

## ACETOGENINAS ANNONÁCEAS DE *ANNONA SQUAMOSA* PROCEDENTE DE BRASIL

José Ruiz Hidalgo<sup>b</sup>, Lilian Di Toto Blessing<sup>a</sup>, Federico Arrighi<sup>b</sup>, Alicia Bardón<sup>a,b</sup>, Nancy Vera<sup>a</sup>, Adriana Neske<sup>a</sup>

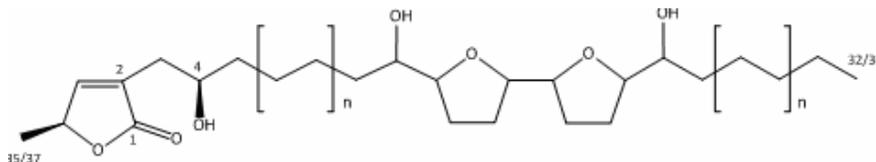
<sup>a</sup>Instituto de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. e-mail: aneskefbqf.unt.edu.ar

<sup>b</sup>INQUINOA-CONICET. Ayacucho 471, (4000) Tucumán, Argentina.

### INTRODUCCION

Las acetogeninas annonáceas (ACG) son metabolitos secundarios aislados exclusivamente de especies de la familia Annonaceae [1,2,3]. Son potentes citotóxicos con aplicaciones como insecticidas, antiparasitarios, acaricidas, fungicidas y drogas antitumorales [4,5]. El mecanismo de la acción insecticida de las ACG bioactivas sería la inhibición del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, mostrando potencias inhibitorias en el rango de concentración nanomolar [6].

Las ACG constituyen una serie de productos naturales (C-35/C-37) de origen policetídeo derivados de ácidos grasos. Se caracterizan por una larga cadena alquílica con una  $\gamma$ -metil- $\gamma$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada terminal, uno, dos o tres anillos THF y algunos sustituyentes oxigenados a lo largo de la cadena, particularmente en posición  $\alpha$  a los anillos THF.



Hemos investigado el subextracto clorofórmico de semillas de una colección brasileña de *Annona squamosa* (Annonaceae). Se aislaron 3 acetogeninas, motrilin (**1**) [7], rolliniastatin-2 (**2**) [8] y squamocin (**3**) [9], cuyas estructuras fueron elucidadas por comparación de los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-RMN con datos bibliográficos y con los resultados obtenidos por auto-ionización química en detectores de trampa de iones, puesta a punta en nuestro laboratorio.

### METODOLOGÍA

El subextracto clorofórmico fue purificado por sucesivas cromatografías en columna usando CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-AcOEt, AcOEt-MeOH en cantidades crecientes y posterior cromatografía líquida-líquida de alta performance (HPLC) usando una columna C<sub>18</sub> y una mezcla de metanol:agua como fase móvil, para dar una serie de bis-THF ACG. Las ACG aisladas fueron identificadas por técnicas de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C de alta resolución mono y bidimensionales y sus PM fueron determinados por Espectrometría de Masas (MS).

El análisis de los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-RMN (Bruker 200 MHz para <sup>1</sup>H y 50 MHz para <sup>13</sup>C) unidos a técnicas complementarias (HSQC, HMBC) permitieron determinar el tipo de anillo lactónico presente en la molécula de la ACG, el número de anillos THF dispuestos en la cadena hidrocarbonada e incluso su configuración relativa. Así también, la existencia de los grupos funcionales hidroxilos.

La comparación de los espectros de masas de baja resolución con espectros de sustancias de referencia depositados en una biblioteca informática, permitió confirmar las estructuras. Los espectros de masas de baja resolución fueron obtenidos en un espectrómetro Thermo Polaris Q (L.I.S.A), CONICET-UNT), que utiliza como detector una trampa de iones, que es capaz de producir en algunas situaciones, iones cuasimoleculares cuando se está utilizando IE. Éste es un fenómeno descrito como auto-ionización química en detectores de trampa de iones [10]. Es un fenómeno intermolecular de transferencia de masas que produce el ión quasi-molecular  $[M+H]^+$ , el cual es particularmente favorecido con moléculas alifáticas que contienen heteroátomos [11].

## RESULTADOS

El estudio químico de las semillas de *A. squamosa* condujo al aislamiento de tres ACG bis-THF conocidas. Los compuestos **1**, **2** y **3** resultaron ser ACG con  $\gamma$ -metil  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada y un sistema bis-tetrahidrofuranico adyacentes  $\alpha,\alpha'$ -dihidroxilados, de configuración relativa *threo/trans/threo/trans/erythro* y de PM 622 (Fig. 1, 2 y 3).

Los fragmentos característicos suelen corresponder a la ruptura de los anillos THF o de un THF y un grupo hidroxilo adyacente. Cuando se trabaja con trampa de iones, resultan de gran utilidad las pérdidas de agua lógicas, con el ión quasi-molecular  $[MH]^+$ . Experimentalmente, se observan tantas pérdidas de  $H_2O$  ( $[MH]^+ - 18$ ) como oxhidrilos y residuos THF existan en la molécula.

Figura 1. Espectro de masa de motrilin (**1**):  $[MH]^+ = 622 + 1 = 623$

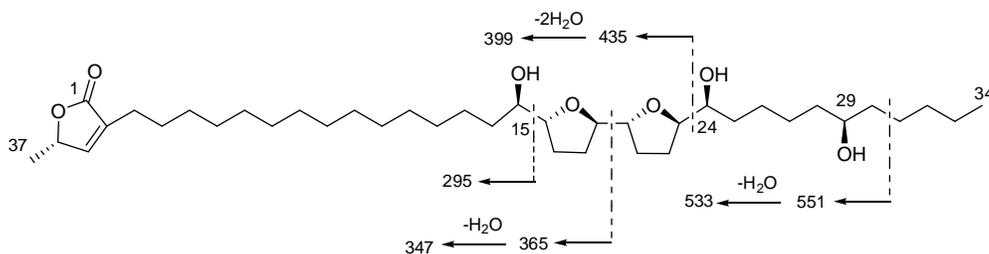


Figura 2. Espectro de masa de rolliniastatin-2 (**2**):  $[MH]^+ = 622 + 1 = 623$

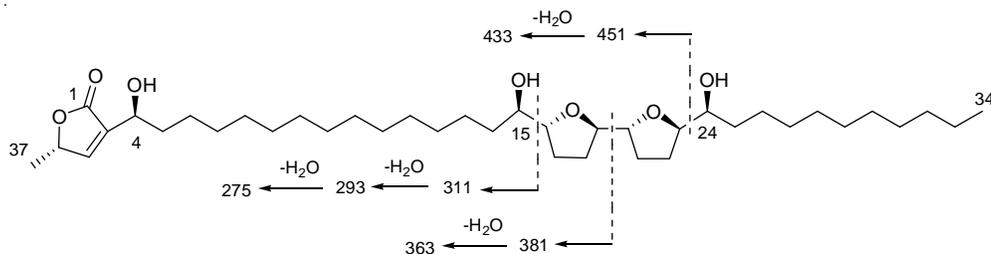
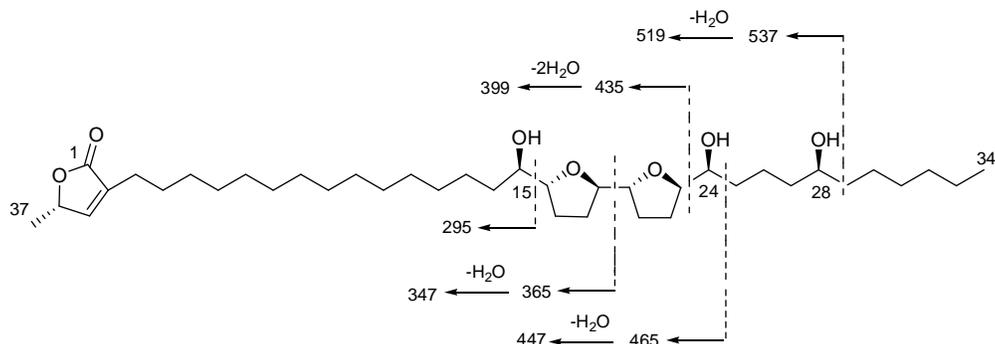


Figura 3. Espectro de masa de squamocin (**3**):  $[MH]^+ = 622 + 1 = 623$



La técnica de la autoionización química, es reportada en este trabajo por primera vez para ACG. Es particularmente útil para determinar además del PM la posición de los anillos THF o de un THF y un grupo hidroxilo adyacente, así como también la posición de los sustituyentes en la cadena.

### Referencias

- <sup>1</sup>Jossang, A, Dubaele, B, Cavé, A, Bartoli, M, Beriel, H. (1991). *J. N. Product.* 54: 967-971.
- <sup>2</sup>Wang, L, Li, Y, Min, B, Nakamura, N, Qin, G, Li, C, Hattori, M. (2001). Cytotoxic mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from leaves of *Annona montana*. *Planta Med.* 67: 847-852.
- <sup>3</sup>Liaw, Ch, Chang, F, Wu, Ch, Chen, S, Bastow, K, Hayashi, K, Nosaki, H, Lee, K, Wu, Y. (2004). Nine new cytotoxic monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Planta Med.* 70: 948-959.
- <sup>4</sup>Alkofahi, A, Rupprecht, J, Anderson, J, Mc Laughlin, J, Mikolajczak, K and Scott, B. (1989). Search for New Pesticides from Higher Plants. In *Insecticides of Plant Origin*, ed. J. T. Arnason, B. Philogene and Morand. *American Chemical Society*, Washington, DC. 25-43.
- <sup>5</sup>Cole, MD. (1994). Key Antifungal, Antibacterial and Anti-insect Assays- a Critical Review. *Biochem. Syst. Ecol.* 22: 837-856.
- <sup>6</sup>Tormo, JR, Estornell, E, Gallardo, T, González, MC, Cavé, A, Granell, S, Cortes, D, Zafrá-Polo, MC. (2001).  $\gamma$ -Lactone-functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 681-684.
- <sup>7</sup>Cortes, D, Myint, S.H., Hocquemiller, R., 1991. Molvizarin and motrilin: Two novel cytotoxic bis-tetrahydro-furanic  $\gamma$ -lactone acetogenins from *Annona cherimolia*. *Tetrahedron*, 47, 8195-8202.
- <sup>8</sup>Pettit, G.R., Riesen, R., Leet, J.E., Polonsky, J., Smith, C.R., Schmidt, J.M., Dufresne, C., Schaufelberger, D., Moretti, C., 1989. Isolation and structure of rolliniastatin-2: a new cell growth inhibitory acetogenin from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles*, 28, 213-217.
- <sup>9</sup>Fujimoto, Y, Eguchi, T, Kakinuma, K, Ikekawa, N, Sahai, M, Gupta, YK. (1988). Squamocin, a new cytotoxic bis-tetrahydrofuran containing acetogenin from *Annona squamosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 4802-4806.
- <sup>10</sup>Eichelberger, J W, Budde, W L, Slivon, L E. (1987). *Anal. Chem.* 59: 2730-2732.
- <sup>11</sup>Pannell, LK, Pu, QL, Fales, HM, Mason, RT, Stepherson, JL. (1989). *Anal. Chem.* 61: 2500-2503.