



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

"Estudio quimiotaxonómico del género  
*Lonchocarpus* y actividad biológica de sus  
metabolitos aislados"

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

DAGOBERTO ERASMO ALAVEZ SOLANO

TUTOR: DR. RICARDO REYES CHILPA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE DE 2010.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la codirección del Dr. Ricardo Reyes Chilpa en la parte química y el M. en C. Mario Sousa Sánchez en la parte botánica, de los Institutos de Química y de Biología de la UNAM, respectivamente, con el apoyo económico del CONACYT.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi gran reconocimiento a la Facultad de Ciencias de la UNAM, a su personal docente por su compromiso para cumplir con su misión que es formar profesionistas bien preparados y con la gran convicción por ser el motor del desarrollo del país como parte integrante de la comunidad científica, así mismo al personal administrativo por su gran disposición para que esta institución cumpla con sus objetivos.

Al programa de becas del CONACYT por el apoyo que se me otorgó como estudiante del programa de posgrado, a través de la secretaría de becas y servicio social de la Facultad de Ciencias de la UNAM. (Becario 115181/115960).

Mis agradecimientos a mis tutores quienes de diferentes maneras permitieron el desarrollo del presente trabajo. Al Doctor Ricardo Reyes Chilpa, quien ha sido mi guía y maestro, pero no solo eso, sino un gran compañero y amigo, de quien debo gran parte del conocimiento adquirido y la inspiración por la investigación de la química de las plantas. Al M. en C. Mario Sousa Sánchez por sus aportaciones al presente trabajo, por su desempeño en que este trabajo tuviera un buen final, por sus sugerencias, su afán de continuar en la búsqueda de la filogenia de las leguminosas. Al Doctor Manuel Jiménez Estrada, por sus atenciones en el desarrollo del trabajo de laboratorio y sus sabios consejos, por su preocupación por quienes deseamos seguir aprendiendo.

A los integrantes del honorable jurado, las doctoras Ana Luisa Anaya y Guillermina Murguía, así como a los doctores José Luis Godínez, Guillermo Avila, Doctor Manuel Jiménez Estrada y Mario Sousa Sánchez, quienes amablemente me hicieron observaciones al trabajo.

Al Instituto de Química donde realice éste trabajo, mis agradecimientos por las atenciones recibidas por parte de sus investigadores y por la responsabilidad de sus autoridades y personal administrativo en el desempeño de su trabajo. Especiales

agradecimientos al Dr. Tirso Ríos Castillo a quien debo su especial afecto, al Dr. Alfredo Ortega a quien agradezco sus consejos.

Al personal del Instituto de Biología, especialmente a los investigadores del herbario por su continua disposición para apoyar a quienes estamos dedicados a la investigación de las plantas. Sin su apoyo es difícil trabajar.

A la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, mi universidad de la que me siento orgulloso, a la que debo mi formación como químico agrónomo y el lugar donde actualmente me desempeño profesionalmente. Especialmente a los directivos de la Escuela de Ciencias por su apoyo para que pudiera llevar a cabo este trabajo, a quienes de alguna manera me apoyaron, entre ellos el Maestro Manuel López Mateos, Dr. Nicolas Atenco Analco, M. en C. Dante Arias Torres, M. en C. Jorge Cruz Pérez, M. en C. Mario Peralta Pérez.

A mis compañeros de la maestría y amigos que de alguna manera han contribuido con los esfuerzos en el desempeño de este trabajo. Al Dr. Saúl, Vásquez Rasgado y al M. en C. Felix Merlin por su apoyo en las colectas. Al Dr. Leonardo León Enríquez por su apoyo en el uso del programa de cladística y mi gran amigo Gerardo Cruz Pérez..

A mis compañeros del laboratorio 2.5 y 2.10 del Instituto de Química de la UNAM, a quienes debo gratos recuerdos y agradable compañía.

A mis alumnos y compañeros de la Escuela de Ciencias de la UABJO, ya que de alguna u otra manera me han impulsado a alcanzar los objetivos que me he planteado, especialmente a Carlos Ilich, Mara Luisa y Rocío, a quienes debo mucho sus consejos y la satisfacción de ser parte de un equipo de trabajo que considero será en beneficio de objetivos comunes y que permitirá conocer mucho de lo que Oaxaca nos puede dar.

Dedico a una gran señora, a quien debo la vida y es la mayor fuente de inspiración para alcanzar las metas que me he propuesto en esta vida

Mi madre

Quien fue capaz de guiar como padre y madre el destino de quienes orgullosamente llama sus hijos, para hacerlos profesionistas.

Gracias mamita por tu tesón y fuerza de voluntad, considero que es la mejor herencia no has dejado

A mis dos amores, a quien debo gran parte de la inspiración para concluir este trabajo

A Esther

A Daguito

*A ellos por lo mucho que merecen y ser tan poco lo que puedo darles*

## INDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCION</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1 El género <i>Lonchocarpus</i>	4
2.1.1. Taxonomía	6
2.1.2. Botánica del género <i>Lonchocarpus</i> .	7
2.1.3. Composición química del género <i>Lonchocarpus</i>	8
2.2. Actividad biológica de los flavonoides	10
2.2.1 Actividad citotóxica	11
2.2.2. Actividad antitumoral	12
2.2.3. Actividad antifúngica	13
2.3.- Quimiotaxonomía	15
2.3.1. Métodos de análisis quimiotaxonómico	17
2.3.2. Análisis de presencia o ausencia.	17
2.3.3. Análisis cuantitativo	18
2.3.4 Análisis de la ruta biosintética	19
2.4. Utilidad de los metabolitos secundarios de Leguminosas como marcadores sistemáticos	20
2.5. Estudios quimiotaxonómicos del género <i>Lonchocarpus</i>	22
<b>3. OBJETIVOS</b>	24
3.1. Objetivo general	24
3.1.1. Objetivos específicos	24
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	25
4.1.- Estudio químico	25
4.1.1. <i>Lonchocarpus obovatus</i> Benth.	26
4.1.1.1. Antecedentes.	26
4.1.1.2. Material vegetal.	26
4.1.1.3. Aislamiento de metabolitos.	27
4.1.2. <i>Lonchocarpus oaxacensis</i> Pittier.	29
4.1.2.1. Antecedentes.	29
4.1.2.2. Material vegetal.	29
4.1.2.3. Aislamiento de metabolitos.	30
4.1.3. <i>Lonchocarpus mutans</i> . M. Sousa.	33
4.1.3.1. Antecedentes.	33
4.1.3.2. Material vegetal.	34
4.1.3.3. Determinación de composición química por comparación de extractos.	34
4.1.4. <i>Lonchocarpus septentrionalis</i> M. Sousa	35
4.1.4.1. Antecedentes.	35
4.1.4.2. Material vegetal.	35
4.1.4.3. Aislamiento de metabolitos.	35
4.1.5. <i>Lonchocarpus guatemalensis</i> Benth. var. <i>mexicanus</i>	

## Continuación **INDICE GENERAL**

(Pittier) Hermann	
4.1.5.1. Antecedentes.	37
4.1.5.2. Material vegetal.	37
4.1.5.3. Aislamiento de metabolitos.	37
4.2. Análisis quimiotaxonómico.	38
4.2.1.- Análisis de ruta biogenética	38
4.2.2.- Valores de Oxidación/Metilación	39
4.3. Estudios de actividad biológica	40
4.3.1. Ensayos de actividad citotóxica	40
4.3.2. Ensayos de actividad antifúngica.	40
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
5.1. Análisis químico de las especies seleccionadas	42
5.1.1. <i>Lonchocarpus obovatus</i>	44
5.1.2. <i>Lonchocarpus oaxacensis</i>	47
5.1.3. <i>Lonchocarpus mutans</i>	53
5.1.4. <i>Lonchocarpus septentrionalis</i>	54
5.1.5. <i>L. guatemalensis</i> var. <i>mexicanus</i>	57
5.2 Actividad biológica de los metabolitos aislados	58
5.2.1. Actividad fungistática	58
5.2.2 Actividad citotóxica de los metabolitos aislados de <i>Lonchocarpus</i>	59
5.3. Caracterización química de los grupos infragenéricos de <i>Lonchocarpus</i>	60
5.3.1. Subgénero <i>Densiflorus</i> .	60
5.3.1.1. Sección <i>Densiflori</i> .	61
5.3.1.2. Sección <i>Obtusifolii</i>	62
5.3.1.3. Sección <i>Muehlbergiani</i> , ined.	64
5.3.1.4. Sección <i>Eriophylli</i>	66
5.3.2.-. Subgénero <i>Lonchocarpus</i>	67
5.3.2.1.-. Sección <i>Punctati</i> .	67
5.3.2.2. Sección <i>Standleyi</i>	68
5.3.2.3. Sección <i>Lonchocarpus</i> .	70
5.4. Análisis quimiotaxonómico con base en la ruta biogenética	72
5.4.1. Subgénero <i>Densiflorus</i> , ined.	73
5.4.2. Subgénero <i>Lonchocarpus</i>	76
5.5.- Análisis taxonómico con base en los valores de oxidación /metilación.	78
5.6.- Análisis taxonómico con base presencia ausencia de determinado metabolito.	83
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>86</b>
6.1. Análisis taxonómico a partir de los valores de oxidación/metilación.	91
6.1.1. Género <i>Lonchocarpus</i> .	91
6.1.1.1. Subgénero <i>Densiflorus</i>	91



## Continuación **INDICE GENERAL**

6.1.1.2. Subgénero <i>Lonchocarpus</i>	92
6.4. Actividad biológica	94
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>99</b>

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 2.1. Propuesta de clasificación de las especies del género <i>Lonchocarpus</i> realizada por Bentham en 1860 (secciones/series).	5
Tabla 2.2. Propuesta de clasificación de las especies americanas del género <i>Lonchocarpus</i> realizada por Pittier en 1917.	5
Tabla 2.3.- Propuesta taxonómica de los grupos infragenéricos en el género <i>Lonchocarpus</i> . (Sousa, com. per.).	7
Tabla 4.1.- Características físicas de los metabolitos aislados de <i>L. oaxacensis</i> .	34
Tabla 4.2.- Valores de oxidación asignados a los sustituyentes de los flavonoides.	39
Tabla 4.3.- Valores de metilación asignados a los sustituyentes de los flavonoides	39
Tabla 5.1 Flavonoides aislados de <i>Lonchocarpus spp.</i>	42
Tabla 5.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Postia placenta</i> por los metabolitos secundarios aislados de las especies de <i>Lonchocarpus</i> ..	58
Tabla 5.3. Ensayo de citotoxicidad con sulforrodamida B con lectura a 515 nm. (% de inhibición del crecimiento).	59
Tabla 5.4. Flavonoides descritos de las especies de la sección <i>Densiflori</i> .	61
Tabla 5.5. Flavonoides descritos de las especies de la sección <i>Obtusifolii</i>	67
Tabla 5.6. Flavonoides descritos de las especies de la sección <i>Muehlbergiani, ined.</i>	65
Tabla 5.7. Flavonoides aislados de <i>L. obovatus</i> , sección <i>Eriophylli</i>	66
Tabla 5.8. Especies estudiadas de la sección <i>Punctati</i> .	67
Tabla 5.9. Especies agrupadas en la sección <i>Standleyi</i> y metabolitos aislados.	69
Tabla 5.10. Especies agrupadas en la sección <i>Lonchocarpus</i> y los metabolitos aislados	71
Tabla 5.11. Arreglo taxonómico del género <i>Densiflorus</i>	72
Tabla 5.12. Arreglo taxonómico de las especies analizadas por el método O/M	
Tabla 4.13. Arreglo de los grupos infragenéricos del subgénero <i>Densiflori</i> , de acuerdo con el análisis de caracteres morfológicos	84
Tabla 5.14. Valores promedio de oxidación y metilación de los flavonoides aislados de las especies del subgénero <i>Densiflori</i> (en orden creciente de valores de oxidación)..	84

## Continuación INDICE DE TABLAS

Tabla 5.15. Arreglo de los grupos infragenéricos del subgénero <i>Lonchocarpus</i> , de acuerdo con el análisis de caracteres morfológicos	81
Tabla 5.16. Valores de oxidación-metilación de los compuestos obtenidos de semillas y como fitoalexinas de especies del género <i>Lonchocarpus</i>	81
Tabla 5.17. Valores de oxidación-metilación de los compuestos obtenidos de semillas y como fitoalexinas de especies del género <i>Lonchocarpus</i>	83
Tabla 5.18. Metabolitos aislados de las especies de la sección <i>Standleyi</i>	84
Tabla 5.19. Matriz de datos considerando a los flavonoides como caracteres de las especies agrupadas en la sección <i>Standleyi</i> .	85

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 2.1. Ruta biogénica de los flavonoides en las Leguminosas (Gottlieb, 1980)	23
Fig. 5.1. Experimento de HMBC y NOESY de la inirebina B (II).	45
Fig. 5.2. Auronoles de <i>L. obovatus</i> y transformación química de I a II	46
Fig. 5.3. Flavonoides aislados de <i>L. oaxacensis</i> .	47
Fig. 5.4. Ión de m/z 217, observado en los espectros de masas de los compuestos aislados de la sección <i>Standleyi</i>	48
Fig. 5.5. Comparación por CCF de los extractos de <i>L. mutans</i> y <i>L. oaxacensis</i>	53
Fig. 5.6. Compuestos aislados de <i>Lonchocarpus septentrionalis</i>	55
Fig. 5.7. Isolonchocarpina, chalcona aislada de <i>L. guatemalensis</i> Benth Var. <i>mexicanus</i> (Pittier) Hermann.	58
Fig. 5.8. Flavonoides reportados de las especies de la sección <i>Densiflori</i> .	62
Fig. 5.9. Estructura de los compuestos aislados de las especies de la sección <i>Obtusifolii</i> .	64
Fig. 5.10. Flavonoides reportados de las especies de la Sección <i>Muehlbergiani</i> .	65
Fig. 5.11. Flavonoides de las especies de la Sección <i>Eriophylli</i>	66
Fig. 5.12. Compuestos reportados de las especies de la Sección <i>Punctati</i>	68
Fig. 5.13. Flavonoides reportados de las especies de la sección <i>Standleyi</i>	70
Fig. 5.14. Flavonoides reportados de las especies de la sección <i>Lonchocarpus</i>	72
Fig. 5.15. Cladograma obtenido por consenso en bootstrap con 500 posibilidades, considerando a los flavonoides aislados de las diferentes especies de la sección <i>Standleyi</i> como caracteres presentes o ausentes.	85

## INDICE DE CUADROS

- Cuadro 5.1. Resumen de flavonoides descritos para las especies del subgénero *Densiflorus*. 75  
77
- Cuadro 5.2. Resumen de flavonoides descritos para las especies del subgénero *Lonchocarpus*.

## INDICE DE GRAFICAS

- Gráfica. 4.1. Valores de Oxidación/Metilación observados para las especies agrupadas en la subgénero *Densiflorus*, M. Sousa *ined*. 80
- Gráfica. 4.2. Valores de Oxidación/Metilación observados por las especies agrupadas en el subgénero *Lonchocarpus* 82

## RESUMEN.

El género *Lonchocarpus sensu lato* (tribu Millettieae, Fabaceae) comprende alrededor de 180 especies distribuidas en el continente americano, presenta una gran variabilidad, por lo cual se ha subdividido en subgéneros, estos a su vez en secciones. En este trabajo se analizaron químicamente las raíces de cinco especies con el fin de caracterizar la estructura molecular de sus flavonoides. Dichos compuestos, así como los descritos para otras especies en la literatura, se consideraron como caracteres taxonómicos con el fin de analizar y aclarar la filogenia entre tales especies. De *L. obovatus* se aislaron dos nuevos flavonoides con estructura de auronoles denominados Inirebina A y B. De *L. oaxacensis* se aislaron dos 3-hidroxiflavanonas, una de ellas nueva nombrada Jayacanol y Mundulinol; y dos flavanonas, la mundulina y minimiflorina. De *L. septentrionalis* se aislaron la isocordoina, metil derricidina y la cordoina, las tres con estructura de flavanonas. De *L. guatemalensis* var. *mexicanus* se aisló la chalcona lonchocarpina. Los flavonoides de *L. mutans* se identificaron por comparación por cromatografía en capa fina con los flavonoides aislados de *L. oaxacensis*. Los resultados del análisis de agrupación mostraron que los flavonoides permiten establecer las relaciones de parentesco entre las especies ubicadas en un mismo nivel infragenérico. De esta forma el subgénero *Densiflorus* se caracteriza por sintetizar principalmente auronoles; mientras que el subgénero *Lonchocarpus* produce flavanonas y 3-hidroxiflavanonas. Así mismo, considerando las propiedades de los flavonoides en la prevención del cáncer, se analizó la actividad citotóxica de los flavonoides aislados en cuatro líneas celulares tumorales humanas laringe (Hep2), cervix (HELA), sistema nervioso central (U251), próstata (PC-3). Solo la minimiflorina presentó alta actividad citotóxica sobre las 4 líneas. El jayacanol A, además, mostró actividad fungistática contra el hongo de pudrición de la madera *Postia placenta*.

## ABSTRACT.

The genus *Lonchocarpus sensu lato* (Fabaceae, Millettieae) includes about 180 species distributed in the American Continent. Due to the great morphological variability of these species, the genus has been subdivided into subgenus, and sections. In this thesis, the roots of five species were chemically analyzed characterizing the molecular structure of the isolated flavonoids. These compounds, as well as those reported for species of the genus, were used as taxonomical characters in order to clarify the phylogenetic relationships among these species. From *L. obovatus*, two new flavonoids with auronol structure were isolated and named as: Inirebin A and B. *Lonchocarpus oaxacensis* afforded two 3-hydroxy flavanones, one new named as Jayacanol, and Mundulinol, and two flavanones, mundulin and minimiflorin. In the case of *L. septentrionalis* three flavanones were isolated: isocordoin, methyl-derricidin and cordoin. A chalcone, lonchocarpin was isolated from *L. guatemalensis* var. *mexicanus*. The flavonoids of *L. mutans* were identified by thin layer chromatography and compared with flavonoids isolated from *L. oaxacensis*. The cluster analysis showed that flavonoids can be useful to establish phylogenetic relationships among species grouped in the same infrageneric level, for instance the subgenus *Densiflorus*, M. Sousa ined., is characterized by synthesizing auronols, while the subgenus *Lonchocarpus* produces flavanones and 3-hydroxyflavanones. Considering the properties of the flavonoids in cancer prevention, the cytotoxic activity of the isolated flavonoids were tested in four human cancer cell lines: larynx (Hep2), cervix (HELA), central nervous system (U251), prostate (PC-3). Only minimiflorine showed high cytotoxic activity on the 4 lines. Jayacanol A also showed fungistatic activity against the wood rot fungus *Postia placenta*.

## 1. INTRODUCCION

La utilización de *Lonchocarpus* data de épocas inmemoriales, ya que se trata de plantas que han sido importantes en las actividades económicas y rituales del hombre. Por ejemplo el “balché”, es una bebida ritual de los mayas, cuyo principal ingrediente es la corteza de *L. longistylus* (Delle Monache *et al.*, 1977). *Lonchocarpus utilis* (*Deguelia utilis* A.C. Sm) A.M.G. Azevedo (Azevedo-Tozzi, 1998) se ha utilizado tradicionalmente por las comunidades indígenas que habitan la selva Amazónica como veneno para pescar, para lo cual se arrojan las raíces maceradas al agua. La raíces de diversas especies de *Lonchocarpus* (*sensus lato*), se han empleado como polvos y soluciones insecticidas, principalmente para uso agrícola (Fukami y Nakajima, 1971). Otras especies de *Lonchocarpus*, han sido de gran utilidad para las comunidades indígenas para elaborar mangos para herramienta por la dureza de su madera (Alavez Solano *et al.*, 2000). La madera de *L. castilloi* Standl., llamado “machiche”, es considerada preciosa por su color y utilizada en ebanistería, para la fabricación de barcasas, esta madera es muy densa y resistente por lo cual también es utilizada para la fabricación de durmientes (Reyes Chilpa *et al.*, 1995).

A finales del siglo XIX, los géneros *Derris* y *Lonchocarpus* despertaron el interés de los investigadores por conocer la composición química de sus principios activos, especialmente por su importancia económica como insecticida agrícola (Fukami y Nakajima, 1971). Dewick (1988) menciona que Geoffroy en 1895, obtuvo de las raíces de *L. nicou*, (Aubl.) DC., proveniente de la Guayana Francesa, un compuesto al cual llamó “nicoulina”, la cual resultó ser tóxica contra insectos. De la misma manera cita a Nagai quien en 1902, obtuvo de las raíces de *Derris chinensis* Benth., un compuesto sólido cristalino, incoloro (p.f. = 162°) al cual nombró “rotenona”.

*Lonchocarpus* es un género que presenta una gran variabilidad morfológica, por lo que su investigación significa un gran reto para los botánicos. La literatura describe el estudio químico de cerca de 50 especies consideradas como *Lonchocarpus*; sin embargo, de acuerdo con una revisión taxonómica detallada del género que

actualmente realiza el M. C. Mario Sousa, sólo 22 de éstas corresponden a *Lonchocarpus (sensu stricto)* (cf. Cap. 2.1.1).

Entre los metabolitos secundarios que se han descrito para las diversas especies de *Lonchocarpus* se encuentran los flavonoides, un grupo de compuestos químicos naturales que tienen gran importancia para la salud humana. Estudios epidemiológicos realizados en poblaciones asiáticas, han demostrado que la dieta abundante en vegetales ricos en estos compuestos ayudan a prevenir la incidencia de cáncer (Wang *et al.*, 2000). La actividad biológica que poseen los flavonoides son de gran interés para la investigación farmacológica, entre otras como antihelmínticos (Beltrán *et al.*, 1946), antibióticos (Alcaraz *et al.*, 2000), antimutagénicos (Beudot *et al.*, 1998, Wall *et al.*, 1988), antivirales –VIH- (Meragelman *et al.*, 2000) y como insecticidas y fungicidas (Reyes-Chilpa *et al.*, 1995, Reyes-Chilpa *et al.*, 1998).

El análisis de los metabolitos secundarios es una herramienta de gran valor para la quimiotaxonomía, ya que proporciona evidencias de parentesco dentro de un grupo taxonómico determinado, lo cual es de gran utilidad para su clasificación. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se eligieron cinco especies distribuidas en la República Mexicana, las cuales están ubicadas taxonómicamente en tres secciones de los dos subgéneros en los que se divide el género *Lonchocarpus*, entre estas la sección *Eriophylli* del subgénero *Densiflori* y las secciones *Standleyi* y *Lonchocarpus* del subgénero *Lonchocarpus*. *L. obovatus*, *L. oaxacensis*, *L. mutans*, *L. septentrionalis* y *L. guatemalensis* var. *mexicanus*

De cinco especies, se colectaron las raíces y se prepararon sus extractos de hexano y diclorometano, los cuales se sometieron a cromatografía para aislar los flavonoides y caracterizar sus estructuras químicas. Posteriormente, se examinó la actividad biológica de los metabolitos aislados. Los bioensayos consistieron en determinar su actividad citotóxica en cuatro líneas celulares cancerígenas humanas, entre estas, carcinoma epidermoide de laringe (Hep2), carcinoma de cervix (HELA), carcinoma del sistema

nervioso central (U251), carcinoma de próstata (PC-3). También se determinó su actividad fungistática sobre *Postia placenta* un hongo de pudrición de la madera.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. El género *Lonchocarpus*

El género *Lonchocarpus* fue establecido por Kunth, en una revisión publicada en la obra *Nova Genera et Species Plantarum* de Humboldt, Bonpland y Kunth publicado en 1823. El nombre *Lonchocarpus* con el cual se asignó a este género, proviene de las raíces λογχη -lanza- y καρπος -frutos-, refiriéndose a la forma de la legumbre en forma de punta de lanza (Pittier, 1917).

Inicialmente De Candolle consideró que el género *Lonchocarpus* se caracterizaba por contar con un estilo glabro. Con este carácter se agruparon inicialmente diversas especies que se encontraban indistintamente en los continentes americano, africano y asiático. Sin embargo, en posteriores revisiones fueron considerados otros caracteres tales como legumbre indehiscente, foliolos sin estiperas, legumbre estipitada, estambres monadelfos con la base del tubo estaminal 2 fenestrada y la dehiscencia con margen fibroso, óvulos de 1 a 12, estilo glabro o escasamente pubescente y hojas alternas con foliolos opuestos (Pittier, 1917).

Tabla 2.1. Propuesta de clasificación de las especies del género *Lonchocarpus* realizada por Bentham en 1860 (secciones/series).

1. <i>Neuroscaphi</i>	3. <i>Eriophylli</i>
2. <i>Densiflori</i>	4. <i>Laxiflori</i>
<i>Macrophylli</i>	5. <i>Punctati</i>
<i>Acuminati</i>	6. <i>Paniculati</i>
<i>Obtusifolii</i>	7. <i>Faciculati</i>



Desde que el género *Lonchocarpus* fue establecido por Kunth en 1823, han sido pocos los intentos por establecer un orden infragenérico, para lo cual se han presentado diversas propuestas con base en el análisis morfológico de sus especies: La primera de ellas fue realizada por Bentham en 1860, quién organizó las 46 especies consideradas como *Lonchocarpus* hasta esa fecha en siete secciones. Cinco de tales grupos son de especies distribuidas en América (Tabla 2.1) y dos con distribución exclusiva en el continente africano, las secciones *Paniculate* y *Fasciculate*. La sección *Densiflori* la divide en tres series *Macrophylli*, *Acuminati* y *Obtusifolii*, considerando el tamaño de las hojas y el ápice de sus foliolos.

Con base en los caracteres morfológicos de 40 especies distribuidas en el continente americano, Pittier (1917) dividió al género en dos subgéneros, cuatro series y seis secciones (Tabla 2.2). Tal revisión puso de manifiesto que los caracteres propuestos para el género *Lonchocarpus*, eran propios de las especies con distribución en el continente americano, sugiriendo que las especies africanas y asiáticas de las secciones *Paniculati* y *Fasciculati* (*sensu* Bentham) deberían ser transferidas a otros géneros.

Tabla 2.2. Propuesta de clasificación de las especies americanas del género *Lonchocarpus* realizada por Pittier en 1917.

<b>Subgénero</b>	<b>Serie</b>	<b>Sección</b>
<i>Eulonchocarpus</i>	<i>Impressinervi</i>	<i>Philenopteri</i>
		<i>Spongopteri</i>
	<i>Planinervi</i>	<i>Punctati</i>
		<i>Epunctati</i>
<i>Neuroscapha</i>	<i>Pubiflori</i>	
	<i>Sericiflori</i>	<i>Concavi</i>
		<i>Carinati</i>

Actualmente una revisión detallada del género *Lonchocarpus*, en la cual se consideran los caracteres morfológicos, ontogénicos, de distribución geográfica, análisis molecular y químicos (flavonoides), ha llevado a una propuesta taxonómica (Palomino y Sousa,

(2000); Sousa, (2005a); Sousa, (2005b); Sousa, (2009a); Sousa, (2009b); Sousa, (2009c); Sousa, (2010a) y Sousa, (2010b)), la cual se presenta en el siguiente inciso.

### 2.1.1. Taxonomía

La revisión taxonómica del género *Lonchocarpus* sugiere un origen común a partir de un ancestro que pertenece al grupo *Millettiae* del continente americano. Su especiación es posible que haya sido favorecida por las últimas glaciaciones después del cuaternario (Gottlieb y Kubitzki, 1983). Actualmente se tienen identificadas cerca de 180 especies distribuidas en general en el Continente Americano, aunque hay una del grupo de *L. sericeus*, que es la única especie que está en el continente africano (Palomino y Sousa, 2000)

Con base en sus caracteres morfológicos y ontogénicos, en el género *Lonchocarpus* se definen dos grupos los cuales son establecidos como subgéneros (*Densiflorus* y *Lonchocarpus*). A su vez, en ambos subgéneros se observan diferencias morfológicas sustanciales, por lo cual, son divididos en secciones, agrupando a las especies con base en la continuidad de sus caracteres (Palomino y Sousa, 2000). Tal variabilidad sugiere que a partir del origen de este grupo, han ocurrido varios eventos de especiación.

Tabla 2.3.- Propuesta taxonómica de los grupos infragenéricos en el género *Lonchocarpus* (Palomino y Sousa, 2000).

<b>Subgénero <i>Densiflorus</i>, Ined.</b>	<b>Subgénero <i>Lonchocarpus</i></b>
<b>Sección <i>Densiflori</i> Benth.</b>	<b>Sección <i>Punctati</i> Benth.</b>
<b>Sección <i>Obtusifolii</i>* (Benth) M. Sousa.</b>	<b>Sección <i>Standleyi</i> M. Sousa</b>
<b>Sección <i>Eriophylli</i> Benth.</b>	<b>Sección <i>Lonchocarpus</i></b>
	<b>Sección <i>Santarrosani</i>, M. Sousa. ined.*</b>

\* Grupos seleccionados para el presente estudio

Considerando los datos de la literatura científica y los resultados de los análisis químicos de las especies estudiadas en la presente investigación, se analizaron las secciones *Densiflori*, *Obtusifolii* y *Eriophylli* del subgénero *Densiflorus* y las secciones *Punctati*, *Standleyi*, *Lonchocarpus* y *Santarrosani* del subgénero *Lonchocarpus* (Tabla 2.3).

### **2.1.2. Características morfológicas del género *Lonchocarpus*.**

Las especies del género *Lonchocarpus* en general son de hábito arbustivo a arbóreo, con corteza lisa; hojas imparipinnadas o raramente unifolioladas; folíolos opuestos, enteros; inflorescencias en cimas racemosas, axilares y simples o pseudoterminales y compuestas; las flores pediceladas generalmente en un par (por aborto de la central), pero en ocasiones en múltiplos de dos, sobre pedúnculos cortos (braquiblastos) dispuestos en racimos en el eje floral (pseudoracimo); la floración tardía (las flores se producen en ramas ya con hojas) o precoz (las flores se producen en ramas desnudas antes de las nuevas hojas); brácteas pedunculares y pedicelares presentes; las bractéolas en pares en la base del cáliz o lejanas sobre los pedicelos; cáliz dentado a truncado, zigomorfo a ciatiforme; pétalos de las alas adheridos a los pétalos de la quilla por presión y/o conformidad estructural o libres (en la sect. *Willardia* (Rose) M. Sousa); los pétalos de la quilla adheridos por cohesión en un sistema de microdientes, estandarte unguiculado, generalmente reflexo, su lámina suborbicular a oblonga, emarginada con una marca de la guía de nectarios cerca de la base, callosa, generalmente auriculado; estambre vexilar libre en la base; anteras uniformes; estilo glabro, estigma terminal, minutamente capitado; fruto generalmente indehiscente, cuando es dehiscente sobre el margen vexilar, es aplanado a grueso; semillas lisas a rugosas (al secar), con el hilo lateral; plántulas con los cotiledones hipogeos o epigeos; el primer par de hojas por encima de los cotiledones (eófilos) generalmente opuestas (cuando son alternas son catafilos), unifolioladas, imparipinnadas o secundariamente simples (Sousa, 1999).

Los dos subgéneros *Densiflorus* M. Sousa, *ined.* y *Lonchocarpus*, se diferencian por el tipo de disposición de las hojas en el tallo; así, en el primer caso son helicoidales y en el segundo son dísticas; también se considera la forma de las estípulas que son en el subgénero *Lonchocarpus* de formas redondeadas a ovales; en cambio en el subgénero *Densiflorus*, *ined.*, tienden a ser mucho más largas que anchas; esto también ocurre con las brácteas y bractéolas florales. Por otro lado, el cáliz del subgénero *Lonchocarpus* tiende a ser trunco o casi trunco y en cambio, en *Densiflorus* tiende a ser 4-dentado a 5-dentado. Así mismo, el mecanismo floral de *Lonchocarpus* es generalmente explosivo y el de *Densiflorus* es valvado; finalmente en las plántulas del subgénero *Lonchocarpus* por lo general los eófilos son unifoliolados a secundariamente simples, y muy raramente de tres a cinco foliolados. En el subgénero *Densiflorus*, *ined.*, sus eófilos generalmente son unifoliolados a 3-foliolados, pero nunca secundariamente simples (Sousa, *com. per.*).

### **2.1.3. Composición química del género *Lonchocarpus***

Inicialmente, el interés por el estudio químico de *Lonchocarpus* fue la búsqueda de los principios activos responsables de las propiedades piscicidas e insecticidas de algunas especies. A mediados del siglo XIX se realizaron las primeras descripciones de dichas propiedades de especies amazónicas que hoy se incluyen dentro del género *Lonchocarpus*, así como de especies asiáticas del género *Derris*. En 1892, el químico japonés Nagai logró aislar el componente piscicida e insecticida más potente de las raíces de *Derris elliptica* Benth., llamada popularmente “roten” en Formosa (Fukami y Nakajima, 1971). A principios del siglo XX, comenzaron a cobrar importancia económica las plantas insecticidas que contienen rotenona, lo cual estimuló los estudios químicos y botánicos. En 1933, tres grupos de investigadores trabajando en forma independiente lograron caracterizar la estructura molecular de la rotenona. Este compuesto es el principal representante de un grupo de compuestos denominados rotenoides. La rotenona es un flavonoide que posee actividad piscicida, acaricida e insecticida, actúa como insecticida por contacto y como veneno estomacal aunque es poco tóxico para

los mamíferos (Fukami y Nakajima, 1971). Desde 1930 hasta 1950 la rotenona fue el principio insecticida comercial más importante, el cual era extraído de las raíces de *Lonchocarpus urucu* (*Deguelia utilis*). Su comercialización generó importantes divisas para los países sudamericanos que cultivaban ésta especie, ya que se exportaron grandes volúmenes de raíces pulverizadas a los países industrializados, quienes demandaban tal insecticida para su cada vez más próspera industria agrícola (Higbee, 1949).

La importancia económica de *L. urucu* estimuló la búsqueda de especies emparentadas con propiedades similares, en otras áreas geográficas, lo cual contribuyó grandemente a incrementar el número de ejemplares de este género en las colecciones botánicas. Recientemente los estudios químicos de *Lonchocarpus* se han realizado considerando sus antecedentes etnobotánicos; por ejemplo se encontraron estilbenos en las hojas de *Lonchocarpus longistylus* Pittier, utilizadas tradicionalmente por los mayas para preparar una bebida llamada “balche”, la cual tiene efectos psicotrópicos, (Gonçalves *et al.*, 1977, Delle Monache *et al.*, 1977).

Las especies de *Lonchocarpus* contienen metabolitos secundarios, principalmente del tipo de los estilbenos, flavonoides e isoflavonoides (Dewick, 1982) (Figura 1.1). Entre las especies que han sido descritas por la literatura y que se distribuyen en la República Mexicana se encuentran: *L. sericeus* (Do Nascimento y Mors, 1972); *L. unifoliolatus* y *L. phlebophyllus* (Delle Monache *et al.*, 1978); *L. lanceolatus* y *L. rugosus* (Menichini, 1982); *L. longistylus* (Delle Monache, 1977); *L. salvadorensis* (Birch *et al.*, 1985); *L. guatemalensis* (Ingham *et al.*, 1988); *L. minimiflorus* (Roussis *et al.*, 1987); y *L. castilloi*, (Gómez *et al.*, 1990 y Reyes *et al.*, 1995), de las cuales se seleccionaron para el presente estudio, las especies de las cuales se cuenta con el estudio químico de sus raíces.

## **2.2. Actividad biológica de los flavonoides**

Los flavonoides están implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos (Middleton y Kandaswami, 1986). Por ejemplo, una revisión sobre las propiedades de los flavonoides aislados en las especies del género *Citrus* describe su actividad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, antialérgica, analgésica, antimicrobiana y cardiovascular (Benavente *et al.*, 1997). Los flavonoides son constituyentes de la dieta humana que pueden prevenir la incidencia de algunas enfermedades. Estudios epidemiológicos a nivel mundial revelaron que las poblaciones asiáticas, así como las poblaciones de origen asiático radicadas en los Estados Unidos, presentan baja incidencia de algunos tipos de cáncer. Tales resultados son atribuidos a las propiedades de los componentes químicos de la dieta oriental constituida principalmente de vegetales, donde los flavonoides están en mayor proporción (Fotsis, *et al.*, 1997). Los flavonoides también han despertado el interés por su capacidad de controlar organismos patógenos. Por ejemplo, Meragelman *et al.* (2000), encontraron que los flavonoides prenilados aislados de *Monotes africanus* pueden inhibir la replicación del virus de inmunodeficiencia humana VIH.

Los estudios sobre estructura-actividad de los flavonoides han mostrado una correlación positiva entre actividad biológica y la presencia de ciertos sustituyentes, entre ellos los grupos prenilos o geranilos. Miranda (2000) encontró que las chalconas y flavanonas preniladas inhibían significativamente la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad humana *in vitro*. Vinson *et al.* (1999) observaron que las chalconas con tales características de sustitución, presentes en la cerveza rubia, en el té verde, el vino tinto y el jugo de uva, son las responsables de la actividad antioxidante.

### **2.2.1. Actividad citotóxica**

Se entiende por citotoxicidad a la actividad que muestran los compuestos químicos al inhibir el desarrollo de líneas celulares cancerígenas *in vitro* (Suffness y Douros 1982).

En torno a estas propiedades se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar el papel y el potencial de los flavonoides en el tratamiento del cáncer. En una revisión de la literatura, realizado por Middleton y Kandaswami (1986), se describe la actividad biológica de los flavonoides en mamíferos; en tales estudios se menciona su acción antitumoral, así como la capacidad de inhibir la proliferación de las células tumorales. Destacan por su número, los estudios realizados con la quercetina, la cual ha demostrado citotoxicidad en varias líneas celulares.

Los sustituyentes prenilados parecen estar implicados en la actividad citotóxica, por ejemplo, De Mello (1974) estudió la actividad citotóxica y anticancerígena de los compuestos aislados de las raíces de *L. cultratus* (= *L. neuroscapha*) y encontró que las chalconas preniladas cordoina, 4-hidroxicordoina y 4-hidroxiderricina, mostraron un ligero efecto contra el sarcoma 180 y el carcinoma Ehrlich en ratones. En tal estudio la derricina inhibió significativamente el crecimiento del sarcoma 180, aunque también la 4-hidroxiderricina, 4-hidroxiionchocarpina, 4-hidroxicordoina y 4-hidroxiisocordoina, mostraron efecto citotóxico *in vitro*. Otro estudio realizado por Shi *et al.* (2000) demostraron que la actividad de las flavanonas preniladas aisladas de *Morus cathayana* fue más potente contra líneas celulares cancerígenas de boca humana (HSC-2 y H5G) que la mostrada por los 2-arilbenzofuranos.

Entre otras características se ha observado que la actividad de algunos flavonoides está en función de sus sustituyentes. Mori *et al.* (1988) observaron que la presencia de un grupo metoxi en los carbonos 3' y 4' aumentaba la toxicidad de las flavanonas contra la línea celular de cancer cérvico uterino (HeLa). Por otra parte, Fang y Casida, (1999) estudiaron la inhibición de la nicotina amida adenina reducida (NADH): ubiquinona oxiderructasa y del inductor forbol éster ornitín descarboxilasa (indicador de la acción quimioprotectora contra el cáncer) y la actividad citotóxica de 29 rotenoides aislados de la raíz de *L. urucu* (*Deguelia utilis*), observando que la actividad tenía una relación importante entre la estructura de cada sistema de acuerdo con su concentración molar.

### **2.2.2. Actividad antitumoral**

Miller (1978) encontró que los flavonoides inhiben la actividad de los agentes cancerígenos, actuando como bloqueadores al impedir su contacto con el ADN. Watenber (1985) menciona que la inhibición de los agentes bloqueadores puede darse por medio de los siguientes mecanismos: a) inhibiendo la actividad metabólica de los carcinogénicos y sus reactivos intermediarios, b) induciendo la actividad enzimática en la desintoxicación del agente cancerígeno, y c) enlazándose al agente cancerígeno; con el fin de prevenir su interacción con los blancos susceptibles dentro de la célula, como son el DNA, RNA y las proteínas. Este autor menciona, además que los flavonoides pueden inhibir también el crecimiento tumoral.

De Vicenzo *et al.* (1995) estudiaron la actividad anticancerígena de diversas chalconas sintéticas y naturales, las cuales inhibieron la proliferación del cáncer de ovario establecido y primario del tipo II, en sitios de enlace del estrógeno (EBS) y el enlace nuclear específico del estradiol-[3H] ([3H]E1) de cáncer de tipo II a concentraciones de 0.1 a 10  $\mu\text{M}$ , y observaron que existía una relación entre la estructura de los flavonoides con la  $\text{IC}_{50}$  (concentración necesaria para inhibir en un 50% el crecimiento celular). Tales autores observaron una mayor actividad en las chalconas, por lo que consideraron que el efecto estaba relacionado con la presencia del doble enlace  $\alpha\text{-}\beta$ , la hidroxilación en 3 o 2 del anillo B y la ausencia de un grupo prenilo. Sus datos mostraron también que la variación de las estructuras fue significativamente concordante con la  $\text{IC}_{50}$  y la concentración necesaria para matar en un 50 % la población de células cancerígenas ( $\text{DI}_{50}$ ), por lo que concluyen que las chalconas poseen un gran potencial como anticancerígenos.

### **2.2.3. Actividad antifúngica**

Fraenkel (1959) considera que las mutaciones genéticas permiten a la población expresar modificaciones en el arreglo estructural de sus metabolitos secundarios, lo cual ha sido



valioso como estrategia para evitar la depredación, eliminar la presencia de posibles competidores por los recursos, estimular la presencia de organismos benéficos como los organismos simbióticos micorrizicos y fijadores de nitrógeno, e inhibir la infección por patógenos.

La actividad tóxica que muestran los metabolitos secundarios aislados de plantas contra patógenos es en muchos casos selectiva. Una de sus funciones es la protección contra el ataque de hongos fitopatógenos. Éstas se llevan a cabo de dos maneras: a) como defensas activas y b) como fitoalexinas. En el primer caso se trata de defensas preformadas que impiden la infección del hongo, mientras que en el segundo, su producción es inducida como una rápida respuesta de la planta a la infección de un hongo (Dieter, 2006). Otra función importante es la de participar en el proceso de colonización de hongos micorrizicos con las plantas (Larose, *et al.* 2002).

Entre los flavonoides, las fitoalexinas son un grupo de compuestos altamente fungitóxicos que han sido estudiados con mayor interés en los años recientes. Son reconocidos como importantes en el proceso de defensa de las plantas (Harborne, 1999). La presencia de estos compuestos se ha detectado en diversas especies de leguminosas al igual que en otras 14 familias, cuando sus tejidos son invadidos por hongos facultativos u obligados (Ingham, 1972). Tales metabolitos están ausentes en tejidos sanos y solo se acumulan después de una invasión microbial (hongos o bacterias), o cuando la planta es tratada con agentes abióticos tales como luz ultravioleta de onda corta (254 nm), solución diluida de sales de metales pesados (cloruros de mercurio o cúprico) y un amplio rango de sustancias químicas, incluyendo entre éstas los antimetabolitos, compuestos intercalados de DNA, así como varios fungitóxicos (Ingham, 1981).

Las fitoalexinas tipo isoflavonoides aisladas de las leguminosas, han demostrado un papel preponderante en las interacciones entre plantas y microorganismos patógenos (Dixon, 1999). Autores como Harborne *et al.* (1980) sugieren su uso potencial para el control de fitopatógenos entre los que se cuentan hongos y bacterias. Se considera

también su potencial para la investigación farmacológica. Por ejemplo, Weinstein *et al.* (1981) y Kuroyanagi *et al.* (1999) evaluaron la actividad antibiótica de las fitoalexinas inducidas y encontraron que tales compuestos poseen actividad significativa contra bacterias Gram-positivas, entre las que se encuentran *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus subtilis*, y *Propionibacterium acnes*.

Por otra parte, un estudio químico realizado por Gómez *et al.* (1990) con la madera del duramen de *L. castilloi*, permitió aislar flavonoides con estructura de auronoles, los cuales mostraron actividad antifúngica sobre hongos de la pudrición de la madera (xilófagos). Los auronoles inhibieron parcialmente el crecimiento del hongo de pudrición blanda *Lenzites trabea* con una dosis de 0.3 mg/ml (Gómez *et al.*, 1990). El mismo equipo de investigación (Reyes *et al.*, 1995) encontró también que estos compuestos están implicados en la resistencia a termitas *Criptonotermes brevis*. Estas evidencias sugieren que tales compuestos son responsables de la alta resistencia de la madera a los microorganismos. Este tipo de compuestos son conocidos también como “defensas preformadas” (Osbourn, 1996). La actividad fungitóxica mostrada por los flavonoides ha motivado su búsqueda por medio de estudios biodirigidos: un ejemplo de éstos es el análisis utilizando cromatografía en capa fina (CCF) del extracto de diclorometano de *Millettia engleri* contra *Candida albicans*, realizado por Garo, *et al.*, (1998), quienes aislaron e identificaron seis compuestos con actividad antifúngica mediante el fraccionamiento del extracto crudo por medio de técnicas de análisis de cromatografía líquida/ultravioleta /espectroscopía de masas (LC/UV/MS) y cromatografía líquida/ultravioleta/ resonancia magnética nuclear (LC/UV/NMR).

### 2.3.- Quimiotaxonomía

La “quimiotaxonomía” o “sistematica micromolecular” utiliza los metabolitos secundarios de la planta como caracteres taxonómicos, esta se diferencia de la “sistemática macromolecular” o “sistemática molecular” donde se utilizan las macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos (Grayer, *et al.* 1999). El análisis químico permite reconocer la afinidad filogenética entre un grupo de especies que se presume están emparentadas. El análisis de metabolitos secundarios, especialmente de los flavonoides como marcadores taxonómicos, resulta ser un método confiable (Stuessy y Crawford, 1983).

Bate y Smith (1968), mencionan que De Candolle en 1804 fue el primero en reconocer el valor de los compuestos químicos de las plantas para fines de clasificación. El mismo De Candolle escribió en 1816 sobre las diferencias que se encuentran en la composición química de las plantas cultivadas bajo diferentes suelos. Erdtman (1963) menciona también que fue De Candolle el primero en reconocer que “las especies que pueden injertarse entre sí, demuestran la analogía de sus jugos y fibras”, lo cual contribuyó a entender el parentesco existente entre tales especies.

Sobre el mismo tema Bate y Smith (1968) mencionan que los trabajos realizados por Eykman y Greshoff a fines del siglo XIX contribuyeron al fortalecimiento de la quimiotaxonomía. Este mismo autor menciona que Eykman en 1888, describió la frecuencia con que se presentaban los alcaloides en ciertas familias, así mismo aludió a Greshoff quien en 1891, destacó sobre el uso de la composición química de las plantas para fines taxonómicos, a partir de la observación que realizó de la laurotetanina, un alcaloide frecuente en los miembros de las Lauraceae. Años después en 1909, Greshoff mencionó que el estudio químico de las plantas podría proporcionar evidencias sobre sus relaciones filogenéticas, por lo que sugirió que la descripción completa de un género o de una especie nueva, debía estar acompañada por una descripción breve sobre su composición química.

Erdtman (1963) menciona que McNair en 1935 propuso que “las plantas pueden ser clasificadas químicamente en concordancia con las sustancias elaboradas por éstas. De esta manera la clasificación química puede compararse o usarse como un complemento para la clasificación morfológica y ser de importancia en el desarrollo del verdadero sistema natural de la filogenia de las angiospermas”. Tal propuesta fue una contribución notable al avance de la quimiotaxonomía. McNair consideró también que las plantas con caracteres más avanzados producen moléculas más complejas. Esta evidencia sustenta la afirmación en el sentido de que los árboles son más primitivos que las plantas herbáceas. El mismo Erdtman (1963) cita a McNair, quien en 1945 publicó sobre la ontogenia y filogenia química de las plantas, en la cual describió que durante la ontogenia de las semillas, es común observar inicialmente carbohidratos, seguidos de aceites saturados y después aceites insaturados, concluyendo que esto representa una recapitulación de la filogenia de las plantas, por lo que el almacenamiento de aceites insaturados es un carácter más avanzado, sugiriendo que las dicotiledóneas son más primitivas que las monocotiledóneas

El análisis químico ha demostrado que los procesos de especiación dependen de la combinación de factores externos e internos tales como mutaciones, recombinación de genes y selección. Durante los procesos evolutivos es posible que grupos no relacionados taxonómicamente den lugar a similitudes morfológicas; fenómeno que es denominado “convergencia” o “desarrollo paralelo”. Por el contrario, cuando grupos de plantas estrechamente emparentadas dan lugar a descendientes no similares se habla de “divergencia”, lo cual ocasiona dificultades para el análisis taxonómico (Erdtman, 1963).

Los flavonoides son el producto de la expresión genética de la planta (Harborne, 1980), su presencia en una especie determinada es constante. Dentro de una población sus concentraciones pueden variar cuando se analizan en sus diferentes etapas fenológicas, así también cuando los ejemplares se desarrollan bajo diferentes sustratos y de acuerdo con la estación del año (Marja-Leena, *et al.*, 2000), o bien bajo condiciones de estrés, donde se afectan especialmente las concentraciones en las hojas (Vargas-Álvarez, 2005);

A diferencia de los caracteres botánicos, estos pueden ser descritos en términos de estructuras definidas y formulas químicas, por lo que el aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos de las diferentes especies, abre la posibilidad para el entendimiento de su filogenia (Stuessy y Crawford, 1983).

### **2.3.1. Métodos de análisis quimiotaxonómico**

El análisis de los metabolitos secundarios como herramienta para la clasificación, se ha realizado bajo tres criterios principales: a) presencia o ausencia, b) cantidad y c) ruta biosintética de los metabolitos secundarios encontrados en los taxa estudiados (Harbone, 1968).

#### **2.3.1.1. Análisis de presencia o ausencia.**

El primer criterio es utilizado por la taxonomía numérica<sup>1</sup>, en el cual se asignan valores de 0 para ausencia y 1 para presencia de un metabolito dado, aunque cabe aclarar que tales estudios son utilizados como herramienta para sustentar hipótesis taxonómicas previamente establecidas mediante el análisis de atributos morfológicos y ontogénicos (Grant y Zandstra, 1968). En el análisis del género *Lonchocarpus* realizado bajo este método por Fellows *et al.* (1978) se pretendió establecer diferencias entre 28 especies con base en el análisis de presencia ausencia de la enduracidina. Dicho aminoácido fue encontrado en 20 especies: sin embargo, aunque la enduracidina tiene gran distribución en el género, no es un marcador taxonómico de utilidad ya que no permite delimitar grupos infragenéricos.

El análisis de presencia-ausencia es también un método de gran utilidad para el análisis cladístico<sup>2</sup>, el cual se fundamenta en criterios de plesiomorfía o apomorfía para un

---

<sup>1</sup> Sokal y Sneath (1963), definen la taxonomía numérica como la evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el agrupamiento de estas unidades en taxones, basándose en el estado de sus caracteres.

<sup>2</sup> Según W. Henning (1968), los caracteres derivados compartidos o sinapomorfías es decir de monofilias, son

carácter determinado. Bajo los principios de la cladística, el criterio de apomorfía establece que los caracteres comunes en varias taxa son ancestrales, por lo cual son descartados en el análisis. Por otra parte, la presencia de un carácter novedoso en una especie dada, permite establecer comparación alguna entre miembros del grupo monofilético analizado; sin embargo, cuando los caracteres son compartidos por dos o más especies, representan elementos de gran utilidad para definir grupos monofiléticos al nivel jerárquico<sup>3</sup> estudiado (Humphries, 1980; Wiley, 1981).

### 2.3.1.2. Análisis cuantitativo

El segundo criterio es útil tanto para la taxonomía numérica como para la cladística. En este caso, la presencia de un determinado metabolito se puede considerar como un carácter en todos los ejemplares del taxa analizado. Sus diferentes concentraciones en las distintas unidades taxonómicas son agrupadas en una escala de valores arbitrarios que pueden ir de 0 a 2, estos valores son considerados como estados de carácter (Crisci y López, 1983).

En muchos casos, el análisis quimiotaxonómico basado a partir de presencia-ausencia de metabolitos secundarios ha conducido a resultados poco satisfactorios, o incongruentes (Estabrook, 1980). Humphries y Richardson (1980) consideran que un análisis taxonómico bajo el método de Hennings (cladística) no permite establecer homologías a partir del análisis de los metabolitos secundarios, ya que muchas veces estos pueden estar presentes o ausentes. La aplicación de este método presenta limitaciones, dado que en ocasiones el metabolito analizado ha sufrido algún proceso de transformación, el cual puede consistir en una sustitución, adición o isomerización, de tal forma que son compuestos exclusivos de una especie. Por ejemplo, los castillenos A, B, C, D y E aislados de *Lonchocarpus castilloi* (Gómez, *et al.*, 1990; Reyes *et al.* 1995), presentan estructura de auronoles sustituidos por un metoxilo unido

---

caracteres heredados de un ancestro común inmediato y exclusivo.

<sup>3</sup> Un grupo monofilético en el sentido cladístico, comprende al antecesor con todos sus descendientes

al C-2 (fig. 5.9), tal patrón de sustitución no se ha observado en otros auronoles aislados de especies emparentadas. La integración de la información química bajo los criterios anteriores a un análisis cladístico sería imposible en este caso, por lo que se ha propuesto un nuevo criterio, el cual considera que el factor crucial para el análisis quimiotaxonómico, son las secuencias biogenéticas que conducen a la síntesis de tipos o clases de compuestos más que los compuestos particulares en si (Gottlieb, 1982).

### **2.3.1.3. Análisis de la ruta biosintética**

La modificación estructural que se observa en los metabolitos secundarios aislados de las diferentes especies, está sujeta a procesos evolutivos. Gottlieb en 1980 propuso dos principios para sustentar lo anterior. El primero de ellos establece que la evolución de los precursores se da por el bloqueo enzimático de pasos de reacción, lo cual origina la síntesis de nuevos linajes químicos. Cada linaje origina grupos biogenéticos por diversificación. El segundo principio establece que la evolución micromolecular se lleva a cabo por procesos de oxidación, los compuestos que presentan mayor grado de oxidación son característicos de nuevos linajes químicos.

De acuerdo con Gottlieb (1982) la utilidad de los metabolitos secundarios para fines quimiotaxonómicos es posible bajo dos esquemas: por una parte, la revisión de la ruta biogenética permite confirmar el arreglo de los grupos taxonómicos infragenéricos de una clasificación previamente establecida con base en los criterios de caracteres morfológicos primitivos o derivados; por otra parte, bajo el mismo esquema son asignados valores medios de oxidación y metilación (O/M) para cada especie, a partir de los valores de O/M de cada uno de los flavonoides presentes en dicha especie. En este sentido Gottlieb (1980) menciona también que cuando estos valores son comparados, permiten establecer el grado de parentesco entre especies consideradas estrechamente emparentadas y que deben estar agrupadas en un mismo nivel infragenérico.

## 2.4. Utilidad de los metabolitos secundarios de leguminosas como marcadores sistemáticos

Las leguminosas contienen diversos grupos de metabolitos secundarios; entre los más importantes se encuentran los flavonoides, alcaloides y aminoácidos no proteicos. Su estudio ha sido una herramienta de gran utilidad para el análisis taxonómico. Los flavonoides, tanto glicosilados como libres (agliconas), son de gran utilidad como marcadores taxonómicos, ya que muestran una gran diversidad estructural y patrones de sustitución, pero sobre todo porque son químicamente estables y razonablemente fáciles de aislar e identificar (Harborne y Turner, 1984, Gottlieb, 1982).

Entre otros metabolitos, los aminoácidos no proteicos son importantes por su gran cantidad y diversidad, constituidos por alrededor de 300 estructuras conocidas (Bell, 1972). Son característicos de las semillas de las leguminosas, muchos son análogos de los aminoácidos comunes, un ejemplo de estos es la canavanina, un análogo de la arginina (Lea y fowden, 1972), la cual está restringida a ciertos géneros y tribus de la familia Papilionoideae. Se considera además que su acumulación se produce en las semillas de los géneros morfológicamente más primitivos de la tribu *Millettiae* (Bell, 1978). La enduracidina está ampliamente distribuida en el género *Lonchocarpus*. Un estudio realizado por Fellows *et al.* (1978) mostró que en 20 semillas de 28 especies se encontraba este compuesto. Posteriormente, los mismos autores (Fellows *et al.*, 1979) analizaron las semillas de *L. macrocarpus* y no encontraron enduracidina, sin embargo, se aisló la tetrahidrolatrina un metabolito estructuralmente relacionado.

Evans *et al.* (1985) realizaron un análisis cualitativo y cuantitativo de los aminoácidos no proteicos y aminos como marcadores taxonómicos en las semillas de 310 especies de la tribu *Tephrosieae* (*Millettiae*), principalmente de los géneros; *Millettia*, *Tephrosia*, *Derris* y *Lonchocarpus*. En tal estudio se observó la acumulación de derivados inusuales de la guanidina (incluyendo entre éstos a la canavanina, enduracidina, 2-aminoimidazol  $\psi$ -hidroxiahomoarginina y tetrahidroalitrina) y aminos simples, algunas no conocidas fuera de este grupo. Tales compuestos no se observaron en las



*Sophoreae* ni en las *Dalbergieae*, sólo en las *Lonchocarpinae*, por lo que sugirieron que la tribu *Tephrosieae* podía incluirse en la subtribu *Lonchocarpinae* de las *Dalbergieae*. Así, estos grupos genéricos están definidos químicamente dentro del gran grupo al que pertenecen también *Millettia*, *Derris* y *Lonchocarpus*.

Algunos metabolitos, como los alcaloides polihidroxiados aislados de las semillas de *Lonchocarpus*, presentan estructura semejante a los azúcares, como la deoximanojirimicina de las semillas de *L. sericeus* (Fellows *et al.*, 1986), tales compuestos son de distribución restringida, por lo cual no son de utilidad para fines quimiotaxonómicos.

Otro grupo de compuestos comúnmente encontrados en las leguminosas son los triterpenos, los cuales presentan poca variabilidad estructural, por lo cual son considerados de poco valor para fines de correlación quimiotaxonómica. Algunos como el  $\beta$ -sitosterol son ubicuos en el reino vegetal, mientras que otros, como los ácidos acácico, echinocístico y acetiloleanólico, poseen una distribución muy restringida en esta familia (Gottlieb y Kubitzky, 1983).

Los flavonoides en cambio tienen gran utilidad como marcadores sistemáticos. Gomes *et al.* (1981) analizaron las relaciones quimiosistemáticas entre las diferentes especies agrupadas en la tribu *Millettiae* a partir del análisis de sus flavonoides, sin embargo, dado que no existía una metodología apropiada y una adecuada revisión botánica, no obtuvieron resultados alentadores.

## **2.5. Estudios quimiotaxonómicos del género *Lonchocarpus***

Del género *Lonchocarpus* se han aislado numerosos flavonoides del tipo de las chalconas, flavanonas, auronas, así como estilbenos; ocasionalmente se han aislado rotenoides, como en *L. salvadorensis* y *L. unifoliolatus*. Entre los flavonoides se encuentran los isoflavonoides, un grupo importante en las leguminosas, ya que parecen

estar restringidos a esta familia, particularmente a las Papilionoideas, aunque ocasionalmente es posible encontrarlos en otras familias (Dixon, 1999).

Gottlieb (1982) considera que el análisis de los constituyentes micromoleculares de las plantas permite entender la evolución de las especies. Siguiendo estas ideas, Gomes *et. al.* (1981) analizaron la secuencia biosintética de los flavonoides de la tribu *Millettieae*, para fines taxonómicos. Primero asignaron valores de oxidación metilación (O/M) a las estructuras básicas de los flavonoides; los valores más bajos corresponden a los precursores y flavonoides más sencillos, en tanto que los valores más altos corresponden a los flavonoides más complejos.

La secuencia inicia con los estilbenos (**A**), que por isomerización originan las chalconas (**B**) y flavanonas (**C**), y sucesivamente las dihidrochalconas (**D**), flavanoles (**E**), flavonoles (**F**), flavanoles (**G**), auronas (**H**), auronoles (**I**),  $\beta$ -hidroxichalconas (**J**), flavonas (**K**), isoflavonas (**L**) 3-fenilcoumarinas (**M**), 2'-hidroxiflavanona (**N**), pterocarpanos (**O**), coumaranocromenos (**P**) y rotenoides (**Q**), subsecuentemente (Fig. 1). Partiendo del hecho de que las modificaciones de las estructuras químicas ocurren mediante procesos de oxidación, a cada paso de oxidación observada en la figura 1.1, corresponde un punto adicional al valor de oxidación. Así mismo, las modificaciones tales como adición o pérdida de grupos OH en la estructura analizada, modifican este valor, tal como se muestra en la tabla 4.2. De la misma manera, el valor de metilación se modifica de acuerdo con la presencia o ausencia de los sustituyentes hidroxilo, tal como se observa en la tabla 4.3. Estos valores son utilizados para establecer el valor de O/M de cada uno de los compuestos presentes en una planta, y el promedio de tales valores es el valor de O/M de la especie analizada.

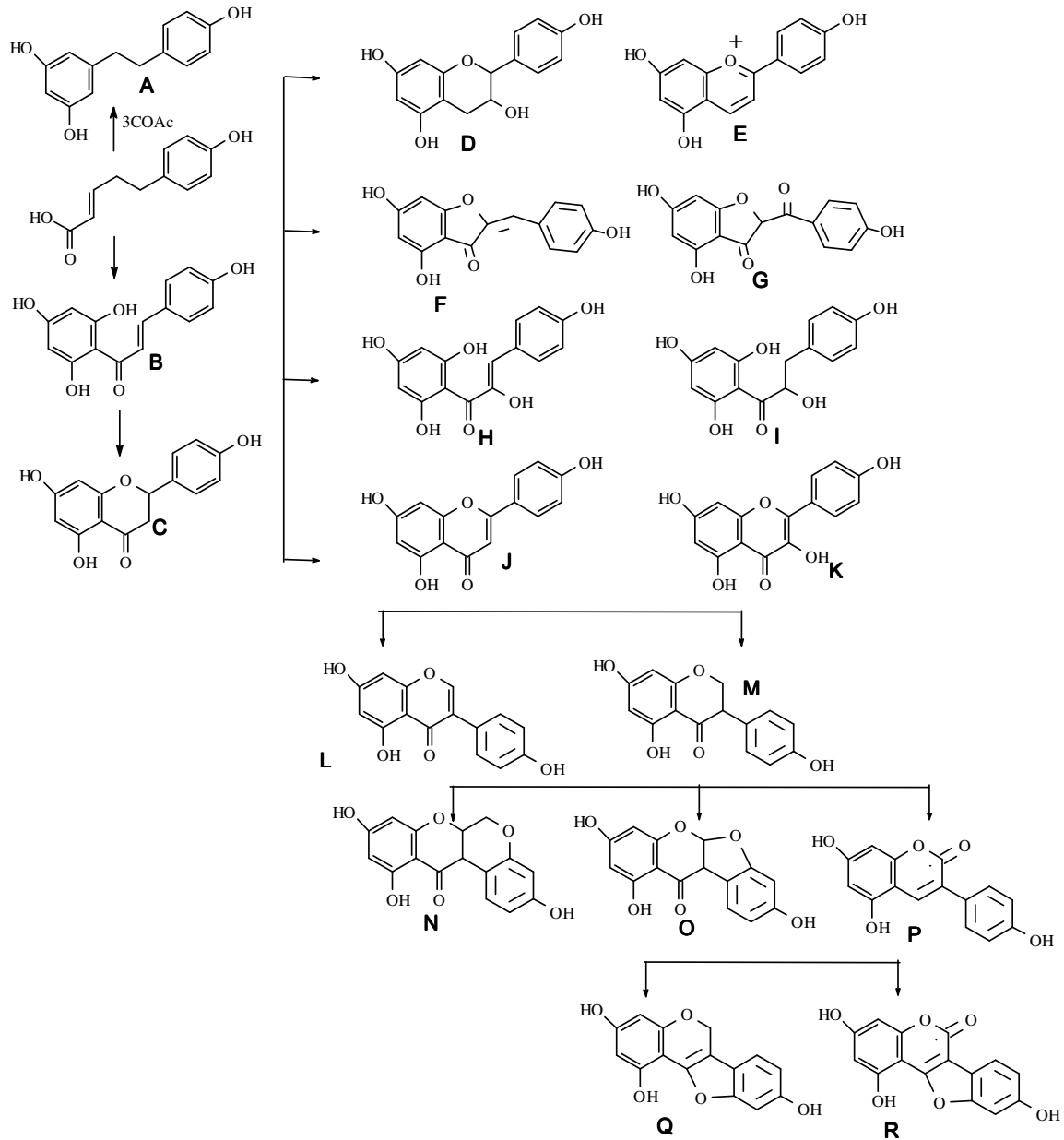


Figura 2.1. Ruta biogénica de los flavonoides en las leguminosas (Gottlieb, 1980)

Otro análisis comparativo de los flavonoides aislados en ejemplares de los diferentes géneros de la tribu *Millettieae* fue desarrollado por Gottlieb (1983), en el cual se analizaron las estructuras y los patrones de sustitución, confirmándose una descendencia ancestral común. Bajo este esquema, Gottlieb (1980) considera que el género *Lonchocarpus* tiene una relación de parentesco que desciende de *Derris*, un

género con distribución en los trópicos del viejo mundo. En contraste, los estudios botánicos realizados por Sousa (com. pers.), sugieren que el género *Lonchocarpus* se ha diversificado a partir de un ancestro común en América, específicamente en el Sur de México y Centroamérica.

Dentro del género *Lonchocarpus*, además de los flavonoides preformados o constitutivos, que presentan una amplia variación estructural, también se han aislado fitoalexinas, esto es sustancias producidas por las plantas en respuesta a factores externos, tales como ataque de patógenos y estrés. Las fitoalexinas están ampliamente distribuidas en la tribu *Millettiae* (Ingham, 1981); sin embargo, bajo el esquema de análisis seguido en el presente trabajo, tales compuestos no son considerados como caracteres quimiotaxonómicos. Geesink (1981) recomienda que las muestras utilizadas para el análisis quimiotaxonómico, deban ser preferentemente de tejidos sanos y de un órgano determinado para todos los ejemplares (raíz, tallo, hojas, semillas, etc.), además que para las determinaciones filogenéticas, sólo es confiable un estudio a nivel infragenérico, tal como la comparación entre especies agrupadas dentro de un género. Por otra parte, considernado que las raíces están menos expuestas a las radiaciones solares y al estrés que representa el viento, la humedad, el frío y el ataque constante de los insectos, es posible encontrar menos variación de sus flavonoides entre especies, y por otra parte en el laboratorio es más fácil trabajar con raíces ya que no poseen clorofilas, las cuales obstruyen el aislamiento de los flavonoides.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

- Realizar el estudio químico de cinco especies del género *Lonchocarpus*, con el fin de determinar las relaciones quimiotaxonómicas entre éstas y las especies descritas por la literatura científica y probar su actividad biológica.

#### 3.1.1. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar la estructura química de los flavonoides de las raíces de cinco especies del género *Lonchocarpus* ubicadas taxonómicamente en cuatro secciones de los dos subgéneros en que éste se divide, con distribución en la República mexicana.
- Comparar la estructura química de los flavonoides entre las especies, y calcular sus valores de oxidación/metilación con el fin de validar las propuestas de análisis quimiotaxonómicos previamente establecidas en la literatura.
- Analizar la actividad biológica de los compuestos aislados de especies de *Lonchocarpus*, mediante el análisis de citotoxicidad en cuatro líneas celulares cancerígenas y de fungitoxicidad en *Postia placenta* y la actividad fungistática en un hongo de pudrición de madera.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.- Estudio químico

Los espectros de infrarrojo (IR) se realizaron en un espectrómetro Tenser 27, la rotación óptica y dicroísmo circular se realizaron en un espectrómetro Perkin Elmer 343 en solución de cloroformo. Los espectros de ultravioleta (UV) se determinaron con un aparato Shimadzu U160. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$  NMR) y de resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$  NMR), se obtuvieron con un espectrómetro analítico Varian Gemini 200 (200MHz), Varian UNITY-300 (300MHz) y Varian UNITY-500  $^1\text{H}$  (500MHz)  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) en solución de cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros de Masas se determinaron en un aparato Jeol JMS-AX505 HA por impacto electrónico (EMIE).

Los ejemplares analizados químicamente, fueron seleccionados de acuerdo con la clasificación taxonómica del género *Lonchocarpus*, establecida con base en los criterios botánicos de Mario Sousa del Instituto de Biología de la UNAM. En dicha clasificación los grupos infragenéricos están ubicados a partir de los criterios de caracteres más primitivos establecidos al inicio del grupo y los caracteres derivados al final. Seleccionándose ejemplares representativos de los dos subgéneros en los cuales se divide este género.

El material vegetal consistió en raíces colectadas de ejemplares vivos. En todos los casos se secaron al ambiente, posteriormente se convirtieron en astillas y se sometieron a extracción con disolventes de polaridad gradual subsecuentemente (hexano, diclorometano y metanol). Los extractos crudos obtenidos con este proceso se sometieron a separación en sus componentes por cromatografía en columna (CC). Para tal fin se utilizó como fase móvil hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, así como mezclas de tales disolventes para aumentar gradualmente la polaridad.

Las columnas se empacaron con Sílica gel (partícula de 0.063-0.200 mm), los productos se purificaron mediante cromatografía en capa fina preparativa utilizando cromatoplasmas de Sílica gel (Si-gel) Merck-F 254 de 10X20 cm, con espesor de 0.5 mm e indicador de fluorescencia. Las fracciones se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) en cromatofolios de Sílica gel Merck-F 254 de 20X20 cm, con espesor de 0.25 mm e indicador de fluorescencia; para visualizar los compuestos en CCF se utilizó luz ultravioleta de onda corta y onda larga (254 y 365 nm, respectivamente) con una lámpara UVS2-25. También se visualizaron los compuestos mediante un revelador químico, para ello los cromatofolios se asperjaron con una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y posteriormente se calentaron en una parrilla.

#### **4.1.1. *Lonchocarpus obovatus* Benth.**

##### **4.1.1.1. Antecedentes.**

*Lonchocarpus obovatus* es un árbol pequeño, con distribución en la región Mixteca que abarca los Estados de Oaxaca, Puebla y Guerrero. Su hábitat se caracteriza por ser de vegetación semidesértica. Taxonómicamente esta especie fue ubicada por Sousa y Soto (1987) en la sección *Eriophylli*. No existen antecedentes sobre el estudio químico de especies agrupadas en este grupo taxonómico.

##### **4.1.1.2. Material vegetal.**

El material vegetal consistió en raíces de un ejemplar arbóreo de 6 metros de altura, colectado en las cercanías del municipio de Chazumba distrito de Huajuapán de León del Estado de Oaxaca. Por la dureza de su madera, este árbol es utilizado en la región para elaborar mangos para herramienta, aunque algunos campesinos mencionaron que la madera no es muy resistente a la pudrición. Un ejemplar fue depositado en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU 810558) como respaldo para la presente investigación.

#### 4.1.1.3. Aislamiento de metabolitos.

El material vegetal (939.2 g) se secó al ambiente y se cortó en trozos. Posteriormente, se sometió a extracción de sus componentes químicos con hexano, diclorometano y metanol subsecuentemente. El residuo del extracto de hexano (8.57 g) se sometió a separación en sus constituyentes por (cc, Silica gel 60, 1:30), con fracciones de 250 ml. De las fracciones 31-32 desarrolladas con Hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (95:5) se aislaron 462g del compuesto I al cual se denominó *Inirebina*\*A, mientras que de las fracciones 34-35 reunidas y después purificadas por cromatografía en capa fina, se obtuvieron 732g del compuesto II al cual se denominó *inirebina* B. Las constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos aislados de *L. obovatus* son descritas a continuación. El nombre de estos compuestos se seleccionó como homenaje a la labor científica que realizó el Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB 1977-1982) y su director el Dr. Arturo Gómez Pompa. Para confirmar la estructura química de ambos compuestos, se realizaron reacciones químicas que permitieron confirmar tales propuestas.

*Inirebina* A (I).- (2-benzoil-furano-6,7,2',3')-coumaran-3-ona, Se aisló como un sólido cristalino de p.f. 112-114 °C. UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 204.5 (12785), 254 (411449), 320 (12785). IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3508 (OH), 2980 y 2931 (C-H alif.), 1709 (C=O), 1627 (C=C), 1465 (C-C Alif). EMIE eV, *m/z* (rel. int.): 262 (C<sub>17</sub> H<sub>10</sub> O<sub>3</sub>) [M]<sup>+</sup> (100), 234 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (11), 205 (6), 185 (35), 176 (2), 129 (8), 117 (6), 105 (15), 77 (16), 75 (2), 40 (8). RMN <sup>1</sup>H 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS.  $\delta$ 7.58 (1H, s, H-3),  $\delta$ 7.55 (1H, *d*, J= 9.0 Hz, H-4),  $\delta$ 7.50 (1H, *dd*, J= 1.0 y 9.0 Hz, H-5.),  $\delta$ 8.01 (2H, *dd*, J= 1.0 y 6.0 Hz, H-2' y 6'),  $\delta$ 7.52 (2H, *dd*, 1.5 y 7.5 Hz, H-3' y 5'),  $\delta$  7.61 (1H, *tt*, 1.5 y 7.5 Hz, H- 4'),  $\delta$ 7.16 (1H, *dd*, J= 1.0 y 2.0 Hz, H- $\alpha$ ) y  $\delta$ 7.71 (1H, *d*, J= 2.5 Hz H- $\beta$ ). RMN <sup>13</sup>C, 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS. 151.80 (C-2),  $\delta$ 118.09 (C-3),  $\delta$ 118.43 (C-4),  $\delta$ 109.43 (C-5),  $\delta$ 137.46 (C-6),  $\delta$ 113.36 (C7),  $\delta$ 156.38 (C8),  $\delta$ 121.87 (C9),  $\delta$ 184.00 (C10),  $\delta$ 137.46 (C-1'),  $\delta$ 129.24 (C-2'),  $\delta$ 128.46 (C3'),  $\delta$ 132.62 (C-4'),  $\delta$ 128.46 (C5'),  $\delta$ 129.24 (C6'),  $\delta$ 103.62 (C- $\alpha$ ),  $\delta$ 145.20 (C- $\beta$ ).



El compuesto **I** (50 mg) se disolvió en 3 mL de metanol, posteriormente se agregaron 30 mg de borohidruro de boro y sodio a temperatura ambiente y agitación constante por 20 minutos. La reacción se detuvo agregando agua y el producto se extrajo con acetato de etilo. El producto principal fue aislado por cromatografía en placa de Silica gel, como un aceite de color amarillo. Las constantes físicas y espectroscópicas de la Inirebina A hidroxilada (**la**) se describen a continuación.

*Inirebina A hidroxilada (la)*. IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3595 (OH), 2920 y 2850 (C-H alif.), 1589 (C=C), 1438 (C-C Alif). RMN  $^1\text{H}$  200MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ .  $\delta$ 6.55 (1H, s, H-3),  $\delta$ 8.5 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-4),  $\delta$ 7.507 (1H, dd,  $J=1$  y 9 Hz, H-5),  $\delta$ 8.019 (2H, dd,  $J=1$  y 6 Hz, H-2' y 6'),  $\delta$ 7.3-7.43 (3H, m, H-3' y 5'),  $\delta$ 7.613 (1H, tt, 2 y 7.5 Hz, H- 4'),  $\delta$ 6.99 (1H, dd,  $J=1.4$  Hz, H- $\alpha$ ),  $\delta$ 7.63 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H- $\beta$ ),  $\delta$ 5.98 (1H, s, H-10),  $\delta$ 2.76 (3H, s OH-10). EMIE eV,  $m/z$  (rel. int.): 264 ( $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_3$ )  $[\text{M}]^+$  (100), 247  $[\text{M}-]^+$  (83), 246 (7), 218 (3), 207 (3), 187 (32), 159 (14), 158 (7), 131 (6), 105 (31), 89 (3), 77 (10).

*Metilación del compuesto la*. El compuesto **la** (50 mg) se disolvió en THF anhidro, a éste se agregó hidruro de sodio (NaH) en exceso. Se dejó en agitación por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó yoduro de metilo ( $\text{Me}_2\text{I}$ ) disuelto en tetrahidrofurano anhidro (THF lentamente con un embudo de adición. La reacción se completó después de una hora. La observación por cromatoplaqueta (Si-gel sistema H/Ac et. 9:1) reveló la presencia de tres subproductos, a continuación se describen las constantes espectroscópicas mostradas por el compuesto mayoritario.

Éter metílico de la Inirebina A. (2-benzoil-furano-6,7,2',3')-coumaran-3-ona Se aisló como un aceite amarillo. IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3595 (OH), 2920 y 2850 (C-H alif.), 1589 (C=C), 1438 (C-C Alif). EMIE eV,  $m/z$  (rel. int.): 278 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$ )  $[\text{M}]^+$  (100), 247  $[\text{M}-]^+$  (83), 246 (7), 218 (3), 207 (3), 187 (32), 159 (14), 158 (7), 131 (6), 105 (31), 89 (3), 77 (10). RMN  $^1\text{H}$  200MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ . Los datos fueron semejantes a los descritos para la inirebina B.

*Inirebina B* (II).- (2-benzoil-furano-6,7,2',3')-coumaran-3-ona Se aisló como un aceite amarillo.  $\alpha_D^{23}=1.63$  (CH<sub>3</sub>, C 2.45). UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 204.5 (12785), 254 (411449), 320 (12785). IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3126 y 3066 (C=C), 2980 y 2931 (C-H alif.), 1641 (C=C), 1440 y 1454 (C-C Alif). EMIE eV, m/z (rel. int.): 278 (C<sub>18</sub> H<sub>14</sub> O<sub>3</sub>) [M]<sup>+</sup> (45.39), 247 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 218 (3.5), 201 (8.5), 189 (8.5), 186 (3.5), 165 (2.1), 139 (3.5), 124 (3.5), 109 (2.1), 105 (15.5), 77 (16.55), 75 (2.11), 40 (8.10). RMN <sup>1</sup>H 500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS.  $\delta$ 6.59 (1H, *d*, 0.5 Hz, H-3),  $\delta$ 7.37 (1H, *d*, J= 7.0 Hz, H-4),  $\delta$ 7.38 (1H, *d*, J= 7.0 Hz, H-5),  $\delta$ 7.50 (2H, *dd*, J=1.5 y 7.0 Hz, H-2' y 6'),  $\delta$ 7.39 (2H, *dd*, J= 1.0 y 7.5 Hz, H-3' y 5'),  $\delta$ 7.34 (1H, *tt*, J= 1.5 y 7.5 Hz, H- 4'),  $\delta$ 7.02 (1H, *dd*, J= 1 y 2 Hz, H- $\alpha$ ),  $\delta$ 7.62 (1H, *d*, J= 2.0 Hz, H- $\beta$ ),  $\delta$ 5.44 (1H, *s*, H-10)  $\delta$ 3.47 (3H, *s*, O-Me-10). RMN<sup>13</sup>C, 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS: 155.85 (C'-2), 106.03 (C-3), 116.58 (C-4), 107.38 (C-5), 154.26 (C-6), 113.10 (C-7), 148.01 (C-8), 122.41 (C-9), 79.40 (C-10), 138.69 (C-1'), 127.29 (C-2'), 128.50 (C-3'), 128.21 (C-4'), 128.50 (C-5), 127.29 (C-6'), 103.18 (C- $\alpha$ ), 144.53 (C- $\beta$ ), 57.20 (O-Me).

#### 4.1.2. *Lonchocarpus oaxacensis* Pittier.

##### 4.1.2.1. Antecedentes.

*Lonchocarpus oaxacensis* fue clasificado por Pittier en 1917, posteriormente Hermann en 1949 lo agrupó cercanamente emparentado con *L. guatemalensis*, la clasificación actual de acuerdo con Sousa (2009c) considera a esta especie en la sección *Standleyi* perteneciente al subgénero *Lonchocarpus*. Es un árbol pequeño de aproximadamente 6 metros de altura y d.a.p. de 15 cm. Su hábitat es de clima seco semidesértico, con distribución endémica en la región de la cañada del Estado de Oaxaca.

##### 4.1.2.2. Material vegetal.

El material vegetal consistió en raíces de un ejemplar arbóreo de 5 m de altura aproximadamente, colectadas sobre el camino rural cerca de la población de

Jayacatlán, distrito de Etlá, Estado de Oaxaca. Un ejemplar herborizado, fue depositado en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU 739650) como respaldo para la presente investigación.

#### 4.1.2.3. Aislamiento de metabolitos.

El material vegetal (raíces, 939.2g.) se secó al ambiente y se cortó en trozos. Se sometió a extracción subsecuente con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. El material extraído con hexano y diclorometano, se reunió (10.3g) y se separó en sus constituyentes por cromatografía en columna (Silica gel 60, 330 g). De las fracciones 35-41 eluidas con un sistema hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y por CCF (Si-gel; H-AcEt 7:3) se aisló el mundulinol (**III**) descrito inicialmente de *Mundulea sericea* (Van Zyl *et al.*, 1979). De las fracciones reunidas 89 a la 106 desarrolladas con hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y purificado por CCF (Silica gel H-AcEt: 8:2 X 2) se aisló un compuesto del cual no se encontró información en la literatura, por lo que lo denominamos jayacanol (**IV**) en remembranza del lugar donde fue colectada la planta analizada. De las fracciones 130-140 eluidas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y purificadas por CCF (Silica gel H-AcEt: 8:2 X 3) se aisló la mundulina (**V**) este flavonoide al igual que **III** fue descrito de *M. sericea* por Van Zyl *et al.*, (1979). En la fracción 118 eluida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se logró aislar pura la minimiflorina (**VI**) este compuesto fue descrito por primera vez de las raíces de *L. minimiflorus* por Mahmoud y Waterman (1985). Finalmente de las fracciones 134-174 obtenidas con un sistema de diclorometano, se sometieron a separación en sus componentes en una columna cromatográfica desarrollada con un sistema H/ac et. y se obtuvieron unos cristales amorfos de color amarillo, los cuales revelaron una mancha no bien definida al aplicarse la solución de sulfato cérico. Esta mezcla se sometió a purificación por placa preparativa (ccf) con un sistema Hex-Ac.Et. 8:2 por cinco veces subsecuentes. Al final, se obtuvo un cristal de color amarillo cuyos estudios espectroscópicos revelaron que se trataba de la mezcla de los compuestos lupinifolinol (**VII**) y orotina (**VIII**) ambos compuestos aislados también de *L. guatemalensis* por Ingham *et al.*, (1988) y *L. parviflorus* descrita por Waterman y Mahmoud (1987), respectivamente.

**Mundulinol (III)**.- (3,5-dihydroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalil)-dihidroflavonol) Se aisló como un aceite de color amarillo purificado por cc y ccf. (hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:1);  $\alpha_D^{23} = +34.82^\circ$ ; (CHCl<sub>3</sub>; c 1.78), reportado  $\alpha_D^{23} = +94.9^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c 0.01) (Van Zyl *et al.*, 1979). UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 205 (4.46), 275.5 (4.53), 316 (4.10), 364 (3.4); IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3508 (OH), 2980 y 2931 (C-H alif.), 1709 (C=O), 1627 (C=C), 1465 (C-C Alif); EMIE eV, *m/z* (rel. int.): 406 (C<sub>25</sub> H<sub>26</sub> O<sub>5</sub>) [M]<sup>+</sup> (74.8), 391 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 363 (5.5), 271 (21.5), 243 (9.4), 215 (9.4), 189 (7), 91(5.5). RMN <sup>1</sup>H 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS: 500 MHz. 12.24 (s, 1H), 7.44 (m, 4H), 6.63(d, 1H, J=10), 5.50 (d, 1H, J=10), 5.40 (dd, 1H, J=7.4 y 1.4Hz), 3.22 (dd, 2H, J=7.5 y 0.8Hz), 3.04 (dd, Hax, J=12.5 y 17.1Hz), 2.82 (dd, Heq, J=3.4 y 1.7Hz), 1.65 (d, J=1.2Hz) 1.44 (d, J=3.04Hz); RMN <sup>13</sup>C 125 MHz, (CDCl<sub>3</sub>/TMS): C-6 (103.17), C-7 (160.73) C-8 (109.30), C-8a (159.25), los datos mencionados, también son descritos por Van Zyl *et al.* (1979); CD (MeOH: c 0.0123):  $[\theta]_{216} 0$ ,  $[\theta]_{232} +4.0$ ,  $[\theta]_{285} 0$ ,  $[\theta]_{299} -3.209$ ,  $[\theta]_{318} 0$ ,  $[\theta]_{323} +0.857$ ,  $[\theta]_{353} +1.150$ ,  $[\theta]_{414} 0$ .

**Jayacanol (IV)** (3,5,2'-trihidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalil)-dihidroflavonol). Se aisló por cc y ccf como sólido aceitosos de color amarillo, (Hexano/acetato de etilo, 8:2),  $\alpha_D^{23} = -147.5^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c1.2); UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 265 (3.44), 276 (4.5), 315 (4.02), 365 (3.44), 276 (4.5), y 203 (4.48). IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3403 (OH), 2930.7 (C-H alif.), 2857.8 (C-H alif.), 1628 (C=O), 1465 (C-C alif.), 1709 (C=O); HREIMS *m/z* 422.1742 para C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub> (calc. 422.1729); EIMS 70 eV, *m/z* (rel. int): 422 (100), [M]<sup>+</sup> (C<sub>25</sub> H<sub>26</sub> O<sub>6</sub>) 407 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (89.7), 287 (27.5) 271 (30), 215 (41.4); RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$ 5.39 (d, J=11.9 Hz, 1H, H-2),  $\delta$ 4.52 (d, J=11.5Hz, 1H, H-3ax, y H-3ec),  $\delta$ 6.97 (dd, J= 1.0 & 8.0 Hz, 1H, H-3'),  $\delta$ 7.27 (td, J= 1.5 & 7.5 Hz, 1H, H-4'),  $\delta$ 7.02 (td, J= 1.5 & 7.5 Hz, 1H, H-5'),  $\delta$ 7.56 (dd, J= 1.5 & 7.5 Hz, 1H, H-6'),  $\delta$ 5.53 (d, J= 10 Hz, 1H, H-3''),  $\delta$ 6.63(d, J=10 Hz, 1H, H-4'')  $\delta$ 3.19 (dd, J= 7.25 y 14.4 Hz, 1H, H-1'''),  $\delta$ 5.13 (tq, J= 7.5 y Hz, 1H, H-2'''),  $\delta$ 1.60 y 1.65 (s, 6H, CH<sub>3</sub> Pr),  $\delta$ 1.45 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-Cr),  $\delta$ 4.65 (s, D<sub>2</sub>Oex, 1H, OH-3),  $\delta$ 11.31 (s, D<sub>2</sub>Oex, 1H, OH-5). RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): 78.50 (C-2), 73.22 (C-3), 195.42 (C-4), 100.29 (C-4a), 160.99 (C-5), 103.45 (C-6), 156.13 (C-7), 109.56 (C-8), 159.07 (C-8a), 124.19 (C-1'), 154.00 (C-2'), 118.01 (C-3'), 129.93 (C-4'), 121.19 (C-5'), 126.93 (C-6'), 78.64 (C-2''), 126.46 (C-3''), 115.33 (C-4''),

21.29 (C-1'''), 122.12 (C-2'''), 131.60 (C-3'''), 17.81 & 25.69 (CH3-3'''), 28.38 (CH3-2''') DC (MeOH: c 0.0123):  $[\theta]_{213} -4.470$ ,  $[\theta]_{225} 0$ ,  $[\theta]_{245} +1.950$ ,  $[\theta]_{256} 0$ ,  $[\theta]_{267} -2.780$ ,  $[\theta]_{274} 0$ ,  $[\theta]_{284} +6.4$ ,  $[\theta]_{293} 0$ ,  $[\theta]_{302} -2.500$ ,  $[\theta]_{313} 0$ ,  $[\theta]_{323} +1.780$ ,  $[\theta]_{359} +1.170$ ,  $[\theta]_{425} 0$ .

*Mundulina* (V). (5,2'-dihidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalil)-flavanona). Se aisló como un aceite de color amarillo por cc y ccf hexano/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2:1);  $\alpha_D^{23} = -0.029^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c 2.92), reportado  $\alpha_D^{23} = -221.0^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c 0.01) (Van Zyl *et al.*, 1979); UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 274 (4.53), 312 (4.03), 363 (3.52); IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3419 (OH), 2980 y 2929.5 (C-H), 1627.2 (C=C), 1451 (CH<sub>2</sub>), 1709 (C=O). EMIE 70 eV, *m/z* (rel. int.): 390 (78.6) [M]<sup>+</sup>, (C<sub>25</sub> H<sub>26</sub> O<sub>4</sub>) 375 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 347 (10), 335 (8), 319 (15.1), 271 (17.24), 215 (45). RMN <sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): 12.24 (s, 1H),  $\delta$ 7.44 (*m*, 4H),  $\delta$ 6.63 (*d*, 1H, J=10 Hz),  $\delta$ 5.50 (*d*, 1H, J= 10 Hz),  $\delta$ 5.40 (*dd*, 1H, J=7.4 y 1.4Hz),  $\delta$ 3.22 (*dd*, 2H, J=7.5 y 0.8Hz),  $\delta$ 3.04 (*dd*, H<sub>ax</sub>, J=12.5 y 17.1Hz),  $\delta$ 2.82 (*dd*, H<sub>ec</sub>, J=3.4 y 1.7Hz),  $\delta$ 1.65 (*d*, J=1.2Hz)  $\delta$ 1.44 (*d*, J=3.04Hz): CD (MeOH: c 0.019):  $[\theta]_{208} -0.099$ ,  $[\theta]_{209} 0$ ,  $[\theta]_{224} +2.380$ ,  $[\theta]_{237} 0$ ,  $[\theta]_{276} -2.650$ ,  $[\theta]_{297} -3.070$ ,  $[\theta]_{302} 0$ ,  $[\theta]_{322} +0.652$ ,  $[\theta]_{363} +0.653$ ,  $[\theta]_{411} 0$ .

*Acetato de mundulina* (Va) El compuesto V fue acetilado utilizando anhídrido acético en piridina, transformándose en el compuesto Va (5, 2'-diacetil-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalil)-dihidroflavonol). Se obtuvo como un aceite amarillo, el cual se purificó por cc y ccf (Silica ge/ 0.25 mm, hexano/acetato de etilo, 9:1);  $\alpha_D^{23} = -0.0049^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c2.45); EMIE 70 eV, *m/z* (rel. int): 432 (12.8) [M]<sup>+</sup> (C<sub>27</sub> H<sub>28</sub> O<sub>5</sub>), 390 [M-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> = A<sup>+</sup> (50), 375 [A<sup>+</sup> -CH<sub>3</sub>] (100), 347 (6), 335 (4.2), 322 (6), 319 (7), 307 (17.8), 285 (3.5), 271 (8.5), 243 (6.4) 215 (15.7), 203 (9.2); RMN <sup>1</sup>H 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$ 5.43 (1H, *dd* 3.0 & 13.0 Hz, H-2),  $\delta$ 2.97 (1H, *dd*, J= 13.0 & 16.6 Hz, H-3 ax),  $\delta$ 2.73 (1H, *dd*, J=3.2 & 16.6 Hz, H-3 ec),  $\delta$ 7.35-7.46 (Ar, *m*, 5H),  $\delta$ 5.63 (1H, *d*, J= 10.4 Hz, H-3'''),  $\delta$ 6.38 (1H, *d*, J=10.1 Hz, H-4''),  $\delta$ 3.29 (2H, *d*, J= 7.4 Hz, H-1'''),  $\delta$ 5.16 (1H, *tt*, J=1.4, 7.4 Hz, H-2'''),  $\delta$ 1.64 (3H, *d*, J= 1.0 Hz, CH<sub>3</sub>-Pr),  $\delta$ 1.65 (3H, *d*, J= 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>Pr),  $\delta$ 1.44 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-DMP),  $\delta$ 1.45 & 2.41 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-DMP).

*Minimiflorina* (VI) (2',5-dihidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalil)-flavanona). Se aisló como un aceite amarillo, purificado por cc y ccf (hexano/acetato de etilo, 85:15);  $\alpha_D^{23} = -27.62^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c2.1), reportado  $\alpha_D^{23} = -66.0^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c 1.00) (Van Zyl et al., 1979); RMN <sup>13</sup>C 125MHz (CDCl<sub>3</sub>/TMS): C-6 (103.16), C-7 (159.97), Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos por Mahmoud y Waterman (1985).

UV  $\lambda_{max}^{MeOH}$  nm (log  $\epsilon$ ): 274 (4.53) 312 (4.03), 363 (3.52); IR  $\nu_{max}^{CHCl_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3419 (OH), 2980 y 2929.5 (C-H), 1627.2 (C=C), 1451 (CH<sub>2</sub>), 1709 (C=O). EMIE 70 eV, *m/z* (rel. int.): 390 (78.6) [M]<sup>+</sup>, (C<sub>25</sub> H<sub>26</sub> O<sub>4</sub>) 375 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 347 (10), 335 (8), 319 (15.1), 271 (17.24), 215 (45). RMN <sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$ 12.24 (s, 1H),  $\delta$ 7.44 (m, 4H),  $\delta$ 6.63 (d, 1H, J=10 Hz),  $\delta$ 5.50 (d, 1H, J= 10 Hz),  $\delta$ 5.40 (dd, 1H, J=7.4 y1.4Hz),  $\delta$ 3.22 (dd, 2H, J=7.5 y 0.8Hz),  $\delta$ 3.04 (dd, Hax, J=12.5 y 17.1Hz),  $\delta$ 2.82 (dd, Hec, J=3.4 y 1.7Hz),  $\delta$ 1.65 (d, J=1.2Hz)  $\delta$ 1.44 (d, J=3.04Hz): CD (MeOH: c 0.019):  $[\theta]_{208} -0.099$ ,  $[\theta]_{209} 0$ ,  $[\theta]_{224} +2.380$ ,  $[\theta]_{237} 0$ ,  $[\theta]_{276} -2.650$ ,  $[\theta]_{297} -3.070$ ,  $[\theta]_{302} 0$ ,  $[\theta]_{322} +0.652$ ,  $[\theta]_{363} +0.653$ ,  $[\theta]_{411} 0$ .

Mezcla de *Orotinina* (VII) (5, 2', 6 -trihidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalil)-flavanona) y *Lupinifolina* (VIII) (4',5-dihidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilcromeno)-8-(3''',3'''-dimetilalil)-flavanona).

#### 4.1.3. *Lonchocarpus mutans*. M. Sousa.

##### 4.1.3.1. Antecedentes.

*Lonchocarpus mutans* fue clasificado por Mario Sousa en el subgénero *Lonchocarpus*, sección *Standleyi*, (Sousa 2009). Es un árbol pequeño de aproximadamente 3 metros de altura y d. a. p de 15 cm. Su hábitat es de clima seco y cálido, con distribución en la costa del Pacífico de la República Mexicana.

#### 4.1.3.2. Material vegetal.

El material vegetal consistió en raíces de un ejemplar arbóreo de 3 m de altura, colectado en un potrero ubicado en el ejido Agua de la Caña, Municipio de Pinotepa Nacional, distrito de Jamiltepec Oaxaca. Un ejemplar herborizado, fue depositado en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU 1155339) como respaldo para la presente investigación.

Tabla 4.1.- Características físicas de los metabolitos aislados de *L. oaxacensis*.

Compuesto	UV onda corta	UV onda larga	CeSO <sub>4</sub>	rf
Aceite	No visible	No visible	Morado	0.94
Mundulina	Oscuro	Oscuro	Amarillo	0.8
Esteroides	No visible	no visible	Morado	0.64
Mundulinol	oscuro	oscuro	Café claro	0.57
Minimiflorina	oscuro	oscuro	Naranja	0.43
Esteroides	No visible	no visible	Morado	0.34
Jayacanol	oscuro	oscuro	Naranja	0.28

rf.- sistema H/Ac-et 85-15

#### 4.1.3.3. Determinación de composición química por comparación de extractos.

El material vegetal (raíces) se secó al ambiente y se cortó en trozos. Se sometió a extracción subsecuente con hexano y diclorometano. Los extractos de hexano y diclorometano, se desarrollaron por cromatografía cromatoplaca de Silica-gel comparándose con los compuestos aislados de *L. oaxacensis*. El compuesto **III** fue aislado con un sistema Hexano-AcOEt 7:3. **IV** (H-AcEt: 8:2 X 2). **V** (H-AcEt: 8:2 X 3) y **VI** (H-AcEt: 8:2 X 3). Para confirmar la presencia de los metabolitos en *L. mutans*, se utilizaron como estándares los compuestos aislados de las raíces de *L. oaxacensis*, de los cuales se compararon sus características físicas tales como el color emitido al ser observados con U.V en onda corta (254nm) y larga (366nm), el color del compuesto al ser sometido a oxidación con sulfato cérico, tales características son descritas en la tabla 4.1.

#### **4.1.4. *Lonchocarpus septentrionalis* M. Sousa**

##### **4.1.4.1. Antecedentes.**

*Lonchocarpus septentrionalis* esta agrupado taxonómicamente en el subgénero *Lonchocarpus*, sección *Lonchocarpus*, (Sousa, 2009b). Es un árbol alto que puede llegar a medir más de 30 metros de altura. Su hábitat es selva alta perennifolia, con distribución en el sureste de la República Mexicana.

##### **4.1.4.2. Material vegetal.**

El material vegetal consistió en raíces obtenidas de un ejemplar arbóreo, colectado en los límites de la estación de Biología de Los Tuxtlas en el Estado de Veracruz. Un ejemplar herborizado fue depositado en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU) como respaldo para la presente investigación.

##### **4.1.4.3. Aislamiento de compuestos.**

El material vegetal (raíces secadas al ambiente y cortadas en trozos pequeños) se sometió a extracción subsecuente con hexano y diclorometano por 72 horas. Los extractos crudos se obtuvieron eliminando el disolvente con presión reducida. Posteriormente ambos extractos se compararon por cromatografía en capa fina y mostraron componentes químicos semejantes. El extracto de hexano (1.53 g) se sometió a separación de sus componentes en una columna cromatográfica empacada con Si-gel (rel 1:30) y desarrollada con hexano, acetato de etilo y metanol, así como mezclas de estos disolventes de polaridad gradual. De este proceso se obtuvieron un total de 61 fracciones. De las fracciones 38-40 (626 g) desarrolladas con un sistema H/Ac et. 2:1 se observaron dos manchas que revelaban con la solución de sulfato cérico con un  $R_f = 0.5$ , por lo que se sometieron a separación en una microcolumna empacada con si-gel (1:30) desarrollada con un sistema H/Ac et 4:1, en fracciones de 50 ml cada una. Al final se obtuvieron un total de 30 fracciones. De la fracción 10 se obtuvo el



compuesto **IX**, de las fracciones reunidas de la 17 a 19, se pudo aislar el compuesto **X**, mientras que el compuesto **XI** se aisló de las fracciones 35-39. De acuerdo a sus constantes físicas y espectroscópicas se determinó que se trataba de tres metabolitos con estructura de chalconas

*Isocordoina (IX)*. RMN<sup>1</sup>H 500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS. δ13.77 (H-2'), δ1.25 (H-3', 6H, s), δ3.48 (2H, d, 7.2Hz) δ5.30 (1H, t, 1.5 y 7.21Hz), δ6.11 (OH-4, s), δ6.43 (H-5', 1H, d, 9Hz), δ7.75 (H-6' 1H, d, 9Hz), δ7.59 (H-α 1H, d, 15.6Hz), δ7.88 (H-β 1H, d, 15.6Hz). EMIE m/z 308 (C<sub>20</sub> H<sub>20</sub> O<sub>3</sub>) (24) [M]<sup>+</sup>, 240 (100), 239 (65), 163 (70), 137 (30), 103 (15), 77 (12.6), 59 (80)

*Metil derricidina (X)*. Se aisló como un sólido amorfo de color amarillo, el cual al ser oxidado con la solución de sulfato de cério sobre una cromatoplaça de sílica gel, mostró un color amarillo claro. IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 2933.6 y 2856.4 (C-H alif.), 1606.6 (C=O), 1463 (C-C alif.), 1255.6. RMN<sup>1</sup>H 500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS. δ3.89 (H-2', 3H, s), δ1.77 y 1.81 (H-3', 6H, s), δ4.58 (2H, d, 6.5Hz), δ5.50 (1H, dt, 1.5 y 6.5Hz), δ7.52 (H-α 1H, d, 15.6Hz), δ7.68 (H-β 1H, d, 15.6Hz). EMIE m/z. 322 (21), 254(100), 253(52), 226(28), 197(3), 177(3), 163(12), 151(22), 136(13), 131(8), 103(10), 91(2), 77(6), 69(36).

*Derricidina (XI)*. Se aisló como un sólido aceitoso de color amarillo, el cual al ser oxidado con la solución de sulfato de cério sobre una cromatoplaça de sílica gel, mostró un color amarillo fuerte. IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3608.2 (OH), 2927.4 (C-C), 1635.7 (C=O), 1578.9, 1359.3 (C-CH<sub>3</sub>), 1134.6. RMN<sup>1</sup>H 500MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS. δ13.45 (H-2', 1H, s), δ1.76 y 1.81 (3H,s), δ4.66 (2H, d, 6.3Hz), δ5.78 (H-3', 1H, dt, 1.5 y 6.3Hz), δ7.59 (H-α, 1H, d, 15.9), δ7.89 (H-β, 1H, d, 15.9Hz). EMIE Ev, m/z (rel. int.): 308 (C<sub>20</sub> H<sub>20</sub> O<sub>3</sub>) (24) [M]<sup>+</sup>, 240 (100), 239 (65), 163 (70), 137 (30), 103 (15), 77 (12.6), 59 (80).

#### **4.1.5. *Lonchocarpus guatemalensis* Benth. var. *mexicanus* (Pittier) Hermann**

##### **4.1.5.1. Antecedentes.**

*Lonchocarpus guatemalensis* Benth. var. *mexicanus* (Pittier) Hermann, es una especie con distribución en las costas del Golfo de México. Fue clasificada como *L. mexicanus* por Pittier (1917), posteriormente en una revisión del complejo *L. guatemalensis* realizada por Herman, en 1949, concluyó que *L. mexicanus* debía considerarse como una variedad de *L. guatemalensis*. De acuerdo con la revisión taxonómica (Sousa, 2009), esta especie está agrupada en la sección *Lonchocarpus*, del género *Lonchocarpus*.

##### **4.1.5.2. Material vegetal.**

El material vegetal consistió en raíces obtenidas de un ejemplar arbóreo colectado en la orilla de un arroyo en el camino que conduce a la Estación de Biología de Los Tuxtlas, en el Estado de Veracruz. Un ejemplar fue depositado en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU 902187) como respaldo para la presente investigación.

##### **4.1.5.3. Aislamiento de metabolitos.**

El material vegetal se secó y se convirtió en viruta, posteriormente se sometió a extracción con hexano por un periodo de 72 horas. El extracto crudo se separó en sus componentes químicos por CC, con fracciones de 200 ml cada una y se obtuvieron un total de 235 fracciones. De la fracción 62 desarrollada con hexano, se aisló un compuesto amorfo de color amarillo el cual de acuerdo con sus constantes espectroscópicas se pudo determinar como lonchocarpina (XII).

*Lonchocarpina* (XII). Se aisló como un sólido amorfo de color amarillo fuerte, al ser sometida a oxidación fuerte con la solución crómica, reveló de color amarillo claro, sus

datos espectroscópicos fueron: IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2981.8, 2934.8, 2934.8 (C-H alif), 1639.4 (C=O), 1583.5, 1357, 116.7. RMN<sup>1</sup>H 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>/TMS)  $\delta$ 7.42 (3H, *m*, H-3, 4 y 5),  $\delta$ 7.64 (2H, *m*, H-2 y 6),  $\delta$ 7.56 (1H, *d*, 15.58Hz, H- $\alpha$ ),  $\delta$ 7.88 (1H, *d*, 15.58, H- $\beta$ ),  $\delta$ 6.38 (1H, *d*, 8.9Hz, H-5'),  $\delta$ 7.72 (1H, *d*, 8.9Hz, H-6'),  $\delta$ 5.59 (1H, *d*, 10.06Hz, H-3'''),  $\delta$ 6.75 (1H, *d*, 10.06Hz, H-4'''),  $\delta$ 1.47 (6H, *s*, 2Me),  $\delta$ 13.67 (1H, *s*, OH *exch*).

## 4.2. Análisis quimiotaxonómico.

El análisis quimiotaxonómico del género *Lonchocarpus*, se realizó con base en los resultados obtenidos con el análisis químico de las especies trabajadas químicamente y con los encontrados en la literatura. Los flavonoides fueron utilizados para corroborar la hipótesis de clasificación propuesta por Sousa, en algunos casos fueron de utilidad para complementar la información y proponer modificaciones.

Un ejemplo de la utilidad de los flavonoides como caracteres útiles para un análisis cladístico, se muestra con las especies de la sección *Standleyi*, para lo cual se realizó una matriz de presencia/ausencia de sus flavonoides (Tabla 6.19). Los datos se procesaron con el programa cladístico Winclada, los cuales se sometieron al análisis bootstrap con 500 repeticiones (Grafica 6.4).

### 4.2.1. Análisis de ruta biogenética

Los flavonoides aislados en las especies analizadas químicamente, así como los descritos por la literatura para las especies de *Lonchocarpus sensu stricto*, son utilizados para el análisis de ruta biogenética, con base en el esquema de síntesis biogenética de los flavonoides en las Leguminosas, descrito por Gottlieb (1980) (Fig. 2.1).

#### 4.2.2- Valores de Oxidación/Metilación

Para cada especie estudiada, se calculó el valor medio de O/M de acuerdo con la metodología propuesta por Gottlieb (1981). Este método consistió en asignar un valor arbitrario a la estructura básica de cada uno de los flavonoides. Los valores de oxidación son asignados a las estructuras de los flavonoides, partiendo de 0 asignado los estilbenos, chalcona y flavanona, este valor va aumentado de acuerdo con la transformación estructural de los flavonoides, los cuales se consideran como valores básicos, descrito en el esquema biogénico (fig. 2.1). Se consideran también para el cálculo la presencia o ausencia de sustituyentes cuyos valores se muestran en la tabla 4.2. Por otra parte, los valores de metilación son determinados considerando los sustituyentes, mismos que son indicados en la tabla 4.3. En este caso el valor básico para cualquier estructura modificada corresponde a 0 puntos, la presencia de un grupo metoxilo o metilendioxi se considera un grado de metilación, adicionándose un punto por cada uno presente en la estructura, por el contrario la ausencia de un OH corresponde a la sustracción de un punto de acuerdo con la figura 1.

Tabla 4.2.- Valores de oxidación asignados a los sustituyentes de los flavonoides.

Valor básico para tipo estructural	X
Incremento: cada grupo OH adicional	+1
Cada grupo OH ausente	-1
Anillo O-CH <sub>2</sub> -O.	+1
Valor básico para $\gamma,\gamma$ o $\alpha,\alpha$ dimetilalilo	0
Incremento: doble enlace o hidroxilo adicional	+1
Ciclación a dimetilcromeno o isoprenildihidrofurano	+2
Ciclación a furano	+3
Ciclación a otros tipos de anillos	

Tabla 4.3.- Valores de metilación asignados a los sustituyentes de los flavonoides

Valor Básico. Presencia de todas las estructuras observadas	0
Incremento para cada O-Me ó O-CH <sub>2</sub> -O	+1
Por cada OH adicional.	- 1

### **4.3. Estudios de actividad biológica**

#### **4.3.1. Ensayos de actividad citotóxica**

El análisis de citotoxicidad de los metabolitos, se realizó siguiendo la metodología de ensayo de citotoxicidad colorimétrica para el screening de drogas anticancerígenas en placas de 96 pozos (Skehan *et al.* 1990). Las líneas celulares utilizadas para evaluar la actividad citotóxica fueron células tumorales humanas: carcinoma epidermoide de laringe (Hep2), carcinoma cérvico uterino (HELA), carcinoma del sistema nervioso central (U251), carcinoma de próstata (PC-3) (tabla 4.2).

Se utilizó un cultivo fijado con ácido tricloroacético el cual fue posteriormente coloreado con sulforrodamida B (URB) al 0.04% (peso/vol.), disuelta en ácido acético al 1%. El exceso de tinte se eliminó con cuatro lavados con ácido acético al 1% y las proteínas se prepararon con una base tris no buffer 10  $\mu$ M (tris [hidroximetil] aminometano) para la determinación de densidad óptica con el apoyo de una computadora de lector de interfase, en placas de 96-pozos para platos de microtubos. La señal del detector fue de 564 nm en el espectro visible, de aproximadamente 1.5 con 1,000 células por pozo (Skehan *et al.*, 1990).

#### **4.3.2. Ensayos de actividad antifúngica.**

Cada compuesto se disolvió en acetona (0.25 mg/ml). Seguidamente se agregó una alícuota de cada una de las soluciones (0.5 ml) en 6 ml de un medio esterilizado (15 atmósferas durante 15 minutos) de malta-agar (1.5%) y se depositó en una caja petri (60x15  $\mu$ m). Las cajas petri se depositaron en una estufa para eliminar el disolvente. Como control se utilizó únicamente agua con disolvente (0.5 ml y como control positivo benzal). Los medios contaminados (tratamientos) se sometieron a agitación en un vortex, eliminando con este proceso el disolvente residual. En cada caja se inoculó una pequeña cantidad del micelio, la cual consistió en una porción circular del micelio de *Postia placenta* (diámetro de 6 mm) tomada con un sacabocado de un cultivo de siete

días de edad. Cada tratamiento consistió de cinco replicas simultáneamente. Después de un periodo de incubación de 7 días a 25 grados centígrados, el porcentaje de inhibición se determinó midiendo el diámetro de crecimiento del micelio (Reyes-Chilpa, *et al.*, 1998).

La inhibición del crecimiento micelial causado por los compuestos se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ inhibición } = \frac{\text{crecimiento del control} - \text{crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del control}} \times 100$$

Los datos se analizaron en una hoja de cálculo, determinándose las medias por tratamientos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis químico de las especies seleccionadas

El estudio químico de las raíces de 5 especies del género *Lonchocarpus*. Una de ellas del subgénero *Densiflorus*, *ined.* y cuatro del subgénero *Lonchocarpus* permitió el aislamiento y elucidación estructural de doce flavonoides (Tabla 5.1) del tipo de las chalconas, flavanonas, 3-hidroxiflavanona y auronoles. Cuatro de tales flavonoides, no habían sido reportados previamente en la literatura. Además se identificaron por CCF cuatro compuestos en los extractos de *L. mutans*, previamente aislados de *L. oaxacensis*.

Tabla 5.1 Flavonoides descritos de *Lonchocarpus spp.*, analizados en el presente trabajo.

<b>Especie</b>	<b>Flavonoide</b>	<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Clave</b>
<i>L. obovatus</i>	Auronoles	Inirebina A <sup>n</sup>	<b>I</b>
		Inirebina B <sup>n</sup>	<b>II</b>
<i>L. oaxacensis</i>	Flavanonas	Mundulina	<b>III</b>
		Minimilflorina	<b>IV</b>
		Orotinina	<b>VII</b>
		Lupinifolina	<b>VIII</b>
	3-hidroxiflavanonas	Mundulinol	<b>V</b>
		Jayacanol <sup>n</sup>	<b>VI</b>
<i>L. mutans</i>	Flavanonas	Mundulina*	<b>III</b>
		Minimilflorina*	<b>IV</b>
	3-hidroxiflavanonas	Mundulinol*	<b>V</b>
		Jayacanol*	<b>VI</b>
<i>L. septentrionalis</i>	Chalcona	Isocordoina	<b>IX</b>
		Metil derricidina <sup>n</sup>	<b>X</b>
		Derricidina	<b>XI</b>
<i>L. guatemalensis</i> var. <i>mexicanus</i>	Chalcona	Lonchocarpina	<b>XII</b>

<sup>n</sup>Compuestos nuevos aislados en este trabajo. \*Identificados por CCF

Todos los flavonoides aislados están sustituidos por uno o dos isoprenilos; en algunas especies este sustituyente se presenta libre, pero con frecuencia se oxida para formar un anillo de furano generalmente en las especies del subgénero *Densiflorus* M. Sousa *ined.*, y de dimetilpirano en las especies del subgénero *Lonchocarpus*. Es interesante

también notar que las especies con caracteres avanzados de ambos subgéneros, producen flavonoides que muestran la pérdida del sustituyente OH ó O-Me sobre C-5.

Del subgénero *Densiflorus* M. Sousa, *ined.*, se estudió una sola especie, *L. obovatus*, la cual se distribuye en la región de la Mixteca que abarca los Estados de Oaxaca, Puebla y Guerrero. De las raíces se aislaron dos flavonoides con estructura de auronas, no descritas previamente en la literatura y a las cuales se nombró inirebina A (I) y B (II). Los datos espectroscópicos de las inirebina A y B, fueron comparados con los datos descritos para la derriobtusona aislada de *Lonchocarpus obtusus* Benth., analizada químicamente bajo *Derris obtusa* por Do Nascimento *et al.* (1976). Aunque la ubicación taxonómica de esta especie aún no es muy clara, ya que morfológicamente puede considerarse como *Lonchocarpus* en la sección *Laxiflori* o bien en el género *Muelleria* (Sousa, com. pers.).

Del subgénero *Lonchocarpus* se estudiaron cuatro especies, dos de ellas agrupadas en la sección *Standleyi* y dos en la sección *Lonchocarpus*. De la sección *Standleyi* se realizó el estudio fitoquímico de las raíces de *L. oaxacensis* y *L. mutans*. La primera especie fue colectada en Jayacatlán, Etlá, de la región de la Cañada; mientras que la segunda fue colectada en Pinotepa Nacional de la región de la costa, ambas del Estado de Oaxaca. De *L. oaxacensis* se logró el aislamiento y elucidación de dos flavanonas: la mundulina (III), la minimiflorina (VI) y dos 3-hidroxi-flavanonas, el mundulinol (IV), así como un compuesto nuevo, no descrito previamente en la literatura el jayacanol (V), por lo tanto es una contribución del presente trabajo (Alavez Solano *et al.*, 2000). Así mismo en las fracciones con mayor polaridad, se pudo identificar en una mezcla, dos compuestos con estructura de flavanona: la orotinina (VII) la lupinifolina (VIII). Los flavonoides de *L. oaxacensis* en todos los casos, mostraron un sustituyente isoprenilo unido al C-7 y un anillo de furano en arreglo lineal. Los datos espectroscópicos de los flavonoides (IV, VI-VIII) aislados de *L. oaxacensis* fueron semejantes a los previamente descritos por la literatura (Ingham *et al.*, 1988; Mahmoud y Waterman, 1985; Waterman y Mahmoud, 1987; Magalhães *et al.*, 1999). En el caso de *L. mutans* los extractos de las



raíces se analizaron y compararon por cromatografía en capa fina (Silica-gel) evidenciando la presencia de los compuestos **III**, **IV** y **V**.

Por otra parte, de la sección *Lonchocarpus* se analizaron químicamente las raíces de *L. septentrionalis* y *L. guatemalensis* var. *mexicanus*. Ambas especies fueron colectadas en la región de Los Tuxtlas, Estado de Veracruz; la segunda, además, fue colectada también en Valle Nacional de la región del Papaloapan del Estado de Oaxaca. De *L. septentrionalis* se aislaron la isocordoina (**IX**), metil derricidina (**X**) y la derricidina (**XI**). Esta es la primera vez que se aísla y describe la estructura molecular de la metil derricidina (**X**). Los compuestos **IX** y **XI** se han aislado previamente de otras especies (Mahmoud y Waterman, 1986; Magalhães *et al.*, 1996; Magalhães *et al.*, 2004; Reyes-Chilpa *et al.*, 1995; y Gómez Garibay *et al.*, 1990), agrupadas en la misma sección a la que pertenece *L. septentrionalis*. De *L. guatemalensis* var. *mexicanus* se aisló la lonchocarpina (**XII**), con estructura de flavanona; este compuesto también es común en las especies agrupadas en la sección *Lonchocarpus*. Los flavonoides aislados de las especies antes mencionadas mostraron un patrón estructural común, el cual cuenta con un anillo de furano unido a los carbonos C-3' y 4' en arreglo angular, además carecen de un OH unido al C-5'.

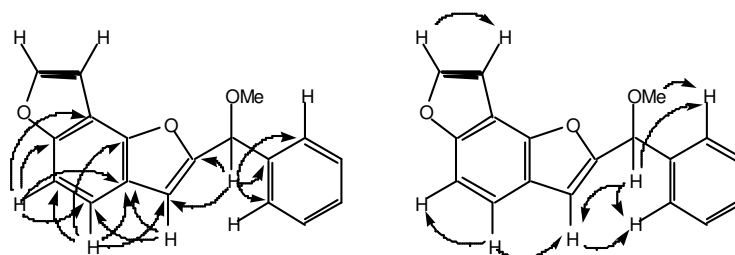
En el siguiente apartado se describe la estructura de los compuestos aislados.

#### **5.1.1. *Lonchocarpus obovatus* Benth.**

Del extracto de hexano de las raíces, se obtuvieron un total de 110 fracciones de 125 ml cada una. De la fracción 31-32 recorrida con hexano, se obtuvo un compuesto cristalino, el cual precipitó espontáneamente y se lavó con hexano, a este se le denominó inirebina A (**I**). De la fracción 34-35 desarrollada con hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por ccf, se aisló un compuesto aceitoso, al cual se denominó como inirebina B (**II**).

*Inirebina A (I)*, se aisló como un sólido cristalino con p.f. 112-114°C, el cual mostró en el espectro de UV dos bandas en 254 y 320 nm que corresponde a la estructura de un flavonoide. El espectro de IR mostró una banda en 1639  $\text{cm}^{-1}$ , que indicó la presencia de un grupo carbonilo conjugado.

El espectro de RMN<sup>1</sup>H mostró una señal simple en  $\delta$  7.58 que integra para un protón, tal señal fue atribuida a la presencia de un protón vinílico aislado (H-3). Dos señales dobles acopladas en  $\delta$  7.71 y 7.09 con  $J = 2$  Hz, indicaron la presencia de los protones H- $\beta$  y H- $\alpha$ , propios de un anillo de furano, el cual se consideró que estaba unido al anillo A de un flavonoide. Lo anterior se confirmó por la presencia de un sistema AB en  $\delta$  7.55 (1H, *d*,  $J = 9.0$  Hz) y  $\delta$  7.50 (1H, *dd*,  $J = 1.0$  y 9.0 Hz), tales señales fueron atribuidas a los protones aromáticos H-4 y H-5. La presencia de un grupo de señales en la región de los protones aromáticos en  $\delta$  8.01 (2H, *dd*,  $J = 1.0$  y 6.0 Hz),  $\delta$  7.52 (2H, *dd*, 1.5 y 7.5 Hz) y  $\delta$  7.61 (1H, *tt*, 1.5 y 7.5 Hz) sugirieron que la molécula presentaba el anillo aromático B no sustituido. Los datos anteriores, así como los observados en el espectro de RMN<sup>13</sup>C, en donde se observó una señal en  $\delta$  118.08, que corresponde a un carbono vinílico unido al C-3, así como una señal en  $\delta$  148.0 de un carbonilo (C-10), y dos señales en  $\delta$  103.6 y  $\delta$  145.2 atribuidas a los carbonos C- $\alpha$  y C- $\beta$ , confirmaron la presencia de un sustituyente furano. El espectro de masas mostró un ión molecular  $[\text{M}]^+ 278$ , congruente con la fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_3$  esperada para la estructura del compuesto I.



2

Figura 5.1.- Experimento de HMBC y NOESY de la inirebina B (II).

El experimento de HMQC realizado al compuesto **I**, confirmó las asignaciones de los protones con sus respectivos carbonos. Así mismo, el experimento HMBC mostró que el protón H-4 interactúa a tres enlaces con los carbonos cuaternarios C-8, C-6 y con el protón vinílico C-3, mientras que el estudio NOESY mostró la interacción espacial entre los protones H-3 con H-4 (fig. 5.1), confirmando el arreglo estructural propuesto.

*Inirebina B* (**II**), se aisló como un aceite de color amarillo, el cual reveló en CCF como una mancha de color morado al someterse a oxidación con la solución de sulfato de cerio al 2%. Su espectro de RMN<sup>1</sup>H mostró señales semejantes a las observadas en el compuesto **I**, lo cual sugiere el mismo patrón estructural. Sin embargo una señal simple en  $\delta$  3.47 que integra para 3 protones, así como otra señal simple que integra para un protón en  $\delta$  4.4, reveló la presencia de un metoxilo (-OMe) unido al C-10. La presencia de tal sustituyente fue confirmada con el análisis del espectro de IR ya que en este espectro no se observó la banda en  $1709\text{ cm}^{-1}$  observada en el compuesto **I**, que corresponde a la presencia de un carbonilo. Por otra parte en el espectro de EMIE se observó un ión molecular de  $m/z$  278 consistente para la fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_3$  y con la estructura propuesta para el compuesto **II**.

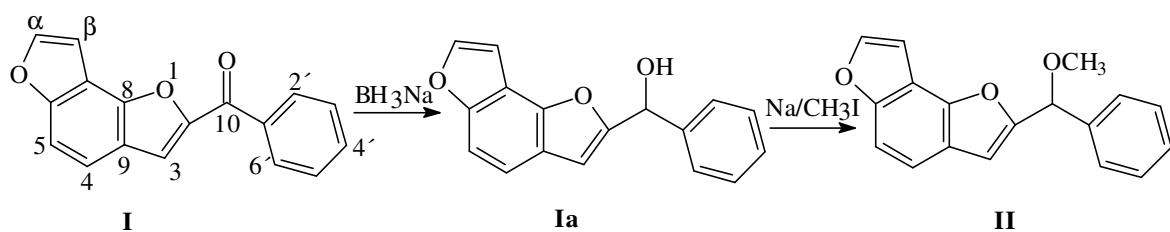


Figura 5.2.- Auronoles de *L. obovatus* y transformación química de **I** a **II**

El compuesto **I** presentó un carbonilo unido al C-10, mientras que **II** está sustituido por un -OMe. La relación entre ambos compuestos se puso de manifiesto con la transformación de la inirebina A en inirebina B (fig. 5.2). Para ello, una muestra de 1.3g del compuesto **I** se sometió a reducción con  $\text{BH}_3\text{Na}$ , como producto principal se obtuvo el compuesto **Ia**, el cual mostró en el espectro de IR, una banda en  $3595\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un sustituyente OH, este dato complementado con una señal en

$\delta$ 2.76 que se observó en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , confirmó la reducción del carbonilo. El producto **la** se sometió a metilación con yoduro de metilo e hidruro de sodio en tetrahidrofurano en condiciones anhidras por un periodo de 2 horas y se obtuvo como producto **II**, tal como se describe en la figura 5.2.

#### 4.1.2. *Lonchocarpus oaxacensis* Pittier

Los extractos de hexano y diclorometano de las raíces de *L. oaxacensis*, fueron similares al ser comparados por cromatoplaaca (1.3g.) por lo tanto se reunieron y se sometieron a separación en sus componentes en cromatografía en columna (cc) y capa fina (cf) sucesivamente. De este proceso se aislaron los flavonoides, mundulina (**III**), mundulinol (**IV**), jayacanol (**V**) minimiflorina (**VI**), orotina (**VII**) y lupinifolina (**VIII**).

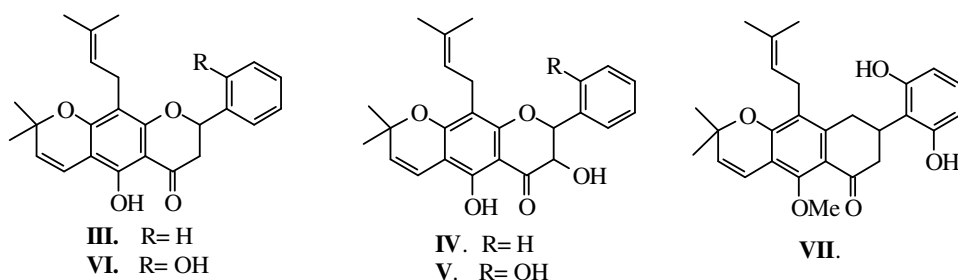


Figura 5.3. Flavonoides aislados de *L. oaxacensis*.

*Mundulina* (**III**). Se aisló como sólido aceitoso de color amarillo. El espectro de  $^1\text{H}$  NMR mostró un sistema  $\text{AX}_2$  lo cual indicó la presencia de los protones H-2, H-3ax. y H-3ec., propios del esqueleto de una flavanona (Harborne *et. al.*, 1975). La señal doble de doble en  $\delta$ 5.40 (3.3 y 12.6Hz, 1H) fue asignada al H-2 mientras que dos señales doble de doble en  $\delta$ 3.04 ( $J= 12.9, 7.1\text{Hz}$ , 1H) y 2.83 ( $J=3$  y 17.1Hz, 1H) fueron asignadas a los H-3ax y H-3ec. En  $\delta$ 12.24 se observó una señal intercambiable con  $\text{D}_2\text{O}$ , la cual fue atribuida a un OH que forma un puente de hidrógeno. En la región de los protones aromáticos, una señal múltiple centrada en  $\delta$ 7.44 que integra para 5 protones, sugirió que el anillo fenólico B no está sustituido. Este compuesto mostró las señales

características para un anillo de cromeno, así como para un sustituyente isoprenilo como las que se encuentran y discuten para el compuesto **IV**.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de la mundulina (**III**), mostró señales para 25 carbonos. En  $\delta 196.4$  se observó la señal para un carbono de carbonilo, una señal en  $\delta 43.4$  fue atribuida al metileno en C-3 alfa al carbonilo, lo anterior confirmó que posee estructura de flavanona.

El espectro de EMIE mostró ión molecular de  $m/z$  390 congruente con la fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_4$  y la estructura propuesta para **III**. Un pico de fragmentación de  $m/z$  271, se atribuyó al anillo A de la flavanona sustituido por un anillo cromeno sobre los C-6 y C-7 y un isoprenilo sobre el C-8 (Waterman y Mahmoud, 1987).

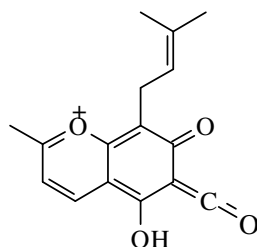


Figura 5.4. Ión de  $m/z$  217, observado en los espectros de masas de los compuestos aislados de la sección *Standleyi*

*Mundulinol* (**IV**).- Se aisló como un aceite de color amarillo. El espectro de  $^1\text{H}$  NMR, mostró un sistema AB en  $\delta 5.05$  ( $d$ ,  $J=11.9$  Hz) y  $4.50$  ( $d$ ,  $J=11.8$ Hz, 1H) característico de los hidrógenos H-2 y H-3 de un 3-hidroxi-flavanona. Una señal múltiple que integra para 5 protones en la región de los aromáticos centrada en  $\delta 7.5$ , indicó la presencia de un anillo aromático B no sustituido. Un sistema AB en  $\delta 6.63$  ( $d$ ,  $J=10$  Hz, 1H) y  $5.50$  ( $d$ ,  $J= 10.0$  Hz, 1H) indicativo de un par de protones vinílicos, así como una señal simple que integra para seis protones en  $\delta 1.44$ , sugirieron la presencia de un anillo de cromeno. Un sistema  $\text{AX}_2$  con señales centradas en  $\delta 3.22$  ( $tq$ ,  $J= 7.5$  y  $0.8$  Hz, 2H)  $5.16$  ( $tt$   $J=1.5$ ,  $7.2$  y  $7.35$ Hz, 1H), así como una señal simple que integra para seis protones en  $\delta 1.65$ , indicaron la presencia de un sustituyente isoprenilo.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR, mostró señales para 25 carbonos. El experimento DEPT indicó la presencia de 4 metilos, 1 metileno y 10 metinos. Una señal en  $\delta 72.5$  fue asignada al C-3, esta mostró un desplazamiento de 30 ppm a campo bajo en comparación con los valores reportados para las flavanonas (Harborne, *et al.*, 1975). Lo anterior sugirió que dicho carbono está soportando un OH. El experimento de HETCOR corroboró las asignaciones correctas para los carbonos.

Los datos antes señalados, sugieren dos arreglos posibles del sustituyente dimetilcromeno unido al esqueleto de la flavanona: a) el arreglo lineal con el anillo de cromeno unido a los C-6 y C-7 y con el isoprenilo unido al C-8, y b) el arreglo angular, con el cromeno unido a los C-7 y C-8 y el isoprenilo unido al C-6. Para los metabolitos aislados de *L. oaxacensis*, se propone el arreglo lineal, con base en la estructura de los compuestos aislados de las especies relacionadas filogenéticamente con *L. oaxacensis*, como la lupinifolina y la minimiflorina de *L. minimiflorus* (Mahmoud y Waterman, 1985), la orotinina y minimiflorina (Waterman y Mahmoud, 1987) de *L. parviflorus* y la lupinifolina y lupinifolinol de *L. guatemalensis* (Ingham *et al.*, 1988). Sin embargo, la elucidación de la posición de un sustituyente dimetil cromeno y un isoprenilo se ha realizado por diferentes métodos, entre ellos mencionamos los siguientes:

a) Por las diferencias observadas en el desplazamiento de las señales de los protones H-4'' y H-3'', cuando el OH-5 se acetila. En este caso se observa que la señal del protón vinílico H-4'' en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se desplaza a campo alto, mientras que el H-3'' se desplaza a campo bajo, tal estudio fue reportado para la minimiflorina por Mahmoud y Waterman (1985).

b) Al utilizar acetona deuterada como disolvente en RMN  $^1\text{H}$ , la señal del protón quelatado OH-5 para un isoprenilo unido al C-6 se observa entre  $\delta 13.0$  y  $13.35$ , en cambio para su isómero con el isoprenilo unido al C-8 se observa entre  $\delta 12.7$ – $13.0$  (Fukai *et al.*, 1998)

c) Es posible demostrar también el arreglo estructural con experimentos de acoplamiento heteronuclear carbono-hidrógeno a larga distancia  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  (INEPT) de esta manera, Taylor *et al.*, (1986) analizaron la molécula de la isoflavanona 2,3-dihidroauriculatina aislada de *Erythrina senegalensis*, en la cual observaron que el protón H-4'' mostraba un acoplamiento a dos y tres enlaces con los carbonos C-5, C-6 y C-7, lo que confirmó el arreglo lineal para la estructura propuesta.

Para decidir el arreglo estructural del mundulinol (**IV**) se utilizaron los experimentos bidimensionales de HMBC (acoplamiento a larga distancia  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ) y NOESY (acoplamiento espacial  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ). Previamente se confirmaron las asignaciones para los protones sobre sus respectivos carbonos mediante el experimento HMQC. El experimento HMBC mostró acoplamiento a dos y tres enlaces entre el protón H-4'' con los carbonos C-7, C-5, C-2'' y C-6. De la misma manera, los protones H-1''' mostraron acoplamiento a tres enlaces con los C-7, C-8a y C-3'''. Los protones del anillo dimetilpirano H-3'' y H-4'' mostraron acoplamiento con la señal correspondiente al C-6 ( $\delta$ 103.1). Lo anterior confirmó que el anillo dimetilpirano está unido a los C-6 y C-7.

El experimento NOESY mostró acoplamiento espacial entre el protón H-4'' del anillo dimetilpirano con el protón quelatado OH-5, este acoplamiento confirmó también que el anillo de cromeno está sustituido en un arreglo lineal. También se observó acoplamiento entre los protones del sustituyente isoprenilo con los metilos del cromeno y los protones H-3' y H-5' del fenilo, tal acoplamiento es posible, por la libre rotación del sustituyente isoprenilo unido al C-8. El espectro de EMIE mostró un ión molecular de  $m/z$  406, congruente con la fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5$  y la estructura propuesta. Un pico de fragmentación de  $m/z$  271 se atribuyó al anillo A de la flavanona sustituido por un anillo cromeno y un isoprenilo (Waterman y Mahmoud, 1987). Finalmente la estereoquímica del compuesto **IV** se determinó de acuerdo al valor de la constante de acoplamiento de los protones H-2 y H-3 ( $J = 12$  Hz), lo cual corresponde a un compuesto con estereoquímica *R, R*. (Ingham *et al.*, 1988)

*Jayacanol (V)*.- Se aisló como un sólido aceitoso de color amarillo, el cual reveló como una mancha de color rojo amarillo en CCF cuando se reveló con sulfato de cerio. El espectro de NMR  $^1\text{H}$  mostró señales semejantes a las observadas para el compuesto **III**, indicando que se trataba de una 3-hidroxi flavanona sustituida por un anillo de cromeno y un isoprenilo. A diferencia del compuesto **III**, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **V** mostró en la región de los protones aromáticos señales para 4 hidrógenos, lo cual sugirió que al anillo B de la 3-hidroxi flavanona estaba sustituida en *orto* por un hidroxilo ( $\delta 7.05$  s, intercambiable con  $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro de EMIE del compuesto **V**, mostró un pico de  $m/z$  422 congruente para una fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_7$ . Este compuesto al igual que el compuesto **III**, se observó el pico de fragmentación de  $m/z$  271 (Fig. 4.4).

*Minimiflorina (VI)*. Se aisló como un sólido aceitoso de color amarillo, el cual reveló en CCF como una mancha de color rojo fuerte con sulfato cérico. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  NMR, fueron semejantes a los observados para **III**, de la misma manera también mostró un sistema  $\text{AX}_2$ , con las señales en  $\delta 5.40$  (*dd*, 3.3 y 12.6 Hz, 1H) para el H-2 y dos señales en  $\delta 3.04$  (*dd*,  $J = 12.9, 7.1$  Hz, 1H) y 2.83 ( $J = 3$  y 17.1 Hz, 1H) para los H-3<sub>ax</sub> y H-3<sub>ec</sub>, las cuales son propias del esqueleto de una flavanona (Harborne *et al.*, 1975). Una señal en  $\delta 12.24$  intercambiable con  $\text{D}_2\text{O}$ , se atribuyó a un OH que forma un puente de hidrógeno. También se observaron las señales que sugirieron la presencia de un anillo de cromeno, así como las del sustituyente isoprenilo.

El arreglo estructural propuesto para el compuesto **VI**, también se corroboró por medio de los experimentos HMBC y NOESY. De la misma manera se confirmaron las asignaciones para los protones sobre sus respectivos carbonos mediante el experimento HMQC. El experimento HMBC mostró los acoplamiento a dos y tres enlaces entre el protón H-4'' con los carbonos C-7, C-5, C-2'' y C-6. Al igual que el compuesto **V** también en **VI** se observó el acoplamiento a tres enlaces del protón H-1''' con los C-7, C-8a y C-3''', así como el de los protones del anillo dimetilpirano H-3'' y H-4'' con la señal del C-6 (103.1), estos datos confirmaron también el arreglo lineal del



sustituyente dimetilpirano. Este estudio mostró además una señal que sugirió la presencia de un protón de OH unido al C-2', mostrando correlación a tres enlaces con los C-2 y C-4', lo anterior corroboró la afirmación en el sentido que tal señal correspondía a este sustituyente sobre el anillo B de la estructura, lo cual confirmó que **VI** se trataba de la minimiflorina, previamente descrita de la semilla de *L. minimiflorus* por Mamhoud y Waterman, (1985).

El espectro de EMIE mostró un ión molecular de m/z 406, congruente con la fórmula molecular  $C_{25}H_{26}O_5$  y la estructura propuesta. Fue visible también un pico de fragmentación de m/z 271, atribuido a la fragmentación del anillo A de la flavanona sustituido por un anillo cromeno y un isoprenilo (Waterman y Mahmoud, 1987).

Mezcla de *Orotinina* (**VII**) y *Lupinifolina* (**VIII**). El espectro de RMN  $^1H$  mostró señales semejantes a las observadas en el compuesto **III**. Fue visible un sistema  $AX_2$  en  $\delta$  5.38 (*dd*, 3.3 y 12.6 Hz, 1H) del H-2 y dos señales *dd* en  $\delta$  3.16 ( $J=14$  y 17.5 Hz, 1H) y 2.80 ( $J=3$  y 17.5 Hz, 1H) propias de los protones H-3ax y H-3ec que indicaron la estructura de una flavanona (Harborne *et al.*, 1975). Una señal en  $\delta$  12.24 de un protón intercambiable con  $D_2O$ , se atribuyó a un OH el cual forma un puente de hidrógeno. Este compuesto mostró también las señales que revelaron la presencia de un anillo de dimetilpirano, así como para un sustituyente isoprenilo. En la región de los protones aromáticos, una señal en 7.06 con integración para tres protones, sugirió la presencia de un anillo fenólico disustituido. Tales constantes demostraron que **VII** se trataba de la orotinina descrita por Waterman y Mahmoud, (1987). El espectro de EMIE mostró un ión molecular de m/z 406, congruente con la fórmula molecular  $C_{25}H_{26}O_5$  y la estructura propuesta.

El experimento HMBC mostró acoplamiento a dos y tres enlaces entre el protón H-4'' con los carbonos C-7, C-5, C-2'' y C-6. De la misma manera, el del protón H-1''' a tres enlaces con los C-7, C-8a y C-3'''. Así como el de los protones del anillo dimetilpirano H-3'' y H-4'' con la señal del C-6 ( $\delta$  103.1 ppm). Lo anterior confirmó también que **VII** posee sustituyente dimetilpirano en un arreglo lineal.

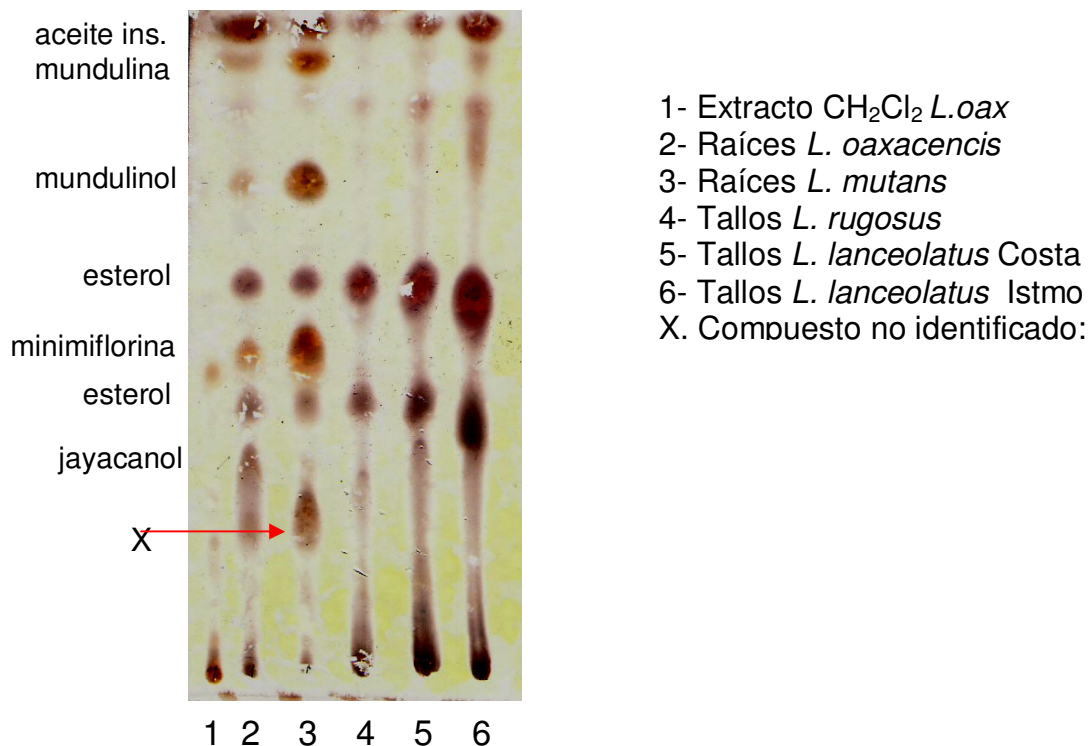
En el mismo espectro de RMN  $^1\text{H}$  fue visible la presencia de lupinifolina **VIII** como componentes minoritarios. La conclusión sobre la presencia de este componente minoritario en la mezcla, se determinó al observar en la región de los protones aromáticos, un par de señales débiles acopladas en  $\delta$  6.8 y 7.3 con  $\delta$  8.5 Hz cada una, con un acoplamiento orto que indicaron la presencia de un sustituyente sobre el C-4' probablemente un OH. Tales datos fueron semejantes con los descritos para la lupinifolina descrita por Ingham *et al.* (1988).

### **5.1.3. *Lonchocarpus mutans* M. Sousa.**

Taxonómicamente *Lonchocarpus mutans* está estrechamente emparentado con *L. oaxacensis*, por lo cual el extracto crudo de hexano de la primera especie fue analizado en CCF (véase inciso 4.1.3) y comparado con los compuestos aislados previamente de *L. oaxacensis*. En las cromatoplasmas observadas al UV de onda corta y onda larga, fue posible observar la fluorescencia que indicaba la presencia de compuestos con  $R_f$  semejante al mostrado por los estándares de mundulina (**III**), mundulinol (**IV**), miniflorina (**V**) y jayacanol (**VI**), así como un compuesto no identificado el cual fue denominado X. Cuando la placa se reveló con el oxidante  $\text{CeSO}_4$  al 2%, las manchas confirmaron la presencia de los compuestos antes señalados (fig.5.5).

Adicionalmente, se compararon los extractos de semillas de *L. rugosus* Benth. y *L. lanceolatus* Benth., colectados en la costa e Istmo de Oaxaca. En ambas especies sólo fueron visibles la presencia de dos esteroides comunes en todas las especies comparadas, pero no de los compuestos de referencia.

Fig.5.5.- Comparación por CCF de los extractos de *L. mutans* y *L. oaxacensis*



#### 5.1.4. *Lonchocarpus septentrionalis* M. Sousa

Del extracto crudo de hexano sometido a separación de sus componentes en una columna cromatográfica empacada con Si-gel (rel 1:30) se obtuvo un total de 61 fracciones. De la fracción 10 fue posible aislar un compuesto aceitoso de color amarillo el cual reveló con la solución de sulfato de cerio de un color amarillo oscuro, sus constantes físicas y espectroscópicas fueron semejantes a las mostradas por la isocordoina (**IX**). De las fracciones 17-19 desarrolladas con un sistema H/Ac et. 2:1 se observó una mancha que reveló con la solución de sulfato de cerio con un color amarillo claro, el cual se purificó en cromatografía en placa preparativa. Este compuesto se identificó como metil derricidina (**X**), del cual no se encontró descripción previa en la literatura, por lo cual se considera que es un compuesto nuevo. Como un producto minoritario en el proceso de purificación de las fracciones 17-19 se pudo aislar un

compuesto minoritario el cual de acuerdo con sus constantes espectroscópicas se pudo determinar que se trataba de la derricidina (**XI**).

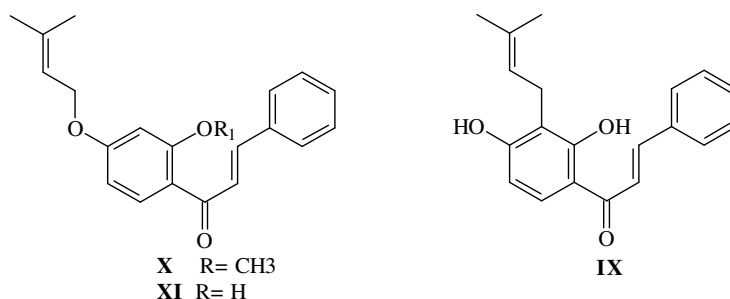


Figura 5.6. Compuestos aislados de *Lonchocarpus septentrionalis*.

*Isocordoina* (**IX**). Se aisló como un aceite de color amarillo el cual reveló en CCF como una mancha de color amarillo fuerte al ser sometida a oxidación con la solución de sulfato de cerio. El espectro de IR mostró una banda en  $3608.2\text{ cm}^{-1}$  propia de grupos OH. Las bandas en  $2927$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  indicaron la presencia de enlaces C-C, mientras que una banda fuerte en  $1635\text{ cm}^{-1}$  reveló un grupo carbonilo.

El espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto **IX** mostró dos señales dobles en  $\delta$  7.59 y 7.88, ambas con  $J= 15.6\text{ Hz}$ . Dichos desplazamientos y la constante de acoplamiento sugirió que se trataba de una chalcona, lo cual se confirmó con la presencia de una señal en  $\delta$  6.11 atribuido a un grupo OH unido al C-4'. Un par de señales dobles acopladas en  $\delta$  6.43 y 7.75 con  $J= 9\text{ Hz}$ , fueron asignadas a los protones 5' y 6'. La presencia de una señal simple en  $\delta$  6.11 intercambiable con D<sub>2</sub>O, fue atribuida a un OH unido al C-4'. La presencia de una señal simple en  $\delta$  1.25 que integra para seis protones, así como una señal doble en 3.48 ppm con  $J= 7.2\text{ Hz}$  que integra para dos protones, acoplada con otra señal triple en  $\delta$  5.3, con  $J= 1.5$  y  $7.2\text{ Hz}$  que integra para un protón vinílico, revelaron la presencia de un grupo isoprenilo. Dicho grupo posiblemente está unido al carbono aromático C-3. Por otra parte un grupo de señales múltiples con integración para 5 protones en la región de los protones aromáticos reveló que el anillo B de la chalcona no está substituido. Los datos mostrados por el compuesto **IX** concordaron

con los previamente descritos para la isocordoina aislada de *L. sericeus* por Goncalves de Lima *et al.* (1973).

*Metil derricidina (X)*. Se aisló como un sólido amorfo de color amarillo. El espectro de IR, mostró una banda en  $1606\text{ cm}^{-1}$  atribuida al carbonilo de una cetona. En 1933 y  $2856\text{ cm}^{-1}$  se observaron bandas atribuidas a carbonos alifáticos. El espectro de RMN  $^1\text{H}$ , mostró un sistema AB, constituido por un par de señales dobles en  $\delta$  7.52 y 7.68, que integran para un protón cada una. El alto valor de la constante de acoplamiento (15.6 Hz) sugiere que el compuesto **X** se trata de una chalcona. Sin embargo no fue posible observar un protón aislado a campo bajo unido al C-2' que soporta a un grupo OH. Una señal simple en  $\delta$  3.89 que integra para tres protones, fue atribuida a la presencia de un metilo, el desplazamiento a campo alto de la señal, sugiere que este está unido a un grupo fuertemente electronegativo, por lo que se consideró que se trataba de un metoxilo.

Dos señales simples en  $\delta$  1.77 y 1.81 que integran cada una para tres protones, así como una señal doble en  $\delta$  4.58 ( $J = 6.5\text{Hz}$ ) que junto con una señal triple en  $\delta$  5.5 ( $J = 6.5$  y  $1.5\text{Hz}$ ), fueron atribuidas a un sustituyente isoprenilo; sin embargo el desplazamiento a campo alto que muestran tales señales, sugieren que el isoprenilo está soportado sobre un átomo electronegativo como el oxígeno, formando un éter. El espectro de masas mostró un ión  $M/z$  322 el cual es congruente con la fórmula molecular propuesta para el compuesto **X**. Finalmente con base en la investigación bibliográfica realizada, suponemos que se trata de un compuesto aun no descrito.

*Derricidina (XI)*. El compuesto **XI** se aisló como un sólido amorfo de color amarillo. El espectro de IR, contrariamente a lo observado en el compuesto **X** mostró una banda en  $3608.2\text{ cm}^{-1}$  de un sustituyente OH. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **XI** al igual que el compuesto **X** mostró un sistema AB, constituido por un par de señales dobles en  $\delta$  7.59 y 7.89 con una constante de acoplamiento 15.9 Hz propias de una chalcona. Dos señales simples en  $\delta$  1.76 y 1.81 que integran cada una para tres protones, así como una señal doble en  $\delta$  4.66 ( $J = 6.3\text{Hz}$ ) que junto con una señal triple en  $\delta$  5.78 ( $J = 6.3$  y

1.5Hz), indicaron la presencia de un sustituyente isoprenilo; con un desplazamiento semejante al observado en **X**. El espectro de masas, mostró un ión  $M/z$  208 el cual es congruente con la formula molecular  $C_{20}H_{20}O_3$  propuesta para el compuesto **XII** el cual de acuerdo con la revisión bibliográfica se trata de la derricidina (Delle Monache *et al.*, 1973).

#### 5.1.5. *L. guatemalensis* Benth. var. *mexicanus* (Pittier) F. J. Hermann

Los extractos de hexano y diclorometano de las raíces analizadas por CCF mostraron composición química semejante, por lo cual se trabajó solamente el extracto de hexano. En este proceso se aisló un sólido amorfo de color amarillo (**XI**), el cual al ser sometido a CCF y oxidación con sulfato de cerio, se reveló como una mancha con una coloración amarilla intensa. En el espectro de IR se observó una banda en  $1639\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la presencia de un carbonilo (C=O), El espectro de UV mostró las señales para un flavonoide. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **XI**, mostró un par de señales dobles acopladas en  $\delta$  7.56 y 7.88 que integran cada una para un protón, con una constante de acoplamiento  $J= 15.58\text{ Hz}$ . El desplazamiento de campo bajo de estas señales y el valor de su constante de acoplamiento, junto con una señal simple en  $\delta$  13.67 que integra para un protón, sugirieron que el compuesto **XI** se trataba de una chalcona. Un par de señales múltiples en la región de los protones aromáticos, una en  $\delta$  7.42 que integra para tres protones fue atribuido a los protones H-3, H-4 y H-5, así como a otra en  $\delta$  7.46 que integra para dos protones se asignaron los protones H-2 y H-6 de un anillo aromático no sustituido. Dos señales dobles en  $\delta$  6.38 y  $\delta$  7.72 con  $J= 8.9\text{ Hz}$ , fueron asignadas a los protones orto H- 4' y H-5 de un anillo aromático sustituido por anillo dimetilpirano. Dicho anillo fue revelado por dos señales dobles acopladas en  $\delta$  5.59 y 6.67 con  $J= 10.0\text{ Hz}$ , el cual se encuentra unido en arreglo angular a los carbonos C-6' y C-7' de la chalcona. Por otra parte el espectro de masas mostró un ión molecular  $[M]^+$  306, el cual resulta congruente con la formula molecular  $C_{20}H_{18}O_3$  propuesta para el compuesto **XI**. Tales datos concordaron con los descritos para la lonchocarpina aislada de *L. sericeus* por Delle Monache *et al.*, (1973) cuyos datos

espectroscópicos de RMN<sup>1</sup>H fueron descritos con mayor detalle por Do Nascimento y Mors (1972).

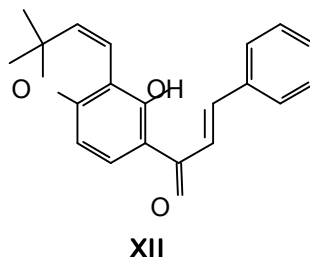


Figura 5.7. Isolochocarpina, chalcona aislada de *L. guatemalensis* Benth. var. *mexicanus* (Pittier) Hermann.

## 5.2. Actividad biológica de los metabolitos aislados

### 5.2.1. Actividad fungistática

Todos los flavonoides analizados mostraron actividad fungistática contra el hongo xilófago de pudrición morena *Postia placenta*, sin embargo solo algunos tuvieron actividad cercana a la mostrada por el testigo positivo. En la tabla 5.2 se describen los valores de inhibición del crecimiento radial del micelio de *Postia placenta* mostrada por los diferentes compuestos, en la cual es posible distinguir tres grupos con valores altos, medios y bajos. Los pterocarpanos (medicarpina y variabilina) aislados de las raíces de *L. robustus*, prácticamente inhibieron el desarrollo del micelio. Tales valores son cercanos al 100% en el tratamiento positivo, lo cual sugiere que su función en la raíz es la de agentes antifúngicos pasivos. La lonchocarpina aislada de *L. guatemalensis* var. *mexicanus*, el jayacanol de *L. oaxacensis* y las inirebina A y B de *L. obovatus*, mostraron actividad moderada. En contraste, la mundulina, mundulinol y la minimiflorina aislados *L. oaxacensis*, prácticamente no inhibieron el desarrollo del micelio, lo cual sugiere que probablemente su función ecológica es otra.

Tabla 5.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Postia placenta* por los metabolitos secundarios aislados de las especies de *Lonchocarpus*.

Compuesto	Crecimiento (cm)*	% de inhibición
Control	4.97 ± 0.23	0.0
Jayacanol	2.89 ± 0.09	41.85
Mundulinol	4.58 ± 0.12	7.84
Mundulina	4.70 ± 0.41	5.43
Minimiflotina	4.49 ± 0.08	9.65
Inirebina A	2.58 ± 0.00	48.08
Inirebina B	2.26 ± 0.56	68.07
Metil derricidina	1.93 ± 0.37	55.19
Lonchocarpina	1.53 ± 0.50	68.07
Medicarpina	0.68 ± 0.07	97.31
Variabilina	0.76 ± 0.11	94.61
Pentaclorofenol	0.00 ± 0.00	100.0

- Media de cinco repeticiones ± desviación estándar.

### 5.2.2. Actividad citotóxica de los metabolitos aislados de *Lonchocarpus*

La actividad citotóxica de los flavonoides aislados fue examinada en cuatro líneas Hep2, HELA, U251 y PC-3 (Tabla 5.3). Se empleó rotenona como testigo positivo debido a su probada actividad citotóxica (Kardono, 1990). La minimiflorina fue el compuesto más potente, pues mostró valores cercanos al cien por ciento en las cuatro líneas tumorales humanas. La medicarpina con estructura de pterocarpano, mostró actividad cercana al 100 por ciento contra las líneas HeLa y Hep2, pero solo inhibió en 35% el crecimiento de las dos líneas restantes. Aunque la minimiflorina y mundulina poseen estructura de flavanona, la primera es la más activa. La lonchocarpina mostró también actividad citotóxica selectiva, inhibiendo en 71-74% el crecimiento de HeLa y Hep 2, sin embargo su actividad fue más baja comparada con las otras dos líneas. Por otra parte, un compuesto cuyas constantes espectroscópicas revelaron que se trata de un aceite poliinsaturado y que para fines de análisis taxonómico no se elucidó, mostró actividad significativa en tres líneas celulares, tal compuesto fue probado a una concentración de 31  $\mu$ M con las líneas HeLa y Hep2, y a 10  $\mu$ M con las líneas PC-3 y U251. Es importante señalar que ningún compuesto con estructura de auronol como los aislados de *L. obovatus* mostraron actividad citotóxica.



Tabla 5.3. Ensayo de citotoxicidad con sulforrodamida B con lectura a 515 nm. (% de inhibición del crecimiento)

Solvente	Clave	HeLa	Hep2	PC-3	U251
DMSO	inirebina a	2	1	0*	0*
EtOH	inirebina b	0.6	0	2	15
DMSO	inirebina a-OH	4	6	0*	0*
EtOH	inirebina a meOH	19	20	27	30
DMSO	insaturado	82	77	8*	98*
MeOH	mundulina	16	13	0	4
MeOH	mundulinol	39	34	42	41
MeOH	minimiflorina	100**	100**	100	100
EtOH	jayacanol	12	3	43	14
EtOH	medicarpina	95**	96**	35	35
MeOH	variabilina	17	22	20	16
EtOH	rotenona	100	100	100	100
EtOH	lonchocarpina	71	74	36	24

Conc. probada 31  $\mu$ M. \*Conc. Probada 10  $\mu$ M, \*\* Conc. Probada 20 mg/ml disuelto en DMSO.

### 5.3. Caracterización química de los diferentes grupos infragenéricos de *Lonchocarpus*

Los flavonoides descritos por la literatura, los cuales se han sido aislados de diversas especies del género *Lonchocarpus sensu stricto*, así como los de las especies estudiadas químicamente en el presente trabajo, son analizados y aparecen agrupados de acuerdo con la propuesta de clasificación presentada en la tabla 2.3. El objetivo es analizar si los grupos taxonómicos propuestos, presentan correlación con respecto a los caracteres que definen su posición taxonómica, y el tipo de estructura química y patrón de sustitución de sus flavonoides.

#### 5.3.1.- Subgénero *Densiflorus*, Ined.

El subgénero *Densiflorus*, es considerado el grupo más primitivo dentro de esta clasificación, con base en sus características morfológicas y ontogénicas que presentan las especies que se agrupan en éste. La literatura describe hasta el momento el estudio químico de solamente cinco especies agrupadas en tres secciones.

### 5.3.1.1. Sección *Densiflora* Benth.

La sección *Densiflora* agrupa a las especies con los caracteres más primitivos del género *Lonchocarpus*. Morfológicamente se caracterizan por contar con corteza interior sin exudado resinoso al corte; foliolos generalmente con el ápice acuminado a agudo, en ocasiones obtuso; nervaduras foliares camptódromas; estípulas, brácteas y bractéolas lanceoladas a linear-lanceoladas u oblongas, siempre más largas que anchas; bractéolas alternas a subopuestas, patentes, generalmente distantes del cáliz, cáliz lobado; alas generalmente patentes en su extremo distal; ovario (1-) 2-4(5)-ovulado; mecanismo floral valvar; legumbre indehiscente, el margen vexilar aquillado a alado, en ocasiones ligeramente surcado. Plántulas con los cotiledones hipogeos, eófilos opuestos, unifoliolados (Sousa, 2005).

De esta sección solamente se cuenta el antecedente de investigación química de *L. pentaphyllus*, determinado incorrectamente como *L. latifolius* por Magalhães *et al.*, (1997 y 2000). De las raíces de esta especie se han aislado doce flavonoides, dos de ellos chalconas aisladas por Magalhães *et al.*, (1997), quienes las denominaron 2'-metoxi-(2'', 3'', 4',3')-furanodibenzoilmetano (**8**) y 3,4-metoxi-lenedioxi-2'-metoxi-(2'', 3'', 4',3')-furano-dibenzoilmetano (**9**) ambas con la estructuras de difenil 1,3-diona, con un sustituyente 1,1-dimetil, 2-propil-ona, con un anillo de furano unido a los C-4' y C-5'. Posteriormente de la misma especie (*L. latifolius*), Maghalaes *et al.* (2000) describieron diez de un total de doce compuestos descritos para esta especie, once no están sustituidos por un OH sobre el carbono C-5, diez presentan un sustituyente furano en arreglo angular, así mismo, seis están sustituidos por un grupo metilendioxi en los C-3 y C-4. A este grupo pertenece *L. macrocarpus*, descrita como *L. costaricensis* por Waterman y Mahomoud (1985), el cual no fue incluido en el análisis ya que de esta especie se estudiaron las semillas.

Tabla 5.4. Flavonoides reportados de las especies de la sección *Densiflori*.

Especie	Compuestos aislados	Referencia
<i>L. pentaphyllus</i>	2'-metoxi-(2'', 3'', 4', 3')-furanodibenzoilmetano ( <b>8</b> )	Maghalaes <i>et al.</i> (1997)
	3,4-metilendioxi-2'-metoxi-(2'', 3'': 4', 4')-furanodibenzoilmetano ( <b>9</b> )	Maghalaes <i>et al.</i> (2000)
(= <i>L. Latifolius</i> )	karanjacromeno ( <b>10</b> )	
	karanjina ( <b>11</b> )	
	lanceolatina b ( <b>12</b> )	
	pongacromeno ( <b>13</b> )	
	pongaglabrona ( <b>14</b> )	
	pongapina ( <b>15</b> )	
	3,5-dimetoxi-2'',2''-dimetilpirona(5'', 6'': 8,7)-flavona ( <b>16</b> )	
	3-metoxi-2(2'', 3'': 7,8)-furanoflavanona ( <b>17</b> )	
	3,4-metilendioxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavanona ( <b>18</b> )	
	(2,3-trans-3,4-trans)-3,4-dimetoxi-(2'',3'': 7,8)-furano-flavano ( <b>19</b> )	

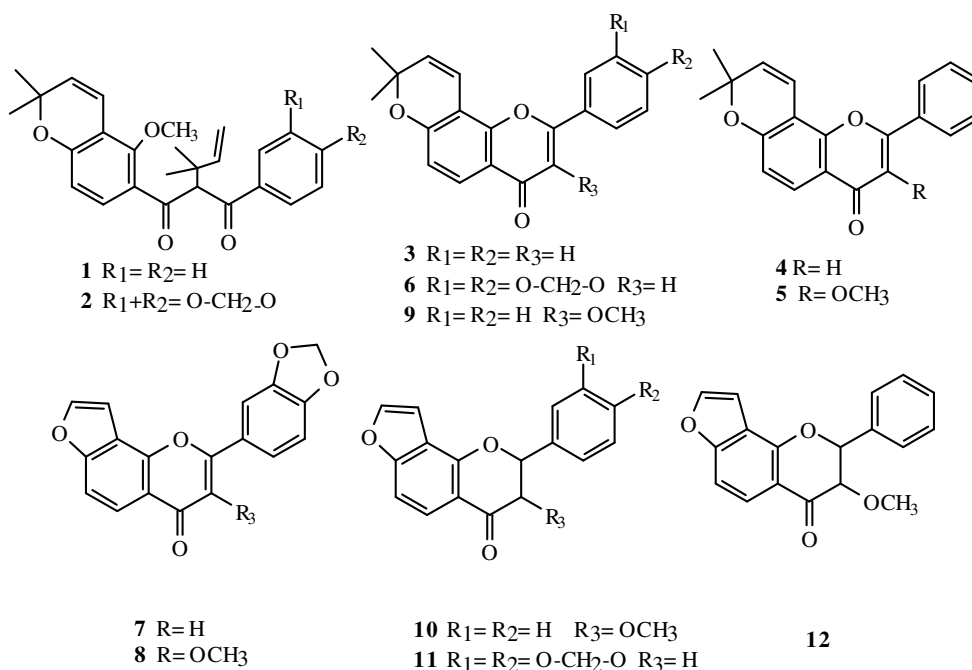


Figura 5.8. Estructura de los flavonoides descritos de las especies de la sección *Densiflori*.

### 5.3.1.2. Sección *Obtusifolii* (Benth.) M. Sousa

Las especies agrupadas en la sección *Obtusifolii* se distribuyen desde Venezuela y Colombia, en Centroamérica y hasta el norte de la República Mexicana. De acuerdo con Sousa (2009b) las especies de este grupo poseen como característica común,

corteza interior que frecuentemente no exuda resina rojiza al corte, aunque en ocasiones sí; hojas con arreglo helicoidal en el tallo; estipulas más largas que anchas, grandes, generalmente patentes a reflexas, frecuentemente persistentes; hojas pelosas, epunteadas, en ocasiones foveoladas; foliolos con el ápice obtuso a emarginado, en ocasiones acuminados, nervaduras frecuentemente realzadas, camptódromas o craspedódromas; brácteas y bractéolas alargadas, las bractéolas alejadas del cáliz sobre el pedicelo, generalmente opuestas, en ocasiones alternas. Flores con mecanismo floral valvar; cáliz lobado, ligeramente zigomorfo peloso; corola pelosa, generalmente epunteada, raramente translúcido linear-punteada, las alas con sus ápices patentes, respecto a la quilla. Legumbres indehiscentes, los márgenes aquillados a nervados, sin alas ni surcos, plantas frecuentemente con los cotiledones epigeos; eofilos (1)3- 5-foliolados, opuestos, en un caso catáfilos alternos presentes.

A esta sección pertenece *Lonchocarpus castilloi*, única especie considerada para el análisis de este grupo. Es un árbol maderable con distribución en el sureste de la República Mexicana. Gómez *et al.* (1990) y Reyes *et al.* (1995), aislaron del duramen de la madera seis flavonoides, cuatro de ellos con estructura de auronoles, los castillenos A, B, C y D (13 al 15), una chalcona cuya estructura sugiere ser la precursora de la aurona llamada castilleno E (17) y una flavona descrita previamente por la literatura como pongaglabrona (18).y descrita por primera vez de *Pongamia glabra*, una especie africana (Khanna y Seshadri, 1963). Otra especie de este grupo de la cual se describen el estudio químico de las semillas es *L. phlebophyllus*, sin embargo no fue considerado en el presente análisis.

Tabla 5.5.- Flavonoides reportados de las especies de la sección *Obtusifolii*.

<b>Especie</b>	<b>Compuestos aislados</b>	<b>Referencia</b>
<i>L. castilloi</i>	Castillenos A (13), B (14), C (15), D (16) y E (17). Pongaglabrona (18)	Gómez <i>et al.</i> (1990) y Reyes <i>et al.</i> (1995).

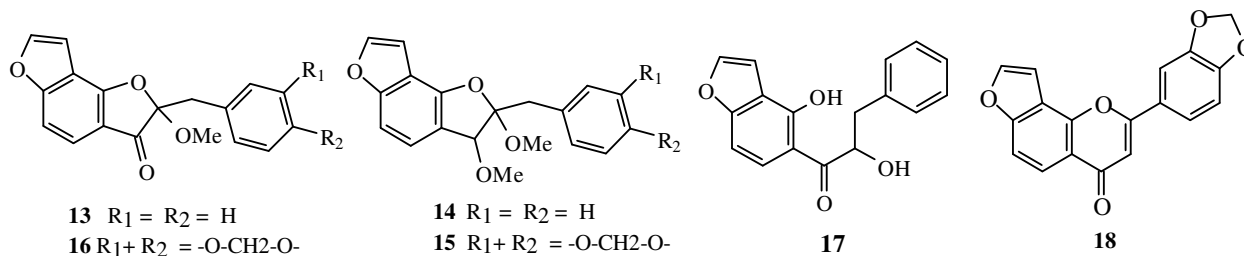


Figura 5.9. Estructura de los compuestos aislados de las especies de la sección *Obtusifolii*.

Todos los metabolitos aislados de *L. castilloi* tienen en común un anillo de furano unido al anillo B en arreglo angular. En el caso de los aurochalcones (**13** al **15**) este sustituyente está unido a los C-6 y C-7. Tal patrón de sustitución se observa también en la chalcona (**17**) en los respectivos C-3' y C-4', así como en los C-7 y C-8 de la flavona (**18**). Con excepción de los castillenos B y C (**14** y **15**) que poseen un grupo metoxilo unido al C-2, todos presentan un grupo cetona en dicha posición, al igual en el caso del castilleno E con estructura de chalcona, el carbonilo está presente en el respectivo C-2. Los compuestos **15**, **16** y **18**, presentan un metilendioxi en los carbonos 3' y 5'. Tal sustitución parece presentarse solamente en los flavonoides de las especies agrupadas en el subgénero *Densiflorus*, ined.

### 5.3.1.3. Sección *Muehlbergiani*, ined.

Las especies de la sección *Muehlbergiani* están distribuidas en el sur del continente Americano. La literatura describe el estudio químico de las raíces de *L. muehlbergianus* y *L. subglaucescens*. De la primera especie, Magalhães *et al.* (1997), aislaron el compuesto **19** un dibenzoilmetano, este compuesto posee una estructura semejante con el compuesto **27**, el cual también está sustituido por tres metoxilos y un anillo de furano. Ambos compuestos están sustituidos por un isoprenilo de diferente posición. Otros flavonoides aislados por Magalhães *et al.* (2004) muestran la presencia de flavanonas **20** al **23** con un anillo de furano unido al anillo C en arreglo lineal y dos OCH<sub>3</sub> unidos a los carbonos C-5 y C-8.

De las raíces de *L. subglaucescens*, Magalhães *et al.* (1996) aislaron seis compuestos (**27** a **32**), de los cuales, con excepción del compuesto **30**, presentan una estructura química semejante, que sugiere ser el producto de diversas rutas de oxidación que parte del compuesto **27**.

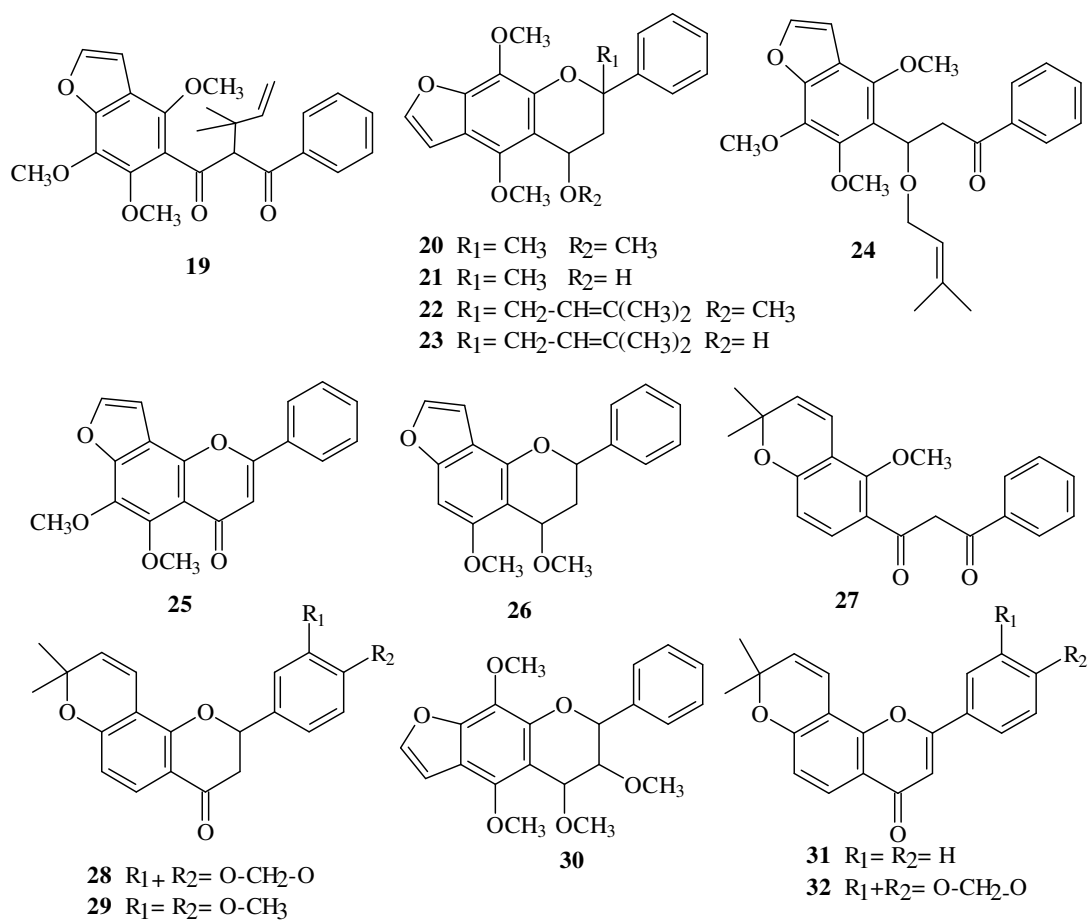


Figura 5.10. Estructuras de los flavonoides reportados de las especies de la sección *Muehlbergiani*, *ined.*

Tabla 5.6. Flavonoides reportados de las especies de la sección *Muehlbergiani, ined.*

Especie	Compuestos aislados	Referencia
<i>L. muehlbergianus</i>	2',5',6'-trimetoxi-(2'',3'',4',3')-furanodibenzoilmetano ( <b>19</b> )	Maghalaes <i>et al.</i> (1997).
	2,4-cis-2,4,5,8-tetrametoxi-(6''',3''':6,7)-furanoflavanona ( <b>20</b> )	
	2,4-cis-4-hidroxy, 2,5,8-trimetoxi-(2''',3''':6,7)-furanoflavanona ( <b>21</b> )	Magalhães <i>et al.</i> (2004)
	2,4-cis-2-preniloxi, 4,5,8-trimetoxi-(2''',3''':6,7)-furanoflavanona ( <b>22</b> )	
	2,4-cis-2-preniloxi, 4-hidroxi-5,8-dimetoxi-(2''',3''':6,7)-furanoflavanona ( <b>23</b> )	
	2',5',6'-trimetoxi-9-(1,1-dimetilaliloxi)-[2'',3'':3',4']-furanochalcona ( <b>24</b> )	
	5,6-dimetoxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavanona ( <b>25</b> )	
2,4-cis-4,5,6-dimetoxi-(2'',3'':7,8)-furanoflavanona ( <b>26</b> )		
<i>L. subglaucescens</i>	purpurenona ( <b>27</b> )	Magalhães, <i>et al.</i> (1996).
	pongamona ( <b>28</b> )	
	ovalicromeno B ( <b>29</b> )	
	3,4-dimetoxiflavano ( <b>30</b> )	
	6'',6''-dimetilcromeno-(2'',3'':7,8)-flavona ( <b>31</b> )	
	3',4'-metilendioxi-6'',6''-dimetilcromeno-(2'',3'':7,8)-flavona ( <b>32</b> )	

#### 5.3.1.4. Sección *Eriophylli* Benth.

Los resultados del estudio químico de las raíces de *L. obovatus*, son una contribución del presente trabajo. De esta especie se aislaron flavonoides con estructuras de auronas con un arreglo estructural que hasta el momento no se ha descrito para otras especies consideradas en este género.

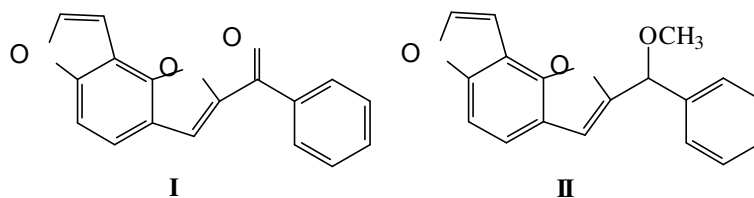


Figura 5.11. Estructura de los flavonoides aislados de *L. obovatus* de la sección *Eriophylli*

Tabla 5.7. Flavonoides aislados de *L. obovatus*, sección *Eriophylli*

Especie	Compuestos aislados	Referencia
<i>L. obovatus</i>	inirebina a (i)	Alavez-Solano, en prensa
	inirebina B (ii)	

### 5.3.2. Subgénero *Lonchocarpus*

El subgénero *Lonchocarpus* es el grupo con mayor número de especies estudiadas químicamente. De las especies de *Lonchocarpus* analizadas en el presente trabajo, 16 están agrupadas en las secciones *Punctati*, *Standleyi* y *Lonchocarpus*. La gran mayoría de ellas se agrupan en las secciones *Standleyi* y *Lonchocarpus*.

#### 5.3.2.1. Sección *Punctati* Benth.

La sección *Punctati* Benth., comprende alrededor de 24 especies, de las cuales 14 se distribuyen en México y 11 de ellas son endémicas. Se caracterizan por que poseen corteza interior que no exuda resina rojiza al corte, hojas con arreglo dístico en el tallo; estípulas pequeñas redondeadas a ligulares, pronto caducas; hojas frecuentemente glabras, sobre todo en el haz, esparcidamente pelosas a glabras y papilosas en el envés, los folíolos frecuentemente pelúcidos punteados; pedúnculos florales y pedicelos delgados, las bractéolas generalmente pequeñas, escamosas y distantes de la base del cáliz; botones florales esféricos a elipsoidales; cáliz trunco a casi trunco, esparcidamente seríceo a glabro, generalmente pelúcido linear-punteado; corola frecuentemente pelúcida linear-punteada, el estandarte abaxialmente en la base 2-lobado y calloso, en ocasiones esparcidamente canescente seríceo en el centro y base. Mecanismo floral ligeramente explosivo. Legumbre indehiscente a dehiscente sólo en el margen vexilar, aplanada, frecuentemente resinosa, las valvas lisas a tuberculadas, el margen vexilar en ocasiones angostamente alado. Plántulas con los coltiledones epigeos en ocasiones hipogeos, eófilos opuestos 1(3) foliolados, la primera hoja alterna 1-3 foliolada (Sousa, 2007).

De este grupo se ha descrito el estudio químico de dos especies, entre estas *L. longistylus* (= *L. punctatus*) (Goncalves, 1973), *L. peninsularis* (Delle Monache *et al.*, 1978). Los metabolitos aislados de las raíces de ambas especies presentan estructura



de estilbenos, los cuatro compuestos poseen sustituyentes dimetilprenilo. Tales compuestos con numeración **35** y **36** son compartidos por ambas especies.

Tabla 5.8. Especies de la sección *Punctati*.

Especie	Compuestos aislados	Referencia
<i>L. longistylus</i>	longistilina a ( <b>33</b> ), b ( <b>34</b> ), c ( <b>35</b> ) y d ( <b>36</b> )	Goncalves, (1973).
<i>L. peninsulares</i>	longistilina c ( <b>35</b> ) y d ( <b>36</b> )	Delle Monache <i>et al.</i> , (1978).

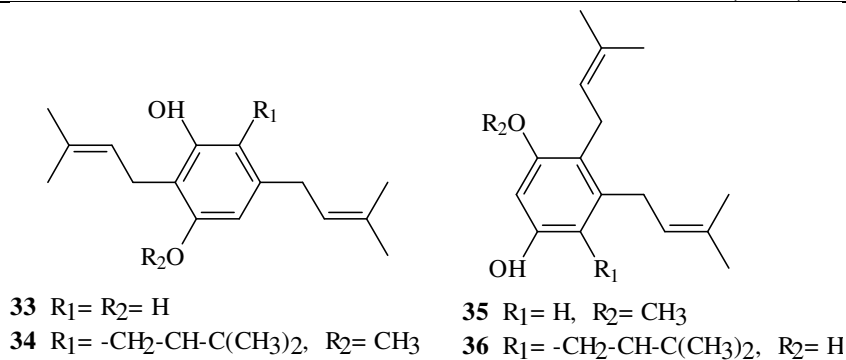


Figura 5.12. Compuestos reportados de las especies de la sección *Punctati*

### 5.3.2.2. Sección *Standleyi* M. Sousa.

La sección *Standleyi*, agrupa a cerca de 28 especies, de las cuales 14 son endémicas de México. Como característica común, corteza interior sin, o bien, con escaso exudado de resina rojiza al corte; flores con bratéolas de medianas a pequeñas, oblongas, ovadas, en general patentes; cáliz con dientes cortos a trancos; pétalos en su superficie adaxial, por lo común moderada a esparcidamente seríceos, el estandarte en su superficie abaxial, en general glabro; semillas pequeñas a medianas, de colores claros; legumbres generalmente indehiscentes, sin fisuras en el margen vexilar, en las especies hidrocoras en los frutos el endocarpo y el epicarpo se unen y forman un tejido único fibroso; plántulas epigeas, eófilos opuestos y 1-foliolados. (Sousa, 2009c).

Entre las especies agrupadas en esta sección, se han estudiado químicamente *L. minimiflorus*, *L. guatemalensis* var. *guatemalensis* (cuya identificación aún está en duda), *L. parviflorus*, *L. atropurpureus* y *L. oaxacensis*. La estructura de los metabolitos

descritos en las cinco especies, presentan uniformidad en el arreglo de sus sustituyentes sobre la estructura de flavanonas, 3-hidroxi-flavanonas y chalconas con un patrón de sustitución común, donde en el caso de las flavanonas y las 3-hidroxi-flavanonas, un isoprenilo unidos al C-8, esta sustitución se observa también en los correspondientes carbonos C-3' y C-5' en las chalconas. También siempre está presente un sustituyente OH, unido al C-5 el cual forma un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo (C=O) unido al C-4 de la flavanona, es propio de este grupo un anillo dimetilpirano con el isoprenilo del C-6. Algunos compuestos como la minimiflorina (VI) son comunes en varias especies.

Tabla 5.9. Especies agrupadas en el la sección *Standleyi* y metabolitos aislados.

<b>Especie</b>	<b>Compuestos aislados</b>	<b>Referencia</b>
<i>L. minimiflorus</i>	minimiflorina (vi). lupinifolina (viii)	Roussis <i>et al.</i> (1987).
<i>L. guatemalensis</i> <i>var. Guatemalensis</i> [?]	lupinifolina (viii) lupinifolinol (37) metil lupinifolinol (38)	Ingham <i>et al.</i> (1988).
<i>L. parviflorus</i>	minimiflorina (vi) orotinina (vii) orotinichalcona (39)	Waterman y Mahmoud, (1987).
<i>L. atropurpureus</i>	5,2'-dihidroxi-3-metoxi-6,7-(2'', 2''-dimetilcromeno)- 8-(3''',3'''-dimetilalil)-flavanona (40) mundulina (iii) mundulinol (iv) jayacanol (v) minimiflorina (vi)	Magalhães <i>et al.</i> (1999)
<i>L. oaxacensis</i>	mundulina (iii) mundulinol (iv) jayacanol (v) minimiflorina (vi) orotinina (vii) lupinifolinol (37)	Alavez-Solano <i>et al.</i> (2000).
<i>L. mutans</i>	mundulina (iii) mundulinol (iv) minimiflorina (vi)	Alavez-Solano <i>et al.</i> (datos no publicados).

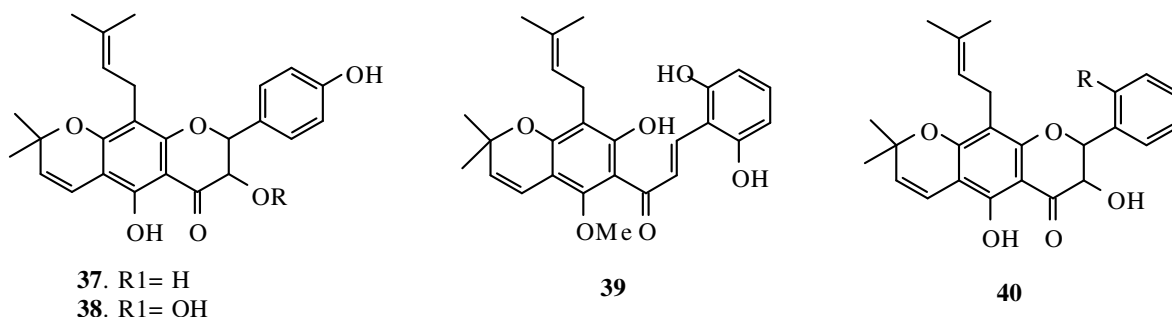


Figura 5.13. Flavonoides aislados de las especies agrupadas en la sección *Standleyi*

### 5.2.2.3. Sección *Lonchocarpus*

La sección *Lonchocarpus*, cuenta con cerca de 47 especies con distribución en México, Mesoamérica y Sudamérica, de las cuales sólo dos son endémicas de México. Las especies agrupadas en esta sección, se caracterizan por ser árboles con corteza interior con exudado frecuentemente abundante de resina rojiza al corte, en ocasiones poco o falta; hojas con disposición dística en las ramas; folíolos generalmente con el ápice acuminado; flores con bractéolas cercanas y adpresas a la base del cáliz; bractéolas pequeñas a grandes, las grandes generalmente oblatas y cubriendo hasta un cuarto de la base del cáliz; cáliz trunco o casi trunco; lámina del estandarte adaxialmente de moderada a densamente serícea abaxialmente canescente pelosa en la parte central de la base hasta el tercio inferior de la lámina, o reducida a la base central de la línea de unión con la uña, ocasionalmente sobre la uña, aurículas y callos presentes en la base; mecanismo floral fuertemente explosivo; legumbres indehiscentes pero en ocasiones se fraccionan los lomentos en unidades monospermas, el márgen vexilar generalmente ensanchado, en ocasiones aquillado; semillas de chicas a grandes, las chicas de colores claros, las grandes frecuentemente de colores oscuros a negruzcos, plántulas con los cotiledones epígeos, eófilos opuestos y simples (Sousa, 2005, Sousa, 2009d).

De este grupo se han estudiado *L. cultratus* (= *L. guillerminiana* = *L. neuroscapha*) (Menichini *et al.*, 1982), *L. sericeus* (Monache *et al.*, 1978), *L. guatemalensis* var.

*Mexicanus* y *L. septentrionalis*. Muchos flavonoides son compartidos entre tales especies, lo cual revela una relación filogenética muy estrecha. En la tabla 5.10 se citan los metabolitos aislados de las especies de la sección *Lonchocarpus*, en la cual se incluyen los flavonoides aislados de *L. sericeus*, una especie cuyos límites aun no son claros, pero que, sin embargo, el análisis fitoquímico los ubica correctamente en este grupo. Por otra parte se excluyen los rotenoides aislados de *L. salvadorensis*, ya que no son considerados para el análisis debido a que fueron aislados de las semillas.

Tabla 5.10. Especies agrupadas en la sección *Lonchocarpus* y los metabolitos aislados

<b>Especie</b>	<b>Compuestos aislados</b>	<b>Referencias</b>
<i>L. cultratus</i> (= <i>L. guillerminiana</i> = <i>L. neuroscapha</i> )	isocordoina (ix) derricidina (cordoina) (xi) lonchocarpina (xii) derricina (41) dihidrocordoina (42) 4-hidroxilonchocarpina (43) 4-hidroxicordoina (44) Ψ-isocordoina (45) isorricidina (46) isolonchocarpina (47)	Menichini <i>et al.</i> (1982)
<i>L. sericeus</i>	isocordoina (ix) derricidina (cordoina) (xi) isolonchocarpina (47) lonchocarpina (xii) derricina (41) 4-hidroxilonchocarpina (43)	Delle Monache <i>et al.</i> (1972); Delle Monache <i>et al.</i> (1978)
<i>L. guatemalensis</i> var <i>mexicanus</i>	lonchocarpina (xii) derricina (41) 4-hidroxilonchocarpina (43)	Alavez Solano, Resultados no publicados
<i>L. septentrionalis</i>	isocordoina (ix). metil derricidina (x). derricidina (xi).	Alavez Solano, Resultados no publicados

Los flavonoides descritos de las raíces de las especies que constituyen este grupo, presentan poca variación estructural, muchos son compartidos entre las especies. Entre éstos se observan estructuras de chalconas, flavanonas y 3-hidroxiflavanonas y un patrón de sustitución común que se caracteriza por contar con un anillo de dimetilpirano en un arreglo angular (unido a los C-7 y C-8 en las isoflavanonas y C-3' y 4' en las chalconas). La mayoría de los compuestos no están sustituidos sobre el C-5 por un OH. Tal uniformidad en la síntesis y cantidad de metabolitos compartidos entre las especies

revela un origen biosintético común, confirmando que los caracteres morfológicos para definir este grupo son los correctos. Esta uniformidad se observa también en *L. septentrionalis* analizada químicamente en el presente trabajo, la cual mostró en común con las especies del grupo la isocordoina y derricidina.

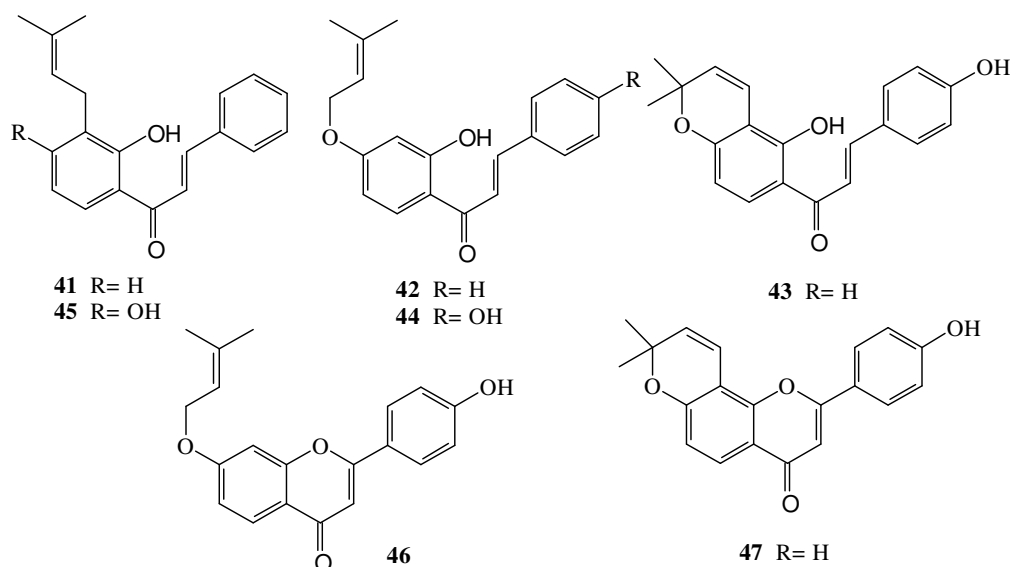


Figura 5.14. Estructura de los flavonoides reportados de las especies de la sección *Lonchocarpus*.

El estudio químico de las raíces de *L. guatemalensis* var. *mexicanus* realizado en el presente trabajo, muestra que los compuestos aislados están relacionados con los aislados de las especies de la sección *Lonchocarpus*, contrariamente a lo descrito para *L. guatemalensis* var. *guatemalensis* en donde los compuestos se relacionan más con los aislados de la sect. *Standleyi*, lo cual quizá se deba a una identificación errónea de esta última variedad.

#### 5.4. Análisis quimi taxonómico con base en la ruta biogénica

Los dos subgéneros en los cuales se divide *Lonchocarpus*, muestran dos rutas biogénicas divergentes. Por un lado dentro del subgénero *Densiflorus*, las especies

agrupadas en las secciones con caracteres morfológicos más primitivos, presentan chalconas con un patrón de sustitución propio de este grupo, mientras que en las secciones con caracteres morfológicos más avanzados, presentan auronas. Por otra parte, en el subgénero *Lonchocarpus*, las especies agrupadas en las secciones con caracteres primitivos, presentan metabolitos con estructura de estilbenos; mientras que en las especies con caracteres más avanzados, se han encontrado flavonoides con estructura de flavanonas y 3 hidroxiflavanonas.

#### 5.4.1. Subgénero *Densiflorus*, *ined*.

El análisis de la ruta biogenética en el subgénero *Densiflorus*, *ined*, confirmó la propuesta taxonómica tal como se describe en la tabla 5.11. En ésta se considera con caracteres más primitivos dentro del grupo a la sección *Densiflori* y con caracteres más avanzados a la sección *Eriophylli*.

Tabla 5.11. Propuesta de arreglo taxonómico del subgénero *Densiflorus*

<b>Subgénero</b> <i>Densiflorus</i>
<b>Sección</b> <i>Densiflorii</i> .
<i>L. macrocarpus</i> , <i>L. pentaphyllus</i> .
<b>Sección</b> <i>Obtusifolii</i>
<i>L. castilloi</i> , <i>L. phlebophyllus</i>
<b>Sección</b> <i>Muehlbergiani</i>
<i>L. muehlbergianus</i> , <i>L. subglaucescens</i> .
<b>Sección</b> <i>Eriophylli</i> *
<i>L. obovatus</i>

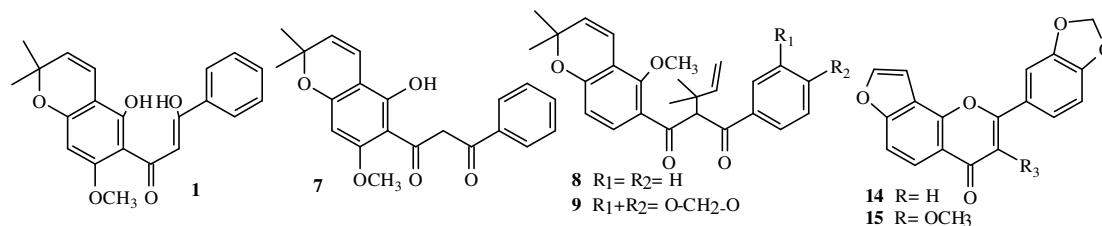
En las secciones *Densiflori* y *Obtusifolii*, se aislaron flavonoides que muestran correlación positiva entre la complejidad de su arreglo estructural y los caracteres morfológicos observados en las especies analizadas. En la sección *Densiflori* y en *L. castilloi* de la sección *Obtusifolii* analizadas hasta la fecha, se observaron dos compuestos con estructuras de chalconas (**1**, **2**), las cuales presentan sustituyentes que sugieren que son precursoras de las auronas aisladas de *L. pentaphyllus*, ambas especies de la sección *Densiflori*. En tales especies, aun cuando no están presentes los

mismos flavonoides, la estructura y el patrón de sustitución muestran un parentesco estrecho.

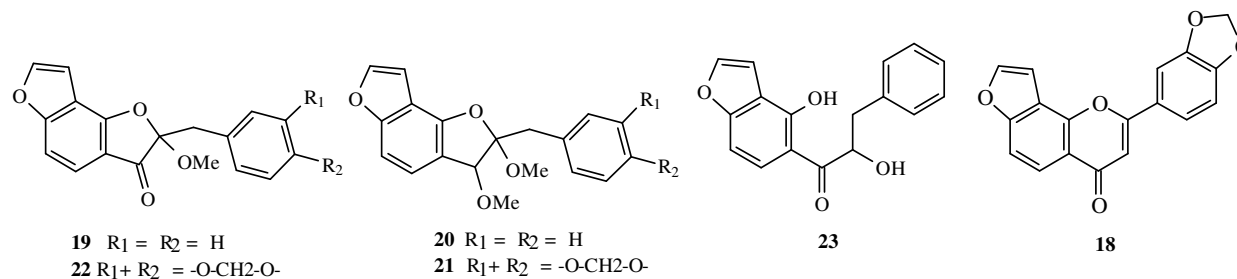
Entre las especies con caracteres mas avanzados dentro del subgénero *Densiflori*, se encuentra *L. castilloi* de la sección *Obtusifolii*, del duramen de la madera Reyes *et al.* (1995), aislaron auronas cuyas estructuras están bastante relacionadas con las auronas aisladas de la raíz de *L. obovatus* de la sección *Eriophylli*. Las auronas de ambas especies se diferencian en el patrón de sustitución. Cabe aclarar que los grupos a los que pertenecen ambas especies poseen un parentesco estrecho. Sin embargo con tales datos no es posible entender con claridad las relaciones filogenéticas entre los grupos infragenéricos, por lo que es necesario un estudio más amplio, con mayor número de especies de ambos grupos.

Cuadro 5.1. Resumen de flavonoides descritos para las especies del subgénero *Densiflorus*

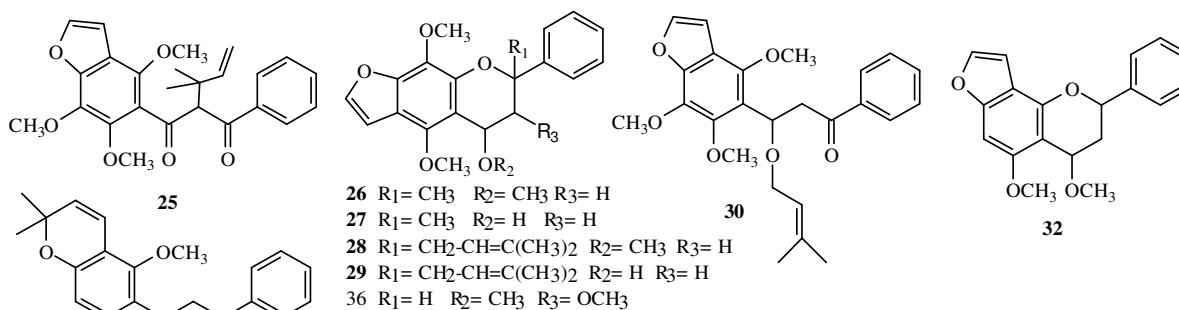
**Sección *Densiflori*\***  
*L. Pentaphyllus*



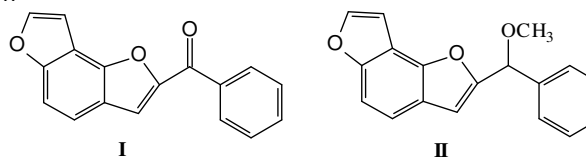
**Sección *obtusifolii***  
*L. castilloi*



**Sección *muelbergianii***  
*L. muelbergianus*  
*L. subglaucescens*



**Sección *Eriophylli*\***  
*L. obovatus*





#### 5.4.2. Subgénero *Lonchocarpus*

De las especies agrupadas en el subgénero *Lonchocarpus* se han aislado flavonoides con estructura de estilbenos, chalconas, flavanonas y 3-hidroxiflavanonas, todos ellos generalmente sustituidos por dos prenilos. De la sección *Punctati* se describen estilbenos prenilados, aunque tal estructura no se considera un flavonoide ya que no presenta el arreglo característico  $C_6C_3C_6$ , es sin embargo, un precursor de la ruta biogénica de los flavonoides. En la sección *Standleyi* los compuestos presentan mayor complejidad estructural con sustitución semejante, la comparación entre tales compuestos, sugiere un arreglo taxonómico tal como se observa en la tabla 5.12.

Tabla 5.12. Arreglo taxonómico de las especies analizadas por el método O/M

---

**Subgénero** *Lonchocarpus*

---

**Sección *Punctati*.** *L. longistylus*, *L. peninsularis*.

**Sección *Standleyi*\*** *L. guatemalensis* var. *guatemalensis* [?], *L. parviflorus*, *L. minimiflorus*, *L. atropurpureus*, *L. oaxacensis*.

**Sección *Lonchocarpus*\*** *L. cultratus*, *L. sericeus*, *L. septentrionalis*,  
*L. guatemalensis* var *mexicanus*.

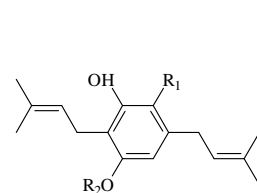
---

La sección *Lonchocarpus* está ubicada taxonómicamente al final del subgénero *Lonchocarpus*, lo cual indica que dicho grupo presenta caracteres morfológicos más avanzados con respecto a los observados en las secciones hermanas (cuadro 5.2). Los flavonoides encontrados en las especies de este grupo, son comunes entre ellas, así mismo, no se observa mucha diferencia entre sus sustituyentes, es común observar la tendencia a la pérdida de un sustituyente OH unido al C-5.

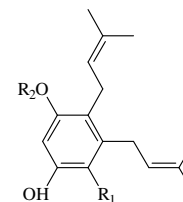
Cuadro 5.2. Resumen de flavonoides descritos para las especies del subgénero *Lonchocarpus*

**Sección *Punctati***

- L. longistylus*
- L. peninsularis*



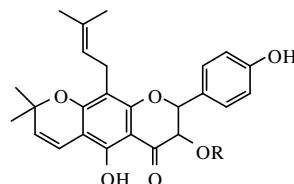
- 33 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H  
 34 R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>-CH-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>



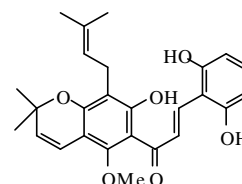
- 35 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
 36 R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>-CH-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = H

**Sección *Standleyi***

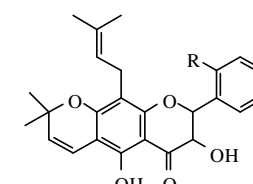
- L. minimiflorus*
- L. guatemalensis* var. *guatemalensis*
- L. parviflorus*
- L. atropurpureus*
- L. oaxacensis*
- L. mutans*



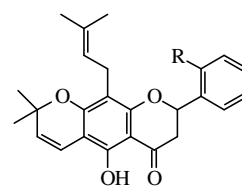
37. R<sub>1</sub> = H  
 38. R<sub>1</sub> = OH



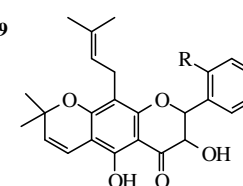
39



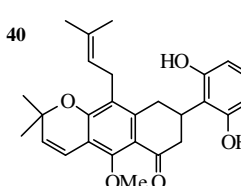
40



- III. R = H  
 VI. R = OH



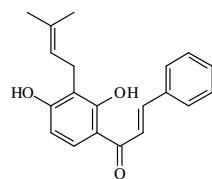
- IV. R = H  
 V. R = OH



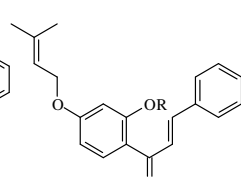
VII.

**Sección *Lonchocarpus*\***

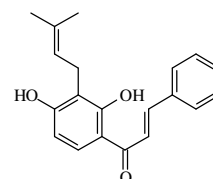
- L. cultratus*
- L. sericeus*
- L. lanceolatus*
- L. Septentrionalis*
- L. guatemalensis* var *mexicanus*



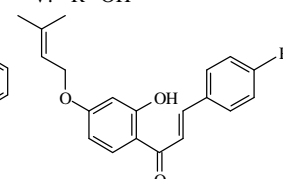
IX



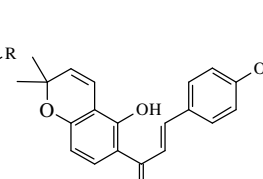
- X R = Me  
 XI R = H



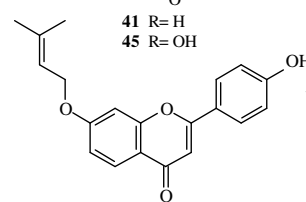
- 41 R = H  
 45 R = OH



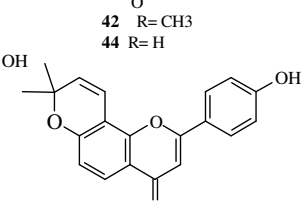
- 42 R = CH<sub>3</sub>  
 44 R = H



43



46



47

En el cuadro 5.2 se muestran los metabolitos pertenecientes a las especies del subgénero *Lonchocarpus*. De acuerdo con la propuesta taxonómica, al inicio del cuadro aparecen las especies agrupadas en la sección *Punctati* (*L. longistylus* y *L. peninsularis*) con caracteres primitivos. En ambas especies se describe la presencia de un grupo de compuestos con estructura de estilbenos denominados longistilina a, b, c, y d. Es importante mencionar que los estilbenos no son considerados flavonoides, pero que sin embargo son precursores de estos. La sección *Standleyi* constituye un grupo de plantas cuyos flavonoides, por lo general flavanonas, 3 hidroxiflavanonas o chalconas, todas ellas poseen un patrón estructural propio. Por otra parte, las especies con caracteres más avanzados agrupadas en la sección *Lonchocarpus*, presentan estructuras más elaboradas y con menos variabilidad en compuestos. Las especies que constituyen la sección *Standleyi* al igual que las agrupadas en la sección *Lonchocarpus* muestran poca variación en sus flavonoides, muchas especies dentro de un mismo grupo, comparten sus metabolitos, lo cual confirma la filogenia que revela el análisis de caracteres morfológicos.

#### **5.5.- Análisis taxonómico con base en los valores de oxidación /metilación.**

Los valores promedios de O/M de cada una de las especies del género *Lonchocarpus*, obtenidos con base en la metodología propuesta por Gottlieb (1980), se analizaron agrupando a las especies separadas en los dos subgéneros, estos valores se arreglaron en orden progresivo. De la misma manera los valores de oxidación y metilación se incorporaron a una gráfica de dispersión para analizar la tendencia de los grupos infragenéricos en cada uno de los subgéneros.

Cuando se analizaron los valores de las especies de ambos subgéneros en conjunto, fue difícil observar grupos bien definidos ya que los valores se traslaparon, por lo cual se realizó una tabla de valores y una gráfica de dispersión para cada subgénero. En ambas tablas se observó que las especies filogenéticamente relacionadas formaban grupos definidos cuando se ordenaban los valores de oxidación en orden creciente.

En las tablas 5.13 se presentan los grupos infragenéricos del subgénero *Densiflorus*. Para facilitar el análisis, a cada sección se le asignó un color, además se ordenaron de acuerdo con el criterio morfológico de carácter primitivo a avanzado.

Tabla 5.13.- Arreglo de los grupos infragenéricos del subgénero *Densiflorus* M. Sousa, *ined.*, de acuerdo con el análisis de caracteres morfológicos

<b>Categoría</b>		<b>Caracteres</b>
	Sección <i>Densiflori</i>	Primitivo
	Sección. <i>Obtusifolii</i>	↓ Avanzado
	Sección <i>Muelbergianii</i>	
	Sección <i>Eriophylli</i>	

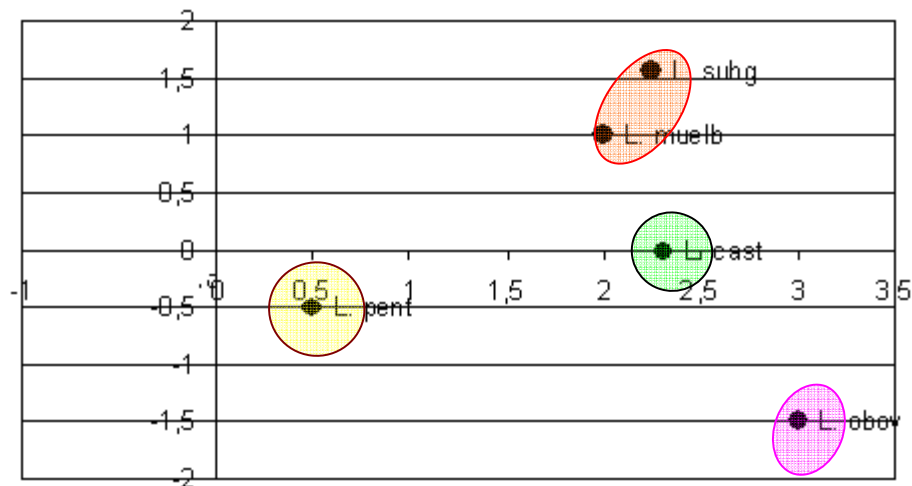
Tabla 5.14.- Arreglo de las especies agrupadas en el subgénero *Densiflorus* M. Sousa, *ined.*, en orden creciente de sus valores de O/M.

<b>Especie</b>	<b>Oxidación</b>	<b>Metilación</b>	<b>clave</b>
<i>L. pentaphyllus</i>	0.5	-0.5	pent
<i>L. muelbergianus</i>	2	1	muel
<i>L. subglaucescens</i>	2.25	1.57	sub
<i>L. castilloi</i>	2.31	0	cas
<i>L. obovatus</i>	3	-1.5	obo

Las especies pertenecientes al subgénero *Densiflorus* al ser agrupadas en orden creciente de sus valores de oxidación (tabla 5.13), muestran tendencia paralela con respecto a los caracteres morfológicos, siguiendo el orden de primitivo a avanzado (Tabla 5.14).

Los valores de O/M observados en una gráfica de dispersión (Fig. 5.1), se distinguen en cuatro grupos, de los cuales sólo uno está constituido por dos especies. Tres de los grupos aparecen en regiones definidas en la gráfica, la sección *Muelbergianii* con valores positivos de metilación, ocupan el segundo cuadrante de la gráfica, *L. castilloi* de la sección *Obtusifolii* con valor de metilación de cero se ubica sobre el origen, mientras que *L. obovatus* de la sección *Eriophylli* con valores negativos, ocupa el tercer cuadrante.

Gráfica 5.1.- Agrupación de las especies del subgénero *Densiflorus* M. Sousa, *ined.* con base en sus valores de O/M.



En la tabla 5.15 las especies del subgénero *Lonchocarpus* son agrupadas en secciones, ordenadas de acuerdo con su carácter primitivo a avanzado tal como las

ubica el análisis de caracteres morfológicos. En la tabla 5.16 las especies se ordenan de acuerdo con sus valores de oxidación, en esta tabla las especies se definen en grupos (sección); aunque el orden de tales grupos no muestra una correlación positiva con respecto al criterio de caracteres morfológicos (primitivos a avanzados), por ejemplo, de acuerdo con la tabla 5.15, esperaríamos que la sección *Lonchocarpus* apareciera al final de dicha tabla.

Tabla 5.15.- Arreglo esperado de los grupos infragenéricos del subgénero *Lonchocarpus*, de acuerdo con el análisis de caracteres morfológicos.

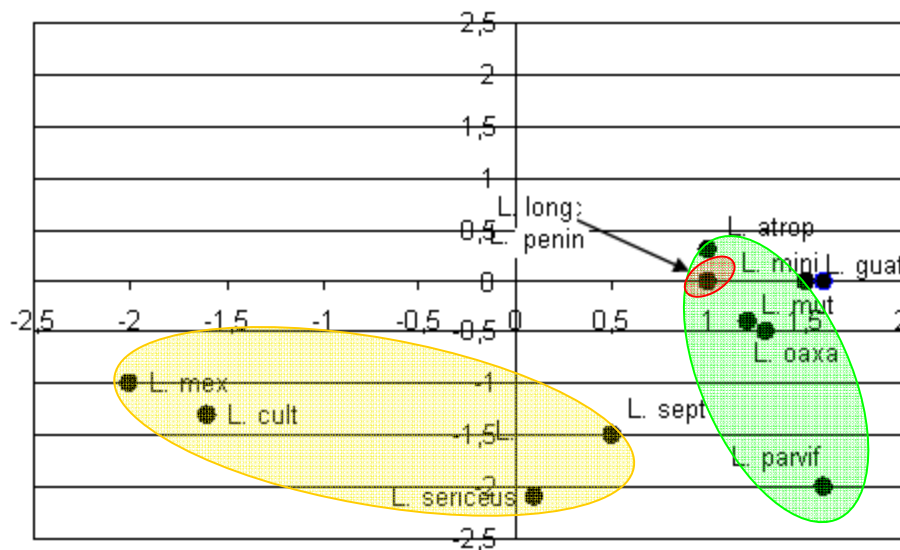
Categoría		Caracteres
	Sección <i>Punctati</i>	Primitivo
	Sección <i>Standleyi</i>	↓
	Sección <i>Lonchocarpus</i>	Avanzado

Tabla 5.16.- Arreglo de las especies agrupadas en el subgénero *Lonchocarpus* a partir del orden creciente de sus valores de O/M.

Especie	Oxidación	Metilación	clave
<i>L. mexicanus</i>	-2	-1	mex
<i>L. cultratus</i>	-1.6	-1.3	cul
<i>L. septentrionalis</i>	0.5	1.5	cru
<i>L. sericeus</i>	0.1	-2.1	ser
<i>L. peninsularis</i>	1	0	pen
<i>L. longistilus</i>	1	0	punc
<i>L. atropurpureos</i>	1	0.3	atr
<i>L. mutans</i>	1.2	-0.4	mut
<i>L. oaxacensis</i>	1.3	-0.5	oax
<i>L. minimiflorus</i>	1.5	0	min
<i>L. parviflorus</i>	1.6	-2.0	par
<i>L. guatemalensis</i> [?]	1.6	0	gua

En la gráfica 5.2 se presentan los valores de O/M de las especies del subgénero *Lonchocarpus*. En ésta se definen por separado tres secciones: *Punctati*, *Standleyi* y *Lonchocarpus*, las cuales ocupan áreas de distribución bien definidas en los cuadrantes. Los valores de oxidación negativos de las especies agrupadas en la sección *Lonchocarpus*, definen su posición en el tercer cuadrante de la gráfica, las especies de la sección *Standleyi* en el cuarto cuadrante con valores de oxidación bajos, mientras que las especies de la sección *Punctati* en el segundo cuadrante con valores de metilación altos.

Gráfica. 5.2.- Agrupación de las especies del subgénero *Lonchocarpus* con base en sus valores de O/M.



En la tabla 5.17 se muestran los valores de O/M de seis especies, los cuales fueron excluidos del análisis, ya que de acuerdo con la metodología propuesta para el presente estudio los flavonoides deben ser aislados de raíces, por lo que en el caso de *L. salvadorensis*, *L. unifoliolatus*, *L. lanceolatus* y *L. phlebophyllus*, se aislaron de las semillas, mientras que de *L. robustus* los compuestos se obtuvieron de las raíces infectadas por hongos.

De *L. salvadorensis* y *L. unifoliolatus* se describen rotenoides, esta característica no permite definir la ubicación taxonómica de ambas especies, mientras que de las raíces de *L. robustus* se aislaron pterocarpanos. De las semillas de *L. phlebophyllus* se describen flavanonas cuya estructura básica está relacionada con la de los compuestos descritos para las especies de la sección *Lonchocarpus*, todos estos compuestos poseen valores de O/M mayores a los calculados para los flavonoides aislados de las raíces de ambos subgéneros analizados. Para homogenizar el análisis y puesto que dichos flavonoides no provienen de los tejidos analizados, estos datos se analizan por separado, excluyéndolos de las gráficas de dispersión.

Tabla 5.17.- Valores de oxidación-metilación de los compuestos obtenidos de semillas y de las raíces de especies del género *Lonchocarpus*.

<b>Especie</b>	<b>Oxidación</b>	<b>Metilación</b>	<b>clave</b>
<i>L. salvadorensis</i>	5.5	1.25	sal
<i>L. robustus</i>	5.5	1	san
<i>L. unifoliolatus</i>	4.5	1.5	unif
<i>L. phlebophyllus</i>	-0.5	0	phl
<i>L. lanceolatus</i>	-1.5	-0.5	lanc
<i>L. macrocapus</i>	-0.57	-0.14	mac

### **5.5.- Análisis taxonómico con base en presencia-ausencia de determinado metabolito.**

El método de análisis por presencia o ausencia de un metabolito dado, tiene poca utilidad para aclarar la filogenia a nivel de género en *Lonchocarpus*, sin embargo a nivel infragenérico por ejemplo sección, es posible observar patrones comunes que permiten definir grados de parentesco. Como ejemplo, en la tabla 5.18 se relacionan algunos flavonoides comunes en las especies de la sección *Standleyi*, tal es el caso de la



minimiflorina, una isoflavanona compartida por la mayoría de las especies de dicha sección, mientras que la orotinina solamente se ha aislado de *L. parviflorus* definiéndose como un carácter propio de esta especie.

Los metabolitos secundarios pueden ser incluidos como caracteres en un análisis taxonómico, sobre todo cuando éstos son compartidos por varias especies en un mismo grupo taxonómico, en éste caso se podría decir que éste es un carácter compartido. En la tabla 5.19 se enumeran diez compuestos compartidos, los cuales se enlistaron en una matriz, donde se analizó la presencia-ausencia en las siete especies de la sección *Standleyi*, asignando valores de 1 para presencia y de 0 para ausencia. De esta manera los valores de presencia-ausencia pueden ser de utilidad para un análisis cladístico.

Tabla 5.18. Metabolitos aislados de las especies de la sección *Standleyi*.

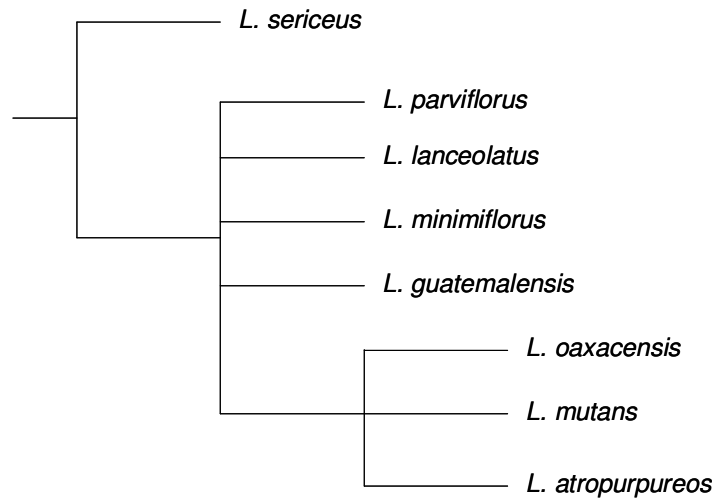
<b>Compuesto</b>	<b>Fuente de obtención</b>
<i>Minimiflorina</i>	<i>L. minimiflorus</i> <i>L. parviflorus</i> <i>L. oaxacensis</i> <i>L. atropurpureus</i> <i>L. mutans</i>
<i>Mundulina</i>	<i>L. atropurpureus</i> <i>L. oaxacensis</i> <i>L. mutans</i>
<i>Lupinifolina</i>	<i>L. minimiflorus</i> <i>L. guatemalensis</i> var. <i>guatemalensis</i> [?]
<i>Lupinifolinol</i> (7)	<i>L. guatemalensis</i> var. <i>guatemalensis</i> [?] <i>L. oaxacensis</i>
<i>Orotinina</i> (6)	<i>L. parviflorus</i>

El cladograma obtenido con el análisis de las especies agrupadas en la sección *Standleyi* (Gráfica 5.3) en el cual se incuyó a *L. sericeus* como grupo externo, define dos grupos fileticos, por un lado elconstituido por *L. parviflorus*, *L. lanceolatus*, *L. minimiflorus* y *L. guatemalensis* y el otro grupo constituido por *L. oaxacensis*, *L. mutans* y *L. atropurpureus*.

Tabla 5.19. Matriz de datos considerando a los flavonoides como caracteres de las especies agrupadas en la sección *Standleyi*.

<b>Especie/Flavonoide</b>	<i>L. sericeus</i>	<i>L. oax</i>	<i>L. mut</i>	<i>L. atro</i>	<i>L. parv</i>	<i>L. lan</i>	<i>L. min</i>	<i>L. guat</i>
Lonchocarpina	1	0	0	0	0	0	0	0
Minimiflorina	0	1	1	1	1	1	1	0
Mundulina	0	1	1	1	0	0	0	0
Mundulinol	0	1	1	1	0	0	0	0
Orotinina	0	1	1	0	1	1	0	0
Jayacanol	0	1	1	1	0	0	0	0
Lupinifolinol	0	1	0	0	0	0	0	1
Lupinifolina	0	0	0	0	0	0	1	1
3-metoxijayacanol	0	0	0	1	0	0	0	0
Metil lupinifolinol	0	0	0	0	0	0	0	1
Orotinichalcona	0	0	0	0	1	0	0	0
Compuesto X	0	0	0	0	0	0	0	0
Compuesto Y	0	0	1	0	0	0	0	0

Figura 5.15. Cladograma obtenido por consenso en bootstrap con 500 posibilidades, considerando a los flavonoides aislados de las diferentes especies de la sección *Standleyi* como caracteres presentes o ausentes.



## 6. DISCUSIÓN

El análisis químico de las raíces de la cinco especies estudiadas en el presente trabajo y los datos descritos en la literatura permitieron comparar la composición química (flavonoides de las raíces) de 12 especies de *Lonchocarpus sensu strictu*, con lo cual se concluye que este género es un grupo homogéneo caracterizado por sintetizar estilbenos, chalconas, flavanonas, 3-hidroxi flavanonas y flavonas, todos ellos sustituidos por uno o dos grupos isoprenilo, o una estructura cíclica (furano o demetil pirano) derivada de la oxidación del isoprenilo. Las especies de algunas secciones consideradas precursoras, se especializan en la biosíntesis de estilbenos y auronas, así como flavonoides raros tales como dibenzoilpropanos y auronoles.

En lo general, estos compuestos se ubican al inicio de la ruta biosintética de los flavonoides propuesta por Gottlieb (1983) (Fig. 2.1). Es decir, en analogía con los caracteres morfológicos, los flavonoides de las raíces de las especies de *Lonchocarpus* revelan una condición primitiva (caracteres plesiomórficos). Sólo si se consideran estudios de otras partes de la planta tales como semillas o cuando los tejidos de la raíz son sometidos al ataque fúngico, se encuentran isoflavonoides tales como rotenoides y pterocarpanos, los cuales por su valor de oxidación, son considerados como flavonoides más avanzados en la ruta biogenética (Gottlieb, 1983).

Si en el análisis se incluyen las especies de *Lonchocarpus sensu lato*, se encuentran isoflavonoides que se ubican al final de ruta biosintética, como rotenoides y pterocarpanos (Fig. 2.1) los cuales son considerados caracteres avanzados. Por ejemplo *L. urucu* o *L. utililis*, es una especie sudamericana de gran importancia económica, citada ininidad de ocasiones en la literatura debido al alto contenido de rotenona en sus raíces, sin embargo la revisión taxonómica concluye que se trata de una especie del género *Deguelia*. De la misma manera encontramos ejemplares cuya

clasificación no pertenece a *Lonchocarpus* o bien no es clara dentro del género, sin embargo el análisis químico podría ser un apoyo para clarificar estas dudas, por ejemplo, los metabolitos aislados de las raíces de *Derris robusta* (East *et al.*, 1969) de los trópicos del viejo mundo, nos afirma que esta especie pertenece al otro género *Derris* ausente en los trópicos de América, ya que la estructura de sus compuestos isoflavonoides, no corresponde con la de los encontrados con las especies de *Lonchocarpus*. Por otra parte de las raíces de *Derris mollis* Lira *et al.* (1972) aislaron los compuestos karanjina (11), lanceolatina B (12) pongaglabrona (14) y pongapina (15), la semejanza en la composición química, revela una estrecharelación filogenética con *L. pentaphyllus* de la sección *Densiflori*, sin embargo morfológicamente *D. mollis* se ubica mejor en el género *Muelleria*.

Los flavonoides aislados de las semillas varían en los patrones de sustitución o en su estructura básica, en ocasiones como en el caso de *L. macrocarpus*, Waterman y Mahmoud *et al.* (1985) encontraron que los flavonoides aislados de las semillas de esta especie, no se diferencian en mucho de los aislados de las raíces de *L. pentaphyllus*, con la cual esta emparentada. Sin embargo, otras veces no se encuentra relación entre los compuestos de especies de un mismo grupo, por ejemplo en *L. phlebophyllus* de la sección *Obtusifoli*, sus compuestos isolonchocarpina y 3-hidroxiisolonchocarpina, no corresponden con los flavonoides del subgénero *Densiflorus*, grupo en el cual esta clasificado, ya que se relacionan más con los aislados de la sección *Lonchocarpus* del subgénero *Lonchocarpus*. En el caso del estudio químico de las semillas de *L. unifoliolatus*, (Delle Monache *et al.*, 1978) y de *L. salvadorensis* (Birch *et al.*, 1985) se describen los rotenoides deguelina, tales compuestos no se han aislado de las raíces de las especies del género *Lochocarpus* y se diferencian también de los aislados de las semillas de las otras especies de *Lonchocarpus* descritas, lo cual podría atribuirse a respuesta a ambientes hostiles de depredación.

El análisis químico de las hojas, como en el estudio químico de *L. minimiflorus* realizado por Mahmoud y Waterman (1985), mostró metabolitos relacionados estructuralmente con los aislados de las raíces, pero con valores de oxidación menor, los flavonoides de estas hojas parecen ser precursores de los aislados de las raíces.

Nuestros resultados contrastan con los descritos por Gomes *et al.* (1981) quienes emplearon el método de Gottlieb para establecer las relaciones de parentesco entre *Derris* y *Lonchocarpus*, así como de géneros emparentados, sin embargo en dicho análisis utilizaron los flavonoides reportados sin discriminar los órganos de los que fueron aislados, ni su carácter de fitoalexinas. Estos autores no observaron una correlación evidente entre los grupos taxonómicos y sus valores de oxidación/metilación, así como la secuencia biogenética. Geesink (1984) al comentar sobre este trabajo sugirió precisamente que dicho análisis debía realizarse con los flavonoides aislados de un órgano determinado de la planta y excluyendo las fitoalexinas. Así mismo, este análisis debería realizarse preferentemente a niveles infragenéricos, siempre que previamente se haya realizado un análisis de caracteres morfológicos. En efecto, en el presente trabajo, no se apreció una tendencia definida cuando los valores de O/M se analizaron a nivel de género; aunque si fue posible observar una correlación positiva cuando se comparó el carácter de primitivo a avanzado con los valores de oxidación de menor a mayor, cuando las especies se analizaron agrupadas en subgénero.

Considerando que las especies de un grupo monofilético comparten un mecanismo enzimático, se esperaría que los flavonoides que producen tuvieran un esqueleto fundamental con pequeñas variaciones en los sustituyentes. La presencia de compuestos con diferentes esqueletos aislados de una especie que se supone pertenece a un grupo, indica la posibilidad de que su ubicación taxonómica sea incorrecta, lo cual sugiere la revisión taxonómica de dicha especie.

Algunas observaciones a la propuesta filogenética de Sousa, a partir de los resultados obtenidos en la presente investigación quimiotaxonómica, se realizaron a nivel de especies aisladas, sin embargo a nivel de subgénero se observó mayor correlación entre caracteres primitivos a avanzados, con el valor de oxidación asignado al tipo estructural de los flavonoides en secuencia de menor a mayor grado. Por otra parte, a nivel de grupo infragenérico (sección) fue posible observar uniformidad en los esqueletos de sus flavonoides.

El subgénero *Densiflorus*, agrupa a las especies con caracteres considerados como los más primitivos dentro del género *Lonchocarpus*. Únicamente se estudiaron cinco especies, lo cual limita el análisis comparativo, sin embargo éstas presentaron por lo general chalconas y auronas substituidas en arreglo angular, así como un sustituyente hidroxilo en el C-5. Lo anterior sugiere que todos los grupos de este subgénero, posiblemente poseen un mecanismo enzimático común. A partir del análisis biosintético, es posible confirmar la filogenia entre los diversos grupos taxonómicos. En las especies con caracteres morfológicos primitivos, la estructura de sus flavonoides sugiere que son los precursores de los encontrados en especies con caracteres más avanzados. Por ejemplo los compuestos **1** y **2** aislados de *L. pentaphyllus* (sección *Densiflori*) poseen estructura de dibenzoilmetanos, los cuales mediante oxidación originan a los flavonoides aislados de especies con caracteres más avanzados. La síntesis realizada por Mathew y Subba Rao, (1983) a partir de un dibenzoilmetano demuestra la oxidación que sufren tales compuestos hasta la obtención de una flavona.

El subgénero *Lonchocarpus* agrupa a las especies con caracteres morfológicos más avanzados en la jerarquía taxonómica del género *Lonchocarpus*. Las estructuras de sus flavonoides van desde las más simples, como los estilbenos observados en la sección *Punctati*, hasta las chalconas y flavanonas observadas en las secciones *Standleyi* y *Lonchocarpus*, además, poseen patrones de sustitución característica, principalmente

un anillo dimetilpirano en arreglo angular. Los grupos más primitivos presentan un hidroxilo en C-5, mientras que los más avanzados no lo presentan.

La Sección *Punctati* se ubica al inicio de la clasificación, ya que presenta los caracteres morfológicos más primitivos. De este grupos se ha descrito el estudio químico de las raíces de *L. longistylus* (Goncalves, 1973) y *L. peninsularis* (Delle Monache *et al.* 1978). La presencia de estilbenos en ambas especies concuerda con la condición primitiva de los caracteres morfológicos, ya que estos compuestos se ubican al inicio de la ruta metabólica de los flavonoides (Fig. 2.1). La presencia de metabolitos comunes en ambas especies (**35** y **36**) confirma un origen ancestral común.

La comparación de los caracteres morfológicos entre las especies agrupadas en la sección *Standleyi* indica una relación de parentesco estrecha, la cual es confirmada con el análisis de sus flavonoides al presentar en común un anillo dimetil pirano en arreglo linear, el grupo OH unido al C-5 que presentan metabolitos comunes entre ellas; por ejemplo, la minimiflorina se ha encontrado en cinco de las seis especies (Tabla 4.19). Lo anterior sugiere que las especies analizadas comprenden un grupo monofilético.

En la sección *Lonchocarpus*, la presencia de varios flavonoides compartidos por las especies de esta sección, sugiere que también se trata de un grupo monofilético. Se ha propuesto que un carácter morfológico elegido como diagnóstico para un grupo taxonómico, es la manifestación de una convergencia adaptativa. Al respecto, Hermann (1949) consideró que la presencia de glándulas translucidas, definían a un grupo al cual denominó *L. guatemalensis* y especies emparentadas. Empero, nuestro análisis químico, indicó que *L. guatemalensis* var. *guatemalensis* no comparte la misma vía biosintética con *L. guatemalensis* var. *mexicanus*, ya que los flavonoides de la primera especie son típicos de la sección *Standleyi*, mientras que los de la segunda especie son característicos de la sección *Lonchocarpus*. Con base en las observaciones anteriores,

consideramos que *L. guatemalensis* var *mexicanus* debe ubicarse en la sección *Lonchocarpus*.

## **6.1. Análisis taxonómico a partir de los valores de oxidación/metilación**

### **6.1.1. Género *Lonchocarpus***

Los valores de oxidación para las especies del género, al ser analizados en conjunto no permitieron distinguir tendencias definidas; sin embargo cuando ambos subgéneros (*Densiflorus* y *Lonchocarpus*) se analizaron por separado, si se observaron patrones definidos. En el caso del subgénero *Densiflorus*, ined., el incremento progresivo en los valores de oxidación correlacionó con el arreglo taxonómico propuesto, siguiendo el orden de caracteres morfológicos primitivos a avanzados (Tabla 5.13). Los valores de metilación en ambos subgéneros, no fueron de utilidad para definir tendencias ni grupos taxonómicos en la clasificación. Cuando los valores O/M fueron analizados en conjunto en una grafica de dispersión, nuevamente las especies se sobreponen, por lo cual los datos de ambos subgéneros se analizaron por separado en una tabla con valores de oxidación progresiva y en una grafica de dispersión.

#### **6.1.1.1. Subgénero *Densiflorus***

Los valores de oxidación de las especies de este grupo, al ser ordenados de menor a mayor, correlacionan positivamente con la tendencia de primitivo a avanzado que muestran los caracteres morfológicos con los cuales se clasificaron las especies de este grupo, sólo el valor de oxidación de *L. phlebophyllus* de la sección *Obtusifolii*, aparece



discordante entre los valores de las especies del subgénero *Densiflorus* (Tablas 5.14 y 5.15).

Cuando los valores de O/M de las especies del subgénero *Densiflorus* se analizaron en una grafica de dispersión (gráfica 5.1) la distribución de los valores de las secciones *Densiflori* y *Obtusifolii* son contiguos, lo cual sugiere que constituyen un sólo grupo. Las dos especies de la sección *Muelbergianii* se distribuyen en la gráfica, lejos de *L. castilloi* de la sección *Obtusifolii* y de *L. obovatus* de la sección *Eriophylli*.

El valor de oxidación no fue de gran utilidad para establecer diferencias entre *L. phlebophyllus*, *L. pentaphyllus*, *L. muelhbergianus* y *L. subglauscesens*, ya que presentaron el mismo valor, sin embargo presentan diferente grado de metilación.

#### **6.1.1.2. Subgénero *Lonchocarpus*.**

Los valores de oxidación de las especies de este grupo, al ser ordenados progresivamente, no mostraron correlación con el arreglo de los taxones infragenéricos en la propuesta taxonómica de Sousa (Tabla 4.3), éstos se muestran también en la tabla 5.16, aunque el orden de los valores de las especies forma grupos definidos, los cual se muestra en la tabla 5.17. A diferencia de lo esperado con la propuesta de Gottlieb (1980), las especies agrupadas en la sección *Lonchocarpus* con caracteres morfológicos más primitivos presentaron valores de oxidación altos. De esta forma, la sección *Lonchocarpus* que presenta caracteres morfológicos más avanzados, se ubica al inicio de la tabla 5.17, aunque se esperaba que apareciera al final. El caso contrario es el observado con la sección *Standleyi*. Lo anterior sugiere que los cambios en la evolución química no siempre tienden a la oxidación como lo propuso originalmente Gottlieb (1980), sino que pudieran dirigirse también a la reducción.

Cuando los valores medios de O/M de las especies de este subgénero son observados en una gráfica de dispersión (Gráfica 5.2), se aprecian tres agrupaciones, una de ellas constituida por la sección *Lonchocarpus* y sección *Standleyi* y la sección *Punctati*, ésta última traslapada sobre el área donde se distribuyen las especies de la sección *Standleyi*.

Las especies que agrupa la sección *Lonchocarpus* ocuparon una región cercana al origen, lo cual contradice nuevamente la propuesta de Gottlieb *et al.* (1980) en el sentido de que los valores de oxidación más altos, corresponden a los grupos más avanzados.

Los valores de metilación no fueron útiles para agrupar especies emparentadas, ni para definir tendencias en la clasificación, sin embargo son de utilidad para diferenciar dos especies con valores de oxidación semejantes. Por ejemplo en la sección *Standleyi*, las especies *L. parviflorus* y *L. guatemalensis* poseen el mismo valor de oxidación (O = 1.6), sin embargo se diferencian en que *L. parviflorus* presenta un valor de metilación de - 2 mientras que el de *L. guatemalensis* fue de 0.

En la grafica de O/M se excluyeron tres especies pertenecientes al subgénero *Lonchocarpus*, entre ellas *L. unifoliolatus*, *L. salvadorensis*, *L. robustus*, ya que no se sujetan al método utilizado en el presente estudio. Los valores altos de oxidación se deben a que el cálculo de estos valores se realizó a partir de los rotenoides y pterocarpanos aislados de las semillas en las dos primeras especies, y de raíces infectadas de la tercera. En esta última especie se aislaron la medicarpina y la variabilina, dos pterocarpanos aislados en varias familias emparentadas con las leguminosas, lo cual se puede considerar un carácter primitivo.

Los valores de O/M obtenidos para las especies analizadas, son datos confiables para un análisis filogenético solo si se analizan a niveles infragenéricos, lo cual fue considerado por Geesink (1984), en el sentido de que tales valores son útiles solo después de haberse establecido la clasificación, con base en un análisis de caracteres morfológicos y ontogénicos.

El cladograma que describe la filogenia entre las especies de la sección *Standleyi*, presenta dos grupos definidos entre éstas, aunque no define vicarianzas. En este análisis filogenético no se observa gran afinidad filogenética entre *L. minimiflorus* y *L. guatemalensis*, contrariamente a lo observado en la grafica de dispersión de valores de O/M (Gráf. 5.2). De la misma manera, la gran afinidad química entre *L. oaxacensis*, *L. mutans* y *L. atropurpureus* es confirmada por el cladograma la cual confirma a su vez el parentesco estrecho entre tales especies.

## **6.2. Actividad biológica**

Todos los flavonoides aislados de las cinco especies estudiadas, mostraron diferentes valores de actividad biológica, sin embargo fueron pocos los que mostraron valores significativos. La actividad mostrada parece estar relacionada con el tipo de estructura química que presentan los compuestos. Se pudo comprobar que los flavonoides fitoalexinas mostraron alta actividad como inhibidores del crecimiento del micelio del hongo de pudrición *Postia placenta*. Algunos flavonoides no fitoalexinas, mostraron actividad moderada, sin embargo en otros dicha actividad fue nula, lo cual hace pensar que su función en la planta no es la protección contra la pudrición. Por ejemplo, los compuestos inirebina A e inirebina B son abundantes en *L. obovatus*, sin embargo la madera aun cuando es muy dura, se pudre rápidamente.

Los compuestos aislados de *Lonchocarpus oaxacensis* poseen estructura básica de flavanonas entre ellos la minimiflorina (**VI**), con estructura de flavanona sustituida por un OH en 2' del anillo B, fue el único que mostró valores altos contra las cuatro líneas celulares cancerígenas, tales valores superan a los mostrados por el testigo rotenona. Es interesante mencionar que esta actividad no se observó en el jayacanol (**IV**) el cual posee estructura de 3-hidroxi-flavanona, el cual al igual que la mayoría no mostraron valores significativos.

## 7. CONCLUSIONES

La variabilidad morfológica, así como la diversidad estructural de los flavonoides observados entre los grupos infragenéricos de *Lonchocarpus*, es semejante a la observada entre los géneros de la tribu *Millettiae* a la cual pertenece (Gomes *et al.* 1981, Geesink 1984).

Los flavonoides aislados de las especies analizadas en el presente trabajo, junto con los descritos por la literatura, fueron de gran utilidad para el análisis taxonómico del género *Lonchocarpus*, ya que demostraron que los caracteres morfológicos considerados para la presente clasificación son confiables. De esta manera se confirma que el análisis químico realizado con fines de clasificación, es una herramienta importante para corroborar las hipótesis taxonómicas establecidas mediante el análisis de caracteres morfológicos y ontogénicos.

Los flavonoides son de gran utilidad como caracteres taxonómicos, ya que cada especie muestra variación en sus patrones de sustitución. La estructura básica común de los flavonoides dentro de un grupo infragenérico, permite afirmar que el grupo analizado se trata de un grupo monofilético, aun cuando no se presenten compuestos compartidos entre las especies hermanas.

La cantidad de especies estudiadas químicamente y las que se han descrito en la literatura de las secciones *Standleyi* y *Lonchocarpus*, permitió observar que la estructura de sus flavonoides es uniforme, lo cual confirma que cada grupo comparte un ancestro común. Ambos grupos presentan mecanismos de biosíntesis diferentes. Aunque es necesario revisar la composición química de un mayor número de especies críticas para afirmar lo anterior, ya que faltan estudios de especies agrupadas en los grupos con caracteres más primitivos dentro del género.

Algunos flavonoides aislados de *Lonchocarpus spp.*, han sido aislados también de varios géneros de la tribu *Millettiae* con amplia distribución mundial. Por ejemplo la pongaglabrona aislada de *Lonchocarpus pentaphyllus*, (*L. Latifolius*) y *L. castilloi*, se ha aislado también en géneros como *Pongamia* y *Millettia* con distribución en el continente africano. Sin embargo la pongaglabrona no se puede considerar como carácter diagnóstico de la tribu, ya que se presenta de manera azarosa.

El análisis de la ruta biogénica de los flavonoides a nivel de género, mostró que los dos subgéneros de *Lonchocarpus* poseen rutas divergentes. En estos grupos se observó también que los grupos con caracteres primitivos presentaron flavonoides con estructuras más simples, mientras que los que presentan caracteres más avanzados, poseen flavonoides más elaborados, al mismo tiempo que tienden hacia la reducción perdiendo un OH en el C-5 de las flavanonas.

Los valores de O/M no son útiles para un análisis a nivel de género, sin embargo tales valores pueden ser útiles cuando se consideran como caracteres para establecer relaciones filogenéticas en grupos infragenéricos. Aunque se presenten los mismos valores, la característica estructural de los metabolitos es diferente, por lo cual es recomendable el estudio a nivel infragenérico, también se sugiere que la comparación de los valores O/M no es válida entre especies de diferente género, y deberá utilizarse como una herramienta auxiliar para delimitar especies, sólo después de haberse establecido la clasificación con base en un análisis de caracteres morfológicos (Geesink, 1984) y ontogenéticos (Sousa y Sousa, 1981).

La utilidad del análisis cladístico considerando a los flavonoides como caracteres taxonómicos parece ser mayor que el de los valores de O/M, ya que es más congruente con los resultados mostrados por el análisis botánico.

La actividad fungistática mostrada por los flavonoides está en función de su estructura. Los flavonoides con mayor actividad fungistática fueron las fitoalexinas. La mayor actividad citotóxica fue la mostrada por las 3-hidroxi-flavanonas, especialmente por la minimiflorina. Gottlieb (1980) menciona la importancia de las micromoléculas en los procesos de especiación de las plantas debido a su papel como intermediarios en la polinización, defensa contra la herbivoría y patógenos, así como reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alavez-Solano, D.; Reyes-Chilpa R.; Jiménez-Estrada, M.; Gómez-Garibay, F.; Sousa-Sánchez, M. and Chávez Uribe, M. I. (2000). Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis* Phytochemistry 55 (8): 953-957.
- Alcaraz, L. E.; Blanco, S. E.; Puig, O. N.; Tomás, F. and Ferretti, F. H. (2000). Antibacterial activity of flavonoids againsts methicillin resistant *Staphylococcus aureus* Strains. Journal of Theoretical Biology 205: 231-240.
- Azevedo-Tozzi, A. M. G. (1998). A identidade do timbó-vedadeiro: *Deguelia utilis* (A.C. Sm.) A.M.G. Azevedo (Leguminosae-Papilionoidae). Revista Brasileira de Biología 58(3): 511-516.
- Bate Smith, E. C. (1968). Chemistry and taxonomy of plants, Systematics association special, Vol. 2, in Chemotaxonomy and serotaxonomy, edited by Hawkes J.G pp. 193-199.
- Bell, E. A. (1972). Toxic amino acid in the Leguminosae, in J. B. Harborne (ed) Phytochemical Ecology, Academic Press, London. pp. 163-178.
- Bell, E. A. (1978). Non-protein amino acids in Leguminosae. In Advances in legume Systematics Vol. 2. Royal Botanical Gardens (Surrey): 489-499.
- Bell, E. A. (1980). The possible significance of secondary compounds in plants, in Secondary Plants Products, E.A. Bell and B. V. Charlwood (ed). Springer-Verlag, 11-21.
- Beltrán, E.; Larenas M. R. y Guerra F. (1946). La acción de la rotenona sobre la infección intestinal de protozoarios y helmintos en la rata. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales VII (1): 53-56.
- Benavente-García, O., Castillo J., Marín F. R., Otuño A. and Del Río, J. (1997). Uses and properties of *Citrus* flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45 (12): 4505-4513.



- Bentham, G. (1860). Synopsis of *Dalbergiae*, a tribu of Leguminosae. Journal of the Linnean Society Botany, 4:1–128.
- Beudot, C.; De Mélo, M. P.; Dauzonne, D.; Elias R.; Laget, M.; Guiraud, H.; Balansard, G. and Duménil, G. (1998). Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test. Mutation Research 417: 141-153.
- Birch, N., Crombie, L. and Crombie, M. W. (1985). Rotenoids of *Lonchocarpus salvadorensis*: their effectiveness in protecting seed against bruchid predation. Phytochemistry 12: 2881-2883.
- Crisci, J. V. y López Armengol, M. F. (1983). Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica, Secretaría General de la OEA, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.
- Delle Monache, F.; Goncalves de Lima, O.; De Mello J. F.; Delle Monache, G. and Marini-Bettolo, G. B. (1973). Chroman- and cromene-chalcone from cordoin and isocordoin. Gazzetta Chimica Italiana 103: 779-791.
- Delle Monache, F.; Marletti, F.; Marini-Bettolo, G. B.; De Mello, J. F. and Goncalves de Lima, O. (1977). Isolation and structure of longistilines A, B, C and D. New prenilated stilbenes from *Lonchocarpus violaceus*. Lloydia, 40 (2): 201-208.
- Delle Monache, F., Cuca Suárez, L. E. and Marini-Bettolo, G. B. (1978). Flavonoids from the seeds of six *Lonchocarpus* species. Phytochemistry 17: 1812-1813.
- De Mello, J. F.; Goncalves de Lima, O.; Fernandes de Albuquerque, M. M.; Marini-Bettolo, G. B.; Lyra F. de A.; Cancavanti da Silva E.; Coelho J. S. de B. and Lins de Oliveira, L. (1974). O- and C-prenilated chalcones with antibiotic and antineoplastic activity isolated from *Lonchocarpus neuroscapha*. Benth. Revista do Instituto de Antibióticos, Universidad Federal de Pernambuco 14(1-2): 39-50.
- De Vincenzo, R., Scambia, G., Panici P. B., Ranelletti, F. O., Bonanno, G., Ercoli, A., Delle Monache, F., Ferrari, F., Plantelli, M. and Mancosu, S. (1995). Effect of synthetic and naturally occurring chalcones on ovarian cancer cell growth; structure-activity relationships. Anti-Cancer Drug design A 10(6): 481-490.

- Dewick, P. M. (1982). Biosynthesis. of the 6a-hydroxypterocarpan. Phytoalexin pisatin. in *Pisum sativum*. Phytochemistry 21: 2235-2242 ..
- Dewick, P.M. (1988). Isoflavonoids. In: The Flavonoids. Advances in Research since 1980. J.B. Harbone (ed.) Chapman & Hall. London & New York, p. 125-210.
- Dieter, T. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: A review. Environmental Chemistry Letters. 4:147–157
- Dixon, R. A. (1999). Isoflavonoides: biochemistry, molecular biology, and biological functions in Comprehensive Natural Products Chemistry, Barton D., Nakanishi, K. and Cohn O. (eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Do Nascimento, M. C. and Mors, W. B. (1972). Chalcones of the root bark of *Derris sericea*. Phytochemistry 11: 3023-3028.
- Do Nascimento, M. C., De Vasconcelos Díaz, R. L. and Mors, B. W. (1976). Flavonoids of *Derris obtusa*: aurones and auronols, Phytochemistry 15: 1553-1558.
- East, A. J., Ollis, W. D. and Wheeler, R. E. (1969) Natural occurrence of 3-aryl-4-hydroxycoumarins. Part I. Phytochemical examination of *Derris robusta* (roxb.) Benth. Journal of the Chemical Society C, 365
- Erdtman, H. (1963). Some aspect of chemotaxonomy in Chemical Plant Taxonomy, T. Swain (ed.). Academic Press, London and New York, pp. 89-125.
- Estabrook, G. F. (1980). The compatibility of occurrence patterns of chemicals. In Plants. Systematics Association Special Volume No. 2, Chemotaxonomy and Serotaxonomy. Howkes J. G. (ed.). pp. 193-199.
- Evans, S. V.; Fellows, L. E. and Bell, E. A. (1985). Distribution and systematics significance of basic non-protein amino acids and amines in the Tephrosieae. Biochemical Systematic and Ecology 13(3): 271-302.
- Evans, S. V.; Shah, A. J.; Adlard, M. W. and Rico Arce, M. L. (1993). Non-protein amino acid in seed of neotropical species of *Acacia*. Phytochemistry 23(1): 123-126.
- Fang, N. and Casida, J. E. (1998). Anticancer action of cube insecticide: correlation for rotenoids constituents between inhibition of NADH: ubiquinone oxidoreductase and

- induced ornithine descarboxilase activities. Proceeding Natural Academic Science U.S.A 95(7): 3380-3384.
- Fang, N. and Casida, J. E. (1999). Cube resin insecticide: identification and biological activity of 29 rotenoids constituents, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47(5): 2130-2136.
- Fellows, L. E.; Polhill, R. M. and Bell, E. A. (1978). 3-[2-amino-2-imidazolin-4-yl] alanine, 2-[2-amino-2-imidazolin-4-yl] acetic-acid, 2-aminoimidazole and other guanidine derivatives in *Tephrosieae*. In: Harborne (ed) Biochemical Systematic and Ecology 6; 213-215
- Fellows, L. E.; Bell, E. A.; Lee, T. and Janzen, D. H. (1979). Tetrahydrolytyrine; a new aminoacid from seed of *Lonchocarpus costarricensis* Phytochemistry 18:1333-1335.
- Fellows, L. E. (1986). The biological activity of polyhydroxialcaloids from plants. Pesticid Science. 17: 602-606.
- Fotsis, T.; Pepper, M. S.; Aktas, E., Breit S.; Rasku, S.; Adlercreutz, H.; Wähälä K.; Montesano, R. and Schweigerer. (1997). Flavonoids, dietary-derived Inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. Cancer Research 57: 2916-2921.
- Fraenkel, G. S. (1959). The raison d'etre of secondary plant substance. Science 129: 1466-1470.
- Fukami, H., and Nakajima, M. (1971). Rotenone and rotenoids in naturally occurring insecticide. M. Jacobson y D. G. Crosby(eds.), Dekker, New York. Pp. 71-97.
- Garo, E. W.; Jean-Luc, H.; Kurt, H. W.; Antus, S. and Mavi, S. (1998). Prenylated flavanones from *Monotes engleri*. Online structure elucidation by LC/UV/NMR. Helvetica Chimica Acta 81(4): 754-763.
- Geesink, R. (1981). *Tephrosieae*. In R. M. Polhill and P. H. Raven (eds.), Advances in legume systematics, part 1, 245–260. Royal botanical gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK.

- Geesink, R. (1984). *Scala millettiarum*. A survey of the genera *Millettia* (Legum.-Pp.). With methodological considerations. Leiden Botanical Series 8: 1-131.
- Gilly, C. L. y Hernández X. E. (1945). Las especies de *Lonchocarpus* en México: lista preliminar. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, Tomo VI (1-2): pp. 107-118.
- Gomes, C. M. R.; Gottlieb, O. R.; Marini Bettolo, G. B.; Delle Monache, F. and Polhill R. M. (1981). Plant chemosystematics and phylogeny. Part XV. Systematic significance of flavonoids in *Derris* and *Lonchocarpus*. Biochemical Systematic and Ecology 9(2-3): 129-47.
- Gomes, C. M. R.; Gottlieb, O. R.; Gottlieb, R. C. and Salantino, A. (1981). Phytochemistry in perspective: chemosystematic of the Papilionoideae. In Advances in Legume Systematic. R. M. Polhill and P. M. Raven (eds.) pp. 465-488.
- Gómez Garibay, F., Reyes Chilpa, R., Quijano, L., Calderón Pardo, J., and Ríos Castillo T. (1990). Methoxy furan auronols with fungistatic activity from *Lonchocarpus castilloi*. Phytochemistry 29: 459-463.
- Gonçalves de Lima, O., De Mello J. F., D'Albuquerque, I. L., Delle Monache, F., Marini-Bettolo, G. B., and Sousa, M. (1977). Contribution to the knowledge of the maya ritual wine: Balche. Lloydia 40 (2): 195-200.
- Gottlieb, O. R. (1980) Micromolecular systematics: principles and practice. Pp. 329-352. In: F.A. Bisby, J.G. Vaughan & C.A. Wright (eds.) Chemosystematics: Principles and Practice. London, Academic Press.
- Gottlieb, O. R. (1980). Towards a scientific status for micromolecular systematics. Acta Amazonica 10(4): 845-862.
- Gottlieb, O. R. (1982). Micromolecular evolution, systematics and ecology. In Essay into a Novel Botanical Discipline, 170 ps, Berlin, Springer-Verlag 170 p.

- Gottlieb, O. R. and Kubitzki, K., (1983). Ecogeographical phytochemistry a novel approach to the study of plant evolution and dispersion. Naturwissenschaften 70: 119-126.
- Grant, W. F. and Zandstra, I. I. (1968). The biosystematic of the genus *Lotus* (Leguminosae). In Canada II. Numerical Chemotaxonomy. Canadian Journal Botany 46: 585-589.
- Grayer, R. J., Chase M. W., and Simmonds, M. S. J. (1999). A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der planzen". Biochemical Systematics and Ecology 27: 369-393.
- Harborne, J. B. (1968). The use of secondary chemical character. In The systematics of higher plants in chemotaxonomy and serotaxonomy, Hawkes (ed.), Academic Press, London.
- Harborne, J. B., Mabry, T. J., and Mabry, H. (1975): The flavonoids. Chapman & Hall, London.
- Harborne, JB (1980). Plant phenolics. In: Bell E. A., Charlwood B. V. (eds). Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 8. Secondary plant products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. Pp. 329-395
- Harborne, J. B. (1999). Recent advances in chemical ecology. Natural Products Report 16: 509-523.
- Harborne, J. B. (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. Biochemical Systematic and Ecology 27: 335-367.
- Harborne, J. B., Turner, B. L. (1984). Plant pigments. Plant Chemosystematics. Academic Press, London, pp. 128–179.
- Henning, W. (1968). Elementos de una sistemática filogenética. Eudeba. Editorial Universitaria de Buenos Aires, 353 pp.

- Hermann, F. J. (1949). Studies in *Lonchocarpus* and related genera, V: New species from Middle America and the *Lonchocarpus guatemalensis* complex. Journal of the Washington Academy of Sciences 39(9): 306-313.
- Higbee, G. C. (1949). *Lonchocarpus, Derris y Piretro*. Publicación agrícola, No 5. 159-160. Unión Panamericana, Departamento de asuntos económicos y sociales, Oficina de agricultura y conservación, Washington 6, D. C. 30 pp.
- Humphries, C. J. and Richardson P. H.(1980). Henning's methods and phytochemistry in systematics association. Special Vol. 16 Chemosystematic Principles and Practice. In: F. A. Braby, J. G. Varghan and C. A. Wright (eds.) Pp 353-378 Academic Press, London New York.
- Ingham, J. L. (1972). Phytoalexins and other natural products as factor in plant disease resistance. Bot. Rev. 38: 343-424.
- Ingham, J. L. (1981). Phytoalexins inductiton and its taxonomic significance, in the Leguminosae (Subfamily Papilionoideae). In R. M. Polhill and P. H. Raven (eds.), Advances in Llegume Systematics, pp. 599–626.
- Ingham, J. L.; Tahara, S. and Dzedzic, S. Z. (1988). Major flavanones from *Lonchocarpus guatemalensis*. Zeitschrift für Naturforschung. 43c: 818-822.
- Kardono, L. B. S.; Tsauri, S.; Padmawinata, K.; Pezzuto, J. M. and Kinghorn, A. D. (1990). Cytotoxic constituents of the seeds of *Pachyrrhizus erosus*. Planta Medica 56: 673-674.
- Khanna, R. N. and Seshadri, T. R. (1963). Pongaglabrone, a new component of the seeds of *Pongamia glabra*: its constitution and synthesis. Journal of Chemical Society 163: 219-225.
- Kuroyanagi, M.; Arakawa T.; Hirayama Y. and Hayashi T. (1999). Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*. Journal of Natural Products 62: 1595–1599.
- Larose, G.; Chênevert, R.; Moutoglis, P.; Gagné, S.; Piché, Y. and Vierheilig H. (2002). Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental

- stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus.  
Journal of Plant Physiology 159: 1329–1339
- Lavin, M. (1986). The occurrence of canavanine in seeds of the tribe Robineae.  
Biochemical Systematic and Ecology 14 (1): 71-72.
- Lavin, M.; Eshbaugh, E. H.; Mathews, S. and Sharrock, R. A. (1998). Monophyletic of the tribe *Millettieae* (Leguminosae) as revealed by phytochrome nucleotide sequence data. American Journal of Botany 85 (3): 412-433.
- Lea, P. J. and Fowden, L. (1972). Stereospecificity of glutamyl-tRNA synthetase isolated from higher plants. Phytochemistry 11: 2129-2138.
- Lira, D. A.; Mello, J. F.; Delle Monache, G. and Delle Monache, F. (1972) Flavonoids from *Derris mollis*. Gazzetta Chimica Italiana 109, 93.
- Magalhães, A. F.; Azevedo-Tozzi, A. M.; Noronha Sales, B. H. and Magalhães, E. G. (1996). Twenty-three flavanoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. Phytochemistry 42: 1459-1471.
- Magalhães, A. F.; Azevedo-Tozzi, A. M.; Magalhães, E. G.; Blanco, I. S. and Nogueira, M. A. (1997). Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species. Phytochemistry 46 (6): 1029-1033.
- Magalhães, A. F.; Ruiz A. L.; Azevedo-Tozzi, A. M. and Magalhães, E. G., (1999). Dihydroflavonols and flavanones from *Lonchocarpus atropurpureus* roots. Phytochemistry 52: 1681-1685.
- Magalhães, A. F.; Azevedo-Tozzi, A. M.; Magalhães, E. G.; Nogueira, M. A. and Queiroz, S. C. N. (2000). Flavanoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. Phytochemistry 55: 787-792.
- Magalhães, A. F.; Azevedo-Tozzi, A. M.; Magalhães, E. G.; Blanco I.S. and Soriano M. P. (2004) Flavanoids from *Lonchocarpus muehlbergianus*. Anais da Academia Brasileira de Ciências 76(4): 651-661.

- Mahmoud, E. N., and Waterman, P. G. (1985). Minimiflorin: a new 3'-hidroxiflavanone from *Lonchocarpus minimiflorus* Seed. Journal of Natural Products 48 (4): 648-650.
- Mahmoud, E. N., Hadi, N., and Waterman, P. G. (1986). Flemistrin B; a chalcone from the seed of *Lonchocarpus sericeus*. Journal of Natural Products. 46 (6): 1179-80.
- Marja-Leena, L.; Julkunen-Tiitto, R., and Rousi, M. (2000). Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. Journal of Chemical Ecology 26 (7): 1609-1622.
- Mathew, J. and Rao, S. (1983). Carpusin: a novel 2-hidroxy-2-benzylcoumaranone from *Pterocarpus marsupium*. Phytochemistry 22 (3): 794-795.
- Menichini, F.; Delle Moncahe, F. and Marini, B. G. B. (1982). Flavonoids and rotenoids from Tephosieae and related tribes of Leguminosae. Planta Medica 45 (4): 243-244.
- Meragelman, K. M.; McKee T. C. and Boyd M. R. (2000). Anti-HIV prenylated flavonoids from *Monotes africanus*. Journal of Natural Products 64(4): 546-548.
- Middleton, E., and Kandaswami, C. (1986). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. Pp 619-652, in J.B. Harborne (ed.). The Flavonoids: Advances in Research. Published in 1993 by Chapman and Hall, London.
- Miller, A. B.; Kelly, A.; Choi, N. W.; Matthews, V.; Morgan, R. W.; Munan, I.; Burch, J. D.; Feather, J.; Howe, G. R. and Jain, M. (1978). A study of diet and breast cancer. American Journal of Epidemiology 107(6): 499-509.
- Miranda, C. L.; Stevens, J. F.; Ivanov, V.; Mc Call M.; Frei, B.; Deinzer, M. L. and Buhler, D. (2000). Antioxidant and prooxidant action of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 386-3884.
- Mori, A.; Nishino, C.; Enoki, N. and Tawata, S. (1988). Cytotoxicity of plant flavonoids against HeLa cells. Phytochemistry 27: 1017-1020.



- Osbourn, A. E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. The Plant Cell 8, 1821-1831.
- Palomino, G. and Sousa, M. (2000). Variation of nuclear DNA content in the biflorus species of *Lonchocarpus* (Leguminosae). Annals of Botany 85: 69-76.
- Pittier, H. (1917). The middle american species of *Lonchocarpus*. Smithsonian Institute, United States National Herbarium. Washington.
- Reyes-Chilpa, R.; Gómez-Garibay, F.; Moreno Torres, G.; Jiménez-Estrada, M., and Quiroz-Vasquez, R. I. (1998). Flavonoids and isoflavonoids with antifungal properties from *Platymiscium yucatanum* heartwood. Holzforschung 52 (5): 459-462.
- Reyes-Chilpa, R.; Viveros-Rodríguez, N.; Gómez-Garibay, F. and Alavez-Solano, D. (1995). Antitermitic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heart wood extracts. Journal Chemical Ecology 21: 455.
- Roussis, V.; Ampofo, S. A. and Wiemer, D. F. (1987). Flavanones from *Lonchocarpus minimiflorus*. Phytochemistry 26(8):2371-2375.
- Salatino, A., and Gottlieb O. R. (1983). Chemogeographical evolution of quinolizidines in Papilionoideae. Plant Systematics and Evolution 143(3):167-174.
- Shi, Y. Q.; Fukai, T.; Sakayam, H.; Chang W. J.; Yang, P. Q.; Wang, F. P. and Nomura T. (2000). Cytotoxic flavonoids with isoprenoids groups from *Morus mongolica*, Journal of Natural Products 64 (2): 181-188.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks A.; McMahon, J.; Vistica D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney ,S. and Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer –drug screening. Journal of the National Cancer Institute 13 (82): 1107-1112.
- Smith, P. M. (1976). The chemotaxonomy of plants. 313 pp. Elsevier Publ. NewYork.
- Sokal, R. R. and Sneath, P. H. A. (1963). Principles of numerical taxonomy, Freeman San Francisco, Ca.

- Sousa, S., M. (1992). *Willardia*. Una nueva sección del género *Lonchocarpus* (Leguminosae). Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica 63: 147-154.
- Sousa, S., M. (2005a). Las especies del género *Lonchocarpus* sect. *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae: Millettieae) para Bolivia. Novon 15, (4): 590–598.
- Sousa, S., M. (2005b). Especies nuevas de *Lonchocarpus* (Millettiae: Leguminosae) para Costa Rica y Panamá; lectotipificación de la sect. *Densiflori* Benth. Revista Mexicana de Biodiversidad 76(2): 119-127.
- Sousa, S., M. (2009a). La Sect. *Punctati* del género *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae) para Mesoamérica, Novon 19: 239-255.
- Sousa, S., M. (2009b). La sect. *Obtusifolii* del género *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae) para Mesoamérica, Novon 19(4): 520-533.
- Sousa, S., M. (2009c). *Standleyi* nueva sección del género *Lonchocarpus* (Leguminosae) nuevas especies para mesoamérica y sudamérica, Acta Botánica Mexicana 86: 39-69.
- Sousa, S., M. (2010a). La sect. *Lonchocarpus* del género *Lonchocarpus* (Leguminosae: Papilionoideae, Millettiae:) nuevas especies y subespecies para México y Mesoamérica, Acta Botánica Mexicana, En prensa.
- Sousa, S., M. (2010b). Revisión del complejo de *Lonchocarpus cruentus* (Leguminosae: Papilionoideae, Millettiae:), con descripción de cinco especies nuevas, Brittonia, En prensa
- Sousa, S., M. and M. Peña de Sousa (1981). New world Lonchocarpaceae, Advance Legume Systematics, P. M. Polhill and P. H. Raven (Eds). Royal Botanical Garden, Kew 22-281 pp.
- Sousa, S., M. y Soto, J. C. (1987). Nuevas taxa de *Lonchocarpus* (Leguminosae) de las cuencas baja y media del río Balsas, México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica, 58: 69-85

- Stuessy, T. F. and Crawford D. J. (1983). Flavonoids and phylogenetic reconstruction. Plant Systematic and Evolution 143: 83-107
- Suffness, M. and Douros, J. (1982). Current Status of the NCI Plant and Animal Products Program. Journal of Natural Products 45 (1): 1-14.
- Taylor, R.; Corley, D. G.; Tempesta, M.; Fomum, Z.; Ayafor, F.; Wandji, J.; Cameroon, Y. and Ifeadike N. (1986). 2,3-dihydroauriculatin, a new prenylated isoflavanone from *Erythrina senegalensis*. Application of the selective INEPT technique. Journal of Natural Products 49 (4): 670-673.
- Vinson, J. A.; Jang, j.; Yang, J.; Dabbagh, Y.; Liang, X.; Serry, M.; Proch, J. and Cai, S. (1999). Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (7): 2502 -2504,
- Van-Zyl, J. J.; Rall, G. J. H. and Roux, D. G. (1979). The structure, absolute configuration, synthesis, and <sup>13</sup>N.M.R. spectra of prenylated pyranoflavonoids from *Mundulea sericea*. Journal of Chemical Research (M): 1301-1320.
- Wall, M. E.; Wani M. C.; Manikumar G.; Abraham P.; Taylor H.; Hughes T. J.; Warner J. and Mc Givney R. (1988). Plant antimutagenic agent, 2. flavonoids. Journal of Natural Products 51 (6): 1084-1091.
- Wang, H. J.; Provan, G. and Helliwell, K., (2000). Tea flavonoids their functions, utilisation and analysis, Trends in Food Sciences and Technology 11: 152-160.
- Wattenberg, L. W. (1985), Chemoprevention of cancer, Cancer Research 20: 32-54.
- Waterman, P. G. and Mahmoud, E. N. (1985). Flavonoids from the seeds of *Lonchocarpus costarricensis*. Phytochemistry 24(3): 571-4.
- Vargas-Álvarez, D.; Soto-Hernández, M.; González-Hernández, V. A.; Engleman, E. M.; Martínez-Garza, Á. (2005). Variación del contenido de flavonoides en hojas de guayaba en condiciones de estrés. Revista Chapingo. Serie horticultura, Vol. 11, Núm. 1, pp. 89-92 Universidad Autónoma Chapingo, México

- Waterman, P. G. and Mahmoud, E. N. (1987). Unusual flavonoids from *Lonchocarpus orotinus* seeds. Phytochemistry 26(4): 1189-1193.
- Weinstein, L. I.; Michael, G.; Hahn, M. G. and Albersheim, P. (1981). Host-Pathogen Interaction: XVIII. Isolation and biological activity of glycinol. A pterocarpan phytoalexin synthesized by soybeans. Plant Physiology 68 (2): 358-363
- Wiley, E. (1981). Phylogenetics. The theory and practice of phylogenetic systematics. John Wiley and Sons Inc. New York. 318-365.



## Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis*<sup>☆</sup>

Dagoberto Alavez-Solano<sup>a,c</sup>, Ricardo Reyes-Chilpa<sup>a,\*</sup>, Manuel Jiménez-Estrada<sup>a</sup>,  
Federico Gómez-Garibay<sup>a</sup>, Isabel Chavez-Uribe<sup>a</sup>, Mario Sousa-Sánchez<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D. F., Mexico

<sup>b</sup>Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D. F., Mexico

<sup>c</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D. F., Mexico

Received 31 March 2000; received in revised form 2 June 2000

### Abstract

The roots of the tropical tree *Lonchocarpus oaxacensis* afforded the 3-hydroxyflavanones jayacanol and mundulinol, as well as two flavanones, mundulin and minimiflorin. Flavonoids bearing 6,7-(dimethylpyran) and 8-( $\gamma\gamma$ -dimethyl allyl) substituents are characteristic for species grouped in the *Minimiflori* subsection. Therefore this subsection seems to be chemically and morphologically homogeneous. The antifungal activity of the four isolated compounds was tested against the wood rotting fungus *Postia placenta*, but only jayacanol was active. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Lonchocarpus oaxacensis*; Leguminosae; Papilionoideae; Flavanones; 3-Hydroxyflavanones; Jayacanol; Mundulinol; Mundulin; Minimiflorin; Roots; Antifungal activity; *Postia placenta*; Wood rotting fungi; Chemotaxonomy

### 1. Introduction

As part of a chemotaxonomical study and survey of biologically active compounds from *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae) species growing in Mexico (Gómez-Garibay et al., 1990; Reyes-Chilpa et al., 1995), we have now investigated the flavonoids present in the roots of *Lonchocarpus oaxacensis*, a small tree endemic to the State of Oaxaca, Mexico. To the best of our knowledge, this plant has not been studied previously from the phytochemical point of view. According to a revised taxonomic classification, *L. oaxacensis* belongs to subgenus *Lonchocarpus*, section *Lonchocarpus*, subsection *Minimiflori* (M. Sousa-Sánchez, in preparation). This subsection comprises 15 species, only four of which have been chemically studied. At the present time, it is known that the seeds of *L. minimiflorus* (Mahmoud and Waterman, 1985), and *L. orotinus* (= *L. parviflorus*) (Waterman and Mahmoud, 1987) contain prenylated flavanones and 3-hydroxyflavanones. These types of flavonoids have

also been obtained from the leaves of *L. minimiflorus* (Roussis et al., 1987), and the roots of *L. guatemalensis* (Ingham et al., 1988).

### 2. Results and discussion

The pooled petroleum ether and methylene chloride extracts from the roots of *L. oaxacensis* afforded, after column chromatography, a new 3-hydroxyflavanone, which was named jayacanol (**1**). Mundulinol (**2**), and two flavanones, mundulin (**3**) and minimiflorin (**4**) were also obtained. The molecular structure of **1** was established by spectroscopic methods, including HMQC, HMBC and NOESY NMR experiments.

Compound **1** was isolated as a yellow gum. The infrared spectrum displayed absorption bands for hydroxyl ( $3403\text{ cm}^{-1}$ ) and conjugated carbonyl ( $1628\text{ cm}^{-1}$ ) functional groups. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Table 1) showed an AB spin system located at  $\delta$  5.39 and  $\delta$  4.52 (both *d*,  $J=12\text{ Hz}$ , 1H) characteristic for H-2 and H-3, respectively, of a 3-hydroxyflavanone skeleton. A broad singlet ( $\text{D}_2\text{O}$ -exchangeable) at  $\delta$  4.65 was assigned to an hydroxyl on C-3. Signals for four coupled aromatic protons suggested that ring B was substituted by

<sup>☆</sup> Contribution 1723 from Instituto de Química, UNAM.

\* Corresponding author. Tel.: +52-616-2576; fax: +52-616-2217.

E-mail address: chilpa@servidor.unam.mx (R. Reyes-Chilpa).

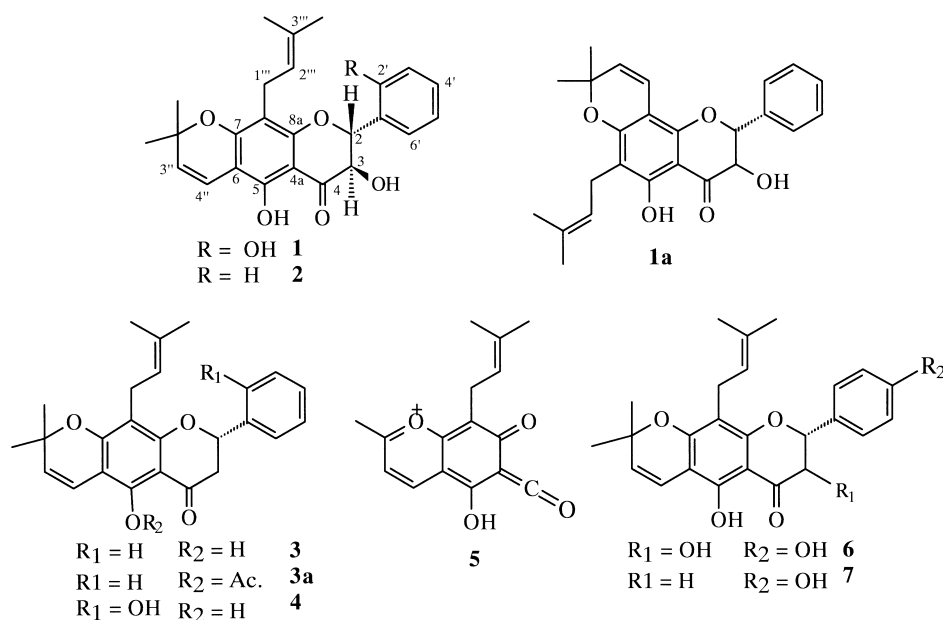


Table 1  
 $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) spectral data ( $\delta$ , ppm) of jayacanol (**1**)

Position	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
2	5.39 ( <i>d</i> , $J = 12.0$ Hz, 1H)	78.50
3	4.52 ( <i>d</i> , $J = 12.0$ Hz, 1H)	73.22
4	–	195.42
4a	–	100.29
5	–	160.99
6	–	103.45
7	–	156.13
8	–	109.56
8a	–	159.07
1'	–	124.19
2'	–	154.00
3'	6.97 ( <i>dd</i> , $J = 1.0$ and 8.0 Hz, 1H)	118.01
4'	7.27 ( <i>td</i> , $J = 1.5$ and 7.5 Hz, 1H)	129.93
5'	7.02 ( <i>td</i> , $J = 1.5$ and 7.5 Hz, 1H)	121.19
6'	7.56 ( <i>dd</i> , $J = 1.5$ and 7.5 Hz, 1H)	126.93
2''	–	78.64
3''	5.53 ( <i>d</i> , $J = 10$ Hz, 1H)	126.46
4''	6.63 ( <i>d</i> , $J = 10$ Hz, 1H)	115.33
1'''	3.19 ( <i>dd</i> , $J = 7.25$ and 14.4, 1H) and 3.25 ( <i>dd</i> , $J = 7.5$ and 14.5, 2H)	21.29
2'''	5.13 ( <i>tt</i> , $J = 1.2$ and 7.5 Hz, 1H)	122.12
3'''	–	131.60
CH <sub>3</sub> -3'''	1.60 and 1.65 ( <i>s</i> , 6H)	17.81 25.69
CH <sub>3</sub> -2''	1.45 ( <i>s</i> , Me, 6H)	28.38
OH-5	11.31 ( <i>s</i> , D <sub>2</sub> O ex, 1H)	
OH-3	4.65 ( <i>s</i> , D <sub>2</sub> O ex, 1H)	
OH-2'	~7.05 (obscure)	

one hydroxyl group ( $\delta$  7.05) located at C-2' as shown by analysis of the multiplicity and coupling constants of the aromatic protons (2 *dd* with  $J = \textit{ortho}, \textit{meta}$ -2H- and 2 *td* with  $J = \textit{ortho}, \textit{meta}$ -2H-). Since no further aromatic protons were evident, ring A should be fully sub-

stituted, presumably with a chelated hydroxyl on C-5 as indicated by a D<sub>2</sub>O-exchangeable singlet at  $\delta$  11.31, a dimethylpyran ring, and a  $\gamma\gamma$ -dimethyl allyl group. The presence of the ring substituent was deduced from the characteristic signals for two vinylic protons at  $\delta$  5.53 and 6.63 (both *d*,  $J = 10$  Hz, 1H), and two gem-methyls at  $\delta$  1.45 (*s*, 6H). The latter substituent could be deduced from signals for two benzylic methylene protons at  $\delta$  3.19 and 3.25 (each *dd*,  $J = 7.5$  and 14.5 Hz, 1H, H-1'''), one vinylic proton at  $\delta$  5.13 (*tt*,  $J = 1.2$  and 7.5 Hz, 1H, H-2''') and two methyls at  $\delta$  1.60 and 1.65 (each *s*, 3H). The observed multiplicity for H-1''' protons indicated they were not magnetically equivalent, probably due to hampered rotation of the prenyl substituent caused by H bonding between OH-2' and H-2'''. Therefore, irradiation of the vinylic proton signal caused a simplification of both H-1''' signals, each now appearing as a doublet with  $J = 14.4$  Hz (geminal coupling). The mass spectrum showed  $[\text{M}]^+ = m/z$  422, in agreement with the molecular formula C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>. A prominent diagnostic ion (**5**) was observed at  $m/z$  271, clearly indicating that ring A supported both the dimethylpyran ring and the  $\gamma\gamma$ -dimethyl allyl group (Ingham et al., 1988). The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum with the aid of DEPT analysis showed signals for 25 carbons, comprising four methyls, one methylene, nine methynes and 11 non-protonated carbons (Table 1). Signals at  $\delta$  73.22 (HC–OH) and 195.42 (C=O) were assigned to C-3 and C-4, respectively. The above data can fit either structure **1** or **1a**. In the former, the dimethylpyran ring is fused to C-6 and C-7 (linear arrangement), while in the latter, the attachment is to C-7 and C-8 (angular arrangement), which would place the  $\gamma\gamma$ -dimethyl allyl group at C-8 or C-6, respectively. Structure **1** was selected based on analysis of HMBC and NOESY data (Fig. 1). The HMBC spectrum clearly

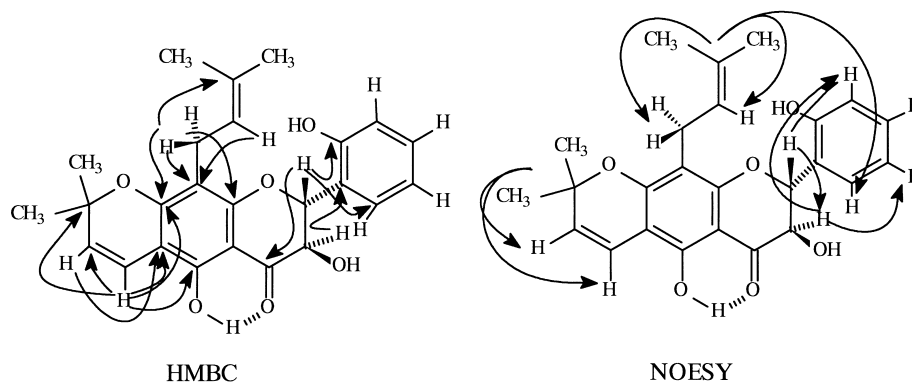


Fig. 1. HMBC and NOESY interactions in jayacanol 1.

showed dimethylpyran H-3'' and H-4'' long range coupling with C-6. In addition, H-4'' was coupled with C-7, C-5, and C-2'', while prenyl H-1''' was coupled with C-8, C-8a, C-2''' and C-3'''. The NOESY spectrum showed interaction of both isoprenyl methyls with H-6' of ring B (Fig. 1). The absolute configuration of jayacanol (**1**) was deduced mainly from analysis of the CD spectrum and comparison to published data for lupinifolinol (**6**) and lupinifolin (**7**) compounds of known stereochemistry (Ingham et al., 1988; Smalberger et al., 1974). Negative and positive Cotton effects were observed at 302 and 323 nm, respectively. In addition, the large  $J_{2,3}$  value (12 Hz) between H-2 and H-3 was indicative of equatorial substituents on C-2 and C-3. The above data suggested the absolute configuration of jayacanol to be 2*R*, 3*R*.

The known compounds mundulinol (**2**), mundulin (**3**) and minimiflorin (**4**) were also isolated. Their spectroscopic data (IR, UV, EIMS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) were very similar to those previously described; however some differences were observed on comparison of the optical rotation data with reported values. Compounds **2** and **3** have been previously isolated only from *Mundulea sericea* (Van Zyl et al., 1979), while **4** was obtained from *L. minimiflorus* (Mahmoud and Waterman, 1985; Roussis et al., 1987). Linear dimethylpyran arrangement previously proposed for compounds **2** and **4** was confirmed here by HMBC and NOESY evidence, as described for compound **1**. HMBC also allowed correct assignment of the chemical shifts for quaternary carbons C-6, C-7, C-8 and C-8a of compounds **2** and **4** (see Experimental). In addition, mundulin acetate (**3a**) was prepared, showing the expected downfield shift for H-4'' (-0.25 ppm), as well as the upfield shift for H-3'' (+0.13 ppm) as compared to the parent compound **3**. This behavior is characteristic of flavanones with linear dimethylpyran arrangement (Mahmoud and Waterman, 1985; Ingham et al., 1988).

Flavonoids **1–4** are closely related to those described previously for other species included in the *Minimiflori* subsection of *Lonchocarpus* genus. Thus *L. minimiflorus*

(Mahmoud and Waterman, 1985; Waterman and Mahmoud, 1987), *L. orotinus* (= *L. parviflorus*) (Roussis et al., 1987), and *L. guatemalensis* (Ingham et al., 1988), and now *L. oaxacensis* seem to be chemically and morphologically homogenous. All synthesize 6,8-prenylated flavanones and 3-hydroxyflavanones. Cyclization of 6-prenyl substituents is rather common, especially to yield a 6,7-dimethylpyran ring. In addition, the chalcone orotinalchalcone with the described substitution pattern has been reported for *L. orotinus* (Smalberger et al., 1974).

Jayacanol (**1**) treatment (0.25 mg/ml) caused 48% inhibition of the growth of wood rotting fungus *Postia placenta* mycelia. Mundulinol, mundulin and minimiflorin at the same concentration inhibited fungal growth less than 10% (Table 2).

### 3. Experimental

#### 3.1. Plant material

*L. oaxacensis* was collected near Jayacatlán, District of Etna, State of Oaxaca, Mexico. The specimen was identified by one of us (M. Sousa-Sánchez). A voucher specimen (No. 739,650) is deposited in the Mexican National Herbarium (MEXU).

#### 3.2. Extraction and isolation

The roots (939.2 g) were dried at room temperature and cut in small pieces. Extraction was carried out at room temperature with petroleum ether,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ethyl acetate, and methanol. The petroleum ether and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extracts were similar as judged by TLC and were pooled. The combined extracts (10.3 g) were subjected to column chromatography (silica gel 60, 330 g) eluted with petroleum ether and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and mixtures of these solvents. All compounds were obtained as oily substances and purified by TLC. Mundulin (**3**) was isolated from fractions 35–41 eluted with a petroleum ether:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  mixture (7:3), mundulinol (**2**) was isolated from

fractions 50–52 eluted with a petroleum ether:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mixture (1:1). Minimiflorin (**4**) and jayacanol (**1**) were isolated from fractions 118 and 130–140, respectively, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### 3.3. Jayacanol (**1**) (3,5,2'-trihydroxy-6,7-(2'',2''-dimethyl cromene)-8-(3''',3'''-dimethylallyl)-dihydroflavonol)

Yellow oil, purified by TLC (petroleum ether–ethyl acetate, 8:2), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = –147.5° (CHCl<sub>3</sub>; *c* 1.2); UV  $\lambda$ <sub>max</sub><sup>MeOH</sup> nm (log  $\epsilon$ ): 265 (3.44), 276 (4.5), 315 (4.02), 365 (3.44), 276 (4.5), and 203 (4.48). IR  $\nu$ <sub>max</sub><sup>CHCl<sub>3</sub></sup> cm<sup>-1</sup>: 3403 (OH), 2930.7 (C–H aliph.), 2857.8 (C–H aliph.), 1628 (C=O), 1465 (C–C aliph.), 1709 (C=O); HREIMS *m/z* 422.1742 for C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub> (calcd 422.1729); EIMS 70 eV, *m/z* (rel. int): 422 (100), [M]<sup>+</sup> (C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>), 407 [M–CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (89.7), 287 (27.5), 271 (30), 215 (41.4); <sup>1</sup>H NMR spectral data (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): see Table 1; <sup>13</sup>C NMR spectral data (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): see Table 1; CD (MeOH: *c* 0.0123): [ $\theta$ ]<sub>213</sub> –4.470, [ $\theta$ ]<sub>225</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>245</sub> +1.950, [ $\theta$ ]<sub>256</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>267</sub> –2.780, [ $\theta$ ]<sub>274</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>284</sub> +6.4, [ $\theta$ ]<sub>293</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>302</sub> –2.500, [ $\theta$ ]<sub>313</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>323</sub> +1.780, [ $\theta$ ]<sub>359</sub> +1.170, [ $\theta$ ]<sub>425</sub> 0.

### 3.4. Mundulinol (**2**) (3,5-dihydroxy-6,7-(2'',2''-dimethyl cromene)-8-(3''',3'''-dimethylallyl)-dihydroflavonol)

Yellow oil, purified by TLC (petrol ether–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:1); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +34.82° (CHCl<sub>3</sub>; *c* 1.78), reported [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +94.9° (CHCl<sub>3</sub>; *c* 0.01) (Van Zyl et al., 1979). <sup>13</sup>C NMR spectral data 125 MHz, (CDCl<sub>3</sub>/TMS): C-6 (103.17), C-7 (160.73) C-8 (109.30), C-8a (159.25), other data as reported (Van Zyl et al., 1979); CD (MeOH: *c* 0.0123): [ $\theta$ ]<sub>216</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>232</sub> +4.0, [ $\theta$ ]<sub>285</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>299</sub> –3.209, [ $\theta$ ]<sub>318</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>323</sub> +0.857, [ $\theta$ ]<sub>353</sub> +1.150, [ $\theta$ ]<sub>414</sub> 0.

### 3.5. Mundulin (**3**) (5,2'-dihydroxy-6,7-(2'',2''-dimethyl cromene)-8-(3''',3'''-dimethylallyl)-flavanone)

Yellow oil, purified by TLC (petrol ether–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2:1); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = –0.029° (CHCl<sub>3</sub>; *c* 2.92), reported [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = –221.0° (CHCl<sub>3</sub>; *c* 0.01) (Van Zyl et al., 1979); CD (MeOH: *c* 0.019): [ $\theta$ ]<sub>208</sub> –0.099, [ $\theta$ ]<sub>209</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>224</sub> +2.380, [ $\theta$ ]<sub>237</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>276</sub> –2.650, [ $\theta$ ]<sub>297</sub> –3.070, [ $\theta$ ]<sub>302</sub> 0, [ $\theta$ ]<sub>322</sub> +0.652, [ $\theta$ ]<sub>363</sub> +0.653, [ $\theta$ ]<sub>411</sub> 0.

#### 3.5.1. Mundulin acetate (**3a**)

Compound **3** was converted into **3a** (5,2'-diacetyl-6,7-(2'',2''-dimethylcromene)-8-(3''',3'''-dimethylallyl)-dihydroflavonol) in the usual way with anhydrous acetic acid in pyridine. Yellow oil, purified by pTLC (Silica gel 0.25 mm, petrol ether–ethyl acetate, 9:1); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = –0.0049° (CHCl<sub>3</sub>; *c* 2.45); EIMS 70 eV, *m/z* (rel. int): 432 (12.8) [M]<sup>+</sup> (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>), 390 [M–C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> = A<sup>+</sup> (50), 375 [A<sup>+</sup>–CH<sub>3</sub>] (100), 347 (6), 335 (4.2), 322 (6), 319 (7), 307 (17.8), 285 (3.5), 271 (8.5), 243 (6.4) 215 (15.7), 203 (9.2); <sup>1</sup>H NMR spectral data 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>/TMS):

Table 2

Inhibition of *Postia placenta* mycelial growth by *L. oaxacensis* flavonoids (0.25 mg/ml)

Compound	Growth (cm) <sup>a</sup>	% Inhibition
Control	4.97±0.23	0.0
<b>1</b>	2.89±0.09	41.85
<b>2</b>	4.58±0.12	7.84
<b>3</b>	4.70±0.41	5.43
<b>4</b>	4.49±0.08	9.65
Pentachlorophenol	0.00±0.00	100.0

<sup>a</sup> Mean of five replicates ± standard deviation.

5.43 (1H, *dd*, *J* = 3.0 and 13.0 Hz, H-2), 2.97 (1H, *dd*, *J* = 13.0 and 16.6 Hz, H-3 ax), 2.73 (1H, *dd*, *J* = 3.2 and 16.6 Hz, H-3 ec), 7.35–7.46 (Ar, *m*, 5H), 5.63 (1H, *d*, *J* = 10.4 Hz, H-3''), 6.38 (1H, *d*, *J* = 10.1 Hz, H-4''), 3.29 (2H, *d*, *J* = 7.4 Hz, H-1'''), 5.16 (1H, *tt*, *J* = 1.4, 7.4 Hz, H-2'''), 1.64 (3H, *d*, *J* = 1.0 Hz, CH<sub>3</sub>-Pr), 1.65 (3H, *d*, *J* = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-Pr), 1.44 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-DMP), 1.45 & 2.41 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-DMP).

### 3.6. Minimiflorin (**4**) (3,5-dihydroxy-6,7-(2'',2''-dimethyl cromene)-8-(3''',3'''-dimethylallyl)-flavanone)

Yellow oil, purified by TLC (petrol ether–ethyl acetate, 85:15); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = –27.62° (CHCl<sub>3</sub>; *c* 2.1), reported [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = –66.0° (CHCl<sub>3</sub>; *c* 1.00) (Van Zyl et al., 1979); <sup>13</sup>C NMR spectral data 125 MHz, (CDCl<sub>3</sub>/TMS): C-6 (103.16), C-7 (159.97), C-8 (108.85), C-8a (159.05), other data as reported (Mahmoud and Waterman, 1985).

### 3.7. Antifungal activity

Bioassays were carried out as described in Reyes-Chilpa et al. (1997). Each compound was dissolved in Me<sub>2</sub>CO. A portion (0.5 ml) of the tested solution was poured into a petri dish (60×15 mm) and immediately 6 ml of hot sterile growth medium (malt-agar 1.5%) was added. Control plates were treated with solvent only. The plates were left to stand overnight inside a sterile hood to remove residual solvent. Each plate was inoculated with a plug (6 mm  $\phi$ ) of *Postia placenta* mycelium taken from the edge of a 7 day culture. Five replicates per treatment were run simultaneously, incubating at 25° for 7 days. Inhibition was determined by measuring the diameter of the mycelial mat.

### Acknowledgements

Research was supported by DGAPA-UNAM, grant IN214996. This paper is based in part on the PhD. thesis (Facultad de Ciencias. UNAM) by Mr. Alavez who acknowledges CONACyT support. We are grateful to Wilber Matus, Hector Ríos, Rocío Patiño, Javier



Pérez and Luis Velasco for recording the NMR, IR, CD and EIM spectra.

## References

- Gómez-Garibay, F., Reyes-Chilpa, R., Quijano, L., Calderón-Pardo, J.S., Ríos-Castillo, T., 1990. Methoxy furan auronols with fungistatic activity from *Lonchocarpus castilloi*. *Phytochemistry* 29, 459–463.
- Ingham, J.L., Tahara, S., Dziedzic, S.Z., 1988. Major flavanones from *Lonchocarpus guatemalensis*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C: Biosciences* 43, 818–822.
- Mahmoud, E.N., Waterman, P.G., 1985. Minimiflorin: a new 3'-hydroxiflavanone from *Lonchocarpus minimiflorus* seed. *Journal of Natural Products* 48, 648–650.
- Reyes-Chilpa, R., Viveros-Rodríguez, N., Gómez-Garibay, F., Alavez-Solano, D., 1995. Antitermitic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. *Journal of Chemical Ecology* 21, 455–463.
- Reyes-Chilpa, R., Jiménez-Estrada, M., Estrada-Muñiz, E., 1997. Antifungal xantones from *Calophyllum brasiliensis* Heartwood. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1901–1911.
- Roussis, V., Ampofo, S.A., Wiemer, D.F., 1987. Flavanones from *Lonchocarpus minimiflorus*. *Phytochemistry* 26, 2371–2375.
- Smalberger, T.M., Vlegaar, R., Weber, J.C., 1974. Flavonoids from tephrosia-VII; the constitution and absolute configuration of lupinifolin and lupinifolinol, two flavanones from *Tephrosia lupinifolia* Burch (DC). *Tetrahedron* 30, 3927–3931.
- Van Zyl, J.J., Rall, G.J.H., Roux, D.G., 1979. The structure, absolute configuration, synthesis, and <sup>13</sup>CNMR spectra of prenylated pyranoflavonoids from *Mundulea sericea*. *Journal of Chemical Research (M)*, 1301–1320.
- Waterman, P.G., Mahmoud, E.N., 1987. Unusual flavonoids from *Lonchocarpus orotinus* seeds. *Phytochemistry* 26, 1189–1193.

## Natural products isolated from Mexican medicinal plants: Novel inhibitors of sulfotransferases, SULT1A1 and SULT2A1

S. Mesía-Vela<sup>1</sup>, R. I. Sánchez<sup>1</sup>, E. Estrada-Muñiz<sup>2</sup>, D. Alavez-Solano<sup>2</sup>, C. Torres-Sosa<sup>2</sup>, M. Jiménez- Estrada<sup>2</sup>, R. Reyes-Chilpa<sup>2</sup> and F. C. Kauffman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Cellular and Biochemical Toxicology, College of Pharmacy, Rutgers University, NJ, USA

<sup>2</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán, México, D.F

### Summary

*Calophyllum brasiliense*, *Lonchocarpus oaxacensis*, and *Lonchocarpus guatemalensis* are used in Latin American folk medicine. Four natural xanthenes, an acetylated derivative, and two coumarins were obtained from *C. brasiliense*. Two flavanones were extracted from *L. oaxacensis* and one chalcone from *L. guatemalensis*. These compounds were tested as substrates and inhibitors for two recombinant sulfotransferases (SULTs) involved in the metabolism of many endogenous compounds and foreign chemicals. Assays were performed using recombinant phenol-sulfotransferase (SULT1A1) and hydroxysteroidsulfotransferase (SULT2A1). Three of the five xanthenes, one of the flavonoids and the coumarins tested were substrates for SULT1A1. None of the xanthenes or the flavonoids were sulfonated by SULT2A1, whereas the coumarin mammea A/BA was a substrate for this enzyme. The natural xanthenes reversibly inhibited SULT1A1 with IC<sub>50</sub> values ranging from 1.6 to 7 µM whereas much higher amounts of these compounds were required to inhibit SULT2A1 (IC<sub>50</sub> values of 26–204 µM). The flavonoids inhibited SULT1A1 with IC<sub>50</sub> values ranging from 9.5 to 101 µM, which compared with amounts needed to inhibit SULT2A1 (IC<sub>50</sub> values of 11 to 101 µM). Both coumarins inhibited SULT1A1 with IC<sub>50</sub> values of 47 and 185 µM, and SULT2A1 with IC<sub>50</sub> values of 16 and 31 µM. The acetylated xanthone did not inhibit either SULT1A1 or SULT2A1 activity. Rotenone from a commercial source had potency comparable to that of the flavonoids isolated from *Lonchocarpus* for inhibiting both SULTs. The potency of this inhibition depends on the position and number of hydroxyls. The results indicate that SULT1A1, but not SULT2A1, is highly sensitive to inhibition by xanthenes. Conversely, SULT2A1 is 3–6 times more sensitive to coumarins than SULT1A1. The flavonoids are non-specific inhibitors of the two SULTs.

Collectively, the results suggest that these types of natural products have the potential for important pharmacological and toxicological interactions at the level of phase-II metabolism via sulfotransferases.

**Key words:** *Calophyllum*, *Lonchocarpus*, sulfotransferases, estradiol, xanthenes, coumarins, flavonoids

### Introduction

The genus *Calophyllum* (Guttiferae) is composed of about 180–200 species confined to the warm humid tropics of the world (Stevens, 1980). Plants of this genus are a rich source of xanthenes and coumarins. In Latin America, one of the most abundant and widely distributed species is *C. brasiliense* Cambess. This

plant has been used in the folk medicine to treat a variety of maladies including: bronchitis, gastric and hepatic disturbances (Sartori et al., 1999), pain (Lewis, 1977), inflammation, diabetes, hypertension (Duke, 1994), diarrhea (Vasquez, 1990), herpes and rheumatism (Rutter, 1990). In addition, some native people from South America such as the Karaja of the Amazon basin drink the bark infusion to treat diarrhea (Vasquez,

1990), while the Palikur use the infusion of the plant mixed with *Coutarea hexandra* Schum. for diabetes and worms (Greenard et al., 1987). The infusion prepared from the stem bark of *C. brasiliense*, known in Brazil as *Guanadi*, is used popularly to treat rheumatism, varicose, hemorrhoids and chronic ulcers (Correa, 1978; Guarim-neto, 1987; Guimarez et al., 1993). In Eastern Polynesia, Fiji, Java and Tropical East Africa, *C. inophyllum* is used to treat tumors (Johnson, 1999). Some reported activities of *Calophyllum* crude extracts are gastroprotective (Sartori et al., 1999), larvicidal (Pushpalatha et al., 1999), molluscicidal (Ravelonjato et al., 1992), antibacterial (Potti and Kurup, 1970) and antimicrobial (Dharmaratne et al., 1999).

The genus *Lonchocarpus* (Leguminosae) consist of about 100 species distributed in tropical America, Africa, Madagascar and Australia. The *Lonchocarpus* spp. has a great diversity of flavonoids (Bisby et al., 1994) but is famous for its high concentration of rotenoid compounds. The rotenoids are known because they are primarily responsible for the toxicity of many *Lonchocarpus* plants to insects and fish (Fang and Casida, 1999; Bellamy and Pfister, 1992). Some *Lonchocarpus* spp. have been used extensively to treat tumors, gastric disturbances, backache, convulsions, eruptions, scurvy and wounds, and as diuretics, laxatives and parasiticides (Johnson, 1999). In Africa, *L. cyanescens* is used to treat cataracts, leprosy, sore, yaws and fever (Johnson, 1999).

The extensive use of ingredients from these plants to treat many human maladies has stimulated studies of the interaction of these plant natural products with enzymes involved in phase-I and phase-II metabolism of xenobiotics and endogenous substances. For example, several flavonoids are known to inhibit glucuronidation via UGT1A8 and UGT1A10 (Cheng et al., 1999). Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adduct formation in human HepG2 cells by altering expression of the cytochrome P450 (CYP) 1A1 (Kang et al., 1999) and the flavanones acacetin and diosmetin are potent inhibitors of ethoxyresorufin O-dealkylase activities catalyzed by CYP1A1 and CYP1B1 (Doostar et al., 2000). Green tea polyphenols are known inhibitors of nitric oxide synthase activity (Srivastava et al., 2000) and the glucuronidation of estrone and estradiol (Zhu et al., 1998). Apigenin, genistein and tangeretin significantly induce the activity of glutathione transferase, and decrease the activities of glutathione reductase, catalase and glutathione peroxidase (Breinholt et al., 1999). Quercetin, kaempferol, genistein and diadzein are potent inhibitors of several sulfotransferases (Walle et al., 1995; Mesía-Vela and Kauffman, 2000).

Sulfonation, which is mediated by cytosolic sulfotransferases, has a profound effect on the biological ac-

tivity of a vast number of xenobiotics and endogenous substances including neurotransmitters and steroids (Coughtrie et al., 1998). Moreover, this process is suggested to have a critical role in regulating the activity of steroid hormones *in vivo* (Kester et al., 2000; Song and Melner, 2000). Sulfotransferases (SULTs) are members of an expanding multigene family and there are at least 8 forms of these proteins in humans (Coughtrie et al., 1998). Historically the mammalian SULTs have been divided into two families, SULT1s and SULT2s, based on their substrate specificities, and more recently on their molecular structures. Two of the most important SULTs in mammalian liver are phenolsulfotransferase (SULT1A1) and hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2A1).

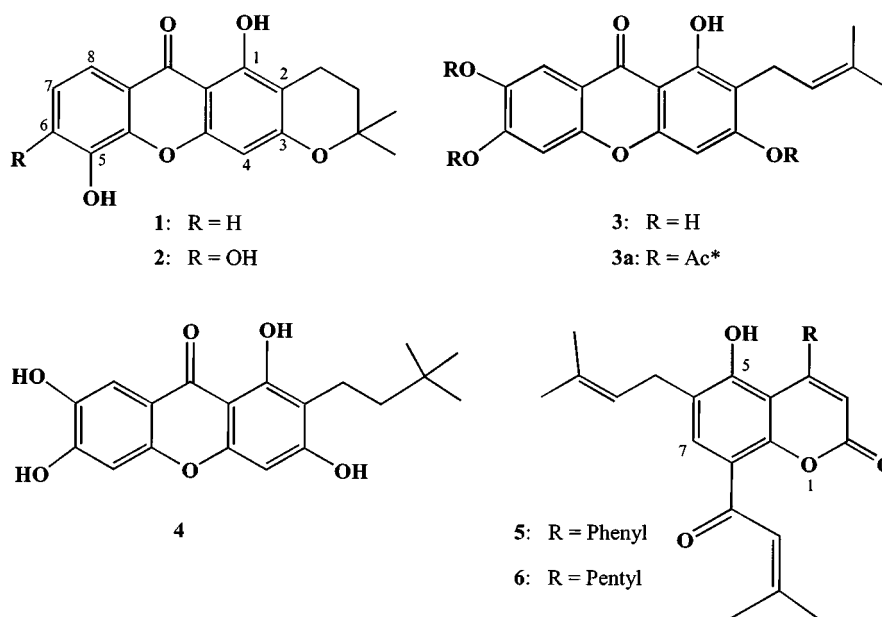
The aim of the present study was to expand understanding of the action of xanthenes and coumarins from *Calophyllum brasiliense* Cambess., as well as flavonoids from *Lonchocarpus oaxacensis* Pittier and *Lonchocarpus guatemalensis* Benth. on the sulfonation of two important endogenous steroids, estradiol (E<sub>2</sub>) and dehydroisoandrosterone (DHEA), which are substrates for SULT1A1 and SULT2A1, respectively. Studies were performed using recombinant enzymes cloned from rat liver and expressed in bacteria.

## ■ Materials and methods

### Experimental Procedures

• **Reagents:** Estradiol (E<sub>2</sub>), dehydroisoandrosterone (DHEA), rotenone and Tris base were obtained from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO). <sup>35</sup>S-PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) was from New England Nuclear (Boston, MA). PAPS (>99% pure) was purchased from H. Glatt and R. Landseidel, German Institute of Nutrition (Potsdam, Germany). The expression vector pET17b and *Escherichia coli* strain BL21(DE3)pLysS were from Novagen (Madison, WI). All other chemicals were of the highest grade from standard sources.

• **Natural products:** *Calophyllum brasiliense* Cambess. heartwood was obtained from a tree collected in the Lacandona Rain Forest, State of Chiapas, Mexico. Voucher and wood samples are deposited at the Herbarium of the Institute of Ecology A.C. (XAL) in Xalapa, Mexico. Chromatographic separation over Silica Gel 60 of the acetone and methanol extracts of the heartwood afforded the prenylated xanthenes: 6-desoxyjacareubin (**1**), jacareubin (**2**), 1,3,5,6-tetrahydroxy-2-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (**3**) and 1,3,5,6-tetrahydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthone (**4**) as described previously (Reyes-Chilpa et al., 1997 and 1999). Acetylation of xanthone **3** with acetic anhydride and pyridine yielded xanthone (**3ac**) (Fig. 1).

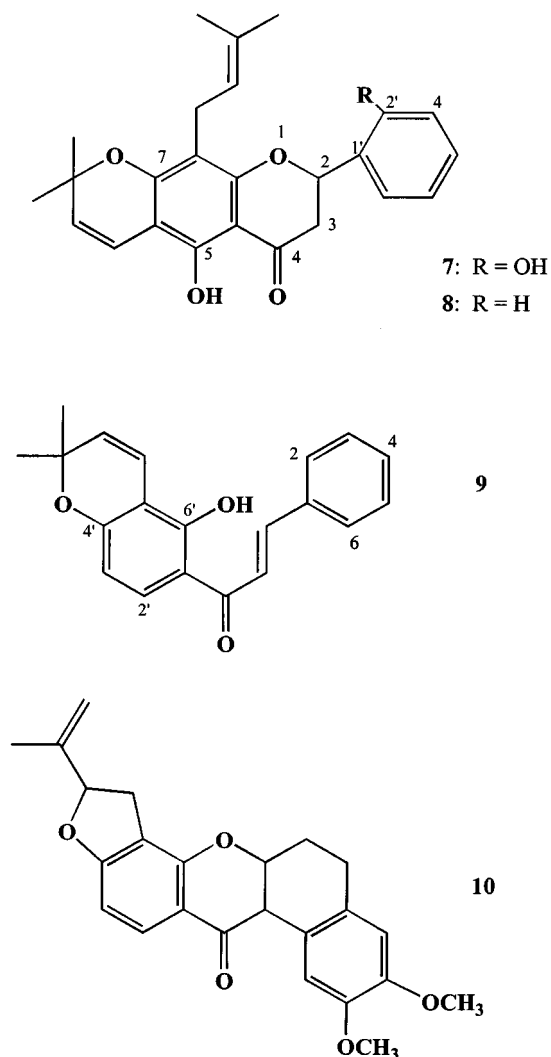


**Fig. 1.** Xanthenes (**1-4**) and coumarins (**5, 6**) isolated from *Calophyllum brasiliense*.

\*Obtained through acetylation of **3**.

*C. brasiliense* leaves were obtained from a tree collected at the Sierra de Santa Marta Rain Forest, Veracruz, Mexico. A voucher is deposited in the Herbarium of Universidad Veracruzana, in Xalapa, Mexico. The leaves were extracted using petroleum ether, and after column chromatography (Silica Gel 60) afforded the coumarins mammea A/BA (**5**) and mammea C/OA (**6**) (Fig. 1), which have been isolated previously from *Mammea americana* L. seeds (Crombie et al., 1972).

*Lonchocarpus oaxacensis* Pittier (Leguminosae) was collected near Jayacatlan, District of Etna, State of Oaxaca, Mexico. A voucher is deposited in the Mexican National Herbarium (MEXU). Column chromatography (Silica Gel 60) of the petroleum ether and  $\text{CHCl}_2$  roots extracts afforded the flavanones minimiflorin and mundulin (Fig. 2) as described previously (Alavez-Solano et al., 2000). *Lonchocarpus guatemalensis* Benth. (Leguminosae) was collected in "Los Tuxtlas" Biological Reserve, State of Veracruz, Mexico. A voucher specimen is deposited in the Mexican National Herbarium (MEXU). Column chromatography (Silica Gel 60) of the petroleum ether extract from the roots of this plant yielded the chalcone lonchocarpine (Fig. 2), which has been obtained previously from the seeds of *L. xuul* Lundell (Delle Monache et al., 1978). The compounds were identified using spectroscopic methods ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance, Mass Spectrometry, IR, and UV Spectroscopy) and compared with published data.



**Fig. 2.** Flavonoids isolated from *Lonchocarpus oaxacensis* (**7, 8**) and *L. guatemalensis* (**9**) and rotenone (**10**).

**Expression of Recombinant Enzymes**

A cDNA clone encoding rat liver SULT1A1 was isolated from a rat liver library prepared in  $\lambda$ ZAP (Stratagene) using PCR. The rat SULT1A1 cDNA was subcloned into pET17-b for expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A rat liver sulfotransferase cDNA (SULT2A1) was derived from a library prepared in  $\lambda$ GT11 (Glatt et al., 2000) and was subcloned into the bacterial expression vector pKK233-2 and transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Expression and preparation of *E. coli* cell-free extracts and purification of recombinant SULT enzymes were performed as described previously (Djani et al., 1999).

• **Sulfotransferase Assays:** Enzyme activities were determined using  $^{35}\text{S}$ -PAP formation according to a modification of the method described previously (Foldes and Meek, 1973). Recombinant sulfotransferases (9–18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were incubated with 25  $\mu\text{M}$   $\text{E}_2$  (substrate for SULT1A1) or 25  $\mu\text{M}$  DHEA (substrate for SULT2A1), 10  $\mu\text{M}$   $^{35}\text{S}$ -PAPS, 4 mM  $\text{MgCl}_2$  with or without the test compounds (0.1–300  $\mu\text{M}$ ) in a final volume of 150  $\mu\text{l}$  Tris.HCl buffer (pH 7.4) for 20 minutes at 37 °C. The reaction was stopped by adding 200  $\mu\text{l}$  of 0.1 M barium acetate. Protein, unreacted PAPS and free sulfate were precipitated by the sequential addition of 0.1 M barium hydroxide (200  $\mu\text{l}$ ) and 0.1 M

zinc sulfate (200  $\mu\text{l}$ ). Radioactivity was measured in 600  $\mu\text{l}$  of the supernatant, following centrifugation at 14000 rpm for 2 minutes. Control incubation (without substrates) were performed for each inhibitor concentration.

**Data Analysis**

Kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{\text{max}}$ ) were derived graphically (by computer linear regression analysis) from Lineweaver-Burk plots. The  $\text{IC}_{50}$  values were calculated fitting the data to the equation:

$$V_i/V_o = 1/(1 + [I]/\text{IC}_{50})$$

using the Kaleida Graph for Windows Program (Synergy Software-Pennsylvania).  $V_i$  = fractional activity,  $V_o$  = remaining activity. All experiments were performed in triplicate.

**Results****Effect of xanthenes on sulfotransferase activity**

Xanthenes **3ac**, **1**, and **2** were substrates for SULT1A1 with  $K_m$  values of 11, 92 and 70  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 1). None of the xanthenes were substrates for SULT2A1 (Table 2). All natural xanthenes (**1–4**)

**Table 1.** Kinetic Parameters for sulfonation of xanthenes, coumarins and flavonoids by SULT1A1, and their inhibition of estradiol sulfonation by this isoform.

Compound	SULT1A1		
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (nmol/mg/min)	$\text{IC}_{50}$ value ( $\mu\text{M}$ )
<b>Xanthenes</b>			
Desoxyjacareubin ( <b>1</b> )	92	13.4	$7.4 \pm 3.9$
Jacareubin ( <b>2</b> )	70	67	$3.5 \pm 0.9$
1,3,5,6-tetrahydroxy-2-(3,3-dimethylallyl)-xanthone ( <b>3</b> )	NA	NA	$2.9 \pm 0.8$
1,3,5,6-tetra-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthone ( <b>4</b> )	NA	NA	$1.6 \pm 0.4$
1-hydroxy-3,5,6-tri-O-acetyl-2(3,3-dimethylallyl)-xanthone ( <b>3ac</b> )	11.4	0.6	NA
<b>Coumarins</b>			
Mammea A/BA ( <b>5</b> )	31.4	3.2	$47.4 \pm 7.3$
Mammea C/OA ( <b>6</b> )	92	26	$185.5 \pm 13.8$
<b>Flavonoids</b>			
Mundulin ( <b>8</b> )	NA	NA	$29.7 \pm 3.8$
Minimiflorin ( <b>7</b> )	4.3	1.4	$60.8 \pm 21.8$
Lonchocarpine ( <b>9</b> )	NA	NA	$100.5 \pm 46.5$
Rotenone ( <b>10</b> )	NA	NA	$9.65 \pm 2.2$
<b>Standard compounds</b>			
Estradiol	11	7.5	–
PNP	0.28	6757.5	–

Values are averages of triplicate samples incubated with bacterial cytosols containing SULT1A1 as described in Methods. Estradiol was 25  $\mu\text{M}$  for  $\text{IC}_{50}$  values determinations. Kinetic parameters and  $\text{IC}_{50}$  values (averages  $\pm$  s.d.) were obtained using rates determined with at least 6 concentrations of compound test ranging between 0.1 and 300  $\mu\text{M}$ . NA – No activity.

**Table 2 .** Kinetic Parameters for sulfonation of xanthenes, coumarins and flavonoids by SULT2A1, and their inhibition of DHEA sulfonation by this isoform.

Compound	SULT2A1		
	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax (nmol/mg/min)	IC <sub>50</sub> value for DHEA ( $\mu\text{M}$ )
<b>Xanthenes</b>			
Desoxyjacareubin ( <b>1</b> )	NA	NA	204.4 $\pm$ 62.1
Jacareubin ( <b>2</b> )	NA	NA	94.2 $\pm$ 7.9
1,3,5,6-tetrahydroxy-2-(3,3-dimethylallyl)-xanthone ( <b>3</b> )	NA	NA	8.5 $\pm$ 1.6
1,3,5,6-tetra-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthone ( <b>4</b> )	NA	NA	26.4 $\pm$ 2.5
1-hydroxy-3,5,6-tri-O-acetyl-2(3,3-dimethylallyl)-xanthone ( <b>3ac</b> )	NA	NA	NA
<b>Coumarins</b>			
Mammea A/BA ( <b>5</b> )	NA	NA	15.7 $\pm$ 2.4
Mammea C/OA ( <b>6</b> )	3.7	4.5	30.5 $\pm$ 5.7
<b>Flavonoids</b>			
Mundulin ( <b>8</b> )	NA	NA	101.4 $\pm$ 16.1
Minimiflorin ( <b>7</b> )	NA	NA	16.9 $\pm$ 2.3
Lonchocarpine ( <b>9</b> )	NA	NA	64.2 $\pm$ 7.7
Rotenone ( <b>10</b> )	NA	NA	11.3 $\pm$ 0.87
<b>Standard compounds</b>			
DHEA	12	4.9	–

Values are averages of triplicate samples incubated with bacterial cytosols containing SULT2A1 as described in *Methods*. DHEA was 25  $\mu\text{M}$  for IC<sub>50</sub> values determinations. Kinetic parameters and IC<sub>50</sub> values (averages  $\pm$  s.d.) were obtained using rates determined with at least 6 concentrations of compound test ranging between 0.1 and 300  $\mu\text{M}$ . NA – No activity.

also reversibly inhibited E<sub>2</sub> sulfonation by SULT1A1 with IC<sub>50</sub> values of 7.4; 3.6; 2.9 and 1.6  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 1). The acetylated xanthone **3ac** was not a substrate for SULT2A1 and did not alter the sulfonation of E<sub>2</sub> or DHEA by SULT1A1 and SULT2A1 (Table 1 and 2). These xanthenes also inhibited DHEA sulfonation by SULT2A1 with IC<sub>50</sub> values of 204, 94, 8.5 and 26  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 2).

#### Effect of coumarins on sulfotransferase activity

Both coumarins, mammea A/BA (**5**) and mammea C/OA (**6**), were substrates for SULT1A1 with Km values of 31 and 92  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 1). These compounds also inhibited E<sub>2</sub> sulfonation by SULT1A1 with IC<sub>50</sub> values of 47 and 186  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 1). Mammea C/OA was a substrate for SULT2A1 with a Km of 3.7  $\mu\text{M}$  (Table 2). The IC<sub>50</sub> values for inhibition of DHEA sulfonation by SULT2A1 were 16 and 31  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 2).

#### Effect of flavonoids on sulfotransferase activity

Minimiflorin (**7**) was the only flavonoid sulfonated by SULT1A1 with a Km of 4.3  $\mu\text{M}$  (Table 1), however, minimiflorin (**7**), mundulin (**8**), lonchocarpine (**9**), and rotenone (**10**) all inhibited E<sub>2</sub> sulfonation by SULT1A1 with IC<sub>50</sub> values of 61, 30, 101 and 9.7  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 1). None of the flavonoids were sulfonated by

SULT2A1 over the concentrations tested (Table 2). The four flavonoids tested minimiflorin, mundulin, lonchocarpine and rotenone, inhibited DHEA sulfonation by SULT2A1 with IC<sub>50</sub> values comparable to those noted for inhibition of estradiol: 17, 101, 64 and 11  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 2).

## Discussion

The importance of studying the metabolism of natural compounds via the sulfonation pathway is emphasized by findings suggesting that several constituents of *Calophyllum* genus are prime candidates for new therapies. Xanthenes and flavonoids from this species have anti-tumor and anti-malarial activities, and pyranocoumarins structurally related to those studied above may be useful as anti-HIV agents (Dharmaratne et al., 1999; Ito et al., 1999; Fuller et al., 1994; Liou et al., 1993). In many instances, isolation of these bioactive compounds has provided pharmacological leads for the development of new synthetic derivatives. For example, the pyranocoumarins calanolide A and B (Ishikawa et al., 1979; Palmer et al., 1995; Zembower et al., 1997) have been established recently as non-nucleoside specific inhibitors of Human immunodeficiency-reverse transcriptase (HIV-RT).

Results presented above show that compounds isolated from *C. brasiliense* are substrates and potent inhibitors of phenolsulfotransferase (SULT1A1) and hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2A1). Cytosolic sulfotransferases are important enzymes involved in phase-II metabolism of a variety of xenobiotics and important endogenous compounds including steroids, thyroid hormones and catecholamines (Coughtrie et al., 1998; Kester et al., 2000). They transfer a sulfonyl moiety from the cofactor 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate to hydroxyl, amino, sulfhydryl and N-oxide groups of their substrates (Glatt et al., 2000). Because sulfonated compounds are, for the most part, poorly reactive, more polar and more water-soluble than parent molecules, they are easily excreted in urine or bile. Although sulfonation is generally considered a detoxification process (Coughtrie et al., 1998), it is now also recognized as the terminal enzymatic step in the bioactivation of procarcinogens, promutagens and drugs (Kauffman et al., 1994). Furthermore, their activity can be recovered through the hydrolytic activity of the arylsulfatases. Thus, sulfonation has important implications for many biological processes including reproduction, development and cancer. Findings reported above indicate that potent and specific inhibition of the sulfonation of endogenous hormones, estradiol and DHEA, by SULT1A1 and SULT2A1 can be achieved with natural products isolated from Mexican medicinal plants used to treat various human diseases. It is therefore important to consider potential interaction of these products with endocrine events regulated by these and related steroids.

*p*-Nitrophenol (PNP) is one of the best and most studied substrates for SULT1A1 with a  $K_m$  of 0.28  $\mu\text{M}$  and a  $V_{max}$  of 6757.5 nmol/mg protein/min for the recombinant enzyme used in the present study. Estradiol is also a good substrate for SULT1A1 with a  $K_m$  of 11  $\mu\text{M}$  and a  $V_{max}$  of 7.5 nmol/mg/min. DHEA is a prototypic substrate for SULT2A1 and has a  $K_m$  of 12  $\mu\text{M}$  and a  $V_{max}$  of 4.9 nmol/mg/min.

Pentachlorophenol (PCP) is one of the most potent inhibitors of SULT1A1 known, with a  $K_i$  of 44 nM (unpublished data). SULT2A1 is also inhibited by this compound but at much higher concentrations ( $K_i = 35 \mu\text{M}$ ). To our knowledge, there exists no published work indicating inhibition of SULT2A1 below concentrations of the compounds reported above.

Xanthenes **3ac**, **1** and **2** were substrates for SULT1A1, suggesting that the hydroxyl at C-1 position is most likely sulfonated by SULT1A1. Compound **3a**, with just one hydroxyl available at C-1 position (Fig. 1) is sulfonated, albeit slowly, by SULT 1A1. All natural xanthenes reversibly inhibited SULT1A1 with  $IC_{50}$  values ranging from 1.6 to 7  $\mu\text{M}$ . The potency of this inhibition was: xanthone **4** > xanthone **3** > xanthone **2** >

xanthone **1**. No inhibitory activity was observed with xanthone **3ac**. These results suggest that the potency of the inhibitory activity depends on steric hindrance by the substituent at C-2 and by the number of hydroxyls in the molecule (Fig. 1). In accord with this conclusion, it was found that xanthone **4**, which was the most potent inhibitor of SULT1A1, had a bulky substituent in the C-2 position. It is noteworthy that xanthone **4** is also the xanthone with the most hydroxyl groups. The bulky substituent at C-2 is not a fixed one like that found in xanthone **2**, which has a dimethyl-pyran ring in that position (Fig. 1). These findings are in line with the observations that xanthone **2** is twice as potent as xanthone **1**, xanthone **4** is twice as potent as xanthone **3** and acetylation of three hydroxyls in this compound abolishes its inhibitory activity. In contrast, SULT2A1 was inhibited only by relatively high concentrations of the xanthenes ( $IC_{50}$  values between 26 and 204  $\mu\text{M}$ ). Furthermore, none of the xanthenes were substrates for this enzyme. These findings suggest strongly that SULT1A1, but not SULT2A1, is highly sensitive to inhibition by xanthenes.

Minimiflorin (**7**) was the only flavonoid substrate for SULT1A1. Mundulin (**8**) bears a similar structure but is hydroxylated on C-2' (Fig. 2) and differed substantially in inhibiting the activity on SULT1A1 ( $IC_{50}$  values of 6.5 and 101  $\mu\text{M}$ ). From the structure of minimiflorin, we suggest that the hydroxyl on position C-2' is the probable location for sulfonation (Fig. 2). This is based on the finding that only minimiflorin (**7**) was a substrate for the SULT1A1 enzyme. The higher potency for SULT1A1 of this compound is likely explained by the presence of two phenols. Thus, the hydroxyl substituents appear to be very important for the activity of flavonoids on SULT1A1 and SULT2A1. Lonchocarpine (**9**) was the weakest flavonoid inhibitor. This can be explained by the difficult accessibility to the hydroxyl in the position C-6' (Fig. 3).

Interestingly, none of the flavonoids were substrates for SULT2A1. Moreover, the flavonoids inhibited the SULT2A1 with  $IC_{50}$  values of 11 and 101  $\mu\text{M}$ . Rotenone (**10**) was equipotent in inhibiting SULT1A1 and SULT2A1. It is interesting to note that rotenone which is a molecule without hydroxyls in its structure, is a potent inhibitor of SULTs. Thus, some natural products without hydroxyls also inhibit SULTs.

Both coumarins were substrates for SULT1A1 and mammea C/OA (**6**) was a substrate for SULT2A1. The coumarins inhibited SULT1A1 with  $IC_{50}$  values of 47 and 185  $\mu\text{M}$ . In contrast, SULT2A1 was inhibited by lower concentrations of coumarins with  $IC_{50}$  values of 16 and 31  $\mu\text{M}$ .

It is concluded that SULT1A1, but not SULT2A1, is highly sensitive to inhibition by xanthenes (**1-4**). The potency of this inhibition depends on the position and

number of hydroxyls. Conversely, SULT2A1 is 3–6 times more sensitive to coumarins (**5**, **6**) as compared to SULT1A1. The flavonoids (**7**, **8**) are mixed inhibitors: some of them are twice as potent inhibitors for SULT1A1 than for SULT2A1, and for others this relation is the opposite. Rotenone (**10**) is a potent non-specific inhibitor of both estradiol and DHEA sulfonation by SULT1A1 and SULT2A1. These results indicate a diversity of interactions between natural products and the sulfonation of endogenous hormones at the level of SULTs that need to be taken into account when these, and related natural products, are used as therapeutic agents.

#### Acknowledgments

This work was supported, in part, by NIEHS grant No. ES05022.

#### References

- Alavez-Solano, D., Reyes-Chilpa, R., Jimenez-Estrada, M., Gomez-Garibay F, Chavez-Uribe I, Sousa-Sanchez M.: Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis*. *Phytochemistry* 55: 953–957, 2000.
- Bellamy, D., Pfister, A. World Medicine.: Plants, Patients and people. Blackwell Publishers Ed. Oxford, UK. 1992.
- Bisby, F.A., Buckingham, J., Harborne, J.B.: Phytochemical dictionary of Leguminosae. Chapman & Hill Publ. London. 1994.
- Breinholt, V., Lauridsen, S.T., Dragsted, L.O.: Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica* 29: 1227–1240, 1999.
- Cheng, Z., Radominska-Pandya, A., Tephly, T.R.: Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-Glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metabol. Disp.* 27: 1165–1170, 1999.
- Correa, M.P.: Dicionario das Plantas Uteis do Brasil e das exoticas cultivadas. Imprensa Nacional Ed. Rio de Janeiro, Brazil. 1978.
- Coughtrie, M.W.H., Djani, R., Kauffman, F.C., Rubin GL, Sharp S.: Sulfotransferases and the biology of sulfation. In: Gooderham NJ. edit. Drug Metabolism: Toward the Next Millenium. Amsterdam: IOS Press. 89–100, 1998.
- Crombie, L., Games, D.E., Haskins, N.J., Reed, G.F.: Extractives of *Mammea americana* LV. The insecticidal compounds. *J. Chem. Soc. PerkinTransactions 1 (18)*: 2255–2260, 1972.
- Delle Monache, F., Cuca Suarez, L.E., Marini-Bettolo, G.B.: Flavonoids from the seeds of six *Lonchocarpus* species. *Phytochemistry* 17: 1812–1813, 1978.
- Dharmaratne, H.R., Wijesinghe, W.M., Thevanasem, V.: Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resitant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Ethnopharmacol.* 66: 339–342, 1999.
- Djani, R., Sharp, S., Graham, S., Bethell, S.S., Cooke, R.M., Jamieson, D.J., Coughtrie, M.W.: Kinetic properties of human dopamine sulfotransferase (SULT1A3) expressed in prokaryotic and eukaryotic systems: comparison with the recombinant enzyme purified from *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 16: 11–18, 1999.
- Doostar, H., Burke, M.D., Mayer, R.T.: Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A1 and CYP1B1. *Toxicology* 144: 31–38, 2000.
- Duke, J.A.: Amazonian Ethnobotanical Dictionary. CRC Press Ed. 1994.
- Fang, N.B. and Casida, J.E.: Cube resin insecticide: Identification and biological activity of 29 rotenoid constituents. *J. Agr. Food Chem.* 47: 2130–2136, 1999.
- Foldes, A. and Meek, J.L.: Rat brain phenolsulfotransferases-partial purification and some properties. *Biochem. Biophys Acta* 327: 365–374, 1973.
- Fuller, R.W., Bokesch, H.R., Gustafson, K.R., McKee, T.C., Cardellina, J.H., McMahan, J.B., Cragg, G.M., Soejarto, D.D., Boyd, M.R.: HIV-inhibitory coumarins from latex of the tropical rain forest tree *Calophyllum teysmannii* var. inophylloide. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letter* 4: 1961–1964, 1994.
- Glatt, H., Engelke, C.E., Pabel, U., Teuber, W., Jones, A.L., Cougtrie, M.W., Andrae, U., Falany, C.N., Meinel, W.: Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* 112–113: 341–348, 2000.
- Greenard, P., Moretti, C., Jacquemen, H. Pharmacopées Traditionnels en Guyane: Creoles, Palikur, Wayapi. Editorial 1-ORSTROM. Coll. Mem. No. 108: 569, 1987.
- Guarim-neto, G.: Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato Grosso. CNPq Assesoria. Brasilia, Brazil. 58, 1987.
- Guimarez, E.F., Mautone, L., Rizzini, C.T., Matos Filho, A.: Arvores do Jardim Botanico do Rio de Janeiro. Jardim Botanico Rio de Janeiro Ed. Rio de Janeiro, Brazil, 99–100, 1993.
- Ishikawa, T., Oku, Y., Kotake, K.: Diastereoselective preparation of a trans, trans 2,3- dimethylchroman-4-ol skeleton: A model synthetic approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum coumarins*. *Tetrahedron* 53: 14915–14928, 1997.
- Ito, C., Itoigawa, M., Miyamoto, Y., Rao, K.S., Takaysu, J., Okuda, Y., Mukainaka, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H.: A new bioflavonoid from *Calophyllum paniciflorum* with antitumor-promoting activity. *J. Nat. Prod.* 62: 1668–1678, 1999.
- Johnson, T.: CRC Ethnobotany Desk Reference. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida. 140–141, 1999.
- Kang, Z.C., Tsai, S.J., Lee, H.: Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P450 1A1 gene expression. *Nutr. Cancer* 35: 175–179, 1999.
- Kauffman, F.C., Zalenski, J., Thurman, R.G., Kwei, G.Y.: Biologically active conjugates of Drugs and Toxic Chemicals. In: Conjugation -deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity. Kauffman F.C., Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1994.
- Kester, M.H., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinel, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M.W., Bergman, A., Safe, S.H., Kuiper, G.C., Schuur, A.G., Brouwer, A., Visser, T.J.: Potential inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology* 141: 1897–1900, 2000.



- Lewis, W.H.: Medical Botany. Plants affecting man's health. Wilbey Interscience Publication. 348–350, 1977.
- Liou, S.S., Shieh, W.L., Cheng, T.H., Won, S.J., Lin, C.N.: Gamma-pyrone compounds as potential anti-cancer drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 791–794, 1993.
- Mesía-Vela, S.M. and Kauffman, F.C.: Inhibition of recombinant sulfotransferases by dietary flavonoids. *FASEB J.* 14: A1446, 2000.
- Palmer, C.J., Josephs, J.L.: Synthesis of the *Calophyllum coumarins* 2. *J. Chem. Society Perkin Transactions 1*, 24: 3135–3152, 1995.
- Potti, G.R., Kurup, P.A.: Antibacterial principle of the root bark of *Calophyllum inophyllum*: isolation and antibacterial activity. *Indian J. Exp. Biol.* 8: 39–40, 1970.
- Pushpalatha, E., Muthukrishnan, J.: Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes. *J. Applied Entomology* 123: 369–373, 1999.
- Ravelonjato, B., Libot, F., Ramiandrasoa, F., Kunesch, N., Gayral, P., Poisson, J.: Molluscicidal constituents of *Calophyllum* from Madagascar: activity of some natural and synthetic neoflavonoids and khellactones. *Planta Med.* 58: 51–55, 1992.
- Reyes-Chilpa, R., Jimenez-Estrada, M., Estrada-Muniz, E.: Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. *J. Chem. Ecol.* 23: 1901–1911, 1997.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muniz, E., Roma, B., Torres-Sosa, C., Jimenez, M., Bejar, E.: 1,3,5,6-Tetra-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthone, from *Calophyllum brasiliensis* heartwood and Antimicrobial Assays. *International Conference on Ethnomedicine and Drug Discovery*. Silver Spring, MD, USA. Abstract P-41, 1999.
- Rutter, R.A.: Catalogo de las Plantas Utiles de la Amazonia Peruana. Linguistico de Verano. Yarinacocha, Iquitos, Peru. 1990.
- Sartori, N.T., Canepelle, D., de SP, Jr., Martins, D.T.: Gastro-protective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* 67: 149–156, 1999.
- Song, W.C., Melner, M.H.: Steroid transformation enzymes as critical regulators of steroid action in vivo. *Endocrinology* 141: 1587–1589, 2000.
- Srivastava, R.C., Hussain, M.M., Hasan, S.K., Athar, M.: Green tea polyphenols and tannin acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced oxido nitric generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.* 153: 1–5, 2000.
- Stevens, P.F.: A revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). *J. Arnold Arboretum* 61: 117–699, 1980.
- Vasquez, M.R.: Useful plants of Amazonian Peru. Spanish Typescript. Filled with USDA's National Agricultural Library Ed. 1990.
- Walle, T., Eaton, E.A., Walle, U.K.: Quercetin, a potent specific inhibitor of human P-form phenolsulfotransferase. *Biochem. Pharmacol.* 50: 731–734, 1995.
- Weinshillboun, R.M., Otterness, D.M., Aksoy, I.A., Wood, T.C., Her, C., Raftoginis, B.B.: -Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J* 11: 3–14, 1997.
- Zembower, D.E., Liao, S., Flavin, M.T., Xu, Z.Q., Stup, T.L., Buckheit, R.W. jr, Khilevich, A., Mar, A.A., Sheinkman, A.K.: Structural analogues of the cananolide as anti-HIV agents. Modification of the trans-10, 11-dimethyldihydropyran-12-ol ring (ring C). *J. Med. Chem.* 40: 1005–1017, 1997.
- Zhu, B.T., Taneja, N., Loder, D.P., Balentine, D.A., Conney, A.H.: Effects of tea polyphenols and flavonoids on liver microsomal glucuronidation of estradiol and estrone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 64: 207–215, 1998.

## ■ Address

S. Mesía Vela, Ph.D., Laboratory for Cellular and Biochemical Toxicology, 41 Gordon Rd., Piscataway, NJ. 08854 USA  
 Tel.: ++1-732-445 6900; Fax: ++1-732-445 6905  
 e-mail: smvela@eohsi.rutgers.edu

# Inhibition of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants

Ricardo Reyes-Chilpa<sup>a</sup>, Cristiane Hatsuko Baggio<sup>b</sup>, Dagoberto Alavez-Solano<sup>a</sup>,  
Elizabeth Estrada-Muñiz<sup>a</sup>, Frederick C. Kauffman<sup>c</sup>, Rosa I. Sanchez<sup>c</sup>,  
Sonia Mesia-Vela<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. Mexico, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná-UFPR. Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, Jardim das Americas, Caixa Postal 19031, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory for Cellular and Biochemical Toxicology, College of Pharmacy, Rutgers University, NJ, USA

Received 27 March 2005; received in revised form 30 September 2005; accepted 13 October 2005

Available online 28 November 2005

## Abstract

Medicinal plants are commonly used in Latin American folk medicine for the treatment of gastric problems. In order to understand the properties of some of their chemical constituents, four natural xanthenes, an acetylated derivative, two coumarins (mammea A/BA and mammea C/OA) isolated from *Calophyllum brasiliense* Cambess and two flavonoids (minimiflorin and mundulin) isolated from *Lonchocarpus oaxacensis* Pittier, and the chalcone lonchocarpin isolated from *Lonchocarpus guatemalensis* Benth were tested for their activities on gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isolated from dog stomach. All the compounds tested inhibited H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity with varied potency. The xanthenes inhibited the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase with IC<sub>50</sub> values ranging from 47 μM to 1.6 mM. Coumarins inhibited H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase with IC<sub>50</sub> values of 110 and 638 μM. IC<sub>50</sub> values for the flavonoids ranged from 9.6 to 510 μM among which minimiflorin was the most potent. The results suggest that H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is sensitive to inhibition by several types of structurally different natural compounds. The potency of the effects on gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase depends on the presence, position and number of hydroxyl groups in the molecule. Collectively, these results suggest a potential for important pharmacological and toxicological interactions by these types of natural products at the level of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase which may explain, at least in part, the gastroprotective properties, indicated by traditional medicine, of the plants from which these compounds were isolated.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Gastric ATPase; Coumarins; Xanthenes; *Calophyllum*; H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition; *Lonchocarpus*; Jayacanol; Mundulinol; Mundulin; Minimiflorin; Gastroprotection

## 1. Introduction

The use of medicinal plants to treat gastrointestinal disturbances is extensive in Latin America. For instance, Mexican medicinal flora have been estimated to be of the order of 3000 species and nearly 1000 species are used against gastrointestinal maladies (Argueta-Villamar et al., 1994). Since plant natural products derived from ingested medicinal plants can interact with the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, which is the last step involved in gastric acid secretion (Sachs et al., 1976), we decided to investigate the effects of phenolic compounds (flavonoids, xanthenes

and coumarins) isolated from Mexican medicinal plants on this enzyme in vitro. Gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is a membrane-bound enzyme located in the apical membrane of parietal cells which pumps protons into the gastric lumen using energy derived from the hydrolysis of ATP (Sachs et al., 1976). Inhibition of this enzyme results in the inhibition of acid secretion. Thus, H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase constitutes the best pharmacological target for the development of drugs to treat acid-related disturbances.

*Calophyllum brasiliense* Cambess is a tropical tree distributed from Brazil to Mexico. It has been widely used in Latin American folk medicine to treat a variety of maladies including pain (Lewis, 1977), inflammation, diabetes, hypertension (Duke, 1994; Greenard et al., 1987), diarrhea (Vasquez, 1990), herpes and rheumatism (Rutter, 1990); however their main use has been to treat gastric and hepatic disturbances (Correa, 1978;

\* Corresponding author. Tel.: +1 212 305 9821; fax: +1 212 305 9349.  
E-mail address: [sm2418@columbia.edu](mailto:sm2418@columbia.edu) (S. Mesia-Vela).

Guarim-Neto, 1987). Despite their extensive use, few biological activities or chemical compositions are reported in the scientific literature. Dichloromethane extracts of *Calophyllum brasiliense* bark protected rats from experimentally induced gastric lesions (Sartori et al., 1999). The bark of this species has been shown to contain xanthenes with cancer chemopreventive properties (Ito et al., 2002). Also, potent analgesic effects were shown (da Silva et al., 2001) by the crude extracts from the leaves of this plant which contain phenolic compounds, such as hyperin (hyperoside), amentoflavone, quercetin, gallic acid and protocatechuic in polar extracts (Guimaraez et al., 1993) and coumarins in less polar extracts (Mesia-Vela et al., 2001). In addition, potent inhibition of sulfotransferase 1A1 activity was shown for the xanthenes and coumarins were also tested here (Mesia-Vela et al., 2001). Chemical analysis has also revealed the presence of prenylated xanthenes in the bark (Sartori et al., 1999) and wood (Reyes Chilpa et al., 1997).

The *Lonchocarpus* genus, which consists of about 135 species distributed in tropical America (Palomino and Sousa, 2000), has a great diversity of flavonoids (Bisby et al., 1994) but is famous for its high concentration of rotenoid compounds. The rotenoids are known because they are primarily responsible for the toxicity of many *Lonchocarpus* plants to insects and fish (Fang and Casida, 1999; Bellamy and Pfister, 1992). We included in this study the compounds isolated from *Lonchocarpus oaxacensis* and *Lonchocarpus guatemalensis* because they are part of a chemotaxonomical study and survey of biologically active compounds from the *Lonchocarpus* species growing in Mexico (Gomez-Garibay et al., 1990; Reyes-Chilpa et al., 1995) and also a number of *Lonchocarpus* spp. has been used as stomachic, to treat tumors, backache, convulsions, eruptions, scurvy and wounds, and as diuretics, laxatives and parasiticides (Johnson, 1999).

The extensive use of these plants in Mexican traditional medicine for gastric-related problems has stimulated the studies of the interaction of these plant natural products with H,K-ATPase, the final step of gastric acid secretion, an important component of gastroprotection and actually considered as one of the best pharmacological targets for the development of drugs to treat gastric disturbances.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Adenosine-5-triphosphate (ATP), saccharose, albumin, ascorbic acid, ammonium molybdate, Tris base and protease inhibitor cocktail P8340 (containing AEBSF 104 mM, aprotinin 0.08 mM, leupeptin 2 mM, bestatin 4 mM, pepstatin A 1.5 mM and E-64 1.4 mM) were obtained from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO). All other chemicals were of the highest grade from standard sources.

### 2.2. Natural products

*Calophyllum brasiliense* Cambess (Guttiferae) heartwood was obtained from a tree collected in the Lacandona Rain For-

est, State of Chiapas, Mexico. Voucher and wood samples are deposited at the Herbarium of the Institute of Ecology A.C. (XAL) in Xalapa, Mexico (Register no., IMSSM 14439). Chromatographic separation in Silica gel 60 of the acetone and methanol extracts of the heartwood, afforded the prenylated xanthenes: 6-desoxyjacareubin (1), jacareubin (2), 1,3,5,6-tetrahydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthone (3) and 1-hydroxy-3,5,6-tri-*O*-acetyl-2(3,3-dimethyl-allyl)-xanthone (4) as previously described (Reyes-Chilpa et al., 1997, 1999) (Table 1). *Calophyllum brasiliense* leaves were obtained from a tree collected at the Sierra de Santa Marta Rain Forest, Veracruz, Mexico. A voucher is deposited in the Mexican National Herbarium (MEXU). The leaves were extracted with petroleum ether, and after column chromatography (Silica gel 60) afforded the coumarins: mamea A/BA and mamea C/OA (Table 1), which have been previously isolated from *Mammea Americana* *Lonchocarpus* seeds (Crombie et al., 1972).

*Lonchocarpus oaxacensis* Pittier (Leguminosae) was collected near Jayacatlán, District of Etlá, State of Oaxaca, Mexico. A voucher specimen no. 739,650 is deposited in the Mexican National Herbarium. Column chromatography (Silica gel 60) of the petroleum ether and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> from the roots afforded the flavanones minimiflorin and mundulin (Table 2) as previously described (Alavez-Solano et al., 2000). *Lonchocarpus guatemalensis* Benth. (Leguminosae) was collected in “Los Tuxtlas” Biological Reserve, State of Veracruz, Mexico. A voucher of the species no. 902,187 is deposited in the Mexican National Herbarium. Column chromatography (Silica gel 60) of the petroleum ether extract from the roots of this plant yielded the chalcone lonchocarpine (Table 2), which has been previously obtained from the seeds of *Lonchocarpus xuul* Lundell (Delle Monache et al., 1978). The compounds were identified by spectroscopic methods (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, mass spectrometry, IR, and UV spectroscopy) and compared with published data.

## 3. Experimental

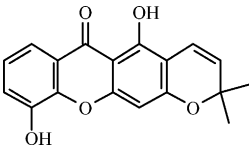
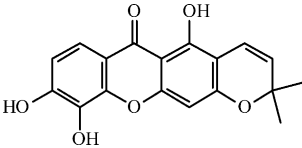
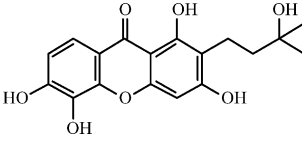
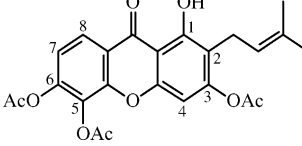
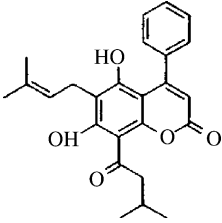
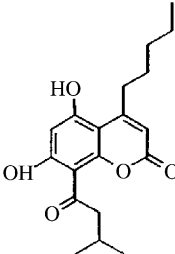
### 3.1. Animal

A female dog (*Canis familiaris*) (7 kg) was obtained from the municipal dog house of Curitiba, Parana, Brazil. The animal was kept at the Animal Facilities of Universidade Federal do Parana under standard laboratory conditions with free access to water and food. All experimental protocols using the dog were performed according to the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH Publication 85-23, revised 1985) considered by the Institutional Ethics Committee of the Universidade Federal do Paraná (number approval 0.66) and by the Brazilian federal laws. The dog was killed a week after arrival using a pentobarbital overdose (75 mg/kg, i.v.) by a certified veterinarian of the Department of Pharmacology of UFPR.

### 3.2. Preparation of dog gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

The stomach was cleaned and processed essentially as described by Kubo et al. (1995) to obtain gastric ATPase.

Table 1  
Inhibition of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by xanthenes and coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* Cambess

Compound type	Origin	Structure	H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity IC <sub>50</sub> (μM)
Xanthenes			
6-Desoxyjacareubin (1)	<i>Calophyllum brasiliense</i> heartwood		1581 ± 37
Jacareubin (2)	<i>Calophyllum brasiliense</i> heartwood		46.7 ± 7.6
1,3,5,6-Tetra-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthone (3)	<i>Calophyllum brasiliense</i> heartwood		173 ± 8.6
1-Hydroxy-3,5,6-tri-O-acetyl-2(3,3-dimethylallyl)- xanthone (4)	<i>Calophyllum brasiliense</i> heartwood		1605 ± 216
Coumarins			
Mammea A/BA	<i>Calophyllum brasiliense</i> leaves		109.5 ± 7.7
Mammea C/OA	<i>Calophyllum brasiliense</i> leaves		638 ± 149

IC<sub>50</sub> values are average ± S.D. based on rates determined using at least six different concentrations of test compounds ranging between 0.01 and 2 mM. ATP was 1 mM.

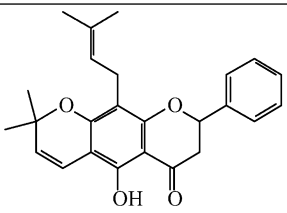
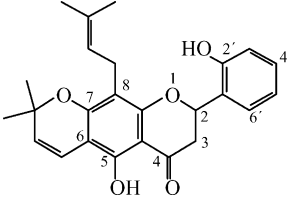
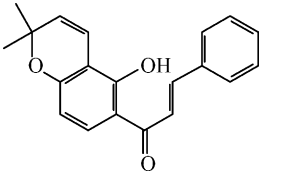
Mucosal tissue scrapings from the corpus region were suspended in 10 volumes of homogenizing buffer (containing 250 mM sucrose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA and 2 mM Hepes, pH 7.4 with 0.1% protease inhibitor cocktail) and homogenized with 20 up/down strokes of a motor-driven Teflon pestle (1500 rpm) and centrifuged at 20,000 × g for 20 min. The supernatant was centrifuged at 100,000 × g for 60 min. The resulting pellet was suspended and further separated by discontinuous density gradient centrifugation. The pellet sample was then layered on top of a 30% sucrose cushion, and spun at 100,000 × g for 2 h. Mem-

brane sediment above the 30% sucrose interface was used as the gastric vesicular fraction containing gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. All procedures were performed at 4 °C. The material was frozen and stored at −80 °C after protein measurement.

### 3.3. Protein concentration

Protein was determined in a 96-well format with the BCA™ protein assay kit (PIERCE, Rockford, IL) according to supplier's instructions using bovine serum albumin as a standard.

Table 2  
Inhibition of dog gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by flavonoids isolated from *Lonchocarpus oaxacensis* Pittier and *Lonchocarpus guatemalensis* Benth

Flavonoids	Origin	Structure	H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity IC <sub>50</sub> (μM)
Mundulin	<i>Lonchocarpus oaxacensis</i> roots		70 ± 10
Minimiflorin	<i>Lonchocarpus oaxacensis</i> roots		9.6 ± 0.9
Lonchocarpine	<i>Lonchocarpus guatemalensis</i> roots		171 ± 35

IC<sub>50</sub> values are average ± S.D. based on rates determined using at least six different concentrations of test compounds ranging between 0.01 and 2 mM. ATP was 1 mM.

### 3.4. H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity assay

ATPase activity was determined colorimetrically by measuring the release of inorganic phosphate (Pi) from ATP (1 mM) as described previously (Fiske and Subbarow, 1925). The reactions were started by addition of the enzyme and stopped with 50 μl of ice-cold trichloroacetic acid after 20 min incubation at 37 °C. Reaction mixtures contained 300 μg of gastric vesicular protein, 1 mM ATP, 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) in the absence or presence of the different test compounds. Experiments were performed in triplicate using at least six different concentrations of test compound ranging from 0.1 μM to 2 mM. Omeprazole (acidified to pH 5, 0.1–1 mM) was used as a positive control of the test.

### 3.5. Data analysis

The IC<sub>50</sub> values were calculated by fitting the data to the equation:  $V_i/V_0 = 1/(1 + [I]/IC_{50})$  using the Kaleida Graph for Windows Program (Synergy Software, PA).  $V_i$  = fractional activity,  $V_0$  = total or control activity. All experiments were performed in triplicate with at least six concentrations each.

## 4. Results

All the compound tested inhibited the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isolated from the stomach of dog with variable potency. The effect of the compounds determined as the concentration needed to inhibit 50% (IC<sub>50</sub>) of the activity of the enzyme is presented in Table 1 for xanthenes and coumarins isolated from *Calo-*

*phyllum brasiliense* and Table 2 for the flavonoids isolated from *Lonchocarpus*. The most potent compounds for inhibition of the ATPase were the flavonoid minimiflorin followed by xanthone jacaurebin. Omeprazole, positive control of the test, reduced the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity with IC<sub>50</sub> = 410 μM.

## 5. Discussion

The activity of the compounds isolated from *Calophyllum brasiliense*, *Lonchocarpus guatemalensis* and *Lonchocarpus oaxacensis* was tested on H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isolated from dog stomach. All the isolated compounds inhibited gastric ATPase activity with variable potency. Xanthenes isolated from the heartwood of *Calophyllum brasiliense* showed a range of potency (IC<sub>50</sub>) from 47 μM to 1.6 mM. The potency of this inhibition was xanthone 2 > xanthone 3 > xanthone 1 > xanthone 4 (Table 1). Steric hindrance by the substituents at C-6 and C-3 appears to influence the potency of inhibition of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of these compounds. The presence of a hydroxy group at C-6 seems to play a role of prime importance in the activity of xanthenes on gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. In accord with this conclusion, it was found that the absence of hydroxyl groups at C-6 in xanthone 1 reduced the potency of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition by 34-fold. In addition, acetylation of hydroxyl groups at this position (xanthone 4) also reduced the activity of the enzyme by similar amount. Also, the presence of a bulky substituent at C-3 significantly reduced (by 3.7-fold) the potency of inhibition of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by xanthone 3 (Table 1). Moreover, the activity of xanthenes indicates that this type of compounds may be the active principles responsi-



ble for the gastroprotective activity previously determined in rats (Sartori et al., 1999), and referred by the folk medicine for *Calophyllum brasiliense* bark (Correa, 1978; Guarim-Neto, 1987). Both coumarins inhibited gastric  $H^+,K^+$ -ATPase with moderate  $IC_{50}$  values (Table 1). Number of hydroxyls in the molecule also seems to be important for the activity of coumarins. No other coumarins are reported as inhibitors of gastric  $H^+,K^+$ -ATPase. The isolated flavonoids were more potent inhibitors of the  $H^+,K^+$ -ATPase activity (Table 2). The flavanone minimiflorin was the most potent inhibitor from the entire set of compounds tested. The flavanone mundulin was 7.3-fold less potent than minimiflorin (Table 2). Hydroxylation at C-2' accounts for this difference in potency. Thus, hydroxylation plays an important role in conferring inhibitory activity of the gastric  $H^+,K^+$ -ATPase to the flavanones isolated from *Lonchocarpus*. The chalcone lonchocarpin isolated from *Lonchocarpus guatemalensis* which has only one hydroxyl group in its molecule showed only moderate inhibition of  $H^+,K^+$ -ATPase activity (about 18-fold less potent than minimiflorin) (Table 2). A comparison of the relative potencies of these active compounds with omeprazole, a specific inhibitor of  $H^+,K^+$ -ATPase shows that many of these isolated compounds have higher inhibitory activity of  $H^+,K^+$ -ATPase than the reference compound from 2 to 44 times higher for the most potent inhibitor of  $H^+,K^+$ -ATPase tested here, mundulin (Table 2). Although some of the compounds did show about 4-fold less activity than omeprazole, it is suggested that all these compounds acting in conjunction may confer a potent inhibitory activity when the appropriate part of these plants are used. Similarly, the activity on ATPase observed for our isolated compounds was between the ranges of other structurally similar compounds isolated from medicinal plants with use on gastrointestinal disturbances. Murakami et al. have investigated the activity of many flavonoids including quercetin (2.3  $\mu$ M), ellagic acid (2.1  $\mu$ M), epigallocatechin ( $IC_{50}$  = 0.7  $\mu$ M), epicatechin ( $IC_{50}$  1.1  $\mu$ M) and cassigarol A ( $IC_{50}$  1.2  $\mu$ M), which are some of the most potent inhibitors found (Murakami et al., 1992, 1999). They have attributed the inhibitory potency of the flavonoids on the  $H^+,K^+$ -ATPase, to the presence and position of hydroxyl groups in the molecules (Murakami et al., 1992, 1999). Our findings are in line with their conclusions and indicate that the effect of number and position of hydroxyl groups on potency holds true for xanthenes and coumarins as well. The studies reported here do not follow the mechanisms involved in the inhibition of ATPase. Murakami's work also established that flavonoids act on the ATPase by competing with ATP binding (Murakami et al., 1992, 1999). It can also be expected that these compounds interact in the same way with other homologous ATPases such as  $Na^+,K^+$ -ATPase.  $H^+,K^+$ -ATPase and  $Na^+,K^+$ -ATPase are the most homologous members of the ATPase family; they are both heterodimeric complexes composed of  $\sim$ 100 kDa  $\alpha$  and  $\sim$ 55 kDa  $\beta$  subunits (Gottardi and Caplan, 1993). Both ion pumps share similar catalytic cycles which appear to be largely the responsibility of the  $\alpha$  subunits which share about 65% amino acid identity (Gottardi and Caplan, 1993). Future studies exploring whether this mechanism will hold true for the natural products described here are warranted. Indeed, studies in vitro/in vivo are needed to assess

if these compounds are able to enter in the cell and to further characterize their interaction with the gastric ATPase.

In conclusion, these results indicate inhibition of the gastric  $H^+,K^+$ -ATPase by several compounds isolated from *Calophyllum brasiliense* and *Lonchocarpus* plants and suggest a rational molecular target for their mode of action on gastric acid secretion.

### Acknowledgments

This work was supported, in part, by NIEHS-US grant no. ES05022 and CNPq-Brazil no. 305462/02–4. We also thank Dr. Masahiko, Professor of UFPR for his invaluable help with the animal preparation.

### References

- Alavez-Solano, S., Reyes-Chilpa, R., Jiménez-Estrada, M., Gomez-Garibay, F., Chavez-Uribe, I., Souza-Sanchez, M., 2000. Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis*. *Phytochemistry* 55, 953–957.
- Argueta-Villamar, A., Cano-Asseleh, L.M., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista (INI). Vols. I–III. Instituto Nacional Indigenista, Mexico, p. 1786.
- Bellamy, D., Pfister, A., 1992. World Medicine. Plants, Patients and People. Blackwell Publishers, Oxford U.K, p. 318.
- Bisby, F.A., Buckingham, J., Harborne, J.B., 1994. *Phytochemical Dictionary of Leguminosae*. Chapman & Hall Publications, London.
- Correa, M.P., 1978. Dicionário das Plantas Uteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Vol. III. Imprensa Nacional Rio de Janeiro, Brasil, p. 388.
- Crombie, L., Games, D.E., Haskins, N.J., Reed, G.F., 1972. Extractives of mammea Americana LV the insecticidal compounds. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions* 1, 2255–2260.
- da Silva, K.L., dos Santos, A.R., Mattos, P.E., Yunes, R.A., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V., 2001. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie* 56, 431–434.
- Delle Monache, F., Cuca Suarez, L.E., Marini-Bettolo, G.B., 1978. Flavonoids from the seeds of six *Lonchocarpus* species. *Phytochemistry* 17, 1812–1813.
- Duke, J.A., 1994. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. CRC Press.
- Fang, N., Casida, J.E., 1999. New bioactive flavonoids and stilbenes in cube resin insecticide. *Journal of Natural Products* 62, 205–210.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66, 375–400.
- Greenard, P., Moretti, C., Jacquemen, H., 1987. *Pharmacopees Traditionnels en Guyane: Creoles, Palikur, Wayapi*. Editorial I-ORSTROM Coll. Mem. no. 108, Paris, p. 569.
- Gottardi, C.J., Caplan, M.J., 1993. Molecular requirements for the cell-surface expression of multisubunit ion-transporting ATPases. Identification of protein domains that participate in  $Na,K$ -ATPase and  $H,K$ -ATPase subunit assembly. *Journal of Biological Chemistry* 268, 14342–14347.
- Guarim-Neto, G., 1987. *Plantas Utilizadas na medicina popular do Estado de Mato Grosso*. CNPq Assessoria Editorial, Brasilia, Brasil, p. 58.
- Guimaraez, E.F., Mautone, L., Rizzini, C.T., Mattos Filho, A., 1993. *Arvores do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Jardim Botânico Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brazil, pp. 99–100.
- Ito, C., Itoigawa, M., Mishina, Y., Filho, V.C., Mukainaka, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H., 2002. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. *Journal of Natural Products* 65, 267–272.
- Johnson, T., 1999. *CRC Ethnobotany Desk Reference*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, pp. 140–141.
- Kubo, K., Uehara, A., Kubota, T., Nozu, T., Moriya, M., Watanabe, Y., Shoji, E., Santos, S.B., Harada, K., Kohgo, Y., 1995. Effects of ranitidine

- on gastric vesicles containing H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 30, 944–951.
- Lewis, W.H., 1977. *Medical Botany. Plants Affecting Man's Health*. Wiley Interscience Publication, pp. 348–350.
- Mesia-Vela, S., Sanchez, R.I., Estrada-Muniz, E., Alavez-Solano, D., Torres-Sosa, C., Jimenez- Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Kauffman, F.C., 2001. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine* 8, 481–488.
- Murakami, S., Arai, I., Muramatsu, M., Otomo, S., Baba, K., Kido, T., Kozawa, M., 1992. Inhibition of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and acid secretion by cassigarol A, a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. *Biochemical Pharmacology* 44, 33–37.
- Murakami, S., Muramatsu, M., Tomisawa, K., 1999. Inhibition of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by flavonoids: a structure–activity study. *Journal of Enzyme Inhibition* 14, 151–166.
- Palomino, G., Sousa, M., 2000. Variation of nuclear DNA content in the biflorus species of *Lonchocarpus* (Leguminosae). *Annals of Botanica* 85, 69–76.
- Reyes Chilpa, R., Jiménez-Estrada, M., Estrada-Muñiz, E., 1997. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1901–1911.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Román, E., Torres-Sosa, C., Jiménez-Estrada, M., Béjar, E., 1999. 1,3,5,6-Tetra-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthone from *Calophyllum brasiliense* heartwood and antimicrobial assays. In: *International Conference on Ethnomedicine and Drug Discovery*. November 3–5. Silver Spring, Maryland, U.S.A.
- Rutter, R.A., 1990. *Catálogo de las Plantas Útiles de la Amazonia Peruana*. Lingüístico de verano, Yarinacocha, Iquitos, Perú, p. 349.
- Sachs, G., Chang, H.H., Rabon, E., Schackman, R., Lewin, M., Saccomani, G.A., 1976. Non-electrogenic H<sup>+</sup> pump in plasma membranes of hog stomach. *Journal of Biological Chemistry* 251, 7690–7698.
- Sartori, N.T., Canepelle, D., De Jr., S.P., Martin, D.T., 1999. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 149–156.
- Vasquez, M.R., 1990. *Useful plants of Amazonian Peru*. Spanish typescript. Filled with USDA's National Agricultural Library.