

## IDENTIFICACIÓN DE LIGNANAS EN HOJAS DE *Rollinia mucosa* (JACQ) BAIL. ANNONACEAE

Juan R. Villegas, Marco Calvo, Ian Castro Gamboa y Óscar Castro C.\*

\*Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química  
Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

### RESUMEN

El extracto etanólico obtenido por maceración de las hojas de *Rollinia mucosa* fue extraído sucesivamente con los siguientes disolventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo y acetato de etilo. Diluciones alcohólicas de todos estos extractos, incluyendo el extracto hidroalcohólico remanente, hasta concentraciones de 100µg/mL, fueron evaluadas utilizando el bioensayo de toxicidad hacia camarones *Artemia salina* Leach, como guía para detectar potencial biológico. Únicamente, el extracto clorofórmico mostró relevante letalidad. La purificación de este extracto por medio de métodos cromatográficos, permitió el aislamiento de dos conocidas lignanas como componentes mayoritarios, las cuales fueron identificadas mediante el análisis de sus correspondientes datos espectroscópicos de (<sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN) como epiudesmina 2 y eudesmina 3. Paradójicamente, ambos compuestos, puros y como mezcla, dieron pobre toxicidad hacia estos camarones. Alcaloides de naturaleza aporfínica y oxaporfínica han sido reportados previamente en hojas de otros materiales clasificados como *Rollinia mucosa*. Sin embargo, los ensayos recomendados para detectar alcaloides en todos nuestros extractos dieron negativo.

### ABSTRACT

Ethanolic extract obtained by maceration of *Rollinia mucosa* leaves was partitioned between hexane, chloroform and ethyl acetate. Samples of all extracts, including the remanent hydroalcoholic extract, were diluted in ethanol to final concentra-

tion of 100µg/mL. These samples were submitted to the Brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay and only the chloroform extract showed market toxicity. This extract was purified by chromatographic methods and yielded, as mainly compounds, two known lignans: epiudesmine 2 and eudesmine 3, which were identified on the basis of spectral studies (<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR). These compounds gave a very low ED<sub>50</sub> value in the Brine shrimp lethality assay. Aporphine and oxaporphine alkaloids have been reported in leaves of this plant, however, any alkaloids could not be detected in our extracts.

### INTRODUCCIÓN

*Rollinia mucosa* es un árbol pequeño, casi de porte arbustivo, distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano. En Costa Rica a esta planta no se le conoce uso en medicina tradicional. Sin embargo, las semillas son reputadas, en Indonesia, para el tratamiento de tumores (HARTWELL 1967) y en República Dominicana, fritas en aceite de coco, dan un producto que se aplica localmente para controlar piojos (WENIGER y ROBINEAU 1988).

Las propiedades insecticidas de la semilla fueron confirmadas por MORETTI (1984) y las antitumorales han sido justificadas por la presencia, en estos mismos materiales, de una acetogénina conocida como rolliniastatina, la cual mostró *in vitro* sensible actividad contra leucemia linfocítica (PETTIT *et al.* 1989).

CAETANO *et al.* (1987) reportan que los extractos derivados de la corteza de una muestra colectada en Brasil, con sensible actividad antimicrobiana y antifúngica, acumulaban además de alcaloides de naturaleza aporfínica, un peculiar alcaloide tipo morfinandienónico. Posteriormente, DE QUEIROZ *et al.* (1991) identifican en las hojas de una muestra de *R. mucosa* recolectada en Perú, dos lignanas: (+) magnolina 1 y (+) epiudesmina 2, en conjunto con dos conocidos alcaloides oxoaporfínicos: lysicamine y liriodenine y uno de naturaleza morfinandienónica (DE QUEIROZ *et al.* 1991).

Con el objetivo de evaluar el potencial biológico de especies de Annonaceae del bosque tropical de Costa Rica, se inició un proyecto de investigación, utilizando como guía preliminar para evaluar potencial biológico, el bioensayo de toxicidad para camarones *Artemia salina* Leach, descrito por MEYER *et al.* (1982).

Se encontró que los extractos de diclorometano derivados de las hojas de una muestra de *R. mucosa*, colectada en Costa Rica, eran particularmente letales para las larvas de estos microcrustáceos en concentraciones equivalentes a 100 mg/mL.

La purificación cromatográfica de estos extractos condujo al aislamiento de dos conocidas lignanas: epiudesmina 2 y eudesmina 3. El presente texto detalla la identificación espectroscópica de estos compuestos y discute la importancia biológica atribuida a esta clase de metabolitos secundarios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** *Rollinia mucosa* fue recolectada en Sacramento, San Carlos, Alajuela, e identificada por el botánico LUIS J. POVEDA, Universidad Nacional. El ejemplar fue comparado con una muestra auténtica depositada en el herbario del Museo Nacional de Costa Rica.

**Extracción y separación.** Hojas secas y molidas (900 g) fueron extraídas dos veces por maceración a temperatura ambiente con una mezcla etanol/agua (80:20). Para cada extracción, la muestra se dejó en contacto con esta mezcla de

solventes durante 48 horas. Los extractos combinados se concentraron hasta consistencia siruposa, en un evaporador rotatorio con vacío y a 50°C. Este concentrado, una vez diluido con 100 mL de una mezcla etanol/agua (1:1), se extrajo sucesivamente con los siguientes solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y acetato de etilo. La actividad toxicológica de estos extractos, incluyendo el remanente alcohólico/acuoso, fue evaluada utilizando el ensayo de toxicidad para camarones (*Artemia salina* Leach), según el procedimiento de MEYER *et al.* (1982). Se observó que el extracto de diclorometano era el más tóxico para estos microcrustáceos.

**Purificación.** Un gramo del extracto de diclorometano fue purificado mediante cromatografía en columna, usando como soporte sílica gel y como eluyentes diclorometano y mezclas de polaridad creciente de diclorometano/acetona. Se recolectaron 49 fracciones, usando las siguientes fases móviles: diclorometano (100%), diclorometano/acetona (95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80), acetona (100%), terminando con metanol. El análisis cromatográfico cualitativo de todas estas fracciones, indicó la presencia de dos compuestos mayoritarios que se acumulaban, uno en las fracciones 8-12 eluidas con diclorometano/acetona (80:20, 70:30 y 60:40), y el otro en las fracciones 24-27 arrastradas con acetona. Ambos compuestos mostraron manchas en cromatografía, que revelaron color naranja al ser rociados con el reactivo de Dragendorff, lo cual es típico de compuestos con naturaleza alcaloidal. Sin embargo, dado que el color desaparecía rápidamente, se sospechó de un falso positivo

Estas fracciones, purificadas mediante cristalizaciones sucesivas en etanol caliente de 95°, dieron dos compuestos cristalinos, los cuales fueron identificados, respectivamente, como las lignanas epiudesmina 2 (125 mg) y o-dimetilpinoresinol 3 (155 mg), con base en el análisis de los siguientes datos de Resonancia Magnética de Protio ( $^1\text{H RMN}$ ) y de Carbono 13 ( $^{13}\text{C RMN}$ ), y por comparación con los datos espectroscópicos, atribuidos a estas mismas moléculas en la literatura (PELTER *et al.* 1976).

## RESULTADOS

**Compuesto 2:**  $^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ), 6,80-6,70 (m, 6H aromáticos), 4,74 (1H, d,  $J=5,19\text{Hz}$ , H-6), 4,32 (1H, d,  $J=7,04\text{Hz}$ , H-2), 4,00 (4H, d,  $J=9,4\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2-4,8$ ), 3,2 (1H, m, H-5), 2,79 (1H, m, H-1),  $^{13}\text{C}$ RMN (100,6MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm), 149,3\*\*\* (C-4<sup>1</sup>), 148,9\*\*\* (C-4<sup>1</sup>), 148,8\* (C-3<sup>11</sup>), 148,1\* (C-3<sup>1</sup>), 133,7 (C-1<sup>11</sup>), 131,0 (C-1<sup>1</sup>), 118,5 (C-6<sup>11</sup>), 117,8 (C-6<sup>1</sup>), 111,1 (C-5<sup>1</sup>, 5<sup>11</sup>), 109,2\* (C-2<sup>1</sup>), 109,0\* (C-2<sup>11</sup>), 87,1 (C-6), 82,1 (C-2), 71,1 (C-4), 69,8 (C-8), 54,5 (C-1), 50,2 (C-5), 56,0 (4 OMe).

**Compuesto 3:**  $^1\text{H}$ RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ), 6,90 (2H, d,  $J=1,7\text{Hz}$ , H-2<sup>1</sup>, 2<sup>11</sup>), 6,87 (2H, d,  $J=8,3\text{Hz}$ , 1,7Hz, H-6<sup>1</sup>, 6<sup>11</sup>), 6,83 (2H, d,  $J=8,2\text{Hz}$ , H-5<sup>1</sup>, 5<sup>11</sup>), 4,75 (2H, d,  $J=4,28\text{Hz}$ , H-2,8), 4,25 (4H, dd,  $J=9,1\text{Hz}$ , 6,9Hz,  $\text{CH}_2-4,8$ ), 3,1 (2H, m, H-1,5),  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm), 149,2 (C-4<sup>1</sup>, 4<sup>11</sup>), 148,7 (C-3<sup>1</sup>, 3<sup>11</sup>), 133,6 (C-1<sup>1</sup>, 1<sup>11</sup>), 118,3 (C-6<sup>1</sup>, 6<sup>11</sup>), 111,1 (C-5<sup>1</sup>, 5<sup>11</sup>), 109,3 (C-2<sup>1</sup>, 2<sup>11</sup>), 85,3 (C-2,6), 71,8 (C-4,8), 54,2 (C-1,5), 56,0 (4 OMe).

## DISCUSIÓN

La presencia de estas dos lignanas de naturaleza furofuránica: epiudesmina 2 y ortodimetilpinoresinol 3, y la ausencia de alcaloides en nuestras hojas de *Rollinia mucosa*, fue consistente con el aislamiento de esta misma clase de metabolitos secundarios en hojas de otras dos especies de *Rollinia*: *Rollinia exalbida* eudesmina 3 y epiyangambina 4 y *Rollinia pickellii* epiyangambina 4 (DE MEZQUITA *et al.* 1988).

Al igual que nosotros, DE MEZQUITA *et al.* (1988) no encontraron alcaloides en las

hojas de estas especies de *Rollinia*. No obstante, parece claro que especies del género *Rollinia* concentran principalmente alcaloides de naturaleza aporfínica en la corteza y la madera, acetogeninas en las semillas y lignanas furofuránicas en las hojas.

De las lignanas furofuránicas elaboradas por especies de *Rollinia*, únicamente magnolina 1 y yangambina 5, ambas identificadas en los frutos inmaduros de *R. mucosa* por DE QUEIROZ *et al.* (1991), se han reportado con propiedades antagonistas contra factores que activan plaquetas (PAN *et al.* 1987) (figura 1).

Similares lignanas, también de naturaleza furofuránica, han sido descritas como inhibidoras de la actividad de la enzima cAMP fosfodiesterasa (MASSANET *et al.* 1989) y efectivas para potenciar la toxicidad de una amplia variedad de insecticidas (MACRAE y TOWERS 1984).

Paradójicamente, las lignanas epiudesmina 2 y eudesmina 3, cuando fueron evaluadas en su forma pura y como mezclas, fueron sensiblemente

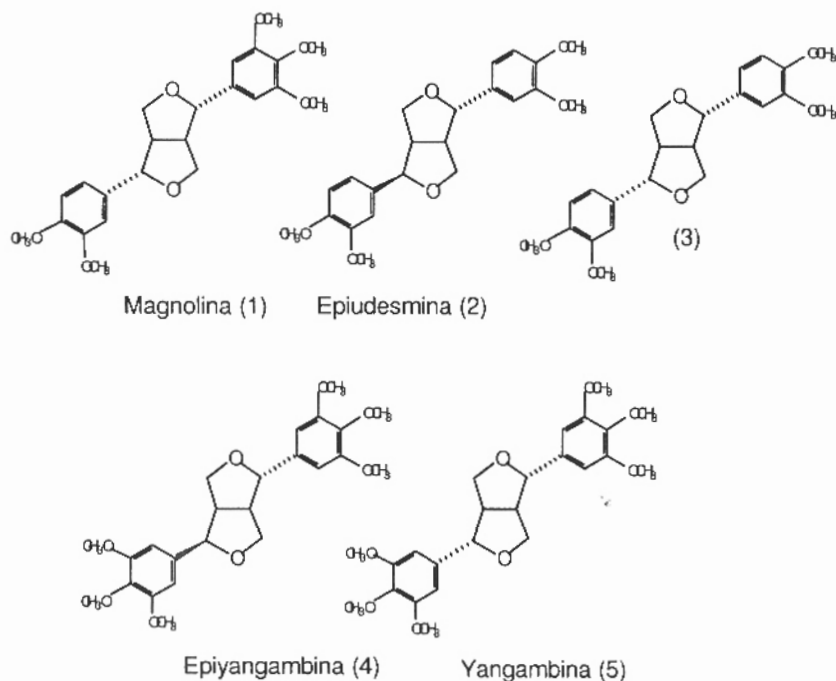


Figura 1. Lignanas furofuránicas identificadas en especies de *Rollinia*.

menos tóxicas para los camarones *Artemia salina* Leach, que el extracto crudo de diclorometano, donde se encontraban principalmente estos compuestos como mayoritarios.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación "Obtención de metabolitos secundarios y determinación de la actividad biológica en plantas de la familia Annonaceae", código 10194, auspiciado con fondos de la Universidad Nacional (UNA), a través del Área de Biodiversidad de su Departamento de Química.

## REFERENCIAS

- Caetano, L.C. y H. Dadoun. 1987. Pallidine and aporphinoid alkaloid from *Rollinia mucosa*. J. Nat. Prod. 50: 330.
- De Mezquita, L.M., N.F. Roque, L.M.B. Quintana, P. Marcal de Q. y J.M. Barbosa Filho. 1988. Bioch. Sist. Ecol. 16: 370-380.
- De Queiroz, P.M., M.A.C. Kaplan, O. Laprevote, F. Roblot, R. Hocquemiller y A. Cave. 1991. Lignans and other nom-alcaloid constituents from *Rollinia mucosa*. Fitoterapia 62: 150-152.
- Hartwell, J.L. 1967. Lloydia 30: 379.
- MacRae, W.D. y G.H.N. Towers. 1984. Phytochemistry 23: 1207.
- Massanet, G.M., E. Pando, L.F. Rodríguez y E. Zubia. 1989. Fitoterapia 60: 3.
- Meyer, B.N., F.R. Ferrigni, J.E. Putnam, D.E. Nichols y J.L. MacLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Médica 45: 31-34.
- Moreti, C. 1984. Seminario Tramil 1, Puerto Príncipe, Haití.
- Pan, J.X., O.D. Hensen, D.L. Zink, M.N. Chan y S.B. Hwang. 1987. Phytochemistry 26: 1377.
- Pelter, A., R.S. Ward y C. Nishina. 1976. Revised structures for epiaschantin and epimagnolin. Tetrahedron Letters 47: 4137-4140.
- Pettit, G.R., R. Riesen, J.E. Leet, J. Polonsky, C.R. Schmidt, J.M. Schmidt, C. Dufresne, D. Schaufelberger y C. Moreti. 1989. Isolation and structure of rolliniastatin: a new cell growth inhibitory acetogenin from *Rollinia mucosa*. Heterocycles 28: 213-217.
- Weniger, B. y L. Robineau. 1988. Elementos para una farmacopea caribeña. Seminario Tramil 3, La Habana, Cuba, pp. 229-231.