, 2008).

Su metabolismo es respiratorio, nunca fermentativo, pero puede crecer en ausencia de oxígeno si hay NO_3 está disponible como aceptor de electrones de la cadena respiratoria. Estas bacterias también forman biopelículas que se adhieren a alguna superficie, o en forma de plancton como un organismo unicelular que nadan utilizando su flagelo (*Idem*).



Figura 23. Microfotografía de un frotis de *P. aeruginosa* (Todar, 2008).

Su resistencia a los antibióticos es notoria, debido a la barrera que ofrece la membrana externa de las Gramnegativas, además, su tendencia a formar biopelículas hace a las células resistentes a los antibióticos, así como la presencia de plásmidos.

Se encuentra en el suelo y agua, también es un patógeno oportunista de plantas, vertebrados e invertebrados (Moore *et al.*, 2006; Yahr y Parsek, 2006), es capaz de infectar organismos eucariotas desde amebas hasta humanos (Yahr y Parsek, 2006). Se reconoce cada vez más como un patógeno oportunista, ya que produce una serie de sustancias que se supone aumentan la colonización e infección de los tejidos del hospedero (Koneman *et al.*, 2003); diversos estudios epidemiológicos indican que la resistencia a los antibióticos está aumentando en los aislamientos clínicos (Hancock y Woodruff, 1988; Yahr y Parsek, 2006; Todar, 2008).

Sólo algunos antibióticos son eficaces contra esta bacteria, incluidas las fluoroquinolonas, imipenem y gentamicina, e incluso estos antibióticos no son eficaces contra todas las cepas (Todar, 2008).

- ***Salmonella Typhi***

Reino: Bacteria

Phylum Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*

Especie: por ejemplo, *S. enterica*

El bacilo de la fiebre tifoidea fue observado por primera vez por Eberth en 1880 y fue Gaffky quien cultivó con éxito la bacteria en 1881 (Todar, 2008). Bacilo cuyo único reservorio conocido son los humanos (Koneman *et al.*, 2003). Es una bacteria entérica, o sea que se aloja en el intestino, la infección por *Salmonella* es

una enfermedad antigua y la fiebre tifoidea ha sido descrita extensamente (Cunha, 2004).

Es un bacilo Gramnegativo, mide 0.6-0.7 x 2-3 μm , aerobio o anaerobio facultativo, móvil con flagelos peritricos (Figura 24). Presenta reacción negativa a las pruebas de lactosa, Voges-Proskauer e indol y no crece en presencia de KCN.

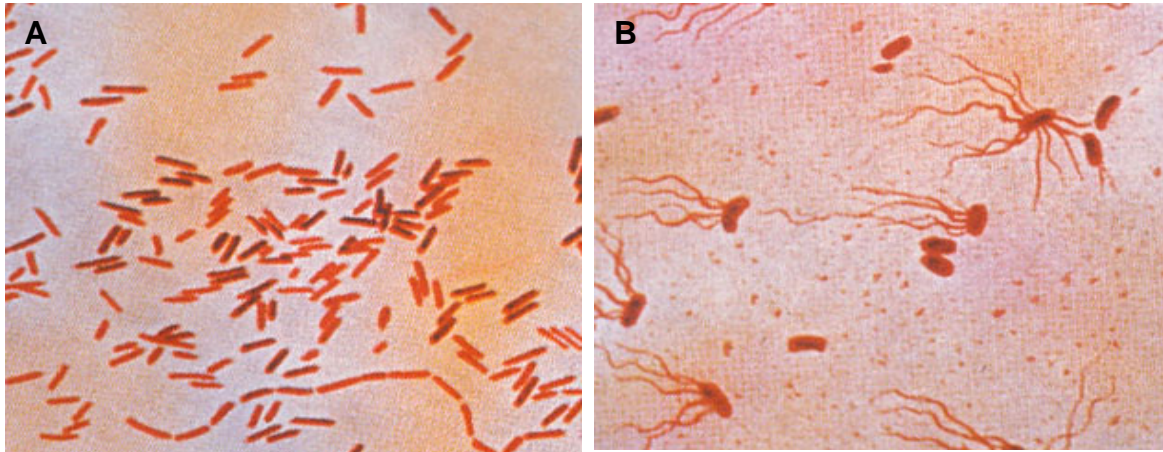


Figura 24. *Salmonella* Typhi. Microfotografías de A, frotis; B, mostrando los flagelos (Todar, 2008).

Ha sido bastante estudiada desde el punto de vista estructural, molecular y bioquímico (Todar, 2008).

En humanos, *Salmonella* puede causar dos enfermedades llamadas salmonelosis: fiebre tifoidea (fiebre entérica) resultado de la invasión al torrente sanguíneo y gastroenteritis aguda, como consecuencia de una infección/intoxicación por alimentos (Todar, 2008).

S. Typhi hasta 1972 había permanecido sensible a los antibióticos, incluyendo cloranfenicol, pero en ese año una epidemia generalizada en México fue causada por una cepa resistente al antibiótico; en la actualidad se han aislado cepas resistentes también en India, Tailandia y Vietnam (Todar, 2008).

Su taxonomía es compleja y está en cambio constante (Brenner *et al.*, 2000). Actualmente, el género *Salmonella* consiste en dos especies, que han sido denominadas *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última se subdivide en siete subespecies, dependiendo de su capacidad para realizar diferentes reacciones bioquímicas, así la nueva taxonomía para esta especie es *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sev. Typhi, pero se acorta a *S. Typhi* (Brenner *et al.*, 2000; Ellermeier y Slauch, 2006).

- ***Bacillus subtilis***

Reino: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus subtilis*

Ferdinand Cohn, en 1872 identificó y nombró a la bacteria *Bacillus subtilis*, microorganismo que representa a lo que posteriormente se convirtió en un diverso y amplio género: *Bacillus* (Todar, 2008) (Figura 25).



Figura 25. *Bacillus subtilis*. Microfotografía sobre agar nutritivo mostrando sus flagelos, cerca de 15,000X de aumento (Departamento de Agricultura, U.S., 2009).

Esta bacteria es en las investigaciones la “*E. coli*” de las bacterias Grampositivas, ya que gran parte de la información sobre la biología, bioquímica y genética de las bacterias Grampositivas se han obtenido del estudio de ella (Todar, 2008).

Es una bacteria Grampositiva, con forma de bacilo, que mide 0.7-1 x 1.3-6 μm , observada pocas veces en cadenas, forma esporas, móvil por flagelos periféricos, crece en presencia de oxígeno, produce una cápsula de carbohidratos que contienen comúnmente dextrano y levano pero también otros polisacáridos complejos (*Idem*).

Presenta quimiotaxis y produce antibióticos como polimixina (anti-Gramnegativas), subtilina (amplio espectro), y micobacilina (antifúngico). En los tejidos de las plantas degrada la pectina y otros polisacáridos y algunas cepas causan la podredumbre de los tubérculos de papa (*Idem*).

Es de amplia distribución, habita agua, suelos y polvo ambiental, morfológica y taxonómicamente relacionado con *B. anthracis* y *B. cereus*, capaz de formar esporas y potencialmente patógeno-oportunista para humanos (Koneman *et al.*, 2003; Slepeck y Hemphill, 2006). Es una especie representativa del género y su evaluación es importante por su relación con *Bacillus anthracis*, agente patógeno del carbunco (cutáneo, pulmonar e intestinal), padecimiento muchas veces mortal para los humanos (Stites, 1993).

- ***Staphylococcus***

Los estafilococos son bacterias Grampositivas, esféricas que miden cerca de 1 μm de diámetro que forman grupos irregulares que se asemejan a racimos de uvas.

En 1884, Rosenbach describe dos tipos de colonias pigmentadas y propuso la siguiente nomenclatura: *Staphylococcus aureus* (amarillo o estafilococo dorado) y *Staphylococcus albus* (blanco). En el Manual de Bergey (2001) se

describen más de 20 especies del género, pero sólo *S. aureus* y *S. epidermidis* son importantes por su interacción con los humanos (Todar, 2008).

Taxonómicamente, este género se ubica en la familia *Staphylococcaceae*, que incluye tres géneros menos conocidos, *Gamella*, *Macrococcus* y *Salinicoccus*. El más conocido de sus parientes cercanos filogenéticamente son los miembros del género *Bacillus* de la familia *Bacillaceae*, los miembros de *Listeriaceae* son también cercanos (*Idem*).

Los estafilococos son inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos que también prosperan en condiciones anaeróbicas y producen principalmente ácido láctico por fermentación. Son catalasa positivas y oxidasa negativas (*Idem*).

- ***Staphylococcus aureus***

Reino: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *Staphylococcus aureus*

Esta especie es inmóvil (Figura 26) y no forma esporas, con frecuencia causa hemólisis en agar sangre. Puede crecer en un rango de temperatura de 15 a 45°C y en concentraciones altas de NaCl (hasta de 15%). Casi todas las cepas coagulan el plasma (coagulasa positivas). Se puede diferenciar de *S. epidermidis* porque fermenta el manitol (Todar, 2008).

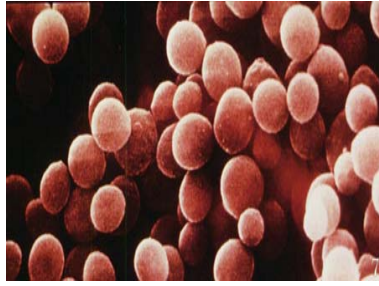


Figura 26. Microfotografía electrónica de *S. aureus* (Todar, 2008).

Es resistente a los antisépticos y desinfectantes como compuestos cuaternarios de amonio, lo que puede ayudar a su sobrevivencia en los ambientes hospitalarios (Todar, 2008).

Coloniza principalmente las fosas nasales, pero puede encontrarse regularmente en la piel, la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y la vagina. Suele formar parte de la microflora humana normal, pero puede producir infecciones oportunistas importantes (Koneman *et al.*, 2003). Es agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones benignas de piel, heridas quirúrgicas infectadas, tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genito-urinario con un rol primordial en las infecciones nosocomiales potencialmente fatales (Gil, 2000).

- ***Staphylococcus epidermidis***

Reino: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *Staphylococcus epidermidis*

Al igual que *S. aureus* crece bien en condiciones aeróbicas, pero no causa hemólisis en agar sangre y es coagulasa negativa. Es un residente de la piel de los humanos (Todar, 2008).

Algunas cepas patógenas tienen la característica de formar biopelículas, que predominantemente es una secreción de ácido teicoico, que se encuentra normalmente en la pared celular de los estafilococos. Esta capacidad de formar biopelículas probablemente es un factor determinante para la virulencia de esta bacteria (*Idem*).

La mayoría de las cepas son no patogénicas y es residente normal de la piel de los humanos e incluso pueden jugar un papel protector como flora normal aunque en el ambiente hospitalario puede ser patógeno (*Idem*).

Hasta hace aproximadamente dos décadas se reconoció como agente importante de enfermedades humanas ya que es un patógeno oportunista y puede causar la infección estafilocócica crónica (Götz, 2002; Götz *et al.*, 2006).

El aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas nuevas y reemergentes, ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos que tienen diversas estructuras químicas y nuevos mecanismos de acción. Los productos naturales o sus derivados semisintéticos, proporcionan nuevos ejemplos de fármacos antiinfecciosos (Copp, 2003).

Aunado a lo anterior, la resistencia a agentes antimicrobianos es un problema importante, por lo que continuamente se deben investigar nuevas sustancias para contrarrestarla (Gil, 2000). En la búsqueda de nuevos fármacos se emplean bioensayos con bacterias patógenas al humano, entre las que se encuentran *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, entre otras (Almeida *et al.*, 2000).

Hasta hoy, son escasos los ensayos bacterianos para determinar el mecanismo de acción de moléculas aisladas de plantas, aunque cada vez van cobrando un mayor interés debido tanto al problema de resistencia a los antibióticos como a la investigación de las rutas metabólicas en bacterias y su siempre analogía con los organismos eucariontes.

2.4.3. Actividad de las ACG sobre bacterias

Existen pocos informes acerca de la actividad bactericida de las ACG, de entre los cuales podemos citar:

La actividad de las ACG isodesacetiluváricina (bis-THF adyacente dihidroxilada), escuamocinona (bis-THF adyacente dihidroxilada con un grupo cetona) y escuamosina (bis-THF adyacente trihidroxilada) y las mezclas de las ACGs uvariamicina I, II y III (mono-THF dihidroxiladas) y narumicina I y II (bis-THF adyacente trihidroxiladas) obtenidas de la corteza de raíz de *Uvaria hookeri* y *Uvaria narum*, tienen actividad sobre bacterias Grampositivas y Gramnegativas a una concentración de 250 µg/disco. Las ACG puras y mezcladas son antibacterianas sobre *P. pyocyanae*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans* y *Bacillus licheniformis*, pero no sobre *Proteus vulgaris*. Con halos de inhibición que miden de 6 hasta 22 mm (Padmaja *et al.*, 1993) (Cuadro 7).

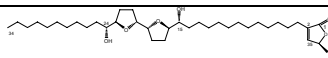
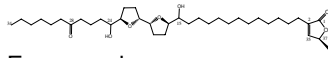
Las ACG gigantetrocina-A y gigantetrocina-B (mono-THF tetrahidroxiladas), aisladas de las hojas de *Goniothalamus sesquipedalis* mostraron actividad bactericida después de 24 horas de incubación (50 µL/disco) tanto en bacterias Grampositivas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea*), como en bacterias Gramnegativas (*E. coli*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella Typhi*), con excepción de *P. aeruginosa* (Mia *et al.*, 1997) (Cuadro 7).

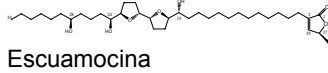
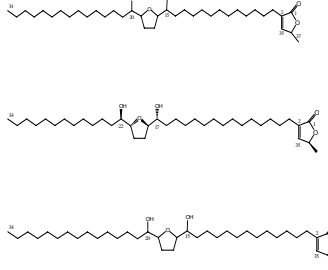
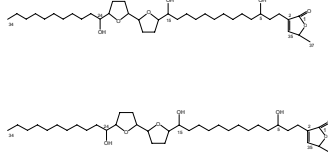
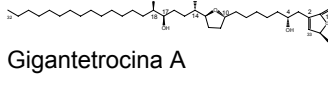
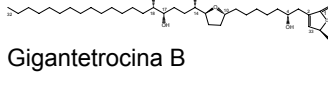
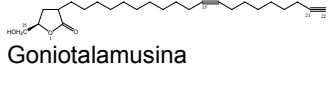
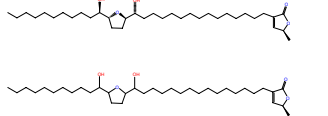
De la corteza de tallo de *Miliusa velutina* se aisló goniotalamusina (mono-THF) así como una mezcla de ACG llamadas A y B. Tanto la goniotalamusina

como la mezcla fueron evaluadas sobre bacterias Grampositivas y Gramnegativas en concentración de 200 µg/disco. La goniotalamusina produjo halos de inhibición sobre *B. cereus*, *S. aureus* y *Streptococcus* β-hemolítico con diámetros de 9, 13 y 14 mm respectivamente; frente a las Gramnegativas: *S. Typhi*, *Sh. flexneri* y *Sh. dysenteriae* de 11 mm en las tres bacterias. La mezcla A produjo halos en las bacterias Grampositivas de 10, 11 y 12 mm respectivamente y en las Gramnegativas de 11, 9 y 11 mm respectivamente. La mezcla B sólo en *B. cereus* produjo un halo de 11 mm (Jumana *et al.*, 2000) (Cuadro 7).

De las semillas de *Annona squamosa* se aislaron anotemoyina-1, anotemoyina-2 y escuamocina, las dos primeras son acetogeninas mono-THF y la tercera es bis-THF adyacente, con grupos hidroxilo flanqueando a los anillos. La actividad antibacteriana se ensayó en concentraciones de 200 y 400 µg/disco sobre diversas bacterias. El efecto inhibitorio de la mezcla de anotemoyina-1 y 2 sobre *B. subtilis* produjo halos de 8 y 10 mm, en *S. aureus* de 13 y 15 mm, en *E. coli* de 12 y 14 mm, en *S. Typhi* de 13 y 16 mm, y en *P. aeruginosa* de 14 y 16 mm; escuamocina inhibió el crecimiento de *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhi* y *P. aeruginosa* exhibiendo halos de 12 y 13 mm, 15 y 18 mm, 15 y 18 mm, 17 y 19 mm y de 18 y 20 mm respectivamente (Rahman *et al.*, 2005) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Acetogeninas con actividad sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas

ACG	Tipo	Grampositivas	Gramnegativas	Referencia
 Isodesacetilivaricina	Bis-THF adyacente dihidroxilada	<i>S. pyogenes</i> <i>B. brevis</i> <i>B. circulans</i> <i>B. licheniformis</i>	<i>S. Typhi</i> <i>E. coli</i> <i>K. aerogenes</i> <i>P. pyocyaneae</i>	Padmaja <i>et al.</i> , 1993
 Escuamocinona	Bis-THF adyacente dihidroxilada con un grupo cetona	<i>S. pyogenes</i> <i>B. brevis</i> <i>B. circulans</i> <i>B. licheniformis</i>	<i>S. Typhi</i> <i>E. coli</i> <i>K. aerogenes</i> <i>P. pyocyaneae</i>	Padmaja <i>et al.</i> , 1993

 Escuamocina	Bis-THF adyacente trihidroxilada	<i>S. pyogenes</i> <i>B. brevis</i> <i>B. circulans</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. megaterium</i> <i>S. aureus</i> <i>Sarcina lutea</i>	<i>S. Typhi</i> <i>E. coli</i> <i>K. aerogenes</i> <i>P. pyocyaneae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella shiga</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Klebsiela spp.</i>	Padmaja <i>et al.</i> , 1993; Rahman <i>et al.</i> , 2005
 Mezcla de Uvariamicina I, II, III	Mono-THF dihidroxiladas	<i>S. pyogenes</i> <i>B. brevis</i> <i>B. circulans</i> <i>B. licheniformis</i>	<i>S. Typhi</i> <i>E. coli</i> <i>K. aerogenes</i> <i>P. pyocyaneae</i>	Padmaja <i>et al.</i> , 1993
 Mezcla de Narumicina I y II	Bis-THF adyacente trihidroxiladas	<i>S. pyogenes</i> <i>B. brevis</i> <i>B. circulans</i> <i>B. licheniformis</i>	<i>S. Typhi</i> <i>E. coli</i> <i>K. aerogenes</i> <i>P. pyocyaneae</i>	Padmaja <i>et al.</i> , 1993
 Gigantetrocina A	Mono-THF tetrahidroxilada	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>Sarcina lutea</i>	<i>E. coli</i> <i>Shigella dysenteriae</i> S. <i>Typhi</i>	Mia <i>et al.</i> , 1997
 Gigantetrocina B	Mono-THF tetrahidroxilada	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>Sarcina lutea</i>	<i>E. coli</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>S. Typhi</i>	Mia <i>et al.</i> , 1997
 Goniotalamusina	Lineal con un triple enlace y otro doble	<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i> <i>Streptococcus β-</i> <i>haemoliticus</i>	<i>S. Typhi</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella dysenteriae</i>	Jumana <i>et al.</i> , 2000
Mezcla A		<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i> <i>Streptococcus β-</i> <i>haemoliticus</i>	<i>S. Typhi</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella dysenteriae</i>	Jumana <i>et al.</i> , 2000
Mezcla B		<i>Bacillus cereus</i>		Jumana <i>et al.</i> , 2000
 Mezcla	Mono-THF dihidroxiladas	<i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. megaterium</i> <i>S. aureus</i> <i>Sarcina lutea</i>	<i>E. coli</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella shiga</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>S. sonnei</i>	Rahman <i>et al.</i> , 2005

Mezcla Anotemoyina-1 y -2			S. Typhi P. aeruginosa Klebsiella spp.	
---------------------------	--	--	--	--

De acuerdo con los resultados reportados, sólo cinco de las ACG probadas son tipo bis-THF adyacente con la lactona insaturada (mismo tipo de la rolliniastatina-2), éstas inhiben tanto a bacterias Grampositivas como a Gramnegativas.

Si bien es cierto que algunas ACG inhiben el crecimiento de las bacterias tanto Grampositivas como Gramnegativas lo hacen en diferente magnitud, aquellas que presentaron los halos de inhibición mayores fueron las que presentaron en sus estructuras una anillación bis-THF adyacentes como la escuamocina, la escuamocinona, la isodesacetiluaricina y la mezcla de nauramicina I y II. De ellas la que presentó mayor actividad fue la escuamocina frente a las bacterias Gramnegativas: *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, *S. Typhi* y *E. coli* con halos de 21, 18, 17 y 15 mm respectivamente; mientras que los mayores producidos en las Grampositivas: *Streptococcus* β -hemolítico, *S. aureus* y *B. circulans* presentan halos de 16, 15 y 14 mm respectivamente. La acción de las ACG sobre la inhibición del crecimiento de las bacterias pareciera no estar relacionada con el tipo de cubierta externa de estos microorganismos, ya que las ACG evaluadas en términos generales inhiben tanto a bacterias Grampositivas como Gramnegativas.

2.5. El Complejo I

La membrana celular de las bacterias contiene diversos complejos enzimáticos que intervienen en la respiración celular, la fosforilación oxidativa y en la biosíntesis de peptidoglicanos. La membrana también participa en la síntesis y secreción de enzimas y toxinas, en la retención de metabolitos y en la eliminación de compuestos (Koneman *et al.*, 2003).

La cadena respiratoria de mitocondrias y microorganismos tienen proteínas complejas de membrana, las cuales actúan de forma concertada para producir energía en forma de ATP (Sazanov *et al.*, 2003). Poseen los complejos I, III y IV, con la notable excepción de *Saccharomyces cerevisiae*, que no posee complejo I (Schägger, 2002). El complejo II no está embebido en la membrana citoplásmica.

La NADH:quinona óxido-reductasa o NADH deshidrogenasa llamada también complejo I, constituye la primera enzima de la cadena respiratoria de la mayoría de eucariotas y procariotas, es la enzima más compleja y menos comprendida de las enzimas que constituyen la cadena respiratoria. Es el componente proteico más grande unido a la membrana que cataliza la oxidación del NADH empleando como aceptor a una quinona (Yano *et al.*, 1997; Sazanov *et al.*, 2003; Nakaruma-Ogiso *et al.*, 2003; Yagi y Matsumo-Yagi, 2003; Mamedova *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006).

Por simplificar, en este documento se empleará el término **complejo I** para los homólogos mitocondrial y bacteriano.

El complejo I cataliza la transferencia de electrones desde el NADH proveniente de varias reacciones del ciclo del ácido cítrico y la oxidación de los ácidos grasos a través de diversos centros redox de la enzima (FMN, centros hierro-azufre), hasta el aceptor natural de electrones, la quinona o coenzima Q₁. El transporte electrónico va acompañado por el movimiento de protones desde la matriz a través de la membrana interna al interior del espacio intermembrana

(McKee y McKee, 2003). No está clara la estructura del complejo I, en consecuencia los mecanismos de bombeo de protones y transferencia de electrones son escasamente comprendidos (Sazanov *et al.*, 2003; Steuber, 2003).

En las mitocondrias de mamíferos (usando corazón de bovino) el complejo I consta de 46 subunidades y tiene una masa molecular de aproximadamente 980 kDa (Carroll *et al.*, 2002, Sazanov *et al.*, 2003), mientras que en las bacterias el complejo I es más pequeño (13 o 14 subunidades), con una masa molecular de aproximadamente 350 kDa (Yano *et al.*, 1997; Guénebaut *et al.*, 1998; Ugalde *et al.*, 2004; Kervinen *et al.*, 2006) con 14 subunidades diferentes (Leif *et al.*, 1995; Yagi *et al.*, 1995; Yagi y Matsumo-Yagi, 2003) y es más delgado (Guénebaut *et al.*, 1998) (Figura 27).

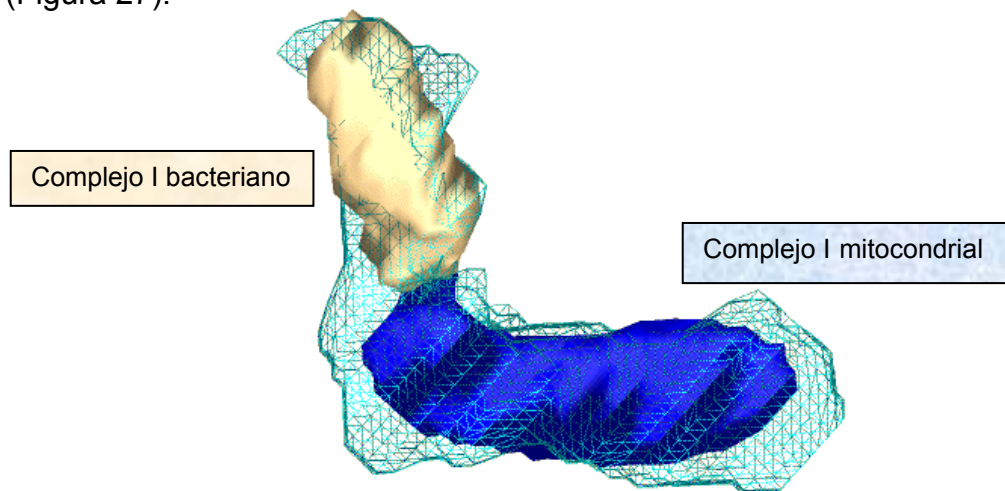


Figura 27. Comparación entre el complejo I mitocondrial y bacteriano por reconstrucción electromicroscópica (Hofhaus *et al.*, 1991).

Friedrich y Scheide (2000) señalan que existen genes homólogos del complejo I de eucariotas en bacterias, arqueobacterias y cloroplastos de plantas. La homología de secuencias, función y grupos prostéticos señalan un ancestro común (Friedrich y Weiss, 1997). Hirst (2005) indica que todos los complejos I tienen en común 14 subunidades, considerándose suficiente para la transducción de energía. Hasta hoy el complejo de las bacterias es menos conocido que el de las mitocondrias.

Dadas las semejanzas entre las propiedades catalíticas del complejo I mitocondrial y procariota (Grivennikova *et al.*, 2003), se asume que sólo 14 de las 46 subunidades de la enzima de los mamíferos se requieren para la capacidad catalítica del complejo I. En los mamíferos la función de las más de 30 subunidades restantes no se conoce (Loskovich *et al.*, 2005).

Además, contienen grupos prostéticos comunes: un flavín mononucleótido (FMN) que es el aceptor de electrones provenientes del NADH, centros hierro/azufre y quinona (Ingledew y Ohnishi, 1980; Sled y Vinogradov, 1993; Friedrich *et al.*, 1995; Schuler *et al.*, 1999; Yano y Yagi, 1999).

En 20 bacterias se ha identificado el grupo de 14 genes del complejo I, estos genes y las proteínas derivadas son denominadas *nuoA-N*, siglas que provienen de NADH:ubiquinona oxidoreductasa o *nqo1-14* de NADH:quinona oxidoreductasa. Los genes *Nuo* codifican siete proteínas periféricas incluyendo las subunidades que portan todos los grupos redox del complejo I. Las siete unidades restantes son proteínas hidrofóbicas que atraviesan la membrana (Friedrich y Scheide, 2000) (Figura 28).

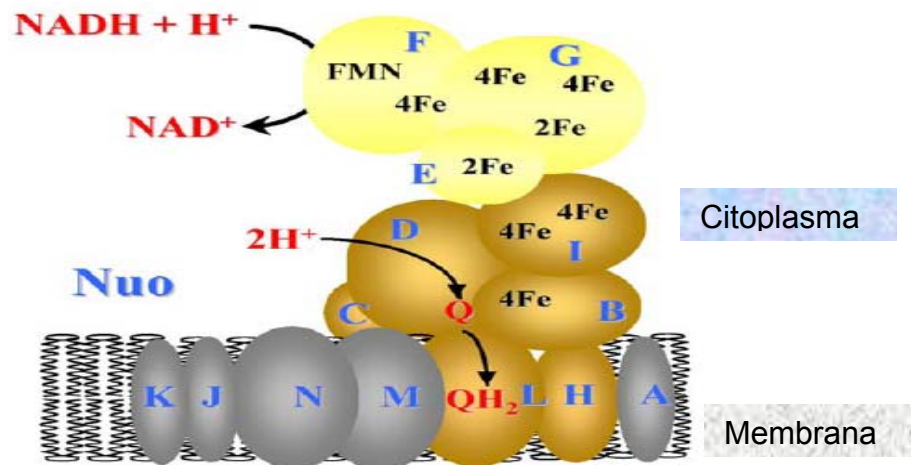


Figura 28. Representación esquemática del complejo I de *E. coli* (Friedrich y Scheide, 2000). Las letras capitales indican las subunidades de la enzima. Abreviaturas: 4Fe: [4Fe-4S]; 2Fe: [2Fe-2S]; FMN: flavín mononucleótido; Q: ubiquinona; Nuo, genes.

Homólogos de los 14 genes *nuo* están presentes en las arqueobacterias *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter capsulatus* y *Thermus thermophilus*, así como en las bacterias *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Streptomyces coelicolor* (AL078618), *Mycobacterium tuberculosis* (AL123456), entre otras (Friedrich *et al.*, 1998; Yagi *et al.*, 1998; Schuler *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 1999; Friedrich y Scheide, 2000; Stolpe y Friedrich, 2004; Kao *et al.*, 2004; Mamedova *et al.*, 2004).

Por microscopía electrónica se demostró que el complejo I de mitocondrias y bacterias posee una forma característica de L. Los estudios topográficos sugieren que un brazo está embebido en la membrana y el otro, brazo periférico, es una protuberancia en la matriz mitocondrial o en el citoplasma bacteriano (Leonard *et al.*, 1991; Djafarzadeh *et al.*, 2000; Grigorieff, 1998; Guenebaut *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2003; Sazanov *et al.*, 2003); Mamedova *et al.* en 2004 sugirieron que la transferencia de electrones involucra un cambio conformacional (Figura 29).

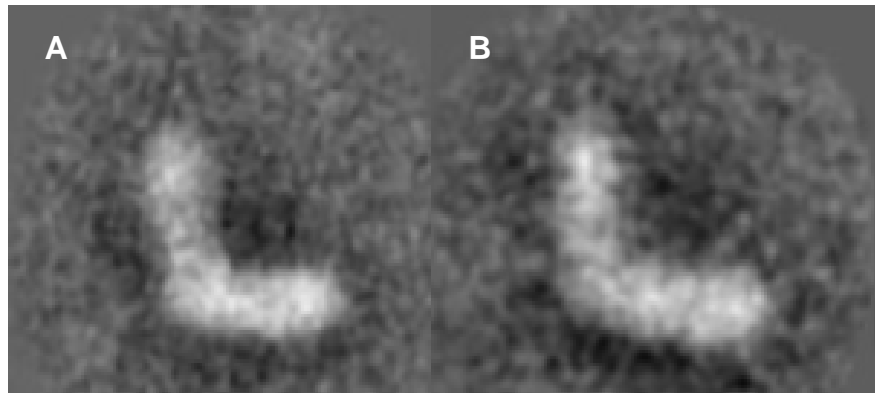


Figura 29. Fotomicrografía electrónica del complejo I de *E. coli*. A, en estado oxidado; B, después de la reducción de NADH. Adaptado de Pohl *et al.* (2008).

La conformación en L se ha demostrado en el complejo I del hongo *Neurospora crassa* (Hofhaus *et al.*, 1991), la levadura *Yarrowia lipolytica* (Djafarzadeh *et al.*, 2000), las mitocondrias de corazón de bovino (Grigorieff, 1998) y el termófilo *Aquifex aeolicus* (Peng *et al.*, 2003).

Böttcher *et al.* (2002) y Friedrich y Böttcher *et al.* (2004) propusieron la forma de herradura con los brazos dispuestos uno al lado del otro como forma alternativa del complejo I activo de *E. coli*, el grupo de Sazanov en las investigaciones realizadas no ha confirmado esta propuesta.

El complejo I ha sido aislado con dodecilmaltósido (DDM) y se estabilizó en un bicapa lipídica, lo que aportó la primera evidencia de que el complejo I de *E. coli* mantiene su estructura en solución detergente y no adopta una conformación diferente en estado activo (en la bicapa de lípidos), apoyando la idea de que el complejo I bacteriano adopta una conformación de L *in vivo* (Sazanov *et al.*, 2003).

Estudios topológicos sugieren que el complejo I bacteriano puede ser disociado en dos subcomplejos, correspondiendo uno al segmento periférico (fase acuosa) y el otro, al segmento de la membrana (hidrofóbico) (Di Bernardo y Yagi, 2001).

El segmento **periférico** (hidrofílico) que se encuentra en el citoplasma, está compuesto de siete subunidades (NuoB, -C, -D, -E, -F, -G, -I) las que son homólogas a las subunidades del ADN mitocondrial (ND1-6 y 4L) involucradas en la translocación de H⁺ (Kao *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2004). En el caso de *E. coli* las subunidades NuoC y -D están fusionadas (forman NuoCD) y las NuoB y NuoI se reconocen por actuar como conectoras entre los segmentos periplásmico (NuoE, NuoF y NuoG) y membranal (Leif *et al.*, 1995; Yano *et al.*, 1999; Di Bernardo y Yagi, 2001). La disociación del complejo I realizada con detergentes indica que los centros redox de la enzima (FMN y los 8-9 centros hierro/azufre) están localizados en este brazo (Leif *et al.*, 1995; Sazanov *et al.*, 2000; Holt *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2004; Mamedova, 2004) (Figura 30).

Este segmento puede ser subdividido en el dominio de la NADH deshidrogenasa conformado por las subunidades NuoE, -F y -G, los que catalizan

la oxidación del NADH y el conector que corresponde a las subunidades NuoCD, I y B.

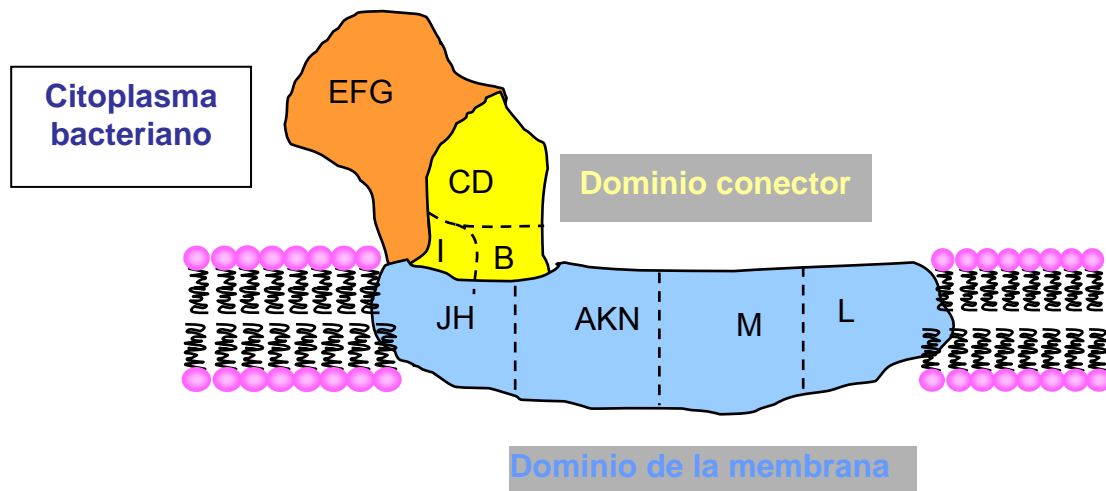


Figura 30. Arreglo de las subunidades en el complejo I de *E. coli*. Adaptado de Holt *et al.* (2003).

El segmento insertado en la membrana citoplásmica (hidrofóbico) también tiene siete subunidades (NuoA, -H, -J, -K, -L, -M y -N), contiene el sitio catalítico de reducción de la quinona y el sitio de unión de los inhibidores (Nakamuro-Ogiso *et al.*, 2003; Steuber, 2003). Estas subunidades también se codifican en las mitocondrias de todos los eucariotas, aunque en estos hay subunidades adicionales (Friedrich y Scheide, 2000; Steuber, 2003). No se sabe mucho sobre la función de estas proteínas que constituyen aproximadamente el 50% del complejo, con la excepción del sitio de unión de la ubiquinona, que se sugiere se encuentra en la subunidad H (Fiedrich *et al.*, 1990).

En 2003 Holt *et al.* demostraron que las subunidades NuoL y NuoM pueden removerse dejando intacto al complejo I de *E. coli*, lo que indica que se encuentran en el extremo del dominio de membrana, por tanto, no participan en el contacto entre los dominios hidrofílico e hidrofóbico de la enzima, lo que ya había demostrado en el complejo I mitocondrial de bovino Sazanov *et al.* (2000) con la subunidad ND5 (NuoL) y la ND4 (NuoM).

Las investigaciones de la cadena respiratoria de los procariotas han permitido identificar en diversas bacterias tres tipos de sistema NADH deshidrogenasas (Matsushita *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1991; Yagi *et al.*, 1998; Kim y Kim, 2004; Kerscher *et al.*, 2008):

1) El sistema NADH deshidrogenasa que trasloca H^+ o NADH:ubiquinona óxido-reductasa, llamado también NDH-1 o complejo I bacteriano, sensible a rotenona. La bomba de protones del lado citosólico al lado periplásmico emplea como cofactor al FMN que está ligado de forma no covalente, 2 [2Fe-2S] y 6-7 [4Fe-4S] y con un sitio de inhibición en el lado periplasmático (Cuadro 8) (Yagi, 1993; Yagi *et al.*, 1998). Se ha reportado en *P. denitrificans*, *T. thermophilus*, *E. coli*, *Rhodobacter capsulatus* y *Vibrio alginolyticus* (Baccarini-Melandri *et al.*, 1973; Yagi, 1991).

2) El sistema NADH deshidrogenasa que carece de un sitio de acoplamiento de energía o NADH:ubiquinona óxido-reductasa no acoplada a una bomba de iones, llamado NDH-2, que no transloca protones a través de la membrana, como cofactor emplea FAD ligado de forma no covalente y es insensible a rotenona (Matsushita *et al.*, 1987; Unemoto y Hayashi, 1989; Hayashi y Unemoto, 1984; Yagi, 1991) (Cuadro 8). Este tipo se encuentra en la cadena respiratoria de bacterias como *B. subtilis* (Yagi, 1990), arqueas como *Acidianus ambivalens*, hongos (Joseph-Horne *et al.*, 2001) y plantas (Rasmusson *et al.*, 1999; Kerscher, 2000).

3) El sistema NADH que trasloca Na^+ o NADH:ubiquinona óxido-reductasa que emplea una bomba de Na^+ (llamado NDH- Na^+) posee varias subunidades (4-6). Como cofactores emplea un FAD ligado de forma no covalente y 1 [2Fe-2S]. (Unemoto y Hayashi, 1993; Hayashi *et al.*, 1995) (Cuadro 8). Krebs *et al.* (1999) y Gemperli *et al.* (2002) demostraron que el complejo I de *K. pneumoniae* actúa como una bomba de Na^+ que cataliza la translocación electrogénica de Na^+ acoplada a la reducción de la quinona o sea que no es capaz de translocar protones y Pfenninger *et al.* (1996) señalaron el mismo sistema en *V. alginolyticus*.

Steuber *et al* (2000) propusieron que *E. coli* emplea una bomba respiratoria de Na⁺ que muestra notable semejanza al complejo I, observaron que el transporte respiratorio de Na⁺ disminuye drásticamente en *E. coli* mutante que es deficiente en complejo I, pero Friedrich *et al.* (2005) señalaron no haber encontrado translocaciones de Na⁺ en el complejo I de la bacteria señalada. Este sistema sólo se ha encontrado en procariontes (Kersher *et al.*, 2008).

Existen reportes de investigaciones que sugieren que *E. coli*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Thermus thermophilus* HB-8 y *Vibrio alginolyticus* poseen NDH-1 y NDH-2 (Yagi, 1991; Kim y Kim, 2004). Mientras que *Zymomonas mobilis* sólo posee NADH:ubiquinona oxido-reductasa (Kim *et al.*, 1995). En el cuadro 8 se resume el complejo I de bacterias.

Cuadro 8. Características de tres NADH: ubiquinona óxido-reductasa bacteriana (Yagi *et al.*, 1998; 2004)

Característica	NDH-1	NDH-2	NDH-Na ⁺
Bomba de iones	H ⁺ (Na ⁺ ?)	Ausente	Na ⁺
Cofactores	1 FMN	1 FAD	1 FAD 2 FMN
	2 [2Fe-2S]		1 [2Fe-2S]
	6-8 [4Fe-4S]		
Subunidades	13-14 ^a	1 ^b	4-6 ^c
Inhibidores	Rotenona, Piericidina A, Capsaicina, Piridaben	Flavona (¿?)	Ag ⁺ , HQNO, Koronimicina

a *E. coli* está compuesta de 14 subunidades diferentes

b En muchas bacterias está presente como subunidad única

c Aislada de *Vibrio alginolyticus*

El NDH-1 y NDH-Na⁺ son complejos enzimáticos con subunidades múltiples, mientras que el NDH-2 posee sólo una. La NDH-1 tiene una marcada similitud estructural y funcional con el complejo I mitocondrial como lo demuestra el hecho de que los mismos inhibidores que actúan sobre el complejo I mitocondrial lo hacen sobre la NDH-1, por lo que algunas bacterias que poseen NDH-1 son usadas como modelo para el estudio del complejo I (Yano *et al.*, 1997).

El complejo I bacteriano ha sido estudiado en *Rhodobacter capsulatus* (Baccarini-Melandri *et al.*, 1973; Dupuis *et al.*, 1998), *Paracoccus denitrificans* (Yagi *et al.*, 1993; Takano *et al.*, 1998), *Thermus thermophilus* (Yano *et al.*, 1997) y *Escherichia coli* (Friedrich, 1998); todos son microorganismos empleados como modelos para elucidar el complejo I, tienen características específicas tales como:

- 1) *R. capsulatus* es una bacteria purpura no sulfurosa considerada desde el punto de vista filogenético como un antecesor de la mitocondria (Woese, 1987) además su NDH-1 es sensible a la rotenona de forma similar al complejo I de la célula eucariota por lo que representa un sistema de estudio para el complejo I mitocondrial.
- 2) La semejanza entre *P. denitrificans*, llamado “mitocondria de vida libre” y la mitocondria radica en que tienen componentes similares para la transferencia de electrones, similitudes en las secuencias de RNAr 16S y de aminoácidos de varias enzimas. El microorganismo posee una cadena respiratoria (NDH-1) del tipo de la mitocondria de mamíferos (NADH:ubiquinona óxido-reductasa).
- 3) *T. thermophilus* es capaz de crecer a temperaturas de 45-85°C, con una temperatura óptima de crecimiento de 70°C, su cadena respiratoria contiene NDH-1, por lo que la termoestabilidad de la enzima es una ventaja para su estudio.
- 4) *E. coli* presenta una sensibilidad relativa a los compuestos que inhiben el complejo I mitocondrial, esto puede deberse a que su membrana citoplásmica puede contener ubiquinona-10, dimetilmenaquinona-8, menaquinona-8 y benzoquinona-8. Debido a que el complejo I de esta bacteria es mucho más simple que el mitocondrial, pero con un

mecanismo similar, se ha utilizado como modelo para estudios estructurales (Sazanov *et al.*, 2003).

2.5.1. Inhibidores de la cadena respiratoria

Numerosos productos químicos pueden bloquear la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, todos ellos son venenos potentes, éstos han demostrado ser una herramienta útil para conocer el mecanismo de transferencia de electrones y de sodio en la cadena respiratoria (Kim y Kim, 2004).

Se conoce un gran número de inhibidores del complejo I, que actúan en la etapa terminal de la transferencia de electrones de esta enzima con excepción de rheim y difenil-eneiodonium, que inhiben la entrada de electrones al complejo I (Miyoshi, 2005).

La secuencia en la cadena de transporte electrónico es elucidada por medio del uso de inhibidores específicos y comprobándose por mediciones de los potenciales de reducción estándar de los compuestos rédox. Así, la velocidad a la que se consume el O₂ por una suspensión de mitocondrias es una medida de la actividad de la cadena de transporte de electrones. Los compuestos que inhiben el transporte de electrones en las mitocondrias y las bacterias se señalan en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Algunos inhibidores de la cadena de transporte de electrones

Complejos proteicos	Mitocondria	Bacteria
I	Rotenona, amital, piericidina A	Rotenona, piericidina A, acetogeninas (rolliniastatina-1), capsaicina
II	Malonato	
III	Antimicina A, dimercaprol	
IV	CN ⁻ , CO, H ₂ S, azida, antimicina A	KCN

Fuente: Yagi, 1998; Tapia *et al.*, 2004; Voet *et al.*, 2006

Se conocen varios inhibidores del complejo I, pero el número de sitios en los que se unen los inhibidores es una cuestión irresuelta y está sujeto a controversia (Vinogradov, 1993; Gong *et al.*, 2003) (Figura 30).

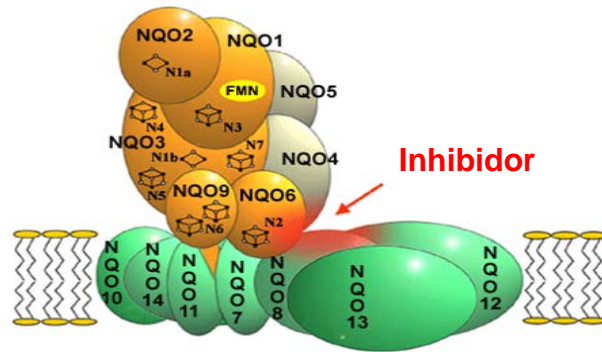


Figura 30. Esquema del complejo I señalando el posible sitio de unión con el inhibidor (Yagi, 2009).

Los inhibidores de la cadena respiratoria han demostrado ser una herramienta útil para sondear el mecanismo de transferencia de electrones y protones, así el NDH-1 de membranas de *E. coli*, *P. denitrificans* y *T. thermophilus* HB-8 al igual que el complejo I de mitocondria de bovino son inhibidos por la rotenona y la capsaicina (Yagi, 1990; Yagi *et al.*, 1998), en contraste NDH-2 es ligeramente inhibida por estos inhibidores. Mientras que NDH-Na⁺ es totalmente resistente a rotenona y capsaicina, pero es altamente sensible a 2-heptil-4-hidroxi-quinolina-N-óxido (Tokuda y Unemoto, 1984) y a AgNO₃ (Asano *et al.*, 1985).

La capsaicina en vesículas de *E. coli*, *P. denitrificans* y PSM de bovino actúa como un inhibidor de la reducción de la quinona por el NADH, de manera no competitiva para la ubiquinona a bajas concentraciones (menos de 20 μM) y como un inhibidor competitivo en concentraciones altas de ubiquinona (>50 μM) (Yagi, 1990).

Yagi (1990) demostró que la capsaicina inhibe la translocación de H⁺ en la NADH:quinona óxido-reductasa, pero no inhibe el complejo I de *B. subtilis* con

NDH-2, que además es resistente a piericidina A y rotenona (Velázquez y Pardo, 2001; Melo *et al.*, 2004).

La N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD) en concentración de 1 μ M inhibe al complejo I con el ensayo la NADH:ubiquinona óxido-reductasa en PSM de bovino y membranas de *P. denitrificans*, *E. coli* y *Thermus thermophilus* porque actúa como un inhibidor de la reducción de la quinona por el NADH, en contraste es inactivo sobre las membranas de *B. subtilis* y mitocondria de *S. cerevisiae*. Además, también inhibe a los complejos III (ubiquinol citocromo c oxidorreductasa), IV (citocromo c oxidasa) y V (ATP sintetasa) (Yagi, 1987).

Ahora se conoce que las ACG son potentes inhibidores del sistema de transporte de electrones del complejo I mitocondrial de mamíferos e insectos, (Tormo *et al.*, 1999). También actúan sobre la NADH oxidasa de la membrana plasmática de células cancerosas y de mitocondrias (Xu *et al.*, 2003) y sobre PSM (Barrachina *et al.*, 2004).

Se cree que las ACG actúan en el paso final de la transferencia de electrones del complejo I, aunque todavía no hay evidencia experimental que verifique que los inhibidores se unen al sitio de reducción de la quinona. Además, no hay similitud estructural entre las ACG y los inhibidores comunes del complejo I tales como piericidina A y rotenona (Miyoshi, 2005).

La actividad del complejo I de mitocondrias de corazón de bovino y de hígado de rata; vesículas de *E. coli*, *P. denitrificans* y *T. thermophilus* se inhibe por sustancias de estructura diversa, tales como rotenona, piericidina A, bullatacina (rolliniastatina-2), rolliniastatina-1, capsaicina y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (Yagi, 1987; Yagi, 1991; Schuler *et al.*, 1999).

En el complejo I aislado de *E. coli* Mamedova *et al.* (2004) señalan que la rotenona es un inhibidor poco efectivo (CI_{50} 100 μ M), con piericidina A (CI_{50} 4-10 μ M) sobre la enzima bovina tiene una CI_{50} 2 nM.

En vesículas de *E. coli* se determinó que la rotenona y la piericidina A, así como rolliniastatina-2 y rolliniastatina-1 son inhibidores del NDH-1, tal como sucede en las partículas submitocondriales de bovino (Yagi *et al.*, 1998).

Una sistematización de los inhibidores permite conocer que tanto el complejo I de mamíferos y bacterias son sensibles a la inhibición por sustancias de estructura diversa, lo que significa que estos compuestos normalmente no discriminan entre membranas de microbios y de mamíferos (Greenwood y Whitley, 2003).

El mejor ensayo enzimático para determinar el efecto de las ACG sobre la actividad del complejo I es el que se realiza en un entorno fisiológico en el interior de la membrana interna mitocondrial, por lo que se prefiere emplear para ello PSM, éstos ensayos se realizan midiendo la actividad de la NADH:ubiquinona óxido-reductasa o de la NADH oxidasa (Tormo, 1999b; Grivennikova *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003). En las membranas bacterianas Tapia *et al.* (2004) han empleado éstos mismos métodos para determinar el efecto del 13-*epi*-esclareol aislado de especies del género *Pseudognaphalium*.

Asimismo, las enzimas de procariotas catalizan las reacciones de la NADH oxidasa y NADH: ubiquinona reductasa con parámetros cinéticos similares a los del complejo I de mamíferos, excepto por una aparente baja de afinidad por los sustratos nucleótidos (Grivennikova *et al.*, 2003). Así, en *E. coli* Matsushita *et al.* (1987) determinaron la actividad de NADH oxidasa en membranas bacterianas y Flemming *et al.* (2003) sobre el complejo I aislado.

Recientemente Janssen *et al.* (2007) diseñaron un ensayo espectrofotométrico para medir el complejo I en fracciones mitocondriales en muestras de tejido y cultivos de fibroblastos, usando 2,6-dicloroindofenol (DCPI) como aceptor terminal de electrones del complejo I. Señalaron que el ensayo tiene más ventajas que los empleados actualmente ya que se fundamenta en la capacidad de reducción del DCPI, lo que evita el empleo de análogos de la coenzima-Q que tienen una pobre solubilidad y disminuye la concentración relativamente alta de extracto de tejido que se emplea para realizar la prueba de la NADH:ubiquinona óxido-reductasa lo que provoca que la turbidez de la mezcla de reacción sea relativamente alta.

De acuerdo a Rodenburg *et al.* (2008) una de las ventajas del método es que el DCIP ayuda a mantener la quinona utilizada en el ensayo en la forma oxidada, lo que es deseable, porque se ha demostrado que la forma reducida (quinol) inhibe la actividad del complejo I.

Por otro lado, los ensayos para realizar una evaluación adecuada de los inhibidores del complejo I son: 1) NADH:ubiquinona óxido-reductasa realizado con decilubiquinona o sus análogos como aceptor de electrones y 2) NADH oxidasa, ya que la disminución de la actividad de esta enzima es directamente atribuida a la inhibición del complejo I, esta enzima representa una actividad integrada en la cual la NADH es oxidada y los electrones son transferidos a lo largo de la cadena respiratoria con la finalidad de aceptar el oxígeno molecular (Degli, 1998; Tormo, 1999b)

III. JUSTIFICACION y OBJETIVOS

Hace más de dos décadas se describió que las anonáceas son fuente potencial de ACG, los ensayos de actividad biológica de estos compuestos se concentran mayoritariamente en las pruebas de citotoxicidad con las tipo bis-THF adyacentes, bis-THF no adyacentes y las mono-THF en diferentes líneas celulares de células cancerosas (Holschneider *et al.*, 1994; Raynaud *et al.*, 1995; Hopp *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001; Kim y Park, 2002; Quispe *et al.*, 2006). Por otro lado, son escasos los informes acerca de la acción antibacteriana de algunas ACG (Padmaja *et al.*, 1993; Mia *et al.*, 1997; Jumana *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2005) y más escasas son la investigaciones sobre el efecto de la rolliniastatina-2 (Schuler *et al.*, 1999) y laherradurina sobre el complejo I bacteriano.

En particular, la rolliniastatina-2 y laherradurina tienen en células cancerosas una actividad diferencial según la línea empleada. Ambas son bis-tetrahidrofurano adyacentes, con dos grupos hidroxilo flanqueando los anillos, un espaciador de 13 C, una cadena de 11 átomos de C y un anillo lactónico; las diferencias se encuentran en la posición de un tercer grupo hidroxilo y el grado de saturación de la lactona.

Los datos sobre la actividad de las ACG en el complejo I de partículas submitocondriales de bovino y la homología entre el complejo I de mitocondrias y bacterias permitió sugerir una actividad inhibitoria contrastante en función del anillo lactónico de estas ACG sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas, sus respectivos esferoplastos y protoplastos, así como el complejo I.

A partir de los antecedentes señalados, se planteó como objetivo general: Evaluar la posible actividad bactericida de la rolliniastatina-2 y laherradurina aisladas de *A. diversifolia* sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas.

Objetivos específicos:

1-Aislar de semillas de *Annona diversifolia* las acetogeninas rolliniastatina-2 y laherradurina.

2-Conocer la acción de las acetogeninas sobre el crecimiento de bacterias Gramnegativas: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* y Grampositivas: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

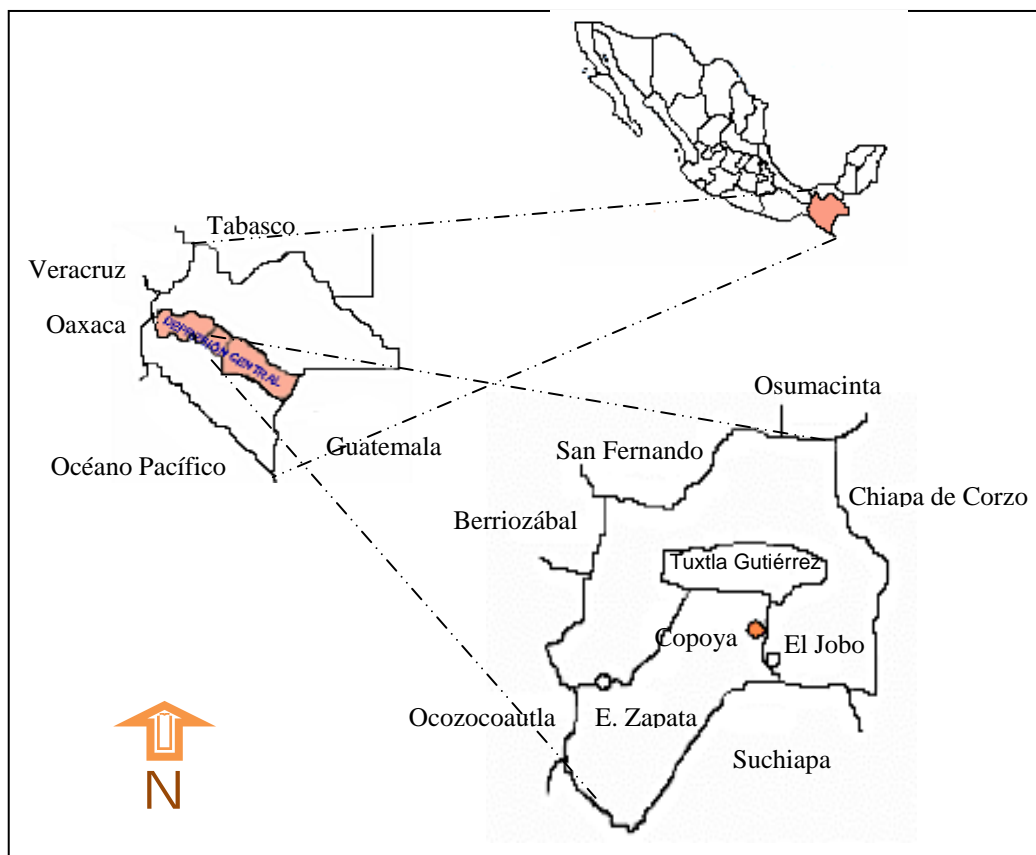
3-Determinar la actividad inhibitoria de rolliniastatina-2 y laherradurina frente a esferoplastos de las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* y protoplastos de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

4-Evaluar la actividad inhibitoria de rolliniastatina-2 y laherradurina sobre el complejo I en membranas de las bacterias *E. coli* y *S. Typhi*.

IV. METODOS

4.1. Material vegetal

En agosto de 2003 se obtuvieron semillas de *A. diversifolia* provenientes de frutos maduros recolectados en la Delegación de Copoya, Municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (Mapa 5). La población se encuentra localizada al sur de Tuxtla Gutiérrez a una altura de 860 msnm, latitud norte 16° 43' y 93° 07' longitud oeste (INEGI, 2002). Un ejemplar de la planta fue depositado bajo el No. 351 en el herbario HEM de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.



Fuente: Modificado de Rueda (2004)

Mapa 5. Ubicación geográfica de la Delegación de Copoya, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

4.2. Aislamiento y purificación de acetogeninas

Las semillas se secaron a la sombra y temperatura ambiente, la testa se separó y el endospermo se molió hasta su pulverización, 350 g de material vegetal se extrajeron con hexano (450 mL) en un equipo Soxhlet durante ocho horas tres veces (24 h). El extracto se concentró por destilación al vacío en un rotaevaporador Caframo WB 2000® y su rendimiento fue de 100 g.

El extracto formó un precipitado (6 g) que se filtró y se etiquetó como una fracción diferente. Ambas fracciones fueron evaluadas con la prueba de *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982; McLaughlin *et al.*, 1998), el filtrado fue inactivo mientras que el precipitado presentó actividad, por lo que se fraccionó en una columna abierta de 4 x 15 cm (6 g en 80 g de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck) y se eluyó con una mezcla de disolventes con un gradiente de polaridad creciente: Hex:AcOEt (100:0, 70:30, 30:70, 0:100) y AcOEt:MeOH (100:0, 70:30, 30:70, 0:100). Se obtuvieron 65 fracciones cuyos perfiles cromatográficos en capa fina (sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck) en Hex: AcOEt (20:80) permitieron agruparlas en 7 fracciones (S1-S7). La fracción S4 presentó un precipitado que se filtró y recrystalizó varias veces para su purificación. Se obtuvieron 500 mg de un cristal blanco amorfo con un punto de fusión de 70-72°C. El producto obtenido fue identificado estructuralmente como **laherradurina** (Figura 13) por el Dr. Mariano Martínez Vázquez del Instituto de Química de la UNAM.

La fracción S5 fue activa sobre *Artemia salina*, por lo que se separó en una columna abierta de 4 x 12 cm (1.2 g en 50 g de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck) eluida con un gradiente de polaridad creciente Hex:AcOEt:MeOH (100:0, 70:30, 30:70; 0:100). Se obtuvieron 5 fracciones, de ellas la fracción S5-3 presentó un precipitado que se recrystalizó en AcOEt, este tuvo un rendimiento de 15 mg y un punto de fusión de 69-71°C. El producto obtenido fue identificado por el Dr. Diego Cortes Martínez del Departamento de Farmacología, Laboratorio de

Farmacognosia de la Universidad de Valencia, España como **rolliniastatina-2** (Figura 12).

4.3. Evaluación de la toxicidad de las acetogeninas

A los compuestos obtenidos se les determinó la toxicidad sobre el crustáceo *Artemia salina* empleando el método de Meyer *et al.* (1982) y McLaughlin *et al.* (1998), este ensayo permite determinar la actividad biológica de los compuestos aislados de plantas, cuando éstos son tóxicos para el crustáceo se puede proceder a realizar el ensayo en el modelo biológico seleccionado. Las concentraciones empleadas en este estudio permitieron explorar en un rango muy amplio la toxicidad de las ACG.

Los huevecillos se incubaron en agua salina y luz artificial, después de 48 h de incubación, las larvas se colectaron con una pipeta Pasteur. Se pesaron 20 mg de cada compuesto, rolliniastatina-2 se disolvió en 2 mL de etanol al 70% (rolliniastatina-2) y la herradurina en dimetilsulfóxido (DMSO), de éstas soluciones se transfirieron 500, 50 y 5 μ L a tubos de ensayo, dejando evaporar el disolvente a sequedad a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 mL de agua salina artificial a cada tubo de ensayo, resultando una concentración final de 10, 100 y 1000 μ g/mL respectivamente. A continuación se añadieron 10 larvas a cada tubo y a las 24 h de contacto se contó el número de crustáceos sobrevivientes. Se preparó un testigo sin extracto, otro con etanol y otro con DMSO, todas las pruebas se realizaron por quintuplicado. El porcentaje (%) de mortalidad se determinó empleando la siguiente fórmula: número de larvas muertas por tratamiento/número de larvas del testigo x 100 y se calculó la concentración letal media (CL₅₀) con un intervalo de confianza del 95% usando el análisis estadístico Probit.

4.4. Susceptibilidad de las bacterias a rolliniastatina-2 y laherradurina

4.4.1. Bacterias utilizadas

Las cepas ensayadas fueron: *Escherichia coli* (ATCC 29223), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella Typhi* (ATCC 6539), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) provenientes del cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Los cultivos fueron mantenidos a 4°C en agar soya tripticaseína y se transfirieron a placas de agar Mueller Hinton por 24 h a 37°C.

4.4.2. Preparación de las acetogeninas

Las ACG de prueba se ensayaron en concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 236 y 512 µg/mL; rolliniastatina-2 se disolvió en etanol al 70% mientras que laherradurina en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5% (prueba de sensibilidad a 18 h). También se prepararon concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ng/mL para realizar el ensayo de sensibilidad a las 7 horas.

Los resultados se expresarán en nmol/mL, porque permite comparar de una manera más adecuada el efecto de los compuestos sobre las bacterias, esferoplastos, protoplastos y complejo I.

4.4.3. Efecto de rolliniastatina-2 y laherradurina sobre el crecimiento de las bacterias

La evaluación del efecto de las ACG se realizó con el método macrodilución en caldo de Andrews (2001) y la estandarización espectrofotométrica del estándar 0.5 de McFarland empleando el de Cona (2002).

Después de sembrar cada bacteria en agar Mueller Hinton (BBL[®]) e incubar por 24 h a 37°C, se tomaron de 3 a 5 colonias y se cultivaron en caldo Mueller Hinton (BBL[®]) a 37°C por aproximadamente 3-5 horas, se ajustó la turbidez al estándar 0.5 de McFarland (absorbancia de 0.1 a 625 nm) por lo que el inóculo contiene aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) o Bact/mL; posteriormente a celdas estériles con 0.95 mL de caldo Mueller Hinton y 1 mL del inóculo bacteriano se les añadieron 50 μ L de diferentes concentraciones (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 236 y 512 μ g/mL) de rolliniastatina-2 y laherradurina. Los tubos se incubaron a 37°C por 18 horas. Los controles fueron un inóculo de 1.5×10^8 UFC/mL sin compuesto, otro con etanol al 70% y otro con DMSO. El efecto sobre la proliferación de las bacterias se determinó por turbidimetría en un espectrofotómetro Genesys 10uv THERMO a 625 nm. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento con la siguiente fórmula= $100 - [(medida \text{ del crecimiento del experimento} / medida \text{ del crecimiento del control}) \times 100]$ (Javor, 1983).

Para determinar el efecto sobre el crecimiento de las bacterias en un lapso de siete horas se realizó el procedimiento anterior con las siguientes modificaciones: se empleó un inóculo de 1.5×10^4 UFC/mL que se obtuvo por dilución del inóculo de 1.5×10^8 UFC/mL (Bact/mL), se emplearon siete concentraciones de cada ACG en concentraciones de ng/mL y se realizaron lecturas en un espectrofotómetro cada hora durante siete horas. En este caso los resultados indican el efecto de las ACG en la disminución del número de bacterias en el medio de ensayo.

Para comparar el efecto de las concentraciones de cada ACG se realizaron una ANDEVA simple y para el efecto de concentración dependencia regresiones lineales; para el efecto de ambas ACG sobre el tipo de bacterias: ANDEVA de dos vías, contraste múltiple de rango con el método de Bonferroni (95%), además de un análisis de muestras pareadas, utilizando el programa Stat Graphics 5.1.

4.5. Susceptibilidad de bacterias libres de pared

4.5.1. Obtención de esferoplastos y protoplastos

Cada cepa bacteriana se cultivó en 50 mL de caldo cerebro corazón (BHI, Fluka®) por 8 h a 37°C. Los esferoplastos se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Padilla *et al.* (2002). Para ello, las bacterias se centrifugaron a 5,000 x g por 15 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall® Biofuge stratos y la pastilla obtenida se lavó dos veces con agua destilada estéril. Se resuspendió en 100 µL de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 20% de sacarosa y 25 µL de lisozima (2 mg/mL) (solución TSL) y se mantuvieron a 0°C por 10-20 min. Después se añadieron 50 mL de EDTA 0.25 M. A la suspensión obtenida se le añadió 1.3 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 con 9% de sacarosa. Los esfero y protoplastos se colectaron por centrifugación a 3,000 x g por 15 minutos y se resuspendieron en 8 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 7.6, 0.75 M de sacarosa y 20 mM de sulfato de magnesio (solución TSM). Después de este procedimiento, más del 90% de las células se convirtieron en esferoplastos que se observaron en un microscopio Carl Zeiss (Figura 32).

4.5.2. Efecto de las acetogeninas sobre esferoplastos y protoplastos bacterianos

Los esferoplastos y protoplastos usados en el experimento se diluyeron en Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 (solución TSM) hasta una absorbancia de 0.35 a 625 nm. Las acetogeninas se añadieron a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ng/mL) durante 30 minutos de tratamiento, la viabilidad fue medida por turbidez cada 10 min a 625 nm. La absorbancia de la suspensión se realizó de acuerdo al método de Abriouel *et al.* (1998) y el tiempo de exposición al de Codling *et al.* (2003). Los controles fueron esferoplastos sin compuesto, con etanol y DMSO.

Todo el experimento se realizó por duplicado y los resultados se expresan como porcentaje de inhibición empleando la ecuación: Porcentaje de inhibición del

crecimiento= $100 - [(medida \text{ del crecimiento del ensayo} / medida \text{ del crecimiento del control}) \times 100]$ (Javor, 1983).

Para comparar el efecto de las concentraciones de cada ACG se realizó una ANDEVA de una vía y para determinar el efecto de la concentración se realizaron regresiones lineales. Para comparar el efecto de ambas ACG sobre el tipo de bacterias se emplearon ANDEVA de dos vías y el contraste múltiple de rango con el método de Bonferroni (95%), además de un análisis de muestras pareadas, utilizando el programa Stat Graphics 5.1.

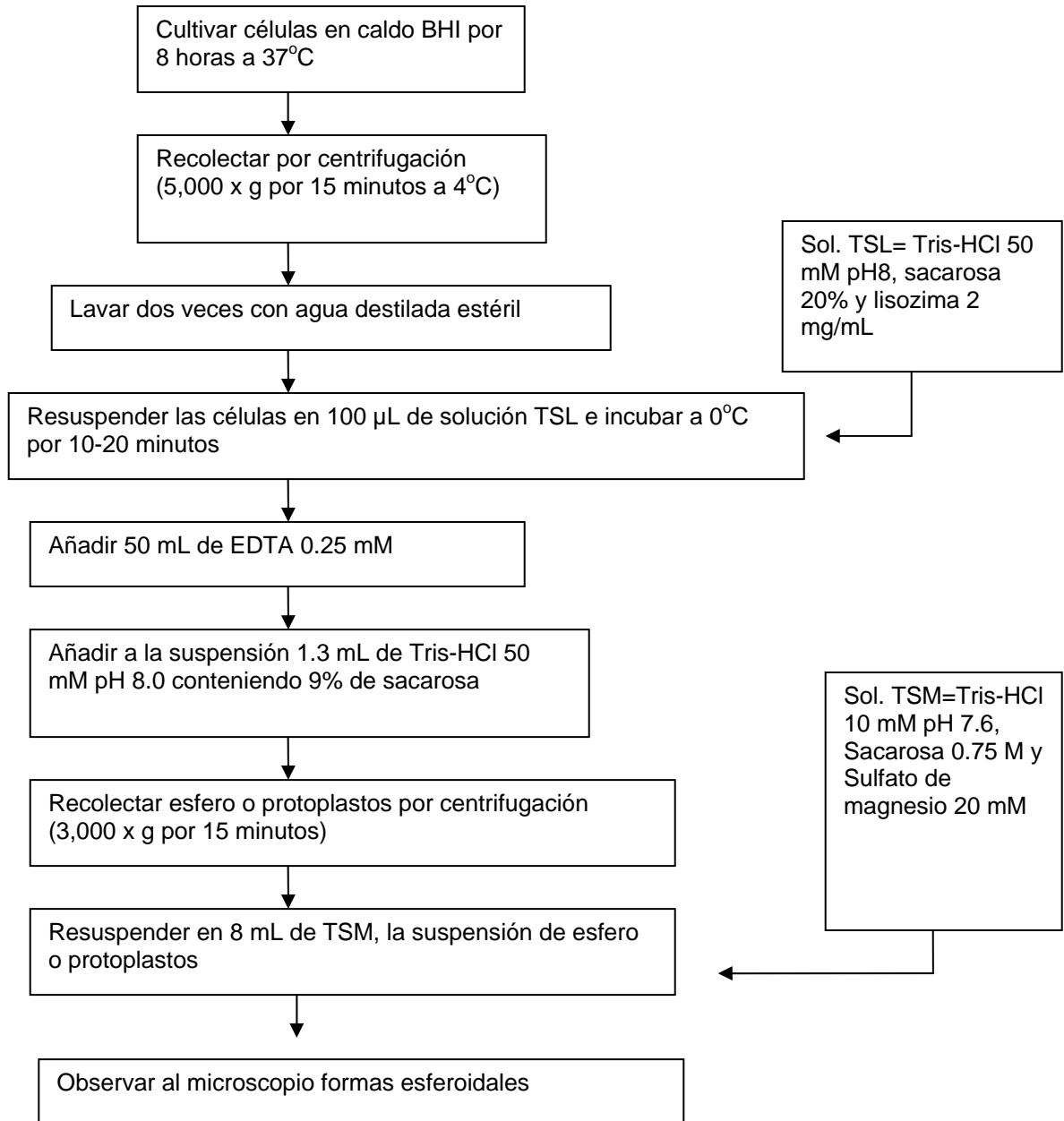


Figura 31. Preparación de bacterias libres de pared (Padilla *et al.*, 2002).

4.6. Actividad de las acetogeninas sobre el complejo I

4.6.1. Preparación de membranas bacterianas

Las bacterias libres de pared se obtuvieron como se señala en el apartado 4.5.1, para obtener las membranas se emplearon los métodos de Kaback y Stadman (1966) y Minai-Tehrani *et al.* (2002) con modificaciones menores. La suspensión de esferoplastos o protoplastos se centrifugó a 16,000 x g por 30 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall® Biofuge stratos. La pastilla se disolvió en Tris-HCl 0.05 M, pH 8, 500 µg de DNasa I y 50 µM de MgCl₂; la mezcla se agitó a intervalos de 5 minutos durante una hora. Se observó una muestra al microscopio para determinar si aún había presencia de esfero o protoplastos, si éstos no se observaban se procedió a centrifugar a 10,000 x g por 15 minutos a 4°C; el sobrenadante se centrifugó a 20,000 x g por 1 hora a 4°C. La pastilla se disolvió en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5, 0.5 M de sacarosa y 10 mM de MgCl₂. Después se realizó la cuantificación de proteínas.

4.6.2. Cuantificación de proteínas

Las proteínas de las membranas bacterianas se determinaron por el método de Bradford (1976), se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina bovina (1, 10, 100 y 1000 µg/mL) y se anotaron las lecturas de absorbancia obtenidas en el espectrofotómetro Genésis 10 UV a 595 nm. Este procedimiento se efectuó por triplicado cada vez que se hizo un nuevo ensayo.

4.6.3 Preparación de las ACG

Se preparó una solución inicial de rolliniastatina-2 a una concentración de 1 mM (6.22 mg/10mL de etanol), por dilución 1:5 se obtuvo una solución de 200 µM, a partir de ésta se realizó una solución patrón inicial de 26714 nM (C1) y por diluciones seriadas 1:10 se obtuvieron 5 concentraciones más (C2 a C6). De cada una de ellas se tomaron 15 µL para obtener en un volumen final de ensayo (2500 µL) concentraciones de 0.0016, 0.016, 0.16, 1.6, 16 y 160 nM. La cantidad de

etanol nunca fue superior al 2% del volumen total de la mezcla de ensayo. El control positivo de la inhibición fue rotenona en las mismas concentraciones que la ACG.

Para la herradura la concentración inicial de 1 mM consistió en 6.24 mg en 10 mL de etanol y la de rotenona fue de 3.42 mg en 10 mL de etanol, realizando a continuación el procedimiento anterior para obtener las concentraciones ya señaladas.

4.6.4. Determinación de la actividad enzimática

La actividad del complejo I de la cadena respiratoria se determinó por el método de Grivennikova *et al.* (2001). Debido a la poca solubilidad del aceptor natural, la ubiquinona, se utilizó el análogo decilubiquinona (DB) o coenzima Q₂ que aunque no contiene cadenas isoprenoides, la cadena hidrocarbonada que contiene le proporciona propiedades hidrofóbicas que permiten su empleo como análoga de la quinona natural.

Todos los reactivos se prepararon el mismo día que se realizaron los ensayos, lo mismo que las membranas bacterianas, las mediciones se realizaron en cubetas desechables de plástico, la actividad de la NADH:ubiquinona óxido-reductasa (EC 1.6.5.3) ensayada como NADH:decilubiquinona óxido-reductasa en las membranas se determinó espectrofotométricamente en cubetas de 1 cm de paso de luz, siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Génesis 10 UV a los 40 minutos de exposición.

La mezcla de reacción de cada una de las cubetas contenía la fracción de membrana equivalente a 10 µg de proteínas (4 µg/mL), 1000 mM de decilubiquinona, 15 µL de cada una de las concentraciones de las ACG, buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 con 0.25 M de sacarosa, 0.2 mM de EDTA y 1.5 mM de KCN (mezcla de reacción) la que se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente.

La reacción enzimática se inició al adicionar 75 μM de NADH (0.075 mM), se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se registró el descenso de la absorbancia a 340 nm correspondiente a la oxidación del NADH a los 40 minutos. Todas las concentraciones de ACG se realizaron por triplicado. Se empleó rotenona como control positivo en las mismas concentraciones que las ACG.

Para calcular las CI_{50} los datos se ajustaron a una regresión logarítmica y se obtuvo la ecuación de la función.

V. RESULTADOS y ANALISIS DE RESULTADOS

Se seleccionaron semillas de *A. diversifolia* porque son una fuente de ACG (Reyes Trejo *et al.*, 1997; de la Cruz Chacón, 2001; González Esquinca, 2001). Así, del extracto hexánico se obtuvieron 15 mg de rolliniastatina-2 y 500 mg de laherradurina.

5.1. Evaluación de la toxicidad de las acetogeninas

La toxicidad de las dos acetogeninas se evaluó sobre *Artemia salina*, con el método de Meyer *et al.* (1982) y McLaughlin *et al.* (1998), ambos compuestos muestran una fuerte actividad a las 24 horas de exposición en las tres concentraciones probadas ($\mu\text{g/mL}$) que para fines comparativos se convirtieron en nanomoles por mL (Cuadro 10).

Cuadro 10. Nanomoles de las ACG utilizados en los ensayos con *Artemia salina*

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración nmol/mL	
	Rolliniastatina-2	Laherradurina
10	6.22	6.24
100	62.2	62.4
1000	622	624

Las ACG mostraron porcentajes de mortalidad prácticamente iguales, la rolliniastatina-2 de 84 a 100% y laherradurina de 84 a 96%.

Los datos de CL_{50} , mostraron a laherradurina con un efecto más potente (CL_{50} de 0.014976 nmol/mL), mientras que la rolliniastatina-2 fue aproximadamente 32 veces menos potente (CL_{50} 0.489514 nmol/mL) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Concentración letal media de rolliniastatina-2 y laherradurina en *A. salina* a 24 h de exposición

Compuestos	CL_{50} (nmol/mL)	Límites	
		Inferior	Superior
Rolliniastatina-2	0.489514	0.000	3.692
Laherradurina	0.014976	0.000	1.309

Los resultados obtenidos de los efectos de las dos ACG sobre *A. salina* corroboran su alta toxicidad (Rupprecht *et al.*, 1990; Alali *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005) y permitieron sugerir una actividad más potente de la herradura en los ensayos con las bacterias.

5.2. Susceptibilidad de las bacterias frente a rolliniastatina-2 y laherradurina

Algunas ACG con estructuras bis-THF adyacentes y lactonas insaturadas mostraron actividad inhibitoria sobre bacterias (Padmaja *et al.*, 1993; Rhaman *et al.* (2005). Las ACG utilizadas en este trabajo también son bis-THF adyacentes, con la variación de la saturación de la lactona. Por ello y debido a que está documentado que las ACG actúan sobre el complejo I se eligieron para realizar el ensayo bacterias Gramnegativas y Grampositivas aeróbicas.

5.2.1. Ensayo a las 18 h utilizando concentraciones en $\mu\text{g/mL}$

Para conocer el potencial antimicrobiano de rolliniastatina-2 y laherradurina se realizó una primera evaluación con concentraciones del orden de $\mu\text{g/mL}$ ya que existen reportes de ACG que inhiben el crecimiento bacteriano en dichas concentraciones. Para comparar el efecto de las dos ACG se realizó la conversión de la concentración a nmol/mL (Cuadro 12)

Cuadro 12. Conversión de $\mu\text{g/mL}$ de ACG a nmol/mL

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración nmol/mL	
	Rolliniastatina-2	Laherradurina
2	3.21	3.20
4	6.43	6.41
8	12.86	12.82
16	25.72	25.64
32	51.44	51.28
64	102.89	102.56
128	205.78	205.12
256	411.57	410.25
512	823.15	820.51

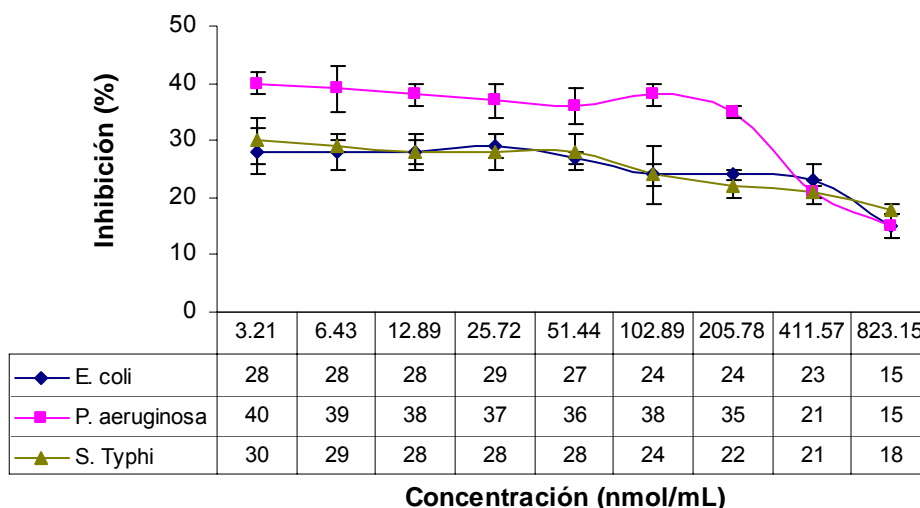
5.2.1.1. Bacterias Gramnegativas

La evaluación del efecto inhibitorio de las ACG se realizó sobre las siguientes bacterias Gramnegativas: *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. Typhi*.

5.2.1.1.1. Rolliniastatina-2

Las tres bacterias fueron sensibles a esta ACG ($P=0.000$); no se presentó un efecto de concentración-dependencia ($r= -0.841$; $r= -0.691$; $r= -0.714$) (Anexo 1) sino por el contrario, con las concentraciones menores la inhibición fue mayor. Con 3.21 nmol/mL (2 µg/mL) se encontraron valores de inhibición de 40% (*P. aeruginosa*), 30% (*S. Typhi*) y 28% (*E. coli*) (Gráfica 1).

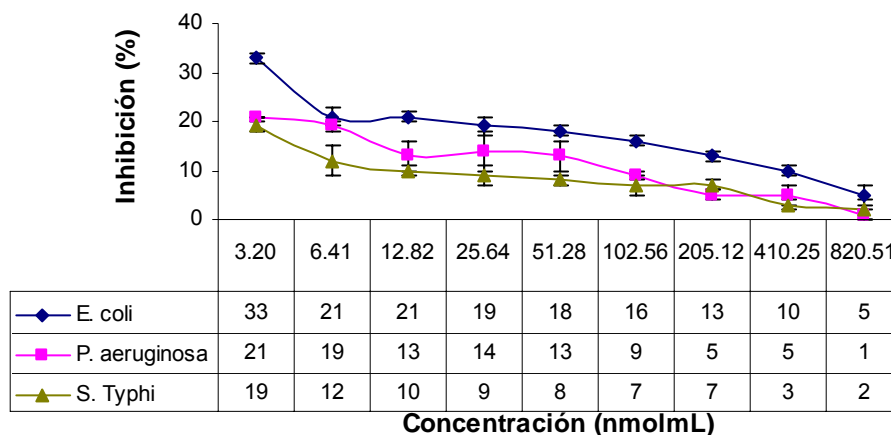
De acuerdo a los porcentajes de inhibición obtenidos; la bacteria más sensible es *P. aeruginosa* ($P=0.000$); la rolliniastatina-2 inhibe de igual manera al crecimiento de *E. coli* y *S. Typhi* con cerca de 10% menos con relación al porcentaje de *P. aeruginosa* ($P>0.05$) (Anexo 1).



Gráfica 1. Efecto inhibitorio de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento de bacterias Gramnegativas. A las 18 h de exposición en medio líquido. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto.

5.2.1.1.2. Laherradurina

Las tres bacterias son sensibles a esta ACG ($P=0.000$); sobre *E. coli* laherradurina presentó un efecto inhibitorio mayor en todas las concentraciones ensayadas ($P<0.000$), seguida de *P. aeruginosa* al menos en las concentraciones menores; *P. aeruginosa* y *S. Typhi*, son inhibidas de manera semejante ($P>0.05$) (Gráfica 2) (Anexo 2).



Gráfica 2. Efecto inhibitorio de laherradurina sobre el crecimiento de bacterias Gramnegativas. A las 18 h de exposición en medio líquido. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto.

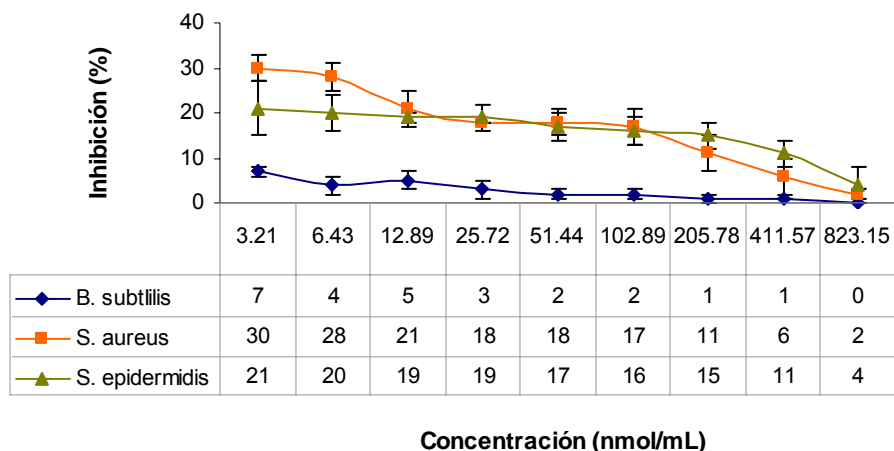
Al comparar la actividad inhibitoria de ambas ACG empleando el análisis de varianza (Anexo 2) destaca la actividad de la rolliniastatina-2 frente a *P. aeruginosa* (40%), contrastando con laherradurina que tiene más actividad sobre *E. coli* (33%, $P=0.000$). Asimismo, al realizar el análisis de varianza (Anexo 3) la respuesta de las bacterias Gramnegativas a ambas ACG varía considerablemente, rolliniastatina-2 con una mayor actividad inhibitoria ($P=0.000$) que laherradurina ($P=0.021$), la diferencia estructural de la rolliniastatina-2 es la posición de los grupos hidroxilo (C24 y C35) o el grado de saturación de la lactona.

5.2.1.2. Bacterias Grampositivas

La concentración inhibitoria de la rolliniastatina-2 y la herradura se realizó sobre *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermidis*.

5.2.1.2.1. Rolliniastatina-2

Esta ACG también afectó a las tres bacterias Grampositivas ($P < 0.000$), sin encontrar tampoco un efecto concentración-dependencia ($r = -0.815$; $r = -0.811$; $r = -0.775$) (Anexo 1), el mayor efecto se encuentra en la concentración más baja, 3.21 nmol/mL (2 µg/mL), las dos especies de *Staphylococcus* son las más sensibles ($P < 0.000$) en tanto que en *B. subtilis* la inhibición es pequeña (Gráfica 3).

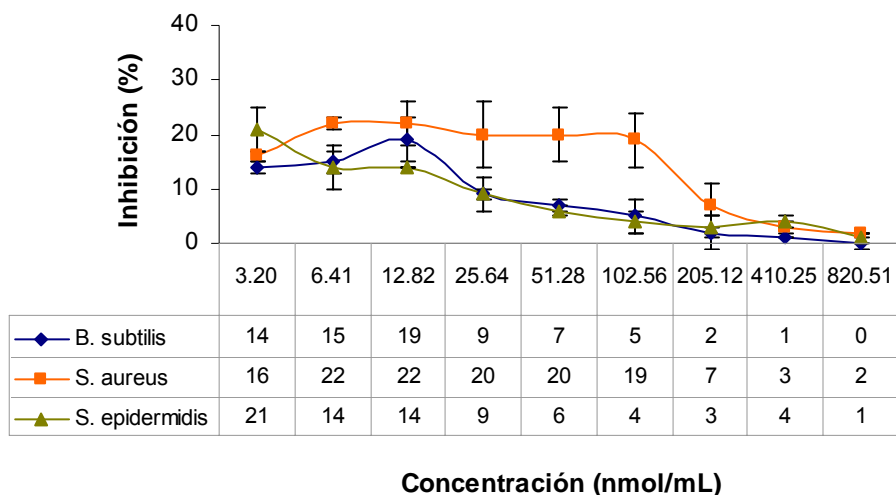


Gráfica 3. Efecto inhibitorio de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento de bacterias Grampositivas. A las 18 h de exposición en medio líquido. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto.

Rolliniastatina-2 con la menor concentración (3.21 nmol/mL) presentó mayor actividad sobre *S. aureus* (30%), siendo 9% mayor que la inhibición de *S. epidermidis* y 23% más a la de *B. subtilis*.

5.2.1.2.2. Laherradurina

Esta ACG mostró actividad inhibitoria en las tres bacterias ($P < 0.000$) inversa a la concentración ($r = -0.793$; $r = -0.775$; $r = -0.816$) (Anexo 2), las concentraciones menores son las que produjeron una mayor inhibición. Laherradurina con las concentraciones mayores 205.12-820.51 nmol/mL (128-512 $\mu\text{g/mL}$) tuvo un efecto mínimo sobre el crecimiento de las bacterias analizadas (Gráfica 4).



Gráfica 4. Efecto inhibitorio de laherradurina sobre el crecimiento de bacterias Grampositivas. A las 18 h de exposición en medio líquido. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto.

S. aureus es marcadamente más susceptible a esta ACG ($P < 0.000$), en tanto que la actividad inhibitoria en *B. subtilis* y *S. epidermidis* es semejante ($P > 0.05$) (Anexo 2). Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento se obtuvieron con *S. aureus* (22%) con 6.41 nmol/mL (4 $\mu\text{g/mL}$) y 12.82 nmol/mL (8 $\mu\text{g/mL}$), seguido de *S. epidermidis* (21%) con 3.20 nmol/mL (2 $\mu\text{g/mL}$) y *B. subtilis* (19%) con 12.82 nmol/mL (8 $\mu\text{g/mL}$) los que disminuyen conforme aumenta la concentración.

5.2.1.3. Análisis de resultados

Los efectos inhibitorios de las ACG se evaluaron en cultivos bacterianos a 18 horas de exposición, destacando de manera sistemática, que la mayor inhibición siempre fue producida por las menores concentraciones, casi siempre del orden de 3.21 nmol/mL (rolliniastatina-2) y 3.20 nmol/nL (laherradurina) y nunca superior al 40% de inhibición, estos datos nos llevaron a realizar los ensayos con concentraciones menores.

Se mostró el efecto de la rolliniastatina-2 y laherradurina sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas, lo que concuerda con los datos de Padmaja *et al.* (1993), Mia *et al.* (1997), Jumana *et al.* (2000) y Rhaman *et al.* (2005) quienes reportaron que diferentes tipos de ACG inhiben el crecimiento de los dos tipos de bacterias.

Aunque la mayor actividad de los dos compuestos fue sobre las Gramnegativas, la rolliniastatina-2 tuvo mayor efecto que laherradurina ($P < 0.001$) en tanto que en las bacterias Grampositivas dependiendo de la especie el mayor efecto lo produjo la rolliniastatina-2 o laherradurina o tener la misma actividad.

Las diferencias antiproliferativas dependieron del tipo y especie bacteriana, mostrando una actividad diferencial documentada para las ACG en éstos (Padmaja *et al.*, 1993; Rahman *et al.*, 2005) y otros sistemas biológicos (Rupprecht *et al.*, 1990; Alali *et al.*, 1999; Tormo *et al.*, 1999b; Hu *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2005, entre otros). Asimismo la estructura química de cada ACG impacta de distinta manera a las especies bacterianas, por ejemplo *B. subtilis* es la bacteria menos “sensible” a la rolliniastatina-2 (7%), sin embargo laherradurina inhibe su crecimiento hasta en un 19% ($P < 0.01$) (Anexos 3 y 4).

Se ha señalado que las ACG despliegan efectos inhibitorios muy potentes en concentraciones muy bajas, por ejemplo la trilobacina y la asiminocina muestran valores de dosis efectiva media (DE₅₀) menores a 10-12 µg/mL en varias líneas celulares tumorales humanas, incluso superiores al taxol (Oberlies *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Esto también se puede apreciar en las bacterias de este ensayo: 3.21 nmol/mL (rolliniastatina-2) y 3.20-12.82 nmol/mL (laherradurina).

En la bibliografía no hay datos para realizar una buena comparación con nuestros resultados, los más cercanos son los de Padmaja *et al.* (1993) y Rahman *et al.* (2005) aunque estos autores usan la técnica de difusión en medio sólido y en este trabajo el de dilución en caldo.

En su estudio Padmaja *et al.* (1993), evaluaron diversas ACG, entre ellas las más parecidas a rolliniastatina-2 fueron la narumicina I y II, cuya diferencia estructural con rolliniastatina-2 es el -OH del C4 se encuentra en el C5. La mezcla de ambas (250 µg/d) inhibió el crecimiento de cuatro Grampositivas del género *Bacillus*, pero no a *B. subtilis* y de cinco Gramnegativas incluyendo *P. aeruginosa*, *S. Typhi* y *E. coli*, con diámetros de inhibición de 16, 10 y 8 mm; aunque nuestros datos se obtuvieron en medios de cultivo líquido y a concentraciones menores, de alguna manera concuerdan con el efecto inhibitorio ya que éstas mismas bacterias son afectadas por rolliniastatina-2 en el mismo orden que los reportados por Padmaja *et al.* (1993), con una concentración 100 veces menor (2 µg/mL) a la empleada por ellos.

Otra de las ACG ensayadas por Padmaja *et al.* (1993), con semejanza estructural a rolliniastatina- 2 es la escuamocina cuya diferencia también es la posición de un -OH, ubicado en esta ACG en lugar del C4 en el C28; los autores reportaron una actividad antibacteriana (250 µg/d) sobre *S. Typhi*, *P. aeruginosa* y *E. coli* con diámetros de inhibición de 10, 9 y 8 mm respectivamente, mientras que

Rahman *et al.* (2005) también con escuamocina en concentraciones de 200 µg/disco reportan halos de inhibición un poco mayores sobre las mismas bacterias [*P. aeruginosa* (18 mm), *S. Typhi* (17 mm) y *E. coli* (15 mm)]; con relación a las bacterias Grampositivas sólo el trabajo de Rhaman *et al.* (2005) señala la inhibición de *S. aureus* (15 mm) y *B. subtilis* (12 mm) coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación ya que rollinistatina-2 fue más potente sobre *S. aureus* (30%) y difiriendo en *B. subtilis* ya que con esta ACG la inhibición de los microorganismos es muy pequeña (7%).

Laherradurina es semejante estructuralmente a la isodesacetilivaricina, ambas tienen dos grupos –OH en los C15 y C24 así como la misma estereoisomería, la diferencia radica en el tipo de lactona, la de la primera es saturada y la segunda insaturada. Los resultados de Padmaja *et al.* (1993), señalaron el mayor halo de inhibición sobre *P. aeruginosa* (16 mm) seguido de los de *S. Typhi* (10 mm) y *E. coli* (8 mm), contrario a los resultados de este ensayo con relación a la susceptibilidad de *E. coli* (33%), *P. aeruginosa* (21%) y *S. Typhi* (19%), aunque como ya se señaló la concentración más activa en este ensayo es 100 veces menor que la empleada por estos autores.

Pareciera entonces que la diferente actividad de la rolliniastatina-2 y laherradurina estuviera más bien asociada al tipo de lactona, teniendo mayor actividad inhibitoria la rolliniastatina-2 con una lactona insaturada. Sin embargo y no obstante todas las investigaciones realizadas en diversos modelos biológicos, ninguno con bacterias, no existe claridad acerca del cuál o cuáles son las partes más importantes de la molécula que le confiere(n) su potencia como inhibidores, señalando tres características esenciales: el número y posición de los anillos THF (Oberlies *et al.*, 1995), la lactona y el número de carbonos entre ellos “espaciador” (Miyoshi *et al.*, 1998; Takada *et al.*, 2000; Motoyama *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2004; Abe *et al.*, 2008).

La rolliniastatina-2 y la herradura producen efectos inhibitorios mayores en las bacterias Gramnegativas mientras que en las Grampositivas este efecto es mayor, aunque se ha señalado que la membrana externa de las bacterias Gramnegativas es menos permeable que las de las Grampositivas (Poole, 2002), se conoce, como indicó Russell (2003) que ambos tipos de bacterias responden de manera diferenciada a los biocidas, esta respuesta es poco conocida hasta hoy, pero la composición química de las cubiertas celulares exteriores puede ser un factor primordial.

Dado que en esta investigación el porcentaje de inhibición no llegó al 50% es posible que en las Gramnegativas la membrana externa actúe como una barrera protectora tal como lo señala Tegos *et al.* (2002) o que el peptidoglucano de ambos tipos bacterianos participe como barrera, lo que posiblemente explicaría también el menor efecto de ambas ACG en las bacterias Grampositivas.

5.2.1.4. Conclusiones

- Ambas ACG tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las seis bacterias.
- La actividad de rolliniastatina-2 y la herradura fue mayor con las concentraciones menores.
- Las bacterias Gramnegativas son las más afectadas por las dos ACG.
- Hay diferencias en la actividad de las dos ACG sobre cada bacteria, la rolliniastatina-2 fue la más potente.
- Los resultados sugieren que la pared celular de las bacterias ensayadas funcionan como barrera para la entrada de las ACG a los microorganismos.

5.2.2. Ensayo durante 7 h utilizando concentraciones en ng/mL

En función de los resultados anteriores, en los que las concentraciones menores son más potentes y producen los mayores porcentajes de inhibición, se decidió realizar un ensayo con concentraciones menores, aunque las pruebas de inhibición bacteriana frente a compuestos de plantas no se realizan en concentraciones tan pequeñas por su bajo nivel de actividad, especialmente sobre las bacterias Gramnegativas (Tegos *et al.*, 2002); se consideró la potencia de las ACG para medir el efecto inhibitorio, de rolliniastatina-2 se emplearon concentraciones de 0.00160 a 0.10289 nmol/mL y de laherradurina de 0.00160 a 0.10256 nmol/mL (siete concentraciones) así como un inóculo bacteriano menor y la densidad óptica se midió cada hora durante siete horas.

Para efectos de comparación las concentraciones se convirtieron de ng/mL a nmol/mL (Cuadro 13).

Cuadro 13. Conversión de ng/mL de rolliniastatina-2 y laherradurina a nmol/mL

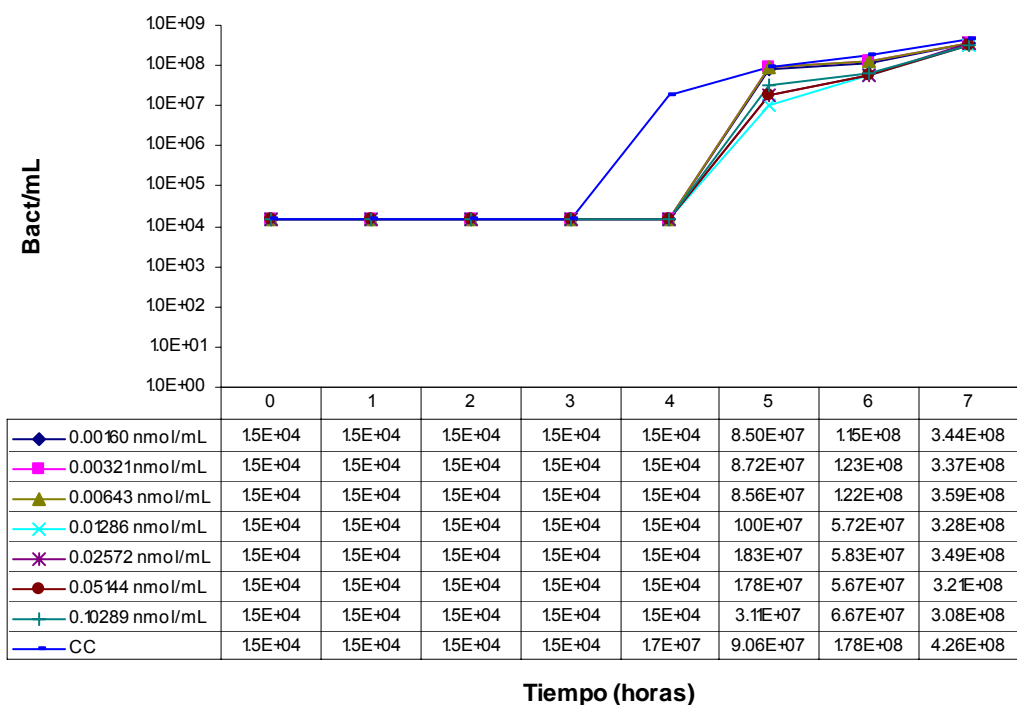
Concentración ng/mL	Concentración nmol/mL	
	Rolliniastatina-2	Laherradurina
1	0.0016	0.0016
2	0.00321	0.0032
4	0.00643	0.00641
8	0.01286	0.01282
16	0.02572	0.02564
32	0.05144	0.05128
64	0.10289	0.10256

5.2.2.1. Bacterias Gramnegativas expuestas a rolliniastatina-2 durante 7 h

Los análisis estadísticos de varianza (ANDEVA) dan valores significativos del efecto de las ACG sobre cada una de las bacterias ($P=0.000$) con todas las concentraciones.

5.2.2.1.1. *E. coli*

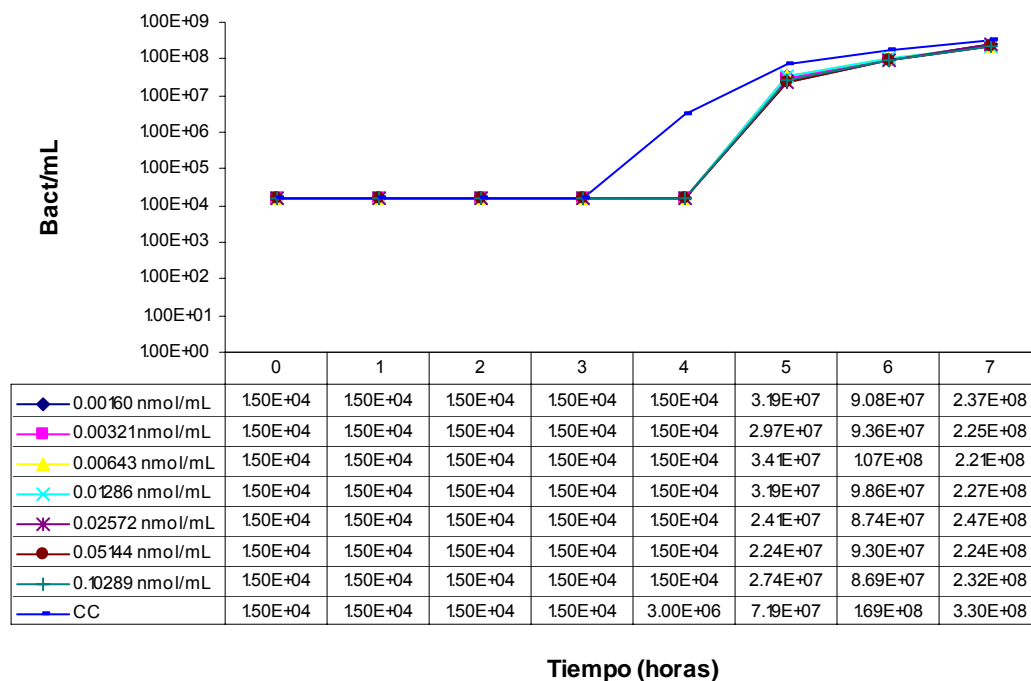
El crecimiento de las bacterias del control y las expuestas a las concentraciones de rolliniastatina-2 hasta la tercera hora no presentaron variación, es hasta la cuarta hora que todas las concentraciones del compuesto tuvieron actividad sobre el crecimiento poblacional de *E. coli*, en la quinta y sexta horas las concentraciones mayores: 0.01286, 0.02572, 0.05144 y 0.10289 nmol/mL (8, 16, 32 y 64 ng/mL) mostraron una ligera actividad, mientras que en la séptima hora prácticamente no hay variación (Gráfica 5).



Gráfica 5. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *E. coli*.

5.2.2.1.2. *P. aeruginosa*

Al igual que en *E. coli* el crecimiento de bacterias del control de *P. aeruginosa* y las expuestas a las concentraciones de rolliniastatina-2 hasta la tercera hora no presentaron variación, en la cuarta hora todas las concentraciones del compuesto tuvieron actividad sobre el crecimiento poblacional, en la quinta y sexta horas todas las concentraciones disminuyeron ligeramente el crecimiento poblacional bacteriano. La mayor diferencia se observó en la cuarta hora de exposición al compuesto (Gráfica 6).

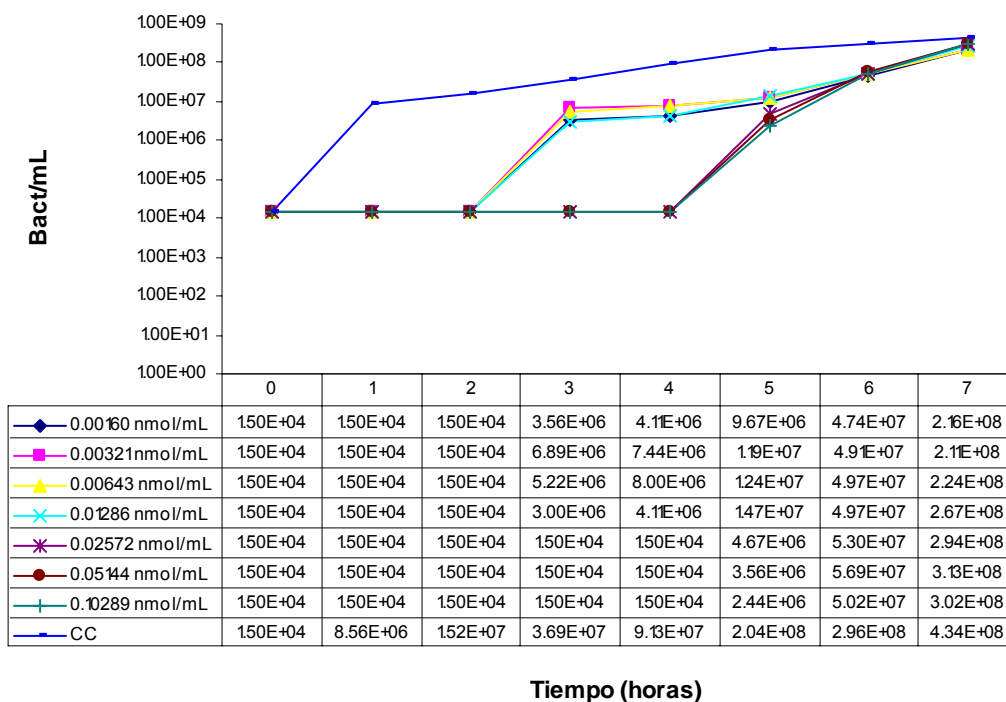


Gráfica 6. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *P. aeruginosa*.

5.2.2.1.3. S. Typhi

A diferencia de las dos bacterias anteriores el crecimiento del control de *S. Typhi* se incrementó a partir de la primera hora de ensayo. Las mayores concentraciones probadas no permitieron el aumento del número de bact/mL hasta la cuarta hora, mientras que las concentraciones menores tuvieron una ligera actividad entre la tercera y quinta hora. Es a partir de la sexta hora que todas las concentraciones tuvieron el mismo efecto (Gráfica 7).

Bajo las condiciones de ensayo *S. Typhi* parece ser la más sensible a rolliniastatina-2 ya que es hasta la séptima hora de tratamiento que se detecta un aumento del número de bact/mL semejante al control.

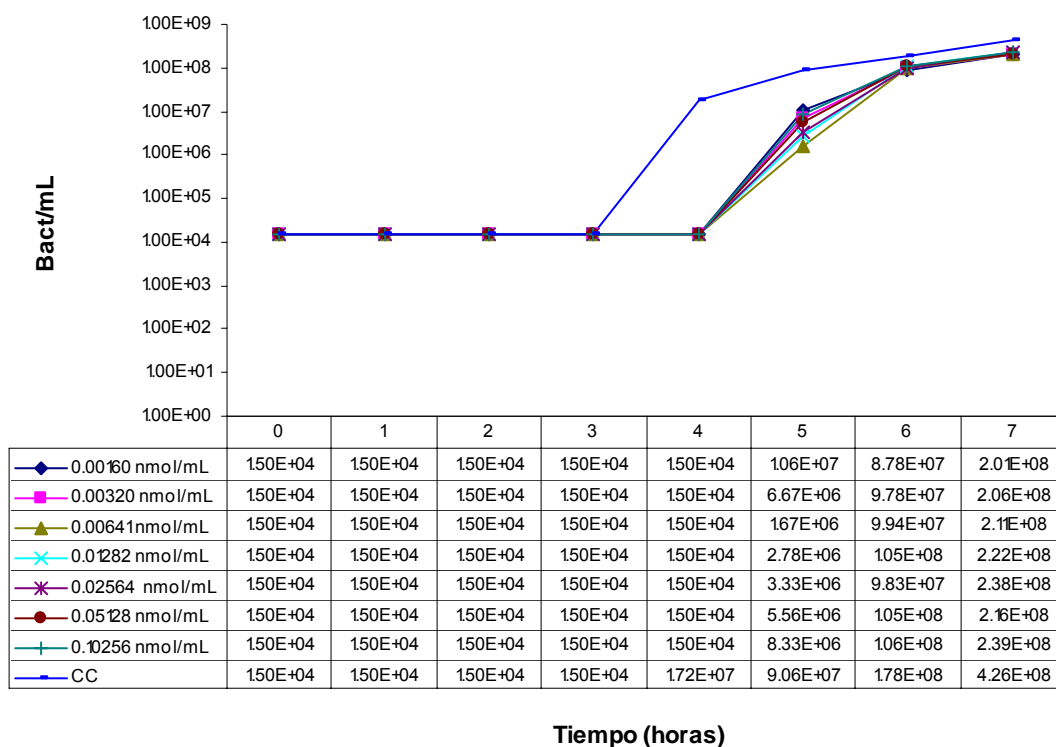


Gráfica 7. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *S. Typhi*.

5.2.2.2. Bacterias Gramnegativas expuestas a laherradurina durante 7 h

5.2.2.2.1. *E. coli*

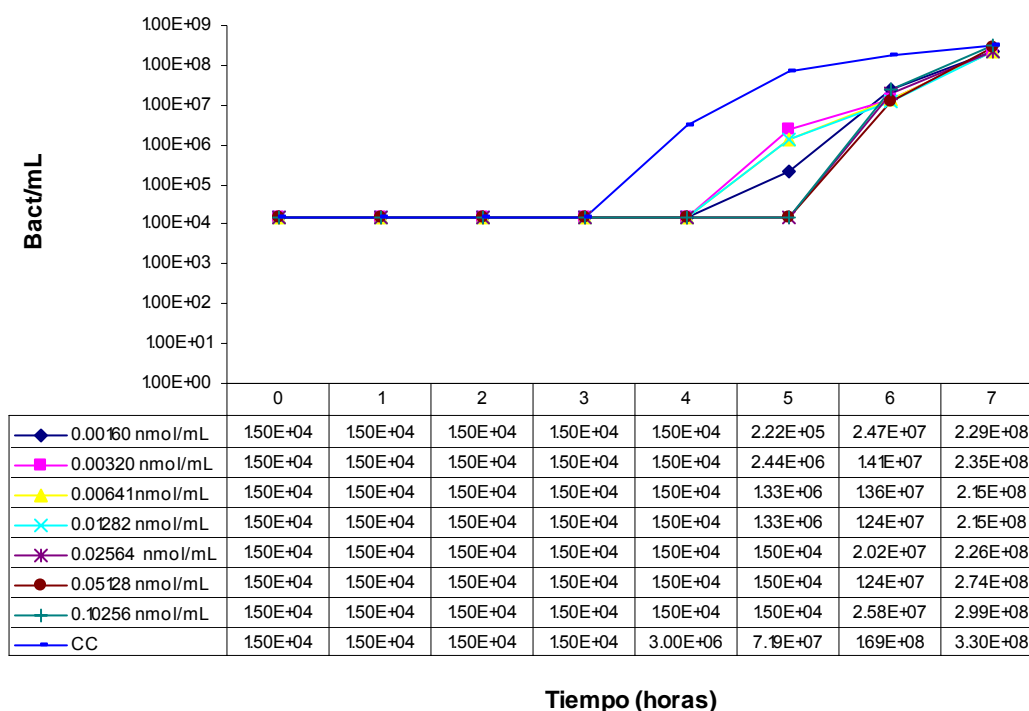
Hasta la tercera hora el número de bacterias del control de *E. coli* y las expuestas a las concentraciones de laherradurina no presentaron variación en su crecimiento, es a partir de la cuarta hora que las diferentes concentraciones de los tratamientos tienen el mayor efecto sobre el número de bact/mL, en las horas subsiguientes el efecto va disminuyendo (Gráfica 8). Todos los tratamientos siguieron el mismo patrón de crecimiento independientemente a la concentración ensayada.



Gráfica 8. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de *E. coli*.

5.2.2.2.2. *P. aeruginosa*

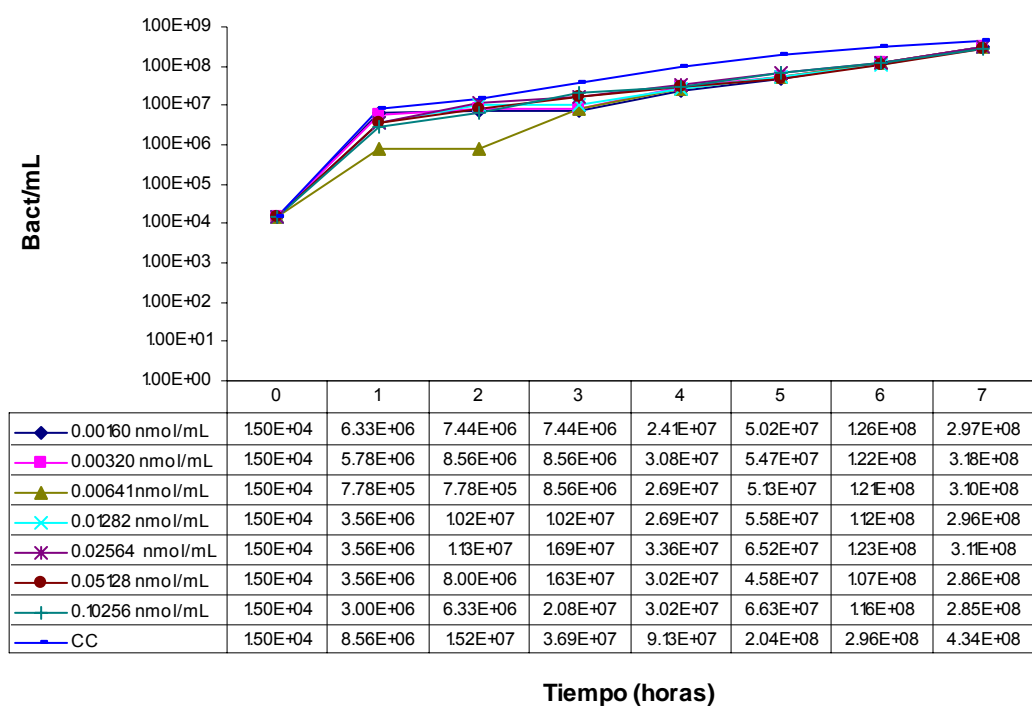
El número de bacterias del control y las expuestas a las concentraciones de laherradurina hasta la tercera hora no presentan variación. El efecto de laherradurina se observó en la cuarta hora con todas las concentraciones, en la quinta hora las concentraciones mayores son las que tuvieron efecto sobre el crecimiento poblacional de *P. aeruginosa*. En la sexta hora al igual que en la cuarta todas las concentraciones ensayadas tienen prácticamente el mismo efecto, pero en la séptima hora el número de bact/mL es prácticamente el mismo (Gráfica 9).



Gráfica 9. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de *P. aeruginosa*.

5.2.2.2.3. S. Typhi

El crecimiento de las bacterias del control de S. Typhi inició en la primera hora al igual que los tratamientos, excepto con la concentración de 0.00641 nmol/mL. En la segunda y sexta horas no se observó una diferencia significativa entre el número de bact/mL del control y los ensayos, excepto en la segunda hora con la concentración de 0.00641 nmol/mL (Gráfica 10).

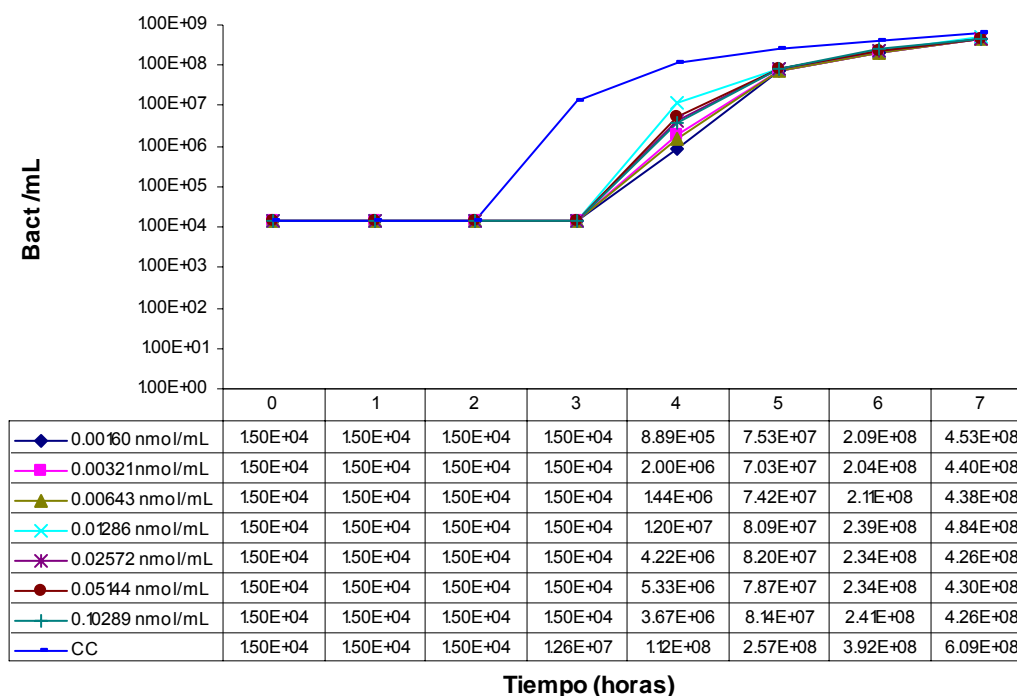


Gráfica 10. Efecto de la serravalina sobre el crecimiento poblacional de S. Typhi.

5.2.2.3. Bacterias Grampositivas expuestas a rollinistatina-2 durante 7 h

5.2.2.3.1. *B. subtilis*

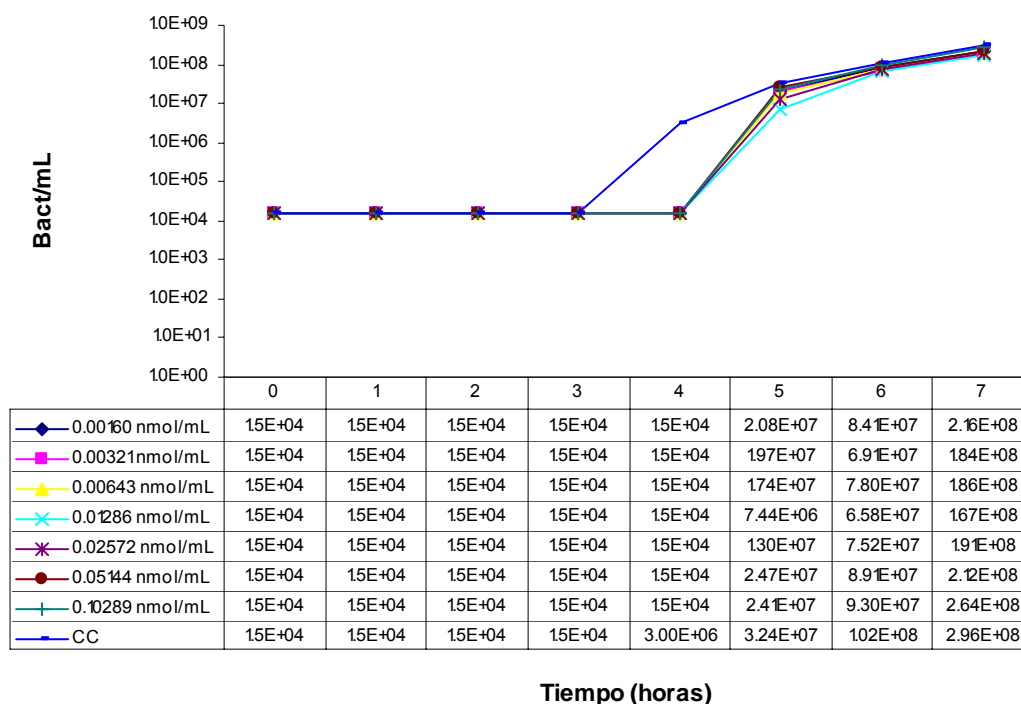
El número de bacterias del control aumentó a partir de la segunda hora. El mayor efecto de la rolliniastatina-2 se observó a partir de la tercera hora de exposición con todas las concentraciones. Entre la cuarta y sexta horas prácticamente todas las concentraciones tienen el mismo efecto. En la séptima hora no hay diferencia entre los tratamientos y el control (Gráfica 11).



Gráfica 11. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *B. subtilis*.

5.2.2.3.2. *S. aureus*

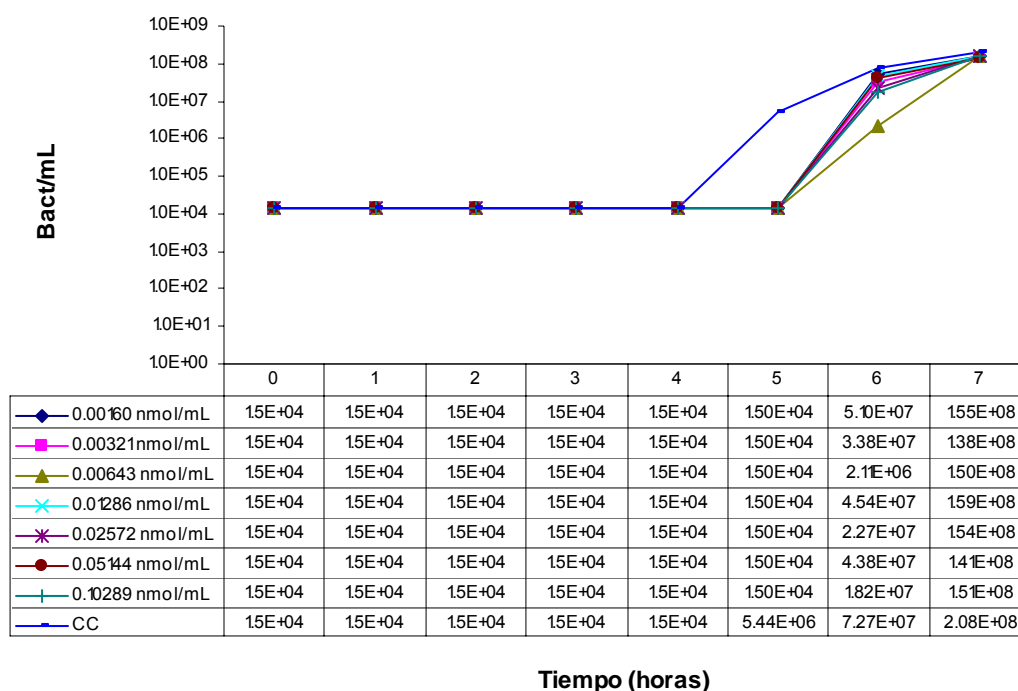
El número de bacterias del control y las expuestas a las concentraciones de rolliniastatina-2 hasta la hora tres no presentan variación. El mayor efecto se observó en la cuarta hora de exposición con todas las concentraciones. En la quinta hora algunas de las concentraciones de la ACG tuvieron una ligera actividad pero en la sexta y séptima hora el efecto fue muy parecido. El comportamiento en el crecimiento de *S. aureus* con las diferentes concentraciones es bastante semejante al del control, excepto en la cuarta hora (Gráfica 12).



Gráfica 12. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *S. aureus*.

5.2.2.3.3. *S. epidermidis*

La cantidad de bacterias del control y los tratamientos hasta la cuarta hora no presentaron variación. En la quinta hora se observó la acción de todas las concentraciones empleadas; en la sexta y séptima el efecto de la rolliniastatina-2 fue muy ligero, excepto en la sexta hora con la concentración de 0.0643 nmol/mL (4 ng/mL) (Gráfica 13).

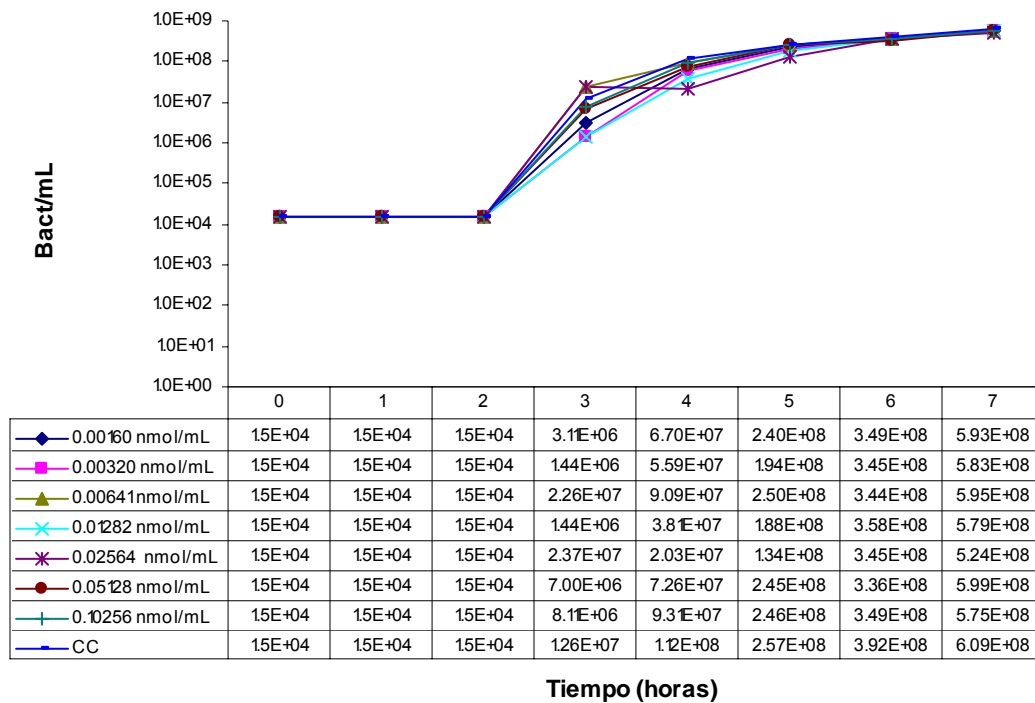


Gráfica 13. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *S. epidermidis*.

5.2.2.4. Bacterias Grampositivas expuestas a laherradurina durante 7 h

5.2.2.4.1. *B. subtilis*

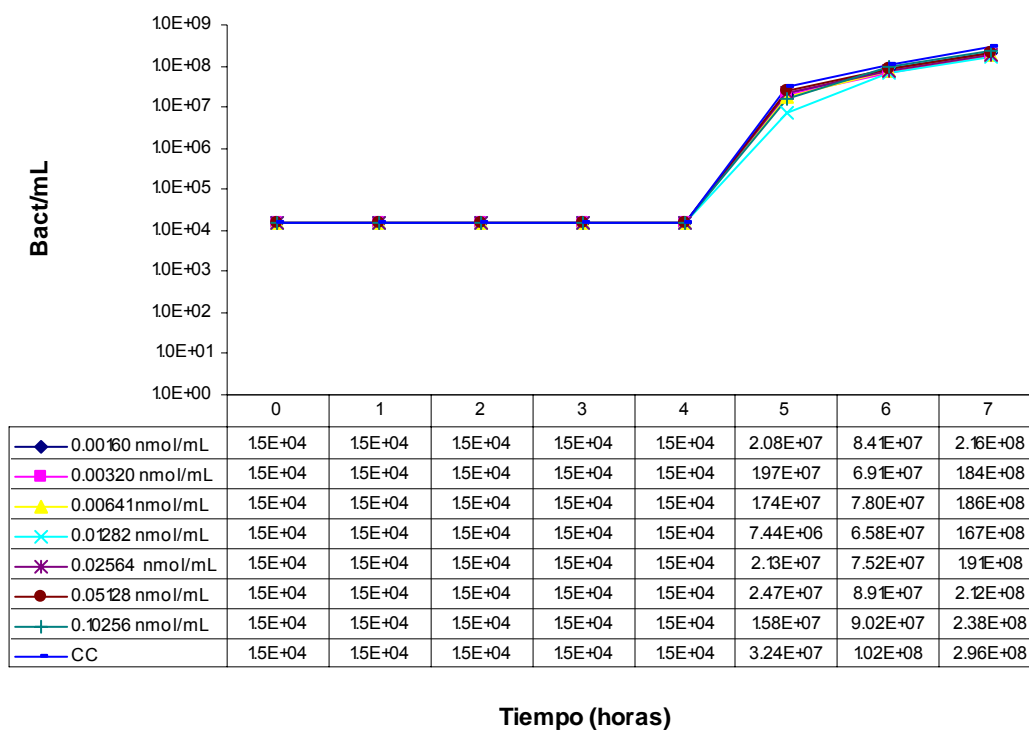
Laherradurina prácticamente no tuvo efecto sobre el crecimiento de esta bacteria ya que tanto el control como las diferentes concentraciones se comportaron de manera semejante (Gráfica 14). Sólo en la tercera hora se observó un ligero efecto de esta ACG con las concentraciones menores.



Gráfica 14. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de *B. subtilis*.

5.2.2.4.2. *S. aureus*

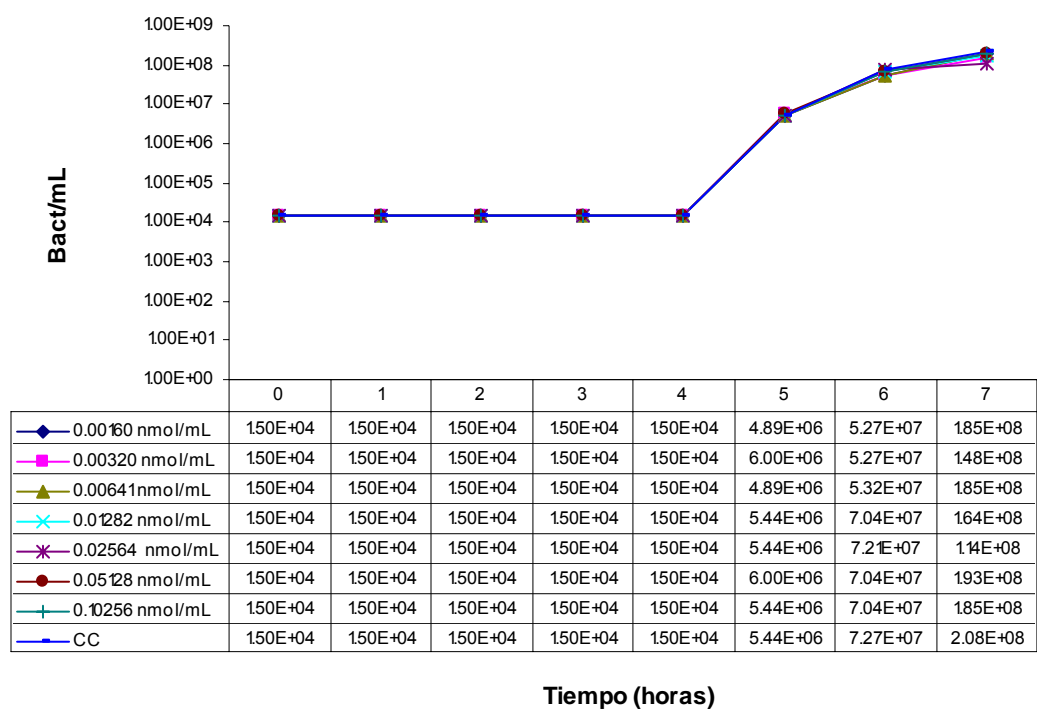
La cantidad de bacterias del control y las expuestas a las concentraciones de laherradurina no presentaron variación con relación al control. En la quinta hora sólo la concentración de 0.01282 nmol/mL (16 ng/mL) tuvo un ligero efecto sobre *S. aureus* (Gráfica 15).



Gráfica 15. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de *S. aureus*.

5.2.2.4.3. *S. epidermidis*

El número de bacterias del control y las expuestas a las concentraciones de laherradurina no presentaron variación. En la séptima hora se apreció una ligerísima actividad de la ACG (Gráfica 16).



Gráfica 16. Efecto de laherradurina sobre el crecimiento poblacional de *S. epidermidis*.

5.2.2.5. Inhibición del crecimiento a la séptima hora

Para calcular y comparar los porcentajes de disminución del crecimiento de cada cepa bacteriana se tomaron los valores del crecimiento bacteriano del control de cada bacteria a la séptima hora (cuando la curva control muestra sus mayores valores).

Bacterias Gramnegativas

El análisis de varianza (ANDEVA) de ambas ACG (Anexo 5) para cada bacteria señaló como más sensible a *E. coli* frente a laherradurina ($P= 0.000$) con porcentajes de inhibición comprendidos en un rango de 43.86-52.87%, mientras que *S. Typhi* es más sensible a la rolliniastatina-2 ($P=0.0018$) (Anexo 5) con porcentajes de inhibición de 27.90-51.45%. *P. aeruginosa* es igualmente sensible a rolliniastatina-2 y laherradurina con valores de 25.11-33.03% y 9.27-34.72% respectivamente ($P= 0.261$) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Actividad inhibitoria (%) de las ACG sobre bacterias Gramnegativas

Concentración		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. Typhi</i>	
nmol/mL R	nmol/mL Lah	R	Lah	R	Lah	R	Lah
0.00160	0.00160	19.19±5.89	52.87±4.31	28.18±4.91	30.50±17.0	50.17±5.68	31.61±1.97
0.00321	0.00320	20.76±16.5	51.57±4.33	31.68±2.10	28.65±8.61	51.45±4.58	26.75±8.72
0.00643	0.00641	15.67±7.74	50.39±5.04	33.03±4.24	34.72±0.29	48.50±19.5	28.67±7.93
0.01286	0.01282	22.85±5.14	47.91±2.96	31.01±11.8	34.72±5.06	38.39±9.60	31.74±6.03
0.02572	0.02564	17.89±6.51	44.13±1.48	25.11±15.8	31.34±5.28	32.25±5.46	28.41±5.98
0.05144	0.05128	24.54±5.26	49.35±24.5	32.02±6.83	17.02±7.16	27.90±3.14	34.17±11.8
0.10289	0.10256	27.55±5.77	43.86±10.9	29.49±5.57	9.27±4.42	30.33±5.16	34.43±13.3

R, rolliniastatina-2; Lah, laherradurina

Bacterias Grampositivas

B. subtilis prácticamente solo fue sensible a rolliniastatina-2 ($P=0.000$) con un rango de inhibición de 20.54%-29.94%; para *S. aureus* la acción de ambas acetogeninas es prácticamente igual (el mayor porcentaje fue de 43.68) ($P=0.166$)

y sobre *S. epidermidis* laherradurina con una concentración de 0.02572 nmol/mL (16 ng/mL) tuvo la mayor actividad inhibitoria (45.06%) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Actividad inhibitoria (%) de las ACG sobre bacterias Grampositivas

Concentración		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
nmol/mL R	nmol/mL Lah	R	Lah	R	Lah	R	Lah
0.00160	0.00160	25.56±1.38	2.56±4.40	27.18±3.30	27.18±3.30	25.83±2.11	11.54±3.87
0.00321	0.00320	27.66 ±2.88	4.38±0.34	38.06±3.74	38.06±3.74	33.81±2.88	29.90±11.8
0.00643	0.00641	28.02±4.35	2.19±3.33	37.31±7.68	37.31±7.68	28.22±1.60	11.22±2.93
0.01286	0.01282	20.54±4.80	4.84±8.44	43.68±3.10	43.68±3.10	23.96±0.46	21.57±6.88
0.02572	0.02564	29.94±0.57	13.38±2.52	35.62±4.07	35.62±4.07	26.09±3.23	45.06±9.77
0.05144	0.05128	29.30±4.41	1.64±1.45	28.50±2.89	28.50±2.89	32.48±10.8	13.92±15.1
0.10289	0.10256	29.94±0.42	5.57±7.22	11.06±9.00	19.69±5.93	27.42±11.1	11.22±9.39

R, rolliniastatina-2; Lah, laherradurina

Ninguna de las bacterias Gramnegativas y Grampositivas presenta una relación dosis dependiente. Al agrupar los datos para buscar la relación de ambas ACG con las bacterias Gramnegativas y Grampositivas, se encontró que los porcentajes de inhibición son más altos en las Gramnegativas (rango de 9.27 a 52.87%) sin que exista diferencia entre las ACG (P=0.26); en tanto que en las Grampositivas (rango de 1.64 a 45.06%) es más fuerte el efecto de la rolliniastatina-2 (P=0.003) (Anexos 6 y 7).

Al comparar cada ACG con ambos tipos de bacterias los datos señalaron que la rolliniastatina-2 no discriminó entre bacterias Grampositivas y Gramnegativas (P=0.59), mientras que laherradurina tuvo un mayor efecto sobre las Gramnegativas (P=0.005).

5.2.2.6. Análisis de resultados

Ambas ACG se ensayaron sobre seis bacterias en siete concentraciones y siete tiempos de exposición con un inóculo de 1.5×10^4 bact/mL. En todos los ensayos en los que se evaluó la actividad con relación al número de bact/mL se observó que la inhibición del crecimiento poblacional bacteriano se detecta en distintos tiempos asociados a una prolongación de la fase lag (de latencia), o a un retraso en el inicio de la fase log de las bacterias Gramnegativas expuestas a las dos ACG, resultado que sugiere que el efecto inhibitorio puede estar asociado con la pared celular.

La actividad de la rolliniastatina-2 sobre las bacterias Gramnegativas en el tiempo en que su inhibición es mayor señala un efecto diferencial dependiente de la bacteria, siendo *S. Typhi* más susceptible que *E. coli* y *P. aeruginosa*, tipo de actividad que ha sido señalada constantemente en la bibliografía para diferentes líneas celulares y mitocondrias de distintos orígenes (Alfonso *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2003; Schlie *et al.*, 2009).

En las bacterias Grampositivas también la sensibilidad hacia ambas ACG se manifestó a diferentes tiempos, aunque los resultados obtenidos indicaron que no existen grandes diferencias entre el número de bact/mL del control y los tratamientos, excepto *B. subtilis* expuesta a rolliniastatina-2.

Los porcentajes de inhibición a la séptima hora señalaron que todas las bacterias son sensibles a ambas ACG, aunque con valores de inhibición diferentes, así las Gramnegativas fueron las más sensibles a los compuestos. Los resultados obtenidos en este ensayo no mostraron un efecto dependiente de la concentración. También se detectó un efecto diferencial, debido tanto de las bacterias como de la estructura de las ACG, efectos ya señalados para líneas celulares neoplásicas en el artículo de revisión de Schlie *et al.* (2009), por ejemplo la asimitrina (ACG bis THF adyacente) muestra diferentes dosis efectivas medias

según el tipo de línea celular de tumores sólidos empleados y dependiendo de la estructura química tienen diferente actividad sobre un mismo blanco como lo reportaron González-Coloma *et al.* (2002), por ejemplo, sobre la línea celular HeLa rolliniastatina-2 tuvo una DE₅₀ de 4.74 µM mientras que laherradurina presentó una DE₅₀ de 0.74×10^{-2} µM.

En nuestro caso *E. coli* es más sensible a laherradurina (52.87%) seguido de *S. epidermidis* (45.06%) con concentraciones diferentes (0.00160 nmol/mL y 0.025641 nmol/mL), en tanto que *S. Typhi* (51.45%) con 0.00321 nmol/mL a la rolliniastatina-2, las otras bacterias no mostraron diferencias estadísticas significativas entre las ACG, pero sí entre ellas.

El análisis estadístico de modelos ajustados señaló que de las dos ACG ensayadas, únicamente la rolliniastatina-2 marca diferencias entre bacterias Gramnegativas y Grampositivas siendo mayor el porcentaje de inhibición sobre las tres Gramnegativas; así mismo al comparar el efecto de una sola ACG sobre ambos tipos de bacterias encontramos que sólo laherradurina es más activa sobre bacterias Gramnegativas. Desde luego que esta agrupación deberá corroborarse con otras bacterias.

Estos resultados sugieren que, las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Grampositivas y Gramnegativas y las estructuras de las ACG tengan un papel importante con relación a los porcentajes de inhibición obtenidos.

5.2.2.7. Conclusiones

-La rolliniastatina-2 y laherradurina tuvieron una actividad inhibitoria sobre todas las bacterias ensayadas.

-La actividad de las ACG está relacionada, en la mayoría de los casos, con el retraso del inicio de la fase log del crecimiento de cada bacteria.

-Los mayores porcentajes de inhibición a la séptima hora con ambas ACG en las seis bacterias se produjeron con concentraciones diferentes.

-En la séptima hora de exposición los mayores porcentajes de inhibición están dados por laherradurina frente a *E. coli* (52.87%, 0.00160 nmol/mL=1 ng/mL) y *S. epidermidis* (45.06%, 0.02564 nmol/mL) y por la rolliniastatina-2 frente a *S. Typhi* (51.45%, 0.00321 nmol/mL=2 ng/mL).

-El efecto de ambas ACG sobre las bacterias Grampositivas es menor con relación al observado en las Gramnegativas.

-Existe un efecto diferencial dependiente de las bacterias y de las bacterias y las estructuras de las ACG.

5.3. Susceptibilidad de las bacterias libres de pared

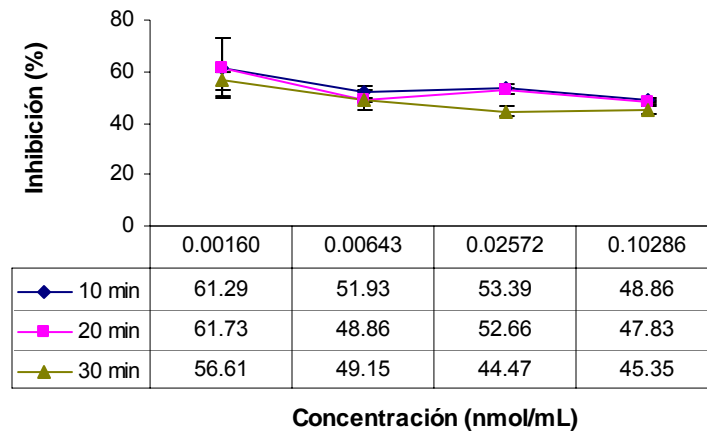
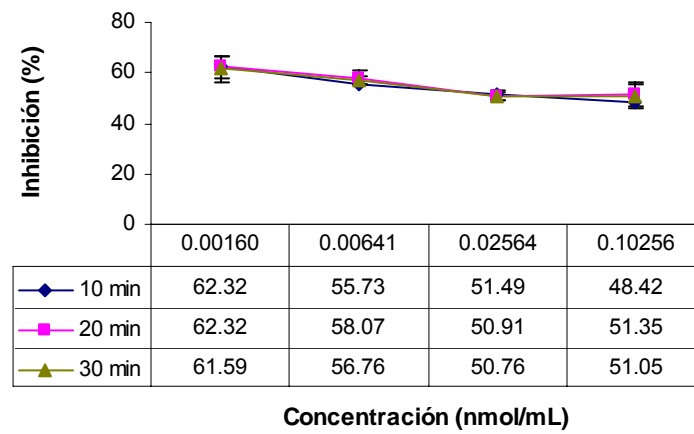
El conocimiento que se tiene sobre las barreras que cruzan las ACG en los diversos sistemas biológicos es escaso, por ejemplo, no se encontró un estudio que relacione membrana plasmática-mitocondria-complejo I de un mismo tipo celular.

En nuestros resultados del efecto sobre el crecimiento de bacterias completas una de las ACG (rolliniastatina-2) se comportó de manera distinta en bacterias Gramnegativas y Grampositivas, mientras que laherradurina al parecer no tiene el mismo efecto general en ellas; estas diferencias llevaron a considerar el papel de la pared celular y de las membranas como barreras selectivas, obteniendo esferoplastos de las bacterias Gramnegativas y protoplastos de las Grampositivas para permitir la exposición de las membranas citoplásmicas a la acción de las ACG. Para ello se ensayaron concentraciones de 0.00160-0.10289 nmol/mL (rolliniastatina-2) y 0.00160-0.10256 nmol/mL (laherradurina) que corresponden a concentraciones de 1 a 64 ng/mL.

5.3.1. Efecto de las ACG en esferoplastos de bacterias Gramnegativas

E. coli

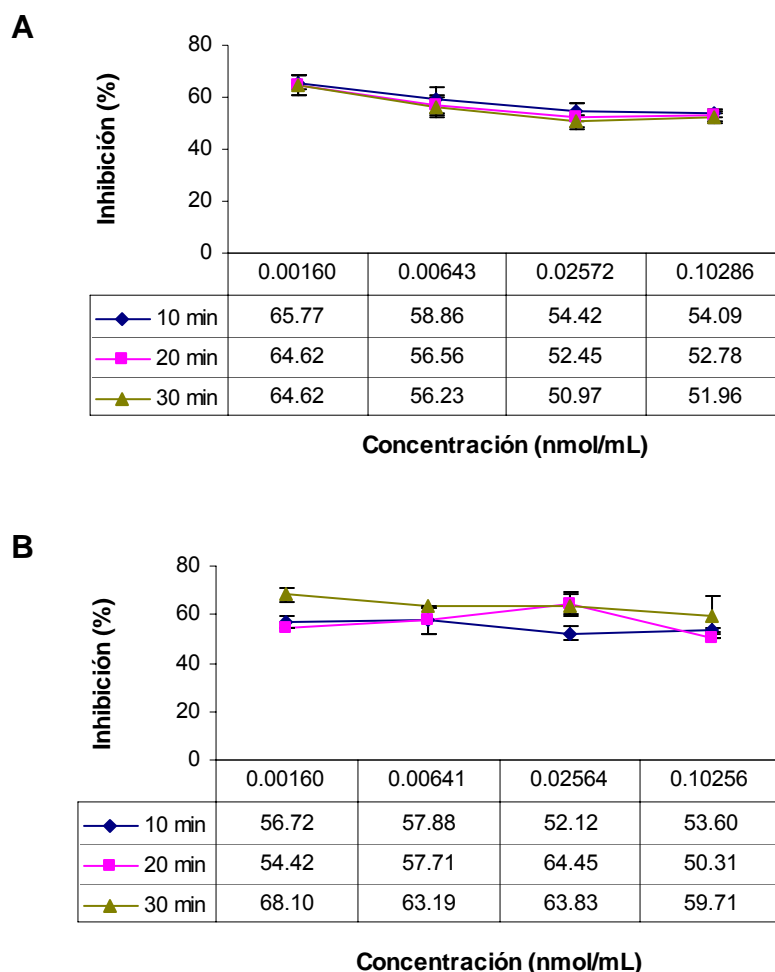
La mayor actividad de la rolliniastatina-2 y de laherradurina se detectó a los 10 minutos de exposición en estos esferoplastos (Gráfica 17), alcanzando su máximo porcentaje de inhibición (61.29 y 62.32% respectivamente) con la concentración más baja (0.00160 nmol/mL); con la rolliniastatina-2 no se percibió más que un ligero decremento con relación a la concentración en los tres tiempos analizados y también una ligera disminución de la inhibición a los 30 minutos, mientras que con laherradurina el porcentaje de inhibición disminuyó ligeramente con el tiempo de exposición, por lo que la actividad fue prácticamente la misma durante todo el ensayo.

A**B**

Gráfica 17. Efecto de las acetogeninas en esferoplastos de *E. coli*. A, rolliniastatina-2; B, laherradurina. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto y corresponde al promedio de dos repeticiones.

P. aeruginosa

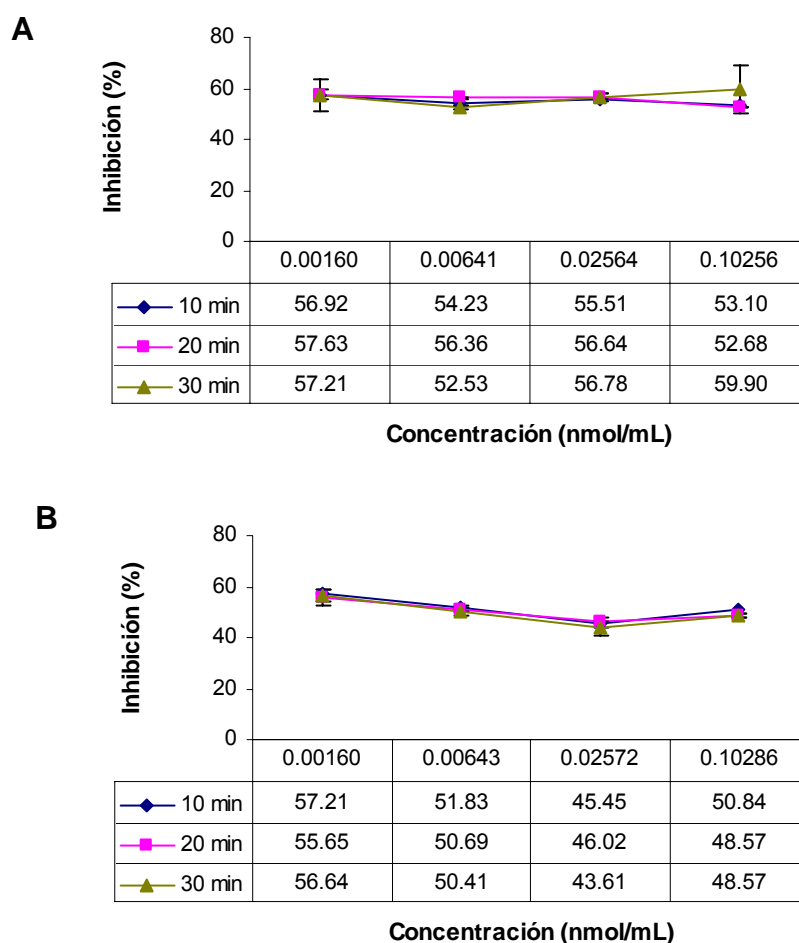
Con esferoplastos de *P. aeruginosa* la mayor acción de la rolliniastatina-2 también se detectó a los 10 minutos de exposición (65.77% con 0.00160 nmol/mL), para después disminuir ligeramente con la concentración, esta tendencia se mantuvo en todo el experimento. La laherradurina alcanza su máxima actividad inhibitoria a los 30 minutos (68%, 0.00160 nmol/mL), aunque tampoco las concentraciones ni el tiempo de exposición tienen un efecto significativamente diferente ($P>0.05$) (Gráfica 18).



Gráfica 18. Efecto de las acetogeninas en esferoplastos de *P. aeruginosa*. A, rolliniastatina-2; B, laherradurina. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto y corresponde al promedio de dos repeticiones.

S. Typhi

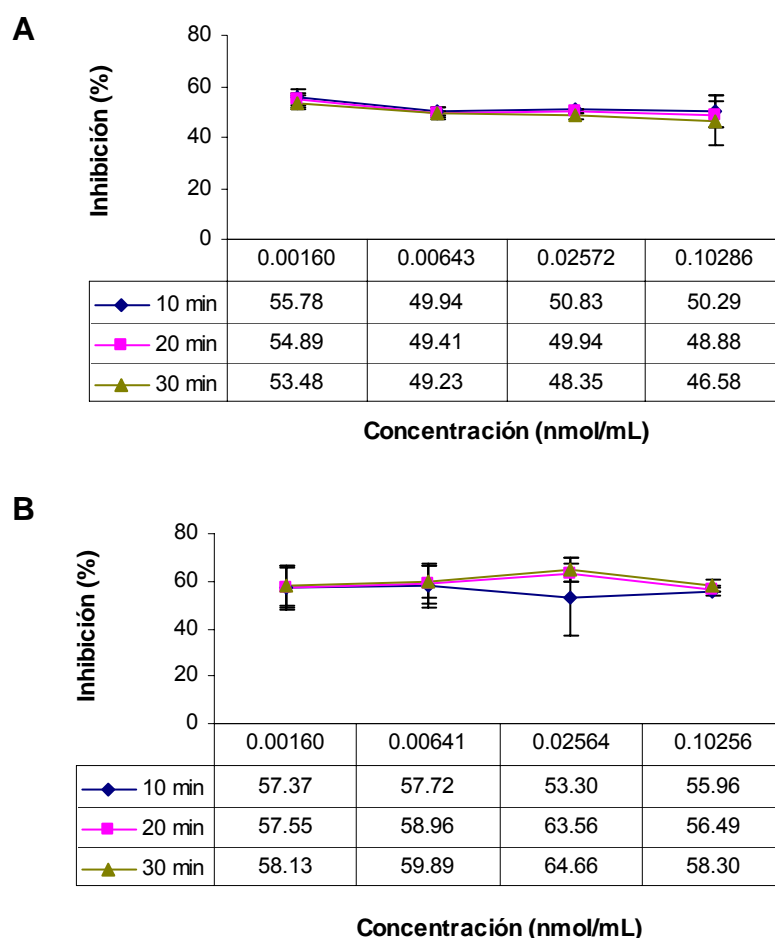
Rolliniastatina-2 y laherradurina inducen un efecto muy semejante en estos esferoplastos, con ambas ACG de nuevo la mayor actividad se detecta a los 10 minutos de exposición, alcanzando en ambos casos 57% con 1ng/mL, disminuyendo ligeramente con las concentraciones mayores, esta tendencia se mantiene en todo el experimento; con laherradurina no hay diferencias significativas con la concentración ni con el tiempo de exposición ($P>0.05$) (Gráfica 19).



Gráfica 19. Efecto de las acetogeninas en esferoplastos de *S. Typhi*. A, rolliniastatina-2; B, laherradurina. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto y corresponde al promedio de dos repeticiones.

5.3.2. Efecto de las ACG en protoplastos de bacterias Grampositivas *B. subtilis*

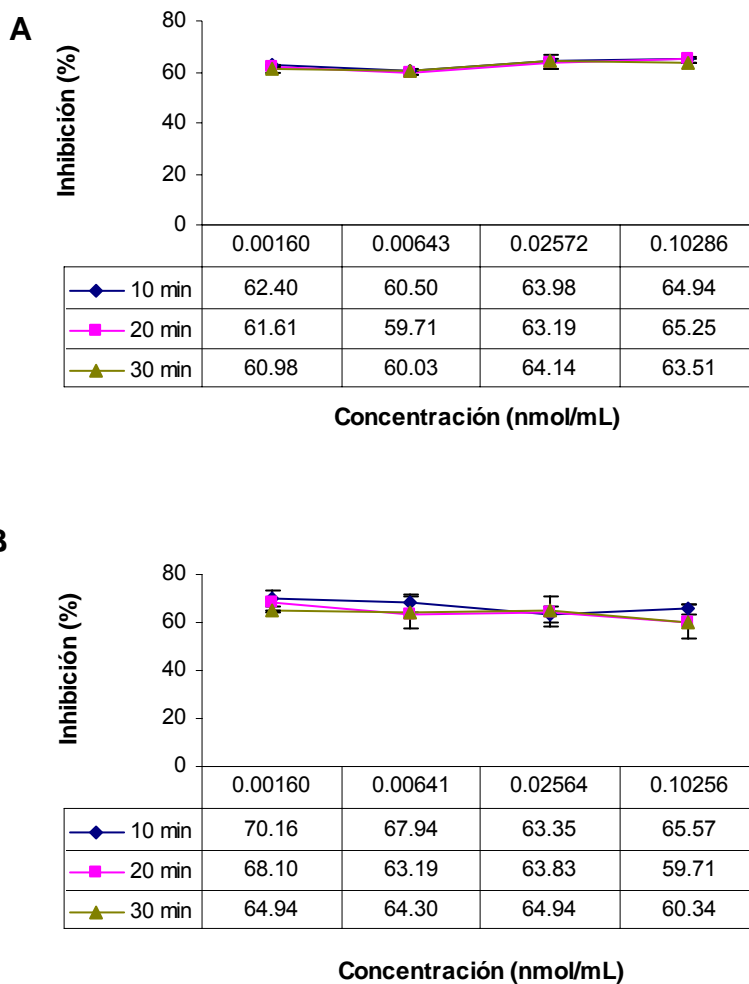
Con los protoplastos de *B. subtilis* la mayor actividad de la rolliniastatina-2 se detecta en los primeros 10 minutos con un máximo de inhibición de 55.78% con 0.00160 nmol/mL, para disminuir ligeramente conforme se incrementa la concentración, el tiempo de exposición no tiene ningún efecto; mientras que laherradurina produce una mayor inhibición a los 30 minutos de exposición (65%) (Gráfica 20). El efecto inhibitorio es semejante durante el experimento ($P>0.05$).



Gráfica 20. Efecto de las acetogeninas en protoplastos de *B. subtilis*. A, rolliniastatina-2; B, laherradurina. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto y corresponde al promedio de dos repeticiones.

S. aureus

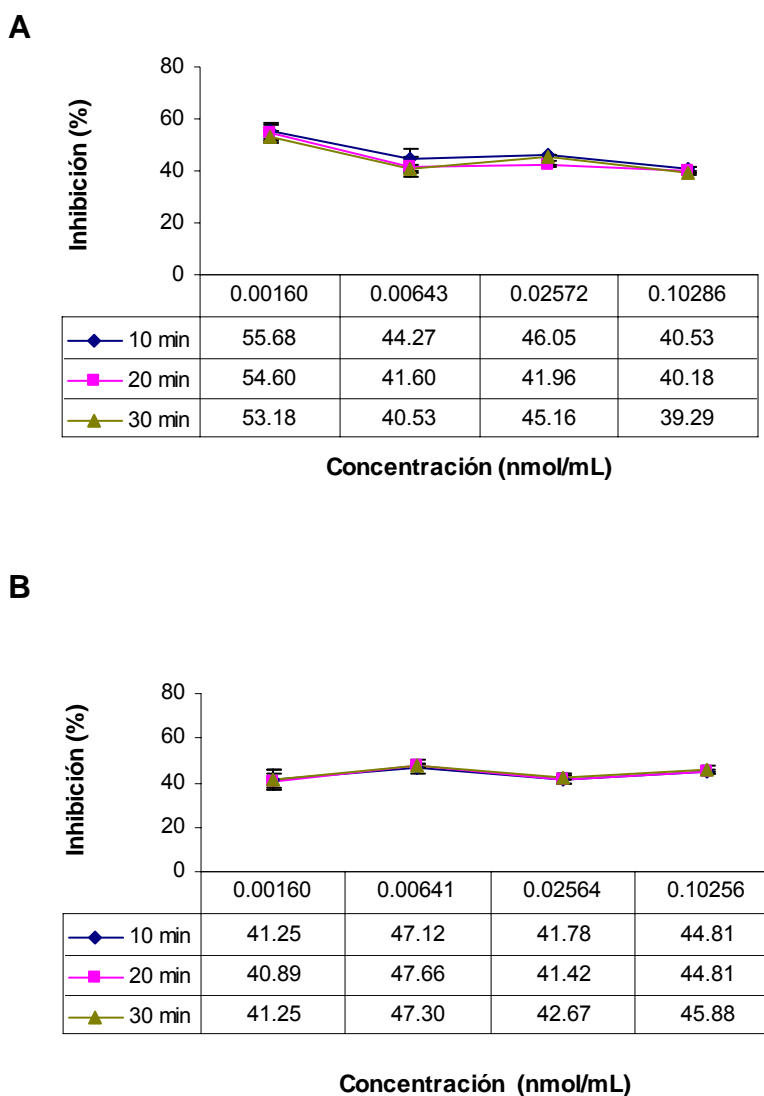
El mayor efecto de rolliniastatina-2 y laherradurina también se detectó a los 10 minutos (0.00160 nmol/mL, 62.40% y 70.16% respectivamente) sin embargo no existe tiempo dependencia con ninguna de las ACG ($P>0.05$) (Gráfica 21).



Gráfica 21. Efecto de las acetogeninas en protoplastos de *S. aureus*. A, Rolliniastatina-2; B, laherradurina. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto y corresponde al promedio de dos repeticiones

S. epidermidis

La rolliniastatina-2 presentó su mayor efecto inhibitorio a los 10 minutos de exposición (0.00160 nmol/mL, 55.68%) para después tener un ligero decremento; la mayor actividad de laherradurina en todos los tiempos se produjo con 0.00641 nmol/mL (47.12-47.66%) (Gráfica 22).



Gráfica 22. Efecto de las acetogeninas en protoplastos de *S. epidermidis*. A, rolliniastatina-2; B, laherradurina. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto y corresponde al promedio de dos repeticiones.

5.3.3. Análisis de resultados

En los esferoplastos y protoplastos, como ya se señaló, el efecto de las ACG también fue independiente de las concentraciones empleadas y del tiempo de exposición, tal como sucedió con las bacterias con pared celular. Al eliminar la pared celular los porcentajes de inhibición producidos por ambas ACG se incrementaron, por ejemplo, en las bacterias Gramnegativas *S. Typhi* 10.6% y *E. coli* 33.6% y entre las Grampositivas *S. epidermidis* 17.5% y en *B. subtilis* 54%, señalando a la pared celular como una barrera para la actividad de éstas; tomando incluso en consideración que el número de esferoplastos es 1000 veces mayor que en el ensayo de las bacterias completas a las siete horas y con respecto a las bacterias completas evaluadas a las 18 horas las concentraciones son 1000 veces menores.

Los mayores valores de inhibición se alcanzaron siempre con las concentraciones más bajas de ambas ACG (0.00160 nmol/mL); este efecto de la menor concentración fue señalado por Teuber (1969) con polimixina B sobre *Proteus mirabilis* resistentes al antibiótico, cuando la bacteria fue convertida en esferoplasto las dosis bajas del compuesto fueron las que tuvieron mayor actividad.

Tanto en esferoplastos como en protoplastos de cada bacteria, el análisis estadístico de ANDEVA y de las muestras pareadas a los 10 minutos de exposición no revela diferencias significativas en la actividad de las ACG, salvo con *S. Typhi* en que la actividad de laherradurina es ligeramente mayor ($P=0.050$) y en *S. aureus* ($P=0.049$) (Anexo 8).

Sin embargo, entre los esferoplastos, *P. aureuginosa* fue más sensible a la rolliniastatina-2 ($P=0.000$) en tanto que laherradurina impactó de igual manera a los tres tipos de esferoplastos ($P>0.05$). Entre los protoplastos, los de *S. aureus* fueron los más sensibles a las dos ACG. Podemos generalizar que las ACG tienen actividad en las seis bacterias libres de pared empleadas en este ensayo.

El incremento en la inhibición que produjeron la rolliniastatina-2 y laherradurina sobre las bacterias libres de pared puso en evidencia que las membranas citoplasmáticas de las bacterias Gramnegativas y Grampositivas son sensibles a su acción.

Al contrastar estos resultados con las bacterias respectivas (cuya actividad empezó cuando muy temprano en la primera hora) a las 7 horas de exposición se encontraron diferencias importantes (Anexo 9): 1) Los porcentajes de inhibición se incrementaron entre 10 y 54%; 2) El porcentaje de inhibición varió tanto entre bacterias como entre ACG y 3) Existió un efecto tipo barrera de la pared celular en todas las bacterias, por ejemplo, en *E. coli* el mayor incremento de inhibición se da con rolliniastatina-2 (de 27.55 a 61.73%) hay un incremento del 34.18%, lo que significó que esta ACG no cruzó tan fácilmente la pared celular como laherradurina (de 52.87 a 62.32%); también en *S. Typhi* y *B. subtilis* la pared celular parece ser un impedimento para la entrada de laherradurina a la bacteria, ya que al eliminarla el porcentaje de inhibición se incrementa de 34.43% a 57.63% en la primera y de 13.38% a 58.13% en la segunda; este efecto no fue evidente en *S. epidermidis*.

Los resultados de los esferoplastos fueron semejantes con el del compuesto de origen vegetal netzahualcoyona (quinona triterpénica) que es inactivo en las bacterias Gramnegativas como *E. coli*, pero al eliminar la pared celular el compuesto es activo sobre sus esferoplastos (Moujir *et al.*, 1991).

Estos datos sugieren que la actividad de las ACG sobre las bacterias responde a la pared celular y que la respuesta está más ligada a la especie bacteriana que al tipo de ACG. Sin embargo, laherradurina con una lactona saturada, presentó una actividad ligeramente mayor que la rolliniastatina-2 cuya lactona es insaturada, pudiendo atribuirse estas diferencias al grado de saturación de la lactona y a la posición de uno de los grupos hidroxilo en la estructura sin que nosotros podamos afirmar cual es la parte de la estructura que está contribuyendo

a la actividad. Los resultados sugieren (como en otros sistemas biológicos) que el sitio blanco de rolliniastatina-2 y laherradurina es el mismo.

La actividad selectiva diferencial de las ACG empleadas en esta investigación ya ha sido señalada en mitocondrias de corazón de bovino (Londerhausen *et al.*, 1982; Ahammadsahib *et al.*, 1993), de insecto (Londerhausen *et al.*, 1982; Ahammadsahib *et al.*, 1993), de hígado de rata (Landolt *et al.*, 1997; Alfonso *et al.*, 1996) o de hígado de pollo (Xu *et al.*, 2003); partículas submitocondriales de corazón de bovino (Tormo *et al.*, 1999a, b, c) y líneas celulares cancerosas (Oberlies *et al.*, 1995; Sinha *et al.*, 1999; Raynaud *et al.*, 1999; Chávez y Mata, 1999).

5.3.4. Conclusiones

- La actividad de las ACG se incrementa en las bacterias sin pared celular.

- El porcentaje de inhibición es variable entre los esferoplastos y protoplastos y las ACG.

- Los esferoplastos de *E. coli* y *S. Typhi* responden a las ACG de manera contrastante a la respuesta inhibitoria de las bacterias completas.

5.4. Efecto de las acetogeninas sobre el complejo I

Está ampliamente documentado que el blanco de acción de las ACG es el complejo I, principalmente sobre PSM de corazón de bovino empleando el ensayo de la NADH:ubiquinona óxido-reductasa (Degli *et al.*, 1994; Tormo *et al.*, 1999b; Tormo *et al.*, 2001) y NADH oxidasa (Tormo *et al.*, 2003; Barrachina *et al.*, 2004), en estos modelos la rolliniastatina-2 y laherradurina han sido descritas como ACG muy potentes, aunque laherradurina está escasamente documentada.

Para determinar si la actividad de las ACG está relacionada con el complejo I bacteriano, se tomaron en consideración tanto los datos obtenidos con bacterias completas (nmol/mL) [*E. coli* es la más sensible a laherradurina (52.87%) y *S. Typhi* a la rolliniastatina-2 (51.45%)] así como los obtenidos con sus respectivos esferoplastos en que la respuesta de las dos bacterias y las dos ACG fue contrastante, es decir, al eliminar la pared celular de *E. coli* mostró un mayor porcentaje de inhibición con rolliniastatina-2 (27.55% a 61.73%) que con laherradurina (52.87% a 62.32%) y *S. Typhi* (con rolliniastatina-2: 51.45%-57.21% y laherradurina: 34.43-57.63%) lo inverso y dado que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de las bacterias libres de pared, se consideró probar el efecto de las ACG sobre el complejo I de *E. coli* y *S. Typhi*.

Para este análisis se ensayaron seis concentraciones de ambas ACG (0.0016, 0.016, 0.16, 1.6, 16 y 160 nM) empleando como control la rotenona en las mismas concentraciones sobre las membranas de *E. coli* y *S. Typhi* obtenidas según los métodos de Padilla *et al.* (2002), Kaback y Stadtman (1966) y Minai-Tehrani *et al.* (2002) con modificaciones menores. La actividad de la NADH:ubiquinona óxido-reductasa (EC 1.6.5.3) o complejo I de la cadena respiratoria se determinó por el método de Grivennikova *et al.* (2001). Debido a la insolubilidad del aceptor natural, la ubiquinona, se utilizó el análogo decilubiquinona (DB) o coenzima Q₂.

5.4.1. *E. coli*

Los datos señalaron un efecto dependiente de la concentración de ambos compuestos obteniendo los valores más altos con laherradurina (61-74%) e incluso superiores a la rotenona (6-50%), aunque la inhibición del complejo I es menor con la rolliniastatina-2 tiene un rango de inhibición de 3-56% y ligeramente superior al control de rotenona en las concentraciones de 0.0016 a 0.16 nmol/mL (24%, 44% y 56% respectivamente) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Efecto de la rolliniastatina-2 y laherradurina sobre el complejo I de *E. coli*¹

Concentración		Rolliniastatina-2	Laherradurina	Rotenona
nM	nmol/mL			
0.0016	0.0000016	3 ± 5	61 ± 8	6 ± 5
0.016	0.000016	7 ± 12	66 ± 1	19 ± 16
0.16	0.00016	17 ± 15	71 ± 1	22 ± 18
1.6	0.0016	24 ± 7	73 ± 6	22 ± 18
16	0.016	44 ± 4	73 ± 8	40 ± 15
160	0.16	56 ± 12	74 ± 1	50 ± 6

¹ Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de tres repeticiones, la rotenona fue el control positivo.

La inhibición de la NADH:DB óxido-reductasa por laherradurina en las membranas de *E. coli* es muy alta, 24% superior a la rotenona con la concentración más elevada (0.16 nmol/mL) incluso 55% más potente con la concentración de 0.0000016 nmol/mL. Con la rolliniastatina-2 sólo las concentraciones mayores fueron ligeramente superiores al control, 6% en el mejor de los casos con la mayor concentración (0.16 nmol/mL).

5.4.2. S. Typhi

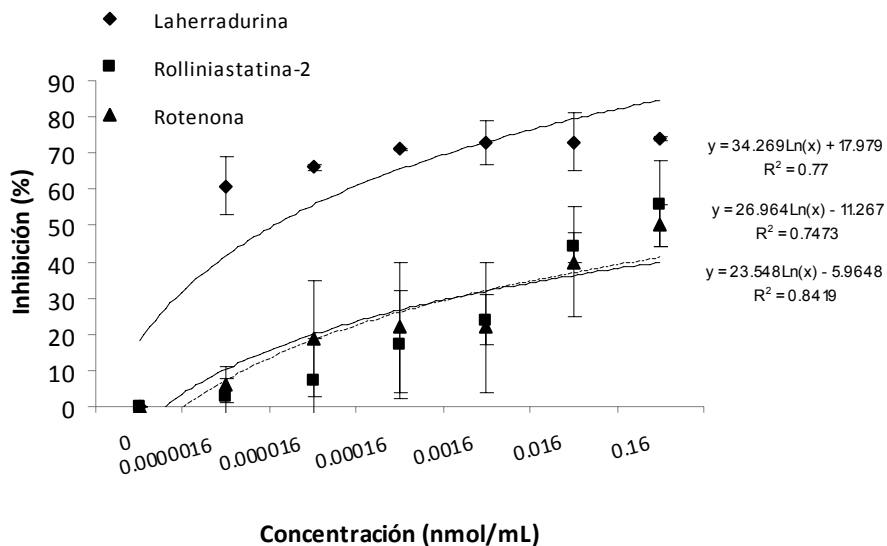
Los resultados del porcentaje de inhibición al ensayar diferentes concentraciones de las ACG sobre el complejo I de S. Typhi se muestran en el cuadro 17. También hubo un efecto dosis dependiente con ambas ACG, la actividad de la rolliniastatina-2 es prácticamente igual a la de la rotenona exceptuando la mayor concentración (0.16 nmol/mL); a diferencia de la herradura cuyo efecto siempre fue menor al del control hasta un 6%. Aunque hay inhibición de la actividad de la NADH:DB óxido-reductasa por ambas ACG son ligeramente menores a los valores encontrados con la rotenona (Cuadro 17).

Cuadro 17. Efecto de la rolliniastatina-2 y la herradura sobre el complejo I de S. Typhi¹

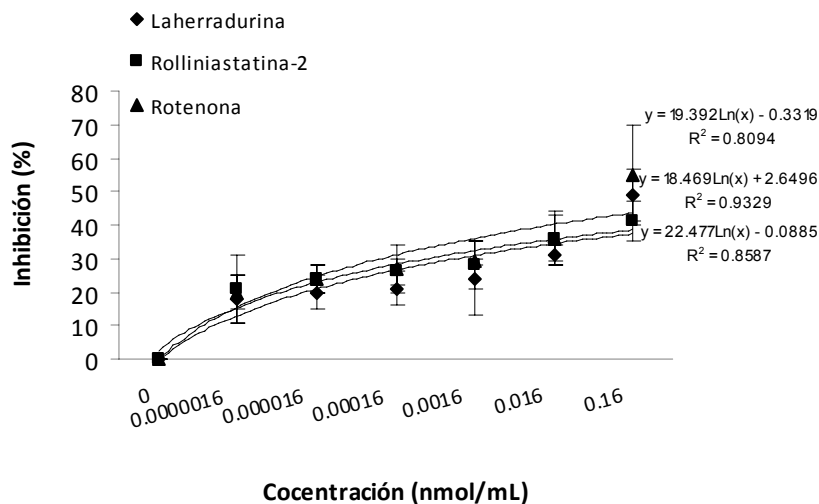
Concentración		Rolliniastatina-2	Laherradura	Rotenona
nM	nmol/mL			
0.0016	0.000016	21±10	18±7	20 ± 5
0.016	0.00016	24±4	20±5	24 ± 4
0.16	0.0016	26±4	21±5	27 ± 7
1.6	0.016	28±7	24±11	29 ± 1
16	0.16	36±7	31±3	36 ± 8
160	0.16	41 ± 6	49 ± 8	55 ± 15

¹ Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de tres repeticiones, la rotenona fue el control positivo.

El efecto inhibitorio de la rolliniastatina-2 y la herradura se determinó mediante el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) que de acuerdo a Arias (1999) mide la concentración molar que produce un efecto inhibitorio y que es capaz de producir el 50% de la inhibición máxima posible (Gráficas 23 y 24).



Gráfica 23. Actividad de las acetogeninas sobre el complejo I de *E. coli*. Rolliniastatina-2, ■; laherradurina, ◆; rotenona, ▲. Los resultados son el promedio de tres repeticiones.



Gráfica 24. Actividad de las acetogeninas sobre el complejo I de *S. Typhi*. Rolliniastatina-2, ■; laherradurina, ◆; rotenona, ▲. Los resultados son el promedio de tres repeticiones.

En *E. coli* las CI_{50} sobre la NADH:DB óxido-reductasa de laherradurina es 4.28 más que la de rotenona mientras que la rolliniastatina-2 muestra una potencia similar a la rotenona (1.1 más). En tanto que con *S. Typhi* la actividad de la rotenona es ligeramente superior a las dos ACG encontrando una escasa

diferencia entre la rolliniastatina-2 (1.5 veces más) y laherradurina (1.4 veces más) (Cuadro 18).

Cuadro 18. Valores de la CI_{50} obtenidos en el ensayo de inhibición de rolliniastatina-2, laherradurina y rotenona sobre el complejo I bacteriano

Complejo I	CI_{50} nmol/mL [†]		
	Rolliniastatina-2	Laherradurina	Rotenona
<i>E. coli</i>	0.0096	0.0025	0.0107
<i>S. Typhi</i>	0.0133	0.0129	0.0092

[†] Los datos se calcularon mediante regresiones logarítmicas del porcentaje de inhibición a los 40 minutos de exposición.

Estos datos constituyen el primer reporte de la acción inhibitoria de laherradurina sobre la actividad de la NADH:DB óxido-reductasa en membranas bacterianas

5.4.3. Análisis de resultados

Los datos de la inhibición de actividad de la NADH:DB óxido-reductasa por la rolliniastatina-2 y laherradurina en el complejo I bacteriano de *E. coli* y *S. Typhi* mostró una actividad mayor de laherradurina, (CI_{50} 0.0025 y 0.0129 nmol/mL respectivamente) y sólo superiores a la rotenona en *E. coli*. En otro modelo, con el complejo I aislado de mitocondrias de corazón de bovino, la potencia inhibitoria de la rolliniastatina-2 ha sido señalada como 20 veces mayor que la rotenona (Ahammadsahib *et al.*, 1993), con partículas submitocondriales de corazón de bovino (Tormo *et al.*, 1999c) obtuvieron una CI_{50} de 0.61 nM valores que muestran una capacidad inhibitoria mayor que la obtenida en las enzimas de estas bacterias.

Las tendencias enzimáticas de nuestros ensayos son comparables y consistentes con las obtenidas de los porcentajes de inhibición encontrados con las bacterias *E. coli* y *S. Typhi*, sin embargo con los esferoplastos de *E. coli* aunque la inhibición producida por la herraadurina es mayor en las concentraciones más bajas no es estadísticamente significativa, por el contrario con los esferoplastos de *S. Typhi* aunque hubieron diferencias significativas entre ambas ACG los porcentajes de inhibición fueron semejantes y la inhibición de la enzima con ambas ACG también.

Es importante señalar que la actividad de las ACG está al parecer limitada principalmente por la pared celular y no por las membranas, esta particularidad depende más del tipo de bacteria ya que en *E. coli* la pared impide más el paso de la rolliniastatina-2 mientras que en *S. Typhi* es lo contrario, y que la actividad de la herraadurina sobre el complejo I de *E. coli* fue mucho mayor que la de la rolliniastatina-2 implicando que esta molécula es la más potente incluso en *S. Typhi*.

5.4.4. Conclusiones

En la bibliografía científica abundan los reportes sobre la actividad antibacteriana de diversos compuestos aislados de plantas pero en escasos estudios se analizan los mecanismos de acción. Por el contrario con las ACG, por su potente actividad, se ha trabajado mayormente sobre líneas celulares cancerosas estudiando el mecanismo de acción sobre el complejo I respiratorio y la relación de la estructura con la actividad, de manera importante también se han convertido en herramientas útiles para el estudio del complejo I de la cadena respiratoria.

Las evaluaciones antibacterianas de estas importantes moléculas son escasas y más aún las que relacionan a las bacterias con pared celular, libres de pared celular y complejo I de bacterias.

Nuestros datos señalaron que las ACG, particularmente la rolliniastatina-2 y la herradura, tienen como filtro principal la pared celular, además de ser la estructura bacteriana que le confiere una selectividad que está en función tanto del tipo de bacteria como de la molécula probada. Los datos de porcentajes de inhibición de la población, así como las CI_{50} corroboran estas aseveraciones.

También podemos señalar que la pared de las bacterias Gramnegativas influye más en la selectividad que la pared de las bacterias Grampositivas.

VI. CONCLUSIONES

Las ACG rolliniastatina-2 y laherradurina aisladas de *A. diversifolia*, ambas tipo bis-THF adyacente, la primera con el anillo γ -lactona insaturado y en la segunda saturado, tuvieron un efecto antiproliferativo sobre las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Typhi*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermidis* con las menores concentraciones ensayadas. A las 18 horas de exposición los mayores porcentajes de inhibición producidos por las dos ACG se observaron en las bacterias Gramnegativas (19 a 40%) con la menor concentración ensayada, 3.21 nmoles/mL de rolliniastatina-2 y 3.20 nmol/mL de laherradurina.

Al realizar el ensayo con bacterias completas a las siete horas de exposición y con concentraciones menores de los compuestos, la bacteria completa más afectada por la rolliniastatina-2 es la Gramnegativa *S. Typhi* (51.45% con 0.00321 nmol/mL) y por laherradurina es *E. coli* (52.87% con 0.00160 nmol/mL), también Gramnegativa.

Las ACG tienen efecto selectivo sobre líneas celulares cancerosas, como el que se observó en esta investigación ya que en términos generales ambas ACG tienen un efecto inhibitorio mayor sobre las bacterias Gramnegativas pero no sobre la misma bacteria. Dicha selectividad aún no ha sido explicada, pero es posible señalar que las ACG utilizadas en este trabajo tienen diferencias estructurales y que las bacterias empleadas son especies diferentes agrupadas por el tipo de pared celular.

Así, al eliminar la pared celular de ambos tipos de bacterias los porcentajes de inhibición fueron superiores al 50% con 0.00160 nmol/mL (1 ng/mL) de cada ACG en los primeros diez minutos de exposición, excepto en *S. epidermidis*, aunque nuevamente el mayor efecto fue producido por ambas ACG sobre los esferoplastos obtenidos de las bacterias Gramnegativas; en los protoplastos de las Grampositivas ambas ACG tuvieron un efecto ligeramente menor, excepto

laherradurina sobre *S. aureus*. El mayor efecto sobre las bacterias libres de pared se puede atribuir al hecho de que ya no existe la barrera que impide la llegada de las ACG al sitio blanco.

Debido a que se ha documentado ampliamente que las ACG tienen actividad sobre el complejo I de partículas submitocondriales de corazón de bovino y dada la homología de este con el complejo I bacteriano resultó importante evaluar el efecto sobre el complejo I de las bacterias empleadas en este trabajo. Por ello para comparar el efecto de las ACG sobre la membrana citoplásmica y el complejo I se obtuvieron fragmentos de membranas de *E. coli* y *S. Typhi*, las que se eligieron por haber sido las más sensibles a ambas ACG con la concentración más baja ensayada.

Al exponer durante 40 minutos los fragmentos de membrana de las dos bacterias a rolliniastatina-2, laherradurina y rotenona (concentraciones de 0.0000016 a 0.16 nmol/mL), el complejo I más afectado fue el de *E. coli* por laherradurina con una CI_{50} de 0.0025 nmol/mL y la rolliniastatina-2 con una CI_{50} de 0.0096 nmol/mL, siendo más activas que la rotenona. El complejo I de *S. Typhi* fue menos sensible a las dos ACG y los valores de las CI_{50} fueron ligeramente mayores al de rotenona.

El efecto de rolliniastatina-2 y laherradurina sobre el complejo I de *E. coli* y *S. Typhi* debe estar relacionado con la disminución de la síntesis de ATP, lo que no es posible aseverar ya que hasta hoy el conocimiento de los procesos de transferencia de energía que se producen en la cadena respiratoria de ambas bacterias es limitado.

Esta investigación constituye el primer reporte conocido que menciona la actividad de acetogeninas sobre bacterias completas, esferoplastos, protoplastos y el complejo I bacteriano, poniendo de manifiesto la diferente susceptibilidad de las especies bacterianas a la rolliniastatina-2 y laherradurina, aportando también las

primeras evidencias de que la pared celular bacteriana constituye una barrera que impide la interacción de estas acetogeninas con su sitio blanco de acción.

VII. LITERATURA CITADA

Abe, M.; Kenmochi, A.; Ichimaru, N.; Hamada, T.; Nishioka, T.; Miyoshi, H. 2004. Essential structural features of acetogenins: role of hydroxy groups adjacent to the bis-THF rings. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 14 (3): 779-782.

Abe, M.; Kubo, A.; Yamamoto, S.; Hatoh, Y.; Murai, M.; Hattori, Y.; Makabe, H.; Nishioka, T.; Miyoshi, H. 2008. Dynamic function of the spacer region of acetogenins in the inhibition of bovine mitochondrial NADH-Ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Biochemistry*. 47 (23): 6260-6266.

Abriouel, H.E., Valdivia, A., Galvez, A., Maqueda, M. 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplast and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4623-4626.

Ahmmadsahib, K. I.; Hollingworth, R. M.; McGovern, J. P.; Hui, Y. H.; McLaughlin, J. L. 1993. Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenins. *Life Sciences*. 53: 1113-1120.

Alali, F. Q.; Rogers, L.; Zhang, Y.; McLughlin, J. L. 1998. Unusual bioactive annonaceous acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. *Tetrahedron*. 54: 5833-5844.

Alali, F. Q.; Liu, X. X.; McLaughlin, J. L. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*. 62: 504-540.

Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2006. Introducción a la biología celular. 2a edición. Editorial Médica Panamericana. España. Pp. 458, 459, 462.

Alfonso, D.; Johnson, H. A.; Colman-Saizarbitoria, T.; Presley, C.P.; McCabe, G. P.; McLaughlin, J. L. 1996. SARs of annonaceous acetogenins in rat liver mitochondria. *Natural Toxins*. 4: 181-188.

Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (Suppl. S1): 5-16.

Andrews, J. M. 2005. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56: 60-76.

Alvarez Colom, O.; Neske, A.; Popich, S.; Bardón, A. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*. 80: 63-67.

Alvarez Colom, O.; Neske, A.; Chaboune, N.; zafra-Polo, M. C.; Bardón, A. 2009. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. *Chemical Biodiversity*. 6 (3): 335-340.

Alves Rodrigues dos Santos Lima, L.; Pinheiro Santos Pimenta, L.; Diamantino Boaventura, M. A. 2009. Two new adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from seeds of *Annona cornifolia*. *Planta Medica*. 75: 80-83.

Anaya Lang, Ana Luisa. 2003. Ecología química. Editorial Plaza y Valdés. México. Pp. 330.

Angulo, A.; Pérez, E.; Meléndez, M.; Sáez, J. 2002. Fitoquímica de Annonaceae del departamento de Córdoba, Colombia. Memoria del VIII congreso Latinoamericano de Botánica. Cartagena de Indias, Colombia. Pp. 349.

Araya, H. 2004. Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. Seeds. *Bulletin of the National Institute of Agro-Environmental Sciences*. 23: 77-149.

Arias, T. D. 1999. Glosario de medicamentos: Desarrollo, evolución y uso. Organización Panamericana de la Salud. Washington, USA. Pp. 44.

Arndt, S.; Emde, U.; Baurle, S.; Friedrich, T.; Grubert, L.; Koert, U. 2001. Quinone-annonaceous acetogenins: Synthesis and complex I inhibition studies of a new class of natural product hybrids. *Chemistry*. 7 (5): 993-1005.

Asano, M.; Hayashi, M.; Umemoto, T.; Tokuda, H. 1985. Ag⁺ sensitive NADH dehydrogenase in the Na⁺-motive respiratory chain of the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49: 2813-2817.

Avilán, L. y F. Leal. 1984. Areas potenciales para el desarrollo de diferentes especies. IV: Anonáceas. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 13 (1-4): 47-59.

Barrachina, I.; Neske, A.; Granell, S.; Bermejo, A.; Chahboune, N.; El Aouad, N.; Alvarez, O.; Bardon, A.; Zafra-Polo, M. C. 2004. Tucumanin, a β -hydroxy- γ -lactone bistetrahydrofuranic acetogenin from *Annona cherimolia*, is a potent inhibitor of mitochondrial Complex I. *Planta Medica*. 70: 866-868.

Barrachina, I.; Royo, I.; Baldoni, H. A.; Chahboune, N.; Suvire, F.; De Pedro, N.; Zafra-Polo, M. C.; Bermejo, A.; El Aouad, N.; Cabedo, N.; Sáez, J.; Tormo, J. R.; Enriz, R. D.; Cortes, D. 2007. New antitumoral acetogenin "Guanacone type" derivatives: Isolation and bioactivity. Molecular dynamics simulation of diacetyl-guanacone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15 (13): 4369-4381.

Bermejo, A.; Figadère, B.; Zafra-Polo, M. C.; Borrachina, I.; Estornell, E.; Cortes, D. 2005. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Products Report* 22: 269-303.

Böttcher, B.; Scheide, D.; Hesterberg, M.; Nagel-Steger, L.; Friedrich, T. 2002. A novel, enzymatically active conformation of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Biological Chemistry*. 277 (20): 17910-17977.

Born, L.; Lieb, F.; Lorentzen, J. P.; Moeschler, H.; Norton, M.; Sollner, R.; Wendisch, D. 1990. The relative configuration of acetogenins isolated from *Annona squamosa*: Annonin 1 (squamocin) and Annonin VI. *Planta medica*. 56: 312-316.

Baccarini-Melandri, A.; Zannoni, D.; Melandri, B. A. 1973. Respiratory sites of energy conservation in membranes from dark *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochim Biophys Acta*. 314: 298-311.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Brenner, F. W.; Villar, R. G.; Angulo, F. J.; Tauxe, R.; Swaminthan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (7): 2465-2467.

Bridg, H. 2000. Micropropagation and determination of the in vivo stability of *Annona cheromilia* Mill. and *Annona muricata*. Akademischen Grades Doctor Rerum Agriculturarm. Humboldt Universität. Zu Berlin. Germany. Pp. 1-30.

Birdsell, D. C. y E. H. Cota-Robles. 1967. Production and ultrastructure of lysozyme and ethylenediaminetetraacetate-lysozyme spheroplasts of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 93 (1): 427-437.

Cabrera Cano, E. F.; Hernández Martínez, E.; Flores, J. S.; Salazar Gómez, C. 2004. Annonaceae de la Península de Yucatán. Taxonomía, florística y etnobotánica. Universidad Autónoma de Yucatán-CONACYT. 63 pp.

Campbell, C. W. and J. Popenoe. 1968. Effect of gibberellic acid on seed dormancy of *Annona diversifolia* Saff. Proceeding of the tropical region American. *Society for Horticultural Science*. 11: 33-36.

Campos, F. R.; Batista, R. L.; Batista, C. L.; Costa, E. V.; Barison, A.; dos Santos, A.; Pinheiro, M. L. B. 2008. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36 (10): 804-806.

Carroll, J.; Shannon, R. J.; Fearnley, I. M.; Walker, J. E.; Hirst, J. 2002. Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I: identification of two new subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 50311-50317.

Cavé, A.; Figaderé, B. Laurens, A.; Cortes, D. 1997. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Products*. 70: 81-288.

Cepleanu, F.; Ohtani, K.; Hamburger, M.; Hostettmann, K.; Gupta, M. P.; Solís, P. 1993. Novel acetogenins from the leaves of *Annona purpurea*. *Helvetica Chimica Acta*. 76 (3): 1379-1388.

Chahboune, N.; Barrachina, I.; Royo, I.; Romero, V.; Sáez, J.; Tormo, J. R.; De Pedro, N.; Estornell, E.; Zafra-Polo, M. C.; Peláez, F.; Cortes, D. 2006. Guanacetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14 (4): 1089-1094.

Chan-Bacab, M. and L. M. Peña-Rodríguez. 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Report*. 18: 674-688.

Chang, F. R.; Wei, J. L.; Teng, C. M.; Wu, Y. C. 1998a. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *Journal Natural Products*. 61 (12): 1457-1461.

Chang, F. R.; Wei, J. L.; Teng, C. M.; Wu, Y. C. 1998b. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Journal Natural Products*. 49 (7): 2015-2018.

Chang, F. R.; Chen, J. L.; Chiu, H. F.; Wu, M. J.; Wu, Y. C. 1998c. Acetogenins from seeds of *Annona recitulata*. *Phytochemistry*. 47 (6): 1057-1061.

Chang, F. R.; Chen, J. -L.; Lin, Ch. -Y.; Chiu, H. -F.; Wu, M. -J.; Wu, Y. -CH. 1999. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. *Phytochemistry*. 51 (7): 883-889.

Chang, F. R.; Chen, C. Y.; Wu, P. H.; Kuo, R. Y.; Chang, C. Y.; Wu, Y. C. 2000. New alkaloids of *Annona purpurea*. *Journal Natural Products*. 63 (6): 746-748.

Chang, F. R.; Liaw, Ch. -Ch.; Lin, Ch. -Y.; Chou, Ch. -J.; Chiu, H. -F.; Wu, Y. -Ch. 2003. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Medica*. 69: 241-246.

Chatrou, L. W.; Rainer, H.; Maas, P. J. M. 2004. Annonaceae (Soursop Family). Smith, N.; Mori, S. A.; Henderson, A.; Stevenson, D. Wm.; Heald, S. V. (Ed.). Flowering plants of the neotropics. Pp. 18-20.

Chavan, M. J.; Shinde, D. B.; Nirmal, S. A. 2006. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. bark. *Natural Product Research*. 20 (8): 754-757.

Chávez, D. and R. Mata. 1998. Purpurediolin and purpurenin, two new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from seeds of *Annona*

purpurea. *Journal of Natural Products*. 61 (5): 580-584.

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

Chávez-Primitivo, E. M.; Marroquín-Andrade, L.; Cedillo-Portugal, E.; Cervera-Backhauss. 1999. Estudio etnobotánico de la ilama (*Annona diversifolia* Saff) en Tejupilco, Estado de México. Memorias del II Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. pp. 118-124.

Cheng, C. Y.; Chang, F. R.; Yen, H. F.; Wu, Y. C. 1998. Amides from stems of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 49 (5): 1443-1447.

Cheng, C. Y.; Chang, F. R.; Chiu, H. F.; Wu, M. J.; Wu, Y. C. 1999. Aromin-, an annonaceous acetogenin from *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 51: 429-433.

Cheng, C. Y.; Chang, F. R.; Pan, W. B.; Wu, Y. C. 2001. Four alkaloids from *Annona chemimola*. *Phytochemistry*. 56 (7): 753-757.

Chih, H. W.; Chiu, H. F.; Tang, K. S.; Chang, F. R.; Wu, Y. C. 2001. Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. *Life Science*. 69: 1321-1331.

Chiu, H. F.; Chich, T. T.; Hsian, Y. M.; Tseng, C. H.; Wu, M. J.; Wu, Y. C. 2003. Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. *Biochemical Pharmacology*. 65 (3): 319-327.

Chomyn, A.; Cleeter, M. W.; Ragan, C. I.; Riley, M.; Doolittle, R. F.; Attardi, G.; 1996. URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science*. 234: 614-618.

Chulia, S.; Noguera, M. A.; Ivarra, M. D.; Cortes, D.; D'Ocon, M. P. 1995. Vasodilatadoreffects of liriodenine and norushinsunine, two aprphine alkaloids isolated from *Annona cherimolia*, in rat aorta. *Pharmacology*. 50: 380-387.

Codling, C. E.; Maillard, J.-Y.; Russell, A. D. 2003. Aspects of antimicrobial mechanisms of action of a polyquaternium and an amidoamine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 1153-1158.

Colman-Saizarbitoria, T.; Jonson, H. A.; Alali, F. Q.; Hoop, D. C.; Rogers, L. L.; McLaughlin, J. L. 1998. Annojahnin from *Annona jahnii*: a possible precursor of mono-tetrahydrofuran acetogenins. *Phytochemistry*. 49 (6): 1609-1616.

Cona T., E. 2002. Condiciones par un buen studio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*. 19 (supl. 2): 77-81.

Copp, B. R. 2003. Antymicobacterial natural products. *Natural Products Reports*. 20: 535-557.

Corner, T. R. and R. E. Marquis. 1969. Why do bacterial protoplasts burst un hypotonic solutions? *Biochimica et Biophysica Acta*. 183: 544-558.

Cortes Martínez, D. 1979. Estudio farmacognóstico y farmacodinámico del aceite de semilla de chirimoyo. Tesis. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. España.

Cortes, D.; Figadére, B.; Cavé, A. 1993a. Bis-tetrahydrofuran acetogenins from Annonaceae. *Phytochemistry*. 32 (6): 1467-1473.

Cortes, D.; Miyint, S. H.; DuPont, B.; Davoust, D. 1993b. Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 32 (6): 1475-1482.

Costerton, J. W. Forsberg, C.; Matula, T. I.; Buckmire, F. L. A.; MacLeod, R. A. 1997. Nutrition and metabolism of marine bacteria. *Journal of Bacteriology*. 93 (5): 1764-1777.

Cruz, E. y H. Deras. 2000. Colecta y establecimiento de anonáceas en El Salvador. *Agronomía Mesoamericana*. 11 (2): 91-95.

Cunha, B. A. 2004. Osler on typhoid fever. Differentiating typhoid from typhus and malaria. *Infectious Disease Clinics of North America*. 18: 111-125.

De Acosta, J. 1940. Historia Natural y Moral de las Indias. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 185.

De la Cruz, I. 2001. Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Saff. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 85 pp.

Degli Esposti, M.; Ghelli, A.; Crimi, M.; Estornell, E.; Fato, R.; Lenaz, G. 1993. Complex I and complex III of mitochondria have common inhibitors acting as ubiquinone antagonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 190 (3): 1090-1096.

Degli Esposti, M.; Ghelli, A.; Ratta, M.; Cortes, D.; Estornell, E. 1994. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochemical Journal*. 301: 161-167.

Degli Esposti, M. 1998. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 1364 (2): 222-235.

Di Bernardo, S. And T. Yagi. 2001. Direct interaction between a membrane domain subunit and a connector subunit in the H⁺-translocating NADH-quinone oxidoreductase. *FEBS Letter*. 508: 385-388.

Djafarzadeh, R.; Kerscher, S.; Zwicker, K.; Radermacher, M.; Lindahl, M.; Schaâgger, H.; Brandt, U. 2000. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1459: 230-238.

Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper, 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 60: 3953-3961.

Duret, P., Gromek, D., Hocquemiller, R., Cavé, A. 1994. Isolation and structure of three new bis-tetrahydrofuran acetogenins from the roots of *Annona cherimolia*. *Journal of Natural Products*. 57 (7): 911-916.

Duret, P.; Hocquemiller, R.; Grantier, J. Ch.; Figadère. B. 1999. Semisynthesis and cytotoxicity of amino acetogenins and derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 7: 1821-1826.

Duval, R. A.; Duret, P.; Lewin, G.; Peris, E.; Hocquemiller, R. 2005. Semisynthesis and biological activity of aminoacyl triesters of squamocin, an annonaceous acetogenin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13 (11): 3773-3781.

Ellermeier, C. D. and J. M. Slauch. 2006. The genus *Salmonella*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackbrandt, E. (Editors). The prokaryotes. 3a edition. Volume 6. Springer Science. Singapore. Pp. 123-158.

Eshiet, I.; Akisanya, A.; Taylor, D. A. H. 1971. Diterpenes from *Annona senegalensis*. *Phytochemistry*. 10: 3294-3295.

Estornell, E.; Tormo, J. R.; Cortes, D. 1997. Cheremolin-1, new selective inhibitor of the first energy-coupling site of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 240: 234-238.

Etcheverry, S.; Sahpaz, S.; Fall, D.; Laurens, A.; Cavé, A. 1995. Annoglaucin, an acetogenin from *Annona glauca*. *Phytochemistry*. 38 (6): 1423-1426.

Faizi, Sh.; Mughal, N. R.; Khan, R. A.; Khan, Sh. A. 2003. Evaluation of the antimicrobial property of *Polyalthia longiflora* var. *pendula*: isolation of a lactone as the active antibacterial agent from the ethanol extract of the stem. *Phytotherapy Research*. 17 (10): 1177-1181.

Fall, D.; Duval, R. A.; Gleye, C.; Laurens, A.; Hocquemiller, R. 2004. Chamuvarinin, an acetogenin bearing a tetrahydropyran ring from the roots of *Uvaria chamae*. *Journal of Natural Products*. 67 (6): 1041-1043.

Fekam Boyom, F.; Amvam Zollo, P. H.; Menut, C.; Lamaty, G.; Bessière, J. M. 1996. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXVII. Comparative study of the volatile constituents of five Annonaceae species growing in Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*. 11 (6): 333-338.

Falk-Krzesinski, H. and A. J. Wolfe. 1998. Genetic análisis of the *nuo* locus, which encodes the proton-translocating NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 180 (5): 1174-1184.

Fernández de Oviedo, G. 1950. Sumario de la Natural Historia de Indias. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 205-206.

Février, A.; Ferreira, M. E.; Fournet, A.; Yaluff, A.; Inchausti, A.; Rojas de Arias, A.; Hocquemiller, R.; Waechter, A. I. 1999. Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. *Planta Medica*. 65: 47-49.

Flemming, D.; Schlitts, A.; Spehr, V.; Bischof, T.; Friedrich, T. 2003. Iron-sulfur cluster N2 of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is located on subunit NuoB. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (48): 47602-47609.

Flemming, D.; Hellwing, P.; Lepper, S.; Kloer, D. P.; Friedrich, T. 2006. Catalytic importance of acidic amino acids on subunit NuoB of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxido-reductase (complex I). *Journal of Biological Chemistry*. 281 (34): 24781-24789.

Frerman, F. E. and D. C. White. 1967. Membrane lipid changes during formation of a functional electron transport system in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 94 (6): 1868-1874.

Friedrich, T.; Stroheicher, M.; Hofhaus, G.; Preis, D.; Sahm, H.; Weiss, H. 1990. The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondria or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase. *FEBS Letter*. 265 (1-2): 37-40.

Friedrich, T.; van Heek, P.; Leif, H.; Ohnishi, T.; Force, E.; Kunze, B.; Jansen, R.; Trowitzsch-Kienast, W.; Höfle, G.; Reichenbach, H.; Weiss, H. 1994. Two binding sites of inhibitors in NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *European Journal of Biochemistry*. 219: 691-698.

Friedrich, T.; Steinmüller, K.; Weiss, H. 1995. The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplast. *FEBS Letters*. 367: 107-111.

Friedrich, T. and H. Weiss. 1997. Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *Journal of Theoretical Biology*. 187 (4): 529-541.

Friedrich, T. 1998. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) form *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 1364: 134-146.

Friedrich, T. and D. Scheide. 2000. The respiratory complex I of bacteria, archae and eucarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Letters*. 479: 1-5.

Friedrich, T. and B. Böttcher. 2004. The gross structure of the respiratory complex I: a lego system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1657 (1): 71-79.

Friedrich, T.; Stolpe, S.; Schneider, D.; Barquera, B.; Hellwig, P. 2005. Ion translocation by the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemical Society Transactions*. 33 (4): 836-839.

Fries, R. E. 1937. Revision der arten einiger Annonaceen Gattungen IV. *Acta Horti Berg*. 12 (2): 221-228.

Gallardo, T.; Sáez, J.; Granados, H.; Tormo, J. R.; Velez, I. D.; Brun, N.; Torres, B.; Cortes, D. 1998a. 10-Oximeguanacone, the first nitrogenated acetogenin derivative found to be a potent inhibitor of mitochondrial complex I. *Journal of Natural Products*. 61 (8): 1001-1005.

Gallardo, T.; Aragón, R.; Tormo, J. R.; Blázquez, M. A.; Zafra-Polo, M. C.; Cortes, D. 1998b. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. *Phytochemistry*. 47 (5): 811-816.

Gallardo, M. T.; Zafra-Polo, C.; Tormo, J. R.; González, M. C.; Franck, X., Estornell, E.; Cortes, D. 2000. Semisynthesis of antitumoral acetogenins: SAR of functionalized alkyl-chain bis-tetrahydrofuranic acetogenins, specific inhibitors of mitochondrial complex I. *Journal of Medical Chemical*. 43: 4793-4800.

Garduño-Pizaña, C. y R. Monroy. 2003. Etonobotánica de *Annona diversifolia* saff. Memoria del V Congreso Mexicano de Etnobiología. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. Pp. 79.

Gemperli, A. C.; Dimroth, P.; Steuber, J. 2003. *K. pneumoniae* NADH-Na⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 839-844.

Gil D.; M. 2000. *Staphylococcus aureus*: microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a la meticilina. *Revista Chilena de Infectología*. 17 (2): 145-152.

Gleye, C.; Duret, P.; Laurens, A.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. 1998. cis-Monotetrahydrofuran acetogenins from the root of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 61: 576-579.

Gleye, C.; Raynaud, S.; Fourneau, C.; Laurens, A.; Laprévote, O.; Serani, L.; Fournet, A.; Hocquemiller, R. 2000. Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. *Journal of Natural Products*. 63 (9): 1192-1196.

Gong, X.; Xie, T.; Yu, L.; Hesterberg, M.; Scheide, D.; Friedrich, T.; Yu, Ch. 2003. The ubiquinone-binding site in NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (28): 25731-25737.

González, M. C.; La Vaud, C.; Gallardo, T.; Zafra-Polo, M. C.; Cortes, D. 1998. New method for the determination of the absolute stereochemistry in antitumoral annonaceous acetogenins. *Tetrahedron*. 54: 6079-6088.

González Esquinca, A. R.; Luna Cazáres, L. M.; Alvarez Moctezuma, J. G.; de Paz Velasco, Y. 1997. Estudios sobre el letargo de *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae). Memorias del I Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. pp. 229-239.

González Esquinca, A. R. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae). Análisis fitoquímico de tres especies del Estado de Chiapas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 251 pp.

González-Coloma, A.; Guadaño, A.; de Inés, C.; Martínez-Díaz, R.; Cortes, D. 2002. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57c: 1028-1034.

González-Trujano, M. E.; Navarrete, A.; Reyes, B.; Hang, E. 1998. Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytoterapy Research*. 12: 600-602.

González-Trujano, M. E.; Navarrete, A.; Reyes, B.; Cedillo-Portugal, M. E.; Hong, E. 2001. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Medica*. 67: 136-141.

González-Trujano, M. E.; Tapia, E.; López-Meraz, L.; Navarrete, A.; Reyes-Ramírez, A.; Martínez, A. 2006a. Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicilin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia*. 47 (11): 1810-1817.

González-Trujano, M. E.; Martínez, A. L.; Reyes, A.; Reyes, B.; Navarrete, A. 2006b. Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Medica*. 72 (8): 703-707.

Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*. 43: 1367-1378.

Götz, F.; Bannerman, T.; Schleifer, K. H. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt (Editors). The prokaryotes. 3a edition. Volume 4. Springer Science. Singapore. Pp. 5-75.

Greenwood, D. and R. Whitley. 2003. Modes of action. In: Finch, Roger G.; Greenwood, David; Norrby, Ragnar; Whitley, Richar (Ed.) Antibiotic and Chemotherapy. 8th edition. Elsevier. Churchill Livingstone. Pp. 11-24.

Grigorieff, N. 1998. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *Journal of Molecular Biology*. 277: 1033-1046.

Grivennikova, V. G.; Kapustin, A. N.; Vinogradov, A. D. 2001. Catalytic activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in intact mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (12): 9038-9044.

Grivennikova, V. G.; Roth, R.; Zakharova, N. V.; Hagerhall, C.; Vinogradov, A. D. 2003. The mitochondrial and prokaryotic proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductases: similarities and dissimilarities of the quinone-junction sites. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1607 (2-3): 79-90.

Gu, Z. M.; Zeng, L.; Schwedler, J. T.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L. 1995. New bioactive adjacent bis-THF annonaceous acetogenins from *Annona bullata*. *Phytochemistry*. 40 (2): 467-477.

Guadaño, A.; Gutiérrez, C.; de la Peña, E.; Cortes, D.; González-Coloma, A. 2000. Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. *Journal of Natural Products*. 63: 773-776.

Guénebaut, V.; Schlitt, A.; Weiss, H.; Leonard, K.; Friedrich, T. 1998. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Molecular Biology*. 276 (1): 105-112.

Gupta, M. P. 2004. Investigaciones farmacognósticas de la flora panameña. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 70: 839-883.

Gupta, R. K.; Kesari, A. N.; Watal, G.; Murthy, P. S.; Chandra, R.; Maithal, K.; Tandon, V. 2005. Hypoglycemic and antidiabetic effect of aqueous extract of leaves of *Annona squamosa* (L.) in experimental animal. *Current Science*. 88 (8): 1224-1254.

Gutiérrez Venegas, G. y P. Cardoso Jiménez. 2006. Acido lipoteicoico: receptores y mecanismos de transducción. *Revista de Educación Química*. 25 (2): 41-49.

Guzmán, D. J. 1975. Especies útiles de la flora salvadoreña. Tomo I. Ministerio de Educación. San Salvador, El Salvador. Centro América. pp. 73.

Hagerhall, C.; Aasa, R.; von Wachenfeldt, C.; Hederstedt, L. 1992. Two hemes in *Bacillus subtilis* succinate:menaquinone oxidoreductase (complex II). *Biochemistry*. 31 (32): 7411-7421.

Hamada, T.; Ichimaru, N.; Abe, M.; Fujita, D.; Kenmochi, A.; Nishioka, T.; Zwicher, K.; Brandt, U.; Miyoshi, H. 2004. Síntesis and inhibitory action of novel acetogenin mimics with bovine Herat mitochondrial complex I. *Biochemistry*. 43: 3651-3658.

Han, H.; Sinha, M. K.; D'Souza, L. J.; Keinan, E.; Sinha, S. C. 2004. Total synthesis of 34-hydroxyasimicin and its photoactive derivative for affinity labeling of the mitochondrial Complex I. *Chemistry European Journal*. 10: 2149-2158.

Hancock, R. E. W. and W. A. Woodruff. 1988. Roles of porin and β -lactamase in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Review of Infectious Diseases*. 10: 770-775.

Harast, J. A.; de Bruye, T.; de Backer, J. P.; Vauquelin, G.; Vlietinck, A. J. 1997. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5HT₂ receptor agonist rats: Unexploited antidepressive (lead) products. *Journal Pharmacognosy and Pharmacology*. 49: 1114-1145.

Haraguchi, H.; Tanimoto, K.; Tamura, Y.; Mizutani, K.; Kinoshita, T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 48 (1): 125-129.

Hartmann, T. 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 67: 2831-2846.

Harold, F. M. 1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriology Review*. 36 (2): 172-230.

Hayashi, M. and T. Unemoto. 1984. Characterization of the Na⁺-dependent respiratory chain NADH:quinone oxidoreductase of the marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, in relation to the primary Na⁺ pump. *Bioenergetic and Biomembranes Journal*. 767 (3): 470-478.

He, K.; Zeng, L.; Ye, Q.; Shi, G.; Oberlies, N. H.; Zhao, G. X.; Njoku, C. J.; McLaughlin, J. L. 1997. Comparative SAR evaluations of annonaceous acetogenins for pesticidal activity. *Pesticide Science*. 49 (4): 372-378.

Hernández, F. 1959. Historia Natural de Nueva España. Obras Completas UNAM. México. Tomo II. Volumen I. Libro Primero, Capítulo LXXXIII; Libro Segundo, Capítulo CXXXV y CXLIII. pp. 23, 90, 92.

Hisham, A.; Sunitha, C.; Sreekala, U.; Pieters, I.; de Bruyne, T.; van den Heuvel, H.; Claeys, M. 1994. Reticulacinone, an acetogenin from *Annona reticulata*. *Phytochemistry*. 35 (5): 1325-1329.

Hirst, J. 2005. Energy transduction by respiratory complex I – an evaluation of current knowledge. *Biochemical Society Transactions*. 33 (3): 525-529.

Hiu, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Anderson, J. E.; Smith, D. L.; Chang, C. J.; McLaughlin, J. L. 1989. Bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. *Journal of Natural Products*. 52 (3): 463-477.

Hofhaus, G.; Weiss, H.; Leonard, K. 1991. Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *Journal of Molecular Biology*. 221 (3): 1027-1043.

Hollingworth, R. M.; Ahammadsahib, K. I.; Gadelhak, G.; McLaughlin, J. L. 1994. New inhibitors of complex I in the mitochondrial electron transport chain with activities as pesticides. *Biochemical Society Transactions*. 22: 230-233.

Holschneider, C. H.; Johnson, M. T.; Knox, R. M.; Rezai, A.; Ryan, W. J.; Montz, F. J. 1994. Bullatacin-in vivo and in vitro experience in an ovarian cancer model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 34 (2): 166-170.

Holt, P. J.; Morgan, D. J.; Sazanov, L. A. 2003. The location of NuoL and NuoM subunits in the membrane domain of the *Escherichia coli* complex I. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (44): 43114-43120.

Hoop, D. C.; Zeng, L.; Gu, Z. M.; Kozlowski, J. F.; McLaughlin, J. L. 1997. Novel mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line, PACA-2. *Journal of Natural Products*. 60: 581-586.

Hu, T. S.; Wu, Y. L.; Yao, Z. J. 2006. Recent progress on the chemical synthesis of annonaceous acetogenins and their structurally modified mimics. In: Liang, X. T. and W. S. Fang. (Ed.). Medicinal chemistry of bioactive products. Wiley-Interscience. John Wiley & Sons. USA. Pp. 429-430.

Huang, L.; Borders, T. M.; Shen, J. T.; Wang, C. J.; Berry, E. A. 2005. Crystallization of mitochondrial respiratory complex II from chicken heart: a membrane-protein complex diffracting to 2.0 Å. *Acta Crystallographica*. D61: 380-387.

Hui, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Anderson, J. E.; Smith, D. L.; Chang, C. J.; McLaughlin, J. L. 1989. Bullatacin and bullatacinone: Two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. *Journal of Natural Products*. 52 (3): 463-477.

Hui, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Wood, K. V.; Smith, D. L.; Chang, C. J.; McLaughlin, J. L. 1990. Bullatacin, bullatacinone and squamone, a new bioactive acetogenin, from the bark of *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*. 53 (1): 81-86.

Hutchinson, J. 1964. The genera of flowering plants. Dicotylednes. Oxford at the Clarendon Press. I: 70-109.

Ingledeu, **W. J.** and T. Ohnishi. 1980. An analysis of some thermodynamic properties of iron-sulphur centres in site I of mitochondria. *Biochemical Journal*. 186: 111-117.

Irigoyen, J. N. 2004. Guía técnica del cultivo de la anona. Ministerio de Agricultura y Ganadería-Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Santa Tecla, El Salvador. pp. 12, 30.

Janssen, A. J. M.; Trijbels, F. J. M.; Sengers, R. C. A.; Smeitink, J. A. M.; van den Heuvel, L. P.; Wintjes, L. T, M.; Stoltenborg-Hogenkamp, B. J. M.; Rodenburg, R. J. T. 2007. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultures fibroblasts. *Clinical Chemistry*. 53 (4): 729-734.

Javor, G. T. 1983. Depression of adenosylmethionine content of *Escherichia coli* by thioclycerol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 24 (6): 860-867.

Johnson, H. A.; Gordon, J.; McLaughlin, J. L. 1996. Monthly variations in biological activity of *Asimina triloba*. In: Janick, J. (Ed.). Progress in new crops. ASHS Press. Arlington, V. A. USA. Pp. 609-614.

Jolad, S. D.; Hoffman, J. J.; Schram, K. H.; Cole, J. R.; Tempesta, M. S.; Kriek, G. R.; Bates, R. B. 1982. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria acuminata* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*. 47: 3151-3153.

Jaworowski, A.; Campbell, H. D.; Poulis, M. I.; Young, I. G. 1981. Genetic identification and purification of the respiratory NADH hydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 20: 2041-2047.

Joy, B. and P. Remani. 2008. Antitumor constituents from *Annona squamosa* fruit pericarp. *Medicinal Chemistry Research*. 17 (2-7): 345-355.

Jumana, S.; Hasan, Ch. M.; Rashid, M. A. 2000. Antibacterial activity and cytotoxic of *Miliusa velutina*. *Fitoterapia*. 71: 559-561.

Kaback, H. R. and E. R. Stadtman. 1996. Proline uptake by an isolated cytoplasmic membrane preparation of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 55: 920-927.

Kao, M. C.; Di Bernardo, S.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T. 2003. Characterization and topology of the domain Nqo10 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*. 42: 4534-4543. *Biochemistry*. 42 (15): 4534-4543.

Kao, M. C.; Di Bernardo, S.; Perego, M.; Ogiso-Nakamaru, E.; Yagi-Matsuno, A.; Yagi, T. 2004. Functional roles of four conserved charged residues in the membrane domain subunit NuoA of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (31): 32360-32366.

Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, L. T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 123-140.

Kelly, L. W. 2000. Annonaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 31: 1-5.

Khallouki, F.; Younos, Ch.; Soulimani, R.; Bessière, J. M. 2002. Chemical composition of the essential oils of *Annona cuneata* L. and *Annona senegalensis* Pers. Stem barks. *Flavour and Fragrance Journal*. 17 (5): 398-400.

Kersher, S.; Dröse, S.; Zickermann, V.; Brandt, U. 2008. The three families of respiratory NADH dehydrogenases. *Results & Problems in Cell Differentiation*. 45: 185-222.

Kervinen, M.; Hinttala, R.; Helander, H. M.; Kurki, S.; Uusimaa, J.; Finel, M.; Majamaa, K.; Hassinen, I. E. 2006. The MELAS mutations 3946 and 3949 perturb the critical structure in a conserved loop of the ND1 subunit of mitochondrial complex. *Human Molecular Genetics*. 15 (17): 2543-2552.

Kim, Y. J.; Mizushima, S.; Tokuda, H. 1991. Fluorescence quenching studies on the characterization of energy generated at the NADH:quinone oxidoreductase and quinol oxidase segments of marine bacteria. *Journal of Biochemistry*. 109: 616-621.

Kim, Y. J.; Song, K.; Rhee, S. 1995. A novel aerobic respiratory chain-linked NADH oxidase system in *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*. 177: 5176-5178.

Kim, D. H.; Ma, E. S.; Suk, K. D.; Son, J. K.; Lee, J. S.; Woo, M. H. 2001a. Annomolin and annocherimolin, new cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. *Journal of Natural Products*. 64 (4): 502-506.

Kim, D. H.; Son, J. K.; Woo, M. H. 2001b. Annomocherin, annonacin and annomonatacin: a novel and two known bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. *Archives Pharmaceutical Research*. 24 (4): 300- 306.

Kim, M. S. and Y. J. Kim. 2004. Enzymatic properties of the membrane-bound NADH oxidase system in the aerobic respiratory chain of *Bacillus cereus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 37 (6): 753-756.

Kita, K.; Vibat R. C. T.; Meinhardt, S.; Guest, J. R.; Gennis, R. B. 1989. One-step purification from *Escherichia coli* of complex II (Succinate:ubiquinone oxidoreductase) associated with succinate-reducible cytochrome *b₅₅₆*. *Journal of Biological Chemistry*. 264 (5): 2672-2677.

Kojima, N.; Fushimi, T.; Maezaki, N.; Tanaka, T.; Yamori, T. 2008. Synthesis of hybrid acetogenins, α,β -unsaturated- γ -lactone-free nitrofen-containing heterocyclic analogues, and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 18: 1637-1641.

Koneman, E.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn, W. 2003. Diagnóstico microbiológico. 5a. edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 9-16.

Konno, H.; Hiura, N.; Makabe, H.; Abe, M.; Miyoshi, H. 2004. Synthesis and mitochondrial complex I inhibition of dihydroxy-cohibin A, non-THF annonaceous acetogenin analogue. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 14: 629-632.

Kotkar, H. M.; Mendik, P. S.; Sadan, S. V. G. S.; Jha, Sh. R.; Upasani, Sh. M.; Maheshwari, V. L. 2001. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. *Pest Management Science*. 58: 33-37.

Kouninki, H.; Ngamo, L. S. T.; Hance, T.; Ngssoum, M. B. 2007. Potential use of Essential oils from local cameroonian plants for the control of red weevil *Trilobium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *AJFAND on line*. 7 (5).

Krebs, W.; Steuber, J.; Gemperli, A. C.; Dimroth, P. 1999. Na⁺ translocation by the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. 33 (3): 590-598.

Kuwabara, K.; Takada, M.; Iwata, J.; Tatsumoto, K.; Sakamoto, K.; Iwamura, H.; Miyoshi, H. 2000. Design syntheses and mitochondrial complex I inhibitory activity of novel acetogenins mimics. *European Journal Biochemistry*. 267: 2538-2546.

Landolt, J. L.; Ahammadsahib, K. I.; Hollingworth, R. M.; Barr, R.; Crane, F. L.; Buerck, N. L.; McCabe, G. P.; McLaughlin, J. L. 1995. Determination of structure-activity relationships of annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*. 98: 1-13.

Lannuzel, A.; Michel, P. P.; Höglinger, G. U.; Champy, P.; Jousser, A.; Medja, F.; Lombés, A.; Darios, F.; Gleye, C.; Laurens, A.; Hocquemiller, R.; Hirsch, E. G. C.;

Ruberg, M. 2003. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience*. 121: 287-296.

Laprévotte, O.; Girad, C.; Das, B. C.; Laugel, T.; Robelt, F.; Leboeuf, M.; Cavé, A. 1992. Location of epoxy rings in a long chain acetogenin by fast-atom bombardment and linked scan (B/E) mass spectrometry of lithium-cationized molecules. *Mass Spectrometry*. 6: 352-355.

Leboeuf, M.; Cave, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B. and Mukherjee, R. 1982. the phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*. 21 (2): 2783-2813.

Leif, H.; Sled, V. D.; Ohnishi, T.; Weiss, H.; Friedrich, T. 1995. Isolation and characterization of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *European Journal Biochemistry*. 230: 538-548.

León, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. San José, Costa Rica. 487 pp.

Lewis, M. A.; Arnason, J. T.; Philogene, B. J. R.; Rupprecht, J. K.; McLaughlin, J. L. 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the paw paw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 45: 15-23.

Li, Ch. -M.; Tan, N. -H.; Mu, Q.; Zheng, H. -L.; Hao, X. -J.; Wu, Y.; Zhu, J. 1997. Cyclopeptides from seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*. 45 (3): 521-523.

Li, N.; Shi, Z.; Tang, Y.; Chen, J.; Li, X. 2008. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 4 (48).

<http://bjoc.beilstein-journals.org/bjoc/browse/singleVolume.htm?vn=4> (Consulta: 6-enero-2009).

Li, X. H.; Hui, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Wood, K. V.; Smith, D. L.; Chang, C. J.; McLaughlin, J. L. 1990. Bullatacin, bullatacinone, and squamone, a new bioactive acetogenin, from the bark of *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*. 53 (1): 81-86.

Li, X. X.; Alali, F. Q.; Pilarinou, E.; McLaughlin, J. L. 1999. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. *Phytochemistry*. 50 (5): 815-821.

Liaw, C. C.; Chang, F. R.; Lin, C. Y.; Chou, C. J.; Chiu, H. F.; Wu, M. J.; Wu, Y. C. 2002. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 65 (4): 470-475.

Liaw Ch. Ch.; Chang, F. R.; Chen, Sh. L.; Wu, Ch. Ch.; Lee, K. H.; Wu, Y. Ch. 2005. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins of *Annona montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13 (15): 4767-4776.

Liaw, C.-C.; Yang, Y. L.; Chen, M.; Chang, F. R.; Chen, S. L.; Wu, S. H.; Wu, Y. C. 2008. Mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* as cytotoxic agents and calcium ion chelators. *Journal of Natural Products*. 71 (5): 764-771.

Liu, X. -X.; Alali, F. Q.; Pilarinou, E.; McLaughlin, J. L. 1999. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. *Phytochemistry*. 50 (5): 815-821.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. 2003. Biología celular y molecular. 4a edición. Editorial Médica Panamericana. España. Pp. 632-637.

Londershausen, M.; Leicht, W.; Lieb, F.; Moeschler, H.; Weiss, H. 1991. Molecular mode of action of annoninas. *Journal of Pest Science*. 33 (4): 427-433.

Loskovich, M. V.; Grivennikova, V. G.; Cecchini, G.; Vinogradov, A. D. 2005. Inhibitory effect of palmitate on the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) as related to the active-de-active enzyme transition. *Biochemical Journal*. 387: 677-683.

Luna Cazáres, L. M.; de la Cruz Chacón, I.; González Esquinca, A. R. 2003. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* Saff. sobre *Culex pipiens quinquefasciatus*. Memoria del V Congreso Mexicano de Etnobiología. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. pp. 99.

McCloud, T. G.; Smith, D. L.; Chang, C. -J.; Cassady, J. M. 1987. Annonacin, a novel biologically active polyketide from *Annona densicoma*. *Experientia*. 43 (8): 947-948.

McKee, T. y J. R. McKee. 2003. Bioquímica. La base molecular de la vida. 3ª edición. Editorial McGraw-Hill – Interamericana. España. Pp. 35-37, 39, 300, 302, 306.

McLaughlin, J. L. 1991. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: Hostettmann, K. (Ed.). *Methods in plant biochemistry*. Academic Press. London. Pp. 1-32.

McLaughlin, J. L.; Rogers, L. L.; Anderson, J. E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 32: 513-524.

Mahdeem, H. 1992. Anonas. En: Hernández Bermejo, J. E. y J. León (Editores). *Cultivos marginados: Otra perspectiva de 1942*. Colección FAO: Producción y protección vegetal No. 26. Jardín Botánico de Córdoba-FAO. Italia. Pp. 14, 42, 44, 83-87.

Makabe, H. 2007. Synthesis of annonaceous acetogenins from muricatin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 71 (10): 2367-2374.

Makabe, H.; Konno, H.; Miyoshi, H. 2008. Current topics of organic and biological chemistry of annonaceous acetogenins and their synthetic mimics. *Current Drug Discovery Technologies*. 5 (3): 213-229.

Mamedova, A. A.; Holt, P. J.; Carroll, J.; Sazanov, L. 2004. Substrate-induced conformational change in bacterial complex I. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (22): 23830-23836.

MARN (Ministerio de Agricultura y Recursos Naturales). 2006. Estrategia Nacional de Diversidad Biológica. Conclusiones, recomendaciones y prioridades. San Salvador, El Salvador. Pp. 173.

Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 1009.

Martínez-Vázquez, M.; de la Cueva Lozano, D. G.; Estrada-Reyes, R.; González-Lugo, N. M.; Ramírez Apan, T.; Jeinze, G. 2005. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. *Fitoterapia*. 76: 733-736.

Matsushita, K.; Ohnishi, T.; Kaback, R. 1987. NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry*. 26: 7732-7737.

Melo, A. M. P.; Bandejas, M.; Texeira, M. 2004. New insights into type-II NAD(P)H:Quinone oxidoreductases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 603-616.

Meneses da Silva, E. L.; Roblot, F.; Mahuteau, J.; Cavé, A. 1996. Coriadienin, the first annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from *Annona coriacea*. *Journal of Natural Products*. 59 (5): 528-530.

Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45: 31-34.

Mia, M. Y.; Hasa, C. M.; Reiner, R. (1997). Antibacterial activity of two acetogenins. *Bangladesh Journal of Botany*. 26 (1): 71-73

Minai-Tehrani, D.; Keyhani, E.; Sobhani-Damavandifar, Z. 2002. The Extractability of inner-membrane proteins from *Salmonella Typhimurium* intact cells, spheroplasts and inner-membrane fragments by non-denaturing detergents. *Iran Journal of Biomedical*. 6 (2&3): 55-61.

Miranda, F. 1998. La vegetación de Chiapas. 3^a. Edición. CONECULTA-Gobierno del Estado de Chiapas. México. Pp. 410.

Miyoshi, H.; Ohshima, M.; Shimada, H.; Akagi, T.; Iwamura, H.; McLaughlin, J. L. 1998. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1365: 443-452.

Miyoshi, H. 2005. Inhibitors of mitochondrial respiratory enzymes. *Journal of Pesticide Science*. 30 (2): 120-121.

Moat, A. G.; Foster, J. W.; Spector, M. P. 2002. Microbial physiology. 4a edition. Wiley-Liss. New York, USA. Pp. 373-374.

Monroy-Ortiz, C. y R. Monroy. 2006. Las plantas, compañeras de Siempre: La experiencia en Morelos. CONABIO-UAEM-CONANP-CIB-Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. Pp. 131-132.

Moore, E. R. B.; Tindall, B. J.; Martins dos Santos, V. A. P.; Pieper, D. H.; Ramos, J. L.; Palleroni, N. J. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt (Editors). The prokaryotes. 3a edition. Volume 6. Springer Science. Singapore. Pp. 643-703.

Mootoo, B. S.; Ali, A.; Khan, A.; Reynolds, W. F.; McLean, S. 2000. Thee novel monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Journal of Natural Products*. 63 (6): 807-811.

Morré, D. J.; de Cabo, R.; Farley, Ch.; Oberlies, N. H.; McLaughlin, J. L. 1995. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HELA and HL-60, but not liver plasma membranas. *Life Science*. 56 (5): 343-348.

Morton, J. 1987. Ilama. In: Fruits of warm climates. Miami, Florida, USA. Pp. 83-85.

Motoyama, T.; Yabunaka, H.; Myoshi, H. 2002. Essential structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12: 2089-2092.

Moujir, L.; Gutiérrez-Navarro, A. M.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Luis, J. G. 1991. Mode of action of netzahualcoyone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35 (1): 211-213.

Myint, S. H.; Cortes, D.; Laurens, A.; Hocquemiller, R.; Leboueuf, M.; Cavé, A.; Cotte, J.; Quéro, A. M. 1991. Solamin, a cytotoxic mono-tetrahydrofuranic γ -

lactone acetogenin from *Annona muricata* seeds. *Phytochemistry*. 30: 3335-3338.

Nakaruma-Ogiso, E.; Sakamoto, K.; Matsumo-Yagi, A.; Miyoshi, H.; Yagi, T. 2003. The ND5 subunit was labeled by a photoaffinity analogue of feproximate in bovine mitochondrial complex I. *Biochemistry*. 42: 746-754.

Nakaruma-Ogiso, Eiko; Seo, Byoung Boo; Yagi, Takao; Matsuno-Yagi, Akemi. 2003. Amiloride inhibition of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of mammals and bacteria. *FEBS Letters*. 549: 43-46.

Oberlies, N. H.; Jones, J. L.; Corbett, T. H.; Fotopoulus, S. S.; McLaughlin, J. L. 1995. Tumor cell growth inhibition by several annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Letters*. 96: 55-62.

Oberlies, N. H.; Croy, V. L.; Harrison, M. L.; McLaughlin, J. L. 1997. The annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Letters*. 115: 73-79

Ocampo S., D. M.; Betancour J., L. A.; Ortíz, A.; Ocampo C., R. 2007. Estudio cromatográfico comparativo de los ácidos grasos presentes en semilla de *Annona cherimolioides* y *Annona squamosa*. *Vector*. 2: 103-112.

Ochse, J. J.; Soule, M. J.; Disman, M. J.; Wehlburg, C. 1986. Anonas. En: Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Vol. I. Editorial Limusa-Wiley. México. pp. 17, 20-21.

Olaya, C. I. 1991. Frutas de América tropical y subtropical. Historia y usos. Editorial Normal. El Salvador.

Orellana Polanco, A. D. y E. Martínez Tambito. 2002. Distribución geográfica de anonáceas en Guatemala. ICTA. Guatemala. 23 pp.

Orru, R. V. A.; Groenendaal, B.; van Heyst, J.; Hunting, M.; Wsseling, C.; Schmitz, R.; Mayer, S. F.; Faber, K. 2003. Biomimetic approach to the stereoselective synthesis of acetogenins. *Pure and Applied Chemistry*. 75 (2-3): 259-264.

Osborn, M. J.; Gander, J. E.; Parisi, E.; Carson, J. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry*. 247 (12): 3962-3972.

Owen, P. and R. Kaback. 1979. Inmunochemical analysis of membrane vesicles from *E. coli*. *Inmunochemical Analysis*. 18 (8): 1413.

Padilla, C., Lobos, O., Brevis, P., Abaca, P., Hubert, E. 2002. Effects of the bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas* sp. on sensitive bacterial strains. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 44 (1): 19-23.

Padmaja, V.; Thankamany, V.; Hisham, A. 1993. Antibacterial, antigungical and antihelmintic activities of root barks of *Uvaria hooki* and *Uvaria narum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 40: 181-186.

Padmaja, V.; Thankamany, V.; Hara, N.; Fujimoto, Y.; Hisham, A. 1995. Biological activities of *Annona glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*. 48: 21-24.

Parés Juárez, A. R. 1997. Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté. España. Pp. 182, 183, 187.

Paulo, M. de Q.; Barbosa-Filho, J. M.; Lima, E. O.; Maia, R. F.; Barbosa, R de C.; Kaplan, M. A. 1992. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from

Annona salzmanii D. C. *Journal of Ethnopharmacology*. 36 (1): 39-41.

Peng, G. H.; Fritsch, G.; Zickermann, V.; Schägger, H.; Mentele, R.; Lottspeich, F.; Bostina, M.; Radermacher, M.; Huber, R.; Stetter, K. O.; Michel, H. 2003. Isolation, characterization and electron microscopic single particle analysis of the NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the hyperthermophilic eubacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochemistry*. 42: 3032-3039.

Pérez Amador, M. C.; González Esquinca, A. R.; García Argáez, A.; Bratoeff, E.; Labastida, C. 1997. Oil composition and flavonoid profiles of the seeds of three *Annona* species. *Phyton*. 61 (1 y 2): 77-80.

Pérez Amador, M. C.; González Esquinca, A.; Morales, M. C.; Toriz, F. 2004. Oxoaporphine alkaloids in *Guatteria diospyroides* Baill. and *Annona squamosa* L. (Annonaceae). *Phyton*. Pp. 53-55.

Pfenninger-Li, X. D.; Albracht, S. P.; van Belzen, R.; Dimroth, P. 1996. NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Vibrio alginolyticus*: purification, properties, and reconstitution of the Na⁺pump. *Biochemistry*. 35 (20): 6233-6242.

Pettit, G. R.; Riesen, R. R.; Leet, J. E.; Polonsky, J.; Smith, C. R.; Schmidt, J. M.; Dufresne, C.; Schaufelberger, D.; Moretti, Ch. 1989. Isolation and structure of rolliniastatin-2: A new cell growth inhibitory acetogenin from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles*. 28 (1): 213-217.

Pohl, T.; Schneider, D.; Heilscher, R.; Stolpe, S.; Döner, K.; Kohlstädt, M.; Böttcher, B.; Hellwig, P.; Friedrich, T. 2008. Nucleotide-induced conformational changes in the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemical Society Transactions*. 36: 971-975.

Poole, R. K. 1993. The isolation of membranes from bacteria. In: Biomembrane Protocols: I. Isolation and analysis. 19: 109-122.

Poole, R. K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92: 55S-64S.

Popenoe, W. 1920. Manual of tropical and subtropical fruits excluding banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive. McMillan Company. New York, USA.

Potchoo, Y.; Richard, D.; Sakie, E.; Guissou, I. P.; Kini, F.; Yaro, B. 2008. Comparative phytochemical content of leaves extracts of two *Annona senegalensis*: The one from Togo and the other originates from Burkina Faso. *Journal of Biological Sciences*. 8 (3): 577-583.

Queiroz, E. F., Roblot, F.; Cavé, A. 1996. Pessoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*. 59 (4): 438-440.

Queiroz, E. F.; Roblot, F.; Figadère, B.; Laurens, A.; Duret, P.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Serani, L.; Laprévotte, O.; Cotte-Laffitte, J.; Quéro, A. M. 1998. Three new bistetrahydrofuran acetogenin from the seeds of *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*. 61 (1): 34-39.

Queiroz, E. F.; Roblot, F.; Cavé, A.; Hocquemiller, R.; Serani, L.; Laprévotte, O.; Paulo, M. Q. 1999. A new bistetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona salzmanii*. *Journal of Natural Products*. 62 (5): 710-713.

Queiroz, E. F.; Roblot, F.; Laprevotte, O.; Paulo, M. De Q.; Hocquemiller, R. 2003. Two unusual acetogenins from the roots of *Annona salzmanii*. *Journal of Natural Products*. 66 (6): 755-758.

Quispe, A.; Zavala, D.; Rojas C., J.; Posso R., M.; Vaisberg W., A. 2006. Efecto citotóxico selectivo in Vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 23 (4): 265-269.

Rahman, M. M.; Parvin, S.; Haque, M. E.; Islam, M. E; Mosaddik, M. A. 2005. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Fitoterapia*. 76: 484-489.

Rakotomanga, M.; Razakantoanina, V.; Raynaud, S.; Loiseau, P. M.; Hocquemiller, R.; Jaureguiberry, G. 2004. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. *Journal of Chemotherapy*. 14 (6): 350-356.

Ramírez, J. L. y S. R. S. Cevallos-Ferriz. 2000. Consideraciones sobre las angiospermas (plantas con flor) fósiles de México. *GEOS, Unión Geofísica Mexicana*. pp. 433-444.

Rasmusson, A. G.; Svensson, A. S.; Knoop, V.; Grohmann, L.; Brennicke, A. 1999. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *The Plant Journal*. 20 (1): 79-87.

Raynaud, S.; Némati, F.; Miccoli, L.; Michel, P.; Poupon, M-F. ; Fourneau, Ch.; Laurens, A.; Hocquemiller, R. 1999. Antitumoral effects of squamocin on parental and multidrug resistant MCF7 (human breast adenocarcinoma) cell lines. *Life Sciences*. 65 (5): 525-533.

Raynaud-Le Grandic, S.; Fourneau, C.; Laurens, A.; Bories C., Hocquemiller, A.; Loiseau, P. M. 2004. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 58 (6-7): 388-392.

REMIB (Red Mundial de Información sobre Biodiversidad). 2008. Bases de Datos de Herbarios.

<http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/clave-remib.cgi?lengua=es.MX> (Consulta: 12-10-2008).

Reyes-Trejo, B.; Marroquín Andrade, L.; Peralta Montero, J.; Navarrete Castro, A.; Joseph-Nathan, P. 1997. Laherradurina: acetogenina activa de *Annona diversifolia* Saff. (ILAMA). Memoria del I Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. pp. 24.

Reyes Trejo, B.; Coeto Juárez, L. P.; Peralta-Montero, J.; Marroquín-Andrade, L.; Navarrete Castro, A.; Pedro, J. N. 1999. Estudio fitoquímico biodirigido de las semillas de *Annona diversifolia* Saff. Memoria del II Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Pp. 89.

Rieser, M. J.; Kozlowski, J. F.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L. 1991. Muricatacin: a simple biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (Annoceae). *Tetrahedron Letter*. 32: 1137-1140.

Rieser, M. J.; Gu, Z. M.; fang, X. P.; Zeng, L.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L. 1996. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seed of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 59 (2): 100-108.

Riley Saldaña, C. A. 2007. Actividad citotóxica y antibacteriana de *Annona diversifolia* Saff. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 82 pp.

Ríos Alegría, Angélica. 2006. Plantas medicinales del ejido Monterrey, municipio de Villacorzo, Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Pp. 72.

Ríos, J. L.; Cortes, D.; Valverde, S. 1989. Acetogenins, aporphinoids and azaantraquinone from *Annona cherimolia* seeds. *Planta Medica*. 55: 321-323.

Ríos, M. Y.; Castrejón, F.; Robledo, N.; León, I.; Rojas, G.; Navarro, V. 2003. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). *Revista de la Sociedad Química de México*. 47 (2): 139-142.

Rivas, R.; Orellana, E.; Mejía de Gutiérrez, G.; Jaimes de Araujo, R.; Vázquez, M. 2003. Perfil de los pueblos indígenas en El Salvador. Banco Mundial-CONCULTURA-RUTA. San Salvador, El Salvador. pp. 116.

Rodenburg, R. J. T.; Stolteborg-Hogenkamp, B. J. M.; Winthes, L. T. M.; Smeitink, J. A.; van den Heuvel, L. P.; Janssen, A. J. M. 2008. Letter to the editor. In reply. *Clinical Chemistry*. 54: 1922-1924.

Rodier, S.; Le Huérou, Y.; Renoux, B.; Doyon, J.; Renard, P.; Pierré, A.; Gesson, J. P.; Grée, R. 2000. Synthesis and cytotoxic activity of acetogenin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 10: 1373-1375.

Royo, I.; de Pedro, N.; Estronell, E.; Cortes, D.; Peláez, F.; Tormo, J. R. 2003. In vitro antitumor SAR of *threo/cis/threo/cis/erythro* bis-THF acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 13 (12): 521-528.

Ruíz Sarabia, E. y L. Morett Alatorre. 1997. Las anonas en el México prehispánico. Memorias del I Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. pp. 169-185.

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

Rzedowski, J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En: Ramamoorthy T. P.; Bye, R.; Lot, A.; Fa, J. (Comps.) Diversidad ecológica de México: Orígenes y distribución. Instituto de Biología. UNAM. México. pp. 129-145.

Saad, J. M.; Hui, Y. H.; Rupperecht, J. K.; Anderson, J. E.; Kozlowski, J. F.; Zhao, G. X.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L. 1991. Reticulacin: A new bioactive acetogenin from *Annona reticulata* (Annonaceae). *Tetrahedron*. 47 (16-17): 2751-2756.

Sahpaz, S.; Bories, Ch.; Loiseau, P. M.; Cortes, D.; Hocquemiller, R.; Laurens, A.; Cavé, A. 1994a. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Medica*. 60: 538-540.

Sahpaz, S.; Laurens, A.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Cortes, D. 1994b. Senegalene, une nouvelle acétogénine oléfinique mono-tétrahydrofurannique des graines d'*Annona senegalensis*. *Canadian Journal of Chemistry*. 72: 1533-1536.

Sahpaz, S.; González, M. C.; Hocquemiller, R.; Zafra-Polo, C.; Cortes, D. 1996. Annosenegalin and annogalene: Two cytotoxic mono-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona senegalensis* and *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 42 (1): 103-107.

Sandoval, D. y H. Ripperger. 1986. Estudios químicos en especies cubanas del género *Annona*. I. *Annona bullata* Rich. *Revista Cubana de Farmacia*. 20 (1): 83.

Sandoval López, D.; Payo Hill, A.; Vélez Castro, H. 2002. Estudio químico en especies cubanas del género *Annona* II. *Annona sclerophylla* Safford. *Revista Cubana de Farmacia*. 36 (2): 107-111.

Santos, P. L.; Boaventura, M. A. D.; Sun, N. J.; Cassady, M. J.; Oliveira, A. B. 1996. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* Mart. *Phytochemistry*. 42 (3): 705-707.

Sazanov, L. A.; Peak-Chew, S. Y.; Fearnley, I. M.; Walker, J. E. 2000. Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry*. 39: 7229-7235.

Sazanov, Leonid A.; Carroll, Joe; Holt, Peter; Toime, Laurence; Fearnley, Ian M. 2003. A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Biological Chemistry*. 278 (21): 19483-19491.

Schägger, H. 2002. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1555: 154-159.

Schlager, T. A.; Hendley, J. O.; Bell, A. L.; Whittam, T. S. 2002. Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infection and Immunity*. 70 (3): 1225-1229.

Schlie-Guzmán, M. A.; González-Esquinca, A. R.; Luna-Cazáres, L. M. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8 (4): 245-257.

Schuler, Franz; Yano, Takahiro; Di Bernardo, Salvatore; Yagi, Takao; Yankovskaya, Victoria; Singer, Thomas P.; Casida, John E. 1999. NADH-quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 4149-4153.

Shimada, H.; Kozlowski, J. F.; McLaughlin, J. L. 1998a. The localisations in liposomal membranes of the tetrahydrofuran ring moieties of the annonaceous acetogenins, annonacin and sylvaticin, as determined by ¹H NMR spectroscopy. *Pharmacological Research*. 37 (5): 357-364.

Shimada, H.; Grutzner, J. B.; Kozlowski, J. F.; McLaughlin, J. L. 1998b. Membrane conformations and their relation to cytotoxicity of asimicin and its analogues. *Biochemistry*. 37: 854-866.

Shokeen, P.; Krishna, R.; Manju, B.; Tandon, V. 2005. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*. 32 (2): 106-111.

Sinha, A.; Sinha, S. C.; Sinha, S.; Keinan, E. 1999. Total synthesis of squamotacin. *Journal of Organical Chemistry*. 64 (19): 7067-7073.

Sled, V. D. and A. D. Vinogradov. 1993. Reductive inactivation of the mitochondrial three subunit NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1143 (2): 199-203.

Slepeck, R. A. and H. E. Hemphill. 2006. The genus *Bacillus*-Nonmedical. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt, E. (Editors). *The prokaryotes*. 3a edition. Volume 4. Springer Science. Singapore. Pp. 530-562.

Souza, V.; Rocha, M.; Valera, A.; Eguiarte, L. E. 1999. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3373-3385.

Standley, P. C. and J. A. Steyermark. 1946. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany. Chicago, USA. Vol. 24. Part V.

Steuber, J. 2001. Na⁺ translocation by bacterial NADH:quinone oxidoreductases: an extension to the complex-I family of primary redox pumps. *Biochimica et Biophysica Acta*. 505 (1): 45-56.

Steuber, J.; Rufibach, M.; Fritz, G.; Neese, F.; Dimroth, P. 2002. Inactivation of the Na⁺-translocation NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio alginolyticus* by reactive oxygen species. *European Journal Biochemistry*. 269: 1287-1292.

Steuber, J. 2003. The C-terminally truncated NuoL subunit (ND5 homologue) of the Na⁺-dependent complex I from *Escherichia coli* transports Na⁺. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. 57 (12): 3613-3615.

Stevens, K. A.; Sheldon, B. W. Klapes, N. A.; Klaenhammer, T. R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (12): 3613-3615.

Stolpe, S. and T. Friedrich. 2004. The *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is primary proton pump but may be capable of secondary sodium antiport. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (18): 18377-18383.

Stroh, A.; Anderkas, O.; Pfeiffer, K.; Yagi, T.; Finel, M.; Ludwing, B.; Schägger, H. 2004. Assembly of respiratory complexes I, III and IV into NADH oxidase

supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (6): 5000-5007.

Sullivan, C. J.; Morrell, J. L.; Allison, D. P.; Doktycz, M. J. 2005. Mounting of *Escherichia coli* Spheroplasts for AFM imaging. *Ultramicroscopy*. 1-7

Takada, M.; Kuwabara, K.; Nakato, H.; Tanaka, A.; Iwamura, H.; Miyoshi, H. 2000. Definition of crucial structural factors of acetogenins potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1460: 302-310.

Takajashi, J.; Pereira, C.; Pimienta, L.; Boaventura, M.; Silvia, L. 2006. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. *Natural Products Research*. 20 (1): 21 -26.

Takahashi, S.; Yonezawa, Y.; Kubota, A.; Ogawa, N.; Maeda, K.; Koshino, H.; Nakata, T.; Yoshida, H.; Mizushima, Y. 2008. Pyranicin, a non-classical annonaceous acetogenin, is a potent inhibitor of DNA polymerase, topoisomerase and human cancer cell growth. *International Journal of Oncology*. 32: 451-458.

Takhjatan, A. 1999. The origin of angiospermus plants. 2a. Edition. Robert Cunningham and Sons. Great Britain.

Tapia, L.; Torres, J.; Mendoza, L.; Urzúa, A.; Ferreira, J.; Pavani, M.; Wilkens, M. 2004. Effect of 13-*epi*-sclareol on the bacterial respiratory chain. *Planta Medica*. 70: 1058-1063.

Tefsen, B.; Geurtsen, J.; Beckers, F.; Tommassen, J.; de Cock, J. 2005. Lypopolysaccharide transport to the bacterial outer membrane in spheroplasts. *Journal of Biological Chemistry*. 280 (6); 4504-4509.

Tegos, G.; Stermitz, F. R.; Lomovskaya, O.; Lewis, K. 2002. Multidrug pump inhibitors remarkable activity of plants antimicrobial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46 (10): 3133-3141.

Teuber, M. 1969. Susceptibility of polymixin B of penicillin G-induced *Proteus mirabilis* L forms and spheroplasts. *Journal of Bacteriology*. 98 (2): 347-350.

Thomsen, K. A. and L. Brimer. 1997. Cyanogenic constituents in woody plants in natural lowland rain forest in Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 124 (3): 273-294.

Todar, K. 2008. Bacteriology.

<http://www.textbookofbacteriology.net/index.html> (Consulta: 12-mayo-2009).

Tokuda, H. and T. Unemoto. 1984. Na⁺ is translocated at NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 259: 7785-7790.

Tokuda, H. and T. Unemoto. 2004. Na⁺ is translocated at NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 259: 7785-7790.

Tormo, J. R.; Gallardo, T.; Aragón, R.; Cortes, D.; Estornell, E. 1999a. Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Chemico-Biological Interactions*. 122: 171-183.

Tormo, J. R.; Gallardo, T.; González, M. C.; Bermejo, A.; Cabedo, N.; Andreu, I.; Estornell, E. 1999b. Annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Current Topics in Phytochemistry*. 2: 69-90.

Tormo, J. R.; González, M. C.; Cortés, D.; Estornell, E. 1999c. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 369 (1): 119-126.

Tormo, J.; Estornell, E.; Gallardo, T.; González, M. C.; Cavé, A.; Granell, S.; Cortes, D.; Zafra-Polo, M. 2001. γ -lactone-functionalized antitumoral acetogenins are the most potente inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 11: 681-684.

Tormo, J. R.; Royo, I.; Gallardo, T.; Zafra-Polo, M. C.; Hernández, P.; Cortes, D.; Peláez, F. 2003. In Vitro antitumor structure-activity relationships of the threo/trans/threo mono-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Oncology Research*. 14 (3): 147-154.

Tormo, J. R.; De Pedro, N.; Royo, I.; Barrachina, I.; Zafra-Polo, M. C.; Cuadrillero, C.; Hernández, P.; Cortes, D.; Peláez, F. 2005. In Vitro antitumor structure-activity relationships of threo/trans/trans/erythro bis-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Oncology Research*. 15 (3): 129-138.

Ugalde, C.; Janssen, R. J.; van den Heuvel, L.; Smeitink, J. A. M.; Nijtmans, L. G. J. 2004. Differences in assembly or stability of complex I and others mitochondrial OXPHOS complexes in inhenited complex I deficiency. *Human Molecular Genetics*. 13 (6):659-667.

Unemoto, T. and M. Hayashi. 1989. Sodium-transport NADH-quinone reductase of a marine *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 21 (6): 649-662.

Unemoto, T. and M. Hayashi. 1993. Na^+ -translocating NADH-quinone reductase of marine and halophilic bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 25 (4): 385.

Vega, M. R. G.; Esteves-Souza, A.; Vieira, I. J. C.; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Echevarria, A. 2003. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 18 (8): 1554-1559.

Vega, M. R. G.; Barreto, I. J. B.; Machado, M. M.; Reghini, R. G.; Esteves-Souza, A.; Vieira, I. J. C.; Mathias, L.; Echevarria, A.; Braz-Filho, R. 2004. Constituintes químicos e atividade biológica de *Annona dioica* St. Hill. Memoria de la 27 Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congreso Latinoamericano de Química. Salvador, BA. Brasil.

Vega, M. R. G.; Esteves-Souza, A.; Vieira, I. J. C.; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Echevarria, A. 2007. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 18 (8): 1554-1559.

Villaseñor, J. L. 2004. Los géneros de las plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 75: 105-135.

Vinogradov, A. D. 1993. Kinetics, control and mechanism of ubiquinone reduction by the mammalian respiratory chain-linked NADH-ubiquinone reductase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 25 (4): 367-375.

Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. 2006. Fundamentos de bioquímica. 2a edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pp. 551, 553.

Waechter, A. I.; Hocquemiller, R.; Laurens, A.; Cavé, A. 1997. Glaucafilin, an acetogenin from *Annona glauca*. *Phytochemistry*. 44 (8): 1537-1540.

Waechter, A. I.; Yaluff, G.; Inchausti, A.; Rojas de Arias, A.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Fournet, A. 1998. Leishmanicidal and trypanocidal activities of

acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research*. 12 (8): 541-544.

Waizel Bucay, J. y S. Waizel Haiat. 2005. Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Parte I. *Anales de Otorrinolaringología Mexicana*. 50 (4): 76-87.

Warmerdam, E.; Tranoy, I.; Renoux, B.; Gesson, J. P. 1998. Study of butyrolactones related to sub-type 3 annonaceous acetogenins. Structure revision of itrabin, jetein, laherradurin and otivarin. *Tetrahedron Letters*. 39: 8077-8080.

Wang, M.; Du, J.; Zhang, P.; Chen, R.; Xie, F.; Zhao, B.; Yu, D. 2002. Saccopetrins A and B, two novel γ -lactones from *Saccopetalum prolificum*. *Planta Medica*. 68: 719-722.

Welch, R. A. 2006. The genus *Escherichia*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt (Editors). The prokaryotes. 3a edition. Volume 6. Springer Science. Singapore. Pp. 60-71.

Wéle, A.; Landon, C.; Labbe, H.; Vovelle, F.; Zhang, Y.; Bodo, B. 2004a. Sequence and solution structure of cherimolacyclopeptides A and B novel cyclo. *Tetrahedron*. 60 (2): 405-414.

Wéle, A.; Zhang, Y.; Ndoeye, I.; Brouard, J. P.; Pousset, J. L.; Bodo, B. 2004b. A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *Journal of Natural Products*. 67 (9): 1577-1579.

Wéle, A.; Ndoeye, I.; Zhang, Y.; Brouard, J. P.; Bodo, B. 2005a. Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. 66 (6): 693-696.

Wéle, A.; Ndoeye, I.; Zhang, Y.; Brouard, J. P.; Pousset, J. L.; Bodo, B. 2005b.

Glaucacyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. *Phytochemistry*. 66 (10): 1154-1157.

Wéle, A.; Mayer, C.; Dermigny, Q.; Yanjun, Z.; Blond, A.; Bodo, B. 2008. Sequence and three-dimensional structure of cycloreticulins A and B, new cyclooctapeptides from the seeds of *Annona reticulata*. *Tetrahedron*. 64 (1): 154-162.

Wilkens, M.; Alarcón, C.; Urzúa, A.; Mendoza, L. 2002. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. *Planta Medica*. 68: 452-454.

Wlech, Rodney A. 2006. The genus *Escherichia*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.; Stackebrandt, E. (Eds.). The prokaryotes. 3 edition. Volume 7. Springer. Pp. 60, 62, 64.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Review*. 51 (2): 221-271.

Woo, M. -H.; Kim, D. -H.; Fotopoulos, S. S.; McLaughlin, J. L. 1999. Annocherin and (2,4)-cis- and trans- annocherinones, monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins with a C-7 carbonyl group from *Annona cherimolia*. *Journal of Natural Products*. 62: 1250-1255.

Wu, F.-E.; Gu, Z.-M.; Zeng, L.; Zhao, G.-X.; Zhang, Y.; McLaughlin, J. L. 1995a. Two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, anomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 58 (9): 1430-1437.

Wu, F.-E.; Zeng, L.; Gu, Z.-M.; Zhao, G.-X.; Zhang, Y.; Schwedler, J. T.; McLaughlin, J. L. 1995b. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, anomuricin C and muricatocin C, from the leaves of *Annona*

muricata. *Journal of Natural Products*. 58 (6): 909-915.

Wu, Y. C.; Chang, G. Y.; Ko, F. N.; Teng, C. M. 1995c. Bioactive constituents from the stems of *Annona montana*. *Planta Medica*. 61 (2): 146-149.

Xie, H. -H.; Wei, X. -Y.; Wang, J. D.; Liu, M. -F.; Yang, R. -Z. 2003. A new cytotoxic acetogenin from the seeds of *Annona squamosa*. *Chinese Chemical Letters*. 14 (6): 588-590.

Xu, L. and Ch. -J. Chang. 1989. Chemistry and selective cytotoxicity of annonacin-10-one, isoannonacin, and isoannonacin-10-one. Novel polyketides from *Annona densicoma*. *Journal of Organic Chemistry*. 54: 5418-5421.

Xu, Z. F.; Wei, X. Y.; Xie, H. H.; Yang, R. Z. 2003. Inhibitory activities of the tree annonaceous acetogenins on NADH oxidase of chicken liver mitochondria. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 26 (5): 729-732.

Yagi, T. 1987. Inhibition of NADH-ubiquinone reductase activity by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide and correlation of this inhibition with the occurrence of energy-coupling site 1 in various organisms. *Biochemistry*. 26 (10): 2822-2828.

Yagi, T. 1990. Inhibition of NADH-ubiquinone reductase activity by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide and correlation of this inhibition with the occurrence of energy-coupling site 1 in various organisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 281 (2): 305-311.

Yagi, T. 1991. Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. *Journal Bioenergetics and Biomembranes*. 23 (2): 211-235.

Yagi, T. 1993. The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1141: 1-17.

Yagi, Takao; Yano, Takiro; Di Bernardo, Salvatore; Matsuno-Yagi, Akemi. 1998. Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1364: 125-133.

Yagi, T. and A. Matsuno-Yagi. 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry*. 42 (8): 2266-2274.

Yagi, T. 2009. Yagi lab home page. The Scripps Research Institute.
<http://www.scripps.edu/mem/yagi/index.shtml>. (Consulta: 23-enero-2009).

Yang, Hai-Jun and Xiang Li. 2008. Study the optimum extraction of annonaceous acetogenins from seeds of *Annona glabra* L by supercritical fluid CO₂ extraction (SFE). *Journal of US-China Medical Science*. 5 (1): 56-59.

Yang, Y. -L.; Chang, F. R.; Hwang, T. L.; Chang, W. T.; Wu, Y. C. 2004. Inhibitory effects of ent-kauranes from the stems of *Annona squamosa* on superoxide anion generation by human neutrophils. *Planta Medica*. 70 (3): 256-258.

Yang, Y. -L.; Hua, K. -F.; Chuang, P. -H.; Wu, S. -H.; Wu, K. -Y.; Chang, F. R.; Wu, Y. -Ch. 2008. New cyclic peptides from seeds of *Annona squamosa* L. and their anti-inflammatory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (2): 386-392.

Yano, T; Chu, S. S.; Sled', V. D.; Ohnishi, T.; Yagi, T. 1997. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8- complete DNA sequence of the gene cluster and thermostable properties of the expressed NQ02 subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 4201-4211.

Yano, T. and T. Yagi. 1999. H⁺-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Paracoccus denitrificans*: studies on topology and stoichiometry of the

peripheral subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 28606-28611.

Yano, T.; Magnitsky, S.; Sled', V. D.; Ohnishi, T.; Yagi, T. 1999. Characterization of the putative 2x[4Fe-4S] binding NQO9 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Paracoccus denitrificans*: expression, reconstitution, and EPR characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 28598-28605.

Yu, J. G.; Hu, X. E.; Ho, D. K.; Bean, M. F.; Stephens, R. 1994. Absolute stereochemistry of (+)- gigantecin from *Annona coriacea* (Annonaceae). *Journal of Biological Chemistry*. 59 (7): 1598-1599.

Yu, J. G.; Luo, X. Z.; Sun, L.; Li, D. Y.; Huang, W. H.; Liu, C. Y. 2005. Chemical constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Yao Xue Xue Bao*. 40 (2): 153-158.

Yuan, S. S. F.; Chang, H. L.; Chen, H. W.; Yeh, Y. T.; Kao, Y. H.; Lin, K. H.; Wu, J. H. 2003. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrest cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Sciences*. 72: 2853-2861.

Yuan, S. S.; Chang, H. L.; Chen, H. W.; Kuo, F. C.; Liaw, C. C.; Su, J. H.; Wu, Y. C. 2006. Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. *Life Sciences*. 78 (8): 869-874.

Zafra-Polo, M. C.; González, M. C.; Estornell, E.; Sahpaz, S.; Cortes, D. 1996. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*. 42 (2): 253-271.

Zafra-Polo, M. C.; Figadère, B.; Gallardo, T.; Tormo, J. R.; Cortes, D. 1998.

Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*. 48 (7): 1087-1117.

Zavala Hernández, Francisco, Chávez Franco, S.; Muratalla-Lua, A. 1997a. Caracterización de una población de llama (*Annona diversifolia* Saff.), ubicada en la región de la Tierra Caliente, Estado de Guerrero. Memorias del I Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. pp. 133-146.

Zavala Hernández, F.; García Villanueva, E.; Muratalla-Lúa, A.; Chávez Franco, S. 1997b. Diferenciación de yemas de *Annona diversifolia* Saff. en la región de tierra caliente, Guerrero. Memoria del I Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. pp. 169-185.

Zeng, L.; Wu, F. E.; Oberlies, N. H.; McLaughlin, J. L.; Sastrodihadjo, S. 1996. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 59 (11): 1035-1042.

Zhao, G.; Hui, Y.; Rupprecht, J. K.; McLaughlin, J. L. 1992. Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. *Journal of Natural Products*. 55 (3): 347-356.

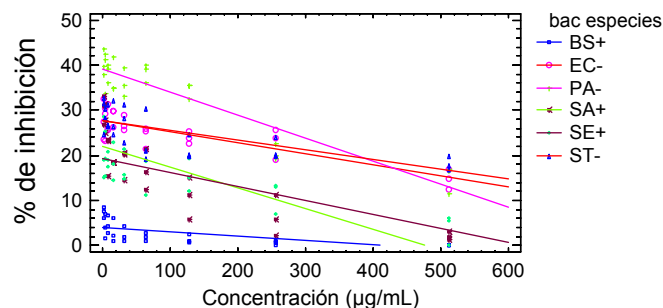
Zhao, G.; Ng, J. H.; Koslowski, J. F.; Smith, D. L.; McLaughlin, J. L. 1994. Bullatin and bullanin: two novel, highly cytotoxic acetogenins from *Asimina triloba*. *Heterocycles*. 38: 1897-1908.

Zhu, X. F.; Liu, Z. C.; Xie, B. F.; Li, Z. M.; Fena, G. K.; Xie, H. H.; Wu, S. J.; Yang, R. Z.; Wei, X. Y.; Zeng, Y. X. 2002. Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. *Life Sciences*. 70 (11): 1259-1269.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Comparación de rolliniastatina-2 vrs. todas las bacterias

Comparación de las líneas de regresión



Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	19656.9	11	1786.99	132.00	0.0000
Residuos	2030.63	150	13.5375		

Total (Corr.) 21687.5 161
 R-Cuadrado = 90.6369 porcentaje
 R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 89.9503 porcentaje
 Error Estándar de la Est. = 3.67934
 Error absoluto de la Media = 2.83178
 Estadístico Durbin-Watson = 1.65094 (P=0.0129)
 Autocorrelación residual Lag 1 = 0.170818

Anova multifactorial

Análisis de la Varianza para % de inhibición - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Bac especies	14825.3	5	2965.07	280.19	0.0000
B:Concentración	4310.2	8	538.775	50.91	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1409.08	40	35.2269	3.33	0.0000
RESIDUOS	1142.89	108	10.5823		
TOTAL (CORREGIDO)	21687.5	161			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rangos para % de inhibición según especies bacterianas

Método: 95.0 porcentaje Bonferroni

bac especies	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BS+	27	2.83527	0.626049	X
SE+	27	15.8203	0.626049	X
SA+	27	16.8624	0.626049	X
EC-	27	24.9028	0.626049	X
ST-	27	25.226	0.626049	X
PA-	27	33.2662	0.626049	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
BS+ - EC-	*-22.0675	2.85536
BS+ - PA-	*-30.431	2.85536
BS+ - SA+	*-14.0271	2.85536
BS+ - SE+	*-12.985	2.85536
BS+ - ST-	*-22.3907	2.85536
EC- - PA-	*-8.36346	2.85536
EC- - SA+	*8.04043	2.85536
EC- - SE+	*9.08251	2.85536
EC- - ST-	-0.323182	2.85536
PA- - SA+	*16.4039	2.85536
PA- - SE+	*17.446	2.85536
PA- - ST-	*8.04028	2.85536
SA+ - SE+	1.04208	2.85536
SA+ - ST-	*-8.36361	2.85536
SE+ - ST-	*-9.40569	2.85536

* indica una diferencia significativa.

Muestras Pareadas - Positivas & Negativas

Datos: Positivas-Negativas
Variable de Selección: concentra
81 valores comprendidos desde -29.67 hasta -0.401024

Frecuencia = 81
Media = -15.959
Varianza = 52.8989
Desviación típica = 7.27316
Mínimo = -29.67
Máximo = -0.401024
Rango = 29.269
Asimetría tipi. = 0.540908
Curtosis típicada = -1.31249
Intervalos de Confianza para Positivas-Negativas

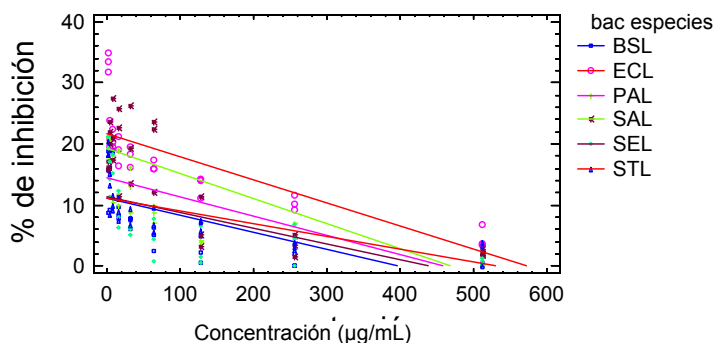
95.0% intervalo de confianza para la media: -15.959 +/- 1.60823 [-17.5673,-14.3508]
95.0% intervalo de confianza para la desviación típica: [6.29987, 8.60494]

contraste t

Hipótesis nula: media = 0.0
Alternativa: no igual
Estadístico t = -19.7481
P-valor = 0.0

Anexo 2. Comparación de la herradura vs. todas las bacterias

Comparación de las Líneas de Regresión:



Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	6225.71	11	565.974	23.82	0.0000
Residuos	3564.56	150	23.7637		
Total (Corr.)	9790.27	161			

R-Cuadrado = 63.5908 porcentaje
R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 60.9208 porcentaje
Error Estándar de la Est. = 4.8748
Error absoluto de la Media = 3.91974
Estadístico Durbin-Watson = 0.898096 (P=0.0000)
Autocorrelación residual Lag 1 = 0.541626

Anova multifactorial

Análisis de la Varianza para % de inhibición - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A: bac especies	2000.86	5	400.172	47.63	0.0000
B: concentración	5736.97	8	717.121	85.36	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1145.1	40	28.6275	3.41	0.0000
RESIDUOS	907.337	108	8.40127		
TOTAL (CORREGIDO)	9790.27	161			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual

Contraste Múltiple de Rangos para % de inhibición según especies bacterianas

Método: 95.0 porcentaje Bonferroni

bac especies	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BSL	27	7.98064	0.557816	X
SEL	27	8.41854	0.557816	XX
STL	27	8.74958	0.557816	XX
PAL	27	10.8796	0.557816	X
SAL	27	14.5762	0.557816	X
ECL	27	17.4138	0.557816	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
BSL - ECL	*-9.43314	2.54415
BSL - PAL	*-2.89899	2.54415
BSL - SAL	*-6.59553	2.54415
BSL - SEL	-0.437901	2.54415
BSL - STL	-0.768935	2.54415
ECL - PAL	*6.53415	2.54415
ECL - SAL	*2.8376	2.54415
ECL - SEL	*8.99524	2.54415
ECL - STL	*8.6642	2.54415
PAL - SAL	*-3.69654	2.54415
PAL - SEL	2.46109	2.54415
PAL - STL	2.13005	2.54415
SAL - SEL	*6.15763	2.54415
SAL - STL	*5.8266	2.54415
SEL - STL	-0.331034	2.54415

* indica una diferencia significativa.

Anexo 3. Actividad de laherradurina y rolliniastatina-2 vs. bacterias Gramnegativas

Anova multifactorial

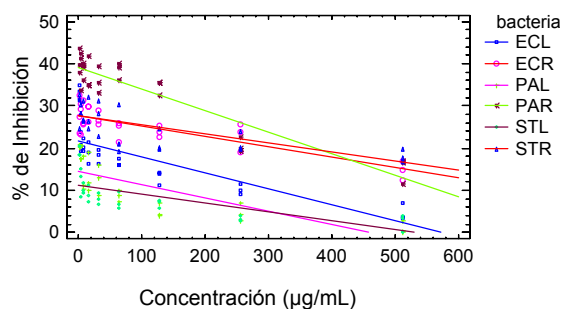
Análisis de la Varianza para% Inhibición - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	4851.84	8	606.48	82.62	0.0000
B:Bacteria	11981.3	5	2396.25	326.43	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1154.16	40	28.8541	3.93	0.0000
RESIDUOS	792.796	108	7.3407		
TOTAL (CORREGIDO)	18780.1	161			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Comparación de las Líneas de Regresión:

% Inhibición frente a concentración según bacteria Gramnegativas



Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	16576.3	11	1506.93	102.57	0.0000
Residuos	2203.81	150	14.6921		
Total (Corr.)	18780.1	161			

R-Cuadrado = 88.2652 porcentaje

R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 87.4046 porcentaje

Error Estándar de la Est. = 3.83302

Error absoluto de la Media = 2.98105

Estadístico Durbin-Watson = 1.21139 (P=0.0000)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0.392238

Contraste Múltiple de Rangos para % Inhibición según bacteria

Método: 95.0 porcentaje Bonferroni

bacteria	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
STL	27	8.74958	0.521419	X
PAL	27	10.8796	0.521419	X
ECL	27	17.4138	0.521419	X
ECR	27	24.9028	0.521419	X
STR	27	25.226	0.521419	X
PAR	27	33.2662	0.521419	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
ECL - ECR	*-7.489	2.37815
ECL - PAL	*6.53415	2.37815
ECL - PAR	*-15.8525	2.37815
ECL - STL	*8.6642	2.37815
ECL - STR	*-7.81218	2.37815
ECR - PAL	*14.0231	2.37815
ECR - PAR	*-8.36346	2.37815
ECR - STL	*16.1532	2.37815
ECR - STR	-0.323182	2.37815
PAL - PAR	*-22.3866	2.37815
PAL - STL	2.13005	2.37815
PAL - STR	*-14.3463	2.37815
PAR - STL	*24.5167	2.37815
PAR - STR	*8.04028	2.37815
STL - STR	*-16.4764	2.37815

* indica una diferencia significativa.

Anexo 4. Actividad de laherradurina y rolliniastatina-2 vrs. bacterias Grampositivas

Anova multifactorial

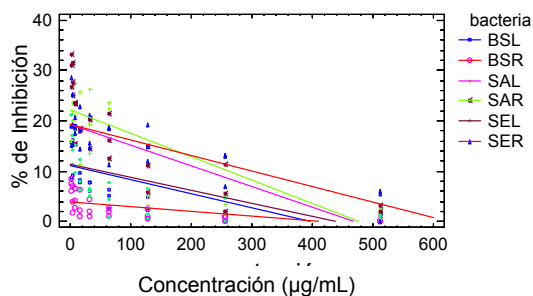
Análisis de la Varianza para% Inhibición - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:concentración	5055.6	8	631.95	54.28	0.0000
B:bacteria	4125.43	5	825.087	70.87	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1539.74	40	38.4935	3.31	0.0000
RESIDUOS	1257.43	108	11.6429		
TOTAL (CORREGIDO)	11978.2	161			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual

Comparación de las Líneas de Regresión:

% Inhibición frente a concentración según bacteria Grampositivas



Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	8586.84	11	780.622	34.53	0.0000
Residuos	3391.37	150	22.6091		
Total (Corr.)	11978.2	161			

R-Cuadrado = 71.6872 porcentaje

R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 69.6109 porcentaje

Error Estándar de la Est. = 4.75491

Error absoluto de la Media = 3.77047

Estadístico Durbin-Watson = 1.17591 (P=0.0000)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0.410334

Contraste Múltiple de Rangos para % Inhibición según bacteria

Método: 95.0 porcentaje Bonferroni

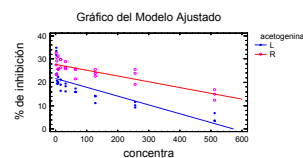
bacteria	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BSR	27	2.83527	0.656672	X
BSL	27	7.98064	0.656672	X
SEL	27	8.41854	0.656672	X
SAL	27	14.5762	0.656672	X
SER	27	15.8203	0.656672	X
SAR	27	16.8624	0.656672	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
BSL - BSR	*5.14537	2.99503
BSL - SAL	*-6.59553	2.99503
BSL - SAR	*-8.88171	2.99503
BSL - SEL	-0.437901	2.99503
BSL - SER	*-7.83963	2.99503
BSR - SAL	*-11.7409	2.99503
BSR - SAR	*-14.0271	2.99503
BSR - SEL	*-5.58327	2.99503
BSR - SER	*-12.985	2.99503
SAL - SAR	-2.28618	2.99503
SAL - SEL	*6.15763	2.99503
SAL - SER	-1.24409	2.99503
SAR - SEL	*8.44381	2.99503
SAR - SER	1.04208	2.99503
SEL - SER	*-7.40173	2.99503

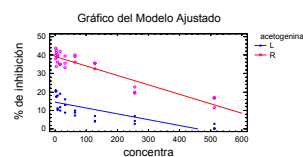
* indica una diferencia significativa.

Anexo 5. Actividad de laherradurina y rolliniastatina-2 vrs. cada bacteria

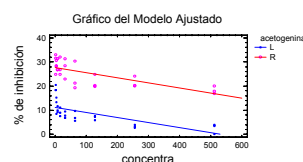
	<i>Escherichia coli</i>			
	Concentración		Comparación	
Rolliniastatina-2	F = 6.54	P= 0.0005	Rolli	
Laherradurina	F = 64.33	P= 0.0000	F=129.93	P= 0.0000



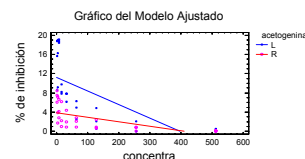
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	Concentración		Comparación	
Rolliniastatina-2	F = 27.23	P= 0.0000	Rolli	
Laherradurina	F = 16.58	P= 0.0000	F= 801.18	P= 0.0000



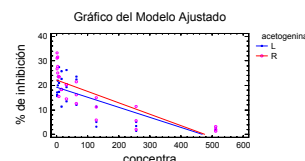
	<i>Salmonella Typhi</i>			
	Concentración		Comparación	
Rolliniastatina-2	F = 21.93	P= 0.0000	Rolli	
Laherradurina	F = 4.15	P= 0.0058	F= 472.89	P= 0.0000



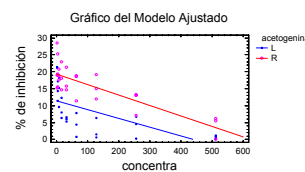
	<i>Bacillus subtilis</i>			
	Concentración		Comparación	
Rolliniastatina-2	F = 5.48	P= 0.0013	Laherra	
Laherradurina	F = 18.95	P= 0.0000	F=72.14	P= 0.0000



	<i>S. aureus</i>			
	Concentración		Comparación	
Rolliniastatina-2	F = 19.76	P= 0.0013	Laherra	
Laherradurina	F = 9.40	P= 0.0000	F= 4.13	P= 0.0497



	<i>S. epidermidis</i>			
	Concentración		Comparación	
Rolliniastatina-2	F = 4.85	P= 0.0026	Iguales	
Laherradurina	F = 16.32	P= 0.0000	F= 57.47	P= 0.0000



Anexo 6. Actividad de rolliniastatina-2 y laherradurina vrs. seis bacterias

Actividad de rolliniastatina-2 vrs. seis bacterias. Análisis a 7 horas.

ANOVA Factorial - % Inhibición rolliniastatina-2

Análisis de la Varianza para % Inhibición rolliniastatina-2 - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:bacteria	3929.25	5	785.849	15.38	0.0000
B:concentración	722.311	6	120.385	2.36	0.0375
INTERACCIONES					
AB	4038.61	30	134.62	2.64	0.0003
RESIDUOS	4291.24	84	51.0862		
TOTAL (CORREGIDO)	12981.4	125			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rangos para % Inhibición rolliniastatina-2 según bacteria

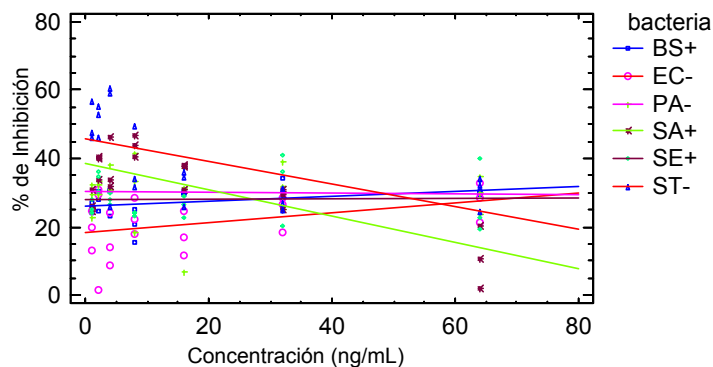
Método: 95.0 porcentaje Bonferroni

bacteria	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
EC-	21	21.2043	1.5597	X
BS+	21	27.2771	1.5597	XX
SE+	21	28.261	1.5597	XX
PA-	21	30.0695	1.5597	X
SA+	21	31.63	1.5597	X
ST-	21	39.8552	1.5597	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
BS+ - EC-	6.07286	7.16631
BS+ - PA-	-2.79238	7.16631
BS+ - SA+	-4.35286	7.16631
BS+ - SE+	-0.98381	7.16631
BS+ - ST-	*-12.5781	7.16631
EC- - PA-	*-8.86524	7.16631
EC- - SA+	*-10.4257	7.16631
EC- - SE+	-7.05667	7.16631
EC- - ST-	*-18.651	7.16631
PA- - SA+	-1.56048	7.16631
PA- - SE+	1.80857	7.16631
PA- - ST-	*-9.78571	7.16631
SA+ - SE+	3.36905	7.16631
SA+ - ST-	*-8.22524	7.16631
SE+ - ST-	*-11.5943	7.16631

* indica una diferencia significativa

Comparación de las Líneas de Regresión - % Inhibición rolliniastatina-2 frente a concentración según bacteria



Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	6658.91	11	605.355	10.92	0.0000
Residuos	6322.5	114	55.4605		
Total (Corr.)	12981.4	125			

R-Cuadrado = 51.2958 porcentaje
R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 46.5962 porcentaje
Error Estándar de la Est. = 7.44718
Error absoluto de la Media = 5.54947
Estadístico Durbin-Watson = 2.23215 (P=0.0969)
Autocorrelación residual Lag 1 = -0.118931

Actividad de laherradurina vs. 6 bacterias. Análisis a 7 horas.

ANOVA Factorial - % Inhibición laherradurina

Análisis de la Varianza para % de Inhibición laherradurina - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:bacteria	21864.9	5	4372.99	85.13	0.0000
B:concentración	1918.3	6	319.716	6.22	0.0000
INTERACCIONES					
AB	4600.87	30	153.362	2.99	0.0000
RESIDUOS	4315.02	84	51.3693		
TOTAL (CORREGIDO)	32699.1	125			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rangos para % de Inhibición laherradurina según bacteria

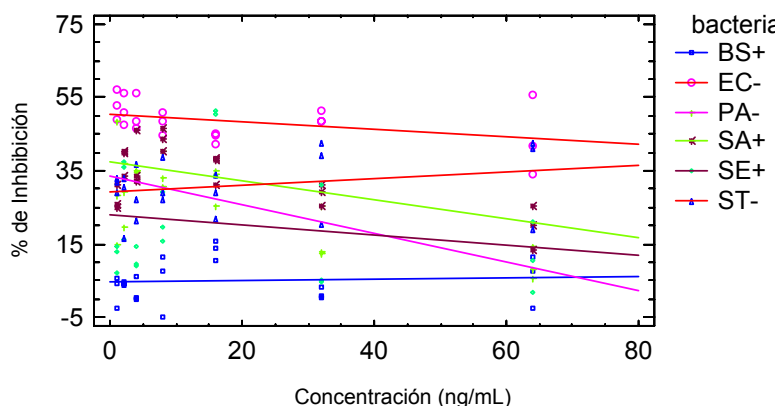
Método: 95.0 porcentaje Bonferroni

bacteria	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BS+	21	4.93714	1.56402	X
SE+	21	20.6362	1.56402	X
PA-	21	26.6014	1.56402	XX
ST-	21	30.8229	1.56402	X
SA+	21	32.8619	1.56402	X
EC-	21	48.5819	1.56402	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
BS+ - EC-	*-43.6448	7.18615
BS+ - PA-	*-21.6643	7.18615
BS+ - SA+	*-27.9248	7.18615
BS+ - SE+	*-15.699	7.18615
BS+ - ST-	*-25.8857	7.18615
EC- - PA-	*21.9805	7.18615
EC- - SA+	*15.72	7.18615
EC- - SE+	*27.9457	7.18615
EC- - ST-	*17.759	7.18615
PA- - SA+	-6.26048	7.18615
PA- - SE+	5.96524	7.18615
PA- - ST-	-4.22143	7.18615
SA+ - SE+	*12.2257	7.18615
SA+ - ST-	2.03905	7.18615
SE+ - ST-	*-10.1867	7.18615

* indica una diferencia significativa.

Comparación de las Líneas de Regresión - % Inhibición rolliniastatina-2 frente a concentración según bacteria



Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	24348.6	11	2213.51	30.22	0.0000
Residuos	8350.57	114	73.2506		
Total (Corr.)	32699.1	125			

R-Cuadrado = 74.4624 porcentaje
R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 71.9983 porcentaje
Error Estándar de la Est. = 8.55866
Error absoluto de la Media = 6.27304
Estadístico Durbin-Watson = 1.68877 (P=0.0403)
Autocorrelación residual Lag 1 = 0.150072

Anexo 7. Comparación entre la actividad de rolliniastatina-2 y laherradurina *vs.* bacterias Gramnegativas y Grampositivas

Comparación entre la actividad de rolliniastatina-2 y laherradurina *vs.* bacterias Gramnegativas

ANOVA Factorial - % Inhibición rolliniastatina-2 y laherradurina *vs.* Gramnegativas

Análisis de la Varianza para % de Inhibición - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	834.901	6	139.15	2.07	0.0653
B:Bacterias	10144.6	5	2028.92	30.18	0.0000
INTERACCIONES					
AB	3503.28	30	116.776	1.74	0.0258
RESIDUOS	5647.42	84	67.2312		
TOTAL (CORREGIDO)	20130.2	125			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Contraste Múltiple de Rangos para % de Inhibición según bacterias

-----Comparación
de las Líneas de Regresión - % de Inhibición frente a concentración según bacterias

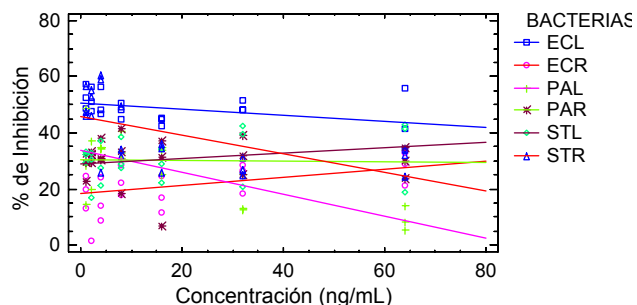
Método: 95.0 porcentaje Bonferroni

BACTERIAS	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ECR	21	21.2048	1.78927	X
PAL	21	26.6021	1.78927	XX
PAR	21	30.0689	1.78927	X
STL	21	30.8238	1.78927	X
STR	21	39.8552	1.78927	X
ECL	21	48.5826	1.78927	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
ECL - ECR	*27.3778	8.2211
ECL - PAL	*21.9805	8.2211
ECL - PAR	*18.5138	8.2211
ECL - STL	*17.7588	8.2211
ECL - STR	*8.72741	8.2211
ECR - PAL	-5.39737	8.2211
ECR - PAR	*-8.86408	8.2211
ECR - STL	*-9.61902	8.2211
ECR - STR	*-18.6504	8.2211
PAL - PAR	-3.46671	8.2211
PAL - STL	-4.22165	8.2211
PAL - STR	*-13.2531	8.2211
PAR - STL	-0.754943	8.2211
PAR - STR	*-9.78635	8.2211
STL - STR	*-9.03141	8.2211

- indica una diferencia significativa.

Comparación de las Líneas de Regresión - % Inhibición rolliniastatina-2 y laherradurina frente a concentración según bacterias Gramnegativas



Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	13035.4	11	1185.04	19.04	0.0000
Residuos	7094.8	114	62.2351		
Total (Corr.)	20130.2	125			

R-Cuadrado = 64.7554 porcentaje
R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 61.3546 porcentaje
Error Estándar de la Est. = 7.88892
Error absoluto de la Media = 5.91938
Estadístico Durbin-Watson = 2.36321 (P=0.0205)
Autocorrelación residual Lag 1 = -0.199643

Comparación entre la actividad de rolliniastatina-2 y laherradurina vrs. bacterias Grampositivas

ANOVA Factorial - % Inhibición rolliniastatina-2 y laherradurina vrs. Gramnegativas

Análisis de la Varianza para % de inhibición - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:concentración	2453.57	6	408.928	11.61	0.0000
B:BACTERIAS	11338.4	5	2267.68	64.38	0.0000
INTERACCIONES					
AB	4488.23	30	149.608	4.25	0.0000
RESIDUOS	2958.8	84	35.2238		
TOTAL (CORREGIDO)	21239.0	125			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

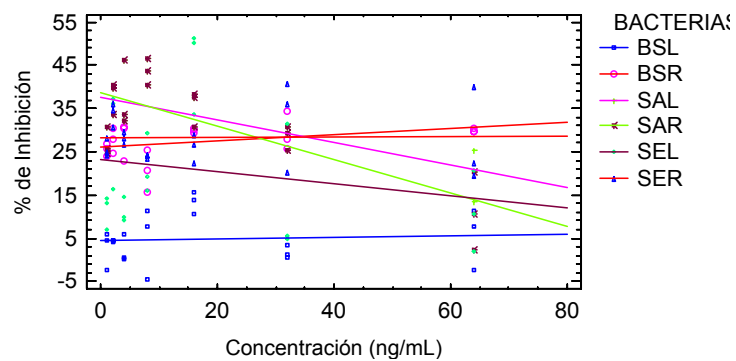
Contraste Múltiple de Rangos para % de inhibición según bacterias

Método: 95.0 porcentaje Bonferroni				
BACTERIAS	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BSL	21	4.93714	1.29512	X
SEL	21	20.6362	1.29512	X
BSR	21	27.2771	1.29512	X
SER	21	28.261	1.29512	X
SAR	21	31.63	1.29512	X
SAL	21	32.8619	1.29512	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
BSL - BSR	*-22.34	5.95062
BSL - SAL	*-27.9248	5.95062
BSL - SAR	*-26.6929	5.95062
BSL - SEL	*-15.699	5.95062
BSL - SER	*-23.3238	5.95062
BSR - SAL	-5.58476	5.95062
BSR - SAR	-4.35286	5.95062
BSR - SEL	*6.64095	5.95062
BSR - SER	-0.98381	5.95062
SAL - SAR	1.2319	5.95062
SAL - SEL	*12.2257	5.95062
SAL - SER	4.60095	5.95062
SAR - SEL	*10.9938	5.95062
SAR - SER	3.36905	5.95062
SEL - SER	*-7.62476	5.95062

* indica una diferencia significativa.

Comparación de las Líneas de Regresión - % Inhibición rolliniastatina-2 y laherradurina frente a concentración según bacteria Grampositivas



Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	13660.7	11	1241.88	18.68	0.0000
Residuos	7578.29	114	66.4763		
Total (Corr.)	21239.0	125			

R-Cuadrado = 64.319 porcentaje
R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 60.8761 porcentaje
Error Estándar de la Est. = 8.1533
Error absoluto de la Media = 5.90293
Estadístico Durbin-Watson = 1.48861 (P=0.0019)
Autocorrelación residual Lag 1 = 0.252684

Anexo 8. Ensayo utilizando concentraciones en ng/mL (7 horas)

Muestras Pareadas	<i>E. coli:</i> Laherra vs Rolli	<i>P.aeruginosa:</i> Laherra vs Rolli	S. Typhi: Laherra vs Rolli
Diferencias	27.3776	-3.4681	-9.03238
IC	[22.4918,32.2634]	[-9.72918,2.79298]	[-16.3521,-1.7127]
desvtip.	10.7335	13.7547	16.0803
	t = 11.6887	t = -1.15545	t = -2.57405
	P= 2.16027E-10	P = 0.261526	P= 0.018114
Anova			
F=	158.78	1.76	10.65
P=	0.0000	0.1952	0.0029

Muestras Pareadas	<i>B. subtilis:</i> Laherra vs Rolli	<i>S. aureus:</i> Laherra vs Rolli	<i>S. epidermidis:</i> Laherra vs Rolli
Diferencias	-22.2824	1.2319	-8.58333
IC	[-31.6861,-12.8787]	[-0.55568,3.01949]	[-18.6754,1.50873]
desvtip.	20.6586	3.92707	22.1708
	t = -4.94276	t = 1.43753	t = -1.77412
	P = 0.0000784046	P= 0.166029	P= 0.0912692
Anova			
F=	18.74	0.63	3.13
P=	0.0002	0.4332	0.0878

Anexo 9. Susceptibilidad de bacterias libres de pared

Muestras Pareadas	<i>E. coli:</i> Laherra vs Rolli	<i>P. aeruginosa:</i> Laherra vs Rolli	<i>S. Typhi:</i> Laherra vs Rolli
Diferencias	0.62	-3.20675	3.61088
IC	[-5.78919,7.03261]	[-6.71946,0.305962]	[-0.00597962,7.22773]
desvtip.	7.66833	4.20169	4.32626
	t = 0.229314	t = -2.15867	t = 2.36072
	P = 0.825181	P-valor = 0.0677414	P= 0.0503962
Anova			
F=	F= 0.05	F= 3.7	F= 7.60
P=	P= 0.835	P= 0.0905	P= 0.0174

Muestras Pareadas	<i>B. subtilis:</i> Laherra vs Rolli	<i>S. aureus:</i> Laherra vs Rolli	<i>S. epidermidis:</i> Laherra vs Rolli
Diferencias	4.38	3.86	-2.89624
IC	[-3.15629,11.9163]	[0.0139359,7.70606]	[-10.3575,4.56507]
desvtip.	9.01445	4.60043	8.92477
	t = 1.3743	t= 2.3732	t = -0.917872
	P = 0.211734	P = 0.0493739	P = 0.389216
Anova			
F=	1.25	9.71	4.2
P=	0.2953	0.0143	0.0745

Anexo 10. Contraste de la susceptibilidad entre bacterias libres de pared y bacterias completas: Rolliniastatina-2 y laherradurina

Rolliniastatina-2

Muestra Pareadas	<i>E.coli</i> : completas vrs. esferoplastos	<i>P. aeruginosa</i> : completas vrs. esferoplastos	S. Typhi: completas vrs. esferoplastos	<i>B. subtilis</i> : completas vrs. protoplastos	<i>S. aureus</i> : completas vrs. protoplastos	<i>S. epidermidis</i> : completas vrs. protoplastos
Media	-33.5725	-30.115	-10.65	-17.5325	-36.715	-21.57
IC	[-46.8208,- 20.3242]	[-41.6765,- 18.5535]	[- 22.7584,1.45842]	[-33.8096,- 1.25536]	[-57.7274,- 15.7026]	[-23.9462,- 19.1938]
desvtip.	8.32586	7.26576	7.6095	10.2293	13.2052	1.49334
Estadistico	-8.06464	-8.28957	-2.79913	-3.42789	-5.5607	-28.8882
Estadistico	0.00398277	0.00367771	0.0679017	0.041602	0.0114735	0.0000910829

Laherradurina

Muestra Pareadas	<i>E.coli</i> : Completas vrs. esferoplastos	<i>P. aeruginosa</i> : completas vrs. esferoplastos	S. Typhi: completas vrs. esferoplastos	<i>B. subtilis</i> : Completas vrs. protoplastos	<i>S. aureus</i> : completas vrs. protoplastos	<i>S. epidermidis</i> : completas vrs. protoplastos
Diferencia	-10.7325	-28.4075	-25.6275	-24.11	-37.54	-54.04
IC	[-12.708,-8.757]	[-45.5494,- 11.2656]	[-31.5579,- 19.6971]	[-53.5268, 5.30678]	[-51.8147,- 23.2653]	[-58.7209,- 49.3591]
desvtip.	1.9752	10.7728	3.72693	18.4869	8.9709	2.9417
t =	-17.292	-5.27395	-13.7526	-2.60834	-8.36928	-36.7407
P =	0.00042144	0.01329	0.000831977	0.0797994	0.00357704	0.0000443479