

00570



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

1  
29

FACULTAD DE QUIMICA

"ACETOGENINAS Y LIGNANOS DE *ROLLINIA*  
*MUCOSA BAILON* (ANNONACEAE)"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS**

**(FARMACIA - QUIMICA FARMACEUTICA)**

P R E S E N T A

**Q.F.B. LAURA ALICIA ACEVEDO ARTEAGA**



MEXICO, D. F.

1998.

267245

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DR. ALFREDO ORTEGA HERNÁNDEZ  
PRIMER VOCAL: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA  
SECRETARIO: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ  
PRIMER SUPLENTE: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO  
SUGUNDO SUPLENTE: DRA. MA. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SITIO DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

LABORATORIO 124, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO "E",  
FACULTAD DE QUÍMICA, U N A M. Y LABORATORIO 6 DE LA UNIDAD  
DE PLANTAS MEDICINALES DEL INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

SUSTENTANTE:

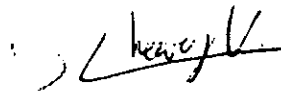


QFB. LAURA ALICIA ACEVEDO ARTEAGA.

ASESOR:

  
DRA. RACHEL MATA ESSAYAG.

ASESOR TÉCNICO:



M. en C. DANIEL CHÁVEZ VELASCO.

## RESUMEN

La evaluación del extracto CHCl<sub>3</sub>-MeOH de las semillas de *Rollinia mucosa* contra varias líneas celulares derivadas de tumores humanos, permitió establecer el potencial citotóxico de la especie.

El fraccionamiento biodirigido del extracto activo, utilizando la determinación de la toxicidad para *Artemia salina*, permitió detectar las fracciones citotóxicas del extracto. Posteriormente, la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución condujo a la separación de ocho metabolitos secundarios de dos fracciones activas. Los compuestos aislados incluyeron seis acetogeninas: la membranacina (27), la desacetiluaricina (56), la roliniastatina 1 (19), la bulatacina (21), la esquamocina (29) y la motrilina (59) y dos lignanos: el éter dimetílico del pinorresinol (58) y la magnolina (15). En todos los casos, los compuestos se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. En el caso particular de las acetogeninas 27 y 56, se determinó la configuración absoluta, de los centros estereogénicos presentes en la molécula mediante la aplicación del método de Mosher.

Todos los compuestos aislados demostraron una toxicidad significativa para *Artemia salina*. Los productos más activos fueron la esquamocina (29) y la motrilina (59). Por otra parte, los compuestos membranacina (27) y desacetiluaricina (56), que contienen dos hidroxilos en la molécula, presentaron una actividad citotóxica selectiva contra las líneas celulares de carcinoma de riñón (A-498) y adenocarcinoma de próstata (PC-3). Los compuestos roliniastatina 1 (19) y motrilina (59) que contienen tres hidroxilos en su molécula presentan una actividad citotóxica significativa en tres líneas celulares: Adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de riñón (A-498) y carcinoma de páncreas (PACA-2). Cabe destacar, que esta investigación constituye el primer informe sobre la actividad biológica de las acetogeninas membranacina (27) y desacetiluaricina (56).

## ABSTRACT

The dried seeds of *R. mucosa* were extracted with  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) the resulting extract exhibited a potent activity in the brine shrimp test ( $\text{LC}_{50} = 0.51 \mu\text{g/ml}$ ) and was cytotoxicity against human kidney carcinoma and human prostate adenocarcinoma ( $\text{DE}_{50} < 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ).

The isolation of eight compounds was guided by brine shrimp lethality test, including six acetogenins membranacin (27), desacetylularicin (56), roliniastatin 1 (19), bulatacin (21), esquamocin (29) and motrilin (59) and two lignans, pinoresinol dimethyl ether (58) and magnoline (15). Their structures were elucidated by spectral and chemical methods. The absolute configurations of membranacin (27), and desacetylularicin (56) were determined using the Mosher's methodology.

All acetogenins were significantly bioactive in the brine shrimp lethality tests. Four acetogenins were also cytotoxic to six human solid tumor cell lines tests. Membranacin (27) and desacetylularicin (56) showed high selective cytotoxic activity against A-498 (human kidney carcinoma) and PC-3 (human prostate adenocarcinoma) tumor cell lines. Roliniastatin 1 (19) and motrilin (59), exhibited potent cytotoxic activity against HT-29 (human colon carcinoma), A-498 (human kidney carcinoma) and PACA-2 (human colon carcinoma) tumor cell lines.

This is the first report on the cytotoxic activity membranacin (27) and desacetylularicin (56).

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de ésta tesis se realizó mediante al apoyo económico otorgado a través del siguiente proyectos: DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN 205197 y CONACyT No. 27978-N.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría en Química Farmacéutica.

A los miembros del jurado designado para la revisión del presente trabajo, cuyas aportaciones y comentarios mejoraron de manera importante la versión final de ésta tesis. En particular al Dr. Rogelio Pereda por sus valiosas observaciones.

Al Biol. Gustavo Carmona por la colecta e identificación del material vegetal.

Al Dr. Jerry McLaughlin de la Universidad de Purdue, Indiana, EEUU, por proporcionar las facilidades para la realización de los ensayos de citotóxicidad y la muestra de la acetogenina roliniastatina 1.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz del laboratorio de espectroscopía (RMN) del Instituto de Química y a la M. en C. Nuria Esturau, Rosa Isela Del Villar y al QFB. Oscar Yáñez de la Facultad de Química U.S.A.I., por el registro de los espectros de RMN.

Al IQ. Luis Velasco y al M. en C. Javier Pérez del laboratorio de espectrometría de masas del Instituto de Química y al M. en C. Jose Luis Gallegos y a la Q. Georgina Duarte, de la Facultad de Química, U.S.A.I., por el registro de los espectros de masas.

A la QFB. Rocio Patiño del laboratorio de espectroscopía del Instituto de Química y a las Q. Marisela Gutiérrez y Graciela Chávez de la Facultad de Química, U.S.A.I., por el registro de los espectros de IR, UV y Dicroísmo circular.

Al M. en C. Daniel Chávez por su asesoría y valiosos consejos durante la realización del trabajo experimental de la tesis.

A la Lic. Mónica Espíndola Mata por su ayuda en la corrección de estilo del presente trabajo.

A la Dra. Rachel Mata Essayag con gran respeto, por su valiosa contribución en mi formación académica y por su invaluable asesoría para la realización de este trabajo.

A los prestadores de Servicio Social de los laboratorios 124 y 6.

Y a todos mis amigos de los laboratorio 124 y 6.

*... gracias a logros y trabajos como este, donde sentimos el apoyo y la ayuda invaluable de mucha gente, se convierten en un aliciente que hace que uno se olvide de las cosas que realmente duelen.*

*A la memoria de mi Padre.*

*Gracias Cristo Jesús porque nos tienes siempre de tu mano, porque te manfiestas en todas las cosa, como la sonrisa de un niño, la lealtad de un amigo y la gran capacidad que tenemos para amar, por esto no podemos sino decir GRACIAS SEÑOR.*



*A mi mamá*

*Por tu fortaleza, por enseñarme a seguir adelante.*

*A mis hermanos*

*Por su confianza y cariño.*

*A mis tíos*

*Porque en todo momento puedo contar con ustedes.*

*A mis amigos*

*Porque en todos los momentos de mi vida han estado para brindarme su apoyo y afecto, por sus agradables charlas y las experiencias compartidas.*

*A todos mis maestros y compañeros de la maestría en Química Farmacéutica que contribuyeron a la realización de mis estudios.*

*A MaryCarmen y Norma estaremos siempre juntas, unidas por la magia de la amistad.*

## INDICE

	Página
Lista de Figuras	i
Lista de Cuadros y Esquemas	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Espectros (Anexo 1)	iv

## CONTENIDO

### I. INTRODUCCION

1.1 Generalidades sobre el género <i>Rollinia</i> (Annonaceae)	1
1.2 Características de la especie <i>Rollinia mucosa</i>	9

### II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS 13

### III. PARTE EXPERIMENTAL 16

3.1 Material vegetal	16
3.2 Ensayos biológicos	16
3.2.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i>	16
3.2.2 Determinación de la actividad citotóxica	17
3.3 Análisis cromatográficos	17
3.3.1 Cromatografía de líquidos a nivel analítico	19
3.3.2 Cromatografía de líquidos a nivel preparativo	19
3.4 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos aislados	20

3.5 Extracción de las semillas de <i>Rollinia mucosa</i>	20
3.6 Fraccionamiento biodirigido del extracto total	21
3.7 Fraccionamiento secundario de la fracción metanólica	22
3.8 Aislamiento y purificación de la membranacina (27), desacetilivaricina (56), éter dimetílico del pinorresinol (58) y magnolina (15) de la fracción activa III	23
3.9 Aislamiento y purificación de roliniastatina (19), bulatacina (21), esquamocina (29) y motrilina (59) de la fracción activa V	27
3.10 Preparación de los derivados de los compuestos puros	30
3.10.1 Procedimiento para obtener los derivados sililados (TMSi) de los compuestos puros	30
3.10.2 Obtención de los ésteres de Mosher de membranacina (27) y desacetilivaricina (56)	31
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
4.1 Caracterización de los lignanos aislados.	36
4.1.1 Caracterización del éter dimetílico del pinorresinol (58)	36
4.1.2 Caracterización de la magnolina (15)	42
4.2 Caracterización de las acetogeninas aisladas de <i>Rollinia mucosa</i>	46
4.2.1 Caracterización de las acetogeninas membranacina (27) y desacetilivaricina (56)	48
4.2.2 Caracterización de las acetogeninas roliniastatina 1 (19), bulatacina (21), esquamocina (28) y motrilina (59)	57

V. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE <i>R. MUCOSA</i>	69
VI. CONCLUSIONES	72
VII. BIBLIOGRAFÍA	74
VIII. ANEXO 1	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Rollinia mucosa</i> (Jacquin) Baillon.	10
Figura 2	Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción III.	23
Figura 3	Cromatograma obtenido del pico a de la fracción III.	24
Figura 4	Cromatograma obtenido del pico b de la fracción III.	25
Figura 5	Cromatograma obtenido del pico c de la fracción III.	25
Figura 6	Cromatograma obtenido del pico d de la fracción III.	26
Figura 7	Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción V.	27
Figura 8	Cromatograma obtenido del pico a de la fracción V.	28
Figura 9	Cromatograma obtenido del pico b de la fracción V.	29
Figura 10	Cromatograma obtenido del pico c de la fracción V.	29
Figura 11	Cromatograma obtenido del pico d de la fracción V.	30
Figura 12	Espectro de RMN <sup>1</sup> H 2D-COSY del éter dimetílico del pinorresinol	38
Figura 13	Espectro de RMN bidimensional HETCOR del éter dimetílico del pinorresinol	40
Figura 14	Patrón de fragmentación de los derivados sililados de los compuestos (27a) y (56a).	50
Figura 15	Patrón de fragmentación de los derivados sililados de los compuestos (19a) y (21a).	60
Figura 16	Patrón de fragmentación del derivado sililado de la esquamocina (29a).	60
Figura 17	Patrón de fragmentación del derivado sililado de la motrilina (59a).	61

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Metabolitos secundarios aislados del género <i>Rollinia</i> .	2
Cuadro 2	Sinonímias encontradas para la especie <i>Rollinia mucosa</i> .	11
Cuadro 3	Agentes cromógenos utilizados para el análisis cromatográfico en capa fina.	18
Cuadro 4	Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.	22
Cuadro 5	Toxicidad para el crustáceo <i>A. salina</i> y citotoxicidad del extracto total de <i>Rollinia mucosa</i> .	33
Cuadro 6	Compuestos aislados de las semillas de <i>Rollinia mucosa</i> .	34
Cuadro 7	Constantes físicas y espectrométricas del éter dimetílico del pinorresinol (58).	37
Cuadro 8	Datos espectroscópicos del lignano éter dimetílico del pinorresinol (58).	41
Cuadro 9	Comparación de desplazamientos químicos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de los lignanos furofuranos del tipo de la sesamina y los aislados de <i>R. mucosa</i> .	42
Cuadro 10	Constantes físicas y espectrométricas de la magnolina (15).	43
Cuadro 11	Datos espectroscópicos del lignano magnolina (15) aislado de <i>R. mucosa</i> .	45
Cuadro 12	Constantes físicas y espectrométricas de la membranacina (27) y de su derivado sililado.	48
Cuadro 13	Constantes físicas y espectrométricas de la desacetiluaricina (56) y de su derivado sililado.	49

Cuadro 14	Comparación de los datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del compuesto (27) con la estereoquímica relativa de la porción <i>bis</i> -THF del modelo 4-hidroxi-25-desoxineorolinicina.	51
Cuadro 15	Desplazamientos químicos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el cierre de anillos <i>treo-trans-treo-trans-eritro</i> del compuesto (56).	52
Cuadro 16	Datos de RMN $^1\text{H}$ de la unidad <i>bis</i> -THF de los ésteres de Mosher de la membranacina (27) y desacetilivaricina (56).	53
Cuadro 17	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN $^{13}\text{C}$ de las acetogeninas membranacina (27) y desacetilivaricina (56).	55
Cuadro 18	Datos espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ de membranacina (27) y desacetilivaricina (56).	56
Cuadro 19	Constantes físicas y espectrométricas de la roliniastatina 1 (19) y de su derivado sililado.	57
Cuadro 20	Constantes físicas y espectrométricas de la bulatacina (21) y de su derivado sililado.	58
Cuadro 21	Constantes físicas y espectrométricas de la esquamocina (29) y de su derivado sililado.	58
Cuadro 22	Constantes físicas y espectrométricas de la motrilina (59) y de su derivado sililado.	59
Cuadro 23	Comparación de los datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de la porción de la metil- $\gamma$ -lactona del modelo con los compuestos 19 y 21.	62
Cuadro 24	Comparación de los datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de los compuestos 19, 21, 29 y 59 con los modelos adecuados.	63

Cuadro 25	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN $^{13}\text{C}$ de las acetogeninas roliniastatina 1 (19) y bulatacina (21).	65
Cuadro 26	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN $^1\text{H}$ de las acetogeninas roliniastatina 1 (19) y bulatacina (21).	66
Cuadro 27	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN $^{13}\text{C}$ de las acetogeninas esquamocina (29) y motrilina (59).	67
Cuadro 28	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN $^1\text{H}$ de las acetogeninas esquamocina (29) y motrilina (59).	68
Cuadro 29	Toxicidad para el crustáceo <i>A. salina</i> de los compuestos aislados de <i>Rollinia mucosa</i> .	69
Cuadro 30	Citotoxicidad de los compuestos aislados de <i>Rollinia mucosa</i> .	70

### LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Proceso de extracción y fraccionamiento primario de las semillas de <i>Rollinia mucosa</i>	21
-----------	--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

A-498	carcinoma de riñón
A-549	carcinoma de pulmón
[ $\alpha$ ]	rotación óptica
<i>bis</i> -THF	sistema <i>bis</i> -tetrahidrofurano
°C	grados centígrados
ccf	cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
CE	Concentración efectiva media
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
CLAR	cromatografía de líquidos de alta resolución
CL <sub>50</sub>	concentración letal media
cm	centímetros
COSY	espectroscopía de correlación homonuclear <sup>1</sup> H
d	doblete
$\delta$	desplazamiento químico
dd	doble de doble
ddd	doble de doble de doblete
DC	dicroísmo circular
EMIE	espectrometría de masas por impacto electrónico
EMFAB <sup>+</sup>	espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos.
h	horas
HETCOR	espectroscopía de correlación heteronuclear
Hex	hexano
HT-29	adenocarcinoma de colon
Hz	hertz
Int. rel.	intensidad relativa
IR	espectro de infrarrojo

---

J	constante de acoplamiento
$\lambda_{\max}$	longitud máxima
m	multiplete
$\mu\text{m}$	micrometros
MCF-7	carcinoma de pecho
MeOH	metanol
mg	miligramos
ml	mililitros
$\mu\text{l}$	microlitros
$\mu\text{g}$	microgramos
m/z	relación masa carga
PACA-2	carcinoma de páncreas
PC-3	adenocarcinoma de próstata
pel.	técnica de película
pf	punto de fusión
ppm	partes por millón
q	cuarteto
RMN $^{13}\text{C}$	resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN $^1\text{H}$	resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	singulete
t	triplete
TAS	toxicidad para <i>Artemia salina</i>
TMS	trimetilsilano
Tr	3,4,5-trimetoxifenilo
UV	ultravioleta
VERO	epitelio de células renales de mono
Vr	Veratriló

## ANEXO 1

### LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro en el IR del éter dimetílico del pinorresinol (58).	83
Espectro 2	Espectro de masas del éter dimetílico del pinorresinol (58).	84
Espectro 3	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del éter dimetílico del pinorresinol (58).	85
Espectro 4	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del éter dimetílico del pinorresinol (58).	86
Espectro 5	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT del éter dimetílico del pinorresinol (58).	87
Espectro 6	Espectro en el IR de la magnolina (15).	88
Espectro 7	Espectro de masas de la magnolina (15).	89
Espectro 8	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la magnolina (15).	90
Espectro 9	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY de la magnolina (15)	91
Espectro 10	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la magnolina (15).	92
Espectro 11	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT de la magnolina (15).	93
Espectro 12	Espectro de RMN 2D-HETCOR de la magnolina (15)	94
Espectro 13	Espectro en el IR de la membranacina (27).	95
Espectro 14	Espectro de masas de la membranacina (27).	96
Espectro 15	Espectro de masas del derivado sililado de la membranacina (27).	97
Espectro 16	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la membranacina (27).	98
Espectro 17	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY de la membranacina (27).	99

Espectro 18	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la membranacina (27).	100
Espectro 19	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT de la membranacina (27).	101
Espectro 20	Espectro de RMN 2D-HETCOR de la membranacina (27).	102
Espectro 21	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del éster de Mosher (S) de la membranacina (27).	103
Espectro 22	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY del éster de Mosher (S) de la membranacina (27).	104
Espectro 23	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del éster de Mosher (R) de la membranacina (27).	105
Espectro 24	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY del éster de Mosher (R) de la membranacina (27).	106
Espectro 25	Espectro en el IR de la desacetilivaricina (56).	107
Espectro 26	Espectro de masas de la desacetilivaricina (56).	108
Espectro 27	Espectro de masas del derivado sililado de la desacetilivaricina (56).	109
Espectro 28	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la desacetilivaricina (56).	110
Espectro 29	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY de la desacetilivaricina (56).	111
Espectro 30	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la desacetilivaricina (56).	112
Espectro 31	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT de la desacetilivaricina (56).	113
Espectro 32	Espectro de RMN 2D-HETCOR de la desacetilivaricina (56).	114
Espectro 33	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del éster de Mosher (S) de la desacetilivaricina (56).	115
Espectro 34	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY del éster de Mosher (S) de la desacetilivaricina (56).	116

Espectro 35	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del éster de Mosher (R) de la desacetilivaricina (56).	117
Espectro 36	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY del éster de Mosher (R) de la desacetilivaricina (56).	118
Espectro 37	Espectro en el IR de la roliniastatina 1 (19).	119
Espectro 38	Espectro de masas de la roliniastatina 1 (19).	120
Espectro 39	Espectro de masas del derivado sililado de la roliniastatina 1 (19).	121
Espectro 40	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la roliniastatina 1 (19).	122
Espectro 41	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY de la roliniastatina 1 (19).	123
Espectro 42	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la roliniastatina 1 (19).	124
Espectro 43	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT de la roliniastatina 1 (19).	125
Espectro 44	Espectro en el IR de la bulatacina (21).	126
Espectro 45	Espectro de masas de la bulatacina (21).	127
Espectro 46	Espectro de masas del derivado sililado de la bulatacina (21).	128
Espectro 47	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la bulatacina (21).	129
Espectro 48	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY de la bulatacina (21).	130
Espectro 49	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la bulatacina (21).	131
Espectro 50	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT de la bulatacina (21).	132
Espectro 51	Espectro en el IR de la esquamocina (29).	133
Espectro 52	Espectro de masas de la esquamocina (29).	134
Espectro 53	Espectro de masas del derivado sililado de la esquamocina (29).	135
Espectro 54	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la esquamocina (29).	136
Espectro 55	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY de la esquacina (29).	137

---

Espectro 56	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la esquamocina (29).	138
Espectro 57	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT de la esquamocina (29).	139
Espectro 58	Espectro en el IR de la motrilina (59).	140
Espectro 59	Espectro de masas de la motrilina (59).	141
Espectro 60	Espectro de masas del derivado silitado de la motrilina (59).	142
Espectro 61	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la motrilina (59).	143
Espectro 62	Espectro de RMN $^1\text{H}$ COSY de la motrilina (59).	144
Espectro 63	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la motrilina (59).	145
Espectro 64	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT de la motrilina (59).	146

## I. INTRODUCCION

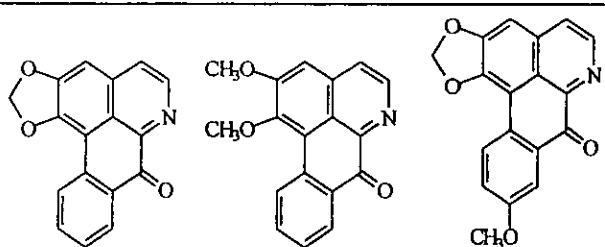
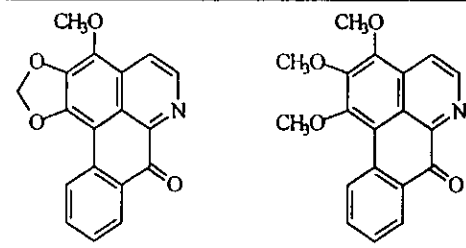
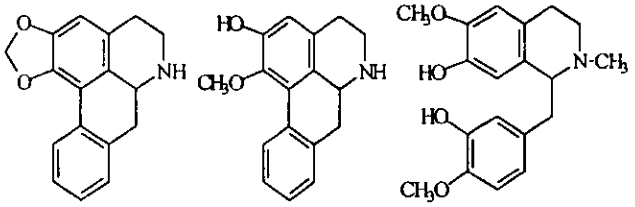
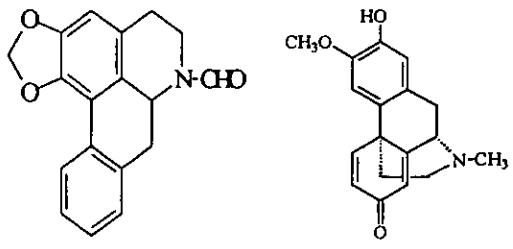
### 1.1 Generalidades sobre el Género *Rollinia* (Annonaceae).

El género *Rollinia* incluye 40 especies, que se distribuyen en el neotrópico, principalmente en las zonas tropicales de México, en el norte de Bolivia y en el sur y centro de Brasil (Maas *et al.* 1992). Muchas especies del género son económicamente valiosas por sus frutos comestibles, los cuales poseen una pulpa blanca o ligeramente crema y un sabor agradable. Así por ejemplo, la pulpa de *R. edulis* es altamente apreciada para la elaboración de mermeladas (Maas, 1992). De manera adicional muchas especies de *Rollinia* gozan de reputación folklórica como agentes medicinales. Por ejemplo, *R. mucosa* se usa para el tratamiento de tumores en las antillas e Indonesia desde tiempos inmemoriales (Pettit *et al.*, 1987). *R. emarginata* se emplea como remedio para la cura de tumores, como un agente astringente y como condimento en las prácticas culinarias populares (Maas, 1992; Nieto, 1986). Por último, *R. sylvatica* es útil para el tratamiento de las úlceras (Maas *et al.*, 1992).

De las 40 especies clasificadas en el género *Rollinia* sólo nueve se han investigado químicamente. Estos estudios han permitido el aislamiento y la caracterización de numerosos metabolitos, los cuales incluyen ácidos grasos (Maas, 1992); alcaloides de los tipos aporfínicos, bencilisoquinolínicos y morfínicos (Dabrah y Sneden, 1983; Nieto, 1986); esteroides de tipo estigmastano; lignanos del tipo furofurano (Maas, 1992; Saez *et al.*, 1993) y acetogeninas, principalmente de los tipos *bis*-tetrahidrofurano adyacentes, *bis*-tetrahidrofurano no adyacentes, *mono*-tetrahidrofurano y acetogeninas sin anillos de tetrahidrofurano (Pettit *et al.*, 1987; Abreo y Sneden, 1989; Mikolajczak *et al.*, 1990; Sahpaz *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1996a; González *et al.*, 1997; *inter alia*). Recientemente, se describieron tres acetogeninas con anillos de tipo tetrahidropirano (Shi *et al.*, 1995a; Shi *et al.*, 1996b; Chávez *et al.*,

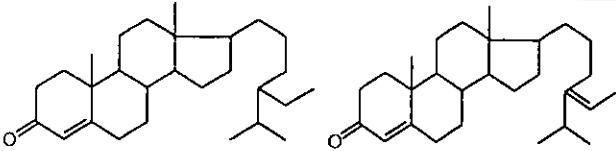
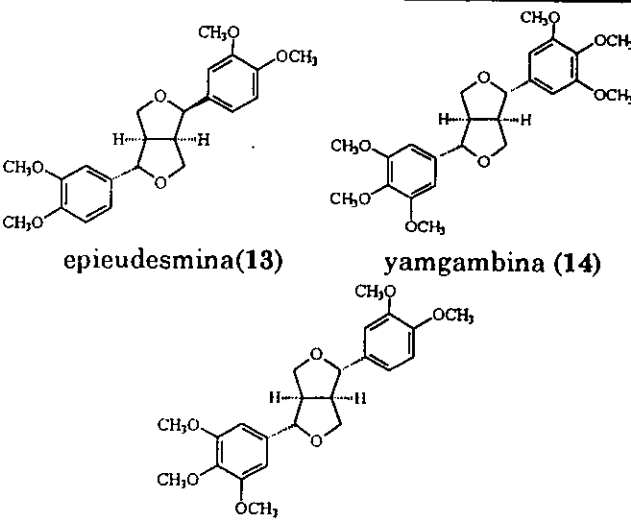
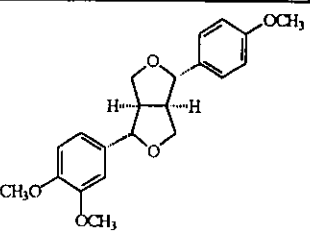
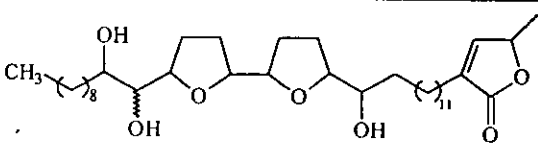
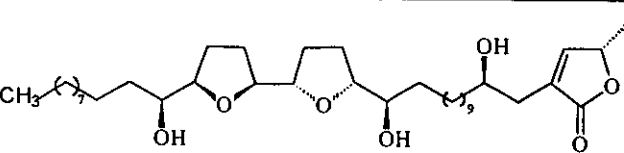
1998a). En el cuadro 1 se resumen los estudios químicos realizados sobre las distintas especies del género estudiadas a la fecha.

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios aislados del género *Rollinia*.

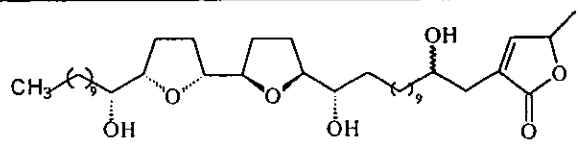
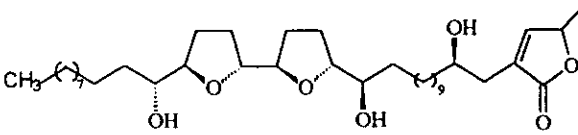
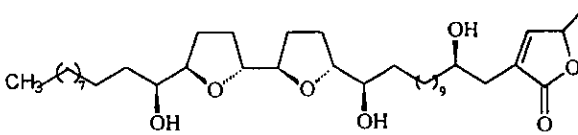
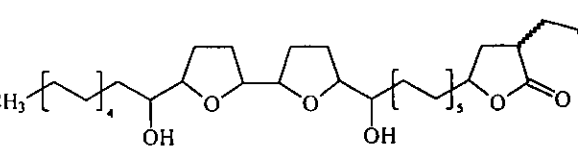
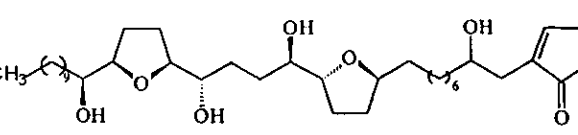
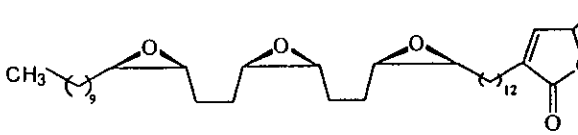
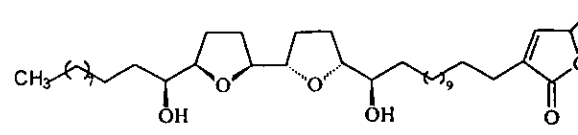
COMPUESTOS	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>liriodenina (1)    lisicamina (2)    lanuginosina (3)</p>	<i>R. papilionella</i>	Dabrah y Sneden, 1983
 <p>aterspermidina (4)    homomoscatoлина (5)</p>	<i>R. sericea</i>	Brash y Sneden, 1983
 <p>(-)-anonaina (6)    (-)-asimilobina (7)    (+)-reticulina (8)</p>	<i>R. emarginata</i>	Nieto, 1986
 <p>N-formilanonaina (9)    palidina (10)</p> <p>liriodenina (1), lanuginosina (3) y (-)-anonaina (6)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Caétano y Dadoun, 1987
<p>liriodenina (1)    lisicamina (2)</p>	<i>R. exsucca</i> y <i>R. ulei</i>	Maas, 1992



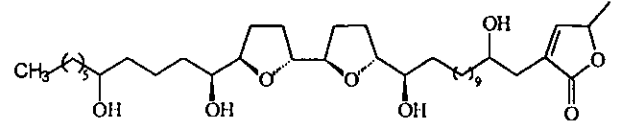
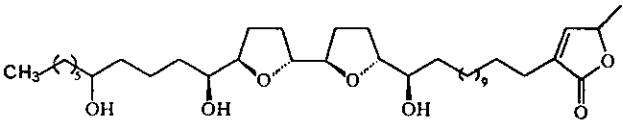
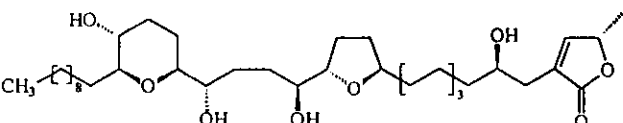
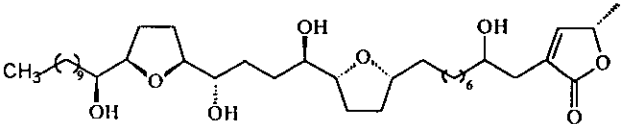
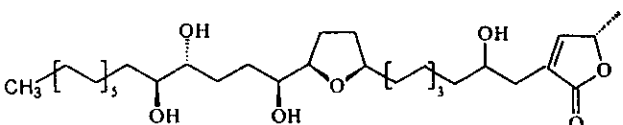
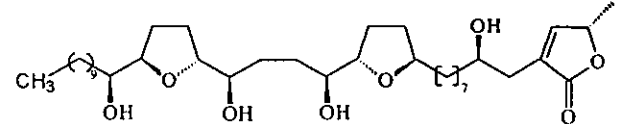
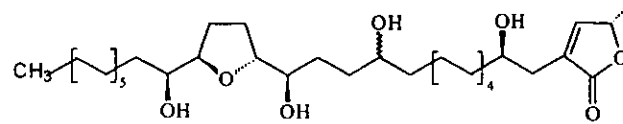
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Rollinia* (Continuación).

COMPUESTOS	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>estigmatenona (11)      fucostenona (12)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	De Quiroz, 1991
 <p>epieudesmina(13)      yangambina (14)</p> <p>magnolina (15)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	De Quiroz, 1991
 <p>membrina (16) y magnolina (15)</p>	<i>R. membranacea</i>	Saez <i>et al.</i> , 1993
 <p>rolincina (17) e isorolincina (18)</p>	<i>R. papilionella</i>	Dabrah y Snedden, 1984
 <p>roliniastatina 1 (19)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Pettit <i>et al.</i> , 1987

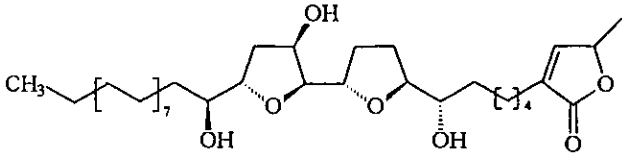
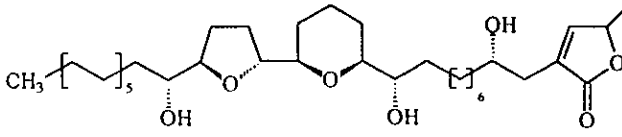
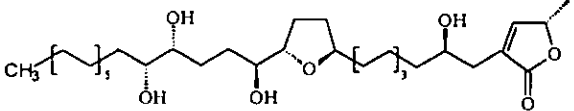
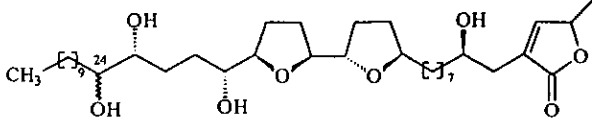
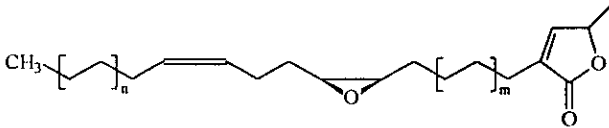
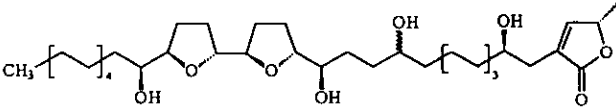
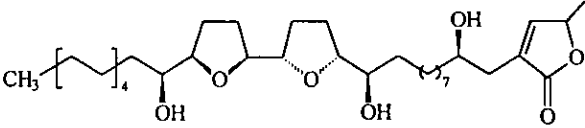
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Rollinia* (Continuación).

	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>4-hidroxi-25-desoxineorollinicina (20)</p>	<i>R. papilionella</i>	Abreo y Sneden, 1989
 <p>roliniastatina 2 [bulatacina] (21)</p>  <p>asimicina (22)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Pettit <i>et al.</i> , 1989
 <p>rolinona (23)</p>	<i>R. papilionella</i>	Dabrah y Sneden, 1990
 <p>silvaticina (24)</p>	<i>R. sylvatica</i>	Mikolajczak <i>et al.</i> , 1990
uleicina A (25) y uleicinas B-E	<i>R. ulei</i>	Laprévotte, <i>et al.</i> , 1991
 <p>tripoxirrolina (26)</p>	<i>R. membranacea</i>	Sahpaz <i>et al.</i> , 1993
 <p>membranacina (27)</p>	<i>R. membranacea</i>	Saez <i>et al.</i> , 1993

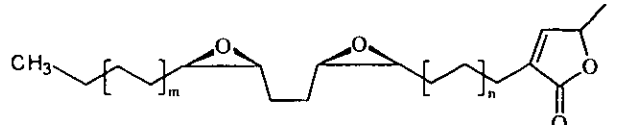
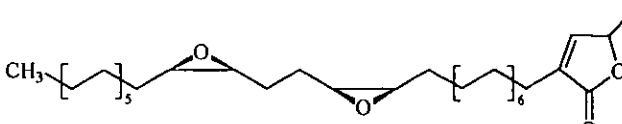
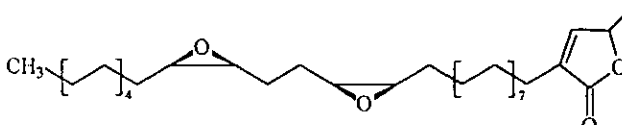
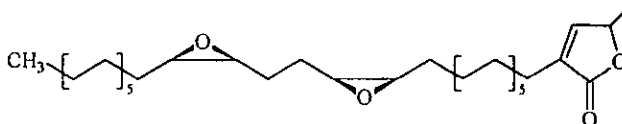
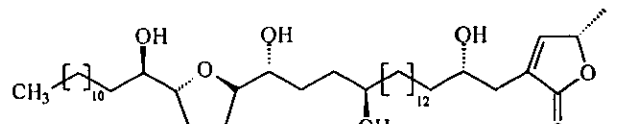
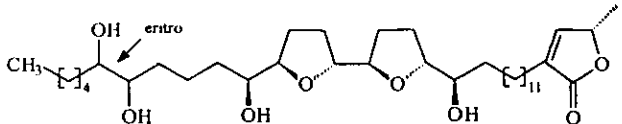
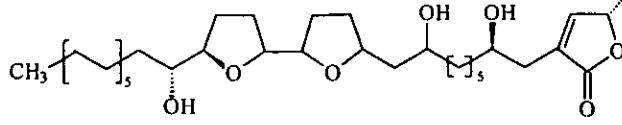
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Rollinia* (Continuación).

	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>rioclarina (28)</p>  <p>esquamocina (29) y roliniastatina 1 (19)</p>	<i>R. membranacea</i>	Saez <i>et al.</i> , 1993
 <p>mucocina (33)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Shi <i>et al.</i> , 1995a
 <p>12,15-cis-silvaticina (30)</p>  <p>muricatetrocina B (31)</p>  <p>bulatalicina (32) y silvaticina (24)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Shi <i>et al.</i> , 1995b
 <p>rolinecina A (14R) (34) y B (14S) (35)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Shi <i>et al.</i> , 1996a

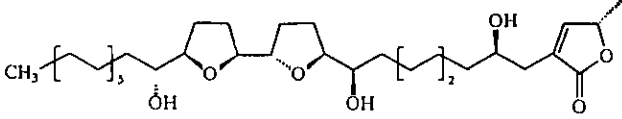
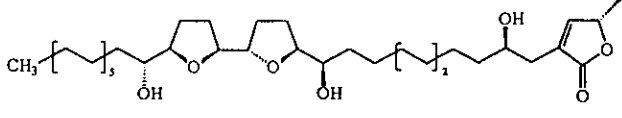
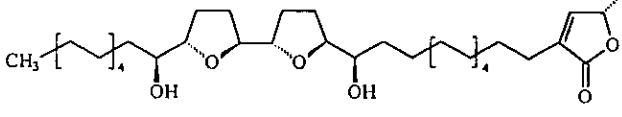
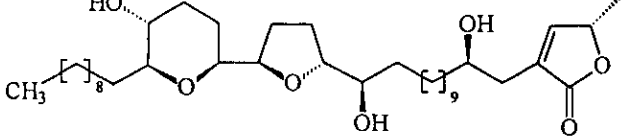
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Rollinia* (Continuación).

	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>mucoxina (36)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Shi <i>et al.</i> , 1996b
 <p>muconina (37)</p>		
 <p>muricatetrocina C (38)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Shi <i>et al.</i> , 1996c
 <p>rolidecina A [24R] (39) y B [24S] (40)</p>		
 <p>epomusenin A (41) m = 6; n = 5 epomusenin B (42) m = 5; n = 6 roliniastatina 1 (19), roliniastatina 2 (21) y esquamocina (29)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Chen <i>et al.</i> , 1996
 <p>12-hidroxi-bulatacina A [12R] (43) y B [12S] (44)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Shi <i>et al.</i> , 1997
 <p>rolimembrina (45)</p>	<i>R. membranacea</i>	González <i>et al.</i> , 1997

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Rollinia* (Continuación).

	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>diepoxirolina (46) <math>n = 6</math>; <math>m = 5</math> diepomuricanina B (47) <math>n = 4</math>; <math>m = 6</math></p>	<i>R. membranacea</i>	Sahpaz <i>et al.</i> , 1997
 <p>dieporeticanina 1 (48)</p>		
 <p>dieporeticanin 2 (49)</p>		
 <p>diepomuricanina A (50) rolinona (23) y silvaticina (24)</p>		
 <p>javoricina (51)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Shi <i>et al.</i> , 1997
 <p>rolitacina (52)</p>		
 <p>rolinacina (53)</p>		

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Rollinia* (Continuación).

	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>rolidecina C (54)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Gu <i>et al.</i> , 1997
 <p>rolidecina D (55)</p>		
 <p>desacetilivaricina (56)</p>		
 <p>jimenezina (57)</p>	<i>Rollinia mucosa</i>	Chávez <i>et al.</i> , 1998

Cabe destacar que la especie de este género que ha sido objeto de un mayor número de investigaciones es *Rollinia mucosa* (Pettit *et al.*, 1987; Laprévotte 1989; Pettit *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1995-97; Rieser *et al.*, 1996; Chávez *et al.*, 1998).

De los compuestos aislados del género *Rollinia* tal vez los de mayor importancia son las acetogeninas las cuales, han demostrado diversas actividades biológicas tales como insecticida, herbicida, antipalúdica, antimicrobiana y anticancerígena, siendo esta última propiedad quizás la más importante desde el punto de vista terapéutico (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1996; Zafra-Polo *et al.*, 1996).

Las acetogeninas de anonáceas son metabolitos secundarios biosintetizados por la ruta acetato malonato. Estos compuestos contienen 35

ó 37 átomos de carbono en su molécula. Invariablemente poseen una metil- $\gamma$ -lactona (saturada o no) y la mayoría posee uno o dos anillos de tipo tetrahidrofurano (THF). Sin embargo, recientemente se han descrito tres productos que presentan un anillo de tetrahidropirano (THP) (Shi *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1996; Chávez *et al.*, 1998). A lo largo de la cadena hidrocarbonada estos compuestos pueden presentar distintos grupos funcionales tales como: hidroxilos, acetilos, epóxidos, dobles ligaduras o cetonas (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1996; Zafra-Polo *et al.*, 1996).

## 1.2 Características de la especie *Rollinia mucosa*.

*Rollinia mucosa* (Jacquin) Baillon es una especie medicinal que se distribuye en toda la zona del neotrópico. En México, se localiza principalmente en el estado de Veracruz donde se conoce con los nombres populares de anonilla, zambo, anonillo, anonita del monte y chirimoya.

Los individuos de esta especie son árboles frondosos que crecen en bosques húmedos y miden hasta 25 m de altura; las hojas son simples y alternas con ápice agudo y venación pinada; la corteza es lisa y de color pardo; la madera, de copa abierta e irregular, es amarilla pálida. Las flores, solitarias o en grupos de tres por nudo, son de color crema. Los frutos, comestibles, son de forma ovoide de color verde; cuando maduran presentan coloración amarillo-café y alcanzan un tamaño de 12 a 20 cm de largo y de 11 a 15 cm de ancho. Las semillas son piriformes y de color café oscuro (ver Figura 1) (Standley y Steyermark, 1946; Williams, 1981; Maas *et al.*, 1992).



Figura 1. *Rollinia mucosa* (Jacquin) Baillon.



La especie *Rollinia mucosa* tiene varias sinonímias taxonómicas, algunas de ellas se enlistan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Sinonímias taxonómicas encontradas para la especie *R. mucosa*.

Nombre de la especie	Autoridad	Localidad
<i>Annona mucosa</i>	Jacquin	Martinique
<i>Annona obtusiflora</i>	Tussac	Las Antillas
<i>Annona squamosa auct.</i>	Linnaeus:Vellozo	Filipinas
<i>Annona biflora</i>	Ruiz y Pavón	Perú
<i>Rollinia pterocarpa</i>	Don Gen	Perú
<i>Rollinia orthopetala</i>	Candolle P.	Guyana
<i>Rollinia sieberi</i>	Candolle P.	Trinidad
<i>Rollinia pulchrinervia</i>	Candolle P.	Guyana, Francesa
<i>Rollinia deliciosa</i>	Safford	Florida E.U.A.
<i>Rollinia jimenezii</i>	Safford J.	Costa Rica
<i>Rollinia permensis</i>	Standley	San Blas, Panamá
<i>Annona pteropetala</i>	Ruiz & Pavón	Perú
<i>Rollinia mucosa var macropoda</i>	(Jacquin) Baillon	Sto. Domingo, Rep. Dominicana
<i>Rollinia mucosa subsp aequatorialis</i>	(Jacquin) Baillon	Amazonas, Brasil
<i>Rollinia mucosa subsp portoricensis</i>	(Jacquin) Baillon	Puerto Rico
<i>Rollinia curvipetala</i>	Fries R.E.	Perú
<i>Rollinia mucosa var. neglecta</i>	(Jacquin) Baillon	Ser Field
<i>Rollinia jimenezii var. nelsonii</i>	Fries R.E.	Veracruz, México.

Al igual que otras especies de *Rollinia*, el fruto de esta especie se emplea para la elaboración de jugos y otras bebidas (Tanaka, 1976). Es

importante destacar que el fruto de esta especie se considera como una exquisitez, motivo por el cual, esta planta se cultiva ampliamente tanto en el nuevo como en el viejo mundo. En América del Sur el fruto se cosecha todo el año y en México y América Central, sólo de Febrero a Julio. La madera de *R. mucosa* es muy apreciada para la construcción. Por otra parte, las hojas son usadas como remedio para el reumatismo. Asimismo, las semillas de la especie se usan para combatir problemas intestinales (Maas *et al.*, 1992). Por último, cabe mencionar que *R. mucosa* goza de reputación folklórica como agente analéptico y antiescorbútico (Morton, 1987).

En investigaciones previas se ha descrito que el extracto alcaloidal de *R. mucosa* de la región de Brasil, presenta actividad antimicrobiana contra microorganismos gram (-) y gram (+) y actividad antifúngica contra *Candida tropicalis* (Caetano y Dadoun, 1987).

Como se indicó previamente, esta especie ha sido objeto de diversas investigaciones químicas y los compuestos obtenidos se indican también en el Cuadro 1.

## II JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La búsqueda de agentes anticancerígenos de origen natural, se ha intensificado notablemente en los últimos años debido a la eficiencia relativamente moderada de algunos agentes quimioterapéuticos como una consecuencia de su alta toxicidad para los tejidos sanos de rápido desarrollo, a la rápida proliferación de algunos tumores y principalmente, a la inducción de resistencia a los fármacos en las células cancerosas (Boyd, 1992; Calabresi y Parks, 1991).

Las investigaciones sistemáticas conducentes a la búsqueda de nuevos agentes antitumorales o moléculas prototipo de origen vegetal, han permitido el descubrimiento de principios biodinámicos de utilidad terapéutica. Ejemplos de fármacos desarrollados mediante este enfoque son la vincristina, la vinblastina, la podofilotoxina, el taxol y la campotecina (Tang, 1992; Robbers *et al.*, 1997). Es importante mencionar, que el criterio más relevante que permitió la preselección de las materias primas vegetales de los agentes quimioterapéuticos antes mencionados, fue la información etnomédica. Recientemente, se descubrió que las anonáceas constituyen una fuente potencial de acetogeninas, compuestos antitumorales que actúan como inhibidores del transporte mitocondrial con una acción específica en el complejo I de la fosforilación oxidativa (Ahammadsahib *et al.*, 1993). Las acetogeninas de las anonáceas al inhibir la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, la generación de ATP impiden la expresión de la resistencia a numerosos agentes quimioterapéuticos (Morré *et al.*, 1995). En consecuencia, este efecto resulta en la inhibición de la glicoproteína P-170, constituyente de la membrana plasmática de las células resistentes a los fármacos y que actúa como una bomba dependiente de ATP, misma que mantiene los niveles de los agentes citotóxicos por debajo de las concentraciones letales para las células cancerosas. La importancia de este mecanismo de acción, es su futura

aplicación en la terapéutica de tumores resistentes y en la posibilidad de su empleo en las terapias de combinación con otros agentes antitumorales en las cuales, las acetogeninas pueden actuar como coadyuvantes terapéuticos mediante la inhibición de la actividad de la P-glicoproteína y, por lo tanto, como agentes inhibidores efectivos para el desarrollo de la resistencia (Ahammadsahib *et al.*, 1993).

México cuenta con un gran número de anonáceas que constituyen una fuente potencial de acetogeninas antitumorales. Sin embargo, a la fecha los estudios fitoquímicos realizados con la finalidad de obtener este importante tipo de compuestos son escasos (Chávez 1998 a, b).

En el caso específico del estudio realizado sobre la especie recolectada en México, condujo al aislamiento de una acetogenina citotóxica con un esqueleto novedoso; este compuesto se designó con el nombre trivial de jimenezina. Considerando que el producto novedoso demostró un efecto citotóxico significativo y selectivo contra tres líneas celulares derivadas de tumores humanos, las que incluyeron adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata y carcinoma de páncreas, se consideró pertinente realizar un nuevo estudio de la especie, con la finalidad de obtener compuestos relacionados a la jimenezina con una actividad citotóxica también selectiva.

En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo primordial la obtención de sustancias citotóxicas con un potencial anticancerígeno a partir de la especie *Rollinia mucosa* (Jacquin) Baillon (Annonaceae) recolectada en la región de los Tuxtlas, Veracruz, México, y contribuir así, al desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

Los objetivos específicos planteados para la implementación de este proyecto de tesis se indican a continuación:

1. Preparar el extracto CH<sub>3</sub>-MeOH (1:1) de las semillas de *Rollinia mucosa* mediante un proceso de maceración.

2. Determinar la toxicidad para *Artemia salina* del extracto resultante y evaluar su potencial citotóxico, utilizando diversas líneas celulares derivadas de tumores humanos.

3. Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto total, monitoreando la actividad biológica mediante la determinación de la toxicidad para el crustáceo *A. salina*.

4. Optimizar las condiciones instrumentales a nivel analítico y preparativo para la purificación de los constituyentes individuales de la mezcla de principios activos mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

5. Caracterizar los compuestos citotóxicos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

6. Determinar la toxicidad de las fracciones y de los compuestos puros contra el crustáceo *Artemia salina*.

7. Evaluar el potencial citotóxico de los compuestos aislados de *Rollinia mucosa* sobre varias líneas celulares derivadas de tumores humanos.

### III PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material vegetal.

Las semillas de *Rollinia mucosa* (Annonaceae) se colectaron en la localidad de San Rafael, municipio de Catemaco, Veracruz, el 9 de Septiembre de 1994. Las semillas se secaron a temperatura ambiente y se fragmentaron en un molino Thomas-Wiley modelo 4.

#### 3.2 Ensayos biológicos.

##### 3.2.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

El extracto orgánico, las fracciones y los compuestos puros se evaluaron utilizando el bioensayo de toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* (TAS), empleando la metodología previamente descrita por Anderson y colaboradores (1991).

Los huevecillos del crustáceo *Artemia salina* se incuban durante 48 h en un medio salino artificial, previamente oxigenado. Al termino de este tiempo, los crustáceos se encuentran disponibles para realizar el bioensayo.

Las muestras se preparan disolviendo 20 mg del material de prueba (extracto, fracción y/o compuesto puro), en 2 ml del disolvente apropiado. De esta solución se transfieren 500, 50 y 5  $\mu$ l a cada vial, por triplicado, y se deja evaporar el disolvente a sequedad, ya sea a temperatura ambiente o al vacío. Posteriormente, se transfieren 10 larvas del crustáceo a cada uno de los viales que contienen las muestras a evaluar y se aforan con 5 ml del medio salino artificial. De esta manera se obtienen concentraciones finales de 1000, 100 y 10  $\mu$ g/ml. De manera adicional, se hicieron diluciones posteriores a fin de obtener concentraciones finales de 10, 1, 0.1 y 0.01  $\mu$ g/ml.

Los viales se mantienen con iluminación artificial durante 24 h; después de este tiempo se procede a contar el número de crustáceos sobrevivientes. Para el cálculo de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se emplea el programa de análisis de probabilidad de Finney mediante un programa de cómputo (Anderson *et al.*, 1991).

Este ensayo se utilizó para monitorear el fraccionamiento biodirigido del extracto total de *Rollinia mucosa*.

### 3.2.2 Determinación de la actividad citotóxica.

La determinación de la actividad citotóxica del extracto y de los compuestos puros se realizó sobre 6 líneas celulares derivadas de tumores humanos: carcinoma de pulmón (A-549); carcinoma de pecho (MCF-7); adenocarcinoma de colon (HT-29); carcinoma de riñón (A-498); adenocarcinoma de próstata (PC-3) y carcinoma de páncreas (PACA-2). Los resultados se expresan en términos de las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>).

Las evaluaciones se realizaron de acuerdo a los protocolos previamente descritos (Anderson *et al.*, 1991), en el "Cell Culture Laboratory, School of Pharmacy and Pharmacal Science, Purdue University", EE.UU.

### 3.3 Análisis cromatográficos.

Con el fin de monitorear el desarrollo de la cromatografía en columna abierta, se utilizó la técnica cromatográfica en capa fina (ccf). Los análisis correspondientes se realizaron en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (silica gel 60 GF 254 Merck) con un espesor de 0.25 mm. El análisis en columna abierta se efectuó siguiendo las técnicas convencionales. Como agente adsorbente se empleó gel de sílice Merck 60, gránulo de

0.20-0.063 mm, malla de 70-230  $\mu$ . Se utilizaron varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos, mismos que se incluyen en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Agentes cromógenos utilizados para el análisis cromatográfico en capa fina.

Reactivo	Composición	Referencia
Sulfato cérico amoniacal	12 g de Sulfato cérico amoniacal. 22.2 ml de Ac. Sulfúrico 350 g de hielo picado	Stahl 1969.
Acido Fosfomolibdico	Ac. Fosfomolibdico al 5 % en Metanol	Rupprecht <i>et al</i> 1986.
Azul de tetrazolio	Azul de tetrazolio al 0.5 % en Metanol y NaOH 5N (1:1)	Rupprecht <i>et al</i> 1986.

♦ En todos los casos para el desarrollo de color fue necesario calentar durante cinco minutos a 30 °C aproximadamente.

Para realizar el análisis en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), se empleó un cromatógrafo marca Waters equipado con una bomba modelo 600E con sistema de entrega de disolventes múltiple y un sistema de bombeo de gradiente a baja presión, provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i. Para visualizar los compuestos se empleó un detector de Ultravioleta/Visible (modelo 996-Waters). El equipo está acoplado a una computadora Venturis 575 y consta de un Software sistema administrador Millenium 2010, el sistema adquiere datos y controla el detector y la bomba. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente.



### **3.3.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel analítico.**

El método de cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel analítico, nos conduce a optimizar las condiciones instrumentales necesarias para lograr la máxima resolución de la muestra y separar posteriormente a nivel preparativo. Los análisis se realizaron en una columna empacada con gel de sílice microporasil con un tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$  y un tamaño de poro de 125Å. El diámetro interno de la columna es de 3.9 mm y la longitud de 300 mm. La concentración de las muestras problema utilizadas en estos análisis fue de 0.5 mg en un volumen inyectado de 20  $\mu\text{l}$ . La elución se realizó con un sistema isocrático y la fase móvil consistió en una mezcla ternaria constituida por hexano-metanol-isopropanol. La velocidad de flujo fue de 0.35 ml/min. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue de 209 nm.

### **3.3.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo.**

Una vez determinadas las condiciones a nivel analítico se realizó el escalamiento a nivel preparativo, lo que nos permitió la separación y purificación de los constituyentes de las fracciones secundarias.

Se utilizó una columna preparativa empacada con gel de sílice microporasil con un tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$  y un poro de 125Å; el diámetro interno es de 19 mm y la longitud de 300 mm; para todas las separaciones se utilizó el mismo sistema de disolventes indicado en el inciso 3.3.1. En todos los casos, se recurrió a la técnica de corte de núcleo y reciclaje de muestra. Este método consistió en someter a los picos mayoritarios de interés a un corte, eliminando así la contaminación causada por los componentes minoritarios eluidos antes y después del pico en cuestión mismo

que se sometió a un reciclamiento en el sistema cromatográfico tantas veces como fue necesario hasta alcanzar su purificación (Hostettmann, 1986).

### **3.4 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos aislados.**

Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 599. En todos los casos las muestras se analizaron utilizando la técnica de película.

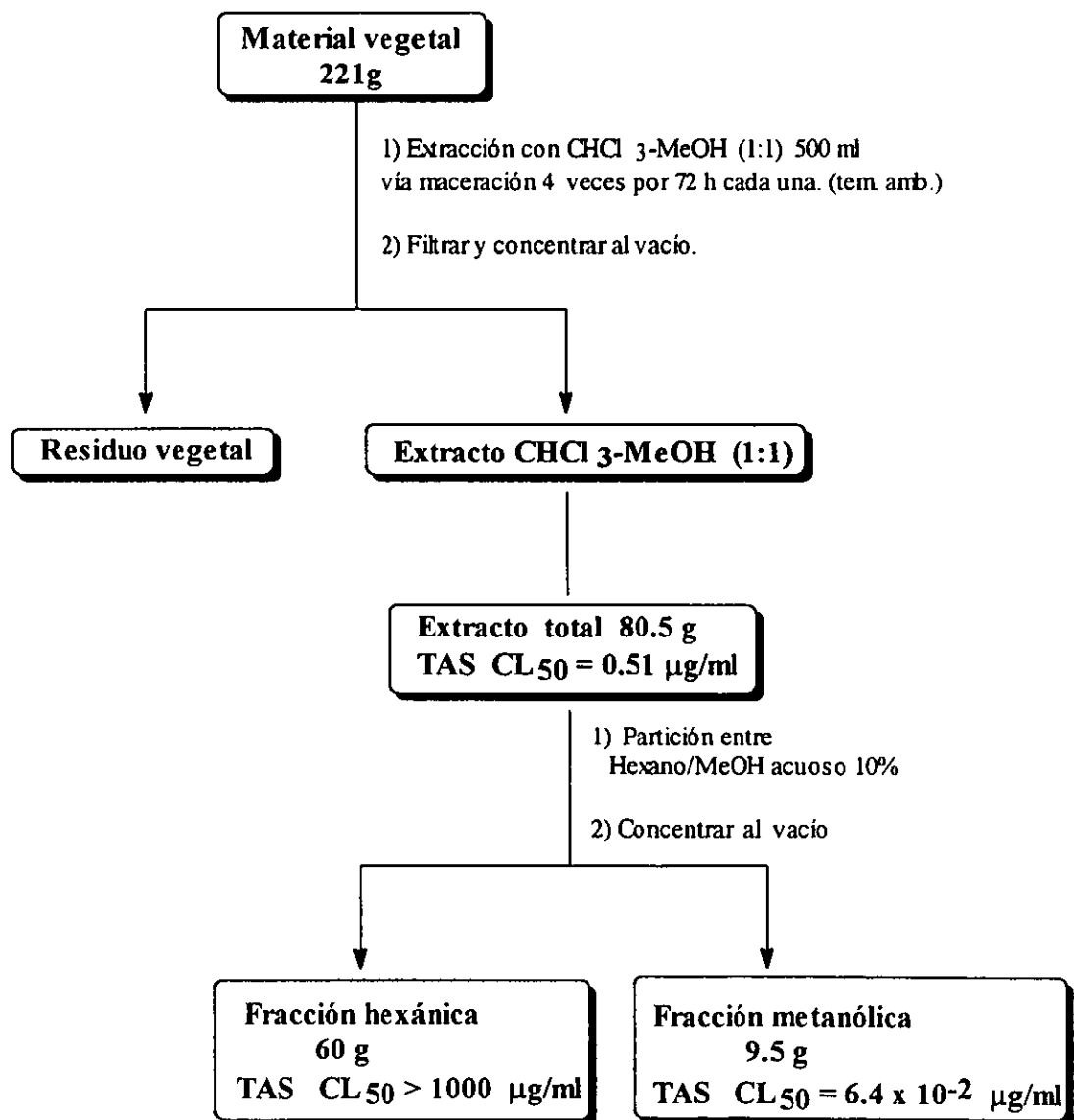
La espectrometría de masas en su modalidad de Bombardeo Rápido de Átomos (FAB) se registró en un aparato JEOL DX 300 con un sistema JMA 3500, empleando como matriz alcohol nitrobencílico (NBA); para el bombardeo de átomos se utilizó Xenón con 6 keV. Los espectros de masas de impacto electrónico para los derivados tetrametilsilados (TMSi) se determinaron en un aparato JEOL-AX505HA, mediante introducción directa a 70 eV. Los espectros de resonancia magnética nuclear se registraron en un aparato Varian VXR-3005 utilizando como disolvente  $\text{CDCl}_3$  y como referencia interna TMS. Todos los espectros se determinaron en el Instituto de Química, UNAM.

### **3.5 Extracción de las semillas de *Rollinia mucosa*.**

El material seco y molido (221 g) se extrajo mediante un proceso de maceración con un volumen de 500 ml de una mezcla binaria de  $\text{CHCl}_3$  -MeOH (1:1). Se realizaron 4 extracciones a temperatura ambiente, cada una por un período de 4 días. Al término de la extracción, el extracto líquido resultante se concentró al vacío obteniéndose un total de 80.5 g de extracto seco. En el Esquema 1 se resume el procedimiento empleado.

### 3.6 Fraccionamiento biodirigido del extracto total.

El extracto total de *Rollinia mucosa* (80.5 g) se fraccionó mediante un proceso de partición líquido-líquido, utilizando para ello, un sistema de hexano (400 ml) y MeOH acuoso 10 % (500 ml). En el Esquema 1 se resume el procedimiento empleado para la extracción y el fraccionamiento preliminar del extracto.



**Esquema 1.** Proceso de extracción y fraccionamiento primario de las semillas de *Rollinia mucosa*.

### 3.7 Fraccionamiento secundario de la fracción metanólica.

La fracción metanólica (9.5 g) tóxica para el crustáceo *A. salina* ( $CL_{50} = 6.4 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ ), se fraccionó de manera secundaria por medio de una cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice (177 g).

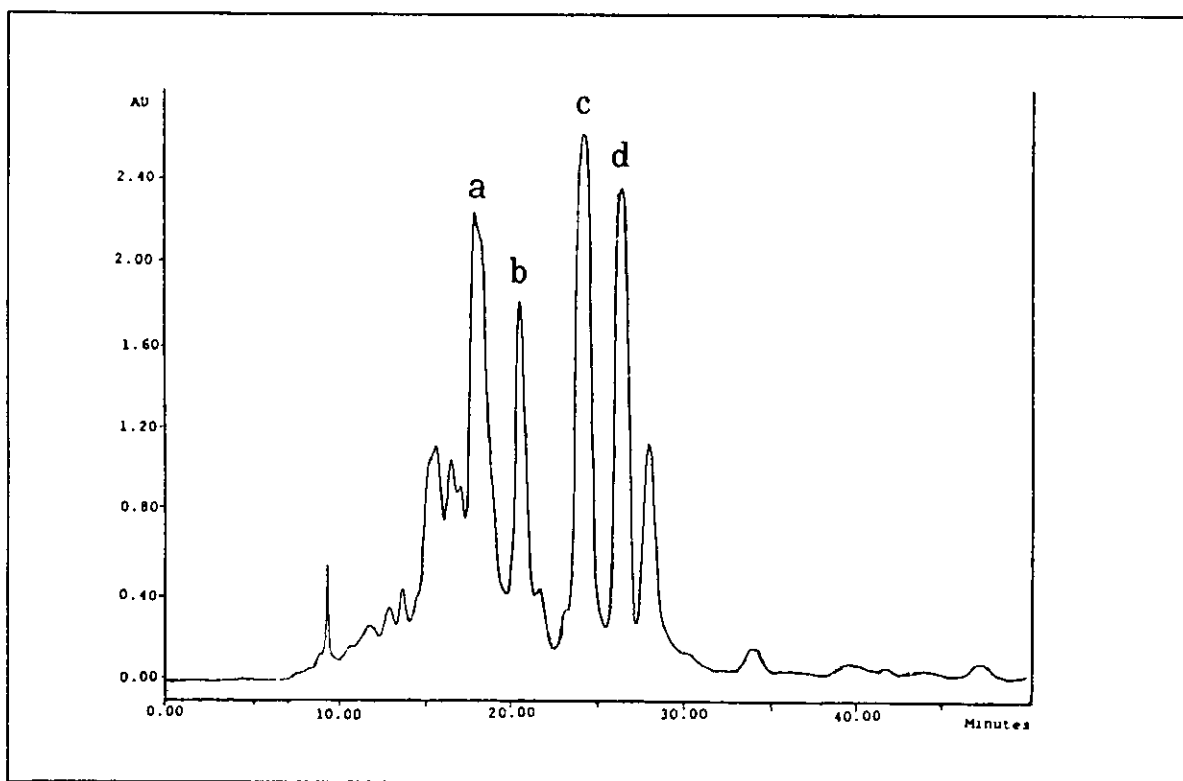
El proceso de elución se efectuó con hexano- $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, en diferentes proporciones. Se recolectó un total de 230 fracciones; cada una se analizó mediante cromatografía en capa fina. Este proceso permitió combinar aquellas que presentaron características similares. En el cuadro 4 se resume el fraccionamiento del extracto metanólico, los eluyentes empleados, las fracciones combinadas y los valores de toxicidad para *Artemia salina* expresados en términos de la concentración letal media  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ).

Cuadro 4. Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )
Hex/ $\text{CHCl}_3$	20:80	1-61	I	1.757	> 1000
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	98:2	62-67	II	0.232	41.9
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	98:2	68-84	III	0.558	2.23
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	97:3	85-101	IV	1.971	$7 \times 10^{-2}$
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	96:4	102-111	V	0.610	$4.5 \times 10^{-2}$
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	95:5	112-122	VI	0.194	$2.8 \times 10^{-2}$
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	92.5-7.5	123-164	VII	0.432	$6.6 \times 10^{-2}$
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	90:10	165-184	VIII	0.110	$1.7 \times 10^{-1}$
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	80:20	185-203	IX	0.289	1.58
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	70:30	204-206	X	0.100	26.94
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	70:30	207-211	XI	0.105	896.05
$\text{CHCl}_3$ -MeOH	50:50	212-230	XII	0.851	49.74

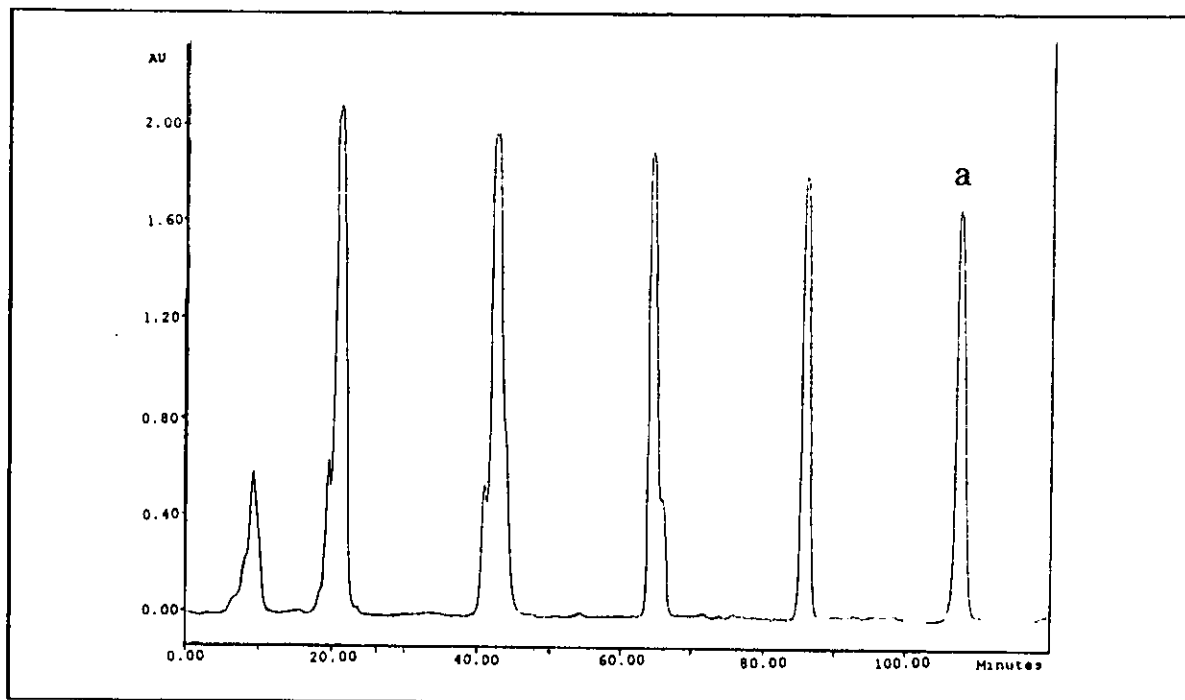
### 3.8 Aislamiento y purificación de membranacina (27), desacetilivaricina(56), éter dimetilico del pinorresinol (58) y Magnolina (15) de la fracción activa III.

El aislamiento y purificación de los constituyentes individuales presentes en las fracciones secundarias activas, se realizó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Para la resolución de la fracción activa III se determinaron en primer lugar las condiciones óptimas de separación a nivel analítico. Posteriormente, se procedió a realizar la separación a nivel preparativo; el cromatograma resultante se muestra en la Figura 2 y como se puede apreciar, la fracción contiene 4 compuestos mayoritarios (picos a-d).



**Figura 2.** Cromatograma obtenido a nivel preparativo para la fracción III. Condiciones de análisis: Detector UV/Visible,  $\lambda = 209$  nm. Sistema de elución: Hexano-MeOH-iPr (92:4:4). Flujo de 7.5 ml/min. Concentración de la muestra 15 mg /500  $\mu$ l. Picos: a  $t_R$  17.9 min, b  $t_R$  20.5 min, c  $t_R$  24.2 min, d  $t_R$  26.4 min.

Para lograr la purificación del compuesto **27** se utilizó el método de rasurado y reciclado del pico a  $t_R$  21.12 min (Figura 3). Este proceso permitió la obtención de 12 mg del producto **27** bajo la forma de un sólido con apariencia de cera blanca.



**Figura 3.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo generado durante la purificación del compuesto **27** mediante la técnica de reciclaje de muestra. Las condiciones instrumentales se indican en el pie de la Figura 2. La concentración de la muestra fue de 3 mg/ 100  $\mu$ l.

Para lograr la purificación del compuesto **56**, correspondiente al pico **b** (46.6 mg), se realizaron cromatografías sucesivas utilizando la técnica de corte de núcleo (Figura 4). El empleo de esta técnica permitió el aislamiento de 17 mg de desacetilivaricina (**56**) bajo la forma de un sólido blanco con un punto de fusión de 61-62 °C.

Para la purificación del compuesto **58** [correspondiente al pico **c** (34.6 mg)] se utilizó la técnica de corte de núcleo (Figura 5). Una vez purificado por CLAR se recristalizó con  $\text{CHCl}_3$ , generando 19 mg del compuesto **58** bajo la forma de agujas cristalinas de color blanco, con un  $pf = 106$  °C.

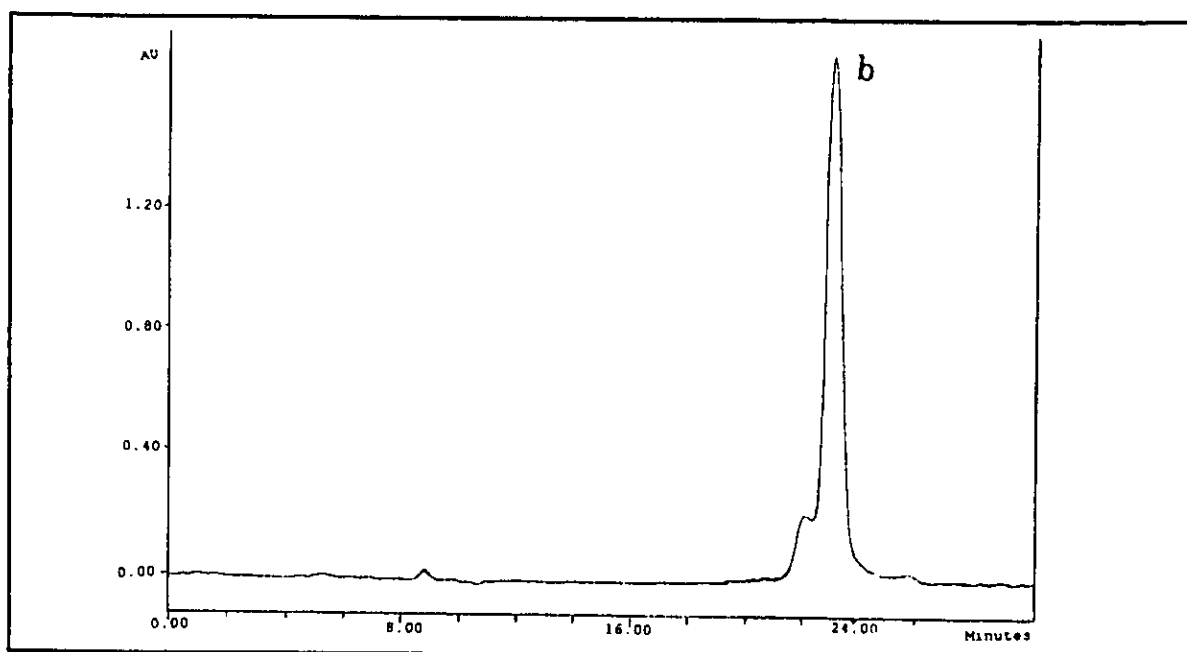


Figura 4. Cromatograma generado durante la purificación del pico b mediante el proceso de corte de núcleo. Las condiciones instrumentales se indican en el pie de Figura 2. La concentración de la muestra fue de 3 mg/100  $\mu$ l.

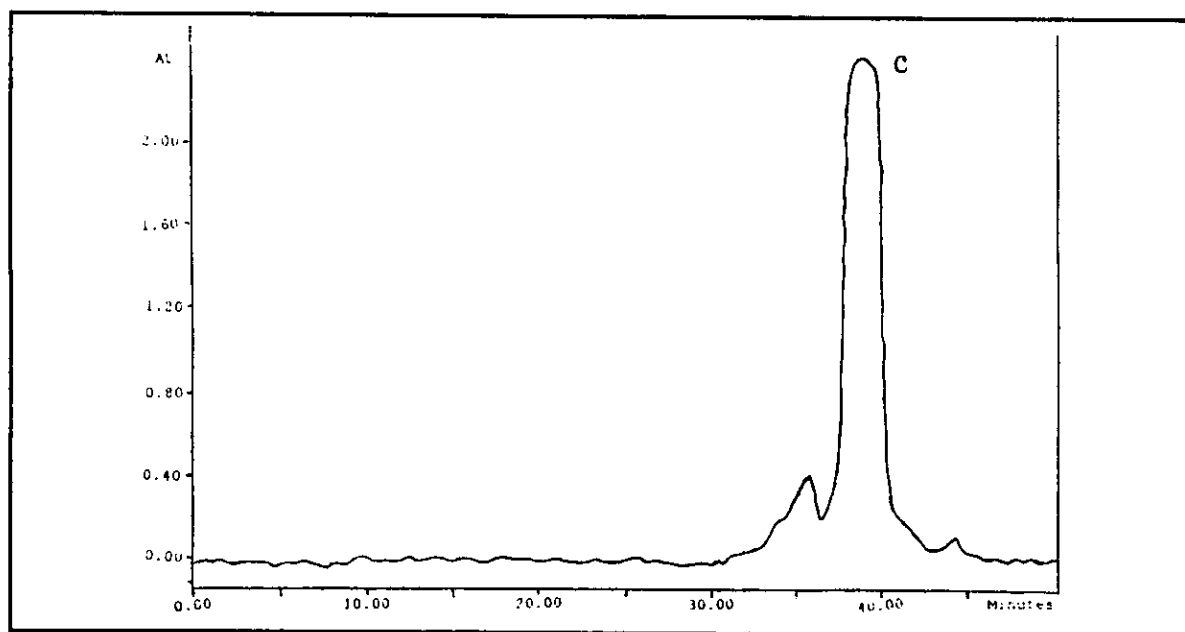


Figura 5. Cromatograma generado durante la purificación del pico c mediante el proceso de corte de núcleo. Las condiciones instrumentales se indican en el pie de Figura 2. La concentración de la muestra fue de 2 mg/100  $\mu$ l.

Por último, el residuo (14.5mg) correspondiente al pico d se recromatografió mediante la técnica de corte de núcleo (Figura 6). Así, se purificaron 9 mg de magnolina (15) como un sólido cristalino en forma de agujas con un  $pf = 96-97\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

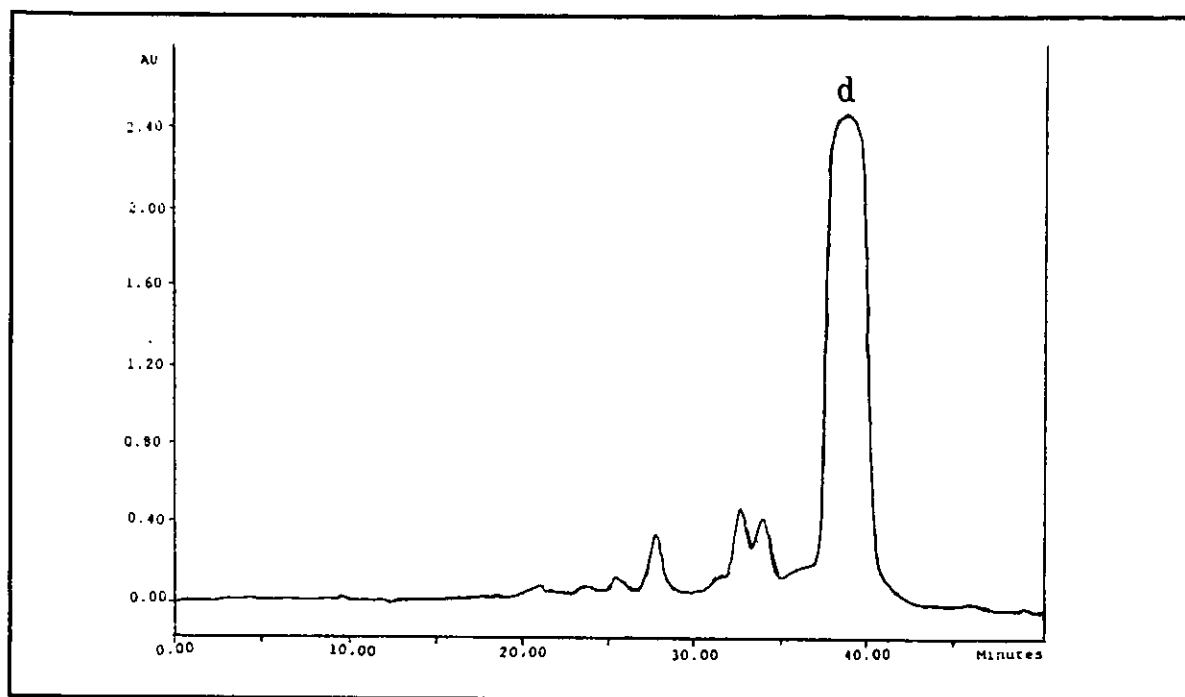


Figura 6. Cromatograma generado durante la purificación del pico d mediante el proceso de corte de núcleo. Las condiciones instrumentales se indican en el pie de Figura 2. La concentración de la muestra fue de 3.2 mg/100  $\mu\text{l}$ .



### 3.9 Aislamiento y Purificación de roliniastatina 1 (19), bulatacina (21), esquamocina (29) y motrilina (59) de la fracción activa V.

Para la resolución de la fracción activa V se determinaron las condiciones a nivel analítico. Después se realizó el escalamiento a nivel preparativo. El cromatograma resultante se muestra en la Figura 7. La purificación de los residuos correspondientes a los picos mayoritarios (a-d) permitió la obtención de los siguientes compuestos: roliniastatina 1 (19) con un  $t_R$  de 32.48 min, bulatacina (21) con un  $t_R$  de 36.9 min, esquamocina (29) con un  $t_R$  de 39.3 min y motrilina (57) con un  $t_R$  de 46.21 min.

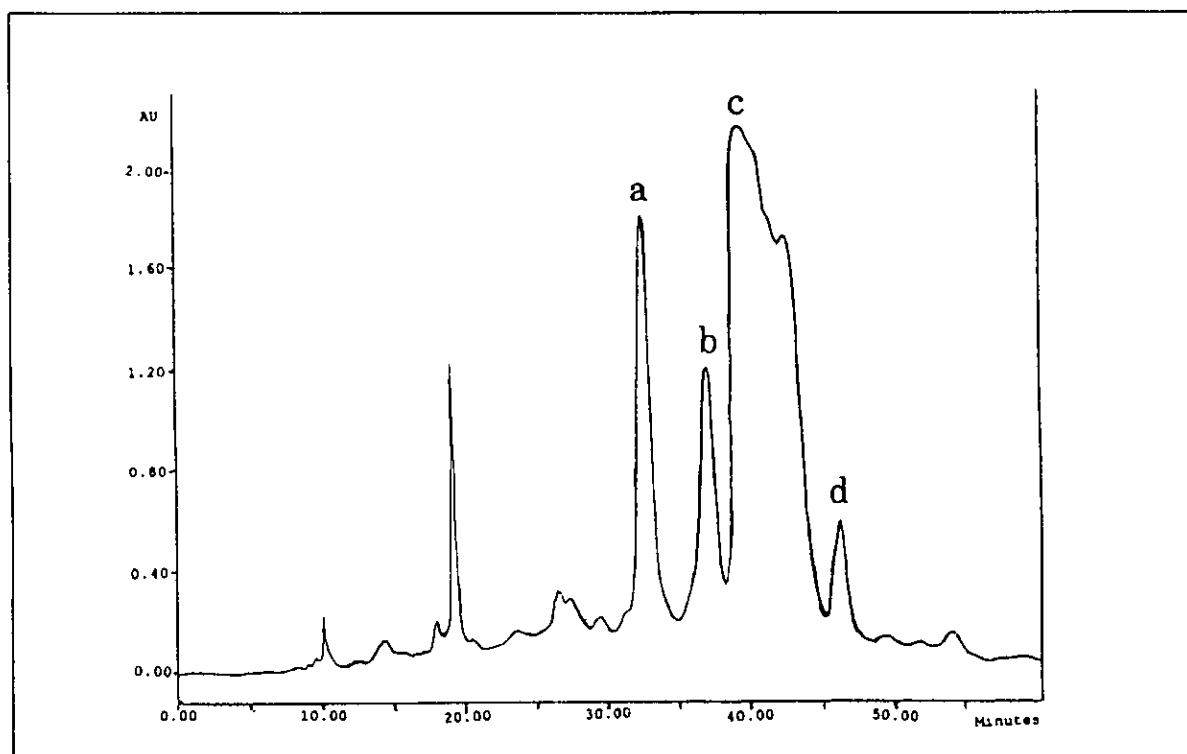


Figura 7. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo que ilustra la separación de la fracción V. Condiciones de análisis: Detector de UV/visible,  $\lambda = 212$  nm. Sistema de elución: Hexano-MeOH-iPr (88:6:6). Flujo de 8.3 ml/min. La concentración de la muestra fue de 15 mg/500  $\mu$ l.

El residuo (437mg) correspondiente al pico a se recromatografió utilizando la técnica de corte y reciclado de núcleo (Figura 8). Este proceso generó 400 mg del compuesto **19** bajo la forma de un aceite amarillo.

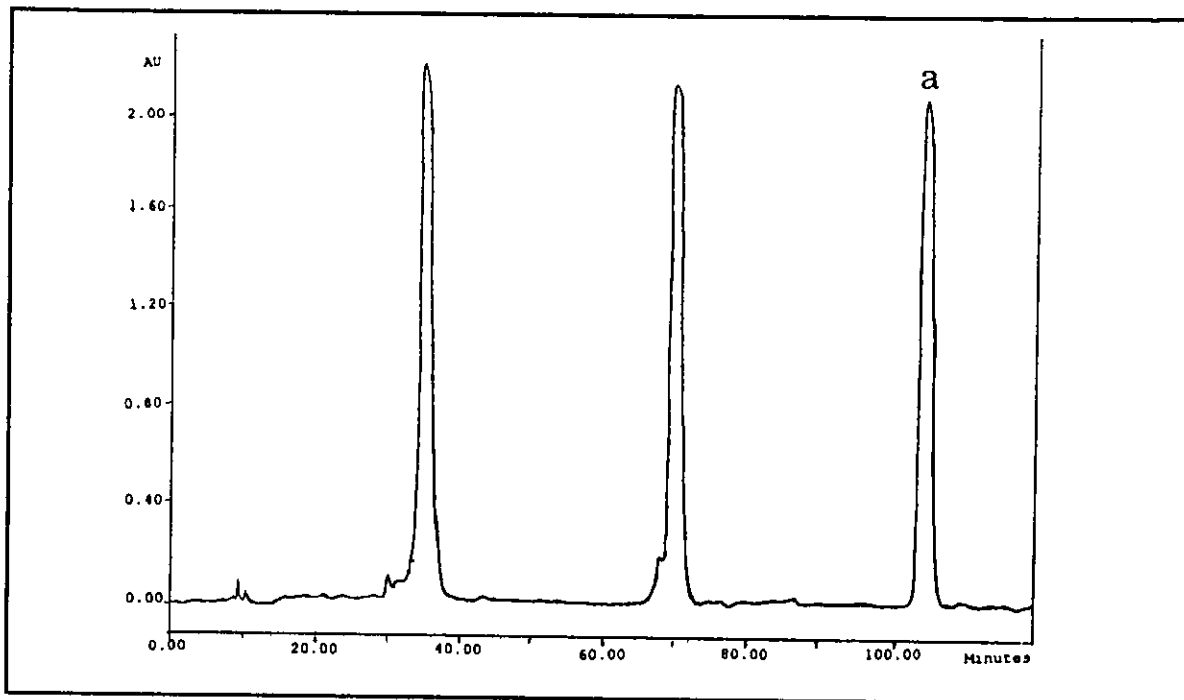


Figura 8. Cromatograma generado durante la purificación del pico a mediante el proceso de corte de núcleo. Las condiciones instrumentales se indican en el pie de Figura 7. La concentración de la muestra fue de 2 mg/100  $\mu$ l.

La aplicación de la técnica de corte de núcleo (Figura 9), permitió la obtención de 45 mg del compuesto **21** como un sólido con apariencia de cera amarillenta, a partir de 51 mg del residuo correspondiente al pico b.

La purificación del residuo correspondiente al pico c (205 mg) se hizo con la técnica de corte y reciclado de núcleo (Figura 10). Este proceso permitió la obtención de 57 mg del compuesto **29** totalmente puro como un sólido con apariencia de cera blanca.

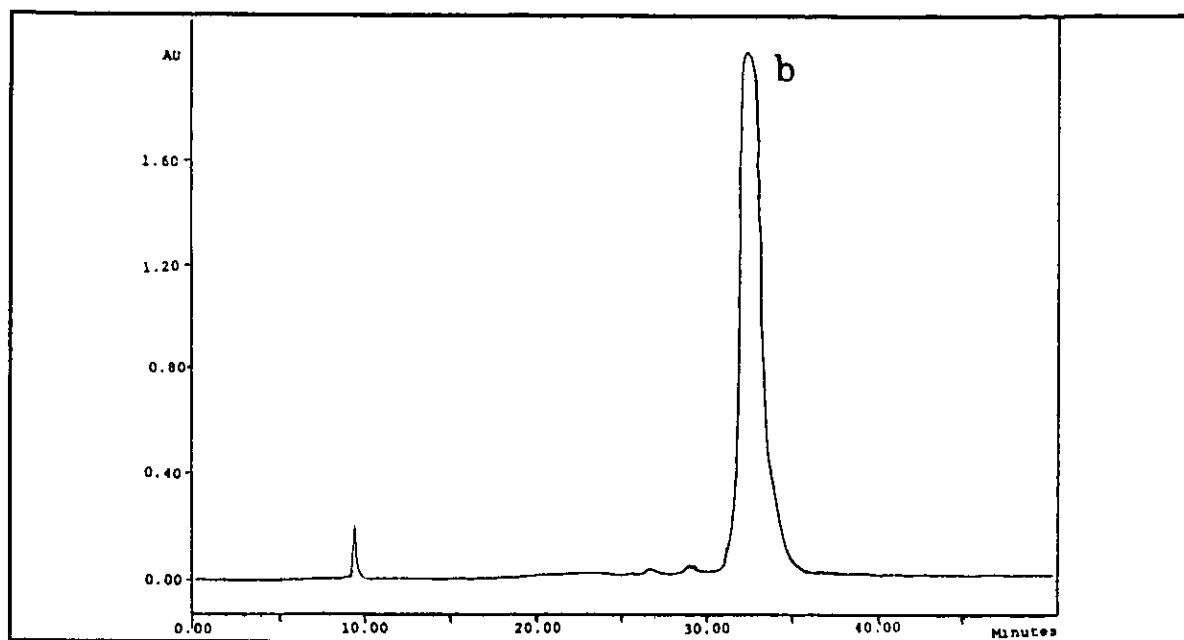


Figura 9. Cromatograma generado durante la purificación del pico b mediante el proceso de corte de núcleo. Las condiciones instrumentales se indican en el pie de Figura 7. La concentración de la muestra fue de 3 mg/100  $\mu$ l.

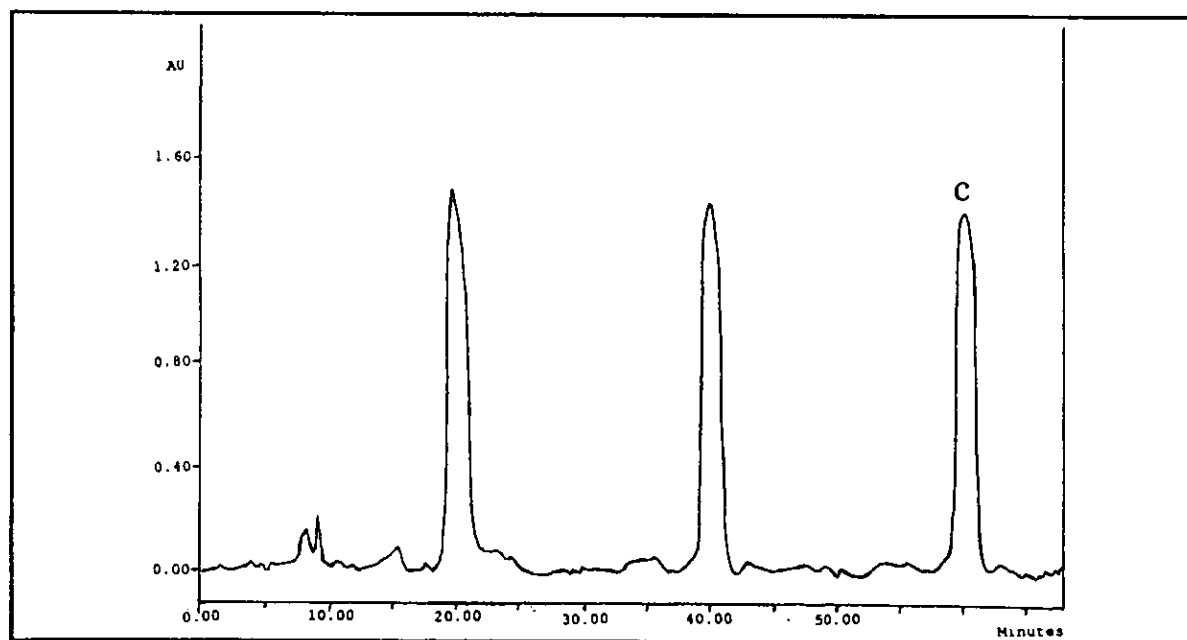


Figura 10. Cromatograma generado durante la purificación del pico c mediante la técnica de reciclaje de muestra. Las condiciones instrumentales se indican en el pie de Figura 7. La concentración de la muestra fue de 8.2 mg/100  $\mu$ l.

Por último, a partir del residuo (27.5 mg) correspondiente al pico d (Figura 11), se obtuvieron 17 mg adicionales del compuesto 59 como un sólido blanco con apariencia de cera.

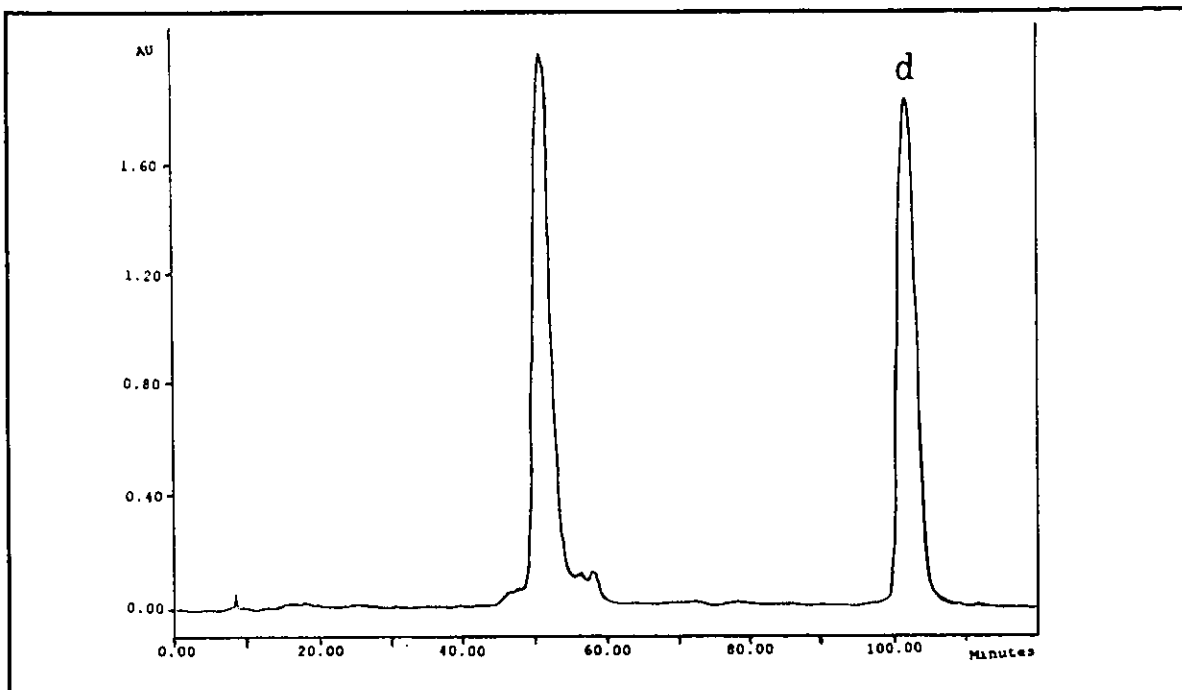


Figura 11. Cromatograma generado durante la purificación del pico d mediante la técnica de rasurado y reciclaje de muestra. Las condiciones instrumentales se indican en el pie de Figura 7. La concentración de la muestra fue de 5.4 mg/100  $\mu$ l.

### 3.10 Preparación de los derivados de los compuestos puros.

#### 3.10.1 Procedimiento para la obtención de los derivados sililados.

La sililación de los compuestos se realizó mediante el tratamiento de 1.0 mg del compuesto puro con 100  $\mu$ l de SIGMA-SIL-A [trimetilclorosilano-hexadimetilsilano-piridina (1:3:9)]. La mezcla resultante se sometió a calentamiento durante 10 min en baño maría a 40 °C (Hussain *et al.*, 1990).

### 3.10.2 Obtención de los ésteres de Mosher de las acetogeninas membranacina (27) y desacetilivaricina (56).

La preparación de los ésteres de Mosher, se realizó mediante el tratamiento de 1.5 mg de compuesto puro disueltos en 0.5 ml de cloroformo deuterado, seguido de la adición de piridina deuterada (0.5 ml) y 25 mg de cloruro de (*R*)-(-)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluorometil)fenilacetilo o cloruro de (*S*)-(+)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluorometil)fenilacetilo, para generar los ésteres de Mosher *S* y *R*, respectivamente (Rieser *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1994).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

La preselección de la especie *Rollinia mucosa* se realizó considerando que la misma ha demostrado en estudios previos ser una fuente de acetogeninas citotóxicas (Pettit *et al.*, 1987 y 1989; Shi *et al.*, 1995 - 1997; Chávez *et al.*, 1998a). Por lo tanto, se realizaron ensayos conducentes a la determinación de la potencialidad citotóxica comprobándose que el extracto de las semillas de la planta, contiene principios capaces de inhibir el crecimiento celular de seis líneas celulares derivadas de tumores humanos. Estas líneas incluyeron: Carcinoma de pulmón (A-549), carcinoma de pecho (MCF-7), adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de riñón (A-498), adenocarcinoma de próstata (PC-3) y carcinoma de páncreas (PACA-2); como un control positivo para estas pruebas se utilizó la adriamicina. Los resultados de estas evaluaciones se indican en el Cuadro 5, y los mismos se expresan en forma de concentraciones efectivas medias ( $CE_{50}$ ). Se considera como una actividad significativa aquellos valores de  $CE_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$  (Suffness and Pezzuto, 1991). De acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto de *Rollinia mucosa* tiene una actividad significativa y selectiva contra el carcinoma de riñón (A-498) y el adenocarcinoma de próstata (PC-3). El extracto también demostró una toxicidad significativa para el crustáceo *Artemia salina* Leach; la concentración letal media  $CL_{50}$  fue de  $0.51 \mu\text{g/ml}$ . Es importante mencionar que la toxicidad para *A. salina* demostrado por el extracto de *R. mucosa* en el presente estudio, es menor a la descrita ( $CL_{50} = 21 \mu\text{g/ml}$ ) por Shi y colaboradores (1997) en un estudio previo.

Estos resultados de citotoxicidad y toxicidad para *A. salina*, no eran inesperados ya que en la especie se ha demostrado la presencia de acetogeninas altamente citotóxicas como la roliniastatina 1 y la bulatacina (Rupprecht *et al.*, 1990; Pettit *et al.*, 1987; Hui *et al.*, 1989).

**Cuadro 5.** Toxicidad para el crustáceo *A. salina* y citotoxicidad del extracto total de *Rollinia mucosa*.

Muestra	TAS	Línea celular CE <sub>50</sub> * (µg/ml)					
	CL <sub>50</sub> + (µg/ml)	A-549 <sup>A</sup>	MCF-7 <sup>B</sup>	HT-29 <sup>C</sup>	A-498 <sup>D</sup>	PC-3 <sup>E</sup>	PACA-2 <sup>F</sup>
Extracto total	0.51	>10	>10	>10	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	>10
Adriamicina	--	8.9x10 <sup>-3</sup>	3.6x10 <sup>-3</sup>	3.7x10 <sup>-3</sup>	8.3x10 <sup>-3</sup>	5.6x10 <sup>-3</sup>	1.1x10 <sup>-3</sup>

+ Concentración letal media. \* Concentración efectiva media. <sup>A</sup>Carcinoma de pulmón. <sup>B</sup>Carcinoma de pecho. <sup>C</sup> Adenocarcinoma de colon. <sup>D</sup> Carcinoma de riñón. <sup>E</sup> Adenocarcinoma de próstata. <sup>F</sup> Carcinoma de páncreas.

Una vez demostrada la potencialidad citotóxica del extracto, este se fraccionó de manera preliminar mediante un proceso de partición entre hexano-MeOH acuoso al 10 %. De nueva cuenta, se determinó la toxicidad para *A. salina* de las fracciones resultantes y la mayor actividad se concentró en la fracción metanólica (ver figura 2 de la sección experimental).

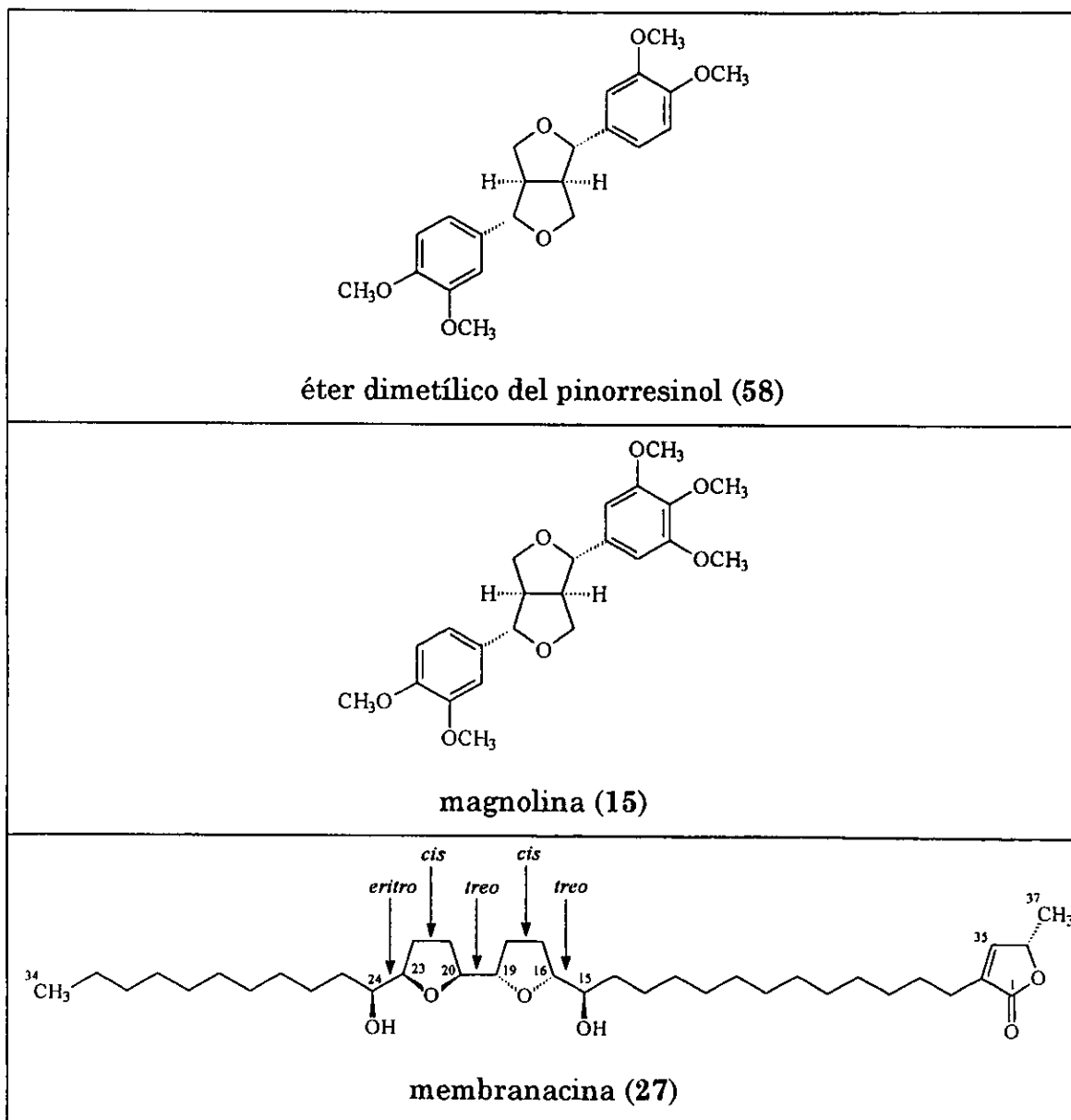
Con la finalidad de obtener los compuestos activos de la fracción metanólica, se realizó en primera instancia, un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta, usando gel de sílice como fase estacionaria. Este proceso permitió la obtención de doce fracciones secundarias. Las fracciones resultantes también se evaluaron con el bioensayo para *A. salina*. El resultado de las evaluaciones se encuentra detallado en el Cuadro 4 (sección experimental). Como se desprende de los mismos, las fracciones III-IX presentan una toxicidad significativa contra *A. salina*, las fracciones II, X-XII tienen una actividad marginal y la fracción I resultó inactiva, ya que los valores de Cl<sub>50</sub> fueron mayores a 20 µg/ml y 1000 µg/ml, respectivamente.

Para la separación de los compuestos presentes en las fracciones activas III y V, se aplicó la cromatografía de líquidos de alta resolución. Este proceso permitió el aislamiento y la purificación de ocho metabolitos secundarios. Los compuestos aislados incluyeron:

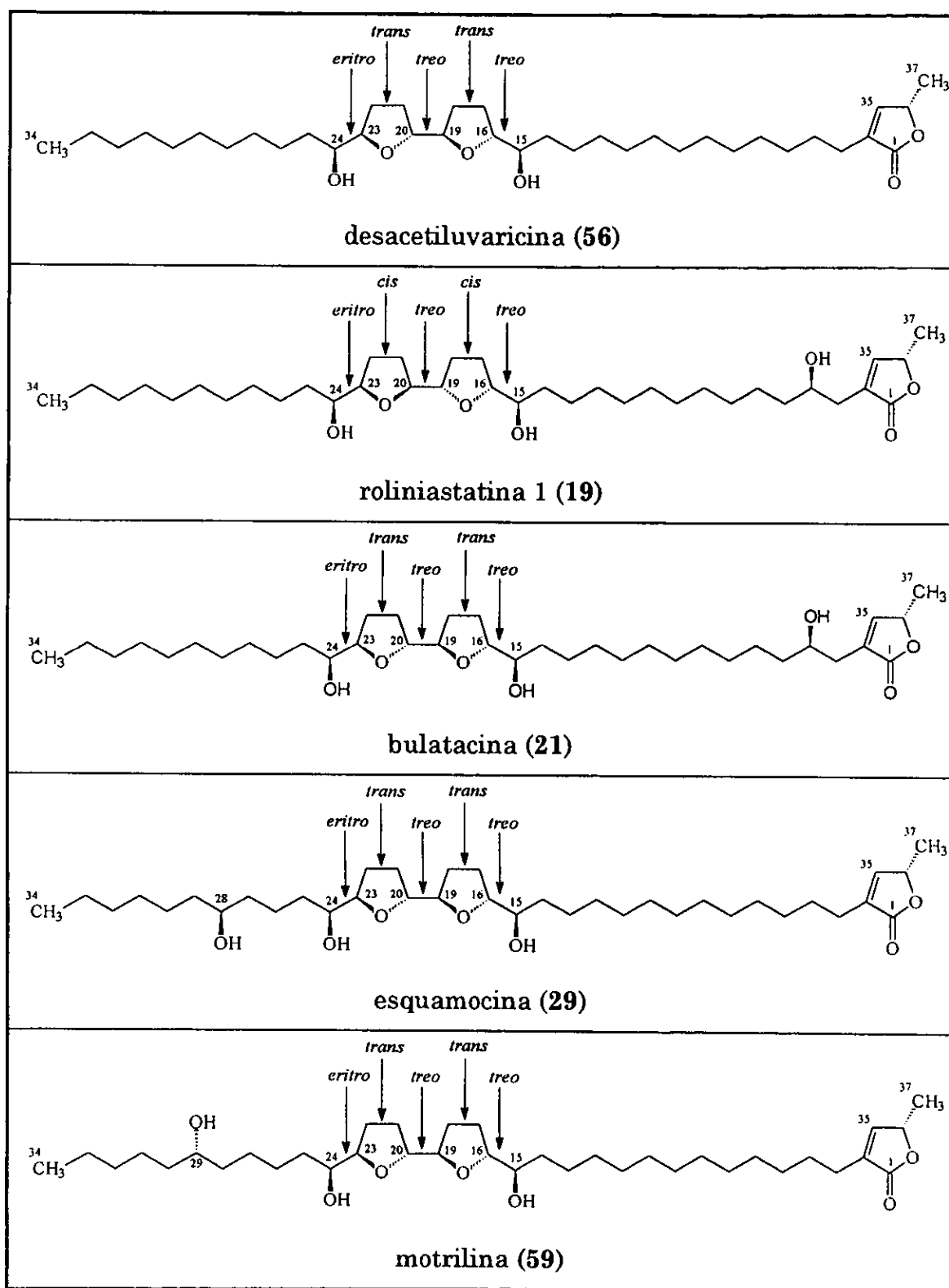
a) Dos lignanos de tipo furofurano: el éter dimetílico del pinorresinol (58) y la magnolina (15).

b) Seis acetogeninas de tipo *bis-tetrahydrofurano* adyacentes: la membranacina (27), la roliniastatina 1 (19), la desacetilivaricina (56), la bulatacina (21), la esquamocina (29) y la motrilina (59). En el Cuadro 6 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados de *Rollinia mucosa*.

**Cuadro 6.** Compuestos aislados de la semillas de *Rollinia mucosa*.





Cuadro 6. Compuestos aislados de las semillas de *Rollinia mucosa*. (Continuación)

La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se llevó a cabo mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. Todos los espectros que se analizan en la siguiente sección se incluyen en el anexo 1 en forma consecutiva.

#### 4.1 Caracterización de los lignanos aislados de *Rollinia mucosa*.

##### 4.1.1 Caracterización del éter dimetílico del pinorresinol (58).

La purificación de la fracción III (Figura 5, sección experimental) mediante la técnica de CLAR, permitió la obtención de un sólido cristalino, ópticamente activo. El espectro en el IR del compuesto 58 (Espectro 1) presentó absorciones asociadas con la presencia de grupos aromáticos. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas como  $C_{22}H_{26}O_6$  (espectro 2) la cual permitió calcular 10 grados de insaturación (Cuadro 7).

El análisis detallado de los espectros de RMN (Cuadro 8) permitió establecer, que el producto natural (58) presentaba el núcleo estructural de un lignano de tipo furofurano, sustituido por dos grupos veratrilo en C-7 y C-7' (Ayres y Loike, 1990). Las evidencias más importantes que permitieron proponer la estructura se resumen a continuación.

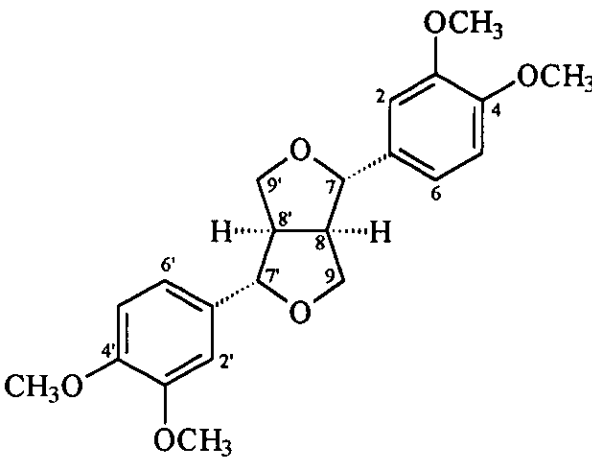
El espectro de RMN  $^1H$  (Espectro 3 y Cuadro 8) presentó similitud con los previamente descritos para lignanos del tipo furofurano del tipo de la sesamina (Ayres y Loike, 1990) y presentó las siguientes características:

1.- En  $\delta_H$  3.90 y 3.87 se observaron dos singuletes, integrando cada uno para seis hidrógenos, asignables a cuatro grupos metoxilo.

2.- En la región de los protones aromáticos se observó un multiplete ( $\delta_H$  6.82-6.90) que integraba para seis hidrógenos.

3.- Por último, se observaron las señales características del núcleo furofurano en  $\delta_H$  4.76 (d,  $J=4.2$  Hz, H-7 y H-7'), 3.12 (m, H-8 y H-8'), 3.88 (m, H-9 $\beta$ ) y 4.26 (dd,  $J=9.0$  y  $7.0$  Hz, H-9 $\alpha$ ). Como era de esperarse, la señal

**Cuadro 7.** Constantes físicas y espectrométricas del éter dimetílico del pinorresinol 58.

 <p style="text-align: center;">Éter dimetílico del pinorresinol (58)</p>
<p>Fórmula molecular: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub></p> <p>[α]<sub>D</sub> = + 33.0      p.f. 106°C</p> <p>UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 206.5 (4.3)</p>
<p>IR ν<sub>max</sub> KBr, (cm<sup>-1</sup>): 2941, 2853, 1592, 1515, 1463, 1417, 1263, 1235, 1140 y 1027. (Espectro 1)</p>
<p>E.M.I.E. <i>m/z</i> (int.rel): 386[M<sup>+</sup> (100)], 355(9.1), 219 (16), 194 (6.3), 177 (53.5), 165 (68.3), 151 (37.3), 138 (9.8). (Espectro 2)</p>

asignable a H-7 y H-7' presentó una clara correlación en el espectro COSY (Figura 12), con la señal correspondiente a H-8 y H-8'. La señal de H-8 y H-8' también mostró interacción con los hidrógenos en C-9 y C-9'.

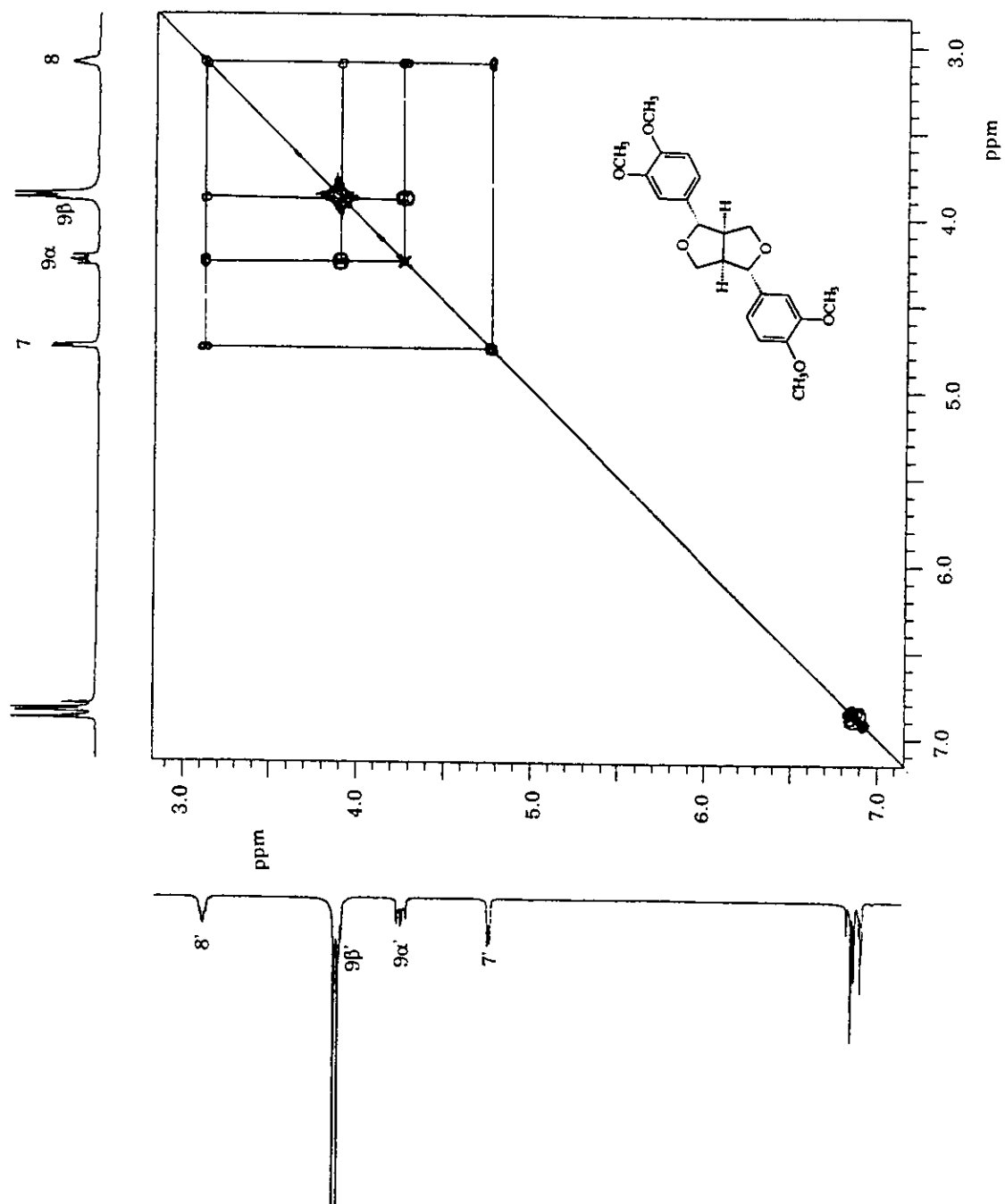
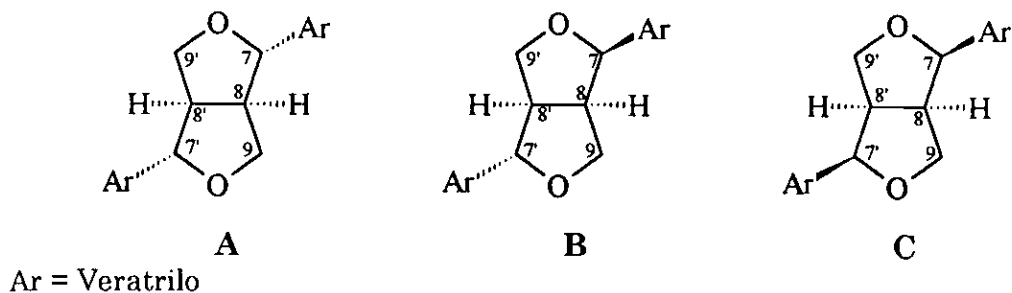


Figura 12. Espectro de RMN -  $^1\text{H}$  2D - COSY del éter dimetílico del pinorresinol.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 4) presentó señales para 10 carbonos. El número de carbonos observados en este espectro indicó que la molécula era simétrica, ya que la mitad de los carbonos presentan el mismo desplazamiento químico. De las diez señales, una fue fácilmente asignable a los grupos metoxilo, otras seis a carbonos aromáticos y las tres restantes a los carbonos de la porción furofuránica. Para determinar la naturaleza de los carbonos se registró el espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT (Espectro 5), el cual reveló que las señales típicas de los metinos de la porción furofuránica se encontraban en  $\delta_c$  85.76 (C-7 y C-7') y en 54.14 (C-8 y C-8'). La correspondiente a los metilenos C-9 y C-9' se observaron en  $\delta_c$  71.7. Este grupo de señales correlacionan claramente con los hidrógenos de la porción furofuránica en el espectro RMN-HETCOR.

Las señales de los seis metinos aromáticos se observaron en  $\delta_c$  111.07 (C-2 y C-2'),  $\delta_c$  109.26 (C-5 y C-5') y en  $\delta_c$  118.21 (C-6 y C-6'). Por último, en  $\delta_c$  55.93 aparece la señal de los grupos metoxilos. De nueva cuenta los metinos aromáticos correlacionaban con el multiplete presente en la región de los hidrógenos aromáticos en el espectro RMN-HETCOR, y el carbono en  $\delta_c$  55.93 con los siguletes asignados a los cuatro grupos metoxilos (Figura 13). El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  evidenció también la presencia de tres carbonos aromáticos cuaternarios, dos de los cuales se encontraban unidos a los grupos metoxilo, [ $\delta_c$  149.21 (C-4 y 4')] y [ $\delta_c$  148.65 (C-3 y 3')] y el restante a la porción furofuránica en [ $\delta_c$  133.55 (C-1 y C-1')].

Las evidencias presentadas permitieron proponer que la estructura del producto natural podía corresponder a cualquiera de las tres posibilidades isoméricas A-C ilustradas a continuación:



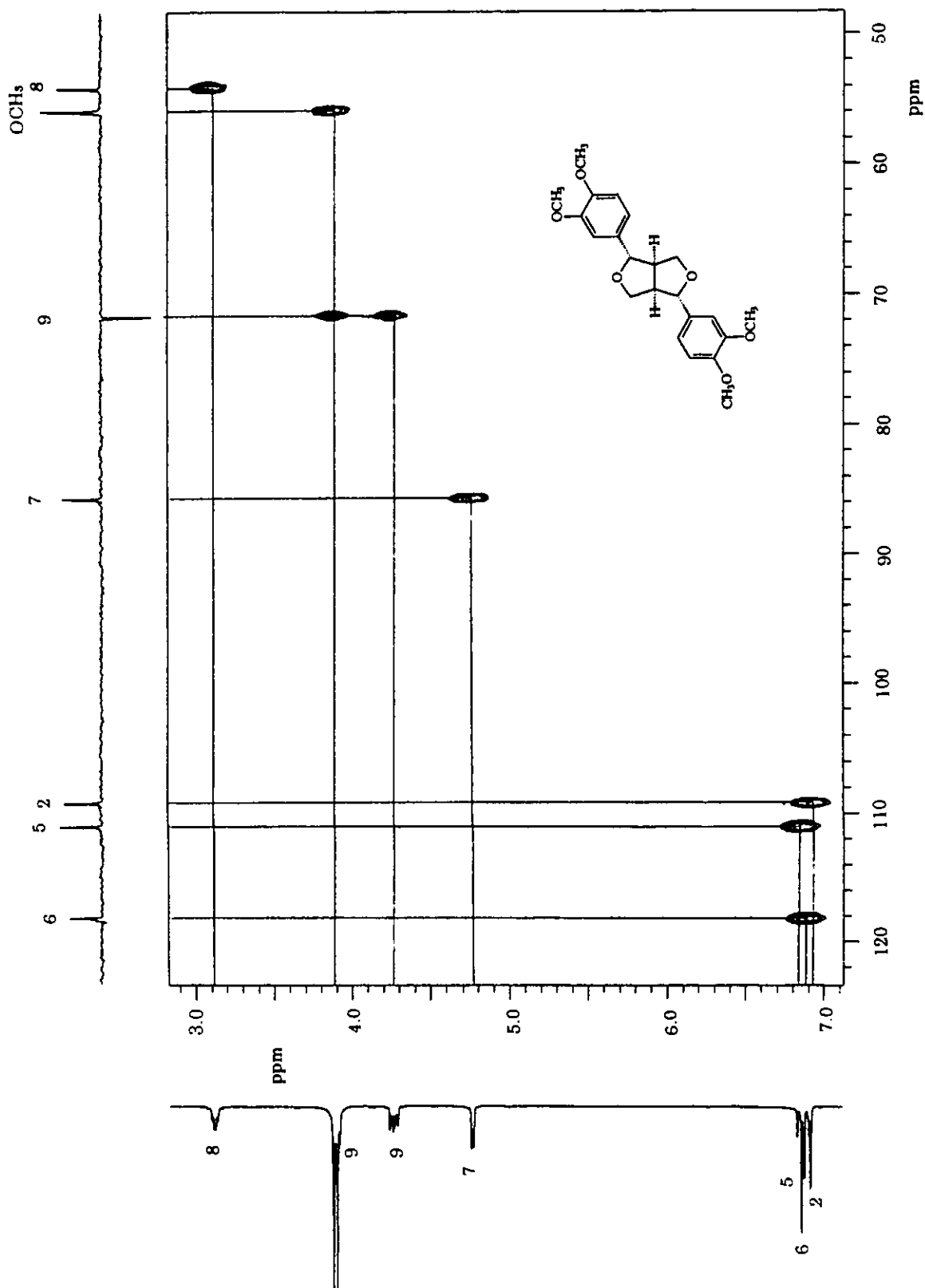


Figura 13. Espectro de RMN bidimensional HETCOR del éter dimetilico del pinorresinol.

**Cuadro 8.** Desplazamientos químicos en los espectros de RMN del éter dimetílico del pinorresinol (58) aislado de *R. mucosa*.<sup>\*</sup>

Carbono	$\delta_C$	Protón	$\delta_H$
7 y 7'	85.76	7 y 7'	4.76 d (4.2)
8 y 8'	54.14	8 y 8'	3.12 m
9 y 9'	71.70		
1 y 1'	133.55	9 $\beta$ y 9' $\beta$	3.88 m
2 y 2'	109.26		
3 y 3'	148.65	9 $\alpha$ y 9' $\alpha$	4.26 dd (9.0, 6.9)
4 y 4'	149.21		-
5 y 5'	111.1	aromáticos	6.82-6.91 m
6 y 6'	118.21		
2 -OCH <sub>3</sub>	55.93	2-OCH <sub>3</sub>	3.89* s
2 -OCH <sub>3</sub>	55.93	2-OCH <sub>3</sub>	3.87* s

<sup>\*</sup> Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz y se encuentran en paréntesis.  
\* Señales intercambiables.

La comparación de los datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C correspondientes a la porción furofuránica del producto 58 con los descritos para la sesamina (Cuadro 9), permitió descartar las posibilidades B y C (Ayres y Loike, 1990).

En consecuencia, la estructura del lignano 58 debía corresponder a cualquiera de los enantiómeros de la estructura diastereoisomérica A. En este sentido el valor positivo de la rotación óptica permitió identificar al producto natural como el enantiómero dextrógiro, el (+)-éter dimetílico del pinorresinol. Este producto ha sido obtenido previamente de otras fuentes naturales (Kakisawa *et al.*, 1972; Pelter y Ward, 1976). Sin embargo, este estudio constituye la primera descripción de la presencia del compuesto en *R. mucosa*.

**Cuadro 9.** Comparación de los desplazamientos químicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los lignanos furofuránicos del tipo de la sesamina y los aislados de *R. mucosa* (Ayres y Loike, 1990).

(+)-Sesamina		Epi-sesamina	dia-sesamina	58 y 15	
Ar = piperonil				X = X <sub>1</sub> = Vr = 58	
				X = Vr X <sub>1</sub> = Tr = 15	
	(±) Sesamina	Epi- sesamina	dia- sesamina	58	15
H-7	4.75 (85.77)	4.45 (87.53)	4.90 (83.96)	4.76 (85.76)	4.75 (86.03)
H-7'		4.85 (81.96)			(85.73)
H-8	3.15 (54.31)	2.90 (54.44)	3.15 (49.49)	3.12 (54.14)	3.10 (54.42)
H-8'		3.30 (50.11)			(54.11)
H-9β	3.8-4.0 (71.7)	3.35 (70.92)	3.3-3.6 (68.7)	3.88 (71.7)	3.92 (71.95)
H-9'β		3.85 (69.64)			
H-9α	4.2-4.4 (71.7)	3.85 (70.92)	3.65-4.0(68.7)	4.26 (71.7)	4.29 (71.77)
H-9'α		4.13 (69.64)			

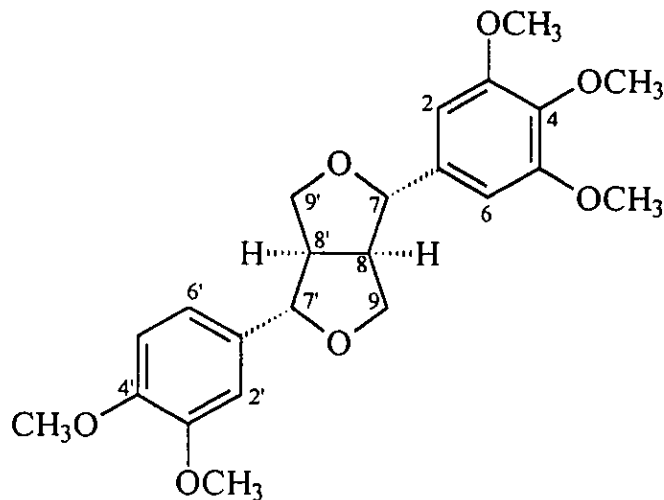
\*  $\text{CDCl}_3$ . Se encuentra en paréntesis el desplazamiento químico de RMN  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.1.2 Caracterización de la Magnolina (15).

El producto 15 también correspondió a un lignano y se obtuvo como un sólido cristalino, ópticamente activo. Su fórmula molecular se estableció como  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$  (Cuadro 10). Su ión molecular se observó en el espectro de masas en



Cuadro 10. Constantes físicas y espectrométricas de la magnolina (15).



Magnolina (15)

Fórmula molecular:  $C_{23}H_{28}O_7$  $[\alpha]_D = + 63.6$  p.f. 96-97°CUV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 205.2 (4.9)IR  $\nu_{max}$  KBr, (cm<sup>-1</sup>) : 2928, 2852, 1591, 1513, 1462, 1417, 1234, 1127, y 1027.

(Espectro 6)

E.M.I.E.  $m/z$  (int.rel): 416[M<sup>+</sup> (100)], 385(6), 224 (9.6), 219 (11.7), 195 (28), 194 (14), 181 (28), 165 (40), 151 (37.7), 138 (8.2). (Espectro 7)

una relación  $m/z$  de 416 es decir, presentó 30 unidades de masa atómica más que el lignano 58. Esta diferencia es congruente con la presencia de un metoxilo adicional en el producto 15 (Espectro 7).

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectros 8-9) indicaban que el producto 15 era también un lignano del tipo de la sesamina simétricamente sustituido (Pelter y Ward, 1976). La principal diferencia entre los espectros de los compuestos 15 y 58, se debe a las señales asociadas con la presencia de un grupo metoxilo adicional en el compuesto 15. Así, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto 15 presenta señales para cinco metoxilos en  $\delta_{\text{H}}$  3.90, 3.87 y 3.84 y para cinco hidrógenos aromáticos en la zona comprendida entre  $\delta_{\text{H}}$  6.83 y 6.91 ppm. Por otro lado, el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 10 y 11) presentó una señal adicional para un carbono cuaternario aromático ( $\delta$  153.45) unido a oxígeno y en la zona alrededor de 55 y 61 ppm se observaron tres singuletes asignables a cinco grupos metoxilos ( $\delta_{\text{C}}$  55.96,  $\delta_{\text{C}}$  56.2 y  $\delta_{\text{C}}$  60.85), en lugar del singulete que se observa en el compuesto 58. Estas diferencias en los espectros de RMN, así como la presencia de los fragmentos en una relación  $m/z$  de 195 y 181 en el espectro de masas (Espectro 7), eran congruentes con un lignano de tipo furofuránico simétricamente sustituido en C-7 y C-7' por un grupo 3,4,5-trimetoxifenilo (Tr) y uno veratrilo (Vr), respectivamente. Al igual que en el caso del producto 58, la comparación de los desplazamientos químicos de las señales en los espectros de RMN de la porción furofuránica del lignano 15 (Ver Cuadro 9), permitieron establecer su estructura como la de cualquiera de los enantiómeros de la magnolina. El signo de la rotación óptica permitió identificar a este producto como a la magnolina dextrógira, o (+)-magnolina (15).

Las constantes espectroscópicas (Cuadro 11) y espectrométricas (Cuadro 10) se encuentran en perfecta armonía con las de la (+)-magnolina, previamente aislada de *R. mucosa*, *R. membranacea* y de otras fuentes naturales (Kakisawa *et al.*, 1972, De Queiroz *et al.*, 1991 y Saez *et al.*, 1993).

Cuadro 11. Datos espectroscópicos del lignano magnolina (15) aislado de *R. mucosa*.

Carbono	$\delta_c$	Protón	$\delta_H$
7	86.04	7	4.76 d (4.5)
7'	85.73	7'	4.74 d (4.5)
8	54.42	8 y 8'	3.10 m
8'	54.11		
9	71.95	9 $\beta$ y 9' $\beta$	3.92 m
9'	71.77	9 $\alpha$ y 9' $\alpha$	4.29 dd (9.0, 7.0)
1	136.85	--	--
1'	133.5	--	--
2	102.89	2	6.57 s
2'	109.3	aromáticos	6.831-6.915 m
3	153.45	--	--
3'	148.69	--	--
4	137.55	--	--
4'	149.24	--	--
5	153.45	--	--
5'	111.1	aromáticos	6.831-6.915 m
6	102.89	6	6.57 s
6'	118.24	aromáticos	6.831-6.915 m
2 -OCH <sub>3</sub>	55.96*	2-OCH <sub>3</sub>	3.90* s
2 -OCH <sub>3</sub>	56.20*	2-OCH <sub>3</sub>	3.87* s
OCH <sub>3</sub>	60.85	OCH <sub>3</sub>	3.84 s

\* RMN <sup>13</sup>C 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>. Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS.

\* Señales intercambiables. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz.

## 4.2 Caracterización de las acetogeninas aisladas de la especie *Rollinia mucosa*.

Las seis acetogeninas aisladas en el presente estudio, presentan un núcleo estructural del tipo *bis*-tetrahidrofuranico (*bis*-THF) adyacente, con funciones carbinólicas secundarias en los extremos del sistema *bis*-THF. Las diferencias en las estructuras se basan en el número y la posición de los hidroxilos presentes en las moléculas, así como en la estereoquímica relativa de la unidad *bis*-THF.

La elucidación estructural de las acetogeninas se realizó mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas, espectrométricas y químicas. Así, los espectros en el IR permitieron detectar los principales grupos funcionales presentes en las moléculas y en todos los casos, se observaron bandas asociadas con la presencia de grupos hidroxilos ( $\sim 3416\text{ cm}^{-1}$ ) y del carbonilo de una  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ - $\beta$  insaturada ( $\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ ). La fórmula molecular de cada uno de los compuestos se determinó por espectrometría de masas en su modalidad FAB<sup>+</sup>. Este análisis permitió determinar que todos los compuestos contienen 37 átomos de carbono.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de los seis productos presentaron el perfil típico de las acetogeninas de anonáceas del tipo *bis*-THF adyacente (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 1996) y en todos los casos, permitieron evidenciar los siguientes grupos funcionales:

- 1.- El metilo terminal de la cadena hidrocarbonada. En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H este grupo se observó en  $\delta_{\text{H}}$  0.9-0.8 (t, J= 7.0 Hz), en tanto que en los espectros de RMN-<sup>13</sup>C la señal correspondiente se observó en  $\delta_{\text{C}}$  14.0.

- 2.- Una unidad *bis*-THF adyacente con una función carbinólica en cada extremo del sistema *bis*-THF. Las señales se observaron en todos los casos en

$\delta_H$  3.38-3.92 y  $\delta_C$  71.3-83.1. La comparación de los desplazamientos químicos de esta parte de las moléculas con los de modelos adecuados (Fang *et al.*, 1993) permitió establecer en todos los casos la estereoquímica relativa de esta unidad estructural.

3.- Otras funciones carbinólicas secundarias distintas a las vecinales a la porción *bis*-THF. Las señales correspondientes se observaron en la zona de  $\delta_H$  3.3-3.8 en los espectros de RMN- $^1H$ . Estas señales correlacionan en el espectro HETCOR con las señales detectadas en la zona  $\delta_C$  69.9-74.1.

4.- Una metil- $\gamma$ -lactona  $\alpha$ - $\beta$ -insaturada. El metilo de esta unidad se observó en  $\delta_H$  1.5-1.4 (d,  $J \cong 7.0$  Hz) y  $\delta_C$  19.1, en tanto que la señal correspondiente al hidrógeno geminal a la función lactónica se observó en  $\delta_H$  4.9-5.0. La absorción del carbonilo se observó en  $\delta_C$  173.8-174.6. Por último, las señales vínicas se aprecian en  $\delta_H$  6.98 y  $\delta_C$  148.4. De las acetogeninas aisladas sólo los compuestos **19** y **21** presentan un hidroxilo en la posición C-4 de la cadena hidrocarbonada. En estos dos casos, la absorción vínica de la  $\gamma$ -lactona se desplaza paramagnéticamente hasta  $\delta_H$  7.19.

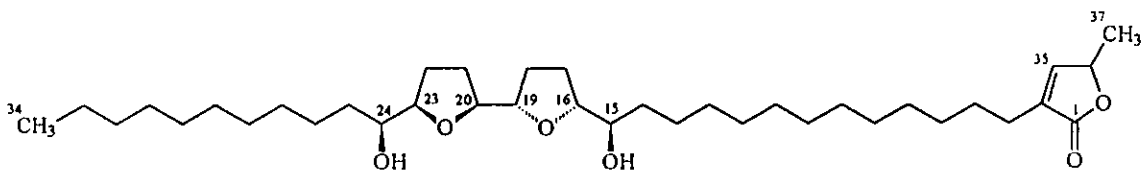
La preparación de los derivados sililados y el posterior análisis de los espectros de masas generados por estos productos permitió determinar la disposición de la unidad *bis*-THF y de los grupos hidroxilos a lo largo de la cadena hidrocarbonada (Shi *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1996a; Shi *et al.*, 1996b). Como resultado de este análisis se determinó que todas las acetogeninas aisladas presentan la porción *bis*-THF con funciones carbinólicas en los extremos, entre los carbonos C-15 y C-24 de la cadena hidrocarbonada.

Por último, para establecer la estereoquímica absoluta de los carbinoles vecinales a la porción *bis*-THF de las acetogeninas membranacina (**27**) y desacetilivaricina (**56**) se aplicó el método de Mosher (Reiser *et al.*, 1992). En los demás casos, la identificación se realizó por comparación con muestras auténticas.

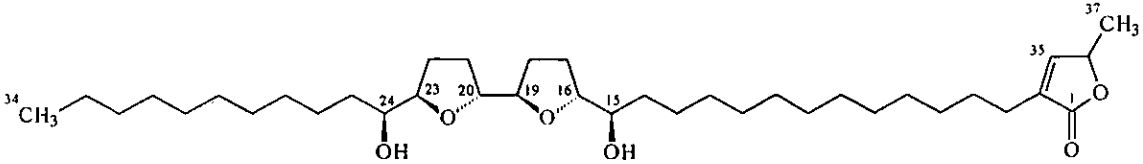
#### 4.2.1 Caracterización de las acetogeninas membranacina (27) y desacetilivaricina (56).

Los productos 27 y 56 presentaron un ión *quasimolecular* de 607 unidades de masa atómica (u.m.a.), lo que permitió establecer la fórmula molecular como  $C_{37}H_{66}O_6$ . La pérdida de dos moléculas de agua a partir del ión molecular indicó la presencia de dos hidroxilos en las dos acetogeninas (Cuadro 12 y 13).

**Cuadro 12.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la membranacina 27 y de su derivado sililado.


<p><b>Membranacina (27)</b></p> <p><math>[\alpha]_D^{20^\circ C} = + 27.3</math> (C 1.1 mg/ml, MeOH)</p> <p>UV (MeOH) <math>\lambda_{max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 207.2 (4.12)</p> <p>CD (MeOH) <math>\Delta E</math> (nm) - 2.49 x 10<sup>4</sup> (238)</p>
<p>Fórmula molecular: <math>C_{37}H_{66}O_6</math></p>
<p>I. R. <math>\nu_{max}</math> pel. (cm<sup>-1</sup>) : 3100-3600, 2925, 2853, 1755, 1460, 1425, 1215, 1074, 1026, 722. (Espectro 13)</p>
<p>E. M. F A B<sup>+</sup>: 607 [M+H]<sup>+</sup> 589 [M+H<sup>+</sup>- H<sub>2</sub>O], 571 [M+H+2 H<sub>2</sub>O] (Espectro 14)</p>
<p>E. M. I. E. derivado sililado <math>m/z</math> (int. rel) : 750, 609 (1.4), 507 (15.8), 437 (9.0), 383 (2.4), 367 (100), 313 (2.0), 293 (4.1), 277 (0.7), 243 (20), 153 (1.4), 111 (3.4). (Espectro 15)</p>

**Cuadro 13.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la desacetilivaricina **56** y de su derivado sililado.

 <p style="text-align: center;"><b>Desacetilivaricina (56)</b></p> <p style="text-align: center;"><math>[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = +17.1</math> (C 0.7 mg/ml, MeOH)</p> <p style="text-align: center;">UV (MeOH) <math>\lambda_{\text{max}}</math> (log <math>\epsilon</math>) 206.4 (4.08)</p> <p style="text-align: center;">CD (MeOH) <math>\Delta E</math> (nm) - 2.17 x 10<sup>4</sup> (246)</p>
Fórmula molecular: C <sub>37</sub> H <sub>66</sub> O <sub>6</sub>
I. R. $\nu_{\text{max}}$ pel. (cm <sup>-1</sup> ) : 3421, 2925, 2853, 1754, 1458, 1072, 772. (Espectro 25)
E. M. F A B <sup>+</sup> : 607 [M+H] <sup>+</sup> , 589 [M+H <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O], 571 [M+H <sup>+</sup> -2 H <sub>2</sub> O], 553 [M+H <sup>+</sup> -3 H <sub>2</sub> O] (Espectro 26)
E. M. I. E. derivado sililado $m/z$ (int. rel) : 750, 609 (1.4), 507 (15.8), 437 (9.0), 383 (2.4), 367 (100), 313 (2.0), 293 (4.1), 277 (0.7), 243 (20), 153 (1.4), 111 (3.4). (Espectro 27)

En general, los espectros de RMN de las acetogeninas **27** y **56** (Espectros 15-20 y Cuadros 17 y 18) presentaron las características indicadas en la sección anterior. Específicamente, los espectros resultaron muy similares a los de la 2,4-*cis*-rolinona y rolinicina, entre otros (Dabrah y Senden, 1984; Abreo y Sneden, 1989; Zeng *et al.*, 1996).

El tratamiento de las acetogeninas **27** y **56** con el reactivo Sigma- Sil-A generó los derivados sililados **27a** y **56a**, respectivamente confirmando químicamente la presencia de dos funciones carbinólicas. Asimismo, como se indicó anteriormente el análisis detallado de los espectros de masas generados por estos derivados (Espectro 15 y Espectro 27, respectivamente), confirmó la disposición de los anillos *bis*-THF con grupos hidroxilos en los extremos, entre C-15 y C-24. Los fragmentos principales observados en los espectros de masas se detallan en la Figura 14. Los fragmentos observados en una  $m/z$  de 367 y 507 [rupturas entre C-15/C-16 y C-23/C-24, respectivamente] son diagnósticos para este tipo de acetogeninas (Sahai *et al.*, 1994).

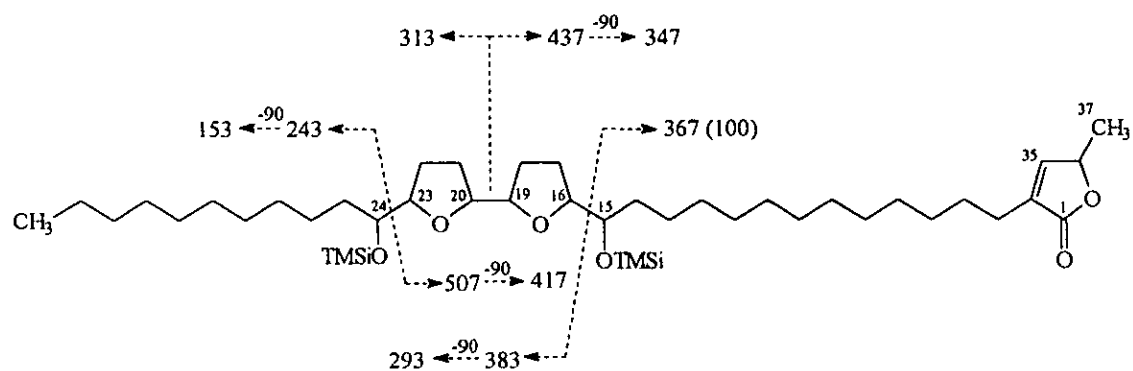


Figura 14. Patrón de fragmentación de los derivados sililados de los compuestos **27a** y **56a**.

El análisis comparativo de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de **27** y **56**, permitió establecer que ambos compuestos difieren en la estereoquímica relativa del sistema *bis*-tetrahidrofurano adyacente con funciones carbinólicas en cada uno de los extremos. Así, en el caso del producto **27** los desplazamientos químicos de los carbonos C-15 - C-24 [ $\delta_{\text{C}}$  72.0-83.1] y los hidrógenos H15 - H24 [ $\delta_{\text{H}}$  3.4-3.9] (Cuadro 14), resultaron prácticamente



idénticos a los hidrógenos y carbonos correspondientes de la 4-hidroxi-25-desoxineorolinicina y la 2,4-*cis*-rolinona (Dabrah y Senden, 1984; Abreo y Sneden, 1989). En consecuencia, la estereoquímica relativa del sistema *bis*-THF adyacente con funciones carbinólicas secundarias en los extremos presente en el compuesto **27**, se determinó como *treo-cis-treo-cis-eritro* (Cuadro 14).

**Cuadro 14.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **27** con la estereoquímica relativa de la porción *bis*-THF del modelo 4-hidroxi-25-desoxineorolinicina.

Compuesto	$^1\text{H}$ ( $\delta$ )						$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )					
	15	16	19	20	23	24	15	16	19	20	23	24
4-hidroxi-25-desoxineorolinicina	3.41	3.84	3.84	3.84	3.84	3.84	74.0	83.0	81.1	81.0	82.9	71.9
<b>27</b>	3.40	3.84	3.86	3.90	3.91	3.87	74.0	82.9	81.1	81.0	83.0	72.0

En el caso del producto **56** los desplazamientos químicos de los carbonos C-15 - C-24 (Cuadro 15), resultaron idénticos a los de la esquamocina-28-ona (Hisham *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1996). Por lo tanto, la estereoquímica relativa del sistema *bis*-THF adyacentes con funciones carbinólicas en los extremos, se estableció como *treo-trans-treo-trans-eritro*.

**Cuadro 15.** Desplazamientos químicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el cierre de anillos *treo-trans-treo-trans-eritro* y del compuesto **56**.

	$^1\text{H}$						$^{13}\text{C}$					
Compuesto	15	16	19	20	23	24	15	16	19	20	23	24
esquamocina-28-ona	3.38	3.83	3.90*	3.83*	3.90	3.83	71.4	83.2	82.4*	82.2*	82.8	71.3
<b>56</b>	3.40	3.86	3.85	3.90	3.92	3.86	74.1	83.2	82.3	82.5	82.8	71.4

\* Señales intercambiables

La configuración absoluta de los centros estereogénicos de **27** y **56** se determinó mediante la aplicación del método de Mosher (Rieser *et al.*, 1992). El análisis de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectros 21-24 y 33-36) de los ésteres de Mosher (*R* y *S*), generados a partir de cada uno de los compuestos, permitió calcular el valor de la diferencia de los desplazamientos químicos  $\Delta\delta_{\text{H}}$  (*S-R*) para los hidrógenos localizados en el segmento C-14 - C-25. Estas diferencias se indican en el Cuadro 16.

En el caso del compuesto **27** la configuración absoluta para los centros quirales C-15 y C-24, se determinó como *R* y *S*, respectivamente, considerando el valor positivo de  $\Delta\delta_{\text{H}}$  (*S-R*) H-14, H-22 y H-23 y el valor negativo de  $\Delta\delta_{\text{H}}$  (*S-R*) H-17, H-18 y H-25. En consecuencia, la estereoquímica absoluta de C-16, C-19, C-20 y C-23 se estableció como *R*, *S*, *S* y *R*, respectivamente (Gu *et al.*, 1994). Para el compuesto **56** la configuración absoluta de los centros quirales C-15 y C-24 se determinó como *R* y *S*, respectivamente, considerando el valor positivo  $\Delta\delta_{\text{H}}$  (*S-R*) para H-14, H-22 y H-23, y el valor negativo  $\Delta\delta_{\text{H}}$  (*S-R*) para H-17 y H-15. En consecuencia, la configuración absoluta

en C-16, C-19, C-20 y C-23, se estableció como *R*, *R*, *R* y *R*, respectivamente (Cuadro 16).

La configuración de C-36 en las dos acetogeninas 27 y 56 se estableció como *S* considerando el efecto Cotton negativo ( $-2.49 \times 10^4$  y  $-2.17 \times 10^4$ ) en 238 nm observado en el espectro de dicroísmo circular (DC).

**Cuadro 16.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  de la unidad *bis*-THF de los esteres de Mosher de la membranacina (27) y desacetiluvanicina (56)\*.

$\delta_{\text{H}}$						
Proton	27 ( <i>S</i> )- MTPA	27 ( <i>R</i> )- MTPA	$\Delta\delta$ ( <i>S</i> - <i>R</i> )	56 ( <i>S</i> )- MTPA	56 ( <i>R</i> )- MTPA	$\Delta\delta$ ( <i>S</i> - <i>R</i> )
14	1.66	1.54	+ 0.12	1.63	1.49	+0.14
15			<i>R</i>			<i>R</i>
16	4.09	3.99	+ 0.10	4.04	4.00	0.04
17a	1.85	1.91	- 0.06	1.93	2.01	-0.08
17b	1.70	1.79	- 0.09	1.53	1.56	-0.03
18a	1.79	1.90	- 0.12	1.84	1.89	-0.05
18b	1.65	1.74	- 0.09	1.72	1.73	-0.01
19	3.64	3.78	-0.14	3.80	3.84	-0.04
20	3.68	3.63	+ 0.05	3.76	3.65	0.11
21a	1.76	1.72	+ 0.04	1.78	1.77	0.01
21b	1.75	1.66	+ 0.09	1.69	1.65	0.04
22a	1.89	1.86	+ 0.03	1.81	1.66	0.15
22b	1.78	1.70	+ 0.08	1.71	1.63	0.08
23	3.98	3.96	+ 0.02	3.99	3.95	0.04
24			<i>S</i>			<i>S</i>
25	1.66	1.69	- 0.03	1.55	1.60	-0.05

\*  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz

Con base en el análisis anterior, el compuesto **27** se identificó como la membranacina, aislado previamente de *R. membranacea* (Saez *et al.*, 1993). Sin embargo, en esa ocasión no se reportó la estereoquímica absoluta del compuesto, misma que en el presente estudio fue determinada.

Por otro lado, el compuesto **56** se identificó como la desacetilivaricina, aislado previamente de *U. acuminata* y de *R. mucosa* (Jolad *et al.*, 1985; Gu *et al.*, 1997).

Cabe destacar que este reporte constituye la primera descripción de la membranacina en la especie *Rollinia mucosa*.

**Cuadro 17.** Datos espectroscópicos observados en los espectos de RMN <sup>13</sup>C de las acetogeninas membranacina (27) y desacetilivaricina (56).\*

Número de Carbono	Membranacina (27) δ <sub>c</sub>	Desacetilivaricina (56) δ <sub>c</sub>
1	173.9	173.8
2	134.4	134.4
3	25.2	25.2
4	27.4	27.4
5 al 13	25.8-30.0	29-30
14	34.3	33.4
15	74.0	74.1
16	82.9	83.2
17	29.2	28.1
18	27.9	29.2
19	81.1	82.3
20	81.0	82.5
21	28.4	29.3
22	23.8	24.5
23	83.1	82.8
24	72.0	71.4
25	32.8	32.5
26 al 31	25.8-30.0	26.0
32	31.9	31.9
33	22.7	22.6
34	14.1	14.1
35	148.8	148.8
36	77.4	77.4
37	19.2	19.20

\* Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS.

**Cuadro 18.** Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  de las acetogeninas membranacina (27) y desacetilivaricina (56).\*

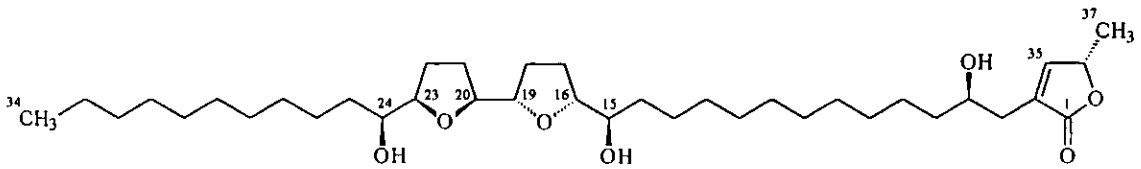
Protón	Membranacina (27) $\delta_{\text{H}}$	Desacetilivaricina (56) $\delta_{\text{H}}$
3	2.26 tt (7.7, 1.5)	2.26 tt (7.5, 1.5)
4	1.55	1.53 m
5 al 13	1.20-1.60	1.20-1.70
14	1.46m	1.39 m
15	3.40 m	3.40 m
16	3.84 m	3.86 m
17	1.92 m, 1.80 m	1.53 m, 1.96 m
18	1.94 m, 1.78 m	1.57 m, 1.92 m
19	3.86	3.85
20	3.90	3.90
21	1.92 m, 1.82 m	1.53 m, 1.96 m
22	1.98 m, 1.78 m	1.80
23	3.91	3.92
24	3.87	3.86
25	1.37	1.77
26 al 33	1.20-1.60	1.20-1.70
34	0.87 t (7.0)	0.88 t
35	6.99 ddd (1.5, 1.5, 1.5)	6.98 ddd (1.5, 1.5, 1.5)
36	4.99 ddq (2.0, 1.5, 7.0)	4.99 dq (1.5, 6.9)
37	1.41 d (6.5)	1.40 d (6.7)

\* Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz y se encuentran en paréntesis.

#### 4.2.2 Caracterización de las acetogeninas roliniastatina 1 (19), bulatacina (21), esquamocina (29) y motrilina (59).

Las cuatro acetogeninas restantes, 19, 21, 29 y 59, presentaron su ión *quasimolecular* en una relación  $m/z$  de 623 ( $M^+H$ ) unidades de masa atómica, congruente con una fórmula molecular de  $C_{37}H_{66}O_7$  (Cuadro 19 - 22). La pérdida consecutiva de tres moléculas de agua a partir del ión *quasimolecular* indicó la presencia de tres grupos carbinólicos en cada uno de los compuestos.

**Cuadro 19.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la roliniastatina 19 y de su derivado sililado.

 <p style="text-align: center;">Roliniastatina 1 (19)</p> <p style="text-align: center;">[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub><sup>20°C</sup> = + 22 (C 1. mg/ml, MeOH)</p> <p style="text-align: center;">UV (MeOH) <math>\lambda_{max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 208.8 (4.23)</p> <p style="text-align: center;">CD (MeOH) <math>\Delta E</math> (nm) - 1.95 x 10<sup>4</sup> (239)</p>
Fórmula molecular: $C_{37}H_{66}O_7$
I. R. $\nu_{max}$ pel. (cm <sup>-1</sup> ) : 3426, 2926, 2854, 1758, 1462, 1186, 1050, 774. (Espectro 37)
E. M. F A B <sup>+</sup> : 623 [ $M+H$ ] <sup>+</sup> 605 [ $M+H$ <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O], 587 [ $M+H$ <sup>+</sup> -2H <sub>2</sub> O], 569 [ $M+H$ <sup>+</sup> -3H <sub>2</sub> O] (Espectro 38).
E. M. I. E. derivado sililado $m/z$ (int. rel) : 838, 727 (3.4), 697 (0.7), 637 (2.0), 625 (0.7), 595 (14), 525 (11), 505 (4.4), 455 (100), 415 (4.0), 383 (18.4), 365 (5.8), 353 (1.4), 313 (3.4), 293 (10.2), 243 (20.5), 213 (10.2), 153 (1.0), 141 (2.1), 123 (3.0), 111 (2.7). (Espectro 39)

**Cuadro 20.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la bulatacina 21 y de su derivado sililado.

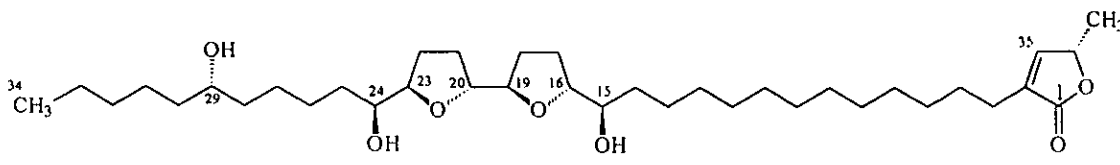
<p style="text-align: center;"><b>Bulatacina (21)</b></p>
Fórmula molecular: $C_{37}H_{66}O_7$
I. R. $\nu_{max}$ pel. ( $cm^{-1}$ ) : 3432, 3019, 2925, 2854, 1749, 1645, 1523, 1424, 1216. 1070, 931. (Espectro 44)
E. M. F A B <sup>+</sup> : 623 [M+H] <sup>+</sup> , 605 [M+H <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O], 587 [M+H <sup>+</sup> -2H <sub>2</sub> O], 569 [M+H <sup>+</sup> -3H <sub>2</sub> O] (Espectro 45).
E. M. I. E. derivado sililado <i>m/z</i> (int. rel) : 838, 727 (3.4), 697 (0.7), 637 (2.0), 625 (0.7), 595 (14), 525 (11), 505 (4.4), 455 (100), 415 (4.0), 383 (18.4), 365 (5.8), 353 (1.4), 313 (3.4), 293 (10.2), 243 (20.5), 213 (10.2), 153 (1.0), 141 (2.1), 123 (3.0), 111 (2.7). (Espectro 46)

**Cuadro 21.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la esquamocina 29 y de su derivado sililado.

<p style="text-align: center;"><b>Esquamocina (29)</b></p>
Fórmula molecular: $C_{37}H_{66}O_7$
I. R. $\nu_{max}$ pel. ( $cm^{-1}$ ) : 3425, 3017, 2927, 2855, 1764, 1462, 1379, 1215. 1054, 932. (Espectro 51)
E. M. F A B <sup>+</sup> : 623 [M+H] <sup>+</sup> 605 [M+H <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O], 587 [M+H <sup>+</sup> -2H <sub>2</sub> O], 569 [M+H <sup>+</sup> -3H <sub>2</sub> O] (Espectro 52)
E. M. I. E. derivado sililado <i>m/z</i> (int. rel) : 838 (0.9), 753 (4.0), 507 (22.5), 437 (31.5), 417(19), 401 (2.3), 367 (100), 365 (28.0), 347 (7.2), 331 (25.2), 277 (0.9), 241 (16.2), 187 (23.4), 151 (5.8), 129 (55.8), 97 (10.8), 73 (68). (Espectro 53)

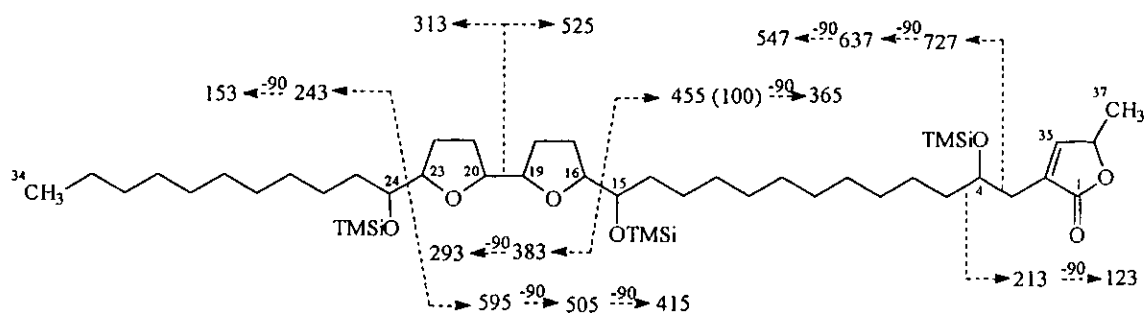


**Cuadro 22.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la motrilina **59** y de su derivado sililado.


<b>Motrilina (59)</b>
Fórmula molecular: $C_{37}H_{66}O_7$
I. R. $\nu_{max}$ pel. ( $cm^{-1}$ ) : 3402, 3021, 2930, 2856, 1749, 1524, 1425, 1216. 1033, 931. (Espectro 58)
E. M. F A B <sup>+</sup> : 623 [M+H] <sup>+</sup> 605 [M+H <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O], 587 [M+H <sup>+</sup> -2H <sub>2</sub> O], 569 [M+H <sup>+</sup> -3H <sub>2</sub> O] (Espectro 59)
E. M. I. E. derivado sililado $m/z$ (int. rel) : 838, 767 (8.3), 609 (0.75), 580 (15.0), 507 (25.4), 471 (1.5), 437 (13.7), 401 (6), 367 (100.0), 347 (6.8), 331 (5.3), 277 (2.0), 265 (2.3), 229 (2.0), 173 (9.0), 151 (7.9), 147 (9.0), 111 (14.7), 83 (21.2), 71 (20.0). (Espectro 60)

Al igual que en el caso de los productos **27** y **56**, la formación de los derivados tri-TMSi confirmó químicamente la presencia de los tres hidroxilos en las moléculas. Asimismo, el análisis de los espectros de masas correspondientes a los derivados trimetilsililados **19a** y **21a**, permitió establecer que dos de los hidroxilos se encontraban en los extremos de la porción *bis*-THF (en C-15 y en C-24) debido a la presencia de los fragmentos en  $m/z$  455 [ruptura en C-15/C-16] y en 595 [ruptura en C-23/C-24]. Por otro lado, el fragmento en una  $m/z$  de 213 u m a permitió determinar que el tercer hidroxilo se encontraba en la posición C-4 (Figura 15).

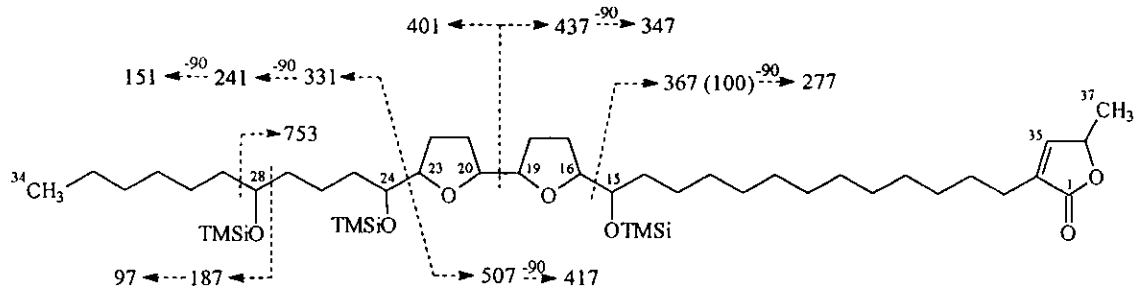
En el caso de los compuestos **29** y **59**, los fragmentos observados en una relación  $m/z$  de 367 y de 507 u.m.a. (generados a las rupturas entre



**Figura 15.** Patrón de fragmentación de los derivados sililados de los compuestos **19a** y **21a**.

C-15/C-16 y en C-23/C-24, respectivamente), confirman la ubicación de la subunidad *bis*-THF, entre C-15 y C-24. Estos fragmentos también sugieren que el tercer hidroxilo debería encontrarse en alguna posición entre C-25 y C-33 de la cadena hidrocarbonada.

En el caso del compuesto **29**, el fragmento en una  $m/z$  187, debido a la ruptura entre C-27/C-28, permitió ubicar el tercer hidroxilo en la posición C-28 (ver Figura 16).



**Figura 16.** Patrón de fragmentación del derivado sililado de la esquamocina (**29a**).

En el compuesto **59** el tercer hidroxilo se ubicó en la posición C-29, debido a la presencia en el espectro de masas de los fragmentos en una  $m/z$  de 173 y 767, generados por las rupturas entre C-28/C-29 y C-29/C-30, respectivamente (Figura 17).

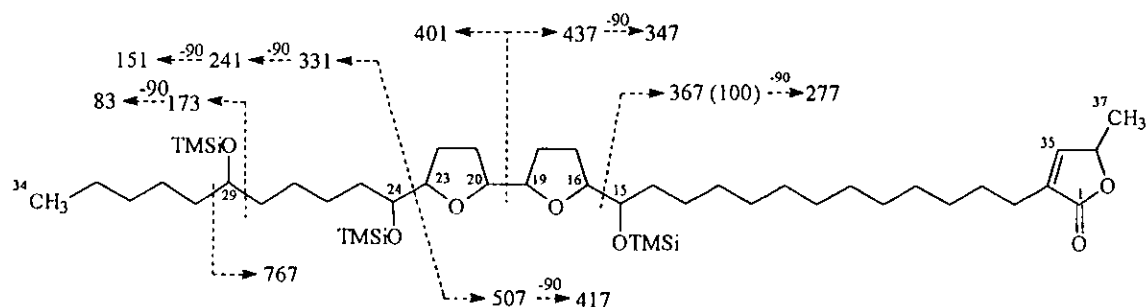
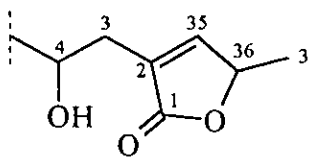


Figura 17. Patrón de fragmentación del derivado sililado de la motrilina (**59a**).

El desplazamiento paramagnético observado en los espectros de RMN de los compuestos **19** y **21** (Espectros 40 y 47), para la señal vinílica (H-35) de la metil- $\gamma$ -lactona- $\alpha$ - $\beta$  insaturada ( $\delta_H$  7.19 y  $\delta_C$  151.7 en **19** y  $\delta_H$  7.18 y  $\delta_C$  151.74 en **21**), confirmó la presencia de un hidroxilo en la posición C-4 (Cuadro 23). Esto también se confirma con el experimento RMN  $^1H$  COSY, ya que se observó la correlación entre los protones en C-3 y el protón en C-4. También se observa una interacción entre los protones en C-3 y el protón en C-35 (Espectro 41 y 48).

Mediante una estrategia similar a la aplicada para los compuestos **27** y **56**, se estableció la estereoquímica relativa de los centros quirales C-15 y C-24 de las cuatro acetogeninas restantes. Así, la estereoquímica relativa de la porción *bis*-THF adyacente del compuesto **19** corresponde a un cierre de

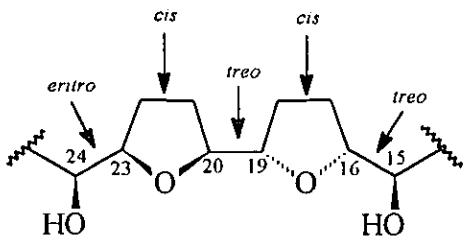
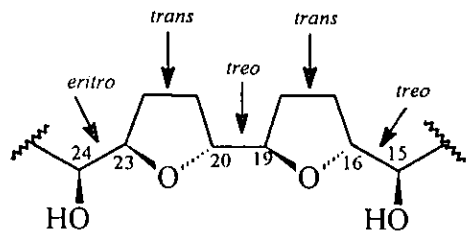
**Cuadro 23.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la porción de la metil- $\gamma$ -lactona del modelo con los compuestos **19** y **21**.

						
Atomo	<b>B</b>		<b>19</b>		<b>21</b>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	--	174.6	--	174.6	--	174.5
2	--	131.1	--	131.2	--	131.2
3	2.51 ddd	33.3	2.39 ddd	33.3	2.52 ddd	33.2
	2.38 ddd		2.39 ddd		2.39 ddd	
4 ó 5	3.83m	69.8	3.85	69.9	3.88	69.9
35	7.17 ddd	151.8	7.19 ddd	151.7	7.18 ddd	151.74
36	5.0 dq	77.9	5.06 dq	77.9	5.05 dq	77.92
37	1.42 d	19.0	1.43 d	19.0	1.43 d	19.0

anillos *treo-cis-treo-cis-eritro*. Por el contrario, en el caso de los compuestos **21**, **28** y **51** la estereoquímica relativa de esta porción se estableció como *treo-trans-treo-trans-eritro*. La comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos para el segmento ubicado entre C-15 y C-24 y de sus respectivos protones de los compuestos **19**, **21**, **29** y **59** y los de los modelos apropiados (Fang *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1993), se resumen en el Cuadro 24.

Este análisis comparativo permitió establecer la estereoquímica relativa para estos centros quirales en todos los casos analizados.

**Cuadro 24.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuesto **19**, **21**, **29** y **59** con los modelos adecuados.

												
	$^1\text{H}$ ( $\delta$ )						$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )					
Compuesto	15	16	19	20	23	24	15	16	19	20	23	24
4-hidroxi-25-desoxineoro- linicina	3.41	3.84	3.84	3.84	3.84	3.84	74.0	83.0	81.1	81.0	82.9	71.9
<b>19</b>	3.41	3.84	3.86	3.90	3.91	3.88	74.0	82.9	81.1	81.0	83.0	71.9
												
	$^1\text{H}$ ( $\delta$ )						$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )					
Compuesto	15	16	19	20	23	24	15	16	19	20	23	24
esquamoci na-28-ona	3.38	3.83	3.90*	3.83*	3.90	3.83	74.1	83.2	82.4*	82.2*	82.8	71.3
<b>21</b>	3.39	3.85	3.92	3.85	3.92	3.85	74.0	83.2	82.2	82.4	82.8	71.3
<b>29</b>	3.39	3.82	3.84	3.88	3.90	3.86	74.1	83.3	82.2	82.5	82.8	71.4
<b>59</b>	3.39	3.83	3.86	3.92	3.94	3.86	74.1	83.2	82.1	82.4	82.7	71.3

\* Señales intercambiables

La comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos de los productos **19**, **21**, **29** y **59** (Cuadro 25-28), y la coelución en CLAR con

muestras auténticas de roliniastatina 1, aislada anteriormente de *R. mucosa*, (Pettit *et al.*,1987); de bulatacina, esquamocina y motrilina, aisladas previamente de *Annona purpurea* (Chávez y Mata, 1998b), permitieron caracterizar a los compuestos como roliniastatina 1, bulatacina, esquamocina y motrilina, respectivamente. De manera adicional, cabe destacar que las acetogeninas roliniastatina 1, bulatacina y esquamocina se han aislado previamente de *R. mucosa* (Pettit *et al.*,1987; Pettit *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1996). Por otro lado, la acetogenina motrilina se describe por primera vez en la especie *Rollinia mucosa*.

**Cuadro 25.** Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de las acetogeninas roliniastatina 1 (19) y bulatacina (21).<sup>\*</sup>

Número de Carbono	Roliniastatina 1 (19) $\delta_c$	Bulatacina (21) $\delta_c$
C-1	174.6	174.58
C-2	131.2	131.22
C-3	33.3	33.32
C-4	69.9	69.98
C-5	37.4	37.39
C-6 a C-13	25.5-29.6	25.53
C-14	34.1	33.32
C-15	74.0	74.08
C-16	82.9	83.22
C-17	29.3	28.34
C-18	27.9	28.91
C-19	81.1	82.24
C-20	81.0	82.47
C-21	28.4	28.91
C-22	23.7	24.50
C-23	83.0	82.80
C-24	71.9	71.36
C-25	32.7	32.44
C-26 a C-31	25.5-29.6	29.2-29.6
C-32	31.8	31.9
C-33	22.6	22.64
C-34	14.1	14.06
C-35	151.7	151.74
C-36	77.9	77.92
C-37	19.0	19.08

<sup>\*</sup> Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS.

**Cuadro 26.** Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  de las acetogeninas roliniastatina 1 (19) y bulatacina (21).\*

Protón	Roliniastatina 1 (19) $\delta_{\text{H}}$	Bulatacina (21) $\delta_{\text{H}}$
3a	2.52 ddd (15.3, 3.6, 1.5, 1.2)	2.52 ddd (15.0, 1.5, 1.5, 1.5)
3b	2.39 ddd (15.3, 8.4, 1.5, 1.2)	2.39 ddd (15.2, 8.5, 1.4)
4	3.85	3.88
5	1.49	1.47
6 al 13	1.20-1.50	1.2-1.9
14	1.46 m	1.40
15	3.41 m	3.39
16	3.84 m	3.85
17	1.91 m, 1.80 m	1.97 (11.2, 1.5)
18	1.94 m, 1.78 m	1.62 (11.2, 3.0)
19	3.86	3.92
20	3.90	3.85
21	1.93 m, 1.82	1.62, 1.97
22	1.98 m, 1.78 m	1.80, 1.90
23	3.91	3.92
24	3.88	3.85
25	1.37	1.31
26 al 33	1.20-1.50	1.20-1.60
34	0.88 t (6.3)	0.87 t
35	7.19 ddd (1.5, 1.5, 1.5)	7.18 ddd (1.5, 1.5, 1.5)
36	5.06 dq (2.0, 7.0)	5.06 dq (1.5, 7.0)
37	1.43 d (7.0)	1.43 d (7.0)

\* Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz y se encuentran en paréntesis.



**Cuadro 27.** Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de las acetogeninas esquamocina (29) y motrilina (59).\*

Número de Carbono	Esquamocina (29) $\delta_c$	Motrilina (59) $\delta_c$
1	173.8	173.8
2	134.3	134.2
3	25.14	25.06
4	27.36	27.30
5	29-30	29-29.6
6	29-30	29-29.6
7 al 12	29-30	29-29.6
13	25.6	25.24
14	33.26	33.12
15	74.10	74.08
16	83.27	83.25
17	28.37	28.33
18	28.9	28.88
19	82.16	82.12
20	82.47	82.45
21	29.14	28.33
22	24.8	24.53
23	82.78	82.74
24	71.4	71.32
25	32.46	32.23
26	21.97	25.55
27	37.23	25.97
28	71.74	37.40
29	37.47	71.67
30	25.60	37.18
31	29.69	25.55
32	31.82	31.83
33	22.56	22.54
34	14.04	13.93
35	148.78	148.84
36	77.37	77.32
37	19.18	19.10

\* Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS.

**Cuadro 28.** Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  de las acetogeninas esquamocina (29) y motrilina (59).\*

Protón	Esquamocina (29) $\delta_{\text{H}}$	Motrilina (59) $\delta_{\text{H}}$
3	2.26 tt (7.0, 1.5)	2.26 tt (7.0, 1.5)
4	1.54	1.54
5	1.20-1.40	1.25-1.35
6 al 12	1.20-1.40	1.25-1.35
13	1.20-1.40	1.25-1.35
14	1.42 m	1.42m
15	3.39 m	3.39 m
16	3.82 m	3.83 m
17	1.58 m , 1.93 m	1.95 m, 1.59 m
18	1.56 m, 1.95m	1.96 m, 1.4 m
19	3.84	3.86
20	3.88	3.92
21	1.38	1.96 m, 1.54 m
22	1.84	1.96 m, 1.54 m
23	3.90	3.94
24	3.86	3.86
25	1.38	1.38
26	1.38	1.34
27	1.41	1.34
28	3.59 m	1.53
29	1.44	3.57 m
30	1.20-1.38	1.53
31 al 33	1.20-1.38	1.26-1.34
34	0.88 t (6.9)	0.88 t (7.0)
35	6.98 ddd (1.5, 1.5, 1.5))	6.99 ddd (1.5, 1.5, 1.5)
36	4.99 dq (1.5, 7.0)	4.99 dq (2.0, 7.0)
37	1.40 d (6.9)	1.40 d (6.5)

\* Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz y se encuentran en paréntesis.

## V. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *ROLLINIA MUCOSA*.

De acuerdo a la estrategia planteada para la investigación de la especie *Rollinia mucosa* se realizaron los ensayos biológicos, conducentes a determinar el potencial citotóxico de los compuestos aislados.

En primer lugar, se determinó la actividad de las acetogeninas y lignanos aislados en el bioensayo de toxicidad para *Artemia salina* (TAS). Los resultados de esta evaluación se presentan en el Cuadro 29. Como puede observarse todos los compuestos tienen una actividad tóxica significativa, ya que los valores de concentración letal media son menores a 1 ppm (Anderson *et al.*, 1991). Los compuestos esquamocina y motrilina resultaron los más tóxicos para *A. salina*.

**Cuadro 29.** Toxicidad para el crustáceo *A. salina* de los compuestos aislados de *Rollinia mucosa*.

Compuesto	Toxicidad <i>Artemia salina</i> CL <sub>50</sub> + (µg/ml)
Membranacina (27)	5.0 X 10 <sup>-2</sup>
Desacetilivaricina (56)	1.6 X 10 <sup>-2</sup>
Éter dimetílico del pinorresinol (58)	2.2 X 10 <sup>-1</sup>
Magnolina (15)	1.2 X 10 <sup>-2</sup>
Roliniastatina 1 (19)	1.7 X 10 <sup>-2</sup>
Bulatacina (21)	1.0 X 10 <sup>-2</sup>
Esquamocina (29)	3.0 X 10 <sup>-3</sup>
Motrilina (59)	1.0 X 10 <sup>-3</sup>

+ Concentración letal media.

Por otra parte, se determinó la actividad citotóxica *in vitro* de algunos de los compuestos aislados de *R. mucosa* sobre seis líneas celulares derivadas

de tumores humanos que incluyeron: Carcinoma de pulmón (A-549), carcinoma de pecho (MCF-7), adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de riñón (A-498), adenocarcinoma de próstata (PC-3) y carcinoma de páncreas (PACA-2) (Cuadro 30).

La membranacina (27) y la desacetiluaricina (56) presentaron una buena actividad, principalmente en contra de las líneas celulares de carcinoma de riñón (A-498) y adenocarcinoma de próstata (PC-3). En ambos casos, las  $CE_{50}$ 's son menores a  $10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$ . El efecto sobre estas líneas fue selectivo. La roliniastatina 1 (19) presenta una buena actividad citotóxica sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de colon ( $CE_{50} = 10^{-5}$   $\mu\text{g/ml}$ ), adenocarcinoma de próstata ( $CE_{50} = 10^{-4}$   $\mu\text{g/ml}$ ) y en carcinoma de páncreas ( $CE_{50} = 10^{-5}$   $\mu\text{g/ml}$ ). Todas las líneas celulares son afectadas por la presencia de motrilina (59), principalmente las derivadas de los adenocarcinoma de colon, páncreas y próstata. Los valores de  $CE_{50}$  obtenidos en este caso son de  $10^{-5}$   $\mu\text{g/ml}$  para las dos primeras y de  $CE_{50} = 10^{-4}$   $\mu\text{g/ml}$  para la última (Cuadro 30). Se considera como una actividad significativa para compuestos puros aquellos valores de  $CE_{50} < 4$   $\mu\text{g/ml}$  (Suffnes y Pezzuto, 1991).

**Cuadro 30.** Citotoxicidad de los compuestos aislados de *Rollinia mucosa*.

Muestra	Línea celular $CE_{50}^*$ ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	A-549 <sup>A</sup>	MCF-7 <sup>B</sup>	HT-29 <sup>C</sup>	A-498 <sup>D</sup>	PC-3 <sup>E</sup>	PACA-2 <sup>F</sup>
Membranacina	$4.0 \times 10^{-1}$	2.18	3.04	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	2.10
Desacetiluaricina	$4.7 \times 10^{-1}$	1.35	1.69	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	1.92
Adriamicina <sup>+</sup>	$8.9 \times 10^{-3}$	$3.6 \times 10^{-3}$	$3.7 \times 10^{-3}$	$8.3 \times 10^{-3}$	$5.6 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$
Roliniastatina 1	$1.4 \times 10^{-2}$	$> 10^{-1}$	$4.2 \times 10^{-5}$	$> 10^{-1}$	$2.5 \times 10^{-4}$	$2.9 \times 10^{-5}$
Motrilina	$6.4 \times 10^{-3}$	$8.5 \times 10^{-3}$	$2.1 \times 10^{-5}$	$> 10^{-1}$	$1.4 \times 10^{-5}$	$4.1 \times 10^{-4}$
Adriamicina <sup>+</sup>	$4.4 \times 10^{-3}$	$8.9 \times 10^{-2}$	$1.6 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-3}$	$2.1 \times 10^{-2}$	$2.9 \times 10^{-3}$

\* Concentración efectiva media. <sup>A</sup>Carcinoma de pulmón. <sup>B</sup>Carcinoma de pecho. <sup>C</sup> Adenocarcinoma de colon. <sup>D</sup> Carcinoma de riñón. <sup>E</sup> Adenocarcinoma de próstata. <sup>F</sup> Carcinoma de páncreas.

+ Control positivo

La actividad citotóxica de la bulatacina se describió por vez primera por el grupo de McLaughlin (Hui *et al.*, 1989). Este compuesto ha sido aislado en múltiples ocasiones de plantas de la familia de las anónaceas y ha demostrado una actividad citotóxica significativa en contra de varias líneas celulares, las cuales incluyen entre otras: Leucemia linfocítica de múridos (normal e inducida por metilcolantreno); carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de pulmón, carcinoma de pecho y adenocarcinoma de colon. Cabe destacar que esta acetogenina ha resultado una de las más potentes descritas a la fecha. También se han demostrado sus propiedades pesticidas contra los gusanos del melón (*Aphisgossypii* sp), maíz y algodón (*Diabrotica undecimpunctata*) y en contra de dos clases de arañas (Hui *et al.*, 1989; Pettit *et al.*, 1989; Born *et al.*, 1990; Sahai *et al.*, 1994).

Para la roliniastatina 1 se ha descrito su actividad citotóxica para la leucemia linfocítica de múrido (3PS) y para aquella inducida por metilcolantreno (9PS) (Pettit *et al.*, 1987). La esquamocina también presenta citotoxicidad para la leucemia de múrido (L1210) y tiene actividad insecticida contra *Drosophila melanogaster* (Fujimoto *et al.*, 1988; Kawazu, *et al.*, 1989; Born *et al.*, 1990). Por otro lado, la motrilina ha sido probada contra el carcinoma nasofaríngeo humano (9KB) y en epitelio de células renales de mono VERO (Cortes *et al.*, 1991; Londershausen *et al.*, 1991).

En el caso de la membranacina y la desacetilivaricina ninguna actividad biológica se ha descrito en la literatura (Saez *et al.*, 1993; Jolad *et al.*, 1985), y por lo tanto, este trabajo constituye la primera descripción de su actividad citotóxica.

## VI. CONCLUSIONES

1.- La evaluación del extracto  $\text{CHCl}_3$ -MeOH de las semillas de *Rollinia mucosa* contra varias líneas celulares derivadas de tumores humanos permitió establecer el potencial citotóxico de la especie colectada en México.

2.- El fraccionamiento biodirigido del extracto activo, utilizando la determinación de la toxicidad para *Artemia salina*, permitió detectar las fracciones citotóxicas de este extracto. Posteriormente, la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución condujo a la separación de ocho metabolitos secundarios a partir de dos de las fracciones activas. Los compuestos aislados incluyeron seis acetogeninas: la membranacina (27), la desacetiluaricina (56), la roliniastatina 1 (19), la bulatacina (21), la esquamocina (29) y la motrilina (59) y dos lignanos: el éter dimetílico del pinorresinol (58) y la magnolina (15). En todos los casos, los compuestos se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. En el caso particular de las acetogeninas membranacina (27) y desacetiluaricina (56), se determinó la configuración absoluta, no conocida a la fecha para la primera, de los centros estereogénicos presentes en la molécula mediante la aplicación del método de Mosher.

3.- Todos los compuestos aislados demostraron una toxicidad significativa para *Artemia salina*. Los productos más activos fueron la esquamocina (29) y la motrilina (59). Por otra parte, los compuestos membranacina (27) y desacetiluaricina (56), que contienen dos hidroxilos en la molécula, presentaron una actividad citotóxica selectiva contra las líneas celulares de carcinoma de riñón (A-498) y adenocarcinoma de próstata (PC-3). Los compuestos roliniastatina 1 (19) y motrilina (59) que contienen tres hidroxilos en su molécula presentan una actividad citotóxica

significativa en tres líneas celulares: Adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de riñón (A-498) y carcinoma de páncreas (PACA-2).

Cabe destacar, que esta investigación constituye el primer informe sobre la actividad biológica de las acetogeninas membranacina (27) y desacetiluaricina (56).

4.- La presente investigación constituye una contribución adicional al conocimiento del contenido metabólico de la especie *Rollinia mucosa* y de las especies de anónaceas con propiedades medicinales de la flora mexicana, con el objetivo de descubrir principios biodinámicos con posible aplicación terapéutica.

5.- Ninguno de los compuestos aislados presentó el esqueleto de la jimenezina, previamente aislada de la especie recolectada en México. Sin embargo, las acetogeninas obtenidas en el presente estudio resultaron del mismo tipo estructural que las obtenidas en la especie recolectada en diversas regiones del mundo.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abreo, M. J., Sneden, A. T. (1989). 4-Hydroxi-25-desoxyneurollinacin, A new bistetrahydrofuranoid acetogenin from *Rollinia papilionella*. *Journal of Natural Products* **52**, 822-828.
- Abreo, M. J., Sneden, A. T. (1990). Rollinone, A revision and extension of structure. *Journal of Natural Products* **53**, 983-985.
- Anderson, J. E., Goetz, C. M., Suffness, M., McLaughlin, J. L. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* **2**, 107-111.
- Ayres, D. C., Loike, J. D. (1990). *Lignans chemical biological and clinical properties*. Ed. Cambrige University Press Gran Bretaña pp. 42-57; 208-216.
- Ahammadshah, K. I., Hollingworth, R. M., McGovern, J. P., Hui, Y. H., McLaughlin J. L. (1993). Mode of action of Bullatacin: a potent antitumor and pesticidal Annonaceous acetogenin. *Life Sciences* **53**, 1113-1120.
- Brash, R. M., Sneden A. T. (1983). Oxoaporphine alkaloids from *Rollinia sericea*. *Journal of Natural Products* **46**, 437.
- Born, L., Lieb, F., Lorentzen, J. P., Moeschler, H., Nonfon, R. and Wendish, D. (1990). Die relative Konfiguration der aus *Annona squamosa* isolierten Acetogenine Annonin I (Squamocin) and Annonin VI. *Planta Medica* **56**, 312-316.



- Boyd, M. R. and PhD, M. D. The Future of New Drug Development. In *Current Therapy in Oncology* Ed. Neiderhuber, J. E. Philadelphia (1992). B. C. Decker, Inc. pp. 11-22.
- Caetano, L. C. and Dadoun, H. (1987). Pallidine and aporphinoid alkaloids from *Rollinia mucosa*. *Journal of Natural Products* **50**, 330-332.
- Calabresi, P., Chabner, B. A. (1991) Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas y Agentes antineoplásicos. En *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Goodman, G. a., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires pp. 1163-1222.
- Chávez, D., Acevedo, L. A., Mata, R. (1998a). Jimenezin, a novel Annonaceous acetogenin from the seeds of *Rollinia mucosa* containing adjacent tetrahydrofuran-tetrahydropyran ring systems. *Journal of Natural Products* **61**, 419-421.
- Chávez, D., Mata R. (1998b). Purpurediolin and Purpurenin, Two new cytotoxic adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products* **61**, 580-584.
- Chen, Y-Y., Chang, F-G., Yen, H-F., Wu, Y-C. (1996). Epomusenins A and B, Two acetogenins from fruit of *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry* **42**, 1081-1083.
- Cortes, D., Myint, S. H. and Hocquemiller R. (1991). Molvizarin and Motrilin: Two novel cytotoxic bis-tetrahydrofuranic  $\gamma$ -lactone acetogenins from *Annona cherimolia*. *Tetrahedron* **47**, 8195-8202.

- Dabrah, T. T., Sneden, A. T. (1983). Oxoaporphine alkaloids from *Rollinia papilionella*. *Journal of Natural Products* **46**, 436.
- Dabrah, T. T., Sneden, A. T. (1984). Rollinicin and Isorollinicin, Cytotoxic acetogenin from *Rollinia papilionella*. *Phytochemistry* **23**, 2013-2016.
- De Queiroz, P. (1991). Lignans and other Non-alkaloidal constituents from *Rollinia mucosa*. *Fitoterapia* **IXII**, 150-152.
- Fang, X., Rieser, M. J., Gu, Z-M., Zhao, G-X. and McLaughlin, J. L. (1993). Annonaceous acetogenins: An updated review. *Phytochemical Analysis* **4**, 27-67.
- Fujimoto, Y., Eguchi, T., Kakinuma, K., Ikekawa, N., Shai, M. and Gupta, Y. K. Squamocin a new cytotoxic Bis-tetrahydrofuran containing acetogenin from *Annona squamosa*. (1988). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **36**, 4802-4806.
- González, M. C., Tormo, J. R., Bermejo, A., Zafra-Polo, M. C., Estornell, E., Cortés, D. (1997). Rollimembrin a novel acetogenin inhibitor of Mammalian Mitochondrial Complex I. *Biorganic Medicinal Chemistry Lett.* **7**, 1113-1118.
- Gu, Z-M., Fang, X-P., Colman, S. T., Hou, M., McLaughlin, J. L. (1994) Determination absolute configurations of stereocenters in Annonaceous acetogenins through formaldehyde acetal derivatives and Mosher ester methodology. *Journal Organic Chemistry* **59**, 5162-5172.

- Gu Z-M., Zhao G-X., Oberlies, N-H., Zeng L., McLaughlin J. L. (1995) Annonaceous acetogenins potent mitochondrial inhibitors with diverse applications. In recent advances in *Phytochemistry*. Arnason, J. T., Mata, R. and Romero, J. T. Ed. Plenum Press, New York pp. 249-310.
- Gu, Z-M., Zhou, D., Lewes, N. J., Wu, J. Shi, G., McLaughlin, J. L. (1997). Isolation of new bioactive Annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. *Biorganic Medicinal Chemistry* 5, 1911-1916.
- Hisham, A., Pieters, L. A., Claeys, M., Esmans, E., Dommissie, R., Vlietinck, A. J. (1991). Squamocin-28-one and panalycin, two acetogenins from *Uvaria narum*. *Phytochemistry* 30, 545-548.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston. (1986) *Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation*. Berlin Heidelberg pp. 27-79.
- Hui, Y. H., Rupprecht, J. K., Liu, Y. M., Anderson, J. E., Smith, D. L., Chag, C. J., McLaughlin J. L. (1989). Bullatacin and Bullatacinone: Two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. *Journal of Natural Products*. 52, 463-477.
- Hussain, R. A., Lin, Y-M., Poveda, L. J., Bordas, B., Chung, B. J., Pezzuto, J. M., Soejarto, D. D., Kinghorn, A. D. (1990). Plant derived sweetening agents saccharide and polyol constituentns of some sweet-tasting plants. *Journal of Ethnopharmacology* 28, 103-115.

- Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Cole, J. R. (1985). Desacetyluvaricin from *Uvaria accuminata*, configuration of Uvaricin AT C-36. *Journal of Natural Products* **48**, 644-645.
- Kakisawa, H., Chen, Y. P., Hsü, H. Y. (1972). Lignans in floer buds of *Magnolia fargesii*. *Phytochemistry* **11**, 2289-2293.
- Kawazu, K., Alcantara, J. P., Kobayashi, A. (1989). Isolation and Structure of Neoannonin, a novel insecticidal compound from the seeds of *Annona squamosa*. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**, 2719-2722.
- Laprévôte, O., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., Charles, B., Tabet J. C. (1991). Structural elucidation of five stereoisomeric Acetogenins Uleicins A-E, By Tandem Mass Spectrometry. *Phytochemistry* **30**, 2721-2727.
- Londershausen, M., Leicht, W., Lieb, F., Moeschler, H. and Weiss H. (1991). Molecular mode of action of Annonins. *Pesticide Science*, **33**, 427-438.
- Maas, P. J., Westra, L. Y. y colaboradores. En *Flora Neotropica, Rollinia* monografía 57, publicado por New York Botanical Garden, New York 1992, pp 41-66, 127-132.
- Mikolajczak, K. J., Madrigal, R. V., Rupprecht, J. K., Hui, Y. H., Liu, Y. M., Smith D. L., MacLaughlin, J. L. (1990). Sylvaticin: A new cytotoxic and insecticidal acetogenin from *Rollinia sylvatica* (Annonaceae). *Experientia* **46**, 324-327.
- Morré D. J., MacLaughlin J. L. (1995). Mode of action of bullatacin a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HELA

- and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sciences* **56**, 343-348.
- Morton, J. F. (1987). *Fruits of Warm Climates* Curtir F. Dowling. Ed. Media Incorporated Greensboro. North Carolain pp. 88-90.
- Nieto, M. (1986). Alkaloids from *Rollinia emarginata*. *Journal of Natural Products* **49**, 717.
- Pelter, A. and Ward, R. S. (1976). Revised structures for Pluviatillol, methyl pluviatol and xanthoxylol. *Tetrahedron* **32**, 2783-2788.
- Pettit, G. R., Cragg, G. M., Polonsky, J., Herald, D. L., Goswami, C. R., Smith, C. R., Moretti, C., Schmidt, J. M., Weisleder, D. (1987). Isolation and structure of rolliniastatin 1 from the South American tree *Rollinia mucosa*. *Canadian Journal of Chemitry* **65**, 1433-1435.
- Pettit, G. R., Riesen, R., Leet, J. E., Polonshy, J., Smith, C. R., Schmidt, J. M., Dufresne, C., Schaufelberger, D., Moretti, C. (1989). Isolation and structure of Rolliniastatin 2: a new cell growth inhibitory acetogenin from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles* **28**, 213-217.
- Rieser, M. J., Hui, Y-H., Rupprecht, J. K., Kozlowski, J. F., Wood, K. V., McLaughlin, J. L., Hason, P. R., Zhuang, Z., Hoye, T. R. (1992). Determination of absolute configuration of stereogenic carbinol centers in Annonaceous acetogenins by <sup>1</sup>H- and <sup>19</sup>F-NMR analysis of Mosher ester derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 10203-10213.

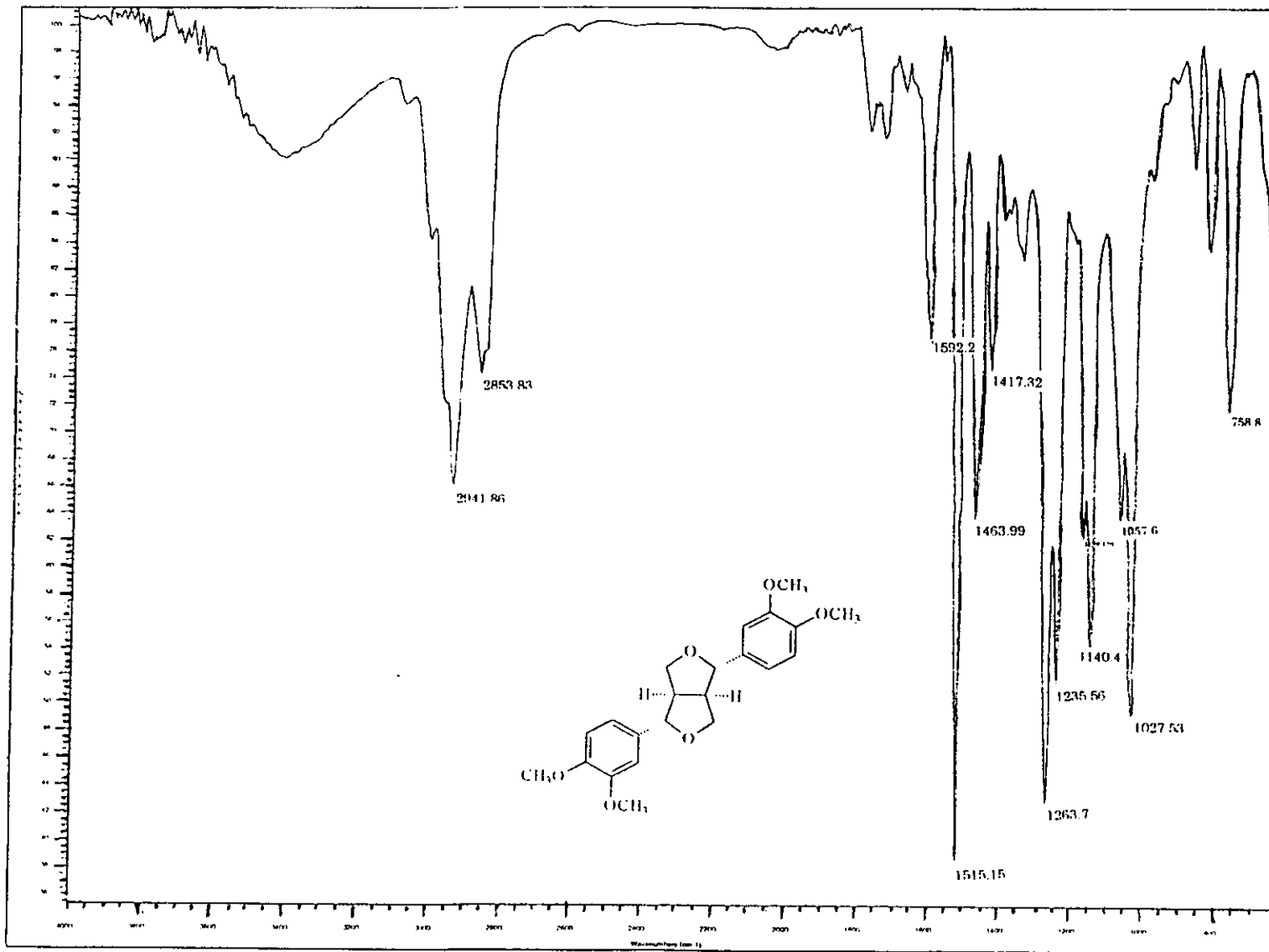
- Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, E. V. (1996). *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Ed. Lea Febiger. Philadelphia pp. 23-285.
- Rupprecht, J. K., Chang, C. J., Cassady J. M., McLaughlin J. L., Mikolajczak K. L., Weisleder, D.(1986). *Heterocycles* **24**, 1197
- Rupprecht, J. K., Yu-Hua, H., McLaughlin J. L. (1990). Annonaceous Acetogenins: a review. *Journal of Natural Products* **53**, 237-278.
- Saez, J., Sahpaz, S., Villaescusa, L., Hocquemiller, R., Cavé, A. (1993). Rioclarine et membranacine, deux nouvelles acetogenines bis-tetrahydrofuraniques des graines de *Rollinia membranacea*. *Journal of Natural Products* **56**, 351-356.
- Sahai, M., Singh, S., Singh, M., Gupta, Y. K., Akashi, S., Yuji, R., Hirayama K., Asaki, H., Araya, H., Hara, N., Eguchi, T., Kakinuma, K., Fujimoto, Y. (1994). Annonaceous acetogenins from the seed of *Annona squamosa*. Adjacent Bis-tetrahydrofuranic acetogenins. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **42**, 1163-1174.
- Sahpaz, S., Figadère, B., Saez, J., Hocquemiller R., Cavé, A., Cortés, D. (1993). Tripoxyrollin, a new epoxy acetogenin from the seeds of *Rollinia membranacea*. *Natural Product Letters* **2**, 301-308.
- Sahpaz, S., Hocquemiller, R., Cavé A. (1997). Diepoxyrollin and Diepomuricanin B: Two new diepoxyacetogenins from *Rollinia membranacea* seeds. *Journal of Natural Products* **60**, 199-201.
- Shi, G., Alfonso, D., Fatope, M. O., Zeng, L., Gu, Z. M., Zhao, G. X., He, K., MacDougal J. M., McLaughlin J. L. (1995a) Muconin: A new

- Annonaceous acetogenin bearing a tetrahydropyran ring. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10409-10410.
- Shi, G., Zeng, L., Gu, Z-M., MacDougal, J. M., McLaughlin, J. L. (1995b). Absolute stereochemistries of sylvaticin and 12,15-*cis*-sylvaticin, bioactive C-20, 23-*cis* non-adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins, from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles* **41**, 1785-1796.
- Shi, G., Ye, Q., He, K., McLaughlin J. L. (1996a). Rollinecins A and B: Two new bioactive Annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Journal of Natural Products* **59**, 548-551.
- Shi, G., Kozlowski, J. F., Schwedler, J. T., Wood, K. V., MacDougal J. M., McLaughlin J. L. (1996b). Muconin and Mucoxin: Additional nonclassical bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Journal Organic Chemistry* **61**, 7988-7989.
- Shi, G. E., Gu Z-M., He, K., Wood, K. V., Zeng, L., Ye, Q., MacDougal, J. M., McLaughlin, J. L. (1996c). Applying Mosher method two Acetogenins bearing vecinal diols. The absolute configuration of Muricatetrocin C and Rollinecin A and B, New bioactive Acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **4**, 1281-1286.
- Shi, G., MacDougal, J. M., McLaughlin, J. L. (1997a). Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry* **45**, 719-723.
- Shi, G. E., He, K., Liu, X., Ye, Q., MacDougal, J. M., McLaughlin, J. L. (1997b). A novel application of Mosher's method to epimeric carbinols in acetogenins: Absolute configurations of 12-hydroxy-bullatacins A

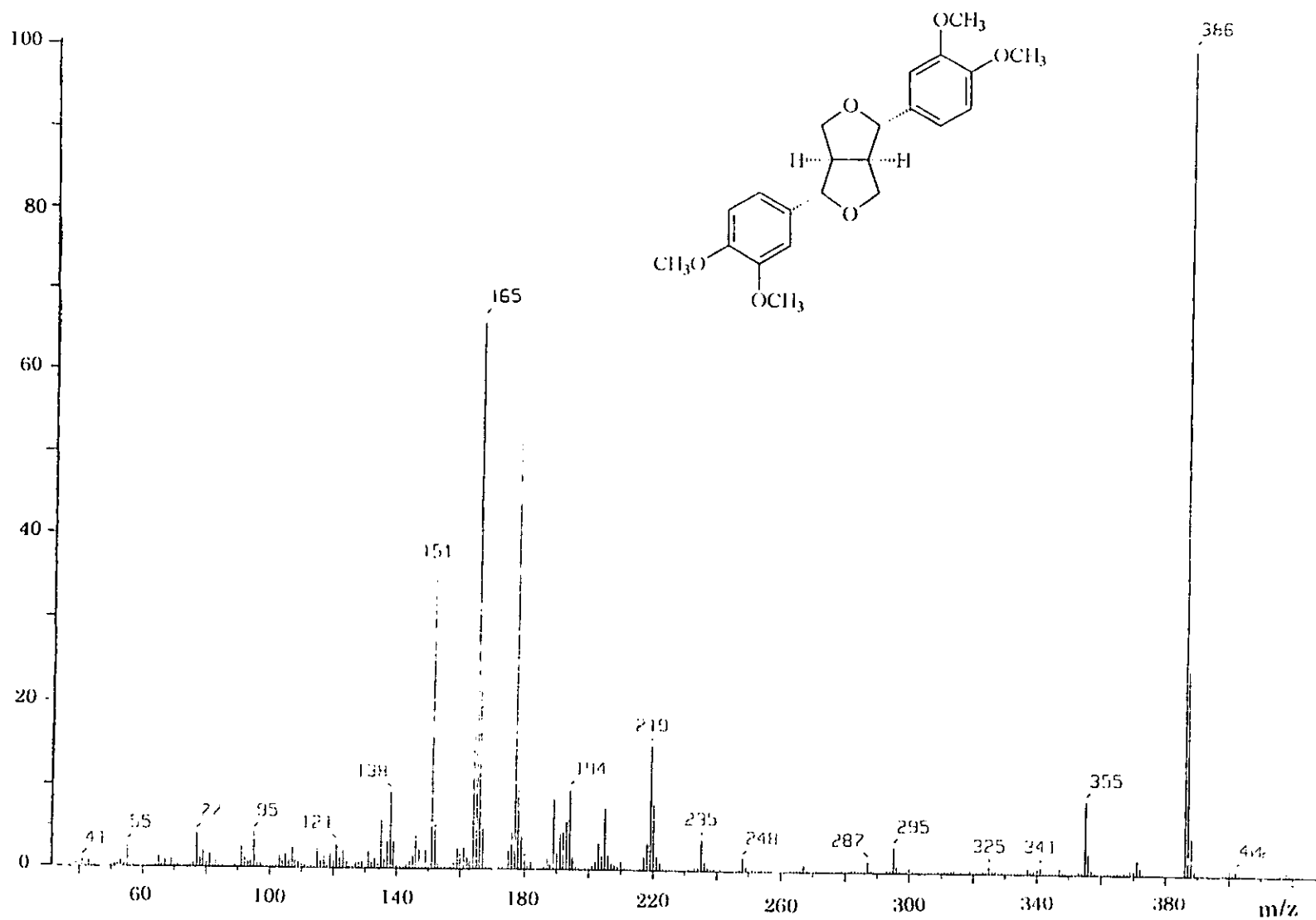
- and B, new acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Natural Product Letters* **10**, 125-132.
- Stahl, E. (1969). *Thin layer chromatography*. Academic Press Inc., New York, pp 487.
- Standley and Steyermark. (1996). *Flora de Guatemala*. Fieldiana Botany **24** pp. 288-291.
- Suffness, M., Pezzuto J. M. (1991) Assays related to cancer drug discovery. In *Methods in plant biochemistry*. By Hostettmann K. Ed. Academic press, London **6**, pp. 71-133.
- Tanaka, T. (1976). *Tanaka's cyclopedia of edible plants of the world*. Keigaku Publishing Co., Tokyo pp. 231.
- Tang, W., Eisenbrand G. (1992) *Chinese Drugs of plant Origin* Springer Verlag, Berlin pp. 239-261.
- Williams, L. O. (1981). *The useful plants of Central America* Ceiba **24** (1-2) pp. 381.
- Zafra-Polo, M.C., González, M. C., Estornell, E., Sahpaz, S., Cortes, D. (1996). Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial Complex I. *Phytochemistry* **42**, 253-271.
- Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N. H., Shi, G., Gu, Z-M., He, K., Mclaughlin, J. L. (1996). In recent advances in Annonaceous Acetogenins. *Natural Product Reports* **13**, 275-306.



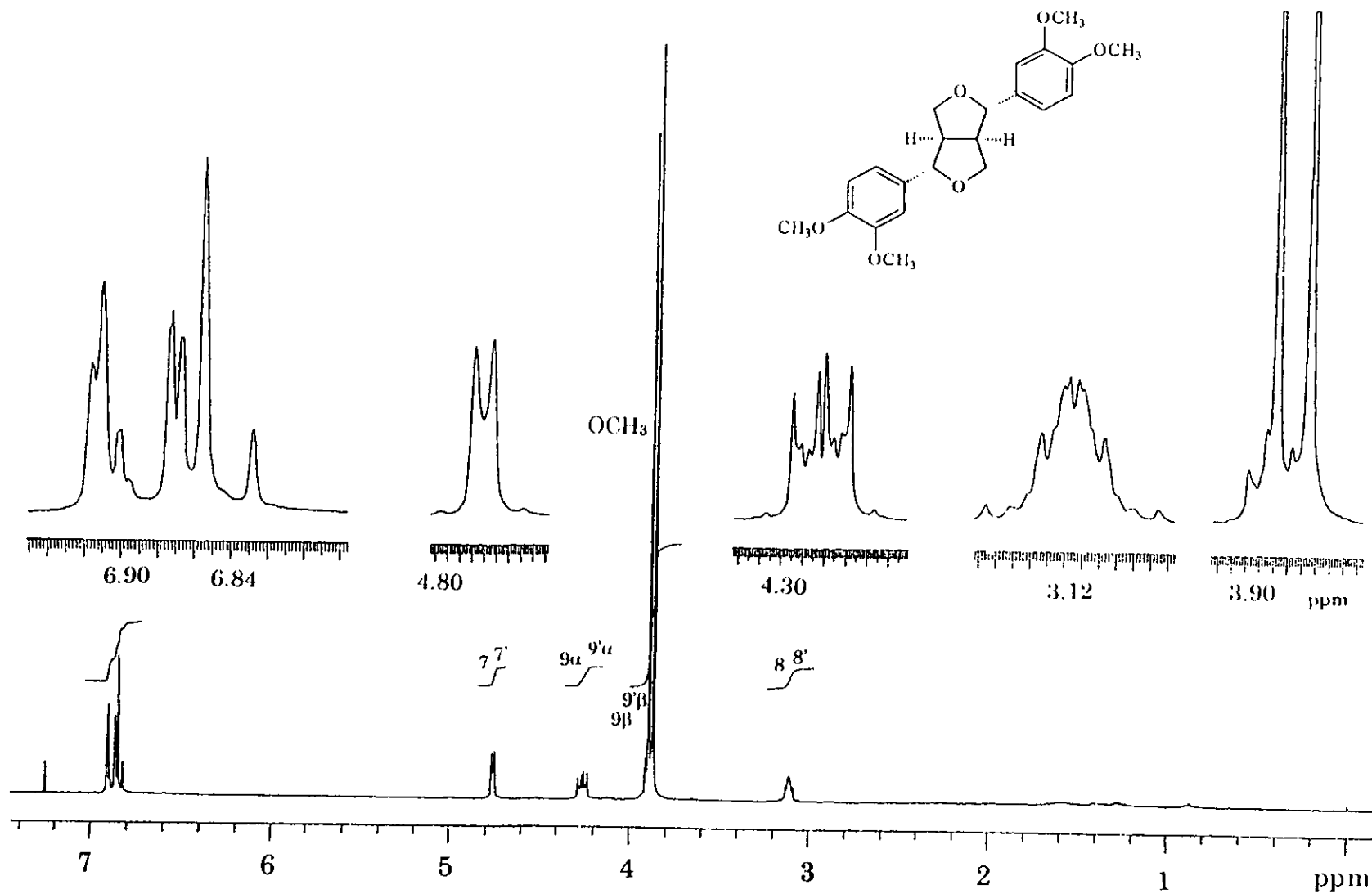
# **VIII. ANEXO 1**



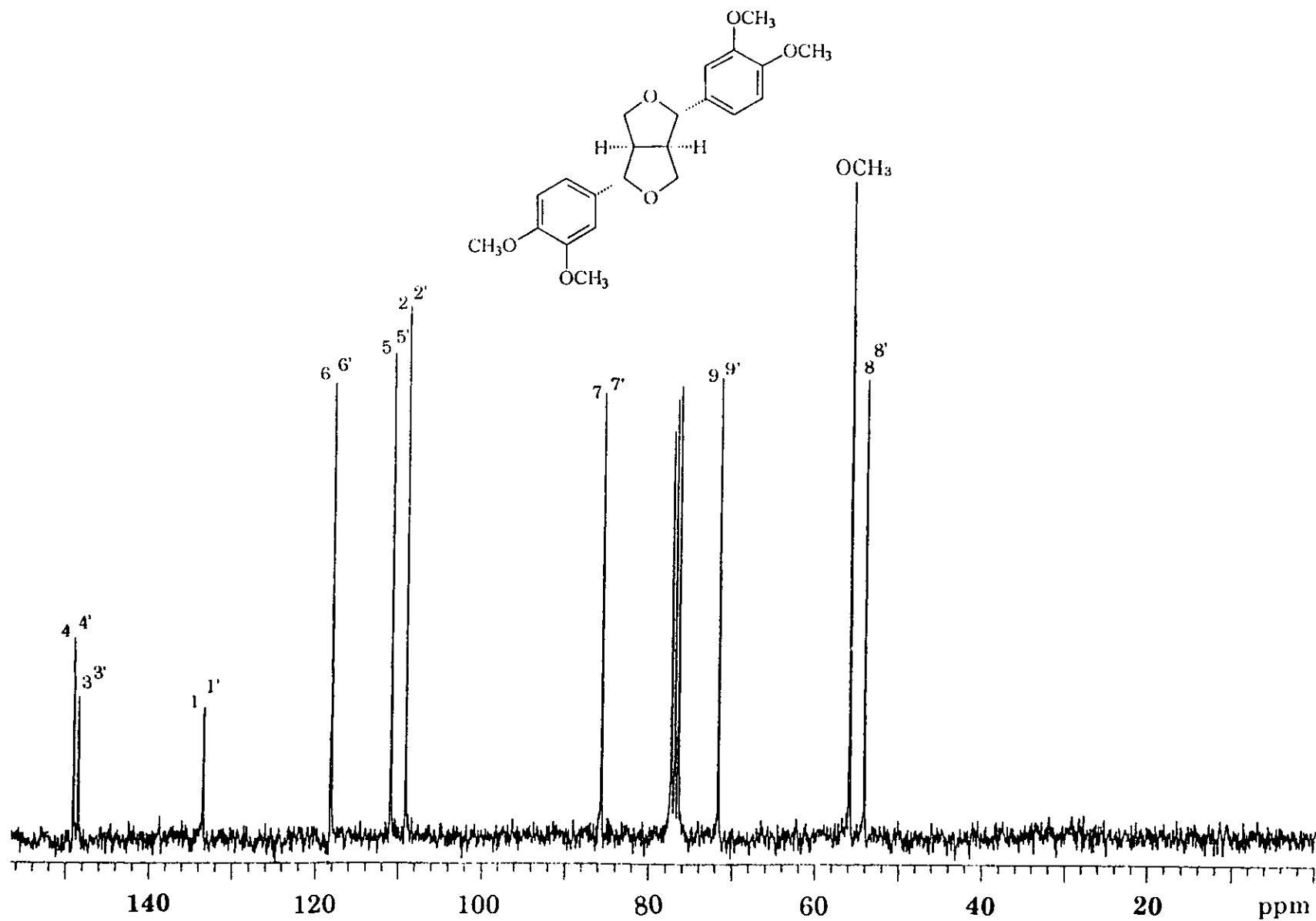
**Espectro 1.** Espectro en el IR del éter dimetílico del pinorresinol (58).



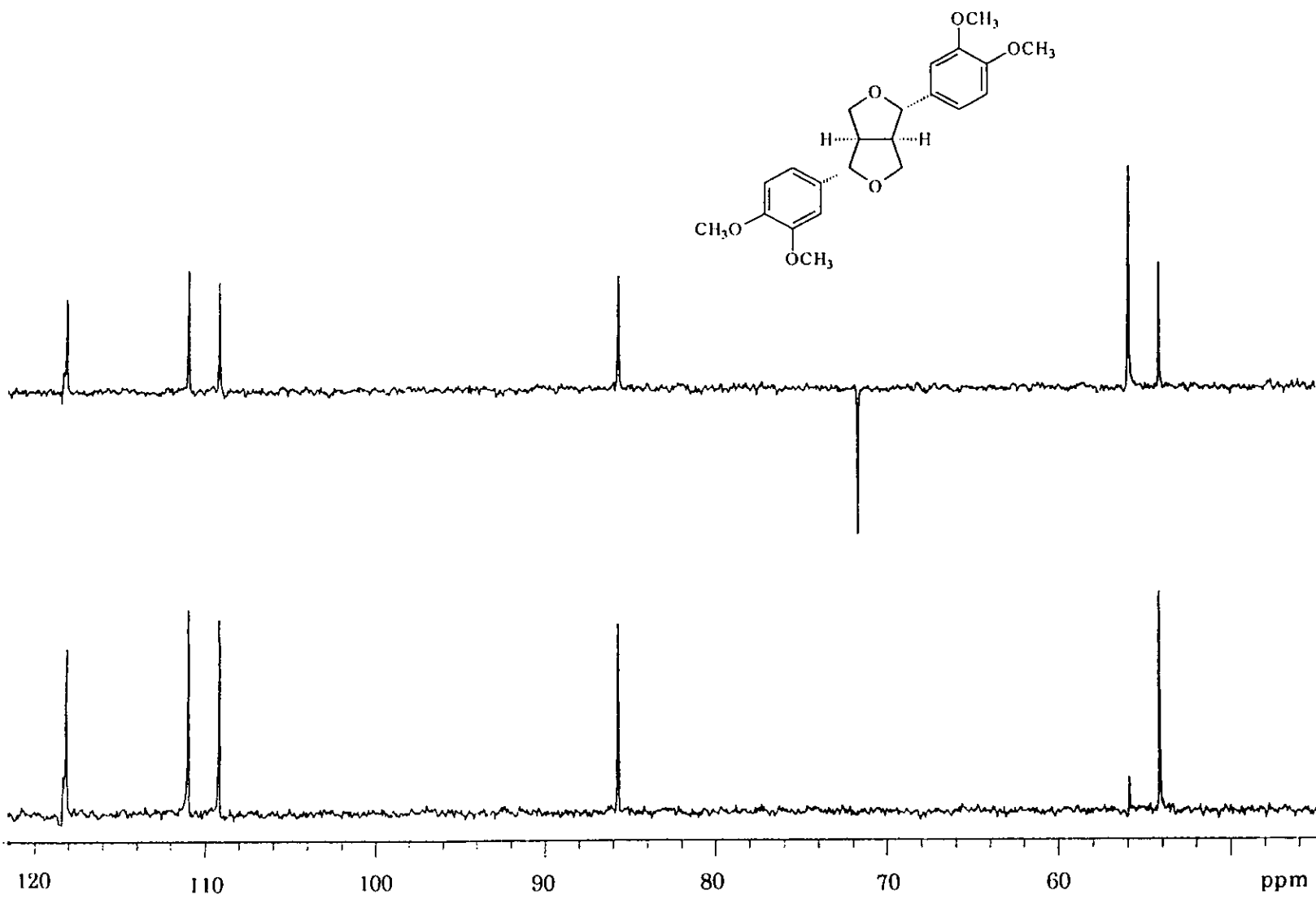
**Espectro 2.** Espectro de masas del éter dimetílico del pinorresinol (58).



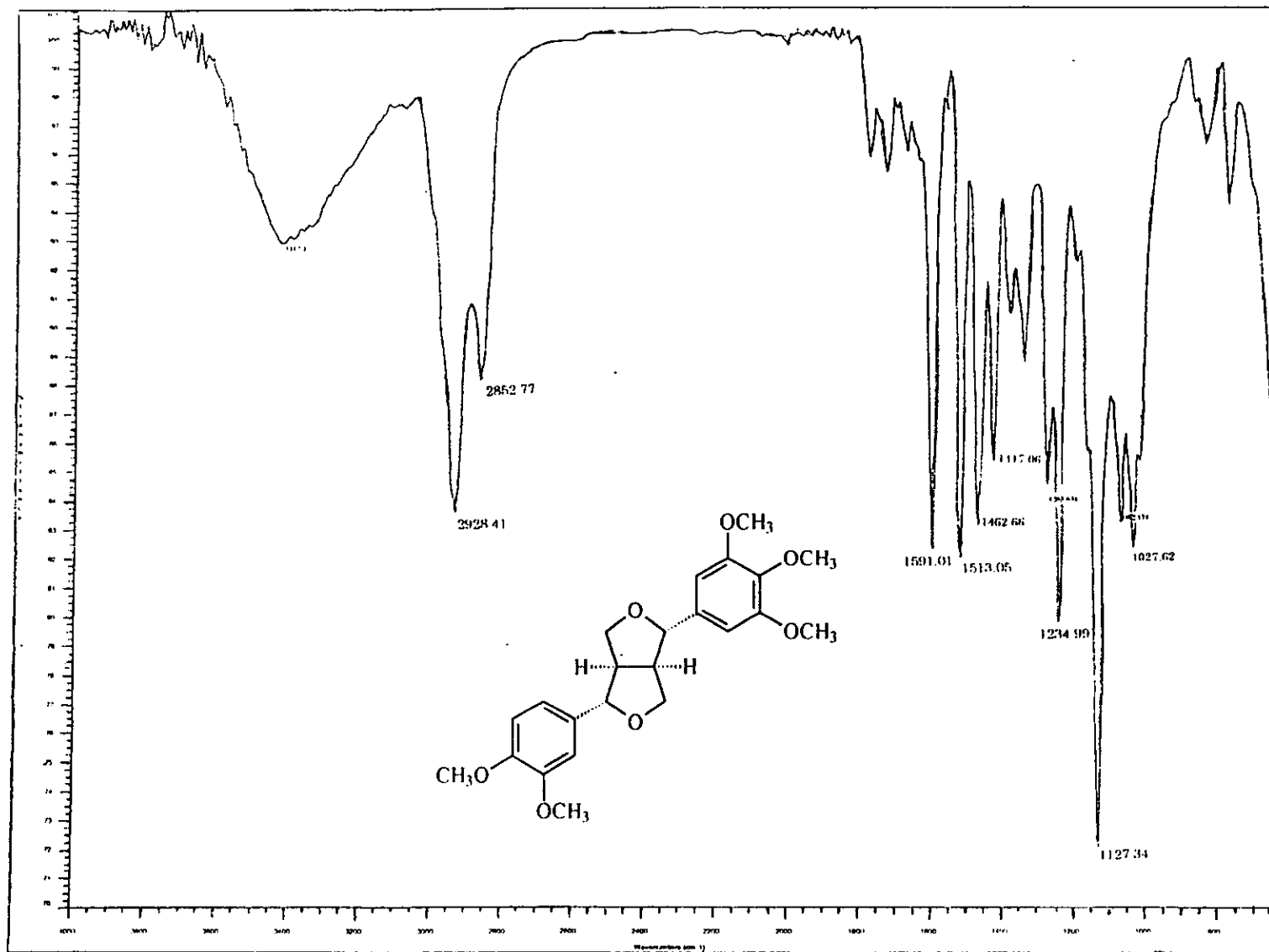
Espectro 3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del éter dimetílico del pinorresinol (58).



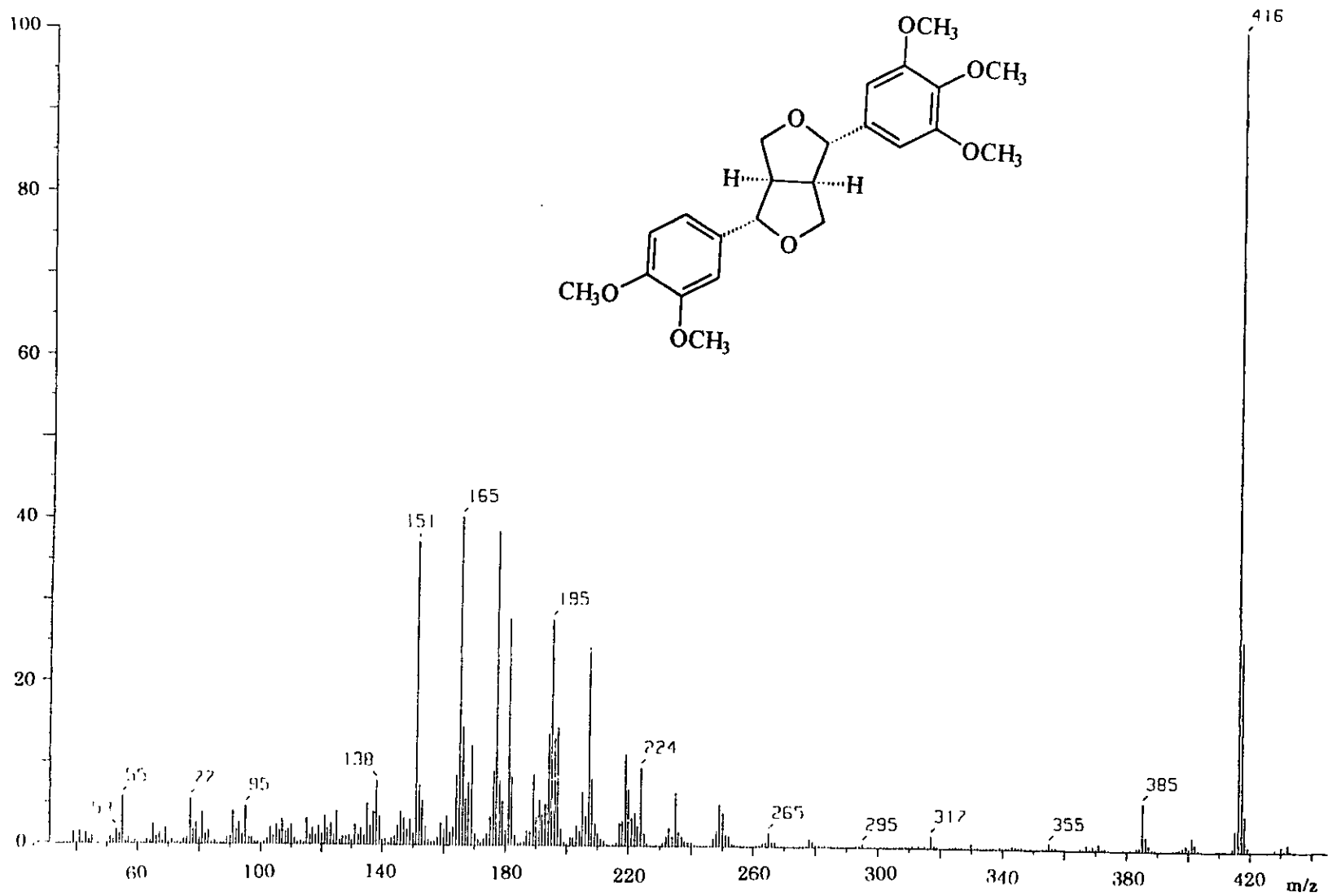
**Espectro 4.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del éter dimetilico del pinorresinol (58).



**Espectro 5.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT del éter dimetílico del pinorresinol (58).

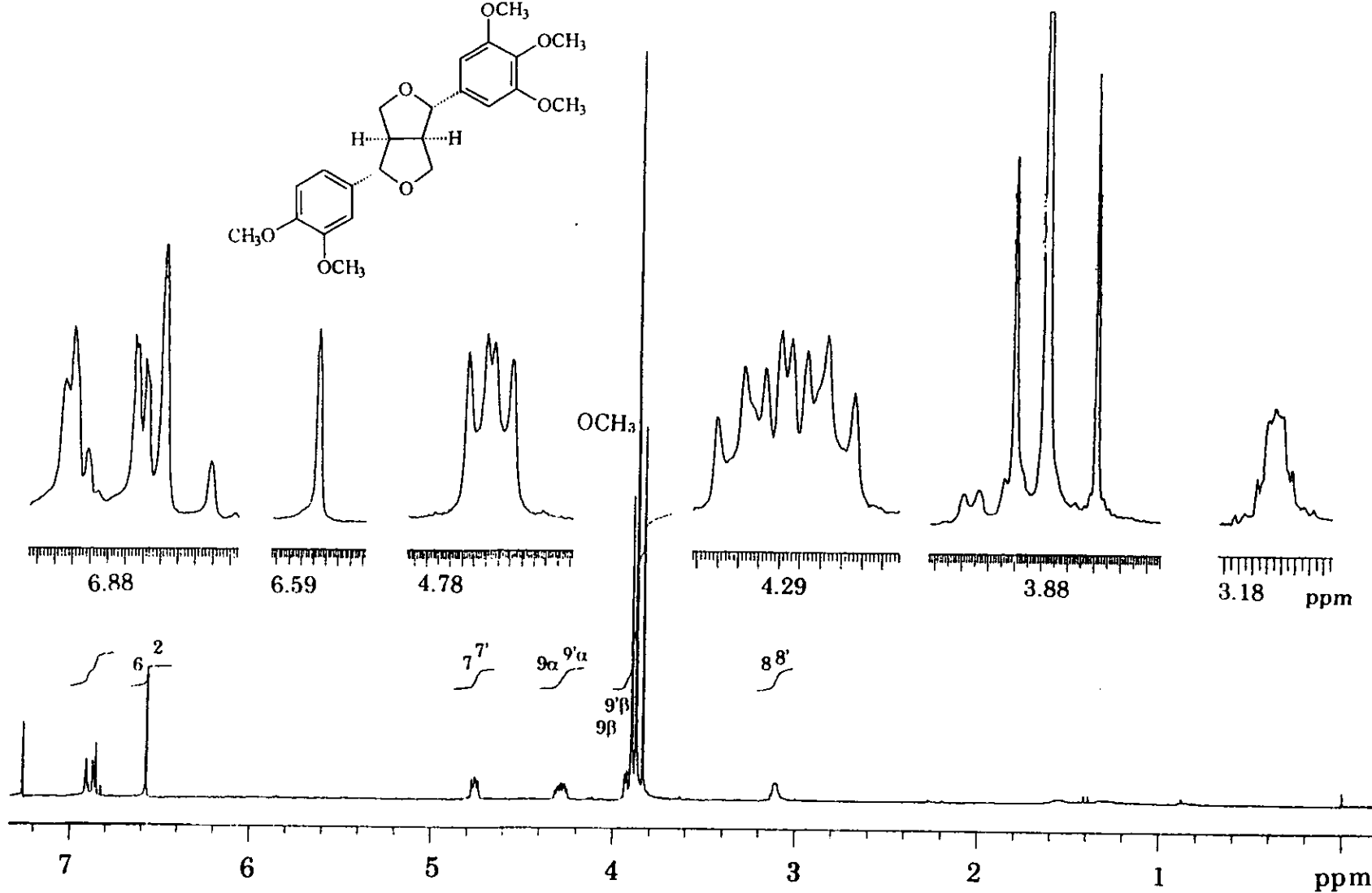
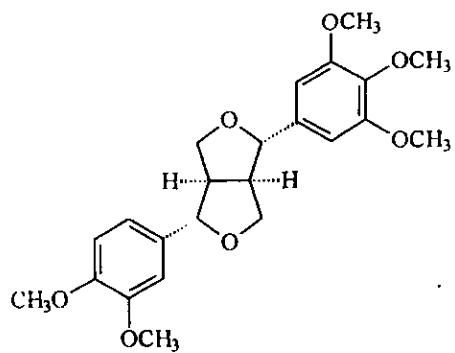


**Espectro 6.** Espectro en el IR de la magnolina (15).

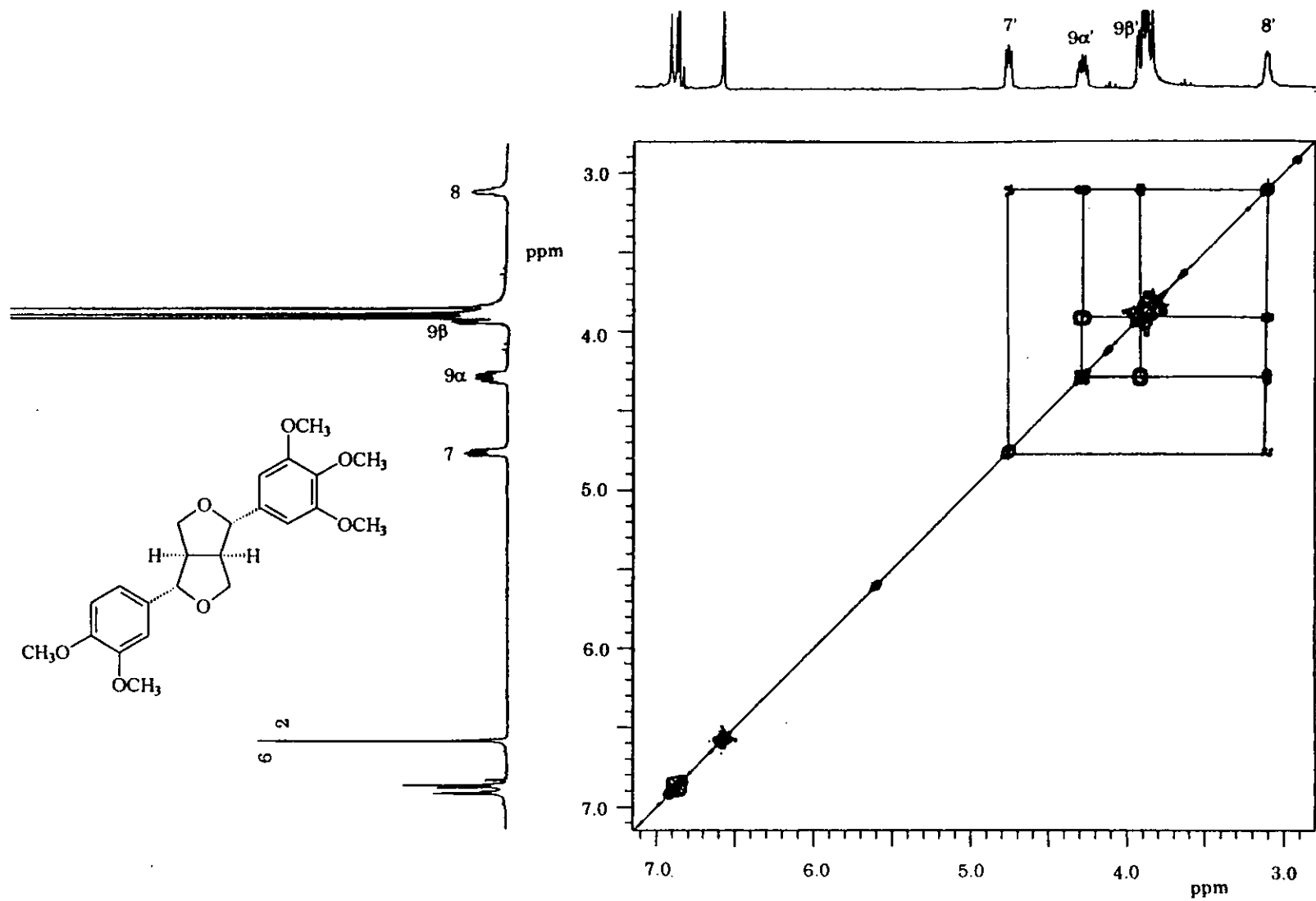


**Espectro 7. Espectro de masas de la magnolina (15).**

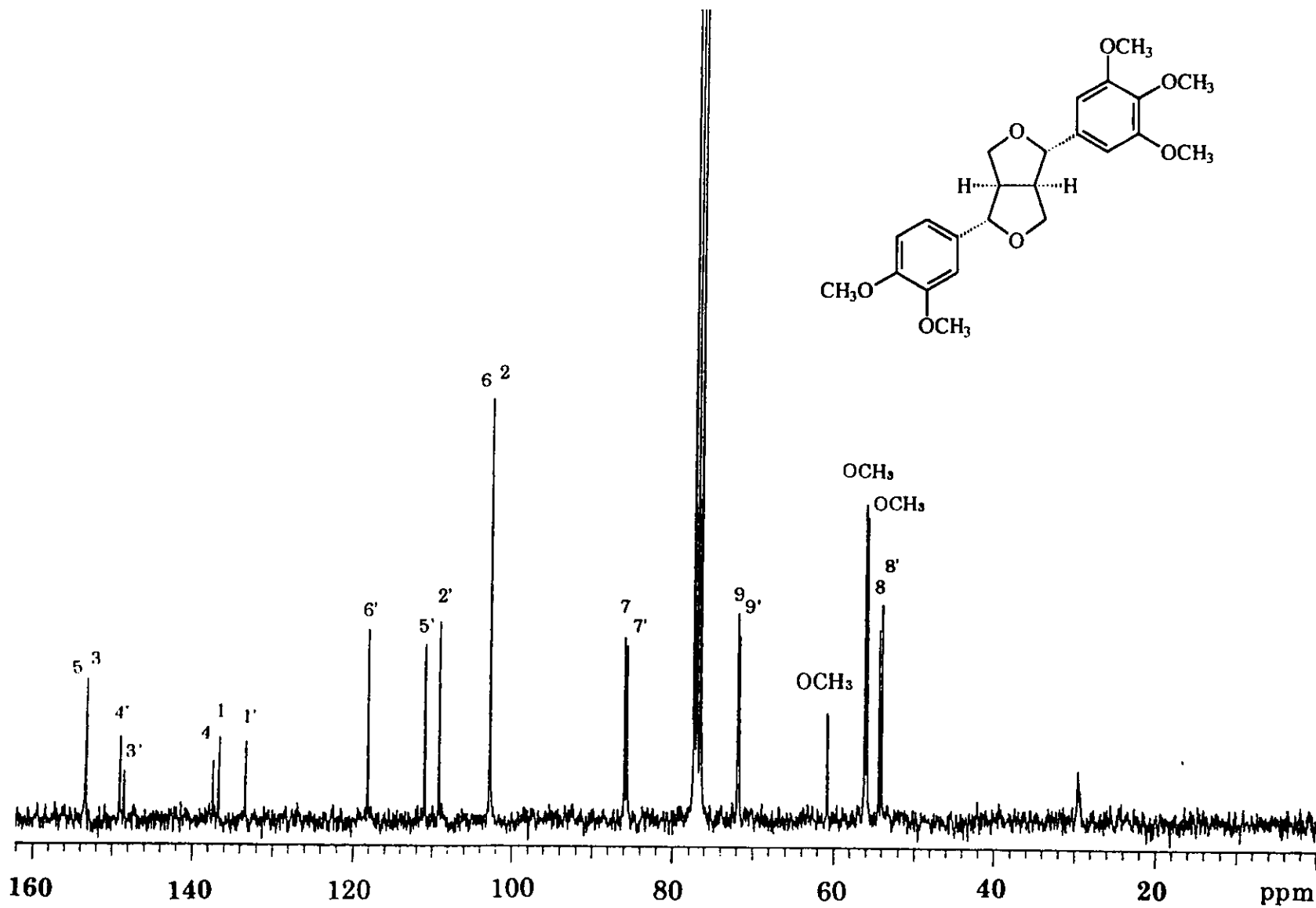




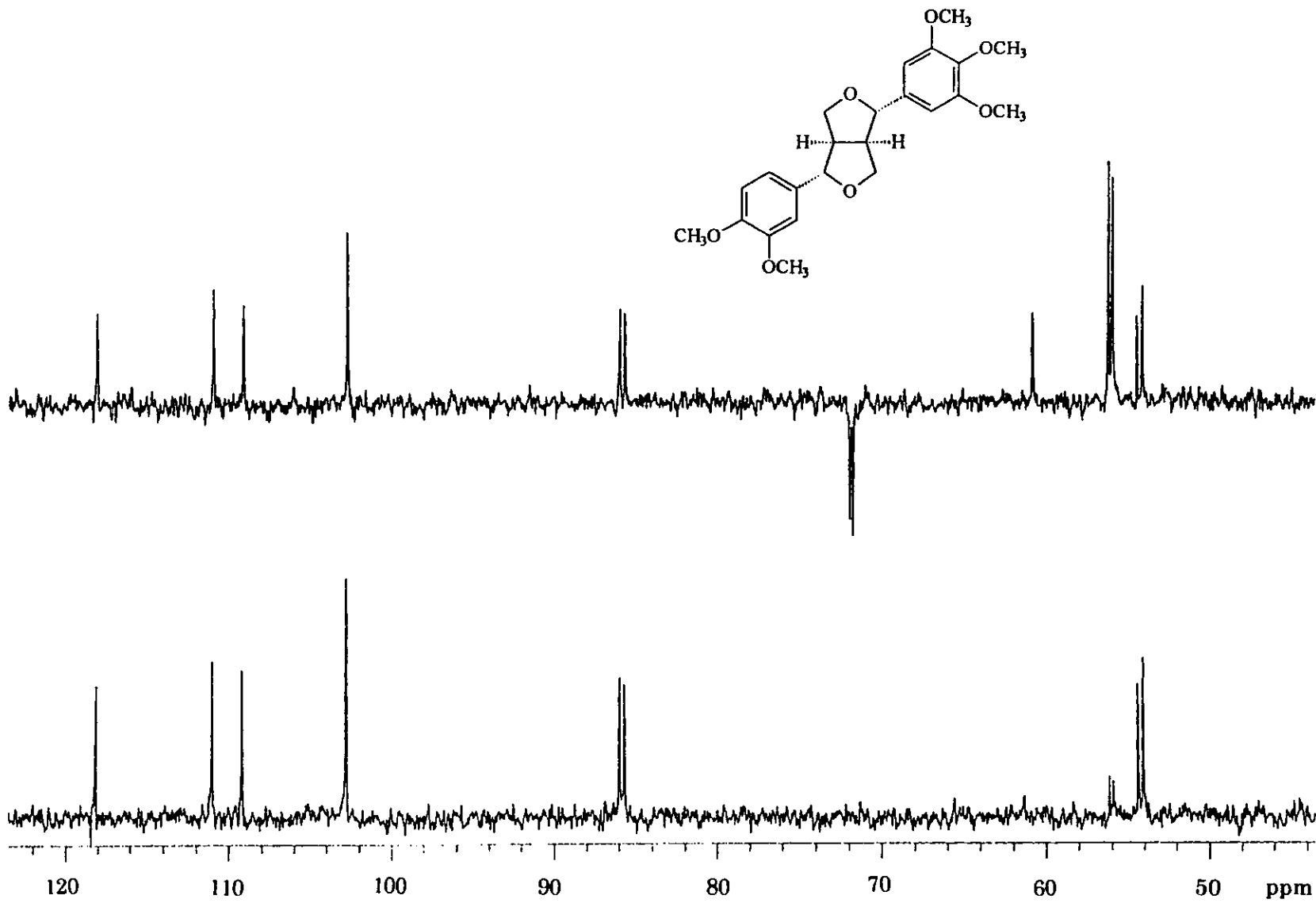
Espectro 8. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la magnolina (15).



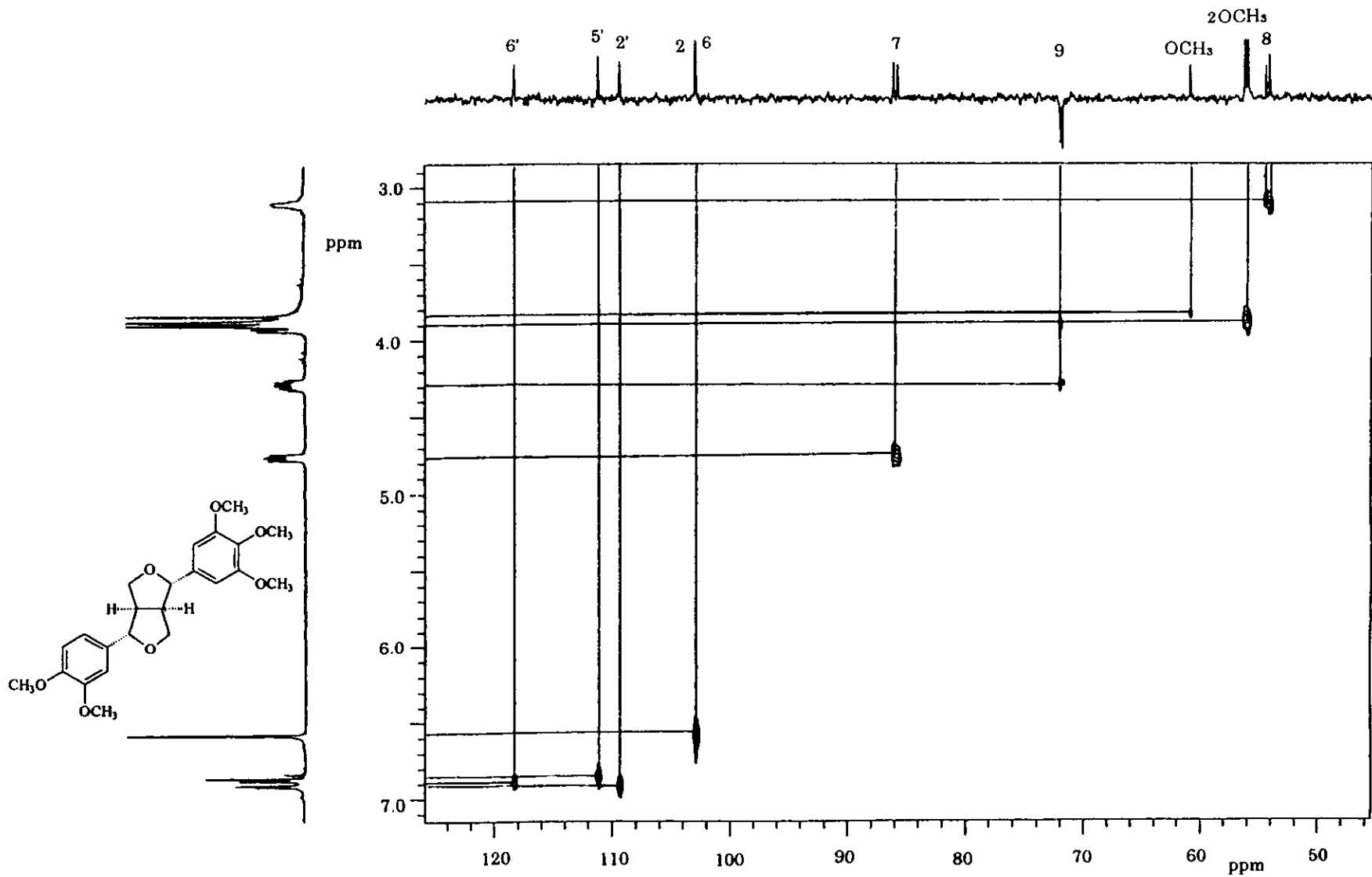
Espectro 9. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  COSY de la magnolina (15).



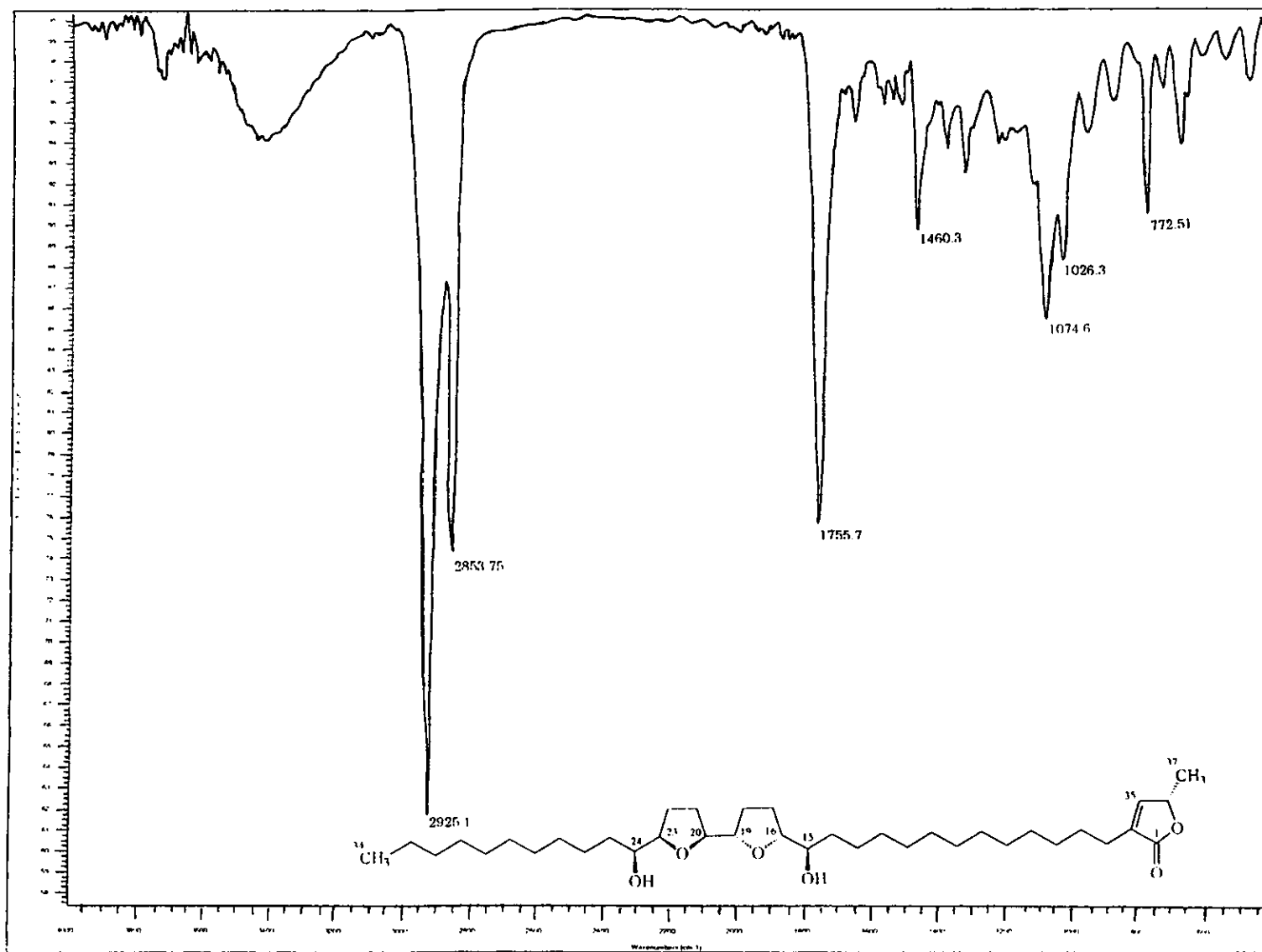
**Espectro 10.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la magnolina (15).



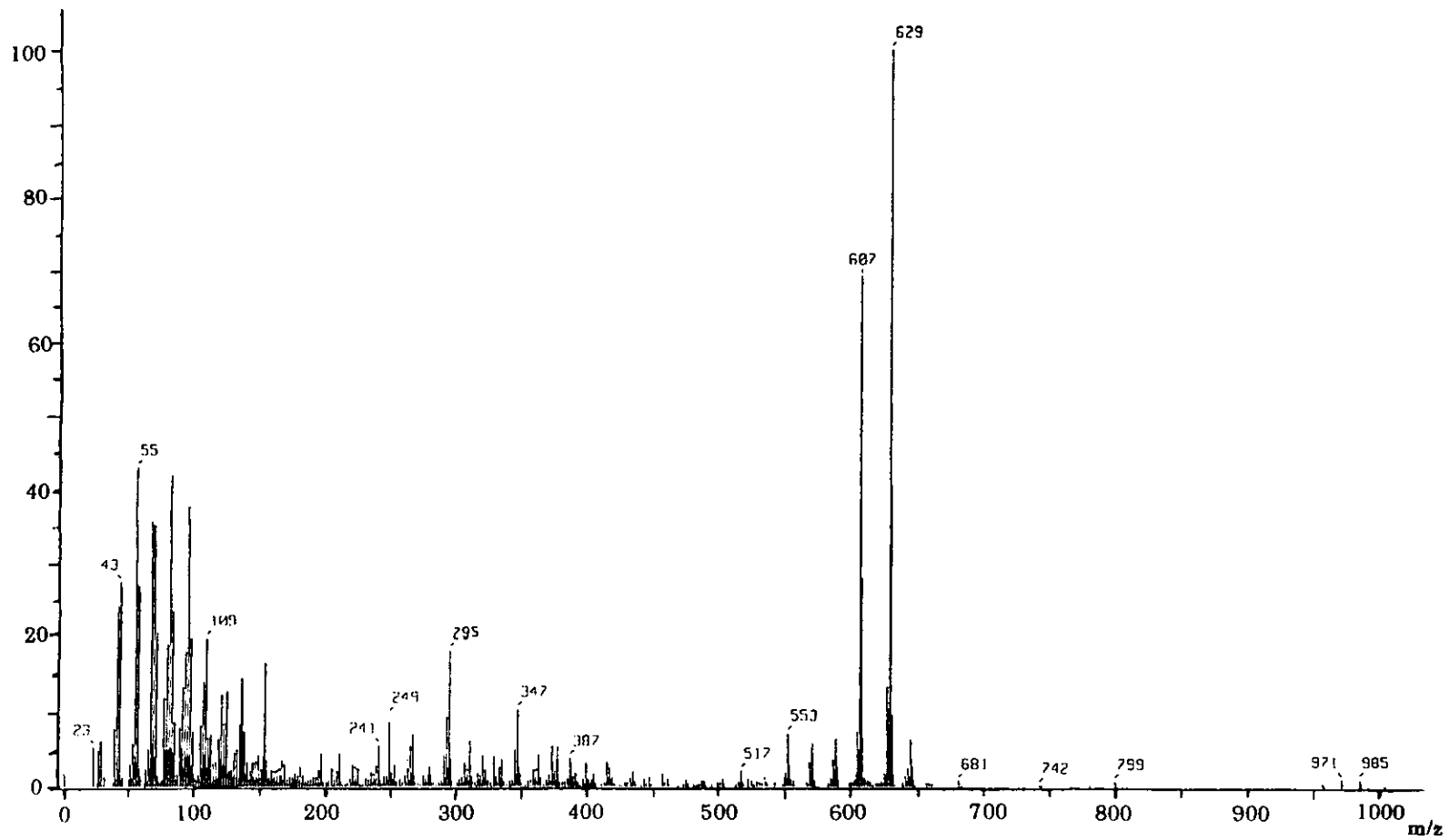
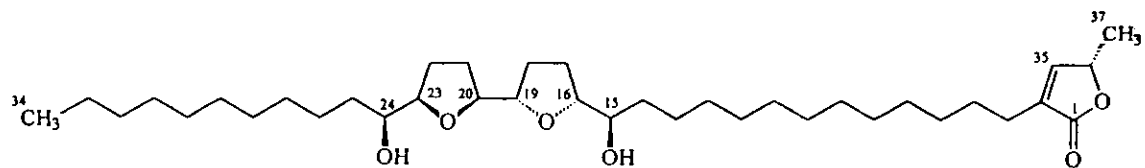
Espectro 11. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT de la magnolina (15).



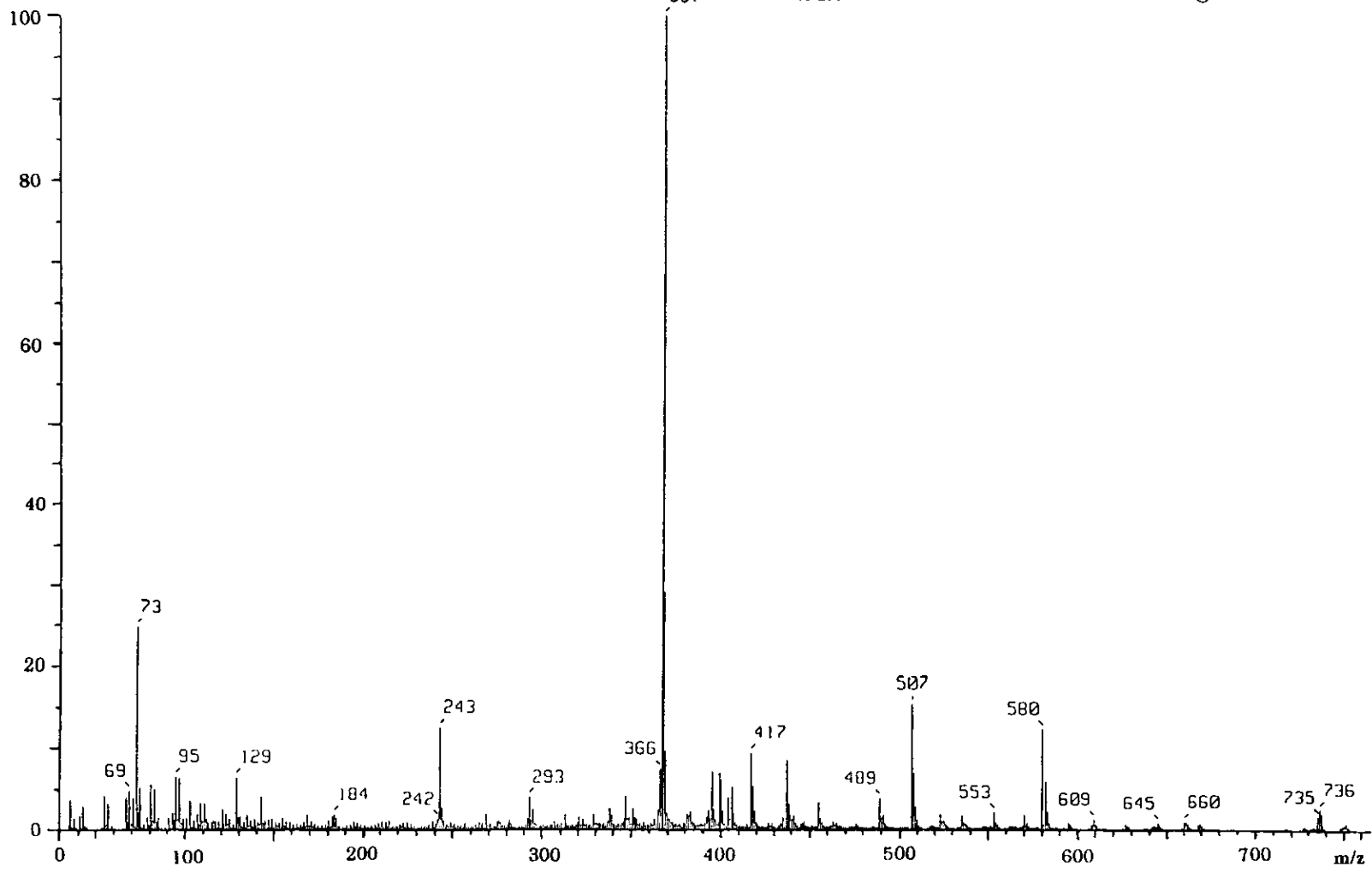
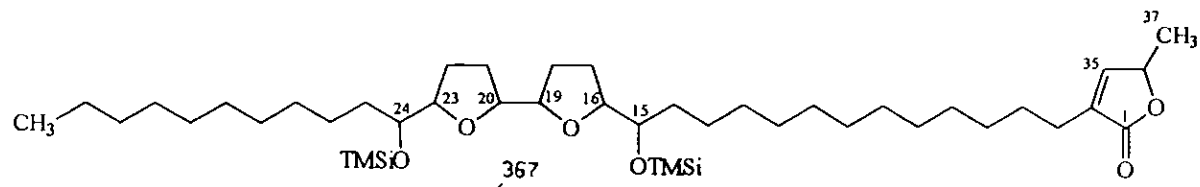
Espectro 12. Espectro de RMN 2D-HETCOR de la magnolina (15).



**Espectro 13.** Espectro en el IR de la membranacina (27).

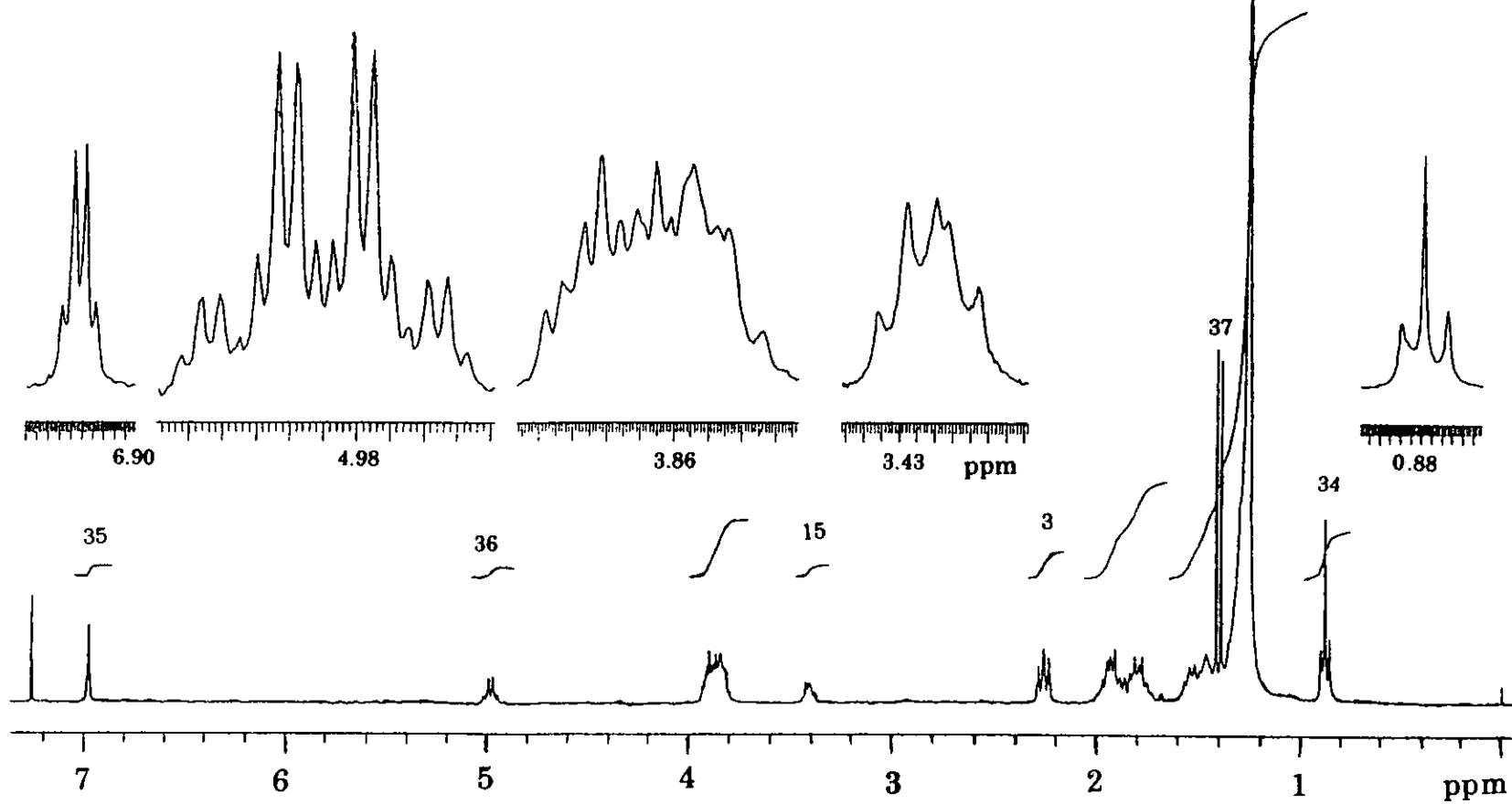
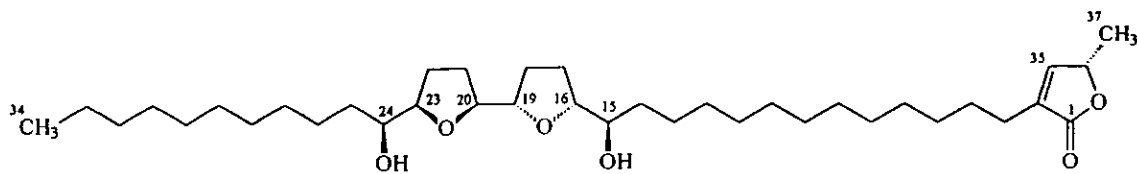


Espectro 14. Espectro de masas de la membranacina (27).

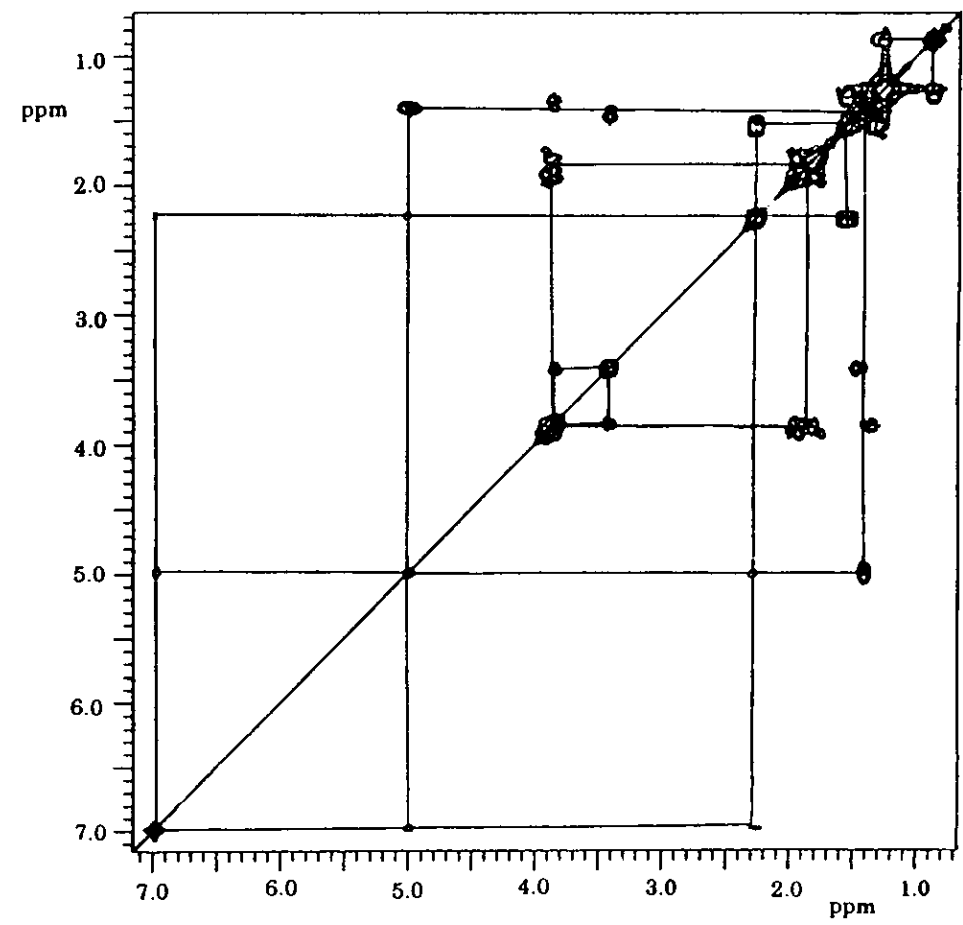
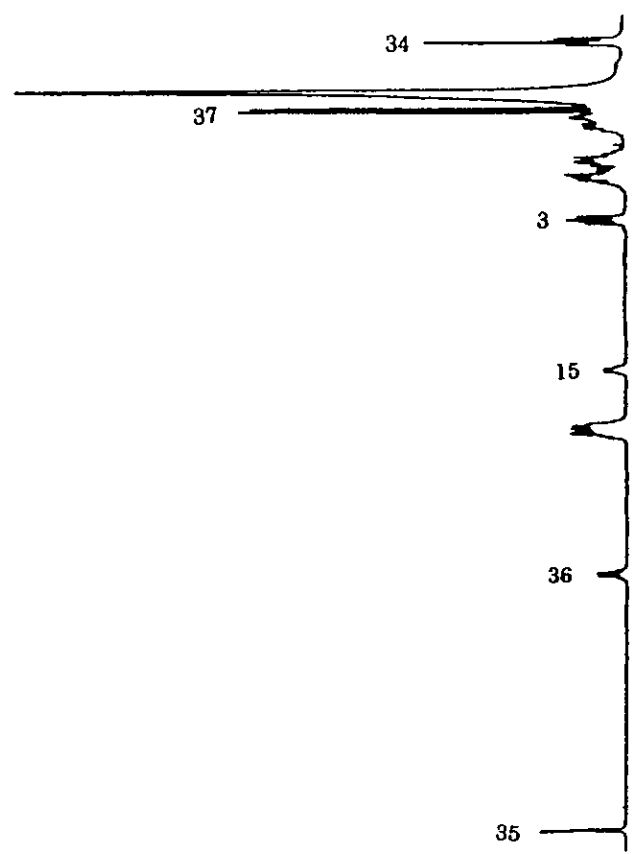
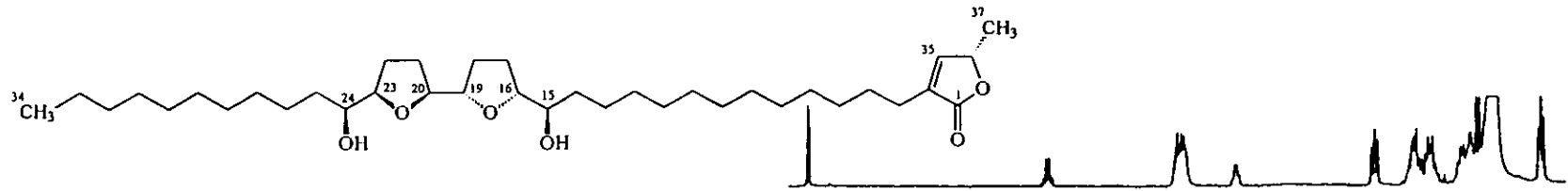


**Espectro 15.** Espectro de masas del derivado sililado de la membranacina (27).

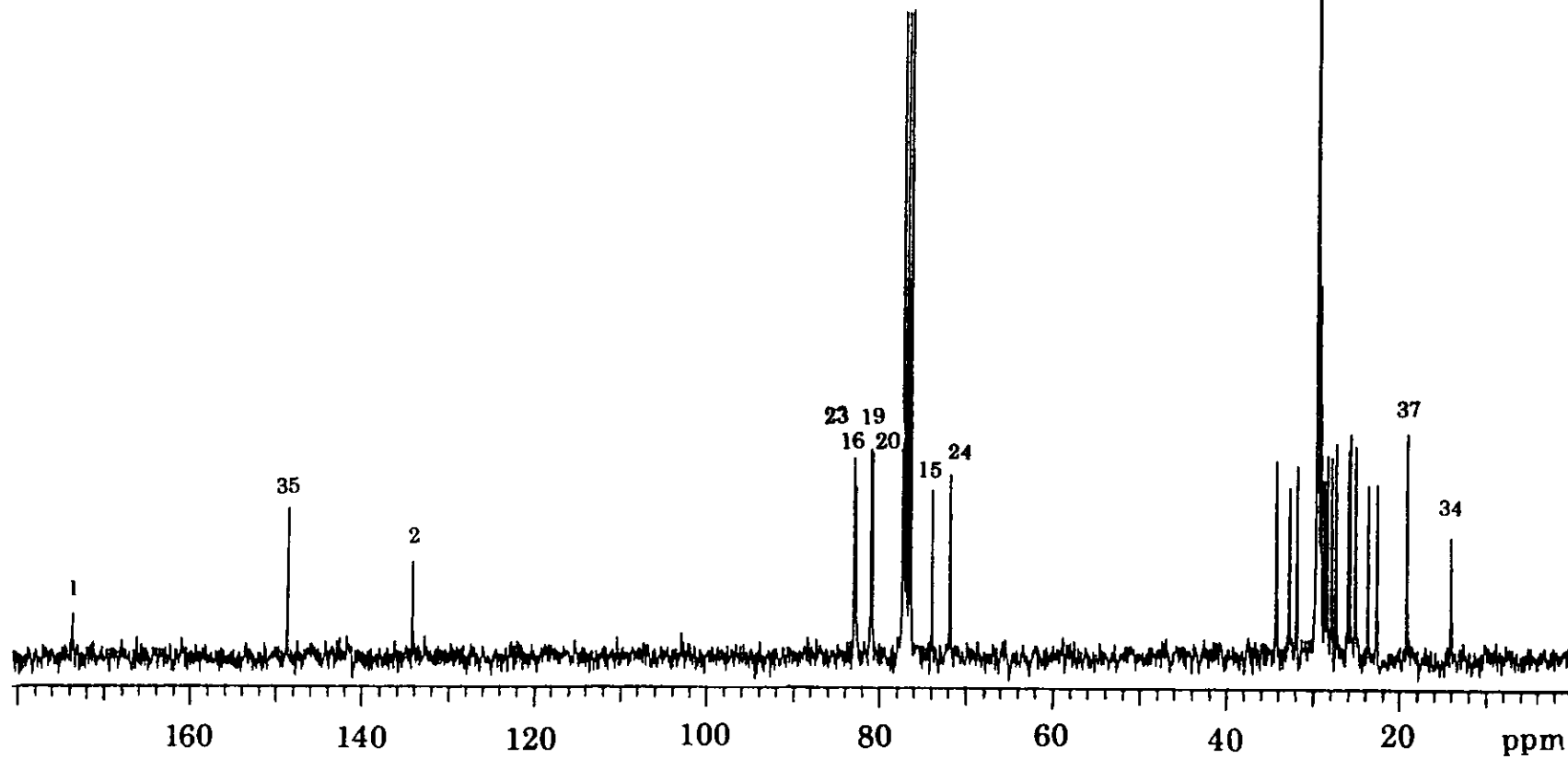
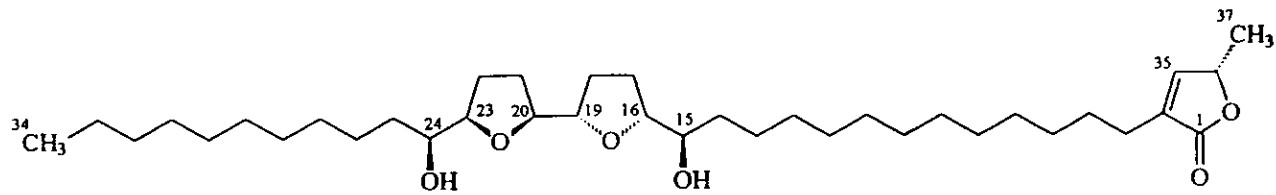




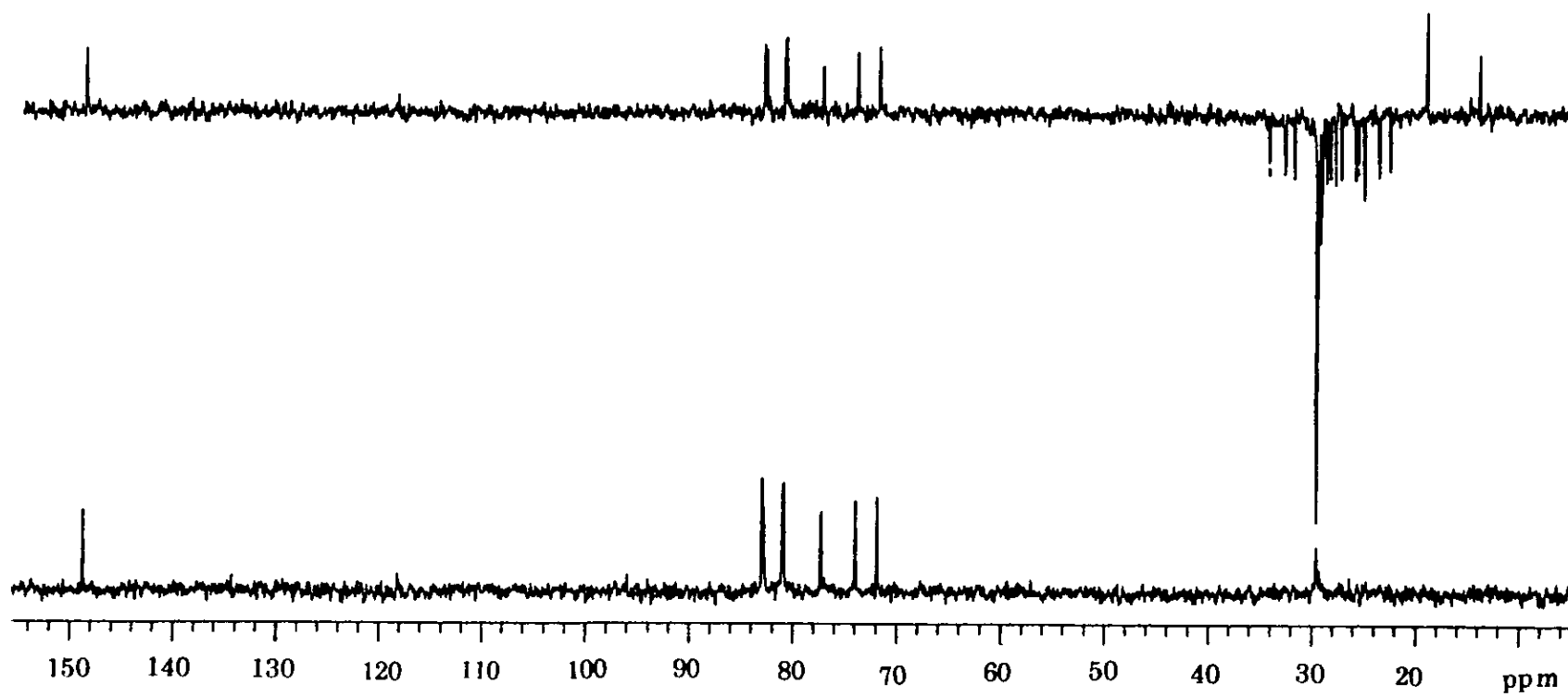
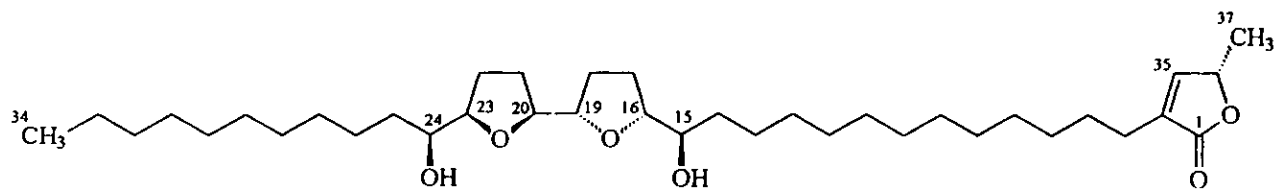
Espectro 16. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la membranacina (27).



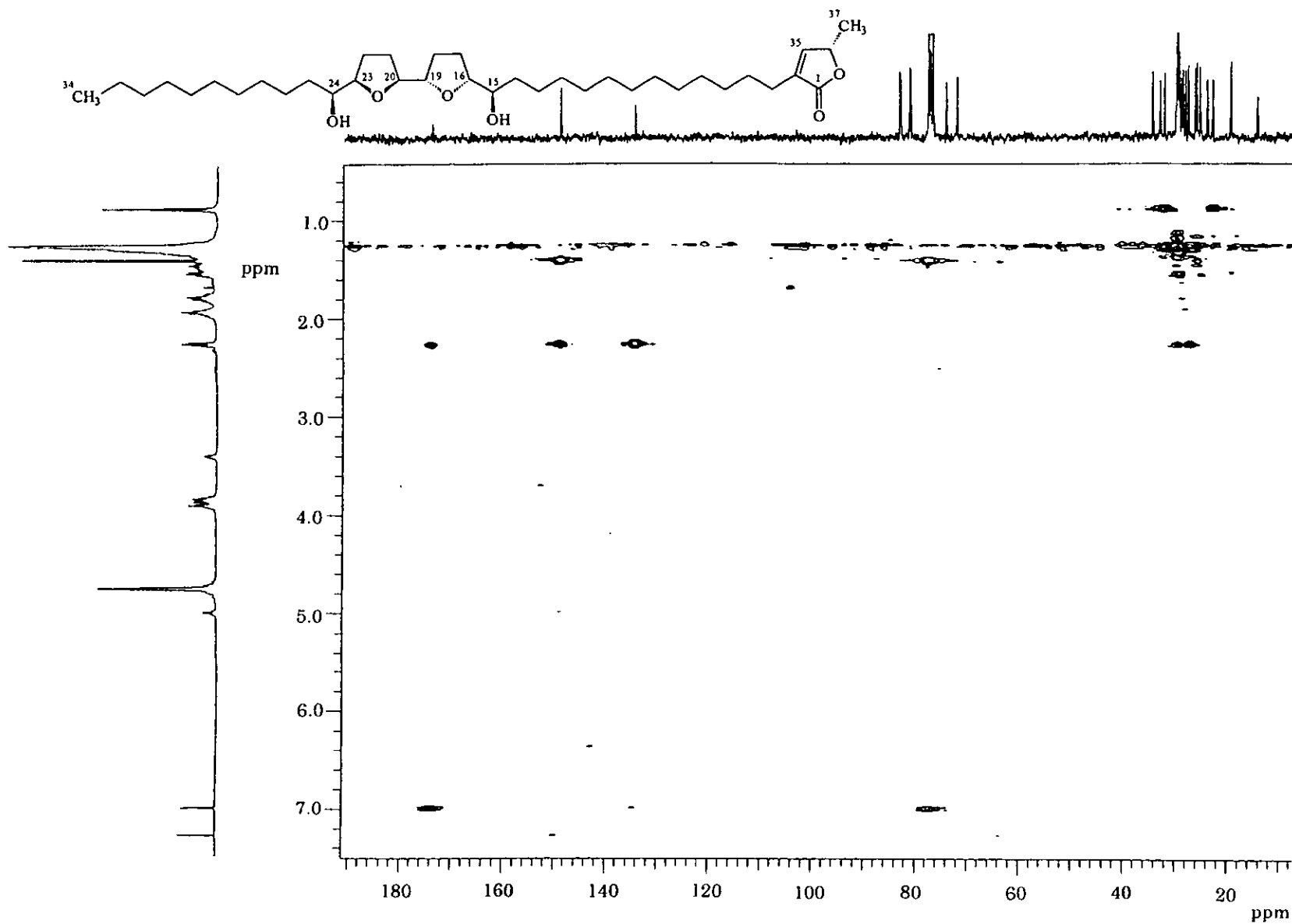
**Espectro 17.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  COSY de la membranacina (27).



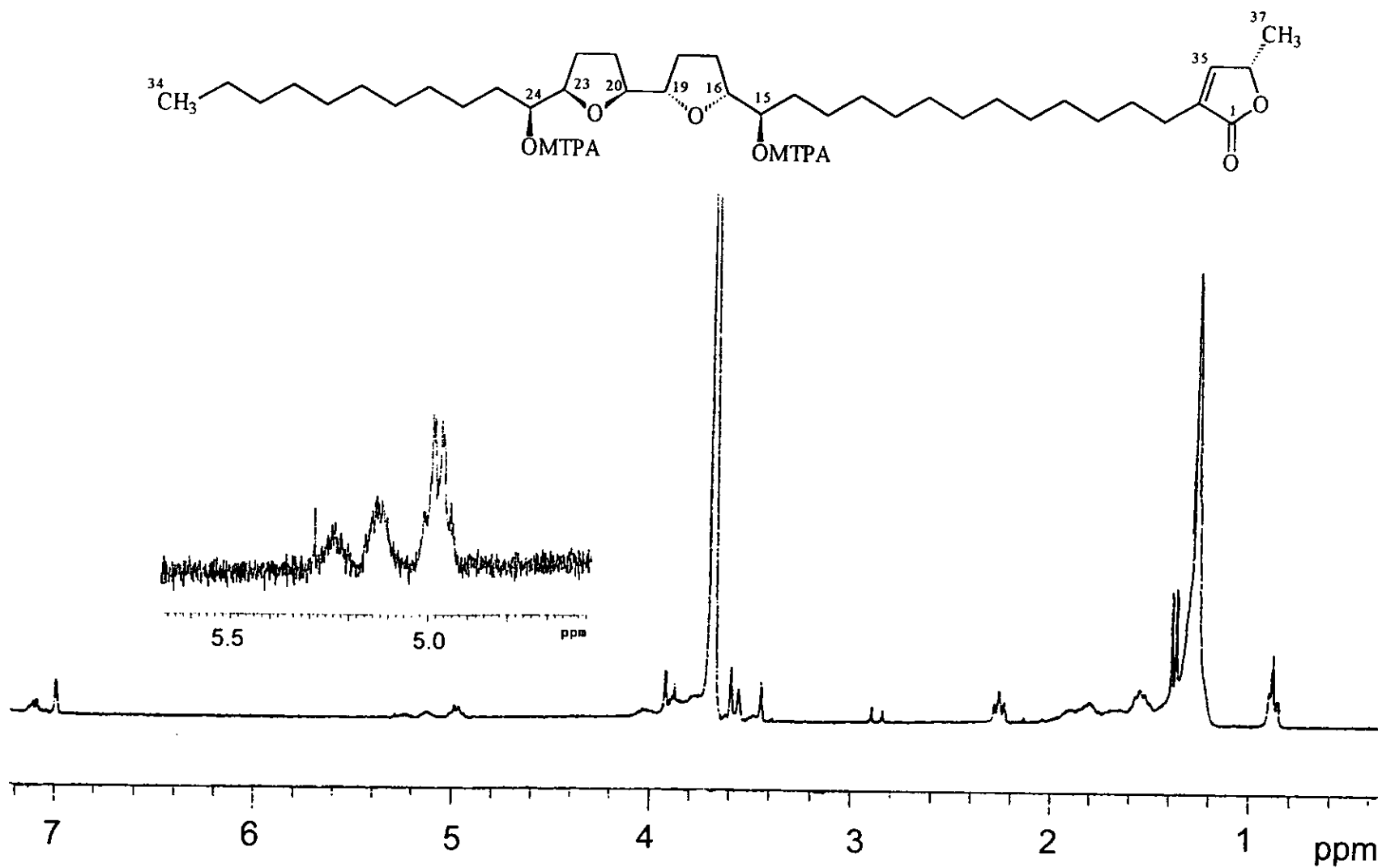
Espectro 18. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de la membranacina (27).



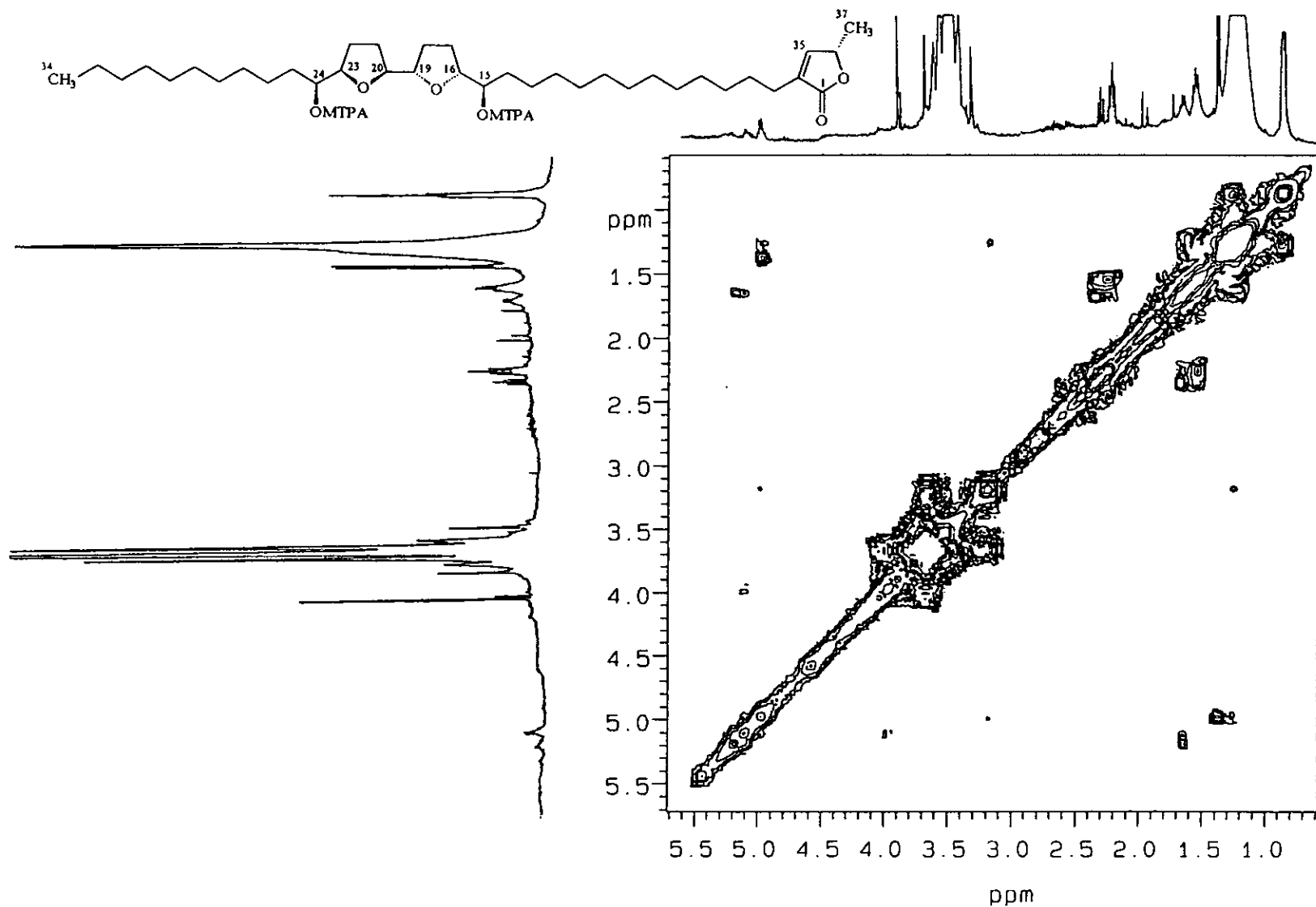
Espectro 19. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT de la membranacina (27).



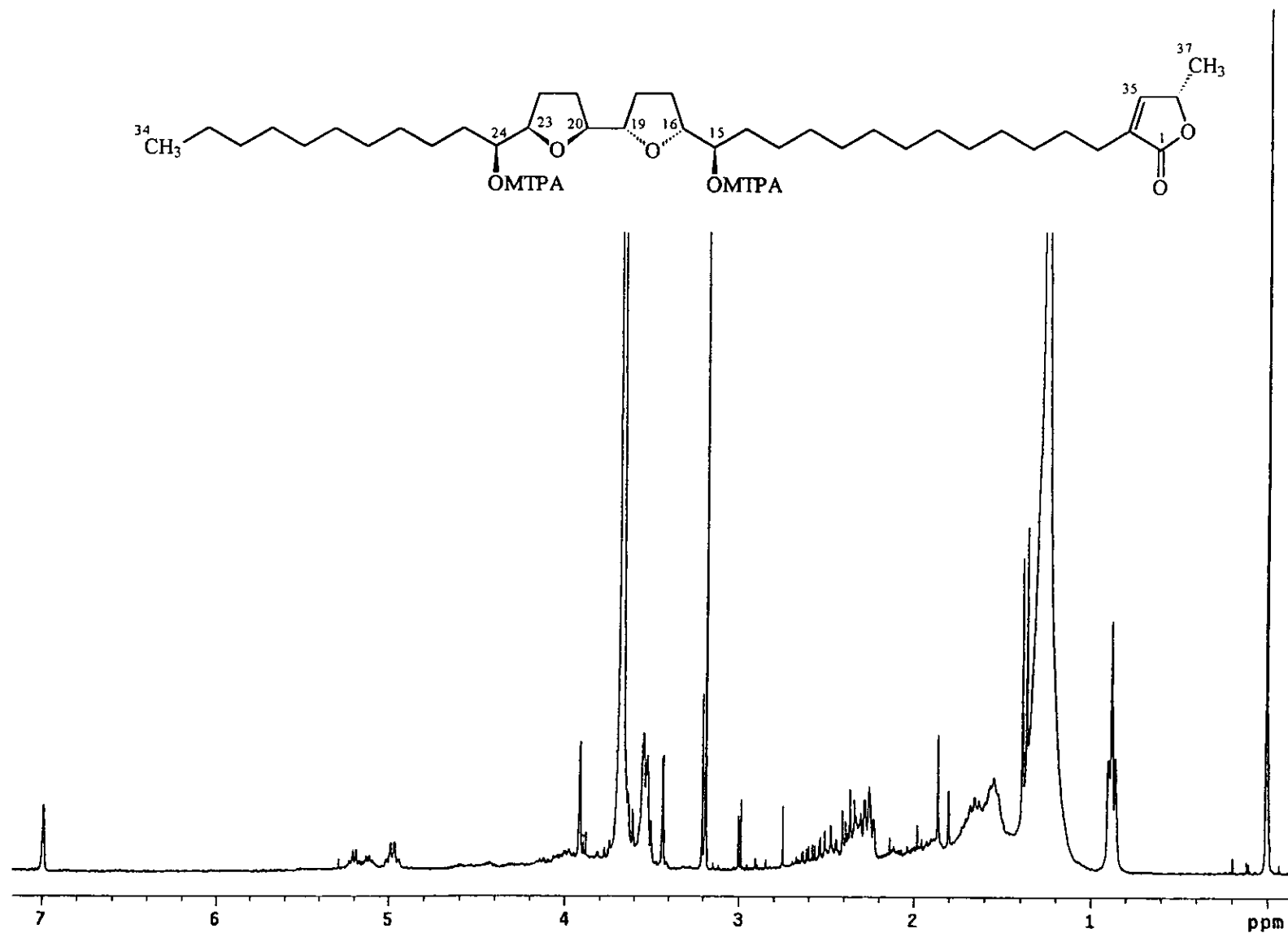
**Espectro 20.** Espectro de RMN 2D-HETCOR de la membranacina (27).



**Espectro 21.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del éster de Mosher (S) de la membranacina (27).

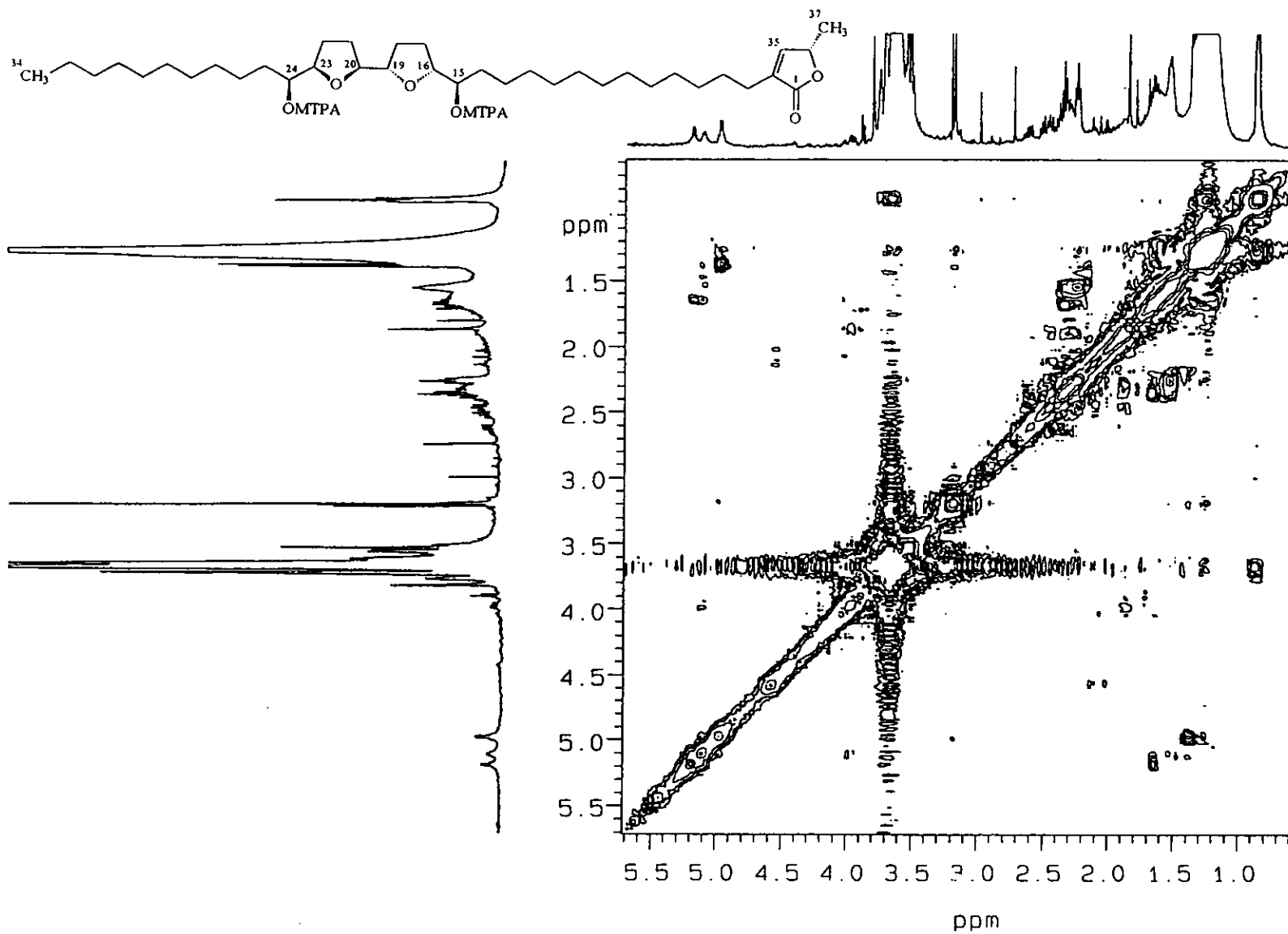


**Espectro 22.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H COSY del éster de Mosher (S) de la membranacina (27).

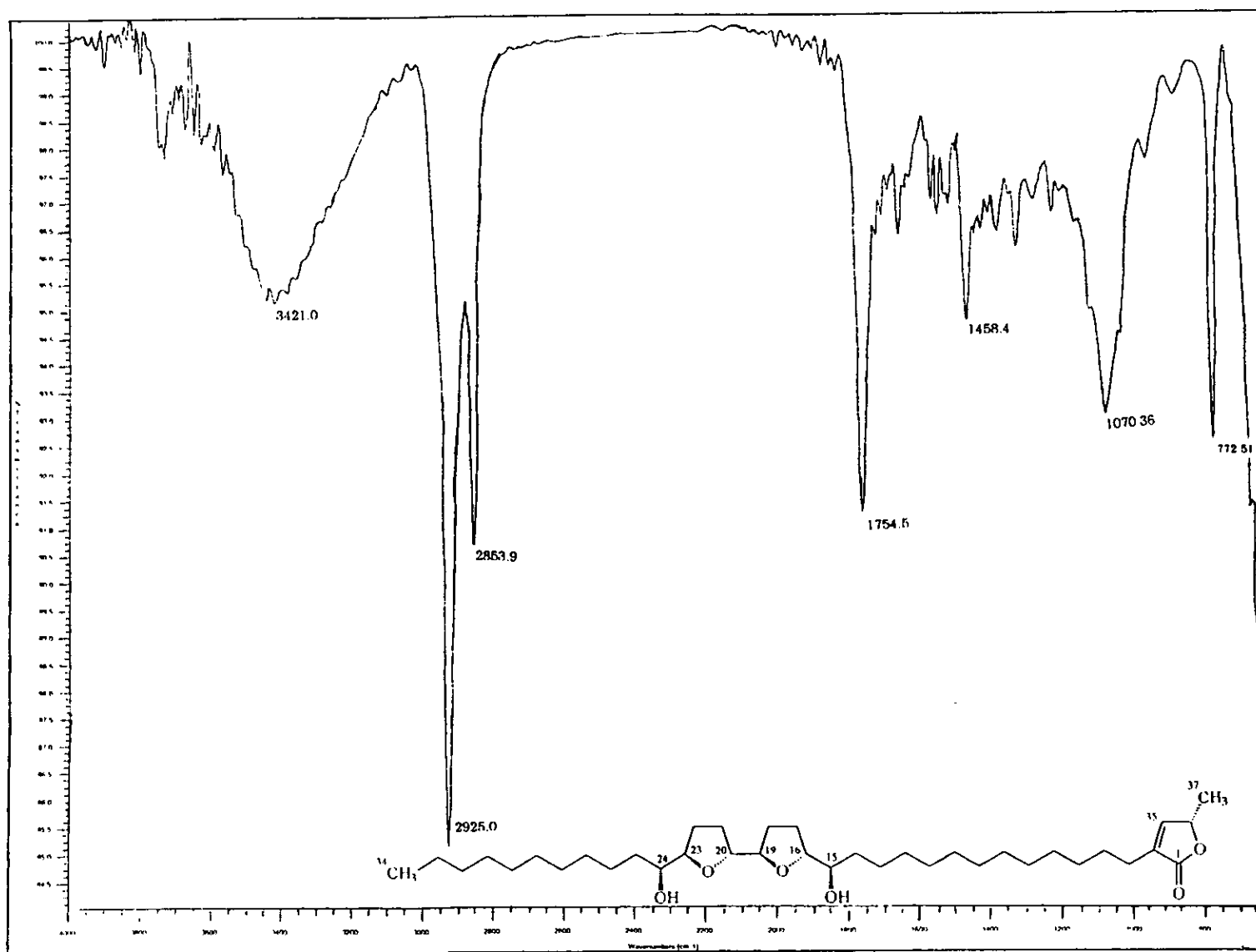


**Espectro 23.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del éster de Mosher (R) de la membranacina (27).

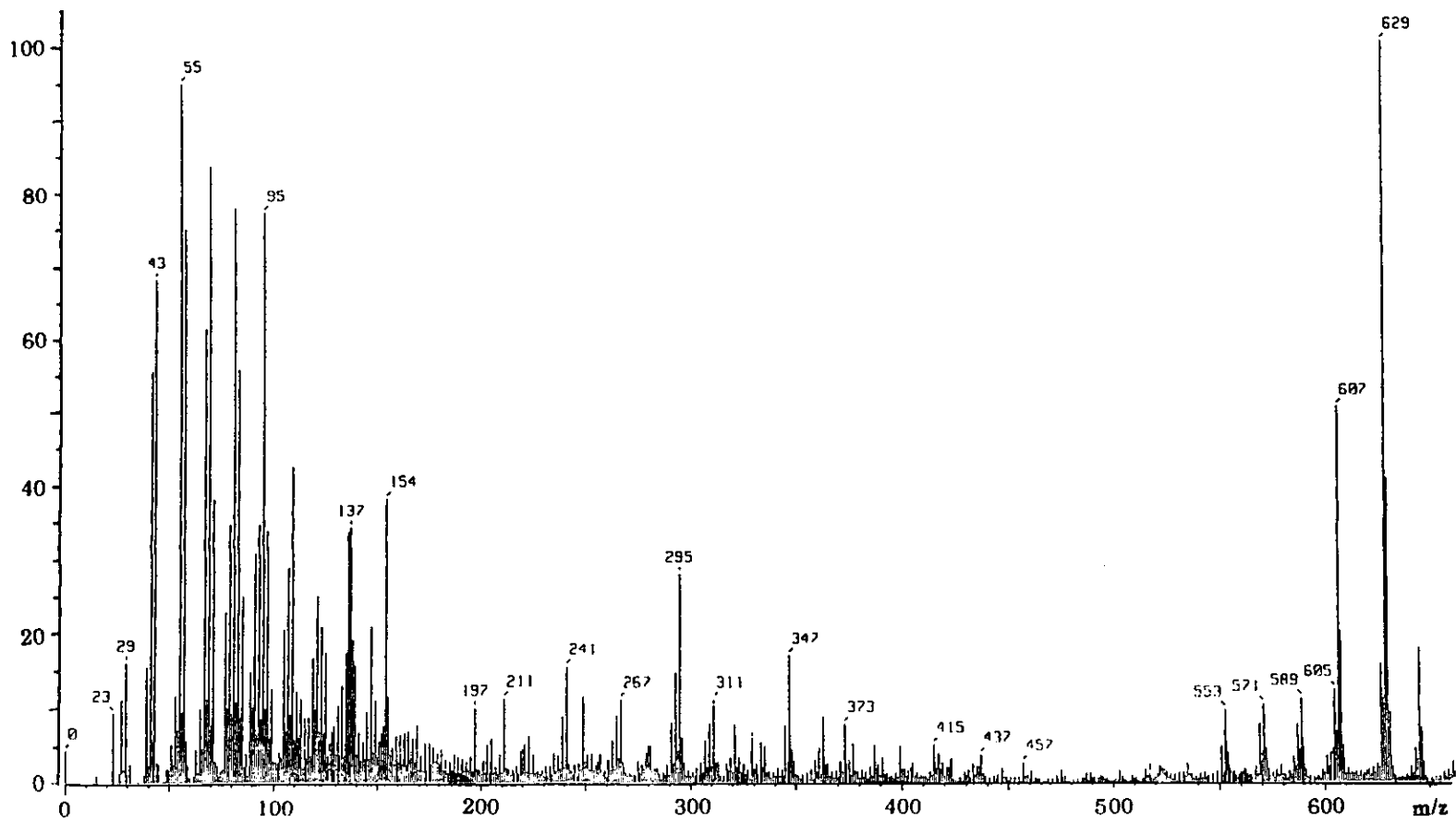
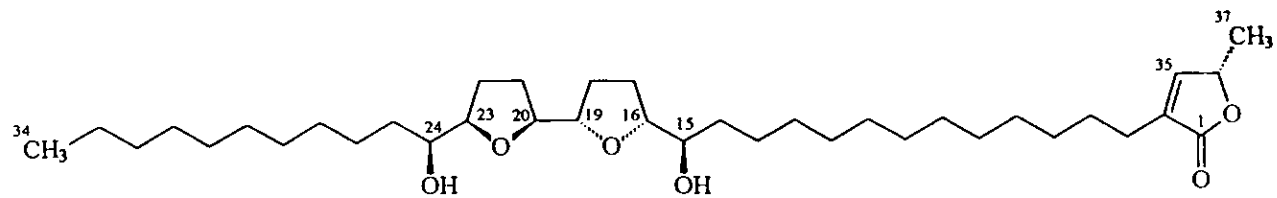




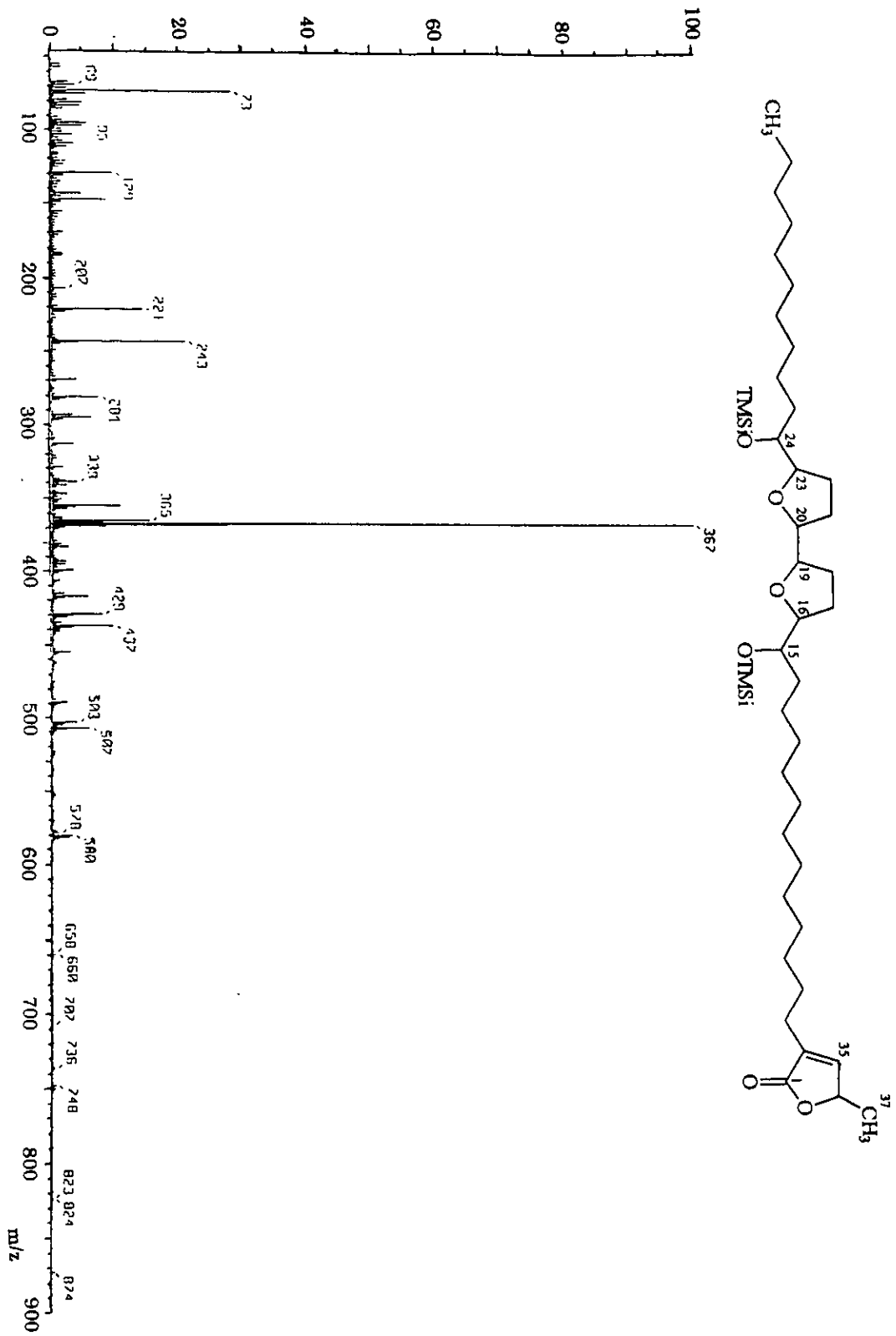
Espectro 24. Espectro de RMN <sup>1</sup>H COSY del éster de Mosher (R) de la membranacina (27).



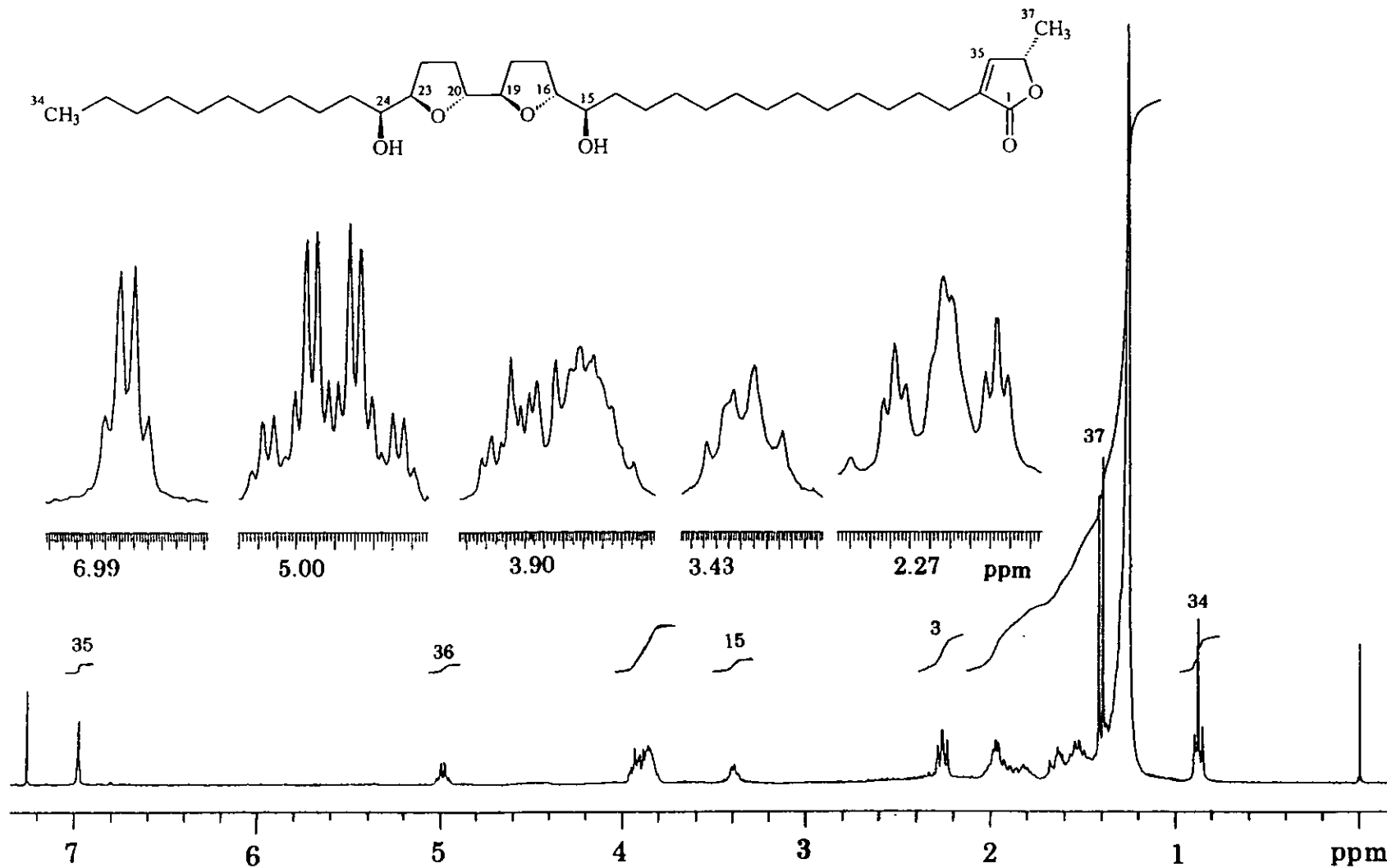
**Espectro 25.** Espectro en el IR de la desacetilvaricina (56).



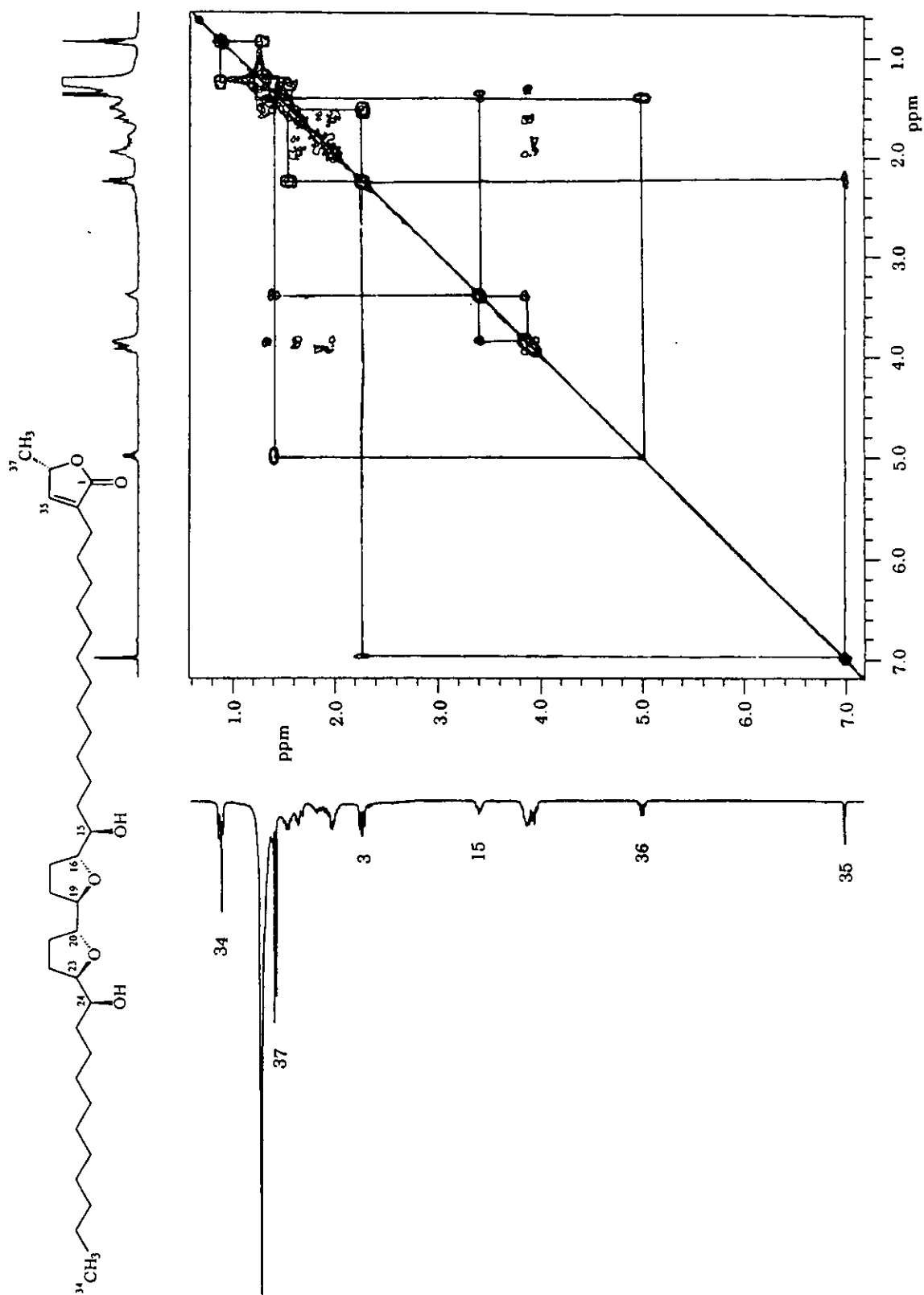
**Espectro 26.** Espectro de masas de la desacetilivaricina (56).



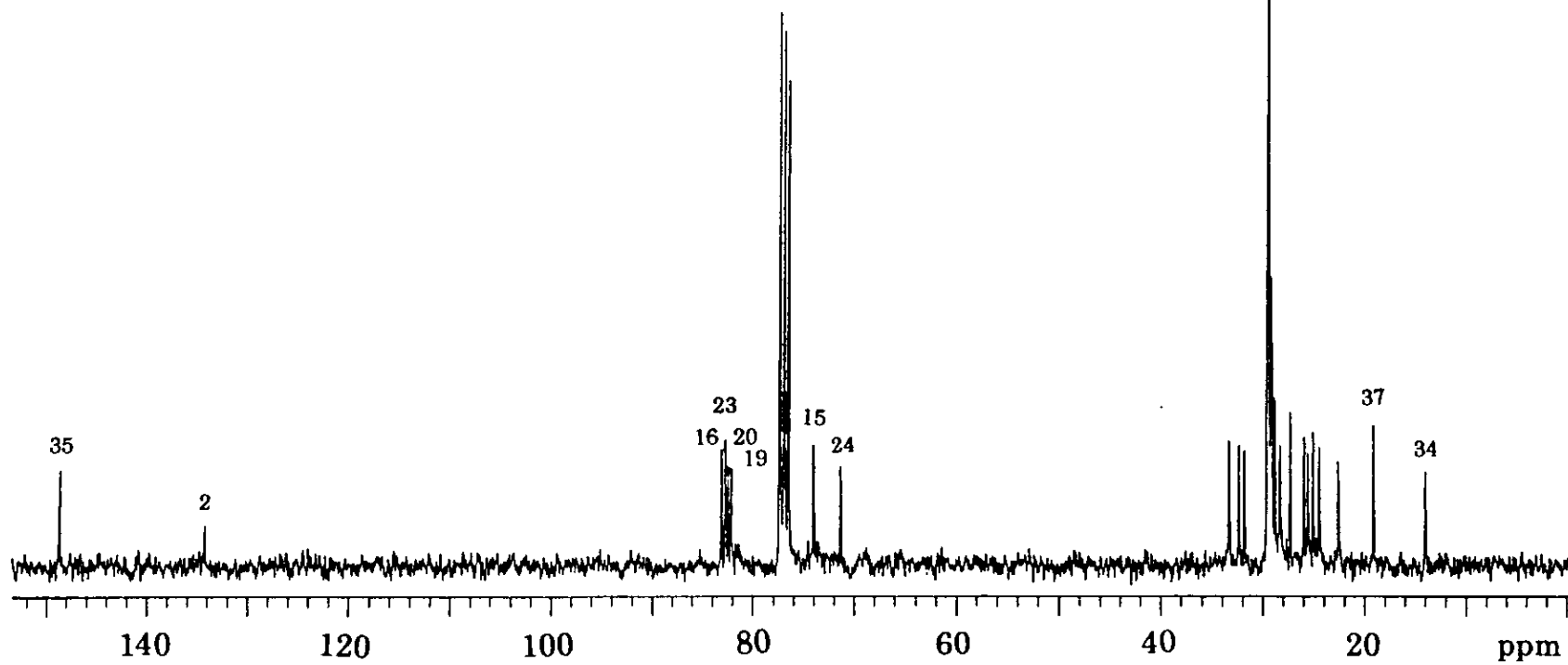
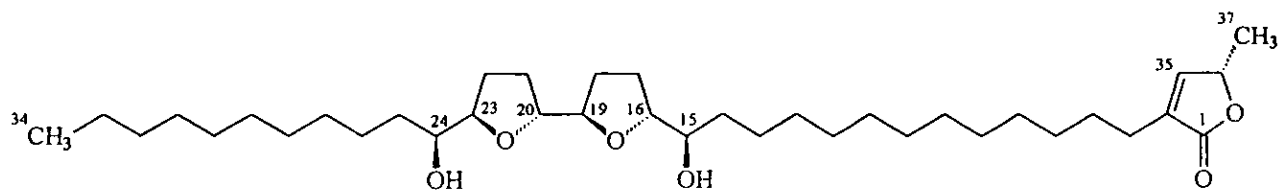
Espectro 27. Espectro de masas del derivado siliado de la desacetilcurvacin (56).



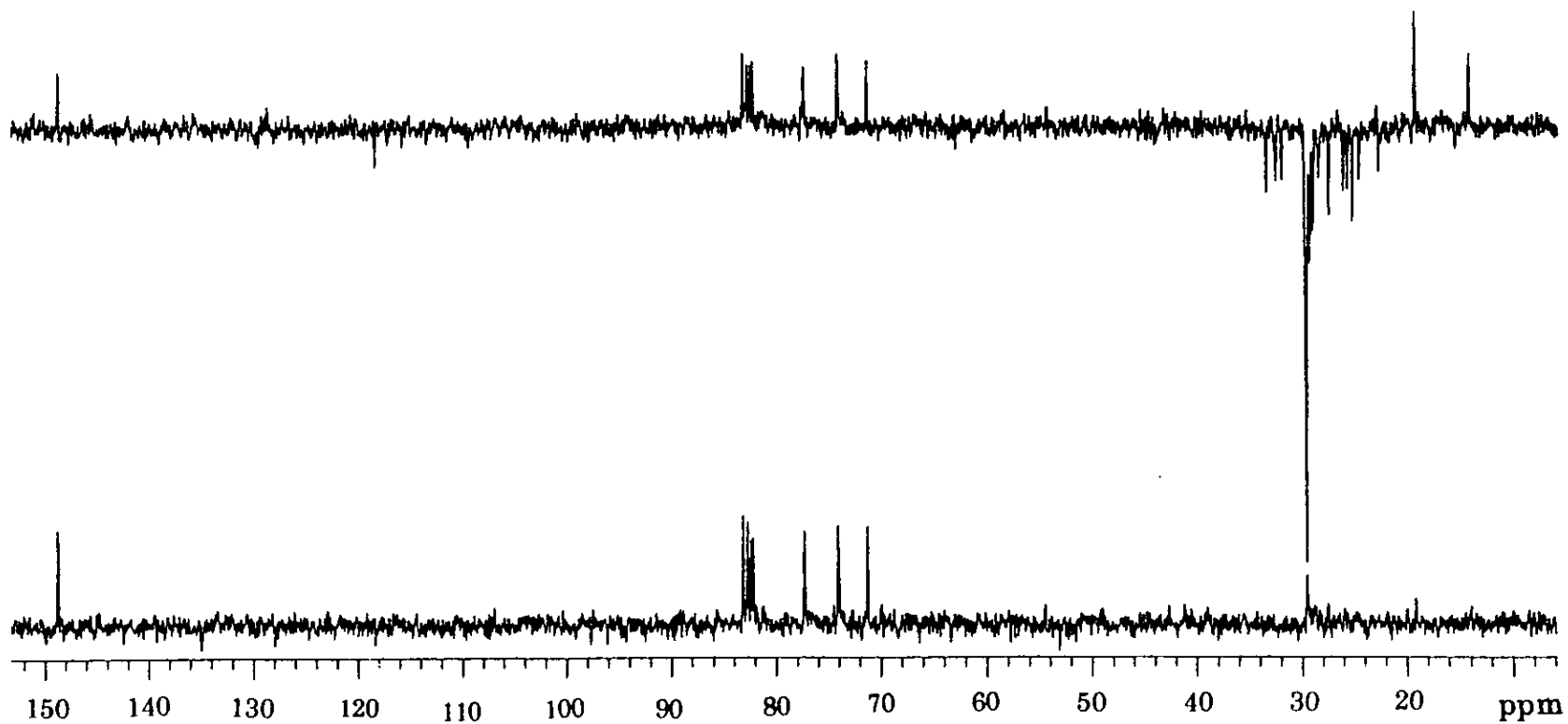
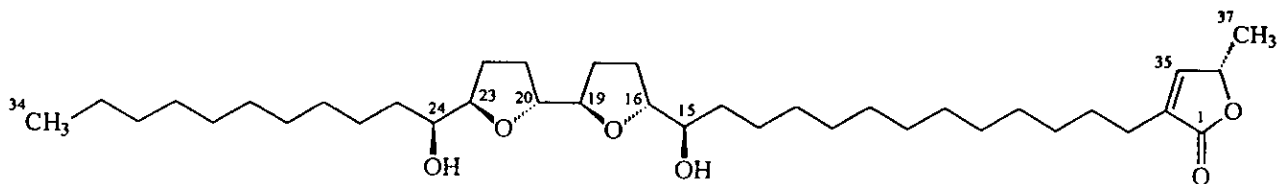
Espectro 28. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la desacetylvaricina (56).



Espectro 29. Espectro de RMN <sup>1</sup>H COSY de la desacetilivaricina (56).

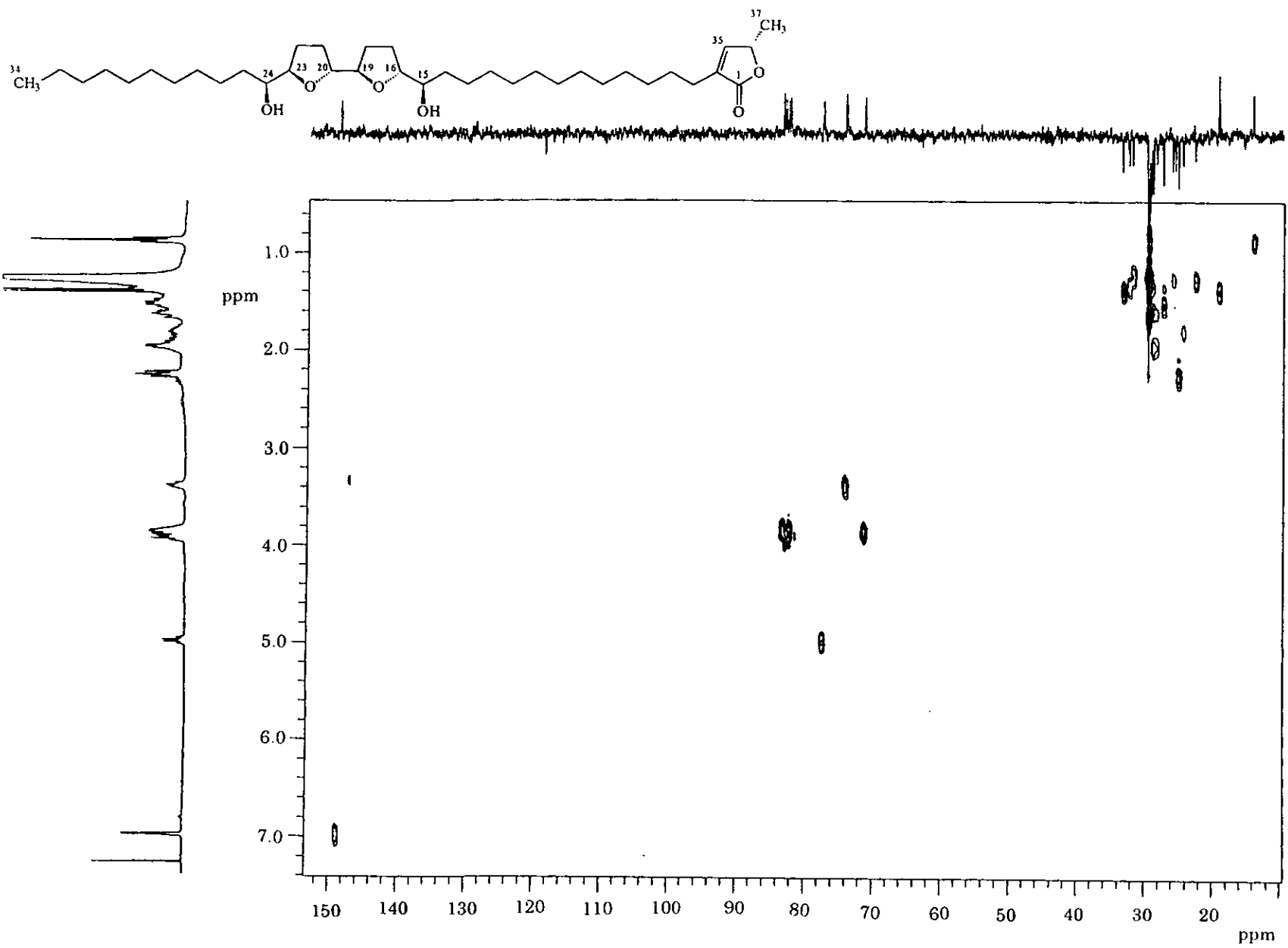


**Espectro 30.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la desacetilivaricina (56).

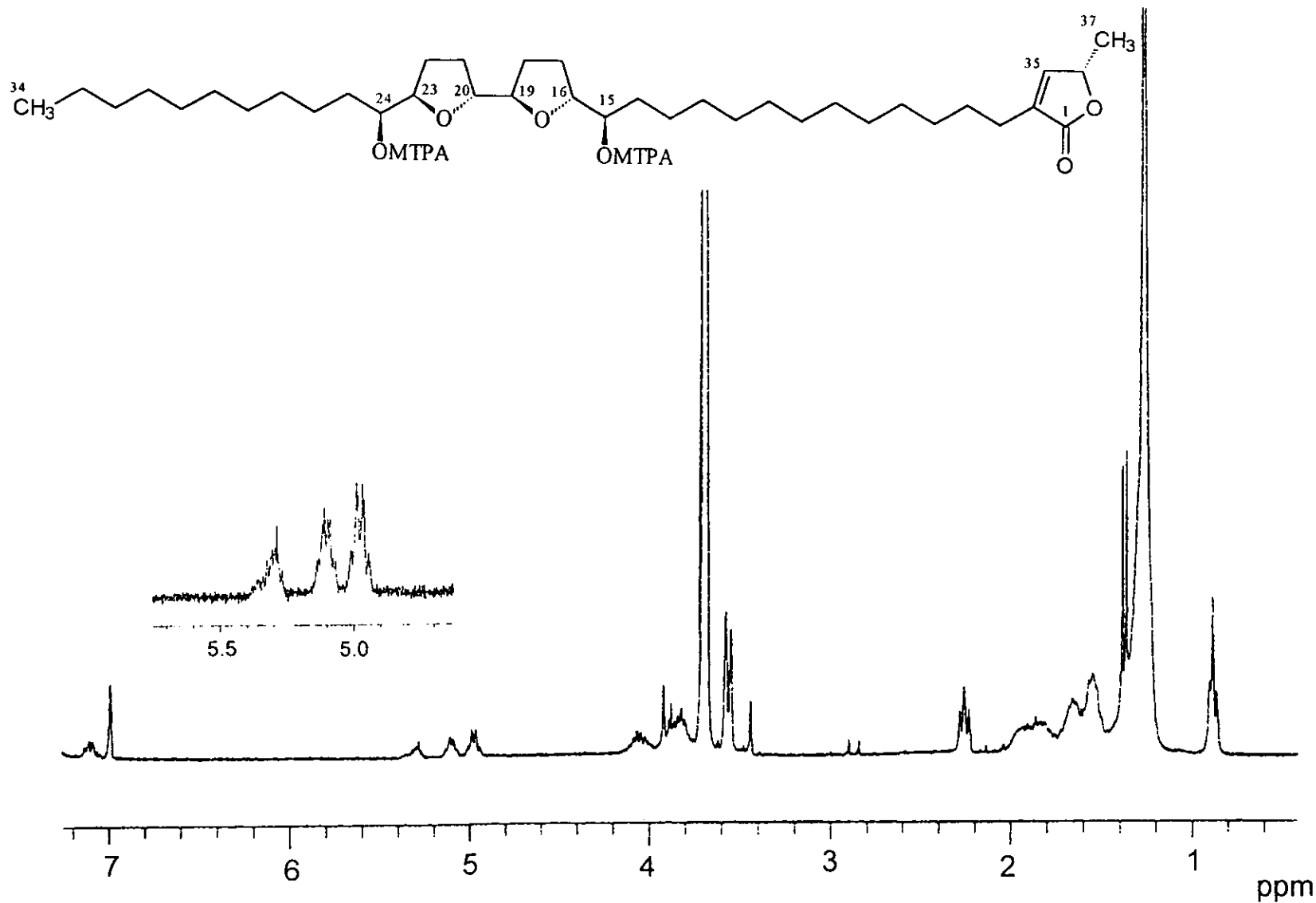


**Espectro 31.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT de la desacetilivaricina (**56**).

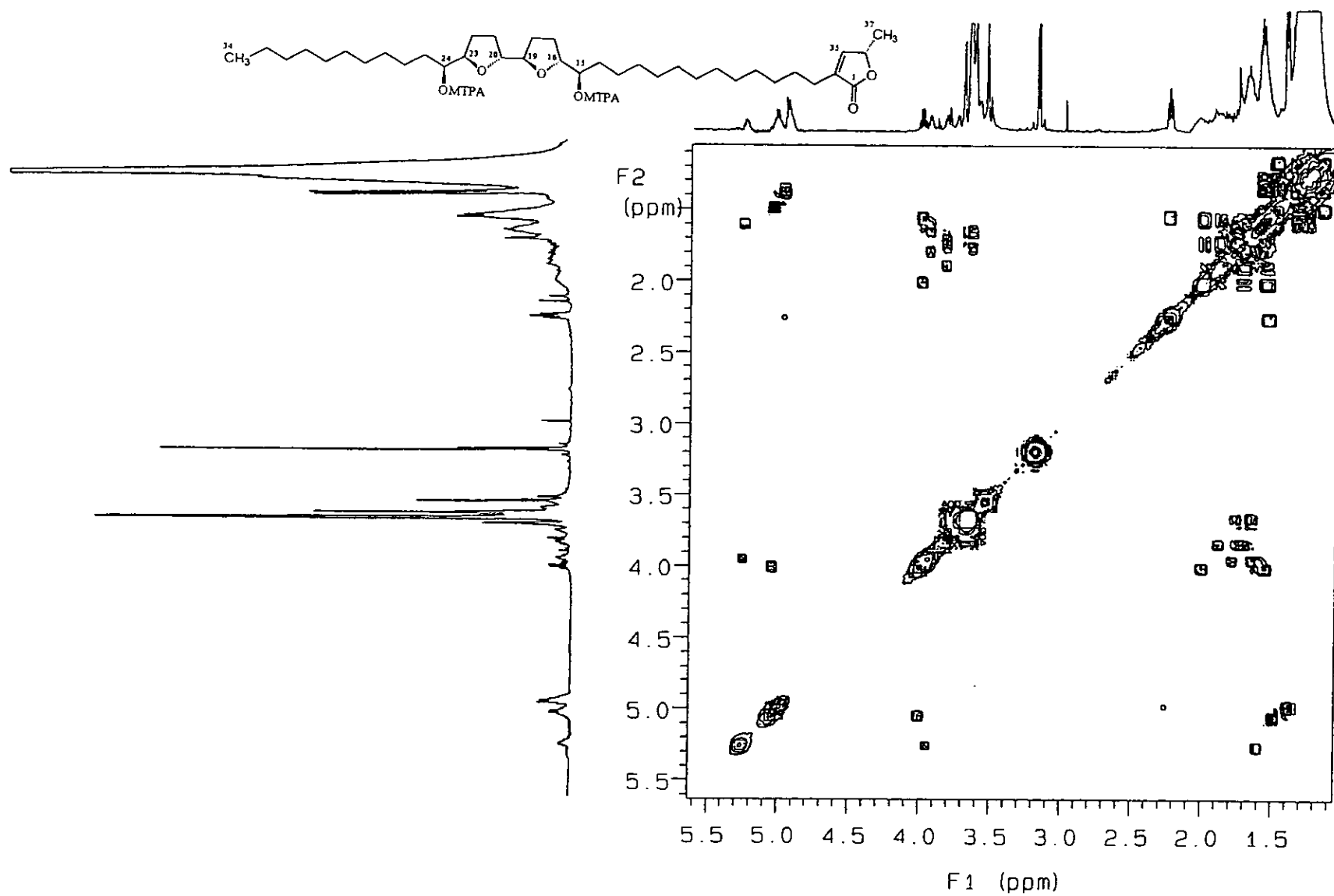




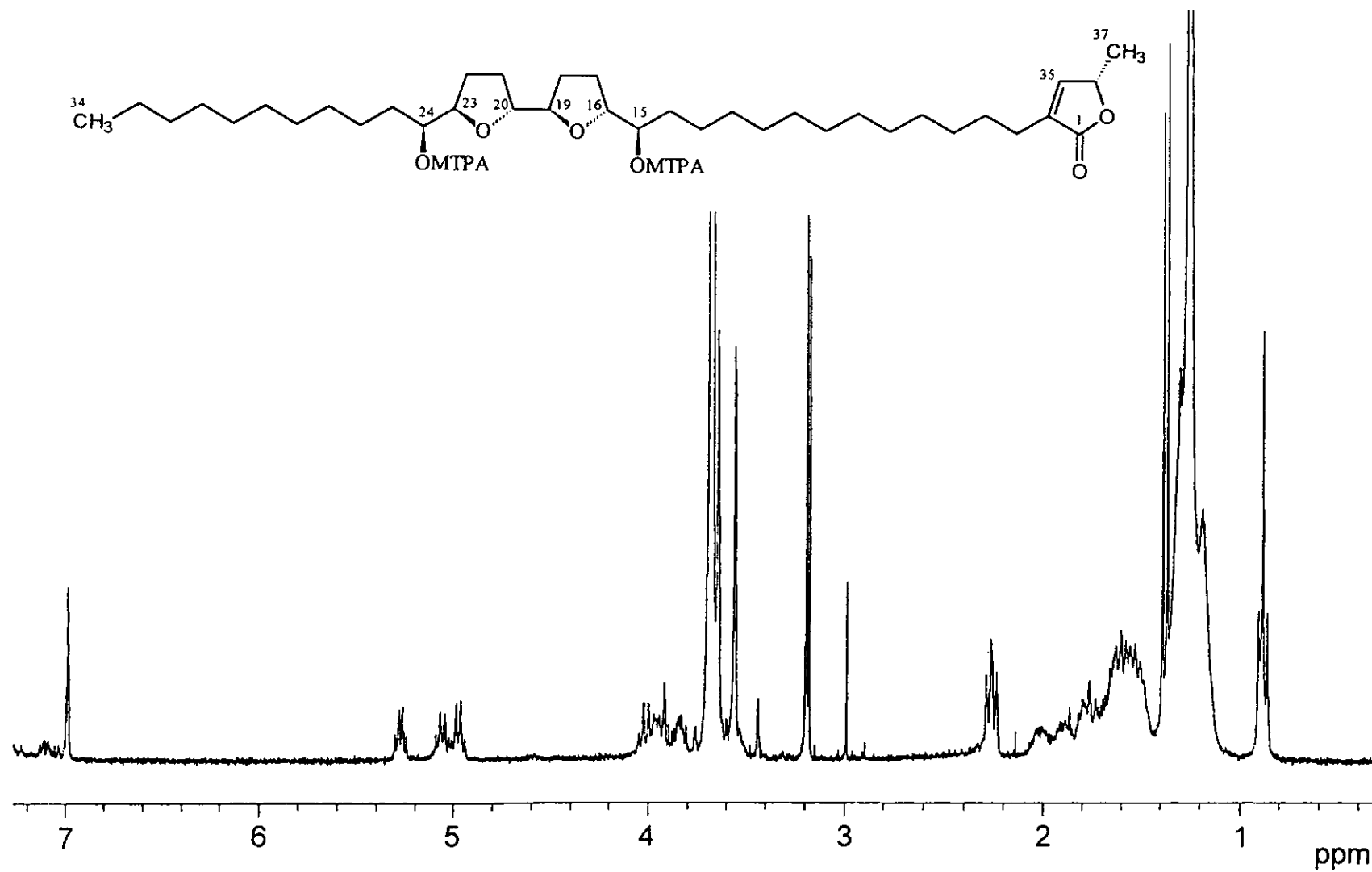
**Espectro 32.** Espectro de RMN 2D-HETCOR de la desacetilvaricina (56).



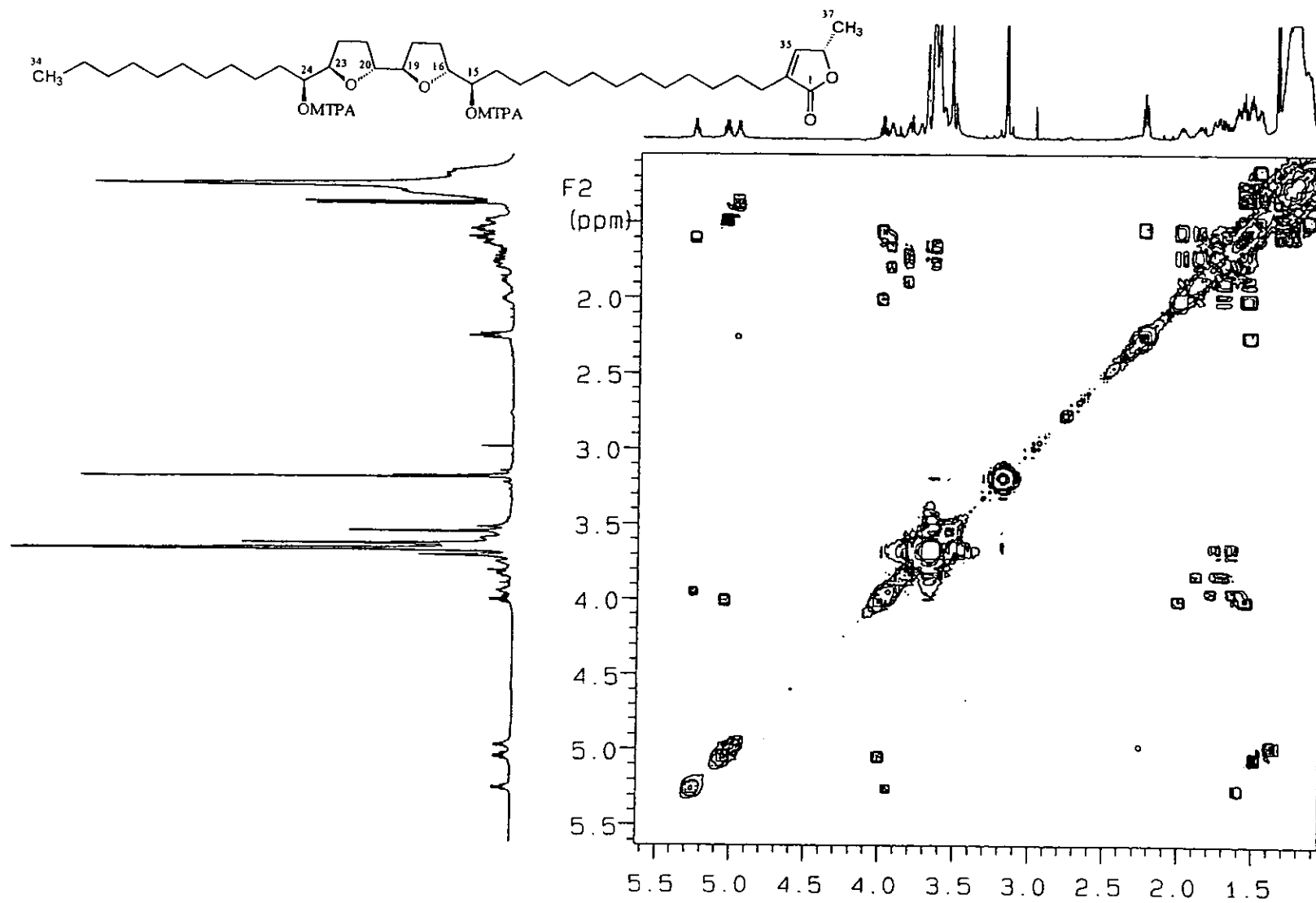
**Espectro 33.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del éster de Mosher (S) de la desacetilvaricina (56).



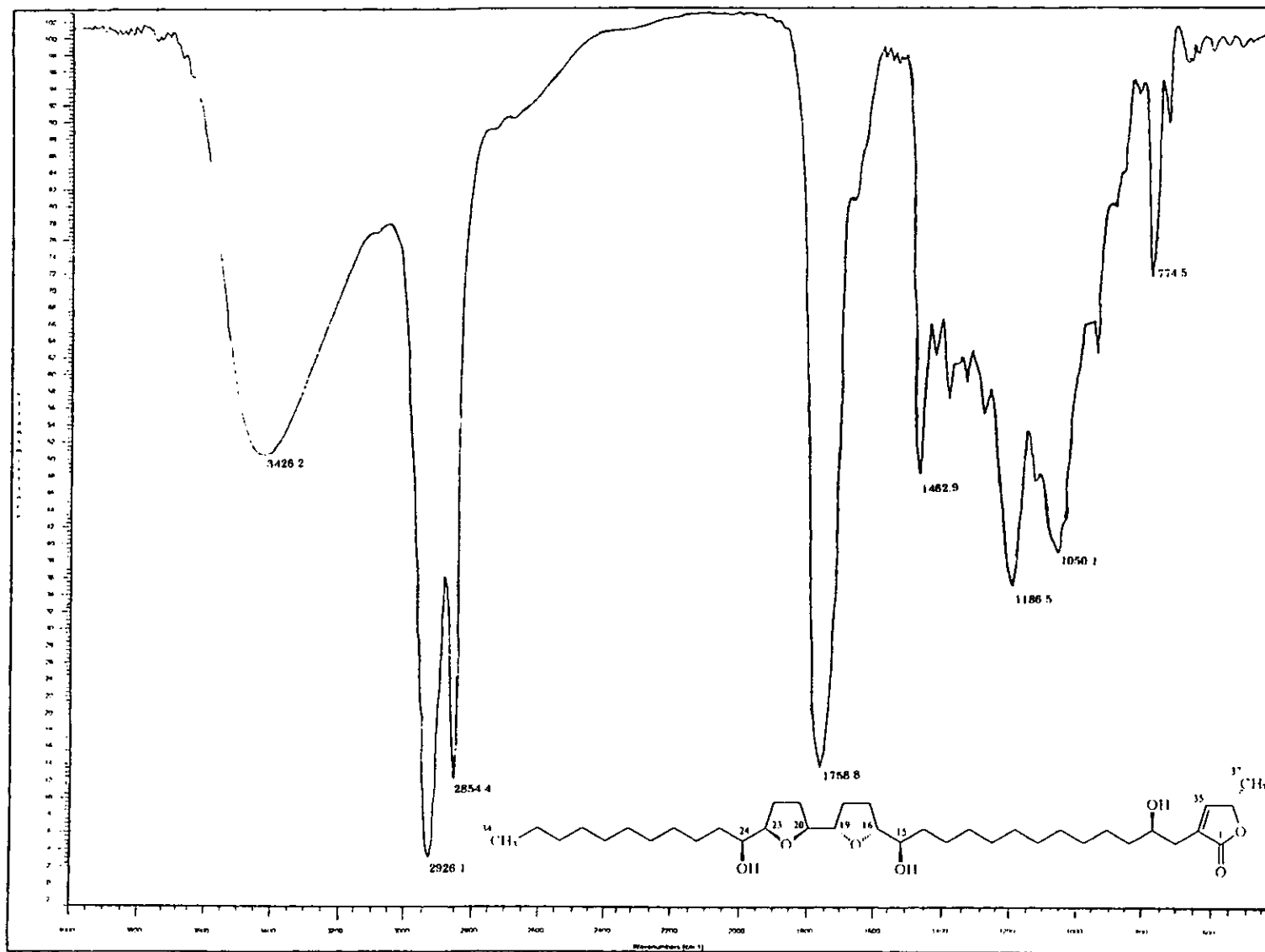
**Espectro 34.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  COSY del éster de Mosher (S) de la desacetilivaricina (56).



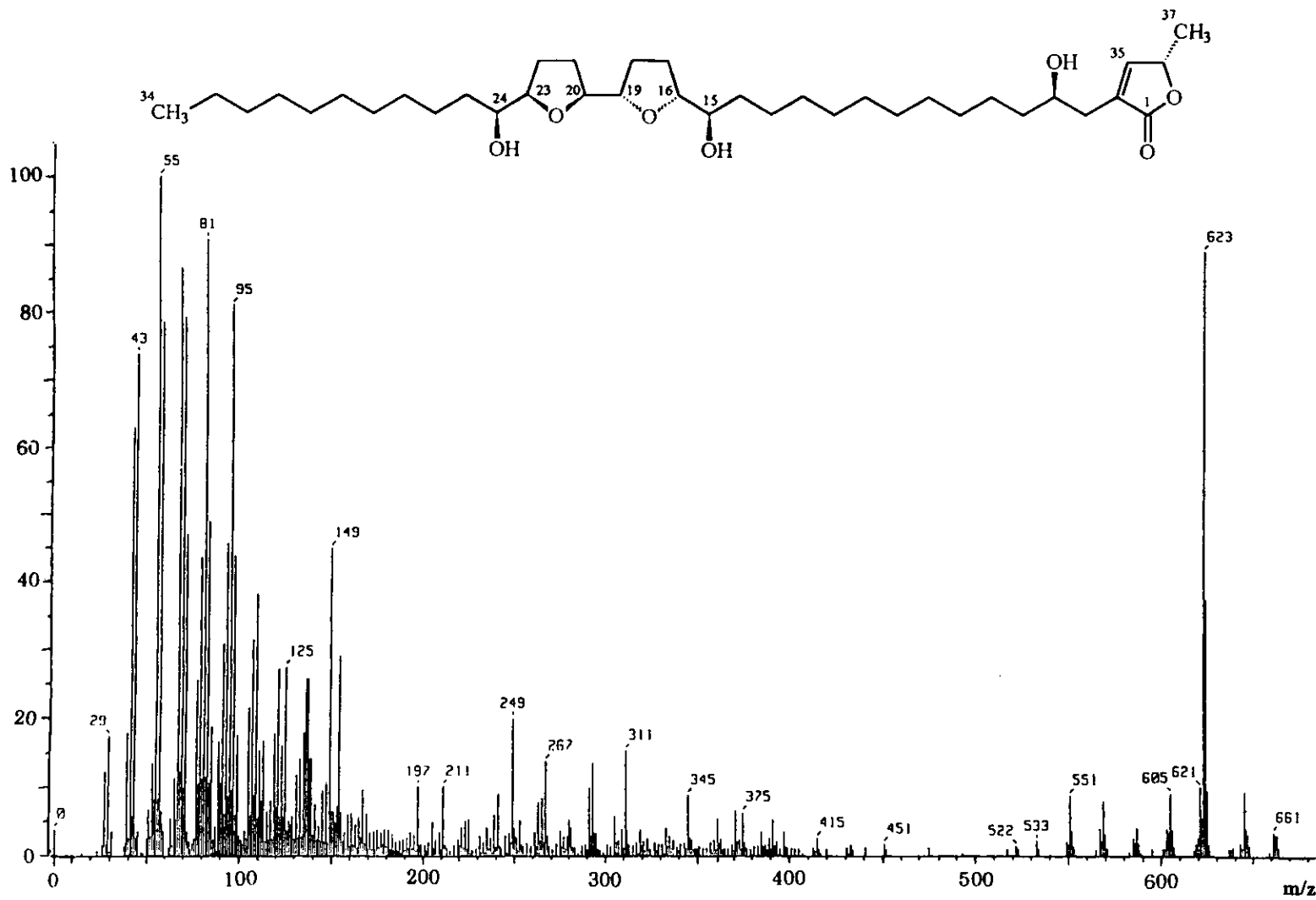
**Espectro 35.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del éster de Mosher (R) de la desacetilivaricina (56).



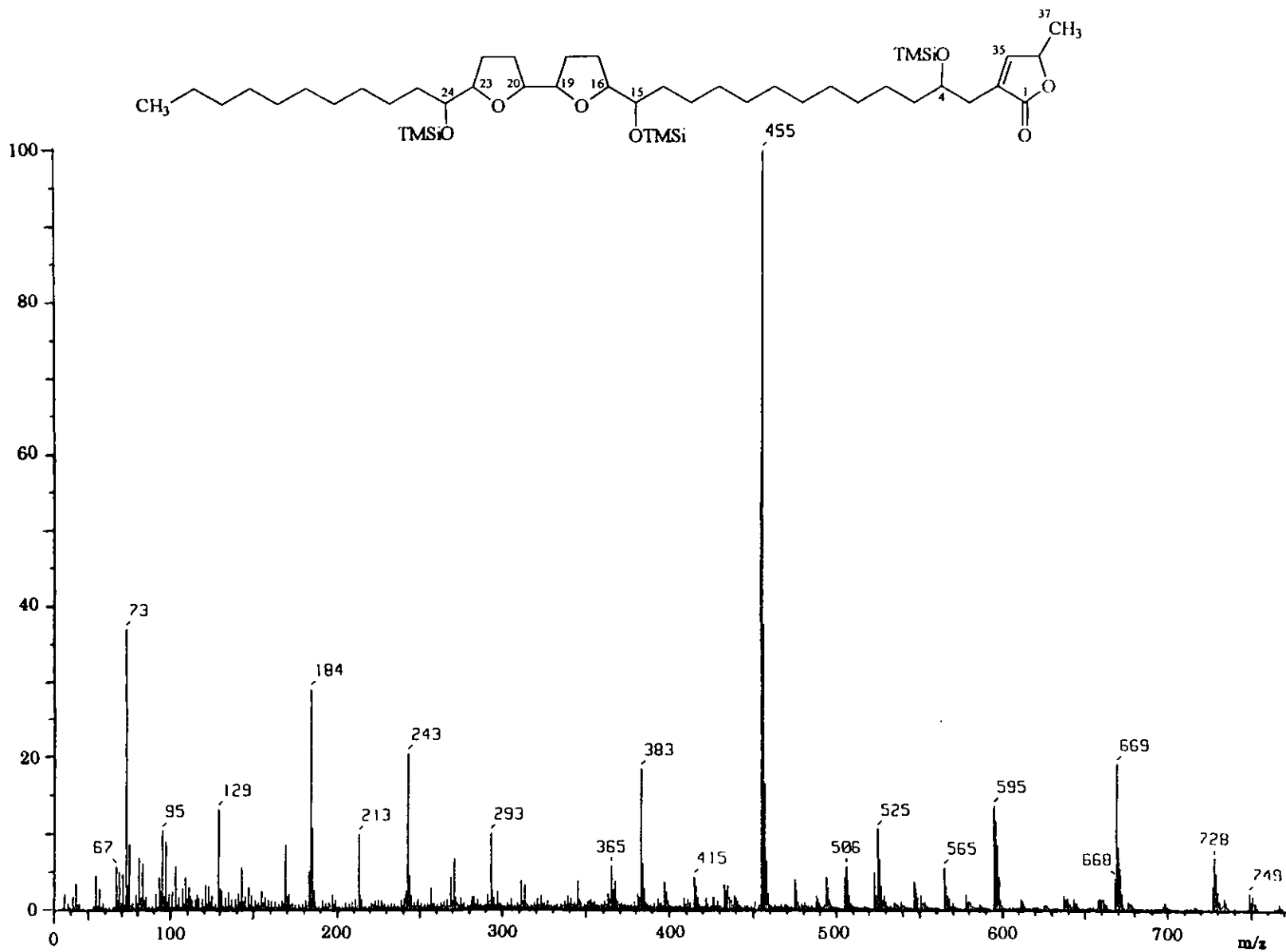
**Espectro 36.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  COSY del éster de Mosher (R) de la desacetilivaricina (56).



Espectro 37. Espectro en el IR de la roliniastatina 1 (19).

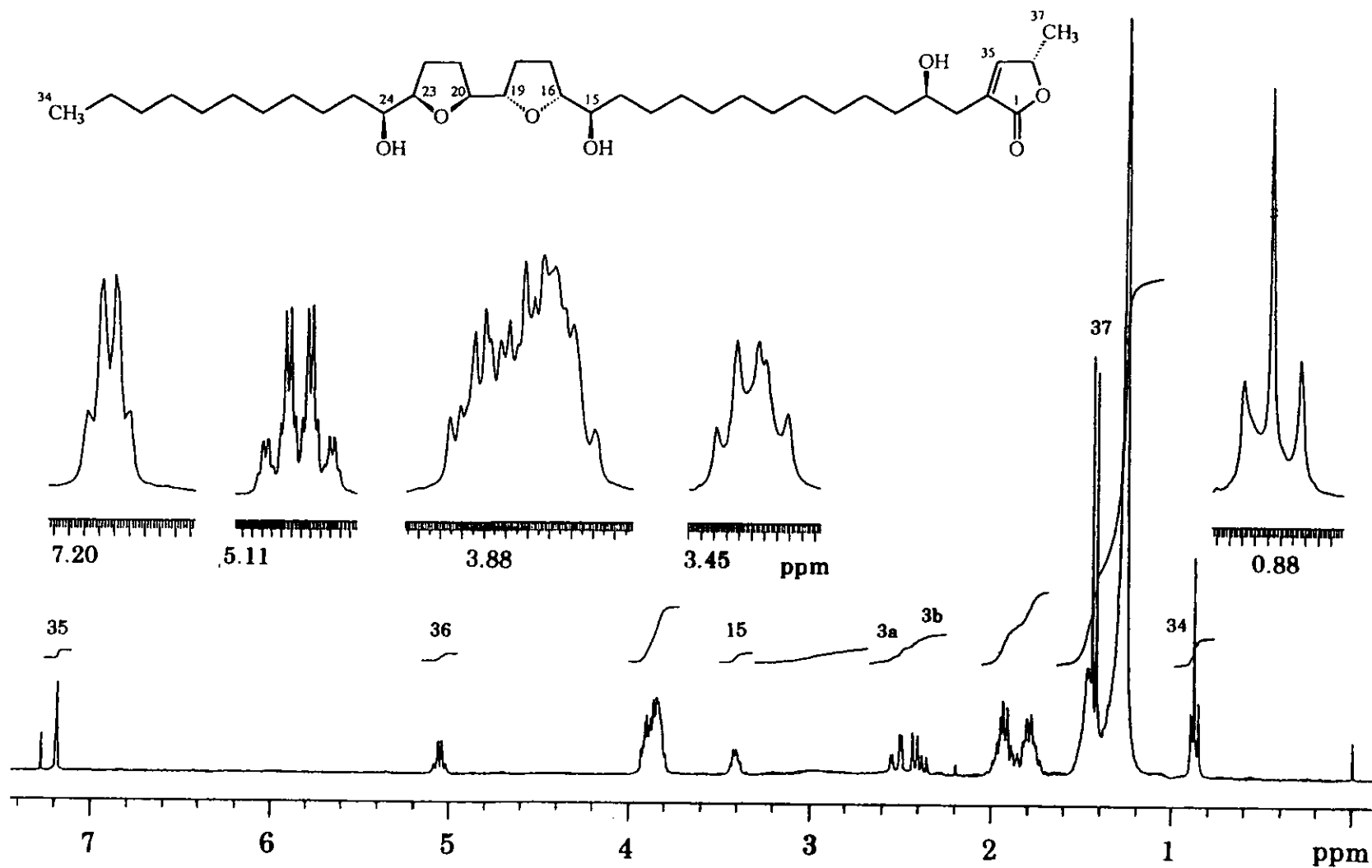


**Espectro 38.** Espectro de masas de la roliniastatina 1 (19).

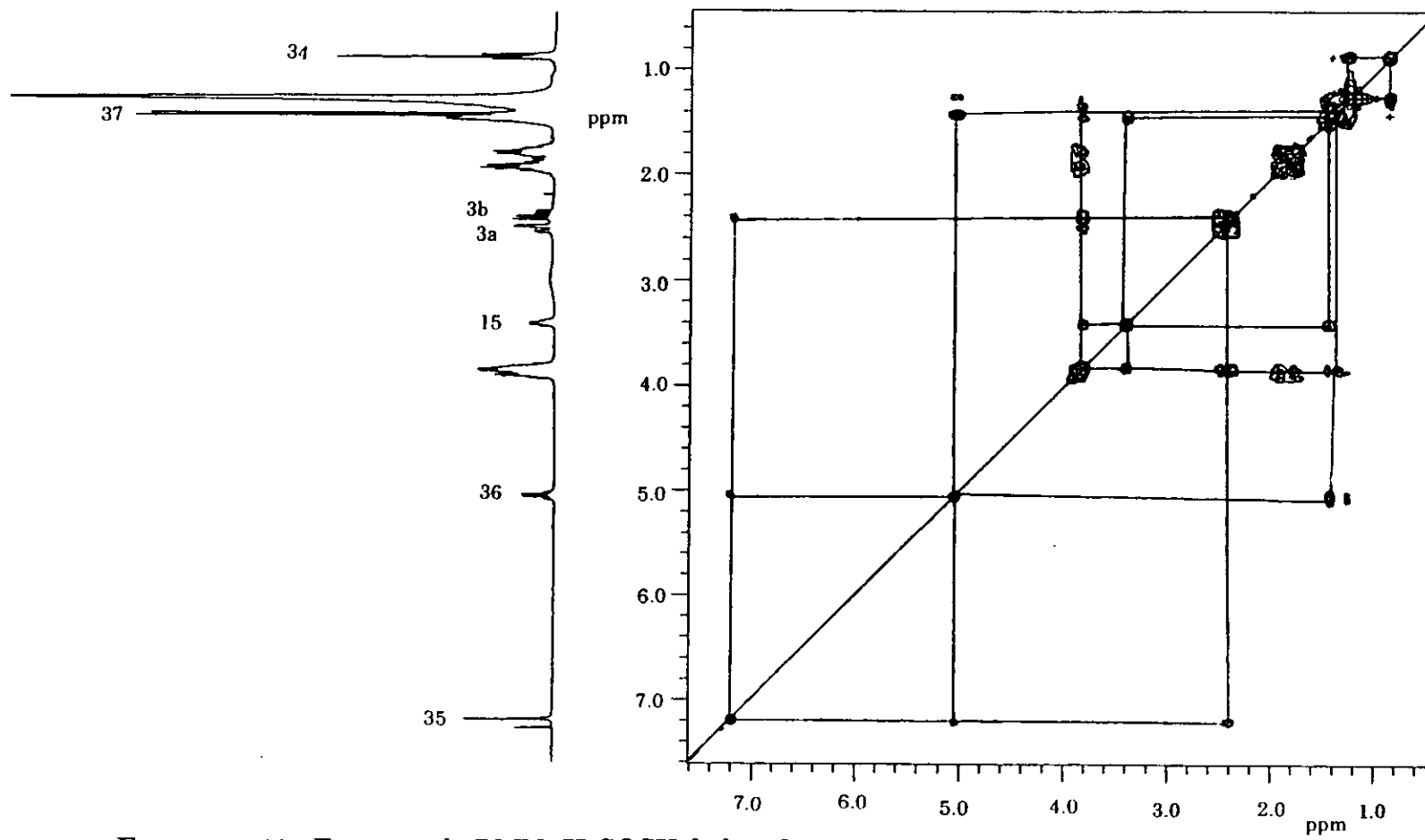
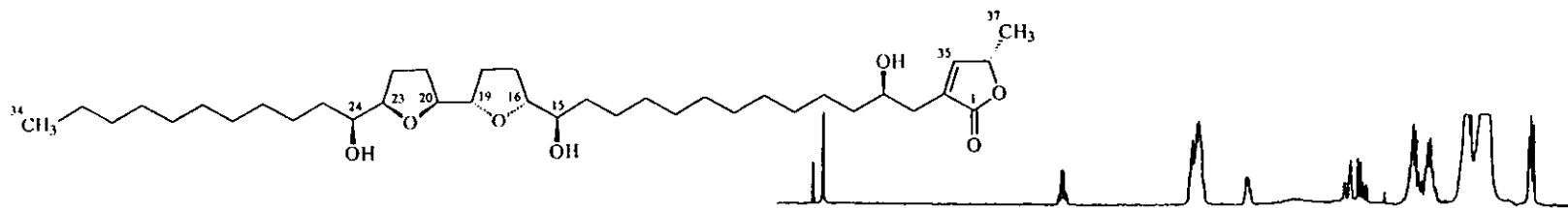


**Espectro 39.** Espectro de masas del derivado sililado de la roliniastatina 1 (19).

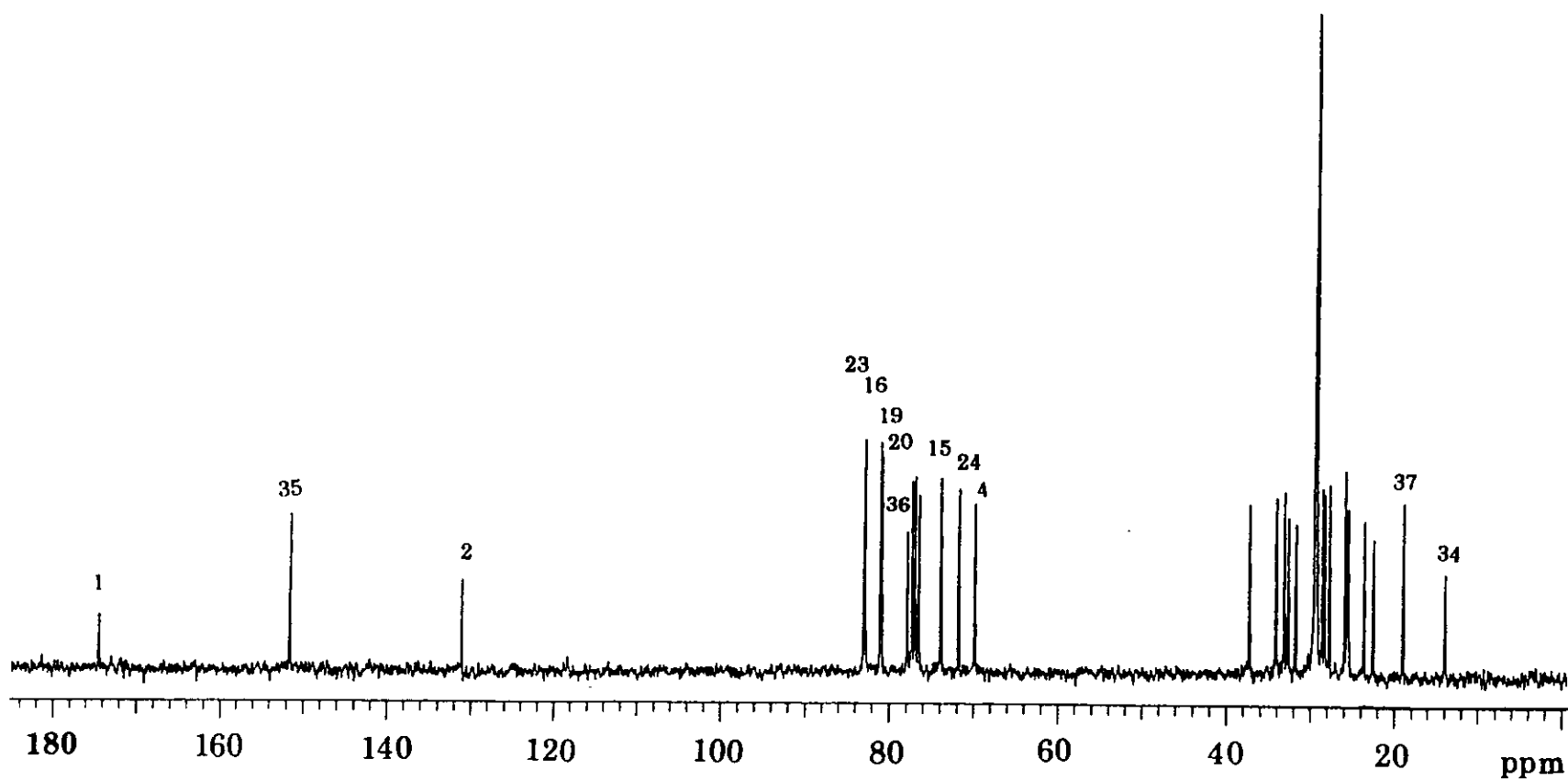
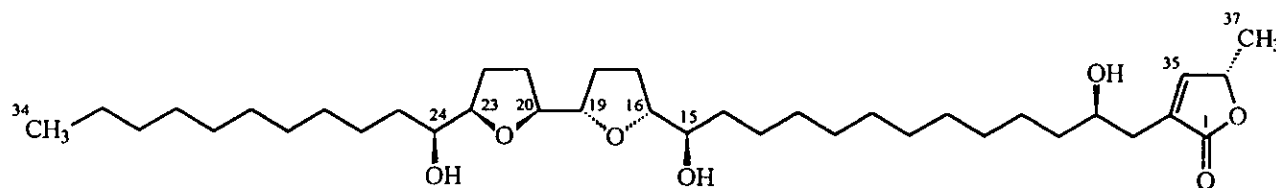




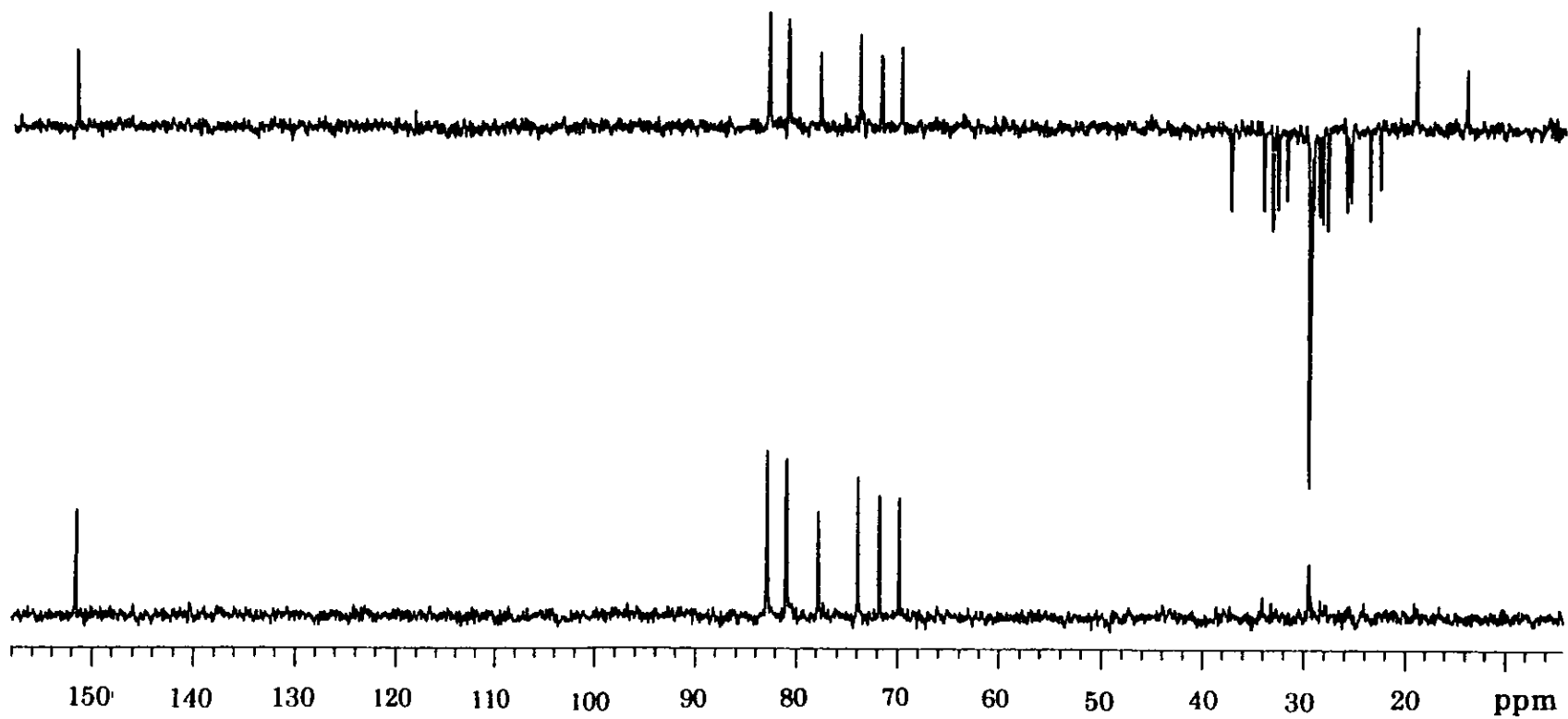
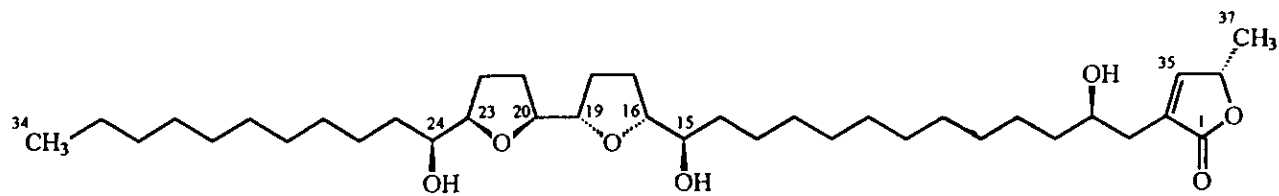
**Espectro 40.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la roliniastatina 1 (19).



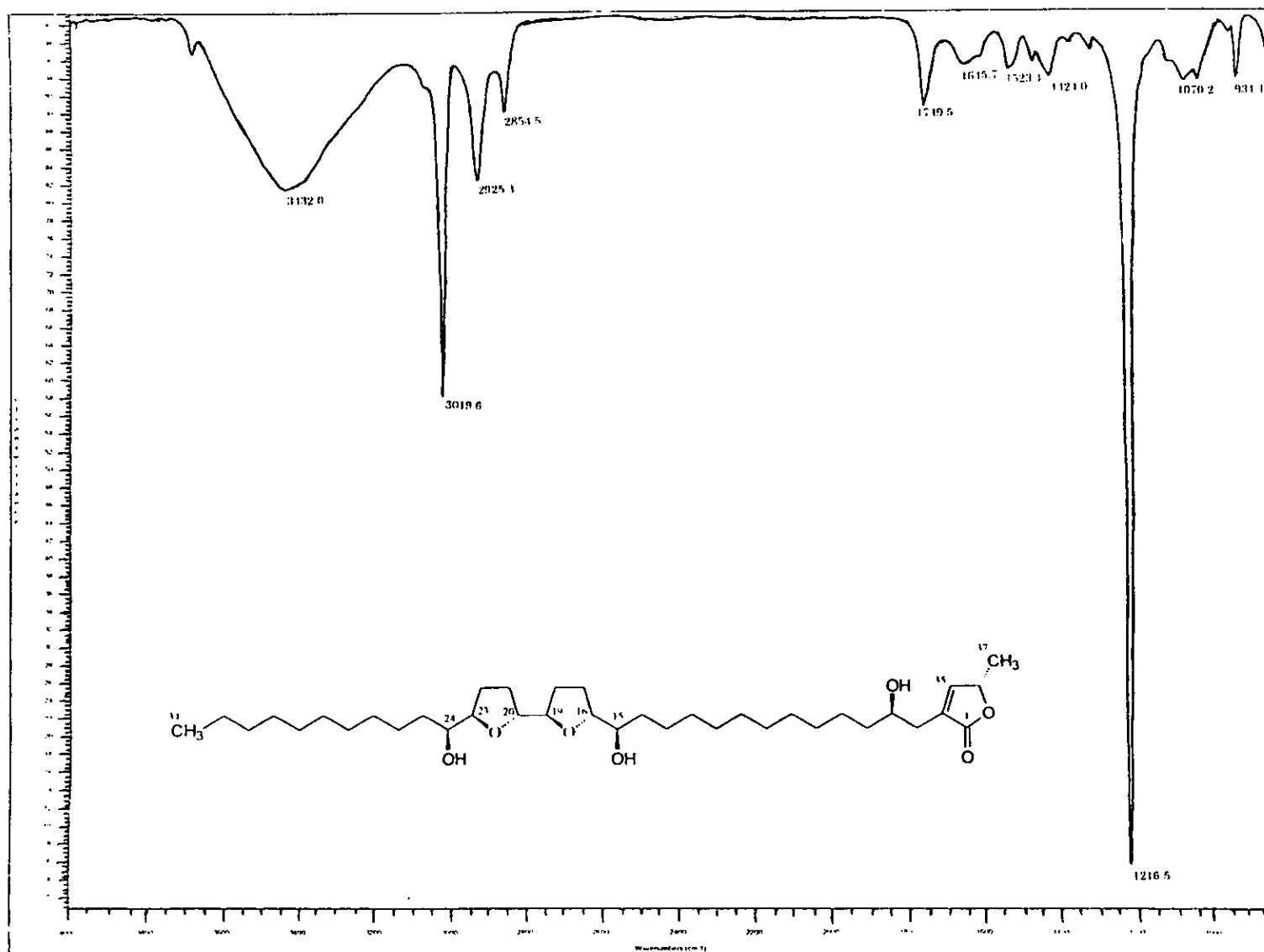
**Espectro 41.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  COSY de la roliniastatina 1 (19).



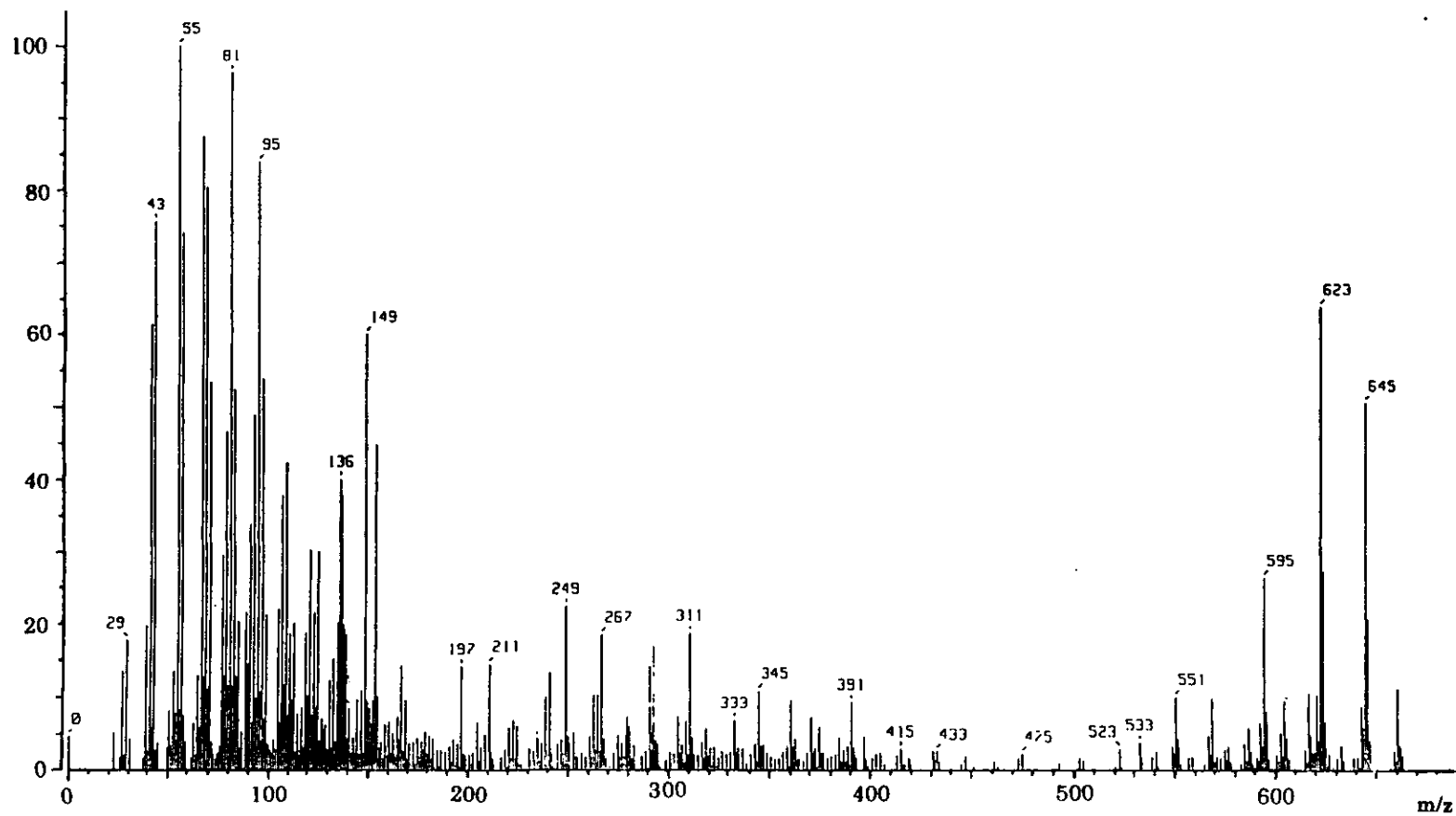
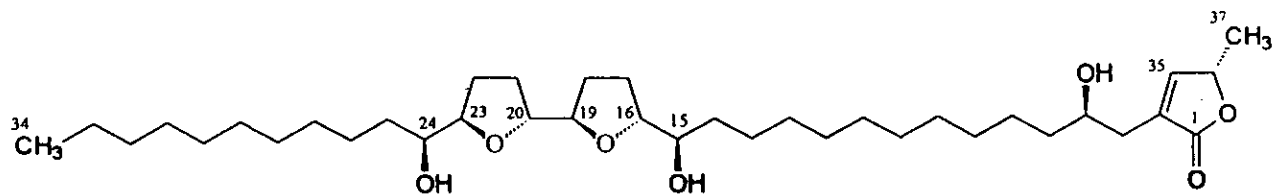
Espectro 42. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la roliniastatina 1 (19).



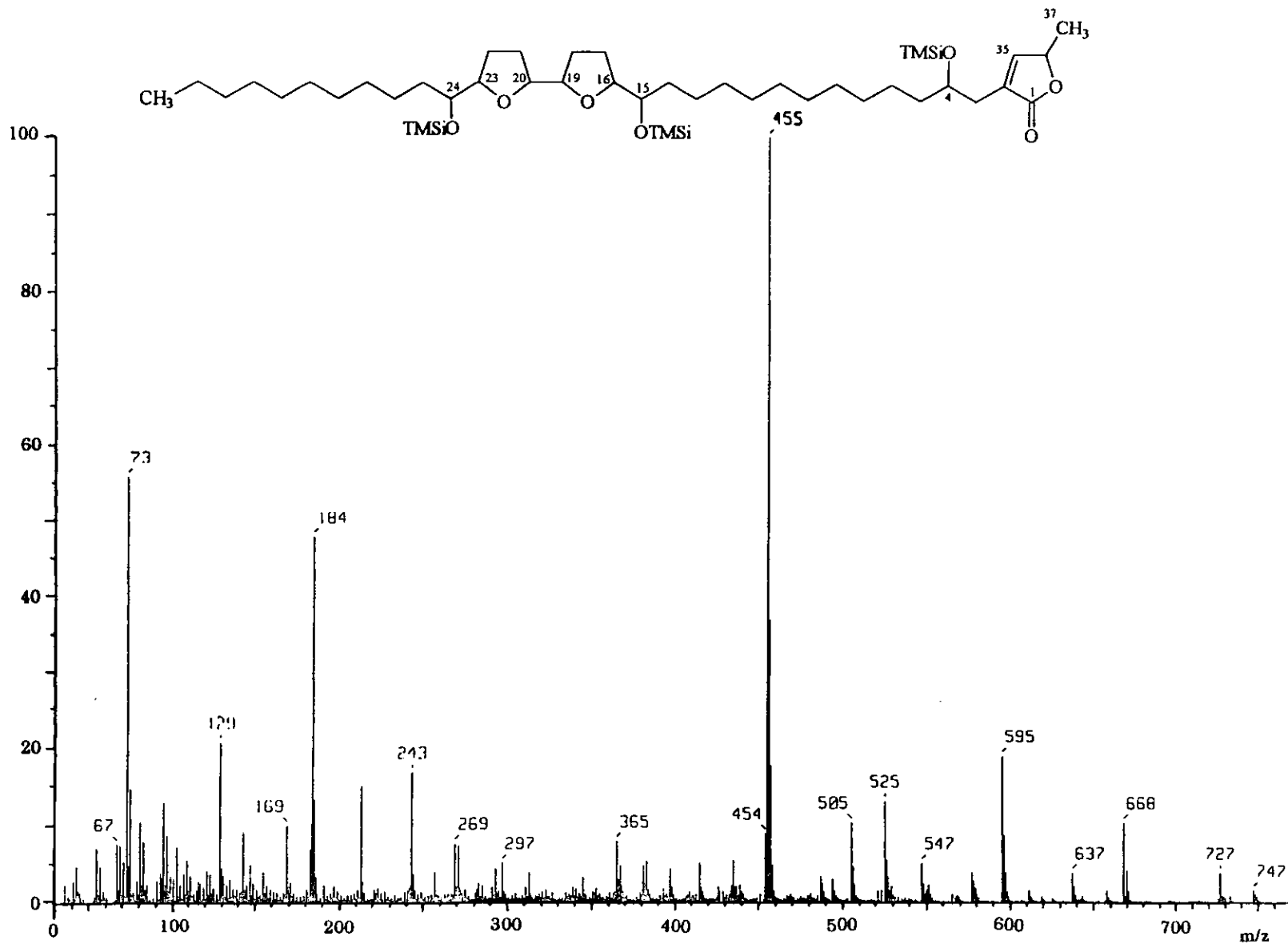
Espectro 43. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT de la roliniastatina 1 (19).



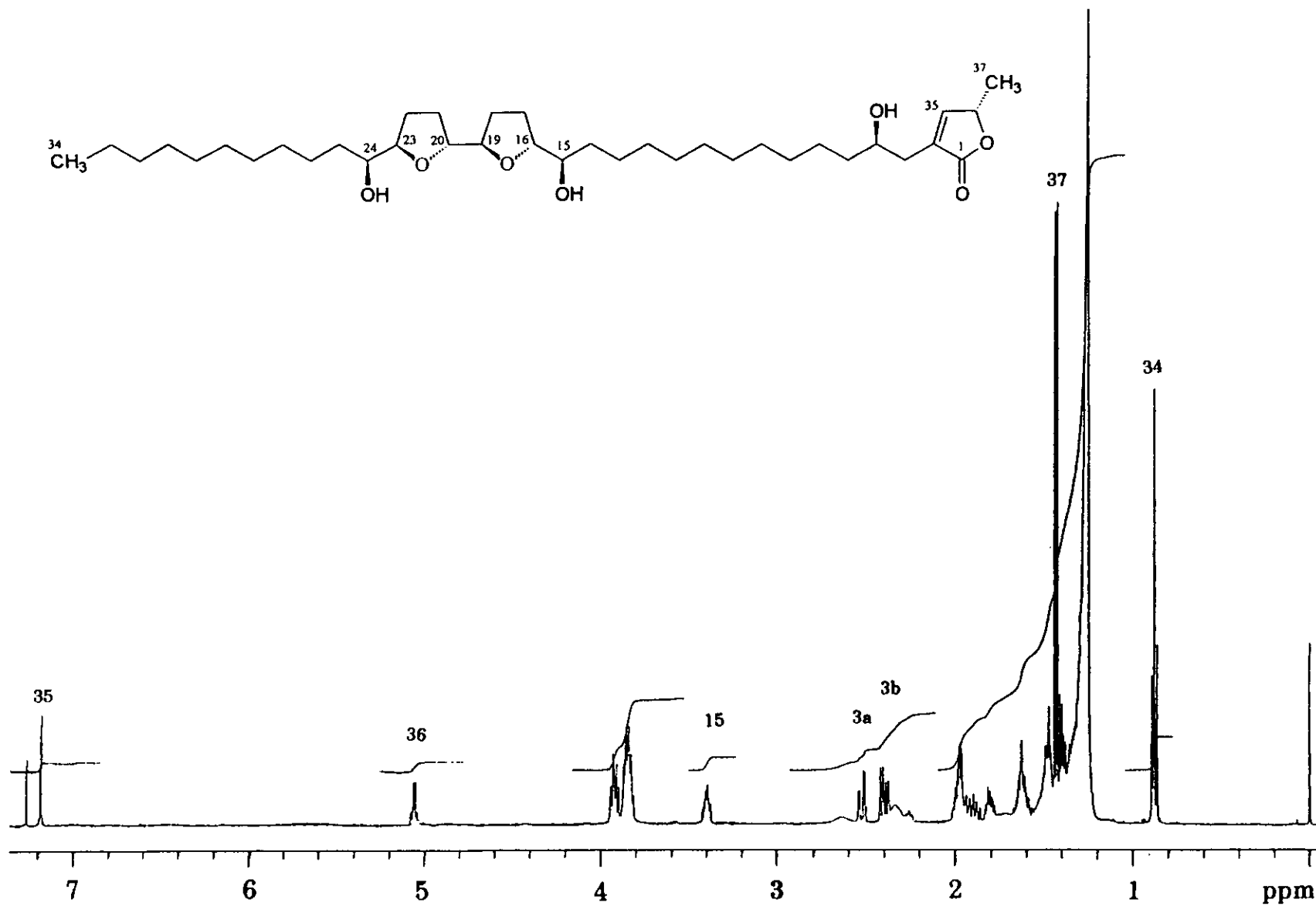
Espectro 44. Espectro en el IR de la bulatacina (21).



Espectro 45. Espectro de masas de la bulatacina (21).

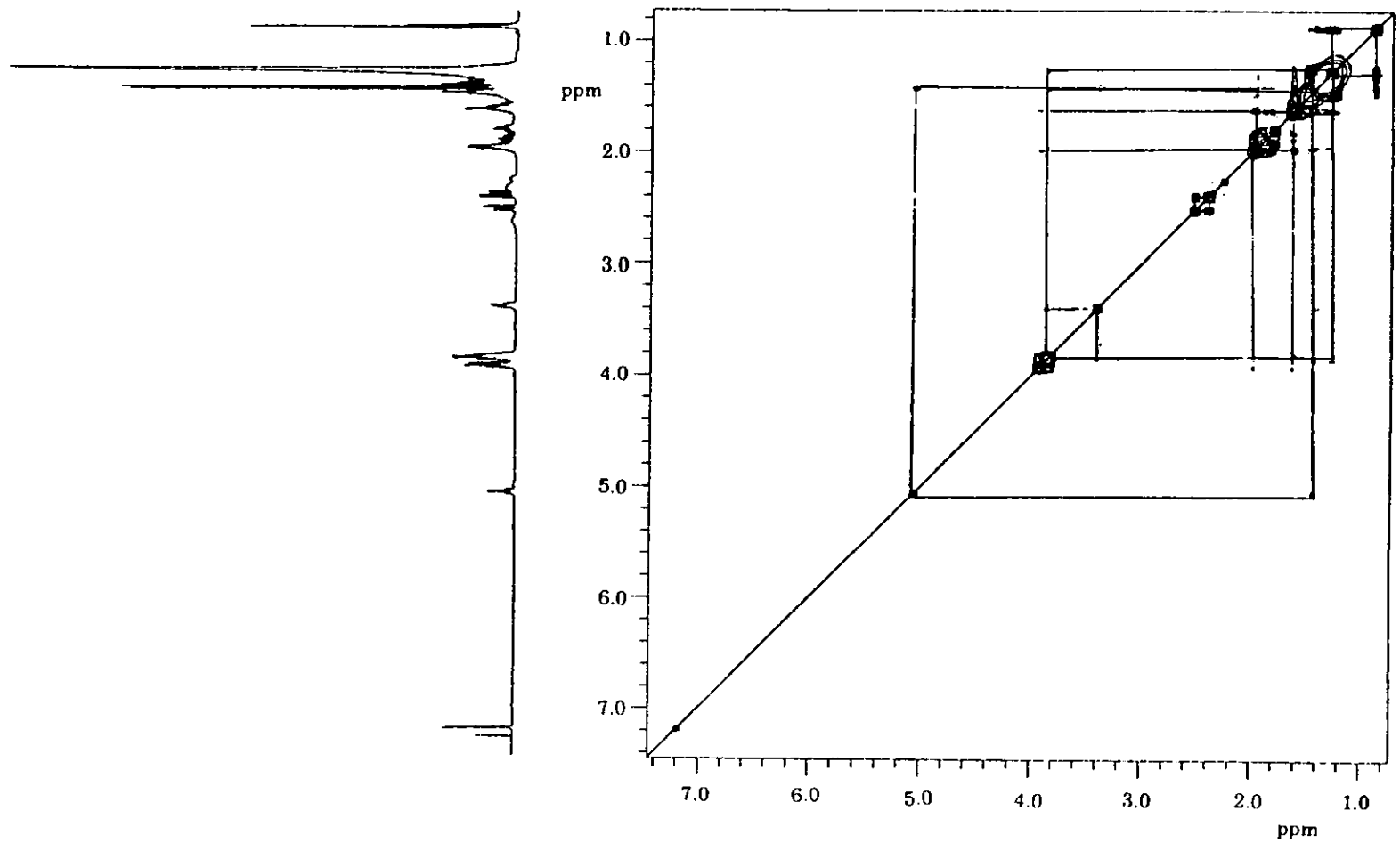
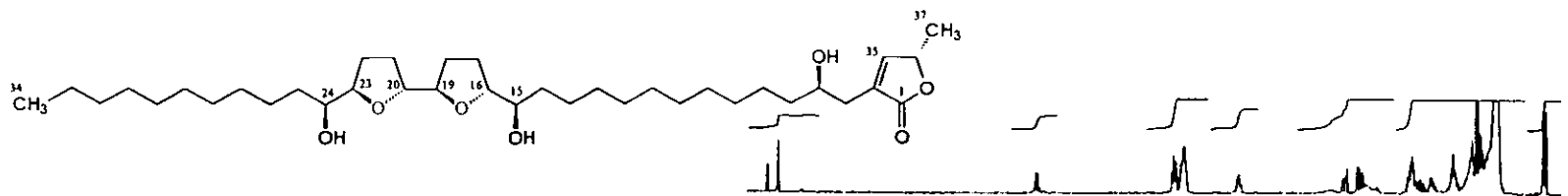


**Espectro 46.** Espectro de masas del derivado sililado de la bulatacina (21).

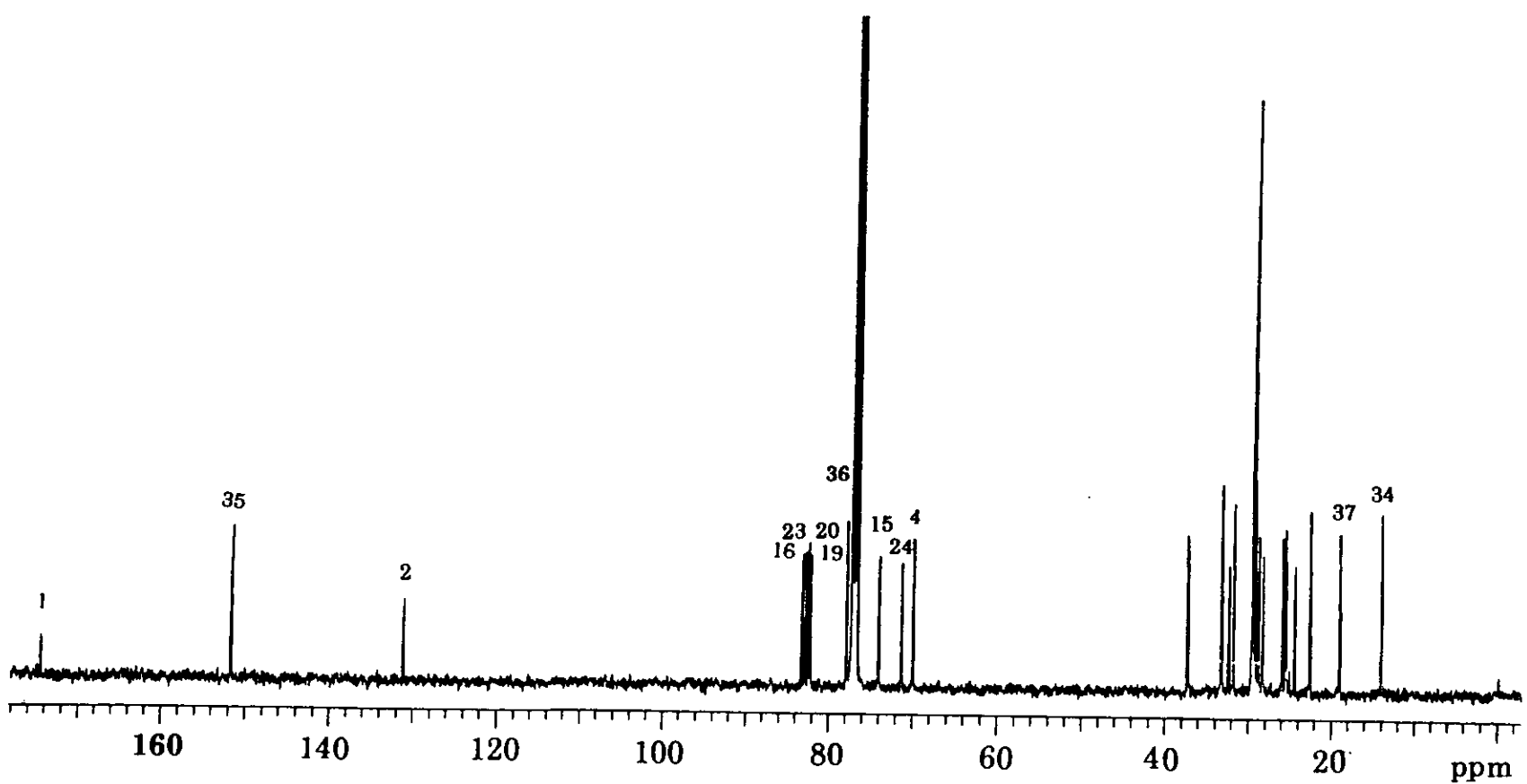
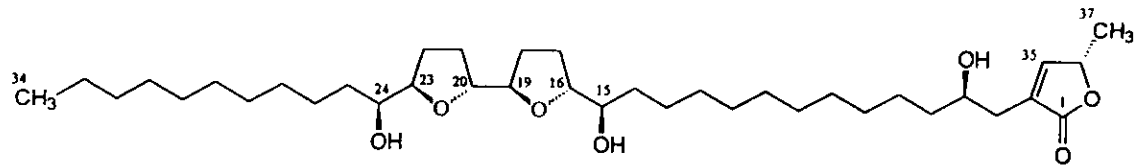


**Espectro 47.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la bulatacina (21).

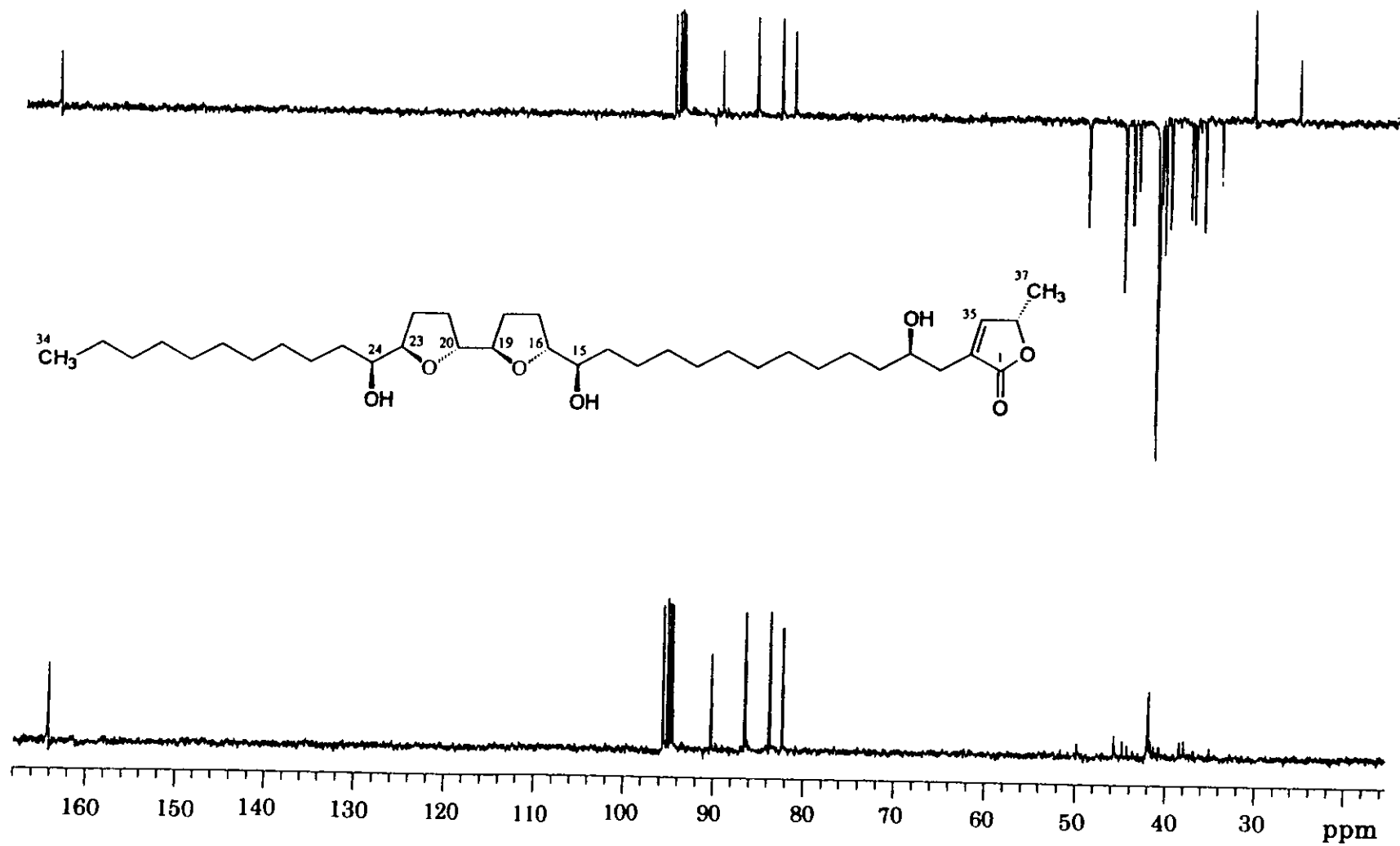




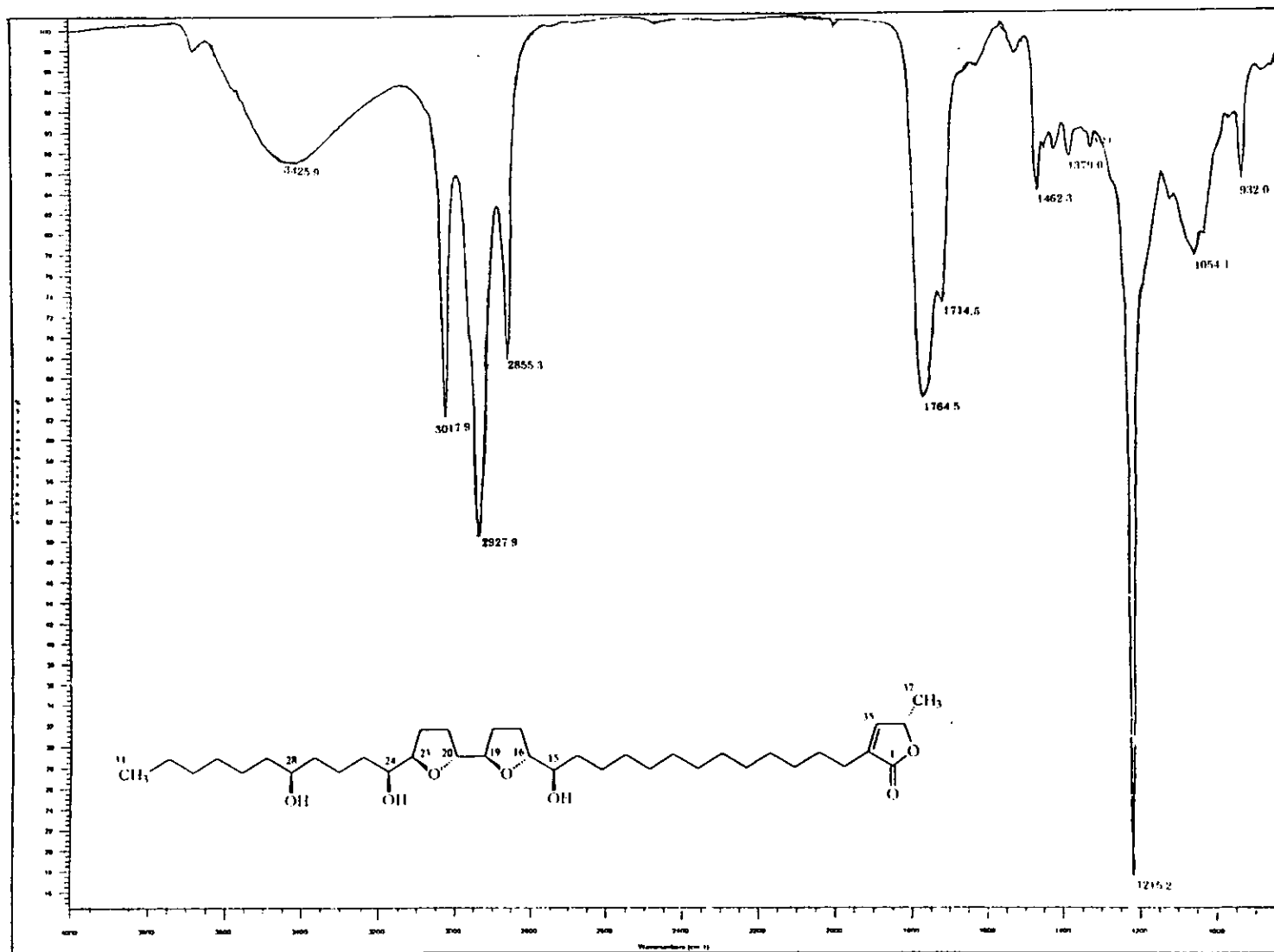
**Espectro 48.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  COSY de la bulatacina (21).



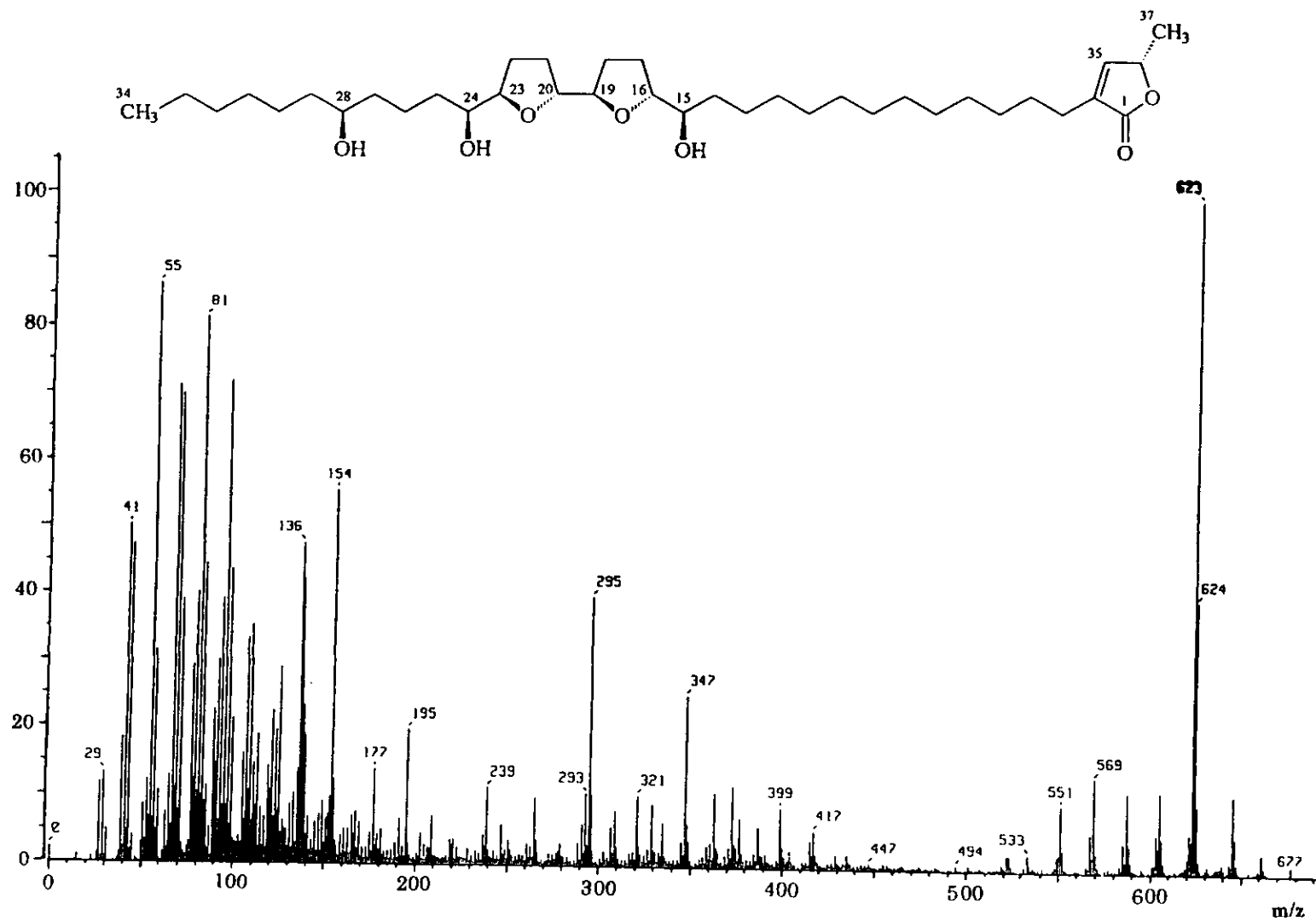
Espectro 49. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de la bulatacina (21).



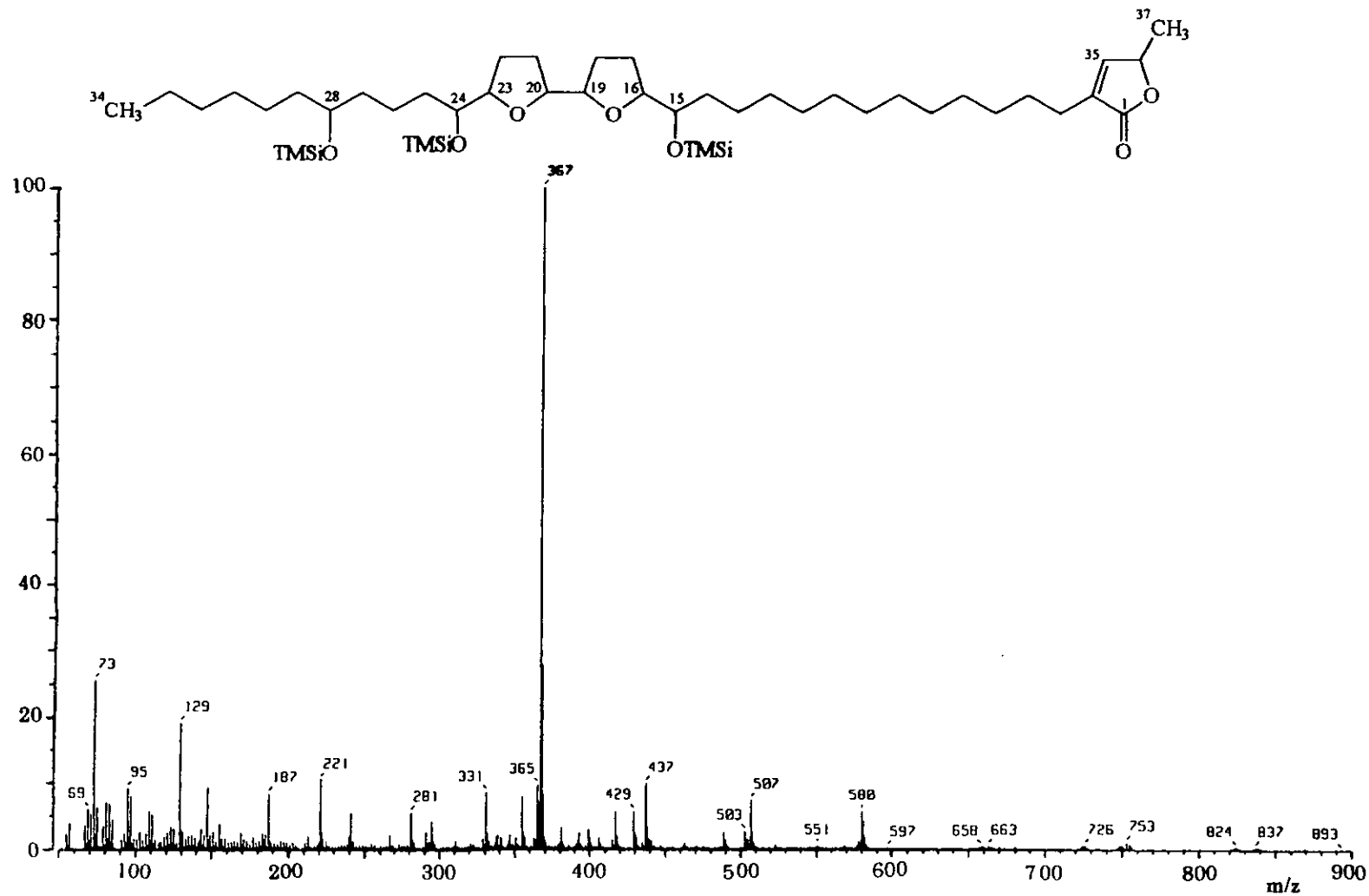
**Espectro 50.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C modalidad DEPT de la bulatacina (21).



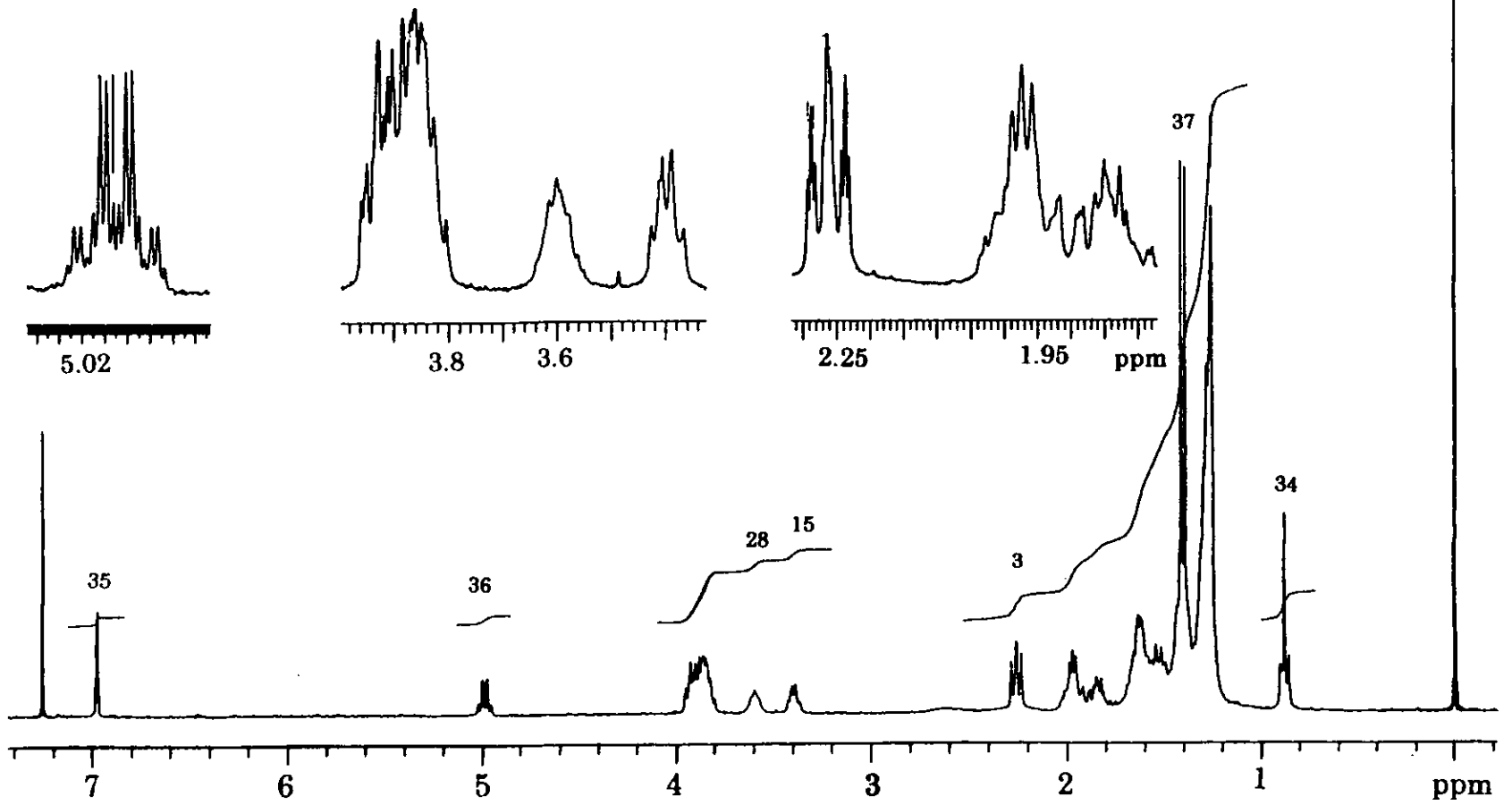
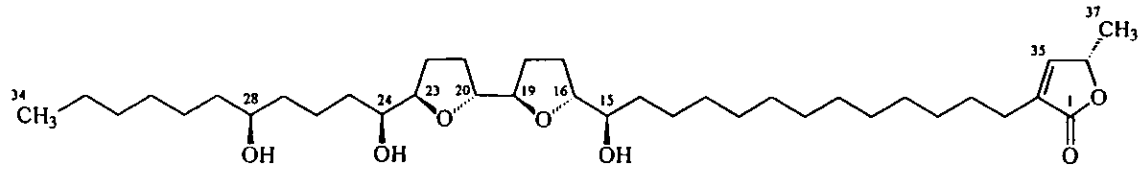
Espectro 51. Espectro en el IR de la esquamocina (29).



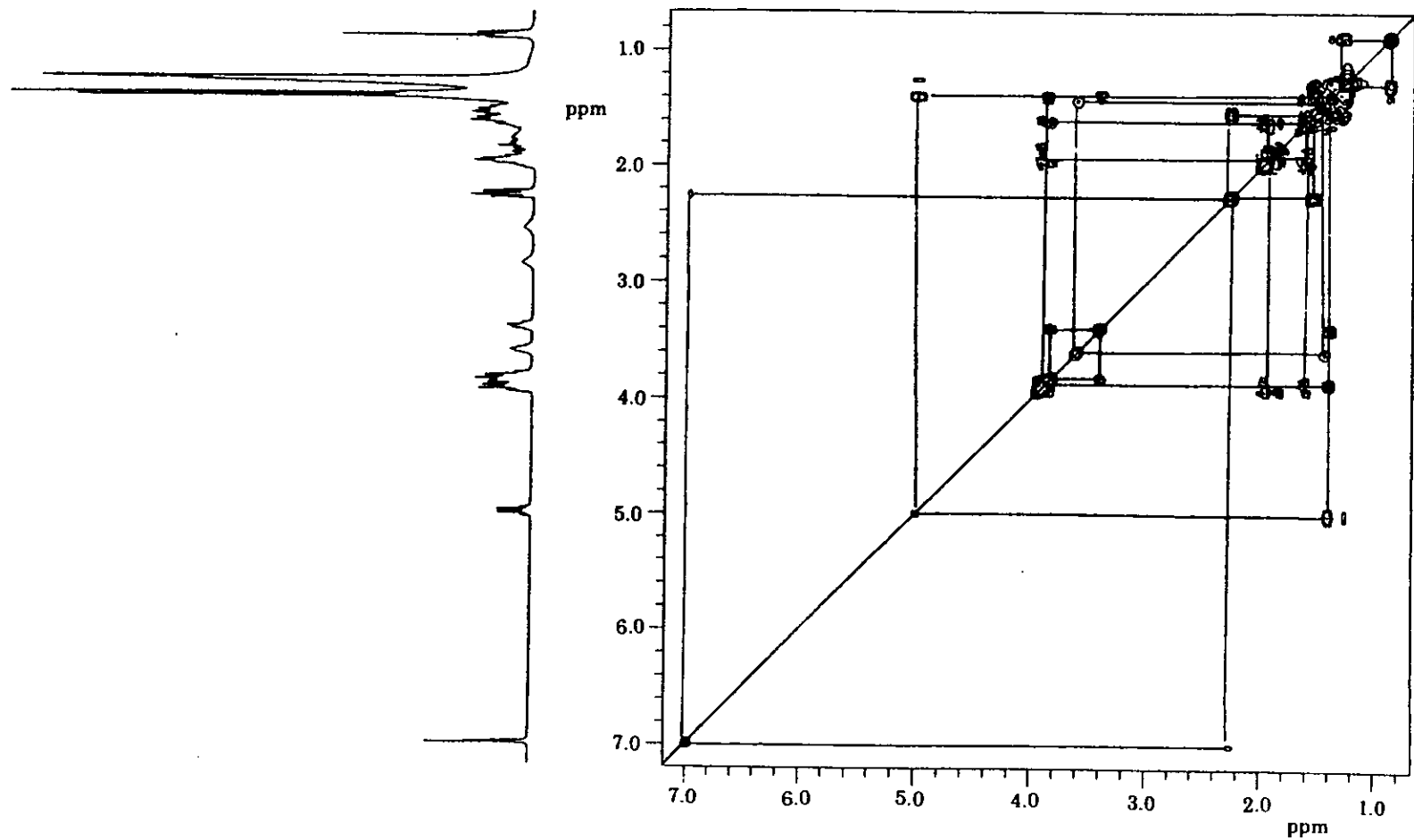
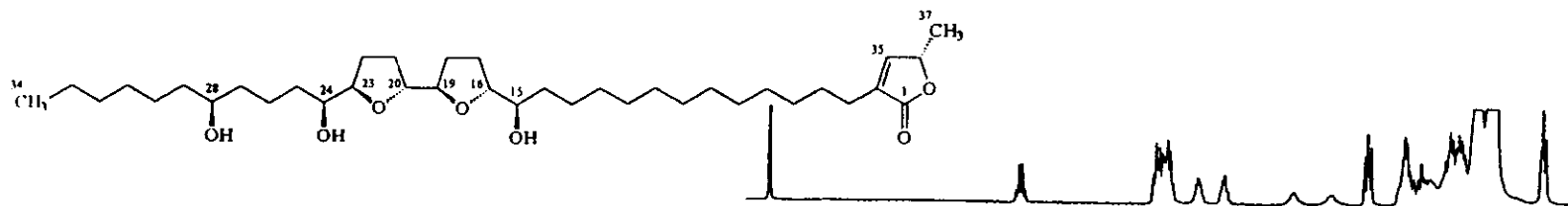
Espectro 52. Espectro de masas de la esquamocina (29).



Espectro 53. Espectro de masas del derivado sililado de la esquamocina (29).

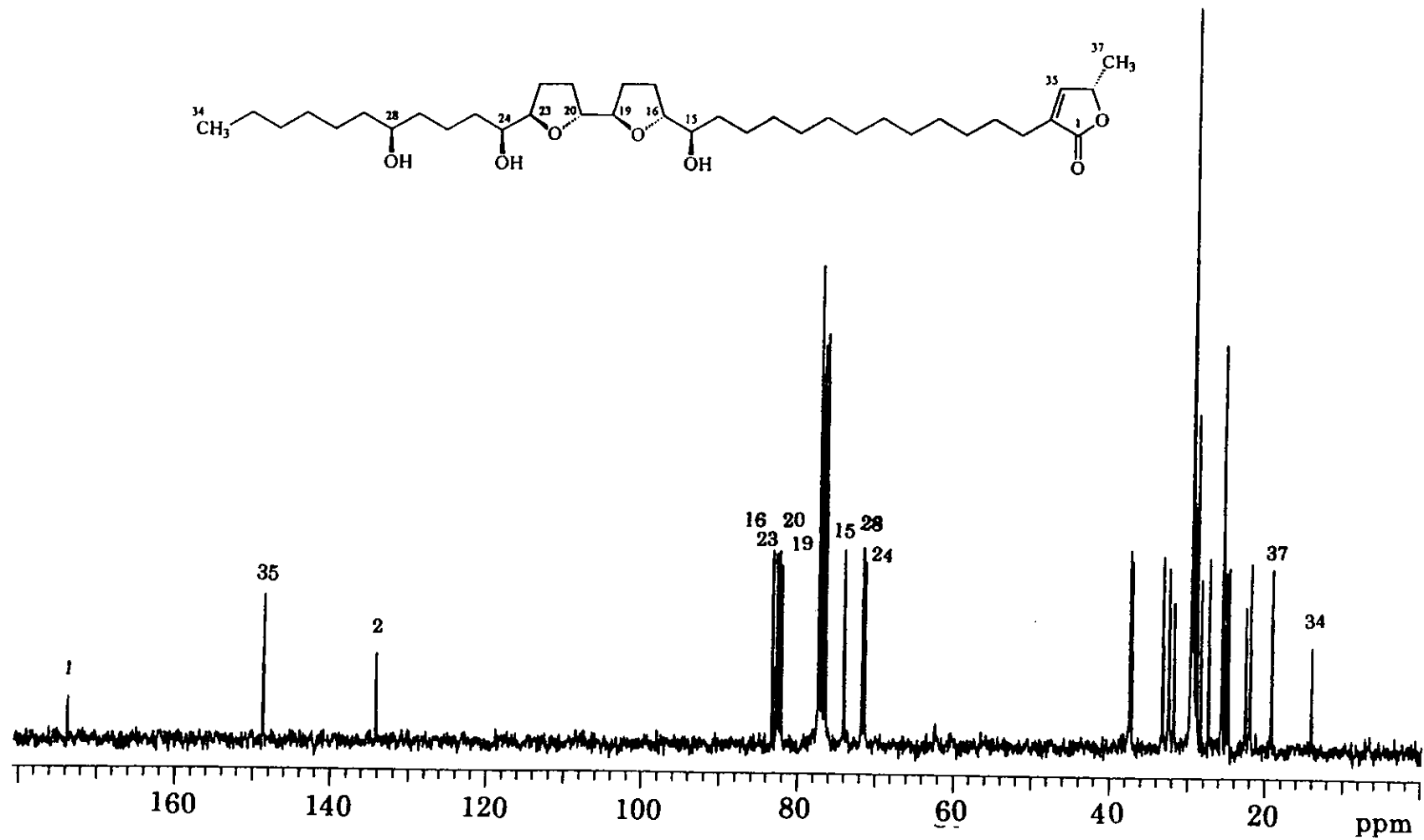
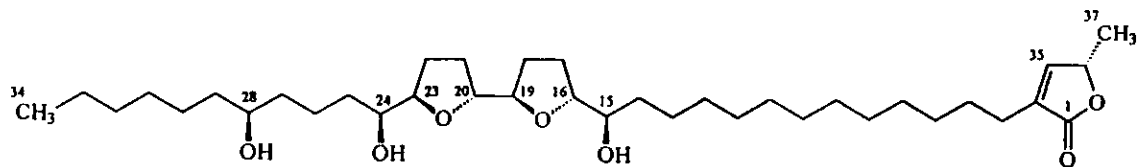


**Espectro 54.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la esquamocina (29).

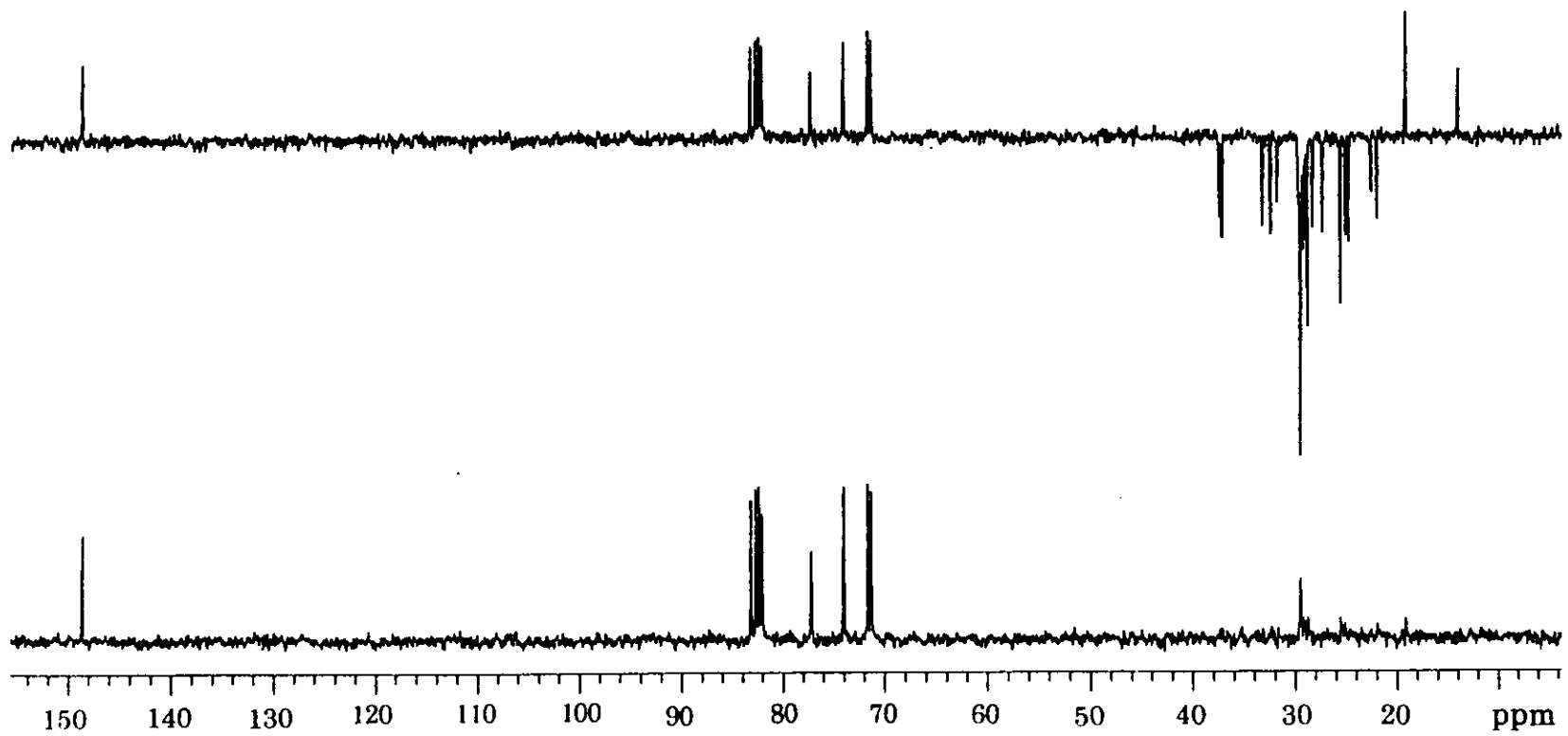
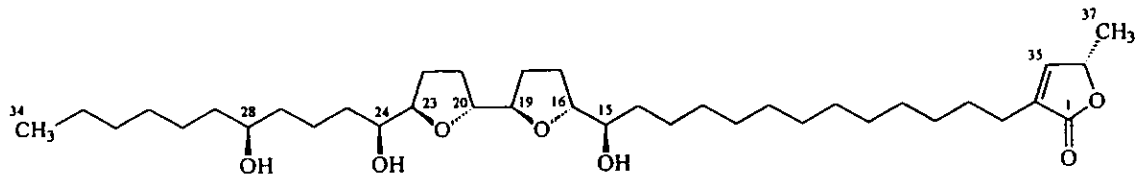


Espectro 55. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  COSY de la esquinina (29).

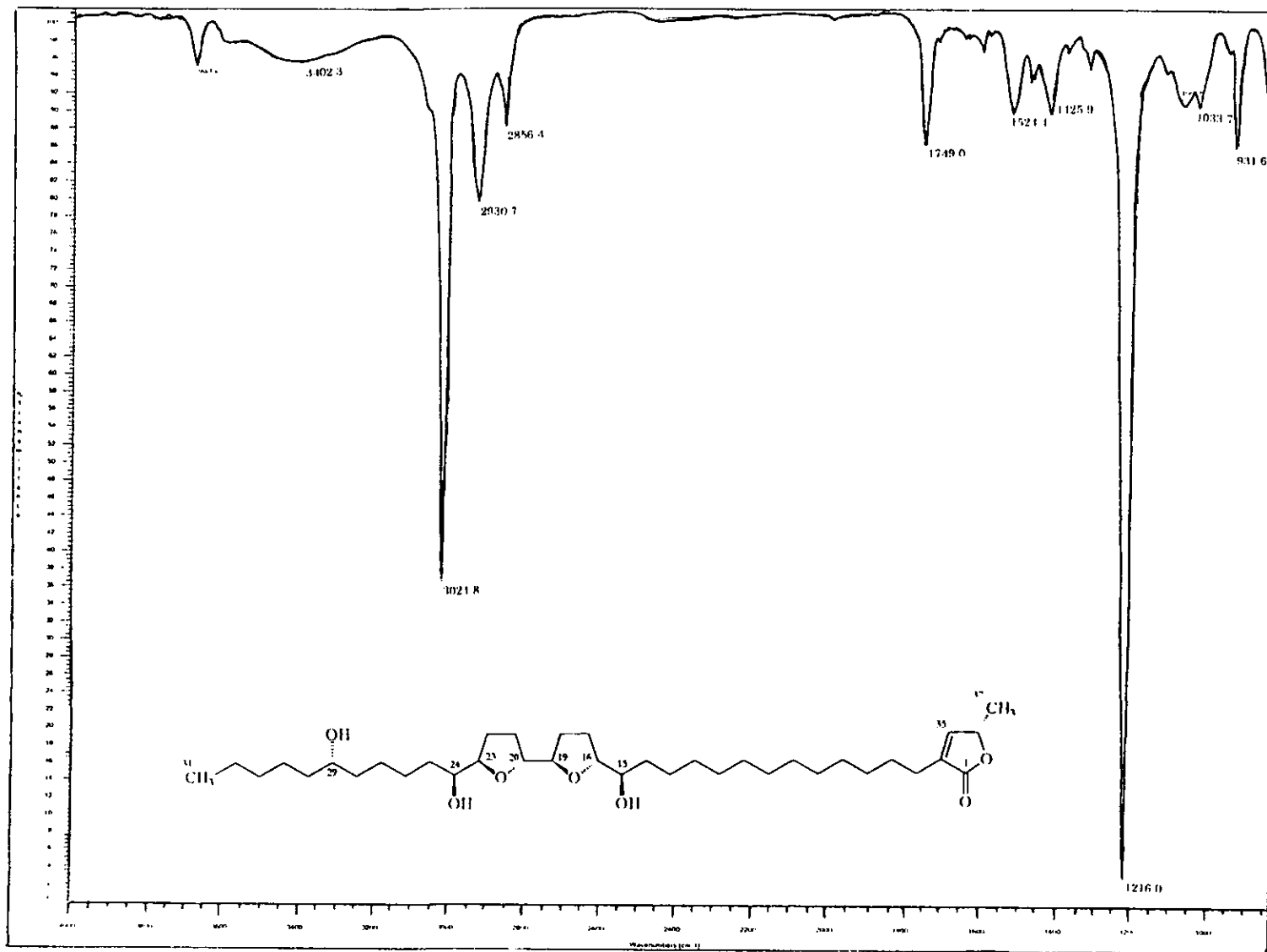




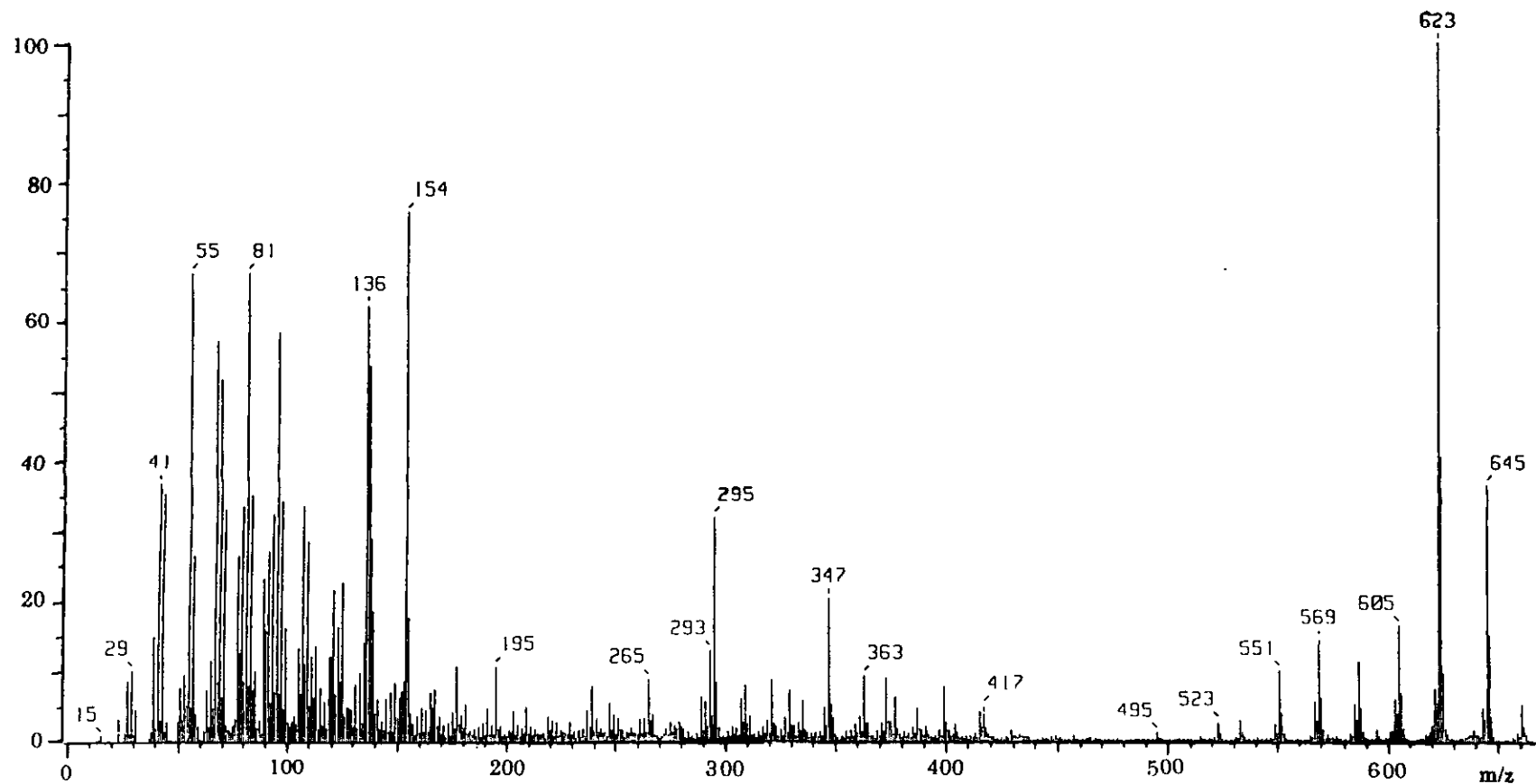
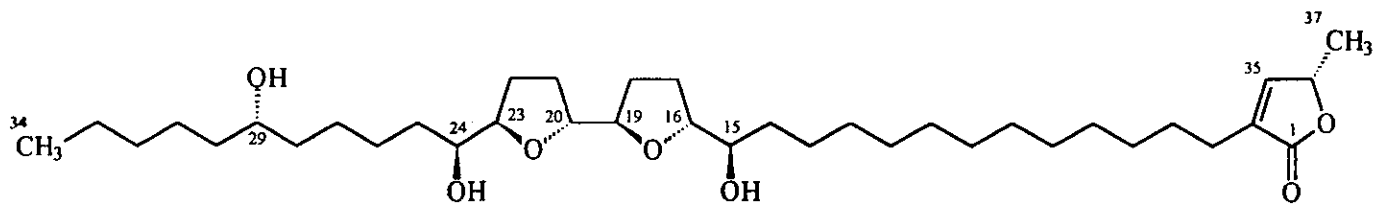
Espectro 56. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la esquamocina (29).



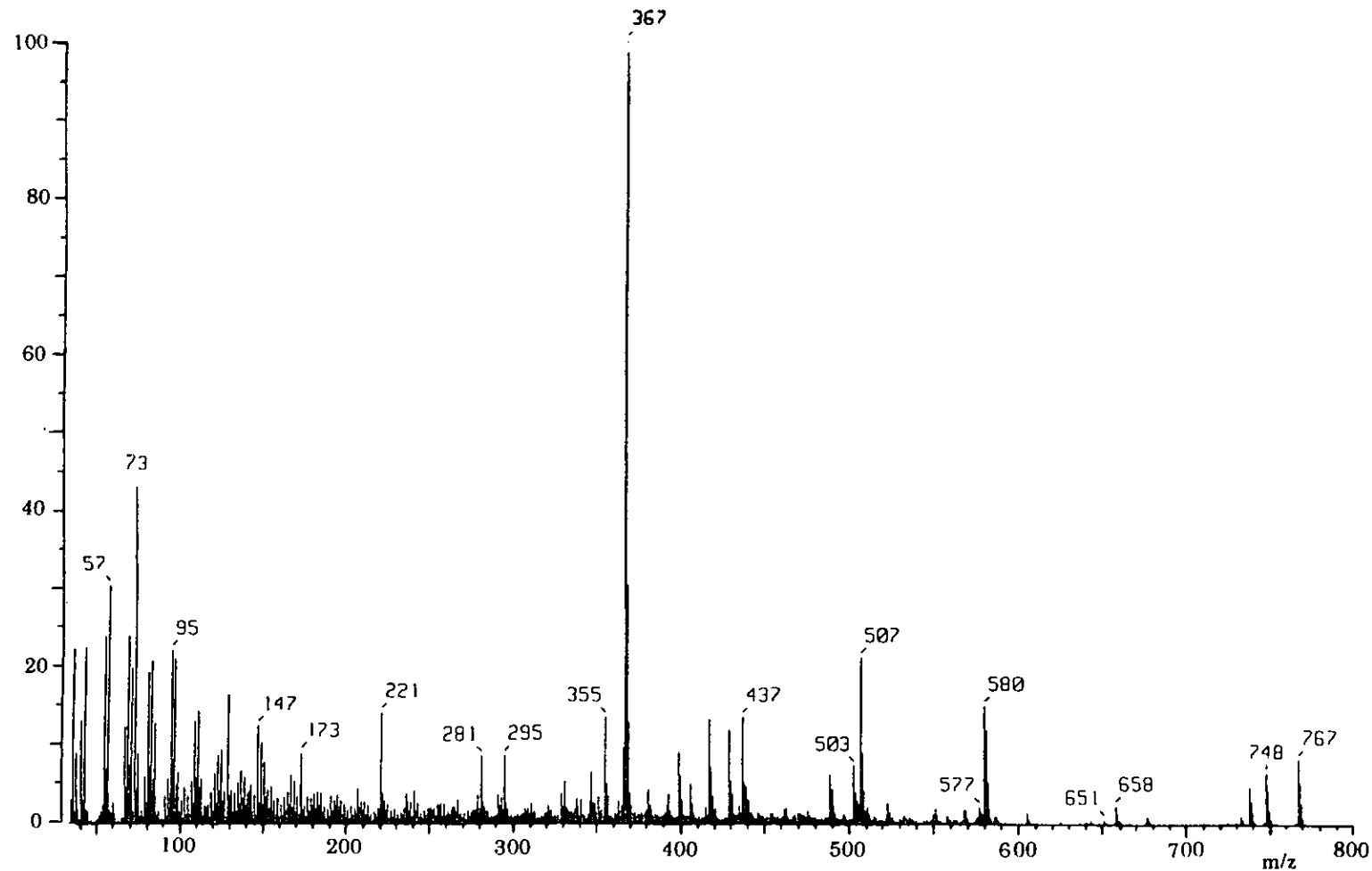
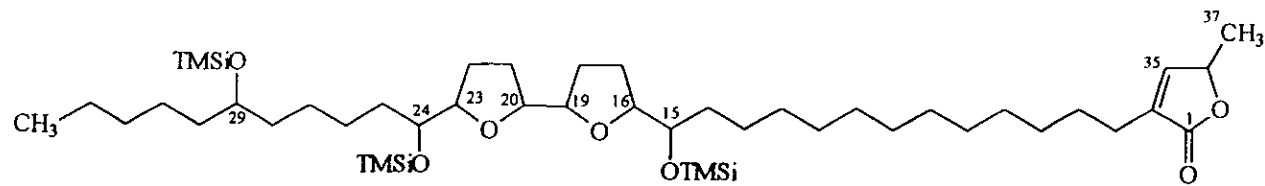
**Espectro 57.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT de la esquamocina (29).



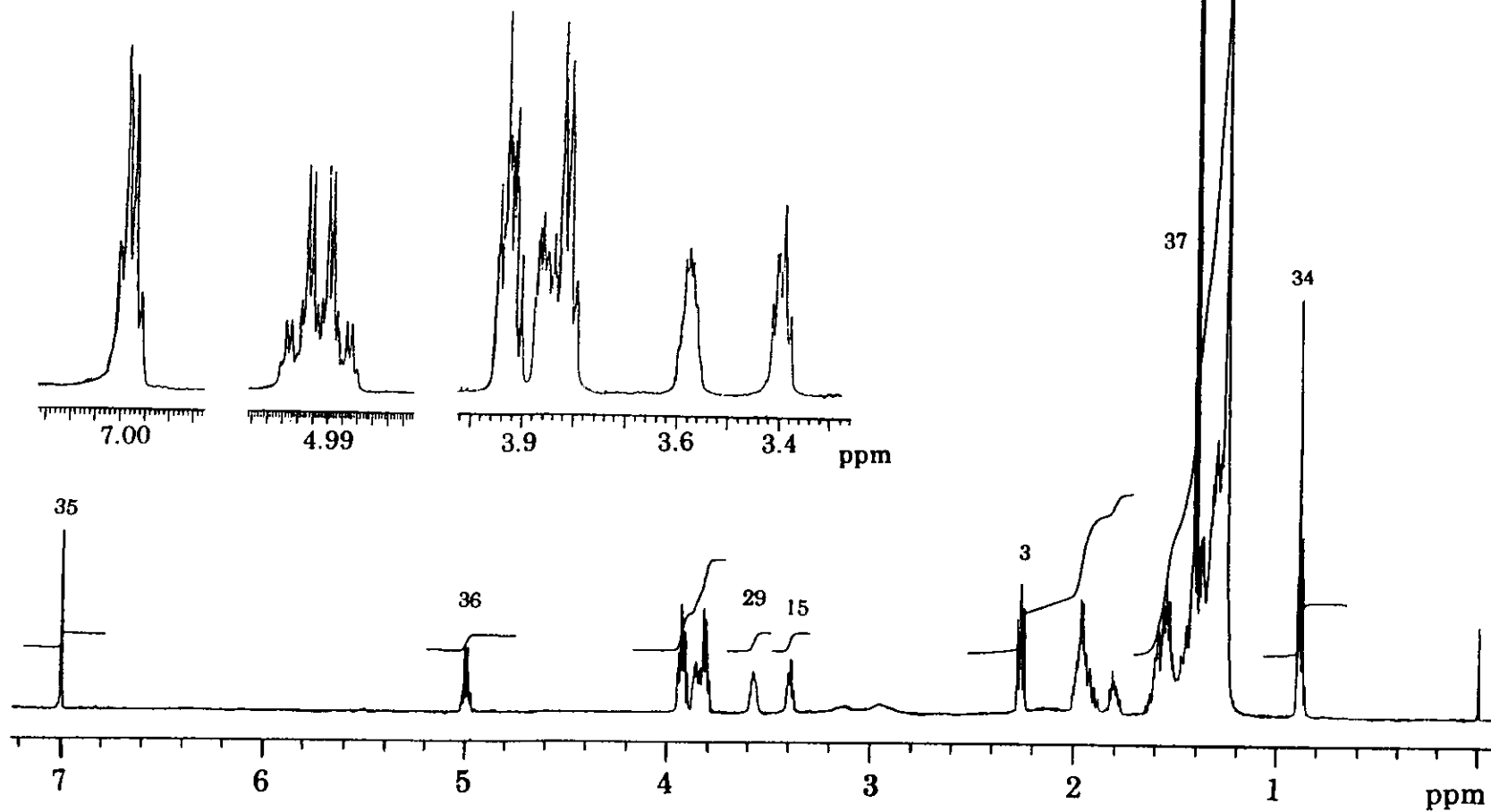
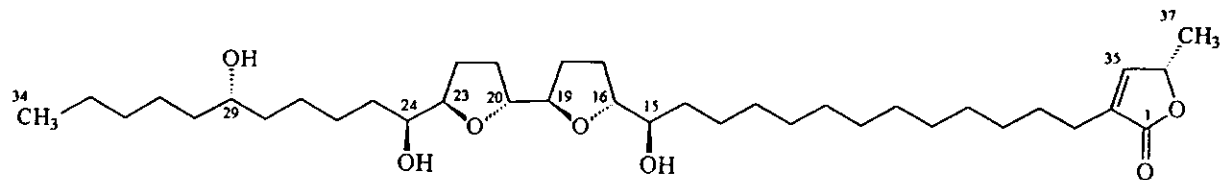
Espectro 58. Espectro en el IR de la motrilina (59).



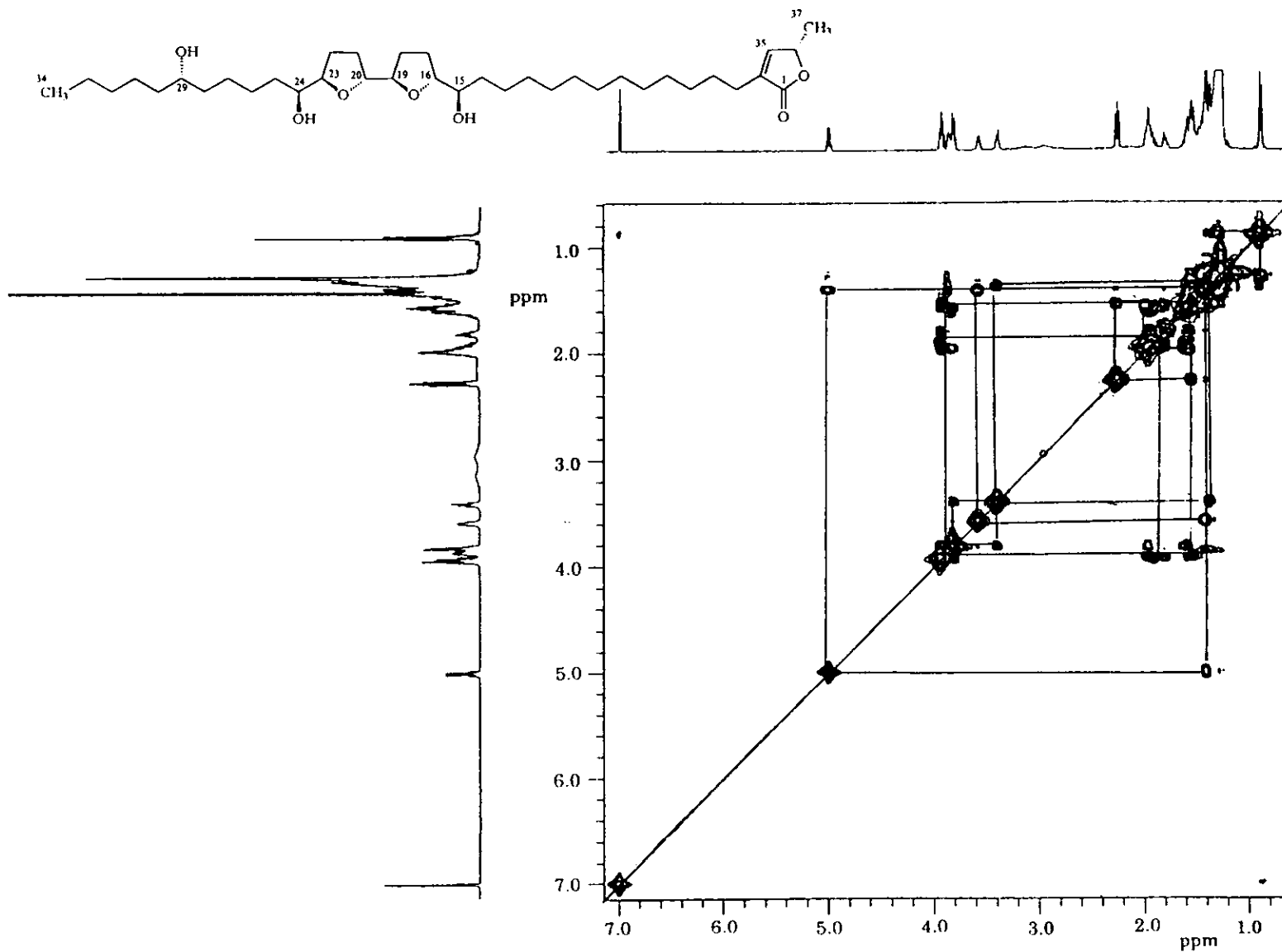
**Espectro 59.** Espectro de masas de la motrilina (59).



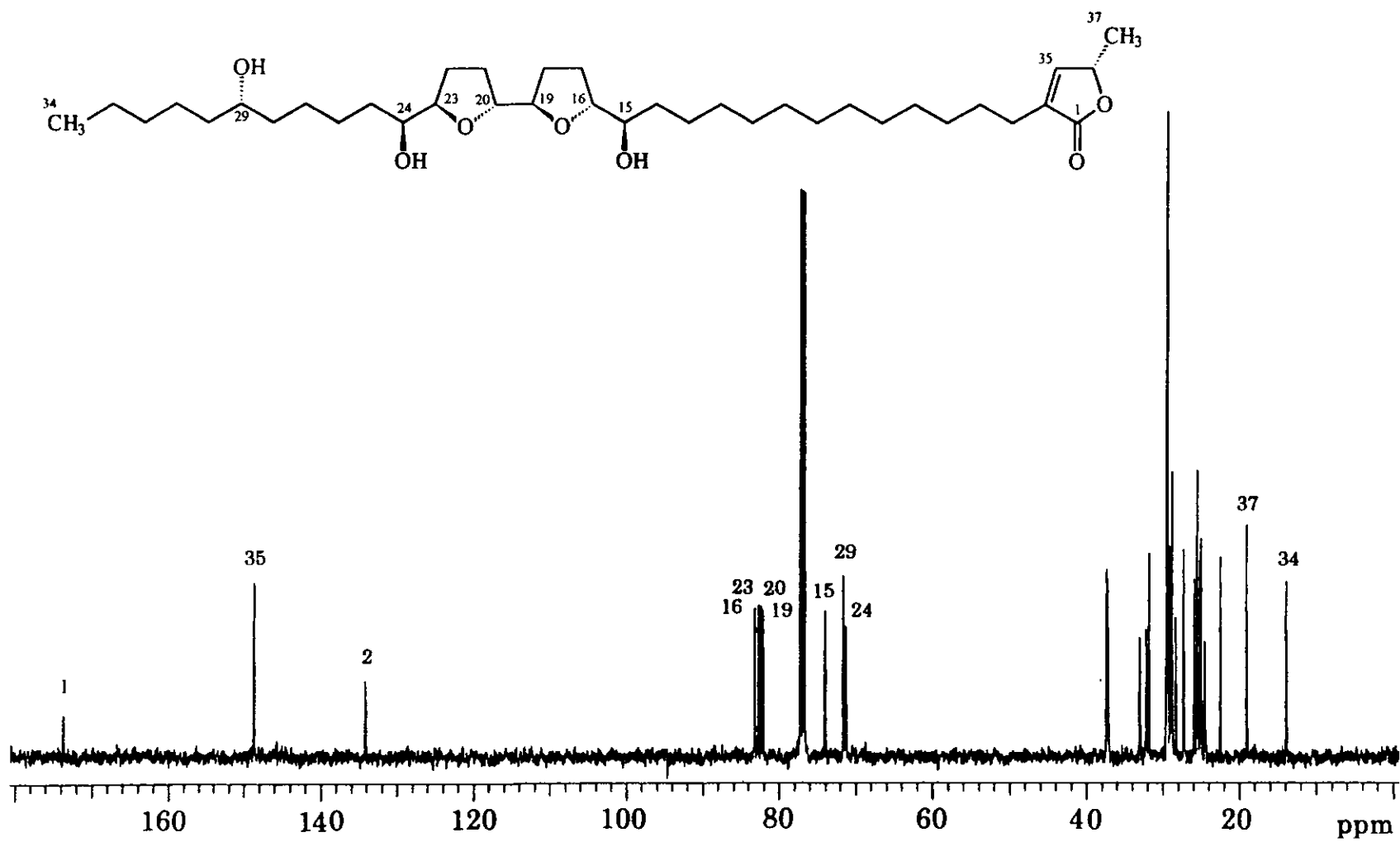
**Espectro 60.** Espectro de masas del derivado sililado de la motrilina (59).



Espectro 61. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la motrilina (59).

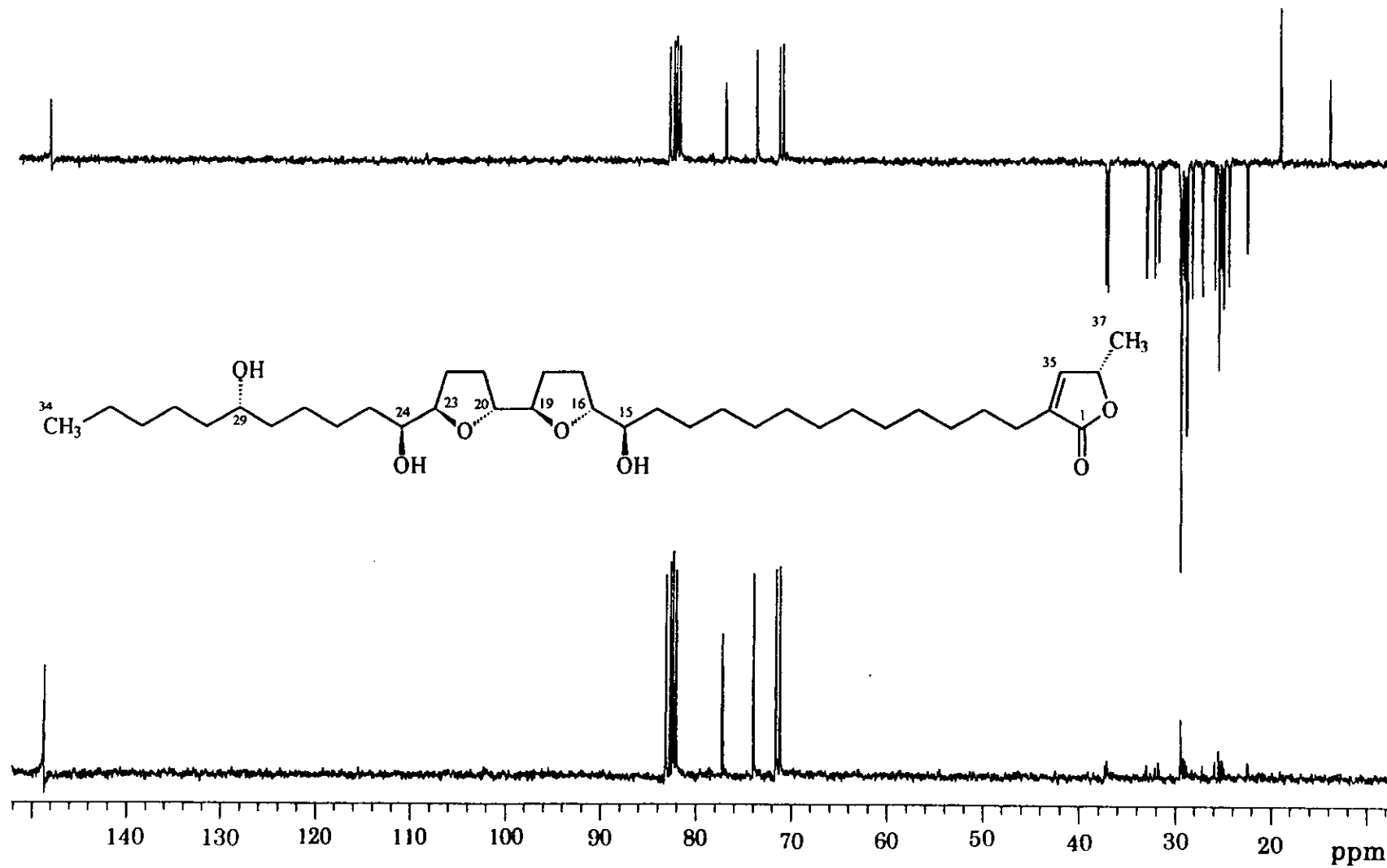


Espectro 62. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  COSY de la motrilina (59).



Espectro 63. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la motrilina (59).





**Espectro 64.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT de la motrilina (59).