

00582

8

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ACETOGENINAS DE ANONACEAS CON ESTRUCTURA NOVEDOSA Y ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA POTENCIAL DE *Annona purpurea* Y *Rollinia mucosa*”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS (F A R M A C I A) P R E S E N T A M O S M. en C. DANIEL CHAVEZ VELASCO



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1998

267648



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Leovigildo Quijano
Primer Vocal: Dra. Rosalinda Contreras Theurel
Segundo Vocal: Dr. Jerry L. McLaughlin
Tercer Vocal: Dr. Guillermo Delgado Lamas
Secretario: Dr. Rogelio Pereda Miranda
Primer Suplente: Dr. Héctor Luna Contla
Segundo Suplente: Dr. Carlos Cerda Rojas

Sustentante:


M. en C. Daniel Chávez Velasco

Asesor:


Dra. Rachel Mata Essayag.

Sitios de realización de la tesis.

Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

Laboratorio 6 de la Unidad de Plantas Medicinales del Instituto de Química de la UNAM.

Laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM (Realización de los ensayos para determinar el efecto de acetogeninas selectas sobre varias actividades fotosintéticas).

Laboratorio 5 de la Estación de Investigaciones Marinas "Puerto Morelos" del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM: Realización de los ensayos de fluorescencia.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguiente proyectos: DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN205197; CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) convenio 400313-5-2576 PM; PADEP (Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado) Nos. 005358, 005379 y 005321.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Blas Lotina Henssen, Investigador del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, y quien fungió como cotutor del presente trabajo, agradezco de manera especial su valiosa dirección para la determinación del efecto de acetogeninas selectas sobre diversas actividades fotosintéticas.

Al Biólogo Gustavo Carmona Díaz por la recolección e identificación del material vegetal utilizado en el estudio.

Al Dr. Jerry McLaughlin, Investigador de la Universidad de Purdue, Indiana, E.U.A. por facilitar los trámites necesarios para la determinación de la actividad citotóxica de los extractos, fracciones y compuestos obtenidos en el presente estudio.

Al Dr. Roberto Iglesias Prieto, Investigador de la Estación de Investigaciones Marinas "Puerto Morelos" del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por su asesoría durante la realización de los ensayos de fluorescencia de las acetogeninas escuamocina, bulatacina y motrilina.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatríz Quiroz del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de la mayoría de los espectros de RMN de los compuestos obtenidos de la especie *Annona purpurea*.

A la Q.F.B. Rocío Patiño del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de UV, IR, rotación óptica y dicroísmo circular.

A las Q.F.B. Graciela Chávez y Marisela Gutiérrez de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de algunos espectros de IR y UV.

A la Q. Georgina Duarte Lisci y el M. en C. José Luis Gallegos Pérez de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas de la jimenezina, de las amidas de la triptamina y de todos los de alta resolución.

A la M. en C. Nuria Esturau Escofet, la Q.F.B. Rosa Isela Del Villar Morales y el Q.F.B. Oscar S. Yañez Muñoz de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de algunos espectros de RMN.

Al I.Q. Luis Velasco Ibarra y el M. en C. Javier Pérez Flores del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas de las acetogeninas de *Annona purpurea*.

Al M. en C. Atilano Gutiérrez de la UAM-Iztapalapa por el registro de los espectros de RMN (500 MHz) de la jimenezina.

A la Q.F.B. Leda C. Gómez y a las M. en C. Laura A. Acevedo y Alicia Hernández por su valiosa asistencia técnica.

A la Q.F.B. Beatriz King Díaz, al M. en C. Lahoucine Achnine y a la Q.F.B. Jacqueline Fernández del laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica, por la ayuda técnica brindada durante la determinación del efecto de las acetogeninas escuamocina, bulatacina y motrilina sobre algunas actividades fotosintéticas.

A Mónica Espíndola Mata por su valiosa colaboración en la revisión y corrección del estilo de la presente disertación.

A los miembros de mi comité tutelar integrado por los doctores Leovigildo Quijano y Rafael Castillo Bocanegra por el apoyo brindado durante la realización del presente proyecto de tesis. También agradezco todos los consejos oportunos proporcionados por el Dr. Rafael Castillo durante la obtención de algunos derivados de los productos naturales aislados en el presente estudio.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones

Por último, deseo agradecer a la Dra. Rachel Mata su guía y enseñanzas, pilares fundamentales de mi formación académica.

DEDICATORIAS

A Daniel Héctor:

Mi amado hijo.

A María Sánchez:

Mi adorable esposa, por estar a mi lado.

A mis Padres:

José Chávez,

Reyna Velasco.

Por darme la vida y por su apoyo incondicional.

A mis hermanos:

Jaime,

Sara,

Gerardo,

Arturo,

Por los lazos que nos unen.

A mis sobrinos:

Jaime Dean,

Alesia Sibia

Con cariño.

A mis amigos de siempre:

Sandra Mendoza, Silvia Montiel, Cesar Flores, Juan Manuel Portillo, Luis Santos,
Mario Martínez y Alejandro Martínez

A mis amigos y compañeros del laboratorio 124, en especial a:

Blanca Rivero, Isabel Rivero, Laura A. Acevedo, Leda Gómez, Teresa Gutiérrez,
Fausto Rivero, José Luis Trejo y Samuel Estrada.

A mis grandes amigos:

Alicia Hernández, Mabel Fragoso, Fernando Soto, Isaac A. Olabode, Moustapha Bah
y Sergio Rodríguez.

A los amigos de "Bioquímica":

Bety, Susana, Lahoucin y Pilo.

Al Dr. Andres Navarrete y al Dr. Rafael Castillo, por su amistad y enseñanzas.

A los profesores del Departamento de Farmacia:

M. en C. Angela Sotelo, Dra. Isabel Aguilar, Dr. Eugene A. Bratoeff,
M. en C. Francisco Hernández y Dr. Rogelio Pereda.

A la Dra Rachel Mata, con admiración y respeto.

INDICE

Resumen	vi
Abstract	x
<hr/>	
Lista de abreviaturas	xiii
Lista de Cuadros	xv
Lista de Esquemas	xviii
Lista de Figuras	xix
Lista de Espectros	xxiv
I INTRODUCCION	1
II ANTECEDENTES	15
2.1 ANTECEDENTES DE ACETOGENINAS DE ANONACEAS.	15
2.1.1 Consideraciones generales de las acetogeninas de anonáceas.	15
2.1.2 Clasificación químico-estructural de las acetogeninas de las acetogeninas de anonáceas.	18
2.1.3 Biosíntesis de las acetogeninas de anonáceas.	29
2.1.4 Actividades biológicas de acetogeninas de anonáceas.	31
2.1.5 Mecanismo de acción de las acetogeninas de anonáceas.	34
2.1.6 Relacion estructura química-actividad.	36
2.2 ANTECEDENTES SOBRE <i>Annona purpurea</i>	38
2.2.1 Descripción botánica de la especie.	38
2.2.2 Distribución.	40
2.2.3 Nombres comunes.	40
2.2.4 Propiedades medicinales e importancia económica.	41
2.2.5 Antecedentes fitoquímicos.	41
2.3 ANTECEDENTES SOBRE <i>Rollinia mucosa</i>	44
2.3.1 Descripción botánica de la especie.	44
2.3.2 Distribución.	46
2.3.3 Nombres comunes.	47

2.3.4 Propiedades medicinales e importancia económica.	48
2.3.5 Estudios químicos.	49
III JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	59
3.1 JUSTIFICACION.	59
3.2 OBJETIVOS GENERALES.	61
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES.	62
IV EXPERIMENTAL	64
4.1 MATERIAL VEGETAL.	64
4.2 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES EN PEQUEÑA ESCALA PARA REALIZAR EL PROCESO DE SELECCION.	65
4.3 ENSAYOS BIOLOGICOS.	65
4.3.1 Determinación de la toxicidad para <i>Artemia salina</i> Leach.	65
4.3.2 Determinación de la actividad citotóxica.	66
4.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS.	66
4.5 ESTUDIO QUIMICO DE LAS SEMILLAS DE <i>Annona purpurea</i>	68
4.5.1 Extracción y fraccionamiento.	68
4.5.2 Separación mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de las acetogeninas presentes en las fracciones activas F ₅ y F ₇ derivadas de la fracción metanólica acuosa (10%) de <i>A. purpurea</i>	70
4.5.2.1 Aislamiento de la bulatacina (16), la escuamocina (80) y la motrilina (97) a partir de la fracción activa F ₅	71
4.5.2.2 Aislamiento de la purpurediolina (98), la purpurenina (99), la purpuracena (100), la anoglaucina (101), la xilomatenina (102) y la anonacina A (21) a partir de la fracción activa F ₇	71
4.6 ESTUDIO QUIMICO DE LAS SEMILLAS DE <i>Rollinia mucosa</i>	72
4.6.1. Extracción y fraccionamiento.	72

4.8.3.2 Determinación de la velocidad del transporte de electrones desacoplado no cíclico de H ₂ O a MV.	82
4.8.3.3 Determinación de la velocidad del transporte de electrones fosforilante no cíclico de H ₂ O a MV.	83
4.8.4 Determinación de la velocidad del transporte de electrones en los fotosistemas I y II.	83
4.8.4.1 Determinación de la velocidad del transporte de electrones en el fotosistema I de DCPIP _{red} a MV.	83
4.8.4.2 Determinación de la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H ₂ O a DCPIP.	84
4.8.4.3 Determinación de la velocidad del transporte de electrones en el fotosistema II de H ₂ O a SiMo.	84
4.8.4.4 Determinación de la velocidad del transporte de electrones en el fotosistema II de DPC a DCPIP.	85
4.8.5 Aislamiento y ensayo de la actividad de la Mg ²⁺ -ATPasa.	86
4.6.7 Ensayo de fluorescencia.	87
V RESULTADOS Y DISCUSION	88
5.1 OBTENCION DE LAS ACETOGENINAS CITOTOXICAS DE <i>Annona purpurea</i>	92
5.1.1 Aislamiento y purificación de las acetogeninas de <i>Annona purpurea</i>	92
5.1.2 Elucidación estructural de las acetogeninas aisladas de <i>A. purpurea</i>	99
5.1.2.1 Elucidación estructural de la purpurediolina (98) y de la purpurenina (99).	101
5.1.2.2 Elucidación estructural de la purpuracenina (100) y de la anoglaucina (101).	120
5.2 OBTENCION DE LOS COMPUESTOS DE <i>Rollinia mucosa</i>	134
5.2.1 Aislamiento y purificación de los compuestos de <i>Rollinia mucosa</i> . ..	134

4.6.2 Separación mediante CLAR de los compuestos presentes en las fracciones activas secundarias F ₄ y F ₆ de <i>R. mucosa</i>	72
4.6.2.1 Aislamiento de la jimenezina (103).	73
4.6.2.2 Aislamiento de los compuestos presentes en la fracción activa F ₄	74
4.7 CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.	75
4.7.1 Equipos utilizados.	75
4.7.2 Obtención de los derivados sililados.	76
4.7.3 Preparación del acetónido de la purpurediolina (98a).	76
4.7.4 Reacción de translaconización para la purpuracena (100) y la anoglaucina (101).	77
4.7.5 Obtención de los ésteres de Mosher.	77
4.7.6 Hidrólisis ácida de la mezcla de N-aciltriptaminas (104) y de la N-lignoceroiltriptamina (105).	78
4.7.7 Obtención del derivado metilado del ácido lignocérico (106a) generado por hidrólisis de la N-lignoceroiltriptamina (105).	78
4.7.8 Obtención de los derivados metilados de los ácidos grasos (107a) generados por hidrólisis de la mezcla de N-aciltriptaminas (104).	78
4.7.9 Prueba de Erlich.	79
4.8 EVALUACION DEL EFECTO DE LAS ACETOGENINAS ESCUAMOCINA (80), BULATACINA (16) Y MOTRILINA (97) SOBRE VARIAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE HOJAS DE ESPINACAS.	79
4.8.1 Aislamiento de cloroplastos y cuantificación de clorofila.	79
4.8.2 Cuantificación de la velocidad de la síntesis de ATP.	80
4.8.3 Determinación de la velocidad del transporte de electrones no cíclico de H ₂ O a MV.	81
4.8.3.1 Determinación de la velocidad del transporte de electrones basal no cíclico de H ₂ O a MV.	82

5.2.2 Elucidación estructural de la jimenezina (103).	138
5.2.3 Elucidación estructural de la N-lignoceroilriptamina (105).	150
5.2.4 Elucidación estructural de los compuestos presentes en la mezcla de N-acilriptaminas (104).	155
<hr/>	
5.3 ACTIVIDAD CITOTOXICA DE LOS COMPUESTOS QUE FUERON AISLADOS DE <i>Annona purpurea</i> Y <i>Rollinia mucosa</i>	161
5.4. EVALUACION DE LA ESCUAMOCINA (80), LA BULATACINA (16) Y LA MOTRILINA (97), SOBRE DIVERSAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS.	163
5.4.1 Efecto de las acetogeninas sobre la síntesis de ATP.	164
5.4.2 Efecto de las acetogeninas sobre la velocidad del transporte de electrones.	166
5.4.3 Efecto de las acetogeninas en las reacciones parciales de la cadena Redox en el transporte de electrones a nivel de los fotosistemas I y II.	171
5.4.4 Efecto de las acetogeninas en la actividad de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa.	179
VI CONCLUSIONES	181
VII PERSPECTIVAS GENERALES DE LA PRESENTE INVESTIGACION ...	185
VIII BIBLIOGRAFIA	186
ANEXO I Espectros.	201
ANEXO II Resultados generales de las evaluaciones realizadas con las acetogeninas escuamocina (80), bulatacina (16) y motrilina, sobre diversas actividades fotosintéticas.	295
ANEXO III Artículos generados de la presente investigación.	301
ANEXO IV Determinación del potencial insecticida de la jimenezina (103).	318

Resumen

Como parte de un estudio sistemático de anonáceas mexicanas, el presente proyecto de tesis doctoral describe la investigación química y la evaluación del potencial antineoplásico de los metabolitos secundarios aislados de las semillas de *Annona purpurea* y *Rollinia mucosa*, recolectadas en la región de los Tuxtlas, Veracruz, México.

La selección de las especies vegetales, objeto de este estudio, se realizó con base en los resultados obtenidos durante la determinación de la toxicidad para *Artemia salina* de una serie de extractos orgánicos que fueron elaborados a partir de las diferentes partes vegetales de diversas especies de anonáceas mexicanas, las cuales se preseleccionaron de acuerdo con los criterios etnomédico y quimiotaxonómico. Posteriormente, se comprobó que los extractos íntegros de las semillas de *A. purpurea* y *R. mucosa* presentaban un efecto citotóxico significativo en contra de seis líneas celulares derivadas de tumores humanos.

El fraccionamiento biodirigido del extracto citotóxico, el cual fue obtenido de las semillas de *A. purpurea*, empleando como bioensayo de monitoreo la toxicidad para *A. salina* y como técnica de separación la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), condujo al aislamiento de nueve acetogeninas. Tres de estos compuestos resultaron ser productos naturales novedosos y se les asignaron los nombres triviales de purpurediolina, purpurenina y purpuracenina. Las seis acetogeninas restantes se identificaron como anoglaucina, xilomatenina, anonacina A, escuamocina, bulatacina y motrilina.

El estudio biodirigido del extracto activo de las semillas de *R. mucosa*, permitió el aislamiento de una acetogenina con un esqueleto novedoso que se designó con el nombre trivial de jimenezina. De manera adicional, se separó una mezcla constituida por ocho amidas de la triptamina. Cromatografías sucesivas de la mezcla de amidas mediante la aplicación de la CLAR, permitió la purificación de la amida mayoritaria la cual se caracterizó como la N-lignoceroiltriptamina. La hidrólisis ácida de la mezcla de amidas y la posterior formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes permitió la caracterización de las siete amidas restantes mediante el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de los ésteres metílicos. Las siete amidas se identificaron como N-palmitoiltriptamina, N-estearoiltriptamina, N-araquinoiltriptamina, N-behenoiltriptamina, N-tricosanoiltriptamina, N-hienoiltriptamina y N-cerotoiltriptamina. Las ocho triptamidas representan también productos naturales novedosos.

De manera general, la elucidación estructural de los productos naturales se realizó mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos y quirópticos. Para determinar la estereoquímica absoluta en los diferentes centros estereogénicos de la anoglaucina y de las nuevas acetogeninas, se utilizó la metodología avanzada de los ésteres de Mosher y la técnica de dicroísmo circular.

El potencial antineoplásico de las acetogeninas aisladas se determinó mediante la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* sobre seis líneas celulares derivadas de tumores humanos. De las acetogeninas obtenidas de *A. purpurea*, se evaluaron los tres productos novedosos (purpurediolina, purpurenina y purpuracenina), así como la anoglaucina y la anonacina A, cuyas propiedades citotóxicas no habían sido

descritas en la literatura. De *R. mucosa* se evaluó la jimenezina. Las seis acetogeninas revelaron una gran actividad citotóxica, destacando la selectividad demostrada por la purpurediolina y la anoglaucina contra la línea celular de adenocarcinoma de colon ($CE_{50} < 10^{-7} \mu\text{g/mL}$). La purpuracena presenta un efecto selectivo sobre las líneas celulares de carcinoma de pulmón ($CE_{50} 4.8 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$), de riñón ($CE_{50} < 10^{-3} \mu\text{g/mL}$) y adenocarcinoma de próstata ($CE_{50} < 10^{-3} \mu\text{g/mL}$). La purpurenina y la anonacina A afectan a todas las líneas celulares en menor grado que el control positivo utilizado (la adriamicina); las CE_{50} calculadas para estos compuestos oscilan entre los 0.3 y 2.0 $\mu\text{g/mL}$. Por último, la jimenezina demostró una gran actividad en contra de cinco de las seis líneas celulares ensayadas (excepto en la línea de carcinoma de mama).

De manera adicional, y con la finalidad de contribuir al conocimiento general de las actividades biológicas de las acetogeninas de anonáceas, se evaluó el efecto de los productos mayoritarios de las semillas de *Annona purpurea* sobre el proceso de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de espinacas. Estos compuestos incluyen a la escuamocina, la bulatacina y la motrilina. Los compuestos estudiados inhiben significativamente la síntesis de ATP de manera dependiente de la concentración ($CE_{50} = 41.7-114.8 \mu\text{M}$). Posteriormente, se dilucidó el mecanismo con el que ejercen esta actividad. Para ello se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de los tres compuestos sobre el transporte de electrones basal, desacoplado y fosforilante. Los resultados obtenidos permitieron proponer que los tres productos actúan como agentes desacoplantes e inhibidores de la reacción de Hill. Por otra parte, el efecto estimulante sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa inducido

por la escuamocina, la bulatacina y la motrilina permitió comprobar las propiedades desacoplantes de las mismas.

Con el objetivo de establecer el blanco de acción de los compuestos de prueba, se determinó su efecto a nivel de los fotosistema I y II utilizando inhibidores, donadores y aceptores artificiales de electrones. La evidencia experimental permite ubicar el sitio de inhibición en el lado donador del FS II, a nivel del complejo enzimático que cataliza la fotólisis del agua. La confirmación del blanco de acción se realizó utilizando ensayos de fluorescencia.

Abstract

In the course of our search on Mexican Annonaceae as sources of antineoplastic agents, the seeds of *Annona purpurea* and *Rollinia mucosa* were chemically and biologically investigated.

Three new bis-THF acetogenins, purpurediolin, purpurenin and purpuracenin were isolated from the fractionated CHCl_3 -MeOH extracts of the seeds of *A. purpurea*, using the brine shrimp lethality test at each step for activity-directed fractionation. In addition, six known acetogenins, namely, annoglaucin, xylomatenin, annonacin A, squamocin, bullatacin and motrilin, were obtained.

Investigation on the seeds of *R. mucosa* led to the isolation of a new cytotoxic acetogenin containing a hydroxylated tetrahydropyran ring along with an adjacent tetrahydrofuran ring and representing a novel carbon skeleton. The new compound was given the trivial name of jimenezin. In addition, a mixture of eight novel tryptamine amides was separated. Extensive HPLC allowed the isolation of the major component of the mixture, which was characterized as N-lignoceroyltryptamine. The remaining amides were identified as N-palmitoyltryptamine, N-stearoyltryptamine, N-arachinoyltryptamine, N-behenoyltryptamine, N-tricosanoyltryptamine, N-hyenoyltryptamine and N-cerotoyltryptamine by GC-MS analysis of the methyl ester derivatives of the fatty acids obtained by acid hydrolysis (H_2SO_4 8 M) of the mixture.

The isolated annonaceous acetogenins were identified by a combination of chemical and spectral methods including MS and NMR measurements. The absolute

configuration of the novel acetogenins and annoglucin was determined using advanced Mosher ester methodology and by CD measurements.

The novel acetogenins, annoglucin and annonacin A were cytotoxic to six human solid tumor cell lines in seven-day MTT test using adriamycin as the positive control. Purpurediolin and annoglucin showed high selectivity against human colon adenocarcinoma cell line ($ED_{50} < 10^{-7}$ $\mu\text{g/mL}$). On the other hand, purpuracenin displayed selectivity against human lung carcinoma ($ED_{50} 4.8 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$), human breast carcinoma ($ED_{50} < 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$) and human prostate adenocarcinoma ($ED_{50} < 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$) cell lines. Purpurenin and annonacin A were less cytotoxic than the positive control for the six cell lines (ED_{50} 0.3-2.0 $\mu\text{g/mL}$) and jimenezin was significantly cytotoxic against all lines but human breast carcinoma.

A number of biological properties, including oxidative phosphorylation-inhibitory activity, have been described for acetogenins. However, their effect on photophosphorylation remains unexplored. Therefore, in order to contribute to the knowledge of the biological properties of this important group of secondary metabolites, the effect of the mayor acetogenins (squamocin, bullatacin, and motrilin) isolated from *A. purpurea* was evaluated on different photosynthetic activities in chloroplasts isolated from spinach leaves. Squamocin, bullatacin, and motrilin inhibited ATP synthesis and uncoupled electron flow in a concentration dependent manner. The three acetogenins stimulated basal electron flow. On the other hand, squamocin and motrilin inhibited phosphorylating electron flow at concentrations lower than 100 μM . Treatment with higher concentrations of both compounds

stimulated this electron flow. Bulatacin, however, inhibited phosphorylating electron flow in a concentration dependent manner. The three compounds also stimulated Mg^{2+} -ATPase activity from bound membrane thylacoid chloroplasts. The overall results indicate that the evaluated acetogenins behave as Hill reaction inhibitors and as uncouplers.

In order to localize the site of inhibition on the electron transport pathway, the effect of the natural products on partial reactions (photosystem I and II) was measured using artificial electron donors, electron acceptors and appropriate inhibitors. None of the acetogenins affect photosystem I but, they inhibited photosystem II. The target was located at the water-splitting enzymes by polarographic and fluorescence measurements.

Lista de abreviaturas

Å	Amstrong	ADN	Acido desoxirribunocleico
ADP	Adenosina difosfato	ARN	Acido ribunocleico
ATP	Adenosina trifosfato	°C	Grado centígrado
ccf	Cromatografía en capa fina	CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CE ₅₀	Concentración efectiva media	CL ₅₀	Concentración letal media
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas		
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución		
cm	Centímetro	CHCl ₃	Cloroformo
d	Doblete	DC	Dicroismo circular
DBMIB	Dibromometilisopropil- <i>p</i> -benzoquinona		
DCMU	3-(3,4,diclorofenil)-1,1-dimetilurea		
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol	dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble	dddd	Doble de doble de doble de doble
DPC	Difenilcarbazida	EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EM-IE	Espectro de masas por impacto electrónico		
FAB	Bombardeo rápido de átomos	FS I	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II	HCl	Acido clorhidrico
Hex	Hexano	<i>i</i> PrOH	Isopropanol
IR	Infrarrojo	<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo	L	Litro
M	Metro	MeOH	Metanol

mg	Miligramo	MHz	Megahertz
mL	Mililitro	mm	Milímetro
ms	Milisegundo	MV	Metilviológeno
MTPA	Acido α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético		
NADH	Dinucleótido de adenina y dihidronicotinamida		
NBA	Alcohol nitrobencílico	NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
pf	Punto de fusión	Ph	Fenilo
P _i	Fosfato inorgánico	ppm	Partes por millón
q	Cuarteto	qq	Cuarteto de cuarteto
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13		
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica		
RMN ¹³ C-DEPT	Resonancia magnética nuclear de carbono 13 con desacoplamiento de los núcleos de hidrógeno		
RMN ¹ H- ¹³ C-HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear múltiple (¹ H- ¹³ C)		
RMN ¹ H- ¹³ C-HMQC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear (¹ H- ¹³ C)		
RMN ¹ H-COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear (¹ H- ¹ H)		
RMN ¹ H-NOESY	Espectroscopía bidimensional por efecto nuclear de Overhauser (¹ H- ¹ H)		
SiMo	Silicomolibdato de sodio	t	Triplete
TAS	Toxicidad para <i>Artemia salina</i>	THF	Tetrahidrofurano
THP	Tetrahidropirano	TMS	Tetrametilsilano

TMSi	Tetrametilsilil	t_R	Tiempo de retención
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano	UV	Ultravioleta
μg	Microgramo	μL	Microlitro
μm	Micrometro	μs	Microsegundo

A-498	Carcinoma de riñón
A-549	Carcinoma de pulmón
HT-29	Adenocarcinoma de colon
MCF-7	Carcinoma de mama
PACA-2	Carcinoma de páncreas
PC-3	Adenocarcinoma de próstata

Lista de Cuadros

Cuadro 1.	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina de las fracciones obtenidas durante el proceso de fraccionamiento del extracto activo de <i>A. purpurea</i>	67
Cuadro 2.	Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción metanólica acuosa (10%) obtenida a partir del extracto íntegro de <i>A. purpurea</i>	70
Cuadro 3.	Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción metanólica acuosa (10%) obtenida a partir del extracto íntegro de <i>R. mucosa</i>	74

Cuadro 4.	Toxicidad para <i>A. salina</i> de los extractos cloroformo-metanólicos de diferentes especies de la familia de las anonáceas.	91
Cuadro 5.	Actividad citotóxica del extracto y de las fracciones secundarias F ₅ y F ₇ de las semillas de <i>A. purpurea</i>	93
Cuadro 6.	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la purpurediolina (98).	102
Cuadro 7.	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la purpurenina (99).	103
Cuadro 8.	Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C de la purpurediolina (98).	104
Cuadro 9.	Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C de la purpurenina (99).	105
Cuadro 10.	Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ¹ H de los hidrógenos carbinólicos de dioles de tipo <i>treo</i> y <i>eritro</i> y los metinos y metilos de los cetales correspondientes (Wu <i>et al.</i> , 1995b) con aquellos de 98 y 98b	110
Cuadro 11.	Desplazamientos químicos en RMN de la subunidad bis-THF adyacentes con diferentes configuraciones relativas.	113
Cuadro 12.	Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C diagnósticos de la estereoquímica relativa entre el anillo de THF y el carbinol adyacente (Born <i>et al.</i> , 1990).	114
Cuadro 13.	Desplazamientos químicos (RMN ¹ H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la purpurediolina 98s y 98r	117
Cuadro 14.	Desplazamientos químicos (RMN ¹ H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la purpurenina 99s y 99r	117
Cuadro 15.	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la purpuracénina (100).	121
Cuadro 16.	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la anoglaucina (101).	122

Cuadro 17.	RMN ¹ H de la purpuracena (100), el compuesto 101 y los datos previamente descritos para la anoglaucina (Etcheverry <i>et al.</i> , 1995).	125
Cuadro 18.	RMN ¹³ C de la purpuracena (100), el compuesto 101 y los datos previamente descritos para la anoglaucina (Etcheverry <i>et al.</i> , 1995).	126
Cuadro 19.	Desplazamientos químicos (RMN ¹ H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la purpuracena (100) y la anoglaucina (101).	129
Cuadro 20.	Desplazamientos en RMN ¹ H de los ésteres de Mosher (S y R) de los modelos sintéticos de las butenólidas I y II. La butenólida I esta constituida por la mezcla racémica (4S/36R + 4R/36S) y la butenólida II corresponde al isómero 4S/36S.	131
Cuadro 21.	Resonancias parciales de RMN ¹ H de las mezclas epiméricas de la isopurpuracena (100t) y la iso-anoglaucina (101t).	133
Cuadro 22.	Desplazamientos químicos (RMN ¹ H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de los derivados translactonizados 100t y 101t.	134
Cuadro 23.	Actividad citotóxica del extracto total obtenido de las semillas de <i>R. mucosa</i>	135
Cuadro 24.	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la jimenezina (103).	140
Cuadro 25.	Desplazamiento químicos de RMN ¹ H y ¹³ C de la jimenezina (103).	141
Cuadro 26.	Desplazamiento químicos en RMN de la mucocina (41) y la muconina (42) (Shi <i>et al.</i> , 1995b; Shi <i>et al.</i> , 1996a).	143
Cuadro 27.	Desplazamientos químicos (RMN ¹ H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la jimenezina (103).	149
Cuadro 28.	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la N-lignoceroiltryptamina (105).	151

Cuadro 29.	Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de la N-lignoceroil triptamina (105).	153
Cuadro 30.	Correlaciones observadas en los espectros de de RMN ^1H -COSY, RMN ^1H -NOESY y RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la N-lignoceroil triptamina (105).	154
Cuadro 31.	N-acil triptaminas detectadas en el espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la mezcla de N-acil triptaminas (104).	157
Cuadro 32.	Acidos grasos derivados de la hidrólisis ácida de la mezcla de N-acil triptaminas (104) identificados como sus ésteres metílicos (107a) en CG-EM.	159
Cuadro 33.	Resultados de toxicidad para <i>A. salina</i> y citotoxicidad de las acetogeninas aisladas de <i>A. purpurea</i> y de <i>R. mucosa</i>	163
Cuadro 34.	Efecto inhibitorio de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en la síntesis de ATP.	166

Lista de Esquemas

Esquema 1.	Extracción y fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico (1:1) de las semillas de <i>A. purpurea</i>	69
Esquema 2.	Extracción y fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico (1:1) de las semillas de <i>R. mucosa</i>	73
Esquema 3.	Diagrama de extracción y fraccionamiento primario para obtener fracciones ricas en acetogeninas de anonáceas a partir de las materias primas (Rupprecht <i>et al.</i> , 1990).	94

Lista de Figuras

Figura 1.	Etapas del desarrollo de un tumor (Weinberg, 1997).	3
Figura 2.	Estructura química de la uvaricina (18).	15
Figura 3.	Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen un anillo de THF.	19
Figura 4.	Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen anillos bis-THF adyacentes.	20
Figura 5.	Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen anillos bis-THF no adyacentes.	26
Figura 6.	Estructura química de la goniocina (40).	24
Figura 7.	Estructura química de la mucocina (41).	24
Figura 8.	Estructura química de la muconina (42).	25
Figura 9.	Ejemplo selecto del grupo de acetogeninas que no contienen anillos de THF o THP.	25
Figura 10.	Diferentes tipos de la subunidad metil- γ -lactona de las acetogeninas de anonáceas.	27
Figura 11.	Mecanismos de translactonización propuestos para la formación de isoacetogeninas a partir de las 4-hidroxi-acetogeninas (Duret <i>et al.</i> , 1994).	28
Figura 12.	Ruta biogénica propuesta para la formación de anillos bis-THF adyacentes.	29
Figura 13.	Ruta biogénica propuesta para la formación de la metil- γ -lactona en las acetogeninas.	30
Figura 14.	Lactonas acetilénicas que fueron aisladas de <i>Porcelia macrocarpa</i>	31
Figura 15.	Estructura química de la escuamostatina A (47).	32
Figura 16.	Representación del proceso de fosforilación oxidativa en la mitocondria.	34
Figura 17.	Estructura química de la rotenona (48).	35
Figura 18.	<i>A. purpurea</i> : A (ampliación del fruto); B (árbol).	39

Figura 19.	Alcaloides que fueron aislados de las hojas y ramas de <i>A. purpurea</i> (Sonnet y Jacobson, 1971).	41
Figura 20.	Acetogeninas que fueron aisladas de las hojas de <i>A. purpurea</i> (Cepleanu <i>et al.</i> , 1993).	43
Figura 21.	<i>Rollinia mucosa</i>	45
Figura 22.	Distribución de <i>R. mucosa</i>	46
Figura 23.	Lignanos y metabolitos no alcaloideos que fueron aislados de <i>R. mucosa</i> (De Quiroz Paulo <i>et al.</i> , 1991; Maas <i>et al.</i> , 1992).	50
Figura 24.	Alcaloides que fueron aislados de <i>R. mucosa</i> (Caetano y Dadoun, 1987; Maas <i>et al.</i> , 1992).	51
Figura 25.	Alcaloides y lignanos que fueron aislados de <i>R. mucosa</i> (Chen <i>et al.</i> , 1996a).	52
Figura 26.	Acetogeninas que fueron aisladas de <i>R. mucosa</i>	54
Figura 27.	Cromatograma de líquidos de la fracción F ₅ de las semillas de <i>A. purpurea</i>	95
Figura 28.	Acetogeninas que fueron aisladas de la fracción F ₅ de las semillas de <i>A. purpurea</i>	96
Figura 29.	Cromatograma de líquidos de la fracción F ₇ de las semillas de <i>A. purpurea</i>	97
Figura 30.	Acetogeninas que fueron aisladas de la fracción F ₇ de las semillas de <i>A. purpurea</i>	98
Figura 31.	Patrón de fragmentación observado en el espectro de masas generado por IE del derivado sililado de la purpurediolina (98a). ..	108
Figura 32.	Patrón de fragmentación observado en el espectro de masas generado por IE del derivado sililado de la purpurenina (99a).	109
Figura 33.	Espectro de RMN ¹ H-NOESY del acetónido de la purpurediolina (98b).	111
Figura 33.	A) Conformación de máxima estabilidad y plano del MTPA propuesto para los ésteres (S)- y (R)- de Mosher. B) Modelo para determinar la estereoquímica absoluta en alcoholes secundarios (Ohtani <i>et al.</i> , 1991).	116

Figura 34.	Patrón de fragmentación observado en los espectros de masas generados por IE de los derivados sililados de la purpuracénina (100a) y la anoglaucina (101a).	123
Figura 35.	Zona comprendida en el intervalo de 70-82 ppm de los espectros de RMN ¹³ C de la purpuracénina (100) y la anoglaucina (101).	127
Figura 36.	Cromatograma de líquidos de la fracción F ₆ de las semillas de <i>R. mucosa</i>	136
Figura 37.	Cromatograma de líquidos (CLAR) de la fracción F ₄ de las semillas de <i>R. mucosa</i>	137
Figura 38.	Compuestos caracterizados de las semillas de <i>R. mucosa</i>	138
Figura 39.	Vista parcial de los espectros de RMN ¹ H (δ 3.0-4.0) y RMN ¹³ C (δ 70.0-83.0) de la jimenezina (103).	142
Figura 40.	Espectro parcial de RMN ¹ H-COSY (δ 3.0-4.0) de la jimenezina (103).	144
Figura 41.	Correlaciones importantes observadas en el espectro de RMN ¹ H-COSY de la jimenezina (103).	144
Figura 42.	Patrón de fragmentación observado en el espectro de masas generado por IE del derivado sililado de la jimenezina (103a).	145
Figura 43.	Espectro RMN ¹ H-NOESY de la jimenezina (103).	147
Figura 44.	Experimento de doble resonancia de la jimenezina (103), irradiación en δ 1.42.	148
Figura 45.	Espectro de masas (CG-EM IE) generado por la N-lignoceroiltriptamina (105).	152
Figura 46.	Correlaciones importantes observadas en el espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMBC de la N-lignoceroiltriptamina (105).	154
Figura 47.	Cromatograma de gases de la mezcla de N-aciltriptaminas (104).	156
Figura 48.	Espectro de masas obtenido por CG-EM IE generado por el pico de t _R 42.3 min (111) presente en la mezcla de N-aciltriptaminas (104).	156
Figura 49.	Cromatograma de gases de la mezcla de de esteres metílicos (107a) derivados de la mezcla de N-aciltriptaminas (104).	158

Figura 50.	Fragmentos característicos de los ésteres metílicos de ácidos grasos.	160
Figura 51.	Efecto de las acetogeninas en la velocidad de la síntesis de ATP ($H_2O \rightarrow MV$).	165
Figura 52.	Efecto de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en la velocidad del transporte de electrones basal de $H_2O \rightarrow MV$	168
Figura 53.	Efecto de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en la velocidad del transporte de electrones desacoplado de $H_2O \rightarrow MV$	169
Figura 54.	Efecto de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en la velocidad del transporte de electrones fosforilante de $H_2O \rightarrow MV$	170
Figura 55.	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS I de $DCPIP_{red} \rightarrow MV$	172
Figura 56.	Efecto de las acetogeninas en la velocidad del transporte de electrones desacoplado a nivel del FS I.	172
Figura 57.	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS II de $H_2O \rightarrow DCPIP$	173
Figura 58.	Efecto de las acetogeninas la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H_2O a $DCPIP$	174
Figura 59.	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS II de $H_2O \rightarrow SiMo$	175
Figura 60.	Efecto de las acetogeninas en la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H_2O a $SiMo$	175
Figura 61.	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS II de $DCP \rightarrow DCPIP$	176
Figura 62.	Efecto de las acetogeninas en la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de DPC a $DCPIP$	177

Figura 63.	Curva de inducción de la clorofila <i>a</i> : a) En cloroplastos intactos, b) En cloroplastos tratados con DCMU, c) En cloroplastos tratados con Tris, y d) En cloroplastos tratados con hidroxilamina.	178
Figura 64.	Curvas de inducción de la clorofila <i>a</i> para los cloroplastos tratados con: A) Tris (0.8 M), B) Escuamocina (80) (200 μ M), C) Bulatacina (16) (200 μ M), y D) Motrilina (97) (200 μ M).	179
Figura 65.	Efecto de las acetogeninas sobre la actividad de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa.	180

Lista de Espectros

Espectro 1.	Espectro en el IR de la purpurediolina (98).	202
Espectro 2.	Espectro de UV de la purpurediolina (98).	203
Espectro 3.	Espectro de DC de la purpurediolina (98).	204
Espectro 4.	Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la purpurediolina (98).	205
Espectro 5.	Espectro de masas modalidad IE del derivado sililado de la purpurediolina (98a).	206
Espectro 6.	Espectro de RMN ¹ H de la purpurediolina (98).	207
Espectro 7.	Espectro de RMN ¹ H-COSY de la purpurediolina (98).	208
Espectro 8.	Espectro de RMN ¹³ C de la purpurediolina (98).	209
Espectro 9.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT de la purpurediolina (98).	210
Espectro 10.	Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMQC de la purpurediolina (98).	211
Espectro 11.	Espectro de RMN ¹ H del acetónido de la purpurediolina (98b).	212
Espectro 12.	Espectro de RMN ¹ H del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la purpurediolina (98s).	213
Espectro 13.	Espectro de RMN ¹ H-COSY del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la purpurediolina (98s).....	214
Espectro 14.	Espectro de RMN ¹ H del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la purpurediolina (98r).....	215
Espectro 15.	Espectro de RMN ¹ H-COSY del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la purpurediolina (98r).	216
Espectro 16.	Espectro en el IR de la purpurenina (99).	217
Espectro 17.	Espectro de UV de la purpurenina (99).	218
Espectro 18.	Espectro de DC de la purpurenina (99).	219
Espectro 19.	Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la purpurenina (99). ...	220
Espectro 20.	Espectro de masas modalidad IE del derivado sililado de la purpurenina (99a).	221
Espectro 21.	Espectro de RMN ¹ H de la purpurenina (99).	222
Espectro 22.	Espectro de RMN ¹ H-COSY de la purpurenina (99).	223

Espectro 23.	Espectro de RMN ^{13}C de la purpurenina (99).	224
Espectro 24.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la purpurenina (99).	225
Espectro 25.	Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la purpurenina (99).	226
Espectro 26.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la purpurenina (99s).	227
Espectro 27.	Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la purpurenina (99s).	228
Espectro 28.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la purpurenina (99r).	229
Espectro 29.	Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la purpurenina (99r).	230
Espectro 30.	Espectro en el IR de la purpuracénina (100).	230
Espectro 31.	Espectro de UV de la purpuracénina (100).	232
Espectro 32.	Espectro de DC de la purpuracénina (100).	233
Espectro 33.	Espectro de masas modalidad FAB $^+$ de la purpuracénina (100).	234
Espectro 34.	Espectro de masas modalidad IE del derivado sililado de la purpuracénina (100a).	235
Espectro 35.	Espectro de RMN ^1H de la purpuracénina (100).	236
Espectro 36.	Espectro de RMN ^1H -COSY de la purpuracénina (100).	237
Espectro 37.	Espectro de RMN ^{13}C de la purpuracénina (100).	238
Espectro 38.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la purpuracénina (100).	239
Espectro 39.	Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la purpuracénina (100).	240
Espectro 40.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la purpuracénina (100s).	241
Espectro 41.	Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la purpuracénina (100s).	242
Espectro 42.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la purpuracénina (100r).	243
Espectro 43.	Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la purpuracénina (100r).	244

Espectro 44.	Espectro de RMN ^1H de la mezcla epimérica de la isopurpuracena (100t).	245
Espectro 45.	Espectro de RMN ^1H del derivado tri-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la mezcla epimérica de la isopurpuracena (100ts).	246
Espectro 46.	Espectro de RMN ^1H del derivado tri-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la mezcla epimérica de la isopurpuracena (100tr).	247
Espectro 47.	Espectro en el IR de la anoglaucina (101).	248
Espectro 48.	Espectro de UV de la anoglaucina (101).	249
Espectro 49.	Espectro de DC de la anoglaucina (101).	250
Espectro 50.	Espectro de masas modalidad FAB^+ de la anoglaucina (101). ..	251
Espectro 51.	Espectro de masas modalidad IE del derivado sililado de la anoglaucina (101a).	252
Espectro 52.	Espectro de RMN ^1H de la anoglaucina (101).	253
Espectro 53.	Espectro de RMN ^1H -COSY de la anoglaucina (101).	254
Espectro 54.	Espectro de RMN ^{13}C de la anoglaucina (101).	255
Espectro 55.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la anoglaucina (101).	256
Espectro 56.	Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la anoglaucina (101).	257
Espectro 57.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la anoglaucina (101s).	258
Espectro 58.	Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la anoglaucina (101s).	259
Espectro 59.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la anoglaucina (101r).	260
Espectro 60.	Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la anoglaucina (101r).	261
Espectro 61.	Espectro de RMN ^1H de la mezcla epimérica de la isoanoglaucina (101t).	262
Espectro 62.	Espectro de RMN ^1H del derivado tri-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la isoanoglaucina (101ts).	263

Espectro 63.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la isoanoglaucina (101tr).	264
Espectro 64.	Espectro en el IR de la jimenezina (103).	265
Espectro 65.	Espectro de UV de la jimenezina (103).	266
Espectro 66.	Espectro de DC de la jimenezina (103).	267
Espectro 67.	Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la jimenezina (103). ...	268
Espectro 68.	Espectro de masas modalidad IE del derivado siliado de la jimenezina (103a).	269
Espectro 69.	Espectro de RMN ^1H de la jimenezina (103).	270
Espectro 70.	Espectro de RMN ^1H -COSY de la jimenezina (103).	271
Espectro 71.	Espectro de RMN ^{13}C de la jimenezina (103).	272
Espectro 72.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la jimenezina (103).	273
Espectro 73.	Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la jimenezina (103).	274
Espectro 74.	Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la jimenezina (103).	275
Espectro 75.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la jimenezina (103s).	276
Espectro 76.	Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(<i>S</i>)-éster de Mosher de la jimenezina (103s).	277
Espectro 77.	Espectro de RMN ^1H del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la jimenezina (103r).	278
Espectro 78.	Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(<i>R</i>)-éster de Mosher de la jimenezina (103r).	279
Espectro 79.	Espectro en el IR de la N-lignoceroilriptamina (105).	280
Espectro 80.	Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la N-lignoceroil-riptamina (105).	281
Espectro 81.	Espectro de UV de la N-lignoceroilriptamina (105).	282
Espectro 82.	Espectro de RMN ^1H de la N-lignoceroilriptamina (105).	283
Espectro 83.	Espectro de RMN ^1H -COSY de la N-lignoceroilriptamina (105).	284
Espectro 84.	Espectro de RMN ^1H -NOESY de la N-lignoceroilriptamina (105)	285

Espectro 85.	Espectro de RMN ^{13}C de la N-lignoceroiltriptamina (105).	296
Espectro 86.	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la N-lignoceroiltriptamina (105).	287
Espectro 87.	Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la N-lignoceroiltriptamina (105).	288
Espectro 88.	Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la N-lignoceroiltriptamina (105).	289
Espectro 89.	Espectro de RMN ^1H de la mezcla de N-aciltriptaminas (104).	290
Espectro 90.	Espectro de masas modalidad FAB $^+$ de la mezcla de N-acil-triptaminas (104).	291
Espectro 91.	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido palmítico.	292
Espectro 92.	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido esteárico.	292
Espectro 93.	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido araquínóico.	292
Espectro 94.	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido behénico.	293
Espectro 95.	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido tricosanóico.	293
Espectro 96.	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido lignocérico.	293
Espectro 97.	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido hiénico.	294
Espectro 98.	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido cerótico.	294

I INTRODUCCION

En la actualidad, una de las metas más importantes de las ciencias médicas y farmacéuticas es la búsqueda de nuevos agentes medicinales para combatir el “cáncer”, término general que se aplica a una serie de enfermedades malignas que pueden afectar a distintas partes del organismo. Es característico de dichas enfermedades la formación rápida e incontrolada de células anormales que se reúnen para formar un tumor *in situ* (tumor primario); éstas células también pueden proliferar en el organismo, iniciando crecimientos anormales en lugares distintos al sitio en que se generó el tumor primario (Dewick, 1991). A la fecha se conocen más de 100 tipos diferentes de cáncer, los 12 más comunes son: Cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, linfomas no Hodgkinianos, cáncer de útero, melanoma (cáncer de piel), cáncer de riñón, leucemia, cáncer de ovario y cáncer de páncreas.

En general, los procesos bioquímicos que inducen los diferentes tipos de cáncer son muy similares. De acuerdo a la teoría clásica o convencional, el proceso de carcinogénesis comprende dos etapas: La iniciación y la promoción. La fase de iniciación resulta de la interacción entre un agente carcinógeno y el ADN (ácido desoxirribonucleico) de una célula somática, de tal forma que induce un cambio irreversible en el material genético (mutación) el cual confiere a la célula el potencial para desarrollarse de manera anómala hasta convertirse en un tumor. Este potencial puede desencadenarse por la acción de un agente promotor que estimula la división celular y por lo tanto facilita la replicación del defecto provocado (fase de

promoción). Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que varios agentes químicos y contaminantes ambientales son carcinogénicos en modelos animales, pero no son mutagénicos en las pruebas *in vitro*. Dichas observaciones son congruentes con un mecanismo de acción que no involucra al componente iniciador de la teoría convencional de la carcinogénesis. El mecanismo de carcinogénesis no genotóxica no se conoce del todo, pero se cree que implica la estimulación de la división celular con el consecuente incremento en la probabilidad de que una mutación ocurra espontáneamente (Shaw y Jones, 1994; Trichopoulos *et al.*, 1997).

El desarrollo de un tumor presenta diferentes etapas (Figura 1): Este se inicia cuando algunas células de una población normal sufren una mutación genética, la cual induce un incremento en la proliferación de las células. Las células alteradas y sus descendientes conservan su apariencia normal, pero se reproducen en exceso. Esta fase del desarrollo de un tumor se conoce como hiperplasia. Después de un cierto tiempo, las células en estado de hiperplasia pueden sufrir otra mutación que les confiere, aún más, la capacidad de multiplicarse de manera desmesurada. La progenie de estas células presenta un aspecto anormal en su morfología y orientación. Esta etapa se designa con el nombre de displasia. En periodos subsecuentes, se produce una tercera mutación que altera el comportamiento celular, de ahí que el grupo de células afectadas muestra una mayor anomalía en su desarrollo y aspecto. Si el tumor no ha traspasado aún ninguna barrera para invadir otro tejido, se habla de un cáncer *in situ*. El tumor puede permanecer en esta fase de manera indefinida, sin embargo, algunas células pueden sufrir nuevas mutaciones. Si los cambios genéticos facilitan la invasión del tumor a los tejidos

circundantes y la entrada de las células anormales al torrente sanguíneo o linfático, entonces se habla de un "tumor maligno". De manera adicional, las células invasoras pueden iniciar nuevos tumores en otras partes del cuerpo. Este último proceso se conoce como metástasis y puede ser letal si afecta a órganos vitales (Weinberg, 1997).

La cirugía, la radiación y los agentes quimioterapéuticos son las principales formas de tratamiento del cáncer. La intervención quirúrgica fue la primera terapia que se estableció contra el cáncer. Este tipo de terapia constituye uno de los métodos más utilizados hoy en día. La extirpación quirúrgica del tumor es un remedio rápido y eficaz, gracias al cual se consigue, con frecuencia, la recuperación del paciente. Sin embargo, en algunos casos, el cáncer afecta órganos vitales de tal forma que las posibilidades de sanar mediante la cirugía son escasas. Ante las limitaciones de la cirugía, en algunas ocasiones es mejor optar por la radioterapia. Este método recurre al empleo de rayos X y gamma para irradiar la región afectada por el tumor canceroso. Puesto que el tejido sano se recupera de los efectos de la exposición a la radiación mejor que las células tumorales, la radioterapia puede preservar las estructuras anatómicas que rodean a la formación cancerosa y, por lo tanto eliminar el cáncer sin incapacitar al paciente. Pese a tales ventajas, la radioterapia no siempre es el tratamiento más indicado, debido a que puede fracasar en la eliminación completa de las células tumorales en particular, en los casos de metástasis avanzadas. Además, este tipo de terapia daña ciertos tejidos vitales, por lo que el uso de la radiación en el cuerpo humano se encuentra limitado (Hellman y Vokes, 1997).

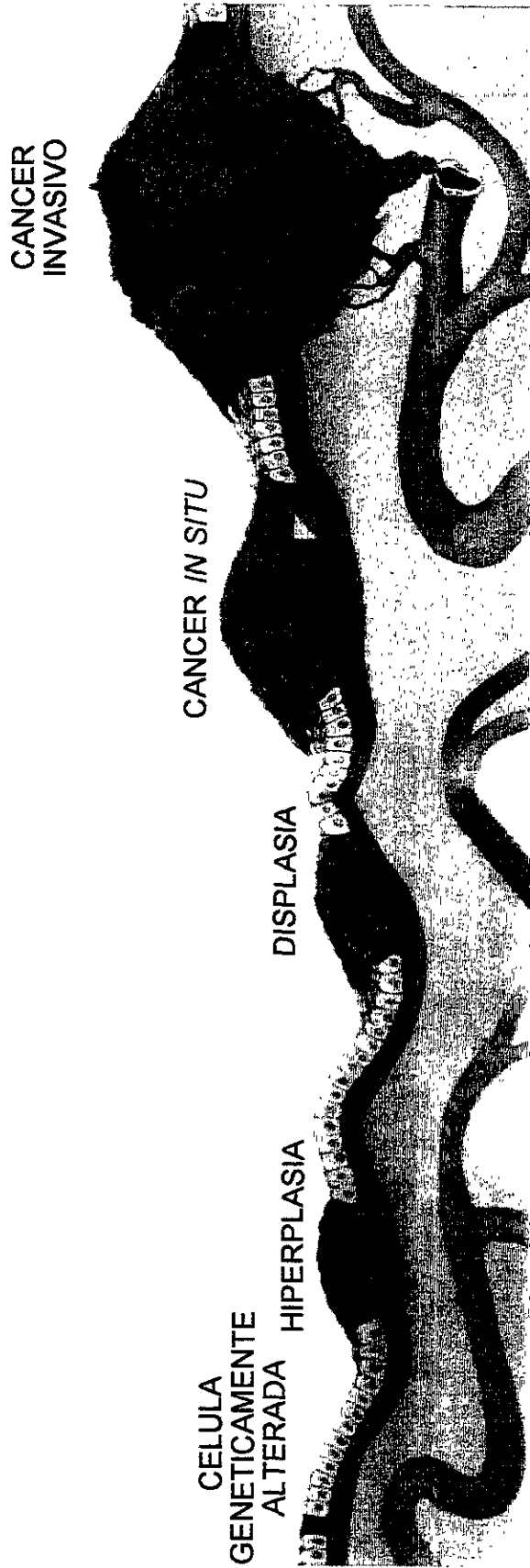


Figura 1. Etapas del desarrollo de un tumor (Weinberg, 1997).

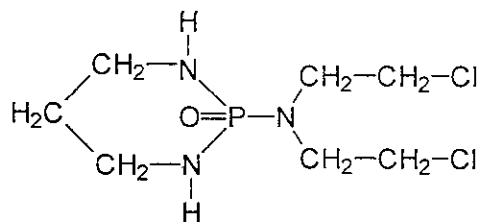
La administración sistémica de agentes anticancerosos, que el torrente circulatorio se encarga de distribuir por todo el cuerpo, es un tratamiento que responde al nombre de quimioterapia. Esta terapia puede en algunas ocasiones proporcionar una mejoría temporal de los síntomas, la prolongación de la vida y ocasionalmente la curación. La quimioterapia es más efectiva si se recetan varios fármacos a la vez ya que permite un tratamiento satisfactorio de ciertas neoplasias malignas tales como leucemias, linfomas y algunos otros cánceres como el de testículo. Lamentablemente, la mayoría de las formas de cáncer más comunes (mama, pulmón, colorrectal y próstata) no se remedian con la sola quimioterapia, sino que ésta deberá integrarse en un plan de ataque global en el cual se incluyen la cirugía y la radioterapia (Hellman y Vokes, 1997).

Los agentes quimioterapéuticos utilizados en la actualidad son efectivos en aquellas células cancerosas con un alto ritmo de crecimiento, pero presentan el problema de ser tóxicos para los tejidos normales de alta proliferación, como es el caso de la médula ósea, los folículos pilosos y el epitelio intestinal. Este inconveniente se refleja en efectos secundarios como son la inmunosupresión, la diarrea, las náuseas, los vómitos y la caída de pelo.

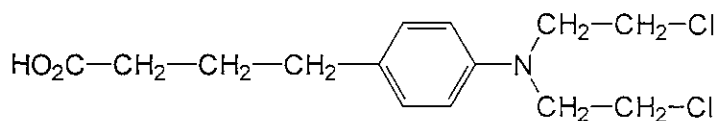
Los agentes quimioterapéuticos de mayor uso comprenden un grupo numeroso de compuestos de origen natural, sintético o semisintético con una gran diversidad estructural. Los mecanismos mediante los cuales estos agentes ejercen su efecto terapéutico es también variado, de tal forma que unos inhiben la síntesis y replicación del ADN; otros bloquean la mitosis o actúan a nivel de la membrana

celular sobre receptores específicos, y algunos otros se comportan como antimetabolitos.

Dentro de los agentes anticancerígenos que inhiben la síntesis y replicación del ADN, algunos alquilan los componentes del ADN. El nitrógeno 7 de la guanina es particularmente susceptible a la formación de una unión covalente con agentes alquilantes monofuncionales y bifuncionales. Otros átomos de las bases púricas y pirimídicas como los nitrógenos 1 ó 3 de la adenina, el nitrógeno 3 de la citosina y el oxígeno 6 de la guanina, también pueden alquilarse en menor grado, lo mismo que los grupos fosfato de las cadenas de ADN, las proteínas asociadas al ADN y los grupos tioles de las enzimas que controlan la división celular (Carter y Kershner, 1975). Un factor común dentro de este grupo de sustancias es que poseen un centro fuertemente electrofílico, como es el caso de la ciclofosfamida (1) y el clorambucilo (2).



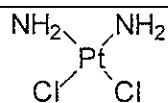
Ciclofosfamida (1)



Clorambucilo (2)

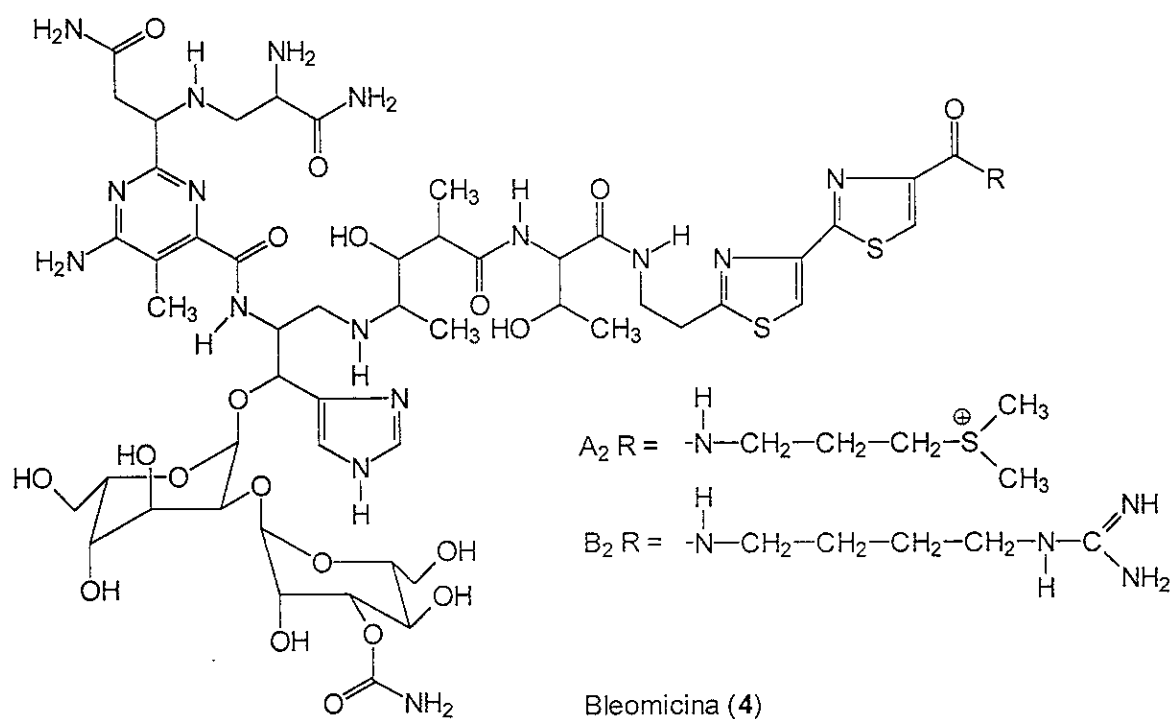
Los complejos de coordinación del platino son sustancias electrofílicas que sin ser alquilantes forman uniones con el ADN. El ejemplo más importante de este grupo de agentes quimioterapéuticos es el cisplatino (3) [cis-diaminodichloroplatino (II)], el cual

al penetrar a la célula pierde por hidrólisis los dos cloruros y en consecuencia se forman dos ligandos activos que producen uniones ínter e intra-cadenas en el ADN (Calabresi y Parks, 1990).

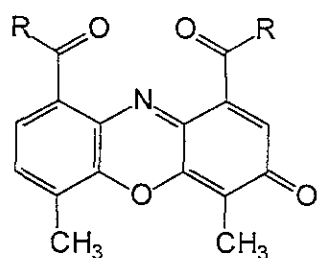


Cisplatino (3)

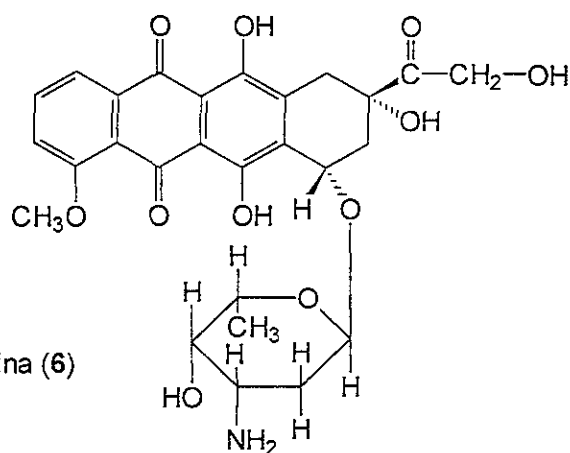
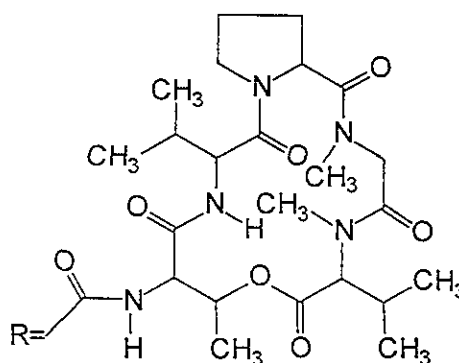
Algunos antibióticos también inhiben la síntesis y replicación del ADN y el más importante es la bleomicina (4), una mezcla de glucopéptidos. Estos productos causan la escisión del ADN por interacción con O_2 y hierro. Las bleomicinas se intercalan en el ADN y forman un complejo oxidado Fe^{3+} -bleomicina, este puede disociarse del ADN, reducirse a Fe^{2+} -bleomicina y unirse de nuevo al ADN. Cada ciclo de oxidación-reducción causa la liberación de una base de purina o de pirimidina, con la consecuente ruptura del ADN (Calabresi y Parks, 1990).



Otros antibióticos como la actinomicina D (5) y la adriamicina (6) (doxorubicina) se intercalan con el ADN ocasionando una inhibición de la síntesis del ARN dependiente del ADN, primer paso en la secuencia de eventos que conduce a la síntesis de proteínas (Dourous, 1976). La actinomicina D (5) se intercala entre un par básico adyacente de guanina-citosina y después de varias interacciones se genera un complejo actinomicina-ADN bastante estable. La adriamicina (6) se intercala entre pares básicos adyacentes del ADN y la porción glicosídica del antibiótico juega un papel esencial en esta unión. La intercalación de estos productos en el ADN también puede causar la escisión de las cadenas por generación de radicales libres reactivos (Calabresi y Parks, 1990).

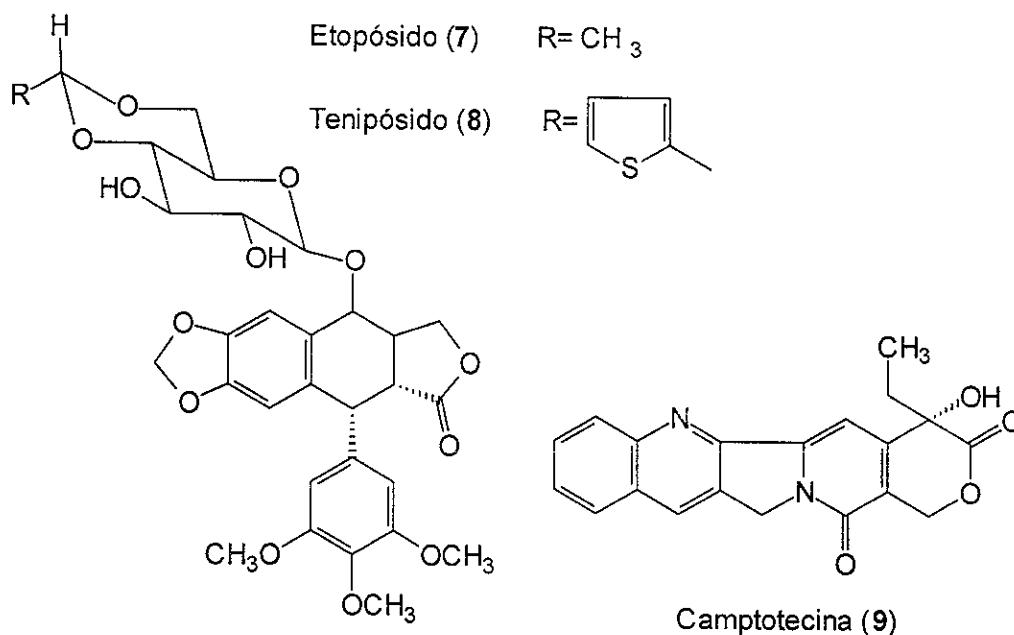


Actinomicina D (5)

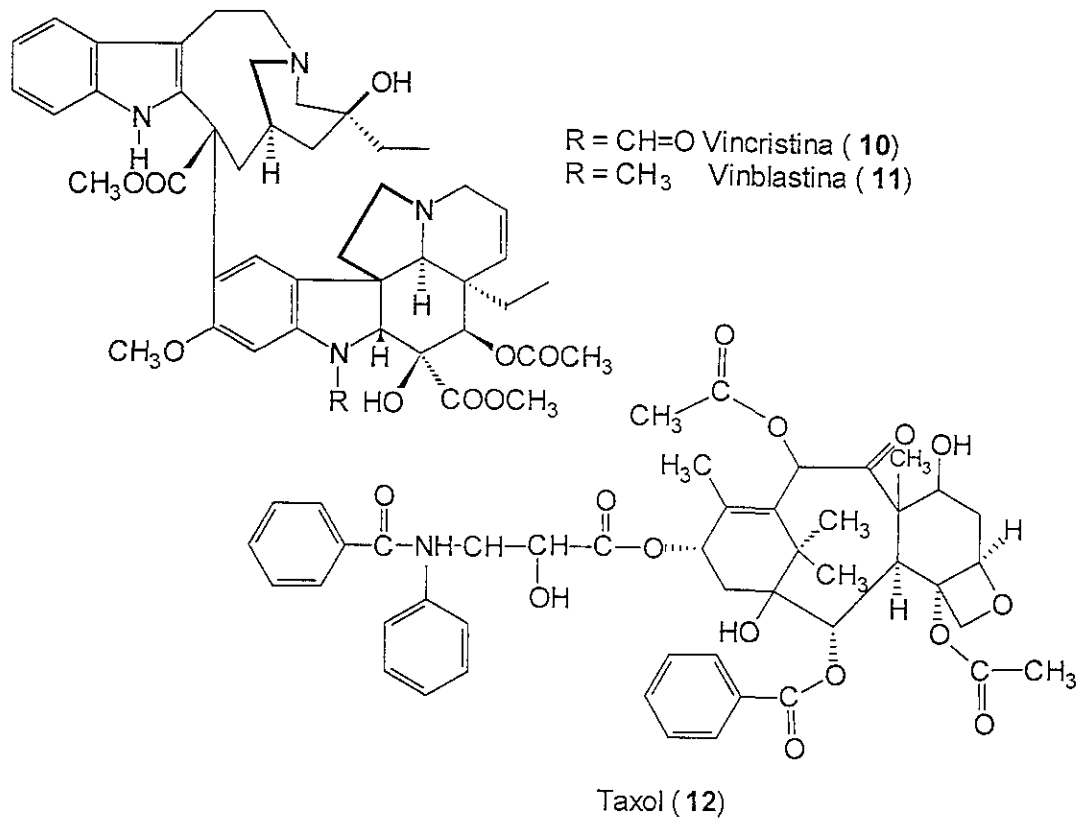


Adriamicina (6)

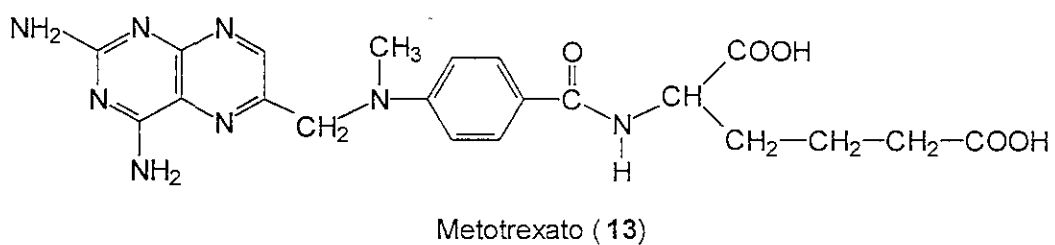
El etopósido (7) y el tenipósido (8), entre otros lignanos semisintéticos derivados del producto natural podofilotoxina, inhiben la enzima topoisomerasa II (Calabresi y Parks, 1990; Shu, 1998). Por otra parte, la camptotecina (9) y sus derivados poseen una actividad específica en el sistema topoisomerasa I (Dewick, 1991; Shu, 1998). Estos mecanismos de acción conllevan a la inhibición de la síntesis y replicación del ADN.



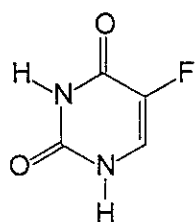
Otros agentes quimioterapéuticos actúan bloqueando la mitosis y, en consecuencia, detienen la división celular en la metafase. Así por ejemplo, los alcaloides naturales vincristina (10) y vinblastina (11), así como sus derivados, se unen con la proteína tubulina en el huso mitótico, evitando la polimerización de los microtúbulos. Por otra parte, el taxol (12), producto natural obtenido de *Taxus brevifolia*, se une a los microtúbulos estabilizándolos, interrumpiendo por otro mecanismo el proceso de la mitosis (Calabresi y Parks, 1990; Shu, 1998).



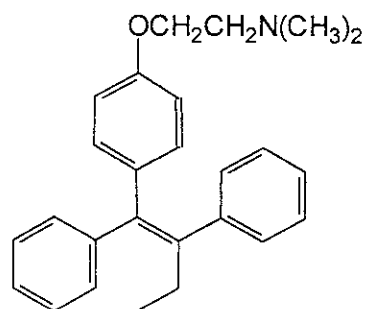
Los antimetabolitos son otros fármacos que impiden el crecimiento celular. Dos ejemplos importantes de este grupo son el metotrexato (13) y el 5-fluorouracilo (14), antimetabolitos del ácido fólico y de las bases pirimídicas, respectivamente. El ácido fólico es el agente responsable de la formación de células sanguíneas, además es esencial para el crecimiento de ciertos tipos de tumores. El 5-fluorouracilo (14) interfiere en actividades celulares vitales como la síntesis y el funcionamiento de los ácidos nucleicos (Calabresi y Parks, 1990).



Los compuestos antes mencionados actúan en fases específicas del ciclo celular y por ello son activos contra las células que se encuentran en proceso de división y su sitio de acción se localiza en el núcleo de la célula. Otros compuestos quimioterapéuticos tienen un mecanismo de acción diferente y actúan a nivel de la membrana celular, como es el caso de las hormonas que aceleran o suprimen el crecimiento específico de las células, tejidos u órganos. Su efectividad contra el cáncer consiste en alterar o revertir el balance hormonal en las células cancerosas, el cual es necesario para que las células se desarrollen. Como ejemplo de este tipo de compuestos se tiene al tamoxifeno (15). Originalmente se pensaba que la actividad de este fármaco se debía a un efecto antagónico sobre los estrógenos, sin embargo, posteriormente se demostró que el producto interfiere con los procesos de transducción de señales en la célula. Así el tamoxifeno (15) inhibe la acción de la proteína-quinasa C, la cAMP-fosfodiesterasa dependiente de Ca^{2+} y la calmodulina. En consecuencia, el tamoxifeno (15) induce la secreción del factor de crecimiento negativo por parte de las células somáticas que rodean a las células cancerosas (Wiseman, 1994).



5-Fluorouracilo (14)



Tamoxifeno (15)

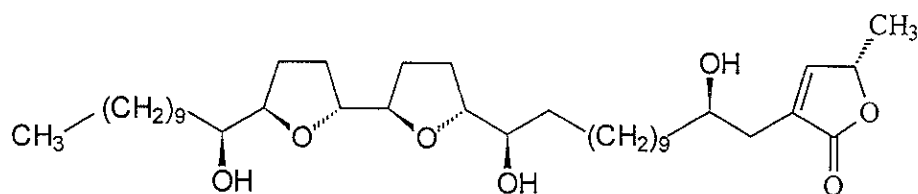
Sin duda alguna, el uso de agentes quimioterapéuticos seguirá siendo una de las principales formas del tratamiento del cáncer, pero se pretende que la terapia del futuro sea más segura, eficaz y selectiva. El efecto de los agentes quimioterapéuticos deberá limitarse a las células cancerosas y los efectos colaterales inducidos por estos fármacos deberán ser también mínimos. Por lo tanto, numerosos grupos de investigación alrededor del mundo han intensificado la búsqueda de nuevos agentes y/o estrategias para el tratamiento del cáncer. Los estudios han conducido al descubrimiento de vacunas capaces de mantener en constante alerta al sistema inmunológico de tal modo que se eliminen cuantas células cancerosas pudiesen surgir (Old, 1997).

El uso de agentes antitumorales transportados por anticuerpos constituye también otro tipo de inmunoterapia con posibilidades de éxito para el tratamiento del cáncer. Esta estrategia consiste en administrar a los pacientes anticuerpos con un repertorio de componentes tóxicos que puedan liberarse al unirse a los antígenos de la superficie de las células cancerosas. De esta manera, se lograría que las dosis de toxinas que alcancen los tumores sean mayores y más letales, sin que los tejidos sanos sufran daño alguno (Old, 1997).

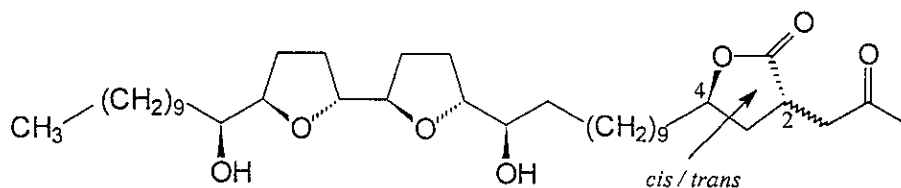
Una terapia alternativa, en vías de desarrollo experimental, es la interrupción de la angiogénesis, es decir, de la proliferación de nuevos capilares. Este proceso es inducido por las células tumorales para asegurar que los nuevos vasos aporten nutrientes y factores de crecimiento de naturaleza proteica que garanticen el desarrollo de la masa tumoral. Mediante el bloqueo de la red de vasos sanguíneos que alimentan a los tumores se espera destruir las estructuras capilares que

favorecen el crecimiento de los tumores, con la ventaja de que no se ataca a los capilares normales (Folkman, 1997).

En el campo de los productos naturales de origen vegetal, uno de los descubrimientos más notables de agentes antineoplásicos potenciales ha sido el de las acetogeninas de anonáceas. Dichos compuestos han demostrado un marcado efecto citotóxico, aún sobre tumores resistentes a los fármacos convencionales (Zeng *et al.*, 1996; Oberlies *et al.*, 1997). Algunos de estos compuestos como la bulatacina (16) y las (2,4-*cis* y *trans*)-bulatacinonas (17) demostraron ser más activas que el taxol (12) contra la leucemia de múrido (L1210) en ensayos *in vivo* (Ahammadsahib *et al.*, 1993).



Bulatacina (16)



(2,4- *cis* y *trans*)-Bulatacinonas (17)

Como se explicará con mayor detalle en la sección de antecedentes, las acetogeninas de anonáceas ejercen un efecto citotóxico y antitumoral mediante la inhibición del proceso de fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial, específicamente a nivel de la enzima NADH-ubiquinona reductasa. En consecuencia, el transporte de

electrones se bloquea, los niveles de ATP intracelular se reducen considerablemente así como el abasto de energía necesario para el crecimiento y el desarrollo celular. Recientemente, se comprobó que estos compuestos inhiben también la NADH-ubiquinona reductasa de las membranas plasmáticas de las células cancerosas (aún de aquellas resistentes a numerosos fármacos) (Morré *et al.*, 1995). Como esta enzima se encuentra sobreexpresada en las células tumorales, constituye un blanco de acción específico para los fármacos antineoplásicos. De allí que las acetogeninas de anonáceas representen un tipo de compuestos de gran interés para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. De manera adicional, cabe resaltar que estos productos naturales han demostrado una gran eficacia para combatir algunos insectos y nemátodos que afectan a cultivos de importancia económica (McLaughlin *et al.*, 1997).

A la fecha se conocen alrededor de 250 acetogeninas de anonáceas y las posibilidades de encontrar nuevas acetogeninas antineoplásicas con esqueletos novedosos es alta. En este marco de referencia, surgió la presente disertación doctoral la cual describe nuevas acetogeninas con actividad antitumoral potencial a partir de especies selectas de anonáceas mexicanas. Tras un cuidadoso proceso de selección se escogieron las especies *Annona purpurea* y *Rollinia mucosa* para cumplir con el objetivo antes mencionado. La propuesta original contempló también contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de dichos compuestos mediante el estudio del efecto de acetogeninas selectas sobre el proceso de fotofosforilación.

II ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES DE ACETOGENINAS DE ANONACEAS.

2.1.1 Consideraciones generales de las acetogeninas de anonáceas.

Los primeros trabajos fitoquímicos sobre las anonáceas se centraron fundamentalmente en el análisis del contenido de alcaloides isoquinolínicos. De manera errónea, estos compuestos se consideraron los responsables de las actividades medicinales y pesticidas que demostraron algunos extractos derivados de especies de esta familia (Leboeuf *et al.*, 1982). A principios de la década de los 80's, el grupo de investigación de Cole descubrió que las anonáceas también biosintetizan una serie de metabolitos derivados de ácidos grasos lineales, los cuales se designaron con el nombre de acetogeninas de anonáceas. El trabajo de Cole y colaboradores describe el aislamiento de la uvaricina (**18**), primera acetogenina de anonáceas reportada en la literatura científica (Jolad *et al.*, 1983). El aislamiento de este compuesto se realizó a partir del extracto etanólico citotóxico de las raíces de *Uvaria acuminata* Oliv. (Annonaceae), aplicando una estrategia biondirigida.

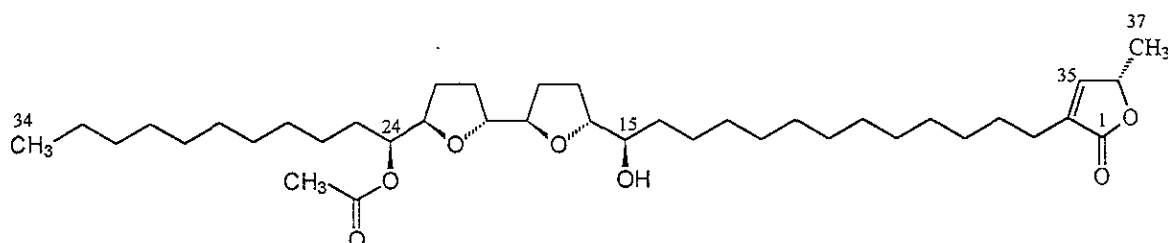


Figura 2. Estructura química de la uvaricina (**18**).

Desde el descubrimiento de Cole hasta 1998, se han descrito alrededor de 250 acetogeninas de anonáceas (Zafra-Polo *et al.*, 1998), las cuales fueron aisladas de 36 especies pertenecientes a los géneros: *Annona*, *Asimina*, *Disepalum*, *Goniothalamus*, *Polyalthia*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Xylopia*. Estos productos naturales se acumulan prácticamente en todos los órganos de las plantas que los biosintetizan.

Desde el punto de vista biogenético, las acetogeninas de anonáceas son derivados de ácidos grasos lineales de 32 ó 34 átomos de carbono y de una unidad de ácido pirúvico. Esta última unidad estructural forma parte de la metil- γ -lactona que se encuentra presente en todos estos compuestos. Las acetogeninas generalmente contienen uno, dos o tres anillos de tetrahydrofurano (THF). Pese a dicha generalidad se han descrito acetogeninas que contienen un anillo de tetrahidropirano (THP) y otras que no poseen anillos de THF o THP. A lo largo de la cadena hidrocarbonada, estos compuestos presentan grupos hidroxilos que se localizan frecuentemente en los carbonos vecinos a los anillos de THF o THP, aunque también se pueden encontrar en otras posiciones. Otros grupos funcionales presentes en estos compuestos son los siguientes: Acetato, epóxido, doble ligadura y cetona (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Gú *et al.*, 1995a; Zeng *et al.*, 1996).

Debido a la presencia de un alto número de grupos funcionales y de varios centros estereogénicos en las moléculas, la elucidación estructural de las acetogeninas de anonáceas es un proceso complejo que requiere de la aplicación simultánea de métodos químicos (formación de derivados sililados, acetilados, ésteres de Mosher, acetónidos, acetales de formaldehído, etc.), quirópticos, espectrométricos y

espectroscópicos, principalmente de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Quizá el método espectroscópico de mayor utilidad es la RMN, la cual genera la información más relevante en el proceso de elucidación estructural. Generalmente se requiere aplicar las técnicas unidimensionales [RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN ^{13}C -APT (Attached Proton Test) y RMN ^{13}C -DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)], bidimensionales homonucleares [RMN ^1H -COSY (COrrrelation SpectroscopY), RMN ^1H -relayed COSY sencillo (4 enlaces) y doble (5 enlaces) y RMN ^1H -NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)], y bidimensionales heteronucleares [RMN ^1H - ^{13}C -HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) y RMN ^1H - ^{13}C -HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation)].

Lamentablemente la naturaleza cética de estos productos ha impedido la aplicación sistemática de la técnica de difracción por rayos X para corroborar las estructuras moleculares establecidas por otros procedimientos. A la fecha solo se han descrito cuatro estudios de difracción por rayos X. El primero de ellos se realizó sobre el derivado 15-O-*p*-bromofeniluretano de la roliniastatina 1 (Pettit *et al.*, 1987). Posteriormente, Born y colaboradores (1990) describieron la estructura cristalina de un derivado de la escuamocina. Para ello sintetizaron el carboxilato de la dihidro- γ -hidroxianonina I, el cual presentó la forma cristalina apropiada para el estudio de difracción por Rayos X. Por último, los estudios restantes se realizaron sobre los productos naturales gigantecina (Yu *et al.*, 1994) y uvarigrina (Zhou *et al.*, 1998).

Los aspectos relacionados con el aislamiento, elucidación estructural, biosíntesis y propiedades biológicas de estos compuestos han sido objeto de excelentes

revisiones (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Cortes *et al.*, 1993; Cavé *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995a; Zeng *et al.*, 1996; Zafra-Polo *et al.*, 1996; McLaughlin *et al.*, 1997; Cavé *et al.*, 1997; Zafra-Polo *et al.*, 1998).

2.1.2 Clasificación químico-estructural de las acetogeninas de anonáceas.

Para la clasificación de las acetogeninas de anonáceas se consideran de manera general los siguientes criterios: a) Presencia o ausencia de anillos de THF o THP a lo largo de la cadena hidrocarbonada, y b) Secuencia y número de anillos heterocíclicos (THF o THP). De tal forma que las acetogeninas se clasifican en los siguientes grupos principales: i) Mono-THF, ii) bis-THF adyacentes, iii) bis-THF no adyacentes, iv) tris-THF adyacentes, v) THF-THP no adyacentes, vi) THF-THP adyacentes y, vii) acetogeninas que no contienen anillos de THF o THP. Cada uno de estos grupos contiene distintos subgrupos tomando en cuenta, por un parte, la presencia o ausencia de grupos hidroxilos en los carbonos adyacentes de los anillos heterocíclicos, y por la otra, la estereoquímica relativa en los centros estereogénicos asociados a los anillos heterocíclicos y funciones carbinólicas vecinales. Para designar a los subgrupos se hace referencia a un compuesto tipo (Zeng *et al.*, 1996). A continuación se hace una breve descripción de cada uno de los principales grupos de acetogeninas.

- i) **Acetogeninas del tipo mono-THF.** Los compuestos de este grupo contienen un anillo de THF, generalmente ubicado entre los carbonos 10-13, 14-17 ó 16-19 de la cadena hidrocarbonada. Este grupo se divide en seis subgrupos considerando

la estereoquímica relativa en el anillo de THF y la presencia de grupos hidroxilos en los carbonos vecinos al anillo heterocíclico. Tres subgrupos presentan hidroxilos en los dos carbonos vecinales al anillo de THF y los otros tres solo contienen un hidroxilo en uno de los carbonos adyacente al anillo de THF; en todos los casos el hidroxilo se encuentra en el extremo más cercano al metilo terminal de la cadena hidrocarbonada. La estereoquímica relativa que identifica a cada uno de estos subgrupos se indica en la Figura 3.

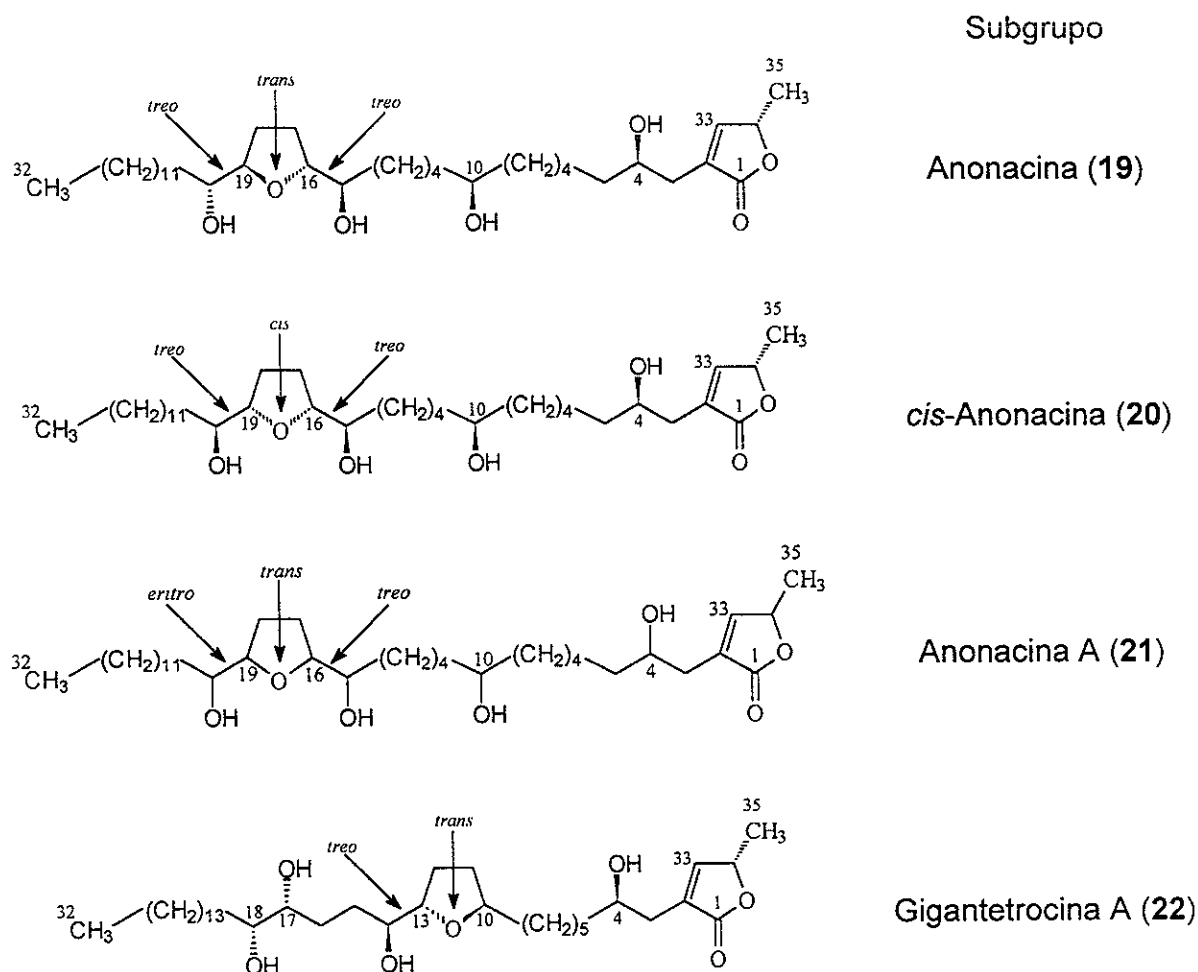


Figura 3. Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen un anillo de THF.

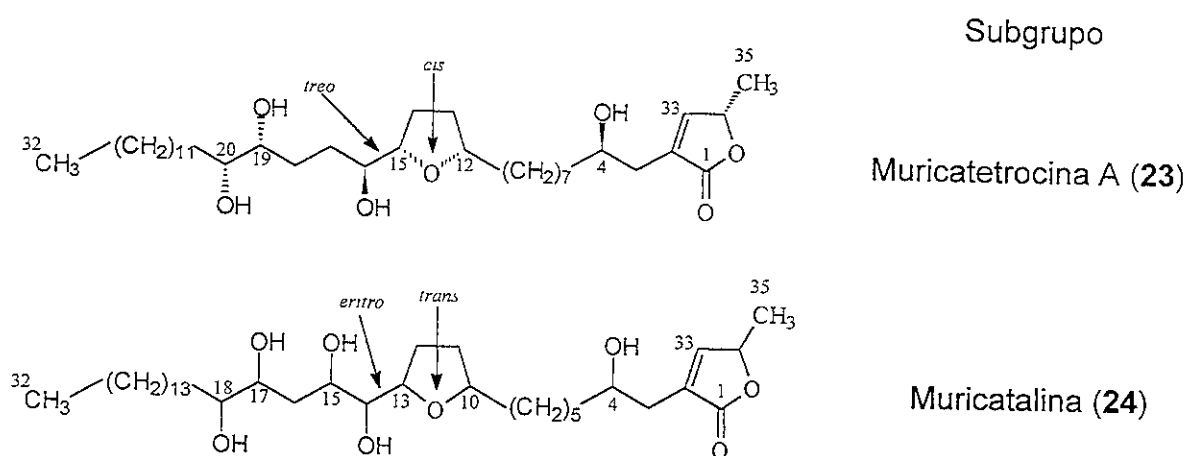


Figura 3. Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen un anillo de THF (cont).

- ii) **Acetogeninas del tipo bis-THF adyacentes.** Este conjunto de policétidos presentan los anillos bis-THF adyacentes, generalmente entre los carbonos 12-19, 14-21, ó 16-23. El grupo se divide en nueve subgrupos, siete de los cuales contienen un hidroxilo en los carbonos vecinos a la porción bis-THF. Los dos restantes presentan un grupo hidroxilo en el carbono adyacente a la porción bis-THF más cercano al metilo terminal de la cadena hidrocarbonada. La estereoquímica relativa de los diferentes tipos de acetogeninas bis-THF adyacentes se indican en la Figura 4.

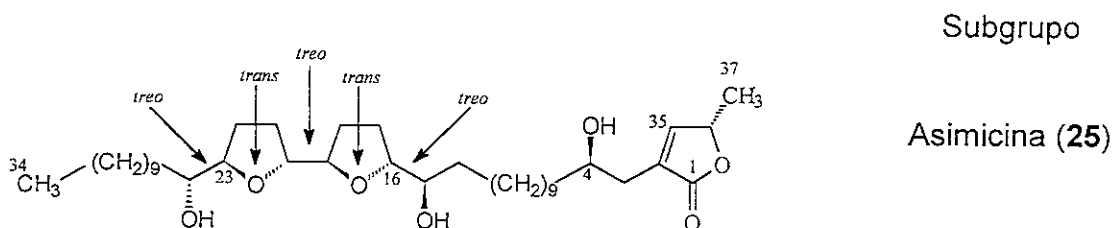
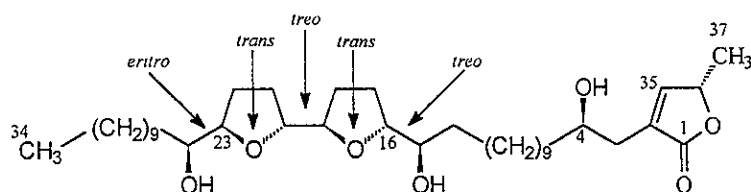


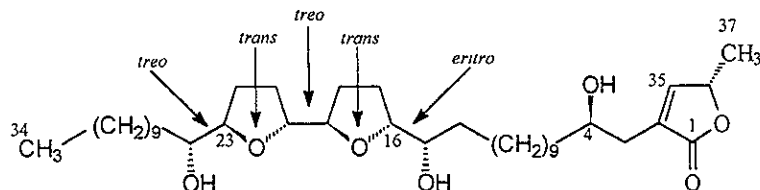
Figura 4. Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen anillos bis-THF adyacentes.

Subgrupo

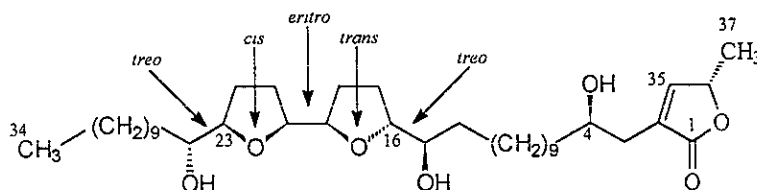
Bulatacina (16)



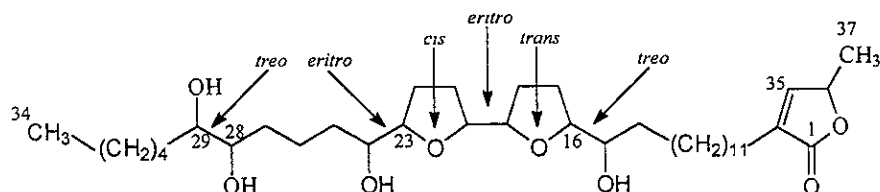
Escuamocina I (26)



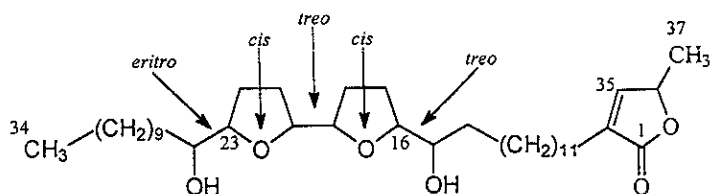
Trilobacina (27)



Espinencina (28)



Esquamocina N (29)



Roliniastatina 1 (30)

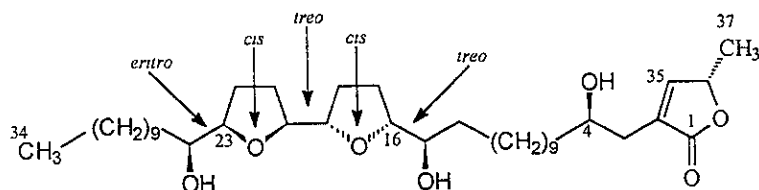


Figura 4. Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen anillos bis-THF adyacentes (cont).

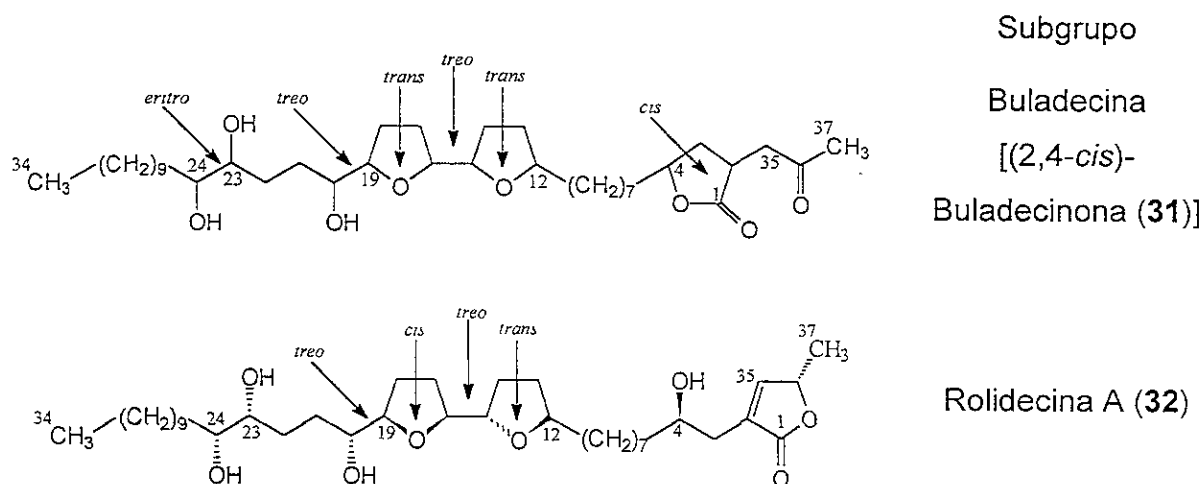


Figura 4. Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen anillos bis-THF adyacentes (cont).

- iii) **Acetogeninas del tipo bis-THF no adyacentes.** Las acetogeninas de este grupo, se subdividen en siete categorías. En las seis primeras los anillos de THF se encuentran separados por cuatro átomos de carbono. El anillo de THF más próximo al metilo terminal generalmente se encuentra localizado entre los carbonos 18-21 ó 20-23, e invariablemente está unido a una función carbinólica en cada uno de sus extremos; el segundo anillo de THF se ubica entre los carbonos 10-13 ó 12-15, vecinal a una función carbinólica secundaria ubicada en C-14 ó C-16. En el último subgrupo, los anillos de THF están separados por ocho átomos de carbono, el anillo próximo a la función lactona no presenta grupos hidroxilos en los carbonos vecinales, en tanto que el segundo anillo ubicado entre las posiciones C-16/C-19 presenta una función carbinólica vecinal en cada uno de los extremos del heterociclo (Figura 5).

- iv) **Acetogeninas del tipo tris-THF adyacentes.** A la fecha solo se ha aislado una acetogenina con tres anillos de THF, su estructura se indica en la Figura 6.

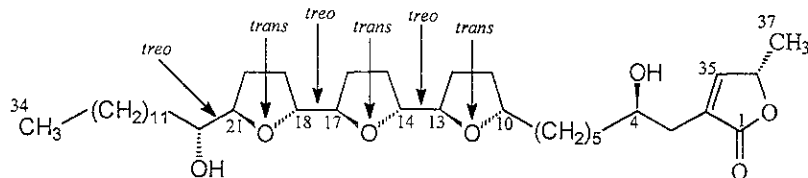


Figura 6. Estructura química de la goniocina (40).

- v) **Acetogeninas del tipo THF-THP no adyacentes.** La única acetogenina que contiene un anillo de THP y THF no adyacentes es la mucocina (41). Este compuesto tiene la particularidad de presentar el anillo de THP hidroxilado. Al igual que la mayoría de las bis-THF no adyacentes, los anillos heterocíclicos se encuentran separados por cuatro átomos de carbono. Este compuesto constituye el primer ejemplo de una acetogenina natural que contiene un anillo de THP (Figura 7).

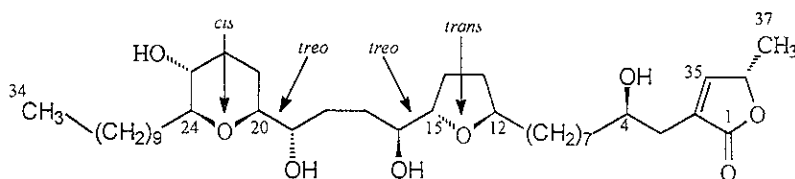


Figura 7. Estructura química de la mucocina (41).

Subgrupo

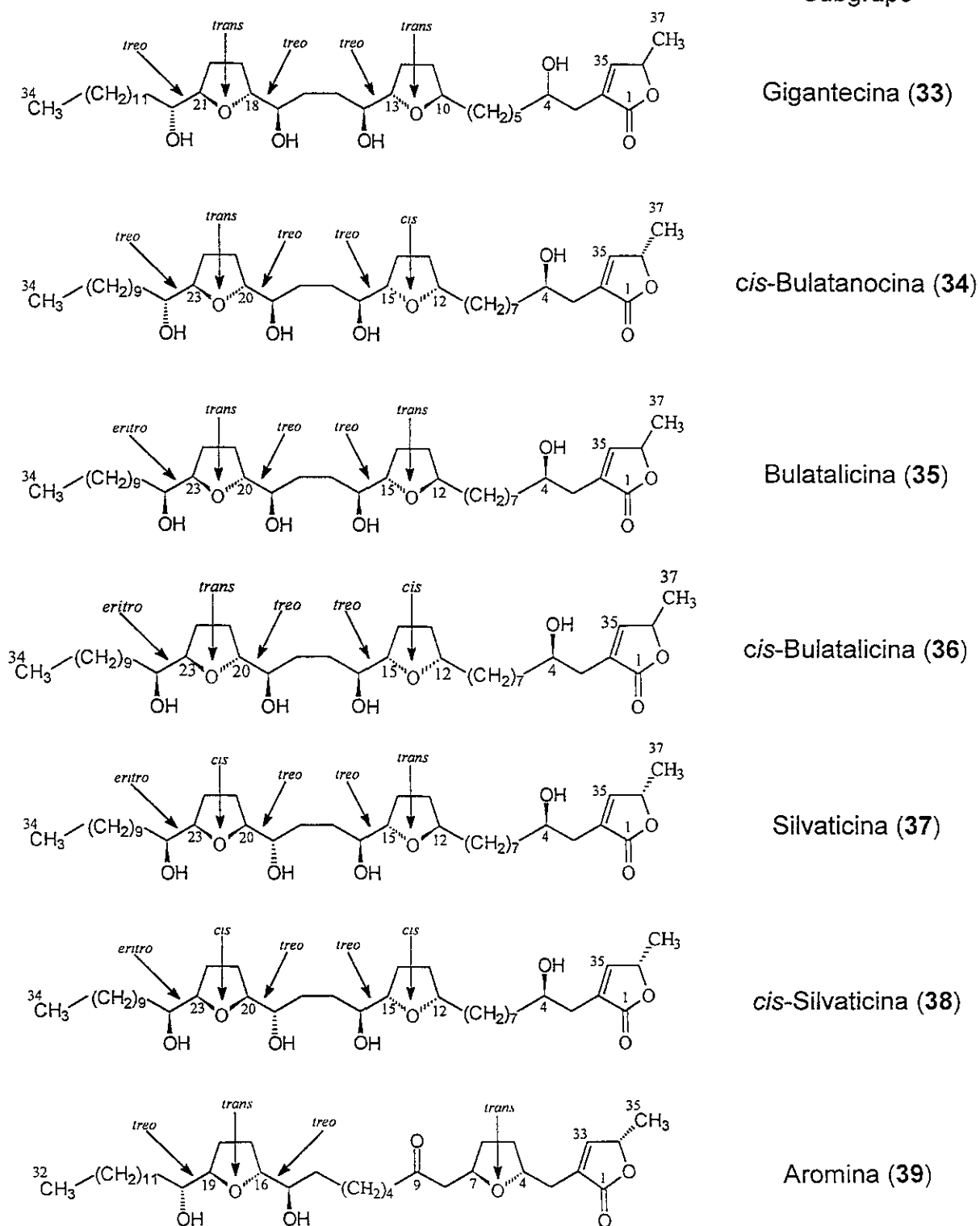


Figura 5. Ejemplos selectos de acetogeninas que contienen anillos bis-THF no adyacentes (cont).

- vi) **Acetogeninas del tipo THF-THP adyacentes.** Recientemente se describió una segunda acetogenina con un anillo de THP a lo largo de la cadena hidrocarbonada, la muconina (**42**). A diferencia de la mucocina (**41**), el anillo de THP se encuentra adyacente al THF y no contiene una función carbinólica (Figura 8).

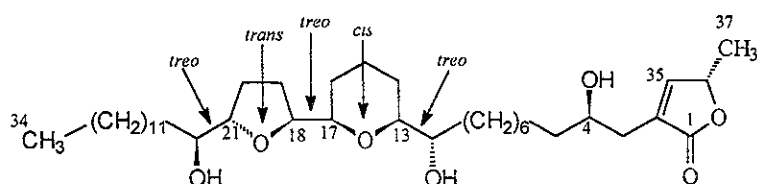


Figura 8. Estructura química de la muconina (**42**).

- vii) **Acetogeninas que no contienen anillos de THF o THP.** Se han descrito varios compuestos con cadenas hidrocarbonadas de 32 ó 34 átomos de carbono, que contienen la metil- γ -lactona- α,β -insaturada y varios grupos funcionales como hidroxilos, cetonas, epóxidos y/o dobles ligaduras. La característica distintiva de este grupo es la ausencia de anillos de THF o THP a lo largo de la cadena hidrocarbonada (Figura 9).

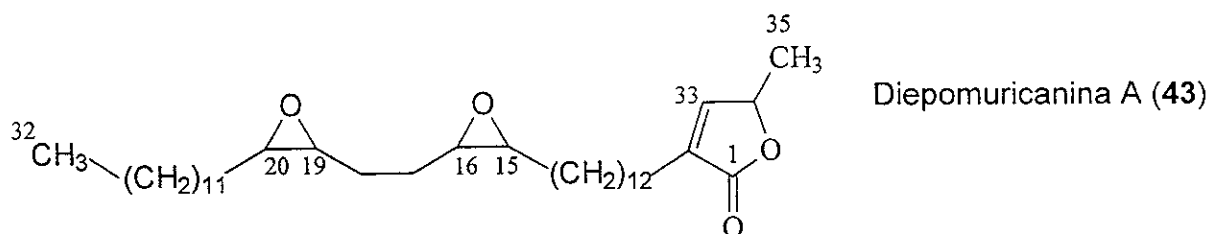


Figura 9. Ejemplo selecto del grupo de acetogeninas que no contienen anillos de THF o THP.

Además de la clasificación antes mencionada, las acetogeninas también pueden agruparse considerando las características estructurales de la metil- γ -lactona (Gu *et al.*, 1995a; Zafra-Polo *et al.*, 1998). Esta clasificación divide a las acetogeninas en cinco grupos (A₁-A₅) (Figura 10). En los grupos A₁ y A₂ la metil- γ -lactona es α,β insaturada y la única diferencia es la presencia de un hidroxilo en la posición C-4 de la cadena hidrocarbonada en los compuestos del grupo A₂. Este hidroxilo induce un cambio en las propiedades espectroscópicas y químicas de la porción lactona.

El grupo A₃ incluye acetogeninas que presentan la metil- γ -lactona saturada y un hidroxilo en la posición C-33/C-35. El grupo A₄ agrupa a los productos con la metil- γ -lactona- α,β insaturada y una función hidroxilo en la posición C-34/C-36. Por último, las del grupo A₅ (cetolactona) se generan por una reacción de translactonización a partir de compuestos del tipo A₂. A estos policétidos se les considera artefactos y se les da el nombre de isoacetogeninas (Duret *et al.*, 1994). La reacción de translactonización que da origen a las isoacetogeninas ocurre fácilmente en presencia de bases fuertes y bases débiles como la dietilamina y los alcaloides isoquinolínicos con los que coexisten las acetogeninas en los extractos vegetales. Cavé y colaboradores demostraron que el calentamiento de una solución metanólica de acetogeninas es suficiente para permitir la reacción de translactonización (Duret *et al.*, 1994).

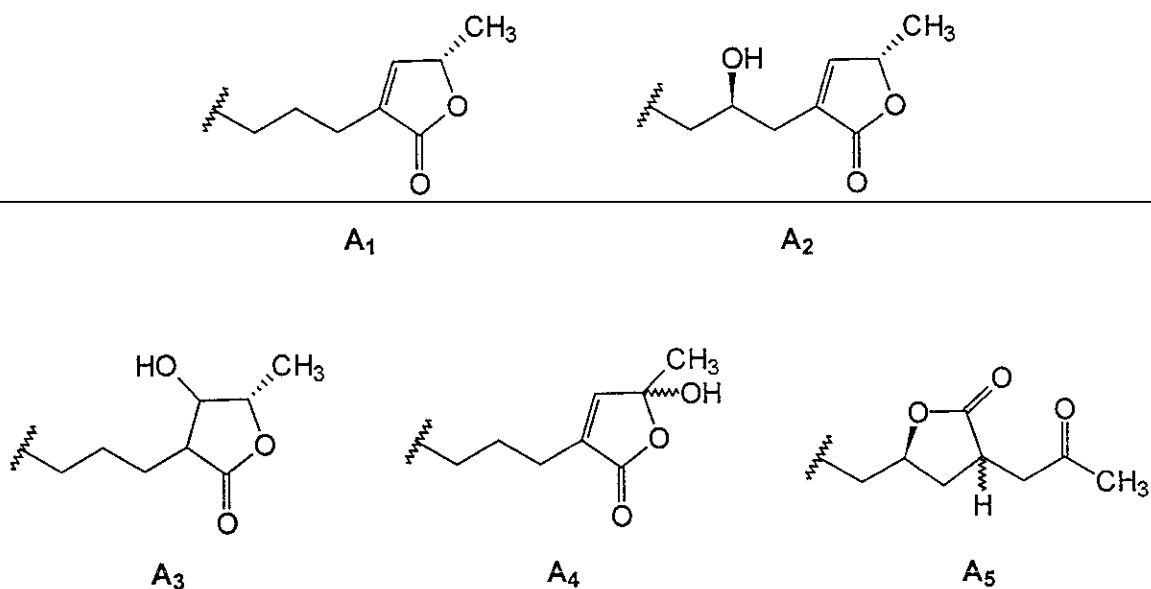


Figura 10. Diferentes tipos de la subunidad metil- γ -lactona de las acetogeninas de anonáceas.

Para explicar el proceso de translactonización que permite la formación de las isoacetogeninas se han propuesto dos mecanismos (Duret *et al.*, 1994). El primero involucra la sustracción del hidrógeno en C-36, para generar la estructura b (Figura 11). El ataque intramolecular del hidroxilo en C-4 al carbonilo lactónico conlleva a la formación del ortoéster cíclico c. Posteriormente, la apertura del ciclo genera la nueva lactona. El segundo mecanismo implica la sustracción del protón del hidroxilo en C-4; el anión resultante ataca al carbonilo para generar de nueva cuenta el ortoéster cíclico b'. En seguida, la apertura del ortoéster genera la estructura c' que sufre un arreglo sigmatrópico antarafacial [1,3] para generar la estructura d' (Figura 11), la cual se tautomeriza en la isoacetogenina correspondiente (Duret *et al.*, 1994). A la fecha no se cuenta con ninguna evidencia experimental que apoye las dos rutas propuestas.

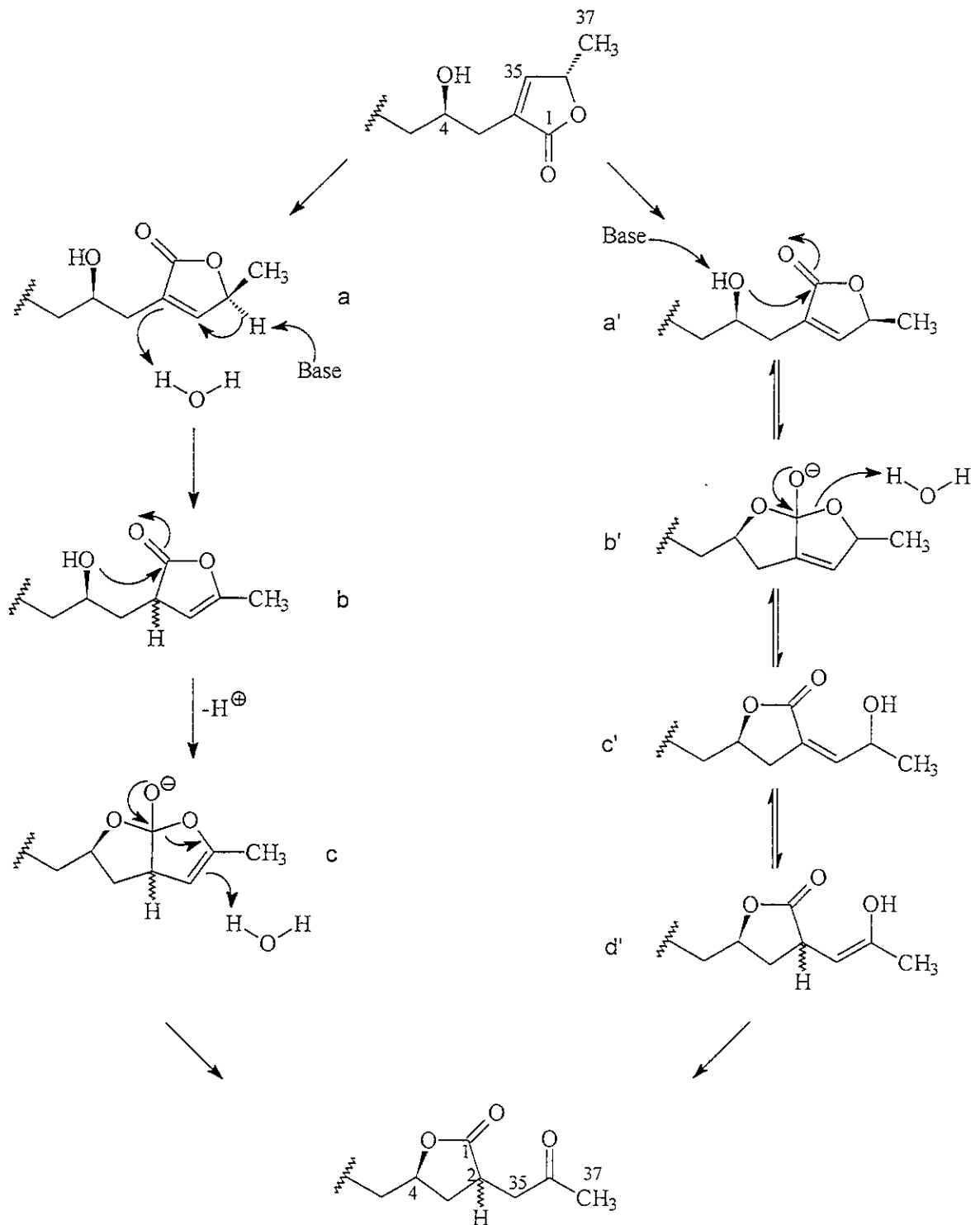


Figura 11. Mecanismos de transactonización propuestos para la formación de isoacetogeninas a partir de las 4-hidroxiacetogeninas (Duret *et al.*, 1994).

2.1.3 Biosíntesis de las acetogeninas de anonáceas.

La hipótesis de la biosíntesis de acetogeninas propone que estos productos naturales derivan de la ruta acetato-malonato. La presencia de anillos de THF en las moléculas sugiere que los productos finales se generan a partir de intermediarios de tipo dienos, trienos o con grupos ceto, los cuales sufren epoxidaciones y ciclizaciones. El descubrimiento de acetogeninas con dobles ligaduras y funciones epóxido apoya claramente esta hipótesis. Las posibles rutas biogénicas que conducen a la formación de los diferentes tipos de acetogeninas se han descrito en forma detallada (Fang *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995a). A manera de ejemplo, en la Figura 12 se ilustra la secuencia biogénica para dos grupos de acetogeninas con anillos bis-THF adyacentes.

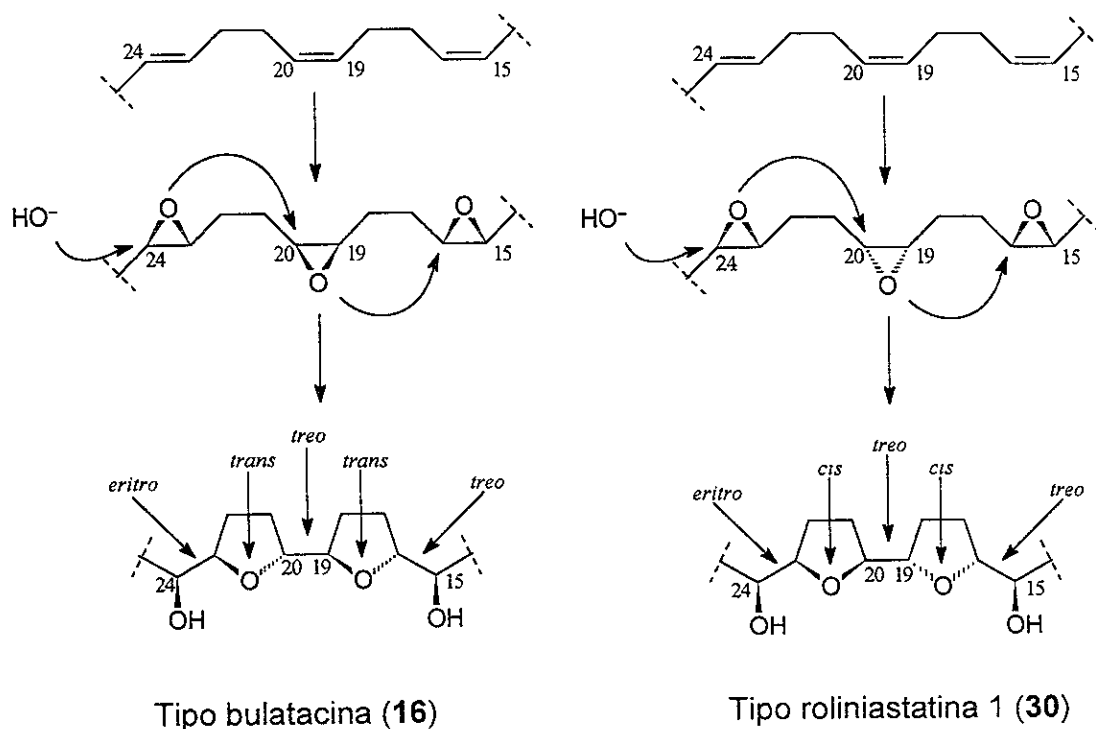
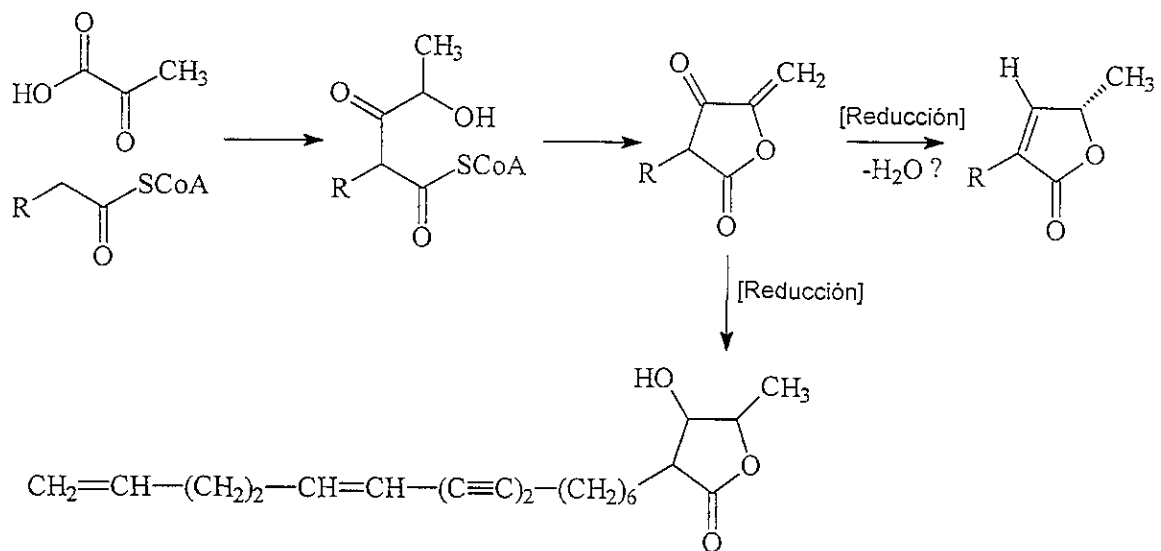


Figura 12. Ruta biogénica propuesta para la formación de anillos bis-THF adyacentes.

La biogénesis de la metil- γ -lactona presente en las acetogeninas de anonáceas no se ha investigado. Sin embargo, Etse y Waterman (1986) proponen una ruta biogenética para la formación de una lactona acetilénica aislada de *Sapranthus palanga* (Annonaceae). Estos investigadores sugieren que la biogénesis de la metil- γ -lactona involucra una condensación de tipo Claisen entre una unidad de un ácido graso (C_{18}) y el ácido pirúvico (C_3). La metil- γ -lactona generada como se indica en la Figura 13, podría deshidratarse para generar la metil- γ -lactona- α,β insaturada, tan común en las acetogeninas de anonáceas.

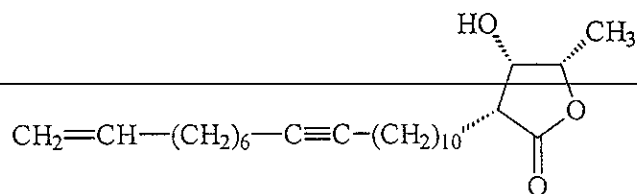


Saprantina (44)

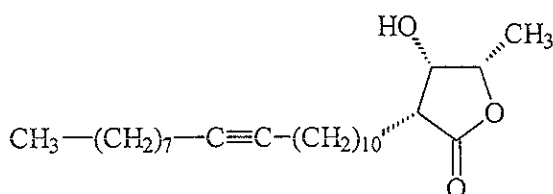
Figura 13. Ruta biogenética propuesta para la formación de la metil- γ -lactona en las acetogeninas.

Recientemente, Chávez y Roque (1997) aislaron e identificaron dos lactonas acetilénicas de la especie *Porcelia macrocarpa*, también de la familia de las anonáceas (Figura 14). De igual forma, éstos investigadores proponen que las

lactonas acetilénicas provienen de un ácido graso de 22 átomos de carbono y del ácido pirúvico.



(2S, 3R,4R)-3-hidroxi-4-metil-2-(9'-n-eicos-1'-enil) butanólida (**45**)



(2S,3R,4R)-3-hidroxi-4-metil-2-(9'-n-eicosanil) butanólida (**46**)

Figura 14. Lactonas acetilénicas que fueron aisladas de *Porcelia macrocarpa*.

2.1.4 Actividades biológicas de acetogeninas de anonáceas.

En los últimos años el potencial de las acetogeninas de anonáceas como agentes medicinales y pesticidas ha sido ampliamente estudiado. Estas investigaciones han permitido establecer que estos compuestos ofrecen grandes posibilidades para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos, inmunosupresores, insecticidas, antiprotozoarios, antihelmínticos y antimicrobianos (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Cortes *et al.*, 1993; Cavé *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995a; Zeng *et al.*, 1996; Zafra-Polo *et al.*, 1996; McLaughlin *et al.*, 1997; Cavé *et al.*, 1997; Zafra-Polo *et al.*, 1998).

Sin duda alguna, la actividad citotóxica y antitumoral de estos compuestos es la que ha llamado la atención de los investigadores. De tal forma que durante los últimos cinco años de la década de los ochenta y gran parte de la década de los noventa, el efecto citotóxico de un gran número de acetogeninas ha sido investigado sobre diversas líneas celulares derivadas de tumores humanos. En la mayoría de los casos estos productos han demostrado no sólo una gran potencia como agentes citotóxicos, sino también un notable grado de selectividad contra algunas líneas celulares, por ejemplo la derivada del cáncer de próstata humano (PC-3) (Hopp *et al.*, 1997). En general los valores de CE_{50} (concentración que inhibe el crecimiento celular en un 50%) oscilan entre 10^{-1} y 10^{-12} $\mu\text{g/mL}$ (Fang *et al.*, 1993). A la fecha, las acetogeninas más potentes son las del grupo bis-THF adyacentes, en particular las de los tipos de la bulatacina (**16**), la asimicina (**25**) y la trilobacina (**27**).

La bulatacina (**16**), la *cis*- y *trans*-bulatacinonas (**17**) y la escuamostatina A (**47**) y sus análogos han sido patentadas como agentes quimioterapéuticos. Las primeras en E.U.A. y la escuamostatina A (**47**) y sus derivados en el Japón.

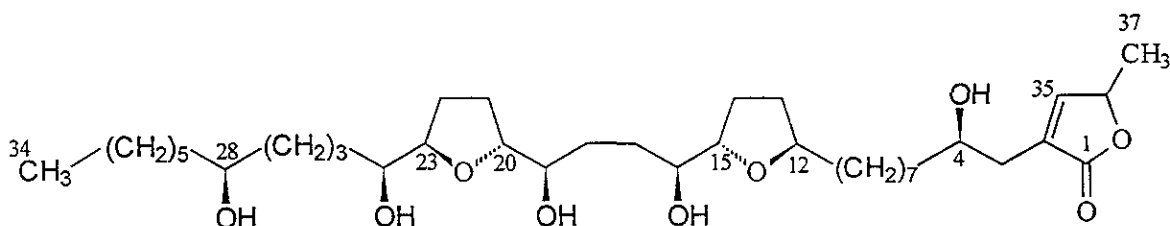


Figura 15. Estructura química de la escuamostatina A (**47**).

El grado de actividad citotóxica manifestado por estos compuestos ha despertado también un gran interés entre numerosos laboratorios farmacéuticos. Así, la

compañía Upjohn realizó varios estudios con la finalidad de determinar la actividad antitumoral *in vivo* de las acetogeninas con mayor actividad citotóxica. De tal forma que la bulatacina (16) y las bulatacinonas (17) se evaluaron como agentes antitumorales en ratones con leucemia (L1210) y demostraron ser más eficaces y potentes que el taxol (12) (300 y 40 veces, respectivamente) (Ahammadsahib *et al.*, 1993). Estudios subsecuentes con la bulatacina (16) y bulatalicina (35) indicaron que estos productos, a las dosis de 0.05 y 1.0 mg/Kg/día durante 10 días inhibieron de manera significativa el desarrollo de tumores de ovario (A2780) en ratones. De manera adicional, se observó que estos compuestos ocasionan una pérdida de peso menor que el cisplatino (3), lo que indica una mejor tolerancia de este tipo de compuestos (Ahammadsahib *et al.*, 1993).

Las acetogeninas y los extractos vegetales que las contienen, han demostrado también una gran eficacia como pesticidas “verdes” en el control de algunos insectos y nemátodos que afectan cultivos de importancia económica (McLaughlin *et al.*, 1997). Así por ejemplo, los extractos crudos y las acetogeninas aisladas de la corteza de *Asimina triloba* y de las semillas de *Annona muricata* (guanábana) son efectivas contra áfidos, la mosca blanca, el escarabajo de la papa y contra el nemátodo *Caenorhabditis elegans* a concentraciones entre 300 y 5000 ppm (Fang *et al.*, 1993).

Las distintas pruebas de seguridad realizadas con los extractos de *Annona muricata* y *Asimina triloba* permitieron establecer que estos no son irritantes ni mutagénicos, sin embargo, son eméticos. Este último efecto sería de gran ventaja en caso de ingesta accidental de estos pesticidas (Fang *et al.*, 1993).

2.1.5 Mecanismo de acción de las acetogeninas de anonáceas.

Los diferentes estudios conducidos con la finalidad de establecer el mecanismo mediante el cual las acetogeninas ejercen su efecto pesticida y citotóxico han permitido definir que estos compuestos son unos potentes inhibidores de la NADH ubiquinona reductasa (Complejo I), importante enzima del proceso de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Este efecto inhibitorio tiene como consecuencia el bloqueo del flujo de electrones justo antes de la reducción de la ubiquinona en el complejo I (Figura 16). De tal manera, que las acetogeninas de anonáceas inhiben el proceso de la fosforilación oxidativa al mismo nivel que la rotenona (48), un inhibidor clásico del complejo I (Ahmmadsahib *et al.*, 1993). En otras investigaciones más recientes, se comprobó que estos compuestos no compiten con la rotenona (48) por su sitio de acción en el complejo I (Gu *et al.*, 1995a).

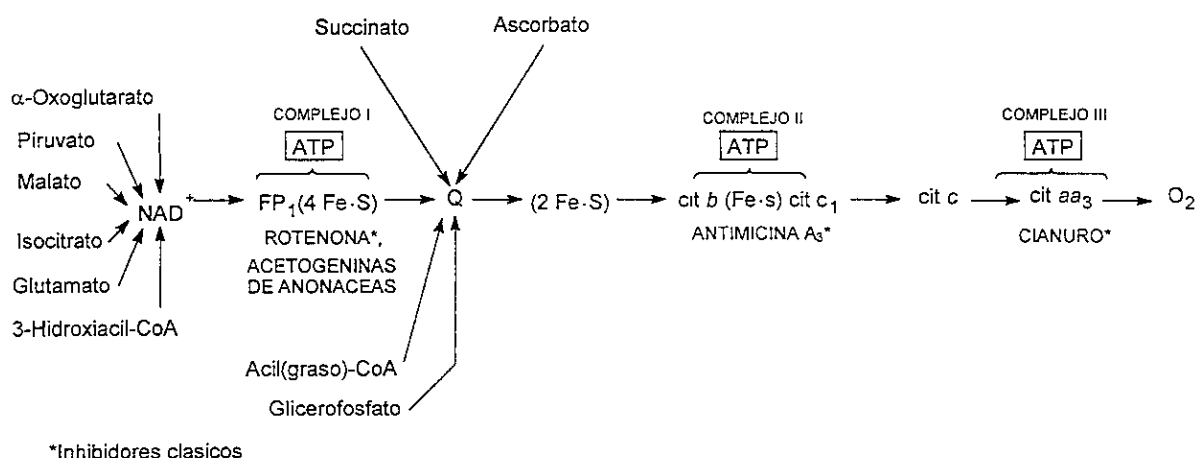


Figura 16. Representación del proceso de fosforilación oxidativa en la mitocondria.

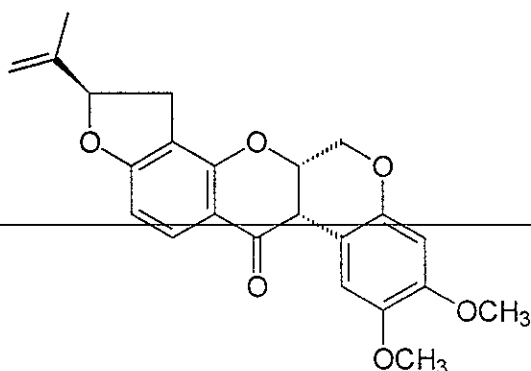


Figura 17. Estructura química de la rotenona (48).

Las acetogeninas, al interrumpir el transporte de electrones mitocondrial, evitan la conversión de ADP y Pi en ATP y en consecuencia el abasto de energía necesario para el funcionamiento y desarrollo celular. La bulatacina (16), una de las acetogeninas más potentes como inhibidor de la enzima NADH-ubiquinona reductasa [28 veces más potente que la rotenona (48)] bloquea el consumo de oxígeno cuando se utiliza glutamato como sustrato (Ahmmadsahib *et al.*, 1993). Por otra parte, cuando el succinato se utiliza como sustrato no se observa la inhibición en el consumo de oxígeno. Estos resultados permiten inferir que el succinato o el ascorbato puede ser empleado como antídotos en casos de intoxicación con acetogeninas en la eventual aplicación de estos productos como agentes quimioterapéuticos.

Para explicar la alta potencia citotóxica demostrada por estos compuestos así como la selectividad para las células tumorales, se han realizado investigaciones conducentes a encontrar un mecanismo de acción secundario. De modo que se ha demostrado que existe una diferencia fundamental entre la actividad de la enzima

NADH-oxidasa presente en la membrana celular de las células normales aisladas de hígados de rata y la de las células cancerosas del tipo HeLa (Carcinoma cervical humano) y HL-60 (leucemia promielocítica humana). La diferencia consiste en que en las células normales, la actividad de la enzima es estimulada por hormonas y factores de crecimiento, en tanto que en las células cancerosas la enzima se mantiene siempre activa. Morré y colaboradores (1995) determinaron que la bulatacina (**16**) inhibe la actividad de la enzima NADH-oxidasa de las vesículas membranales plasmáticas aisladas de células HeLa y HL-60 a una concentración efectiva media (CE_{50}) de 5 a 10 nM. Sin embargo, la bulatacina (**16**) no afecta la actividad de la NADH-oxidasa de las vesículas membranales plasmáticas aisladas de células de hígado de rata. Esta especificidad sobre la enzima de las células tumorales explica la potencia y la selectividad de las acetogeninas sobre las células tumorales. Por último, la bulatacina (**16**) también inhibió la actividad de la enzima NADH-oxidasa en las células HL-60 resistentes a adriamicina (**6**). Esta última observación ha despertado un gran interés por el estudio de este grupo de compuestos como agentes potenciales para el tratamiento de tumores resistentes (Morré *et al.*, 1995).

2.1.6 Relación estructura química-actividad.

El análisis comparativo de la vasta información publicada acerca de las propiedades citotóxicas y antitumorales de las acetogeninas de anonáceas ha permitido establecer las siguientes correlaciones estructura química-actividad biológica (Fang *et al.*, 1993):

- a) Las acetogeninas del grupo bis-THF adyacentes son más potentes que las bis-THF no adyacentes. Estas últimas, a su vez, son más potentes que las mono-THF. Por último, los compuestos que no contienen anillos de THF son los menos potentes.
-
- b) La metil- γ -lactona- α,β -insaturada presente en un extremo de la cadena hidrocarbonada es esencial para la actividad biológica. La reducción de la doble ligadura de la γ -lactona- α,β -insaturada disminuye notablemente la actividad. La transformación de acetogeninas en isoacetogeninas conlleva también a una pérdida sensible de las propiedades citotóxicas.
- c) La presencia de un grupo hidroxilo en C-4 o en cualquiera de las posiciones entre C-28 y C-32 incrementa la actividad biológica.
- d) Los compuestos con un grupo ceto, son menos activos que los alcoholes correspondientes.
- e) La presencia de dobles ligaduras y/o dioles a lo largo de la cadena hidrocarbonada, también incrementa la actividad citotóxica.
- f) Los derivados de tipo acetónido o acetato son menos activos que los compuestos naturales.

Recientemente, McLaughlin y colaboradores (Gu *et al.*, 1995a; Zeng *et al.*, 1996) realizaron un estudio de relación estructura química-actividad biológica utilizando 33 acetogeninas representativas de los diferentes grupos y subgrupos. En este caso la actividad biológica consistió en la evaluación del efecto inhibitorio ejercido por los compuestos sobre el consumo de oxígeno en suspensiones de mitocondrias

aisladas de hígado de rata. La bulatacina (**16**) se utilizó como un control positivo durante cada determinación para normalizar los datos. Los resultados revelan un notable paralelismo con las correlaciones previamente establecidas para el efecto citotóxico. De manera adicional, se comprobó que cuando el número de hidroxilos libres presentes en la molécula es mayor a tres, la inhibición del proceso de fosforilación oxidativa decrece considerablemente.

2.2 ANTECEDENTES SOBRE *Annona purpurea*.

2.2.1 Descripción botánica de la especie.

Annona purpurea Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae) (Figura 18) es un árbol pequeño cuyas medidas oscilan entre los 6 y 10 m de altura. Presenta un tronco corto y de 45 cm de diámetro; las ramas jóvenes son de color rojizo; las hojas son grandes, onduladas y miden entre 15 y 25 cm de largo; las flores son sésiles, solitarias y están protegidas por dos brácteas; los pétalos son rojizos. El fruto, de forma esférica u ovoide, llega a medir 15 cm o más. Además, presenta protuberancias piramidales longitudinalmente hendidas, ligeramente encorvadas hacia el pedúnculo. Las semillas son abundantes y miden entre 2.5 y 3 cm de largo. La pulpa es fragante y agradable al paladar (Martínez, 1989).



A



B

Figura 18. *Annona purpurea*: A (ampliación del fruto); B (árbol).

2.2.2 Distribución.

La especie *A. purpurea* se distribuye en las zonas costeras, desde el sur de México hasta Panamá, Colombia y Venezuela. De manera adicional, esta especie puede encontrarse en Filipinas y Puerto Rico, lugares en donde fue introducida a principios de este siglo. *A. purpurea* requiere para su crecimiento un clima caliente y húmedo de modo que no se localiza en altitudes mayores a 1,200 m (Morton, 1987).

2.2.3 Nombres comunes.

Los nombres comunes con que se designa a la especie varían según la región de distribución. De acuerdo a una revisión de Morton (1987) los más conocidos son los siguientes:

- Ilama, cabeza de negro (Veracruz), cabeza de ilama (Veracruz, Oaxaca), chincua, ilama de tehuantepec (Oaxaca), chak-ooop, chak koor, pol-box y chincuyaya, (Yucatán), en México.
- Anona sincuya, chincuya, cabeza de muerto, sencuya, suncuyo, soncolla y matacuy, en Guatemala.
- Soncoya, en Costa Rica.
- Guanábano torete y toreta, en Panamá.
- Gallina gorda, guanábano pun y matimba, en Colombia.
- Castiguire, maniré, manirote, tiragua y tucuria, en Venezuela.

2.2.4 Propiedades medicinales e importancia económica.

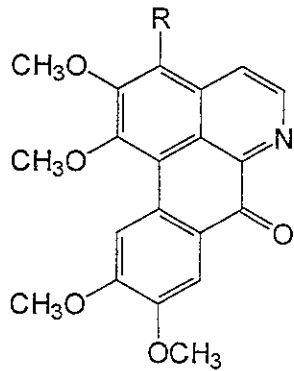
En México, el jugo de *A. purpurea* se utiliza como remedio para la fiebre y la gripe (Martínez, 1989). En otras partes de la América Tropical, el fruto se emplea para aliviar la ictericia. La decocción de la corteza es efectiva contra la disentería y la infusión de la corteza interna es útil para el tratamiento del edema. El extracto de las semillas es tóxico. Además se emplea como insecticida (Morton, 1987). Con respecto al fruto, su utilización es principalmente alimenticia: su pulpa se consume cruda o en jugo como una bebida refrescante.

2.2.5 Antecedentes fitoquímicos.

Desde el punto de vista fitoquímico, la especie ha sido objeto de dos investigaciones previas. En 1971, Sonnet y Jacobson reportan el estudio del contenido alcaloideo de las hojas y ramas de *A. purpurea* recolectadas en Puerto Rico. En esta investigación los autores arriba señalados, describen el aislamiento y la caracterización de ocho alcaloides citotóxicos del tipo aporfínico (Figura 19).

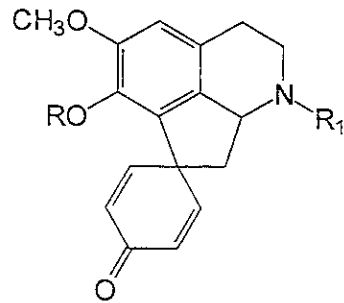
En un estudio más reciente de las hojas de la planta, recolectadas en Panamá, el grupo de Hostettmann (Cepleanu *et al.*, 1993) describe el aislamiento y caracterización de seis acetogeninas, tres de tipo bis-THF adyacentes y tres de la clase de las bis-THF no adyacentes (Figura 20). Las acetogeninas aisladas demostraron una gran actividad tóxica contra la larva del mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*) y el crustáceo *Artemia salina*. Adicionalmente, las acetogeninas del tipo bis-THF no adyacentes, así como la purpureacina 2 (57),

presentaron una notable actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Por último, la purpureacina 1 (**59**) presentó una débil actividad contra la bacteria *Bacillus subtilis*.



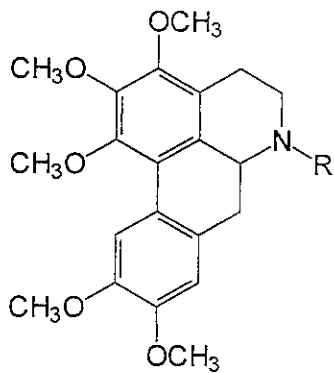
R= H O-Metilaterolina (**49**)

R = OCH₃ Oxopurpureina (**50**)



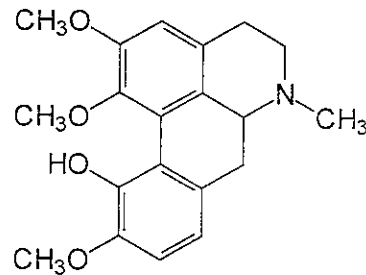
R= H, R₁= CH₃ Glaziovina (**51**)

R= CH₃, R₁= H Stefarina (**52**)

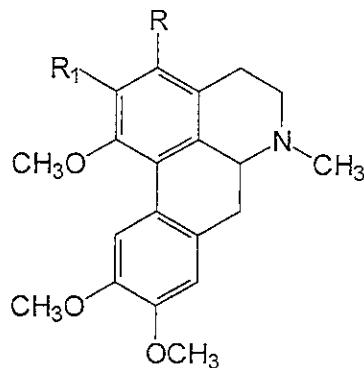


R= H Norpurpureina (**53**)

R= CH₃ Purpureina (**54**)

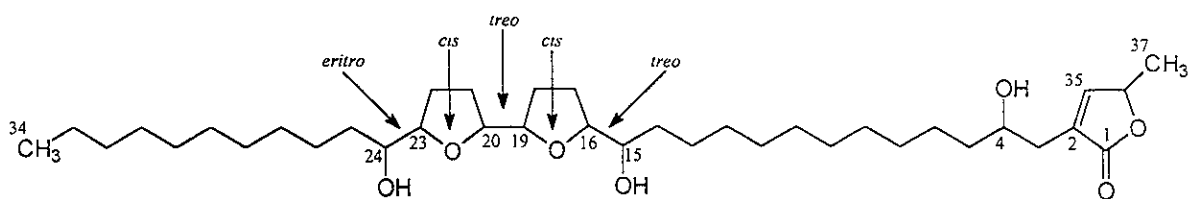


Isocoridina (**55**)

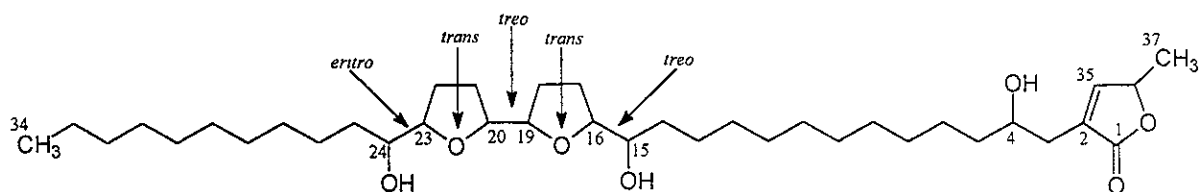


R, R₁= OH y OCH₃ O-desmetilpurpureina (**56**)

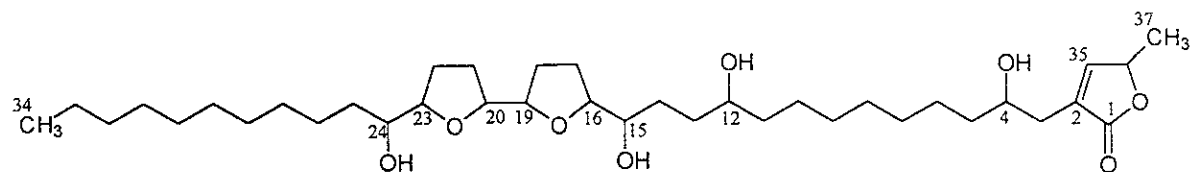
Figura 19. Alcaloides que fueron aislados de las hojas y ramas de *A. purpurea* (Sonnet y Jacobson, 1971).



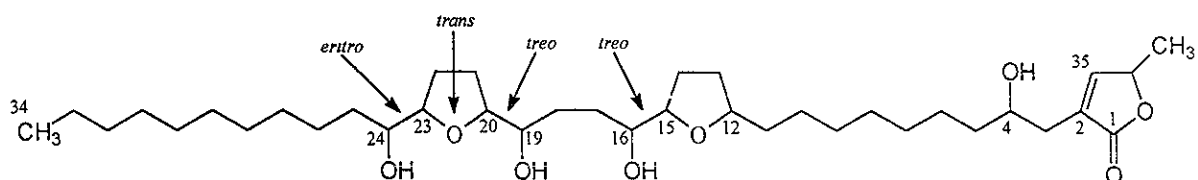
Roliniastatina 1 (30)



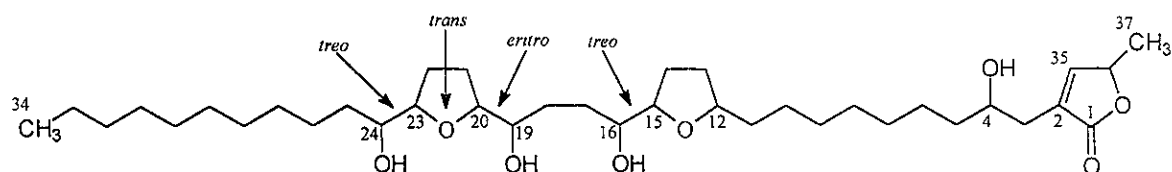
Bulatacina (16)



Purpureacina 2 (57)

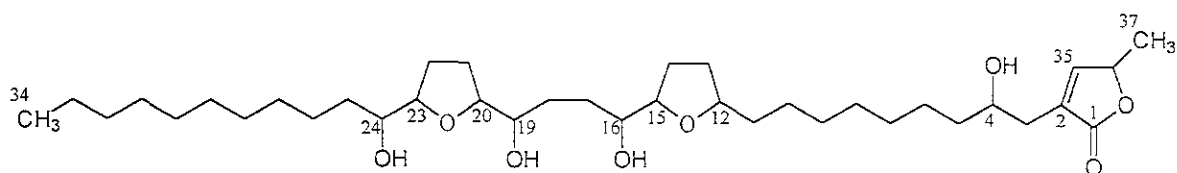


Cherimolina (58)



Silvaticina (37)

Figura 20. Acetogeninas que fueron aisladas de las hojas de *A. purpurea* (Cepleanu *et al.*, 1993).



Purpureacina 1 (59)

Figura 20. Acetogeninas que fueron aisladas de las hojas de *A. purpurea* (cont).

2.3 ANTECEDENTES SOBRE *Rollinia mucosa*.

2.3.1 Descripción botánica de la especie.

La especie *Rollinia mucosa* (Jacquin) Baillon (Annonaceae) (Figura 21) es un árbol que mide aproximadamente entre 20 y 25 m de altura, sus ramas color café, poseen vellosidades y sus hojas, alternas y elípticas, miden entre 10 y 25 cm de largo. El fruto, de forma esférica, posee protuberancias hexagonales en donde se encuentran las semillas que miden entre 2.5 y 3 cm de largo. Las medidas del fruto, por cierto, oscilan entre los 2 y 12 cm de largo y los 2.5 y 11 cm de diámetro. La pulpa es blanca, jugosa y de sabor agridulce. La especie florece en la Amazonia con mayor abundancia en los meses que van de enero a julio, aunque se encuentra durante todo el año, en Florida (E.U.A.) y México florece en noviembre y diciembre. La *R. mucosa* es la especie más abundante de este género (Maas *et al.*, 1992).

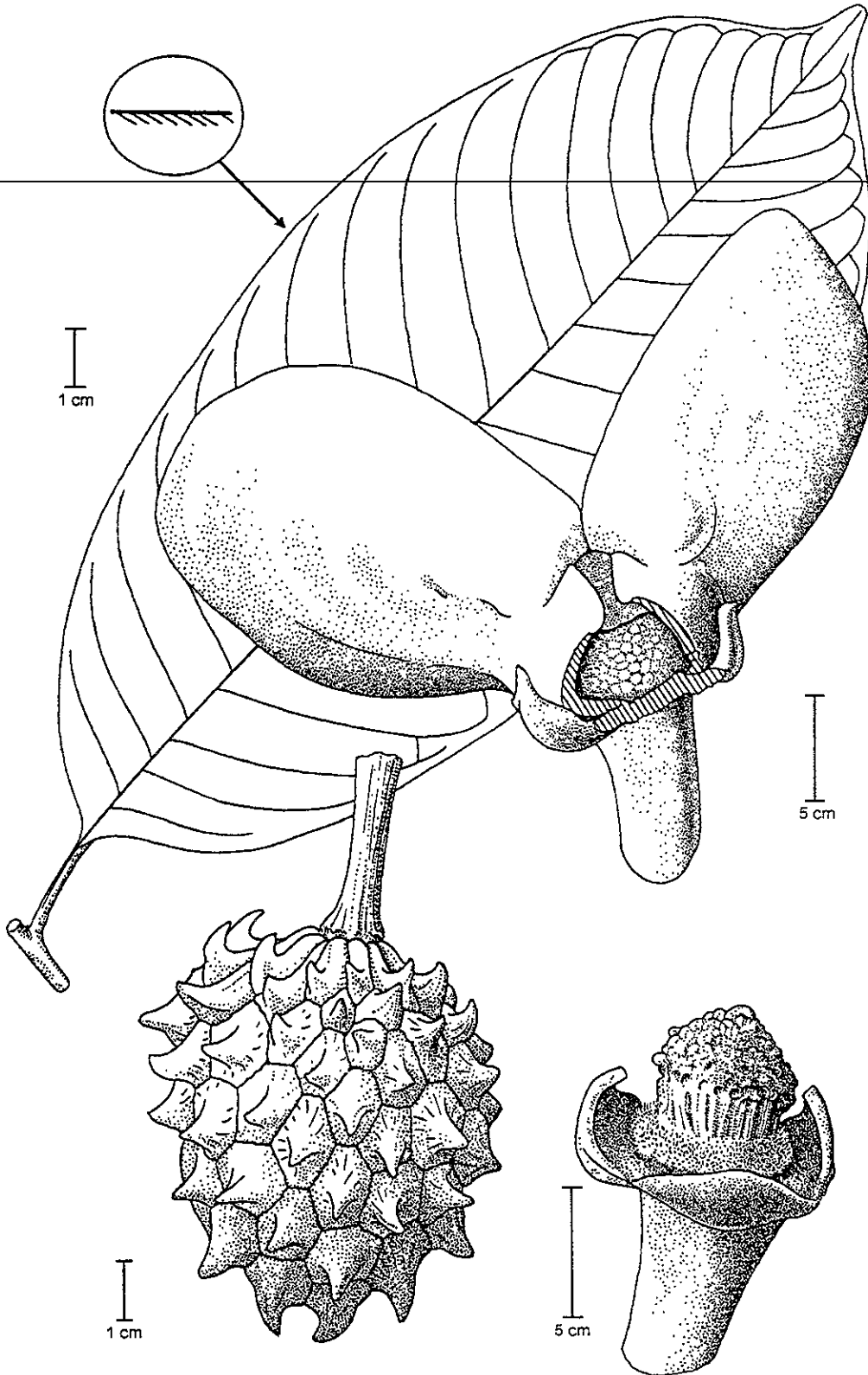


Figura 21. *Rollinia mucosa*.

2.3.2 Distribución.

R. mucosa crece en diferentes tipos de bosques, desde la selva alta *perennifolia* hasta las tierras bajas húmedas y se distribuye principalmente en la América Tropical (Figura 22), desde el norte de Argentina hasta el sur de México, incluyendo algunas islas del Caribe como Puerto Rico, Haití, República Dominicana, Trinidad y las Antillas Menores (Guadalupe, Martinica y San Vicente). La especie fue introducida a principios de este siglo en Estados Unidos, Indonesia y Filipinas. *R. mucosa* se cultiva en altitudes hasta 1,500 m sobre el nivel del mar (Morton, 1987; Maas *et al.*, 1992).

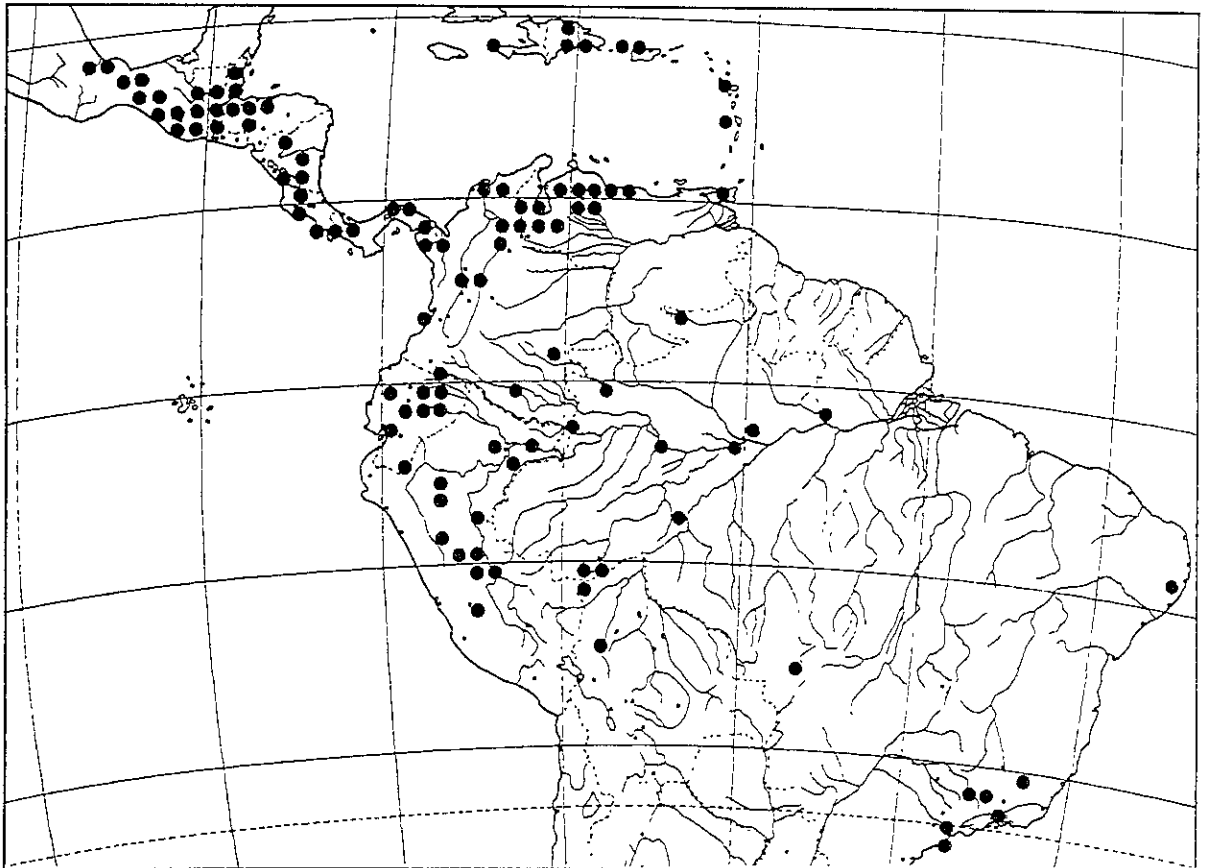


Figura 22. Distribución de *R. mucosa*.

2.3.3 Nombres comunes.

Los nombres comunes con los que se designa a la especie en distintos lugares (Morton, 1987; Maas *et al.*, 1992) son los siguientes:

- Anonilla, anonillo, anonita, anonita de monte, cherimoya, anona babosa y zambo, en México.
- Anona, anona silvestre, anonillo, chirimoya, saramullo silvestre, en Guatemala.
- Anonilla, anonillo y *wild custard apple*, en Belice.
- Anona, en Honduras.
- Anonillo, en Costa Rica.
- Anona y toreta, en Panamá.
- Cachimán y anón cimarrón, en Puerto Rico.
- Candón, candóngo y anona, en la República Dominicana.
- Cachimán montange, cachimán morveux y cachimán cochón, en Guadalupe y Martinica.
- Anón, anón de montaña, anón enorme, anón silvestre, anóna, anona, cherimoya, chirimoyo, guai-tu-to, k'han-no, mulato y picá, en Colombia.
- Anón de monte, cherimoya, chirimoya, chirimoyo, riñón, riñón de montaña, riñón montañoso y riñón de monte, en Venezuela.
- Cachima, *wild sugar apple*, *sugar-apple* y *wild cashima*, en Trinidad.

- Casimo, en Guyana.
- Abriba, en Guyana Francesa
- Ananas panga, anúna, cabeza de negro, chirimoya, chirimoyo arisco y zambo, en Ecuador.
- Annóna, anón, anóna, anonilla y anúna, en Perú.
- Araticum, araticu, articum, biribá, biribá de pernambuco, pitaya, condessa, fructa da komdessa, fruta de conde, fruta da condessa, graviola brava y jaca de pobre, en Brasil.

2.3.4 Propiedades medicinales e importancia económica.

R. mucosa se utiliza ampliamente en las prácticas medicinales populares de las distintas zonas donde se distribuye. Así, en las Antillas e Indonesia se emplea para el tratamiento de tumores (Pettit *et al.*, 1987). En Ecuador las hojas se emplean para la cura del reumatismo. En Brasil y otros lugares, las semillas pulverizadas son apreciadas para combatir problemas intestinales incluyendo la enterocolitis (Maas *et al.*, 1992; Morton, 1987). En el Caribe, el fruto es altamente valorado como refrigerante, analéptico y antiescorbútico. La corteza y la madera de la planta son también de importancia económica: De la corteza se obtienen tiras largas de gran resistencia que se utilizan para amarrar objetos de diversa naturaleza para su posterior transporte; la madera se emplea para la construcción de casas, de canoas, botes y otros enseres. Por último, el fruto es apreciado como alimento y se consume como tal o se destina a la elaboración de bebidas refrescantes. Como dato curioso,

en Brasil el fruto se fermenta para elaborar una bebida alcohólica (Maas *et al.*, 1992; Morton, 1987).

2.3.5 Estudios químicos.

Los estudios fitoquímicos de *R. mucosa* han permitido el aislamiento y caracterización de numerosos metabolitos secundarios. Estos metabolitos incluyen ácidos grasos y derivados; lignanos del tipo furofuránicos (De Queiroz Paulo *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1996a), esteroides del tipo estigmastano (Maas *et al.*, 1992); alcaloides isoquinolínicos de los tipos aporfínicos, morfínicos y protoberberinas (Caétano y Dadoun, 1986; Chen *et al.*, 1996a); y acetogeninas, en su mayoría del tipo bis-THF adyacentes (Pettit *et al.*, 1987; Pettit *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1996a; Shi *et al.*, 1996b; Chen *et al.*, 1996b; Shi *et al.*, 1997a; Shi *et al.*, 1997b), aunque también se han descrito algunas de los tipos bis-THF no adyacentes (Shi *et al.*, 1995a; Shi *et al.*, 1996b), mono-THF (Shi *et al.*, 1995a; Shi *et al.*, 1996a; Shi *et al.*, 1997b;), THP (Shi *et al.*, 1995b; Shi *et al.*, 1996b) y sin anillos de THF ó THP (Chen *et al.*, 1996b).

En la investigación de De Queiroz Paulo y colaboradores (1991), se utilizaron tres diferentes muestras de *R. mucosa* recolectadas en Brasil y Perú. De la corteza recolectada en Brasil, se obtuvieron cinco ácidos grasos (el palmítico, el hexanóico, el oléico, el octanóico y el esteárico), un éster (el palmitato de metilo) y dos aldehídos (el 2-decenal y el 2-undecenal). De los frutos inmaduros recolectados en Brasil, se aislaron tres lignanos del tipo furofuránicos [la (+)-yangambina (**60**), la (+)-magnolina (**61**) y la (+)-epieudesmina (**62**)]. De las hojas recolectadas en Perú,

se aislaron dos lignanos, la (+)-magnolina (**61**) y la (+)-epieudesmina (**62**). En una investigación posterior del mismo extracto de la corteza recolectada en Brasil (Maas *et al.*, 1992), se aislaron dos esteroides, la estigmastenona (**63**) y la fucostenona (**64**) (Figura 23).

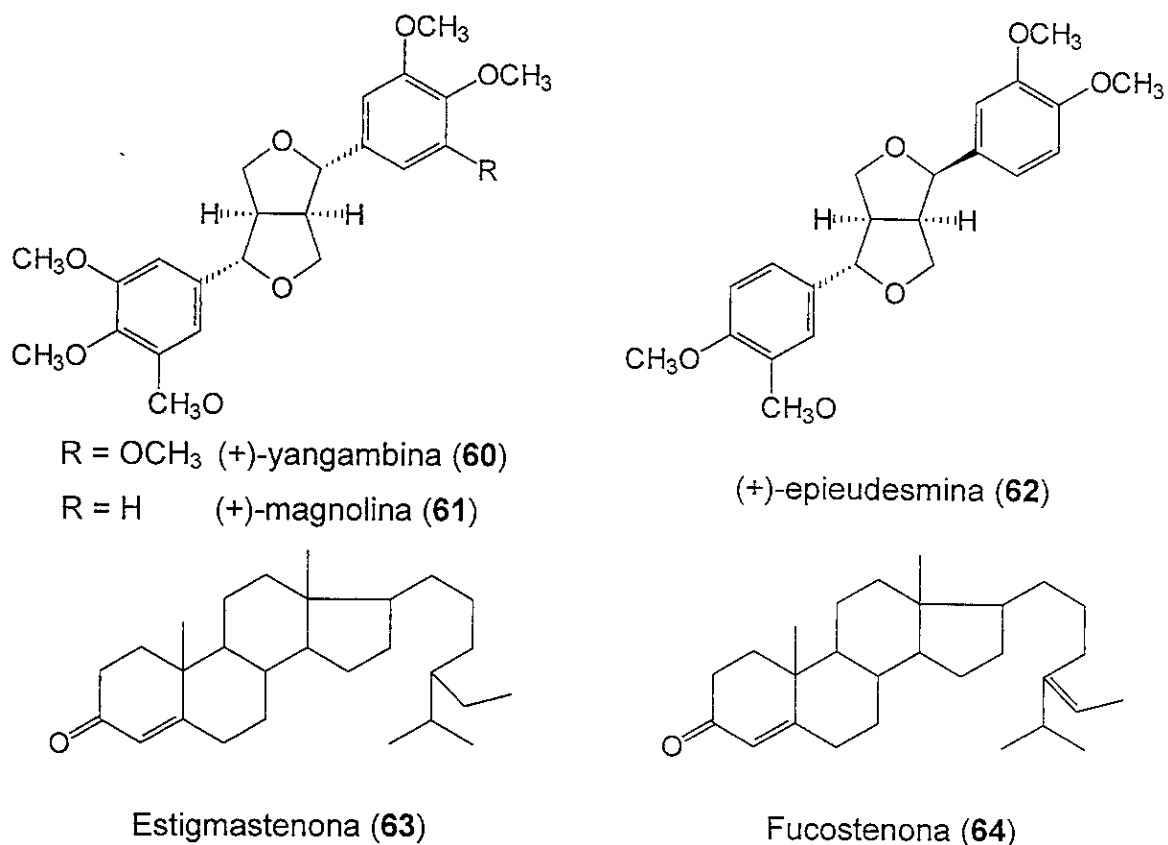


Figura 23. Lignanos y metabolitos no alcaloideos que fueron aislados de *R. mucosa* (De Quiroz Paulo *et al.*, 1991; Maas *et al.*, 1992).

Caetano y Dadoun (1987) demostraron que el crudo alcaloideo de la corteza recolectada en Brasil, presentaba una actividad antimicrobiana en contra de bacterias gram (+) y gram (-) y una actividad antifúngica contra *Candida tropicalis*. A partir del extracto activo aislaron cinco alcaloides, dos noraporfina [la anonaina (**65**)

y su derivado N-formil (**66**), dos oxoaporfinas [la liriodenina (**67**) y la lanuginosina (**68**)] y un morfinao [la palidina (**69**)] (Figura 24). En un estudio posterior de hojas recolectadas en Perú, se describió el aislamiento de los mismos alcaloides oxoaporfínicos, previamente encontrados en la corteza recolectada en Brasil (Maas *et al.*, 1992).

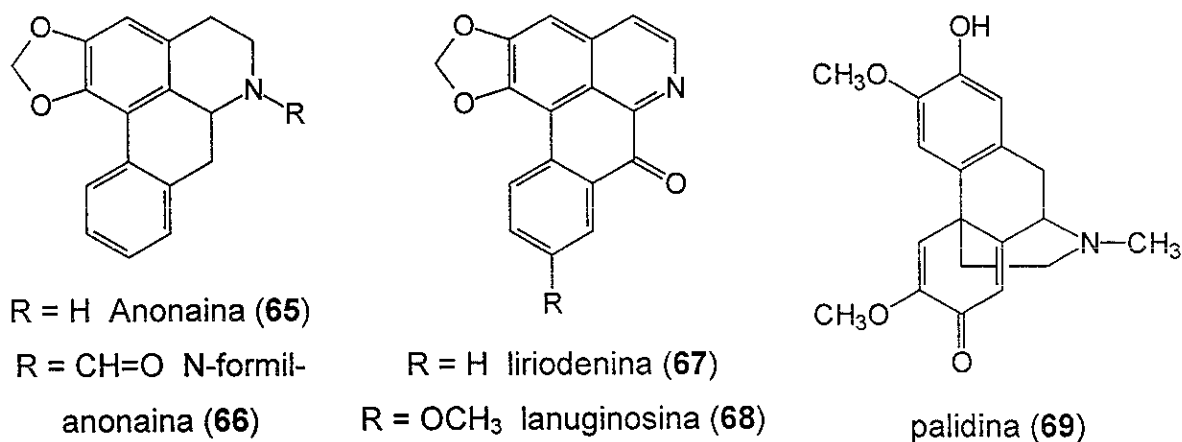
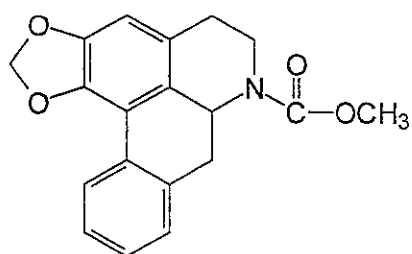


Figura 24. Alcaloides que fueron aislados de *R. mucosa* (Caetano y Dadoun, 1987; Maas *et al.*, 1992).

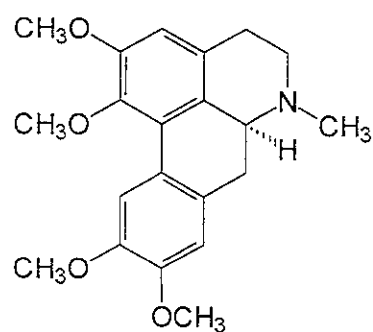
En un estudio reciente de los frutos inmaduros recolectados en Taiwan, Chen y colaboradores (1996a) describen el aislamiento de nueve alcaloides isoquinolínicos (de tipo aporfínico y protoberberina) y cuatro lignanos (Figura 25). Los alcaloides incluyen a la romucosina (**70**), la anonaina (**65**), la glaucina (**71**), la purpureina (**54**), la liriodenina (**67**), la oxoglaucina (**72**), la oxopurpureina (**50**), la berberina (**73**) y la tetrahydroberberina (**74**). Los lignanos descritos son: La yangambina (**60**), la eudesmina (**75**), la magnolina (**61**) y la membrina (**76**).



Romucosina (70)

Anonaina (65)

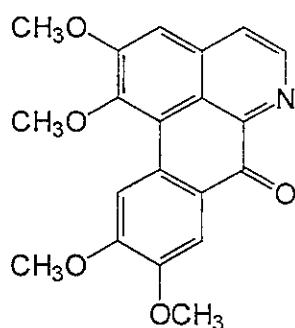
Liriodenina (67)



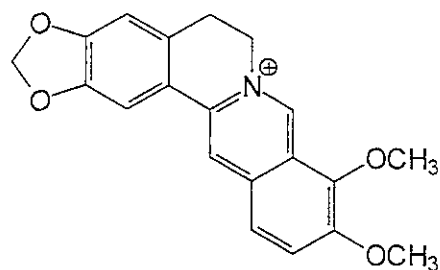
Glaucina (71)

Purpureina (54)

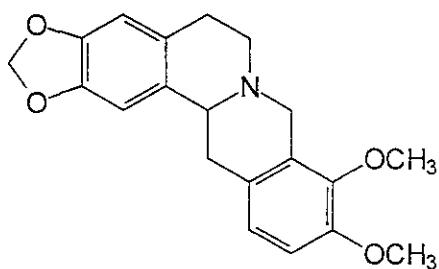
Oxopurpureina (50)



Oxoglaucina (72)



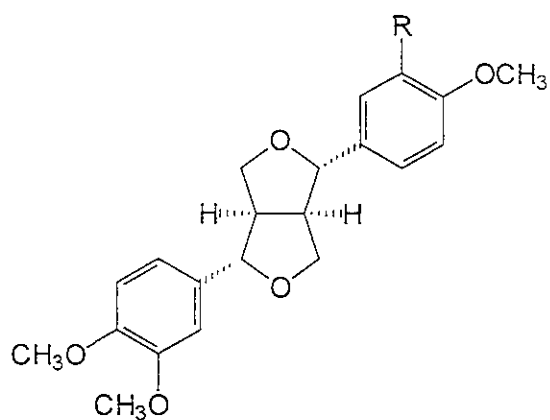
Berberina (73)



Tetrahydroberberina (74)

Yangambina (60)

Magnolina (61)

R = OCH₃ Eudesmina (75)

R = H Membrina (76)

Figura 25. Alcaloides y lignanos que fueron aislados de *R. mucosa* (Chen *et al.*, 1996a).

De las semillas de *R. mucosa* recolectadas en la Guayana Francesa, Pettit y colaboradores (1987) aislaron la roliniastatina 1 (**30**), una acetogenina del tipo bis-THF. En un segundo estudio, estos investigadores describen el aislamiento de la roliniastatina 2 (**77**) [bulatacina (**16**)] y la asimicina (**25**), ambas acetogeninas del tipo bis-THF (Figura 26) (Pettit *et al.*, 1989).

Chen y colaboradores (1996b), reportan el aislamiento de cinco acetogeninas de los frutos de *R. mucosa*. Dos de las acetogeninas carecen de anillos THF o THP [las epomuseninas A (**78**) y B (**79**)]. Las restantes acetogeninas aisladas incluyen a la roliniastatina 1 (**30**), la roliniastatina 2 (**77**) [bulatacina (**16**)] y la escuamocina (**80**) (Figura 26).

De las hojas de *R. mucosa* recolectadas en el Jardín Botánico de Missouri, E.U.A., el grupo de McLaughlin y colaboradores ha aislado 24 acetogeninas (Figura 26), de las cuales 15 son novedosas. Estas incluyen: Tres mono-THF, las rolinecinas A (**83**) y B (**84**) (Shi *et al.*, 1996b) y la muricatetrocina C (**87**) (Shi *et al.*, 1996c). Una acetogenina bis-THF no adyacente, la *cis*-silvaticina (**38**) (Shi *et al.*, 1995a). Nueve bis-THF adyacentes: la mucoxina (**82**) (Shi *et al.*, 1996a), las rolidecinas A-D (**32**, **88-90**) (Shi *et al.*, 1996c; Gu *et al.*, 1997), las 12-hidroxiulatacinas A (**92**) y B (**93**) (Shi *et al.*, 1997a), la rolitacina (**94**) y la rolinacina (**95**) (Shi *et al.*, 1997b). Por último, las dos primeras acetogeninas con anillos de THP, la mucocina (**41**) (Shi *et al.*, 1995b) y la muconina (**42**) (Shi *et al.*, 1996a).

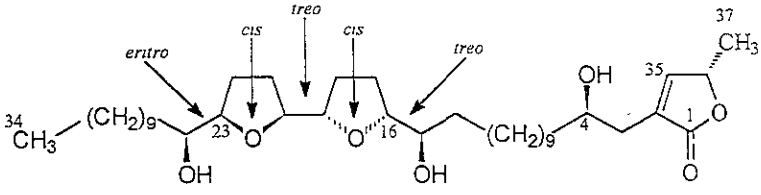
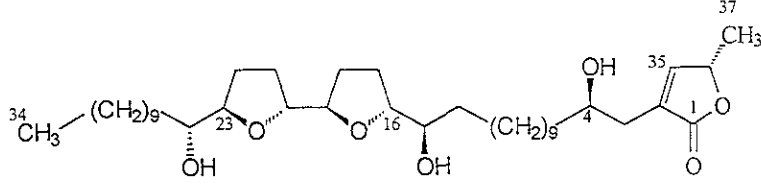
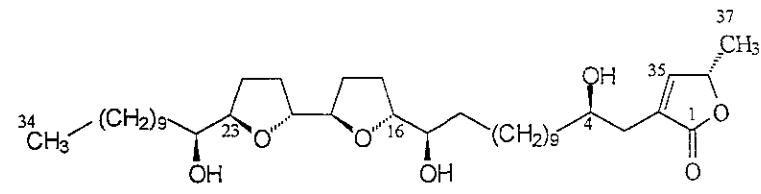
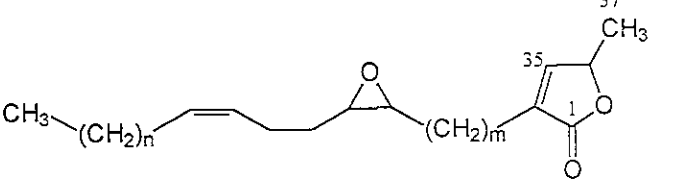
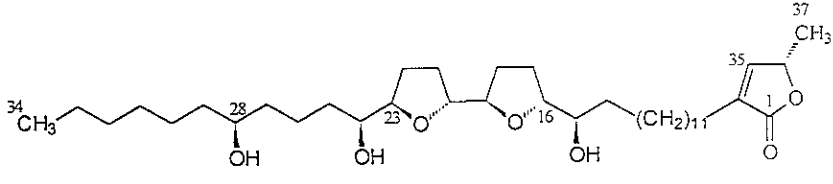
 <p style="text-align: center;">Roliniastatina 1 (30)</p>	Pettit <i>et al.</i> , 1987
 <p style="text-align: center;">Asimicina (25)</p>	Pettit <i>et al.</i> , 1989
 <p style="text-align: center;">Roliniastatina 2 (77) [bulatacina (16)]</p> <p style="text-align: center;">Roliniastatina 1 (30)</p>	Pettit <i>et al.</i> , 1989
 <p style="text-align: center;">$m = 14 ; n = 11$ Epomusenina A (78) $m = 12 ; n = 13$ Epomusenina B (79)</p>  <p style="text-align: center;">Escuamocina (80)</p>	Chen <i>et al.</i> , 1996b

Figura 26. Acetogeninas que fueron aisladas de *R. mucosa*.

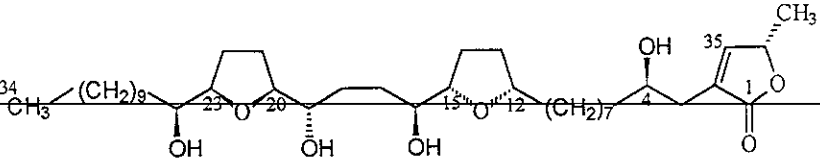
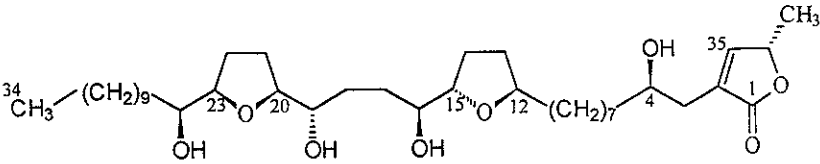
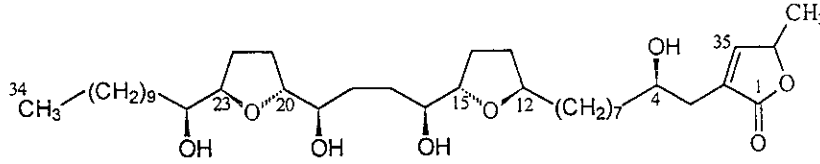
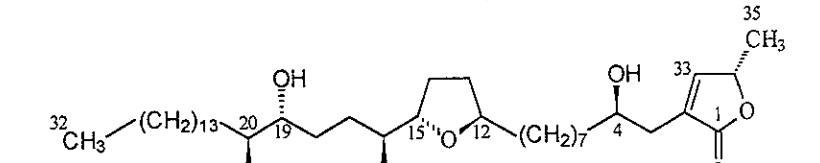
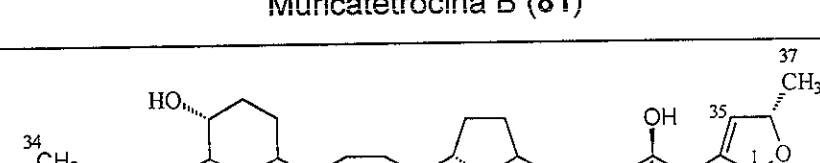
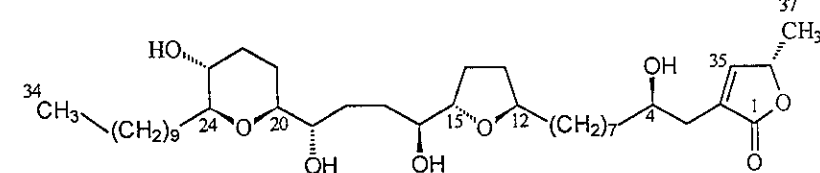
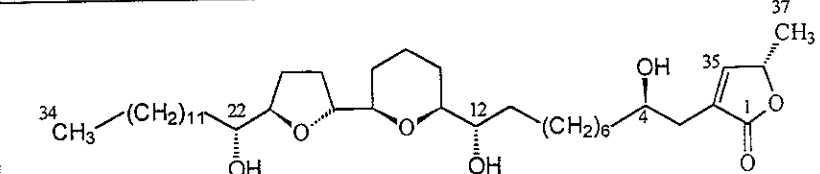
<p>Roliniastatina 1 (30)</p> <p>Roliniastatina 2 (77) [bulatacina (16)]</p>	Chen <i>et al.</i> , 1996b
 <p><i>cis</i>-Silvaticina (38)</p>  <p>Silvaticina (37)</p>  <p>Bulatacina (35)</p>  <p>Muricatetrocina B (81)</p> 	Shi <i>et al.</i> , 1995a
 <p>Mucocina (41)</p>	Shi, <i>et al.</i> , 1995b
 <p>Muconina (42)</p>	Shi <i>et al.</i> , 1996a

Figura 26. Acetogeninas que fueron aisladas de *R. mucosa* (cont).

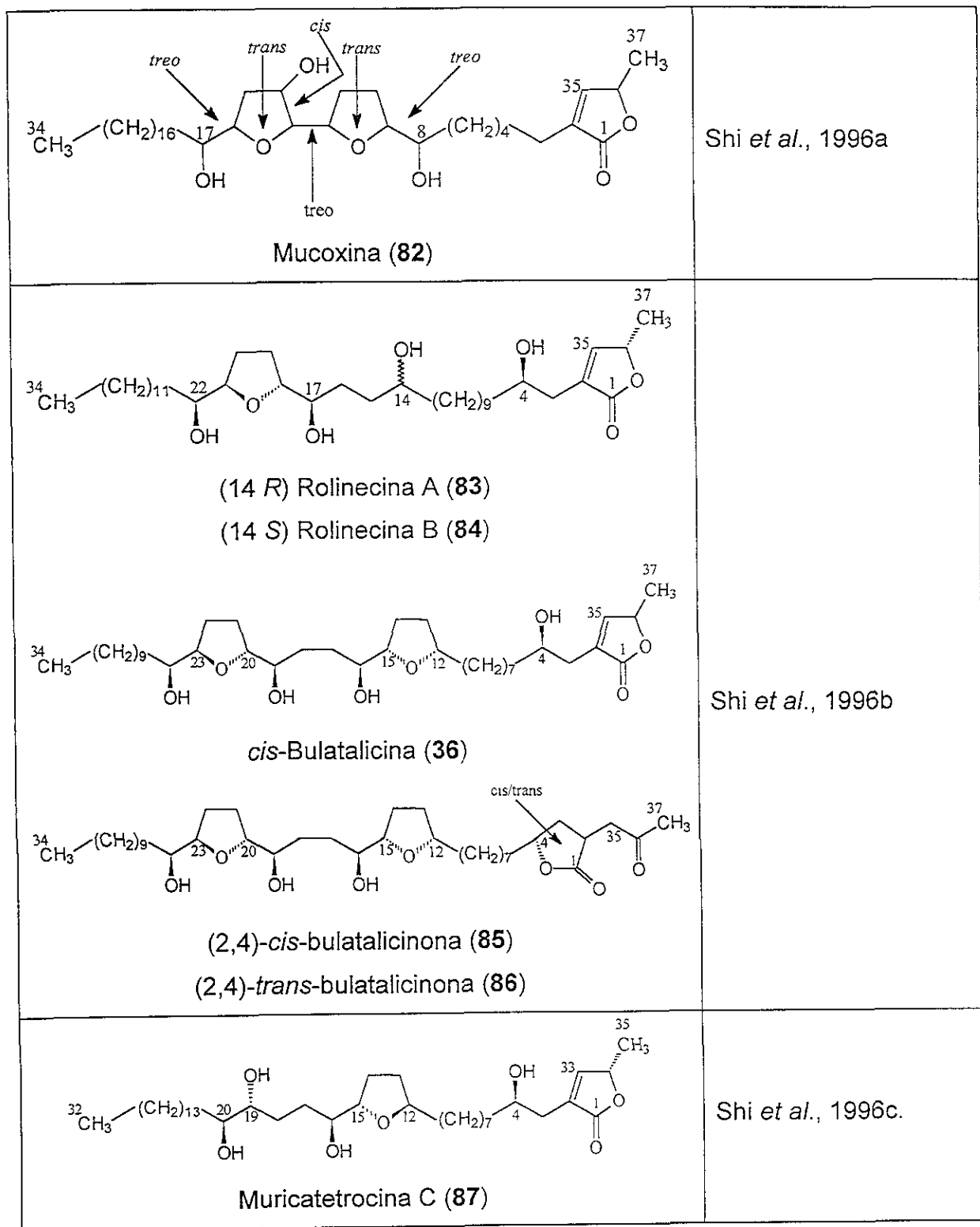


Figura 26. Acetogeninas que fueron aisladas de *R. mucosa* (cont).

<p>(24R) Rolidecina A (32) (24S) Rolidecina B (88)</p>	Shi <i>et al.</i> , 1996c.
<p>(n= 7) Rolidecina C (89) (n= 9) Rolidecina D (90)</p> <p>Desacetilivaricina (91)</p>	Gu, <i>et al.</i> , 1997
<p>(12R) 12-Hidroxi bulatacina A (92) (12S) 12-Hidroxi bulatacina B (93)</p>	Shi <i>et al.</i> , 1997a
<p>Rolitacina (94)</p>	Shi <i>et al.</i> , 1997b

Figura 26. Acetogeninas que fueron aisladas de *R. mucosa* (cont).

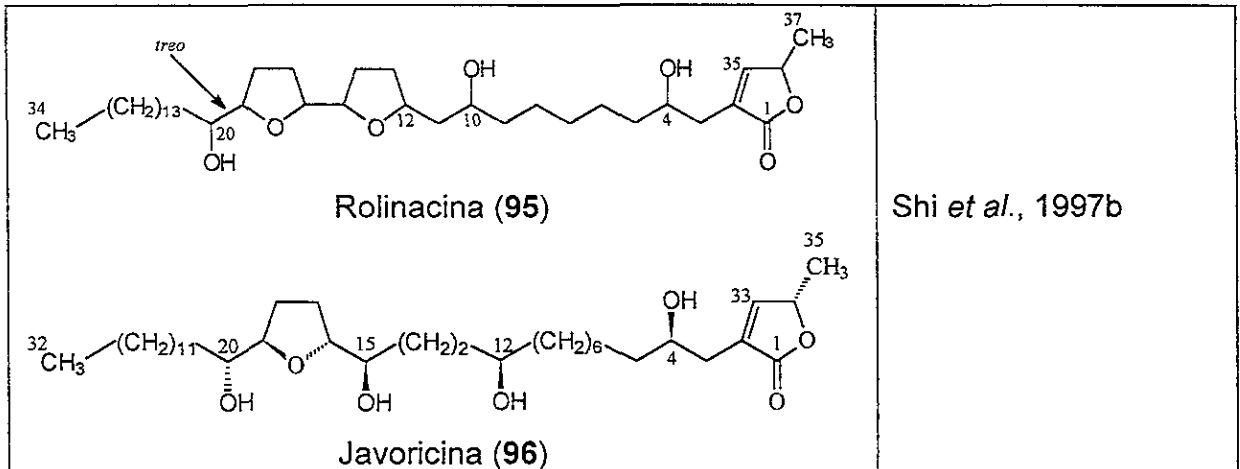


Figura 26. Acetogeninas que fueron aisladas de *R. mucosa* (cont).

Las actividades biológicas demostradas por las diferentes acetogeninas aisladas de *R. mucosa* son diversas. Así, la roliniastatina 1 (30), la roliniastatina 2 (77) [bulatacina (16)] presentaron una gran actividad contra la leucemia linfocítica de múrdo (P388) (Pettit *et al.*, 1987; Pettit *et al.*, 1989). Por otro lado, todas las acetogeninas aisladas de las hojas de *R. mucosa* por McLaughlin y colaboradores, demostraron una alta toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina* y una gran actividad citotóxica contra seis líneas celulares derivadas de tumores humanos, que son: A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma de colon), A-498 (carcinoma de riñón), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) y PACA-2 (carcinoma de páncreas) (Shi *et al.*, 1995a; Shi *et al.*, 1995b; Shi *et al.*, 1996a; Shi *et al.*, 1996b; Shi *et al.*, 1996c; Shi *et al.*, 1997a; Shi *et al.*, 1997b; Gu *et al.*, 1997). Por último, las acetogeninas 32, 35, 37, 38, 41, 81, 83, 84, 87, 88 y 92-94 demostraron actividad larvica contra el mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*) (He *et al.*, 1997).

III JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICACION.

La respuesta insuficiente de un gran número de agentes anticancerígenos para el tratamiento de tumores de lento crecimiento o de rápida proliferación, los altos índices de toxicidad de la mayoría de estos agentes y el desarrollo de resistencia de algunos tumores a los mismos, son algunas de las causas que justifican plenamente la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos. La síntesis de nuevos productos continua siendo una estrategia importante para el desarrollo de nuevos anticancerígenos, sin embargo, esta metodología ha generado relativamente pocos productos con aplicación terapéutica. En contraste, las investigaciones sistemáticas conducentes a la búsqueda de nuevos agentes antitumorales a partir de materias primas vegetales, como se señaló en la sección introductoria, han permitido, sin duda alguna, el hallazgo de agentes quimioterapéuticos o de moléculas prototipo de gran utilidad para el desarrollo de productos de aplicación terapéutica (Boyd, 1992; Cragg *et al.*, 1997; Shu, 1998).

En este sentido, las acetogeninas de anonáceas, entre otros productos naturales, ofrecen una gran posibilidad de éxito para el desarrollo de nuevos productos quimioterapéuticos debido a sus notables propiedades antineoplásicas y a su efectividad contra ciertos tumores resistentes (Oberlies *et al.*, 1997).

La eficacia demostrada por las acetogeninas como agentes antineoplásicos y el mecanismo de acción mediante el cual ejercen este efecto, ofrecen grandes perspectivas en las terapias de combinación. De tal manera que, bajo este régimen

terapéutico, las acetogeninas aún en bajas dosis, disminuirían los niveles de ATP celular con la consecuente inducción de la apoptosis y prevención del desarrollo del fenómeno de resistencia (usualmente mediada por la glicoproteína P-170) por parte de los tumores tratados. Asimismo, las dosis requeridas de los fármacos anticancerígenos que formaran parte de la terapia de combinación, serían menores al igual que los efectos colaterales provocados por los mismos.

La búsqueda de nuevas acetogeninas se justifica aún mas conforme se aíslan un mayor número de acetogeninas y se realizan nuevos ensayos de citotoxicidad. Los resultados de numerosas investigaciones recientes indican que la mayoría de estos policétidos son muy potentes contra varias líneas celulares derivadas de tumores humanos. Además, se ha encontrado que algunos de estos compuestos, con núcleos estructurales novedosos, ejercer su efecto citotóxico de manera selectiva, afectando solo cierto tipo de tumores. Por otra parte, se presume que existen alrededor de 1000 acetogeninas diferentes en la familia de las anonáceas y la mayoría de estos compuestos podrían ser aislados y caracterizados en los próximos 20 años (McLaughlin *et al.*, 1997). Esta perspectiva ofrece grandes posibilidades de descubrir productos antineoplásicos más potentes, eficaces y selectivos.

Por todos estos motivos se consideró ampliamente justificado plantear una propuesta de investigación dirigida a la búsqueda de nuevas acetogeninas antitumorales a partir de anonáceas mexicanas. El número de especies de esta familia presente en el territorio nacional es alto, sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios químicos o biológicos conducentes a determinar el potencial terapéutico de las mismas.

De manera adicional, y con la única finalidad de ampliar el conocimiento de las actividades biológicas de las acetogeninas de anonáceas, se consideró conveniente investigar el efecto de algunos de estos metabolitos sobre la fotofosforilación en cloroplastos aislados de espinacas, proceso metabólico homólogo a la fosforilación oxidativa mitocondrial de los organismos eucariotes. Tanto la fosforilación oxidativa como la fotofosforilación constituyen, individualmente, los dos procesos más importantes de transducción de energía en la biósfera. Como se señaló anteriormente, las acetogeninas interfieren con la síntesis de ATP mitocondrial mediante la inhibición del transporte de electrones a nivel del complejo I. Sin embargo, no se ha descrito ningún trabajo relacionado con el efecto de estos compuesto sobre la fotofosforilación, por lo que los resultados que deriven de la presente investigación asumen el carácter de original. Del mismo modo, los resultados obtenidos podrían ser de importancia para determinar si las acetogeninas de anonáceas afectan el crecimiento vegetal a nivel postemergente. Este último aspecto cobra importancia ante la perspectiva de utilizar estos productos como agentes pesticidas para el control de algunos insectos nocivos en cultivos de importancia económica.

3.2 OBJETIVOS GENERALES.

1. Obtener acetogeninas con una actividad potencial citotóxica a partir de especies de anonáceas mexicanas con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos de utilidad terapéutica.

2. Explorar el efecto de acetogeninas selectas sobre el proceso de la fotofosforilación con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de estos compuestos.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES.

Para el cumplimiento de los objetivos generales se plantean los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar una investigación bibliográfica sobre diversos aspectos de la familia Annonaceae con la finalidad de identificar las especies presentes en el territorio nacional, determinar su distribución en el mismo y recopilar la información etnomédica pertinente.
2. Recolectar por lo menos 20 gramos de material vegetal seco de las diferentes partes vegetales (hojas, corteza y semillas) de un grupo de anonáceas mexicanas preseleccionadas con base en los criterios etnomédico y/o quimiotaxonómico.
3. Seleccionar las especies ricas en acetogeninas mediante la evaluación de la toxicidad para *Artemia salina* de los extractos de las especies preseleccionadas.
4. Realizar el estudio fitoquímico biodirigido de las dos especies que resulten más tóxicas para el crustáceo *A. salina*. Como bioensayo de monitoreo se empleará de nueva cuenta la determinación de la toxicidad para *A. salina*.

5. Evaluar el potencial citotóxico de los compuestos aislados utilizando seis líneas celulares derivadas de tumores humanos: A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma de colon), A-498 (carcinoma de riñón), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) y PACA-2 (carcinoma de páncreas).

6. Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios bioactivos, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas, así como de métodos químicos y quirópticos.
7. Evaluar el efecto de acetogeninas selectas sobre diversas actividades fotosintéticas en cloroplastos aislados de hojas de espinacas. Las actividades incluyen la síntesis de ATP, el transporte de electrones (basal, fosforilante y desacoplado) y reacciones parciales del transporte de electrones de los fotosistemas I y II.
8. Proponer un mecanismo de acción de las acetogeninas ensayadas de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos indicados en el inciso 7.

IV EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL VEGETAL.

Para realizar el proceso de selección, se recolectaron aproximadamente 100 g de material vegetal fresco de las diferentes partes vegetales (hojas, corteza y semillas) de diez especies de anonáceas distribuidas en la región de los Tuxtlas, Veracruz. Estas incluyen: *Annona glabra* L. (Voucher CA93-1), *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal, (Voucher CA93-3), *Cymbopetalum baillonii* R.E. Fries (Voucher CA93-2), *Cymbopetalum pendiflorum* Baill. (Voucher CA94-8), *Despumpsis trunciflora* Schldl & Cham. (Voucher CA94-4), *Guamia mexicana* G.E. Schatz, (Voucher CA94-2), *Rollinia mucosa* (Jaquin) Baillon, (Voucher CA93-4), *Saprantus humilis* Stanley (Voucher CA94-5), *Tridimeris hahniana* L. (Voucher CA94-6) y *Tridimeris tuxtliensis* Schatz, (Voucher CA94-7). La recolección estuvo a cargo del Biólogo Gustavo Carmona Díaz. Los ejemplares de referencia de cada una de las plantas se depositaron en el Herbario del Instituto de Ecología (XAL), Xalapa, Veracruz .

Posteriormente, se recolectó una mayor cantidad de las semillas de las dos especies más activas (i.e. *A. purpurea* y *R. mucosa*) en el municipio de Catemaco, en el Estado de Veracruz. *A. purpurea* se recolectó en julio de 1994 (Voucher CA94-1) y *R. mucosa* en el ejido San Rafael, Estado de Veracruz, en septiembre de 1994 (Voucher CA94-3). Las muestras de herbario se depositaron también en el herbario del Instituto de Ecología (XAL), Xalapa, Veracruz.

4.2 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES EN PEQUEÑA ESCALA PARA REALIZAR EL PROCESO DE SELECCION.

Para la selección de las especies más activas, se prepararon los extractos cloroformo-metanólicos (1:1) o etanólicos a partir de 20 gramos de material vegetal seco y molido de las diferentes partes vegetales (hojas, corteza y semillas) de cada una de las especies preseleccionadas. Los extractos resultantes se evaluaron en el bioensayo de toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina*.

4.3 ENSAYOS BIOLOGICOS.

4.3.1 Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* Leach.

Los diferentes extractos, fracciones y compuestos puros se evaluaron utilizando el ensayo de la toxicidad para *Artemia salina* (TAS) de acuerdo a la metodología descrita por Anderson y colaboradores (1991). Las muestras a evaluar se preparan de la siguiente forma: 20 mg del extracto, fracción o compuesto puro objeto de evaluación, se disuelven en 2 mL del disolvente apropiado. De la solución resultante se transfieren 5, 50 y 500 μL , a tres viales y se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío. Cada concentración se ensaya por triplicado. Después de incubar los huevecillos de *A. salina* en un medio salino artificial durante 48 horas, se transfieren 10 crustáceos a cada uno de los frascos que contienen las muestras a evaluar y se afora a 5 mL con medio salino artificial, para obtener así una concentración final de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De manera adicional, se realizaron diluciones subsecuentes para obtener concentraciones finales de 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g/mL}$.

Los frascos se mantienen con iluminación artificial durante 24 horas; transcurrido este tiempo se procede a contar el número de crustáceos sobrevivientes. Para el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀) se utiliza el programa de análisis de probabilidad de Finney (Anderson *et al.*, 1991).

4.3.2 Determinación de la actividad citotóxica.

El potencial citotóxico se determinó de acuerdo a los procedimientos establecidos en el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos (E.U.A) en el laboratorio del Purdue Cancer Center, Univeridad de Purdue, Indiana, E.U.A. (Anderson *et al.*, 1991 y referencias allí citadas). Las líneas celulares empleadas fueron las siguientes: A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma de colon), A-498 (carcinoma de riñón), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) y PACA-2 (carcinoma de páncreas). Los resultados se expresan como concentración efectiva media (CE₅₀). La adriamicina se utilizó como un control positivo.

4.4 ANALISIS CROMATOGRAFICOS.

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula, 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). Los análisis cromatográficos en capa fina (ccf) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60-254, Merck), varios eluyentes y los agentes reveladores que se indican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina de las fracciones obtenidas durante el proceso de fraccionamiento del extracto activo de *A. purpurea*.

Agente revelador	Composición	Referencia
Sulfato cérico	Sulfato cérico amoniacal 12 g Acido sulfúrico conc. 22.5 mL Hielo. 350 g	Stahl, 1969
Acido fosfomolibdico	Acido fosfomolibdico. 5.0 g Etanol. 100 mL	Rupprecht <i>et al.</i> , 1990
Azul de tetrazolio	Azul de tetrazolio. 0.25 g Metanol. 50 mL Hidróxido de sodio 6 N. 50 mL	
Reactivo de Dragendorff	Carbonato de bismuto. 2.6 g Ioduro de sodio. 7.0 g Acido acético. 25 mL Acetato de etilo. 80 mL Agua. 0.5 mL	Stahl, 1969

Para el desarrollo de color es necesario calentar durante dos minutos a 110°C.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de diodos (996). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software millennium 2000 (Waters). La purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 125Å, tamaño de partícula 10 μ M) de 19 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud. La detección se ajustó entre 209-220 nm.

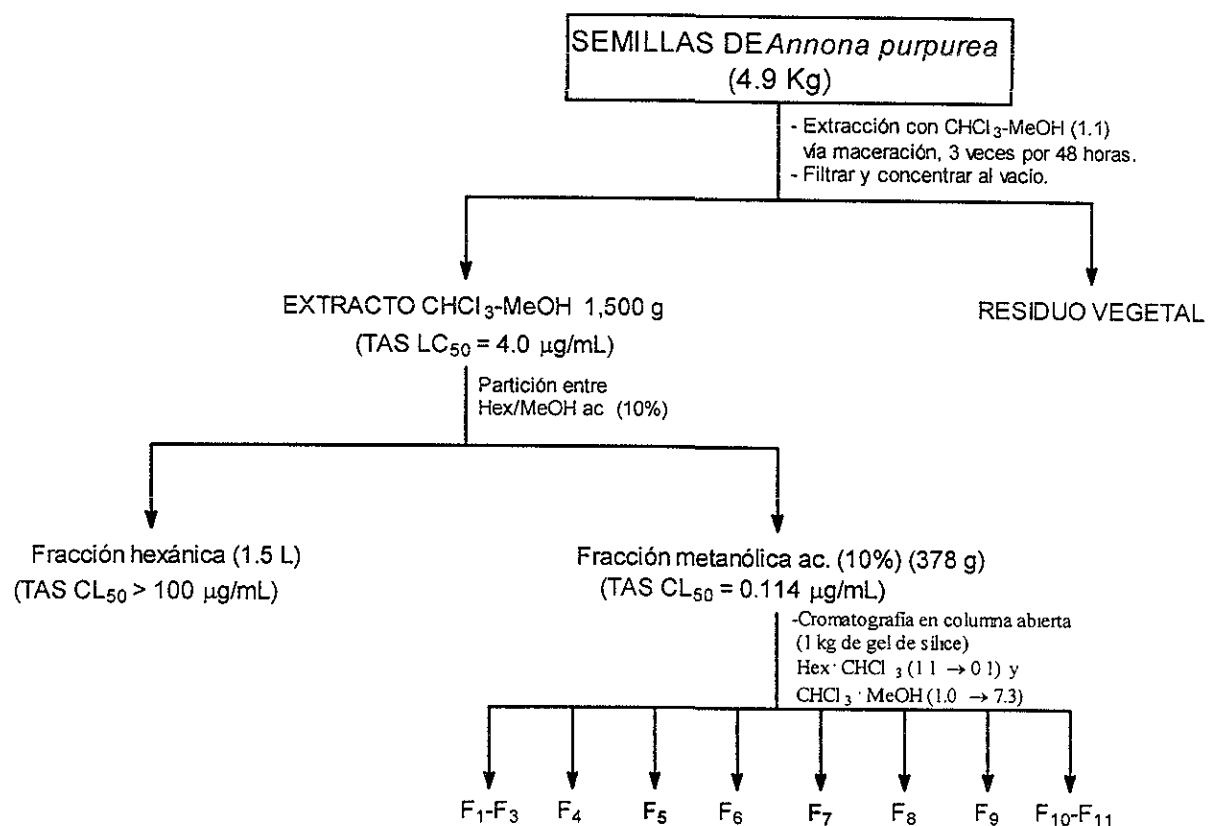
La separación e identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis de la mezcla de N-aciltriptaminas obtenidas de *R. mucosa*, se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas JEOL JMS-AX505HA. La columna utilizada fue del tipo 5 % fenil-metil silicón HP, con una longitud de 30 m por 0.32 mm de diámetro. El helio se empleó como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. La temperatura de la columna se programó de 150-300 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura del eyector y detector se ajustó a 275 °C. El voltaje para el registro de los espectros de masas utilizado fue de 70 eV. Las masas se registraron en un rango de 33-800 uma.

4.5 ESTUDIO QUIMICO DE LAS SEMILLAS DE *Annona purpurea*.

4.5.1 Extracción y fraccionamiento.

El proceso de desecación de las semillas de *A. purpurea* se llevó a cabo a temperatura ambiente. El material vegetal desecado (4.9 Kg) se fragmentó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4. Las semillas pulverizadas se extrajeron con una mezcla de CHCl₃-MeOH (1:1). El extracto resultante [1,500 g, toxicidad contra *Artemia salina* (TAS) CL₅₀ = 4.0 µg/mL] se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante un proceso de partición entre hexano y metanol acuoso (10 %). La fracción metanólica acuosa (378 g, TAS LC₅₀ = 1.14 x 10⁻¹ µg/mL) se sometió a fraccionamiento secundario por cromatografía sobre gel de sílice (1 Kg) en columna abierta. Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de disolventes con incrementos de polaridad [Hex:CHCl₃ (1:1→0:1) y CHCl₃:MeOH (1:0→7:3)]. Se

obtuvieron un total de 89 fracciones (1 L) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica para así obtener 11 conjuntos de fracciones secundarias. En el Esquema 1 se resumen los procesos de extracción, fraccionamiento primario y fraccionamiento secundario. En el Cuadro 2 se sintetiza el fraccionamiento secundario de la fracción metanólica acuosa (10%) y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos, fracciones combinadas y la actividad tóxica contra el crustáceo *Artemia salina*.



Esquema 1. Extracción y fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico (1:1) de las semillas de *A. purpurea*.

Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción metanólica acuosa (10%) obtenida a partir del extracto íntegro de *A. purpurea*.

Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fracciones Combinadas		TAS (µg/mL)
Hex-CHCl ₃	50:50	1-12	1-6	F ₁	> 1000
Hex-CHCl ₃	40:60	13-24	7-11	F ₂	> 1000
Hex-CHCl ₃	20:80	25-36	12-21	F ₃	> 1000
CHCl ₃	100	37-41	22-32	F ₄	3.18 x 10 ⁻¹
CHCl ₃ -MeOH	99:1	42-47	33-49	F ₅	1.38 x 10 ⁻²
CHCl ₃ -MeOH	97:3	48-60	50-59	F ₆	1.89 x 10 ⁻²
CHCl ₃ -MeOH	95:5	61-69	60-62	F ₇	1.47 x 10 ⁻²
CHCl ₃ -MeOH	90:10	70-84	63-68	F ₈	5.89 x 10 ⁻²
CHCl ₃ -MeOH	80:20	85-88	69-74	F ₉	4.70 x 10 ⁻²
CHCl ₃ -MeOH	70:30	89	75-79	F ₁₀	> 1000
			80-89	F ₁₁	> 1000

4.5.2 Separación mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de las acetogeninas presentes en las fracciones activas F₅ y F₇ derivadas de la fracción metanólica acuosa (10%) de *A. purpurea*.

La separación de las acetogeninas mediante CLAR a partir de la fracción activa F₅ (400 mg, TAS LC₅₀ = 1.38 x 10⁻² µg/mL) se realizó en una columna de fase normal empacada con gel de sílice utilizando un flujo de 7.9 mL/min y como fase móvil una mezcla ternaria constituida por hexano-*i*PrOH-MeOH, en las proporciones 90:5:5. Para la fracción activa, F₇ (500 mg, TAS CL₅₀ = 1.47 x 10⁻² µg/mL) se utilizó la misma columna, un flujo de 8.3 mL/min y como fase móvil, la mezcla ternaria de hexano-*i*PrOH-MeOH en las proporciones: 85:7.5:7.5.

4.5.2.1 Aislamiento de la bulatacina (**16**), la escuamocina (**80**) y la motrilina (**97**) a partir de la fracción activa F₅.

De la fracción activa F₅ se aislaron las acetogeninas bulatacina (**16**), escuamocina (**80**) y motrilina (**97**). La bulatacina (**16**) se purificó como un sólido con apariencia de cera de color blanco (20 mg) con un punto de fusión (pf) de 69-71 °C y un tiempo de retención (t_R) de 44.0 min; la escuamocina (**80**) se obtuvo como un aceite transparente (70 mg) con un t_R de 45.2 min; y la motrilina (**97**) se aisló como un sólido ceroso blanco (110 mg) con un pf de 48-50 °C y un t_R de 47.0 min.

4.5.2.2 Aislamiento de la purpurediolina (**98**), la purpurenina (**99**), la purpuracénina (**100**), la anoglaucina (**101**), la xilomatenina (**102**) y la anonacina A (**21**) a partir de la fracción activa F₇.

De la fracción activa F₇ se aislaron seis acetogeninas, tres de las cuales son compuestos novedosos, la purpurediolina (**98**), la purpurenina (**99**) y la purpuracénina (**100**). La purpurediolina (**98**) se obtuvo como un sólido ceroso blanquecino (22 mg) con un pf de 35-39 °C y un t_R de 34.6 min; la purpurenina (**99**) se aisló como un sólido con apariencia de cera de color amarillo pálido (44 mg), con un pf de 36-38 °C y un t_R de 50.0 min; la purpuracénina (**100**) se obtuvo como un sólido con apariencia de cera de color amarillo (10.4 mg) con un pf de 42-44 °C y un t_R de 37.2 min; la anoglaucina (**101**) se aisló como una cera de color amarillo pálido (46 mg) con un pf de 58-59 °C y un t_R de 42.0 min; la xilomatenina (**102**) se obtuvo como un sólido blanco (30 mg) de pf igual a 54-56 °C y un t_R de 31.5 min; por último, la anonacina A (**21**) se purificó como un sólido blanco ceroso (10 mg) con un pf de 34-36 °C y un t_R de 33.0 min.

4.6 ESTUDIO QUIMICO DE LAS SEMILLAS DE *Rollinia mucosa*.

4.6.1. Extracción y fraccionamiento.

El proceso de desecación de las semillas de *R. mucosa* se llevó a cabo a temperatura ambiente. El material vegetal desecado (663 g) se fragmentó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4. Las semillas pulverizadas se extrajeron con una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). El extracto resultante (241 g, TAS LC_{50} = 0.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se fraccionó de manera preliminar mediante un proceso de partición entre hexano y MeOH acuoso al 10 %. La fracción metanólica (26 g, TAS LC_{50} = 6×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$) se sometió a fraccionamiento secundario por cromatografía sobre gel de sílice (531 g) en columna abierta. Como eluyentes se utilizaron mezclas de disolventes con incrementos de polaridad [Hex: CHCl_3 (1:1→0:1) y CHCl_3 :MeOH (1:0→0:1)]. Se obtuvieron un total de 230 fracciones (250 mL c/u) reuniéndose aquellas que resultaron cromatográficamente similares para obtener así 14 conjuntos de fracciones secundarias. En el Esquema 2 se resume los procesos de extracción, fraccionamiento primario y fraccionamiento secundario. En el Cuadro 3 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción metanólica acuosa (10%) y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos, fracciones combinadas y la actividad tóxica contra el crustáceo *Artemia salina*.

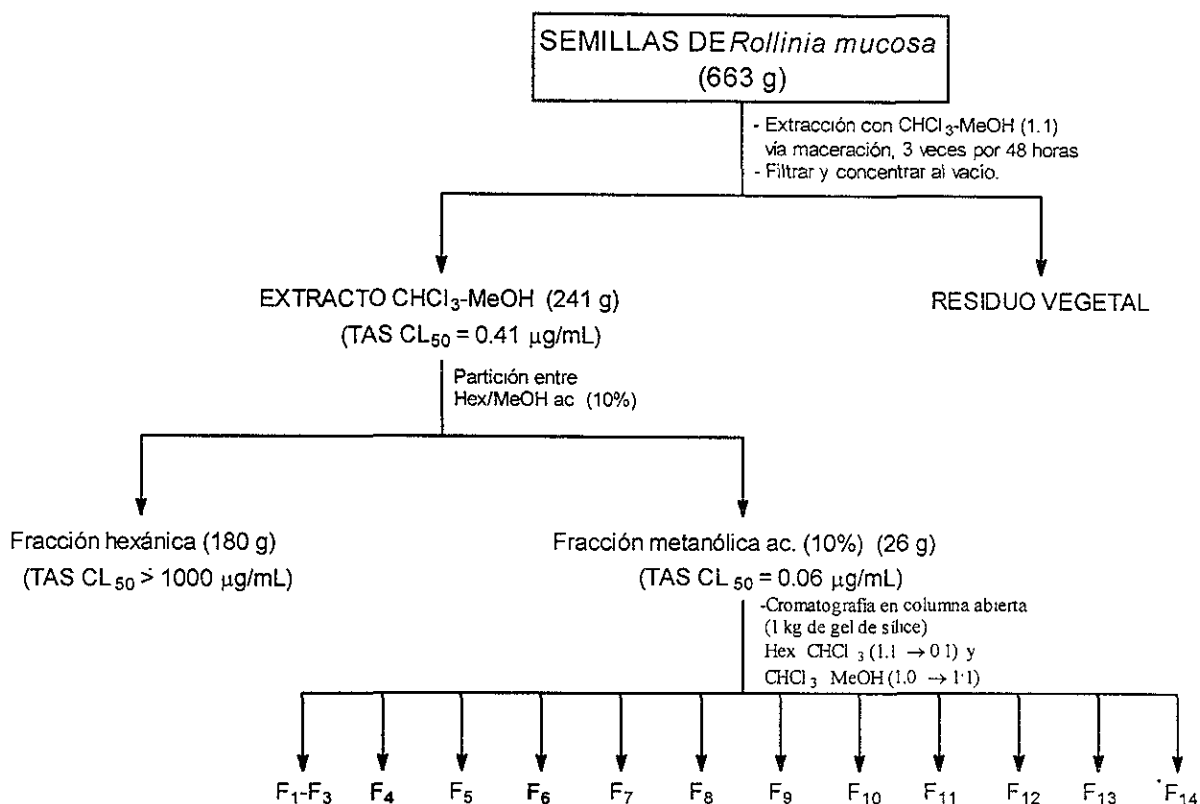
4.6.2 Separación mediante CLAR de los compuestos presentes en las fracciones activas secundarias F_4 y F_6 de *R. mucosa*.

La purificación mediante CLAR de la fracción activa F_4 (120 mg, TAS CL_{50} = 41.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se realizó en una columna de gel de sílice (fase normal) utilizando un flujo de

7.3 mL/min y la mezcla ternaria de disolventes: hexano-*i*PrOH-MeOH en las proporciones: 90:5:5. La purificación de la fracción activa F₆ (500 mg, TAS LC₅₀ = 7 × 10⁻³ µg/mL) se realizó por CLAR en la misma columna de fase normal con un flujo de 7.5 mL/min, y la mezcla ternaria de hexano-*i*PrOH-MeOH (90:5:5)].

4.6.2.1 Aislamiento de la jimenezina (103).

La jimenezina (103) se purificó por CLAR de la fracción activa F₆, como un aceite amarillo (16 mg); el tiempo de retención del producto es de 45.0 min.



Esquema 2. Extracción y fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico (1:1) de las semillas de *R. mucosa*.

Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción metanólica acuosa (10%) obtenida a partir del extracto íntegro de *R. mucosa*.

Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fracciones Combinadas		TAS ($\mu\text{g/mL}$)
Hex- CHCl_3	50:50	1-7	1-31	F ₁	> 1000
Hex- CHCl_3	75:25	8-15	32-53	F ₂	> 1000
CHCl_3	100	16-33	54-61	F ₃	> 1000
CHCl_3 -MeOH	99:1	34-54	62-66	F ₄	41.95
CHCl_3 -MeOH	98:2	55-77	67-84	F ₅	2.22
CHCl_3 -MeOH	97:3	78-95	85-101	F ₆	7.0×10^{-3}
CHCl_3 -MeOH	94:4	96-108	102-111	F ₇	4.5×10^{-1}
CHCl_3 -MeOH	95:5	109-124	112-122	F ₈	2.8×10^{-2}
CHCl_3 -MeOH	92.5-7.5	125-162	123-164	F ₉	6.6×10^{-3}
CHCl_3 -MeOH	90:10	163-188	165-184	F ₁₀	1.7×10^{-1}
CHCl_3 -MeOH	80:20	189-200	185-203	F ₁₁	1.57
CHCl_3 -MeOH	70:30	201-213	204-206	F ₁₂	26.93
CHCl_3 -MeOH	60:40	214-221	207-211	F ₁₃	896
CHCl_3 -MeOH	50:50	222-228	212-230	F ₁₄	49.7
MeOH	100	229-230			

4.6.2.2 Aislamiento de los compuestos presentes en la fracción activa F₄.

De la fracción secundaria activa F₄ se aisló una mezcla de N-aciltriptaminas (**104**).

Sucesivas separaciones por CLAR permitieron el aislamiento del producto

mayoritario (12 mg) como un sólido color blanco con un pf de 114-115°C, el cual se identificó como la N-lignoceroiltryptamina (**105**). El tiempo de retención fue de 23.0 min. La mezcla de donde se separó el producto principal **105**, se sometió a un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con la finalidad de identificar el resto de los compuestos presentes en la misma.

4.7 CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

4.7.1 Equipos utilizados.

- Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns, y no están corregidos.
- La rotación óptica se registró en un polarímetro JASCO DIP-360.
- Los espectros en el UV se obtuvieron en un espectrómetro Shimadzu 160 en MeOH.
- Los espectros de dicroísmo circular (DC) se determinaron en un espectropolarímetro JASCO 720 a 25 °C en MeOH.
- Los espectros en el IR (film) se midieron en un espectrómetro Perkin Elmer 599.
- Los espectros de RMN se obtuvieron en un aparato Varian UNITY PLUS 500 utilizando CDCl₃ como disolvente y TMS como referencia interna. RMN ¹H (500 MHz) y RMN ¹³C (125 MHz). Los espectros de RMN de la jimenezina (**103**) se obtuvieron en un aparato Bruker DMX500. RMN ¹H (500 MHz) y RMN ¹³C (125 MHz), utilizando como disolvente CDCl₃ y como referencia interna TMS.

- Los espectros de masas modalidad FAB⁺ se registraron en un espectrómetro de masas JEOL DX300 utilizando una matriz de glicerol.
- Los espectros de masas de alta resolución modalidad FAB⁺ se obtuvieron en un espectrómetro de masas JEOL JX102 utilizando una matriz de alcohol nitrobencílico (NBA).
- Los espectros de masas de los derivados sililados se determinaron por la técnica de impacto electrónico en un espectrómetro de masas JEOL JMS-AX505HA .
- Los espectros de masas de los ésteres metílicos se obtuvieron por la técnica de impacto electrónico en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas JEOL JX102.

4.7.2 Obtención de los derivados sililados.

Para la obtención de los derivados sililados de las acetogeninas aisladas, pequeñas cantidades de cada compuesto (~0.5 mg) se trataron con 100 μ L del reactivo comercial Sigma-Sil-A (trimetilclorosilano-hexadimetilsilano-piridina 1:3:9). Posteriormente, la mezcla resultante se calentó a 60 °C durante 10 min.

4.7.3 Preparación del acetónido de la purpurediolina (98a).

A una solución de 3 mg de **98** en 5 mL de acetona se agregó 1.5 μ g de HCl (concentrado). La mezcla se dejó reaccionar por 48 h. El curso de la reacción se

monitoreó mediante ccf. Al cabo de la reacción se eliminó el disolvente obteniéndose el acetónido **98a** (3 mg).

4.7.4 Reacción de translactonización para la purpuracena (100) y la anoglaucina (101).

3 mg del compuesto **100** se disolvieron en 2.7 mL de MeOH acuoso (5%), a esta solución se le agregó 0.3 mL de dietilamina. La mezcla anterior se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, el crudo de la reacción se concentró al vacío para obtener 3 mg de la mezcla isomérica C-2/C-4 *cis* y *trans* (**100b**). 5 mg del compuesto **101**, se trataron de la misma manera para obtener 5 mg de la mezcla isomérica C-2/C-4 *cis* y *trans* (**101b**).

4.7.5 Obtención de los ésteres de Mosher.

A una solución de cada una de las acetogeninas obtenidas en el presente estudio (1.5 mg en 0.5 mL de CDCl₃ en un tubo de RMN) se agregó piridina-d₅, (100 μL), 4-(dimetilamino)piridina (~0.5 mg) y cloruro del ácido (*R*)-(-)α-metoxi-α-(trifluorometil)fenilacético (25 mg). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 4 h bajo atmósfera de nitrógeno para obtener el éster de Mosher *S*. Asimismo, el tratamiento de cada compuesto (1.5 mg) con el cloruro del ácido (*S*)-(+)-α-metoxi-α-(trifluorometil)fenilacético, como se describe anteriormente, permitió la obtención del éster de Mosher *R*.

4.7.6 Hidrólisis ácida de la mezcla de N-aciltriptaminas (104) y de la N-lignoceroiltriptamina (105).

3 mg de la N-lignoceroiltriptamina (105) y 5 mg de la mezcla de N-aciltriptaminas (104), por separado, se disolvieron en 0.5 mL de agua y 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. La solución resultante se calentó a reflujo durante 2 horas. Al cabo de este tiempo, el ácido lignocérico (106) o la mezcla de ácidos grasos (107) se extrajeron con cloroformo.

4.7.7 Obtención del derivado metilado del ácido lignocérico (106a) generado por hidrólisis de la N-lignoceroiltriptamina (105).

Para obtener el derivado metilado del ácido lignocérico (106a) se utilizó una mezcla etérea de diazometano preparada con una solución de hidróxido de potasio (5.0 g en 7.5 mL de agua), 25 mL de etanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-*p*-toluen sulfonamida (Diazald, Aldrich) en 45 mL de éter etílico. El ácido lignocérico (106) se disolvió en 0.5 mL de éter y se le agregó 5 mL de la solución etérea de diazometano; la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas. El éster resultante (106a) se identificó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

4.7.8 Obtención de los derivados metilados de los ácidos grasos (107a) generados por hidrólisis de la mezcla de N-aciltriptaminas (104).

Para la obtención de los derivados metilados de los ácidos grasos (107a) generados por hidrólisis de la mezcla de N-aciltriptaminas (104) se utilizó la misma metodología descrita en el inciso 4.7.7.

4.7.9 Prueba de Erlich.

En tubos de ensayos se disolvieron por separados pequeñas cantidades de la N-lignoceriltriptamina (105) y de la mezcla de N-aciltriptaminas (104) en 0.5 mL de metanol. A estas soluciones se adicionó aproximadamente 1 mg del reactivo de Erlich [4-(dimetilamino)benzaldehído]. En seguida, se agregó por la pared del tubo de ensayo dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, observándose una coloración púrpura en la interfase de los líquidos. La coloración fue indicativa de una prueba positiva para la identificación de indoles. Como control positivo se utilizó el ácido indolacético.

4.8 EVALUACION DEL EFECTO DE LAS ACETOGENINAS BULATACINA (16), ESCUAMOCINA (80) Y MOTRILINA (97) SOBRE VARIAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE HOJAS DE ESPINACAS.

4.8.1 Aislamiento de cloroplastos y cuantificación de clorofila.

Los cloroplastos se obtuvieron de hojas frescas de espinacas (*Spinacea oleracea* L.). El proceso de aislamiento de cloroplastos se realizó por homogeneización durante cinco segundos de las hojas fragmentadas (30 g) en 150 mL de medio de aislamiento de cloroplastos (sacarosa 400 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCl 20 mM y tricina 30 mM, ajustado a pH 8.0). El homogenado se filtró a través de ocho capas de gasa y se centrifugó a 4000 rpm durante cinco minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 1 mL del medio de aislamiento y se cuantificó la clorofila de acuerdo con el método de Strain y colaboradores (1971). Este consiste en tomar una alícuota de 50 μ L de la suspensión de cloroplastos y se adiciona acetona al 80 % hasta obtener

5 mL de la suspensión, que se mantiene en la oscuridad durante 5 minutos. Posteriormente se centrifuga a 2000 rpm, durante 5 minutos; transcurrido este tiempo se cuantifica el contenido de clorofila espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 663 y 645 nm. La concentración de la clorofila se calcula empleando la siguiente ecuación. $[\text{clorofila}] = [8.05 (A_{663}) + 20.29 (A_{645})] \times 5$. El resultado obtenido es en μg de clorofila por mililitro.

4.8.2 Cuantificación de la velocidad de síntesis de ATP.

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.0 y 8.1, utilizando un microelectrodo (Orion) combinado, conectado a un potenciómetro (Corning modelo 12) de escala expandida. El cambio de voltaje generado por los cambios de pH se transdujeron a un registrador gráfico Gilson. El medio de reacción contiene: sacarosa 100 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, ADP 1 mM, KH_2PO_4 3 mM, KCN 0.5 mM, tricina 1 mM, metilviológeno (MV) 0.05 mM, el equivalente a 60 μg de clorofila en 3 mL del medio y diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar. El cambio de pH se determinó durante un periodo de iluminación de 1 minuto, durante este tiempo el medio de reacción se mantuvo en agitación constante. La velocidad de síntesis de ATP se calculó empleando la siguiente ecuación:

$V = a h / C$, donde,

V = Velocidad de la síntesis de ATP ($\mu\text{moles de ATP} / \text{mg clorofila} \cdot \text{h}$).

a = $\mu\text{moles de H}^+$ utilizados en la titulación [mezcla de reacción con 10 μL de KOH (0.01 N), en presencia de cloroplastos sin iluminar (Peña-Valdivia *et al.*, 1991)].

h = Altura de la curva obtenida durante un minuto de iluminación (en cm).

C = Concentración de clorofila empleada (60 μg).

4.8.3 Determinación de la velocidad del transporte de electrones no cíclico de H_2O a MV.

El transporte de electrones no cíclico se determinó de manera indirecta al monitorear la producción de oxígeno que se libera durante la fotólisis del agua y se determinó bajo tres condiciones experimentales (Basal, fosforilante y desacoplado), de acuerdo con el protocolo descrito por Calera y colaboradores (1995). La producción de oxígeno se midió con un monitor de oxígeno (Yellow Spring Instrument Model 5300) y un electrodo tipo Clark. Todas las reacciones fueron iluminadas durante un minuto con luz actínica de una lámpara de proyector (GAF 2660). El haz luminoso se hizo pasar a través de un filtro de 5 cm de espesor de una solución de CuSO_4 al 2%.

La cantidad de oxígeno que se desprende se calculó a partir de las pendientes de las gráficas obtenidas al registrarse los cambios del potencial redox. A partir de la cantidad de oxígeno desprendido se midió la velocidad del flujo de electrones, la cual se calculó mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$$V = a / X_t \cdot X_p \cdot C, \text{ donde,}$$

V = Velocidad del transporte de electrones (μ equiv de e^- / mg clorofila \cdot h).

a = 0.4 μ equivalentes de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ utilizados en la titulación. El medio de transporte de electrones sin MV, 10 μL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (40mM) y el equivalente

a 60 μg de clorofila en 3 mL del medio, se iluminó el tiempo necesario para la reducción total del $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

X_t = Altura de la curva obtenida durante un minuto de iluminación (en cm).

X_p = Altura de la curva obtenida al consumirse 0.4 $\mu\text{equivalentes}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

C = Concentración de clorofila empleada (60 μg).

4.8.3.1 Determinación de la velocidad del transporte de electrones basal no cíclico de H_2O a MV.

El medio de reacción utilizado para medir la velocidad del transporte de electrones basal fue el siguiente: sacarosa 100 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, tricina 15 mM, KCN 0.5 mM y MV 0.05 mM, ajustado a pH 8.0. A 3 mL del medio se agregó 60 μg de clorofila y los compuestos de prueba en el intervalo de concentración de 50 a 200 μM . El medio se mantuvo en agitación constante e iluminación. Las velocidades obtenidas se compararon con las del control (mismo medio, sin compuesto a evaluar). Bajo estas condiciones se determinaron las velocidades del transporte de electrones basal (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972).

4.8.3.2 Determinación de la velocidad del transporte de electrones desacoplado no cíclico de H_2O a MV.

Para obtener la velocidad del transporte de electrones desacoplado, se utilizó el medio de transporte de electrones basal al cual se le adicionó NH_4Cl 6 mM y 60 μg de clorofila. Las velocidades obtenidas se compararon con el control (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972).

4.8.3.3 Determinación de la velocidad del transporte de electrones fosforilante no cíclico de H₂O a MV.

Para la medida de la velocidad del transporte de electrones fosforilante, se utilizó el medio de transporte de electrones basal al cual se le adicionó ADP 1 mM, KH₂PO₄ 3 mM y 60 µg de clorofila. Las velocidades del transporte de electrones fosforilante se compararon con el control (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972).

4.8.4 Determinación de la velocidad del transporte de electrones en los fotosistemas I y II.

La determinación del flujo de electrones en los fotosistemas I y II se efectuó utilizando el medio de reacción general para los fotosistemas, compuesto de: Sacarosa 100 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM y tricina 15 mM, ajustado a pH 8.0. La velocidad del flujo de electrones de las reacciones parciales de los fotosistemas I y II se midió empleando el procedimiento descrito anteriormente para la determinación de la velocidad del transporte de electrones no cíclico (ver inciso 4.8.3). Se adicionaron desacoplantes, donadores y aceptores de electrones artificiales e inhibidores de la cadena redox como se indica a continuación.

4.8.4.1 Determinación de la velocidad del transporte de electrones en el fotosistema I de DCPIP_{red} a MV.

Para determinar el transporte de electrones en el fotosistema I, se empleó 3 mL del medio de reacción general para fotosistemas, al cual se le adicionó DCMU 10 µM, DCPIP 100 µM reducido con ascorbato 0.3 mM, MV 0.05 mM, NH₄Cl 6mM, 60 µg de clorofila y diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar. El DCMU [3-

(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea] se empleó como un inhibidor de la enzima Q_B para impedir el flujo de electrones del FS II al FS I (Astier y Eliene, 1984), el DCPIP [2,6-diclorofenol indofenol] reducido (con ascorbato), se utilizó como un donador artificial de electrones a nivel del complejo Cit b_6/f , debido a que compite con la PQ (Gromet-Elhaman *et al.*, 1963) y el MV se empleó como aceptor final de electrones (Benz y McLaughlin, 1983).

4.8.4.2 Determinación de la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H_2O a DCPIP.

A 3 mL del medio de reacción para los fotosistemas, se le adicionó DBMIB 1 μ M, DCPIP 0.05 mM, $K_3[Fe(CN)_6]$ 300 mM, NH_4Cl 6 mM, 60 μ g de clorofila y varias concentraciones de los compuestos a evaluar. El DBMIB [2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-1,4-benzoquinona] se adicionó para impedir el flujo de electrones hacia el FS I a nivel de PQ (Giaquinta y Dilley, 1974), el DCPIP se utilizó como aceptor final de electrones y el $K_3[Fe(CN)_6]$ para oxidar al DCPIP reducido por el flujo de electrones.

4.8.4.3 Determinación de la velocidad del transporte de electrones en el fotosistema II de H_2O a SiMo.

Para 3 mL del medio de reacción de fotosistemas, se le adicionó SiMo 200 mM (silicomolibdato) como aceptor artificial de electrones (Giaquinta y Dilley, 1974) NH_4Cl 6 mM como desacoplante, DCMU 10 μ M como inhibidor del FS I, 60 μ g de clorofila y varias concentraciones de los compuestos a evaluar.

4.8.4.4 Determinación de la velocidad del transporte de electrones en el fotosistema II de DPC a DCPIP.

Esta actividad se determinó de manera indirecta en un espectrofotómetro Beckman (modelo DU650) utilizando cloroplastos “envenenados” con Tris [tris-(hidroximetil)-aminometano] (Vernon, 1969). Al medio general para los fotosistemas se le adicionó tris 0.8 M con la finalidad de inhibir la fotólisis del agua. En este medio se incubaron durante 30 min a 0 °C con agitación constante y en la oscuridad a los cloroplastos en una proporción de 1 ml de medio por cada 0.3 mg de clorofila. Posteriormente, la suspensión se centrifugó por 5 min a 4,000 rpm y se determinó el contenido de clorofila de acuerdo con el método descrito en el inciso 4.8.1.

A 3 mL del medio de reacción general de fotosistemas, se le adicionó DPC 200 mM (difencilcarbácida) como donador artificial de electrones, DCMU 10 μ M como inhibidor del FS I, DCPIP 0.05 mM como aceptor final de electrones, 60 μ g de clorofila (cloroplastos “envenenados” con Tris) y varias concentraciones de los compuestos a evaluar. La mezcla anterior se agitó y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 630 nm. Posteriormente, la mezcla se iluminó durante un minuto bajo agitación. Al finalizar el tiempo de iluminación se determinó nuevamente la absorbancia a 630 nm. La velocidad del transporte de electrones se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$V = \Delta a \cdot 1.4 \text{ eq } e^- / 1000 \cdot \epsilon \cdot t \cdot c \cdot \text{donde,}$$

V = Velocidad del transporte de electrones en $\mu\text{eq } e^- / \text{mg clorofila} \cdot \text{h}$

Δa = Diferencia de las lecturas de absorbancia a 630 nm.

ϵ = Coeficiente de extinción molar (4.6×10^{-4}).

t = Tiempo de iluminación (1 min).

c = Concentración de clorofila (60 mg).

4.8.5 Aislamiento y ensayo de la actividad de la Mg^{2+} -ATPasa.

La actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa se determinó por el método de Mills y colaboradores (1980). El procedimiento se describe a continuación:

Los cloroplastos se obtuvieron de hojas de espinacas frescas, las cuales fueron homogeneizadas durante cinco segundos con 150 mL de medio de aislamiento compuesto de sorbitol 0.35 mM, ácido ascórbico 5 mM y MES 20 mM, ajustado a pH 6.5. El homogenado se filtró a través de ocho capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 4,000 rpm durante tres minutos. El sedimento se lavó con 2 mL de medio de aislamiento y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto. El sedimento se reconstituyó con 1 mL del medio de resuspensión (sorbitol 0.35 mM, EDTA 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM y tricina, ajustado a pH 7.6). Finalmente, el contenido de clorofila se cuantificó por el método de Strain y colaboradores (1971).

Para la activación de la enzima se le adicionaron a 300 μ g de clorofila (en 0.1 mL de la suspensión de cloroplastos) 0.25 mL del medio de activación I (sorbitol 1.2 M y tricina 100 mM, ajustado a pH 8.0) y 0.65 mL del medio de activación II ($MgCl_2$ 5 mM y tricina 100 mM, ajustado a pH 8.0). Posteriormente, se iluminó durante 1.5 minutos con luz actínica, bajo agitación. Para determinar el grado de hidrólisis de ATP, se mezclaron 0.1 mL de cloroplastos activados con 0.9 mL del medio para determinar la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa ($MgCl_2$ 2 mM, KCl 50 mM, ATP 2.2 mM y

tricina 15 mM, ajustado a pH 8.0). Este proceso se realizó en absoluta oscuridad y bajo agitación. La reacción se suspendió adicionando 0.5 mL de ácido tricloroacético al 10%. Las proteínas precipitadas, se eliminaron por centrifugación durante 5 minutos a 2,000 rpm. El fosfato liberado se cuantificó por el método colorimétrico de Fieske-Subbarow (Sumner, 1974). Simultáneamente, se realizó una curva patrón de KH_2PO_4 , en un intervalo de concentraciones de 0.5 mM a 1mM. Los resultados del fosfato liberado al hidrolizarse el ATP se interpolaron en esta gráfica para obtener las concentraciones de P_i . La actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa es proporcional a la concentración de P_i liberado.

4.8. Ensayo de fluorescencia.

La fluorescencia de la clorofila *a* se midió con un fluorómetro (Plant Efficiency Analyser, PEA; Hansatech UK). Los cloroplastos intactos (15-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se incubaron en completa oscuridad, con los compuestos a evaluar, durante 5 minutos. La excitación se indujo con un conjunto de seis diodos transmitiendo 600 watts m^2 de luz roja (con el pico a 650 nm). El instrumento capta automáticamente el rendimiento de fluorescencia de la clorofila *a* mediante un diodo filtrante cada 10 μs durante los primeros dos ms; cada ms entre los 2 ms a 1 segundo; después de este tiempo, cada 100 ms. El aumento del rendimiento de la fluorescencia de un valor mínimo (F_0) a un valor máximo (F_m) es indicativo de la acumulación de electrones por el aceptor primario ($Q_A \rightarrow Q_A^-$) que es reducido por los centros de reacción del fotosistema II (Strasser *et al.*, 1995). Como control positivo se utilizó Tris (un inhibidor clásico de la fotólisis del agua).

V RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la presente disertación se dividen en tres partes. La primera, abarca aquellos concernientes a la investigación del contenido de acetogeninas citotóxicas en las semillas de *Annona purpurea*. La segunda, comprende el estudio químico de las semillas de *Rollinia mucosa*. Por último, la tercera parte se refiere a la evaluación de los efectos de acetogeninas selectas sobre el proceso de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de hojas de espinacas (*Spinacea oleracea* L.).

Antes de describir y discutir los resultados derivados de las dos primeras partes, es importante destacar que la selección de las dos especies de anonáceas objeto de estudio, se realizó de acuerdo con los procedimientos convencionales que conducen a la detección de las materias primas idóneas para la obtención de compuestos bioactivos de interés medicinal (Farnsworth y Warner, 1990; Hamburger y Hostettmann, 1991; Cox y Balick, 1994; *inter alia*). De tal forma que en primer lugar se realizó una selección primaria (preselección) de diez especies de anonáceas mexicanas con base en consideraciones del tipo etnomédico y quimiotaxonómico. La primera consideración, tiene su fundamento en el hecho de que las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares han demostrado ser de primordial importancia para el descubrimiento de fármacos de aplicación terapéutica (Cox y Balick, 1994; Prance, 1994). El segundo criterio se basa en los antecedentes de un gran número de especies de anonáceas como una fuente valiosa de acetogeninas, metabolitos secundarios con notables propiedades antineoplásicas y pesticidas (Hui *et al.*,

1989a; Colman-saizarbitoria *et al.*, 1994a; Zhao *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995a; *inter alia*).

Durante la fase inicial del proceso de preselección, se realizó una cuidadosa revisión bibliográfica sobre diversos aspectos de la familia de las anonáceas y algunos estudios de campo. Estas actividades indicaron que en México existen numerosas especies de anonáceas, algunas medicinales y/o endémicas. Como característica común, la mayoría de estas especies se encuentran distribuidas principalmente en la vertiente del golfo de México (Veracruz, Campeche, Tabasco y Quintana Roo), aunque también pueden encontrarse en la vertiente del Pacífico (Nayarit, Colima, Sinaloa, Oaxaca, Chiapas y Guerrero). Posteriormente, tomando en cuenta una serie de razones de índole práctico tales como la facilidad de obtener información etnomédica y de realizar las futuras colectas de material vegetal, se decidió circunscribir el proceso de preselección a la región de los Tuxtlas en el Estado de Veracruz. Entonces, una vez definida la zona geográfica se preseleccionaron las siguientes diez especies de anonáceas: *Annona glabra*, *Annona purpurea*, *Cymbopetalum baillonii*, *Cymbopetalum pendiflorum*, *Desmopsis trunciflora*, *Guamia mexicana*, *Rollinia mucosa*, *Sapranthus humilis*, *Tridimeris hahniana* y *Tridimeris tuxtensis*.

De estas especies, *A. glabra*, *A. purpurea* y *Rollinia mucosa* son utilizadas en la medicina tradicional mexicana; *G. mexicana*, *C. baillonii* y *T. tuxtensis* son endémicas y su preselección, así como de las restantes especies se basó únicamente en el criterio quimotaxonómico.

Una vez realizado el proceso de preselección, se procedió a la recolección de las especies para realizar las pruebas biológicas de selección. En cada caso se recolectó aproximadamente 100 g de material fresco de las diferentes partes de la planta (hojas, corteza y semillas).

A partir del material vegetal desecado, se prepararon los extractos vegetales en pequeña escala, utilizando una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1) y etanol como disolventes. Los extractos resultantes se ensayaron para determinar su toxicidad contra el crustáceo *A. salina*. La selección del bioensayo se realizó considerando que en repetidas ocasiones se ha encontrado una magnífica correlación entre la presencia de acetogeninas citotóxicas y la toxicidad demostrada frente al crustáceo por los extractos crudos obtenidos a partir de distintas especies de anonáceas (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995b; *inter alia*). De manera adicional, el ensayo es simple, rápido y económico (Meyer *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1991). En el Cuadro 4 se resumen los resultados obtenidos de las evaluaciones de los extractos CHCl_3 -MeOH (1:1). Los extractos etanólicos fueron menos activos (resultados no indicados) que los preparados con la mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1).

Como se desprende de los resultados indicados en el Cuadro 4, las especies con una mayor toxicidad para *A. salina* fueron *A. purpurea* y *R. mucosa*. En ambos casos los extractos más activos correspondieron a los de las semillas. Como se indicó en la sección de antecedentes, las dos especies han sido objeto de estudios químicos y biológicos previos, incluso estas investigaciones permitieron el aislamiento de numerosas acetogeninas citotóxicas. Sin embargo, las poblaciones que crecen en el territorio nacional no han sido previamente investigadas. Considerando las

variaciones del contenido metabólico generados por las diferencias geográficas (clima, tipo de suelo, etc.) y otras de carácter ontogénico, cabría esperar que las especies procedentes del Estado de Veracruz contengan acetogeninas citotóxicas distintas a las descubiertas anteriormente en ambas especies, de tal manera que se inició el estudio de las semillas de *A. purpurea* y *R. mucosa* y para ello se utilizó un estrategia biodirigida utilizando como ensayo biológico de monitoreo la prueba de *A. salina*.

Cuadro 4. Toxicidad para *Artemia salina* de los extractos cloroformo-metanólicos de diferentes especies de la familia de las anonáceas.

ESPECIE	TAS* CL ₅₀		
	Corteza	Semillas	Hojas
<i>Annona glabra</i>	740	623	>1000
<i>Annona purpurea</i>	2.43	0.65	>1000
<i>Cymbopetalum baillonii</i>	72.70	102	>1000
<i>Cymbopetalum pendiflorum</i>	320	715	> 1000
<i>Despompsis trunciflora</i>	> 1000	890	> 1000
<i>Guamia mexicana</i>	>1000	> 1000	764.65
<i>Rollinia mucosa</i>	30.14	1.16	>1000
<i>Saprantus humilis</i>	947	526	> 1000
<i>Tridimeris hahniana</i>	814	> 1000	530
<i>Tridimeris tuxtensis</i>	66.37	956.30	279

*La concentración letal media (CL₅₀) para *Artemia salina* se expresa en µg/mL.

5.1 OBTENCION DE LAS ACETOGENINAS CITOTOXICAS DE *Annona purpurea*.

5.1.1 Aislamiento y purificación de las acetogeninas de *Annona purpurea*.

Para obtener las acetogeninas de *A. purpurea* se recolectó una mayor cantidad de las semillas (4.9 kg, peso seco) y se preparó el extracto en gran escala utilizando el mismo procedimiento descrito para la fase de selección. El extracto resultante (1,500 g TAS $CL_{50} = 4.0 \mu\text{g/mL}$) demostró un efecto citotóxico significativo (Cuadro 5) en contra de seis líneas celulares (en todos los casos la CE_{50} fue menor a $4 \mu\text{g/mL}$), destacándose el efecto selectivo sobre las líneas A-549 ($CE_{50} < 10^{-2} \mu\text{g/mL}$) y PACA-2 ($CE_{50} < 10^{-2} \mu\text{g/mL}$). El extracto citotóxico se sometió a un fraccionamiento primario vía una partición entre hexano y metanol acuoso (10 %), tal como se indicó en la sección experimental. La actividad tóxica para *A. salina*, se concentró en la fracción metanólica acuosa (378 gr, TAS $CL_{50} = 1.14 \mu\text{g/mL}$). Es importante destacar que el disolvente utilizado para la extracción, así como los procedimientos de fraccionamiento primario utilizados en el presente estudio permitieron obtener mejores niveles de actividad (tanto en el extracto como en las fracciones primarias), que cuando se empleó como disolvente el EtOH y el procedimiento de fraccionamiento descrito en la literatura para obtener fracciones ricas en acetogeninas a partir de los extractos de anonáceas estudiadas a la fecha (Esquema 3).

La fracción metanólica acuosa se sometió a una cromatografía en columna abierta utilizando como eluyente mezclas de disolventes (hexano/cloroformo/metanol) con incrementos de polaridad. Este proceso condujo a la obtención de 89 fracciones

secundarias, las cuales se reunieron de acuerdo con su homogeneidad cromatográfica en 11 conjuntos de fracciones (F₁-F₁₁). Los resultados de la determinación de la toxicidad para *A. salina* (Cuadro 2) indicaron que la actividad se concentraba en seis conjuntos de fracciones (F₄-F₉), por lo que se procedió a la separación de los constituyentes de las dos fracciones más abundantes, la F₅ y la F₇. En el Cuadro 5 se muestran también los resultados de las evaluaciones de citotoxicidad en contra de seis líneas celulares de las fracciones F₅ y F₇.

Cuadro 5. Actividad citotóxica del extracto y de las fracciones secundarias F₅ y F₇ de las semillas de *Annona purpurea*.

	Líneas celulares derivadas de tumores humanos. CE ₅₀ (µg/mL).					
	A-549 ^a	MCF-7 ^b	HT-29 ^c	A-498 ^d	PC-3 ^e	PACA-2 ^f
Extracto	< 10 ⁻²	1.53	1.47	3.53	1.16	< 10 ⁻²
F ₅	< 10 ⁻²	1.61 x10 ⁻¹	1.27 x10 ⁻¹	2.44	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²
F ₇ *	2.13x10 ⁻¹	5.24x10 ⁻¹	3.46x10 ⁻²	2.58x10 ⁻¹	1.43x10 ⁻¹	2.19x10 ⁻¹
Adriamicina	3.22 x10 ⁻²	2.04 x10 ⁻²	4.21 x10 ⁻¹	3.48 x10 ⁻¹	2.41 x10 ⁻²	1.20 x10 ⁻²
Adriamicina*	3.67x10 ⁻³	2.12x10 ⁻¹	9.66x10 ⁻³	1.98x10 ⁻³	2.27x10 ⁻²	1.45x10 ⁻³

*Muestras ensayas simultáneamente.

^aCarcinoma de pulmón.

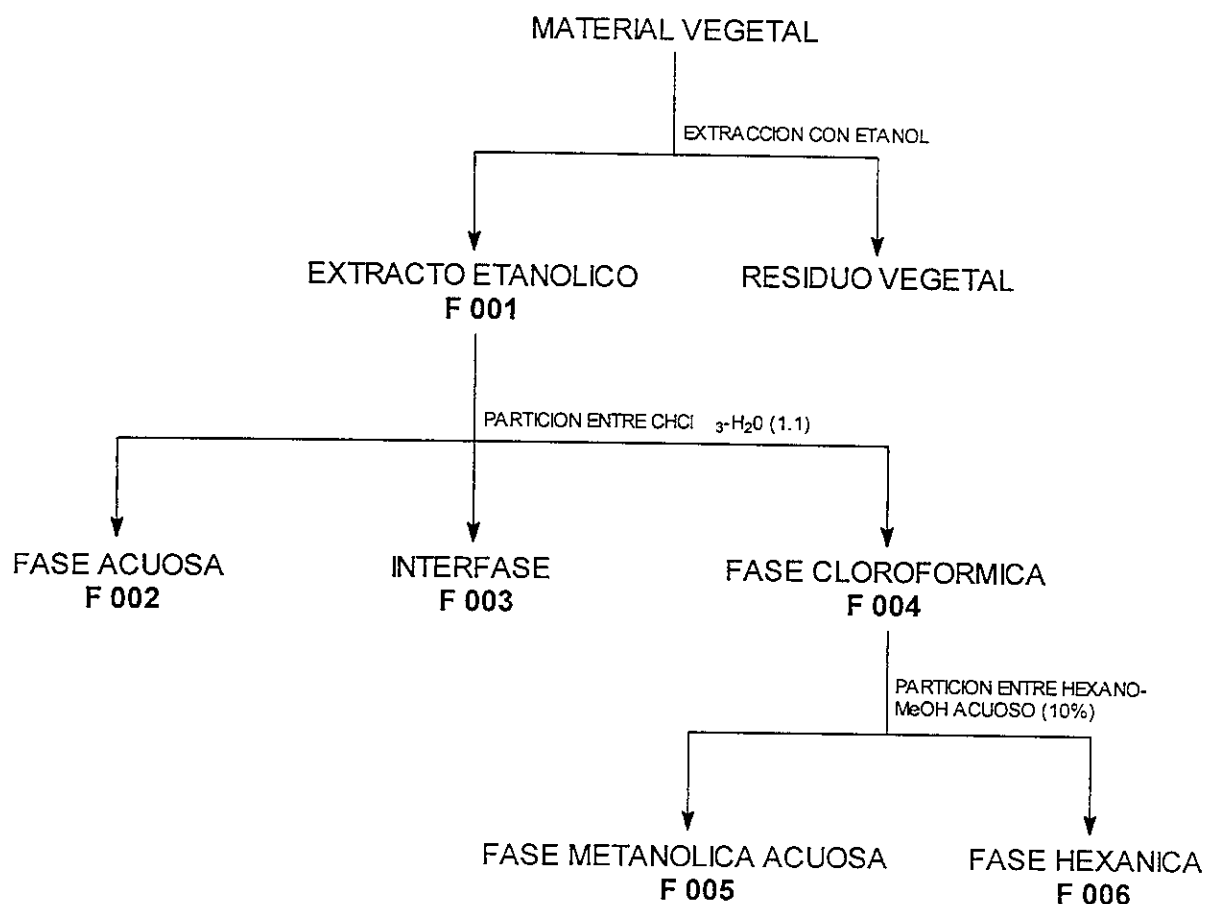
^bCarcinoma de mama.

^cAdenocarcinoma de colon.

^dCarcinoma de riñón.

^eAdenocarcinoma de próstata.

^fCarcinoma de páncreas.



Esquema 3. Diagrama de extracción y fraccionamiento primario para obtener fracciones ricas en acetogeninas de anonáceas a partir de las materias primas (Rupprecht *et al.*, 1990).

La purificación por CLAR (Figura 27) de la fracción activa F₅ (400 mg, TAS CL₅₀ = 1.38 x 10⁻² µg/mL) permitió el aislamiento de tres acetogeninas conocidas: la bulatacina (16), la escuamocina (80) y la motrilina (97) (Figura 28), con un rendimiento en relación al peso seco del material vegetal de 0.0055, 0.019 y 0.030 %, respectivamente.

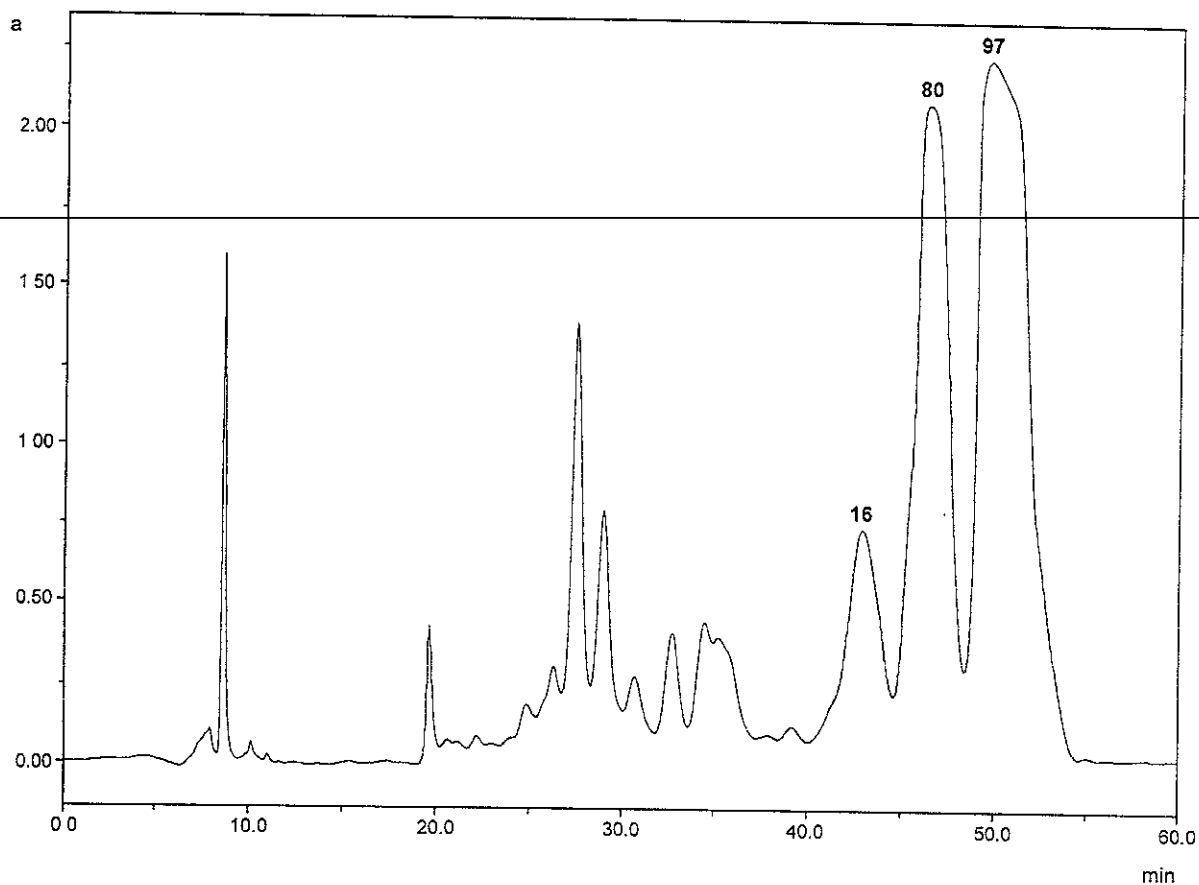
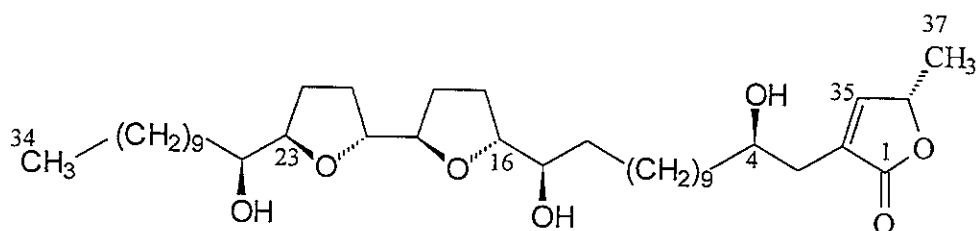
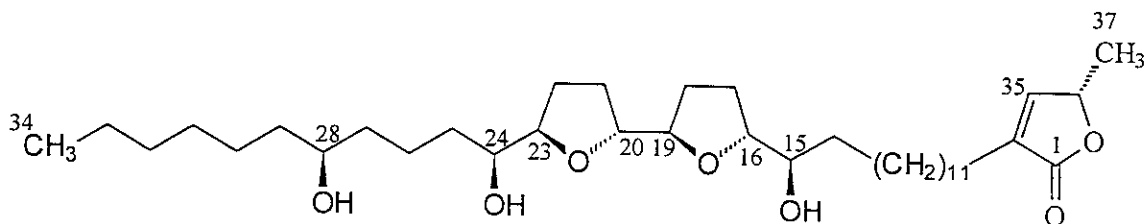


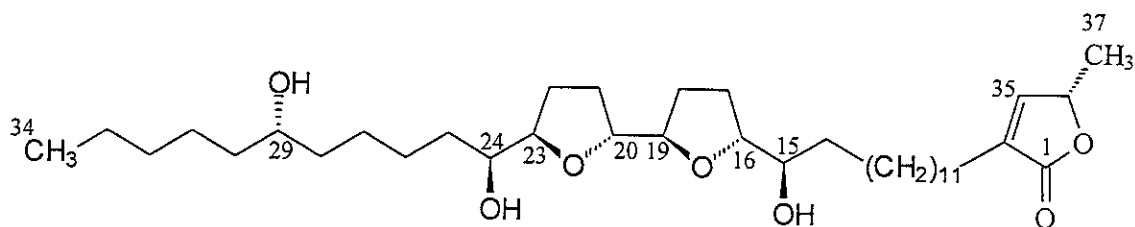
Figura 27. Cromatograma de líquidos de la fracción F_5 de las semillas de *A. purpurea*. **Condiciones de análisis:** Detector, UV (Waters 996 UV con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 212$ nm; Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 x 19 mm, 125Å, 10 μ M); Fase móvil, hexano-*i*PrOH-MeOH (90:5:5); Flujo 7.9 mL/min. Asignación de los picos: **16**, bulatacina ($t_R = 44.0$ min), **80**, escuamocina ($t_R = 45.2$ min) y **97**, motrilina ($t_R = 47.0$ min).



Bulatacina (16)



Escuamocina (80)



Motrilina (97)

Figura 28. Acetogeninas que fueron aisladas de la fracción F₅ de las semillas de *A. purpurea*.

La purificación por CLAR de la fracción activa F₇ (500 mg, TAS CL₅₀ = 1.47 x 10⁻² µg/mL) permitió el aislamiento de seis acetogeninas adicionales (Figura 29). Tres compuestos resultaron ser productos naturales novedosos y se les asignaron los nombres triviales de purpurediolina (98), purpurenina (99) y purpuracénina (100). Los rendimientos de estos compuestos en relación al peso seco del material vegetal son los siguientes: 0.0025, 0.0050 y 0.012 %, respectivamente. Los otros tres

compuestos podrían corresponder a las estructuras planas previamente propuestas para la anoglaucina (**101**), la xilomatenina (**102**) y la anonacina A (**21**). Los rendimientos de estos compuestos son: 0.0053, 0.0034 y 0.0011 %, respectivamente (Figura 30).

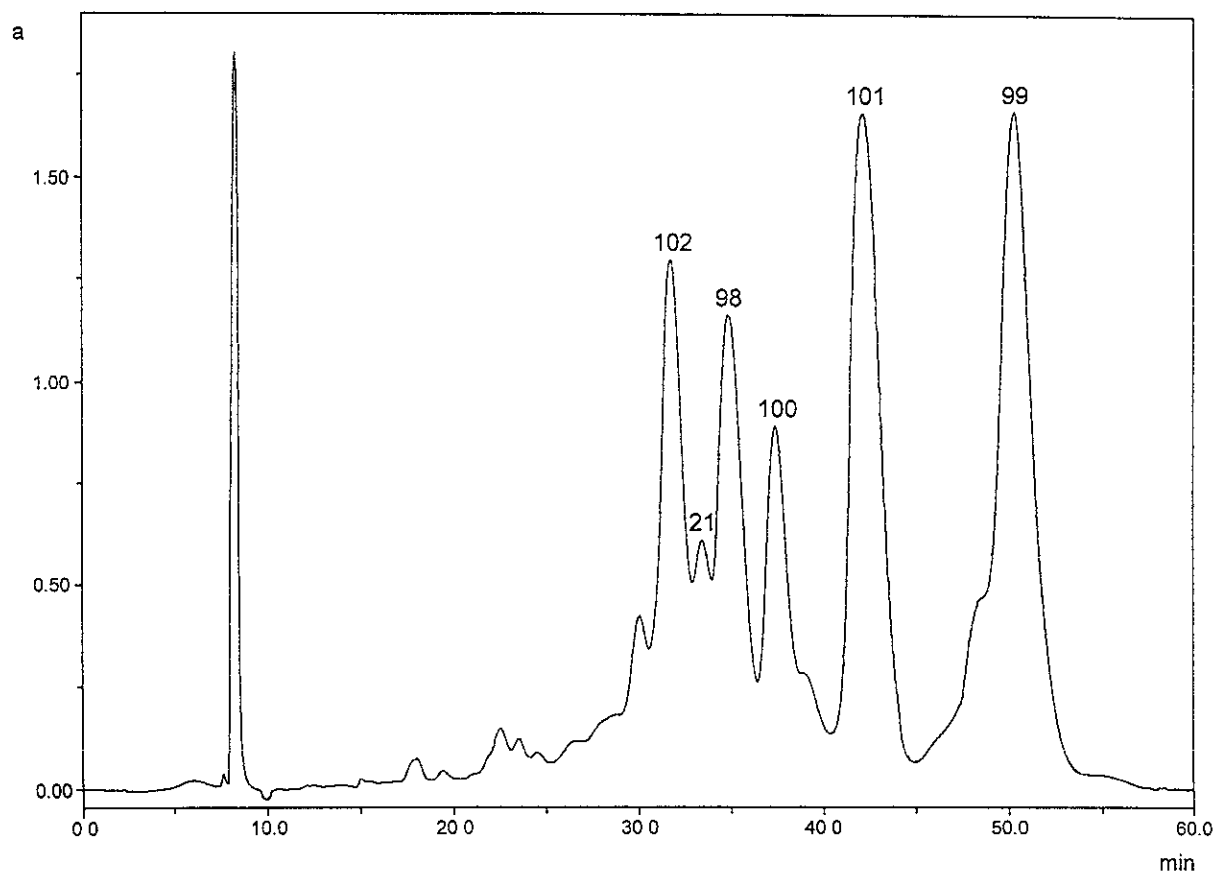
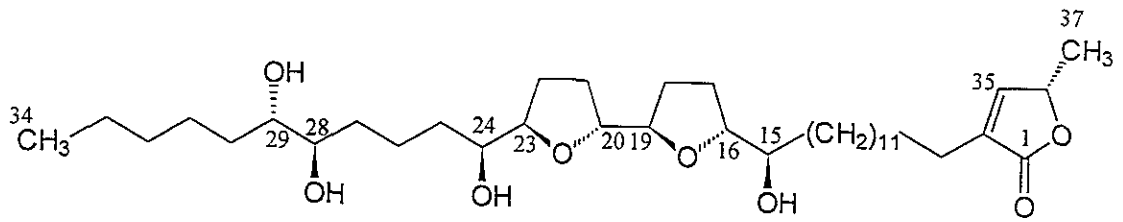
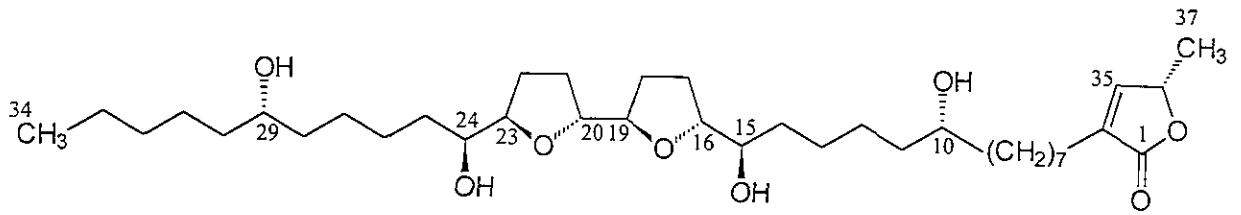


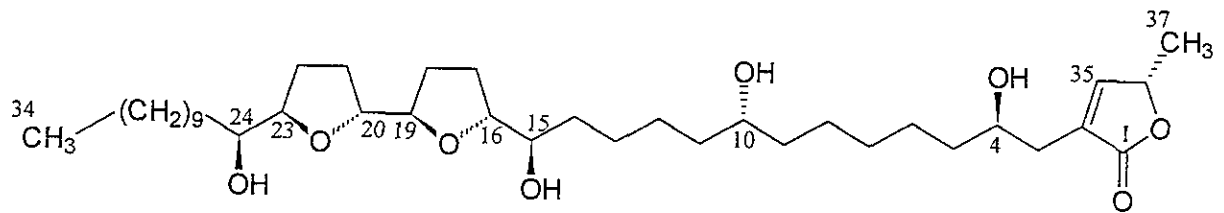
Figura 29. Cromatograma de líquidos de la fracción F_7 de las semillas de *A. purpurea*. **Condiciones de análisis:** Detector, UV (Waters 996 UV con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 212$ nm; Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 x 19 mm, 125Å, 10 μ M); Fase móvil, hexano-*i*PrOH-MeOH (85:7.5:7.5); Flujo 8.3 mL/min; Asignación de los picos: **98** purpurediolina ($t_R = 34.6$ min), **99** purpurenina ($t_R = 50.0$ min), **100** purpuracena ($t_R = 37.2$ min), **101** anoglaucina ($t_R = 42.0$ min), **102** xilomatenina ($t_R = 31.5$ min) y **21** anonacina A ($t_R = 33.0$ min).



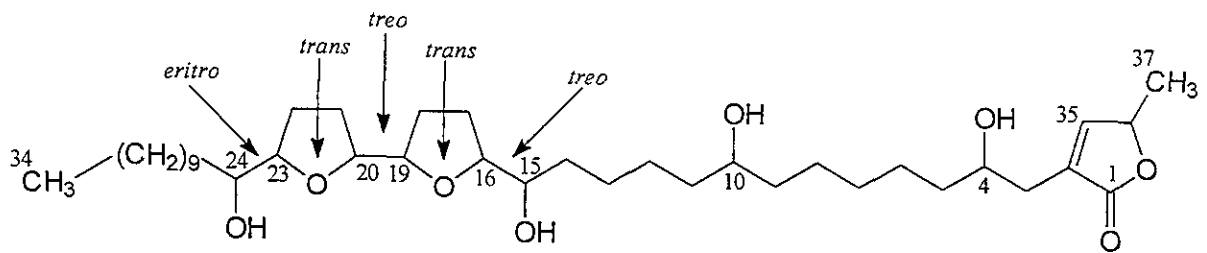
Purpurediolina (98)



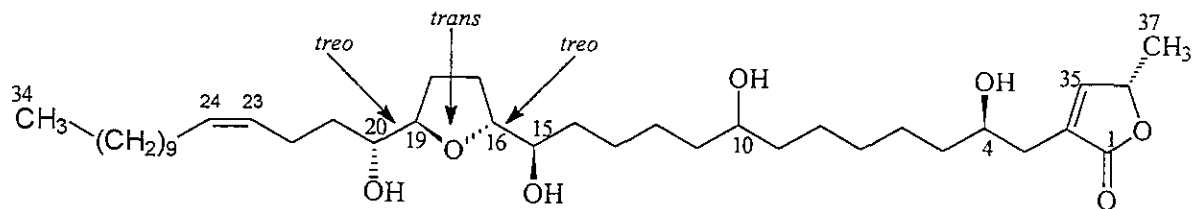
Purpurenina (99)



Purpuracena (100).

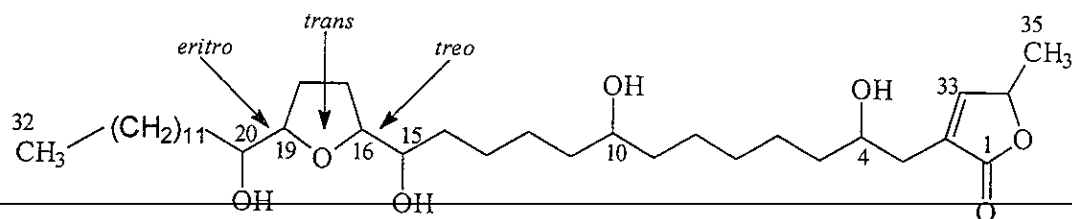


Anoglaucina (101)



Xilomatenina (102)

Figura 30. Acetogeninas que fueron aisladas de la fracción F₇ de las semillas de *A. purpurea*.



Anonacina A (21)

Figura 30. Acetogeninas que fueron aisladas de la fracción F₇ de las semillas de *A. purpurea* (cont).

5.1.2 Elucidación estructural de las acetogeninas aisladas de *A. purpurea*.

De las nueve acetogeninas obtenidas de *A. purpurea* en la presente investigación (Figuras 28 y 30), siete, incluyendo los tres nuevos productos naturales, pertenecen al grupo de las bis-THF adyacentes con una función carbinólica secundaria en cada uno de los extremos de la unidad bis-THF y las dos restantes al tipo de las mono-THF. La longitud de la cadena hidrocarbonada de los compuestos del primer grupo es de 34 átomos de carbono y todos presentan una metil- γ -lactona- α,β -insaturada. La unidad de bis-THF adyacentes con funciones carbinólicas secundarias en cada uno de los extremos se ubica entre las posiciones C-15 y C-24 en todos los productos. La estereoquímica relativa de esta unidad estructural es *treo/trans/treo/trans/eritro* en seis de los compuestos. Sin embargo, en el caso de la purpuracina (100), la estereoquímica relativa de la unidad mencionada es *treo/cis/treo/cis/eritro*.

La principal diferencia entre las siete acetogeninas del tipo bis-THF adyacentes radica en el grado de hidroxilación y en la disposición de las funciones carbinólicas

secundarias (distintas a las de C-15 y C-24), a lo largo de la cadena hidrocarbonada. Así, la bulatacina (**16**), la escuamocina (**80**) y la motrilina (**97**), todas acetogeninas previamente descritas en la literatura, son trihidroxiladas, en tanto que la purpurediolina (**98**), la purpurenina (**99**), la purpuracena (**100**) y la anoglaucina (**101**) son tetrahidroxiladas.

De las acetogeninas de tipo mono-THF la xilomatenina (**102**) contiene 37 átomos de carbono y la anonacina A (**21**) contiene 35. Las dos acetogeninas presentan la función mono-THF con funciones carbinólicas en cada uno de los extremos entre los carbonos C-15 y C-20. Además, ambos compuestos presentan grupos hidroxilos en C-4 y C-10. Por último, la xilomatenina (**102**) contiene una doble ligadura entre C-23/C-24.

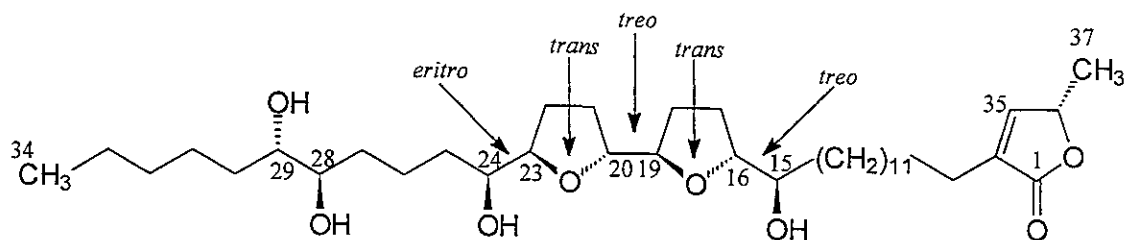
De manera general, la elucidación estructural de los compuestos se realizó mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos y quirópticos. El análisis detallado de la información proporcionada por los espectros de RMN, IR, EM y DC, tanto de los productos naturales como de sus derivados químicos (derivados sililados y ésteres de Mosher), permitió comprobar que las estructuras de los compuestos **16**, **80** y **97**, corresponden a la bulatacina (Hui *et al.*, 1989b), la escuamocina (anonina I) (Sahai *et al.*, 1994; Born *et al.*, 1990) y la motrilina (escuamocina C) (Cortes *et al.*, 1991; Sahai *et al.*, 1994), respectivamente. En el caso de los productos xilomatenina (**102**) y anonacina A (**21**), la interpretación de los espectros de masas (tanto del producto natural como del derivado sililado) y RMN sugirió que las estructuras corresponden a las de las estructuras primarias propuestas para la xilomatenina (Colman-saizarbitoria *et al.*, 1994b) y la anonacina A

(Lieb *et al.*, 1990), respectivamente. La elucidación de las estructuras moleculares de los tres compuestos novedosos, denominados purpurediolina (**98**), purpurenina (**99**) y purpuracena (**100**) y de la anoglaucina (**101**), se describirá con detalle en esta sección. En primer lugar se discutirá la caracterización de la purpurediolina (**98**) y la purpurenina (**99**), acetogeninas sin hidroxilo en la posición C-4. Posteriormente se describirá la identificación de la purpuracena (**100**) y de la anoglaucina (**101**), ambos compuestos con un grupo hidroxilo en la posición C-4. Como se mencionó en la sección de antecedentes, la hidroxilación en C-4, modifica de manera característica los desplazamientos químicos de la porción metil- γ -lactona- α,β -insaturada en los espectros de RMN. Es importante mencionar que la estructura plana de la anoglaucina (**101**) fue descrita previamente por Etcheverry y colaboradores (1995), sin embargo, en el presente estudio se establece la estereoquímica absoluta de los centros estereogénicos presentes en la molécula.

5.1.2.1 Elucidación estructural de la purpurediolina (**98**) y de la purpurenina (**99**).

La purpurediolina (**98**) y la purpurenina (**99**) se aislaron como sólidos con apariencia de cera de color blanco y amarillo pálido, respectivamente. Los espectros en el IR (Espectros 1 y 16) presentan bandas de absorción para grupos hidroxilo (3418 cm^{-1}) y para carbonilo de γ -lactona- α,β -insaturada (1751 cm^{-1}). El máximo de absorción a $\sim 207\text{ nm}$ en los espectros en el UV (Espectros 2 y 17), apoya también la presencia de la γ -lactona α,β -insaturada, tan común en las acetogeninas de anonáceas. La fórmula molecular de los dos compuestos se estableció como $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$ por espectrometría de masas de alta resolución en su modalidad FAB⁺ (Cuadros 4 y 19).

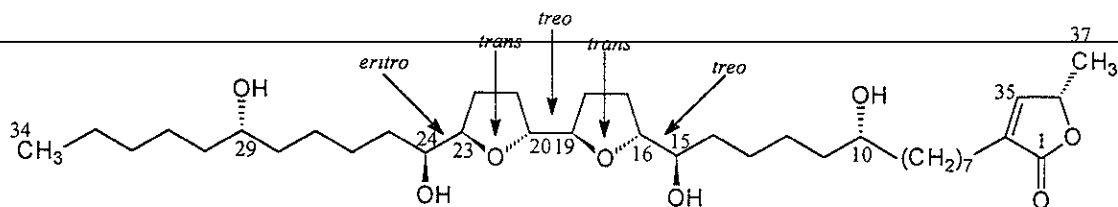
Cuadro 6. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la purpurediolina (**98**).



Purpurediolina (**98**)

p.f. =	35-39 °C
$[\alpha]^{20} =$	+ 20° (c= 1.3 mg/mL)
$\lambda_{\max} =$	207 nm (log $\epsilon = 3.89$) (Espectro 2)
DC =	238 nm ($\Delta\epsilon = -3.77 \times 10^3$) (Espectro 3)
P.M.	638 uma EM-FAB ⁺ (glicerol) m/z 639 [M+H] ⁺ (Espectro 4)
F.M. = C ₃₇ H ₆₆ O ₈	Calculada por EM de alta resolución, modalidad FAB ⁺ (NBA) m/z 639.4897 (teórico 639.4895) para [M+H] ⁺ .
IR =	ν max (film) 3100-3650, 3023, 2928, 1751, 1641, 1423, 1215, 1028, 930 cm ⁻¹ (Espectro 1)
RMN ¹ H y ¹³ C.	Cuadro 8. (Espectros 6-10)
EM-IE de 98a .	m/z (int. rel.): 753 (17.0), 663 (10.2), 573 (5.4), 507 (10.9), 489 (4.8), 483 (4.8), 437 (9.5), 417 (9.5), 399 (9.5), 367 (79.6), 347 (6.1), 309 (2.0), 173 (32.7), 111 (14.3), 83 (25.3), 73 (100) (Espectro 5)

Cuadro 7. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la purpurenina (99).



Purpurenina (99).

p.f. =	36-38 °C
$[\alpha]^{20} =$	+ 27 (c 1.0 mg/mL)
$\lambda_{\max} =$	208 nm ($\log \varepsilon = 4.09$) (Espectro 17)
DC =	238 nm ($\Delta\varepsilon = -2.66 \times 10^3$) (Espectro 18)
P.M.	638 uma EM-FAB ⁺ (glicerol) m/z 639 [M+H] ⁺ (Espectro 19)
F.M. =	C ₃₇ H ₆₆ O ₈ Calculada por EM de alta resolución, modalidad FAB ⁺ (NBA) m/z 639.4897 (teórico 639.4895) para [M+H] ⁺ .
IR =	ν max (film) 3100-370, 3021, 2940, 2859, 1751, 1642, 1428, 1215, 1074, 927 cm ⁻¹ (Espectro 16)
RMN ¹ H y ¹³ C.	Cuadro 9. (Espectros 21-25)
EM-IE de 99a.	m/z (int. rel.): 765 (4.7), 731 (6.0), 675 (2.0), 641 (6.7), 595 (30.7), 585 (2.6), 551 (7.3), 505 (27.3), 495 (6.7), 461 (4.0), 455 (96.7), 415 (32.0), 365 (63.3), 331 (10.7), 297 (83.3), 275 (22.0), 241 (9.3), 173 (21.3), 151 (14.7), 111 (12.0), 107 (14.0), 83 (18), 73 (100). (Espectro 20)

Cuadro 8. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de la purpurediolina (**98**).

Posición	δ_{H}	δ_{C}
1	-	173.9
2	-	134.4
3	2.26 tt (7.5, 2.0)	25.1
4	1.54 m	27.4
5-13	1.20-1.60 m	28.3-29.7
14	1.37 m	33.2
15	3.40 m	74.1
16	3.83 m	83.3
17	1.63 m, 1.97 m	28.4
18	1.63 m, 1.97 m	28.9
19	3.85 m	82.5
20	3.93 m	82.2
21	1.59 m, 1.97 m	29.1
22	1.59 m, 1.90 m	25.1
23	3.93 m	82.9
24	3.86 m	71.6
25	1.42 m	32.5
26	1.44 m	22.3
27	1.47 m*	30.8*
28	3.59 m	74.6"
29	3.59 m	74.7"
30	1.41 m*	31.4*
31	1.20-1.60 m	28.3-29.7
32	1.20-1.60 m	31.8
33	1.20-1.60 m	22.5
34	0.89 t (7.0)	13.9
35	6.99 ddd (2.0, 2.0, 2.0)	148.9
36	5.00 qq (7.0, 2.0)	77.4
37	1.40 d (7.0)	19.1

CDCl_3 , ^1H [500 MHz. (J in Hz)], ^{13}C (125 MHz), δ en ppm. "*" asignaciones intercambiables.

Cuadro 9. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de la purpurenina (99).

Posición	δ_{H}	δ_{C}
1	-	173.8
2	-	134.4
3	2.26 tt (7.0, 1.5)	25.1
4	1.55 m	27.4
5-8	1.20-1.60 m	28.3-29.6
9 y 11	1.42 m	37.4*
10	3.58 m	71.8
12-13	1.20-1.62 m	28.3-29.6
14	1.40 m	33.3
15	3.40 m	74.0
16	3.83 m	83.2
17	1.62 m, 1.97 m	28.4
18	1.62 m, 1.97 m	28.8
19	3.85 m	82.4
20	3.93 m	82.2
21	1.62 m, 1.97m	29.2
22	1.60 m, 1.90m	24.7
23	3.93 m	82.8
24	3.85 m	71.5
25	1.41 m	32.4
26-27	1.20-1.62 m	28.3-29.6
28	1.42 m	37.3*
29	3.58 m	71.8
30	1.42 m	37.4*
31	1.20-1.62 m	28.3-29.6
32	1.20-1.62 m	31.9
33	1.20-1.62 m	22.6
34	0.89 t (7.0)	14.0
35	6.99 ddd (1.5, 1.5, 1.5)	148.8
36	5.00 qq (7.0, 1.5)	77.3
37	1.40 d (7.0)	19.2

CDCl_3 , ^1H [500 MHz. (J in Hz)], ^{13}C (125 MHz), δ en ppm. * asignaciones intercambiables.

La fórmula permite calcular 5 grados de insaturación, de los cuales tres se asignan a la lactona y los dos restantes deben corresponder a dos anillos, posiblemente de naturaleza tetrahidrofurano considerando los antecedentes químicos de las acetogeninas del género *Annona* (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995a; Zeng *et al.*, 1996; Cavé *et al.*, 1997; *inter alia*). Las pérdidas consecutivas de cuatro moléculas de agua a partir del ion cuasimolecular detectado en cada uno de los espectros de masas de tipo FAB⁺ (Espectros 4 y 19) y la formación de los derivados tetra-trimetilsililado (tetra-TMSi) sugieren la presencia de cuatro grupos hidroxilos en cada una de las moléculas (Espectros 5 y 20).

Los espectros de RMN (Espectros 6, 8, 21 y 23) de los productos **98** y **99** presentan el perfil típico de acetogeninas del tipo bis-THF adyacentes (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995a; Zeng *et al.*, 1996; Cave *et al.*, 1997). La comparación de los desplazamientos químicos de los compuestos **98** y **99** (Cuadros 8 y 9) con los de la bulatetrocina, una acetogenina del tipo bis-THF adyacentes que contiene cuatro grupos hidroxilos (He *et al.*, 1996), confirma la presencia de la metil γ -lactona- α,β -insaturada, de una unidad de bis-THF adyacentes con una función carbinólica secundaria en cada uno de los extremos y de dos grupos hidroxilos adicionales. Las señales diagnósticas correspondientes se observan en los espectros de RMN de la siguiente manera:

- a) Las absorciones de la metil- γ -lactona- α,β -insaturada aparecen en δ_{H} 6.99 (H-35), 5.00 (H-36) y 1.40 (H-37) y δ_{C} 173 (C-1), 148 (C-35), 134.4 (C-2), 77 (C-36) y 19 (C-37).

- b) Las señales de la unidad de bis-THF adyacentes con una función carbinólica secundaria en cada uno de los extremos se observan en el intervalo entre δ_H 3.40 y 3.93 en el espectro de RMN 1H . Algunas de estas señales correlacionan con ocho resonancias entre δ_C 71.5 y 83.3 de acuerdo al análisis del espectro de RMN 1H - ^{13}C -HMQC (Espectros 10 y 25).
- c) En el caso del compuesto **98**, las señales para las dos funciones carbinólicas adicionales se aprecian en δ_C 74.7 y 74.6 y δ_H 3.59 (m, 2H), mismas que son características de un diol vecinal (Wu *et al.*, 1995b). Por otra parte, en el compuesto **99**, las señales para los dos carbinoles restantes aparecen en δ_H 3.58 (2H) y δ_C 71.8 (2C). En consecuencia la diferencia entre los compuestos **98** y **99** es la disposición del tercer y cuarto hidroxilo a lo largo de la cadena hidrocarbonada.

El análisis de los espectros de masas de los derivados sililados **98a** y **99a** (Espectros 5 y 20) permitió determinar que la unidad bis-THF adyacentes con las funciones carbinólicas vecinales se encuentra ubicada entre C-15 y C-24 en los dos compuestos y que las otras dos funciones carbinólicas se encuentran en C-28 y C-29 en el caso del compuesto **98** y en C-10 y C-29 en el caso de **99**. Las rupturas dirigidas por el grupo trimetilsilil éter son diagnósticas de la posición de los grupos hidroxilos. Así, en el espectro de masas del compuesto **98a**, la señal intensa observada en m/z 367 es consistente con una ruptura entre C-15/C-16 y el fragmento de m/z 507 con la ruptura en C-23/C-24. Por otro lado, los fragmentos observados en m/z 489 y 437, son congruentes con la ruptura entre C-19/C-20. Los

fragmentos antes descritos son los que permiten evidenciar la disposición de la unidad de bis-THF adyacentes con funciones carbinólicas en los extremos entre C-15 y C-24. Por último, la presencia de los fragmentos de m/z 173 y 753, permiten establecer que el diol se encuentra entre C-28/C-29 (Figura 31).

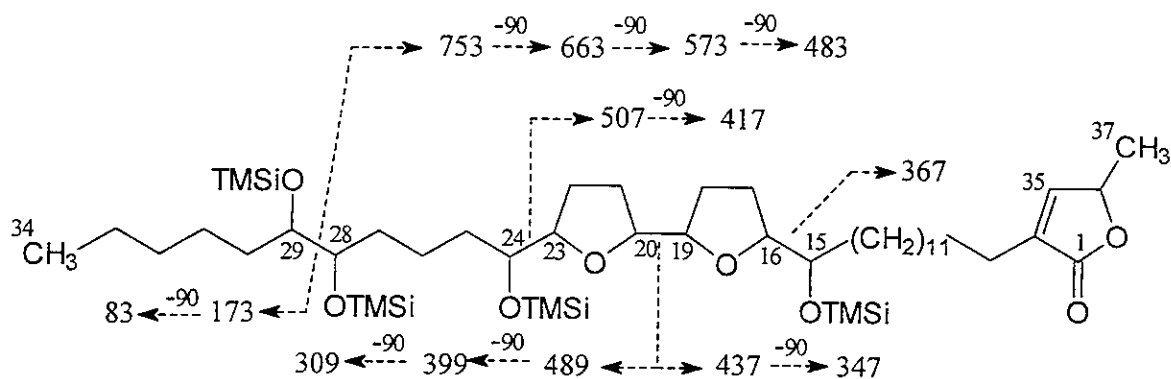


Figura 31. Patrón de fragmentación observado en el espectro de masas generado por IE del derivado sililado de la purpurediolina **98a**.

En el espectro de masas del derivado tetra-TMSi **99a** se observan picos de moderada intensidad en m/z 731 y 297, los cuales son consistentes con rupturas entre C-9/10 y C-10/11, respectivamente, y en consecuencia con la ubicación de uno de los hidroxilos en C-10. Asimismo, el fragmento de m/z 173 (ruptura entre C-28/29) permite proponer que el otro hidroxilo se encuentra en la posición C-29. Por último, los fragmentos de m/z 455 y 595, generados por las rupturas entre C-15/16 y C-23/24, respectivamente (Figura 32), indican claramente que la unidad bis-THF adyacentes α,α' -dihidroxilada se localiza entre C-15 y C-24 como es el caso de la purpurediolina (**98**).

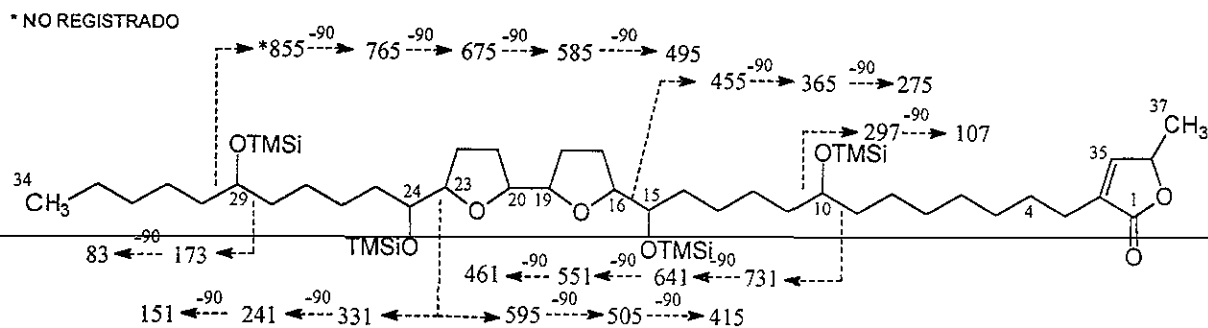
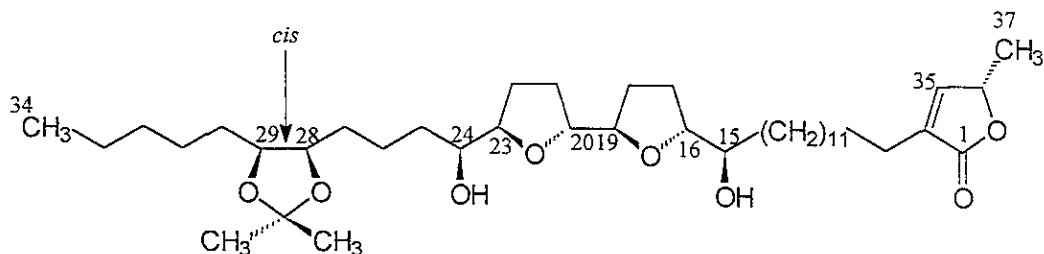


Figura 32. Patrón de fragmentación observado en el espectro de masas generado por IE del derivado sililado de la purpurenina (**99a**).

La presencia del diol vecinal en la purpurediolina (**98**), se comprobó también químicamente mediante la formación del acetónido **98b** por tratamiento del producto natural **98** con acetona/HCl (Wu *et al.*, 1995b). El análisis detallado del espectro de RMN ^1H (Espectro 11) del acetónido **98b** permite determinar que la estereoquímica relativa del diol es *eritro*. Los desplazamientos químicos de los protones de los metilos del cetal en δ 1.42 (s) y 1.33 (s), así como las señales de los oximetinos del anillo de dioxolano en δ_{H} 4.03 y 4.01 (Cuadro 10) son consistentes con esta propuesta. Cabe mencionar que cuando un diol vecinal posee la estereoquímica relativa *treo*, los desplazamientos químicos de los metilos y los oximetinos del anillo dioxolano del cetal correspondiente son equivalentes y aparecen en δ_{H} 1.37 y 3.58, respectivamente (Wu *et al.*, 1995b).

La confirmación de la estereoquímica *eritro* del diol, y en consecuencia *cis* del dioxolano, se realizó con base en el análisis del espectro RMN ^1H -NOESY en el cual se observa que solo uno de los metilos del cetal (δ_{H} 1.33) presenta cuadros de conectividad con los dos oximetinos del dioxolano (Figura 33).

Cuadro 10. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ^1H de los hidrógenos carbinólicos de dioles de tipo *treo* y *eritro* y los metinos y metilos de los cetales correspondientes (Wu *et al.*, 1995b) con aquellos de **98** y **98b**.



	Protones de metinos		Metilos del acetónido	
	<i>treo</i>	<i>eritro</i>	<i>treo</i>	<i>eritro</i>
Diol	3.45 (2 H)	3.62, 3.58	-	-
Acetónido	3.58 (2 H)	4.03, 4.00	1.37 (6 H)	1.43, 1.33
98	3.59 (2 H)		-	
98b	4.03, 4.01		1.42, 1.33	

CDCl_3 , 500 MHz, δ en ppm

La estereoquímica relativa de la unidad bis-THF adyacentes y de las funciones carbinólicas ubicadas en cada uno de los extremos se estableció mediante el análisis comparativo de los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN de **98** y **99** en los intervalos comprendidos entre δ_c 71.6 y 74.1 y entre δ_H 3.40 y 3.93, con los de una serie de modelos descritos en la literatura (Fang *et al.*,

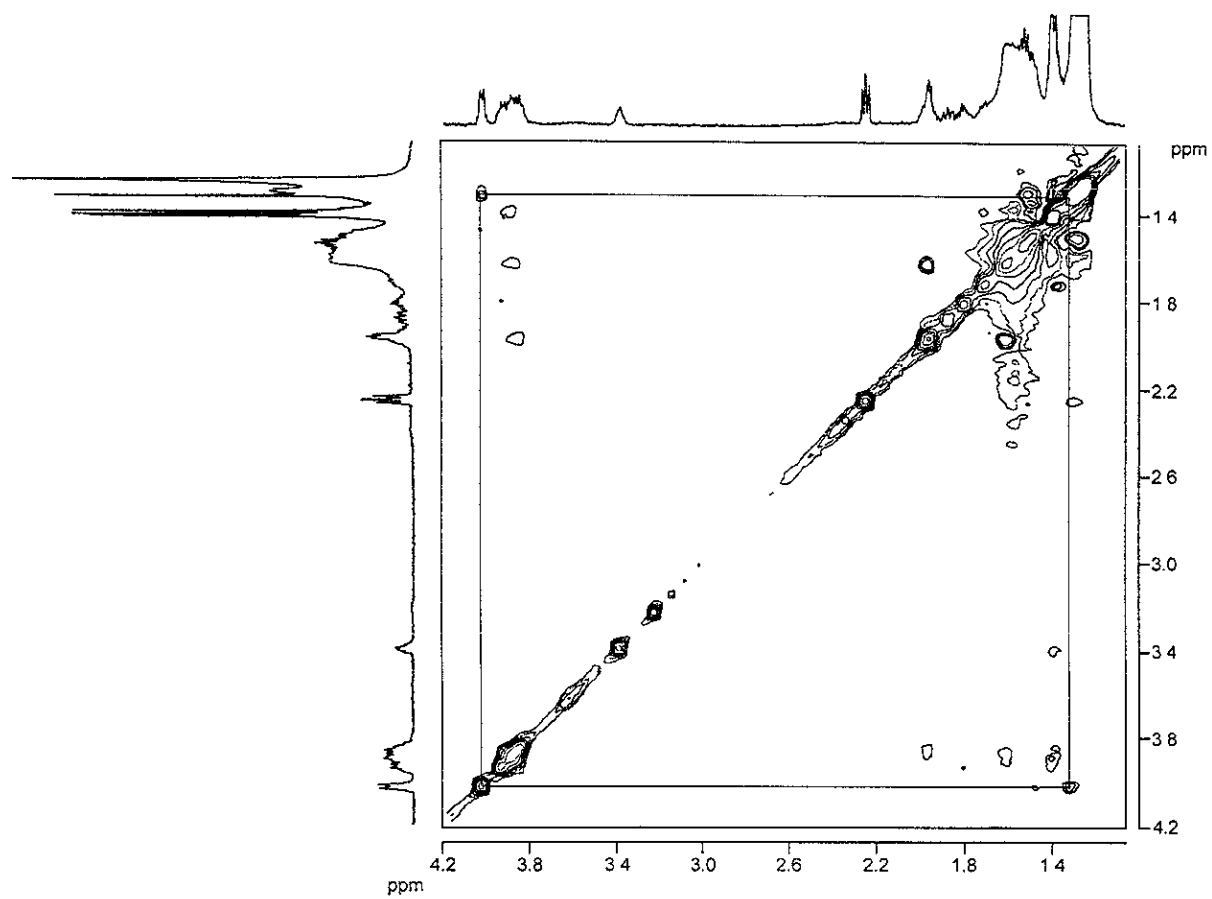
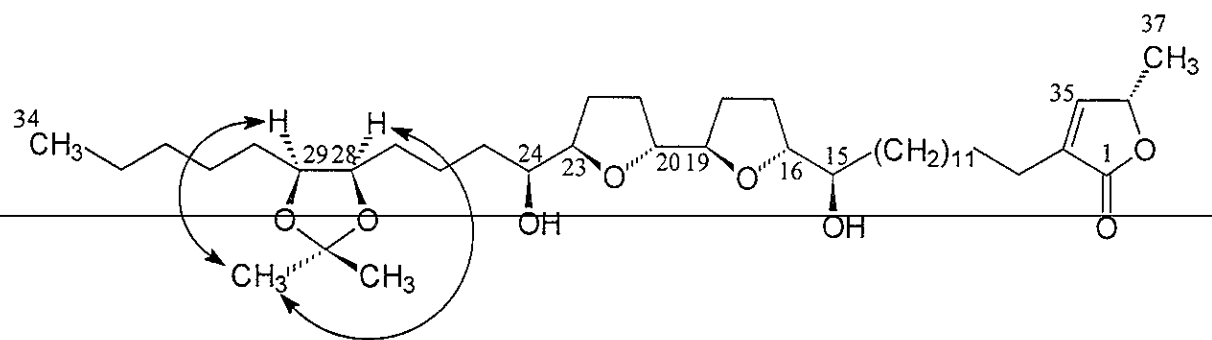
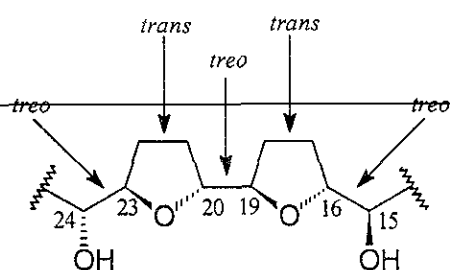


Figura 33. Espectro de RMN ^1H -NOESY del acetónido de la purpurediolina (**98b**).

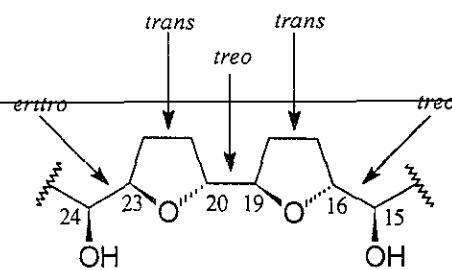
1993). Los modelos seleccionados se indican en el Cuadro 11 y son representativos de los distintos tipos de acetogeninas de anonáceas en lo que se refiere a la estereoquímica relativa de la función bis-THF adyacentes α,α' -hidroxilada. De tal forma, que los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C en la zona antes mencionada son prácticamente idénticos a los de la bulatacina (**16**), la cual presenta una estereoquímica relativa *treo/trans/treo/trans/eritro*. Por lo tanto, las señales correspondientes a la unidad bis-THF adyacentes α,α' -dihidroxilada en los compuestos **98** y **99** se asignaron como se indica en los Cuadros 8 y 9.

De manera adicional, la estereoquímica relativa *treo* y *eritro* de las funciones carbinólicas localizadas en C-15 y C-24, se confirmó mediante la aplicación de la regla de Born (Born *et al.*, 1990). Born y colaboradores sintetizaron dos modelos, uno con la estereoquímica relativa *treo* entre en anillo THF y la función carbinólica vecinal, y el segundo con una estereoquímica *eritro*. El estudio de los espectros de RMN de los modelos sintéticos permitió correlacionar la estereoquímica relativa con los desplazamientos químicos observados para los metinos del THF y del carbinol vecino. Cuando la estereoquímica es *treo* el metino del carbinol aparece en δ_{H} 3.40 y δ_{C} 73.87, en tanto que el metino del THF aparece en δ_{H} 3.79 y δ_{C} 82.47. Por otra parte, cuando la estereoquímica es *eritro* los desplazamientos químicos son δ_{H} 3.84 / δ_{C} 71.83 y δ_{H} 3.84 / δ_{C} 82.29, respectivamente (Cuadro 12).

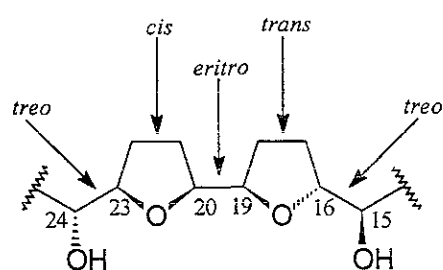
Cuadro 11. Desplazamientos químicos en RMN de la subunidad bis-THF adyacentes con diferentes configuraciones relativas.



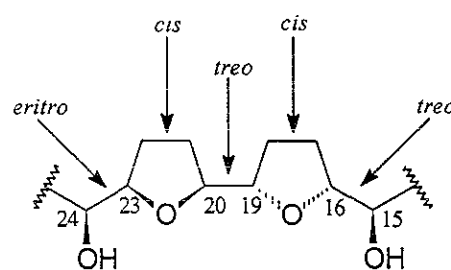
Tipo Asimicina (25)



Tipo Bulatacina (16)



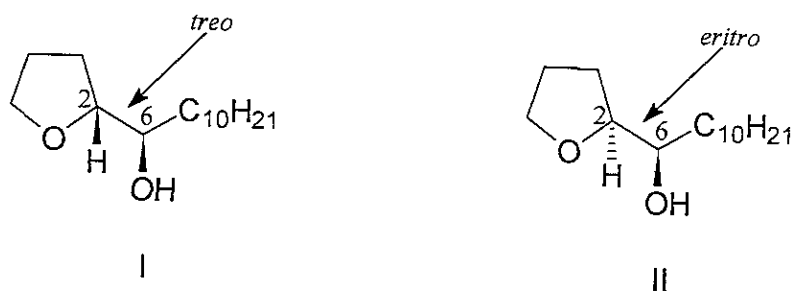
Tipo Trilobacina (27)



Tipo Roliniastatina 1 (30)

Tipo de acetogenina	$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ (δ en ppm)					
	15	16	19	20	23	24
Asimicina (25)	3.37 / 74.0	3.84 / 83.1	3.84 / 81.8	3.84 / 81.8	3.84 / 83.1	3.37 / 74.0
Bulatacina (16)	3.38 / 74.1	3.83 / 83.2	3.83 / 82.2	3.92 / 82.4	3.92 / 82.2	3.83 / 71.3
Trilobacina (27)	3.34 / 73.9	3.80 / 82.6	4.01 / 80.9	3.93 / 81.6	3.80 / 83.3	3.34 / 74.6
Roliniastatina 1 (30)	3.38 / 74.0	3.85 / 83.0	3.85 / 81.1	3.85 / 81.0	3.85 / 83.0	3.85 / 71.8
Purpurediolina (98)	3.40 / 74.1	3.89 / 83.3	3.85 / 82.5	3.93 / 88.2	3.93 / 82.9	3.86 / 71.6
Purpurenina (99)	3.40 / 74.0	3.89 / 83.2	3.85 / 82.4	3.93 / 88.2	3.93 / 82.8	3.85 / 71.5

Cuadro 12. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C diagnósticos de la estereoquímica relativa entre el anillo de THF y el carbinol adyacente (Born *et al.*, 1990).



Modelo	$\delta_{\text{H/C}}$	
	2	6
I	3.79 / 82.47	3.40 / 73.87
II	3.84 / 82.29	3.84 / 71.83
Purpurediolina (98)	3.83 / 83.3	3.40 / 74.1
	3.93 / 82.9	3.86 / 71.6
Purpurenina (99)	3.89 / 83.2	3.40 / 74.0
	3.93 / 82.8	3.85 / 71.5

δ en ppm

En el caso de la purpurediolina (**98**) y la purpurenina (**99**) los desplazamientos químicos para H-15/C-15 (δ_{H} 3.40 / δ_{C} 74), H-16/C-16 (δ_{H} 3.83 / δ_{C} 83), H-23/C-23 (δ_{H} 3.93 / δ_{C} 82) y H-24/C-24 (δ_{H} 3.8 / δ_{C} 71) permiten establecer que la estereoquímica relativa entre C-15/16 y entre C-23/24 es *treo* y *eritro*, respectivamente.

Una vez establecida la configuración relativa de la porción bis-THF adyacentes α, α' -hidroxilada, el siguiente paso en el proceso de elucidación estructural de los compuestos **98** y **99** fue la determinación de la estereoquímica absoluta de los carbinoles presentes en la molécula y para ello se aplicó la metodología de los ésteres de Mosher. Para establecer la configuración absoluta de alcoholes secundarios por el método de Mosher es necesario la formación de los ésteres correspondientes con los ácidos quirales (S)- y (R)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético (S- y R-MTPA). Posteriormente se analizan las diferencias de los desplazamientos químicos en los espectros de RMN ^1H de los ésteres (S)- y (R)-MTPA con el fin de establecer el efecto protector inducido por el anillo aromático y el efecto desprotector inducido por el grupo metoxilo del MTPA sobre los hidrógenos cercanos al centro quiral (Dale y Mosher, 1973; Ohtani *et al.*, 1991). Según el modelo empleado por Ohtani y colaboradores (1991), los hidrógenos del lado derecho del plano del MTPA deben de tener diferencias de desplazamientos químicos ($\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$) positivas ($\Delta\delta > 0$), y los hidrógenos del lado izquierdo del plano deben de tener diferencias negativas ($\Delta\delta < 0$), tal como se ilustra en la Figura 33. Por último, se determina la configuración absoluta del alcohol secundario aplicando la regla de Cahn-Ingold-Prelog (Figura 33). McLaughlin y colaboradores (Rieser *et al.*, 1992) aplicaron este procedimiento para la determinación de la configuración absoluta de los carbinoles secundarios vecinales a los anillos heterocíclicos y en aquellos próximos tanto a la lactona α, β -insaturada como al metilo terminal, en numerosas acetogeninas de anonáceas.

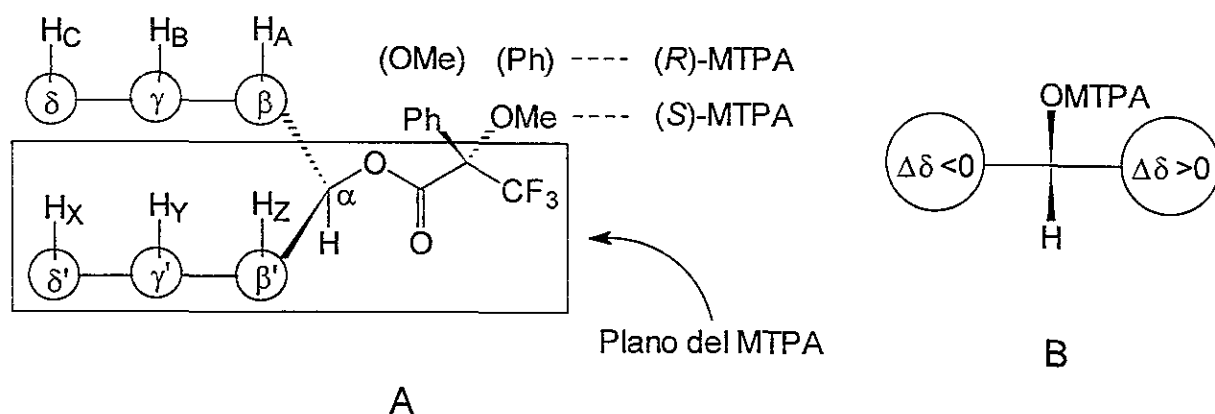


Figura 33. A) Conformación de máxima estabilidad y plano del MTPA propuesto para los ésteres (S)- y (R)- de Mosher. B) Modelo para determinar la estereoquímica absoluta en alcoholes secundarios (Ohtani *et al.*, 1991).

La comparación de los desplazamientos químicos en los espectros de RMN ¹H de los per-ésteres de Mosher S y R de la purpurediolina (**98**) (Espectros 12-15) y de la purpurenina (**99**) (Espectros 26-29), permitió realizar las siguientes observaciones y conclusiones (Cuadros 13 y 14): a) La diferencia positiva ($\Delta\delta_{S-R}$) para H-14 y las diferencias negativas para los protones H-17 y H-18 del anillo de THF indican una estereoquímica R para el centro quiral C-15. b) La diferencia positiva para los protones H-22 y H-23 y la diferencia negativa para H-25 permiten proponer una estereoquímica S para el centro quiral C-24 (Cuadro 13). Posteriormente, la configuración absoluta para los centros quirales C-16, C-19, C-20 y C-23 en los dos compuestos, se dedujo con base en la estereoquímica relativa de la unidad bis-THF como R, R, R y R, respectivamente.

Cuadro 13. Desplazamientos químicos (RMN ^1H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la purpurediolina **98s** y **98r**.

Protones	Purpurediolina (98)			
	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{(S-R)}$	Configuración absoluta
14	1.600	1.511	+ 0.089	15 <i>R</i>
16	3.922	3.921	+ 0.001	
17	1.976	1.982	- 0.006	
	1.528	1.559	- 0.031	
22	1.854	1.807	+ 0.047	24 <i>S</i>
	1.616	1.613	+ 0.003	
23	3.906	3.905	+ 0.001	
25	1.556	1.597	- 0.041	
34	0.832	0.866	- 0.034	29 <i>S</i>

CDCl_3 , 500 MHz.

Cuadro 14. Desplazamientos químicos (RMN ^1H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la purpurenina **99s** y **99r**.

Protones	Purpurenina (99)			
	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{(S-R)}$	Configuración absoluta
3	2.250	2.238	+ 0.012	10 <i>R</i>
4	1.532	1.514	+ 0.018	15 <i>R</i>
14	1.630	1.488	+ 0.131	
16	3.976	3.944	+ 0.032	
17	1.899	1.971	- 0.072	
	1.600	1.616	- 0.016	24 <i>S</i>
22	1.824	1.798	+ 0.026	
	1.664	1.606	+ 0.058	
23	3.944	3.930	+ 0.014	
25	1.532	1.554	- 0.022	29 <i>S</i>
34	0.832	0.864	- 0.032	

CDCl_3 , 500 MHz.

Es importante hacer notar que el valor $\Delta\delta_{S-R}$ para H-16 es anómalo, ya que en lugar de obtener valores negativos se obtienen valores positivos. McLaughlin y colaboradores (Zhao *et al.*, 1996) proponen que este desplazamiento irregular se debe a los efectos de compresión estérica entre los anillos bis-THF adyacentes y la unidad MTPA, que obligan al H-16 a ubicarse en el plano de la unidad MTPA. El efecto diamagnético ocasionado por el anillo aromático del éster *S* o *R* es siempre de la misma magnitud y en consecuencia la diferencia $\Delta\delta_{S-R}$ es nula o ligeramente positiva.

La predicción de la configuración absoluta para los centros estereogénicos localizados en medio de la cadena hidrocarbonada, por ejemplo en acetogeninas hidroxiladas en C-28-C-30, es posible gracias al trabajo realizado por Fujimoto y colaboradores (Nishioka *et al.*, 1994). Mediante la aplicación de la metodología de los ésteres de Mosher, estos investigadores determinaron la estereoquímica absoluta del 6-undecanol y el 8-pentadecanol. Las diferencias medidas en el desplazamiento químico del metilo terminal ($\Delta\delta_{S-R}$) de los ésteres de Mosher correspondientes fueron de 0.039 y 0.007 ppm, respectivamente. Las diferencias observadas permiten determinar la estereoquímica absoluta de los carbinos separados hasta por seis metilenos del metilo terminal. Con base en estas consideraciones, el análisis de los espectros de RMN ^1H de los ésteres de Mosher del compuesto **98** (**98s** y **98r**) permite establecer que la configuración absoluta para el centro quiral C-29 es *S*, ya que la diferencia $\Delta\delta_{S-R}$ para el metilo terminal C-34 es de -0.034 ppm (Cuadro 13). Por lo tanto, la configuración absoluta para C-28 se determinó como *R*, con base en la estereoquímica relativa *eritro* previamente determinada para el diol vecinal C-28/29.

En el caso de la purpurenina (**99**) el análisis de los espectros de RMN ^1H de los esteres de Mosher permite establecer una diferencia negativa ($\Delta\delta_{S-R}$) para H-34, por lo que la configuración para C-29 se establece también como S. Para la determinación de la estereoquímica absoluta del centro quiral C-10 se analizaron las señales más cercanas claramente asignables, las cuales corresponden a H-4 y H-3. Así, los valores positivos ($\Delta\delta_{S-R}$) observados para H-4 y H-3 (+ 0.018 y + 0.012 ppm, respectivamente) permiten establecer la configuración absoluta R para el centro quiral C-10 (Cuadro 14).

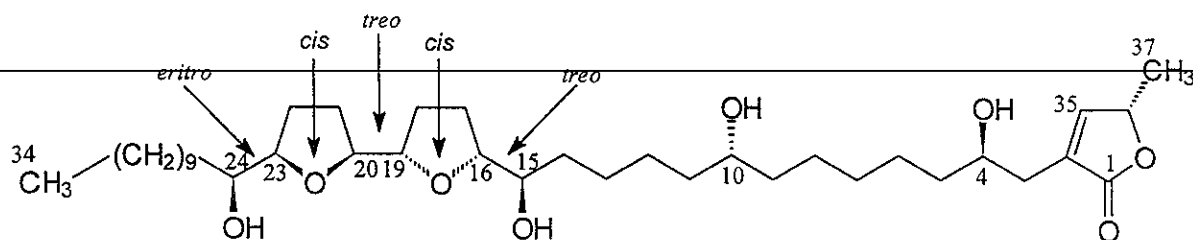
El último paso de la determinación de las estructuras de la purpurediolina (**98**) y la purpurenina (**99**) fue la determinación de la configuración absoluta en C-36. De acuerdo a Fujimoto y colaboradores (Sahai *et al.*, 1994), el signo negativo del efecto Cotton en el espectro de DC entre 235 y 240 nm observado para un gran número de acetogeninas es indicativo de la configuración S en C-36. La validez de este método se obtuvo con base en la configuración evidenciada a través de la correlación química realizada de la función lactona de la escuamocina (**80**) con el ácido (2S)-láctico (Sahai *et al.*, 1994)

El efecto Cotton negativo observado en los espectros de DC de los compuestos **98** y **99** (Espectros 3 y 18) a 238 nm, es consistente con una configuración S en C-36. En síntesis, la estereoquímica absoluta de los centros estereogénicos de la purpurediolina (**98**) y de la purpurenina (**99**) se estableció como 15R, 16R, 19R, 20R, 23R, 24S, 28R, 29 S y 36S y 10R, 15R, 16R, 19R, 20R, 23R, 24S, 29S y 36S, respectivamente (Figura 30).

5.1.2.2 Elucidación estructural de la purpuracena (**100**) y la anoglaucina (**101**).

Los compuestos **100** y **101** se obtuvieron como ceras de color amarillo pálido con puntos de fusión de 42-44 °C y 58-59 °C, respectivamente. Los datos espectroscópicos y espectrométricos de ambos compuestos se resumen en los Cuadros 15 y 16. Como se indicó previamente, las acetogeninas **100** y **101** presentan como característica común la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-4 de la cadena hidrocarbonada y difieren entre sí en la estereoquímica de los anillos (cierre de los anillos) de la porción bis-THF adyacentes. Al igual que los compuestos **98** y **99**, la fórmula molecular de ambos compuestos se estableció como $C_{37}H_{66}O_8$ por espectrometría de masas de alta resolución y la pérdida consecutiva de cuatro moléculas de agua a partir del ion cuasimolecular detectado en los espectros de masas FABMS de los compuestos **100** y **101** (Espectros 34 y 50) que indicó, de nueva cuenta, la presencia de cuatro grupos carbinólicos en los dos compuestos. Al igual que en el caso de los productos **98** y **99**, la formación de los derivados tetra-TMSi **100a** y **101a** (Espectros 35 y 51) confirmó químicamente la presencia de cuatro hidroxilos en las moléculas. Por otra parte, el análisis del patrón de fragmentación observado en los espectros de masas generados por los derivados **100a** y **101a** (Figura 34) permite establecer que la función bis-THF con una función carbinólica en cada uno de los extremos se encuentra también entre C-15/C-24. En esta ocasión, los fragmentos diagnósticos se aprecian en m/z 543, 683, 243, 313 y 613. El primero corresponde a la ruptura entre C-15/16, el segundo y tercer fragmento a las rupturas entre C-23/24 y los últimos a la ruptura entre C-19/20. La presencia de los fragmentos de m/z 643 (ruptura entre C-9/10) y 385

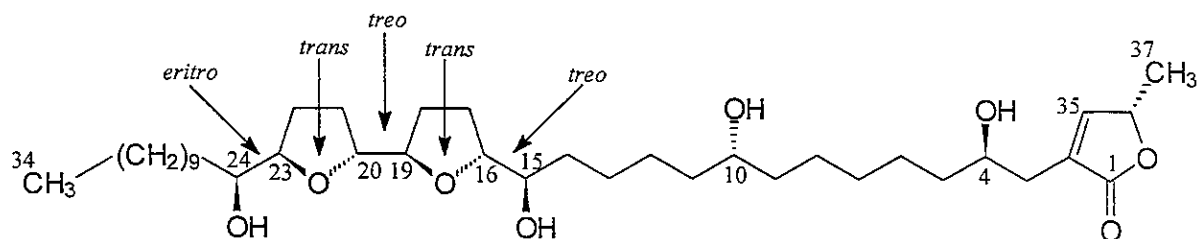
Cuadro 15. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la purpuracena (100).



Purpuracena (100)

p.f. =	42-44 °C
$[\alpha]^{20} =$	+ 26° (c= 1.0 mg/mL)
$\lambda_{\max} =$	207 nm (log $\epsilon = 4.32$) (Espectro 32)
DC =	237.5 nm ($\Delta\epsilon = -1.06 \times 10^3$) (Espectro 33)
P.M.	638 uma EM-FAB ⁺ (glicerol) m/z 639 [M+H] ⁺(Espectro 34)
F.M. =	C ₃₇ H ₆₆ O ₈ Calculada por EM de alta resolución, modalidad FAB ⁺ (NBA) m/z 639.4897 (teórico 639.4895) para [M+H] ⁺ .
IR =	ν max (film) 3100-3650, 3023, 2929, 1755, 1642, 1429, 1215, 1028, 930 cm ⁻¹ (Espectro 31)
RMN ¹ H y ¹³ C.	Cuadros 17 y 18. (Espectros 35-39)
EM-IE de 100a. m/z (int. rel.):	725 (3), 689, (10), 643 (3), 635 (2), 613 (4), 593 (9), 543 (49), 523 (9), 503 (9), 453 (27), 433 (5), 413 (7), 385 (54), 383 (14), 363 (11), 313 (19), 293 (11), 295 (13), 273 (11), 243 (100), 223 (11), 213 (29), 205 (9), 123 (14) (Espectro 35)

Cuadro 16. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la anoglaucina (101).



Anoglaucina (101)

p.f. =	58-59°C
$[\alpha]^{20} =$	+ 31 (c 1.0 mg/mL)
$\lambda_{\max} =$	211 nm (log $\epsilon = 4.05$) (Espectro 48)
DC =	238 nm ($\Delta\epsilon = -2.14 \times 10^3$) (Espectro 49)
P.M.	638 uma EM-FAB ⁺ (glicerol) m/z 639 [M+H] ⁺ (Espectro 50)
F.M. =	C ₃₇ H ₆₆ O ₈ Calculada por EM de alta resolución, modalidad FAB ⁺ (NBA) m/z 639.4896 (teórico 639.4895) para [M+H] ⁺ .
IR =	ν_{\max} (film)) 3100-3600, 3023, 2931, 2853, 1750, 1627, 1430, 1216, 1029, 930 cm ⁻¹ (Espectro 47)
RMN ¹ H y ¹³ C.	Cuadros 17 y 18 (Espectros 52-56)
EM-IE de 101a.	m/z (int. rel.): 725 (11), 689, (38), 643 (6), 635 (7), 613 (11), 593 (32), 543 (100), 523 (17), 503 (22), 453 (45), 433 (8), 413 (9), 385 (43), 383 (10), 363 (9), 313 (7), 293 (5), 295 (5), 273 (4), 243 (25), 223 (3), 213 (11), 205 (3), 123 (3) .. (Espectro 51)

(ruptura entre C-10/11) son consistentes con la ubicación del tercer hidroxilo en C-10. Por último, el pico de m/z 213, es congruente con la posición del cuarto hidroxilo en C-4.

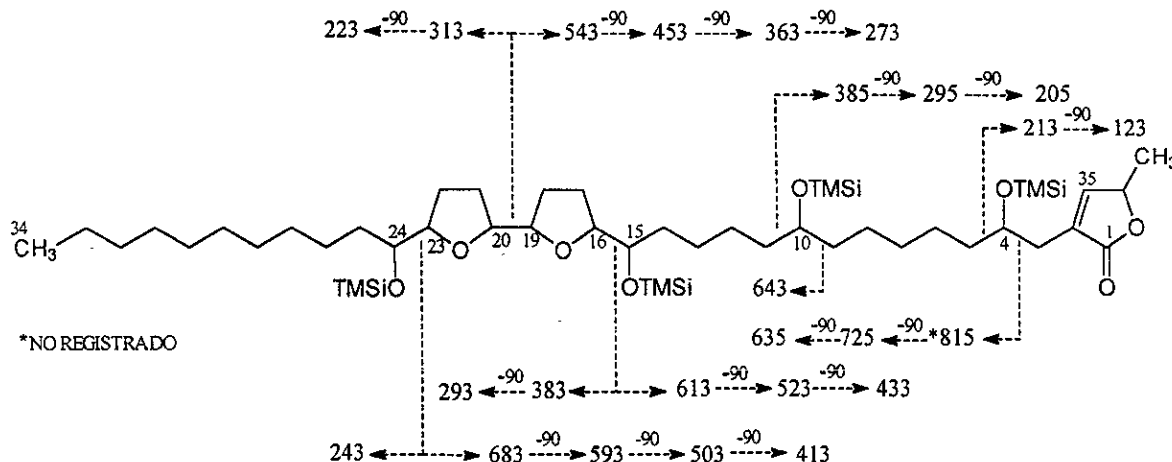


Figura 34. Patrón de fragmentación observado en los espectros de masas generados por IE de los derivados sililados de la purpuracena (**100a**) y la anoglaucina (**101a**).

Una evidencia adicional de la presencia del grupo hidroxilo en la posición C-4 de la cadena hidrocarbonada se obtuvo mediante el análisis de las correspondientes señales de la porción metil- γ -lactona- α,β -insaturada y de los desplazamientos químicos de la función carbinólica en C-4 (Cuadros 17 y 18) en los espectros de RMN de las dos acetogeninas (Espectros 36, 38, 52 y 54). A diferencia de los compuestos **98** y **99**, las absorciones correspondientes a los hidrógenos vinílicos (H-35) y geminal a la función lactona (H-36) se encuentran desplazados paramagnéticamente; en el caso de H-35 ($\Delta\delta$ 0.2) la señal se desplaza hasta δ_H 7.2 y H-36 ($\Delta\delta$ 0.07) hasta δ_H 5.06. La señal correspondiente a H-3, que se observa en los compuestos **98** y **99** como un tt ($J = 7.5, 2.0$) en δ_H 2.26, aparece

como la parte AB de un sistema ABXYZ en los espectros de **100** y **101**. La parte A se observa como dddd ($J = 15.5, 8.5, 1.5, 1.5$) en δ_H 2.40 y la parte B como dddd ($J = 15.5, 3.5, 1.5, 1.5$) en δ_H 2.5. Por otra parte, la señal del carbinol en C-4 se observa en δ_H 3.85 y δ_C 69.9. Por último, en los espectros de RMN ^{13}C , las señales correspondientes a la metil- γ -lactona- α,β -insaturada aparecen en δ_C 174 (C-1), 151.8 (C-35), 131.2 (C-2), 78 (C-36), y 19 (C-37).

La comparación de los desplazamientos químicos de las señales de los metinos unidos a oxígeno del compuesto **101** (Cuadros 17 y 18) con aquellos de modelos adecuados (ver Cuadro 11), permite establecer que la estereoquímica relativa de la unidad bis-THF con hidroxilos en los carbonos vecinos es *treo/trans/treo/trans/eritro*, al igual que en la purpurediolina (**98**) y la purpurenina (**99**). En consecuencia las señales para la unidad de bis-THF adyacentes con una función carbinol en cada uno de sus extremos y la correspondiente al carbinol en C-10 se asignaron como se indica en los Cuadros 17 y 18.

Sin embargo, en el compuesto **100** los desplazamientos químicos de los carbonos asignables a C-16, C-19, C-20, C-23 y C-24, presentan diferencias significativas con relación a los del compuesto **101** (Figura 35). La comparación con modelos descritos en la literatura (ver Cuadro 11), y en particular con la roliniastatina 1 (**30**) (Pettit *et al.*, 1987) indicó que estas diferencias se deben a un cambio en la estereoquímica relativa de los anillos de THF (cierre de los anillos). De tal manera, que la estereoquímica relativa de los anillos entre C-16/C-19 y C-20/C-23 es *cis* en el compuesto **100** en lugar de *trans* como en el caso de los compuestos **98**, **99** y **101**.

Cuadro 17. RMN ^1H de la purpuracena (100), el compuesto 101 y los datos previamente descritos para la anoglaucina (Etcheverry *et al.*, 1995).

Posición	Purpuracena (100) [#]	Compuesto 101 [#]	Anoglaucina*
3a	2.53 dddd (15.5, 3.5, 1.5, 1.5)	2.51 dddd (15.5, 3.5, 1.5, 1.5)	2.50 m
3b	2.40 dddd (15.5, 8.5, 1.5, 1.5)	2.40 dddd (15.5, 8.5, 1.5, 1.5)	2.38 m
4	3.85 m	3.84 m	3.86 m
5	1.49 m	1.48 m	1.46 m
6-8	1.20-1.65 m	1.20-1.63 m	1.15-1.75
9, 11	1.40 m	1.41 m	1.42 m
10	3.59 m	3.58 m	3.59 m
12-13	1.20-1.65 m	1.20-1.63 m	1.15-1.75
14	1.46 m	1.40 m	1.42 m
15	3.42 m	3.40 m	3.39 m
16	3.85 m	3.85 m	3.80 m
17	1.82 m, 1.94 m	1.62 m, 1.97 m	1.85 m
18	1.78 m, 1.93 m	1.62 m, 1.97 m	1.77 m
19	3.90 m	3.93 m	3.90 m
20	3.86 m	3.85 m	3.90 m
21	1.83 m, 1.94 m	1.60 m, 1.97m	1.77 m
22	1.76 m, 1.98 m	1.80 m, 1.90m	1.85 m
23	3.92 m	3.94 m	3.80 m
24	3.87 m	3.86 m	3.85 m
25	1.41 m	1.41 m	1.42 m
26-33	1.20-1.65 m	1.20-1.63 m	1.15-1.75
34	0.88 t (7.0)	0.88 t (7.0)	0.88 t (7)
35	7.18 ddd (1.5, 1.5, 1.5)	7.20 ddd (1.5, 1.5, 1.5)	7.17 d (1.4)
36	5.06 qq (7.0, 1.5)	5.06 qq (7.0, 1.5)	5.05 dq (7, 1.4)
37	1.43 d (7.0)	1.43 d (7.0)	1.44 d (7)

[#]CDCl₃, 500 MHz. (J in Hz). *CDCl₃, 200 MHz. (J in Hz)

Cuadro 18. RMN ^{13}C de la purpuracena (**100**), el compuesto **101** y los datos previamente descritos para la anoglaucina (Etcheverry *et al.*, 1995).

Posición	Purpuracena (100) [#]	Anoglaucina (101) [#]	Anoglaucina*
1	174.6	174.5	174.5
2	131.2	131.2	131.0
3	33.4	33.3	33.3
4	69.9	69.9	69.5
5	37.3	37.3	37.3
6-8	25.5-29.7	25.3-29.6	24.2-29.4
9	37.3	37.2	37.0
10	71.7	71.7	71.6
11	37.3	37.2	37.0
12-13	25.5-29.7	25.3-29.6	24.2-29.4
14	34.2	33.3	32.7 ⁺
15	73.9	74.0	74.0
16	82.9	83.2	83.1
17	28.7	28.9	28.1-29.2
18	27.9	28.9	28.1-29.2
19	81.1	82.2	82.4
20	80.9	82.4	82.1
21	28.4	28.3	28.1-29.2
22	23.7	24.5	28.1-29.2
23	83.1	82.8	82.6
24	71.9	71.4	71.3
25	32.8	32.4	32.7
26-31	25.5-29.7	25.3-29.6	24.2-29.4
32	31.9	31.8	31.7 ⁺
33	22.7	22.6	22.5
34	14.1	14.0	13.9
35	151.8	151.8	151.8
36	78.0	77.9	77.8
37	19.1	19.0	18.9

[#]CDCl₃, 125 MHz. *CDCl₃, 50 MHz. ⁺Señales intercambiables.

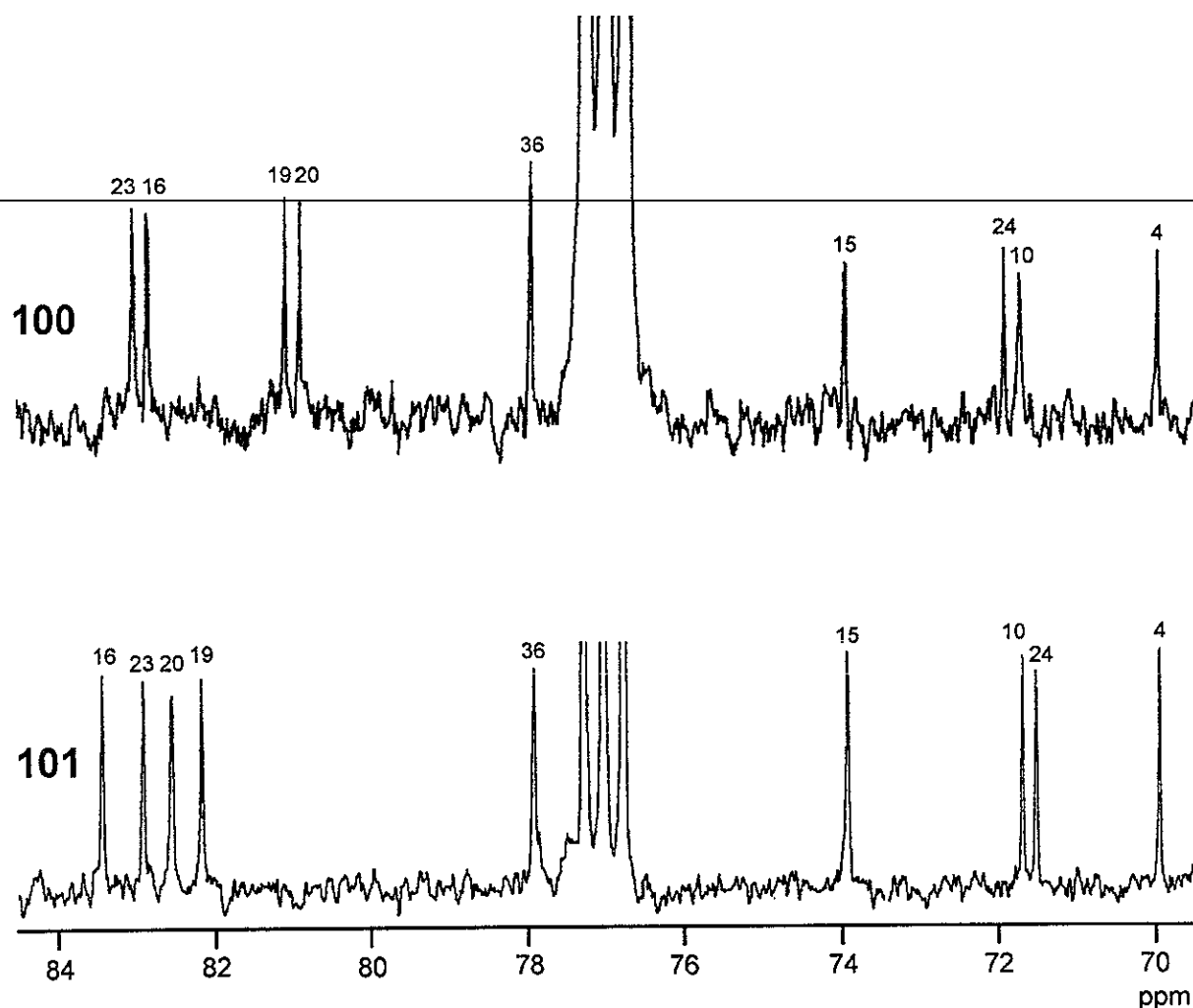


Figura 35. Zona comprendida en el intervalo de 70-82 ppm de los espectros de RMN ^{13}C de la purpuracena (**100**) y la anoglaucina (**101**).

El desplazamiento diamagnético de los carbonos C-16, C-19, y C-20, en el compuesto **100**, se debe a la compresión estérica que sufren los anillos de THF por el cierre *cis*. De manera adicional, en el espectro de RMN ^1H se observa que los hidrógenos Ha y Hb de los metilenos en los anillos de THF, presentan diferencias de desplazamiento químico, así, en los isómeros *cis*, los protones aparecen en δ 1.82 y

1.94, por otra parte, en los de tipo *trans* estos aparecen en δ 1.65 y 1.98 (Gu *et al.*, 1994). Por lo tanto, la estereoquímica relativa de la unidad bis-THF α,α' -dihidroxilada se determinó como *treolcisltreolcisl*eritro. Los desplazamientos químicos de la unidad de bis-THF adyacentes y los de los carbinoles en C-15, C-24 y C-10 para la purpuracénina (**101**) se asignaron como se indica en los Cuadros 17 y 18.

Con base en la discusión presentada, se propusieron las estructuras primarias de ambas acetogeninas. En el caso específico del compuesto **101**, se comprueba que la estructura plana coincide con la previamente descrita para la anoglaucina (Etcheverry *et al.*, 1995).

La estereoquímica absoluta de los carbinoles asociados a la unidad estructural bis-THF adyacentes y de C-4, se estableció por la metodología de los ésteres de Mosher (Rieser *et al.*, 1994). Así, de nueva cuenta, el análisis de los valores de $\Delta\delta_H$ (S-R) de los per-ésteres (S) y (R)-MTPA de la purpuracénina (**100**) y de la anoglaucina (**101**) (Cuadro 19) permitió determinar la estereoquímica absoluta para los centros estereogénicos C-15 y C-24 como R y S, respectivamente. En consecuencia, la estereoquímica absoluta para C-16, C-19, C-20, y C-23 en la purpuracénina (**100**), se dedujo como R, R, R y R, respectivamente, y para la anoglaucina (**101**) como R, S, S y R, respectivamente. La diferencia positiva para H-5 y los valores negativos [$\Delta\delta_H$ (S-R)] para H-3a,b, H-35, H-36 y H-37 indican una configuración absoluta R para el hidroxilo en C-4, en ambos compuestos.

Cuadro 19. Desplazamientos químicos (RMN ^1H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la purpuracena (**100**) y la anoglaucina (**101**).

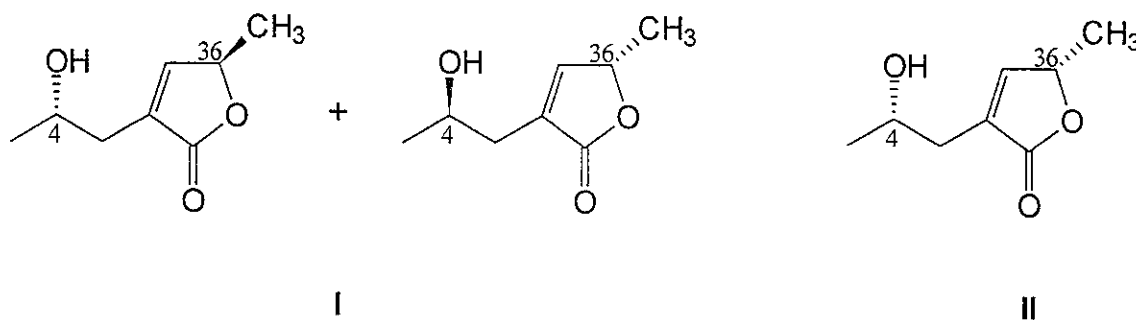
Protones	Purpuracena (100)				Anoglaucina (101)			
	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	Config. Absoluta	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	Config. Absoluta
14	1.67	1.50	+0.17	15R	1.60	1.49	+0.11	15R
15	5.06	5.09	-		5.03	5.02	-	
16	4.02	3.99	+0.03		4.03	3.99	+0.04	
17a	1.86	1.89	-0.03		1.90	2.00	-0.10	
17b	1.71	1.78	-0.07		1.47	1.58	-0.11	
18a	1.70	1.73	-0.03		1.84	1.88	-0.04	
18b	1.67	1.76	-0.09		1.67	1.69	-0.02	
19	3.65	3.67	-0.02		3.80	3.83	-0.03	
20	3.69	3.67	+0.02		3.80	3.65	+0.15	
21a	1.76	1.73	+0.03		1.86	1.84	+0.02	
21b	1.78	1.73	+0.05		1.67	1.62	+0.05	
22a	1.88	1.78	+0.10		1.84	1.79	+0.05	
22b	1.79	1.67	+0.12		1.72	1.62	+0.10	
23	3.99	3.90	+0.09	3.99	3.94	+0.05	24S	
24	5.22	5.22	-	5.27	5.27	-		
25	1.67	1.69	-0.02	1.53	1.58	-0.05		
5	1.63	1.60	+0.03	4R	1.65	1.59	+0.06	4R
4	5.35	5.39	-		5.33	5.37	-	
3a	2.55	2.59	-0.04		2.54	2.59	-0.05	
3b	2.61	2.67	-0.06		2.61	2.67	-0.06	
35	6.78	7.00	-0.12		6.75	6.98	-0.13	
36	4.87	4.90	-0.03		4.87	4.91	-0.04	
37	1.24	1.27	-0.03		1.27	1.29	-0.02	

CDCl_3 , 500 MHz.

La determinación de la configuración absoluta para C-36 se realizó de acuerdo con el método propuesto por Hoye y colaboradores (1994). Este método es de utilidad para determinar la estereoquímica absoluta del metino base de la lactona en las acetogeninas hidroxiladas en C-4, y se basa en la metodología de los ésteres de Mosher. Hoye y colaboradores sintetizaron dos series de butenólidas con una configuración relativa específica para C-4 y C-36. Una serie está constituida por la mezcla racémica $4S/36R + 4R/36S$ (configuración *unlike*) y, la otra por el diastereoisómero $4S/36S$ (configuración *like*). La magnitud de las diferencias de los desplazamientos químicos $\Delta\delta_{S-R}$ observados en los espectros de RMN 1H para los hidrógenos de la butenólida en los ésteres de Mosher de ambas series, son muy diferentes, principalmente en el caso de los hidrógenos vinílico y base de la lactona (Cuadro 20).

En el caso de que la estereoquímica relativa sea *unlike*, la magnitud de $\Delta\delta_{S-R}$ para H-35 debe de ser menor o igual a 0.23 ppm y en el caso de H-36 debe de ser menor o igual a 0.07 ppm. Sin embargo, si la estereoquímica relativa es *like*, la magnitud $\Delta\delta_{S-R}$ será mayor o igual a 0.32 y 0.17 ppm para H-35 y H-36, respectivamente. Por lo tanto, este método permite predecir si la relación entre C-4/C-36 corresponde a una configuración relativa *unlike* o *like* en las acetogeninas hidroxiladas en C-4. Entonces, si se conoce la estereoquímica absoluta en C-4, puede establecerse la configuración absoluta en C-36.

Cuadro 20. Desplazamientos en RMN ^1H de los ésteres de Mosher (*S* y *R*) de los modelos sintéticos de las butenólidas I y II. La butenólida I esta representada por la mezcla racémica (*4S/36R* + *4R/36S*) y la butenólida II corresponde al isómero *4S/36S*.



Butenólida	Relación C-4/C-36	$\Delta\delta_{S-R}$				
		H-5	H-3a,b	H-35	H-36	H-37
I	<i>S/R</i> + <i>R/S</i>	0.05	0.04, 0.06	0.23	0.07	0.04
II	<i>S/S</i>	0.07	0.04, 0.09	0.32	0.17	0.06

CDCl_3 , 500 MHz.

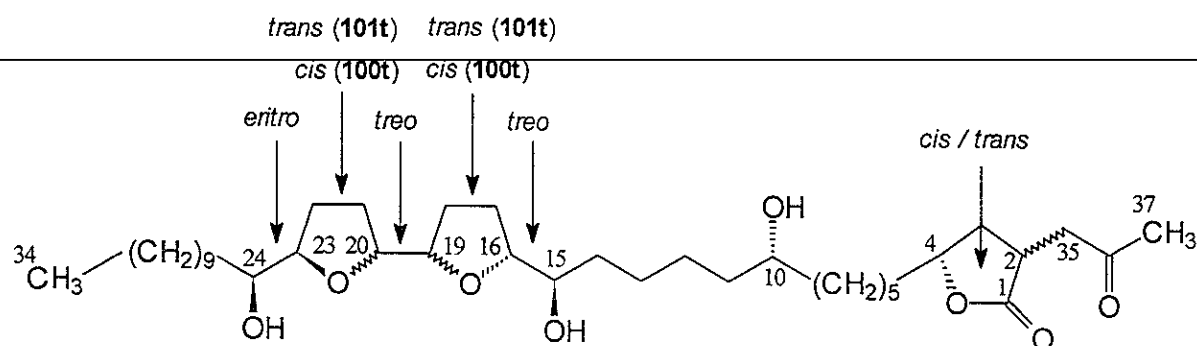
La magnitud de la diferencia ($\Delta\delta_{S-R}$) observada para H-35 y H-36 en los ésteres de Mosher de la purpuracena (**100**) es de 0.12 y 0.03 ppm, respectivamente; para la anoglaucina (**101**) las diferencias son 0.13 y 0.04 ppm, respectivamente (Cuadro 19). Estos resultados sugieren una configuración relativa *unlike* para C-4/C-36. Por lo tanto, si C-4 presenta una configuración absoluta *R*, C-36 deberá poseer la configuración absoluta *S*, en ambos compuestos. Por otra parte, el efecto Cotton negativo a 238 nm en el espectro de DC (Espectros 33 y 49) para la purpuracena (**100**) y la anoglaucina (**101**), proporciona una evidencia adicional para la configuración *S* en C-36 (Zhao *et al.*, 1995).

En el caso de C-10, la estereoquímica absoluta no pudo determinarse por el análisis de los espectros de los ésteres de Mosher preparados a partir de los productos naturales, debido a que los desplazamientos químicos de H-9 y H-11 son virtualmente indistinguibles en RMN ^1H . Con la finalidad de resolver la configuración en el centro estereogénico C-10, se requirió transformar las acetogeninas **100** y **101** en las correspondientes isoacetogeninas **100t** y **101t** (He *et al.*, 1996) para inducir una mayor disimetría en uno de los sustituyentes de la función carbinólica en C-10. Posteriormente, la preparación de los correspondientes tri-ésteres de Mosher permitió y evaluar de manera contundente el efecto diamagnético inducido por el anillo aromático de los ésteres de Mosher de la posición C-10.

Para preparar las isoacetogeninas, cada uno de los compuestos se trató con una base débil (10 % de dietilamina en MeOH) como se indicó en la sección experimental. Este proceso permitió obtener las isoacetogeninas **100t** y **101t** como la mezcla isomérica C-2/C-4 *cis* y *trans*. En el Cuadro 21 se presentan las resonancias más importantes que permitieron confirmar la estructura química de los derivados **100t** y **101t**.

El análisis de los espectros de RMN ^1H de los tri-ésteres de Mosher de los derivados translactonizados **100t** y **101t** indicaron una diferencia positiva $\Delta\delta_{\text{H}}$ (*S-R*) para los hidrógenos en la posición C-4 de las mezcla isoméricas C-2/C-4 *cis* y *trans* (0.02 ppm, en ambos casos). En consecuencia, la configuración absoluta para el hidroxilo en C-10, se determinó como *R*, tanto para la purpuracénina (**90**) como para la anoglaucina (**91**) (Cuadro 22).

Cuadro 21. Resonancias parciales de RMN ^1H de las mezclas epiméricas de la isopurpuracena (**100t**) y la isoanoglaucina (**101t**).



Posición	100t	101t
2	3.02-3.08 m	3.02-3.08 m
4 <i>trans</i>	4.55 m	4.55 m
4 <i>cis</i>	4.40 m	4.40 m
10	3.60 m	3.59 m
15	3.42 m	3.42 m
16, 20, 24	3.86 m	3.86 m
19, 23	3.91 m	3.93 m
35a	2.60-2.70 m	2.58-2.70 m
35b	3.02-3.08 m	3.02-3.08 m
34	0.88 t (7.0)	0.88 t (7.0)
37	2.20 s	2.20 s

CDCl_3 , 500 MHz. (*J* in Hz).

En síntesis, la estereoquímica absoluta para la purpuracena (**100**) y la anoglaucina (**101**) se determinó como *4R*, *10R*, *15R*, *16R*, *19R*, *20R*, *23R*, *24S*, *36S* y *4R*, *10R*, *15R*, *16R*, *19S*, *20S*, *23R*, *24S*, *36S*, respectivamente (Figura 30).

Cuadro 22. Desplazamientos químicos (RMN ^1H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de los derivados translactonizados **100t** y **101t**.

Protones	Isopurpuracena (100t)				Isoanoglaucina (101t)			
	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	Conf. Absoluta	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	Conf. Absoluta
4	4.54	4.52	+0.02	10R	4.55	4.53	+0.02	10R
(cis y trans)	4.37	4.35	+0.02		4.39	4.37	+0.02	

CDCl_3 , 500 MHz.

5.2 OBTENCION DE LOS COMPUESTOS DE *Rollinia mucosa*.

5.2.1 Aislamiento y purificación de los compuestos de *Rollinia mucosa*.

Los procedimientos de extracción y fraccionamiento primario de las semillas de *R. mucosa* se realizaron de igual manera que para las semillas de *A. purpurea*. La extracción de las semillas (663 g) secas y pulverizadas generaron 241 g de extracto crudo, el cual demostró una toxicidad significativa en el ensayo de *A. salina* (TAS $\text{CL}_{50} = 0.41 \mu\text{g/mL}$) y una actividad citotóxica notable y selectiva en contra de dos líneas celulares (A-498 y PC-3) (Cuadro 23). El extracto activo se fraccionó mediante una partición entre hexano y metanol acuoso (10%). La fracción metanólica activa (26 g, TAS $\text{CL}_{50} = 6 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta utilizando como eluyente mezclas de disolventes con incrementos de polaridad (hexano/cloroformo/metanol). Este proceso permitió la obtención de 230 fracciones secundarias, las cuales se reunieron de acuerdo con su homogeneidad cromatográfica en 14 conjuntos de fracciones (F_1 - F_{14}).

Cuadro 23. Actividad citotóxica del extracto total obtenido de las semillas de *R. mucosa*.

	Líneas celulares derivadas de tumores humanos. CE ₅₀ (µg/mL).					
	A-549 ^a	MCF-7 ^b	HT-29 ^c	A-498 ^d	PC-3 ^e	PACA-2 ^f
Extracto	> 10	> 10	1.69	< 10 ⁻³	< 10 ⁻³	6.95
Adriamicina	4.47 x 10 ⁻³	8.97 x 10 ⁻²	1.62 x 10 ⁻²	1.10 x 10 ⁻³	2.13 x 10 ⁻²	2.88 x 10 ⁻³

^aCarcinoma de pulmón.

^bCarcinoma de mama.

^cAdenocarcinoma de colon.

^dCarcinoma de riñón.

^eAdenocarcinoma de próstata.

^fCarcinoma de páncreas.

La purificación por CLAR (Figura 36), de la fracción secundaria activa F₆ (500 mg, TAS CL₅₀ = 7 × 10⁻³ µg/mL) condujo al aislamiento de una acetogenina con un esqueleto novedoso (Figura 38) que se designó con el nombre trivial de jimenezina (**103**).

De manera adicional, el análisis por CLAR de la fracción F₄ (Figura 37) conllevó a la separación de una mezcla constituida por ocho amidas de la triptamina (**104**). Cromatografías sucesivas de la mezcla de amidas mediante la aplicación de la CLAR permitió la separación en forma pura de la amida mayoritaria la cual se caracterizó como la N-lignoceroiltriptamina (**105**). Las siete amidas restantes se caracterizaron como N-palmitoiltriptamina (**108**), N-estearoiltriptamina (**109**), N-araquinoiltriptamina (**110**), N-behenoiltriptamina (**111**), N-tricosanoiltriptamina (**112**), N-hienoiltriptamina (**113**) y N-cerotoiltriptamina (**114**) (Figura 38), con base en el análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de la mezcla de los ésteres metílicos generados a partir de los ácidos grasos

obtenidos de la hidrólisis ácida de la mezcla de amidas. Las ocho amidas caracterizadas, representan también productos naturales novedosos.

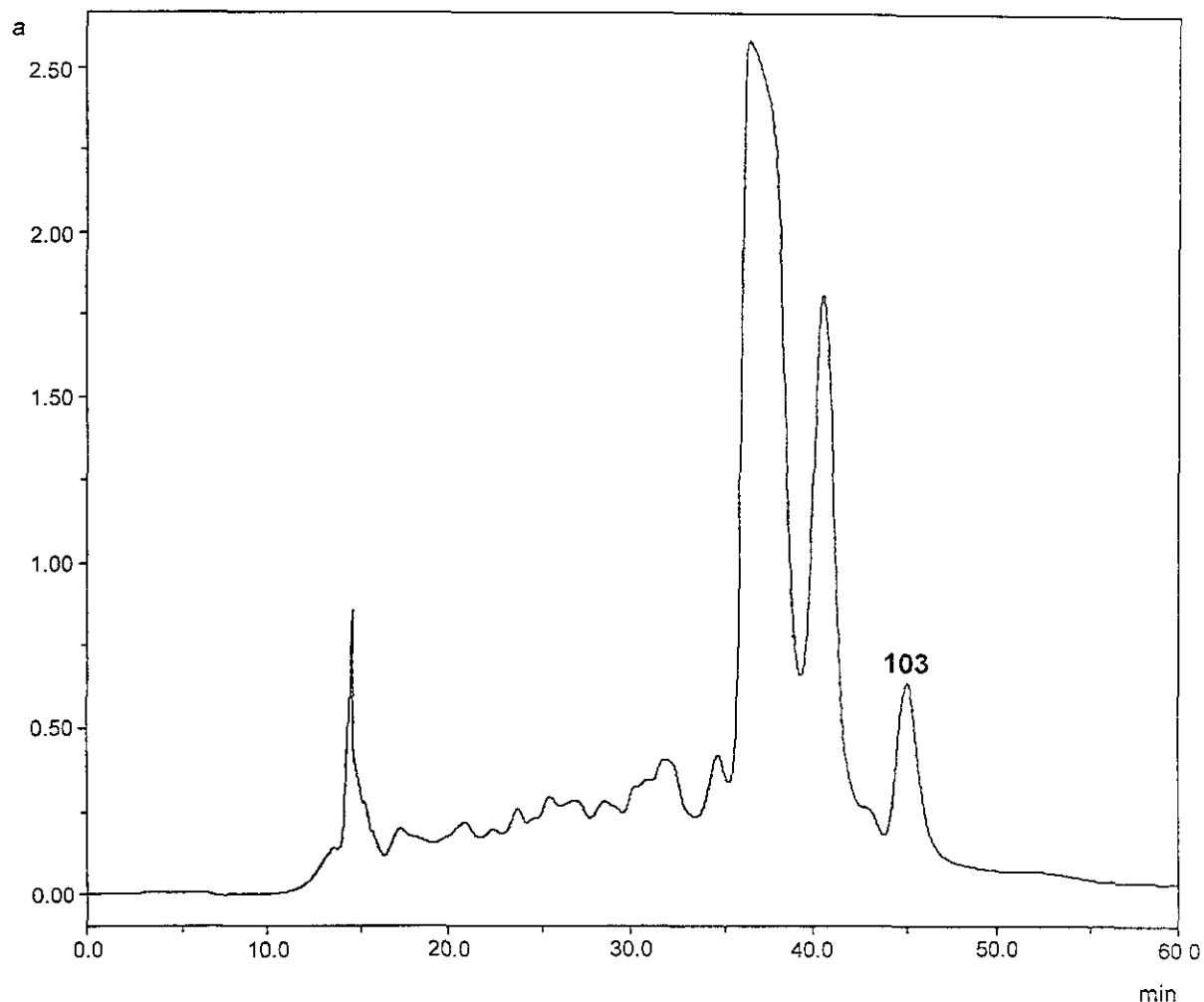


Figura 36. Cromatograma de líquidos de la fracción F_6 de las semillas de *R. mucosa*.

Condiciones de análisis: Detector, UV (Waters 996 UV con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 212 \text{ nm}$; Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, $300 \times 19 \text{ mm}$, 125 \AA , $10 \mu\text{M}$); Fase móvil, hexano-*i*PrOH-MeOH (90:5:5); Flujo 7.5 mL/min . Asignación de los picos: **103**, jimenezina ($t_R = 45.0 \text{ min}$).

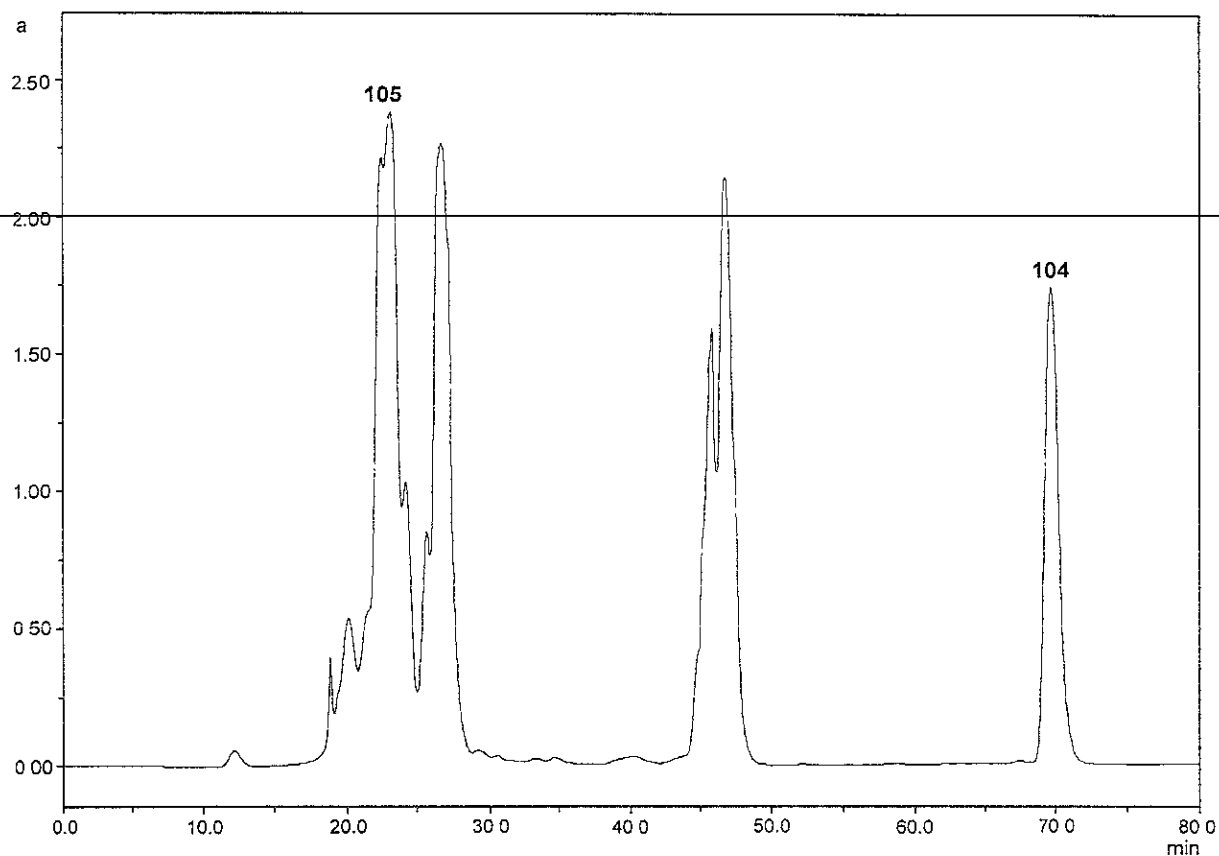
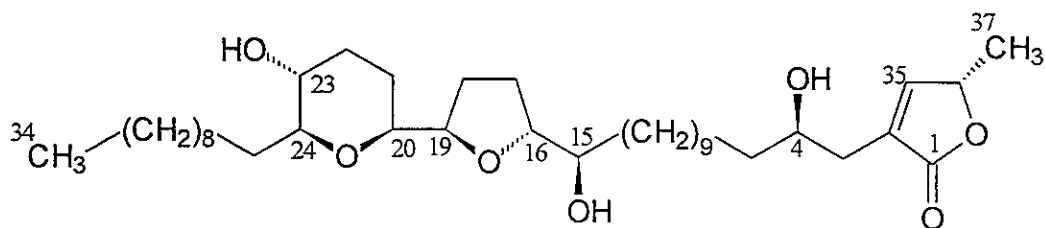
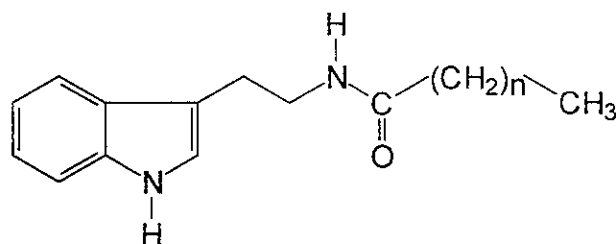


Figura 37. Cromatograma de líquidos de la fracción F_4 de las semillas de *R. mucosa*.

Condiciones de análisis: Detector, UV (Waters 996 UV con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 209$ nm; Columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 x 19 mm, 125Å, 10 μ M); Fase móvil, hexano-*i*PrOH-MeOH (90:5:5); Flujo 7.3 mL/min. Asignación de los picos: **104**, mezcla de N-aciltriptaminas **105**, N-lignoceroiltriptamina (purificado mediante el proceso de corte del núcleo y reciclaje del producto mayoritario).

Jimenezina (**103**).n = 14 N-Palmitoiltryptamina (**108**)n = 16 N-Estearoiltryptamina (**109**)n = 18 N-Araquinoiltryptamina (**110**)n = 20 N-Behenoiltryptamina (**111**)n = 21 N-Tricosanoiltryptamina (**112**)n = 22 N-Lignoceroiltryptamina (**105**)n = 23 N-Hienoiltryptamina (**113**)n = 24 N-Cerotoiltryptamina (**114**)Figura 38. Compuestos caracterizados de las semillas de *R. mucosa*.

5.2.2 Elucidación estructural de la jimenezina (**103**).

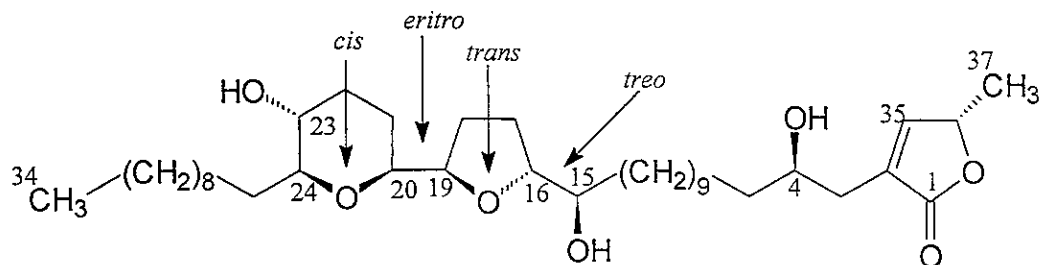
La jimenezina (**103**) se obtuvo como un aceite amarillo (16 mg). Su fórmula molecular se estableció por EMAR-FAB⁺ como C₃₇H₆₆O₇ y permite cinco grados de insaturación. El espectro en el IR (Espectro 64) indica la presencia de grupos hidroxilos (3418 cm⁻¹) y de una γ -lactona α,β -insaturada (1751 cm⁻¹). Las pérdidas consecutivas de tres moléculas de H₂O a partir del ion cuasimolecular detectado en el espectro de masas modalidad FAB⁺ (Espectro 67) y la formación del derivado tri-

TMSi **103a** confirman la existencia de tres grupos hidroxilos en el compuesto **103** (Cuadro 24).

Los espectros de RMN unidimensionales (Espectros 69 y 71) generados por el producto **103** presentan una gran similitud con los de la mucocina (**41**) y la muconina (**42**), acetogeninas previamente aisladas de *R. mucosa*. Estos compuestos tienen la particularidad de presentar en su estructura anillos de THP y THF, además de la metil- γ -lactona α,β -insaturada y un hidroxilo en la posición C-4 (Shi *et al.*, 1995b; Shi *et al.*, 1996a). En el caso de la mucocina (**41**) los anillos THF y THP no son adyacentes y el anillo de THP, ubicado en la parte terminal de la cadena hidrocarbonada, se encuentra hidroxilado. En contraste, en la muconina (**42**) los anillos heterocíclicos THF y THP son adyacentes, y presentan una función carbinólica en cada uno de los extremos de la unidad estructural. Es importante hacer notar que en el compuesto **42** el anillo de THP no se encuentra hidroxilado y su ubicación en la cadena hidrocarbonada es del lado de la γ -lactona.

Al igual que la mucocina (**41**) y la muconina (**42**), el producto **103**, contiene la metil- γ -lactona α,β -insaturada y la función carbinólica secundaria en la posición C-4 de la cadena hidrocarbonada. Las señales que confirman la porción estructural antes mencionada se observan en: δ_{H} 7.18 (H-35), 5.06 (H-36), 3.85 (H-4), 2.53 (H-3a), 2.40 (H-3b) y 1.43 (H-37) en el espectro de RMN ^1H y en δ_{C} 174.6 (C-1), 151.7 (C-35), 131.2 (C-2), 78.0 (C-36), 70.0 (C-4), 33.3 (C-3) y 19.1 (C-37) en el espectro de RMN ^{13}C (Cuadro 25).

Cuadro 24. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la jimenezina (**103**).



Jimenezina (**103**)

$[\alpha]^{20} =$	+ 8.3 (c = 1.2 mg/mL)
$\lambda_{\max} =$	210 nm (log $\epsilon = 3.97$) (Espectro 65)
DC =	238 nm ($\Delta\epsilon = - 1.7 \times 10^3$) (Espectro 66)
P.M.	622 uma EM-FAB ⁺ (glicerol) m/z 623 [M+H] ⁺ (Espectro 67)
F.M. =	C ₃₇ H ₆₆ O ₇ Calculada por EM de alta resolución, modalidad FAB ⁺ (NBA) m/z 623.4877 (teórico 623.4887) para [M+H] ⁺ .
IR =	ν max (film) 3100-3650, 3023, 2928, 1750, 1641, 1423, 1215, 1028, 930 cm ⁻¹ (Espectro 64)
RMN ¹ H y ¹³ C.	Cuadro 25. (Espectros 69-74)
EM-IE de 103a .	m/z (int. rel.): 525 (6), 455 (100), 453 (3), 383 (18), 365 (8), 313 (12), 293 (14), 223 (4), 213 (10), 123 (10) Espectro 68)

Cuadro 25. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de la jimenezina (103).

Posición	δ_{H}	δ_{C}
1	-	174.6
2	-	131.2
3a	2.53 dddd (15.1, 3.2, 1.5, 1.5)	33.3
3b	2.40 dddd (15.1, 8.2, 1.5, 1.5)	
4	3.85 m	70.0
5	1.47 m	37.4
6-13	1.2-1.4 m	25-33
14	1.47 m	34.9
15	3.35 m	73.9
16	3.90 m	82.4
17	1.62 m, 1.93 m	28.0
18	1.60 m, 2.0 m	28.3
19	3.94 m	80.9
20	3.24 ddd (11.5, 2.3, 2.3)	79.0
21	1.64 m, 1.77 m	27.9
22	1.45 m, 2.13 m	32.9
23	3.28 ddd (10.8, 9.2, 4.6)	70.6
24	3.00 ddd (9.2, 9.0, 2.1)	82.3
25	1.42 m	25.5
26-31	1.2-1.4 m	25-33
32	1.2-1.4 m	31.9
33	1.2-1.4 m	22.7
34	0.88 t (6.8)	14.1
35	7.18 ddd (1.5, 1.5, 1.5)	151.7
36	5.06 qq (6.8, 1.5)	78.0
37	1.43 d (6.8)	19.1

CDCl_3 , ^1H [500 MHz. (J in Hz)], ^{13}C (125 MHz), δ en ppm. asignaciones confirmadas por RMN ^{13}C -DEPT, RMN ^1H - ^{13}C -HMQC y HMBC.

Además de la señal correspondiente a H-4/C-4, los espectros de RMN (Espectros 69 y 71) presentan seis resonancias adicionales para metinos oxigenados en el intervalo comprendido entre δ_H 3.0-4.0 y δ_C 70.0-83.0 (Figura 39). Por analogía con los desplazamientos químicos de la mucocina (**41**), tres de estas señales [δ_H 3.00 (H-24), 3.24 (H-20), 3.28 (H-23) y δ_C 82.3 (C-24), 79.0 (C-20) y 70.6 (23)] se asignan a un anillo de THP hidroxilado. En tanto que las tres restantes [δ_H 3.35 (H-15), 3.90 (H-16), 3.94 (H-19) y δ_C 73.9 (C-15) 82.4 (C-16) y 80.9 (C-19)] por comparación con la muconina (**42**), se asignan a un anillo de THF y a una función carbinólica vecinal a este heterociclo (Cuadro 26).

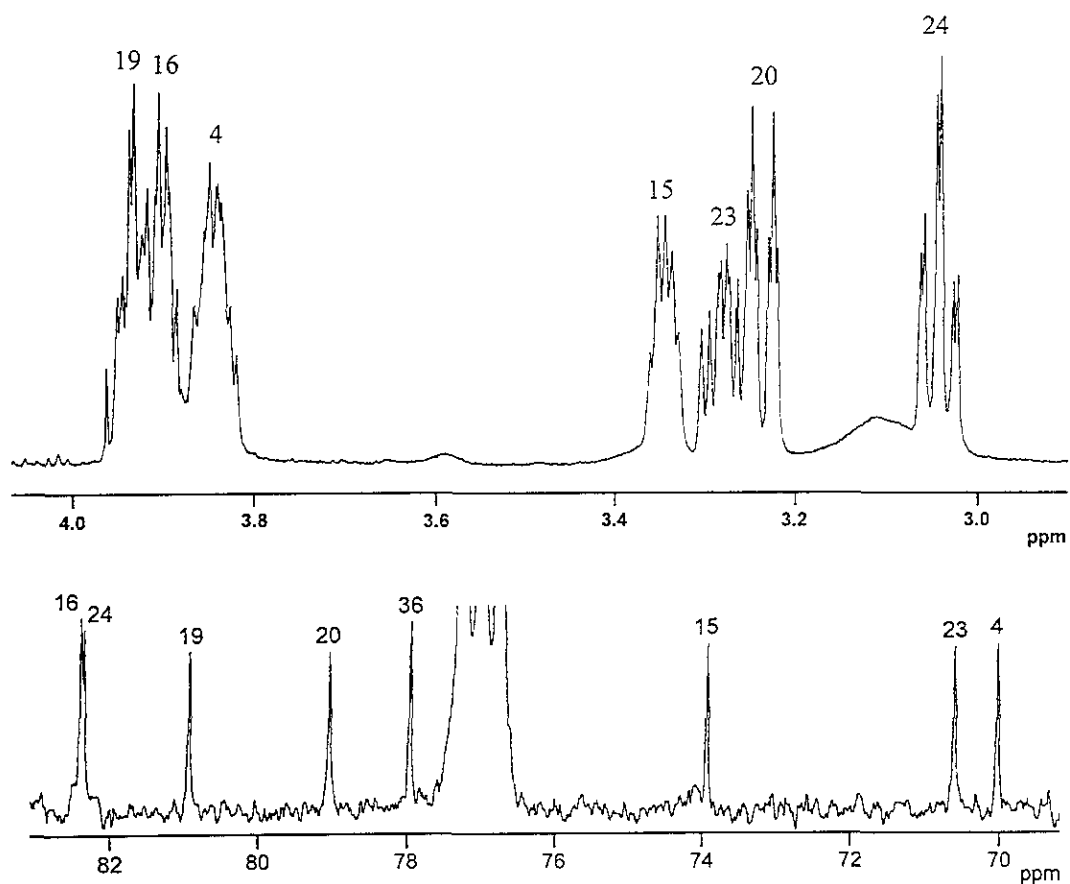
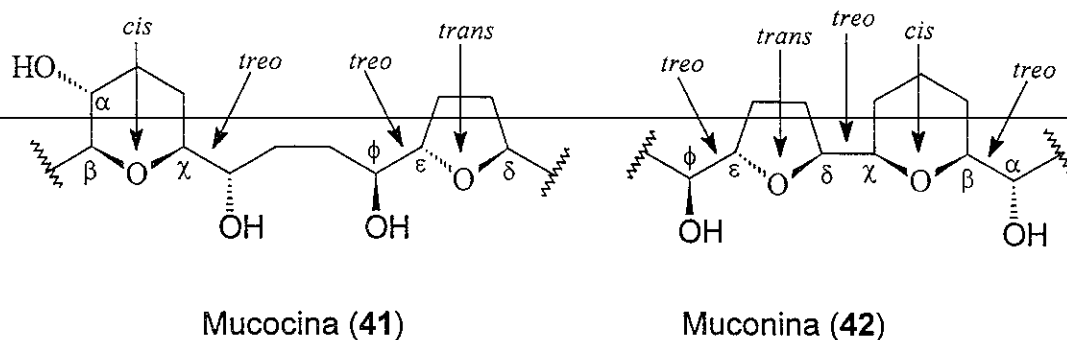


Figura 39. Vista parcial de los espectros de RMN ^1H (δ 3.0-4.0) y RMN ^{13}C (δ 70.0-83.0) de la jimenezina (**103**).

Cuadro 26. Desplazamientos químicos parciales en RMN de la mucocina (**41**) y la muconina (**42**) (Shi *et al.*, 1995b; Shi *et al.*, 1996a).



Tipo de acetogenina	$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$					
	α	β	χ	δ	ε	ϕ
Muconina (41)	3.28/70.5	3.05/82.0	3.43/74.2	3.88/79.3	3.80/91.9	3.43/73.8
Mucocina (42)	3.43/74.2	3.16/80.9	3.31/80.0	3.90/81.2	3.80/82.8	3.38/74.1

El análisis detallado de los cuadros de conectividad observados en el espectro RMN ^1H -COSY (Espectro 70) permite comprobar, por una parte, que los anillos de THP y THF se encuentran adyacentes (Figura 40), como en el caso de la muconina (**42**), y por la otra, que el anillo de THP se encuentra hidroxilado en la misma posición que la mucocina (**41**). Las correlaciones más importantes que permiten llegar a esta conclusión se resumen en la Figura 41. De manera adicional, el cuadro de conectividad observado entre H-15 y H-16 proporciona una evidencia adicional de la presencia de una función carbinólica secundaria vecinal al anillo de THF (Figura 40).

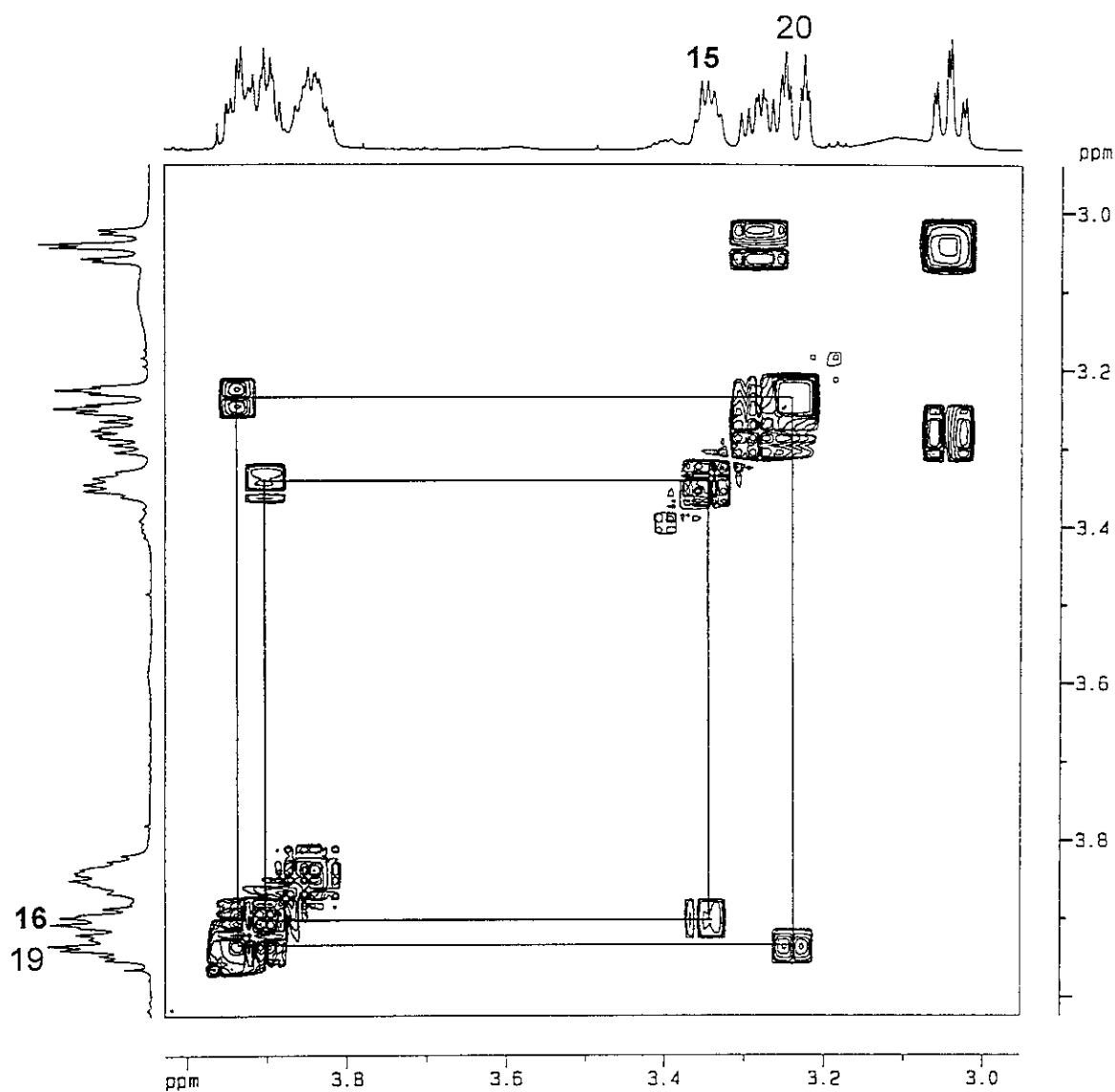


Figura 40. Espectro parcial de RMN $^1\text{H-COSY}$ (δ 3.0-4.0) de la jimenezina (103).

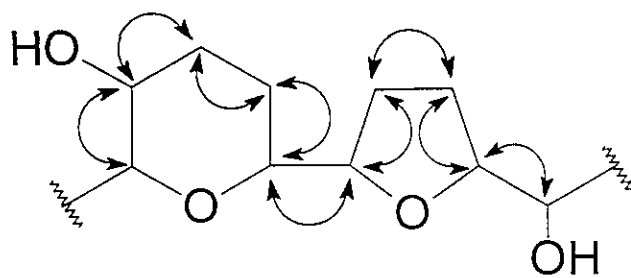


Figura 41. Correlaciones importantes observadas en el espectro de RMN $^1\text{H-COSY}$ de la jimenezina (103).

La ubicación de los anillos de THF-THP adyacentes a lo largo de la cadena hidrocarbonada se determinó por el análisis del espectro de masas del derivado siliado **103a** (Espectro 68). Así, el fragmento intenso de m/z 455 (ruptura en C-15/16) y los fragmentos de m/z 525 y 313 (rupturas entre C-19/20) permiten proponer que el anillo THF con un hidroxilo en el carbono vecino se encuentra entre C-15 y C-19, y que el anillo de THP hidroxilado se ubica entre C-20 y C-24. Esta información indica que la disposición de los anillos de THF y THP a lo largo de la cadena hidrocarbonada es inversa a la propuesta para la muconina (**42**), en consecuencia el esqueleto hidrocarbonado del compuesto **103** es novedoso. Por último, el fragmento observado en m/z 213 confirma la presencia del grupo hidroxilo en C-4 (Figura 42).

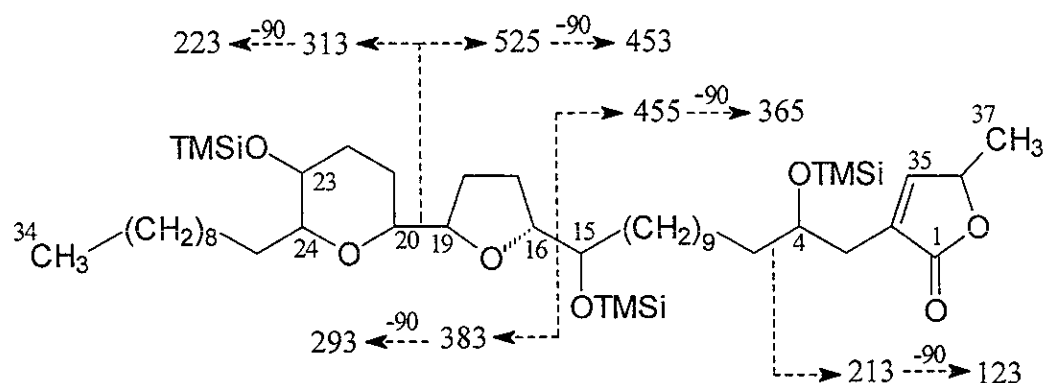


Figura 42. Patrón de fragmentación observado en el espectro de masas generado por IE del derivado siliado de la jimenezina (**103a**).

Una vez establecida la estructura plana del producto **103**, el siguiente paso en el proceso de la elucidación estructural fue el establecimiento de la estereoquímica relativa del anillo THF con una función carbinólica vecinal y del anillo de THP hidroxilado. Para establecer la configuración relativa entre C-15/16 se aplicó de

nueva cuenta la regla de Born (Born *et al.*, 1990). Así, los desplazamientos químicos para C-15 / H-15 (δ_C 73.9 / δ_H 3.35) y C-16 / H-16 (δ_C 82.4 / δ_H 3.90) son congruentes con una relación *trans* entre C-15 y C-16 (Cuadro 25). La estereoquímica relativa para el anillo de THF se determinó como *trans* por comparación de los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN con los de la muconina (**42**) (Shi *et al.*, 1996a). Por otro lado, las magnitudes de las diferencias de desplazamiento químico entre H-17a - H-17b ($\Delta\delta_H$ 0.31) y entre H-18a - H-18b ($\Delta\delta_H$ 0.40) proporciona una evidencia alternativa de la estereoquímica *trans* del anillo de THF. Como se indicó previamente, si la estereoquímica del anillo de THF hubiese sido *cis*, las diferencias de los desplazamientos químicos de los hidrógenos de los metilenos 17 y 18, hubiesen sido menores a 0.15 ppm (Gu *et al.*, 1994).

El cierre del anillo de THP se propone como *cis* con base en la correlación observada en el espectro RMN ^1H -NOESY entre H-20 (δ 3.24) y H-24 (δ 3.00). (Figura 43). Si la estereoquímica del cierre del anillo fuese *trans*, el cuadro de conectividad recién descrito no se observaría. Por último, la disposición ecuatorial de la *cadena lateral* en C-24 se determinó con base en el patrón de acoplamiento observado para H-24, luego de irradiar la señal en δ 1.42 (H-25). En los espectros de RMN ^1H , la señal para H-24 aparece como un ddd ($J = 9.2, 9.0, 2.1$ Hz), sin embargo, al irradiar la señal correspondiente a H-25 (δ 1.42), la señal de H-24 se simplifica a un doblete con una constante de acoplamiento de 9.2 Hz (Figura 44). El valor de la constante de acoplamiento observada es congruente con una relación *trans*-*di*axial entre H-23 y H-24, y en consecuencia con la orientación ecuatorial tanto de la *cadena hidrocarbonada* en C-24, como del hidroxilo en C-23.

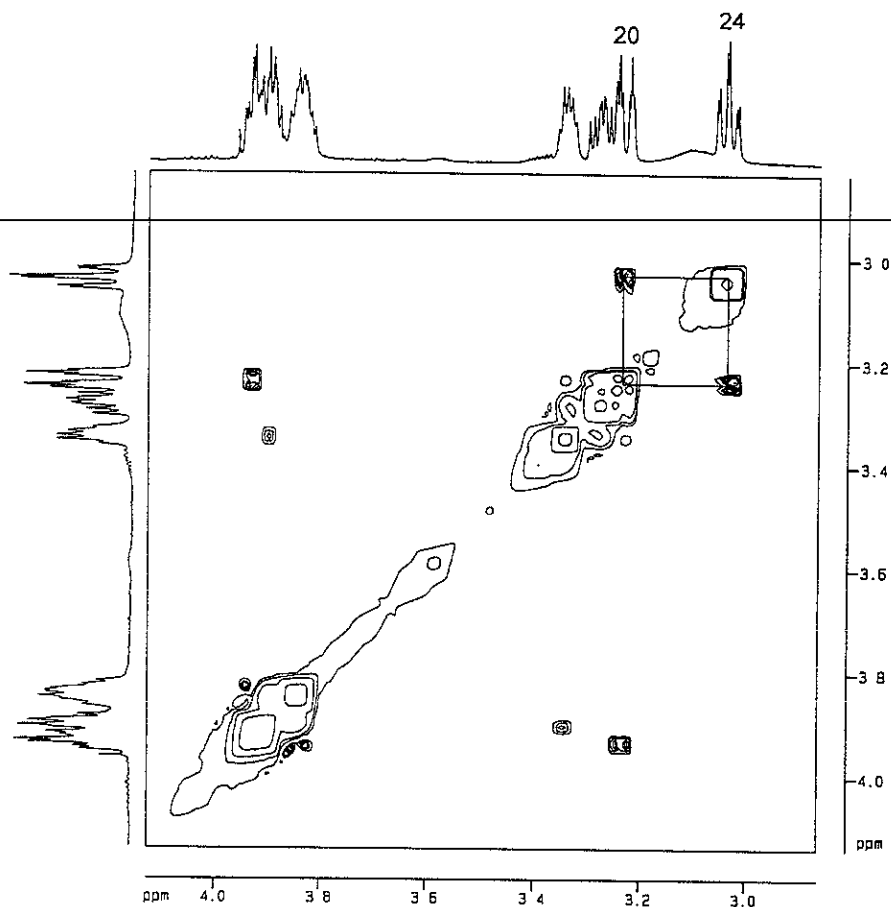


Figura 43. Espectro RMN ^1H -NOESY de la jimenezina (**103**).

Una vez determinada la estereoquímica relativa de los centros estereogénicos ubicados en la porción estructural correspondiente a los anillos bis-THF-THP adyacentes, el último paso en la elucidación estructural de la jimenezina (**103**) fue la determinación de la configuración absoluta de los diferentes centros quirales de la molécula. Así, la estereoquímica absoluta en los carbinos C-4, C-15 y C-23 se estableció mediante la aplicación de la metodología avanzada de Mosher (Rieser *et al.*, 1994). Por otro lado, la configuración absoluta en C-36 se estableció mediante el DC y se confirmó con el método de Hoye (Hoye *et al.*, 1994), al igual que en el caso de la purpuracénina (**98**) y la anoglaucina (**99**).

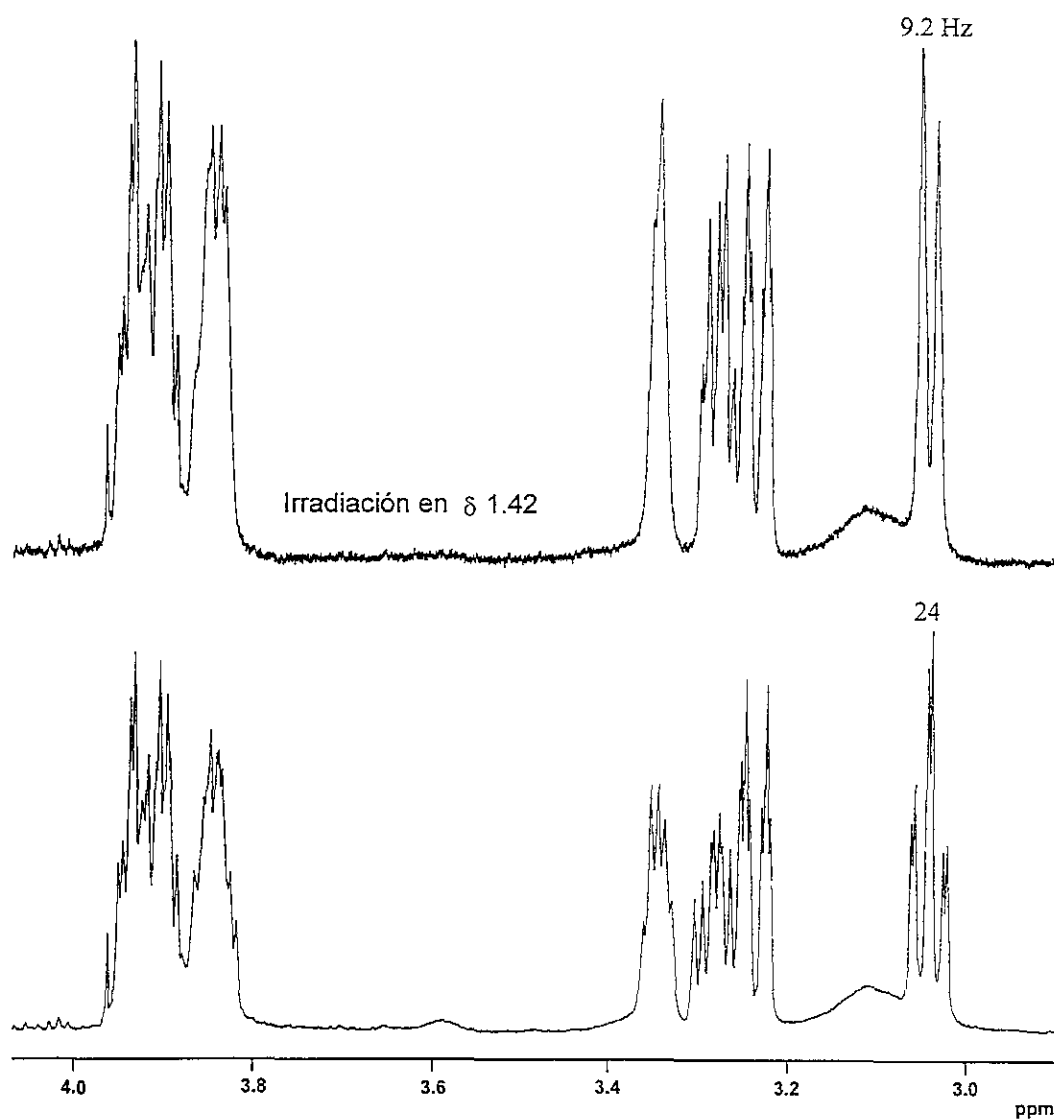


Figura 44. Experimento de doble resonancia de la jimenezina (**103**), irradiación en δ 1.42.

El análisis de las diferencias de desplazamiento químico ($\Delta\delta_{S-R}$) de los esteres de Mosher **103s** y **103r** (Cuadro 26) permite calcular un valor positivo para H-5 y valores negativos [$\Delta\delta_H (S-R)$] para H-3a,b, H-35, H-36, y H-37. Estos resultados son consistentes con una configuración absoluta *R* para el hidroxilo en C-4. Por otra parte, la diferencia positiva para H-14 y las diferencias negativas para los protones H-16, H-17 y H-18 del anillo de THF indican una configuración absoluta *R* en C-15.

Por último, las diferencias positivas para los protones H-20, H-21, y H-22 así como las diferencias negativas para H-24 y H-25, permitieron determinar que la estereoquímica en C-23 es *R* (Cuadro 27). Por lo tanto, la configuración absoluta para C-20 y C-24 se dedujo como *S* con base en la estereoquímica relativa asignada para el anillo THP. De igual manera, la estereoquímica en C-16 y C-19 se estableció como *R* considerando la estereoquímica relativa del anillo THF.

Cuadro 27. Resonancias parciales de RMN ^1H de los ésteres de Mosher de la jimenezina (**103**).

Protones	103s	103r	$\Delta\delta_{S-R}$
14	1.62	1.51	+ 0.11
15	5.14	5.20	<i>R</i> *
16	4.01	4.02	- 0.01
17a	1.81	1.91	- 0.10
17b	1.46	1.70	- 0.24
18a	1.90	1.91	- 0.01
18b	1.52	1.79	- 0.27
19	3.93	3.91	+ 0.02
20	3.28	3.21	+ 0.07
21a	1.81	1.61	+ 0.20
21b	1.54	1.53	+ 0.01
22a	2.32	2.24	+ 0.08
22b	1.62	1.41	+ 0.21
23	4.71	4.75	<i>R</i> *
24	3.23	3.26	- 0.03
25	1.30	1.49	- 0.19
35	6.78	7.03	- 0.25
36	4.86	4.92	- 0.06
3a	2.54	2.62	- 0.08
3b	2.62	2.69	-0.07
4	5.36	5.43	<i>R</i> *
5	1.69	1.65	+ 0.04

CDCl_3 , 500 MHz. * Configuración absoluta.

Al igual que todas las acetogeninas descritas en el presente estudio, el efecto Cotton negativo observado a 238 nm en el espectro de DC de la jimenezina (Espectro 66), permite proponer una configuración S en C-36. La configuración absoluta en C-36 se confirmó por el método de Hoye. De tal manera que la magnitud de la diferencia ($\Delta\delta_{S-R}$) para H-35 y H-36 (Cuadro 27) de los ésteres de Mosher **103s** y **103r** de 0.25 y 0.06 ppm, respectivamente sugiere una configuración relativa *unlike* para C-4/C-36. En consecuencia, si C-4 tiene la configuración absoluta *R*, C-36 debe tener la configuración absoluta *S*.

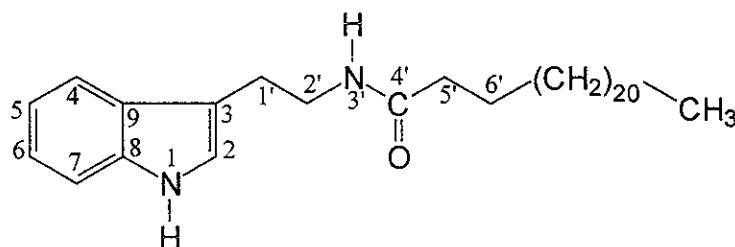
En síntesis, la aplicación de la metodología de los ésteres de Mosher y el análisis del efecto Cotton en el DC, permitió establecer la estereoquímica absoluta de los centros estereogénicos de la jimenezina (**103**) de la siguiente forma: 4*R*, 15*R*, 16*R*, 19*R*, 20*S*, 23*R*, 24*S* y 36*S* (Figura 38).

5.2.3 Elucidación estructural de la N-lignoceroiltryptamina (**105**).

El compuesto **105** se obtuvo como un polvo de color blanco con un pf de 114-115 °C. El espectro en el IR (Espectro 79) presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de funciones amina (3390 cm^{-1}) y amida (1630 cm^{-1}). El espectro en el UV (Espectro 80) registra máximos de absorción en λ_{max} 281.5 y 222 nm, los cuales son característicos del núcleo estructural indol (Riemer *et al.*, 1997) (Cuadro 28). La reacción positiva frente el reactivo de Erlich proporciona una evidencia química alternativa de la presencia de esta unidad estructural en el producto **105**.

Su fórmula molecular se determinó como $C_{34}H_{58}ON_2$ por EM-AR modalidad FAB⁺. El espectro de masas generado por impacto electrónico no presentó el ion molecular, sin embargo, se observan fragmentos intensos característicos para triptaminas en m/z 143 (pico base) y 130 (Figura 45). El pico de m/z 143 corresponde al fragmento vinilindol resultante de un arreglo de McLafferty y el pico de m/z 130 se genera por la ruptura alílica entre C-1' / C-2' (Riemer *et al.*, 1997).

Cuadro 28. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la N-lignoceroiltriptamina (**105**).



N-lignoceroiltriptamina (**105**)

p.f.	114-115°C
λ_{max} =	281.5, 250v, 222, 209.5v y 205.5 (Espectro 80)
P.M.	510 uma EM-FAB ⁺ (glicerol) m/z 511 [M+H] ⁺ (Espectro 81)
F.M. =	$C_{34}H_{58}ON_2$ Calculada por EM de alta resolución, modalidad FAB ⁺ (NBA) m/z 511.4610 (teórico 511.4628) para [M+H] ⁺ .
EM-IE de 105 m/z (int. rel.):	143 (100), 129 (18) (Figura 45)
IR = ν max (film)	3,390, 3265, 2957, 2920, 2849, 1630, 1562, 1111 cm^{-1} (Espectro 79)
RMN ¹ H y ¹³ C.	Cuadro 29. (Espectros 82-88)

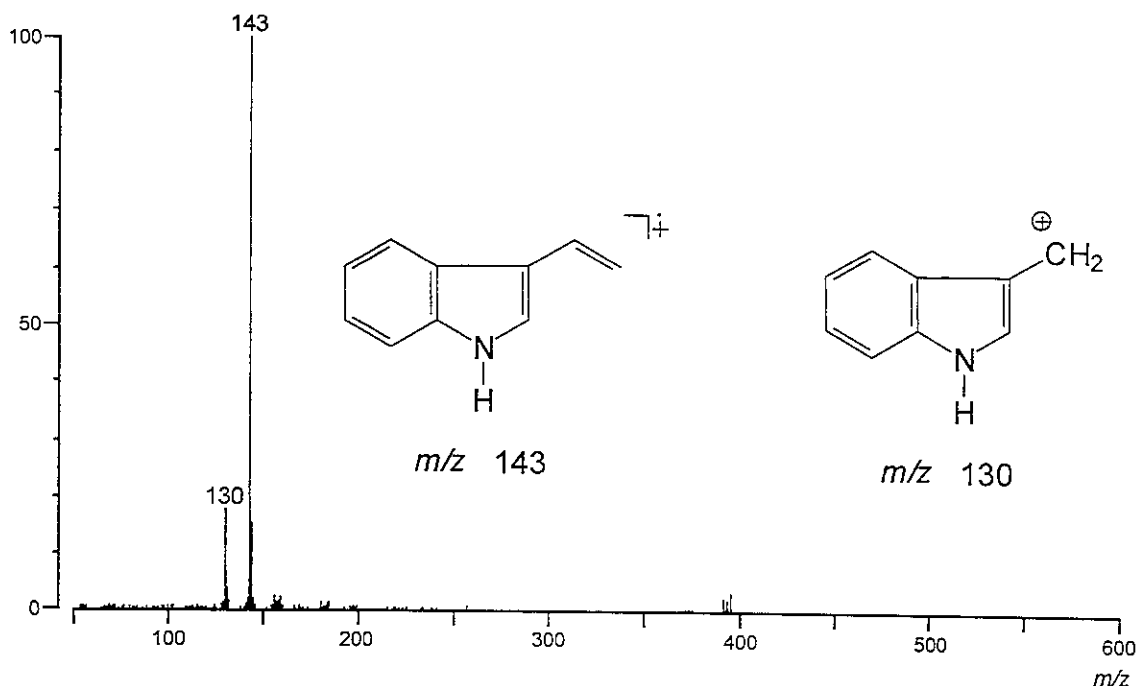


Figura 45. Espectro de masas (CG-EM IE) generado por la N-lignoceroiltryptamina (**105**).

Los espectros de RMN confirman que el producto natural **105** es una amida derivada de la triptamina y un ácido graso lineal de 24 carbonos. Así, las señales correspondientes a la porción de la triptamina se observan en el espectro de RMN ^1H (Espectro 82) como se describe a continuación: a) las señales de los hidrógenos aromáticos del anillo carbocíclico forman un sistema ABCD típico [δ_{H} 7.61 (H-4), 7.13 (H-5), 7.21 (H-6) y 7.38 (H-7)]. b) El hidrógeno de la posición C-2 del indol se aprecia como un doblete ($J = 2.5$ Hz) en δ_{H} 7.04. El conjunto de señales recién descrito correlacionan en el espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC (Espectro 88) con las señales en δ_{C} 118.8 (C-4), 119.6 (C-5), 122.3 (C-6), 111.2 (C-7) y 121.9 (C-2), respectivamente. c) por último las resonancias de la función etilamino ubicada en la posición C-3 del núcleo base aparecen en δ_{H} 2.98 (H-1') y 3.61 (H-2') y conforman la parte A_2B_2 de un sistema $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$. Estas dos últimas señales correlacionan con los

metilenos en δ_C 25.4 (C-1') y 39.7 (C-2') en el espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC (Espectro 88).

Por otra parte, las señales más relevantes de la unidad del ácido graso son: a) Las correspondientes a los metilenos α [δ_H 2.09 (H-5'), δ_C 36.9 (C-5')] y β [δ_H 1.57 (H-6'), δ_C 25.7 (C-6')] al carbonilo de la amida. b) El metilo terminal de la cadena hidrocarbonada (δ_H 0.88 (t, $J = 6.5$ Hz); δ_C 14.1) c) Por último, el carbonilo de la amida aparece en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 86) en δ_C 173.1 (Cuadro 29).

Cuadro 29. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de la N-lignoceroiltriptamina (105).

Posición	δ_H	δ_C
1	8.04 sa	-
2	7.04 d (2.5)	121.9
3	-	113.3
4	7.61 dd (8.0, 1.0)	118.8
5	7.13 ddd (8.0, 8.0, 1.0)	119.6
6	7.21 ddd (8.0, 8.0, 1.0)	122.3
7	7.38 dd (8.5, 1.0)	111.2
8	-	136.5
9	-	127.5
1'	2.98 t (6.5)	25.4
2'	3.61 q (6.5)	39.7
3'	5.45 br s	-
4'	-	173.1
5'	2.09 t (7.5)	36.9
6'	1.57 t (7.5)	25.7
CH ₃	0.88 t (6.5)	14.1

CDCl₃, ^1H [500 MHz. (J in Hz)], ^{13}C (125 MHz), δ en ppm. asignaciones confirmadas por RMN ^1H -COSY, RMN ^1H -NOESY, RMN ^{13}C -DEPT, RMN ^1H - ^{13}C -HMQC y HMBC.

Las asignaciones arriba indicadas se verificaron mediante el análisis de los espectros bidimensionales de tipo RMN ^1H -COSY (Espectro 83), RMN ^1H -NOESY (Espectro 84) y RMN ^1H - ^{13}C -HMBC (Espectro 88). En el Cuadro 30 se resumen las correlaciones más importantes encontradas. Asimismo, en la Figura 46 se muestran las correlaciones que apoyan claramente la propuesta de que el ácido lignocérico se encuentra unido a la unidad triptamina formando una amida.

Cuadro 30. Correlaciones observadas en los espectros de RMN ^1H -COSY, RMN ^1H -NOESY y RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la N-lignoceroiltryptamina (**105**).

Protón	Correlaciones ^1H - ^1H		Correlaciones ^1H - ^{13}C HMBC
	COSY	NOESY	
H-1	H-2	H-2, H-7	—
H-2	H-1	H-1, H-1', H-2', H-3'	C-3, C-8, C-9
H-4	H-5, H-6	H-5, H-1', H-2'	C-8, C-6
H-5	H-4, H-6, H-7	H-4, H-6	C-9
H-6	H-4, H-5, H-7	H-5, H-7	C-8, C-4
H-7	H-6, H-5	H-1, H-6	C-9, C-5
H-1'	H-2'	H-2, H-4, H-2', H-3'	C-2, C-3, C-9, C-2'
H-2'	H-1', H-3'	H-2, H-4, H-1', H-3'	C-3, C-1', C-4'
H-3'	H-2'	H-1', H-2', H-5'	—
H-5'	H-6'	H-3', H-6'	C-4', C-6'
H-6'	H-5'	H-3', H-5'	—

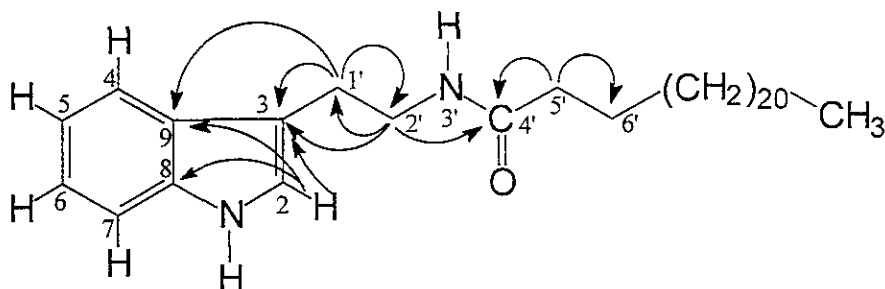


Figura 46. Correlaciones importantes observadas en el espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la N-lignoceroiltryptamina (**105**).

La hidrólisis del producto natural en condiciones ácidas drásticas permitió la obtención del ácido lignocérico el cual se identificó bajo la forma de éster metílico por CG-EM. Las evidencias presentadas permiten claramente proponer que el producto **105** es la triptamida del ácido lignocérico (N-lignoceroiltriptamina) el cual constituye un nuevo producto natural.

5.2.4 Elucidación estructural de los compuestos presentes en la mezcla de N-aciltriptaminas (**104**).

La mezcla de N-aciltriptaminas (**104**) presenta un espectro de RMN ^1H (Espectro 89) muy similar al del producto puro **105**, sin embargo, al analizar el producto por CG-EM se observó que el mismo era una mezcla de ocho productos muy similares (Figura 47).[†] Los espectros de masas generados de los componentes de la mezcla resultaron idénticos y presentan el pico base de m/z 143 (Figura 48), el cual corresponde al fragmento vinilindol, detectado en el espectro del producto puro **105**. En ninguno de los casos se detectó el ion molecular, sin embargo, el análisis por EM del tipo FAB⁺ (Espectro 90) de la mezcla permitió la detección de ocho iones cuasimoleculares (Cuadro 31) lo que confirma la presencia de ocho amidas incluyendo al compuesto **105**.

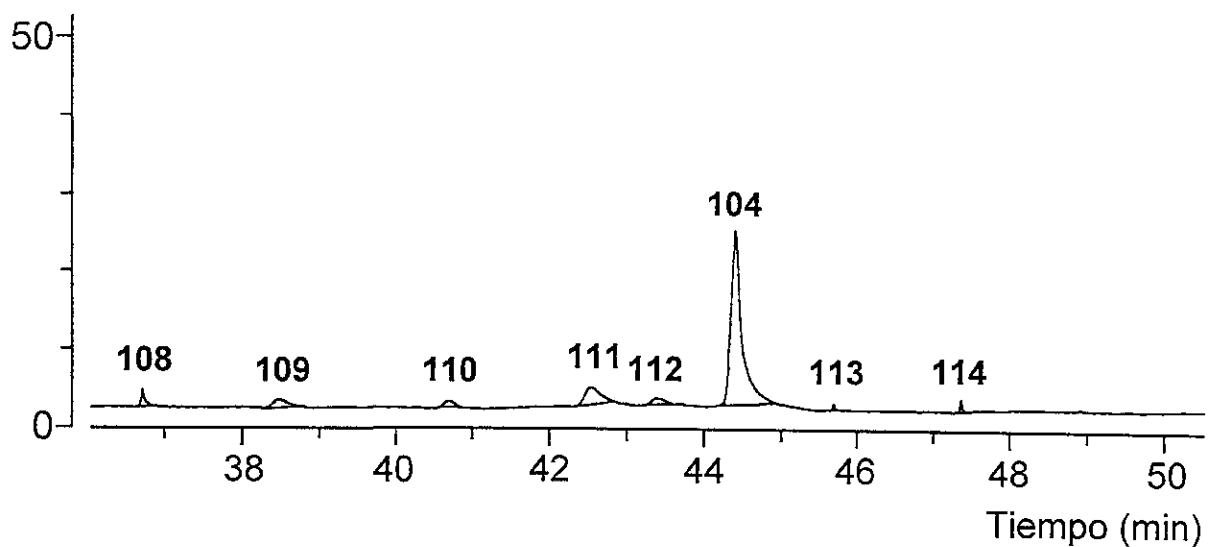


Figura 47. Cromatograma de gases de la mezcla de N-aciltryptaminas (104).

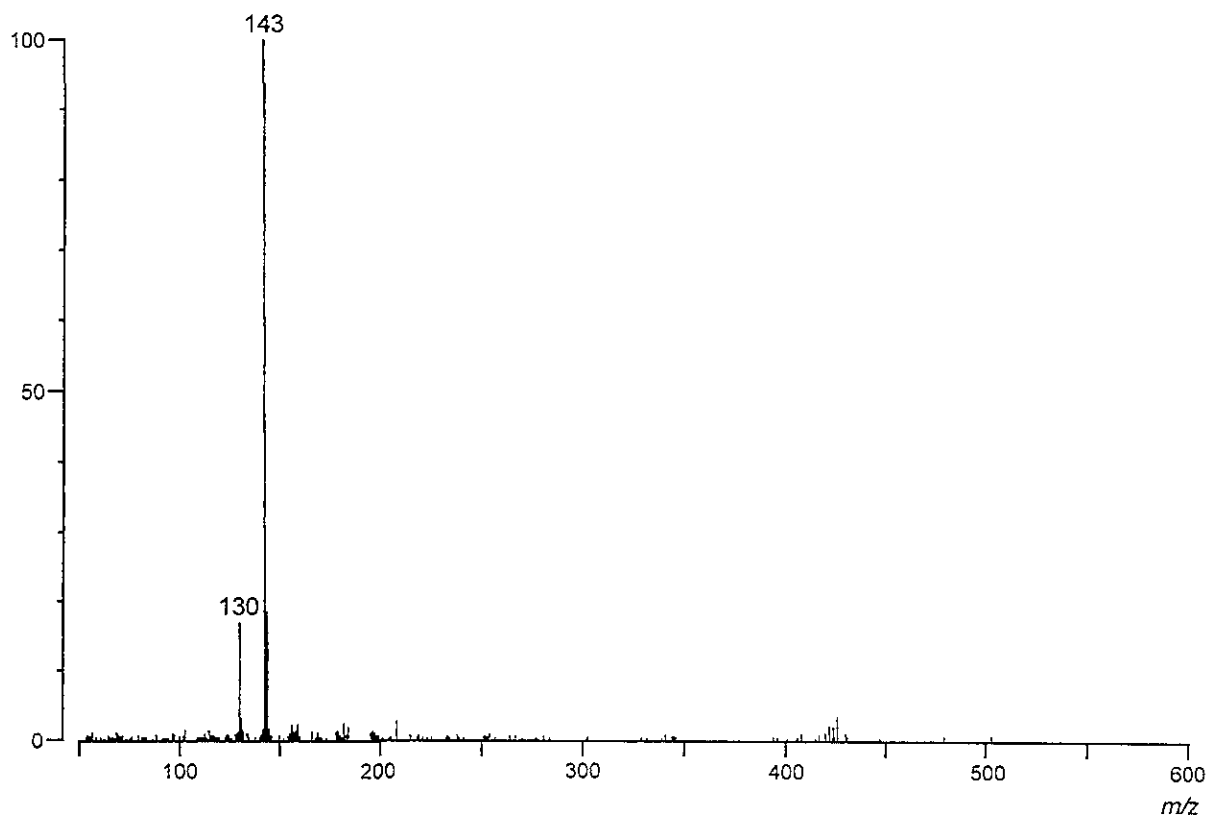
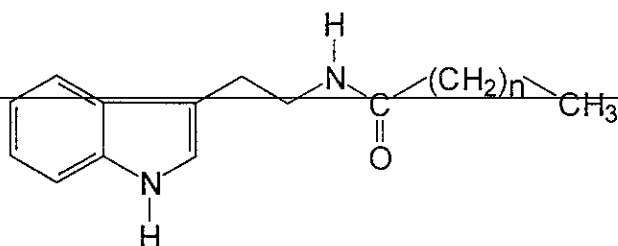


Figura 48. Espectro de masas obtenido por CG-EM IE generado por el pico de t_R 42.3 min (111) presente en la mezcla de N-aciltryptaminas (104).

Cuadro 31. N-aciltriptaminas detectadas en el espectro de masas modalidad FAB⁺ de la mezcla de N-aciltriptaminas (104).



Compuesto	n	Peso Molecular ([M+H] ⁺)
N-palmitoiltriptamina (108)	14	398
N-estearoiltriptamina (109)	16	422
N-araquinoiltriptamina (110)	18	454
N-behenoiltriptamina (111)	20	482
N-tricosanoiltriptamina (112)	21	496
N-lignoceroiltriptamina (105)	22	510
N-hieniltriptamina (113)	23	524
N-cerotoiltriptamina (114)	24	538

Para comprobar la identidad de las siete amidas restantes presentes en la mezcla original de amidas (104) se procedió a la hidrólisis total de las mismas utilizando las condiciones aplicadas en el caso del producto puro 105. Como resultado de este proceso se obtuvo una mezcla de ácidos grasos (107), los cuales se metilaron con una solución etérea de diazometano y se analizaron por CG-EM. El cromatograma de gases resultante (Figura 49) indicó claramente la presencia de ocho componentes los cuales se caracterizaron mediante la interpretación de sus espectros de masas como los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico, araquínico, behénico, tricosanóico, lignocérico, hiénico y cerótico. En el Cuadro 32 se resumen los tiempos

de retención, proporción en la mezcla y los fragmentos de masa/carga mas importantes observados en los espectros de masas de cada uno de los compuestos antes mencionados.

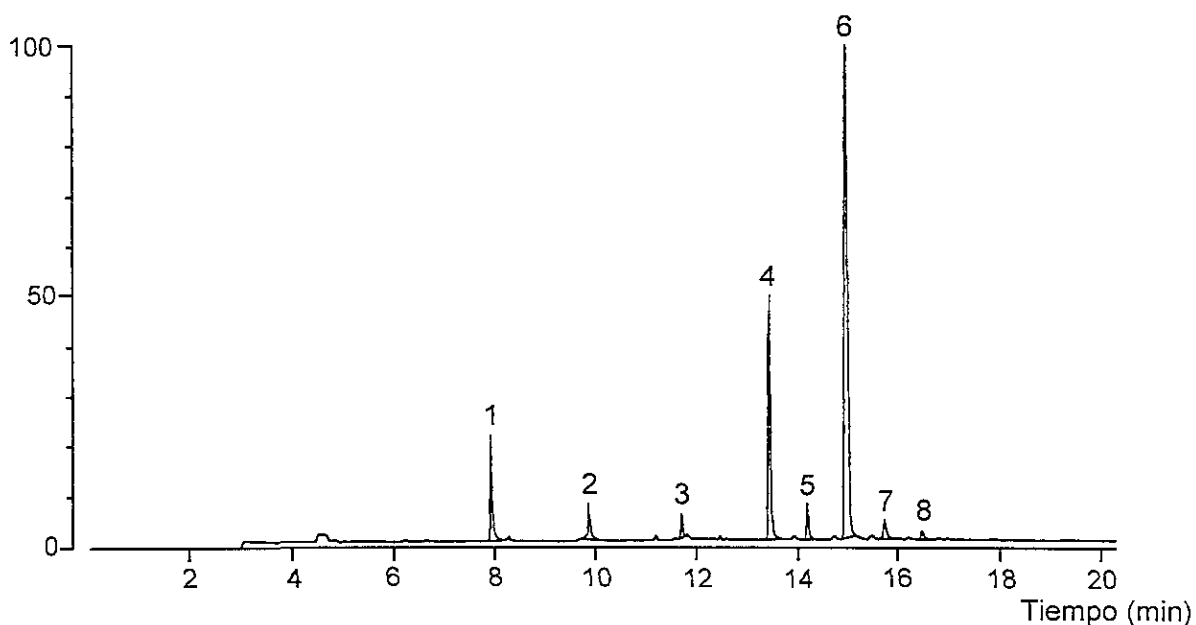


Figura 49. Cromatograma de gases de la mezcla de ésteres metílicos (**107a**) derivados de la mezcla de N-aciltriptaminas (**104**). Asignación de los picos: Ésteres metílicos de los ácidos palmítico (1), esteárico (2), araquínóico (3), behénico (4), tricosanóico (5), lignocérico (6), hiénico (7) y cerótico (8). Espectros 93-100.

Los ácidos grasos son fácilmente identificados bajo la forma de sus ésteres metílicos utilizando la técnica de CG-EM. Los ésteres generados son más volátiles, y por lo tanto la separación por cromatografía de gases es más eficiente. Además, los fragmentos característicos en la espectrometría de masas, permiten su clara identificación. Los números de masa/carga de los fragmentos diagnósticos son productos con oxígeno o resultantes de la transposición sencilla de hidrógeno del

Nombre	t.r.* (min)	%	Fórmula	P.M. (g/mol)	Fragmentos m/z (%)				Espectro
					M ⁺	M - 31	87	74	
Acido palmítico	7.95	7.84	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	62	30	84	100	Espectro 91
Acido esteárico	9.88	3.25	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	47	14	80	100	Espectro 92
Acido araquínico	11.70	1.60	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326	44	10	84	100	Espectro 93
Acido behénico	13.44	21.77	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354	47	8	84	100	Espectro 94
Acido tricosánico	14.21	2.96	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368	57	8	87	100	Espectro 95
Acido lignocérico	15.02	58.98	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382	78	9	91	100	Espectro 96
Acido hiénico	15.73	2.60	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	396	62	7	91	100	Espectro 97
Acido cerótico	16.45	1.00	C ₂₇ H ₅₄ O ₂	410	100	9	67	71	Espectro 98

*Correspondientes a los ésteres metílicos.

Cuadro 32. Acidos grasos derivados de la hidrólisis de la mezcla de N-aciltriptaminas (**104**) identificados como sus ésteres metílicos (**107a**) en CG-EM.

tipo McLafferty (Seibl, 1973). En el caso de los primeros, la fragmentación es de ambos lados del carbonilo y los iones resultantes no producen necesariamente señales intensas, pero sí características. Estos fragmentos se diferencian solamente en 14 unidades de masa por exceso (m/z 59, 87n). El fragmento de m/z 74 es el producto de la transposición de McLafferty y generalmente representa el pico base en los espectros de masas de los ésteres metílicos con más de dos metilenos (Figura 50). La intensidad del ion molecular (M^+) en los ésteres metílicos de ácidos saturados, forma parte de las señales mas intensas de los espectros, lo que facilita su interpretación y determinación del peso molecular.

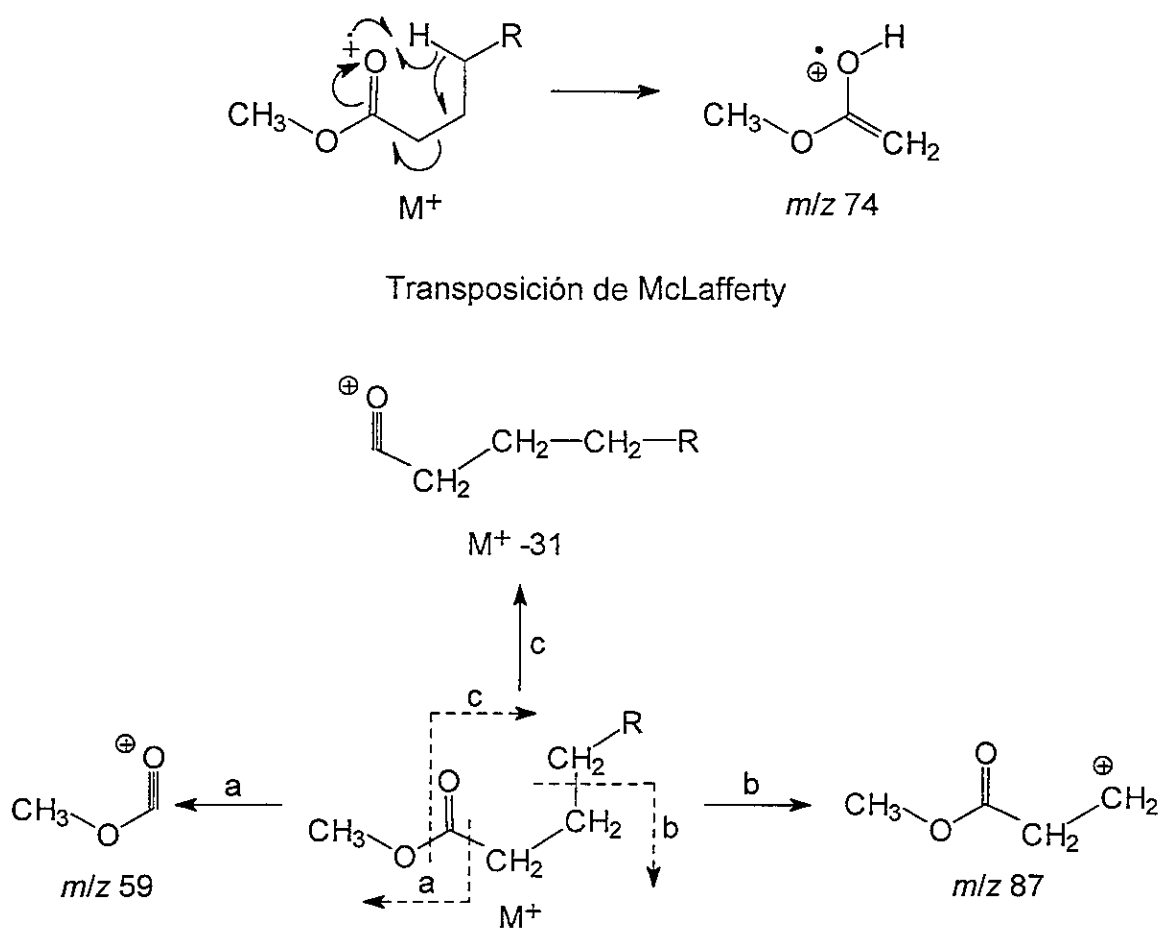


Figura 50. Fragmentos característicos de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

De acuerdo a la proporción de los ésteres metílicos analizados por CG-EM, resulta evidente que la amida mayoritaria presente en la mezcla **104** es el producto **105**, la cual se encuentra en una proporción de 59 %; la otra amida que se encuentra en una cantidad apreciable (21.8 %) es la correspondiente a la N-beheniltriptamina (**111**) (Cuadro 32).

5.3 ACTIVIDAD CITOTOXICA DE LOS COMPUESTOS QUE FUERON AISLADOS DE *Annona purpurea* Y *Rollinia mucosa*.

De acuerdo a la estrategia planteada para la presente investigación, se realizaron los ensayos biológicos conducentes a determinar el potencial citotóxico de los compuestos aislados. Para ello se evaluó en primer lugar el efecto tóxico de las acetogeninas para el crustáceo *A. salina*. Posteriormente, se determinó la actividad citotóxica *in vitro* sobre las seis líneas celulares derivadas de tumores humanos utilizadas para evaluar el potencial antineoplásico de los extractos crudos de *A. purpurea* y *R. mucosa*. En el caso de las acetogeninas obtenidas de *A. purpurea*, se evaluó el potencial citotóxico de los productos novedosos [purpurediolina (**98**), purpurenina (**99**) y purpuracénina (**100**)], así como de la anoglaucina (**101**) y la anonacina A (**21**). De *R. mucosa* se evaluó la jimenezina (**103**), la mezcla de N-aciltriptaminas (**104**) y la N-lignoceroiltriptamina (**105**).

En general, todas las acetogeninas presentan una actividad tóxica significativa en el bioensayo de *A. salina*. Como se muestra en el Cuadro 33, la concentración letal media calculada es menor o igual a 3 µg/mL.

Por otro lado, las seis acetogeninas revelaron una gran actividad citotóxica, destacando la selectividad demostrada por la purpurediolina (98) y la anoglaucina (101) contra la línea celular de adenocarcinoma de colon. La purpuracena (100) presenta un efecto selectivo sobre las líneas celulares derivadas de los carcinomas de pulmón y riñón y del adenocarcinoma de próstata. La jimenezina (103) muestra una gran actividad en contra de cinco de las seis líneas celulares ensayadas (excepto en la línea de carcinoma de mama). Por último, la purpurenina (99) y la anonacina A (21), afectan a todas las líneas celulares en menor grado que el control positivo utilizado (la adriamicina). Las CE_{50} calculadas para estos dos últimos compuestos, oscilan entre 0.3 y 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 33).

La mezcla de N-aciltryptaminas (104) y la N-lignoceroiltryptamina (105) no demostraron un efecto citotóxico apreciable en contra de las seis líneas celulares utilizadas de manera rutinaria en este estudio para determinar el efecto citotóxico de las acetogeninas. En todos los casos la CE_{50} fue mayor a 10 $\mu\text{g/mL}$. Tampoco resultaron tóxicas para *A. salina*; las CL_{50} calculadas fueron de 780.5 y 625.0 $\mu\text{g/mL}$ para la mezcla de amidas (104) y la N-lignoceroiltryptamina (105), respectivamente.

Cuadro 33. Resultados de toxicidad para *Artemia salina* y citotoxicidad de las acetogeninas aisladas de *A. purpurea* y *R. mucosa*.

Compuesto	TAS ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Líneas celulares derivadas de tumores humanos					
		CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					
		A-549 ^b	MCF-7 ^c	HT-29 ^d	A-498 ^e	PC-3 ^f	PACA-2 ^g
Purpurediolina (98)	7.0×10^{-2}	4.43×10^{-1}	9.16×10^{-1}	$< 10^{-7}$	1.36	3.53×10^{-1}	1.44
Purpurenina (99)	2.9×10^{-2}	1.29	1.67	3.16×10^{-1}	1.25	1.07	1.98
Purpuracena (100) ⁺	3.0	4.8×10^{-2}	>10	>10	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	>10
Anoglauca (101)	2.2×10^{-2}	1.08	1.56	$< 10^{-7}$	1.01	3.56×10^{-1}	1.45
Anonacina A (21)	4.6×10^{-1}	1.32	1.96	1.18	1.16	1.33	1.90
Jimenezina (103)*	5.7×10^{-3}	1.64×10^{-2}	$> 10^{-1}$	4.25×10^{-3}	4.94×10^{-2}	2.77×10^{-4}	1.69×10^{-4}
Adriamicina	-	3.67×10^{-3}	2.12×10^{-1}	9.66×10^{-3}	1.98×10^{-3}	2.27×10^{-2}	1.45×10^{-3}
Adriamicina ⁺	-	8.89×10^{-3}	3.69×10^{-1}	3.71×10^{-2}	8.35×10^{-2}	5.68×10^{-2}	1.13×10^{-2}
Adriamicina*	-	4.47×10^{-3}	8.97×10^{-2}	1.62×10^{-2}	1.10×10^{-3}	2.13×10^{-2}	2.88×10^{-3}

* + Muestras ensayas simultáneamente.

^bCarcinoma de pulmón.

^cCarcinoma de mama.

^eCarcinoma de riñón.

^fAdenocarcinoma de próstata.

^aToxicidad para *Artemia salina*.

^dAdenocarcinoma de colon.

^gCarcinoma de páncreas.

5.4. EVALUACION DE LA ESCUAMOCINA (80), LA BULATACINA (16) Y LA MOTRILINA (97), SOBRE DIVERSAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS.

Con la finalidad de contribuir al conocimiento general de las actividades de las acetogeninas de anonáceas se evaluó el efecto de los productos mayoritarios de las semillas de *Annona purpurea* sobre diversas reacciones del proceso de la fotofosforilación, en cloroplastos aislados de espinacas. Los compuestos investigados incluyen a la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97).

Para realizar el estudio sobre el proceso de la fotofosforilación, en primer lugar se investigó la actividad de los tres metabolitos sobre la síntesis de ATP. Posteriormente, considerando que las acetogeninas inhibieron de manera significativa la síntesis de ATP, se procedió a dilucidar el mecanismo mediante el cual afectan este proceso. Cabe mencionar que los compuestos que inhiben la síntesis de ATP, lo pueden hacer por mecanismos de desacoplamiento, interfiriendo con la transducción de energía o bien afectando la reacción de Hill (Trebs, 1978; Moreland, 1980; Ort, 1986). Para discriminar entre estas tres posibilidades se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de los tres compuestos sobre los transportes de electrones basal, desacoplado y fosforilante. Por último, se interpretó el mecanismo de acción y se procedió a caracterizar el sitio o la enzima redox de la cadena transportadora de electrones que fue afectada por los compuestos evaluados.

La discusión del efecto demostrado por cada una de las acetogeninas sobre las actividades fotosintéticas antes mencionadas, es el objetivo de la sección siguiente. Cabe mencionar que los resultados integrales de todas las evaluaciones realizadas se incluyen el apéndice II.

5.4.1 Efecto de las acetogeninas sobre la síntesis de ATP.

La síntesis de ATP se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Dilley (1972). Este procedimiento se basa en medir el cambio de pH en el medio de reacción inducido por la síntesis de ATP en presencia de ADP y P_i (Calera *et al.*, 1996; Castañeda *et al.*, 1998). Durante la síntesis de ATP a pH 8.0, la enzima

Mg^{2+} -ATPasa consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada de acuerdo a la siguiente reacción: $ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \rightarrow ATP^{4-} + H_2O$.

En consecuencia, la variación de pH debido al consumo de protones es proporcional a la cantidad de ATP generada.

En la Figura 51 se muestra el efecto de los compuestos evaluados sobre la síntesis de ATP cuando los electrones se transportan del H_2O al metilviológeno (MV) (aceptor artificial de electrones). Como se puede observar, los compuestos inhiben de manera significativa y dependiente de la concentración el proceso de la fotofosforilación. En el Cuadro 34 se muestra las concentraciones que inducen el 50 % de inhibición (IC_{50}) de la síntesis de ATP para cada compuesto ensayado.

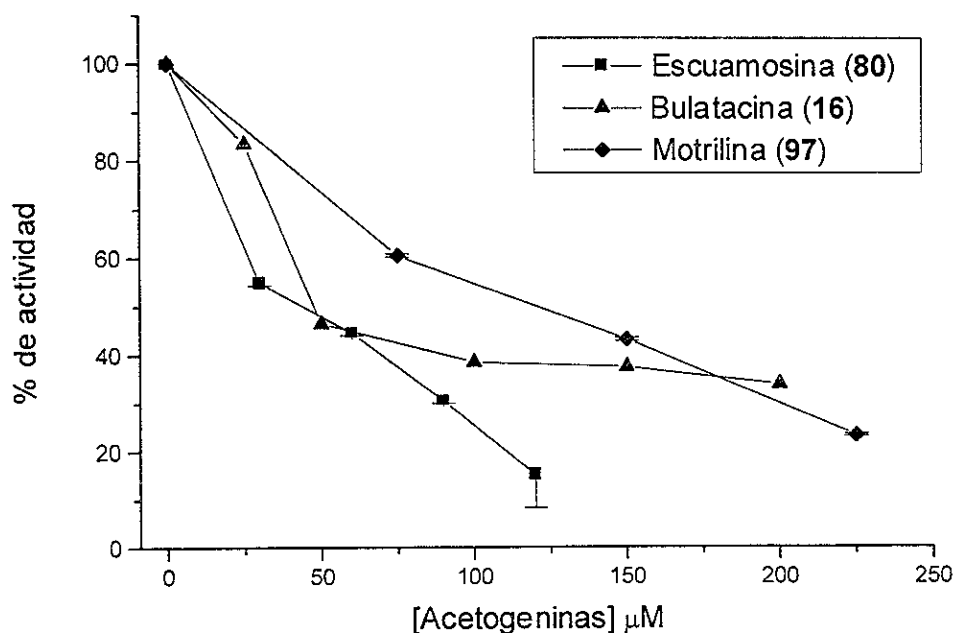


Figura 51. Efecto de las acetogeninas en la velocidad de la síntesis de ATP ($H_2O \rightarrow MV$). Las velocidades de síntesis de ATP de los controles fueron para la escuamosina (80), bulatacina (16) y motrilina (97), 556, 301 y 350 $\mu mol / mg$ clorofila $\cdot h$, respectivamente.

Cuadro 34. Efecto inhibitorio de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en la síntesis de ATP.

Acetogeninas	CI ₅₀ μM
Escuamocina (80)	41.7
Bulatacina (16)	47.2
Motrilina (97)	114.8

5.4.2 Efecto de las acetogeninas sobre la velocidad del transporte de electrones.

A continuación, para determinar el mecanismo de acción mediante el cual los compuestos inhiben la síntesis de ATP, se determinó el efecto *in vitro* de los mismos sobre el transporte de electrones fotosintético no-cíclico, empleando el agua como un donador natural de electrones y el MV como un aceptor final de electrones. Para este ensayo se emplearon tres condiciones experimentales diferentes: Basal, desacoplado y fosforilante.

En primer lugar se evaluó el transporte de electrones basal mediante la determinación del flujo de electrones dependiente de la luz en el medio basal; en este caso, la velocidad del transporte de electrones es baja debido a la ausencia de ADP y Pi en el medio (Trebs, 1972). En el caso de que un compuesto active el flujo de electrones en estas condiciones, significa que este actúa como un desacoplante clásico, puesto que disipa el gradiente de protones generado con el consecuente incremento en el flujo de electrones (Hooper, 1984). En la segunda determinación se

midió el transporte de electrones desacoplado, para lo cual se adicionó al medio de reacción basal NH_4Cl (6 mM) como un agente desacoplante. Este último, promueve la disipación del gradiente H^+ generado en la cadena fotosintética, observándose una velocidad máxima de flujo de electrones. Si un compuesto inhibe el transporte de electrones bajo estas condiciones se le considera como un inhibidor del transporte de electrones acoplado a la síntesis de ATP, es decir un inhibidor clásico de la reacción de Hill (McCarty, 1977; Trebs, 1972; Mitchel, 1977). Por último, se determinó el transporte de electrones fosforilante y para ello se adicionó al medio de reacción basal ADP (1 mM) y P_i (3 mM) para así permitir la actividad catalítica de la enzima Mg^{2+} -ATPasa; en este caso la velocidad del transporte de electrones es mayor que la del transporte de electrones basal, debido a que el gradiente de pH es utilizado para la fosforilación (Trebs, 1972). Los compuestos que activan este transporte, lo hacen por un mecanismo de desacoplamiento. Por el contrario, si lo desactivan, significa que afectan a la cadena redox y por lo tanto son inhibidores de la reacción de Hill. Los inhibidores de la transferencia de energía afectan directamente a la enzima Mg^{2+} -ATPasa que cataliza el proceso de fotofosforilación. Por lo tanto, la velocidad de los transportes de electrones en las condiciones basal y desacoplante no se afectan y el transporte fosforilante se inhibe (Izawa y Good, 1983).

Los resultados de la Figura 52 indican que la escuamocina (**80**), la bulatacina (**16**) y la motrilina (**97**) estimulan notablemente el transporte de electrones basal (234.8, 322.0 y 131.0 %, respectivamente, a la concentración de 200 μM). En consecuencia, los tres compuestos se comportan como agentes desacoplantes.

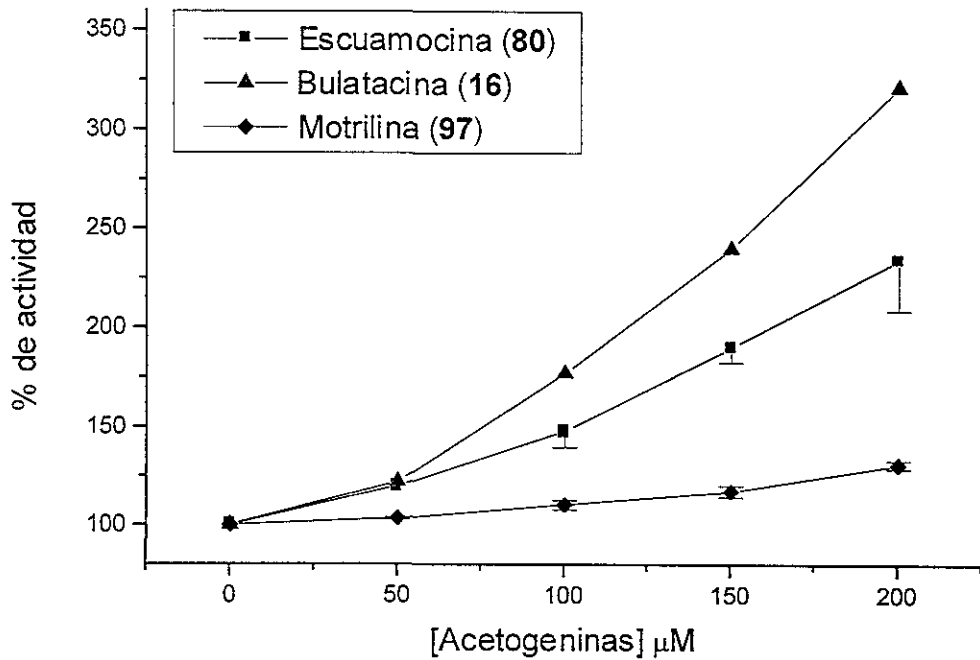


Figura 52. Efecto de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en la velocidad del transporte de electrones basal de $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$. Las velocidades controles de transporte de electrones fueron: 200, 112 y 193 $\mu \text{equiv e}^- / \text{mg clorofila} \cdot \text{h}$, respectivamente.

El transporte de electrones desacoplado se inhibe en presencia de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en un 51.6, 54.5, y 65.5 %, a la concentración de 200 μM , respectivamente (Figura 53). Estos resultados sugieren que los tres compuestos actúan como inhibidores de la reacción de Hill.

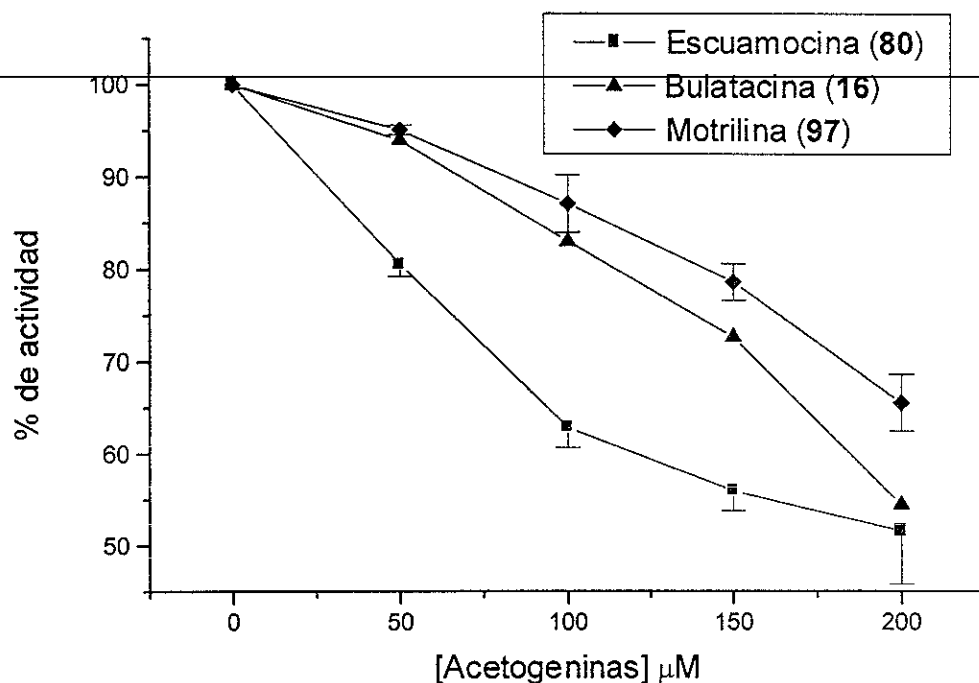


Figura 53. Efecto de la escuamocina (**80**), la bulatacina (**16**) y la motrilina (**97**) en la velocidad del transporte de electrones desacoplado de $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$. Las velocidades controles de transporte de electrones fueron: 668, 481 y 107 μ equiv e^- / mg clorofila \cdot h, respectivamente.

Por último, el transporte de electrones fosforilante se inhibe por el tratamiento con la escuamocina (**80**) a bajas concentraciones (73.2%, 50 μM). A concentraciones mayores a 50 μM el efecto del producto es contrario alcanzando una activación del 151.2 % a 200 μM . La motrilina (**97**) demostró un comportamiento similar ya que inhibe el transporte de electrones a la concentración de 100 μM (70.8 %) y lo estimula ligeramente (hasta un 104.2 %) a la concentración de 200 μM . Por otra

parte, la bulatacina (**16**) solo inhibe el transporte de electrones fosforilante hasta un 51.2 %, a la concentración de 200 μM (Figura 54). Los resultados para la escuamocina (**80**) y la motrilina (**97**) revelan que estos compuestos afectan a la cadena redox a bajas concentraciones, comportándose como inhibidores de la reacción de Hill. A concentraciones mayores de 100 μM actúan como agentes desacoplantes. La bulatacina (**16**) se comporta exclusivamente como un inhibidor de la reacción de Hill.

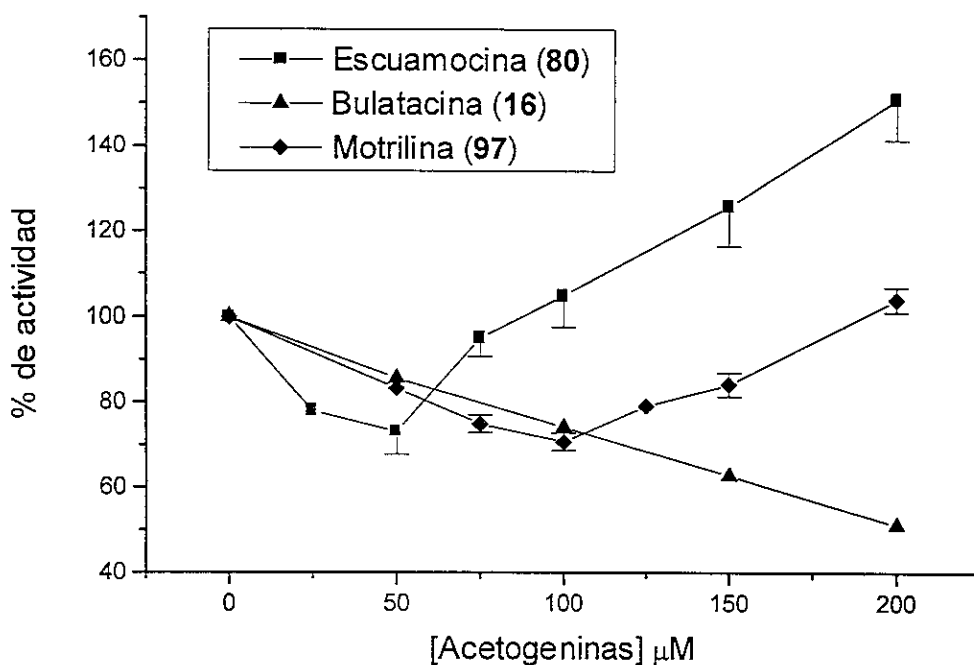


Figura 54. Efecto de la escuamocina (**80**), la bulatacina (**16**) y la motrilina (**97**) en la velocidad del transporte de electrones fosforilante de $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$. Las velocidades controles de transporte de electrones fueron: 301, 219 y 320 μ equiv e^- / mg clorofila \cdot h, respectivamente.

Los resultados obtenidos permiten proponer que el mecanismo mediante el cual las acetogeninas escuamocina (**80**), bulatacina (**16**) y motrilina (**97**) inhiben la síntesis de ATP, implica por una parte, un efecto desacoplante que disipa el gradiente electroquímico de protones generado y por lo tanto, el cloroplasto no dispone de la energía necesaria para la síntesis de ATP. Por otra parte, al inhibir la reacción de Hill, los productos evitan la generación del gradiente electroquímico de protones necesario para la síntesis de ATP. En consecuencia, las tres acetogeninas se caracterizaron como agentes desacoplantes e inhibidores de la reacción de Hill.

5.4.3 Efecto de las acetogeninas en las reacciones parciales de la cadena Redox en el transporte de electrones a nivel de los fotosistemas I y II.

Con el objetivo de localizar el blanco de acción de los compuestos de prueba en la cadena de transporte de electrones, se determinó su efecto sobre los transportes de electrones en las reacciones parciales del fotosistema I (FS I) y II (FS II) usando donadores y aceptores artificiales de electrones.

En el caso del fotosistema I se determinó el efecto de las acetogeninas en el transporte de electrones desacoplado de DCPIP_{red} (2,6-diclorofenolindofenol) a MV. El DCPIP reducido con ascorbato actúa como un donador artificial de electrones a nivel del complejo b_6/f y el MV como el aceptor final de electrones. El DCMU [3-(3,4,diclorofenil)-1,1-dimetilurea] se adiciona a la mezcla de reacción con la finalidad de inhibir el flujo de electrones procedente del FS II a nivel de Q_B (Figura 55). Los resultados de los experimentos en esta reacción parcial indican que las

acetogeninas evaluadas no afectan este transporte de electrones, por lo que el blanco de inhibición debe de encontrarse en el FS II (Figura 56).

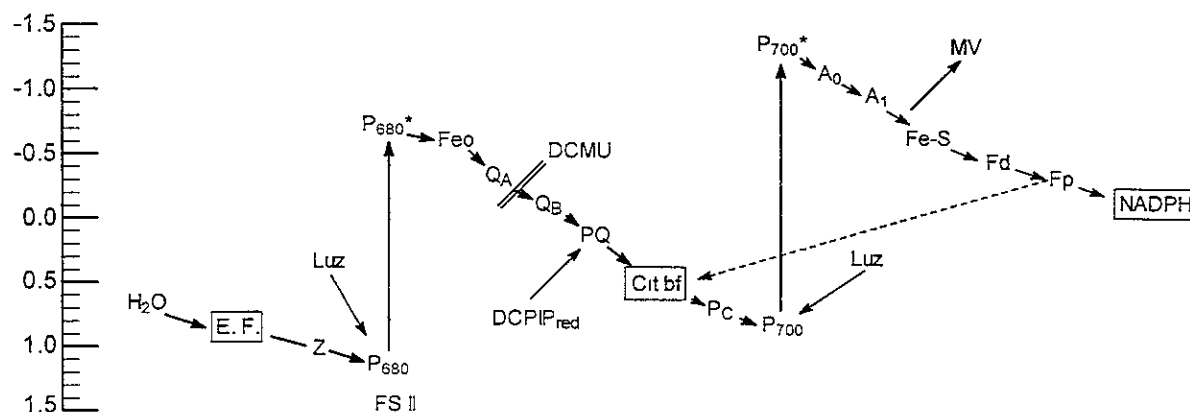


Figura 55. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS I de DCPIP_{red} a MV.

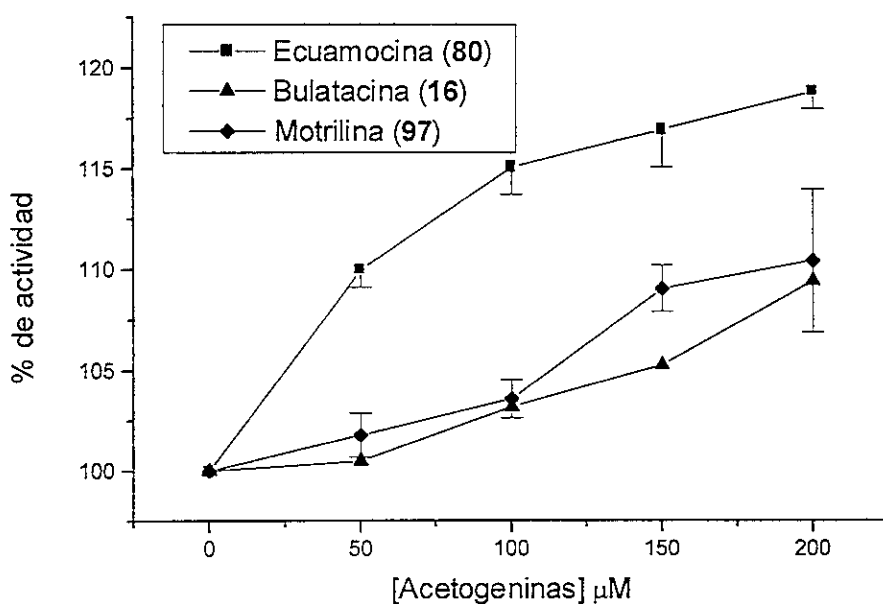


Figura 56. Efecto de las acetogeninas sobre la velocidad del transporte de electrones en el FS I. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97), 151, 157 y 136 μ equiv e^-/mg clorofila \cdot h, respectivamente.

Para determinar si el transporte de electrones desacoplado en el FS II resulta afectado por las acetogeninas de prueba, se ensayaron tres reacciones parciales en el FS II ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}_{\text{ox}}$; $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$; y $\text{DCP} \rightarrow \text{DCPIP}_{\text{ox}}$). En primer lugar, se determinó la actividad de agua a DCPIP_{ox} . En esta reacción el agua es el donador natural de electrones y el DCPIP es el aceptor artificial de electrones, equivalente al aceptor natural Cit b_6/f . Para inhibir el paso de electrones hacia el FS I se adicionó DBMIB (dibromometilisopropil-*p*-benzoquinona) a la mezcla de reacción (Figura 57). Los resultados obtenidos permitieron comprobar que el transporte de electrones de $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}_{\text{ox}}$ es inhibido por la escuamocina (**80**), la bulatacina (**16**) y la motrilina (**97**) en un 10.4, 73.0, y 73.0 % respectivamente, a la concentración de 200 μM (Figura 58).

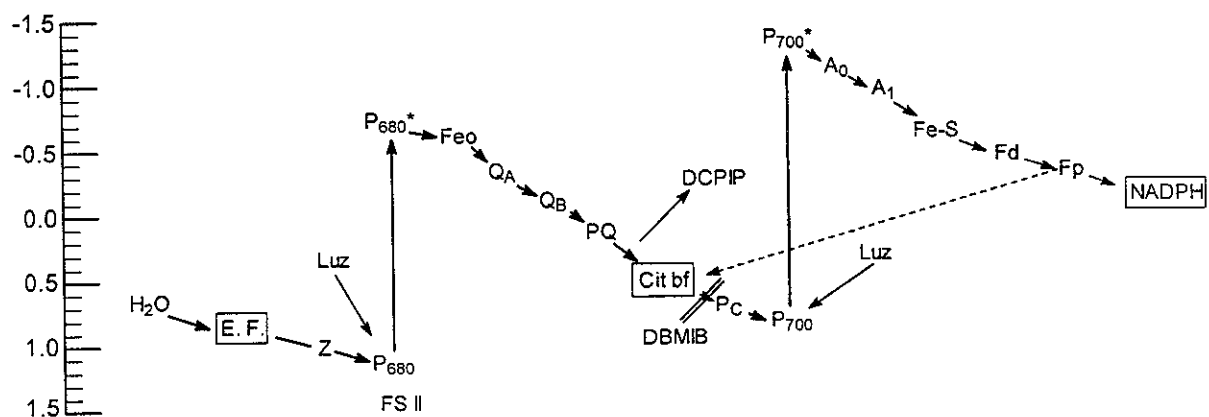


Figura 57. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS II de H_2O a DCPIP.

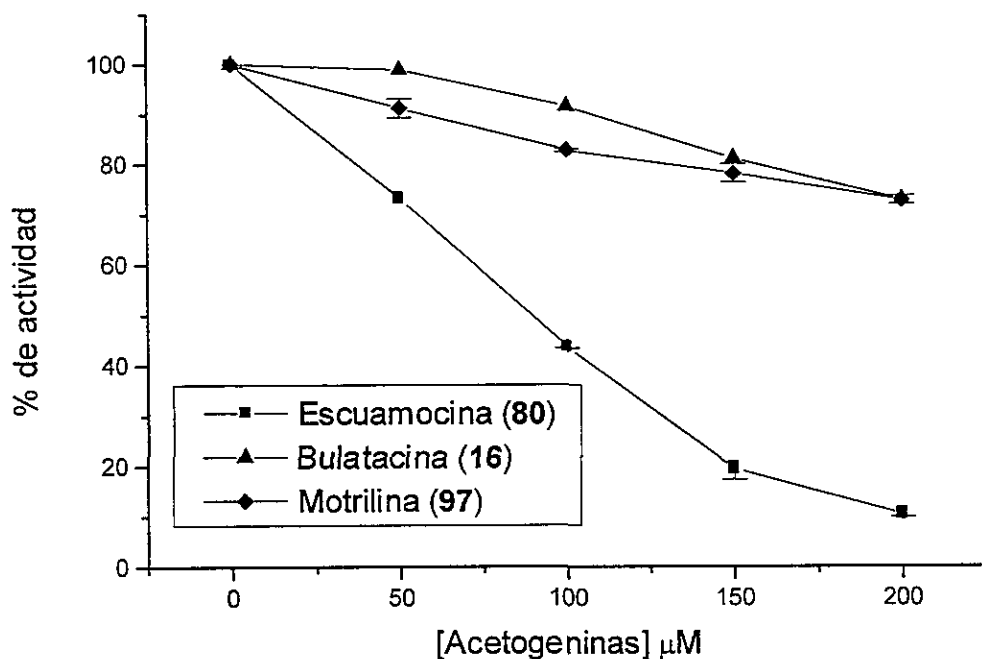


Figura 58. Efecto de las acetogeninas en la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97), 177, 145 y 105 $\mu \text{equiv e}^- / \text{mg clorofila} \cdot \text{h}$, respectivamente.

Posteriormente, se determinó el efecto de las acetogeninas sobre la segunda reacción parcial de H_2O a SiMo (silicomolibdato). De nueva cuenta el agua es el donador natural de electrones y el SiMo actuó como un aceptor artificial de electrones equivalente a FeO. El DCMU, se empleó para inhibir el transporte de electrones hacia el FS I (Figura 59). En este caso, la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) inhibieron en un 30.0, 66.0, y 18.2 % respectivamente, a la concentración de 200 μM (Figura 60).

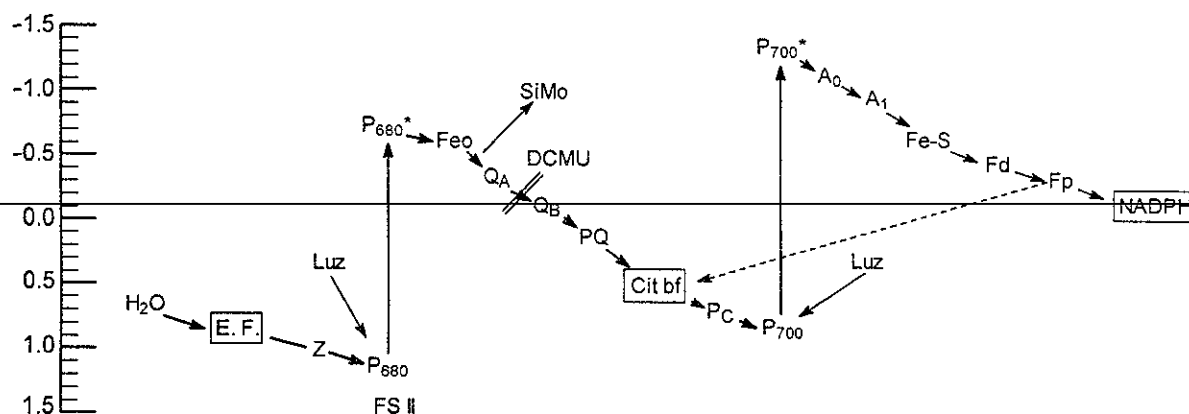


Figura 59. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS II de H_2O a SiMo.

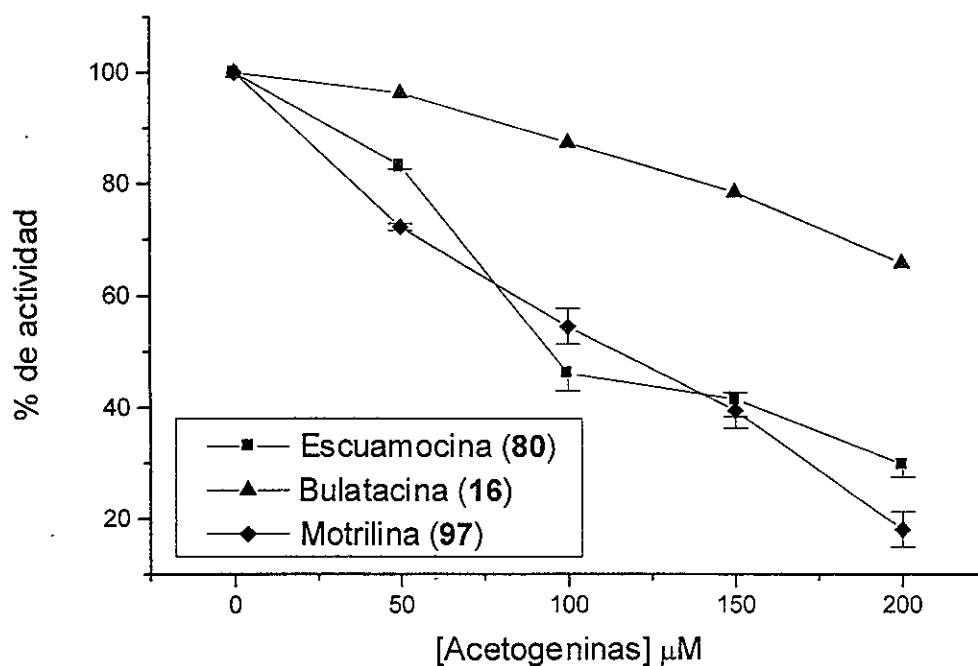


Figura 60. Efecto de las acetogeninas en la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97), 53, 55, y 73 $\mu\text{equiv e}^- / \text{mg clorofila} \cdot \text{h}$, respectivamente.

Por último, se determinó el transporte de electrones en el intervalo de DPC (difenilcarbazida) a DCPIP. En esta última determinación se adiciona al medio de reacción Tris [tris-(hidroximetil)-aminometano] con la finalidad de inhibir a la enzima de la fotólisis del agua (Figura 61). El DPC actuó como un donador artificial de electrones a nivel de P_{680} , y el DCPIP como un aceptor final de electrones. Los compuestos evaluados no mostraron un efecto inhibitorio en esta última reacción parcial (Figura 62), por lo que el sitio de acción se localizó en el complejo de la fotólisis del agua, en el lado donador del fotosistema II.

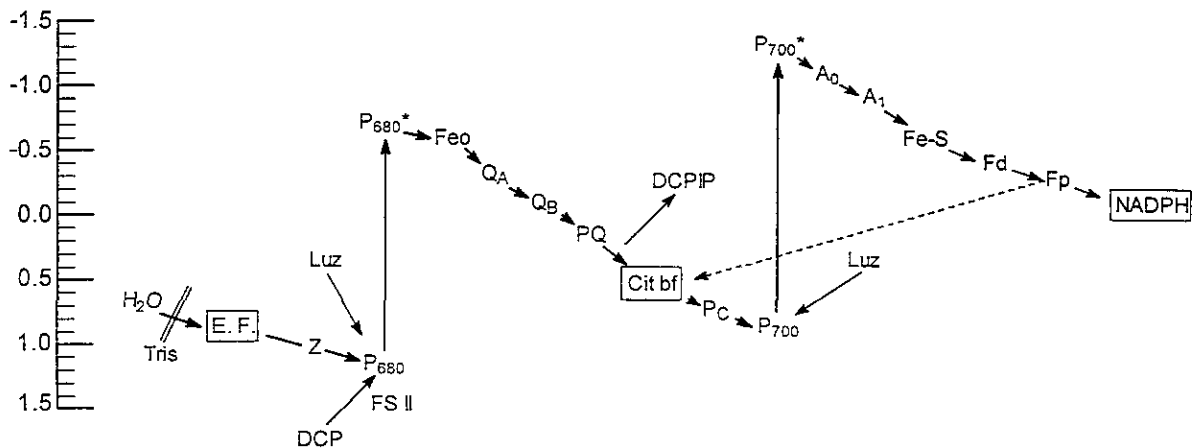


Figura 61. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS II de DCP a DCPIP.

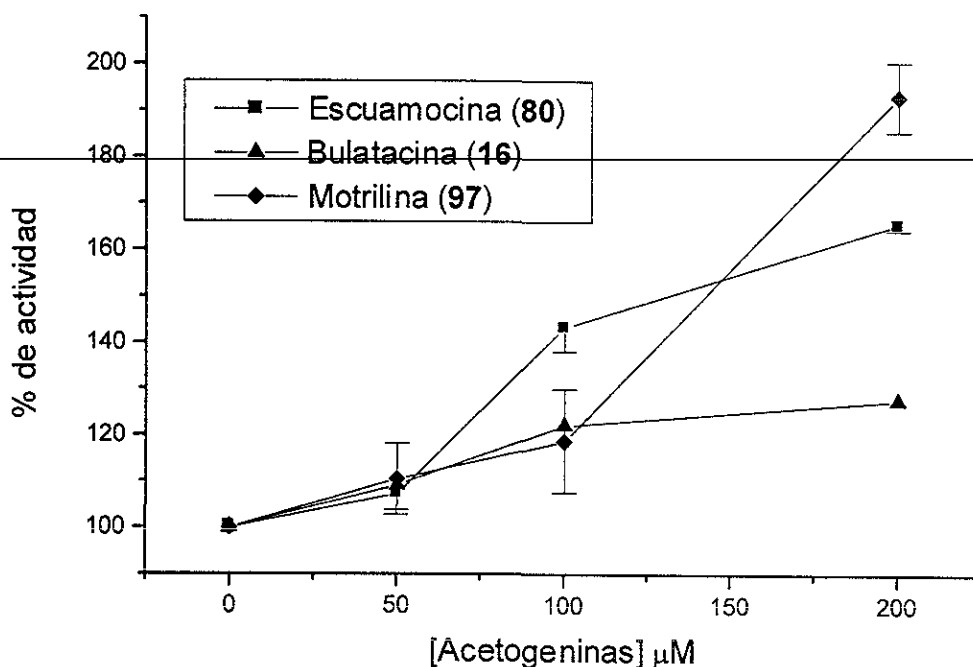


Figura 62. Efecto de las acetogeninas en la velocidad del transporte de electrones en el fotosistema II de $\text{DPC} \rightarrow \text{DCIPIP}$. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97), 215, 357 y 235 $\mu \text{equiv } e^- / \text{mg clorofila} \cdot \text{h}$, respectivamente.

Para confirmar el efecto inhibitorio a nivel de la fotólisis del agua provocado por las acetogeninas escuamocina (80), bulatacina (16) y motrilina (97), se empleó una técnica de fluorimetría (Bolhàr-Nordenkampf y Öquist, 1993). Este procedimiento se basa en que la clorofila *a*, tiene un patrón de fluorescencia variable con una curva de inducción que contiene a las diferentes fases del transporte de electrones del fotosistema II (Figura 63) y, por lo tanto, permite detectar los posibles daños del lado donador o aceptor del fotosistema II (Strasser *et al.*, 1995).

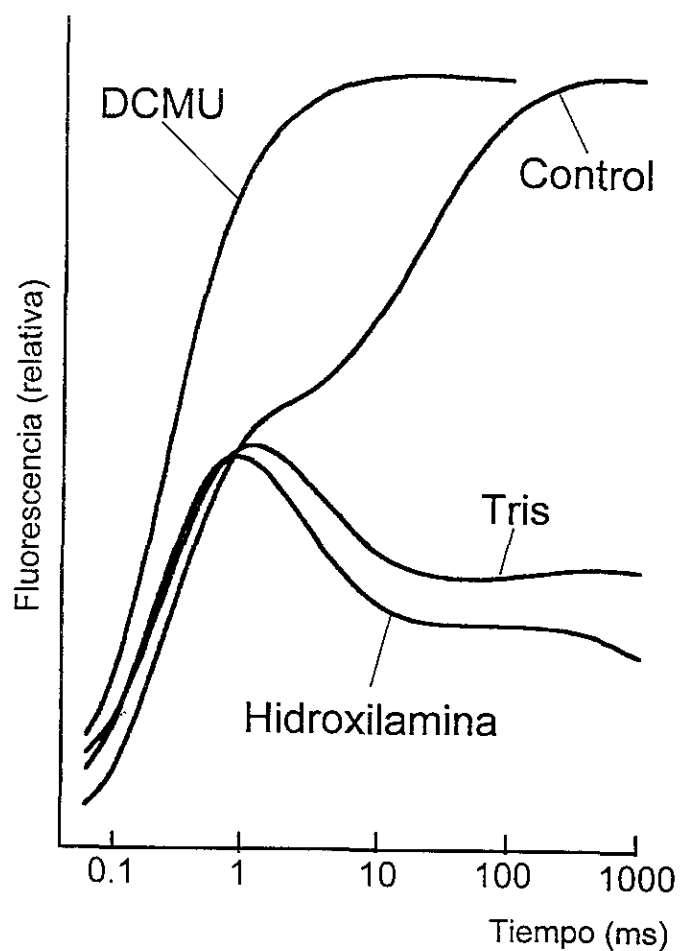


Figura 63. Curva de inducción de la clorofila *a*: a) En cloroplastos intactos, b) En cloroplastos tratados con DCMU, c) En cloroplastos tratados con Tris, y d) En cloroplastos tratados con hidroxilamina.

Las tres acetogeninas evaluadas mostraron curvas de inducción de la fluorescencia de la clorofila *a* similar a la obtenida por tratamiento de los cloroplastos con 0.8 M de tris (un inhibidor clásico de la enzima de la fotólisis del agua) (Figura 64). En consecuencia, se confirma que el blanco de acción como inhibidores de la reacción de Hill de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) se encuentra en el lado donador del FS II, en el complejo enzimático que cataliza la fotólisis del agua.

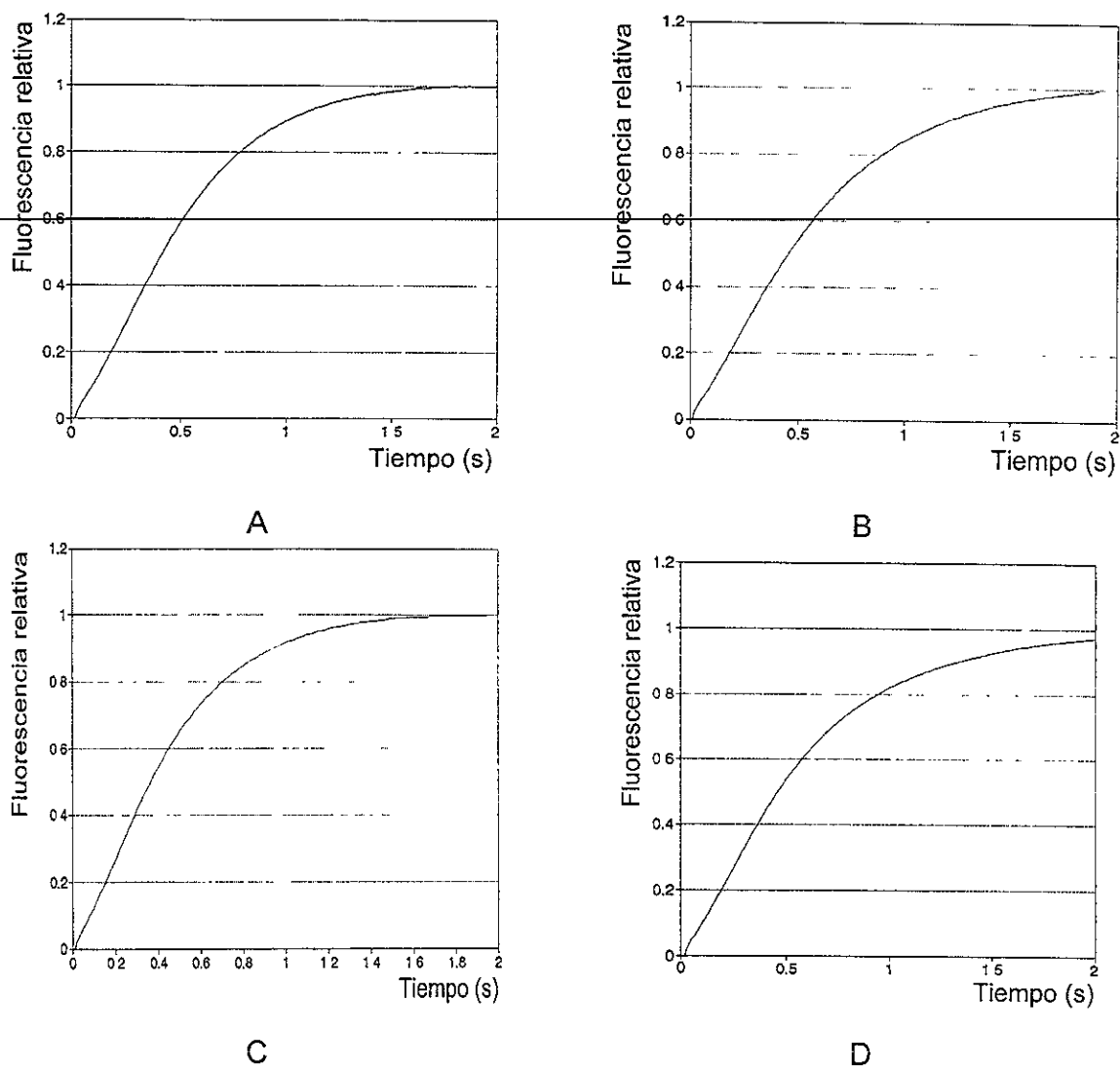


Figura 64. Curvas de inducción de la clorofila *a* para los cloroplastos tratados con: A) Tris (0.8 M), B) Escuamocina (80) (200 μ M), C) Bulatacina (16) (200 μ M), y D) Motrilina (97) (200 μ M).

5.4.4 Efecto de las acetogeninas en la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa.

Con la finalidad de caracterizar la actividad desacoplante de las acetogeninas evaluadas se determinó su efecto sobre la estimulación de la enzima Mg^{2+} -ATPasa. La habilidad de los productos de estimular la actividad de la enzima se mide

indirectamente monitoriando la cantidad de ATP hidrolizada en condiciones de oscuridad.

Los resultados obtenidos para las acetogeninas de prueba (Figura 65) sugieren que al incrementar la concentración de los productos, se induce una estimulación de la actividad de la enzima con respecto al control. La bulatacina (**16**) presenta un efecto estimulante significativo del 137% (200 μM), mientras que la escuamocina (**80**) y la motrilina (**97**) solo la estimulan ligeramente (117 y 107% a 200 μM , respectivamente). Estos resultados confirman que las acetogeninas evaluadas se comportan como agentes desacoplantes.

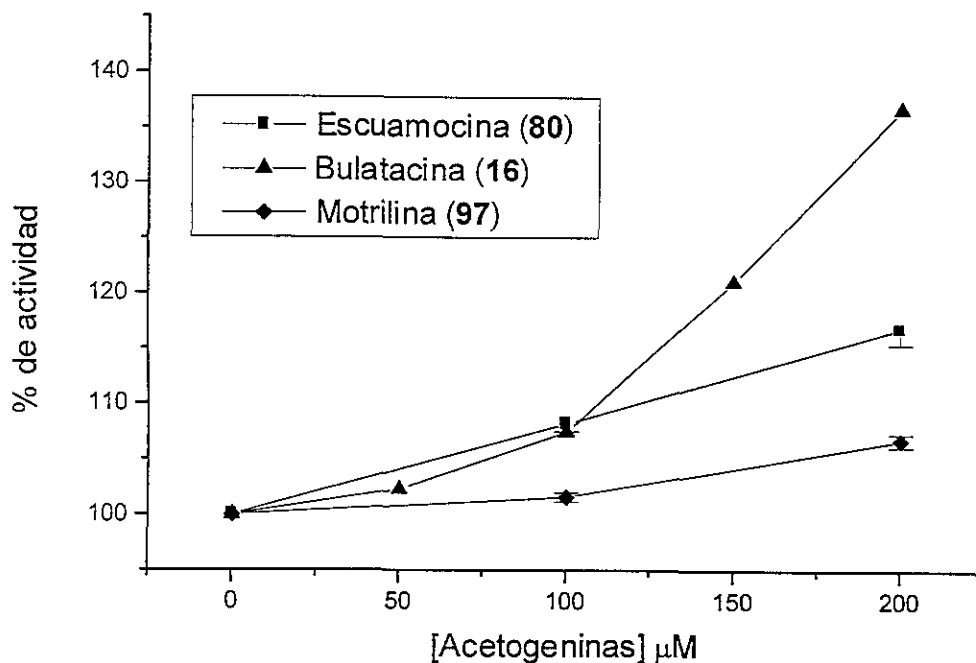


Figura 65. Efecto de las acetogeninas sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (**80**), la bulatacina (**16**) y la motrilina (**97**), 831, 843 y 1,106 μ moles Pi / mg clorofila \cdot h, respectivamente.

VI CONCLUSIONES

1. El estudio químico biodirigido de las semillas de la especie *Annona purpurea* permitió el aislamiento de nueve acetogeninas citotóxicas: la bulatacina (**16**), la escuamocina (**80**), la motrilina (**97**), la xilomatenina (**102**), la anonacina A (**21**), la purpurediolina (**98**), la purpurenina (**99**), la purpuracena (**100**) y la anoglaucina (**101**). Tres de estos productos (**98**, **99** y **100**) presentan estructuras novedosas. La naturaleza de las acetogeninas encontradas en la especie son similares a otras descritos en el género *Annona*. Sin embargo, la purpuracena (**90**) representa la primera acetogenina con cuatro grupos hidroxilos que posee la estereoquímica relativa en la unidad bis-THF adyacentes con hidroxilos en los carbonos vecinos del tipo *treolcis/treolcisleritro*. Debido a posibles variaciones ontogénicas, el extracto derivado de las hojas de *A. purpurea* recolectadas en el Estado de Veracruz, no demostró actividad significativa en el bioensayo de *A. salina*, utilizado para detectar la presencia de acetogeninas tóxicas. Estos resultados contrastan notablemente con los descritos previamente por Hostettmann y colaboradores (Cepleanu *et al.*, 1993), quienes aislaron varias acetogeninas tóxicas para *A. salina* a partir de las hojas de la especie recolectada en Panama. De los compuestos obtenidos en el presente estudio, solo la bulatacina (**16**) fue descrita como metabolito de las hojas, por estos investigadores.
2. El estudio químico biodirigido de las semillas de *R. mucosa* permitió el aislamiento de la jimenezina (**103**), una acetogenina citotóxica con un esqueleto

novedoso. La jimenezina (**103**) constituye la tercera acetogenina que contiene un anillo de THP en su estructura. Cabe destacar que a la fecha, las tres acetogeninas con anillo de THP se han descrito en la especie *R. mucosa*. Indudablemente, el hallazgo de una acetogenina con un esqueleto novedoso constituye un aporte original a la química de este importante grupo de compuestos.

El estudio de *R. mucosa* también permitió la caracterización de ocho amidas novedosas derivadas de la triptamina [N-palmitoiltriptamina (**108**), N-estearoiltriptamina (**109**), N-araquinoiltriptamina (**110**), N-behenoiltriptamina (**111**), N-tricosanoiltriptamina (**112**), N-lignoceroiltriptamina (**105**), N-hienoiltriptamina (**113**) y N-cerotoiltriptamina (**114**)]. Este descubrimiento representa una contribución original al conocimiento de la química de las anonáceas, ya que la presencia de alcaloides del tipo indólico en esta familia de plantas, que se caracteriza por la biosíntesis de alcaloides isoquinolínicos, no tiene precedente.

Al igual que el caso de la *A. purpurea*, debido a posibles variaciones ontogénicas, la especie *R. mucosa* que crece en el territorio nacional biosintetiza acetogeninas distintas a las que se han descrito para la especie recolectada en otras regiones del mundo.

3. En relación a la citotoxicidad de las acetogeninas aisladas en el presente estudio, el nivel de actividad demostrada por las mismas es equiparable a los descritos previamente para compuestos similares. Cabe destacar la selectividad demostrada por la purpurediolina (**98**) y la anoglaucina (**101**) contra la línea

celular de adenocarcinoma de colon ($CE_{50} < 10^{-7}$ $\mu\text{g/mL}$). La comparación de la actividad citotóxica demostrada por la purpuracena (100) y la anoglaucina (101), indica que el cambio de la configuración del cierre de los anillos de THF de *cis* a *trans* se traduce en una diferencia en la selectividad del efecto citotóxico.

Así, la purpuracena (100) con una configuración *treol/cis/treol/cis/eritro* muestra un efecto selectivo sobre las líneas celulares de carcinoma de pulmón (CE_{50} 4.8×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$), de riñón ($CE_{50} < 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$) y adenocarcinoma de próstata ($CE_{50} < 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$). Por otra parte, la anoglaucina (101) con una configuración *treol/trans/treol/trans/eritro* presenta un efecto selectivo contra la línea celular de adenocarcinoma de colon ($CE_{50} < 10^{-7}$ $\mu\text{g/mL}$).

4. El estudio del efecto de las acetogeninas bulatacina (16), escuamocina (80) y motrilina (97) sobre el proceso de fotofosforilación permite comprobar que estos productos también inhiben la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinacas. La evidencia experimental obtenida en la presente investigación permitió establecer que estos compuestos inhiben la síntesis de ATP mediante un mecanismo de desacoplamiento y a través de una interferencia con el transporte de electrones a nivel de la fotólisis del agua en el fotosistema II. Por analogía al efecto demostrado por las acetogeninas sobre membranas liposomales (Shimada *et al.*, 1998), es altamente probable que la actividad desacoplante en los cloroplastos se deba a una perturbación de la membrana de los tilacoides, de tal forma de disipar el gradiente electroquímico de protones necesario para la síntesis de ATP. Sin pretender establecer de manera contundente una relación estructura química-actividad biológica, los resultados

obtenidos en el presente estudio indican que la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-4 [caso de la bulatacina (**16**)] incrementa las propiedades desacoplañtes. Por otro lado, la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-28 [caso de la escuamocina (**80**)] incrementa la potencia como un agente inhibidor de la reacción de Hill.

El grado de actividad de inhibición demostrado por las acetogeninas sobre el proceso de fotofosforilación (medido en términos del efecto inhibitorio sobre la síntesis de ATP) en cloroplastos aislados de hojas de espinacas es menor que el efecto inhibitorio de estos productos sobre la fosforilación oxidativa. Así, la concentración requerida por la bulatacina (**16**) para inhibir en un 50 % (CI_{50}) la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata es de 71 nM (Gu *et al.*, 1995a), en tanto que la CI_{50} calculada en el caso de la fotofosforilación es de 47.2 μ M.

Estos resultados no permiten predecir *a priori* que las acetogeninas de anonáceas carecen de efecto herbicida postemergente, sin embargo, es claro que no afectan de manera considerable el proceso de fotosíntesis, el cual constituye el blanco de acción de la mayoría de los agentes herbicidas postemergentes de uso comercial.

5. Este estudio constituye una aportación adicional al conocimiento de la flora medicinal mexicana y al campo de las acetogeninas de anonáceas.

VII PERSPECTIVAS GENERALES DE LA PRESENTE

INVESTIGACION.

1. Determinar la configuración absoluta de la xilomatenina (**102**) y la anonacina A (**21**), acetogeninas aisladas de *A. purpurea*.
2. Determinar el efecto de acetogeninas selectas sobre la fosforilación oxidativa en mitocondrias vegetales.
3. Comprobar el mecanismo de acción como agentes desacoplantes de las acetogeninas bulatacina (**16**), escuamocina (**80**) y motrilina (**97**) utilizando la técnica de apagamiento de la fluorescencia inducida por la 9-amino acridina y la 9-amino-6-cloro-2-metoxi acridina (Rottenberg y Moreno-Sanchez, 1993).
4. Determinar el potencial insecticida de la jimenezina (**103**)

VIII BIBLIOGRAFIA

- Ahammadsahib, K.I., Hollingworth, R.M., McGovren, J.P, Hui, Y.-H. y McLaughlin, J.L. (1993). Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sciences*, **53**, 1113-1120.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., Suffnes, M. y 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.
- Benz, R. y McLaughlin, M. (1983). *Biophysical Journal*, **41**, 381-398.
- Bolhàr-Nordenkamp H.R. y Öquist, G. (1993). Capítulo 12. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A field and Laboratory Manual*. Eds. Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C. y Long, S.P. Chapman & Hall, London. 193-206.
- Born, L., Lieb, F., Lorentzen, J.P., Moeschler, H., Nonfon, M., Söllner, R. y Wendisch, D. (1990). The relative configuration of acetogenins isolated from *Annona squamosa*: annonin I (squamocin) and annonin VI. *Planta Medica*, **56**, 312-316.
- Boyd, M.R. (1992). The future of new drug development. En: *Current Therapy in Oncology*. Ed. Neiderhuber, J.E. Philadelphia, B.C. Decker, Inc., 11-22.
- Caetano, L.C., Dadoun, H. (1987). Pallidine and aporphinoid alkaloids from *Rollinia mucosa*. *Journal of Natural Products*, **50**, 330.

- Calabresi, P. y Parks, A.C. (1990). Capitulo 52. Antineoplastic agents. En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds. Goodman, A., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. Pergamon Press, McMillan Publishing company, New York, 8a. Edición. 1209-1293.
- Calera, M.R., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. y Anaya, A.L. (1995). Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplast: structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2966-2969.
- Carter, S.K. y Kershner, L.M. (1975). What you should know about cancer vs. drugs. *Pharmacy Times*, August, 50-66.
- Castañeda, P., Mata, R. y Lotina-Hennsen, B. (1988). Effect of encealin, euparin and demethylencecalin on thylacoid transport and photophosporylation in spinach chloroplast. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **78**, 102-108.
- Cavé, A., Cortes, D., Figadère, B., Hocquemiller, R., Laprèvote, O., Laurens, A. y Leboeuf, M. (1993). Capitulo 8. Recent advances in the acetogenins of Annonaceae. En: *Recent Advances In Phytochemistry*; Eds. Downum, K.R., Romeo, J.T. y Stafford, H.A. Plenum Press: New York, **27**, 167-202.
- Cavé, A., Figadère, B., Laurens, A. y Cortes, D. (1997). Acetogenins from Annonaceae. En: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Eds. Herz, W., Kirby, G.W., Moore, R.E., Steglich, W. y Tamm, C. Springer-Verlag, Wien., 81-290
- Cepleanu, F., Ohtani, K., Hamburger, M., Gupta, M.P. Solis. P. y Hostettmann, K. (1993). Novel acetogenins from the leaves of *Annona purpurea*. *Helvetica Chimica Acta*, **76**, 1379-1388.

- Chávez, M.H. y Roque, N.F. (1997). Acetogenins from *Porcelia macrocarpa*: stereochemical determination of 2-alkyl-3-hydroxy-4-methyl γ -lactones by ^{13}C NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, **44**, 523-528.
- Chen Y.-Y., Chang, F.-R. y Wu, Y.-C. (1996a). Isoquinoline alkaloids from *Rollinia mucosa*. *Journal of Natural Products*, **59**, 904-906.
- Chen, Y.-Y., Chang, F.-R., Yen, H.-F., Wu, Y.-C. (1996b). Epomusenins A and B, two acetogenins from fruits of *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, **42**, 1081-1083.
- Colman-Saizarbitoria, T., Gu, Z.-M. y McLaughlin, J.L. (1994b). Two new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the Bark of *Xylopia aromatica*. *Journal of Natural Products*. **57**, 1661-1669.
- Colman-Saizarbitoria, T., Zambrano, T., Ferrigni, N.R. Gu,Z.-M. Ng, J.H., Smith, D.L. y McLaughlin, J.L. (1994a). Bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica*. *Journal of Natural Products*, **57**, 486-593.
- Cortes, D., Figadère, B., Cavé A. (1993). Bis-tetrahydrofuran acetogenins from Annonaceae. *Phytochemistry*, **32**, 1467-1473.
- Cortes, D., Myint, S.H. y Hocquemiller, R. (1991). Molvizarin and Motrilin: Two novel cytotoxic bis-tetrahydrofuranic γ -lactone acetogenins from *Annona cherimolia*. *Tetrahedron*, **47**, 8195-8202.
- Cox, P.A. y Balick, M.J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, June, 82-87.

- Dale J.A. y Mosher H.S. (1973). Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlation *via* nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters. *Journal of the American Chemical Society*, **95**, 512-519.
- De Quiroz-Paulo, M., Kaplan, M.A.C., Lapr votte, O., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cav , A. (1991). Lignans and other non-alkaloidal constituents from *Rollinia mucosa*. *Fitoterapia*, **LXII**, 150-152.
- Dewick, P.M. (1991). Capitulo 32. Plantas con inhibidores de tumores. En: Trease y Evans, Farmacognosia. Ed. W.C. Evans. Interamericana Mc Graw-Hill, 13a. Edición., 692-713.
- Dilley, R.A. (1972). Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena). *Methods in Enzymology*, **24**, 68-74.
- Dourous, J.D. (1976). Lower plants as a source of anticancer drugs. *Cancer Treatment Report*, **60**, 1069-1080.
- Duret, P., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cortes, D. y Cav , A. (1994). Isoacetogenins, artifacts issued from translactonization from annonaceous acetogenins. *Heterocycles*, **39**, 741-749.
- Etcheverry, S., Sahpaz, S., Fall, D., Laurens, A. y Cav , A. (1995). Annoglucin, an acetogenin from *Annona glauca*. *Phytochemistry*, **38**, 1423-1426.
- Etse, J.T. y Waterman, P.G. (1986). Alkaloids and an acetylenic lactone from the stem bark of *Sapranthus palanga*. *Phytochemistry*, **25**, 1903-1905.

- Fang, X.-P., Rieser, M.J., Gu, Z.-M., Zhao G.-X., y McLaughlin, J.L. (1993). Annonaceous acetogenins: an updated review. *Phytochemical Analysis*, **4**, 27-67.
- Farnsworth N.R. y Warner, H. (1990). Economic and medicinal plant research. **4**, 38-56.
- Folkman, J. (1997). Capitulo 11. Fighting cancer by attacking Its blood supply. En: *What you Need to Know About Cancer*. Scientific American a special issue. W.H. Freeman and Company, New York, 123-128.
- Giaquinta, R.T. y Dilley, R.A. (1974). A partial reaction in FS II: Reaction of silicomolibdate prior to the site of dichlorophenyldimethylurea inhibition. *Biochemical and Biophysical Acta*, **37**, 288-305.
- Gromet-Elhaman Z. y Auron M. (1963). *Biochemical and Biophysical Acta Research Communication*, **10**, 215-218.
- Gu, Z.-M.-. Zhou, D., Lewis, 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **5**, 1911-1916
- Gu, Z.-M., Fang, X.-P., Zeng, L., Song, R., Ng, J.H., Wood K.V. Smith, D.L. y McLaughlin, J.L. (1994). Gonionenin: a new cytotoxic annonaceous acetogenins from *Goniothalamus giaganteus* and the conversion of mono-THF acetogenins to bis-THF acetogenins. *Journal of Organic Chemistry*, **59**, 3472-3479.
- Gu, Z.-M., Zeng, L., Schwedler, J.T., Wood K.V. y McLaughlin, J.L. (1995b). New bioactive adjacent bis-THF annonaceous acetogenins from *Annona bullata*. *Phytochemistry*, **40**, 467-477.

- Gu, Z.-M., Zhao, G.-X., Oberlies, N.H., Zeng L. y McLaughlin, J.L. (1995a). Capitulo 11, Annonaceous acetogenins. Potent mitochondrial inhibitors with diverse applications. En: *Recent Advances In Phytochemistry*. Eds. Arnason, J.T., Mata, R., Romeo, J.T., Eds.; Plenum Press: New York, 249-310.
- Hamburger M. y Hostettmann, K. (1991). Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30**, 3864-3874.
- He, K., Shi, G., Zhao, G.-X., Zeng, L., Ye, Q., Schwedler, J.T., Wood K.V. y McLaughlin, J.L. (1996). Three new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins with four hydroxyl groups from *Asimina triloba*. *Journal of Natural Products*, **59**, 1029-1034.
- He, K., Zeng, L., Ye, Q., Shi, G., Oberlies, N.H., Zhao, G.-X., Njoku, C.J. y McLaughlin, J.L. (1997). Comparative SAR evaluations of annonaceous acetogenins for pesticidal activity. *Pesticide Science*, **49**, 372-378.
- Hellman, S y Vokes, E.E. (1997). Capitulo 8. Advancing current treatments for cancer. En: *What you Need to Know About Cancer*. Scientific American a special issue. W.H. Freeman and Company, New York, 77-84.
- Hopp, D.C., Zeng, L., Gu, Z.-M. y McLaughlin, J.L. (1996). Squamotacin: An annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). *Journal of Natural Products*, **59**, 97-99.
- Hoye, T.R., Hanson, P.R., Hasenwikel, L.E., Ramirez, E.A. y Zhuang, Z. (1994). Stereostructural studies on the 4-hydroxylated annonaceous acetogenins: A novel use of Mosher ester data determining relative configuration [between C(4) and C(36)]. *Tetrahedron letters*, **35**, 8529-8532.

- Hui, Y.-H., Rupprecht, J.K, Anderson, J.E., Liu, Y.-M., Smith, D.L., Chang, L.-J. y McLaughlin, J.L. (1989a). Bullatalicin, a novel bioactive acetogenin from *Annona bullata*. *Tetrahedron*, **45**, 6941-6848.
- Hui, Y.-H., Rupprecht, J.K., Liu, Y.M., Anderson, J.E., Smith, D.L., Chang, C.-J. y McLaughlin, J.L. (1989b). Bullatacin and Bullatacinone: Two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. *Journal of Natural Products*, **52**, 463-477.
- Izawa, S. (1977). Inhibitors of electron transport. *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*. Eds. Trebs, A. y Avron, M. Springer-Verlag. New York, **5**, 226-282.
- Izawa, S. y Good, N.E. (1972). Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Methods in Enzymology*, **24**, 355-359.
- Jolad S.D., Hoffmann, J.J., Cole, J.R., Barry III, C.E., Bates, R.B., Linz, G.S., Konig, W.A. (1985). Desacetyluvaricin from *Uvaria accuminata*, configuration of uvaricin at C-36. *Journal of Natural Products*, **48**, 644-645.
- Jolad S.D., Hoffmann, J.J., Shram, J.R., Cole, J.R., Tempesta, M.S., Kriek, G.R., y Bates, R.B. (1982). Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, **47**, 3151-3153.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B. y Mukherjee, R. (1982). The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21**, 2783-2813.
- Lieb, F., Nonfon, M., Wachendorff-Neumann, U. y Wendisch, D. (1990). Annonacins and annonastatin from *Annona squamosa*. *Planta Medica*, **56**, 317-319.

- Maas, P.J.M., Westra, L.Y Th. y colaboradores. (1992). En: *Flora Neotropica. Rollinia*. The New York Botanical Garden, New York, Monograph 57, 41-66 y 127-132.

- Martinez, M., (1989). *Las Plantas Medicinales de México*, 6a Edición. Editorial Botas, México, D.F., 481.
- McCarty, R.E. (1977). Energy tranfer inhibitors of photophosphorylation in chloroplasts. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, **5**, 436-447.
- McLaughlin, J.L., Zeng, L., Oberlies, N.H., Alfonso, D., Johnson, H.A. y Cummings, B.A. (1997). Capitulo 9. Annonaceous acetogenins as new natural pesticides: Recent progress. En: *Phytochemicals for Pest Control*. Eds. Hedin, P.A., Hollingworth, R.M., Masler, E.P., Miyamote, J. y Thompson, D.G. American Chemical Society, Washington, D.C., 117-133.
- Meyer, B.M., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols D.E. y McLaughlin, J.L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, **45**, 31-34.
- Mills, J.D., Mitchel, P. y Schurmann, P. (1980). Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Letters*, **112**, 173-177.
- Mitchel, P. (1977). A comentary an alternative hypothesis of protonic coupling in the membrane system catalisis oxidative and photosynthetic phosphorylation. *FEBS Letters*, **78**, 1-20.
- Moreland, D.E. (1980). Mechanism of action of herbicides. *Annual Review Plant Physiology*, **31**, 597-638.

- Morr , D.J., de Cabo, R., Farley, C., Oberlies, N.H., y McLaughlin, 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. Ed. Curtis F. Dowling. Media incorporated, Greensboro. N.C. 85-90.
- Nishioka, S., Araya, H., Murasaki, C., Sahai, M. y Fujimoto, Y. (1994). Determination of absolute stereochemistry at carbinol stereocenters of tetrahydrofuranic acetogenins by the advanced Mosher ester method. *Natural Product Letters*, **5**, 117-121.
- Oberlies, N.H., Croy, V.L., Harrison, M.L. y McLaughlin, J.L. (1997). The annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Letters*, **115**, 73-79.
- Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y. y Kakisawa, H. (1991). High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configuration of marine terpenoids. *Journal of the American Chemical Society*, **113**, 4092-4096.
- Old, L.J. (1997). Capitulo 9. Immunotherapy for Cancer. En: *What you Need to Know About Cancer*. Scientific American a special issue. W.H. Freeman and Company, New York, 101-111
- Ort, D.R. (1986). Energy transduction in oxygenic photosynthesis: an overview of structure and mechanism. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, Eds. Staehelin, L.A. y Arnzter, C.J. **19**, 143-196.

- Peña-Valdivia, C.B., Rodriguez-Flores, L., Tuena de Gómez-Puyou M. y Lotina-Hennsen, B. (1991). Inhibition of photophosphorylation and electron transport by N,N-dimethylformamide. *Biophysic Chemical*, **41**, 169-174.
- ~~Pettit, G.R., Cragg, G.M., Polonski, J., Herald, D.L., Goswami, A., Smith, C.R., Moretti, C., Schmidt, J.M., Eisleder, D. (1987). Isolation and structure of rolliniastatin 1 from the South American tree *Rollinia mucosa*. *Canadian Journal of Chemistry*, **65**, 1433-1435.~~
- Pettit, G.R., Riesen, R., Leet, J.E., Polonski, J., Smith, C.R., Schmidt, J.M., Dufresne, C., Schaufelberg D., Moretti, C. (1989). Isolation and structure of rolliniastatin 2: a new cell growth inhibitory acetogenin from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles*, **28**, 213-217.
- Prance, G.T. (1994). Ethnobotany and the search for new drugs. Ciba Foundation Symposium 185. Eds. John Wiley and sons. New York.
- Riemer, B., Hofer, O. y Greger, H. (1997). Tryptamine derived amides from *Clausena indica*. *Phytochemistry*, **45**, 337-341.
- Rieser, M.J., Hui, Y.-H., Rupprecht, J.K., Kozlowski, J.F., Wood, K.V., McLaughlin, J.L., Hanson, P.R., Zhuang, Z. y Hoye, T.R. (1992). Determination of absolute configurations of stereogenic carbinol centers in annonaceous acetogenins by ^1H - and ^{19}F -NMR analysis of Mosher ester derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, **114**, 10203-10213.
- Rottenbergl, H. y Moreno-Sanchez, R. (1993). The proton pumping activity of H^+ -ATPase: an improved fuorescence assay. *Biochimical and Biophysical Acta*, **1183**, 161-170.

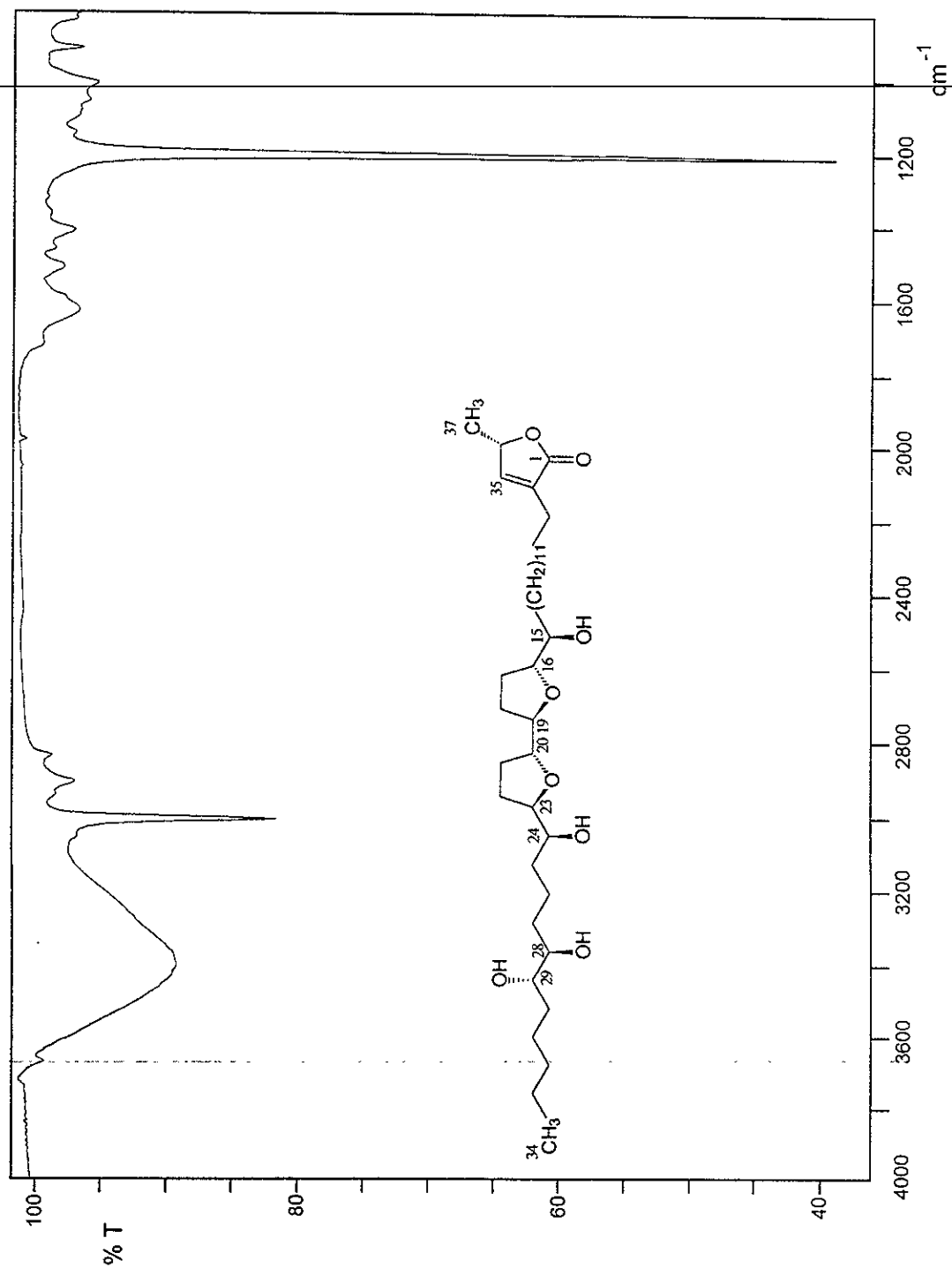
- Rupprecht, J.K., Hui, Y.-H. y McLaughlin, J.L. (1990). Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products*, **53**, 237-278.
- Sahai, M., Singh, S., Singh, M., Gupta, Y.K., Akashi, S., Yuji, R., Hirayama, K., Asaki, H., Araya, H., Hara, N., Eguchi, T., Kakinuma, K. y Fujimoto, Y. (1994). Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Adjacent bis-tetrahydrofuranic acetogenins. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **42**, 1164-1174.
- Seibl, J. (1973). Espectrometría de masas. Editorial Alhambra, Madrid, España.
- Shaw, I.C. y Jones, H.B. (1994). Mechanism of non-genotoxic carcinogenesis. *TIPS*, **15**, 89-93.
- Shi, G., Alfonso, D., Fatope, M.O., Zeng, L., Gu, Z.-M., Zhao, G.X., He, K., MacDougal, J.M., McLaughlin, J.L. (1995b). Muconin: a new annonaceous acetogenin bearing a tetrahydropiran ring. *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 10409-10410.
- Shi, G., He, K., Liu, X., Ye, Q., MacDougal, J.M., McLaughlin, J.L. (1997a). 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 Products Letters*, **10**, 125-132.
- Shi, G., He, Shi, G., Zeng, L., He, K., Ye, Q., Gu, Z.-M, MacDougal, J. M., and McLaughlin, J.L. (1996c). Applying Mosher method to acetogenins bearing vicinal diols. The absolute configuration of muricatetrocin C and Rollidecins A and B, new bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **4**, 1281-1286.

- Shi, G., Kozlowski, J.F., Schwedler, J.T., Wood, K.V., MacDougal, J.M., McLaughlin, J.L. (1996a). Muconin and Mucoxin; Additional non classical bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Journal of Organic Chemistry*, **61**, 7988-7989.
- Shi, G., MacDougal, J.M., McLaughlin, J.L. (1997b). Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, **45**, 719-723.
- Shi, G., Ye, Q., He, K., McLaughlin, J.L. (1996b). Rollinecins A and B: Two new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Journal of Natural Products*, **59**, 548-551.
- Shi, G., Zeng, L., Gu, Z.-M., MacDougal, J.M., McLaughlin, J.L. (1995a). Absolute stereochemistries of sylvaticin and 13,15-cis-sylvaticin, bioactive C-20, 23-cis non-adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin, from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles*, **41**, 1785-1796.
- Shimada, H., Grutzner, J.B., Kozlowski, J.F. y McLaughlin, J.L. (1998). Membrane conformations and their relation to cytotoxicity of asimicin and its analogues. *Biochemistry*, **37**, 854-866.
- Shu, Y.-Z. (1998). Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, **61**, 1053-1071.
- Sonnet, P.E. y Jacobson, M. (1971). Tumor inhibitors II: Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **60**, 1254-1256.
- Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography. Academic Press Inc., New York.

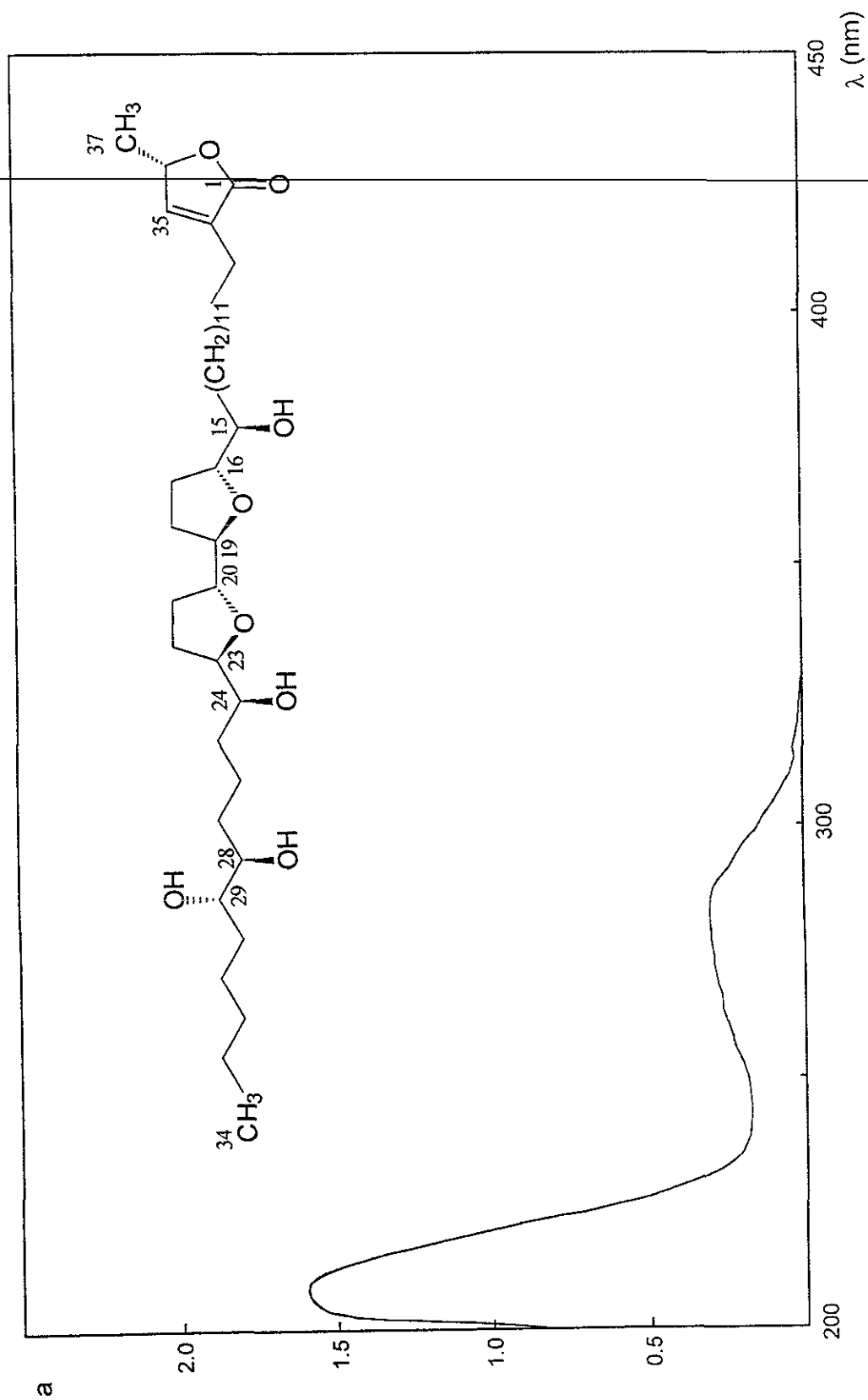
- Strain, H.H., Coppe, B.T. y Svec, W. (1971). Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophyll. *Methods Enzimology*, **24**, 452-476.
- Strasser R.J., Srivastava, A. y Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, **61**, 32-44.
- Sumner, J.B. (1974). Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science*, **100**, 413-415.
- Trebs, A. (1972). Measurement of Hill reactions and photoreduction. *Methods in Enzimology*, **24**, 146-165.
- Trichopoulos, D, Li, F.P and Hunter, D.J. (1997). Capitulo 4. What causes cancer. En *What you Need to Know About Cancer*. Scientific American a special issue. W.H. Freeman and Company, New York, 25-36.
- Vernon, L.P. y Shaw, E.R. (1969). Photoreduction of 2,6-dichlorophenol-indofhenol by diphenilcarbazine: a photosystem II Z reaction catalyzed by tris-washed chloroplast and subchloroplast fragments. *Plant Physiology*, **44**, 1645-1649.
- Weinberg, R. A. (1997). Capitulo 1. How cancer arises. En *What you Need to Know About Cancer*. Scientific American a special issue. W.H. Freeman and Company, New York, 3-14.
- Wiseman, H. (1994). Tamoxifen: new membrane mediated mechanism of action and therapeutic advances. *TIPS*, **15**, 83-89.

- Wu, F.-E., Gu, Z.-M., Zeng, L., Zhao, G.-X., Zhang Y. y McLaughlin J.L. (1995b). Two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, annomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, **58**, 830-836.
- Wu, F.-E., Zeng, L., Gu, Z.-M., Zhao, G.-X., Zhang, Y., Shwedler, J.T. y McLaughlin, J.L. (1995a). Muricatocins A and B, two new bioactive monothetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, **58**, 902-908.
- Yu, J.-G., Hu, X.E., Ho, D.K., Bean, M.F., Stephens, R.E. y Cassady, J.M. (1994). Absolute stereochemistry of (+)-gigantecin from *Annona coriacea* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, **59**, 1598-1599.
- Zafra-Polo, M.C., Figadère, B., Gallardo, T., Tormo, J.R. y Cortes, D. (1998). Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanism of action. *Phytochemistry*, **48**, 1087-1117.
- Zafra-Polo, M.C., González, M.C., Estornell, E., Sahpaz, S. y 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. y McLaughlin, J.L. (1996). Recent advances in annonaceous acetogenins. *Natural Product Reports*, **13**, 275-306.

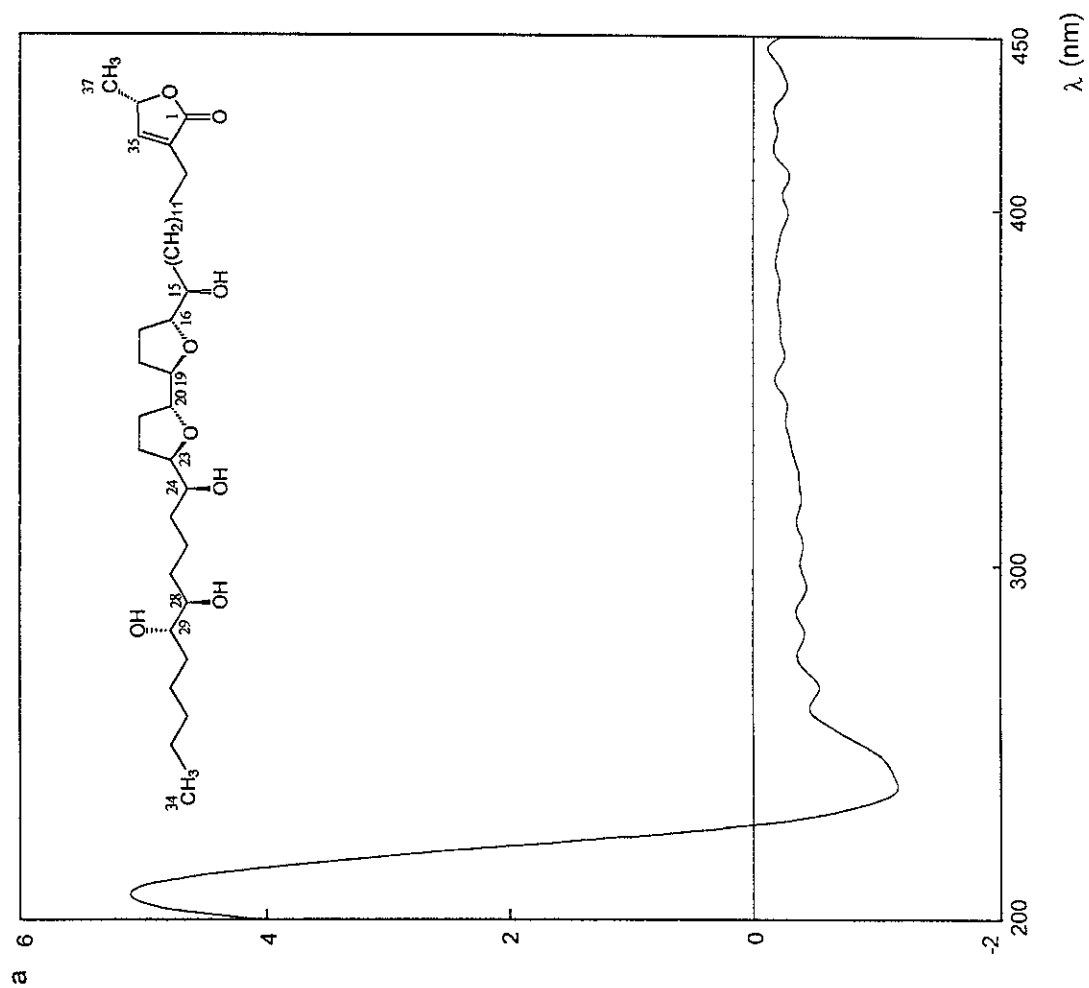
- Zhao, G.-X., Chao, J.-F., Rieser M.J. y McLaughlin, J.L. (1996). The absolute configuration of adjacent bis-THF acetogenins and asiminocin, a novel highly potent asimicin isomer from *Asimina triloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **4**, 25-32.
- Zhao, G.-X., Ng, J.H., Kozłowski, J.F., Smith, D.L. y McLaughlin, J.L. (1995). Bullatin and bullanin: two novel highly cytotoxic acetogenins from *Asimina triloba*. *Heterocycles*, **38**, 1897-1908.
- Zhou, G.-X., Chen, R.-Y., Zhou, L.-E. y Yu, D.-Q. (1998). Calamistrin A and B, two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Uvaria calamistrata*. *Journal of Natural Products*, en prensa.



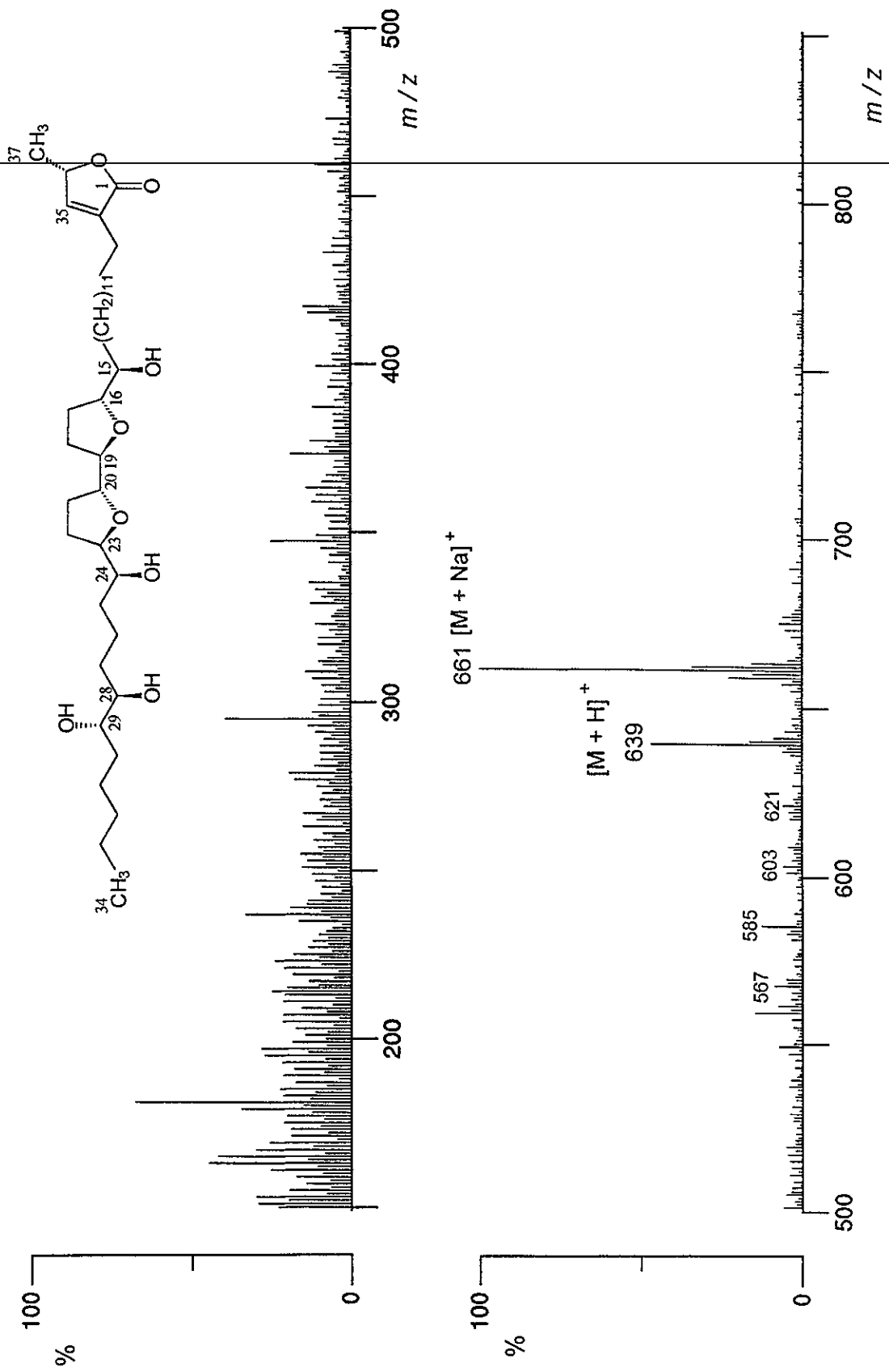
Espectro 1. Espectro en el IR de la purpurediolona (98).



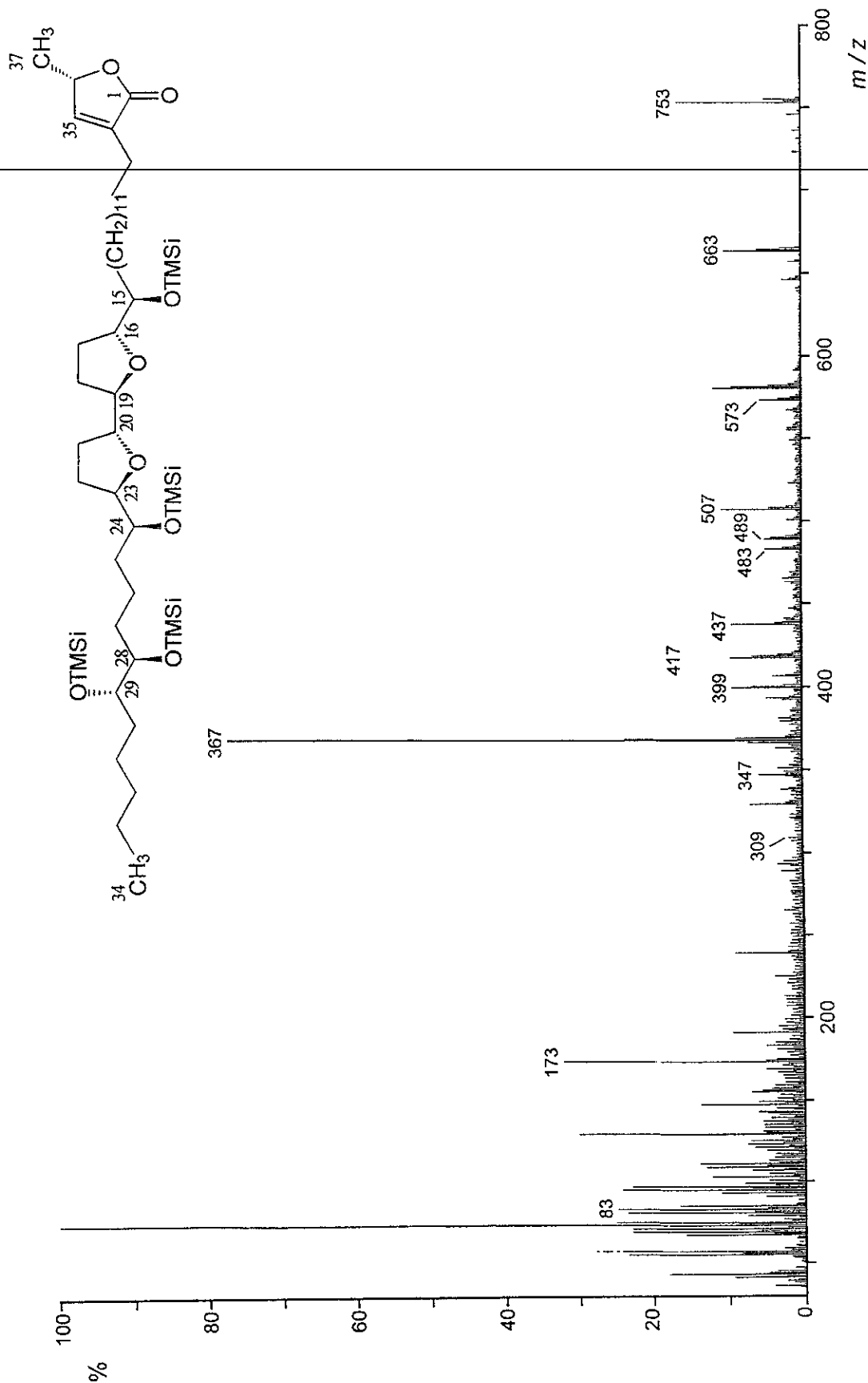
Espectro 2. Espectro en el UV de la purpurediolina (98).



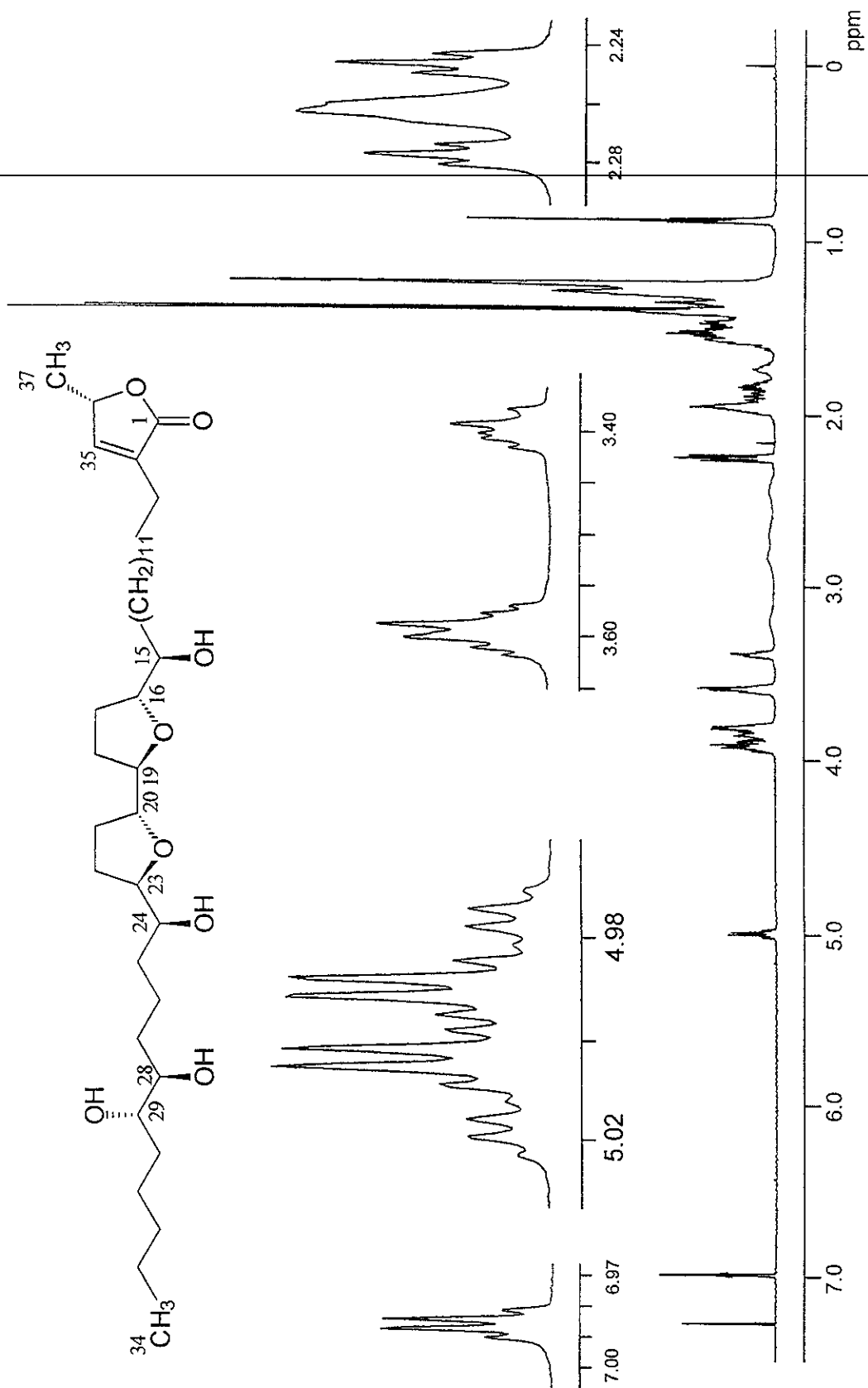
Espectro 3. Espectro de DC de la purpurediolina (98).



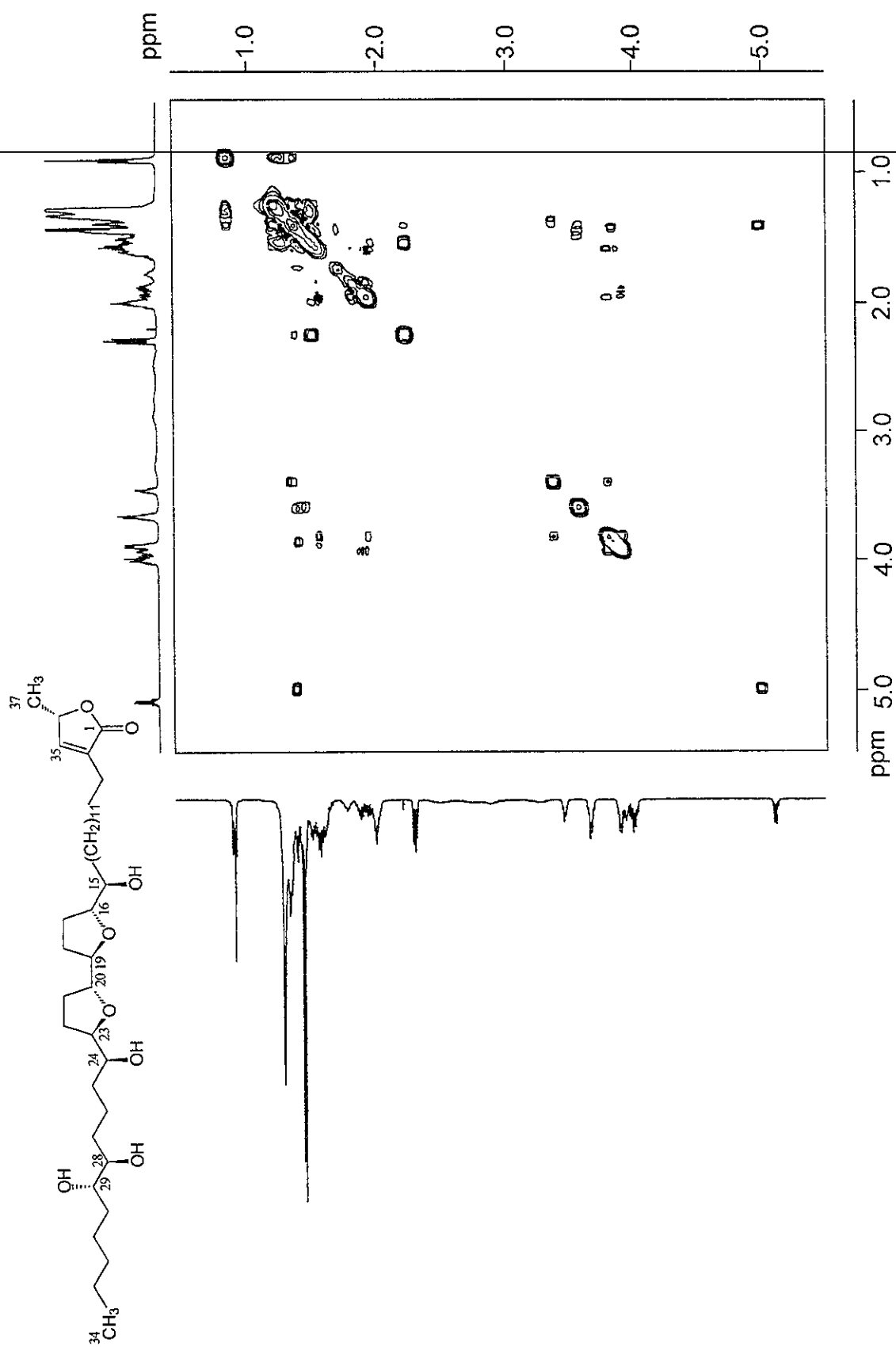
Espectro 4. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la purpurediolina (98).

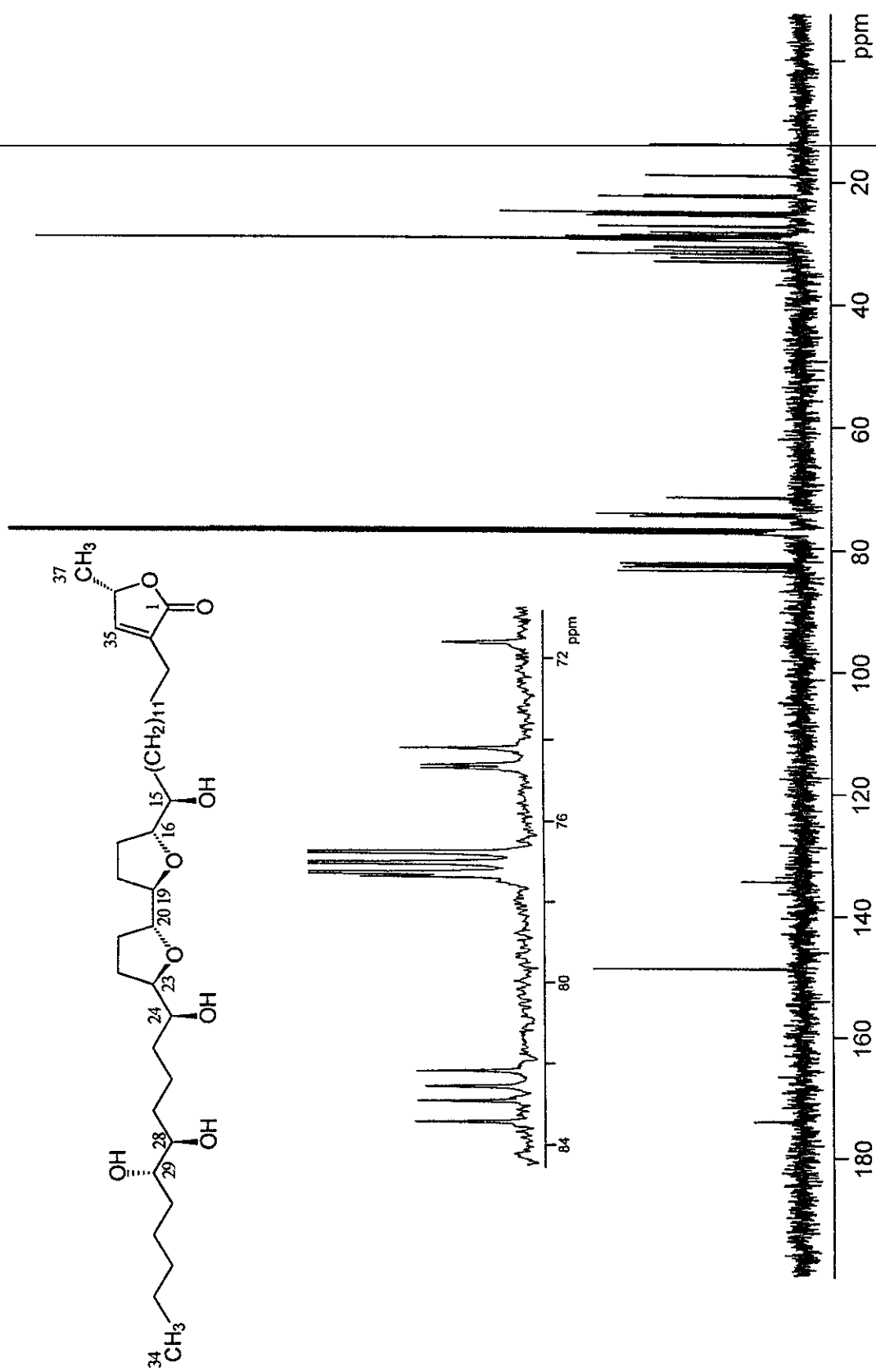


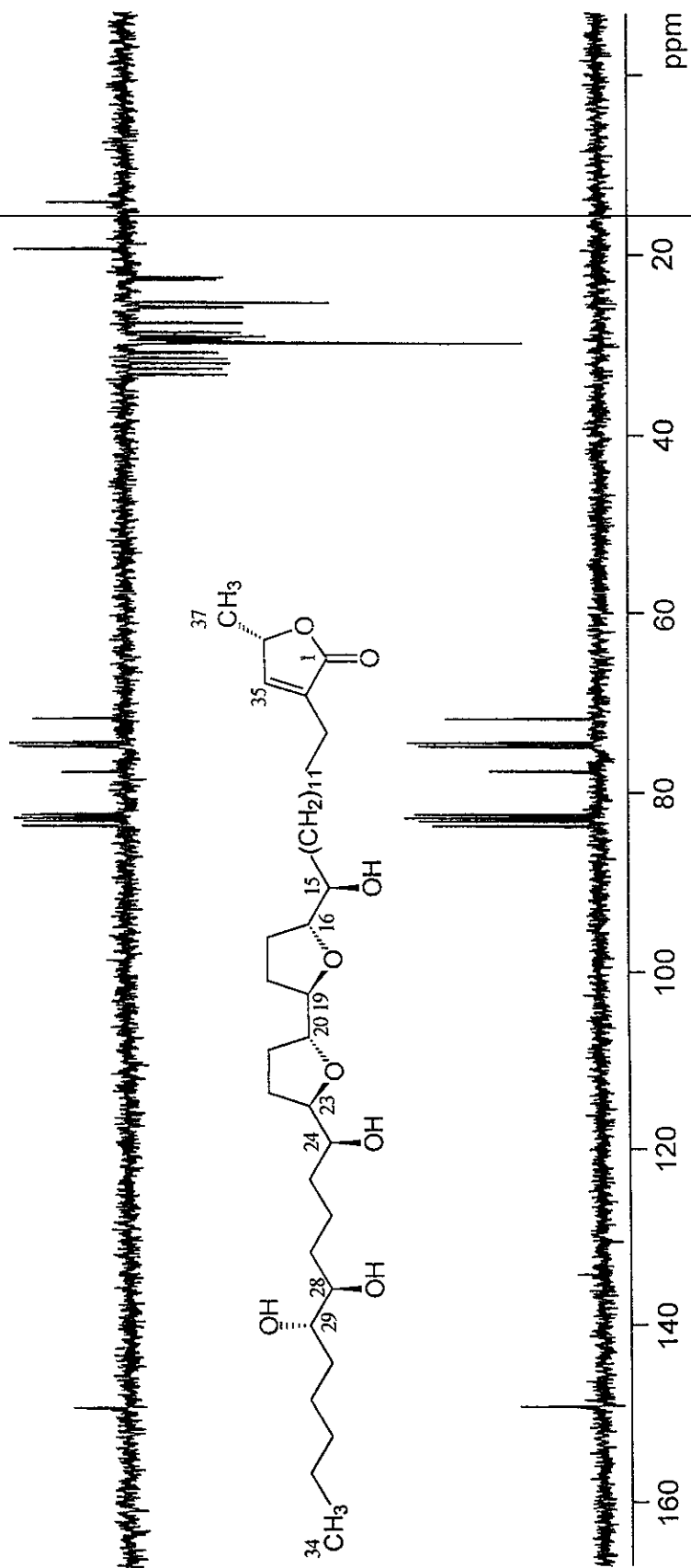
Espectro 5. Espectro de masas modalidad IE del derivado siliado de la purpuredioina (98a).

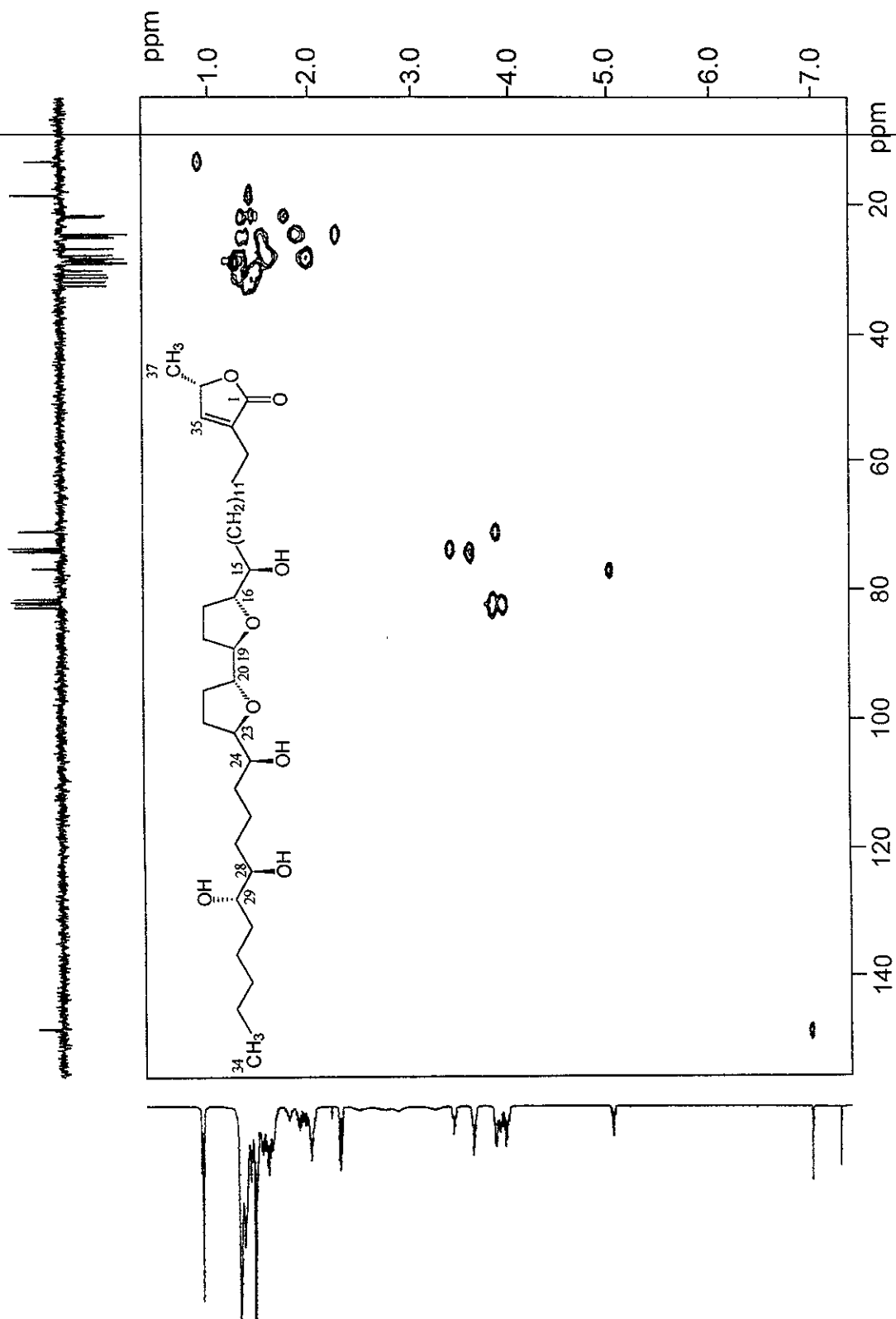


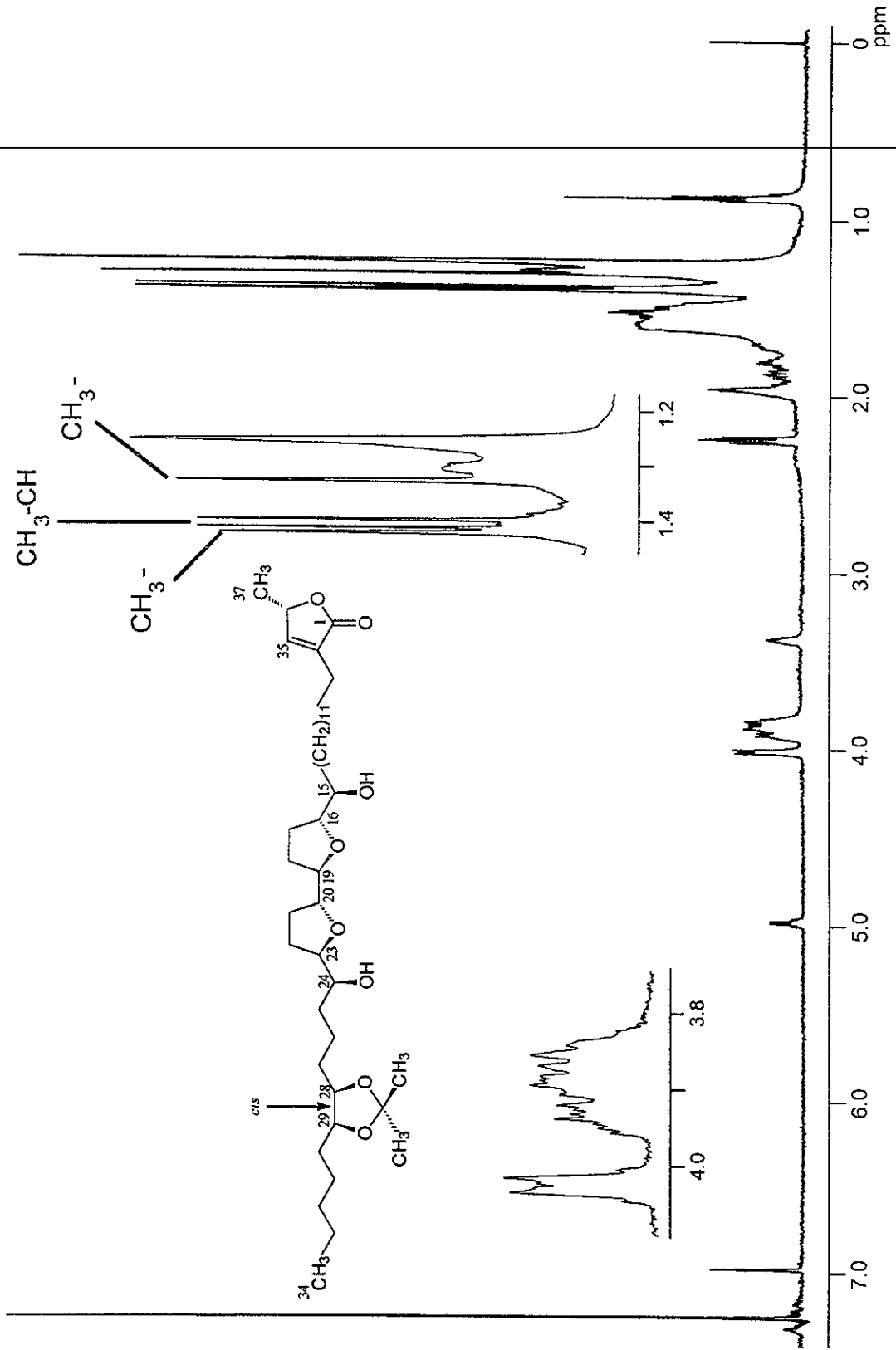
Espectro 6. Espectro de RMN ¹H de la purpurediolina (98).

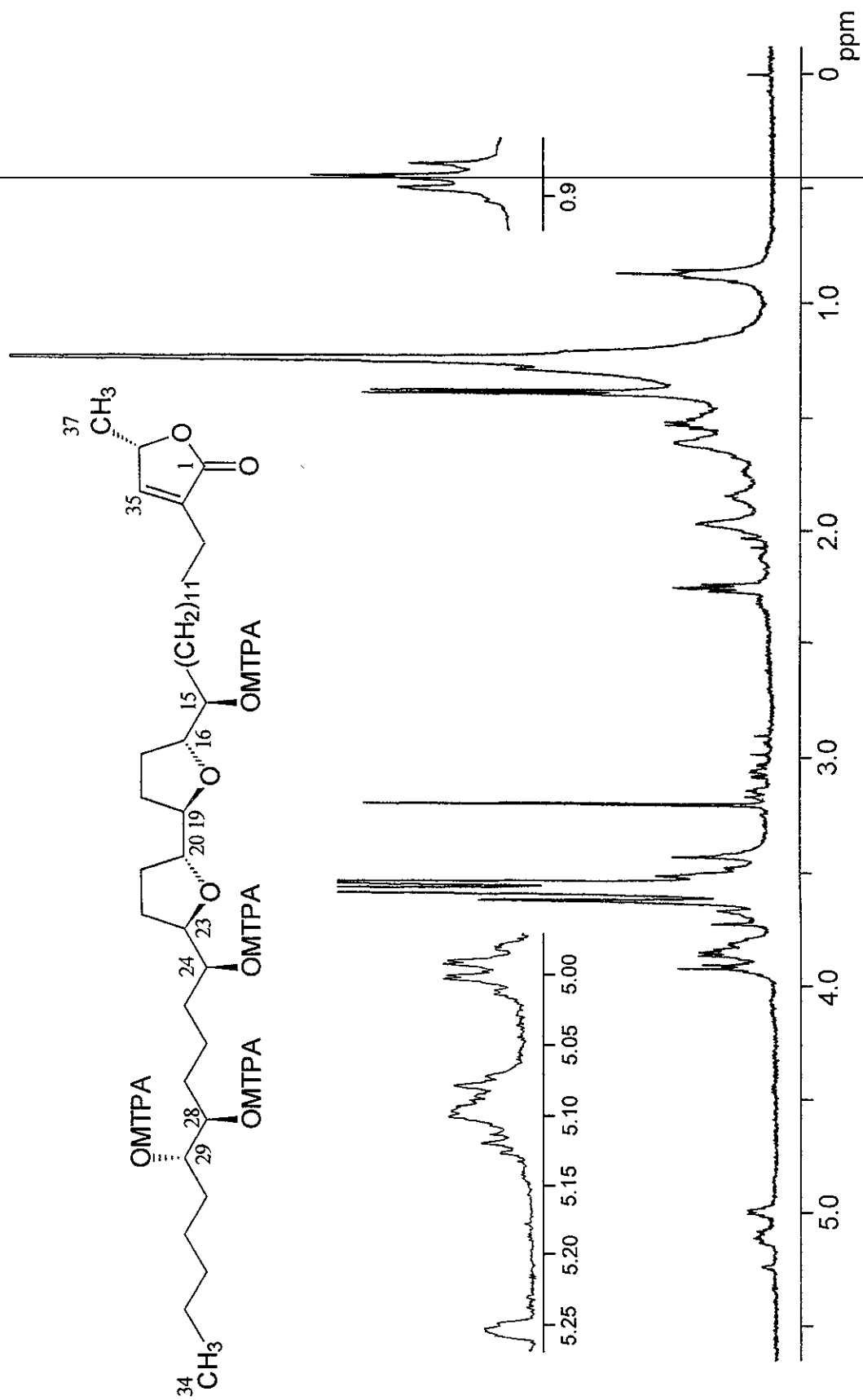
Espectro 7. Espectro de RMN ^1H -COSY de la purpurediolona (98).

Espectro 8. Espectro de RMN ^{13}C de la purpuredioina (98).

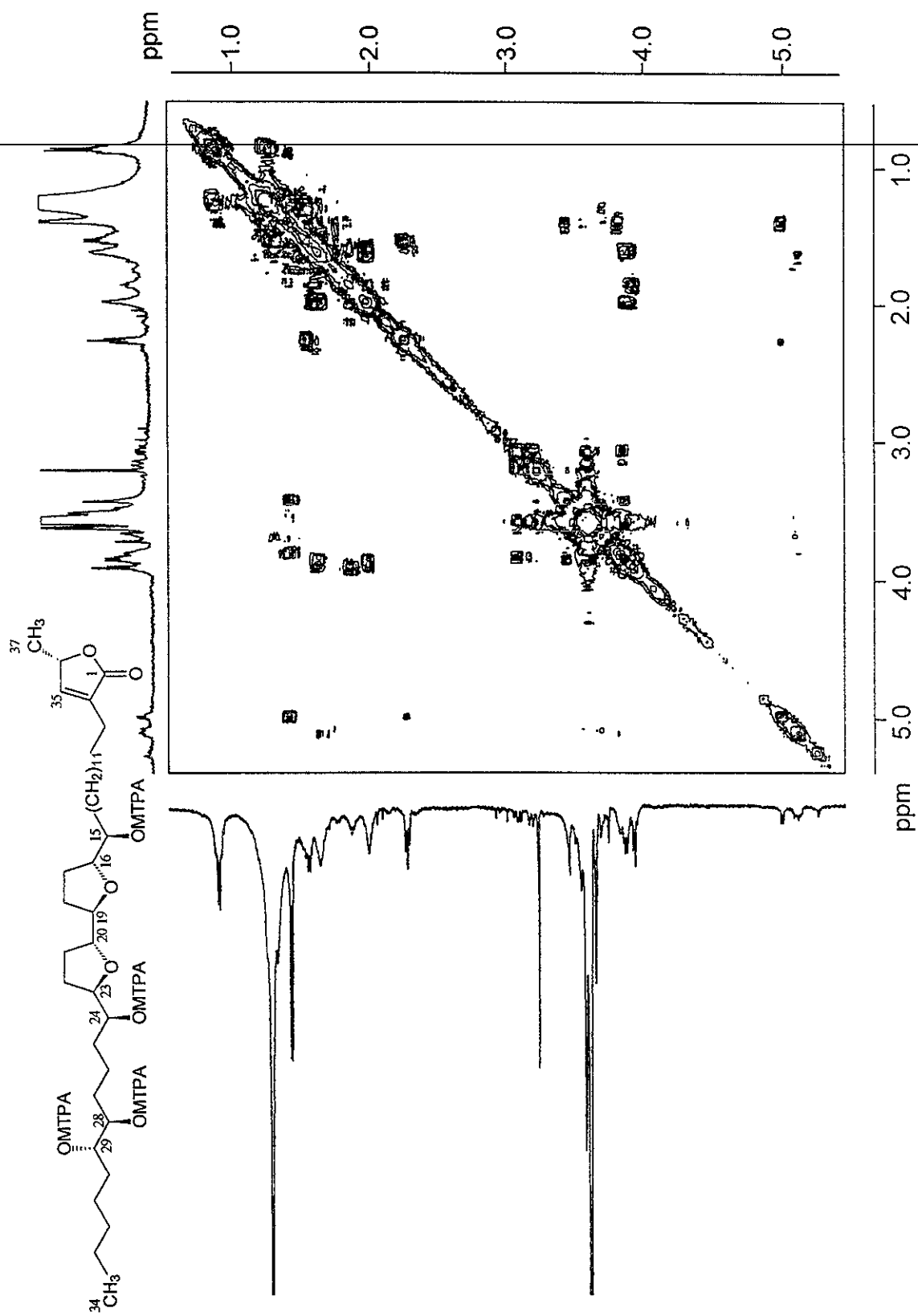
Espectro 9. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la purpurediolina (98).

Espectro 10. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la purpurediolina (98).

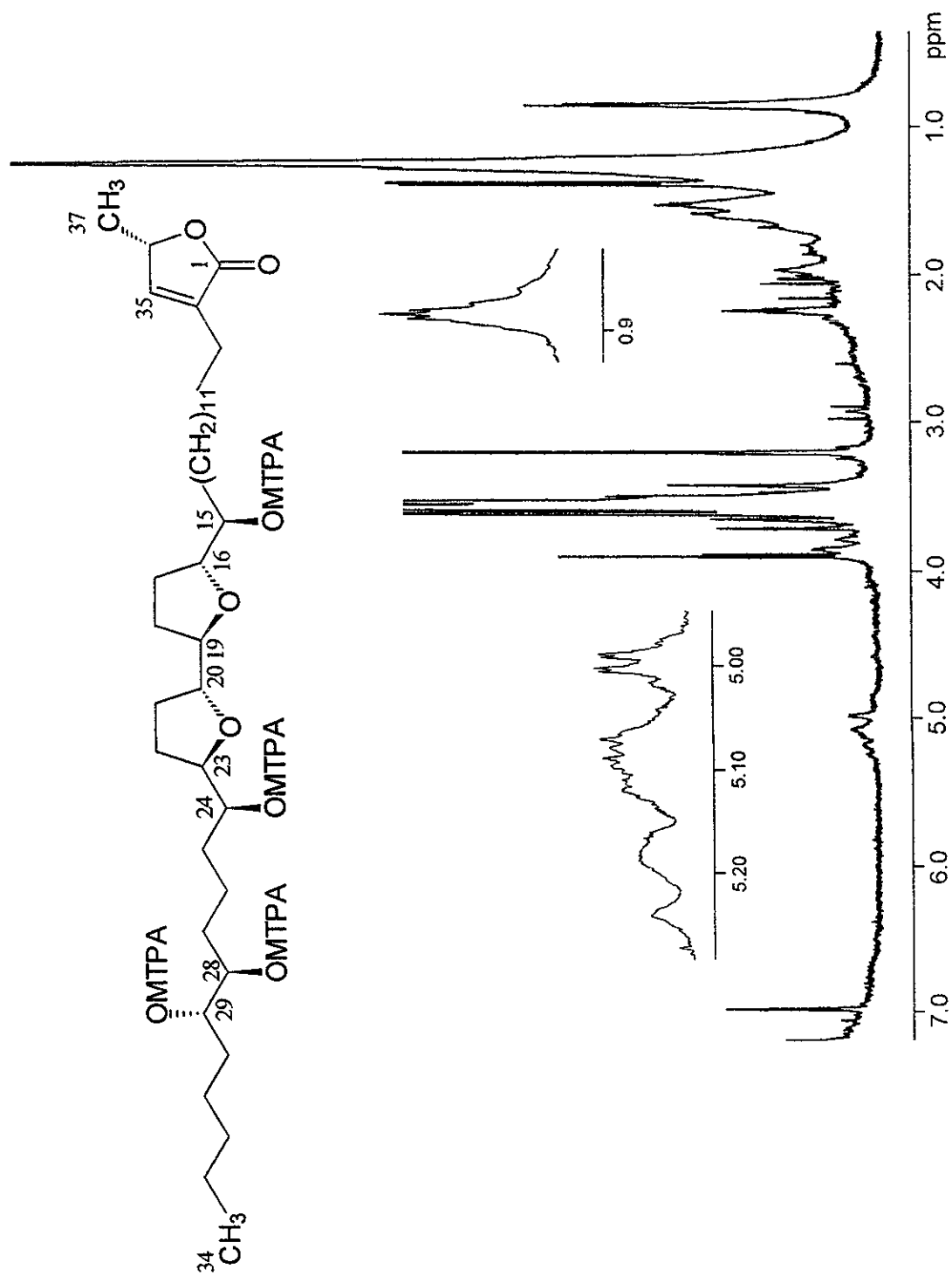
Espectro 11. Espectro de RMN ^1H del acetónido de la purpurediolina (98b).



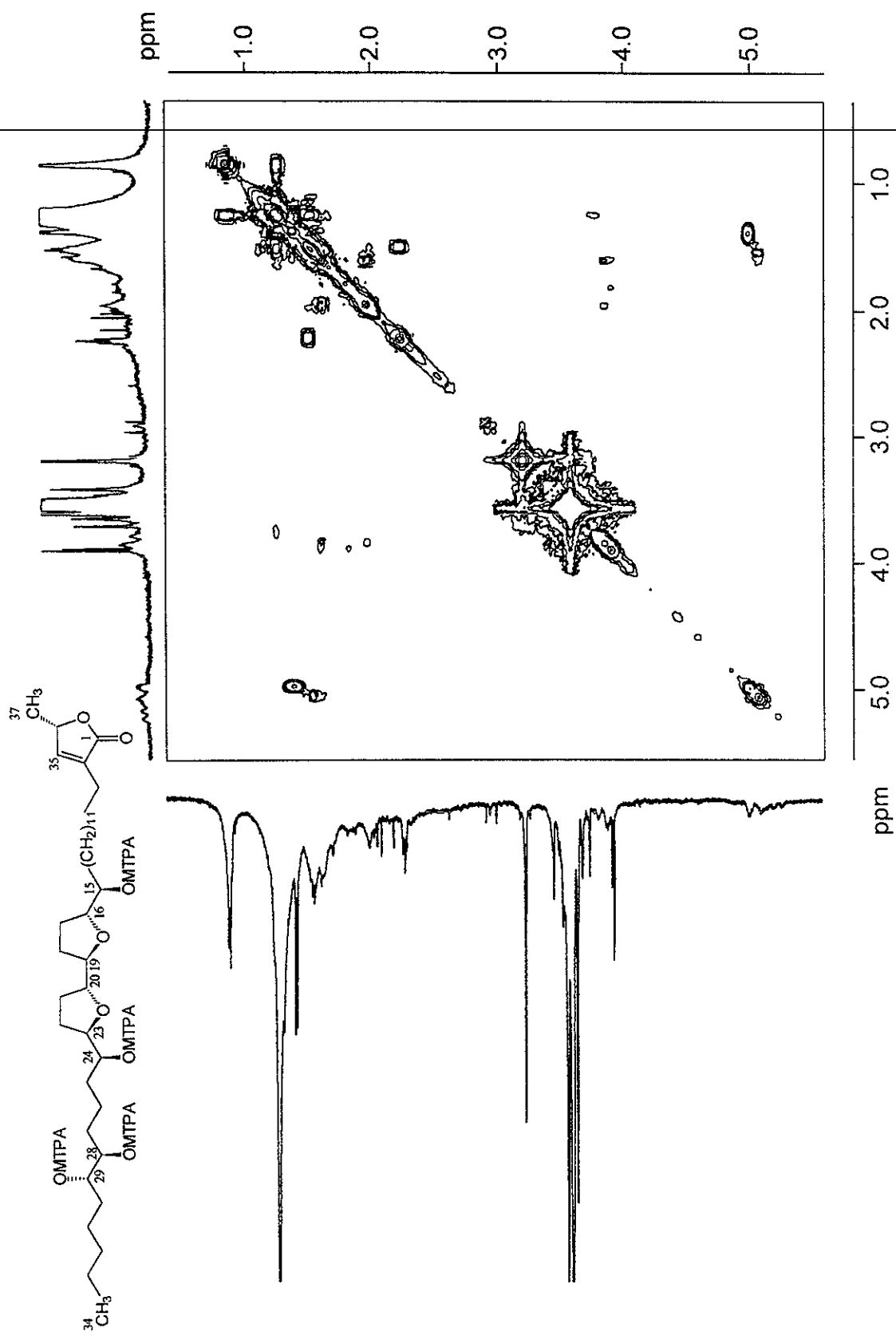
Espectro 12. Espectro de RMN ¹H del derivado per-(S)-éster de Mosher de la purpuredioina (98s).



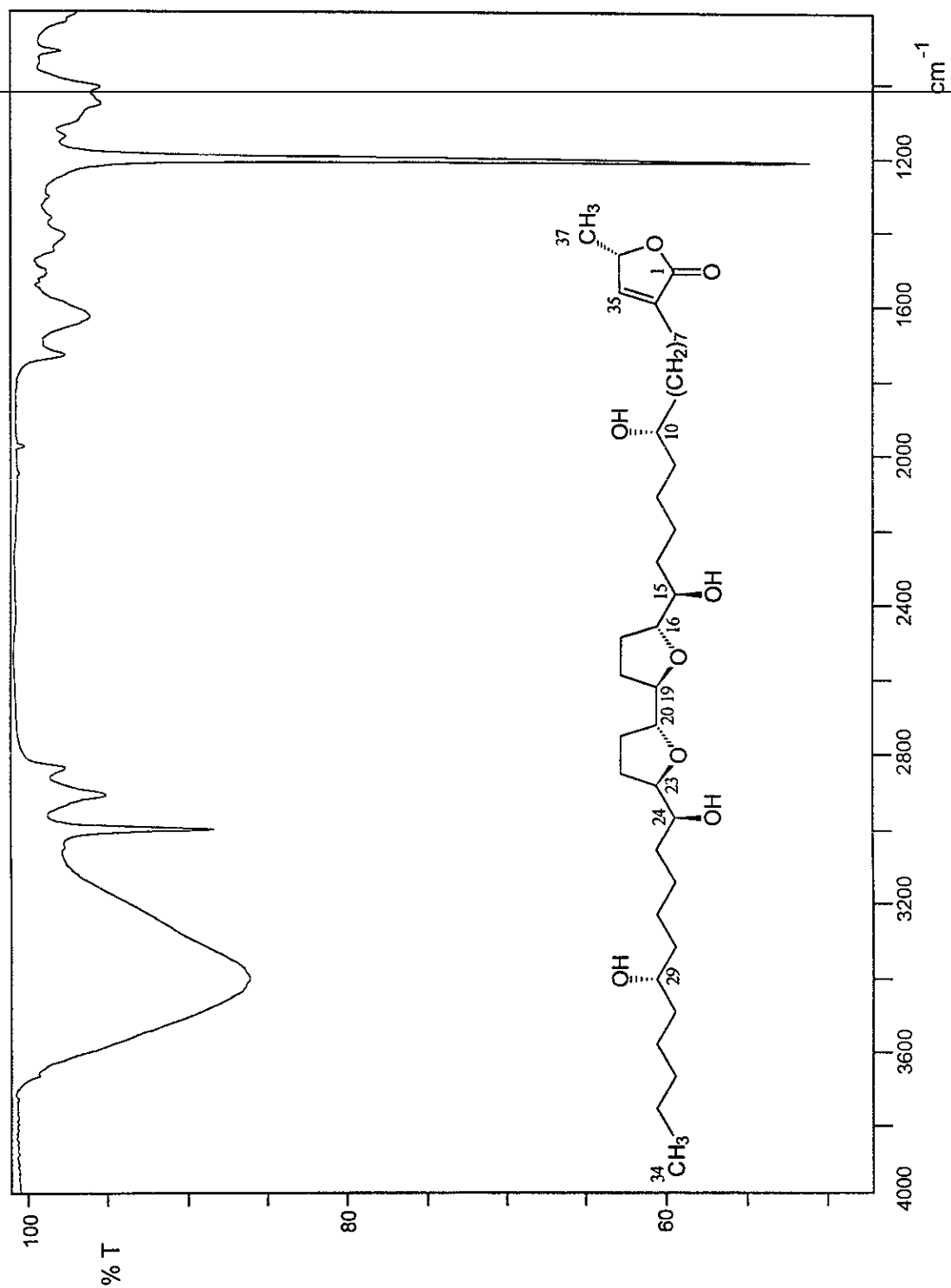
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(S)-éster de Mosher de la purpurediolina (98s).



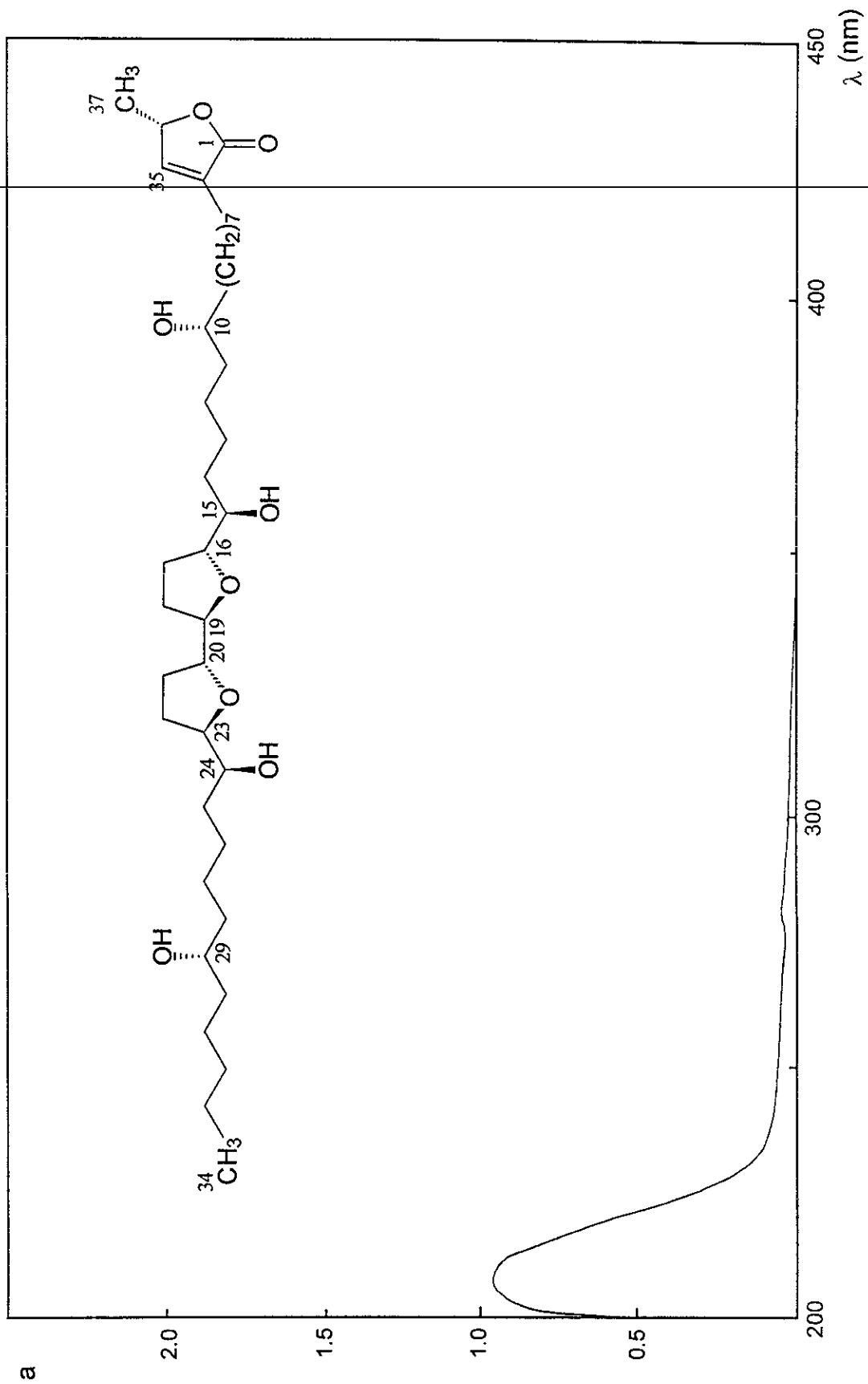
Espectro 14. Espectro de RMN ¹H del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la purpurediolina (98r).



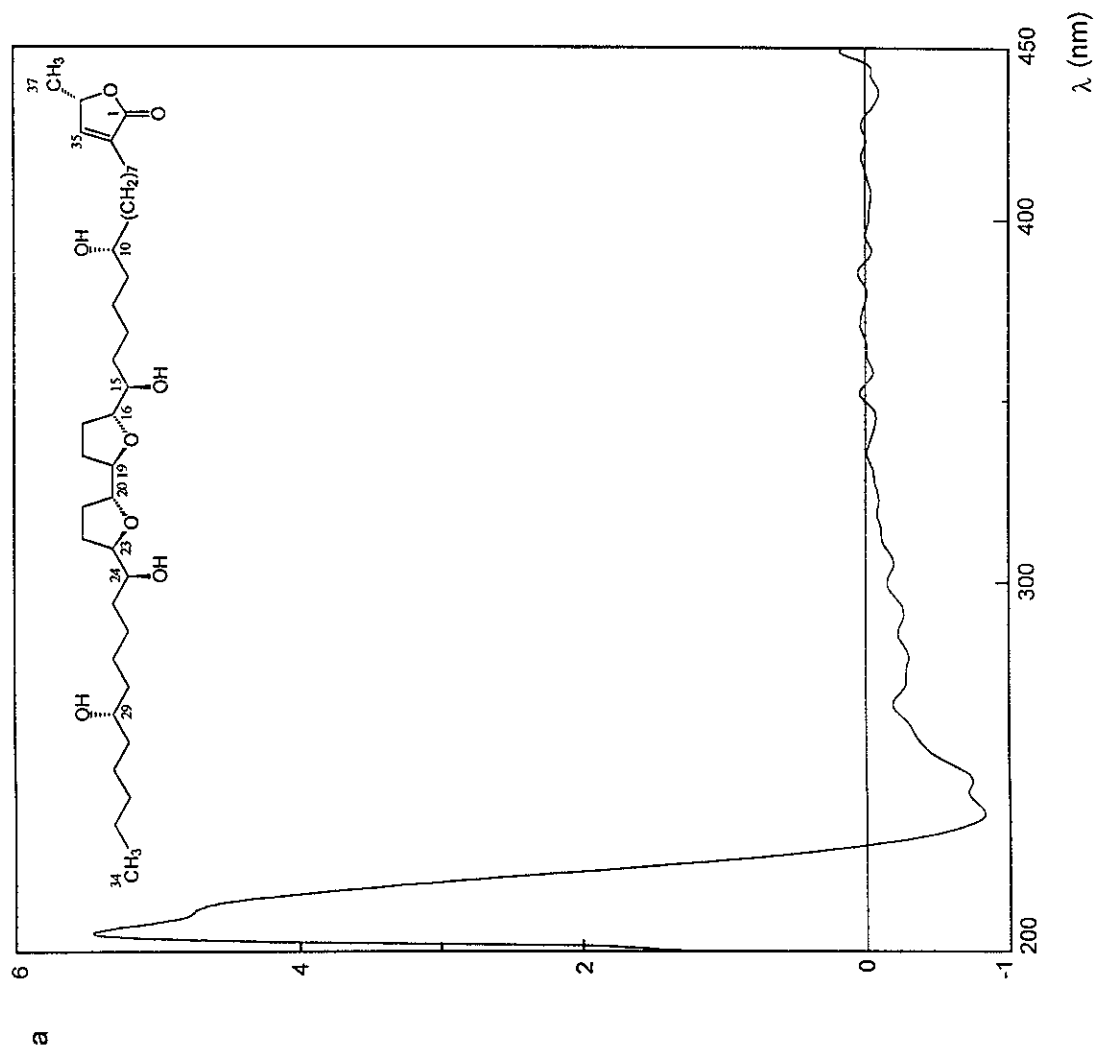
Espectro 15. Espectro de RMN ¹H-COSY del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la purpurediolina (98r).



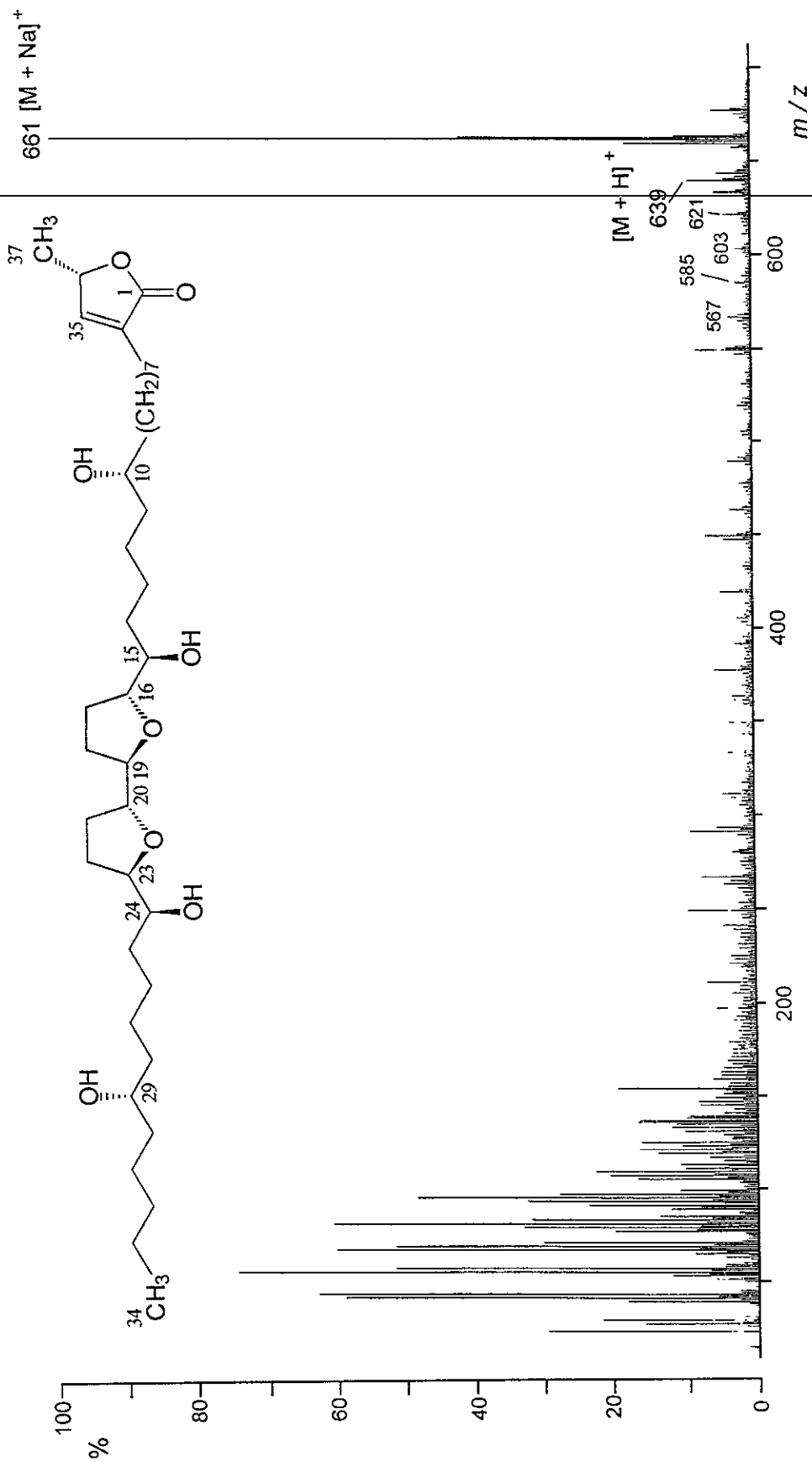
Espectro 16. Espectro en el IR de la purpurenina (99).

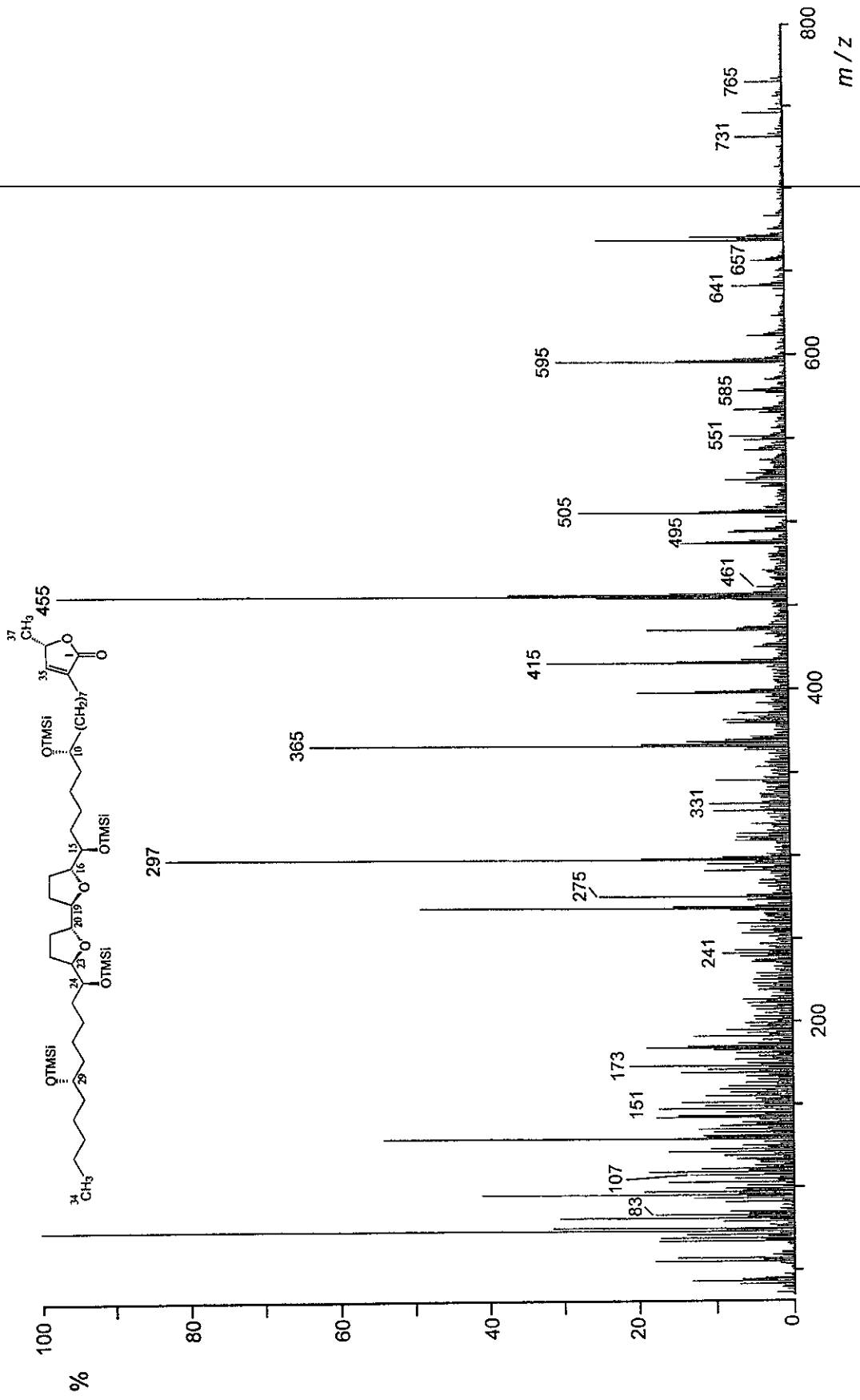


Espectro 17. Espectro en el UV de la purpurenina (99).

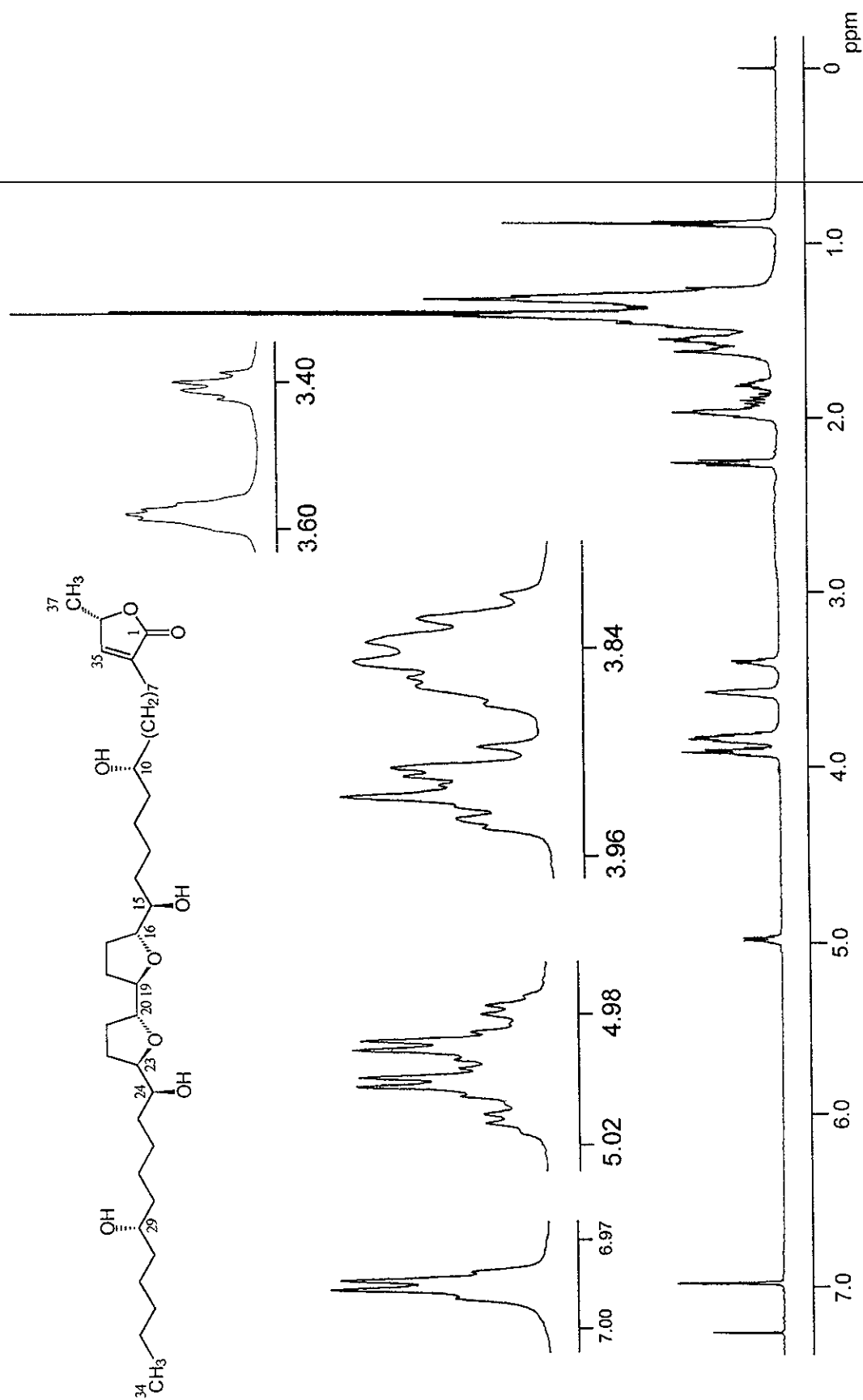


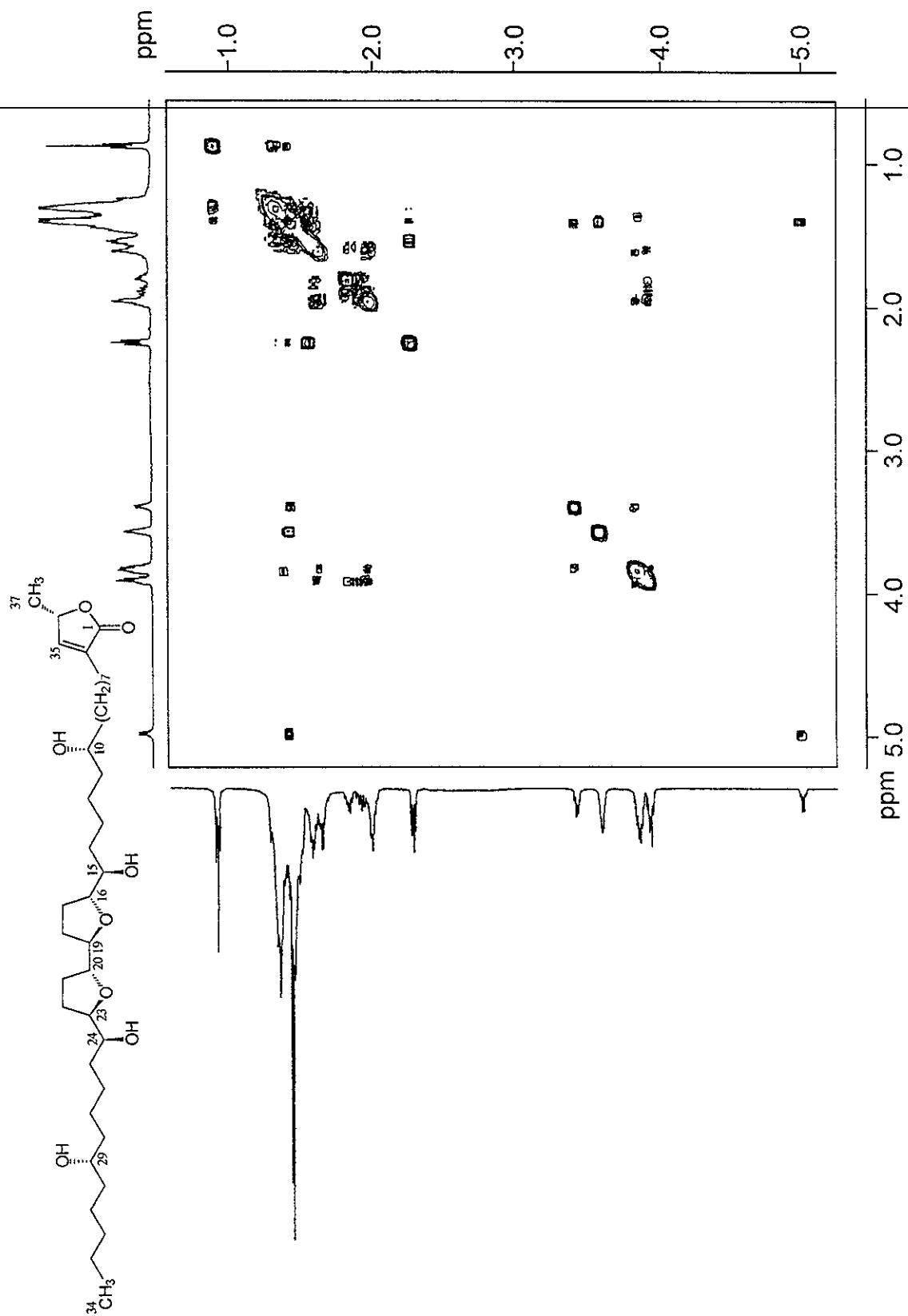
Espectro 18. Espectro de DC de la purpurenina (99).

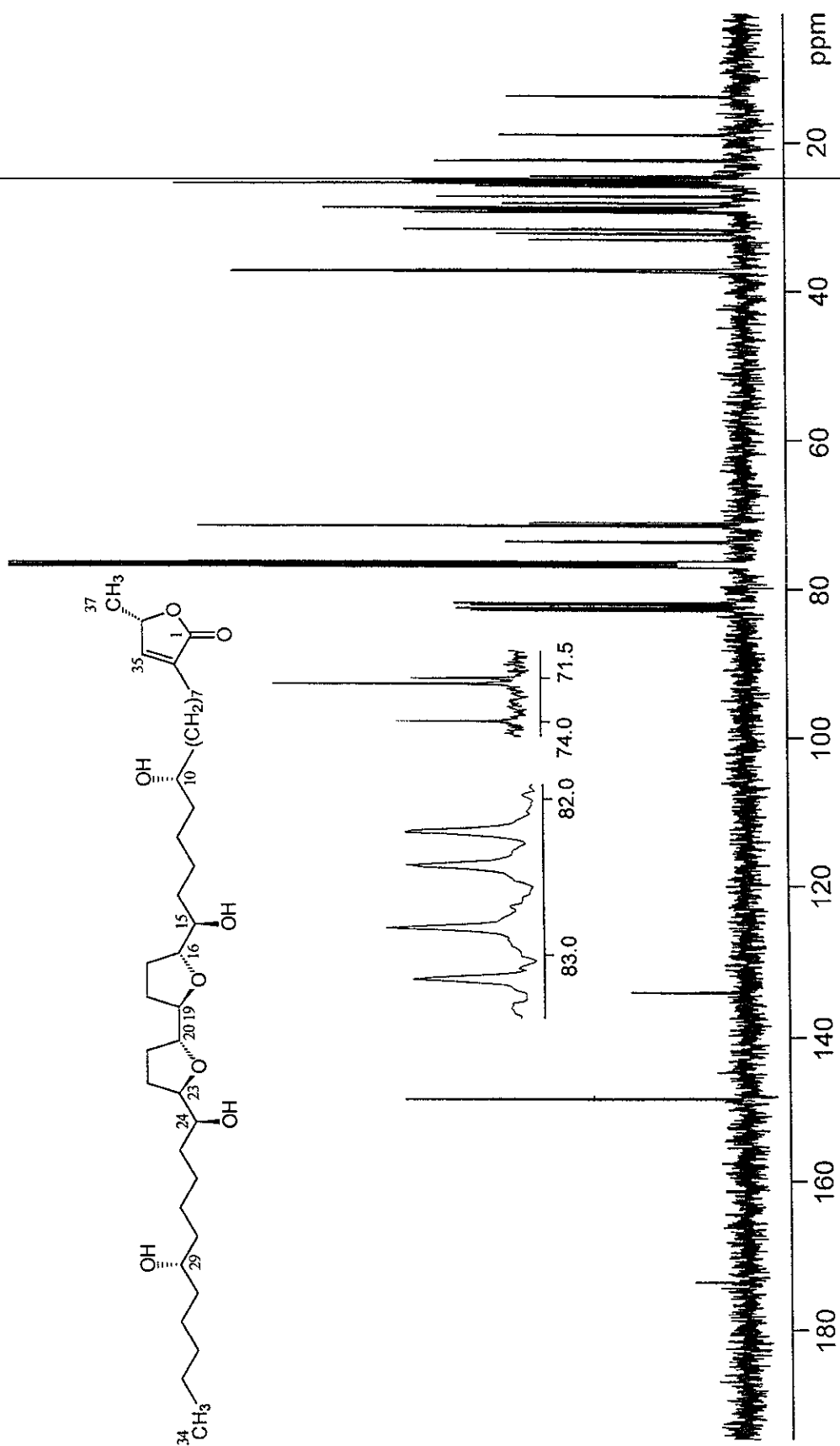
Espectro 19. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la purpurenina (99).

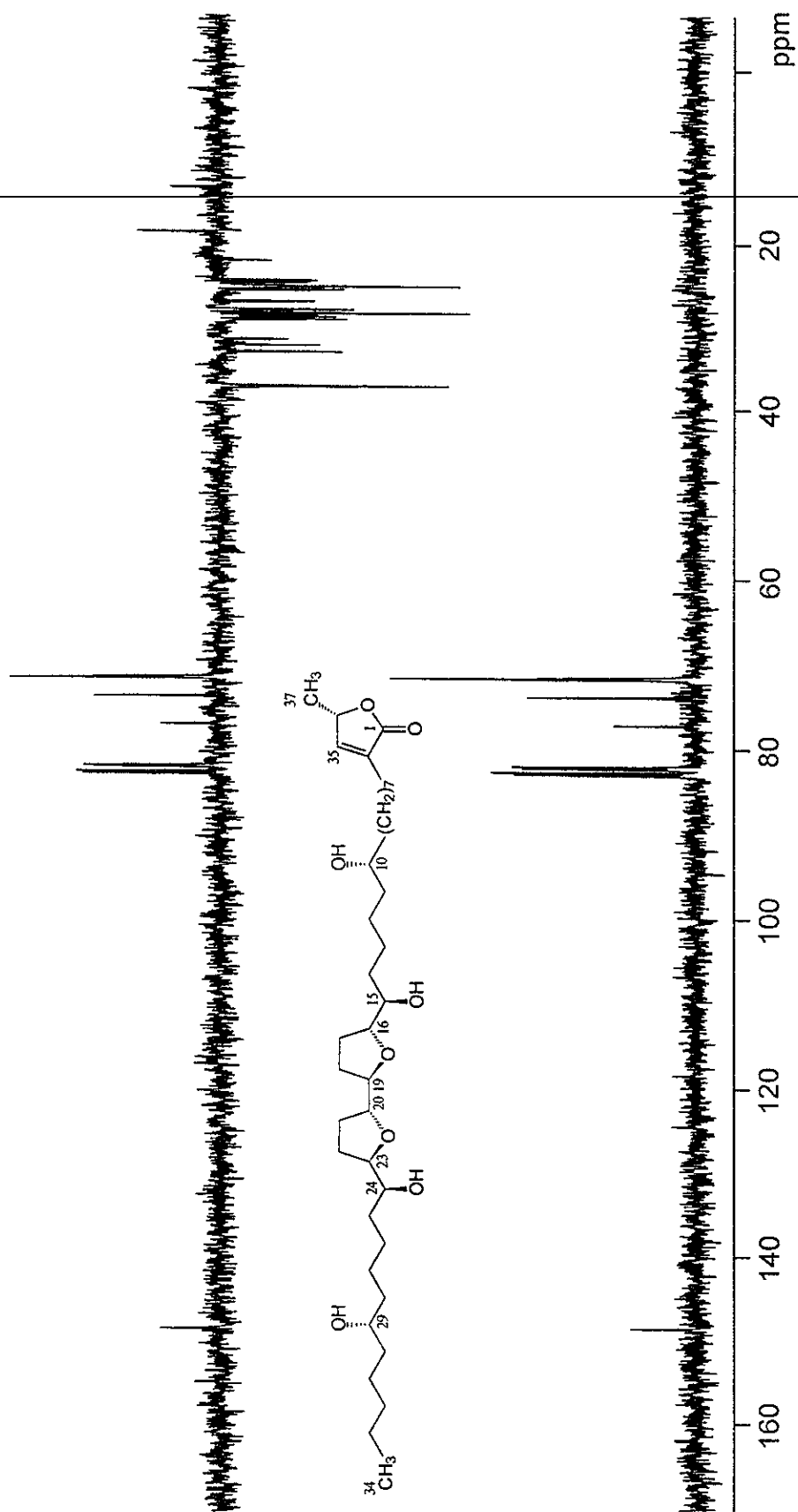


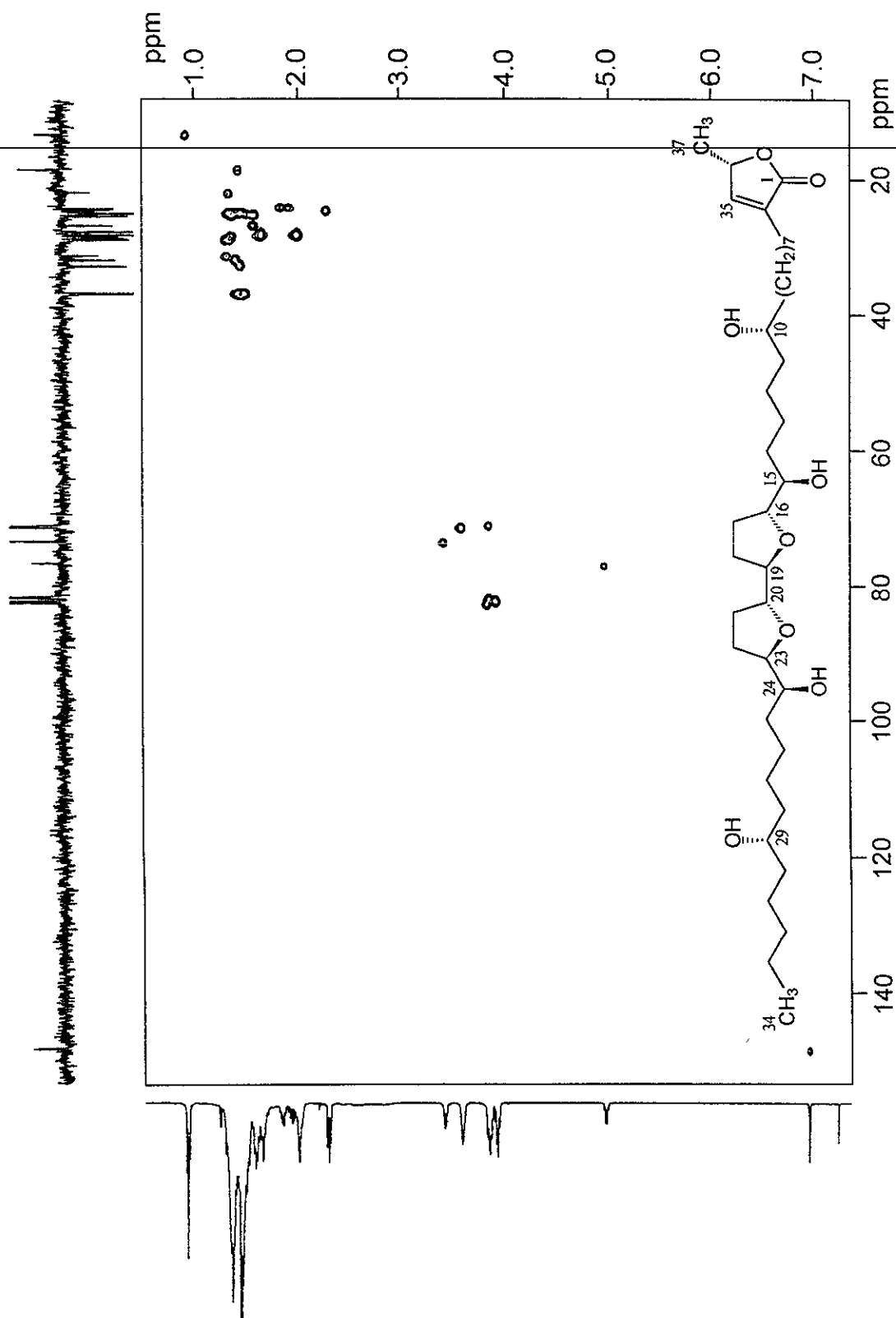
Espectro de masas modalidad IE del derivado siliado de la purpurenina (99a).

Espectro 21. Espectro de RMN ^1H de la purpurenina (99).

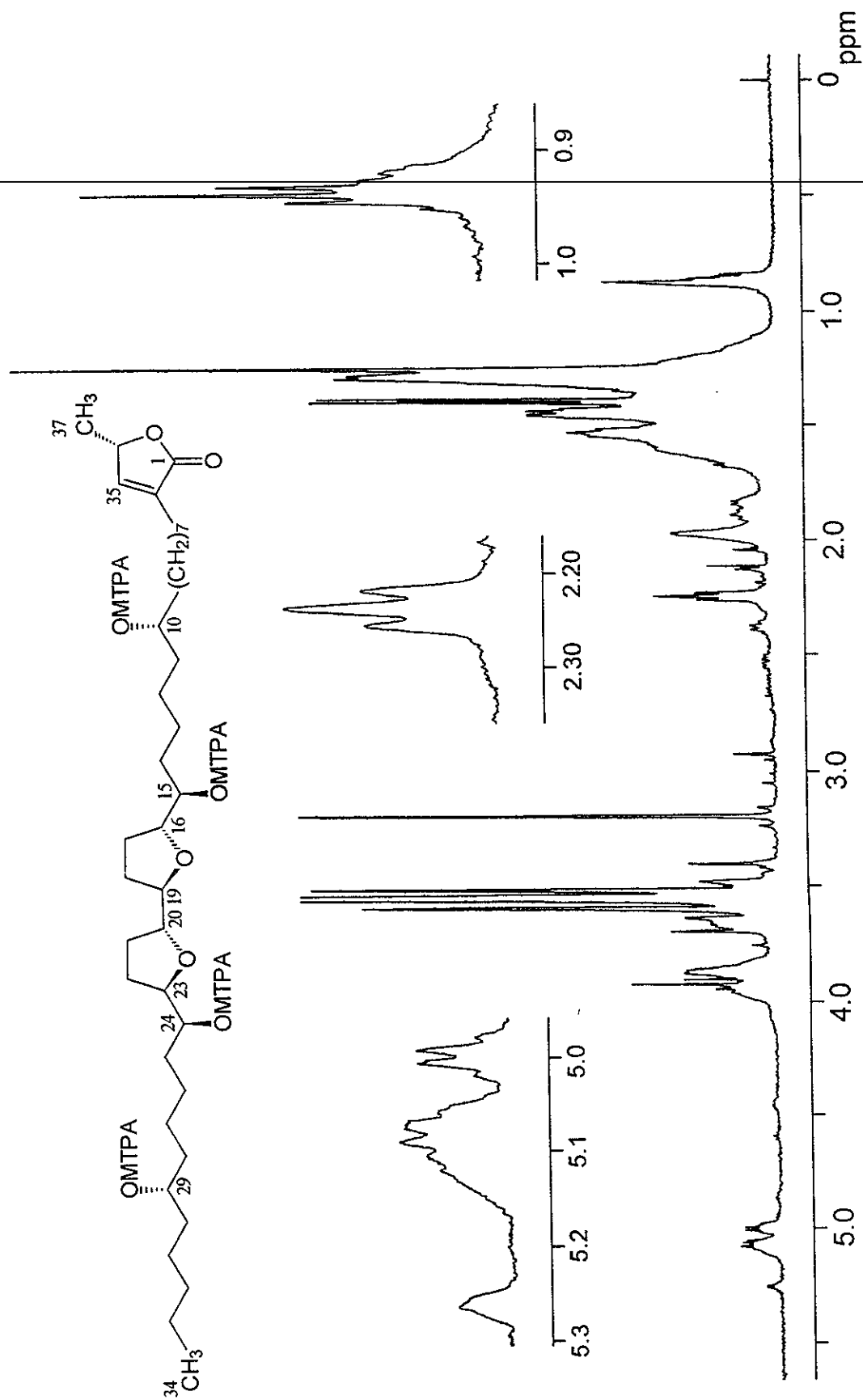
Espectro 22. Espectro de RMN ^1H -COSY de la purpurenina (99).

Espectro 23. Espectro de RMN ^{13}C de la purpurenina (99).

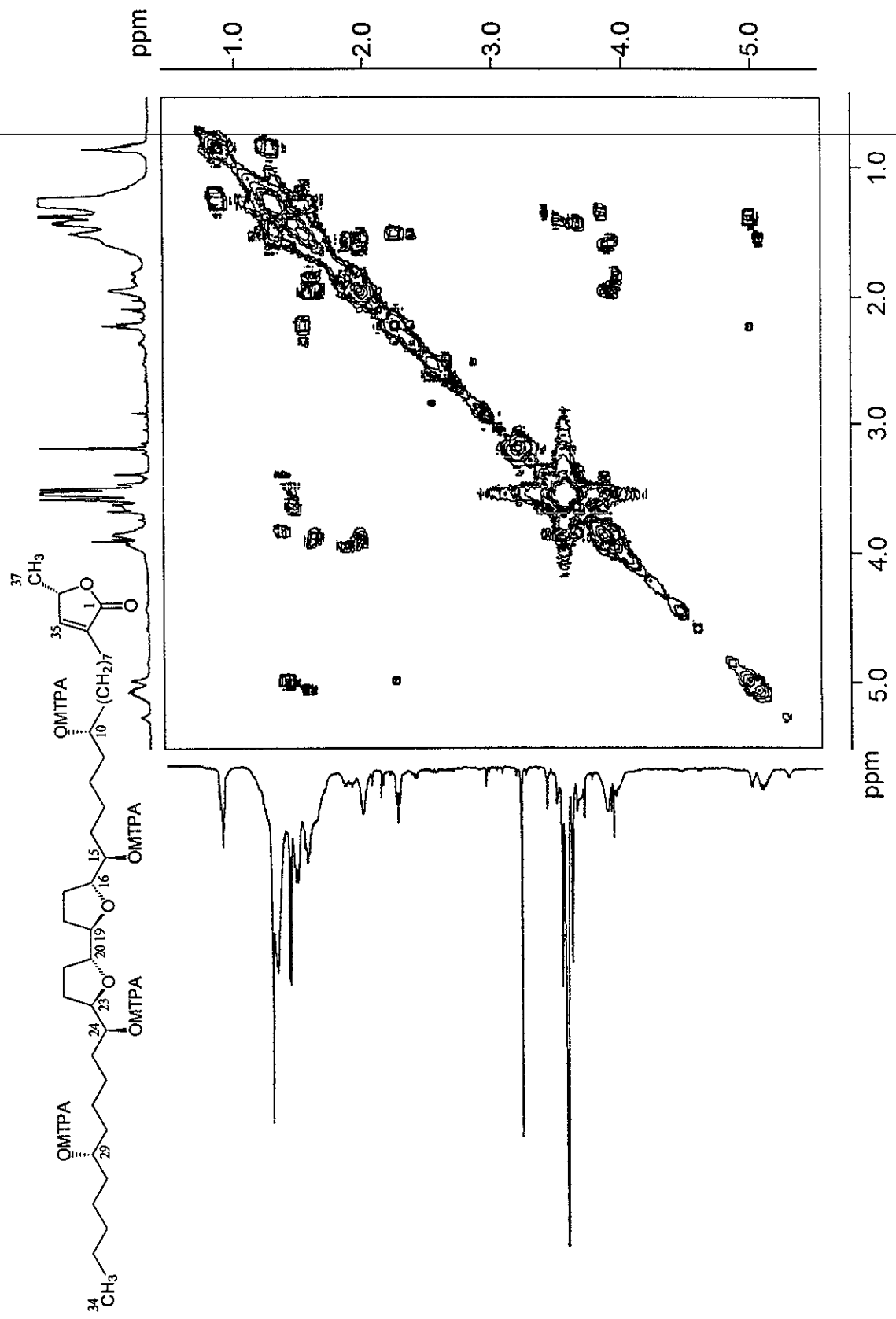
Espectro 24. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la purpurenina (99).



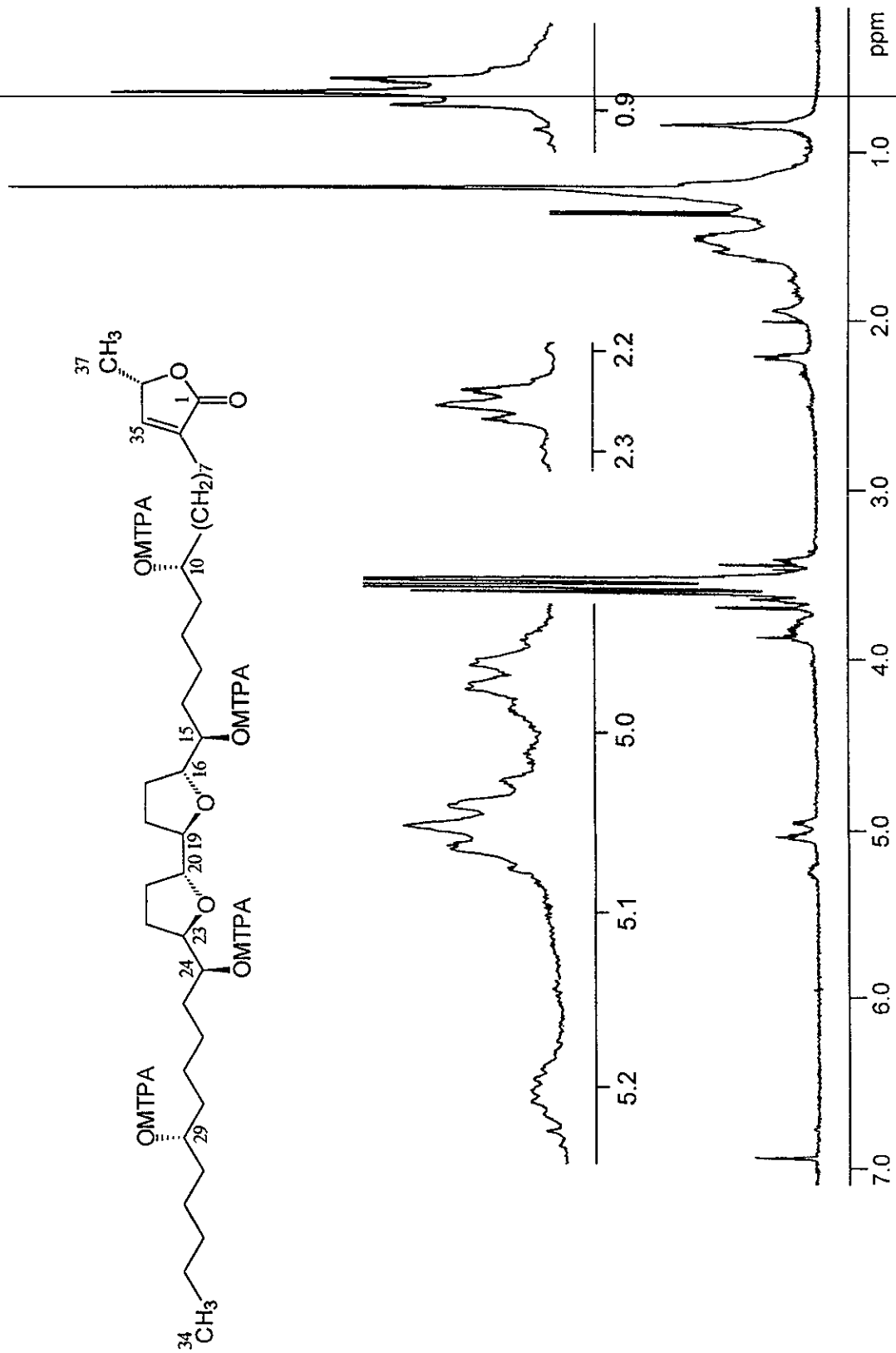
Espectro 25. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la purpurenina (99).



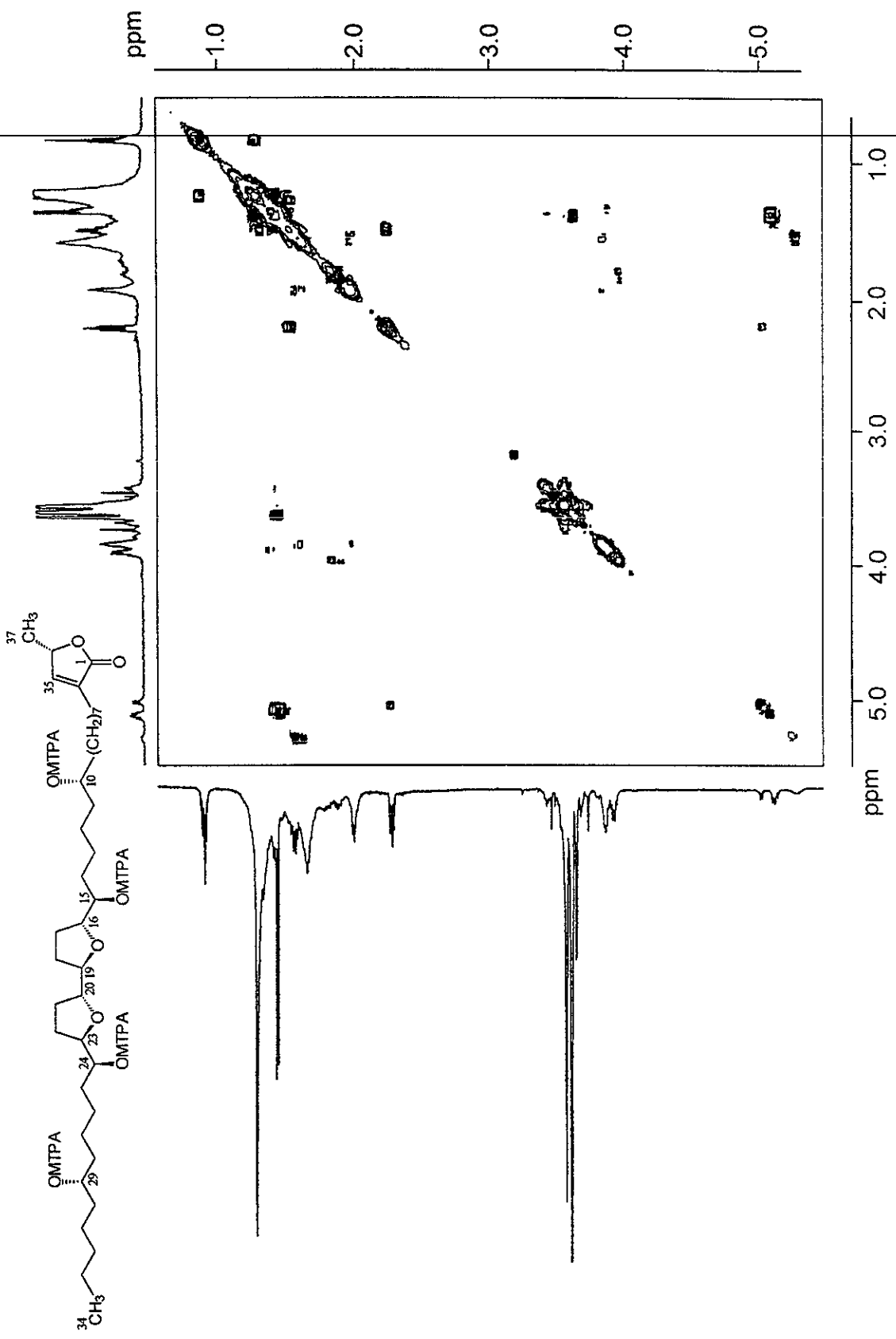
Espectro 26. Espectro de RMN ^1H del derivado per-(S)-éster de Moshier de la purpurenina (99s).



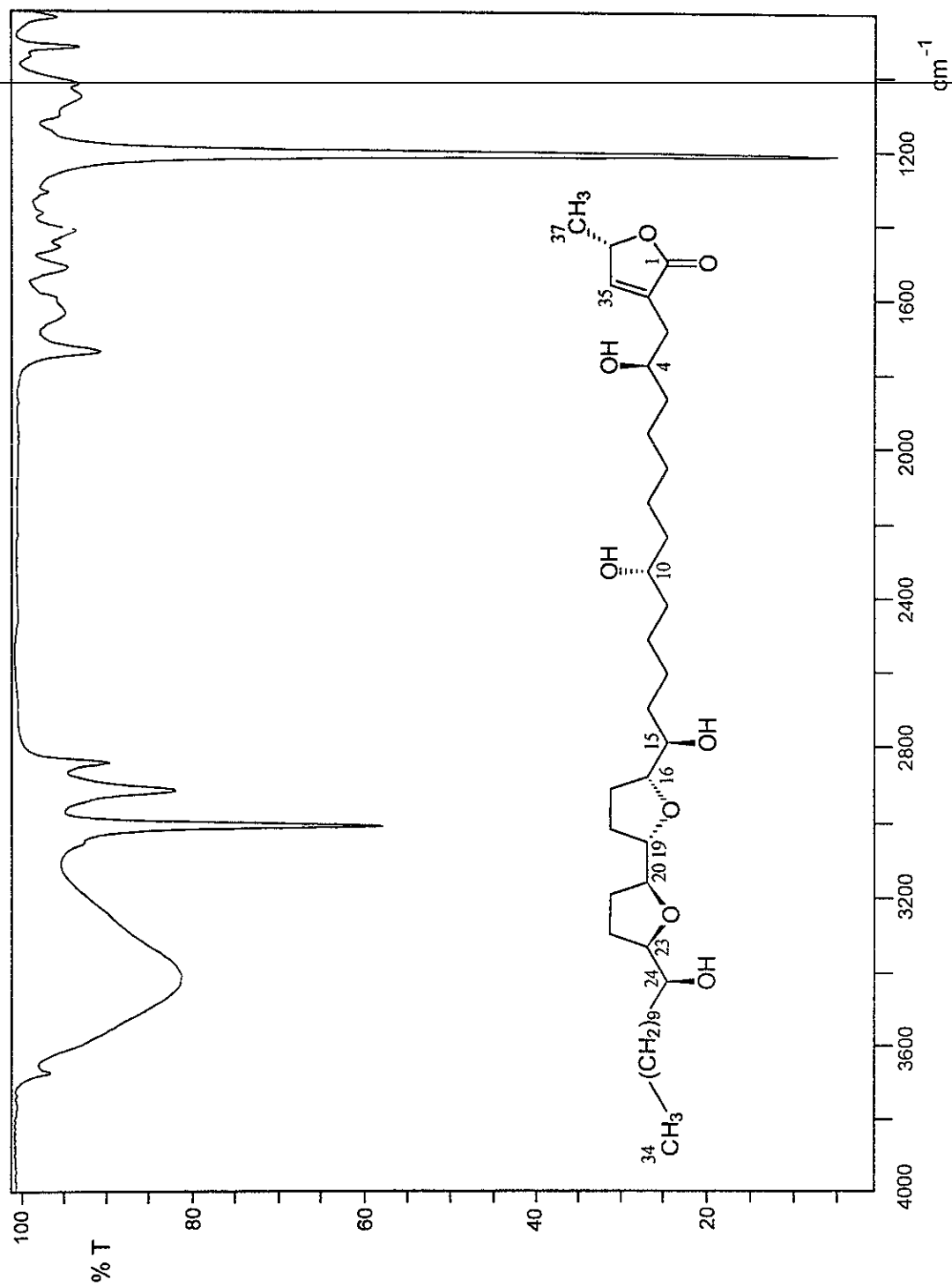
Espectro 27. Espectro de RMN ¹H-COSY del derivado per-(S)-éster de Mosher de la purpurenina (99s).



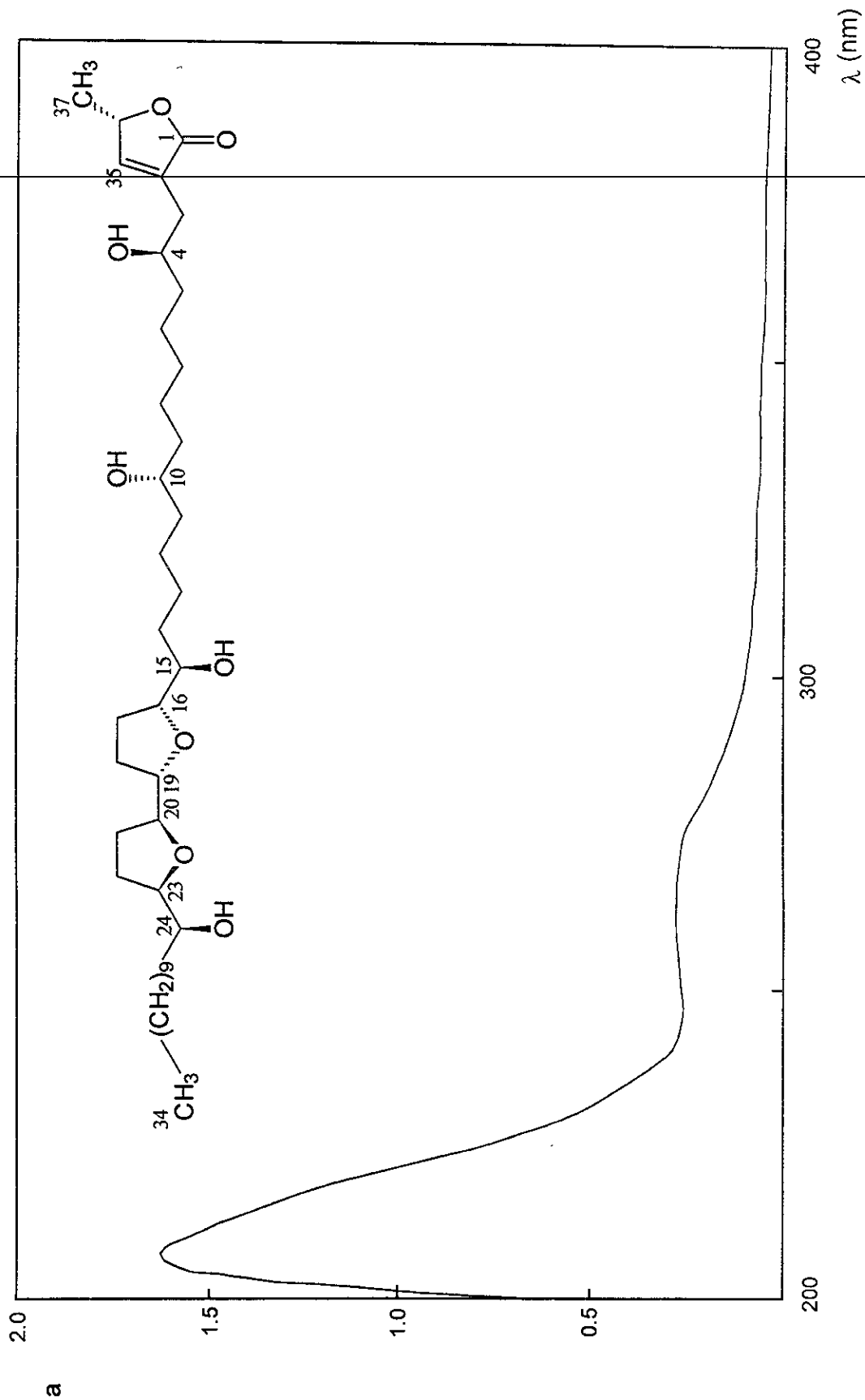
Espectro 28. Espectro de RMN ^1H del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la purpurenina (**99r**).



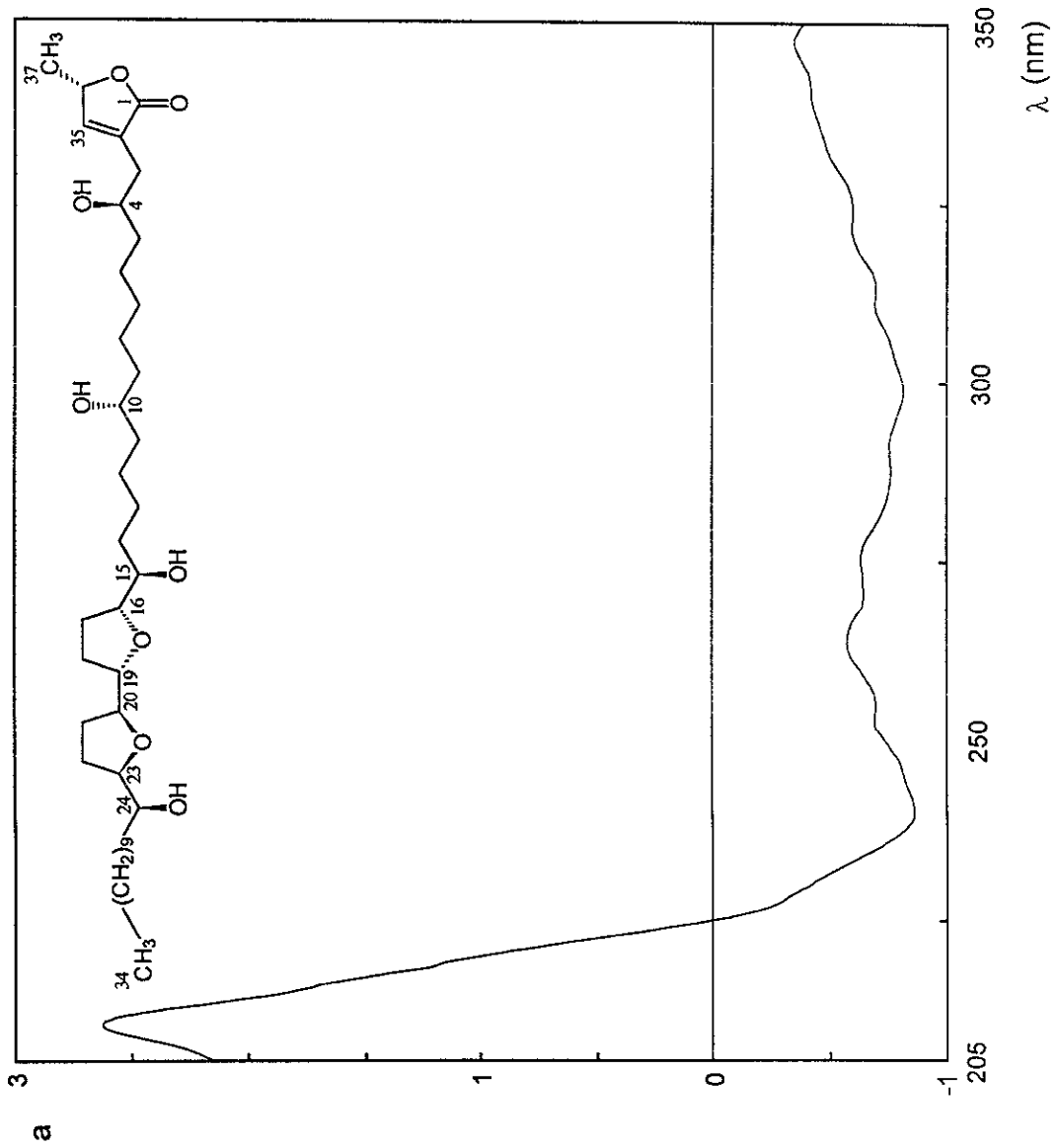
Espectro 29. Espectro de RMN ¹H-COSY del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la purpurenina (99r).



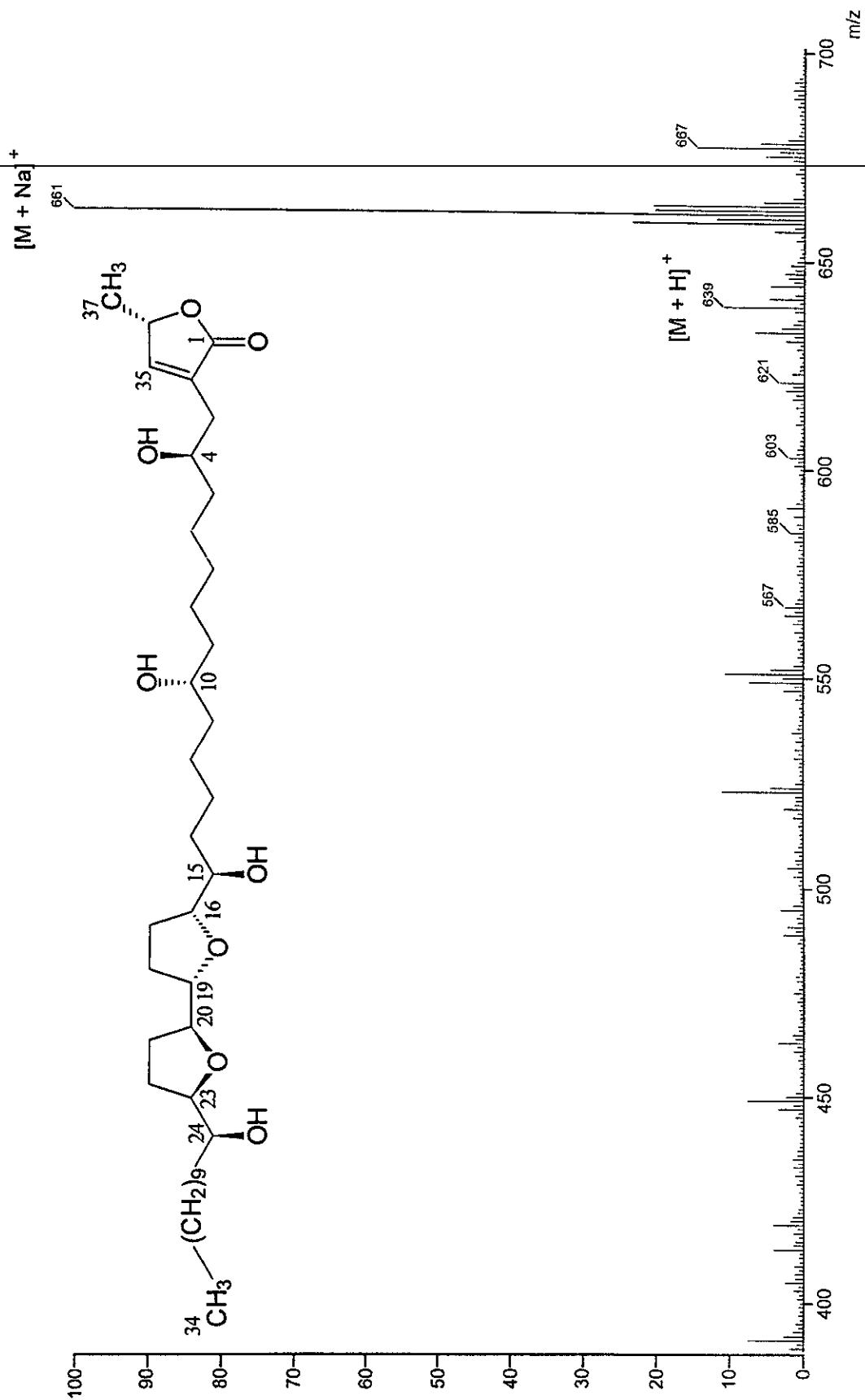
Espectro 30. Espectro en el IR de la purpuracena (100).

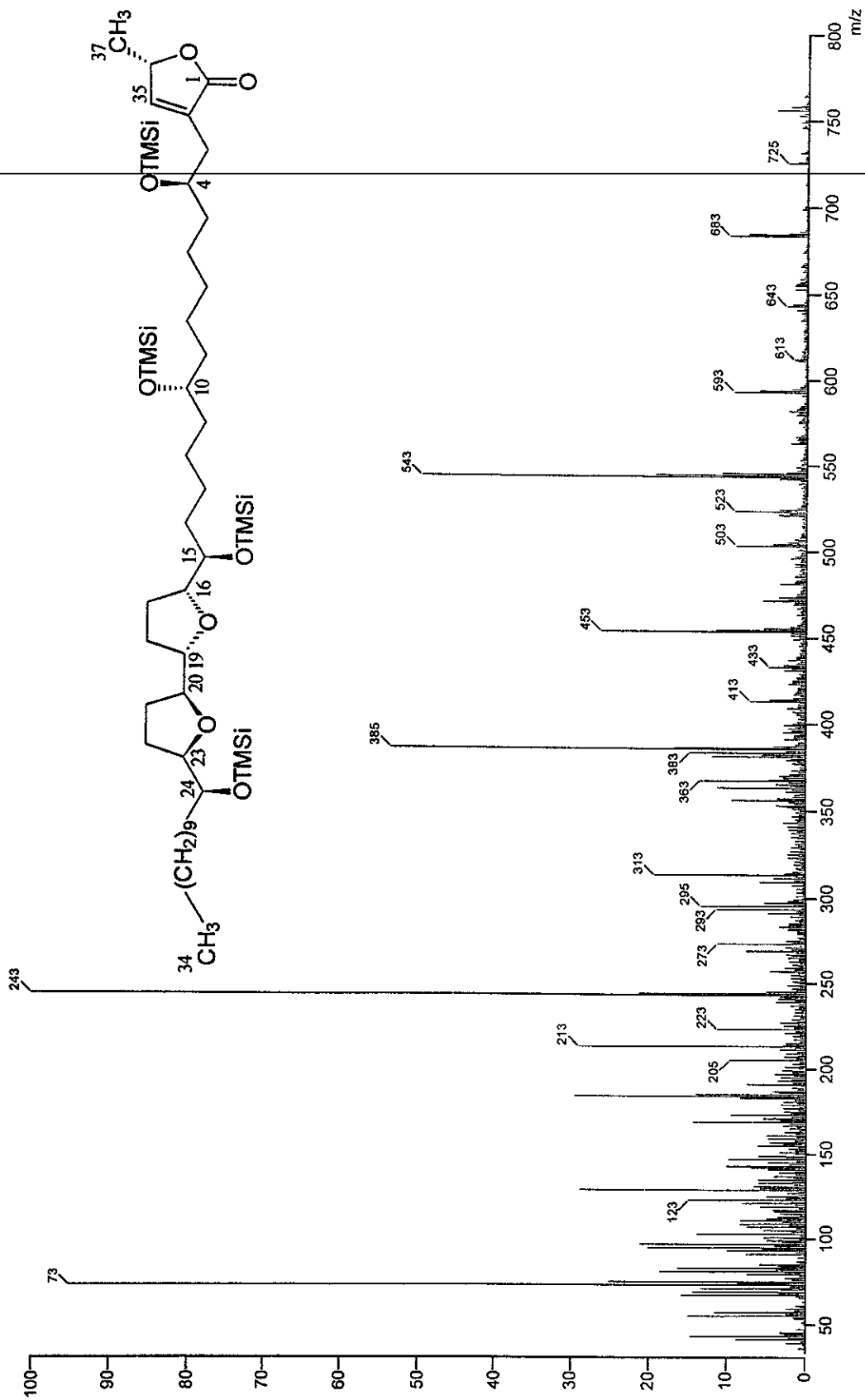


Espectro 31. Espectro en el UV de la purpuracina (100).

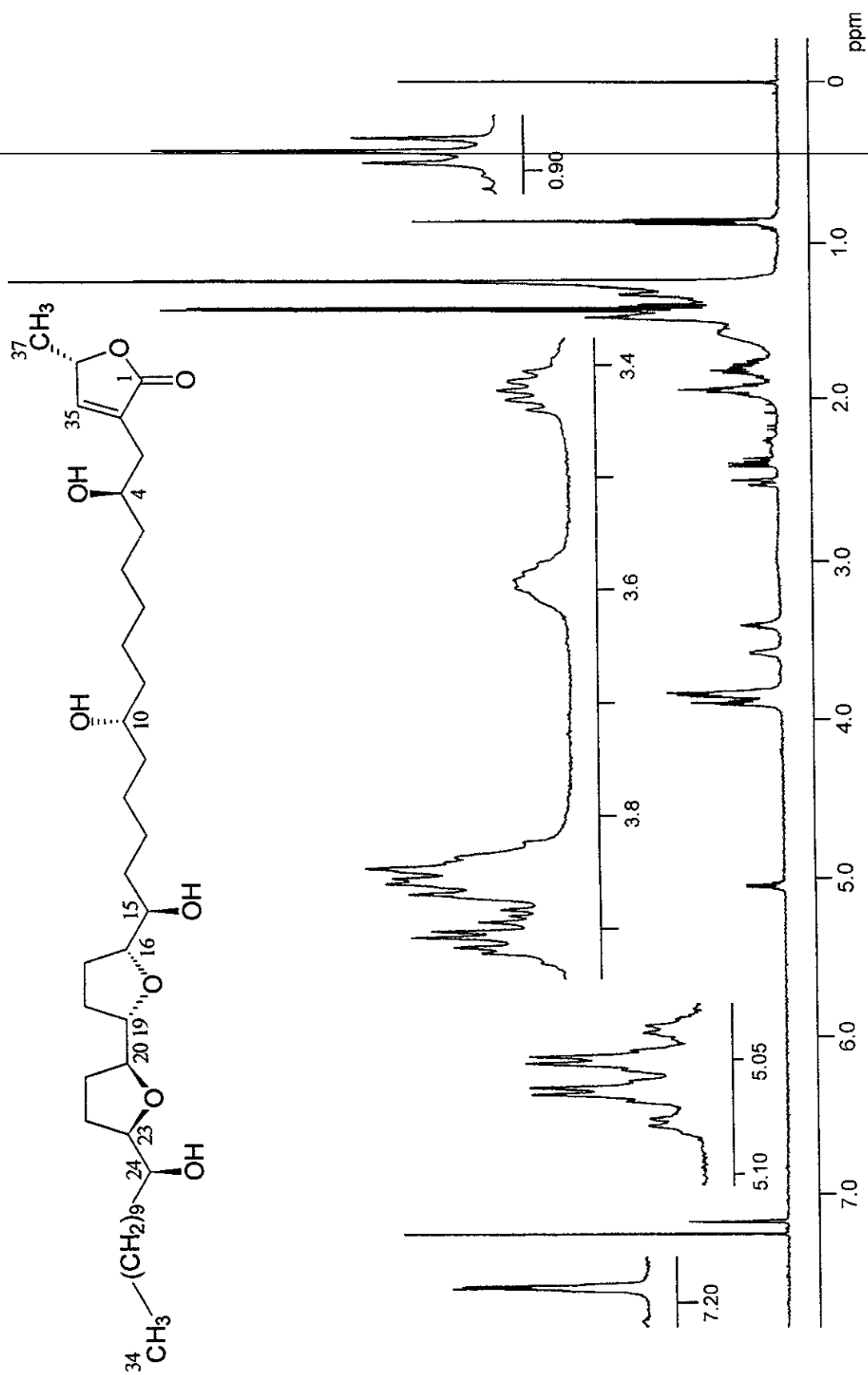


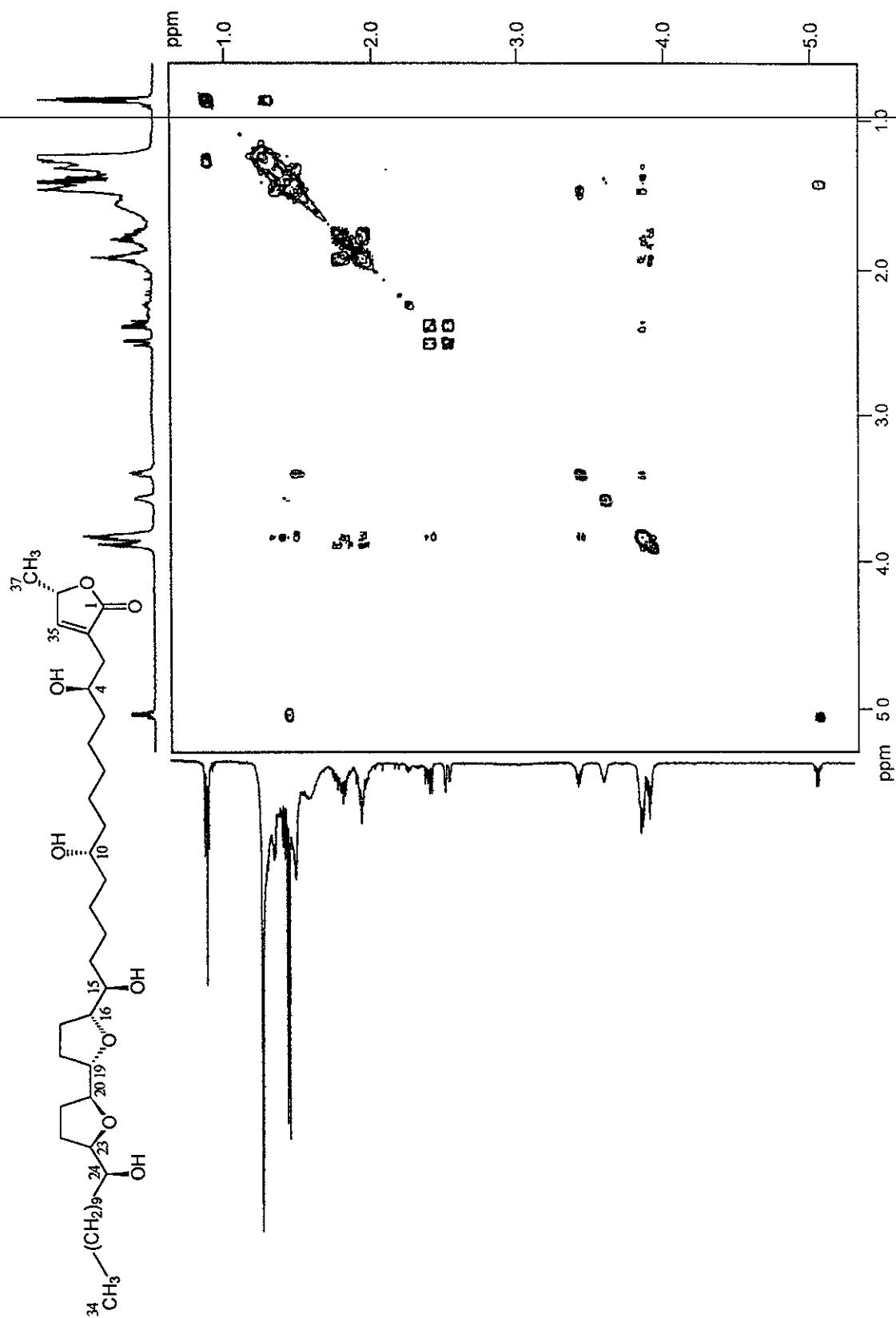
Espectro 32. Espectro de DC de la purpuracena (100).

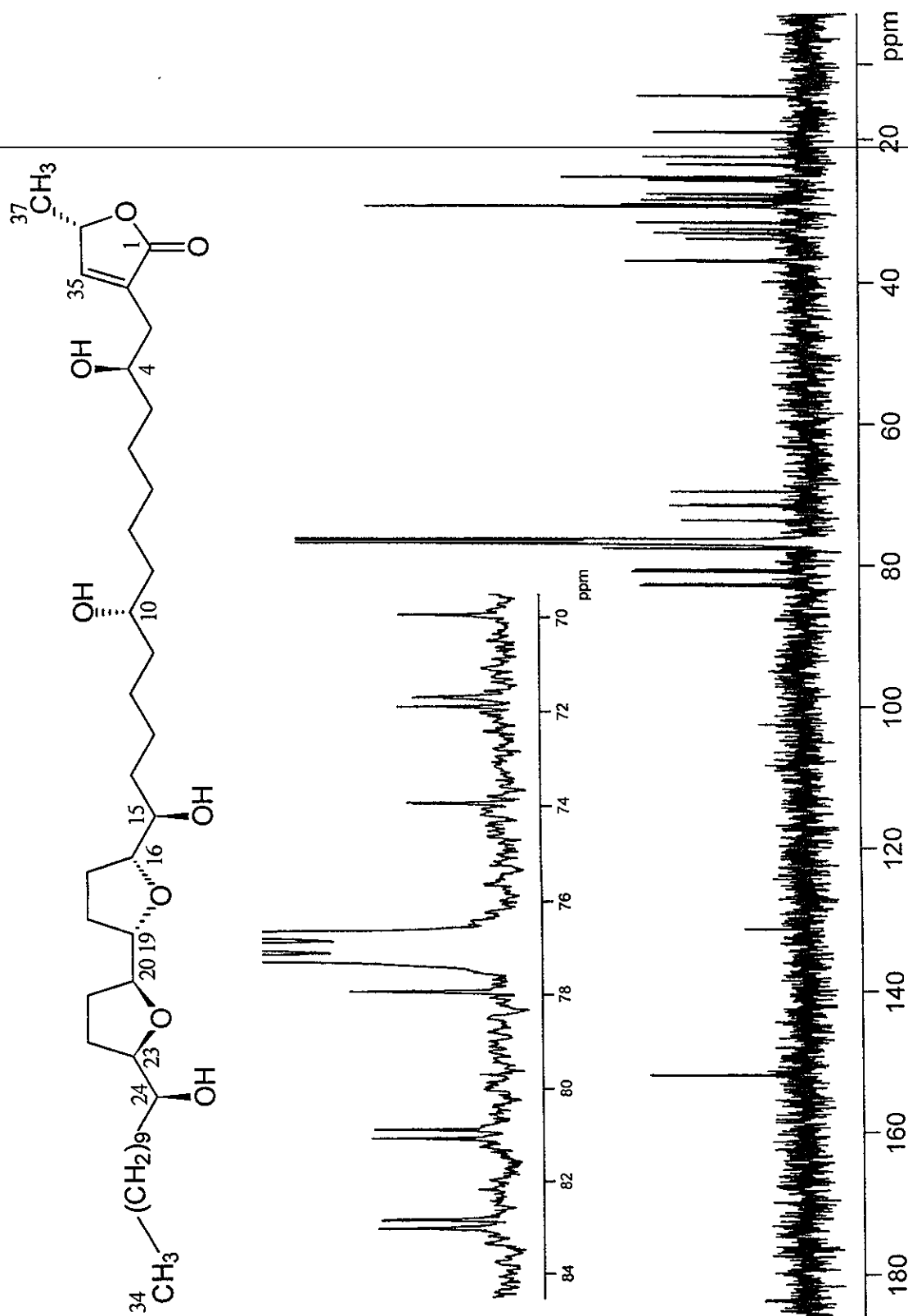
Espectro 33. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la purpuracénica (100).

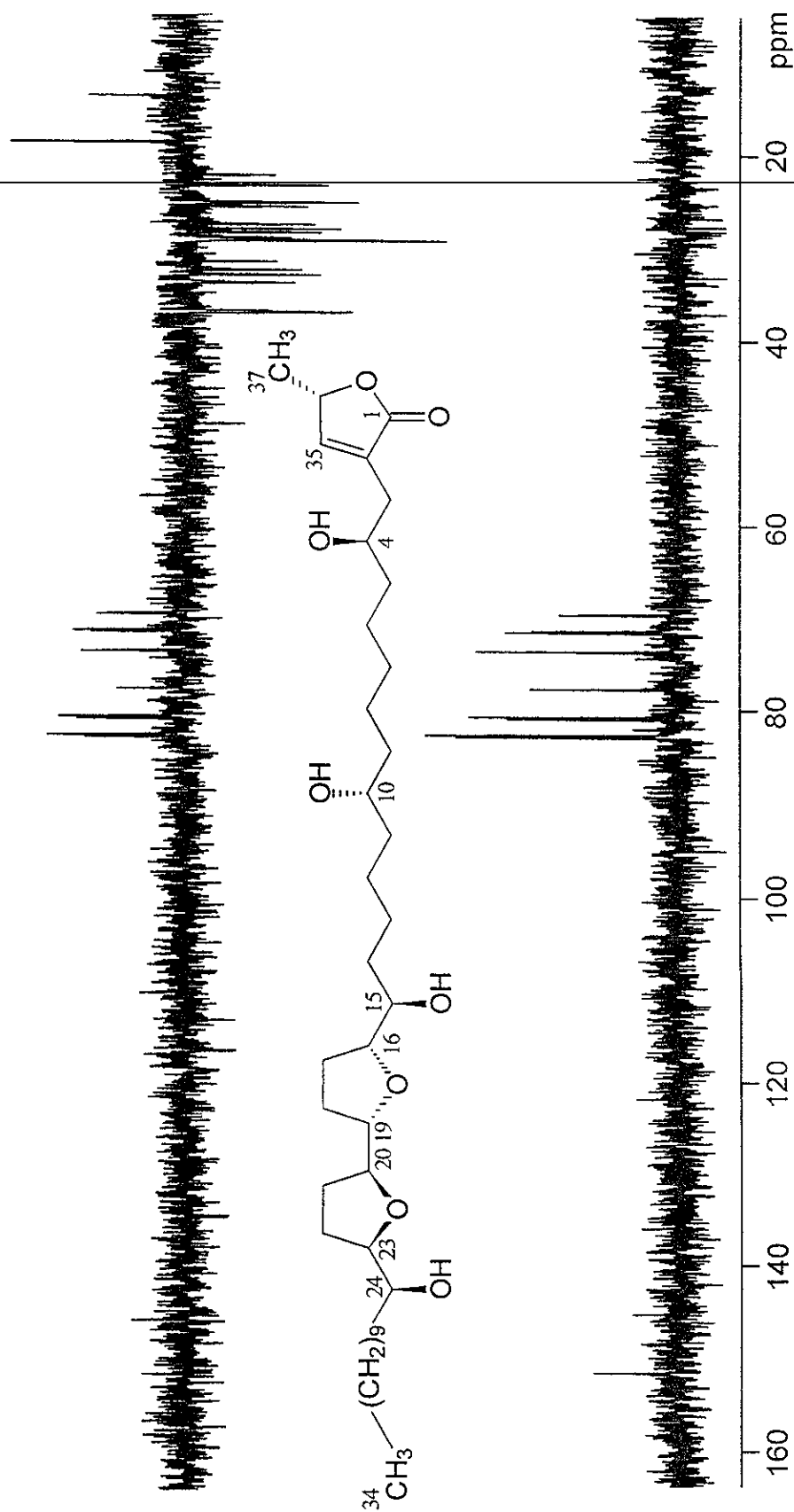


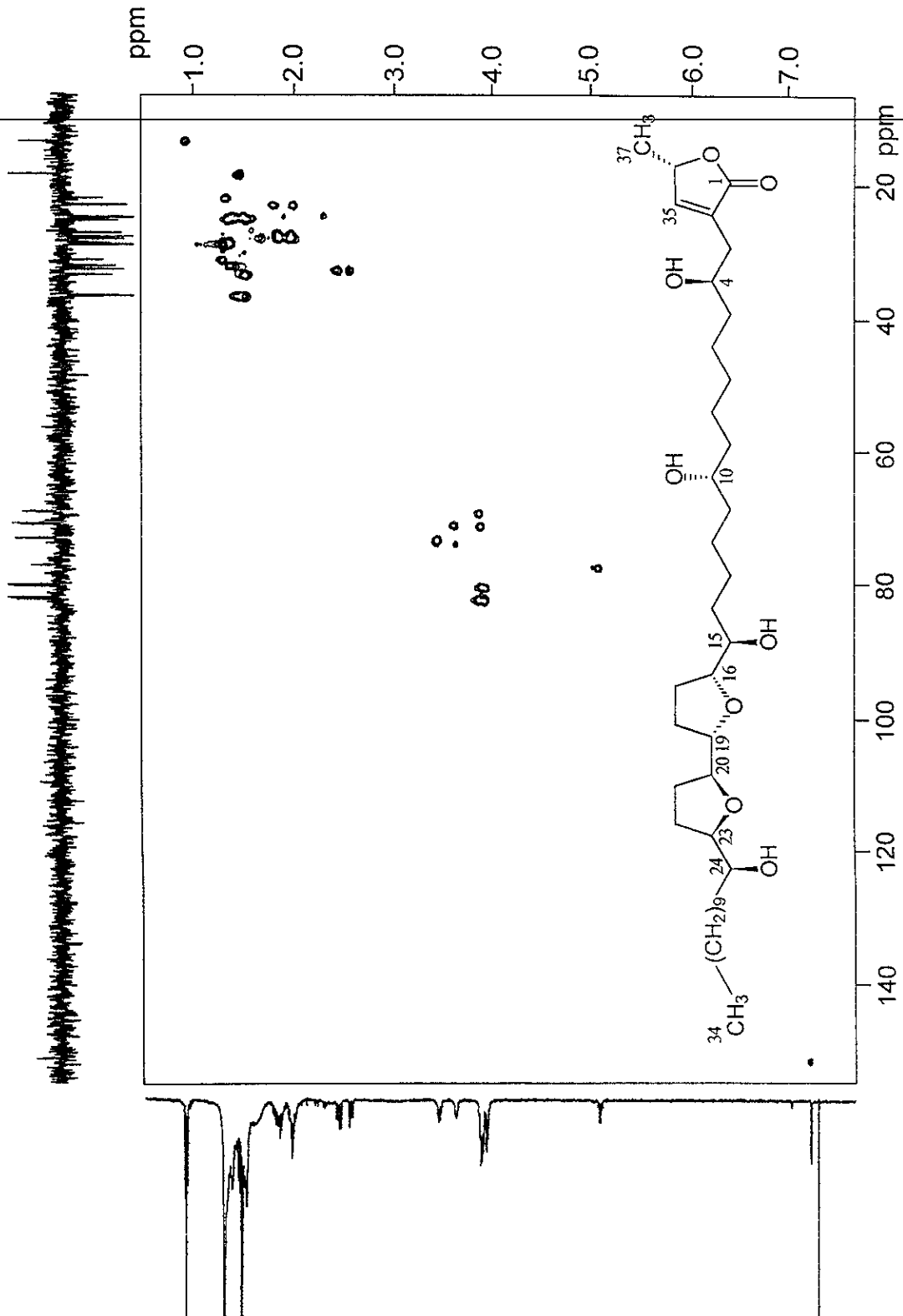
Espectro de masas modalidad IE del derivado siliado de la purpuracena (100a).

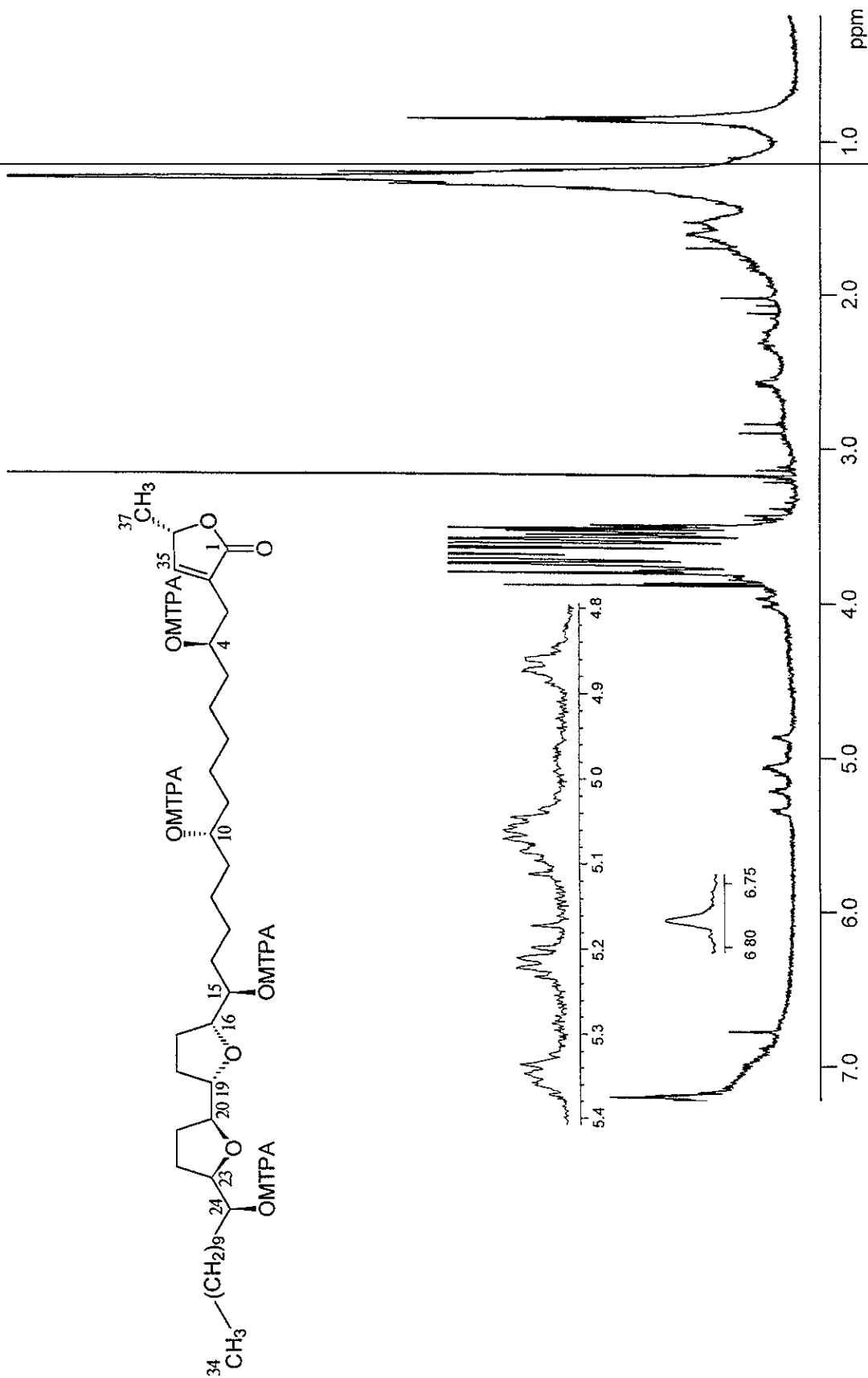
Espectro 35. Espectro de RMN ^1H de la purpuracenicina (100).

Espectro 36. Espectro de RMN ^1H -COSY de la purpuracina (100).

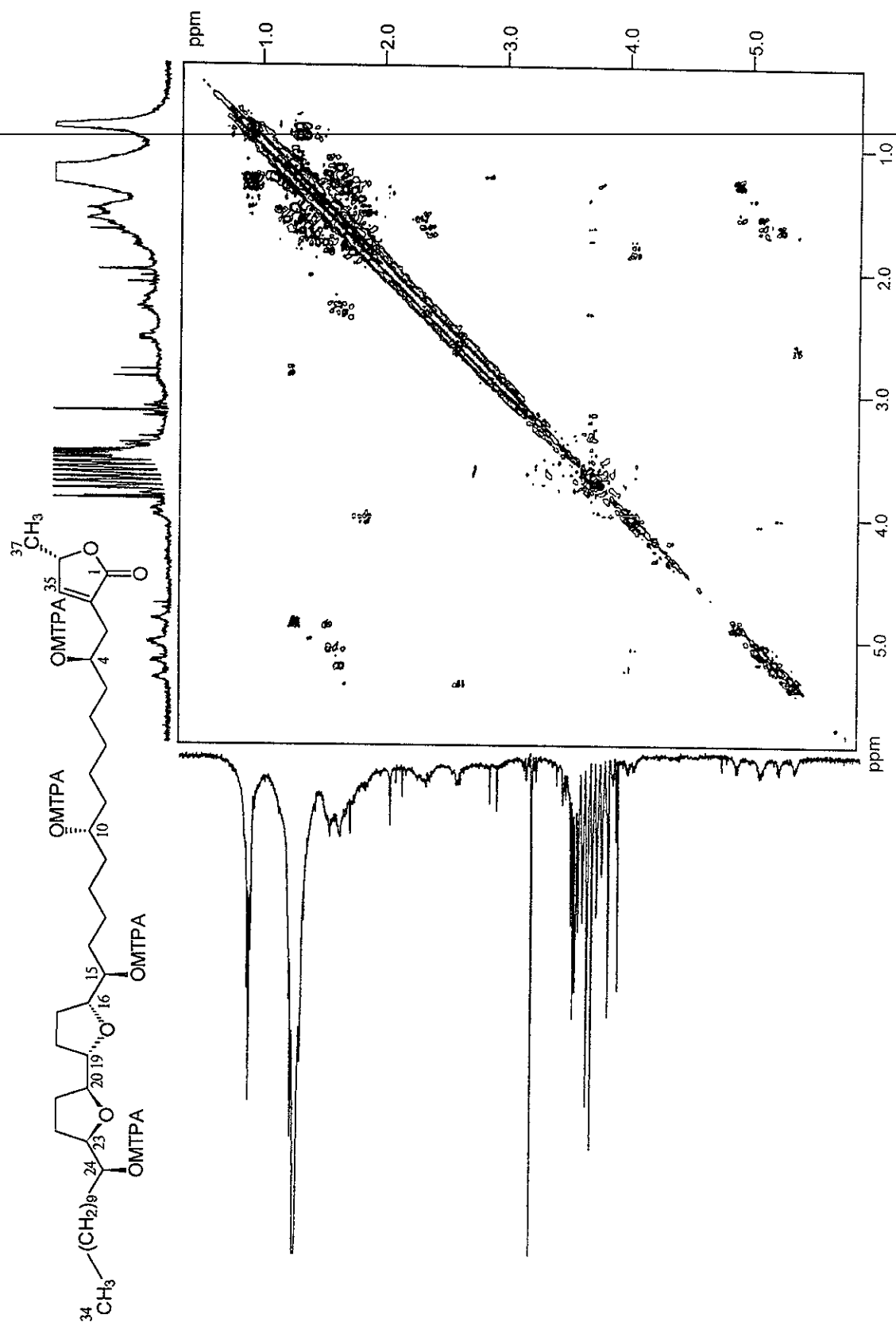
Espectro 37. Espectro de RMN ^{13}C de la purpuracena (100).

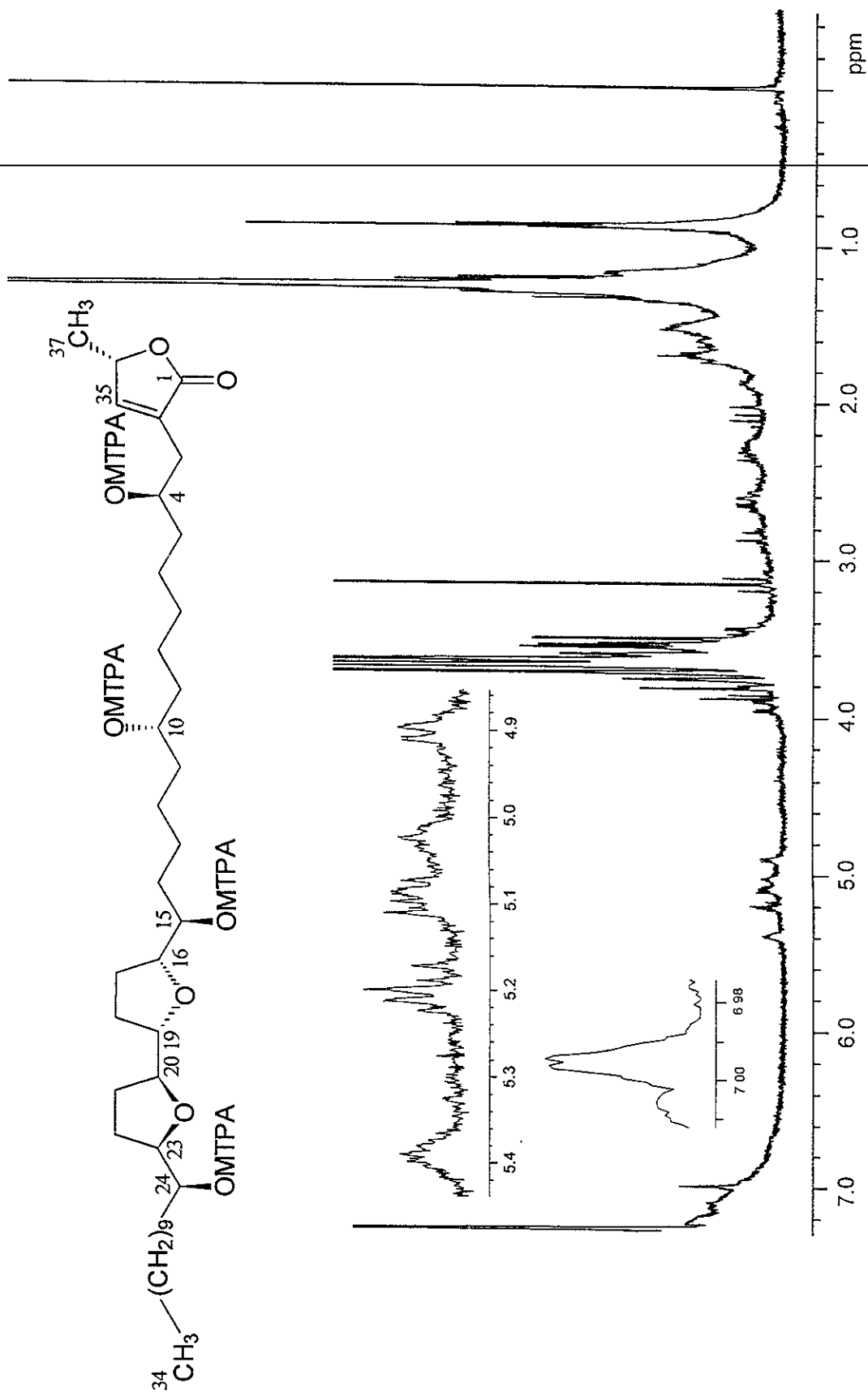
Espectro 38. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la purpuracenicina (100).

Espectro 39. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la purpuracena (100).

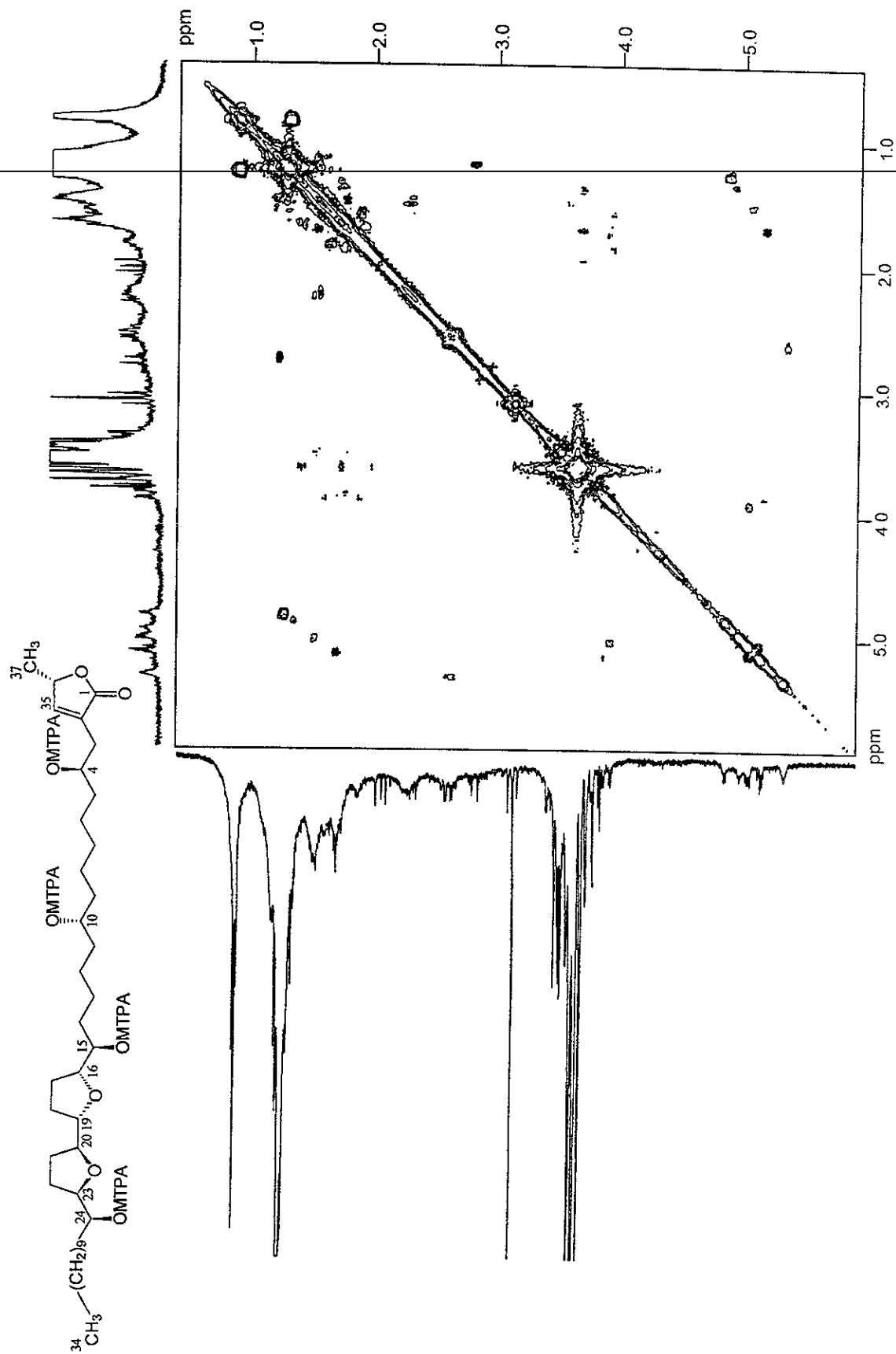


Espectro 40. Espectro de RMN ¹H del derivado per-(S)-éster de Mosher de la purpuracénina (100s).

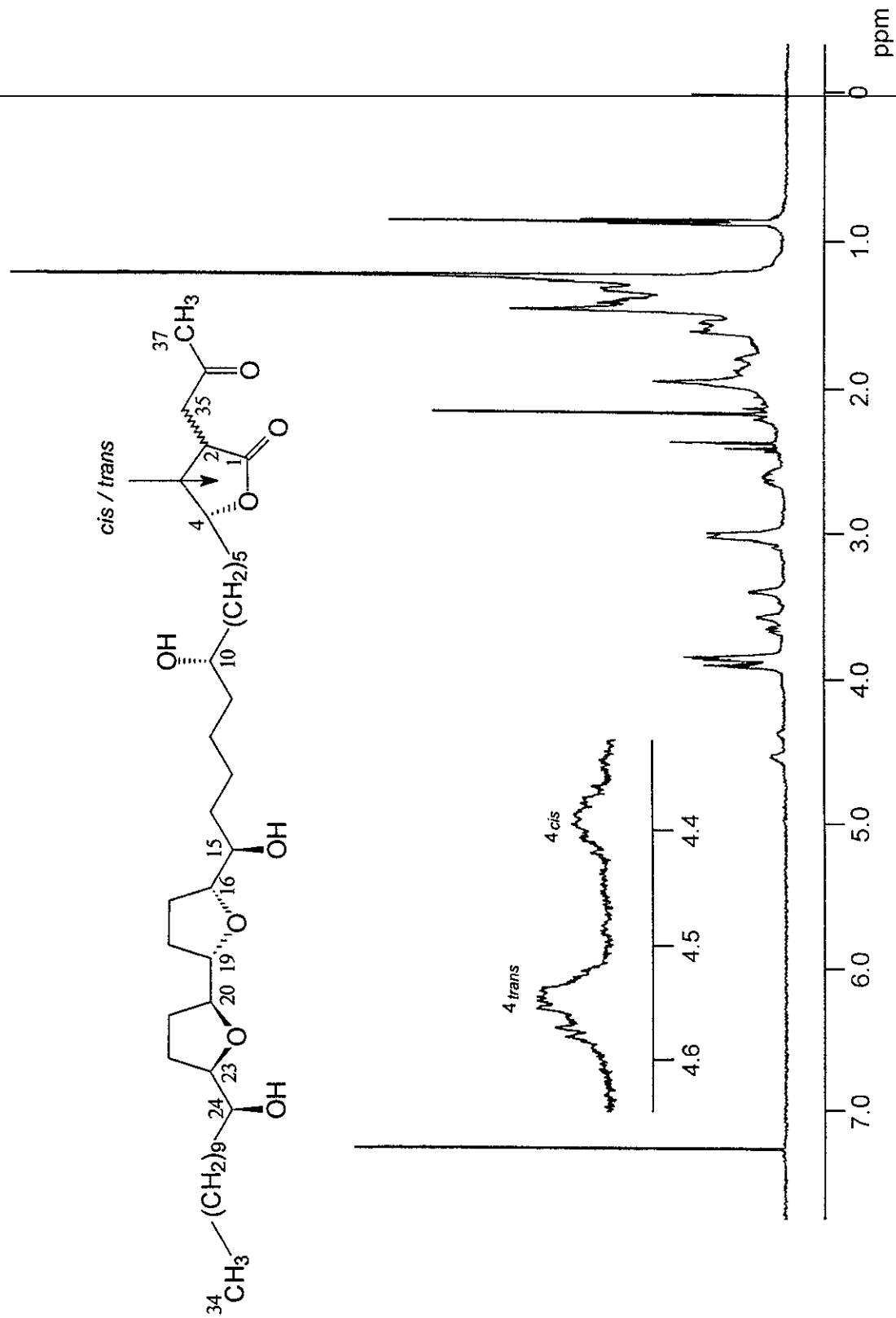
Espectro 41. Espectro de RMN ¹H-COSY del derivado per-(S)-éster de Mosher de la purpuracena (100s).

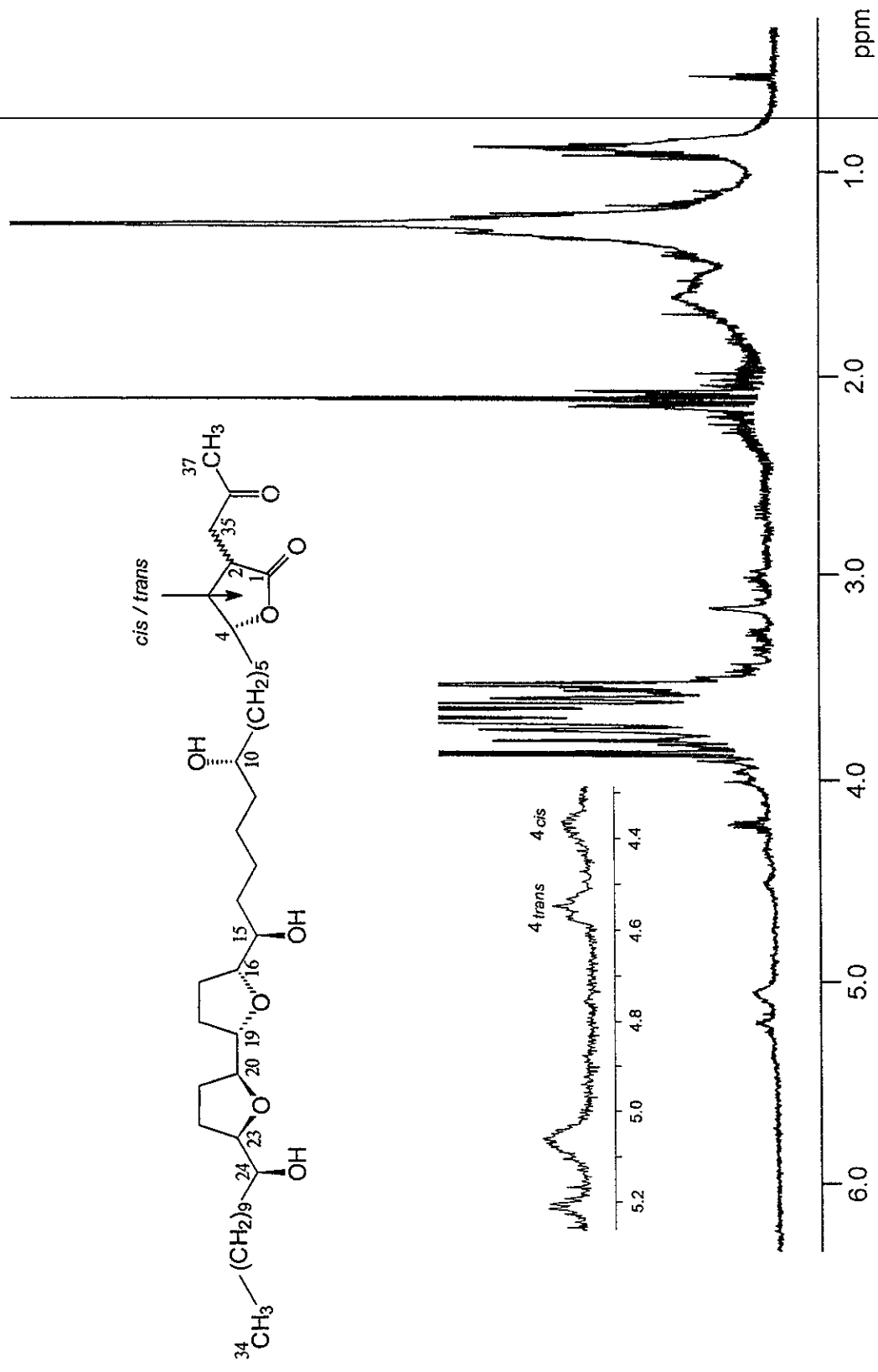


Espectro 42. Espectro de RMN ^1H del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la purpuracénina (100r).

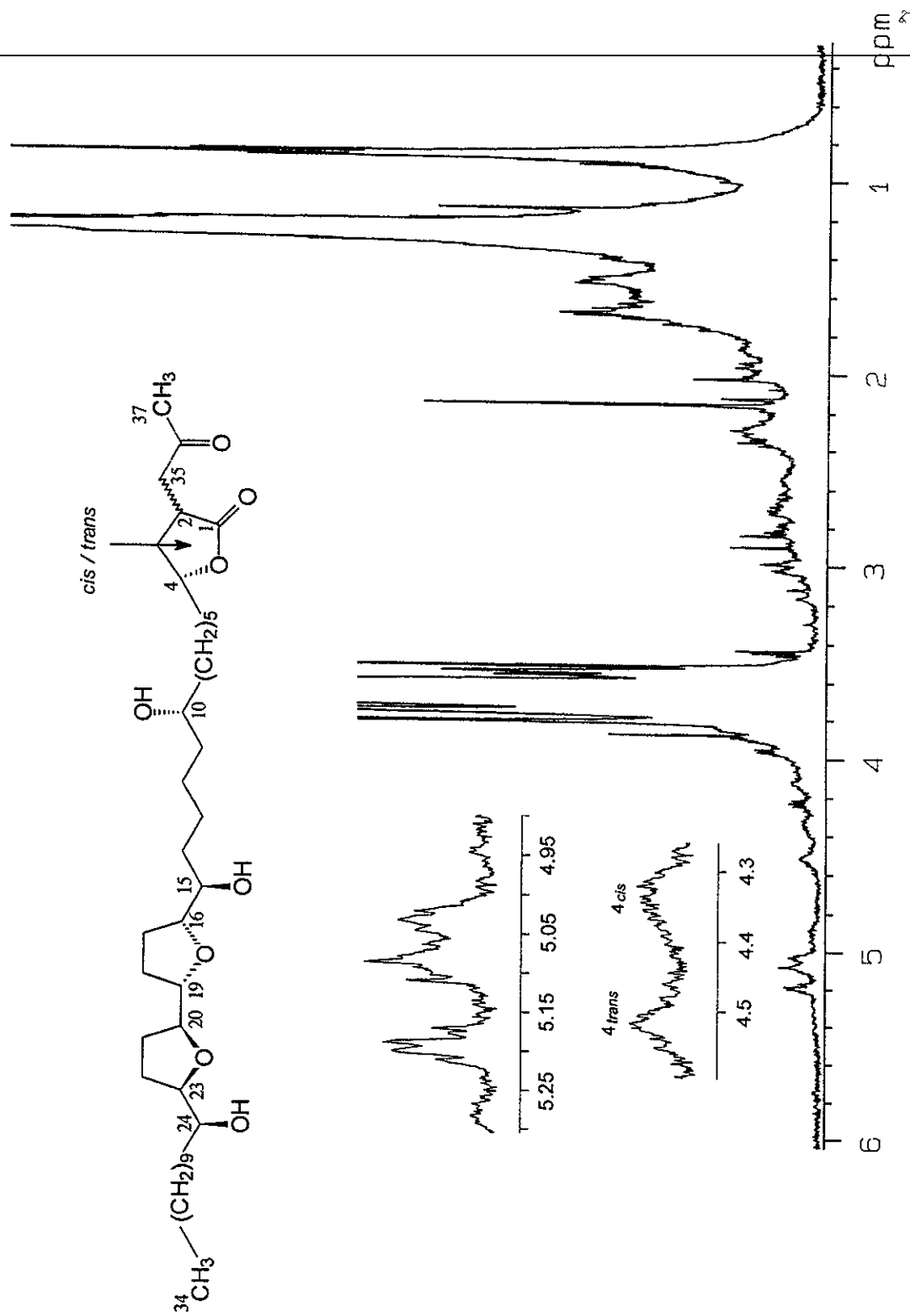


Espectro 43. Espectro de RMN ¹H-COSY del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la purpuracena (100r).

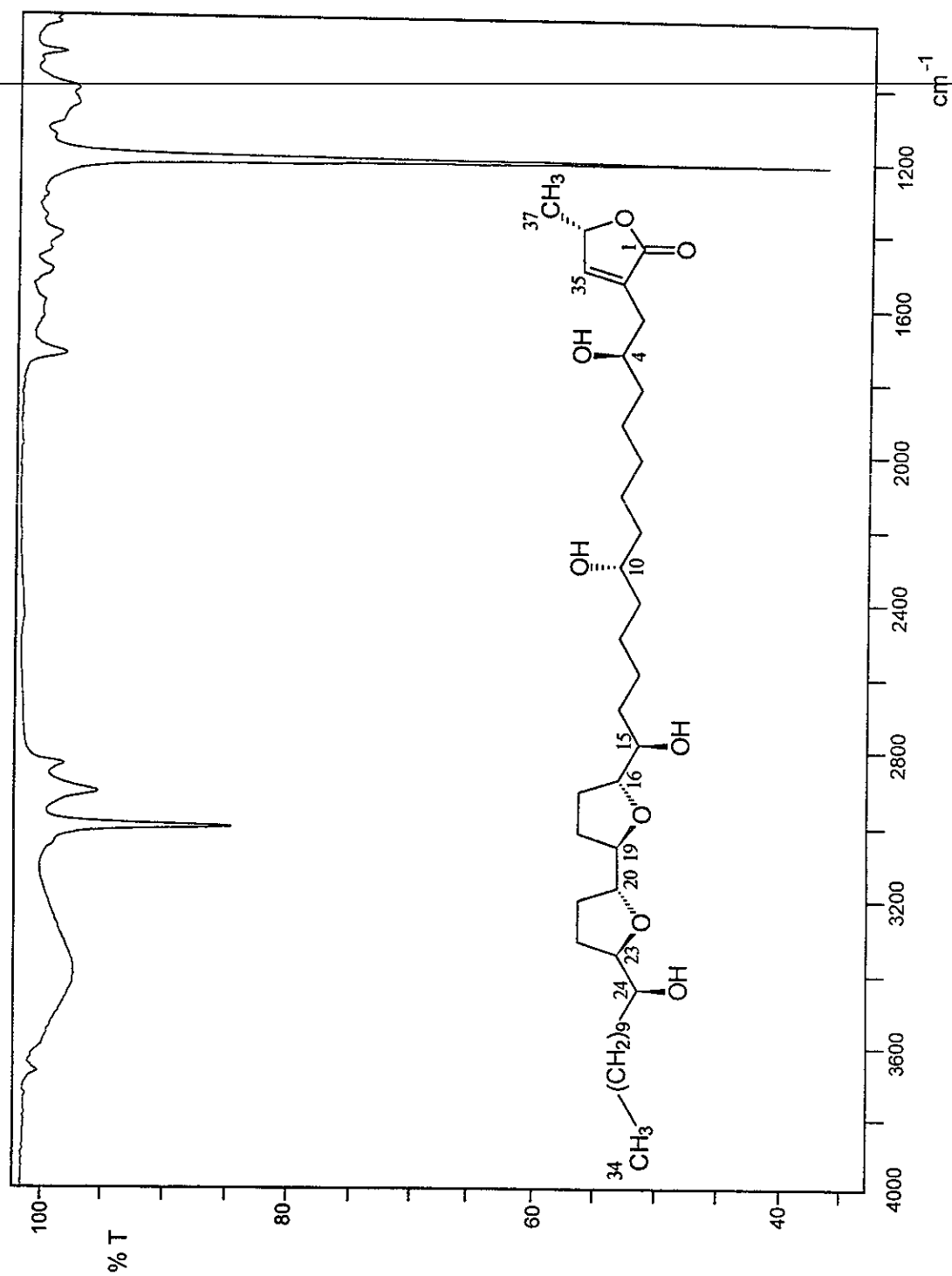
Espectro 44. Espectro de RMN ^1H de la mezcla epimérica de la isopurpuracena (**100t**).



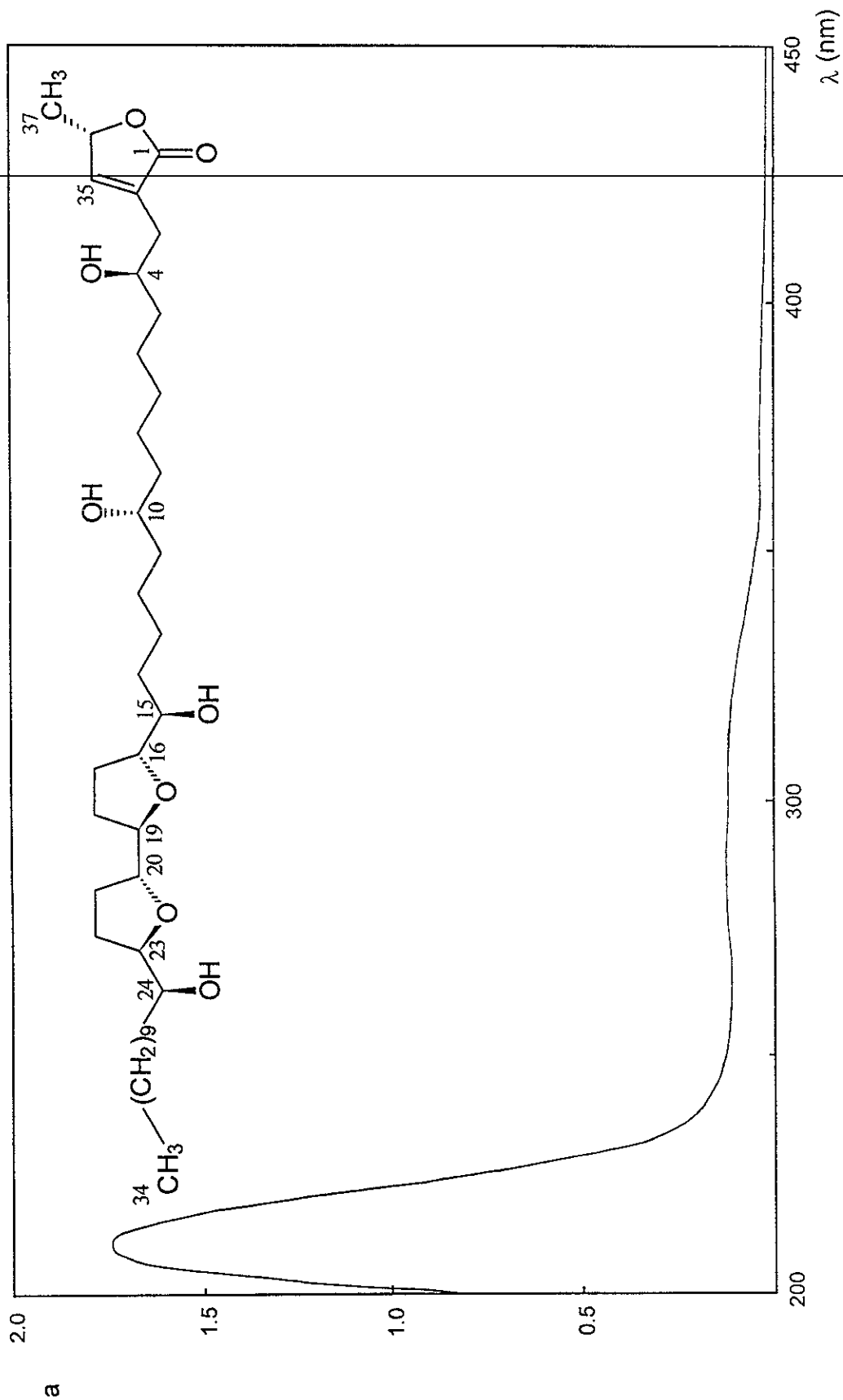
Espectro 45. Espectro de RMN ¹H del derivado tri-*S*-éster de Mosher de la mezcla epimérica de la isopuracenicina (100ts).



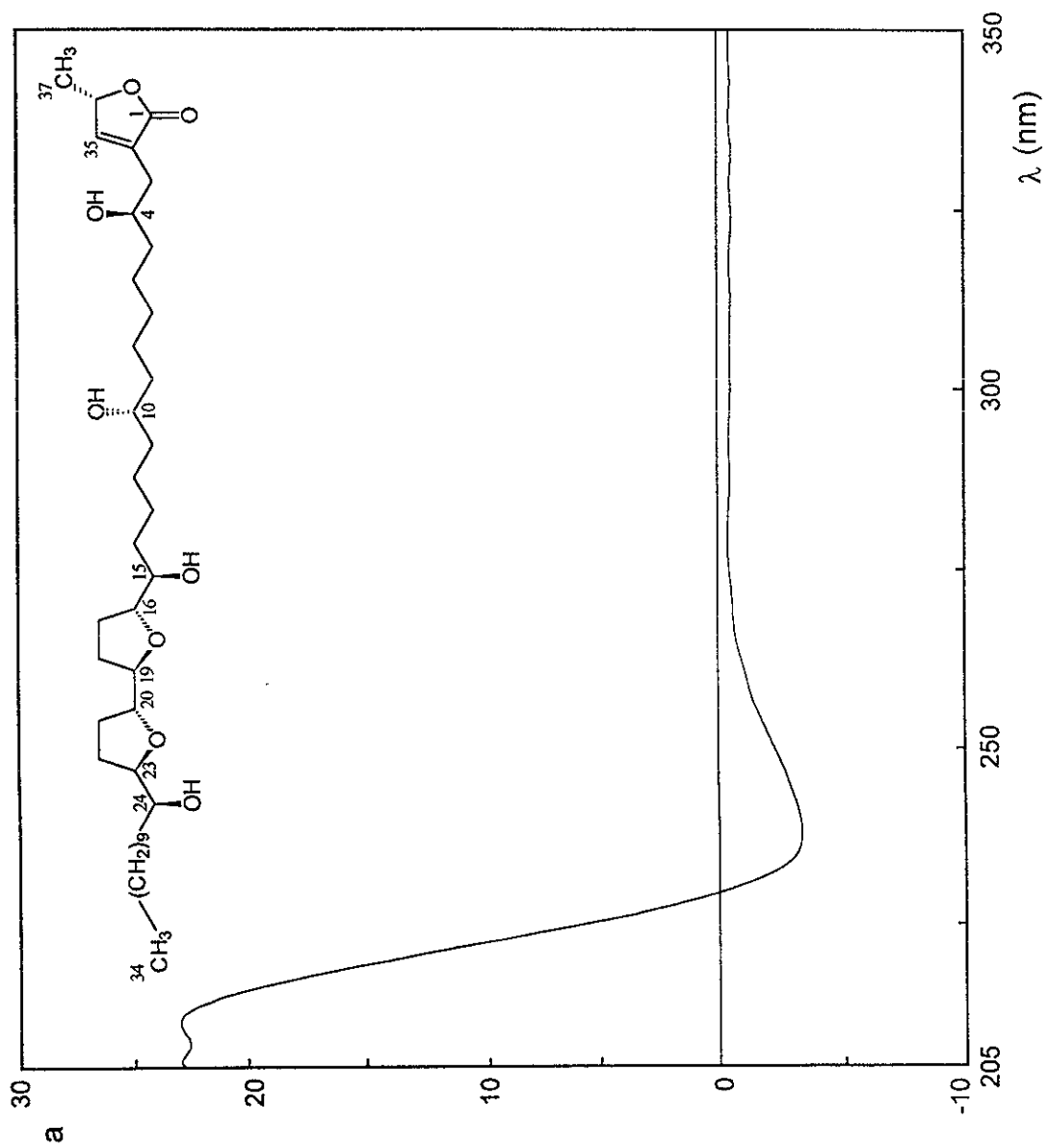
Espectro 46. Espectro de RMN ^1H del derivado tri-(R)-éster de Mosher de la mezcla epimérica de la isopuracénina (100tr)



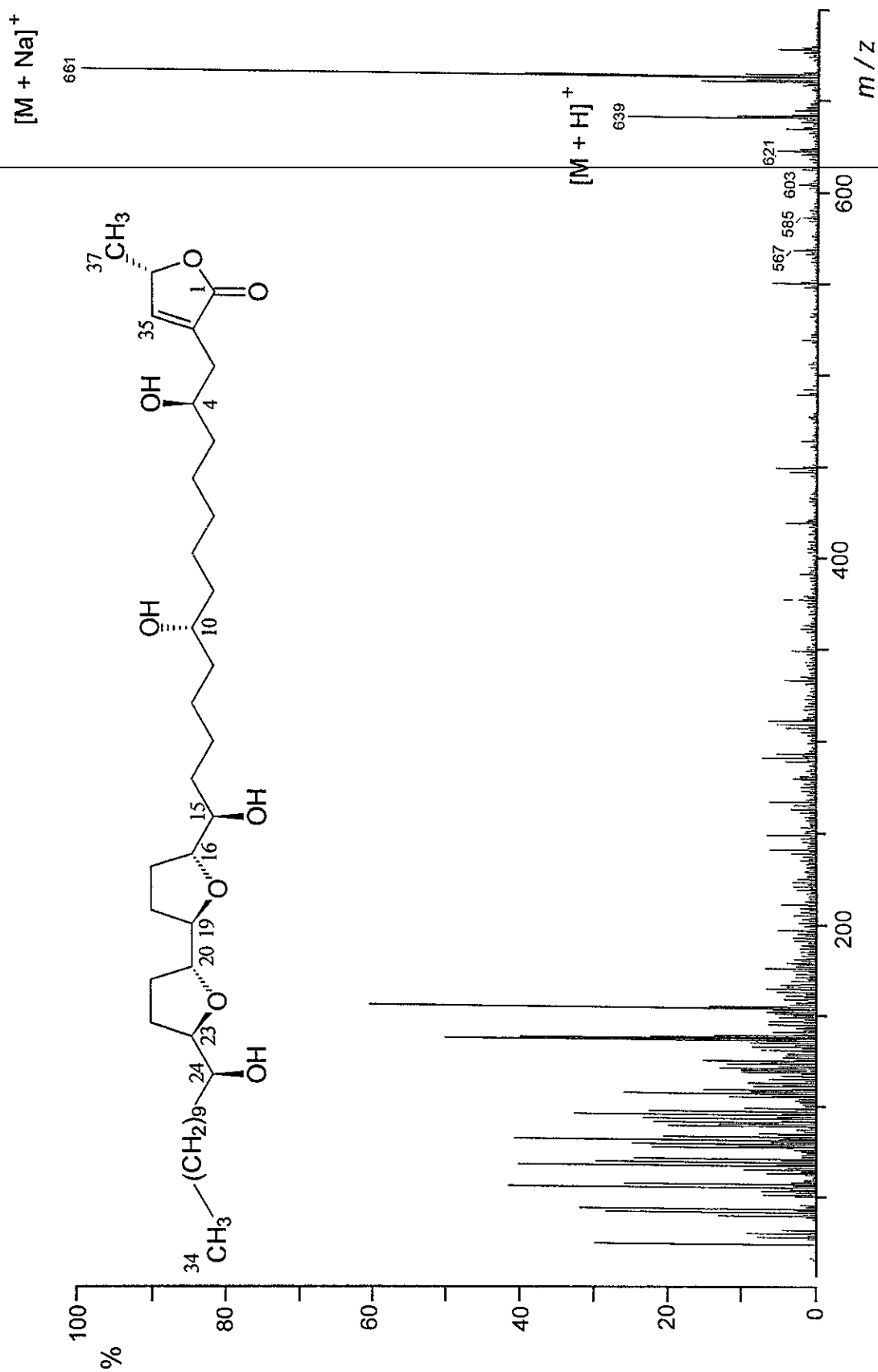
Espectro 47. Espectro en el IR de la anoglaucina (101).

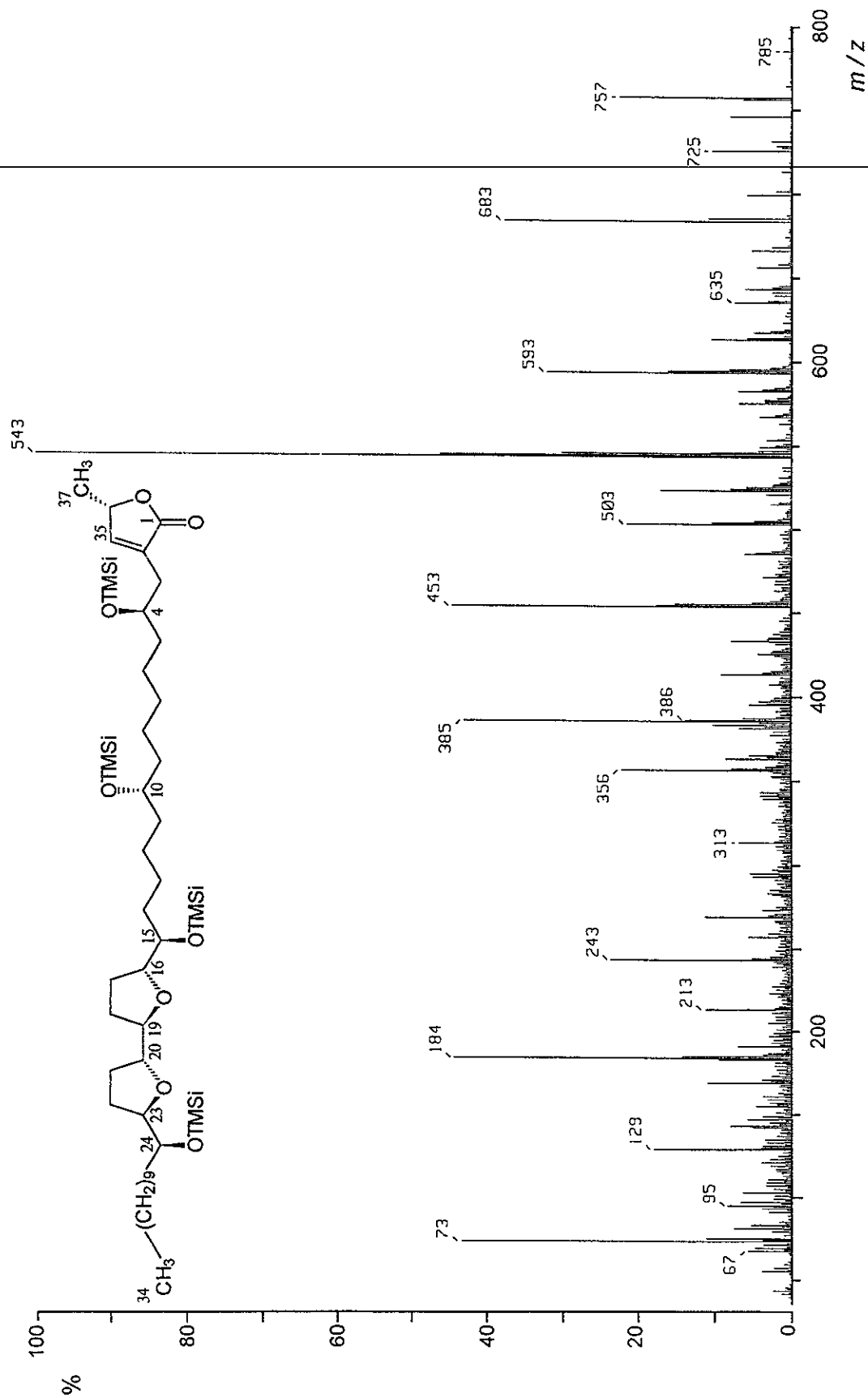


Espectro 48. Espectro en el UV de la anoglaucina (101).

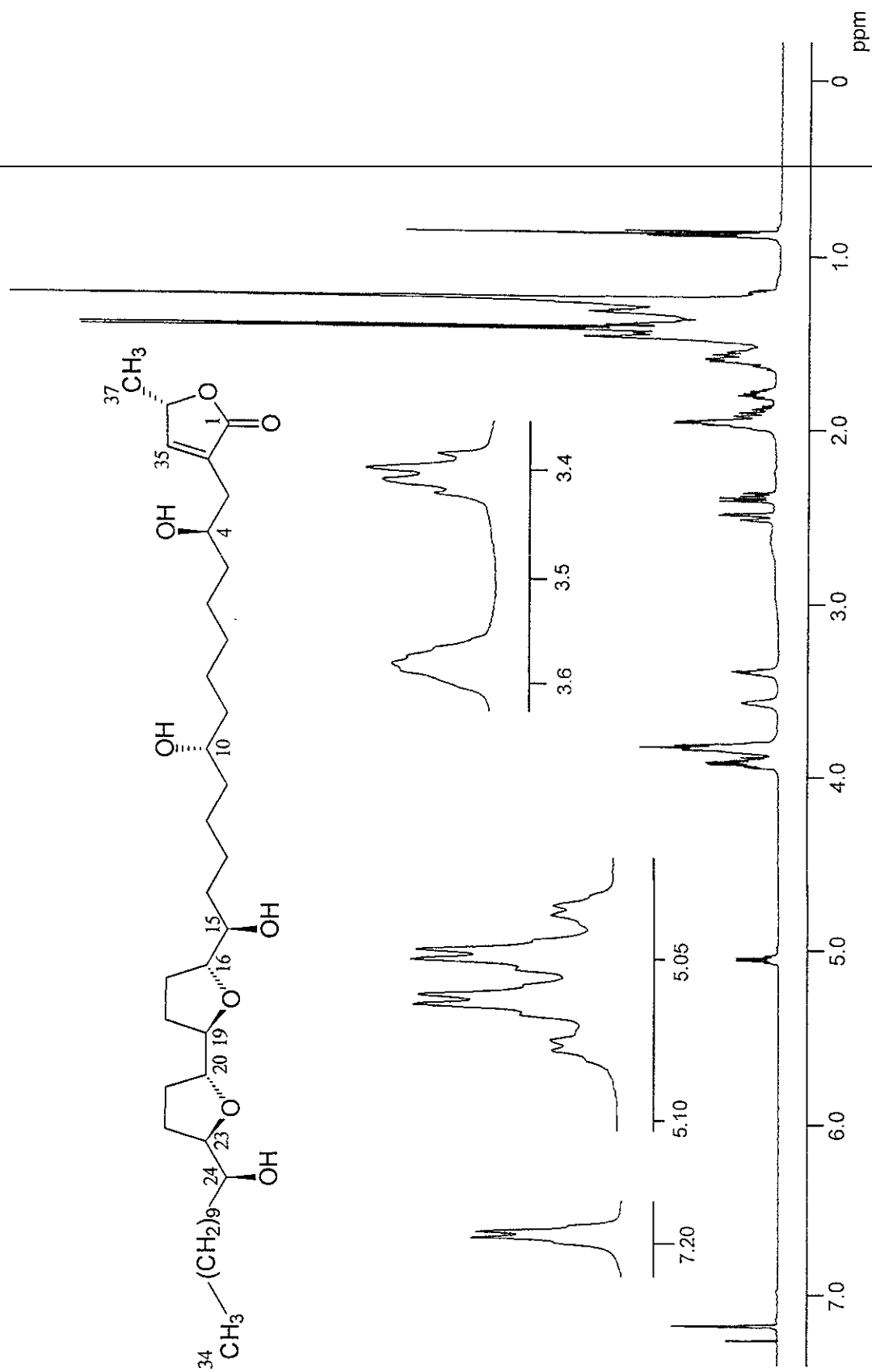


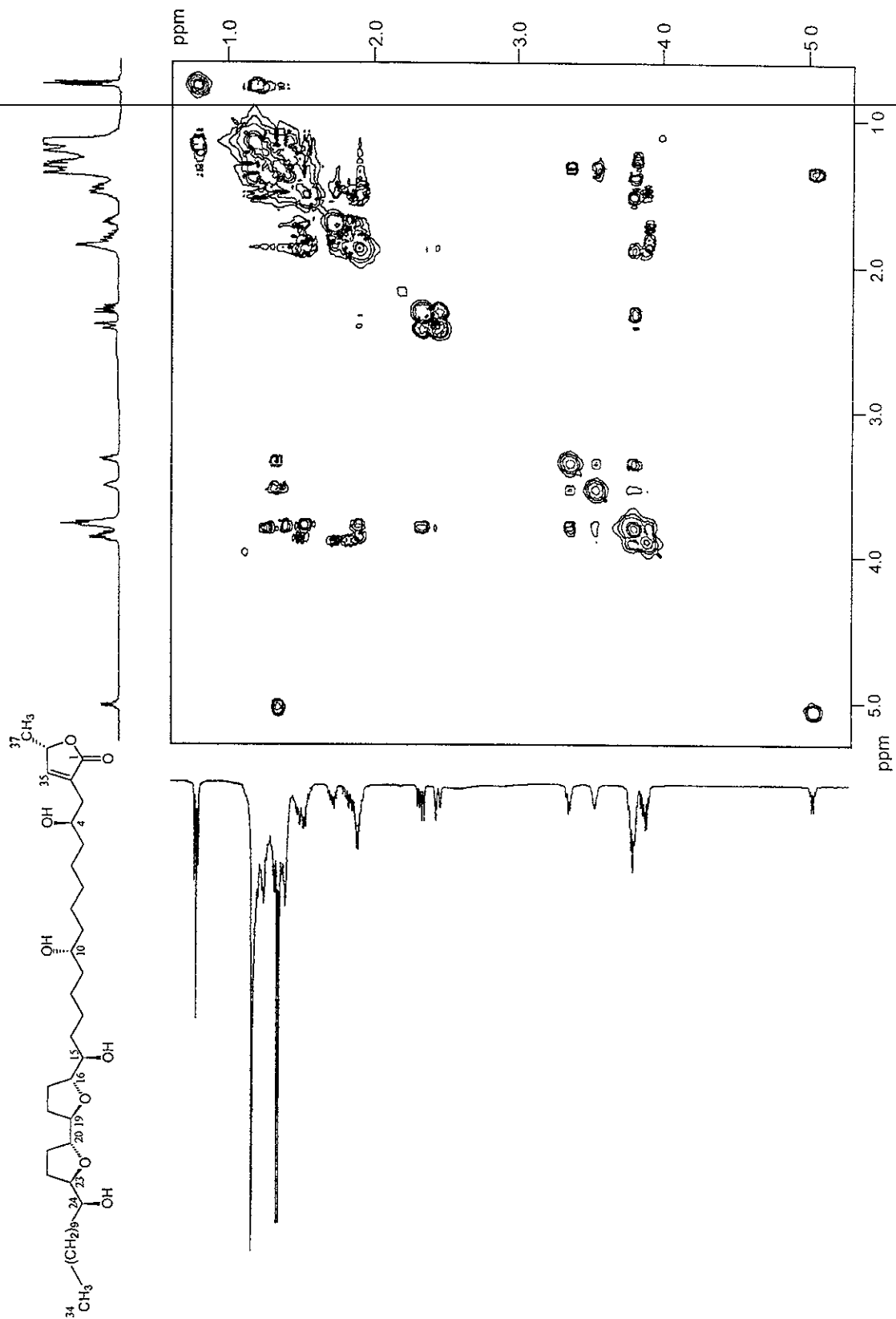
Espectro 49. Espectro de DC de la anoglaucina (101).

Espectro 50. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la anoglaucina (101).

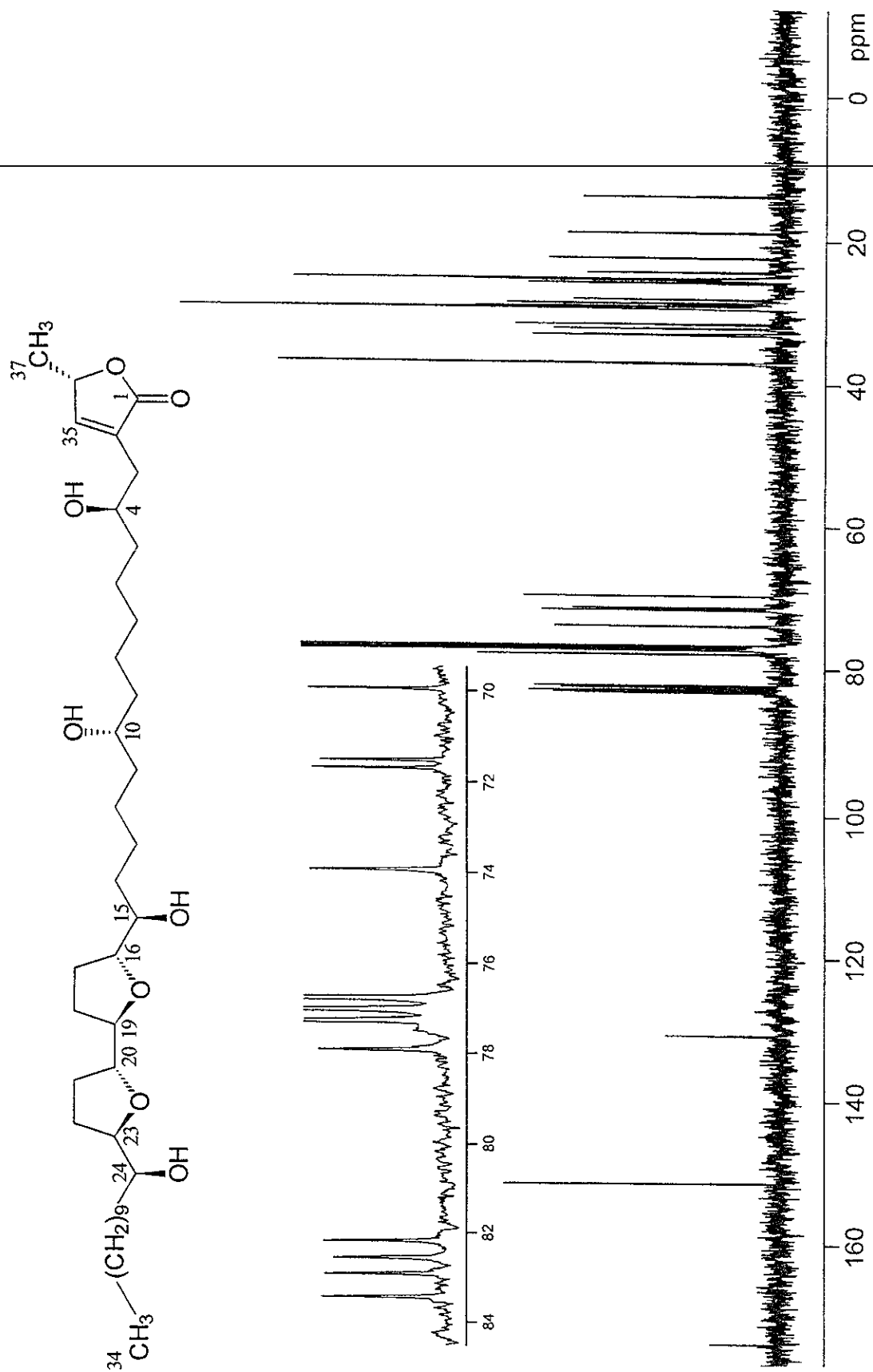


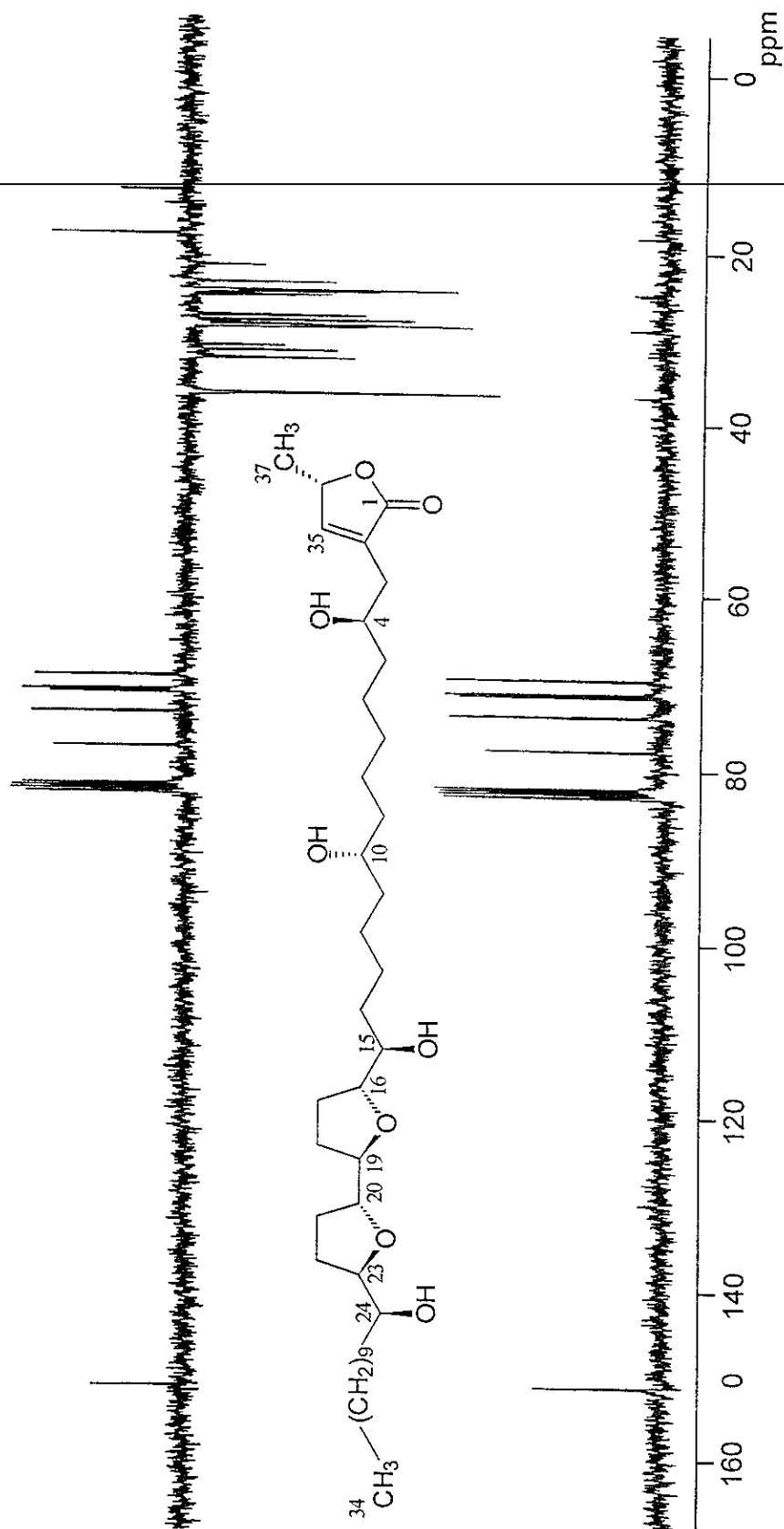
Espectro 51. Espectro de masas modalidad IE del derivado siliado de la anoglaucina (101a).

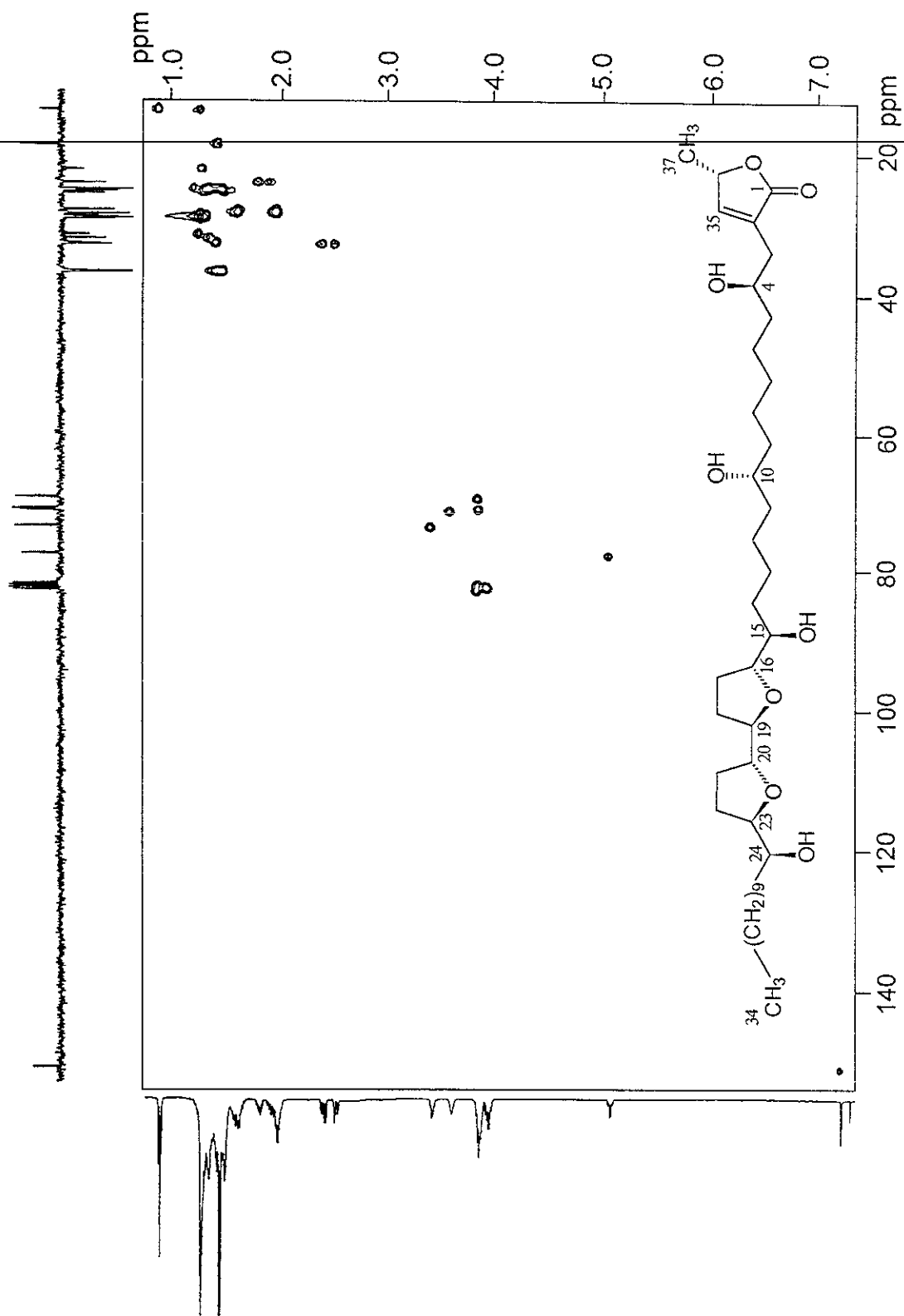
Espectro 52. Espectro de RMN ^1H de la anoglaucina (101).



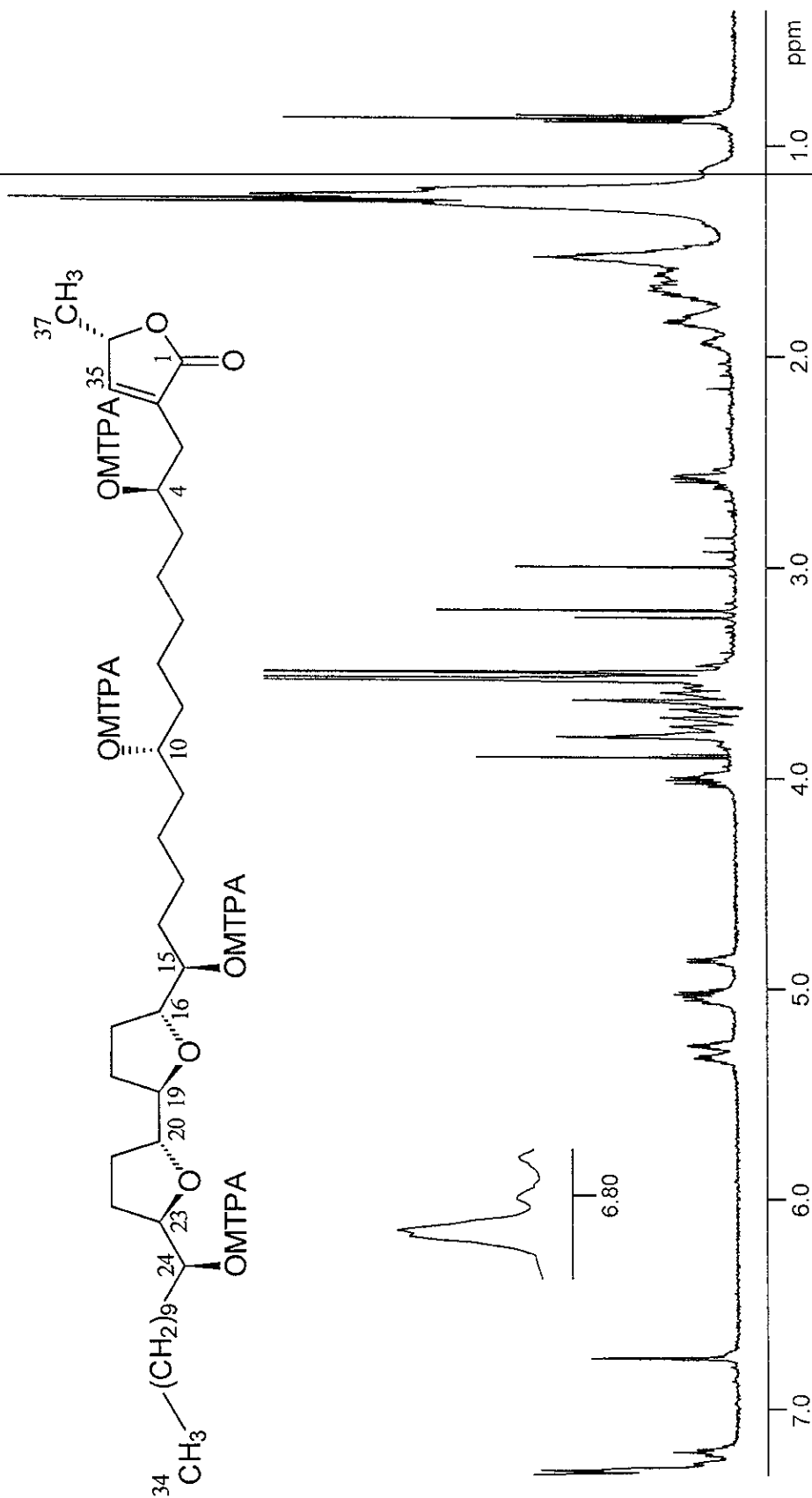
Espectro 53. Espectro de RMN ¹H-COSY de la anoglaucina (101).

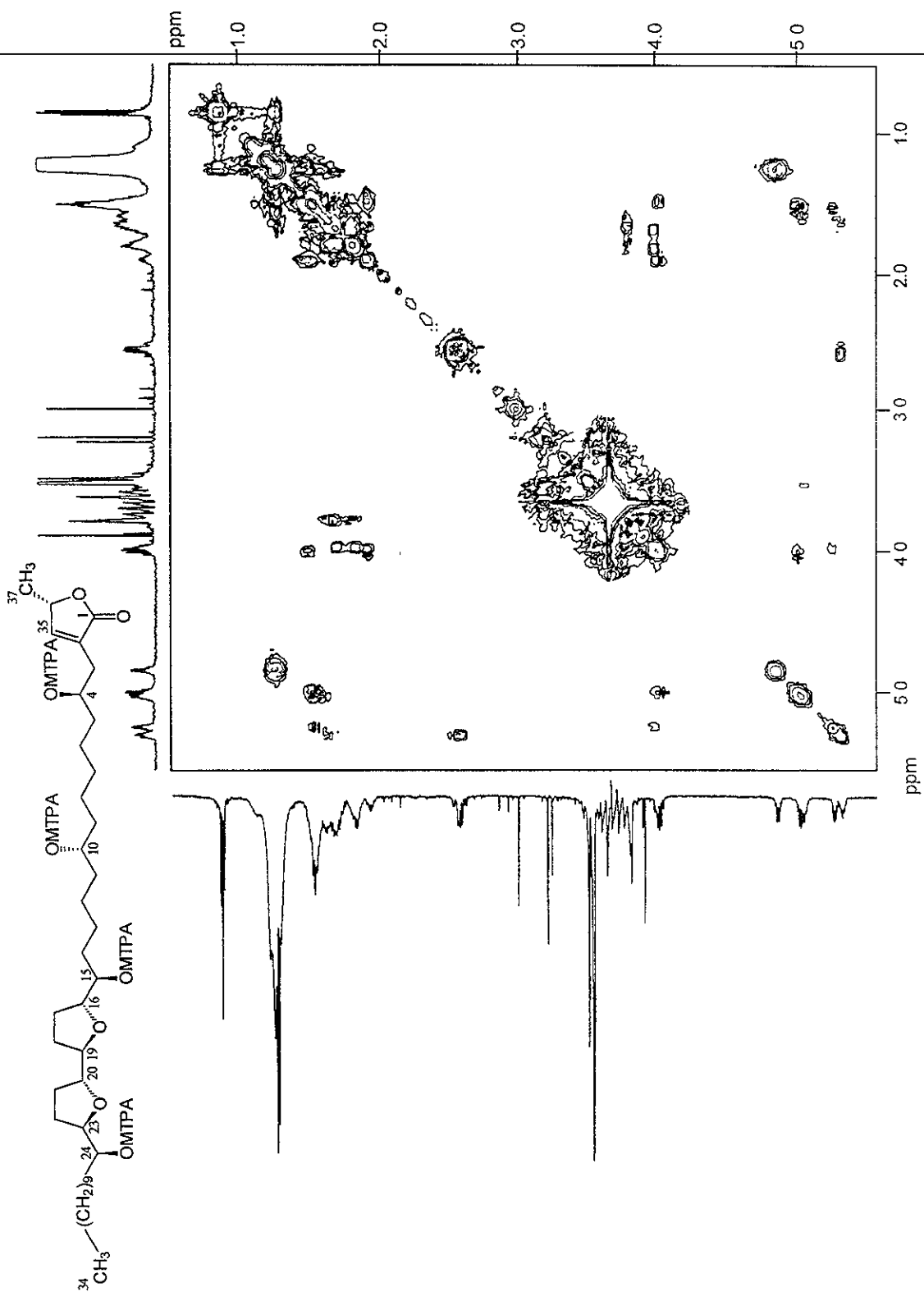
Espectro 54. Espectro de RMN ^{13}C de la anoglaucina (101).

Espectro 55. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la anoglaucina (101).

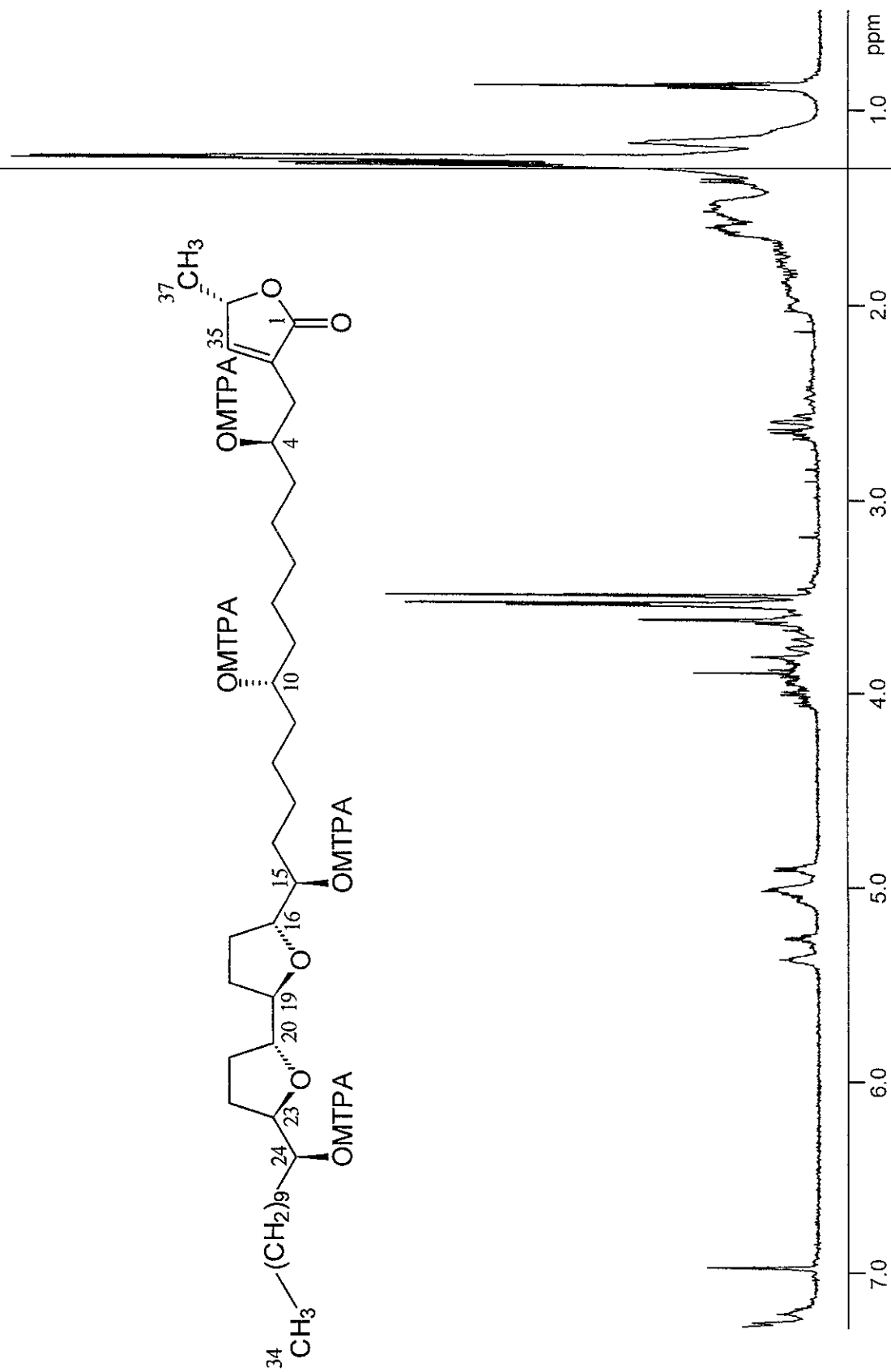


Espectro 56. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMOC de la anoglaucina (101).

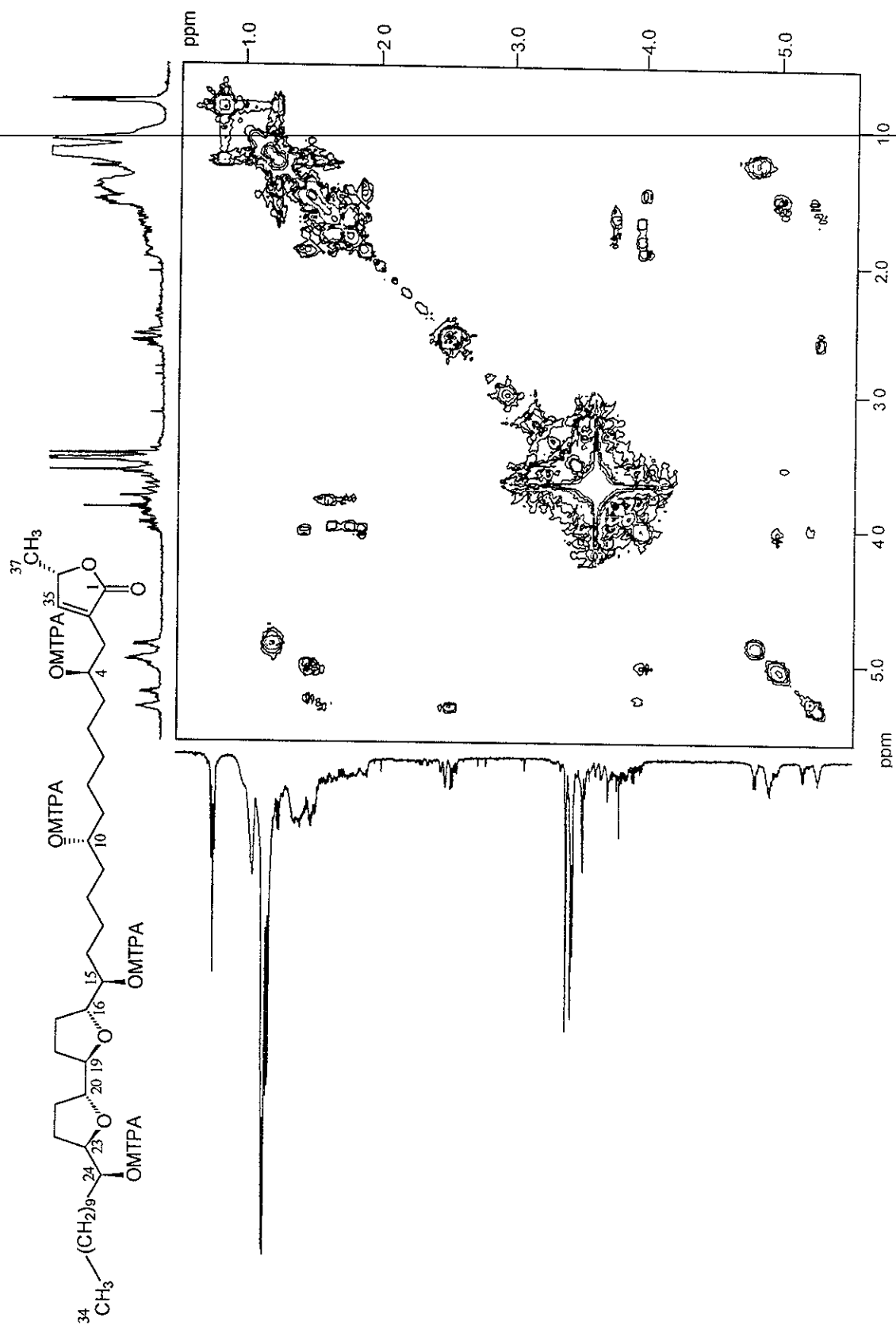
Espectro 57. Espectro de RMN ^1H del derivado per-(S)-éster de Mosher de la anoglaucina (101s).



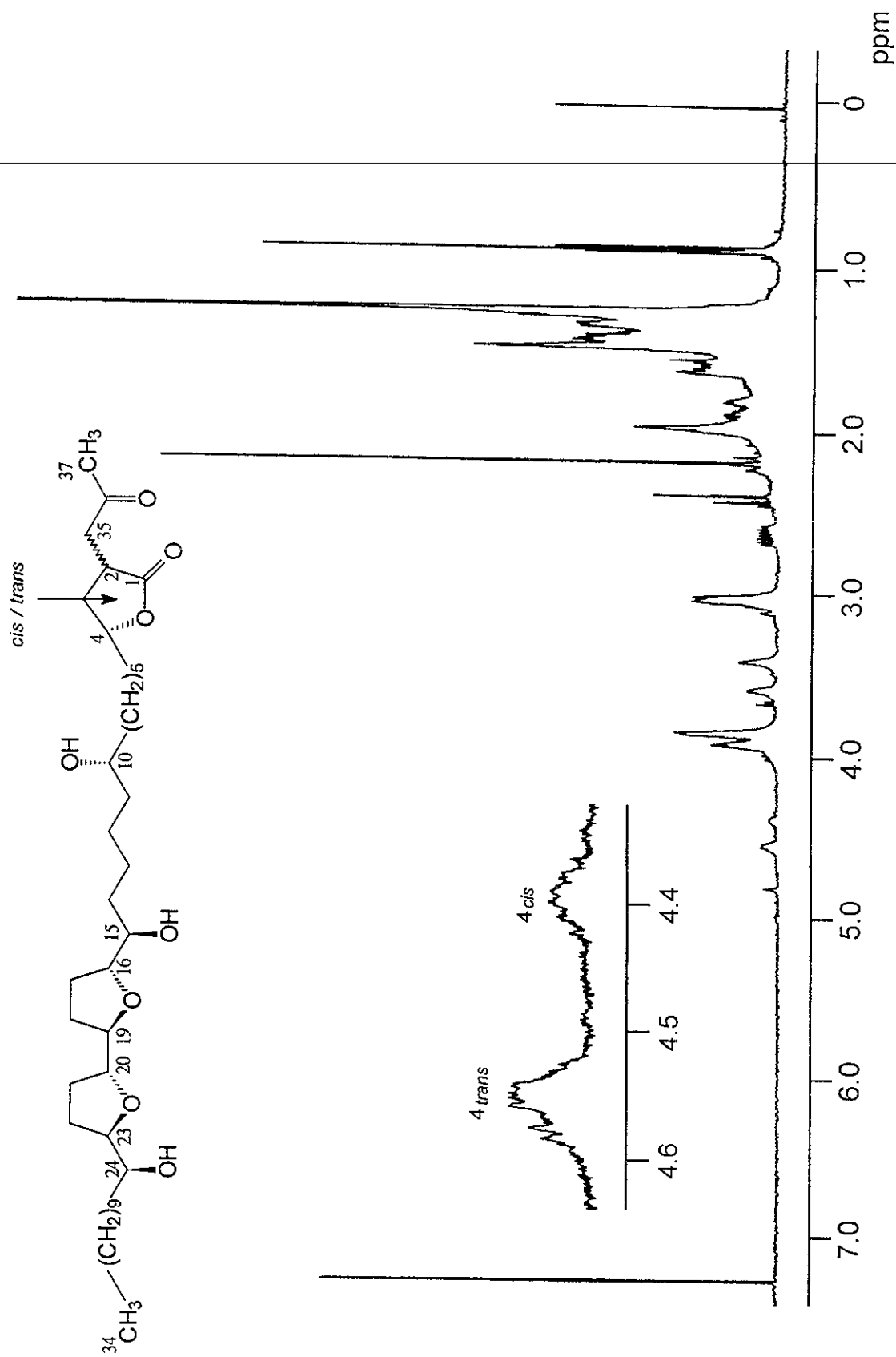
Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(S)-éster de Mosher de la anoglaucina (**101s**).

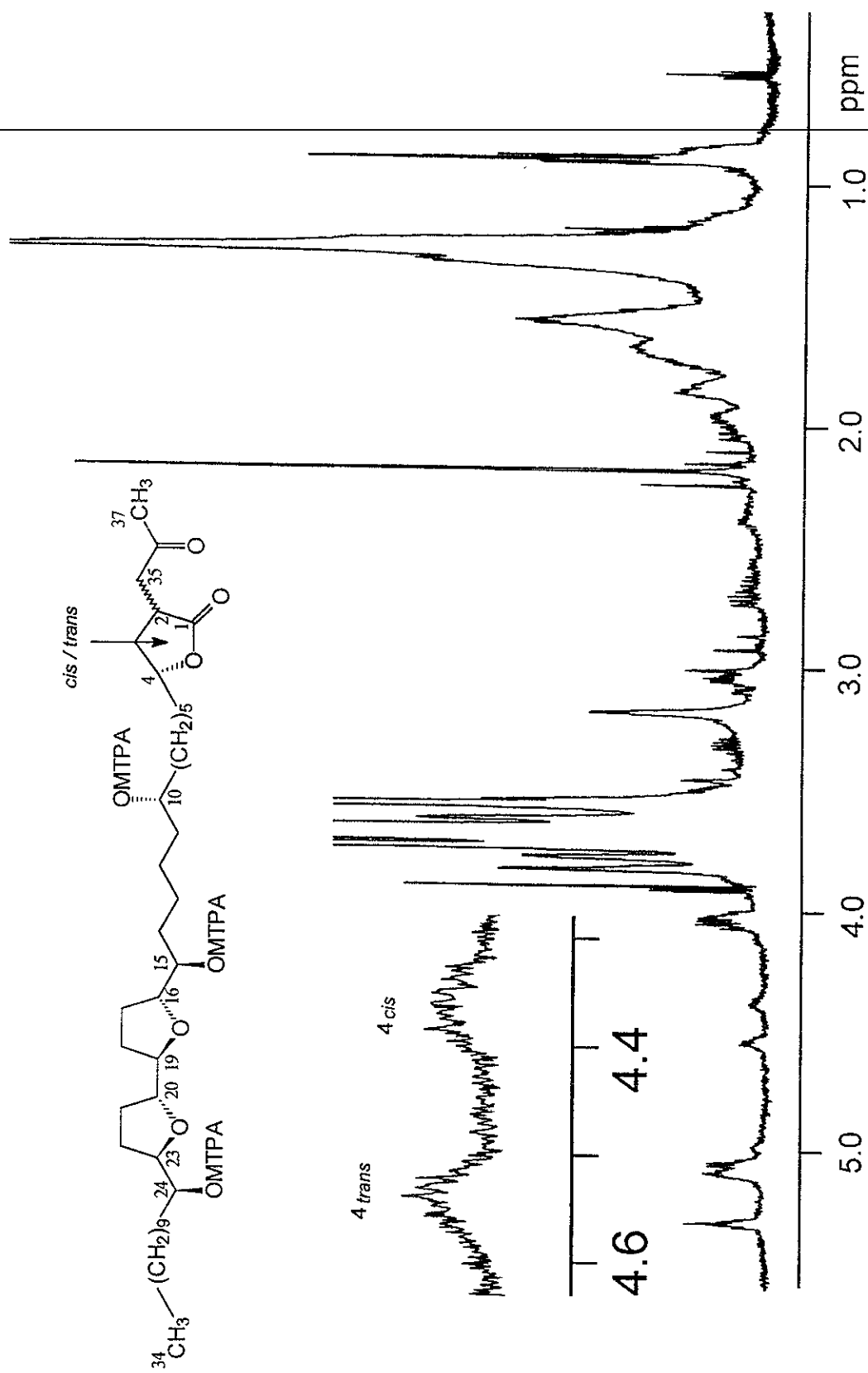


Espectro 59. Espectro de RMN ¹H del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la anoglaucina (**101r**).

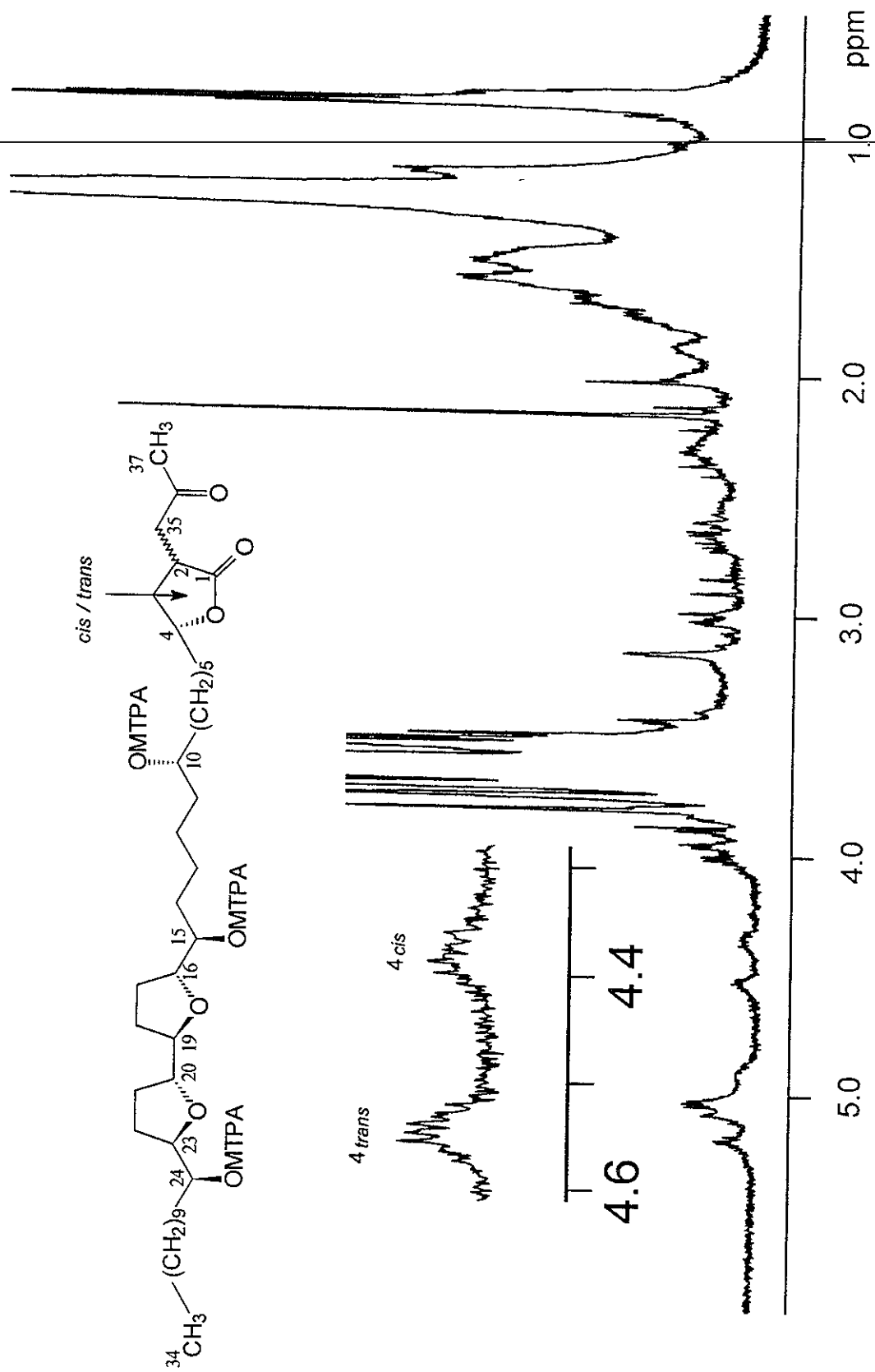


Espectro 60. Espectro de RMN ^1H -COSY del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la anoglaucina (**101r**).

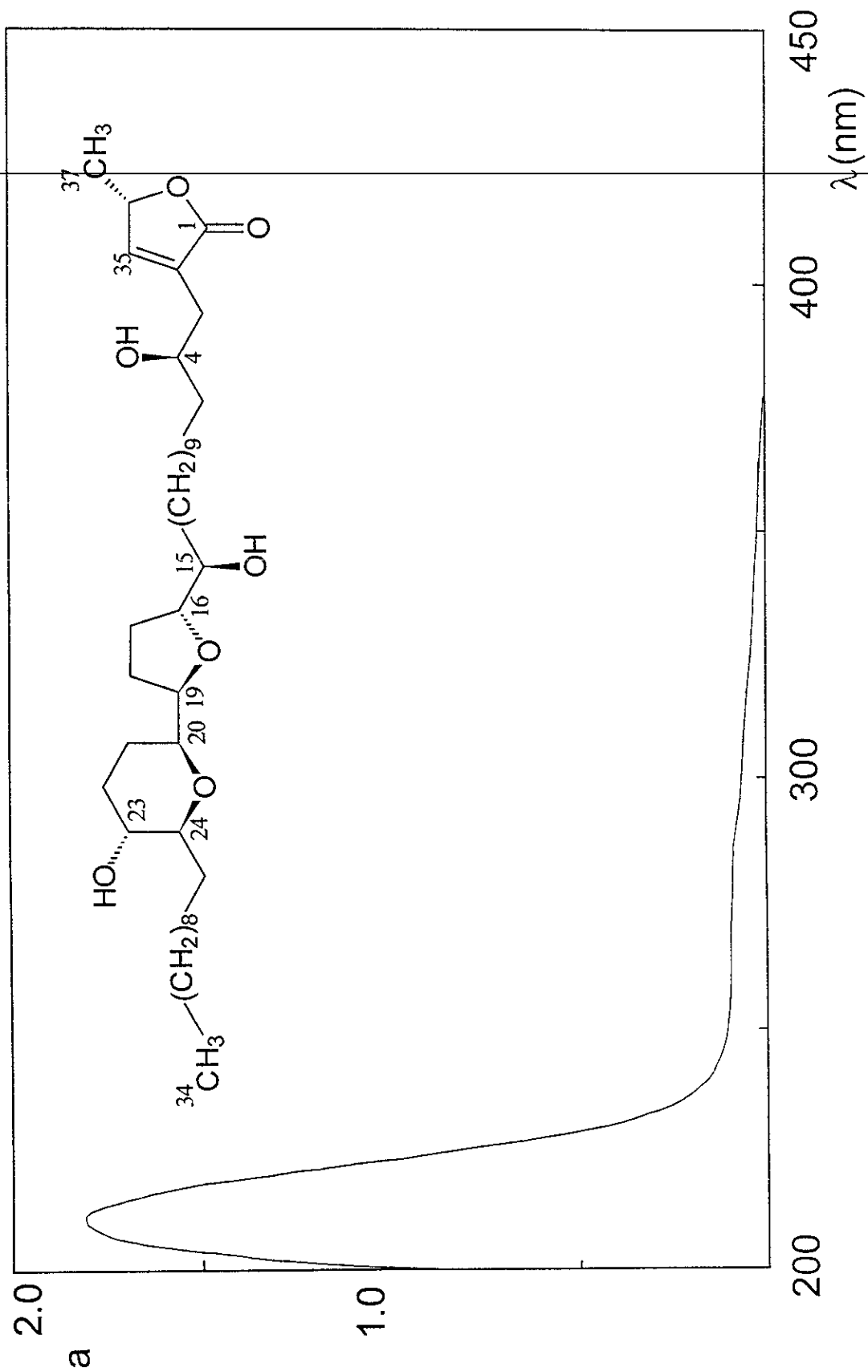
Espectro 61. Espectro de RMN ¹H de la mezcla epimérica de la isoanoglaucina (**101t**).



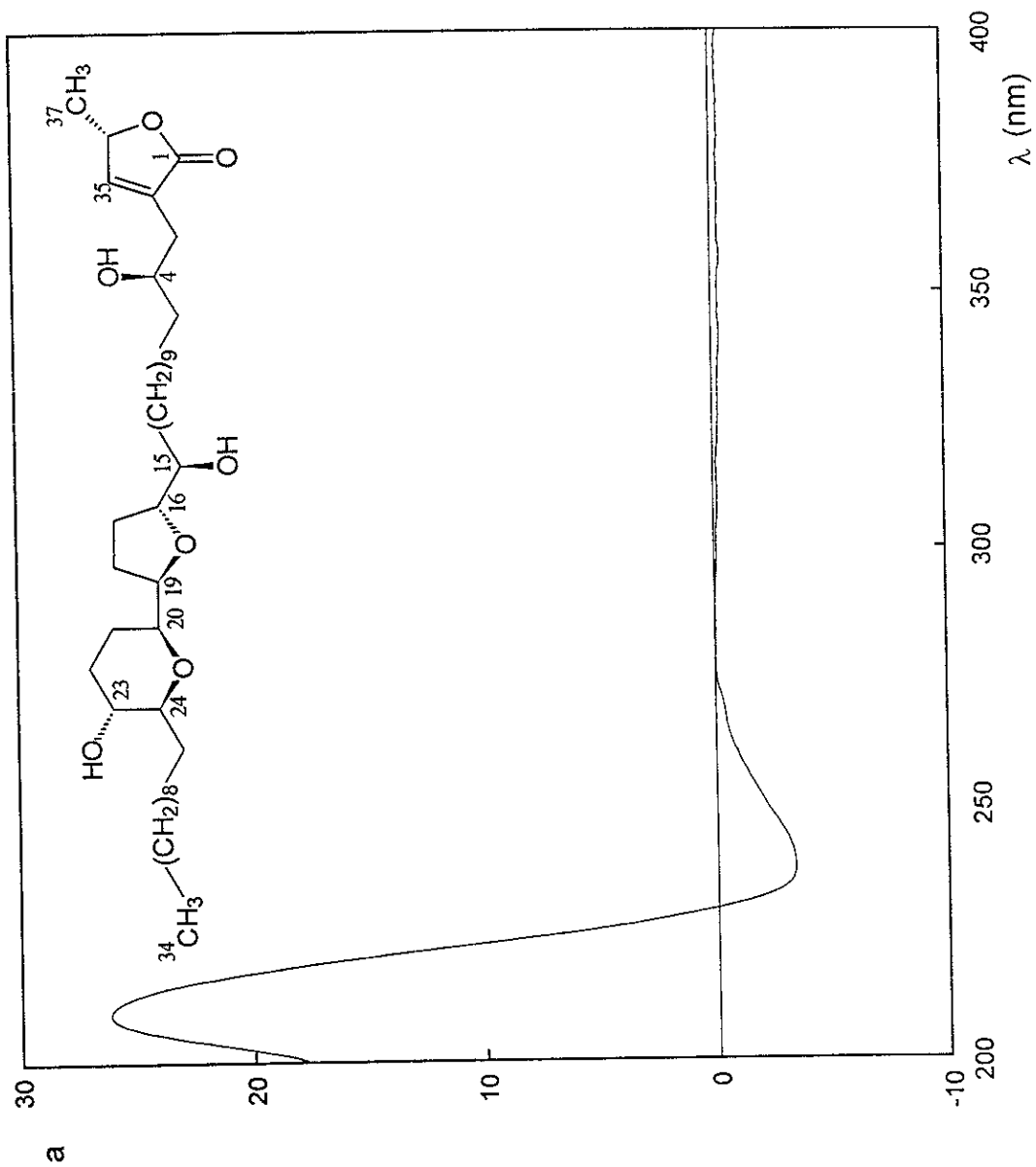
Espectro 62. Espectro de RMN ¹H del derivado tri-(S)-éster de Mosher de la mezcla epimérica de la isoanoglaucina (**101ts**).



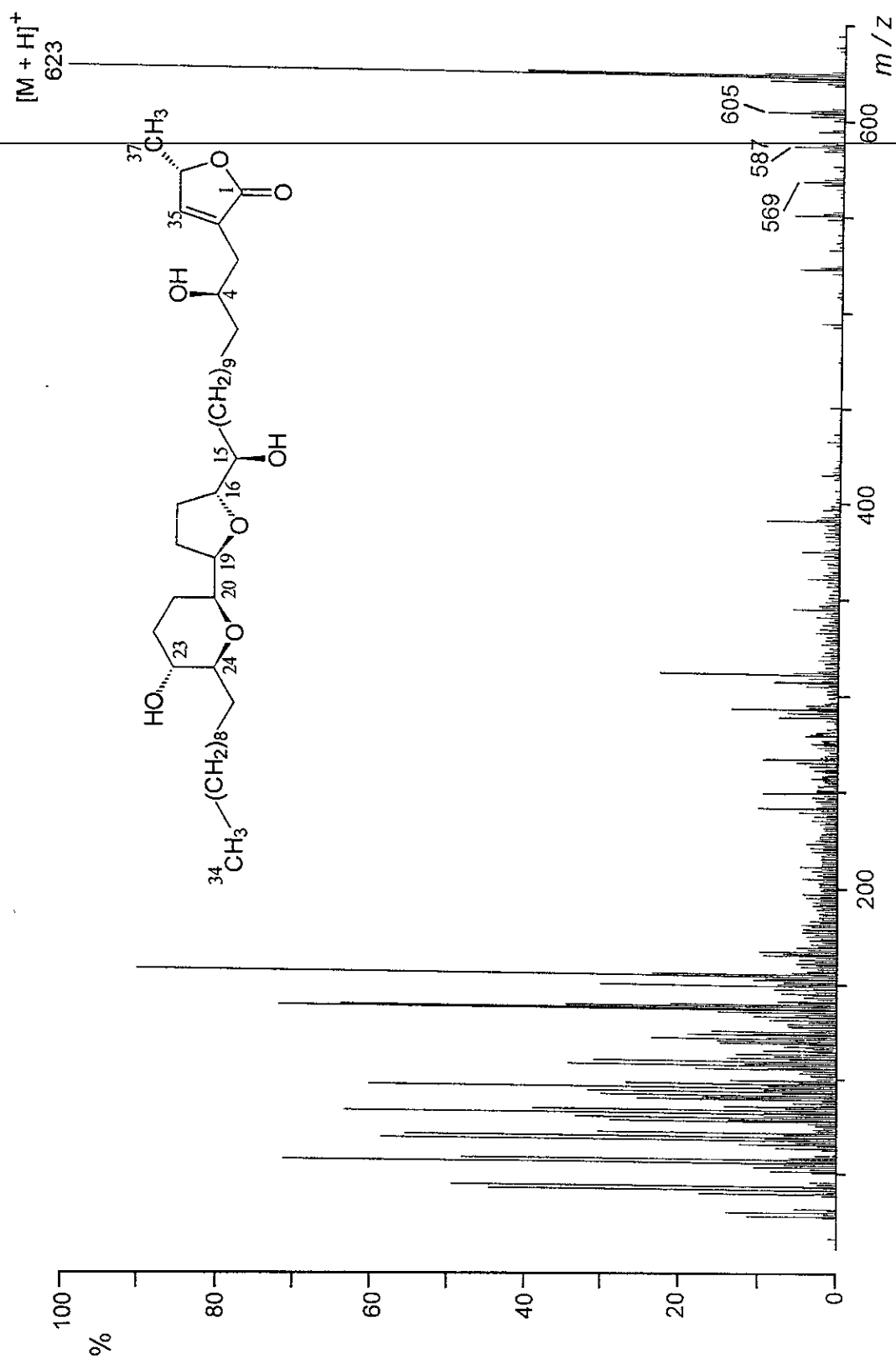
Espectro 63. Espectro de RMN ¹H del derivado tri-(*R*)-éster de Mosher de la mezcla epimérica de la isoanoglaucina (101ts)

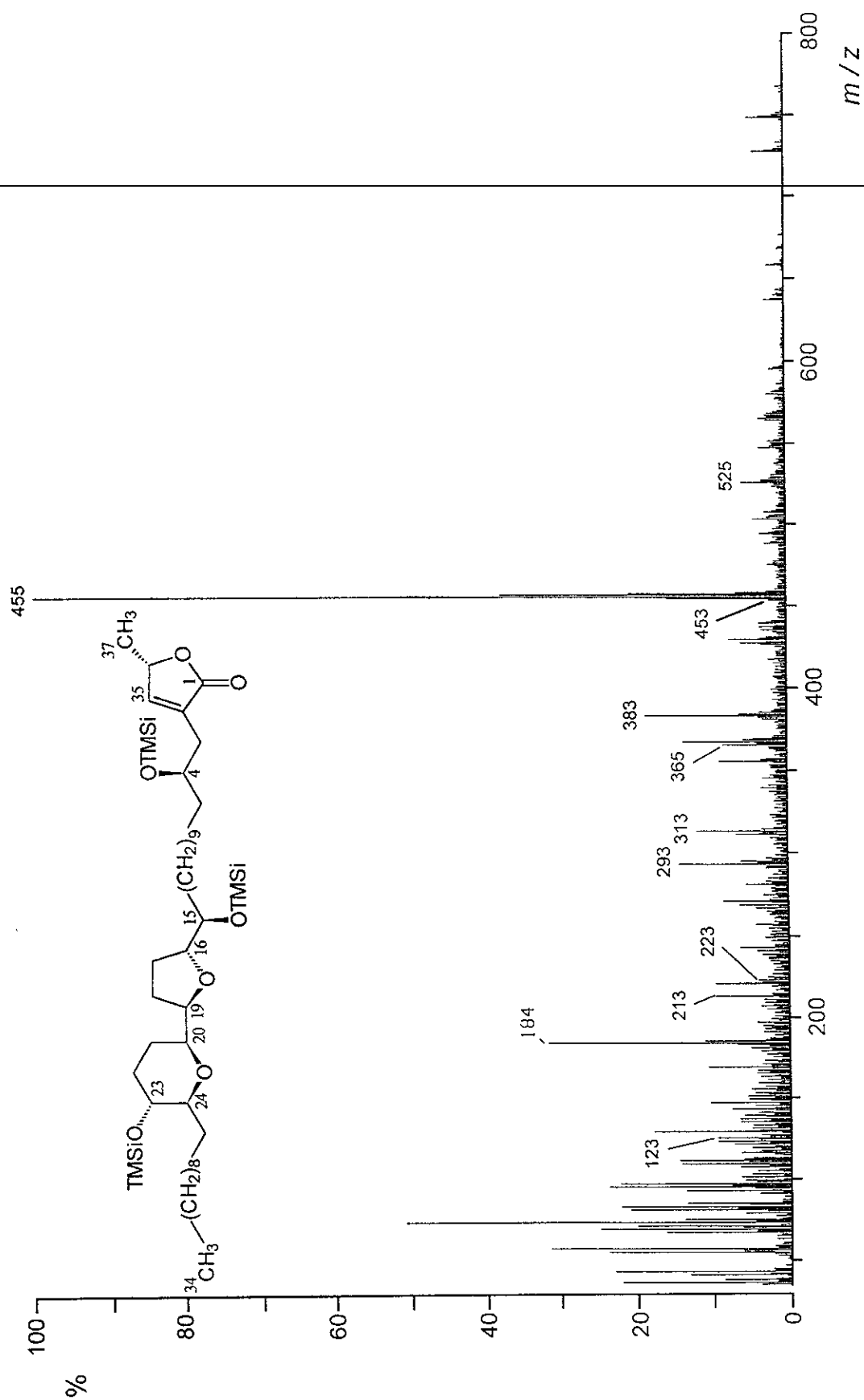


Espectro 65. Espectro en el UV de la jimenezina (103).

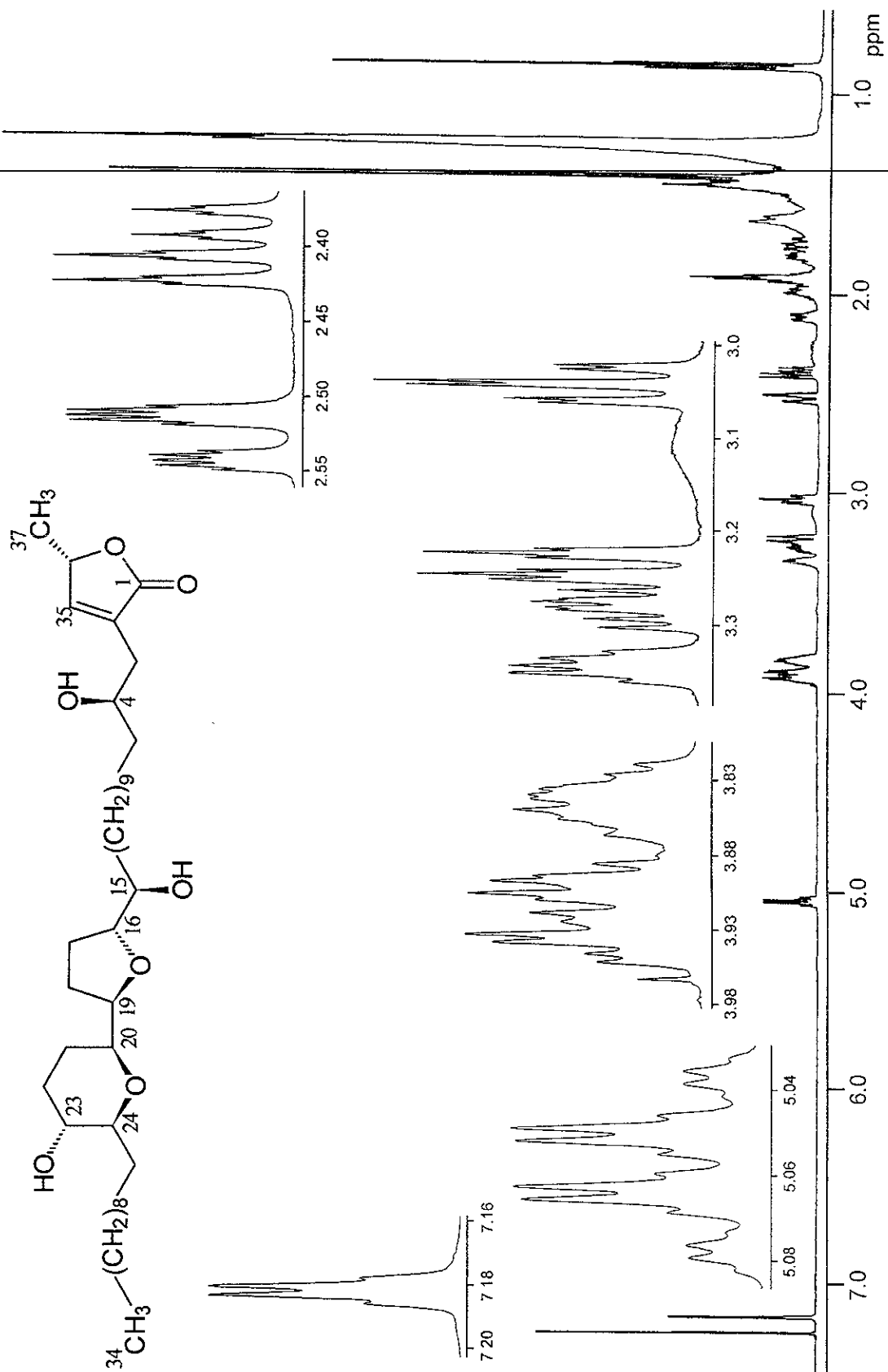


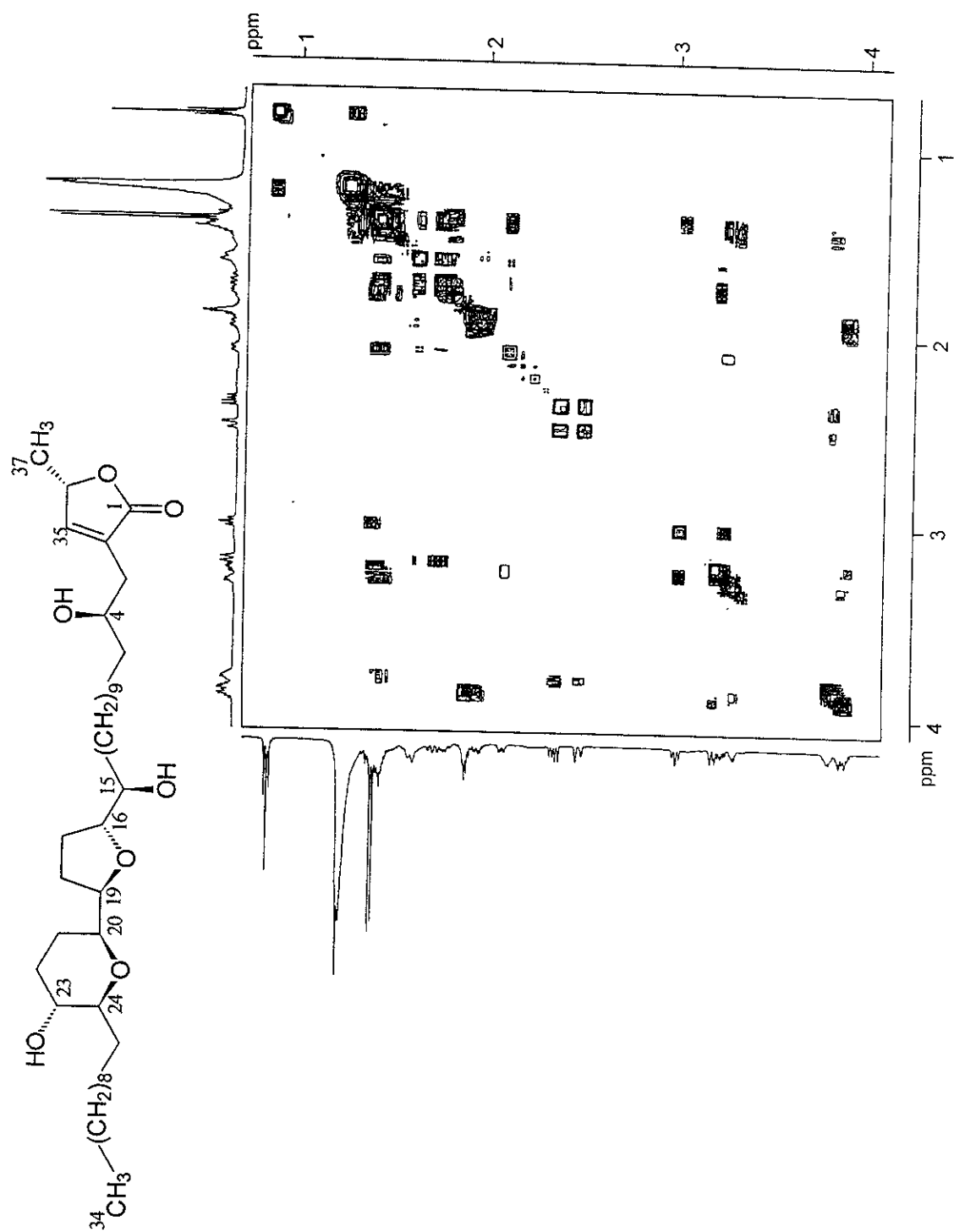
Espectro 66. Espectro de DC de la jimenezina (103).

Espectro 67. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la jimenezina (103).

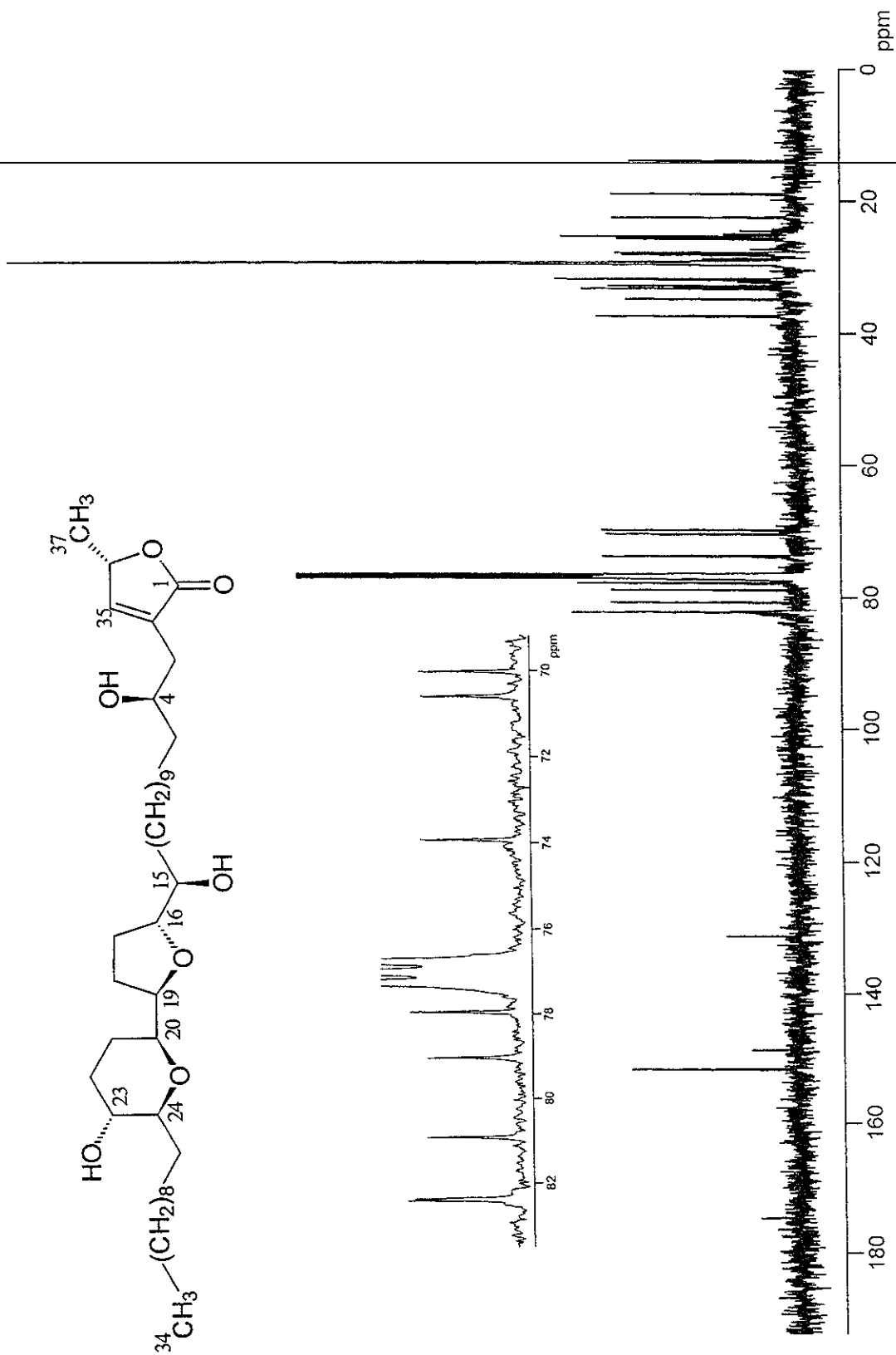


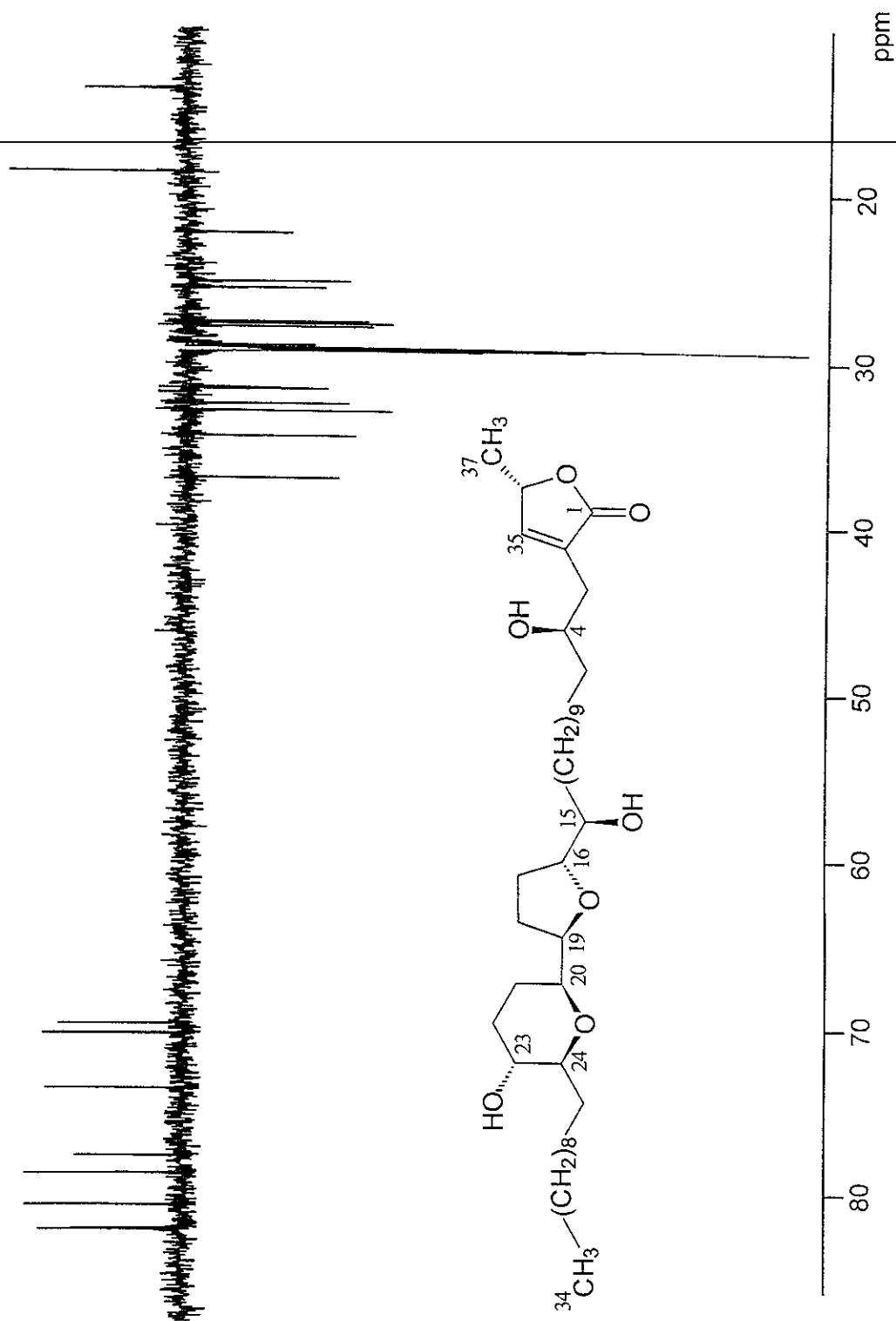
Espectro 68. Espectro de masas modalidad IE del derivado siliado de la jimenezina (103a).

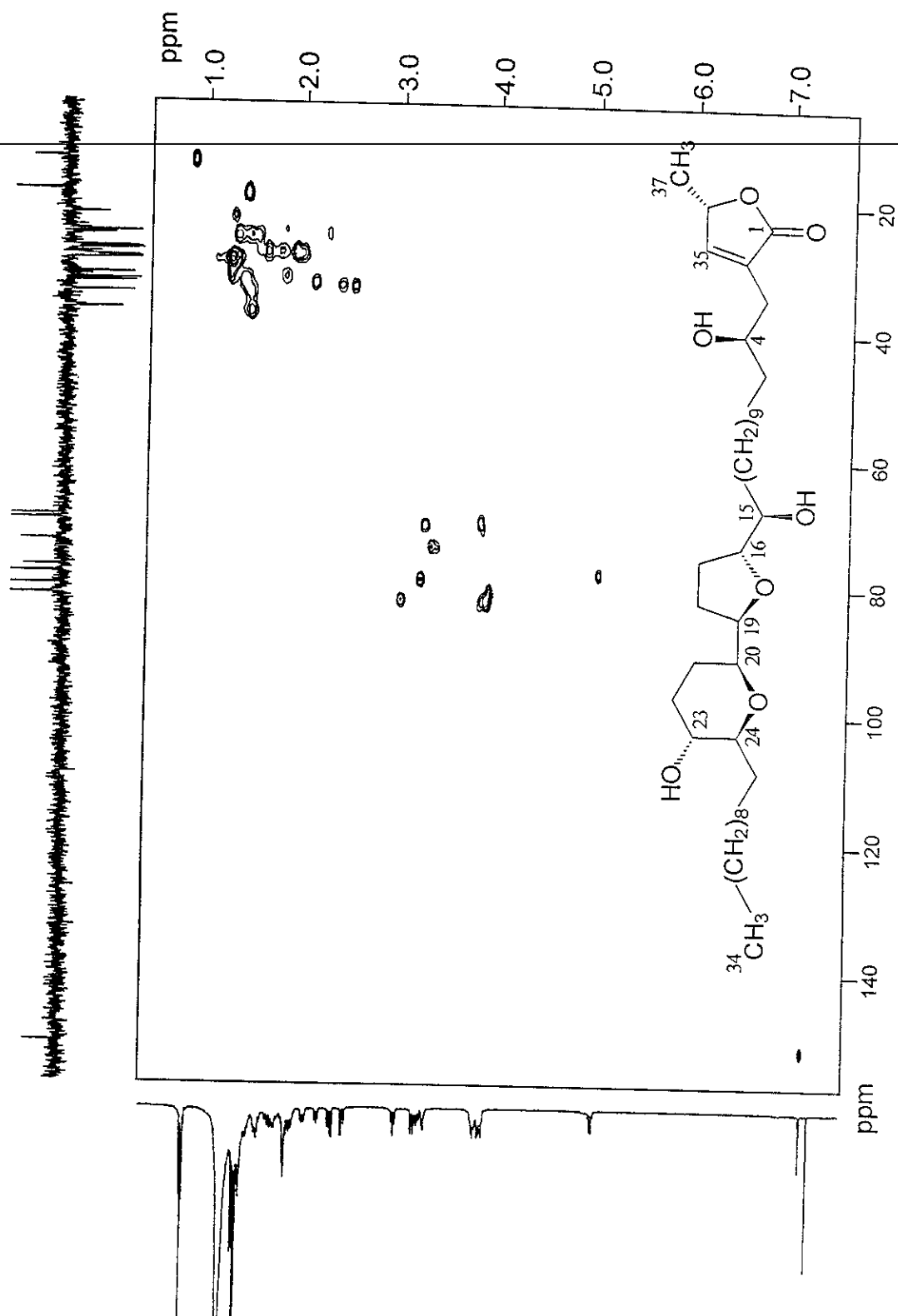
Espectro 69. Espectro de RMN ^1H de la jimenezina (103).



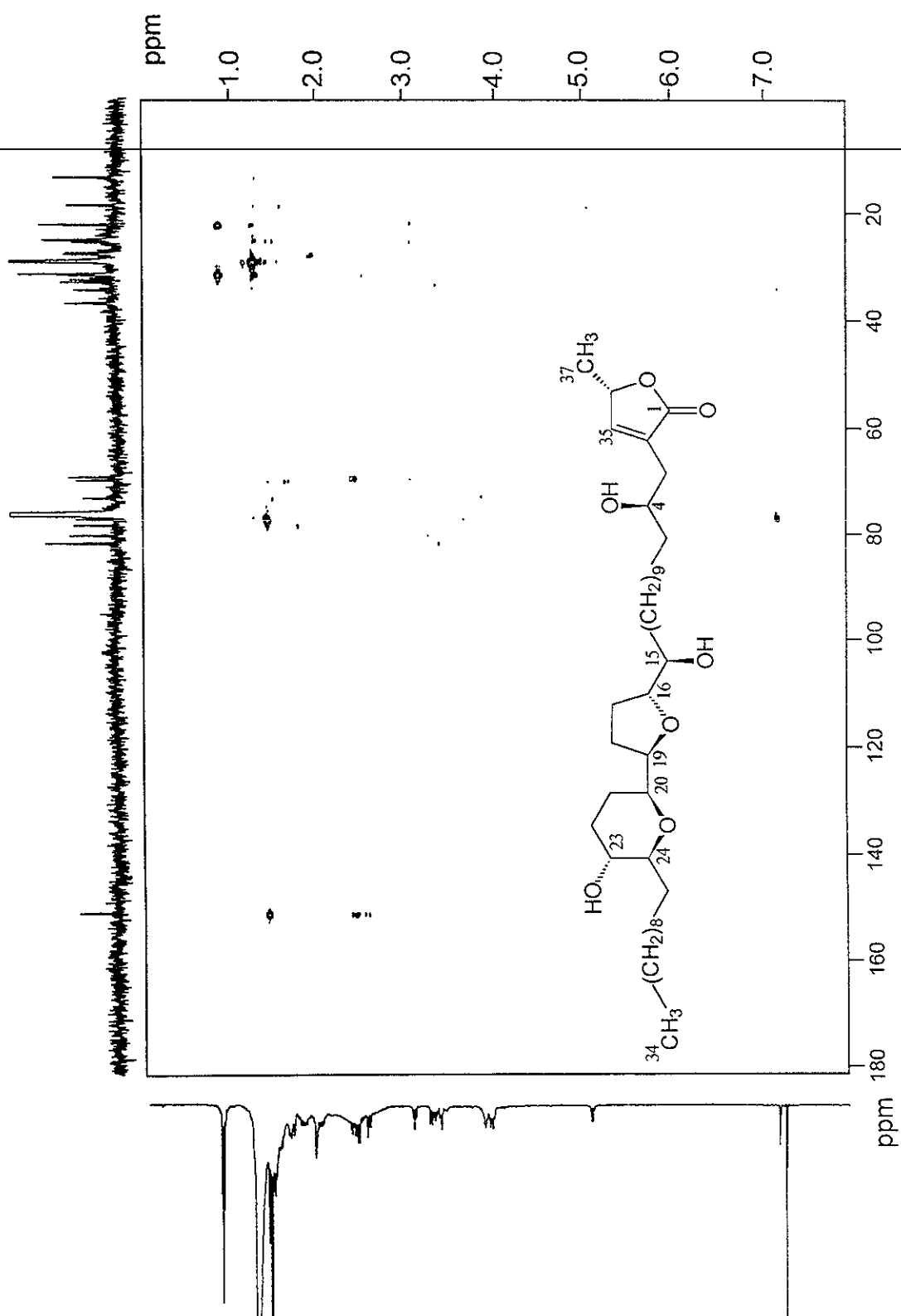
Espectro 70. Espectro de RMN $^1\text{H-COSY}$ de la jimenezina (103).

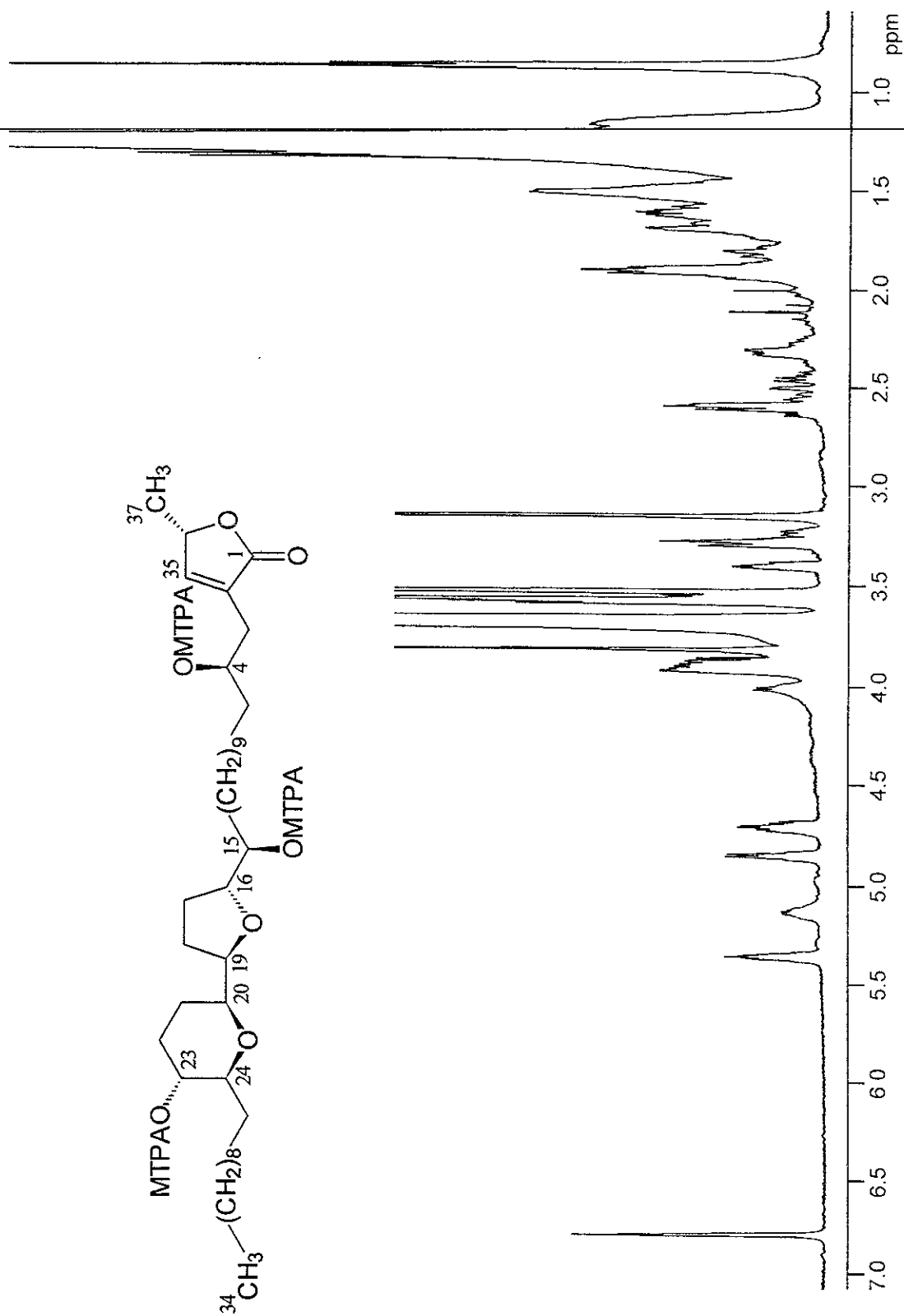
Espectro 71. Espectro de RMN ^{13}C de la jimenezina (103).

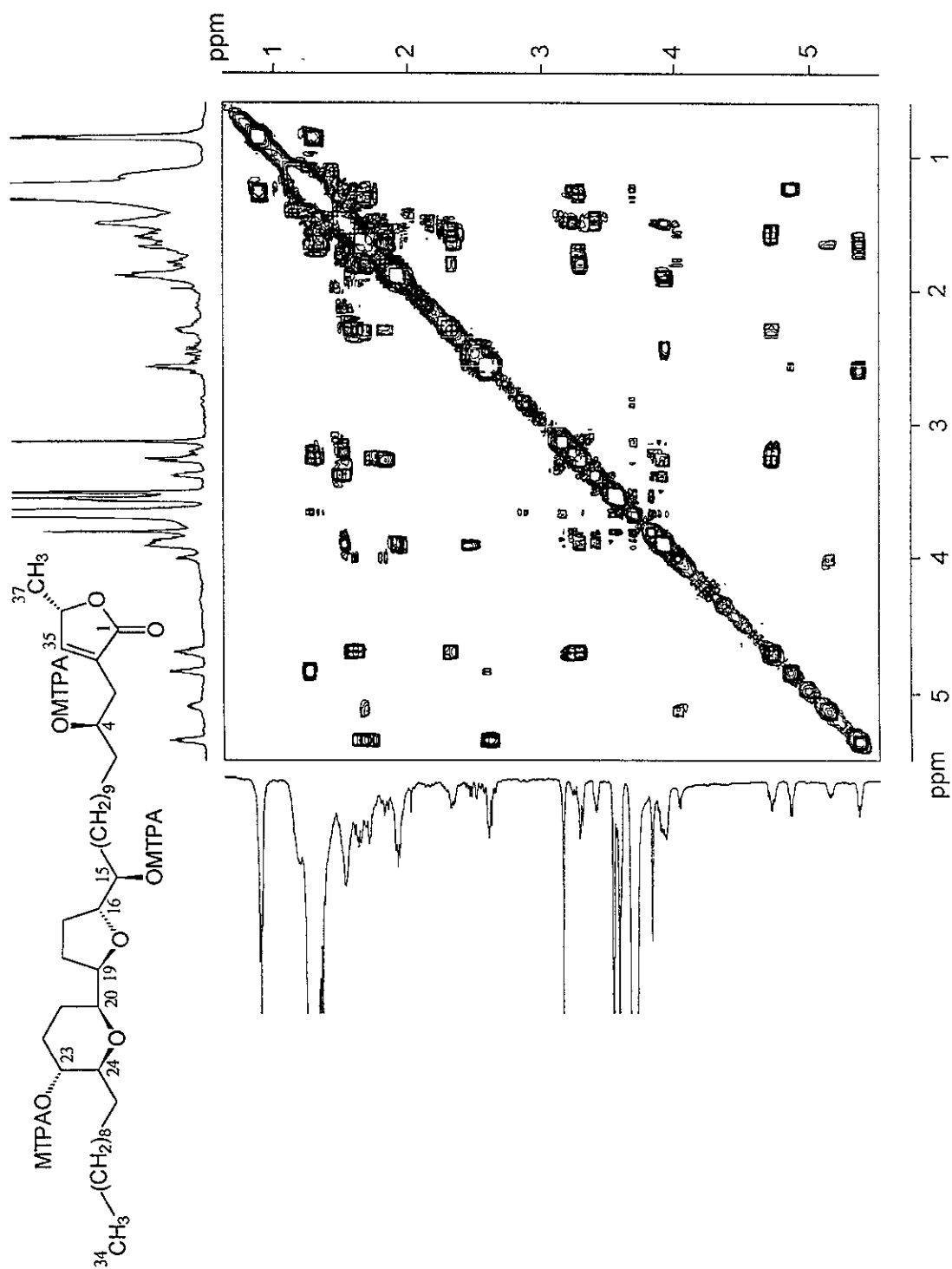
Espectro 72. Espectro de RMN ¹³C-DEPT de la jimenezina (103).



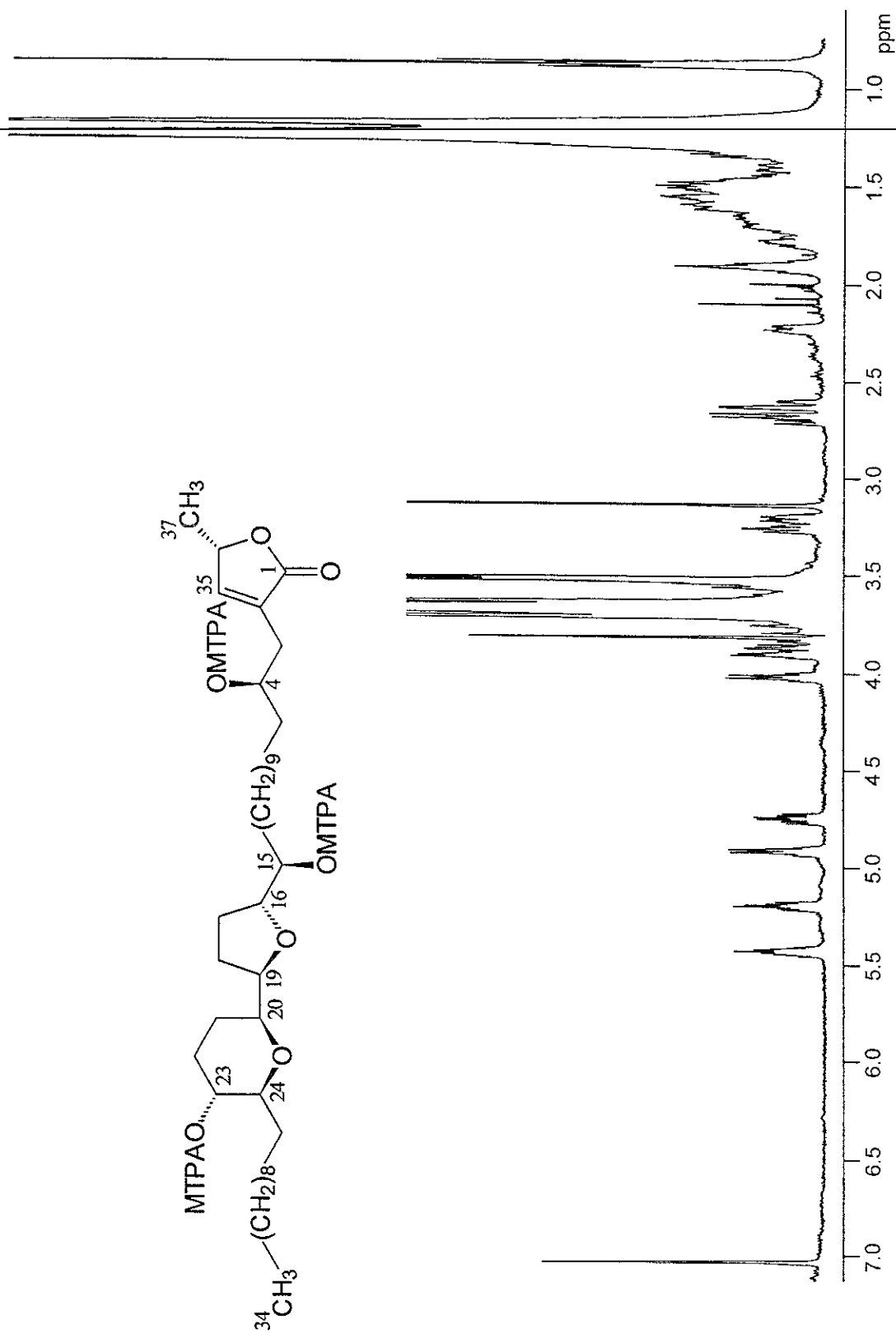
Espectro 73. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la jimenezina (103).

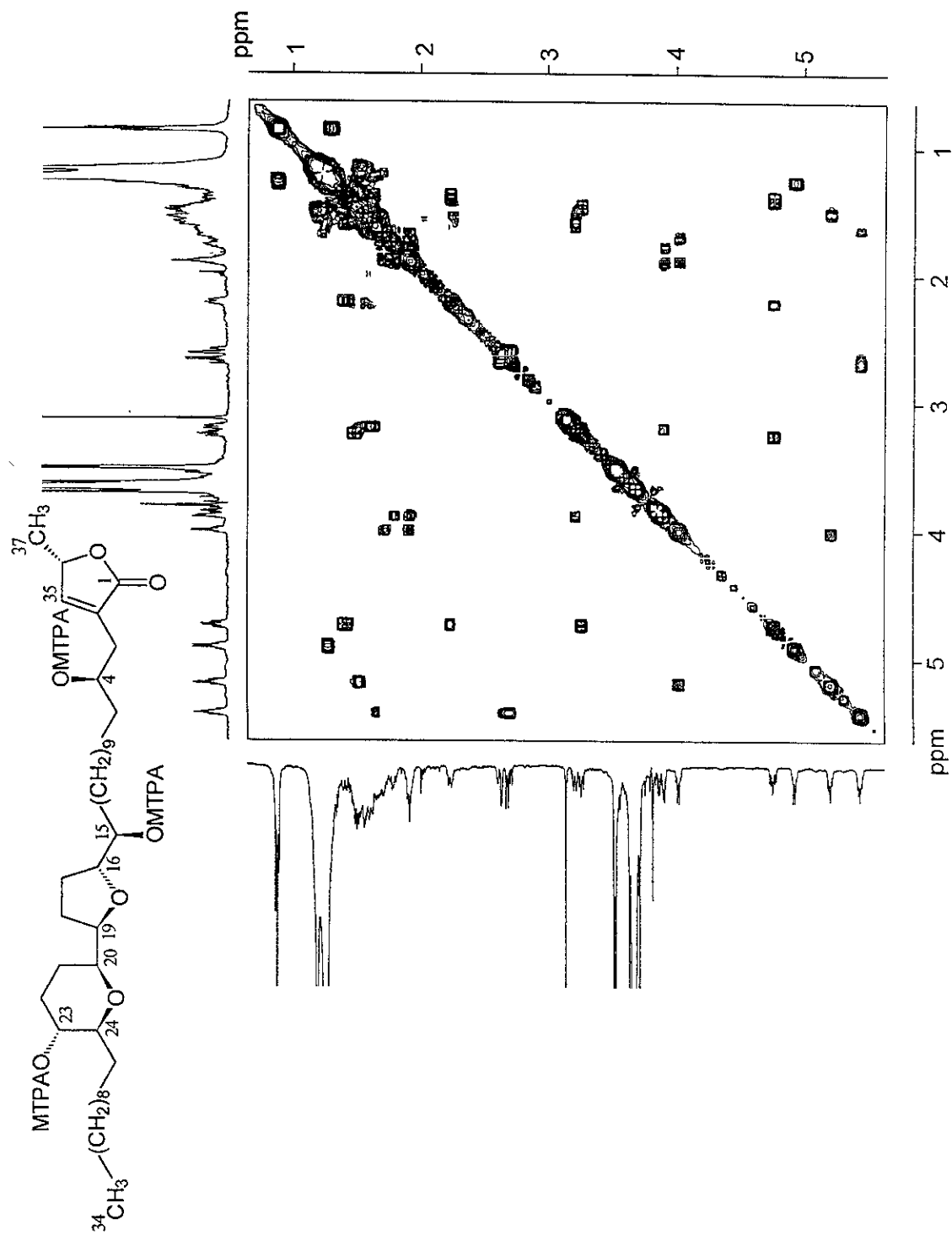
Espectro 74. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la jimenezina (103).

Espectro 75. Espectro de RMN ^1H del derivado per-(S)-éster de Mosher de la jimenezina (103s).

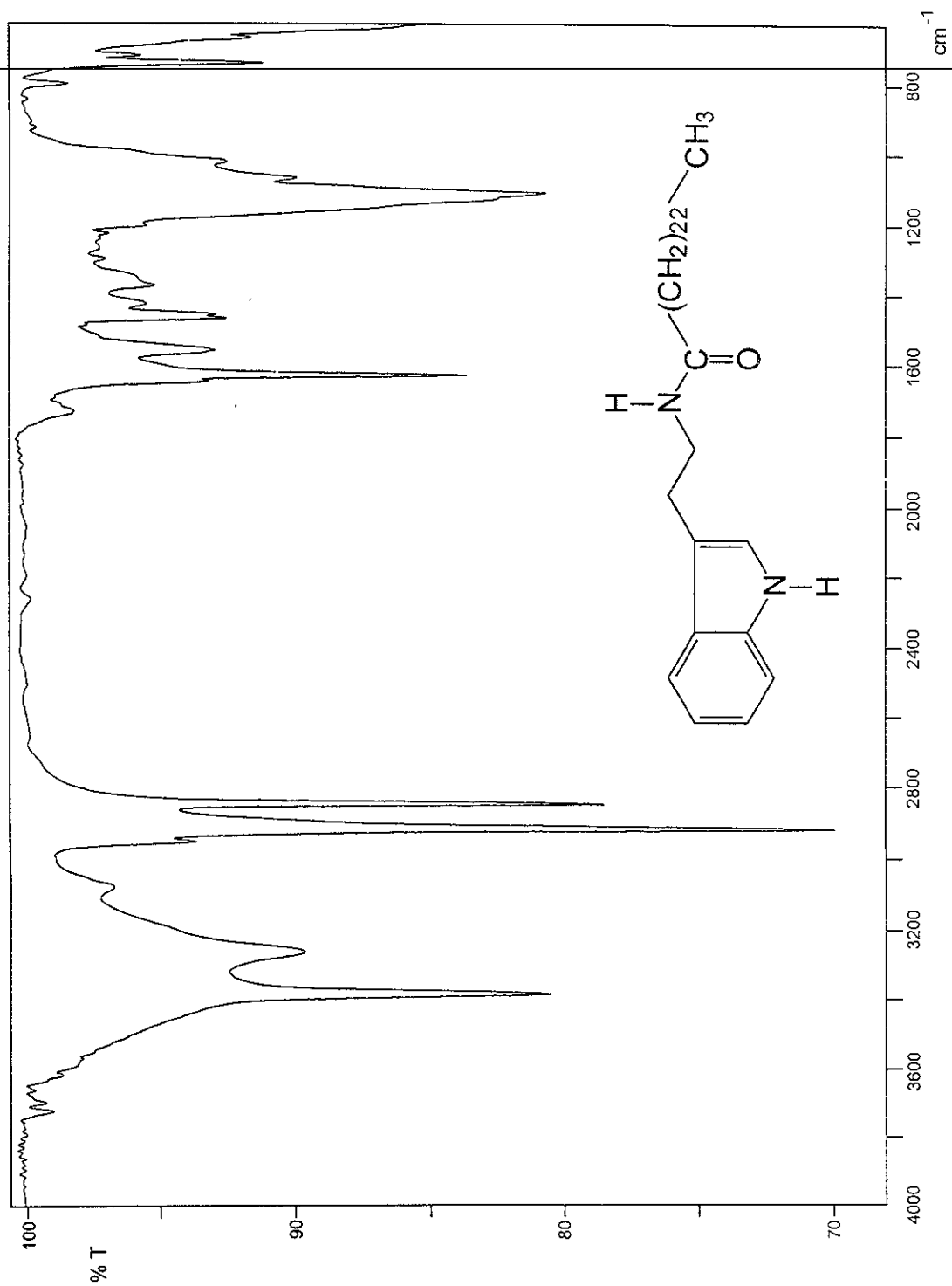


Espectro 76. Espectro de RMN $^1\text{H-COSY}$ del derivado per-(S)-éster de Mosher de la jimenezina (103s).

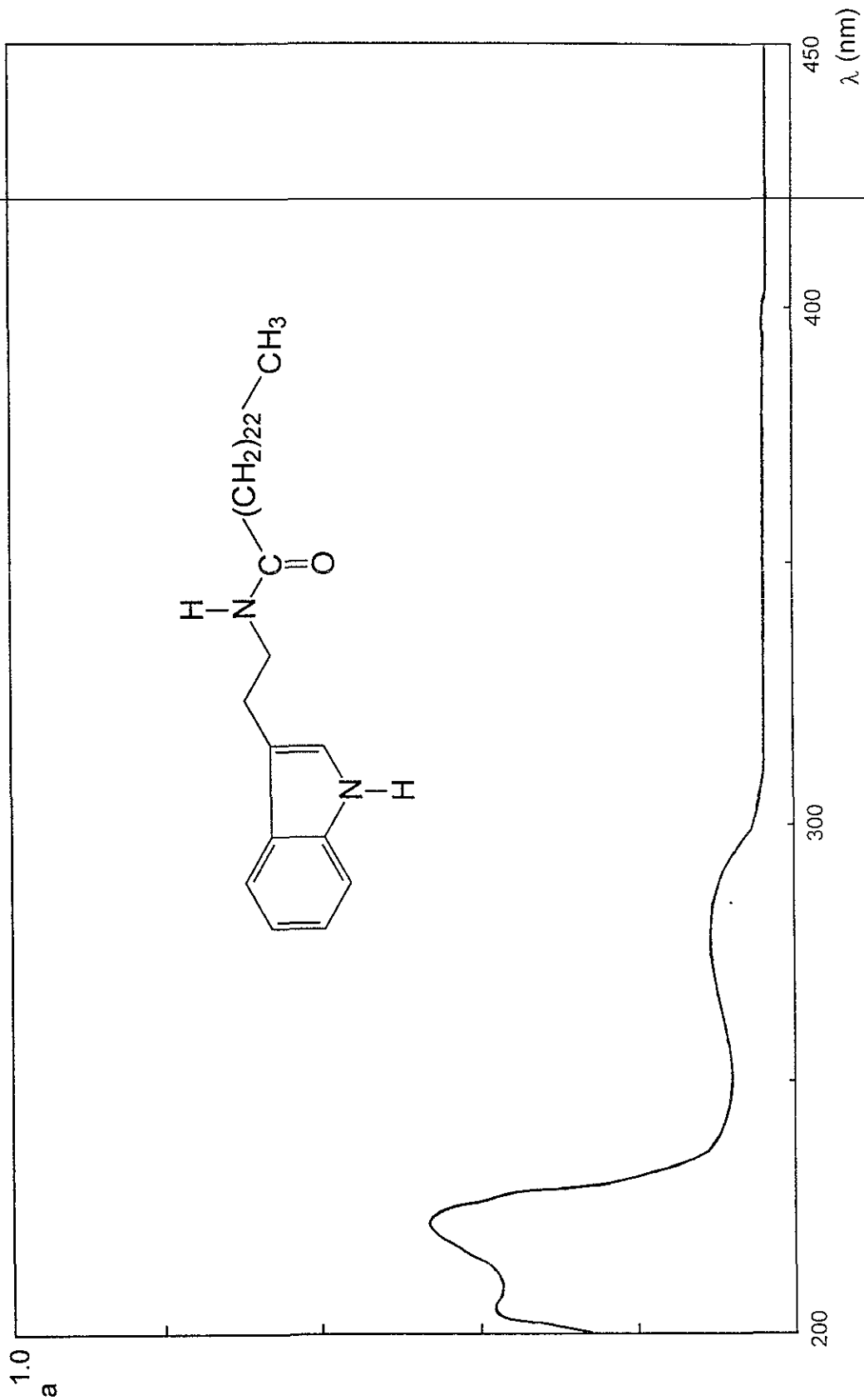
Espectro 77. Espectro de RMN ^1H del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la jimenezina (103r).



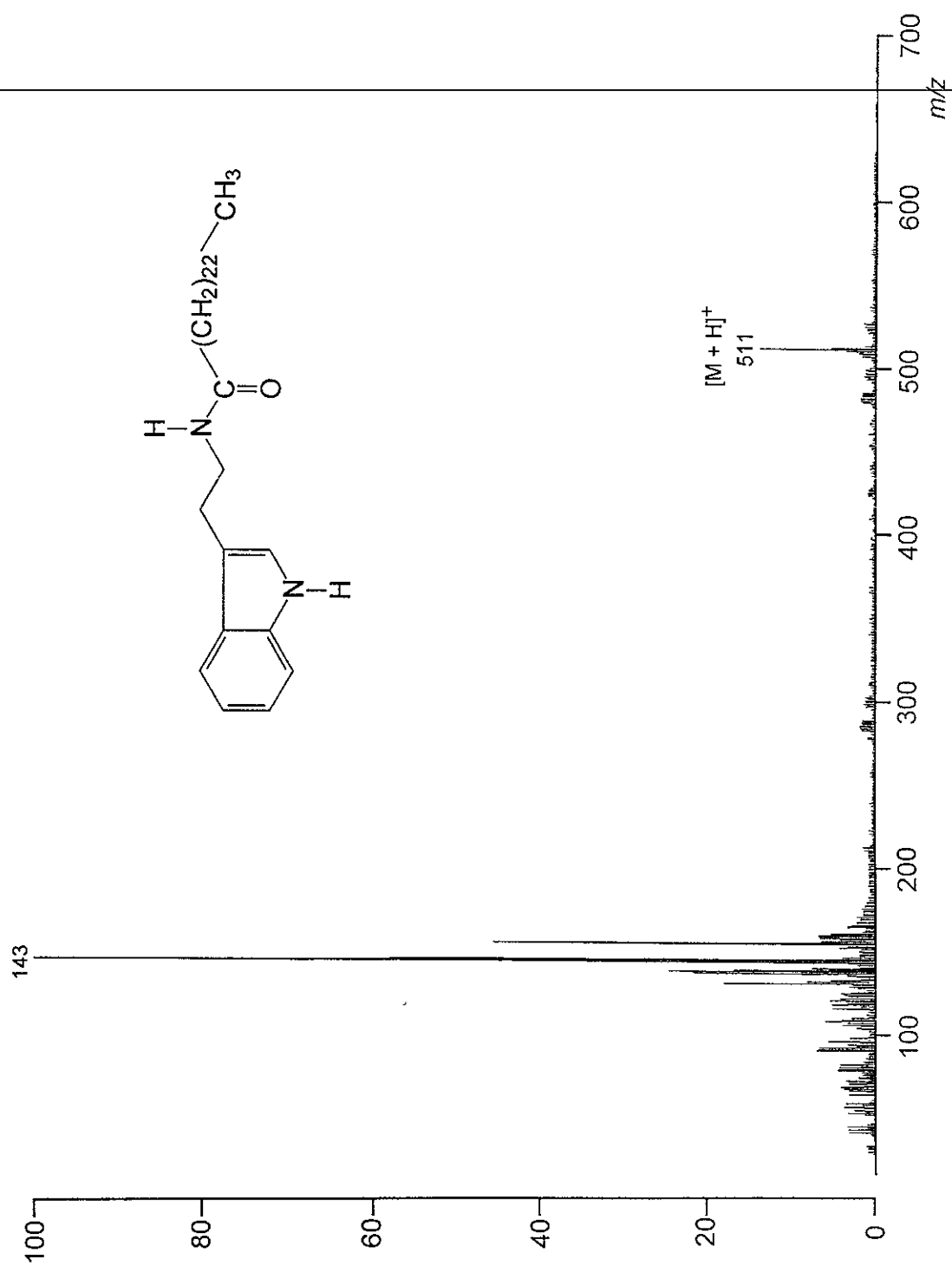
Espectro 78. Espectro de RMN $^1\text{H-COSY}$ del derivado per-(*R*)-éster de Mosher de la jimenezina (103r).

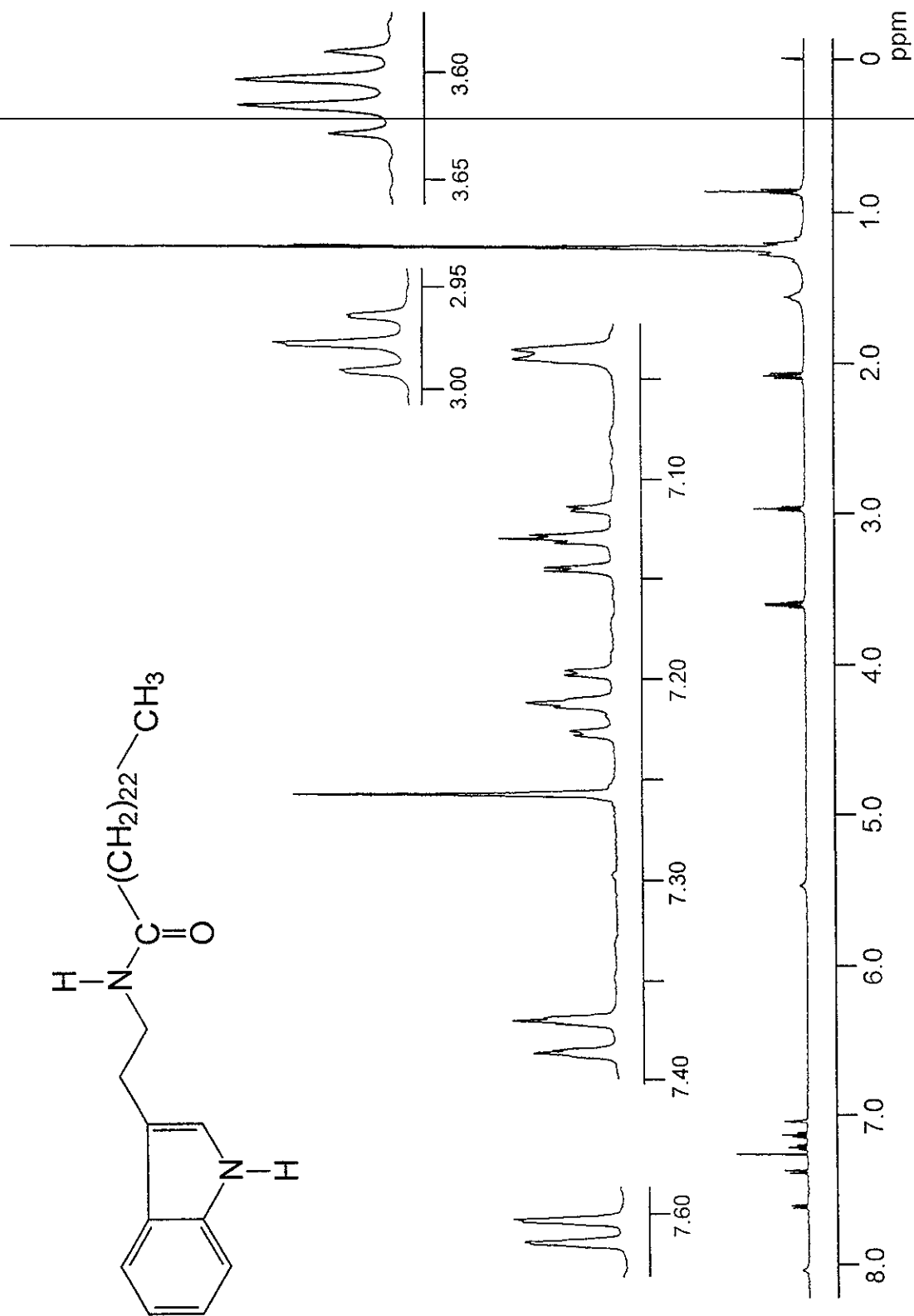


Espectro 79. Espectro en el IR de la N-lignoceroiltryptamina (105).

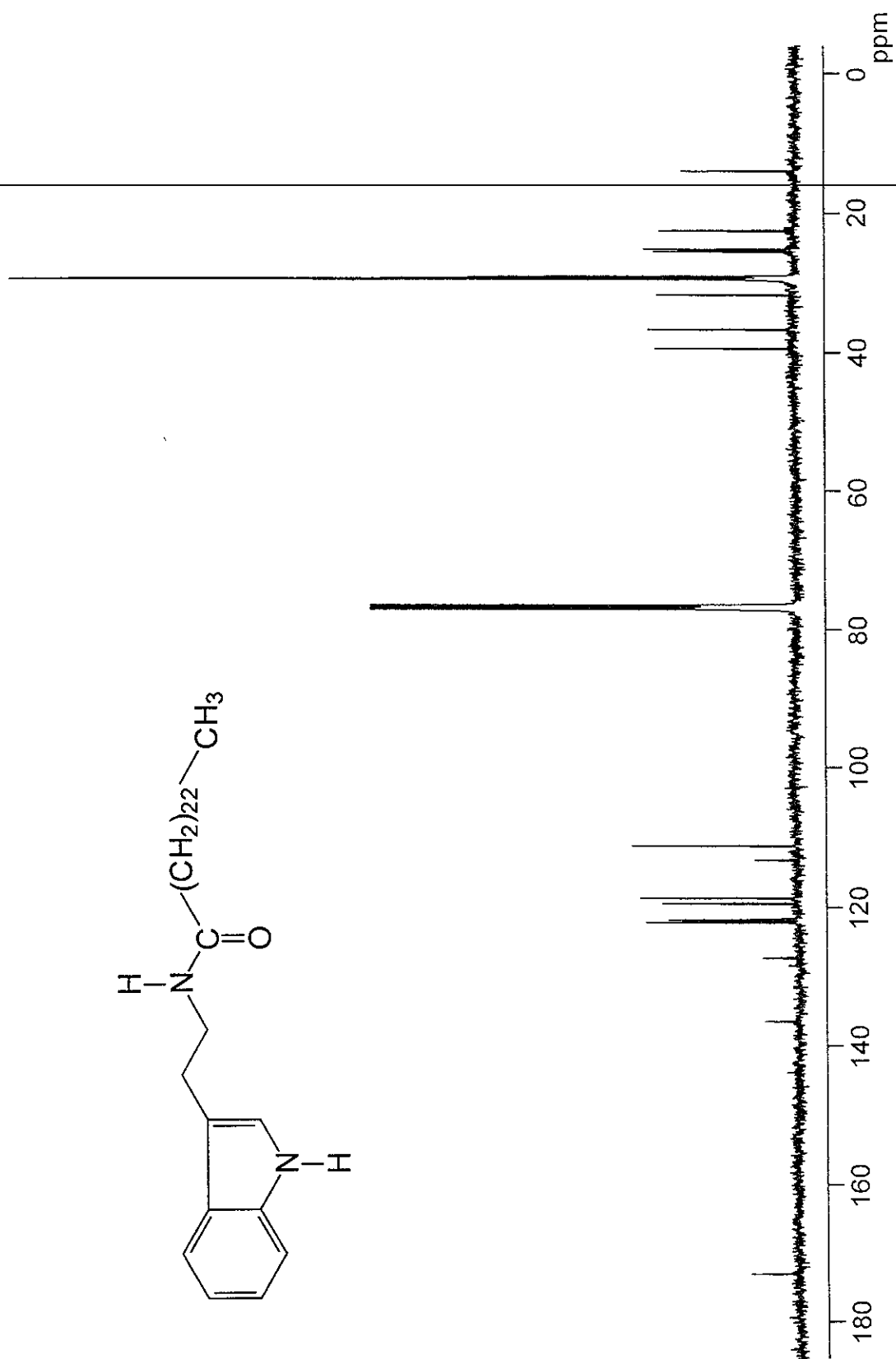


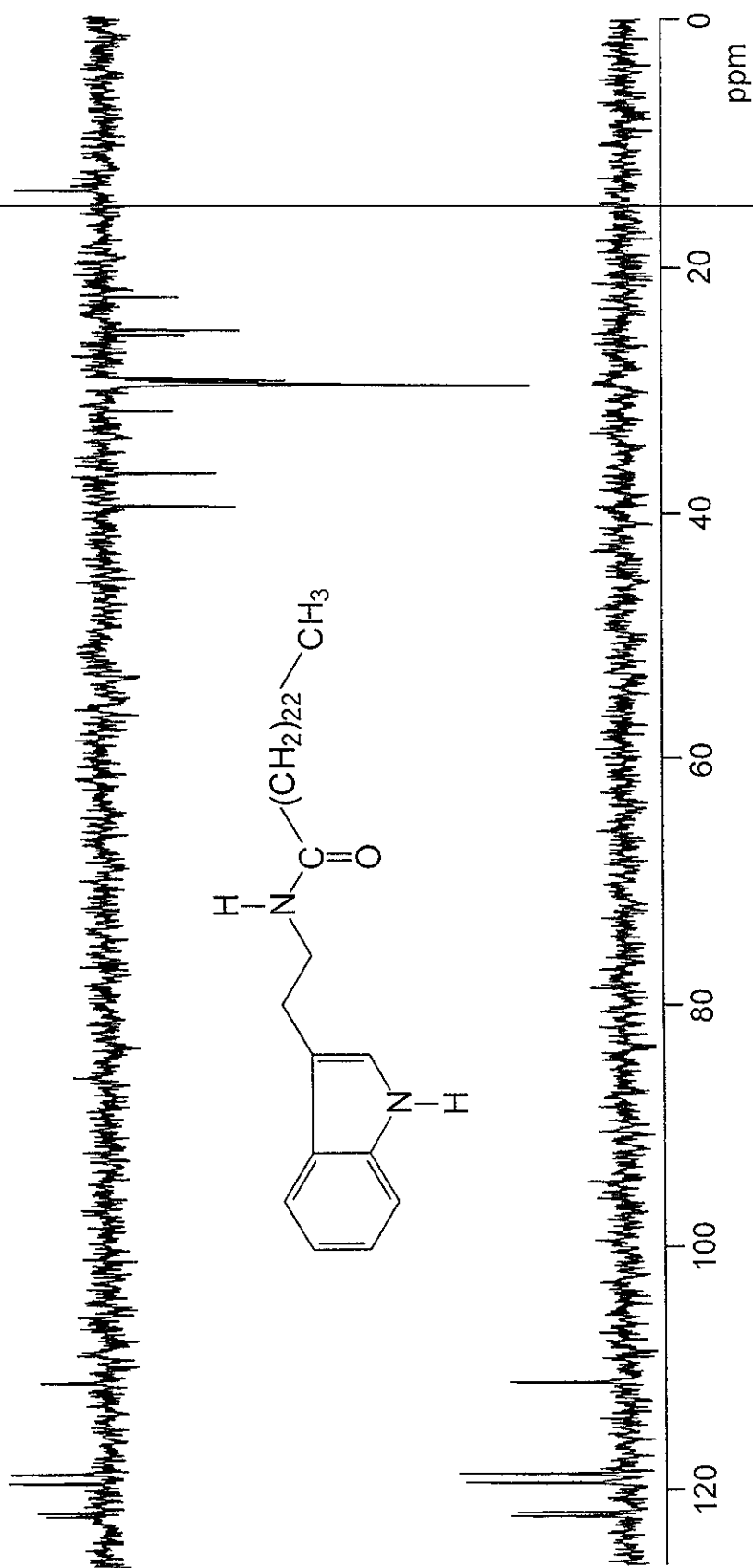
Espectro 80. Espectro en el UV de la N-lignoceroiltriptamina (105).

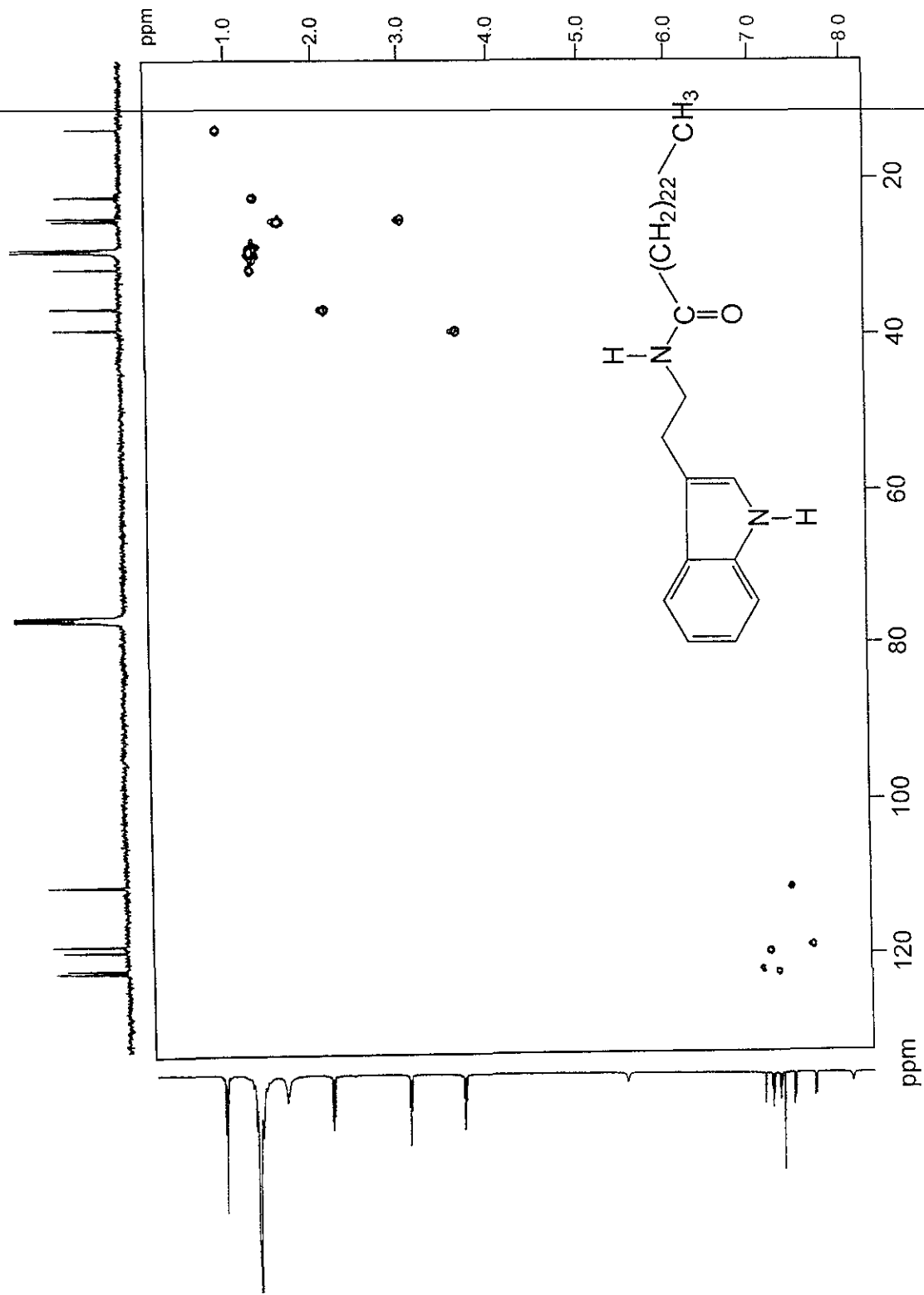
Espectro 81. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la N-lignoceroiltryptamina (105).

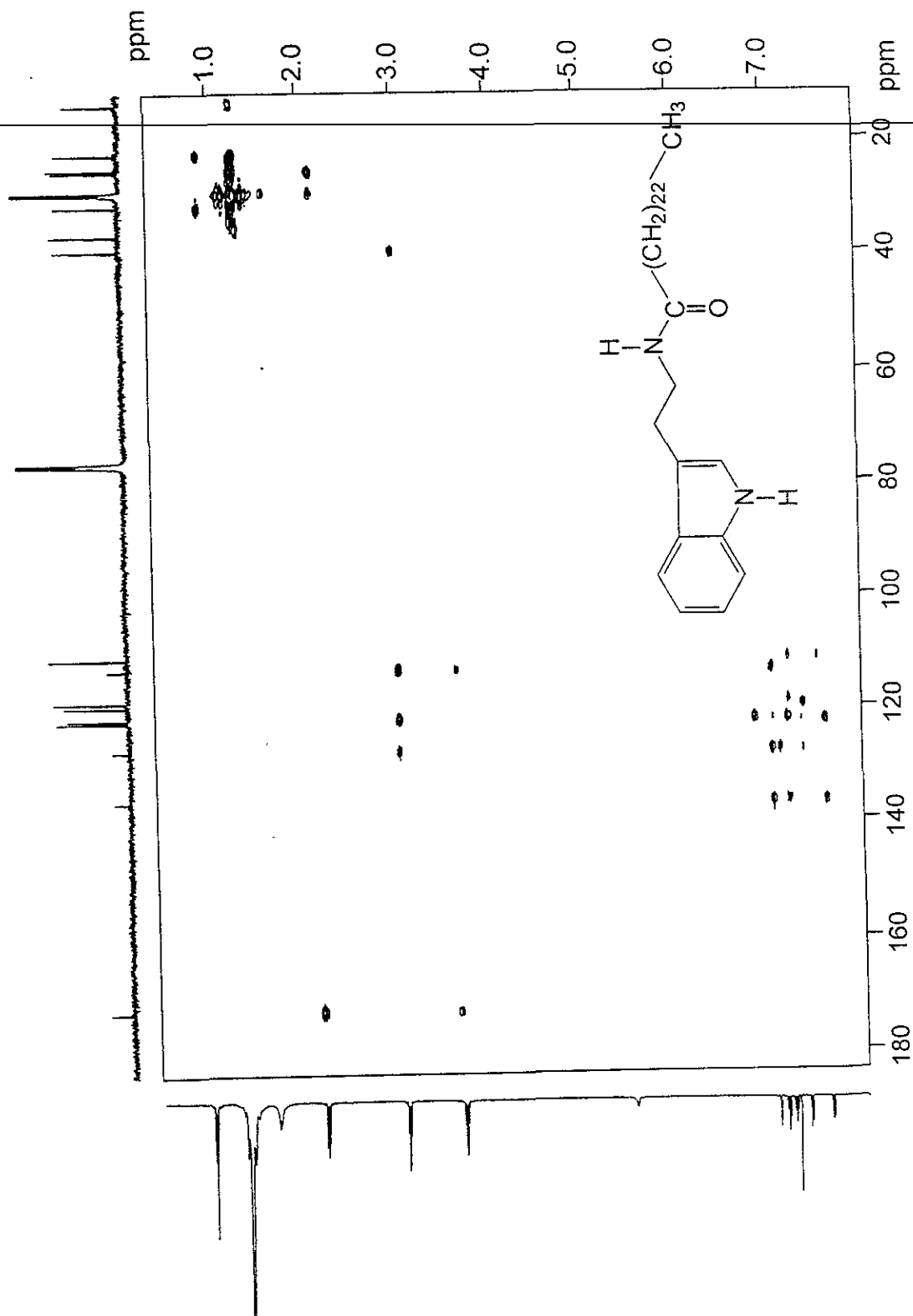


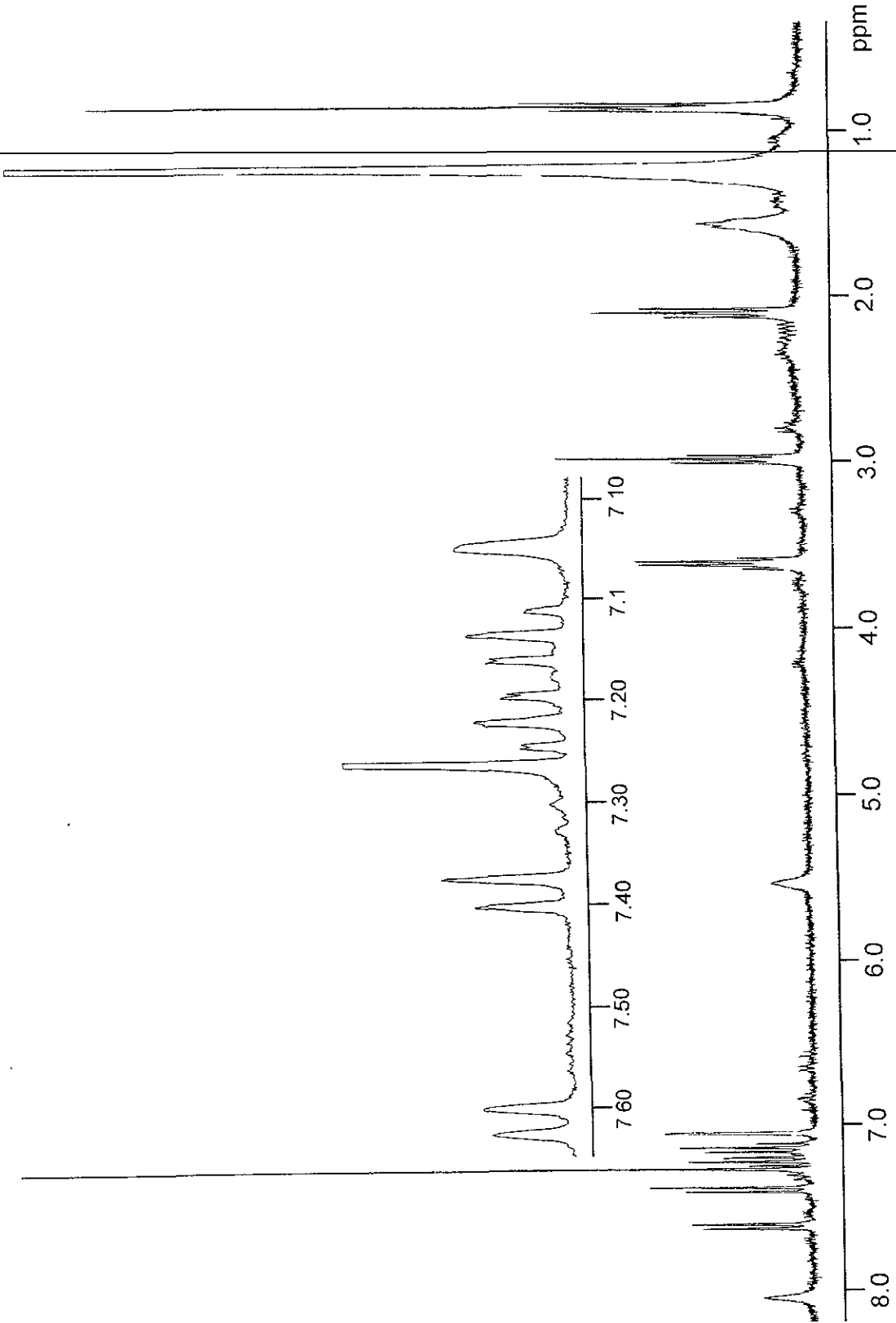
Espectro 82. Espectro de RMN ¹H de la N-lignoceroiltryptamina (105).

Espectro 85. Espectro de RMN ^{13}C de la N-lignoceroiltryptamina (105).

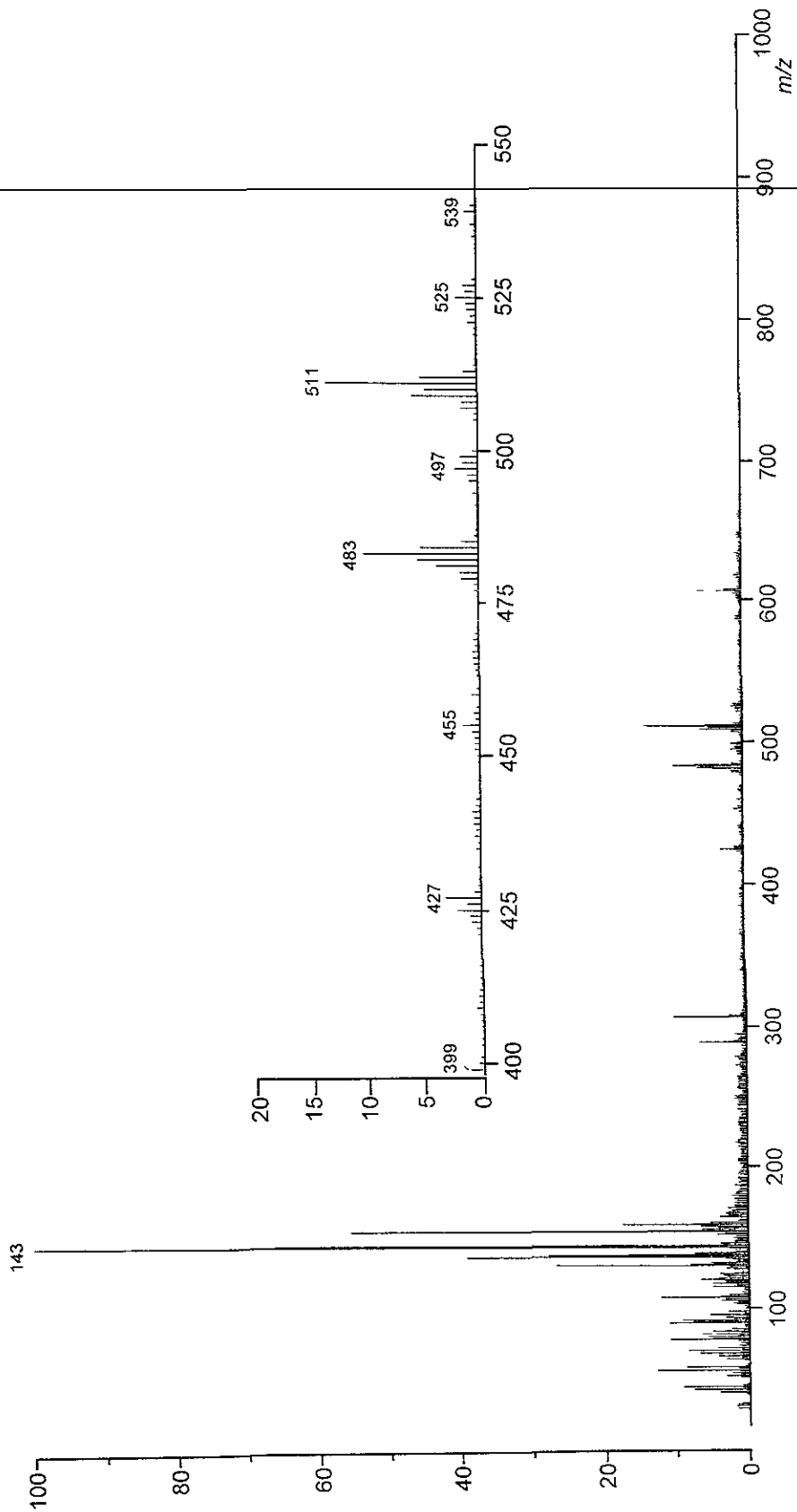
Espectro 86. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la N-lignoceroiltryptamina (105).

Espectro 87. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la N-lignoceroilriptaмина (105).

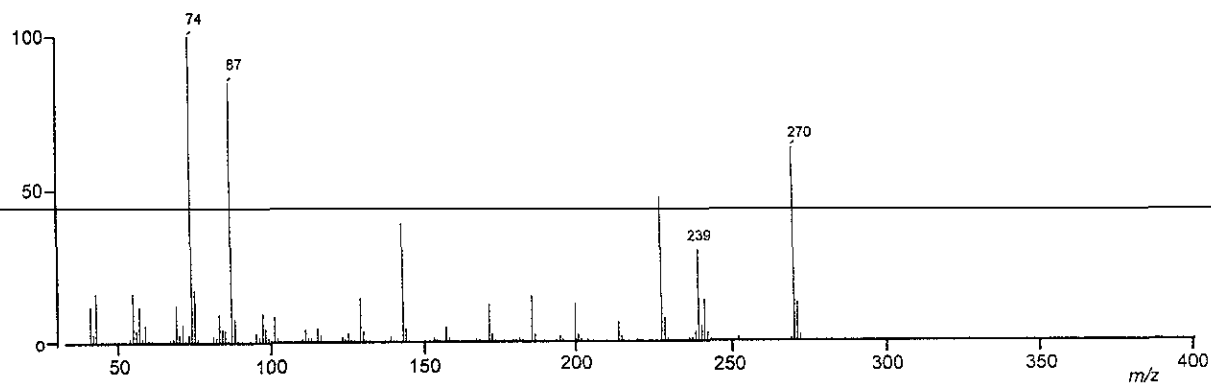
Espectro 88. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la N-lignoceroitriptamina (105).



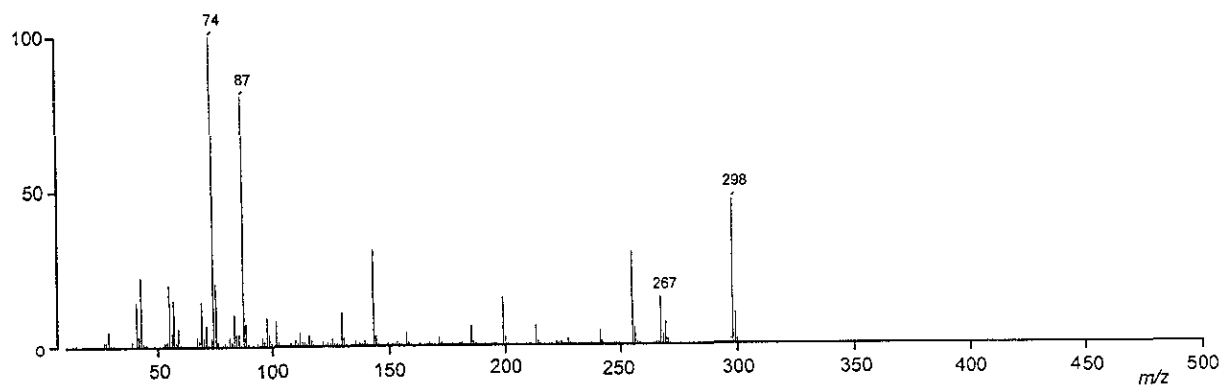
Espectro 89. Espectro de RMN ¹H de la mezcla de N-aciltriptaminas (104).



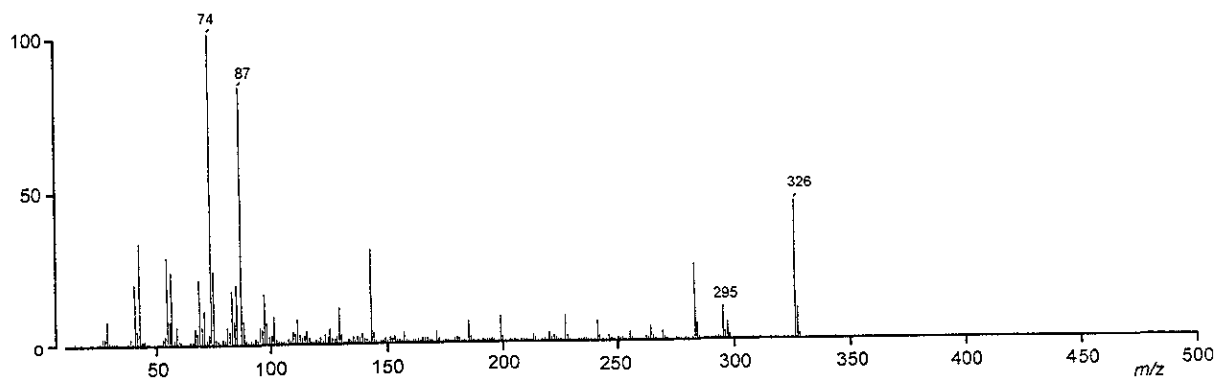
Espectro 90. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la mezcla de N-acitriptaminas (104).



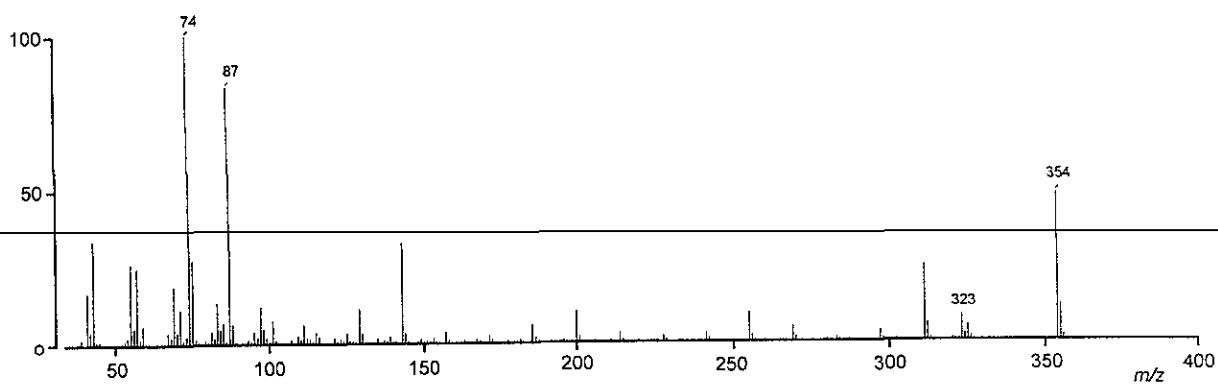
Espectro 91. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido palmítico.



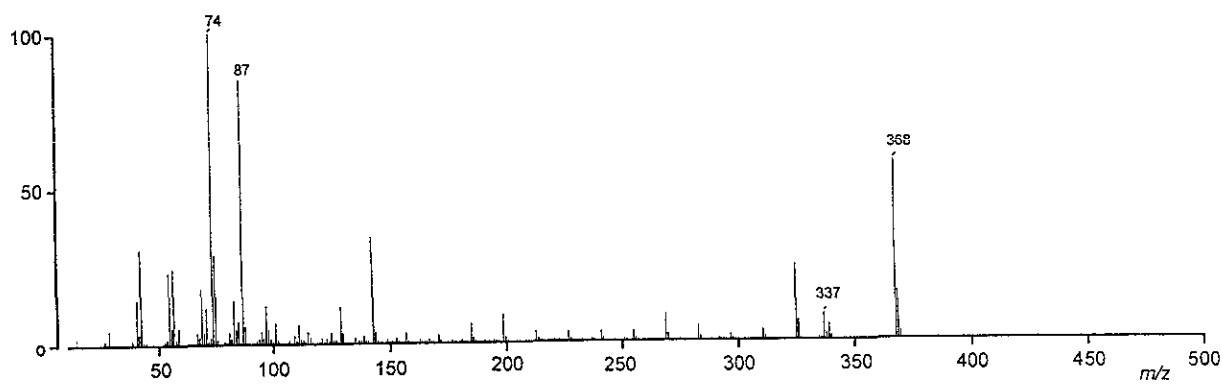
Espectro 92. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido esteárico.



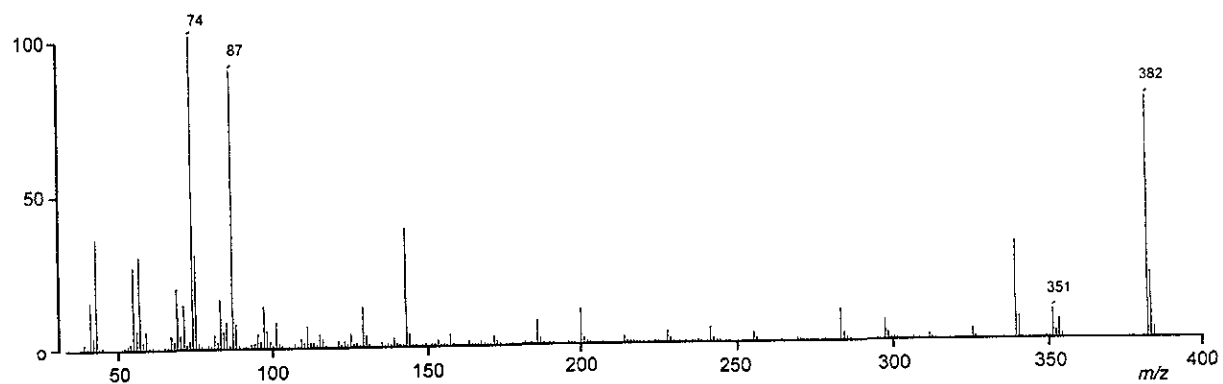
Espectro 93. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido araquínico



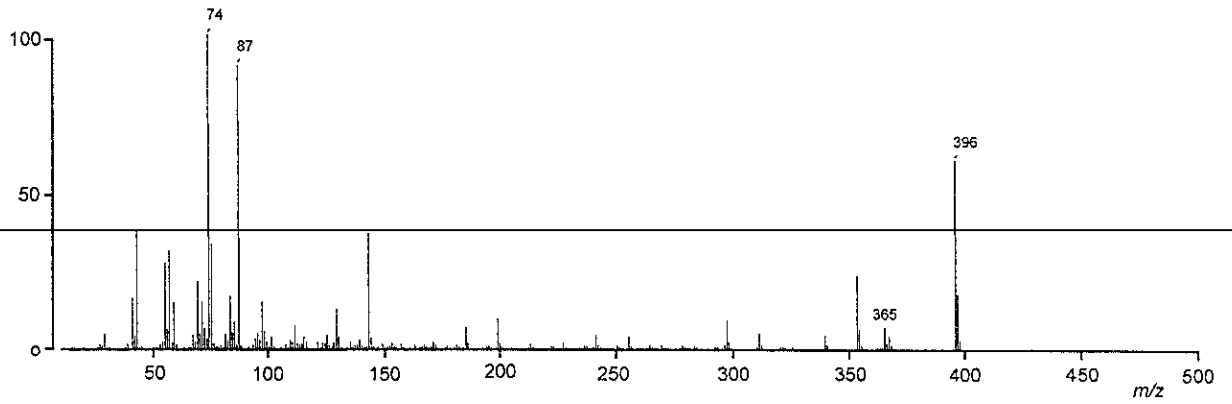
Espectro 94. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido behénico



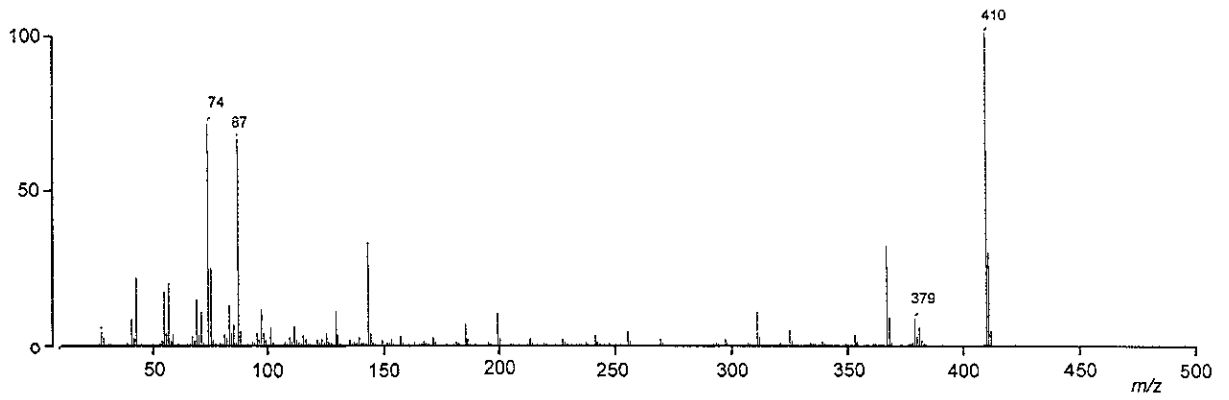
Espectro 95. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido tricosanóico



Espectro 96. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido lignocérico



Espectro 97. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido hiénico



Espectro 98. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido cerótico.

ANEXO II

Resultados generales de las evaluaciones realizadas con las acetogeninas esquamocina (80), bulatacina (16) y motrilina (97), sobre diversas actividades fotosintéticas.

Cuadro A.II.1. Efecto de las acetogeninas en la síntesis de ATP ($H_2O \rightarrow MV$). Las velocidades de síntesis de ATP de los controles fueron para la escuamocina (80), bulatacina (16) y motrilina (97), 556, 301 y 350 μ mol / mg clorofila · h, respectivamente.

[con]	Escuamocina (80)	s	[con]	Bulatacina (16)	s	[con]	Motrilina (97)	s
0	100.0	-	0	100	-	0	100.0	-
30	54.9	0.45	25	83.5	6.83	75	60.6	0.38
60	44.6	0.45	50	46.5	0.80	150	43.3	0.37
90	30.7	0.61	100	38.6	0.80	225	23.4	0.21
120	15.2	6.81	150	37.6	1.60			
			200	34.0	1.68			

Cuadro A.II.2. Efecto de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en el transporte de electrones basal de $H_2O \rightarrow MV$. Las velocidades controles del transporte de electrones fueron: 200, 112 y 193 μ equiv e^- / mg clorofila · h, respectivamente.

[con]	Escuamocina (80)	s	Bulatacina (16)	s	Motrilina (97)	s
0	100.0	-	100.0	-	100.0	-
50	120.0	0.00	122.0	7.40	103.4	0.52
100	147.8	8.23	177.0	0.00	110.3	2.40
150	190.0	7.44	240.0	8.00	117.2	3.00
200	234.8	25.83	322.0	12.0	131.0	2.08

Cuadro A.II.3. Efecto de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en el transporte de electrones desacoplado de $H_2O \rightarrow MV$. Las velocidades controles del transporte de electrones fueron: 668, 481 y $107 \mu \text{equiv } e^- / \text{mg clorofila} \cdot \text{h}$, respectivamente.

[con]	Escuamocina (80)	s	Bulatacina (16)	s	Motrilina (97)	s
0	100.0	-	100.0	-	100.0	-
50	80.6	1.33	94.0	2.18	95.1	0.50
100	62.9	2.18	83.1	3.19	87.2	3.10
150	56.0	2.19	72.7	5.80	78.7	2.00
200	51.6	5.80	54.5	9.40	65.6	3.07

Cuadro A.II.4. Efecto de la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97) en el transporte de electrones fosforilante de $H_2O \rightarrow MV$. Las velocidades controles del transporte de electrones fueron: 301, 219 y $320 \mu \text{equiv } e^- / \text{mg clorofila} \cdot \text{h}$, respectivamente.

[con]	Escuamocina (80)	s	[con]	Bulatacina (16)	s	[con]	Motrilina (97)	s
0	100.0	-	0	100.0	-	0	100	-
25	78.0	0.00	50	85.7	0.00	50	83.3	0.00
50	73.2	5.44	100	74.3	5.40	75	75.0	2.04
75	95.1	4.32	150	62.9	9.00	100	70.8	2.04
100	104.9	7.20	200	51.2	8.00	125	79.2	0.00
150	126.0	9.40				150	84.3	2.80
200	151.2	9.42				200	104.2	2.90

Cuadro A.II.5. Efecto de las acetogeninas sobre el transporte de electrones en el FS

I. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97), 151, 157 y 136 μ equiv e^- /mg clorofila \cdot h, respectivamente.

[con]	Escuamocina (80)		Bulatacina (16)		Motrilina (97)	
0	100.0	-	100.0	-	100.0	-
50	110.0	0.85	100.5	0.55	101.8	1.10
100	115.1	1.35	103.2	0.20	103.6	0.95
150	117.0	1.85	105.3	2.15	109.1	1.15
200	118.9	0.85	109.5	0.55	110.5	3.57

Cuadro A.II.6. Efecto de las acetogeninas en el transporte de electrones

desacoplado en el fotosistema II de $H_2O \rightarrow DCPIP$. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97), 177, 145 y 105 μ equiv e^- / mg clorofila \cdot h, respectivamente.

con]	Escuamocina (80)	s	Bulatacina (16)	s	Motrilina (97)	s
0	100.0	-	100.0	-	100.0	-
50	73.2	0.00	98.9	0.15	91.3	1.85
100	43.7	0.20	91.7	0.35	82.9	0.35
150	19.5	2.15	81.3	1.30	78.3	1.85
200	10.4	0.55	73.0	0.95	73.0	0.85

Cuadro A.II.7. Efecto de las acetogeninas en el transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de $H_2O \rightarrow Si-Mo$. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97), 53, 55, y 73 μ equiv e^- / mg clorofila $\cdot h$, respectivamente.

[con]	Escuamocina (80)	s	Bulatacina (16)	s	Motrilina (97)	s
0	100.0	-	100.0	-	100.0	-
50	83.3	0.61	96.4	3.57	72.3	0.61
100	46.1	3.01	87.5	3.20	54.5	3.20
150	41.7	3.20	78.6	7.15	39.6	3.20
200	30.0	2.32	66.0	3.20	18.2	3.20

Cuadro A.II.8. Efecto de las acetogeninas en el transporte de electrones en el fotosistema II de $DPC \rightarrow DCPIP$. Las velocidades de los controles fueron para la escuamocina (80), la bulatacina (16) y la motrilina (97), 215, 357 y 235 μ equiv e^- / mg clorofila $\cdot h$, respectivamente.

[con]	Escuamocina (80)	s	Bulatacina (16)	s	Motrilina (97)	s
0	100.0	-	100.0	-	100.0	-
50	107.2	3.42	109.1	1.11	110.4	7.70
100	143.4	5.26	122.1	11.5	118.7	11.2
200	165.8	1.37	127.7	3.57	193.4	7.50

Cuadro A.II.9. Efecto de las acetogeninas sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa. Las velocidades de los controles fueron para la squamocina (**80**), la bulatacina (**16**) y la motrilina (**97**), 831, 843 y 1,106 μ moles P_i / mg clorofila \cdot h, respectivamente.

[con]	Escuamocina (80)	s	[con]	Bulatacina (16)	s	[con]	Motrilina (97)	s
0	100.0	-	0	100.0	-	0	100.0	-
100	108.2	0.69	50	102.3	3.16	100	101.6	0.41
200	116.9	1.42	100	107.5	1.53	200	106.8	0.57
			150	121.1	2.66			
			200	136.9	7.05			

ANEXO III

Artículos generados de la presente investigación.

1. Daniel Chávez, Laura A. Acevedo, and Rachel Mata. (1998). Jimenezin: a Novel Annonaceous Acetogenin from the Seeds of *Rollinia mucosa* Containing Adjacent Tetrahydrofuran-Tetrahydropyran Ring Systems. *Journal of Natural Products*, **61**, 419-421.
2. Daniel Chávez and Rachel Mata. (1998). Purpurediolin and Purpurenin, Two New Cytotoxic Adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, **61**, 580-584.
3. Daniel Chávez and Rachel Mata. (1998). Purpuracenin: a New Cytotoxic Adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona purpurea*. *Phytochemistry* (en prensa).
4. Daniel Chávez, Laura A. Acevedo, and Rachel Mata. Additional Compounds from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*. Manuscrito en preparación.
5. Daniel Chávez, Rachel Mata, Roberto Iglesias and Blas Lotina-Hennsen. Effect of Bullatacin, Squamocin, and Motrilin on Photophosphorylation in Isolated Spinach Chloroplasts. *Pesticide Science*. Manuscrito en preparación.

**Jimenezin, a Novel Annonaceous
Acetogenin from the Seeds of
Rollinia mucosa Containing Adjacent
Tetrahydrofuran–Tetrahydropyran
Ring Systems**

Daniel Chávez, Laura A. Acevedo, and Rachel Mata

Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de
Investigación en Plantas Medicinales, Instituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México D.F. 04510, Mexico

**JOURNAL OF
NATURAL
PRODUCTS®**

Reprinted from
Volume 61, Number 4, Pages 419–421

Rapid Communications

Jimenezin, a Novel Annonaceous Acetogenin from the Seeds of *Rollinia mucosa* Containing Adjacent Tetrahydrofuran-Tetrahydropyran Ring Systems^{†,1}

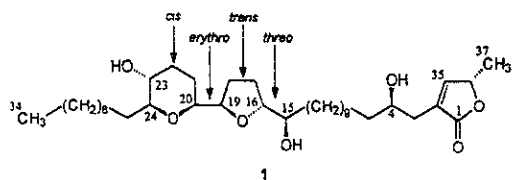
Daniel Chávez, Laura A. Acevedo, and Rachel Mata*

Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de Investigación en Plantas Medicinales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México D.F. 04510, Mexico

Received November 17, 1997

Abstract: A new cytotoxic acetogenin, jimenezin (1), containing a hydroxylated tetrahydropyran ring along with an adjacent tetrahydrofuran ring and representing a novel carbon skeleton, was isolated from the seeds of *Rollinia mucosa*. The structure was elucidated by means of chemical and spectral methods including MS and NMR measurements. Compound 1 exhibited potent cytotoxic activity against six human solid tumor cell lines.

As part of our ongoing investigation on biologically active compounds from Mexican medicinal plants, we have studied the seeds of *Rollinia mucosa* (Jacquin) Baillon (syn. *Rollinia jimenezii* Safford)² (Annonaceae) and isolated the novel acetogenin 1, which was given the trivial name jimenezin. In this paper, we describe the structure elucidation and cytotoxic activity of compound 1.



Jimenezin (1) belongs to the rare type of acetogenins containing a tetrahydropyran (THP) ring. The first THP ring acetogenin, named mucocin, was discovered by McLaughlin's group in 1995.³ Mucocin is an acetogenin that bears a hydroxylated THP ring, as well as a nonadjacent tetrahydrofuran (THF) ring. Later on, the same group described another related acetogenin,⁴ muconin, that contains a nonhydroxylated THP ring along with an adjacent THF ring. We have now isolated a closely related acetogenin possessing a hydroxylated

Table 1. ¹H (500 MHz, CDCl₃, J (Hz)) and ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) Data of 1^a

position	δ_H	δ_C	COSY ^b	HMBC ^c
1		174.6		
2		131.2		
3a	2.53 dddd (15.1, 3.2, 1.5, 1.5)	33.3	H-4, H-35	C-1, C-2,
3b	2.40 dddd (15.1, 8.2, 1.5, 1.5)			C-4, C-35
4	3.85 m	70.0	H-3a,b, H-5	
5	1.47 m	37.4		
6-13	1.2-1.4 m	25-33		
14	1.47 m	34.9		
15	3.35 m	73.9	H-14, H-16	C-16
16	3.90 m	82.4	H-15, H-17a,b	C-15
17	1.62 m, 1.93 m	28.0		
18	1.60 m, 2.0 m	28.3		
19	3.94 m	80.9	H-18a,b, H-20	C-20
20	3.24 ddd (11.5, 2.3, 2.3)	79.0	H-19, H-21a,b	C-19
21	1.64 m, 1.77 m	27.9	H-20, H-22a,b	
22	1.45 m, 2.13 m	32.9	H-21a,b, H-23	
23	3.28 ddd (10.8, 9.2, 4.6)	70.6	H-22a,b, H-24	C-24
24	3.00 ddd (9.2, 9.0, 2.1)	82.3	H-23, H-25	C-23, C-25
25	1.42 m	25.5		
26-31	1.2-1.4 m	25-33		
32	1.2-1.4 m	31.9		
33	1.2-1.4 m	22.7		
34	0.88 t (5.8)	14.1		
35	7.18 ddd (1.5, 1.5, 1.5)	151.7	H-3a,b, H-36	C-1, C-36
36	5.06 qq (6.8, 1.6)	78.0	H-3a,b, H-37	
37	1.43 d (6.8)	19.1		

^a Assigned by HMQC, HMBC, and DEPT spectra. ^b Key ¹H-¹H correlations. ^c Important long-range ¹H-¹³C correlations.

THP ring along with an adjacent THF ring and one flanking hydroxyl group on the THF side.

Compound 1 was isolated from the cytotoxic CHCl₃-MeOH (1:1) extract of the seeds of *R. mucosa*.^{5,6} The brine shrimp lethality test⁷ was employed to direct the fractionation of the active extract.

Jimenezin (1)⁸ was obtained as a yellow oil. Its molecular formula was established as C₃₇H₆₆O₇ by HRFABMS.⁹ The IR spectrum⁹ contained absorptions for hydroxyl (3418 cm⁻¹) and α,β -unsaturated γ -lactone (1751 cm⁻¹) functionalities. Sequential losses of three molecules of H₂O from the MH⁺ in the FABMS⁹ as well as the formation of the tri-TMSi derivative 1a confirmed the existence of three hydroxyl groups in compound 1.

The presence in jimenezin (1) of an α,β -unsaturated methyl γ -lactone with a hydroxyl group at C-4 was suggested by the ¹H NMR⁹ resonances at δ 7.18 (H-35), 5.06 (H-36), 3.85 (H-4), 2.53 (H-3a), 2.40 (H-3b), and 1.43 (H-37) corresponding in the ¹³C NMR⁹ spectrum to the resonances at δ 174.6 (C-1), 151.7 (C-35), 131.2 (C-2), 78.0 (C-36), 70.0 (C-4), 33.3 (C-3), and 19.1 (C-37) (Table 1).¹⁰ In addition to the resonance attributable to H-4, the ¹H NMR spectrum (Table 1) of compound 1 exhibited six well-defined signals in the range δ_H 3.0-4.0. Those

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: (525) 622-5289. Fax: (525) 622-5329 E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

[†] Taken in part from the Ph.D. thesis of D.C.

Table 2. Partial ^1H NMR Data of the Mosher Esters of **1s** and **1r**^a

proton	δ_{H}		$\Delta\delta_{S-R}$
	1s	1r	
14	1.62	1.51	+0.11
15	5.14	5.20	<i>R</i> ^b
16	4.01	4.02	-0.01
17a	1.81	1.91	-0.10
17b	1.46	1.70	-0.24
18a	1.90	1.91	-0.01
18b	1.52	1.79	-0.27
19	3.93	3.91	+0.02
20	3.28	3.21	+0.07
21a	1.81	1.61	+0.20
21b	1.54	1.53	+0.01
22a	2.32	2.24	+0.08
22b	1.62	1.41	+0.21
23	4.71	4.75	<i>R</i> ^b
24	3.23	3.26	-0.03
25	1.30	1.49	-0.19
35	6.78	7.03	-0.25
36	4.86	4.92	-0.06
3a	2.54	2.62	-0.08
3b	2.62	2.69	-0.07
4	5.36	5.43	<i>R</i> ^b
5	1.69	1.65	+0.04

^a Obtained in CDCl_3 at 500 MHz. ^b Absolute configuration.

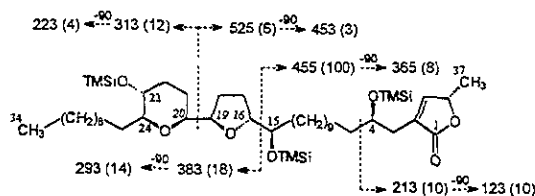


Figure 1. Diagnostic EIMS fragment ions of the TMSi derivative **1a** (shown as m/z values, intensities indicated in parentheses).

at δ 3.75 (H-15), 3.90 (H-16), and 3.94 (H-19) were assigned to the THF ring with a flanking hydroxyl group.¹⁰ The remaining signals at δ 3.00 (H-24), 3.24 (H-20), and 3.28 (H-23) were consistent with the presence of a hydroxylated THP ring in the molecule.³ The COSY NMR relationships found between H-20/H-19, H-24/H-23, H-23/H-22, H-22/H-21, and H-21/20 not only confirmed the presence of a hydroxylated THP moiety but also established that this was adjacent to the THF ring that was itself flanked by a hydroxyl group.

The disposition of the adjacent THF-THP unit along the aliphatic chain was determined by the analysis of the fragmentation pattern displayed by the tri-TMSi derivative **1a** (Figure 1). Thus, the intense fragment ions peaks at m/z 455 (cleavage at C-15/16) and m/z 525 (cleavage at C-19/20) allowed placement of the THF ring with a flanking hydroxyl between C-15 and C-19 and of the hydroxylated THP ring between C-20 and C-24.

The relative stereochemistry at C-15/C-16 was assigned according to Born's rule.¹² Thus, the chemical

shift values of both C-15 (δ 73.9) and H-15 (δ 3.35) indicated a threo relationship. On the other hand, the relative configuration of the chiral carbon centers of the THF moiety was determined as trans by comparing the NMR information with that of muconin.⁴ The cis stereochemistry of the THP ring was established by interpreting the NOESY spectrum that exhibited an intense cross-peak between H-20 (δ 3.24) and H-24 (δ 3.00). The trans-diaxial relationship of H-23 and H-24 was determined by a homodecoupling NMR experiment. Thus, irradiation of the resonance at δ 1.42 (H-25) simplified the signal assignable to H-24 to a doublet ($J = 9.2$ Hz). The magnitude of the coupling constant observed for this doublet was consistent with the trans relationship between H-23 and H-24 and, therefore, with the equatorial orientation of the hydroxyl group at C-23.

The absolute configuration of the stereogenic carbinol centers was established using Mosher ester methodology.¹³ Analysis of the $\Delta\delta_{S-R}$ data (Table 2) of the per-(*S*)- and per-(*R*)-MTPA Mosher ester derivatives¹⁴ **1s** and **1r** showed that the absolute stereochemistry of the chiral centers at C-15, C-23, and C-4 were *R*, *R*, and *R*, respectively. Thus, the absolute stereochemistry for C-16, C-19, C-20, and C-24 was deduced as *R*, *R*, *S*, and *S*, respectively. The erythro relationship at C-19/C-20 was confirmed according to these results. Finally, the *S* configuration at C-36 was established by the negative Cotton effect at 238 nm.^{15,16}

Acetogenin **1** was significantly active in the brine shrimp lethality test and was also cytotoxic for six human solid tumor cell lines in a 7-day MTT test¹⁷ using adriamycin as the positive control (Table 3).

The proposed sequence of the THP ring and the adjacent THF ring in jimenezin (**1**) is opposite to the order of those moieties in muconin.⁴ Therefore, the type of acetogenin skeleton exhibited by jimenezin (**1**) is new. Accordingly, three annonaceous acetogenins bearing a THP ring have now been isolated from *R. mucosa*.^{3,4}

Acknowledgment. This work was supported by grants from PADEP (Nos. 005358, 005379, and 005321), CONACyT (convenio 400313-5-2576 PM), and DGAPA IN205197. We thank M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM-Iztapalapa) for recording the NMR spectra. Thanks are also due to M. en C. Isabel Chávez, M. en C. Beatriz Quiroz, I. Q. Luis Velasco-Ibarra, M. en C. Javier Pérez-Flores, and QFB Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM) for recording the NMR, MS, UV, IR, and CD spectra. We are also grateful to Q. Georgina Duarte-Lisci and QFB Jose Luis Gallegos-Pérez (Facultad de Química, UNAM) for obtaining the HRFABMS. Special thanks are due to Dr. Jerry McLaughlin, West Lafayette, IN, who kindly arranged for the cytotoxicity evaluations, and to B. Gustavo Carmona Díaz for collecting the plant material. D.C. acknowledges a graduate

Table 3. Brine Shrimp Lethality and Cytotoxicity Data for Compound **1**

compd	BST ^a ($\mu\text{g/mL}$)	tumor cell line [ED ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)]					
		A-549 ^b	MCF-7 ^c	HT-29 ^d	A-498 ^e	PC-3 ^f	PACA-2 ^g
1	5.7×10^{-3}	1.64×10^{-2}	$>10^{-1}$	4.25×10^{-3}	4.94×10^{-2}	2.77×10^{-4}	1.69×10^{-4}
adriamycin		4.47×10^{-3}	8.97×10^{-2}	1.62×10^{-2}	1.10×10^{-3}	2.13×10^{-2}	2.88×10^{-3}

^a Brine shrimp lethality test. ^b Human lung carcinoma. ^c Human breast carcinoma. ^d Human colon adenocarcinoma. ^e Human kidney carcinoma. ^f Human prostate adenocarcinoma. ^g Human pancreatic carcinoma.

student fellowship awarded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

References and Notes

- (1) Chemical Studies on Mexican Plants used in Traditional Medicine. 34. Part 33. Mata, R.; Rojas, A.; Acevedo, L.; Estrada, S.; Calzada, F.; Rojas, I.; Bye, R.; Linares, E. *Planta Med.* 1997, 63, 31–35.
- (2) Maas, P. J. M.; Westra, L. Y. Th. In *Flora Neotropica*; Monograph 57; The New York Botanical Garden: New York, 1992; pp 127–132.
- (3) Shi, G.; Alfonso, D.; Fatope, M. O.; Zeng, L.; Gu, Z.-M.; Zhao, G. X.; He, K.; MacDougal, J. M.; McLaughlin, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 10409–10410.
- (4) Shi, G.; Kozlowski, J. F.; Schwedler, J. T.; Wood, K. V.; MacDougal, J. M.; McLaughlin, J. L. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 7988–7989.
- (5) The seeds of *R. mucosa* (Annonaceae) were collected in September 1994 in Catemaco, Veracruz, México. A voucher specimen of the plant (no. CA94-3) is preserved in the Herbarium of the Instituto de Ecología (XAL), Xalapa, Veracruz, México.
- (6) The air-dried seeds of *R. mucosa* (663 g) were pulverized in a Wiley 4 mill. The pulverized seeds were extracted with CHCl_3 -MeOH (1:1). The extract (241 g, brine shrimp lethality test LC_{50} = 0.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was partitioned between hexane-MeOH (10% water). The methanolic fraction (26 g, brine shrimp lethality test LC_{50} = 6×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$) was subjected to open column chromatography (531 g of Si gel Kieselgel 60 Merck, 0.063 mm, 230 mesh ASTM) and eluted with a gradient of increasing polarity with hexane/ CHCl_3 /MeOH. Altogether, 230 fractions were collected and combined according to their similar TLC patterns to yield 14 primary fractions. Purification of the active pool F₈ (500 mg, brine shrimp lethality test LC_{50} = 7×10^{-3} ppm) on a normal-phase silica gel column [7.5 mL/min, hexane-*i*-PrOH-MeOH (90:5:5)] yielded 1 (16 mg; retention time 45.0 min).
- (7) Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. *Planta Med.* 1982, 45, 31–34.
- (8) Jimenezin (1): yellow oil; $[\alpha]_D^{20}$ +8.3° (c 1.2 mg/mL, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 210.5 (3.97) nm; CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) -1.7×10^3 (238); IR ν_{max} (film) 3100–3650, 3023, 2928, 1750, 1641, 1423, 1215, 1028, 930 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; FABMS (glycerol) m/z (MH)⁺ 623; HRFABMS (NBA) m/z 623.4877 [M + H]⁺, calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_7$ + H 623.4887; EIMS of the TMSi derivative 1a, see Figure 1.
- (9) The optical rotation was taken on a JASCO DIP-360 polarimeter. The UV spectrum was obtained on a Shimadzu 160 UV spectrometer in MeOH solutions, and the CD spectrum was performed on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25 °C in MeOH solution. The IR spectrum (film) was measured on a Perkin-Elmer 599 spectrometer. The ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) spectra (all in CDCl_3) were obtained either on a Bruker DMX500 or a Varian UNITY PLUS 500 spectrometer. The FABMS data were recorded using a glycerol matrix on a JEOL DX300 mass spectrometer, with the HRFABMS obtained in a JEOL JX102A mass spectrometer, and the EIMS of the TMSi derivative performed on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer. HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with Waters UV photodiode array detector (900) set at 209–220 nm, using a silica gel column (19 i.d. \times 300 mm). Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the millennium 2000 software program (Waters).
- (10) Gu, Z.-M.; Zhao, G.-X.; Oberlies, N. H.; Zeng, L.; McLaughlin, J. L. In *Recent Advances in Phytochemistry*; Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., Eds.; Plenum Press: New York, 1995; Vol. 29, pp 249–310.
- (11) A small amount (0.5 mg) of compound 1 was treated with 100 μL of Sigma-Sil-A (trimethylchlorosilane-hexadimethylsilane-pyridine 1:3:9) and heated at 60 °C for 10 min to yield the TMSi derivative 1a.
- (12) Born, L.; Lieb, F.; Lorentzen, J. P.; Moeschler, H.; Nonfon, M.; Söllner, R.; Wendisch, D. *Planta Med.* 1990, 56, 312–316.
- (13) Reser, M. J.; Hui, Y.-H.; Rupprecht, J. K.; Kozlowski, J. F.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, Z.; Hoyer, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 10203–10213.
- (14) To a solution of 1 (1.5 mg in 0.5 mL of CDCl_3 in a NMR tube) was sequentially added pyridine- d_5 (100 μL), 4-(dimethylamino)pyridine (0.5 mg), and (*R*)-(-)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl chloride (25 mg). The mixture was heated at 50 °C for 4 h under a N_2 atmosphere to give the *S*-Mosher ester (1a). Treatment of 1 (1.5 mg) with (*S*)-(+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl chloride as described above yielded the *R*-Mosher ester 1r.
- (15) 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. *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42, 1164–1174.
- (16) He, K.; Shi, G.; Zhao, G.-X.; Zeng, L.; Ye, Q.; Schwedler, J. T.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 1029–1034.
- (17) Cytotoxicity against human solid tumors cells was measured in a 7-day MTT assay at the Purdue Cell Culture Laboratory using adriamycin as a positive control.

NP970510F

**Purpurediolin and Purpurenin, Two New
Cytotoxic Adjacent Bis-tetrahydrofuran
Annonaceous Acetogenins from the
Seeds of *Annona purpurea***

Daniel Chávez and Rachel Mata

Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de
Investigación en Plantas Medicinales, Instituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
D.F. 04510, Mexico

**JOURNAL OF
NATURAL
PRODUCTS®**

Reprinted from
Volume 61, Number 5, Pages 580-584

Purpurediolin and Purpurenin, Two New Cytotoxic Adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona purpurea*[†]

Daniel Chávez and Rachel Mata*

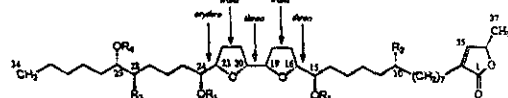
Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de Investigación en Plantas Medicinales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, Mexico

Received September 3, 1997

Two novel cytotoxic acetogenins, purpurediolin (1) and purpurenin (2), were isolated from the seeds of *Annona purpurea*. Their structures were elucidated by a combination of chemical and spectral methods including MS and NMR measurements. In addition, six known acetogenins were obtained, namely, bullatacin, squamocin (annonin I), motrilin (squamocin C), annoglaucin, xylomatenin, and annonacin A. Compounds 1 and 2 exhibited potent cytotoxic activity in vitro against six human solid tumor cell lines.

Annona purpurea Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae) is a small tree up to 7 m high. The fruit of this plant, commonly known as "ilama" in Mexico, is edible. It is also used in folk medicine as remedy for fevers and colds.¹ From the leaves of this species, Hostettmann and co-workers obtained six acetogenins, namely, bullatacin, rolliniastatin 1, purpureacin 2, cherimoline, sylvaticin, and purpureacin.²

In our continued search for biologically active natural compounds from Mexican medicinal plants, we have investigated the seeds of *A. purpurea* and isolated the novel acetogenins 1 and 2, which were given trivial names of purpurediolin and purpurenin, respectively. In addition, the six known acetogenins bullatacin,³ squamocin⁴ (annonin I⁵), motrilin⁶ (squamocin C⁴), annoglaucin,⁷ xylomatenin,⁸ and annonacin A⁹ have been isolated from the same source. In this paper, we describe the isolation, structure elucidation, and cytotoxic activity of compounds 1 and 2.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	H	OH	H
1a	TMSi	H	TMSi	TMSi
1b	H	H	Acetonide	
1a	(S)-MTPA	H	(S)-MTPA	(S)-MTPA
1r	(R)-MTPA	H	(R)-MTPA	(R)-MTPA
2	H	OH	H	H
2a	TMSi	TMSi	H	TMSi
2s	(S)-MTPA	(S)-MTPA	H	(S)-MTPA
2r	(R)-MTPA	(R)-MTPA	H	(R)-MTPA

Results and Discussion

The dried seeds of *A. purpurea* were extracted with CHCl₃-MeOH (1:1). As for most extracts from *Annona* species,¹⁰⁻¹² the crude extract of *A. purpurea* exhibited potent activity in the brine shrimp lethality test¹³ and against human solid tumor cell lines. The active extract (LC₅₀ = 4.0 μg/mL) was subjected to solvent partition with hexane and 10% H₂O in MeOH. The most active fraction as evaluated in the brine shrimp lethality test was the methanolic fraction (brine shrimp lethality test LC₅₀ = 0.11 μg/mL). This fraction was further fractionated by open column chromatography using silica gel with increasing solvent polarities to yield 11 primary fractions (F₁-F₁₁, see the Experimental Section). Extensive HPLC separation of the most active fraction F₅ (brine shrimp lethality test LC₅₀ = 1.38 × 10⁻² μg/mL) yielded three known acetogenins, bullatacin, squamocin, and motrilin. Active fraction F₇ (brine shrimp lethality test LC₅₀ = 1.47 × 10⁻² μg/mL) was also chromatographed by HPLC to yield the known compounds annoglaucin, xylomatenin, and annonacin A, as well as the novel acetogenins 1 and 2. The spectral properties, including UV, IR, NMR, and MS of the known compounds, were identical to those previously described for bullatacin,³ squamocin⁴ (annonin I⁵), motrilin⁶ (squamocin C⁴), annoglaucin,⁷ xylomatenin,⁸ and annonacin A,⁹ respectively. All compounds except bullatacin have never been isolated from *A. purpurea* before.

Purpurediolin (1) was obtained as a white wax. Its molecular formula was established as C₃₇H₆₈O₈ by HRFABMS. The IR spectrum contained absorptions for hydroxyl (3418 cm⁻¹) and α,β-unsaturated methyl γ-lactone (1751 cm⁻¹) functionalities. Sequential losses of four molecules of H₂O from the MH⁺ in the FABMS as well as the formation of the tetra-TMSi derivative 1a confirmed the presence of four hydroxyl groups.

The NMR data of compound 1 (Tables 1 and 2) clearly indicated that it was an adjacent bis-THF acetogenin very similar to bullatetrocin, a bullatacin-type of acetogenin possessing a 1,2-diol unit at C-31/32.¹⁴ The resonances for the 4-deoxy-α,β-unsaturated methyl γ-lactone were observed at δ 6.99 (H-35), 5.00 (H-36),

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: (525) 622-5289. Fax: (525) 622-5329 E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

[†] Chemical Studies on Mexican Plants used in Traditional Medicine. 35. Taken in part from the Ph.D. thesis of D.C.

Table 1. ^1H NMR Data of Purpurediolin (1) and Purpurenin (2)^a

position	1	2
3	2.26 tt (7.5, 2.0)	2.26 tt (7.0, 1.5)
4	1.54 m	1.55 m
5-8	1.20-1.60 m	1.20-1.60 m
9	1.20-1.60 m	1.42 m
10	1.20-1.60 m	3.58 m
11	1.20-1.60 m	1.42 m
12-13	1.20-1.60 m	1.20-1.62 m
14	1.37 m	1.40 m
15	3.40 m	3.40 m
16	3.83 m	3.83 m
17	1.63 m, 1.97 m	1.62 m, 1.97 m
18	1.63 m, 1.97 m	1.62 m, 1.97 m
19	3.85 m	3.85 m
20	3.93 m	3.93 m
21	1.59 m, 1.97 m	1.62 m, 1.97 m
22	1.59 m, 1.90 m	1.60 m, 1.90 m
23	3.93 m	3.93 m
24	3.86 m	3.85 m
25	1.42 m	1.41 m
26	1.44 m	1.20-1.62 m
27	1.47 m ^b	1.20-1.62 m
28	3.59 m	1.42 m
29	3.59 m	3.58 m
30	1.41 m ^b	1.42 m
31-33	1.20-1.60 m	1.20-1.62 m
34	0.89 t (7.0)	0.89 t (7.0)
35	6.99 ddd (2.0, 2.0, 2.0)	6.99 ddd (1.5, 1.5, 1.5)
36	5.00 qq (7.0, 2.0)	5.00 qq (7.0, 1.5)
37	1.40 d (7.0)	1.40 d (7.0)

^a CDCl₃, 500 MHz (*J* in Hz). ^b Interchangeable assignments.Table 2. ^{13}C NMR Data of Purpurediolin (1) and Purpurenin (2)^a

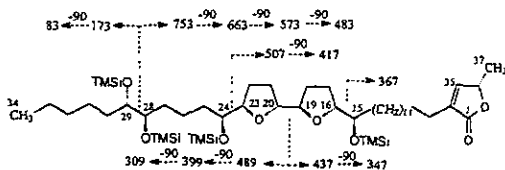
position	1	2
1	173.9	173.8
2	134.4	134.4
3	25.1	25.1
4	27.4	27.4
5-13	28.3-29.7	28.3-29.6
9, 11	28.3-29.7	37.4 ^b
10	28.3-29.7	71.8
12-13	28.3-29.7	28.3-29.6
14	33.2	33.3
15	74.1	74.0
16	83.3	83.2
17	28.4	28.4
18	28.9	28.8
19	82.5	82.4
20	82.2	82.2
21	29.1	29.2
22	25.1	24.7
23	82.9	82.8
24	71.6	71.5
25	32.5	32.4
26	22.3	28.3-29.6
27	30.8 ^b	28.3-29.6
28	74.6 ^c	37.3 ^b
29	74.7 ^c	71.8
30	31.4 ^b	37.4 ^b
31	28.3-29.7	28.3-29.6
32	31.8	31.9
33	22.5	22.6
34	13.9	14.0
35	148.9	148.8
36	77.4	77.3
37	19.1	19.2

^a CDCl₃, 125 MHz. ^{b,c} Interchangeable assignments within same column.

2.26 (H-3), and 1.40 (H-37) in the ^1H NMR spectrum (Table 1) and at δ 173.9 (C-1), 148.9 (C-35), 134.4 (C-2), 77.4 (C-36), 25.1 (C-3), and 19.1 (C-37) in the ^{13}C NMR spectrum (Table 2). The absorptions for the

Table 3. ^1H NMR Signals for the Protons of the Threo and Erythro Diols,¹⁵ 1 and 1b^a

	methine protons		acetyl methyls	
	threo	erythro	threo	erythro
diol	3.45 (2 H)	3.62, 3.58		
acetonide	3.58 (2 H)	4.03, 4.00	1.37 (6 H)	1.43, 1.33
1	3.59 (2 H)			
1b	4.03, 4.01		1.42, 1.33	

^a CDCl₃, 500 MHz.Figure 1. Diagnostic EI/MS fragment ions of 1a (shown as *m/z* values).

adjacent bis-THF α,α' -dihydroxylated portion appeared at δ 74.1 (C-15), 83.3 (C-16), 82.5 (C-19), 82.2 (C-20), 82.9 (C-23), and 71.6 (C-24) in the ^{13}C NMR spectrum. The signal attributable to C-15 showed a cross-peak with the signal at δ 3.40 (H-15) in the HETCOR spectrum. The remaining five carbon resonances correlated with two multiplets in the region at δ 3.81-3.96 (5H, H-16, H-19, H-20, H-23, and H-24).

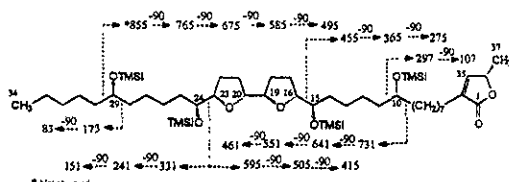
The presence of a vicinal diol moiety in the molecule was ascertained by the resonances at δ_{H} 3.59 (m, 2H) and δ_{C} 74.6 and 74.7 in the NMR spectra. Treatment of compound 1 with acetone/HCl afforded the acetonide derivative 1b, which confirmed chemically the presence of the vicinal diol in 1. The ^1H NMR data (Table 3) of this derivative substantiated an erythro configuration for the diol group. The appearance of the acetyl methyl protons as two well-separated singlet peaks at δ 1.42 and 1.33 and the chemical shift values of the oximethine signals at δ 4.03 (H-28) and 4.01 (H-29) were consistent with this proposal.¹⁵

The disposition of the diol moiety and the adjacent bis-THF unit along the aliphatic chain were determined by analysis of the MS fragmentation pattern displayed by the tetra-TMSi derivative 1a (Figure 1).¹² Thus, the intense fragment ion peak at *m/z* 367 was consistent with a cleavage at C-15/16; the fragment at *m/z* 507 (cleavage at C-23/24) placed the bis-THF rings with two flanking hydroxyl groups at C-15 to C-24. Finally, the presence of fragments ions at *m/z* 173 and 753 located the vicinal diol at C-28/29 rather than at C-31/32 as in the case of bullatetrocin.¹⁴

The threo/trans/threo/trans/erythro relative stereochemistry from C-15 to C-24 was assigned on the basis of the chemical shift values observed for these nuclei in the NMR spectra, which were very similar to those previously described for bullatacin and related compounds.¹⁶⁻¹⁹

Table 4. Partial ^1H NMR Data of the (*S*)- and (*R*)-Mosher Esters of 1 and 2^a

protons	1				2			
	(<i>S</i>)-MTPA	(<i>R</i>)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	carbinol confign	(<i>S</i>)-MTPA	(<i>R</i>)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	carbinol confign
3					2.250	2.238	+0.012	10 <i>R</i>
4					1.532	1.514	+0.018	
14	1.600	1.511	+0.089	15 <i>R</i>	1.63	1.482	+0.131	
16	3.922	3.921	+0.001		3.976	3.944	+0.032	15 <i>R</i>
17	1.976	1.982	-0.006		1.899	1.971	-0.072	
	1.528	1.559	-0.031		1.600	1.616	-0.016	
22	1.854	1.807	+0.047	24 <i>S</i>	1.824	1.798	+0.026	
	1.616	1.613	+0.003		1.664	1.606	+0.058	
23	3.906	3.905	+0.001		3.944	3.930	+0.014	24 <i>S</i>
25	1.556	1.597	-0.041	29 <i>S</i>	1.532	1.554	-0.022	
34	0.832	0.866	-0.034		0.832	0.864	-0.032	29 <i>S</i>

^a CDCl_3 , 500 MHz.Figure 2. Diagnostic EIMS fragment ions of 2a (shown as m/z values).

The *S* configuration at C-36 was established by the negative Cotton effect at 238 nm.^{4,19} The absolute configuration of the stereogenic carbinol centers were established using Mosher ester methodology.¹³ The analysis of the $\Delta\delta_{H(S-R)}$ data (Table 4) of the per-(*S*)- and per-(*R*)-MTPA Mosher ester derivatives 1s and 1r showed that the absolute stereochemistry of the chiral centers at C-15 and C-24 was *R* and *S*, respectively. On the other hand, the absolute configuration at C-29 was established as *S* considering the negative difference in chemical shift for the terminal methyl group with respect to the (*S*)- and (*R*)-Mosher ester derivatives.¹⁹ Thereafter, the absolute configuration at C-23 was determined as *R* because of the *erythro* configuration of the vicinal diol at C-23/29.

Recently, a similar compound to purpurediolin (1), namely rollitacin, was isolated from *Rollinia mucosa*.²⁰ However, the absolute stereochemistry for the stereogenic carbinol centers was not described. Thus, purpurediolin (1) and rollitacin could be the same compound.

Purpurenin (2) was obtained as a pale yellow wax. The molecular formula $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$ was also deduced by HRFABMS. The NMR properties of compound 2 indicated that its structure was very similar to those of compound 1. Once again, the existence of four hydroxyl groups was revealed by the analysis of the FABMS data and the formation of the tetra-TMSi derivative 2a. The major differences observed between compounds 1 and 2 referred to the third and fourth hydroxyl groups along the aliphatic chain. According to an analysis of the EIMS of the tetra-TMSi derivative 2a (Figure 2), these two groups were at C-10 and C-29. The presence of fragment ions at m/z 731 (cleavage between C-9/10), 297 (cleavage between C-10/11), and 173 (cleavage between C-28/29) was in agreement with this proposal. On the other hand, as in compound 1, the adjacent bis-THF α,α' -dihydroxylated moiety was located between C-15

and C-24 due to the presence of fragment ions at m/z 455 and 595 (cleavages at C-15/16 and C-23/24, respectively).

The relative configuration of this system from C-15 to C-24 was deduced as threo/trans/threo/trans/erythro by considering the similarity of the ^1H and ^{13}C NMR data of 2 with those of 1 and other bullatacin-type acetogenins.¹⁶⁻¹⁹ The absolute configuration of the carbinol centers was also determined by analysis of the ^1H NMR data of the per-(*S*)- and per-(*R*)-Mosher ester derivatives 2s and 2r. The negative value ($\Delta\delta_{S-R}$) obtained for H-34 (Table 4) was consistent with an *S* configuration at C-29. The absolute stereochemistry at C-10 was assigned as *R* because the difference values for H-3 and H-4 were positive. In the case of C-15 and C-24, the absolute stereochemistries turned out to be identical to those of compound 1. Finally, the configuration at C-36 was determined to be *S* on the basis of CD measurements.^{4,19}

Acetogenins 1, 2, annoglaucin, and annonacin A were significantly bioactive in the brine shrimp lethality test and were also cytotoxic to six human solid tumor cell lines in a 7-day MTT test using adriamycin as the positive control (Table 5). Purpurediolin (1) and annoglaucin showed high selectivity against HT-29 (human colon adenocarcinoma). Purpurenin (2) was less potent than 1 and annoglaucin. The level of activity displayed by acetogenins 1 and 2 is comparable to that previously described for similar compounds.¹⁴

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting point determinations were performed on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were taken on a JASCO DIP-360 polarimeter. UV spectra were obtained on a Shimadzu 160 UV spectrometer in MeOH solution. CD spectra were performed on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25 °C in MeOH solution. IR spectra (film) were measured on a Perkin-Elmer 599 spectrometer. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) spectra (all in CDCl_3) were obtained on a Varian Unity Plus 500 spectrometer. The FABMS data were recorded using a glycerol matrix on a JEOL DX300 mass spectrometer. HRFABMS were obtained in a JEOL JX102A mass spectrometer using an NBA matrix. EIMS for TMSi derivatives was performed on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer. HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with a Waters UV photodiode array detector (900) set at 209–220 nm, using a silica gel column (19 mm i.d. \times

Table 5. Brine Shrimp Lethality and Cytotoxicity Data for the Extract and Selected Compounds from *A. purpurea*

compound	BST ^a (μg/mL)	tumor cell line [ED ₅₀ (μg/mL)]					
		A-549 ^b	MCF-7 ^c	HT-29 ^d	A-498 ^e	PC-3 ^f	PACA-2 ^g
extract	1.1 × 10 ⁻¹	<10 ⁻²	1.53	1.47	3.53	1.16	<10 ⁻²
1	7.0 × 10 ⁻²	4.43 × 10 ⁻¹	9.16 × 10 ⁻¹	<10 ⁻⁷	1.36	3.53 × 10 ⁻¹	1.44
2	2.9 × 10 ⁻²	1.29	1.67	3.16 × 10 ⁻¹	1.25	1.07	1.98
annoglaucin	2.2 × 10 ⁻²	1.08	1.66	<10 ⁻⁷	1.01	3.56 × 10 ⁻¹	1.45
annonacin A	4.6 × 10 ⁻¹	1.32	1.96	1.18	1.16	1.33	1.90
adriamycin		3.67 × 10 ⁻³	2.12 × 10 ⁻¹	9.66 × 10 ⁻³	1.98 × 10 ⁻³	2.27 × 10 ⁻²	1.45 × 10 ⁻³

^a Brine shrimp lethality test. ^b Human lung carcinoma. ^c Human breast carcinoma. ^d Human colon adenocarcinoma. ^e Human kidney carcinoma. ^f Human prostate adenocarcinoma. ^g Human pancreatic carcinoma.

300 mm). Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters).

Plant Material. The seeds of *A. purpurea* (Annonaceae) were collected in July 1994 in Catemaco, Veracruz, Mexico. A voucher specimen of the plant (no. CA94-1) is preserved in the Herbarium of the Instituto de Ecología (XAL), Xalapa, Veracruz.

Bioassays. Brine shrimp lethality test of the extract, fractions and isolated compounds was performed according to the standard procedure.¹³ Cytotoxicity against human solid tumors cells was measured in a 7-day MTT assay at the Purdue Cell Culture Laboratory using adriamycin as a positive control.¹³

Extraction and Isolation. The air-dried seeds of *A. purpurea* (4.9 kg) were pulverized in a Wiley 4 mill. The pulverized seeds were extracted with CHCl₃-MeOH (1:1). The dried extract (1,500 g, brine shrimp lethality test LC₅₀ = 4.0 μg/mL) was partitioned between hexane-MeOH (10% water). The methanolic fraction (378 g, brine shrimp lethality test LC₅₀ = 1.14 × 10⁻¹ μg/mL) was subjected to open column chromatography (1 kg of Kieselgel 60 Merck, 0.063 mm, 230 mesh ASTM) and eluted with a gradient of increasing polarity with hexane/CHCl₃/MeOH. Altogether, 89 fractions were collected and then combined according to their TLC patterns to yield 11 primary fractions (F₁-F₁₁). Bioactivities in the brine shrimp lethality test showed six active pools (F₄-F₉). HPLC purification of the active fraction F₇ (500 mg, brine shrimp lethality test LC₅₀ = 1.47 × 10⁻² ppm) on a normal-phase silica column [8.3 mL/min, hexane-*i*-PrOH-MeOH (85:7.5:7.5)] yielded 1 (22 mg), 2 (44 mg), and the known compounds annoglaucin, xylomatenin, and annonacin A (46, 30, and 10 mg, respectively). The retention times were 34.6, 50.0, 42.0, 31.5, and 33.0 min, respectively. HPLC purification of the most active pool F₅ (400 mg, brine shrimp lethality test LC₅₀ = 1.38 × 10⁻² ppm) on a normal-phase silica column [7.9 mL/min, hexane-*i*-PrOH-MeOH, (90:5:5)] afforded the known compounds bullatacin (20 mg), squamocin (70 mg), and motrilin (110 mg); retention times: 44.0, 45.2, and 47.0 min, respectively.

Purpurediolin (1): whitish wax; mp 35-39 °C; [α]_D²⁰ +20° (c 1.3 mg/mL, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 207 (3.89) nm; CD (MeOH) Δε (nm) -3.77 × 10³ (238); IR ν_{max} (film) 3100-3650, 3023, 2928, 1751, 1641, 1423, 1215, 1028, 930 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (Tables 1 and 2); FABMS (glycerol) *m/z* [MH]⁺ 639; HRFABMS (NBA) *m/z* 639.4837 [MH]⁺, calcd for C₃₇H₅₆O₈, 639.4835.

Purpurenin (2): pale yellow wax; mp 36-38 °C; [α]_D²⁰ +27° (c 1.0 mg/mL, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 208

(4.09) nm; CD (MeOH) Δε (nm) -2.66 × 10³ (238); IR ν_{max} (film) 3100-3700, 3021, 2940, 2859, 1751, 1642, 1428, 1215, 1074, 927 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (Tables 1 and 2); FABMS (glycerol) *m/z* [MH]⁺ 639; HRFABMS (NBA) *m/z* 639.4837 [MH]⁺, calcd for C₃₇H₅₆O₈, 639.4835.

TMSi Derivatizations. Small amounts (1.0 mg) of compounds 1 and 2 were treated with 100 μL of Sigma-Sil-A (trimethylchlorosilane-hexadimethylsilane-pyridine 1:3:9) and heated at 60 °C for 10 min to yield the respective TMSi derivatives 1a and 2a. 1a: EIMS *m/z* 753 (17), 663 (10), 573 (5), 507 (11), 489 (5), 483 (5), 437 (10), 417 (10), 399 (10), 367 (80), 347 (6), 309 (2), 173 (33), 111 (14), 83 (25), 73 (100). 2a: EIMS *m/z* 765 (5), 731 (6), 675 (2), 641 (7), 595 (31), 585 (3), 551 (7), 505 (27), 495 (7), 455 (97), 461 (4), 415 (32), 365 (63), 331 (11), 297 (83), 275 (22), 241 (9), 173 (21), 151 (15), 111 (12), 107 (14), 83 (18), 73 (100).

Preparation of Acetonide Derivative 1b. To a solution of 3 mg of 1 in 5 mL of acetone was added 1.5 μg of HCl (concentrated). The mixture was allowed to react for 48 h and monitored by TLC until the reaction was completed. The mixture was dried in vacuo to give the acetonide derivative 1b (partial ¹H NMR spectrum shown in Table 3).

Preparation of Per-(S)- and Per-(R)-MTPA Ester Derivatives. To a solution of 1 or 2 (2 mg in 0.8 mL of CDCl₃ in a NMR tube) were sequentially added pyridine-*d*₅, (20 μL), 4-(dimethylamino)pyridine (0.5 mg), and (R)-(-)-*α*-methoxy-*α*-(trifluoromethyl)phenylacetyl chloride (25 mg). The mixture was heated at 50 °C for 4 h under an N₂ atmosphere to give the (S)-Mosher esters 1s and 2s (¹H NMR data, Table 4). Treatment of 1 (2 mg) or 2 (2 mg) with (S)-(+)-*α*-methoxy-*α*-(trifluoromethyl)phenylacetyl chloride as described above yielded the (R)-Mosher esters 1r and 2r, respectively (¹H NMR data, Table 4).

Acknowledgment. This work was supported by grants from PADEP (Nos. 005358, 005379, and 005321), CONACyT (convencio 400313-5-2576 PM), and DGAPA (IN205197). We thank M. en C. Isabel Chávez, M. en C. Beatriz Quiroz, I. Q. Luis Velasco-Ibarra, M. en C. Javier Pérez-Flores, and QFB Rocío Patiño, Instituto de Química, UNAM, for recording the NMR, MS, UV, IR, and CD spectra. Thanks are also due to Q. Georgina Duarte-Lisci and QFB Jose Luis Gallegos-Pérez (Facultad de Química, UNAM) for obtaining the HRFABMS. The technical support of Laura Acevedo Arteaga is also acknowledged. We are also grateful to B. Gustavo Carmona Díaz for collecting the plant material. Special thanks are due to Dr. Jerry McLaughlin, Purdue University, IN, who kindly arranged for the cytotoxicity evaluations. D.C. acknowledges a fellowship awarded

by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) to carry out graduate studies.

References and Notes

- (1) Martínez, M. *Las Plantas Medicinales de México*, 6th ed.; Editorial Bozar: Mexico, D.F., 1989.
- (2) Cepleanu, F.; Ohtani, K.; Hamburger, M.; Gupta, M. P.; Solis, P.; Hostettmann, K. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1379-1388.
- (3) Hui, Y.-H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Anderson, J. E.; Smith, D. L.; Chang, C.-J.; McLaughlin, J. L. *J. Nat. Prod.* **1989**, *114*, 463-477.
- (4) 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. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1164-1174.
- (5) Born, L.; Lieb, F.; Lorentzen, J. P.; Moeschler, H.; Nonfon, M.; Söllner, R.; Wendisch, D. *Planta Med.* **1990**, *56*, 312-316.
- (6) Cortes, D.; Myint, S. H.; Hocquemiller, R. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8195-8202.
- (7) Etcheverry, S.; Sahpaz, S.; Fall, D.; Laurens, A.; Cavé, A. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1423-1426.
- (8) Colman-Saizarbitona, T.; Gu, Z.-M.; McLaughlin, J. L. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1661-1669.
- (9) Lieb, F.; Nonfon, M.; Wachendorff-Neumann, U.; Wendisch, D. *Planta Med.* **1990**, *56*, 317-319.
- (10) Fang, X.-P.; Rieser, M. J.; Gu, Z.-M.; Zhao G.-X.; McLaughlin, J. L. *Phytochem. Anal.* **1993**, *4*, 27-67.
- (11) Gu, Z.-M.; Zhao, G.-X.; Oberlies, N. H.; Zeng L.; McLaughlin, J. L. In *Recent Advances In Phytochemistry*; Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., Eds.; Plenum Press: New York, 1995; pp 249-310.
- (12) Zeng, L.; Ye, Q.; Oberlies, N. H.; Shi, G.; Gu, Z.-M.; He K., McLaughlin, J. L. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *275-293*.
- (13) Meyer, B. M.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols D. E.; McLaughlin, J. L. *Planta Med.* **1982**, *45*, 31-34.
- (14) He, K.; Shi, G.; Zhao, G.-X.; Zeng, L.; Ye, Q.; Schwedler, J. T.; Wood K. V.; McLaughlin, J. L. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1029-1034.
- (15) Wu, F.-E.; Gu, Z.-M.; Zeng, L.; Zhao, G.-X.; Zhang Y.; McLaughlin, J. L. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 830-836.
- (16) Gu, Z.-M.; Fang, X.-P.; Miesbauer, L. R.; Smith, D. L.; McLaughlin, J. L. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 870-876.
- (17) Gu, Z.-M.; Zeng, L.; Schwedler, J. T.; Wood K. V.; McLaughlin, J. L. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 467-477.
- (18) Rieser, M. J.; Hui, Y.-H.; Rupprecht, J. K.; Kozlowski, J. F., Wood, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, Z.; Hoyer, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10203-10213.
- (19) Zhao, G.-X.; Chao, J.-F.; Rieser M. J.; McLaughlin, J. L. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 25-32.
- (20) Shu, G.; MacDougal, J. M.; McLaughlin, J. L. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 719-723.

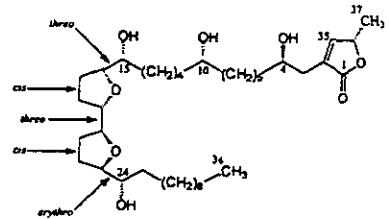
NP970410+

Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*

Daniel Chávez, Rachel Mata

Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de Investigación en Plantas Medicinales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyocacán, México

Purpuracenin, a novel cytotoxic acetogenin was isolated from the seeds of *Annona purpurea*. Cytotoxic activity against six human solid tumor cell lines and the absolute configuration are presented.





PERGAMON

Phytochemistry 00 (1998) 1-6

Journal Logo

To come

Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*^{***}

Daniel Chávez, Rachel Mata*

Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de Investigación en Plantas Medicinales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, México

Received 8 April 1998; received in revised form 6 July 1998, accepted 6 July 1998

Abstract

Purpuracenin, a novel cytotoxic acetogenin and annoglaucin, a known compound, were isolated from the seeds of *Annona purpurea*. Their structures were elucidated by a combination of chemical and spectral methods including MS and NMR spectral measurements. The absolute configurations of both compounds are presented. The new compound and annoglaucin exhibited potent cytotoxic activity in vitro against six human solid tumor cell lines © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Annona purpurea*, Annonaceae; Annonaceous acetogenins, Purpuracenin, Annoglaucin

1. Introduction

Annona purpurea Moc. and Sessé ex Dunal (Annonaceae) is a small tree up to 7 m high. The fruit of this plant, commonly known as 'ilama' in Mexico, is edible. The fruit is also used in folk medicine as a remedy for fever and cold. Our previous studies with the seeds of this species yielded the new bioactive bis-tetrahydrofuran (THF) acetogenins, purpurediolin and purpurenin and the known bis-THF acetogenins, annoglaucin, bullatacin, squamocin (annonin I) and motrilin (squamocin C) and the known mono-THF acetogenins, xylomatenin and annonacin A (Chávez & Mata, 1998). In this paper we describe the isolation, structure elucidation, absolute stereochemistry and cytotoxic activity of an additional novel compound, namely purpuracenin (1). In addition, the absolute stereochemistry for the known acetogenin annoglaucin (2) (Etcheverry, Sahpaz, Fall, Laurens, & Cavé, 1995) is presented.

2. Results and discussion

As previously reported (Chávez & Mata, 1998), the seeds of *A. purpurea* obtained from Veracruz, Mexico, were extracted with CHCl_3 -MeOH (1:1) and the extract residue was subjected to solvent partition with hexane and 10% H_2O in MeOH. The aqueous MeOH residue exhibited a potent activity in the brine shrimp lethality test (Meyer et al., 1982). This fraction was further fractionated by open column chromatography using Si gel with increasing solvent polarity to yield eleven secondary fractions (F_1 - F_{11}) (Chávez & Mata, 1998). Repeated HPLC separation of the active fraction F_7 (brine shrimp lethality test $\text{LC}_{50} = 1.47 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$) yielded the compound 1 and the known acetogenin 2.

Purpuracenin (1) was obtained as a yellow wax. Its molecular formula was established as $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$ by HRFABMS. The IR spectrum contained absorptions for hydroxyl (3432 cm^{-1}) and α,β -unsaturated lactone (1755 cm^{-1}) functionalities. Sequential losses of four molecules of H_2O from the MH^+ in the FABMS spectral analysis as well as the formation of the tetra-TMSi derivative 1a confirmed the presence of four hydroxyl groups.

Part 36 in the series 'Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine'. For part 35 see (Chávez & Mata, 1998).

* Taken in part from the Ph.D. thesis of Daniel Chávez.

** Corresponding author. Tel.: +52-5-622-5289; Fax: +52-5-622-5329; E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

Table 1
¹H NMR spectral data of purpuracennin (1) and annoglaucin (2)^a

Position	Compound 1	Compound 2
3a	2.53 dddd (15.5, 3.5, 1.5, 1.5)	2.51 dddd (15.5, 3.5, 1.5, 1.5)
3b	2.40 dddd (15.5, 8.5, 1.5, 1.5)	2.40 dddd (15.5, 8.5, 1.5, 1.5)
4	3.85 m	3.84 m
5	1.49 m	1.48 m
6-8	1.20-1.65 m	1.20-1.63 m
9, 11	1.40 m	1.41 m
10	3.59 m	3.58 m
12-13	1.20-1.65 m	1.20-1.63 m
14	1.46 m	1.40 m
15	3.42 m	3.40 m
16	3.85 m	3.85 m
17	1.82 m, 1.94 m	1.62 m, 1.97 m
18	1.78 m, 1.93 m	1.62 m, 1.97 m
19	3.90 m	3.93 m
20	3.86 m	3.85 m
21	1.83 m, 1.94 m	1.60 m, 1.97 m
22	1.76 m, 1.98 m	1.80 m, 1.90 m
23	3.92 m	3.94 m
24	3.87 m	3.86 m
25	1.41 m	1.41 m
26-33	1.20-1.65 m	1.20-1.63 m
34	0.88 t (7.0)	0.88 t (7.0)
35	7.18 ddd (1.5, 1.5, 1.5)	7.20 cddd (1.5, 1.5, 1.5)
36	5.06 qq (7.0, 1.5)	5.06 qq (7.0, 1.5)
37	1.43 d (7.0)	1.43 d (7.0)

^aCDCl₃, 500 MHz. (*J* in Hz).

Table 2
¹³C NMR spectral data of purpuracennin (1) and annoglaucin (2)^a

Position	Compound 1	Compound 2
1	174.6	174.5
2	131.2	131.2
3	33.4	33.3
4	69.9	69.9
5	37.3	37.3
6-8	25.5-29.7	25.3-29.6
9	37.3	37.2
10	71.7	71.7
11	37.3	37.2
12-13	25.5-29.7	25.3-29.6
14	34.2	33.3
15	73.9	74.0
16	82.9	83.2
17	28.7	28.9
18	27.9	28.9
19	81.1	82.2
20	80.9	82.4
21	28.4	28.3
22	23.7	24.5
23	83.1	82.8
24	71.9	71.4
25	32.8	32.4
26-31	25.5-29.7	25.3-29.6
32	31.9	31.8
33	22.7	22.6
34	14.1	14.0
35	151.8	151.8
36	78.0	77.9
37	19.1	19.0

^aCDCl₃, 125 MHz

and *R*, respectively. The absolute stereochemistry at C-10 was not solvable by spectral analysis of the (*S*)- and (*R*)-per-Mosher ester derivatives (1c, 1d) of compound 1. Therefore, a transesterification reaction was necessary (He et al., 1996). Treatment of 1 with a weak base (diethylamine) (Duret, Laurens, Hocquemiller, Cortez, & Cavé, 1994) afforded the mixture of the C-2/C-4 *cis* and *trans* transesterified isomers 1b. The tri-Mosher esters of the transesterified mixture (1e and 1f) indicated the *R* configuration at C-10, because the difference values for H-4 were positive (Table 3).

The absolute configuration of C-36 was determined according to the Hoye's method (Hoye, Hanson, Hasenwinkel, Ramirez, & Zhuang, 1994). The $\Delta\delta_{S-R}$ values for H-35 and H-36 were -0.12 and -0.03 ppm, respectively (Table 3), suggesting an unlike relative configuration for C-4/C-36. Since C-4 has the *R* configuration, C-36 must possess the *S* configuration. Compound 1 showed a negative Cotton effect at 237.5

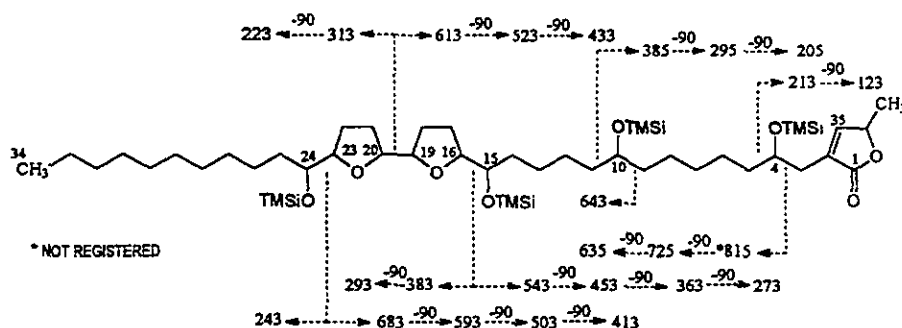


Fig. 1. Diagnostic EIMS fragment ions of 1a and 2a (shown as *m/z* values).

mentation pattern displayed by the tetra-TMSi derivative 1a (Fig. 1). The hydroxyl group was located at C-

and *S*, respectively. Thus, the absolute stereochemistry for C-16, C-19, C-20 and C-23 was deduced as *R*, *S*, *S*

Table 3
Partial ^1H NMR spectral data of the Mosher esters of 1c, 1d, 1e, 1f, 2c, 2d, 2e and 2f^a

Protons	Compound 1				Compound 2			
	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	Absolute configuration	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	Absolute configuration
4	4.54	4.52	+ 0.02	10R	4.55	4.53	+ 0.02	10R
(e and f)	4.37	4.35	+ 0.02		4.39	4.37	+ 0.02	
14	1.67	1.50	+ 0.17		1.60	1.49	- 0.11	
15	5.06	5.09	-	15R	5.03	5.02	-	15R
16	4.02	3.99	- 0.03		4.03	3.99	+ 0.04	
17a	1.86	1.89	- 0.03		1.90	2.00	- 0.10	
17b	1.71	1.78	- 0.07		1.47	1.58	- 0.11	
18a	1.76	1.73	- 0.03		1.84	1.88	- 0.04	
18b	1.67	1.76	- 0.09		1.67	1.69	- 0.02	
19	3.65	3.67	- 0.02		3.80	3.83	- 0.03	
20	3.69	3.67	+ 0.02		3.80	3.65	+ 0.15	
21a	1.76	1.73	+ 0.03		1.86	1.84	+ 0.02	
21b	1.68	1.73	+ 0.05		1.67	1.62	+ 0.05	
22a	1.88	1.78	+ 0.10		1.84	1.79	+ 0.05	
22b	1.79	1.67	+ 0.12		1.72	1.62	+ 0.10	
23	3.99	3.90	+ 0.09		3.99	3.94	- 0.05	
24	5.22	5.22	-	24S	5.27	5.27	-	24S
25	1.67	1.69	- 0.02		1.53	1.58	- 0.05	
5	1.63	1.60	- 0.03		1.65	1.59	- 0.06	
4	5.35	5.39	-	4R	5.33	5.37	-	4R
3a	2.55	2.59	- 0.04		2.54	2.59	- 0.05	
3b	2.61	2.67	- 0.06		2.61	2.67	- 0.06	
35	6.78	7.00	- 0.12		6.75	6.98	- 0.13	
36	4.87	4.90	- 0.03		4.87	4.91	- 0.04	
37	1.24	1.27	- 0.03		1.27	1.29	- 0.02	

nm in the CD spectrum, which provided further evidence for the 36 *S* configuration (Zhao et al., 1995).

Annoglaucin (2) was previously isolated by Cave's research group from the roots of *Ammonia glauca*, but the absolute stereochemistry and biological evaluations were not reported. The NMR properties (Tables 1 and 2) of the compound that we isolated were very close with those described for annoglaucin (Etcheverry et al., 1995). The analysis of the EIMS of the tetra-TMSi derivative 2a (Fig. 1) confirmed the presence of the bis-THF with two flanking hydroxyls from C-15 to C-24 and the remaining hydroxyls at C-4 and C-10. The

relative configuration of the adjacent bis-THF α,α' -dihydroxylated portion from C-15 to C-24 was deduced as *threo/trans/threo/trans/erythro* considering the similarity of the ^1H and ^{13}C data of 2 (Tables 1 and 2) with those of the bullatacin-type of acetogenins (Gu, Zeng, Schwedler, Wood, & McLaughlin, 1995; Zeng et al., 1996).

The absolute configuration of the carbinol centers was also determined by the analysis of the ^1H NMR data of the (*S*)- and (*R*)-per-Mosher ester derivatives 2c and 2d. The $\Delta\delta_{S-R}$ values (Table 3) around the bis-THF rings were very similar to those of the related

Table 4
Brine shrimp lethality and cytotoxicity data for compounds 1 and 2 from *A. purpurea*

Compound	BST ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Tumor cell line [ED ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)]					
		A-549 ^b	MCF-7 ^c	HT-29 ^d	A-498 ^e	PC-3 ^f	PACA-2 ^g
1	3.0	4.8×10^{-2}	> 10	> 10	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	> 10
2 ^h	2.2×10^{-2}	1.08	1.56	$< 10^{-7}$	1.01	3.56×10^{-1}	1.45
Adriamycin	-	8.89×10^{-1}	3.69×10^{-1}	3.71×10^{-2}	8.35×10^{-2}	5.68×10^{-2}	1.13×10^{-2}
Adriamycin ⁱ	-	3.67×10^{-3}	2.12×10^{-1}	9.66×10^{-3}	1.98×10^{-3}	2.27×10^{-2}	1.45×10^{-3}

^aSamples tested in the same cytotoxicity runs. Taken from Chávez and Mata, 1998. ^bBrine shrimp lethality test ^cHuman lung carcinoma ^dHuman breast carcinoma ^eHuman colon adenocarcinoma ^fHuman kidney carcinoma ^gHuman prostate adenocarcinoma ^hHuman pancreatic carcinoma.

protons of bullatacin (Rieser et al., 1992). Thus, the absolute stereochemistries for C-15 and C-24 were *R* and *S*, respectively. The positive difference for H-5 and the negative difference values for H-3, H-35, H-36 and H-37 indicated the *R* stereochemistry for C-4. As in the case of compound 1, the absolute configuration at C-10 was determined on basis of the analysis of the tri-Mosher ester derivatives of the mixture C-2/C-4 *trans* and *cis* translaconized isomers (2e and 2f). The $\Delta\delta_{S-R}$ showed positive differences (0.02 and 0.02 ppm) for H-4; this result is according to an *R* configuration at C-10 (He et al., 1996). Finally, the configuration at C-36 was determined to be *S* by the Hoye's Mosher ester method (Hoye et al., 1994) and by CD measurements (Zhao et al., 1995).

Purpuracenin (1) represents the first annonaceous acetogenin with four hydroxyl groups possessing the stereochemistry of rolliniastatin 1 (*threo/cis/threo/cis/erythro*) around the adjacent bis-THF unit with two flanking hydroxyls. The acetogenins 1 and 2 were significantly bioactive in the brine shrimp lethality test and were also cytotoxic to six human solid tumor cell lines in a 7-day MTT test using adriamycin as the positive control (Table 4). The stereochemistry around the adjacent bis-THF makes a notable difference in the cytotoxic activity of compounds 1 and 2. Purpuracenin (1) with a *threo/cis/threo/cis/erythro* configuration showed selectivity against A-549, A-498 and PC-3. On the other hand, annoglucin (2) with *threo/trans/threo/trans/erythro* configuration displayed selectivity against HT-29.

3. Experimental

3.1. General

Mp determinations were performed on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were taken on a JASCO DIP-360 polarimeter. UV spectra were obtained on a Shimadzu 160 UV spectrometer in MeOH solution. CD spectra were performed on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25°C in MeOH solution. IR spectra (film) were measured on a Perkin Elmer 599 spectrometer. ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) spectra (all in CDCl₃) were obtained on a Varian Unity Plus 500 spectrometer. FABMS data were recorded using a glycerol matrix on a JEOL DX300 mass spectrometer. HRFABMS (NBA) were obtained in a JEOL JX102A mass spectrometer using a NBA matrix. The EIMS for TMSi derivatives was performed on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer. HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with Waters UV photodiode array detector (900) set at 209–220 nm, using a silica gel column (19 mm ID × 300 mm).

Control of the equipment, data acquisition, processing and management of chromatographic information were performed by the millennium 2000 software program (Waters).

3.2. Plant material

The seeds of *A. purpurea* were collected in July, 1994 in Catemaco, Veracruz, Mexico. A voucher specimen of the plant (CA94-1) is preserved in the Herbarium of the Instituto de Ecología (XAL), Xalapa, Veracruz.

3.3. Bioassays

Brine shrimp lethality test of the extract, fraction and isolated compounds was performed as described (Meyer et al., 1982). Cytotoxicity against human solid tumors cells was measured in a 7-day MTT assay at the Purdue Cell Culture Laboratory using adriamycin as a positive control (He et al., 1996).

3.4. Extraction and isolation

The air-dried and ground seeds of *A. purpurea* (4.9 kg) were extracted and treated as previously described to yield 11 secondary chromatographic fractions (F₁–F₁₁) (Chávez & Mata, 1998). HPLC purification of the active fraction F₇ (500 mg, brine shrimp lethality test LC₅₀ = 1.47 × 10⁻² µg/mL) on a normal phase silica column [8.3 mL/min, hexane-*i*-PrOH-MeOH (85:7.5:7.5)] afforded compounds 1 and 2 (retention times 37.2 and 42.0 min, respectively).

3.5. Purpuracenin (1)

Pale yellow wax (10.4 mg); mp 42–44°C; [α]_D +26° (c 1.0 mg/mL, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (4.32); CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -1.06×10^3 (237.5); IR ν_{max} (film) 3100–3650, 3023, 2929, 1755, 1642, 1429, 1215, 1028, 930 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (Tables 1 and 2); FABMS (glycerol) *m/z* [MH]⁺ 639; HRFABMS (NBA) *m/z* 639.4837 [MH]⁺, calcd for C₃₇H₆₆O₈, 639.4835.

3.6. Annoglucin (2)

Pale yellow wax (46 mg); mp 58–59°C; [α]_D +31 (c 1.0 mg/mL, MeOH); CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -2.14×10^3 (238); ¹H and ¹³C NMR (Tables 1 and 2); FABMS (glycerol) *m/z* [MH]⁺ 639; HRFABMS (NBA) *m/z* 639.4836 [MH]⁺, calcd for C₃₇H₆₆O₈, 639.4835. For UV and IR data see Etcheverry et al., 1995.

3.7. TMSi derivatizations

A small amount (1.0 mg) of compounds **1** and **2** were treated with 100 μ L of Sigma-Sil-A (trimethylchlorosilane-hexamethyl silane-pyridine 1:3:9) and heated at 60°C for 10 min to yield the respective TMSi derivatives **1a** and **2a**. **1a**: EIMS m/z (rel. int.): 725 (3), 683 (10), 643 (3), 635 (2), 613 (4), 593 (9), 543 (49), 523 (9), 503 (9), 453 (27), 433 (5), 413 (7), 385 (54), 383 (14), 363 (11), 313 (19), 293 (11), 295 (13), 273 (11), 243 (100), 223 (11), 213 (29), 205 (9), 123 (14). **2a**: EIMS m/z (rel. int.): 725 (11), 683 (38), 643 (6), 635 (7), 613 (11), 593 (32), 543 (100), 523 (17), 503 (22), 453 (45), 433 (8), 413 (9), 385 (43), 383 (10), 363 (9), 313 (7), 293 (5), 295 (5), 273 (4), 243 (25), 223 (3), 213 (11), 205 (3), 123 (3).

3.8. Preparation of the transactonized mixtures **1b** and **2b**

3 mg of **1** was treated with 10% diethylamine (0.3 mL) in MeOH/H₂O (95/5) (2.7 mL) at room temperature for 24 h; the solution was dried under vacuum to give the mixture **1b** (3 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 4.55 (m, H-4_{trans}), 4.40 (m, H-4_{en}), 3.91 (2 H, m, H-20, H-23), 3.86 (3 H, m, H-16, H-20, H-24), 3.60 (m, H-10), 3.42 (m, H-15), 3.02-3.08 (2 H, m, H-35_b, H-2), 2.60-2.70 (m H-35_a), 2.20 (3H, s, CH₃-37), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$, CH₃-34). Treatment of 5 mg of **2** as described above yielded 5 mg of the mixture **2b**. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 4.55 (m, H-4_{trans}), 4.40 (m, H-4_{en}), 3.93 (2 H, m, H-19, H-23), 3.86 (3 H, m, H-16, H-20, H-24), 3.59 (m, H-10), 3.42 (m, H-15), 3.02-3.08 (2 H, m, H-35_b, H-2), 2.58-2.70 (m H-35_a), 2.20 (3H, s, CH₃-37), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$, CH₃-34).

3.9. Preparation of per-(S)- and per-(R)-MTPA ester derivatives

To a solution of **1**, **1b**, **2** or **2b** (1.5 mg in 0.5 ml of CDCl₃ in a NMR tube) were sequentially added pyridine-*d*₅, (100 μ L), 4-(dimethylamino) pyridine (0.5 mg) and (R)-(-)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl) phenylacetyl chloride (25 mg). The mixture was heated at 50°C for 4 h under nitrogen atmosphere to give the *S*-Mosher esters **1c**, **1e**, **2c** and **2e** (¹H NMR data, Table 3). Treatment of **1**, **1b**, **2** or **2b** (1.5 mg) with (S)-(+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl chloride as described above yielded the *R*-Mosher esters **1d**, **1f**, **2d** and **2f**, respectively (¹H NMR data, Table 3).

4. Unlinked References

Saez et al., 1993

Acknowledgements

This work was supported by grants from PADEP (No. 005358, 005379 and 005321), CONACyT (convenio 400313-5-2576 PM) and DGAPA IN205197. We thank M. en C. Isabel Chávez, M. en C. Beatriz Quiroz, I.Q. Luis Velasco-Ibarra, M. en C. Javier Pérez-Flores, M. en C. Héctor Rios-Olivares and QFB Rocío Patiño, (Instituto de Química, UNAM), for recording the NMR, MS, UV, IR and CD spectra. We are also grateful to M. en C. Nuria Esturau-Escofet, QFB Oscar S. Yañez-Muñoz, QFB Graciela Chávez, QFB Marisela Gutiérrez, Q. Georgina Duarte-Lisci and QFB Jose Luis Gallegos-Pérez (Facultad de Química, UNAM), for obtaining the NMR, IR and HRFABMS spectra. The technical support of Laura Acevedo Arteaga is also acknowledged. Special thanks are due to Dr. Jerry McLaughlin, West Lafayette, IN, USA, who kindly arranged for the cytotoxicity evaluations. Daniel Chávez acknowledges a graduate student fellowship awarded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

References

- Abreo, M. J., & Sneden, A. T. (1989) *J. Nat. Prod.*, 52, 822
 Chávez, D., & Mata, R. (1998) *J. Nat. Prod.*, 61, 580
 Duret, P., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cortez, D. & Cavé, A. (1994) *Heterocycles*, 39, 741.
 Etcheverry, S., Sahpaz, S., Fall, D., Laurens, A., & Cavé, A. (1995) *Phytochemistry*, 38, 1423
 Gu, Z.-M., Zeng, L., Schwedler, J. T., Wood, K. V., & McLaughlin, J. L. (1995) *Phytochemistry*, 40, 467.
 He, K., Shi, G., Zhao, G.-X., Zeng, L., Ye, Q., Schwedler, J. T., Wood, K. V., & McLaughlin, J. L. (1996) *J. Nat. Prod.*, 59, 1029.
 Hoye, T. R., Hanson, P. R., Hasenwinkel, L. E., Ramirez, E. A., & Zhuang, Z. (1994) *Tetrahedron Lett.*, 35, 8529.
 Meyer, B. M., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982) *Planta Med.*, 45, 31
 Pettit, G. R., Cragg, G. M., Polonski, J., Herald, D. L., Goswami, A., Smith, C. R., Moretti, C., Schmidt, J. M., & Eisleder, D. (1987) *Can. J. Chem.*, 65, 1433.
 Rieser, M. J., Huu, Y.-H., Rupprecht, J. K., Kozlowski, J. F., Wood, K. V., McLaughlin, J. L., Hanson, P. R., Zhuang, Z., & Hoye, T. R. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 10203.
 Saez, J., Sahpaz, S., Villaseca, L., Hocquemiller, R., Cavé, A., & Cortez, D. (1993) *J. Nat. Prod.*, 56, 351.
 Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N. H., Shi, G., Gu, Z.-M., He, K., & McLaughlin, J. L. (1996) *Nat. Prod. Rep.*, 0, 275.
 Zhao, G.-X., Gu, Z.-M., Zeng, L., Chao, J.-F., Kozlowski, J. F., Wood, K. V., & McLaughlin, J. L. (1995) *Tetrahedron*, 51, 7149

ANEXO IV

Determinación del potencial insecticida de la jimenezina (103).

Durante la fase final del presente trabajo, se presentó la oportunidad de determinar el potencial insecticida de la jimenezina (103). Como insecto de prueba se utilizó *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz) (Yie *et al.*, 1996), encontrándose que el producto inhibe de manera significativa ($39.18 \% \pm 0.146$ con respecto al control) la ingesta de la dieta tratada con jimenezina (103) a la concentración de 0.5 %.

El ensayo biológico lo realizó la Bióloga María del Carmen Ramírez Ahumada, en el laboratorio del Dr. John T. Arnason, en el Departamento de Biología de la Universidad de Ottawa, Canadá.

- Yie, Y.S., Bodnaryk, R.P. y Fields, P.G. (1996). A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-products insects. *The Canadian Entomologist*, **128**, 865-887.