



# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

## **ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas  
obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*.  
Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico.**

**Tesis**

**Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Quimicobiológicas**

**Presenta:**

**Karol Karla García Aguirre.**

**Directores:**

**Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo.  
Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar.**

**México, D.F.**

**Enero 2009**

El presente trabajo se realizó en el departamento de Química Orgánica y el departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo y el Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar, gracias al apoyo otorgado por el CONACyT bajo el registro número 178125.

# Contenido

	Página
Contenido	<i>i</i>
Índice de figuras	<i>iv</i>
Índice de tablas	<i>vii</i>
Índice de abreviaturas	<i>viii</i>
Resumen	<i>ix</i>
Abstract	<i>x</i>
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Familia <i>Annonaceae</i>	2
2.1.1 <i>Annona cherimolia</i>	3
2.1.2 Estudio fitoquímico en <i>Annona cherimolia</i> Mill.	3
2.1.3 <i>Annona muricata</i>	6
2.1.4 Estudio fitoquímico de <i>Annona muricata</i> .	7
2.2 Acetogeninas (ACG)	8
2.2.1 Características estructurales	8
2.2.2 Mecanismo de acción de las ACG sobre el sistema celular	10
2.2.3 Relación estructura-actividad	11
2.2.4 Actividades biológicas reportadas	12
2.2.4.1 Actividad citotóxica	12
2.2.4.2 Actividad antimicrobiana	14
2.2.4.3 Actividad antiparasitaria	14
2.2.4.4 Actividad plaguicida	14
2.3 Cáncer	15
2.3.1 Etapas del cáncer	16

2.3.2 Cáncer de colon	19
2.3.3 Azoximetano (AOM)	21
2.4 Evaluación del efecto genotóxico	22
2.4.1 Micronúcleos	23
2.5 Citotoxicidad	25
3. Justificación	27
4. Objetivos	28
5. Metodología	29
5.1 Aislamiento de ACGs a partir de la semilla de <i>Annona cherimolia</i> y <i>Annona muricata</i>	29
5.1.1 Material vegetal	29
5.1.2 Obtención de los extractos	29
5.2 Separación cromatográfica preliminar mediante cromatografía en columna	30
5.3 Validación de un método cromatográfico mediante HPLC para la separación de ACG.	30
5.4 Aislamiento de ACGs mediante la técnica de HPLC	33
5.5 Caracterización estructural	33
5.6 Evaluación de la toxicidad de una ACG obtenida de las semillas de <i>Annona muricata</i> en un estudio subcrónico <i>in vivo</i>	34
5.6.1 Determinación de la DL <sub>50</sub>	35
5.6.2 Inducción de criptas con AOM	36
5.6.3 Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad en sangre periférica de ratón	36
5.6.4 Evaluación de apoptosis en plasma sanguíneo	37
5.6.5 Evaluación del efecto quimioterapéutico	38
6. Resultados y Discusión	39
6.1 Aislamiento, purificación y elucidación estructural de acetogeninas a	

partir de la semilla de <i>Annona cherimolia</i> Mill y <i>Annona muricata</i>	39
6.1.1 Obtención de los extractos crudos	39
6.1.2 Purificación de acetogeninas mediante cromatografía en columna y HPLC	39
6.2 Resultados de la validación del método cromatográfico (HPLC) para la purificación de ACGs	40
6.2.1 Purificación de ACGs mediante HPLC	43
6.3 Determinación estructural de las ACG aisladas de <i>A. muricata</i> y <i>A. cherimolia</i>	45
6.3.1 Consideraciones generales	45
6.3.2 Propuestas estructurales de las ACG aisladas de <i>A. muricata</i> y de <i>A. cherimolia</i> Mill (2F2 y 2F3)	47
6.3.2.1 Datos de ultravioleta (UV) y de infrarrojo (IR)	48
6.3.2.2 Análisis de los espectros de RMN <sup>1</sup> H y de <sup>13</sup> C y el uso de criterios de desplazamiento químico para la asignación de configuración relativa	48
6.3.2.3 Determinación de la composición exacta y de la isomería posicional mediante el análisis de los espectros de masa de alta y baja resolución	59
6.4 Evaluación de la toxicidad de una ACG obtenida de las semillas de <i>Annona muricata</i> en un estudio subcrónico <i>in vivo</i>	66
6.4.1 DL <sub>50</sub>	66
6.4.2 Genotoxicidad	67
6.4.3 Efecto quimioterapéutico	73
6.4.4 Citotoxicidad y apoptosis	79
7. Conclusiones	88
8. Referencias	89
Anexo	98

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de la familia <i>Annonaceae</i>	2
<b>Figura 2.</b> Fruto de <i>Annona cherimolia</i> Mill	3
<b>Figura 3.</b> <i>Annona muricata</i>	6
<b>Figura 4.</b> Estructura general de las ACG	8
<b>Figura 5.</b> Esquema general para el estudio del efecto genotóxico, citotóxico y antineoplásico de las ACG	34
<b>Figura 6.</b> Representación de un micronúcleo en un eritrocito policromático	37
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de la ACG tetrahidroxilada aislada de la semilla de <i>Annona muricata</i>	42
<b>Figura 8.</b> Relación concentración/respuesta para la ACG obtenida de la semilla de <i>Annona muricata</i>	42
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas correspondientes a las tres ACGs obtenidas de la semilla de <i>Annona cherimolia</i> Mill	44
<b>Figura 10.</b> Cromatograma correspondiente a la mezcla de las tres ACGs obtenidas de la semilla de <i>Annona cherimolia</i> Mill	45
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la ACG aislada de <i>A. muricata</i>	49
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la ACG 2F2 aislada de <i>A. cherimolia</i>	50
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la ACG 2F3 aislada de <i>A. cherimolia</i>	51
<b>Figura 14.</b> Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la ACG aislada de <i>A. muricata</i>	52
<b>Figura 15.</b> Espectros de RMN <sup>13</sup> C de las ACG aisladas de <i>A. muricata</i> (abajo), de 2F2 (en medio) y 2F3 (arriba) aisladas de <i>A. cherimolia</i> .	53

- Figura 16.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  que muestran los desplazamientos químicos de los protones bases de THF y bases de los grupos OH adyacentes al anillo, los cuales se utilizaron para determinar la estereoquímica relativa. 57
- Figura 17.** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  que muestran los desplazamientos químicos de los protones bases de THF y bases de los grupos OH adyacentes al anillo, los cuales se utilizaron para determinar la estereoquímica relativa. 58
- Figura 18.** Fórmula molecular y espectros de masa de alta resolución (EM-AR) de la acetogenina aislada de *A. muricata* mostrando las masas exactas del ión molecular y de los iones generados por la pérdida consecutiva de hasta 4 moléculas de agua. 61
- Figura 19.** Fórmula molecular y espectros EM-AR de la acetogenina 2F2 aislada de *A. cherimolia* mostrando las masas exactas del ión molecular y de los iones generados por la pérdida consecutiva de hasta 4 moléculas de agua. 61
- Figura 20.** Fórmula molecular y espectros EM-AR de la acetogenina 2F3 aislada de *A. cherimolia* mostrando las masas exactas del ión molecular y de los iones generados por la pérdida consecutiva de hasta 4 moléculas de agua. 62
- Figura 21.** Espectros EM-AR mostrando los iones de fragmentaciones más representativas de las acetogeninas de *A. muricata* (arriba) y de 2F3 (abajo) que permitieron establecer la posición de los grupos THF y OH a lo largo de la cadena alifática. 64
- Figura 22.** Espectros EM-AR mostrando los iones de fragmentaciones más representativas de la acetogenina 2F2 aislada de *A. cherimolia* que permitieron establecer la posición de los grupos THF y OH a lo largo de la cadena alifática. 65

<b>Figura 23.</b> Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados en sangre periférica de ratón.	72
<b>Figura 24.</b> Número de focos de criptas aberrantes (FCA) presentes en el colon	78
<b>Figura 25.</b> Relación de los eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos presentes en sangre periférica de ratón	86
<b>Figura 26.</b> Análisis de apoptosis inducidas por fragmentación de ADN	87
<b>Figura 27.</b> Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la acetogenina 2F2 aislada de <i>A. cherimolia</i> Mill	99
<b>Figura 28.</b> Espectro de correlación heteronuclear (gHSQC) de la acetogenina 2F2 aislada de <i>A. cherimolia</i> Mill	100
<b>Figura 29.</b> Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la acetogenina 2F3 aislada de <i>A. cherimolia</i> Mill	101
<b>Figura 30.</b> Espectro de correlación heteronuclear (gHSQC) de la acetogenina 2F3 aislada de <i>A. cherimolia</i> Mill	102
<b>Figura 31.</b> Espectro de correlación heteronuclear a larga distancia (gHMBC) de la acetogenina 2F3 aislada de <i>A. cherimolia</i> Mill	103
<b>Figura 32.</b> Espectro de correlación heteronuclear (gHSQC) de la acetogenina aislada de <i>A. Muricata</i>	104



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Compuestos aislados de <i>Annona cherimolia</i> Mill	5
<b>Tabla 2.</b> Compuestos aislados de <i>Annona muricata</i>	7
<b>Tabla 3.</b> ACG tetrahidroxiladas C <sub>35</sub> obtenidas de diversas fuentes	9
<b>Tabla 4.</b> Concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (IG <sub>50</sub> )	13
<b>Tabla 5.</b> Principales causas de mortandad nacionales	15
<b>Tabla 6.</b> Características observadas en las etapas de iniciación y promoción generadas por agentes genotóxicos y epigénicos	18
<b>Tabla 7.</b> Grupos de trabajo para el estudio de citotoxicidad, genotoxicidad para una ACG aislada de <i>Annona muricata</i>	35
<b>Tabla 8.</b> Fracciones obtenidas a partir de la primera separación cromatográfica	40
<b>Tabla 9.</b> Desplazamientos químicos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C usados para discriminar entre configuraciones relativas de ACG mono-THF flanqueadas por grupos OH	55
<b>Tabla 10.</b> Clasificación de sustancias según la DL <sub>50</sub> .	67
<b>Tabla 11.</b> Multiplicidad observada en las FCA presentes en colon posteriores a la administración de una ACG tetrahidroxilada de <i>Annona muricata</i> .	77

## Índice de Abreviaturas

ACG acetogenina

ADN ácido desoxirribonucleico

AOM Azoximetano

ccf cromatografía en capa fina

ENC eritrocito normocrómico

EPC eritrocito policromático

MN micronúcleo

RMN resonancia magnética nuclear

MS muestra sanguínea

FCA foco de criptas aberrantes

EtOH etanol

MeOH metanol

## Resumen

En el presente trabajo se describe el aislamiento de acetogeninas (ACG) a partir de las semillas de *Annona cherimolia* Mill. y *Annona muricata* para su evaluación toxicológica. En el caso de *Annona cherimolia* Mill se logró el aislamiento de tres ACGs tetrahidroxiladas monotetrahidrofurano con fórmula mínima  $C_{35}H_{64}O_7$ , denominadas en esta trabajo como 1F1, 2F2 y 2F3. Mediante HPLC mostraron tiempos de retención de 14.08, 16.76 y 17.42 min, respectivamente, empleando como sistema de elución MeOH:H<sub>2</sub>O (85:15). De *Annona muricata* se aisló una ACG tetrahidroxilada monotetrahidrofuránica con fórmula mínima  $C_{35}H_{64}O_7$  y tiempo de retención de 14.50 min, empleando el sistema de disolventes mencionado anteriormente.

Considerando la actividad citotóxica que reportan *in vitro* para las ACGs, se desarrolló un modelo murino de cáncer de colon donde se cuantificó la formación y/o inhibición de focos de criptas aberrantes (FCA), esto con la finalidad de evaluar el efecto quimioterapéutico producido por la ACG obtenida de *Annona muricata* en un estudio subcrónico de 6 semanas *in vivo*. Paralelamente se evaluó el efecto genotóxico y citotóxico en sangre periférica.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la ACG de *Annona muricata* evaluada reduce hasta en un 80% el índice de lesiones preneoplásicas en el colon generadas por el azoximetano (AOM) a una dosis de 0.17 mg/Kg tras seis semanas de tratamiento; el efecto es secundado por la dosis de 0.7 mg/Kg con una reducción del 60% y, finalmente, la dosis de 0.07 mg/Kg redujo el daño 40%. La prueba de micronúcleos (MN) indicó que la ACG evaluada no induce daño sobre el ADN, ya que en ninguna de las muestras evaluadas se observa un incremento significativo en el número de MN presentes en eritrocitos normocrómicos (ENC) con relación al grupo administrado con el vehículo.

Complementariamente, se realizó una evaluación de ELISA para apoptosis, empleando plasma sanguíneo tomado en las semanas tres y seis posteriores al tratamiento con la ACG. Los resultados fueron positivos para los tres grupos de ACG evaluados.

## Abstract

The present work describes the isolation of acetogenins (ACG) from seeds of *Annona cherimolia* Mill and *Annona muricata* and their evaluation of their genotoxic and cytotoxic properties. From *A. cherimolia* Mill three tetrahydroxylated monotetrahydrofuranic ACGs containing  $C_{35}H_{64}O_7$  as general formula were isolated, which were named in this work as 1F1, 2F2 and 2F3 according of their retention time in HPLC (14.08, 16.767 and 17.417 min, respectively; MeOH:H<sub>2</sub>O, 88:12). From *A. muricata* was isolated another tetrahydroxylated monoterahydrofuranic ACG with the same general formula (HPLC: retention time 14.5 min; MeOH:H<sub>2</sub>O, 88:12).

According to the cytotoxic activity described for ACGs in *in vitro* studies, a murine model of colon cancer in mice was developed, in which was quantified the formation of aberrant crypt foci (AFC) to evaluate the chemotherapeutic effect of the ACG isolated from *A. muricata* in a subchronic *in vivo* study during six weeks. The genotoxic and cytotoxic effects were also evaluated in peripheral blood.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la ACG de *Annona muricata* evaluada reduce hasta en un 80% el índice de lesiones preneoplásicas en el colon generadas por el azoximetano (AOM) a una dosis de 0.17 mg/Kg tras seis semanas de tratamiento; el efecto es secundado por la dosis de 0.7 mg/Kg con una reducción del 60% y, finalmente, la dosis de 0.07 mg/Kg redujo el daño 40%. La prueba de micronúcleos (MN) indicó que la ACG evaluada no induce daño sobre el ADN, ya que en ninguna de las muestras evaluadas se observa un incremento significativo en el número de MN presentes en eritrocitos normocrómicos (ENC) con relación al grupo administrado con el vehículo.

The results showed that 0.17 mg/Kg of ACG from *A. muricata* reduces 80% the frequency of preneoplastic colon damage induced by azoxymethane (AOM) during six weeks of treatment. Similarly, 0.7 mg/Kg and 0.07 mg/Kg reduce the colon damage in 60 and 40%, respectively. The micronucleus (MN) test revealed that ACG does not induce DNA damage, since no one of the above doses increase the number of MN contained in normochromic erythrocytes (NCE).

Finally, the ELISA test was performed to evaluate the apoptotic index, obtaining positive results at all the above ACG doses and the AOM group.

## 1. Introducción

Muchos compuestos químicos que se usan actualmente como medicamentos se obtienen de fuentes como las plantas y los hongos. Algunos se han encontrado de manera azarosa y otros a partir de comunidades que los emplean tradicionalmente para aliviar ciertos padecimientos. Los estudios al azar suelen ser altamente costosos y poco efectivos; sin embargo, con mucha suerte se puede llegar a tener resultados tan exitosos como el descubrimiento del taxol, extraído del árbol *Taxus breviflora*, que desde 1994 se usa para el tratamiento de cáncer de pecho<sup>1</sup>.

Tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo el uso de las plantas medicinales, o productos derivados de éstas, ha aumentado considerablemente, aunque las causas sean diferentes. Los primeros principalmente por tratarse de una moda, pero tanto en unos como en otros se ha presentado su uso en forma indiscriminada, lo que ha traído como consecuencia, un aumento en el interés científico y en la comprobación de las propiedades atribuidas a las plantas medicinales<sup>2</sup>.

Considerando la riqueza cultural y de recursos naturales que presenta nuestro país, el estudio de la flora y la comprobación de sus propiedades terapéuticas resulta relevante desde un punto de vista científico y cultural. Por otro lado, la presencia de diversos padecimientos crónico-degenerativos como el cáncer, la diabetes, la hipertensión, entre otros ha motivado que los grupos de investigación vuelvan la mirada a los productos naturales, con la finalidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas<sup>3</sup>.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Familia *Annonaceae*

En general, la familia *Annonaceae* es de distribución subtropical como se muestra en la figura 1 (área en rojo). Consta de 130 géneros con 2300 especies. Los usos más comunes para estas plantas van desde el cultivo para el consumo de sus frutos, la obtención de aceites para perfumería y el interés por las propiedades de dureza y elasticidad que presenta su madera, usada en la fabricación de tacos de billar y arpones<sup>4</sup>.

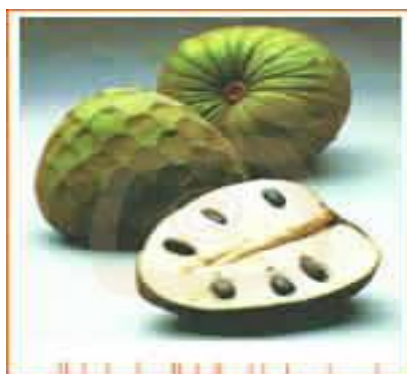


**Figura 1.** Distribución geográfica de la familia *Annonaceae*.

En México, la familia *Annonaceae* está integrada por 75 géneros aproximadamente y un poco más de 600 especies, pero únicamente cuatro géneros contienen especies de importancia frutícola, éstos son: *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina*. Son originarias principalmente de América Tropical y Subtropical de las que solamente de 8 a 10 especies del género *Annona* tienen importancia frutícola. En el país existen alrededor de 16 especies de anonáceas con este interés, donde algunas especies de gran importancia comercial son el guanábano (*A. muricata*), el chirimoyo (*A. cherimola*) y el anono (*A. reticulata*)<sup>4</sup>.

### **2.1.1. *Annona cherimolia* Mill.**

En el caso de *Annona cherimolia* Mill se sabe que ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana de diversas maneras. El té se emplea contra la diarrea, las infecciones intestinales y la úlcera. Las semillas molidas sin cáscara se recomiendan como emético e insecticida. El té de la cáscara se usa contra la tos, los resfriados, la gripe, la pulmonía y la neumonía<sup>5</sup>.



**Figura 2.** Fruto de *Annona cherimolia* Mill

La chirimoya es un fruto que crece en clima subtropical (Figura 2), semicaducifolio, cuyo crecimiento y fructificación natural son óptimos cuando la temperatura media anual está comprendida entre los 14 y 24 °C.<sup>4</sup>

### **2.1.2 Estudio fitoquímico en *Annona cherimolia* Mill.**

Para aprovechar de una manera más eficiente los recursos naturales y con el propósito de encontrar productos naturales con aplicación terapéutica, algunos organismos internacionales, como el Instituto Nacional del Cáncer (EUA), realizan actualmente estudios fitoquímicos de la flora mundial.<sup>3</sup> En lo concerniente a la *Annona cherimolia* Mill,

varios grupos de trabajo han realizado estudios sobre la composición química de las hojas, tallo, semilla, corteza, raíces y frutos.

A partir de dichos estudios se ha aislado una amplia variedad de compuestos, dentro de los que se pueden mencionar ACG, alcaloides, amidas, aminas, flavonoides, aminoácidos, y ácidos grasos, muchos de los cuales han demostrado una variedad de actividades biológicas (Tabla 1) <sup>6-13</sup>.



**Tabla 1.** Compuestos aislados de *Annona cherimolia* Mill.<sup>6-13</sup>

<b>NOMBRE DEL COMPUESTO</b>	<b>TIPO DE COMPUESTO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA REPORTADA</b>	<b>REFERENCIA</b>
Annomolon A	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	9
34- <i>epi</i> -annomolon A	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	9
Amidas	Amidas	Corteza	_____	7
Annomolon B	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	9
Annocherina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	6
Cherimolina	Alcaloide	Corteza	-----	13
N-cis-cafeoiltilamina	Amida	Corteza	-----	12
Dihidro-feruloiltiramina	Amida	Corteza	-----	12
Isomolvizarina-1	Acetogenina	Raíz	-----	11
Isocherimolina	Acetogenina	Raíz	-----	11
Isomolvizarina-2	Acetogenina	Raíz	-----	11
Annomolina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	10
Annocherimolina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	10
Aromina-A	Acetogenina	Corteza	Citotóxica	8
Annocherina A	Alcaloide	Corteza	Inhibe agregación de plaquetas	11
Annocherina B	Alcaloide	Corteza	Inhibe agregación de plaquetas	11
Cheranoína	Alcaloide	Corteza	Inhibe agregación de plaquetas	11

### 2.1.3 *Annona muricata*



**Figura 3.** *Annona muricata*

La *Annona muricata* es comúnmente conocida como guanábana (Figura 3). Su origen no se conoce con certeza, sin embargo, actualmente se cultiva en América tropical, el sudeste Asiático y en las islas Filipinas<sup>14</sup>.

Dentro de la medicina tradicional las hojas se usan en infusión como antidiarreicas y como digestivas. Aplicadas localmente como cataplasma, son antiinflamatorias y se han empleado en el caso de las paperas<sup>5</sup>.

Las flores son pectorales y febrífugas, por lo que se usan en tisana en casos de gripe y catarro bronquial. Poseen propiedades astringentes, colagogas (facilitan el vaciamiento de la vesícula biliar), digestivas, y también vermífugas. Se recomienda a los hipertensos, obesos, cardíacos, y diabéticos<sup>5</sup>.

### 2.1.4 Estudio fitoquímico de *Annona muricata*.

Es una de las annonaceas ampliamente estudiadas, lo mismo que en el caso de *Annona cherimolia*, se han aislado metabolitos como alcaloides, ácidos grasos, amidas y ACG tanto de corteza, como de la semilla, el tallo y las hojas. En la Tabla 2, se mencionan algunos de los compuestos aislados para esta especie<sup>15-25</sup>.

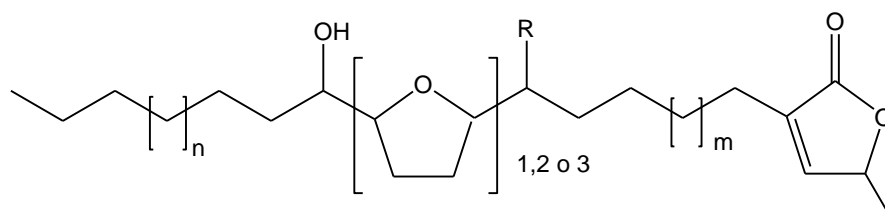
**Tabla 2.** Compuestos aislados de *Annona muricata*.

<b>NOMBRE DEL COMPUESTO</b>	<b>TIPO DE COMPUESTO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA REPORTADA</b>	<b>REFERENCIA</b>
Cis-annonacina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	25
Annomuricin E	Acetogenina	Hoja	Citotóxica	16
Cohibina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	22
Acetogenina	Acetogenina	Semillas	-----	19
Acido butanoico	Aceite	Semillas	-----	21
Javoricina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	25
Motecristin	Precursor de Acetogenina	Raíz	_____	15
Cis-solamin	Acetogenina	Raíz	Citotóxica	17
Acetogenina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	20
Annopentocina	Acetogenina	Hojas	Citotóxica	18
Longicin	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	23
Annomutacin	Acetogenina	Hoja	Citotóxica	24

## 2.2 Acetogeninas (ACG)

### 2.2.1 Características estructurales

Estructuralmente, las ACG son una serie de productos naturales de 35 o 37 carbonos derivados de ácidos grasos de 32 a 34 carbonos enlazados a una unidad de 2-propanol. Usualmente, se caracterizan por una larga cadena alifática unida en la parte terminal a un anillo de una  $\gamma$ -metil- $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada, uno, dos o tres anillos de tetrahydrofurano (THF) y algunos sustituyentes oxigenados a lo largo de la cadena, particularmente alfa a un tetrahydrofurano, y en algunos casos puede contener dobles enlaces o epóxidos (Figura 4)<sup>22</sup>.



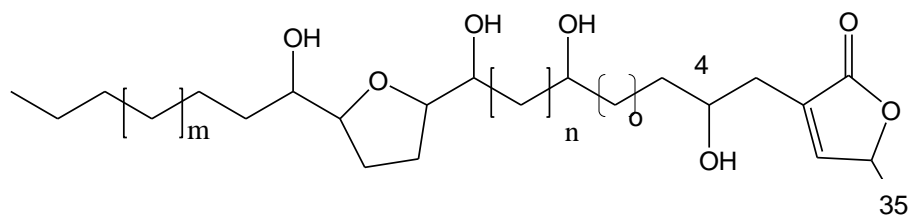
R = OH ó H

**Figura 4.** Estructura general de las ACG.

En el caso de ACG con fórmula mínima  $C_{35}H_{64}O_7$  se tienen reportes de diversas fuentes, donde la variación no solamente es la posición de los sustituyentes hidroxilo a lo largo de la cadena, sino también de la estereoquímica que presentan. En la Tabla 3 se presentan compuestos reportados con dicha fórmula mínima.

**Tabla 3.** ACG tetrahidroxiladas C35 obtenidas de diversas fuentes.<sup>23-29</sup>

Acetogenina	Fuente	m	n	o	Referencia
Longicin	<i>Asimina longifolia</i> Hojas	9	2	4	23
Annomutacin	<i>Annona muricata</i> Hojas	5	6	4	24
cis-annonacin	<i>Annona muricata</i> semillas	7	4	4	25
Arianacin	<i>Annona muricata</i> semillas	7	2	6	25
Javoricin	<i>Annona muricata</i> semillas	7	2	6	25
Glacins A	<i>Annona glabra</i> corteza	5	4	6	26
Glacins B	<i>Annona glabra</i> corteza	7	2	6	26
Rolliacocin	<i>Rollinia mucosa</i> Baill Fruto	7	3	5	27
Annonacin	<i>Annona densicoma</i> corteza	7	4	4	28
Asitrocín	<i>Asimina triloba</i> semillas	7	2	6	29



### **2.2.2 Mecanismo de acción de las ACG sobre el sistema celular.**

Las ACG tienen la capacidad de bloquear la respiración mitocondrial, al inhibir la NADH ubiquinona reductasa (Complejo I), una enzima unida a la membrana y esencial para la producción de ATP. Al interferir en la producción de ATP se produce una disminución en la concentración de esta molécula en el interior celular y en consecuencia se promueve la muerte; por lo anterior, las ACG intervienen en el punto terminal de la cadena de transferencia de electrones del Complejo I de forma similar a los inhibidores ordinarios de la cadena respiratoria, aunque existen pocas similitudes estructurales entre las ACG y los inhibidores convencionales, como la rotenona<sup>30-32</sup>.

Recientemente, se ha demostrado que las ACG también inhiben la actividad de la NADH oxidasa presente en la membrana plasmática. Este segundo modo de acción produce una disminución del nivel intracelular de ATP, bloqueando la regeneración del NAD e inhibiendo la fosforilación glicolítica en el citosol; la combinación de los dos modos de acción promueven el proceso de apoptosis y explican la potencia de este tipo de compuestos<sup>33,34</sup>.

En estudios realizados in vitro se ha observado que las ACG presentan selectividad contra las células tumorales, que puede ser explicada por la elevada actividad de la NADH oxidasa que es peculiar en estos tipos celulares, así como por un incremento en la demanda de ATP que es inherente a su crecimiento incontrolado<sup>35-39</sup>. Además, investigaciones recientes vinculan a las modificaciones estructurales y funcionales del Complejo I de la cadena respiratoria con enfermedades congénitas y adquiridas, dentro de las que se pueden mencionar a la enfermedad de Huntington, la de Parkinson, y la diabetes<sup>30</sup>. El estudio del Complejo I involucra en la actualidad la evaluación de diversos

agentes terapéuticos y plaguicidas<sup>30</sup>.

En los últimos años se ha encontrado, a través del empleo de RMN, que las ACG tienen la capacidad de complejarse con el ión  $\text{Ca}^{2+}$ , y que la formación de dicho complejo está relacionada con la configuración relativa de las ACG. Como consecuencia de dicha acción se ha postulado que quizás sea la formación de este complejo el que interviene en la inhibición de la NADH ubiquinona reductasa, ya que ésta es una enzima dependiente de calcio<sup>22,33</sup>. El calcio es un ión que interviene en una variedad de procesos metabólicos como cofactor de diversas enzimas, por lo cual su captura, mediante la formación de complejos con las ACG puede modificar las funciones biológicas.

### **2.2.3 Relación estructura-actividad**

Diversos estudios han sugerido una relación entre la estructura de las ACG y la actividad biológica al considerar las siguientes características<sup>22</sup>.

- Las ACG que contienen en su estructura dos anillos de tetrahidrofurano adyacentes en su estructura son las que han presentado mayor actividad biológica. Los estudios realizados han sugerido que la función del anillo de THF sea anclar la ACG a la región que contiene glicerol en la membrana liposomal.
- La  $\gamma$ -lactona terminal es esencial para la actividad, ya que una reducción del doble enlace de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada reduce la actividad. Las cetolactonas son menos potentes que las  $\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas.
- El número de grupos hidroxilo presentes a lo largo de la cadena también está relacionado con la actividad, presentando mayor actividad aquellas ACG que poseen un mayor número de grupos OH.
- Un grupo hidroxilo en C-4 es esencial para la actividad.

- ACG con grupos ceto a lo largo de la cadena alifática son menos activas que aquellas que presentan grupos hidroxilo.
- La presencia de dobles enlaces o de dioles vecinales a lo largo de la cadena hidrocarbonada aumenta la actividad.
- La longitud de la cadena C-35 o C-37 es la ideal para que se presente actividad.
- Otro factor que afecta la actividad biológica es la distancia entre los grupos funcionales presentes en la ACG.
- Se observa una mayor actividad cuando la distancia entre la  $\gamma$ -lactona y el THF es de trece carbonos. Las ACG que presentan un hidroxilo en C-9 presentan actividad considerable, así como aquellas que presentan anillos de THF flanqueados por OH.

## 2.2.4 Actividades biológicas reportadas

### 2.2.4.1 Actividad citotóxica

Las ACG evaluadas hasta el momento han mostrado actividad citotóxica determinada mediante la prueba de toxicidad *in vitro* contra células VERO (“African green monkey kidney epithelial cell”) o K.B. (carcinoma nasofaríngeo humano), en un intervalo de concentración entre  $10^{-1}$  y  $10^{-12}$  (g/mL)<sup>22, 40-42</sup> y/o contra *Artemia salina* (brine screen test BST)<sup>43</sup>.

Además de las pruebas mencionadas anteriormente, también se han hecho estudios adicionales sobre la actividad de las ACG en líneas celulares entre las que se pueden mencionar colon, riñón, páncreas, pulmón, y seno, entre otras. En la tabla 4, se presenta un espectro de la acción citotóxica de las ACG, reportando los resultados de la



concentración media inhibitoria de crecimiento ( $IG_{50}$ ) en 60 líneas celulares siguiendo el protocolo por el Instituto Nacional de Cáncer (USA), que mide el efecto producido por tres días de exposición. La  $IG_{50}$  se observó en un intervalo de 1 a  $10 \mu M^{22}$ .

**Tabla 4.** Concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular ( $IG_{50}$ )

ACETOGENINA	$IG_{50}$ PROMEDIO DE 60 LÍNEAS CELULARES
Anonacina	0.81
Anonacinona	1.55
Isoanonacina	1.35
Isoanonacinona	3.02
Gigantetrocina	0.87
Bulatacina	1.91

\* Banco de líneas celulares empleadas en el NCI (National Cancer Institute)

Uno de los mayores problemas en la quimioterapia moderna ha sido el surgimiento de líneas celulares tumorales que han desarrollado resistencia a los agentes terapéuticos convencionales, como la adriamicina, vincristina, taxol, entre otros<sup>32</sup>. Considerando el mecanismo de acción de las ACG mencionado en el apartado anterior, en diversos estudios in vitro se ha encontrado que estos compuestos producen un efecto citostático o/y citotóxico en líneas de células resistentes a fármacos.<sup>22,44</sup> Además, se ha reportado que en algunos casos la actividad citotóxica contra células no cancerosas es menor en relación a la que se observa contra células tumorales<sup>22</sup>. Por otro lado, en estudios recientes se ha reportado que la citotoxicidad producida por ACG es dependiente del ciclo

celular, mediante el empleo de citometría de flujo se ha observado que estos compuestos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento en líneas celulares cancerosas en la fase G1 del ciclo celular y que en células que se encuentran en la fase S de crecimiento el efecto citotóxico es mayor<sup>45-47</sup>.

#### **2.2.4.2 Actividad antimicrobiana**

Los estudios realizados con las ACG en esta área ha sido reportada tanto para bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*) como para Gram negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*). En relación a la actividad antifúngica existen estudios que reportan actividad contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Aspergillus niger*, entre otros<sup>22</sup>.

#### **2.2.4.3 Actividad antiparasitaria**

En este punto, existen referencias donde las ACG han mostrado actividad *in vitro* contra *Leishmania donovani* con un buen índice terapéutico, las ACG aisladas de *Annona senegalensis* han presentado actividad contra *Leishmania major*, *L. donovani* y *Trypanosoma bruce*, y las ACG aisladas de *Annona muricata* y *Annona cherimolia* muestran actividad contra las larvas de *Molineria dessatae*<sup>22</sup>. Parásitos de importancia relevante en el área de la salud.

#### **2.2.4.4 Actividad plaguicida**

Los estudios en relación a esta actividad han mostrado efectos positivos contra insectos, como el mosquito trasmisor de la fiebre amarilla, las cucarachas, *Drosophila melanogaster*

y algunas especies de arañas. Con base en los resultados observados se puede considerar que las ACG son un buen candidato para el desarrollo de plaguicidas. En este sentido también es pertinente mencionar que en algunas regiones de Sudamérica los aceites extraídos a partir de ciertas especies de *Annonaceae* son empleados como plaguicidas en forma tradicional<sup>22</sup>.

### 2.3 Cáncer

Actualmente el cáncer es considerado como la segunda causa de muerte a nivel mundial y en el caso particular de México de acuerdo con los datos reportados por el INEGI en relación al índice de mortalidad, la incidencia de tumores malignos es la tercera causa de muerte (Tabla 5)<sup>48</sup>.

**Tabla. 5** Principales causas de mortalidad nacionales.<sup>48</sup>

Causa de muerte	Porcentaje
Enfermedades del corazón	14
Diabetes mellitus	14
Tumores malignos	13
Accidentes	6
Enfermedades del hígado	5
Enfermedades cerebrovasculares	10
Demás causas	38

El cáncer es uno de los padecimientos multifactoriales que ha llamado la atención del medio científico debido a la diversidad que éste presenta, y al hecho de que no se conoce un sistema que lo controle por completo de forma eficiente. Por tal motivo, se han desarrollado investigaciones con el propósito de encontrar alternativas para su tratamiento y prevención. Dichas alternativas involucran el estudio y empleo de los productos naturales como posibles agentes quimioterapéuticos<sup>49</sup>.

El desarrollo del cáncer está ligado a factores tanto ambientales (radiación UV), como químicos (agentes oxidantes) y biológicos (infecciones bacterianas o virales).

Los carcinógenos químicos y físicos influyen de modo significativo en el desarrollo de los tumores mediante varias vías, ya sea actuando como iniciadores (mutágenos comunes), promotores o como agentes que inducen estrés oxidativo, generando estrés e inestabilidad en el genoma<sup>50</sup>.

### **2.3.1 Etapas del cáncer**

El proceso de carcinogénesis es un proceso que involucra al menos tres etapas: la iniciación seguida por la fase de promoción a partir de la cual se puede llegar al desarrollo de la fase de progresión. Durante la iniciación, el ADN adquiere mutaciones que pueden ser irreversibles y que requieren de uno o más ciclos celulares para mantenerse. Tanto el incremento en la velocidad de replicación y como el decremento en el proceso de apoptosis pueden contribuir a la promoción de la neoplasia a través de la producción de las clonas de las células inicialmente modificadas. En este contexto los carcinógenos químicos pueden clasificarse como genotóxicos o no genotóxicos<sup>51, 52</sup>.

Los carcinógenos genotóxicos son especies que reaccionan directamente con el ADN y actúan sobre las células de los órganos blancos mediante la formación de aductos en el material genético los cuales contribuyen a la formación de las neoplasias<sup>51</sup>.

Los carcinógenos no-genotóxicos o epigénicos reaccionan en las células blanco de tal modo que producen indirectamente la neoplasia o estimulan el desarrollo de tumores a partir de células dañadas<sup>51</sup>.

Existe más información sobre el modo de acción de los carcinógenos genotóxicos. Su efecto mutagénico puede ser medido mediante varias pruebas ya sea *in vitro*, como la de Ames, y pruebas *in vivo*, como la de micronúcleos, que puede realizarse a corto plazo. En el caso de los carcinógenos epigénicos se han discutido diversos mecanismos, los cuales involucran un incremento en las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que pueden actuar sobre el ADN, los lípidos y las proteínas. De forma directa o mediante productos de la lipoperoxidación pueden generar daño sobre el ADN, y contribuir de este modo con la etapa de iniciación. La producción de proteínas oxidadas puede tener efecto sobre las rutas de señalización, incluyendo la regulación de los factores de transcripción y las cascadas de las cinasas. Estos pueden ser los medios que generen aberraciones en la expresión genética y conlleven a un incremento en la proliferación celular o decremento en la apoptosis. Los carcinógenos no genotóxicos pueden contribuir al proceso de proliferación celular mediante interacciones sobre el proceso de mitosis o diversos procesos citotóxicos. Lo anterior se resume en la Tabla 6<sup>53</sup>.

En el caso de las dos primeras etapas del proceso de carcinogénesis, se considera que están relacionadas en forma directa con el proceso de mutación; por consiguiente la evaluación del efecto anticancerígeno está ligada a la evaluación de antimutagénesis.

**Tabla 6.** Características observadas en las etapas de iniciación y promoción generadas por agentes genotóxicos y epigénicos.

<b><i>Etapa</i></b>	<b><i>Carcinógeno genotóxico</i></b>	<b><i>Carcinógeno epigénico</i></b>
<b>Iniciación:</b>		
Daño sobre ADN/ mutación	Exógeno  Vía directa mediante la modificación de bases por el compuesto o un metabolito activo, lo cual genera una mutación	Endógeno  Vía secundaria mediante estrés oxidativo  Genera modificación de las bases mediante oxidación
Cambios en la expresión de genes	Respuesta a un daño sobre ADN  Elevada p53, asociada a genes p21 y ciclina G1  Elevación de la MGMT	Respuestas a estrés oxidativo  Inducción de APEX1  Compuestos específicos de la respuesta a estrés oxidativo  Altas concentraciones de proteosoma por PBO y Wy  De HSP mitocondrial y citosólico  Genes asociados con PBO, MPy y DES
<b>Promoción</b>		
Alta proliferación celular y supervivencia  Baja en apoptosis  Fijación del daño sobre el ADN	La mutación actúa sobre  -Activación de los oncogenes o inactivación de los supresores de tumores  - Inhibición de rutas de apoptosis y proliferación	Inducción de la proliferación celular  -Control en mitosis  -Citotoxicidad que genera hiperplasia
Cambios en la expresión genética asociados con la promoción	Elevado índice en las proteínas que promueven la supervivencia celular  Elevada ciclina D1	Elevación de la expresión de genes relacionados con el ciclo celular

Los anticarcinógenos son compuestos que pueden inhibir la iniciación o la promoción del proceso de carcinogénesis. Muchos anticarcinógenos son también antimutágenos, de ahí la importancia de evaluar este tipo de compuestos. Instituciones como el Chemoprevention Branch of the National Cancer Institute (U.S.A.), han desarrollado una serie de modelos animales para evaluar el efecto de diversos compuestos como agentes quimiopreventivos, uno de estos modelos es el desarrollo de criptas en colon de ratón inducidas por el azoximetano (AOM)<sup>54, 55</sup>.

### **2.3.2 Cáncer de colon**

Se ha demostrado mediante estudios epidemiológicos y experimentales que existe una correlación directa entre el cáncer de colon y la alimentación. La hipótesis de que existe una relación entre la adopción de la cultura occidental y el cáncer de colon parece estar fuertemente sustentada por un incremento en la incidencia de cáncer de colon en los países occidentales y en vías de desarrollo<sup>56, 57</sup>.

Los factores ambientales pueden contribuir en el desarrollo de este tipo de cáncer y se ha sugerido que la incorporación de comida a base de frutas y vegetales, ricos en micronutrientes puede reducir la incidencia de cáncer y otras enfermedades degenerativas<sup>54</sup>.

El cáncer de colon es el segundo más desarrollado en Centro y Sur América con una incidencia mayor en el género masculino en comparación al observado en el género femenino y se ha observado que la incidencia de cáncer puede variar entre la población debido a diferencias regionales, de comportamiento y genéticas<sup>54</sup>.

En el colon el aumento de la proliferación celular, la expansión de la zona con proliferación celular y la inhibición de apoptosis son considerados factores de riesgo para el desarrollo de tumores. El mecanismo preventivo de algunos agentes como los retinoides y otra variedad de sustancias antioxidantes puede estar ligado a la reducción de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis<sup>55</sup>.

Para el estudio de este tipo de padecimientos se han desarrollado diversos modelos, que permitan elucidar los factores que lo promueven y buscar alternativas para su control. Uno de ellos es la inducción de lesiones preneoplásicas mediante agentes químicos como el azoximetano (AOM) que actúan de modo específico sobre el órgano blanco, en este caso el colon. Estas lesiones se conocen como criptas aberrantes<sup>56-58</sup>.

Los focos de criptas aberrantes (FCA) son lesiones preneoplásicas de adenocarcinoma que aparecen en la superficie del colon en roedores después del tratamiento con inductores químicos de cáncer de colon, como el AOM. Estas formaciones están caracterizadas por un incremento en el diámetro, luz dilatada en su parte media inferior y algunas irregularidades, con ocasionales evaginaciones de la capa epitelial de la mitad superior de la cripta. Las células en estos FCA manifiestan basofilia citoplásmica, baja relación núcleo citoplasma, nucleolos prominentes y pérdida de polaridad. Numerosos estudios indican que un incremento en el número de FCA después del tratamiento con el carcinógeno, un incremento en la proliferación celular y en algunos casos revela displasia histológica<sup>59,60</sup>.

Las FCA son lesiones hiperproliferativas que se encuentran en el colon de humanos y animales tratados con carcinógenos y poseen características en común con el cáncer de colon. También se sabe que este tipo de lesiones se presenta en la mucosa de los



pacientes con cáncer de colon y se ha sugerido que este tipo de criptas son precursoras de lesiones como adenomas. En la actualidad la identificación de FCA se han establecido como biomarcador de carcinogénesis en colon de roedores<sup>56</sup>.

### 2.3.3 Azoximetano (AOM)

El AOM es una especie altamente reactiva, que resultó ser un inductor específico de cáncer de colon. Se genera como resultado del metabolismo de la 1,2-dimetilhidrazina, la cual sufre una serie de transformaciones químicas *in vivo*, generando el azometano y azoximetano como intermediarios, y como carcinógenos al metilazoximetanol y al ión metildiazonium<sup>61</sup>.

Estas especies químicas se presume que reaccionan como agentes metilantes de macromoléculas y otros compuestos tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. La alteración de estas macromoléculas es considerada como fundamental en el proceso de carcinogénesis por agentes químicos.

En relación a la formación endógena del AOM, este puede provenir del metabolismo realizado por la flora microbiana de compuestos como la metilamina o por órganos como el hígado. Sin embargo, las reacciones hipotéticas que originan *in vivo* al AOM no son consistentes con los mecanismos propuestos en química orgánica para la síntesis de compuestos azo y azoxi<sup>61</sup>.

En relación al metabolismo *in vivo*, los estudios indican que parte del AOM administrado es excretado a través de la respiración y en la orina. La evaluación de residuos o compuestos derivados del metabolismo del AOM en homogenizado de hígado resultaron

positivos, indicando que éste es un órgano clave para la transformación de este compuesto. Al parecer los metabolitos activos no son transportados mediante las heces fecales hasta el colon, sino que llegan a este órgano mediante el torrente sanguíneo<sup>54</sup>.

El metilmetoximetanol, derivado del AOM, es una especie altamente reactiva que puede generar especies capaces de metilar macromoléculas, mediante la formación de puentes de hidrógeno, reacciones que puede ser catalizada por enzimas específicas de ciertos tejidos.

## **2.4 Evaluación del efecto genotóxico**

La genética toxicológica, identifica y analiza la acción de xenobióticos sobre los componentes hereditarios de los sistemas vivos. En ocasiones estos agentes producen también una respuesta citotóxica<sup>62</sup>.

Los agentes que producen una alteración en los ácidos nucleicos y por consiguiente, una modificación hereditaria o la inactivación del DNA, son denominados genotóxicos. Dichas sustancias pueden actuar sobre células somáticas participando en la iniciación de un proceso de transformación maligna responsable de cáncer<sup>62</sup>.

Los daños producidos sobre el DNA pueden ser en general de dos tipos de acuerdo al tamaño: macrolesiones (cromosómicas) que involucran la ruptura y/o intercambio de segmentos de DNA en estructuras cromosómicas o microlesiones (génicas) donde las alteraciones ocurren a nivel de la secuencia de nucleótidos<sup>62</sup>.

Existe una amplia variedad de técnicas que han sido desarrolladas en el transcurso de los años con la finalidad de determinar el efecto de diversos agentes sobre el DNA, dentro de

estas técnicas podemos mencionar la prueba de Ames, el estudio de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y la determinación de micronúcleos<sup>62, 63</sup>.

#### **2.4.1 Micronúcleos**

La determinación de la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica es un método que forma parte de las baterías internacionales para la determinación de daño citogenético<sup>63</sup>. Los micronúcleos (MN) son fragmentos de cromatina que se encuentran en el citoplasma una vez que se han separado del núcleo principal, son morfológicamente idénticos, pero con un diámetro que varía entre 1/16 y 1/3 del que corresponde al núcleo principal, además no son refringentes cuando se tiñen con colorantes hematológicos<sup>64</sup>.

Los micronúcleos se forman a partir de fragmentos cromosómicos o por cromosomas completos que no se desplazan por el uso acromático hacia los polos nucleares, lo que corresponde a un rezago anafásico<sup>65-67</sup>.

Las ventajas que presenta la prueba de MN son varias, ya que es una prueba que se realiza en un tiempo corto, en la que se utiliza un número moderado de animales cuando el experimento es *in vivo*, y permite la detección de agentes capaces de romper a los cromosomas (clastógenos) y de agentes que pueden interactuar con las proteínas del huso acromático (aneúgenos) impidiendo que todo el cromosoma incorpore normalmente a la célula hija formada, además, los MN pueden observarse en casi todas las poblaciones celulares<sup>64</sup>.

Hacia 1970, Schmid y colaboradores estudiaron a los MN como indicadores del daño citogenético en la medula ósea de ratones tratados *in vivo*, investigación que llevó a la

conclusión de que la incidencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) era un claro biomarcador del daño cromosómico producido por agentes ambientales, es decir, un indicador de genotoxicidad<sup>65</sup>.

La eritropoyesis es un proceso que se efectúa en la médula ósea y que incluye numerosas divisiones celulares que se inician a partir de una célula sanguínea madre y que culmina con la formación del eritrocito. En las últimas etapas del proceso se pueden observar dos tipos celulares, en primer término los eritrocitos policromáticos, que corresponden a células inmaduras, que posteriormente pierden el ARN y el núcleo principal, completan su síntesis de hemoglobina y disminuyen su tamaño al convertirse en eritrocitos maduros, conocidos como normocrómicos (ENC)<sup>67</sup>. Para un estudio agudo, el efecto genotóxico se determina sobre la población de eritrocitos policromáticos (EPC), ya que el compuesto a evaluar actuará sobre la fase S del ciclo celular, lo que permitirá la evaluación solo en las células que han culminado recientemente su división<sup>64</sup>.

La prueba de MN también permite la observación de la capacidad citotóxica del compuesto en estudio, dicho análisis depende del comportamiento que muestren los eritrocitos policromáticos con respecto a los normocrómicos, de tal manera que una reducción o un incremento en su número representa una alteración en la capacidad eritropoyética de la médula y el grado de alteración refleja el nivel de citotoxicidad<sup>67</sup>.

## 2.5 Citotoxicidad

Otro factor importante en el proceso de carcinogénesis es la evaluación del efecto citotóxico de diversos agentes. Esta muerte celular puede darse por dos vías básicamente:

a) La necrosis se promueve cuando las células se exponen a condiciones fisiológicas extremas, como hipotermia o hipoxia, lo que produce un daño en la membrana plasmática. El proceso comienza con la pérdida de la habilidad de las células para mantener la homeostasis, llevando esto a una afluencia de agua e iones extracelulares. Los organelos, principalmente la mitocondria aumentan de tamaño llevando la célula a lisis.

b) La apoptosis es un tipo de muerte celular que ocurre bajo condiciones fisiológicas normales en donde la célula misma induce su muerte. Las células que mueren por apoptosis muestran características morfológicas y bioquímicas específicas. Estas características incluyen agregación de la cromatina, condensación nuclear y citoplásmica, así como partición del citoplasma y núcleo en vesículas membranosas que contienen ribosomas, mitocondrias y material nuclear<sup>69</sup>.

La apoptosis es un mecanismo de defensa celular innata contra la generación de tumores al menos por dos vías: la remoción de células con inestabilidad genómica producida por un agente epigénico y por la eliminación de células que sufrieron daño sobre el ADN debido a un carcinógeno genotóxico<sup>69</sup>.

Existe evidencia de que las rutas reguladas por apoptosis están frecuentemente dañadas

en el cáncer colorectal, con un incremento en su activación y un desorden progresivo de la homeostasis apoptótica durante la carcinogénesis como un incremento progresivo en la inestabilidad genómica. Como consecuencia las células genéticamente defectuosas escapan del proceso de muerte por apoptosis con la posible sobrevivencia de las clonas que poseen mutaciones significativas.

Se ha observado además que algunos compuestos y agentes quimioterapéuticos con efecto antitumoral pueden disparar la apoptosis de células cancerosas. Las ACG al bloquear la cadena respiratoria, pueden activar este mecanismo celular.

Los ensayos para determinar la citotoxicidad pueden ser realizados *in vitro* mediante el cultivo de líneas celulares específicas, o *in vivo*, determinando el efecto del agente sobre el organismo en general, un órgano o sistema empleando modelos animales.<sup>55</sup> Estos métodos pueden estar relacionados con la viabilidad celular o la capacidad metabólica. La observación de los cuerpos apoptóticos empleando técnicas de tinción como la de hematoxilina-eosina es útil y ofrece resultados confiables.

### 3. Justificación

Es ampliamente conocido que compuestos químicos aislados de fuentes naturales han representado una alternativa eficaz para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan a los seres humanos. La persistencia y repunte de enfermedades malignas, así como el resurgimiento de aquellas causadas por gérmenes patógenos fármaco-resistentes, mantienen muy activas las investigaciones en todas las disciplinas competentes que conducen a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural para su tratamiento eficiente. Desde su descubrimiento, las ACGs han sido objeto de intensos estudios debido a sus variadas actividades biológicas, particularmente por su marcado efecto citotóxico *in vitro*, en la cuales se han cimentado muy buenas expectativas para el tratamiento de algunos tipos de cánceres y de enfermedades de origen parasitario. Por fortuna, la fuente natural de las ACGs (Familia *Annonaceae*, particularmente el género *Annona*) es abundante, por lo cual ofrecen una buena oportunidad de seguir explorando sus propiedades biológicas. En este sentido, se ha encontrado previamente, a través de un estudio tipo agudo realizado *in vivo*, una baja genotoxicidad y alta citotoxicidad de una mezcla de ACGs aisladas de *Annona cherimolia* Mill. Estos resultados motivaron el desarrollo del presente trabajo, el cual consiste en realizar un estudio subcrónico de genotoxicidad y citotoxicidad de una ACG pura en un modelo murino de cáncer de colon, una de las enfermedades con mayor incidencia en la actualidad.

## 4. Objetivos

4.1. Aislamiento y caracterización de ACG a partir de semillas de *Annona cherimolia* Mill y *Annona muricata*.

4.1.1 Obtener las ACG a partir de los extractos de las semillas en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

4.1.2 Validar un método cromatográfico para la purificación de las ACG.

4.1.3 Caracterizar las ACG aisladas mediante métodos espectroscópicos.

4.2 Evaluar la toxicidad de una ACG tetrahidroxilada obtenida de las semillas de *Annona muricata* en un estudio subcrónico *in vivo*.

4.2.1 Obtener la DL<sub>50</sub> de la ACG.

4.2.2 Cuantificar el efecto genotóxico producido por la ACG mediante la determinación de eritrocitos normocrómicos micronucleados.

4.2.3 Evaluar el efecto quimioterapéutico de la ACG en un modelo murino de lesiones preneoplásicas en colon.

4.2.4 Determinar el efecto citotóxico de la ACG mediante la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos en sangre periférica de ratón.

4.5 Evaluar apoptosis en sangre.



## **5. Metodología**

### **5.1 Aislamiento de ACGs a partir de la semilla de *Annona cherimolia* y *Annona muricata***

#### **5.1.1 Material vegetal**

Los frutos procesados para la obtención de semilla de *A. cherimolia* se colectaron en el municipio de Arteaga, Michoacán, y los de *A. muricata* se consiguieron en la Central de Abasto de la Cd. de México de frutos provenientes del Estado de Nayarit.

#### **5.1.2 Obtención de los extractos**

El proceso para la obtención de los extractos crudos fue el mismo para ambas plantas. Las semillas se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se molió empleando un molino manual. Para la extracción, el material pulverizado se maceró en EtOH por siete días, después se filtró para separar los restos vegetales. El extracto crudo se obtuvo después de evaporar el disolvente en el rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 65 °C.

El extracto crudo etanólico se sometió a un proceso de partición empleando hexano/agua, posteriormente, la fracción acuosa se extrajo nuevamente con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/agua en proporción 1:1. La fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se secó con sulfato de sodio anhidro para eliminar las trazas de agua, se filtró y se evaporó en el rotavapor a una temperatura de 30 °C, obteniéndose los extractos respectivos en forma de una miel color

café claro. Estos extractos fueron los empleados en el siguiente nivel de purificación.

## **5.2 Separación cromatográfica preliminar mediante cromatografía en columna**

Aproximadamente 7 g de cada uno de los extractos anteriores se sometieron a separación cromatográfica usando una columna de 6 cm de diámetro y una altura de 25 cm, empleando silica gel de malla 200-300 como soporte y eluyendo con un gradiente de hexano:acetato:etanol en una proporción inicial de 80:10:10, con un aumento gradual de polaridad hasta finalizar con etanol al 100%. Se colectaron 820 fracciones de 10 mL, las cuales se agruparon en función de sus  $R_f$  comunes presentados en cromatografía en capa fina (ccf). La presencia de ACG en las fracciones 50 a la 700 se confirmó mediante los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las fracciones más representativas.

Para la obtención de muestras de mayor pureza se realizó una segunda separación cromatográfica, empleando como eluyentes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :EtOH:hexano en un gradiente que va de una proporción 2:1:7 hasta llegar a una proporción 50:50 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :EtOH. Se utilizaron 1.2 g de muestra para una columna de 3 cm de diámetro y una altura de 22 cm empacada con silica gel malla 200-300, obteniéndose 125 fracciones de 10 mL. El seguimiento de la columna se realizó empleando ccf y RMN  $^1\text{H}$ . Nuevamente, las fracciones obtenidas se reunieron en función de sus respectivos  $R_f$ .

## **5.3 Validación de un método cromatográfico mediante HPLC para la separación de ACG.**

La gran cantidad de ACG presentes en los extractos crudos, así como su gran parecido estructural, exigen métodos cromatográficos muy eficientes para lograr su purificación y posterior determinación estructural. La experiencia acumulada previamente en nuestro

grupo de trabajo sobre estudios de extracción, purificación y elucidación estructural de acetogeninas, motivó a establecer un método cromatográfico reproducible para separarlas y diferenciarlas mediante sus tiempos de retención a nivel de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, de sus siglas en inglés). Para concretar este propósito se decidió llevar a cabo la validación de un método que permitiera establecer condiciones generales de separación de acetogeninas a nivel analítico que pudiera servir de referencia para separaciones futuras de este tipo de compuestos. Las bases de dicho procedimiento se describen enseguida.

La validación de métodos analíticos se considera como un juicio que proporciona el fundamento para decidir si un método reúne las condiciones necesarias para su aplicación en un análisis químico. Por medio de este proceso también se establece que las características de un método cumplen con los requerimientos de aplicación analítica para los que fue diseñado. Para la validación del método se utilizó un cromatógrafo de líquidos System Gold, Beckman, con arreglo de diodos en el sistema de detección.

Las muestras se analizaron empleando una columna fase reversa C18 (250 x 4.6 mm d.i.) Phenomenex eluyendo con MeOH:H<sub>2</sub>O en una proporción 85:15, con un flujo de 1 mL/min y leyendo a 220 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL y cada muestra se analizó por triplicado.

Los puntos analizados son los siguientes:

a) Linealidad del sistema: Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. Se realizó una curva de calibración por triplicado donde se

monitoreó la relación concentración vs. respuesta medida. Se analizaron 5 diluciones (50, 100, 200, 400 y 600  $\mu\text{g/mL}$ ).

Criterios de aceptación: el coeficiente de correlación lineal debe de ser mayor o igual a 0.99, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser mayor a 0.98 y el coeficiente de variación  $CV \leq 5\%$ .

b) Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

c) Repetibilidad: precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones. Se analizó un mismo día por quintuplicado, las cantidades de 10, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . Criterio de aceptación: El  $CV \leq 5\%$

d) Reproducibilidad: Expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero a diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columna o analista. Se realizó el análisis de 6 muestras con la concentración máxima establecida, en este caso 500  $\mu\text{g/mL}$ , bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista. Los resultados son aceptables si se obtiene un  $CV \leq 15\%$

e) Límite de detección: concentración más baja que puede ser cuantificada cumpliendo con la exactitud y precisión del método. Los resultados son aceptables si se obtiene un  $CV \leq 20\%$

f) Estabilidad de la muestra. Se evaluó la estabilidad de la muestra a diferentes períodos (1 semana, 15 días, 1 mes). Realizando la comparación de los resultados de los análisis

iniciales de la muestra con los obtenidos de la misma muestra después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

#### **5.4 Aislamiento de ACGs mediante la técnica de HPLC**

Para una separación cromatográfica a mayor escala de las ACG se desarrolló un método semipreparativo empleando un sistema de HPLC. En una primera separación se empleó una columna C18 y la detección fue a  $\lambda = 220$  nm, la fase empleada fue CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (88:12) con un volumen de inyección de 500  $\mu$ L y un flujo de 12 mL/min. Posteriormente, la muestra colectada a un tiempo de retención de 20-25 min se separó nuevamente por HPLC bajo las siguientes condiciones: Columna C18 a una  $\lambda = 220$  nm, empleando en este caso como sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (88:12), manteniendo el volumen de inyección en 500  $\mu$ L con un flujo de 12 mL/min. La concentración en las muestras inyectadas fue de 50  $\mu$ g/mL. Bajo estas condiciones se colectaron las fracciones de *Annona cherimolia* con un tiempo de retención de 14.08, 16.767 y 17.417 min.

Las muestras colectadas se extrajeron del volumen de eluyente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> grado HPLC y posteriormente fueron concentradas en el rotavapor. La pureza de las ACG sólo fue posible confirmarla a nivel analítico, de tal manera que las condiciones empleadas para determinar la pureza fueron las encontradas con el método validado.

#### **5.5 Caracterización estructural**

La caracterización estructural de las ACG se llevó a cabo empleando diferentes técnicas mono y bi-dimensionales de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en un equipo Varian NMR con frecuencias de observación de <sup>1</sup>H a 500 MHz y de <sup>13</sup>C a 125 MHz (CDCl<sub>3</sub> como



### 5.6.1 Determinación de la DL<sub>50</sub>

El estudio de la toxicidad aguda se realizó en ratones macho (CF1) de un peso aproximado de 25 g. La vía de administración fue intraperitoneal empleando como vehículo EtOH al 0.5% y el protocolo a seguir para determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) fue el propuesto por Lorke<sup>70</sup>.

Se emplearon dos lotes de 3 ratones cada uno, las dosis administradas fueron de 100 y 10 mg de ACG por kilogramo de peso en una primera etapa. En una segunda etapa se emplearon las dosis de 2, 4, 8 y 16 mg/kg para determinar mediante la media geométrica en función de los decesos la DL<sub>50</sub>. Los grupos de trabajo se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Grupos de trabajo para el estudio preliminar de citotoxicidad y genotoxicidad para una ACG aislada de *Annona muricata*

<b>Grupos de trabajo</b>
Etanol 0.5 %
AOM 15 mg/kg
AOM+ACG 0.07 mg/kg
AOM+ACG 0.17 mg/kg
AOM+ACG 0.7 mg/kg

### **5.6.2 Inducción de criptas con AOM**

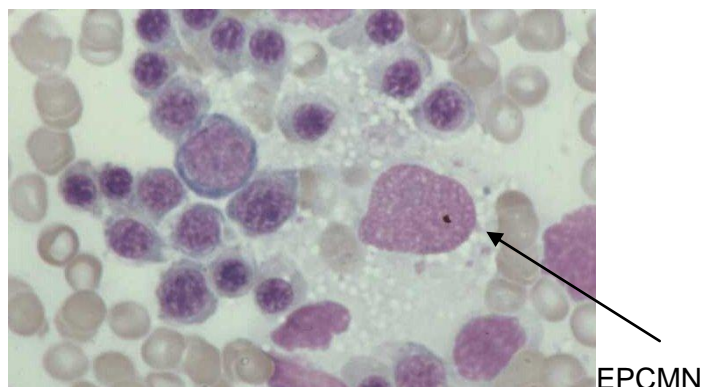
Se indujeron lesiones preneoplásicas con AOM administrándola de forma intraperitoneal cada cuarto día por dos semanas empleando una dosis de 15 mg/kg. El AOM se disolvió en solución salina y el volumen de administración fue de 0.3 mL.

### **5.6.3 Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad en sangre periférica de ratón**

Para determinar el efecto genotóxico y citotóxico en sangre periférica se obtuvieron muestras sanguíneas (dos gotas) del extremo de la cola realizando un corte pequeño, las muestras se tomaron los días 1, 8, 15, 22, 29, 36 y 42 a partir de la administración de la ACG, la muestra se colocó en portaobjetos perfectamente limpios y se realizó un frotis. Para la tinción de los frotis, como primer paso se fijaron con MeOH sumergiéndolos durante 5 minutos, después de lo cual se lavaron con agua corriente y se tiñeron colocándolos por 12 minutos en colorante Giemsa al 5% en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8. Las láminas se observaron al microscopio a inmersión. Los eritrocitos policromáticos (EPC) se tiñen de color violáceo y los eritrocitos normocrómicos (ENC) se tiñen de color azul. Los micronúcleos se observan de un color violeta intenso, como se presenta en la Figura 6.

Para evaluar la citotoxicidad se determinó la relación entre el número de EPN y de ENC. La cuenta se realizó en 2000 células por cada ratón en los horarios establecidos. Para determinar la genotoxicidad se observó el número de eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) en un total de 2000 eritrocitos por individuo tratado.





**Figura 6.** Representación de un micronúcleo en un eritrocito policromático.

#### **5.6.4 Evaluación de apoptosis en plasma sanguíneo**

Se emplearon muestras de plasma sanguíneo colectadas mediante punción cardiaca en los tiempos establecidos para el sacrificio de los individuos. La determinación se realizó empleando una prueba de ELISA empleando el kit Cell Death detection ELISA Plus de Roche. El principio de la prueba consiste en detectar nucleosomas, un aumento en su concentración en la circulación es indicio de apoptosis.

Los pasos seguidos se enuncian a continuación:

- Transferir una alícuota de la muestra a una placa de titulación donde los pozos contienen estreptavidina.
- Conjugar los nucleosomas en el sobrenadante con los dos anticuerpos monoclonales, antihistona (marcado con biotina) y anti-DNA (peroxidasa-conjugado)\* (incubar 2 h).
- Lavar los complejos inmobilizados de histona-anticuerpo con buffer, tres veces para remover los componentes celulares que no son inmuno-reactivos.

- Incubar la muestra con el substrato de la peroxidasa (15 min.)
- Leer absorbancia a 405 nm.

### **5.6.5 Evaluación del efecto quimioterapéutico**

El monitoreo se realizó después de tres semanas de haber iniciado la administración de las ACG y al cumplir la sexta semana, sacrificando 7 individuos de cada dosis evaluada. El sacrificio fue por dislocación cervical, se extrajo el colon y se lavó con amortiguador de fosfatos, posteriormente el colon se abrió en forma longitudinal y se colocó en amortiguador de fosfatos con formalina al 10%, manteniéndolo por 24 horas a una temperatura de 4 °C, finalmente se tiñó con una solución de azul de metileno al 0.2% en regulador de fosfatos.

El daño está en función del número de criptas observadas, el tamaño y el grado de degeneración en el tejido, así como el lugar de mayor incidencia de ACF.

La observación de las criptas se realizó a 40X. Su morfología corresponde a círculos formados por células teñidas en forma más intensa que la mucosa normal del colon.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Aislamiento, purificación y elucidación estructural de ACGs a partir de la semilla de *Annona cherimolia* Mill y *Annona muricata*

#### 6.1.1 Obtención de los extractos crudos

A partir de 1.15 Kg de semilla de *Annona cherimolia*, colectada en abril del 2006, se obtuvieron 185.7 g del extracto etanólico. Este extracto crudo fue fraccionado en hexano:agua, la fase acuosa se separó y se lavó posteriormente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Después de evaporar el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se obtuvieron 175.5 g de extracto crudo. Usando el mismo procedimiento, a partir de 800 g de semilla de *A. muricata* se obtuvieron 64.5 g del extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Los rendimientos obtenidos para el extracto en cloruro de metileno fueron de 16.1% y 8.06 % para *Annona cherimolia* y *Annona muricata*, respectivamente.

#### 6.1.2 Purificación de ACGs mediante cromatografía en columna y HPLC

Respecto a *Annona cherimolia*, se realizó el fraccionamiento cromatográfico del extracto obtenido en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  empleando dos cromatografías en columna consecutivas. Primeramente se cromatografiaron 7 g de extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , de esta separación cromatográfica se obtuvieron 820 fracciones de 10 mL. Estas fracciones fueron unidas en tres grupos en concordancia con sus *R<sub>f</sub>* obtenidos por ccf (Tabla 8), utilizando como eluyente una mezcla de hexano:acetona en una proporción 4:1. En la Tabla 8 se muestran los tres grupos generales de ACGs obtenidas.

**Tabla 8.** Fracciones obtenidas a partir de la primera separación cromatográfica

<b>TIPO DE ACG</b>	<b>Rf</b>	<b>FRACCIONES</b>	<b>g OBTENIDOS</b>
Menos polares (A)	0.85	50-170	1.16
Intermedias (B)	0.7	138-540	1.28
Más polares (C)	0.2	550-700	0.265

Posteriormente, los 1.28 g de la fracción intermedia rica en ACGs fueron sometidos a otro proceso de separación empleando como eluyente hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH en proporción 7:1.5:1.5. De esta columna se obtuvieron 125 fracciones de 10 mL cada una. Las fracciones 55-110 se reunieron en base a sus *Rf*, obteniéndose 118 mg de una muestra correspondiente a ACG, tal como se determinó por RMN <sup>1</sup>H. El rendimiento de esta columna fue del 9.2% respecto a la cantidad de muestra aplicada.

Para el caso de *Annona muricata* la separación consto de las mismas etapas que en laso de *Annona cherimolia*, en la primera separación se obtuvieron 645 fracciones, las fracciones de la 148-167 se obtuvieron 0.95 g con un *Rf* de 0.6. Esta muestra se empleó para la segunda separación obteniendo 115 fracciones de aproximadamente 10 mL. Donde finalmente se obtuvieron 90 mg de las fracciones 22-33 con una pureza adecuada para su empleo posterior en el análisis por HPLC.

## **6.2 Resultados de la validación del método cromatográfico (HPLC) para la purificación de ACGs**

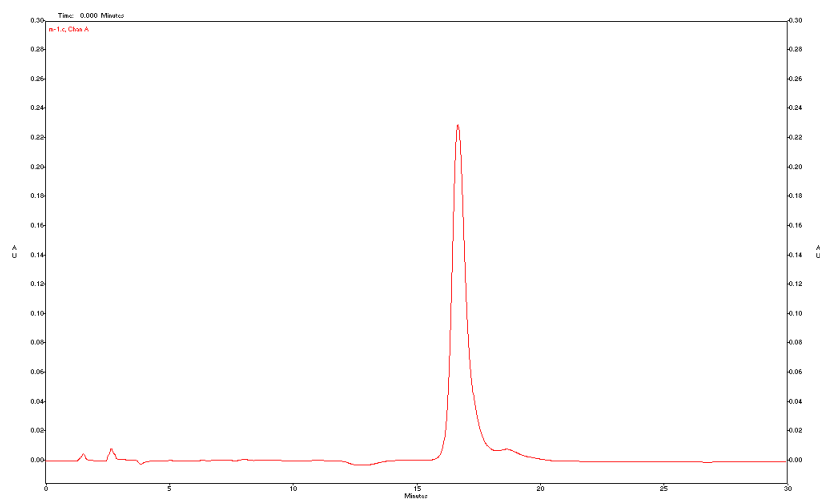
Mediante un análisis por HPLC se observó que la ACG obtenida de la semilla de *Annona muricata* presentó una pureza adecuada y un tiempo de retención de 14.5 minutos (Figura 7), muestra que se usó para validar el método.

Los parámetros evaluados para la validación de este método fueron: factor de respuesta, estabilidad de la muestra, repetibilidad y reproducibilidad,

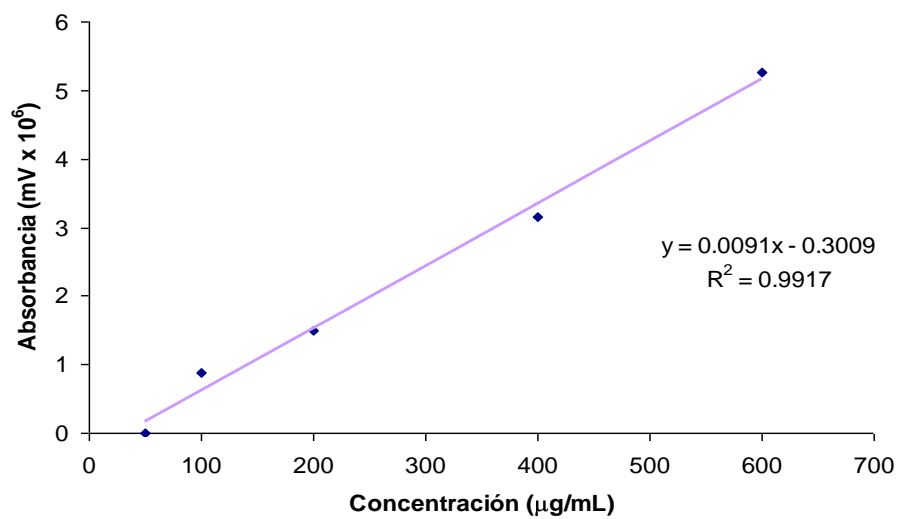
Para el estudio de reproducibilidad la muestra se inyectó en varias ocasiones durante el mismo día y en días posteriores, encontrándose un coeficiente de variación menor al 12%, lo cual indica que la técnica de análisis es reproducible. Posteriormente se verificó la estabilidad de la muestra empleando la misma secuencia de análisis, observando que el tiempo de retención de la muestra de interés permanece constante realizando corridas en horarios diversos.

También se realizó el estudio de reproducibilidad del procesamiento de la muestra verificando que éste no afecta los resultados de forma individual, para lo cual se procesó la muestra por triplicado. Se obtuvo un coeficiente de variación general menor al 8%, que indica que el procesamiento de las muestras previo a la inyección es reproducible. Cabe mencionar que también se realizó el estudio de la elusión total de la columna para verificar que después de cada inyección no hay muestra residual.

Para la relación concentración/respuesta se inyectaron por triplicado y en días diferentes muestras con concentraciones en un intervalo de 10 hasta 600  $\mu\text{g/mL}$ , observando un índice de correlación lineal de 0.9917 (Figura 8).



**Figura 7.** Cromatograma de la ACG tetrahidroxilada aislada de la semilla de *Annona muricata*



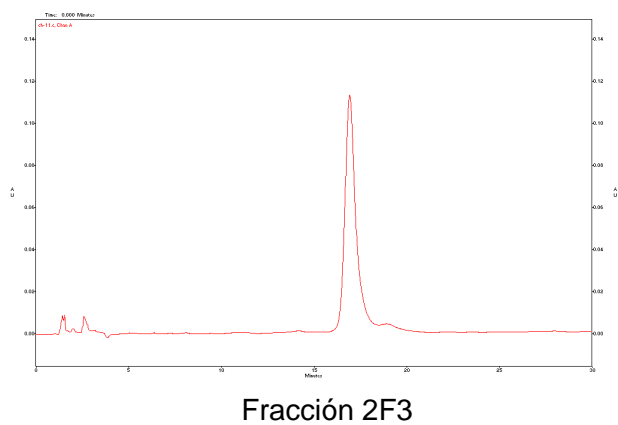
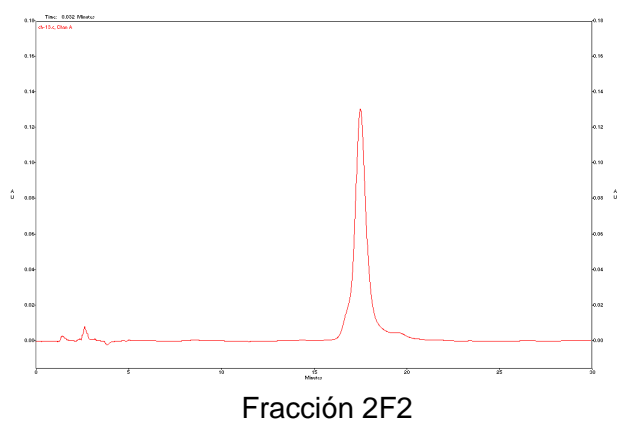
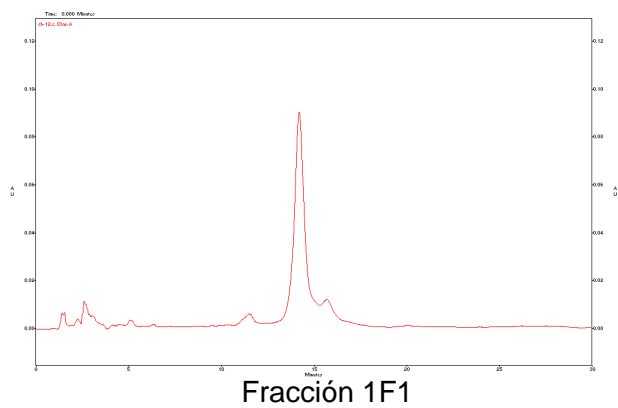
**Figura 8.** Relación concentración/respuesta para la ACG obtenida de la semilla de *Annona muricata*.

### 6.2.1 Purificación de ACGs mediante HPLC

La muestra obtenida de *Annona muricata* después de la segunda columna de separación (fracciones 22-33) se empleó para desarrollar el método de HPLC.

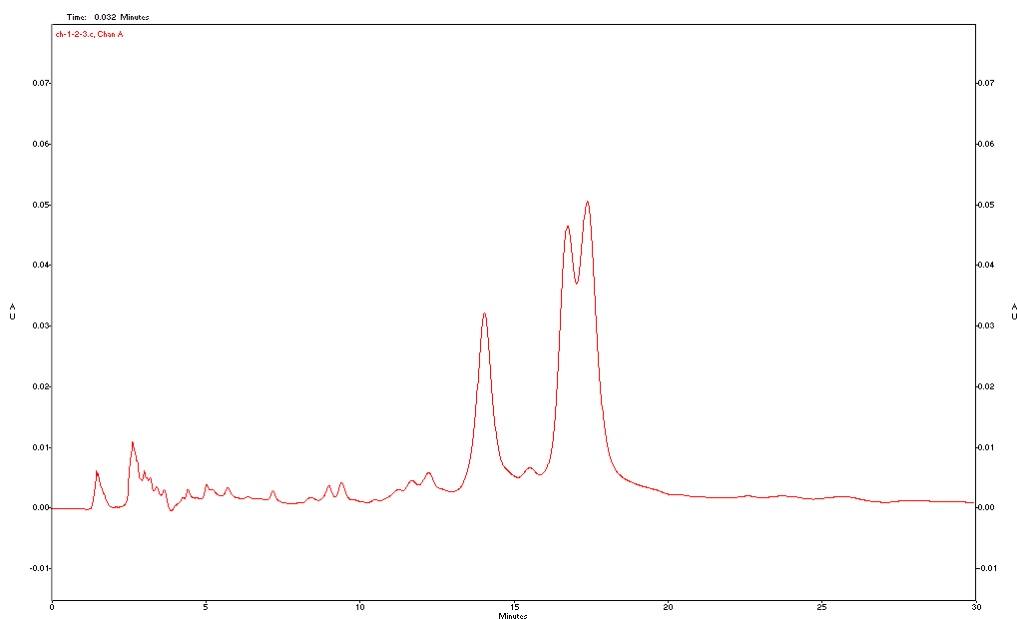
Mediante el empleo de los métodos de HPLC descritos en la sección de Metodología, primero separando con acetonitrilo:agua y posteriormente con metanol:agua, se obtuvieron finalmente tres ACG puras a partir de la semilla de *Annona cherimolia* Mill y una ACG de *Annona muricata*. Como se mencionó anteriormente, esta última se usó para la validación del método debido a su mayor pureza (Figura 7). En la Figura 9 se muestran los cromatogramas pertenecientes a las ACGs obtenidas de *Annona cherimolia* Mill.

Las muestras, denominadas 1F1, 2F2 y 3F2, presentan tiempos de retención de 14.08, 16.767 y 17.417 min, respectivamente, y las cantidades obtenidas finalmente fueron de 20, 78 y 23 mg, respectivamente. Para corroborar que las fracciones colectadas en los tiempos de retención señalados correspondían efectivamente a muestras diferentes, se preparó una mezcla de las muestras 1F1, 2F2 y 3F2 colectadas previamente y se realizó una nueva cromatografía en HPLC bajo las mismas condiciones de separación, observándose la presencia de las tres ACGs con sus respectivos tiempos de retención (Figura 10). Aplicar este criterio fue necesario en virtud de que los tres compuestos presentan *Rf* idénticos en ccf, así como espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  muy semejantes.



**Figura 9.** Cromatogramas correspondientes a las tres ACGs obtenidas de la semilla de *Annona cherimolia* Mill.





**Figura 10.** Cromatograma correspondiente a la mezcla de las tres ACGs obtenidas de la semilla de *Annona cherimolia* Mill

### 6.3 Determinación estructural de las ACG aisladas de *A. muricata* y *A. cherimolia* Mill

#### 6.3.1 Consideraciones generales

Dadas las características estructurales de las ACG, su determinación estructural debe hacerse con sumo cuidado debido a que las variaciones espectrales pueden ser mínimas entre estructuras diferentes. A pesar de que sus estructuras son aparentemente simples, en virtud de sus largas cadenas no ramificadas, su complejidad deriva fundamentalmente de las amplias posibilidades de isomería posicional derivada de la presencia de grupos funcionales o sustituyentes a lo largo de la cadena. Esta complejidad se ve severamente acentuada debido a la presencia de centros estereogénicos, incrementando con ello el

reto de una elucidación estructural inequívoca; esto explica que la información estereoquímica proporcionada se limite sólo a la configuración relativa en la gran mayoría de la ACG descritas actualmente.

Para extraer información de configuración absoluta se tiene la opción de aplicar el método extendido de Mosher,<sup>71</sup> pero éste adolece de varias limitaciones debido a las dificultades de interpretar los resultados de desplazamientos químicos inducidos si no se tiene la certeza en la asignación inequívoca del espectro de RMN correspondiente. No obstante, los avances más notables en este sentido han sido gracias a las síntesis estereoselectivas logradas exitosamente en los últimos años,<sup>72,73</sup> ya que el control estereoquímico logrado en las transformaciones clave genera certidumbre al conocer de manera inequívoca la estereoquímica absoluta del intermediario o producto final. La información estereoquímica así generada se está tomando como referencia para extrapolarla en el proceso de elucidación estructural de nuevas ACGs naturales.

Por otro lado, debido a la consistencia cerosa de las ACGs es muy difícil obtener cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos-X, de tal manera que esta técnica está prácticamente marginada como una herramienta útil en el estudio estructural de ACG.

Las dos herramientas analíticas más útiles para la determinación estructural de ACG son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masa (EM). La primera, en las frecuencias de hidrógeno (<sup>1</sup>H) y de carbono (<sup>13</sup>C), brinda la posibilidad de conocer el tipo de sustituyentes y grupos funcionales presentes en la estructura, y con un análisis cuidadoso de las integraciones en la frecuencia de <sup>1</sup>H, en combinación con algunas técnicas en la frecuencia de <sup>13</sup>C (APT, DEPT), es posible obtener el peso molecular de la sustancia en estudio. Por supuesto que también es una herramienta de elección para

extraer información estereoquímica relativa y, como se mencionó anteriormente, aunque con ciertas reservas, información estereoquímica absoluta. Adicionalmente, donde hay más limitaciones para aplicar esta técnica es definitivamente en la isomería posicional, ya que habiendo un buen número de grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) adyacentes a cierto sustituyente o grupo funcional la información de conectividad que comúnmente es resuelta por interacciones escalares (constantes de acoplamiento) o dipolares (efecto  $n\text{Oe}$ ) se diluye por el aglomeramiento en desplazamientos químicos de los grupos  $\text{CH}_2$  mencionados.

Definitivamente, los problemas de conectividad son abordados con eficiencia usando las técnicas apropiadas de espectrometría de masa de baja y, sobre todo, de alta resolución (EM-BR y EM-AR, respectivamente). La composición exacta de la molécula es posible gracias a la EM-AR, siendo actualmente un criterio ampliamente aceptado para establecer la fórmula mínima en el estudio de ACG. En general, las diversas técnicas disponibles en EM son el pilar para establecer con certidumbre la composición exacta de una ACG y para establecer confiablemente la posición relativa de los sustituyentes y grupos funcionales a lo largo de la cadena alifática. En definitiva, la combinación de esta información con la obtenida mediante la aplicación de las técnicas adecuadas de RMN hace posible que la elucidación estructural de ACG sea una tarea confiable.

### **6.3.2 Propuestas estructurales de las ACGs aisladas de *A. muricata* y de *A. cherimolia* Mill (2F2 y 2F3)**

De las tres acetogeninas aisladas de *A. cherimolia* se hizo el estudio estructural en las clasificadas como 2F2 y 2F3 debido a que la 1F1 no presentó la pureza adecuada, según su espectro de RMN  $^1\text{H}$ , para su estudio confiable por EM. Los resultados de análisis espectroscópico de las dos ACGs mencionadas, junto con la ACG aislada de *A. muricata*, se describen enseguida.

### 6.3.2.1 Datos de ultravioleta (UV) y de infrarrojo (IR)

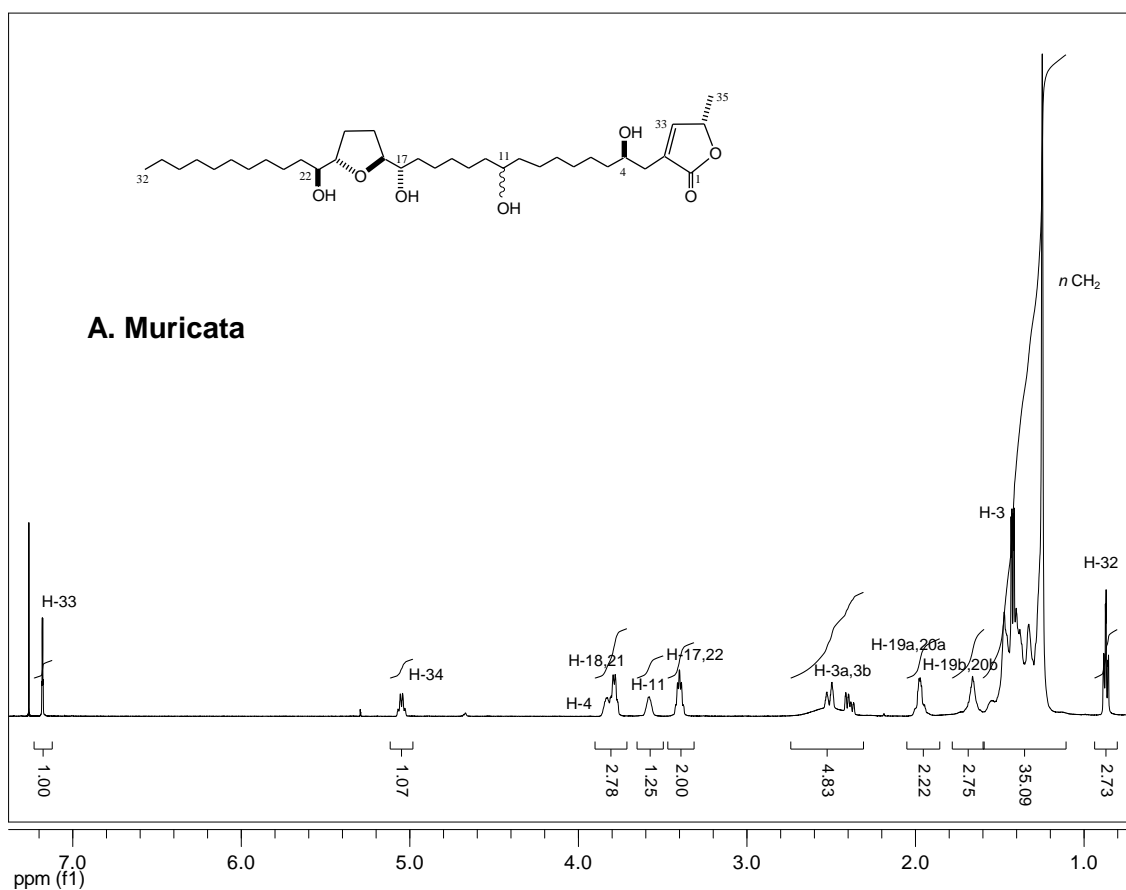
Los espectros de UV de las tres ACG presentan una absorción máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) a 220 nm, misma que sirvió como frecuencia de detección en su purificación por HPLC. Los espectros de IR muestran una banda de absorción intensa en  $1755 \text{ cm}^{-1}$  característico de un grupo C=O conjugado, sugiriendo la presencia de una  $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada que distingue a la gran mayoría de las ACGs.

### 6.3.2.2 Análisis de los espectros de RMN $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ y el uso de criterios de desplazamiento químico para la asignación de configuración relativa

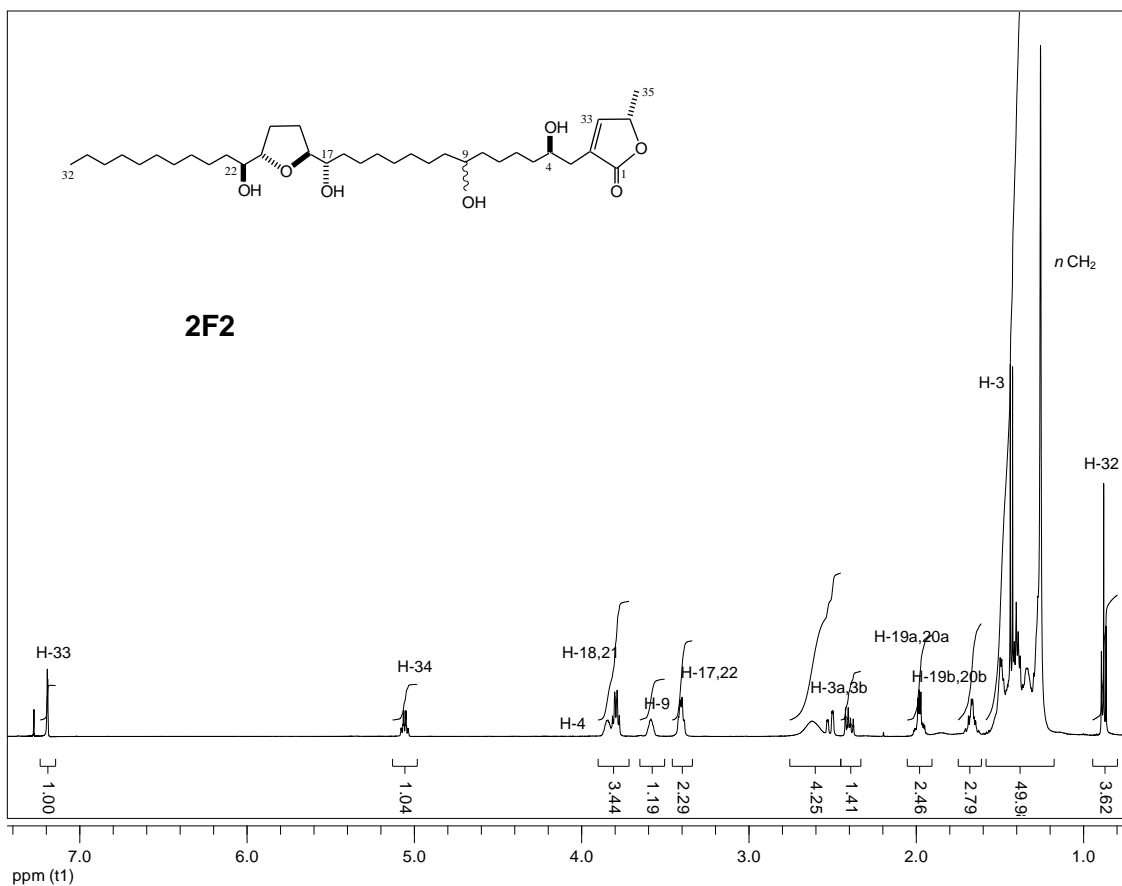
Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las tres ACGs son prácticamente indistinguibles (Figuras 11, 12 y 13), habiendo solo pequeñas variaciones en los desplazamientos químicos entre sus señales, denotando con ello su similitud estructural. En consecuencia, sólo se describirán los detalles espectrales del espectro de la Figura 11, perteneciente a la ACG que proviene de *A. muricata*, debido a que los espectros restantes poseen las mismas características generales de desplazamientos químicos y multiplicidades.

De campo bajo hacia campo alto, aparece en 7.19 ppm una cuarteto ancho ( $J = 1.5 \text{ Hz}$ ) perteneciente a un protón vinílico en posición 4 de un sistema conjugado con acoplamiento alílico equivalente con tres protones; su desplazamiento químico y su multiplicidad (en este caso acopla con un grupo  $\text{CH}_2$  y un CH) confirman la presencia de la  $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada descrita anteriormente. Hacia 5.03 ppm muestra un cuarteto de cuartetos ( $J = 7.2, 1.5 \text{ Hz}$ ) originada por el protón base de oxígeno de la lactona, el cual presenta acoplamiento vecinal con el grupo Me y con el protón vinílico, así como acoplamiento homoalílico con el metileno en C-3. En la región de bases de oxígeno, de 3.30 a 3.85 ppm, aparecen 4 grupos de señales que integran, de campo bajo a campo

alto, para 1, 2, 1 y 2 protones, respectivamente. En todos los casos las señales que integran para 1 protón son señales anchas que no aportan información de conectividad por acoplamiento escalar, mientras que las otras señales aparecen como cuarteto (2F2) y quintetos (*A. muricata* y 2F3) anchos denotando un acoplamiento equivalente ( $J = 6.8$  Hz para el que aparece alrededor de 3.7 ppm, y  $J = 5.5$  Hz para el cercano a 3.3 ppm) con tres y cuatro hidrógenos, respectivamente.

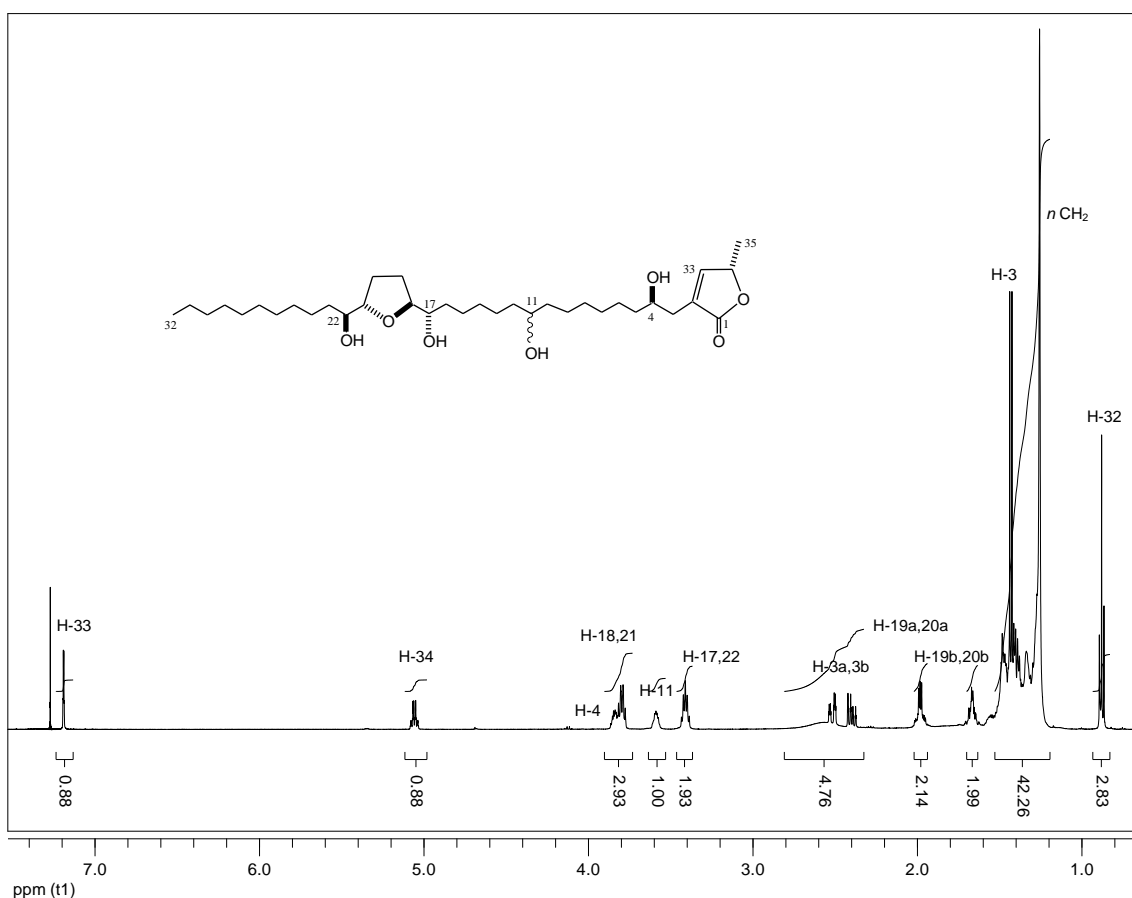


**Figura 11.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la ACG aislada de *A. muricata*



**Figura 12.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la ACG 2F2 aislada de *A. cherimolia*

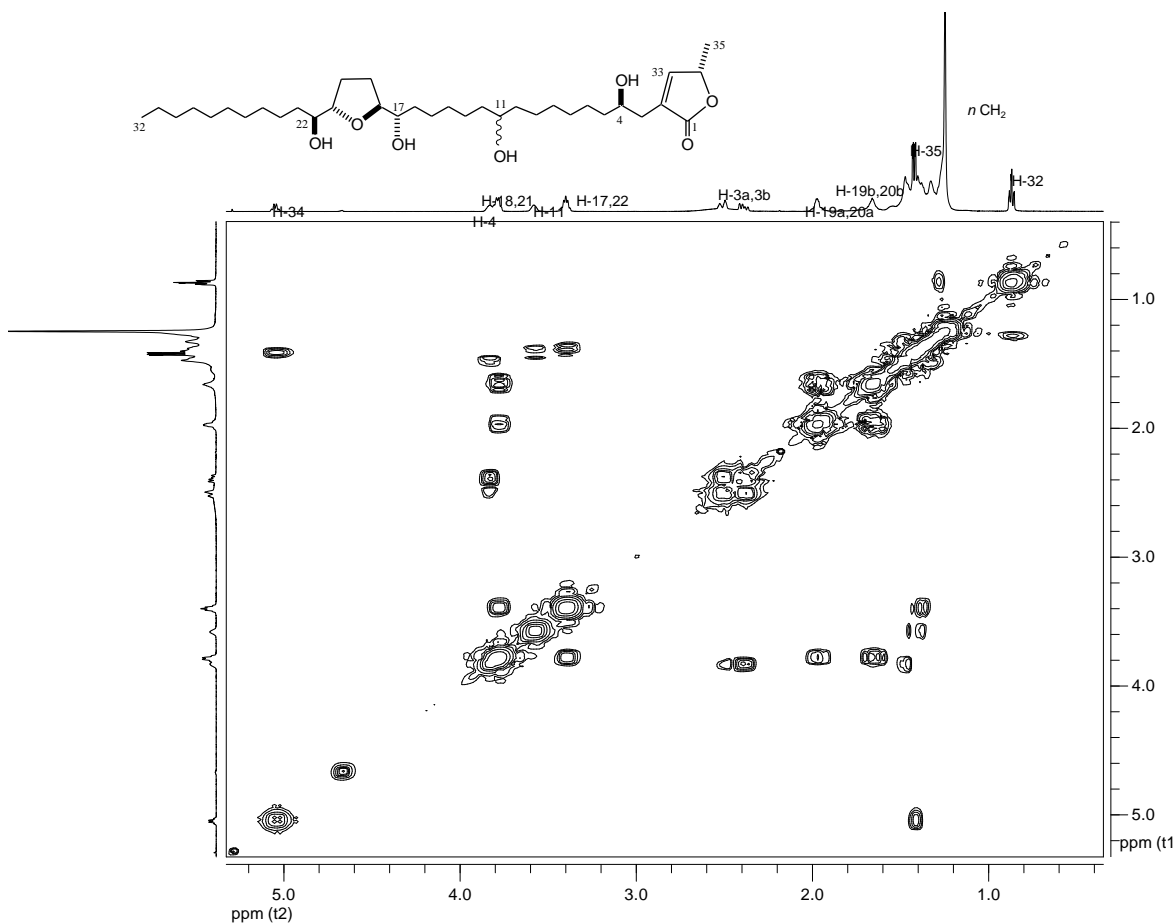
El número de hidrógenos en esta región, seis, aunado a sus características en multiplicidad sugirieron fuertemente la presencia de una ACG con un anillo de tetrahydrofurano (THF) y cuatro grupos oxhidrilo, dos de ellos flanqueando al anillo de THF. Los datos en la literatura<sup>74</sup> confirmaron este arreglo de grupos funcionales, corroborando además que la señal cuádruple de 3.7 ppm pertenece a las bases de oxígeno del anillo de THF y los de 3.3 ppm a las bases de oxígeno de los grupos OH adyacentes al THF. Así mismo, la base de oxígeno que aparece alrededor de 3.8 ppm es característica de un grupo OH en C-4.



**Figura 13.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la ACG 2F3 aislada de *A. cherimolia*

Las señales de algunos de los grupos OH por lo general aparecen entre 2.4 y 2.8 ppm, y algunos otros se sobreponen con el conjunto de señales que aparecen entre 1.2 y 2.0 ppm. Entre 2.3 y 2.6 ppm aparece en todos los casos la parte AB ( $J = 15$  Hz) de un sistema ABX (considerando sólo los acoplamiento geminal y vecinal) perteneciente al metileno en C-3. La presencia del grupo metilo secundario de la lactona se confirma por la señal doble ( $J = 6.8$  Hz) que aparecen cerca de 1.4 ppm, en tanto que el Me terminal de la cadena alifática se puede observar en la señal triple ( $J = 6.9$  Hz) de 0.85 ppm. El resto de las señales pertenecen a grupos CH<sub>2</sub>.

El espectro de correlación homonuclear (COSY, de sus siglas en inglés) de la ACG de *A. muricata*, mostrado en la Figura 14, permitió establecer algunas conectividades. Entre las correlaciones más destacadas se encuentran las de las señales cuádruples que aparecen en 3.3 y 3.7 ppm, confirmando la presencia del anillo de THF flanqueado por dos grupos OH. También las correlaciones de los protones base de oxígeno del anillo de THF con los multipletes cercanos a 2.0 y 1.63 ppm permitió determinar que estos últimos pertenecen a los metilenos del mismo anillo. La presencia del grupo OH en C-4 quedó también confirmada por la correlación entre el grupo metileno en C-3 (2.3 y 2.6 ppm) con la base de oxígeno que aparece cerca de 3.82 ppm, la cual pertenece a H-4.

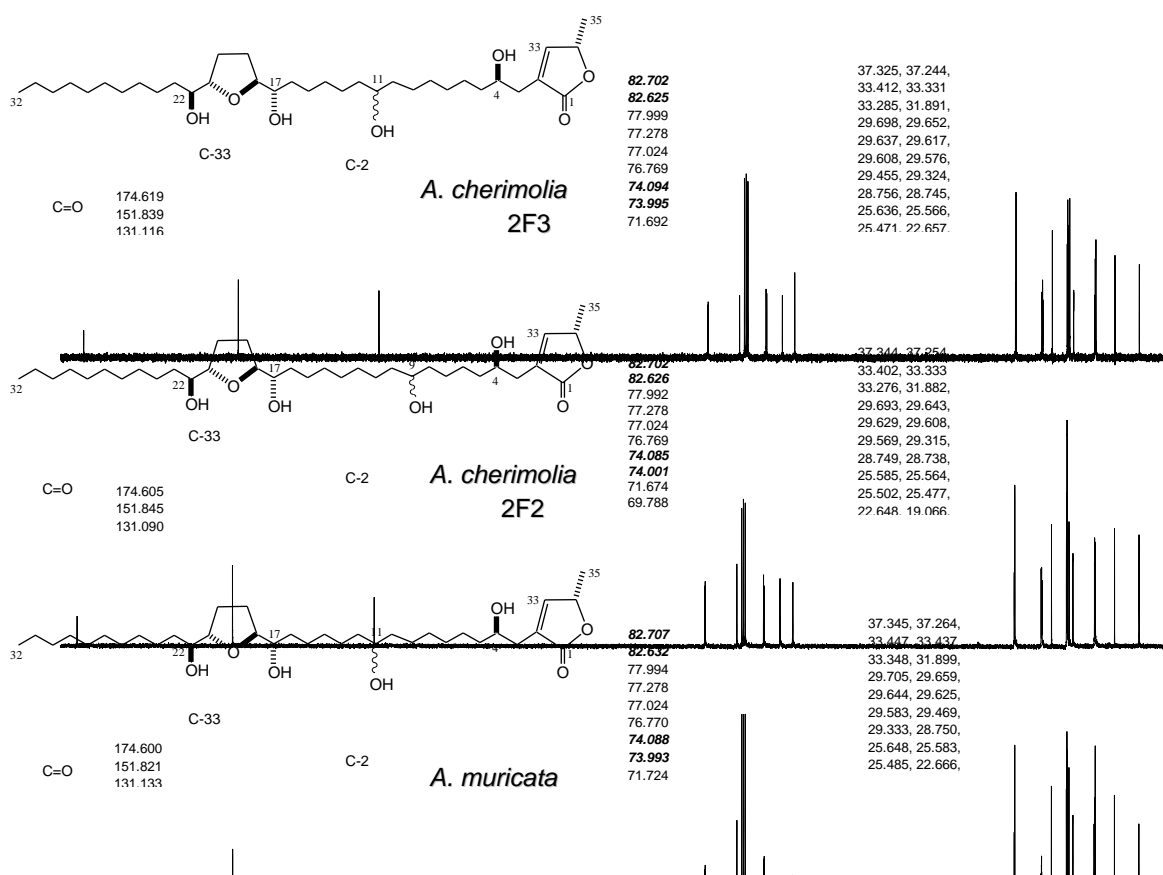


**Figura 14.** Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la ACG aislada de *A. muricata*



La correlación de la base de oxígeno que aparece alrededor de 3.6 ppm con grupos metilenos centrados en 1.4 ppm hace suponer que un grupo oxhidrilo se encuentra insertado en una parte de la cadena alifática. En el anexo se muestran los espectros COSY para 2F2 y 2F3.

Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de las tres ACG (Figura 15) son también muy similares, solo mostrando variaciones pequeñas en desplazamientos químicos. Entre las señales más significativas que revelan la presencia de grupos funcionales se encuentran el grupo  $\text{C}=\text{O}$  (174 ppm), los carbonos del doble enlace conjugado (151 y 131 ppm) y entre 68 y 83 ppm aparecen las señales de 7 carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$  base de oxígeno.



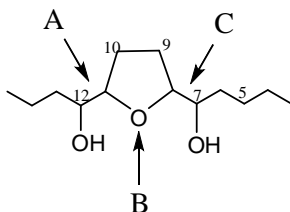
**Figura 15.** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de las ACG aisladas de *A. muricata* (abajo), de 2F2 (en medio) y 2F3 (arriba) aisladas de *A. cherimolia*.

Sus correspondientes espectros de correlación heteronuclear a un enlace (Ver Figuras en anexo), obtenidos por detección inversa (gHSQC), permitieron la asignación de un buen número de carbonos protonados, entre los que destacan aquellos que soportan grupos funcionales (doble enlace, bases de oxígeno), los adyacentes a estos grupos y los grupos Me. Dada la dificultad de diferenciar la gran mayoría de los grupos metileno (CH<sub>2</sub>) en los espectros de RMN <sup>1</sup>H, genera incertidumbre en la asignación de los mismos grupos en los espectros de RMN <sup>13</sup>C, aún usando la información del espectro de correlación heteronuclear a un enlace (gHSQC). No obstante, el espectro de correlación heteronuclear a larga distancia (gHMBC, Ver anexo) ayudó a diferenciar algunos de ellos.

Respecto a la información estereoquímica, la RMN se usa más comúnmente en extraer información de configuración relativa en torno a la estereoquímica del anillo de THF, aplicando para ello sólo criterios de desplazamiento químico. En la Tabla 9 se muestran los desplazamientos químicos más representativos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C que se toman como referencia en la asignación de la configuración relativa de ACG mono-THF flanqueadas por grupos OH adyacentes. Aunque la aplicación de este criterio podría no ser concluyente, muchos autores lo utilizan para asignar la estereoquímica relativa de ACG nuevas.<sup>74</sup> En nuestro caso también tomamos en cuenta este criterio, el cual consideramos que podría arrojar información importante con relación a la estereoquímica relativa.

Como se puede apreciar, este criterio podría no ser preciso si se usan sólo los desplazamientos químicos de hidrógeno (RMN <sup>1</sup>H) para diferenciar entre las configuraciones *treo-trans-treo* (*t-t-t*) y *treo-cis-treo* (*t-c-t*), ya que en ambos casos los

**Tabla 9.** Desplazamientos químicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  usados para discriminar entre configuraciones relativas de ACG mono-THF flanqueadas por grupos OH.<sup>74,75</sup>



# Carbono	Configuración relativa*							
	<i>treo-trans-treo</i> A-B-C		<i>treo-cis-treo</i> A-B-C		<i>treo-trans-eritro</i> A-B-C		<i>treo-cis-eritro</i> A-B-C	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
5	-	25.5	-	25.6	-	25.5	-	25.7
6	-	33.4	-	34.0	-	33.2	-	34.2
7	3.41	74.0	3.42	74.3	3.40	74.3	3.44	74.2
8	3.79	82.7	3.82	82.8	3.82	83.3	3.83	82.3
9a	1.98	28.8	1.93	28.1	2.00	28.6	1.92	28.4
9b	1.66		1.74		1.64		1.76	
10a	1.98	28.8	1.93	28.1	1.91	25.2	1.96	24.1
10b	1.66		1.74		1.86		1.80	
11	3.79	82.7	3.82	82.8	3.82	82.2	3.90	82.8
12	3.41	74.0	3.42	74.3	3.88	71.6	3.83	72.1

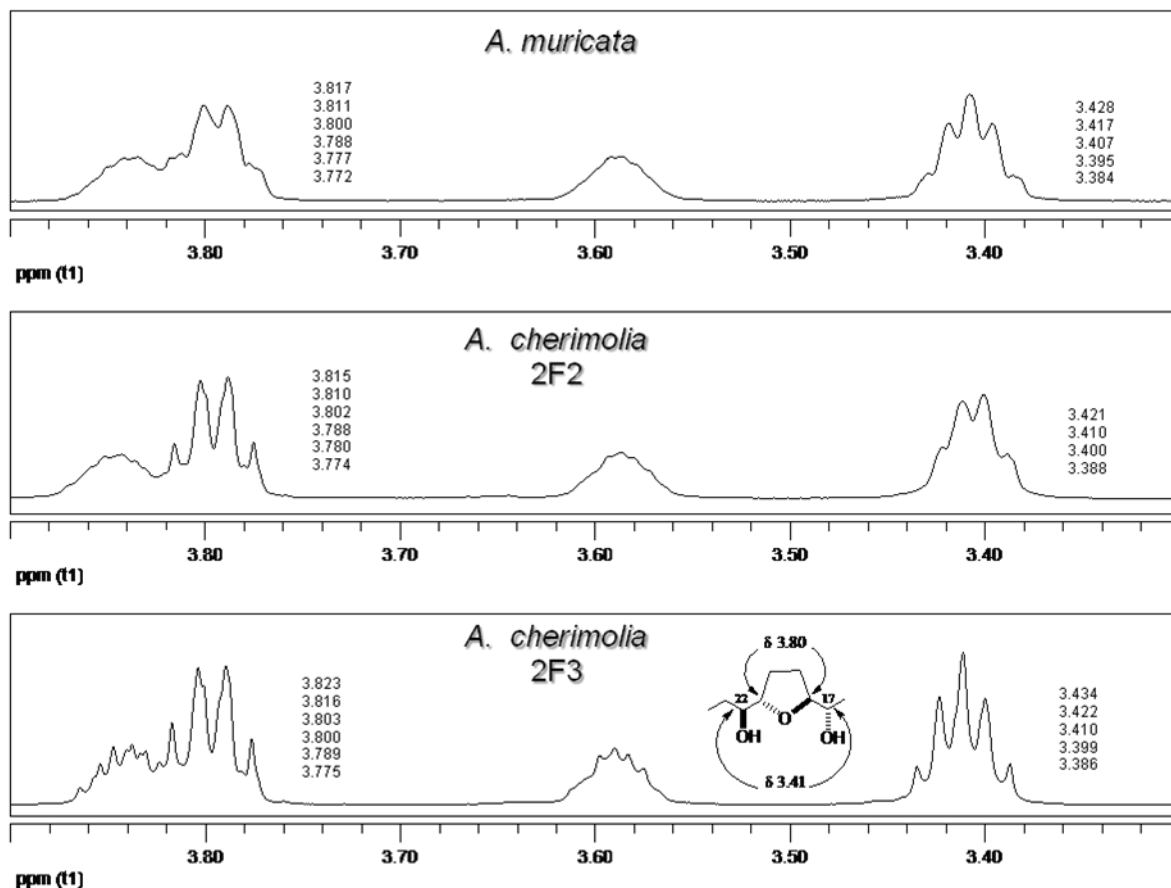
\*Los desplazamientos químicos están tomados usando como referencia TMS y  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. Las letras A-B-C corresponden con la estereoquímica relativa en los fragmentos C12-C11, C11-C8 y C8-C7, respectivamente. La numeración usada en el fragmento molecular mostrado se eligió de manera arbitraria.

desplazamientos químicos de los pares H-7/H-12 (3.41/3.41 para *t-t-t* y 3.42/3.42 para *t-c-t*) y H-8/H-11 (3.79/3.79 para *t-t-t* y 3.82/3.82 para *t-c-t*) son muy parecidos. No obstante, la diferencia en RMN  $^{13}\text{C}$  de 0.3 ppm para los pares de carbonos C-7/C-12, y de 0.1 ppm para los pares C-8/C-11, entre los arreglos configuracionales *t-t-t* y *t-c-t* pueden ser usados con mayor certidumbre para diferenciarlos entre sí. Analizando las

configuraciones *treo-trans-eritro* (*t-t-e*) y *treo-cis-eritro* (*t-c-e*), ambas pueden diferenciarse con las dos primeras debido a que éstas presentan un mayor nivel de simetría que las últimas, lo cual ocasiona que los desplazamientos químicos en RMN  $^1\text{H}$  de los pares H-7/H-12, o H-8/H-11, sean ahora marcadamente diferentes. Lo mismo ocurre en RMN  $^{13}\text{C}$ , pues, por ejemplo, ahora el estereoisómero *t-t-e* tiene un desplazamiento de 74.3 ppm para C-7 con respecto a 71.6 ppm de C-12 (Compárense estos valores con los estereoisómeros *t-t-t* o *t-c-t*, en donde no es posible diferenciar los desplazamientos químicos de H-7 y H-12 o C-7 y C-12).

Aplicando los criterios anteriores se pudieron establecer las configuraciones relativas del anillo de THF y los carbonos base de los grupos OH adyacentes a éste. De acuerdo a los espectros de RMN  $^1\text{H}$  para las acetogeninas en discusión (2F2, 2F3 y la proveniente de *A. muricata*), se puede apreciar claramente que los desplazamientos químicos de los hidrógenos base de los grupos OH que flanquean al anillo de THF no se pueden diferenciar, y la misma situación se da en los desplazamientos químicos de las respectivas bases de oxígeno del anillo de THF (Figura 16). Esto significa que los estereoisómeros *t-t-e* y *t-c-e* pueden descartarse en virtud de que en estos casos los desplazamientos químicos para los hidrógenos mencionados deberían ser diferentes. En la Figura 16 se muestra una ampliación de la región comprendida entre 3.30 y 3.90 ppm que corresponde a la zona donde aparecen los protones base de furano y de las bases de los grupos OH adyacentes, mostrando en ellas sus frecuencias de absorción respectivas, en ppm. Cabe observar que en los casos de *A. muricata* y 2F3 las bases de grupos OH aparecen como quintetos anchos debido a que presentan acoplamiento vecinales cercanos en magnitud con los hidrógenos de los grupos CH, CH<sub>2</sub> y OH. Como se puede observar, los desplazamientos químicos son prácticamente idénticos entre las tres acetogeninas, lo cual significa que poseen la misma configuración relativa en el fragmento

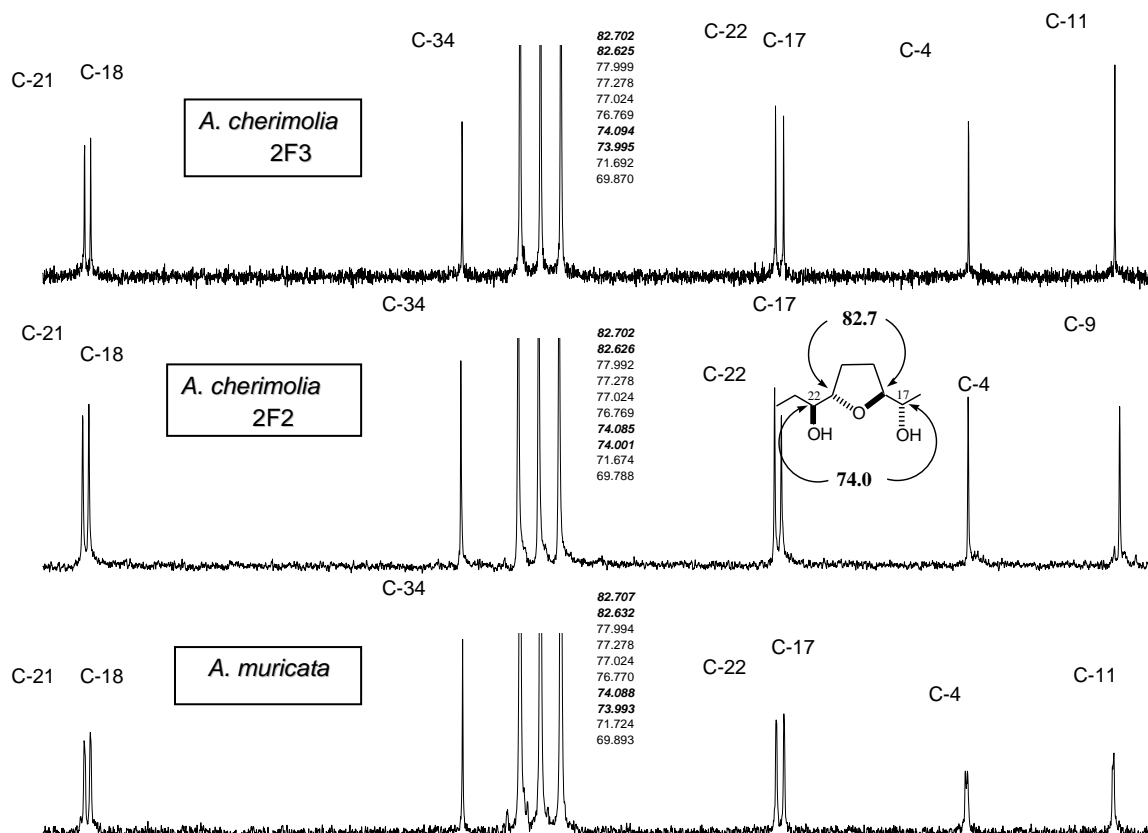
en cuestión. Ahora bien, las configuraciones relativas *t-t-e* y *t-c-e* pueden descartarse debido a las razones de simetría mencionadas anteriormente. Finalmente, para descartar entre las configuraciones relativas *t-t-t* y *t-c-t* las pequeñas diferencias en desplazamiento químico en RMN  $^1\text{H}$  son menos confiables, por lo que se recurrió al análisis de los desplazamientos químicos de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 16.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  que muestran los desplazamientos químicos de los protones bases de THF y bases de los grupos OH adyacentes al anillo, los cuales se utilizaron para determinar la esteoquímica relativa.

En la Figura 17 se muestran los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de las ACG *A. muricata*, 2F2 y 2F3, ilustrando solo la región de los carbonos base de oxígeno. Los desplazamientos químicos que ocuparemos para este análisis son los correspondientes a las bases de oxígeno del anillo de furano ( $\sim 82$  ppm) y a las bases de los grupos OH adyacentes a éste ( $\sim 74$  ppm). De acuerdo a la Tabla 9, en el estereoisómero *t-t-t* los desplazamientos químicos

promedio para las bases de oxígeno son 82.7 ppm y para las bases de oxígeno adyacentes son 74.0 ppm, mientras que para el estereoisómero *t-c-t* son 82.8 y 74.3 ppm, respectivamente. Los desplazamientos químicos encontrados en las presentes acetogeninas para los mismos carbonos son en promedio 82.7 y 74.0 ppm, los cuales coinciden plenamente para una configuración relativa *t-t-t*.



**Figura 17.** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  que muestran los desplazamientos químicos de los protones bases de THF y bases de los grupos OH adyacentes al anillo, los cuales se utilizaron para determinar la estereoquímica relativa.

Por otro lado, la determinación de la configuración absoluta no se ha intentado en estas ACGs, pero cabe mencionar que aparentemente por razones biogenéticas la gran mayoría de las ACGs que poseen el anillo de la lactona y un grupo oxhidrilo en C-4 presentan estereoquímica absoluta (*S*) y (*R*), respectivamente.<sup>75</sup> Por las mismas razones, consideramos que las presentes ACGs poseen la estereoquímica anterior.

Probablemente, en un futuro próximo se abordará la determinación de la configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en las ACG aisladas en este trabajo aplicando el método de Mosher extendido, pero ahora usando nuevos análogos de Mosher desarrollados en nuestro grupo de trabajo.

### **6.3.2.3 Determinación de la composición exacta y de la isomería posicional mediante el análisis de los espectros de masa de alta y baja resolución**

Es bien conocido que las ACGs generalmente poseen 35 o 37 átomos de carbono, y el método más preciso para obtener esta información es mediante el análisis de las muestras por espectrometría de masa, ya sea de alta o de baja resolución. En nuestro caso recurrimos a la técnica de alta resolución para conocer la composición exacta de nuestras moléculas. Las tres muestras se analizaron en un equipo marca Jeol Modelo GCmate por impacto electrónico. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Como se puede observar, las tres ACGs corresponden con la fórmula mínima  $C_{35}H_{64}O_7$  por lo que poseen una relación estructural isomérica. Cabe notar que las ACGs 2F2 y 2F3 dieron un resultado de masa molecular más uno ( $M^+ + 1$ ), más exacta que la de *A. cherimolia*. No obstante, los iones generados por las subsecuentes pérdidas de 4 moléculas de agua en los tres compuestos están claramente definidos en sus respectivos espectros de masa. En las Figuras 18-20 se muestran los espectros de masa de alta resolución de la acetogenina aislada de *A. muricata*, de 2F2 y de 2F3, respectivamente junto con sus fórmulas estructurales y los fragmentos resultantes de la pérdida de agua.

### a) Acetogenina 2F3

012109\_GZV\_2F3\_300\_600\_SM(1)  
ATHACH11\_300\_600\_SM(1)  
Scan : 141-144 TIC : 1034544 Base : .1%FS #ions : 921  
Selected Isotopes : H(0-64)C(0-35)O(0-7)  
Allowable Error : 20 mmu

Measured Mass	% Base	Formula	Calculated Mass	Error (mmu)
<b>597.4732</b>	35.5%	<b>C35H65O7</b>	<b>597.4730</b>	0.2

---

### b) Acetogenina 2F2

012609\_GZV\_2F2\_500\_700  
2F2\_500\_700  
Scan : 90-95 TIC : 1045294 Base : .1%FS #ions : 923  
Selected Isotopes : H(0-64)C(0-35)O(0-7)  
Allowable Error : 20 mmu

Measured Mass	% Base	Formula	Calculated Mass	Error (mmu)
<b>597.4729</b>	30.1%	<b>C35H65O7</b>	<b>597.4730</b>	-0.1

---

### c) Acetogenina de *A. muricata*

012709\_GZV\_Amuricata\_500\_700  
Amuricata\_500\_700  
Scan : 85 TIC : 703808 Base : .6%FS #ions : 274  
Selected Isotopes : H(0-64)C(0-35)O(0-7)  
Allowable Error : 20 mmu

Measured Mass	% Base	Formula	Calculated Mass	Error (mmu)
<b>596.4670</b>	7.1%	<b>C35H64O7</b>	<b>596.4652</b>	1.8

---

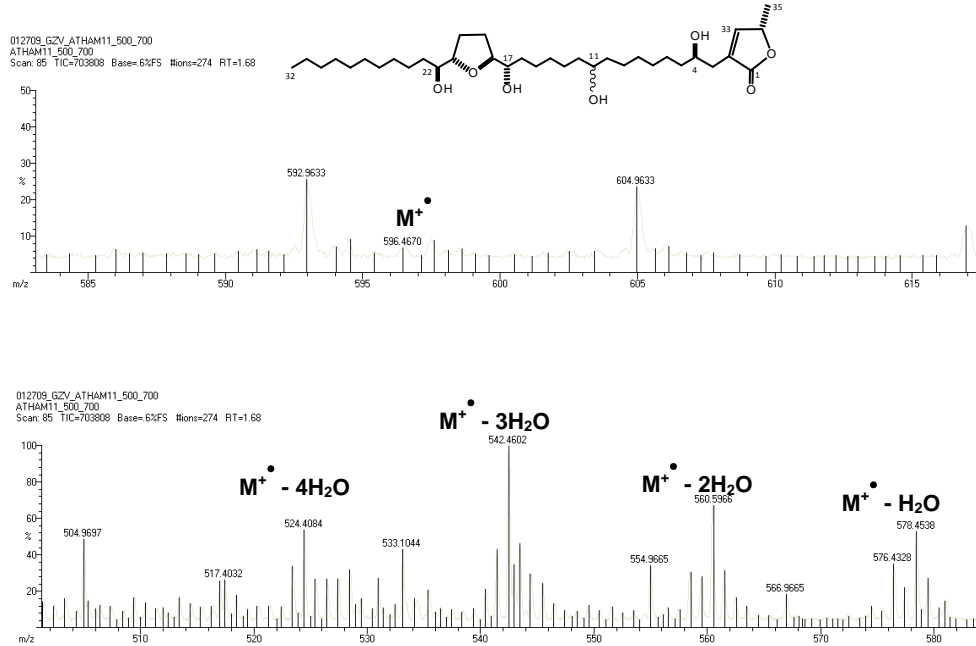
**Tabla 10.** Resultados teóricos y experimentales de las masas de los iones moleculares de las ACGs a) 2F3, b) 2F2 y c) *A. muricata*.

Para obtener información estructural derivada del resto de fragmentaciones se consideraron primeramente los iones que se forman por ruptura directa de un enlace.

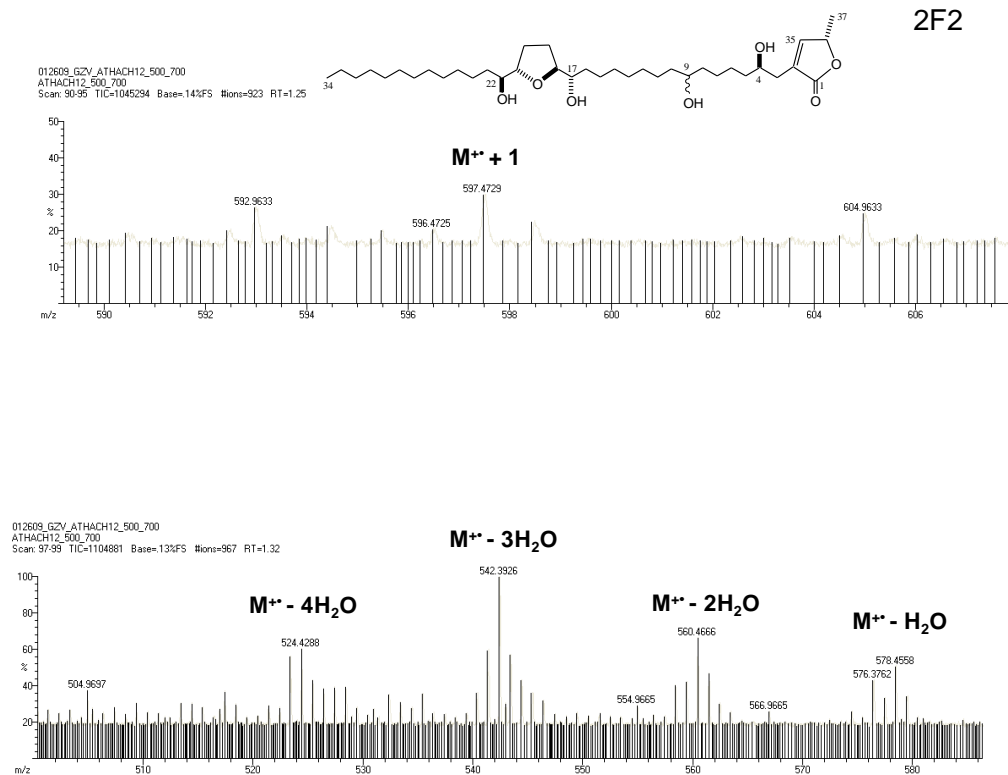
Es bien sabido que los sitios más comunes donde toman lugar dichas rupturas es en los enlaces adyacentes a los heteroátomos (en este caso oxígenos) debido a la mayor



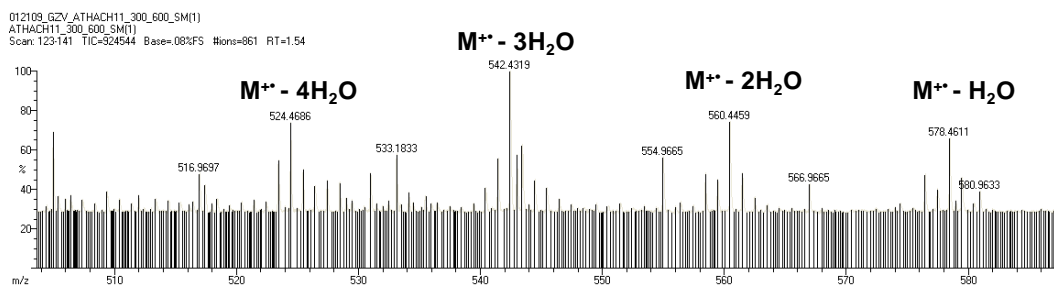
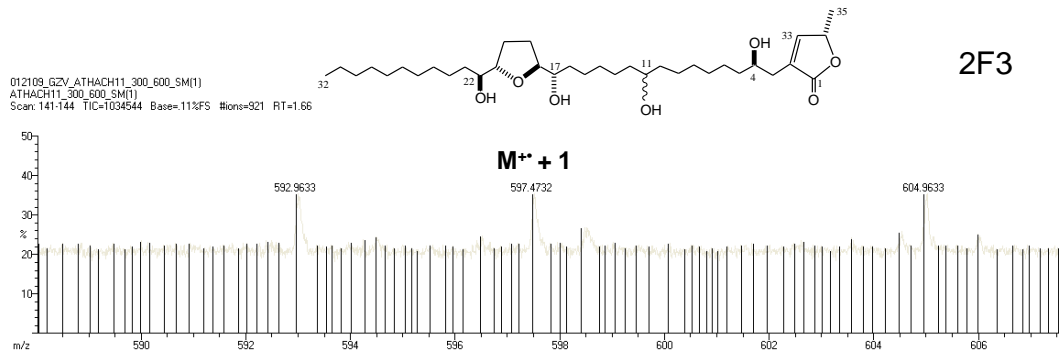
*A. muricata*



**Figura 18.** Fórmula molecular y espectros de masa de alta resolución (EM-AR) de la ACG aislada de *A. muricata* mostrando las masas exactas del ión molecular y de los iones generados por la pérdida consecutiva de hasta 4 moléculas de agua.



**Figura 19.** Fórmula molecular y espectros EM-AR de la ACG 2F2 aislada de *A. cherimolia* mostrando las masas exactas del ión molecular y de los iones generados por la pérdida consecutiva de hasta 4 moléculas de agua.



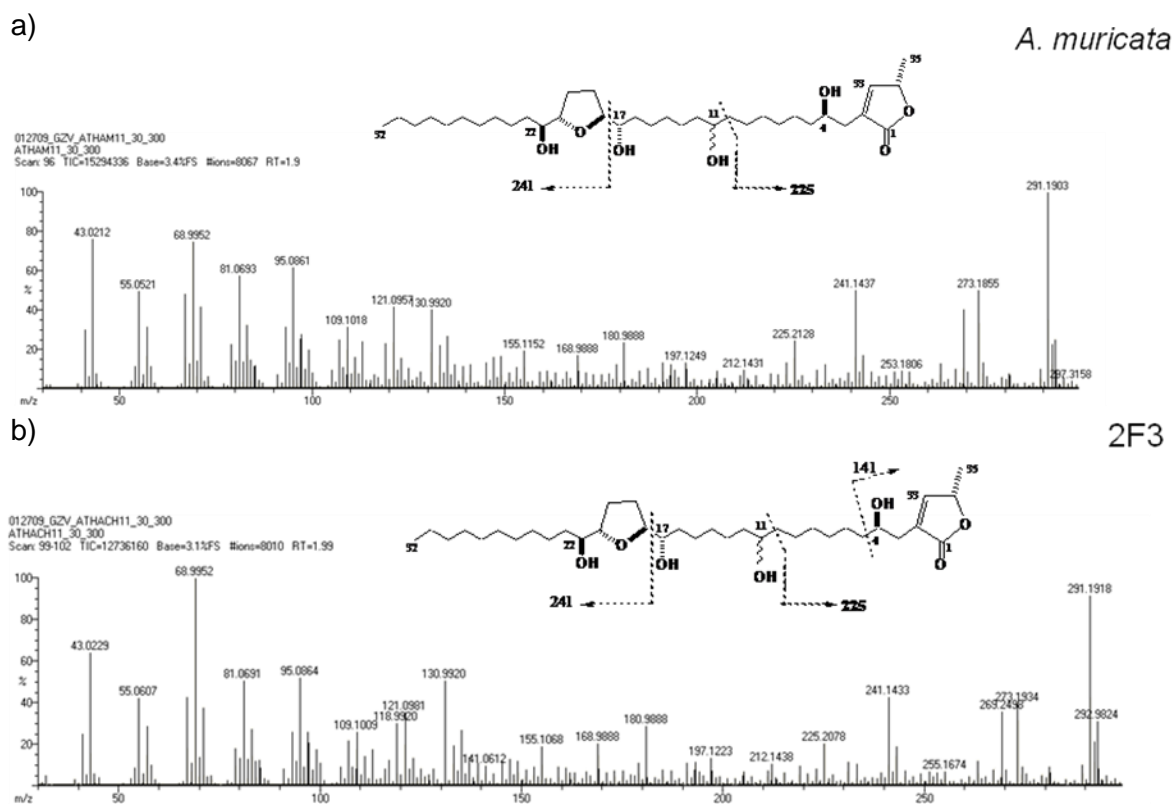
**Figura 20.** Fórmula molecular y espectros EM-AR de la ACG 2F3 aislada de *A. cherimolia* mostrando las masas exactas del ión molecular y de los iones generados por la pérdida consecutiva de hasta 4 moléculas de agua.

estabilidad de los iones así generados. En base a lo anterior, los iones obtenidos en los espectros de cada compuesto fueron correlacionados con las rupturas esperadas para diferentes isómeros posicionales. Es decir, de los datos espectroscópicos anteriores se conocía con certidumbre que las acetogeninas poseen una fórmula condensada de  $C_{35}H_{64}O_7$ , que está presente un anillo de gama-lactona, que existe un solo anillo de THF con dos oxhidrilos que lo flanquean y que hay un par de oxhidrilos más, uno de ellos ubicado con certeza en C-4. Por lo tanto, la correlación de los iones observados con los sitios de ruptura involucró cambiar sistemáticamente la posición del anillo de THF con sus dos oxhidrilos a lo largo de la cadena alifática, haciendo lo mismo con el cuarto oxhidrilo. En cada posición se calcularon los iones que se formarían por ruptura directa y se compararon sus masas con las observadas en los espectros respectivos.

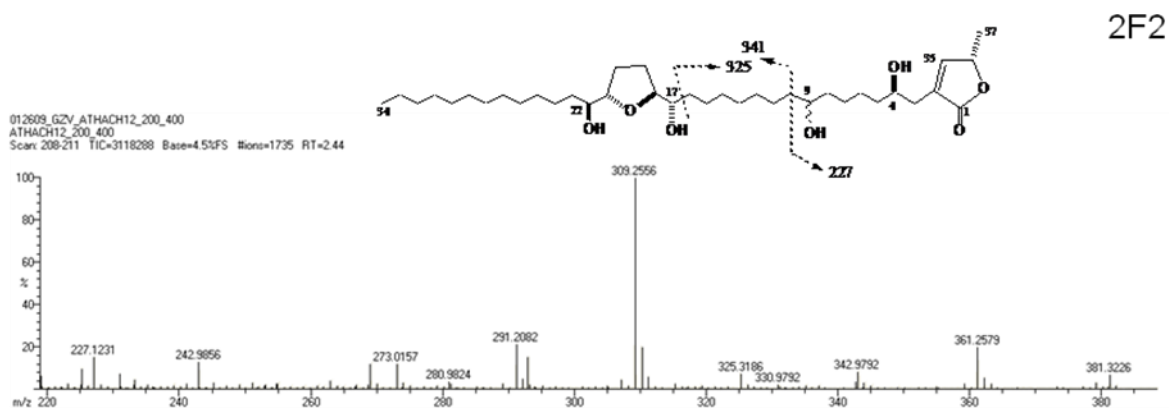
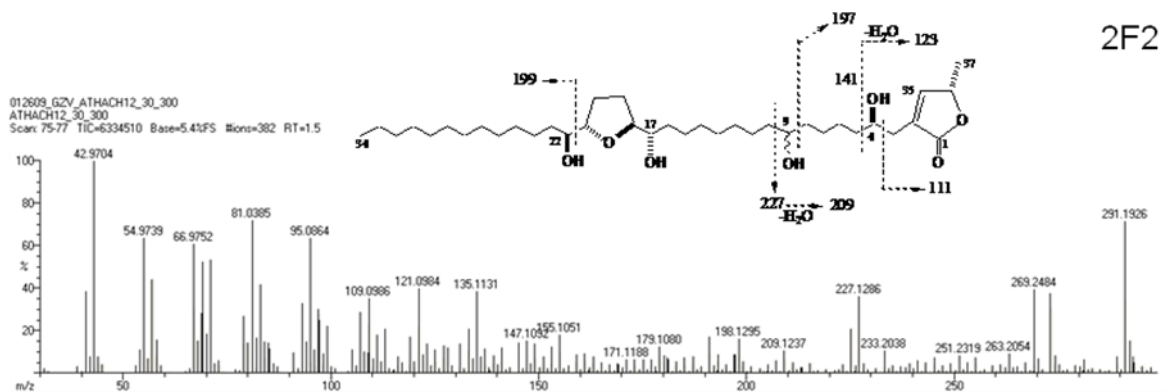
Después de hacer las permutas posibles, se encontró que en las tres ACGs hubo fragmentos que ubicaron al anillo de THF y sus oxhidrilos cercanos en las posiciones C-18 y C-21 para los carbonos base de oxígeno del THF, y los grupos OH adyacentes en C-17 y C-22 (Figuras 21 y 22). Un análisis similar permitió proponer la ubicación del cuarto grupo OH: en las ACG 2F3 y en la proveniente de *A. muricata* se encontraron las masas de algunos iones que lo ubican en C-11; en el caso de 2F3 se encontraron fragmentos que lo posicionan en C-9 (Figura 22). Este resultado es en cierta manera consistente con los desplazamientos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrados por el carbono que soporta este oxhidrilo, pues en el caso de 2F3 y en la ACG aislada de *A. muricata* los desplazamientos químicos son muy similares (69.870 y 69.893 ppm, respectivamente), mientras que en 2F2 el desplazamiento químico es menor (69.788 ppm) que el de los anteriores (Figura 17).

Resumiendo los resultados del análisis espectroscópico podemos concluir que las ACGs 2F2 y la aislada de *A. muricata* poseen la misma composición y conectividad, y que además su estereoquímica relativa es *t-t-t*. Por lo tanto, la diferencia estructural entre estas dos acetogeninas muy probablemente se deba solo a un cambio epimérico en C-11, aunque esto es arriesgado de suponer por la falta de argumentos experimentales adicionales. Respecto a la acetogenina 2F3, se puede concluir que también posee una estereoquímica relativa *t-t-t*, que la posición del anillo de THF también se localiza en C-18/C-21, y que su diferencia estructural con las dos anteriores reside en que el cuarto grupo OH se encuentra en posición C-9.

Cabe mencionar que después de una revisión bibliográfica en la base de datos de SciFinder no se encontró alguna estructura que coincida con las obtenidas en este trabajo.



**Figura 21.** Espectros EM-AR mostrando los iones de fragmentaciones más representativas de las ACG de *A. muricata* (arriba) y de 2F3 (abajo) que permitieron establecer la posición de los grupos THF y OH a lo largo de la cadena alifática.



**Figura 22.** Espectros EM-AR mostrando los iones de fragmentaciones más representativas de la ACG 2F2 aislada de *A. cherimolia* que permitieron establecer la posición de los grupos THF y OH a lo largo de la cadena alifática.

## **6.4 Evaluación de la toxicidad de una ACG obtenida de las semillas de *Annona muricata* en un estudio subcrónico *in vivo***

### **6.4.1 DL<sub>50</sub>**

La dosis letal media para la ACG de *Annona muricata* fue de 2.7 mg/kg. La administración del compuesto durante la evaluación de este parámetro produjo la disminución del peso corporal un 20% en los individuos 24 h después de la administración, con un periodo de recuperación de tres días.

La determinación de este parámetro permite definir cuan tóxica es una sustancia y por cuál de las vías de penetración en el organismo es más efectiva, generalmente se emplea para la clasificación de las sustancias con base al riesgo potencial de alterar la salud y se definen como la dosis cuya administración causa la muerte al cincuenta por ciento de los individuos que la reciben y se expresa en mg de la sustancia por Kg de peso<sup>70</sup>.

Por ejemplo, organizaciones internacionales como la CEE enuncian en el Real Decreto 2.216/1985 dentro del acuerdo de la Directiva 92/32/CEE sobre la declaración de sustancias nuevas, su clasificación, envasado y etiquetado, las dosis y vías de administración para la clasificación de las nuevas sustancias como se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Clasificación de sustancias según la DL<sub>50</sub>.

CATEGORÍA	DL <sub>50</sub> Oral rata (mg/Kg)	DL <sub>50</sub> Cutánea rata o conejo (mg/Kg)	CL <sub>50</sub> Inhal rata (mg/L)
Muy tóxica	menor a 25	menor 50	0,50
Tóxica	20-200	50-400	0,5-2
Nociva	200-2.000	400-2.000	2-20

Realmente son pocos los antecedentes referentes al empleo de ACG en estudios *in vivo*, sin embargo, se puede mencionar que la toxicidad observada por estos compuestos depende de la estructura química y la composición de la muestra evaluada, por ejemplo, en un estudio tipo agudo donde se administró el extracto etanólico de una Annonacea (*Annona crassiflora* Mart), el intervalo de prueba fue de 10-160 mg/Kg y para un estudio del mismo tipo realizado con una mezcla de ACG obtenidas de *Annona cherimolia* Mill la DL<sub>50</sub> fue de 6 mg/Kg<sup>76</sup>.

Para el caso de la ACG en cuestión se presentó una DL<sub>50</sub> de 2.7 mg/Kg situándola dentro de los compuestos altamente tóxicos de acuerdo al criterio mencionado anteriormente, este valor sirvió como pauta para la elección de las dosis a emplear en el estudio subcrónico realizado y reafirma que el efecto de un compuesto está relacionado con factores como la composición de la muestra administrada y la estructura química de los compuestos involucrados.

La evaluación de la DL<sub>50</sub> para productos naturales es relevante considerando que estos representan el 50% de los compuestos de uso clínico en los países desarrollados<sup>2</sup> y que

en forma tradicional la población tiende a consumirlos considerando sus propiedades farmacológicas sin una evaluación toxicológica previa que permita su empleo de forma segura.

#### **6.4.2 Genotoxicidad**

La Figura 23 se construyó con los valores promedio de la frecuencia de MN presentes en 2000 ENC cuantificados por individuo, los grupos fueron monitoreados cada semana durante el estudio. Los datos presentados en la Figura 23 muestran el promedio para los grupos evaluados  $\pm$  el error estándar y fueron tratados estadísticamente con las pruebas ya mencionadas.

En general, se obtuvieron resultados negativos en la prueba de MN para todos los grupos evaluados. El grupo administrado con el vehículo (EtOH 0.5 %) mantuvo el promedio de ENCMN de 2 y en el grupo administrado con AOM tampoco se generó un incremento significativo en la producción de ENCMN entre las muestras evaluadas respecto al grupo administrado con el vehículo manteniéndose el valor entre 2.5 y 3.5.

Para el caso de los grupos administrados con AOM + ACG de *Annona muricata* en las tres dosis (0.07, 0.17 y 0.76 mg/kg) el promedio de los ENCMN se mantuvo entre 1.5 y 2.5.



Considerando que los daños sobre el ADN y su fijación mediante mutaciones o daños cromosómicos son considerados generalmente como esenciales en el proceso multietapas de la carcinogénesis, las pruebas de genotoxicidad han sido empleadas en las últimas décadas para la identificación de químicos que puedan inducir daños genéticos en forma indirecta o directa<sup>51</sup>.

En el caso de los compuestos carcinógenos no genotóxicos una infinidad de mecanismos de acción han sido descritos, dentro de los que se incluye un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que dañan el ADN, los lípidos y las proteínas<sup>67</sup>. En el caso del AOM uno de los intermediarios finales de su biotransformación es el ion metildiazonium, especie altamente reactiva responsable de alquilaciones sobre macromoléculas, el cual es un paso esencial para la iniciación de tumores<sup>61</sup>.

Los resultados obtenidos tras la administración del AOM en la prueba de MN indican que el mecanismo mediante el cual este compuesto induce las lesiones preneoplásicas no implica una relación directa sobre el ADN, ya que el resultado fue negativo manteniendo el número de los ENCMN en un valor promedio de 2.5.

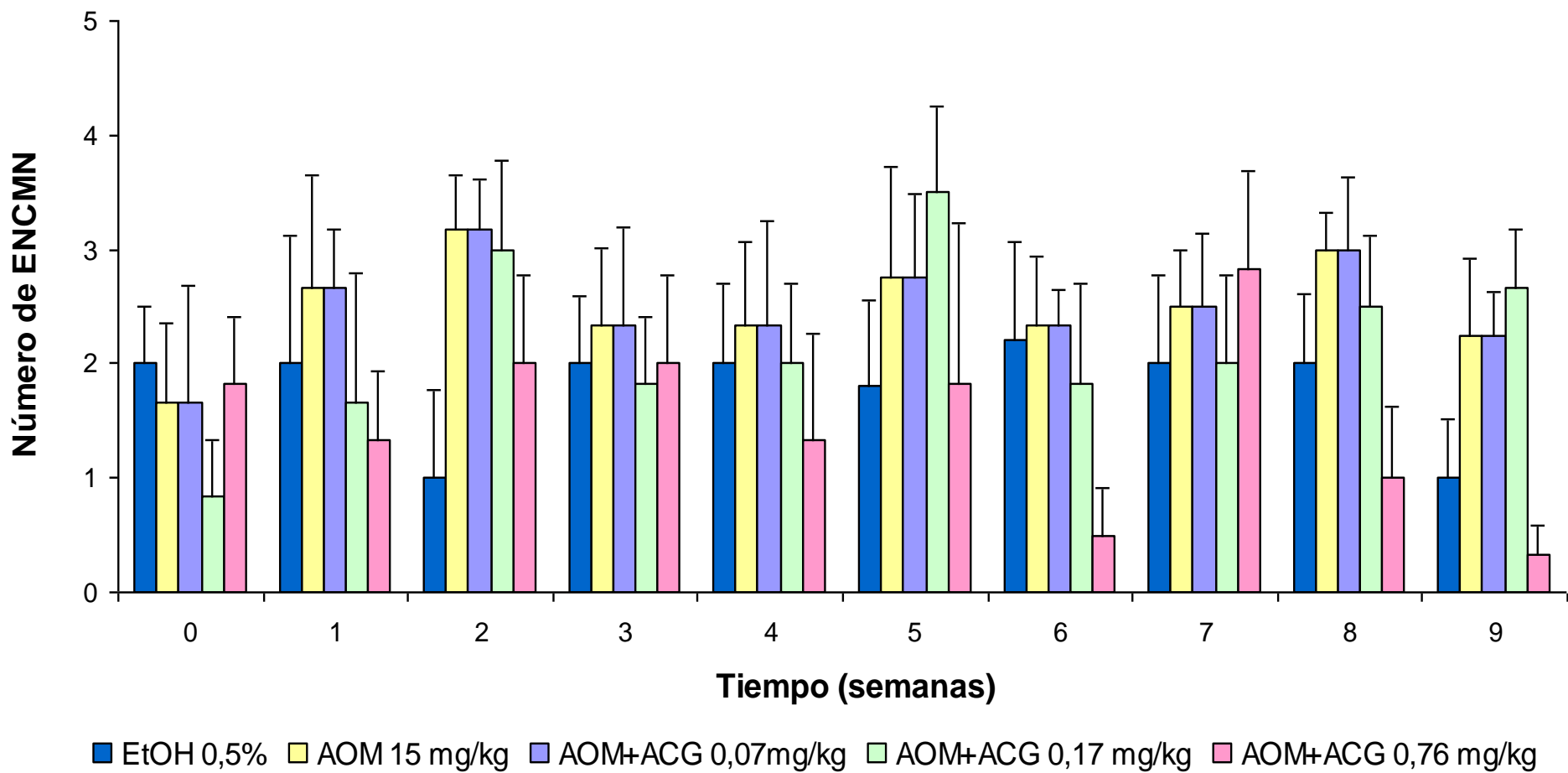
Este mismo efecto fue observado en un estudio tipo agudo<sup>76</sup>, lo cual corrobora que al menos en la dosis de 15 mg/Kg y en el esquema de administración empleados este compuesto no es genotóxico, lo que es consistente con lo reportado en la prueba de Ames realizada donde el resultado también fue negativo y con los mecanismos propuestos para la iniciación de tumores empleando este compuesto.

Respecto a los estudios de genotoxicidad realizados para las ACG los reportes indican que el resultado depende de diversos factores como las características del compuesto evaluado, la dosis y el tiempo de exposición.

Por ejemplo, para un estudio *in vitro* empleando la prueba de Ames se obtuvo un resultado negativo y en el caso de estudios tipo agudo *in vivo* se reportó un efecto negativo en la prueba de MN empleando un extracto etanólico de *Annona crassiflora* Mart, sin embargo, en un estudio del mismo tipo pero empleando una fracción definida de ACG de *Annona cherimolia* con dosis cercanas a la  $DL_{50}$  la respuesta fue positiva<sup>76</sup>, efecto esperado de acuerdo al modo de acción propuesto para este tipo de compuestos el cual involucra el bloqueo del Complejo I de la cadena mitocondrial de transporte de electrones que puede generar estrés oxidativo dando origen a especies reactivas que interaccionen con el ADN.

En el caso particular de la ACG de *Annona muricata* evaluada en un esquema de administración continua por seis semanas donde las dosis empleadas son subletales, el efecto genotóxico fue negativo. Este tipo de comportamiento es reportado para diversos compuestos como la mitomicina C donde se presentan resultados positivos en estudios a corto plazo y negativos en períodos más largos (28 días) debido a que se emplean dosis por debajo de la  $DL_{50}$  lo cual permite la evaluación de diversos parámetros como biotransformación de los compuestos administrados ó la acumulación en tejidos, así como los efectos en la eritropoyesis<sup>67</sup>.

Los resultados presentan una expectativa positiva al compararlos con lo observado para otros compuestos que se emplean como quimioterapéuticos, como la mitomicina empleada en el tratamiento adenocarcinoma de estomago y de páncreas, así como en el carcinoma de colon y vejiga donde en dosis más bajas que las empleadas<sup>67</sup> en este estudio para la ACG son genotóxicos, lo cual es una desventaja para los compuestos que se emplean actualmente con este fin.



**Figura 23.** Frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados en sangre periférica de ratón.

Se representa el valor promedio de cada grupo  $\pm$  ee.

### 6.4.3 Efecto quimioterapéutico

El cáncer de colon es una de las causas de muerte más comunes actualmente, motivo por el cual se han desarrollado diversas pruebas para el estudio de este padecimiento. Uno de los ensayos que forma parte de la batería de pruebas para el estudio de compuestos que puedan ser empleados para el control y prevención de este cáncer es la observación de FCA<sup>56</sup>.

Los FCA son lesiones preneoplásicas generadas en el colon mediante la administración de compuestos como el AOM, la disminución en la frecuencia de estas lesiones así como en su multiplicidad mediante la administración de un xenobiótico son indicadores del efecto positivo de dicho control sobre la incidencia de FCA<sup>58</sup>.

La Figura 24 presenta el promedio de FCA para cada grupo de trabajo  $\pm$  el error estándar. Los individuos administrados con EtOH al 0.5% mostraron un índice en la inducción de criptas bajo con un valor de 3.8 FCA en el primer monitoreo y de 4.6 en el segundo. En cuanto al grupo administrado con AOM los valores de criptas fueron de 100 y 96 para los dos monitoreos realizados en el estudio.

Para los grupos administrados con AOM+ACG se observa que las tres dosis administradas generan una disminución en el índice de FCA presentes en el colon, la dosis de 0.07 mg/kg reduce 25 % la incidencia de criptas respecto al grupo administrado con el AOM, efecto que es mayor al final del tratamiento generando una disminución del

50%. Estas disminuciones en el índice de criptas son estadísticamente significativas respecto al grupo administrado con el AOM.

Por otro lado, en el grupo de AOM+ACG ( 0.17 mg/kg) se generó una disminución promedio del 50% en el número de FCA la cual es estadísticamente significativa respecto al grupo administrado con el AOM, este valor se observó en los monitoreos realizados a la mitad del tratamiento y al final.

Finalmente, en el grupo administrado con AOM+ACG en la mayor dosis ( 0.76 mg/kg) se redujo inicialmente la incidencia de FCA un 30% respecto al grupo administrado con el AOM, efecto que resulta estadísticamente significativo al final del estudio donde se presenta una disminución del 49% en las criptas presentes.

Además se evaluó la multiplicidad presente en los FCA, el promedio obtenido para cada grupo se presenta en la Tabla 11. Se observó que el grupo tratado con el vehículo de administración (EtOH 0.5%) presentó un valor promedio de criptas de 3.5, siendo todas ellas sencillas en cambio, el grupo administrado con el AOM generó criptas de diversas multiplicidades, siendo mayor la frecuencia de FCA de 3 y 4 criptas.

En los grupos administrados con AOM+ACG en sus diversas dosis se observó una disminución en cuanto a la multiplicidad presente en los FCA. Para el grupo administrado con la dosis de 0.07 mg/kg la disminución en la multiplicidad solo se manifiesta al final del tratamiento siendo en general la multiplicidad de 1 a 2 criptas.

Para las otras dosis evaluadas en los grupos de AOM+ACG (0.17 y 0.76 mg/kg) la disminución en la multiplicidad en las criptas se redujo desde el primer monitoreo siendo mayor la incidencia de criptas de multiplicidad sencilla y doble, eliminándose los FCA con 5 ó más criptas.

Por lo tanto, en este estudio se comprobó la eficiencia de la administración de una ACG en el control de las lesiones preneoplásicas generadas con la administración del AOM.

Las ACG se han probado regularmente *in vitro* sobre líneas celulares cancerosas con buenos resultados debidos a la alta citotoxicidad y la selectividad que presentan por las líneas celulares tumorales debido a los mecanismos de acción mencionados anteriormente. Además debido a que la actividad citotóxica es debida a una respuesta apoptótica por lo cual esta familia de compuestos se vislumbra como una alternativa de agente quimioterapéutico.

No se cuenta con antecedentes del empleo de ACG en estudios *in vivo* a largo plazo, pero los resultados obtenidos demostraron que son una buena alternativa para el control de lesiones preneoplásicas en colon ya que disminuyeron hasta un 70% la incidencia de FCA con la dosis de 0.17 mg/kg y un 50% con las dosis de 0.07 y 0.76 mg/kg respecto al grupo administrado solamente con el AOM.

Además, la disminución observada en la multiplicidad en los FCA es otro punto a favor, ya que se ha observado que algunos agentes recomendados para la prevención y control del

cáncer de colon como las frutas y verduras, así como los agentes antioxidantes tienen la cualidad de actuar no solo sobre la incidencia, sino también sobre la multiplicidad en estas lesiones.

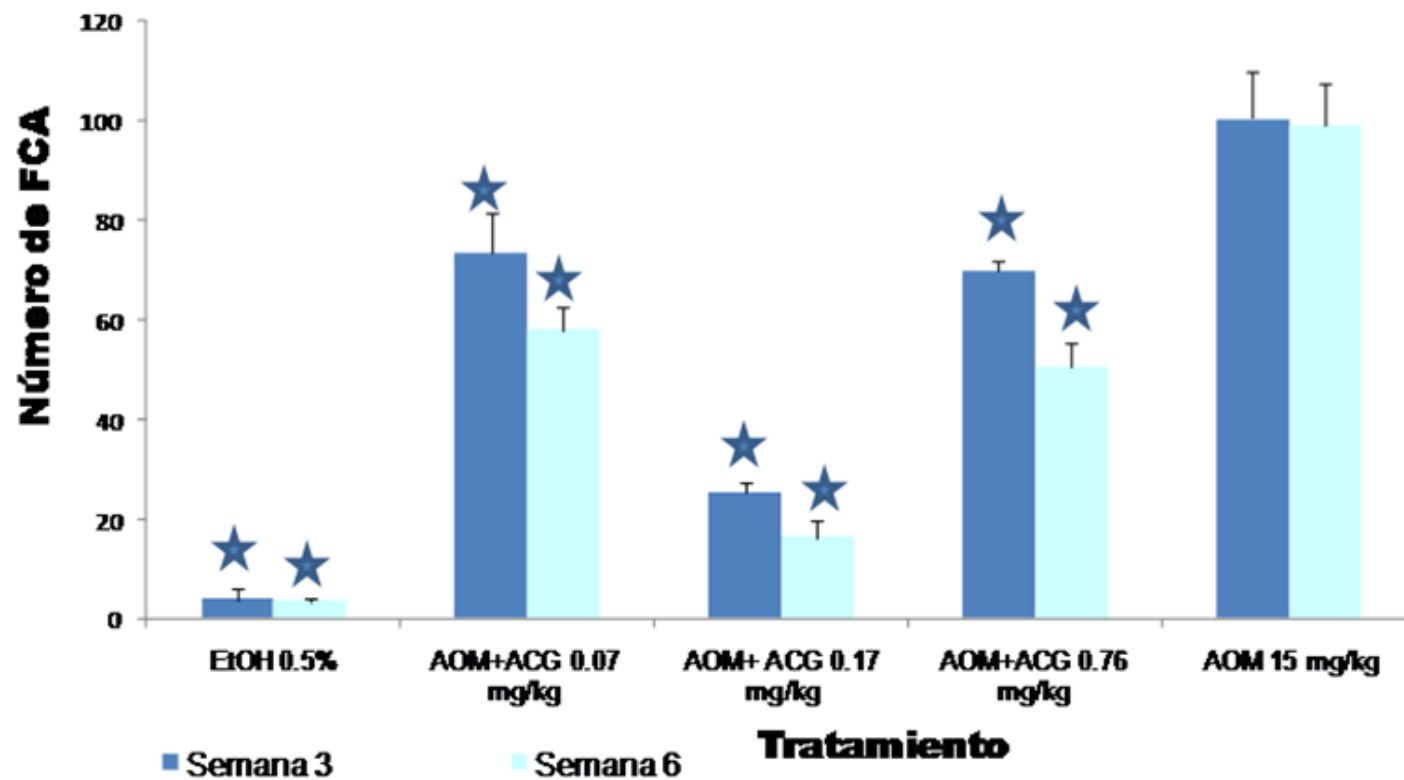
En general se puede decir que el empleo de las ACG para el control de lesiones preneoplásicas en colon es positivo gracias al efecto citotóxico relacionado con la apoptosis, además de no ser genotóxicas en las dosis evaluadas y disminuir considerablemente el efecto del carcinógeno en el colon al reducir la presencia de FCA.

En resumen, la administración del AOM generó FCA y la administración de la ACG redujo la incidencia de FCA presentes en relación al grupo administrado únicamente con el AOM, además también tuvo efecto sobre la multiplicidad en los FCA desarrollados.



**Tabla 11.** Multiplicidad observada en las FCA presentes en colon posteriores a la administración de una ACG tetrahidroxilada de *Annona muricata*.

Tratamiento	Multiplicidad en los FCA								
	1	2	3	4	5	6	7	>7	Criptas totales
<b>Semana 3</b>									
EtOH 0.5 %	0,83	0,33	0,50	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	3,83
ACG 0.07 mg/Kg	12,00	12,17	10,83	5,67	5,67	2,50	0,33	2,00	73,50
ACG 0.17 mg/Kg	6,83	4,33	2,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,00
ACG 0.76 mg/Kg	13,86	5,57	3,57	3,00	2,71	1,57	1,00	0,00	69,67
AOM 15 mg/Kg	12,50	11,33	9,17	4,67	2,50	0,83	0,33	0,00	100,50
<b>Semana 6</b>									
EtOH 0.5 %	2,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,50
ACG 0.07 mg/Kg	15,00	5,57	4,14	1,86	1,14	0,43	0,29	0,00	58,29
ACG 0.17 mg/Kg	9,50	5,00	1,38	1,38	0,25	0,13	0,00	0,00	31,13
ACG 0.76 mg/Kg	9,00	7,17	3,50	2,83	0,83	0,00	0,00	8,00	50,67
AOM 15 mg/Kg	17,67	10,33	7,50	4,50	2,83	0,50	0,17	0,00	99,00



**Figura 24.** Número de focos de criptas aberrantes (FCA ) presentes en el colon. Se presenta el promedio para cada grupo  $\pm$  ee.  
 ★Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo administrado con AOM. Pruebas de ANOVA y Tukey-Kramer.  $P < 0.05$

#### 6.4.4 Citotoxicidad y apoptosis

Como parte del estudio toxicológico se evaluó el efecto que tiene la administración continua de la ACG tras la administración del AOM en la eritropoyesis. El empleo de la técnica de MN permite evaluar el efecto citotóxico de un xenobiótico mediante la relación de EPC/ENC presentes en la sangre periférica<sup>65</sup>.

La Figura 25 muestra el promedio por grupo de trabajo y horarios evaluados para la determinación del número de EPC presentes en 2000 eritrocitos totales (EPC/ENC), relación que como se mencionó es un indicador del efecto citotóxico. Las muestras fueron tratadas estadísticamente del mismo modo que para el caso de genotoxicidad.

Se observó que tanto el grupo administrado con AOM como los grupos administrados con la ACG de *Annona muricata* indujeron un efecto citotóxico al disminuir el número de EPC presentes en sangre periférica.

En el caso del grupo administrado con el AOM disminuyó hasta un 60 % en el número de EPC manteniéndose en un intervalo entre 27-34, esta diferencia fue estadísticamente significativa en relación al grupo administrado con el vehículo. Efecto que se aprecia desde la primera semana de administración.

El AOM es un carcinógeno químico que actúa generando especies altamente reactivas como se ha mencionado anteriormente, estas especies pueden interaccionar de diversos modos con el ADN como en la alquilación de las bases guanidina y timina, que de no ser reparadas mediante los mecanismos correspondientes pueden ocasionar la iniciación de la tumorigenesis, además de que la inestabilidad del material genético promueve la muerte celular<sup>61</sup>. Efecto que se observó tras la administración del AOM, ya que el número de EPC disminuyó hasta un 60% en relación al número de células presente en el estado basal, efecto que se mantiene a lo largo del periodo evaluado.

La administración de la ACG se realizó una vez inducidas las lesiones preneoplásicas en colon. La administración de la dosis más baja (0.07 mg/kg) disminuyó la producción de EPC un 30% manteniendo un valor promedio de 53 EPC, no observando diferencias estadísticamente significativas en relación con el grupo administrado con el vehículo en las últimas 5 semanas del estudio.

Con la segunda dosis evaluada (0.17 mg/Kg), se observó un efecto citotóxico al presentarse una disminución del 52% estadísticamente significativa en relación al grupo administrado con el vehículo, con 25-32 EPC en promedio, valor que se mantiene a lo largo del tratamiento.

Respecto a la última dosis evaluada (0.76 mg/Kg), también presentó un efecto citotóxico variable generando una disminución en la relación EPC/ENC. La diferencia solo resulta

estadísticamente significativa respecto al grupo administrado con el vehículo en las últimas semanas del tratamiento con un valor promedio de EPC de 35.

Respecto a la actividad citotóxica de la ACG evaluada, diversos autores sugieren que dicha actividad se atribuye a los mecanismos de acción de las ACG, ya que bloquean la respiración mitocondrial al inhibir el transporte de electrones a nivel del Complejo I<sup>42</sup>, así como la formación de complejos con el ión  $\text{Ca}^{2+}$ ,<sup>40</sup> lo que estaría indirectamente relacionado con la inhibición de la ubiquinona reductasa. Ambos mecanismos generan un estado de estrés oxidativo con efecto citotóxico.

Los estudios de citotoxicidad *in vitro* realizados para este tipo de compuestos muestran que la actividad depende de la estructura química de la ACG y de la concentración. En relación a los reportes *in vivo* en estudios tipo agudo los resultados muestran que estos compuestos son altamente citotóxicos, ocasionando una depleción en la relación de EPC/ENC del 50% 48 h después de la administración para el caso de ACG de *Annona cherimolia*<sup>76</sup>.

No hay un estudio *in vivo* a largo plazo que pueda emplearse como referencia, sin embargo, el comportamiento citotóxico marcado concuerda con lo indicado en estudios *in vitro* así como en estudios *in vivo* tipo agudo. La actividad reportada es lo esperado considerando que es un compuesto altamente tóxico, sin embargo, el comportamiento no es dosis dependiente, ya que el máximo efecto se presenta con la dosis intermedia donde se presentó una depleción del 50% en la relación de EPC/ENC respecto al grupo

administrado con el vehículo empleando la dosis de 0.17 mg/Kg. El efecto observado quizás esté relacionado con el tiempo de exposición y los mecanismos de acción de las ACG.

Otro de los parámetros monitoreados en el transcurso de este trabajo fue la respuesta de muerte celular debida a la apoptosis. La apoptosis es un mecanismo de defensa celular innata contra la generación de tumores al menos por dos vías: la remoción de células con inestabilidad genómica producida por un agente epigénico y por la eliminación de células que sufrieron daño sobre el ADN debido a un carcinógeno genotóxico<sup>49</sup>.

En este caso se monitoreo la presencia de nucleosomas presentes en la circulación como un indicador de muerte celular por apoptosis, ya que durante la apoptosis varias endonucleasas actúan liberando nucleosomas.

En condiciones normales los nucleosomas se presentan dentro de los cuerpos apoptoticos y son posteriormente fagocitados por los macrófagos o las células vecinas, en situaciones de muerte celular esos mecanismos están sobre expresados y los nucleosomas son liberados a la circulación.

En relación a la determinación de la apoptosis, la Figura 25 muestra el promedio de la absorbancia registrada en los grupos de trabajo presentando un comportamiento semejante al observado en la prueba anterior.

Tanto el AOM como la administración de la ACG de *Annona muricata* indujeron una respuesta positiva al incrementar la absorbancia en las muestras evaluadas siendo este incremento estadísticamente significativo respecto al grupo administrado con el vehículo (EtOH), además la respuesta estuvo en función del tiempo, ya que en la última muestra los datos registrados son mayores.

Como se observa en la Figura 26, el grupo tratado con el AOM generó la respuesta más alta al registrar lecturas de absorbancia de 0.4 y 0.57 en las muestras evaluadas.

El grupo administrado con la menor dosis de AOM+ACG (0.07 mg/kg) presenta absorbancias de 0.13 y 0.08 en los dos periodos evaluados y el grupo administrado con AOM+ACG (0.17 mg/kg) fue el que presentó la respuesta más alta de los grupos administrados con la ACG con valores de 0.184 y 0.152 en las muestras evaluadas, relación que concuerda con lo observado en la determinación de la relación de EPC/ENC donde este grupo fue el de mayor actividad citotóxica.

Finalmente, el grupo administrado con AOM+ACG (0.76 mg/kg) registró incrementos en la absorbancia con valores de 0.12 y 0.08 para los dos monitoreos registrados.

Debido a los mecanismos de acción reportados para las ACG donde se propone el bloqueo de la cadena respiratoria inhibiendo la generación de ATP y promoviendo por tal motivo la muerte celular por apoptosis<sup>46</sup> se esperaba un resultado positivo. Los datos confirmaron que la citotoxicidad generada por la ACG evaluada es por apoptosis, ya que

se presentó un incremento en la formación del complejo nucleosoma-anti-histona al administrar la ACG respecto a los valores presentados en el grupo administrado con el vehículo.

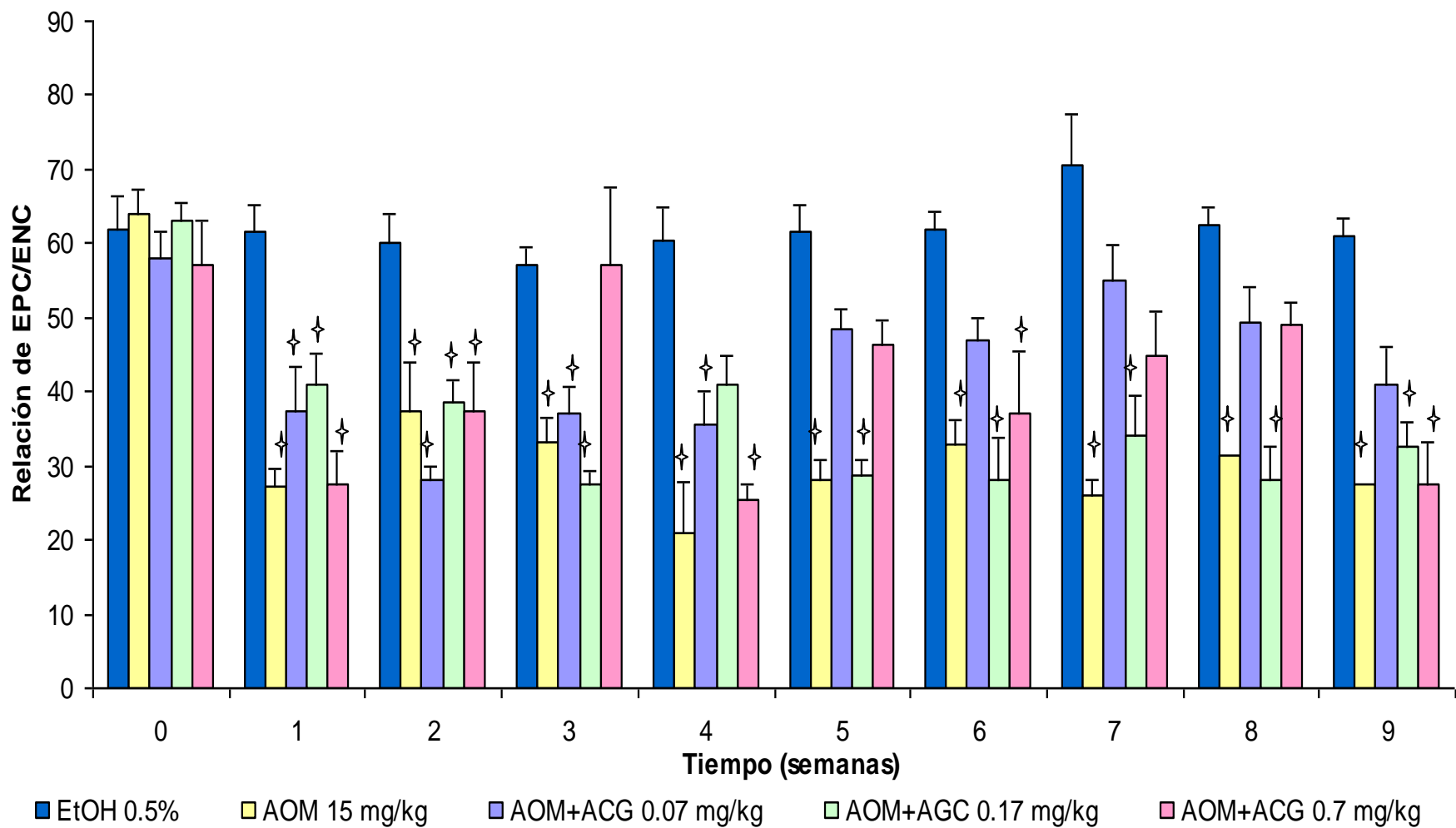
La respuesta observada en esta prueba concuerda con lo reportado en sangre periférica mediante la determinación de la relación EPC/ENC y con lo señalado por diversos autores que mediante estudios *in vitro* han descrito que las ACG en general promueven la muerte celular mediante la activación de rutas apoptóticas involucradas con el control del ciclo celular o con otras rutas bioquímicas como la cadena respiratoria.

El hecho de que esta familia de compuestos promueva la muerte celular por apoptosis es una ventaja considerando que esta es una vía de muerte celular innata que se genera como respuesta contra la generación de tumores, de tal modo que favorece el empleo de las ACG con fines quimioterapéuticos.

En relación al AOM, considerando el mecanismo de acción propuesto por diversos autores donde se indica su acción como carcinógeno no genotóxico y el hecho de que interacciona con las macromoléculas mediante las especies químicas derivadas de su biotransformación<sup>61</sup>, se esperaba una respuesta positiva lo cual concuerda con lo establecido en el resultado de la prueba de ELISA empleada, donde se presentó un incremento significativo en la absorbancia respecto al grupo administrado con el vehículo lo cual indica que parte de la citotoxicidad observada se debe a la apoptosis. Los



resultados concuerdan con otros estudios donde mediante evaluación histológica del colon se ha observado la presencia de células apoptóticas.

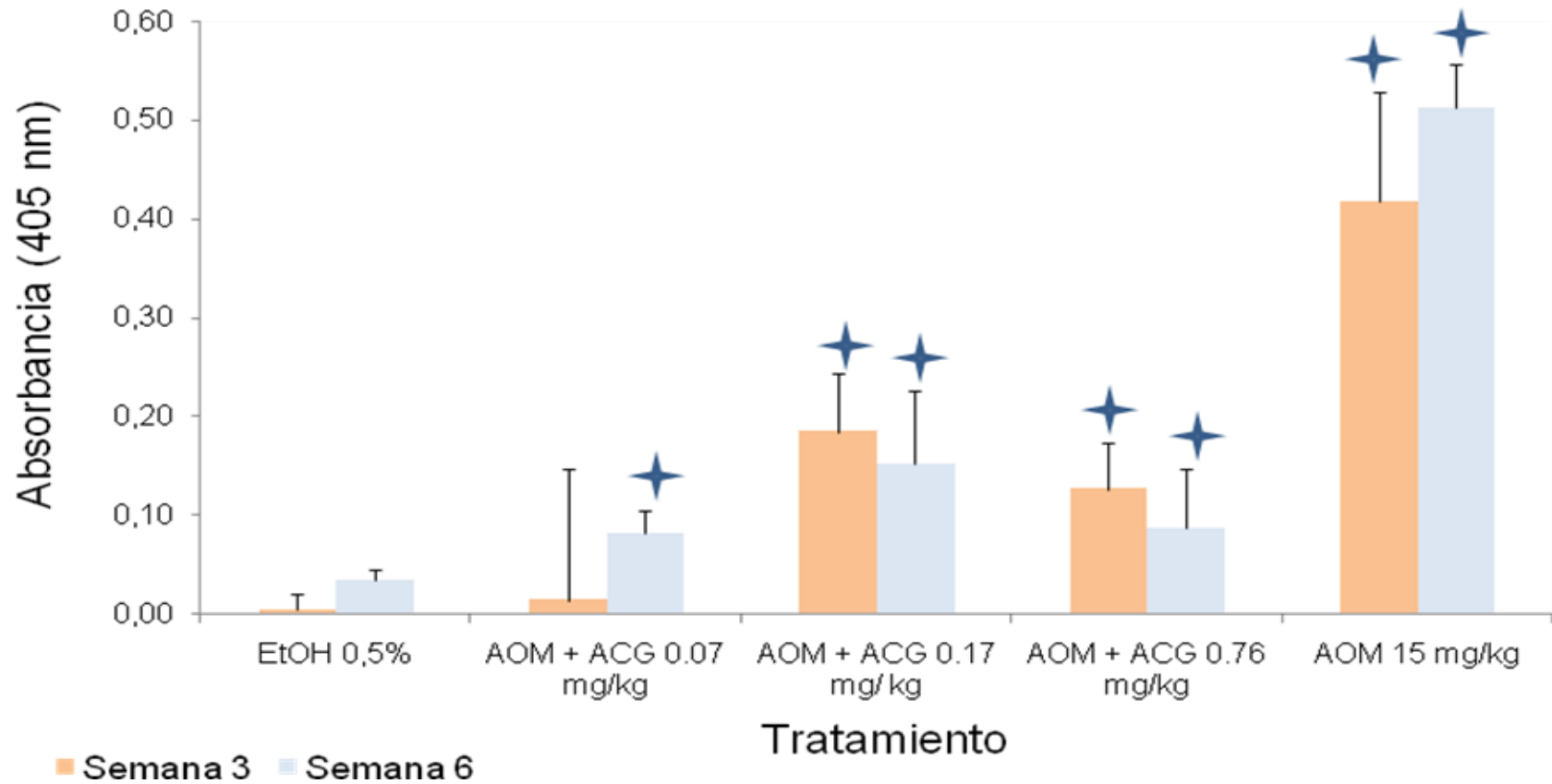


**Figura 25.** Relación de los eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos presentes en sangre periférica de ratón.

Se presenta el promedio de cada grupo  $\pm$  ee.

✦ Diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo negativo.

Pruebas de ANOVA v Tukey-Kramer.  $P < 0.05$ .



**Figura 26.** Análisis de apoptosis inducidas por fragmentación de ADN. Se presenta el promedio de los individuos tratados para cada grupo  $\pm$ ee. Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con EtOH. Pruebas de Anova y de Tukey-Kramer.  $P < 0.05$ .

## 7. Conclusiones

- Se desarrolló y validó un método para la purificación de ACG mediante HPLC.
- Se aislaron tres ACG tetrahidroxilada presentes en la semilla de *Annona cherimolia* Mill. Mediante sus datos espectroscópicos de RMN y de EM se propuso que la acetogenina 2F2 presenta un oxhidrilo en C-9 mientras que 2F3 lo presenta en C-11. Ambas poseen el anillo de furano en C-18/C-21, cuya relación estructural con los grupos OH adyacentes es *t-t*.
- Se aisló una ACG tetrahidroxilada presente en las semillas de *Annona muricata*. De acuerdo a sus datos de RMN y EM, esta acetogenina podría ser epimérica con 2F3, probablemente en C-11.
- Se evaluó la DL<sub>50</sub> para la ACG tetrahidroxilada de semilla de *Annona muricata* siendo de 1.6 mg/kg.
- La ACG evaluada en un estudio subcrónico *in vivo* en ratón no indujo daño genotóxico empleando la prueba de MN.
- La ACG evaluada resultó citotóxica produciendo una depleción del 50% en la producción de EPC presentes en sangre periférica en el estudio subcrónico realizado.
- La ACG evaluada presentó un efecto quimioterapéutico inhibiendo hasta un 50% el desarrollo de las lesiones preneoplásicas inducidas en un modelo murino de cáncer de colon.
- Se observó respuesta positiva en la prueba de apoptosis realizada para citotoxicidad.

## 8. Referencias

1. Colegate, S., Russell, J. Molyneux, J. (1993) Bioactive Natural Products Detection and Isolation. Screening for bioactive metabolites. 10-48.
2. Tulp M., Bohlin, L. (2004) Drug Discovery Today. 9: 250-258
3. Cassady, J. M., Baird, W. M., Chang Ching-Jer. (1990) Natural Products as a Source of Potential Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. J. Nat. Prod. 53: 23- 41
4. <http://www.ecovivero.org/agroforestahuertofamiliar.pdf>
5. Márquez, A. C., Lara, O. F., Esquivel, R. B., Mata E. R. (1999) Plantas Medicinales de México II Composición, uso y Actividad Biológica. Ed. UNAM, México, D.F. 49-51
6. Woo, D., Fotopoulos, S. S., MacLaughlin, J. L. (1999) Annocherin (2,4)-Cis-and trans-annocherinones. J. Nat. Prod. 62: 1250-1255
7. Chen, Chung-Yi, Chang, Fang-Rong, Yen, Hsin-Fu, Wu Yang-Chang. (2001) Amides from Stems of *Annona cherimola*. Phytochemistry. 56: 753-757
8. Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong, Chiu Hui-Fen, Wu Ming-Jung, Wu Yang-Chang. (1999) Aromin-A, an Annonaceous Acetogenin from *Annona cherimola*. Phytochemistry. 51: 429-433
9. Jong Keun Son, Dal Hwan Kim, Hee Woo. (2003) Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. J. Nat. Prod. 66: 1369-1372
10. Dal Hwan Kim, Eun Sook Ma, Kui Duk Suk, Jong Keun Son, Jong Soon Lee, Mi Hee Woo. (2001) Annomalin and Annocherimolin, New Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* Seeds. J. Nat. Prod. 64: 502-506.

11. Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong, Pan Wen-Bin, Wu Yang-Chang. (2001) Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*.56: 753-757
12. Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong and Wu Yang-Chang. (1998) Cherininaine, a Novel Dimeric Amide from the Stems of *Annona cherimola*.*Tetrahedron Lett.* 39: 407-410
13. Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong and Wu Yang-Chang. (1997) Cherimoline, a Novel Alkaloid from the Stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Lett.* 38: 6247-6248
14. Chih-Chuang Liaw, Fang-Rong Chang, Chih-Yuan Lin, Chi-Jung Chou, Hui-Fen Chiu, Ming-Jung Wu, and Yang-Chang Wu. (2002) New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 65: 470-475
15. Gleye, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cave, A. (1997) Isolation of Montecristin, a Key metabolite in Biogenesis of Acetogenins from *Annona muricata* and Its Structure elucidation by Using Tandem Mass Spectrometry. *J. Org. Chem.* 62: 510-513
16. Geum-soog, K., Lu Zeng, Feras, A., Lingling, L. R., Feng-E, Wu, McLaughlin, J. L., Sastrodihardjo, S. (1998) Two New Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the Leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 61: 432-436
17. Gleye, C., Duret, P., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cave, A. (1998) cis-Monotetrahydrofuran Acetogenins from the Roots of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 61: 576-579
18. Zeng, L., Wu, F., Oberlies, N., McLaughlin, J., (1996) Five New Monotetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 59: 1035-1042

19. Rieser, M. (1996) Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 59: 100-108
20. Chang, F., Wu, F. (2001) Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 64: 925-931
21. Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M. (1998) Essential Oil Compounds of the *Annona muricata* Fresh Fruit Pulp from Cameroon. J. Agric. Food Chem. 46: 3719-3720
22. Cave, A., Figadère, B., Laurens, A., and Cortes, D. (1997) Acetogenins from Annonaceae. Progress in the chemistry of Organic Natural Products. Springer-Verlag, New-York. 81-287.
23. Qingy, E., Lu Zeng, Yan Zhang, Geng-Xian Zhao, McLaughlin, J. L. (1995) Longicin and goniotalamicinone: novel bioactive monotetrahydrofuran acetogenins from *Asimina*. J. Nat. Prod. 58: 1398-1406
24. Wu, F., Wo Geng-Xian, Zeng Lu, Zhang Yang, Schwedler, J. T. (1995) McLaughlin J. L., Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2, *d-trans* and *cis*)-10-R-annonacin-ones from the leaves of *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 58: 1430-1437
25. Matthew, J., Rieser, M. J., Gu Zhe-Ming., Fang Xin-Ping, Zeng L., Wood, K. V., McLaughlin, J.L. (1996) Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 59: 100-108
26. Liu Xiao-Xi, Alali, F. Q., Pilarinou, E., McLaughlin, J. L. (1998) Glacins A and B: Two Novel Bioactive Mono-tetrahydrofuran Acetogenins from *Annona glabra*. J. Nat. Prod. 61: 620-624
27. Liaw Chih-Chuang, Chang Fang-Rong, Chen Yuan-Yng, Chiu Hui-Fen, Wu Ming-Jung, Wu Yang-Chang. (1999) New Annonaceous Acetogenins from *Rollinia mucosa*. J. Nat. Prod. 62: 1613-1617

28. McCloud, T. G., Smith, D. L., Chang, C. J., Cassady, J. L. (1987) Annonacine, a novel, biologically active polyketide from *Annona desicora*. *Experientia*, 43: 4010-4015
29. Kim, E. J., Tian, F., Woo, M. (2000) Asitrocin, (2,4)-*cis*- and *trans*-Asitrocinones: Novel Bioactive Mono-tetrahydrofuran Acetogenins from *Asimina triloba* seeds. *J. Nat. Prod.* 63: 1503-1506
30. Zafra-Polo, M. C., Figadère, B., Gallardo, T., Tormo, J., Cortes, D. (1998) Natural Acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanism of action. *Phytochemistry*. 48: 1087-1117
31. Esposti, M. D., Ghell, A., Ratta, M., Cortes, D. (1994) Estrornell E., Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *J. Biochem.* 301: 161-167.
32. Gallardo, T., Zafra-Polo, M. C., Tormo, J., González, C., Franck, X., Esstornell, E., Cortes, D. (2000) Semisynthesis of Antitumoral Acetogenins: SAR of Functionalized Alkyl-Chain Bis-Tetrahydrofuranic Acetogenins, Specific Inhibitors of Mitochondrial. *J. Med. Chem.* 43: 4793-4800
33. Oberlies, N., Jones, J., Corbett, T., Fotopoulos, S., McLaughlin, J. (1995) Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Lett.* 96: 55-62
34. Oberlies, N., Croy, V., Harrison, M., McLaughlin, J. (1997) The Annonaceous acetogenin butacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.* 115: 73-79
35. Zeng, B., Wu, Y., Jaing S., Yu Q., Yao Z., Liu Z., Li H., Li Y., Chen X., Wu Y. (2003) Studies on Mimicry of Naturally Occurring Annonaceous Acetogenins: Non-THF Analogues Leading to Remarkable Selective Cytotoxicity against Human Tumor Cells. *Chem. Eur.* 9: 282-290



36. Fang X. P., Rieser M. J., Gu M., Zhao, G., McLaughlin, J. (1993) *Phytochemistry Anal.* 4: 27-67
37. Miyoshi, H., Ohshima, M., Shimada, H., Akagi, T., Iwamura, H., McLaughlin, J. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioch. Bioph. Acta.* 1365: 443-452
38. Motoyama, T., Yabunaka, H., Miyoshi, H. (2002) Essential Structural Factors of Acetogenins, Potent Inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2089-2092
39. Yabunaka, H., Abe, M., Kenmochi, A., Hamada, T., Nishioka, T., Miyoshi, H. (2003) Synthesis and Inhibitory Activity of Ubiquinone- Acetogenin Hybrid Inhibitor with Bovine Mitochondrial Complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 2385-2388
40. Nakanishi, Y., Chang, F., Liaw, C., Wu, Y., Bastow, K. F., Lee, K. (2003) Acetogenins as Selective Inhibitors of the Human Ovarian 1A9 Tumor Cell Line. *J. Med. Chem.* 46: 3185-3188
41. Chang, F., Wu, Y. (2001) Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 64: 925-931
42. Tormo, J. R., Estornell, E., Gallardo, T., Gonzalez, M. C., Cavé, A., Granell, S., Cortes, D., Zafra-Polo, M. C. (2001)  $\gamma$ -Lactone-Functionalized Antitumoral Acetogenins are the Most Potent Inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 681-684
43. Santos, L. P., Pinto, G. B., Takahashi, J. A., Silva, M. A. (2003) Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* ( Brine Shrimp Test ). *Phytomedicine.* 10: 209-211
44. Queiroz, E., Roblot, F., Duret, P., Figadère, B., Gouyette, A., Laprévotte, O., Serani, L., Hocquemiller, R. (2000) Syntesis, Spectroscopy, and Cytotoxicity of Glycosylated Acetogenin Derivatives as Promising Molecules for Cancer Therapy.

*J. Med. Chem.* 4: 1604-1610

45. Chang, F., Liaw, C., Lin, C., Chou, C., Chiu, H., Wu, Y. (2003) New Adjacent Bis-Tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med.* 69: 241-246
46. Chih, H., Chiu, H., Tang, K., Chang, F., Wu, Y. (2001) Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. *Life Sci.* 69: 1321-1331
47. Zhu X., Liu Z., Xie B., Li Z., Feng G., Xie H., Wu S., Yang R., Wei X., Zeng Y. (2002) Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. *Life Sci.* 1259-1260
48. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
49. Sugimura, T. (2004) Establishment of the concept that cancer is a disease of DNA: Serendipitous discoveries in my research career concerning the science of carcinogenesis. *Comprehensive Biochemistry.* 43: 355-392
50. Hirst, G., L., G Balmain, A. (2004) Forty years of cancer modeling in the mouse. *European J. Cancer.* 40: 1974-1980
51. Brambillia, G., Martrelli, A. (2004) Failure of the standard battery of short term tests in detecting some rodent and human genotoxic carcinogens. *Toxicology.* 196:1-19
52. Martinez-Climent, J. A., Andreu, E. J., Prosper, F. (2006) Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clinical & Translational Oncology.* 9: 647-663
53. Cerri, E.; Falcone, A.; Innocenti, F. (2007) Cancer pharmacogenomics: germline DNA, tumor DNA, or both? *Current Pharmacogenomics.* 2: 87-101
54. Hu, Y., Martin, J., Le Leu, R., Young, G. P. (2002) The colon response to genotoxic carcinogens in the rat: regulation by dietary fibre. *Carcinogenesis.* 23: 1131-1137

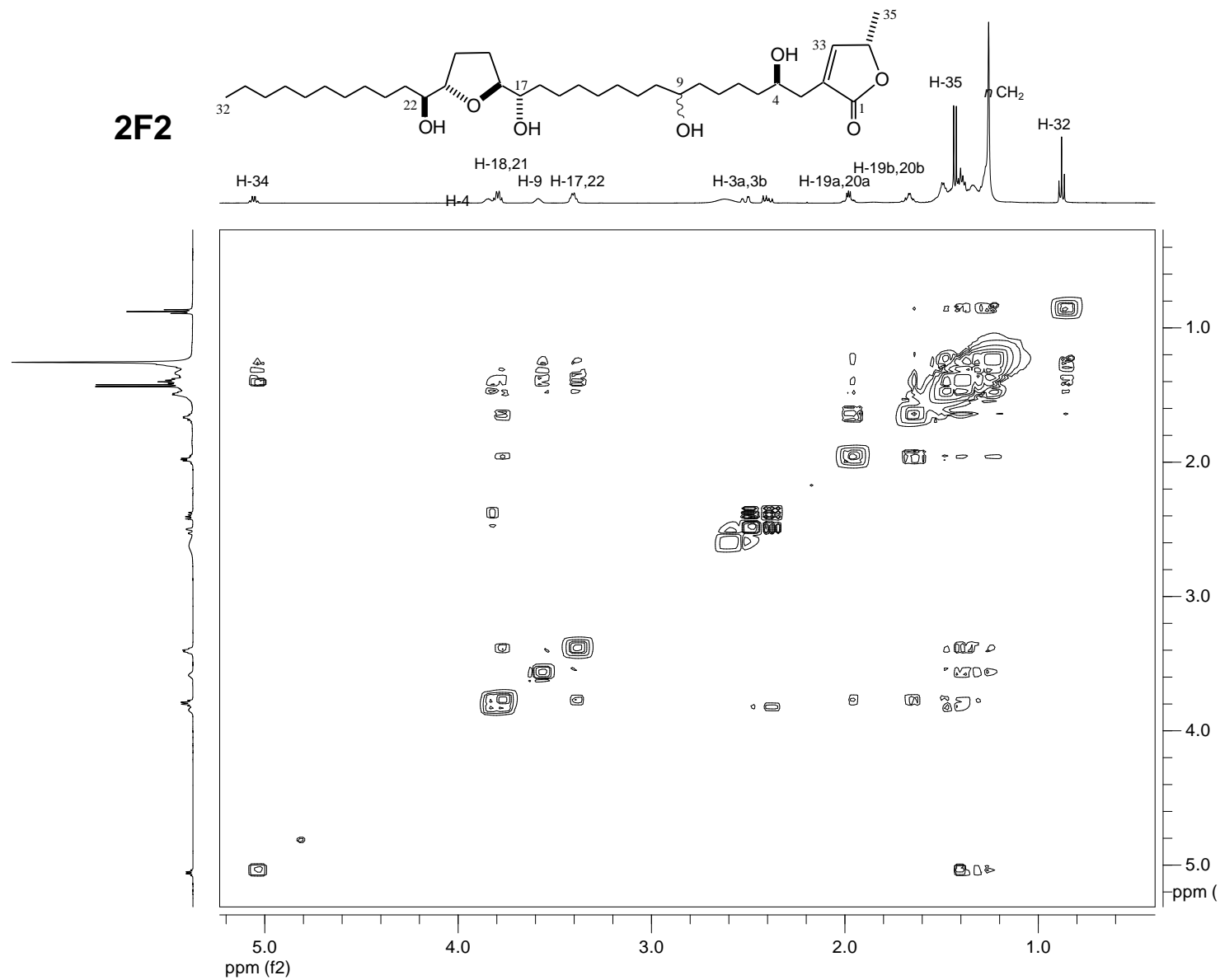
55. De Flora, S., Ferguson, L. R. (2005) Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 591: 8-15
56. Bird, P. R. (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 93: 55-71
57. Yasuhiro, Y., Mori, H. (2003) Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents: a new concept. *Carcinogenesis.* 6: 1015-1019
58. Bird, R, P. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary finding. *Cancer Lett.* 37: 147-151
59. Pretlow, T. P., Cheter, C., O`Riordan, M. A. (1994) Abberant crypt foci and colon tumor in F344 rats have similar increases in proliferative activity. *Int. J. Cancer.* 56: 599-602
60. Roncucci, L., Stamp, D., Medline, A., Cullen, J. B., Bruce, W. R. (1991) Identification of quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum. Pathol.* 22: 2887-294
61. Sohn, O. S., Fiala, E. S., Requeijo, S. P., Weisburger, J. H., González, F. J. (2001) Differential effect of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoximethanol. *Cancer Res.* 61: 8425-8440
62. Brusick, D., *Genetic Toxicology in Toxicology*, Academic Press, 1999, 127-149.
63. Shmid, W. *The micronucleus Test for cytogenetic Analysis.* 31-48
64. Krishna, G., Fiedler, R., Theiss, J. (1992) Simultaneous evaluation of clastogenicity, aneugenicity and toxicity in the mouse micronucleus assay using immunofluorescence. *Mut. Res.* 282: 159-167
65. Heddle, J. (1973) A Rapid in Vivo Test For Chromosomal Damage, *Mut. Res.* 18: 187-189

66. Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T., Newell, G., Salamone, M. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 123: 61-118
67. Mavournin, K., Blakey, D., Ciminom, M., Salamone, M., Heddle, J. (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 239: 29-80
68. Sykiotis, G. P.; Papavassiliou, A. G. (2006) Apoptosis: the suicide solution in cancer treatment and chemoprevention. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15: 575-577
69. Bignold, L. P. (2003) The mutator phenotype theory of carcinogenesis and the complex histopathology of tumors: Support for the theory from the independent occurrence of nuclear abnormality, loss of specialization and invasiveness among occasional neoplastic lesions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60: 883-891
70. Lorke, D. (1985) A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Arch Toxicol.* 54: 275-287
71. Dale, J. A.; Mosher, H. S. (1973) Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelates, O-methylmandelate, and  $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 512-519.
72. Hanson, P. (1993) *Studies on Stereochemistry of the Annonaceous Acetogenins: The Total Synthesis of Hexepi-Uvaricin and Ent-Bullatacin*, Ph.D. Thesis, University of Minnesota, Minneapolis, MN, p. 134.
73. Li, N.; Shi, Z.; Tang, Y.; Chen, J.; Li, X. (2008) Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae, *Belst. J. Org. Chem.*, v. 4, No. 48.

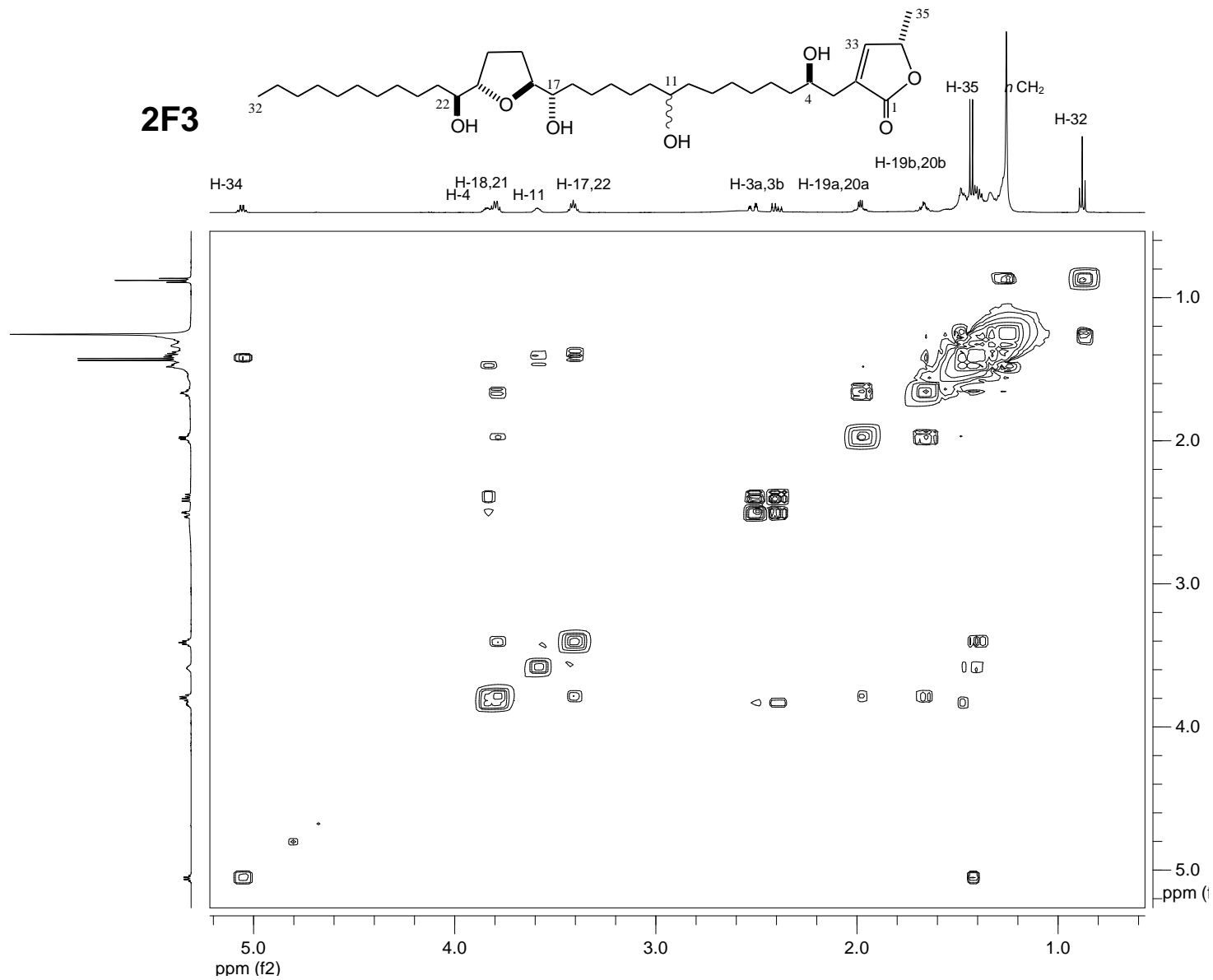
74. Arnason, J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T. (1995), *Phytochemistry of Medicinal Plants (Recent Advances in Phytochemistry)*. Proceedings of the 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America, Vol 29, p. 261.
75. Rieser, M. J.; Hui, Y.-H.; Rupprecht, J. K.; Kozlowzki, J. F.; Word, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, A.; Hoye, T. R. (1992), Determination of absolute configuration of stereogenic carbinol center in Annonaceous acetogenins by <sup>1</sup>H and <sup>19</sup>F-NMR analysis of Mosher ester derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10203-10213.
76. García-Aguirre, K., Zepeda-Vallejo, L., Ramón-Gallegos, E., Álvarez-González I., Madrigal-Bujaidar, E. (2008) Genotoxic and cytotoxic effects produced by acetogenins obtained from *Annona Cherimolia Mill.* *Biol. Pharm. Bull.* 31: 2346-2349

## ANEXO

**Espectros de RMN bidimensionales de las acetogeninas aisladas de *A. muricata* y de *A. cherimolia* Mill (2F2 y 2F3)**

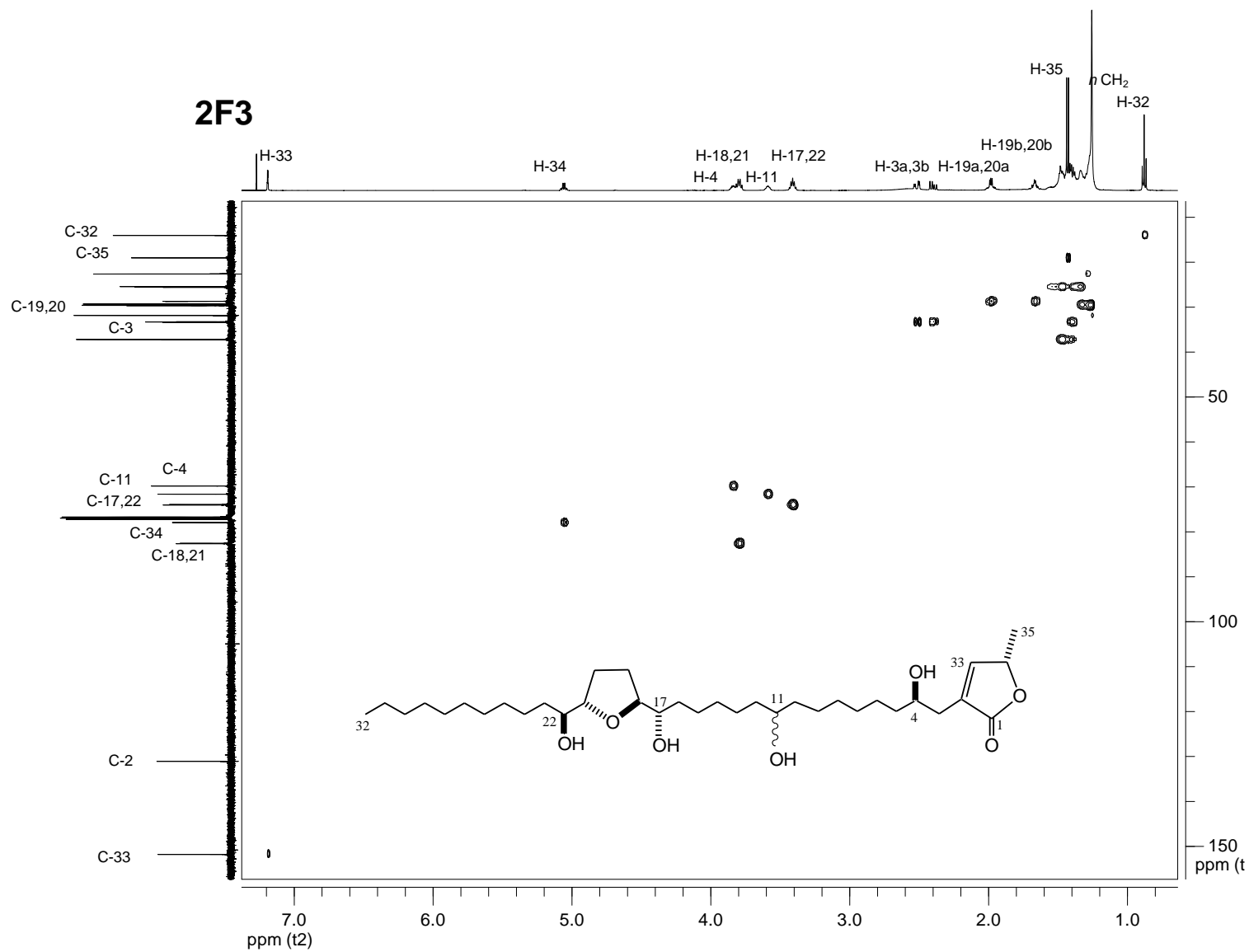


**Figura 27.** Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la acetogenina 2F2 aislada de *A. cherimolia* Mill

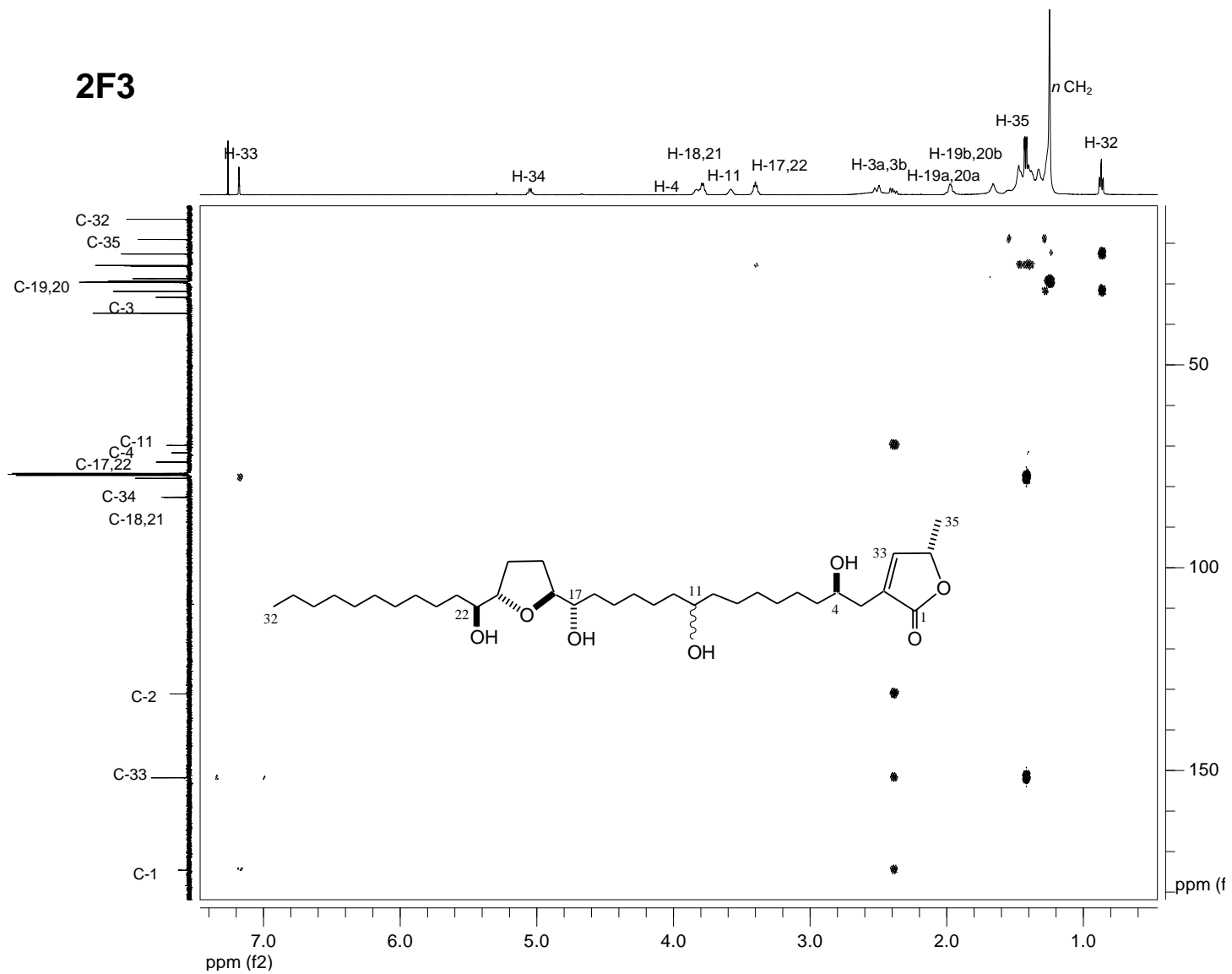


**Figura 28.** Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la acetogenina 2F3 aislada de *A. cherimolia* Mill





**Figura 29.** Espectro de correlación heteronuclear (gHSQC) de la acetogenina 2F3 aislada de *A. cherimolia* Mill



**Figura 30.** Espectro de correlación heteronuclear a larga distancia (gHMBC) de la acetogenina 2F3 aislada de *A. cherimolia* Mill

# A. muricata

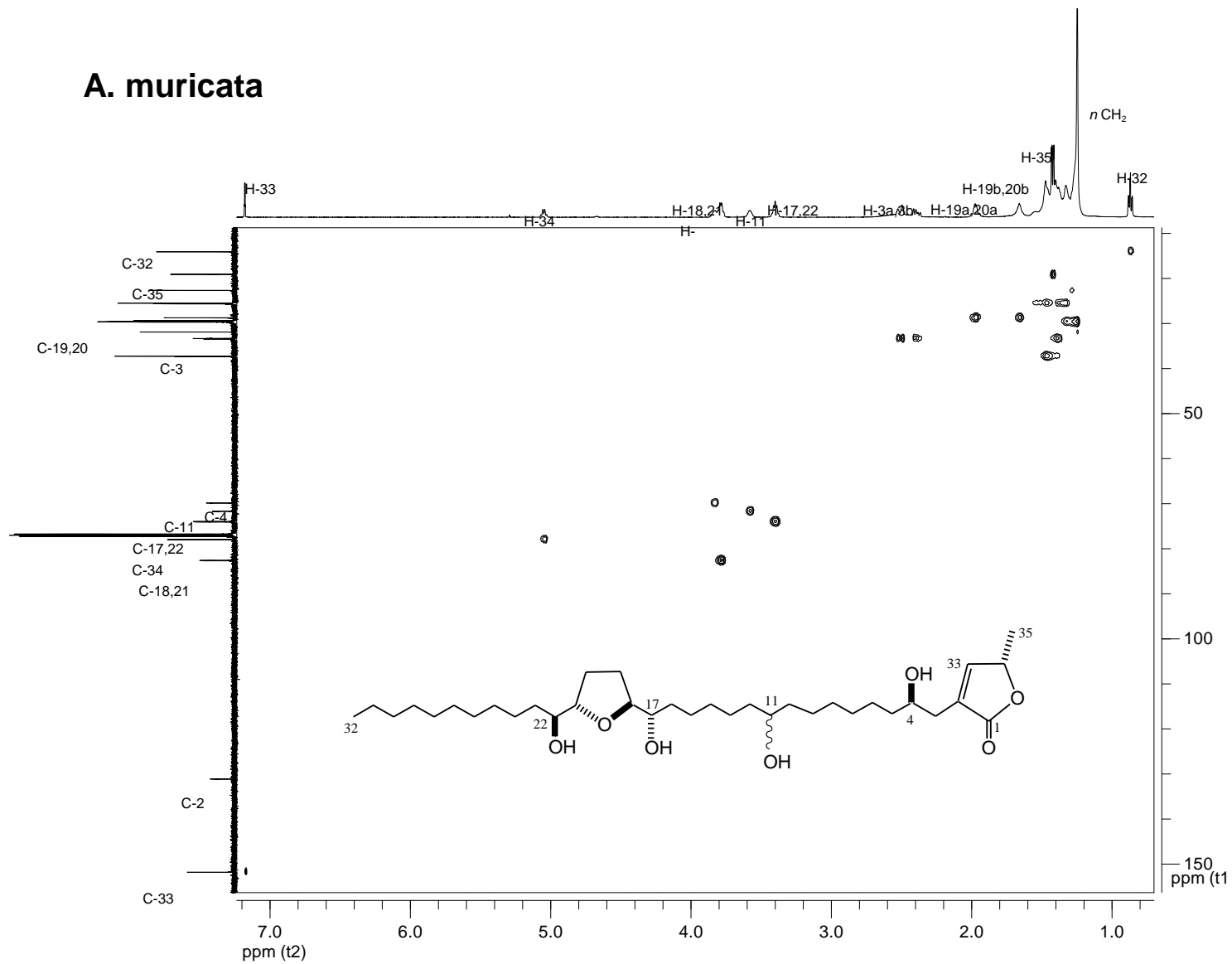


Figura 31. Espectro de correlación heteronuclear (gHSQC) de la acetogenina aislada de *A. muricata*

# A. muricata

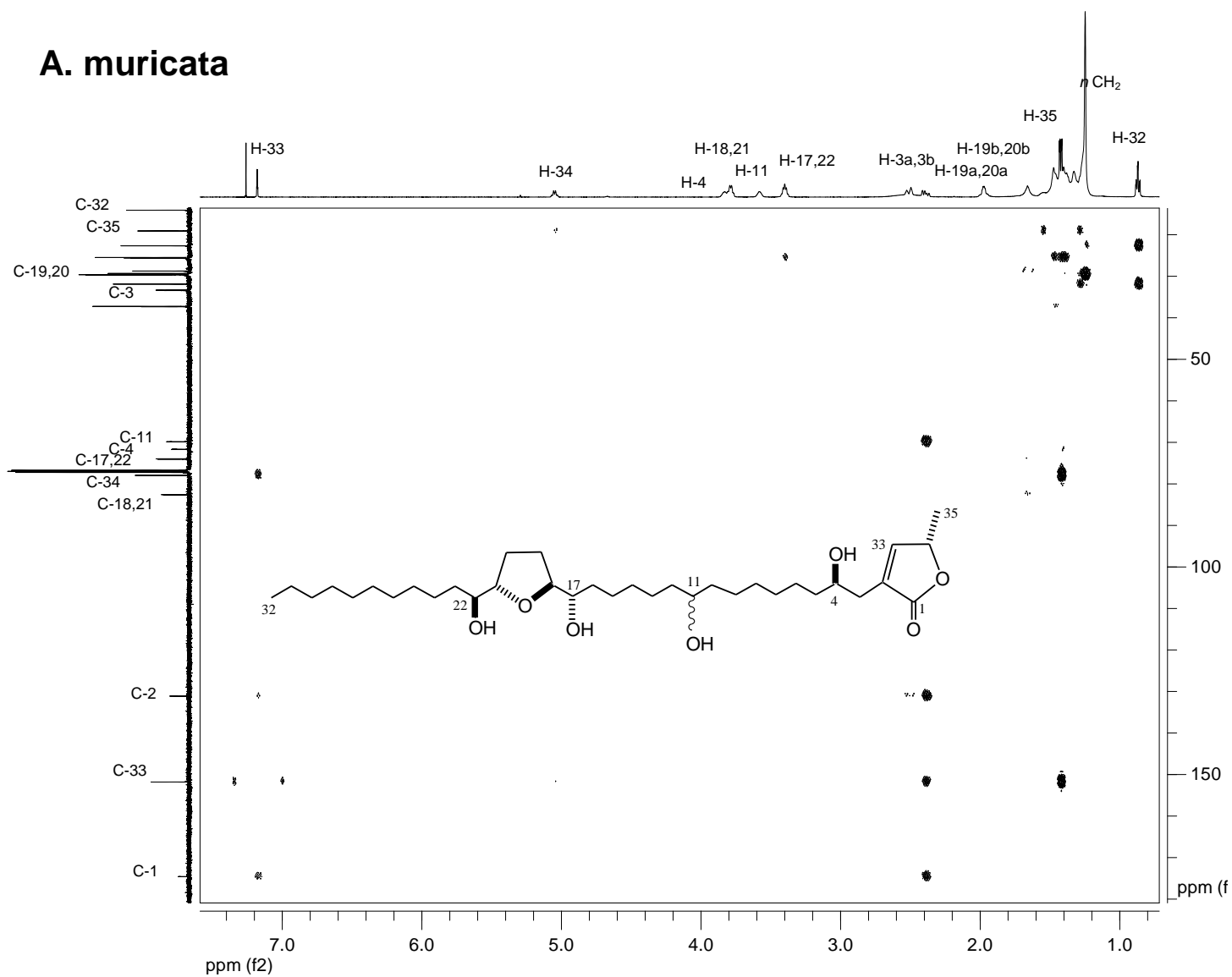


Figura 32. Espectro de correlación heteronuclear (gHSQC) de la acetogenina aislada de *A. muricata*