

Rolliniastatina-2 sobre bacterias Grampositivas

Luna-Cazáres, Lorena Mercedes¹, González-Esquinca, Alma Rosa¹
Guevara Fefer, Patricia², Brechu Franco, Alicia Enriqueta²

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte-Poniente 1150. Colonia Lajas Maciel. C.P. 29035. Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México. lucaz58@hotmail.com

²Facultad de Ciencias, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán C.P. 04510 Universidad Nacional Autónoma de México.

Resumen

Algunas acetogeninas (ACG) inhiben a bacterias Gramnegativas y Grampositivas, la ACG rolliniastatina-2 no se ha investigado aún, por ello y en la búsqueda de alternativas para el control de bacterias el propósito de este trabajo fue el de evaluar el efecto de ésta sobre el crecimiento de las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. La ACG se obtuvo de semillas de *Annona diversifolia* Saff. colectadas en la delegación de Copoya, municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; se aisló del extracto hexánico (González Esquinca, 2001). La actividad antibacteriana de rolliniastatina-2 en concentraciones de µg/mL (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 236 y 512) y ng/mL (1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64) se evaluó utilizando macrodilución en

caldo (Andrews, 2001) y los inóculos se ajustaron al estándar 0.5 de McFarland (Cona, 2002). Se hicieron lecturas espectrofotométricas a las 18 y 7 h; para determinar el efecto de la ACG sobre el aumento poblacional de cada bacteria se realizó la lectura de cada una de las concentraciones (ng/mL) cada hora durante 7 h. Rolliniastatina-2 en concentraciones de $\mu\text{g/mL}$ y ng/mL a las 18 y 7 h presentó mayor efecto inhibitorio sobre *S. aureus* (30%) con la concentración más baja (2 $\mu\text{g/mL}$) y 43.68% (8 ng/mL) respectivamente. Ninguna de las bacterias ensayadas presentó una relación concentración-dependencia. El efecto sobre el aumento poblacional de cada bacteria (bact/mL) no presentó grandes diferencias, excepto en *B. subtilis*, la inhibición se detectó en diferentes tiempos asociados a una prolongación de la fase de latencia. La ACG tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las tres bacterias, su mayor actividad se produjo sobre *S. aureus* en los dos tiempos de exposición ensayados y al parecer la actividad sobre la proliferación de las bacterias está relacionada con el retraso del inicio de la fase logarítmica del crecimiento de cada una de ellas.

Palabras clave: *acetogenina*, *Annona*, *Grampositivas*

Introducción

Las plantas constituyen una fuente natural de compuestos bioactivos (antifúngicos, antiparasitarios, antimicrobianos, insecticidas) lo que ha propiciado el aumento de investigaciones sobre dichas moléculas y su efecto sobre diferentes sistemas biológicos (Yeaman y Yount, 2003). Aunado a ello, la detección de microorganismos multirresistentes o de susceptibilidad reducida a los antibióticos que se emplean en la actualidad, así como la presencia de infecciones oportunistas asociadas al síndrome de inmunodeficiencia adquirida y la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, ha propiciado la investigación de compuestos bioactivos provenientes de plantas (Domingo y López-Brea, 2003; Zampini *et al.*, 2007).

Especies de la familia Annonaceae, han sido estudiadas de manera casi sistemática por su contenido de alcaloides, y desde el aislamiento

de la uvaricina en 1982 por Jolad *et al.* el interés se centró en la presencia de compuestos de origen policétido llamados: acetogeninas de anonáceas (ACG).

Uno de los géneros más representativos de la familia es *Annona*, del que se han caracterizado y aislado más de 180 ACG de 22 especies (Cavé *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005; Alvarez Colom *et al.*, 2009; Alves Rodrigues *et al.*, 2009).

Diferentes bioensayos realizados con estos compuestos indican actividad biológica frente a insectos (González-Coloma *et al.*, 2002; Alvarez Colom *et al.*, 2007), levaduras y hongos (Cepleanu *et al.*, 1993; Padmaja *et al.*, 1993), parásitos (Raynaud *et al.*, 2004; Rakotomanga *et al.*, 2004), bacterias (Padmaja *et al.*, 1995; Rahmann *et al.*, 2005) y líneas celulares cancerosas y tumorales (Han *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005; Schlie *et al.*, 2009). Su efecto sobre diferentes sistemas biológicos se ha relacionado con la capacidad de inhibir al Complejo I, enzima presente en la cadena respiratoria de prácticamente todos los sistemas biológicos.

Los ensayos para determinar la actividad antibacteriana de las ACG son escasos (Padmaja *et al.*, 1993; Mia *et al.*, 1997; Rhamann *et al.*, 2005), aunque también se han realizado con mezclas de ACG obtenidas de diversas estructuras botánicas (Padmaja *et al.*, 1993; Jumana *et al.*, 2000). De acuerdo a los resultados reportados tanto los compuestos puros como las mezclas inhiben tanto a bacterias Gramnegativas como a Grampositivas.

Se ha demostrado el efecto de isodesacetiluvavicina y escuamocina sobre *Salmonella Typhi* y *Escherichia coli*; escuamocina y gigantetrocina A y B sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. Typhi* y *E. coli*, además escuamocina tuvo efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa*, y goniotalamusina sobre *S. aureus* y *S. Typhi* (Padmaja *et al.*, 1993; Mia *et al.*, 1997; Jumana *et al.*, 2000; Rhamann *et al.*, 2005)

Sin embargo, el efecto de rolliniastatina-2 sólo se ha reportado sobre bacterias Gramnegativas (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2010), por ello y en la búsqueda de alternativas para el control de bacterias el propósito de este trabajo fue el de evaluar el efecto de esta ACG sobre el crecimiento de las bacterias Grampositivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Método

Material vegetal

La acetogenina se obtuvo de semillas de *Annona diversifolia* Saff., colectadas en la delegación de Copoya del municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México en 2004. El ejemplar herborizado se depositó en el herbario HEM de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (no. 351).

Obtención de la acetogenina

Las semillas se secaron a temperatura ambiente y luz natural, después se molieron hasta obtener un polvo fino, se pesaron 350 g de material vegetal que se extrajo con hexano en un equipo Soxhlet durante 8 horas tres veces (24 h). El extracto se concentró por destilación al vacío en un rotaevaporador Caframo WB 2000® (rendimiento 100 g) a partir del que se obtuvo la acetogenina empleando el procedimiento de González-Esquina (2001).

El producto obtenido fue identificado por el Dr. Diego Cortes del Departamento de Farmacología, Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad de Valencia, España como rolliniastatina-2.

Susceptibilidad de las bacterias a la acetogenina

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

Rolliniastatina-2 se disolvió en etanol al 70%, para la prueba de sensibilidad a las 18 h se ensayaron concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 236 y 512 µg/mL (3.21, 6.43, 12.89, 25.72, 51.44, 102.89, 205.78, 411.57 y 823.15 nmol/mL). También se prepararon concentraciones de

1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ng/mL (0.0016, 0.00321, 0.00643, 0.01286, 0.02572, 0.05144 y 0.10289 nmol/mL) para realizar el ensayo de sensibilidad de 7 horas.

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

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

Se realizó el mismo procedimiento pero con concentraciones menores: 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ng/mL y también se determinó el efecto sobre el crecimiento de las bacterias en un lapso de 7 horas, para ello se realizó el procedimiento anterior con las siguientes modificaciones: se empleó un inóculo de 1.5×10^4 UFC/mL que se obtuvo por dilución del inóculo de 1.5×10^8 UFC/mL, se emplearon 7 concentraciones de la ACG en concentraciones de ng/mL y se realizaron lecturas en un espectrofotómetro y cada hora durante 7 horas. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. En este último caso los resultados indican el efecto de las ACG en la disminución del número de bacterias en el medio de ensayo.

Resultados y discusión

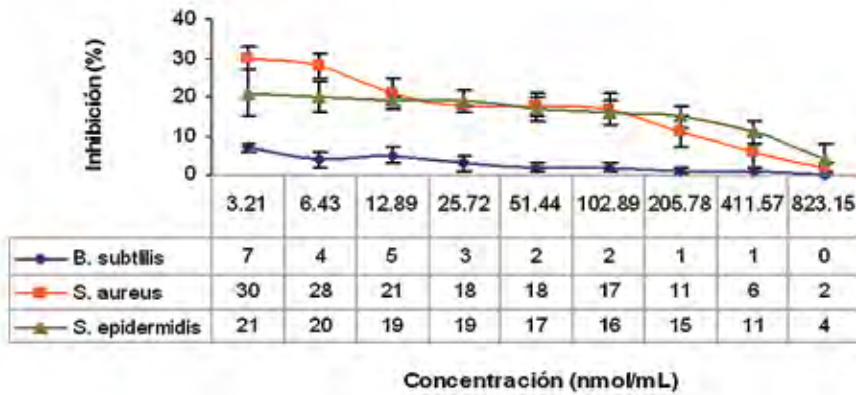
Se seleccionaron semillas de *A. diversifolia* porque son fuente de ACG (Reyes Trejo *et al.*, 1997; de la Cruz Chacón, 2001; González Esquinca, 2001). Así, del extracto hexánico se obtuvieron 15 mg de rolliniastatina-2.

Algunas ACG con estructura bis-tetrahidrofurano adyacente (THF), adyacentes y lactona insaturada muestran actividad inhibitoria sobre bacterias (Padmaja *et al.*, 1993; Rhaman *et al.* 2005). La ACG utilizada en este trabajo también es bis-THF adyacente. Por ello y debido a que está documentado que las ACG actúan sobre el Complejo I se eligieron para realizar el ensayo bacterias Grampositivas aeróbicas.

Ensayo a las 18 h utilizando concentraciones en µg/mL

Para conocer el potencial antimicrobiano de rolliniastatina-2 se realizó una primera evaluación con concentraciones del orden de µg/mL ya que existen reportes de ACG que inhiben el crecimiento bacteriano en dichas concentraciones.

Las bacterias *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron sensibles a rolliniastatina-2 ($P < 0.000$); no se encontró un efecto concentración-dependencia ($r = -0.815$; $r = -0.811$; $r = -0.775$) sino por el contrario, el mayor efecto se encuentra en la concentración más baja, 3.21 nmol/mL (2 µg/mL), las dos especies de *Staphylococcus* son las más sensibles ($P < 0.000$) en tanto que en *B. subtilis* la inhibición es pequeña (gráfica 1).



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

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

La diferencia antiproliferativa a las 18 h dependió de la especie bacteriana, mostrando una actividad diferencial documentada para las ACG en éstos (Padmaja *et al.*, 1993; Rahman *et al.*, 2005) y otros sistemas biológicos (Rupprecht *et al.*, 1990; Alali *et al.*, 1999; Tormo *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2005). Por ejemplo, *B. subtilis* es la bacteria menos “sensible” a la rolliniastatina-2 (7%), sin embargo inhibe el crecimiento de *S. aureus* hasta en un 30%.

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

En la bibliografía no hay datos para realizar una buena comparación con los resultados obtenidos, los más cercanos son los de Padmaja *et al.*

(1993) y Rahman *et al.* (2005) aunque estos autores usan la técnica de difusión en medio sólido y en este trabajo el de dilución en caldo, por tanto sus resultados y los obtenidos en esta investigación sólo señalan si la ACG tiene o no efecto sobre las bacterias comunes a ambos ensayos.

Rahman *et al.* (2005) con escuamocina (ACG bis-THF con lactona insaturada cuya diferencia radica en la posición de un -OH) en concentraciones de 200 µg/disco reportaron halos de inhibición en las bacterias Grampositivas *S. aureus* (15 mm) y *B. subtilis* (12 mm) coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación ya que rollinistatina-2 fue más potente sobre *S. aureus* (30%) y difiriendo en *B. subtilis* ya que con esta ACG la inhibición es muy pequeña (7%).

Dado que en esta investigación el porcentaje de inhibición no llegó al 50% es posible que el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Grampositivas participe como barrera.

Ensayo a las 7 h utilizando concentraciones en ng/mL

En función de los resultados anteriores, en los que las concentraciones menores son más potentes y producen los mayores porcentajes de inhibición, se decidió realizar un ensayo con concentraciones menores, aunque las pruebas de inhibición bacteriana frente a compuestos de plantas no se realizan en concentraciones tan pequeñas por su bajo nivel de actividad, especialmente sobre las bacterias Gramnegativas (Tegos *et al.*, 2002); se consideró la potencia de la ACG para medir el efecto inhibitorio, se emplearon siete concentraciones de rolliniastatina-2 (cuadro 1) así como un inóculo bacteriano menor y la densidad óptica se midió a un menor tiempo (7 horas).

Bajo las condiciones del experimento los resultados obtenidos (cuadro 1) indican que *S. aureus* es más sensible (43.68%) seguida de *S. epidermidis* (33.81%) y *B. subtilis* fue menos sensible (29.94%) (cuadro 1).

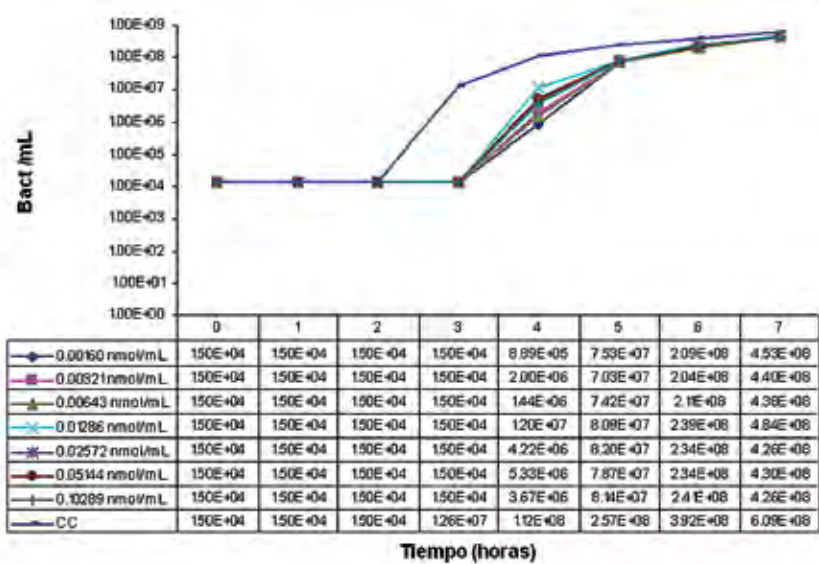
Cuadro 1. Actividad inhibitoria de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento de bacterias Grampositivas. A la 7 h de exposición en medio líquido, el porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto

ng/mL	nmol/mL	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
		% de inhibición		
1	0.0016	25.56	27.18	25.83
2	0.00321	27.66	38.06	33.81
4	0.00643	27.66	37.31	28.22
8	0.01286	20.54	43.68	23.96
16	0.02572	29.94	35.62	26.09
32	0.05144	29.3	28.5	32.48
64	0.10289	29.94	11.06	27.42

En la séptima hora de exposición los mayores porcentajes de inhibición se produjeron frente a *S. aureus* (43.68%, 0.01286 nmol/mL=8 ng/mL), *S. epidermidis* (33.81%, 0.00321 nmol/mL=2 ng/mL) y *B. subtilis* (29.94%, 0.10289 nmol/mL=64 ng/mL). Los porcentajes de inhibición a la séptima hora señalaron que todas las bacterias son sensibles a la ACG, aunque con valores de inhibición diferentes. Ninguna de las bacterias Grampositivas presentó una relación concentración-dependencia. Los porcentajes de inhibición son mayores a los obtenidos con las mayores concentraciones evaluadas (3.21 a 823.15 nmol/mL=2 a 512 mg/mL), pero sin llegar al 50%.

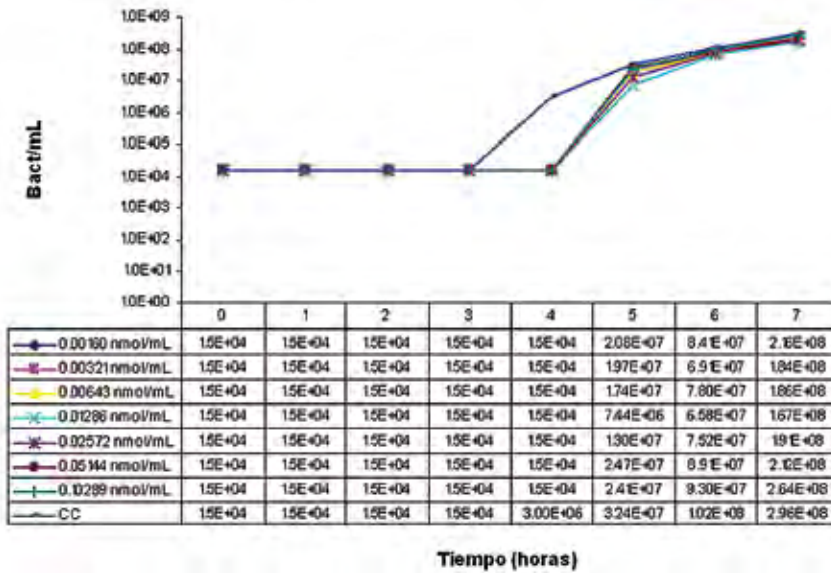
Ensayo durante 7 h utilizando concentraciones en ng/mL

Con el fin de determinar el efecto de la ACG sobre el aumento poblacional de cada bacteria se realizó la lectura de cada una de las concentraciones evaluadas cada hora durante 7 h. El número de bact/mL de la curva de crecimiento del control de *B. subtilis* aumentó a partir de la segunda hora. El mayor efecto de la rolliniastatina-2 se observó a partir de la tercera hora de exposición con todas las concentraciones. Entre la cuarta y sexta hora prácticamente todas las concentraciones tienen el mismo efecto. En la séptima hora el crecimiento de los tratamientos es igual al del control del crecimiento (gráfica 2).



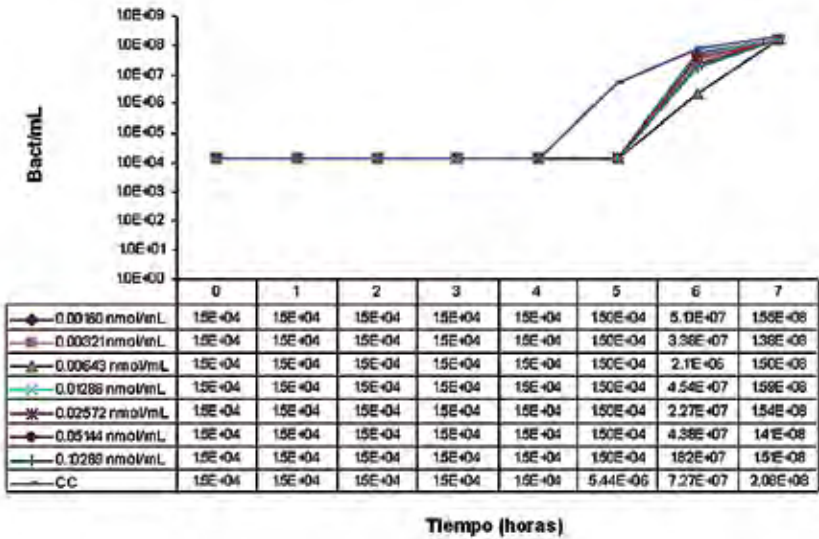
Gráfica 2. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *B. subtilis*

El número de bact/mL de la curva de control del crecimiento de *S. aureus* y las expuestas a las concentraciones de rolliniastatina-2 hasta la hora tres no presentaron variación. El mayor efecto se observó en la cuarta hora de exposición con todas las concentraciones. En la quinta hora algunas de las concentraciones de la ACG tuvieron una ligera actividad pero en la sexta y séptima hora el efecto fue muy parecido. El comportamiento con las diferentes concentraciones es bastante semejante a la del control del crecimiento bacteriano, excepto en la cuarta hora (gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *S. aureus*

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



Gráfica 4. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *S. epidermidis*

En los ensayos en los que se evaluó la actividad con relación al número de bact/mL se observó que la inhibición del crecimiento poblacional bacteriano se detecta en distintos tiempos asociados a una prolongación de la fase lag (de latencia) o a un retraso en el inicio de la fase log (logarítmica) de las bacterias expuestas a la ACG, efecto que tal vez pudiera estar asociado con la pared celular.

La sensibilidad hacia rolliniastatina-2 se manifestó a diferentes tiempos, aunque los resultados obtenidos indicaron que no existen grandes diferencias entre el número de bact/mL del control y los ensayos, excepto en *B. subtilis* expuesta a rolliniastatina-2.

Conclusiones

- Rolliniastatina-2 tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las tres bacterias Grampositivas ensayadas.

- A las 18 h el mayor porcentaje de inhibición se produjo con la menor concentración evaluada en las tres bacterias (3.21=2 µg/mL) mientras que a la séptima hora se produjeron con concentraciones diferentes.

-El mayor efecto inhibitorio de rolliniastatina-2 se produjo sobre *S. aureus* en los dos tiempos de exposición ensayados.

-La actividad de rolliniastatina-2 fue mayor con las concentraciones menores y es independiente del tiempo de exposición.

-Con un inóculo y concentraciones menores se produjo el retraso del inicio de la fase logarítmica de crecimiento de las bacterias.

-Los resultados sugieren que la pared celular de las bacterias ensayadas funciona como barrera para la entrada de la ACG.

Referencias

- Alali, F.Q.; Liu, X.X. and McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62: 504-540.
- Alvarez Colom, O., Neske, A., Popich, S. and Bardón, A. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science.* 80: 63-67.
- Alvarez Colom, O., Neske, A., Chaboune, N., Zafra-Polo, M.C. and Bardón, A. 2009. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex. *Chemical Biodiversity.* 6 (3): 335-340.
- Alves Rodrigues dos Santos Lima, L., Pinheiro, Santos Pimenta, L. and Diamantino Boaventura, M.A. 2009. Two new adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from seeds of *Annona cornifolia*. *Planta Medica.* 75: 80-83.
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 48 (Suppl. S1): 5-16.
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.C., Borrachina, I., Estornell, E. and Cortes, D. 2005. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, síntesis and mechanisms of action. *Natural Product Report.* 22: 269-303.

- Cavé, A., Figaderè, B., Laurens, A. and Cortes, D. 1997. Acetogenins from Annonaceae. In: Hertz, W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich, W. and Tamm, Ch. (Ed.). *Progress in the chemistry of organic natural products* 70. SpringerWienNewYork. Austria. Pp. 81-288.
- Cepleanu, F., Ohtani, K., Hamburguer, M., Hostettman, K., Gupta, M.P. and Solís, P. 1993. Novel acetogenins from the leaves of *Annona purpurea*. *Helvetica Chimica Acta*. 76 (3): 1379-1388.
- Cona T., E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*. 19 (Supl. 2): 77-81.
- De la Cruz Chacón, I. 2001. Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Saff. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 85 pp.
- Domingo, E. y López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16 (4): 385-393.
- González-Coloma, A., Guadaño, A., de Inés, C., Martínez-Díaz, R. and Cortes, D. 2002. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Z. Naturforsch.* 57c: 1028-1034.
- González Esquinca, A.R. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae). Análisis fitoquímico de tres especies del Estado de Chiapas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 251 pp.
- Han, H., Sinha, M.K., D'Souza, L.J., Keinan, E. and Sinha, S.C. 2004. Total synthesis of 34-hydroxiasimicin and its photoactive derivative for affinity labeling of the mitochondrial complex I. *Chem. Eur. J.* 10: 2149-2158.

- Javor, G.T. 1983. Depression of adenosylmethionine content of *Escherichia coli* by thioglycerol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 24 (6): 860-867.
- Jumana, S., Hasan, Ch.M. and Rashid, M.A. 2000. Antibacterial activity and citotoxicity of *Miliusa velutina*. *Fitoterapia*. 71: 559-561.
- Li, X.X., Alali, F.Q., Pilarinou, E. and MacLaughlin, J.L. 1999. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. *Phytochemistry*. 50 (5): 816-821.
- Luna-Cazáres, L.M y González-Esquinca, A.R. 2010. Susceptibility of bacteria and complete spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhi* to rolliniastatin-2. *Natural Product Research*. 24 (12): 1139-1145
- Mia, M.Y., Hasa, C.M. and Reiner, R. 1997. Antibacterial activity of two acetogenins. *Bangladesh J. Bot.* 26 (1): 71-73.
- Oberlies, N.H., Croy, V.L., Harrison, M.L. and McLaughlin, J.L. 1997. The annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Letters*. 115: 73-39.
- Padjama, V., Thankamany, V. and Hisham, A. 1993. Antibacterial, antifungal and antihelmintic activities of root barks of *Uvaria hooki* and *Uvaria narum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 40: 181-186.
- Padjama, V., Thankamany, V., Hara, N., Fujimoto, Y. and Hisham, A. 1995. Biological activities of *Annona glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*. 48: 21-24.
- Rahman, M.M., Parvin, S., Haque, M.E., Islam, M.E. and Mosaddik, M.A. 2005. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Fitoterapia*. 76: 484-489.

- Rakotomanga, M., Razakantoanina, V., Raunaud, S., Loiseau, P.M., Hocquemiller, R. and Jaureguiberry, G. 2004. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate-translocase. *J. Chemother.* 16 (4): 350-356
- Raynaud-Le, G.S., Fourneau, C., Laurens, A., Bories, C., Hocquemiller, R. and Loiseau, P.M. 2004. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomed Pharmacother.* 58 (6-7): 388-392
- Reyes Trejo, B., Coeto, J.L., Peralta, M.J., Marroquín-Andrade, L., Navarrete Castro, A. y Nathan, Pedro Joseph. 1997. Laherradurina: acetogenina activa de *Annona diversifolia* Safford. Memorias del Primer Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. Pp. 24.
- Ruppercht, J.K., Hui, Y.H. and McLaughlin, J.L. 1990. Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products.* 53 (2): 237-278.
- Schlie-Guzmán, M.A., González-Esquínca, A.R. and Luna-Cazáres, L.M. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 8 (4): 245-257.
- Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O. and Lewis, K. 2001. Multi-drug pump inhibitors remarkable activity of plants antimicrobial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 46 (10): 3133-3134.
- Tormo, J.R., González, M.C., Cortes, D. and Estornell, E. 1999. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 369 (1): 119-126.
- Tormo, J.R., De Pedro, N., Royo, I., Barrachina, I., Zafra-Polo, M.C., Cuadrillero, C., Hernández, P., Cortes, D. and Pelaez, F. 2005. *In Vitro* antitumor structure-activity relationships of threo/trans/threo/

trans/erythro bis-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Oncol Res.* 15 (3): 129-128.

Yeaman, M.R. and, Yount, N.Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews.* 55: 27-55.

Zampini, I.C.; Cudmani, N. e Isla, M.I. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 41 (3): 385-393.

