



**Secretaría de Educación Pública TECNOLÓGICO NACIONAL DE
MÉXICO**

Instituto Tecnológico de Veracruz

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS CON BIOACTIVIDAD DE
ESPECIES DEL GÉNERO *ANNONA*”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

Q.C DALIA SANTOS LUNA

ASESORES:

DR. GERARDO VALERIO ALFARO

DRA. MA. GUADALUPE SÁNCHEZ OTERO

DR. FRANCISCO ABELARDO CEN PACHECO

H. VERACRUZ VER.

Índice General

Resumen	9
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Familia <i>Annonaceae</i>	4
2.1.1. Taxonomía y características botánicas.	4
2.1.2. Distribución natural.	5
2.2. Estudio fitoquímico de la familia <i>Annonaceae</i>	5
2.3. Actividad biológica de los extractos crudos.	6
2.4. Acetogeninas.....	7
2.4.1. Características estructurales de las ACGs.....	9
2.4.2. Clasificación de las ACGs.....	11
2.4.3. Biosíntesis de las ACGs.....	14
2.4.4. Mecanismos de acción de las ACGs.....	16
2.4.5. Actividad biológica de las ACGs.....	17
2.5. Péptidos.....	20
2.5.1. Clasificación de péptidos en plantas.	22
2.5.2. Péptidos de la familia <i>Annonaceae</i>	22
3. HIPÓTESIS.	26
4. OBJETIVOS.	27
4.1. <i>Objetivo general</i>	27
4.2. <i>Objetivos específicos</i>	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	28
5.1. Material vegetal y biológico.	28
5.2. Obtención de los extractos.	28
5.2.1. Fraccionamiento por el método de <i>Kupchan</i>	28
5.3. Técnicas cromatográficas.....	29
5.4. Bioensayo de actividad antiproliferativa.....	31
5.5. Purificación de la fracción DAE-1B de <i>A. scleroderma</i>	33
5.6. Purificación de la fracción DAE-1C de <i>A. scleroderma</i>	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	39
6.1. Estudio de elucidación estructural de DAE-3E1B.	40

6.1. Estudio de elucidación estructural de DAE-1C7D.....	49
Referencias	58

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia Annonaceae.....	4
Tabla 2. Bioactividad del extracto crudo de la familia Annonaceae.....	7
Tabla 3. Desplazamientos químicos de rolliniastina 2 <u>40</u>	48
Tabla 4. Desplazamientos químicos de DAE-1C7D <u>41</u>	53

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución mundial de las especies de la familia Annonaceae	5
Figuro 2. Estereoquímica de los centros quirales de las ACGs.....	9
Figura 3. Representación de la estructura general de las ACGs con una ACG <i>bis</i> - THF. Se indican los cuatro módulos estructurales característicos de las ACGs.....	11
Figura 4. Mecanismo de acción de las ACGs bis-THF sobre los fosfolípidos de la membrana celular (Liaw, et al., 2016).....	17
Figura 5. Representación del enlace peptídico.....	21
Figura 6. Ensayo de actividad anti proliferativa de las fracciones por el método de Kupchan (DEA-1, DAE-1A, DAE-1B, DAE-1C y DAE-1D). La fracción DAE-1B fue una de las fracciones que mostró una actividad citotóxica importante.....	33
Figura 7. Graficas de actividad anti proliferativa de las fracciones DAE2A.....	34
Figura 8. Graficas de actividad anti proliferativa de las fracciones DAE- 2A3.....	35
Figura 9. Graficas de actividad anti proliferativa de las fracciones DAE-3E1.....	36
Figura 10. Espectro de protón de rolliniastatina 2 40 . (X=heteroátomo). 41	
Figura 11. Estructuras parciales de rolliniastatina 2 40 . Arriba se muestra todas las correlaciones ^1H - ^1H que se observarían si no hubiese superposición. Abajo se muestra las conectividades ^1H - ^1H que se pudieron extraer del experimento COSY.....	43
Figura 12. Espectro COSY de rolliniastatina 2 40	43
Figura 13. Espectro HSQC de rolliniastatina 2 40	44
Figura 14. Correlaciones COSY y HMBC más importantes observadas para el rolliniastatina 2 40	45
Figura 15. Espectro HMBC de rolliniastatina 2 40	45

Figura 16. Espectro de Masas de rolliniastatina 2 40	46
Figura 17. Espectro de carbono del rolliniastatina 2 40	47
Figura 18. Espectro de Masas de DAE-1C7D 41	49
Figura 19. Correlaciones COSY observadas para los aminoácidos de DAE-1C7D 41	50
Figura 20. Correlaciones COSY observadas para la arginina de DAE-1C7D 41	51
Figura 21. Espectro HSQC de DAE-1C7D 41	51
Figura 22. Correlaciones COSY y HMBC más importantes observadas para los aminoácidos de DAE-1C7D 41	52
Figura 23. Correlaciones NOESY y HMBC más importantes observadas entre los aminoácidos de DAE-1C7D 41	54
Figura 24. Espectro HMBC de DAE-1C7D 41	55
Figura 25. Espectro NOESY de DAE-1C7D 41	55

Índice de Esquemas

Esquema 1. Ruta de biosíntesis de policétidos. Las unidades iniciadoras y elongadoras para los policétidos son ácidos carboxílicos lineales y como unidad elongadora puede utilizar malonil-CoA, metilmalonil-CoA o etilmalonil-CoA.....	15
Esquema 2. Fraccionamiento del extracto metanólico por el método de Kupchan.....	29
Esquema 3. Marcha cromatográfica del extracto metanólico de <i>Annona scleroderma</i> . I. Método de Kupchan. II. Cromatografía de exclusión molecular: Columna por gravedad; Sephadex LH-20; Metanol. III. HPLC: Fase normal; <i>n</i> -Hex/acetona (75:25); flujo: 1 mL/min. IV. HPLC: Fase normal; <i>n</i> -Hex/acetona (80:20); flujo: 1 mL/min. V. HPLC: Fase normal; <i>n</i> -Hex/Acetona (90:10); flujo: 1 mL/min.....	37
Esquema 4. Marcha cromatográfica del fraccionamiento de DAE-1C. I. Método de Kupchan. II. Cromatografía a media presión: Fase reversa Lobar® LiChroprep® RP-18; MeOH/H ₂ O (60:40); flujo: 1mL/min. III. HPLC: Fase reversa Lobar® LiChroprep® RP-18; MeOH/H ₂ O (60:40); flujo: 1mL/min. IV. HPLC: Fase reversa Lobar® LiChroprep® RP-18; MeOH/H ₂ O (50:50); flujo: 1mL/min.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACGs	Acetogeninas
AcOEt	Acetato de etilo
ACP	Proteína transportadora de grupos acilo
AMPs	Antimicrobial peptides
AT	Acil transferasa
ATP	Adenocin trifosfato
CCD	Cromatografía de capa delgada
DH	Deshidratasa
ER	Enoilreductasa
KR	β -ceto-reductasa
KS	β -cetoacil sintetasa
MAT	Malonil acetiltransferasa
MeOH	Metanol
NAD	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido
PKS	Policetido sintetasa
TE	Tioesterasa
THF	Tetrahidrofurano
THP	Tetrahidropirano

Resumen

Dalia Santos Luna M. en C. Unidad de Investigación en desarrollo de alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. “Estudio fitoquímico de extractos con bioactividad de especies del género *Annona*”. Asesores: Dr. Gerardo Valerio Alfaro, Dra. Ma. Guadalupe Sánchez Otero y el Dr. Francisco Abelardo Cen Pacheco.

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha realizado desde la antigüedad, una de las principales fuentes de obtención de nuevos fármacos son los metabolitos secundarios obtenidos de plantas. Uno de estos grupos de organismos vegetales que constituye una fuente invaluable de compuestos bioactivos, son las plantas de la familia *Annonaceae* a las que se les ha demostrado un gran número de actividades biológicas (actividad insecticida, citotóxica, antibacterial, pesticida y antiparasitaria), asociadas a los metabolitos secundarios que produce.

Es probable que *Annona escleroderma*, *A. globiflora* y *A. muricata*, poseen metabolitos que aún no han sido identificados y evaluados como potenciales agentes biológicos; por tal motivo en la presente memoria se propone el estudio fitoquímico de estas especies recolectadas en el estado de Veracruz, el cual permitirá iniciar una quimioteca de extractos y metabolitos secundarios puros que puedan sentar las bases para el desarrollo de nuevos fármacos.

El objetivo general de este trabajo fue realizar un estudio fitoquímico de semillas de una especie de la familia *Annonaceae* (*Annona scleroderma*, *A. muricata* o *A. globiflora*) para identificar metabolitos con actividad anti-proliferativa. Para conseguir lo anterior, es necesario cumplir con una serie de objetivos específicos como: 1. Medir el potencial anti-proliferativo de los extractos de las semillas de *Annona escleroderma*, *A. globiflora* y *A. muricata*. 2. Aislar y purificar los metabolitos del extracto metanólico de la especie que presente una pronunciada actividad citotóxica, mediante un proceso biodirigido. 3. Elucidar la o las estructuras químicas de los metabolitos secundarios obtenidos, mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Los especímenes de *A. escleroderma*, *A. globiflora* y *A. muricata* fueron recolectados en marzo del 2012, en Jalcomulco, Veracruz, México. Inicialmente se obtuvieron los extractos metanólicos de las semillas de las especies en estudio, obteniéndose tres extractos crudos, a los que llamamos DAE-1 (*A. escleroderma*), CHI-1 (*A. globiflora*) y DAM-1 (*A. muricata*). Posteriormente, los extractos fueron sometidos a una partición por el método de Kupchan, la fracción DAE-1B (fracción de diclorometano) mostro una actividad antiproliferativa sobre las línea RAW (Leucemia de macrófagos de ratón), partiendo de estos resultados se realizó una marcha cromatográfica biodirigida, obteniéndose así una acetogenina, cuya estructura fue establecida por sus datos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (HRMS) y se determinó que es el compuesto conocido como rolliniastatina. Por otra parte, la fracción DAE-1C (fracción de AcOEt), aun cuando no mostró una actividad antiproliferativa importante, fue purificada, ya que mostró un perfil interesante en su espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón, este estudio dio como resultado el aislamiento de un compuesto puro, cuya estructura fue establecida mediante el uso de técnicas de RMN y HRMS, este metabolito resultó ser un péptido de ocho residuos de aminoácidos.

En este proyecto se concluyó que el extracto metanólico de *A. scleroderma* presenta actividad antiproliferativa sobre la línea celular RAW, aislándose y purificándose uno de los metabolitos que presenta dicha bioactividad, al mismo tiempo se aisló un octapéptido que no ha sido descrito en la literatura científica. Las estructuras de ambos compuestos se determinaron mediante el uso de RMN y HRMS.

ABSTRACT

Dalia Santos Luna M. en C. Research Unit in Development of Food. Instituto Tecnológico de Veracruz. "Phytochemical study of extracts with bioactivity of species of the genus *Annona*". Advisers: PhD. Gerardo Valerio Alfaro, PhD. Ma. Guadalupe Sanchez Otero and PhD. Francisco Abelardo Cen Pacheco.

The use of medicinal plants for curative purposes is a practice that has been made since the antiquity, one of the main sources of obtaining new drugs, are the secondary metabolites derived from plants; a group of organisms which constitutes a source invaluable of bioactive compounds, are the plants of the family *Annonaceae* who have demonstrated possess a large number of biological activities (insecticide, cytotoxic, antibacterial, pesticide and antiparasitic), associating itself with the secondary metabolites that produces.

Annona scleroderma, *A. globiflora* and *A. muricata*, have metabolites which have still not been identified and evaluated as potential cytotoxic agents; in addition, a phytochemical study of plants of the family *Annonaceae* of the Veracruz state will initiate a quimioteca of extracts and secondary metabolites pure.

General Objective: Perform a phytochemical study of seeds of a species of the family Moraceae (*Annona scleroderma*, *A. muricata* or *A. globiflora*) to identify metabolites with antiproliferative activity. Specific objectives: 1. Measure the potential anti-proliferative the extracts from the seeds of *Annona scleroderma*, *A. globiflora* and *A. muricata*. 2. Isolate and purify the metabolites of the extract metanólico of the species that present a pronounced cytotoxic activity, through a process bioassay-guided. 3. Elucidate the chemical structures of the secondary metabolites obtained by spectroscopic methods.

The specimens of *A. scleroderma*, *A. globiflora* and *A. muricata* were collected in march 2012, in Jalcomulco, Veracruz, Mexico. Initially the methanolic extracts were obtained of seeds of the species under study, obtaining three crude extracts, to what we call the DAE-1 (*A. scleroderma*), CHI-1 (*A. globiflora*) and DAM-1 (*A. muricata*). Subsequently, the extracts were subjected to a partition by

the method of Kupchan, the fraction DAE-1B (dichloromethane fraction) showed activity antiproliferative on the RAW cell line (leukemia of macrophages mouse), starting from these results, a chromatography process bioassay-guided was realized, obtaining a acetogenin, whose structure was established by its data from Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and HRMS and it was determined that is the compound known as rolliniastatin. On the other hand, the fraction DAE-1C (ethyl acetate fraction) was purified by show interesting ^1H NMR signals, of this process was obtained a pure compound, whose structural studies by NMR, revealed that is a peptide of eight amino acid residues. In this project it was concluded that the extract metanólico from to *A. scleroderma* presents anti-proliferative activity on the cell line RAW.

This project concluded that the methanol extract of *A. scleroderma* showed antiproliferative activity on the cell line RAW, isolating and purifying a metabolite having such bioactivity, while an octapeptide has not been described in the scientific literature was isolated. The structures of these compounds were determined by using NMR and HRMS.

INTRODUCCIÓN.

El empleo de las plantas medicinales con fines terapéuticos se ha utilizado desde la antigüedad; la herbolaria forma parte de la medicina alternativa, la cual incluye el conocimiento y el uso terapéutico de las plantas, ya que poseen componentes activos útiles para el tratamiento de enfermedades (Pino, *et al.*, 2004; Bach, *et al.*, 2014). Todas las células realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos característicos en ellas, como carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, polímeros, entre otros, todos ellos son esenciales para la vida de un organismo (Ávalos, *et al.*, 2009), a la suma de estos procesos se le conoce como metabolismo primario. Además del metabolismo primario, los seres vivos han desarrollado rutas alternas a estas, que en muchos casos son específicas de una familia, de un género o de una especie particular, estas rutas biogénicas constituyen el metabolismo secundario, que inducen la formación de los denominados metabolitos secundarios, los cuales parecen no participar directamente en el crecimiento y desarrollo del organismo, asociándoseles más con funciones particulares, como puede ser de defensa contra depredadores, atracción de insectos polinizadores, protección a la radiación UV, entre otras funciones (Almaraz, *et al.*, 2005). Muchos de los metabolitos secundarios han sido o están siendo estudiados en relación a alguna actividad biológica de interés, con la finalidad de utilizar estos compuestos para el desarrollo de fármacos (Robles, *et al.*, 2009). En efecto, el descubrimiento de nuevos compuestos a partir de productos naturales, es el punto de partida para las empresas farmacéuticas que pretenden desarrollar nuevos fármacos de origen natural (Rojas, *et al.*, 2004).

México se encuentra en el cuarto lugar a nivel mundial en biodiversidad vegetal, las investigaciones científicas de la flora mexicana se han destacado por avances en el estudio fitoquímico y farmacológico de muchas especies botánicas, a pesar de ello, se estima que cerca de un 90 % de las especies endémicas no ha sido objeto de algún estudio fitoquímico. Esto puede representar una pérdida significativa de nuevos principios activos que podrían ser la formulación de nuevos fármacos (Cirilo, *et al.*, 2011).

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas, la herbolaria tradicional mexicana, está constituida por 4,500 especies (García de Alba, *et al.*, 2012), algunas de ellas, tales como las especies pertenecientes a la familia *Annonaceae*, se caracterizan por poseer numerosas sustancias bioactivas en sus hojas, raíces, frutos, cortezas y semillas (Moolgavkar, *et al.*, 2003). Es por ello, que en las últimas décadas, los estudios fitoquímicos y farmacológicos sobre especies de anonáceas se han intensificado, debido a que los metabolitos que poseen, tienen importantes actividades insecticidas, citotóxicas, antibacterial, pesticidas y antiparasitarias (Ocampo *et al.*, 2007); lo anterior, sumado al hecho de que los metabolitos bioactivos, poseen estructuras químicas novedosas, hacen de estos compuestos excelentes candidatos para el desarrollo de nuevos medicamentos (Ferreiro, 2014).

Por todos los motivos expuestos anteriormente el presente trabajo se centró en el estudio de fitoquímico de tres especies de anonáceas: *Annona scleroderma*, *A. muricata* y *A. globiflora*, los especímenes fueron recolectados en Jalcomulco, Veracruz, México. Se obtuvieron los extractos metanólicos de las semillas de cada especie, a los que se les denominó DAE-1 (*A. escleroderma*), CHI-1 (*A. globiflora*) y DAM-1 (*A. muricata*). Posteriormente, los extractos fueron sometidos a una partición líquido-líquido por el método de Kupchan (Kupchan, *et al.*, 1973), y así se obtuvieron cuatro fracciones de cada extracto (1A, *n*-Hexano; 1B, CH₂Cl₂; 1C, AcOEt y 1D, MeOH:H₂O), las 12 fracciones así obtenidas se evaluaron frente a la línea celular RAW (leucemia de macrófagos de ratón).

La fracción DAE-1B mostró una actividad antiproliferativa prometedora y por tanto se le realizó una marcha cromatográfica biodirigida, lo que permitió la obtención de una acetogenina, cuya estructura fue establecida por sus datos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y HRMS, determinándose que es el compuesto conocido como rolliniastatina **40**, el cual posee una marcada actividad citotóxica en ratones con leucemia murina (L1210 y P-388), en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón (PC-6) y en líneas celulares de cáncer gástrico (NUGC-3) (Bhavani, *et al.*, 2002; Guzmán, *et al.*, 2011). Por otro lado, la fracción DAE-1C (AcOEt) se purificó en virtud de que su espectro de RMN ¹H

presentaba un perfil interesante de señales y de este estudio cromatográfico se obtuvo un compuesto puro; que mediante el uso de RMN y HRMS, se estableció que es un péptido lineal de ocho residuos de aminoácidos que no ha sido reportado previamente en la literatura.

2. ANTECEDENTES

2.1. Familia *Annonaceae*.

Las anonáceas son del orden Magnoliales, que consta de 130 géneros con 2,300 especies, distribuidas a nivel mundial, de acuerdo al Sistema Integrado de Información Taxonómica (SSIT-CONABIO), actualmente se han aceptado para México 13 géneros y 37 especies de la familia *Annonaceae* (Hernández *et al*, 2014).

2.1.1. Taxonomía y características botánicas.

La clasificación taxonómica de la familia *Annonaceae* según el SSIT-CONABIO se puede observar en la **Tabla 1**.

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Magnoliidae</i>
Orden:	<i>Magnoliales</i>
Familia:	<i>Annonaceae</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia *Annonaceae*.

Las especies de esta familia son árboles, arbustos o lianas caracterizadas por tener una corteza externa que se desprende en tiras y una corteza interna que es reticulada; sus hojas son alternas, simples, enteras, finas o coriáceas, deciduas o persistentes y sin estípulas; las flores son bisexuales, con frecuencia en tonos de color café y amarillo, compuestas de tres sépalos y seis pétalos, generalmente el cáliz es tubular; los estambres son numerosos, aglomerados, con filamentos carnosos portando anteras largas y espirales; la fruta es grande, carnosa, formada por la fusión de los pistilos y los receptáculos; las semillas son grandes, brillantes y algunas veces con arilos (Agustín, *et al.*, 2011).

2.1.2. Distribución natural.

Las especies de la familia *Annonaceae* están ampliamente distribuidas en áreas tropicales y húmedas, ya que es una especie que crece en climas húmedos y a bajas altitudes; se distribuye mundialmente en las siguientes regiones: el Caribe, principalmente: Centroamérica, Sudamérica, el sureste de China, Vietnam, Australia, Nueva Zelanda, África y en las islas del Pacífico (**Figura 1**) (González, 2013). En México se distribuye en áreas de clima cálido, tales como las zonas costeras de Veracruz, Tabasco, Quintana Roo, Nayarit, Colima, Michoacán, Oaxaca, Guerrero, Yucatán y Chiapas (Agustín, 2011).

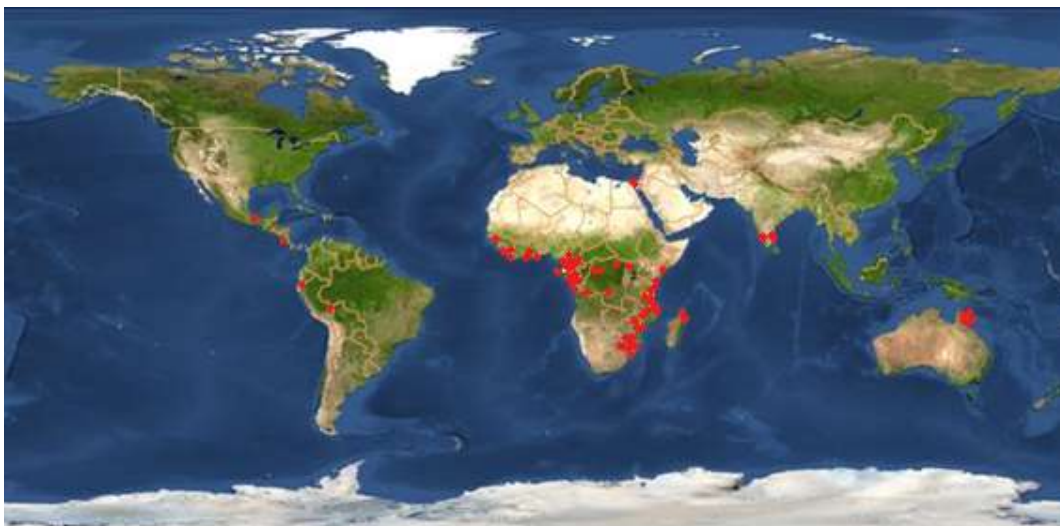


Figura 1. Distribución mundial de las especies de la familia *Annonaceae*.

2.2. Estudio fitoquímico de la familia *Annonaceae*.

Con el propósito de encontrar nuevas estrategias para la obtención de compuestos con estructuras novedosas y posibles actividades fitoterapéuticas, se ha intensificado el estudio fitoquímico de diferentes especies de plantas, una de las cuales son las especies de la familia *Annonaceae*, las plantas pertenecientes a esta familia son de gran relevancia desde la antigüedad, ya que muchas de ellas poseen frutos comestibles, además de ser útiles en la medicina tradicional (Estrada, *et al.*, 2011), esta familia se caracteriza por sintetizar una diversidad de metabolitos secundarios con estructuras novedosas, a los que se

les atribuye numerosas propiedades farmacológicas (Ocampo, *et al.*, 2006). Los estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados a especies de la familia *Annonaceae*, muestran que dos de las principales familias de metabolitos secundarios obtenidos de estas plantas son los ciclopéptidos y las acetogeninas, (Gajalakshmi, *et al.*, 2012), sin embargo, las anonáceas también producen otras familias de compuestos como taninos, flavonoides, aceites esenciales, terpenos, compuestos fenólicos, glucósidos, entre otros (Bermejo, *et al.*, 2005).

2.3. Actividad biológica de los extractos crudos.

El extracto crudo es el resultado de un proceso de maceración del material biológico con diferentes disolventes orgánicos, con la finalidad extraer los compuestos que se encuentran dentro del material vegetal, estos se pueden obtener de diferentes partes de la planta, ya sea, de la raíz, del tallo, de las hojas, fruto o semillas. Los estudios fitoquímico sobre el extracto crudo de plantas, inician con el cribado farmacológico, para determinar si este tiene o no alguna actividad biológica y partir de ahí se inicia su purificación (Novo, *et al.*, 2006). Se han realizado estudios fitoquímicos en búsqueda de sustancias bioactivas a partir de plantas de la familia *Annonaceae* (Osorio, *et al.*, 2006; Moghadamtousi, *et al.*, 2015), en estos estudios se determinaron diversas actividades biológicas en modelos *in vivo* e *in vitro*, encontrándose que poseen diferentes actividades sobre distintos tipos de cáncer, induciendo la apoptosis en células de cancerosas, además de evitar la migración y por lo tanto la invasión a otros órganos, este último efecto de evaluó en modelos murinos (**Tabla 2**).

Especie	Material vegetal	Naturaleza del extracto	Actividad biológica reportada	Referencia
<i>Annona squamosa</i>	Hojas	Etanólico	Bactericida (<i>Salmonella typhimurium</i>). Citotóxica en líneas celulares cancerosas (MCF-7, K-562 y COLO-205).	Pandey, <i>et al.</i> 2011.
		Metanólico	Bactericida (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i>).	
<i>Annona muricata</i>	Hojas	Acetato de etilo	Citotóxica (células A-549 de cáncer de pulmón, de colon HT-29).	Moghadamtousi, <i>et al.</i> , 2015.
		Acuoso	Cáncer de próstata en un modelo murino.	
		Etanólico	Células de leucemia K-572.	
<i>Annona diversifolia</i> <i>Annona purpurea</i>	Hojas	Metanólico	Bactericida (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhi</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>).	Luna, <i>et al.</i> , 2008.
	Corteza	Acetato de etilo		
<i>Annona cherimola</i>	Corteza	Etanólico	Artemia salina.	Galvis, <i>et al.</i> , 2012.

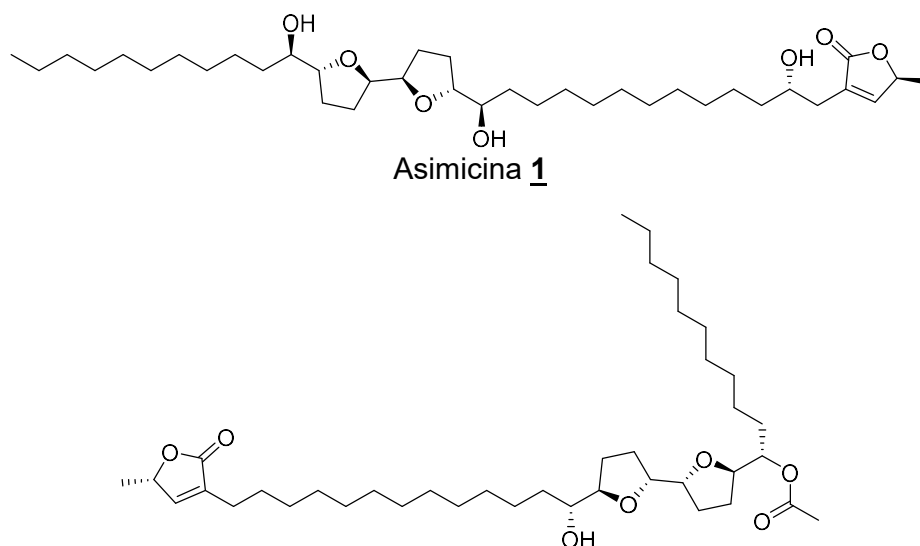
Tabla 2. Algunas bioactividades encontradas en los extractos crudos de especies de la familia *Annonaceae*.

2.4. Acetogeninas.

Los principales metabolitos secundarios de la familia *Annonaceae* son las acetogeninas (ACGs), se han aislado e identificado en varias partes de la planta, pero especialmente en sus semillas, estos compuestos muestran una gama importante de actividades biológicas, así como también estructuras novedosas, hasta la fecha se han encontrado únicamente en las anonáceas, es por ello que reciben el nombre de “acetogeninas de anonáceas”. Entre las bioactividades que

poseen se encuentran la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas, actividad bactericida, antiparasitaria e insecticida (Liu Xia-Hai, *et al.*, 2007), a partir de su primera aparición hasta la actualidad se han aislado aproximadamente 593 ACGs (Esquinca, *et al.*, 2014).

Los estudios sobre estos compuestos iniciaron en la Universidad de Purdue, partir del análisis de 3,500 extractos de diferentes especies de plantas, con el fin de evaluar su posible actividad anticancerígena, los estudios se realizaron *in vitro* en la línea celular de cáncer nasofaríngeo (3PS) e *in vivo* en modelos murinos con leucemia, de acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que los extractos con mayor actividad citotóxica fueron de dos especies de anonas: *Goniothalamus giganteus* Hook. f., Thomas y *Asimina triloba*. Estos extractos también se evaluaron contra plagas agrícolas, los resultados más prometedores en este caso los dió el extracto de *Asimina triloba* (“paw paw”), en 1972 la compañía farmacéutica Eli Lilly (Greenfield, IN), inició un estudio fitoquímico sobre esta especie, utilizando un bioensayo con artemia salina y por medio de una marcha cromatografica biodirigida se aisló una acetogenina con un anillo de tetrahidrofurano (THF), asimicina **1** (Jerry L. McLaughlin, 2008), en el mismo año pero por el grupo de trabajo del profesor André cavé en Francia se aisló la uvaracina **2** de la raíz de *Uvaria accuminata* estos resultados dieron la pauta para que otros grupos de trabajo realizaran estudios sobre esta familia de compuestos (Fera Q. Alal, *et al.*,1982).



Uvaricina 2

2.4.1. Características estructurales de las ACGs.

Las ACGs se obtienen como un polvo amorfo de color blanco, están constituidas por una cadena hidrocarbonada larga de 35 a 37 átomos de carbono, el tamaño de la cadena es proporcional a una actividad óptima para protección de la planta contra herbívoros y plagas (Pankewitz, *et al.*, 2007). Las ACGs derivan de ácidos grasos conformados por 32 a 34 átomos de carbono que se han combinado con una unidad de 2-propanol en el C-2 lo que da lugar a un grupo metilo secundario terminal y la función γ -lactona, mediante la esterificación intramolecular del ácido carboxílico y el grupo alcohol. Además, las ACGs posee varias funciones oxigenadas como grupos alcoholes y éteres cíclicos de cinco miembros, tetrahifuranos (THF), y de seis miembros, tetrahidropiranos (THP), la gran mayoría de las acetogeninas suelen poseer dos anillos de THF adyacentes, separados por un enlace, cuyos hidrógenos alfa se suelen encontrar con una disposición *trans* y en menor medida como *cis*; en la estereoquímica entre dos centros quirales adyacentes predomina la disposición *treo*, la cual consiste en que los sustituyentes similares de los centros quirales adyacentes no se puedan eclipsar, mientras que la disposición *eritro*, menos común en las ACG's, los sustituyentes similares de los centros quirales adyacentes se puedan eclipsar (**Figura 2**).

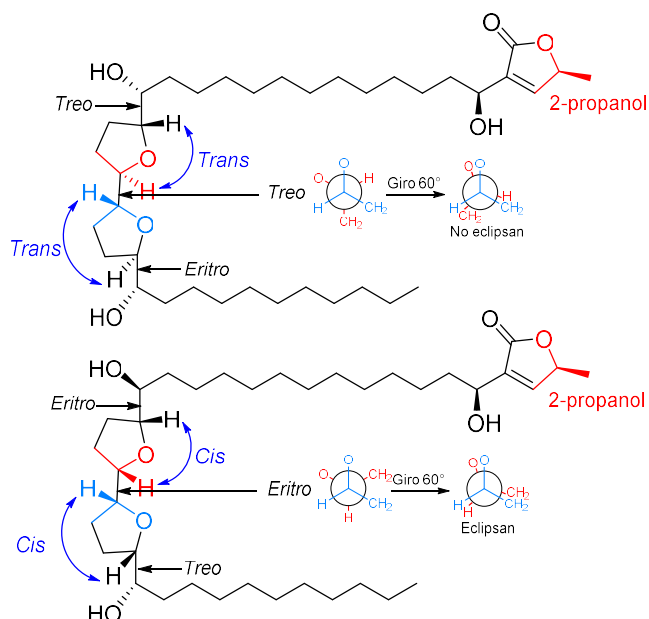
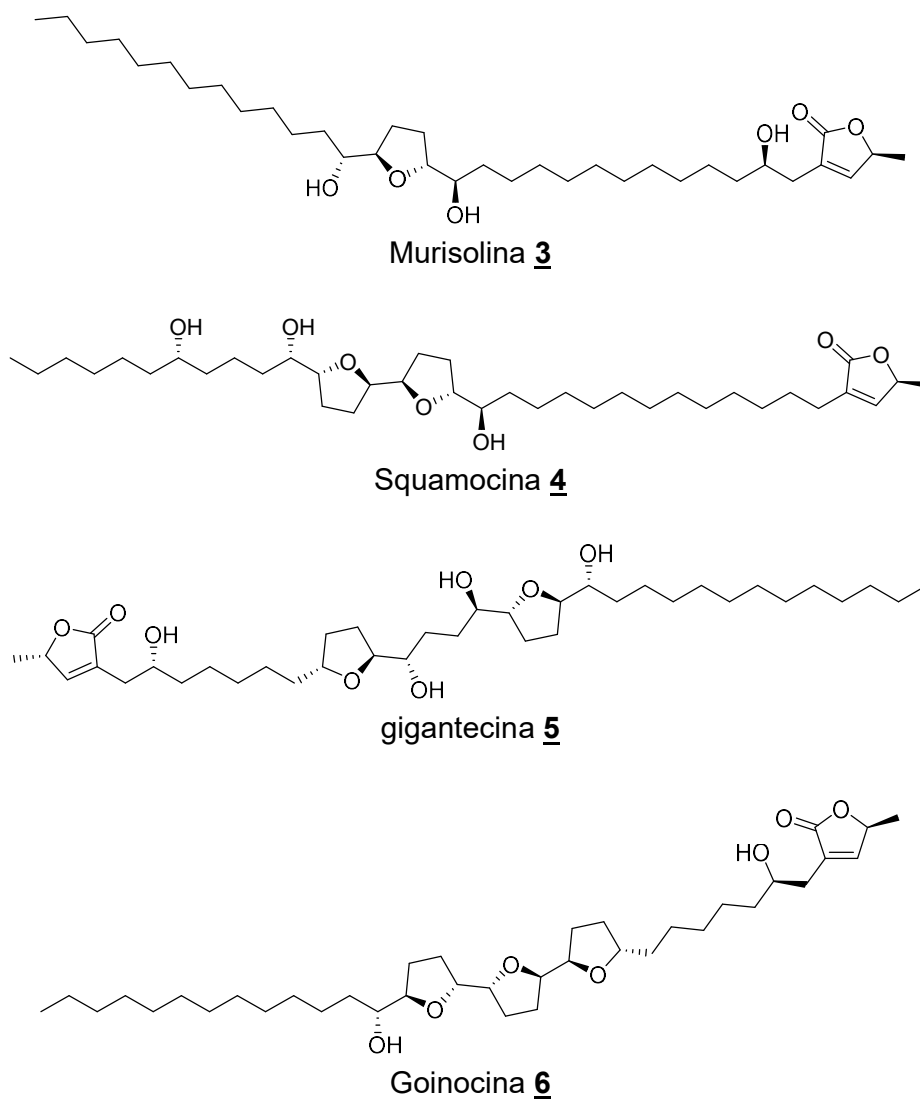
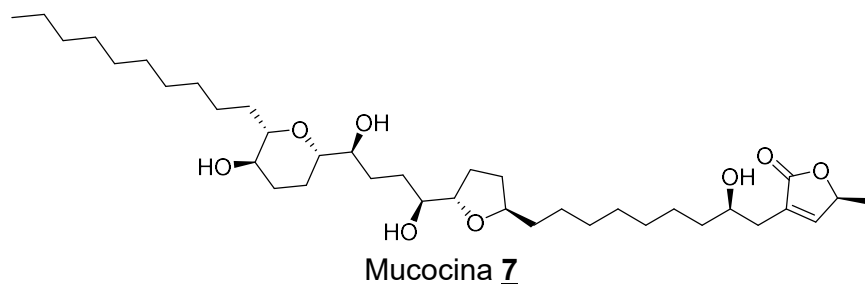


Figura 2. Estereoquímica de los centros quirales de las ACGs.

Las ACGs tienen uno dos o tres anillos y estos poseen diversas disposiciones, así encontramos estructuras que posea un solo anillo de tetrahydrofurano, mono-THF como la Murisolina **3**, compuestos como la esquamocina **4** que se incluyen en los bis-THF adyacentes, dentro de los bis-THF no adyacentes se incluye a la gigantecina **5**, la goinocina **6** se incluye en los tri-THF adyacentes y menos común es encontrar estructuras con anillos de THP como en la mucocina **7**; estas características estructurales junto con la presencia de una γ -lactona o una cetolactona, representan las características principales de estos compuestos (Jerry L. McLaughlin, 2008; Ndob ba Bajin idensi, *et al.*, 2009).





Independientemente de la estructura que posean, las ACGs contienen cuatro dominios característicos, el dominio lactónico terminal, el dominio espaciador, el dominio polioxigenado y el dominio hidrofóbico terminal (**Figura 3**) (Esquinca, *et al.*, 2011).

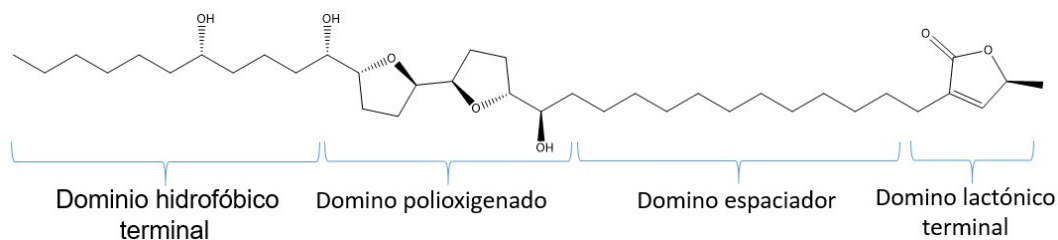


Figura 3. Representación de la estructura general de las acetogenina con una ACG bis-THF. Se indican los cuatro dominios estructurales característicos de las acetogeninas.

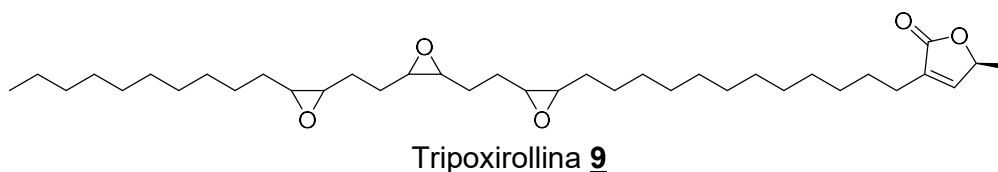
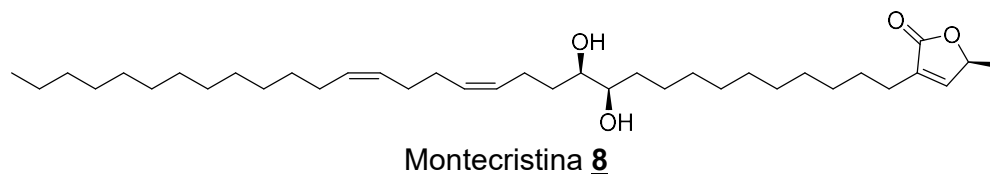
2.4.2. Clasificación de las ACGs.

Tal y como ya se comentó, las ACGs poseen una gran diversidad estructural, motivo por el cual se han realizado diferentes clasificaciones sobre ellas, enfocándose en el número y disposición de los anillos THF, la γ -lactona terminal y los sustituyentes de la cadena alifática. Las primeras clasificaciones reportadas sobre este grupo de compuestos fueron realizadas por André Cavé y McLaughlin's en donde tomaban en cuenta la estereoisomería a través de los anillos de THF, sin embargo, fue necesario realizar modificaciones a estas clasificaciones, debido a la aparición de nuevos cambios estructurales en el esqueleto principal (Cavè, *et al.*, 1997; Alali, *et al.*, 1998). Entre los años 1996 y 2014 se aislaron más de 200 ACGs, es por ello que se ha simplificado la clasificación de las mismas, dependiendo de los sustituyentes que conforman la cadena alifática, en cuatro grupos (Bermejo, *et al.* 2005; Liaw, *et al.*, 2016).

1. ACGs lineales y ACGs-epóxi (incluyendo las ACGs sin anillos THF, sustituyéndolas por un epóxido y/o un doble enlace).
2. ACGs mono-THF.
3. ACGs bis-THF (incluyendo las ACGs bis-THF, adyacentes o no adyacentes).
4. ACGs no clásicas (incluyendo a las ACGs con anillos THP, la subclasificación de las γ -lactona y cetolactonas).

1. ACGs lineales y epoxi.

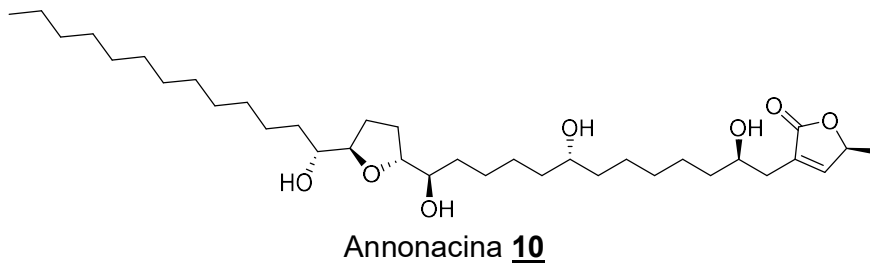
Este grupo de compuestos está conformado por 52 estructuras, aisladas a partir de 15 especies de 9 géneros entre los que se incluyen *Annona Goniiothalamus*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Xylopia* (Esquinca, *et al.*, 2005). Las ACGs lineales se diferencian por el grado de insaturación, la hidroxilación de la cadena alifática y la presencia de γ -lactona o cetolactona; son consideradas precursores biogénicos de aquellas ACGs que poseen epóxidos, un ejemplo de estas es la montecristina **8**. Las epoxi-ACGs, como la tripoxirollina **9**, son originadas a partir de la oxidación de la cadena lineal y estas son metabolitos clave en la biosíntesis de las mono-, bis-, tri-THF y THP.



2. ACGs mono-THF.

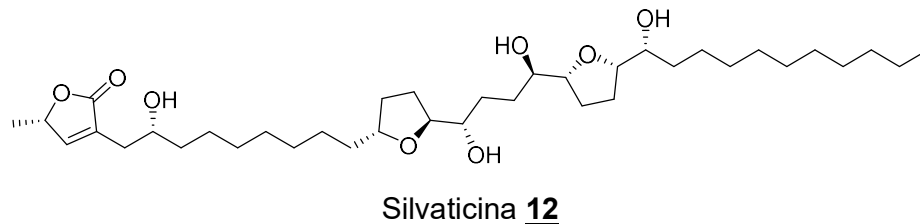
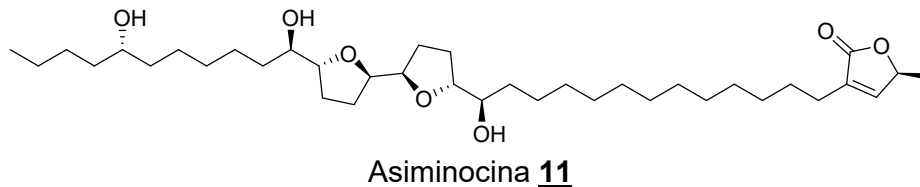
Poseen solo un núcleo de THF, como la annonacina **10**, se subclasifican en base a la cantidad de grupos hidroxilo que poseen, en la mayoría el grupo THF está flanqueado por dos hidroxilos en las posiciones α y α' (THF 1), el otro grupo son solamente α -monohidroxiladas (THF 2). Son el grupo más amplio de esta familia

de compuestos, lo conforman 119 ACGs, que se han aislado de 15 especies en siete generos, entre las que se encuentran: *Ampelocissus*, *Annona*, *Asimina*, *Disepalum*, *goniothalamus*, *Rollinia* y *Uvaria*.



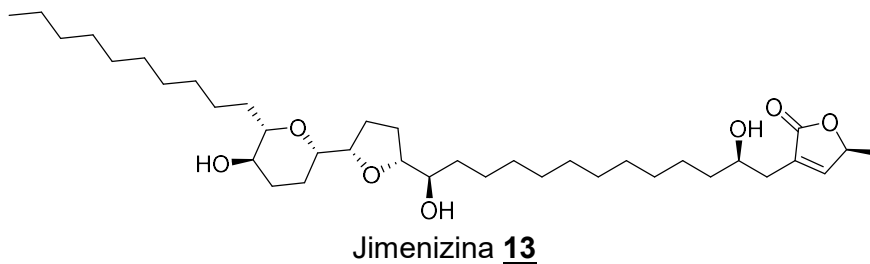
3. ACGs bis-THF.

La característica estructural principal de este grupo es la presencia de dos anillos THF, al menos un grupo hidroxilo en una cadena alifática de 35/37 átomos de carbono, se diferencian entre sí por el grado de oxidación, tipo, número y ubicación del sustituyente, así como de su estereoquímica, en esta clasificación encontramos metabolitos con anillos bis-THF adyacente, un ejemplo es la asiminocina 11, así como compuestos bis-THF no adyacente como la silvaticina 12, se han aislado 48 ACGs bis-THF adyacentes de quince especies en cuatro géneros (*Annona*, *Asimina*, *Rollinia* y *Uvaria*), junto con 15 ACGs no adyacentes de seis especies en cuatro géneros (*Goniothalamus*, *Annona*, *Rollinia*, entre otras).



4. ACGs no clásicas.

Este grupo de compuestos son los menos reportados entre las ACGs, presentan anillos de THP en su cadena alifática, producidos al igual que los anillos de THF por un proceso de ciclación intramolecular del sistema éter, estos anillos de THP pueden estar combinados con γ - lactonas insaturadas, γ - lactonas substituidas y cetolactonas, uno de estos ejemplos es la Jimenizina **13**.

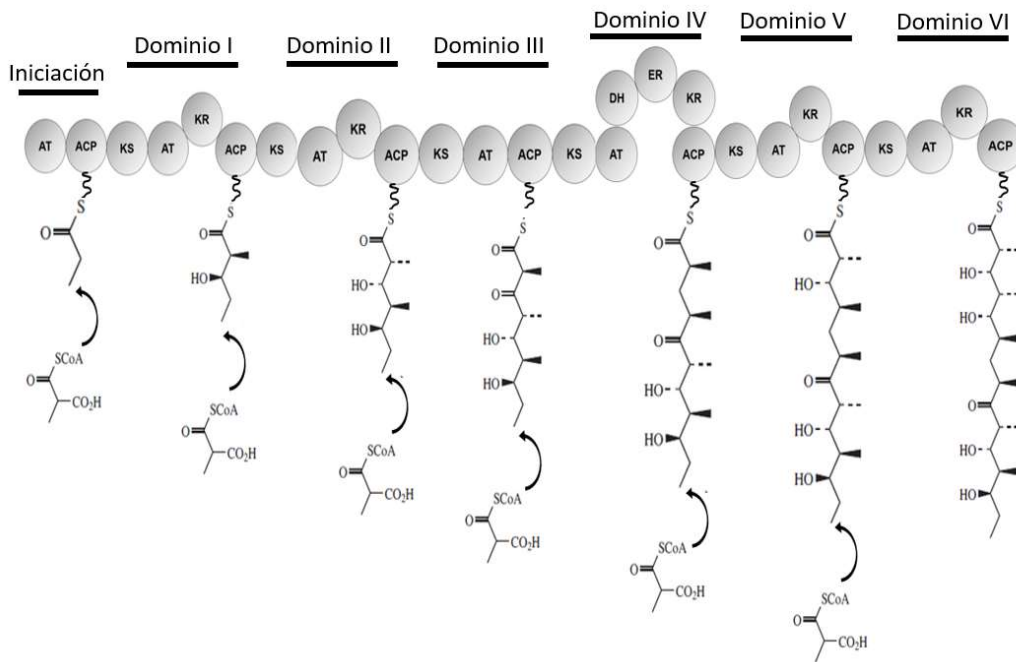


2.4.3. Biosíntesis de las ACGs.

Las acetogeninas se forman a partir de la ruta biogenética de los policetidos, la enzima clave que interviene para la biosíntesis de estos compuestos es las policetido-sintetasa tipo III (PKS III), enzima relacionada con la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (C32/C34), los cuales actúan como intermediarios de vida corta en el proceso biosintético de las ACGs (por tal motivo no se encuentran estos ácidos grasos en estas plantas). Son 7 los módulos que participan en este complejo: manlonil acetiltransferasa (MAT), acil transferasa (AT), β -cetoacil sintetasa (KS), proteína transportadora de grupos acilo (ACP), β -cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH), enoilreductasa (ER) y tioesterasa (TE) (Shen, *et al.*, 2003; Pankewitz, *et al.*, 2008).

Inicialmente, este proceso involucra que el módulo AT transfiera un grupo acilo activo (tioester CoA) al módulo KS y que la MAT transfiera un grupo malonilo al módulo ACP, la unión del grupo acilo y malonilo con sus respectivos módulos es por un enlace tioester; seguidamente el módulo KS cataliza condensación de Claisen entre los grupos tioester de acilo y de malonilo, dándose así el primer ciclo de elongación y la consecutiva pérdida de CO₂, el grupo oxo del acilo incorporado a la cadena en el ACP, puede sufrir diferentes grados de reducción,

dependiendo de si está presente en ese dominio, los módulos KR, DH y ER, el módulo KR transforma el grupo oxo a un grupo hidroxilo, por β -cetorreducción y en conjunto con el módulo DH origina un grupo enoilo, en el caso de que estén presentes los tres módulos, KR, DH y ER, el grupo oxo se reduce hasta alcano, tal y como sucede en los ácidos grasos. Sin embargo, a diferencia de los ácidos grasos, en la biogénesis de los policétidos, la cadena elongada puede pasar a un nuevo ciclo de elongación, actuando sobre ella los tres módulos KR, DH y ER que daría lugar a un alcano, solamente los módulos KR y DH que darían un grupo enoilo, solamente el módulo KR obteniéndose un grupo alcohol o sin que actué ninguno de ellos, lo que no modificaría al grupo oxo. Una vez que se hayan dado todos los ciclos necesarios para elongar la cadena, el módulo TE, rompe el enlace tioéster, separando así el policetido del dominio ACP (**Esquema 1**) (Escudero, 2010; Sarasa, *et al.*, 2015).



Esquema 1. Ruta de biosíntesis de policétidos. Las unidades iniciadoras y elongadoras para los policétidos son ácidos carboxílicos lineales y como unidad elongadora puede utilizar malonil-CoA, metilmalonil-CoA o etilmalonil-CoA.

Las subunidades enzimáticas resultantes son posteriormente metabolizadas por oxido reductasas y transferasas, para sufrir “Modificaciones de adorno” o post-PKS en la cadena policetónica lineal y/o parcialmente oxigenada, que

posteriormente se ciclaran o sufrirán una serie de modificaciones como una deshidrogenación, epoxidación o formación de una γ - lactona, sintetizando así a las a las epoxi-ACGs, ACGs-THF o anillos THP (el aislamiento de los precursores con dobles enlaces y la síntesis de los anillos THF a partir de las ACG`S que contienen dobles enlaces confirman esta biosíntesis) (Cavé, *et al.*; Feras, *et al.*, 1998).

2.4.4. Mecanismos de acción de las ACGs.

Se han realizados estudios sobre el mecanismos de acción de las ACGs, simulando bicapas lipídicas artificiales, en donde se demuestra la relación entre la estructura y la actividad biológica, esta familia de compuestos interactúan con los grupos fosfato y carbonilo de los fosfolípidos, la interacción inicia a partir de los anillos THF a través del flanqueado de los grupos hidroxilo al formar puentes de hidrogeno que actúan como anclas, en donde la parte hidrofóbica interacciona con el núcleo de la bicapa, y una parte hidrofílica con el citosol (**Figura 4**), se ha demostrado que la γ -lactona terminal así como también el dominio polioxigenado, modulan la actividad de estos compuestos frente a líneas celulares cancerosas, es decir que mientras más grupos hidroxilo posea la estructura mayor actividad citotóxica tendrá la ACG, los resultados obtenidos, apoyan la idea de la inhibición del complejo I mitocondrial (Cabedo, *et al.*, 2011; Liaw, *et al.*, 2016). Las acetogeninas tienen la capacidad de unirse al ion Ca^{+2} , bloqueando así, la respiración mitocondrial, a nivel de la enzima NADH ubiquinona reductasa (enzima participante en dicho complejo), que es esencial para la producción de ATP en el interior de las células; por otro lado, se ha demostrado que las acetogeninas también inhiben la actividad de la NADH oxidasa presente en la membrana plasmática, esto produce una disminución del nivel intracelular de ATP, bloqueando la regeneración de NAD e inhibiendo la fosforilación glicolítica, la combinación de estos dos mecanismos inducen el proceso de apoptosis (Degli, *et al.*, 1994; González, *et al.*, 2007; Blessing, *et al.*, 2007; McLaughlin, 2008; Guzmán, *et al.*, 2009).

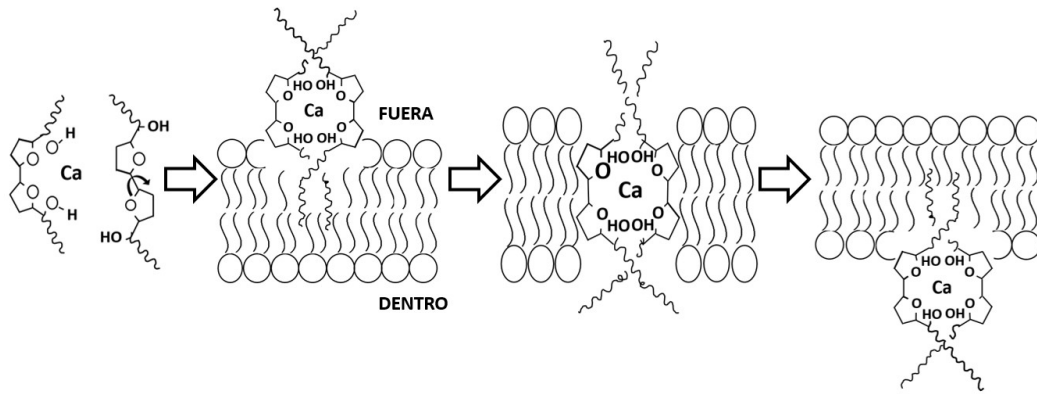


Figura 4. Mecanismo de acción de las ACGs bis-THF sobre los fosfolípidos de la membrana celular (Liaw, et al., 2016).

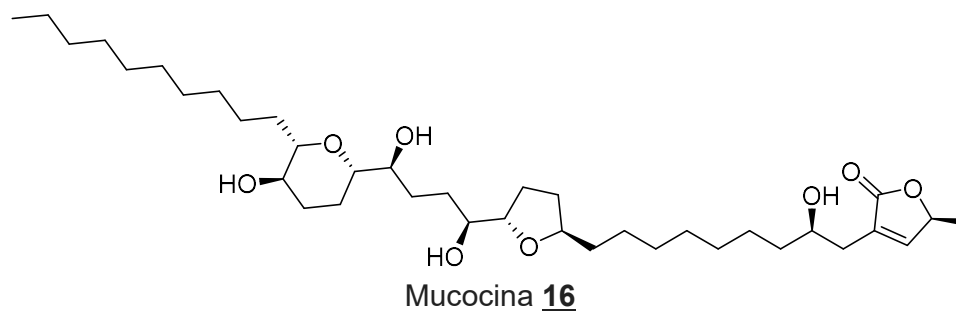
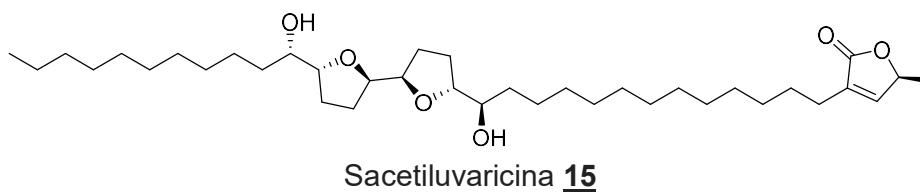
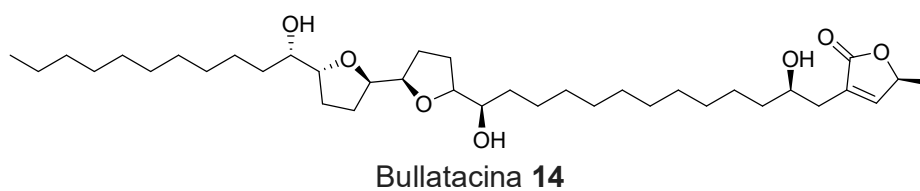
2.4.5. Actividad biológica de las ACGs.

Como se mencionó anteriormente las ACGs presentan diferentes actividades biológicas, las cuales se describirán a continuación:

1. Actividad anticancerígena.

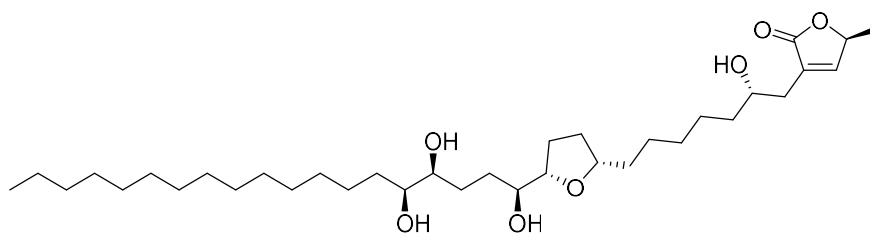
A partir de 1982 las ACGs son consideradas como una posible fuente para la generación de fármacos anticancerígenos para aquellos tipos de cáncer resistentes a los fármacos actuales, debido a que se necesitan concentraciones nanomolares para ejercer la inhibición del crecimiento de estas células, como ya se ha mencionado anteriormente, la actividad biológica de las ACGs es debida a que inhiben el complejo I mitocondrial (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) y la enzima NADH oxidasa (enzima encontrada en la membrana plasmática de las células tumorales), lo que disminuye la concentración de ATP, ocasionando la apoptosis de la célula cancerosa. Desde que en el año 1982 se estableció la actividad citotóxica a la uvaricina **2** sobre un modelo murino con leucemia linfocítica P-388, muchos son los estudios realizados sobre las ACGs para encontrar las propiedades antiproliferativas, hacia diferentes líneas celulares cancerígenas, ensayos *in vitro* demostraron que el 12 % de las ACGs reportadas, poseen actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas y que muchas de ellas tienen efectos citotóxicos selectivos. De entre ellas se destacan las ACGs *bis*-THF, ya que son las que poseen una mayor actividad, como por ejemplo la bullatacina **14**, la squamocina **4**, sacetiluvarina **15** y mucocina **16** (Feras, et al.,

1998; Bermejo, *et al.*, 2005; McLaughlin, 2008; Zorofchian, *et al.*, 2015; Mohamad, *et al.*, 2015; Coria, *et al.*, 2016; Liaw, *et al.*, 2016).

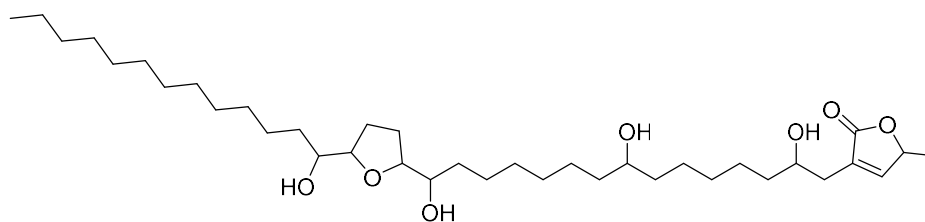


2. Actividad insecticida.

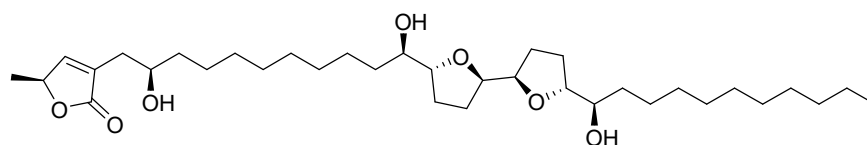
Las ACGs también son un grupo de compuestos promisorios como futuros fitoinsecticidas, ya que presentan en su mayoría actividad insecticida contra *Drosophila melanogaster*, moscos transmisores de enfermedades y plagas resistentes, como las cucarachas y garrapatas. La mayoría de las ACGs interfieren con el buen funcionamiento del sistema nervioso, entre los compuestos que presentan esta actividad se encuentran las ACGs mono-THF, gigantetrocina A **17**, anomontacin **18**, *bis*-THF adyacentes como la asimicina **1**, parviflorina **19** y *bis*-THF no adyacentes como la silvaticina **20** (Ahammadsahib, *et al.*, 1993; Feras, *et al.*, 1998; Hincapié, *et al.*, 2008; Téllez, *et al.*, 2016; Liaw, *et al.*, 2016).



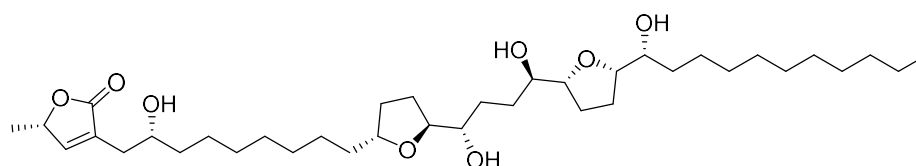
Gigantetrocina **17**



Annomontacina **18**



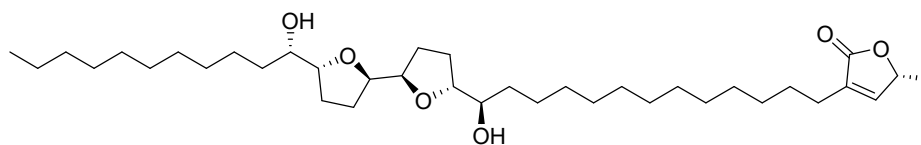
Parviflorina **19**



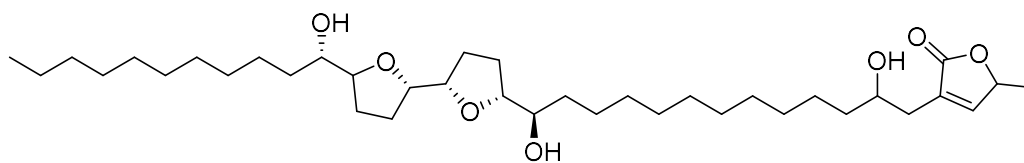
Silvaticina **20**

3. Actividad bactericida.

Las actividades antimicrobianas reportadas sobre este grupo de metabolitos demuestran que poseen un efecto bactericida importante tanto sobre bacterias gram positivas como gram negativas, así por ejemplo; el isodesacetiluvacino **21** y squamocina **4**, inhiben el crecimiento de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*; gigantetrocina A **17** sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y rolliniastatina-1 **22** en *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus typhi* (Cavé, et al.; Luna, et al., 2010; Luna, et al., 2011).



Isodesacetilivaracino **21**



Rolliniastatina 1 **22**

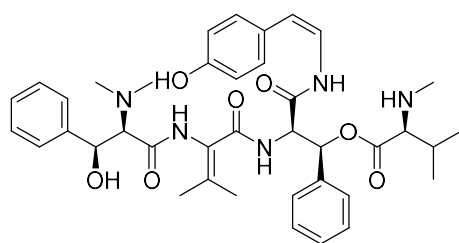
2.5. Péptidos.

Las plantas frecuentemente se encuentran amenazadas por patógenos, ataque de herbívoros o insectos, esto ha ocasionado que modifiquen su metabolismo produciendo barreras físicas y químicas para su supervivencia: como alteraciones en la en la estructura celular, induciendo a apoptosis en sus extremidades para evitar la propagación a patógenos, producción de metabolitos de defensa como ya se ha mencionado anteriormente, entre esos metabolitos se encuentran los péptidos, los cuales son sintetizados por las plantas, desempeñando diferentes funciones. Las investigaciones en los últimos años han demostrado que las plantas tiene la capacidad de generar péptidos que proporcionan funciones generales como regulación del crecimiento y desarrollo de la misma, encontrándose en mayor abundancia en las semillas, determinando el crecimiento y desarrollo de ella, aun no se ha determinado el rol específico de los péptidos dentro del desarrollo de la planta, pero algunos de ellos son expresados en diferentes órganos, sirviendo de defensa ha patógenos (Mashall, *et al.*, 2011; Ingram, *et al.*, 2015; Xudong, *et al.*).

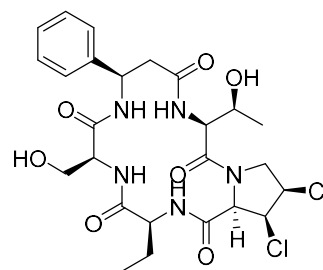
Los péptidos son polímeros de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos (enlaces amida) entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, como se observa en la **Figura 5**. La mayoría de los péptidos son producidos a partir de la proteólisis por la acción de peptidasas específicas, existen péptidos de bajo peso molecular producido por la síntesis de enzimas no ribosomales por ejemplo el glutatión **23**, el cual es un tripéptido formado en las plantas para protección a agentes tóxicos y estrés oxidativo, se basa en el poder

2.5.1. Clasificación de péptidos en plantas.

En base a su estructura química los péptidos se dividen en péptidos lineales y ciclopéptidos, siendo estos últimos los más encontrados en plantas. Los ciclopéptidos son compuestos cíclicos formados principalmente por un enlace peptídico de 2 a 37 residuos de aminoácidos, de acuerdo a su esqueleto se dividen para su estudio en dos clases: heterociclopéptidos como la lasiodina A **24**, que son péptidos conformados por enlaces peptídicos simples y homociclopéptidos como la astina A **25**, ciclopéptidos formados por enlaces peptídicos con grupos estirilamina (Tan, *et al.*, 2006; Lomchoey, 2011; Han, *et al.*, 2011).



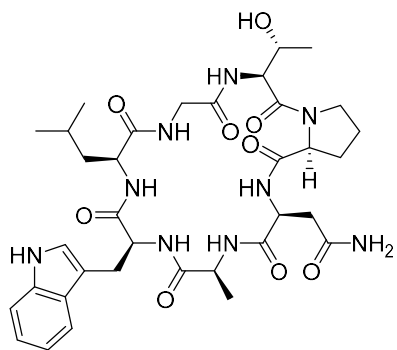
Lasiodina A **24**



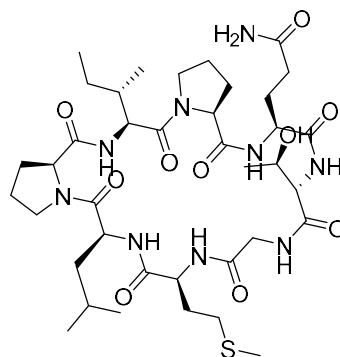
Astina A **25**

2.5.2. Péptidos de la familia *Annonaceae*.

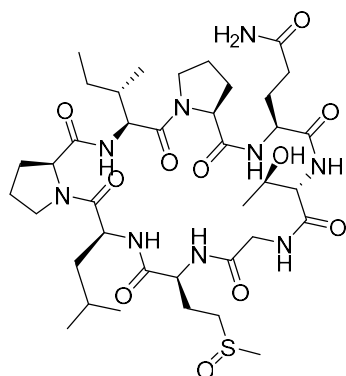
En la familia *Annonaceae* los reportes sobre este grupo de compuestos se centran en su mayoría en estudios estructurales de homociclohexapéptidos, aislados de las semillas de diferentes anonas: así por ejemplo: de *Annona muricata* se aisló annomuricata A y B **26** y C (Miug, *et al.*, 1995; Miug, *et al.*, 1997, Wélé, *et al.*, 2004; Wu, *et al.*, 2007), de *Annona squamosa*, annosquamosina (Ming, *et al.*, 1997), de *Annona cherimolia*, Cherimoliaciclopéptido A **27**, B **28**, C **29**, D **30**, F **31** (Wélé, *et al.*, 2005), de *Annona reticulata*, cicloreticulina A **32**, B **33**, C **34** (Wélé, *et al.*, 2009), de *Annona glabra*, glabrina A **35**, B **36**, C **37**, D **38** (Ming, *et al.*, 1997) y de *Annona glauca*, glaucaciclopeptido A **39** (Wélé, *et al.*, 2005), son pocos los reportes sobre la bioactividad de estos péptidos, salvo la de los ciclopeptidos cherimoliaciclopéptidos A y B que poseen actividad antiinflamatoria y citotóxica (Dellai, *et al.*, 2010; Tan, *et al.*, 2016), así como también los péptidos aislados de *Annona squamosa* (ciclosquamosin D y H) (Yang, *et al.*, 2008).



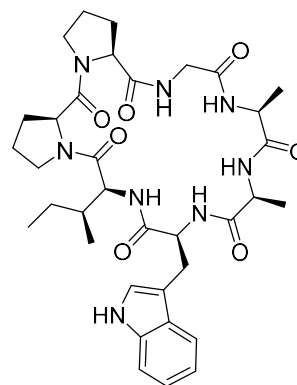
Annomuricata B **26**



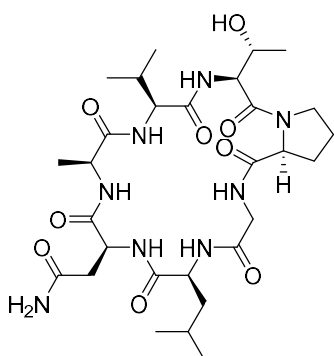
Cherimolaciclopéptido A **27**



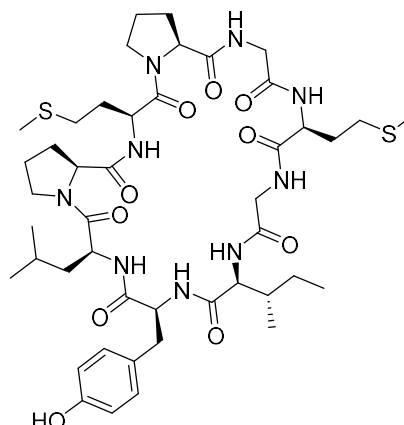
Cherimolaciclopéptido B **28**



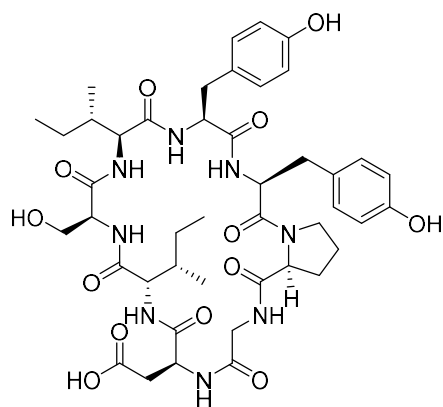
Cherimolaciclopéptido C **29**



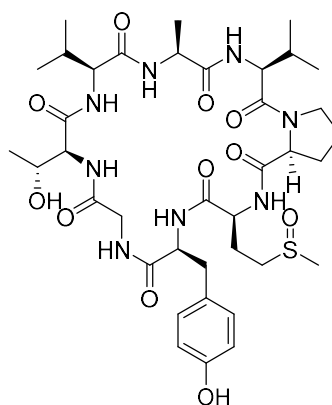
Cherimolaciclopéptido D **30**



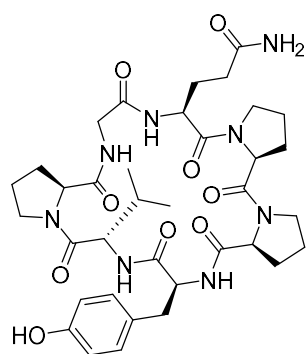
Cherimolaciclopéptido F **31**



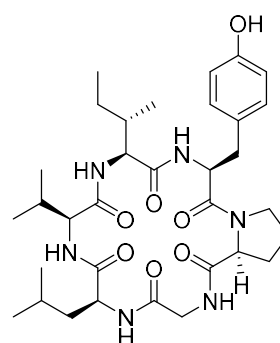
Cicloreticulina A **32**



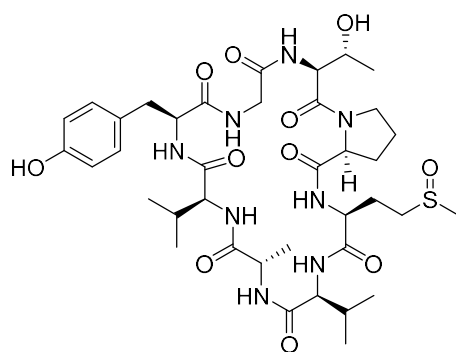
Cicloreticulina B **33**



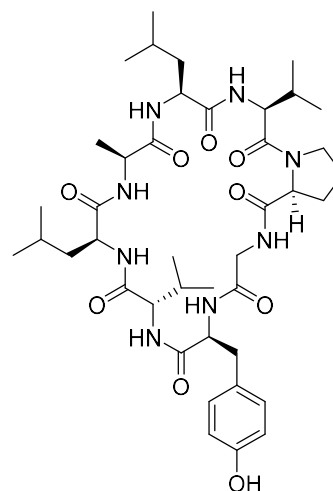
Cicloreticulina C **34**



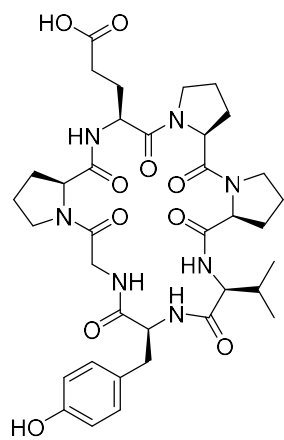
Glabrina A **35**



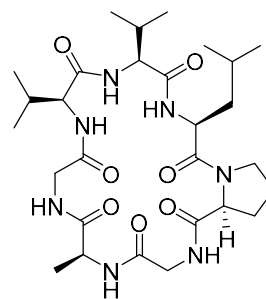
Glabrina B **36**



Glabrina C **37**



Glabrina D **38**



Glaucaciclopeptido A **39**

3. HIPÓTESIS.

- ❖ Los extractos metanólicos de las semillas de las especies *A. escleroderma*, *A. muricata* y *A. globiflora*, poseen metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

4. OBJETIVOS.

4.1. *Objetivo general.*

- ❖ Realizar un estudio fitoquímico de semillas de una especie de la familia *Annonaceae*, para identificar metabolitos con actividad citotóxica.

4.2. *Objetivos específicos.*

- ❖ Medir el potencial antiproliferativo de los extractos de las semillas de *Annona escleroderma*, *A. globiflora* y *A. muricata*.
- ❖ Aislar y purificar los metabolitos del extracto metanólico de la especie que presente una mayor actividad antiproliferativa, mediante un proceso biodirigido.
- ❖ Elucidar la o las estructuras de los metabolitos secundarios puros obtenidos, que posean o no actividad citotóxica, mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1. Material vegetal y biológico.

Los especímenes de *A. escleroderma*, *A. globiflora* y *A. muricata* fueron recolectados en marzo del 2012, en Jalcomulco, Veracruz, México.

Para realizar los bioensayos de actividad anti proliferativa se utilizó la línea celular RAW 264.7 (monocito-macrófagos de ratón leucémico).

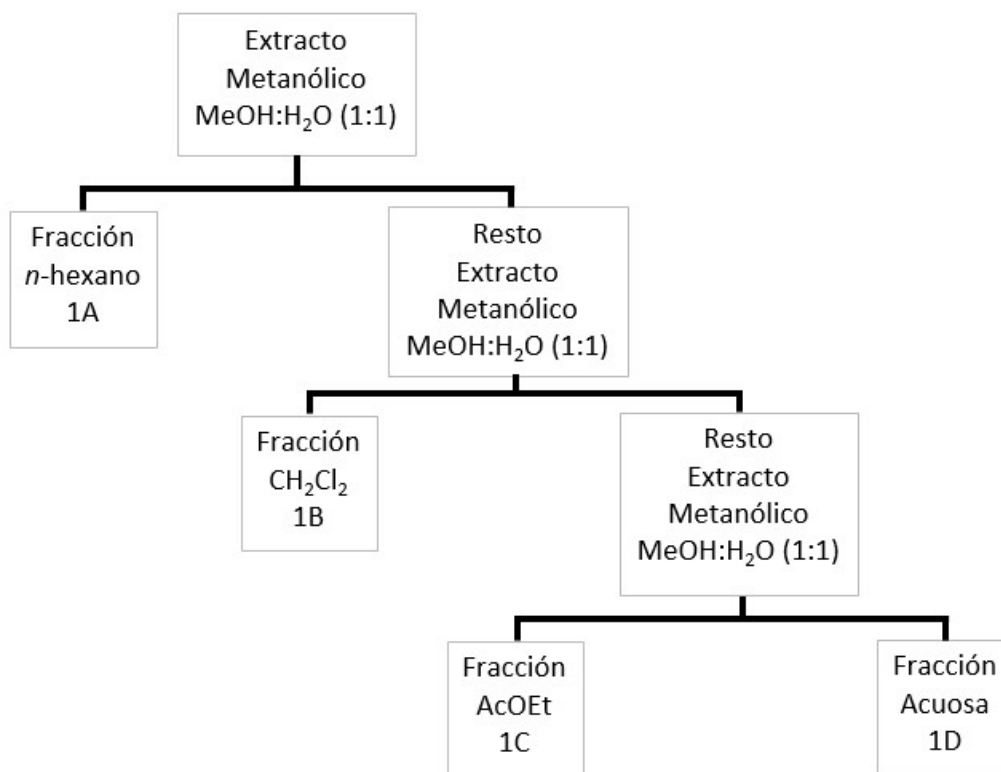
5.2. Obtención de los extractos.

Inicialmente las semillas de *A. escleroderma* (700 g), *A. globiflora* (250 g), y *A. muricata* (700 g), fueron secadas a temperatura ambiente (25 °C) por 1 semana, bajo la sombra y posteriormente se molieron (tamaño de partícula ≤ 1 cm) para realizar una maceración en frío con metanol como disolvente, esto se llevó a cabo por un lapso de tiempo suficiente para que el disolvente se sature de las sustancias producidas por las plantas (7 días), cada siete días se separó el disolvente de las semillas, mediante un proceso de filtración, evitando así el paso de partículas sólidas al extracto, renovando el disolvente y repitiendo el proceso por cuatro veces. Los filtrados obtenidos, se sometieron a una evaporación rotatoria bajo presión reducida, utilizando un rotaevaporador R-3 y una bomba de vacío V-700, de la marca BUCHI®, así se obtuvieron tres extractos crudos de consistencia aceitosa y de color café oscuro, a los que llamamos DAE-1 (*A. escleroderma*) (750gr.), CHI-1 (*A. globiflora*) (250gr.) y *A. muricata* (DAM-1) (800gr).

5.2.1. Fraccionamiento por el método de Kupchan.

Los extractos metanólicos, DAE-1, CHI-1 y DAM-1, se fraccionaron por el método de Kupchan, proceso que consiste en utilizar las diferentes solubilidades que poseen los metabolitos con los disolventes *n*-hexano, CH₂Cl₂, AcOEt y una mezcla de MeOH/H₂O (1:1). Así, cada uno de los extractos, DAE-1, CHI-1 y DAM-1, se re-disolvieron en 250 mL de la disolución MeOH:H₂O (1:1) y seguidamente se agregó 250 mL de *n*-hexano, la mezcla obtenida se puso en agitación por dos horas a una temperatura de 25 °C y posteriormente se separó la fase de *n*-hexano en un embudo de separación. Este proceso se efectuó tres

veces para este disolvente, y así sucesivamente con CH₂Cl₂ y AcOEt. Después de separar cada una de las fases orgánicas, el disolvente se eliminó bajo presión reducida en un rotaevaporador, así se obtuvieron cuatro fracciones para cada extracto metanólico (**Esquema 2**).



Esquema 2. Fraccionamiento del extracto metanólico por el método de Kupchan.

5.3. Técnicas cromatográficas.

Para los diferentes procesos de extracción y purificación se usaron disolventes grado analítico. Para el proceso de eliminación de los disolventes se usó el evaporador rotatorio equipado con un baño maría a una temperatura ≤ 40 °C y una bomba de vacío V-700, ambos de la marca Büchi, para monitorear cada una de las técnicas cromatográficas utilizadas se usó la cromatografía de capa delgada (CCD). Éstas se llevaron a cabo usando placas cromatográficas de aluminium backed CCD silica gel 20 x 20 cm F-254 de la marca Dynamic Adsorbents, empleándose diferentes mezclas de disolventes como eluyentes cromatográficos. El agente revelador de las CCD fue una disolución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol y posteriormente calentarlas en una placa de

calentamiento. La marcha cromatográfica realizada para las fracciones que se purificaron, incluyeron diversas técnicas estándar de purificación entre las que se encuentran:

- Cromatografía de exclusión molecular.

Esta metodología tiene como principio separar las mezclas complejas de compuestos en base a la diferencia de sus pesos moleculares, en este método también conocido como permeación en gel, se utilizó como fase estacionaria la resina lipofílica Sephadex LH-20[®] (25–100 μm) de la casa comercial Sigma-Aldrich[®]. La columna es preparada siguiendo las instrucciones del fabricante, la cual indica que la resina se humecte con metanol durante 12 h previas al empaquetamiento por gravedad de la columna.

- Cromatografía en columnas abiertas fase normal.

El principio de esta metodología, consiste en separar los componentes de una mezcla en función de la cantidad de grupos funcionales polares que posea cada molécula. Este fraccionamiento se realizó en columnas de cristal abiertas usando una fase estacionaria de gel de sílice 60 G y H (Merck[®]), así se utilizaron columnas de cristal de diversos diámetros, las cuales se empacaron con la fase estacionaria, hidratando la gel de sílice con la mezcla de disolventes de elución a utilizar con una relación entre el peso del producto/peso de gel de sílice (1/100) y una vez que la mezcla sea homogénea, esta se vierte en la columna y se deja depositar por gravedad.

- Cromatografía en columnas de media presión.

Para estas etapas cromatográficas se utilizó la columna sellada y pre-empaquetada de media presión, Lobar[®] LiChroprep[®] RP-18 (40–63 μm) Gröbe B (\varnothing 310 x 25 mm) Merck[®] por la cual se hará pasar la muestra, para este tipo de columnas se utilizó una bomba de embolo, RP-SY (Fluid Metering, Inc.), para hacer pasar la mezcla de disolvente a la columna. Es importante destacar que esta columna particularmente separa los compuestos en base a su polaridad, sin embargo, a diferencia de la fase normal, esta separa los componentes de una mezcla de forma inversa, por eso se le suele llamar columna de fase reversa.

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las purificaciones finales se realizaron en un equipo de HPLC, equipado con un sistema de bomba GBC Scientific Equipment, modelo LC 1110 HPLC Pump. Para las separaciones se ocupó una columna semipreparativa de fase normal de la marca Agilent-technology (\varnothing 4 x 40 cm) y una columna de fase reversa semipreparativa μ -Bondapak™ C-18 (\varnothing 1.9 x 15 cm).

5.4. Bioensayo de actividad antiproliferativa.

Para el seguimiento de la actividad antiproliferativa de los extractos y las fracciones se realizó el ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), es un ensayo colorimétrico, que determina la supervivencia celular a través de la cantidad de sales de tetrazolio (MTT) que ha sido reducida, ya que este proceso lo realiza la enzima succinato deshidrogenasa, que solo se encuentra en la mitocondria de los organismos vivos. Esta reducción, produce un compuesto coloreado de color azul (cristales de formazan), y a mayor viraje mayor viabilidad celular. El seguimiento de la actividad de los extractos y fracciones se realizó sobre la línea células RAW 264.7 (Línea celular de leucemia de monocitos de ratón).

Inicialmente las células se mantuvieron en fase de crecimiento en el medio de cultivo RPMI-1640 enriquecido con 10 % suero fetal bovino, L-glutamina 2.0 mM y con la presencia de los antibióticos penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (100 μ g/mL), utilizando una Incubadora a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad. El número de células mantenidas en fase exponencial fue cuantificado y posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas para obtener la densidad celular necesaria para el bioensayo. De este modo, se colocaron en volúmenes de 100 μ L, 5,000 células por pocillo, utilizando cajas de 96 pozos y seguidamente las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad por 24 horas. Por otro lado, los extractos a ensayar fueron disueltos en DMSO y medio RPMI-1640 enriquecido a una concentración dos veces superior a la deseada (500 μ g/mL).

Finalizadas las 24 horas de incubación, se agregó por triplicado 100 μ L de cada disolución de los extractos y fracciones correspondientemente, obteniéndose una concentración final de 250 μ g/mL y se repitió el proceso de incubación por 48 horas. La supervivencia de las células se observó agregando 20 μ L de MTT a una concentración de 5 mg/mL y la cuantificación de la reducción del MTT a formazán se determinó mediante el uso de técnicas espectrofotométricas en un lector de ELISA Spectra SLT Rainbow a una longitud de onda de 490 nm/ref.- 630 nm. Los efectos producidos por los metabolitos sobre las enzimas mitocondriales responsables de disminuir la tintura del MTT se excluyó por comparación de los valores de absorbancia de células tratadas y no tratadas después de los dos días de incubación, se utilizaron testigos con disolvente (testigos negativos) y células no tratadas. El porcentaje de viabilidad se obtiene dividiendo la densidad óptica de las células tratadas entre las densidad óptica células control por 100.

5.5. Purificación de la fracción DAE-1B de *A. scleroderma*.

La fracción DAE-1B fue una de las fracciones que mostró una actividad citotóxica importante (**Figura 6**), por lo que se le realizó un estudio cromatográfico, iniciando este con una cromatografía en una columna abierta (460 mm X 57 mm) por gravedad, utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y metanol como fase móvil, este fraccionamiento dió lugar a dos fracciones: **DAE-2A** (15-660 mL; 630 gr) y **DAE-2B** (675-1,245 mL; 89 gr) (**Esquema 3**).

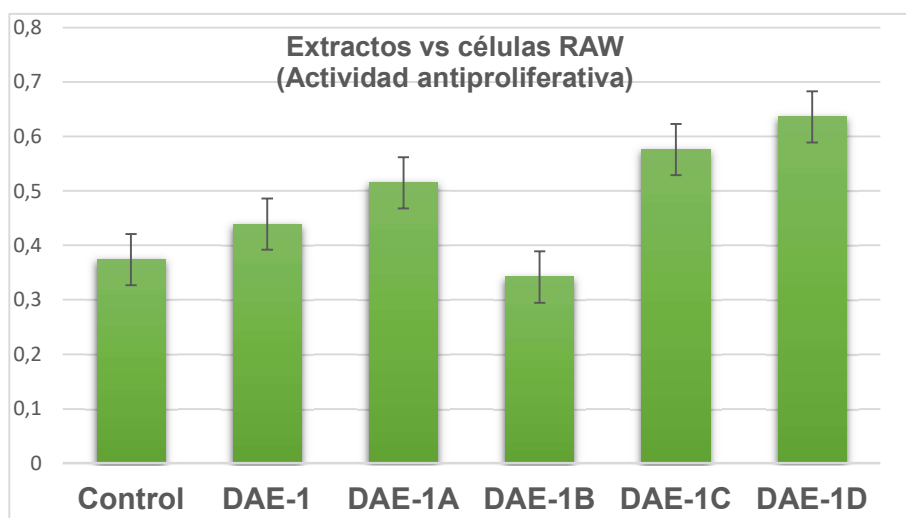


Figura 6. Ensayo de actividad anti proliferativa de las fracciones por el método de Kupchan (DEA-1, DAE-1A, DAE-1B, DAE-1C y DAE-1D). La fracción DAE-1B fue una de las fracciones que mostró una actividad citotóxica importante.

- Fraccionamiento de DAE-2A.

En la evaluación de las dos fracciones obtenidas de la cromatografía anterior, se observó que la actividad biológica se encontraba en la fracción **DAE-2A**, motivo por el cual se procedió a su purificación, utilizando una columna abierta (560 mm X 55 mm) empacada con gel de sílice 60 G y H (Merck®) y como eluyente cromatográfico una mezcla inicial de *n*-hexano/acetona 75:25 hasta llegar a una proporción de estos mismos disolventes de 55:45, se obtuvieron así 128 fracciones y dos lavados, a los cuales se les realizó una CCD y de acuerdo a la similitud de las manchas que se mostraban se reunieron en: **DAE-2A1** (15-75 mL; 59 g), **DAE-2A2** (90-120 mL; 37 g), **DAE-2A3** (135-165 mL; 105 g), **DAE-2A4** (180-345 mL; 68 g), **DAE-2A5** (350-590 mL 92 g), **DAE-2A6** (605-1,025 mL;

49 g), **DAE-2A7** (1,040-1,175 mL; 50 g), **DAE-2A8** (1,190- 1,520 mL; 53 g), **DAE-2A9** (1,535-1,760 mL; 47 g), **DAE-2A10** (lavado con acetona; 500 mL; 77 g) y **DAE-2A11** (lavado con MeOH; 750 mL 85 g) (**Esquema 3 y Figura 7**).

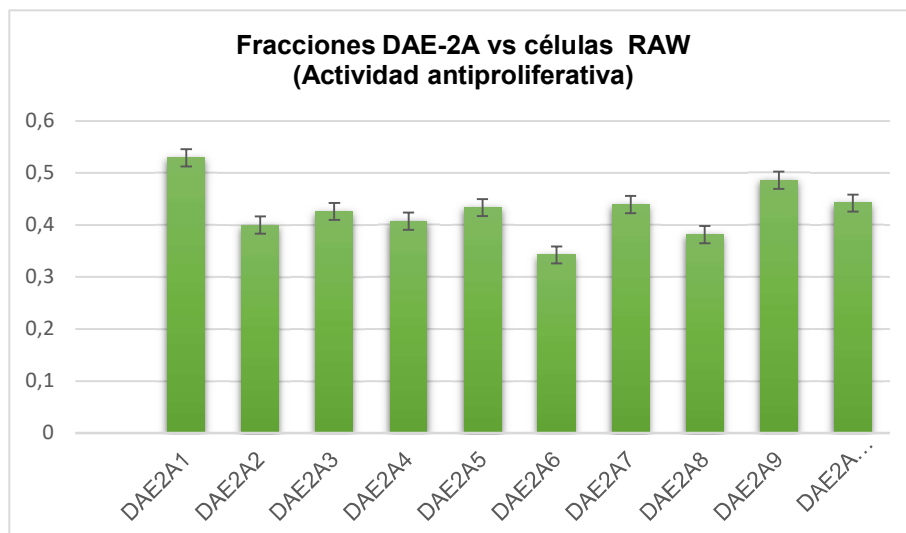


Figura 7. Graficas de actividad anti proliferativa de las fracciones DAE-2A.

- Fraccionamiento de DAE-2A3.

Al evaluar todas las fracciones anteriores por el bioensayo de citotoxicidad, ninguna de las fracciones mostró una importante actividad citotóxica, lo cual nos pareció muy extraño, por lo que se decidió realizar espectros de RMN ¹H de todas las fracciones y aunque la fracción **DAE-2A3**, no mostró una importante actividad citotóxica, su espectro RMN ¹H mostró señales características de las ACG's, por lo que se decidió purificarla. Así, la fracción **DAE-2A3** fue sometida a una cromatografía en una columna abierta fase normal abierta (560 mm X 55 mm X 30 cm) usando como fase móvil una mezcla *n*-hex/Acetona (de 80:20 hasta 20:80), se obtuvieron 14 fracciones principales a las que se llamaron: **DAE-3A** (7-35 mL; 16.15 mg), **DAE-3B** (42-91 mL; 25.6 mg), **DAE-3C** (98-119 mL; 8.7 mg), **DAE-3D** (126-189 mL; 19 mg), **DAE-3E** (196-250 mL; 66.4 mg), **DAE-3F** (257-474 mL; 111.5 mg), **DAE-3G** (481-530 mL; 161.2 mg), **DAE-3H** (537-565 mL; 359.5 mg), **DAE-3I** (572-635 mL; 1032.1 mg), **DAE-3J** (542-640 mL; 27,012 mg), **DAE-3K** (647-717 mL; 1,557 mg), **DAE-3L** (724-782 mL; 714.6 mg), **DAE-**

3M (789-803 mL; 255.9 mg), **DAE-3N** (810-831 mL; 217.8 mg) y **DAE-3Ñ** (838-866 mL; 174.7 mg) (**Esquema 3** y **Figura 8**).

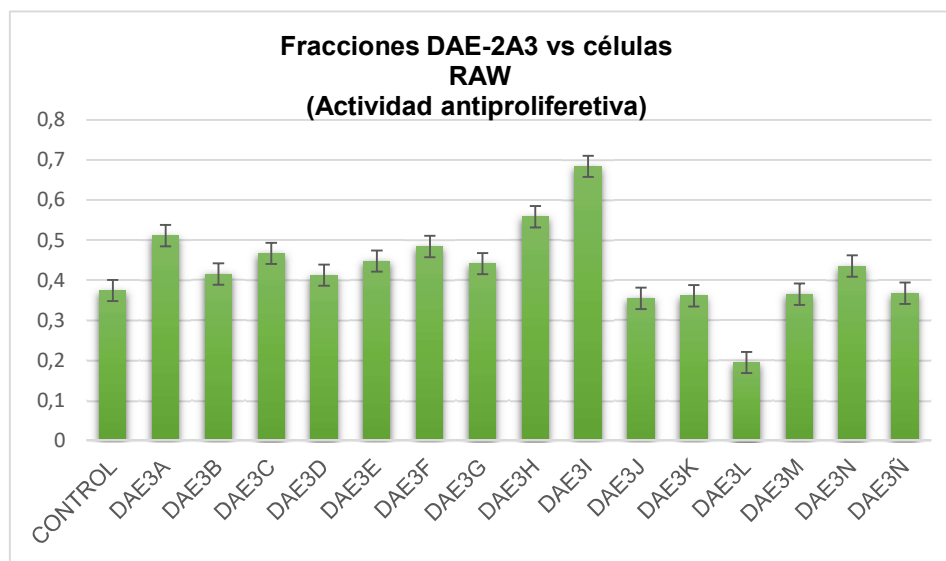


Figura 8. Graficas de actividad anti proliferativa de las fracciones DAE-2A3.

- Fraccionamiento de DAE-3E.

Nuevamente, la fracción **DAE-3E** fue purificada porque su espectro de RMN ¹H mostraba señales características de las ACG's y no por la pobre actividad citotóxica que mostraba. Su separación por HPLC equipado con una columna semi-preparativa en fase normal con una mezcla de elución de *n*-hex/acetona/MeOH (80:20:2 gotas) las fracciones obtenidas fueron las siguientes: **DAE-3E1** (9-45 mL; 13.17 mg) , **DAE-3E2** (46- 91 mL; 5.3 mg), **DAE-3E3** (92- 136 mL; 4.33 mg), **DAE-3E4** (137-181 mL; 13 mg), **DAE-3E5** (182-226 mL; 5.9 mg), **DAE-3E6** (127- 271 mL; 2.4 mg), **DAE-3E7** (271- 316 mL;1.9 mg), **DAE-3E8** (317-361 mL;4.8 mg), **DAE-3E9** (361- 406 mL; 25.6 mg) (**Esquema 3** y **Figura 9**).

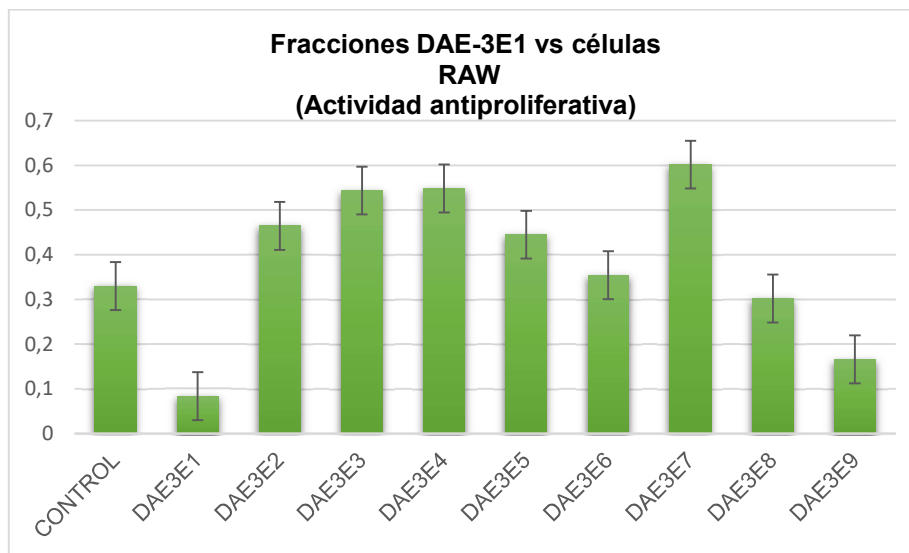
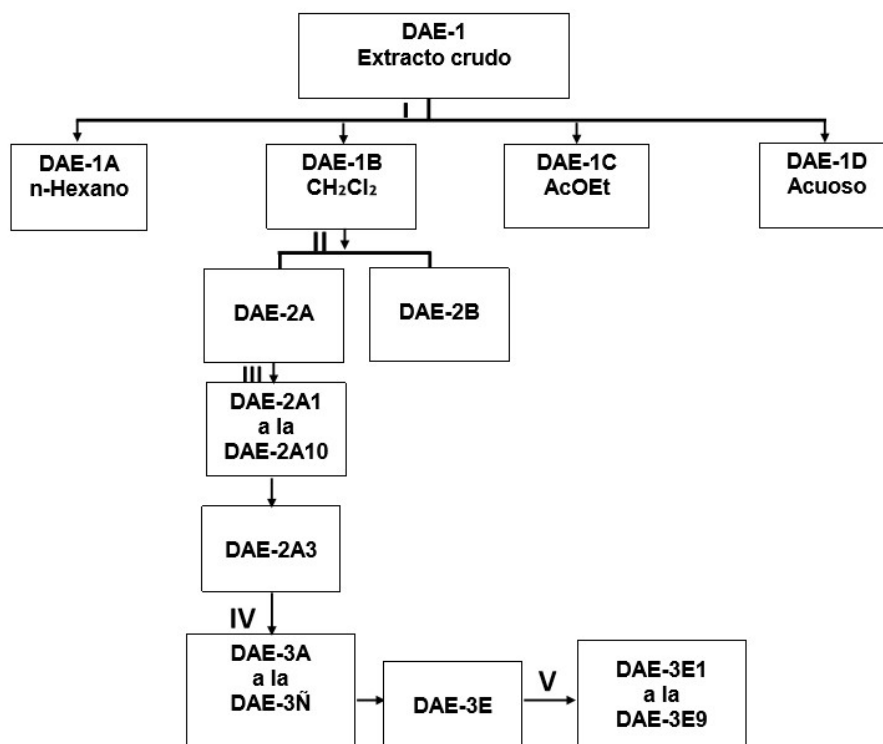


Figura 9. Graficas de actividad anti proliferativa de las fracciones DAE-3E1.

- Fraccionamiento de DAE-3E1.

En este punto del fraccionamiento pudimos comprender los pobres resultados observados en los bioensayos anteriores, ya que como se puede observar en la **Figura 8**, la actividad citotóxica de la fracción **DAE-3E1** es muy significativo, lo que se corresponde con el hecho de que el espectro de RMN ^1H de esta fracción se ven claramente señales típicas de ACG's, a diferencia de esto, en varias fracciones se ve un aumento en la proliferación celular, lo cual pudo haber estado enmascarando la actividad citotóxica de la ACG presente en estas fracciones. La fracción **DAE-3E1** resulto ser una fracción con un alto grado de pureza por lo que se decidió terminar de purificarla, para ello nuevamente se utilizó el HPLC con una columna fase normal, utilizando un sistema de elución *n*-hex/acetona (80:20→70:30). Esta marcha dio lugar a: **DAE-3E1A** (1-27 mL; 1.6 mg), **DAE-3E1B** (28-38 mL; 1 mg), **DAE-3E1C** (39-44 mL; 1 mg), **DAE-3E1D** (45-53 mL; 1.3 mg), **DAE-3E1E** (54-62 mL; 1.4 mg), **DAE-3E1F** (63-82 mL; 1.5 mg), **DAE-3E1G** (83-200 mL; .9 mg), **DAE-3E1H** (370 mL; .8 mg). El resultado fue que la fracción DAE-3E1B resulto ser el compuesto puro rolliniastatina- 2, el cual ya había sido descrito por Pettit, *et al.*, evaluando la actividad citotóxica frente a la línea celular de leucemia linfocítica (P- 388) (Pettit, *et al.*, 1989).

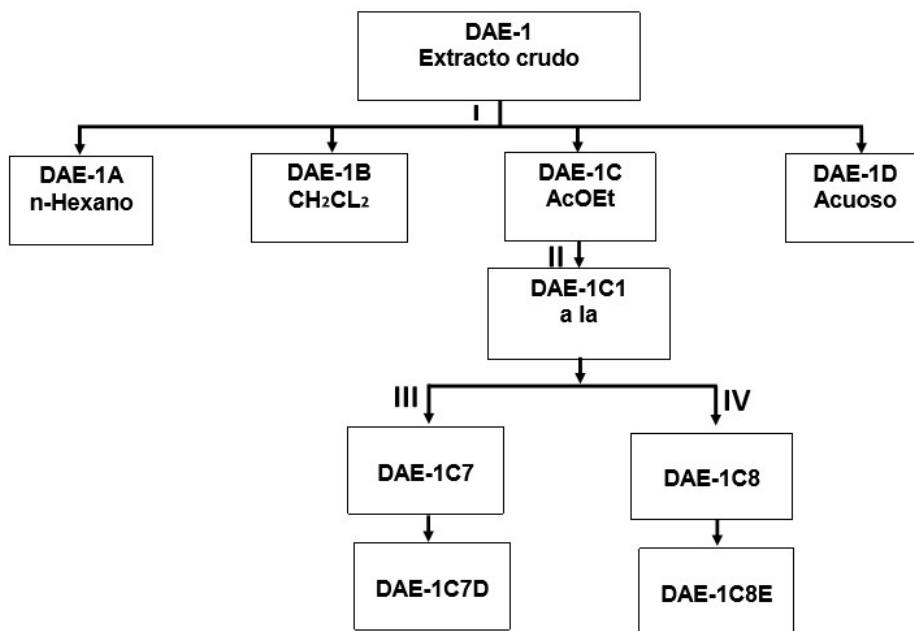


Esquema 3. Marcha cromatográfica del extracto metanólico de *Annona scleroderma*. I. Método de Kupchan. II. Cromatografía de exclusión molecular: Columna por gravedad; Sephadex LH-20; Metanol. III. HPLC: Fase normal; *n*-Hex/acetona (75:25); flujo: 1 mL/min. IV. HPLC: Fase normal; *n*-Hex/acetona (80:20); flujo: 1 mL/min. V. HPLC: Fase normal; *n*-Hex/Acetona (90:10); flujo: 1 mL/min.

5.6. Purificación de la fracción DAE-1C de *A. scleroderma*.

Como se comentó el espectro de RMN ¹H de **DAE-1C1** presentaba un perfil interesante por RMN, motivo por el cual fue sometida a un fraccionamiento mediante el uso de una columna fase reversa Lobar® LiChroprep® RP-18, y como fase móvil se ocuparon distintas mezclas de disolventes, iniciando con MeOH/H₂O (60:40) y bajando la polaridad hasta llegar a la proporción 90:10, así, de este fraccionamiento se obtuvieron 120 tubos, los cuales se reunieron según sus CCD, de la siguiente manera: **DAE-1C1** (7-70 mL; 2.1 mg), **DAE-1C2** (77-126; 5.1 mg), **DAE-1C3**(133-182 mL; 1.3 mg), **DAE-1C4** (189-212 mL; 4.6 mg), **DAE-1C5** (219-247 mL; 3.0 mg), **DAE-1C6** (2.254-303 mL; 4.3 mg), **DAE-1C7** (310-471 mL; 6.7 mg), **DAE-1C8** (478-604 mL; 2.5 mg), **DAE-1C9** (611-660 mL; 0.9 mg), **DAE-1C10** (667-800 mL; 3.7 mg) (**Esquema 4**).

Continuando con la búsqueda biodirigida, se realizaron espectros de RMN-¹H de todas las fracciones y se observó que las reuniones **DAE-1C7** y **DAE-1C8** tenían un perfil de señales interesantes por RMN ¹H, por lo que se decidió purificar la fracción **DAE-1C7** en HPLC con una columna fase reversa Lobar[®] LiChroprep[®] RP-18, utilizando un sistema de elución MeOH/H₂O (60:40), recolectándose 80 tubos, de los cuales se reunieron según sus CCD en cuatro fracciones **DAE-1C7A**, **DAE-1C7B**, **DAE-1C7C** y **DAE-1C7D**, este último resultado ser un compuesto puro. En lo referente a la fracción **DAE-1C8**, se obtuvo una fracción semipura al fraccionarla por HPLC, con una columna fase reversa Lobar[®] LiChroprep[®] RP-18, en un sistema de elución MeOH/H₂O (50:50), a la que llamamos, **DAE-1C8E**, y que resulto ser la fracción **DAE-1C7D** pero un poco sucia (**Esquema 4**).



Esquema 4. Marcha cromatográfica del fraccionamiento de DAE-1C. **I.** Método de Kupchan. **II.** Cromatografía a media presión: Fase reversa Lobar[®] LiChroprep[®] RP-18; MeOH/H₂O (60:40); flujo: 1mL/min. **III.** HPLC: Fase reversa Lobar[®] LiChroprep[®] RP-18; MeOH/H₂O (60:40); flujo: 1mL/min. **IV.** HPLC: Fase reversa Lobar[®] LiChroprep[®] RP-18; MeOH/H₂O (50:50); flujo: 1mL/min.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

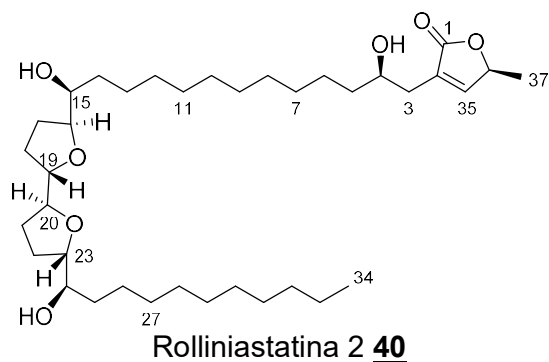
Como ya se comentó en los antecedentes, estudios fitoquímicos previos de especies de la familia anonácea han puesto de manifiesto que estos organismos producen una gran cantidad de metabolitos secundarios como poliéteres como las acetogeninas y proteínas. Estos metabolitos además de poseer una gran diversidad estructural han demostrado tener interesantes actividades farmacológicas, principalmente como agentes citotóxicos, insecticidas, bactericidas, pesticidas y antiparasitarias.

El estudio cromatográfico realizado sobre especies de anonas recolectadas en el estado de Veracruz permitió el aislamiento e identificación de dos compuestos puros, tal y como se describe a continuación: Los especímenes de *Annona scleroderma*, *A. muricata* y *A. globiflora* fueron recolectados en Jalcomulco, Veracruz, México. Estos especímenes se maceraron con MeOH durante 7 días, después de evaporar el disolvente, se obtuvo un primer extracto de cada espécimen de color verde oscuro, los cuales fueron particionados por el método de Kupchan con *n*-hexano, CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH:H₂O (1:1).

Las fracciones resultantes se evaluaron frente a células RAW (leucemia de macrófagos de ratón) para ver su actividad antiproliferativa, con base a estos resultados, se cromatografió la fracción **DAE-1B** (fracción de CH₂Cl₂ de *annona scleroderma*) siguiendo las pautas que se exponen en el **Esquema 3** y así se obtuvo el compuesto rolliniastatina 2 **40**, que ya había sido reportado anteriormente en la literatura, este metabolito resultó ser uno de los compuestos que le daba la propiedad antiproliferativa a la fracción **DAE-1B**. Del mismo modo, pero en este caso guiándonos en los espectros de RMN-¹H se purificó la fracción **DAE-1C** (fracción de AcOEt de *annona scleroderma*), tal y como se muestra en el **Esquema 4**, este proceso permitió el aislamiento de un compuesto, que al ser elucidado por RMN y masas, resultó ser un octapeptido que no ha sido reportado anteriormente en la literatura.

6.1. Estudio de elucidación estructural de DAE-3E1B.

El análisis de los datos espectroscópicos del primer compuesto puro, rolliniastatina 2 **40**, nos sugirió que está estructuralmente relacionado con las ACGs. Siguiendo esta analogía estructural, se inició la determinación estructural del compuesto aislado mediante un estudio comparativo de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados para otras ACGs ya reportadas en la literatura.



Así, para la elucidación de nuestro compuesto, el rolliniastatina 2 **40**, inicialmente se analizó los datos de RMN ^1H , los cuales confirmaron la presencia de una señal triplete a δ_{H} 0.87 ppm correspondiente a al metilo terminal de la cadena, así como una señal doblete del metilo en el anillo lactónico a δ_{H} 1.43 ppm. En esa misma zona del espectro se localizó una señal con un desplazamiento químico de δ_{H} 1.26, que integra para 32 protones (16 metilenos de las porciones hidrofóbicas). En la parte central del espectro se observa con claridad la presencia de varias señales que integran para ocho protones que son característicos de protones α a un heteroátomo. A campos bajos, encontramos una señal singulete a δ_{H} 7.18 ppm que se corresponde al protón del carbono sp^2 H-35 (**Figura 10**).

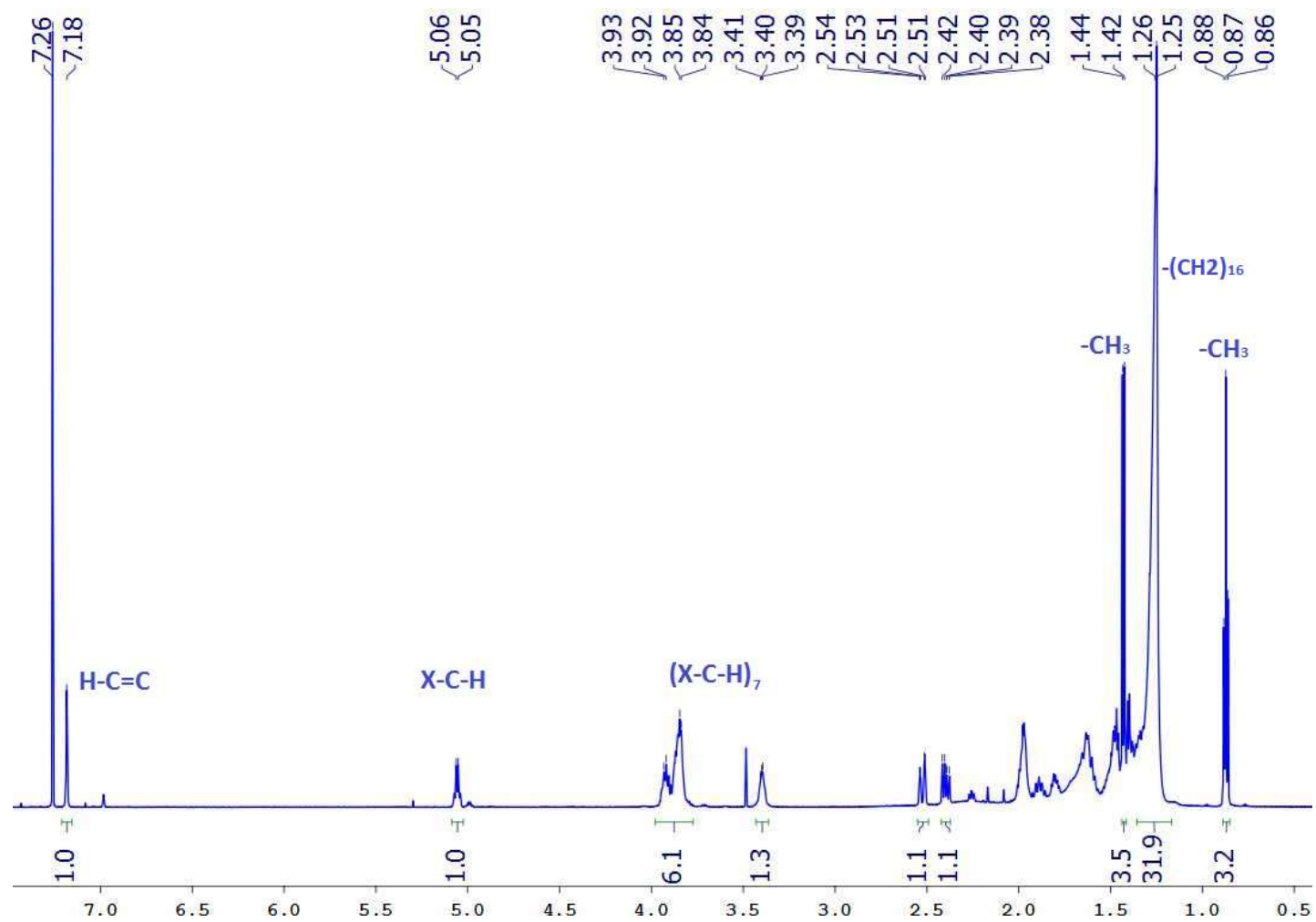


Figura 10. Espectro de protón de rolliniastatina 2 40. (X=heteroátomo).

El análisis del espectro COSY (correlation spectroscopy) permitió establecer las conectividades de tres sistemas de espines ^1H — ^1H en este compuesto, que se corresponden con los fragmentos que se muestran en la **Figura 11**. La asignación de los desplazamientos químicos de los protones en el segmento C-3—C-5 se inició a partir de los protones H₂-3 (δ_{H} 2.39/2.52 ppm), el cual se correlacionó con H-4 (δ_{H} 3.84 ppm), y estos secuencialmente con H₂-5 (δ_{H} 1.46); en este punto es importante destacar que el experimento COSY, permite establecer fragmentos de la molécula por correlaciones entre protones vecinos, por lo que en presencia de carbonos cuaternarios estas correlaciones se ven truncadas, en este sentido aun cuando los siguientes carbonos no son cuaternarios (C-6→C-13), poseen el mismo desplazamiento químico, lo cual imposibilitó seguir conectando el sistema de espines por solapamiento de señales en el experimento COSY. La asignación del siguiente sistema de espines comenzó con el acoplamiento que presentó el metino H-35 (δ_{H} 7.18) con el protón H-36 (δ_{H} 5.06), y este a su vez con el metilo doblete H-37 (δ_{H} 1.43). El último sistema de espin se inició con la correlación de H₂-14 (δ_{H} 1.35) con el protón H-15 (δ_{H} 3.38) y este secuencialmente con H-16 (δ_{H} 3.83), H₂-17 (δ_{H} 1.30), H₂-18 (δ_{H} 2.00), H-19 (δ_{H} 3.92), H-20 (δ_{H} 3.83), H₂-21 (δ_{H} 2.00), H₂-22 (δ_{H} 1.30), H-23 (δ_{H} 3.92), H-24 (δ_{H} 3.83) y H₂-25 (δ_{H} 1.30), nuevamente la superposición de las señales impidió que se pudiera seguir conectando este fragmento con protones vecinos (**Figura 11**). Establecida una buena parte de las señales de protón del metabolito aislado, se procedió a correlacionar cada protón con el carbono que lo soporta, para esto se utilizó el experimento HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation), experimento que nos permite unir los protones con su respectivo carbono (**Figura 12 y 13**).

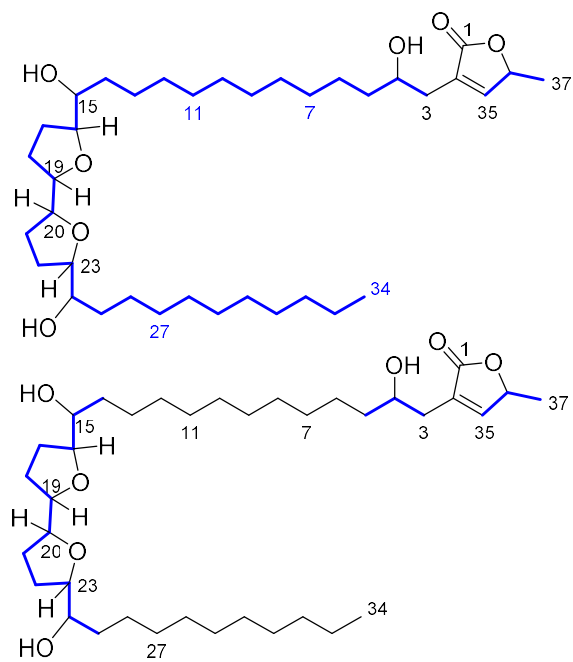


Figura 11. Estructuras parciales de rolliniastatina 2 **40**. Arriba se muestra todas las correlaciones ^1H - ^1H que se observarían si no hubiese superposición. Abajo se muestra las conectividades ^1H - ^1H que se pudieron extraer del experimento COSY.

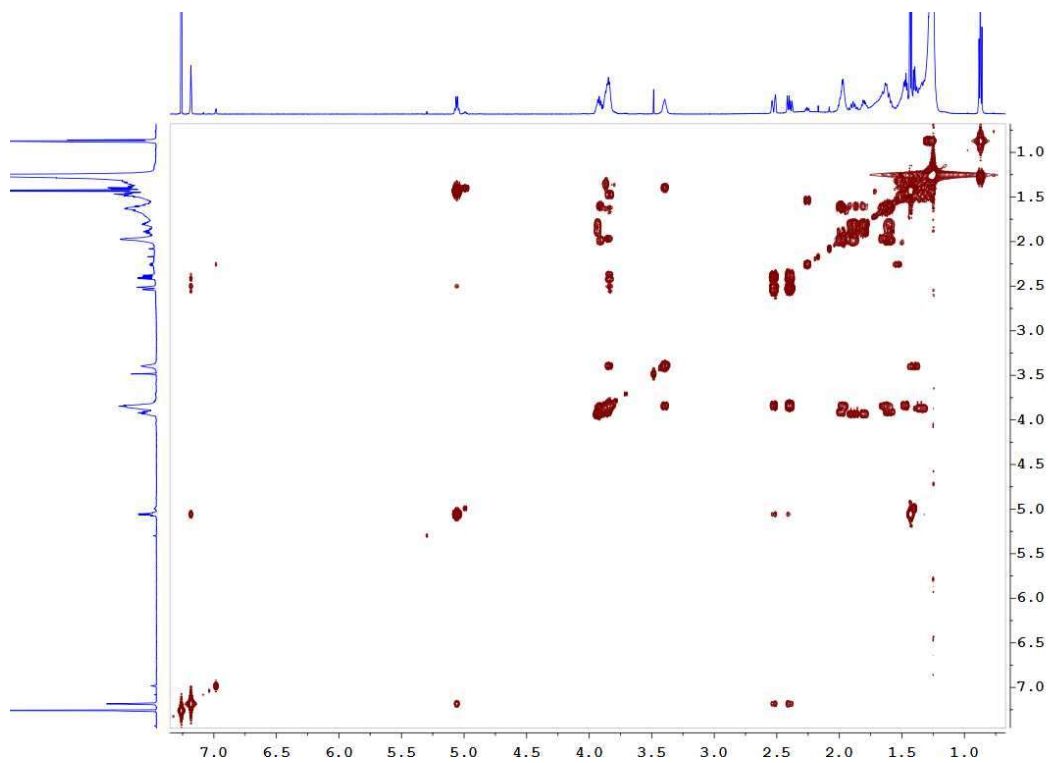


Figura 12. Espectro COSY de rolliniastatina 2 **40**.

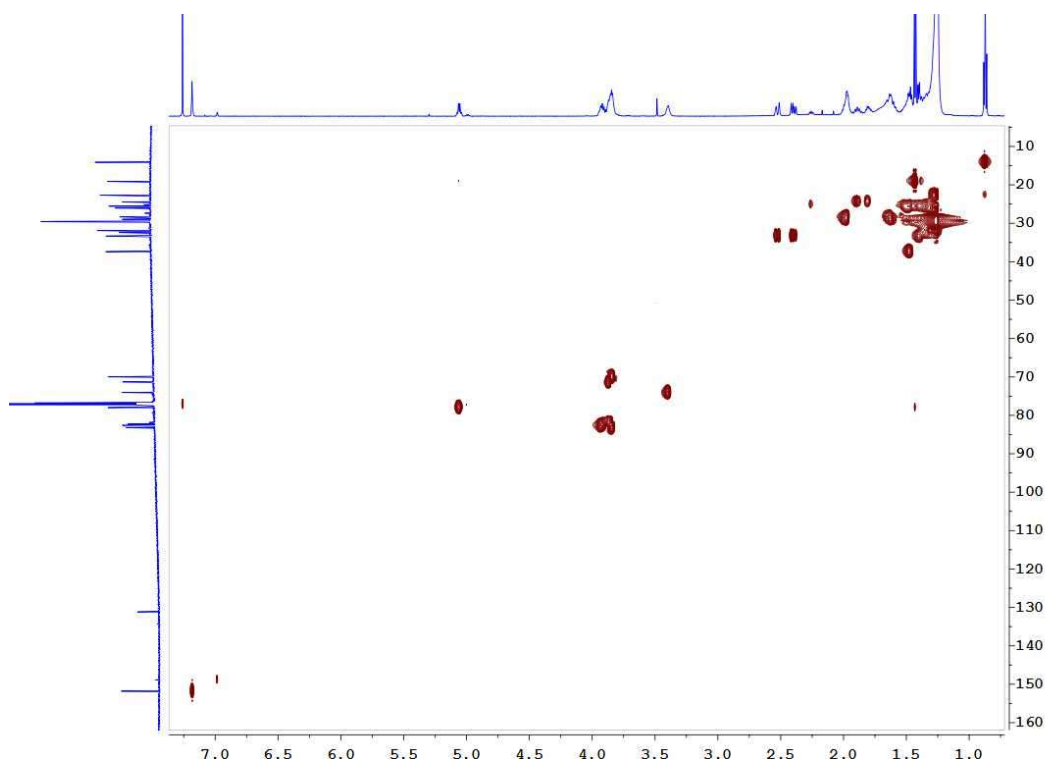


Figura 13. Espectro HSQC de rolliniastatina 2 40.

Por lo general, el experimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) es un experimento que nos permite unir los fragmentos obtenidos del experimento COSY y HSQC, ya que permite correlacionar protones con carbonos vecinos que se encuentren a dos y tres enlaces de distancia, lo cual permite unir los fragmentos COSY separados por carbonos cuaternarios, estableciendo así la estructura plana de la molécula, desafortunadamente en este caso y debido a la superposición de señales no se pudieron establecer por completo las correlaciones COSY, por lo cual la información útil que se pudo extraer del experimento HMBC permitió resolver la estructura de la porción del anillo β -lactónico de la siguiente manera, la correlación de los protones H₂₋₃ (δ_H 2.39/2.52) con los carbonos C-1 (δ_C 174.5), C-2 (δ_C 131.1) y C-35 (δ_C 151.7), estas conexiones unidas a la observada a través del oxígeno entre el protón H-36 (δ_H 5.06) y el carbonilo C-1. Las correlaciones que presentan a través del oxígeno H-15 (δ_H 3.38) con C-19 (δ_C 82.4), H-19 (δ_H 3.92) con C-15 (δ_C 74.1), H-23 (δ_H 3.92) con C-20 (δ_C 82.2) y H-20 (δ_H 3.83) con C-23 (δ_C 82.7) (**Figura 14 y 15**).

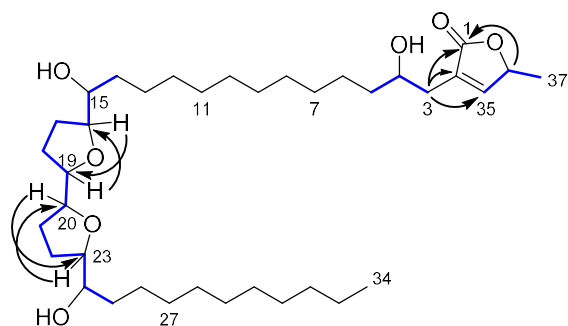


Figura 14. Correlaciones COSY y HMBC más importantes observadas para el rolliniastatina 2 **40**.

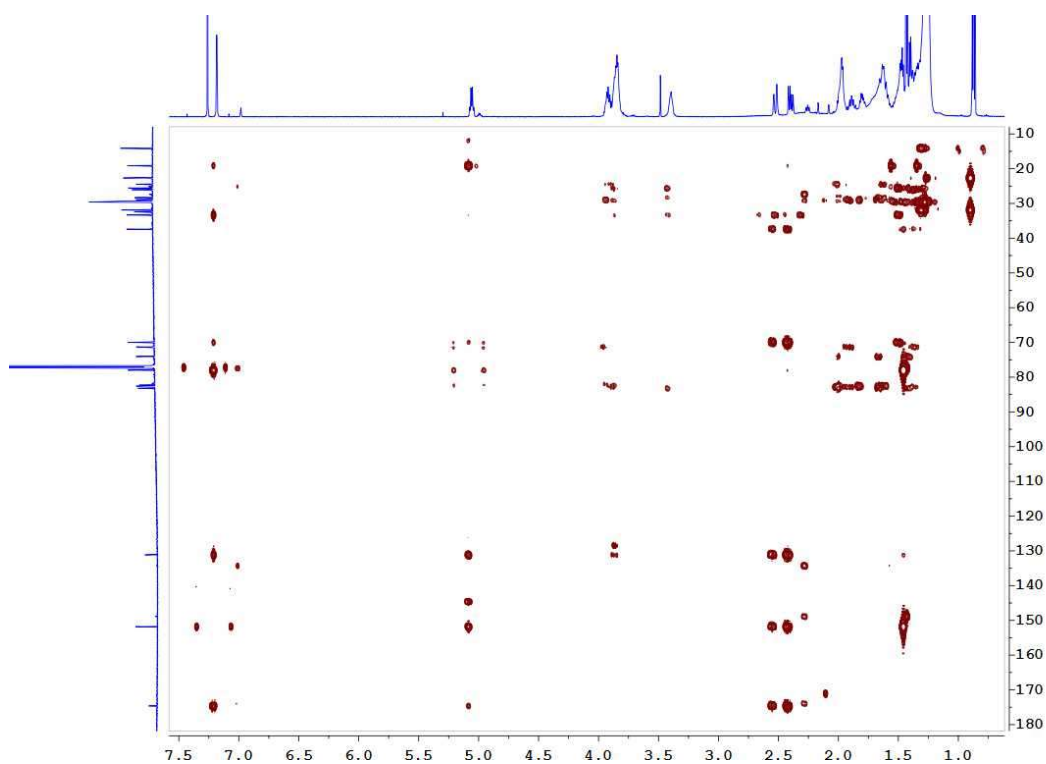


Figura 15. Espectro HMBC de rolliniastatina 2 **40**.

Para establecer la estructura del resto de la molécula rolliniastatina 2 **40**, fue necesario recurrir a la espectrometría de masas, en la cual observamos un pico a m/z 622.4710 que se corresponde al ión molecular $[M]^+$, con la fórmula molecular, $C_{37}H_{66}O_7$, que indica que **40** posee cinco insaturaciones en su estructura (**Figura 16**). Esta información, junto con el análisis de los datos obtenidos por espectroscopía de RMN ^{13}C , que indican la presencia de dos metilos, 24 metilenos, nueve metinos (uno de ellos sp^2 y ocho α a un oxígeno) y

dos carbonos cuaternarios (uno de ellos sp^2 de un grupo carbonilo y el otro de un doble enlace) (**Figura 16**), coinciden con los datos establecidos anteriormente y permiten establecer los grupos metilenos faltantes de la estructura, estableciendo así la estructura plana de rolliniastatina 2 **40** (**Tabla 3**)

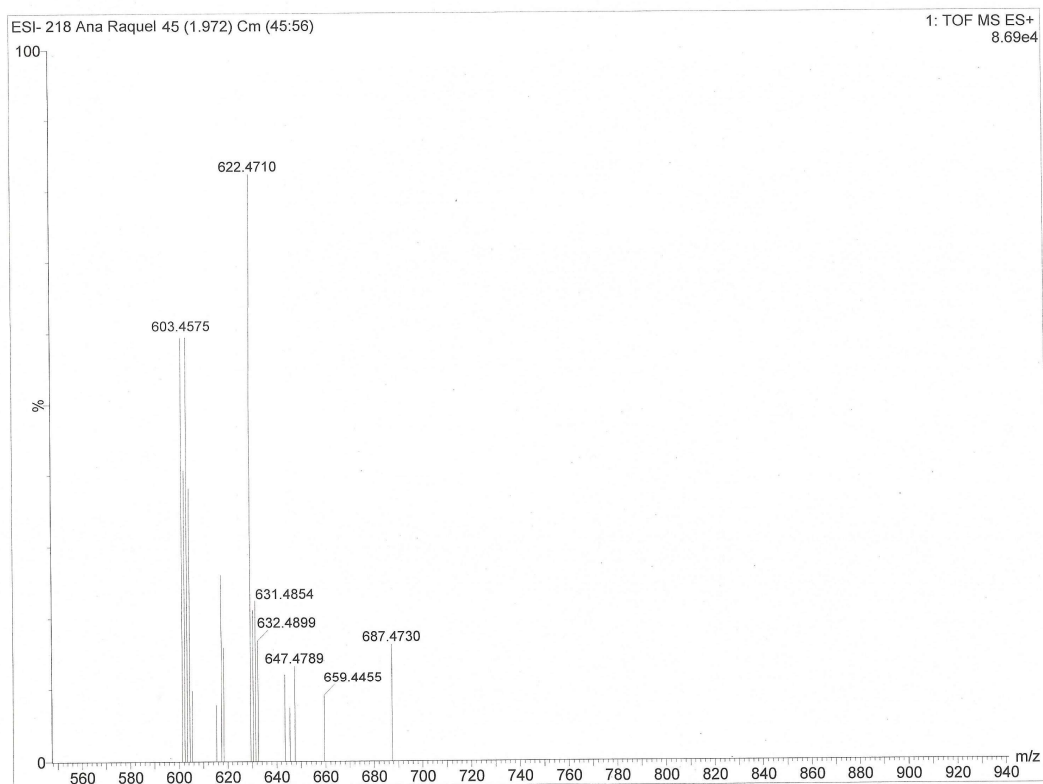


Figura 16. Espectro de Masas de rolliniastatina 2 **40**.

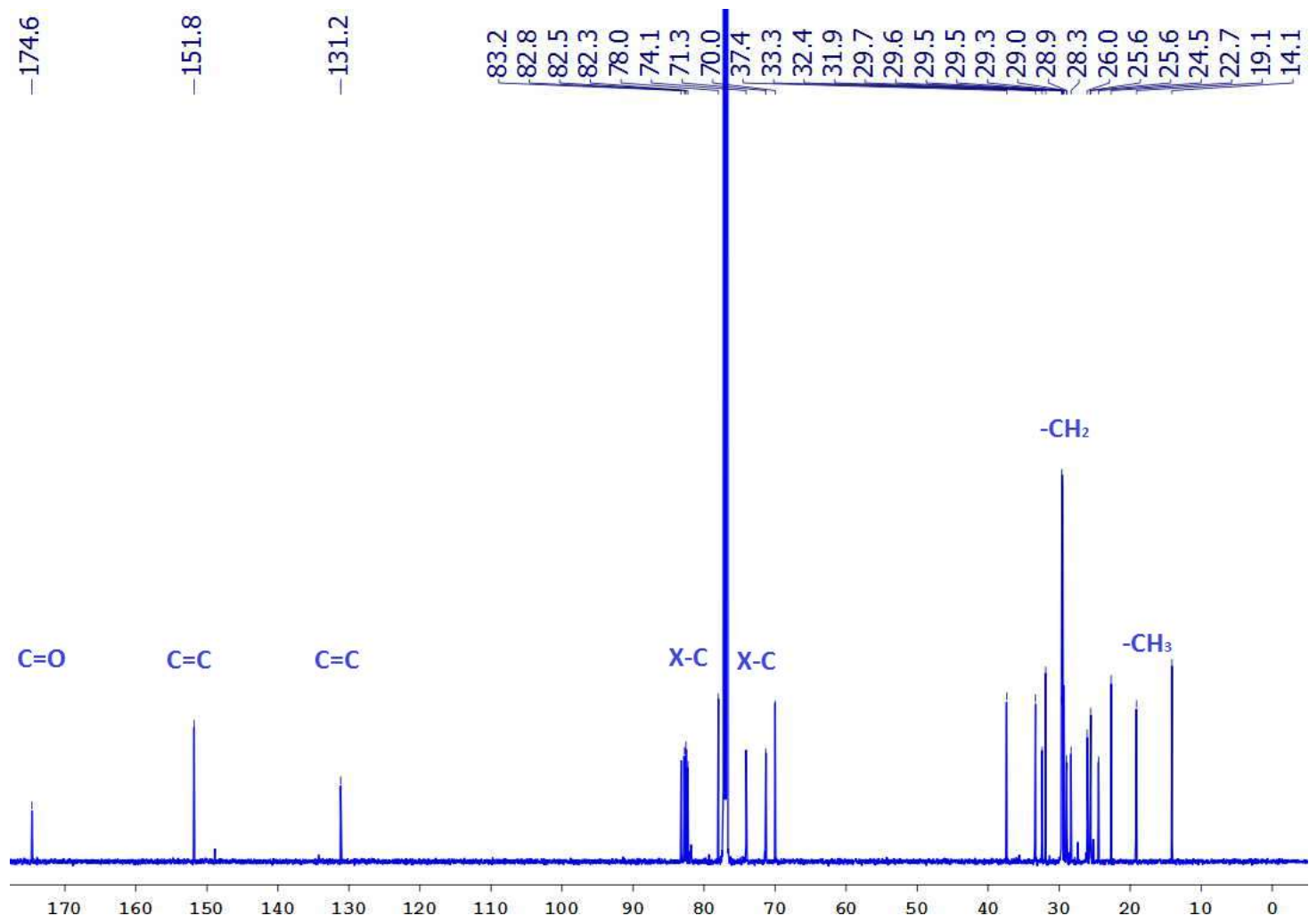


Figura 17. Espectro de carbono del rolliniastatina 2 40.

n C	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	---	174.5
2	---	131.1
3	2.39/2.52	33.2
4	3.84	69.9
5	1.46	37.3
6-13	1.25	25.2—29.9
14	1.35	33.2
15	3.38	74.1
16	3.83	83.2
17	1.30	28.9
18	2.00	28.4
19	3.92	82.4
20	3.83	82.2
21	1.30	28.9
22	2.00	28.4
23	3.92	82.7
24	3.83	72.3
25	1.30	32.4
26-33	1.25	22.6—31.8
34	0.85	14.1
35	7.18	151.7
36	5.06	77.9
37	1.43	19.1

Tabla 3. Desplazamientos químicos de rolliniastatina 2 **40**.

Una vez establecida la estructura plana, se observó que desafortunadamente, nuestro compuesto, rolliniastatina 2 **40**, ya había sido reportado en la literatura, motivo por el cual no fue necesario establecer su estereoquímica relativa, ya que esta ya había sido determinada.

6.1. Estudio de elucidación estructural de DAE-1C7D.

Los datos obtenidos del espectro de masas para **DAE-1C7D 41**, $[M+Na]^+$ a m/z 888.4032, estableció una fórmula empírica de $C_{38}H_{63}N_{11}O_{12}Na$ (**Figura 18**). El análisis de los espectros de RMN indicó que se trataba de un péptido. Así el estudio se inició con el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C , el cual permitió establecer la presencia de 6 metilos (4 de ellos terciarios y 2 secundarios), 7 metilenos (ninguno de ellos sp^2), 14 metinos (4 de ellos aromáticos, 8 α a un heteroátomo y 2 de alcanos) y 11 carbonilos (8 de ellos de grupos carbonilos, 2 aromáticos y un carbono de un grupo guanidino).

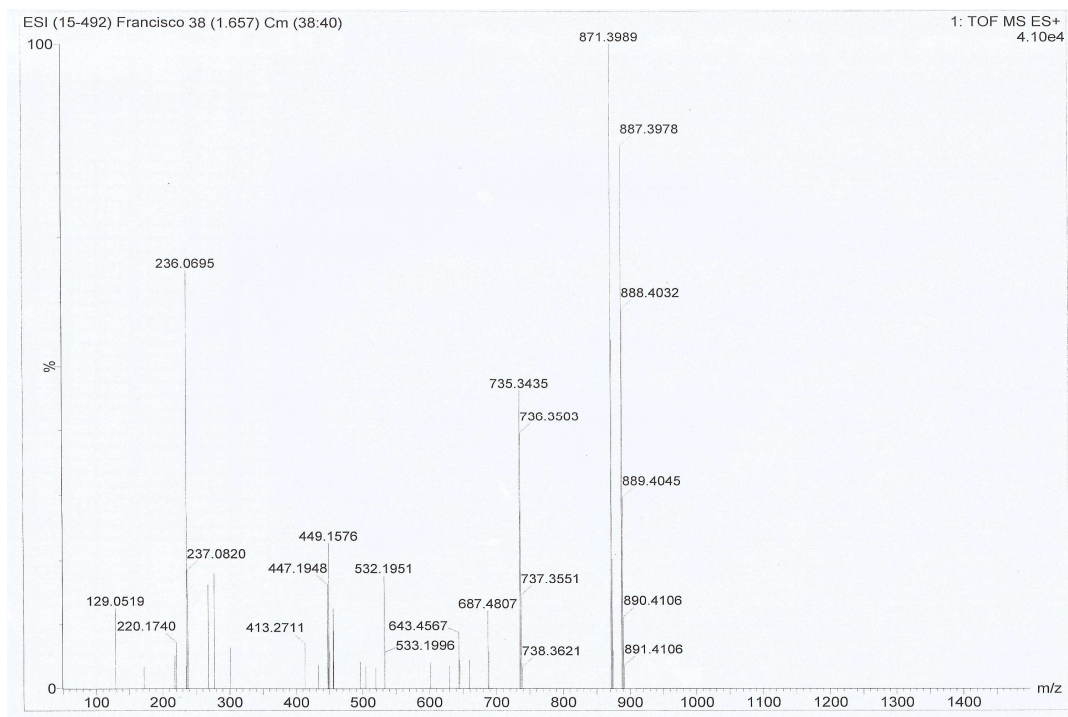
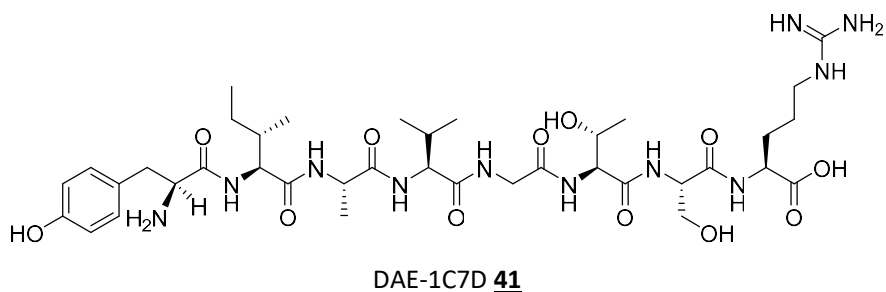


Figura 18. Espectro de Masas de DAE-1C7D **41**.

El análisis del experimento COSY permitió establecer los sistemas de espín presentes en cada aminoácido de la molécula, dando lugar a las estructuras parciales que se observan en la **Figura 19**. Este estudio se inició con determinando tres sistemas de espín en la tirosina, **sistema 1** (H-31—H₂-32), **sistema 2** (H-34—H-35) y **sistema 3** (H-37—H-38). En el caso de la isoleucina se estableció un grupo de correlaciones que permitió establecer el grupo sec-butilo de la siguiente manera, **sistema 4** (H-25—H₃-28 incluyendo al metilo H₃-29). En el caso de la alanina, solamente se vio el **sistema 5** (H-22—H₃-23). El espectro de COSY del siguiente aminoácido, la valina, permitió establecer el grupo isopropilo, **sistema 6** (H-17—H₃-19 incluyendo al metilo H₃-20). La glicina, únicamente mostró un acoplamiento geminal entre los protones del metileno H₂-15, **sistema 7**. Las correlaciones del espectro COSY, permitió establecer el **sistema 8** de la treonina de la siguiente manera (H-11—H₃-13). En el caso de la serina se pudo establecer el **sistema 9** con las correlaciones de los protones (H-8—H₂-9). Finalmente, la secuencia de correlaciones para la arginina nos permitió establecer el **sistema 10** (H-2—H₂-5), a modo de ejemplo en la **Figura 21** se muestra como se determinaron estos sistemas de espín ¹H-¹H en la arginina. El análisis del experimento HSQC, permitió asignar los carbonos de cada uno de los sistemas de espín (**Figura 21**).

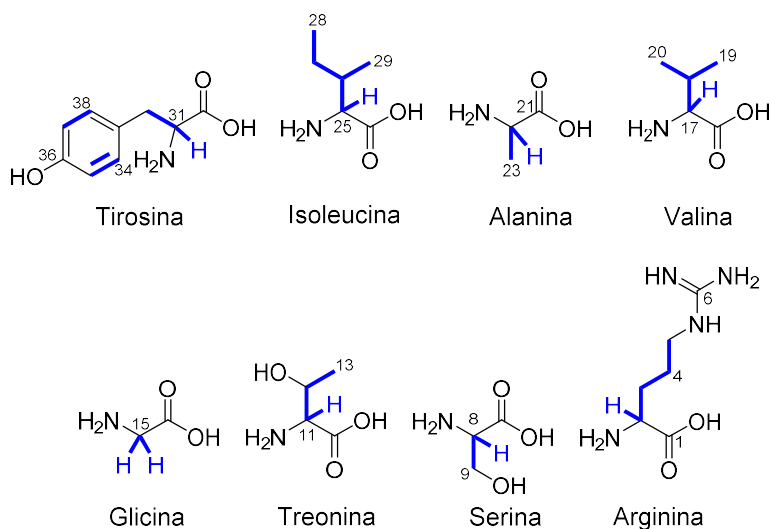


Figura 19. Correlaciones COSY observadas para los aminoácidos de DAE-1C7D **41**.

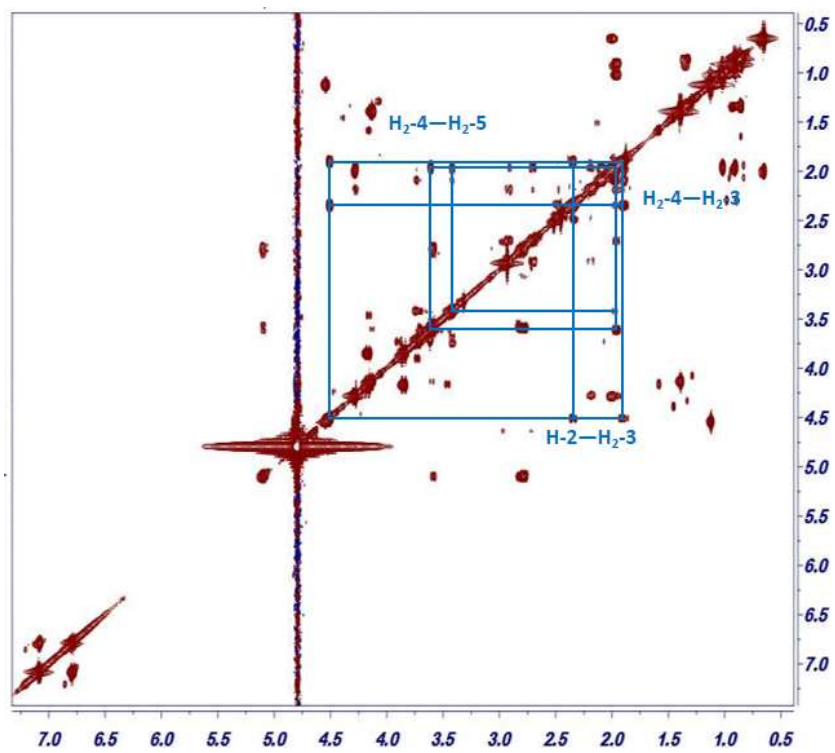


Figura 20. Correlaciones COSY observadas para la arginina de DAE-1C7D 41.

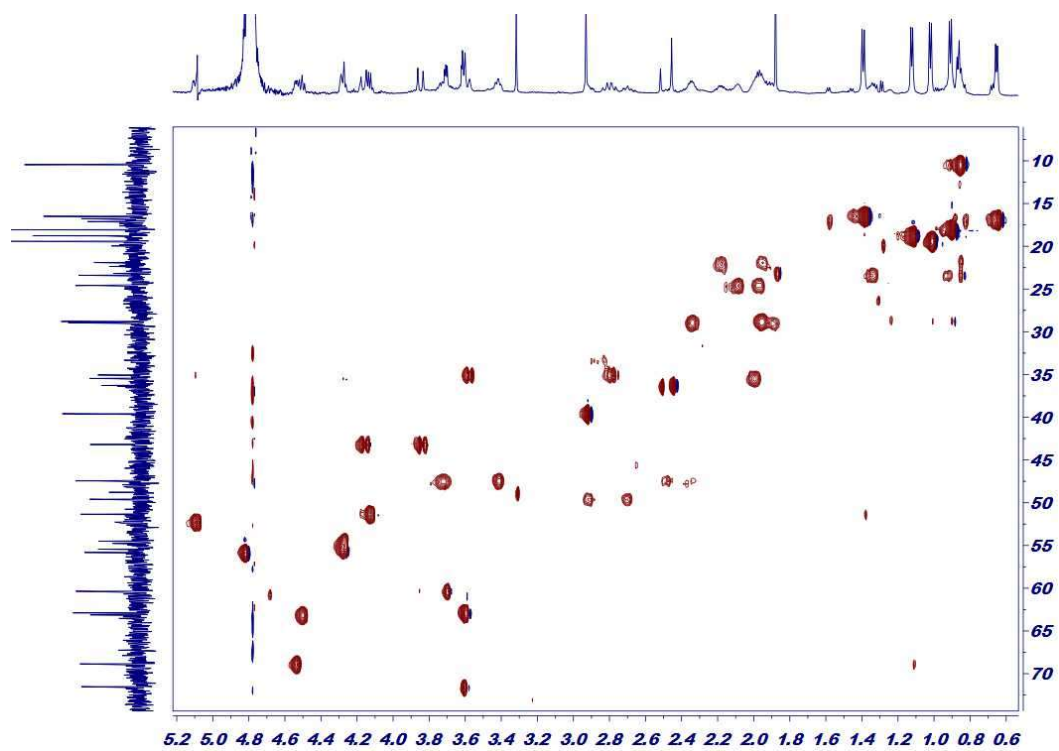


Figura 21. Espectro HSQC de DAE-1C7D 41.

Las estructuras parciales de cada uno de los ocho aminoácidos que conforman al compuesto **DAE-1C7D** debían ser unidas a los carbonos cuaternarios en cada aminoácido, para ello se utilizó nuevamente el experimento HMBC, que como ya se citó, este experimento permite conectar protones con carbonos vecinos a dos y tres enlaces; Así, la correlación del protón H-31 (δ_H 5.08) con el carbonilo C-30 (δ_C 173.6) y las observadas para los protones H₂-32 (δ_H 2.78/3.59) con los carbonos C-33 (δ_C 127.8), C-34 (129.3) y C-38 (δ_C 129.3), junto con las observadas para H-35 (δ_H 6.79) y H-37 (δ_H 6.79) con C-36 (δ_C 155.2), permitieron establecer la estructura de la tirosina. Asimismo, las correlaciones H-25 (δ_H 4.28) con C-24 (δ_C 170.8), H-22 (δ_H 4.13) con C-21 (δ_C 175.6), H-17 (δ_H 3.60) con C-16 (δ_C 175.1), H₂-15 (δ_H 3.84/4.15) con C-14 (δ_C 171.6), H-11 (δ_H 4.82) con C-10 (δ_C 172.0), H-8 (δ_H 3.70) con C-7 (δ_C 171.0) y H-2 (δ_H 4.48) con C-1 (δ_C 177.7), permitieron establecer el desplazamiento químico de todos los grupos carbonilos de todos los aminoácidos, al tiempo que se pudo establecer la secuencia de todos los mismos (**Figura 22** y **Tabla 4**).

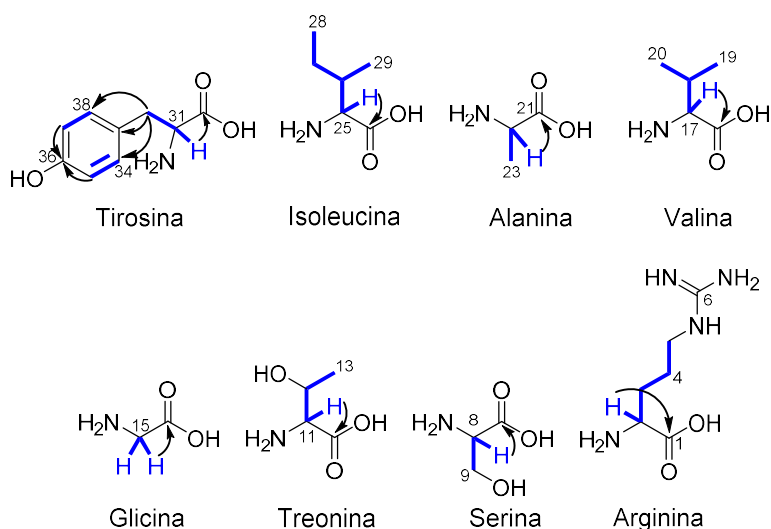


Figura 22. Correlaciones COSY y HMBC más importantes observadas para los aminoácidos de DAE-1C7D 41.

n C	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	---	177.7
2	4.48	63.1
3	1.91/2.34	29.0
4	1.97/2.08	24.6
5	3.43/3.71	47.4
6	---	157.5
7	---	171.0
8	3.70	71.8
9	3.60	60.6
10	---	172.0
11	4.82	55.8
12	4.53	68.9
13	1.12	18.8
14	---	171.6
15	3.84/4.15	43.2
16	---	175.1
17	3.60	62.9
18	1.95	28.8
19	1.02	19.4
20	0.91	18.1
21	---	175.6
22	4.13	51.3
23	1.39	16.5
24	---	170.8
25	4.28	55.4
26	1.99	35.5
27	0.94/1.33	23.4
28	0.86	10.5
29	0.65	16.9
30	---	173.6
31	5.08	52.3
32	2.78/3.59	35.1
33	---	127.8
34	7.08	129.3
35	6.79	115.6
36	---	155.2
37	6.79	115.6
38	7.08	129.3

Tabla 4. Desplazamientos químicos de DAE-1C7D **41**.

Establecida las estructuras de los aminoácidos presentes en **DAE-1C7D**, el siguiente paso fue establecer como se unen estos aminoácidos entre sí, para ello se utilizó las correlaciones observadas en el experimento HMBC, pero debido a que no eran del todo claras, nos apoyamos en las correlaciones espaciales protón—protón observadas en el experimento NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy). Las correlaciones del protón H-31 (δ_H 5.08) con H-25 (δ_H 4.28) y H-26 (δ_H 1.99) permitieron unir la tirosina y la isoleucina, del mismo modo que las correlaciones NOE de H-25 con H-22 (δ_H 4.13) y H₃-23 (δ_H 1.39), junto con la correlación HMBC de H-25 con C-21 (δ_C 175.6), permitieron unir los aminoácidos isoleucina y alanina. Continuando con la elucidación estructural, los NOE's observados entre el protón H-22 con los protones H-17 (δ_H 3.60), H-18 (δ_H 1.95) y H₃-20 (δ_H 1.02), nos indicó que la alanina y la valina están unidas. De la misma forma, la correlación de H-17 con H₂-15 (δ_H 3.84/4.15), permitieron unir la valina con la glicina y la correlación H₂-15 con H-12 (δ_H 4.53) y H₃-13 (δ_H 1.12) unieron la glicina con la treonina. Finalmente, las correlaciones NOESY de H-11 (δ_H 4.82) con H-8 (δ_H 3.70) y H₂-9 (δ_H 3.60) y de H-8 con H-2 (δ_H 4.48), permitieron establecer la secuencia de los aminoácidos, tal y como se muestra en la **Figura 23-25**. Se asume que la configuración absoluta de DAE-1C7D, es aquella en que todos son L-aminoácidos; sin embargo, se realizará el método de Marfey para confirmarlo.

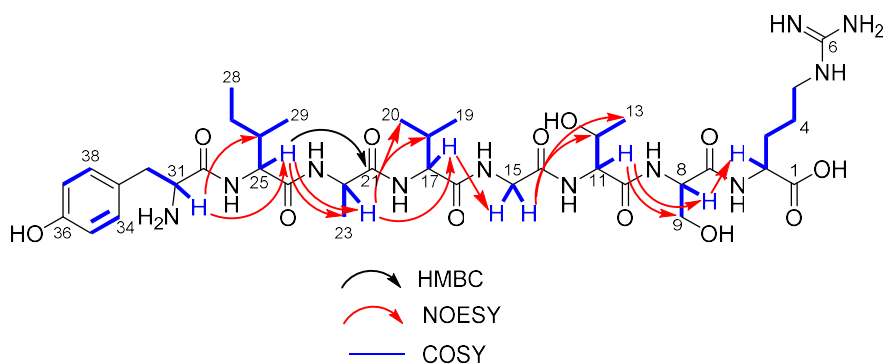


Figura 23. Correlaciones NOESY y HMBC más importantes observadas entre los aminoácidos de DAE-1C7D **41**.

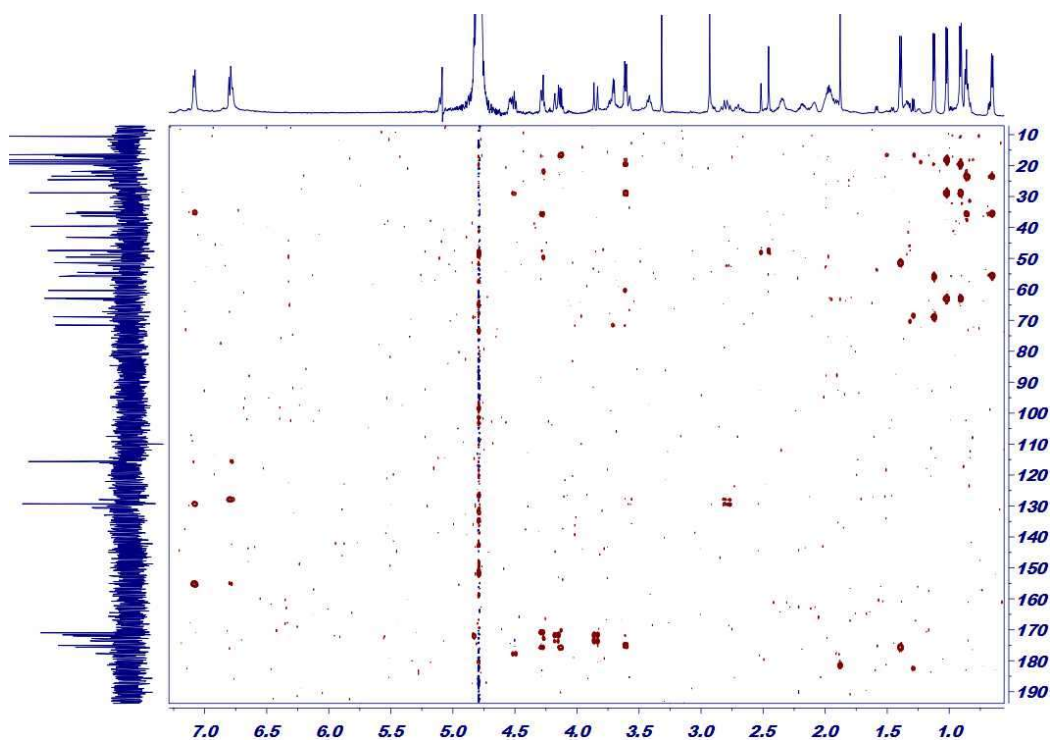


Figura 24. Espectro HMBC de DAE-1C7D 41.

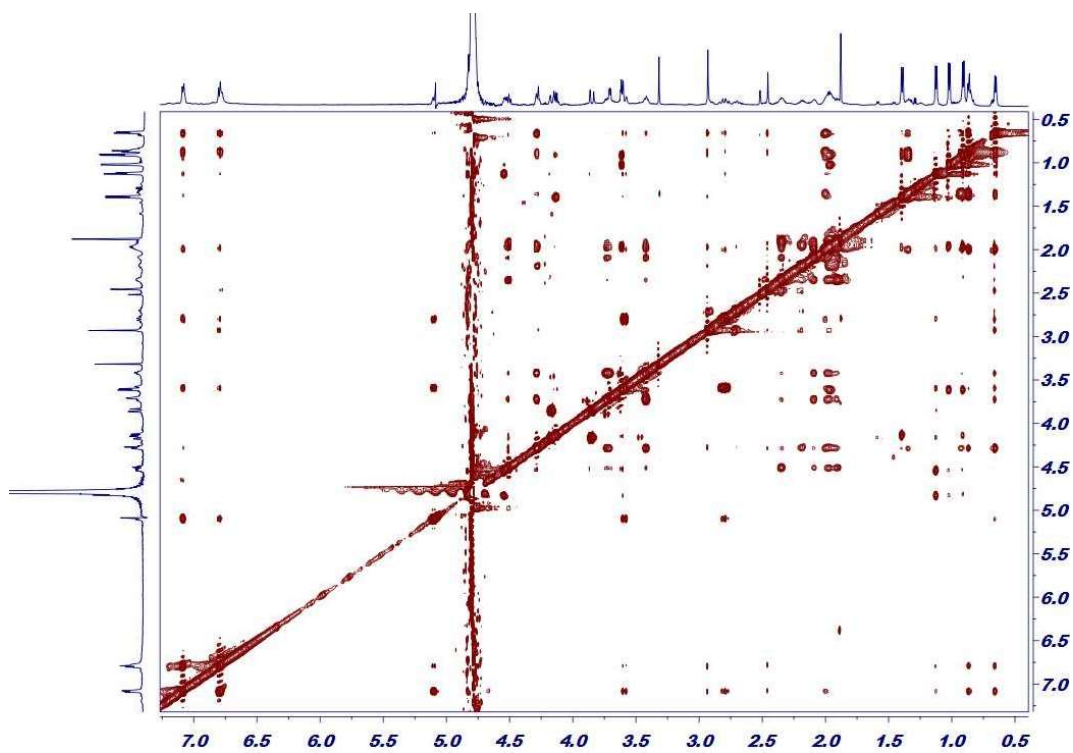


Figura 25. Espectro NOESY de DAE-1C7D 41.

CONCLUSIONES

Con el fin de profundizar en el estudio de los metabolitos secundarios bioactivos producidos por especies de la familia anonácea se realizó un estudio cromatográfico del extracto MeOH de las semillas de tres especies de anonas, *A. muricata*, *A. scleroderma* y *A. globiflora*. Las evaluaciones citotóxicas iniciales, nos sugirieron que *A. scleroderma* era la especie más prometedora para aislar metabolitos interesantes, tanto desde el punto de vista estructural como bioactivo.

El estudio cromatográfico de esta especie, utilizando diversas técnicas cromatográficas, como columnas por gravedad, columnas de media presión y HPLC, usando en ellas varios soportes cromatográficos como sephadex, gel de sílice SI-60, fase reversa C-18 y diversos sistemas de disolventes, permitió el aislamiento de dos compuestos puros. La elucidación de estos compuestos puros se realizó mediante el uso de una gran variedad de técnicas de RMN, tanto de monodimensionales (RMN ^1H y ^{13}C), como bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC y NOESY), los cuales se apoyaron de los resultados observados en el espectro de masas de alta resolución.

Desafortunadamente el primero de ellos resultó ser un compuesto conocido, rolliniastatina 2 **40**, que posee una marcada actividad citotóxica en ratones con leucemia murina (L1210 y P-388), en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón (PC-6) y en líneas celulares de cáncer gástrico (NUGC-3). Sin embargo, el segundo compuesto DAE-1C7D **41**, resultó ser un octapéptido que no había sido reportado con anterioridad y que posee una secuencia de tirosina—isoleucina—alanina—valina—glicina—treonina—serina—arginina. La gran diversidad de metabolitos que presentan las especies de la familia anonácea, confirman el enorme potencial que poseen como productoras de compuestos interesantes, lo cual sentará precedente para continuar estudiando estas especies propias del estado de Veracruz y explotar su potencial como futuros fármacos.

El siguiente paso, una vez determinada la estructura de nuestros compuestos es evaluarlos frente varias líneas celulares cancerosas como *Jurkat* (Células de leucemia linfóide aguda), *MM144* (Células de mieloma múltiple sensible a doxorubicina), *HeLA* (Células de adenocarcinoma de cérvix) y *CADO ES1* (Sarcoma de ewing's), entre otras, para probar su potencial citotóxico. Estos resultados, aunque no se pudieron anexar al presente trabajo, se están realizando para la escritura de la publicación.

Referencias

- A.V. Coria-Téllez, E. Montalvo-González, E.M. Yahia, E.N. Obledo Vázquez. (2016). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity, *Arabian Journal of Chemistry*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>.
- Adelina, M., Rosa, A., Mercedes, L., Schlie-guzmán, M. A., González-esquinca, A. R., & Luna-cazárez, L. M. (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas.
- Ahammadshah, 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 acetogenin. *Life Sciences*, 53(14), 1113–1120. [http://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90547-G](http://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90547-G).
- Alali, F. Q., Liu, X. X., & McLaughlin, J. L. (1999). Annonaceous acetogenins: Recent progress. *Journal of Natural Products*, 62(3), 504–540. <http://doi.org/10.1021/np980406d>
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas, 2(3), 119–145.
- Bach, H. G., Wagner, M. L., Ricco, R. A., & Fortunato, R. H. (2014). Original article Sale of medicinal herbs in pharmacies and herbal stores in Hurlingham district, Buenos Aires, Argentina, 24, 258–264.
- Bajin ba Ndob, I., Champy, P., Gleye, C., Lewin, G., & Akendengué, B. (2009). Annonaceous acetogenins: Precursors from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry Letters*, 2(2), 72–76. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.11.006>
- Bhawani, S. a., Sulaiman, O., Hashim, R., & Mohamad Ibrahim, M. N. (2010). Thin-layer chromatographic analysis of steroids: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(3), 301–313. <http://doi.org/10.4314/tjpr.v9i3.56293>.
- Budzikiewicz, H. (2015). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 100* (Vol. 100). <http://doi.org/10.1007/978-3-319-05275-5>
- Cabedo. (2015). Síntesis de nuevas isoquinoleínas 1-sustituidas con actividad antibacteriana y antifúngica o dopaminérgica Síntesis de nuevas isoquinoleínas 1-sustituidas con actividad antibacteriana y antifúngica o dopaminérgica.
- Cave, a, Laurens, F. a, & Cortes, D. (1997). Acetogenins from Annonaceae, (1).
- 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). *The*

Biochemical Journal, 301 (Pt 1, 161–167.
<http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.11.021>.

- Dellai, A., Maricic, I., Kumar, V., Arutyunyan, S., Bouraoui, A., & Nefzi, A. (2010). Parallel synthesis and anti-inflammatory activity of cyclic peptides cyclosquamosin D and Met-cherimolacyclopeptide B and their analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(19), 5653–5657. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.033>.
- Estornell, E., & Cortes, D. (2005). Mechanisms of Action, 269–303.
- Fallis, A. (2013). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S., & V, D. R. (2012). Phytochemical and pharmacological properties of *annona muricata*: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 13–16.
- Galvis, H. G., Ocampo, M.D., Crdenas, G.A. (2012). Actividad tóxica de los extractos de la corteza de *A. cherimolioides* (Annonaceae). 16(31), 17–22.
- García, G. D. A., Javier, E., Hernández, R., Blanca, C., Arellano, R., Rocha, S., Verduzco, D. A. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara *.
- González-Esquinca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., & Riley-Saldaña, C. A. (2014). Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 01–16. <http://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500001>.
- González-esquinca, A. R., Luitla-cazares, L. M., Gutierrez-jimenez, J., Schlieguzman, M. A., & Vidal-lopez, D. G. (n.d.). *Anonaceas*.
- Han J, Ji CJ, He WJ, Shen Y, Leng Y, Xu WY, Fan JT, Zeng GZ, Kong LD, T. N. (2011). Cyclopeptide Alkaloids from *Ziziphusapetala*. *Journal of Natural Products*, 74, 2571–2575.
- Hincapié Llanos, C. A., Lopera Arango, D., & Ceballos Giraldo, M. (2008). (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 76–82.
- Hong, A. B., Panday, N., Shen, J., Wang, H. V., & Gong, W. (2010). Accepted Manuscript. <http://doi.org/10.1016/j.marevres.2010.03.010>.
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein and Cell*, 1(2), 143–152. <http://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>

- Ingram, G., & Gutierrez-Marcos, J. (2015). Peptide signalling during angiosperm seed development. *Journal of Experimental Botany*, 66(17), 5151–5159. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv336>.
- Jerry L. McLaughlin. Paw, P. (2008). Reviews Paw Paw and Cancer : Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products \perp , 1311–1321.
- Kador, P. F., Lee, J. W., Fujisawa, S., Blessing, K., & Lou, M. F. (2000). Relative importance of aldose reductase versus nonenzymatic glycosylation on sugar cataract formation in diabetic rats. *J Ocul.Pharmacol.Ther.*, 16(1080-7683), 149–160.
- Kupchan, S. M., Davies, V. H., Fujita, T., Cox, M. R., Restivo, R. J., & Bryan, R. F. (1973). The isolation and structural elucidation of liatrin, a novel antileukemic sesquiterpene lactone from *Liatris chapmanii*. *Journal of Organic Chemistry*, 38(10), 1853–1858. <http://doi.org/10.1021/jo00950a017>.
- Li, C. M., Tan, N. H., Zheng, H. L., Mu, Q., Hao, X. J., He, Y. N., & Zou, J. (1998). Cyclopeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, 48(3), 555–556. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00002-8](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00002-8).
- Lomchoey, N. (2011). Cyclopeptide alkaloids from some ziziphus plants, (May).
- Luna, C. L. M., & González, E. A. R. (2008). Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia* Safford y *Annona purpurea* Mociño & sessé ex dunal. *Polibotanica*, 25, 121–125.
- Luna, C. L. M., & Gonzalez-Esquinca, a. R. (2010). Susceptibility of complete bacteria and spheroplasts of *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to rolliniastatin-2. *Natural Product Research*, 24(12), 1139–1145. <http://doi.org/10.1080/14786410902836644>
- Marmioli, N., & Maestri, E. (2014). Plant peptides in defense and signaling. *Peptides*, 56, 30–44. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.03.013>.
- Marshall, E., Costa, L. M., & Gutierrez-Marcos, J. (2011). Cysteine-Rich Peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1677–1686. <http://doi.org/10.1093/jxb/err002>.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625–15658. <http://doi.org/10.3390/ijms160715625>.
- Moghadamtousi, S. Z., Rouhollahi, E., Karimian, H., Fadaeinasab, M., Firoozinia, M., Abdulla, M. A., & Kadir, H. A. (2015). The chemopotential effect of *annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of acetogenin

- annomuricin e in HT-29 cells: A bioassay-guided approach. *PLoS ONE*, 10(4), 1–28. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122288>.
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, 59(3), 181–196. <http://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>.
- Novo, R. J., & Nassetta, C. I. C. M. (2006). Actividad biológica de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav . y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L .), XXIII(2), 83–89.
- Osorio, E. J. D., Montoya, G. L. P., Munoz, K. D., & Arango, G. J. a. (2006). Actividad antiplasmodial de alcaloides aporfinicos de *Rollinia pittieri* y *Pseudomalmea boyacana* (Annonaceae). *Vitae*, 13(1), 49–54.
- Pandey, N., Barve, D., Pharmacy, T. I. T. C. O., Nagar, A., & Bhopal, M. P. (2011). Review Paper Phytochemical and Pharmacological Review on *Annona squamosa* Linn, 1404–1412.
- Pankewitz, F., & Hilker, M. (2008). Polyketides in insects: Ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis. *Biological Reviews*, 83(2), 209–226. <http://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00040.x>.
- Pino-rodriguez, S., Lez, S. P. Á., Elena, M., & Jorge, P. É. R. (2004). Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica, 23(2), 252–258.
- Tan, N. H., & Zhou, J. (2006). Plant cyclopeptides. *Chemical Reviews*, 106(3), 840–895. <http://doi.org/10.1021/cr040699h>.
- Wélé, A., Zhang, Y., Caux, C., Brouard, J. P., Pousset, J. L., & Bodo, B. (2004). Annomuricin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 981–988. <http://doi.org/10.1016/j.crci.2003.12.022>.
- Wu, L., Lu, Y., Zheng, Q. T., Tan, N. H., Li, C. M., & Zhou, J. (2007). Study on the spatial structure of annomuricin A, a cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Journal of Molecular Structure*, 827(1-3), 145–148. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.05.016>.
- Yang, Y. L., Hua, K. F., Chuang, P. H., Wu, S. H., Wu, K. Y., Chang, F. R., & Wu, Y. C. (2008). New cyclic peptides from the seeds of *Annona squamosa* L. and their anti-inflammatory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 386–392. <http://doi.org/10.1021/jf072594w>.