



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO: Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral:

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y FRACCIONES BIOACTIVAS DE
“CHIRIMOYA”, *ANNONA CHERIMOLA* MILL. (ANNONACEAE).
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS, CROMATOGRÁFICOS Y
ACTIVIDAD CON NANOPARTÍCULAS BIODEGRADABLES CON ANTICUERPOS
MONOCLONALES EN SU SUPERFICIE (PENETRAN CÉLULAS DE LLC-B) COMO
UNA NUEVA POSIBILIDAD TERAPÉUTICA**

Tesista: Lic. Griselda Octavia Haag

Directores:

**Prof. Dr. Gustavo Marin
Prof. Dra. María A. Rosella**

Año: 2021



Agradecimientos

- A la Universidad Nacional de La Plata, especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas y a la Facultad de Ciencias Médicas que permitieron la realización de este trabajo.
- Al Prof. Dr. Gustavo Marín por su dirección en esta investigación, y generosidad en brindarme los medios para hacer posible esta tesis y sobre todo por su tiempo.
- A la Prof. Dra. Maria Rossella por su dirección, colaboración y compartir sus conocimientos desinteresadamente.
- Al Prof. Dr. Eduardo Mansilla por abrirme las puertas del Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante – Argentina (INCUCAI), para poder realizar las pruebas de actividad.
- Al Dr. Heriberto Bruzzoni del Centre de Recherche Clinique, Hôpital Saint Louis, Francia por su colaboración en la la realización de nanopartículas marcadas con anticuerpos.
- Al Dr. Jorge Montanari y su equipo de trabajo del Laboratorio de Biomembranas. Universidad Nacional de Quilmes del Departamento de Ciencia y Tecnología por introducirme en el tema y su colaboración para poder realizar las nanopartículas.
- A la Dr. Alan Talevi por su colaboración en la determinación de actividad antiinflamatoria y anticonvulsiva en el modelo computacional y Dra. Esperanza por la realización de las cromatografías HPLC.
- A mis compañeros de las cátedras de Farmacología y Farmacognosia por escucharme, acompañar y colaborar en este proceso, siempre bien dispuestos.

Y agradezco muy especialmente

- A Dios por todo.
- A mi madre María Elena del Valle por su cooperación en el desarrollo de esta tesis, por su esfuerzo para mi formación académica como espiritual y su estímulo constante.
- A mi Esposo Marcos y mis hermanos Eugenia, René y Rulo por haberme acompañado y brindado apoyo incondicional durante la elaboración de esta tesis.



Índice

Agradecimientos	1
Índice	2
Indice de Ilustraciones	6
Indices de Tablas	8
1. Introducción	9
1.1. Las plantas son una de las fuentes más importantes de medicamentos:	9
1.2. Plantas utilizadas en la medicina.....	9
1.3. La Leucemia Linfática Crónica de células B	11
1.4. Los anticuerpos monoclonales y leucemia.....	12
1.5. La nanotecnología y leucemia.....	12
1.6. Fundamentos de la elección del tema.....	13
2. Antecedentes	15
2.1. Botánica	15
2.1.1. Familia Annonaceae.....	15
2.1.1.1. Descripción general de la familia Annonaceae y del género <i>Annona</i>	15
2.1.1.2. Descripción botánica del género <i>Annona</i> L.	15
2.1.1.3. Distribución geográfica y hábitat	16
2.1.1.4. Antecedentes de Annonaceae.....	17
2.1.1.5. Antecedentes de uso en medicina tradicional	17
2.1.1.6. Componentes químicos de las hojas de <i>Annona muricata</i>	18
2.1.2. Especie: <i>Annona cherimola</i> Mill.....	19
2.1.2.1 Taxonomía.....	19
2.1.2.2. Historia y Etimología	20
2.1.2.3. Origen y distribución geográfica.....	21
2.1.2.4. Descripción morfológica y anatómica.....	23
2.2. Antecedentes Fitoquímico de <i>A. cherimola</i>	25
2.2.1. Antecedentes fitoquímicos: su relación con las actividades biológicas y usos en la medicina tradicional.....	25
2.2.1.1. Actividad antidiabética.....	27
2.2.1.2. Actividad antimicrobiana y antiviral.....	28
2.2.1.3. Actividad asociada con trastornos dopaminérgicos	29
2.2.1.4. Actividad antiinflamatoria y analgésica	29
2.2.1.5. Actividad citotóxica y antitumoral.....	29
2.2.1.6. Actividad ansiolítica.....	30
2.2.1.7. Actividad antiparasitaria	30
2.2.1.8. Actividad antioxidante	30
2.2.1.9. Otras actividades y usos	31
2.2.1.10. Principios activos aislados de “Chirimoya” de diferentes extractos y fraccionamientos	32
2.3. Antecedentes fitoquímicos de Plantas Medicinales	37
2.3.1. Polifenoles aislados de Plantas Medicinales	37
2.3.1.1. Rutósido (“Rutina”).....	37
2.3.1.2. Isoquercetina	38
2.3.1.3. Ácido cafeico.....	38
2.3.2. Terpenoides aislados de Plantas Medicinales	39
2.3.2.1. Triterpenoides pentacíclicos: Ácido Oleanólico y Ácido Ursólico.....	40
2.4. Introducción al tema: Leucemia Linfocítica Crónica-B	42
2.4.1. Linfocitos – B.....	42
2.4.2. Leucemia Linfocítica Crónica-B	43
2.4.3. Cuadro clínico	43



2.4.4. Inmunofenotipo	44
2.4.5. Sistema de clasificación de Rai	45
2.5. Introducción a las Nanopartículas	46
3. Hipótesis y objetivos.....	50
Hipótesis:	50
Objetivo general	51
Objetivos específicos	51
4. Materiales y Métodos.....	52
4.1. Preparación del material vegetal.....	52
4.1.1. Recolección y almacenamiento del material vegetal	52
4.1.2. Identificación Botánica	52
4.1.3. Procesamiento Material Vegetal	52
4.2. Analítica macroscópica y microscópica	53
4.2.3. Disociado leve	54
4.2.4. Eliminación de tricomas.....	54
4.2.5. Remoción de epidermis.....	54
4.3. Estudio Fitoquímico.....	55
4.3.1. Equipos e instrumental utilizado	55
4.3.2. Extracción y fraccionamiento para los distintos compuestos.....	55
4.3.3. Obtención de un extracto hidroalcohólico y su fraccionamiento	56
4.3.4. Obtención del extracto diclorometánico:	57
4.3.5. Obtención de cocimiento y extracto acetato de etilo:	57
4.3.6. Obtención de infusión	58
4.3.7. Pruebas fitoquímicas a los extractos y fracciones de <i>A. cherimola</i>	58
4.3.7.1. Detección de Alcaloides:	58
4.3.7.1.a Dragendorff (reactivo para alcaloides según Munier y Macheboeuf).....	58
4.3.7.1.b Reactivo de Mayer	59
4.3.7.1.c Reactivo de Marmé	59
4.3.7.1.d. Solución de ácido tánico	59
4.3.7.1.e. Solución de ácido pícrico	59
4.3.7.1.f. Bouchardat.....	59
4.3.7.2. Detección de Polifenoles y flavonoides	59
4.3.7.2.a. Reacción de Shinoda	59
4.3.7.2.b. Reacción de Rosenheim	60
4.3.7.2.c. Reacciones de toque sobre papel.....	60
4.3.7.2.d. Solución de Hidróxido de sodio.....	61
4.3.7.2.e. Solución de Ácido bórico	61
4.3.7.2.f. Solución de Cloruro férrico	61
4.3.7.2.g. Solución con Cloruro de aluminio	62
4.3.7.3. Detección de Terpenoides y esteroides.....	62
4.3.7.3.a. Reacción de Liebermann Buchard	62
4.3.7.3.b. Detección de saponinas.....	63
4.3.7.3.c. Reacciones de precipitación	63
4.3.7.4. Reacción de Fehling indirecta.....	64
4.3.7.5. Reactivo revelador: Anisaldehído sulfúrico.....	64
4.4. Métodos cromatográficos utilizados.....	65
4.4.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	65
4.4.1.1. CCD para Polifenoles.....	66
4.4.1.2. CCD para Terpenos y Esteroides	66
4.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD)	67
4.4.2.1. HPLC-DAD para Polifenoles.....	68
4.4.2.2. HPLC-DAD para Terpenos.....	68
4.5. Elaboración Nanoliposomas.....	70



4.5.1. Nanoliposomas Biodegradables	70
4.5.2. Nanoliposomas conjugados a anticuerpos monoclonales cargadas con infusión de “Chirimoya”:	72
4.5.3. Pruebas de Internalización Celular de los nanoliposomas	73
4.5.4. Cuantificación de los Fosfolípidos de los nanoliposomas	73
4.5.5. Comprobación de tamaño de nanopartículas	74
4.5.6. Cuantificación de extracto dentro de los liposomas.....	74
4.5.7. Técnica: Determinación del contenido de polifenoles totales de Folin- Ciocalteau para cuantificar la cantidad de extracto encapsulado	74
4.6. Actividad anti- leucémica linfocítica crónica	76
4.6.1. Obtención y procesamiento de células normales y leucémicas.....	76
4.6.2. Fenotipificación de las células obtenidas	78
4.6.3. Cultivos de las Células	78
4.6.4. Ensayo de Citotoxicidad y Apoptosis con Extractos de “Chirimoya” y nanoliposomas	79
4.6.5. Ensayo de Citotoxicidad con extractos de “Chirimoya”	80
4.6.6. Ensayo de Apoptosis con nanoliposomas	81
4.6.7. Análisis Estadístico	82
4.7. Predicción de la actividad drogas anticonvulsivas y antiinflamatorias.....	82
5. Resultados:.....	83
5.1. Análisis botánico	83
5.1.1. Morfología macroscópica y Microscopia analítica	83
5.1.2. Morfología macroscópica:.....	83
5.1.3. Análisis micrográfico	84
5.2. Pruebas de caracterización fitoquímicas efectuadas a los extractos y fracciones de hojas de <i>A. cherimola</i>	88
5.2.1. Rendimientos de los extractos de hojas de <i>A. cherimola</i> , calculados en % (g extracto/100 g de material vegetal seco).....	88
5.2.2. Detección de Alcaloides.....	89
5.2.3. Detección de Polifenoles:.....	90
5.2.4. Detección de Terpenoides y/o Esteroides	91
5.2.1.4.a. Reacción de Liebermann Bouchard.....	91
5.2.1.4.b. Detección de saponinas	91
5.2.1.4.c. Reacciones de precipitación	91
5.2.1.5. Reacción de Fehling indirecta:	92
5.3. Sistemas Cromatográficos.....	92
5.3.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)	92
5.3.1.1 CCD para Polifenoles (flavonoides) presentes en hojas de <i>A. cherimola</i>	92
5.3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD)	97
5.3.2.1. HPLC-DAD para polifenoles (Flavonoides y ácido cafeico) presentes en <i>A. cherimola</i>	97
5.3.2.2. HPLC-DAD para terpenoides presentes en <i>A. cherimola</i>	100
5.4. Nanoliposomas.....	102
5.4.1. Pruebas de internalización celular de los Nanoliposomas	102
5.4.2. Cuantificación de los Fosfolípidos de los liposomas	104
5.4.3. Determinación de tamaño y potencial	104
5.5. Ensayos de actividad.....	105
5.5.1. Fenotipificación celular por citometría de flujo	105
5.5.2. Actividad citotóxica de los extractos	106
5.5.3. Ensayo de citotoxicidad Nanoliposomas.....	111
5.5.4. Ensayos de Apoptosis con NLP	111
5.6. Predicción de la actividad anticonvulsiva y antiinflamatoria de compuestos detectados en <i>A. cherimola</i>	113
6. Discusión	115
Modelo computacional: Actividad anticonvulsiva y antiinflamatoria	121
7. Conclusiones	123



8. Resumen	125
9. Bibliografía	130
10. Abreviaturas	152
11. Participaciones en Congresos y Publicaciones	154
11.1. XVII Congreso Federación Farmacéutica Sudamericana FEFAS.	154
11.2. XXIV SILAE Congress and II Internacional Congress on Integrativen Medicine”	155
11.3. XXIII Congreso Farmacéutico Argentino. COFA Y I Jornadas Rionegrinas de psicofármacos	159
11.4. Exposición en la Reunión Científica SAFyT-AMA mayo 2017.....	161
11.5. Revista Científica S.A.F.yT.-A.M.A.,.....	162
11.6. Publicación en Revista Profesional Bifase.....	171
11.7. Primer Premio en el 2º Congreso de Preparaciones Magistrales.	178



Indice de Ilustraciones

Ilustración 1 Distribución de la familia Annonaceae (Heywood, 1985).....	16
Ilustración 2 <i>Annona cherimola</i> , A, rama florífera 1/2 t.n.:B, flor a la que se le quitó el pétalo anterior, aumentada; c, fruto ½ t.n.; D, el mismo cortado longitudinalmente para dejar ver los carpelos carnosos y las semillas; E, semilla t.n.; F., la misma cortada carpelos carnosos y las semillas; E, semilla t.n.; F., la misma cortada longitudinalmente para dejar ver el albumen rugoso (Milan J. Dimitri, 1987).	23
Ilustración 3 Alcaloides isoquinoleicos: (1) Annocherine A; (2) Annocherine B; (3) Cherianoine; (4) Romucosine H; (Chen Chung-Yi et al., 2001; estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).	26
Ilustración 4 Acetogenina: Aromin-A (Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 1999; estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).	26
Ilustración 5 Estructura de la “Rutina” (3-rutinosil quercetol) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).	38
Ilustración 6 Estructura de isoquercetina (3-O-glucósido de quercetina) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).....	38
Ilustración 7 Estructura del ácido cafeico (Ácido 3,4-dihidroxicinámico) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).....	39
Ilustración 8 Izquierda corresponde a la estructural del ácido oleanólico (ácido 3β-hidroxi-olea- 12- en - 28- oico; N°CAS: 508-02-1; peso molecular 456.7) Derecha, ácido ursólico (3β-Hydroxy-12-ursen-28-ic acid; N° CAS 77-52-1; peso molecular 456.7) (estructuras realizadas con el programa Marvin Sketch).....	40
Ilustración 9 Componentes de la sangre. (OpenStax College, anatomía y fisiología, Recuperado: Marzo 2020).....	42
Ilustración 10 Sintomas y diagnostico de la Americam Cancer Society. Guía detallada: CLL diagnosis.....	44
Ilustración 11 Esquema representativo del tamaño de los nanomateriales que se utiliza. (Schalit, 2020).....	46
Ilustración 12 Liposoma (bicapa lipídica) y en su interior en medio acuoso la Doxorubicina	48
Ilustración 13 Hojas de "Chirimoya" proceso de selección y molienda	52
Ilustración 14 Esquema de extracción marcha de Chen <i>et al.</i> modificada	57
Ilustración 15 Flavonoides: Reacción de Shinoda	60
Ilustración 16 Flavonoides: Reacción con ácido bórico	61
Ilustración 17 Flavonoides: Reacción con cloruro de aluminio.....	62
Ilustración 18 Terpenoides: Reacción de Liebermann Buchard	63
Ilustración 19 Azúcares: Reacción de Fehling indirecta.....	64
Ilustración 20 Esquema de nanoliposoma de fosfatidilcolina marcados con rodamina con infusión liofilizada de “Chirimoya”	70
Ilustración 21 Lipex extruder Transferra Nanosciences Inc 8855 northbrookcourt 10 ml extruder Modelo MAOP Psig 850; bar 58,6; Maot (°C) 80; Min Vol Extrusión 1ml	71
Ilustración 22 Esquema de Nanoliposoma marcada con CD-20.....	72
Ilustración 23 Obtención de células mononucleares de sangre periférica por Ficoll-Hypaque	77
Ilustración 24 La figura de arriba izquierda corresponde a Microscopio Binocular de fluorescencia (Motic Ba 210®). Arriba derecha al reactivo fluoroquench y Placa de 96 Microwells. Abajo izquierda Microscopio marca Motic de visión invertida con Fluorescencia del CUCAIBA. Abajo Derecha Microscopio Láser Confocal Espectral (CLSM) Leica TCS SP5. Laboratorio de Microscopía Avanzada Facultad de Cs. Exactas	81
Ilustración 25 Visualización de pelos de hoja fresca con Lupa Nikon con binocular C-W 10xA/22.....	84
Ilustración 26 Hoja seca de <i>A. cherimola</i> observada con lupa binocular.	84
Indice de Ilustraciones	



Ilustración 27 Epidermis adaxial. (100X). A la derecha, se observa por transparencia el parénquima en empalizada (pal)	85
Ilustración 28 Epidermis abaxial desprovista de pelos. (100X) s: estoma paracítico; e: célula epidermica; b: base del pelo. A la derecha: detalle del estoma paracítico (400X)	85
Ilustración 29 Pelos glandulares en hoja de <i>A. cherimola</i> . (100X) a) Observación en vista transversal. b) Base del pelo en vista transversal. c) Pelo y base en vista superficial	85
Ilustración 30 Izquierda hoja diafanizada de <i>A. cherimola</i> . (400X). Derecha hoja desprovista de epidermis (400X).....	86
Ilustración 31 Hoja de <i>A. cherimola</i> . Elementos observados luego del disociado leve (400X). Izquierda, Astroesclereida. Centro, Osteoesclereida. Derecha, Braquiesclereida	86
Ilustración 32 Hoja de <i>A. cherimola</i> . Elementos observados luego del disociado leve (400X). Izquierda, conjunto de braquiesclereidas. Derecha, elementos de los vasos	87
Ilustración 33 Hoja de <i>A. cherimola</i> . Elementos observados luego del disociado leve (400X).....	87
Ilustración 34 Precipitados característicos con ácido pícrico. Formación de cristales	89
Ilustración 35 Precipitados con Permanganato de potasio. Formación de cristales.....	89
Ilustración 36 Sistema 1 (EtOAc / AcOH / ForH / H ₂ O) (100:11:11:26).....	93
Ilustración 37 Sistema 2 (EtOAc/MetOH/H ₂ O 100:13,5:10)	93
Ilustración 38 Izquierda, sistema 1 (Tolueno / EtOAc 8:2). Derecha, sistema 2 (DCM/MeOH 95:5)	95
Ilustración 39 Ilustración 39 HPLC-DAD de las Sustancias de Referencia (Ácido caféico, Rutina, Isoquercetina)	97
Ilustración 40 Perfil por HPLC-DAD del extracto metanólico.....	98
Ilustración 41 Perfil por HPLC-DAD de fracción n-butanólica	98
Ilustración 42 HPLC-DAD del extracto acuoso	99
Ilustración 43 HPLC-DAD con la Fase Móvil 1 Terpenos.....	100
Ilustración 44 HPLC-DAD con la Fase Móvil 2 Terpenos.....	101
Ilustración 45 Vista general de LLC-B expuestas a NLP-RD-Chiri tomada de Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP con Microscopía Confocal.	103
Ilustración 46 vista de LLC-B individuales expuestas a NLP-RD-Chiri con filtro y sin filtro UV, realizadas en Centro de Microscopía. Microscopio Confocal Leica SP5 (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP).....	103
Ilustración 47 Estructura del ácido cafeico (Ácido 3,4-dihidroxicinámico) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).....	116
Ilustración 48 Estructura de la rutina también llamada 3-rutinosil quercetol, (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).....	116
Ilustración 49 Estructura de isoquercetina (3-O-glucósido de quercetina) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).....	117
Ilustración 50 Terpenoides presentes en hojas de <i>A. cherimola</i> . Izquierda corresponde a la estructura del ácido oleanólico (ácido 3β-hidroxi-olea- 12- en - 28- oico; N°CAS: 508-02-1; peso molecular 456.7) y derecha al ácido ursólico (3β-Hydroxy-12-ursen-28-ic acid; N° CAS 77-52-1; peso molecular 456.7) (estructuras realizadas con el programa Marvin Sketch).....	118



Indices de Tablas

Tabla 1 Compuestos aislados de <i>Annona cherimola</i> Mill. Se resume los compuestos presentes en distintos órganos de <i>A. cherimola</i> , así como sus actividades biológicas comprobadas.....	27
Tabla 2 Principios activos aislados de “Chirimoya” de diferentes extractos y fraccionamientos	32
Tabla 3 Estudios realizados de la Actividad biológica del Ácido Oleanólico y Ácido Ursólico, sus efectos	41
Tabla 4 Criterios de diagnóstico de cinco pacientes con B-LLC para los estadios 0-I de Rai.	76
Tabla 5 Criterios de diagnóstico para cinco pacientes con B-LLC resistentes a Fludarabina en estadio II y III de Rai	76
Tabla 6 Procesamiento de células de sujetos sanos como blanco.....	76
Tabla 7 Cuadro resumen de procesamiento de células normales y leucémicas.....	77
Tabla 8 Tipos de NLP	79
Tabla 9 Resultados de pruebas de detección de Alcaloides.....	89
Tabla 10 Reacciones de caracterización para polifenoles. Se indica coloración y fluorescencia al UV366.....	90
Tabla 11 CCD de los extractos y fracciones en los sistemas de solventes para Polifenoles	94
Tabla 12 CCD de los extractos y fracciones en los sistemas de solventes para Terpenoides...	96
Tabla 13 Resultados del porcentaje de penetración.....	103
Tabla 14 Fenotipificación celular por citometría de flujo.....	105
Tabla 15 Fenotipificación de las células obtenidas de muestras de B-LLC	106
Tabla 16 Citotoxicidad del extracto de Cloroformo 1	108
Tabla 17 Citotoxicidad del extracto de Cloroformo 2	108
Tabla 18 Citotoxicidad del extracto de n-butanol.....	108
Tabla 19 Citotoxicidad del extracto de Acetato de etilo.....	108
Tabla 20 Citotoxicidad fracción acuosa 1	108
Tabla 21 Citotoxicidad de infusión.....	109
Tabla 22 Citotoxicidad de infusión continuación	109
Tabla 23 Nivel de significancia de citotoxicidad de la Infusión comparada con células normales.....	110
Tabla 24 Porcentaje de Citotoxicidad de infusión	110
Tabla 25 Ensayo de citotoxicidad NLP.....	111
Tabla 26 Apoptosis en LLC-B tratada con NLP-CD20-Chiri	112
Tabla 27 Resultados de la predicción de la actividad anticonvulsiva y antiinflamatoria de compuestos informados en bibliografía de <i>A. cherimola</i>	113



1. Introducción

1.1. Las plantas son una de las fuentes más importantes de medicamentos:

Desde los comienzos de la humanidad se han utilizado las plantas medicinales por su valor terapéutico.

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), los sistemas de medicina tradicional siguen desempeñando un papel esencial en el cuidado de la salud ya que los países en desarrollo no tienen acceso a las especialidades medicinales y muchas veces es el único recurso terapéutico. Se calcula que aproximadamente un 80% de la población mundial utiliza las plantas y sus derivados para la atención primaria de salud (OMS, 2000; OMS, 2013).

Son excelentes fuente de principios activos medicinales: Aunque en la actualidad muchos de ellos se obtienen por síntesis o semisíntesis química, un 80% de los fármacos de síntesis disponibles encuentran su origen en las plantas medicinales.

Entre los ejemplos de drogas estudiadas en un principio por el uso tradicional de las mismas. (Rivera *et al.*, 2013; Walker, 2015), podemos citar: la digoxina, los antitumorales derivados de la vinca, la ergotamina, la morfina, la pilocarpina, la atropina, el taxol, la penicilina, etc. (Schwabe, 2017).

1.2. Plantas utilizadas en la medicina

Tradicionalmente las plantas propias de cada región geográfica son empleadas por la población local con diferentes fines medicinales. Este conocimiento se ha sido mantenido mediante transmisión oral, de generación en generación y a lo largo de los años. (Penco Martín *et al.*, 2003)

Pero estos saberes y su transferencia generacional están desapareciendo rápidamente debido a la adopción de una nueva cultura que pondera aspectos tecnológicos en detrimento de la medicina tradicional.

Debido a lo anteriormente dicho es necesario documentar estos conocimientos para “salvar” la cultura de los pueblos que es la construcción de la sabiduría colectiva de miles de años (Balunas *et al.*, 2005).



Hay que destacar que éste es un conocimiento de gran interés en medicina natural y cobra actualidad para corrientes alternativas y/o complementarias, resultando menos oneroso para la salud pública (Linares *et al.*, 1995; OMS, 2013; Pita Labori *et al.*, 2017; Rojas, 2019).

En los últimos años, se muestra mayor interés hacia los productos naturales por parte de los países industrializados por falta de nuevas moléculas de síntesis que presenten buenos efectos terapéuticos, pocos efectos secundarios y de toxicidad.

Es el momento donde la fitoterapia se muestra como una opción para el control de patologías que no responden a medicamentos convencionales (Bird, *et al.*, 2001; Rojas, 2019).

Es, por lo tanto, de suma importancia hallar nuevos compuestos, ya sea provenientes de la modificación de fármacos existentes, o bien surgidos de la búsqueda de nuevas sustancias naturales aún no exploradas.

Las plantas medicinales se encuentran en la Argentina incluidas en la categoría de medicamentos herbarios, por lo tanto, se hace necesario hacer llegar a la sociedad la idea de que todo fitopreparado empleado con los fines terapéuticos es un medicamento y por lo tanto hay que exigir el cumplimiento de los parámetros propios de los mismos: calidad, seguridad, y eficacia (OMS, 2003).

Las monografías de la farmacopea (FNA, 2008) así como las guías de procedimientos analíticos de la OMS (2011) son la bibliografía de elección respecto al control de calidad de las drogas vegetales, incluyendo las definiciones de identidad, pureza y contenidos o ensayos de principios activos, y siempre que sea posible constituyen la mejor estrategia es seguir.

Entre las metodologías analíticas utilizadas para estudiar la composición de un producto natural de origen vegetal, la cromatografía presenta importantes ventajas tales como su especificidad y la posibilidad de poder ser utilizados tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo, por lo cual constituyen una parte fundamental en el análisis de las plantas medicinales, siendo los más frecuentemente utilizados la cromatografía en capa fina (CCD o TLC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Ambos métodos se emplean tanto para el aislamiento de componentes individuales a partir de un extracto a escala preparativa como micropreparativa. (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).



1.3. La Leucemia Linfática Crónica de células B

Las neoplasias hematológicas son enfermedades que se originan en células hematopoyéticas anormales, las cuales presentan:

- ventaja proliferativa y rápida reproducción (como en el caso de las leucemias agudas).
- alteraciones en el proceso de desarrollo, maduración ó apoptosis (como en el caso de las leucemias crónicas).

En las neoplasias hematológicas las células hematopoyéticas anormales sufren una acumulación en el organismo (Reed., 1998; Rodriguez Diaz Regañon, 2015; Calvillo Batlles *et al.*, 2015).

La Leucemia Linfática Crónica de células B (LLC- B) sigue siendo la leucemia del adulto más frecuente y sin tratamiento curativo definitivo por el momento (Robak T., 2005; Dupont, 2016).

Las nuevas drogas y los anticuerpos monoclonales entre otros, han representado verdaderos avances farmacológicos, pero en general los efectos colaterales indeseables son frecuentes y la aparición de resistencia o recidiva es inevitable (Faderl *et al.*, 2006).

Sabemos que la quimioterapia resulta aún una alternativa válida para el tratamiento de diferentes tipos de neoplasia, entre ellos la leucemia con alta tasa de replicación, (Bryd *et al.*, 1998; Valdespino Gomez, 2014) según los tres principios:

- Gompertz (Norton L ,1976): si “la masa tumoral es mayor el periodo de duplicación es prolongado”.
- Goldie & Coldman (1983): “las células antitumorales desarrollan mutaciones espontáneas; (resistencia al fármaco)”.
- Skipper (1964): “los antineoplásicos actúan con cinética de primer orden”, es decir que destruyen una fracción constante de la masa tumoral.

Estos conocimientos han resultado de enorme utilidad para planificar la administración de los diversos medicamentos antineoplásicos.

A partir de ellos ahora sabemos que si la masa tumoral es grande el ritmo de crecimiento se enlentece, resultando que debemos asociar las distintas drogas para evitar la resistencia; o bien que, al eliminarse una fracción constante de células, los fármacos deben administrarse en ciclos secuenciales (Crown y Norton, 1995).

Por otro lado, existe una verdad irrefutable: un antineoplásico es capaz de eliminar a cualquier célula tumoral, si se administra en las concentraciones adecuadas (De Vita *et*



al., 1975). Sin embargo, la limitación está dada por los efectos adversos que provocarían dichas dosis sobre las células normales.

1.4. Los anticuerpos monoclonales y leucemia

Los fármacos con anticuerpos monoclonales han aportado un enorme avance en la terapéutica ya que se focalizan en el blanco hacia el cual van dirigidos, actúan por saturación, siendo muchas veces limitados sus efectos sobre enfermedades con gran masa tumoral como lo es la LLC-B (van Der Velden *et al.*, 2001; Colunga Pedraza *et al.*, 2017; Best Aguilera *et al.*, 2018).

El objetivo del fármaco ideal en esta patología sería entonces, lograr someter a las células LLC a una dosis apoptótica del mismo, personalizando el efecto solo en ellas, sin involucrar a las células sanas, minimizando así los efectos adversos, y maximizando los resultados esperados, especialmente en aquellas situaciones donde se ha desarrollado resistencia a drogas.

Resulta entonces prioritario desarrollar nuevas modalidades terapéuticas y así incrementar las posibilidades de los fármacos anti-LLC ya existentes, aportando una mayor actividad biológica, una mayor especificidad, buscando calidad, eficacia y seguridad.

1.5. La nanotecnología y leucemia

La nanotecnología, es una de las ciencias que estudia, desarrolla y emplea sistemas complejos de escala nanométrica, que podría ser la clave para mejorar los resultados, tanto diagnósticos como terapéuticos en oncología, pero muy especialmente en onco-hematología y LLC-B (Vicent & Duncan, 2005; Barboza Almeida, 2009; Santos Dias, 2017).

Las nanopartículas, tienen la posibilidad de ser construidas y diseñadas con diferentes materiales y/o polímeros naturales o sintéticos, casi a medida para cada enfermedad (Ferrari, 2005; Pagani *et al.*, 2008; Santos Dias, 2017) y muy especialmente para B-LLC (Mansilla *et al.*, 2019).



Las drogas son disueltas y encapsuladas dentro de una “cáscara” de matriz polimérica; y de acuerdo a como sean producidas, se podrán controlar la liberación del fármaco incorporado (Moses *et al*, 2003).

En la actualidad hay varios modelos polímero-proteína y otros modelos conjugados polímero- fármaco en fase clínica, pero hasta donde sabemos, no hay muchos antecedentes del uso de nanopartículas biodegradables (NPB) cargadas con extractos vegetales, para el tratamiento de la LLC como se propone en esta investigación.

Asimismo, la nanotecnología permite la posibilidad de adherir anticuerpos monoclonales específicos en la superficie de las NPB, dirigiendo selectivamente a éstas contra los componentes antigénicos específicos de las células tumorales, facilitando su internalización por endocitosis y posterior liberación de su carga de drogas ó las combinaciones más efectivas de las mismas. Actuando en el citoplasma de cada una de las células malignas, disminuyéndose así los efectos colaterales y proveyendo potencialmente, grandes cantidades de medicamento intracelular, aún de aquellos que tengan grandes dificultades de biodisponibilidad o farmacocinética para alcanzar concentraciones antitumorales útiles, venciéndose de esta manera el mecanismo de resistencia tumoral y logrando un aumento en la sobrevida de los pacientes (Marin *et al.*, 2008).

1.6. Fundamentos de la elección del tema

A pesar de los usos tradicionales conocidos para las especies de la familia Annonaceae, no existen para **hojas y tallos** de la especie *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) “**Chirimoya**”, antecedentes de estudios micrográficos o fitoquímicos que permitan su reconocimiento, ni datos farmacológicos o toxicológicos, que justifiquen su empleo en el tratamiento de la LLC.

Se propone entonces:

- La obtención de distintos extractos, totales y/o sus fracciones, seleccionando los de mayor actividad.
- La caracterización de grupos fitoquímicos presentes en hojas de *A. cherimola*, así como el establecimiento de perfiles cromatográficos que contribuyan a la determinación de la genuinidad de esta droga vegetal o la detección de sus posibles adulterantes.



-El desarrollo y aplicación distintas técnicas mediante las cuales con los extractos obtenidos (libres y vehiculizados en nanopartículas) se realizarán estudios antineoplásicos *in vitro* en células linfoides malignas provenientes de la estirpe LLC-B resistente a quimioterápicos.



2. Antecedentes

2.1. Botánica

2.1.1. Familia Annonaceae

2.1.1.1. Descripción general de la familia Annonaceae y del género *Annona*

Annonaceae es una de las familias más antiguas de plantas y es la familia más amplia dentro del orden Magnoliales. Las plantas pertenecientes a dicha familia se encuentran distribuidas a través de áreas subtropicales y tropicales: en América (900 especies), en África (450 especies) y en Australasia (1200 especies).

La familia Annonaceae, está compuesta por 130 géneros con aproximadamente 2500 especies. De ellas, alrededor de 300 a 400 especies producen frutos comestibles de formas muy variadas. Algunas tienen, además del uso alimenticio, interés desde el punto de vista medicinal, como insecticidas, en perfumería, como condimento y ornamental (Cruz, 2002).

El gran número de especies de la familia Annonaceae y las dificultades para la clasificación, no permiten detallar la variedad en cuanto a flores, frutos y morfología del polen, hábitat, preferencias de hábitat y aspectos de la polinización. Esta variabilidad contribuye a explicar su aparente capacidad para ocupar un amplio rango de nichos ecológicos.

Estudios realizados en el Amazonas han permitido afirmar que la familia Annonaceae está entre las cinco familias de plantas más importantes en términos de diversidad y abundancia de especies. (González Vega, 2013; Valencia *et al.*; 1994)

Del total de generos de Annonaceae, solo cuatro contienen especies de importancia económica en la fruticultura moderna, estos son: *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimia*. El género *Annona* es el más importante en la fruticultura, ya que posee la mayoría de especies comestibles, incluyendo “Anona”, “Guanabana” y “Chirimoya”.

2.1.1.2. Descripción botánica del género *Annona* L.

Integrado por unas sesenta especies originarias en su mayoría de América tropical. Árboles o arbustos inermes o espinosos, de hojas simples, enteras y flores generalmente



solitarias, pedunculadas, terminales u opuestas a las hojas. Posee flores hermafroditas, regulares, de cáliz compuesto de tres sépalos pequeños, valvados; seis pétalos, de prefloración valvada, dispuestos en dos series, la serie interior a veces es más pequeña o aún puede faltar.

Los estambres son numerosos, íntimamente coherentes entre sí, con el conectivo prolongado, terminado en un apéndice más ancho; anteras bitecas, de dehiscencia longitudinal. Carpelos numerosos, a menudo coherentes, uniovulados; estambres numerosos dispuestos en varias series (Gayoso y Chang, 2017). Fruto sincárpico carnoso muy desarrollado.

Claves de las especies:

A. Hojas densamente pubescentes en la cara inferior. Frutos lisos..... *A. cherimola*

AA. Hojas glabras o sólo ligeramentes pubescentes a lo largo de la nervadura

B.Pétalos internos muy desarrollados. Frutos espinosos*A. muricata*

BB. Pétalo internos muy pequeños. Fruto tuberculado.....*A. squamosa*
(Dimitri M.J., 1987).

2.1.1.3. Distribución geográfica y hábitat

La familia Annonaceae se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. Habitan en los bosques siempre verdes de tierras bajas (Heywood, 1985). En el siguiente mapa se representa su distribución.



Ilustración 1 Distribución de la familia Annonaceae (Heywood, 1985)



2.1.1.4. Antecedentes de Annonaceae

Desde el punto de vista químico, Annonaceae es una de las familias de plantas tropicales menos conocidas, destacándose la presencia de alcaloides bencil isoquinoleínicos. Sin embargo, los estudios fitoquímicos y, en menor extensión, los estudios farmacológicos sobre especies de Annonaceae se han intensificados en los últimos años.

Este interés comenzó a partir del descubrimiento, en el año 1982, de la uvaricina aislada de las raíces de *Uvaria acuminata*, la primera acetogenina reportada (Jolad *et al.*, 1982; Alali *et al.*, 1998) de las llamadas “acetogeninas de Anonáceas”, una clase de compuestos naturales exclusivos de esta familia, con gran variedad de actividades biológicas, tales como citotóxica, antitumoral, plaguicidas, antimaláricas, antihelmínticas, antivíricas y antimicrobianas, cardiotónico e insecticida (Zafra-Polo *et al.*, 1996; Alali *et al.*, 1999; Schlie Guzman *et al.*, 2009).

Como ejemplo, podemos citar: efecto antitumoral en perros (Gaviria Calle *et al.*, 2018), actividad antioxidante y antiproliferativa en líneas celulares neoplásicas (Santos y Santana, 2001; Schlie Guzman *et al.*, 2009; Munguia, 2015), actividad estimulante de la producción de biofilms bacterianos aprovechados para la biorremediación (Parrellada *et al.*, 2011).

2.1.1.5. Antecedentes de uso en medicina tradicional

Algunas especies de la familia Annonaceae han sido utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de diversas afecciones.

En tal sentido podemos citar la utilización del “Anón”, *Annona squamosa* L. y “Yaya”, *Oxandra lanceolata* (S.W) Bail. para el tratamiento de problemas gastrointestinales (Scull Lizama *et al.*, 1998; Beneval Bento *et al.*, 2016)

Annona globiflora Schldl. se emplea para el control de la presión arterial; la tos seca y con flema y la llamada “diarrea de empacho” (Gheno Heredia, 2011).

La “graviola” *Annona muricata* se usa en medicina natural. La fruta y el jugo de fruta se toman para gusanos y parásitos, para disminuir la temperatura en casos de fiebre, para aumentar la leche materna después del parto y como astringente para la diarrea y la disentería. Las semillas trituradas se usan contra parásitos internos y externos, piojos y



gusanos. La corteza, las hojas y las raíces se consideran sedantes, antiespasmódicas, hipotensoras, y se preparan en té para diversos trastornos relacionados con esos efectos. (Yajid *et al.*, 2018)

Por otra parte, la “Graviola” también tiene uso registrado en la medicina indígena. En los Andes peruanos, se usa un té de hoja para el catarro (inflamación de las membranas mucosas) y la semilla triturada se usa para matar parásitos. En la Amazonía peruana, la corteza, las raíces y las hojas se usan para la diabetes, como sedante y antiespasmódico. Las tribus indígenas en Guyana usan té de hoja y / o corteza como sedante y tónico cardíaco. En la Amazonía brasileña, el té de hoja se usa para problemas hepáticos, y el aceite de las hojas y la fruta verde se mezclan con aceite de oliva y se usan externamente para la neuralgia, el reumatismo y el dolor de la artritis. En Jamaica, Haití y las Indias Occidentales, la fruta y / o jugo de fruta se usan para la fiebre, parásitos y diarrea; la corteza o la hoja se usa como antiespasmódico, sedante y nervioso para afecciones cardíacas, tos, gripe, parto difícil, asma, hipertensión y parásitos. (Rady *et al.*, 2018)

Los estudios de los compuestos hallados en extractos de *Annona muricata* se relacionan con una variedad de efectos anticancerígenos que incluyen citotoxicidad, inducción de apoptosis (Pieme *et al.*, 2014), necrosis (Torres *et al.*, 2012) e inhibición de la proliferación (Sun *et al.*; 2016) en una variedad de líneas celulares de cáncer, incluyendo mama, próstata, colon rectal, pulmón, leucemia, renal, pancreático, hepático, oral, melanoma, cervical y de ovario. Además, todas las partes aéreas de esta planta, incluida la corteza, los frutos, las hojas, la raíz y las semillas, se usan como medicamentos naturales en los trópicos. (Rady *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2012; Jaramillo *et al.*, 2000). Sus bondades han sido estudiadas por el Instituto Purdue, en Indiana (USA) que avala sus aplicaciones y la considera uno de los más poderosos anticancerígenos que existen. Esto se atribuye a la alta concentración de acetogeninas (Ragasa *et al.*, 2012; Gleye *et al.*, 1997) que pueden inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerígenas. (Morton, 1987; Badrie *et al.*, 2010; Rady *et al.*, 2018).

2.1.1.6. Componentes químicos de las hojas de *Annona muricata*

Tradicionalmente, diversas especies del género *Annona* han sido utilizadas en el tratamiento de afecciones entre las que se cuentan los distintos tipos de cáncer



mencionados en el punto anterior (Quispe *et al.*, 2006; Ruiz Hidalgo *et al.*, 2014; Yajid *et al.*, 2018; Coria-Téllez *et al.*, 2016).

Respecto a la composición fitoquímica de *A. muricata* se encuentra que contiene una alta concentración de metabolitos de clase secundaria, como alcaloides, saponinas, terpenoides, flavonoides, cumarinas y otras lactonas, antraquinonas, taninos, glucósidos cardíacos, fenoles y fitosteroles. También cabe mencionar la presencia de compuestos como megastigmanos, ciclopéptidos y aceites esenciales, así como minerales esenciales, como K, Ca, Na, Cu, Fe y Mg (Yajid *et al.*, 2018; Gavamukulya *et al.*, 2014; Coria-Téllez *et al.*, 2016; Liaw *et al.*, 2016; Alonso, 2004).

Se puede enumerar los siguientes alcaloides de tipo isoquinolínico dentro de su composición: annomonicina, annomurina, annonaína, annoníina, (+) coclaurina, (+) coreximina, (+) reticulina. Alcaloides misceláneos: muricina, muricinina, estefarina, aterospermina, aterosperminina (Mahabir, 1995).

Entre los lípidos podemos citar los glicéridos de ácido esteárico, ácido linoleico y ácido lignocérico (Mahabir, 1995; Moghadamtousi *et al.*, 2015; Coria-Téllez *et al.*, 2016; Liaw *et al.*, 2016).

Además se han reportado las siguientes lactonas: annomontacina, annonacina, muricatacina (Mahabir, 1995; Moghadamtousi *et al.*, 2015; Coria-Téllez *et al.*, 2016; Liaw *et al.*, 2016).

Pero los compuestos a los que se le atribuye en gran parte su actividad anticancerígena son las acetogeninas anonáceas, de las cuales se ha demostrado que inducen la citotoxicidad celular al inhibir el complejo mitocondrial I (Yajid *et al.*, 2018; Coria-Téllez *et al.*, 2016; Liaw *et al.*, 2016).

2.1.2. Especie: *Annona cherimola* Mill.

2.1.2.1 Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: magnoliidae



Orden: Magnoliales

Suborden:

Familia: Annonaceae

Subfamilia: Annonoideae

Tribu: Annoneae

Género: *Annona*

Especie: *Annona cherimola* Miller

(International Plant Names Index, 2020)

Sinonimia y Nombres comunes:

Sinonimia en latín: *Annona pubescens* Salisb. *Annona tripetala* Aiton

Quechua: “Chirimoya”

Aymara: “Yuructira”

Español: “Chirimoya”, “Cherimoya”, “Cherimalla”, “Cherimoyales”, “Anona del Perú”, “Chirimoyo del Perú”, “Cachimán de la China”, “Catuche”, “Momona”, “Girimoya”, “Masa”, “Anona”, “Uruata” (lengua purhépechaanón), “Bichichinejo”, “Catreche”, “Chirimorriñón”.

Portugués: “Cherimólia”, “Grabiola”, “Graveola”, “Graviola”

Inglés: “Cherimoya”, “Cherimoyer”, “Annona”, “Custard-apple”,

Francés: “Chérimolier”, “Anone”.

Italiano: “Cerimolia”

Holandés: “Cherimola”, “Cherimola”

Alemán: “Chirimoyabaum”, “Cherimoyer”, “Cherimola”, “Peruanischer”, “Flaschenbaum”, “Flachsbaum”.

Japanese: “Cherimoa”, “Cherimoya”

México: “Pox or poox”

Hindi: “Hanuman phal”, “Marytiphal”

(González Vega, 2013; Arun Jyothi *et al.*, 2011)

2.1.2.2. Historia y Etimología

En Perú, Chile, España y México, el fruto es conocido como “Chirimoya”, en cambio en Costa Rica se lo llama “Anona”.



Etimológicamente “Anona” (nombre que se le da al fruto) proviene del nombre popular Anón (nombre del árbol en las poblaciones aborígenes). El nombre “Chirimoya” proviene del quechua, (lengua nativa de los Andes peruanos). En el manual de W. Popenoe, citado por Gardiazabal (1993), esta palabra es traducida como semilla fría ya que “chiri” significa frío y “moya” semilla.

Agrega Gardiazabal que el chileno Benjamín Vicuña Mackenna, en su obra “De Valparaíso a Santiago” escribe acerca de las chimoyas que crecen en Aconcagua, donde “moyu” significa “seno” en lengua quechua, por lo que otra traducción de “Chirimoya” significaría “seno frío” o “seno helado de mujer”.

En el período precolombino, los valles interandinos y algunas áreas similares en Mesoamérica fueron mantenidas por nuestros indígenas para el cultivo de las anonas; ellos encontraron en estos frutales, adaptabilidad, variedad de sabores y gran valor nutritivo. Las tres especies más conocidas del género anona, son: *Annona muricata* (“guanábana” en español, “graviola” en portugués y “soursop” en inglés), *A. squamosa* (conocida como “soncoya” en nuestro país; “sarumuyo” o “anón” en español; “ata” o “pinha” en portugués y “sugar apple” en inglés) y *A. cherimola*, del quechua “chirimuya”, conocida en español como “anona” o “Chirimoya”, “cherimoyer” y “custard apple” en inglés; “anona do Chile”, “fruta do conde” o “cabeza de negro” en portugués; “chérimole”, “corossol du Perou” y “cherimolier” en francés; “cherimoia”, “cherimoyabaum” y “perunischer fraschenbaum” en alemán (García, 1956).

2.1.2.3. Origen y distribución geográfica

El origen de la “Chirimoya” es materia de discusión y suele justificarse con observaciones tales como la gran variabilidad de anonas existentes en Mesoamérica y Sudamérica.

Algunos autores dicen que es originaria de las tierras altas de Mesoamérica, de la región montañosa del Sur del Ecuador y del Norte del Perú, porque constituye un “punto de máxima diversidad”.

La evidencia biológica a favor de la segunda región, basado en que crece en estado espontáneo formando bosques naturales en Los Andes, es dudosa, ya que las especies de *Annona* tienden a naturalizarse fácilmente.



Los datos arqueológicos que parecen indicar a América del Sur como área de origen son muy escasos e inseguros, mientras que la evidencia histórica se inclina por Mesoamérica (Castro, 2007).

Actualmente, la “Chirimoya” está presente en sitios naturales o en huertos semi-domesticados en los valles interandinos, ya sea por crecimiento espontáneo o cultivo para su comercialización, en Ecuador, Perú, Bolivia, España, México y Estados Unidos (Bioversity International y Cherla; 2008).

Ibar (1979) dice que es originario del Perú, donde se encuentra espontáneo en los Andes, hasta alturas de 1500 metros su cultivo se ha extendido por México, California, Antillas, Argentina, Chile, África, Central, Indochina, Islas Canarias y en el litoral mediterráneo, por Argelia, Egipto, Israel y en España en el sur de las provincias de Granada y Málaga. En cambio, Sanjinés *et al.* (2006) dicen que es originaria de los valles fríos, pero libres de heladas, de los Andes en el sur de Ecuador. Se desarrolla comúnmente entre 1.500 msm y 2.000 msm y se la encuentra creciendo silvestre, en huertas y jardines. Señala, además, que su cultivo para la comercialización se extiende en España, Chile, Australia, Israel y USA.

En conclusión, todos los autores coinciden que su origen es la zona de centro América en los valles trasandinos en alturas de 1500 y 2000 m extendiéndose a Ecuador o Perú, según el autor. Otros amplían esta zona a Colombia y Bolivia, por hallarse allí la mayor diversidad de la especie, y que después se ha esparcido su cultivo, sea para jardines domésticos o para la comercialización de su fruta, entre la zona de los trópicos de América y Europa, en regiones donde no hace mucho calor ni hay heladas. (Haag, 2018)

2.1.2.4. Descripción morfológica y anatómica

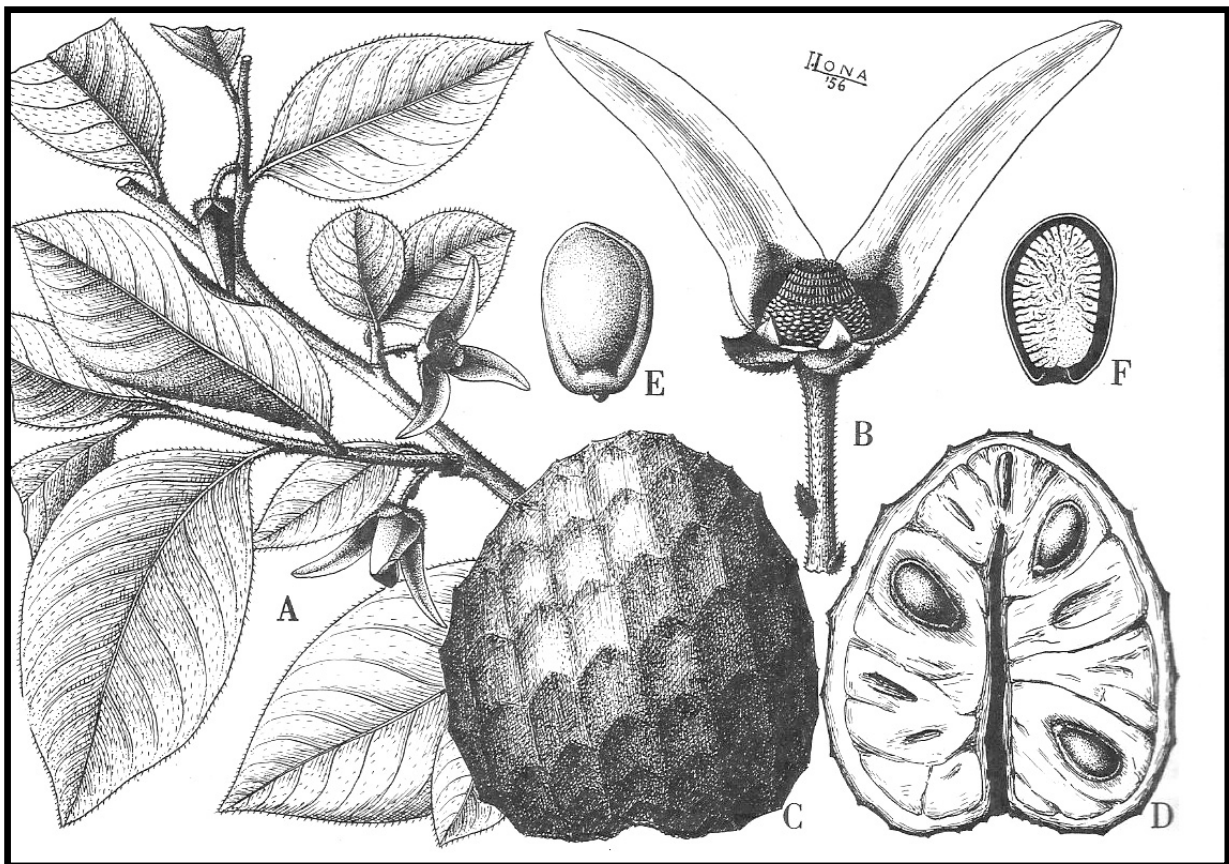


Ilustración 2 *Annona cherimola*, A, rama florífera 1/2 t.n.:B, flor a la que se le quitó el pétalo anterior, aumentada; c, fruto 1/2 t.n.; D, el mismo cortado longitudinalmente para dejar ver los carpelos carnosos y las semillas; E, semilla t.n.; F., la misma cortada carpelos carnosos y las semillas; E, semilla t.n.; F., la misma cortada longitudinalmente para dejar ver el albumen rugoso (Milan J. Dimitri, 1987).

La “Chirimoya” es un árbol de crecimiento lento y exuberante follaje, que puede adquirir en su madurez una altura de 7 a 8 m; de porte erguido y a veces ramificado irregularmente. Crece y se cultiva en regiones tropicales o subtropicales de suelos arcillo-arenosos, con buen drenaje, entre los 900 y 1800 msm, sobre todo en la región andina de Perú y Ecuador, donde se lo cultiva.

Las hojas son simples, enteras, de entre 10 a 25 cm de longitud, de disposición alterna y forma ovalada u oval-lanceolada, ligeramente coriáceas, de color verde oscuro en la cara adaxial y aterciopelada en el envés, debido a la presencia de numerosos tricomas eglandulares. El peciolo, de aproximadamente 1 cm de longitud, es acanalado en la cara adaxial y pubescente.



Tanto las hojas como los tallos son utilizados en la medicina tradicional latinoamericana para el tratamiento de distintas patologías, entre ellas distintos tipos de cáncer, y con esos propósitos se comercializan.

Las flores son solitarias, opuestas a las hojas, de seis pétalos amarillentos jaspeados de púrpura, hermafroditas, muy aromáticas, poco llamativas, solitarias o en ramilletes de dos o tres, sobre un pedúnculo corto e hirsuto, insertado inclinado en las axilas de las hojas. El caliz esta formado por 2-4 sépalos. Corola con 6 pétalos, dispuestos en dos ciclos, prefloración imbricada o valvada.

Estambres numerosos, dispuestos en varias series, filamentos breves, anteras conniventes, bitecas, conectivo glanduloso en el ápice.

Gineceo súpero, formado por numerosos carpelos, íntimamente adosados entre sí o bien separados, a veces reducidos a uno solo, estigma simple, capitado-oblongo o bilobulado, lóculos 1-pluriovulados (FAO, 2006; Gonzalez Vega, 2013; Gayoso y Chang, 2017).

Como en todas las especies de esta familia, el fruto es sincárpico de 15-20 cm de largo, cordiforme, de color verde claro, pulpa blanca y semillas negras. Está conformado por un agregado de frutos adheridos sobre un sólo receptáculo, producto de las pequeñas flores que se fecundan por separado. Así, la “Chirimoya” perfecta es acorazonada y sólo se consigue en condiciones ideales de polinización, abundante y uniforme, hecha por escarabajos, como la mayoría de las especies pertenecientes al orden Magnoliales, o por la mano humana. Su tamaño es similar al pomelo y llega a pesar 500-800 g (Hoyos, 1994). El interior de la fruta, de color blanco, posee una textura carnosa, blanda y de sabor dulce, semi-acido, a veces descrito como una mezcla entre la piña, el mango y la fresa (FAO, 2006; Gonzalez Vega, 2013; Gayoso y Chang, 2017).



2.2. Antecedentes Fitoquímico de *A. cherimola*

2.2.1. Antecedentes fitoquímicos: su relación con las actividades biológicas y usos en la medicina tradicional

La planta de “Chirimoya” cuenta entre sus componentes, diferentes metabolitos secundarios: alcaloides, esteroides, saponinas, acetogeninas, flavonoides, taninos, esteroides insaturados, terpenoides, aceites esenciales etc. (Castro, 2007; Bioversity Internacional y Cherla; 2008)

Otros autores coinciden que en los tallos y semillas de *Annona cherimola* poseen compuestos tales como alcaloides, terpenoides, flavonoides, ácidos grasos saturados e insaturados, acetogeninas, (González Vega, 2013) que han demostrado actividad antitumoral (Quispe *et al.*, 2009).

Las semillas de “Chirimoya” son una importante fuente de acetogeninas, coincidiendo su actividad con el uso popular (Arun Jyothi *et al.*, 2011; Cortes *et al.*; 2014; Paes *et al.*, 2016).

Las hojas de *Annona cherimola* se utilizan en la medicina popular para el tratamiento de golpes o torceduras, por su acción antiinflamatoria. En la forma de té se emplea contra la diarrea, infecciones intestinales y úlcera. Las semillas molidas sin cáscara se recomiendan como emético e insecticida, principalmente para matar piojos, como antiparasitario y en trastornos de la piel. El té de la cáscara del fruto se usa para combatir tos, resfrío, gripe, pulmonía y neumonía (Márquez *et al.*, 1999; Haag, 2018).

Se conocen numerosas actividades por la presencia de metabolitos secundarios con diversas propiedades farmacológicas: antitumorales, insecticidas, dopaminérgicos, antimaláricos, etc. Si bien la familia Annonaceae se ha caracterizado especialmente por la presencia de alcaloides benciltetrahydroisoquinolínico, a partir de los años 80 se descubrieron las “acetogeninas de Annonaceae”, compuestos exclusivos y que han resultado ser metabolitos secundarios de gran originalidad, tanto química como biológica.

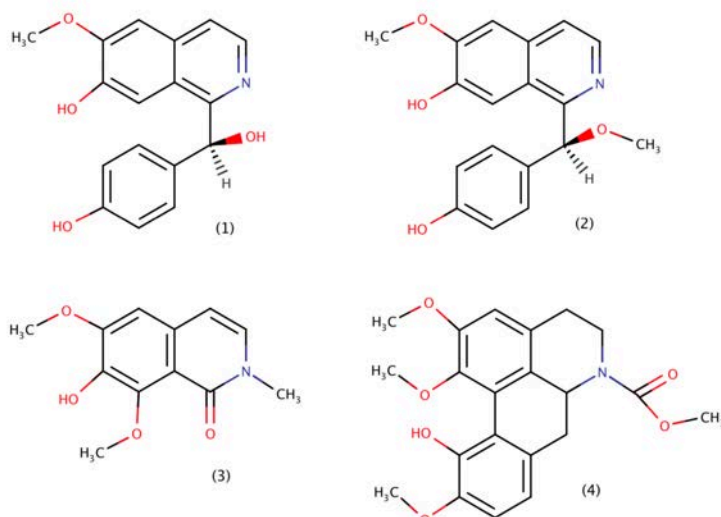


Ilustración 3 Alcaloides isoquinoleicos: (1) Annocherine A; (2) Annocherine B; (3) Cherianoine; (4) Romucosine H; (Chen Chung-Yi et al., 2001; estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).

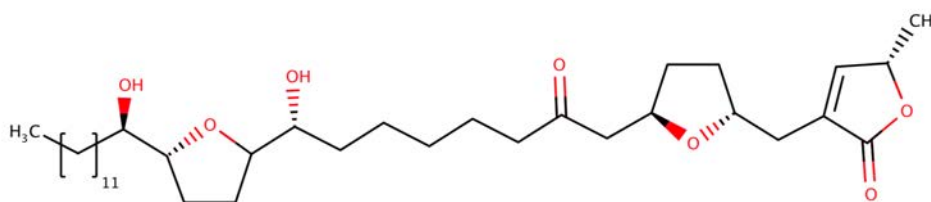


Ilustración 4 Acetogenina: Aromin-A (Chen Chung-Yi et al., 1999; estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).

Hay estudios que demuestran que las acetogeninas tienen una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial, concretamente de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I).

En particular la acetogenina aislada de las semillas de *Annona cherimola*, con una función β -hidroxi γ -lactona, inhibe con mayor potencia la cadena respiratoria mitocondrial. (Cortes et al.; 2014).

Recientemente las acetogeninas: la herradurina, junto con la itrabina, jeteina y otivarina, fueron las primeras aisladas en las semillas de *Annona cherimola* con una función hidroxilada en la γ -lactona.

La herradurina exhibe la capacidad de inhibir las líneas celulares tumorales y al mismo tiempo no afectar a las células no-tumorales. Se trataría por tanto de un serio candidato a su utilización como antitumoral (De Pedro et al., 2012).



Tabla 1 Compuestos aislados de *Annona cherimola* Mill. Se resume los compuestos presentes en distintos órganos de *A. cherimola*, así como sus actividades biológicas comprobadas

Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	Fuente	Actividad biológica reportada	Referencia
Annomolona A	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Jong Keun Son <i>et al.</i> , 2003)
34-epi-annomolona A	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Jong Keun Son <i>et al.</i> , 2003)
Amidas	Amidas	Corteza	-----	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 2001)
Annomolona B	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Jong Keun Son <i>et al.</i> , 2003)
Annocherina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Woo <i>et al.</i> , 1999)
Cherimolina	Alcaloide	Corteza	-----	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 1997)
N-cis-cafeoil tiramina	Amida	Corteza	-----	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 1998)
Dihidro-feruloiltiramina	Amida	Corteza	-----	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 1998)
Isomolvizarina-1	Acetogenina	Raíz	-----	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 2001)
Isocherimolina	Acetogenina	Raíz	-----	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 2001)
Isomolvizarina-2	Acetogenina	Raíz	-----	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 2001)
Annomolina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Dal Hwan Kim, <i>et al.</i> 2001)
Annocherimolina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Dal Hwan Kim <i>et al.</i> , 2001)
Aromina-A	Acetogenina	Corteza	Citotóxica	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 1999)
Annocherina A	Alcaloide	Corteza	Inhibe agregación de plaquetas	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 2001)
Annocherina B	Alcaloide	Corteza	Inhibe agregación de plaquetas	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 2001)
Cheranoína	Alcaloide	Corteza	Inhibe agregación de plaquetas	(Chen Chung-Yi <i>et al.</i> , 2001)

2.2.1.1. Actividad antidiabética

Siendo la actividad antidiabética una de las propiedades atribuidas a las hojas de *A. cherimola*, se han llevado a cabo diversos estudios *in vivo*, utilizando distintos modelos de inducción de diabetes tipo 2 en ratas, tendientes a validar este uso popular. Los



resultados han sido muy alentadores, si bien aun no hay pruebas clínicas que los confirmen.

En el trabajo de Chakrapani y Roja (2012) se probó la actividad antidiabética del extracto de hojas de *A. cherimola* en ratas inducidas a hiperglucemia por estreptozotocina. Cuando el extracto de hojas de *A. cherimola* era administrado a ratas normales y diabéticas, se observó en estas últimas una disminución del nivel de glucosa en sangre después de 2 h, con efecto máximo a las 6 h. Se presume que el extracto de la hoja podría estimular la liberación de insulina y restaurar el nivel de glucosa en sangre a sus valores normales.

La actividad hipoglucémica del extracto metanólico de las hojas de *A. cherimola* fue comparable al de la glibenclamida, un fármaco hipoglucemiante estándar (Rojas Rani *et al.*, 2011).

En el trabajo de Solares-Pascasio *et al* (2013) efectuado en ratas con diabetes mellitus tipo 2, estas fueron tratadas durante 4 semanas con 300mg/kg/d de un extracto etanólico de *A. cherimola* y se midieron los niveles de glucosa en ayuno y el peso de las ratas. Luego del tratamiento se observó un descenso en los niveles de glucemia de los animales (de 290mg/dL a 108mg/dL a partir de la segunda semana) en comparación con el grupo control diabético (de 290mg/dL a >500mg/dL).

F. Calzada *et al.* (2017) midió la glucemia postprandial en ratas con diabetes tipo 2 inducida por aloxano, encontrando que la administración del extracto etanólico de hojas disminuía la hiperglucemia postprandial de 331,5 mg/dL a 149.2 mg / dL.

2.2.1.2. Actividad antimicrobiana y antiviral

El aceite esencial de hojas, flores y frutos de *A. cherimola* fue estudiado por su actividad antimicrobiana y antifúngica in vitro contra cinco microorganismos: gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) y gram negativos (*E. coli*, *Shigella sonnei* y *Proteus mirabilis*) y un hongo (*Candida albicans*).

Los resultados mostraron que los valores más altos de inhibición se observaron para el extracto de hoja contra *E. coli*, atribuyéndose esta actividad al trans-cariofileno presente en la esencia (Rios *et al.*, 2003; Knôpfel Capelinha, 2018).

El cherimolaciclopéptido E, compuesto presente en las semillas de esta planta, exhibió actividad antihelmíntica (Rajiv Dahiya, 2007; Knôpfel Capelinha, 2018)



Al igual que para *A. muricata*, los extractos metanólicos de las semillas de *A. cherimola* inhibieron, *in vitro*, la replicación del virus herpes simple tipo 2 (HSV-2) (Betancur-Galvis *et al.*; 1999; Knöpfel Capelinha, 2018).

2.2.1.3. Actividad asociada con trastornos dopaminérgicos

Los alcaloides isoquinoleínicos encontrados en Annonaceae (por ejemplo, la annonaina en “Chirimoya”), se biosintetizan a partir de dos moléculas de tirosina (p-OH-fenilalanina) pasando a dopamina. Dicha molécula muestra afinidad por algunos de los receptores dopaminérgicos aumentando la recaptación de la dopamina. Estos receptores están implicados en desórdenes importantes del comportamiento como la esquizofrenia, enfermedad de Huntington, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y la enfermedad de Parkinson. (Martinez Vazquez *et al.*, 2012; Martinez Vazquez y Estrada-Reyes 2014)

2.2.1.4. Actividad antiinflamatoria y analgésica

La actividad analgésica, antiinflamatoria y antiartrítica fue validada *in vivo*, para el extracto metanólico de hojas de *A. cherimola*, con resultados comparables a la indometacina y diclofenac sodico (Ugandhar *et al.*, 2013).

2.2.1.5. Actividad citotóxica y antitumoral

La planta *Annona cherimola* es una fuente importante de compuestos citotóxicos, como por ejemplo las acetogeninas Annomolina y Annocherimolina que fueron aisladas de las semillas de *A. cherimola*, recolectadas en Perú (Kim *et al.*, 2001; Orrego Escobar, 2015; Paes *et al.*, 2016).

La Annomolina fue selectivamente citotóxica contra la línea celular de tumor de próstata humano (PC-3), con una potencia 10.000 mayor que la de la Adriamicina (Bode y Dong, 2009).

Además, la Annocherimolina posee una actividad citotóxica 10.000 veces mayor que la Adriamicina en la línea celular MCF- 7 (cáncer de mama) y la línea HT-29 (cáncer de



colon) (Newmann y Dong, 2007; Quispe *et al.*, 2009; Knôpfel Capelinha, 2018; Kim *et al.*, 2001).

Asimismo, las acetogeninas tipo bis-tetrahidrofurano aisladas extracto etanólico de las hojas exhibieron actividad citotóxica *in vitro* frente a células renales bovinas (MDKB) y de carcinoma epidermoide de laringe (HEp-2) observando que exhibe una importante actividad antitumoral *in vitro* contra MDBK y Hep-2 células. (Arun Jyothi *et al.*, 2011; Betancur *et al.*, 1999).

2.2.1.6. Actividad ansiolítica

El extracto hexánico de las hojas de *A. cherimola* presentó un efecto ansiolítico en ratones y evitó el comportamiento exploratorio. El efecto fue antagonizado por la picrotoxina, un bloqueador de canales de cloruro dependiente de GABA, sugiriendo la participación del complejo receptor GABA A.

El autor del trabajo sugiere que los compuestos responsables de dicha actividad serían β -cariofileno, β -selineno, β -cubebeno y linalool (López-Rubalcava *et al.*; 2006).

2.2.1.7. Actividad antiparasitaria

Se probaron extractos metanólicos de semillas de *A. cherimola* contra *Entamoeba histolytica*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Molinema dessetae* y *Artemia salina*. Las acetogeninas aisladas de estos extractos inhiben las larvas de *Molinema dessetae* (Bories *et al.*; 1991)

2.2.1.8. Actividad antioxidante

Investigando la actividad antioxidante, se probó el potencial de eliminación de radicales libres de los extractos de frutos, por el método *in-vitro* de DPPH a 1000 μ g extracto/ml de solvente; dando actividad dependiente de la concentración; observando un 52,7% de actividad en el extracto etanólico, 50,5% en el metanólico y 69% en el dimetilsulfóxido. Esta tendencia de actividad se mantuvo también en ABTS y en FRAP, mientras que el etanol mostró mayor actividad contra la peroxidación de lípidos. (Barreca *et al.*, 2011)



2.2.1.9. Otras actividades y usos

Las decocciones de las hojas de *Annona cherimola* Mill. han sido usadas tradicionalmente en Portugal para tratar la hipercolestolemia. (Falé *et al.*, 2013)

Las semillas poseen efectos larvicidas e insecticidas, incluyendo el de ser pediculicidas, probablemente debidas a un efecto sinérgico entre los alcaloides bencilisoquinolínicos y las acetogeninas. (Bobadilla *et al.*, 2002; Castro, 2007)

Como alimento, la población cultiva sus frutos comestibles y consume la pulpa del fruto, en forma fresca. A nivel industrial se emplea para la elaboración de productos alimenticios como jugos, yogurt, cremas, helados, saborizantes, licores y dulces. (Martínez Crovetto, 1985).

Producción de Bio Gas: En países como Alemania y algunos otros países europeos utilizan los residuos de cultivos de frutales con semillas, entre ellos la “Chirimoya”, por contener un metil éster de ácido graso que desencadena la producción del gas para la producción de biogas.



2.2.1.10. Principios activos aislados de “Chirimoya” de diferentes extractos y fraccionamientos

Tabla 2 Principios activos aislados de “Chirimoya” de diferentes extractos y fraccionamientos

<u>Autor / parte planta</u>	<u>Fraccionamiento y compuestos</u>			
Chen et al., 1999 / hoja	<u>Extracto metanólico partición con cloroformo:</u>	<u>Extracción CHCl₃ + HCl 3% y esta parte se neutralizo con NH₄OH; se particionó con cloroformo:</u>	<u>Extracto H₂O; se particionó con n-BuOH:</u>	
	<ul style="list-style-type: none"> • Nicotinic acid • Thalifoline • Doryphomine • (-)-norstephalagine • (-) romucosine • (+)-pronuciferine • (+)-norisocorydine • Oxoasimilobine 	<ul style="list-style-type: none"> • Cheritamine • Sitosterol-D-glucosid • Beta Stigmasterol-V-glucoside • 6'- (Beta-sitosteryl].3-O-Beta- glucopyranosidyl) hexadecanoate 	<ul style="list-style-type: none"> • (p-Hydroxybenzaldehyde • (p-Hydroxybenzoic Acid • Methylparabene • 3-Chlorobenzoic Acid • Vanillin • Isovanillin • Vanillic Acid • Isovanillic Acid • Methyl Vanillate • Methyl • Isovanillate Syringaldehyde 	<ul style="list-style-type: none"> • 3,4 S-Trimethoxylbenzoic Acid • (trans-Methyl p-Coumarate • Ferulic Acid • p-Dihydrocoumacic Acid • 3-(4-Hydroxy-3,S- dimethoxyphenyl)-1,2- propanediol • 3,4,S- Trimethoxyphenyl·Bet a·D-glucopyranosi • Thalictoside • 2,6-Dimethoxyl-p-quinone • Uridine



• Syringic Acid

Chen et al., 1998 Extracción con MeOH →Partición con CHCl₃; se extraen bases con HCl 3%: →Extracto con agua fue particionado con n-BuOH
 El extract butanolico:
 • N-p-coumaroyltyramine
 • N-cis- feruloyltyramine
 • N- trans-feru- loylmethoxytyramine
 • N-cis-feru- loylmethoxytyramine

Chen et al., 1998 Extracto MeOH →Particion con CHCl₃:
 • Cherinonaine

3-Chen et al., 1998 / Hoja **Extracción con MeOH:** **Extracción con MeOH:**
→Partición con CHCl₃: **→Extracto acuoso: particionado con n-Butanol**
 • 16Beta-hydroxy-17, 19- diacetoxy-ent-kaurane
 • (+)-epi- syringaresinol
 • (+) syringaresinol
 • Liriodendrin
 • (+) dia-syringaresinol



- 16Beta-hydro-17-hydroxy-ent-kauran-19-al
- 16Alfa-hydro-17-hydroxy-ent-kauran-19-al
- 16Beta-hydro-17-hydroxy-ent-kauran-19-oic acid
- 16Alfa-hydro-17-hydroxy-ent-kauran-19-oic acid

Chen et al.,
1997

Extracción con MeOH:

→CHCl₃: + Hcl 3% (parte B), se
agrego NH₄OH y se le hace
extracción con CHCl₃:

- Lyslcamine
- Liriodenine
- Atherospermidine
- Oxoxylopine
- Oxoanobine
- Oxogiaucine
- (-)-Anonaine

CHCl₃ (parte B):

- ent-kaur-16-en-19-oic acid
- Beta- Sltosterol
- Stigmasterol
- Adenosine
- Squamolone
- 6 Beta-hydroxy-beta- sitosterone
- 6 beta- hydroxystigmasterone



- (-)-Asimilobine
- (-)-Xylopjine
- (-)-Anolobine
- (-)-Norisocorydine
- (+)-Laurotetanine
- (+)-Isocorydine
- (-)-N-methylasimlobine
- (+)-N-methylaurotetanine
- (-)-Norushimunine
- (-)-Ushinsunine
- (-)-N-formylanonaline
- (+)-Stepharine
- (+)-Orentaline
- (-)-Klkernanine
- N-trans-feruloyltyramine
- N-trans-caffeoyltyramine

Chen <i>et al.</i>, 1997 / semilla	<u>H₂O + MeOH: se extrae con HEXANO</u>	<u>Extracción con MeOH</u> <u>→particion con CHCl₃: se extraen las bases con HCl 3%, quedando porcion acida (A) y (B)</u>
---	--	---



A la fase acuosa se le hace otra extracción con DCM y de esta se obtiene:

Extracto metanólico:

→partición con CHCl₃:

- Aromin A
- Squamocin

A la porcion (A) se le agrego NH₄OH y luego se le hizo una extracción con CHCl₃. De esta ultima se obtiene:

- Romucosine H
- Artabonatine B
- Cherianoine
- Annocherine A
- Annocherine B



2.3. Antecedentes fitoquímicos de Plantas Medicinales

2.3.1. Polifenoles aislados de Plantas Medicinales

Los Polifenoles son metabolitos secundarios y constituyen el grupo fitoquímico más grande de la naturaleza. Generalmente se los encuentra en vegetales y algunos microorganismos. Están constituidos como mínimo con un anillo bencénico al cual se une un grupo hidroxilo libre o ligado a otra función; tienen su origen en las rutas biosintéticas del ácido shikímico y del acetato. La gran diversidad de estos compuestos no permite un estudio global de métodos de extracción, caracterización, aislamiento y valoración. Además de la gran diversidad de propiedades biológicas que presentan. En muchos su importancia reside en la acción antioxidante, que se vincula con su capacidad para reducir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer (Arts y Hollman, 2005). Otros presentan efectos vasodilatadores, capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenuar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). También hay evidencia de polifenoles con efectos antiinflamatorios a su vez capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular (Quiñones y Aleixandre, 2012). Teniendo en cuenta todo esto se resalta que pueden incluirse entre los productos de origen natural con aplicaciones valiosas en la medicina tradicional (Hernandez y Prieto, 1999).

Así, para los flavonoides presentes en “Chirimoya”, Ugandhar (2013) alude a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Del mismo modo otros autores proponen la capacidad antioxidante de estos compuestos (Pineda *et al.*, 1999; Salkia *et al.*, 2016), que también presentan efecto hepatoprotector (Zhao *et al.*, 2015) y anti VIH (Ahman *et al.*, 2015; Haag *et al.*; 2017).

2.3.1.1. Rutósido (“Rutina”)

Flavonoide aislado por primera vez de “Ruda” *Ruta graveolens*, también encontrado en cantidad interesante desde el punto de vista farmacéutico en “Trigo sarraceno” *Fagopyrum esculentum*, “Sofora” *Sophora japónica* y *Eucalyptus macrorrhyncha*.

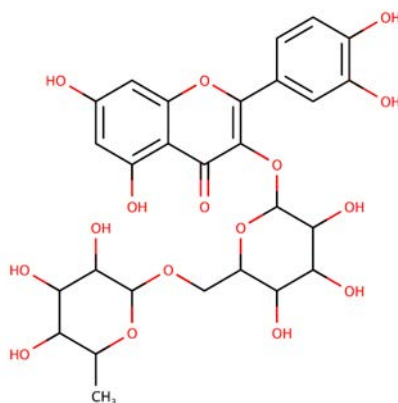


Ilustración 5 Estructura de la “Rutina” (3-rutinosil quercetol) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).

La “rutina”, presenta las siguientes propiedades; disminuye la fragilidad capilar, empleado en hemorroides, várices, mejora la memoria, antitrombótico, anticonvulsivo, neuroprotector. (Estrada-Reyes *et al.*, 2012)

2.3.1.2. Isoquercetina

Isoquercetina es un flavonoide que presenta actividad antiinflamatoria (Chanh *et al.*, 1986), protección contra las lesiones por oxidación del ADN, y posee propiedades preventivas contra lesiones de tejidos vasculares en el cerebro y en otros órganos (Pérez, 2003).

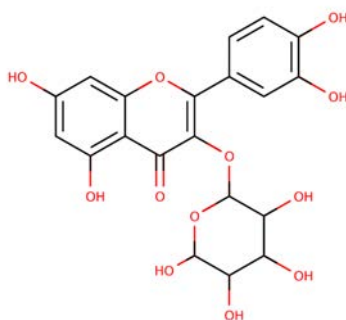


Ilustración 6 Estructura de isoquercetina (3-O-glucósido de quercetina) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).

2.3.1.3. Ácido cafeico

El ácido cafeico es un compuesto fenólico encontrado en numerosos vegetales, empleados en a la elaboración de suplementos dietéticos; que ha demostrado tener actividades



biológicas tales como efectos antiinflamatorios, antibacteriales, antivirales, antitumorales y antioxidativos mediante la modulación de distintas respuestas inmunológicas en modelos experimentales. No se han demostrado efectos adversos de su uso *in vitro* o *in vivo*. (Morones Alba *et al.*, 2016)

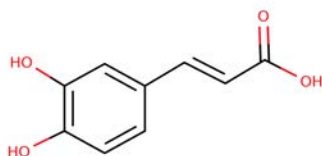


Ilustración 7 Estructura del ácido cafeico (Ácido 3,4-dihidroxicinámico) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).

2.3.2. Terpenoides aislados de Plantas Medicinales

Los terpenoides, derivan de la fusión de unidades isopreno (C₅) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se crea en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta DXP (deoxi-xilulosa-fosfato) (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2004). Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias, en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, entre otras (Ávalos y Perez, 2009). En este trabajo enfocamos el estudio a los triterpenos (C₃₀); entre los triterpenos se encuentran algunos esteroides en forma de glicósidos (cardenólidos y saponinas), con importantes funciones en medicina y en la industria

Las saponinas son triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. La adición del grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes que las caracterizan. También se pueden presentar como aglicones, en cuyo caso se denominan sapogeninas (Ávalo y Perez, 2009). Las saponinas han mostrado tener diversas actividades biológicas entre las que cabe destacar la acción en las membranas celulares, que puede cambiar la permeabilidad o incluso conducir a su destrucción (actividad hemolítica, molusquicida e ictiotóxicas). También se han reportado actividades hipocolesterolémicas e



hipoglucemiantes, por la formación de complejos con saponinas en el intestino, evitando su absorción. Tradicionalmente se han usado como expectorantes, por acción irritante de las mucosas, y diuréticas (Vieira, 2011).

2.3.2.1. Triterpenoides pentacíclicos: Ácido Oleanólico y Ácido Ursólico

Ejemplos de triterpenoides pentacíclicos abundantes en plantas medicinales son el Ácido Oleanólico y el Ácido Ursólico en forma de ácido libre o como aglicón formando parte de saponinas. Estos compuestos tienen un amplio espectro de actividades farmacológicas, y por esta razón se han convertido en medicamentos promisorios de origen natural (Liu, 1995).

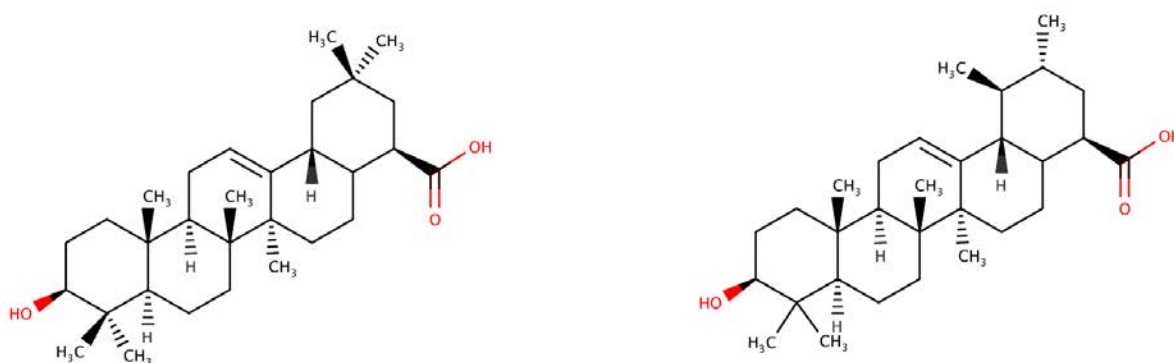


Ilustración 8 Izquierda corresponde a la estructural del ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxi-olea-12-en-28-oico; N^oCAS: 508-02-1; peso molecular 456.7) Derecha, ácido ursólico (3 β -Hydroxy-12-ursen-28-ic acid; N^o CAS 77-52-1; peso molecular 456.7) (estructuras realizadas con el programa Marvin Sketch).

Así mismo, los glicósidos naturales del ácido oleanólico presentan múltiples actividades, por ejemplo, actividad antidiabetogénica, la cual fue investigada en ratas alimentadas con glucosa (Yoshikawa y Matsuda, 2000). Algunos derivados sintéticos muestran inhibición en la formación de osteoclastos (células que causan osteoporosis cuando hay desequilibrio entre la formación y la resorción de hueso) (Zhang *et al.*, 2005) y presentan actividad anti-VIH (Zhu *et al.*, 2001; Kashiwada *et al.*, 1998).



Tabla 3 Estudios realizados de la Actividad biológica del Ácido Oleanólico y Ácido Ursólico, sus efectos

Actividad	Modelo de estudio	Efectos	Referencias
Cicatrizante	Lesiones gástricas crónicas en ratas macho Sprague- Dawley inducidas con ácido acético	Cicatrizante	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003
	Ratones machos con incisión de 1cm.	Epitelizante	Moura <i>et al.</i> , 2006
Antitumoral	Línea celular de leucemia meloidial humana (HL60)	Inducción de apoptosis	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	Ratones machos ICR inoculados con células tumorales de sarcoma 180.	Inhibición del crecimiento tumoral y recuperación del sistema hematopoyético posirradiación	Hsu <i>et al.</i> , 1997
Hepato-protectora	Lesiones hepáticas inducidas con tetracloruro de carbono en ratones BALB/c machos.	Inhibición de la expresión y actividad del citocromo P450 2E1 Por bloqueo de la bioactivación de tetracloruro de carbono	Jeong, 1999.
Anti VIH	Línea de células T H9 infectadas con virus HIV-I	Inhibición de la replicación del virus	Kashiwada <i>et al.</i> , 1998
Anti-cariogénica	<i>Streptococcus mutans</i>	Inhibición de glucosiltransferasa	Kosai <i>et al.</i> , 1987 (citado por Liu, 1995).
Anti-angiogénica	Embriones de pollo	Inhibición de la angiogénesis	Sohn <i>et al.</i> , 1995
Anti-hipertensiva	Ratas Dalh macho sensibles a hipertensión (sal-sensibles).	Previene el desarrollo de hipertensión severa, aterosclerosis y mejora resistencia a la insulina	Somova <i>et al.</i> , 2003.
Inmuno-moduladora	Ratones BALB/c machos	Incrementa número de células de la médula ósea y leucocitos, la producción de anticuerpos es más alta.	Raphael y Kuttan, 2003.



2.4. Introducción al tema: Leucemia Linfocítica Crónica-B

2.4.1. Linfocitos – B

Los linfocitos B o células B son un tipo de linfocito que se encuentra en la sangre, componente esencial en la respuesta inmune humoral.

Las funciones principales de los linfocitos B son:

- Elaborar anticuerpos que se adhieren a un antígeno (pueden reconocer lípidos, proteínas, glúcidos).
- Funcionar como células presentadoras de antígeno.
- Eventualmente se transforman en células de memoria B después de ser activadas por la interacción con un antígeno.

Los linfocitos B tienen dos procesos de maduración y diferenciación.

Primera maduración: Se originan en el saco vitelino e hígado fetal y después del nacimiento, en la médula ósea, que no está expuesta a los antígenos.

Segunda maduración: se produce en el ganglio linfático. En esta segunda etapa la célula B se diferencia en otros tipos de células: células plasmáticas y células B de memoria.

Diferenciación: Al completar su proceso de maduración y ser estimuladas con su antígeno, proliferan y se diferencian en células plasmáticas. Circulando por el torrente circulatorio, donde liberan anticuerpos. Los anticuerpos son específicos, ya que sólo reconocerán al antígeno que indujo su producción.

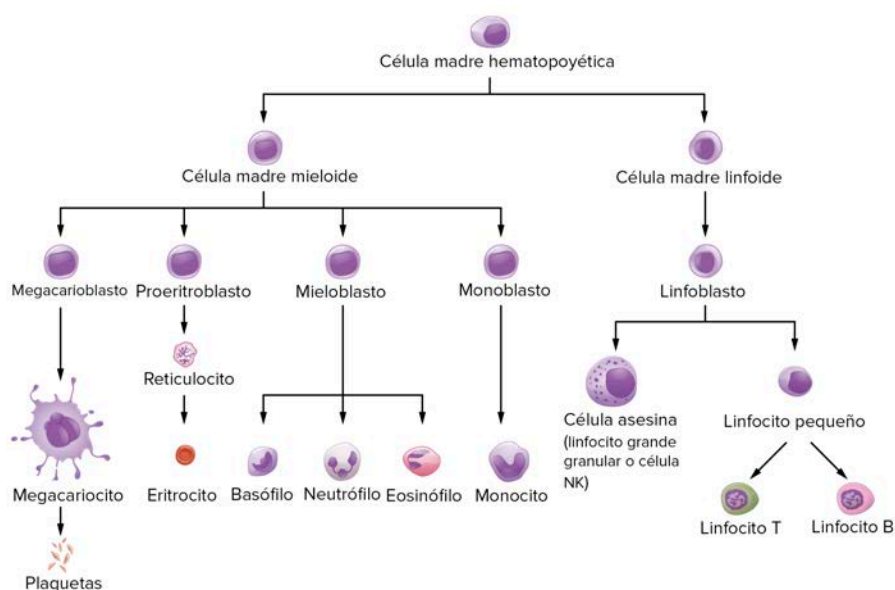


Ilustración 9 Componentes de la sangre. (OpenStax College, anatomía y fisiología, Recuperado: Marzo 2020)



2.4.2. Leucemia Linfocítica Crónica-B

La leucemia linfoide crónica (LLC) es un síndrome linfoproliferativo crónico que se caracteriza por la acumulación de linfocitos en sangre periférica, médula ósea, ganglios linfáticos, bazo y otros tejidos.

La LLC es el tipo de leucemia más frecuente en los individuos caucásicos y resulta raro en los asiáticos. En los países occidentales su incidencia es de alrededor de 3 casos nuevos por 100 000 habitantes/año. Se presenta generalmente en personas de edad avanzada y es la más común después de los 50 años. Se ha señalado que sólo el 10 % de los enfermos tiene menos de esa edad en el momento del diagnóstico. Su incidencia depende de la edad, pues aumenta de 5,2 a 30,4 casos por 100.000 personas por encima de las edades de 50 y 80 años, respectivamente. La variedad más frecuente es la de LLC-B (Sánchez Segura *et al.*, 2004).

Esta enfermedad constituye un paradigma de las enfermedades malignas humanas y se encuentra situada en un punto crítico de la hematología, la inmunología y la oncología. Existen al menos 3 razones principales:

- es el prototipo de enfermedad maligna que involucra defectos en la inducción de la apoptosis.
- los pacientes de LLC-B desarrollan una severa inmunodeficiencia con hipogammaglobulinemia progresiva
- los pacientes de LLC-B pueden tener una alta prevalencia de fenómenos autoinmunes. (Hernández Ramírez, 1999)

2.4.3. Cuadro clínico

La LLC presenta diversas manifestaciones clínicas. Con mucha frecuencia, aproximadamente en la mitad de los casos, el diagnóstico se realiza en un individuo totalmente asintomático que se ha hecho un hemograma de rutina o en alguno que se hizo esta prueba por presentar síntomas de una enfermedad banal. En ocasiones, los primeros síntomas consisten en aparición de adenopatías, astenia y mal estado general. A diferencia de lo que sucede en los linfomas, la fiebre, sudoración y pérdida de peso no son habituales. Otras veces son las infecciones repetidas, virales o bacterianas, las que motivan la indicación de un hemograma que pone de manifiesto la enfermedad. Es mucho más raro que la primera manifestación de una LLC sea una anemia hemolítica autoinmune.

El examen físico también es variable, pues puede ser negativo como sucede en algunos casos con enfermedad poco avanzada o bien mostrar adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia propias de la infiltración progresiva por los linfocitos leucémicos. (Gore, 2014; American Cancer Society, 2019).

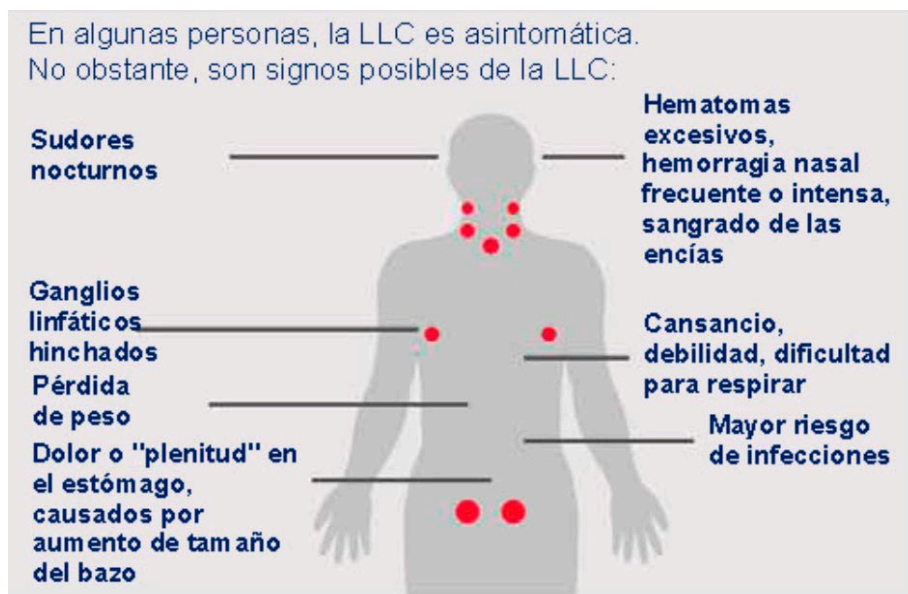


Ilustración 10 Síntomas y diagnóstico de la American Cancer Society. Guía detallada: CLL diagnosis.

2.4.4. Inmunofenotipo

Las células leucémicas son linfocitos B que tienen un inmunofenotipo definido por 3 características principales: comparten antígenos B (expresión débil de los antígenos CD19, CD20, CD22 y reactividad habitual con CD23) con fuerte positividad del antígeno T CD5 en ausencia de otros marcadores T; expresan sólo una cadena ligera de las inmunoglobulinas (κ o λ) y tienen una baja densidad de inmunoglobulinas de superficie (IgS) con una capacidad muy reducida de formación de casquetes en la superficie del linfocito. Estos elementos son adecuados para un diagnóstico preciso de la LLC y muy importantes para establecer el diagnóstico diferencial con otros síndromes linfoproliferativos crónicos (Hernández Ramírez, 1999).



2.4.5. Sistema de clasificación de Rai

El sistema Rai fue originalmente inventado en 1968. Originalmente esto se definía como más de 15,000 linfocitos/mm³ de sangre y al menos 40% de la médula ósea compuesta por linfocitos.

Hoy día, para el diagnóstico de la CLL, el paciente tiene que contar con al menos 5000/mm³ de linfocitos monoclonales (algunas veces se le llama una linfocitosis monoclonal), aunque el recuento general de linfocitos no tiene que ser elevado. (Hernández Ramírez, 1999; Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2018)

El sistema Rai divide la CLL en cinco etapas:

- **Etapa Rai 0:** linfocitosis sin agrandamiento de los ganglios linfáticos, el bazo, o el hígado, y con recuentos de glóbulos rojos y plaquetas casi normales.
- **Etapa Rai I:** linfocitosis y ganglios linfáticos agrandados. El bazo y el hígado no se han agrandado y los recuentos de glóbulos rojos y plaquetas son casi normales.
- **Etapa Rai II:** linfocitosis con bazo agrandado (y posiblemente hígado agrandado), con o sin aumento de tamaño de los ganglios linfáticos. Los recuentos de glóbulos rojos y de plaquetas son casi normales.
- **Etapa Rai III:** linfocitosis con anemia (muy pocos glóbulos rojos), con o sin agrandamiento de los ganglios linfáticos, bazo o hígado. El recuento de plaquetas es casi normal.
- **Etapa Rai IV:** linfocitosis con trombocitopenia (muy pocas plaquetas), con o sin anemia, agrandamiento de los ganglios linfáticos, bazo o hígado.

Los médicos separan las etapas Rai en grupos de riesgo bajo, intermedio y alto al momento de determinar las opciones de tratamiento.

- La etapa 0 se considera de bajo riesgo.
- Las etapas I y II se consideran de riesgo intermedio.
- Las etapas III y IV se consideran de alto riesgo.

2.5. Introducción a las Nanopartículas

Nano significa una billonésima (1×10^{-9}) de un metro y en lengua griega “enano”.

Las nanopartículas existieron en el planeta por siglos, algunas civilizaciones antiguas las utilizaban, aprovechando sus propiedades ópticas y minerales. Los egipcios empleaban nanopartículas de oro como coloides medicinales para preservar la juventud y la buena salud; la civilización china, las utilizaban con fines curativos. (López De la Peña *et al.*, 2016)

En la siguiente escala nanométrica se observa diferente orden de tamaño de estructuras biológicas.

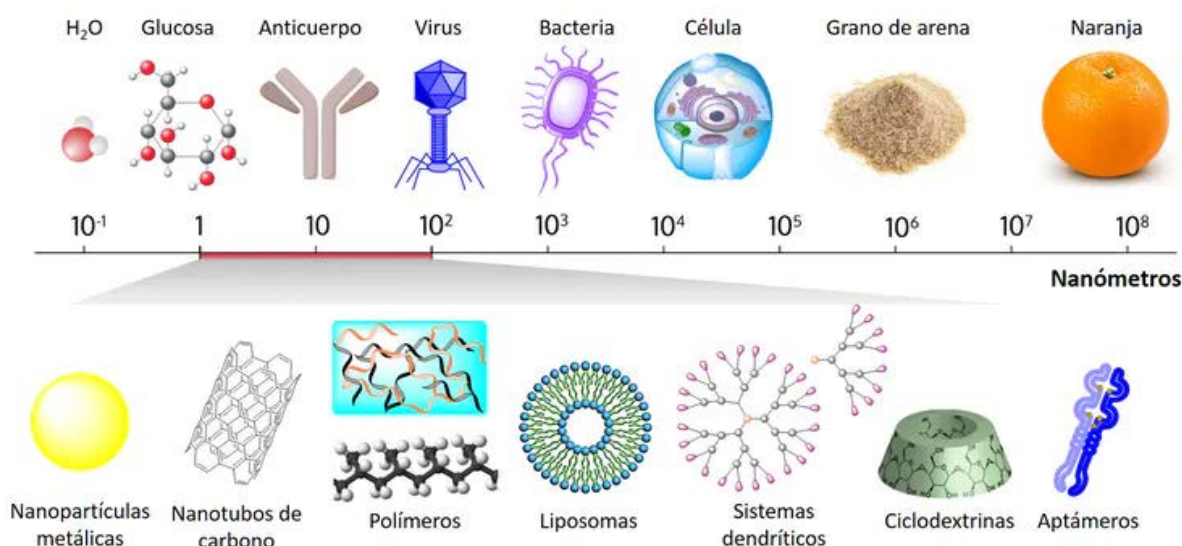


Ilustración 11 Esquema representativo del tamaño de los nanomateriales que se utiliza.
(Schalit, 2020)

En la reducción del tamaño pueden surgir fenómenos cuánticos y no cuánticos (ausencia de efectos gravitatorios, predominio de fuerzas electromagnéticas, y movimientos brownianos) diferentes a los homólogos macroscópicos.

Entre las ventajas que aportan las nanopartículas en la tecnología farmacéutica se pueden citar:

-Capacidad para proteger la molécula encapsulada frente a su eventual degradación, desde el momento de la administración en el paciente hasta que alcanza su lugar de acción o de absorción.



- Capacidad para atravesar las barreras biológicas como la piel, las mucosas gastrointestinal o respiratoria o, también la barrera hematoencefálica.
- Capacidad para alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción.
- Capacidad para alcanzar compartimentos intracelulares.
- Capacidad para controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o de absorción. Cuando un fármaco o molécula biológicamente activa, se administra en una forma convencional (comprimido, inyectable, etc.), el fármaco es liberado rápidamente al medio biológico, y su comportamiento en el organismo es completamente dependiente de su estructura química. Al distribuirse en el organismo, las moléculas del fármaco son capaces de llegar al tejido enfermo, pero al mismo tiempo alcanzar regiones o tejidos sanos induciendo efectos secundarios y/o indeseables. Por el contrario, cuando la molécula activa se administra bajo forma de nanopartículas, son las propiedades físico-químicas de éstas, las que condicionan la distribución de la nanomedicina en el organismo y su concentración en su lugar de acción. Una vez alcanzada esa región enferma, las nanopartículas transportadoras de fármaco deben controlar la liberación de su contenido. El hecho de poder concentrar el fármaco en su lugar de acción o de absorción ofrece la posibilidad de minimizar los efectos secundarios y aumentar el índice terapéutico de la molécula en cuestión. Este planteamiento es de vital importancia en el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento del cáncer, así como en la mejora de los tratamientos actuales. Es destacar la nanotecnología en la industria farmacéutica para nuevos fármacos o nuevas formulaciones para viejos fármacos, (p. ej. Abraxane[®] (Taxol), Doxil[®] (Doxorubicina))

En la imagen se observa el liposoma constituido por una bicapa lipídica (fosfolípidos), con PGE (Polietilenglicol) como componente hidrofílico estéricamente estabilizador, que evitan o retrasan el fenómeno de opsonización y en su interior en medio acuoso la Doxorubicina.

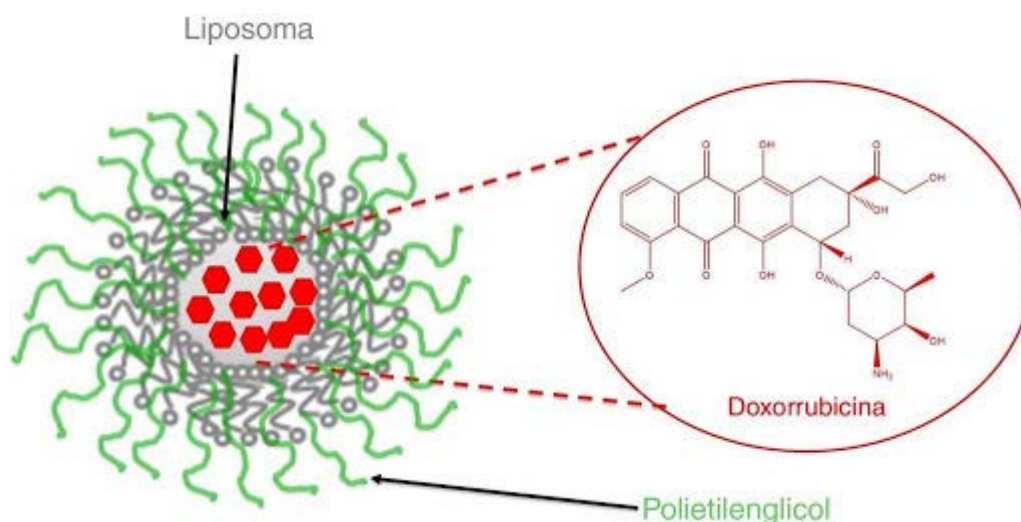


Ilustración 12 Liposoma (bicapa lipídica) y en su interior en medio acuoso la Doxorubicina

La posibilidad de adherir anticuerpos monoclonales específicos en la superficie de las nanopartículas, permitiría dirigirlas selectivamente contra los componentes antigénicos específicos de las células tumorales y así facilitar su internalización por endocitosis y posterior liberación dentro de ellas, de su carga de drogas, fitofármacos o las combinaciones más efectivas de las mismas, disminuyéndose así los efectos colaterales potenciales de dichos fármacos y proveyendo potencialmente, grandes cantidades de medicamento activo a nivel intracelular, aún de aquellos que tengan grandes dificultades de biodisponibilidad o farmacocinética para alcanzar concentraciones antitumorales útiles, venciendo de esta manera el mecanismo de resistencia tumoral y derivar seguramente en un aumento de la sobrevida de los pacientes.

Los avances recientes en el desarrollo de diferentes nanopartículas específicas brindan nuevas y significativas posibilidades para los sistemas de administración de fármacos mediados por liposomas utilizados como terapia anti-tumoral (Willis y Forssen, 1998; Sapra y Allen, 2003; Sapra *et al.*, 2005)

Hasta la fecha, se han informado varios marcadores o “targets/blancos terapéuticos” posibles para poder atacar a las células malignas de B-CLL con esta estrategia, incluidos CD19, CD20, CD52, etc, existiendo ya anticuerpos monoclonales comerciales aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en linfomas B y B-CLL como el anti-CD20, Rituximab.

Es cierto que el marcador CD20 se encuentra expresado también en linfocitos B normales, pero si el agente antineoplásico con que se cargue la nanopartícula tuviera alta potencia



selectiva antitumoral solo sobre las células de B-LLC, respetando al resto de los linfocitos normales, esto no sería un impedimento.



3. Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

Teniendo en cuenta los antecedentes de la familia Annonaceae y de especies del género *Annona*, se plantean las siguientes hipótesis:

- La posible actividad de los extractos de hojas de *A. cherimola* para Leucemia Linfocítica Crónica (B-LLC): dado que *A. cherimola* pertenece a la misma familia botánica que *Annona muricata*, cuyo uso popular como antineoplásico fue estudiado con resultados positivos para LLC, existen grandes probabilidades desde el punto de vista filogenético y quimitaxonómico de que las hojas de “Chirimoya” (*A. cherimola* Mill., Annonaceae) presenten actividad similar.

- El posible éxito en el tratamiento *in vitro* de B-LLC utilizando:

- * Extractos de hojas de “Chirimoya”
- * Nanoliposomas cargados con Extracto de hojas de “Chirimoya”
- * Nanoliposomas cargados con Extracto de hojas de “Chirimoya” conjugados con anticuerpos monoclonales.

Aquí planteamos la hipótesis de que un sistema de administración de nanopartículas liposomales (NLPs) con anticuerpos monoclonales anti-CD20 conjugados a su superficie y cargadas con fitofármacos naturales obtenidos de extractos de “Chirimoya” podrían dirigirse específicamente a las células CD20+ de la B-LLC e internalizarlas, induciendo su apoptosis selectivamente con muy bajas concentraciones del extracto empleado, incluyendo aquellos clones celulares malignos que han adquirido resistencia a fármacos como la Fludarabina.



Objetivo general

Obtención de extractos y fracciones bioactivas de “Chirimoya”, *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae).

Determinación de parámetros fisicoquímicos, cromatográficos y actividad con nanopartículas biodegradables con anticuerpos monoclonales en su superficie como una nueva posibilidad terapéutica

Objetivos específicos

- Obtener extractos y fracciones bioactivas a partir de las hojas de *A. cherimola*
- Establecer los elementos histológicos de diagnóstico presentes en las hojas que contribuyan al reconocimiento de la especie vegetal.
- Establecer perfiles cromatográficos (CCD y HPLC) para los extractos obtenidos, que contribuyan a la determinación de la genuinidad de la droga vegetal.
- Detectar, a partir de los extractos y/o fracciones obtenidos, grupos fitoquímicos (polifenoles, terpenoides, esteroides, alcaloides) y/o compuestos presentes en los mismos, relacionados con la actividad biológica.
- Determinar la actividad antineoplásica de las fracciones libres obtenidas en estirpes celulares de LLC-B resistentes a terapias habituales.
- Demostrar la penetración en células de LLC-B resistentes a fármacos habituales de nanopartículas biodegradables cargadas con extracto y fracciones de *A. cherimola* y recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos.
- Establecer el grado de apoptosis y citotoxicidad provocado por las nanopartículas con “Chirimoya”.
- Comparar la acción antineoplásica *in vitro* de extractos y fracciones libres y nanopartículas con los agentes quimioterápicos para el tratamiento de LLC-B



4. Materiales y Métodos

4.1. Preparación del material vegetal

4.1.1. Recolección y almacenamiento del material vegetal

Las hojas de *Annona cherimola* fueron recolectadas en la zona del Parque Nacional “El Rey” en el Departamento de Anta de la Provincia de Salta, a unos 80 km., en línea recta al este de la capital provincial de Salta, en la época de noviembre 2013 y 2016, por personal del área que comercializa la planta de forma particular. El material fue secado a la sombra y acondicionado para su conservación.

4.1.2. Identificación Botánica

La identificación botánica se realizó en la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Un ejemplar de herbario, fue depositado en el Museo de Botánica y Farmacognosia “Carlos Spegazzini”: LPE1165.

4.1.3. Procesamiento Material Vegetal

El material vegetal: se seleccionaron las hojas que no presentaran signos de ataque de plagas o descomposición y se trituró mecánicamente a polvo fino en molinillo Glen Creston (Stanmore England). Ilustración 13



Ilustración 13 Hojas de "Chirimoya" proceso de selección y molienda



4.2. Analítica macroscópica y microscópica

4.2.1. Equipos utilizados

Observación del material vegetal: hoja entera fresca y seca a ojo desnudo y también con auxilio de lupa binocular Nikon con ocular C W 10 x A/22.

Las observaciones microscópicas se efectuaron con: microscopio estereoscópico Iroscope YZ-6 y un microscopio óptico (MO) Olympus CH.

4.2.2. Diafanización de las hojas y coloración con safranina

El diafanizado es el proceso por el cual una muestra vegetal se hace diáfana o transparente, mediante técnicas que igualan los índices de refracción de la luz del interior del órgano con el medio que lo contiene.

Basándonos en este concepto, las hojas de *A. cherimola* fueron sometidas a este proceso según la técnica descrita por D'Ambrogio (1986); Dizeo de Strittmatter (1973); Castellaro *et al.* (2007); OMS (2011).

El material se sumergió en alcohol 96° y se llevó a ebullición durante 10 min (eliminación de la clorofila).

Se colocó en una mezcla de alcohol 96°: hidróxido de sodio al 5% (2:1) manteniéndolo en ebullición 2-3 min (eliminación de taninos, resinas, etc.).

Las hojas se lavaron con abundante agua caliente hasta eliminar los restos de alcohol e hidróxido completando con pasajes por agua destilada.

El material fue sumergido en una solución de hipoclorito de sodio al 50% hasta su diafanización, la cual se produjo entre los 5 y 30 min.

Se realizaron lavados de 3 min cada uno con agua destilada para eliminar el remanente de hipoclorito de sodio.

Las hojas se colocaron en la solución de hidrato de cloral (5 g en 2 ml de agua) durante 5- 10 min para quitar la opacidad (transparentado).

Se realizó la coloración con safranina en alcohol 80° y posterior montaje en gelatina glicerinada.



4.2.3. Disociado leve

Se utiliza para material herbáceo. Consiste en el tratamiento de porciones de hojas con NaOH al 5% acuoso y calentamiento a 100°C durante 5 min, a fin de separar los elementos histológicos de diagnóstico y posterior observación con microscopio óptico (D'Ambrogio de Argüeso, 1968; Normas IRAM, 1993; Gimenez *et al.*, 2016)

4.2.4. Eliminación de tricomas

Mediante la técnica desarrollada en la Cátedra de Farmacobotánica por la Dra. Silvia Aquila, la superficie foliar fue recubierta por una capa de laca comercial de uso cosmético, constituida por un polímero formador de película (nitrocelulosa) disuelto en acetato de etilo y adicionado de alcanfor y resina de tosilamida y formaldehído, a fin de asegurar adhesividad y plasticidad (Schneider *et al.*, 2001).

Una vez seco el polímero, se recubre con esparadrapo y se retira, removiendo los tricomas sin afectar la epidermis.

4.2.5. Remoción de epidermis

Mediante la técnica desarrollada en la Cátedra de Farmacobotánica por la Dra. Silvia Aquila se realizó la disección de las hojas diafanizadas con auxilio del microscopio estereoscópico y pinza chata quirúrgica, eliminando las epidermis a fin de facilitar la observación del parénquima subyacente.



4.3. Estudio Fitoquímico

4.3.1. Equipos e instrumental utilizado

Se empleó material de vidrio de uso habitual en laboratorios.

Los solventes y reactivos utilizados, son grado analítico, de la marca Merck.

El descarte de solventes y demás reactivos se hizo de acuerdo a las normas de seguridad vigentes. (Ley de la Provincia Buenos Aires 11720: “Residuos especiales”, y ley nacional 24051: Residuos peligrosos y especiales).

Para las liofilizaciones se utilizó un liofilizador LABCONCO modelo 7949030, cedido gentilmente por el Dr. Cavallito (CINDEFI, Fac. Cs. Exactas, UNLP).

La concentración de los extractos se llevó a cabo en un evaporador rotatorio Heidolph 2000

Durante la extracción se empleó un sonicador Cleanson CS-1109.

Las observaciones con luz UV se realizaron con una lámpara Camag UV dual 254-366.

Se utilizó una campana de extracción de gases y vapores marca Jinan Biobase Biotech Co., LTD. Modelo FH 1200X.

Espectros Ultravioleta (UV): se efectuaron en metanol, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 con microprocesador y registrador PR-1.

Análisis por cromatografía en capa delgada y cromatografía líquida de alta resolución: se detallarán en el respectivo ítem.

4.3.2. Extracción y fraccionamiento para los distintos compuestos

Se utilizaron diferentes técnicas, con el fin de optimizar la extracción de los grupos fitoquímicos presente en *A. cherimola*.

Los extractos y fracciones obtenidos se sometieron a diferentes ensayos (reacciones de caracterización, identificación, cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) tendientes a determinar la presencia de polifenoles



(flavonoides: quercetina, isoquercetina, ácido cafeico), terpenoides (ácido oleanólico y ursólico), saponinas, alcaloides

Los extractos también fueron utilizados para determinación de actividades frente a LLC-B solos y con nanopartículas biodegradables con y sin anticuerpos monoclonales en su superficie.

4.3.3. Obtención de un extracto hidroalcohólico y su fraccionamiento

Se aplicó la técnica descrita por Chen *et al.* (1999), utilizada para la extracción de acetogeninas, aminos y alcaloides, adaptándola para lograr la extracción de polifenoles y otros grupos fitoquímicos presentes en las hojas de *A. cherimola*.

Las hojas de “Chirimoya” (100 g) secas y molidas, se maceraron en metanol, con sonicación inicial durante 30 minutos y posterior agitación ocasional durante una semana. Se filtró con papel de filtro Wathman Nro. 1.

Se efectuaron otras dos maceraciones sucesivas, de manera similar, cada una sobre el marco de la extracción anterior.

Los extractos obtenidos se reunieron y evaporaron a presión reducida, conservándolos en desecador hasta peso constante.

El extracto así preparado, se retomó con 250 ml de agua destilada y se extrajo con cloroformo (4 x 75 ml) en ampolla de decantación, mediante la técnica de colocar la ampolla en posición horizontal y agitar suavemente imprimiendo un movimiento circular durante 5 minutos a fin de evitar la formación de emulsiones. Se obtuvieron dos fases: **clorofórmica** y **acuosa**.

La **fase clorofórmica** fue extraída en ampolla de decantación con solución acuosa de ácido clorhídrico al 3%, obteniendo una fracción "cloroformo 1" y una fase acuosa ácida que fue neutralizada con NH₄OH y extraída nuevamente con cloroformo, obteniendo la fracción “cloroformo 2” y la fracción "acuoso 2" (ver Ilustración 14).

La **fase acuosa** fue extraída en ampolla de decantación con n-butanol previamente saturado con agua (4 x 75 ml), obteniéndose una fracción acuosa ("acuoso 1") y una fracción n-butanólica ("n-butanol"). (ver Ilustración 14).

Los extractos y fracciones obtenidos fueron evaporados a presión reducida y desecados hasta peso constante, determinando su rendimiento en g de extracto / 100 g de planta seca.



Sobre estos extractos y fracciones se hicieron distintos ensayos (reacciones, CCD y HPLC) para determinar la presencia de polifenoles (flavonoides: quercetina, isoquercetina, ácido cafeico), terpenoides (ácido oleanólico y ursólico), saponinas, alcaloides.

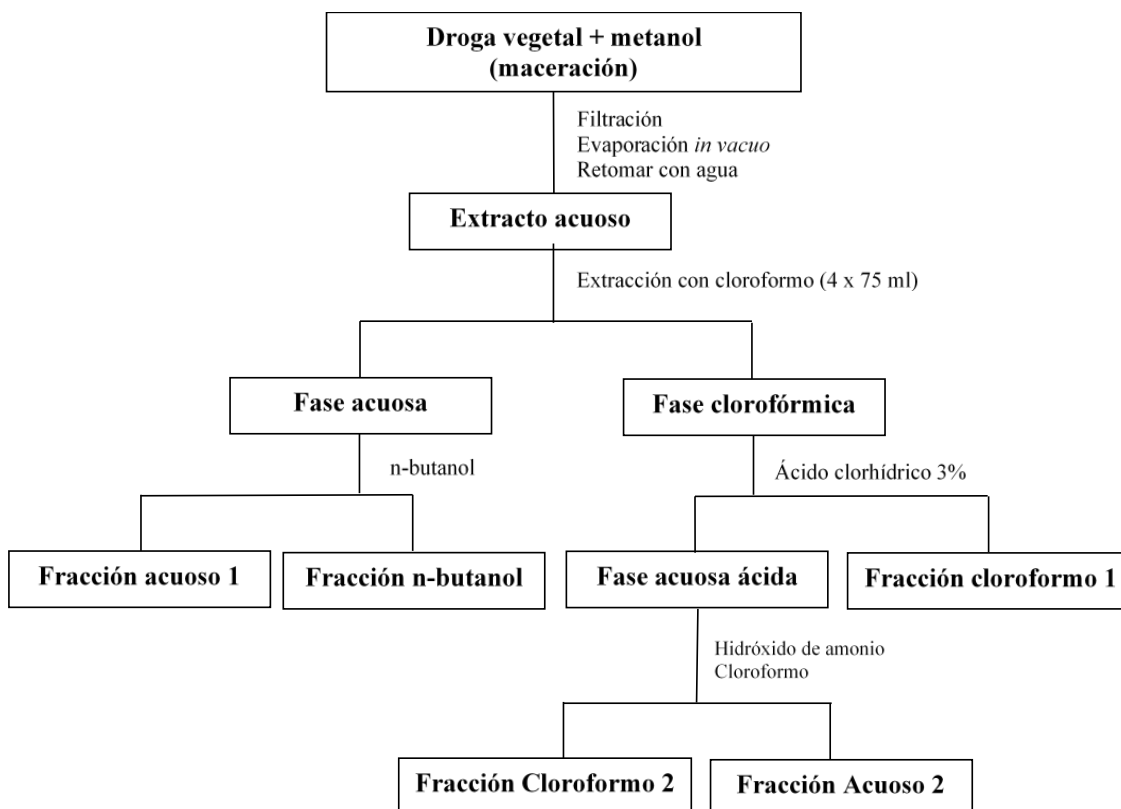


Ilustración 14 Esquema de extracción marcha de Chen *et al.* modificada

4.3.4. Obtención del extracto diclorometánico:

La droga vegetal seca y finamente pulverizada (2 g) se colocó en tubo de ensayo con 10 ml de cloruro de metileno (DCM), dejándolo macerar con agitación ocasional durante 30 min, calentando cuidadosamente a baño María (37°C). Luego se filtró y rotuló.

4.3.5. Obtención de cocimiento y extracto acetato de etilo:

Se realizó un cocimiento colocando 2 g de la droga vegetal seca y finamente pulverizada en un elermeyer, agregando 20ml de agua destilada. Se enfrió, filtró y se completó el volumen original de 20 ml con agua destilada. Posteriormente se hicieron extracciones



con acetato de etilo (3 veces con 5ml cada una), reuniendo los extractivos. Se secó con sulfato de sodio anhidro. Se rotuló.

4.3.6. Obtención de infusión

Dado que esta suele ser la forma más usual para la utilización popular de una planta medicinal, se realizó una infusión de acuerdo a la técnica de Farmacopea Argentina VII edición.

Las hojas desecadas de *A. cherimola* (25 g) se colocaron en un Erlenmeyer, vertiendo sobre ellas 500 ml de agua destilada hirviendo; se tapó y se dejó reposar durante 20 minutos; se filtró por papel y se añadió cantidad suficiente de agua destilada hasta completar 500 ml totales.

La infusión así realizada se conservó en freezer hasta la liofilización. El liofilizado se conservó en desecador hasta su uso.

4.3.7. Pruebas fitoquímicas a los extractos y fracciones de *A. cherimola*

4.3.7.1. Detección de Alcaloides:

Se emplearon diversos reactivos generales de alcaloides, observando la aparición de precipitados amorfos o cristalinos, que indican la presunta presencia de alcaloides (Domingues, 1973; Wagner y Bladt, 1996).

Estas reacciones se realizaron sobre el extracto “Cloroformo 2”.

4.3.7.1.a Dragendorff (reactivo para alcaloides según Munier y Macheboeuf)

Solución A: Se disolvieron 0,85 g de bismuto (III) nitrato básico en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua.

Solución B: Se disolvieron 8 g de yoduro potásico en 20 ml de agua.

Solución: se mezclaron 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B y se añadieron 20 ml de ácido acético glacial. La solución se completó con agua hasta 100 ml. Se reservó en heladera.



4.3.7.1.b Reactivo de Mayer

En un matraz Erlenmeyer de 125mL, se disolvieron 1,36 g de cloruro mercúrico con 60 ml de agua. En otro matraz de la misma capacidad, se disolvieron en agua 5 g de yoduro de potasio. Se mezclaron las soluciones y se aforó a 100 ml con agua destilada. El reactivo solo se agregó a soluciones previamente aciduladas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

4.3.7.1.c Reactivo de Marmé

Se preparó una solución de 4 gr de yoduro de potasio en 12 ml de agua, se llevó a ebullición y se adicionaron 2g de yoduro de cadmio II a la solución hirviendo; finalmente se mezcló con 12 ml de solución saturada de yoduro de potasio.

4.3.7.1.d. Solución de ácido tánico

En un matraz Erlenmeyer de 100 ml, se disolvieron 10g de ácido tánico en agua destilada.

4.3.7.1.e. Solución de ácido pícrico

En un matraz Erlenmeyer de 100 ml, se disolvió 1g de ácido pícrico en agua destilada.

4.3.7.1.f. Bouchardat

Se preparó una solución acuosa de 2 g de yodo y 4 g de yoduro de potasio, en matraz de 100 ml.

4.3.7.2. Detección de Polifenoles y flavonoides

4.3.7.2.a. Reacción de Shinoda

La caracterización de flavonoides se realizó en todos los extractos, mediante la reacción de Shinoda. (Domínguez, 1973)



A 0,50 ml de cada uno de los extractos se les agregó unas granallas de Magnesio metálico seguido de HCl concentrado en exceso. Luego de terminada la reacción exotérmica se diluyó con agua destilada y se agregaron 0,5 ml de alcohol amílico.

Una coloración magenta en fase amílica indica la presencia de flavonoides. (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, xantonas). (Domínguez, 1973)

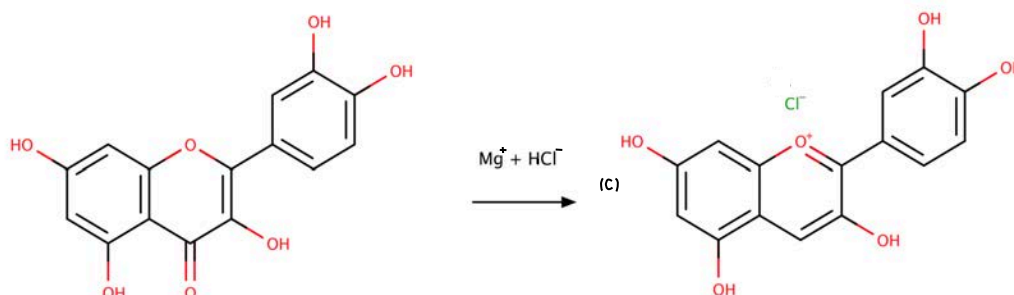


Ilustración 15 Flavonoides: Reacción de Shinoda

4.3.7.2.b. Reacción de Rosenheim

Se colocaron 0,5 ml del extractivo en un tubo de ensayo, se agregaron 0,2 ml de ácido clorhídrico concentrado; 0,2 ml de alcohol amílico y 2 ml de agua destilada. Se agitó y dejó reposar.

Si en estas condiciones se obtiene una coloración roja, la prueba es positiva para leucoantocianidinas y si da una coloración café-amarillento es prueba positiva para catequinas (Lock de Ugaz, 1998).

4.3.7.2.c. Reacciones de toque sobre papel

Sobre papel de filtro se sembraron 5 gotas de cada extracto, secando entre una y otra aplicación.

Sobre cada siembra, se añadió una gota de soluciones etanólicas al 2% P/V de diferentes reactivos, dejando una de las siembras como blanco.

Se observó luego al visible y al UV 366.



4.3.7.2.d. Solución de Hidróxido de sodio

La reacción es debida a la formación de estructuras resonantes, por la ionización de los grupos -OH fenólicos, por lo que, en presencia de flavonas, flavanonoles e isoflavonas se observa amarillo; en presencia de flavanonas y flavanoles pasa de amarillo a naranja; en presencia de chalconas se torna de naranja a rojizo; si tienen dos hidroxilos adyacentes el color será estable con álcalis y en caso de que tenga 3 hidroxilos adyacentes da coloraciones de rojo a amarillo.

Se observa incremento de la intensidad de la fluorescencia al UV366.

4.3.7.2.e. Solución de Ácido bórico

La aparición de color amarillo con fluorescencia verde al UV 366, indica la presencia de flavonas y flavonoles. El ácido bórico en medio alcalino forma quelatos con los hidroxilos fenólicos en posición relativa en orto. También es positivo para flavonoides con grupo carbonilo en 4 y -OH fenólico en posición 5.

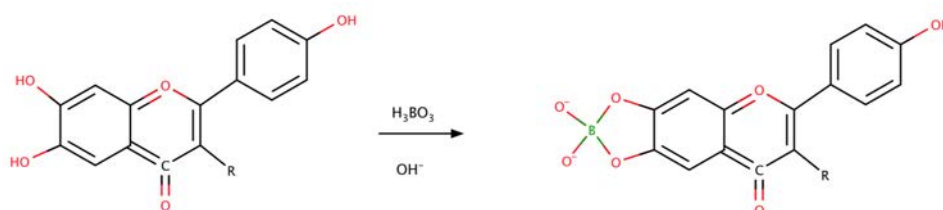


Ilustración 16 Flavonoides: Reacción con ácido bórico

4.3.7.2.f. Solución de Cloruro férrico

Esta reacción es inespecífica, y permite observar a la luz visible coloraciones que van entre el amarillo, verde, azul o negro según el número y ubicación de los -OH fenólicos. Esto es debido a la formación de un complejo con el hierro (un hidroxilo da amarillo, dos hidroxilos da verde y tres hidroxilos da color azul o negro).

4.3.7.2.g. Solución con Cloruro de aluminio

La reacción positiva es debida a la formación de complejos con O- hidroxilos o con hidroxil-cetonas vecinos de los flavonoides; se observa una intensa fluorescencia verde amarillenta a la luz UV366.

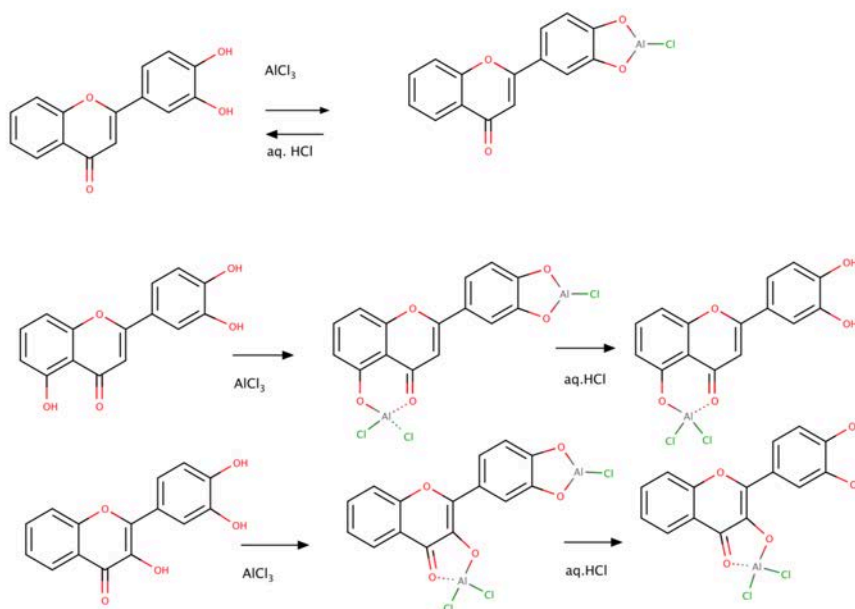


Ilustración 17 Flavonoides: Reacción con cloruro de aluminio

4.3.7.3. Detección de Terpenoides y esteroides

Se efectuó sobre los extractos DCM y Acetato de etilo.

4.3.7.3.a. Reacción de Liebermann Buchard

Sobre los extractos en DCM y Acetato de Etilo. Se tomaron 2 ml de cada extractivo y se evaporaron sobre un vidrio de reloj, se retomó con cloroformo y agregó 1,8 ml de anhídrido acético y 0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Se observó al minuto, a los 30 y 60 minutos.

La reacción es positiva para esteroides cuando aparece una coloración verde.

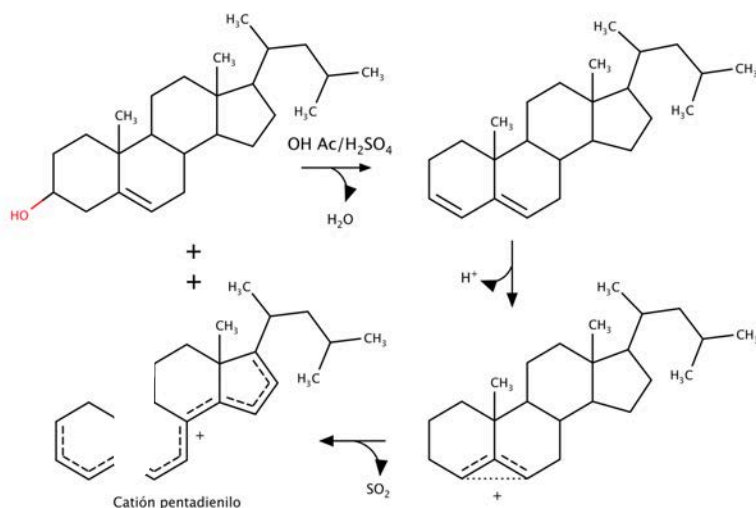


Ilustración 18 Terpenoides: Reacción de Liebermann Buchard

4.3.7.3.b. *Detección de saponinas*

Estas reacciones se realizaron sobre el extractivo acuoso (infusión) y n-butanólico.

Capacidad Afrógena

Se realizó la reacción sobre la infusión y la fracción n-butanol. Se colocaron 2 ml de la muestra (dilución 1:2 con agua destilada), en tubo de ensayo, agitando enérgicamente durante 30 segundos.

Esta prueba es positiva cuando hay aparición de espuma persistente y estable frente al agregado de ácido clorhídrico diluido.

4.3.7.3.c. *Reacciones de precipitación*

Se considera reacción positiva si aparece precipitado.

Reacción de precipitación 1

2 ml del extractivo acuoso se le añadió unas gotas de solución de hidróxido de calcio (Ca (OH)₂).



Reacción de precipitación 2

a 2 ml del extractivo acuoso se le añaden unas gotas de solución de subacetato de plomo $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$.

4.3.7.4. Reacción de Fehling indirecta

A 5 ml del extractivo acuoso se le agregó 2 ml de ácido clorhídrico concentrado, esta solución se llevó a ebullición durante 3 minutos, pasado ese tiempo se dejó enfriar y se filtró. Al filtrado se le agregó hidróxido de sodio hasta obtener un pH alcalino, se le añadió una cantidad igual de volumen del reactivo de Fehling (sulfato cúprico cristalizado, tartrato de sodio y potasio en medio alcalino) y se calentó nuevamente a ebullición.

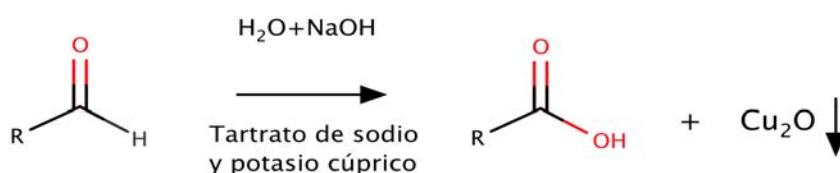


Ilustración 19 Azúcares: Reacción de Fehling indirecta

4.3.7.5. Reactivo revelador: Anisaldehído sulfúrico

A 0,5 ml de Anisaldehído se le agregó 10 ml de ácido acético glaciar, seguido por la adición de 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, en ese orden. La placa se pulveriza y se calienta a 100 °C por 5-10 min.



4.4. Métodos cromatográficos utilizados

4.4.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Esta técnica cromatográfica está incluida en las principales Farmacopeas del mundo, incluyendo la Farmacopea Argentina y Latinoamericanas, Farmacopea de Estados Unidos, Farmacopea China, Farmacopea Europea, recomendaciones de la OMS sobre el análisis de plantas medicinales y medicamentos herbarios (Ankli *et al.*, 2008)

La CCD provee valiosa información a la hora establecer la identidad de una planta o sus extractos, pudiendo obtenerse información cuali y cuantitativa sobre la presencia o ausencia de distintos metabolitos secundarios (Bandaranayake, 2006).

Esta técnica es ampliamente utilizada tanto para el análisis cualitativo de compuestos orgánicos, aislamiento de componentes individuales a partir de mezclas multicomponentes, análisis cuantitativo y aislamiento a escala preparativa. La preparación de las muestras es más simple y pueden ser analizadas varias muestras y estándares en forma simultánea sin interferencias (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008; Skalicka-Wozniak *et al.*, 2008).

Entre sus ventajas se cuentan la gran diversidad de sistemas que pueden utilizarse.

Los perfiles cromatográficos tienen una gran importancia en el análisis de mezclas complejas, como es el caso de los extractos vegetales, permitiendo distinguir entre distintas especies vegetales (Zhi Zeng y Jiuwei Teng, 2007) y son adecuados para el control de la identidad y pureza de las drogas vegetales, así como para detectar posibles adulteraciones y sustituciones. También pueden ser utilizados para analizar mezclas de drogas y preparaciones fitoquímicas (Wagner y Blatt, 1996).

Los distintos extractos de *A. cherimola* y las fracciones obtenidas a partir del mismos, fueron cromatografiados en distintos sistemas de solventes, que se seleccionaron de acuerdo al o los grupos fitoquímicos que se buscaban encontrar en ellos. La elección de las condiciones óptimas para llevar a cabo las cromatografías, se realizó con ayuda de técnicas tales como PRISMA o bien recurriendo a la bibliografía especializada (Cseke *et al.*, 2006).



4.4.1.1. CCD para Polifenoles

(Wagner y Bladt, 1996).

Sistema 1

Fase estacionaria: Cromatofolios de Sílica gel 60 F254 Merk 0,25 mm.

Fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua destilada.
(100:11:11:27). Fase superior.

Sistema 2

Fase estacionaria: Cromatofolios de Sílica gel 60 F254 Merk 0,25 mm.

Fase móvil: Acetato de etilo / Metanol/ Agua destilada (100:13,5:10)

Sustancias de referencia

Solución metanólica de rutina (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml

Solución metanólica de isoquercetina (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml

Solución metanólica de ácido caféico (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml

Revelado de los cromatogramas

Observación a la luz UV. 254 nm, UV366 nm y UV 366 + más vapores de amoníaco.

Pulverización con Reactivo de Productos Naturales (solución metanólica de ácido 2-aminoetildifenilbórico al 1%) y posterior observación al visible y a la luz UV 366 nm.

4.4.1.2. CCD para Terpenos y Esteroides

(Wagner y Bladt, 1996).

Sistema 1

Fase estacionaria: Cromatofolios de Sílica gel 60 F254 Merk, 0.25 mm.

Fase móvil: Tolueno, Acetato de etilo (8:2)

Sistema 2

Fase estacionaria: Cromatofolios de Sílica gel 60 F254 Merk, 0.25 mm.

Fase móvil: **DCM:** Metanol (95:5)



Sustancias de referencia

* Solución de ácido ursólico 1 mg/ml en cloroformo

* Solución de ácido oleanólico 1 mg/ml en cloroformo

Una muestra auténtica de ácido oleanólico fue aislada a partir del extracto diclorometánico de *Gentianella multicaulis* e identificada por métodos espectroscópicos (UV, ¹HNMR, ¹³CNMR, 2D, MNR EIMS, FAB, MS) (Nadimic, 2000).

Una muestra auténtica de ácido ursólico fue aislada a partir del extracto diclorometánico de *Cecropia pachystachya* e identificada por métodos espectroscópicos (¹HNMR, ¹³CNMR) (Schinella G. *et al.*, 2008).

Revelado de los cromatogramas

Observación al visible y al UV254

Pulverización del cromatograma con la solución de p-anisaldehído sulfúrico. Calentar 5-10 min a 90 - 100°C.

El reactivo consiste en una solución recién preparada de 0,5 ml de anisaldehído + 9 ml de etanol + 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado + 0,1 ml de ácido acético glacial.

4.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD)

Esta técnica permite la separación de gran número de compuestos. En la mayoría de los casos se utiliza como técnica analítica, aunque también puede emplearse como técnica semipreparativa. Los sistemas de detección pueden ser de distinta naturaleza: en especial el que utiliza arreglo de fotodiodos (DAD) permite escanear el rango de absorción UV de cada compuesto separado.

Para la separación de extractos de plantas esto constituye una gran ventaja, ya que según el compuesto involucrado puede existir una gran diferencia en sus absorciones UV máximas. El análisis de los espectros UV, contribuye a caracterizarlos. (Vogel y Setzer, 2006).

Los distintos extractos de *A. cherimola* y las fracciones obtenidas a partir de los mismos, fueron cromatografiados por HPLC-DAD en distintos sistemas de solventes, que se seleccionaran de acuerdo al o los grupos fitoquímicos que se esperaban encontrar en ellos.



4.4.2.1. HPLC-DAD para Polifenoles

Equipo: Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA) configurado con una bomba terciaria de gradiente dual (DGP-3000)

Fase estacionaria: Columna BDS Hypersil RP-18 (250 x 4 mm, 5 μ m, Thermo Scientific).

Fase móvil: mezcla de Tetrahidrofurano: Metanol: Agua (15: 5: 85) ajustada a pH = 2,5 con ácido fosfórico.

Caudal: 1 ml / min

Preparación de las muestras: el extracto acuoso (infusión), metanólico y n-butanólico (10 mg del extracto desecado) se resuspendió con 1000 μ l de metanol y se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm. Después de esto, se hicieron diluciones 1: 100 (extracto butanólico) o 1: 3 (extractos metanólico y acuosos) con la fase móvil. Las soluciones obtenidas se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 mm antes de su inyección.

Volumen de Inyección: 20 μ l muestra

Detector: de matrices de diodos DAD-3000

Detección efectuada a 330 nm.

4.4.2.2. HPLC-DAD para Terpenos

Equipo: Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA) configurado con una bomba terciaria de gradiente dual (DGP-3000)

Fase estacionaria: Columna BDS Hypersil RP-18 (250 x 4 mm, 5 μ m, Thermo Scientific).

Fase móvil 1: Metanol: THF: Agua (92:4:4)

Fase móvil 2: Metanol 100%

Caudal: 1,2 ml / min.



Preparación de muestra: el extracto DCM seco se resuspendió con 1000 μ l de metanol y se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm. Después de esto, se hizo una dilución 1: 100 con la fase móvil. Las soluciones se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 mm antes de su inyección.

Volumen de Inyección: 20 μ l muestra

Detector: de matrices de diodos DAD-3000

Detección: 190-210 nm

4.5. Elaboración Nanoliposomas

4.5.1. Nanoliposomas Biodegradables

Los nanoliposomas (NLP) se prepararon de acuerdo con las técnicas desarrolladas en el Laboratorio de Biomembranas de Universidad Nacional de Quilmes (Montanari *et al*, 2013).

Primero se fabricaron los NLP sin carga de Rodamina, ni extractos, ni anticuerpos monoclonales. Luego se incorporaron en los mismos la Rodamina y la infusión liofilizada de “Chirimoya”.

Se preparó una película lipídica fina de fosfatidilcolina de soja a partir de una solución del lípido en cloroformo, eliminándose el solvente orgánico por evaporación rotatoria a 40°C en un balón. La película delgada de lípidos se barrió con nitrógeno para eliminar trazas de solvente.

El extracto se re-suspendió en buffer Tris pH 7,4 (Tris-HCl 10 mM más NaCl 0,9% p / v; en1:19) en una concentración de 20 mg de extracto por ml y lípidos en 40 mg/ml.

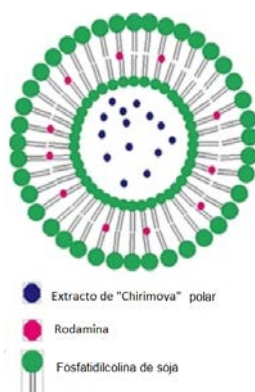


Ilustración 20 Esquema de nanoliposoma de fosfatidilcolina marcados con rodamina con infusión liofilizada de “Chirimoya”

A su vez, se adicionó en la solución lipídica un fluoróforo lipofílico (Rhodamina PE, color rojo) en una proporción de 1:1000 mol: mol respecto de los lípidos.

Se sonicó la suspensión 45 minutos (con un baño Tipo sonicador 80W, 40 kHz) para reducir lamelaridad.

Se extrudó 3 veces a través de membrana de 0,2 μm diámetro de poro, para reducir el tamaño de la suspensión.



Se eliminó por cromatografía de filtración en gel en una mini-columna de Shepadex G-50 el extracto y fluoróforos no incorporados, usando el Método de centrifugación en columna (Fry *et al*, 1978).



Ilustración 21 Lipex extruder Transferra Nanosciences Inc 8855 northbrookcourt 10 ml extruder Modelo MAOP Psig 850; bar 58,6; Maot (°C) 80; Min Vol Extrusión 1ml

4.5.2. Nanoliposomas conjugados a anticuerpos monoclonales cargadas con infusión de “Chirimoya”:

Se prepararon Nanoliposomas (NLP) utilizando Poly-lactico-glicolicAcid recubierto con Polietilenglicol (PEG) con Rodamina (RD) cargados con extracto aucoso liofilizado de “Chirimoya” y (NLP-CD20-RD-Chiri) y (NLP-CD20-RD) sin extracto, realizado en el Centro de Research Clinique Hayem, Hopital Saint Louis, Francia.

Para esto se sintetizó primero Distearoil-N- (3-carboxipropionil poli (etilenglicol) succinil) fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG-COOH).

Por otro lado, se conjugó el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (BD Bioscience, San José, CA) con los NLP mediante la reacción de residuos de sulfhidrilo en el anticuerpo con el extremo distal de las cadenas de PEG siguiendo la técnica de Maruyama (Maruyama *et al*, 1995).

Finalmente se prepararon los liposomas a partir de fosfatidilcolina y colesterol (2: 1 m / m) que contenían 6 mol % de DSPE-PEG-COOH y RD en una concentración final de 50 µg/ml mediante la evaporación en fase inversa y la formación de los films lipídicos. Se resuspendió con el agregado la infusión liofilizada de “Chirimoya” disuelta en buffer seguido de sonicación y extrusión (LipexBiomembranes, Vancouver, BC, Canadá) a través de Filtros de membrana de policarbonato apilados en 2 (tamaño de poro de 0,2 µm; Whatman, Maidstone, Reino Unido) (Maruyama *et al*, 1995; Klibanov *et al.*, 1991). El tamaño promedio de los liposomas utilizados en este estudio fue de aproximadamente 200 nm.

Esta técnica proporciona un medio simple de conjugar anticuerpos directamente al extremo distal del PEG que ya está unido a la membrana del liposoma, constituido por 6% en moles de DSPE-PEG-COOH, y un anticuerpo monoclonal el anti-CD20, que es altamente específico para los linfocitos B tanto normales como leucémicos de la B-CLL.

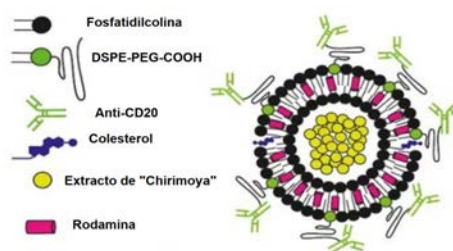


Ilustración 22 Esquema de Nanoliposoma marcada con CD-20



4.5.3. Pruebas de Internalización Celular de los nanoliposomas

Los NLP marcados con RD con y sin anticuerpo monoclonal anti-CD20 (NLP-CD20-RD, NLP-RD respectivamente) se usaron para las pruebas de internalización de los NLP en las células normales y leucémicas.

Primero se realizó la preparación de los NLP sólo con Rodamina B (Alfa Aesar, Ward Hill, MA); NLP-RD y NLP-RD-Chiri siguiendo la técnica de formación NLPs descrita en 4.5.1.; y NLP-CD20-RD y NLP-CD20-RD-Chiri con el agregado de anti CD20 los siguiendo la técnica de formación NLPs descrita en 4.5.2.

Para estos ensayos las PBMCs (células mononucleares de sangre periférica pacientes sanos), y las células B-CLL sensibles y resistentes a Fludarabina se sembraron en 2ml de medio de cultivo Roswel II Park Cancer Institute (RPMI 1640) y 10% de suero fetal bovino (SFB) a una concentración de 3×10^4 células/ml en tubos plásticos estériles de 15 ml (Falcon), un día antes de la adición de los NLP-RD y NLP-RD-Chiri (sin anti CD20); y los NLP-CD20-RD y NLP-CD20-RD-Chiri (con anti CD20) a concentraciones de 0,5; 1; 2 y $3 \mu\text{g/ml}$ y se incubaron durante 6 horas. La penetración de los liposomas dentro de las células y la absorción de RD se analizó por microscopía confocal de fluorescencia Microscopio Láser Confocal Espectral (CLSM) Leica TCS SP5 a 0, 1, 2, 3 y 6 horas. El grado de penetración fue determinado por un observador independiente de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP entrenado en observación celular con Microscopía Confocal mediante la evaluación de 5 imágenes tomadas en cada punto de tiempo (0, 1, 2, 3 y 6 horas) de incubación de cada uno de los tipos de células con los diferentes NLP y a la concentración seleccionada y mencionada anteriormente. Para este propósito, se re-suspendieron con pipeta plástica estéril cada cultivo celular en cada tubo cónico y en cada tiempo pre-establecido de estudio de las células con NLP. Luego se tomó de cada tubo 500 μl del medio con células y las mismas se sometieron a dos ciclos de lavado y finalmente a un paso de resuspensión en PBS antes de realizar el montaje de las células y su observación bajo microscopía confocal.

4.5.4. Cuantificación de los Fosfolípidos de los nanoliposomas

Se cuantificaron las nanoliposomas realizados con el grupo de trabajo de la Facultad de Quilmes, mediante un micro ensayo de fosfato colorimétrico (Bötcher *et al*, 1961).



Se realizó una digestión ácida (en ácido perclórico) seguida de una reacción de los fosfatos de los fosfolípidos con molibdatos, y que luego, cuando se agrega ácido ascórbico, se forma un producto coloreado cuya absorbancia a 818 nm permite estimar (curva de calibración mediante) la concentración de fosfatos.

4.5.5. Comprobación de tamaño de nanopartículas

El diámetro efectivo de los nanoliposomas realizados en Quilmes se determinaron en el CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos, CONICET, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, CIC) mediante dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering, o DLS) y Potencial Zeta en un NanoPartica SZ-100 series, marca Horiba. Las muestras fueron medidas por quintuplicado.

4.5.6. Cuantificación de extracto dentro de los liposomas

Para cuantificar el contenido de extracto en los liposomas se realizó mediante la siguiente técnica:

- Se preparó una curva de calibración a distintas concentraciones de cada extracto disueltas en etanol absoluto y se midió a 583,5 nm.
- Por otro lado, se rompió la suspensión liposomal con 2 volúmenes de etanol absoluto.
- Se centrifugó para precipitar los lípidos
- Se tomó el sobrenadante y midió la absorbancia
- Se determinó la concentración por medio de la extrapolación de las ecuaciones derivadas de cada curva de calibración.

4.5.7. Técnica: Determinación del contenido de polifenoles totales de Folin-Ciocalteu para cuantificar la cantidad de extracto encapsulado

El contenido total de fenoles fue analizado por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu siguiendo el procedimiento propuesto por Erkan *et al.* (2008) usando ácido gálico como material de referencia. Para determinar la cantidad de fenoles totales en la fase dispersa se tomó 1 ml (diluido 1:1000), enseguida se adicionaron 6,25 ml de



carbonato de sodio al 20%; 1,25 ml de Folin 1N y el resto de agua hasta completar 10 ml, se agitó vigorosamente y dejó en reposo durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 765 nm. Este procedimiento se realizó para cada uno de los ensayos señalados por el diseño experimental, tanto para las variables de formulación como preparación, con el objetivo de determinar el porcentaje de fenoles totales retenidos por diferencia de concentración entre la cantidad presente en la fase dispersa y el sobrenadante acuoso producto de la separación de las microesferas. En este sentido, se aplicó el mismo procedimiento de análisis al sobrenadante. La preparación de los blancos fue considerada para cada caso con la finalidad de eliminar cualquier interferencia. La cantidad de fenoles totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (mg ácido gálico/mg de extracto seco).



4.6. Actividad anti- leucémica linfocítica crónica

4.6.1. Obtención y procesamiento de células normales y leucémicas

Se obtuvieron después del consentimiento informado y en forma estéril, muestras de sangre periférica heparinizada (20 ml) de cinco pacientes con B-LLC, sin tratamiento previo, que cumplieran con los criterios de diagnóstico para los estadios 0-I de Rai (**Tabla 4**), cinco de pacientes con B-LLC resistentes a Fludarabina en estadio II y III de Rai (**Tabla 5**), así como de cinco donantes sanos (**Tabla 6**) y se utilizaron los mismos para todos los experimentos, respectivamente.

Tabla 4 Criterios de diagnóstico de cinco pacientes con B-LLC para los estadios 0-I de Rai.

Grupo	Nº	Edad	Sexo	TAD años	Linfocitosis	Adenopatía	Hepato/ Esplenomegalia	Anemia	Plaquetopenia	RAI
B-LLC sin tratamiento *	LS1	57	F	1,8	Si	No	No	No	No	0
	LS2	61	F	2,4	Si	Si	No	No	No	I
	LS3	66	M	4	Si	No	No	No	No	0
	LS4	69	M	3,2	Si	Si	No	No	No	I
	LS5	72	F	2,8	Si	Si	No	No	No	I

*LS: Linfocitos B Leucémicos sin tratamiento previo

Tabla 5 Criterios de diagnóstico para cinco pacientes con B-LLC resistentes a Fludarabina en estadio II y III de Rai

Grupo	Nº	Edad	Sexo	TAD años	Linfocitosis	Adenopatía	Hepato/ Esplenomegalia	Anemia	Plaquetopenia	RAI
B-LLC Resistente a Fludarabina *	LR1	59	F	4,3	Si	Si	Si	Si	No	III
	LR2	63	F	5	Si	No	Si	No	No	II
	LR3	68	F	2,9	Si	Si	Si	No	No	II
	LR4	74	M	3,6	Si	Si	Si	Si	No	III
	LR5	57	M	6,7	Si	Si	Si	No	No	II

*LR: Linfocitos B Leucémicos Resistentes a Fludarabina

Tabla 6 Procesamiento de células de sujetos sanos como blanco.

Grupo	Nº	Edad	Sexo	TAD **	Linfocitosis	Adenopatía	Hepato/ Esplenomegalia	Anemia	Plaquetopenia
Sujetos Normales	PBMC1	57	F	NC	No	No	No	No	No
	PBMC 2	61	F	NC	No	No	No	No	No
	PBMC 3	66	M	NC	No	No	No	No	No
	PBMC 4	69	M	NC	No	No	No	No	No
	PBMC 5	72	F	NC	No	No	No	No	No

* PBMC Concentrado monocitario proveniente de sujetos normales ** TAD: Tiempo al diagnóstico (NC) No Corresponde por no tener patología



Tabla 7 Cuadro resumen de procesamiento de células normales y leucémicas

Grupo	N°	Edad	Sexo	Estadio RAI	*Tiempo al diagnóstico
Sujetos Normales	PBMC1	57	F	-	-
	PBMC 2	61	F	-	-
	PBMC 3	66	M	-	-
	PBMC 4	69	M	-	-
	PBMC 5	72	F	-	-
B-LLC Sensible	LS1	59	M	0	1,8
	LS2	63	F	I	2,4
	LS3	68	M	I	4
	LS4	74	M	I	3,2
	LS5	57	F	I	2,8
B-LLC Resistentes Fludarabina ^a	LR1	64	F	III	4,3
	LR2	67	F	II	5
	LR3	71	F	II	2,9
	LR4	77	M	III	3,6
	LR5	62	M	II	6,7

Las muestras fueron sometidas a Separación por Gradiente de Densidad con Ficoll-Hypaque (PharmaciaBiotech) para aislar y obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC-Peripheral Blood Mononuclear Cells) en forma estéril y viables. Las PBMCs así aisladas de voluntarios sanos contienen en general la mayoría de los linfocitos normales de los cuales entre un 10-20 % del total de PBMCs fueron linfocitos B normales. En el caso de las muestras de las B-LLC (tanto sensibles como resistentes a Fludarabina) los linfocitos B tumorales constituyeron entre el 70-90% del total de los concentrados monocitarios.

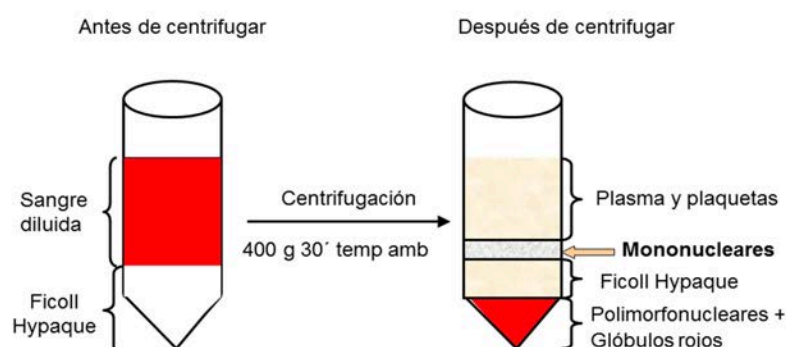


Ilustración 23 Obtención de células mononucleares de sangre periférica por Ficoll-Hypaque



4.6.2. Fenotipificación de las células obtenidas

El porcentaje de células/linfocitos B CD20+/CD19+ y aquellos CD5+/CD19+/CD20+ (en voluntarios sanos y en pacientes con B-LLC respectivamente) se determinó por análisis de citometría de flujo (Citometro CoulterEpics XL) CUCAIBA-La Plata en todas las muestras de B-LLC y en sangre periférica de donantes sanos antes y posteriormente a ser procesados con Ficoll-Hypaque (ver tabla Tabla 14 y 15 en la sección de Resultados).

4.6.3. Cultivos de las Células

Luego de separadas y tipificadas de esta forma, todas las PBMCs, tanto de donantes sanos, como de pacientes con B-LLC, fueron re-suspendidas en medio de cultivo (RPMI 1640 con 10% de Suero Fetal Bovino-Invitrogen).

El medio RPMI 1640 contiene biotina, vitamina B12, PABA, las vitaminas inositol y colina están presentes en concentraciones muy altas. El medio RPMI 1640 no posee proteínas, lípidos o factores de crecimiento; requiere suplementación, comúnmente con 10% de suero bovino fetal (FBS). El medio RPMI 1640 utiliza un sistema tampón de bicarbonato sódico (2,0 g / L) y es necesario un entorno de 5 - 10% de CO₂ para mantener el pH fisiológico.

Todas las PBMCs, tanto de donantes sanos, como de pacientes con B-LLC, fueron resuspendidas en medio de cultivo y sembradas en tubos plásticos cónicos de 15 ml (Falcon) estériles usando 2 ml del mismo medio de cultivo a una concentración de 2×10^5 células por ml medido en contador celular automático (Cell-dyn Emerald, Abbott Lab; ICM-La Plata). Las células mononucleares de sangre periférica (PBM) obtenidas de donantes sanos fueron luego utilizadas en todos los ensayos como controles-células normales no tumorales.

Las células de leucemia, B-LLC resistentes y no resistentes a Fludarabina, así como las PBMCs normales de donantes sanos se probaron cultivándolas únicamente con el medio de cultivo mencionado (controles) y con los distintos extractos de “Chirimoya” obtenidos y a distintas diluciones y tiempos, así como con los distintos NLPs. **Tabla 8.**



Tabla 8 Tipos de NLP

NLP:	NLP sola sin extracto ni monoclonal
NLP-RD:	Nanoliposoma con Rodamina sin anticuerpo conjugado.
NLP-RD-Chiri:	NLP con extracto de “Chirimoya” * sin monoclonal con Rodamina
NLP-CD20-RD:	Nanoliposoma con Rodamina conjugado con anti CD20.
NLP-CD20:	Nanoliposoma conjugado con anti-CD20 sin extracto.
NLP-CD20-RD-Chiri:	Nanoliposoma conjugado con anti-CD20 con Rodamina y cargado con Extracto de “Chirimoya” *.

4.6.4. Ensayo de Citotoxicidad y Apoptosis con Extractos de “Chirimoya” y nanoliposomas

Para los ensayos de citotoxicidad con los distintos extractos de “Chirimoya” y NLP y de apoptosis con los NLPs, se testearon sobre las distintas PBMCs de donantes sanos y de pacientes B-CLL resistentes y no resistentes a Fludarabina, en cultivos por triplicado de 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino a una densidad celular de 2×10^5 células por ml en tubos de ensayo plásticos estériles (Falcon) de 15 mililitros, incubados en condiciones estériles y estándar en estufa de cultivos celulares (Nuair), es decir a 37°C, 5% de CO₂ y 80% de humedad, usando distintas diluciones de los diferentes Extractos de “Chirimoya” en medio de cultivo: puros, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32. Si se observara en alguno de estos extractos mortalidad celular significativa a la última dilución usada se continuarían los ensayos con ese extracto a diluciones superiores sucesivas: 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024.

Para testear el impacto de los distintos NLPs con y sin anticuerpo monoclonal, así como aquellos con y sin extracto de Chirimoya (NLP-RD-Chiri, NLP-CD20-RD y NLP-CD20-RD-Chiri) sobre los distintos tipos de células, se realizaron tests de apoptosis celular, cultivándolas con los distintos NLPs a una concentración de 2 µg/ml, respectivamente durante 3 días. Los NLP-RD-Chiri y NLP-CD20-RD-Chiri se cargaron con el extracto acuoso de “Chirimoya” por ser el más activo para los estudios de citotoxicidad sobre células de B-LLC tanto sensibles como resistentes (a una dilución de 1/256).



4.6.5. Ensayo de Citotoxicidad con extractos de “Chirimoya”

Los diferentes extractos de “Chirimoya” se obtuvieron como ya se ha mencionado y se usaron agregándolos a estos tubos de cultivo con células (10^5 x ml) en diluciones decrecientes desde puros hasta 1/1024. De ser necesario, si se observara en alguno de estos extractos mortalidad celular significativa a la última dilución usada con acción de citotoxicidad significativa, por ejemplo 1/32, se continuarían los ensayos con ese extracto a diluciones superiores sucesivas: 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024. Los tubos de ensayo así condicionados se incubaron entonces en condiciones estériles y estándar, 37°C, 5% de CO₂ y 80% de humedad. La incubación continuó durante tres días.

Para los análisis de citotoxicidad se tomaron muestras de células de todos los cultivos (100µl), luego de re-suspender bien con pipeta estéril plástica descartable cada tubo cónico, a las 0, 24, 48 y 72 h y se colocaron las mismas en los micro-pocillos de placas plásticas para visión bajo microscopía invertida, estériles (Corning) x 96 micro-pocillos. El efecto citotóxico *in vitro* de los distintos extractos de “Chirimoya” se midió entonces en los distintos tiempos mencionados en cada pocillo agregando 10µl de una mezcla de colorantes vitales fluorescentes: yoduro de propidio / naranja de acridina (Fluoroquench) e incubando por 5 minutos en la estufa de cultivos para luego observar bajo visión microscópica invertida fluorescente usando un microscopio Binocular de fluorescencia (Motic Ba 210®).

Todas las células también se analizaron de la misma forma para el medio de cultivo con y sin extractos. Los porcentajes de Mortalidad Celular (Citotoxicidad) se calcularon contando las células muertas por campo de bajo aumento/microwell (rojo bajo microscopía con luz fluorescente) en relación con el número total de células vivas en el mismo campo (verdes en la coloración vital bajo microscopía con luz fluorescente) residuales dándole el observador un porcentaje de mortalidad a cada observación es decir a cada MicroWell de 0 a 100%.

El resultado final expresado en porcentaje de mortalidad fue el promedio de mortalidad final observada en cada uno de los 3 tubos de cada ensayo y de cada uno de los 5 pacientes de cada grupo de B-LLC y de los controles normales.

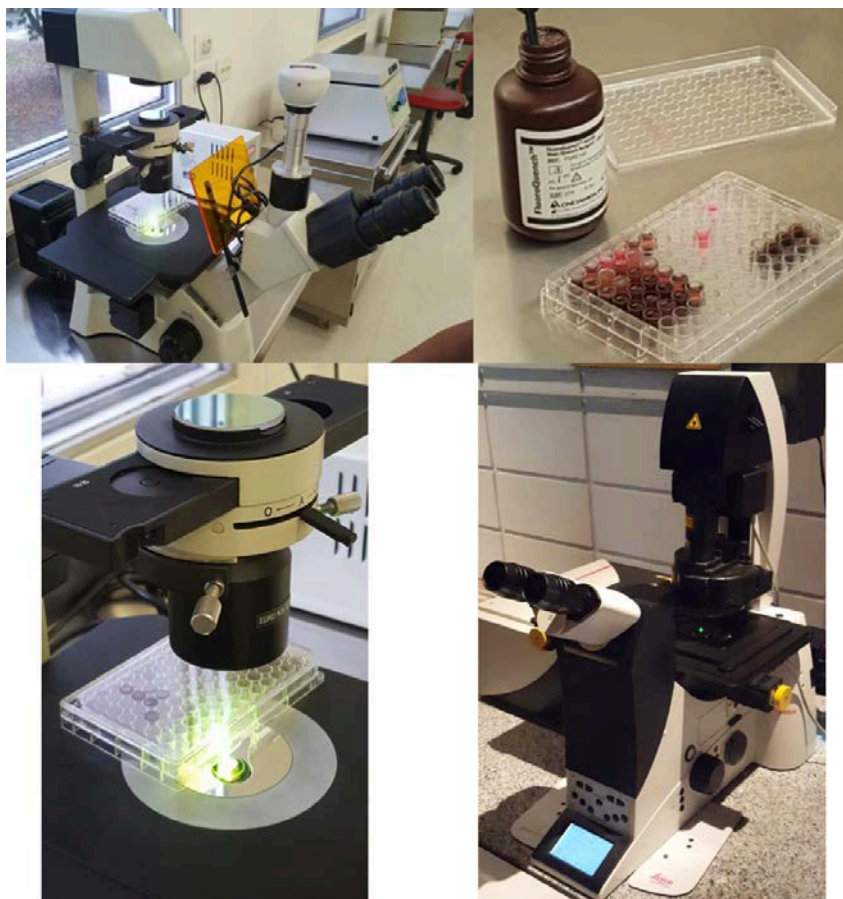


Ilustración 24 La figura de arriba izquierda corresponde a Microscopio Binocular de fluorescencia (Motic Ba 210®). Arriba derecha al reactivo fluoroquench y Placa de 96 Microwells. Abajo izquierda Microscopio marca Motic de visión invertida con Fluorescencia del CUCAIBA. Abajo Derecha Microscopio Láser Confocal Espectral (CLSM) Leica TCS SP5. Laboratorio de Microscopía Avanzada Facultad de Cs. Exactas

4.6.6. Ensayo de Apoptosis con nanoliposomas

Se valoró por pruebas de apoptosis el impacto de los NLPs sobre los distintos tipos de células. El grado de apoptosis se evaluó en cada uno de los ensayos mediante técnica de citometría de flujo (Citometro CoulterEpics XL) CUCAIBA- La Plata a través de la marcación de las células a estudiar con Anexina V y Ioduro de Propidio a 0, 24, 48 y 72 hs de cultivo.

Se testeó apoptosis en todos los tipos celulares: mediada por NLPs con y sin extracto de “Chirimoya”; con y sin anticuerpo monoclonal anti-CD20.

Se seleccionó el extracto acuoso de “Chirimoya” para cargar los NLPs, ya que fue el que alcanzó el nivel mayor de citotoxicidad sobre las células de B-LLC tanto sensibles como resistentes a Fludarabina. Los NLPs se cargados según la técnica descripta se diluyeron en medio de cultivo a 1/256.



Los distintos NLPs (NLP-RD, NLP-RD-Chiri, NLP-CD20-RD y NLP-CD20-RD-Chiri) fueron agregados con el medio de cultivo (2 ml) y las distintas células (2×10^5 células x ml) a una concentración de 2 mg/ml en distintos tubos de ensayo estériles de 15 ml (Falcon). Todas las células también se analizaron para el medio de cultivo sólo, sin NLPs. El resultado final expresado fue el porcentaje de apoptosis promedio de cada uno de los 3 tubos de cada ensayo y de cada uno de los 5 pacientes de cada grupo en los distintos tiempos de cultivos 0, 24, 48 y 72 hs.

4.6.7. Análisis Estadístico

La significación estadística de todos los experimentos se determinó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

4.7. Predicción de la actividad drogas anticonvulsivas y antiinflamatorias.

Como una actividad no prevista en el plan de tesis original de *A. cherimola*, se aplicó el programa de modelos computacionales desarrollado en el LIDEB (Fac. de Cs. Exactas, UNLP) a diversos componentes químicos presentes en hojas de *A. cherimola*, encontrados como parte de la revisión de antecedentes con el fin de seleccionar plantas medicinales como potenciales tratamientos para la enfermedad antinflamatorias y anticonvulsivas.

5. Resultados:

5.1. Análisis botánico

5.1.1. Morfología macroscópica y Microscopia analítica

Para lograr la identificación botánica de una especie, se recurre a la observación de diversos caracteres macro y microscópicos y a la determinación cuantitativa de distintas variables (magnitudes proporcionales), analizándolos luego en forma complementaria.

Tanto las Farmacopeas como el Código Alimentario Nacional y la Organización Mundial de la Salud, recomiendan para el reconocimiento de los caracteres anatómicos, distintas técnicas de preparación de las muestras (diafanización, disociados, cortes, tinciones, etc.) y el uso del microscopio óptico para su observación. (Farmacopea Argentina, 2003; OMS, 2011; Gimenez *et al.*, 2016).

El análisis micrográfico aplicado a las drogas vegetales se basa en el reconocimiento y la valoración cualitativa y cuantitativa de caracteres diagnósticos, mediante el estudio de los tejidos, en ocasiones complementado con reacciones histoquímicas (Gatusso, 2013). El análisis de estos caracteres contribuye no solo a la determinación de la identidad del material vegetal, sino a la detección de distintas situaciones anómalas como adulteraciones, sustituciones, mezclas, sobre todo cuando la droga vegetal se halla fragmentada o pulverizada.

Las hojas de *A. cherimola* fueron preparadas mediante técnicas habituales de diafanización, tinciones, disociado leve y en los casos que así lo requerían, técnicas propias de eliminación de tricomas y ablación de epidermis a fin de observar los tejidos subyacentes.

5.1.2. Morfología macroscópica:

Se trata de una hoja simple, con pecíolo corto, ahuecado, de aproximadamente 1 cm de longitud. La hoja es entera, oval-lanceolada, color verde oscuro, verde claro en el envés, que es tomentoso y con nervaduras notables. Los tricomas se observaron fácilmente con auxilio de una lupa binocular (ver Ilustración 25 y 26.)



Ilustración 25 Visualización de pelos de hoja fresca con Lupa Nikon con binocular C-W 10xA/22



Ilustración 26 Hoja seca de *A. cherimola* observada con lupa binocular.

5.1.3. Análisis micrográfico

Observada al microscopio óptico (MO) la hoja de *A. cherimola* presenta una epidermis superior o adaxial con células aproximadamente isodiamétricas, de forma geométrica o muy levemente sinuosa. En la hoja diafanizada se observó por transparencia el parénquima en empalizada (ver ilustración 27). La epidermis inferior o abaxial presenta numerosos pelos glandulares unicelulares largos, engrosados en la base, que dificultan la observación. En vista superficial, las células epidérmicas que rodean la base del pelo, se disponen en forma de corona de 8-10 células (ver ilustración 29)

Una vez eliminados los tricomas, se observaron las células epidérmicas aproximadamente isodiamétricas, levemente sinuosas; cicatrices donde se insertaban los pelos; estomas paracíticos, siendo una hoja hipostomática (ver ilustración 28).

En el mesófilo de la hoja diafanizada se observó por transparencia, el tejido de conducción; la presencia de idioblastos que aparentan algún tipo de conexión con el tejido de conducción (ver ilustración 30). En la hoja desprovista de epidermis, se apreció mejor que se trataba del parénquima lagunoso (ver iustración 30).

El disociado leve permitió apreciar con mas detalle, la presencia de fibras, diversas clases de esclereidas (astroesclereidas, braquiesclereidas, osteoesclereidas) que acompañan al tejido de conducción, así como la presencia de elementos de los vasos con engrosamientos espiralados y placa perforada simple (ver Ilustraciones 31,32 y 33.).

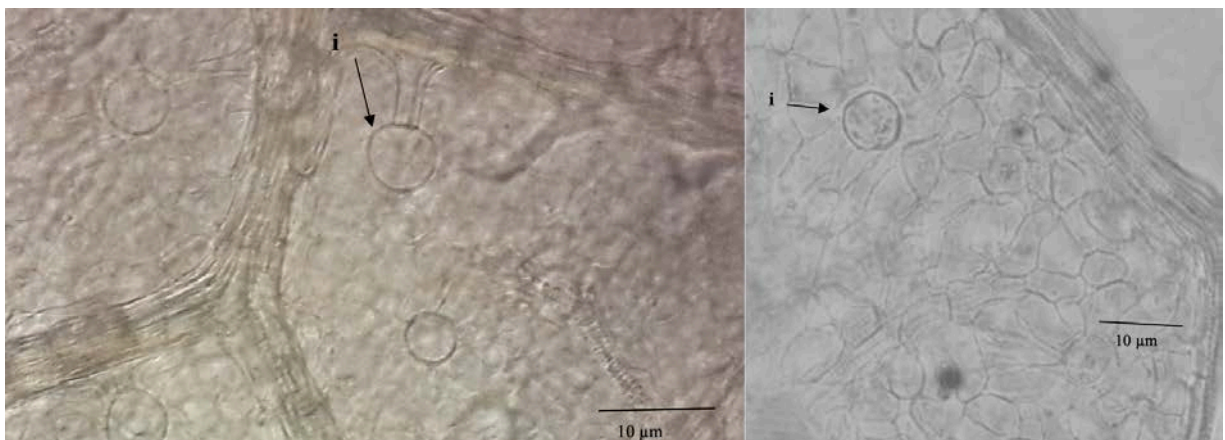


Ilustración 30 Izquierda hoja diafanizada de *A. cherimola*. (400X). Derecha hoja desprovista de epidermis (400X)



Ilustración 31 Hoja de *A. cherimola*. Elementos observados luego del disociado leve (400X). Izquierda, Astroesclereida. Centro, Osteoesclereida. Derecha, Braquiesclereida

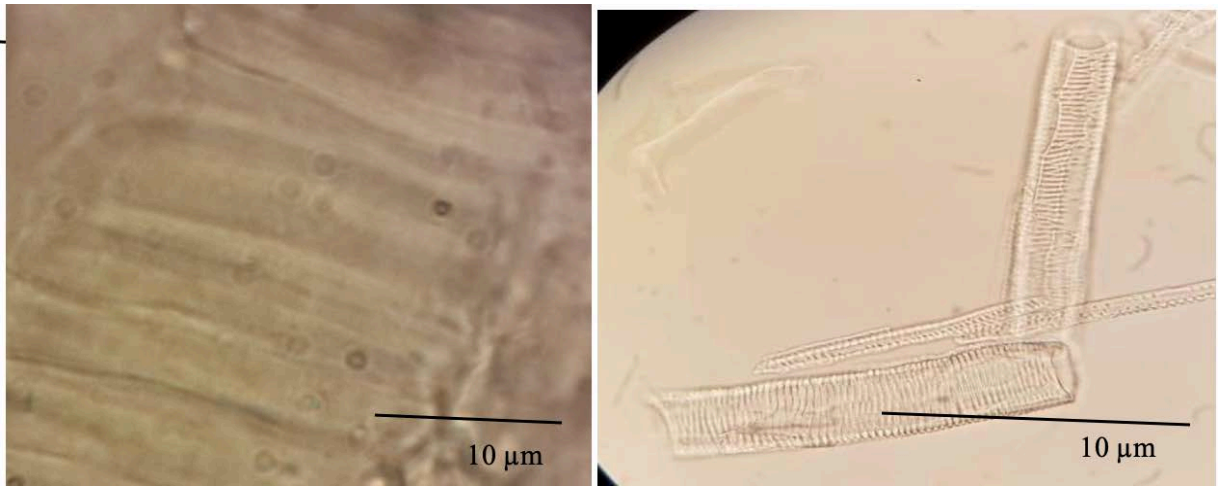


Ilustración 32 Hoja de *A. cherimola*. Elementos observados luego del disociado leve (400X). Izquierda, conjunto de braquiesclereidas. Derecha, elementos de los vasos

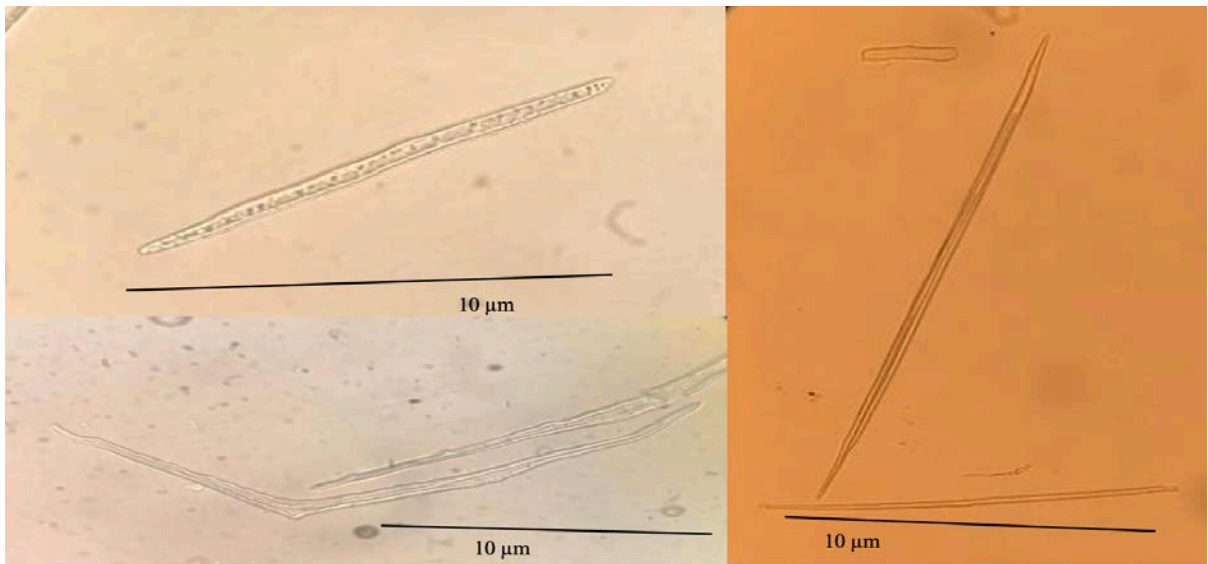


Ilustración 33 Hoja de *A. cherimola*. Elementos observados luego del disociado leve (400X)



5.2. Pruebas de caracterización fitoquímicas efectuadas a los extractos y fracciones de hojas de *A. cherimola*

5.2.1. Rendimientos de los extractos de hojas de *A. cherimola*, calculados en % (g extracto/100 g de material vegetal seco)

	Extracto MeOH (Marcha de Chen <i>et al.</i>)	Extracto CH ₂ Cl ₂	Infusión
Hojas <i>A. cherimola</i>	14,32 %	2,69 %	5,92 %

5.2.2. Detección de Alcaloides.

Tabla 9 Resultados de pruebas detección de Alcaloides

Reactivo	Extracto metanólico	Fracción Cloroformo 2
Dragendorff	+	++ precipitado castaño rojizo
Marme	+	++ precipitado castaño rojizo
Mayer	+	++ precipitado blanco amarillento
Acido Tánico	+	++ precipitado grisáceo amarillento
Acido pícrico	+	++ precipitado amarillo, cristalino
Bouchardat	+	++ Precipitado marrón
Solución Permanganato de potasio	+	++ Precipitado cristalino

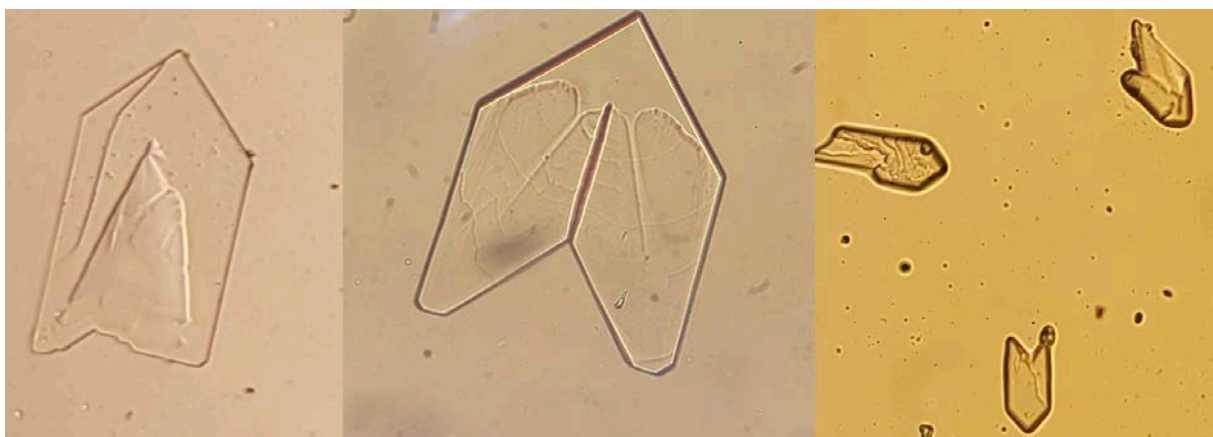


Ilustración 34 Precipitados **característicos** con ácido pícrico. Formación de cristales

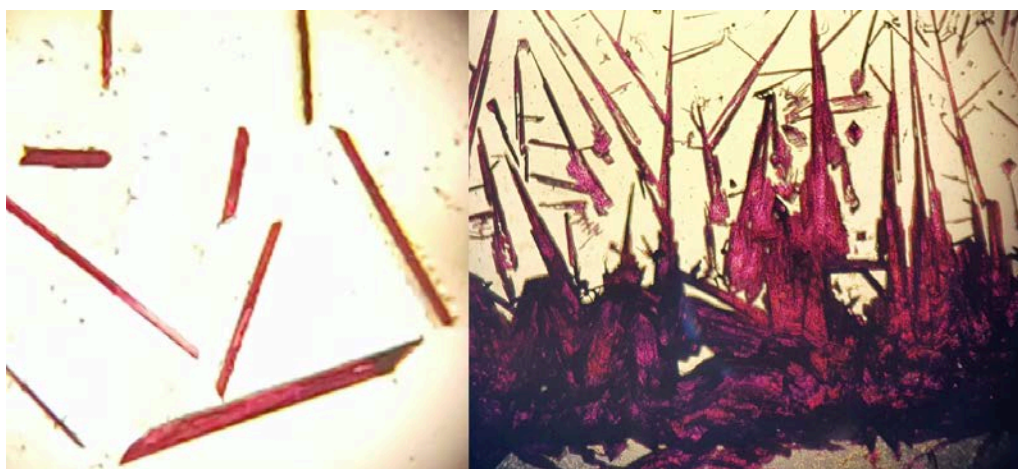


Ilustración 35 Precipitados con Permanganato de potasio. Formación de cristales



5.2.3. Detección de Polifenoles:

Se realizó sobre el extracto y fracciones obtenidas en la marcha de Chen *et al.*, modificada, encontrándose flavonoides en el extracto metanólico inicial, acuoso (después de la evaporación del metanol) y fracción: n-butanólico y cloroformica 1 (ver tabla 10)

Tabla 10 Reacciones de caracterización para polifenoles. Se indica coloración y fluorescencia al UV366

Reacción /Extracto	Extracto Metanólico	Extracto Acuoso	Fracción n-butanólico	Fracción cloroformica1
Shinoda	+ (rosa)	+ (naranja)	+ Rojo	-
NaOH	+ (amarillento)	+ (amarillento)	+ (amarillo-verdoso)	-
Cl₃Fe	+ (negro)	+ (negro)	+ (negro)	-
Cl₃Al	+ (fluorescencia amarilla)	+ (fluorescencia amarilla)	+ (fluorescencia amarilla)	-
BO₃H₃	+ (fluores. amarillo-verdoso)	+ (fluoresc. celeste)	+ (fluores. amarillo-verdoso)	-

Nota: La fluorescencia se intensifica en presencia de vapores de NH₃



5.2.4. Detección de Terpenoides y/o Esteroides

5.2.1.4.a. Reacción de Liebermann Bouchard

Se observó la coloración al minuto y a los treinta minutos de agregado el reactivo.

Se tomó la precaución de que el trabajo fuera en medio anhidro.

Una coloración verde-azulada indica la presencia de algún grupo esteroide y un color rosa-violáceo indica la presencia de grupos triterpenicos.

Resultado

En el extracto DCM se observó una coloración marrón que pasó a verde al minuto indicando la presencia de grupos esteroides.

5.2.1.4.b. Detección de saponinas

Estos ensayos se realizaron sobre el extracto acuoso y la fracción n-butanólica diluida.

Capacidad Afrógena

Resultado: Formación de espuma persistente y estable frente al agregado de ácidos clorhídrico diluidos en ambos casos.

5.2.1.4.c. Reacciones de precipitación

Reacción de precipitación 1: hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$).

Resultado: Al agregar el reactivo se visualizó la formación de precipitado.

Reacción de precipitación 2: Subacetato de plomo $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$

Resultado: Al agregar el reactivo se visualizó la formación de precipitado.



5.2.1.5. Reacción de Fehling indirecta:

Resultado: Solución de color rojizo y mucho precipitado de igual color. Reacción positiva presencia de azúcares reductores.

5.3. Sistemas Cromatográficos

5.3.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)

5.3.1.1 CCD para Polifenoles (flavonoides) presentes en hojas de *A. cherimola*

Se presentan los resultados, expresados como R_f , de la CCD contra testigos en los dos sistemas de solventes que tuvieron mejor resolución.

Las soluciones analizadas fueron: el extracto metanólico, la fase clorofórmica y la fracción n-butanólica resultantes de la marcha de Chen *et al.* modificada.



En el **Sistema 1** (EtOAc / AcOH / ForH / H₂O) (100:11:11:26) se destaca, en el extracto metanólico y la fracción n-butanol, la presencia de tres bandas cuyas características y R_f son coincidentes con las sustancias de referencia Rutina, Isoquercetina y ácido cafeico; en tanto que, para la fase clorofórmica, no se observan coincidencias con ninguna de las sustancias de referencia utilizadas, ni el perfil cromatográfico guarda relación con el de los otros extractos. (Ver Ilustración 36 y tabla 11)

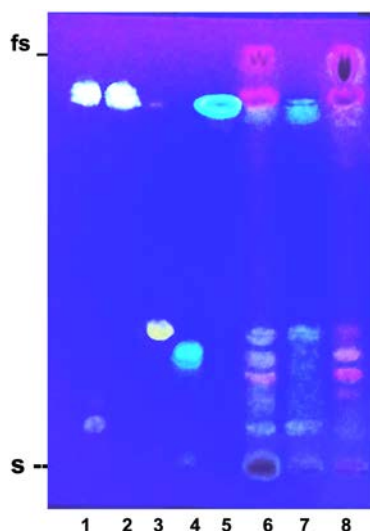


Ilustración 36 Sistema 1 (EtOAc / AcOH / ForH / H₂O) (100:11:11:26)

En el **Sistema 2** (EtOAc/MetOH/H₂O 100:13,5:10) nuevamente se observa, en el extracto metanólico y la fracción n-butanol, la presencia de tres bandas cuyas características y R_f son coincidentes con las sustancias de referencia Rutina, Isoquercetina y ácido cafeico. Estas bandas no se observan para la fase clorofórmica, ni el perfil cromatográfico guarda relación con el de los otros extractos. (Ver Ilustración 37 y tabla 11)



Ilustración 37 Sistema 2 (EtOAc/MetOH/H₂O 100:13,5:10)



Tabla 11 CCD de los extractos y fracciones en los sistemas de solventes para Polifenoles

Sustancias de referencia y Extractos cromatografiados	Rf en los Sistemas cromatográficos		Revelado	
	S1- AcEt/AcH /ForH/H2O 100:11:11:26	S2- AcEt/ MeOH /H2O 100:13,5:10	Visible	RPN y Luz UV 366 nm + NH ₃
1.- Rutina	0,38	0,41	Amarillo	Fluorescencia amarilla que se intensifica con NH ₃
2.- Quercetina	0,98	0,89	Amarillo	Fluorescencia amarilla que se intensifica con NH ₃
3.- Isoquercetina	0,52	0,52	Amarillo	Fluorescencia amarilla /naranja que se intensifica con NH ₃
4.- Acido clorogénico	0,47	0,25	Incoloro	Fluorescencia celeste intensa
5.- Acido Cafeico	0,98	0,73	Pardo	Fluorescencia celeste intensa
6.- Extracto MeOH	0	0	---	negro
	----	0,25	amarillo	Fluorescencia amarilla
	0,38	0,40	Amarillo	Fluorescencia amarilla que se intensifica con NH ₃
	----	0,42	incoloro	Fluorescencia celeste
	0,44	---	Amarillo	Fluoresc. rosa
	0,47	---	Amarillo	Fluoresc. rosa
		0,45	Incoloro	Fluorescencia celeste
	0,50	---	Amarillo	Fluoresc. rosa
	0,52	0,51	Amarillo	Fluorescencia amarilla /naranja que se intensifica con NH ₃
	0,98	0,74	Pardo	Fluorescencia celeste intensa
1,00	1,00	Verde	Rojo Fluor	
7.- Fase n-BuOH	0	0	---	---
	0,38	0,41	Amarillo	Fluorescencia amarilla que se intensifica con NH ₃
	0,52	0,52	Amarillo	Fluorescencia amarilla /naranja que se intensifica con NH ₃
	0,98	0,73	Pardo	Fluorescencia celeste intensa
8.- Fase Cloroformo	N/D	N/D	---	---



5.3.1.2. CCD para Terpenoides presentes en hojas de *A. cherimola*

Se presentan los resultados, expresados como Rf, de la CCD contra testigos en los dos sistemas de solventes que tuvieron mejor resolución.

Las soluciones de las muestras fueron el extracto DCM y la fracción EtOAc obtenida anteriormente.

En el **Sistema 1** (Tolueno / EtOAc 8:2) se observan perfiles cromatográficos bastantes similares para ambas muestras, con dos bandas coincidentes con los testigos utilizados.

Los testigos utilizados, ácido ursólico y ácido oleanólico, tienen en este sistema cromatográfico, el mismo Rf, por lo que no pueden diferenciarse (ver Ilustración 38, izquierda y tabla 12).

En el **sistema 2** (DCM/MeOH 95:5) los Rf de los ácidos ursólico y oleanólico son diferentes y pueden observarse bandas coincidentes con dichos testigos tanto en el extracto DCM como en la fracción EtOAc. (ver Ilustración 38, derecha y tabla 12).

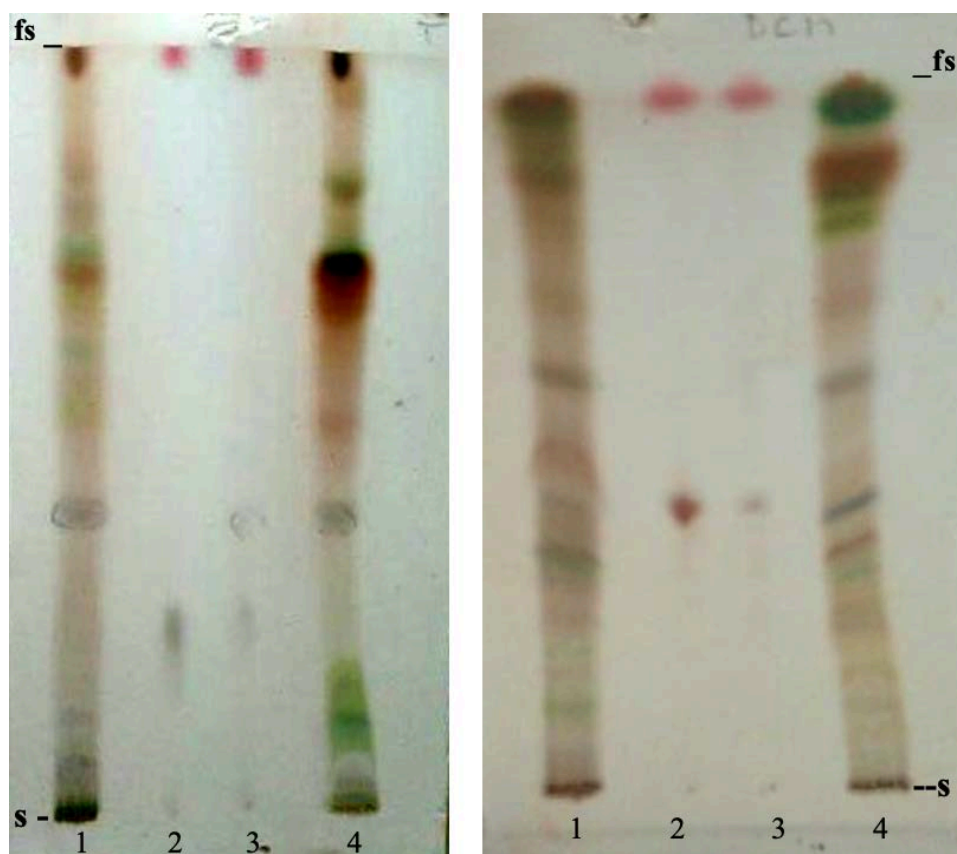


Ilustración 38 Izquierda, sistema 1 (Tolueno / EtOAc 8:2). Derecha, sistema 2 (DCM/MeOH 95:5)



Tabla 12 CCD de los extractos y fracciones en los sistemas de solventes para Terpenoides

Sustancias de referencia y Extractos cromatografiados	Rf en los Sistemas cromatográficos		Revelado
	1 Tolueno/Acetato de etilo (8:2)	2 DCM/Metanol (95:5)	AS + 5 min 105 °c
2.- Acido ursolico (U)	0,25	0,42	Rojo-grisaceo
3.- Acido oleanolico (O)	0,38	0,58	Rojo-grisaceo
1.- Extracto DCM		0,12	Verde
	0,10 y 0,17		Gris
		0,37	Verde-rojizo
	0,25	0,42	Gris
	0,38	0,58	Rojo-grisaceo
		0,62	Marron rojizo
	0,82	0,70	Rojizo
	0,85	0,80-0,84	Verde-rojizo
	0,92	0,87	Marron-rojizo
		0,98	Verde
	1,0	1,00	Rojo
4.- Fraccion AcOEt		0,12	Verde
		0,17	Verde-rojizo
	0,25	0,42	Gris
		0,31	Verde
		0,34	Marron
		0,38	Azul
	0,38	0,58	Rojo-grisaceo
	0,52	0,62	Marron rojizo
		0,70	Rojizo
		0,80-0,84	Verde-rojizo
	0,72	0,87	Marron-rojizo
	0,83	0,98	Verde
	1,0	1,00	Rojo



5.3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD)

5.3.2.1. HPLC-DAD para polifenoles (Flavonoides y ácido cafeico) presentes en *A. cherimola*.

Se presentan los resultados, expresados como t_R (tiempo de retención) de la HPLC-DAD contra testigos.

Las soluciones de las muestras fueron el extracto metanólico y la fracción n-butanólica resultantes de la marcha de Chen *et al.* modificada; y la infusión (Cfr. ítem 4.4.2.1).

Los testigos utilizados fueron: ácido cafeico ($t_R = 13,95$ min), rutina ($t_R = 20,65$ min) e isoquercetina ($t_R = 27,80$ min)

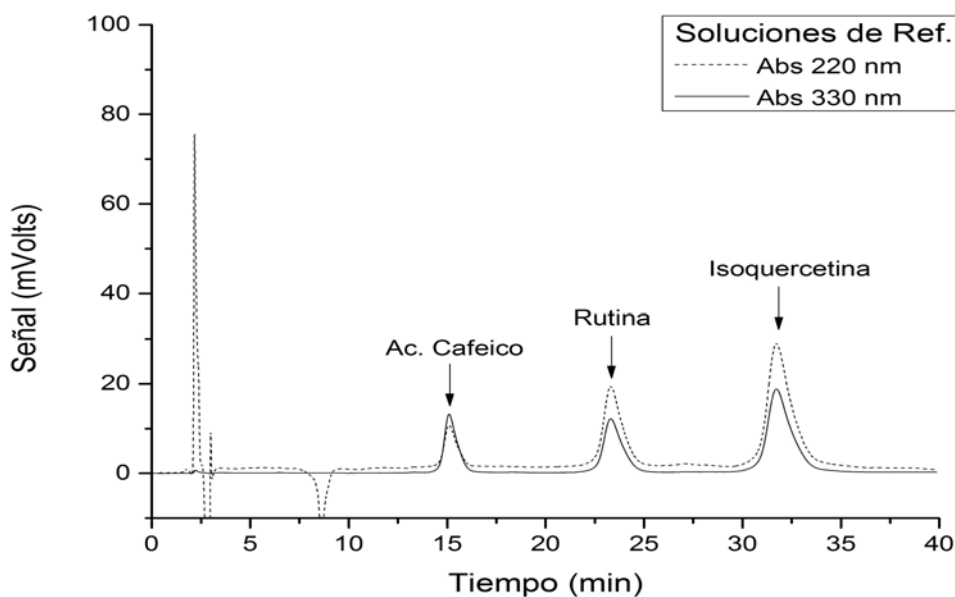


Ilustración 39 Ilustración 39 HPLC-DAD de las Sustancias de Referencia (Ácido caféico, Rutina, Isoquercetina)



El perfil por HPLC-DAD del **extracto metanólico** (dilución 1:3) permite observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R=13,95$ min), rutina ($t_R=20,65$ min) e isoquercetina ($t_R=27,8$ min) (ver Ilustración 40.) confirmando así los resultados de las CCD previas.

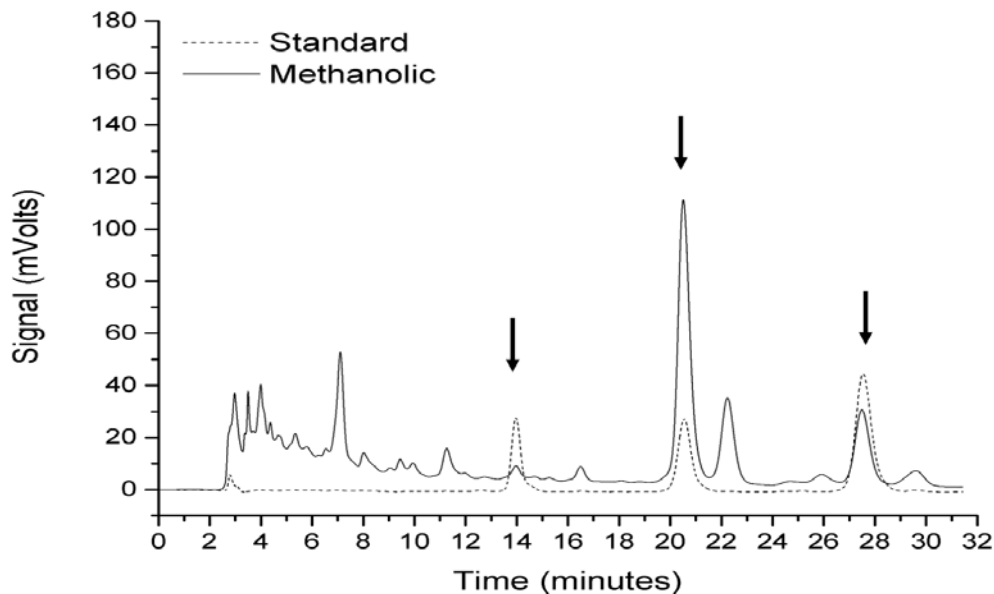


Ilustración 40 Perfil por HPLC-DAD del extracto metanólico

Para la fracción n-butanólica (dilución 1:10), el perfil observado en el HPLC-DAD permite observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R =13,95$ min), rutina ($t_R=20,65$ min) e isoquercetina ($t_R=27,8$ min) (ver Ilustración 41).

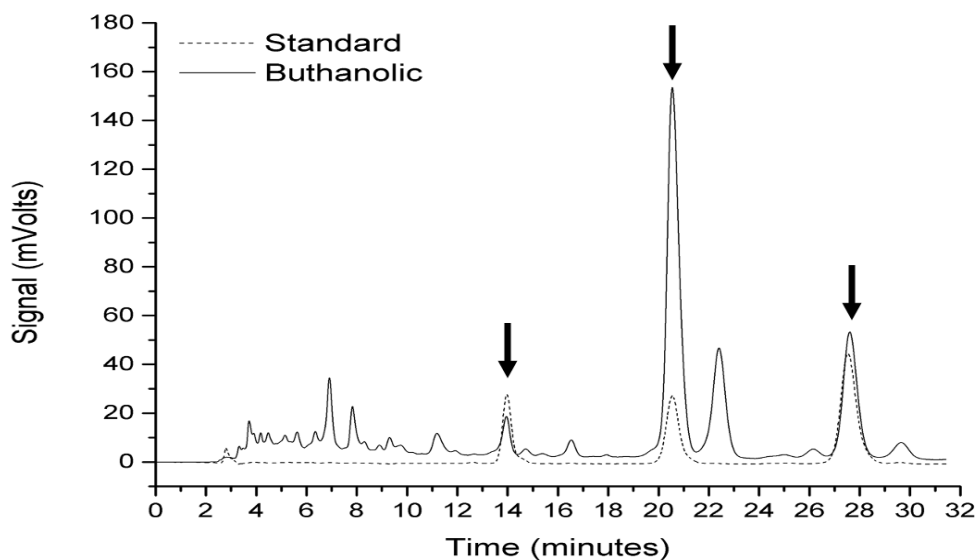


Ilustración 41 Perfil por HPLC-DAD de fracción n-butanólica



En el caso del extracto acuoso, (dilución 1:3), el perfil observado en el HPLC-DAD también permite observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R=13,95$ min), rutina ($t_R=20,65$ min) e isoquercetina ($t_R=27,8$ min) si bien la intensidad de la señal es sensiblemente menor a las anteriores. (ver Ilustración.42).

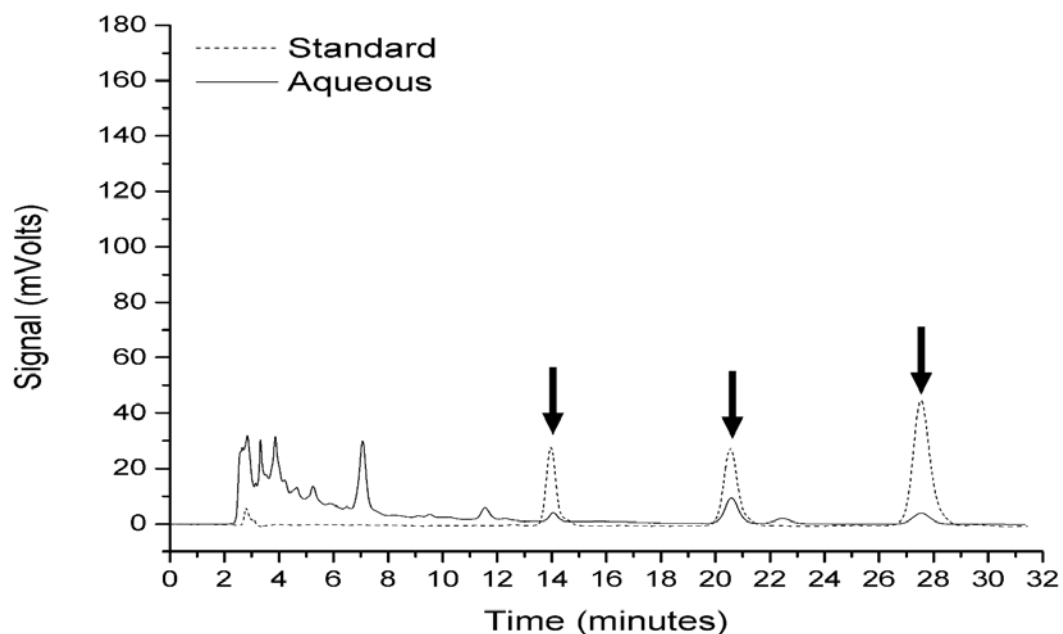


Ilustración 42 HPLC-DAD del extracto acuoso



5.3.2.2. HPLC-DAD para terpenoides presentes en *A. cherimola*

Se presentan los resultados, expresados como t_R (tiempo de retención) de la HPLC-DAD contra testigos.

La solución muestra fue el extracto DCM (Cfr. Ítem 4.4.2.2).

Los testigos utilizados fueron: ácido ursólico y ácido oleanólico

Se utilizaron dos fases móviles, en las cuales los t_R de los testigos fueron:

Fase móvil 1: Metanol: THF: Agua (92:4:4)

Acido ursólico ($t_R = 24,90$ min); Acido oleanólico ($t_R = 24,90$ min)

Fase móvil 2: Metanol 100%.

Ácido ursólico ($t_R = 17,01$ min); ácido oleanólico ($t_R = 17,01$ min)

Como puede observarse en las ilustraciones 43 y 44, si bien el extracto presenta picos a t_R similares a los de los testigos, no puede diferenciarse ácido ursólico de oleanólico, por medio del sistema HPLC-DAD utilizado.

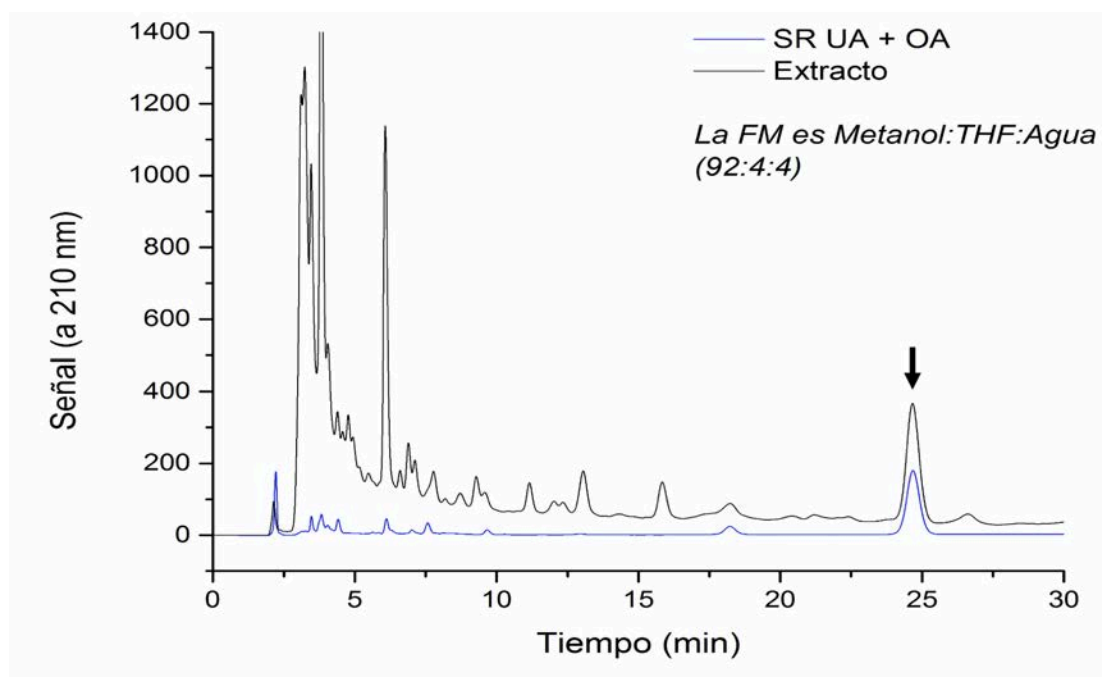


Ilustración 43 HPLC-DAD con la Fase Móvil 1 Terpenos

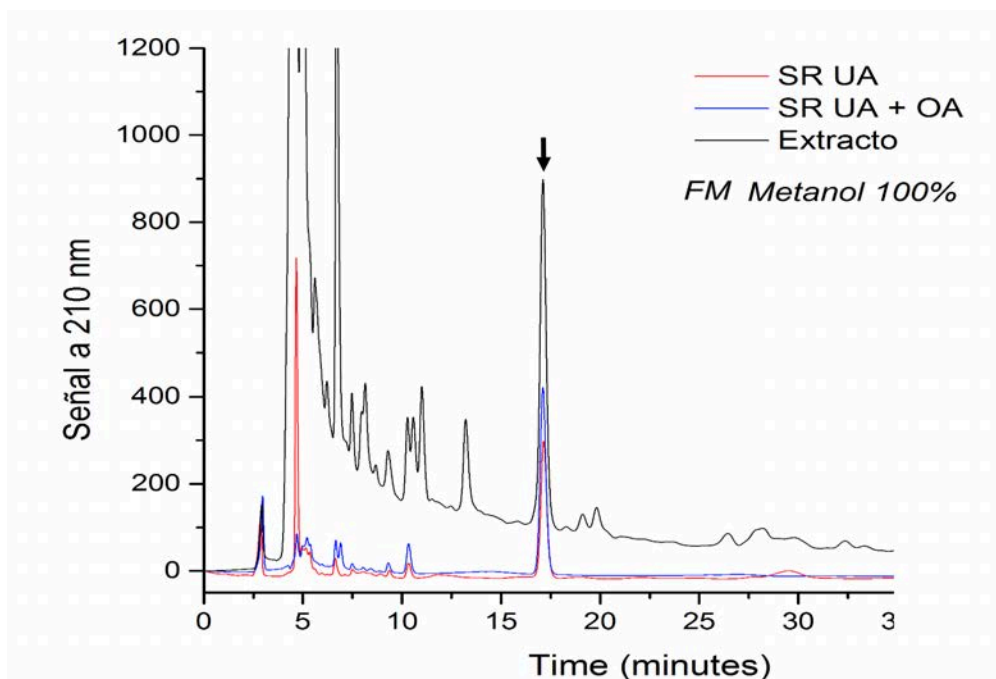


Ilustración 44 HPLC-DAD con la Fase Movil 2 Terpenos



5.4. Nanoliposomas

5.4.1. Pruebas de internalización celular de los Nanoliposomas

Se evaluó el efecto de cuatro concentraciones diferentes (0,5; 1; 2 y 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de cada uno de los NLPs producidos para estos ensayos (NLP-RD y NLP-CD20-RD, NLP-RD-Chiri, NLP-CD20-RD-Chiri) probándolos en su capacidad de penetración en PBMCs y células B-LLC sensibles y resistentes, durante un período de cultivo total de 3 h.

Los resultados de estos experimentos indicaron que 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los NLPs conjugados con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 resultaron en una intensa actividad creciente de penetración celular hasta las 2 horas de cultivo (pico máximo de penetración: Intensa) y superior a la observada cuando se usaron las concentraciones menores testeadas de NLPs de 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (penetración discreta y moderada respectivamente) y que no se acentuó ya significativamente al aumentar a la concentración más alta de NLP-CD20-RD de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ni a un tiempo más prolongado de incubación (3 a 6 horas), tanto en PBMCs y células B-LLC sensibles y resistentes ($p < 0.005$). Debido a esto, se decidió usar la concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NLPs en todos experimentos posteriores realizados con otros NLPs.

Aquellos NLPs sin anti CD20 tuvieron un porcentaje de internalización tanto en PBMCs como en células leucémicas sensibles y resistentes a Fludarabina de una magnitud similar (moderada-intensa) que las encontradas en los experimentos anteriores con NLP-CD20-RD pero en un período de tiempo significativamente más prolongado (3 horas) y a una concentración mayor (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ($p > 0.005$).

A tiempo cero, no se observaron NLP dentro de ninguna de las células, pero a la hora y a las 2 hs, había una penetración moderada e intensa de los NLPs conjugados con anti-CD20 en ambos tipos de células B-CLL (sensibles y resistentes a Fludarabina) y en las PBMCs de donantes sanos.

Los resultados se muestran como el promedio de los puntajes de penetración dados por el observador a las 5 imágenes para cada NLP específica, a las distintas concentraciones mencionadas y en cada punto de tiempo (0,1, 2, 3 y 6 horas).

Finalmente, el nivel de penetración se clasificó en relación con la superficie celular total cubierta con NLP fluorescentes por Rodamina, como ninguno (0–5%), discreto (6–45%),



moderado (46–75%) o intenso (76–100%), como se ve en cada imagen con microscopia confocal.

Tabla 13 Resultados del porcentaje de penetración

Tipo de NLP	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	3µg/ml
NLP-RD	45	55	60	63
NLP-CD20-RD	60	64	74	77
NLP-RD-Chiri	63	68	79	79
NLP-CD20-RD-Chiri	73	75	87	89

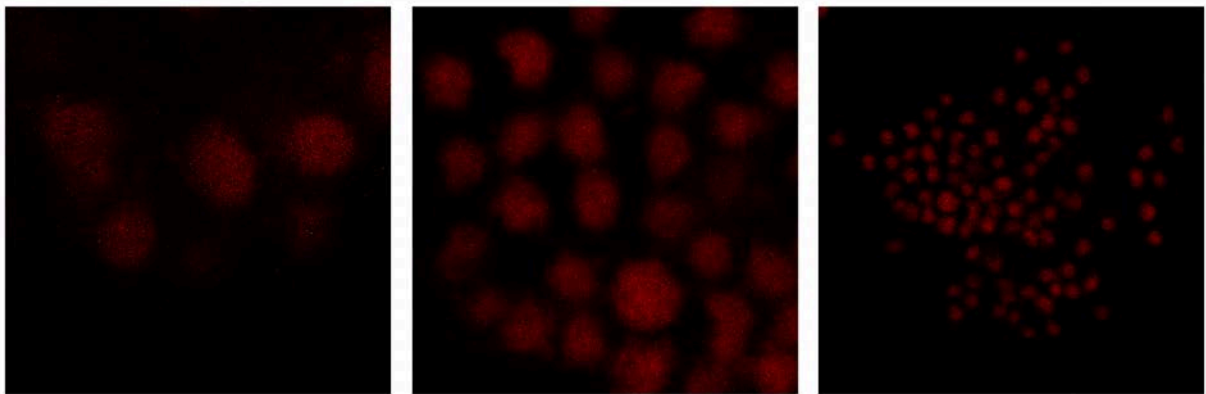


Ilustración 45 Vista general de LLC-B expuestas a NLP-RD-Chiri tomada de Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Medicas, UNLP con Microscopía Confocal.

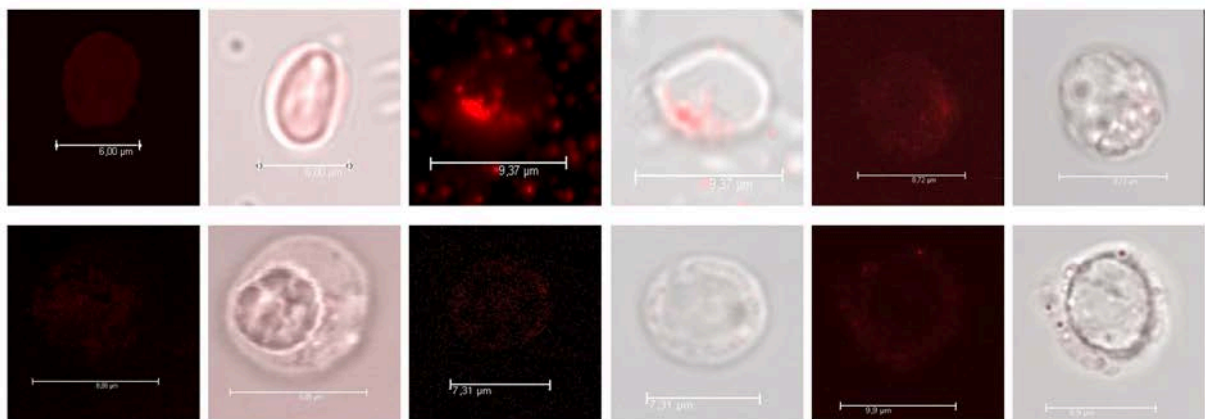


Ilustración 46 vista de LLC-B individuales expuestas a NLP-RD-Chiri con filtro y sin filtro UV, realizadas en Centro de Microscopia. Microscópio Confocal Leica SP5 (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP)



5.4.2. Cuantificación de los Fosfolípidos de los liposomas

Los Fosfolípidos de los nanoliposomas desarrollados mediante la técnica del punto 4.5.1 se encontraron en una concentración de 40 mg de lípidos/ml de suspensión.

5.4.3. Determinación de tamaño y potencial

Las mediciones fueron realizadas sobre los nanoliposomas realizados en Universidad Nacional de Quilmes en el CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos, CONICET, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, CIC) por dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering, o DLS) y Potencial Zeta en un NanoPartica SZ-100 series, marca Horiba.

Las muestras fueron medidas por quintuplicado.

Los liposomas vacíos tuvieron un tamaño de 109,1 nm (Z-average), con -18,7 mV de potencial zeta.

Los liposomas cargados con el extracto de “Chirimoya” tuvieron un tamaño de 142,5 nm (Z-average) con potencial zeta de valor cero.



5.5. Ensayos de actividad

5.5.1. Fenotipificación celular por citometría de flujo

Las PBMCs de personas sanas fueron 15,11% ($\pm 2,65$) positivas para CD19+/CD20+ (linfocitos B) y 0% de positividad para células CD5+/CD19+/CD20+. El fenotipo CD5+/CD19+/CD20+ fue positivo en el $91,72 \pm 0,68\%$ de células B-LLC sensibles y $97,18 \pm 1,05\%$ en células resistentes a Fludarabina. (Tablas 14 y 15).

Tabla 14 Fenotipificación celular por citometría de flujo

Grupo	Nº	CD20 %*	CD19 %	CD5/CD20 (co-expresión) %
PBMCs normales	PBMC1	13	17	0
	PBMC 2	19	21	0
	PBMC 3	11	15	0
	PBMC 4	14	18	0
	PBMC 5	10	13	0
B-LLC Sensibles	LB1	84	90	82
	LB2	91	95	90
	LB3	88	98	83
	LB4	89	91	85
	LB5	90	93	85
B-LLC Resistentes a Fludarabina	LR1	90	94	89
	LR2	92	95	90
	LR3	90	96	86
	LR4	91	99	87
	LR5	87	90	82

*PBMCs: Concentrado de Elementos mononucleares de la muestra de voluntarios sanos.

**Valor obtenido del total de elementos mononucleares de la muestra.



Tabla 15 Fenotipificación de las células obtenidas de muestras de B-LLC

Muestra	% de CD5/CD19/CD20+ basal	% de CD5/CD19/CD20+ luego de separación Ficoll-Hypaque
1. B-CLL sensible	81,1	90,3
2. B-CLL sensible	89,2	92,4
3. B-CLL sensible	85,4	92,9
4. B-CLL sensible	81,8	91,9
5. B-CLL sensible	83,2	91,1
1. B-CLL resistente	82,7	94,4
2. B-CLL resistente	90,1	96,8
3. B-CLL resistente	85,9	98,7
4. B-CLL resistente	86,4	97,9
5. B-CLL resistente	87,4	98,1
Pool de Células mononucleares normales	0 %	0 %

A cada una de las muestras obtenidas se les realizó en forma basal y luego de la obtención del concentrado de células mononucleares por Ficoll-Hypaque, un inmunofenotipo por citometría de flujo para determinar el componente de linfocitos B normales (CD19⁺CD20⁺) y leucémicos (CD5⁺CD19⁺CD20⁺).

5.5.2. Actividad citotóxica de los extractos

Todas las células cultivadas solo en medio de cultivo sin extractos de “Chirimoya” presentaron una mortalidad espontánea entre el 10-30% durante los distintos tiempos de cultivo.

Todos los extractos de “Chirimoya” demostraron actividad citotóxica significativa, comparada a los medios de cultivo, sólo sobre células B-CLL resistentes y no resistentes a distintas concentraciones (p NS). No hubo diferencia significativa para ninguno de ellos en el nivel de citotoxicidad producido ya sea en células sensibles o resistentes a Fludarabina (p NS). Cultivos con ambas células tuvieron el mismo tipo de sensibilidad a los diferentes extractos en las diferentes concentraciones decrecientes usadas, de hasta 1/32 y aún mayor, hasta 1/1024 para el caso del extracto de infusión liofilizado de “Chirimoya”, en los distintos tiempos de cultivo. A concentraciones mayores a 1/32 no



hubo citotoxicidad significativa con ninguno de los extractos utilizados tanto en las células resistentes como en las no resistentes a Fludarabina, en relación a aquella espontánea con el medio de cultivo solo, salvo para el extracto de la infusión obtenido que tuvo actividad citotóxica hasta una dilución de 1/512. A la dilución mayor testada de 1/1024 este extracto ya no presentó citotoxicidad significativamente mayor al medio de cultivo solo (p NS).

Los datos de citotoxicidad muestran que las diluciones sucesivas de los distintos extractos de “Chirimoya” mencionados hasta una concentración de 1/32 son en general activos contra las células B-LLC resistentes y no resistentes a la Fludarabina, ya que ambos tipos de células tienen una viabilidad muy baja después de 24 hs en las pruebas de citotoxicidad realizadas, que no disminuye a las 48 ni 72 hs posteriores al inicio del cultivo.

El extracto de la infusión de “Chirimoya”, hasta una dilución 1/512, causó la mayor muerte celular tanto en células B-CLL resistentes y no resistentes, llegando hasta un 68,33 % a la dilución de 1/256, siendo este extracto significativamente más efectivo que todos los otros en relación al nivel de citotoxicidad alcanzada sobre células leucémicas (p 0.03). Sin embargo, a diluciones de 1/1024 de la infusión de “Chirimoya”, la citotoxicidad fue similar y no significativamente mayor a la obtenida con medio de cultivo solo, sin extractos, no observándose diferencia significativa en muerte celular a estas diluciones en relación con la mortalidad espontánea (p NS).

Las PBMCs normales presentaron un bajo porcentaje de citotoxicidad en los ensayos realizados con los distintos extractos aún en las mayores concentraciones, no encontrándose diferencias significativas en la mortalidad causada por los distintos extractos sobre estas células en comparación a la mortalidad espontánea en medio solo (p NS).



Tabla 16 Citotoxicidad del extracto de Cloroformo 1

Hs	Control			Pura			A la ½			A la ¼			A la 1/8			A la 1/16			A la 1/32		
	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R
24	13	18	17	58	80	97	44	64	68	23	40	40	22	25	23	19	23	25	18	20	21
48	20	22	23	68	100	100	52	72	72	28	40	44	25	27	30	22	29	29	22	29	32
72	24	27	31	72	100	100	60	74	75	38	50	52	26	30	32	26	36	34	27	31	36
Promedio	19	22,3	23,6	66	100	100	52	70	71,6	29,6	43,3	45,3	24,3	27,3	28,3	22,3	28,6	29,3	22,3	26,6	29,6

Pura: 10mg/ml disuelta en DMEM 1%DMSO; N: PBMCs normales; S: Células B-LLC no resistentes a la Fludarabina; R: Células B-LLC resistentes a la Fludarabina

Tabla 17 Citotoxicidad del extracto de Cloroformo 2

Hs	Control			Pura			A la ½			A la ¼			A la 1/8			A la 1/16			A la 1/32		
	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R
24	15	18	18	38	70	93	42	34	70	24	39	40	22	32	21	11	11	14	9	10	11
48	19	24	25	40	89	92	45	68	72	28	44	44	25	33	23	13	12	19	11	13	17
72	23	28	30	47	100	100	53	69	70	40	49	52	26	36	33	15	18	22	14	16	18
Promedio	19	23,3	24,3	41,6	86,3	95	46,6	57	70,6	30,6	44	45,3	24,3	33,6	25,6	13	13,6	18,3	11,3	13	15,3

Tabla 18 Citotoxicidad del extracto de n-butanol

Hs	Control			Pura			A la ½			A la ¼			A la 1/8			A la 1/16			A la 1/32		
	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R
24	13	19	20	37	90	90	30	62	66	26	68	70	23	69	70	22	50	50	18	28	30
48	20	23	25	46	90	100	44	70	71	36	76	80	33	78	78	28	53	50	26	34	35
72	26	29	20	50	100	100	49	78	80	41	80	85	38	78	80	32	56	50	32	36	35
Promedio	19,6	23,3	21,7	44,3	93,3	96,6	41	70	72,3	34,3	74,6	78,3	31,3	75	76	27,3	53	50	25,3	32,6	33,3

Tabla 19 Citotoxicidad del extracto de Acetato de etilo

Hs	Control			Pura			A la ½			A la ¼			A la 1/8			A la 1/16			A la 1/32		
	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R
24	18	20	19	41	50	50	29	31	30	28	29	30	16	20	20	17	19	20	18	20	20
48	20	20	21	45	53	50	33	37	30	30	31	35	19	24	25	20	24	25	19	21	20
72	23	25	27	49	57	50	35	39	40	31	36	38	29	28	30	23	25	25	21	23	25
Promedio	20,3	21,7	22,3	45,0	53,3	50	32,3	35,6	33,3	29,6	32,0	32,7	21,3	24	21,7	20,0	22,6	23,3	19,3	21,3	21,7

Tabla 20 Citotoxicidad fracción acuosa 1

Hs	Control			Pura			A la ½			A la ¼			A la 1/8			A la 1/16			A la 1/32		
	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R
24	16	21	19	34	100	90	30	60	63	27	50	51	24	40	42	20	30	32	19	20	21
48	21	23	21	41	100	88	35	65	65	32	60	53	28	40	45	23	35	39	21	25	22
72	23	25	27	49	100	100	42	65	68	36	60	64	30	45	49	26	25	33	24	20	26
Promedio	20,0	23,0	22,3	41,3	100	92,6	35,6	63,3	65,3	31,6	56,6	56	27,3	41,6	45,3	23	30	34,6	21,3	21,6	23



Tabla 21 Citotoxicidad de infusión

Hs	Control			Pura			A la ½			A la ¼			A la 1/8			Al 1/16			A la 1/32		
	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	N	S	N	S	R	N	S	R	N	S	R
24	17	20	21	38	95	100	30	93	95	26	89	95	23	94	92	21	95	92	20	93	92
48	21	23	24	40	98	100	35	94	97	31	94	97	30	98	94	29	79	92	26	91	92
72	24	25	27	43	91	100	39	96	94	36	99	94	33	99	90	31	80	91	29	90	93
Promedio	20,6	22,6	24	40,3	94,6	100	34,6	94	95,3	31	94	95,3	28,6	97	92	27	79	91	25	91,3	92,3

Tabla 22 Citotoxicidad de infusión continuación

Hs	Control			Pura			Al 1/64			Al 1/128			Al 1/256			Al 1/512			A la 1/1024		
	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	N	S	N	S	R	N	S	R	N	S	R
24	17	20	21	38	95	100	20	94	90	19	78	83	20	71	78	19	63	64	19	44	41
48	21	23	24	40	98	100	25	98	94	24	79	85	23	75	80	22	69	67	21	49	45
72	24	25	27	43	91	100	27	99	89	26	80	88	25	80	79	24	72	72	23	51	53
Promedio	20,6	22,6	24	40,3	94,6	100	24	97	91	23	79	85,3	22,6	75,3	79	21,6	68	67,6	21	48	46,3

* En la infusión con “Chirimoya”, se muestran hasta diluciones de 1/1024 por ser la de mayor actividad demostrada en relación a otros extractos.

A partir de estos resultados, surge que el extracto de “Chirimoya” obtenido por infusión fue el más activo, y por esta razón se continuó con las diluciones de 1/256 (activa), y perdiendo actividad progresivamente a mayores diluciones 1/512 y 1/1024 (tabla 14b). Asimismo, este extracto de “Chirimoya” se lo seleccionó para realizar los ensayos con NLP cultivadas con células B-LLC sensibles y resistentes a Fludarabina, y con células mononucleares normales comprobando el grado de apoptosis obtenido en cada caso (ver Resultados de Apoptosis).

Los ensayos de citotoxicidad muestran que la infusión de “Chirimoya” fue activa tanto contra las células B-LLC tanto sin tratamiento, como en células resistentes a la Fludarabina, logrando una viabilidad muy baja de estas en relación a las células mononucleares controles-PBMCs, después de 24 hs de cultivo en las pruebas de citotoxicidad realizadas (Tabla 23). Esta toxicidad no se incrementó significativamente en los cultivos de 48 ni 72 hs en relación a las primeras 24 hs de cultivo.



Tabla 23 Nivel de significancia de citotoxicidad de la Infusión comparada con células normales

Infusión "Chirimoya"	Citotoxicidad con el extracto en cultivo						Nivel de significancia de citotoxicidad comparada con células normales	
	Células Normales		Células B-LLC sensibles		Células B-LLC Resistentes a Fludarabina		Con B-LLC no sensibles (valor de p)	Con B-LLC resistentes (valor de p)
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	(24-48h)	(24-48h)
1/64	20	25	94	98	90	94	0,01	0,01
1/128	19	24	78	79	83	85	0,01	0,01
1/256	20	23	71	75	78	80	0,03	0,03
1/512	19	22	63	69	64	67	0,04	0,04
1/1024	19	21	44	49	41	45	0,04	0,04

Por otro lado, las PBMCs normales presentaron un bajo porcentaje de citotoxicidad en los ensayos realizados con las distintas concentraciones de extracto aún en las concentraciones más elevadas (Tabla 24). No se encontró diferencia significativa en la mortalidad causada por los distintos extractos sobre estas células PBMCs en comparación a la mortalidad espontánea en medio solo ($p > 0.05$). Tabla 24.

Tabla 24 Porcentaje de Citotoxicidad de infusión

Tipo de Cultivo	Células Normales	Células Normales	Células Normales	Células Normales	Células Normales	Células Normales	Células Normales	Células Normales	Células Normales	Células Normales	
Dilución	(Control) Mortalidad espontanea	Extracto Acuoso de "Chirimoya" 1/8	Extracto Acuoso de "Chirimoya" 1/16	Extracto Acuoso de "Chirimoya" 1/32	Extracto Acuoso de "Chirimoya" 1/64	Extracto Acuoso de "Chirimoya" 1/128	Extracto Acuoso de "Chirimoya" 1/256	Extracto Acuoso de "Chirimoya" 1/512	Extracto Acuoso de "Chirimoya" 1/1024	Valor p*	
Tiempo											
24 h	20,4	23,3	21,3	21,0	20,5	20,3	21,0	20,9	20,5	NS	
48 h	22,2	30,0	29,0	26,0	25,0	24,0	23,3	22,6	21,3	NS	
72 h	24,9	33,3	31,3	29,0	27,3	26,3	25,0	24,6	23,3	NS	

*Diferencia de la mortalidad espontanea con la concentración más elevada de "Chirimoya" realizada con método yoduro de propidio/naranja de acridina (Fluoroquench) (promedio de 5 lecturas).



5.5.3. Ensayo de citotoxicidad Nanoliposomas

Con respecto a las pruebas de citotoxicidad provocada por las NLP con y sin producto y con y sin anticuerpo CD20 en su superficie, se refleja una mayor citotoxicidad con NLP que poseen “Chirimoya” en su interior, con valores entre un 216 y un 287% más toxicidad que las NLP sin extracto (Tabla 25).

Tabla 25 Ensayo de citotoxicidad NLP

		PBMCs (normales)		LLC-B Sensibles		LLC-B Resistente	
Tipo de NLP↓	Tiempo	24	48	24	48	24	48
NLP-RD		28,1	29,4	31,2	33,7	34,6	35,9
NLP-RD-Chiri		31,2	33,9	66,4	74,3	68,1	74,3
NLP-CD20		31,9	32,5	39,4	41,3	44,1	46,3
NLP-CD20-RD		33,8	35,2	40,3	45,7	43,1	44,5
NLP-CD20-RD-Chiri		30,2	33,9	69,8	74,6	70,1	73,3

* NLP cargados con “Chirimoya” a una dilución de 1/1024

5.5.4. Ensayos de Apoptosis con NLP

Los NLP cargados con la infusión de “Chirimoya” y anticuerpos monoclonales anti-CD20 conjugados en su superficie, produjeron en nuestros ensayos de apoptosis sobre células B-LLC sensibles y resistentes a Fludarabina, luego de 24 y 48 hs de cultivo, una actividad apoptótica promedio de 68,4 y 71,2% respectivamente, comparable a la acción del extracto de “Chirimoya” aplicado *per se* sobre las células sin NLPs a la concentración de 1/256. Cuando se evaluó el grado de apoptosis de estas NLP sobre células leucémicas, demostraron baja toxicidad en los PBMCs de donantes sanos, observándose similar nivel de apoptosis que con el cultivo de las mismas en medio de cultivo solo sin NLPs (entre 20 -35%). La diferencia observada entre la apoptosis mediada por NLPs cargados con extracto y con anti-CD20 sobre células leucémicas (sensibles o resistentes) comparadas con PBMCs normales resultó en diferencias significativas (p 0,03). Los NLPs con o sin anti-CD20 pero sin extracto no produjeron mayor apoptosis sobre las células leucémicas



ni las PBMCs normales, siendo la misma similar y sin diferencia significativa a la apoptosis espontánea observada utilizando solo el medio de cultivo sin NLPs ni extractos (Tabla 26). Los NLPs con extracto acuoso de “Chirimoya” obtenido por infusión sin conjugación al anticuerpo monoclonal anti-CD20 produjeron un menor grado de apoptosis sobre células leucémicas tanto sensibles como resistentes, aunque sin diferencia significativa al producido por los NLPs con extracto y conjugados al anti-CD20 (tabla 26).

Por otro lado, la acción pro apoptótica de estas NLP sobre PBMCs normales fue significativamente menor que las NLP-Chiri o las NLP-CD20-Chiri ($p < 0.05$) (Tabla 26).

Tabla 26 Apoptosis en LLC-B tratada con NLP-CD20-Chiri

		PBMCs N		LLC-B S		LLC-B R	
Tipo de NLP	Tiempo	24	48	24	48	24	48
NLP-RD		22,3	23,7	31,1	33,2	30,9	32,0
NLP-RD- Chiri *		30,7	30,4	66,9	68,7	65,5	68,1
NLP-CD20		29,3	30,0	33,9	36,0	35,37	39,4
NLP-CD20-RD		28,5	30,9	36,1	38,9	33,77	34,4
NLP-CD20-RD-Chiri*		30,2	31,4	72,9	74,1	71,3	74,0

*PBMCs: Células mononucleares normales; LLC-B: Leucemia Linfoide Crónica B, (resistentes o No resistentes al tratamiento de Fludarabina) * NLP cargados con “Chirimoya” a una dilución de 1/1024*



5.6. Predicción de la actividad anticonvulsiva y antiinflamatoria de compuestos detectados en *A. cherimola*

Tabla 27 Resultados de la predicción de la actividad anticonvulsiva y antiinflamatoria de compuestos informados en bibliografía de *A. cherimola*

Actividad	Nombre	MES TEST*	AI	AE	AI+AE
Drogas antiinflamatorias	Dihydro-feruloyltyramine	-1,1866	1	0	1
	N-cis-caffeoyltyramine	-1,1540	1	0	1
	N-trans-caffeoyltyramine	-1,1540	1	0	1
	N-p-coumaroyltyramine	-0,7692	1	0	1
Drogas anticonvulsivas	Stepharine	0,0011	0	1	1
	Isovanillic acid	0,0117	0	1	1
	Ferulic Acid	0,0429	0	1	1
	Norushimuline	0,0543	0	1	1
	Norstephalagine	0,0749	0	1	1
	Dimethoxyphenil propanediol	0,1050	0	1	1
	Syringaldehyde	0,1114	0	1	1
	Adenosine	0,1574	0	1	1
	Dimethoxyparaquinone	0,1714	0	1	1
	Atherospermidine	0,2063	0	1	1
	Romucosine	0,2390	0	1	1
	Romucosine H	0,2484	0	1	1
	Laurotetanine	0,2558	0	1	1
	Squamolone	0,2692	0	1	1
	Vanillic acid	0,2890	0	1	1
	N-formylanonalne	0,2906	0	1	1
	Pronuciferine	0,3074	0	1	1
	Llrlodenine	0,3398	0	1	1
	Anonaine	0,3490	0	1	1
	Oxoasimilobine	0,3682	0	1	1
	Oxogiaucne	0,3766	0	1	1
	N-methylaurotetanine	0,3803	0	1	1
	16beta-hidrokauranoic acid	0,3821	0	1	1
	Syringic Acid	0,3862	0	1	1
	Methylparabene	0,3878	0	1	1
	Ushinsunine	0,4047	0	1	1
	Trimethoxybenzoic acid	0,4165	0	1	1
	Norisocorydine	0,4369	0	1	1
	Asimilobine	0,4494	0	1	1
	16alfa-hidrokauran	0,4557	0	1	1
16Beta-hidrokauran	0,4557	0	1	1	
entkaurenoic acid	0,5198	0	1	1	



Actividad	Nombre	MES TEST*	AI	AE	AI+AE
	Lyslcamine	0,5201	0	1	1
	Trans methyl p coumarate	0,5412	0	1	1
	Isocorydine	0,5471	0	1	1
	N-methylasimobine	0,7812	0	1	1
	p-Hydroxybenzaldehyde	0,9245	0	1	1
	p-Hydroxybenzoic acid	1,4326	0	1	1
	Methyl vanillate	1,7367	0	1	1
Drogas antiinflamatorias y anticonvulsivas	p-dihidrocoumaric acid	0,5697	1	1	2

* Inducción de la convulsión mediante estímulo eléctrico



6. Discusión

Es bien conocida la presencia de alcaloides y acetogeninas en *A. cherimola*, hecho documentado por diversos autores (cfr. capítulo "Antecedentes" 2.2.1).

No ocurre lo mismo en el caso de los polifenoles, flavonoides, terpenoides y triterpenoides.

La presencia de dichos grupos fitoquímicos fue investigada aquí.

Para ello se hicieron diversas pruebas químicas orientativas sobre los extractos y fracciones obtenidos según el procedimiento de Chen *et al* (1997).

En el caso de los **alcaloides**, se recurrió a diversos reactivos generales de precipitación. Las reacciones fueron todas positivas (formación de precipitados) en el extracto metanólico inicial.

Si bien estas reacciones son inespecíficas, nótese que los resultados se repiten en la fracción "cloroformo 2", luego de realizar un procedimiento de extracción con solventes activos donde se aprovecha la propiedad de los alcaloides de formar sales solubles en agua, en medio ácido; y retornar a su forma básica, soluble en cloroformo, cuando la solución ácida es alcalinizada.

Este procedimiento permite separar y semipurificar los alcaloides presentes en el extracto hidroalcohólico inicial, por lo cual existe una razonable seguridad de que los precipitados obtenidos al realizar las reacciones generales se deban a la presencia de alcaloides.

En este caso en particular, es de hacer notar que los precipitados en presencia de permanganato de potasio y ácido pícrico son cristalinos y cristalizan de manera particular y característica, que eventualmente podría ser aprovechada para su reconocimiento (Ilustración 34 y 35).

Respecto a los **polifenoles**, los ensayos realizados permiten determinar su presencia en los extractos metanólico inicial, acuoso (luego de eliminado el metanol) y fracción n-butanólica.

De acuerdo a los resultados de las pruebas realizadas (color y/o fluorescencia al UV₃₆₆ con efecto batocrómico) los polifenoles presentes serían flavonoides (Shinoda +), con entre 3 y 4 grupos -OH fenólicos libres (Cl₃Fe +, color negro), varios de ellos adyacentes o próximos a una función C=O. Esto último se evidencia debido a la intensa fluorescencia amarilla-naranja al UV₃₆₆ que se observa en presencia de Cl₃Al y BO₃H₃ por la formación



de lacas (ver Ilustración 16 y 17). Dicha fluorescencia se intensifica por exposición a vapores de NH_3 (efecto batocrómico).

La CCD y HPLC-DAD contra testigos, en distintos sistemas de solventes, permite confirmar esta presunción, siendo los polifenoles presentes el Ácido cafeico y los flavonoides, Rutina e Isoquercetina, ambos heterósidos de la Quercetina (ver Ilustraciones 36, 37, 40, 41 y 42)

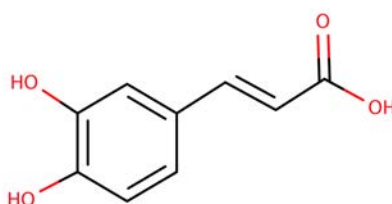


Ilustración 47 Estructura del ácido cafeico (Ácido 3,4-dihidroxicinámico) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch)

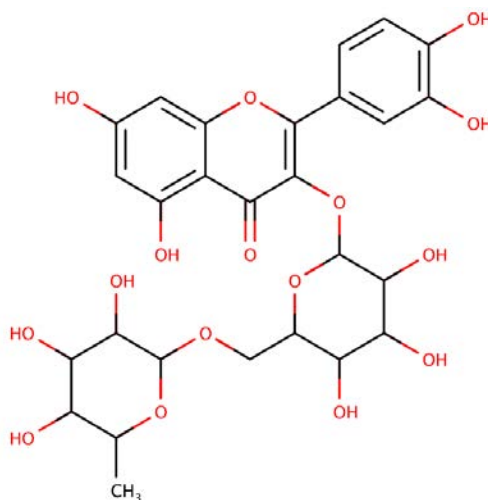


Ilustración 48 Estructura de la rutina también llamada 3-rutinosil quercetol, (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch)

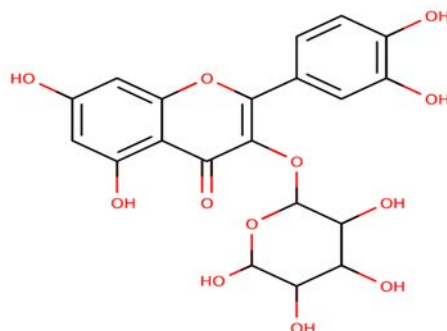


Ilustración 49 Estructura de isoquercetina (3-O-glucósido de quercetina) (estructuras realizadas con el programa MarvinSketch).

Teniendo en cuenta la presunción de la presencia de estos compuestos y actividades reflejadas en “Antecedentes”, podemos relacionar el efecto de protección de los extractos de *A. cherimola*. Recordemos lo informado para cada uno:

El **ácido cafeico**, con actividad diurética, hipotensora, antiinflamatoria, antibacterial, antitumoral, antioxidante.

En cuanto a la actividad antiinflamatoria el ácido cafeico en modelos experimentales *in vivo* a demostrado tener eficacia comparable a indometacina al inhibir los linfocitos, los neutrófilos porlimorfonucleares y macrófagos, (Morones *et al.*, 2016). En el caso de “Chirimoya” entre los antecedentes farmacológicos se investigó el efecto antiinflamatorio, analgésico, comparable con indometacina y diclofenac sódico (Ugandhar *et al.*, 2013). El hecho de encontrar en esta investigación el ácido cafeico, nos permite hablar de la posible relación que presenta este compuesto con la actividad antiinflamatoria.

La **rutina** disminuye la fragilidad capilar, es usada en el tratamiento de hemorroides, várices, antitrombótica, neuroprotector, anticonvulsiva. En cuanto a la presencia de este compuesto se podría destacar la actividad de prevención o tratamiento de diabetes, y protector de trastornos cardiovasculares (Ghorbani, 2017).

Un estudio en líneas celulares de cáncer de pulmón y colorectal ha demostrado que la rutina inhibe la proliferación, logrando atenuar la producción de superóxido, disminuyendo la adhesión y migración de las células cancerosas humanas (Sghaier *et al.*, 2016).

Otro estudio prueba la eficacia terapéutica de la rutina junto al cisplatino, demostrando su efecto protector contra la hematotoxicidad inducida por este antitumoral, interesante para posibles tratamientos (Prasad y Prasad, 2018).

La **isoquercetina** posee actividad antiinflamatoria, antioxidante, protector vascular; también es de destacar que se ha demostrado la actividad antidiabética de este flavonoide (Zhang *et al.*, 2011), siendo un potente inhibidor de la α -glucosidasa, trabajando *in vivo*, con modelo animal diabético tipo dos.

La presencia de isoquercetina y rutina podría explicar la actividad antidiabética mencionada por Chakrapani y Rojas, (2012) y Ghorbani, (2017) para “Chirimoya”. Otros autores también determinaron esta actividad para esta especie (Rojas Rani *et al.*; 2011; Solares-Pascasio *et al.*, 2013; Calzada *et al.*, 2017).

Respecto a los **terpenoides y esteroides**, las pruebas orientativas nos hablan de la presencia de núcleos esteroides (Lieberman Bouchrad +); saponósidos (capacidad afrógena + en infusión y en extracto n-butanólico diluido; Fehling + luego de la hidrólisis en los mismos extractos). El aglucón probablemente contenga grupos ácido carboxílicos (precipitación en presencia de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y subacetato de plomo).

La cromatografía por HPLC-DAD contra testigos, para determinar la presencia de los ácidos oleanólico y ursólico (Ilustración 43 y 44) no resultó eficaz, dado que estos compuestos tienen iguales t_R en las dos fases móviles utilizadas y sus espectros UV son muy similares.

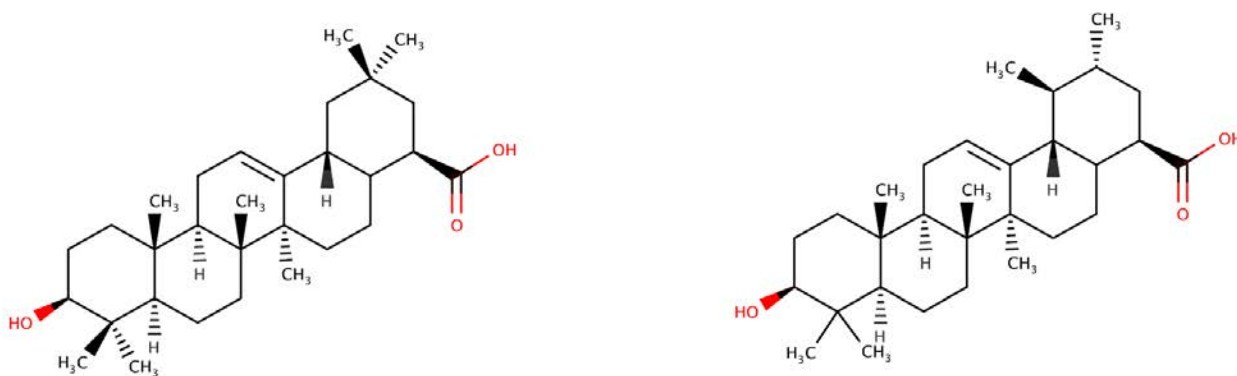


Ilustración 50 Terpenoides presentes en hojas de *A. cherimola*. Izquierda corresponde a la estructural del ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxi-olea- 12- en - 28- oico; N $^{\circ}$ CAS: 508-02-1; peso molecular 456.7) y derecha al ácido ursólico (3 β -Hydroxy-12-ursen-28-ic acid; N $^{\circ}$ CAS 77-52-1; peso molecular 456.7) (estructuras realizadas con el programa Marvin Sketch).

Sin embargo, el análisis por CCD, contra testigos, en dos sistemas de solventes, permite confirmar esta presunción de la presencia de los ácidos ursólico y oleanólico (ver Ilustración 38).



Teniendo en cuenta la presunción de la presencia de estos compuestos y las actividades citadas en el capítulo “Antecedentes”, podemos relacionar el efecto de protección de los extractos de *A. cherimola*, recordando lo informado para el ácido ursólico y oleanólico con actividad cicatrizante, inhibición del crecimiento tumoral, angiogénesis, prevención de desarrollo hipertensión, aterosclerosis, incremento de células de la médula ósea y leucocitos y acción inmunomoduladora.

Hasta donde sabemos, es la primera vez que se reporta la presencia de estos cinco compuestos (rutina, quercetina, ácido cafeico, ácidos oleanólico y ursólico) en las hojas de *A. cherimola*.

Dada la bibliografía existente sobre las actividades de los mismos (Ugandhar *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Somova *et al.*, 2003; Penxia *et al.*, 2007; Kashyap *et al.*, 2016) y los resultados de los ensayos biológicos realizados, es lógico suponer que la actividad de los extractos de hojas de *A. cherimola* sería el producto de una acción sinérgica entre las acetogeninas con actividad citotóxica y antitumoral (ver 2.2.1.5) y otros compuestos como los polifenoles-flavonoides y alcaloides detectados.

Se suma el hecho de que estén presentes saponinas derivadas de los ácidos ursólico y oleanólico explicaría el alto grado de actividad que presentan la infusión con respecto a los extractos y fracciones menos polares (cfr. resultados de las actividades biológicas), ya que las saponinas favorecerían la solubilización en un medio acuoso de compuestos cuya solubilidad en agua es limitada.

Uno de los objetivos de esta tesis fue probar la actividad antineoplásica mediada por extractos de “Chirimoya” en células B-LLC ya sean sin tratamiento previo o bien B-LLC resistentes a la Fludarabina.

En este trabajo se demuestra la capacidad de extractos de “Chirimoya” para provocar apoptosis y toxicidad en células de B-LLC (sensibles o resistentes a Fludarabina) tanto de manera libre como incorporados a Nanoliposomales (NLPs) biodegradables, que fueron cargadas con un extracto acuoso de “Chirimoya” y que fueron conjugadas con anticuerpos monoclonales anti-CD20.

Con esta tecnología de nanoliposomas marcados con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 se ha logrado someter a las células B-LLC a una dosis pro-apoptótica de la infusión de “Chirimoya” mencionada, significativamente menor a la necesaria cuando no se usa el nanoliposoma (dilución 1/1024), personalizando el efecto solo en las células leucémicas



mediante el anclaje en las mismas de dicho anticuerpo con los antígenos que expresan (en este trabajo se utilizó CD20), sin involucrar a las células sanas del organismo, minimizando así los efectos adversos, y maximizando los resultados esperados, especialmente en aquellas situaciones donde se ha desarrollado resistencia a drogas como es el caso de la B-CLL resistente a Fludarabina, un medicamento que se utiliza de rutina en la primer o segunda línea de tratamiento de esta enfermedad y que ante la resistencia de las células a este fármaco, se genera un dilema terapéutico.

De esta forma cantidades mínima de los NLPs unidos al anticuerpo monoclonal anti-CD20 cargando de infusión de “Chirimoya” se unen específicamente a las células B-LLC y a medida que penetran en ellas, se observa un proceso apoptótico de más del 74% a las 48 horas incluidas aquellas células resistentes a Fludarabina, pero sin un daño significativo en los PBMCs de donantes sanos; concordando con lo observado por Mao *et al.*, (2014) y Bucci *et al.*, (2018) donde sistemas de cultivo celular *in vitro* demuestran la captura liposomal tanto en células especializadas como en otras donde se da una endocitosis sin receptor específico.

Se observó que 2 μg / ml de NLPs con anticuerpo monoclonal anti- CD20 pero sin infusión no tenía diferencias significativas en la viabilidad de las células B-CLL en relación con la de las muestras de control sin NLPs incubadas en medio de cultivo solo.

A la concentración de 2 μg / ml, los NLPs conjugados a anti-CD20 y cargados con el extracto de “Chirimoya” seleccionado fueron efectivos en su actividad contra las células B-LLC, mientras que tuvieron un efecto mínimo como se ha dicho sobre los PBMCs normales.

Como estos compuestos (infusión solo o NLPs con infusión) tienen poco impacto citotóxico *in vitro* para los PBMC humanos normales, los efectos secundarios en el entorno clínico probablemente podrían minimizarse, y esto es, por supuesto, un aspecto muy importante a considerar en una enfermedad crónica como B-LLC, especialmente usando los NLPs conjugados al anticuerpo monoclonal.

Finalmente, también es posible que una formulación que combine “Chirimoya” con otras moléculas naturales o los tratamientos clásicos podría tener un efecto beneficioso sinérgico en B-LLC, siendo una estrategia potencialmente prometedora para el tratamiento de esta leucemia.



Los extractos de hojas (infusión) de “Chirimoya” por lo tanto podrían ser una opción terapéutica eficaz contra el cáncer especialmente la B-LLC.

Este trabajo de investigación no solo destaca la aplicación de esta clase de fitofármacos en este tipo de leucemia, sino que confirma la potencial ventaja de focalizar de dichos extractos en tumores mediante la encapsulación de los mismos en NLPs especialmente si se los liga o une a anticuerpos monoclonales específicos como el anti-CD20 utilizado aquí.

La encapsulación de la infusión de “Chirimoya” dentro de los liposomas que se dirigen selectivamente a las células neoplásicas de la B-LLC CD20+ promete no solo mitigar los efectos secundarios de la quimioterapia convencional sino también aquellos potencialmente indeseables y obtener resultados terapéuticos específicos con mínimas cantidades de los mismos, concidiendo con lo dicho por Mao *et al.*, (2013) que compara los medicamentos libres con los medicamentos liposómicos cuya ventaja es la de disminuir la toxicidad y aumentar el tiempo de circulación.

Los niveles de apoptosis producidos por NLPs con anti-CD20 y cargados con la infusión de “Chirimoya” seleccionado a una dilución de 1/1024 sobre las células B-LLC tanto resistentes como no resistentes en comparación con la producida por estos mismos NLPs sobre PBMCs normales a las 24 y 48 hs, fueron en todos los casos significativamente mayores.

El efecto citotóxico de la infusión de *Annona cherimola* es muy alentador por su alta citotoxicidad para células tumorales y su baja toxicidad para las células normales. Estos hallazgos *in vitro* deben ser confirmados en modelos *in vivo*, pero cabe destacar que sigue los mismos resultados observados en otras líneas celulares como: MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), ME-180 (carcinoma epidermoide de cérvix), K562 (leucemia mieloide crónica) y 3T3 (fibroblastos normales de ratón) donde supera en cuanto a índice de selectividad a los fármacos ampliamente conocidos como el 5-fluorouracilo y el cisplatino (Quispe *et al.*, 2009).

Modelo computacional: Actividad anticonvulsiva y antiinflamatoria

Los modelos computacionales ya desarrollados por el grupo del Dr. Talevi son aplicados en el tamizado virtual de las bases de datos DrugBank 3.0 (Knox C et al, Nucleic Acids Res 39, 2011), Sweetlead (Novick PA et al., PLOS One 8, 2013) y NCGC Pharmaceutical



Collection (Huang R et al., Sci Transl Med 3, 2011). Estos recursos compilan fármacos aprobados y experimentales de la FDA y otras agencias regulatorias, incluyendo productos naturales. Es interesante destacar que las plantas medicinales suelen incluir en su composición una gran diversidad de sustancias químicas altamente relacionadas entre sí, por lo que al identificar un compuesto activo en una planta determinada es altamente probable que la misma incluya un conjunto de compuestos activos similares desde el punto de vista molecular y –por lo tanto- farmacológico.

Una actividad no prevista en el plan de tesis original, fue la aplicación del programa de modelos computacionales a diversos componentes presentes en la especie *A. cherimola*.

Como resultados iniciales alentadores, varios de los componentes reportados y compuestos relacionados con estos han sido predichos como activos sobre actividad antiinflamatoria y anticonvulsiva, lo que condice con los antecedentes de uso tradicional y farmacológicos para *A. cherimola*.



7. Conclusiones

- La especie *A. cherimola* fue reconocida taxonómicamente. Se realizó una descripción macroscópica; se trata de una hoja simple, con pecíolo corto, ahuecado, de aproximadamente 1 cm de longitud. La hoja es entera, oval-lanceolada, color verde oscuro, verde claro en el envés, que es tomentoso y con nervaduras notables. Los tricomas se observaron fácilmente con auxilio de una lupa binocular y microscópica.

En las observaciones microscópicas se describió la presencia de epidermis adaxial y abaxial, gran cantidad de pelos uniseriados, estomas paracíticos; células epidérmicas. Presencia de astroesclereidas, osteoesclereidas, braquiesclereida, conjunto de braquiesclereidas, elementos de los vasos. En el mesófilo presencia de idioblastos.

Estos caracteres de diagnóstico constituyen la base para un futuro control de calidad.

Las reacciones histoquímicas con ácido pícrico y permanganato de potasio y la formación de cristales característicos podrían contribuir al control de calidad de *A. cherimola*.

- Se obtuvieron diferentes extractos y fracciones bioactivas a partir de las hojas de *A. cherimola*, detectándose con ensayos fitoquímicos la presencia de diferentes grupos (polifenoles, terpenoides, esteroides, alcaloides) y/o compuestos presentes en los mismos, relacionados con la actividad biológica. Los distintos sistemas de CCD, demostraron la presencia de rutina, isoquercetina y ácido cafeico; ácido ursólico y ácido oleanólico que fueron confirmados por UHPLC. Esto es un hecho novedoso ya que no se había encontrado descrito en bibliografía y fue reportado por primera vez en esta especie.

- Se determinó la actividad antineoplásica de los diferentes extractos y fracciones obtenidas, en estirpes celulares de LLC-B, resistentes a terapias habituales y se seleccionó la infusión de *Annona cherimola* por ser potencialmente más efectiva. Es de destacar que los linfocitos normales no son afectados significativamente por estos extractos sugiriendo un alto nivel de selectividad y seguridad biológica de los mismos.

- La infusión se encapsuló en liposomas (de fosfatidilcolina de soja, tamaño 200 nm y marcados con Rhodamina) por la técnica de formación de films, resuspensión, sonicación y pasaje por extrusor (J. Montanari, 2013).

- Luego se procedió a realizar los NLPs recubiertas con anticuerpos monoclonales.

- Se comprobó la penetración de nanoliposomas biodegradables cargadas con infusión



de *A. cherimola* con/sin anticuerpos monoclonales específicos anti-CD20 en células de LLC-B resistentes a fármacos habituales.

- La investigación del grado de citotoxicidad de la infusión y los nanoliposomas con “Chirimoya” demostró actividad contra células de LLC-B, tanto sin tratamiento, como células resistentes a Fludarabina; además de baja toxicidad en PBMCs de donantes sanos.
- Se determinó una actividad apoptótica promedio de 68,4% (nanoliposoma sin anticuerpo con “Chirimoya”) y 71,2% (nanoliposoma con anticuerpo con “Chirimoya”) y baja toxicidad en PBMCs de donantes sanos.
- Se comparó la acción antineoplásica *in vitro* de la infusión de hojas de “Chirimoya” y nanoliposomas de la misma, para el tratamiento de LLC-B resistente a Fludarabina.
- La infusión de hojas de “Chirimoya” en NLPs unido a anticuerpo monoclonal anti-CD20 se presenta como una opción terapéutica eficaz contra el cáncer, especialmente la B-LLC y combinados con los tratamientos clásicos, podrían tener un efecto sinérgico beneficioso, constituyendo una estrategia prometedora.



8. Resumen



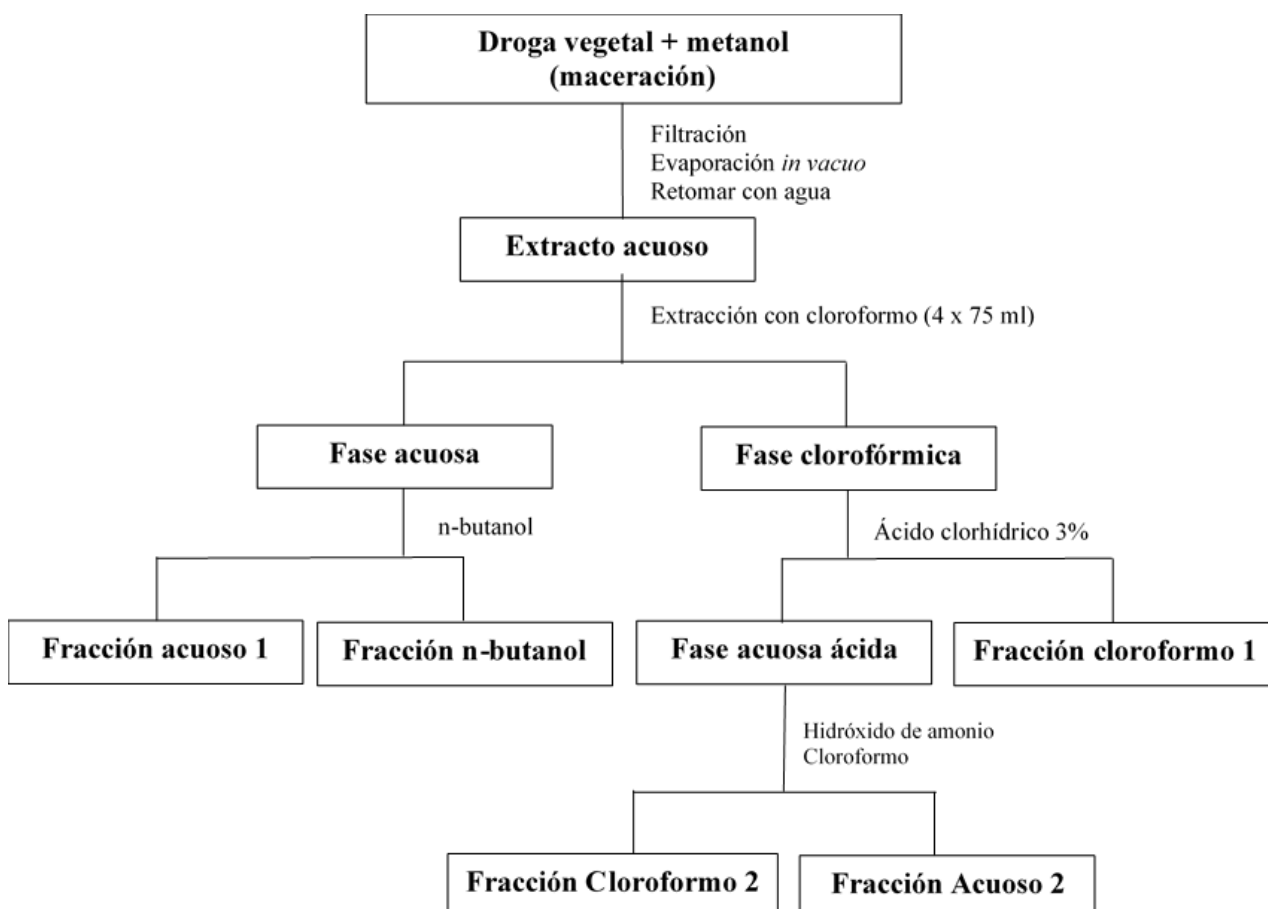
Identificación Botánica

- *Annona cherimola* Mill (Annonaceae) “Chirimoya”: un ejemplar de herbario, fue depositado en el Museo de Botánica y Farmacognosia “Carlos Spegazzini”: LPE1165. Reserva de exsicata.
- Descripción botánica: reconocimiento taxonómico, descripción de la hoja macroscópica y microscópica con identificación de elementos histológicos y reacciones histoquímicas con formaron cristales característicos de diagnóstico como constituyentes, base para un futuro control de calidad.



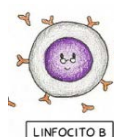
Elaboración de extractos

- Elaboración de infusión de las hojas de *A. cherimola*.
- Elaboración de extractos de las hojas de *A. cherimola*.





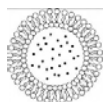
- Elaboración de extracto DCM de las hojas de *A. cherimola*.
- Ensayos fitoquímicos sobre los diferentes extractos:
 - Extracto metanólico, extracto acuoso y fracción n-butanólica se caracterizó la presencia de polifenoles, flavonoides. Se reporta por primera vez, en esta especie utilizando distintos sistemas de TLC, la presencia de ácido cafeico, 2 flavonoides: rutina y isoquercetina, todos confirmados por UHPLC.
 - Fracción n-butanólica: reacción de caracterización de saponinas.
 - Extracto cloroformo 2: se caracterizó la presencia de alcaloides.
 - Extracto DCM se caracterizó la presencia de terpenoides, esteroides Se reporta por primera vez, en esta especie utilizando distintos sistemas de TLC y UHPLC, la presencia de terpenoides: ácido ursólico y ácido oleanólico.



Ensayos *in vitro* de la actividad antineoplásica de extractos

Ensayos *in vitro* de la actividad antineoplásica de los diferentes extractos y fracciones obtenidas para seleccionar el más activo, en estirpes celulares de LLC-B, resistentes a terapias habituales. Mostrando actividad de 68% a una dilución 1/512

Los linfocitos normales no son afectados significativamente por estos extractos sugiriendo un alto nivel de selectividad y seguridad biológica de los mismos. Realizados en el INCUCAI



Realización Nanoliposomas

Realización de NLP cargados con infusión de *A. cherimola* con/sin anticuerpos monoclonales específicos anti-CD20 en células de LLC-B resistentes a fármacos habituales.

- NLP sin anticuerpo monoclonal marcado con Rodamina realizados en UNQ Lab. De Biomembranas.
- NLP recubiertos con anti-CD20 marcado con Rodamina realizados en Centro de Research Clinique Hayen, Hospital Saint Louis.

Pruebas de caracterización NLP: tamaño, potencial, cuantificación de los Fosfolípidos de los liposomas, penetración a distintas concentraciones.



Ensayos *in vitro* de la actividad antineoplásica de NLPs

- Actividad Citotoxicidad de NLPs con “Chirimoya” contra células de LLC-B, tanto sin tratamiento, como células resistentes a Fludarabina; además de baja toxicidad en PBMCs de donantes sanos.
- Actividad apoptótica promedio de 68% (NLP sin anticuerpo) y 71% (NLP con anticuerpo) a diluciones 1/1024 y baja toxicidad en PBMCs de donantes sanos.



Actividad complementaria

- Actividad antiinflamatoria y anticonvulsiva en modelo computacional. Realizado en la cátedra Química Medicinal, dando la predicción de varios compuestos con actividad.



Concluyendo

- Se avanzó en el conocimiento botánico y fitoquímico de esta especie encontrando elementos característicos para su correcta identificación. Y se describieron por primera vez la presencia de ácido cafeico, rutina, isoquercetina, ácido ursólico y ácido oleanólico. Considerando los resultados de los ensayos biológicos realizados, es lógico suponer que la actividad de los extractos de hojas de *A. cherimola* sería el producto de una acción sinérgica entre las acetogeninas presentes y compuestos encontrados.
- Con los extractos obtenidos a partir de *Annona cherimola*, se investigó la actividad antitumoral *in vitro* sobre linfocitos B de voluntarios sanos y en enfermos de LLC-B, determinándose que el extracto acuoso presenta la mayor actividad.
- Se evaluó la internalización de los nanoliposomas dentro de los linfocitos B de los pacientes enfermos y la actividad apoptótica resultantes mediante microscopía confocal.
- Desde el punto de vista tecnológico moderno e innovador se encapsuló el extracto acuoso de *Annona cherimola* en nanoliposomas con anticuerpo monoclonales (forma farmacéutica nanoparticulada) con gran especificidad y seguridad, selectivos para dirigir este sistema de administración (delivery) de fármacos a su células blanco, en este caso Linfocitos B. Para maximizar los efectos terapéuticos y minimizar los



efectos secundarios, que combinados con los tratamientos clásicos, podrían tener un efecto sinérgico beneficioso, presentándose como una estrategia prometedora para una patología que no dispone de un desarrollo tecnológico suficiente para las necesidades actuales.



Presentaciones, Publicaciones y Premios

Presentaciones a congresos:

- “Micrografía foliar y perfiles cromatográficos de compuestos polifenólicos presentes en *Annona cherimola* Mill. “Chirimoya” (Annonaceae).”
Autores: Haag G.O, Del Valle, M.E, Ramos Corrales, P.C. Rosella, M.A
XVII Congreso Federación Farmacéutica Sudamericana FEFAS. Ecuador. 2014
- “Phytochemical screening and chromatographic profile of flavonoids and terpenoids from *Annona cherimola* Mill “Chirimoya” (Annonaceae)”
Autores: G.O. Haag, M.E. del Valle, E. Ruiz, S. Scioli Montoto, M.A Rosella, G.H. Marin, G. Roque, E. Mansilla
Congreso Republica Dominicana. 2015 “XXIV SILAE Congress and II Internacional Congress on Integrativen Medicine” Punta Cana. 2015
- “Evaluación de la Actividad de Extractos de *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) encapsulado en Liposomas en Leucemia Linfática Crónica.”
Autores: Haag, Griselda O.; Del Valle, Maria Elena; Montanari, J.A.; Alonso, S.d.V.; Rosella, Maria Adelaida; Marin, Gustavo H.; Mansilla, E.
XXIII Congreso Farmacéutico Argentino y Jornadas Rionegrinasde Psicofarmacos. Bariloche. Noviembre 2017
- “Nuevas formas para viejos conocidos: Nanoliposomas como vehículo para la administración de extractos de *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae).”
Autores: Autores: Haag, G.O.; Del Valle, M.E.; Montanari, J.A.; Alonso, S.; Rosella, M.A; Marin, G.H.; Mansilla, E.
2º Congreso de Preparaciones Magistrales. Buenos Aires. 2019

Publicaciones

- “Determinación de compuestos polifenólicos, terpénicos y perfil cromatográfico en distintos sistemas de *Annona cherimola* Mill. “Chirimoya” (Annonaceae).”
Autores: Haag, G.O.; Del Valle, ME; Scioli Montoto, S; Ruiz, ME; Rosella, MA; Marin, GH
Revista Profesional Médica. S.a.f.yt - A.M.A., n° 77, vol.I, año 2017. Revista Safyt-



ama, n° 77, vol.I, 2017. ISSN 2362-4345

- Farmopiantas “Chirimoya” *Annona cherimola* Mill.

Autora: Griselda O. Haag

Publicación en Revista Profesional Farmacéutica. Bifase. 2018. vol 31 num 2 pag 33-39 ISSN 1515-5560.

Premio

Primer Premio "Estimulo científico para la investigación y desarrollo de medicamentos individualizados" del trabajo presentado en el 2º Congreso de Preparaciones Magistrales. Buenos Aires. 2019

“Nuevas formas para viejos conocidos: Nanoliposomas como vehículo para la administración de extractos de *Annona cherimola* MILL. (Annonaceae)”.

Autores: Haag, G.O.; Del Valle, M.E.; Montanari, J.A.; Alonso, S.; Rosella, M.A; Marin, G.H.; Mansilla, E.

9. Bibliografía

Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed Z., Shafiq H. (2015). Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review *Food Research International*, 77, 221–235

Alali F.Q., Liu X.X., Mc Laughlin J.L. (1999). Annonaceous acetogenins: Recent progress. *J Nat Prod*, 62(3),504- 540.

Alali F.Q., Rogers L., Zhang Y., Laughlin J.L. (1998). Unusual Bioactive Annonaceous Acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. *Tetrahedron*, 54 (22), 5833- 5844.

Alonso, J., (2004). Tratado de fitofármacos y nutracéuticos., Rosario - Argentina., Corpus., Pp. 641- 646, 927-930,1037-1041.

American Cancer Society. Guía detallada: CLL diagnosis. Disponible en <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-chroniclymphocyticcll/detailedguide/leukemia-chronic-lymphocytic-diagnosis> consultado nov 2019.

Ankli A., Reich I, Steiner M, Widmer V. (2008) A Rapid HPTLC Method for Detecting 5% of Adulteration of *Cimicifuga racemosa* (A. racemosa) with *C. foetida*, *C. heracleifolia*, *C. dahurica*, or *C. americana*. *Planta Med*; 74 - P-128 DOI: 10.1055/s-2008-1075324

Arts, I.C. and Hollman P.C., (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal Clinical Nutrition*. 81(1):317-325

Arun Jyothi B., Venkatesh K., Chakrapani P. and Roja Rani A., (2011). Phytochemical and Pharmacological potential of *Annona cherimola*-A Review *International Journal of Phytomedicine* 3, 439-447 <http://www.arjournals.org/index.php/ijpm/index> ISSN: 0975-0185



Ávalo, A. Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie *Fisiología Vegetal*; 2 (3): 119-145.

Badrie N, Alexander G.; Schauss Chapter (2010) Soursop (*Annona muricata L.*): Composition, Nutritional Value, Medicinal Uses, and Toxicology. *Bioactive Foods in Promoting Health*, 621-643

Balunas MJ., Kinghorn AD. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*; 78(5):431-41.

Bandaranayake, Wickramasinghe. (2006). Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*; 25 - 57. 10.1002/9783527609987.ch2.

Barboza Almeida T. J. (2009). Avanços e perspectivas para o diagnóstico da leucemia linfóide aguda. *Revista Virtual Candombá*, 5(1), 40-55

Barreca D., Lagana G., Ficarra S., Tellone E., Leuzzi U., Galtieri A., Bellocco E. (2011) Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. *Food Research International*; 44:2302-2310

Beneval Bento E.B., Brito Monteiro A., Santiago Lemos I.C., de Brito Junior F.E., de Oliveira D.R., Alencar de Menezes I.R., Kerntopf M.R. (2016). Estudio etnofarmacológico comparativo en la región del Araripe de la *Annona muricata L.* (Graviola). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*;21(1):9-19

Best-Aguilera C., Guzmán-Hernández E.A. (2018). The modern treatment of chronic lymphocytic leukemia: An approach of the personalized therapy. *Hematol Mex.* 19(2):77-82.

Betancur-Galvis, L. A., Saez, J., Granados, H., Salazar, A. and Ossa, J. E. (1999). Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 531–535



Bioversity International y Cherla. (2008). Descriptores para chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). Bioversity International, Roma, Italia; Proyecto CHERLA, Málaga, España.

Bird, J.; Shulaw, W.P.; Pope, W.F. & Bremer, C.A. (2001) Control of anthelmintic resistant endoparasites in a commercial sheep flock through parasite community replacement. *Veterinary Parasitology*; 97: 219-225.

Bobadilla M.; Espejo G.Z.; Franco F.G.; Velásquez L.P.; Gonzales M.S. (2002). Efecto Bioinsecticida del Extract Etanólico de las Semillas De *Annona cherimola* Miller "Chirimoya" y *A. muricata* Linneaus "Guanabana" Sobre Larvas Del IV Estadio De Anophles, 9 (2): 64 -73.

Bode AM, Dong Z. (2009) Cancer prevention research the and now. *Nat Rev. Cancer*;9(7):508-516

Bories C. Loisea P., Cortes D., Myint S.H., Hocquemiller R., Grayral P., Cave A., Laurens A. (1991) Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimola* seed. *Plant Med.*; 57(5):434-436.

Bötcher C. J. F., Van Gent C. M., and Pries C., (1961) A rapid and sensitive submicro phosphorus determination. *Anal. Chim.*;24, 203–204.

Bryd J.C.; Rai K.R; Sausville E.A; Grever M.R. (1998). Old and new therapies in chronic lymphocitic leukemia: now is the time for a reassessment of therapeutic goals. *Sem Oncol*; 25:65-74.

Bucci P, Prieto MJ, Milla L, Calienni MN, Martinez L, Rivarola V, Alonso S, Montanari J. (2018). Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries. *J Cosmet Dermatol.* ;17(5):889-899. doi: 10.1111/jocd.12436. Epub 2017 Oct 3.

Calvillo Batllésa P., Carreres Poloa J., Sanz Caballer J., Salavert Lletíc M., Compte Torrero L. (2015) Neoplasias hematológicas: interpretación de los hallazgos pulmonares en la tomografía computarizada torácica. *Radiología*; 57(6):455-470



Calzada F., Solares-Pascasio J.I., Ordoñez-Razo R.M., et al. (2017). Antihyperglycemic Activity of the Leaves from *Annona cherimola* Miller and Rutin on Alloxan-induced Diabetic Rats. *Pharmacognosy Research*. r;9(1):1-6. DOI: 10.4103/0974-8490.199781.

Castellaro G.G., Squella N.F., Ullrich R.T., León F.C., Raggi A.S. (2007). Algunas técnicas microhistológicas utilizadas en la determinación de la composición botánica de dietas de herbívoros. *Agricultura técnica*; 67(1):86-93

Castro, J., (2007). Cultivo de la *Annona*. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Fundación para el fomento y promoción de la investigación y transferencia de tecnología agropecuaria - Costa Rica. 75p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00109.pdf>

Chakrapani P., Roja Rani A. (2012) Antidiabetic activity of *Annona cherimola*. The 5th Internacional conference on Advanced Technologies and Treatments for diabetes. Barcelona, Spain, 8-11

Chanh, P.H. Ifansyah N, Chahine R, Mounayar-Chalfoun A, Gleye J, Moulis C. (1986). Comparative effects of total flavonoids extracted from *Ribes nigrum* leaves, rutin and isoquercitrin on biosynthesis and release of prostaglandins in the ex vivo rabbit heart. *Prostaglandins Leukotrienes & Medicine*. 22: 295-300

Chen CY, Chang FR and Wu Y-C. (1997) Cherimoline, a Novel Alkaloid from the Stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Lett*. 38: 6247- 6248

Chen CY, Chang FR and Wu YC. (1998) Cherininaine, a Novel Dimeric Amide from the Stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Letter*. 39: 407-410

Chen CY, Chang FR, Chiu HF, Wu MJ, Wu YC. (1999) Aromin-A, an Annonaceous Acetogenin from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. 51: 429-433

Chen CY, Chang FR, Pan WB, Wu YC. (2001) Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*.56: 753-757



Chen CY, Chang FR, Teng CM, Wu YC. (1999). Cheritamine, A new N-fatty acyl tryptamine and other constituents from the stems of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society*; 46 (1): 77-86.

Chen CY, Chang FR, Wu YC.(1997) The constituents from the stems of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society*; 44 (3): 313-319.

Chen CY, Chang FR, Wu YC.(1998) Cherinonaine, a novel dimeric amide from stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Letters*; 39 (5): 407-410.

Chen CY, Chang FR, Yen HF, Wu YC.(1998) Amides from the stems of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*; 49 (5): 1443-1447.

Chen CY, Wu TY, Chang FR, Wu YC.(1998) Lignans and kauranes from the stems of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society*; 45 (5): 629-634

Chen, CY, Chang, FR, Yen, HF, Wu YC.(2001) Amides from Stems of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. 56: 753-757

Colunga Pedraza P.R.; Colunga Pedraza J.E.; Lozano Morales, R.E.; Garza Acosta A.C., Cantu Rodriguez, O.G. (2017) Anticuerpos monoclonales en neoplasias hematológicas *Rev Hematol Mex*. 18(1):16-25.

Coria-Téllez AV, Montalvo-González E, Yahia EM, Obledo-Vázquez EN. (2016). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian J Chem*.

Cortes D., Moreno L., Párraga, J., Galán A., & Cabedo N. (2014). Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 22-31. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500003>

Crown J.; Norton L. (1995). Potential strategies for improving the results of high-dose chemotherapy in patients with cancer *Ann Oncol*;6 Suppl 4:21-6.



Cruz, E. (2002). Boletín técnico No. 7, cultivo de annona. El Salvador, 5- 17. Consultado Agosto del 2015, de la world wide web:
<http://www.centa.gob.sv/uploads/documentos/anona.pdf>

Cseke Leland J., William N. Setzer, Bernhard Vogler, Ara Kirakosyan, and Peter B. Kaufman. (2006) Cap. 8: *Traditional, Analytical, and Preparative Separationsof Natural Products*

D'Ambrogio de Argueso, A. (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. Editorial hemisferio sur. Buenos Aires.

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.

De Pedro, N.; Cautain, B.; Melguizo, A.; Cortes, D.; Vicente, F.; Genilloud, O.; Tormo, J. R.; Peláez, F. 2012. Analysis of cytotoxic activity at short incubation times reveals profound differences among Annonaceous acetogenins, inhibitors of mitochondrial Complex I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, New York. In press.

De Vita V.T., Young R.C., Canellos G.P. (1975). Combination versus single agent chemotherapy. Review of the basis of selection of drug treatment of cancer. *Cancer*; 35: 98-109

Dimitri J.M. (1987). Enciclopedia Argentina de agricultura y Jardinería Milan Tomo 1 Tercera Edición. 392-393. Ed. ACME S.A.C.I.

Dizzeo de Strimatter, C. (1973). Nueva Técnica de diafanización. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*; 15:126-129.

Dominguez X (1973) Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limunsa, Mexico DF, Mexico.



Dupont Juan. (2016) Leucemia linfocítica crónica. Experiencia argentina. *Hematología*. Vol 20 Número Extraordinario I Jornada Latinoamericana de la SAH: 140 - 151, 2016

Estrada-Reyes R., Ubaldo-Suárez D., Araujo-Escalona A.G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*.;35(5):375-384.

Faderl S.; O'Brien S.; Keating, M.J. (2006). Monoclonal antibody combinations in CLL: evolving strategies. *Best Pract Res Clin Haematol*;19(4):781-93

Falé P.L.; Ferreira C., Maruzzella F.; Florêncio M.H., Frazão F.N.; Serralheiro M.L.M. (2013) Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*; 150:718–723

FAO (2006) Ficha técnica de "Chirimoya" recuperado de internet abril 2020 http://www.ipcinfo.org/fileadmin/user_upload/inpho/InfoSheet_pdfs/CHIRIMOYA.pdf

Farmacopea Nacional Argentina. 7ma. Ed. 2003. Ministerio de Salud – ANMAT

Ferrari M. (2005). Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Rev. Cancer*; 5: 161-171.

Fry D. W., White JC, and Goldman ID. (1978) Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Anal. Biochem.*, 90(2), 809–815.

García E., (1956). La "Chirimoya". (*Annona cherimola*, Mill). Ministerio Agricultura. Estación Experimental Agrícola, Perú, "La Molina". Circular No 71. p.25

Gardiazabal F., Rosenberg G. (1993). El cultivo del Chirimoyo. UCV. Facultad de Agronomía, Valparaiso Chile, 145

Gattuso M (2013) Micrografía analítica y la farmacobotánica. *Dominguezia*; 29(1) 5-6

Gavamukulya Y, Abou-Elella F, Wamunyokoli F, HAE-S. (2014). Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water



leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola) *Asian Pac J Trop Med.* 7(Suppl 1): 355–363

Gaviria Calle MM, Posada Arias S, Mira Hernández J. (2018). Acetogeninas, alternativa en el tratamiento de cáncer en caninos. *Rev. CES Med. Zootec*; Vol 13 (2): 157-172

Gayoso & Chang. (2017). *Annona cherimola* Mill. “Chirimoya” (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa* 24 (2): 619-634

Gheno Heredia Y.A. (2011). Plantas medicinales de parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo. *Polibotanica México*; 31:199-251, ISSN 1405-2768

Ghorbani A. (2017). Mecanismos de los efectos antidiabéticos de la rutina flavonoide. *Biomedicina y farmacoterapia*, 96, 305-312
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>

Giménez L. A. S., Vignale N. D., Gurni A. A. (2016). La microscopía y su aplicación en la identificación de especies y en el control de calidad de agroalimentos. *Acta Microscopica*; 25(A)

Gleye C., Alain L., Reynald H., Laprévotte O., Serani L., CavéCohibins A. (1997). A and B, acetogenins from roots of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, 44 (8): 1541-1545

Goldie JH, Coldman AJ. (1983) Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treat Rep*; 67: 923-7.

González Vega M. E. (2013) Cherimoya (*Annona cherimola* Miller), fruit-bearing tropical and sub-tropical of promissory values. *Cultivos Tropicales*. 34 (3): 52-63

Gore J.M. (2014) Chronic myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *JAAPA*; 27(2);45-46

Haag G. (2018). Farmoplasmas “Chirimoya” *Annona cherimola* Mill. *Bifase*; 31(2) 33-39. ISSN 1515-5560. <http://www.bifase.org.ar>



Haag, G.O.; del Valle, M.E; Scioli Montoto, S.; Ruiz, M.E.; Rosella, M.A.; Marin G. (2017). Determinación de compuestos polifenólicos, terpenicos y perfil cromatográfico en distintos sistemas de *Annona cherimola* Mill. “Chirimoya” (Annonaceae)” *Revista Científica S.a.f.yt - A.M.A.* n° 77, vol. I

Hernández Ramírez P. (1999). Leucemia Linfoide Crónica. Aspectos clínicos y biológicos. Instituto de Hematología e Inmunología. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*; 15(1):7-20

Hernández, M. & Prieto, E. (1999). Plantas que contienen polifenoles antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev Cubana Invest Biomed.* 18(1):12-4

Heywood, V. H. (1985). Flowering plants of the world. Croom Helm, London, U.K. & Sydney, Australia. 336 p.

Hoyos J. (1994) Frutales en Venezuela (Nativos y Exóticos). Sociedad de Ciencias Naturales La Salle; Caracas, Venezuela. Monografía N° 36. pp.381

Hsu Y., Yang J.J., Lin Chin Ching, (1997). Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Letters*; 111: 7-11.

Ibar, L., 1979. Cultivo del Aguacate, Chirimoyo, Mango y Papaya. Ed. Aedos. Barcelona. 121-144.

Internacional Plant Names Index, 2020
<http://florawww.eeb.uconn.edu/199500093.html>, 2020

Jaramillo M.C., G.J. Arango, M.C. González, S.M. Robledo, I.D. Velez (2000) Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp *Fitoterapia*, 71, (2): 183-186



Jeong H.G. (1999). Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride- induced hepatic injury. *Toxicology Letters*; 105: 215-222.

Jolad, S. D.; Hoffmann, J. J.; Schram, K. H.; Cole, J. R.; Tempesta, M. S.; Kriek, G. R.; Bates, R. B. (1982). «Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae)» *The Journal of Organic Chemistry* 47 (16): 3151-3153.

Jong Keun Son, Dal Hwan Kim, Hee Woo. (2003) Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimola* Seeds. *J. Nat. Prod.* 66: 1369-1372

Kashiwada Y., Wang H.K., Nagao T., Kitanaka S., Yasuda I., Fujioka T., Yamagishi T., Consentino M., Kozuka M., Okabe H., Ikeshiro Y., Hu C.Q., Yeh E., Lee K.H. (1998). Anti- AIDS Agents. 30. Anti-VIH activity of oleanolic acid, Pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.*; 61:1090-1095.

Kashyap D., Tuli HS, Sharma AK. (2016) Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sciences*; 146, 201-213. ISSN 0024-3205, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.017>

Kim, D. H., Ma, E. S., Suk, K. D., Son, J. K., Lee, J. S. and Woo, M. H. (2001). Annomolin and annocherimolin, new cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. *J. Nat. Prod.* 64, 502–506.

Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP, Huang L.(1991) Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim Biophys Acta*;1062(2):142-148. doi:10.1016/0005-2736(91)90385-1

Knöpfel Capelinha B. (2018) Propiedades Farmacológicas da *Annona cherimola* Mill. Monografia Universidade de Coimbra, Portugal



Liaw C.C, Liou J.R, Wu T.Y, Chang F.R, Wu Y.C. (2016). Acetogenins from Annonaceae. *Prog Ch Org Nat Prod*. 101:113–230.

Linares E. Y Bye R. (1995). Plantas medicinales de México: Usos y remedios tradicionales. Segunda edición. Centro de Tecnología Electrónica e Informática (CETEI) e Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB, UNAM), Eds. México, D.F.

Liu J., (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic. *Journal of Ethnopharmacology*; 49: 57-68.

Lock de Ugaz O (1998). "Investigación fitoquímica" segunda edición, fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima- Perú.

López De la Peña H.Y.; López Badillo C.M.; Múzquiz Ramos E.M. (2016). Nanopartículas: aplicaciones actuales y futuras en la industria alimentaria. *CienciAcierta*. número 48

Lopez Rubalcava C., Pina Medina B., Estrada Reyes R., Heinze G., Martinez Vazquez M. (2006) Anxiolytic like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimola* in two anxiety paradigms: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sci*; 78:730-737.

Mahabir, P., (1995). Plantas Medicinales Iberoamericanas., Santa Fe de Bogotá-Colombia., *Editorial Converse.*, 26-27.

Mao, Y., Wang, J., Zhao, Y., Wu, Y., Kwak, KJ, Chen, CS, Byrd, JC, Lee, RJ, Phelps, MA, Lee, LJ., Muthusamy, N. (2013). Una novedosa formulación liposomal de FTY720 (fingolimod) para una entrega dirigida mejorada y prometedora. *Nanomedicina: nanotecnología, biología y medicina*, 10 (2), 393-400.

Marín G.H., Drago H, Sturla F, Olaiz N, Ibar R, Nuñez L, Mansilla E. (2008) Nanopartículas Biodegradables con Anticuerpos Monoclonales en su Superficie y Clorambucilo en su Interior Penetran Células de B-LLC. Nueva Posibilidad Terapéutica. *Hematología*, Vol. 12 No 1



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

Martínez Crovetto. (2013). Guía de Consultas Botánica II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) MAGNOLIIDAE-Annonaceae. Archivo recuperado 2015. web <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/3.Anonnaceae.pdf>

Martínez-Vázquez M, Estrada-Reyes R, Araujo Escalona AG, Ledesma Velázquez I, Martínez-Mota L, Moreno J, Heinze G. (2012). Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimola* in mice. *J Ethnopharmacol.* 139(1):164-70. doi: 10.1016/j.jep.2011.10.033.

Martínez-Vázquez M. y Estrada-Reyes R (2014). Secondary metabolism in annonaceae: potencial source of drugs. *rbf.* 36, edição especial, e., p. 141-146

Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M. (1995) Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*;1234(1):74-80. doi:10.1016/0005-2736(94)00263-o

Masilla E., Nunez L., Marin G., Rivera L., Macor P.(2019). New advances in chronic lymphocytic leukemia treatment: Biodegradable ZnO hybrid cluster nanoparticle as antineoplastic agents. Ed. William Andrew. *Biomedical Applications of Nanoparticles* Cap. 15 ;409-430, ISBN 0128166304, 9780128166307

Moghadamtousi S.Z., Fadaeinasab M., Nikzad S., Mohan G., Ali H.M., Kadir H.A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci.* 16(7):15625–15658

Montanari J., M. Vera, E. Mensi, M. Morilla, E. Romero. (2013) Nanoberries for topical delivery of antioxidants. *J Cosmet Sci.*;64 (6):469-81



Morones Alba J.D., Macías Hernández S.I., Villanueva López G.C., Aragón Flores M. (2016). Antiinflammatory effect of caffeic acid in an experimental model of pulpitis in guinea pigs. *Revista ADM*; 73 (5): 250-254 www.medigraphic.org.mx

Morton, J. (1987). Descripción de *Annona muricata*. Fruits of warm climates. Soursop. Purdue University. 75-80. ISBN 0-9610184-1-0)

Moses M. A., Brem H.& Langer R. (2003). Advancing the field of drug delivery: taking aim at cancer. *Cancer Cell*; 4: 337-341.

Moura G., Villegas L., Marcalo A., Vaisberg A., Hammond G., (2006). In vivo wound healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*. *J. Nat. Prod*; 69: 978-979.

Munguia C.C. (2015) Identificación de la modulación de la proteína tau en el tratamiento in vitro con acetogeninas de guanábana (*Annona muricata*). Tesis maestría Ciencias alimenticias. Universidad Veracruzana.

Nadimic E. (2000) Estudio farmacognóstico de una planta medicinal Argentina conocida como “nencia” *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho y Liu. Tesis doctoral Universida de Buenos Aires.

Newmann D.J., Cragg G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 year. *J Nat. Prod*;70(3):461-477

Normas IRAM. (1993) Instituto Argentino de Normalización y Certificación. Números 37500 y 37501

Norton L. (1976) Predicting the course of Gompertzian growth. *Nature*; 264:542-49.

OMS, 2000. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional, Geneva, Switzerland. 1-80.



OMS, 2003. Directrices de la OMS sobre Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de plantas medicinales; <http://www.fitoica.com/BibliotecaALibros/OMS/OMS08.pdf>

OMS, 2011. Quality control methods for herbal materials.

OMS, 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra, Suiza

OpenStax College, anatomía y fisiología Componentes de la sangre. Recuperada julio 2019
<https://es.khanacademy.org/science/biology/human-biology/circulatory-pulmonary/a/components-of-the-blood/>

Orrego Escobar E.F. (2015). Plantas latinoamericanas como fuente de nuevos antineoplásicos, situación actual y nuevas oportunidades contra el cáncer. *Medwave* 15(3): e6121 doi: 10.5867 / 2015.03.6121

Paes, M. M.; Vega, M. R. G.; Cortes, D.; Kanashiro, M. M. (2016). Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. *Rev. Virtual Quim.* 8 (3) 945-980

Pagani, F. Martin, N.; Sabas, M.; Fanjul, V.; Vijnovich Varon, A.; Zanetto, U. (2008) Aplasia Eritroide Pura y Aplasia Mieloide Pura en Pacientes con Síndrome de Sjögren Primario. Presentación de Dos Casos. *Hematología*, 12 (1) 9-17

Parellada E.A.; Ramos A.N.; Ferrero M.; Cartagena E.; Bardón A.; ValdezJ.C.; Neske A. (2011) Squamocin mode of action to stimulate biofilm formation of *Pseudomonas plecoglossicida* J26, a PAHs degrading bacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, ISSN: 0964-8305, 65 (7): 1066-1072

Penco Martín A.D., Gordon Vázquez F. (2003). Remedios de origen vegetal utilizados en Medicina Popular Veterinaria en la Comarca de Zafía. *Revista de Estudios Extremeños*. 59, 265-279.



Pengxia Z., Hongmei L., Dong C., Juhua N., Yuming K., Shuqiu W., (2007). Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cell through caspase activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage. *Acta biochimica et biophysica sinica*. 39: (10) 803-809.

Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 22(1):48-57

Pieme C. A., Kumar S. G., Dongmo M. S. et al., (2014). “Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*; 14(1), 516

Pineda A.D., Salucci M., Lázano R., Madani G., Ferro-Luzzi A. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentos y Nutrición* 13(2): 104 – 111.

Pita Laborí L.Y., Tabera García M.E., Matos Cantillo D., Thomas Ferrer F., Thomas Ferrer A. (2017). Beneficios, contraindicaciones y precauciones de la Medicina Natural y Tradicional como respuesta a los problemas de salud estomatológicos. *Rev Inf Cient.*; 96 (2):314-324

Prasad R. & Prasad SB. (2018) Antitumor activity of rutin-cisplatin in combination and its protective effect against hematotoxicity. *Life Science Informatics*; 4(6) 42- 56 DOI: 10.26479/2018.0406.04

Quiñones, M. & Aleixandre, A. (2012) Revisión: Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*; 27(1):76-89

Quispe A., Zavala D, Rojas J., Posso M., Vaisberg A. (2006) Efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 23 (4), 265-269

Quispe M.A., Callacondo D., Posso M. (2009). Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica *Acta Med Per* 26(3) 155-161



Rady I., Bloch M.B., Chamcheu R.C.N., Mbeumi S.B., Rafi Anwar Md, Mohamed H., Babatunde A.S., Kuate J.R., Noubissi F.K., El Sayed K.A., Kerr Whitfield G. (2018) Anticancer Properties of Graviola (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic. *Oxid.Medicina. Celda. Longev* <https://doi.org/10.1155/2018/1826170>

Ragasa C.Y., Soriano G, Torres O B, Ming-Jaw Don, Chien-Chang Shen. (2012). Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy Journal*, 4(32): 32-37

Rajiv Dahiya. (2007). Synthesis, characterization and biological evaluation of a glycine-rich peptide- cherimolacyclopeptide *E.J. Chil. Chem. Soci.*,52: 1224-1229

Raphael T. J., Kuttan G., (2003). Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. *Phytomedicine*; 10: 483-489.

Reed JC. (1998) Molecular biology of chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Oncol*; 25: 11-18.

Ríos, M. Y., Castrejón, F., Robledo, N., León, I., Rojas, G. and Navarro, V. (2003). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). *Rev. la Soc. Quim. Mex.* 47, 139–142

Rivera J.O., Loya A.M., Ceballos R. (2013). Use of Herbal Medicines and Implications for Conventional Drug Therapy *Medical Sciences Altern Integ Med*, 2:6

Robak T. (2005) Therapy of chronic lymphocytic leukemia with purine analogs and monoclonal antibodies. *Transfus Apher Sci*;32(1):33-44

Rodriguez Diaz Regañon, Inmaculada (2015) Neoplasias hematológicas. Tratado de geriatría para residentes, cap. 65. Ed: Sociedad española de geriatría y gerontología. Madrid, España. ISBN: 84-689-8949-5



Rodriguez J., Astudillo L., Schemeda G., (2003). Oleanolic acid promotes healing of acetic acid induced chronic gastric lesions in rats. *Pharmacological Research*; 48: 291-294.

Roja Rani A., Venkatesh K., Chakrapani P., Arunjyothi B., Amareshwari P., Saraswathi S. Indian. (2011). Medicinal plant *Annona cherimola*, *Erythina indica*, *Gymnema* and *Andrographis* species. The best cure for diabetes. "nd Whord Congress on bioavailability and bioequivalence: Pharmaceutical 23-26

Rojas Crespo J.S. (2019) Medicina Tradicional y su impacto en la salud Pública. DOI: 10.13140/RG.2.2.31834.59841 <https://www.researchgate.net/publication/330277328> (Recuperado 18-03-19)

Ruiz Hidalgo J., Di Toto Blessing L., Arrighi F., Bardón A., Vera N., Neske A. (2014). Acetogenina anonáceas de *Annona squamosa* procedente de brasil 30° Congreso Argentina de Química. Anales de la Asociación Química Argetnina AAQAE 095-196 <https://www.aqa.org.ar/pdf101/cd/Qca.Organica/3-086.pdf>

Saikia S., Mahnot N.K., Mahanta C.L. (2016). Phytochemical content and antioxidant activities of thirteen fruits of Assam, India. *Food Bioscience* 13: 15–20.

Sánchez Segura M.C., Marsán Suárez V., Socarrás Ferrer B.B. y Martínez Machado M. (2004). Leucemia linfoide crónica - B. Aspectos inmunitarios y moleculares. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 20(1)

Sanjinés A., A.; Ilgaard, B.; Balslev, H., (2006). Frutos comestibles (en línea). Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz - Bolivia. No. 329-346. Consultado abril 2017. Disponible en <http://www.beisa.dk/Publications/.../Capitulo%2021.pdf>

Santos A. F.; Santana A. E. G. (2001) Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine*; 8(2), 115–120.



Santos Dias, D.J. (2017) Nanopartículas poliméricas contendo clorambucil funcionalizadas com peptídeo direcionador: produção, caracterização e ensaios biológicos com células tumorais. Tesis doctoral. Universidad de Brasilia. Brasilia, Brasil.

Sapra P., Allen T.M. (2003). Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res*; 42:439e62

Sapra P., Tyagi P., Allen T.M. (2005) Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. *Curr Drug Deliv*; 2:369e81

Schalit N., (2020) Nanotecnología para evitar que las infecciones se conviertan en pandemia. The conversation. Imagen recuperada junio 2020 <https://images.theconversation.com/files/323571/original/file-20200327-146719-1v4k5.jpg?ixlib=rb-1.1.0&q=45&auto=format&w=754&fit=clip>

Schinella G., Aquila S., Dade M., Giner R., del Carmen Recio M., Spegazzini E., Buschiazzo P., Tournier H., Ríos J. L. (2008). Anti-Inflammatory and Apoptotic Activities of Pomolic Acid Isolated from *Cecropia pachystachya*. *PlantaMed*; 74:215–222

Schlie-Guzmán, M. A., González-Esquinca, A. R., & Luna-Cazáres, L. M. (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 8, 245-257.

Schwabe, (2017) Recuperado de internet noviembre 2019. *Pharmaceuticals Fitoterapia*. <http://www.schwabe.es/fitoterapia.html>

Scull Lizama, R; Miranda Martinez, M y Infante Lantigua, Raúl E. (1998) Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río: Estudio etnobotánico. I. *Rev Cubana Farm*;32(1): 57-62. ISSN 1561-2988.

Sepúlveda-Jiménez, G. Porta-Ducoing, H. Rocha-Sosa, M. (2004). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (3):355-363.



Sghaier BM, Pagano A, Mousslim M, Ammari Y, Kovacic H, Luis J. (2016) Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomed Pharmacother*; 84:1972-8.

Skalicka-Woźniak, K., Głowniak, K. (2008). Quantitative Analysis of Phenolic Acids in Extracts Obtained from the Fruits of *Peucedanum alsaticum* L. and *Peucedanum cervaria* (L.) Lap. *Chroma* 68, 85. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0671-x>

Skipper HE, Schabel FM, Wilcox WS. (1964) Experimental evaluation of potential anticancer agents. On the criteria and kinetic associated with curability of experimental leukaemia. *Cancer Chemother Rep*; 35: 1-9.

Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2018
<https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-cronica/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-por-etapas.html>

Sohn K.H., Lee H.Y., Chung H.Y., Young H.S., Yi S.Y., Kim K.W., (1995). Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Letter*; 94: 213-218.

Solares-Pascasio J.I., Calzada F. y Olivares I.M. (2013) Actividad antidiabética de la *Annona cherimola* Mill. (annonaceae) en ratas con diabetes mellitus tipo 2. *Silae XXII*.
Costa Rica recuperado julio 2020.
<http://kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/14833/13147-21972-1-SM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Somova L.I., Shode F.O., Ramnanan P., Nadar A., (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africa* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*; 84: 299-305.

Sun S., Liu J., Zhou N., Zhu W., Dou Q. P., and Zhou K., (2016). "Isolation of three new annonaceous acetogenins from graviola fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 26, (17): 4382–4385



Torres M.P., Rachagani S., Purohit V. et al., (2012). “Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism,” *Cancer Letters*; 323 (1), 29–40.

Ugandhar Raju D, Sudhakar Babu K, Raghavendra H G, Sridhar C, Suresh Kumar S V, Udaya Sree K and Trimurthulu Golakoti (2013). Phytochemical constituents, anti-inflammatory and analgesic effects of methanol extract of leaves of *Annona cherimola*. *Pharmacie Globale (IJCP)* 2 (04): 1-6

Valdespino-Gómez V.M. (2014) Leucemia linfocítica crónica de linfocitos B: un modelo personalizado de valoración clínica y molecular. *Hematol Mex.* 15:103-121.

Valencia, R.; Balsev, H. y Miño, G. G., (1994) High tree alpha diversity in Amazonian Ecuador. *Biodiversity and Conservation*, vol. 3, p. 21-28. 35.

Van Der Velden V.H., te Marvelde J.G., Hoogeveen P.G., Bernstein I.D., Houtsmuller A.B., Berger M.S., van Dongen J.J. (2001). Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood*; 97(10):3197-204

Vicent MJ & Duncan R. (2005) Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol*; 24: 39-47

Vieira, F. (2011). Taninos e saponinas. Seminários Aplicados, Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Vogler B. and Setzer W.N. (2006) Characterization of Natural Products En: Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs. Cap 9. Edited by *Iqbal Ahmad, Farrukh Aqil, and Mohammad Owais*

Wagner H. y Bladt S. (1996) Plant Drug Analysis. Ed *Spring. Verlag*. Berlin Alemania

Waksmundzka Monika -Hajnos, Joseph Sherma, and Teresa Kowalska (2008) “Overview of the Field of TLC in phytochemistry”



Walker D.R. (2015). Report on the regulation of herbal medicines and practitioners
<http://www.dcscience.net>

Willis M, Forssen E. (1998). Ligand-targeted liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*;29: 249e71

Woo D., Fotopoulos, S. S., Mac Laughlin, J. L. (1999) Annocherin (2,4)-Cis-and trans-annocherinones. *J. Nat. Prod.* 62: 1250-1255

Yajid A.I., H.S., Kai Wong M.P., and Wan Zain W.Z. (2018). Potential Benefits of *Annona muricata* in Combating Cancer: A Review *Malays J Med Sci.*; 25(1): 5–15

Yoshikawa M, Matsuda H, (2000). Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs. *Biofactors*;13, 231-237.

Zafra-Polo, M. C.; González, M. C.; Estornell, E.; Sahpaz, S.; Cortes, D. (1996). Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry* 42 (2): 253-271. doi:10.1016/0031-9422(95)00836-5

Zhang P., Hongmei L.i., Chen D., Juhua N.I., Kang Y., Wang S., (2007). Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cell through caspase activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage. *Acta biochimica et biophysica sinica*; 39(10):803-809.

Zhang Y., Li J. X., Zhao J., Wang S. Z., Pan Y., Tanaka K., Kadota S., (2005). Synthesis and activity of oleanolic acid derivatives, a novel class of inhibitors of osteoclast formation. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*;15 (6):1625-1632.

Zhao P., Chao Qia C., Wanga G., Daia X., Houb X. (2015). Enrichment and purification of total flavonoids from Cortex *Juglandis mandshuricae* extracts and their suppressive effect on carbontetrachloride-induced hepatic injury in Mice *J. Chromatogr. B* 1007; 8–17



Zhi Zeng and Jiuwei Teng (2007) Application of Chromatographic Fingerprint to Quality Control for *Clematis chinensis*. *Natural Products*; 177-187.
https://doi.org/10.1142/9789812707444_0016

Zhu Y.M., Shen J.K., Wang H.K., Cosentino L.M., Lee K.H., (2001). Synthesis and Anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 11: 3115-3118.

10. Abreviaturas

CCD o TLC: Cromatografía en capa fina

FInR: Fludarabina no resistente

FIR: Fludarabina resistente

FNA: Farmacopea Nacional Argentina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

Lipo-CD20-Blanco Liposoma blanco marcado con CD20

Lipo-CD20-Chiri Liposoma marcado con CD20 y extracto de infusión liofilizada de “Chirimoya”

Lipo-CD20-RD Liposoma CD20 Rodamina

Lipo-CD20-RD Liposoma CD20 Rodamina

Lipo-RD Liposoma- Rodamina

LLC-B: Leucemia Linfática Crónica de células B

LLC: Leucemia Linfática Crónica

NLP: nanoliposoma

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica pacientes sanos

PBS: Buffer fosfatos salino

RPMI: Medio de cultivo Roswell II Park Cancer Institute

PEG: Polietilenglicol

PLGA Poly-lactico-glicolic Acid

RD: Rodamina

SFB: Suero fetal bovino

CUCAIBA: Centro único de coordinación de Ablación e Implantes de la Provincia de Buenos Aires



UNLP: Universidad Nacional de La Plata



11. Participaciones en Congresos y Publicaciones

11.1. XVII Congreso Federación Farmacéutica Sudamericana FEFAS.

Ecuador. Quito. 9-11 octubre 2014

Trabajo presentado: "Micrografía foliar y perfiles cromatográficos de compuestos polifenólicos presentes en *Annona cherimola* Mill. "Chirimoya" (Annonaceae)." Haag G.O. del Valle, M.E., Ramos, P. Rosella, M.A.

Características micrográficas, perfil cromatográfico y análisis del contenido de flavonoides de *Annona cherimola* "Chirimoya" (Annonaceae).

HAAG G.O.2;3; DEL VALLE, M.E.1, 2; ROSELLA, M.A.:1, 2

1Maestría baño Plantas Medicinales, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

2Cátedras de Farmacobotánica y Farmacognosia, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Argentina, CP 1900.

3Cátedras de Farmacología, Facultad de Ciencias Medicas, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 120, La Plata, Argentina, CP 1900

Palabras clave: *Annona cherimola*, micrografía foliar, flavonoides.

Introducción:

Las hojas de Annona cherimola se utiliza en la medicina tradicional para la diarrea; golpes o torceduras(antiinflamatorio) y para el cáncer por su parecido con la "graviola"(pertenecen a la misma familia). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar la micrografía y el perfil cromatográfico de las hojas a fin de establecer identidad y poder detectar la presencia de compuestos que podría avalar sus usos en la medicina tradicional.

Material y Métodos:

Las hojas se recolectaron provincia de Tucumán, Argentina. La identificación botánica la realizó la Dra. María Rosella. Estudios anatómicos se realizaron con la técnica diafanización de Dizeo de Strittmatter (1973). Las hojas se tiñeron con safranina alcohólica al 80% y se montaron en gelatina de glicerina. Se hicieron observaciones con microscopio óptico. Se realizó una extracción metanólica, con partición líquido líquido con n-butanol; cloroformo, agua. Dichos extractos se analizaron utilizando Shinoda y Rosenheim reactivos, soluciones de etanol de Cl_3Al , Cl_3Fe , ácido bórico y NaOH. Se realizó cromatografía en capa fina TLC en fases móviles apropiadas para polifenoles (Wagner y Bladt, 1995) EtOAc/AcOH/ForH/H₂O (100:11:11:26) y EtOAc/MetOH/H₂O (100:13,5:10). Los compuestos de referencia: solución metanólica (1%) de rutina, isoquercetina y ácido caféico. Detección con reactivo de productos naturales luz UV366nm.

Resultados:

Hoja en se observan mucha cantidad de pelos uniseriados y en la cara aboxial, células pétreas y estomas paracíticos. Ensayos fitoquímicos establecieron la presencia de flavonoides en los extractos metanólicos n-butanol y acuoso. Resultados de TLC habían demostrado la presencia de rutina, isoquercetina y ácido caféico.

Conclusiones:

Hojas *Annona cherimola* se pueden identificar microscópicamente por sus características anatómicas y su perfil cromatográfico. Estos caracteres de diagnósticos constituyen la base para un futuro control de calidad. La Chirimoya se suele usar y comercializar sus hojas con alusión a su actividad para la cura del cáncer. Uno de los posibles mecanismos podría deberse al poder antioxidante que contienen dichos flavonoides ya que su actividad contra radicales libres podría estar relacionada al menos en parte a la presencia de rutina isoquercetina y ácido caféico.

Agradecimientos: Subvenciones 11/X582, SECYT-UNLP

Referencias bibliográficas:

DIZEO DE STRITTMATTER, C. 1973. Nueva Técnica de diafanización. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 15:126-129.

WAGNER, H. y S. Bladt. 1995. Análisis de Medicamentos de Plantas. 2^a ed. Springer-Verlag. Berlín, Heidelberg, Nueva York.



Colegio de Químicos, Bioquímicos y
Farmacéuticos de Pichincha

PRESIDENTA

Yolanda Zapata B.

VICEPRESIDENTA

María del C. Pasqual C.

SECRETARIA

Fanny Sánchez R.

PROSECRETARIA

Reina López G.

TESORERA

Cecilia Izuriaga G.

VOCAL PRINCIPALES

Janeth Montalvo J.
Amparo Forzuana B.
Diego Hidalgo L.
Ana María Olivado C.
María Elena Bernal G.

VOCAL ALTERNOS

Iván Cardenas M.
César Masache G.
Fernando Vargas M.
Dolores Samaniego G.
Cecilia González V.

TRIBUNAL DE HONOR

Elsa Ibarra T.
L. Antonieta Piedra C.
Osvaldo Lujánaga F.

ALTERNOS


Cecilia Gómez M.
Héctor Abill B.
Ana Lucía Cobos C.


CERTIFICADO

El Comité Organizador y Científico del XVII CONGRESO INTERNACIONAL DE FEFAS Y III DEL COLEGIO DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS Y BIOQUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE PICHINCHA, certifica que:

GRISELDA HAAG participó en la modalidad PÓSTERS en el marco de este evento, en el área de Tecnología Farmacéutica.

Desarrollado en Quito, del 9 al 11 de octubre del 2014


QE. Yolanda Zapata B.
PRESIDENTA
COMITÉ ORGANIZADOR


Dra. Janeth Montalvo J.
PRESIDENTA
COMISIÓN CIENTÍFICA



11.2. XXIV SILAE Congress and II Internacional Congress on Integrativen Medicine”

8 – 12 septiembre 2015 Congreso Republica Dominicana - Punta Cana.

- Trabajo presentado: “Phytochemical screening and chromatographic profile of flavonoids and terpenoids from *Annona cherimola* Mill “Chirimoya” (Annonaceae)”

G.O. Haag M.E. del Valle, E. Ruiz, S Scioli Montoto, M.A. Rosella G.H. Marin G. Roque E. Mansilla “

Phytochemical screening and chromatographic profile of flavonoids and terpenoids from *Annona cherimola* Mill "Chirimoya" (Annonaceae).

G.O. Haag^{a,b}, M.E. del Valle^a, E. Ruiz^c, S. Sciolo Montoto^c, M.A Rosella^a, G.H. Marin^b, G. Roque^d, E. Mansilla^d

- Cátedras de Farmacobotánica y Farmacognosia, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Argentina, CP 1900.
- Cátedras de Farmacología, Facultad de Ciencias Medicas, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 120, La Plata, Argentina, CP 1900
- Cátedra de Ensayos y Valoración de Medicamentos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Argentina, CP 1900.
- Servicio de Ingeniería Tisular, Medicina Regenerativa y Terapias Celulares, CUCAIBA, Ministerio de Salud Provincia de Buenos Aires, Argentina.
(griseldahaag@gmail.com tel 54-0221-15-317-7477)

Annona cherimola's leaves are traditionally used for the treatments of diarrhea, punches or trauma and cancer, just as “Graviola” (*Annona muricata* L, Anonaceae).

The aims of this work is the phytochemical screening and chromatographic analysis as well as to test the ability of extracts of "chirimoya" to induce apoptosis of B-CLL cells *in vitro*.

The leaves of *A.cherimola* were collected in Tucumán, Argentina. Both, methanol and dichloromethane extracts were carried out.

For methanol extract, flavonoids reactions and thin layer chromatography (TLC) on mobile phases for polyphenols against reference substances were performed.

For dichloromethane extract characterization reactions of terpenoids and TLC against reference substances were performed.

The presence of several compounds were confirmed on a Dionex Ultimate 3000 UHPLC.

B-CLL cells chlorambucil were separated and cultivated in the presence of extract. Apoptosis analysis by flow cytometry measuring annexin V positive cells. (GH Marin, 2010).

Phytochemical trials established the presence of flavonoids and terpenes. Different TLC's systems showed the presence of rutine, isoquercetin and caffeic acid in methanol extract, and ursolic acid and oleanolic acid in dichloromethane extract. All of these compounds were confirmed by UHPLC.

Apoptosis analysis confirmed the apoptotic properties of “Chirimoya” on B-CLL cells. The evidence suggests a repertoire potentially effective treatment for B-CLL. This leaves extract might have promising therapy strategies in treating B-CLL.

Remains to confirm if their therapeutic activity may be related to a synergism between acetogenins and the compounds identified.

Bibliography:

- G.H. Marin, E. Mansilla. 2010 Apoptosis induced by *Magnolia grandiflora* extract in chlorambucil-resistant B-chronic lymphocytic leukemia cells. Journal of Cancer Research and Therapeutics. Volume 6 - Issue 4
- Schlie-Guzmán, M. A., González-Esquinca, A. R., & Luna-Cazáres, L. M. (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas



- celulares neoplásicas. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 8, 245-257.
- Quispe, A., Zavala, D., & Posso, M. (2007). Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *CIMEL*, 12(1), 19-22.
 - SALINAS A, Dorka I et al. Inhibición del tránsito intestinal por el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L (guanábana) en ratones. *Ciencia e Investigación*, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 9-14, may. 2014. ISSN 1609-9044.
 - WAGNER, H. y S. Bladt. 1995. *Análisis de Medicamentos de Plantas*. 2^a ed. Springer-Verlag. Berlín, Heidelberg, Nueva York.



XXIV SILAE CONGRESS
II INTERNATIONAL CONGRESS ON
INTEGRATIVE MEDICINE



CERTIFICATE OF PRESENTATION

Title: Phytochemical screening and chromatographic profile of flavonoids and terpenoids from *Annona cherimola* Mill "Chirimoya" (Annonaceae).

Authors: G.O. Haag, M.E. del Valle, E. Ruiz, S. Sciolo Montoto, M.A Rosella, G.H. Marin, G. Roque, and E. Mansilla

has been presented at the XXIV SILAE Congress and II International Congress on Integrative Medicine

Plenary Lecture Session Lecture Poster

Punta Cana, 8 - 12 September, 2013
Hotel Melia Caribe Tropical




Dr. Martha Butler de Lister
Scientific Coordinator
Integrative Medicine


Dr. Jose O. Terrero
Scientific Coordinator
SILAE


Dr. Alberto J. Nuñez Sellés
Executive Secretary



11.3. XXIII Congreso Farmacéutico Argentino. COFA Y I Jornadas Rionegrinas de psicofármacos

Bariloche 30/11 al 2/12 del 2017

Evaluación de la Actividad de Extractos de *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) encapsulado en Liposomas en Leucemia Linfática Crónica. Haag, G.O.; Alonso, S.; del Valle, M.E., Masilla, E.; Marin, G.H.; Montanari, J.A.; Rosella, M.A.

<http://congresos.cofa.org.ar/wp-content/uploads/2017/12/Indice-y-Resumenes-de-Trabajos-Cientificos-Final-27-de-nov-FINAL.pdf>



I JORNADAS RIONEGRINAS DE PSICOFÁRMACOS

SERVICIOS FARMACÉUTICOS PARA LA SALUD DE LA COMUNIDAD
DE LA TEORÍA A LA ACCIÓN

www.congresos.cofa.org.ar



I&D44

Evaluación de la Actividad de Extractos de *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) encapsulado en Liposomas en Leucemia Linfática Crónica.

Rosella, María Adelaida - marirosella@yahoo.com.ar

HAAG, GRISELDA O.; ALONSO, S.d.V.; DEL VALLE, MARIA ELENA; MANSILLA, E.; MARIN, GUSTAVO H.; MONTANARI, J.A.; ROSELLA, MARIA ADELAIDA

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

Lugar de Trabajo: Farmacobotánica y Farmacognosia, FCE-UNLP; Farmacología, FCM-UNLP; CUCAIBA-MSBA; GBeyB-IMBICE-CONICET

Introducción: Las hojas de *A.cherimola* se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de la diarrea, los traumatismos y el cáncer especialmente por su parecido con la "Graviola".

Objetivos: Testear in vitro la acción antitumoral de extractos y nanopartículas de *A.cherimola* sobre células de B-CLL intentando mejorar la penetración, selectividad y potencia antineoplásica de dichos extractos en las células leucémicas.

Metodología: Se realizó una decocción y fraccionamiento de *A.cherimola*. Se probó la capacidad de dichos extractos de inducir apoptosis in vitro sobre células B-CLL cultivadas 24, 48 y 72 hs con concentraciones decrecientes en RPMI1640. El grado de apoptosis y muerte celular se comprobó mediante uso de colorantes vitales y citometría de flujo.

Los extractos más activos se encapsularon en liposomas de fosfatidilcolina de soja, tamaño 250nm marcados con Rhodamina, por la técnica de formación de films, resuspensión, sonicación y pasaje por extrusor (J. Montanari, 2013). El tamaño fue determinado por dispersión de luz dinámica.

Los liposomas con extracto fueron probados sobre las células B-CLL nuevamente. Realizando mediciones de penetración con microscopio de fluorescencia confocal a 5, 30 y 60 minutos. se aplicaron las mismas técnicas para estimar los niveles de apoptosis y muerte celular.

Resultados y Discusión: Se testearon con células de B-CLL siete extractos de *A.cherimola*: 1. Acuoso infusión total y fracciones de 2. cloroformo, 3. n-butanol y 4. metanol, 5. acuoso remanente, 6. acetato de etilo, 7. cloroformo 2.

La mayor actividad pro-apoptótica ocurrió luego de 24 hs de cultivo por acción de los extractos: 1 92%; 2 80 % y 3 60 %.

Las nanopartículas 1, 2 y 3 cargadas con los extractos en una concentración de 1/320 mostraron porcentajes de apoptosis de células tumorales similares a las obtenidas con extractos en suspensión a 24 hs de cultivo. El extracto número 1 administrado en forma de nanopartícula fue el único que demostró niveles de apoptosis en células de B-CLL de hasta el 90% aún en concentraciones de 1/640. Los linfocitos normales controles mostraron el mismo porcentaje de apoptosis que cuando se usaron los extractos en suspensión.

Conclusiones: El extracto acuoso de *A.cherimola* es potencialmente efectivo para el tratamiento de B-CLL. Los linfocitos normales no son afectados significativamente por estos extractos sugiriendo un alto nivel de selectividad y seguridad biológica de los mismos.



Evaluación de la Actividad de Extractos de *Annona cherimola* Mill. (*Annonaceae*) encapsulado en Liposomas en Leucemia Linfática Crónica.

Haag, Griselda O.; Del Valle, Maria Elena; Montanari, J.A.; Alonso, S.D.V.; Rosella, Maria Adelaida; Marin, Gustavo H.; Mansilla, E.

ha participado en carácter de **AUTOR/A DE TRABAJO CIENTÍFICO** en el **23/Congreso Farmacéutico Argentino "Servicios Farmacéuticos para la Salud de la Comunidad: De la teoría a la acción"** y las **Jornadas Rionegrinas de Psicofarmacos**, realizadas del 30 de Noviembre al 2 de Diciembre de 2017 en San Carlos de Bariloche, Río Negro.

Farm. Marcelo Yop
Presidente
Colegio de Farmacéuticos
de Río Negro

Dr. Raúl Mascaro
Secretario
Confederación
Farmacéutica Argentina

Farm. María Isabel Reinoso
Presidente
Confederación
Farmacéutica Argentina

15044



11.4. Exposición en la Reunión Científica SAFyT-AMA mayo 2017

y publicado en el boletín en la pág. Web de la Asociación Médica Argentina:
www.ama-ed.org.ar Publicitado en el Boletín Informativo AMA Mayo -2016.
Considerado de Interés Legislativo

ISSN: 2362-4345

	<p align="center">- Asociación Médica Argentina - - Sociedad Argentina de Farmacología y Terapéutica - Santa Fe 1171 - 1059 Buenos Aires, Argentina Tel.-Fax: (54-11) 4811-1633/3850-4814- 0634/2182 4815-8893 - Pag. Web: www.ama-med.org.ar E-mail: amadata@mar.com.ar, farmacomarin@yahoo.com.ar; galcr1@yahoo.com.ar; aevitale@ciudad.com.ar</p>	
---	--	---

REVISTA CIENTIFICA S.A.F.yT.-A.M.A., N° 77, VOL.I, AÑO 2017.

Reunión Científica correspondiente a la SAFyT – AMA del 4 de Mayo 2017.

SESION CIENTÍFICA:

Revista SAFyT-AMA, N° 77, Vol.I, Año 2017.

Presidente: Prof. Dr. Alfredo Rafael Umberto Vitale
Secretario Ejecutivo: Prof. Dr. Gustavo Horacio Marin

Reunión Científica correspondiente a la SAFyT – AMA del 4 de Mayo 2017.

SESION CIENTÍFICA: Presentación de Trabajos Científicos

- 1.- **DISTANCIA A LAS LÍNEAS DE ALTA TENSIÓN COMO ESTIMADOR DE RIESGO DE MORTALIDAD POR NEOPLASIAS MAMARIAS** *Paula Risso, Betina Zucchini, Gustavo H. Marin. CIC-Universidad Nacional de La Plata-CONICET* pág 6

- 2.- **INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II PARA EL TRATAMIENTO ANTIHIPERTENSIVO EN PACIENTES DIABÉTICOS BASES PARA UNA SELECCIÓN RACIONAL** *Gustavo H. Marin, Lupe Marin, Jorge Errecalde. Universidad Nacional de La Plata - CONICET* pág 14

3. **DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS, TERPENICOS Y PERFIL CROMATOGRÁFICO EN DISTINTOS SISTEMAS DE ANNONA CHERIMOLA MILL. "CHIRIMOYA" (ANNONACEAE).** *Haag, G.O.^{1,2}; Del Valle, M.E¹; Scioli Montoto, S.³; Ruiz, M.E.³; Rosella, M.A.¹; Marin G.² Universidad Nacional de La Plata - CONICET* pág 17



11.5. Revista Científica S.A.F.yT.-A.M.A.,

N° 77, vol.I, año 2017. Revista Safyt-ama, n° 77, vol.I, año 2017 ISSN: 2362-4345

<http://www.safyt.org/revista-n-77/>

“Determinación de compuestos polifenólicos, terpenicos y perfil cromatográfico en distintos sistemas de Annona cherimola mill. “Chirimoya” (Annonaceae)”. Haag, G.O.; del Valle, M.E ; Scioli Montoto, S.; Ruiz, M.E.; Rosella, M.A.; Marin G. Universidad Nacional de La Plata – Conicet.

ISSN: 2362-4345

	<p align="center">- Asociación Médica Argentina - - Sociedad Argentina de Farmacología y Terapéutica - Santa Fe 1171 - 1059 Buenos Aires, Argentina Tel.-Fax: (54-11) 4811-1633/3850-4814- 0634/2182 4815-8893 - Pag. Web: www.ama-med.org.ar E-mail: amadatamar.com.ar, farmacomarin@yahoo.com.ar; galcr1@yahoo.com.ar; aevitale@ciudad.com.ar</p>	
---	--	---

REVISTA CIENTÍFICA SAFyT-AMA, N° 77, Vol. I, Año 2017

4 de Mayo de 2017

ISSN: 2362-4345

Publicado en la pág. Web de la Asociación Médica Argentina: www.ama-ed.org.ar

Publicitado en el Boletín Informativo AMA Mayo -2016. Considerado de Interés Legislativo

COMISIÓN DIRECTIVA

PRESIDENTE: Prof. Dr. Alfredo Rafael Umberto Vitale

SECRETARIO EJECUTIVO: Prof. Dr. Gustavo H. Marin

VICE-PRESIDENTE: Prof. Dra. Cristina Volmer

VICE-PRESIDENTE 2DO: Prof. Dr. Ricardo Cerdá

PRESIDENTES HONORARIOS Y TRIBUNAL DE HONOR:

Prof. Consulto Dr. Abraham Lemberg

Prof. Dr. Académico Amilcar Argüelles (†)

Prof. Dr. Académico Ricardo Rosendo Rodríguez (†)

TESOREROS:

Prof. Dr. Vicente R. Ciancio; Prof. Dr. Alberto Re

VOCALES:

Prof. Dr. Miguel A. Paladino; Prof. Dr. Carlos E. Klein; Prof. Dr. Juan C. Cervellino;
Prof. Dr. Eduardo Mansilla; Prof. Dr. Ricardo Santilli; Dr. Marcelo Almada; Dr. Daniel
Goldenberg; Dra. Diana Fligman; Dr. Jorge Efrain Salvioli; Dr. Agustín Capurro; Dra.
Marcela Varela; Dr. Julio Ciappa; Dr. Walter Espeche; Dr. Adrian Salas; Dr. Alejandro
Púncense; Dr. Juan Ferreira Prof. Dr. Daniel De Antoni; Dra. Marcela Laura Dalieri.

ASESOR JURIDICO:

Dr. Leopoldo Houssay

COMITÉ DE PUBLICACIONES DE REVISTA CIENTÍFICA S.A.F.yT.-A.M.A

DIRECTORES:

Prof. Dr. Tetra-Académico Jorge Errecalde; Prof. Dr. Osvaldo H. Hugo Farina

EDITORES:

Prof. Dr. Gustavo H. Marin; Dr. Cristian Galeano

DIRECTORES DE RELACIONES INSTITUCIONALES Y DISTRIBUCIÓN:

Prof. Dra. Nora Mestorino; Prof. Dr. Daniel Corsiglia; Dr. Roberto Pardo

SECRETARIOS DE REDACCIÓN Dr. Eliseo H. Ferrari; Dr. Sergio Avalos



**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS, TERPENICOS Y PERFIL
CROMATOGRÁFICO EN DISTINTOS SISTEMAS DE ANNONA CHERIMOLA MILL.
"CHIRIMOYA" (ANNONACEAE).**

**DETERMINATION OF POLYPHENOLIC, TERPENIC AND CHROMATOGRAPHIC
PROFILES IN DIFFERENT SYSTEMS OF ANNONA CHERIMOLA MILL.
"CHIRIMOYA" (ANNONACEAE).**

Griselda Haag, GO.^{1,2}; M.E Del Valle, ¹; S Scioli Montoto,³; M.E Ruiz,³; M.A Rosella,¹;
Gustavo H. Marin ²

1 Cátedras de Farmacobotánica y Farmacognosia, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Argentina

2 Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 120, La Plata, Argentina, CP 1900

3 Cátedras de Ensayo y Valoración de Medicamentos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Argentina

Abstract

The objective of the present work was to extract, isolate, characterize and identify, from the leaves of A. cherimola, polyphenols and triterpenes steroids that could support their uses in traditional medicine; As well as to establish chromatographic profiles for the extracts of this species in order to establish the identity and the quality control of the same. The results found allow to determine the presence of flavonoids and other polyphenolic compounds in the methanolic extracts n-butanol and aqueous; As well as terpenoids in the chloroform extract. TLC and HPLC-DAD against controls show that flavonoids and polyphenolic compounds correspond to rutin, isoquercetin and caffeic acid; While among the terpenes were ursolic and oleanolic acids. Given the aforementioned antecedents, it is reasonable to argue that traditional uses of cherimoya could be related to the activity and / or synergy of some of the flavonoids and polyphenols (rutin, isoquercetin, caffeic acid) and terpenoids (ursolic and oleanolic acids) found .

Palabras Clave: cherimola, chirimoya, extracto

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue el de extraer, aislar, caracterizar e identificar, a partir de las hojas de A. cherimola, polifenoles y triterpenos esteroides que pudieran avalar sus usos en la medicina tradicional; así como establecer perfiles cromatográficos para los extractos de dicha especie a fin de establecer la identidad y el control de calidad de la misma. Los resultados hallados permiten determinar la presencia de flavonoides y otros compuestos polifenólicos en los extractos metanólicos n-butanol y acuoso; así como terpenoides en el extracto clorofórmico. La TLC y HPLC-DAD contra testigos muestra que los flavonoides y compuestos polifenólicos corresponden a rutina, isoquercetina y ácido caféico; en tanto que entre los terpenos se encontraron los ácidos ursólico y oleanólico. Dados los antecedentes ya mencionados, es razonable plantear que los usos tradicionales de la chirimoya podrían estar relacionados con la actividad y/o sinergia de algunos de los flavonoides y polifenoles (rutina, isoquercetina, ácido caféico) y terpenoides (ácidos ursólico y oleanólico) hallados.

Key Word: cherimola, chirimoya, extract



INTRODUCCIÓN:

Las plantas son una de las fuentes más importantes de medicamentos. Desde los comienzos de la civilización, la humanidad ha utilizado las plantas medicinales por su valor terapéutico. Fuente de principios activos medicinales durante miles de años, un gran número de principios activos que hoy forman parte de medicamentos modernos han sido aislados a partir de fuentes naturales, muchas veces en base al uso tradicional (Rivera et al., 2013; Walker, 2015)

Según la OMS, los sistemas de medicina tradicional siguen desempeñando un papel esencial en el cuidado de la salud. Se calcula que aproximadamente un 80% de la población mundial utiliza las plantas y sus derivados para la atención primaria de salud (OMS, 2000; OMS, 2013).

La "chirimoya", *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) es una especie originaria de América (Safford, 1914). Tradicionalmente, algunas especies del género *Annona* han sido utilizadas en el tratamiento de diversas afecciones entre las que se incluyen distintos tipos de cáncer (Quispe et al., 2006; Ruiz Hidalgo et al., 2014).

Las hojas de *Annona cherimola* se utilizan en la medicina popular para el tratamiento de diarreas, golpes o torceduras, por su acción antiinflamatoria y debido a su proximidad quimio-taxonomica con otra especie de la familia Annonaceae, la "Graviola" o "guanábana" (*Annona muricata* L.), se les atribuye también actividad contra distintos tipos de cáncer, (Quispe et al., 2009)

Los tallos y semillas de *Annona cherimola* poseen compuestos tales como alcaloides, terpenoides, flavonoides, ácidos grasos saturados e insaturados, acetogeninas, (González Vega, 2013) que han demostrado actividad antitumoral. (M. Quispe et al., 2009)

Hasta el momento, las pruebas que se han hecho para validar el uso tradicional de *A. cherimola* se han centrado principalmente en las semillas y frutos, pero muy pocas sobre sus hojas (Lima et al., 2012; González Vega, 2013).

Objetivos:

- Extraer, aislar, caracterizar e identificar, a partir de las hojas de *A. cherimola*, polifenoles y triterpenos esteroides que pudieran avalar sus usos en la medicina tradicional.
- Establecer perfiles cromatográficos para los extractos de *A. cherimola*, a fin de establecer identidad y control de calidad de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas se recolectaron en Argentina, provincia de Tucumán durante el 2013.

La determinación la realizó la Dra. María Rosella. Un ejemplar se depositó en el Museo "Carlos Spegazzini" de la Facultad de Cs. Exactas UNLP bajo el registro LPE1165.

Polifenoles

Extracción:

Las hojas de *A. cherimola* (15g) fueron extraídas por maceración con metanol durante 48 hs. El extracto obtenido fue evaporado a presión reducida, y posteriormente se efectuó una partición líquido-líquido con cloroformo y n-butanol quedando un remanente acuoso.

Simultáneamente se realizó una infusión seguida de filtración y liofilización.

Reacciones de caracterización:

Sobre las fracciones clorofórmicas, n-butanólica y acuosa se efectuaron diversas reacciones a fin de investigar la presencia de polifenoles (flavonoides) con los reactivos de Shinoda, Rosenheim, y



soluciones etanólicas al 2% de cloruro de aluminio, cloruro férrico, ácido bórico e hidróxido de sodio. (Dominguez X.A., 1973).

Cromatografía en capa delgada (TLC):

Los extractos obtenidos se cromatografiaron en dos sistemas de solventes adecuados para polifenoles (Wagner y Bladt, 1995), en las siguientes condiciones:

Fase estacionaria: Cromatofolios de silicagel F254, 60 Merck, 0,25 mm.

Fases móviles: Sistema 1: Acetato de Etilo/Acido fórmico/ Ácido acético glacial/ Agua destilada (100:11:11:27) Fase superior y Sistema 2: Ácido acético/ Metanol/ Agua destilada (100:13,5:10).

Revelado: Luz UV de 366 nm, con vapores de amoníaco y Solución de ácido 2-aminoetildifenilbórico y calor (105 °C durante 5 min.)

Siembra: Extractos metanólico, n-butanólico y acuoso de las hojas de *A. cherimola*

Sustancias de referencia: Soluciones metanólicas 1 mg/ml de rutina, isoquercetina y ácido caféico.

HPLC

Los extractos liofilizados fueron resuspendidos en 1 mL de metanol y centrifugados 13000 rpm durante 10 min. A partir del sobrenadante se realizaron diluciones en fase móvil (1:100 para el extracto butanólico y 1:3 para los extractos en agua y metanol) las cuales fueron filtradas a través de una membrana de nylon (0,45 µm) antes de su inyección (20 µl) en el sistema cromatográfico. El equipo empleado fue un Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA) configurado con una bomba de doble gradiente terciario (DGP-3000), un detector de arreglo de diodos DAD-3000 y una columna BDS Hypersil RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm, Thermo Scientific).

La fase móvil consistió en una mezcla tetrahidrofurano: metanol: agua (15:5:85 v/v) cuyo pH se ajustó a 2,5 con ácido fosfórico. Se trabajó a un flujo de 1 ml/min y la detección se realizó a 330 nm.

Compuestos Terpénicos:

Las hojas de *A. cherimola* fueron extraídas mediante una maceración al 20% P/V en cloruro de metileno (primer extracto).

Simultáneamente, se efectuó una decocción al 10% (segundo extracto) seguida de un fraccionamiento en ampolla de decantación con acetato de etilo. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro obteniéndose el "extractivo de acetato de etilo" (tercer extracto).

Sobre los extractos y fracciones obtenidas se practicaron las siguientes reacciones:

Reacciones de caracterización de terpenos: Reacción de Liebermann Bouchard.

Reacciones de caracterización de saponinas: Capacidad Afrógena, Poder emulgente, Reacciones de precipitación con soluciones de hidróxido de calcio, y subacetato de plomo; Reacción de Fehling indirecta. (Dominguez X.A., 1973).

Cromatografía en capa delgada (TLC)

Se determinaron los perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones obtenidos en dos sistemas de solventes, en las siguientes condiciones:

Fase estacionaria Silicagel 60 F254: 0,25 mm (Merck)

Fase móviles: Sistema 1: Tolueno : Acetato de etilo (8:2); Sistema 2: DCM : Metanol (9,5:5).

Detección: anisaldehído sulfúrico y calor a 105° C durante 5 min.

Siembra: Extractos acuoso, ext. DCM y extracto acetato de etilo de las hojas de *A. Cherimola*.



Sustancias de referencia: soluciones metanólicas al 1% de ácido oleanólico y ácido ursólico

RESULTADOS

Los ensayos para flavonoides permitieron establecer la presencia de este grupo fitoquímico en los extractos metanólico, n-butanol y acuoso.

La TLC contra testigos en los dos sistemas de solventes utilizados mostraron la presencia de rutina, isoquercetina y ácido caféico, lo cual fue confirmado por HPLC-UV contra testigos (ver Figuras 3, 4 y 5).

Los ensayos fitoquímicos para terpenos permitieron establecer su presencia en el extracto diclorometano. Las TLC contra testigos en los distintos sistemas de

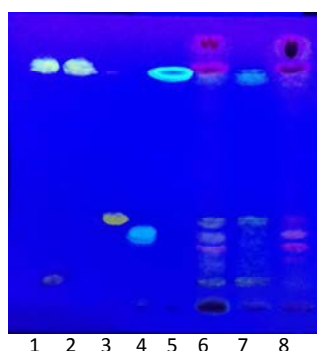
solventes ensayados, demostraron la presencia de ácido ursólico y ácido oleanólico.

Los sistemas cromatográficos ensayados para terpenos, no presentaron buena resolución para el extracto acuoso.

Para los extractos DCM y Acetato de Etilo se determinó la presencia, contra testigos, de ácidos ursólico y oleanólico en ambos sistemas de solventes.

Rf_{Sistema1} ácido oleanólico 0,34; ácido ursólico 0,32

RF_{Sistema2} ácido oleanólico; ácido ursólico ambos juntos 0,61



1 2 3 4 5 6 7 8



1 2 3 4 5 6 7 8 9

1. Rutina Rf:0,38 Vis: Amar UV: Amar Fluor
2. Quercetina Rf:1 Vis: Amar UV: Amar Fluor
3. Isoquercetina Rf:0,52 Vis: Amar UV: Amar Fluor
4. Ac. Clorogénico Rf: 0,47 Vis: incol UV: cel fluor
5. Ac. Caféico: Rf:0,98 Vis: Marr UV: cel fluor
6. Ext. Metanólico Rf:0,38 Vis: Amar UV: Amar Fluor
Rf:0,44 Vis: Amar UV: Rosa Fluor
Rf:0,47 Vis: Amar UV: Rosa Fluor

1. Rutina Rf:0,41 Vis: Amar UV: Amar Fluor
2. Quercetina Rf:0,89 Vis: Amar UV: Amar Fluor
3. Isoquercetina Rf:0,52 Vis: Amar UV: Amar Fluor
4. Ac. Clorogénico Rf: 0,25 Vis: incol UV: cel fluor
5. Ac. Caféico: Rf:0,73 Vis: Marr UV: cel fluor
6. N-Butanol Rf:0,41 Vis: Amar UV: Amar fluor
Rf:0,52 Vis: Amar UV: Amar fluor
Rf:0,73 Vis: marrón UV: cel fluor
7. Ext. Cloroformo

Fig. 1 2. TLC en el S1 EtOAc/MetOH/H₂O (100:13,5:10)

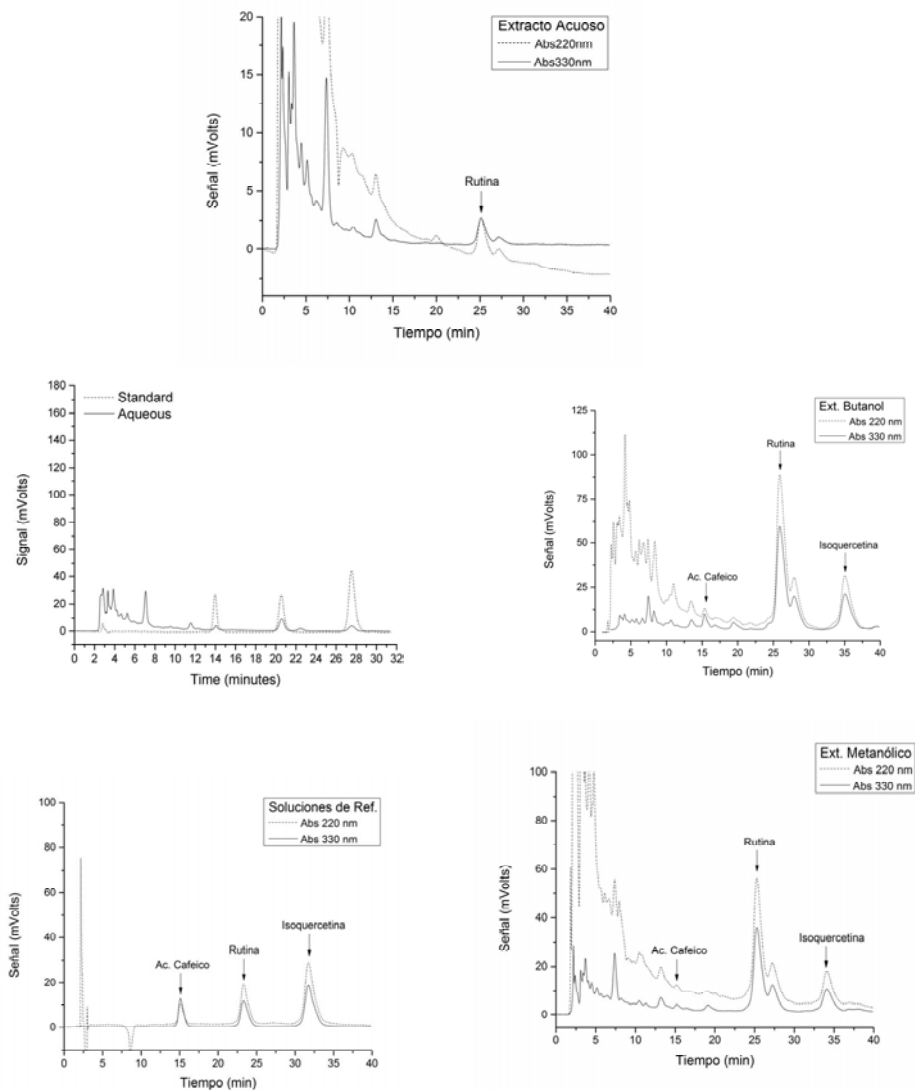


Fig.3. Perfil por HPLC-DAD del extracto acuoso (dilución 1:3). Se pueden observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R=13.95$ min), rutina ($t_R=20.65$ min) e isoquercetina ($t_R=27.8$ min).

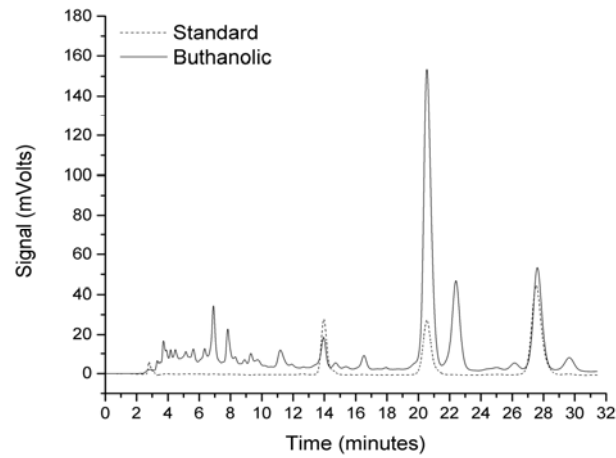


Fig.4. Perfil por HPLC-DAD del extracto butanólico (dilución 1:10). Se pueden observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R=13.95$ min), rutina ($t_R=20.65$ min) e isoquercetina ($t_R=27.8$ min).

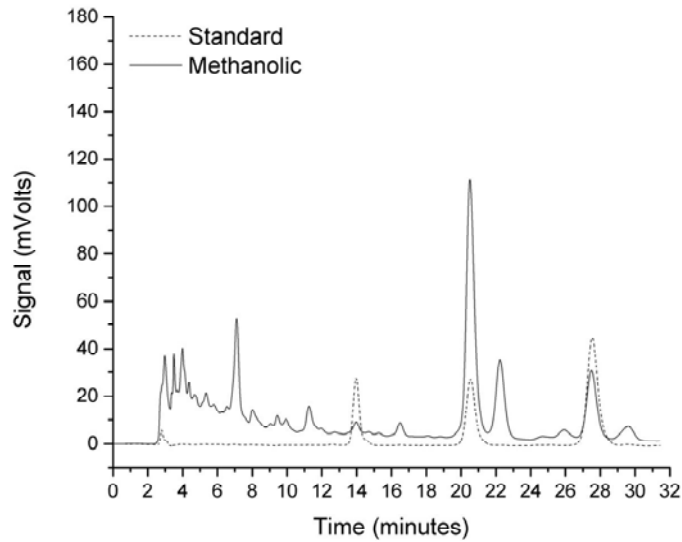


Fig.5. Perfil por HPLC-DAD del extracto metanólico (dilución 1:3). Se pueden observar los picos correspondientes a ácido cafeico ($t_R=13.95$ min), rutina ($t_R=20.65$ min) e isoquercetina ($t_R=27.8$ min).



9. Giménez E., Juan M.E., Calvo-Melià S., Barbosa J., Sanz-Nebota V., Planas JM. 2015. Pentacyclic triterpene in *Olea europaea* L: A simultaneous determination by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1410: 68–75
10. Jeong Hye Gwang, 1999. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride- induced hepatic injury. *Toxicology Letters*. (105) 215-222.
11. Kashiwada Yoshiki, Wang Hui- Kang, Nagao Tsuneatsu, Kitanaka Susumu, Yasuda Ichiro, Fujioka Toshihiro, Yamagishi Takashi, Consentino Mark, Kozuka Mutsuo, Okabe Hikaru, Ikeshiro Yasumasa, Hu Chan-Qi, Yeh Eric, Lee Kuo- Hsiung, 1998. Anti- AIDS Agents. 30. Anti-VIH activity of oleanolic acid, Pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* Vol. 61. Pp. 1090-1095.
12. Kiekow C.J., Figueiró F., Dietrich F., Dalla Vecchia F., Pires E.N.S., Jandrey E.H.F., Gnoatto S.C.B., Salbego C.G., Battastini A.M.O., Gosmann G. 2016. Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating NF-KB nuclear translocation and caspase-3 activation *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 :116–122
13. Lima, L.A.R.S.; Lopes, M.T.P.; Cunha, M.M.; Pimenta, L.P.S.; Boaventura, M.A.D. 2012. Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae) / Evaluation of the cytotoxic activity of seeds of *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae) *Rev. bras. plantas med*;14 (4): 629-634.
14. Liu J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 49. Pp. 57-68.
15. Nelson A.T., Camelio A.M., Claussen K.R., Cho J., Tremmel L, DiGiovanni J, Siegel D. 2015. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 : 4342–4346
16. OMS. 2000. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional, Geneva, Switzerland. 1-80.
17. OMS, 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ediciones de la OMS, Organización Mundial de la Salud, 20 Avenue Appia, 1211 Ginebra 27, Suiza
18. Pérez, G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 22(1):48-57
19. Pineda AD, Salucci M, Lázano R, Madani G, Ferro-Luzzi A. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentos y Nutrición* 13(2): 104 – 111.
20. Raphael T. J., Kuttan G., 2003. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. *Phytomedicine.* 10: 483-489.
21. Rauf A, Uddin G, Siddiqui B.S., Khan H., Shah S.U.A., Hadda T.B., Mabkhot Y.N., Farooq U., Kha A. 2016. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls *Complementary Therapies in Medicine* 25 : 132–138
22. Rodriguez J, Astudillo L, Schemeda G, 2003. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid- induced chronic gastric lesions in rats. *Pharmacological Research.* 48: 291-294.
23. Saikia S., Mahnot N.K., Mahanta C.L. 2016. Phytochemical content and antioxidant activities of thirteen fruits of Assam, India. *Food Bioscience* 13: 15–20.
24. Somova L.I., Shode F.O., Ramnandan P., Nadar A., 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africa* leaves. *Journal of Ethnopharmacology.* 84 : 299-305.
25. Ugandhar Raju D, Sudhakar Babu K, Raghavendra H G, Sridhar C, Suresh Kumar S V, Udaya Sree K and Trimurthulu Golakoti. 2013. Phytochemical constituents, anti-inflammatory and analgesic effects of methanol extract of leaves of *Annona cherimola*. *Pharmacie globale international journal of*

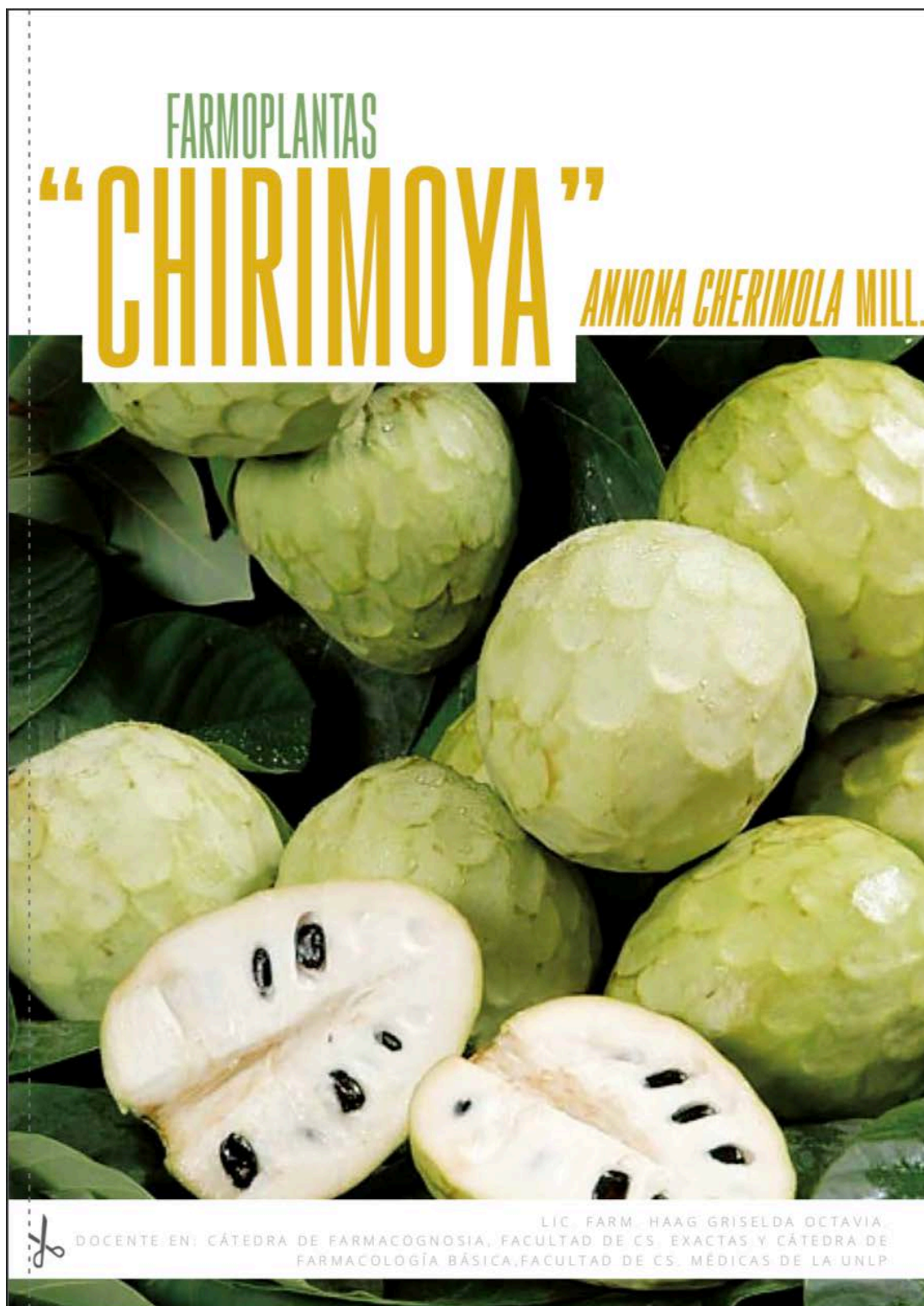


- comprehensive pharmacy*. 04: (02) 1-5. ISSN 0976-8157
26. Wagner, H. y S. Bladt. 1995. *Análisis de Medicamentos de Plantas*. 2^a ed. Springer-Verlag. Berlín, Heidelberg, Nueva York.
27. Pengxia Z., Hongmei L., Dong C., Juhua N., Yuming K., Shuqiu W., 2007. *Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cell through caspase activation and poly (ADP- ribose) polymerase cleavage*. *Acta biochimica et biophysica sinica*. 39 : (10) 803-809.
28. Quispe A., Zavala D, Rojas J., Posso M., Vaisberg A. 2006 *Efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (acetogenina de Annona muricata) en cultivos celulares de cáncer de pulmón*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 23 (4), 265-269
29. Quispe, M. D. Callacondo Riva, A. Vaisberg, D. Zavala, J. Rojas, M. Posso *Acta Med Per* 2009. *Cytotoxic activity of seeds of Annona cherimola in cell cultures of cervical and breast cancer and chronic myeloid leukemia*. 26 (3) 156-161
30. Rivera JO, Loya AM, Ceballos R. 2013. *Use of Herbal Medicines and Implications for Conventional Drug Therapy* *Medical Sciences Altern Integ Med*, 2:6
31. Ruiz Hidalgo J., Di Toto Blessing L., Arrighi F., Bardón A., Vera N., Neske A. 2014. *Acetogenina anonáceas de Annona squamosa procedente de brasil 30º Congreso Argentina de Química*. *Anales de la Asociación Química Argetnina AAQAE* 095-196
32. SAFFORD, W. E. 1914. *Classification of the genus Annona, with de- scriptions of new and imperfectly know species*. *Countributions U. S. National Herbarium* 18: 1-68.
33. Walker D.R. 2015. *Report on the regulation of herbal medicines and practitioners* <http://www.dcscience.net>
34. Zhaoa P., Chao Qia C., Wanga G., Daia X., Houb X. 2015. *Enrichment and purification of total flavonoids from Cortex JuglandisMandshuricae extracts and their suppressive effect on carbontetrachloride-induced hepatic injury in Mice* *J. Chromatogr. B* 1007 ; 8–17



11.6. Publicación en Revista Profesional Bifase.

Farmoplantas “Chirimoya” *Annona Cherimola* MILL vol 31 num 2 pag 33-39 ISSN 1515-5560. <http://www.bifase.org.ar>





"CHIRIMOYA" / Resumen

NOMBRE CIENTÍFICO

Annona cherimola Mill.

FAMILIA

Annonaceae

SINONIMIAS DE ANNONA CHERIMOLA

- **Sinonimia en latín:** *Annona pubescens* Salisb., *Annona tripetala* Aiton
 - **Quechua:** "Chirimoya"
 - **Aymara:** "Yuructira"
 - **Español:** "Chirimoya", "Cherimoya", "Cherimalla", "Cherimoyales", "Anona del Perú", "Chirimoyo del Perú", "Cachimán de la China", "Catuche", "Momona", "Girimoya", "Masa", "Anona", "Uruata" (lengua purhépechaanón) "Bichichinejo", "Catreche", "Chirimorrión"
 - **Portugués:** "Ccherimólia", "Grabiola", "Graveola", "Graviola"
 - **Inglés:** "Cherimoya", "Cherimoyer", "Annona", "Custard-apple",
 - **Francés:** "Chérimolier", "Anone".
 - **Italiano:** "Cerimolia"
 - **Holandés:** "Cherimola", "Cherimola"
 - **Aleman:** "Chirimoyabaum", "Cherimoyer", "Cherimola", "Peruanischer", "Flaschenbaum", "Flachsbaum".
 - **Japanese:** "Cherimoa", "Cherimoya"
 - **México:** "Pox or poox"
 - **Hindi:** "Hanuman phal", "Marytiphal"
- (M. E. González Vega, 2013); (Arun Jyothi B, 2011)

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árbol pequeño, con ramitas nuevas vellosas. Hojas aovadas, densamente pubescentes en la cara inferior, de 10-25 cm de largo, obtusas, brevemente pecioladas. Flores solitarias opuestas a las hojas, brevemente pedunculadas, con perfume similar al de "magnolia foscata", pétalos internos muy pequeños. Fruto sincárpico aovado, de 15-20 cm de largo, verde claro, con la pulpa blanca y las semillas negras.

Las flores son protoginias y la antesis se inicia con la separación de los pétalos mayores, que se abren por el ápice, generalmente en las primeras horas de la mañana. En esta etapa los pistilos son receptivos y tienen los estigmas blancos y brillantes, pero las flores estaminadas aún no emiten polen. Uno o dos días después de la fertilización los pétalos caen y se inicia el desarrollo del fruto. De 6 a 8 horas más tarde los pétalos mayores están completamente abiertos y las anteras emiten polen por suturas longitudinales, ya entonces los estigmas están marchitos y no pueden fertilizarse. Polinización: anemófila o entomófila. La protoginia y la ineficiencia de los agentes de polinización determinan la formación de frutos pequeños y asimétricos, por lo que se ha hecho necesario desarrollar métodos de polinización artificial.

La "chirimoya" no es un fruto simple, sino agregado (*sincárpico*), que se adhieren sobre un receptáculo pero se fecundan por separado. Por esta razón cuando la fecundación no es uniforme se producen frutos muy irregulares. El fruto bien fecundado es homogéneo y llega a pesar hasta 500 u 800 gramos. Es carnoso o seco, sésil o estipitado, dehiscente o indehiscente, presentando los carpelos libres entre sí. Las semillas son aplanadas, elípticas, de color castaño claro a negro. (Milan J. Dimitri, 1987)



Annona cherimola. A, rama florífera 1/2 tn.; B, flor a la que se le quitó el pétalo anterior, aumentada; C, fruto 3/4 tn.; D, el mismo cortado longitudinalmente para dejar ver los carpelos carnosos y las semillas; E, semilla 1/4 tn.; F, la misma cortada longitudinalmente para dejar ver el albumen rugoso (Milan J. Dimitri, 1987)

BIFAZE Volumen 31 | Número 2

8

Lic. Farm. Haag Griselda Octavia. Docente en: Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Ciencias Exactas y Cátedra de Farmacología Básica, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata - Pcia. Buenos Aires, Argentina CP 1900. Email: griseldahaag@gmail.com

HISTORIA, ORIGEN Y ETIMOLOGÍA

Etimológicamente se cree que "Anona" (nombre que se le da al fruto) proviene del nombre popular "Anón" (nombre del árbol en las poblaciones aborígenes). El nombre "Chirimoya" proviene del quechua, (lengua nativa de los Andes peruanos). En el manual de W. Popenoe, esta palabra es traducida como semilla fría ("chiri" significa frío y "moya" semilla) mientras que para el chileno Benjamín Vicuña Mackenna, en su obra "De Valparaíso a Santiago" dice que "moyu" significa "seno" en lengua quechua, por lo que otra traducción de "chirimoya" significaría "seno frío" o "seno helado de mujer" (Gardiazábal, 1991).

Se encuentra registro que en el período precolombino en los valles interandinos y algunas áreas similares en Mesoamérica fueron usadas por nuestros indígenas, para el cultivo de las anonas; ellos lo utilizaban como frutales aprovechando la adaptabilidad, variedad de sabores y gran valor nutritivo de la "chirimoya". Las tres especies más conocidas del género anona son: *Annona muricata* ("Guanábana" o "Graviola"), *A. squamosa* ("Soncoya", "Sarumuyo" o "Anón") y *A. cherimola*, (García, 1956).

El origen de la "Chirimoya" todavía está en discusión ya que diversos autores justifican su origen con distintas observaciones. Algunos autores dicen que es originaria de la región montañosa del Sur del Ecuador y del Norte del Perú, porque constituye un "punto de máxima diversidad". (Bioversity International y CHERLA; 2008)

Ibar (1979) dice que es originario del Perú, donde se encuentra cultivos espontáneos en los Andes, hasta alturas de 1500 metros y se ha extendido por México, California, Antillas, Argentina, Chile, África, Central, Indochina, Islas Canarias y de Madera y en el litoral mediterráneo, por Argelia, Egipto, Israel y en España en el sur de las provincias de Granada y Málaga.

En cambio Sanjinés dicen que es originaria de los valles fríos, pero libres de heladas de los Andes en el sur de Ecuador. Crece comúnmente entre 1.500 m y 2.000 m y se la encuentra silvestre, en huertas y jardines. Su cultivo para la comercialización se extiende en España, Chile, Australia, Israel y US. (Sanjinés et al., 2006)

En conclusión todos los autores coinciden que su origen es de la zona céntrica de América en los valles trasandinos en altura de 1500 y 2000m; Ecuador o Perú según el autor, y otros amplían a Colombia y Bolivia, por ubicarse la mayor diversidad de la especie, y que después se ha esparcido su cultivo en jardines domésticos o para su comercialización por su fruta entre la zona de los trópicos de América y Europa, en zonas donde no hace mucho calor ni hay heladas. (Castro, 2007).

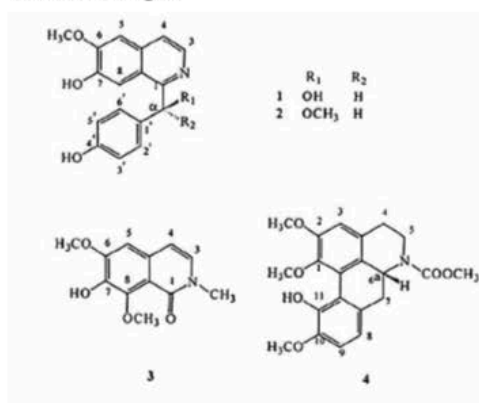
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL FRUTO

La composición nutricional de la fruta de "Chirimoya" es la de una fruta dulce típica pero con un alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de ácidos

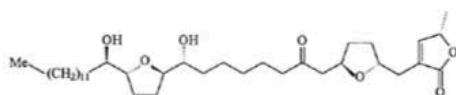
Constituyentes	Cantidad (por 100g de porción comestible)
Agua	77.1 g
Proteínas	1.9 g
Grasas	0.1 g
Carbohidratos	18.2 g
Fibra	2.0 g
Cenizas	0.7 g
Calcio	32.0 mg
Fosforo	37.0 mg
Hierro	0.5 mg
Vitamina A	0.01 IU
Tiamina (Vitamina B1)	0.1 mg
Riboflavina (Vitamina B2)	0.14 mg
Niacina (Vitamina B3)	0.9 mg
Ácido ascórbico (Vitamina C)	5 mg
Calorías	73 kcal

ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y DE ACTIVIDAD

De la familia Annonaceae se conocen numerosas actividades por la presencia de metabolitos secundarios con diversas propiedades farmacológicas: antitumorales, insecticidas, dopaminérgicos, antimaláricos, etc. Si bien esta familia se ha caracterizado especialmente por la presencia de alcaloides benciltetrahidroisoquinolínico, a partir de los años 80 se descubrieron las "acetogeninas de Annonáceas", compuestos exclusivos de esta familia y que han resultado ser metabolitos secundarios de gran originalidad tanto química como biológica.



Alcaloides Isoquinolínicos:
(1) Annocherine A, (2) Annodherine B, (3) Cherianzine, (4) Romuzosine H. (Chen Chung-Yi, 2001)



Acetogenina
Annonin A (Chen Chung-Yi, 1999)

La "Chirimoya" cuenta entre sus componentes, diferentes metabolitos secundarios; alcaloides, esteroides, saponinas, acetogeninas, flavonoides, taninos, esteroides insaturados, terpenoides, aceites esenciales etc. (Castro, J., 2007); (CHERLA; 2008)

La acetogeninas de la Annonaceae son un nuevo grupo de poderosos agentes bioactivos, se han encontrado más de 300 de estos compuestos. Entre las propiedades atribuidas a estos compuestos se encuentran actividades: citotóxica, antitumoral, plaguicidas, antimaláricas, antihelmínticas, antivíricas y antimicrobianas cardiotónico e insecticida. Tradicionalmente, las semillas de "Chirimoya" son trituradas y usado como insecticida, principalmente para matar piojos y curar parásitos trastornos de la piel. Bioquímicamente, las semillas de "Chirimoya" son importantes fuente de aceto-

geninas coincidiendo su actividad con el uso popular. (Arun Jyothi B, 2011) (Cortes D.; 2014).

Hay estudios donde demuestran que la presencia de acetogeninas tiene una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial, concretamente de la NADH-ubiquinona óxidoreductasa (complejo I).

En particular la acetogenina aislada de las semillas de *Annona cherimola*, con una función hidroxilada en la g-lactona, inhibe con mayor potencia la cadena respiratoria mitocondrial. Recientemente, se ha podido observar la capacidad de Laherradurin de inhibir las líneas celulares tumorales y al mismo tiempo no afectar a las células no-tumorales, se trataría por tanto de un serio candidato a su utilización como antitumoral (Cortes D.; 2014).

PRINCIPIOS ACTIVOS AISLADOS DE "CHIRIMOYA"

En el siguiente cuadro se detalla los compuestos aislados, fuente de obtención, actividad biológica reportada, y referencias.

Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	Fuente	Actividad biológica reportada	Referencia
Annomolon A, 3,4-epi-Annomolon A, Annomolon B	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Jong Keun Son, 2003)
Annocherina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Woo D., 1999)
Cherimolina	Alcaloide	Corteza	-----	(Chen Chung-Yi, 1997)
N-cis-cafeoiltramina, Dihidro-feruloiltiramina	Amida	Corteza	-----	(Chen Chung-Yi, 1998) (Chen Chung-Yi, 2001)
Isomolvizarina-1, Isocherimolina, Isomolvizarina-2	Acetogenina	Raíz	-----	(Chen Chung-Yi, 2001)
Annomolina, Annocherimolina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	(Dal Hwan Kim, 2001)
Aromina-A	Acetogenina	Corteza	Citotóxica	(Chen Chung-Yi, 1999)
Annocherina A, Annocherina B, Cheranoína	Alcaloide	Corteza	Inhibe agregación de plaquetas	(Chen Chung-Yi, 2001)
Laherradurin	Acetogeninas	Semilla	inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial	(Cortes D.; 2014).

ACTIVIDAD ASOCIADA CON TRASTORNOS DOPAMINÉRGICOS

Los alcaloides isoquinoleínicos encontrados en Annonaceae (por ejemplo la annonina en "Chirimoya"), se biosintetizan a partir de dos moléculas de tirosina (p-OH-fenilalanina) y a través de la dopamina. Dicha molécula muestra afinidad por algunos de los receptores dopaminérgicos aumentando la recaptación de la dopamina. Estos receptores están implicados en desórdenes importantes del comportamiento como la esquizofrenia, enfermedad de Huntington, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y la enfermedad de Parkinson.

ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA

Varios estudios *in-vivo* de distintos modelos de inducción

de diabetes tipo 2 sobre ratas han dado resultados muy positivos; pero no hay pruebas clínicas que lo confirmen por el momento.

En uno de los trabajo se ha detectado la actividad anti-diabética del extracto de hoja de *A. cherimola* en ratas inducidas a hiperglucemia por estreptozotocina. Cuando el extracto de hoja de *A. cherimola* era administrado a ratas normales y diabéticas, se observó hipoglucemia después de 2 h, con efecto máximo a las 6 h. Se asume que el extracto de la hoja podría ser responsable de la estimulación de liberación de insulina y restauración observada en sangre del nivel de glucosa (Chakrapani P; 2012)

La actividad hipoglucémica del extracto metanólico de las hojas de *A. cherimola* fue comparable con glibenclamida,



un fármaco hipoglucemiante estándar (Rojas Rani A.; 2011). El extracto metanólico de hojas de *A. cherimola* posee considerable actividad hipoglucémica en ratas normales (Rojas Rani A.; 2011).

Estudios sobre ratas con Diabetes mellitus 2, fueron tratadas por 4 semanas con extracto etanólico de *A. cherimola* 300mg/kg/d, se midieron los niveles de glucosa en ayuno y el peso de las ratas. Luego del tratamiento se mostró una baja en los niveles de glucemia de los animales (de 290mg/dL a 108mg/dL a partir de la segunda semana) en comparación con el grupo control diabético (de 290mg/dL a >500mg/dL). (Solares-Pascasio JI; 2013)

Un ensayo biológico con extracto etanólico atenuó la hiperglucemia postprandial en la prueba aguda usando ratas diabéticas tipo 2 inducidos por alloxan (331.5 mg / dL) llevando los niveles de glucemia a 149.2 mg / dL. (Calzada F, 2017)

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La composición química de los aceites esenciales de hojas, flores y frutos de *A. cherimola* fueron estudiados por su actividad antimicrobiana. Cinco grampositivos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Shigella sonnei* y *Proteus mirabilis*) y uno hongos (*Candida albicans*) fueron seleccionados para el cribado.

Los resultados del cribado mostraron que la zona más alta de inhibición se observaron en extracto de hoja contra *E. coli* (Rios M.Y.; 2007). Compuesto volátil (cherimolaciclopéptido E) de esta planta también fue estudiada por su actividad antimicrobiana (Rajiv D. 2007). Los extractos metanólicos de las hojas y un puro compuesto aislado de la planta *A. cherimola* actividad antiviral contra el herpes simple tipo 2 (HSV-2) virus (Betancur-Galvis LA; 1999).

ACTIVIDAD ANTITUMORAL

La planta *Annona cherimola* es una fuente importante reportada de compuestos citotóxicos, acetogeninas; Annomolin y annocherimolin fueron aislados de las semillas de *A. cherimola*, recolectadas en Perú (Kim DH, 2001).

Annomolin fue selectivamente citotóxico contra la línea celular de tumor de próstata humano (PC-3), con potencia mayor de 10.000 veces que Adriamicina (Bode AM, 2009). También Annocherimolin poseen actividad citotóxicas de 10.000 veces más que la Adriamicina en el pecho (MCF-7) y colon (HT-29) en líneas celulares de cáncer (Newmann DJ, 2007). El efecto de los extractos etanólicos de la hoja de *A. cherimola* se estudió en células de riñón bovino (MDBK) y células de carcinoma epidermoide laríngeo humano (Hep-2), el extracto etanólico de las hojas posee importante actividad antitumoral *in vitro* contra MDBK y Hep-2 células. (Arun Jyothi B, 2011)

ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA

El extracto hexánico de las hojas de *A. cherimola* ha producido acción ansiolítica en ratones y evitó comportamiento exploratorio. El efecto fue antagonizado por la picrotoxina, una

Bloqueador de canales de cloruro dependiente de GABA, sugiriendo la participación del complejo receptor GABA A.

El autor del trabajo sugiere que los compuestos responsables de dicha actividad serían β -cariophyllene, β -selinene, β -cubebene y linalool (López-Rubalcava C; 2006).

ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

Se probaron extractos metanólicos de semillas de *A. cherimola* para la actividad antiparasitaria contra *Entamoeba histolytica*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Molinema dessetae* y *Artemia salina*. Las acetogeninas aisladas de estos extractos inhiben las larvas de *Molinema dessetae* (Bories C; 1991)

ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROMIANTE

Decocciones de las hojas de *Annona cherimola* Mill. se usan tradicionalmente en Portugal para tratar la hipercolesterolemia.

Solo se le hizo pruebas en esa misma región y se analizaron dos enfoques terapéuticos utilizados para reducir el colesterol en plasma: la inhibición de la absorción de colesterol en la dieta y la inhibición de la actividad reductasa HMG-CoA. Algunos de los componentes de la decocción fue activo en la permeabilidad utilizando monocapas de células Caco-2 en el modelo de la barrera intestinal (absorción de colesterol en la dieta probado en ratas).

En los resultados de dicho análisis se evidenció una ligera reducción en la absorción del colesterol a través de las líneas de células Caco-2 y la reducción de la actividad de la HMG-CoA reductasa en un 50% cuando se usaron 137,3 μ g del extracto / ml.

El autor solo puede "justificar" el uso tradicional de decocciones de las hojas de *Annona cherimola* por la inhibición de la actividad de HMG-CoA reductasa, por pruebas *in-vitro*. (Falé P. L., 2013)

Resultados obtenidos en los bioensayos general de letalidad con larvas de *A. salina* y en el ensayo específico con larvas del 4° estadio de *C. quinquefasciatus* se encontró que la actividad biológica de las semillas de *A. cherimola* puede deberse a una interacción o efecto sinérgico de principios activos entre ellos el complejo alcaloidal benciltetrahidroisoquinoleínico de acción citotóxica y por la presencia de las acetogeninas conocidas por tener propiedades insecticidas, larvicidas, citotóxicas y anticancerígenas. Sin embargo, no establecen el de mayor incidencia. (Bobadilla M, 2002; Castro L 2010)

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se probó el potencial de eliminación de radicales libres de los extractos por el método *in-vitro* de DPPH a 1000 μ g extracto/ ml de solvente; dando actividad dependiente de la concentración; observando un 52,7% de actividad en el extracto etanólico, 50,5% en el metanólico y 69% en el dimetilsulfóxido. Esta tendencia de actividad se mantuvo también en ABTS y en FRAP, mientras que el etanol mostró mayor actividad contra la peroxidación de lípidos. (Barreca D, 2011)



OTROS USOS

- **Como alimento:** la población consume la pulpa del fruto, en forma fresca. Y a nivel industrial para la elaboración de productos alimenticios como jugos, yogurt, cremas, helados, saborizantes, licores y dulces.
- **Pediculicida:** semillas molidas de "chirimoya" en agua en forma de pasta, es usada para el tratamiento de piojos en niños.
- **Repelente de insectos:** la maceración de días en agua del polvo de semillas es usada de forma personal y doméstico en las zonas infestadas.
- **Pesticidas:** la maceración de días en agua del polvo de semillas es usada como un pesticida en jardín de casa.
- **Producción de Bio Gas:** en Países como Alemania y algunos otros países europeos utilizan los Residuos de cultivos de frutales con semillas, entre ellos la "chirimoya", por contener un metil éster de ácido graso que desencadena la producción del gas para la producción de biogás.

CONCLUSIÓN

Por todo lo expuesto sobre "Chirimoya" para su conocimiento en esta revisión, se puede considerar como planta alimenticia, aprovechada por sus sabrosos frutos y desde el punto de vista medicinal, interesante por los resultados farmacológicos obtenidos y la presencia de moléculas que podrían ser importantes en el desarrollo de nuevos fármacos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arun Jyothi B, Venkatesh K, Chakrapani P and A Roja Rani, 2011. Phytochemical and Pharmacological potential of *Annona cherimola*-A Review *International Journal of Phytomedicine* 3, 439-447
- Barreca D., Laganà G., Ficarra S., Tellone E., Leuzzi U., Galtieri A., Bellocco E., 2011, Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). *Food Research International* 44, 2302-2310
- Betancur-Galvis LA, Saez J, Granados H, Salazar A, Ossa JE., 1999. Antitumoral y antiviral actividad de extractos de plantas medicinales colombianas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro; 94 (4): 531 - 535.
- Bobadilla, M; Zavaleta, G; Franco, F; Pollack, L; Sisnegas, M., 2002. Efecto Bioinsecticida del Extracto Etanólico de las semillas de *Annona cherimola* Mill. "Chirimoya" y *A. muricata* Linneus "guanábana" Sobre Larvas del IV Estadio de *Anopheles* sp. *Revista Peruana de Biología*, 9: 64-73.
- Bode AM, Dong Z. 2009; Prevención del cáncer investigación, entonces y ahora. *Nat. Rev. Cáncer*, 9 (7): 508-516.
- Bories C, Loiseau P, Cortes D, Myint SH, Hocquemiller R, Gayral P, Cueva A, Laurens A., 1991. Actividad antiparasitaria de *Annona muricata* y semillas de *Annona cherimola*. *Planta Med.* 57 (5): 434-436.
- Calzada F., Solares-Pascasio J.I., Ordoñez-Razo RM, Velázquez C., Barbosa E., García-Hernández N., Méndez-Luna D., Correa-Basurto J., 2017. Antihyperglycemic Activity of the Leaves from *Annona cherimola* Miller and Rutin on Alloxan-induced Diabetic Rats *Pharmacognosy Res.* 9 (1): 1-6.
- Castro L., Alzate M., Guerrero G.E., 2010. Estudio preliminar de la bioactividad de extractos de semillas de *Annona cherimola* de la familia Annonaceae. *Cientia et Technica* Año XVI, No 44. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Castro, J., 2007 Cultivo de la Anona. *Ministerio de Agricultura y Ganadería, Fundación para el fomento y promoción de la investigación y transferencia de tecnología agropecuaria* - Costa Rica. 75p.
- Chakrapani P, Roja Rani A. 2012. Antidiabética actividad de *Annona cherimola*. *La 5ª Conferencia internacional sobre Avanzado Tecnologías y tratamientos para la diabetes*. Barcelona, España, 8 y 11 de febrero.
- Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong and Wu Yang-Chang, 1997. Chermoline, a Novel Alkaloid from the Stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Lett.* 38: 6247- 6248
- 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
- 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
- Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong, Pan Wen-Bin, Wu Yang-Chang, 2001. Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry.* 56: 753-757
- Chen, Chung-Yi, Chang, Fang-Rong, Yen, Hsin-Fu, Wu Yang-Chang, 2001. Amides from Stems of *Annona cherimola*. *Phytochemistry.* 56: 753-757
- Cherla y Bioersity International. 2008. Descriptores para chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). *Bioersity International*, Roma, Italia; Proyecto CHERLA, Málaga, España.
- Cortes D., Moreno L, Párraga J, Galán A, Cabedo N., 2014. Nuevos fármacos inspirados en annonáceas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol.36, n.spe1, pp.22-31
- Dal Hwan Kim, Eun Sook Ma, Kui Duk Suk, Jong Keun Son, Jong Soon Lee, Mi Hee Woo. (2001) Annomalin and Annoncherimolin, New Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimola* Seeds. *J. Nat. Prod.* 64: 502-506.
- Falé P. L., Ferreira C., Maruzzella F., Florêncio M.H., Frazão F. N., Serralheiro M. L.M. 2013. Evaluation of cholesterol



absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 150: 718-723

• Ibar, L., 1979. Cultivo del Aguacate, Chirimoyo, Mango y Papaya. *Editorial Aedos*. Editora San Juan Despi. pp. 121-144.

• Jong Keun Son, Dal Hwan Kim, Hee Woo, 2003. Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimola* Seeds. *J. Nat. Prod.* 66: 1369-1372

• Kim DH, Ma ES, Suk KD, Son JK, Lee JS, Woo MH. 2001; Annonolin and annocherimolin, nuevo acetogeninas anóxicas citotóxicas de Semillas de *Annona cherimola*. *J. Nat. Pinchar.*, 64 (4): 502 - 506.

• López-Rubalcava C, Pina-Medina B, Estrada-Reyes R, Heinze G, Martínez-Vázquez M., 2006. Acciones de tipo ansiolítico del extracto de hexano de hojas de *Annona cherimola* en dos paradigmas de ansiedad: posible participación del Complejo receptor GABA / benzodiazepina. *Vida Sci*; 78: 730-737.

• Martínez-Vázquez M., Estrada-Reyes R, Araujo Escalona A.G., Ledesma Velázquez I., Martínez-Mota L., Moreno J., Heinze G., 2012. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*. Volume 25, Issue 2, 179-184

• Milan J. Dimitri, 1987. Enciclopedia Argentina de agricultura y Jardinería. Tomo 1 Tercera Edición pag392-393. Ed. ACME S.A.C.I. Bs. As.

• Newmann DJ, Cragg GM., 2007. Productos naturales como fuentes de nuevas drogas en los últimos 25 años. *J. Nat. Prod.*; 70 (3): 461-477.

• Rajiv D., 2007. Síntesis, caracterización y evaluación biológica de un péptido rico en glicina- cherimolaciclopéptido *Ej Chil. Chem. Soci.*, 52: 1224-1229.

• Rios M. Y., Castrejon F., Robledo N., León I., Rojas G., Navarro V. 2003. Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Annona cherimola*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47 (2): 139-142.

• Roja Rani A, Venkatesh K, Chakrapani P, Arunjothi B, Amareshwari P, Saraswathi S. 2011. Plantas medicinales indias *Annona cherimola*, *Erythrina indica*, *Gymnema* y *Andrographis* especies. La mejor cura para la diabetes. 2º Mundial Congreso en Biodisponibilidad y Bioequivalencia 23-26. (DOI: 10.4172 / 1948- 593X.1000051).

• Sanjinés A., A.; Ilgaard, B.; Balslev, H., 2006. Frutos comestibles (en línea). *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Bolivia. No. 329-346. Disponible en <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdf/er/Capitulo%2021.pdf>

• Solares-Pascasio JI, Calzada F. y Olivares IM; 2013; Actividad antidiabética de la *Annona cherimola* Mill. (annonaceae) en ratas con diabetes mellitus tipo 2. XXII Congreso

Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. Costa Rica.

• Woo D., Fotopoulos, S. S., MacLaughlin, J. L.; 1999. Annoncherin (2,4)-Cis-and trans-annoncherinones. *J. Nat. Prod.* 62: 1250-1255



11.7. Primer Premio en el 2º Congreso de Preparaciones Magistrales.

Premio "Estimulo científico para la investigación y desarrollo de medicamentos individualizados." Premio de 15000 \$ y beca para Congreso Farmacéutico Argentino.

Trabajo presentado: Nuevas formas para viejos conocidos: Nanoliposomas como vehículo para la administración de extractos de *Annona cherimola* MILL. (annonaceae)
Haag, G.O.; del Valle, M.E.; Montanari, J.A.; Alonso, S.; Rosella, M.A; Marin, G.H.; Mansilla, E.

Realizado en el hotel Grand Brizo. 51 y 9. La Plata 7 y 8 de junio- Organizado por el Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires.





**NUEVAS FORMAS PARA VIEJOS CONOCIDOS: NANOLIPOSOMAS COMO VEHICULO
PARA LA ADMINISTRACION DE EXTRACTOS DE *Annona cherimola* MILL.
(ANNONACEAE)**

Haag, G.O.^{a,b}; del Valle, M.E.^a; Montanari, J.A.^d; Alonso, S.^d; Rosella, M.A.^a; Marin, G.H.^b; Mansilla, E.^c

- a. Cátedras de Farmacobotánica y Farmacognosia, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Argentina, CP 1900.
- b. Cátedras de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 120, La Plata, Argentina, CP 1900
- c. Servicio de Ingeniería Tisular, Medicina Regenerativa y Terapias Celulares, CUCAIBA, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.
- d. Laboratorio de Biomembranas, Universidad Nacional de Quilmes, GBeyB-IMBICE-CONICET. (griseldahaag@gmail.com tel 0221-15-317-7477)

Introducción: *A.cherimola* es una especie utilizada tradicionalmente con diversos propósitos medicinales. Sus extractos han demostrado ser efectivos *in vitro* como agentes citotóxicos.

Objetivo: Preparación de liposomas conteniendo extractos de *A.cherimola* y comparación de su efectividad (penetración, selectividad y potencia) con respecto a la administración del extracto solo sobre células B-CLL *in vitro*.

Población: Células tumorales (B-CLL) aisladas de pacientes oncológicos

Materiales y métodos: Extracción de hojas de *A.cherimola* y fraccionamiento.

Células B-CLL cultivadas 24, 48 y 72 hs con concentraciones decrecientes en RPMI1640.

Evaluación del grado de apoptosis y muerte celular mediante uso de colorantes vitales y citometría de flujo.

Encapsulación de extractos más activos en liposomas de fosfatidilcolina de soja, (250nm, marcados con Rhodamina) por la técnica de formación de films, resuspensión, sonicación y pasaje por extrusor.

Los liposomas con extracto fueron probados sobre las células B-CLL nuevamente. Las mediciones de penetración se realizaron a los 5, 30 y 60 minutos post inicio de los cultivos. La penetración celular se midió con el microscopio de fluorescencia confocal.

Los niveles de apoptosis y muerte celular se evaluaron mediante las mismas técnicas.

Se testearon con células de B-CLL siete extractos de *A.cherimola*: **1.**Acuoso total y fracciones **2.**cloroformo, **3.** n-butanol, **4.** metanol, **5.** acuoso remanente, **6.** acetato de etilo, **7.** cloroformo.

Resultados

Los extractos con mayor actividad pro-apoptotica a 24 hs de cultivo, fueron: **1:** 92%; **2:** 80 % y **3:** 60 %.

Las nanopartículas **1**, **2** y **3** cargadas con los extractos en una concentración de 1/320 mostraron porcentajes de apoptosis de células tumorales similares a las obtenidas con extractos en suspensión a 24 hs de cultivo. El extracto **1** administrado en forma de nanopartícula fue el único que demostró niveles de apoptosis en células de B-CLL de hasta el 90% aún en concentraciones de 1/640. Los linfocitos normales controles mostraron el mismo porcentaje de apoptosis que cuando se usaron los extractos en suspensión.

Conclusiones: El extracto acuoso de *A.cherimola* es potencialmente efectivo para el tratamiento de la B-CLL, con alto nivel de selectividad y seguridad biológica, ya que no afecta los linfocitos normales en forma significativa.

La efectividad aumenta cuando el extracto se utiliza en forma de liposomas, abriendo la posibilidad de una nueva forma farmacéutica para su administración.