

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION ESTRUCTURAL
DE DIVERSOS ISOFLAVONOIDES Y OTROS
CONSTITUYENTES DE LA PLANTA MEDICINAL
Eysenhardtia polystachya (Leguminosae)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
CARLOS ENRIQUE ESQUIVEL SIRVENT

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Vocal M. en C. Baldomero Esquivel Rodriguez

Secretario Dra. Rachel Mata Essayag

1er Suplente M. en C. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

2do Suplente M. en C. Blas Flores Perez

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Instituto de Química

Asesor: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Supervisor técnico: M. en C. Marfa Yolanda Ríos Gomez

Sustentante: Carlos Enrique Esquivel Sirvent

Al Dr. Guillermo Delgado
Con profundo respeto y admiración
por haberme guiado en la realización
de este trabajo, siendo un ejemplo
de motivación y superación tanto
personal como profesional.

A las M. en C. Yolanda Ríos
e Isabel Aguilar por haberme
brindado su apoyo incondicional
como maestras, compañeras y amigas.
Muchas gracias a las dos.

A la M. en C. Isabel Chavez
Por su valiosa colaboración en
la realización de esta tesis.

**A mis padres
Por su paciencia, comprensión
y apoyo en todo momento.**

A mi hermano Raul.

**A mis amigos de la Facultad
de Química y del laboratorio 2-7.**

A la UNAM.

CONTENIDO

I .	INTRODUCCION	1
II .	ANTECEDENTES	3
III .	SECCION EXPERIMENTAL	18
	Aislamiento, propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los constituyentes químicos de <i>Eysenhardtia polystachya</i>	
IV .	DISCUSION DE RESULTADOS	28
	Determinación estructural de los constituyentes químicos de <i>Eysenhardtia polystachya</i>	
V .	RESUMEN Y CONCLUSIONES	46
VI .	ESPECTROS	48
	1. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 7-hidroxi-2',3',4',5',8- pentametoxi-isoflavano (59)	48
	2 RMN ¹³ C(75 MHz. CDCl ₃) de 7-hidroxi-2',3',4',5',8- pentametoxi-isoflavano (59)	49
	3. RMN ¹ H- ¹ H COSY (300 MHz, CDCl ₃) de 7-hidroxi- 2',3',4',5', 8-pentametoxi-isoflavano (59).	50
	4. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 7-acetoxi-2',3',4',5',8- pentametoxi-isoflavano (59a).	51
	4a. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃), NOEDiff de 7-hidroxi- 2',3',4',5',8- pentametoxi-isoflavano (59).	52
	5. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃), NOEDiff de 7-hidroxi- 2',3',4',5',8- pentametoxi-isoflavano (59).	53
	6. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 5',7-dihidroxi-2',3',4'- tetrametoxi-isoflavano (60).	54
	7. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 5',7-diacetoxi-2',3',4'- tetrametoxi-isoflavano (60a).	55
	8. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃), NOEDiff de 5',7-dihidroxi- 2',3',4',8- tetrametoxi-isoflavano (60).	56
	9. RMN ¹ H- ¹³ C COLOC (300 MHz, CDCl ₃) de 5',7- dihidroxi-2',3',4',8-tetrametoxi-isoflavano (60).	57
	10. RMN ¹ H- ¹³ C HETCOR (300 MHz, CDCl ₃) de 5',7 dihidroxi-2',3',4',8-tetrametoxi-isoflavano (60).	58
	11. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 5',7-dihidroxi- 2',3',4'-tetrametoxi-isoflavano (60).	59
	12. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de isoduartina (45).	60

13. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxiptero-carpano (54).	61
14. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxiptero-carpano (54).	62
15. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ + DMSO) de cuneatina (61).	63
16. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ + DMSO) de 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxi-isoflavona (52).	64
17. RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ + DMSO) de 7-acetoxi-2',4',5'-trimetoxi-isoflavona (52).	65
VII. BIBLIOGRAFIA	66

INTRODUCCION

Desde que el ser humano surgió en el planeta, aparecieron también las enfermedades, y con ellas la necesidad de buscar su cura. Fue así como el hombre comenzó a hacer infusiones y elixires a partir de variadas materias primas, con el fin de curar picaduras, aliviar diversas heridas, así como en el tratamiento de algunas enfermedades, dando inicio a los primeros estudios en medicina. Uno de los aspectos importantes consistió en investigar las propiedades terapéuticas de productos de origen diverso, principalmente del reino vegetal. Con el paso de los años el estudio sobre las plantas se fue enriqueciendo, y no sólo se amplió el conocimiento sobre las cualidades curativas de diversas especies, sino que se aplicaron éstas para obtener alimento, perfumes, colorantes, combustible, entre muchos otros productos.

Lo anterior ha quedado constatado en las diferentes culturas antiguas como la egipcia, china, griega y romana entre otras. El empleo de las plantas con fines curativos en América se registró en numerosos códices. Parte de la información correspondiente a Mesoamérica ha llegado hasta nuestros días gracias a las recopilaciones de Fray Bernardino de Sahagún en 1530, Martín de la Cruz en 1552 (Códice Badiano) y el de Francisco Hernández en 1582, en los que se describen los recursos naturales de la Nueva España y las aplicaciones que los indígenas prehispánicos le daban a diversas plantas y animales de la región.^{1,2}

Las sociedades contemporáneas han seguido utilizando los recursos naturales para beneficio de la población, aprovechando la tecnología para explotarlos y obtener de ellos diversas materias primas, como son: principios activos para la fabricación de medicamentos, obtención de diversos combustibles, fragancias y colorantes para la industria cosmética, además de ser una fuente de alimento.

La industrialización masiva de los recursos naturales está produciendo un desastre ecológico mundial, ya que la flora y la fauna del planeta son destruidas a una velocidad sorprendente. Se estima que el 10% de las especies vegetales (aproximadamente 50 000) se extinguirán a finales de este siglo,³ causando graves desequilibrios ecológicos, generando a su vez, la pérdida de una gran biodiversidad de especies animales que interactúan con las especies vegetales devastadas.

El deterioro ecológico que se vive, ha impulsado la realización de diversos esfuerzos para proteger los recursos naturales. Uno de estos ha consistido en realizar estudios exhaustivos sobre la biota, y los beneficios que pueden brindar diversos miembros del reino vegetal, las consecuencias que traería su destrucción, y la manera de conservarlos y utilizarlos de manera racional.

La investigación que se realiza sobre las plantas con uso medicinal, ha sido motivada en cierta medida por el hecho de que la producción de medicamentos es

sumamente costosa y algunos de ellos son sustancias encontradas en diversas plantas, por lo que algunos sectores de muchas sociedades recurren a ellas, en lugar de usar formas farmacéuticas industrializadas. Actualmente un alto porcentaje de la población mexicana, sobre todo la que se ubica en zonas rurales o de bajos recursos económicos, prefiere el uso de la medicina tradicional. Es evidente que esta terapia representa una alternativa para mejorar la salud de diversos sectores de la población, y una fuente potencial de trabajo, ya que mediante un manejo adecuado de este tipo de plantas, es posible, que el país se convirtiera en el productor de algunos medicamentos, adecuando esta comercialización a sus necesidades y tecnología.⁴

Por lo anterior, las investigaciones realizadas en productos naturales son de suma importancia, ya que algunos descubrimientos en esta área han permitido hallazgos que han trascendido a nivel mundial. Tal es el caso del estudio del barbasco, del cual se obtuvo la diosgenina, impulsando notablemente a la industria farmacéutica, en particular, el área de hormonas esteroidales. Otro caso de trascendencia en la investigación en productos naturales es el descubrimiento de las propiedades anticancerígenas del taxol, una sustancia que se obtiene del árbol *Taxus brevifolia*. Los intentos de comercialización de esta sustancia han motivado una investigación intensa sobre posibles fuentes alternas y sobre su síntesis total.⁵

Así como los casos mencionados, pueden existir otros metabolitos secundarios presentes en ciertas especies o poblaciones de algún género endémico de nuestro país, y que puedan representar soluciones a diversos problemas de salud que se viven actualmente.

El presente trabajo es el estudio químico de una planta originaria de México, *Eysenhardtia polystachya*, que se conoce con el nombre de palo dulce y se emplea en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos, como se describe más adelante. Consta del aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en el vegetal, y pretende sentar las bases químicas para estudios posteriores del vegetal, en particular, sobre la relación que puede existir entre los metabolitos secundarios del vegetal y la actividad farmacológica que se atribuye a las preparaciones del mismo.

ANTECEDENTES

La planta medicinal *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. es un arbusto que mide generalmente alrededor de 3 metros de altura, que puede alcanzar en ocasiones hasta 8 metros. Sus hojas son pinadas y ovales de 10 a 20 mm con flores blancas de 7 mm aromáticas y melferas.⁶ Esta especie pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionadeae (Lotoideae), tribu Galegeae subtribu Psoralieae.⁷

La familia Leguminosae también es conocida como Fabaceae y es una de las tres más amplias del reino vegetal, conteniendo alrededor de 12000 especies, solo superada en número de especies por las familias Compositae y Orchidaceae, pero siendo tal vez la más abundante en biomasa. Las leguminosas tienen una importancia mundial no sólo por su gran cantidad de especies y diversidad de climas en los que habitan, sino también por la variedad de usos que se les da a muchas de las especies que la componen, como fuente de alimentos y materias primas para obtener diversos compuestos químicos con uso medicinal, cosmético, sustancias con uso insecticida, entre otros usos.

Esta familia ha sido dividida taxonómicamente por diversos autores,⁷ siendo la clasificación de Taubert (1894) la generalmente aceptada. Esta divide a la familia en tres subfamilias, que son:

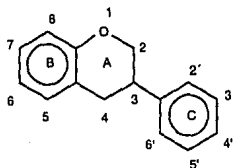
- I. Mimosoideae
- II. Caesalpinioideae
- III. Papilionoideae

Cada subfamilia está dividida en distintas tribus, y estas a su vez contienen diversas subtribus. La subfamilia papilionácea se divide en 10 tribus, la tribu Galegeae contiene 46 subtribus, una de éstas es la Psoralieae, a la que pertenece la planta en estudio.

Los miembros de esta familia pueden contener diversos metabolitos secundarios como son alcaloides, terpenos, esteroides y flavonoides, que están distribuidos dependiendo de varios factores, como es el grupo taxonómico al que pertenecen.⁸ En el caso de la subfamilia Lotoidea los flavonoides, en especial los isoflavonoides, se encuentran invariablemente en todas las subtribus, en concentraciones variables.⁹ Dentro de este grupo de compuestos, la mayoría de los autores incluyen, además de las isoflavonas, isoflavanonas e isoflavanos, a los cumestanos, pterocarpanos y a los rotenoides, por ser derivados de las isoflavonas.¹⁰

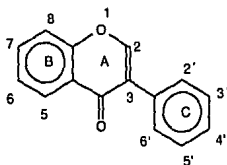
Dentro de los isoflavanoides, los isoflavanos son metabolitos secundarios muy interesantes, debido a que son el grupo de compuestos menos abundante y se encuentran distribuidos exclusivamente en las especies de la subfamilia Lotoideae de las

leguminosas. En el reino animal se han encontrado cuatro compuestos de este grupo como productos derivados del metabolismo que sufren los flavonoides en los mamíferos. Uno de estos, fue el primer compuesto de este tipo en descubrirse.^{9,11} Los isoflavanos son compuestos heterocíclicos que presentan quince átomos de carbono en su esqueleto base, con una conectividad molecular C₆-C₃-C₆, formando un núcleo 3,4-dihidro benzopirano (anillo A) que presenta un anillo bencénico (anillo C) unido en posición 3 [1].



1

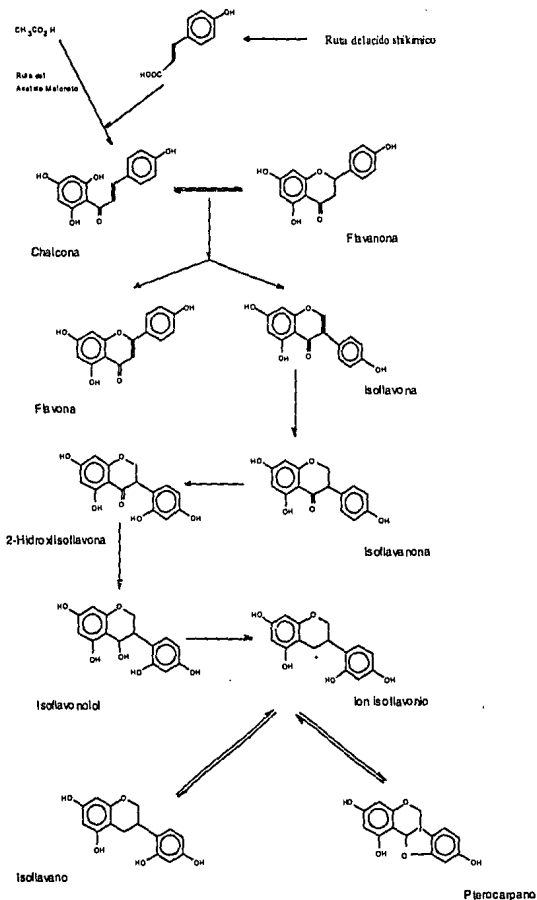
Los isoflavanos se diferencian de las isoflavonas en que estas últimas contienen un grupo carbonilo en posición 4, por lo que tienen como núcleo base una benzopirona. Al esqueleto de las isoflavonas se les conoce también como 3-fenil cromeno [2]. Estos compuestos son los más importantes dentro del grupo de los isoflavonoides ya que su abundancia es relativamente alta, comparada con los demás componentes del mismo grupo, y su distribución no se ve limitada a una sola familia de vegetales.



2

Biogénicamente los isoflavanos se derivan de las isoflavonas, por lo que comparten la misma vía biogénica, esta es una ruta mixta que involucra la del acetato malonato, que da origen al anillo B, y la del ácido siquímico, que origina a la unidad C₆ del anillo C y a la C₃ de la pirona. Estas secuencias biogénicas utilizan como sustratos

iniciales a la fenilalanina y a la acetil-CoA, respectivamente. La ruta biogenética que da origen a los isoflavanos y a otros isoflavonoides mas comunes se muestra en el esquema 1.12.13



Esquema 1

El grupo de los isoflavanos, como ya se mencionó, es muy pequeño y exclusivo de una sola subfamilia de las leguminosas. El primero en conocerse fue el equol [3] en 1965, que fue encontrado como metabolito en diversos mamíferos. A partir de ese año se han encontrado 51 isoflavanos naturales y 4 biisoflavanos. Los isoflavanos y biisoflavanos encontrados como productos provenientes de vegetales, han sido aislados únicamente de plantas pertenecientes a la familia Leguminosae, subfamilia Lotoideae. Los isoflavanos descritos hasta el momento se muestran en la tabla 1, sus estructuras aparecen en la tabla 2.

Tabla 1
Isoflavanos reportados en la literatura

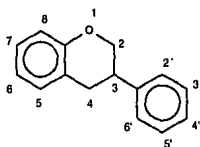
Estructura	Nombre	Referencia
3	Equol	14
4	Dimetilvestitol	15
5	Vestitol	14
6	Isovestitol	14
7	Neovestitol	17
8	Sativano	16
9	Isosativano	18
10	Arvensano	19
11	Laxiflorano	20
12	Mucronulato	14
13	Isomucronulato	21
14	Maackiainisoflavano	22
15	Astracicerano	23
16	7,2'-(OH) ₂ ,6,4'-(OMe) ₂ Isoflavano	22
17	Briaflavano	24
18	8-Dimetilduartina	25
19	Duartina	14
20	Esferosinina	26
21	Neorauflavano	27
22	Glabridina	28
23	4'-Metilglabridina	29
24	3'-Metoxiglabridina	29
25	Leiocina	30
26	Heminitidulano	30
27	Nitidulina	30
28	Nitidulano	30
29	Leiocinol	30
30	2'-Metilfaseolidinisoflavano	30
31	faseolinisoflavano	29

Estructura	Nombre	Referencia
32	2'-Metilfaseolinisoflavano	31
33	Dimetilalliciclobina	32
34	Unanisoflavano	29
35	Hispaglabridin A	29
36	Hispaglabridin B	29
37	Licoricidina	22
38	3-Hidroximaackiainisoflavano	22
39	Bisciclobina	32
40	Crotmarina	33
41	Lotisoflavano	34
42	5-O-Metillicoricidina	38
43	7-O-Glucosil isomucronulato	35
44	3',8'-Dihidroxiestitol	39
45	Isoduartina	37
46	5'-Metoxiestitol	39
47	7,3'-Dihidroxiisoflavan	35
48	6,2'-Dihidroxi-7,8,3',4'-tetra metoxiisoflavano	36
49	6,8,2'-Trihidroxi-7,3'4'-tri metoxiisoflavano	36
50	5-Metoxiestitol	23
51	Lonchocarpano	26

Biisoflavanos:

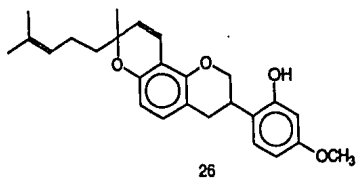
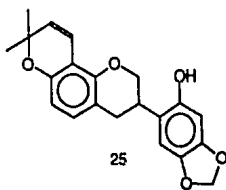
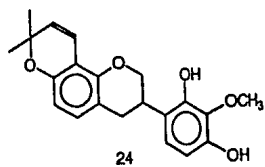
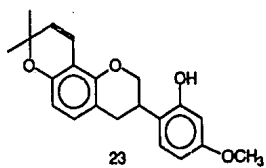
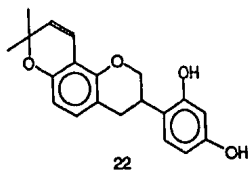
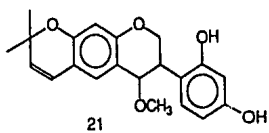
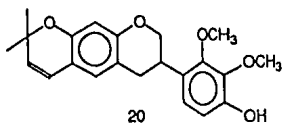
52a	(3R,4R)- <i>trans</i> 2',3',7'-Trihidroxi-4-metoxi-4-[3R-2',7'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavan 5'-il] isoflavano	39
52b	(3R,4R)- <i>trans</i> 2',7'-Dihidroxi-4-metoxi-4-[3R-2',7'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavan 5'-il] isoflavano	39
52c	(3R,4R)- <i>trans</i> 2',7'-Dihidroxi-4,5-dimetoxi-4-[3R-2',7'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavan 5'-il] isoflavano	39
52d	(3R,4R)- <i>trans</i> 3,7'-Dihidroxi-2,4-dimetoxi-4-[3R-2',7'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavan 5'-il] isoflavano	39

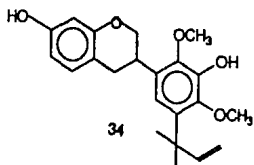
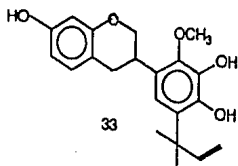
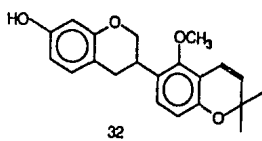
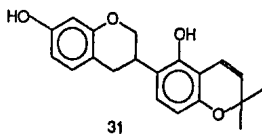
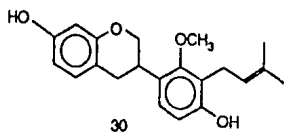
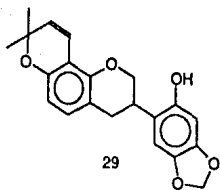
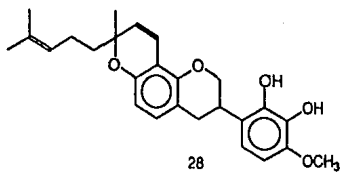
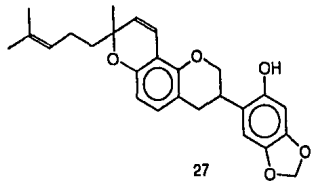
Tabla 2
Estructuras de isoflavanos reportados

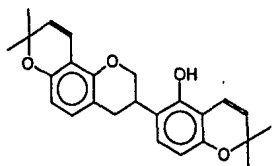


Estructura	Sustituyentes									
	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	
3			OH				OH			
4			OH		OH		OH			
5			OH		OH		OMe			
6			OH		OMe		OH			
7			OMe		OH		OH			
8			OH		OMe		OMe			
9			OMe		OH		OMe			
10			OMe		OMe		OH			
11			OH		OMe	OMe	OH			
12			OH		OMe	OH	OMe			
13			OH		OH	OMe	OMe			
14			OH		OH		OCH ₂ O			
15			OH		OMe		OCH ₂ O			
16		OMe	OH		OH		OMe			
17		OH	OH		OMe	OH	OMe			
18			OH	OH	OMe	OH	OMe			
19			OH	OMe	OMe	OH	OMe			
38			OH		OH	OH	OCH ₂ O			
41	OMe		OMe		OH		OH			
44			OH	OH	OH	OH	OMe			
45			OH	OMe	OH	OMe	OMe			

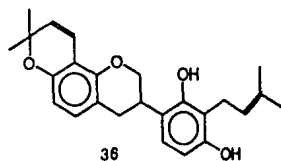
Estructura	Sustituyentes									
	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	
46			OH		OH		OMe	OMe		
47			OH			OH				
48		OH	OMe	OMe	OH	OMe	OMe			
49		OH	OMe	OH	OH	OMe	OMe			
50	OMe		OH		OH		OMe			
51			OH		OMe	OMe	OH		OMe	



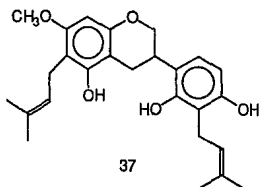




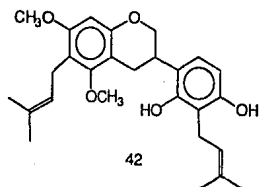
35



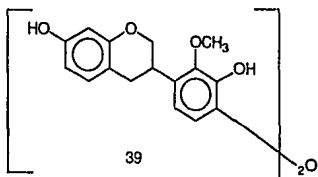
36



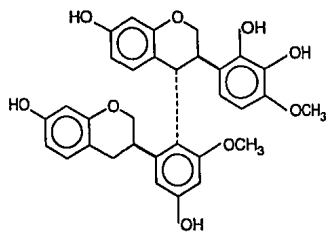
37



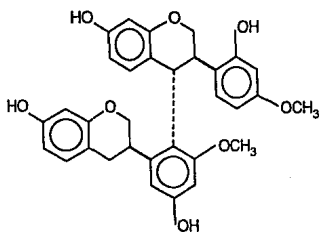
42



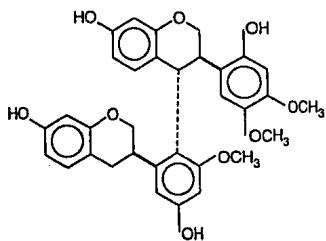
39



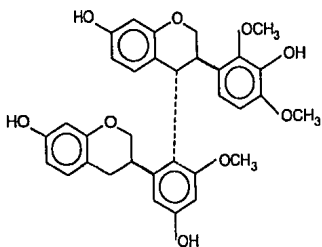
52a



52b



52c



52d

Eysenhardtia polystachya (Ortega) Sarg. es una leguminosa papilionácea utilizada en la medicina tradicional de nuestro país, que se encuentra distribuida a lo largo del territorio nacional y en el sur de Texas, pudiéndola localizar tanto en pastizales, matorrales, altiplanicies, climas semidesérticos y subtropicales, lo que nos indica que en la mayoría de los estados de la república puede existir. Jalisco, Michoacán, el valle de México y Veracruz son los lugares con mayor abundancia de esta especie.⁴⁰

Los nombres populares con los que se conoce esta especie son variados y muchos de ellos dependen de la zona en la que se localiza, pero los más comunes son los de "palo dulce" y "palo azul". En Sinaloa se conoce como "palo cuate", en Durango como "taray", en lengua otomí se llama "urza" y en náhuatl "coatli" cuyo significado es el de serpiente de agua. Otros nombres que recibe esta especie son: rosilla, vara dulce, varaduz y lanae.⁴¹

Los usos que se le da a este vegetal son tan variados como sus nombres, ya que el conocimiento de sus propiedades medicinales data desde los aztecas, que lo conocían como "tlapalespatli" y lo usaban como "medicina escarlata de la sangre", para disminuir la acidez de la orina, curar cólicos y fiebres. Posteriormente los españoles lo llevaron a Europa donde le dieron el nombre de leña nefrítica, utilizando las astillas para hacer un agua de color azul que servía para las enfermedades renales, que aumentaba su eficacia si se combinaba con raíces de maguey.⁴² En la época de la colonia se fabricaron copas con esta madera en donde se vertía agua y se dejaba en lugares oscuros, después de varios días esta agua adquiría un color azul y era tomada para la cura de padecimientos renales y como "agua de tiempo", considerándola como agua milagrosa que tenía la "magia" o propiedad de que el color azul que la caracterizaba podía cambiar de tonalidad, a rojo, amarillo o naranja, según la incidencia de la luz solar.^{6,43}

En la actualidad su uso dentro de la medicina tradicional es extenso ya que no sólo se limita a los males renales, si no que se emplean los tallos como antiespasmódico, antipirético y contra el hipo. Extractos de esta se aplican como cicatrizantes, cáustico, febrífugo y para efectuar lavado de ojos.⁴⁴ La corteza la usan para remojarla en el agua de consumo para gallinas, presumiblemente para prevenir enfermedades. También han sido utilizadas algunas poblaciones de esta especie por diabéticos debido a sus presumibles propiedades hipoglucemiantes.⁴⁵

Esta planta no solo se ha usado como remedio terapéutico, sino que ha sido estudiada debido a que el extracto acuoso de la corteza presenta fluorescencia. Esta característica fue aprovechada en el siglo XVIII por Robert Boyle utilizando el extracto de este vegetal como indicador ácido-base fluorescente.⁴⁶

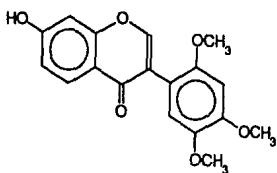
Además de esta especie, el género *Eysenhardtia* esta integrado por otras tres: *E. punctata*, *E. adenostylis* y *E. texani*. En la actualidad se considera que esta última especie

es la misma que la *E. polystachya*.⁴⁷ La especie *E. adenostylis* es endémica del bosque tropical de Chiapas⁴⁰ y no existen informes sobre su uso. La especie *E. punctata* se ha usado como si fuera "palo dulce", pero esta no presenta la coloración fluorescente en su extracto acuoso. Esta especie se localiza en el estado de Aguascalientes.⁴⁴

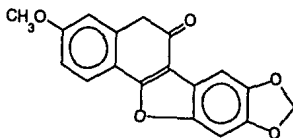
Desde el punto de vista fitoquímico, *E. polystachya* ha sido la única especie estudiada del género, y hay tres informes en la literatura. Uno de ellos se refiere a una población en la zona de Xalapa, Veracruz⁴⁶ y los otros dos, lamentablemente, no indican la zona de colecta.^{48,49} Los compuestos aislados de esta planta en esos estudios fueron las indicadas en la tabla 3 y cuyas estructuras se presentan en el esquema 2.

Tabla 3
Metabolitos aislados de *E. polystachya* en estudios previos

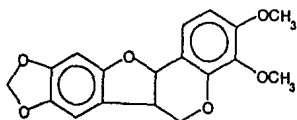
Estructura	Nombre	Referencia
52	7-Hidroxi-2',4',5' trimetoxisoflona	46
53	9-Metoxi-2,3-metilen dioxicumestano	46
54	Dehidrorrotenona	48
55	3,4-Dimetoxi-8,9 metilendioxipterocarpano	48
56	Coatlina A	49
57	Coatlina B	49



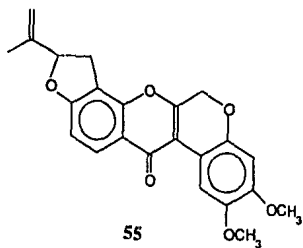
52



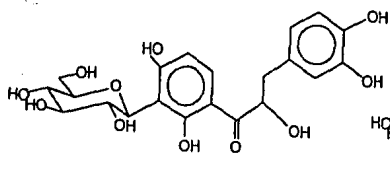
53



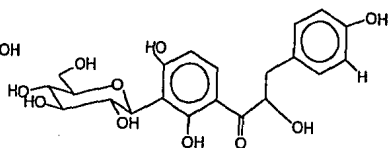
54



55



56



57

Esquema 2

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es generar nuevos conocimientos sobre los constituyentes químicos de la vegetación de nuestro país, la cual, debido a su diversidad, representa una fuente de recursos naturales con gran potencial para su aprovechamiento racional.

Particularmente se pretende realizar el aislamiento y caracterización estructural de los metabolitos secundarios de la planta *Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae), la cual es utilizada en la medicina tradicional mexicana para diversos padecimientos, y conocida comúnmente con el nombre de palo dulce o varaduz. Este estudio pretende establecer las bases químicas del empleo biológico de la planta, y generar antecedentes químicos para la realización de estudios posteriores sobre la misma especie.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó el estudio de la planta medicinal *Eysenhardtia polystachya*, utilizando la corteza y tronco del árbol, que es la parte del vegetal empleada para las preparaciones medicinales. Este material fue recolectado cerca de Xalapa en el estado de Veracruz y fue identificado por los profesores Esteban M. Martínez y Clara H. Ramos, del Centro de Ecología de la UNAM, y a quienes expreso mi agradecimiento por su colaboración.

Se maceraron 3.2 Kg del material vegetal seco y molido, usando una mezcla de cloroformo y etanol en relación 1:1, realizando tres maceraciones por un lapso de 48 horas. En cada una de ellas se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida. La reunión de estos extractos proporcionaron 195.4 g de residuo.

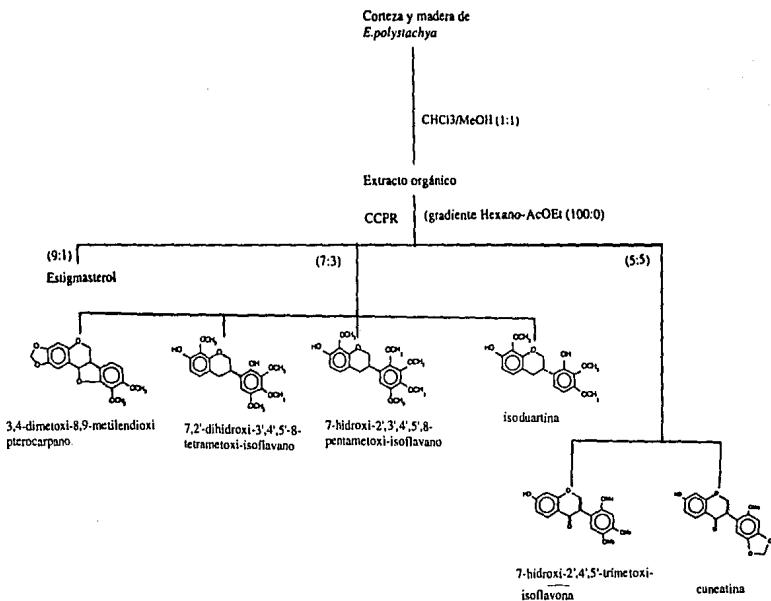
El extracto orgánico total así obtenido se fraccionó en mezclas menos complejas mediante cromatografía en columna, usando como fase estacionaria gel de sílice para placa y mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente como fase móvil, desarrollando el proceso a presión reducida. Una vez obtenidas las fracciones, se analizaron por el método de cromatografía en capa fina analítica para determinar la composición y homogeneidad de las mezclas. Las fracciones obtenidas que tenían propiedades cromatográficas similares se reunieron y se resolvieron los diferentes conjuntos de fracciones en sus componentes por medio de cromatografías sucesivas en columna (CC) y en capa fina (CCF) preparativa, llevando un seguimiento de estas por CCF analítica. La metodología general del estudio se resume en el esquema 3.

Las cromatografías en columna se efectuaron con sílica gel 60 Merk (Malla 70-230 ASTM), y el análisis en capa fina se hizo en placas Merk-F254, usando como revelador luz ultravioleta de una lámpara modelo UVSL-25 a longitudes de onda de 365 y 254 nm y/o solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns, y no están corregidos.

La determinación estructural de los metabolitos aislados en las cromatografías se realizó mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas de infrarrojo (IR) y ultravioleta (UV), resonancia magnética nuclear protónica (RMN^1H) y de carbono 13 ($RMN^{13}C$), y la técnica de espectrometría de masas (EM). Los espectros de RMN^1H fueron obtenidos a 80, 200 y 300 MHz, según se indica en cada espectro, utilizando un espectrómetro analítico Varian FT-80 A, Varian- Gemini 200A y Varian XR-300 respectivamente, utilizando como disolvente cloroformo deuterado y tetrametil silano (TMS) como referencia interna. Los espectros de $RMN^{13}C$ se determinaron en un equipo Varian XR-300 a 75.4 MHz. En casos especiales se usaron técnicas de resonancia magnética nuclear bidimensional como COSY, COLOC y HETCOR. Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en solución de cloroformo o en pastilla de KBr según lo indica cada espectro, usando un espectrofotómetro

Perkin-Elmer 283-B. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B, utilizando la técnica de impacto electrónico a 70 eV.

Por último, los espectros de UV fueron hechos en un espectro fotómetro Perkin-Elmer 552 en solución metanólica y las rotaciones ópticas en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 241.



Esquema 3

Fraccionamiento del extracto orgánico total

El fraccionamiento del extracto se realizó en una columna empacada con gel de sílice para placa, adsorbiendo en esta los 194.5 g de extracto obtenido. A esta columna la llamaremos columna original. La fase móvil inicial fue hexano 100% y posteriormente se incrementó la polaridad usando mezclas de hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones. De este fraccionamiento se obtuvieron 96 fracciones de 500 ml, que se concentraron en rotaevaporador, mismas que fueron analizadas por CCF y reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica, separándolas en sus constituyente químicos por cromatografías sucesivas.

El análisis cromatográfico (CCF) de las fracciones 19 a 31 de la columna original eluidas con hexano/acetato de etilo (AcOEt) 95:5 indicó la presencia de un componente mayoritario. El concentrado de estas fracciones permitió obtener 4.60 g de residuo, que se adsorbió en la misma cantidad de gel de sílice y se aplicó en una columna empacada con 200 g de ésta, con el fin de separar el componente mayoritario, que eluyó de esta columna con hexano/AcOEt 98:2. El desarrollo de esta columna permitió aislar 70 mg de un sólido blanco cristalino, p_f 148-152°C que por igualdad de comportamiento cromatográfico con una muestra auténtica, y por comparación con datos espectroscópicos informados previamente, se identificó como estigmasterol [58].

Rf: 0.6 (hexano/acetato de etilo (7:3))

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃): (desplazamiento, multiplicidad, asignación) δ 5.24 (1H, m, H-6), 3.50 (1H, m, H-3), 2.25 (2H, d, H-9), 1.51 (1H, s, OH) 1.01 (3H, s, H-19), 0.89-0.69 (15H, m, H-19, H-21, H-29, H-26, H-27), 0.68 (3H, s, H-18)

La reunión de las fracciones 54 a 57 que fueron eluidas de la columna original con hexano/AcOEt (7:3) proporcionaron 2.23 g de residuo. Este se aplicó a una columna empacada con 75 g de sílice gel. A esta recromatografía se le llamará C-54.

De la columna C-54 se obtuvieron 2 compuestos de polaridad similar que eluyeron en el siguiente orden: 7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxi-isoflavano [59] (fracciones 46-53) y 7,5'-Dihidroxi-2',3',4',8-tetrametoxi-isoflavano [60] (fracciones 73-75).

El primer compuesto fue un aceite de color naranja que después de varios días solidificó, obteniéndose 133.6 mg. Las características físicas y espectroscópicas de este compuesto novedoso, identificado como: 7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxi-isoflavano [59], son las siguientes:

Pf: 125-126°C

Rf: 0.46 (Hex/AcOEt 7:3)

UV: λ max: 218 nm (ϵ 8286); 284 (ϵ 785)

$[\alpha]_D^{25}$: +3.12 (0.320, MeOH)

IR (CHCl₃): 3530, 2939, 2840, 1603, 1494, 1463, 1411, 1350, 1193, 1080, 1040 cm⁻¹

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6.73 (1H, d, J=8.3Hz, H-5), 6.54 (1H, d, J=8.3Hz, H-6), 6.41 (1H, s, H-6'), 5.80 (1H, sa, OH), 4.40 (1H, ddd, J=10.5 Hz, J=3.5 Hz, J=1.5 Hz, H-2a), 4.05 (1H, dd, 10.2 Hz, H-2), 3.95 (3H, s, CH₃O), 3.91 (3H, s, CH₃O), 3.89 (3H, s, CH₃O), 3.84 (3H, s, CH₃O), 3.79 (3H, s, CH₃O), 3.6† (1H, m, H-3), 2.93 (2H, m, 2H-4).

RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N): δ 6.94 (1H, d, J=8.1Hz, H-5), 6.86 (1H, d, J=8.1Hz, H-6), 6.70 (1H, s, H-6'), 5.10 (1H, sa, OH), 4.51 (1H, ddd, J=10.2 Hz, 3.6Hz, 1.8 Hz, H-2a), 4.14 (1H, dd, J=10.2 Hz, H-2), 3.97 (3H, s, CH₃O), 3.96 (3H, s, CH₃O), 3.94 (3H, s, CH₃O), 3.84 (3H, s, CH₃O), 3.81(3H, s, CH₃O), 2.98(2H, m, 2H-4').

RMN¹³C (75MHz, CDCl₃, desplazamiento, asignación): δ 31.3 (C-4), 31.8 (C-3), 56.2, 60.9, 61.0, 61.1, 61.5 (cada una de C de OCH₃), 70.2 (C-2), 105.2 (C-6'), 107.2 (C-6), 114.9 (C-4a), 124.2 (C-5), 128.9 (C-1'), 134.8 (C-8), 141.8 (C-5'), 145.4 (C-4'), 147.1 (C-8a), 147.6 (C-7), 149.6 (C-3')

RMN¹³C (75MHz, C₅D₅N): δ 31.8 (C-4), 32.6 (C-3), 56.3, 60.4, 60.9, 61.1, 61.6 (cada una de C de OCH₃), 70.4 (C-2), 106.3 (C-6'), 109.7 (C-6), 114.2 (C-4a), 124.6 (C-5), 129.7 (C-1'), 135.8 (C-8), 137.8 (C-2'), 142.7 (C-5'), 146.0 (C-4'), 147.7 (C-8a), 148.8 (C-7), 150.5 (C-3')

EM *m/z* (especie, intensidad relativa %): 376 (M⁺, C₂₀H₂₄O₇, 73), 224 (C₁₂H₁₆O₄, 100), 209 (C₁₂H₁₆O₄-CH₃, 42), 152 (C₈H₁₈O₃, 16), 151 (C₈H₁₈O₃, 38), 121 (C₈H₁₈O₃-OCH₃, 14)

7,2'-Dihidroxi-5',3',4',8-tetrametoxi-isoflavano [60] fué el segundo compuesto obtenido de la columna C-54, aislado inicialmente como un aceite cafe el cual solidifica posteriormente. Se obtuvieron 152 mg que eluyeron de la columna con hexano-acetato de

etilo (7:3). Este compuesto, al igual que el anterior, es un nuevo producto natural, con las siguientes características físicas y espectroscópicas:

Pf: 97-98°C

Rf: 0.4 (hexano/acetato de etilo 7:3)

$[\alpha]_D^{25}$: + 6.5 (0.2, MeOH)

UV λ_{max} : 281nm (ϵ 5622)

IR (CHCl₃): 3531, 2940, 1603, 1494, 1470, 1373, 1246, 1173, 1093, 1044 cm⁻¹

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6.71 (1H, d, J=8.3Hz, H-5), 6.51 (1H, d, J=8.3Hz, H-6), 6.47 (1H, s, H-6'), 5.85 (2H, sa, OH), 4.39 (1H, ddd, J=10.2, 3.8, 1.5 Hz, H-2a), 4.15 (1H, dd, J=10.2 Hz, H-2), 3.95 (6H, s, 2 CH₃O), 3.93 (3H, s, CH₃O), 3.82 (3H, s, CH₃O), 3.55 (1H, m, H-3'), 2.88(2H, m, 2H-4')

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 6.71 (1H, d, J=8.3Hz, H-5), 6.52 (1H, d, J=8.3 Hz, H-6), 6.46 (1H, s, H-6'), 5.75 (2H, sa, OH), 4.37 (1H, ddd, J=10.2, 3.8, 1.5 Hz, H-2a), 4.08 (1H, dd, J=10.2 Hz, H-2), 3.95 (6H, s, 2CH₃O), 3.93 (3H, s, CH₃O), 3.81 (3H, s, CH₃O), 3.55 (1H, m, H-3'), 2.91(2H, m, 2H-4')

RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ 31.5 (C-4), 31.6 (C-3), 56.2, 60.9, 61.0, 61.5 (cada una de C de OCH₃), 70.3 (C-2), 107.1 (C-6'), 107.5 (C-6), 115.1 (C-4a), 124.2 (C-5), 128.9 (C-1'), 134.1 (C-8), 139.8 (C-2'), 144.7 (C-5'), 145.4 (C-4'), 147.1 (C-8a), 147.6 (C-7), 149.6 (C-3')

EM m/z (especie, intensidad relativa %): 362 (M⁺, C₁₉H₂₂O₇, 47), 210 (C₁₁H₁₄O₄, 100), 195 (C₁₁H₁₄O₄ - CH₃, 47), 183 (C₉H₁₁O₄, 58), 152 (C₈H₁₈O₃, 30), 138 (C₇H₆O₃, 10), 123 (C₇H₆O₃ - CH₃, 20)

Las asignaciones para cada señal de los espectros de resonancia de hidrógeno y de carbono-13 de los dos isoflavanos descritos fueron comprobadas por medio de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética bidimensional como COSY, HETCOR y COLOC. La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se discute de manera amplia en la sección de discusión de resultados.

Las fracciones 54-60 (285 mg) eluidas de la columna C-54, consistieron en una mezcla compleja en la que predominaba un metabolito que se separó por recromatografía en

columna. La recromatografía de este residuo (40 g de silicagel 70-230) permitió obtener, utilizando hexano/acetato de etilo (85:15) como fase móvil, 65 mg de un aceite amarillo claro, identificado como 7,2'-dihidroxi 3',4',8-trimetoxi-isoflavano (isoduartina) [45]. Las propiedades espectroscópicas de la isoduartina coinciden con las informadas en la literatura³⁷ y son las siguientes:

Pf: 105-108°C

Rf: 0.34(hexano/acetato de etilo 7:3)

$[\alpha]_D$: -60 (0.21 MeOH)

UV λ_{max} : 277nm(ϵ 5622), 312nm(ϵ 1500)

IR (CHCl₃): 3519, 3002, 2938, 1618, 1497, 1464, 1173, 1095, 1040 cm⁻¹

RMN¹H (200 MHz ,CDCl₃): δ 6.77 (1H, d, J=8.6 Hz, H-5'), 6.71 (1H, d, J=8.2 Hz, H-5), 6.51 (1H, d, J=8.2 Hz, H-6), 6.49 (1H, d, J=8.6 Hz, H-6'), 6.15 (2H, sa, OH), 4.45 (1H, ddd, J=10.2, 3.5, 1.8 Hz, H-2a), 4.10 (1H, dd, J=10.2 Hz, H-2), 3.89 (3H, s, CH₃O), 3.88 (3H, s, CH₃O), 3.81 (3H, s, CH₃O), 3.55 (1H, m, H-3'), 2.90 (2H, m, 2H-4')

RMN¹³C (75MHz ,CDCl₃): δ 30.8 (C-4), 31.9 (C-3), 56.1, 56.3, 56.7, (cada una de C de OCH₃), 69.9 (C-2), 103.5 (C-6'), 106.9 (C-6), 115.1 (C-4a), 121.7 (C-5'), 124.2 (C-1'), 134.8 (C-8), 135.3 (C-2'), 140.0 (C-5), 147.4 (C-8a), 147.6 (C-7), 151.1 (C-3')

EM *m/z* (especie, intensidad relativa %): 332 (M⁺, C₁₈H₂₀O₆, 51), 180 (C₁₀H₁₂O₃, 100), 165 (C₁₀H₁₂O₃-CH₃, 51), 152 (C₈H₈O₃, 48), 149 (C₁₀H₁₂O₃-OCH₃, 24), 137 (C₈H₈O₃-OCH₃, 32), 121 (C₇H₆O₃-CH₃, 24)

Las fracciones 58 a 61 obtenidas de la columna cromatográfica original con hexano-acetato de etilo (7:3) se reunieron y se recromatografiaron aplicando el residuo (2.5 g) adsorbido en celita en una columna empacada con 98g de gel de sílice. De esta recromatografía se aislaron 25 mg de un sólido blanco conocido como 3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxi-pterocarpano[54].⁴⁸

Pf: 265-268°C

Rf: 0.5 (hexano/acetato de etilo 7:3)

$[\alpha]_D$: -94.5 (0.20, MeOH)

IR (CHCl₃): 2930, 2853, 1757, 1614, 1502, 1470, 1143, 1112, 1042 cm⁻¹

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7.215 (1H, d, J=13Hz, H-1), 6.74 (1H, s, H-7), 6.65 (1H, d, J=13Hz, H-2), 6.43 (1H, s, H-10), 5.91 (2H, dd, J=10.6 Hz, J=4.7 Hz, OCH₂O), 5.51 (d, J=6.8 Hz, H-11a), 4.34 (1H, dd, J=10.6 Hz, J=4.5 Hz, H-6), 3.88 (3H, s, CH₃O), 3.85 (3H, s, CH₃O), 3.66 (1H, t, J=10.6 Hz, H-6B), 3.5 (1H, m, J=10.6 Hz, H-6a)

RMN¹³C 75MHz (CDCl₃): δ 40.04 (C-6a), 56.12 (CH₃O), 61.0 (CH₃O), 66.6 (C-6), 78.5 (C-11a), 93.80 (C10), 101.3 (OCH₂O), 104.8 (C-7), 105.9 (C-2), 114.1 (C-1a), 117.8 (C-7a), 122.9 (C-4a), 125.6 (C-1), 137.4 (C-8), 141.8 (C-9), 149.5 (C-3), 153.7 (C-4a), 154.2 (C-10a)

EM *m/z* (especie, intensidad relativa %): 328 (M⁺, C₁₈H₁₆O₆, 100), 327 (M⁺- H, 17.5), 313 (M⁺-CH₃, 18), 298 (M⁺-2CH₃, 13), 162 (C₉H₆O₃, 23), 175 (C₁₀H₇O₃, 10)

El residuo de las fracciones 62-68 de la columna original (2.0g) se recromatografió en una columna de 60 g de sílica gel. Las fracciones 4 a 11 eluidas con hexano-acetato de etilo 9:1, se filtraron para obtener 87 mg del 3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxi-pterocarpano [54].

La filtración de las fracciones 31-32 de esta cromatografía permitió la obtención de 38 mg del 7,2'-Dihidroxi-8,3',4',5'-tetrametoxi-isoflavano [60].

Las fracciones 75-86 de la columna original eluidas con mezcla hexano-acetato de etilo 1:1, fueron reunidas obteniéndose 4.63 g de residuo. Este fué recromatografiado en una columna abierta, y el residuo de la fracción 5 se sometió a un proceso de cristalización fraccionada con hexano-acetato de etilo, obteniéndose 23 mg de un sólido café claro que se identificó como 7-hidroxi 2'-metoxi-4',5'-metilendioxi-isoflavona (cuneatina) [61].

Pf: 238°C

Rf: 0.5 (hexano/acetato de etilo 7:3)

IR (CHCl₃): 2927, 2853, 1730, 1624, 1496, 1378, 1226, 1247 cm⁻¹

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃ + DMSO): δ 10.08 (1H, s, OH), 8.10 (1H, d, J=8.7 Hz, H-5), 7.92 (1H, s, H-2), 6.85 (1H, d, J=2.2 Hz, H-8), 6.83 (1H, dd, J=8.7, J=2.3 Hz, H-6), 6.79

(1H, d, J=1.5 Hz, H-6'), 6.72 (1H, d, J=1.5 Hz, H-3') 5.90 (2H, s, OCH₂O), 3.93 (3H, s, CH₃O).

EM *m/z* (especie, intensidad relativa %): 312 (M⁺, C₁₇H₂₁O₆, 100), 176 (C₁₈H₈O₃, 24), 136 (C₇H₄O₃, 10)

Las fracciones 12-14 de esta recromatografía fueron reunidas, obteniéndose un sólido amorfo café el cual se recrystalizó de hexano-acetato de etilo varias veces. este procedimiento permitió obtener 183mg de 7-hidroxi- 2',4',5',-trimetoxi isoflavona [52], que constituye el tercer producto aislado de *E. polystachya* no reportado. Sus características son:

Pf: 240°C

Rf: 0.5 (hexano/acetato de etilo 7:3)

UV λ_{\max} : 204nm (ϵ :3680), 295 nm (ϵ :17506).

IR (KBr) : 3250, 1620, 1580, 1520, 1465, 1390, 1250, 1210, 1150, 840 cm⁻¹

RMN¹H (200 MHz ,CDCl₃ + DMSO): δ 10.51 (1H, sa, OH), 8.15 (1H, s, H-2), 7.94 (1H, d, J=9.0 Hz, H-5), 6.90 (1H, dd, J=2.4, 9Hz, H-6), 6.89 (1H, d, J=2.4 Hz, H-8), 6.83 (1H, d, J=1.1 Hz, H-6'), 6.76 (1H, s, H-3'), 3.83 (3H, s, CH₃O), 3.70 (3H, s, CH₃O), 3.69 (3H, s, CH₃O).

RMN¹H (300 MHz ,CDCl₃+DMSO): δ 10.51 (1H, sa, OH), 8.0 (1H, s, H-2), 7.95 (1H, d, J=9.0 Hz, H-5), 6.91 (1H, dd, J=2.4 Hz, J=9 Hz, H-6), 6.88 (1H, d, J=2.4 HZ, H-8), 6.858 (1H, d, J=2.1, H-6'), 6.68 (1H, s, H-3'), 3.87 (3H, s, CH₃O), 3.76 (3H, s, CH₃O), 3.74 (3H, s, CH₃O).

RMN¹³C (75MHz ,CDCl₃): δ 55.6 (CH₃O), 56.1 (CH₃O), 98.0 (C-3'), 101.9 (C-6'), 111.9 (C-1'), 114.7 (C-8), 115.7 (C-6), 116.6 (C-2'), 120.8 (C-3), 126.8 (C-5), 142.1 (C-4'), 149.3 (C-7), 151.5 (C-5'), 153.7 (C-2), 157.3 (C-10), 162.2 (C-9), 174.5 (C=O)

EM *m/z*(especie, intensidad relativa %) : 328 (M⁺, C₁₈H₁₆O₆, 98), 313 (M⁺-CH₃, 25), 297 (M⁺-OCH₃, 42.5), 120 (C₁₀O₃H₁₀-OCH₃, 19), 106 (C₇OH₆, 17)

Obtención de derivados acetilados

Con el propósito de confirmar las estructuras propuestas para los tres productos novedosos obtenidos de *E. polystachya*, se obtuvo el derivado acetilado de cada una de ellas.

La reacción de acetilación se realizó usando 0.5 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético para 50 mg de compuesto a acetilar. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en tiempos variables dependiendo del consumo de la materia prima. Una vez concluida la reacción, se destruyó el exceso de anhídrido acético mediante la adición de aproximadamente 5 g de hielo picado. Posteriormente se separó el producto acetilado del medio de reacción mediante extracciones sucesivas: primero con acetato de etilo (3 veces de 15 ml c/u), la fase orgánica así obtenida se lavó con una solución de HCl al 10% para formar el clorhidrato de piridina y eliminarla en la fase acuosa. Seguido a esto la fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (con el propósito de eliminar el exceso de HCl y el ácido acético producto de la reacción), finalmente se lavó con agua y se secó con sulfato de sodio anhidro para luego concentrar. Los productos obtenidos de estas reacciones y sus propiedades espectroscópicas son las siguientes:

7-Acetoxi-2',3',4',5',8-pentametoxi-isoflavano [59a], a partir de 45 mg de materia prima [59], se obtuvieron 23.8 mg de este. El tiempo de reacción fue de 2 horas, las propiedades espectroscópicas y físicas son:

Pf: 79°C

IR (CHCl₃): 2939, 1760, 1491, 1464, 1238, 1083, 1047 cm⁻¹.

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6.81 (1H, d, J=8.4 Hz, H-5), 6.59 (1H, d, J=8.4 Hz, H-6), 6.31 (1H, s, H-6'), 4.44 (1H, ddd, J=10.5 Hz, J=3.5 Hz J=1.5 Hz, H-2a), 4.07 (1H, dd, 10.2 Hz, H-2), 3.95 (3H, s, CH₃O), 3.88 (3H, s, CH₃O), 3.86 (3H, s, CH₃O), 3.84 (3H, s, CH₃O), 3.79 (3H, s, CH₃O), 3.65 (1H, m, H-3), 3.01 (2H, m, 2H-4),.

7,2'-Diacetoxi-3',4',5',8-tetrametoxiisoflavano[60a]: A partir de 65 mg del producto natural [60]se obtuvieron 39 mg del derivado acetilado, después de tres horas de reacción. Sus datos de resonancia de hidrógeno son los siguientes:

Pf: 57°C

IR (CHCl₃): 2938, 1762, 1488, 1462, 1370, 1090, 1049 cm⁻¹.

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6.81 (1H, d, J=8.3 Hz, H-5), 6.59 (1H, d, J=8.3 Hz, H-6), 6.55 (1H, s, H-6'), 4.42 (1H, ddd, J=10.2, 3.8, 1.5 Hz H-2a), 3.98 (1H, dd, J=10.2 Hz, H-2),

3.93 (3H, s, CH₃O), 3.88 (6H, s, 2CH₃O), 3.85 (3H, s, CH₃O), 3.61 (1H, m, H-3'), 2.96 (2H, m, 2H-4'), 2.33(s, 3H, CH₃CO), 2.31(s, 3H, CH₃CO)

7-Acetoxy-2',4',5'-trimetoxiisoflavano [52a]: A partir de 74.5 mg de la materia prima [62] se obtuvieron 38.2 mg despues de dos horas cuarenta minutos. Los datos espectroscópicos de este compuesto son:

Pf: 135°C

IR (CHCl₃): 1728, 1612, 1501, 1462, 1049, 1037 cm⁻¹.

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8.31 (1H, d, J=9.0 Hz, H-5), 8.01 (1H, s, H-2), 7.16 (1H, dd, J= 2.4, 9 Hz, H-6), 7.3 (1H, d, J=2.4 Hz, H-8), 6.93 (1H, d, J=2.1 Hz, H-6'), 6.63 (1H, s, H-3'), 3.93 (3H, s, CH₃O), 3.86 (3H, s, CH₃O), 3.77 (3H, s, CH₃O).

DISCUSION DE RESULTADOS

Del extracto orgánico total de *E. polystachya* fue posible aislar y caracterizar siete sustancias: un esteroles, tres isoflavanos, un pterocarpano y tres isoflavanos. Los nombres de las sustancias aisladas son los siguientes:

estigmasterol [58]

7-hidroxi 8,2',3',4',5'-pentametoxiisoflavano [59]

7,2'-dihidroxi-5',3',4',8 tetrametoxiisoflavano [60]

7,2'-dihidroxi 8,3',4'-isoflavano (isoduartina) [45]

3,9-dimetoxi-8,9-metilendioxi pterocarpano [54]

7-hidroxi-2'-metoxi-4',5'-metilendioxiisoflavona (cuneatina) [61]

7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxi isoflavona [52]

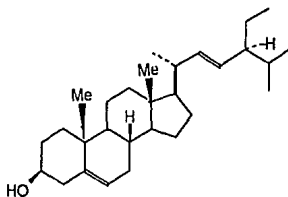
La elucidación y discusión de las estructuras propuestas se realizará analizando las propiedades físicas, espectrométricas y espectroscópicas tanto de los productos naturales como de los derivados acetilados, y la comparación de estas con las informadas en la literatura.

Para fines de la discusión de las estructuras de los productos naturales aislados, estos se clasificaran en cuatro grupos:

- I) Esteroles
- II) Isoflavanos
- III) Pterocarpanos
- IV) Isoflavonas

I) Esteroles.

El estigmasterol [58] se aisló de las fracciones menos polares del fraccionamiento del extracto clorofórmico-metanólico. Fue identificado por comparación con una muestra auténtica. Las propiedades físicas y espectroscópicas obtenidas para el mismo se encuentran descritas en la sección experimental. Cabe mencionar que esta sustancia natural se encuentra presente en una amplia variedad de vegetales, en proporciones variables. En ocasiones se encuentra esterificado con ácidos grasos, ó formando glucósidos, o bien, derivados de ambos.



58

II) Isoflavanos.

Este grupo está constituido por tres compuestos, y fué aislado de las fracciones eluidas con hexano-AcOEt (7:3), del fraccionamiento inicial del extracto. Las propiedades físicas y espectroscópicas de los mismos se encuentran descritas en la sección experimental.

7-Hidroxi-8,2',3',4',5'-pentametoxiisoflavano [59]:

Este compuesto, aislado por cromatografía de las fracciones 54-57 de la columna original, presentó inicialmente una apariencia aceitosa color naranja, pero después solidificó. Es ópticamente activo, $[\alpha]_D = +3.12$ (0.320, MeOH), y peso molecular de 376, determinado por espectrometría de masas. La integración del área bajo la curva en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN¹H, espectro 1) indica la presencia de 24 hidrógenos, y el espectro de resonancia magnética de carbono 13 (RMN¹³C, espectro 2) presenta las señales correspondientes a 20 carbonos. Conjuntando la información espectroscópica con el peso molecular, se puede deducir la fórmula molecular C₂₀H₂₄O₇, por lo que esta sustancia tiene nueve insaturaciones.

El espectro de RMN¹H (espectro 1) muestra cinco señales singlete con integración para tres hidrógenos cada una de ellas, las cuales se encuentran entre δ 3.78-3.94. Este desplazamiento a campo bajo lo presentan hidrógenos sobre carbono base de oxígeno, por lo que se deduce la presencia de cinco metoxilos. Por otro lado, a campo bajo se observan señales que, de acuerdo a su desplazamiento químico e integración, deben corresponder a tres hidrógenos aromáticos. Estos se presentan como un sistema AB centrado en δ 6.73 (d, J=8.3 Hz) y 6.53 (d, J=8.3 Hz), así como un singlete en δ 6.40. Este tipo de multiplicidad hace suponer la existencia de dos sistemas aromáticos: en uno de ellos se encuentran dos hidrógenos en posición *orto* entre sí, mientras que en el otro existe un hidrógeno aislado, estableciendo que los anillos bencenoides están tetra y penta sustituidos (figura 1).

El máximo de absorción en ultravioleta (284 nm), junto a la evidencia de los dos sistemas bencenoides en la molécula así como nueve insaturaciones hace suponer que se trate de un flavonoide.

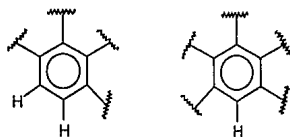


Figura 1

Adicionalmente se observan otros tres grupos de señales que integran para un total de 5 hidrógenos, lo que indica que el esqueleto de este compuesto es el de un flavano ó isoflavano. En δ 4.40 se observa un doble de doble de doble que integra para un hidrógeno, y que tiene una constante de acoplamiento geminal de 10.2 Hz, vecinal de 3.5 Hz, y constante de acoplamiento a larga distancia de 1.8 Hz. La primera constante coincide con la que presenta un doblete de doble que integra para un hidrógeno en δ 4.05

Adicionalmente se observa un multiplete de un hidrógeno en δ 3.61 y un segundo multiplete para dos hidrógenos en δ 2.93. Comparando con datos bibliográficos de flavanos e isoflavanos, se puede concluir que las señales características que presenta el espectro de resonancia son las de los hidrógenos en posición 2, 3 y 4. En flavanos estas señales aparecen en δ 5.0-5.3 (dd) para H-2, δ 2.7 (m) H-4, δ 2.2-2.4 (m) para H-3.⁵⁰ En el caso de isoflavanos, la señal de H-3 aparece en δ 3.5-3.9 como multiplete, el hidrógeno en C-2 presenta dos señales doble de doble en δ 4.0 a 4.5. Estos datos se muestran esquemáticamente en la figura 2.

Las señales que se observan en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrogeno del producto natural aislado de *E. polystachya* son similares a los isoflavanos lonchocarpano [51]²⁰ y duartina [19].¹⁴ Esta comparación establece la estructura de isoflavano para este metabolito secundario (figura 2).

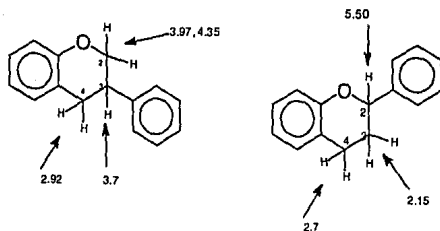


Figura 2

El valor de la constante de acoplamiento vecinal entre H-2 y H-3 de 3.5 Hz, establece la relación axial-ecuatorial de los mismos,¹⁴ este acoplamiento se produce entre H-2 α y H-3. Además, se manifiesta una constante de acoplamiento a larga distancia (1.8 Hz) correspondiente a la interacción entre H-2 α y H-4.⁵¹ La existencia de los acoplamientos vecinal y a larga distancia, fue comprobada por medio de la correlación espectroscópica homonuclear ^1H - ^1H (HOMO-COSY, espectro 3), donde se observa la correlación entre el *ddd* centrado en δ 4.50 correspondiente a H-2 y el multiplete a campo alto centrado en δ 2.98, asignado a H-4, así como una segunda correlación entre esta última señal y la señal de H-3, que a su vez correlaciona con las señales de H-4 (figura 3).

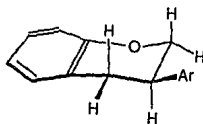
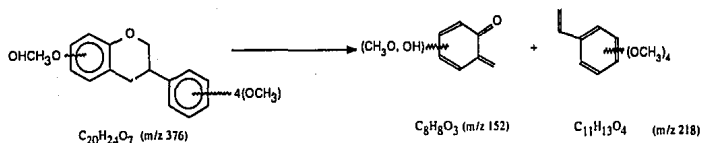


Figura 3

Para la determinación del tipo de sustitución se tomó como referencia el análisis del espectro de masas. Es conocido que isoflavanos presentan un patrón de fragmentación de tipo retro Diels Alder (RDA) en el anillo A.²⁰ En este compuesto, los fragmentos más significativos fueron los obtenidos con una relación m/z 224 (100) y 152 (16) (esquema 4) El primer fragmento es debido al anillo B tetrametoxilado, el segundo indica que el anillo C cuenta con un sustituyente metoxilo y un hidroxilo.



Esquema 4

Lo anterior es consistente con lo mencionado en el análisis de los datos de RMN¹H, donde se hizo notar la presencia de dos hidrógenos en *orto* (anillo C) y uno no acoplado en un segundo anillo (anillo B). La ubicación de los sustituyentes en los anillos aromáticos se determinó mediante los siguientes argumentos: por razones biogénicas la posición C-7 de los isoflavanos siempre esta oxigenada,¹¹ por lo que la existencia de dos hidrógenos *orto* en el anillo C sólo permite localizarlos en las posiciones C-5 y C-6; así se establece que la segunda posición oxigenada es C-8. Esto permite establecer dos posibles estructuras parciales (figura 4) que difieren entre sí por la ubicación relativa del metoxilo e hidroxilo.

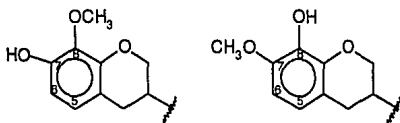


Figura 4

Para discernir entre ambas estructuras se compararon los datos obtenidos del el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno del producto natural (espectro 1) con los del derivado acetilado (espectro 4, tabla 5), observando que la señal asignada al hidrógeno sobre C-6 (δ 6.54) se desplaza a campo bajo en el derivado acetilado (δ 6.59, $\Delta\delta$: 0.05) por efecto de la desprotección generada por el grupo carbonilo del acetilo, así como un desplazamiento a campo bajo del grupo metoxilo ($\Delta\delta$: 0.06) y del hidrógeno benzénico asignable a H-5 ($\Delta\delta$: 0.1). Estas evidencias permiten determinar que el hidroxilo se encuentra en C-7 y el metoxilo en C-8. La asignación de las señales de los hidrógenos en H-

5 y H-6 del derivado acetilado, se comprobó con el espectro NOEDIFF,^a (espectro 4a) donde la irradiación de los hidrógenos en C-4 (δ 2.95) produce el aumento de la integración de la señal en (δ 6.81), que corresponde a H-5.(figura 5).

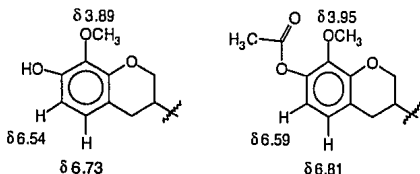


Figura 5

De acuerdo con los datos informados en la literatura, biogenéticamente el tipo de oxigenación del anillo B es 2',3',4',⁵² por lo que se consideran las posibilidades de que el sistema de sustitución en dicho anillo tenga el patrón de oxigenación 2',3',4',5' o 2',3',4',6' (figura 6).

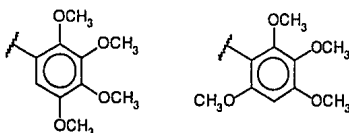


Figura 6

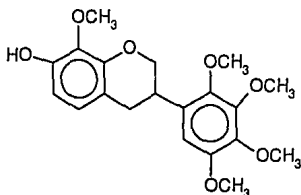
Con el objetivo de discernir entre estas dos posibilidades se realizó el análisis del espectro de resonancia magnética nuclear NOEDIFF (Nuclear Overhauser Effect differential) (Espectro 5).

La irradiación de H-4 permitió observar un aumento considerable en la integración de la señal singulete del hidrógeno del anillo B y en la del H-3, por lo que se deduce que el

^aEste efecto se observa al obtener el espectro de RMN¹H irradiando uno de los hidrógenos de interés, y determinar el efecto que esta irradiación tiene sobre los hidrógenos vecinos especialmente al hidrógeno saturado. De esta manera es posible determinar su posición relativa. Este efecto se cuantifica mediante la diferencia del área bajo la curva de las señales afectadas.

metoxilo se localiza en posición 5' y el hidrógeno en 6' ya que este último interacciona espacialmente con los hidrógenos en C-4.

La integración de las estructuras parciales deducidas mediante la discusión anterior permite concluir que la estructura de este compuesto es: (+)- 7-hidroxi 8,2',3',4',5'-pentametoxi isoflavano [59]. Este es un producto natural novedoso en la literatura química.



59

La configuración absoluta de algunos isoflavanos se ha determinado mediante el análisis de las curvas de dispersión óptica rotatoria (DOR).³⁵ La recopilación de los resultados informados en la literatura de algunas isoflavonas correlacionadas con la rotación específica (585 nm) de los mismos (tabla 4),^{20,35a} permite establecer la generalización entre el signo de la rotación y su configuración en C-3 estableciéndose la generalización que los isoflavanos dextrorrotatorios poseen configuración *R* en C-3 y los levorrotatorios tienen configuración *S* en ese centro quiral. Cabe resaltar que existen excepciones a la generalización arriba descrita, por lo que debe considerarse con la incertidumbre que corresponde.

Tabla 4
Relación entre rotación óptica y configuración absoluta de isoflavanos

Compuesto	$[\alpha]_D$	Configuración
Vestitol	+21.6 (0.58 Me ₂ CO)	<i>S</i>
Mucronulatol	-18.5 (0.52 Me ₂ CO)	<i>S</i>
Duartina	-25.0 (0.47 Me ₂ CO)	<i>S</i>
Mucroquinona	-15.4 (0.42 Me ₂ CO)	<i>S</i>
Methoxyvestitol	+26.2 (0.65 Me ₂ CO)	<i>R</i>
Claussequinona	+65.2 (0.49 MeOH)	<i>R</i>

Compuesto	$[\alpha]_D$	Configuración
Mucronulatol	+19.4 (0.24 MeOH)	R
Vestitol	-18.9 (0.43 Me ₂ CO)	R

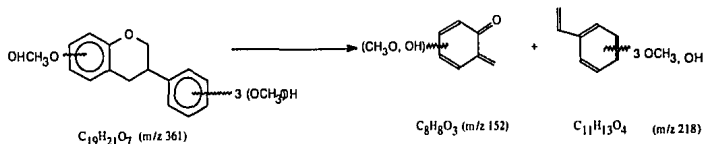
La determinación de la estructura molecular de los dos isoflavanos restantes aislados de este vegetal, se realizará tomando como referencia la discusión del isoflavano **59**.

7,2'-Dihidroxi 3',4',5',8-tetrametoxi-isoflavano [**60**]:

Este producto natural, al igual que **59**, fué ópticamente activo ($[\alpha]_D$:+6.5 (0.2, MeOH)). Por EM se determinó un ión molecular de 362, y el área bajo la curva del espectro de resonancia magnética de hidrógeno (Espectro 6) integra para 22 hidrógenos. Este espectro presentó gran similitud con el del compuesto **59**, observándose las señales características de isoflavanos en δ 4.37 (ddd, 1H, H-2), 3.98 (dd, 1H, H-2'), 3.55 (m, H-3), 2.89 (m, H-4), por lo que se determinó la fórmula molecular C₁₉H₂₂O₆.

En el mismo espectro se observan además tres señales singulete que integran para un total de 12 hidrógenos, que por desplazamiento químico (δ 3.80-3.95) pertenecen a cuatro metoxilos. Una señal amplia en δ 5.70 que integra para dos hidrógenos, es atribuida a la presencia de dos hidrógenos hidroxílicos. Finalmente, se observa el mismo sistema de señales de hidrógenos aromáticos que el isoflavano anterior; es decir: un sistema AB con constante de acoplamiento *orto* y una señal no acoplada, por lo que se deduce que este compuesto se diferencia del primero únicamente en la sustitución de un grupo metoxilo por un grupo hidroxilo.

Por espectrometría de masas se determinó el patrón parcial de sustitución, ya que el espectro presentó como fragmentos importantes aquellos en relación *m/z* 210 (100) y 152 (30). El primer fragmento indica la presencia de tres metoxilos y un hidroxilo en el anillo B, y el segundo fragmento indica la existencia de un metoxilo y un hidroxilo como sustituyente del anillo C, estableciendo el mismo patrón de sustitución que **59** en este último anillo (hidroxilo en C-7 y metoxilo en C-8, Esquema 5).



Esquema 5

La ubicación de estos sustituyentes en las posiciones indicadas se verificaron mediante la comparación de los datos espectroscópicos del producto natural con las de su derivado acetilado (espectro 7). Se observan dos señales singulete con integración para tres hidrógenos cada una en δ 2.33 y 2.31, correspondientes a los grupos acetilo. Las señales de los hidrógenos en relación *orto* se desplazaron a campo bajo de la misma manera que en el derivado **59**. En el anillo C, el patrón de oxigenación se estableció como 2',3',4',5', posiciones determinadas por analogía con **59**. Esto se confirmó mediante el experimento NOEDIFF (espectro 8), irradiando al igual que en **59**, a los hidrógenos en C-4, manifestándose su cercanía con H-5 y con H-6'.

Con el fin de determinar en cual de las cuatro posiciones oxigenadas del anillo B se localiza el oxhidrilo, se recurrió a la comparación espectroscópica del producto natural **60** con el derivado acetilado **60a** (espectro 7, tabla 5), y por análisis del espectro de resonancia magnética nuclear bidimensional ^1H - ^{13}C (COLOC, espectro 9). El espectro del derivado acetilado muestra que la señal doblete de doblete generada por H-2 y el multiplete de H-4, se encuentran dentro del cono de protección del grupo acetilo, desplazándose la señal a campo alto ($\Delta\delta$: 0.2.), permitiendo deducir que el acetilo (y por tanto el hidroxilo en la substancia original) se localiza en posición 2'. El patrón de sustitución indicado puede confirmarse mediante el análisis del espectro de RMN ^1H - ^{13}C a larga distancia (COLOC). Para una clara interpretación de este espectro se utilizó el espectro de RMN ^1H - ^{13}C (HETCOR, espectro 10) y se comprobaron las asignaciones dadas para cada señal en el espectro RMN ^{13}C comparando con los datos reportados en la literatura.²⁸ Una vez determinada cada asignación de las señales en el espectro de carbono, se procedió a establecer las correlaciones con los hidrógenos a larga distancia (dos y tres enlaces σ) mediante la ayuda del experimento COLOC (espectro 9), donde se puede observar que la señal en δ 31.56 asignada al C-3 presenta una correlación con la señal del protón aromático asignado a H-6', este hidrógeno aromático interacciona con uno de los carbonos base de metoxilo. Estas conectividades se determinaron por la interacción a tres enlaces entre el carbono base y el hidrógeno del metoxilo (figura 7).

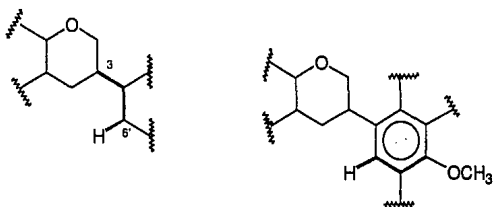


Figura 7

Una vez determinados los carbonos base de metoxilos, se observó en este espectro que el carbono 1' no interacciona a tres enlaces con ningún hidrógeno aromático, por lo que se determinó un patrón de sustitución parcial que se representa en la figura 8.

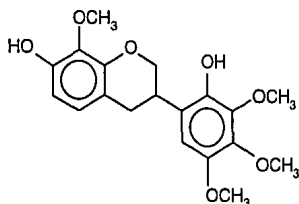
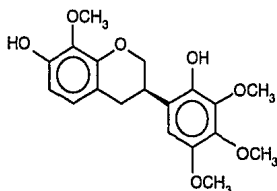


Figura 8

La integración de las estructuras parciales deducidas permite concluir que 7,2'-dihidroxi 3',4',5',8-tetrametoxi-isoflavano[60] es un constituyente de *E. polystachya*. 60 es un producto natural novedoso en la literatura química.



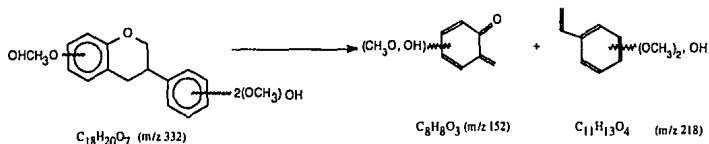
60

La configuración *R* en C-3 se determinó por la rotación dextrorrotatoria de este producto natural, y de la misma manera que 59; es decir, por comparación bibliográfica de los resultados reportados que correlacionan la configuración absoluta con la rotación específica (tabla 4).

7,3'-Dihidroxi 8,2',4'-trimetoxi-isoflavano [45]

45 es el tercer isoflavano aislado de *E. polystachya*. Se obtuvo como un sólido amarillo claro que presenta actividad óptica ($[\alpha]_D^{25} -60$ (0.21, MeOH)), y un peso molecular de 332, determinado por espectrometría de masas.

Por comparación con los datos espectroscópicos de los dos compuestos discutidos anteriormente, se determinó el esqueleto de isoflavano, ya que al igual que los anteriores, esta sustancia presentó las señales características de H-2, H-3, H-4, como se pueden observar en su espectro de RMN¹H (espectro 12). En este se observa que el área bajo la curva integra para 20 hidrógenos. De éstos, nueve están incluidos en tres señales (3 H por cada una), entre δ 3.80 y 3.95, por lo que son hidrógenos de metoxilos. Dos oxhidrilos se manifiestan en dicho espectro a través de dos señales amplias en δ 5.85 y 6.15. Adicionalmente, dos sistemas AB con constante de acoplamiento *orto* son observables en la zona de resonancia característica de hidrógenos aromáticos. El primer sistema AB esta formado por las señales en δ 6.77 (d, $J = 8.6$ Hz) y 6.49 (d, $J = 8.6$ Hz), el segundo sistema lo componen el doblete en δ 6.71 y en δ 6.51; los dos con constantes de 8.4 Hz. Esta disposición de las señales nos indica la presencia de dos pares de hidrógenos en posición *orto* uno respecto al otro, tanto en el anillo B como en el C del isoflavano, lo que se ve comprobado en el espectro de masas que contiene el fragmento 152 característico del anillo C sustituido por un metoxilo y un hidroxilo, así como el fragmento mayoritario de 180 que indica que el anillo C contiene dos metoxilos y un hidroxilo (esquema 6).



Esquema 6

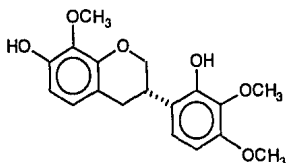
Por analogía con los compuestos antes discutidos, se determina que el anillo B del isoflavano esta sustituido en C-8 con un metoxilo y en C-7 con un hidroxilo. La variación en la posición del grupo hidroxilo en el anillo C permite deducir la estructura de tres posibles isómeros para este compuesto que son:

7,3'-Dihidroxi-8,2',4'-trimetoxi isoflavano (duartina)

7,4'-Dihidroxi-8,2',3'-trimetoxi isoflavano (no reportado)

7,2'-Dihidroxi-8,4',3'-trimetoxi isoflavano (isoduartina) **45**

De acuerdo con los datos informados por Sankawa y colaboradores,³⁷ la principal diferencia para distinguir entre estas posibilidades radica en las resonancias protónicas de 5' y 6', que se desplazan a campo bajo y la señal de H-2 α se protege cuando en carbono 2 hay un metoxilo. La comparación de los datos informados por este autor con los del compuesto obtenido de *E. polystachya*, permiten concluir que la isoduartina **45** es el constituyente presente en este vegetal. **45** había sido caracterizada previamente de *Dalbergia odorifera* (Leguminosa).³⁷ Cabe mencionar que la elucidación de este compuesto se comprobó por comparación directa con los espectros originales, proporcionados por Sankawa y colaboradores de la Universidad de Tokyo.



45

Tabla 5. Datos de RMN¹H (200MHz, CDCl₃)de Isoflavanos aislados

Compuesto	H-5	H-6	H-2	H-2a	H-3	H-4	H-5'	H-6'
45	6.71 d (8.2)	6.51 d(8.2)	4.10 dd(10.2)	4.45 ddd	3.55 m	2.90 m	6.77 d(8.6)	6.49 d(8.6)
59	6.73 d (8.3)	6.54 d (8.3)	4.05 dd(10.2)	4.45 ddd	3.61 m	2.98 m	----	6.41 s
59a	6.81 d (8.3)	6.59 d (8.3)	4.07 dd(10.2)	4.45 ddd	3.65 m	2.98 m	----	6.41 s
60	6.71 d (8.3)	6.51 d (8.3)	4.14 dd(10.2)	4.39 ddd	3.55 m	2.88 m	---	6.47 s
60a	6.81 d (8.3)	6.59 d (8.3)	3.98 dd(10.2)	4.42 ddd	3.61 m	2.96 m	---	6.55 s

III) Pterocarpanos

3,4-Dimetoxi-8,9-metilendioxi pterocarpano [54].

Este compuesto se obtuvo como un sólido cristalino a partir de las fracciones eluidas con hexano/AcOEt 7:3. Presenta un ión molecular en 348 en su espectro de masas, y en el espectro de IR es posible observar la banda característica de doble enlace de tipo aromático en (1470 cm⁻¹).

En el espectro de RMN¹H (espectro 13) se puede observar la presencia de dos dobletes que integran para 1 H cada uno, que resuenan en δ 5.91 y 5.92. Estas señales indican la presencia de un grupo metilendioxi en el compuesto (figura 9).

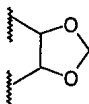


Figura 9

En δ 3.88 y 3.89 se observan dos singuletes con integración para tres hidrógenos cada uno que corresponden a dos metoxilos. La presencia de estos tres carbonos (los dos metoxilos y el del metilendioxi) permite deducir que el esqueleto base del compuesto contiene 15 átomos de carbono. De acuerdo con el peso molecular deducido por espectrometría de masas (348) es posible deducir la fórmula molecular C₁₈H₁₆O₆, por lo que esta sustancia posee once insaturaciones, lo que indica que se trata de un derivado flavonoide con dos insaturaciones,

las cuales se explican posteriormente. En el espectro de RMN¹H se observa un sistema AB compuesto por las señales en δ 7.21 y 6.74 con constante de acoplamiento *orto* de 13 Hz. Dos singuletes en δ 6.74 y 6.45 son asignables a protones aromáticos en relación *para* entre sí. Por analogía con los compuestos descritos anteriormente es posible inferir la estructura parcial que se muestra en la figura 10 :

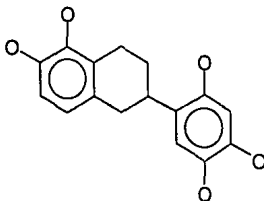


Figura 10

Los isoflavonoides de este tipo presentan un índice de insaturación de nueve. De acuerdo al grado de insaturación observado para este compuesto ($\Omega = 11$), se puede deducir que este presenta una estructura pentacíclica, donde el metilendioxi forma uno de los dos ciclos adicionales de la molécula, y un oxígeno une a los anillos A y C, formando un anillo de dihidrofurano, deduciéndose así el esqueleto del pterocarpano, el cual se muestra en la figura 11.

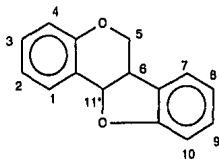


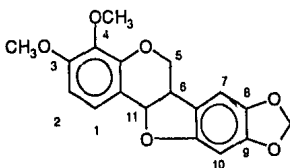
Figura 11

De acuerdo a los datos reportados en la literatura, estos compuestos tienen como señales características una señal doble en δ 5.50 para el hidrógeno benéfico unido al oxígeno, una señal doble dobleteada en δ 4.30 para H-5 y en 3.66 un triplete para el segundo hidrógeno en C-5, así como un multiplete para el hidrógeno benéfico en posición 6, de acuerdo a la numeración de los pterocarpanos. Todas estas señales las presenta el espectro de RMN¹H del compuesto aislado de *E. polystachya*. Los datos de rmn^{13}C (espectro 14)

también presentan señales características que son consistentes con la estructura de un pterocarpano.⁵⁴ En particular, las señales correspondientes a C-5 (δ 66.6), C-6 (δ 40.0) y C-11 (δ 78.5), confirman este tipo de esqueleto.

Asignación (C)	Desplazamiento reportado (δ)	Desplazamiento encontrado (δ)
11	78.5	78.5
6	40.5	40.0
5	67.0	46.6

Por comparación con los datos espectroscópicos del pterocarpano aislado de esta misma especie por el Dr. Domínguez,⁴⁸ se determinó que se trataba del mismo compuesto: el 3,9-dimetoxi-8,9-metilendioxi pterocarpano [54].



54

IV) Isoflavonas.

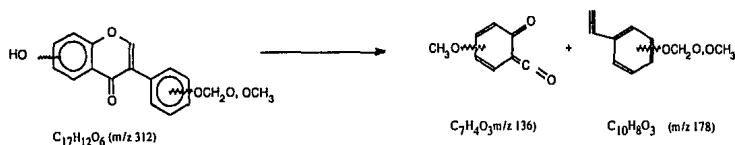
7-Hidroxi-2'-metoxi-4',5'-metilendioxi-isoflavona (Cuneatina) [61]:

Este primer compuesto se aisló como un sólido de color café, *mp* 238°C, que por espectrometría de masas presentó un ión molecular de 312. En el espectro de IR se observa una banda amplia en 3200 cm^{-1} , además de observar una banda de carbonilo en 1730 cm^{-1} .

El área bajo la curva del espectro de RMN¹H (espectro 15) integró para 12 hidrógenos. En el mismo espectro se observa una señal en δ 3.93 que integra para tres hidrógenos, correspondientes a un metoxilo. En la zona de δ 5.90 se observa un singulete que integra para dos hidrógenos, que por su desplazamiento químico se deduce corresponden a un grupo metilendioxi. Otra señal que indica un grupo sustituyente es la de δ 10.2 que

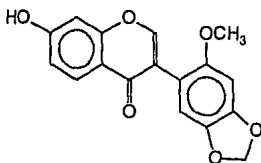
pertenece a un hidrógeno oxhidrílico, evidenciado este grupo funcional en el espectro de infrarojo (3200 cm^{-1}). También se observa un singlete que integra para un hidrógeno en δ 7.92 característico de H-2 de una isoflavona (una flavona presenta señal característica de H-3 en 6.60).⁵⁵ Adicionalmente a las señales de los grupos sustituyentes, se observa una señal doble en δ 8.10, con constante de acoplamiento de 8.7 Hz, constante que coincide con la de la señal en δ 6.83 (dd $J = 8.7$ (*orto*) y $J = 2.3$ (*meta*)), lo que indica un sistema ABX acoplándose a la última señal con el doble en δ 6.85. Otro sistema aromático lo componen dos señales acopladas en *para* con $J=1.2$, centradas en δ 6.72 y 6.70 respectivamente.

La ubicación de los sustituyentes en los anillos B y C se estableció mediante el análisis de los datos del espectro de masas, donde los fragmentos m/z 136 y 176 indican que el anillo C se sustituye con un oxhidrilo (1er fragmento), y los grupos metoxilo y metilendioxi se localizan en el anillo B (segundo fragmento), tomando en cuenta la fragmentación retro Diels Alder de estos compuestos (esquema 7).



Esquema 7

Al igual que los isoflavanos, estos compuestos tienen un patrón biogenético de oxigenación fijo tipo 7,2',4', por lo que el oxhidrilo del anillo C se localiza en C-7, correspondiendo, por lo tanto, al sistema ABX que se localiza sobre este anillo, mientras que los hidrógenos en *para* se ubican en el anillo B. La única posibilidad de ubicación del metilendioxi y del metoxilo en B, dejando dos hidrógenos en *para*, es en C-4'-C-5' y C-2', respectivamente. De esta manera este compuesto se identificó, por comparación con datos bibliográficos, como la cuneatina [61], producto natural aislado previamente de varias especies del género *Cicer* (leguminosa).⁵⁶

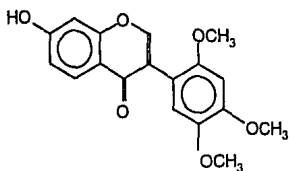


61

7'-Hidroxi-2',4',5'-trimetoxi-isoflavona [52]:

La estructura de este producto natural fué elucidada por comparación de sus datos espectroscópicos con los obtenidos para la cuneatina **61**, recién descrita (tabla 6). Esta substancia presentó un ión molecular de 328 en espectrometría de masas y una integración del área bajo el trazo del espectro de RMN^1H (espectro 16) para 18 hidrógenos. Este espectro presentó notable similitud con el obtenido para la cuneatina **61** observando en este, un singulete en δ 7.92 asignado a H-2, además de identificarse también en este caso un sistema ABX cuyas señales se encuentran desplazadas en δ 8.10 ($J=8.70$ Hz), 6.94 (dd, $J=8.7, 2.3$ Hz) y 6.86 (d, $J=2.3$) y dos señales singuletes de hidrógenos en relación para en del anillo B. Finalmente la presencia de tres singuletes (δ 3.93, 3.85, 3.78) que integran para tres hidrógenos cada uno establecen la presencia de tres grupos metoxilos en la molécula. Estos datos permiten deducir la estructura **52** (análoga a la cuneatina **61**) para esta substancia. La comprobación de la posición del grupo hidroxilo en el anillo B se realizó por comparación del espectro de resonancia de **52** con el espectro del derivado acetilado **52a** (espectro 18, tabla 6) observando que las señales de los hidrógenos en C-5 (δ 8,12), C-6 (δ 6.93) y C-8 (δ 6.86) se ven desplazados a campo bajo, con diferencias de desplazamiento de 0.18, 0.23 y 0.44 respectivamente.

La anterior discusión permite concluir que la substancia **52** es la 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona, substancia que había sido caracterizada anteriormente en un estudio de *E. polystachya*.⁴⁶



52

Tabla 6. Datos de RMN¹H (200MHz, CDCl₃ + DMSO) de Isoflavonas aisladas

Compuesto	H-5	H-6	H-8	H-2	H-3'	H-6'	OMe	OMe	OMe
52	8.12 <i>d</i> (8.7)	6.94 <i>dd</i>	6.86 <i>d</i> (2.3)	7.92 <i>s</i>	6.62 <i>s</i>	6.93 <i>s</i>	3.93	3.85	3.78
52a	8.27 <i>d</i> (8.7)	7.16 <i>dd</i>	7.31 <i>d</i> (2.3)	8.04 <i>s</i>	6.64 <i>s</i>	6.93 <i>s</i>	3.93	3.86	3.77
61	8.10 <i>d</i> (8.7)	6.83 <i>dd</i>	6.85 <i>d</i> (2.1)	7.92 <i>s</i>	6.72 <i>d</i> (1.1)	6.79 <i>d</i> (1.1)	3.93	5.90 (OCH ₂ O)	

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El estudio químico del extracto clorofórmico-metanólico de la corteza de *Eysenhardtia polystachya*, que se realizó con la finalidad de caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios, permitió el aislamiento de siete compuestos: un esteroles, tres isoflavanos, un pterocarpano y dos isoflavonas. Las sustancias se aislaron utilizando métodos cromatográficos convencionales y formación de derivados, y las estructuras fueron deducidas mediante el análisis y la integración de los datos espectroscópicos y espectrométricos.

Las sustancias aisladas de la corteza y madera de *E. polystachya* son:

Estigmasterol [58], 7-hidroxi-8,2',3',4',5'-pentametoxiisoflavano [59], 7,2'-dihidroxi-5',3',4',8-tetrametoxiisoflavano [60], isoduartina [45], 3,9-dimetoxi-8,9-metilendioxi pterocarpano [54], cuneatina [61] y 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxi isoflavona [52]

De los metabolitos mencionados, dos fueron aislados de un estudio previo de otra población de este vegetal: el 3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxi pterocarpano [54] y la 7'-hidroxi-2',4',5'-trimetoxi-isoflavona [52]. Adicionalmente a estos dos, se aislaron estigmasterol, la isoflavona cuneatina [61] y el isoflavano isoduartina [45], que son sustancias caracterizadas previamente de otros vegetales. Dos metabolitos secundarios caracterizados en este estudio son novedosos en la literatura química y son:

7-hidroxi 8,2',3',4',5'-pentametoxiisoflavano [59]

7,2'-dihidroxi-5',3',4',8 tetrametoxiisoflavano [60]

Es interesante señalar que uno de los isoflavanos presentes en *E. polystachya*, la isoduartina [45], se ha reconocido como un inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas, en especial con la PGI₂.³⁷ lo que posiblemente correlacione con las propiedades analgésicas y antipiréticas^{16,17} que se le atribuyen a las preparaciones hechas de este vegetal. Los isoflavanos adicionales a la isoduartina [45], [59] y [60], presentes en la corteza analizada, pueden participar en las actividades biológicas mencionadas.

Mediante el mismo mecanismo de inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas de la isoduartina, y posiblemente de los otros isoflavanos, puede correlacionarse el empleo de las infusiones de la corteza de *E. polystachya* como presumible hipoglucemiante, ya que precisamente algunos compuestos inhibidores de prostaglandinas se emplean en el tratamiento de la diabetes infantil insípida nefrogénica.⁵⁷

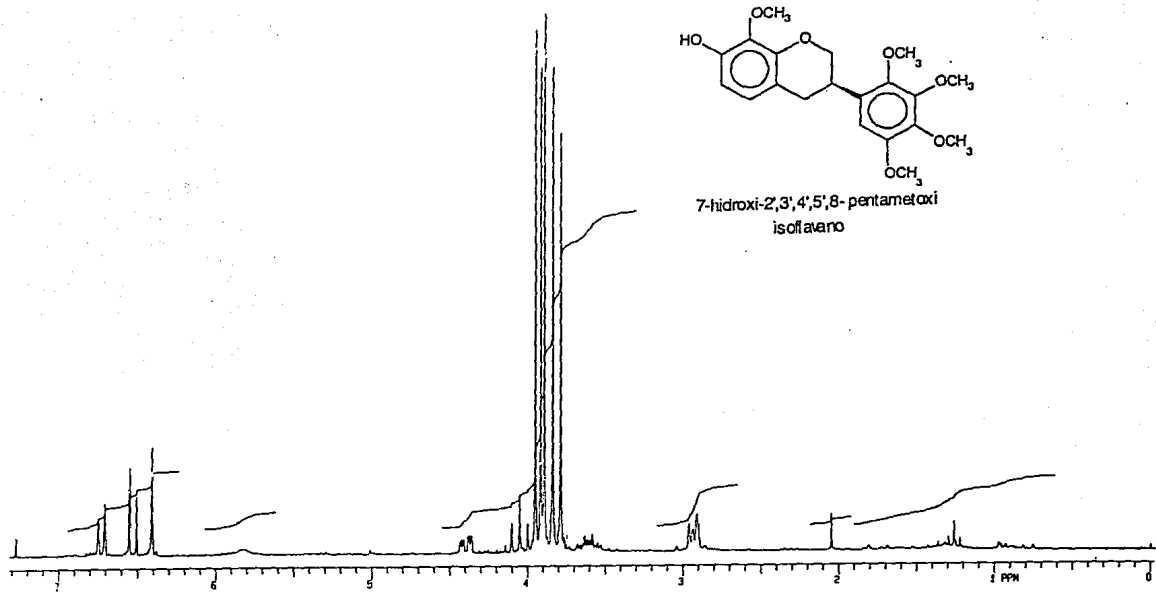
Por otro lado, se conoce que ciertos isoflavanos fenólicos análogos a los caracterizados de *E. polystachya* poseen notable actividad antifúngica.⁵⁸

Recientemente se realizó un estudio en el que se demuestra que animales con una dieta rica en fibras con alto contenido en isoflavonoides presentan bajas posibilidades de padecer cáncer de colon, seno y próstata, por lo que se considera que este tipo de sustancias son fitoestrógenos protectores⁵⁹.

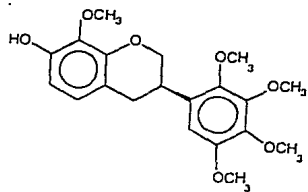
Las consideraciones anteriores, aunado a los antecedentes bibliográficos del vegetal, sugieren la conveniencia de ponderar la bioactividad de los constituyentes de este vegetal en diversos censores farmacológicos.

La proporción de cada uno de los metabolitos secundarios es aproximadamente 0.005% con respecto a la corteza seca. Lo anterior sugiere la necesidad de optimizar el método de extracción y separación de los compuestos secundarios, a la vez de procesar mayor cantidad de material vegetal, con el fin de obtener cantidades apropiadas de sustancias para realizar ensayos en modelos biológicos adecuados. La optimización del aislamiento y procesamiento de mayor cantidad de vegetal permitiría, complementariamente, la caracterización de los constituyentes minoritarios presentes en *E. polystachya*.

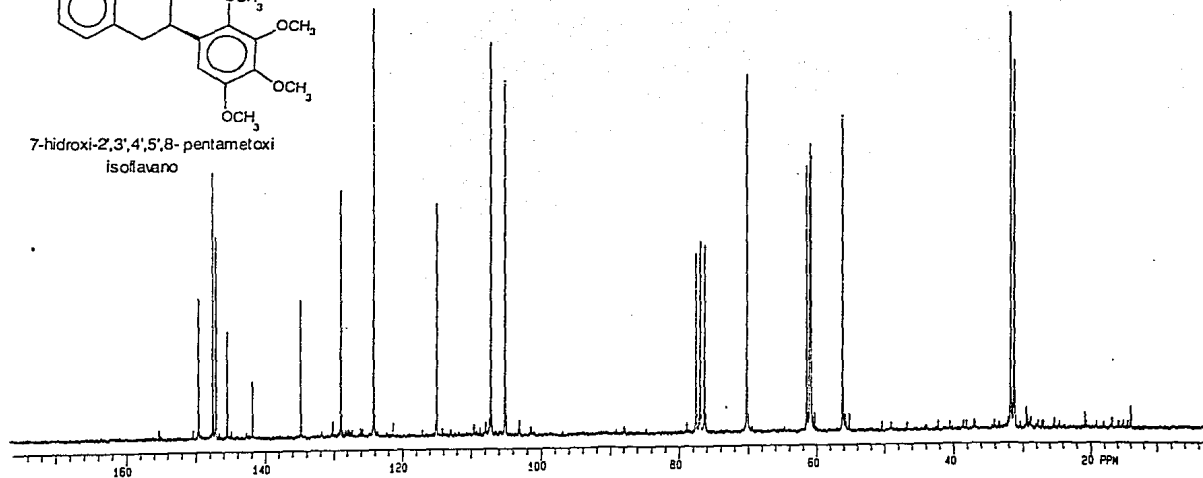
ESPECTROS



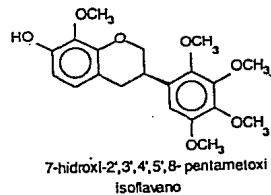
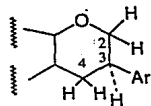
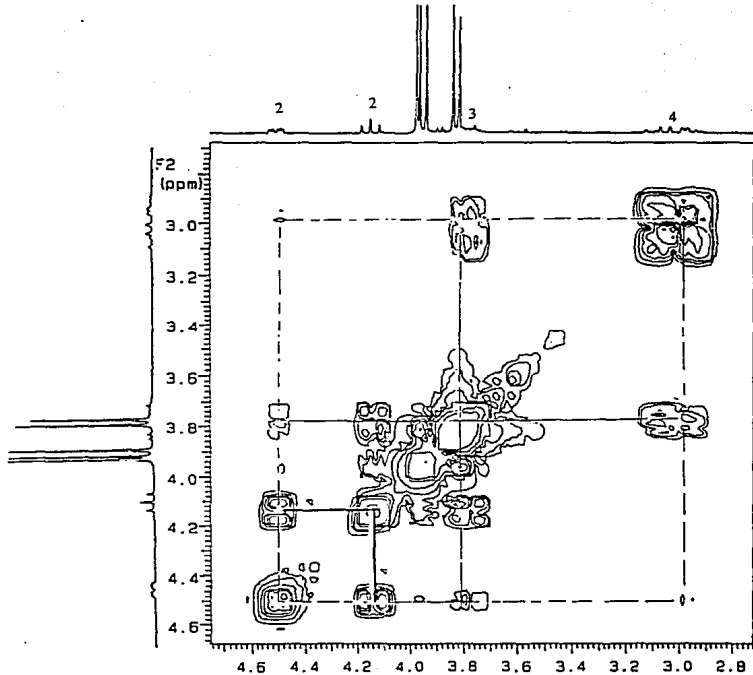
Espectro 1. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) de 7-hidroxi-2,3,4,5,8- pentametoxi-isoflavano (59)



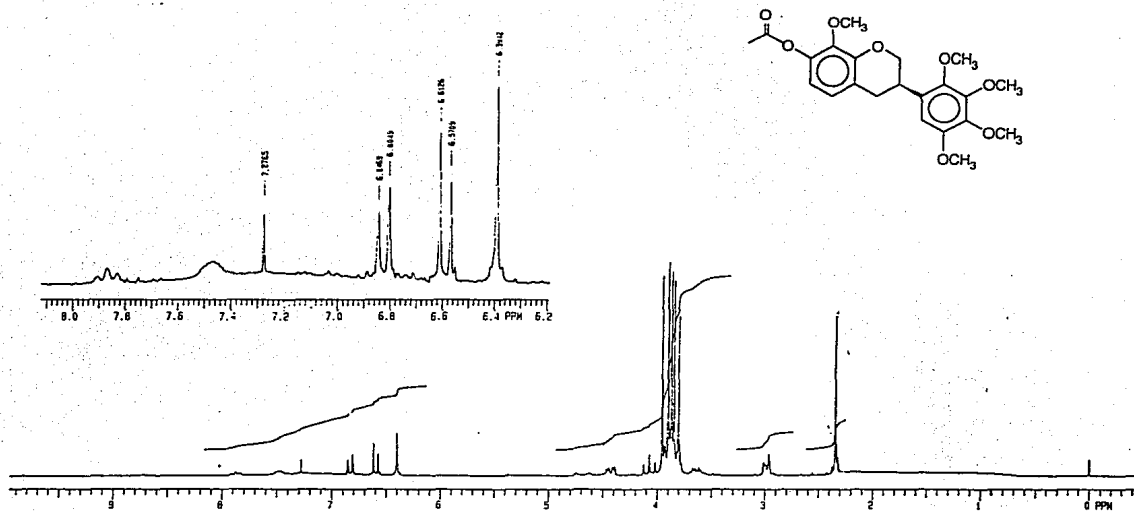
7-hidroxi-2',3',4',5',8- pentametoxi
isoflavano



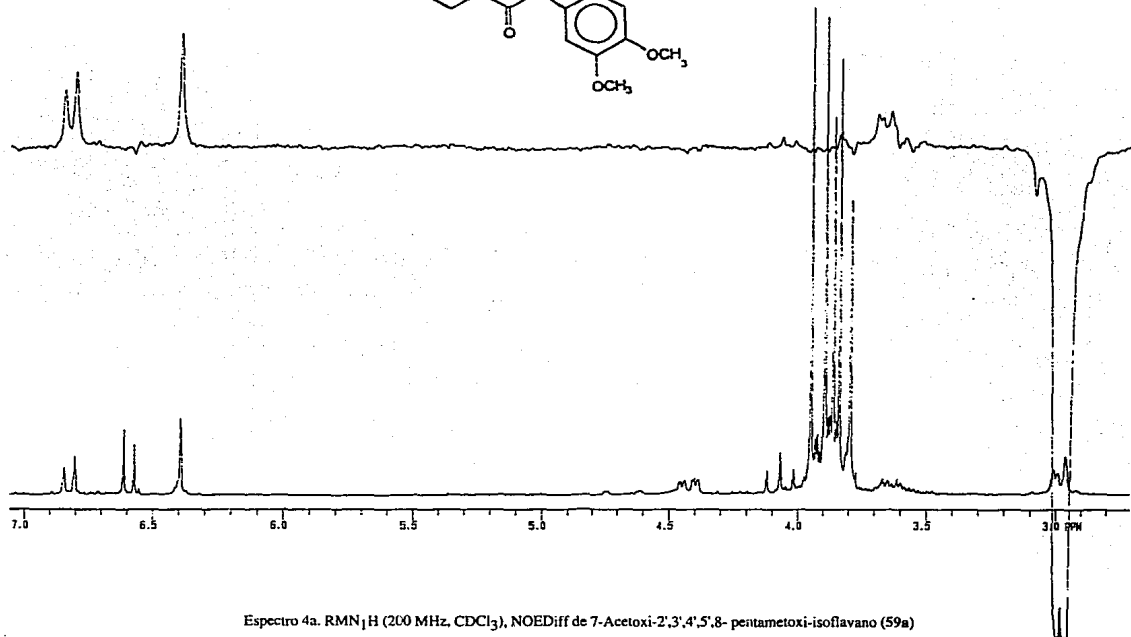
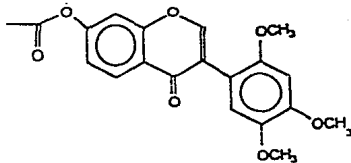
Espectro 2. RMN¹³C(75 MHz, CDCl₃) de 7-hidroxi-2',3',4',5',8- pentametoxi-isoflavano (59)



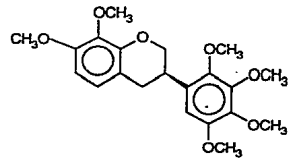
Espectro 3. RMN¹H-¹H COSY (300 MHz, CDCl₃) de 7-hidroxi-2',3',4',5', 8-pentametoxi-isoflavano (59).



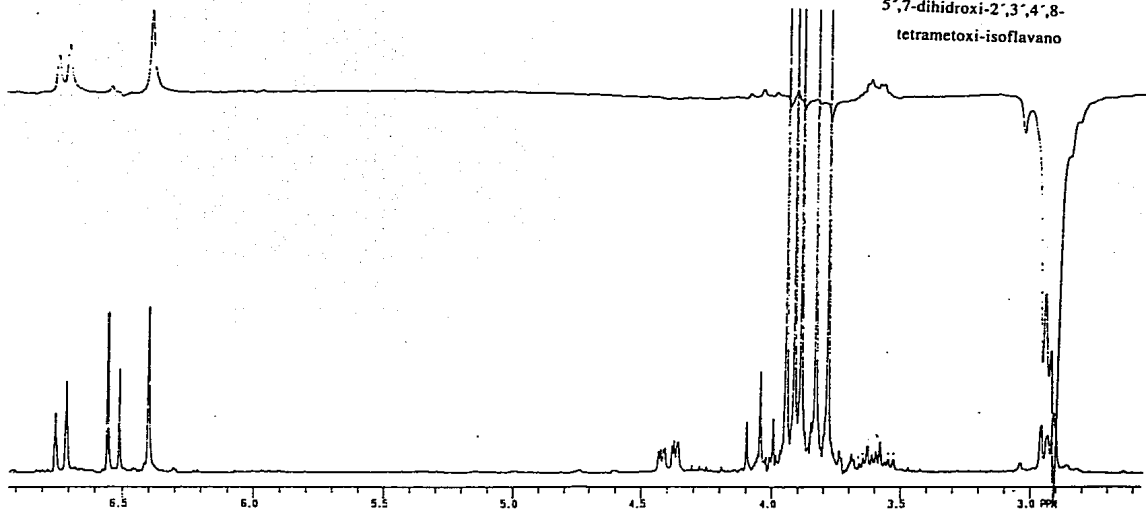
Espectro 4. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 7-acetoxy-2',3',4',5',8- pentametoxy-isoflavano (59a).



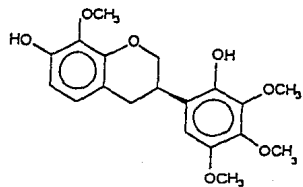
Espectro 4a. RMN_1H (200 MHz, CDCl_3), NOEDiff de 7-Acetoxy-2',3',4',5',8-pentametoxy-isoflavano (59a)



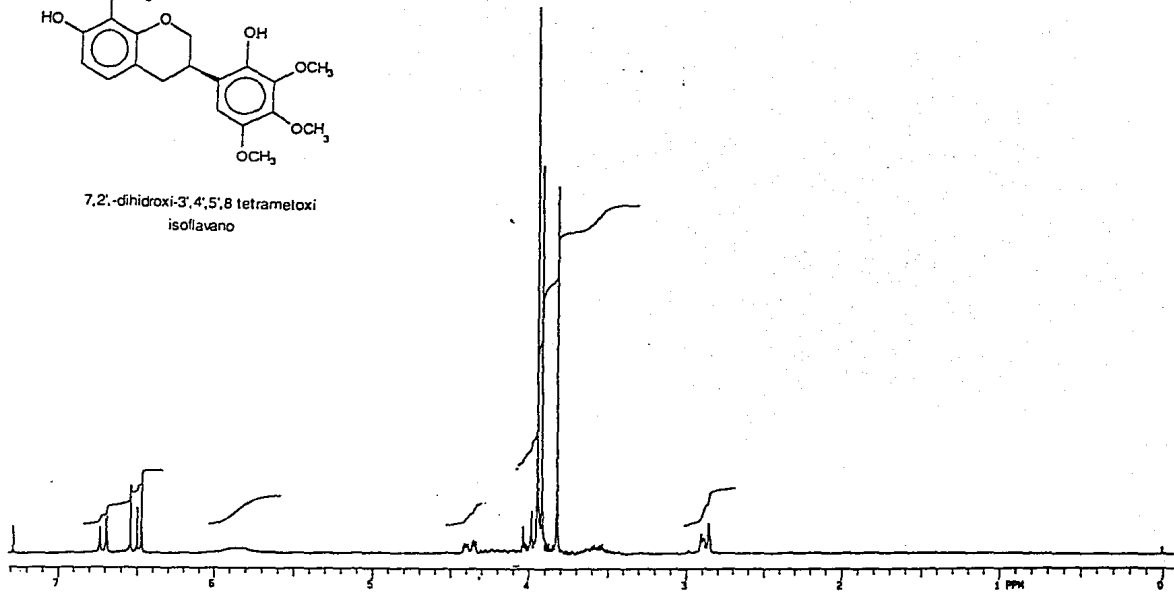
5',7-dihidroxi-2',3',4',8-tetrametoxi-isoflavano



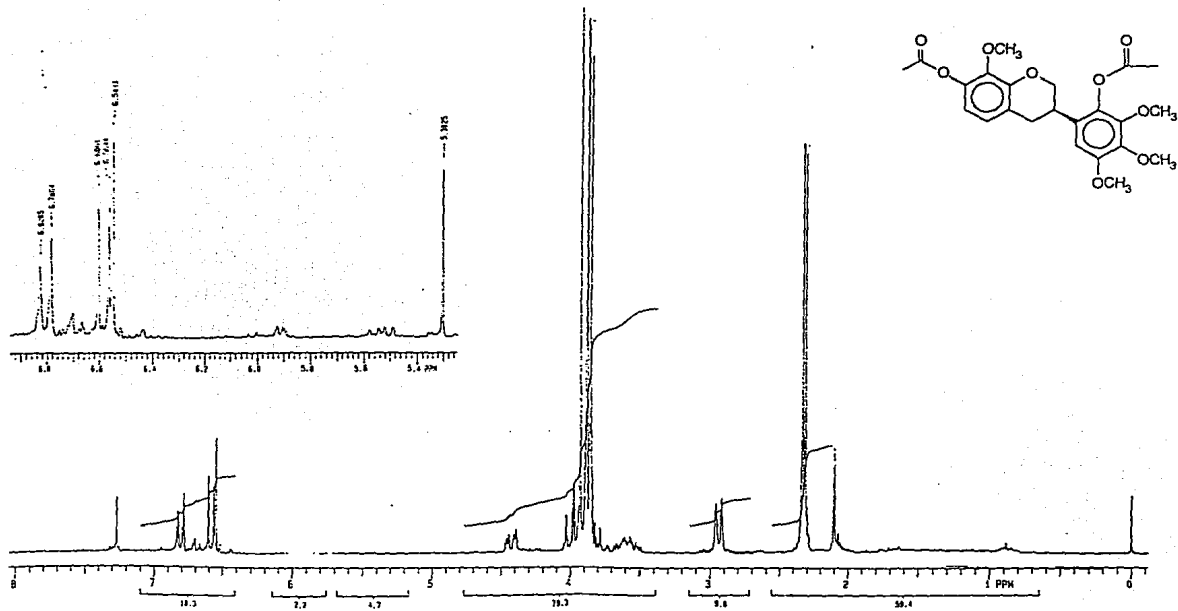
Espectro 5. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃), NOEDiff de 7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxi-isoflavano



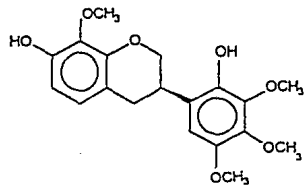
7,2'-dihidroxi-3',4',5',8 tetrametoxi
isoflavano



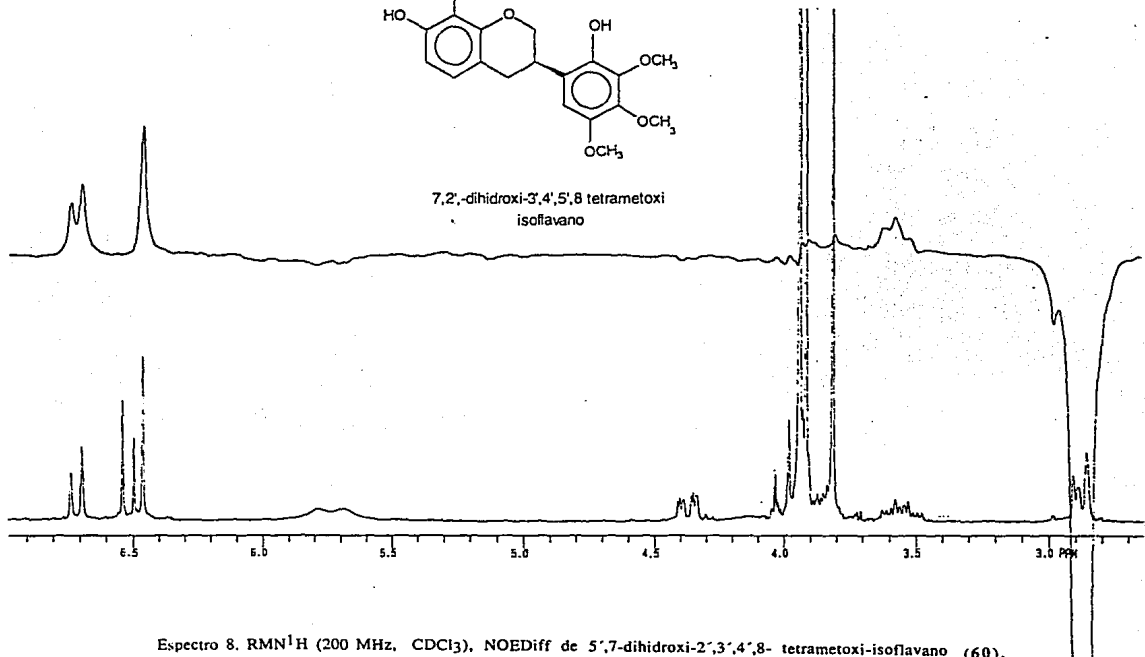
Espectro 6. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) de 5',7-dihidroxi-2',3',4'-tetrametoxi-isoflavano (60).



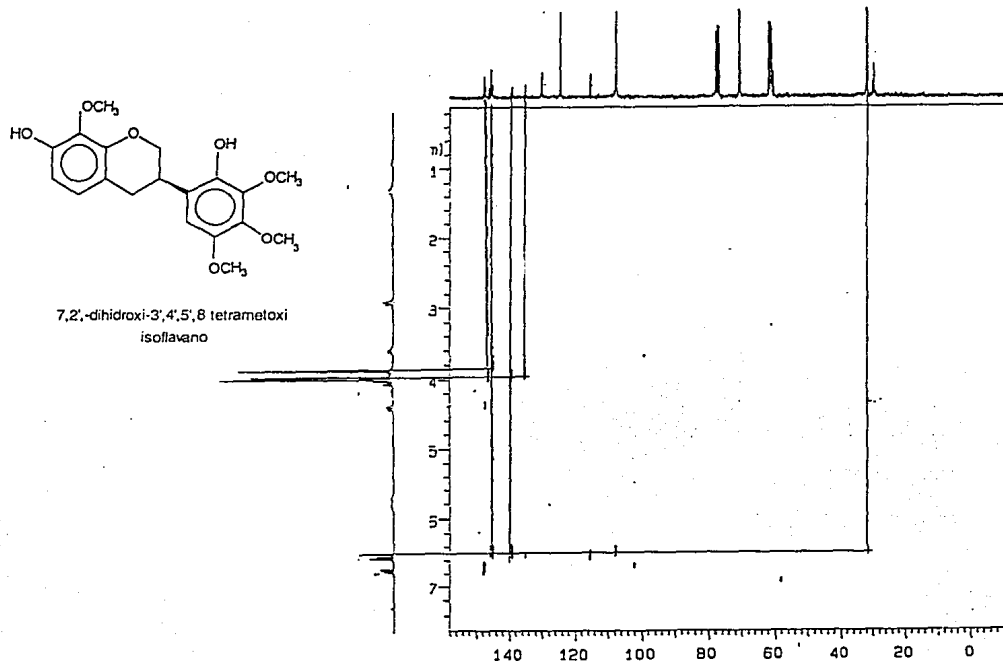
Espectro 7. RMN^1H (200 MHz, CDCl_3) de 5',7-diacetoxi-2',3',4'-tetrametoxi-isoflavano (60a).



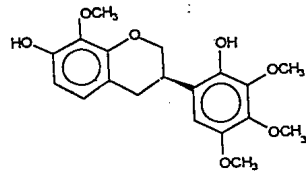
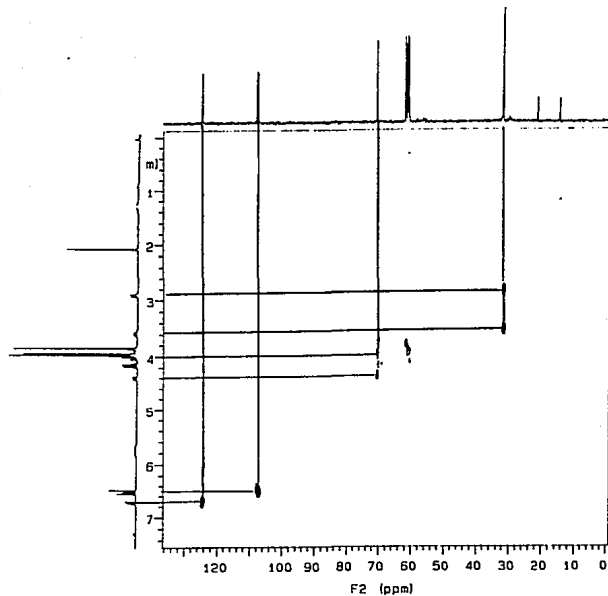
7,2'-dihidroxi-3',4',5',8 tetrametoxi
isoflavano



Espectro 8. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃), NOEDiff de 5',7-dihidroxi-2',3',4',8- tetrametoxi-isoflavano (60).

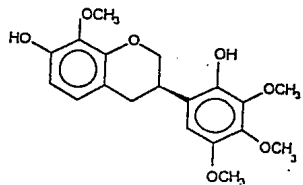


Espectro 9. RMN ^1H - ^{13}C COLOC (300 MHz, CDCl_3) de 5',7'-dihidroxi-2',3',4',8-tetrametoxi-isoflavano (60).

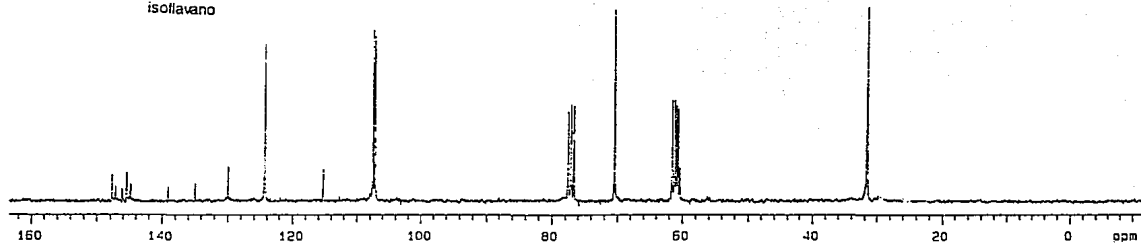


7,2'-di-hidroxi-3',4',5',8 tetrametoxi isoflavano

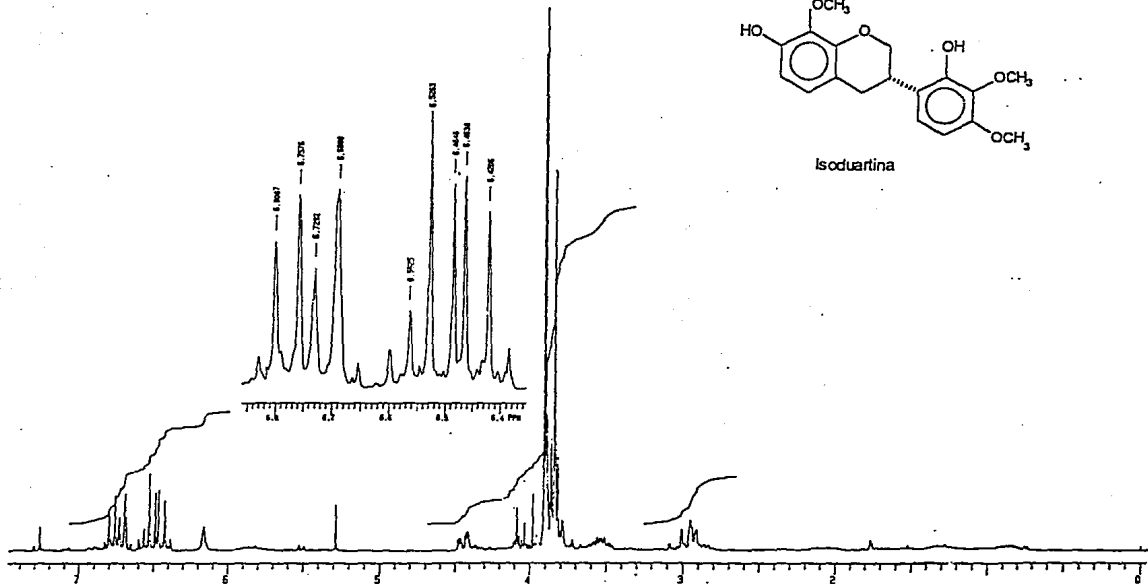
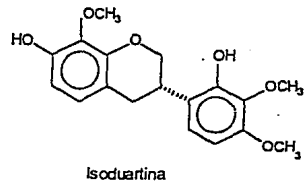
Espectro 10. RMN¹H-¹³C HETCOR (300 MHz, CDCl₃) de 5',7-dihidroxi-2',3',4',8-tetrametoxi- isoflavano (60).



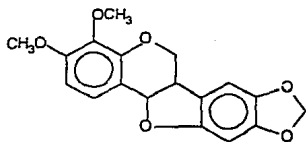
7,2'-dihidroxi-3',4',5',8 tetrametoxi
isoflavano



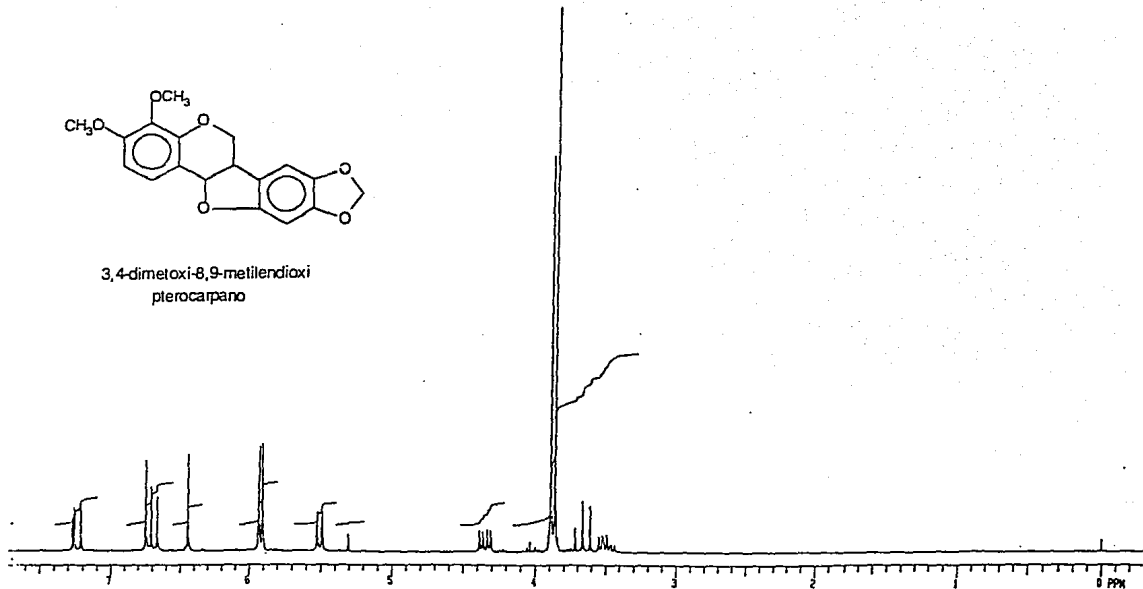
Espetro 11. RMN¹³C (75 MHz. CDCl₃) de 5',7-dihidroxi-2',3',4'-tetrametoxi-isoflavano (60).



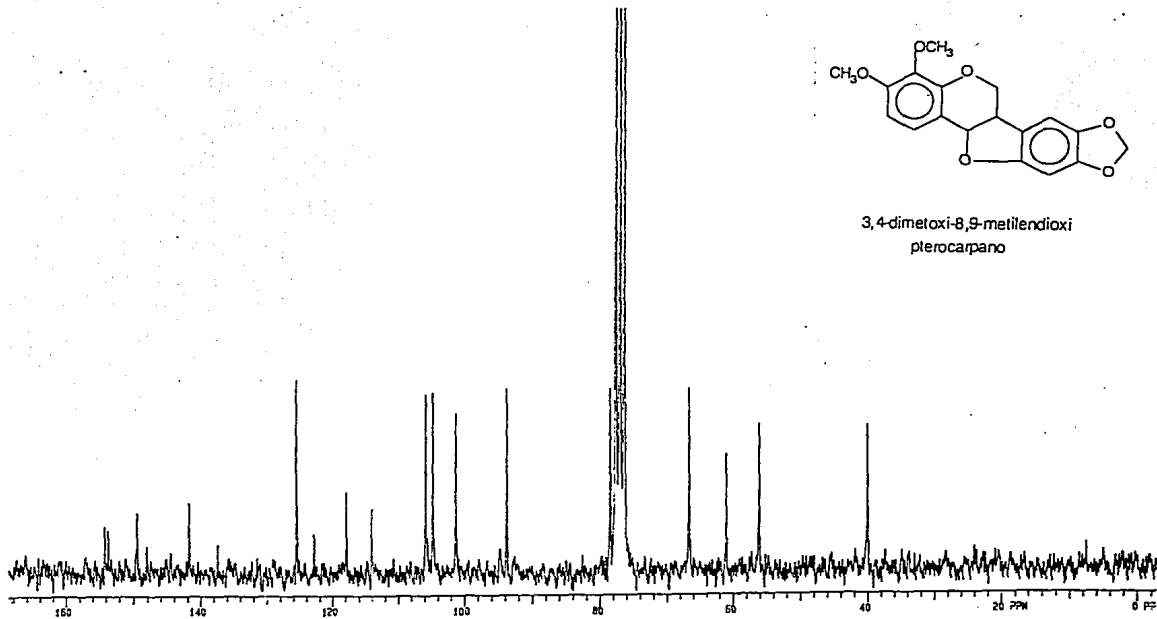
Espectro 12. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) de isoduartina (45).



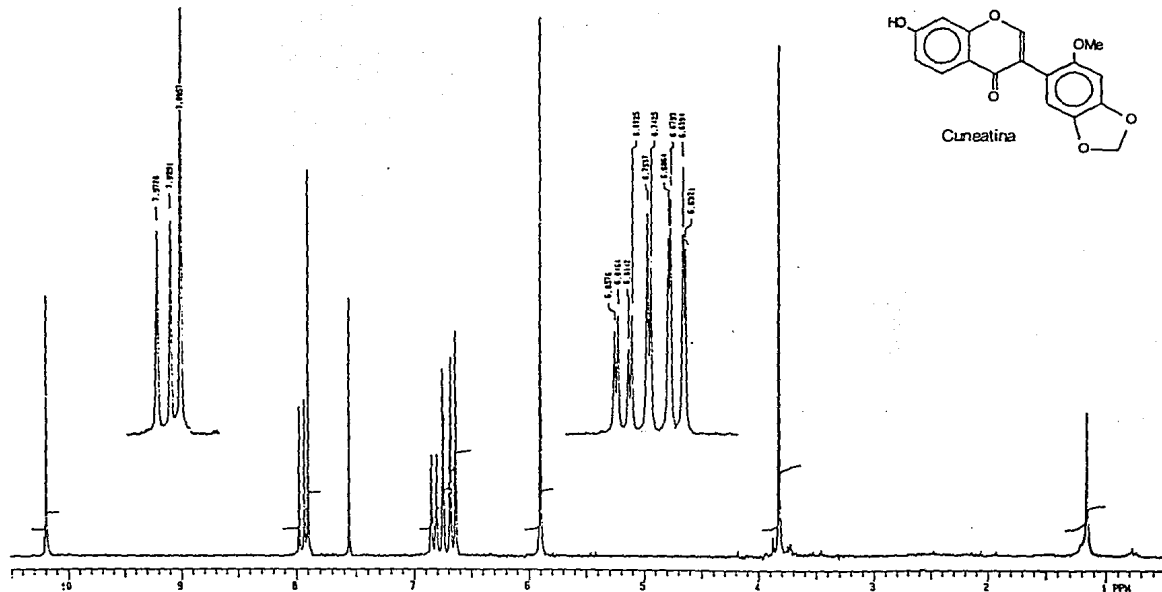
3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxi
plero-carpano



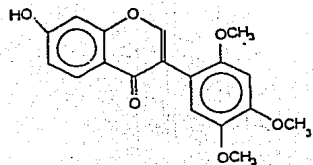
Espectro 13. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) de 3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxiplero-carpano (54).



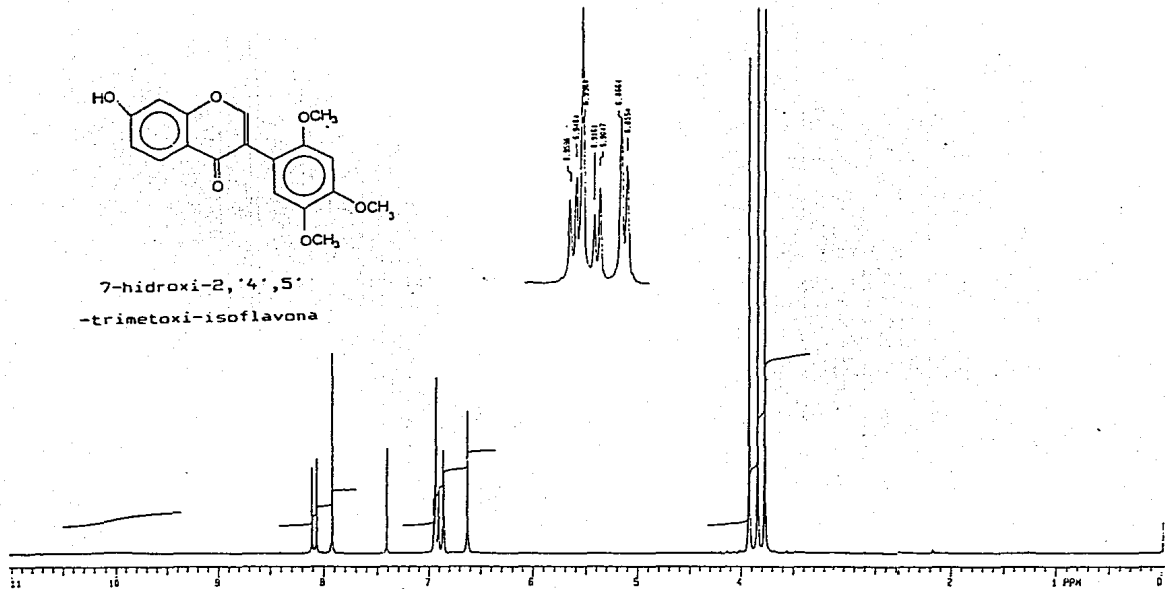
Espectro 14. RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) de 3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxiptero-carpano (54).



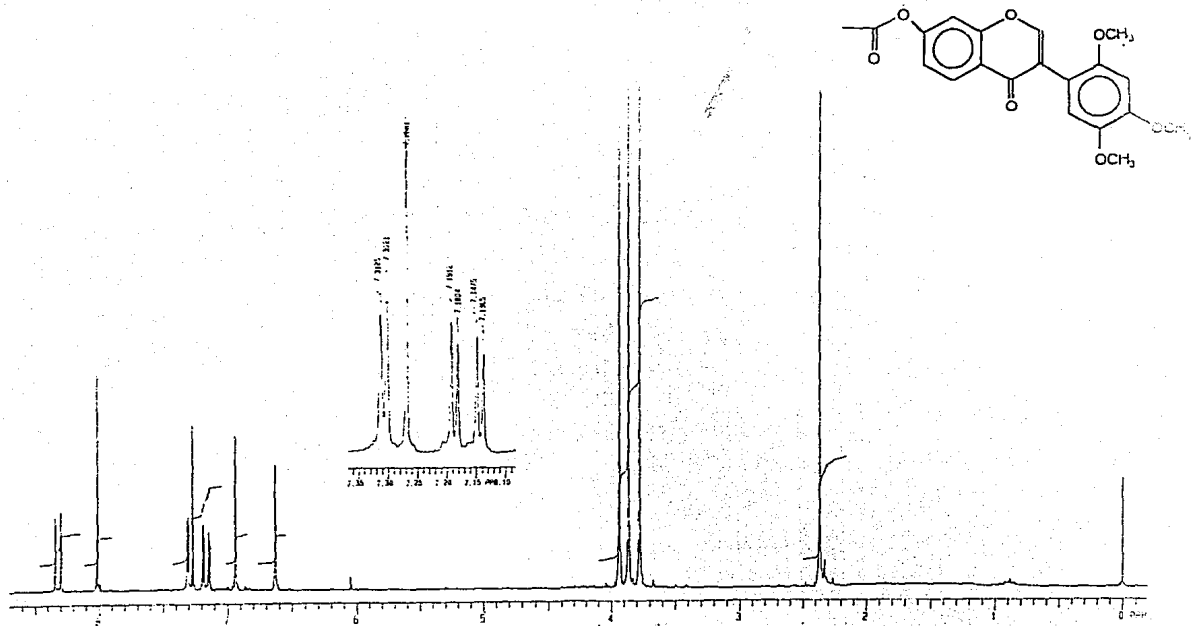
Espectro 15. RMN^1H (200 MHz, CDCl_3 +DMSO), de Cuneatina (61)



7-hidroxi-2',4',5'
-trimetoxi-isoflavona



Espectro 16. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃ + DMSO) de 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxi-isoflavona (52).



Espectro 17. RMN^1H (200 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$), NOEDIFF de 7-Acetoxy-2',4',5'-trimetoxy-isoflavuna (52a)

BIBLIOGRAFIA

1. Encyclopaedia Britannica 15a Ed., Vol 11, p.823 (1980)
2. Lozoya, X., Los Señores de las Plantas, Herbolaria y Medicina en Mesoamérica, Pangea Editores, México, 1990, p. 52-53.
3. Principe, P. in: "Economic and Medicinal Plant Research" (Wagner, H., Hikino, R. and Fransworth, N.) Vol 3, Academic Press, New York, 1985, p. 1-2
4. Lozoya, X., Lozoya, M., Flora Medicinal de México, Vol 1, IMSS, México, 1982, p.1.
5. Borman, S., Scientists Mobilize to Increase Supply of Anticancer Drug. *Taxol*. *Chem. and Eng. News.*, Sept 2, 1991, p.11
6. Martinez, M., Catálogo De Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Medicinales, Fondo de Cultura Económica, México, 1987, p. 684.
7. Heywood, V. H. in: "Chemotaxonomy of the Leguminosae" (Harborne, J., Boulter, D., Turner, B. L.), Academic Press, New York, 1971, p. 29.
8. Heywood, V. H. in: "Chemotaxonomy of the Leguminosae" (Harborne, J., Boulter, D., Turner, B. L.), Academic Press, New York, 1971, p. 14.
9. Harborne, J. B. in: "Chemotaxonomy of the Leguminosae" (Harborne, J., Boulter, D., Turner, B. L.), Academic Press, New York, 1971, p. 52.
10. Dewick, P. in: "Flavonoids Advances in Research" (Harborne, J. B.), Chapman and Hall, New York, 1978, p.620
11. Wong, E. in: "The Flavonoids" (Harborne, J., Mabry, T.J.), Chapman and Hall, New York, 1975, p. 743
12. Dewick, P. in: "Flavonoids Advances in Research Science 1980" (Harborne, J. B.), Chapman and Hall, New York, 1988, p.190
13. Markham, K., Techniques Flavonoid Identification, Academic Press, London, G.B., 1982, p. 2.
14. Kurosawa, K., Ollis, W. D., Redman, B.T. and Sutherland, O.I., The Natural Occurrence of Isoflavans and Isoflavaquinone, *Chem. Commun.* 1263, 1968.
15. Inham, J.L., Isoflavan Phytoalexins from *Anthyllis*, *Lotus* and *Tetraglobus*, *Phytochemistry* **16**, 1279 (1977).
16. Bonde, M., Miller, R., Ingham, J.L. Induction and Identification of Sativan and Vestititol as Two Phytoalexins from *Lotus corniculatus*, *Phytochemistry* **12**, 1157 (1973).
17. Ingham, J.L., Isoflavanoid Phytoalexins of genus *Medicago*, *Z.Naturforsch* **34c**, 630 (1979).
18. Matos, A., Gottlieb, O.R. and Souza, C.R., Flavonoids from *Dalbergia ecastophyllum*, *Phytochemistry* **14**, 825 (1975).

19. Ingham, J.L. and Dewick, P.M., Isoflavonoids Phytoalexins from Leaves of *Trifolium arvense*, *Z. Naturforsch* **32c**, 446 (1977).
20. Pelter, A., Amenachi, P.I., Isoflavonoid and Pterocarpinoid Extractives of *Lonchocarpus laxiflorus*, *J.Chem. Soc. (C)*, 887 (1969).
21. Ingham J.L. An Isoflavan Phytoalexin from Leaves of *Glycyrrhiza glabra*, *Phytochemistry* **14**, 825 (1975).
22. Dewick, P., in: "The Flavonoids Advances in Research, Science 1980" (Harborne, J.B.), Chapman and Hall, New York, 1988, p.192.
23. Ingham, J.L. and Dewick, P. A New Isoflavan Phytoalexin from leaflets of *Lotus hispidus*, *Phytochemistry* **118**, 1711 (1979).
24. Ferrera, M., Thomson, R., Margarida, A , New Pterocarpenes from *Bryaebenus*, *J. Chem. Soc. Perkin I* 1113 (1975).
25. Dervilla, M.X., Keenan, P.J. and Prendergast, J.P., Isoflavonoid of *Dalbergia ecastophyllum*, *Phytochemistry* **12**, 1157 (1973).
27. Brink, A.J., Phenolic *Neurautaneia* Isoflavonoids, *Tetrahedron*, **30**, 311(1974).
28. Saitoh, T., Kinoshita, T and Shibata, S., New Isoflavonoid and Flavanone from *Licorice* root, *Chem. Pharm. Bull.* **24** 752 (1976).
29. Kattaev N.S. and Nikonov G.K, Flavonoids of *Thermopsis alterniflora*, *Khim. Prir. Soedin*, 140 (1983). Chem Abs. 100, 4754 (1984).
30. Van Heerden, F., Structure and Synthesis of Some Complex Pyranoisoflavonoids from the bark of *Dalbergia nitidula*, *J. Chem., Soc., Perkin I*, 137 (1978).
31. Van Etten H.D. Identification of a Second Antifungal Isoflavan from Diseased *Phaseolus vulgaris* Tissue, *Phytochemistry* **12**, 1791 (1973).
32. Gottlieb, O.,Oliveira, A.B., Goncalves, T.M and Pereira, S.A., Isoflavonoids from *Cyclolobium* species, *Phytochemistry* **14**, 2495 (1975).
33. Bhakuny, D., Chaturvedi, R., Chemical Constituents of *Crotalaria madurensis*, *J. Nat. Prod.* **47**, 585 (1984).
34. Lu, G., Zhang, G, Shuhuaia,L, Isolation and Identification of Flavone Constituents from Mongolian Mulkreich, *Zhongcayao* **15**, 452(1984). Chem Abs., 102, 50760 (1985)
35. Ingham J., Dewick, P., Isolation of a New Isoflavan Phytoalexin from Two *Lotus* species, *Phytochemistry* **19**, 2799 (1980).
36. Imamura, H., Shinpuku, H., Inove, H. and Ohashi, H., A Benzoquinone and Two Isoflavans from the heartwood of *Machaerium sp.*, *Mokuzai gakkishi* **28**, 174 (1982).

37. Goda, Y., Sankawa, V., Shibuyi, Y., Inhibitors of Prostaglandin Biosynthesis from *Dalbergia odorifera*, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5606, (1985).
38. Lam, T. Y., Sandrino-Meinz, H., Hung, R. D., Busch, T. and Mellin, D., 5-O-Methyllicoricidin a New and Potent Benzodiazepine Binding Stimulator from *Glycyrrhiza viralanesis*, *Planta Medica* **58**, 220 (1992).
39. Mitscher, L. A., Clark, D. and Beal, J., Antimicrobial Agents from Higher Plants, *J. Nat. Prod.* **43**, 259 (1980).
40. Rzedowski, J., Vegetación de México, Edit. Limusa, México 1978, p. 202.
41. Martínez, M., Las Plantas Medicinales de México, 4^a ed., Edit. Botas, México, 1959, p. 469,470.
42. Hernández, F., Historia Natural de la Nueva España, Obras Completas de F. Hernández, Vol II, UNAM, México, 1959, p.173, 212.
43. Enciclopedia de México, Vol 10 p.p 206, 207, (1976).
44. Díaz, J. L., Usos de las Plantas Medicinales de México, Monografías Científicas, vol II, IMEPLAM, México, 1976.
45. Comunicación personal con los Prof. Clara Ramos y Esteban Martínez, Centro de Ecología, UNAM (1993).
46. Burns, D. T., Delgrano, B., Gargan, P. and Grinshaw, J., An Isoflavone and Coumestan from *Eysenhardtia polystachya*-Robert Boyle's Fluorescent Acid-Base Indicator, *Phytochemistry*, **23**,167, (1984).
47. Altschul, V. R., Drugs and Food from Little Known Plants, Harvard University, USA, 1973, p 119.
48. Dominguez, X. A., Franco, R., Diaz Viveros, Y., Mexican Medicinal Plants XXXIV. Rotenoids and a Fluorescent Compound From *Eysenhardtia polystachya*, *Rev. Latinoam. de Quím.*, **9**, 209, (1978).
49. Beltrami, E., Bernari, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vilaridi, G. and Vitafinzi, P., Coatline A and B. Two C-Glucosyl hydroxydehydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*, *Phytochemistry*, **21**, 2931, (1982).
50. Gómez, F., Quijano, L., Calderón, J., Rodríguez, C. and Ríos, T., Prenylflavans from *Tephrosia wastiona*, *Phytochemistry* **24**, 1057 (1985).
51. Gunther, P. NMR Spectroscopy, Ed. J. Wiley and sons, E.U.A., 1973, p. 116.
52. Hakim, A. and Dewick, P. M., Biosynthesis of the Isoflavan Isomucronulatol Origin of the 2',3',4'-oxigenation pattern, *Phytochemistry* **24**, 5561 (1987).
53. Kurosawa, K., Ollis, D.W, Sutherland, I., Gottlieb O.R. and Oliveira, A.B., Absolute Configuration of Isoflavans, *Phytochemistry* **17**, 1423 (1978).

54. Chalmers, A., Rall, C., Oberhalzer, M., ^{13}C NMR of Pterocarpan, *Phytochemistry* **33**, 1735(1977).
55. Fang, N., Leidig, M. and Mabry, T., Fiftyone Flavonoids from *Gutierrezia microcephalea*, *Phytochemistry* **25**, 927 (1986).
56. Ingham, J., Isolation and Identification of *Cicer* isoflavonoids, *Biochem. System. and Ecol.* **9**, 125 (1981)
57. Hays, R.M., en "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" (Goodman Gilman, A., Eds.), Edit. Médica Panamericana, 8ª Ed. México D.F., 1988, p. 722.
58. Weidenborner, M., Hindorf, H., Chandra J.H., Tsotsonos, P. and Egge, H., Antifungal activity of isoflavonoids in different reduced stages on *Rhizoctonia solani*, *Phytochemistry* **29**, 801 (1990).
59. Hileman, B., Environmental Estrogens Linked to Reproductive Abnormalities, Cancer, *Chem. and Eng. News.*, Jan 31, 1994, p.19.

ESTA TESIS NO PUE
SALIR DE LA BIBLIOTECA