

00582  
2  
24!

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR Y  
EVALUACION FARMACOLOGICA PRELIMINAR DE LOS  
CONSTITUYENTES QUIMICOS PRESENTES EN LAS  
PLANTAS HIPOGLUCEMIANTES *Bidens pilosa* y  
*Eysenhardtia polystachya*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN  
CIENCIAS QUIMICAS (QUIMICA ORGANICA)

PRESENTA: M. C. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER

260957

ASESOR:

DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1998



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.

TESIS SIN

PAGINACION

## INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un trastorno del sistema endocrino que afecta aproximadamente al 10% de la población mundial.<sup>1</sup> Es un estado de hiperglucemia crónica, producido por numerosos factores ambientales y genéticos que generalmente actúan juntos. El principal regulador de la concentración de glucosa en la sangre es la insulina, hormona que sintetizan y secretan las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. La hiperglucemia y otros trastornos bioquímicos pueden deberse a la falta de producción de insulina o a factores de contrarregulación que se oponen a su acción. La diabetes mellitus comprende una serie de desordenes clínicos heterogéneos con síntomas comunes: sed excesiva, hambre, debilidad muscular y pérdida de peso, orinación excesiva, y elevación del nivel de glucosa en sangre, el cual si excede el umbral renal, resulta en la excreción de glucosa en la orina. Existen tres principales tipos de diabetes mellitus reconocidos por la Organización Mundial de la Salud:<sup>2</sup> (a) Diabetes mellitus Insulino-dependiente (DMID), o Diabetes de tipo I, que requiere de la administración diaria de insulina, se caracteriza por la virtual ausencia de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas; y como consecuencia la no producción de insulina. (b) La Diabetes mellitus No Insulino-dependiente (DMNID), o Diabetes de tipo II, representa una variedad de estados diabéticos en los cuales las células  $\beta$  se encuentran en número menor al de las células  $\alpha$ , y la secreción de insulina no es suficiente para prevenir la hiperglucemia. Se le relaciona frecuentemente con la obesidad; para controlar los niveles de glucosa en sangre, se utilizan los agentes hipoglucemiantes orales. (c) Diabetes mellitus relacionada con la malnutrición (DMRM), se refiere a la condición de diabéticos jóvenes. Se presenta principalmente en los países en desarrollo con una deficiencia nutricional histórica y cuyos síntomas no entran en las dos definiciones anteriores.

El tratamiento de la DMID inicia con el descubrimiento de la insulina en 1922 (Figura 1). Desafortunadamente, aunque la administración de insulina revierte los síntomas de la diabetes, no previene todos los defectos metabólicos y complicaciones relacionadas con la enfermedad.<sup>3</sup> Se cree que el problema radica principalmente en las fluctuaciones de los niveles de glucosa causadas por la insulina. La terapia de la DMNID involucra

modificaciones en el estilo de vida y la dieta, régimen de ejercicios y uso de agentes hipoglucemiantes orales, entre ellos las sulfonilureas y biguanidas (Figura 1), los cuales con frecuencia, no permiten controlar adecuadamente la glucemia de los pacientes. Estos productos son de origen sintético y la administración crónica de estos fármacos puede eventualmente ocasionar severas afecciones secundarias, relacionadas principalmente con el sistema cardiovascular.<sup>4</sup>

En la mayoría de los países desarrollados, la diabetes mellitus ocupa del cuarto al octavo lugar entre las causas de defunción<sup>5</sup> y en México, el 6.7% de la población entre los 20 y los 69 años de edad padece DMNID.<sup>6</sup> En 1994 ocupaba el tercer lugar como causa de muerte<sup>7</sup> y actualmente, la Secretaría de Salud indicó que alcanzó el primer lugar.

Este padecimiento constituye la primera causa de amputaciones y de ceguera por motivos no traumáticos. La tercera parte de los casos de cardiopatía isquémica se encuentra asociada a la diabetes.

Según la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, la incidencia ha aumentado de 18.39 por 100,000 habitantes en 1978 a 155.6 en 1990.<sup>8</sup> Por otro lado, el padecimiento crónico de esta enfermedad es motivo de preocupación por el sector salud, ya que el tratamiento de los cerca de 5.4 millones de mexicanos que se estima son diabéticos, demandó una erogación aproximada de 430 millones de dólares, lo que corresponde a la tercera parte del presupuesto destinado a salud por el gobierno mexicano en 1991.<sup>9</sup>

Además, los costos indirectos de tratamientos de complicaciones de diabetes, de morbilidad a corto tiempo, inhabilidad a largo tiempo y mortalidad por causas de la diabetes han aumentado considerablemente, conforme se va alargando la vida de los pacientes.

Con el fin de encontrar agentes terapéuticos alternos y con menores efectos secundarios en el tratamiento de la diabetes mellitus se ha dirigido la atención a las plantas. Para entender cómo los constituyentes de plantas pueden actuar como hipoglicémicos en animales, es necesario considerar las razones por las que estos compuestos se encuentran en las plantas. Se ha postulado que los metabolitos secundarios bioactivos de origen vegetal juegan un papel importante en los mecanismos de defensa. A niveles moleculares y



celulares, las plantas y los animales no son muy diferentes en sus procesos metabólicos. La glucosa es la fuente de energía y el precursor biosintético más importante en las plantas, la glucosa se almacena y moviliza bajo controles hormonales, tanto en plantas como en animales. Se ha encontrado que algunos reguladores del crecimiento de plantas, tales como ácido 3-indolacético, L-triptofano y el ácido p-clorofenoxiacético, inhiben la insulina *in vitro* y son hipoglucemiantes *in vivo* en ratas normales.<sup>10</sup> El ácido nicotínico y el ácido antranílico también inhiben la insulina y simultáneamente potencian la acción de la insulina administrada. Entonces los constituyentes de plantas que regulan la glucosa pueden también ser agentes reguladores de la glucosa en animales.

Existen en el mundo más de 1123 especies vegetales que han sido usadas en la medicina tradicional de los diferentes países para tratar los síntomas de la diabetes mellitus. Estas plantas representan 725 géneros en 183 familias (Tabla 1).<sup>11</sup>

La investigación realizada con algunas de estas especies ha permitido el aislamiento y la caracterización estructural de algunos principios con demostrada actividad hipoglucemiante; entre ellos, los alcaloides catharantina, leurosina y vindolina aislados de *Catharanthus roseus*,<sup>12</sup> tecomina y tecostatina de *Tecoma stans*,<sup>13</sup> las hipoglicinas A y B de *Blighia sapida*,<sup>14</sup> el  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterol de especies de *Centaurea*,<sup>15</sup> la difenilamina, el disulfuro de alilpropilo y la alicina de *Allium cepa*,<sup>16,17</sup> el ácido torméntico de *Poterium ancistroides*,<sup>18</sup> y una gran cantidad de glicanos obtenidos de diferentes especies principalmente de *Momordica charantia*,<sup>19</sup> *Morus alba*,<sup>20</sup> y *Panax ginseng*.<sup>21</sup> Las estructuras de estos compuestos se ilustran en la figura 2.

En México, las plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes son alrededor de 35 (Tabla 2); sin embargo, hasta el momento no se ha realizado un estudio interdisciplinario tendiente a la obtención de los principios activos hipoglucemiantes.<sup>22-24</sup>

En el presente trabajo, fueron elegidas dos de estas especies para su estudio químico-biológico (*Bidens pilosa* y *Eysenhardtia polystachya*). Estas especies fueron

Tabla 1. Familias citadas más frecuentemente por su actividad antidiabética<sup>11</sup>

<b>Familia</b>	<b>Total de especies</b>	<b>Especies citadas</b>
Fabaceae	18,000	127
Asteraceae	21,300	98
Lamiaceae	3,500	36
Liliaceae	6,460	35
Poaceae	10,000	30
Euphorbiaceae	7,000	30



Tabla 2. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diabetes

Nombre científico	Familia	Nombre científico	Familia
<i>Acrocomia mexicana</i>	Palmaceae	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Crassulaceae
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	<i>Lepechinia caulescens</i>	Labiatae
<i>Astianthus viminalis</i>	Bignoniaceae	<i>Malus comunis</i>	Rosaceae
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Cactaceae
<i>Bromelia karatas</i>	Bromeliaceae	<i>Parmentiera edulis</i>	Bignoniaceae
<i>Buddelia cordata</i>	Loganiaceae	<i>Pinnus taeda</i>	Pinaceae
<i>Cacalia decomposita</i>	Asteraceae	<i>Phisalis ixocarpa</i>	Solanaceae
<i>Calamintha macrostema</i>	Labiatae	<i>Pistia stratiotes</i>	Araceladeae
<i>Capraria biflora</i>	Soralaceae	<i>Salpianthus macrodontus</i>	Nictaginaceae
<i>Casearia exulenta</i>	Flacurtiaceae	<i>Taraxacum officinale</i>	Asteraceae
<i>Cecropia obtusifolia</i>	Moraceae	<i>Tecoma stans</i>	Bignoniaceae
<i>Cnidioscolus chayamansa</i>	Euforbiaceae	<i>Teucrium polium</i>	Labiatae
<i>Coutarea latiflora</i>	Rubiaceae	<i>Trixis radiale</i>	Asteraceae
<i>Erigeron pusillus</i>	Asteraceae	<i>Turnera difusa</i>	Turneraceae
<i>Eucaliptus citriodora</i>	Mirtaceae	<i>Valeriana mexicana</i>	Valeranaceae
<i>Eysenhardtia polystachya</i>	Leguminosae	<i>Valeria procera</i>	Valeranaceae
<i>Guazuma tomentosa</i>	Sterculiaceae	<i>Zea steyles</i>	Gramíneae
<i>Hyosiamus niger</i>	Loganiaceae		

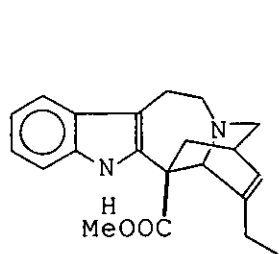
escogidas debido principalmente a que las dos, además de ser utilizadas para el tratamiento de la diabetes mellitus, son consideradas útiles para una gran cantidad de padecimientos (*vide infra*), por lo que el conocimiento acerca de su contenido metabólico, así como la actividad biológica de los mismos contribuirá a esclarecer si estas especies podrían ser consideradas agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de la diabetes mellitus; así mismo, se correlacionarán las diferentes actividades biológicas descritas para cada especie con sus constituyentes químicos bioactivos. Además de su reconocido uso popular antidiabético la elección consideró también la abundancia botánica y disponibilidad y la ausencia de información detallada de sus constituyentes hipoglucemiantes.

Como las especies estudiadas pertenecen a familias diferentes, los constituyentes presentes en cada una de ellas son también diferentes. Con el fin de facilitar la discusión de los resultados obtenidos, el presente trabajo se dividió en tres partes, basado en el tipo de constituyentes obtenidos.

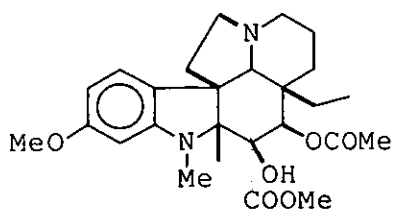
La primera parte consiste en el estudio químico-biológico de *B. pilosa*, esta parte se llevó a cabo de una manera biodirigida.

La segunda parte es la elucidación estructural y evaluación biológica de los constituyentes presentes en las fracciones menos polares del extracto total de la corteza de *E. polystachya*.

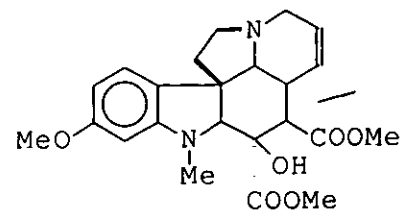
La tercera parte trata del aislamiento, elucidación estructural y evaluación biológica preliminar de los constituyentes de mayor polaridad del extracto total de *E. polystachya*.



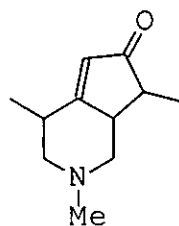
CATARANTINA



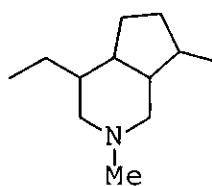
LEUROSINA



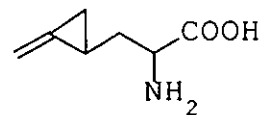
VINDOLINA



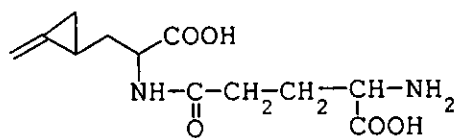
TECOMINA



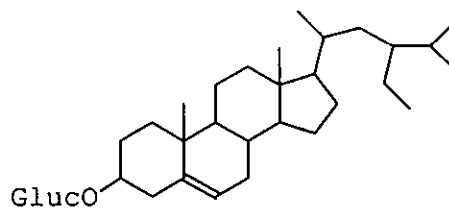
TECOSTANINA



HIPOGLICINA A



HIPOGLICINA B



$\beta$ -D-GLUCOSIDO DE  
3 $\beta$ -SITOSTEROL

Figura 2. Metabolitos secundarios hipoglucemiantes.

## OBJETIVO

Aplicar los conocimientos y herramientas de la química orgánica en la búsqueda de metabolitos secundarios bioactivos a partir de plantas apreciadas en la medicina tradicional mexicana, que representen alternativas terapéuticas útiles.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### Primera Parte

- Efectuar el estudio químico de *Bidens pilosa* dirigido por las actividades biológicas más frecuentemente descritas para esta especie.
- Obtención del extracto metanólico de *B. pilosa*.
- Llevar a cabo las evaluaciones biológicas pertinentes.
- Fraccionar y purificar las fracciones con actividad biológica.
- Determinar la estructura química de los constituyentes bioactivos aislados.

### Segunda Parte

- Determinar la estructura química de los constituyentes de tipo isoflavano obtenidos en un estudio previo de *E. polystachya*.
- Evaluar el potencial biológico de los constituyentes presentes en las fracciones menos polares de *E. polystachya*.

### Tercera parte

- Llevar a cabo el estudio químico de las fracciones de mayor polaridad de *E. polystachya*.
- Llevar a cabo la evaluación biológica preliminar del extracto total así como de los constituyentes presentes en las fracciones más polares de *E. polystachya*.

***Bidens pilosa* L.**

**Antecedentes.**

*Bidens pilosa* (Asteraceae, Heliantheae, Coreopsidinae). Nombre común: aceitilla. Es una planta herbácea de hojas opuestas y elípticas, ~~florece en cabezuelas~~ <sup>con flores blancas</sup> ~~amarillas~~ <sup>blancas</sup>, alcanza más o menos un metro de altura (Figura 3). Es originaria de las Antillas, aunque actualmente se encuentra extendida en todos los continentes; en México, ~~crece de preferencia en las regiones cálidas y húmedas del Golfo de México,~~ <sup>abundancia en el valle de México y la zona central donde constituye un problema por su invasiva a los cultivos.</sup> ~~florece de Agosto a Octubre.~~ <sup>25</sup>

En la medicina folklórica de numerosos países se le reconocen propiedades medicinales para el tratamiento de las diarreas,<sup>26</sup> como un agente bacteriostático,<sup>27</sup> bactericida,<sup>27,28</sup> fungistático y fungicida;<sup>27</sup> para el tratamiento de heridas, contra las inflamaciones y contra infecciones gastrointestinales.<sup>28</sup> En Sudáfrica, las hojas tostadas y molidas se toman como una bebida semejante al café.<sup>29</sup>

En la medicina popular mexicana se recomienda tomar la infusión de las hojas frescas y principalmente de las flores en ayunas para calmar los cólicos, es digestivo, sirve para combatir el estreñimiento, para tratar las hemorroides, como diurético y para el control de la diabetes.<sup>30</sup> En Puebla, donde se le conoce como *acahual*, la infusión de las hojas es utilizada para tratar enfermedades de los riñones.<sup>31</sup>

Los numerosos estudios farmacológicos efectuados a extractos de esta especie han permitido confirmar sus propiedades antibióticas, ya que las hojas acumulan el 1-fenilhepta-1,3,5-trieno (1), un poliacetileno tóxico a bacterias y hongos en presencia de luz ultravioleta.<sup>32</sup> Este compuesto ha despertado un gran interés, y los estudios farmacológicos efectuados al mismo han demostrado que inhibe el crecimiento de algunas bacterias gram positivas y de una gran cantidad de hongos en diluciones de 1:100 y 0.1: 200,000.<sup>32,33</sup> Se ha demostrado que esta inhibición se sensibiliza en presencia de luz ultravioleta, por lo que se describe como un agente fototóxico.<sup>34-36</sup> También se ha demostrado su actividad antihelmíntica y protozoacida *in vitro* e *in vivo*,<sup>37</sup> es cercaricida,<sup>38</sup> citotóxico.<sup>39,41</sup> y alelopático.<sup>42</sup>

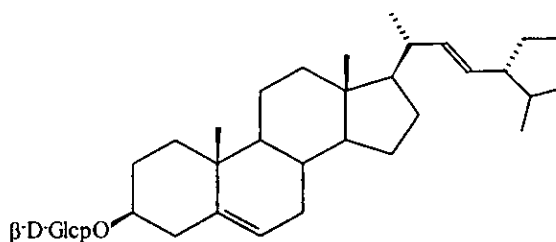


1

Las propiedades farmacológicas demostradas en **1** y otros poliacetilenos presentes en diferentes especies de la familia Asteraceae, han motivado que se intente su producción a través de cultivo de tejidos<sup>43</sup> y/o de raíces transformadas.<sup>44-47</sup>

A raíz del aislamiento de **1** en 1962 por Bohlmann, F. y colaboradores,<sup>48</sup> en las partes aéreas de *B. pilosa*, y el hallazgo posterior (en 1968) de su alta actividad antimicrobiana,<sup>32</sup> se han efectuado numerosos estudios químicos y farmacológicos, tanto a extractos, como a algunos de los metabolitos presentes en este espécimen: Estos estudios han confirmado algunas de las propiedades medicinales que se le atribuyen, y han propiciado el descubrimiento de otras actividades biológicas no relacionadas con su uso popular.

Así, en 1967, investigadores de Taiwan describen el estudio químico y farmacológico de *B. pilosa* var. *minor*, de ella se aisló el principio activo Fitosterina B, el cual presentó actividad hipoglucemiante en ratas normales y aloxanadas (1.0, 2.0, ó 4.0 mg/Kg), que fue comparada con la insulina (0.125, 0.250, o 0.500 unit/Kg). El efecto hipoglucémico fue proporcional a la dosis. La estructura de la Fitosterina B no fue determinada, pero los autores proponen que pudiera ser el  $\beta$ -sitosterol.<sup>49</sup> Más adelante, en el estudio farmacológico de los extractos de una población de esta especie colectada en Egipto,<sup>50</sup> se encontró que presentaba una alta actividad antimicrobiana, pero en la evaluación de sus propiedades hipoglucemiantes, los resultados fueron negativos, a pesar de que se describe el aislamiento de la fitosterina B y del  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterol (**2**).



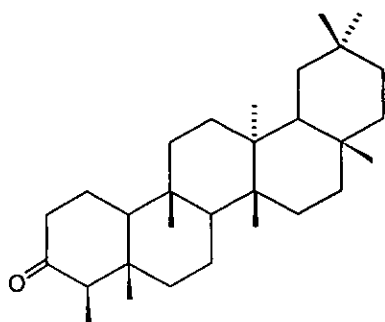
2

Por otro lado, en el extracto alcohólico de una población también colectada en Egipto, se determinó el contenido de saponinas, el cual fue correlacionado con la actividad hipoglucemiante que mostró tener el extracto.<sup>51</sup>

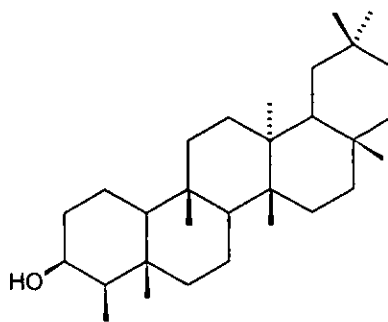
En relación a su actividad hipoglucemiante, los estudios realizados por Guerra en 1951 de una población de *B. pilosa* colectada en México, demostraron que en el humano, esta especie no disminuye significativamente la concentración de glucosa en sangre.<sup>52</sup>

Relacionando su ingestión en varias comunidades de Sudáfrica con la alta incidencia de cáncer de esófago, investigadores del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, administraron la planta en forma de polvo a ratas a las cuales se les indujeron tumoraciones (papilomas) en el esófago, encontrando que se producía un incremento en el crecimiento de los mismos, lo cual indica que la planta es un cocarcinogénico muy potente.<sup>29,53</sup> Asimismo, en 1996, investigadores de Panamá describen la actividad de un extracto metanólico de *B. pilosa* como intercalador de DNA, lo cual podría estar relacionado con su actividad cocarcinogénica.<sup>54</sup>

En 1991, Geissberger y colaboradores llevaron a cabo un estudio químico-biológico de esta especie. En este estudio, encontraron que los extractos de éter de petróleo y metanólico presentaron actividad antimicrobiana. El estudio químico de estos extractos dio lugar al aislamiento de los compuestos antimicrobianos: fenilheptatriino (1), ácido linoléico y ácido linolénico, y los agentes antiinflamatorios: friedelina (3) y friedeleán-3- $\beta$ -ol (4). Con estos resultados, los autores justifican el uso de *B. pilosa* en la medicina tradicional para el tratamiento de heridas, contra las inflamaciones y contra infecciones gastrointestinales.<sup>28</sup>



(3)



(4)

El extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de *B. pilosa* Linn, fue encontrado ser bacteriostático a concentraciones de 3000  $\mu\text{g/ml}$  y bactericida a concentraciones de 4000  $\mu\text{g/ml}$  contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), fungistático a 3000  $\mu\text{g/ml}$  y 2500  $\mu\text{g/ml}$  contra *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), respectivamente, y fungicida a concentraciones de 4000  $\mu\text{g/ml}$  y 3000  $\mu\text{g/ml}$  contra los mismos hongos. Una solución del extracto al 10% tiene actividad aproximada a la potencia de 5.6  $\mu\text{g}$  y 11  $\mu\text{g}$  del hidrocloreuro de tetraciclina contra *B. subtilis* y *S. aureus* respectivamente. Contra *C. albicans* y *S. cerevisiae*, el mismo extracto aproximó la potencia a 360  $\mu\text{g}$  y 1000  $\mu\text{g}$  de anfotericina B, respectivamente.<sup>27</sup>

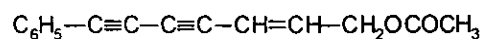
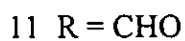
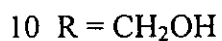
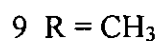
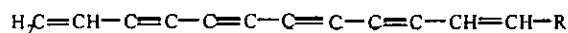
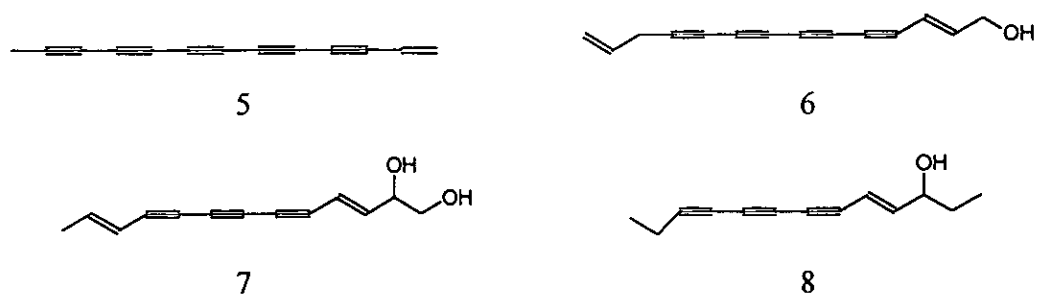
En Portugal, poblaciones colectadas en diferentes regiones presentaron esta actividad también contra *Staphylococcus aureus*.<sup>55</sup>

Una población colectada en Rwanda, demostró tener acción inhibitoria sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>56</sup>

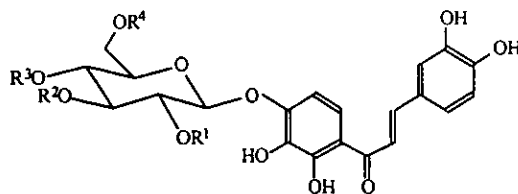
Desde el punto de vista fitoquímico, se encuentran descritos diez estudios, en donde se describe el aislamiento y caracterización de otros poliacetilenos (5-12),<sup>48,50</sup> chalconas (13-17),<sup>57-60</sup> auronas (18-21)<sup>61</sup>, fenilpropanoides glucosilados (22-26),<sup>61,62</sup> y un diterpeno alicíclico (27).<sup>63</sup> En la figura 4 se ilustran las estructuras de estos compuestos.



Poliacetilenos:

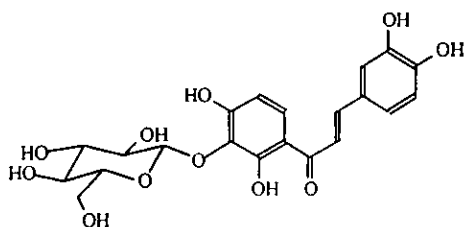


Chalconas:



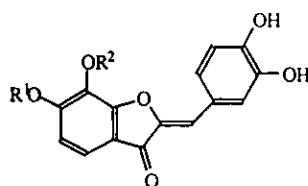
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
13	H	H	COCH <sub>3</sub>	p-cumaroilo
14	COCH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	p-cumaroilo
15	H	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	p-cumaroilo
16	H	H	H	p-cumaroilo

Figura 4. Constituyentes aislados de *Bidens pilosa* L.



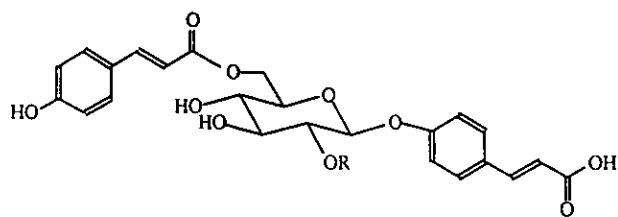
17

Auronas:



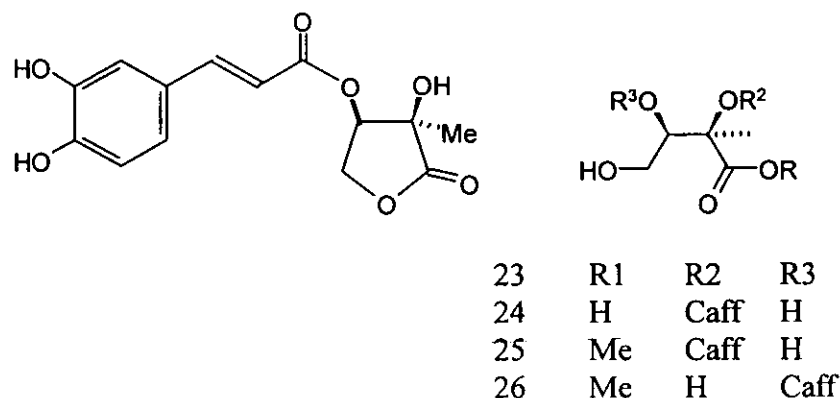
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
18	H	β-D-glcp
18a	H	H
19	6-O-p-cumaroil-β-D-glcp	H
20	6-O-acetil-β-D-glcp	H
21	β-D-glcp	H

Fenilpropanoides glicosilados:

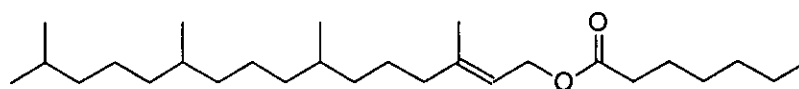


22 R = H

Figura 4. Constituyentes aislados de *Bidens pilosa*



Diterpenos:



27

Figura 4. Constituyentes aislados de *Bidens pilosa* L.

Dado que esta especie es utilizada para diversos fines en diferentes países, y aunque ya se haya correlacionado su uso popular para el tratamiento de las inflamaciones, de las heridas e infecciones gastrointestinales, con la presencia, en altas concentraciones, del fenilheptatriino (1) en las hojas de *B. pilosa*, quedan muchos puntos aún por develar, como son:

- 1. Los resultados <sup>que</sup> ~~son~~ relativamente ambiguos acerca de su actividad hipoglucemiante, ya que algunas poblaciones sí han demostrado tener este efecto en estudios farmacológicos, mientras que otras, recolectadas en diferentes regiones, no la presentan.
2. Los informes acerca de su contenido metabólico, también difieren, dependiendo del lugar donde se recolectó el vegetal.<sup>64</sup>
3. La diversidad de actividades biológicas encontradas para este vegetal por diferentes autores, entre ellas destacan, la actividad anticancerígena, cocarcinogénica y antituberculosa.

De acuerdo a estos antecedentes, y con el fin de esclarecer si la población de *B. pilosa* colectada en México, puede ser considerada como un agente terapéutico útil para los usos populares que se le atribuyen, se decidió efectuar el estudio químico-biológico de la planta completa.

## Resultados

Parte de los resultados obtenidos en el estudio químico biológico de *B. pilosa* se encuentran publicados,<sup>68</sup> por lo que en esta parte del trabajo <sup>solo</sup> se describirán en detalle los resultados que no fueron incluidos en dicha publicación. (Los resultados incluidos en la publicación se referirán a la misma.)

Con el fin de corroborar el uso popular medicinal de *B. pilosa* como antidiabético, se evaluó su actividad hipoglucemiante,<sup>65</sup> administrando por vía intravenosa el extracto metanólico a dosis de 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 g/Kg de peso, a ratas normales con hiperglucemia inducida por cargas de dextrosa. La determinación de los niveles de glucemia en las ratas tratadas con el extracto metanólico (Figura 5), en comparación con la curva control, indicó que la administración del extracto metanólico de *B. pilosa* disminuye los niveles de glucosa en 120 minutos. Sin embargo, se observó que, aunque los animales no morían después de 48 horas de administrado el producto, presentaban la sangre hemolizada; este resultado indica un efecto tóxico sobre los animales. Este bioensayo fue repetido tres ocasiones, y en cada caso, los valores de glucemia variaron considerablemente, por lo que es posible que el efecto tóxico observado al administrar el extracto, interfiera para la observación de los valores de glucosa.

El extracto metanólico de *B. pilosa* fue fraccionado entonces mediante cromatografía líquida al vacío,<sup>66</sup> utilizando un gradiente de *n*-hexano-AcOEt-MeOH, obteniéndose siete fracciones (ver publicación No 1).

No obstante los resultados negativos obtenidos en la determinación del efecto hipoglucemiante en el extracto metanólico de esta especie, y dados los antecedentes de actividad antimicrobiana<sup>32</sup> y cocarcinogénica descritos para la misma,<sup>29,52</sup> las fracciones obtenidas en el fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico fueron evaluadas para su actividad antimicrobiana contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; los dermatofitos *Trycophyton mentagrophytes* y *Microsporium gypseum*; y la levadura *Candida albicans*. Asimismo, se evaluó su actividad citotóxica contra la líneas celulares KB y P388. Los

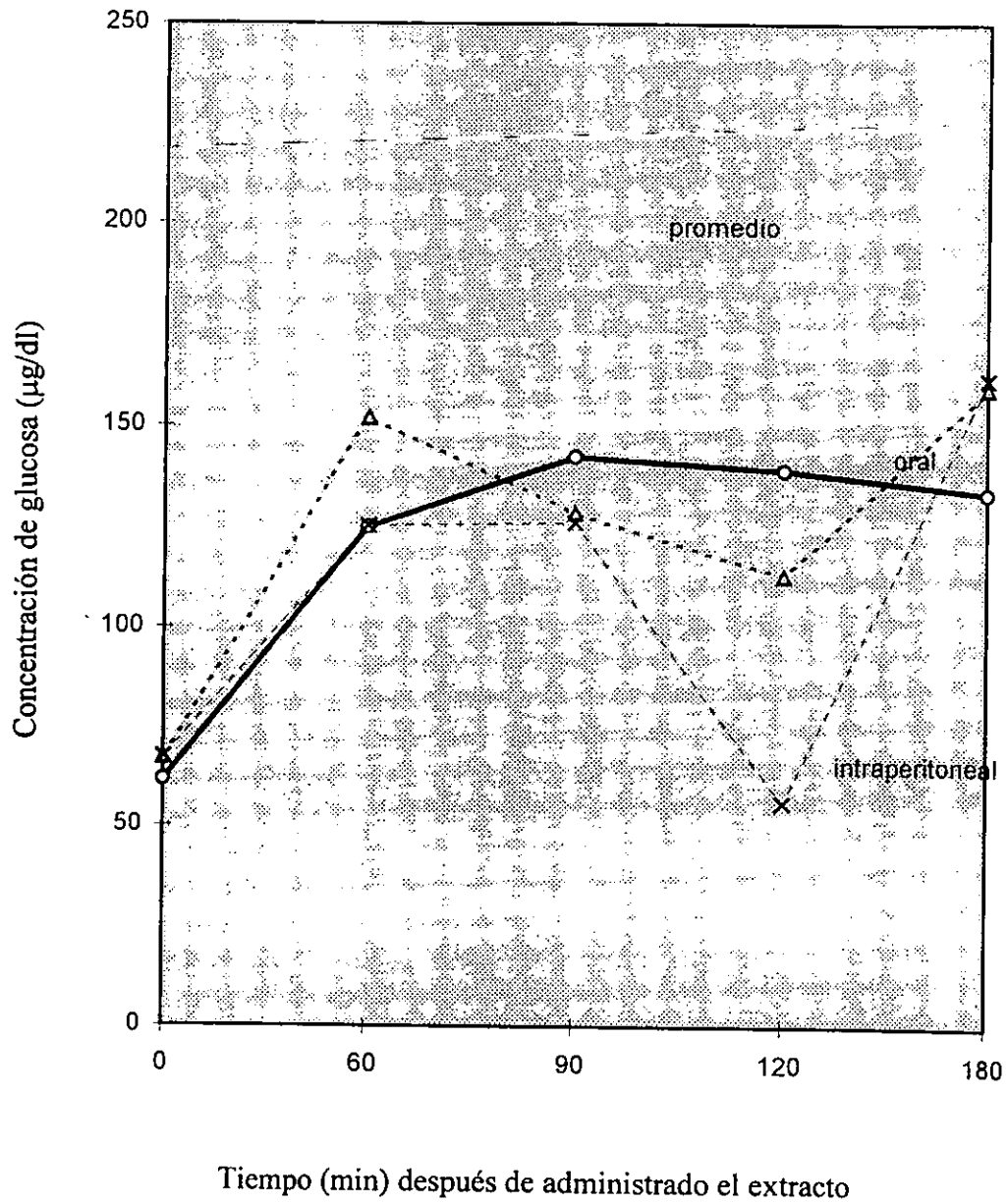


Figura 5. Efecto del extracto metanólico de *Bidens pilosa* sobre la glucemia de ratas con hiperglucemia inducida por cargas de dextrosa

resultados obtenidos en estos estudios indicaron que la actividad antimicrobiana estaba concentrada en la fracción soluble en hexano (Fracción 1); no se detectó actividad citotóxica en ninguna de las fracciones, pero se observó que los cultivos de las líneas celulares evaluadas mostraban un sobrecrecimiento en presencia de la fracción 6, eluida con AcOEt-MeOH (9:1). En el esquema 1 se ilustra este proceso.

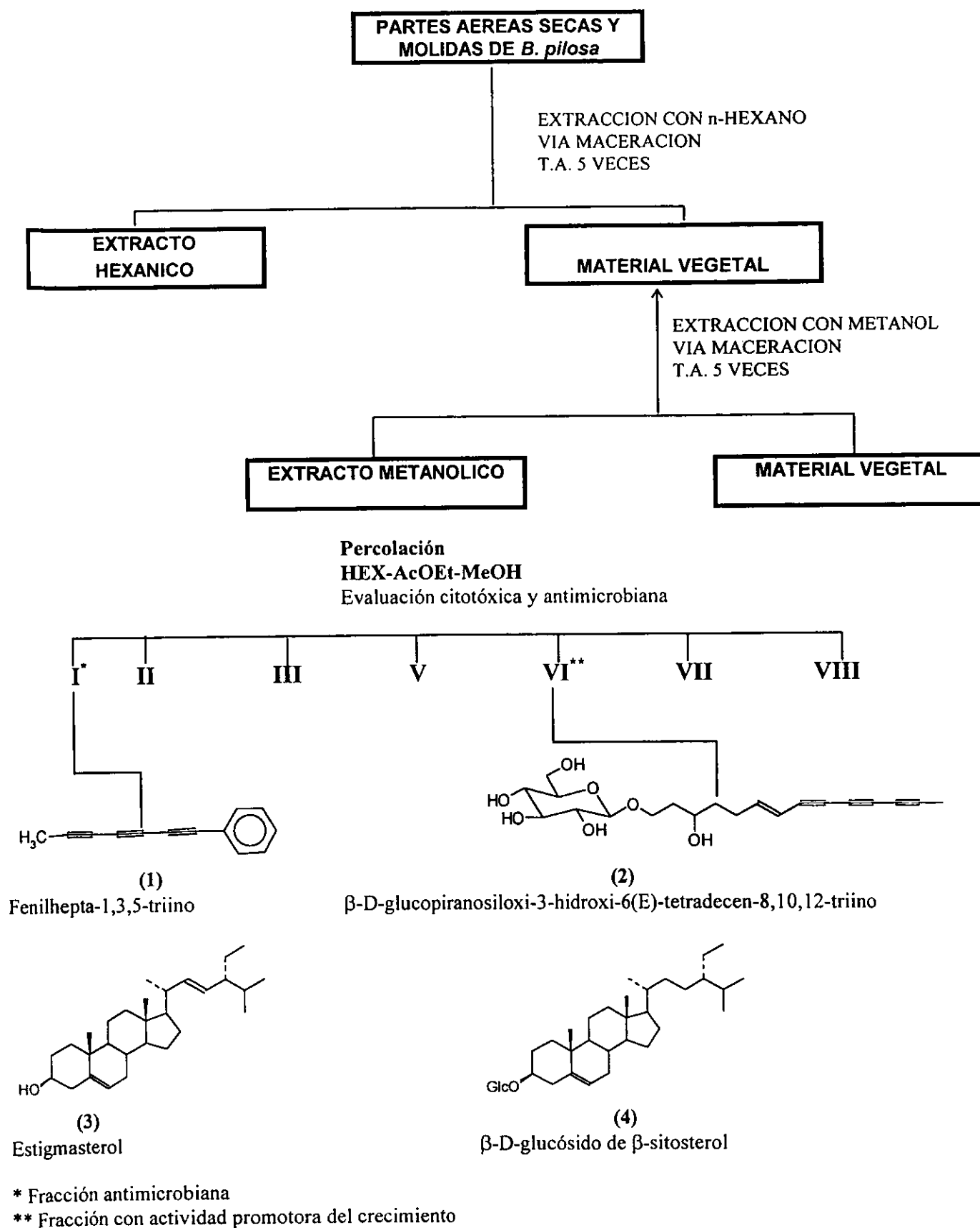
La separación cromatográfica de la fracción soluble en hexano, permitió el aislamiento y caracterización del 1-fenilheptatriino (1), ya descrito anteriormente en este mismo espécimen.<sup>67</sup> La fracción más polar dio lugar a la purificación del  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterol (28) y de un poliacetileno glucosilado, inestable a la luz y al calor, el cual fue caracterizado como el  $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino (29).

#### *Caracterización del 1-fenilhepta-1,3,5-triino (1).*

Este compuesto fue aislado de las fracciones menos polares del extracto hexánico de *B. pilosa*. Es un sólido cristalino blanco de punto de fusión de 57°C, el cual descompone al estar en contacto con el aire o la luz. Su fórmula molecular de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub> fue determinada por espectrometría de masas. Su espectro de infrarrojo (Espectro 1) mostró bandas de absorción a 2220, 2190, 2915 y 2840 cm<sup>-1</sup>, características de triples enlaces; entre 1673 y 1850 cm<sup>-1</sup> se observan las bandas características de un anillo aromático monosustituido. Este compuesto es un poliacetileno con tres triples ligaduras conjugadas con un anillo aromático, ya que su espectro de ultravioleta en MeOH (Espectro 2) presentó máximos de absorción a 210, 236, 248, 272, 288, 307 y 328 nm, característicos de este tipo de sistemas conjugados.<sup>69</sup>

Su espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 3) muestra dos multipletes centrados en  $\delta$  7.49 y  $\delta$  7.34, que integran para cinco hidrógenos y se asignaron a los hidrógenos del anillo aromático monosustituido presente en la molécula.

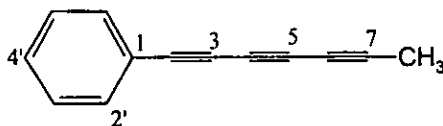
En  $\delta$  2.02 se observa un singulete que integra para tres hidrógenos y se asigna a los hidrógenos de un metilo unido a la cadena acetilénica.<sup>70</sup> El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 4), junto con el experimento DEPT de este compuesto (Espectro 4), confirmó la estructura propuesta ya que se observan cinco carbonos aromáticos, que fueron



Esquema 1. Esquema general de extracción de *Bidens pilosa* L.

asignados, por comparación con los desplazamientos químicos de fenilos monosustituídos. Entre  $\delta$  55.0-80.0 se encuentran seis carbonos cuaternarios que corresponden a los carbonos acetilénicos de la molécula; éstos fueron asignados en base a la comparación con triinos descritos en la literatura.<sup>71</sup> Finalmente, en  $\delta$  29.2 resuena el metilo del final de la cadena acetilénica.

Esta información permitió establecer la estructura **1** para este compuesto, a la cual le corresponde el nombre de 1-fenilhepta-1,3,5-triino, y el cual ya había sido aislado con anterioridad de esta misma especie. La comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con los informados en la literatura, confirmó la estructura para este producto natural.



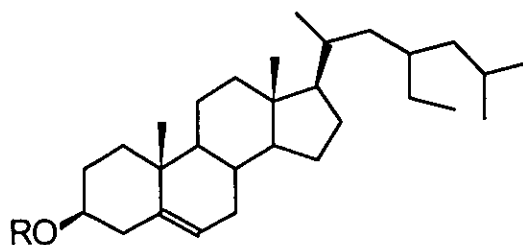
1

#### *Caracterización del $\beta$ -D-glucopiranosido de $\beta$ -sitosterol (2).*

Este compuesto fue aislado de las fracciones de mediana polaridad del extracto metanólico. Es un sólido amorfo de punto de fusión de 180-182°C, su espectro de infrarrojo (Espectro 5) mostró bandas de absorción características de grupos hidroxilo ( $3500\text{ cm}^{-1}$ ) y dobles ligaduras ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ). Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 6), muestra que se trata de un esteroil glicosilado, ya que se observan, entre  $\delta$  3.00 y 5.00 las señales características de un azúcar, así mismo, en la región de los hidrógenos vinílicos, aparece una señal multiplete que integra para un hidrógeno y que se asigna a un doble enlace trisustituído. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto de acetilación (espectro 7), permitió asignar las señales del azúcar, y determinar la naturaleza de la aglicona como el  $\beta$ -sitosterol (**28**). Los espectros de masas del producto natural y del producto tetraacetilado confirmaron la estructura de este compuesto.



Finalmente, la estructura de este compuesto fue establecida inequívocamente como el  $\beta$ -D-glucopiranoósido de  $\beta$ -sitosterol (2), por comparación directa de la aglicona (obtenida por hidrólisis ácida con HCl al 10%) con el  $\beta$ -sitosterol (28), el cual se encuentra disponible en nuestro laboratorio. La glucosa fue identificada también por comparación en ccf ( $R_f = 0.34$  AcOEt/AcOH/MeOH/H<sub>2</sub>O 11:2:2:1) del producto de reacción de hidrólisis y una muestra auténtica..



(2) R =  $\beta$ -D-Glcp

(28) R = H

***Caracterización del  $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(E)-tetradecen-8,10,12-triino (29).***

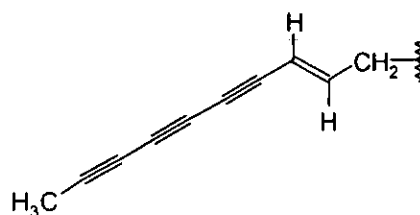
Este compuesto fue aislado de las fracciones más polares del extracto metanólico (Esquema 1), como un sólido cristalino en forma de placas, sensible a la luz, al calor y al aire.

Su espectro de ultravioleta (espectro 8) fue típico para un cromóforo en-triino:<sup>69</sup> (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}} = \text{nm}$  ( $\log \epsilon$ ): 328 (4.02), 306 (4.18), 288 (4.04), 256 (3.46), 240 (4.60) y 228 (4.04).

La hidrólisis ácida de este compuesto generó glucosa (identificada por comparación en ccf con una muestra auténtica), la aglicona correspondiente no fue aislada debido a su descomposición en las condiciones de reacción.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H de este compuesto (Espectro 9), muestra una señal simple que integra para tres hidrógenos en  $\delta$  2.00 y que se asigna a un metilo unido a la cadena acetilénica. En la región de los hidrógenos vinílicos se observan dos señales: en  $\delta$

6.32 un doblete tripleteado con constantes de acoplamiento de 16.0 y 7.0 Hz, que se encuentra acoplado con la señal doblete centrada en  $\delta$  5.56 con constante de acoplamiento de 16 Hz. Las multiplicidades y constantes de acoplamiento de estas señales indican que se trata de una doble ligadura con configuración *E*, conjugada con la cadena acetilénica por un extremo, y con un metileno por el otro (Fórmula parcial A).



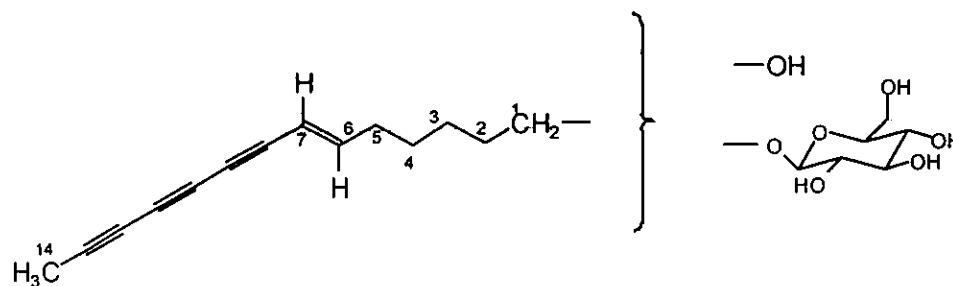
FORMULA PARCIAL A

En  $\delta$  2.30,  $\delta$  1.64 y  $\delta$  1.50 se observan tres señales multipletes que integran, cada una, para dos hidrógenos, por lo que se asignan a los hidrógenos de tres metilenos. Entre  $\delta$  3.00 y  $\delta$  4.5 resuenan los hidrógenos correspondientes a la glucosa, los cuales fueron asignados por comparación con los descritos en la literatura. El protón anomérico de la glucosa se encuentra en  $\delta$  4.22 como un doblete con constante de acoplamiento de 8.0 Hz, lo cual proporciona evidencia adicional de la presencia de glucosa en la molécula. En  $\delta$  3.5-3.8 se observa una señal multiplete, que no corresponde a la glucosa, por lo que se asigna a un protón carbinólico secundario adicional.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y el experimento DEPT de este compuesto (Espectro 10), indicaron la presencia de 20 átomos de carbono, de los cuales uno es un metilo ( $\delta$  3.1), tres metilenos ( $\delta$  28.2, 34.7 y 35.8), cinco oximetinos ( $\delta$  75.6, 75.1, 72.1, 69.1 y 65.6), dos oximetilenos ( $\delta$  65.4 y 60.4), seis carbonos cuaternarios acetilénicos ( $\delta$  73.6, 71.5, 69.1, 65.0, 63.3 y 57.7).

La fórmula molecular establecida para este compuesto ( $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_7$ ), requiere de ocho insaturaciones, las cuales se cubren completamente con los fragmentos estructurales hasta ahora deducidos: el sistema cromóforo triin-eno, al cual le corresponden siete insaturaciones, y el anillo de la glucosa que proporciona la insaturación faltante.

Integrando la información discutida hasta el momento, es posible establecer que este compuesto es un triineno con catorce átomos de carbono, y que incluye en su estructura una glucosa y un hidroxilo secundario, como se ilustra en la fórmula parcial B



FORMULA PARCIAL B

Para determinar el punto de unión de la glucosa, el compuesto **29** fue acetilado con anhídrido acético y piridina. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del derivado peracetilado (**29a**) (Espectro 11), muestra cinco señales de cinco acetilos en el rango de  $\delta$  1.98 a 2.10, uno de ellos pertenece a la aglicona y cuatro al azúcar.

La acetilación causó un efecto paramagnético de  $\Delta\delta$  1.25 en la señal del hidrógeno carbinólico secundario ( $\delta$  4.95 contra 3.70 en **29**), por lo que éste soporta a un hidroxilo. El desplazamiento químico de los hidrógenos del oximetileno ( $\delta$  3.88) no fue afectado por la acetilación, por lo tanto, la glucosa debe ubicarse en la posición 1.

Finalmente, para determinar la ubicación relativa del hidroxilo dentro de la estructura del poliacetileno y efectuar la asignación de las señales de los metilenos presentes en la molécula, se hizo uso del experimento de resonancia magnética homonuclear en dos dimensiones (COSY) del compuesto pentaacetilado (Figura 6), en el cual se observa la correlación entre H-3 ( $\delta$  4.95) y H-4 ( $\delta$  1.63); H-3 y H-2 ( $\delta$  1.68); H-2 y los dos protones de H-1 ( $\delta$  3.50 y 3.88 respectivamente); y H-7 ( $\delta$  5.52) con H-5 ( $\delta$  2.17). Por lo tanto, las conectividades descritas, establecen la relación 1,3 entre los carbonos carbinólicos.

La asignación de los protones de la glucosa se llevó a cabo también, mediante las conectividades encontradas en el espectro COSY.

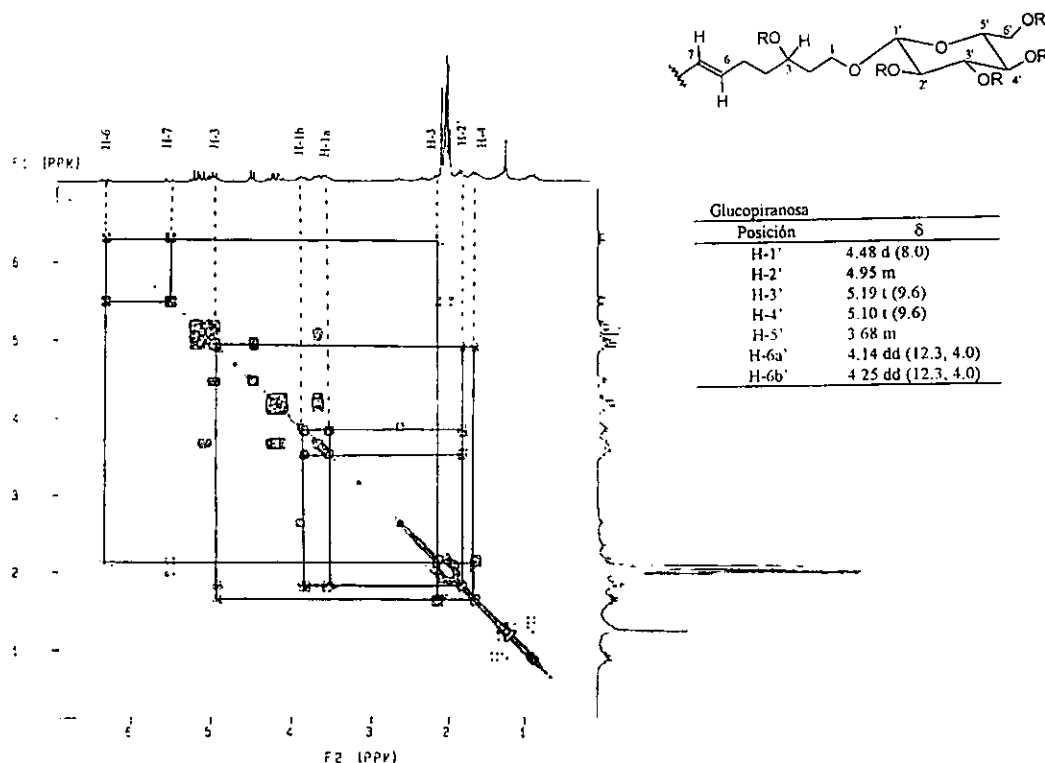
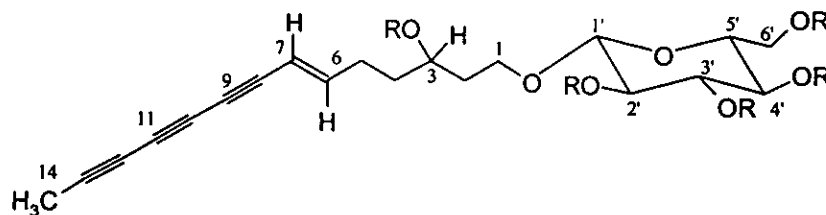


Figura 6. Conectividades de H-1 y H-3 en el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de **29**.

Por lo anteriormente discutido, el compuesto **29** fue identificado como el  $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino. Los datos del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT de su derivado peracetilado (**29a**) (Espectro 12), (Tabla 1 de la primera publicación), estuvieron de acuerdo con la estructura propuesta.



**29** R = H

**29a** R = Ac

Este compuesto no ha sido descrito en la literatura, por lo que representa un nuevo metabolito secundario.

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### *Evaluación de la actividad antimicrobiana.*

Los poliacetilenos **1** y **29** fueron evaluados para su actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y dermatofitos. Los resultados de este estudio indican que los valores de MIC obtenidos para **29** son mayores de 200  $\mu\text{g/ml}$ , para *Staphylococcus aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. gypseum* y *C. albicans*, lo cual, de acuerdo a lo establecido en este tipo de pruebas, no representa actividad.<sup>72</sup> Sin embargo, **29** mostró una actividad media contra el dermatofito *Trycophyton mentagrophytes* (MIC = 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Los valores de MIC obtenidos para el 1-fenilhepta-1,3,5-triino (**1**) indican que este compuesto fue tóxico a *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 58  $\mu\text{g/ml}$ ), *Trycophyton mentagrophytes* (MIC 62  $\mu\text{g/ml}$ ), y *Microsporium gypseum* (MIC 125  $\mu\text{g/ml}$ ). Estos resultados confirman la actividad antimicrobiana descrita anteriormente para **1**<sup>32-36,73-76</sup> contra otros microorganismos. El rendimiento total obtenido de este compuesto en los extractos hexánico y metanólico de *B. pilosa* (0.008 %) es relativamente alto, por lo que justifica su uso popular en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.<sup>10</sup>

### ***Actividad citotóxica.***

Los poliacetilenos 1 y 29 fueron ensayados frente a dos líneas celulares KB y P388, encontrándose valores de ED<sub>50</sub> mayores de 4 µg/ml, lo cual indica que no fueron tóxicos a las líneas ensayadas;<sup>77</sup> sin embargo, en el caso de 29, se observó un marcado sobrecrecimiento de las mismas, por lo que se decidió efectuar un estudio de cinética de crecimiento de varias líneas celulares en presencia del poliacetileno, para corroborar dicha observación.

### ***Cinética de crecimiento.***

El poliacetileno 29 fue ensayado frente a cuatro líneas celulares: HCT-15, UISO, KB y WI 38.

Se comparó el crecimiento de las líneas celulares contra el control, observándose una variación en su crecimiento, así como en la concentración macromolecular (total de proteínas), durante el tiempo de cultivo.

Las diferencias en el número de células y en la concentración de proteínas entre las líneas celulares y las células control, se expresaron en porcentajes (Tablas 3 y 4 respectivamente). Las gráficas correspondientes a estos valores se muestran en la primera publicación (Figuras 1 y 2).

Los resultados obtenidos claramente indican un efecto de crecimiento sobre las líneas celulares ensayadas.

Aunque la inducción de crecimiento fue generalizada, se observó una respuesta diferenciada, siendo la línea celular KB la menos afectada, mientras que las líneas transformadas UISO y HCT-15 mostraron valores mayores del 100% sobre el control durante el último día de cultivo.

Es importante enfatizar que la línea celular WI 38, la cual es la única célula no transformada, mostró un destacado sobrecrecimiento.

De acuerdo a estos resultados, y a la actividad cocarcinogénica de las hojas secas de *B. pilosa* sobre tumores de esófago, descrita por Sutherland *et. al.*,<sup>29,53</sup> y a que

generalmente los promotores de tumores causan proliferación celular, es posible postular que **29** se encuentre involucrado en este efecto, siendo el factor de promoción de tumores. Por otro lado, la actividad intercalante sobre el DNA del extracto metanólico de *Bidens pilosa* descrita por Gupta et. al.<sup>54</sup> podría también estar relacionada con la actividad promotora del crecimiento celular y por lo tanto de tumores cancerosos.

Se ha informado, que algunos poliacetilenos presentan actividad insecticida y cercaricida,<sup>38</sup> por lo que se evaluó esta actividad para los poliacetilenos obtenidos en este estudio. Los compuestos **1** y **29** fueron administrados a larvas del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera:Noctuidae), el cual es una peste que afecta principalmente al maíz.<sup>78</sup>

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que en todos los tratamientos en presencia del poliacetileno **29**, se obtuvo un promedio del 80% de larvas sobrevivientes, lo que indica en este tipo de bioensayos<sup>79</sup> que este poliacetileno no fue tóxico a la larva. En los ensayos en los que se administró el 1-fenilheptatiino (**1**) incorporado en el alimento, se observó una gran mortandad de las larvas ( $LC_{50} = 204 \text{ ng/cm}^2$ ), lo que indica que **1** es altamente tóxico a este organismo.

Como se mencionó anteriormente (*vide supra*), el extracto metanólico de *B. pilosa* mostró actividad hipoglucemiante en el modelo ensayado. Este mismo extracto presentó cantidades considerables del  $\beta$ -D-glucopiranoósido de  $\beta$ -sitosterol (**2**), el cual ha sido descrito como un agente hipoglucemiante *in vitro* y a altas dosis *in vivo*,<sup>80</sup> lo que correlaciona entonces el uso popular antidiabético que se le da a la planta. Asimismo, este compuesto podría ser la fitosterina A descrita anteriormente como el agente hipoglucemiante de una población de *B. pilosa* recolectada en Taiwan.<sup>49</sup> Debido a estos resultados, se tiene considerado, en un futuro próximo,<sup>81</sup> evaluar la actividad hipoglucemiante del  $\beta$ -D-glucopiranoósido de  $\beta$ -sitosterol (**2**), con el fin de determinar la viabilidad de dicho compuesto como un agente terapéutico para el tratamiento de la diabetes mellitus.

Por otro lado, es posible que en las preparaciones acuosas de *B. pilosa* se encuentre el triin-eno **29**, encontrado en las fracciones de mayor polaridad del extracto metanólico

Para determinar si el triineno **29** se encuentra presente en las preparaciones acuosas de *B. pilosa*, se preparó una infusión acuosa de las partes aéreas de esta planta, y el extracto obtenido fue analizado por HPLC, y se determinó que este constituyente si se encuentra presente en dicho extracto. También se evaluó la presencia de este compuesto en la infusión de las hojas tostadas y molidas, que es la preparación que se utiliza en Sudáfrica, y no se encontraron indicios de su presencia, por lo que no se descarta que los productos de degradación del mismo sean los causantes de la actividad promotora del crecimiento celular.

Por los antes discutido no se recomienda el uso popular de *B. pilosa* en ninguna de sus preparaciones puesto que se ha demostrado que actúa como un potente agente promotor del crecimiento de ciertos tumores, tanto la infusión de las partes aéreas, como la infusión de las hojas tostadas de esta especie.



Tabla 3. Diferencia en porcentaje de la concentración de proteínas relativo al control

<b>LINEA CELULAR</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>DIA 4</b>	<b>DIA 5</b>	<b>DIA 6</b>	<b>DIA 7</b>
<b>HCT-15</b>	8.5	8.0	15.0	18.5	34.0	45.0	52.0
<b>UIISO</b>	0.0	69.0	37.0	95.0	98.0	110.0	125.0
<b>KB</b>	0.0	2.5	8.0	23.4	4.9	10.2	-
<b>WI38</b>	0.0	2.0	7.5	19.0	17.0	32.0	-

Tabla 4. Diferencia en el porcentaje del rendimiento celular relativo al control

<b>LINEA CELULAR</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>DIA 4</b>	<b>DIA 5</b>	<b>DIA 6</b>	<b>DIA 7</b>
<b>HCT-15</b>	10.0	28.0	52.0	83.0	129.0	217.0	-
<b>UIISO</b>	0.0	-	45.0	-	133.0	-	175.0
<b>WI 38</b>	0	1.8	6.9	25.2	14.8	38.0	-
<b>KB</b>	-19.4	2.2	9.2	3.8	4.6	-	-

## Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa* L.

*Laura Alvarez*<sup>1,5</sup>, *Silvia Marquina*<sup>1</sup>, *Maria Luisa Villarreal*<sup>2</sup>, *Daniel Santos*<sup>2</sup>, *Eduardo Aranda*<sup>3</sup>, and *Guillermo Delgado*<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Orgánica, División de Estudios Superiores de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Cuernavaca 62210, Morelos, México

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS, Argentina No. 1, Xochitepec, Morelos

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Cuernavaca 62210, Morelos, México

<sup>4</sup> Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México

<sup>5</sup> Address for correspondence

*Bidens pilosa* L. (Heliantheae, Coreopsidinae) is a widely distributed weed in subtropical regions. The leaves and flowers have been used in Mexican folk medicine for treating stomach disorders, hemorrhoids (1), and diabetes (2); the plant is also known for its antimicrobial properties, consistent with the accumulation of the antibiotic acetylene phenylhepta-1,3,5-triyne (**1**) (3). In addition, *B. pilosa* administered as a powder has shown cocarcinogenic activity for papilloma induction in the rat esophagus (4). Previous work on this species has led to the isolation and identification of lipophilic acetylenes (3), phenylpropanoids (5), and chalcone and aurone glucosides (5,6,7).

When the MeOH extract of this plant was fractionated with the guidance of antimicrobial and cytotoxicity assays, the antibiotic activity was concentrated in the n-hexane-soluble fraction. We did not find any cytotoxic activity; however, we observed an overgrowing activity in fraction 6. From fraction 1, the polyacetylene phenylhepta-1,3,5-triyne (**1**) was isolated as fine colorless crystals of mp 57°C and identified on the basis of its previously described physical and spectroscopic properties (8). Additionally, we were able to assign the <sup>13</sup>C-nmr chemical shifts of **1** (Table 1). Copies of the original spectra are obtainable from the author of correspondence.

From the fraction with overgrowing activity, the polyacetylene **2** was obtained. The uv spectrum of compound **2** was typical for an ene-triyne chromophore (9) (*vide infra*). Acid hydrolysis gave glucose, identified by tlc; the aglycone was not isolated. The ir spectrum showed characteristic absorption bands caused by acetylenic groups at 2200 and 2128 cm<sup>-1</sup>, hydroxyl groups at 3330 cm<sup>-1</sup>, and a conjugated double bond at 950 cm<sup>-1</sup>. The ei-ms showed a molecular-ion peak at m/z 378 which, together with the <sup>13</sup>C-nmr data (Table 1), suggests the molecular formula C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>.

The <sup>13</sup>C-nmr spectrum of **2** provides additional evidence of glucopyranose as the sugar moiety (10). The DEPT experiment indicated the presence of 20 carbon atoms including one methyl carbon, three methylenes, five oxygen-bearing methines, two oxygen-bearing methylenes, six conjugated acetylenic carbon atoms, one acetal carbon, and two olefinic carbon atoms. The <sup>1</sup>H-nmr spectrum showed a terminal methyl characteristic singlet at δ 2.02 (9); two olefinic protons at δ 6.44 (dt, J = 16.0, 7.0 Hz) and δ 5.56 (d, J = 16.0 Hz) which correspond to a double bond with the *E* configuration adjacent to the polyene chromophore; and three methylene multiplets at δ 2.26, 1.65, and 1.50. The anomeric hydrogen of the β-D-glucopyranose appears at δ 4.22 (d, J = 8.0 Hz) (10).

The linkage of glucopyranose was determined by means of acetylation of **2**. The <sup>1</sup>H-nmr spectrum of the pentaacetate (**2a**) exhibited signals of five acetyl groups in the range of δ 1.98-2.10, one of them belonging to the aglycone and four to the sugar moiety. Acetylation caused a downfield shift of Δδ 1.25 for the proton at C-3 (δ 4.95 versus δ 3.70 in **2**). The shift of H-1 (δ 3.88) was not affected by the acetylation. Therefore, β-D-glucopyranose must be linked at C-1 of the aglycone. The <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY experiment on **2a** showed correlation among H-3, H-4 and H-2; H-2 and both protons at H-1; and H-6 and H-7 and H-5. These connectivities establish the 1,3 relationship between the carbinolic carbon atoms. The <sup>13</sup>C-nmr spectral data of **2a** (Table 1) were in good agreement with the proposed structure,

and the assignments were achieved by comparing the  $^{13}\text{C}$ -nmr data with those of similar acetylenes (11). The structure of compound **2** could be elucidated as  $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-3-hydroxy-6(*E*)-tetradecene-8,10,12-triyn, the *regio* isomer of **3** which has previously been found in *Microglossa pyrifolia* (12).

**1** showed antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* (58  $\mu\text{g/ml}$ ), *Tricophyton mentagrophytes* (62  $\mu\text{g/ml}$ ), and *Microsporium gypseum* (125  $\mu\text{g/ml}$ ); this activity is in good agreement with that already reported (13,14,15). It is noteworthy that compound **2** was not active against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Microsporium gypseum* and *Candida albicans* (MIC>200  $\mu\text{g/ml}$ ). However, it exhibited a medium activity against *Tricophyton mentagrophytes* (MIC=100  $\mu\text{g/ml}$ ).

The results of the insecticide bioassay with laboratory-reared fall armyworm showed that compound **2** was not toxic, while phenylhepta-1,3,5-triyn (**1**) exhibited marked toxicity ( $\text{LC}_{50} = 204 \text{ ng/cm}^2$ ). All treatments with compound **1** resulted in significantly fewer first instars recovered; the effect was dose-dependent.

Evaluation of the cytotoxicity of compounds **1** and **2** gave  $\text{ED}_{50}$  values greater than 4  $\mu\text{g/ml}$  in both cell cultures (KB and P388); nevertheless, it was observed a marked overgrowing of the cells in the presence of the polyacetylene **2**. Further cell kinetic evaluation performed with cell lines HCT-15, UISO, KB, and WI38 in the presence of compound **2** showed a variation in cell yield as well as in macromolecular concentration (total proteins) of the cultures tested; values are expressed as percentages (experimental cultures in the presence of compound **2**, versus control) and are illustrated in Figures 1 and 2. The results clearly indicated an overgrowing effect induced by compound **2** over the tested cell lines. Although the growth induction was generalized in the studied cultures, they were differentially responsive, KB being the least affected, while UISO and HCT-15 transformed cell lines exhibited values greater than one hundred percent over controls during the last days in culture. Likewise, WI38 cells (the only nontransformed culture) exhibited an outstanding overgrowth. This proliferative activity could be of significance and may be related with the previously reported cocarcinogenic action displayed by the dried leaves of *Bidens pilosa* for esophageal tumors induced in rats (4).

## Materials and Methods

### *Plant Material and Isolation*

Whole plants of *B. pilosa* L. were collected in December 1992 in the city of Cuernavaca near the university campus. Reference specimens have been deposited at the Taxonomic Department, Biological Research Center, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. (Voucher: LA 018). The powdered plant material (1.7 Kg) was extracted with *n*-hexane and then with MeOH at room temperature. The MeOH extract was evaporated in vacuo to yield a dark residue (441 g). An aliquot

(150 g) was fractionated by vacuum liquid chromatography (silica gel 60 mesh, 100 g) with a gradient of increasing amounts of EtOAc in *n*-hexane to 100% EtOAc, then increasing amounts of MeOH (fractions of 150 ml) to afford seven fractions, which were analyzed for their cytotoxic and antimicrobial activity (*vide supra*). Fraction 1 yielded 63 mg of **1** (8). Fraction 6 (2.14 g) eluted with EtOAc:MeOH (9:1), showed overgrowth activity against the cell lines tested; it was rechromatographed on a silica gel (70 g) column using CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5) as a constant eluent system. The fractions containing the polyacetylene (Fractions 17-38, 416 mg) were purified by preparative tlc using CHCl<sub>3</sub>:MeOH (98:2) as solvent to yield 180 mg of **2** (R<sub>f</sub> = 0.43, UV light detection). The purity of this compound was checked by HPLC on a  $\mu$ -bondapak RP-18 250 X 10 mm, 10 $\mu$  column (Waters) using MeCN-H<sub>2</sub>O (67:33) isocratically as the mobile phase (1.5 ml/min, uv detection at 312 nm) affording a t<sub>R</sub> of 8.5 min.

$\beta$ -*D*-glucopyranosyloxy-3-hydroxy-6(*E*)-tetradecene-8,10,12-triylne (**2**). Compound **2** was obtained as crystals from (MeOH-CHCl<sub>3</sub>), mp 164-165°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> - 0.0046° (MeOH, *c* 0.108); uv  $\lambda_{\max}$  (MeOH), nm (log  $\epsilon$ ): 328 (4.02), 306 (4.18), 288 (4.04), 256 (3.46), 240 (4.60), 228 (4.42); ir  $\nu_{\max}$  (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3500, 3330 (OH), 2200, 2128 (C $\equiv$ C), 950 (C=C); <sup>1</sup>H-nmr (CDCl<sub>3</sub>:DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  6.44 (1H, *dt*, J = 16, 7 Hz, H-6), 5.56 (1H, *d*, J = 16 Hz, H-7), 4.22 (1H, *d*, J = 7.6 Hz, H-1'), 3.98 (1H, *m*, H-1a), 3.78 (1H, *m*, H-6a'), 3.58 (1H, *m*, H-6b'), 3.5-3.8 (1H, *m*, H-3), 3.28 (1H, *m*, H-1b), 3.26-3.5 (2H, *m*, H-3'-H-5'), 3.12 (1H, *t*, J = 9 Hz, H-2'), 2.26 (2H, *m*, H-5), 2.02 (3H, *s*, H-14), 1.65 (2H, *m*, H-4), 1.50 (2H, *m*, H-2); <sup>13</sup>C-nmr (CDCl<sub>3</sub>:DMSO-*d*<sub>6</sub>): Table 1.

*Acetylation of 2*. Treatment of **2** (30 mg) with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (0.5:0.2 ml) gave **2a** (22 mg) as a syrup: ir  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 2220, 2120 (C $\equiv$ C), 1745, 1240 (acetates), 940 (C=C); <sup>1</sup>H-nmr (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.32 (1H, *dt*, J=16, 7 Hz, H-6), 5.52 (1H, *d*, J = 16 Hz, H-7), 5.19 (1H, *t*, J = 9.6 Hz, H-3'), 5.10 (1H, *t*, J = 9.6 Hz, H-4'), 4.95 (2H, *m*, H-2', H-3), 4.48 (1H, *d*, J = 8 Hz, H-1'), 4.25 (1H, *dd*, J = 12.3, 4.0 Hz, H-6b'), 4.14 (1H, *dd*, J = 12.3, 4.0 Hz, H-6a'), 3.88 (1H, *m*, H-1b), 3.68 (1H, *m*, H-5'), 3.50 (1H, *m*, H-1a), 2.17 (2H, *ddd*, J = 7.0, 4.0 Hz, H-5), 2.01 (3H, *s*, H-14), 1.82 (2H, *ddd*, J = 7 Hz, H-2), 1.64 (2H, *ddd*, J = 7 Hz, H-4); <sup>13</sup>C-nmr (CDCl<sub>3</sub>): Table 1.

*Acid Hydrolysis of 2*. Treatment of **2** with 2N HCl for 40 min at room temperature allowed the identification of glucose as the sugar moiety by tlc on silica gel with CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (8:5:1) as the mobile phase, by comparison with an authentic sample.

#### Antimicrobial activity

Antimicrobial screening studies were carried out by the conventional disc assay procedure (16,17) for activity against the bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhimurium* (ATCC 06539), *Escherichia coli* (ATCC 8937), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); the dermatophytes *Trycophyton mentagrophytes* (NRRL 1942) and *Microsporium gypseum* (NRRL-

A2605); and the fungal organism *Candida albicans* (ATCC 10231). Nystatin (5-160 µg/ml) and gentamicin (2-128 µg/ml) were included as controls.

### *Insecticidal activity*

Insecticidal activity of **1** and **2** was tested by ingestion of solutions of the compounds by the target insect larvae following the artificial diet feeding assay (18). In all cases, we used first instar larvae of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera:Noctuidae), an important pest in Mexico with a wide variety of plant hosts, mainly corn (19). The concentrations used ranged from 20 to 20,000 ng per square centimeter of surface diet. All experiments were run in triplicate. Concentration-response curves were analyzed by the log dose/probit method to determine the doses that kill half of the organisms (LC50).

### *Cytotoxicity and Growth Kinetic Tests.*

Cytotoxic evaluation was determined in KB and P388 cell cultures according to Geran and Greenberg's screening protocols (20). Growth kinetic studies of **2** were performed in HCT-15 (colon carcinoma), UIISO (uterine-cervix cancer), KB (nasopharyngeal carcinoma) and WI38 (lung embryonic fibroblasts) human cell lines, which were plated in the log phase of the growth cycle in 2.25 cm<sup>2</sup> (multi 24) well dishes at a density of 2.5 X 10<sup>4</sup> cells/well in 1 ml of complete medium. On day 0, the compound to be tested was dissolved in DMSO and 50 µl were added to each well. Identical control cultures in media not containing the polyacetylene were also prepared. Test and control cultures were grown for 7 days at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air and 100% humidity. On days 1-7 the media were changed using appropriately supplemented complete nutrients. Triplicates of test and control cells were harvested for cell counting and macromolecular determinations (protein concentration) during the time in culture.

### **Acknowledgements**

We thank Messrs María Isabel Chávez, Federico del Río, Rocío Patiño, Luis Velasco, and Javier Pérez-Flores, Instituto de Química de la UNAM for the measurement of the spectra. We also thank Ms. Laura Patricia Lina García (Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM) for her technical assistance. This research was supported in part by Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM. México (Grant IN 205892).

## References

- 1 Díaz, J. L. (1976) Usos de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas I and II. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A. C.
- 2 Long, L., Linn, C., and Hsing-Chien, H. (1968). From *Chem. Abstr.* **68**, 20822b.
- 3 Wat, C.-K., John, T., and Towers, G. H. N. (1980) *J. Ethnopharmacol.* **2**, 279.
- 4 Mirvish, S. S., Salmasi, S., Lawson, T. A., Pour, P., and Sutherland, D. (1985) *J. Natl. Cancer Inst.* **74**, 1283-1290.
- 5 Sashida, M., Ogawa, K., Kitada, M., Karikome, H., Mimaki, Y., and Shimomura, H. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 709-711.
- 6 Hoffmann, B., and Hölzl, J. (1988) *Phytochemistry* **27**, 3700-3701.
- 7 Hoffmann, B., and Hölzl, J. (1988) *Planta Med.* **54**, 450-451.
- 8 Bohlmann, F., Arndt, Ch., Bornowski, H., und Kleine, K.-M. (1962) *Chem. Ber.* **95**, 1315-1319.
- 9 Bohlmann, F., Burkhardt, T. and Zdero, Ch. (1973) Naturally Occurring Acetylenes. Academic Press, New York.
- 10 Agrawal, P. K. (1992) *Phytochemistry* **31**, 3307-3330.
- 11 Bauer, R., Redl, K. and Davis, B. (1992) *Phytochemistry* **31**, 2035-2037.
- 12 Rucker, G., Kehrbaum, S., Sakulas, H., Lawong, B., and Goeltenboth, F. (1992) *Planta Med.* **58**, 266-269.
- 13 Lam, J., Breteler, H., Arnason, T. and Hansen, L. (1988) Chemistry and Biology of Naturally Occurring Acetylenes and Related Compounds. Amsterdam. Elsevier.
- 14 Hudson, J.B., Graham, E.A., Rossi, R., Carpita, A., Neri, D., and Towers, G.H.N. (1993) *Planta Med.* **59**, 446-450,
- 15 N'dounga, M., Balansard, G., Babadjamian, A., Timon-David, P., Gasquet, M. and Boudon, G. (1983) *Plantes Med. et Phytother.* **17**, 64-75.
- 16 Vanden, D. A. and Vlietnick, A. J. (1991) in: Methods in Plant Biochemistry (Dey, P. M., Harborne, J. B., and Hostettmann, K., eds.), Vol. 6, pp. 47-69, Academic Press, New York.
- 17 Paxton, J. D. (1991) in: Methods in Plant Biochemistry (Dey, P. M., Harborne, J. B., and Hostettmann, K., eds.), Vol. 6, pp. 33-46, Academic Press, New York.
- 18 Kubo, I. (1991) in: Methods in Plant Biochemistry (Dey, P. M., Harborne, J. B., and Hostettmann, K., eds.) Vol. 6, pp. 179-193, Academic Press, New York.
- 19 Ghidui, G. M. and Andaloro, J. T. (1993) *Florida Entomologist* **76**, 549-552.
- 20 Geran, R. I., Greenberg, N. H., MacDonald, M. N., Schumacher, A. M., and Abbott, B. J. (1972) *Cancer Chemother. Rep.* **3** (3), 1-17.

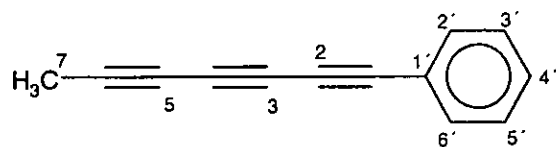
Table 1  $^{13}\text{C}$  nmr data<sup>a</sup> and DEPT spectra for compounds 1, 2 and 2a.

1	Carbon	2	DEPT	2a
29.2	1	65.4	CH <sub>2</sub>	65.9
58.9	2	28.2	CH <sub>2</sub>	29.2
64.8	3	65.6	CH	70.8
67.3	4	34.7 <sup>b</sup>	CH <sub>2</sub>	32.9 <sup>b</sup>
74.5	5	35.8 <sup>b</sup>	CH <sub>2</sub>	33.9 <sup>b</sup>
75.1	6	149.8	CH	148.6
78.2	7	106.3	CH	108.8
	8	57.7	C	58.1
	9	63.3	C	59.4
	10	65.0	C	66.2
	11	69.1	C	69.5
	12	71.5	C	70.5
	13	73.6	C	74.1
	14	3.1	CH <sub>3</sub>	4.6
		Glucose moiety		
121.0	1'	101.6	CH	100.4
132.9	2'	72.1	CH	71.1 <sup>b</sup>
128.4 <sup>b</sup>	3'	75.6 <sup>b</sup>	CH	71.8 <sup>b</sup>
129.4 <sup>b</sup>	4'	69.1	CH	68.4
128.4 <sup>b</sup>	5'	75.1 <sup>b</sup>	CH	72.8 <sup>b</sup>
132.9	6'	60.4	CH <sub>2</sub>	61.9

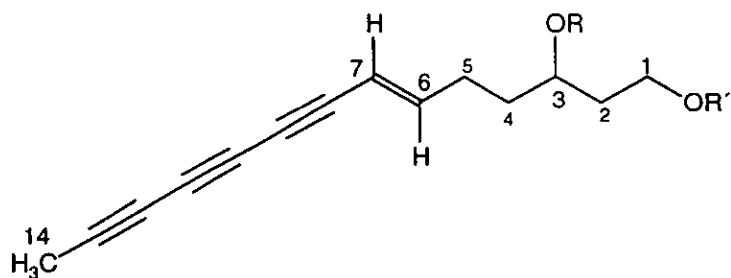
<sup>a</sup> Spectra of 1 and 2a were measured in CDCl<sub>3</sub>, while of 2 was taken in CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>.

<sup>b</sup> These assignments in each column may be interchanged.





1



	<b>R</b>	<b>R'</b>
<b>2</b>	H	$\beta$ -D-Glucopyranose
<b>2a</b>	Ac	$\beta$ -D-Glucopyranose (OAc) <sub>4</sub>
<b>3</b>	$\beta$ -D-Glucopyranose	H

Figure 1 % Difference in cell yield of cell lines (versus control) in the presence of polyacetylene 2.

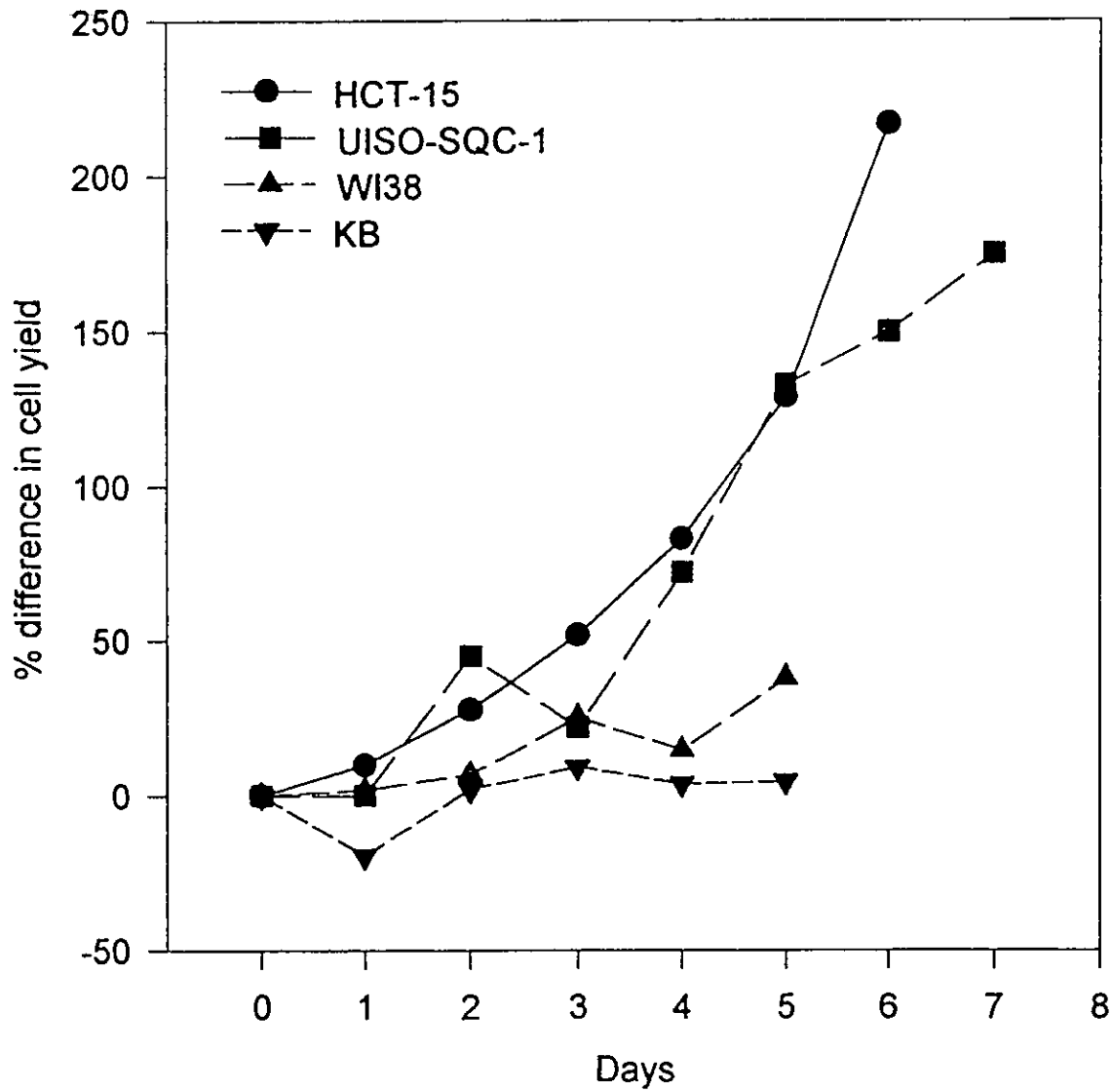
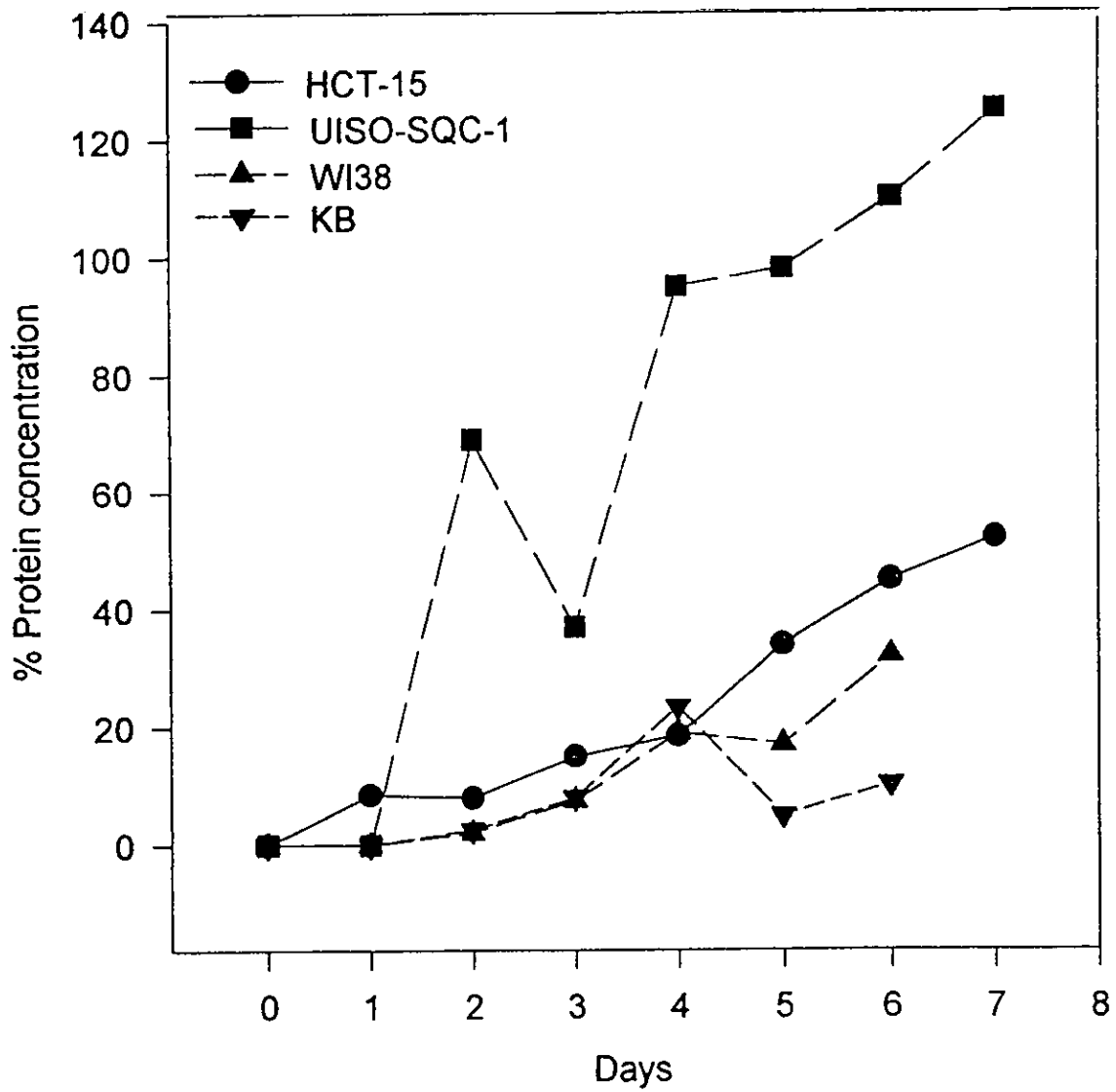


Figure 2 % Protein concentration of cell lines (versus control) in the presence of polyacetylene 2.



*Eysenhardtia polystachya* (Ortega)

**Antecedentes**

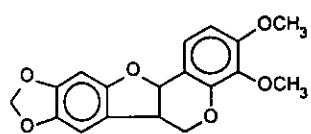
¿ 2 m ?

*Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. es un árbol que alcanza hasta 20 m de altura que pertenece a la subtribu Psoralieae, Tribu Galegeae, Subfamilia Papilionaceae (Lotoideae) de la familia de las Leguminosas (Fabaceae). Se encuentra ampliamente distribuida a lo largo del territorio nacional y en el sur de Texas.<sup>82</sup> En México se le conoce con una gran variedad de nombres comunes, como: palo dulce, palo azul, palo cuate, taray, etc.,<sup>83</sup> En la medicina tradicional de nuestro país se le atribuyen diversas propiedades terapéuticas, tales como: antiespasmódico, antipirético, febrífugo, antiinflamatorio, cicatrizante,<sup>84</sup> para el tratamiento de enfermedades de los riñones,<sup>85-87</sup> y como antidiabético.<sup>88</sup>

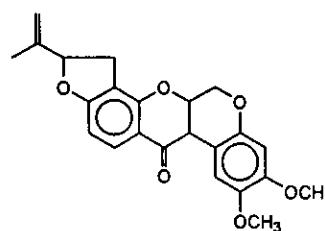
La infusión de la corteza de este árbol tiene una fluorescencia de color verdedorado. Es usada como diurético, y en Europa era muy conocido en el siglo XVI, donde era llamado "*Lignum nephriticum*". La decocción de la madera es usada en Sonora como una bebida refrescante para los pacientes con fiebre. La madera se usa en muchas localidades para tratar enfermedades del riñón y la vejiga. En Oaxaca es usada para la contracepción. En 1985 Ortiz et. al. correlaciona esta última actividad con la presencia de  $\beta$ -sitosterol, el cual mostró tener un 90% de anti-implantación en ratas.<sup>89</sup> En el noroeste de México, se toma la infusión de las hojas y se da un baño de cuerpo con esta misma infusión para combatir la anemia. Se atribuye que la ingestión de preparaciones obtenidas a partir de la corteza de esta especie es útil en el tratamiento de enfermedades renales y para la cura de diferentes enfermedades que no responden a los remedios normales.<sup>90</sup>

Un estudio farmacológico efectuado a la corteza de esta planta, mostró una inhibición moderada de la germinación de maíz, buena inhibición de la germinación de frijol, actividad insecticida significativa, y una alta actividad muloscicida. El estudio fitoquímico de la corteza dio lugar al aislamiento de un polifenol, bajo nivel de taninos, ~~los terpenos~~  $\beta$ -sitosterol y  $\beta$ -amirina.<sup>91</sup>

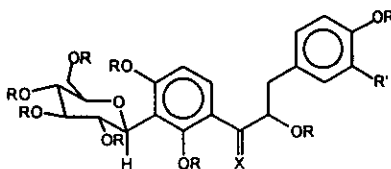
Desde el punto de vista fitoquímico, *E. polystachya* ha sido estudiada en tres ocasiones; el primer estudio fue realizado por Domínguez,<sup>92</sup> quien describe el aislamiento del 3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxi-pterocarpano (30) y de la dehidrorotenona (31); posteriormente, en 1982, Beltrami y col.<sup>93</sup> aislaron las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas 32 y 33; y en 1984 Burns y col.<sup>94</sup> describen la obtención de la 7-hidroxi-2', 4', 5'-trimetoxiisoflavona (34) y del 9-metoxi-2.3-metilendioxi-cumestano (35). Las estructuras de estos compuestos se ilustran en la figura 7.



30

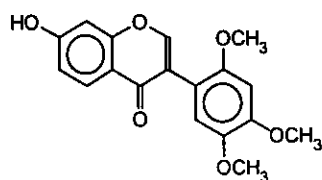


31

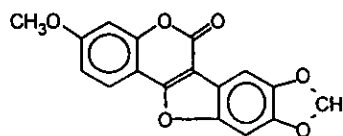


32 R = H, R' = H

33 R = H, R' = OH



34



35

Figura 7. Constituyentes Aislados de *E. polystachya*

Posteriormente a los estudios antes mencionados, en 1994, en nuestro laboratorio, se realizó el estudio químico de las fracciones menos polares del extracto cloroformo-metanol (1:1) de la corteza y troncos de *Eysenhardtia polystachya*;<sup>95</sup> en este estudio, el extracto total fue fraccionado mediante cromatografía en columna abierta eluyendo inicialmente con un gradiente de hexano-AcOEt, y posteriormente con acetona y metanol.

La separación cromatográfica de las fracciones eluidas con el gradiente hex-AcOEt dio lugar al aislamiento y caracterización del estigmasterol (36) y los isoflavonoides (-)-3,4-dimetoxi-8,9-metilendioxiptero-carpano (37), cuneatina (38), 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona (39), (3S)-(-)-isoduartina (40), 7-hidroxi-8,2',3',4',5'-pentametoxiisoflavano (41) y 7,2'-dihidroxi-3',4',5',8-tetrametoxiisoflavano (42). Este procedimiento se ilustra en el Esquema 2 y las estructuras de estos compuestos se ilustran en la figura 8.

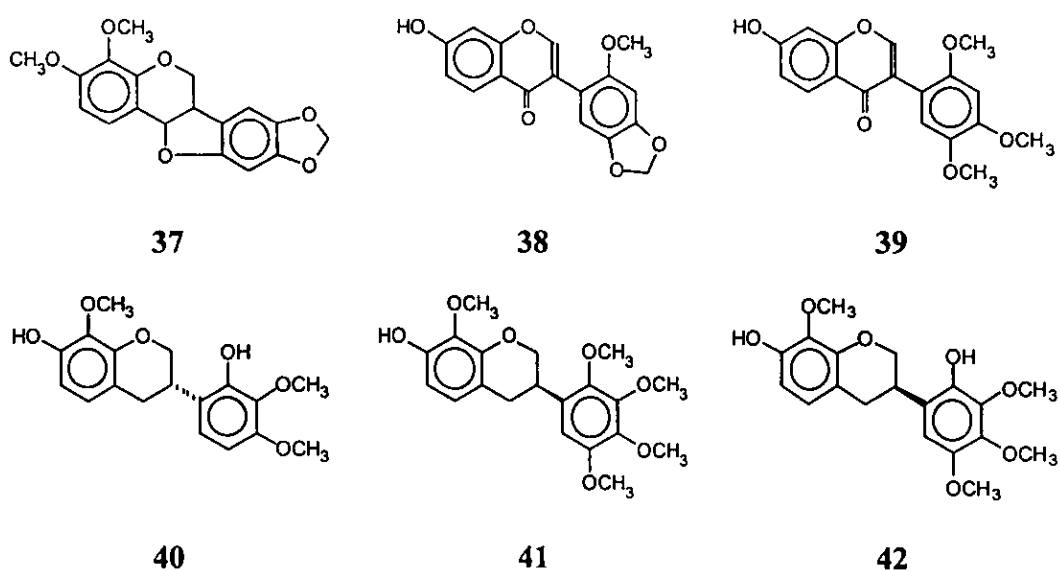


Figura 8. Isoflavonoides obtenidos por Esquivel<sup>81</sup> de *E. polystachya*.

El pterocarpano 37 y la isoflavona 39 habían sido aislados anteriormente por Domínguez y Burns respectivamente (*vide supra*); el isoflavano 40 había sido descrito anteriormente como constituyente de *Dalbergia odorifera*,<sup>96</sup> y la isoflavona 38 ha sido aislada anteriormente de especies del género *Cicer*.<sup>97</sup>

Los isoflavanos 41 y 42 fueron descritos como nuevos metabolitos secundarios.

La elucidación estructural de **41** y **42** se basó en el análisis e interpretación de los espectros de IR, EM, UV, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y experimentos de RMN en dos dimensiones como COSY, HETCOR, COLOC y NOEDIFF como se resume a continuación:

- Mediante la interpretación e integración de la información proporcionada por los espectros de IR, UV, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se estableció que el esqueleto de estos compuestos pertenecía al de un isoflavano que incluía en su estructura a cinco metoxilos y un hidroxilo para **41** y cuatro metoxilos y dos hidroxilos para **42**.
- La detección de los iones fragmento característicos de la fragmentación de tipo Retro Diels-Alder en el espectro de masas de impacto electrónico de ambos compuestos, indicó que en **41** y **42** el anillo A contenía un hidroxilo y un metoxilo (ion fragmento a  $m/z$  152), mientras que en el anillo B de **41** se encontraban presentes cuatro metoxilos (ion fragmento a  $m/z$  224) y tres metoxilos y un hidroxilo ( $m/z$  210) en **42** (Figura 9).

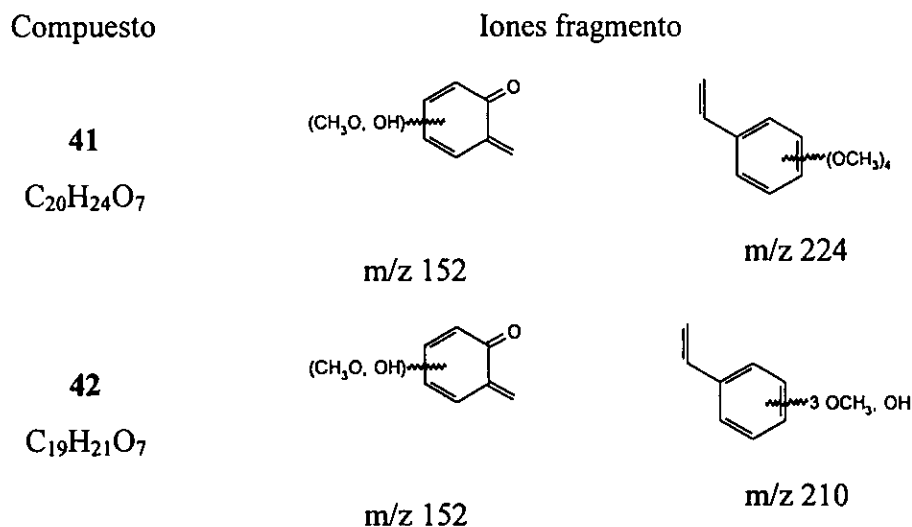
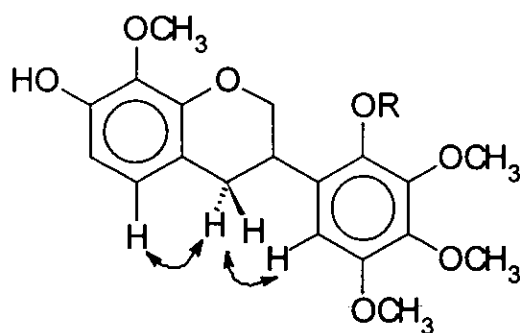


Figura 9. Iones derivados de la fragmentación retro Diels-Alder de **41** y **42**

- La ubicación de los sustituyentes en los anillos A y B de ambos compuestos fue establecida en base al Efecto Nuclear Overhauser diferencial observado entre H-5 ( $\delta$  6.73) y H-6' ( $\delta$  6.41) al irradiar el metileno de C-4 en  $\delta$  2.93 (Figura 10). Estas asignaciones están de acuerdo con la biogénesis de este grupo de sustancias, ya que la posición C-7 siempre está oxigenada y el tipo de sustitución en el anillo B es 2',3',4'.<sup>98</sup>



41 R = OCH<sub>3</sub>

42 R = H

Figura 10. Interacciones observadas en el espectro NOEDIFF de 41 y 42

4. La ubicación relativa del hidroxilo y el metoxilo en el anillo A en ambos compuestos, se estableció tomando como criterio el desplazamiento paramagnético que experimenta la señal asignada a H-6 en el espectro de RMN<sup>1</sup>H de los derivados monoacetilado (41a,  $\delta\Delta$  0.05) y diacetilado (42a,  $\delta\Delta$  0.08) respectivamente, con respecto a los productos naturales. Además de la similitud encontrada en los desplazamientos químicos en RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de estos compuestos con los descritos para la isoduartina (40).

5. El hidroxilo del anillo B de 42, se ubicó en C-2' debido al desplazamiento diamagnético ( $\Delta\delta$  0.2) que experimentó el metileno H-2 del derivado diacetilado (42a), esta asignación fue apoyada por el experimento COLOC, donde el protón aromático asignado a H-6 sólo mostraba correlación <sup>3</sup>J con un carbono base de metoxilo.

6. Finalmente, la configuración absoluta en C-3 fue asignada tentativamente como (*R*), en base a la comparación del signo de la rotación óptica de estos compuestos, con el descrito para otros isoflavanos. Sin embargo, esta asignación tendría que ser corroborada con el análisis de sus curvas de dicroísmo circular.<sup>99</sup>



Es evidente que el efecto paramagnético de H-6 en el derivado acetilado de **41** y **42**, no resulta un criterio contundente para establecer la ubicación relativa del hidroxilo y el metoxilo en el anillo A. El análisis de las dos únicas posibilidades para la ubicación de estos sustituyentes (Figura 11, Fórmulas parciales C y D), permitió deducir que el experimento de correlación heteronuclear a dos o tres ligaduras (HMBC) proporcionaría argumentos adicionales para la ubicación de los sustituyentes. Para el caso de que la estructura parcial C sea la correcta se observaría la correlación entre H-5 y el carbono ipso al hidroxilo en C-7. Para el caso de la estructura parcial D, se observaría la correlación del mismo protón con el carbono ipso al metoxilo.

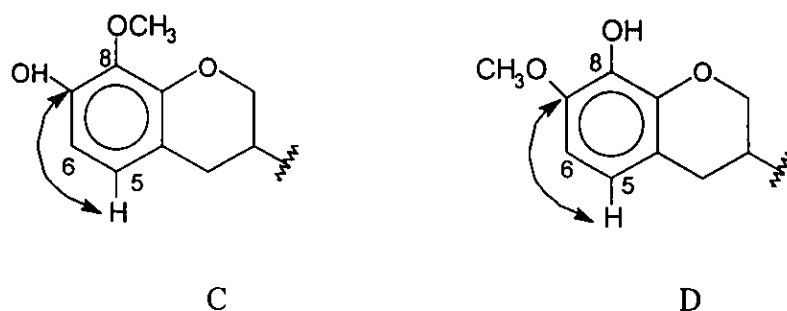


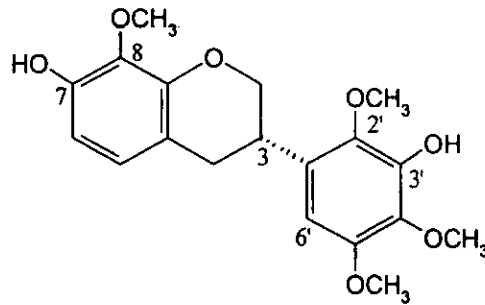
Figura 11. Correlaciones esperadas en el espectro HMBC de los protones del anillo A de los isoflavanos **41** y **42**.

Para llevar a cabo dicho análisis se requiere la asignación de todos los carbonos e hidrógenos de **41** y **42**, diferenciando concretamente entre los carbonos base de oxígeno C-7, C-8 y C-8a, mediante el análisis de sus espectros de RMN de correlación heteronuclear a una ligadura (HMQC) y a dos y tres ligaduras (HMBC).

De manera análoga, para la confirmación estructural del anillo B en **41** y **42**, es necesaria la asignación de las resonancias de los carbonos e hidrógenos, la cual permitirá el establecimiento de las conectividades moleculares.

Debido a la poca resolución obtenida en los espectros a 300 MHz de que se disponía (HETCOR y COLOC de **42**), se registraron los espectros de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz), RMN <sup>13</sup>C (125 MHz), NOESY NOEDIFF HMQC y HMBC de ambos isoflavanos. Asimismo, se registraron e interpretaron las curvas de dicroísmo circular de ambos compuestos para determinar su configuración absoluta.

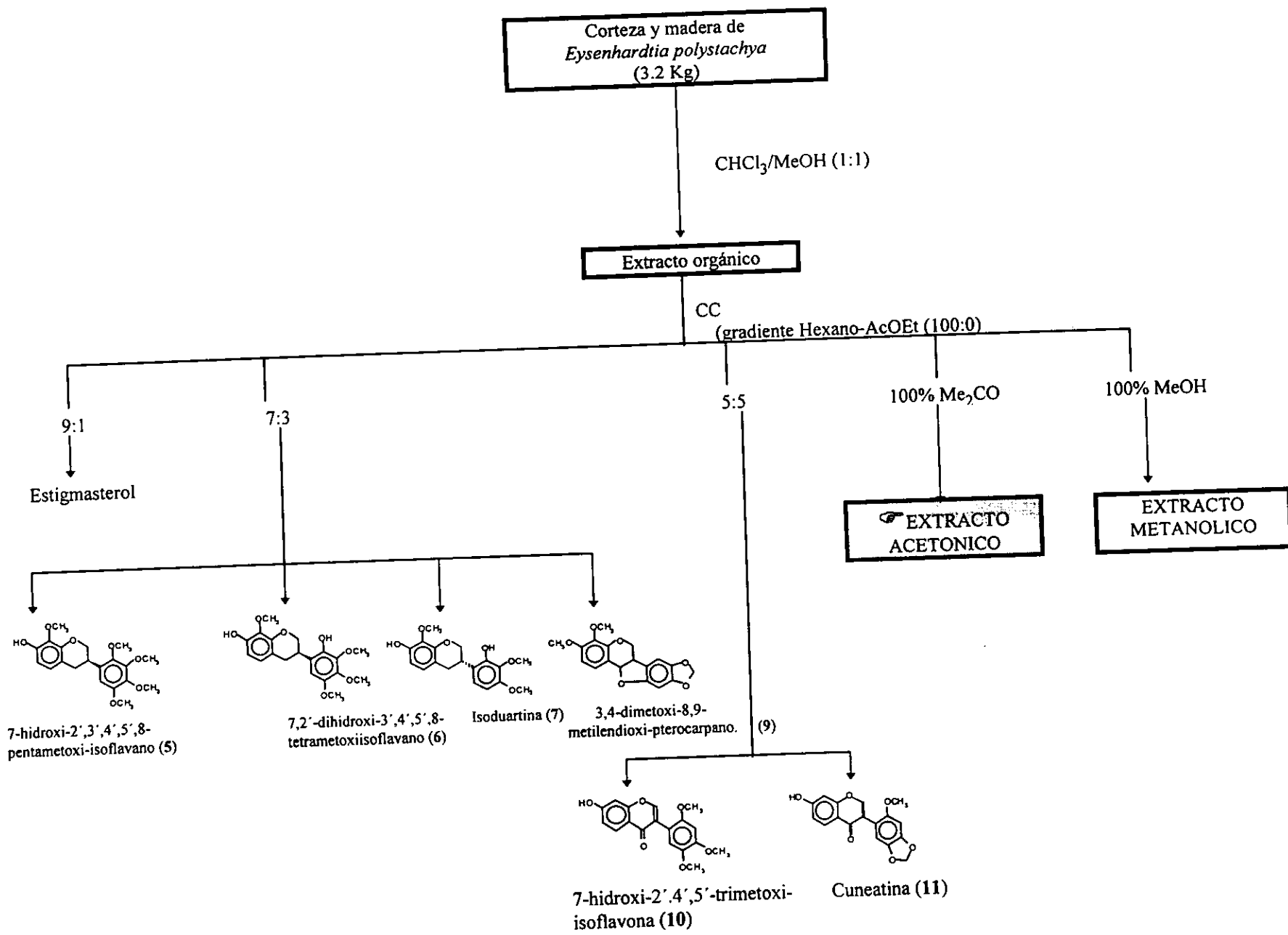
Al analizar cuidadosamente los espectros obtenidos, se confirmó plenamente la estructura del isoflavano **41** y se descubrió que en el isoflavano **42**, la ubicación del hidroxilo en C-2' debía modificarse a C-3', como se ilustra en la estructura **43**. Así mismo, se determinó la configuración absoluta de ambos compuestos.



**43**

A continuación se describen en detalle los resultados que permitieron, en primer lugar, confirmar la estructura de **41**; en segundo, asignar correctamente los carbonos base de metoxilo del anillo B, y modificar la estructura de **42** a **43**; y en tercero, determinar la configuración absoluta para estos compuestos.

Asimismo, se describe el aislamiento y caracterización estructural de los constituyentes presentes en la fracción soluble en acetona del extracto cloroformo-metanol (1:1) de *E. polystachya*.



Esquema 2. Extracción y fraccionamiento de la corteza y madera de *Eysenhardtia polystachya*

**Determinación de la Estructura Química y Estereoquímica de los isoflavanos 41 y 43 y evaluación de la actividad biológica de los constituyentes presentes en las fracciones menos polares de *E. polystachya*.**

Los resultados de esta parte del trabajo se enviaron recientemente para su publicación al *Journal of Natural Products*, cuyo manuscrito se anexa como publicación 2.

**Determinación de la Estructura Molecular y Estereoquímica del (+)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavano (41).**

Las asignaciones de las señales en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 500 MHz (Espectro 13) de este compuesto, se establecieron por comparación con las descritas anteriormente. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  junto con el experimento DEPT (Espectro 14, Tabla 2 de la Publicación No. 2) mostró, en la región de los carbonos aromáticos, siete carbonos unidos a oxígeno de los cuales uno es ipso a hidroxilo, uno base del oxígeno etéreo del anillo de dihidropirano (C-8a), y cinco se encuentran unidos a los cinco metoxilos que contiene la molécula. También se observan tres metinos y dos carbonos cuaternarios. Asimismo, se observan los dos metilenos alifáticos en  $\delta$  70.28 y  $\delta$  31.32 asignables a C-2 y C-4 del anillo heterocíclico respectivamente; y el metino bencílico C-3 en  $\delta$  31.84.

La asignación de los carbonos unidos a hidrógeno se realizó mediante las conectividades encontradas en el espectro de correlación heteronuclear a una ligadura (HMQC, Espectro 15), las cuales se enlistan en la Tabla 5. Las conectividades entre las señales de  $^1\text{H}$  de los metoxilos con sus respectivos carbonos se llevó a cabo mediante la expansión apropiada del espectro HMQC de esa región (Figura 12).

Mediante las expansiones apropiadas en el espectro HMBC (Espectro 16, Figura 13), fue posible observar las correlaciones a  $^3\text{J}$  entre los hidrógenos de los metoxilos y de cada uno de los carbonos que los soportan (Tabla 5).

Una vez diferenciados los cinco carbonos enlazados a los metoxilos, es claro que la señal en  $\delta$  147.60 corresponde al carbono unido a hidroxilo.

↙  
no  
DEPT

Tabla 5. Datos de RMN<sup>1</sup>H y correlaciones HMQC y HMBC de 41

Posición	$\delta_H$	HMQC, $\delta_C$	HMBC
H-5	6.72 d (8.5)	124.20	C-7, C-8a, C-6, C-5, C-4
H-6	6.52 d (8.5)	107.10	C-7, C-8, C-4a
H-6'	6.40 s	105.23	C-1', C-2', C-4', C-5'
H-2 $\alpha$	4.05 dd (10.5, 10.5)		C-8a, C-4, C-1'
		70.28	
H-2 $\beta$	4.39 ddd (10.5, 3.5, 1.0)		
H-3 $\beta$	3.61 dddd (10.5, 3.5, 5.5, 10.5)	31.84	C-2', C-6'
H-4 $\alpha$	2.96 ddd (16.0, 10.5, 1.0)		C-5, C-8a, C-1'
		31.32	
H-4 $\beta$	2.90 ddd (16.0, 5.5, 1.0)		
OMe	3.949 s	61.00	C-3'
OMe	3.919 s	60.90	C-8
OMe	3.893 s	61.89	C-4'
OMe	3.837 s	61.51	C-2'
OMe	3.788 s	56.25	C-5'

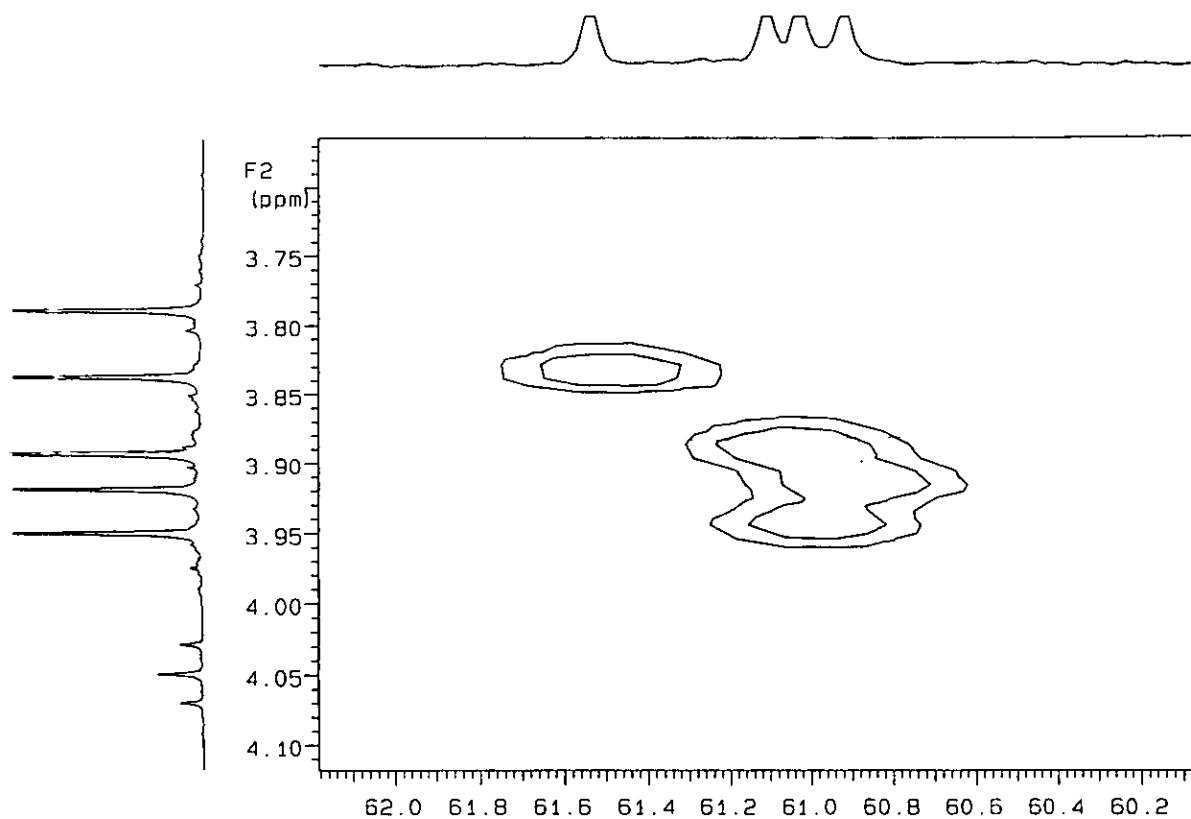


Figura 12. Expansión de la región de los metoxilos en el espectro HMOCC de **41**

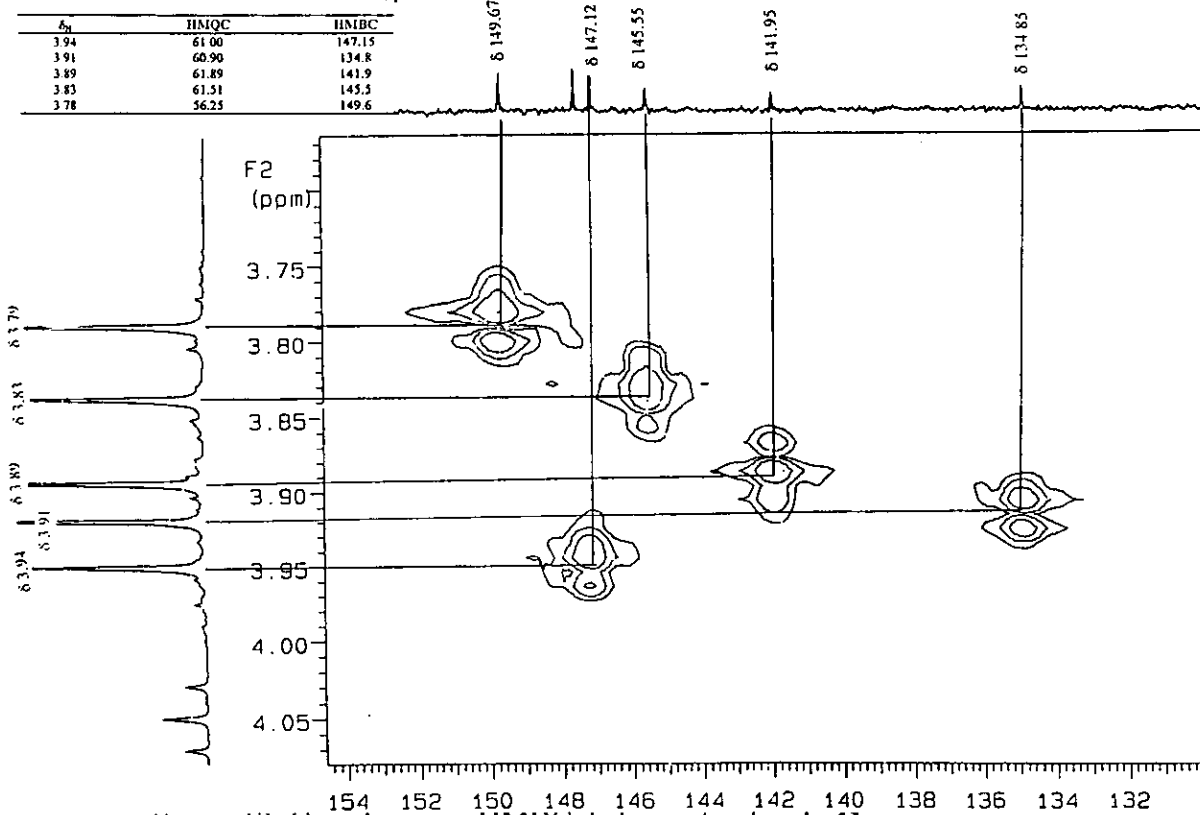


Figura 13. Correlaciones HMBC de los metoxilos de **41**.

Para la asignación de los carbonos unidos a oxígeno del anillo A, se tomaron como base los hidrógenos *orto* en  $\delta$  6.72 y  $\delta$  6.52, correspondientes a H-5 y H-6 respectivamente (Figura 14). H-5 mostró correlación  $^3J$  con el carbono unido al hidroxilo en  $\delta$  147.60, con uno de los carbonos en 147.12 ó 147.15 ( $^3J$ ), con los metinos en  $\delta$  107.1 (C-6,  $^2J$ ) y  $\delta$  124.2 (C-5), y con el metileno de C-4 ( $\delta$  31.32,  $^3J$ ); mientras que H-6 mostró correlación  $^2J$  con el carbono enlazado con el hidroxilo ( $\delta$  147.60), con el carbono base de metoxilo en  $\delta$  134.8 ( $^3J$ ), y con el carbono cuaternario en  $\delta$  115.04 ( $^3J$ ). Estas correlaciones confirman, en primer lugar, la asignación del doblete centrado en  $\delta$  6.72 a H-5, ya que sólo en esa posición correlacionaría con el metileno de C-4; y en segundo lugar, la ubicación relativa del hidroxilo y del metoxilo en C-7 y C-8 respectivamente. Por otro lado, la interacción a  $^3J$  observada entre el metileno alifático de C-2 ( $\delta$  4.39, H-2 $\beta$ ) y el carbono aromático cuaternario en  $\delta$  147.15 (Figura 15), permitió asignar esta última señal a C-8a y diferenciarla de la de C-3' con desplazamiento químico similar ( $\delta$  147.12, *vide infra*). Asimismo, la correlación ( $^3J$ ) de H-6 con el carbono cuaternario en  $\delta$  115.04, permitió asignar esta última señal como C-4a (Tabla 5)

Para establecer la sustitución presente en el anillo B de **41**, también fue de utilidad el espectro de correlación heteronuclear a dos y tres ligaduras (HMBC), junto con las expansiones apropiadas en el experimento NOESY (Espectro 17). De las tres posibilidades de ubicación de los sustituyentes en el anillo B (estructuras parciales E, F y G, Figura 16), se eligió E debido a las siguientes evidencias:

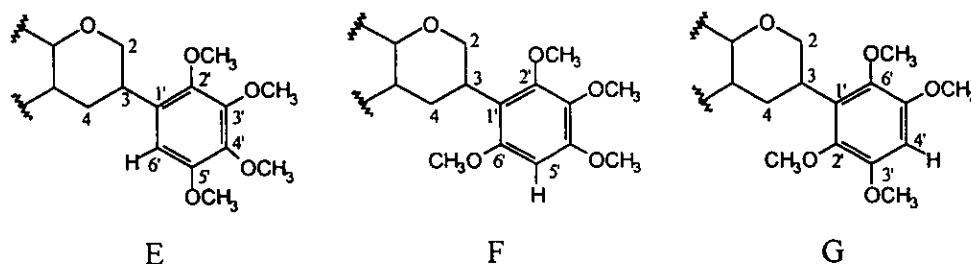


Figura 16. Estructuras probables para el anillo B de **41**.

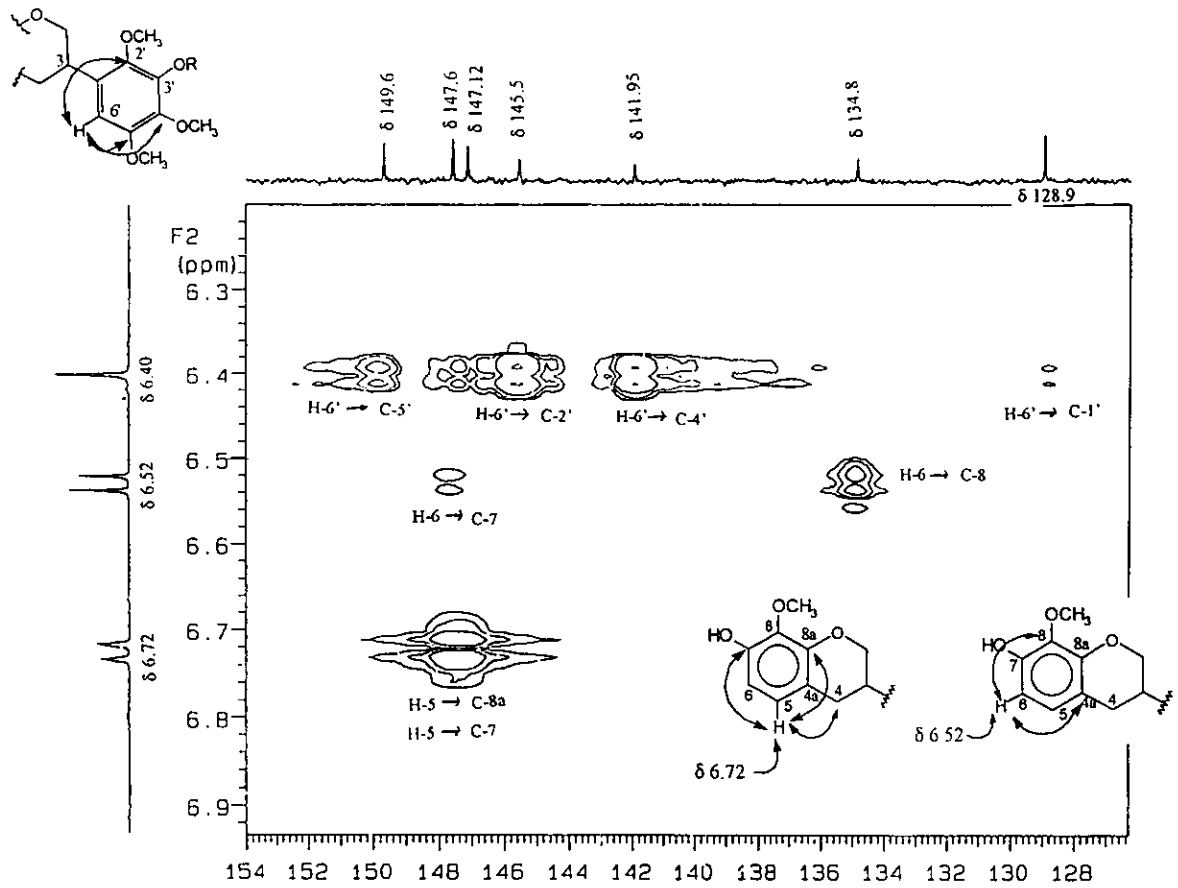


Figura 14. Correlaciones HMBC de H-5 y H-6 de 41.

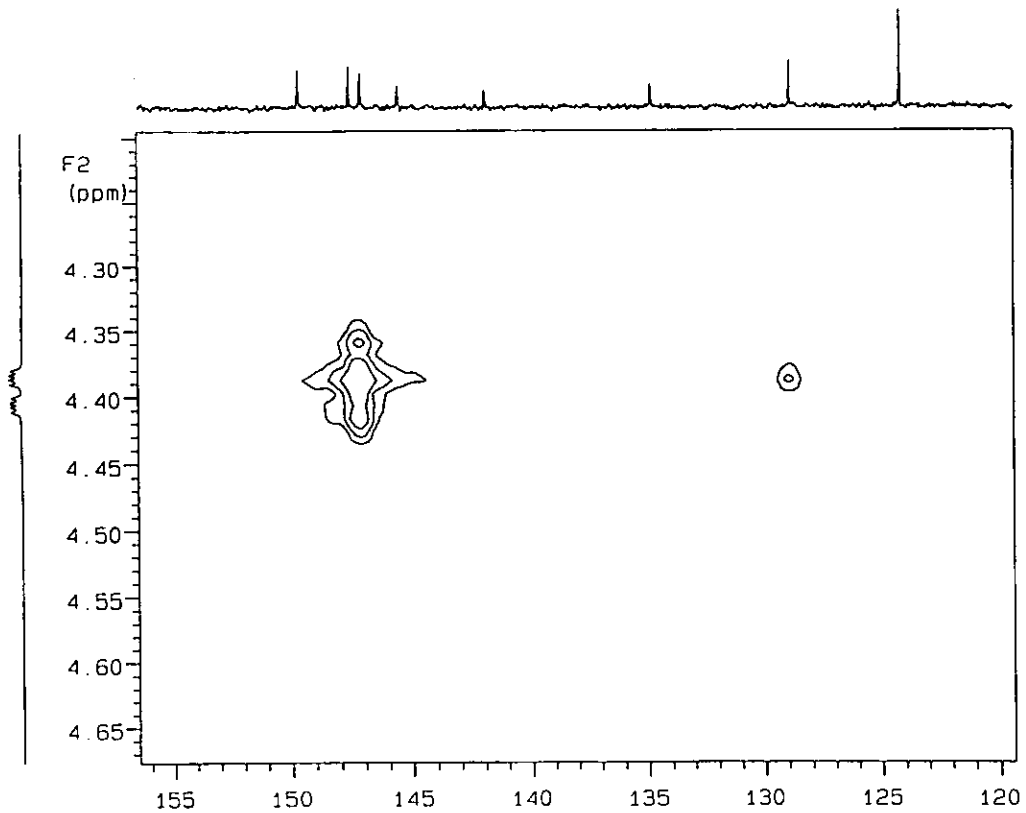


Figura 15. Interacción a  $^3J$  entre H-2 $\beta$  y C-8a



Las conectividades observadas en el espectro HMBC entre el protón bencílico H-3 ( $\delta$  3.61) con el único metino aromático ( $\delta$  105.23) y con el carbono base de metoxilo en  $\delta$  145.5, permitió establecer el patrón de sustitución 2',3',4',5' en el anillo B (Figura 17).

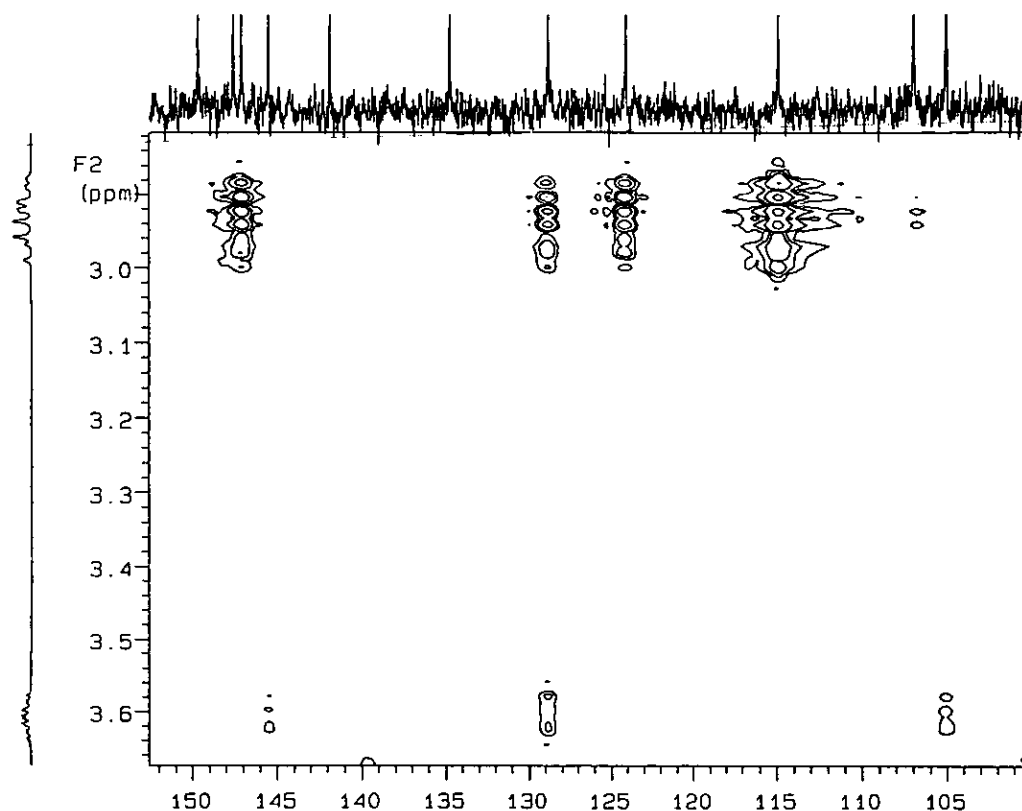


Figura 17. Conectividades a  $^3J$  de H-3 con C-2' y C-6' del anillo B

Las conectividades a  $^2J$  y  $^3J$  observadas para H-6' (Tabla 5, Figura 18) permitieron la asignación en primera instancia del carbono cuaternario C-1' ( $\delta$  128.9) y del carbono unido al metoxilo C-2' ( $\delta$  145.5), mientras que las tres señales que restan por asignar en este anillo ( $\delta$  149.6, 147.12 y 141.9) fueron diferenciadas utilizando el experimento NOESY (Espectro 17, Figura 19) en el que se observa que el hidrógeno aromático H-6' interacciona con el metoxilo en  $\delta$  3.78, que a su vez correlaciona con el carbono en  $\delta$  149.65 (HMBC, Tabla 5), el cual queda asignado a C-5';<sup>100</sup> por lo tanto, la señal en  $\delta$  141.9 corresponde entonces a C-4'. Finalmente, la interacción NOE entre el metoxilo de C-2' ( $\delta$  3.83) con el metoxilo en  $\delta$  3.94, permite asignar la señal de  $\delta$  147.12 para C-3'.

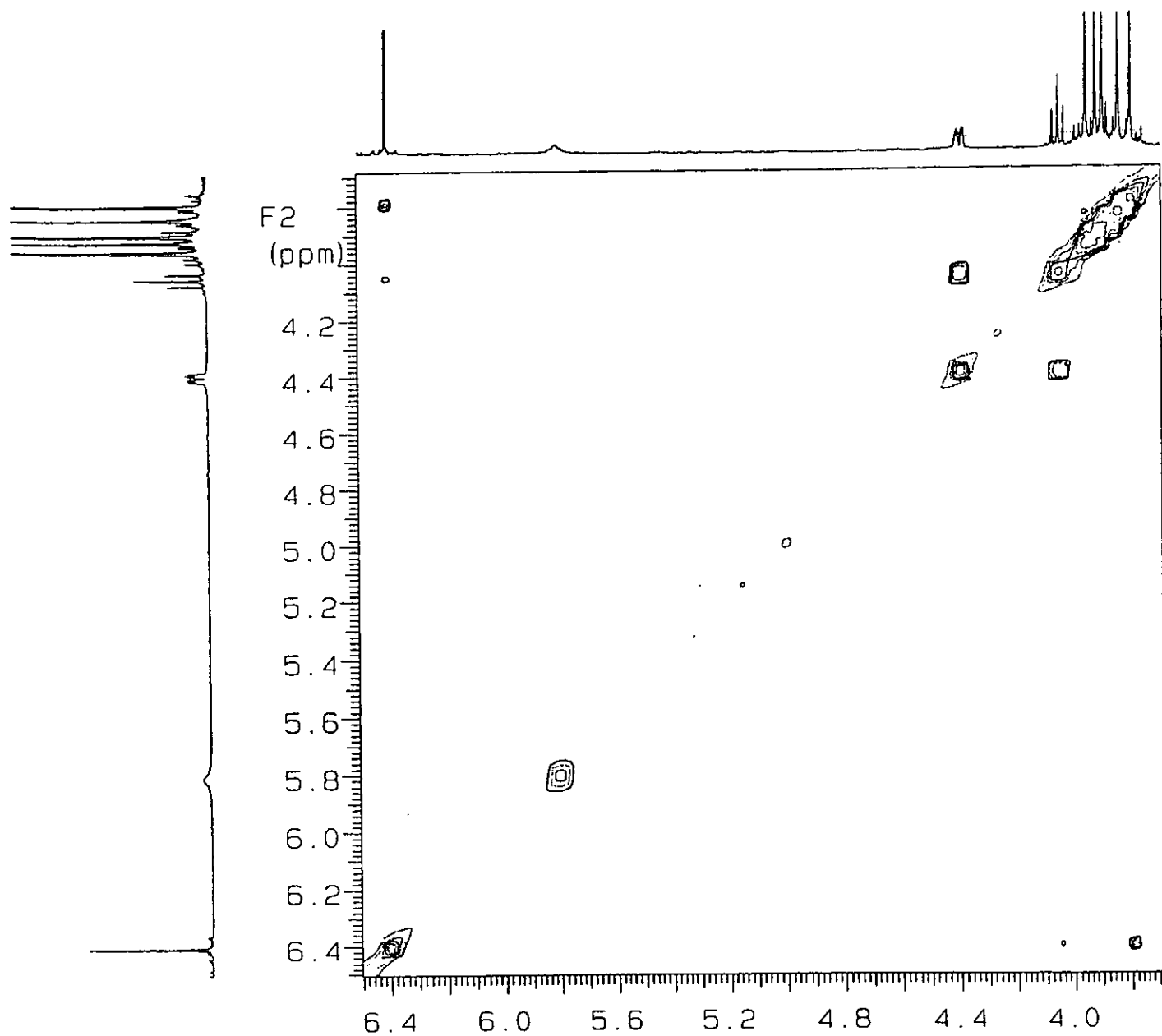


Figura 19. Interacciones en el espectro NOESY de H-6'

Por otro lado, el espectro de RMN <sup>1</sup>H de 41 muestra, en la región de los protones alifáticos un sistema ABMXY, el cual se discute a continuación: en  $\delta$  4.39 y  $\delta$  4.05,

aparecen las señales asignables a los hidrógenos del metileno en C-2 (parte AB); el primero de ellos (*ddd*), presenta constantes de acoplamiento debidas a interacciones *gem* ( $J_{2\alpha,2\beta} = 10.5$  Hz), *axial-ecuatorial* ( $J_{2\beta,3\beta} = 3.5$  Hz) y a larga distancia ( $J = 1.0$  Hz), por lo que se asigna a H-2 $\beta$ ; el segundo, aparece como un triplete con constantes de acoplamiento *gem* ( $J = 10.5$  Hz) y *diaxial* ( $J_{2\alpha,3\beta} = 10.5$  Hz) por lo que se asigna a H-2 $\alpha$ . En  $\delta$  3.61 se observa un *dddd* con constantes de acoplamiento de 10.5, 3.5, 5.5 y 10.5 Hz, y se asigna a H-3 (Parte M); los hidrógenos del metileno en C-4 (parte XY) se observan en  $\delta$  2.96 (1H, *ddd*,  $J = 16.0, 10.5, 1.0$  Hz, H-4 $\alpha$ ) y  $\delta$  2.90 (1H, *ddd*,  $J = 16.0, 5.5, 1.0$  Hz, H-4 $\beta$ ). Estas asignaciones fueron corroboradas por el experimento NOESY (Espectro 19), ya que se observan las conectividades entre cada uno de estos hidrógenos; además, se observa interacción entre la señal de H-3 con el metoxilo unido a C-2' ( $\delta$  3.83). El hidrógeno aromático en  $\delta$  6.41 (H-6') muestra interacción con H-2 $\alpha$  ( $\delta$  4.05) y con el metileno en C-4. Para determinar cual de los hidrógenos de C-4 interacciona con H-6' y H-2 $\alpha$ , en un experimento NOEDIFF (Figura 20), se irradió el protón asignado a H-6', observándose un incremento en el tamaño de las señales en  $\delta$  2.96 y  $\delta$  4.05 que corresponden a H-4 $\alpha$  y H-2 $\alpha$  respectivamente. Las constantes de acoplamiento de estos hidrógenos ( $J_{4\alpha,3\beta} = J_{2\alpha,3\beta} = 10.5$  Hz) indican su relación antiperiplanar, lo que permite establecer que el anillo de dihidropirano adopta la conformación de media silla<sup>101</sup> en la que el grupo arilo en C-3 ocupa la posición ecuatorial como se ilustra en la figura 1 de la publicación No 2.

Por lo tanto, la estructura para este isoflavano se establece como la (+)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavano, restando hasta este momento de la discusión, establecer la configuración absoluta del centro estereogénico C-3.

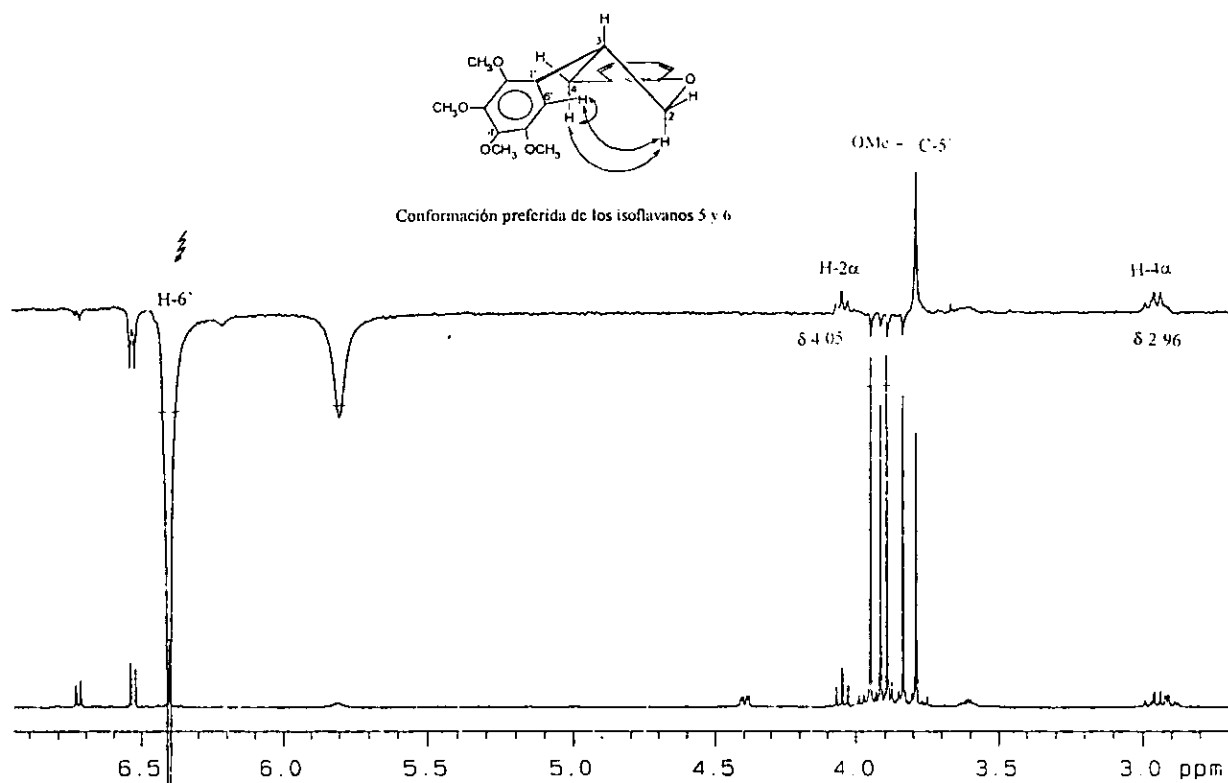


Figura 20. Interacciones NOE de H-6' de 41.

#### ***Determinación de la configuración absoluta de 41.***

La configuración absoluta de los isoflavanos ha sido determinada mediante la interpretación de sus curvas de dispersión óptica rotatoria (DOR) o de dicroísmo circular (DC).<sup>99</sup> Los espectros mencionados de los isoflavanos muestran al menos dos transiciones electrónicas diferentes, una cerca de 290 nm y la otra cerca de 230 nm,<sup>99,102-102</sup> debidas a los anillos aromáticos cromóforos presentes en la molécula. Hasta el momento se ha determinado la configuración absoluta de aproximadamente 49 isoflavanos utilizando esta técnica; en algunos casos, ésta ha sido corroborada mediante correlación química con pterocarpanos o degradación química.<sup>104</sup>

Comparando las curvas de DC y de DOR de algunos isoflavanos descritos en la literatura [Tabla 6 para isoflavanos con configuración (3*R*) y tabla 7 para isoflavanos con configuración (3*S*)], es posible encontrar una regla en su comportamiento, ya que como puede observarse en las tablas mencionadas, los isoflavanos con configuración (3*R*) muestran un efecto Cotton negativo en la región cercana a 230 nm, y un efecto Cotton

positivo en la región cercana a 290 nm; mientras que los isoflavanos con configuración (3S), presentan efectos Cotton con signos opuestos en esas regiones.

La presencia del grupo prenilo en un isoflavano desplaza la frecuencia de absorción con respecto a los isoflavanos no prenilados; se ha observado que el espectro de dicroísmo circular de los isoflavanos prenilados que tienen configuración (3R) como 51, 60-64, 74, 79 y 80 muestran un efecto Cotton negativo en la región de 236-278 nm y un efecto Cotton positivo en la región de 281-294 nm..

Los espectros de dicroísmo circular de pirano y furano isoflavanos (compuestos 65-70, y 75-77 de la tabla 6) muestran un comportamiento "anormal", por lo que la configuración absoluta de algunos de ellos ha sido establecida mediante correlaciones químicas con isoflavanos prenilados. Hasta el momento, no se ha establecido una regla para su comportamiento en esta técnica.

Finalmente, recientemente se aislaron isoflavanos con un grupo formilo en su estructura (compuestos 71-73 de la tabla 6). La configuración absoluta de 71 y 72, cuyos espectros de CD fueron similares, fue establecida mediante la correlación química de 71 con 74. El espectro de CD de 73 fue diferente, mostrando efecto Cotton positivo a 277 nm y negativo a 298 nm; en este caso, los autores sugieren que estos máximos en el espectro se deben al involucramiento del efecto Cotton de Davydov-split entre el aldehído y el cromóforo aromático, el cual debe analizarse por el método de la quiralidad excitada, lo cual no fue realizado por los autores del trabajo.

Por otro lado, la interpretación de las curvas de dicroísmo circular de los isoflavanos requiere conocer la conformación preferida del anillo de dihidropirano.<sup>106</sup> Se ha informado que algunos isoflavanos presentan movilidad conformacional, ocasionando que las curvas de dicroísmo circular de los mismos presenten un comportamiento "anómalo", en comparación con las de los isoflavanos descritos en la tabla 7.<sup>130</sup>

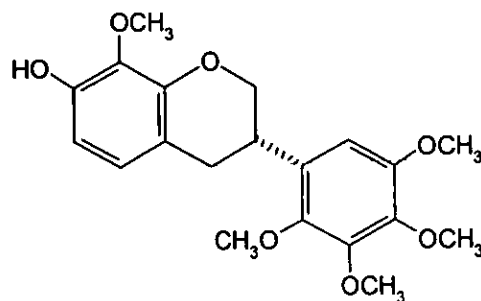
Como se discutió anteriormente (*vide supra*), 41 presenta una conformación preferida (Figura 1 de la publicación No. 2), por lo que su curva de dicroísmo circular puede ser interpretada sin ambigüedades. La curva de DC de este compuesto (Figura 21), muestra un efecto Cotton positivo a 226 nm  $[\theta] = 0.4130$  (pico) y otro negativo a 294 nm  $[\theta] = -1.1193$  (valle), la similitud con las curvas de dicroísmo circular de isoflavanos-

51 es (3S) no prenilado  
70 es prenilado

La tabla 6, comp. 71-73  
2047

de la tabla 6, comp. 71-73  
41 - 294 nm

(3*S*) (Tabla 7) establece que la configuración absoluta en C-3 es también (*S*), por lo que a la estructura de este compuesto le corresponde el nombre de (3*S*)-(+)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavano (**41**), el cual no ha sido descrito anteriormente en la literatura, por lo que representa un nuevo metabolito secundario.



**41**

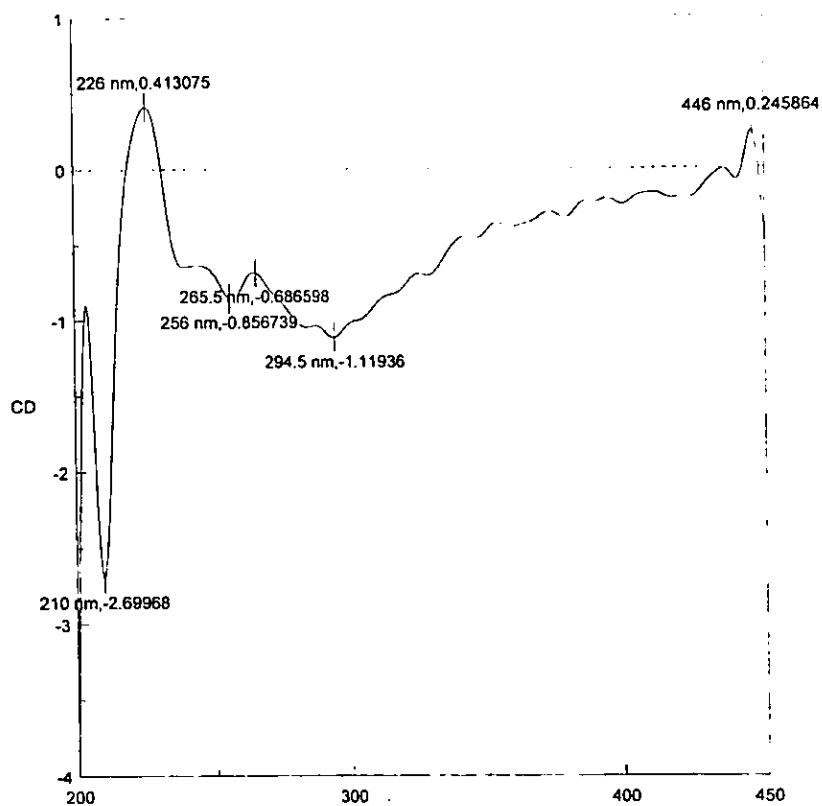


Figura 21. Espectro de dicroísmo circular de **41**.

Tabla 6. (3*R*)-isoflavanos

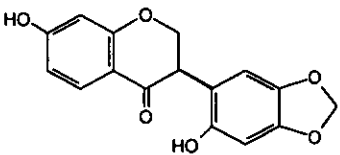
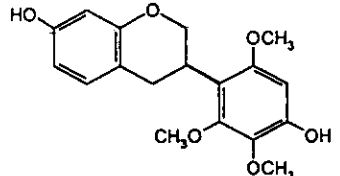
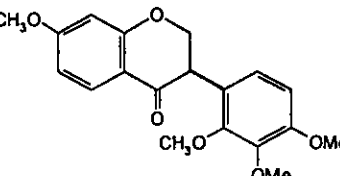
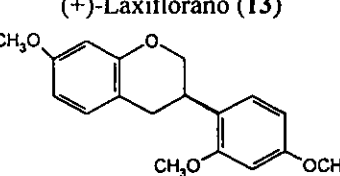
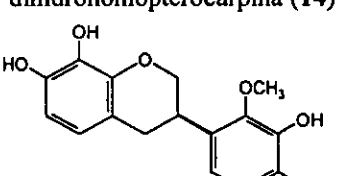
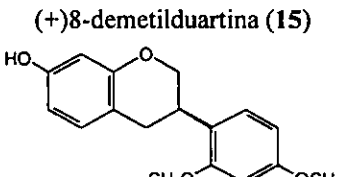
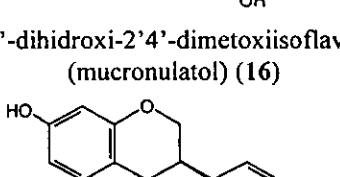
Nombre	Efecto Cotton	Referencia
 (-)-dihydropterocarpina (11)	-8000 (236) +2800 (288)	99, 111
 (+)-lonchocarpano (12)	+4310 (244) +1295 (292)	112
 (+)-Laxiflorano (13)	-1850 (267) no indican	112
 dihidrohomopterocarpina (14)	-1850 (267) +775 (300)	112
 (+)8-demetilduartina (15)	-3200 (227) +3400 (279)	111
 7,3'-dihidroxí-2'4'-dimetoxiisoflavano (mucronulatol) (16)	-3140 (270) +3850 (290)	113
 Vestitol (17)	+925 (291)	114

Tabla 6. (3*R*)-isoflavanos. Continuación

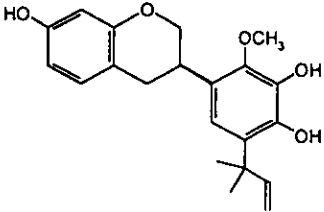
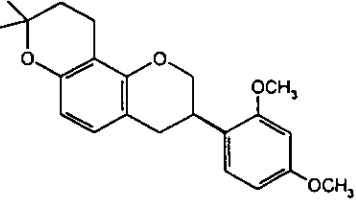
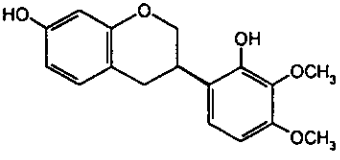
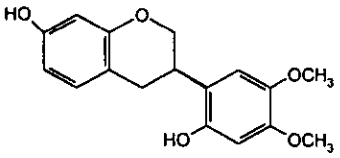
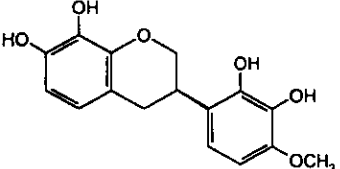
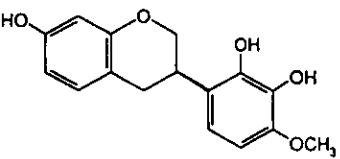
Compuesto	Efecto	Cotton	Referencia
 <p><math>\alpha,\alpha</math>-dimetilalilciclobina (18)</p>	-8900 (250)	+19580 (300)	114
 <p>(+)-glabridina (19)</p>		+19000 (290)	115
 <p>(-)-isomucronulatol (20)</p>	-11800 (230)	+3500 (284) MeOH	116
 <p>(-)-5'-metoxivestitol (21)</p>	-33000 (237)	+4300 (290) MeOH	117
 <p>(-)-3',8-dihidroxivestitol (22)</p>	-18200 (232)	+4300 (242) MeOH	117
 <p>(-)-2',3',7-trihidroxi-4'-metoxiisoflavano (23)</p>	-20600 (234)	+3600 (288) DMSO	117



Tabla 6. (3*R*)-Isoflavanos. Continuación

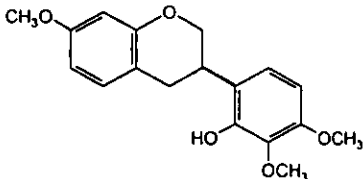
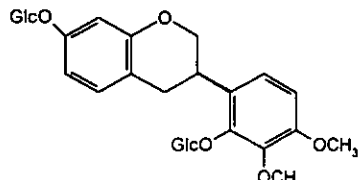
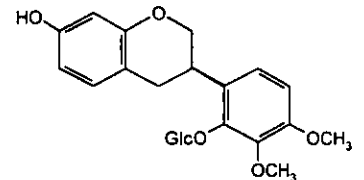
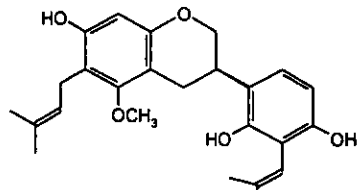
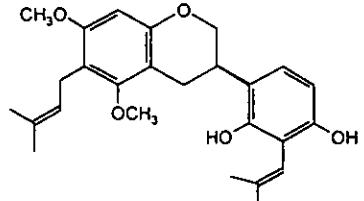
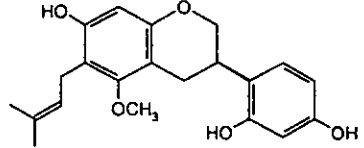
Compuesto	Efecto	Cotton	Referencia
 (-)-7-O-metilisomucronulatol (24)	-5630 (227)	+1040 (281) MeOH	118
 (-)-7,2'-di-O-glucosido de isomucronulatol (25)	-5630 (227)	+1040 (280) MeOH	118
 (-)-2',5'-di-O-glucosido de 5'-hidroxiisomucronulatol (26)	-4250 (227)	+1820 (280) MeOH	118
 Licoricidina (27)	-1500 (272)	+2100 (288)	119
 licorisoflavano A (28)	-1400 (275)	+1900 (286)	119
 gliasperina C (29)	-2400 (275)	+1600 (289)	119

Tabla 6. (3*R*)-Isoflavanos. Continuación

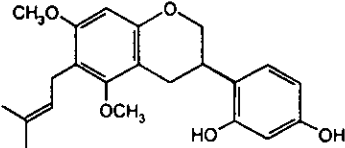
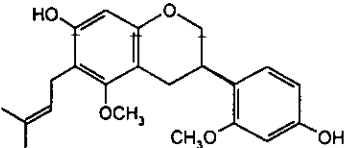
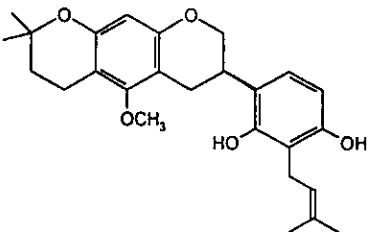
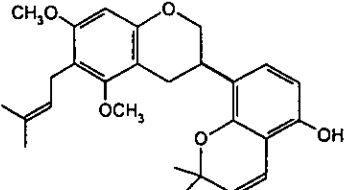
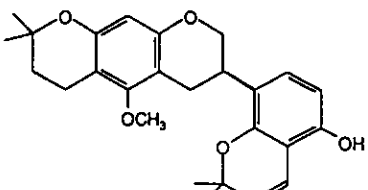
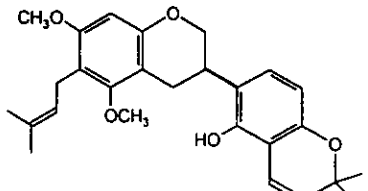
Compuesto	Efecto	Cotton	Referencia
 Glyasperina D (30)	-1900 (274)	+1100 (288)	119
 glyasperina Y (31)	-2000 (275)	+1100 (288)	119
 (+)-kanzonol H (32)	-1700 (273)	+2500 (287)	119
 Kanzonol I (33)	-4500 (240)	+840 (270) +2500 (287)	119
 Kanzonol J (34)	-4600 (240)	+2700 (270)	119
 16 (35)	-6600 (240)	+2700 (270)	119

Tabla 6. (3*R*)-Isoflavanos. Continuación

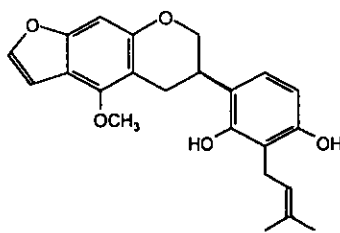
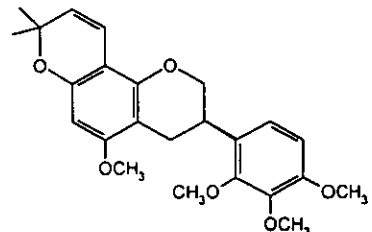
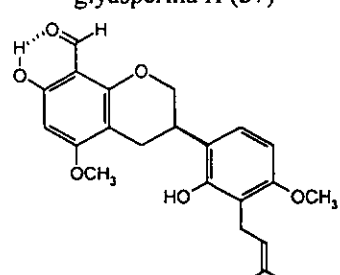
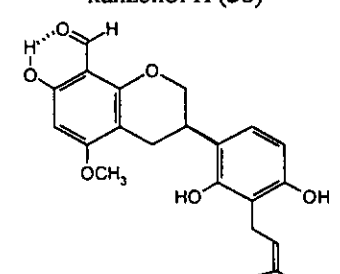
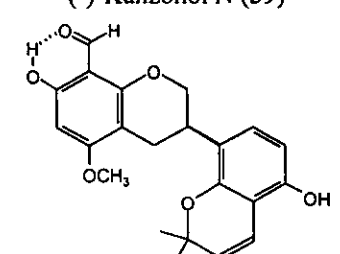
Compuesto	Efecto	Cotton	Referencia
 glyasperina G (36)	+670 (242)	+100 (276)	119
 glyasperina H (37)	+130 (255)	+200 (290)	119
 kanzonol H (38)	-570 (276)	+700 (289) MeOH	120
 (-)-Kanzonol N (39)	+6400 (288)	-4700 (310) MeOH	120
 (-)-Kanzonol O (40)	+620 (277)	-800 (298) MeOH	120

Tabla 6. (3*R*)-Isoflavanos. Continuación

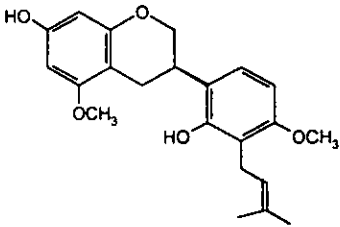
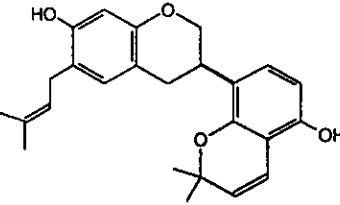
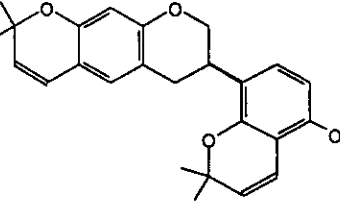
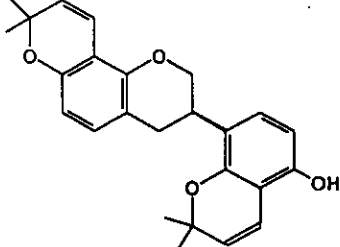
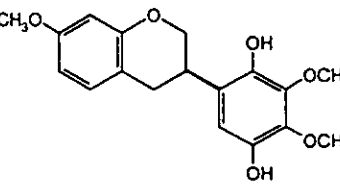
Compuesto	Efecto	Cotton	Referencia
 (-)-Kanzonol R (41)	+1200 (278)	-940 (294)	120
 (+)-glyinflanina I (42)	-7900 (236)	+1800 (284) MeOH	121
 (+)-glyinflanina J (43)	-5400 (236)	+3500 (287) MeOH	121
 (+)-glyinflanina K (44)	-18000 (237)	+2600 (268) -10000 (284)	121
 colutehidroquinona (45)	-8900 (231)	+600 (256) MeOH	122

Tabla 6. (3*R*)-Isoflavanos. Continuación

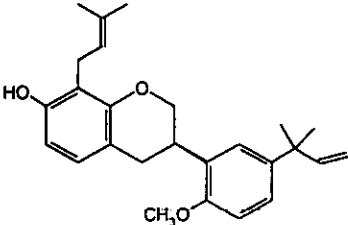
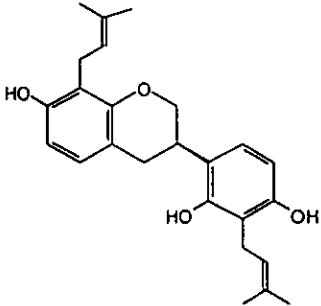
Compuesto	Efecto	Cotton	Referencia
 <p>(-)-tenuifolina A (46)</p>	-7590 (236)	+2301 (281) MeOH	123
 <p>(+)-tenuifolina B (47)</p>	-30360 (220)	+2640 (283) MeOH	123

Tabla 7. (3S)-isoflavanos

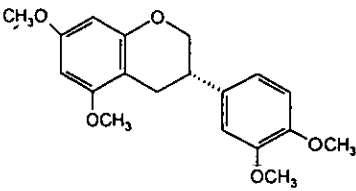
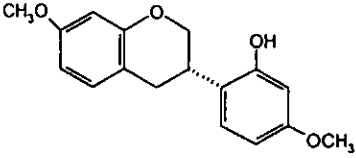
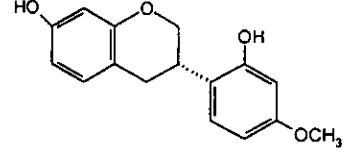
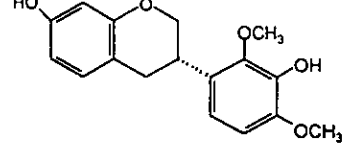
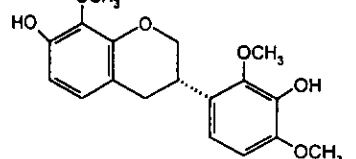
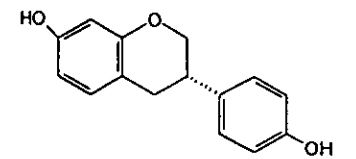
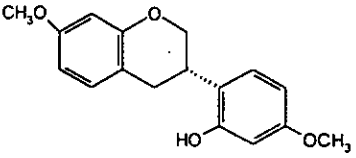
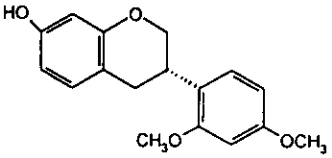
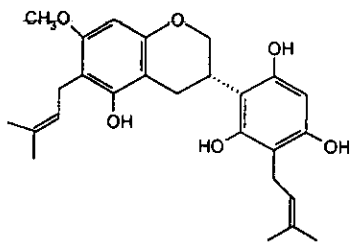
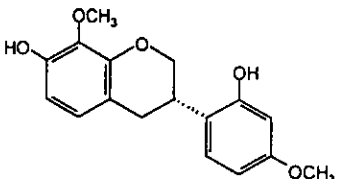
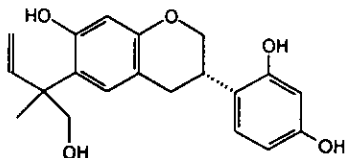
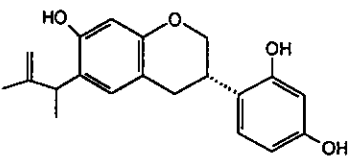
Compuesto	Efecto	Cotton	Referencia
 (+)-5,7,3',4'-tetrametoxiisoflavano (48)	+4600 (236)	-1400 (280)	99, 111
 (-)-dihidrohomopterocarquina (49)	+ (~260)	- (~280)	124
 (+)-vestitol (50)	+ (~260)	- (~280)	124
 (-)-mucronulatol (51)	+5330 (278)	-2960 (292) no disolvente	125
 (-)-duartina (52)	+ (~260) no ponon	- (~280) disolvente	124
 (-)-equol (53)	+3500 (267)	-2500 (290) no disolvente	126
 2'-hidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavano (54)	+ (~260)	- (~280) no solvente	124
	-3720 (256)	-392 (333) no solvente	127
	+2500 (236)	-3500 (280)	99
	+2500 (236)	-3500 (280)	111
	+1980 (270)	-2760 (284)	128

Tabla 7. (3S)-isoflavanos. Continuación

Compuesto	Efecto	Cotton	Referencia
 <p>2'-O-metilvestitol (55)</p>	-7200 (283)		114
 <p>(-)-kanzonol G (56)</p>	+1900 (293)	-800 (333)	119
 <p>(-)-8-metoxivestitol (57)</p>	+3865 (284) MeOH		125
 <p>(-)-millinolol (58)</p>	+1300 (288) MeOH		129
 <p>(-)-neomillinolol (59)</p>	+1239 (287) MeOH		129

**Elucidación estructural del (3*S*)- 3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxi-isoflavano (43)**

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  A 500 MHz (Espectro 18) de este compuesto, muestra las señales para el sistema AB de los hidrógenos H-5 y H-6 del anillo A en  $\delta$  6.66 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz) y  $\delta$  6.49 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz) respectivamente. En  $\delta$  6.46 aparece el singulete correspondiente al hidrógeno del anillo B. Los cuatro metoxilos presentes en la molécula se observan como singuletes en  $\delta$  3.81, 3.87, 3.90 y 3.92. Estas evidencias indicaron que el patrón de oxigenación en los anillos aromáticos de este compuesto es idéntico al de 41. Los hidrógenos del anillo de dihidropirano se encuentran formando un sistema ABMXX' en donde la parte AB del sistema está formada por los hidrógenos del metileno en C-2, cuyas señales se observan en  $\delta$  4.35 (1H, ddd,  $J = 10.5, 3.0, 1.5$ ) y  $\delta$  3.94 (1H, t,  $J = 10.5$  Hz); las constantes de acoplamiento observadas para cada uno de ellos, permite asignarlos a H-2 $\alpha$  y H-2 $\beta$  respectivamente; este último protón muestra una constante de acoplamiento pequeña ( $J = 1.5$  Hz), la cual, al igual que para el isoflavano 41 (*vide supra*), se atribuye al acoplamiento de tipo W con H-4 $\beta$ , lo que indica que la conformación de este compuesto debe ser similar a la descrita para 41. La parte MXX' del sistema antes mencionado, se encuentra formada por los hidrógenos del metino en C-3 y el metileno en C-4, cuyas señales se observan en  $\delta$  3.54 (1H, *m*, H-3) y  $\delta$  2.83 (2H, *m*, H-4). La asignación de estas señales fueron corroboradas mediante sus conectividades en los espectros NOESY (Espectro 19), HMQC (Espectro 21) y HMBC (Espectro 22, Tabla 8).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT (Espectro 20, Tabla 1 de la publicación No. 2), se observan las señales correspondientes a los carbonos del compuesto en estudio, las cuales se encuentran señaladas con un asterisco. En la región de los carbonos aromáticos se observan siete señales para carbono cuaternario unido a oxígeno, tres metinos y dos carbonos cuaternarios no unidos a oxígeno.<sup>131</sup> También se observan cuatro señales características de metoxilo y, en la región de los carbonos alifáticos, dos metilenos ( $\delta$  70.02 y 31.26) asignables a C-2 y C-4 respectivamente, y un metino que se asigna a C-3 del anillo C.



La asignación de los tres metinos aromáticos en  $\delta$  123.97 a C-5, en  $\delta$  107.61 a C-6' y en  $\delta$  107.20 a C-6; se llevó a cabo mediante las conectividades encontradas en el espectro HMQC (Espectro 21) con los protones en  $\delta$  6.66, 6.46 y 6.49 respectivamente. Asimismo, la expansión de la región  $\delta$  59.8 y  $\delta$  62.0 en este mismo espectro (Figura 22), permitió observar las conectividades entre los metilos de los metoxilos y sus respectivos carbonos (Tabla 8).

Para diferenciar los carbonos unidos a metoxilo de los que están unidos a hidroxilo, se registró la expansión de la zona de metoxilos en el espectro HMBC (Figura 23), en donde se observa la correlación a  $^3J$  entre  $\delta$  3.81 con  $\delta$  144.41,  $\delta$  3.87 con  $\delta$  134.77,  $\delta$  3.90 con  $\delta$  138.99 y  $\delta$  3.92 con  $\delta$  146.00; por lo que, de los tres carbonos enlazados a oxígeno restantes ( $\delta$  147.41, 146.95 y 145.42), dos pertenecen a los carbonos unidos a hidroxilo y uno a C-8a.

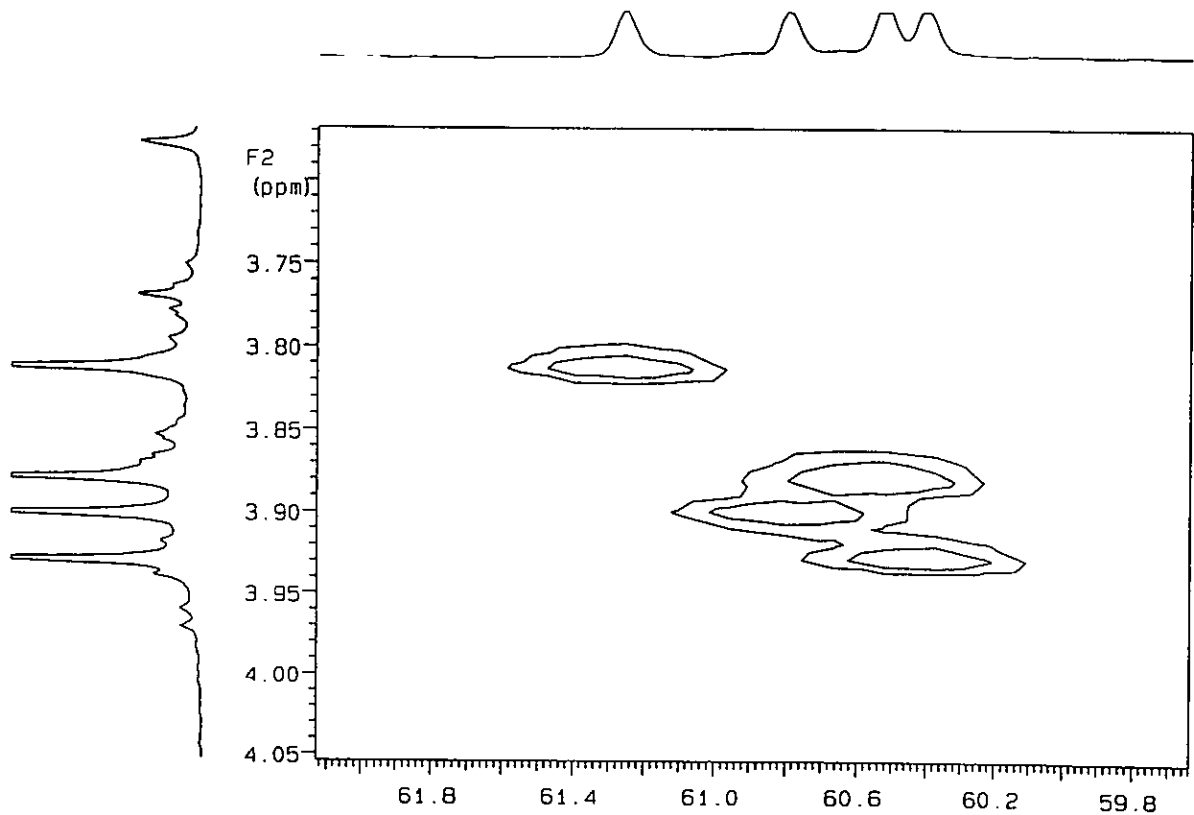


Figura 22. Expansión de la región entre  $\delta$  59.8-62 en el espectro HMQC de 43.

Tabla 8. Conectividades HMQC y HMBC del isoflavano 43

HMBC $\delta_c$	$\delta_H$	Asignación	HMQC $\delta$ (DEPT)	Asignación
C-7, C-8a, C-6, C-4	6.66, d (8.5)	H-5	123.97 (CH)	C-5
C-7, C-8, C-4a	6.49, d (8.5)	H-6	107.20 (CH)	C-6
C-5', C-2', C-4'	6.46, s	H-6'	107.61 (CH)	C-6'
C-8a, C-3	4.35, ddd (10.5, 3.0, 1.5)	H-2 $\beta$	70.02 (CH <sub>2</sub> )	C-2
	3.94, t (10.5)	H-2 $\alpha$		
C-2', C-1', C-6', C-2, C-4	3.54, m	H-3	31.19 (CH)	C-3
C-5, C-4a, C-2, C-3	2.83, m 2H	H-4	31.26 (CH <sub>2</sub> )	C-4
C-5'	3.92, s 3H	OCH <sub>3</sub>	60.40 (CH <sub>3</sub> )	
C-4'	3.90, s 3H	OCH <sub>3</sub>	60.79 (CH <sub>3</sub> )	
C-8	3.87, s 3H	OCH <sub>3</sub>	60.53 (CH <sub>3</sub> )	
C-2'	3.81, s 3H	OCH <sub>3</sub>	61.25 (CH <sub>3</sub> )	

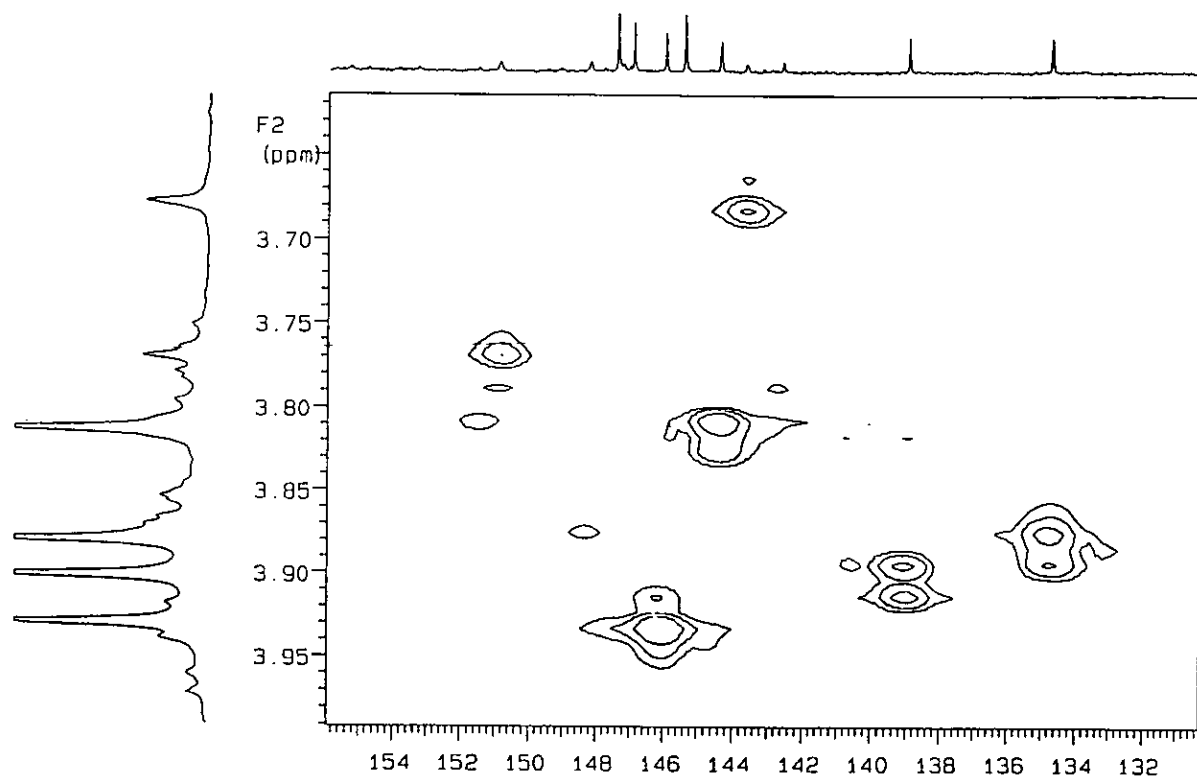


Figura 23. Expansión de la zona de metoxilos del espectro HMBC

Para asignar los carbonos cuaternarios C-4a, C-7, C-8 y C-8a del anillo A en el espectro HMBC, al igual que para el compuesto **41** anteriormente discutido, se tomó como base del análisis los protones del sistema AB en  $\delta$  6.66 y  $\delta$  6.49, como se indica a continuación: La señal en  $\delta$  6.66 fue asignada H-5, ya que mostró interacción con el metileno asignado a C-4 ( $\delta$  31.26); H-5 también correlaciona con los metinos en  $\delta$  107.20 y 123.9, los cuales, en base a sus conectividades en el espectro HMQC (Tabla 8) corresponden a C-6 y C-5 respectivamente; y con los carbonos enlazados a oxígenos en  $\delta$  147.41 y 146.95. La asignación de estas dos últimas señales, a C-7 y C-8a respectivamente, se basó en la correlación a  $^2J$  observada entre H-6 y la señal en  $\delta$  147.41; además que también se observa correlación entre H-2 ( $\delta$  4.35) y  $\delta$  146.95. Las señales en  $\delta$  134.77 (carbono unido a metoxilo) y  $\delta$  114.86, que correlacionan también con H-6 se asignaron a C-8 y C-4a respectivamente. Estas correlaciones se ilustran en la figura 24.

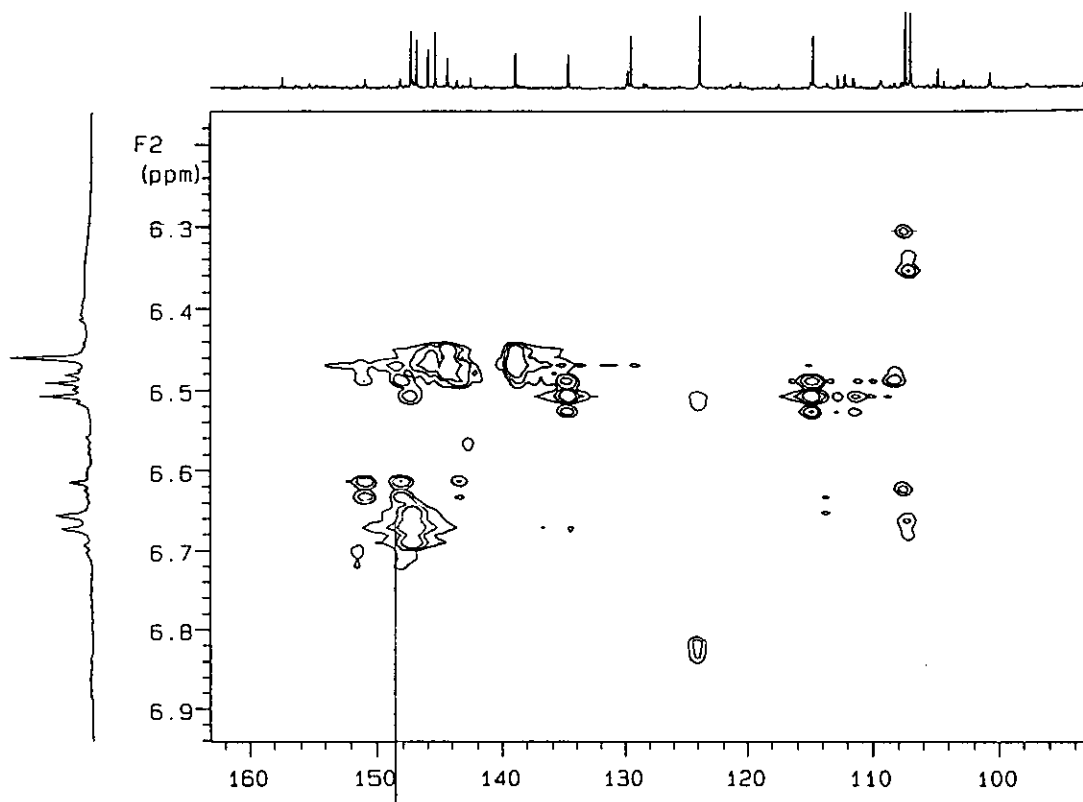


Figura 24. Correlaciones HMBC del anillo A de **43**

La asignación de los carbonos cuaternarios en el anillo B de este compuesto, se llevó a cabo también por medio de sus conectividades encontradas a dos o tres ligaduras entre estos carbonos, el metino bencílico H-3 ( $\delta$  3.54) y H-6' ( $\delta$  6.46), en el espectro HMBC, como se enlista en la tabla 8.

La conectividad entre el hidrógeno bencílico y el metino aromático en  $\delta$  107.61, implica que este último debe ubicarse en la posición C-6', por lo que el patrón de oxigenación en este anillo también es 2',3',4',5', como en el del compuesto **41**. La correlación  $^3J$  de este mismo protón con la señal de carbono cuaternario en  $\delta$  144.41, el cual está enlazado a metoxilo, permite asignar este último a C-2'; H-3 también

correlaciona con el carbono en  $\delta$  129.59, que por su desplazamiento químico es asignable a C-1'; estas correlaciones se ilustran en la figura 25.

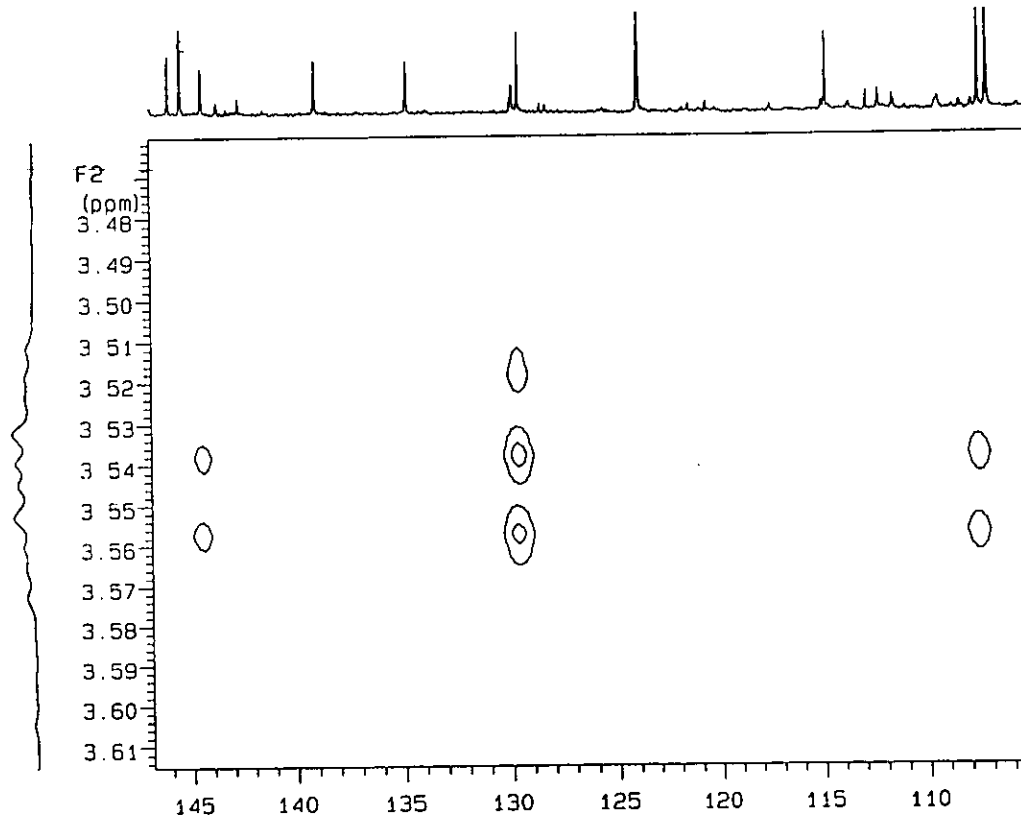


Figura 25. Correlaciones HMBC de H-3

Asimismo, H-6' muestra correlación (Figura 26, Tabla 8) con tres carbonos enlazados a metoxilo, de los cuales, el que resuena en  $\delta$  144.41 corresponde a C-2', por lo que los dos restantes,  $\delta$  146.00 y  $\delta$  138.99, deben corresponder a C-4' y C-5'. La interacción observada entre H-6' y el metoxilo en  $\delta$  3.92 (Metoxilo unido al carbono en  $\delta$  146.00) en el espectro NOESY (Espectro 23, Figura 27), permitió asignar esta señal como C-5', por lo que la señal en  $\delta$  138.99 se asigna entonces a C-4', el cual se encuentra unido al metoxilo en  $\delta$  3.90.

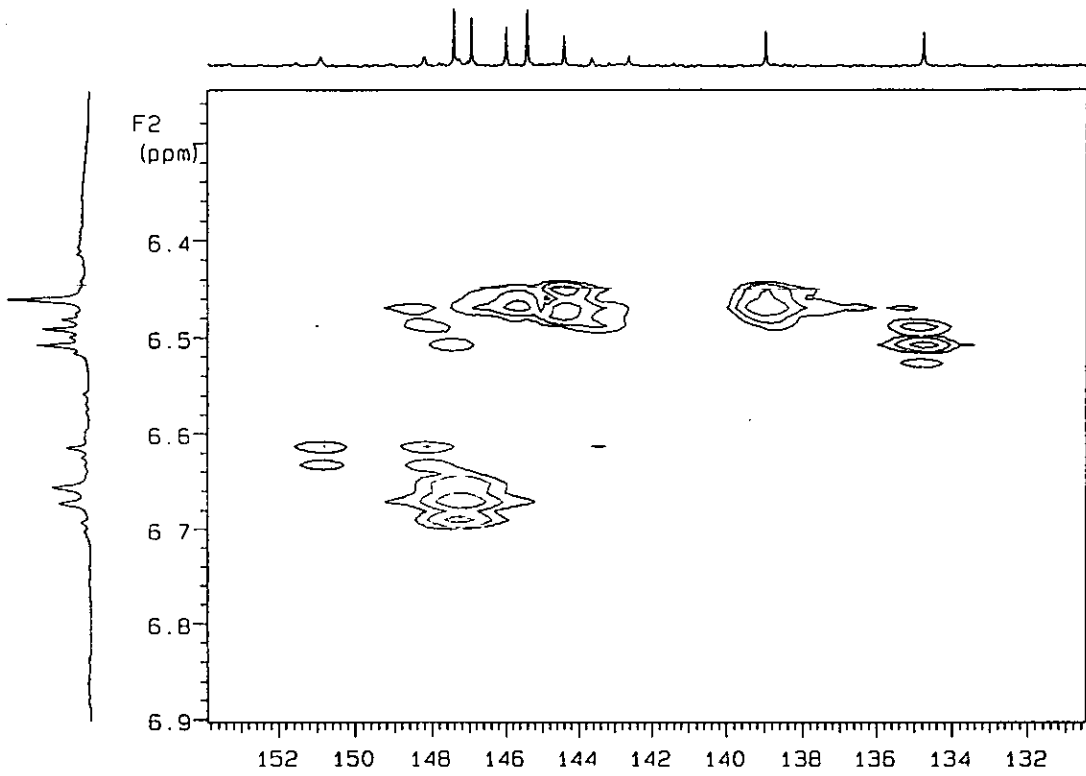


Figura 26. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para H-6' de 43

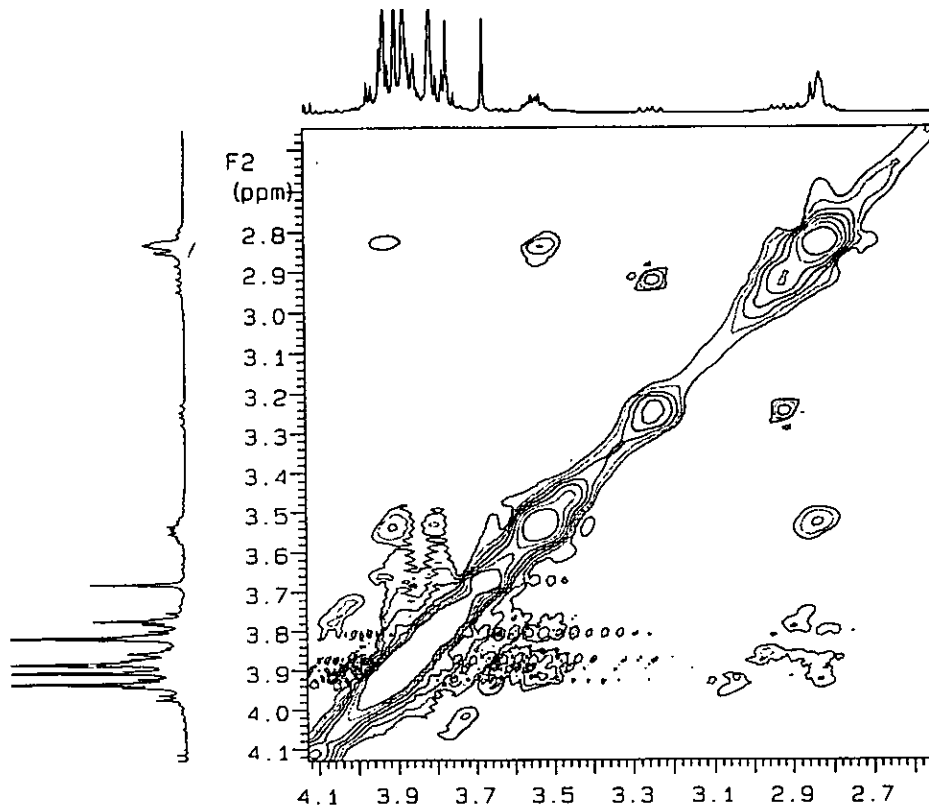
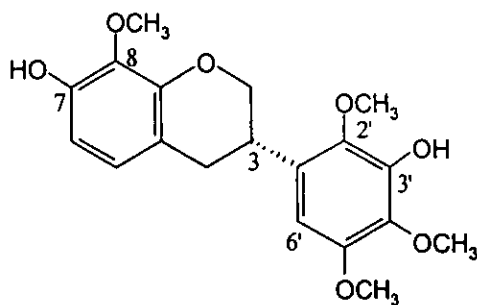


Figura 27. Interacción NOESY entre H-6' y el metoxilo en  $\delta$  3.92

Estas evidencias permiten hasta el momento asignar inequívocamente los carbonos C-1', C-2', C-4', C-5' y C-6', restando por asignar el carbono C-3'. La única señal de carbono cuaternario que falta por asignar ( $\delta$  145.42) debe corresponder precisamente a C-3'. De acuerdo a las evidencias presentadas, éste es un carbono unido a hidroxilo, por lo que la estructura **42** (Hidroxilo en C-2') que se había propuesto anteriormente para este compuesto, debe modificarse a la que presenta el hidroxilo en C-3' como se ilustra en la estructura **43**.

La rotación absoluta del isoflavano **43**, muestra el mismo signo que el isoflavano **41** anteriormente discutido, lo cual, apoyados en el hecho de que este compuesto presenta la misma conformación que **41** (Figura 27), permite establecer que presentan la misma estereoquímica en C-3 (*S*), como se muestra en la estructura **43**, por lo que el nombre que le corresponde es (3*S*)- 3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxi-isoflavano.



**43**

**CYTOTOXIC ISOFLAVANS FROM *EYSENHARDTIA POLYSTACHYA***

**Laura Alvarez<sup>†</sup> and Maria Yolanda Ríos**

*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería,  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Chamilpa 62210,  
Cuernavaca, Morelos, México*

**Carlos Esquivel, María Isabel Chávez and Guillermo Delgado\***

*Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior,  
Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D.F., México*

**María Isabel Aguilar**

*Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de  
México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán 04510, México, D. F.*

**María Luisa Villarreal and Víctor Navarro**

*Unidad de Investigación Biomédica del Sur, IMSS, Argentina No. 1 Xochitepec, Morelos,  
México*

---

\* To whom correspondence should be addressed. L.A.: Phone: (73) 29-7000 ext. 3173. Fax: (73) 29-7056. Email: [lalvarez@dunsun.cti.uaem.mx](mailto:lalvarez@dunsun.cti.uaem.mx). G. D.: Phone: (525) 622-4446. Fax: (525) 616-2217. Email: [delgado@servidor.unam.mx](mailto:delgado@servidor.unam.mx)



Two new cytotoxic isoflavans (3*S*)-7-hydroxy-2',3',4',5',8 -pentamethoxy-isoflavan (**1**) and (3*S*)- 3',7-dihydroxy-2',4',5',8-tetramethoxy-isoflavan (**2**), were isolated from the bark and trunks of *Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae), together with the known constituents stigmasterol, isoduartin, cuneatin, 7-hydroxy-2',4',5'-trimethoxy-isoflavone and 3,4-dimethoxy-8,9-methylenedioxypterocarpan. The structures of **1** and **2** were elucidated on the basis of spectroscopic methods. The antimicrobial, cytotoxic and insecticidal potential of some of these compounds were evaluated. The isoflavans **1**, **2** and isoduartin (7,2'-dihydroxi-8,3',4' trimethoxyisoflavan) displayed moderate cytotoxic activity against KB cell lines.

*Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. (Leguminosae: Lotoideae) is a small tree distributed throughout Mexico and Southern Texas<sup>1</sup> which has been used in Mexican traditional medicine as a herbal remedy for centuries.<sup>2</sup> Locally it is known as "palo dulce" (sweet wood), "palo azul" (blue wood), "tlapalezpatli" (in Náhuatl language), "urza" (in Otomí language), among other common names,<sup>3</sup> and it has wide use for the treatment of kidney and bladder infections, and as diuretic.<sup>4</sup> It is also used as an antispasmodic and febrifuge.<sup>5</sup> During the sixteenth and seventeenth centuries the wood of this plant was exported from Mexico to Europe, where it was known as *lignum nephriticum*.<sup>3,6</sup> Infusions of the wood in water display a golden color with a bluish fluorescence, and vessels and cups made from this material were used to keep drinking water.<sup>3</sup> Interestingly, Robert Boyle used aqueous extract of this wood as acid-base indicator in the seventeenth century,<sup>6,7</sup> and an isoflavone has been identified as one of the fluorescent constituents.<sup>6</sup> Previous chemical examination of this species has led to the isolation of 3,4-dimethoxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and dehydrorotenone,<sup>8</sup> two C-glucosyl- $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones,<sup>9</sup> 7-hydroxy-2',4',5'-trimethoxyisoflavone and 9-methoxy-2,3-methylenedioxcoumestan.<sup>6</sup> As a part of our ongoing search for biologically active principles,<sup>10</sup> we describe herein the isolation and structural elucidation of two new isoflavans: (3*S*)-7-hydroxy-2',3',4',5',8 -pentamethoxy-isoflavan (**1**) and (3*S*)- 3',7-dihydroxy-2',4',5',8-tetramethoxy-isoflavan (**2**), and five known compounds, stigmasterol, isoduartin,<sup>11</sup> cuneatin,<sup>12</sup> 7-hydroxy-2',4',5'-trimethoxyisoflavone<sup>6</sup> and 3,4-dimethoxy-8,9-methylenedioxypterocarpan.<sup>8,13</sup> The structures of **1** and **2** have been determined on the basis of detailed <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR and NOE studies, including 2D experiments (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY,

NOESY, HMQC and HMBC). The known compounds were identified by comparing their spectroscopic data with those reported. The isolates were evaluated for their antimicrobial, cytotoxic and insecticidal activities

## Results and Discussion

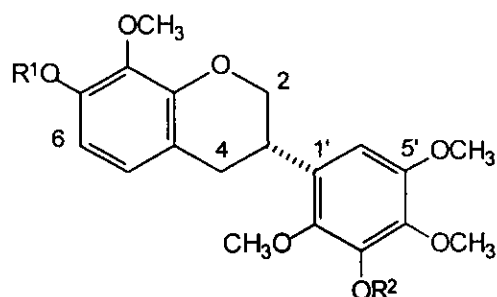
Compound **1**, obtained as an orange amorphous solid, was optically active  $[\alpha]_D + 3.12$  (0.320, MeOH). Its molecular formula  $C_{20}H_{24}O_7$  was deduced from the  $[M]^+$  ion peak at  $m/z$  376 in the EIMS and from the elemental analysis. Its IR spectrum was devoid of carbonyl absorption, and the band at  $3530\text{ cm}^{-1}$  indicated the presence of a single hydroxyl group in the structure. Acetylation of **1** afforded the monoacetyl derivative **3**.

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** showed signals at  $\delta$  2.90 (1H, *ddd*,  $J = 16.0, 5.5, 1.0$  Hz),  $\delta$  2.96 (1H, *ddd*,  $J = 16.0, 10.5, 1.0$  Hz),  $\delta$  3.61 (1H, *dddd*,  $J = 10.5, 3.5, 5.5, 10.5$  Hz), 4.05 (1H, *dd*,  $J = 10.5, 10.5$ ) and  $\delta$  4.39 (1H, *ddd*,  $J = 10.5, 3.5, 1.0$  Hz) assigned to the  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{Ar})-\text{CH}_2-\text{O}-$  moiety of an isoflavan skeleton.<sup>14-16</sup> This skeleton was further supported by its UV spectrum ( $\lambda_{\text{max}}$  at 218 and 284 nm),  $^{13}\text{C}$  NMR data (Table 1, which showed peaks for C-2, C-3 and C-4 at  $\delta$  70.28,  $\delta$  31.84 and  $\delta$  31.32, respectively), and  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY crosspeaks (which showed correlations between H-2/H-3, and between H-3/H-4). The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** also revealed three aromatic hydrogen signals at  $\delta$  6.72 (1H, *dd*,  $J = 8.5, 1.0$  Hz),  $\delta$  6.53 (1H, *d*,  $J = 8.5$  Hz) and  $\delta$  6.40 (1H, *s*), in addition to five aromatic methoxyl signals at  $\delta$  3.95, 3.92, 3.89, 3.83 and 3.79 (3H, each *s*). These data indicated that **1** has 1,2,3,4-tetra- and 1,2,3,4,5-pentasubstituted benzene rings. The EIMS

exhibited peaks at  $m/z$  376  $[M]^+$ , 224 (100), 209 (42), 152 (16) and 121 (14). The peaks at  $m/z$  224 (B-ring) and 152 (A-ring) which resulted from RDA cleavage of **1** clearly showed that the ring B has four methoxyl groups and the ring A has one hydroxyl and one methoxyl groups.<sup>17</sup>

Crosspeaks were observed in the HMBC spectrum between the methylene protons at C-2 ( $\delta$  4.05 and 4.39) and the oxygenated quaternary carbon at  $\delta$  147.12, assigned to C-8a. The carbon-bearing the methoxyl ( $\delta$  134.8) in ring A was assigned to C-8 by its three bond correlation with H-6 ( $\delta$  6.53). The signal at  $\delta$  6.73 was assigned to H-5, since it presented three-bond interactions with C-4, C-8a and C-7. These observations, also supported by the observed enhancement of H-5 when the methylene on C-4 was irradiated in a NOE difference experiment, indicated that isoflavan **1** has a 7-hydroxy-8-methoxy substituted A-ring, similar to that of isoduartin (7,2'-dihydroxy-8,3',4' trimethoxy-isoflavan).<sup>11</sup>

The singlet aromatic proton at  $\delta$  6.40 on ring B showed HMBC correlations with the methoxyl-bearing carbons at  $\delta$  141.95 (C-4'), 145.50 (C-2') and 149.67 (C-5'), and with the benzylic carbon at  $\delta$  31.84 (C-3), confirming the 2',3',4',5'-tetramethoxy substitution pattern on B ring. Identification of the NOE interactions between H-6' and the methoxyl group at  $\delta$  3.78, linked to C-5' (at  $\delta$  149.6, by HMBC); between the methoxyl group at  $\delta$  3.89, linked to C-2' ( $\delta$  145.50, by HMBC) and the methoxyl group at  $\delta$  3.94, linked to C-3' (at  $\delta$  147.12, by HMBC) allowed to assign the signals.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
1	H	CH <sub>3</sub>
2	H	H
3	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>
4	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub> CO

The magnitude of the vicinal couplings between H-2 $\alpha$ /H-3 $\beta$  and H-3 $\beta$ /H-4 $\alpha$  ( $J_{2\alpha,3\beta} = J_{3\beta,4\alpha} = 10.5$  Hz) indicated an equatorial orientation of the 3-aryl group, and the *pseudo* chair conformation of the dihydropyran ring.<sup>18</sup> This conformation was in agreement with the observed long range W-coupling between H-2 $\beta$  and H-4 $\beta$  ( $J = 1$  Hz). Furthermore, NOESY interactions between H-6'/H-2 $\alpha$  and H-6'/H-4 $\alpha$ , as well as the interaction between H-3 and the methoxyl hydrogens at C-2' established a preferred conformation with the methoxyl at C-2' and H-3 in a *syn* spatial relationship, as depicted in Figure 1.

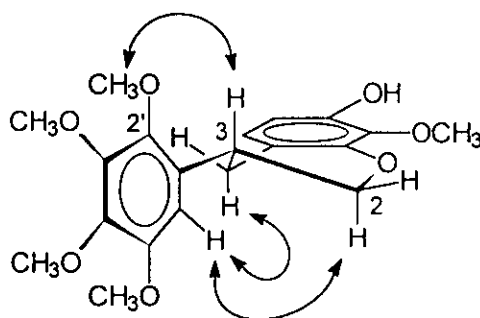


Figure 1. Preferred conformation of **1** and selected NOESY interactions.

Finally, the CD curve of **1** in MeOH showed a positive Cotton effect at 226 nm and a negative Cotton effect at 294 nm, indicating its 3*S*- configuration as previously discussed.<sup>18,19</sup> Thus, **1** was characterized as (3*S*)-7-hydroxy-2',3',4',5',8-pentamethoxyisoflavan.

The more polar compound **2** differed from **1** by the absence of a methyl group and by the presence of an additional hydroxyl group. Acetylation of **2** afforded the diacetyl derivative **4**. **2** was spectroscopically very similar to **1**, having the same structural features and the oxidation pattern on A and B rings of the isoflavan nucleus. The <sup>1</sup>H NMR data of **2** also showed the signals corresponding to the -CH<sub>2</sub>-CH(Ar)-CH<sub>2</sub>-O- moiety at δ 2.83 (2H, *m*, H-4), 3.54 (1H, *m*, H-3), 3.94 (1H, *t*, *J* = 10.5 Hz, H-2α) and 4.35 (1H, *ddd*, *J* = 10.5, 3.0, 1.5 Hz, H-2β); three aromatic hydrogens at δ 6.66 (1H, *dd*, *J* = 8.5, 1.0 Hz), 6.49 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz) and 6.46 (1H, *s*); and a two proton broad singlet at δ 5.75 which suggested the presence of two phenolic hydrogens. The presence of four methoxyl groups was also shown by signals at δ 3.81 (3H, *s*), 3.88 (3H, *s*), 3.90 (3H, *s*) and 3.93 (3H, *s*). The MS of **2** exhibited the molecular ion at *m/z* 362 and the diagnostic peaks of the RDA cleavage at *m/z*

152 and  $m/z$  210, indicating that A ring has the same substituents as **1**, while B ring has three methoxyl and one hydroxyl groups.<sup>14</sup>

The carbon resonances of **2** were assigned by its HMQC, HMBC and NOESY spectra (Table 1). The HMBC spectrum revealed crosspeaks between H-5 ( $\delta$  6.66) and C-4, C-7 and C-8a; between H-6 ( $\delta$  6.49) and C-4a and C-8; and between H-6' and C-3, C-2' and C-4'. In the NOESY spectrum of **2** the aromatic singlet at H-6' showed correlation with the methoxyl group at  $\delta$  3.93, which in turn correlated with the methoxyl group at  $\delta$  3.90, permitting the carbon resonances at  $\delta$  146.00 and 138.99 to be assigned to C-5' and C-4', respectively (HMBC). These data confirmed that the oxidation pattern of **2** is similar to that of **1**; that the hydroxyl group on B ring is attached to C-3', and that three methoxyl groups are attached to C-2', C-4' and C-5'. The specific rotation value of **2**,  $[\alpha]_D + 6.5$  (c 0.2, MeOH), similar to that of **1**, suggested a 3*S* configuration. Thus, the structure of this compound was confirmed to be (3*S*)-7, 3'-dihydroxy-2',4',5',8-tetramethoxyisoflavan.

The natural substances **1**, **2**, isoduartin (7,2'-dihydroxi-8,3',4' trimethoxyisoflavan),<sup>11</sup> cuneatin (7-hydroxy-2'-methoxy-4',5'-methylenedioxyisoflavone),<sup>12</sup> 7-hydroxy-2',4',5'-trimethoxyisoflavone<sup>6</sup> and 3,4-dimethoxy-8,9-methylenedioxypterocarpan,<sup>8,13</sup> isolated from this population of *E. polystachya*, did not display antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella sonnei* or *Candida albicans* at concentrations up to 200  $\mu\text{g/ml}$ . These compounds were also tested for their cytotoxic activity against P388, UISO and KB tumor cells, and **1**, **2** and isoduartin (7,2'-dihydroxi-8,3',4' trimethoxyisoflavan). exhibited moderate cytotoxic activity against KB cell line ( $\text{ED}_{50}$  values of 3.8, 3.0 and 2.63  $\mu\text{g/ml}$ , respectively). No cytotoxicity was shown by the

additional natural compounds ( $ED_{50} > 4 \mu\text{g/ml}$ ). In the insecticidal bioassay, the isoflavans **1**, **2** and isoduartin did not display toxicity against the *Spodoptera frugiperda* larvae ( $LC_{50} > 1000 \text{ ng/cm}^2$ ), however, some morphological changes were observed.

## Experimental Section

**General Experimental Procedures.** The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Varian VXR-200 and Varian Unity Plus-500 instruments, and the chemical shifts are expressed in parts per million ( $\delta$ ) relative to tetramethylsilane. Samples for NOE experiments were degassed and sealed under Argon. Standard pulse sequences were used for COSY, NOEdiff, DEPT, HMQC and HMBC experiments. Infrared spectra were recorded with a Nicolet Magna IR TM 750 and Perkin Elmer 283B instruments. MS data were recorded with a JEOL JMS-AX 505 HA mass spectrometer. Electron impact mass spectra were obtained at 70 eV ionization energy. TLC: Merck silica gel 60 F254 plates (0.25 mm), spots and bands were detected by UV irradiation (254 and 365 nm).

**Plant Material.** The bark and trunks of *E. polystachya* were collected near Xalapa, Veracruz, México, and identified by Profs. Clara H. Ramos and Esteban M. Martínez. Voucher specimens (CHR 739) are deposited at the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

**Extraction and Isolation.** The air-dried and finely powdered bark and trunks of *E. polystachya* (3.2 Kg) were extracted with  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) three times at room



temperature. Filtration and removal of solvent *in vacuo* afforded 195 g of crude extract which was chromatographed on a silica gel column (800 g) eluting with a *n*-hexane-EtOAc gradient system and then with acetone to give six main fractions (F-1 to F-6). F-1 (3.4 g) mainly contained fatty materials while the last (F-6, eluted with acetone, 56 g) was a complex mixture. F-2 (4.6 g) was rechromatographed with *n*-hexane-EtOAc gradient to give stigmasterol (70 mg). F-3 (2.28 g) was rechromatographed on silica gel, using *n*-hexane-EtOAc gradient elution system to give 1 (133 mg), 2 (190 mg) and 2',7-dihydroxy-3',4',8-trimethoxy-isoflavan (isoduartin, 65 mg), respectively. Mp of isoduartin: 105-108 °C (previously it was reported as an oil<sup>11</sup>). F-4 (4.5 g) was rechromatographed on silica gel CC and eluted with *n*-hexane-EtOAc gradient to afford 3,4-dimethoxy-8,9-methylenedioxypterocarpan (112 mg). Mp: 253-254 °C [lit.<sup>13</sup> 245-247 °C]. F-5 (4.6 g) was purified by silica gel CC (*n*-hexane-EtOAc, 1:1), fraction 5 from this rechromatography, afforded 7-hydroxy-2'-methoxy-4',5'-methylenedioxy-isoflavone (cuneatin,<sup>12</sup> 23 mg), mp: 236-237 °C; IR, <sup>1</sup>H NMR and MS data for cuneatin, not previously reported,<sup>12</sup> were in agreement with its structure: IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  3500, 2927, 2852, 1729, 1624, 1464, 1378, 1275, 1247 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO, 200 MHz):  $\delta$  10.08 (1H, s, OH), 8.10 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5), 7.92 (1H, s, H-2), 6.85 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.83 (1H, dd, J = 8.7, 2.3, H-6), 6.79 (1H, d, 1.0, H-6'), 6.72 (1H, d, J = 1.0 Hz, H-3'), 5.90 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 3.93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); EIMS *m/z* (rel. int.): 312 [M]<sup>+</sup> (100), 176 (24), 131 (15), 70 (16), 63 (18), and fractions 12-14 gave 7-hydroxy-2',4',5'-trimethoxy-isoflavone (183 mg), mp: 239 - 240 °C [lit.<sup>6</sup>: 234 - 237 °C]. R<sub>f</sub> values for the new compounds were as follows, 1: 0.46, 2: 0.40 (*n*-hexane-EtOAc 7:3).

(3*S*)-7-Hydroxy-2',3',4',5',8-pentamethoxyisoflavan (1). Orange amorphous powder: mp 125-126°C;  $[\alpha]_D + 3.12$  (c 0.320, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 218 (3.91); 284 (2.89) nm; CD (c 0.0136, MeOH):  $[\theta]_{210} -2.699$ ,  $[\theta]_{226} 0.4130$ ,  $[\theta]_{256} -0.8567$ ,  $[\theta]_{265.5} -0.6865$ ; IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  3530, 2939, 2840, 1603, 1494, 1193, 1040 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  6.72 (1H, dd,  $J_{5,6} = 8.5$ ,  $J_{4\alpha,5} = 1.0$  Hz, H-5), 6.53 (1H, dd,  $J_{5,6} = 8.5$  Hz, H-6), 6.40 (1H, s, H-6'), 5.80 (1H, brs, OH), 4.39 (1H, ddd,  $J_{2\beta,2\alpha} = 10.5$ ,  $J_{2\beta,3\beta} = 3.5$ ,  $J_{2\beta,4\beta} = 1.0$  Hz, H-2 $\beta$ ), 4.05 (1H, dd,  $J_{2\beta,2\alpha} = J_{2\alpha,3\beta} 10.5$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 3.95 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-C-3'), 3.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-C-8), 3.89 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-C-4'), 3.83 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-C-2'), 3.79 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-C-5'), 3.61 (1H, dddd,  $J = 10.5, 3.5, 5.5, 10.5$  Hz, H-3), 2.96 (1H, ddd,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.0$ ,  $J_{4\alpha,3\beta} = 10.5$ ,  $J_{4\alpha,5} = 1.0$  Hz, H-4 $\alpha$ ), 2.90 (1H, ddd,  $J = 16.0$ ,  $J_{3\beta,4\beta} = 5.5$ ,  $J_{2\beta,4\beta} = 1.0$  Hz, H-4 $\beta$ ); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): see Table 1; EIMS  $m/z$  (rel. int.): 376 [M]<sup>+</sup> (73), 224 (100), 209 (42), 152 (16), 151 (38), 121 (14). *anal.* C 63.65%, H 6.68%, calcd for C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>, C 63.82%, H 6.43%.

**Acetylation of 1.** A solution of 1 (45 mg) in a mixture of Ac<sub>2</sub>O (1 ml) and pyridine (0.5 ml) was allowed to stand at room temperature for 2 h to afford 3 (23.8 mg), after usual work-up and TLC purification (*n*-hexane - EtOAc 85:15). 3: mp 79 - 80 °C; IR (CHCl<sub>3</sub>) 2939, 1760, 1491, 1238, 1047 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  6.81 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.59 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6), 6.31 (1H, s, H-6'), 4.44 (1H, ddd,  $J_{2\alpha,2\beta} = 10.5$ ,  $J_{2\beta,3\beta} = 3.5$ ,  $J_{2\beta,4\beta} 1.5$  Hz, H-2 $\beta$ ), 4.07 (1H, dd,  $J = J_{2\alpha,2\beta} = 10.5$ ,  $J_{2\alpha,3\beta} 10.5$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 3.95 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.88 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.86 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.84 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.79 (3H, s, CH<sub>3</sub>O),

3.65 (1H, m, H-3), 3.01 (2H, m, H-4), 2.31 (3H, s  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); EIMS  $m/z$  (rel. int.): 418  $[\text{M}]^+$  (65), 416 (78), 403 (35), 488 (55), 375 (80), 224 (100), 197 (81), 184 (85), 43 (80).

**(3S)-7,3'-Dihydroxy-2',4',5',8-tetramethoxyisoflavan (2).** Brown amorphous powder: mp 97-98°C;  $[\alpha]_{\text{D}} + 6.5$  (c 0.2, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 216 (3.91), 281 (3.75) nm; IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3530, 2939, 2840, 1603, 1494, 1193, 1040  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  6.66 (1H, dd,  $J_{5,6} = 8.5$ ,  $J_{4\alpha,5} = 1.0$  Hz, H-5), 6.49 (1H, d,  $J_{5,6} = 8.5$  Hz), 6.46 (1H, s, H-6'), 5.75 (2H, s, OH), 4.35 (1H, ddd,  $J_{2\alpha,2\beta} = 10.5$ ,  $J_{2\beta,3\beta} = 3.0$ ,  $J_{2\beta,4\beta} = 1.5$  Hz, H-2 $\beta$ ), 3.94 (1H, dd,  $J_{2\alpha,2\beta} = J_{2\alpha,3\beta} = 10.5$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 3.93 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O-C-5}'$ ), 3.90 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O-C-4}'$ ), 3.88 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O-C-8}$ ), 3.81 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O-C-2}'$ ), 3.54 (1H, m, H-3), 2.83 (2H, m, H-4);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): see Table 1; EIMS  $m/z$  (rel. int.): 362  $[\text{M}]^+$  (47), 210 (100), 195 (47), 183 (58), 152 (30), 138 (10), 123 (20).

**Acetylation of 2.** Compound 2 (65 mg) was acetylated with  $\text{Ac}_2\text{O}$  (1.5 ml) and pyridine (0.5 ml) to afford 4 (39 mg) as a yellow amorphous solid. 4: mp 56-58 °C; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 2938, 1762, 1488, 1462, 1370, 1090, 1049  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  6.81 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5), 6.59 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-6), 6.55 (1H, s, H-6'), 4.42 (1H, ddd,  $J_{2\alpha,2\beta} = 10.2$ ,  $J_{2\beta,3\beta} = 3.8$ ,  $J_{2\beta,4\beta} = 1.5$  Hz, H-2 $\beta$ ), 3.98 (1H, dd,  $J_{2\alpha,2\beta} = J_{2\alpha,3\beta} = 10.2$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 3.93 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.88 (6H, s,  $2\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.85 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.61 (1H, m, H-3'), 2.96 (2H, m, H-4), 2.33 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.31 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); EIMS  $m/z$  (rel. int.): 446  $[\text{M}]^+$  (70), 444 (68), 431 (80), 416 (75), 414 (70), 386 (81), 252 (100), 194 (85), 43 (90).

**Evaluation of the Biological Activity. Cytotoxic activity.** The KB (nasopharyngeal carcinoma), P388 (murine leukemia) and SQC-1 UISO (Squamous cell cervix carcinoma) cell lines were maintained in RPMI culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS). All cell lines were cultured at 37° C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air (100% humidity). The cells at a log phase of their growth cycle were treated in triplicate at various concentrations of the natural compounds (0.5-100 µg/ml), and incubated for 72 h at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The cell concentration was determined by protein analysis. Results were expressed as the dose that inhibits 50% control growth after the incubation period (ED<sub>50</sub>). The values were estimated from a semi-log plot of the drug concentration (µg/ml) against the percent of viable cells.<sup>20</sup>

**Antimicrobial activity.** Evaluations were performed with cultures of *Escherichia coli* (ATCC 8937), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Shigella sonnei* (ATCC 11060) and *Candida albicans* (ATCC 10231). The bacteria were maintained in trypticase soy agar (TSA), and the yeast on Sabourand's dextrose agar (SDA). The screening method was performed in duplicates and based on disk assay procedures.<sup>21</sup>

**Insecticidal activity.** This activity was tested by ingestion of solutions of the compounds 1, 2 and isoduartin by target insect neonate larvae following the artificial diet feeding.<sup>22</sup> We used neonate larvae of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), an important pest in Mexico. The concentrations used ranged from 100 to 1,000 ng per square centimeter of surface diet. The experiments were run in triplicate. Concentration-response curves were analyzed by the log dose/probit method to determine the doses that kill half of the organisms (LC<sub>50</sub>).

**Acknowledgments.** We thank Rocío Patiño, Luis Velasco, and Javier Pérez-Flores (Instituto de Química de la UNAM), and Atilano Gutiérrez (Universidad Autónoma Metropolitana), for technical assistance. We also thank Dr. Masaaki Shibuya (Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo) for spectroscopic data of isoduartin, and Profs. Clara H. Ramos (Facultad de Ciencias, UNAM) and Esteban M. Martínez (Instituto de Biología, UNAM) for collection and identification of the plant material. This work was supported in part by UNAM (PADEP project 5373 and DGAPA-IN 212195) and CONACyT (project 3419P-N9607 and grant 940040).

#### References and Notes

- (1) Rzedowski, J. *Vegetación de México*, Limusa, México, 1978, p 202.
- (2) Hernández, F. Historia Natural de la Nueva España, In *Obras Completas de F. Hernández*, vol. II, UNAM, México, 1959, p 173-212.
- (3) *Enciclopedia de México*. (José R. Alvarez, Dir.). Vol. XI, p 6167. México City, 1994. Sabeca Int. Inv. Corp. c/o Encyclopaedia Britannica de México.
- (4) Martínez, M. *Las Plantas Medicinales de México*, Editorial Botas, México, 1959, p 469-470.
- (5) Díaz, J. L. Usos de las Plantas Medicinales de México, Monografías Científicas, vol II, IMEPLAM, México, 1976.

- (6) Burns, D. T.; Dalgarno, B.G.; Gargan, P.E.; Grimshaw, J. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 167-169.
- (7) Safford, W. E. *Ann. Rep. Smithsonian Inst.* **1915**, 271-275.
- (8) Domínguez, X. A.; Franco, R.; Díaz Viveros, Y. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1978**, *9*, 209-211.
- (9) Beltrami, E.; De Bernardi, M.; Fronza, G.; Mellerio, G.; Vidari, G.; Vita-Finzi, P. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2931-2933.
- (10) Alvarez, L.; Marquina, S.; Villarreal, M.L.; Alonso, D.; Aranda, E.; Delgado, G. *Planta Medica* **1996**, *62*, 355-357.
- (11) Goda, Y.; Katayama, M.; Ichikawa, K.; Shibuya, M.; Kiuchi, F.; Sankawa, U. *Chem Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 5606-5609.
- (12) Ingham, J. *Biochem. System. and Ecol.* **1981**, *9*, 125-132.
- (13) Harper, S. H.; Kemp, A. D.; Underwood, W. G. E.; Campbell, R. V. M. *J. Chem. Soc. (C)*, **1969**, 1109-1116.
- (14) Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Redman, B. T.; Sutherland, I. O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1968**, 1265-1267.
- (15) Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Sutherland, I. O.; Gottlieb, O. R.; Oliveira, A. B. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1405-1411.
- (16) Grosvenor, P. W.; Gray, D. O. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 377-380.

- (17) Pelter, A.; Amenachi, P. Y. *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, 887-896.
- (18) Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Redman, T.; Sutherland, I. O.; Alves, H. M.; Gottlieb, O. R. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1423-1426.
- (19) Verbit, L.; Clark-Lewis, J. W. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 5519-5527.
- (20) Geran, R. I.; Greenberg, N. H.; MacDonald, M. N.; Schumacher, A. M.; Abbott, B. J. *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, Part 3 (2).
- (21) Vanden Berghe, D. A.; Vlietinck, A. J., in: *Methods in Plant Biochemistry* (Dex, P. M., Harborne, J. B., Hostettmann, K. Eds.), Academic Press, **1991**, vol 6, p 47-70.
- (22) Kubo, I. in: *Methods in Plant Biochemistry* (Dex, P. M., Harborne, J. B., Hostettmann, K. Eds.), Academic Press, **1991**, vol 6, p 179-193.

Table 1.  $^{13}\text{C}$  NMR Data (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) for Compounds 1 and 2<sup>a</sup>

C	1	2
2	70.28	70.02
3	31.84	31.19
4	31.32	31.26
4a	115.00	114.86
5	124.20	123.97
6	107.10	107.20
7	147.60	147.41
8	134.80	134.77
8a	147.12 <sup>b</sup>	146.95
1'	128.90	129.59
2'	145.50	144.41
3'	147.15 <sup>b</sup>	145.42
4'	141.95	138.99
5'	149.67	146.00
6'	105.23	107.61
OCH <sub>3</sub> C-8	60.90	60.53
OCH <sub>3</sub> C-2'	61.51	61.25
OCH <sub>3</sub> C-3'	61.00	-
OCH <sub>3</sub> C-4'	61.89	60.79
OCH <sub>3</sub> C-5'	56.25	60.40

<sup>a</sup>Assignments were confirmed by APT, NOE, HMQC and HMBC experiments ( $\delta$  values).

<sup>b</sup>Signals may be interchangeable



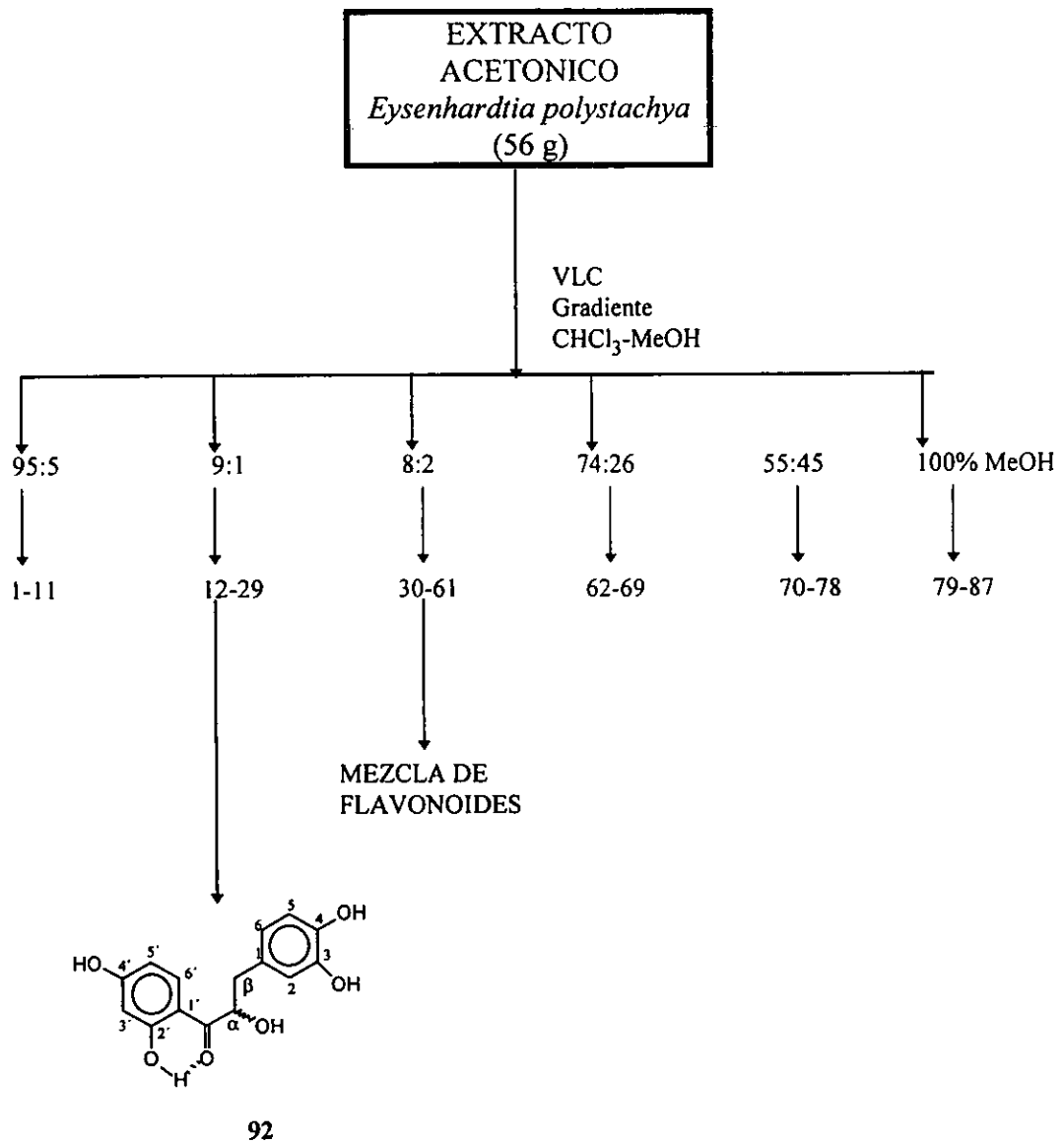
### Constituyentes de la Fracción soluble en Acetona.

Los resultados de esta parte del trabajo fueron enviados para su publicación a la revista *Phytochemistry* y se anexa como publicación número 3.

La fracción soluble en acetona (56 g) de la percolación del extracto total de *E. polystachya* (Esquema 2) fue aplicada a un embudo Buchner de 13 cm de diámetro, empacado con 280 g de sílica gel. La elución se llevó a cabo con un gradiente de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, se colectaron 87 fracciones que fueron reunidas en 6 grupos de acuerdo a su homogeneidad observada en ccf, como se ilustra en el esquema 3. Las fracciones 12-29 (265 mg) mostraron un compuesto homogéneo, el cual fue purificado mediante cromatografía en capa fina obteniéndose 8.3 mg de la  $\alpha,2',3,4',4$ -pentahidroxidihidrochalcona (92).

Las fracciones 30-39 (230 mg) de esta cromatografía (Esquema 3) mostraron un sólo compuesto en ccf, pero su espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicó que se trataba de una mezcla de dos compuestos flavonoides glicosilados. Para la separación de esta mezcla se probaron diferentes sistemas de disolventes, tanto en placas de sílica gel en fase normal, como en fase reversa, sin éxito. Se observó que estos compuestos presentaban una gran movilidad en sistemas de elución polares al usar la fase enlazada con C-18, mientras que al utilizar la fase normal y sistemas de elución de mediana polaridad, éstos eran retenidos en gran proporción sin separarse, por lo que se decidió utilizar la cromatografía líquida de alta resolución.

Al tratar de solubilizar la muestra, se presentaba un sólido insoluble, producto probablemente de la polimerización de los compuestos, por lo que, para eliminar este sólido, la mezcla de flavonoides se pasó por un cartucho de sílica gel Sep-pak-vac (Waters), eluyendo con 150 ml de una mezcla isocrática de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (4:1); se colectaron fracciones de 10 ml cada. Las siete primeras fracciones cristalizaron, observándose una diferencia en la forma de los cristales entre tres de estas fracciones. El punto de fusión de las mismas indicó que se trataba de dos compuestos diferentes, lo cual fue confirmado al registrar el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cada una de ellas. Como esta



Esquema 3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto soluble en acetona

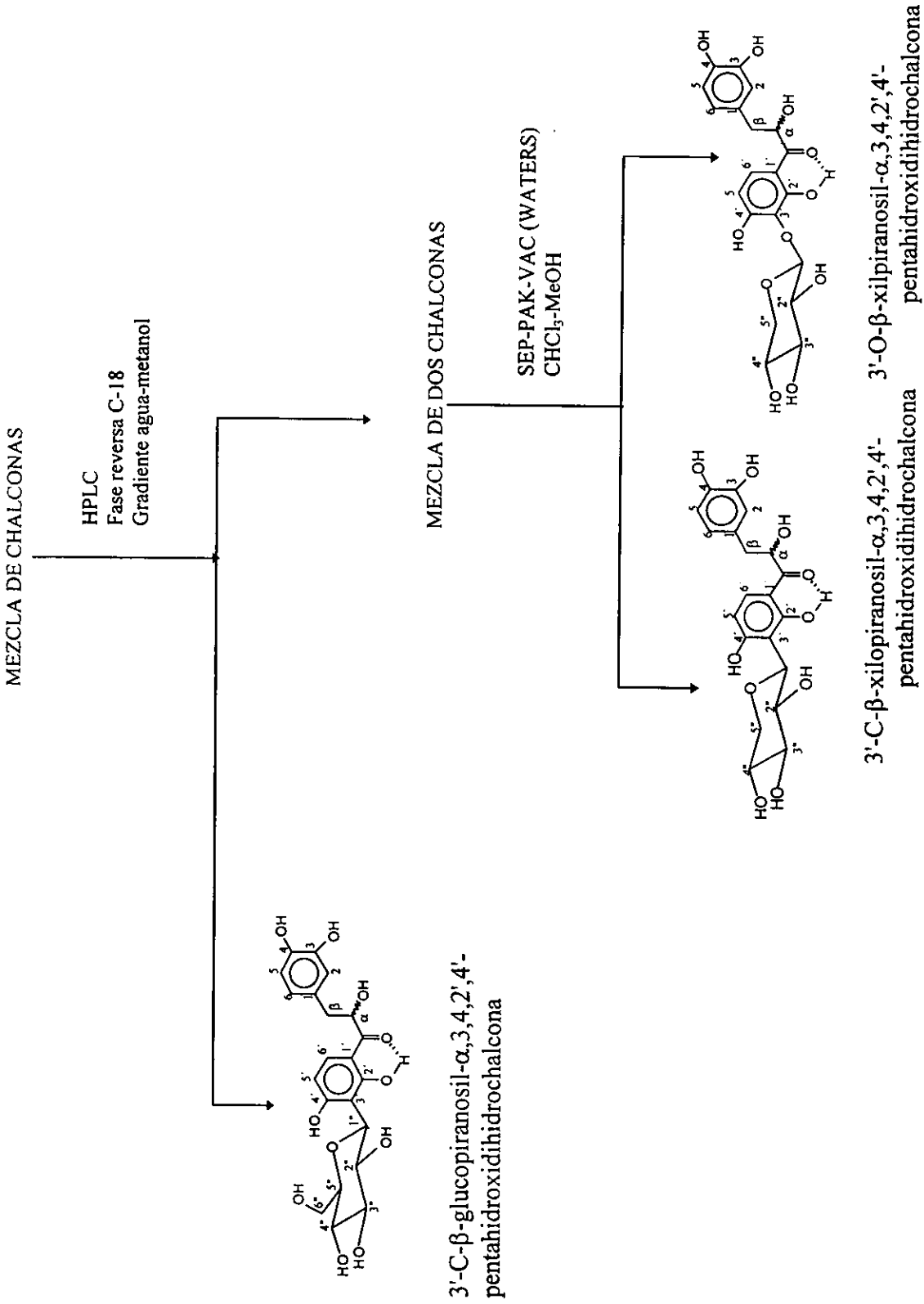
separación sólo permitió la purificación de pequeñas cantidades de los compuestos, las restantes fracciones fueron reunidas y aplicadas a otro cartucho, utilizando ahora un gradiente de elución de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, lo cual permitió la separación de 62 mg de la chalcona **93** y 8.0 mg de **94**.

Las fracciones 40-61 de la percolación inicial (Esquema 3), mostraron un sólido amarillo claro, homogéneo en ccf, por lo que se reunieron. El producto obtenido (6.32 g) consistía también en una mezcla de dihidrochalconas con el mismo  $R_f$  que los compuestos **93** y **94** aislados de la fracción anterior. Una alícuota de esta mezcla se separó en sus componentes mediante el empleo de HPLC seguido de cartuchos sep-pak-vac como se ilustra en el esquema 4. La figura 28 muestra el cromatograma generado en la cromatografía líquida de alta resolución de esta mezcla, utilizando una columna de fase reversa C-18 y un gradiente de  $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{CH}_3\text{CN}$ , los detalles de la elución se indican en la parte experimental de la publicación No 3. Como puede observarse, este cromatograma permitió la separación de dos picos, los cuales fueron colectados por separado; el primero de ellos ( $R_t = 2.0$  min) fue caracterizado como la Coatlina B (**33**), mientras que el segundo pico ( $R_t = 3.0$  min) estaba constituido por la mezcla de las chalconas **93** y **94**, las cuales fueron separadas entre sí mediante el empleo del cartucho de sílica Sep-pak-vac, de la misma manera como se describió anteriormente.

A continuación se describe la elucidación estructural de cada uno de estos compuestos.

#### **Elucidación de la estructura molecular de la 3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (93).**

Este fue el primer compuesto aislado de la mezcla de dihidrochalconas, y se obtuvo como un sólido amarillo claro insoluble en cloroformo, y soluble en metanol, con punto de fusión de 192-195° C. Su fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$  fue deducida por su espectro de masas por impacto electrónico (Espectro 23) junto con el número de hidrógenos y carbonos observados en sus espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (espectros 25 y 26 respectivamente).



Esquema 4. Separación de las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas de la fracción soluble en acetona

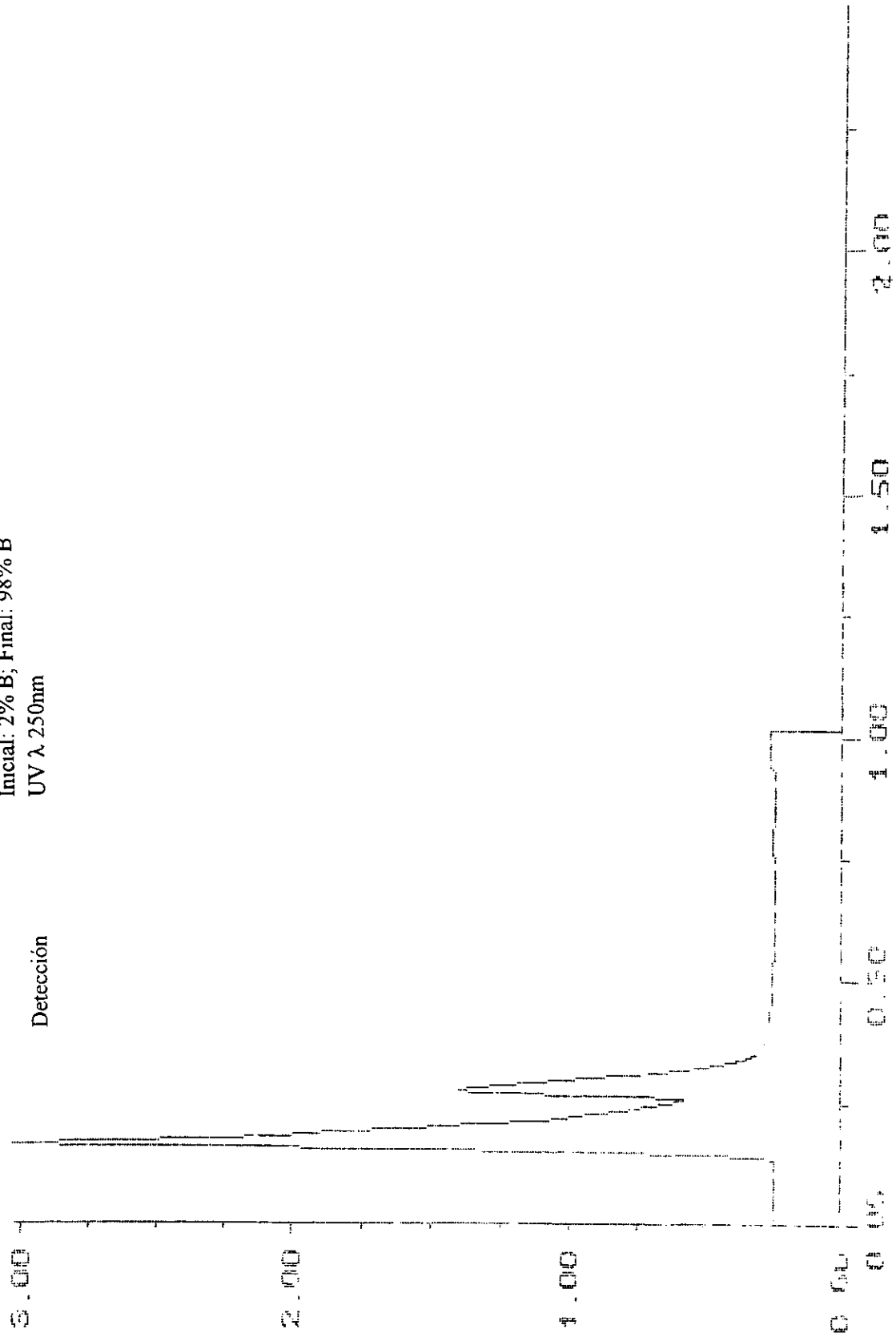


Figura 28. Cromatograma generado en la separación HPLC de la mezcla de chalconas

Equipo: Waters  
Columna:  $\mu$ -Bondapak C18  
Flujo: 0.90 ml/min  
Eluyente: Gradiente: Agua (Solvente A)-Metanol (Solvente B)  
Inicial: 2% B; Final: 98% B  
Detección: UV  $\lambda$  250nm

Su espectro de infrarrojo (Espectro 24) sugirió la presencia de grupos hidroxilo ( $3412\text{ cm}^{-1}$ , banda intensa), carbonilo quelatado ( $1624\text{ cm}^{-1}$ ) y anillos aromáticos ( $1590$  y  $1503\text{ cm}^{-1}$ ).

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 25, tabla 1 de la publicación No. 3) de este compuesto, mostró señales para cinco hidrógenos aromáticos, de los cuales, los dos dobletes con acoplamiento *orto* que resuenan en  $\delta$  7.62 y 6.45 indican que forman parte de un anillo 1,2,3,4-tetrasustituído, mientras que las resonancias de tipo ABX en  $\delta$  6.69, 6.65 y 6.52 indicaron la presencia de un anillo aromático 1,3,4-trisustituído. A campo bajo ( $\delta$  13.0), aparece un singulete que integra para un hidrógeno, típico de hidroxilo quelatado;<sup>132</sup> además, se observan tres señales adicionales en  $\delta$  9.68 (1H, *sa*), 8.17 (1H, *sa*) y 8.03 (1H, *s*) que intercambian con  $\text{D}_2\text{O}$ . Estas evidencias indican que se trata de un compuesto de tipo flavonoide con cuatro hidroxilos fenólicos, lo cual se confirma por las cuatro señales observadas en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 26, tabla 2 de la publicación No 3), para carbonos aromáticos unidos a oxígeno<sup>133</sup> en  $\delta$  163.3, 163.1, 143.7 y 142.7.

En la región de los protones unidos a heteroátomo, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se observaron 12 señales, cinco de las cuales ( $\delta$  4.74, 4.68, 4.62, 4.29 y 4.08) fueron asignadas a hidroxilos presentes en la molécula ya que desaparecen al agregar  $\text{D}_2\text{O}$ . Estas señales forman parte de un residuo glicosídico, ya que se observa en  $\delta$  4.81 un doblete con  $J = 10.0\text{ Hz}$  característico del protón anomérico de un azúcar.<sup>134</sup>

El análisis de los hidrógenos geminales a hidroxilo por la técnica de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figura 29), permitió establecer la identidad del azúcar como xilosa de acuerdo a las siguientes evidencias: El análisis se inició con el protón anomérico, cuya señal en  $\delta$  4.81 muestra correlación con el triplete centrado en  $\delta$  4.06 (1H, *t*,  $J = 9.0$ ) que se asigna al hidrógeno de C-2, a su vez H-2 correlaciona con el triplete centrado en  $\delta$  3.46 (1H, *t*, 9.0 Hz) y con el doblete que intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$  en  $\delta$  4.29 (1H, *d*,  $J = 3.5$ ), asignados a H-3 y al hidroxilo de C-2 respectivamente; H-3 por su parte, muestra correlación con el *ddd* centrado en 3.69 ( $J = 9.2, 9.5, 4.5$ ), que corresponde entonces a H-4, y con su hidroxilo localizado en  $\delta$  4.62 como un singulete ancho. Finalmente H-4 correlaciona con las señales en  $\delta$  3.32 (1H, *t*, 10.5),  $\delta$  4.02 (1H,

*dd*,  $J = 11.0, 5.5$ ) y con un doblete centrado en  $\delta 4.74$  ( $J = 4.0$ ), asignables, los dos primeros, a los protones del metileno de C-5 de la xilosa, y el último, al hidroxilo que soporta, respectivamente.

En la región de los protones alifáticos, resuenan un par de señales en  $\delta 2.96$  y  $\delta 2.77$  que claramente forman la parte AB de un sistema ABX. El análisis del espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY permitió asignar el fragmento  $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$  formado por el sistema ABX antes mencionado en el que la parte X corresponde a un hidroximetino cuya señal en  $\delta 5.05$  interacciona con los dos dobletes de dobletes centrados en  $\delta 2.96$  y  $\delta 2.77$  respectivamente; esta señal presenta un acoplamiento adicional ( $J = 7.5$  Hz), debida a la interacción con el protón del hidroxilo que soporta en  $\delta 4.68$  (Figura 29).

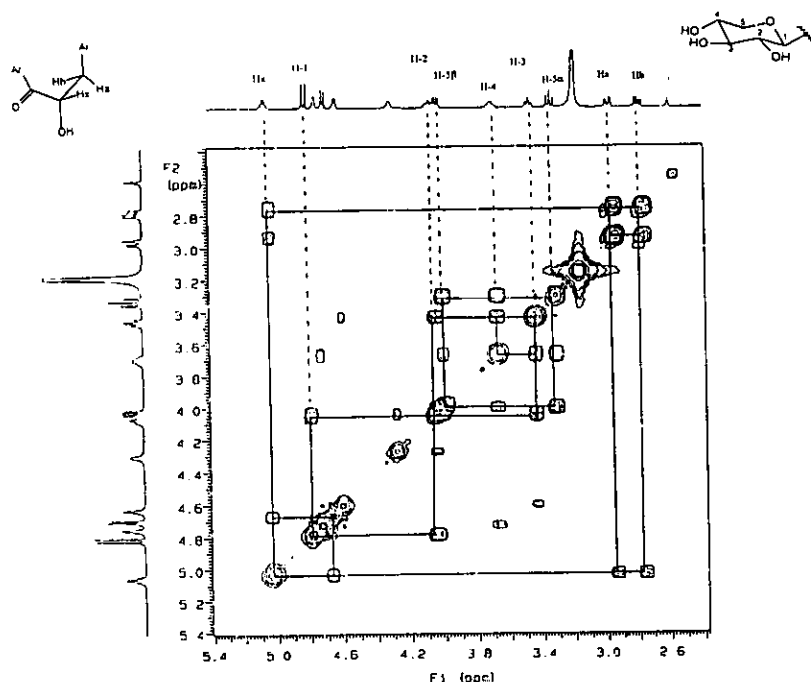


Figura 29. Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de los protones alifáticos de 93

La integración de los dos anillos aromáticos antes deducidos, con este fragmento, permite establecer el esqueleto de este compuesto como el de una  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona que incluye cuatro hidroxilos fenólicos, uno de ellos quelatado con el carbonilo, y una xilosa, como se ilustra en la figura 1 de la publicación No 3. Su espectro de ultravioleta (Espectro 27), que presenta máximos de absorción en 321, 309, 285 y 253 nm, confirmó dicha estructura.<sup>132</sup>

Por otro lado, el análisis del espectro de RMN<sup>13</sup>C y el experimento DEPT (Espectro 26, tabla 2 de la publicación No 3) permitió confirmar la estructura propuesta para este compuesto, observándose: un carbonilo, cinco metinos aromáticos; cuatro carbonos unidos a oxígeno y tres carbonos cuaternarios no unidos a oxígeno. En la región de los carbonos unidos a heteroátomo se observan cinco metinos, un metileno y el metileno alifático de la chalcona. Cabe destacar que entre  $\delta$  100 y  $\delta$  165 aparecen doce carbonos que corresponden a los dos anillos aromáticos de la  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona. Sin embargo, no se observa en esta región la presencia del carbono anomérico de la xilosa, lo cual hace suponer que se trata de un compuesto C-glicosilado.<sup>133</sup> Esta suposición se confirmó al someter a este compuesto a condiciones de hidrólisis ácida y no observarse progreso en la reacción.

El espectro de correlación heteronuclear a una ligadura (HETCOR, Espectro 28), permitió establecer las conectividades de los metinos y metilenos de la molécula, como se muestra en la tabla 9.

El patrón de sustitución en los anillos aromáticos de la chalcona se estableció mediante el análisis del espectro de correlación heteronuclear a larga distancia <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HMBC (Espectro 29, tabla 9).

El doblete en  $\delta$  7.62, que correlacionó en el espectro HETCOR con el carbono en  $\delta$  130.71, mostró correlación con el carbonilo en  $\delta$  203.2 y con los carbonos base de oxígeno en  $\delta$  163.3 y  $\delta$  163.1; esto permitió establecer que el anillo tetrasustituído se encontraba directamente unido al carbonilo, y la señal en  $\delta$  7.62 se asigna a H-6'. Debido a la presencia de un hidroxilo quelatado con el carbonilo (IR, RMN<sup>1</sup>H), los hidroxilos solo pueden ubicarse en C-2' y C-4' ( $\delta$  163.3 y  $\delta$  163.1). La cercanía en el



desplazamiento químico de estos dos carbonos no permitió diferenciarlos. Por otro lado, la existencia de correlación a  $^3J$  entre H-5' y los carbonos en  $\delta$  109.7 y  $\delta$  110.7, permitió la asignación de estos últimos como C-3' y C-1' respectivamente. La ubicación de la xilosa se estableció en C-3' debido a que el protón anomérico ( $\delta$  4.81) muestra correlación  $^3J$  con los carbonos aromáticos en  $\delta$  163.1 (C-2'), 163.3 (C-4') y 109.7 (C-3') (Figura 1 de la publicación No 3 y figura 30).

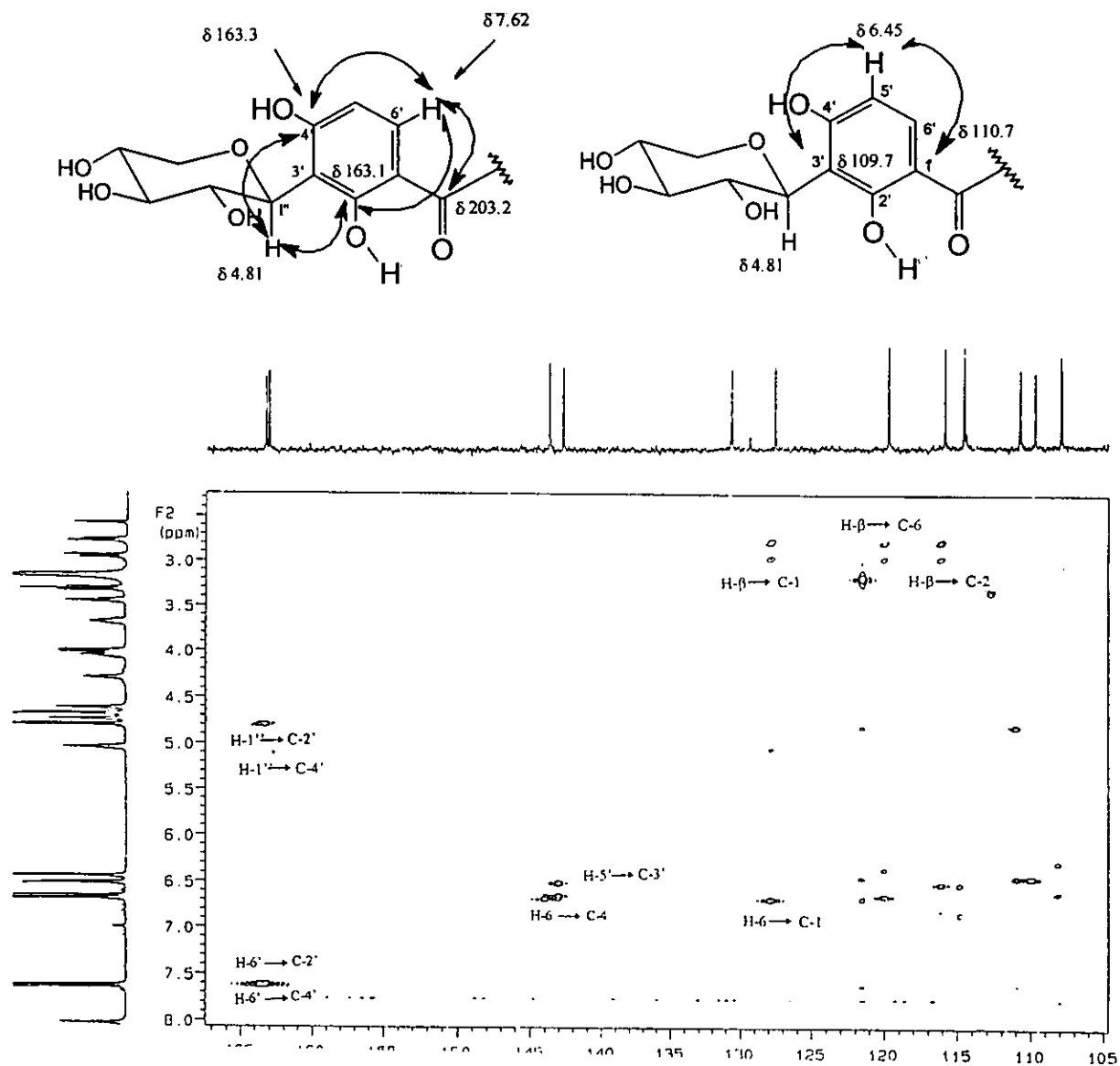


Figura 30. Correlaciones HMBC de los hidrógenos del anillo B

Tabla 9. Correlaciones HETCOR y HMBC de la  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona 93.

Posición	$\delta_C$	HETCOR	HMBC
		$\delta_H$	$\delta_C$
OH-C-2'		13.00, s	C-2', C-4', C-1', C-3'
$\alpha$	72.34	5.05 <i>dd</i> (12.5, 7.5)	C-1
$\beta$	40.57	2.96 <i>dd</i> (14.0, 4.5) 2.97 <i>dd</i> (14.0, 7.0)	C=O, C-1, C-6, C-2, C- $\alpha$
2	114.57	6.65 <i>d</i> (2.0)	C-3, C-4, C-6, c- $\beta$
5	115.88	6.69 <i>d</i> (8.0)	C-3, C-4, C-1
6	119.78	6.52 <i>dd</i> (8.0, 2.0)	C-4, C-5, C-2, C- $\beta$
5'	107.92	6.45 <i>d</i> ((9.0)	C-3', C-1'
6'	130.71	7.62 <i>d</i> (9.0)	C=O, C-4', C-2'
1''	73.98	4.81 <i>d</i> (10.0)	C-4', C-2', C-3', C-3'', C-2'', C-5''
2''	70.47	4.06 <i>t</i> (9.0)	C-3'', C-1''
3''	78.44	3.46 <i>t</i> (9.0)	C-2'', C-5''
4''	69.20	3.69 <i>ddd</i> (9.2, 4.5, 4.5)	-
5''	69.65	4.02 <i>dd</i> (11.0, 5.5) 3.32 <i>t</i> (10.5)	C-3'', C-1'', C-4''

De las cuatro posibilidades para ubicar los sustituyentes en el anillo A, estructuras H-K de la figura 31, se eligió K de acuerdo a las siguientes evidencias:

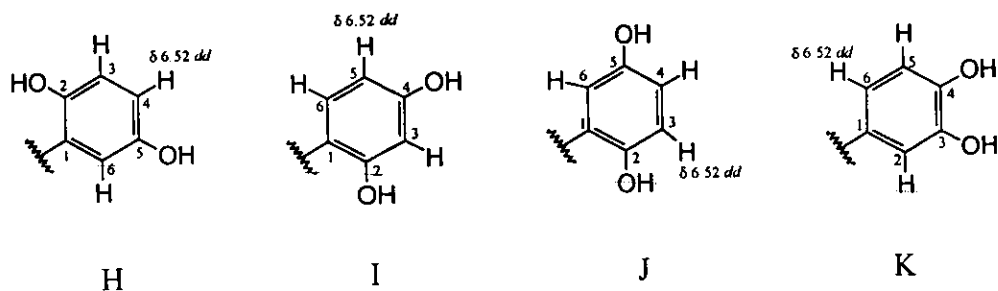


Figura 31. Estructuras probables del anillo A de la  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona 93

La correlación  $^3J$ , en el espectro HMBC (Tabla 9, figura 32), del doblete de dobletes centrado en  $\delta$  6.52 con sólo uno de los carbonos unidos a oxígeno en  $\delta$  142.7, así como con los carbonos en  $\delta$  115.8 ( $^2J$ ) y  $\delta$  114.5 ( $^3J$ ), permitió excluir las posibilidades H-J, ya que en estas, este protón daría lugar a correlación ya sea  $^3J$  ó  $^2J$  con ambos carbonos base de oxígeno; y en la estructura K, no es posible observar correlación entre el *dd* y el C-3. Esto permitió asignar, por un lado, el *dd* a H-6, y por el otro, la señal del carbono en  $\delta$  142.7 a C-4 y diferenciarlo del de C-3 que presenta un desplazamiento químico similar ( $\delta$  143.7). Las señales en  $\delta$  115.8 y  $\delta$  114.5 deben corresponder a C-5 y C-2, sin poder hasta este momento determinar la correspondencia a cada una, debido a su desplazamiento químico similar. Estas fueron diferenciadas gracias a la correlación observada entre los protones del carbono  $\beta$  ( $\delta$  2.96 y  $\delta$  2.77) y la señal de  $^{13}C$  en  $\delta$  115.8, la cual sólo puede corresponder a C-2 (Figura 31). Esta última correlación permitió también corroborar la estructura de  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona, ya que, hasta este momento de la discusión, no se descartaba la posibilidad de que el esqueleto fuera el de una  $\beta$ -hidroxidihidrochalcona.

Por otro lado, H-5 mostró correlación con los carbonos en  $\delta$  143.7 (C-3,  $^2J$ ),  $\delta$  142.7 (C-4,  $^3J$ ) y  $\delta$  127.6 (C-1,  $^3J$ ), mientras que el protón asignado a H-2 correlacionó con C-3 ( $^2J$ ), C-4 ( $^3J$ ) y C-6 ( $^3J$ ) (Tabla 9) lo que confirmó el patrón de sustitución 1, 3, 4- en el anillo A.

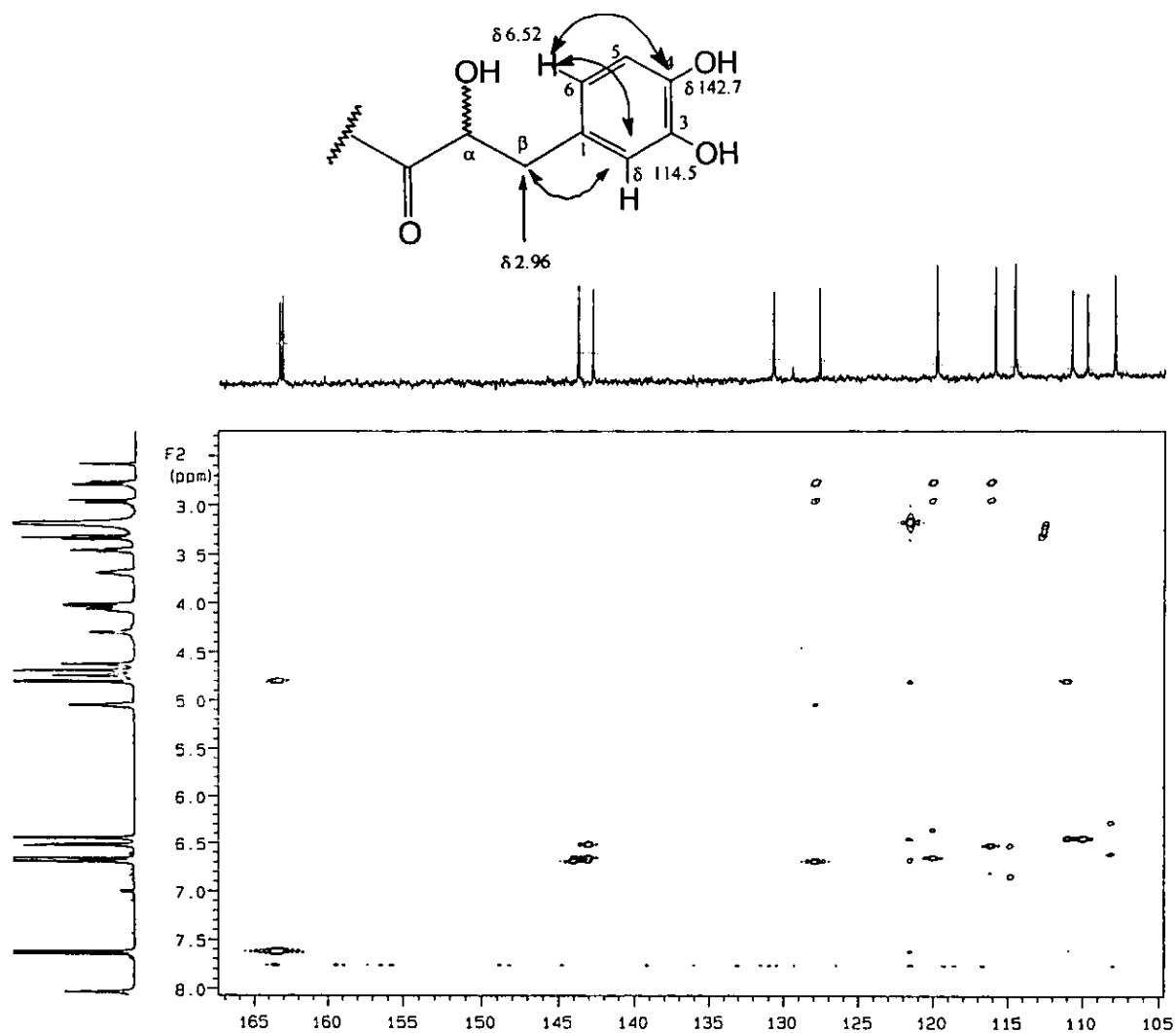


Figura 32. Correlaciones HMBC de los hidrógenos del anillo A

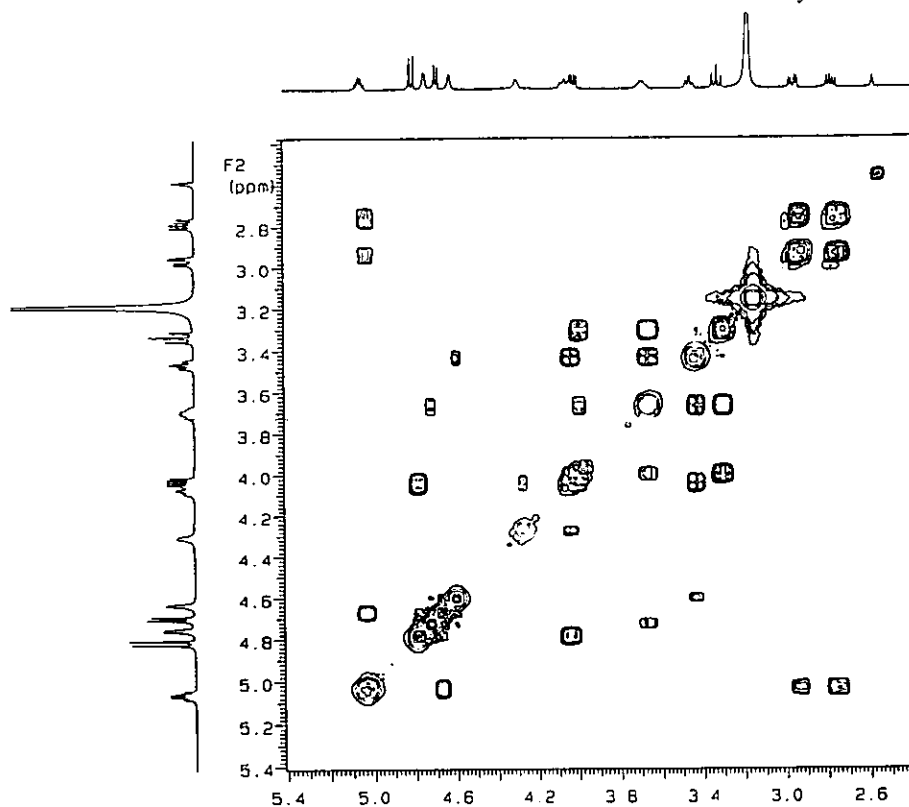
La acetilación de este compuesto, dio lugar a un solo producto (**93a**), cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 30) mostró la presencia de siete metilos de acetato en  $\delta$  2.92 (*s*, 6H), 2.82 (*s*, 3H), 2.10 (*s*, 3H), 2.07 (*s*, 3H), 2.02 (*s*, 3H) y 1.77 (*s*, 3H); confirmando la existencia de siete hidroxilos libres y uno quelatado con el carbonilo, cuya señal se observa en  $\delta$  12.79. En  $\delta$  7.59 y  $\delta$  6.45 se observa el sistema AB ( $J = 9.6$  Hz) del anillo B. La acetilación ocasionó que las señales de los hidrógenos del anillo A se colapsaran, observándose ahora un multiplete que integra para tres hidrógenos centrado en  $\delta$  7.10 para los hidrógenos H-2, H-5 y H-6. En  $\delta$  5.88 se localiza el doblete de dobletes con constantes de acoplamiento de 8.1 y 5.7 Hz asignable al hidrógeno

carbinólico de la posición  $\alpha$ , el cual muestra correlación en el espectro COSY (Espectro 31) con el doble de dobles que integra para dos hidrógenos centrado en  $\delta$  3.11 (2H, *dd*,  $J = 6.0, 4.5$  Hz) y que corresponde a los protones del metileno bencílico (H- $\beta$ ). En  $\delta$  6.45 aparece el doblete característico del protón anomérico de la xilosa con constante de acoplamiento de 9.0 Hz.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto peracetilado (Espectro 32, tabla 2 de la publicación No 3), muestra la señal para el carbono del carbonilo, los doce carbonos aromáticos, de los cuales cuatro se encuentran unidos a acetato ( $\delta$  164.04, 163.11, 142.01 y 141.21), tres son carbonos cuaternarios ( $\delta$  127.28, 108.74 y 134.60) y cinco son metinos ( $\delta$  123.50, 110.21, 124.45, 108.74 y 131.77). En la región de los carbonos unidos a heteroátomo, se observan seis carbonos, cinco correspondientes a la xilosa y uno al carbono  $\alpha$  de la dihidrochalcona; a campo alto, se observa la señal del metileno bencílico C- $\beta$ .

Al igual que para el producto natural, la asignación de los protones de la xilosa fue establecida siguiendo las conectividades entre estos protones en el espectro COSY. Estas asignaciones se encuentran enlistadas en la Tabla 1 de la publicación 3.

Por otro lado, el experimento NOESY del producto natural (Espectro 33), permitió corroborar la estructura de la xilosa, ya que se observan las correlaciones a través del campo entre H-1'' con H-3'' y H-5 $\alpha$ '', y H-2'' con H-4'', como se ilustra en la expansión de este espectro de la Figura 33. Este experimento, sin embargo muestra los acoplamientos escalares entre los protones *trans* del azúcar, esto es, se observan acoplamientos entre H-1'' con H-2'', H-2'' con H-3'' etc. Esto probablemente sea debido a que la resolución digital del equipo era suficientemente alta como para registrar dichos acoplamientos.



Este experimento también permitió observar interacción entre el protón aromático en  $\delta$  7.62 (H-6') con uno de los protones del metileno alifático de la posición  $\beta$  ( $\delta$  2.96) y con el protón carbinólico secundario  $\alpha$  en  $\delta$  5.05. Asimismo, se observa interacción entre este último protón con los hidrógenos aromáticos de la posición C-6 ( $\delta$  6.52) y C-2 ( $\delta$  6.65) del anillo A. Mediante el análisis de modelos Dreiding de la molécula, y utilizando el programa Spartan resultó evidente que existe una conformación preferida en la  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona, en la que los grupos bencilo y fenilo se encuentran antiperiplanares entre sí, con respecto al enlace formado por los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 34), esto permite que el hidrógeno proS del metileno  $\beta$  se ubique cerca del hidrógeno aromático de C-6'; el giro libre existente en el anillo A explica la interacción del hidrógeno carbinólico con los hidrógenos aromáticos de C-6 y C-2. Esta preferencia conformacional podría ser debida a que el anillo A más voluminoso, se oriente opuesto al hidroxilo del carbono  $\alpha$ .

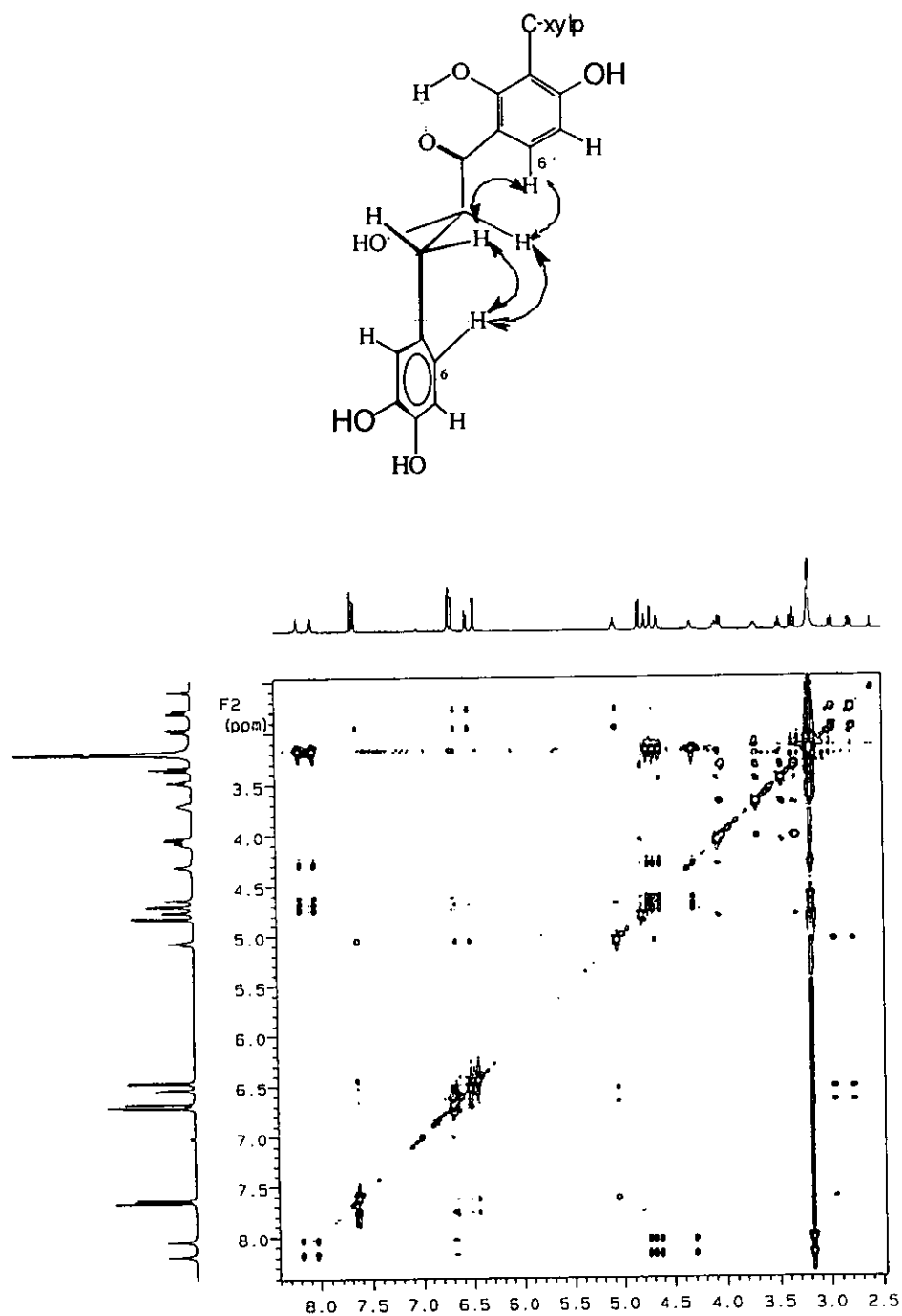
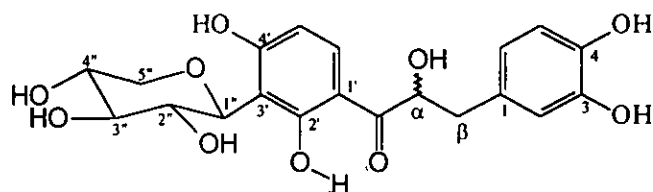


Figura 34. Interacciones NOE y conformación preferida de 93.

Aunque no hay evidencias experimentales que permitan establecer a que familia estereoquímica pertenece la xilosa (D ó L), se asume, por su frecuencia en la naturaleza, la pertenencia a la familia D, por lo que a este producto natural le corresponde el nombre

de 3'-C-β-D-xilopiranosil-α,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (93), la cual no ha sido descrita hasta el momento, por lo que representa un nuevo metabolito secundario.



93

### Elucidación de la Estructura Molecular de la 3'-O-β-D-xilopiranosil-α, 2', 3, 4, 4'-pentahidroxidihidrochalcona (94)

El compuesto minoritario de la mezcla de α-hidroxidihidrochalconas de las fracciones 40-61 fue obtenido como un sólido amarillo claro de p.f. de 146-149 °C. Su espectro de infrarrojo (Espectro 34) indicó la presencia de hidroxilos (3399 cm<sup>-1</sup>), carbonilo quelatado (1620 cm<sup>-1</sup>) y anillos aromáticos (1517 cm<sup>-1</sup>), lo que sugiere la existencia del mismo tipo de esqueleto que el compuesto anteriormente descrito; esto se confirmó con el espectro de ultravioleta (Espectro 35), el cual resultó ser idéntico al del compuesto (93). También se observan máximos de absorción en 322.5, 309, 284.5, 253.0, 218.5, 213.0 y 203.5, característicos de una dihidrochalcona.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (espectro 36) de este compuesto fue muy similar al de (93), observándose en δ 13.22 el hidrógeno quelatado con el carbonilo; en la región de los hidrógenos aromáticos resuena el sistema AB formado por los hidrógenos del anillo B tetrasustituído y el sistema AMX formado por los hidrógenos del anillo A trisustituído.

Este compuesto también incluye en su estructura un fragmento glicosídico, puesto que el protón anomérico del mismo se muestra como un doblete con J = 9.6 Hz, centrado en δ 4.50. Con la ayuda del experimento de correlación homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Figura 35), se identificó el azúcar también como xilosa, al establecerse la conectividad secuencial entre los hidrógenos H-1'' (δ 4.50), H-2'' (δ 4.03, t, J = 9.5 Hz),



H-3" ( $\delta$  3.03, *t*,  $J = 10.5$  Hz), H-4" ( $\delta$  3.63, *m*), H-5" *ax* ( $\delta$  3.12 *t*,  $J = 8.7$  Hz) y H-5" *ec* ( $\delta$  4.85, *t*,  $J = 5.2$  Hz). Mediante esta misma técnica se localizó el sistema ABX formado por el hidrógeno carbinólico  $\alpha$  y los hidrógenos del metileno bencílico  $\beta$ .

La similitud del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de este compuesto con el discutido para **93**, establece la presencia de los mismos substituyentes, y sólo puede deberse al tipo de glicosilación o a la diferente ubicación del azúcar en la molécula. Esta cuestión fue resuelta al examinar los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT (Espectro 37) de este compuesto, los cuales al ser comparados con el del compuesto **93** (Tabla 2 de la publicación No 3), permitió establecer que en la región entre  $\delta$  100.0 y  $\delta$  164.0 se localizan trece carbonos en lugar de doce. Asimismo, en la región de los carbonos unidos a heteroátomoa pueden contarse sólo cuatro metinos y un metileno. En  $\delta$  204.7 y  $\delta$  40.04 resuenan las señales del carbonilo y del metileno bencílico, respectivamente.

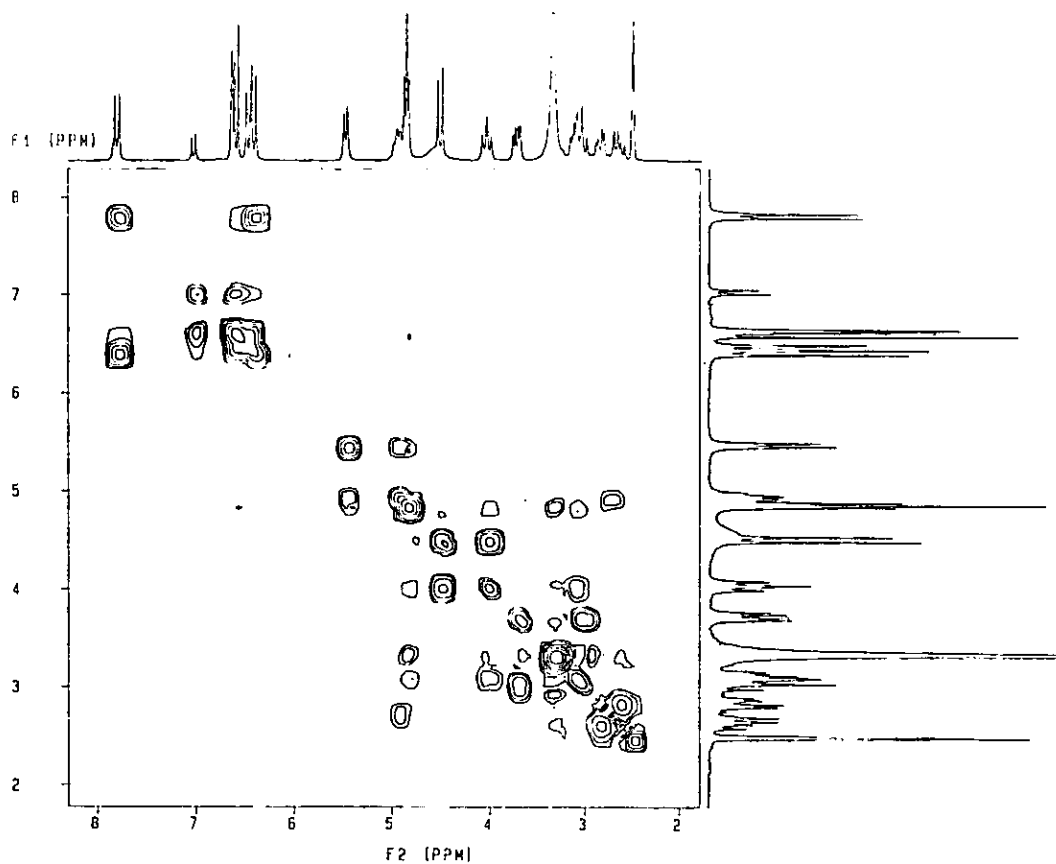
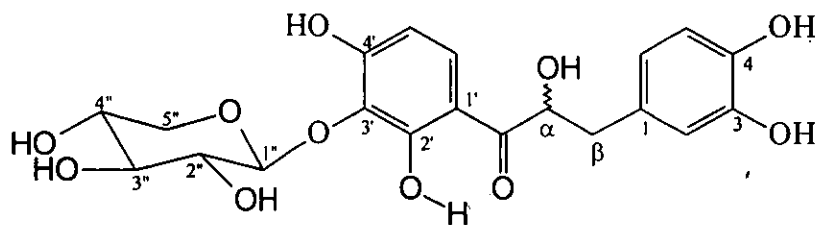


Figura 35. COSY de los hidrógenos del azúcar de **94**.

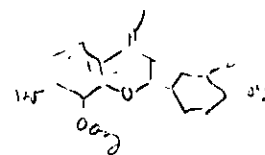
Este análisis hace evidente que este compuesto es una  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona con el mismo patrón de sustitución que 93, pero que difiere de esta última en que este compuesto presenta O-glicosilación. La similitud en los desplazamientos químicos de los carbonos en ambos compuestos permitió establecer el mismo patrón de sustitución, y asignar cada uno de los carbonos en este compuesto como se muestra en la Tabla 2 de la publicación No 3.

El efecto paramagnético generado por la presencia de un azúcar a través de un enlace C-C (C-glicosilación), en un anillo aromático, es de  $\Delta\delta$  5-10, mientras que el efecto inducido por un enlace C-O (O-glicosilación) es de  $\Delta\delta$  10-20.<sup>133</sup> Por lo tanto, la presencia de un carbono cuaternario en  $\delta$  128.6, permite su asignación como C-3', mientras que la señal de metino en  $\delta$  114.8 fue asignada al carbono anomérico de la xilosa (C-1'').

Estas evidencias espectroscópicas permiten asignar la estructura 94 a este compuesto, a la que le corresponde el nombre de 3'-O- $\beta$ -D-xilopiranosil- $\alpha$ , 2', 3, 4, 4'-pentahidroxidihidrochalcona. Este compuesto también representa un nuevo metabolito secundario, aún no descrito en la literatura.



94



### Determinación de la Estructura Química de la 3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ , 2', 3, 4, 4'-pentahidroxidihidrochalcona (33)

El componente mayoritario de la mezcla de  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas, fue obtenido en forma pura de las fracciones que eluyeron con un tiempo de retención de 2.0 min en la cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa (ver la parte

experimental de la publicación número 3). Fue un producto cristalino amarillo claro de p.f. 200-203°C. Su espectro de infrarrojo (Espectro 38), mostró bandas de absorción para hidroxilo ( $3450\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo quelatado ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ) y doble enlace aromático ( $1515\text{ cm}^{-1}$ ). El espectro de UV del mismo (Espectro 39), también fue idéntico al de los otros compuestos, observándose máximos de absorción en 321.5, 309.0, 284.5, 253.5, 218.0, 213.5 y 204.0 nm.

El espectro de RMN<sup>1</sup> H a 300 MHz (Espectro 40) de este compuesto, presentó una gran similitud con el de los compuestos anteriores (93 y 94). En  $\delta$  12.86 aparece el singlete del hidroxilo quelatado con el carbonilo; el sistema AB del anillo B, formado por los hidrógenos H-6' y H-5'; el sistema ABX del anillo A, formado por los protones H-2, H-5 y H-6 y el sistema ABX alifático formado por los hidrógenos H- $\alpha$  y H- $\beta$  del esqueleto de la  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona. Estas asignaciones fueron corroboradas mediante el espectro de correlación homonuclear a dos dimensiones <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Espectro 42).

El protón anomérico de la parte glicosídica, resuena en  $\delta$  4.97 (1H, *d*,  $J = 9.6\text{ Hz}$ ), y sirvió de base para establecer la secuencia de correlación del azúcar en el espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Figura 36).

El análisis del espectro de RMN <sup>13</sup>C y DEPT de este compuesto (Espectro 41, Tabla 2 de la publicación No 3) está de acuerdo con la estructura 33, ya que se observan doce carbonos aromáticos, de los cuales, cinco son metinos, cuatro son carbonos cuaternarios unidos a oxígeno, y tres son carbonos cuaternarios unidos a carbono, lo que indica que al igual que para el compuesto 93, esta chalcona debe de estar C-glicosilada, al no localizarse en esta región el carbono anomérico del azúcar. Así mismo, en la región de los carbonos alifáticos unidos a heteroátomo, se localizan siete de ellos, de los cuales, seis corresponden a la hexosa y uno al carbono carbinólico  $\alpha$ . El carbono del carbonilo resuena en  $\delta$  204.7, y el carbono bencílico  $\beta$  aparece en  $\delta$  40.2.

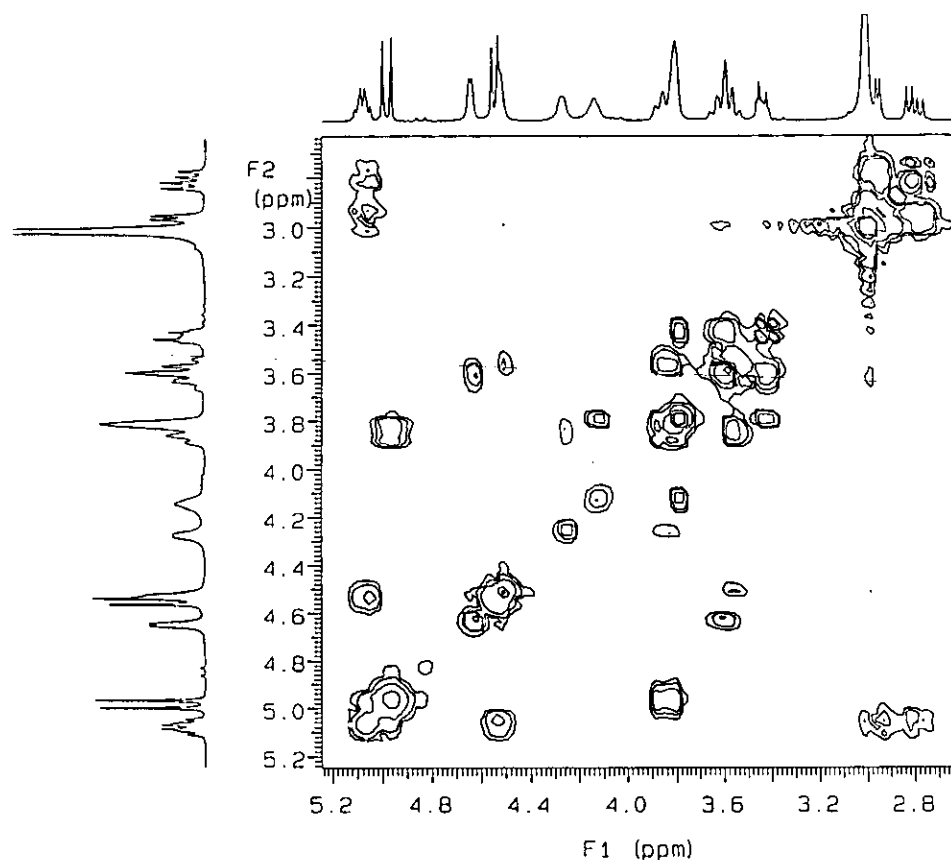
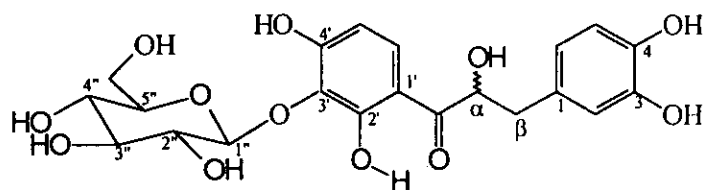


Figura 36 Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de los hidrógenos del azúcar de **33**.

El azúcar presente en esta molécula fue caracterizado como  $\beta$ -D-glucopiranososa mediante la comparación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos y los carbonos de la misma con los descritos en la literatura,<sup>133</sup> por lo que la estructura propuesta para este compuesto queda establecida como la 3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ -2' 2, 4',4-pentahidroxidihidrochalcona (**33**), la cual ya había sido aislada anteriormente de esta misma especie por Beltrami et. al.<sup>93</sup>



33

La naturaleza polihidroxílica de estos compuestos hace que los desplazamientos químicos sean muy sensibles al disolvente. Se observa que al pasar de un disolvente menos polar a uno más polar, existe un efecto de protección en los hidrógenos adyacentes al hidroxilo, debido al mayor efecto de solvatación en disolventes polares. Esto se ve evidenciado por el efecto de protección que registran los protones H- $\alpha$ , H-5, H-6 y H-6' en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 33 (Tabla 10), al cambiar el disolvente de  $\text{CDCl}_3$ -DMSO (Espectro 40) a DMSO- $\text{D}_2\text{O}$  (Espectro 43). Evidentemente, los protones geminales a hidroxilo de la glucosa sufren también este efecto, al encontrarse más solvatados. En este caso, los hidrógenos H-3'' y H-5'' del azúcar, que en  $\text{CHCl}_3$ -DMSO se encuentran colapsados, al utilizar DMSO- $\text{D}_2\text{O}$  se separan considerablemente (Tabla 10), H-3'' aparece en  $\delta$  3.66 como triplete ( $J = 9.6$  Hz), mientras que H-5'' se observa también como triplete en  $\delta$  3.20 ( $J = 10.2$  Hz). Estos efectos de solvatación hacen difícil la comparación de espectros de RMN  $^1\text{H}$  corridos en diferentes disolventes, como sucedió al comparar el espectro de este compuesto con el descrito por Beltrami quien registró el espectro en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Tabla 10) y en donde se observa que los hidrógenos que sufren un mayor efecto son H- $\alpha$ , y los protones base de hidroxilo de la glucosa, haciendo difícil su comparación. En el presente caso, además de correr el espectro de 33 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  para su comparación directa, fue necesario hacer uso de otras técnicas de RMN como la comparación del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , para establecer la similitud entre estos compuestos.

Cabe mencionar que Beltrami *et. al.* no establecieron inequívocamente la asignación de los carbonos aromáticos en este compuesto, por lo que en el presente trabajo se llevó a cabo dicha asignación mediante el análisis de los espectros de

correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a una ligadura (HMQC, Espectro 44) y a dos y tres ligaduras (HMBC, Espectro 45).

De manera análoga al análisis descrito para la  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona **93**, las asignaciones de los carbonos unidos a hidrógeno de este compuesto, se basaron en las conectividades a una ligadura encontradas en el espectro HMQC.

**Tabla 10. RMN $^1\text{H}$  de **33** en diferentes disolventes**

	DMSO- $\text{CDCl}_3$	DMSO- $\text{D}_2\text{O}$	$\text{CD}_3\text{OD}^a$
H- $\alpha$	5.07 dd (12.3, 7.2)	4.93 dd (7.2, 5.4)	5.15, dd (7.4, 5.0)
H- $\beta$	2.95 d (4.8)	2.84 dd (14.1, 5.4)	2.96, dd (13.6, 7.4)
H- $\beta$	2.80, d (14.1, 7.2)	2.64 dd (14.1, 7.5)	2.78, dd (13.6, 5.0)
H-2	6.62, d (2.1)	6.59 d (2.1)	6.64, d (1.8)
H-5	6.70, d (8.4)	6.57 d (7.8)	6.65, d (8.1)
H-6	6.54, dd (8.1, 2.1)	6.43 dd (8.1, 2.4)	6.53, dd (8.1, 1.8)
H-5'	6.41, d (9.0)	6.39 d (8.7)	6.42, d (8.8)
H-6'	7.62, d (9.0)	7.71 d (9.0)	7.69, d (8.8)
H-1''	4.97, d (9.6)	4.63 d (9.9)	4.93, d (9.3)
H-2''	3.87, t, (8.7)	3.95 t (9.3)	4.11, t (9.0)
H-3''	3.59, m (9.3)	3.66 t (9.6)	3.45-3.52, m
H-4''	3.44, m	3.45 dd (11.7, 4.5)	3.45-3.52, m
H-5''	3.59, m (9.3)	3.20 t (10.2)	3.35-3.45, m
H-6''a	3.80, sa	3.20, m	3.35-3.45, m
H-6''b			3.86, dd (12.1, 1.8)

<sup>a</sup> Datos tomados de Beltrami *et. al.*<sup>98</sup>

Igualmente, los hidrógenos de los anillos A y B sirvieron de base para la asignación de los carbonos cuaternarios en el espectro HMBC (Figura 37, tabla 11). De esta manera, las correlaciones encontradas entre el hidrógeno doblete del anillo B con el carbonilo ( $\delta$  204.08), y con los carbonos unidos a hidroxilo en  $\delta$  163.7 y 163.5, establece su ubicación en H-6'; mientras que la correlación de este mismo protón con el carbono

Tabla 11. Conectividades a  $^1J$ ,  $^2J$  y  $^3J$  encontradas en los espectros de HMQC y HMBC de 33.

Posición	$\delta_H$	HMQC $\delta_C$	HMBC
OH-C-2'	13.07 s		C-1', C-2', C-3'
H- $\alpha$	4.99 dd (12.0, 6.0)	73.11	C-1, C-1'
H- $\beta$	2.93 dd (14.0, 5.5) 2.75 dd (14.0, 8.0)	40.47	C=O, C-1, C-6, C-2, C- $\alpha$
H-2	6.66 d (2.5)	116.53	C-4, C-1, C-6
H-5	6.65 d (8.5)	115.13	C-3, C-1
H-6	6.51 dd (8.5, 2.0)	120.05	C-4, C-2, C-6, C- $\beta$
H-5'	6.42 d (9.0)	108.40	C-3', C-1', C-4'
H-6'	7.72 d (9.0)	131.36	C=O, C-4', C-2'
H-1''	4.82 d (9.5)	73.55	C-2', C-3', C-4', C-2'', C-3'', C-5''
H-2''	3.94 t (9.0)	71.10	C-3'', C-1''
H-3''	3.44 sa (2H)	78.38	C-4''
H-4''	3.44 sa (2H)	69.77	C-3''
H-5''	3.34 m	80.57	C-3'', C-4''
H-6''	3.75 dd (12.0, 2.0) 3.65 dd (12, 5.0)	60.83	C-4''

cuaternario en  $\delta$  110.4, permite asignar esta última señal a C-1'. Asimismo, las conectividades a  $^3J$  entre H-5' ( $\delta$  6.42) y los carbonos cuaternarios unidos a carbono en  $\delta$  110.4 (C-1') y 111.73, permitió la asignación de esta última señal a C-3'. La correlación a  $^3J$  entre el protón anomérico de la glucosa ( $\delta$  4.97) y C-3', establece la ubicación del azúcar en esa posición.

Por otro lado, en el anillo A, la correlación  $^3J$  observada entre la señal del hidrógeno asignado a H-6 ( $\delta$  6.51) y los carbonos en  $\delta$  143.37 y 116.53, permitió su asignación como C-4 y C-2 respectivamente (Figura 38). H-2 ( $\delta$  6.65) y H-5 ( $\delta$  6.66) tienen un desplazamiento químico similar, por lo que no fue posible diferenciar sus conectividades en el espectro HMBC; no obstante, la correlación observada entre estos dos protones con el carbono cuaternario unido a carbono en  $\delta$  128.29, permitió la asignación de este último a C-1.

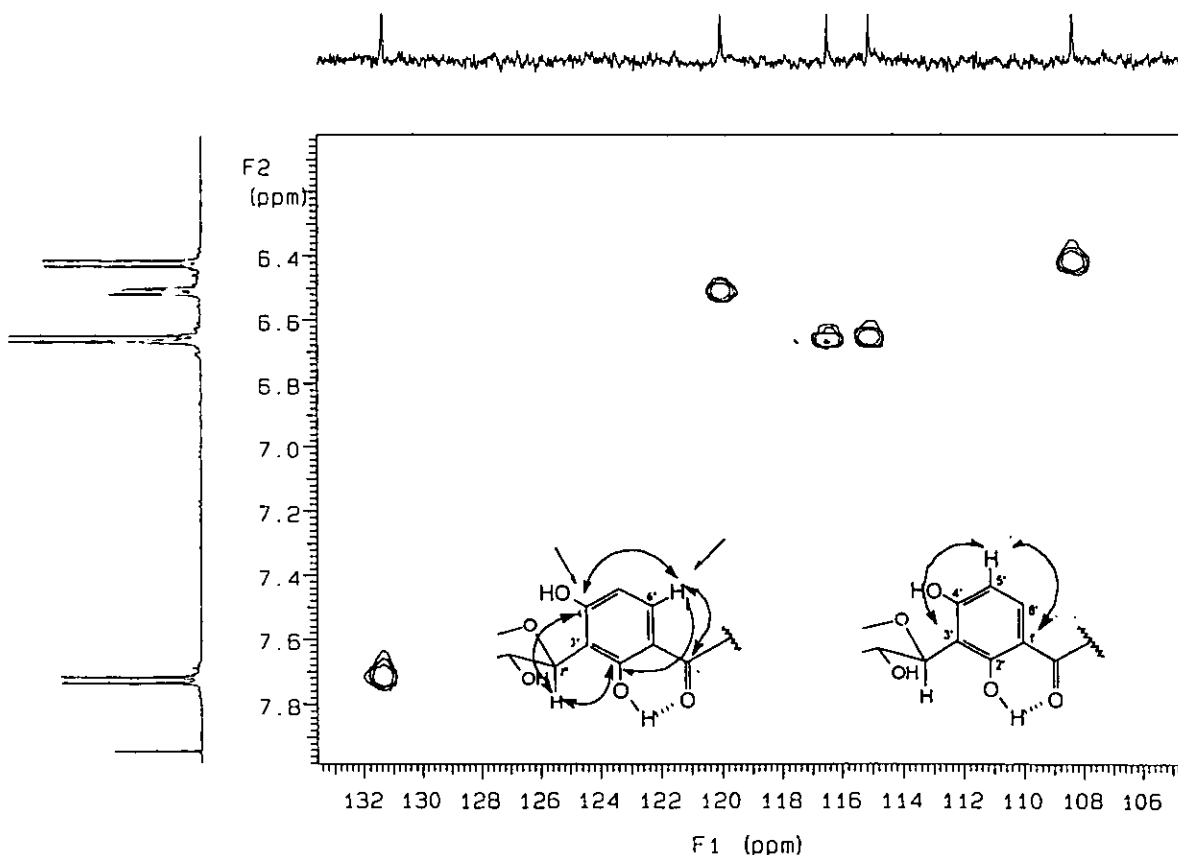


Figura 37. Conectividades HMBC de los protones del anillo B de 33.



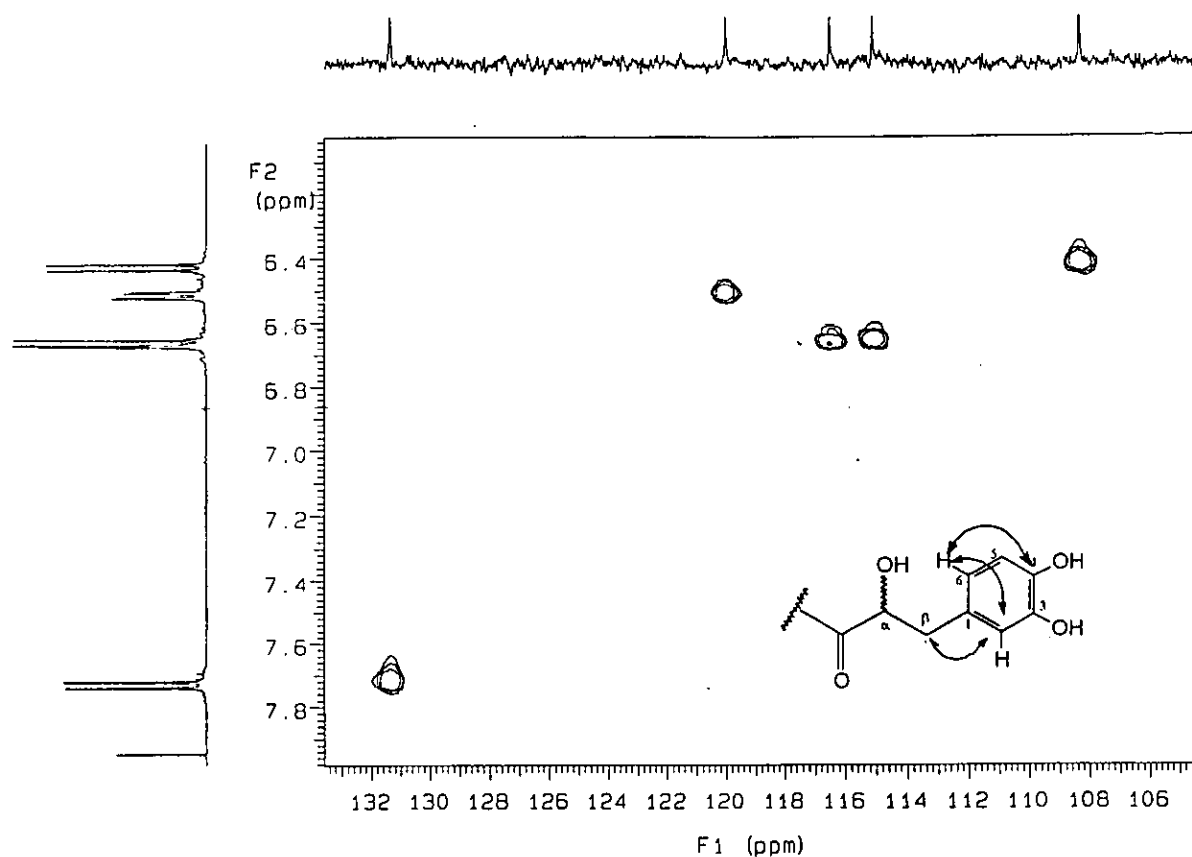


Figura 38. Correlaciones HMBC de los hidrogenos del anillo A

Por lo tanto, con este análisis fueron asignadas inequívocamente las señales en RMN  $^{13}\text{C}$  de la 3'-C- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (33), las cuales se enlistan en la tabla 2 de la tercera publicación.

#### Determinación de la Estructura de la $\alpha$ , 2', 3, 4, 4'-pentahidroxidihidrochalcona (92)

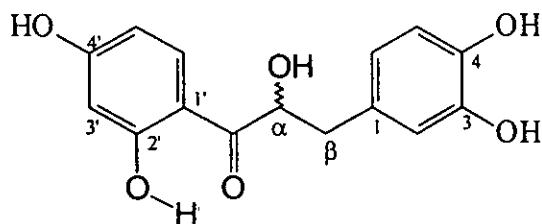
El compuesto menos polar aislado del extracto acetónico de *E. polystachya*, fue un sólido amorfo de color amarillo, relativamente inestable en solución. Su espectro de infrarrojo (Espectro 46) mostró gran similitud con el de las hidroxidihidrochalconas antes descritas, observándose la banda de absorción característica de hidroxilos ( $3398\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo quelatado ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ) y anillos aromáticos ( $1499\text{ cm}^{-1}$ ). Su espectro de

RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 47), no presenta, en la región de los hidrógenos unidos a heteroátomo, las señales del azúcar, por lo que se trata de una aglicona de las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas **33** y **93-94** descritas anteriormente. En  $\delta$  7.77, 6.54 y 6.44, se localiza un sistema ABX de un anillo aromático trisustituído; en  $\delta$  7.00,  $\delta$  6.89 y  $\delta$  6.81 se observa un segundo sistema ABX de otro anillo aromático trisustituído. En la región de los hidrógenos alifáticos resuena un tercer sistema ABX en  $\delta$  5.30  $\delta$  3.00 y  $\delta$  2.73 que es asignado a los hidrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  del esqueleto de  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona. El doblete centrado en  $\delta$  7.77 fue asignado al protón H-6', el cual debido a su cercanía al carbonilo, muestra un efecto de desprotección característico. Estas conectividades fueron establecidas mediante las correlaciones encontradas en el espectro de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Espectro 48)

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 49, Tabla 2 de la publicación No 3) de este compuesto muestra: un carbonilo, seis metinos aromáticos, seis carbonos cuaternarios también aromáticos, un metino alifático base de oxígeno y un metileno.

Las conectividades encontradas en el espectro de correlación heteronuclear a una ligadura  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC, espectro 50) entre los hidrógenos y metinos y metilenos de la molécula, permitieron las asignaciones espectroscópicas de los mismos, las cuales están de acuerdo con los datos de  $^{13}\text{C}$  de las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas **33**, **93** y **94** anteriormente descritas.

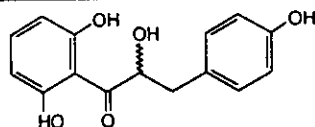
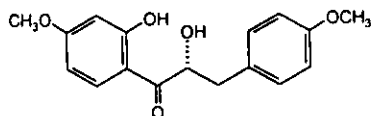
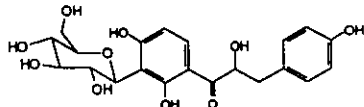
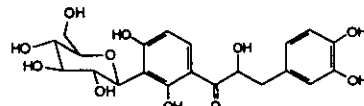
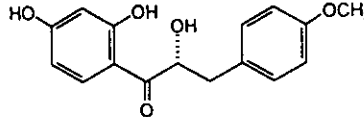
Por lo tanto, a la estructura propuesta para este compuesto (**92**) le corresponde el nombre de  $\alpha,2',2,4'4$ -pentahidroxidihidrochalcona.

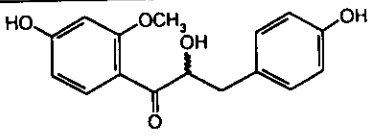
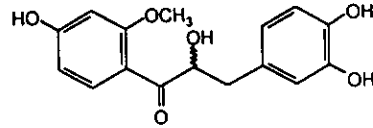
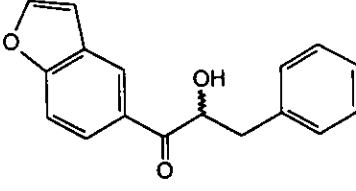
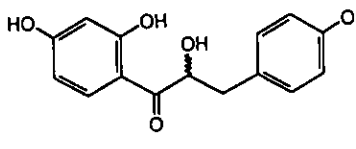


**Determinación de la configuración absoluta de las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas 33, 92-94.**

Las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas son relativamente raras en la naturaleza, habiéndose descrito hasta el momento, solamente nueve de ellas (32-33 y 96-101) de nueve especies diferentes, pertenecientes únicamente a la familia Leguminosae (Tabla 12).

Tabla 12.  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas naturales

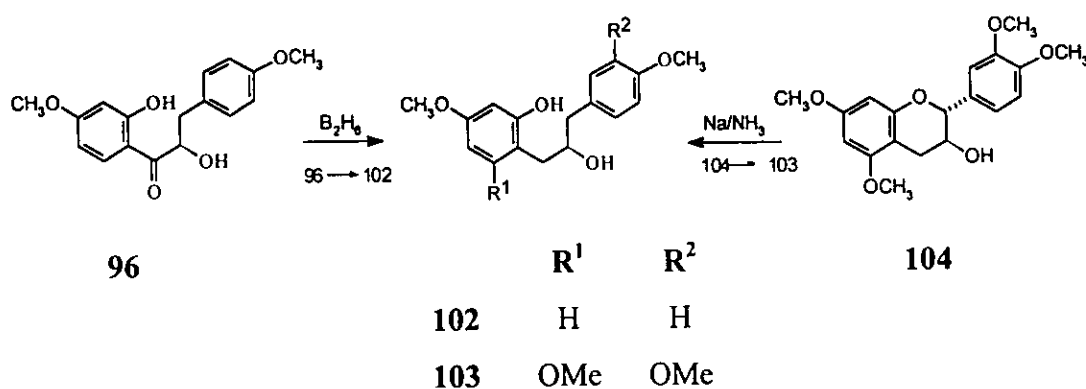
Compuesto	Origen vegetal	Referencia
 Nubigenol <b>95</b>	<i>Podocarpus nubigena</i>	135
 ( $\alpha$ R)- $\alpha$ ,2'-dihidroxi-4,4'- dimetoxidihidrochalcona <b>96</b>	<i>Pterocarpus angolensis</i>	136
 Coatlina A <b>32</b>	<i>Eysenhardtia polystachya</i> <i>Pterocarpus marsupium</i>	93 137
 Coatlina B <b>33</b>	<i>Eysenhardtia polystachya</i>	93
 ( $\alpha$ R)-4-metoxi- $\alpha$ ,2',4'- trihidroxidihidrochalcona <b>97</b>	<i>Pericopsis elata</i> <i>Virgilis oroboides</i>	138 139

Compuesto	Origen vegetal	Referencia
 <p>2'-metoxi-<math>\alpha</math>, 4', 4'- trihidroxidihidrochalcona <b>98</b></p>	<i>Xanthocercis zambesiaca</i>	140
 <p>2'-metoxi-<math>\alpha</math>, 3, 4', 4'- tetrahidroxidihidrochalcona <b>99</b></p>	<i>Xanthocercis zambesiaca</i>	140
 <p>Castillena E <b>100</b></p>	<i>Lonchocarpus castilloi</i>	141
 <p><math>\alpha</math>, 2', 4, 4'- tetrahidroxidihidrochalcona <b>101</b></p>	<i>Pericopsis elata</i> <i>Zollernia paraensis</i>	138 142

Aunque solamente se ha descrito la configuración absoluta de dos  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas naturales (96 y 97); en 1990, Bezuidenhout y col.,<sup>143</sup> describieron la síntesis de una gran número de ( $\alpha R$ ) y ( $\alpha S$ )- $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas a partir de las correspondientes chalconas, correlacionando sus espectros de dicroísmo circular con la configuración absoluta, utilizando además el método de la quiralidad excitada. En este estudio, se ha determinado que el espectro de dicroísmo circular de las ( $\alpha R$ )- $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas, muestra un pequeño efecto Cotton negativo en la región de 310-330 nm debido a la transición  $n, \pi^*$ . La transición  $\pi, \pi^*$ , muestra un efecto

Cotton positivo en la región de 260-290, y uno negativo en la región de 230-250 nm. Las ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas presentan efectos Cotton contrarios.

El espectro de dicroísmo circular de la  $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**92**) aislada de *E. polystachya* en este trabajo, se muestra en la figura 39. Este muestra un fuerte efecto Cotton negativo en 306.5 nm (-1.3374), la curva, a mayor longitud de onda, no muestra efectos Cotton, pero es semejante a la descrita para **96**<sup>136</sup>. La  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona **92** difiere de **96** en la presencia de una función oxigenada adicional en el anillo A, lo cual ocasiona que la transición  $\pi, \pi^*$  que aparece con dos efectos Cotton en la región de 260-290 nm y 230-250 nm, se desplace a longitudes de onda mayores (225-270 y 305-315 nm), cubriendo la transición  $n, \pi^*$  ((310-330 nm) que es débil.<sup>143</sup> La similitud en las curvas de dicroísmo circular de estos compuestos, indica que estos presentan la misma configuración absoluta en C- $\alpha$ , la cual fue descrita para **96** como (*R*), y fue corroborada mediante la comparación de la curva de dicroísmo circular de su derivado 2-propanol (**102**), con el análogo (**103**) obtenido por reducción de Birch de la (2*R*,3*S*)-(+)-3', 4', 5, 7-tetrametoxi-catequina (**104**) de configuración absoluta conocida (Esquema 5).



Esquema 5. Correlación Química de la ( $\alpha$ R)- $\alpha,2'$ -dihidroxi-4,4'-dimetoxidihidrochalcona (**96**)

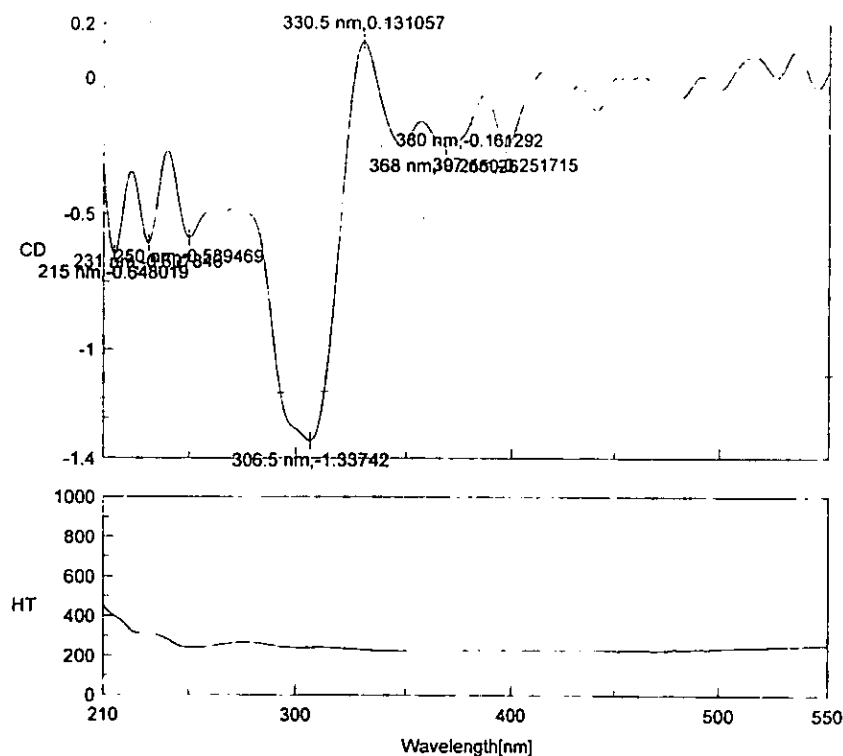
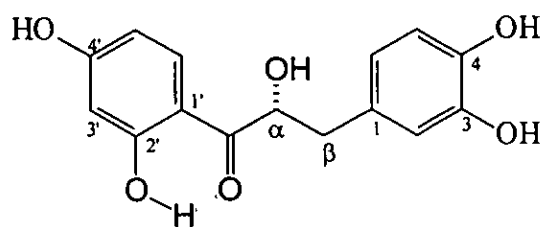


Figura 39. Espectro de dicroísmo circular del compuesto **92**.

De acuerdo ha estos resultados, el nombre que le corresponde a **92** es ( $\alpha R$ )- $\alpha$ , 2', 3, 4, 4'-pentahidroxidihidrochalcona, y corresponde al derivado 2'-desmetil de **99** aislada de *Xanthocercis zambesiaca*.<sup>140</sup> La dihidrochalcona **92** no ha sido descrita aún como producto natural por lo que representa un nuevo metabolito secundario de *E. polystachya*.



**92**

Los espectros de dicroísmo circular de las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas **33**, **93** y **94**, se muestran en las figuras 40-42. La dihidrochalcona **93** muestra efectos Cotton negativo y positivo secuenciales (Figura 40) a 203 (-2.81), 212 (1.84), 239 (-16.72), 256 (1.37),

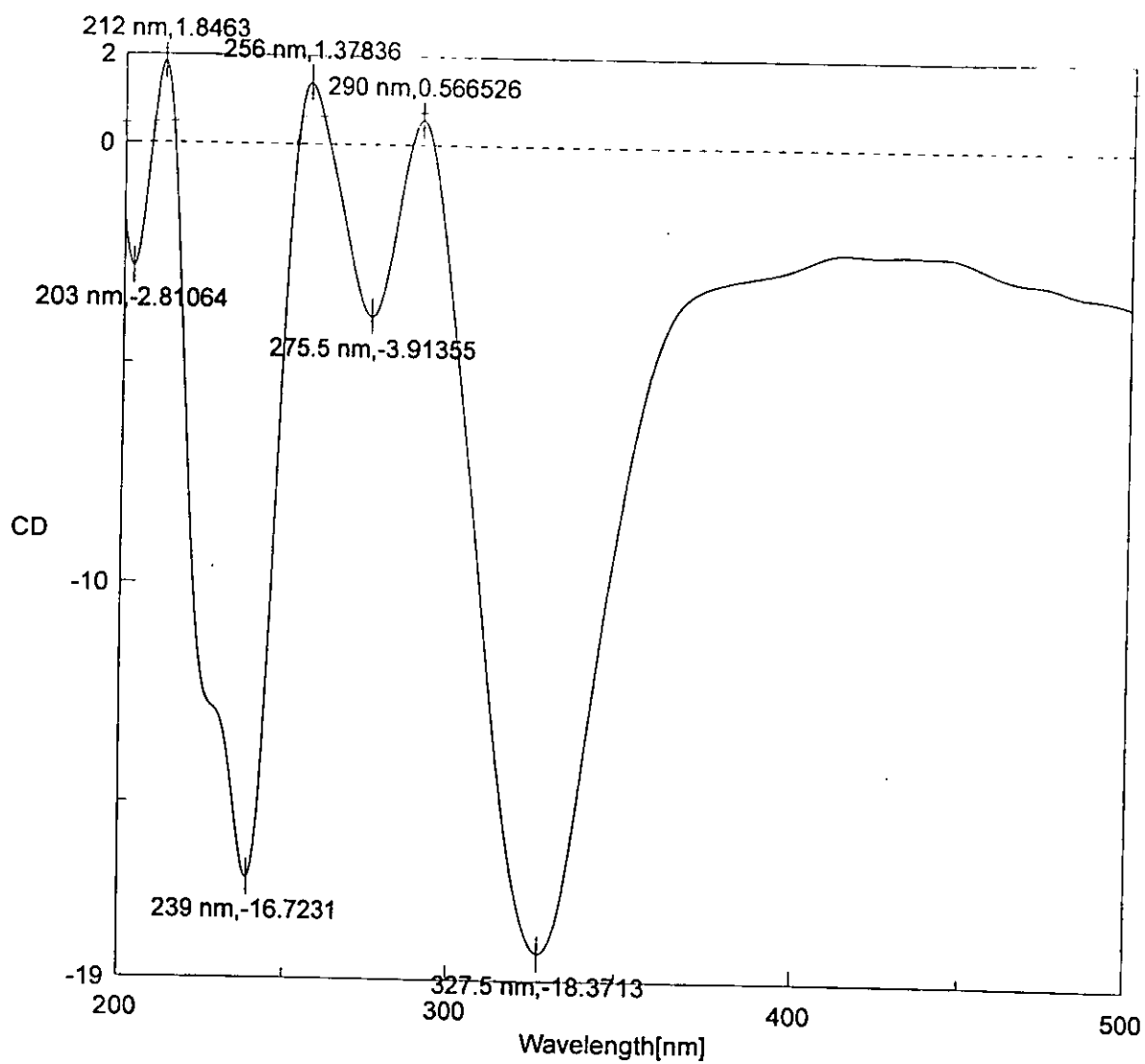


Figura 40. Espectro de dicroísmo circular de la dihidrochalcona 93

275.5 (-3.91), 290 (0.56) y 327 nm (-18.37); la comparación de esta curva con la de la aglicona **92**, pone en evidencia una mayor complejidad de la misma en la región de 203-240 nm, lo cual es debido a la presencia de los centros quirales de la unidad de  $\beta$ -D-xilopiranosilo en C-3'; no obstante, es posible observar en el espectro los dos efectos Cotton correspondientes a la transición  $\pi, \pi^*$  a 290 nm (positivo) y 239 nm (negativo), así como el efecto Cotton negativo a 327 nm correspondiente a la transición  $n, \pi^*$ , por lo que este compuesto tiene la misma configuración en C- $\alpha$  que **92**, y por lo tanto el nombre que le corresponde es ( $\alpha$ R)-3'-C- $\beta$ -D-xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**93**).

Las curvas de dicroísmo circular de las dihidrochalconas **94** y **33** (Figuras 41 y 42 respectivamente) son similares entre sí, éstas muestran el efecto Cotton negativo 330 nm correspondiente a la transición  $n, \pi^*$ . Sin embargo sólo se observa uno de los dos efectos Cotton correspondientes a la transición  $\pi, \pi^*$  (efecto Cotton negativo a 239 nm). Puede observarse; sin embargo que la forma de la curva es similar a la de **92** indicando su relación estereoquímica. Además, debido a su mismo origen biosintético, es probable que presenten la misma configuración en C- $\alpha$ .

Por otro lado, Bezuidenhoudt y col. describieron el espectro de dicroísmo circular de la Coatlina A (**32**) aislada de *Pterocarpus marsupium*,<sup>137</sup> el cual resulta ser totalmente opuesto al obtenido para el mismo compuesto aislado de *E. polystachya* en este trabajo, por lo que se trata de curvas enantioméricas, indicando entonces la relación enantiomérica en  $\alpha$ .



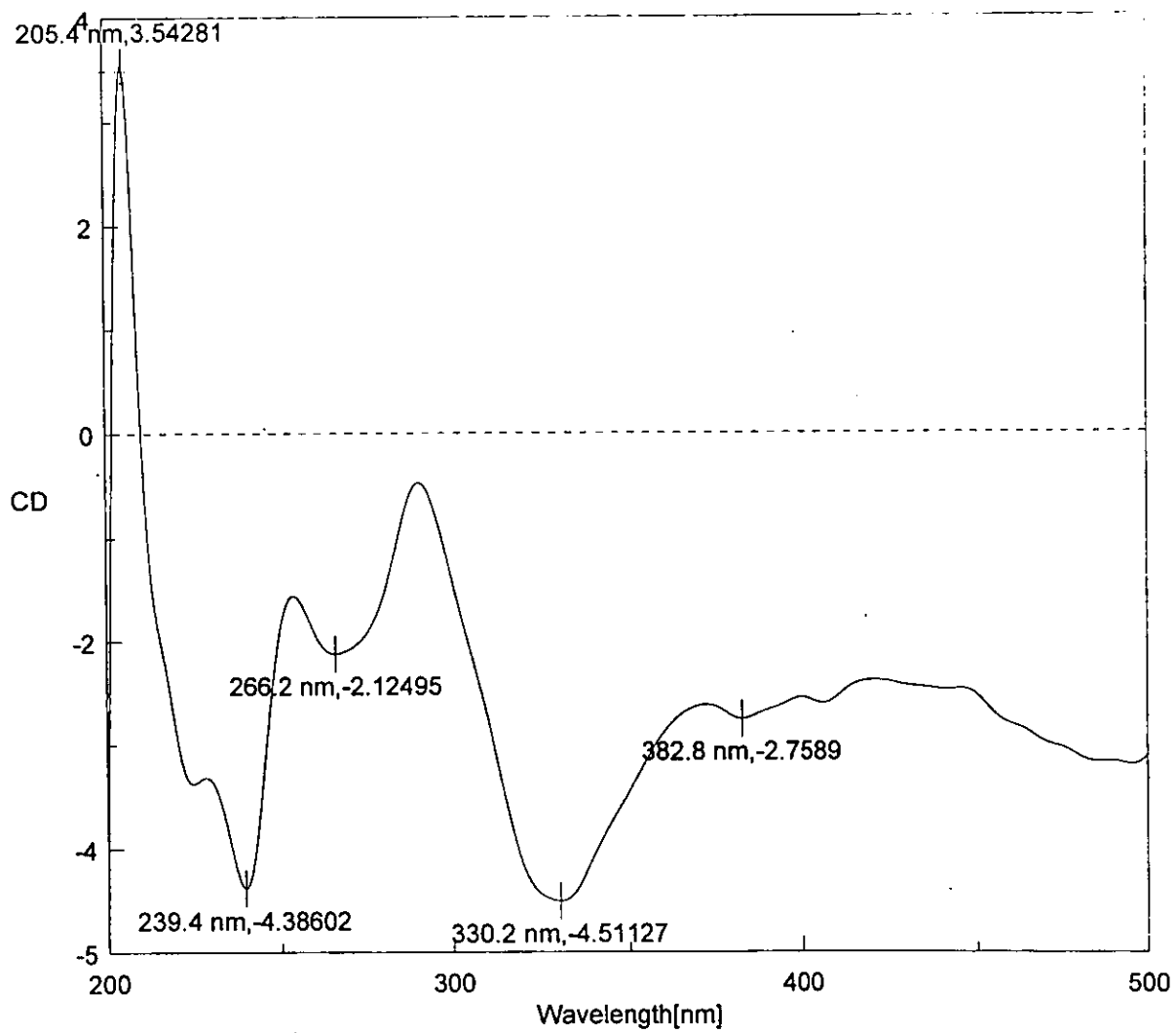


Figura 41. Espectro de dicroísmo circular de la dihidrochalcona 94

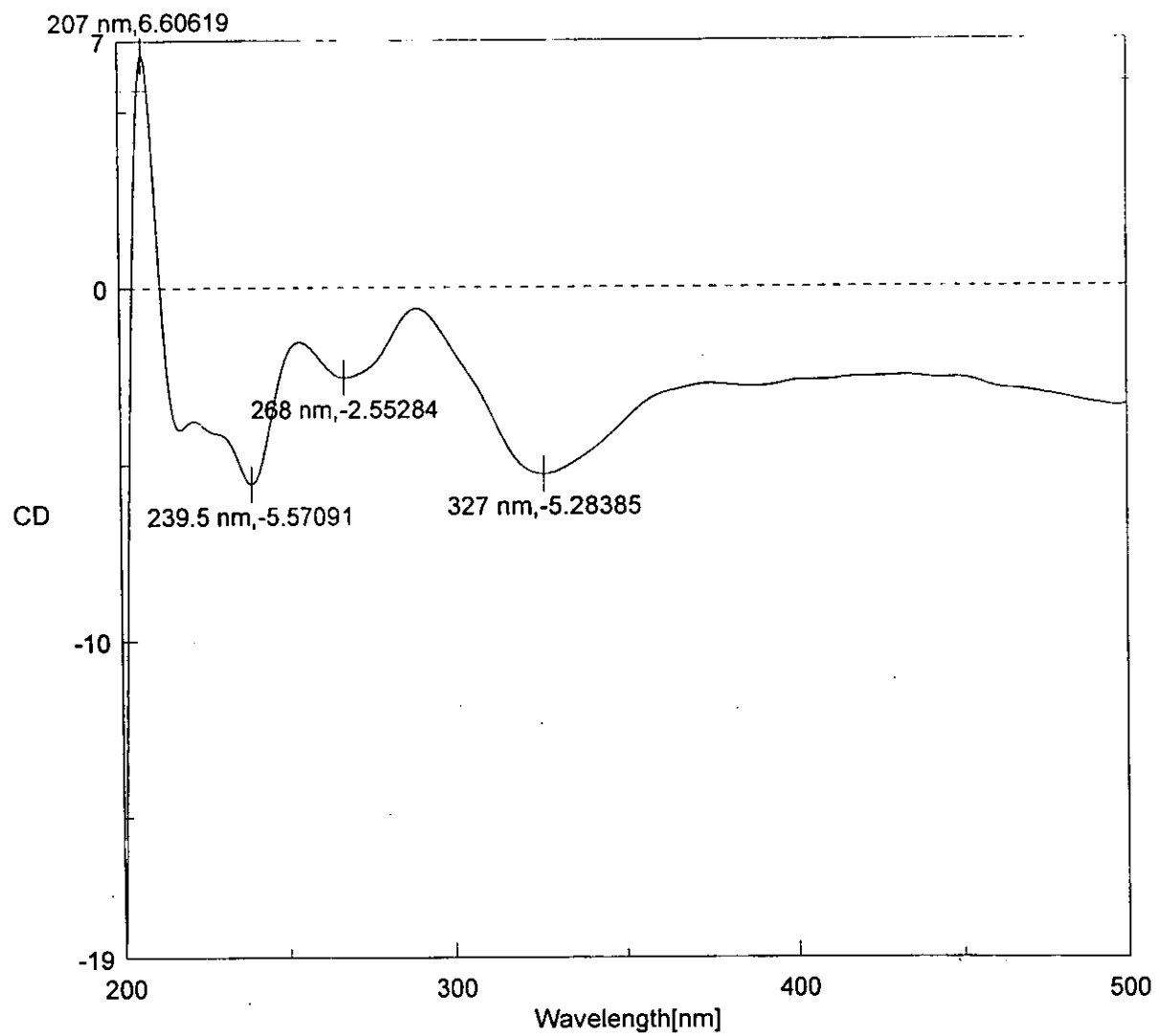


Figura 42. Espectro de dicroísmo circular de la dihidrochalcona 33

### ***Actividad Biológica.***

Se conocen numerosos isoflavanos naturales, los cuales, a excepción del equol que es un metabolito animal, han sido aislados de plantas pertenecientes a las leguminosas.<sup>144</sup> Normalmente se encuentran sustituidos con grupos hidroxilo/metoxilo en las posiciones 7, 2' y 4', menos frecuentemente en C-8 y/o C-3'.<sup>144,146-147</sup>

Algunos isoflavanos, especialmente las isoflavanquinonas, muestran actividad antimicrobiana y fungicida.<sup>148-151</sup> Muchos isoflavanos y pterocarpanos con actividad antibiótica fueron primeramente identificados como fitoalexinas,<sup>152-155</sup> pero posteriormente se ha demostrado que se encuentran como productos naturales.<sup>144</sup>

Estos compuestos, junto con los lignanos e isoflavonoides tienen gran relevancia desde el punto de vista farmacológico, ya que son considerados como fitoestrógenos capaces de prevenir cánceres dependientes de los niveles hormonales.<sup>156-158</sup>

Los isoflavonoides presentes en la soya<sup>145</sup> se metabolizan en el tracto digestivo<sup>159</sup> y son considerados que reducen el cáncer mamario.<sup>160</sup> Su estructura que se asemeja a la de un esteroide (Figura 43), probablemente influya en su actividad biológica como antiandrógenos<sup>161</sup> y como fitoestrógenos que compiten con las hormonas estrogénicas por el sitio de unión.<sup>162</sup> Un estudio reciente demuestra que animales con una dieta rica en fibras con alto contenido de flavonoides presentan bajas posibilidades de padecer cáncer de colon, seno y próstata, por lo que se considera que este tipo de sustancias son fitoestrógenos protectores.<sup>163</sup>

Es interesante señalar que uno de los isoflavanos presentes en *E. polystachya*, la isoduartina (40), se ha reconocido como un inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas, en especial con la PG I<sub>2</sub>,<sup>96</sup> lo que posiblemente correlacione con las propiedades analgésicas y antiinflamatorias que se le atribuyen a las preparaciones hechas de este vegetal.

Como se mencionó anteriormente, se han descrito pocas  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas naturales, lo cual es explicable al encontrarse restringidas a una sola familia, y probablemente a un grupo más restringido dentro de la misma familia, por lo que el conocimiento de sus propiedades biológicas es muy limitado.

En el presente trabajo, los constituyentes aislados de *E. polystachya* fueron evaluados para su actividad antimicrobiana, citotóxica e insecticida, además de la evaluación de su actividad hipoglucemiante, con el fin de determinar su potencial biológico.

La metodología empleada para estos bioensayos ya fue descrita anteriormente (*vide supra*), y se encuentra también detallada en la segunda y tercera publicación anexas; por lo que a continuación solamente se describen y discuten los resultados obtenidos en cada uno de ellos:

#### ***Actividad antimicrobiana***

Los resultados de la evaluación antimicrobiana de los isoflavanos y  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas obtenidas de *E. polystachya* en el presente trabajo (compuestos **33**, **37-43** y **92-94**) contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* o *Candida albicans*, proporcionaron valores de MIC superiores a los 200  $\mu\text{g/ml}$ , lo cual indica que ninguno de estos compuestos fueron tóxicos frente a los organismos ensayados.

#### ***Actividad citotóxica***

Los isoflavanos Isoduartina (**40**), (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxi-isoflavano (**41**) y (3*S*) 3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxi-isoflavano (**43**) mostraron toxicidad frente a la línea celular KB (valores de  $\text{ED}_{50}$  de 2.63, 3.8 y 3.0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) no resultando activos contra UISO y P388, mientras que las dihidrochalconas: ( $\alpha$ R)-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (**33**), ( $\alpha$ R)- $\alpha$ , 2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (**92**), ( $\alpha$ R)-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (**93**) y ( $\alpha$ R)-3'-O- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha$ , 2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (**94**), mostraron valores de  $\text{ED}_{50}$  superiores a los 4  $\mu\text{g/ml}$  lo que indica que estos no fueron activos contra estas líneas celulares.

### ***Actividad insecticida.***

La evaluación de la actividad insecticida se llevó a cabo con larvas de *Epilachna varivestis*, conocida como la "conchuela del frijol", para las dihidrochalconas **33**, **93** y **94**, las cuales fueron administradas en la dieta artificial a concentraciones que van desde 100 hasta 1000 ng/cm<sup>2</sup> de superficie de dieta. Los resultados mostraron que los compuestos **33** y **93** no presentaron ninguna toxicidad contra las larvas, permitiendo obtener vivas todas las larvas después de siete días de tratamiento. Por el contrario, el compuesto **94** resultó ser altamente tóxico a la mínima concentración empleada (100 µg/ml), ya que después de siete días, ninguna larva sobrevivió en todas las repeticiones efectuadas. Estos resultados indican que **94** es un potencial agente insecticida contra la conchuela del frijol, estudios posteriores permitirán establecer la LC<sub>50</sub> para este compuesto, que con los resultados hasta ahora obtenidos indica que es menor de 100 µg/ml.

Los isoflavanos **40**, **41** y **43** fueron administrados, también a diferentes concentraciones, a larvas de *Spodoptera frugiperda*, y los resultados de estos estudios no mostraron ninguna toxicidad (LC<sub>50</sub> > 1000 ng/cm<sup>2</sup>).

### ***Actividad hipoglucemiante.***

Para este ensayo se emplearon tres grupos de seis ratas cada uno, machos de 250 a 280 g y en ayuno de 18 horas. El primer grupo fue utilizado como control; el extracto total de *E. polystachya*, solubilizado parcialmente en agua, se administró por vía intragástrica en un volumen de 2-3 ml al segundo grupo, a una concentración de 1g/Kg de peso; mientras que al tercer grupo se le inyectó por vía intraperitoneal 0.1 g/Kg del extracto en un volumen de 1 ml de agua. Seguido a la administración del extracto, los animales recibieron una carga de dextrosa (2 g/Kg) por vía subcutánea. Los animales en cada grupo se anestesiaron con pentobarbital sódico y se tomaron muestras de sangre de la vena porta a los 60, 90, 120 y 180 min siguientes a la administración del extracto. La cuantificación de los niveles de la glucosa en el plasma se determinó por medio de juegos de reactivos comerciales basados en una reacción enzimática y para la lectura se utilizó el analizador bicromático VP-Abbott.

Los resultados se expresaron como el promedio + desviación estándar ( $n = 3$ ) de los niveles de glucosa determinados para cada animal (Tabla 13) y como los porcentajes de los valores obtenidos en cada tiempo, respecto al valor control en ayuno (64.97 mg/dl, Tabla 14).

La figura 44 muestra la curva de tolerancia a la glucosa obtenida con estos valores, en donde se observa que en la administración intragástrica del extracto, se produce un ligero incremento en la glucemia de los animales. En las condiciones establecidas para el estudio, el máximo incremento de los niveles de glucosa plasmática se observó a los 60 min de administrado el producto vegetal, esta condición se mantiene estable hasta los 90 min, momento en el que se observa una disminución de los niveles de la glucosa y a los 120 min se obtiene el mínimo valor que corresponde a una disminución del 34% con respecto al control.

En la administración intraperitoneal, la hiperglucemia observada en el intervalo de 60 a 90 min es más acentuada; también se observa una disminución de los niveles de glucosa con respecto a la curva control a los 120 min, pero ésta es menos acentuada que la observada con la administración intragástrica.

Estos resultados preliminares, indican *a priori* que el extracto metanólico de *E. polystachya* sí muestra efecto hipoglucemiante en ratas normoglucémicas, este efecto es más evidente cuando se administra por vía intragástrica, lo que podría sugerir un efecto de protección a nivel gástrico como ocurre con extractos con alto contenido de fibras.<sup>165</sup>

Este resultado permite correlacionar el uso hipoglucemiante descrito para esta especie.

Los resultados de la evaluación biológica de las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas de *E. polystachya* indican que no presentan en general toxicidad, lo que permitió considerarlos candidatos promisorios para su evaluación hipoglucemiante. La mezcla de  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas obtenidas en el fraccionamiento preliminar, compuesta por 33, 93 y 94, fue ensayada con ratas con hiperglucemia inducida con cargas de dextrosa a una concentración de 0.2 g/Kg y 0.4 g/Kg de peso en la administración intraperitoneal. Se midieron los niveles de glucosa a 120 min de administrado el producto, que fue el tiempo en el que el extracto de la planta mostraba el mayor efecto hipoglucemiante. Durante este

control		glucosa mg/dl							
t (min)	n1	n2	n3	n4	n5	n6	ds	esm	
0	0	0	0	0	0		0	0	
60	64	103	69	104	85		21	11	
90	116	94	127	97	109		16	8	
120	39	112	118	130	115		12	7	
180	96	95	79		90		10	5	
basal 64.97 mg/dl promedio de tres animales en ayuno									
vía intragástrica 1g/kg de peso									
t (min)	n1	n2	n3	n4	n5	n6	ds	esm	
60	106	110	120	105	68	110	8	4	
90	92	121	107	135	104	112	17	8	
120	26	91	37	36	36	34	5	3	
180	86	80	100	88	73	85	10	4	
vía intraperitoneal 0.1 g/Kg de peso									
t (min)	n1	n2	n3	n4	n5	n6	ds	esm	
60	163	126	124	206	194	163	38	17	
90	162	160	145	134	187	158	20	8	
120	75	69	86	92	52	75	16	7	
180	143	77	127	107	141	130	17	9	

**Tabla 13. Efecto del extracto total de *Eysenhardtia polystachya* en ratas con hiperglucemia inducida por cargas de dextrosa**

glucemia promedio en ayuno: 64.97 %			
dosis exto total			
t (min)	control	1 g/Kg (i.g)	0.1 g/Kg (i.p)
0	0	0	0
60	85	110	163
90	109	112	158
120	115	34	75
180	90	85	130

Tabla 14. glucemia % con respecto al valor promedio en ayuno al administrar el extrato total de *E. polystachya*



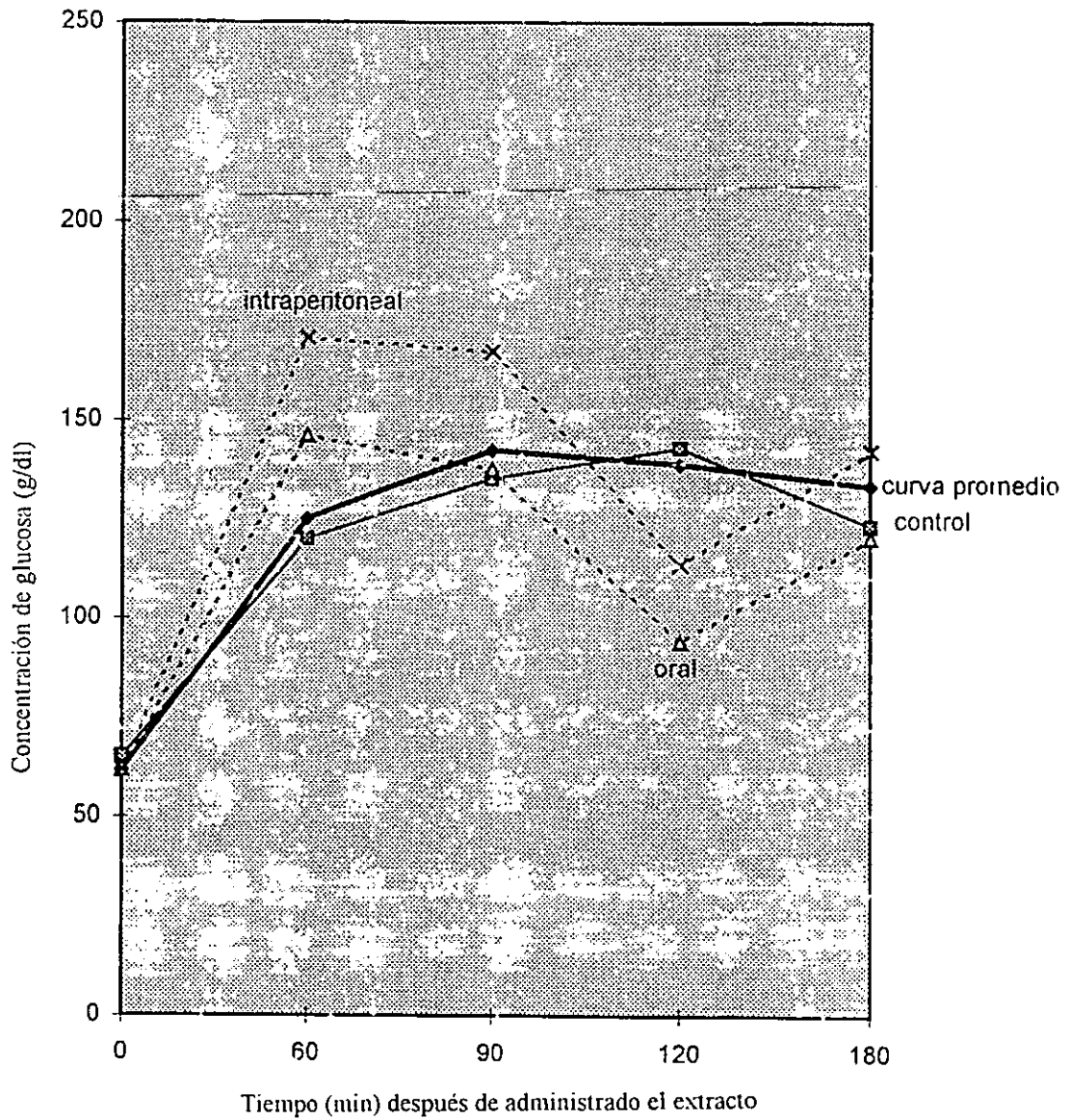


Figura 44. Efecto del extracto íntegro de *Eysenhardtia polystachya* sobre la glucemia de ratas con hiperglucemia inducida por cargas de dextrosa

tiempo, las ratas manifestaron gran somnolencia, y al extraerles sangre en el tiempo indicado, ésta se observaba rojo-oscura, indicando un efecto de tipo anóxico. Al cabo de 120 min de administrado el producto, las ratas morían; sin embargo, se observa una ligera disminución de los niveles de glucosa, con valores de  $157.33 \pm 25.11$  mg/dl ( $\Delta\% = 156$ ) para la administración de 0.2 g/Kg de la mezcla, y  $119.86 \pm 24.13$  mg/dl ( $\Delta\% = 94$ ) para la administración de 0.4 g/Kg, estos valores fueron tomados con respecto al valor promedio del control (161.93 mg /dl). Estas observaciones indican que la mezcla de  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas de *E. polystachya*, disminuyen la concentración de glucosa en sangre a los 120 min de administrado el producto; sin embargo, también se observa un cierto grado de toxicidad de la mezcla de  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas sobre los animales tratados. Al parecer, la dosis empleada resultó ser demasiado alta al grado de intoxicar al animal, por lo que es necesario repetir el experimento con dosis menores para observar el efecto de dichos compuestos sobre la glucemia, realizando una  $LC_{50}$ .

Los resultados obtenidos en este estudio indican una baja toxicidad de los constituyentes presentes en *E. polystachya*, por lo que esta especie podría ser considerada como un buen candidato para la obtención de un agente terapéutico. La actividad hipoglucemiante encontrada para el extracto de esta especie, y posteriormente para la mezcla de  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas, permiten correlacionar su uso popular como antidiabético; sin embargo, no se puede, en este momento, avalar el uso medicinal de la corteza, debido al ligero efecto tóxico observado al administrar la mezcla de dihidrochalconas a las ratas, siendo necesarios más estudios para establecer las dosificaciones que no presenten toxicidad.

La toxicidad observada de la  $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona 94 contra la conchuela del frijol se correlaciona con la actividad insecticida descrita para el extracto metanólico de la corteza de este árbol.

Por otro lado, se ha postulado que los conjugados glicosídicos, como las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas presentes en *E. polystachya*, son la fuente de agliconas libres producidas en respuesta al ataque de microorganismos. Las  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas se encuentran relacionadas biogénicamente con los isoflavonoides, y se ha postulado que

éstas pueden ser los precursores biogénicos de los isoflavanos y pterocarpanos. La presencia de relativamente altas concentraciones de  $\alpha$ -hidroxidihidrochalconas glicosiladas en *E. polystachya* puede ser de importancia agronómica, ya que éstas podrían dar lugar a isoflavanos o pterocarpanos con actividad antimicrobiana y fungicida (fitoalexinas) en un eventual ataque por algún microorganismo. Estos resultados pueden constituirse en las bases para el planteamiento de proyectos que permitan ponderar estas posibilidades.

C- AND O-GLYCOSYL- $\alpha$ -HYDROXYDIHYDROCHALCONES FROM

*EYSENHARDTIA POLYSTACHYA*

LAURA ALVAREZ\*† AND GUILLERMO DELGADO‡

\*Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Cuernavaca 62210, Morelos, México.

‡Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México

**Key Word Index-** *Eysenhardtia polystachya*; Leguminosae; C- and O-glycosyl  $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones; insecticidal activity

---

†Author to whom correspondence should be addressed

Three new  $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones, ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4',4$ -pentahydroxydihydrochalcone, ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -D-xylopiranosyl- $\alpha,2',3,4',4$ -pentahydroxydihydrochalcone, and ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -D-xylopiranosyl- $\alpha,2',3,4',4$ -pentahydroxydihydrochalcone, together with the known Coatlin B ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -D-glucopiranosyl- $\alpha,2',3,4',4$ -pentahydroxydihydrochalcone), have been isolated from the bark and trunks of *Eysenhardtia polystachya* and their structures were deduced by spectral methods. None of these compounds showed antimicrobial or cytotoxic activity. One of the isolates displayed insecticidal activity.

## INTRODUCTION

*Eysenhardtia* is a small genus of the Leguminosae (Subfamily Lotoideae, Subtribe Psoralieae) which comprises three species located in North America [1], and all of them are used in Mexican traditional medicine [2]. *E. polystachya* (*lignum nefriticum*) has been the subject of several phytochemical studies [3-5] due in part that it is the *Eysenhardtia* species most widely used for medicinal purposes [6].

We have previously reported [7] the isolation of several isoflavonoids from the less polar fractions of a dichloromethane-methanol extract obtained of the bark and trunks of this plant. Here we report the structure of four  $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones isolated from the bark of this species.

The acetone-soluble part of the dichloromethane-methanol extract of bark and trunks showed complex glycosidic phenolic compounds by TLC. Separation of constituents was done by repeated column chromatography over silica gel and HPLC, giving ( $\alpha R$ )- $\alpha$ ,2',3,4',4-pentahydroxydihydrochalcone (1), ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -D-xylopiranosyl- $\alpha$ ,2',3,4',4-pentahydroxydihydrochalcone (2), ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\alpha$ ,2',3,4',4-pentahydroxydihydrochalcone (3) and ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\alpha$ ,2',3,4',4-pentahydroxydihydrochalcone (coatlin B, 4). Coatlin B had been previously isolated from this source [5], while compounds 1-3 are new natural products.

## RESULTS AND DISCUSSION

The less polar compound (1) was obtained as a yellow oil, whose molecular formula  $C_{15}H_{14}O_6$ , was confirmed by EIMS ( $[M]^+$   $m/z$  290) and the  $^{13}C$  and  $^{13}C$  DEPT NMR analysis. The IR spectrum showed bands for hydroxyl groups ( $3398\text{ cm}^{-1}$ ), chelated carbonyl ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ) and aromatic rings ( $1499\text{ cm}^{-1}$ ).

The  $^1H$  NMR and  $^1H$ - $^1H$  COSY spectra of 1 (Table 1) revealed two aromatic ABX systems; the first was located at  $\delta$  7.77 (1H, *d*,  $J = 8.7$  Hz), 6.54 (1H, *dd*,  $J = 8.7, 2.1$  Hz) and 6.44 (1H, *d*,  $J = 2.1$  Hz); and the second, at  $\delta$  7.00 (1H, *d*,  $J = 1.8$  Hz), 6.89 (1H, *d*,  $J = 8.1$  Hz) and 6.81 (1H, *dd*, 8.1, 1.8 Hz), indicating the presence of two trisubstituted aromatic rings. Aliphatic signals at  $\delta$  5.30 (1H, *dd*,  $J = 13.2, 3.0$  Hz), 3.00 (1H, *dd*,  $J = 16.8, 13.2$  Hz) and 2.73 (1H, *dd*,  $J = 16.8, 3.0$  Hz), were ascribable to a third ABX system, the chemical shifts and coupling patterns indicated the presence of an -CO-CH(OH)-CH<sub>2</sub>- subunit. These data and the UV absorption maximum at 321, 309, 284 218 213 and 204 nm were indicative of dihydrochalcone structure [8].

In agreement with this, the  $^{13}C$  and  $^{13}C$  APT spectra of 1 (table 2), showed the presence of a chelated carbonyl, twelve aromatic carbons, an aliphatic carbinol ( $\delta$  79.48) and a methylene ( $\delta$  44.0). The connectivities between each of the  $^{13}C$  signals and the related  $^1H$  signals were established by the HMQC spectrum, as shown in table 2. The oxygen-bearing aromatic carbon signals at  $\delta$  164.76, 163.54, 144.98 and 144.66, the IR and mass spectra revealed that 1 possessed four hydroxyl groups. The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data of 1

were closely comparable to those of 2'-methoxy- $\alpha$ , 3, 4'-4-tetrahydroxydihydrochalcone (5) [9], with the major differences being ascribable to the absence of resonances due to the 2'-methoxy group in compound 1. Thus the planar structure of 1 was established as  $\alpha$ , 2', 3, 4, 4'-tetrahydroxydihydrochalcone., which is a new natural product.

The *R*-configuration of the asymmetric C- $\alpha$  of 1 was inferred by a comparison of its CD spectrum (negative Cotton effect at 306.5 nm) with that of ( $\alpha R$ )- $\alpha$ , 2'-dihydroxy-4, 4'-dimethoxydihydrochalcone (negative Cotton effect at 310 nm), isolated from *Pterocarpus angolensis*, whose absolute stereochemistry was unequivocally demonstrated by chemical correlation to (2*R*, 3*S*)-(+)-catechin 3',4',5,7-tetramethyl ether [10], and with that of ( $\alpha R$ )-4-methoxy- $\alpha$ ,2',4'-trihydroxydihydrochalcone (negative Cotton effect at 283 nm) obtained from *Pericopsis elata* [11] and *Virgilis oroboides* [12]. Thus, compound 1 is assigned the structure ( $\alpha R$ )- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahydroxydihydrochalcone.

The 200 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of 2-4 were almost superimposable on each other, but high resolution (500 MHz)  $^1\text{H}$  NMR analysis permitted the differentiation of these compounds.

Compound 2 was obtained as pale yellow amorphous powder and its molecular formula was ascertained to be  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$  based on the number of protons and carbon signals observed in the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra respectively. This was supported by EI mass spectrum which showed the  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$  at  $m/z$  404. The IR spectrum suggested the presence of hydroxyl groups ( $3400, 3150\text{ cm}^{-1}$ ), chelated carbonyl ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) and aromatic rings ( $1590, 1540\text{ cm}^{-1}$ ).



The  $^1\text{H}$  NMR spectral data (Table 1) showed a hydrogen-bonded hydroxyl group at  $\delta$  13.00 (1H, *s*). The appearance of two aromatic one-proton doublets at  $\delta$  7.62 (1H, *d*,  $J = 9.0$  Hz) and 6.45 (1H, *d*,  $J = 9.0$  Hz) indicated the occurrence of a 1,2,3,4-tetrasubstituted benzene ring, while the aromatic ABC type resonances at  $\delta$  6.69 (1H, *d*,  $J = 8$  Hz), 6.65 (1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz) and 6.52 (1H, *dd*,  $J = 8.0, 2.0$  Hz), the chemical shifts and coupling patterns clearly showed the presence of a 1,3,4-trisubstituted benzene ring. Examination of homonuclear correlation spectra led to the identification of an aliphatic ABX system which, in conjunction with the observed chemical shifts, led to the assignment of the Ar-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-C=O subunit. In the same way, we found all the correlations of the aliphatic proton signals which support the presence of a  $\beta$ -xylopyranose moiety (Table 1) [13]. These data, along with the UV maximum at 321.5, 284.5, 253.5, 218.0, 213.5 and 204.0 nm suggested that **2** was a glycosyldihydrochalcone.

In agreement with this, the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (Table 2) exhibited the signals of a carbonyl carbon ( $\delta$  203.2), along with 12 aromatic carbons, four of which have an oxygen function, the aliphatic carbons C- $\alpha$  ( $\delta$  72.34) and C- $\beta$  ( $\delta$  40.57), together with five aliphatic oxygen-bearing methines corresponding to the pentose moiety at  $\delta$  73.9, 70.47, 78.44, 69.20, and 69.65. The observation that **2** was resistant to hydrolysis with HCl and that the signal of the anomeric carbon was not observed in the  $\delta$  110-118 region of the spectra [14], provided evidence that there was a C-glycoside linkage in the molecule.

All protonated carbons were assigned by CH correlation spectroscopy (HETCOR). The oxygen-bearing aromatic carbon signals at  $\delta$  163.30, 163.10, 143.76 and 142.79, and the IR and mass spectra revealed that **2** possessed four hydroxyl groups. The number of

hydroxyl groups in **2** was established by acetylation with acetic anhydride/pyridine to afford a heptaacetate **2a**., in which it remains the chelated proton at  $\delta$  12.79.

The HETCOR and HMBC spectra were used to assemble the segments of the partial structures of **2**, followed by assignment of each carbon and proton signals. The HMBC spectrum of **2** (Figure 1), showed correlations between one of the protons ( $\delta$  7.62) on the 1,2,3,4-tetrasubstituted benzene ring and the carbonyl carbon ( $\delta$  203.25), which indicated that the proton was located at a *peri*-position to the carbonyl group. The same proton showed cross peaks with the aromatic oxygenated carbons at  $\delta$  163.30 and 163.10. Furthermore the HMBC spectrum exhibited correlations between the chelated hydroxyl proton ( $\delta$  13.00) and three quaternary carbons ( $\delta$  109.74, 110.75 and 163.30. The carbon signal at  $\delta$  110.75 was assigned to C-1' as it presented a cross-peak with H- $\alpha$  ( $\delta$  5.05). The  $\beta$ -xylopyranosyl moiety was determined to be linked at the C-3', since cross peaks between xylopyranosyl H-1'' ( $\delta$  4.81) and C-2' ( $\delta$  163.30) and C-4' (163.10 ) were observed. Therefore, the plausible partial structure of **2** was considered to be **A** in Fig. 1. On the other hand, long-range correlations of the only methylene of the molecule allowed us to link the two aromatic parts through an  $\alpha$ -hydroxydihydrochalcone framework, already suggested by the UV data. The methylene group at  $\delta$  2.96 and 2.97 showed correlations to C-1 ( $\delta$  127.65), the carbonyl carbon ( $\delta$  203.25) and to two aromatic protonated carbons at  $\delta$  119.78 and 114.57 assignable to C-6 and C-2 respectively. The former carbon was further correlated to an aromatic proton  $\delta$  6.52 (H-6) which also correlated to the aromatic carbons at 114.57 (C-2) and 142,79 (C-4). As the doublet signals at  $\delta$  6.69 (H-5) and  $\delta$  6.65 (H-2) in **2** shifted both to  $\delta$  7.10 in **2a**, the presence of hydroxyl groups at C-3 and C-4 was clarified.

In the HMBC spectrum, the H-5 signal ( $\delta$  6.69) was correlated to the aromatic carbons at  $\delta$  127.65 (C-1) and 143.76 (C-3), showing that the partial structure of **2** was characterized as B in Fig. 1. Other correlations observed in the HMBC spectrum supported the partial structure B.

Thus, the planar structure of **2** was established as 3'-C-xylopyranosyl- $\alpha$ , 2', 3, 4, 4'-pentahydroxydihydrochalcone (structure C in Fig 1).

This structure was confirmed by NOESY experiment, which further allowed the establishment of the preferred conformation as shown in Fig. 2.

The CD curve of **2** shows sequential positive and negative Cotton effects at 290 nm ( $\pi$ ,  $\pi^*$  transition) and 327 nm (n,  $\pi^*$  transition) respectively indicating an  $\alpha$ R configuration [15].

Compound **3** was obtained as an amorphous powder, whose molecular formula was confirmed to be  $C_{20}H_{22}O_{11}$  by the  $^{13}C$  and  $^{13}C$  DEPT NMR spectra. UV and IR absorptions suggested that **3** also had a dihydrochalcone skeleton. The  $^1H$ - and  $^{13}C$  NMR spectral data of **3** were similar to those of **2** except for the presence of an anomeric carbon signal at  $\delta$  128.6 indicating that **3** is a O-glycosyldihydrochalcone. The  $^{13}C$  NMR revealed 20 carbon signals which were sorted by DEPT  $^{13}C$  NMR into one carbonyl group, five aromatic methines, seven aromatic quaternary carbons, five aliphatic methines and two aliphatic methylenes. The  $^1H$  NMR spectrum (Table 1) also displayed a hydrogen-bonded hydroxyl group at  $\delta$  13.22; one aromatic AB due to the protons at H-6' and H-5'; the aromatic ABX system ascribable to the H-2, H-5 and H-6 of the trisubstituted A ring. The  $^1H$  NMR spectrum also displayed an aliphatic ABX system assigned to the CO-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-Ar

subunit; as well as the due to a  $\beta$ -xylopyranose moiety. The 2D NMR of **3** showed close resemblance to those of **2**, confirming the identical connectivities in these two isolates.

It was demonstrated that changes in the functionality of C- $\alpha$  and C-2' hydroxyl groups cause great influence on the conformation of  $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones and consequently on their CD curves [15]. The CD curve of **3** shows a negative Cotton effect at 327 nm, but did not show the positive Cotton effect due to the  $\pi, \pi^*$  transition (ca 290 nm), owing probably to the presence of the O-xylopyranosyl moiety in C-3'; even though, the shape of the curve is very similar to that of **2** in that region, further demonstrating their similarity in stereochemistry. Therefore, the structure for this compound was assigned as ( $\alpha$ R)-3'-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahydroxydihydrochalcone (**3**), a novel  $\alpha$ -hydroxydihydrochalcone of *E. polystachya*.

Compound **4**, C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub> was obtained as pale yellow needles,. The IR and UV spectra closely resembled that of **2** and **3**, indicating that **4** is also an  $\alpha$ -hydroxydihydrochalcone. Spectral analysis of **4**, in particular the <sup>13</sup>C and HMBC spectra, showed that the structure of **4** was identical to that of Coatlin B, previously isolated from this source [5]. In our present study, the complete assignment of <sup>13</sup>C NMR was achieved with the aid of HMQC and HMBC spectra, the results of which are shown in Table 2. Furthermore, the CD curve of this compound was comparable with that of compounds **2** and **3**, indicating that the absolute configuration in C- $\alpha$  is (*R*).

None of the isolated compounds (**2-4**) showed any antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*

*typhimurium* and *Candida albicans*, at concentrations up to 400 µg/ml. These compounds did not show any toxic effect against UISO, HCT-15, OVCAR and KB tumor cell lines in culture (ED<sub>50</sub> values above 4 µg/ml). Compounds 2-4 were also tested for their insecticidal activity against *Epilachna varivestis* (Conchuela del frijol) larvae. The results of these experiments demonstrate that compounds 2 and 4 were no toxic (LC<sub>50</sub> > 1000 ng/cm<sup>2</sup>); while (3) displayed toxicity (LC<sub>100</sub> < 100 ng/cm<sup>2</sup>).

The occurrence of C- and O-glycosyl- $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones (2-4) in *E. polystachya* is of chemotaxonomic interest, since so far only Coatlin A (3'-C- $\beta$ -glucopyranosyl- $\alpha$ , 2', 4', 4-tetrahydroxydihydrochalcone) [5, 16], and Coatlin B (3'-C- $\beta$ -glucopyranosyl- $\alpha$ , 2', 4', 3, 4-pentahydroxydihydrochalcone, 4) [5] had been isolated as natural products. Therefore, C-glycosyl- $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones could be considered as chemotaxonomic markers for the genus [17]

## EXPERIMENTAL

Mps uncorr. IR: KBr Nicolet Magna IR TM 750 and Perkin Elmer 283B instruments; UV and CD spectra were obtained in MeOH; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR: Varian VXR-300 and Varian Unity Plus-500 instruments. The chemical shift values are reported in ppm units relative to TMS and chloroform signals and the coupling constants are in Hz. Samples for NOE experiments were degassed and sealed under Argon. Standard pulse sequences were used for COSY, NOESY, DEPT, HETCOR, HMQC and HMBC experiments; IEMS: 70 eV on a JEOL JMS-AX ; CC: Merck silica gel 60 (70-230 mesh); TLC and prep. TLC:

Merck silica gel 60 F254 plates (0.25 mm and 2 mm respectively), spots and bands were detected by UV irradiation (254 and 365 nm); Vacuum liquid chromatography (VLC): Merck silica gel 60 (0.040-0.063 mm).

HPLC was performed on a Waters 600 programmable pump with UV detection. Semipreparative HPLC purifications employed Waters microporasil C-18 column (5  $\mu$ m particles, 330 X 10 cm) at a flow rate of 6.0 ml/min with UV detection at 250 nm; for analytical HPLC, a 330 X 3.9 mm microporasil C-18 column was used.

*Plant Material.* Voucher specimens (CHR 739) of *Eysenhardtia polystachya* are deposited at the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

*Extraction and Isolation of compounds.* Extraction of plant material, and the first fractionation has been described previously [7]. The acetone soluble fraction (56 g) was eluted from a vacuum-liquid chromatography column (280 g Sigel) with  $\text{CHCl}_3$ -MeOH mixtures (100%  $\text{CHCl}_3$  to 100% MeOH). The material eluted with  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (9:1, 265 mg) was further chromatographed by preparative TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetone, 85:15) to afford 1 (8.3 mg).

Fractions eluted with  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (21:4, 230 mg) were loaded on a silica cartridge (Sep-pak vac Silica, Waters), previously equilibrated with 12 ml MeOH, followed by 15 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and attached to a 5 ml syringe; the elution system used was a gradient of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH; compound 2 (62 mg) eluted with 25 ml of a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (93:7) and comp. 3 (8 mg) was obtained after elution with 20 ml of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (22:3). Several fractions of the main VLC column crystallized, this solid (6.32 g) contained mixtures of glycosyl- $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones, as determined by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analyses. An

aliquot (100  $\mu$ l) was applied to a microporasil C-18 column (3.9 X 300 mm, 5  $\mu$ m, Waters) and eluted with a 30 min linear gradient of H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN. Elution details: solvent ratio H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN initial 85:15; final 5:95; flow rate 1.5 ml/min and eluant monitoring at  $\lambda$  = 250 nm. For semipreparative purposes, aliquots (250  $\mu$ l) were applied to a microporasil C-18 column as before, using a flow rate of 6 ml/min. The first major peak ( $R_t$  = 2.0, 29.4 mg) was Coatlin B (4). The second major peak ( $R_t$  = 3.0 min, 12.6 mg) was still a mixture. Purification on a silica cartridge as above, yielded additional amounts of 9.8 mg of 2, and 2.8 mg of 3.

( $\alpha$ -R)- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahydroxydihydrochalcone (1). Oil: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> (found: C 62.13, H 4.75; requires: C 62.06, H 4.86); IR $\nu_{\max}$  (film) cm<sup>-1</sup>: 3398, 1620, 1499; CD:  $\Delta\epsilon_{306.5}$  -1.337,  $\Delta\epsilon_{330.5}$  0.1310,  $\Delta\epsilon_{380}$  -0.1612; UV  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ): 321 (3.31), 284 (3.47), 213 (4.07); EIMS m/z (rel. int): 290 [M]<sup>+</sup> (1); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Tables 1 and 2.

( $\alpha$ R)-3'-C- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahydroxydihydrochalcone (2). Amorphous powder, C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub> (found: C 56.88, H 5.27; requires: C 56.86, H 5.25); mp 153-155°C; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3412, 1624, 1503, 1255; UV  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ): 321.0 (3.19), 309.0 (3.16), 285.0 (3.44), 253.0 (2.68), 204.0 (3.76); CD:  $\Delta\epsilon_{203}$  -2.81,  $\Delta\epsilon_{212}$  1.8463,  $\Delta\epsilon_{239}$  -16.7231,  $\Delta\epsilon_{256}$  1.3783,  $\Delta\epsilon_{275.5}$  -3.9135,  $\Delta\epsilon_{290}$  0.5665,  $\Delta\epsilon$  327.5 -18.3713; EIMS m/z (rel. int.): 404 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (5), 386 (33), 368 (10), 282 (77), 264 (52), 251 (53), 233 (100), 149 (56), 123 (75); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Tables 1 and 2.

*Acetylation of 2.* Compound **2** (43 mg) was acetylated with Ac<sub>2</sub>O (1.0 ml) and pyridine (0.3 ml) to afford **2a** (38 mg) as a yellow syrup. **2a**: IR (film)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3352, 1735, 1625, 1519, 1488, 1252; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Tables 1 and 2.

*(αR)-3'-O-β-D-xylopyranosyl-α,2',3,4,4'-pentahydroxydihydrochalcone (3).* C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>. Amorphous powder, mp 146-149°C; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3399, 1621, 1517, 1499, 1255; UV  $\lambda_{\max}$  nm (log ε): 322.5 (3.85), 309 (3.81), 284.5 (4.10), 253.0 (3.29), 218.5 (4.27), 213.0 (4.26), 203.5 (4.46); CD:  $\Delta\epsilon_{207}$  6.60,  $\Delta\epsilon_{239.5}$  -5.5709,  $\Delta\epsilon_{327}$  -5.2836; EIMS m/z (rel. int.): 402 [M-H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (0.8), 386 (29), 282 (85), 251 (61), 233 (100), 179 (51), 149 (67), 123 (73), 107 (70), 57 (50); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Tables 1 and 2.

*(αR)-3'-C-β-D-glucopyranosyl-α,2',3,4,4'-pentahydroxydihydrochalcone (4).* C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>. Pale yellow needles, mp 202-205°C; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3398, 1621, 1518, 1499, 1255, 1114, 1082; UV  $\lambda_{\max}$  nm (log ε): 321.5 (3.85), 309.0 (3.82), 284.5 (4.10), 253.5 (3.34), 218.0 (4.25), 213.5 (4.23), 204.0 (4.42); CD:  $\Delta\epsilon_{239}$  -3.2015; EIMS m/z (rel. int.): 452 [M]<sup>+</sup> (1.2), 405 (7), 386 (32), 368 (8), 313 (6), 282 (62), 251 (43), 233 (70), 149 (55), 123 (100), 55 (21); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Tables 1 and 2.

*Biological activity. Antimicrobial activity.* Screening studies were carried out by the conventional disc assay procedure [18, 19] for activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimorium* (ATCC 065922) and *Candida albicans* (ATCC 10231). Nystatin (5-160 μg/ml) and gentamicin (2-128 μg/ml) were included as controls.



*Cytotoxic evaluation.* Studies were performed in UISO (uterin-cervix cancer), HCT-15 (colon carcinoma), OVCAR (ovarian cancer) and KB (nasopharyngeal carcinoma) cell cultures according to Geran and Greenberg's screening protocols [20]. *Insecticidal activity.* *Epilachna varivestis* (Coleoptera: occinellidae) larvae were used for this bioassay by ingestion of solutions of compounds 2-4 by target insect following published protocol [21]. The concentration ranged from 100 to 1000 ng per square centimeter of surface of artificial diet on which larvae were reared (10 larvae for each concentration). The experiments were run in triplicate.

*Acknowledgments.* We thank María Isabel Chávez, Federico del Río, Beatriz Quiroz, Rocío Patiño, Francisco Javier Pérez Flores and Luis Velasco, for technical assistance. We also thank Dr. Eduardo Aranda (Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM) for the insecticidal bioassays. This work was supported in part by UNAM (PADEP project 5373) and CONACyT (project 3419P-N9607 and grant 940040).

## REFERENCES

1. Standley, P. C. (1922) Trees and shrubs of Mexico. *Contr. U.S. Natl. Herb.* **23**(2), 429.
2. Hernández, F. (1959) Historia Natural de la Nueva España, In: *Obras Completas de F. Hernández*, vol. II, UNAM, México, p 173.

3. Domínguez, X. A., Franco, R. and Díaz Viveros, Y. (1978) *Rev. Latinoamer. Quím.* **9**, 209.
4. Burns, D. T., Dalgarno, B. G., Gargan, P. E. and Grimshaw, J. (1984) *Phytochemistry* **23**, 167.
5. Beltrami, E., De Bernardi, M. Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G. and Vita-Finzi, P. (1982) *Phytochemistry* **21**, 2931.
6. Hastings, R. B. (1990) *Economic Botany* **44**, 336.
7. Alvarez, L., Rios, M. Y., Esquivel, C., Chávez, M. I., Delgado, G., Aguilar, I., Villarreal, M. L. and Navarro, V. (1997) *J. Nat. Prod.* Submitted.
8. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*, p. 253. Springer, Berlin.
9. Bezuidenhout, S. C., Bezuidenhout, B. C. B. and Ferreira, D. (1988) *Phytochemistry* **27**, 2329.
10. Bezuidenhout, B. C. B., Brandt, E. V. and Roux, D. G. (1981) *J. Chem. Soc., Perkin 1* 263.
11. Bezuidenhout, B. C. B., Swanepoel, A., Augustyn, J. A. N. and Ferreira, D. (1987) *Tetrahedron Letters* **28**, 4857.
12. Malan, E. and Swinny, E. (1990) *Phytochemistry* **29**, 3307.
13. Agrawal, P. K. (1992) *Phytochemistry* **31**, 3307.
14. Pawan, K., Agrawal, P. K. and Mahesh, C. B. (1989) in *Carbon-13 NMR of flavonoids* (Agrawal, P. K. De.), p. 285, Elsevier, Amsterdam.
15. Augustyn, J. A. N., Bezuidenhout, B. C. B., Swanepoel, A. and Ferreira, D. (1990) *Tetrahedron* **46**, 4429.

16. Bezuidenhout, B. C. B., Brandt, E. V. and Ferreira, D. (1987) *Phytochemistry* 26, 531.
17. Hegnauer, R. and Grayer-Barkmeijer, R. (1993) *Phytochemistry* 34, 3.
18. Vanden, D. A., Vlietnick, A. J. (1991) in: *Methods in Plant Biochemistry* (Dey, P. M., Harborne, J. B., Hostettmann, K. Eds.), Vol. 6, p 47, Academic Press, New York.
19. Paxton, J. D. (1991) in: *Methods in Plant Biochemistry* (Dey, P. M., Harborne, J. B., Hostettmann, K. Eds.), Vol. 6, p 33, Academic Press, New York.
20. Geran, R. I., Greenberg, N. H., MacDonald, M. N., Schumacher, A. M., Abbott, B. J. (1972) *Cancer Chemother. Rep.* 3, 1.
21. Kubo, I. (1991) in: *Methods in Plant Biochemistry* (Dey, P. M., Harborne, J. B., Hostettmann, K. Eds.), Vol. 6, p 179, Academic Press, New York.

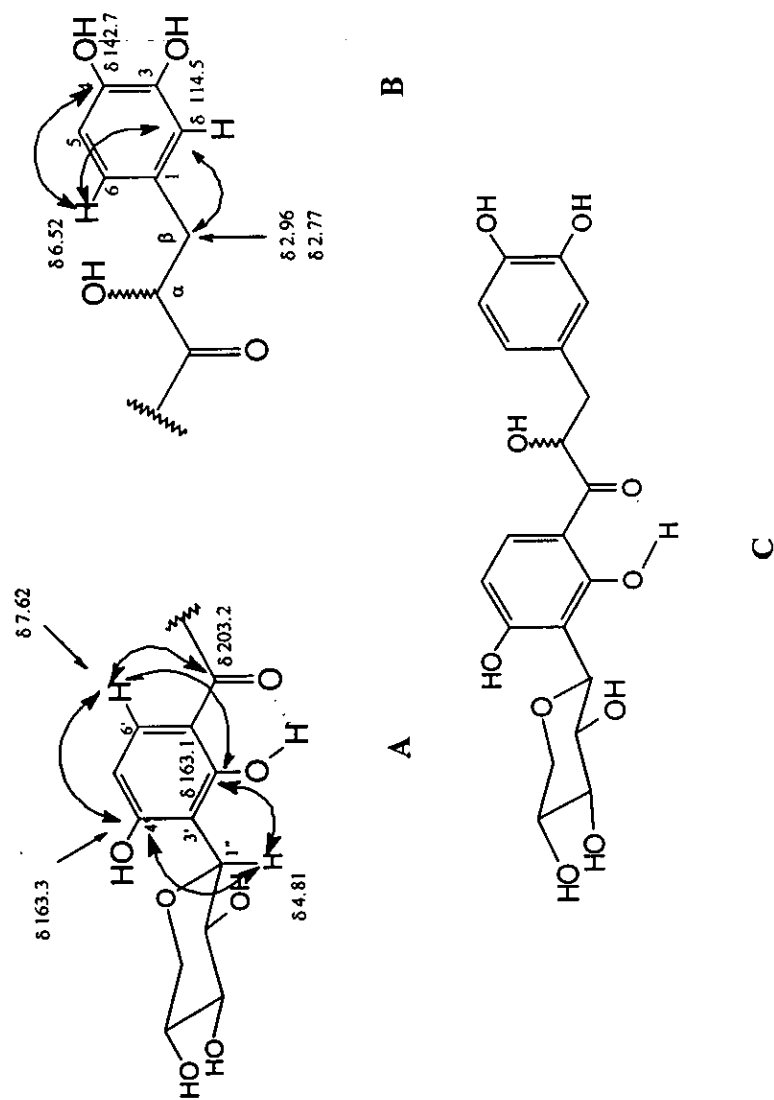


Fig. 1. Partial Structures (A, B and C) of 2.

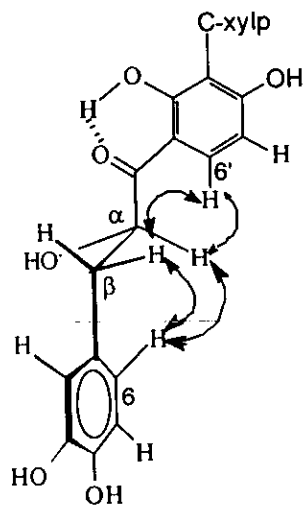
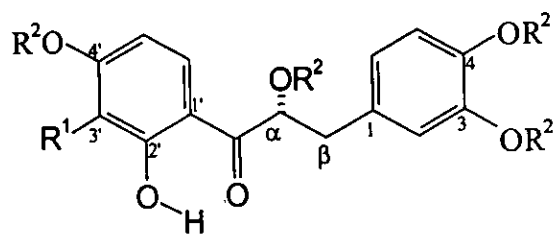


Figure 2. NOE interactions and preferred conformation of 2.

## Formulae



	$R^1$	$R^2$
1	H	H
2	C- $\beta$ -xylopyranosyl (OH) <sub>3</sub>	H
2a	C- $\beta$ -xylopyranosyl-(OAc) <sub>3</sub>	Ac
3	O- $\beta$ -xylopyranosyl (OH) <sub>3</sub>	H
4	C- $\beta$ -glucopyranosyl (OH) <sub>4</sub>	H

Table 1. <sup>1</sup>H NMR spectral data for compounds 1-4 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-*d*<sub>6</sub>)<sup>a</sup>

H	1	2	2a	3 <sup>b</sup>	4
α	5.30 dd (13.2, 3.0)	5.05 dd (12.5, 7.5)	5.88 dd (8.1, 5.7)	5.01 sa	4.93 dd (7.2, 5.4)
β	3.0 dd (16.8, 13.2)	2.96 dd (14., 4.5)	3.11, dd (6.0, 4.5)	2.93 dd (14.0, 4.0)	2.84 dd (14.1, 5.4)
β	2.73 dd (16.8, 3.0)	2.77 dd (14, 7)		2.74 dd (10.0, 6.5)	2.64 dd (14.1, 7.5)
2	7.0 d (1.8)	6.65 d (2.0)	7.10, m	6.68 d (2.5)	6.59 d (2.1)
5	6.89 d (8.1)	6.69 d (8.0)	7.10, m	6.67 d (8.0)	6.57 d (7.8)
6	6.81 dd (8.1, 1.8)	6.52 dd (8.0, 2.0)	7.10, m	6.51 dd (8.0, 2.0)	6.43 dd (8.1, 2.4)
3'	6.44 d (2.1)				
5'	6.54 dd (8.7, 2.1)	6.45 d (9.0)	6.45, d (9.0)	6.45 d (9.5)	6.39 d (8.7)
6'	7.77 d (8.7)	7.62 d (9.0)	7.59, d (9.0)	7.66 d (9.0)	7.62 d (9.0)
1''		4.81 d (10.0)	5.17, d (9.9)	4.74 d (10.0)	4.63 d (9.9)
2''		4.06 t (9.0)	5.41, t (9.3)	4.11 t (9.0)	3.95 t (9.3)
3''		3.46 t (9.0)	5.27, t (9.9)	3.37 t (11.0)	3.66 t (9.6)
4''		3.69 ddd (9.25, 4.5, 4.5)	5.12, ddd (10.2, 10.8, 5.7)	3.63 m	3.45 dd (11.7, 4.5)
5''		3.32 t (10.5)	3.51, t (11.1)	3.27 t (11.0)	3.20 t (10.2)
5''		4.02 dd (11, 5.5)	4.34, dd (11.4, 5.7)	3.96 dd (11.0, 5.5)	
6''					3.8 sa 2H
2'-OH		13.0 s	12.79 s	13.22 br s	13.07 s
α-OH		4.68 d (7.5)		5.46 d (7.04)	4.53 br s
2''-OH		4.29 br d (3.5)			4.26 br s
3''-OH		4.62 br s			
4''-OH		4.74 d (4.0)			4.64 d (3.6)
6''-OH					4.14 br s

<sup>a</sup>The assignments were established by COSY, NOESY, HETCOR (for compound 2), HMQC and HMBC analyses

<sup>b</sup> Was run at 300 MHz

Table 2. <sup>13</sup>CNMR spectral data for compounds 1-4 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-*d*<sub>6</sub>)<sup>a</sup>

C	1	2	2a	3 <sup>a</sup>	4
C=O	190.85	203.25	198.82	204.76	204.08
α	79.48	72.34	70.38	72.89	73.11
β	44.00	40.57	37.26	40.74	40.47
1	130.65	127.65	127.28	128.62	128.29
2	113.51	114.57	123.50	115.23	116.53
3	144.66	143.76	142.01	144.75	144.43
4	144.98	142.79	141.21	143.59	143.37
5	115.20	115.88	110.21	116.87	115.13
6	118.14	119.78	124.45	120.02	120.05
1'	113.89	110.75	108.74	112.23	110.41
2'	163.54	163.30	163.11	164.58	163.50
3'	103.03	109.74	134.60	110.27	111.73
4'	164.76	163.10	164.04	163.92	163.73
5'	110.73	107.92	108.74	107.97	108.40
6'	128.68	130.71	131.77	131.91	131.36
1''		73.98	70.66	114.82	73.55
2''		70.47	74.20	73.97	71.10
3''		78.44	74.44	79.23	78.38
4''		69.20	69.09	70.28	69.77
5''		69.65	67.58	69.96	80.57
6''					60.83

These assignments were established by COSY, NOESY, HETCOR, HMQC and HMBC analyses

<sup>a</sup>The spectra was run at 75 MHz.

## BIBLIOGRAFIA

1. Saldaña, J.R., Sosa, E.P. y García, M.M.(1994) *Rev. Fac. Med. UNAM* 37, 15-28.
2. World Health Organization. Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group, WHO Technical Report Series 727, WHO, Geneva, 1985.
3. Tattersall, R. and Gale, E. (1981) Patient Self-Monitoring of Blood Glucose and Refinements of Conventional Insulin Treatment En: Diabetes Mellitus (Skyler, J. S., Cahill, Jr., G. F., Eds.), Yorke Medical Books, p. 101.
4. Campbell, G.D. Oral Hypoglycaemic Agents, Pharmacology and Therapeutics, London, Academic (1969).
5. Prado, R.V., *Rev. Fac. Med. UNAM* 24, 15 (1981)
6. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación (1990). *Mortalidad* 1992, 55-86
7. Saldaña, J.R., Sosa, E.P. y García, M.M.(1994) *Rev. Fac. Med. UNAM* 37, 15-28.
8. Lezama, M. A., Velazquez, O., Alvarez, C. H., Rodríguez, F. (1990) *Bol. Epidemiol (Méx)*, 5, 69-87.
9. Sepúlveda, J., Tapia, R., Rull, J. (1993) Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. Dirección General de Epidemiología, S.S.A.
10. Marles, R., and Farnsworth, N.R. En: *Economic and Medicinal Plant Research* pp. 149-187 (1994).
11. Soejarto, D. D. and Farnsworth, N. R. (1989) *Perspectives in Biol. and Med.* 32, 244.
12. Svoboda, G.H., Gorman, M., Root, M. (1964) *Lloydia* 27, 361.
13. Lozoya, M., Mellado-Campos, V. (1985) *J. Ethnopharmacology* 14, 1.
14. Tanaka, K., Isselbacher, K.J. and Shih, V. (1972) *Science* 175, 69.
15. Villar, A., Paya, M. (1980) *Planta Medica* 39, 248.
16. Karawya, M.S., Abdelwahab, S.M., Farrag, N.M., El-Allawy, R.M. (1984) *J. Nat. Prod.* 47, 775.



17. Sharma, K.K., Gupta, S., Samuel, K.C. (1977) *Indian J. Med. Res.* **65**, 422.
18. Villar, A., Paya, M., Hortiguera, M.D. (1986) *Planta Medica* **43**, 81.
19. Khanna, P., Jain, S.C., Pnigariya, M.D., Dixit, V.P. (1981) *J. Nat. Prod.* **44**, 648.
20. Hikino, H., Mizuno, T., Oshima, Y., Konno, C. (1985) *Planta Medica* **42**, 159.
21. Oshima, K., Konno, C., Hikino, H. (1985) *J. Ethnopharmacol.* **14**, 69.
22. Socorro Victoria Cosme (1989) Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de la diabetes mellitus Tesis de Licenciatura. UNAM.
23. Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J. L., Partida-Hernández, G., Lara-Lemus, A. and Alarcón-Aguilar, F. (1991) *Arch. Invest. Med. (México)* **22**, 87-91.
24. Roman-Ramos, R., Alarcon-Aguilar, F., Lara-Lemus, A. and Flores-Saenz, J. L. (1992) *Arch. Invest. Med. (México)* **23**, 59-64
25. Martínez, M. y Matuda, E. (1934) Flora del Estado de México Ed. Botas. México.
26. Polygenis-Bigendako, M. J. and Lejoly, J. (1989) *Bulletin de la Societe Royale de Botanique de Belgique* **122**, 87-97. (Biological Abstracts en: CD January-December 1989).
27. Mantaring-Chua, N. (1991) *Acta Manilana* **39**, 31-37. (B.A. en CD January-June 1993).
28. Geissberger, P., Sequin, U. (1991) *Acta Tropica* **48**, 251-261. (C.A.: 115: 179302t).
29. Mirvish, S. S., Rose, E. F., Sutherland, D. H. (1979) *Cancer Lett.* **6**, 159-165. (C.A. 90:91843m).
30. Díaz, J.L. Usos de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas I y II Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A.C. 1976
31. Abigaíl Aguilar (1994) Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. del IMSS, México pag. 41.
32. Bundarenko, A. S., Bakina, L. A., Kleiner, E.H., Sheichenko, V.L., Gil'zin, A. S., Khokhlov, A. S., Poddubnaya, N.M., Skorobugat'ko, M. A. (1968) *Antibiotiki* **13**, 167-171 (C.A. 68:85073c).

33. Bondarenko, A. S., Petrenko, G.T., Aizenman, B. E., Euseenko, O. V. (1985) *Mikrobiol. Zh.* **47**, 81-83 (C.A. 103:3549s)
34. Arnason, T., Wat, Ch.-K., Kownum, K., Yamamoto, E., Graham, E., Towers, G. H. N. (1980) *Can. J. Microbiol.* **26**, 698-705. (C.A. 93:62442z).
35. Bourque, G., Arnason, J. T., Madhosingh, C. (1985) *Can. J. Bot.* **63**, 899-902. (C.A. 103:18297g).
36. Marchant, Y. Y., Towers, G. H. N. (1986) *Biochem Syst. Ecol.* **14**, 565-568. (C.A. 106:46508g).
37. N'Dunga, M., Balansard, G., Babadjamian, A., David, P. T., Gasquet, M. (1983) *Phytother.* **17**, 64-75. (C.A. 100:171592g).
38. Towers, G. H. N., Arnason, J.T., Wat, Ch.-K., Lambert, J.D.H. (1984) Patente canadiense Can. CA 1,169,767. (C.A. 101:146144a).
39. Wat, Ch.-K., Biswas, R. K., Graham, E. A., Bohm, L., Towers, G. H. N., Waygood, E. R. (1979) *J. Nat. Prod.* **42**, 103-111.
40. Una patente internacional describe una preparación farmacológica que contiene el fenilheptatriino(1), a partir del extracto clorofórmico de *B. cernua*, la cual previene el crecimiento de tumores de mama a una concentración de 5-100 mg/Kg de peso corporal.<sup>41</sup>
41. Sminov, V. V., Bondarenko, A. S., Mishenkova, E. L., Petrenko, G. T., Prikhodko, V. A., Enseynko, O. V. (1995) *Patente Internacional. PCT Int. Appl. WO* 95 12,378.
42. Campbell, G., Lambert, J. D. H., Arnason, T., Towers, G. H. N. (1982) *J. Chem Ecol.* **8**, 961-72.
43. Di Cosmo, F., Norton, R., Towers, G. H. N. (1982) *Naturwissenschaften* **69**, 550-551.
44. Marchant, Y. Y. (1988) *Bioact. Mol.* **7** (Chem. Biol. Nat.-occurring Acetylenes Relat. Compd.), 217-231. (C.A. 110:189469p).
45. Flores, H. E., Pickard, J. J., Hoy, M. W. (1988) *Bioact. Mol.* **7** (Chem. Biol. Nat.-occurring Acetylenes Relat. compd.), 233-254. (C.A. 110:189470g).

46. Norton, R. A., Towers, G. H. N. (1986) *J. Plant. Physiol.* **122**, 41-53. (C.A. 104:126620m).
47. Norton, R. A. (1986) Patente Internacional 1,4107. (C.A. 105:13074s).
48. Bohlmann, F., Arndt, Ch., Bornowski, H. and Kleine, K.-M. (1962) *Chemische Berichte* **95**, 1315-1319.
49. Long-Lii, Ch.-Y. W., Hsing-Chien, H., Mei-Tai, Wang and Hsia Chuang (1967) *T'ai-Wan Y Hsueh Hui Tsa-Chih* **66**, 58-66. (C.A. 68:20822b).
50. Sarg, T. M., Aleya, A.M., Farrag, N.M., Abbas, F.A. (1991) *Acta Pharm. Hung.* **61**, 317-323. (C.A. 118: 120939q).
51. Abdel-Monem, A. (1992) *Zagazig J. Pharm. Sci.* **1**, 60-67. (C.A. 120: 280391z).
52. Guerra, F., y Goyos, C. (1951) *Prensa Med. Méx.* **16**:7-11
53. Mirvish, S. S., Salmasi, S., Lawson, T. A., Pour, P., Sutherland, D. (1985) *J. Natl. Cancer Inst.* **74**, 1283-1290.
54. Gupta, M. P., Monge, A., Karikas, G. A., López de Cerain, A., Solis, P. N., de León, E., Trujillo, M., Suarez, O., Wilson, F., *et. al.* (1996) *Int. J. Pharmacogn.* **34**, 19-27. (C:A: 124:312243).
55. Machado, J. O., Santos, E. D., Lefevre, A. F. V. (1988) *Revista de Ciencias Farmacéuticas* **10**, 55-62. (B.A. on CD January-December 1989).
56. Van Puyvelde, L., Ntawukiliyago, J. D., Portaels, F., Hakizamungu, E. (1994) *Phytother. Res.* **8**, 65-69. (C.A. 121:251016w).
57. Hoffmann, B. und Holz, J. (1988) *Planta Medica* **54**, 52-544.
58. Hoffmann, B. und Holz, J. (1988) *Planta Medica* **57**: 450-451.
59. Hoffmann, B. and Holz, J. (1988) *Phytochemistry*, **27**:3700-3701.
60. Hoffmann, B., and Holz, J. (1989) *Phytochemistry* **28**, 247-249.
61. Sashida, Y., Ogawa, K., Kitada, M., Karikome, H., Mimaki, Y. and Shimomura, H. (1991) *Chem Pharm Bull.* **39**, 709-711.
62. Ogawa, K. and Sashida, Y. (1992) *Phytochemistry* **31**, 3657-3658.
63. Zulueta, M .C. A., Tada, M. and Ragasa, C. Y. (1995) *Phytochemistry* **38**, 1449-50 (1995).

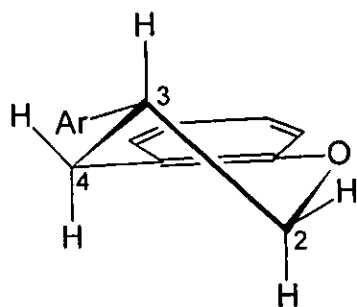
64. Como los estudios fitoquímicos efectuados a *B. pilosa* no están dirigidos a la obtención de los principios activos de la misma, los constituyentes aislados podrían estar en función de la técnica empleada para su obtención, el tipo de extracto y parte de la planta utilizadas para el estudio.
65. El modelo farmacológico empleado para determinar la actividad hipoglucemiante del extracto metanólico de *B. pilosa*, fue diseñado con la colaboración de la Profa. Mariana Meckes Fischer de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Centro Médico siglo XXI del IMSS, en base a su experiencia previa en este campo.
66. Coll, C. and Powden, E. (1986) *J. Nat. Prod.* **49**, 934-936.
67. El extracto hexánico de *B. pilosa* fue fraccionado mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente isocrático hexano al 100 %. Las fracciones 4-8 mostraron en ccf la presencia del poliacetileno 1, las cuales, después de recristalizar de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona, dieron 74 mg de 1.
68. Alvarez, L., Marquina, S., Villarreal, M. L., Alonso, D., Aranda, E. and Delgado, G. (1996) *Planta Medica* **62**, 355-357.
69. Bohlmann, F., Burkhardt, T., Zdero, Ch. (1973) Naturally Occurring Acetylenes, Academic Press, New York.
70. Bohlmann, F., Kleine, K.-M. und Arndt, Ch. (1964) *Chemische Berichte* **97**, 2125-2134.
71. Redl, K., Breu, W., Davis, B. and Bauer, R. (1994) *Planta Medica* **60**, 58-62.
72. Vanden Berghe, D. A.; Vlietinck, A. J. (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. En: *Methods in Plant Biochemistry* (Dex, P. M., Harborne, J. B., Hostettmann, K. Eds.), , vol 6, p 47-70. Academic Press.
73. Rücker, G., Kehrbaum, S., Sakulas, H., Lawong, B., Goeltenboth, F. (1992) *Planta Medica* **58**, 266-269.
74. Lam, J. B., Breteler, H., Arnason, T., Hansen, L. (1988) Chemistry and Biology of Naturally Occurring Acetylenes and Related Compounds, Amsterdam. Elsevier.

75. Hudson, J. B., Graham, E. A., Rossi, R., Carpita, A., Neri, D., Towers, G. H. N. (1993) *Planta Medica* **59**, 446-450.
76. N'dounga, M., Balansard, G., Babadjamian, A., Timon-David, P., Gasquet, M., Boudon, G. (1983) *Plantes Med. et Phytother.* **17**, 64-75.
77. Geran, R. I., Greenberg, N. H., MacDonald, M. N., Schumacher, A. M., Abbott, B. J. (1972) *Cancer Chemother. Rep.* **3**, 1-17.
78. Los hábitos de masticación de esta larva causan perforaciones características en las hojas de maíz y hacen girones las hojas en desarrollo que aún no se extienden, llegan a desfoliar las plantas maduras, destruyen los meristemos de las plantas jóvenes, y también pueden cortar o minar los tallos a nivel del suelo. Morón, M. A. y Terrón, R. A. (1988) *Entomología Práctica*. pp. 373-374, Instituto de Ecología A.C. México, D.F.
79. Kubo, Y. (1991) en: *Methods in Plant Biochemistry* (Dey, P. M., Harborne, J. B., Hostettmann, K., eds.) Vol. 6, pp. 179-193, Academic Press, New York.
80. Marles, R. J. and Farnsworth, N. R. (1994) *Plants as Sources of Antidiabetic Agents*. En: *Economic and Medicinal Plant Research Vol 6*, pp 151-187, Academic Press. Ltd.
81. En la literatura química se han descrito numerosos metabolitos secundarios aislados de plantas con acción hipoglucemiante; estos compuestos presentan una estructura molecular variada, por lo que se ha postulado<sup>80</sup> la existencia de diferentes mecanismos probables de acción, por lo cual, el modelo farmacológico empleado debe ser capaz de determinar la acción hipoglucemiante de los diferentes compuestos independientemente de su mecanismo de acción. Recientemente, se diseñó y se puso en operación un modelo farmacológico *in vivo* que permitirá esclarecer si *B. pilosa* es hipoglucemiante.
82. Rzedowski, J. (1978) *Vegetación de México*. pp. 202, Edit. Limusa, México.
83. Martínez, M. ((1987) *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Medicinales*. p. 684, Fondo de Cultura Económica, México.
84. Díaz, J. L. (1976) *Usos de las Plantas Medicinales de México*, Monografías Científicas, Vol II, IMEPLAM, México.

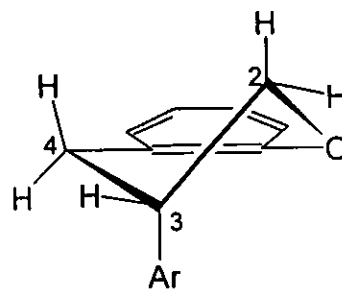
85. Martínez, M. ((1959) Las Plantas Medicinales de México, 4<sup>a</sup> ed., p. 469, 470, Edit. Botas, México.
86. Hernández, F. (1959) Historia Natural de la Nueva España, Obras Completas de F. Hernández, Vol II, p. 173, 212, UNAM, México.
87. Standley, P. C. (1922) Trees and shrubs of Mexico. *Contr. U.S. Natl. Herb.* **23**, 429-515. (1930) Flora de Yucatán. *Field Mus. Nat. Hist. Bot.. Ser. 3*, 157-492.
88. Comunicación personal con los Prof. Clara Ramos y Esteban Martínez, Centro de Ecología, UNAM (1993).
89. Ortiz de Montellano, B. R. and Browner, C. H. (1985) *J. Ethnopharmacol.* **13**, 57-88.
90. Hastings, R. B. (1990) *Economic Botany* **44**, 336-348.
91. Domínguez, X. A. and Alcorn, J. B. (1985) *J. Ethnopharmacol.* **13**, 139-156.
92. Domínguez, X. A., Franco, R., Díaz Viveros, Y. (1978) *Rev. Latinoam. de Quím.* **9**, 209-
93. Beltrami, E., Bernari, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vilardi, G. and Vitafinzi, P. (1982) *Phytochemistry* **21**, 2931-
94. Burns, D. T., Delgrano, B., Gargan, P. and Grinshaw, J. (1984) *Phytochemistry* **23**, 167-
95. Carlos Enrique Esquivel Sirvent (1994) Aislamiento y caracterización estructural de diversos isoflavonoides y otros constituyentes de la planta medicinal *Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae). Tesis Profesional, UNAM.
96. Goda, Y., Sankawa, V., Shibuyi, Y. (1985) *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 5606-
97. Ingham, J. (1981) *Biochem. System. and Ecol.* **9**, 125-
98. Hakim, A. and Dewick, P. M. (1987) *Phytochemistry* **24**, 5561-
99. Verbit, L. and Clark-Lewis, J. W. (1968) *Tetrahedron* **24**, 5519-5527.
100. Esta interacción se corroboró con el espectro NOEDIFF (Figura 19), en donde se observa que al irradiar el protón H-6' se incrementa la señal del metoxilo en  $\delta$  3.78.
101. Existen dos posibles conformaciones de media silla, energéticamente equivalentes, para el anillo de dihidropirano (**105a** y **105b**); mediante el análisis de

las señales de los hidrógenos en C-2, C-3 y C-4 del anillo de dihidropirano en el espectro de RMN<sup>1</sup>H, es posible establecer cual es la adoptada por el compuesto.<sup>102</sup>

102. Los valores esperados para las constantes de acoplamiento vecinal del sistema ABMXY o ABMXX' que forman los protones del anillo de dihidropirano en la conformación en la que el anillo aromático de C-3 ocupa una posición ecuatorial (**105a**) son:  $J_{2,3} = 2-3.5$  y  $10-10.5$  Hz;  $J_{3,4} = 5-7$  y  $10.5-12.5$ ; y los valores esperados cuando el anillo aromático de C-3 ocupa la posición axial (**105b**) son:  $J_{2,3} = 2.5-3$  y  $6.0-6.5$  Hz;  $J_{3,4} = 6$  y  $6.5$  Hz.<sup>98</sup>



**105a**



**105b**

103. Kurosawa, K., Ollis, W. D., Redman, B. T., Sutherland, I. O., Alves, H. M. and Gottlieb, O. R. (1978) *Phytochemistry* **17**, 1423-1426
104. Crabbé, P. (1965) *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, Holden-Day, San Francisco.
105. El uso empírico de esta técnica ha sido corroborado para algunos compuestos por medio de degradación.
106. En 1954 Robertson *et. al.*<sup>103</sup> determinaron la configuración absoluta de la (-)-dihidrohoptero carpina, mediante la oxidación con KMnO<sub>4</sub> al ácido (+)-7-metoxicroman-3-ácido carboxílico. Similarmente, los isoflavanos (3S)-(+)-dihidrohoptero carpina y (3S)-(+)-7,2',4'-trimetoxiisoflavano preparados por Gottlieb *et. al.* a partir del (6aS, 11aS)-3,9-dimetoxiptero carpano, que mostraron efecto Cotton negativo en la región de 260 a 300 nm, dieron por tratamiento con KMnO<sub>4</sub> el enantiómero de la dihidrohoptero carpina.<sup>98</sup>

107. La configuración absoluta del tetraacetato de dihidrotrifolirhizina fue establecida por ozonólisis al ácido (S)-(-)-paracónico.<sup>104,105</sup> Similar ozonólisis del 7,8,3',4'-tetrametoxiisoflavano, cuya configuración 3S fue establecida por síntesis,<sup>106</sup> y su relación con el ácido (S)-(-)-metilsuccínico, y de la (-)-duartina dio el ácido (R)-(+)-paracónico.<sup>98</sup>
108. Robertson, A. and Whalley, W. B. (1954) *J. Chem. Soc.* 1440.
109. Ito, S., Fujise, Y. and Mori, A. (1965) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 595-596.
110. Suginome, H. and Iwadare, T. (1966) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **39**, 1535-1541.
111. Clark-Lewis, J. W., Dainis, Y. and Ramsay, G. C. (1965) *Australian J. Chem.* **18**, 1035.
112. Donnelly, D. M. X., Keenan, P. J. and Prendergast, J. P. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1157-1161.
113. Pelter, A. and Amenechi, I. (1969) *J. Chem. Soc. (C)* 887-896.
114. Guimaraes, Y. S. S., Gottlieb, O. R., Souza, A. C. and Magalhaes, M. T. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1452-1453.
115. Filho, R. B., Gottlieb, O. R., Mourao, A. P., Rocha, Y. D.-R. and Oliveira, F. S. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1454-1456.
116. Saitoh, T., Kinoshita, T. and Shibata, S. (1976) *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 752-755.
117. Manners, G. D. and Jurd, L. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1037-1042.
118. Yahara, S., Ogata, T., Saijo, R., Konishi, R., Yamahara, J., Miyahara, K. and Nohara, T. (1989) *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 979-987.
119. Subarnas, A., Oshima, Y. and Hikino, H. (1991) *Phytochemistry* **30**, 2777-2780.
120. Fukai, T., Nishizawa, M. and Nomura, T. (1993) *Heterocycles* **36**, 2565-2576.
121. Fukai, T., Nishizawa, J., Yokoyama, M., Tantai, L. and Nomura, T. (1994) *Heterocycles* **38**, 1089-1098.
122. Fukai, T. and Nomura, T. (1995) *Phytochemistry* **38**, 759-765.
123. Grosvenor, P. W. and Gray, D. O. (1996) *Phytochemistry* **43**, 337-380.
124. Zeng, J.-F., Li, G.-L., Xu, X. and Zhu, D.-Y. (1996) *Phytochemistry* **43**, 893-896.
125. Kurosawa, K., Ollis, W. D., Redman, B. T. and Sutherland, I. O. (1968) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1265-1267.



126. Kurosawa, K., Ollis, D. O., Redman, B. T., Sutherland, I. O. and Gottlieb O. R. (1978) *Phytochemistry* **17**, 1413-1415.
127. Kurosawa, K., Ollis, W. D., Sutherland, I. O., Gottlieb O. R. and Oliveiras, A. B. (1978) *Phytochemistry* **17**, 1405-1411.
128. Ollis, W. D., Sutherland, I. O., Alves, H. M. and Gottlieb, O. R. (1978) *Phytochemistry* **17**, 1401-1403.
129. Matos, F. J., Gottlieb, O. R. and Andrade, C. H. S. (1975) *Phytochemistry* **14**, 825-826.
130. Rao, C. P., Prashant, A. and Krupadanam, G. L. D. (1996) *Phytochemistry* **41**, 1223-1224.
131. Tal es el caso de las (3R)-isoflavanquinonas #y #, las cuales presentan un equilibrio conformacional, evidenciado por las multiplicidades observadas en sus espectros de RMN<sup>1</sup>H.<sup>98</sup>
132. Pelter, A., Ward, R. S. and Gray, T. I. (1976) *J. C. S. Perkin I* 2475-2483.
133. Markham, K. (1982) *Techniques in Flavonoid Identification*. p. 2. Academic Press, London, G.B.
134. Agrawal, P.K. (de) (1989) *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Elsevier, Amsterdam.
135. Agrawal, P. K. (1992) *Phytochemistry* **31**, 3307-3330.
136. Bhakuni, D., Bittner, M., Silva, M. and Sammes, P. G. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2777-2779.
137. Bezuidenhout, B. C. B., Brandt, E. V. and Roux, D. G. (1981) *J. Chem. Soc. Perkin I*, 263-269.
138. Bezuidenhout, B. C. B., Brandt, E. V. and Ferreira, D. (1987) *Phytochemistry* **26**, 531-535.
139. Bezuidenhout, B. C. B., Swanepoel, A., Augustyn, J. A. N. and Ferreira, D. (1987) *Tetrahedron Lett.* **28**, 4857-4860.
140. Malan, E. and Swinng, E. (1990) *Phytochemistry* **29**, 3307.
141. Bezuidenhout, S. C., Bezuidenhout, B. C. B. and Ferreira, D. (1988) *Phytochemistry* **27**, 2329-2334.

142. Gómez-Garibay, F., Reyes, Ch. R., Quijano, L., Calderón, P. J. and Ríos, C. T. (1990) *Phytochemistry* **29**, 459-463.
143. Ferrari, F., Botta, B. and Alves de Lima, R. (1983) *Phytochemistry* **22**, 1663.
144. Augustyn, J. A. N., Bezuidenhout, B. C. B., Swanepoel, A. and Ferreira, D. (1990) *Tetrahedron* **46**, 4429-4442.
145. Ingham, J. L. (1983) *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **43**, 1.
146. Adlercreutz, H., Van der Wilt, J., Kinzel, J., Atalla, H., Waehaehae, K., Maekelae, T., Hase, T. Fostis, T. (1995). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**, 97-103. (C.A. 122: 129255d).
147. Dewick, P.M. (1988) in *The Flavonoids, Advances in Research Since 1980* (Harborne, J. B., de.), p. 125. Chapman and Hall, London
148. Dewick, P. M. (1994) in *The Flavonoids, Advances in Research Since 1986* (Harborne, J. B., de.), p. 117. Chapman and Hall, London.
149. El-Sebakhy, N., Asaad, A. M., Abdallah, R. M., Toaima, S. M., Abdel-Kader, M. S. and Stermitz, F. R. (1994) *Phytochemistry* **36**, 1387-1389.
150. Hamburger, M. O., Cordell, G. A., Tantivatana, P. and Ruangrunsi, N. (1987) *J. Nat. Prod.* **50**, 696-699.
151. Grosvenor, P. W. and Gray, D. O. (1996) *Phytochemistry*, **43**, 377-380.
152. Weidenbörner, M., Hindorf, H., Jha, H. Ch., Tsotsonos, P. and Egge, H. (1990) *Phytochemistry* **29**, 801-803.
153. Soby, S., Caldera, S., Bates, R. and VanEtten, H. (1996) *Phytochemistry* **41**, 759-765.
154. Ingham, J. L. (1991) *Biochem. Syst. Ecol.* **19**, 497-506.
155. Ingham, J. L. and Millar, R. L. (1973) *Nature* **242**, 125-126.
156. Ingham, J. L. (1979) *Z. Naturforsch* **34C**, 630.
157. Sheehan, D. and Medlock, K. (1995). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 116-119.
158. Hileman, B. (1994) *Chem. and Eng. News.*, Jan 31, p 19.
159. Yu-Chen, Ch., Muralcedharan, G. and Nitiss, J. L. (1995) *J. Nat. Prod.* **58**, 1901-1905.
160. Yu-Chen, Ch. and Muralcedharan, G. (1995) *J. Nat. Prod.* **58**, 1892-1896.

161. Chang, C. J. and Geahlen, R. L. (1992) *J. Nat. Prod.*, **55**, 1529
162. Una patente japonesa utiliza isoflavanos y pterocarpanos como un tratamiento profiláctico por desórdenes hormonales como secreción de sebo, acné, caída del cabello, etc. Ytaka, M., Tomoo, I. and Jusuke, H. (19 Dec 1995) *Antiandrogens. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. C.A. 124: 194331f.*
163. Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Huckerstedt, K. and Makela, T. (1992) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**, 331-337.
164. Una patente inglesa propone un método para prevenir y tratar los síntomas premenstruales y de la menopausa ocasionados por una disminución en los niveles de estrógenos endógenos, mediante la administración de isoflavonoides.
165. Sherwood, G. L., Goldin, B. R. and Adlercreutz, H. M (1994) *PCT Int. Appl. WO 9423,716. C.A. 121: 308366r.*
166. Ibañez-Camacho, R., Meckes-Lozoya, M., Mellado-Campos, V. (1983) *J. Ethnopharmacol.* **14**, 1.

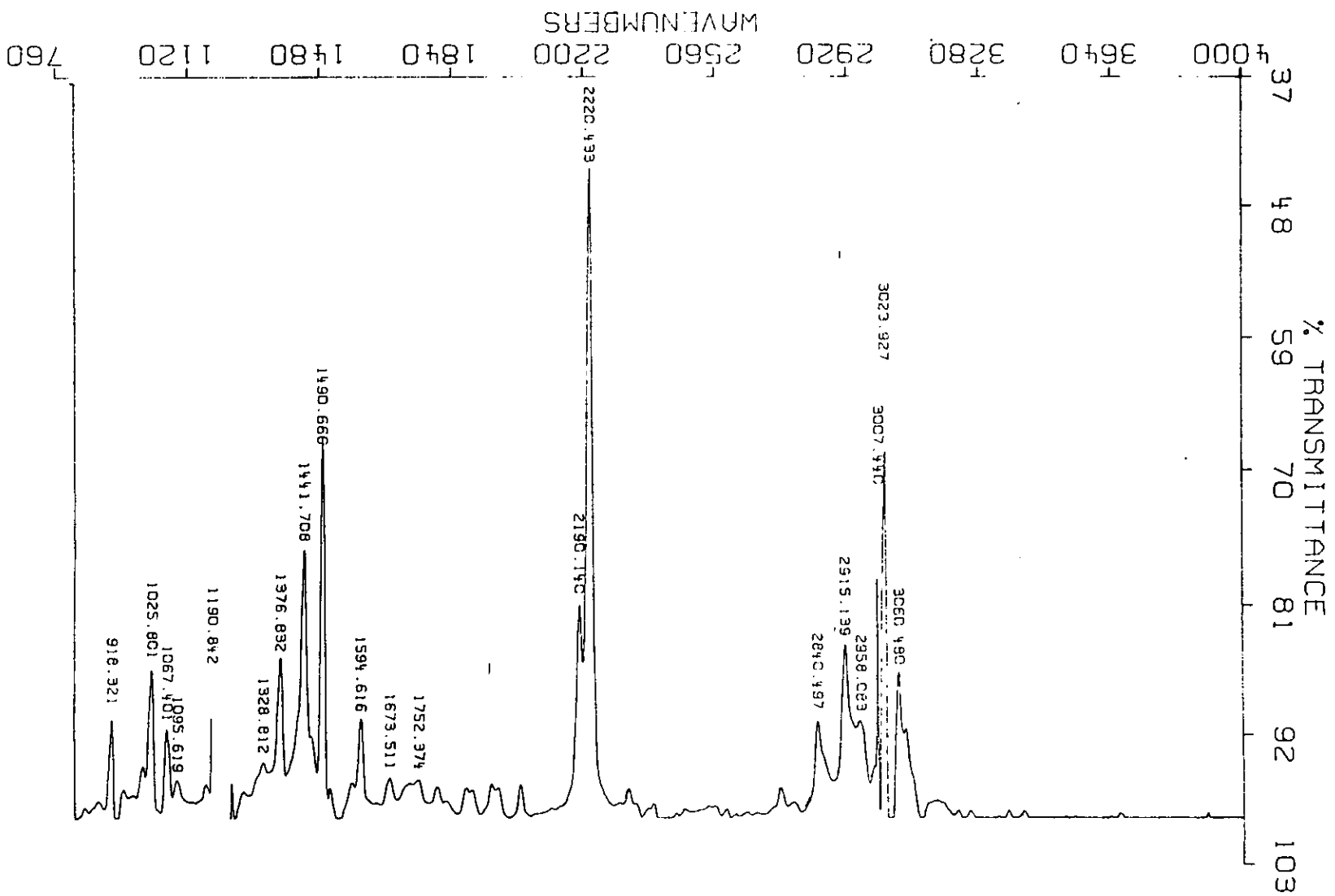
## Lista de espectros

- Espectro 1. Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>) del fenilhepta-1,3,5-triino (1)
- Espectro 2. Espectro de UV (MeOH) del fenilhepta-1,3,5-triino (1)
- Espectro 3. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) del fenilhepta-1,3,5-triino (1)
- Espectro 4. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del fenilhepta-1,3,5-triino (1)
- Espectro 5. Espectro de IR (susp. nujol) del β-D-glucósido de β-sitosterol (2)
- Espectro 6. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) del β-D-glucósido de β-sitosterol (2)
- Espectro 7. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del β-D-glucósido de β-sitosterol (2)
- Espectro 8. Espectro de UV (EtOH) del β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino (29)
- Espectro 9. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) del β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino (29)
- Espectro 10. Espectro de RMN <sup>13</sup>C+DEPT (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) del β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino (29)
- Espectro 11. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino peracetilado (29a)
- Espectro 12. Espectro de RMN <sup>13</sup>C y DEPT (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino peracetilado (29a)
- Espectro 13. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5'.8-pentametoxiisoflavano (41)
- Espectro 14. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5'.8-pentametoxiisoflavano (41)
- Espectro 15. Espectro de correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMQC, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5'.8-pentametoxiisoflavano (41)
- Espectro 16. Espectro de correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMBC, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5'.8-pentametoxiisoflavano (41)
- Espectro 17. Espectro de correlación <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (NOESY, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5'.8-pentametoxiisoflavano (41)
- Espectro 18. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5'.8-tetrametoxiisoflavano (43)
- Espectro 19. Espectro de correlación <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (NOESY, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5'.8-tetrametoxiisoflavano (43)
- Espectro 20. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5'.8-tetrametoxiisoflavano (43)
- Espectro 21. Espectro de correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMQC, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5'.8-tetrametoxiisoflavano (43)
- Espectro 22. Espectro de correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMBC, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5'.8-tetrametoxiisoflavano (43)
- Espectro 23. Espectro de correlación <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (NOESY, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5'.8-tetrametoxiisoflavano (43)
- Espectro 24. Espectro de IR (KBr) de la (α*R*)-3'-C-β-xilopiranosil-α,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (93)

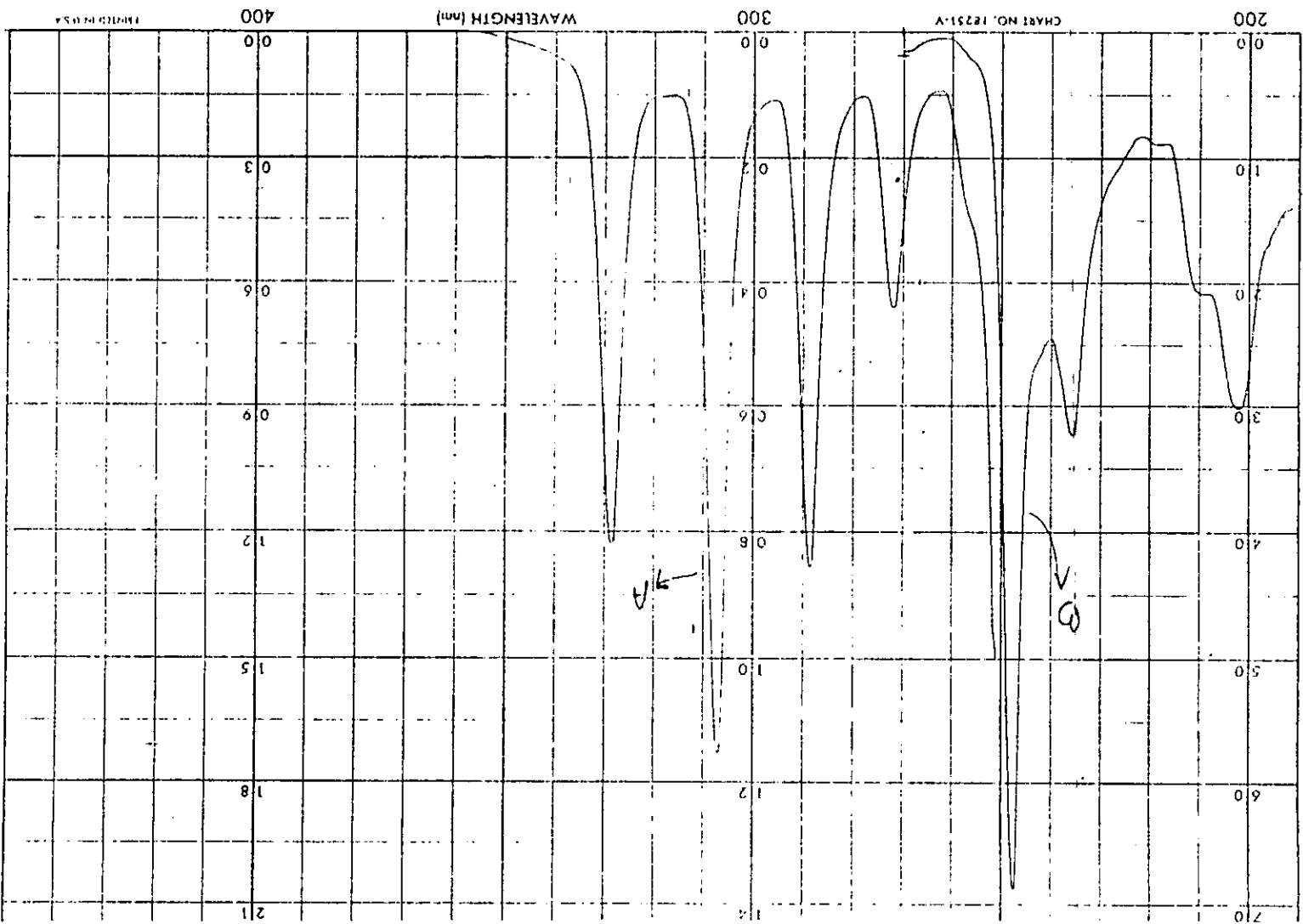
- Espectro 25. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**93**)
- Espectro 26. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**93**)
- Espectro 27. Espectro de UV (MeOH) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**93**)
- Espectro 28. Espectro de correlación  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HETCOR, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**93**)
- Espectro 29. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**93**)
- Espectro 30. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona peracetilada (**93a**)
- Espectro 31. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona peracetilada (**93a**)
- Espectro 32. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona peracetilada (**93a**)
- Espectro 33. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (NOESY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**93**)
- Espectro 34. Espectro de IR (KBr) de la ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**94**)
- Espectro 35. Espectro de UV (MeOH) de la ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**94**)
- Espectro 36. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**94**)
- Espectro 37. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**94**)
- Espectro 38. Espectro de IR (KBr) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**33**)
- Espectro 39. Espectro de UV (MeOH) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**33**)
- Espectro 40. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**33**)
- Espectro 41. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**33**)
- Espectro 42. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**33**)
- Espectro 43. Espectro RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ - $\text{D}_2\text{O}$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**33**)
- Espectro 44. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**33**)
- Espectro 45. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (**33**)

- Espectro 46. Espectro de IR (película) de la ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (92)
- Espectro 47. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (92)
- Espectro 48. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (92)
- Espectro 49. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (92)
- Espectro 50. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (92)

Espectro 1. Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>) del fenilhepta-1,3,5-trino (1)



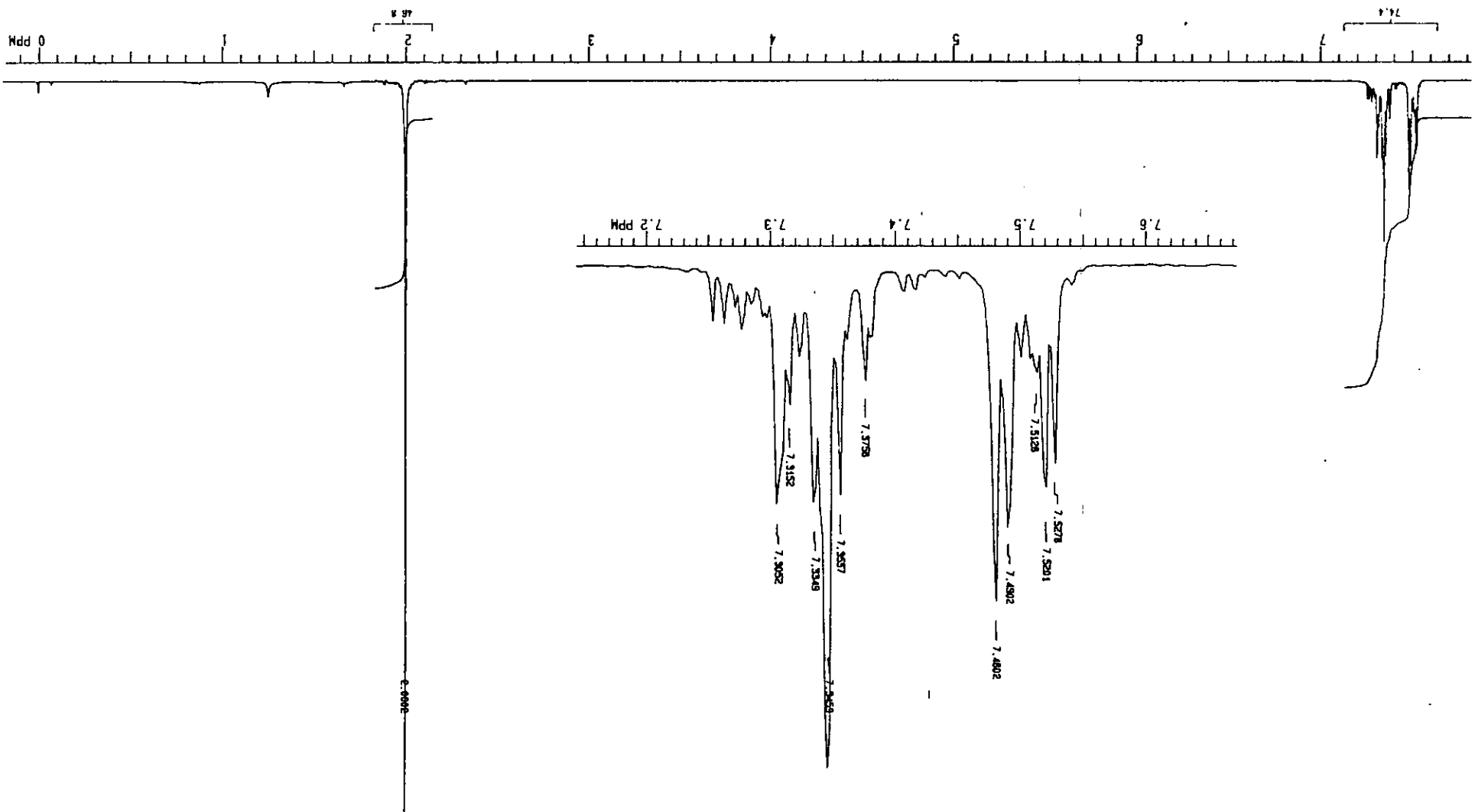
Espectro 2. Espectro de UV (MeOH) del fenilhepta-1,3,5-trino (I)



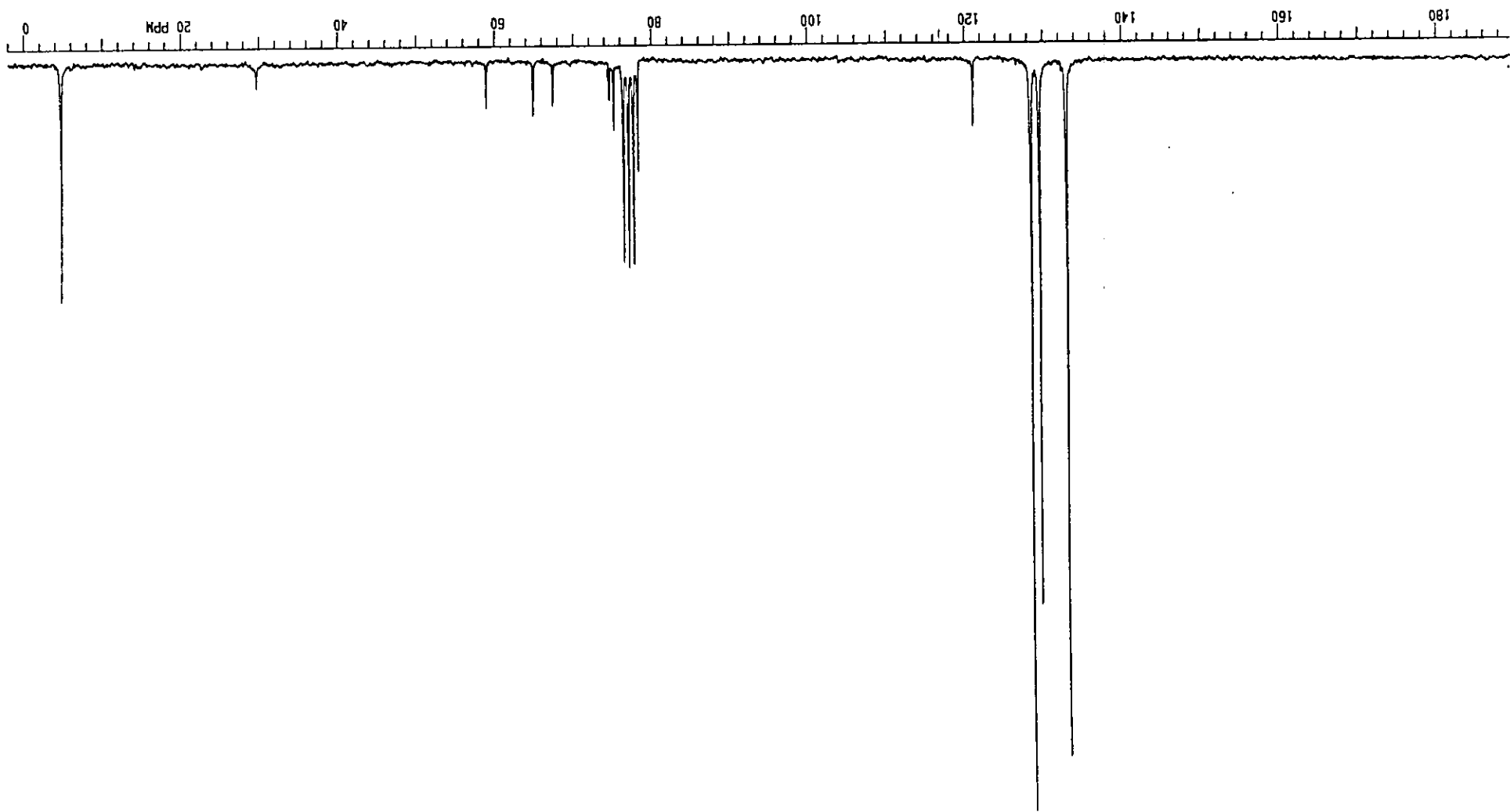
PERKINELMER U.S.A.



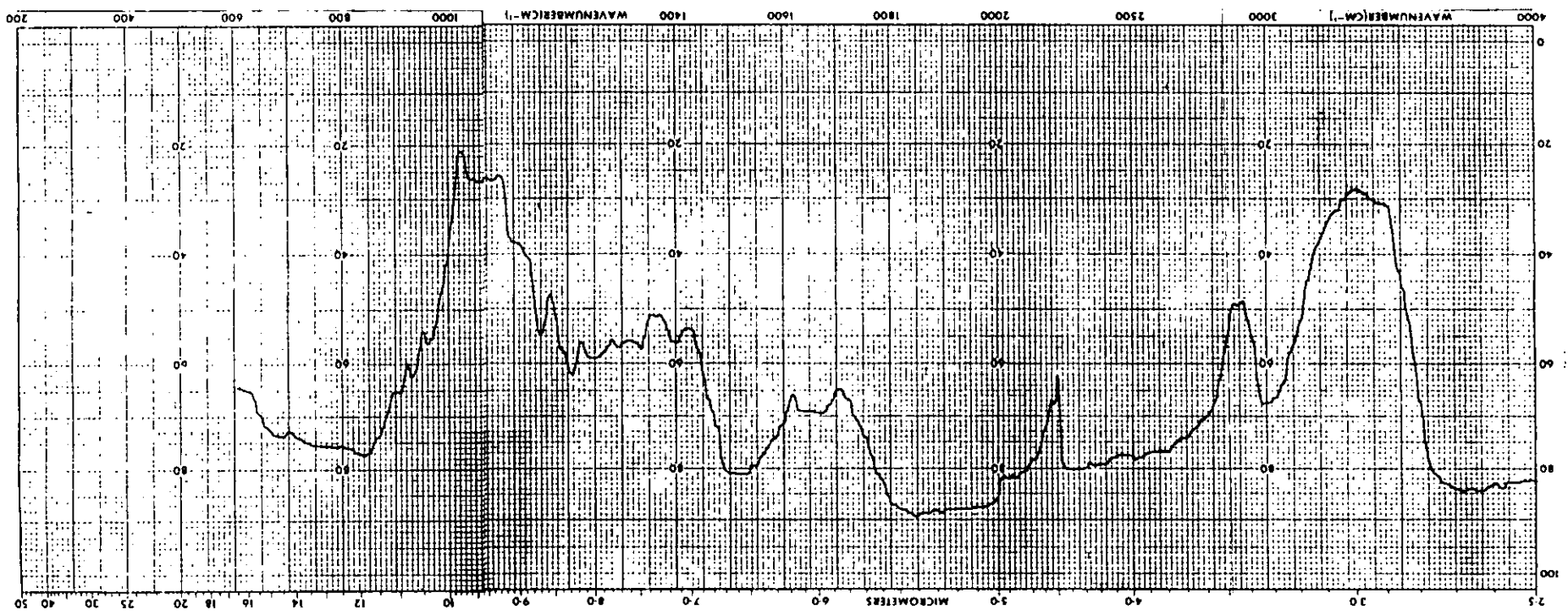
Espectro 3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) del fenilhepta-1,3,5-trieno (1)



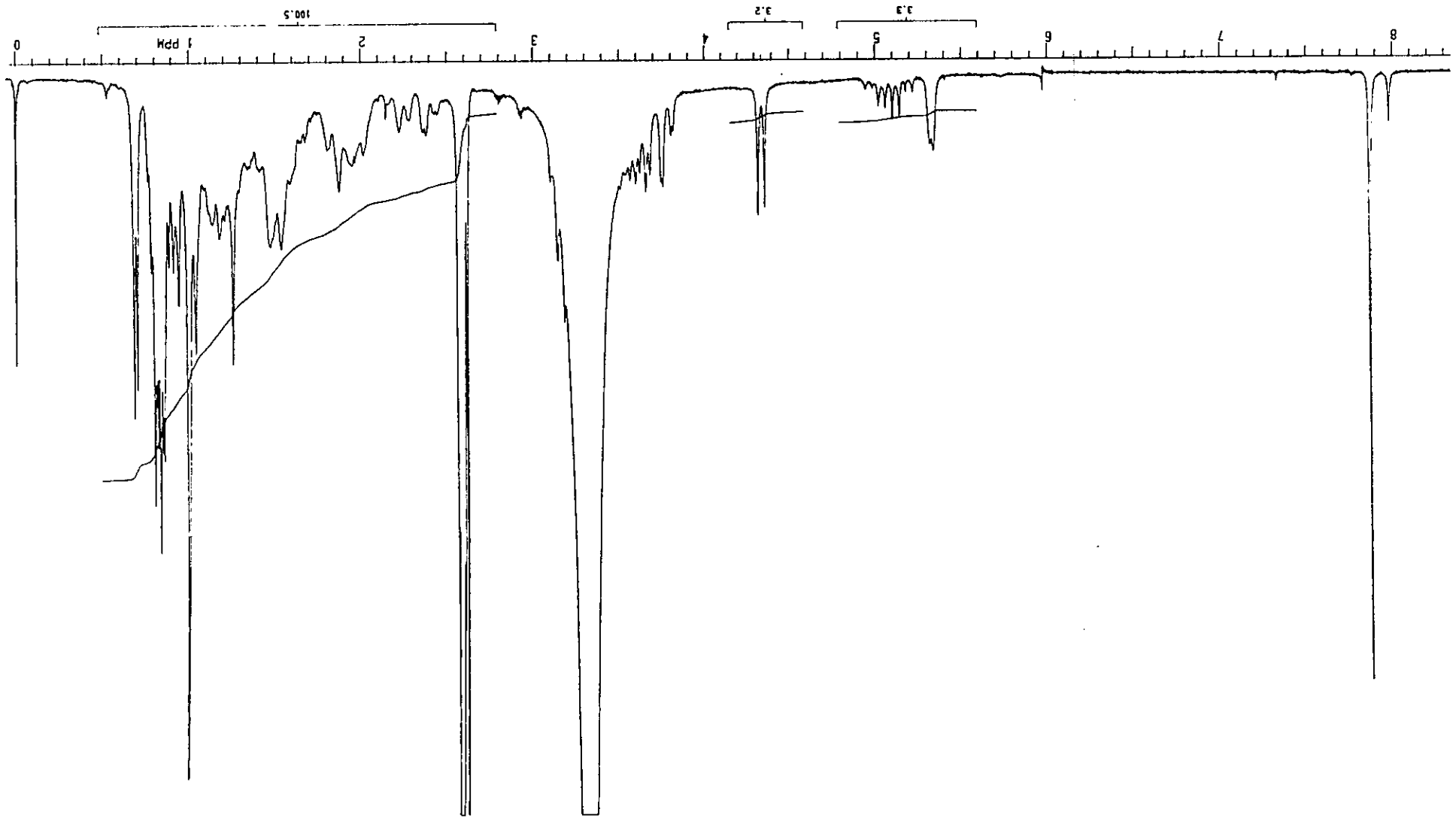
Espectro 4. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del fenilhepta-1,3,5-trieno (1)



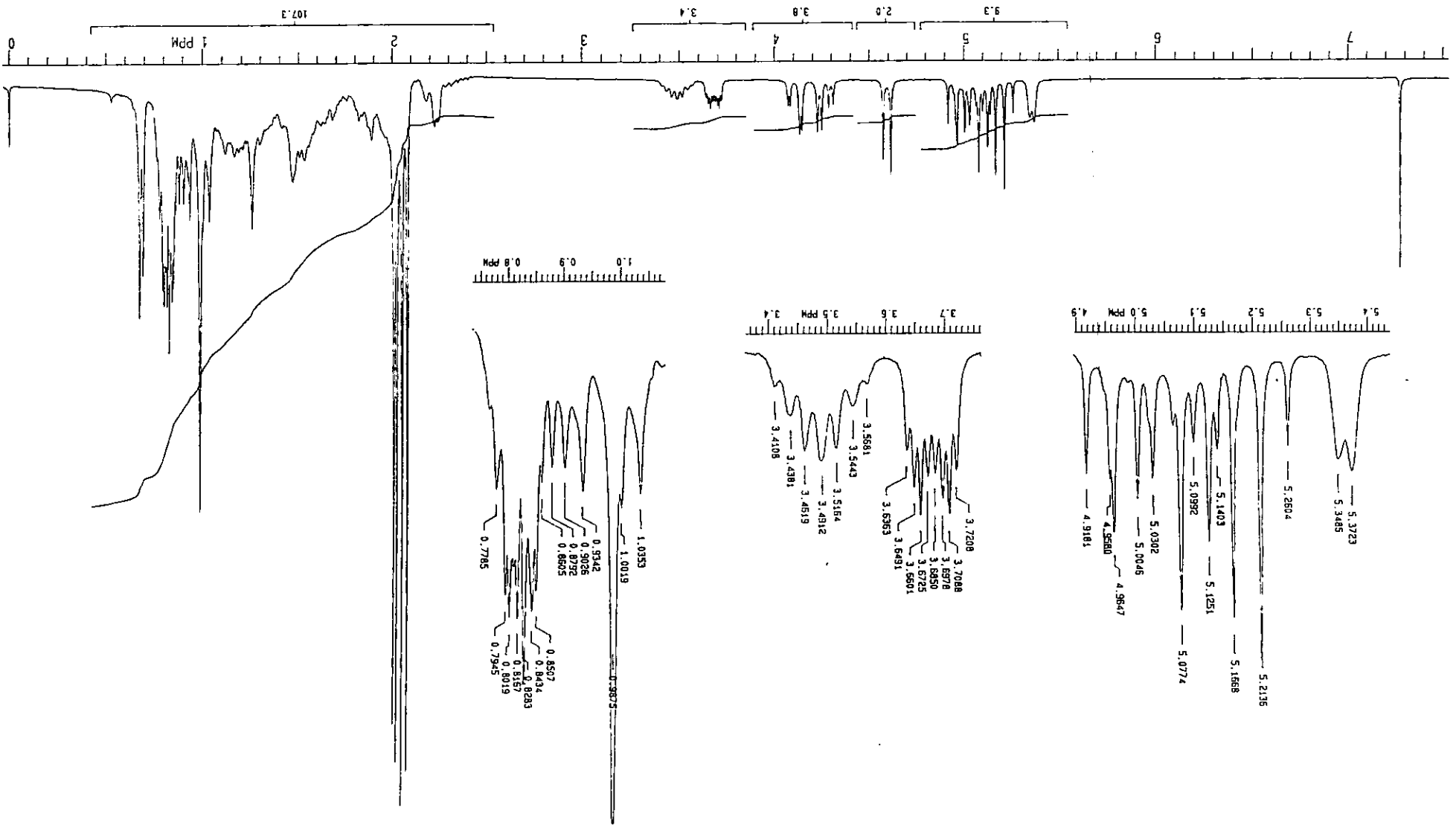
Espectro 5. Espectro de IR (susp. nujol) del  $\beta$ -D-glucósido de  $\beta$ -sitosterol (2)



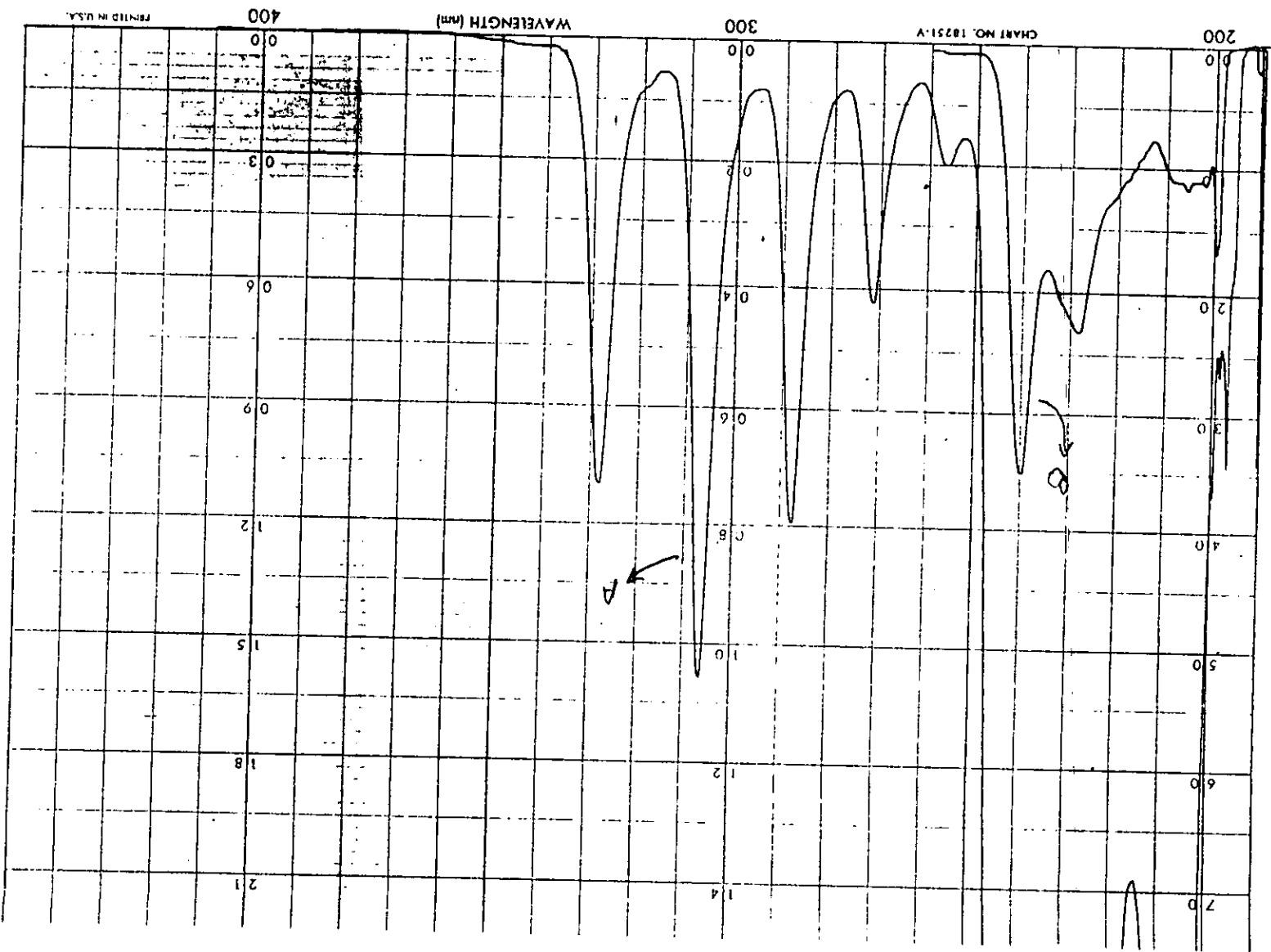
Espectro 6. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) del β-D-glucósido de β-sitosterol (2)



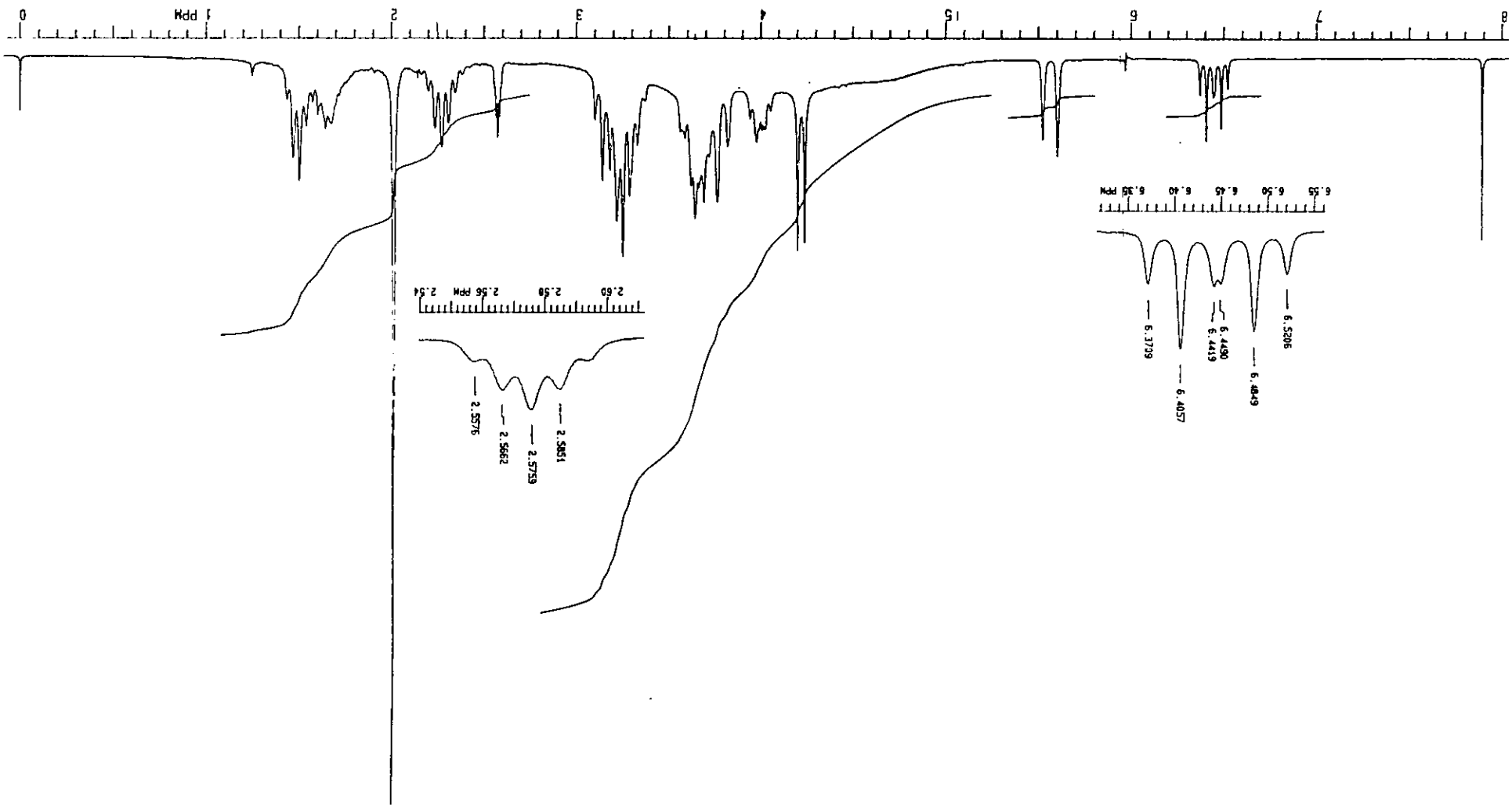
Espectro 7. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del β-D-glucósido de β-sitosterol (2)



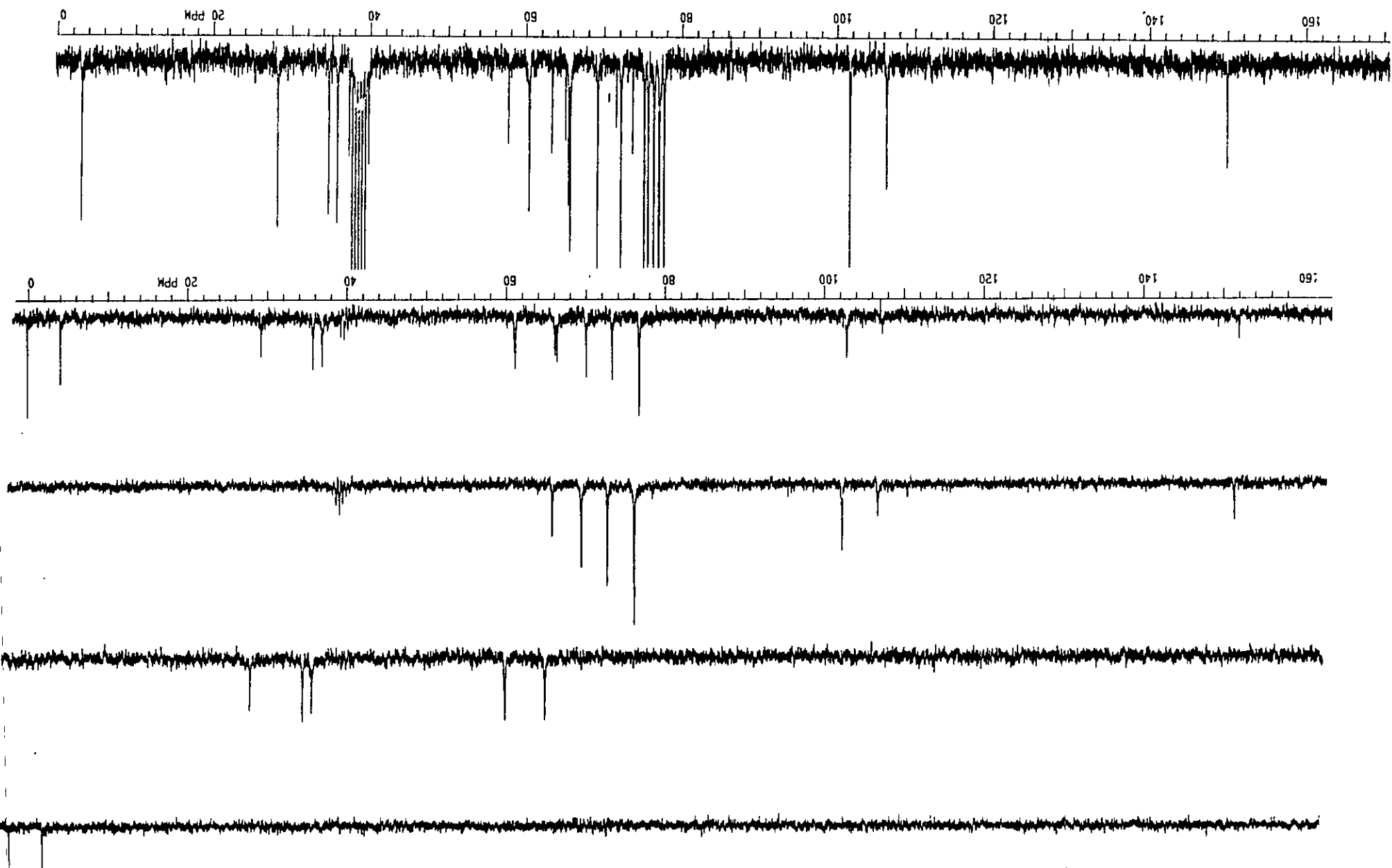
Espectro 8. Espectro de UV (EtOH) del  $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(E)-tetradecen-8,10,12-trino (29)



Espectro 9. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>) del β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(E)-tetradecen-8,10,12-triino (29)

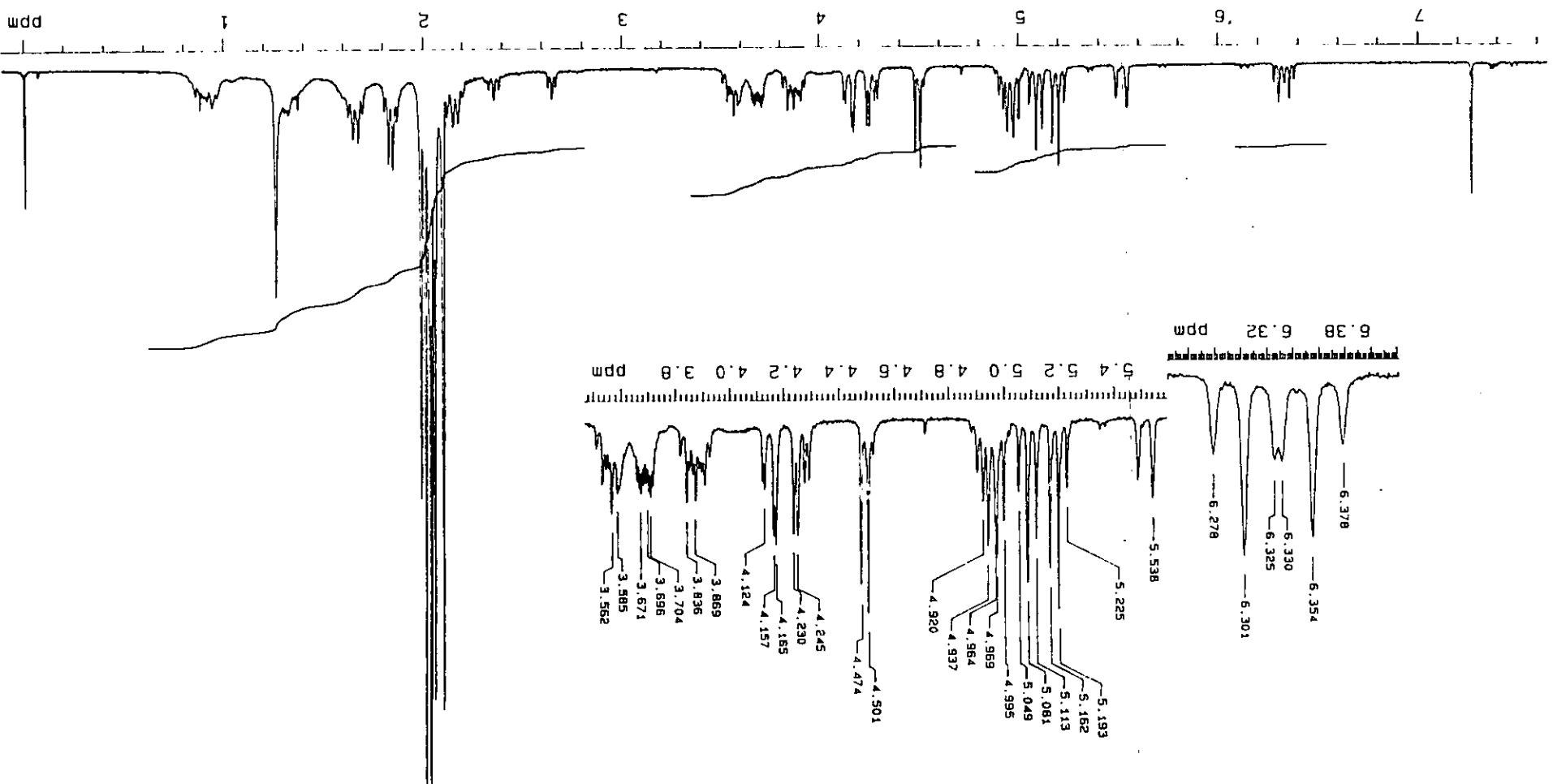


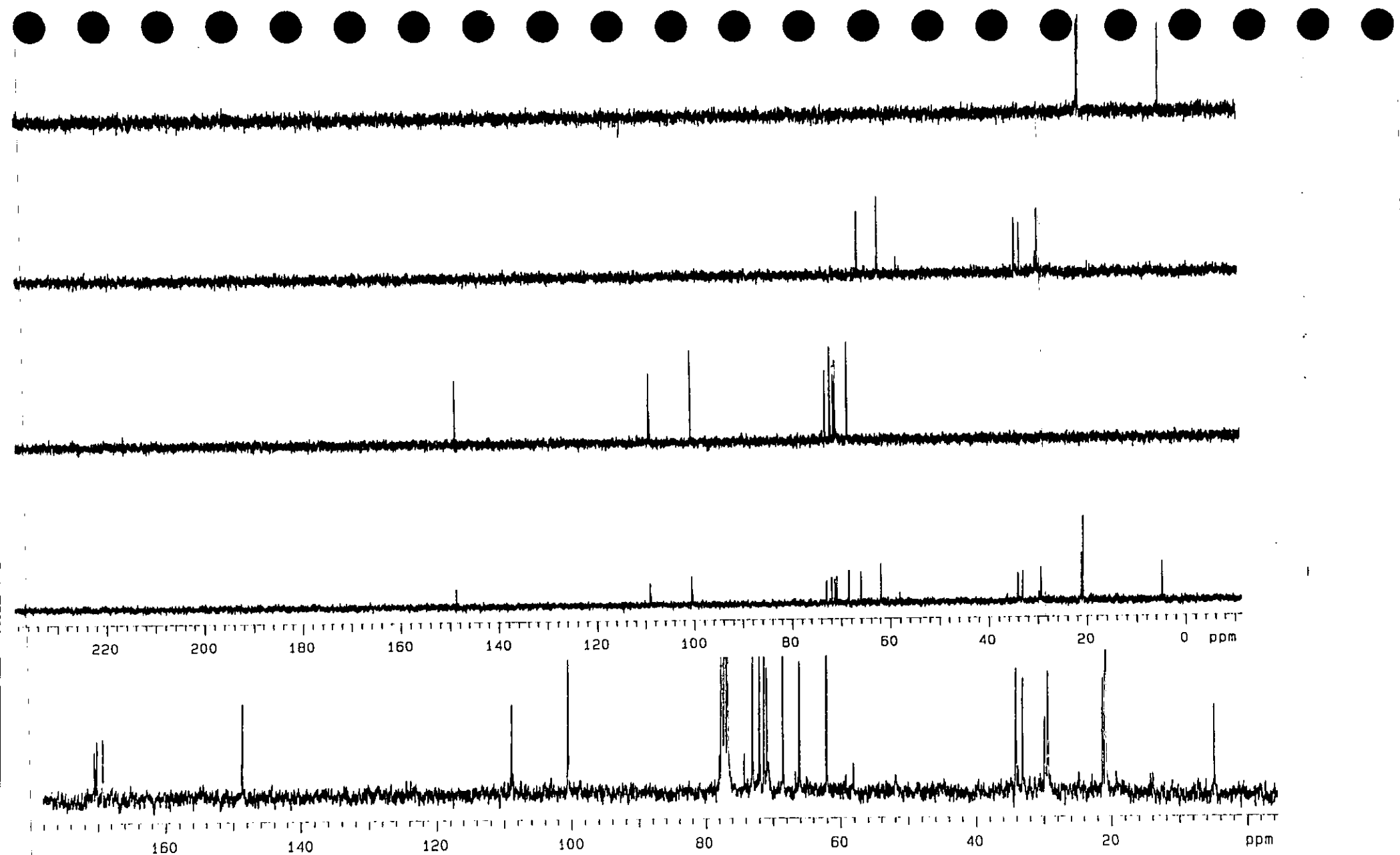
Espectro 10. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ +DEPT (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) del  $\beta$ -D-glucopiranosilo-3-hidroxi-6-(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino (29)



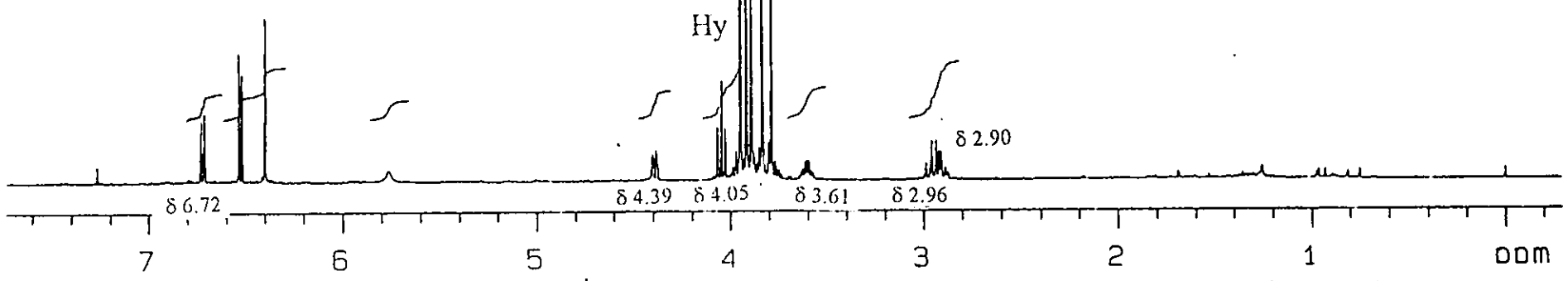
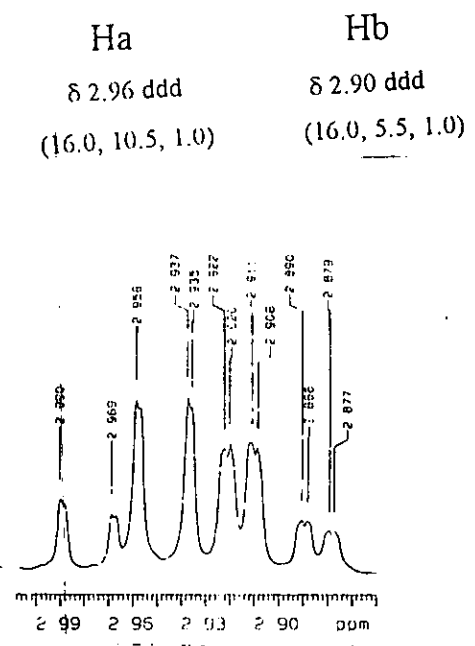
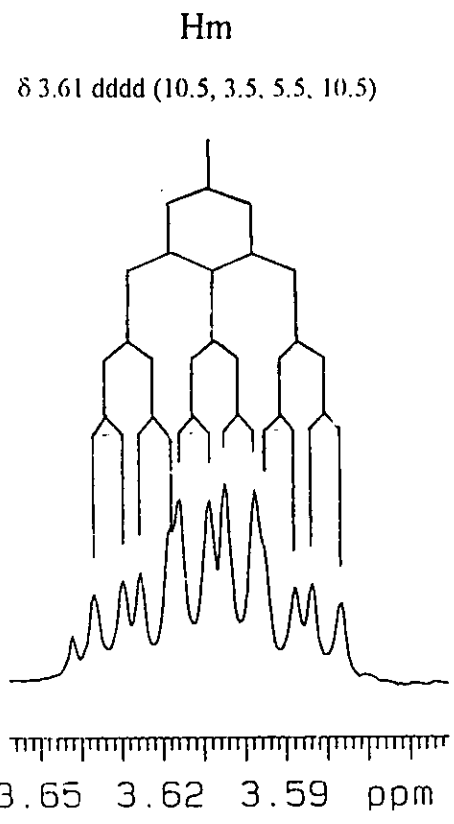
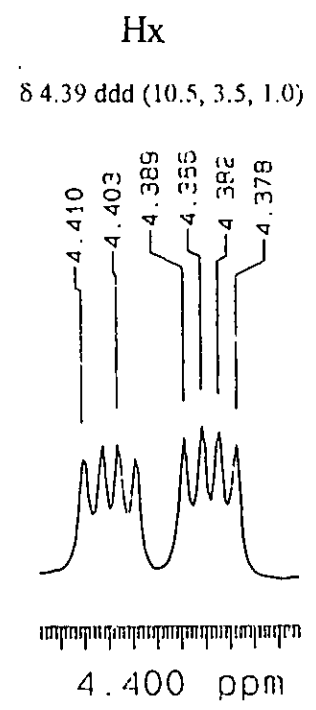
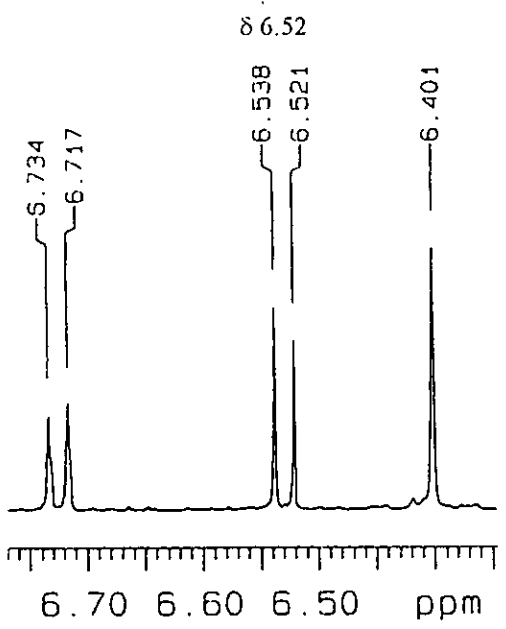
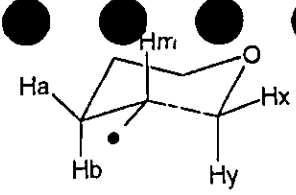
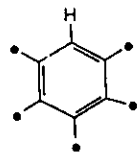
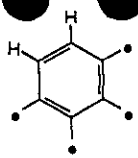


Espectro 11. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(E)-tetradecen-8,10,12-triino peracetilado (29a)

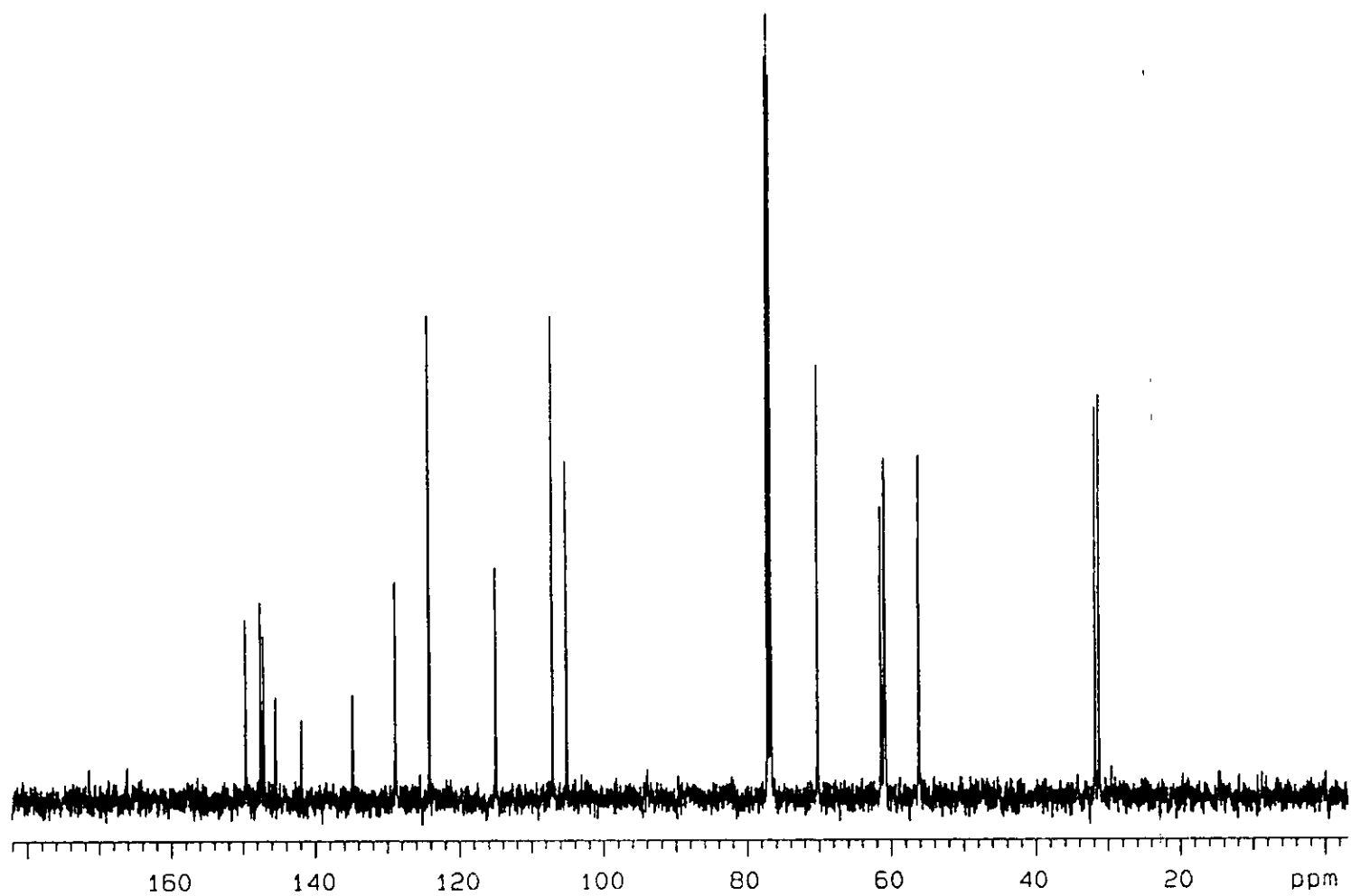




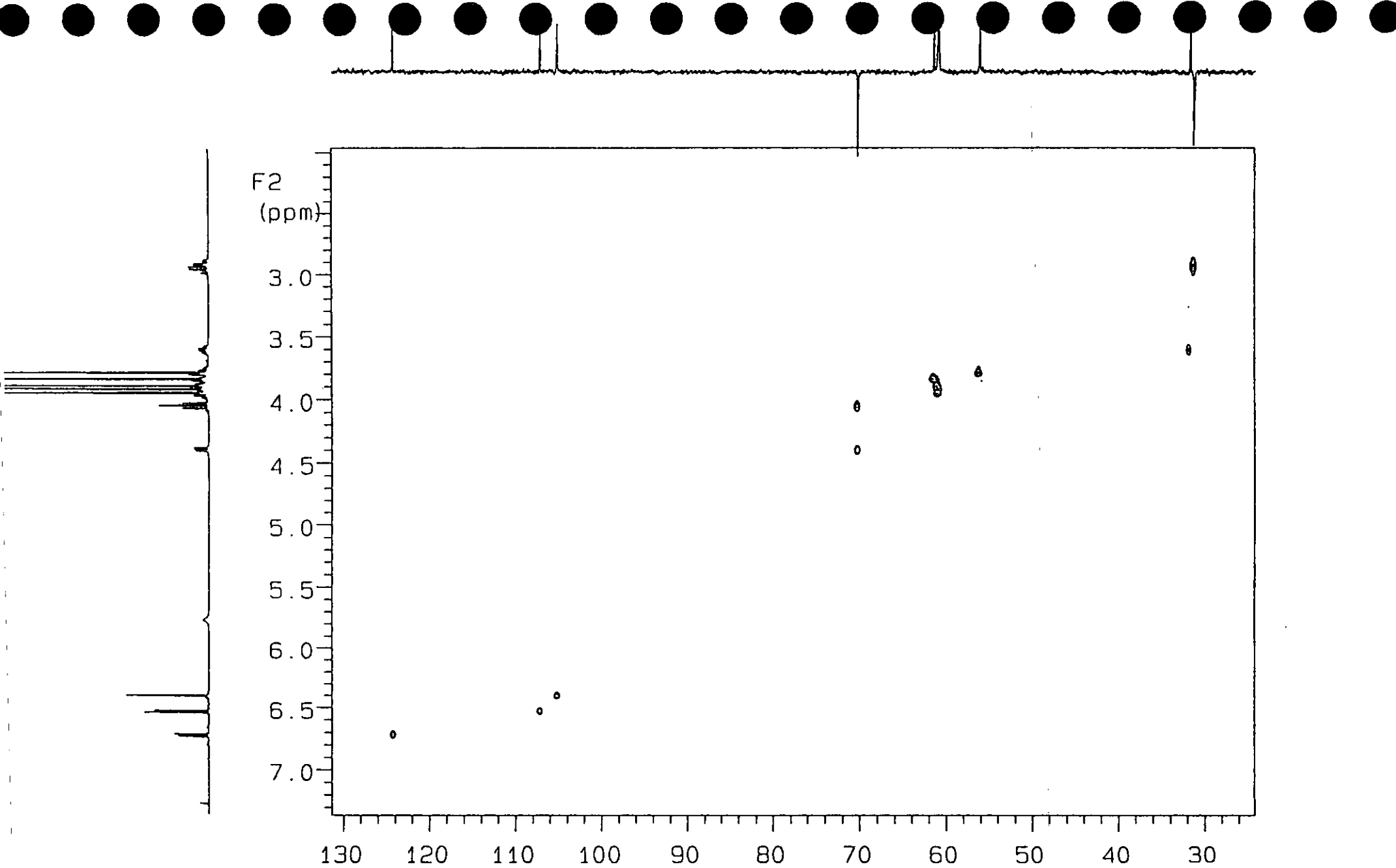
Espectro 12. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del  $\beta$ -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6-(*E*)-tetradecen-8,10,12-triino peracetilado (29a)



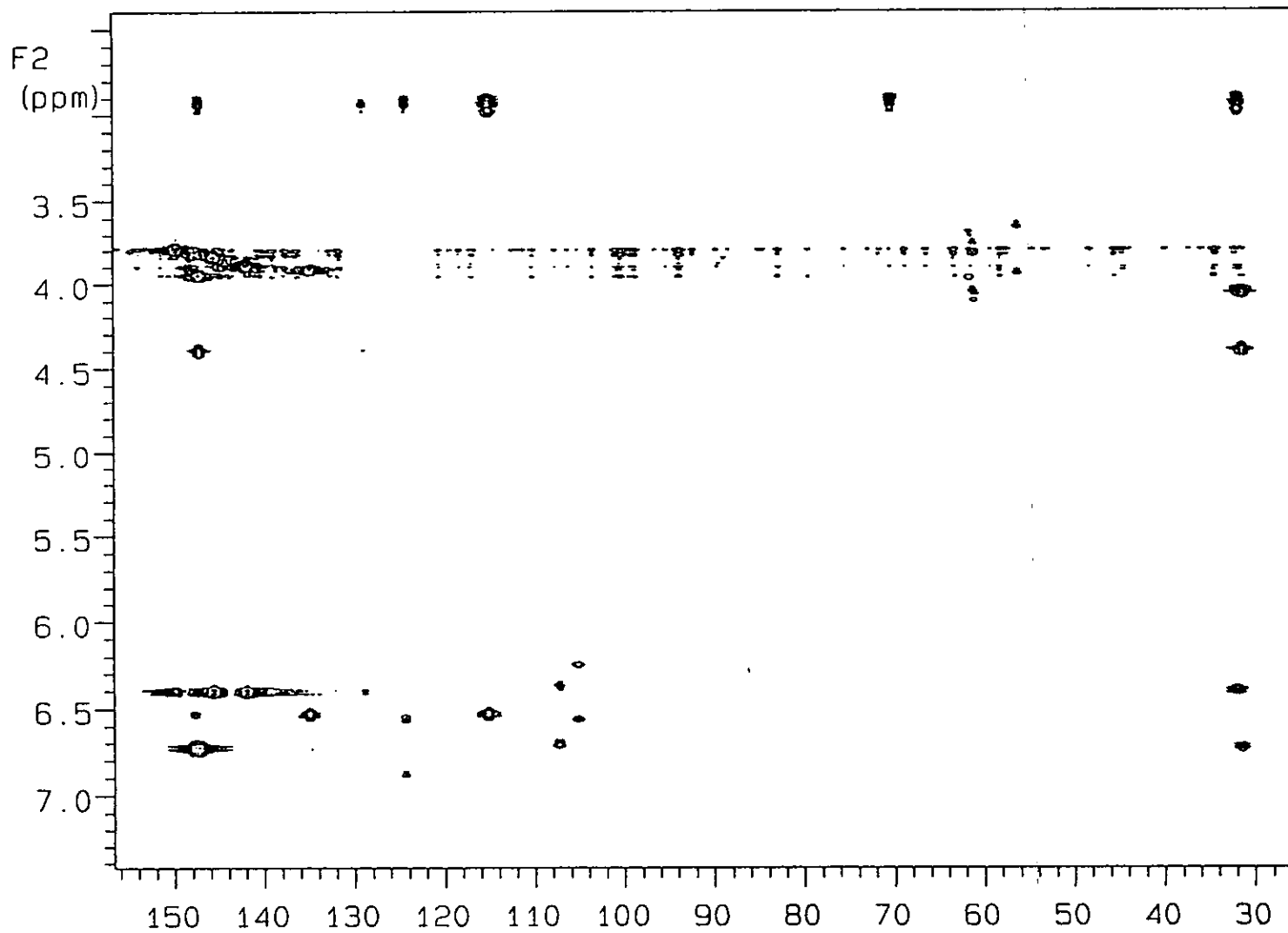
Espectro 13. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5'.8-pentametoxiisoflavano (41)



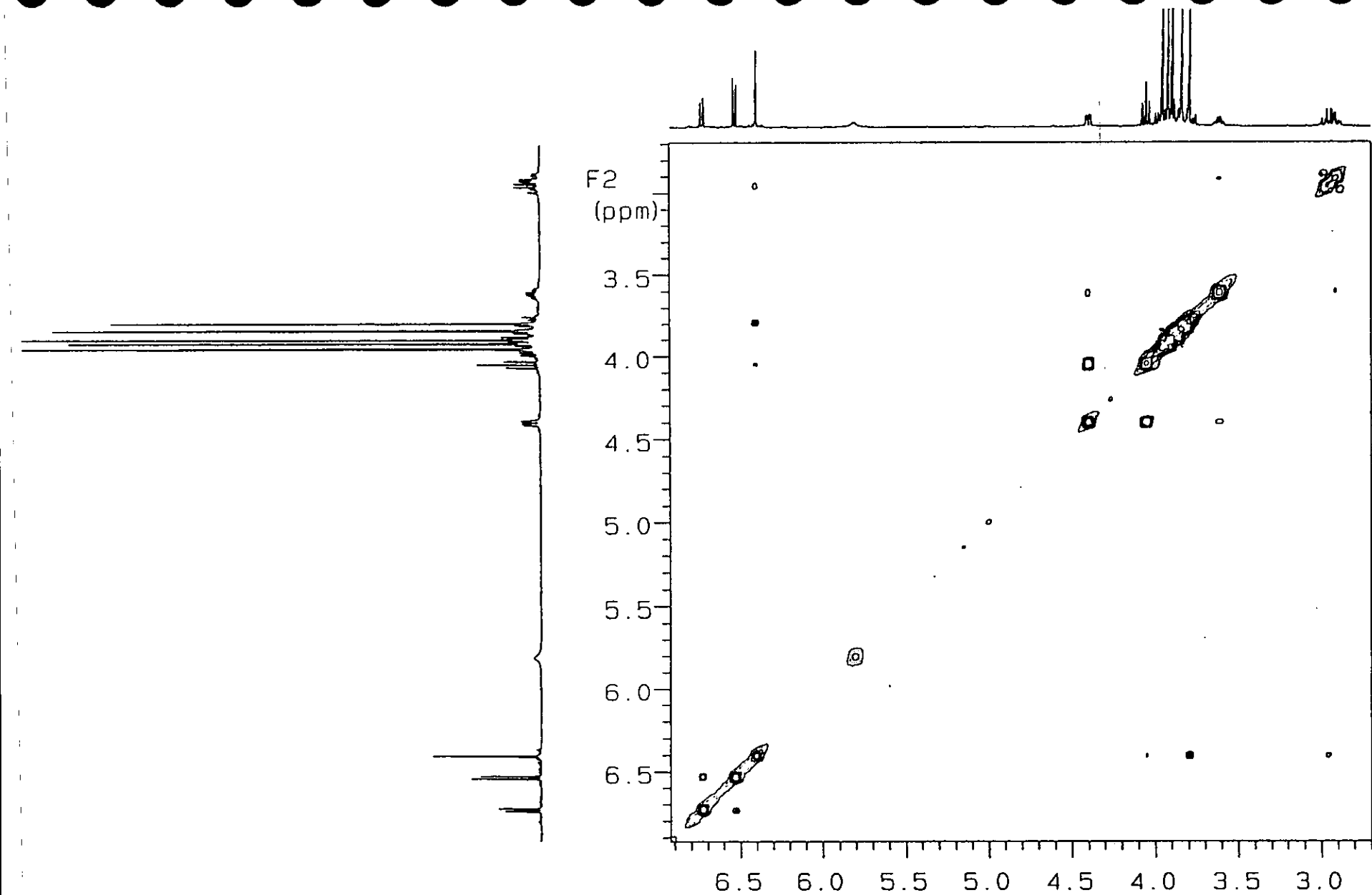
Espectro 14. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavano (41)



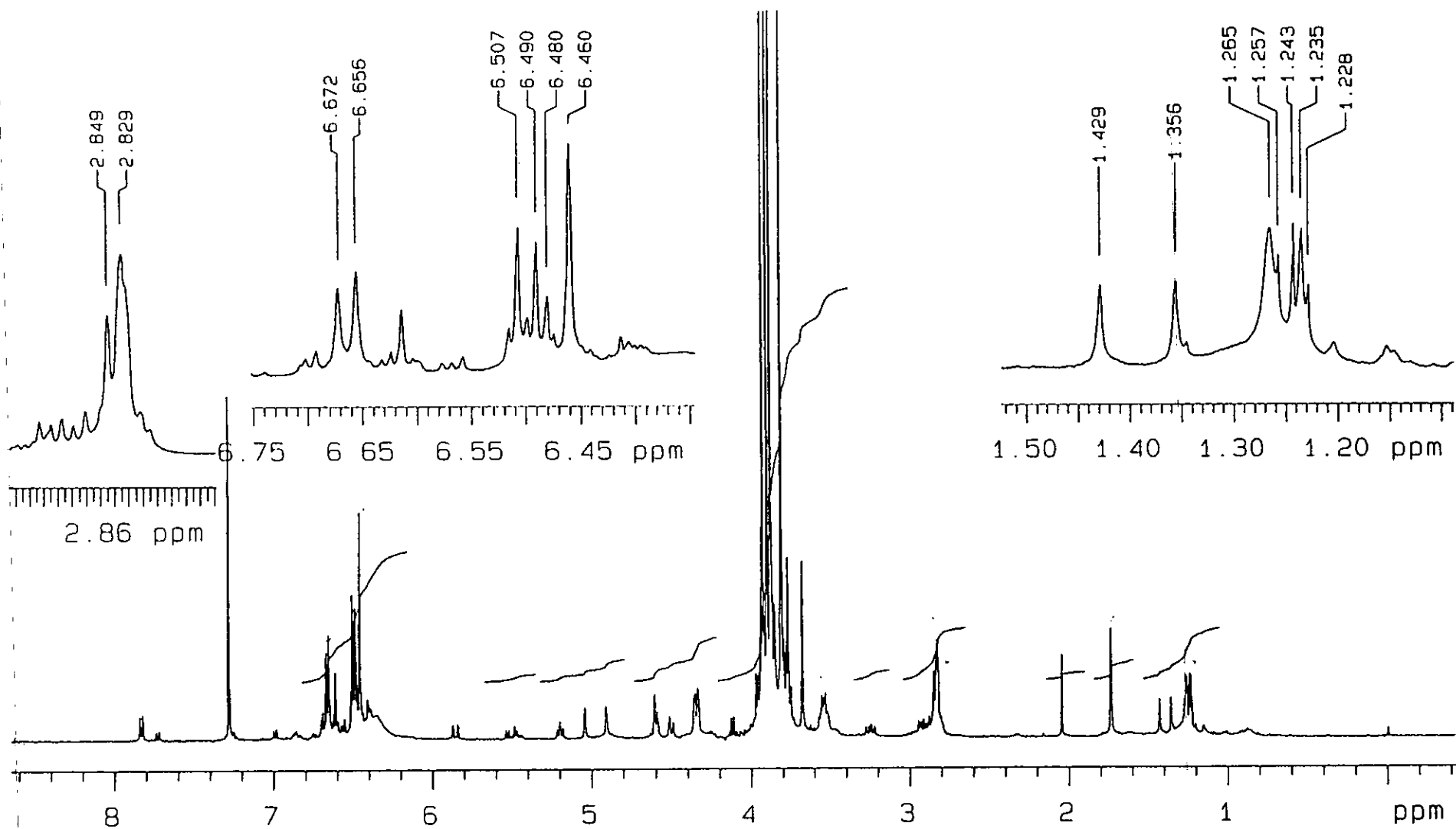
Espectro 15. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMOC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavano (41)



Espectro 16. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavano (41)

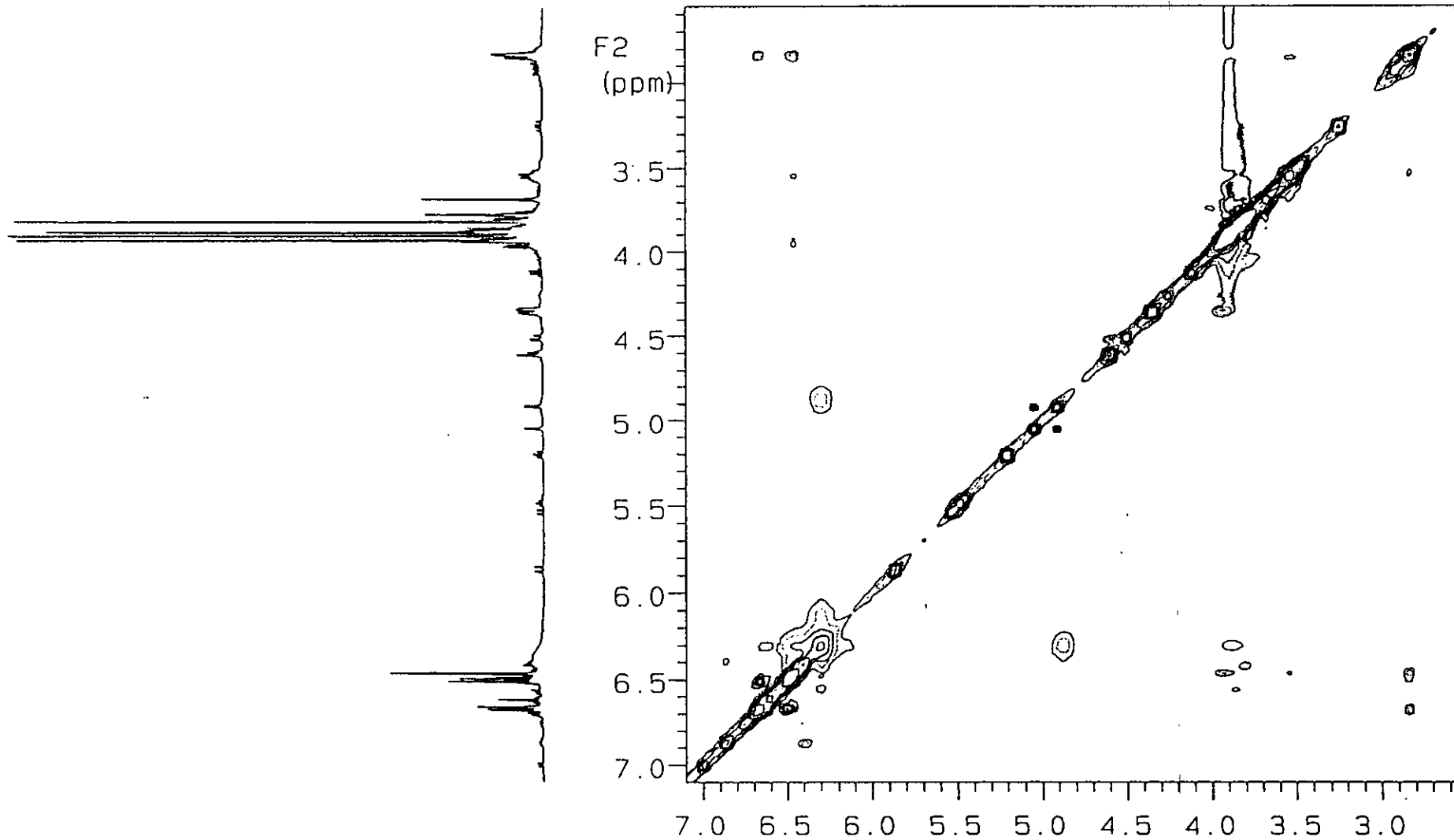


Espectro 17. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (NOESY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavano (41)

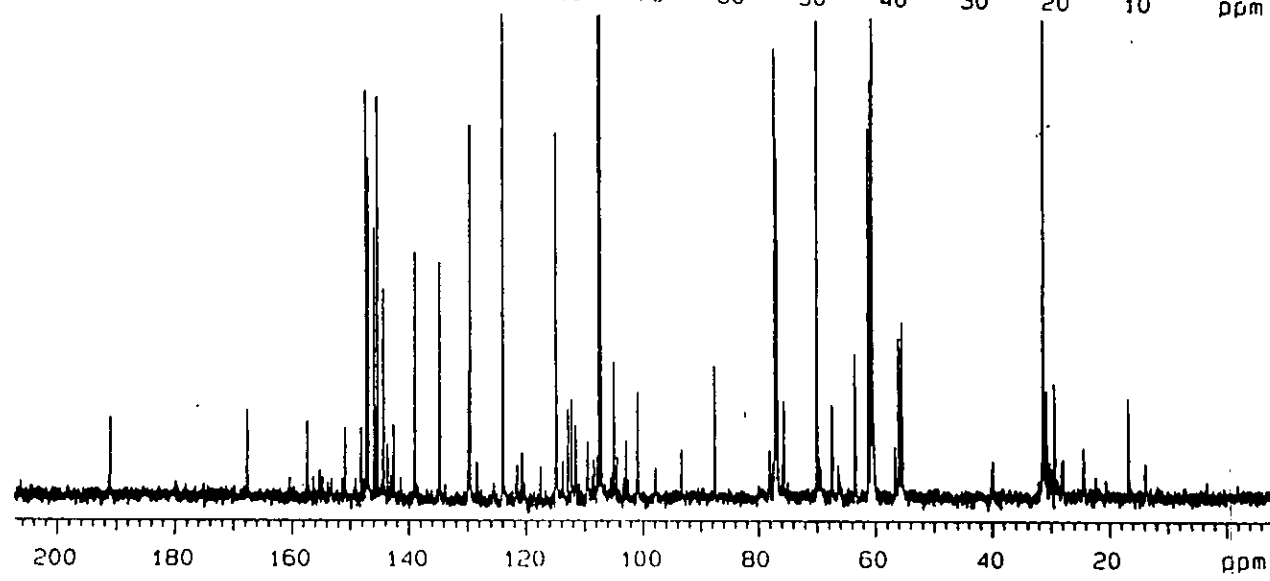
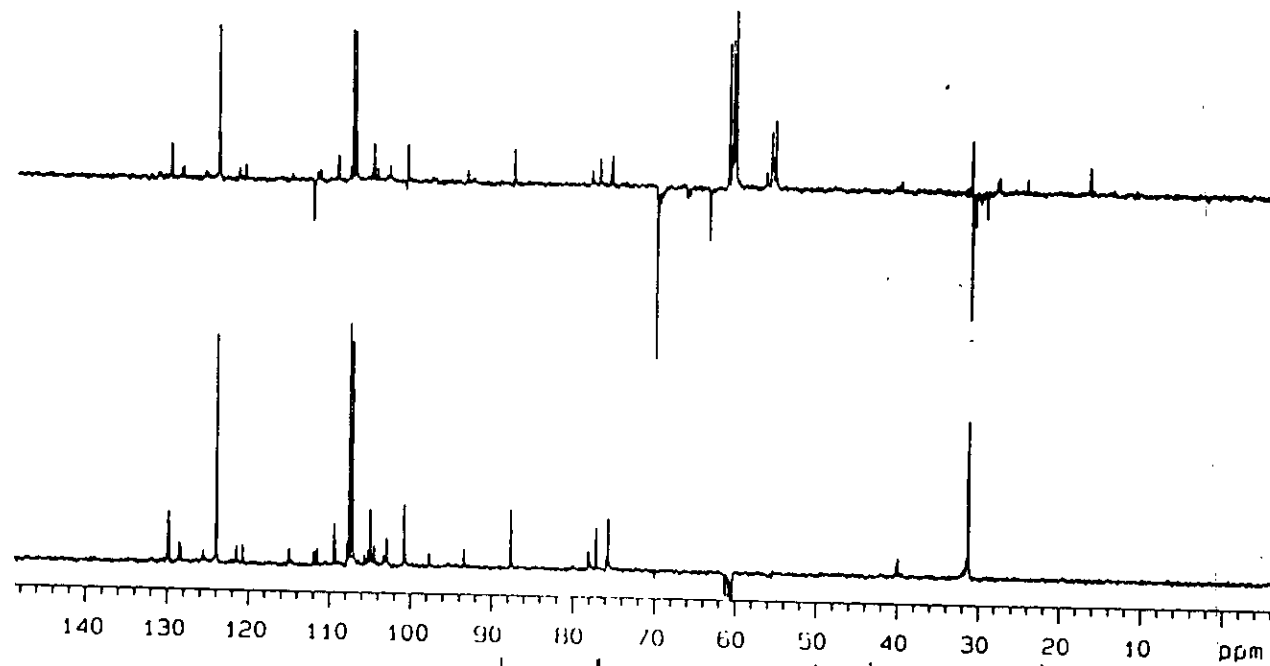


Espectro 18. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavano (43)

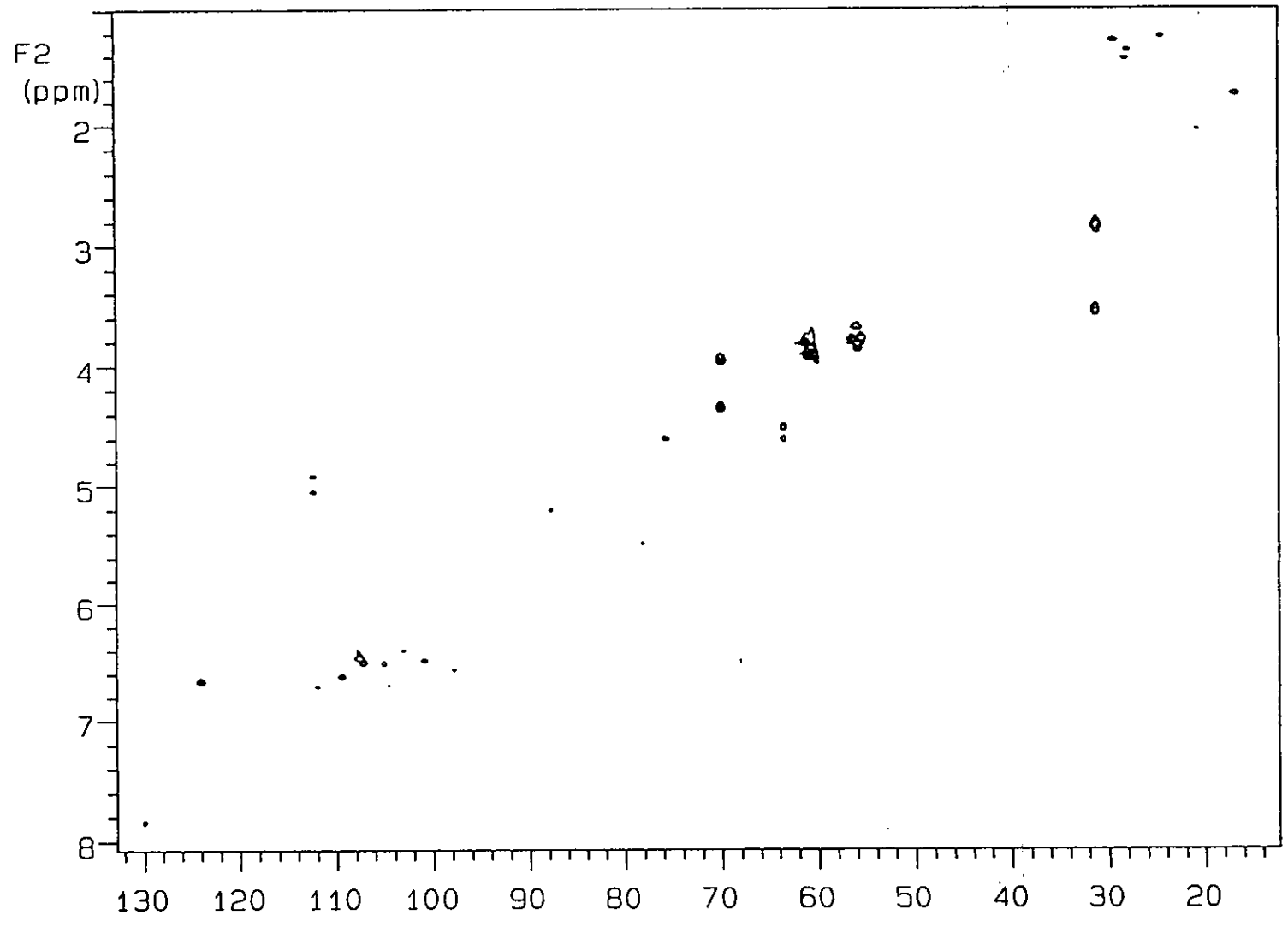
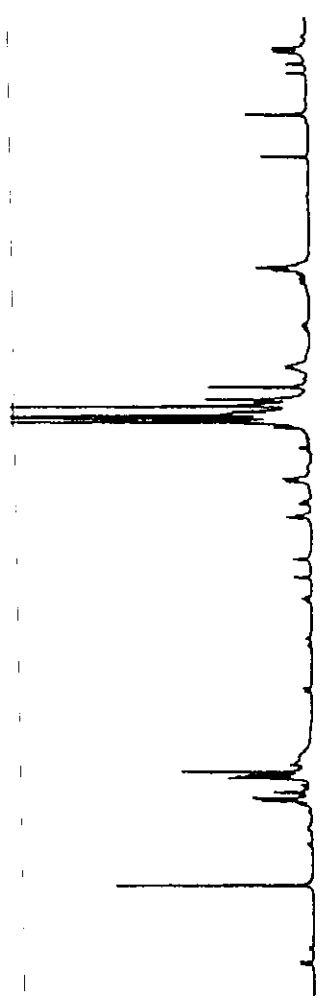




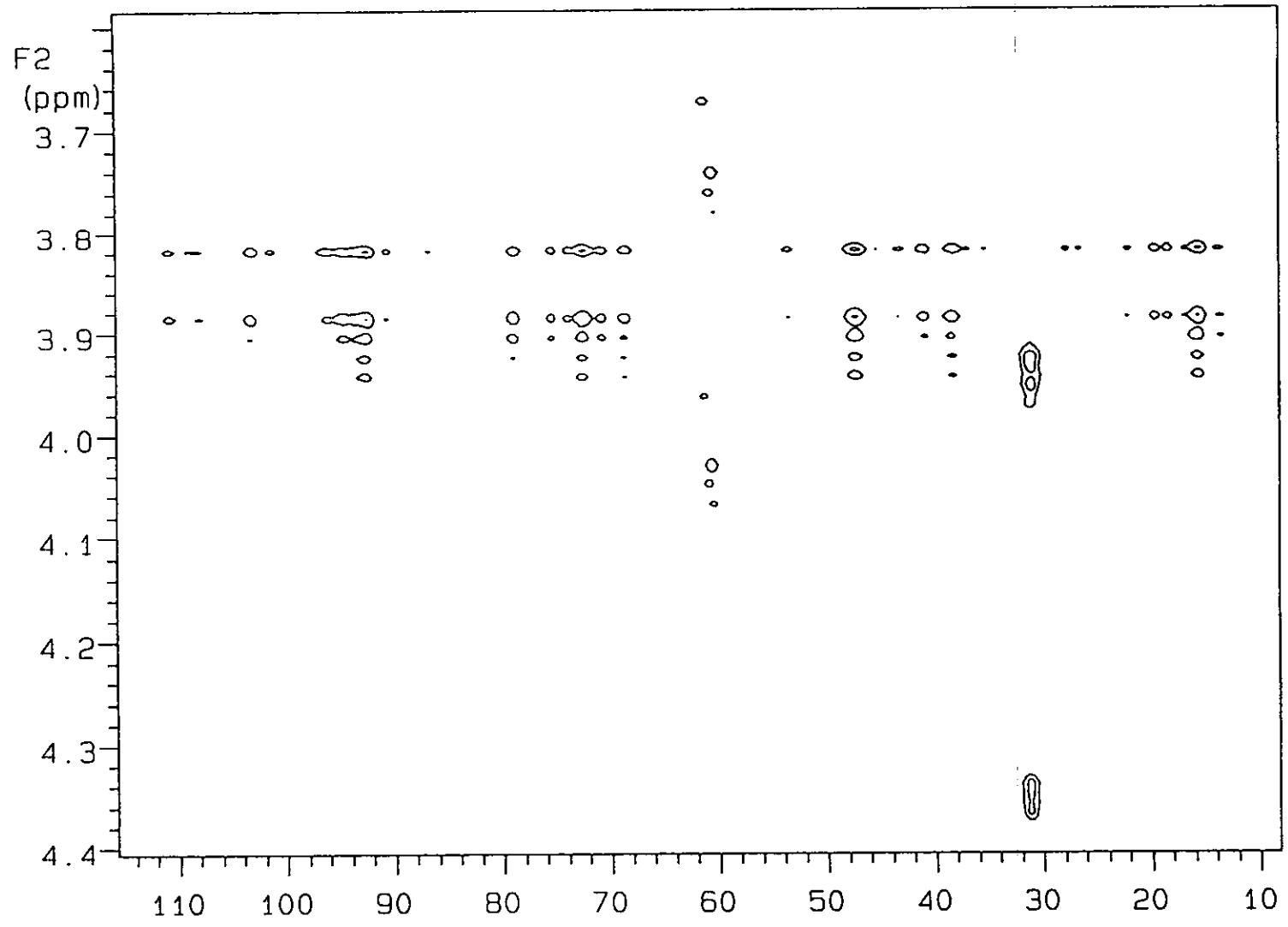
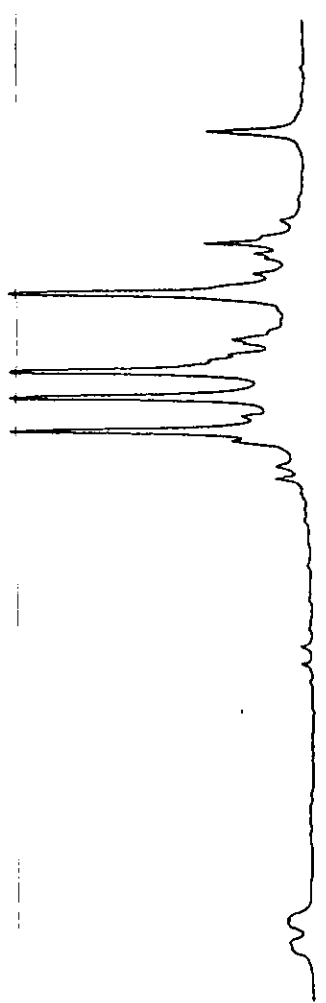
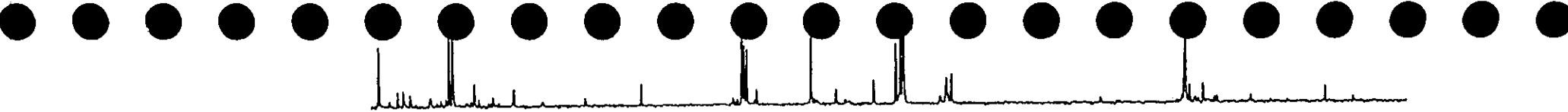
Espectro 19. Espectro de correlación <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (NOESY, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavano (43)



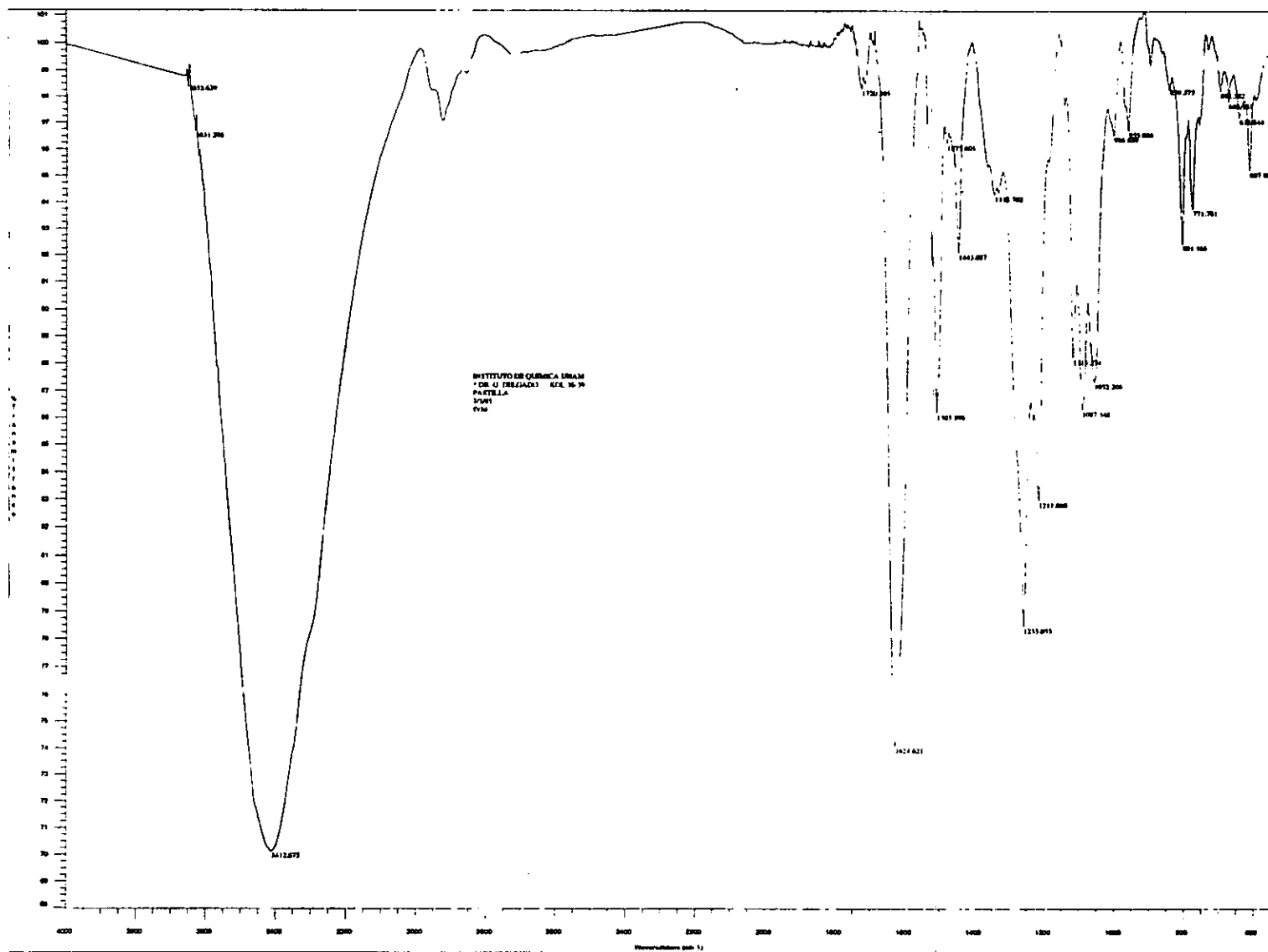
Espectro 20. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavano (43)



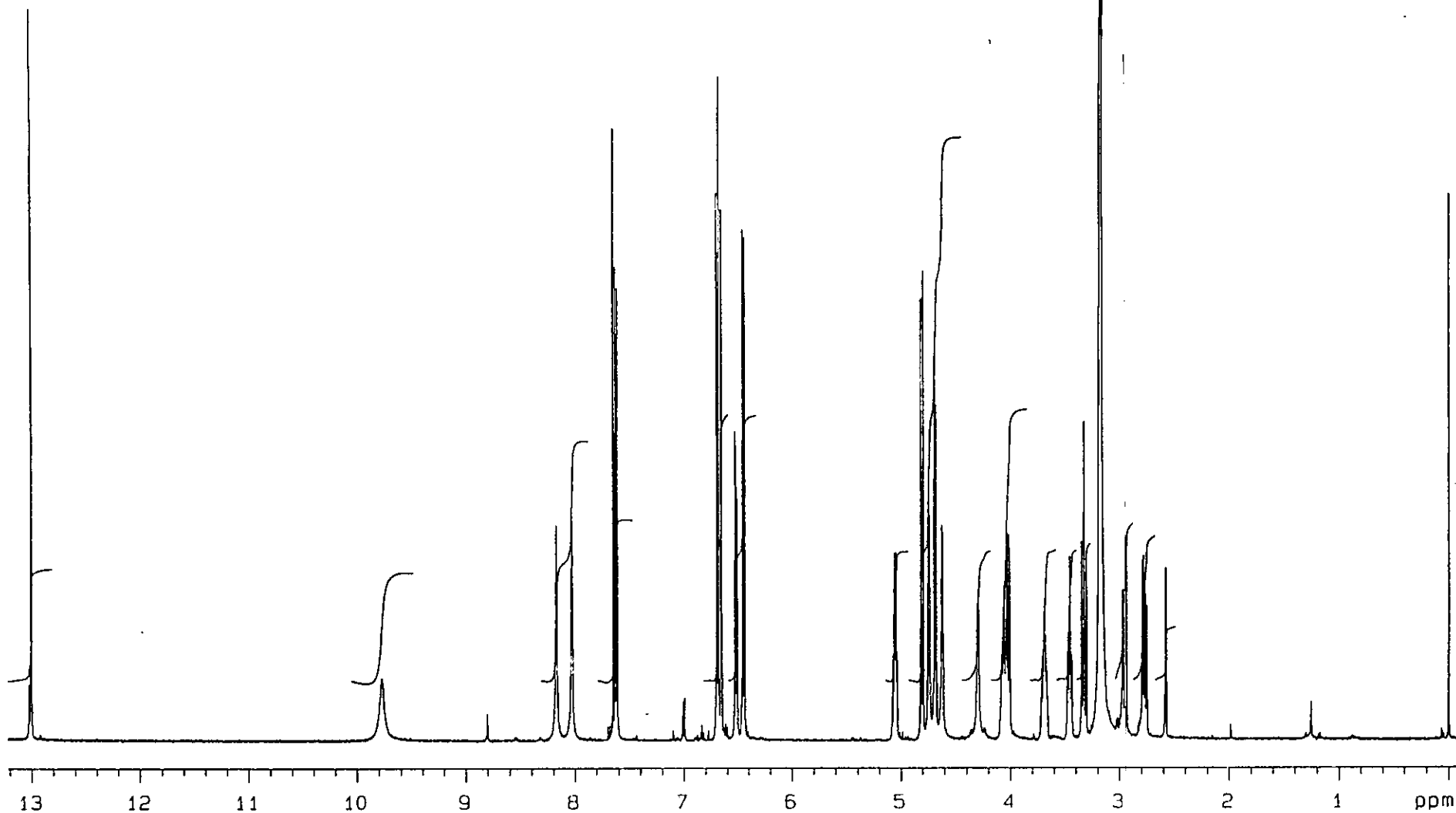
Espectro 21. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMOC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5'.8-tetrametoxiisoflavano (43)



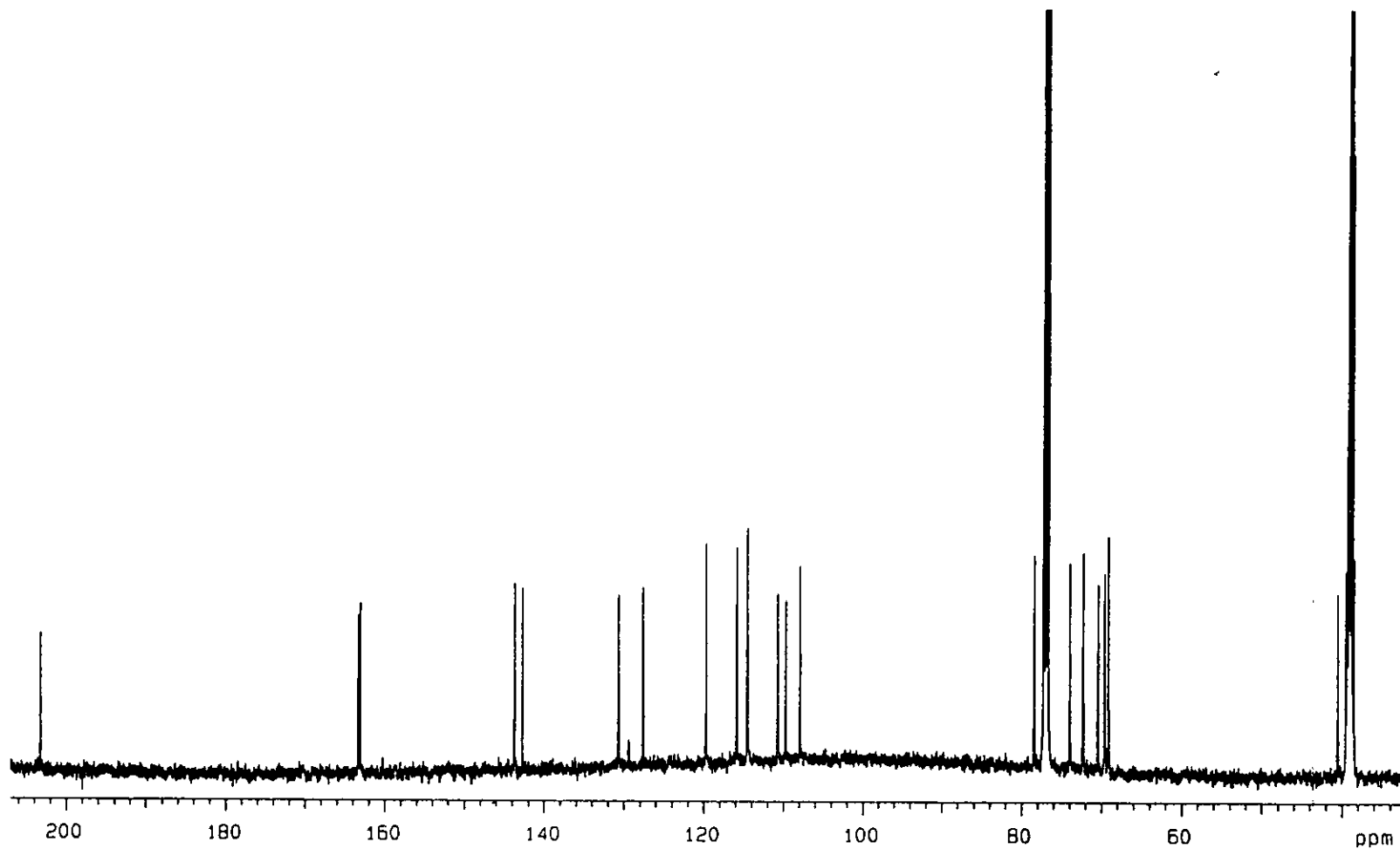
Espectro 22. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5'.8-tetrametoxiisoflavano (43)



Espectro 24. Espectro de IR (KBr) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (93)



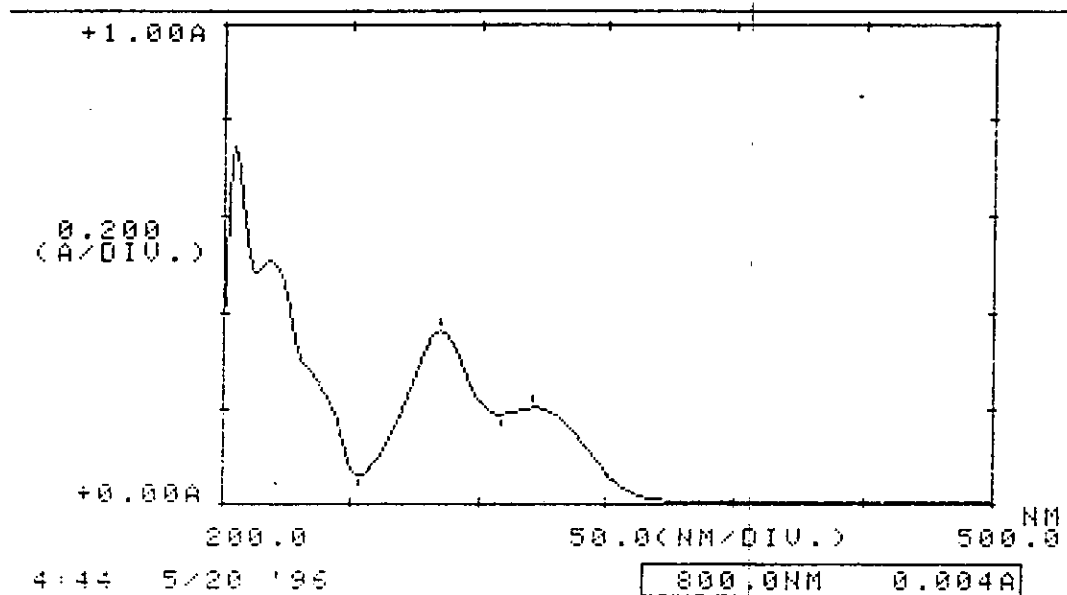
Espectro 25. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (93)



Espectro 26. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxiidrochalcona (93)

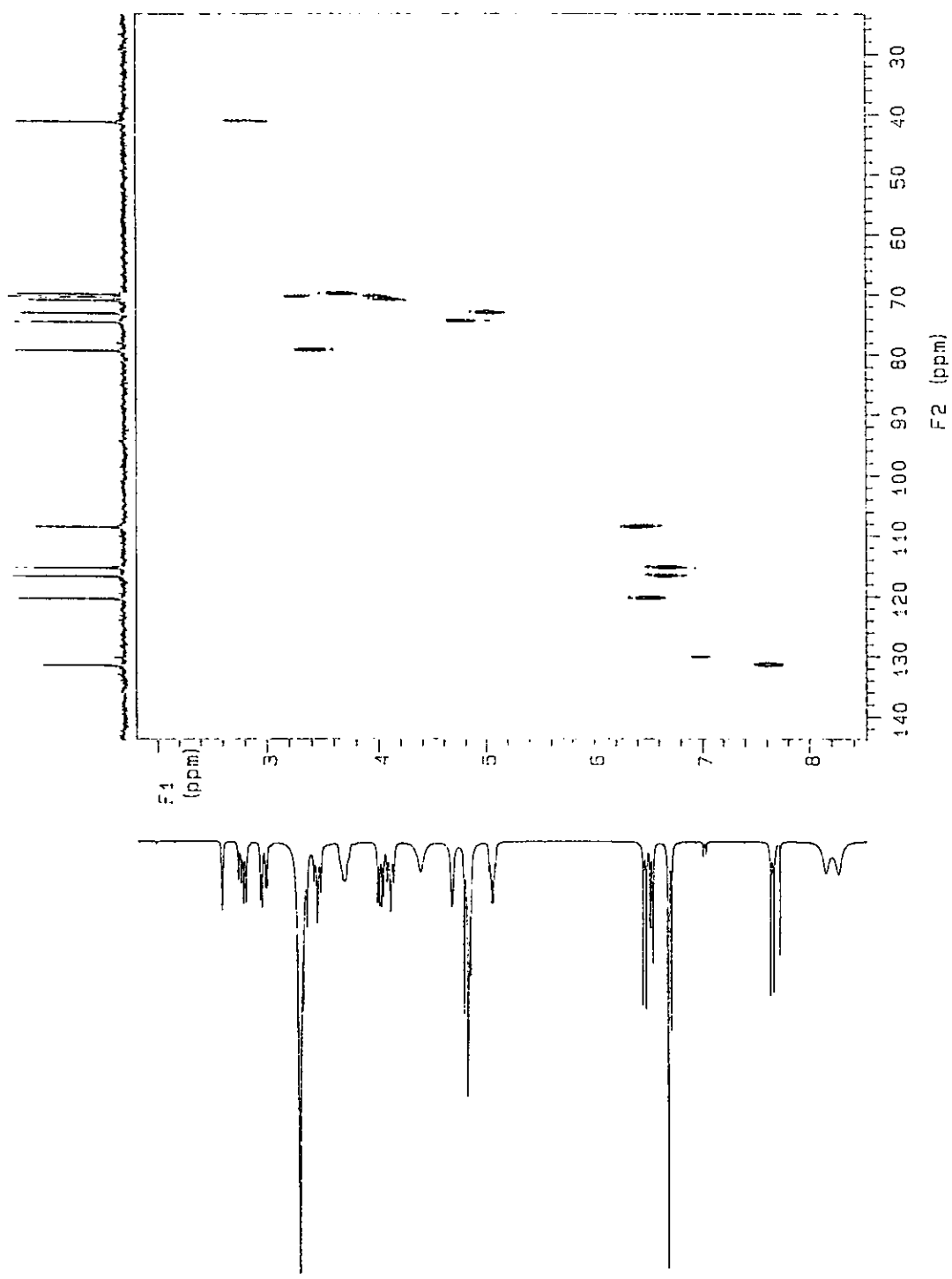
\*\*\* PEAK-PICK \*\*\*

--> PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
321.0	0.203	309.0	0.189
285.0	0.363	253.0	0.063

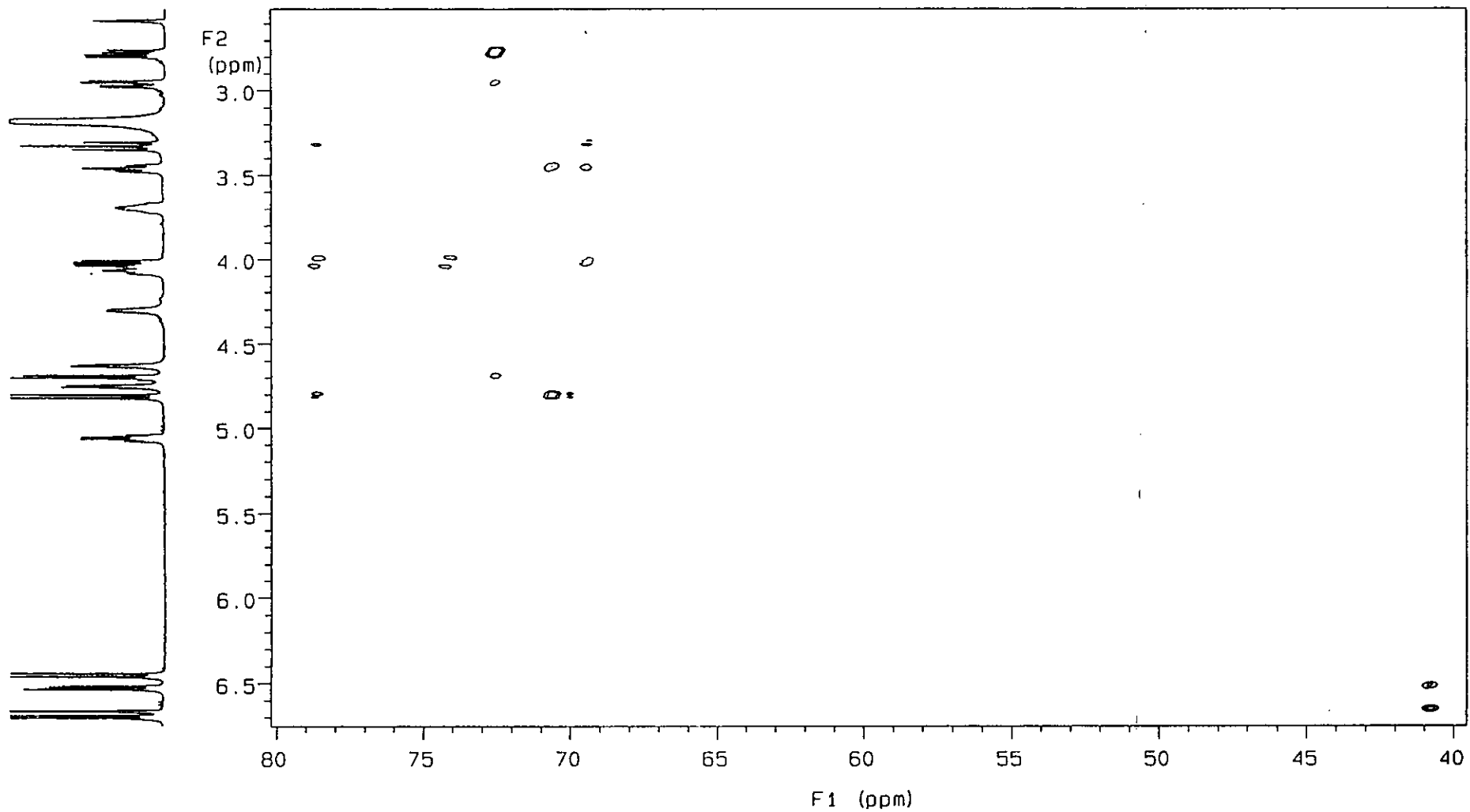


Espectro 27. Espectro de UV (MeOH) de la ( $\alpha$ R)-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (93)

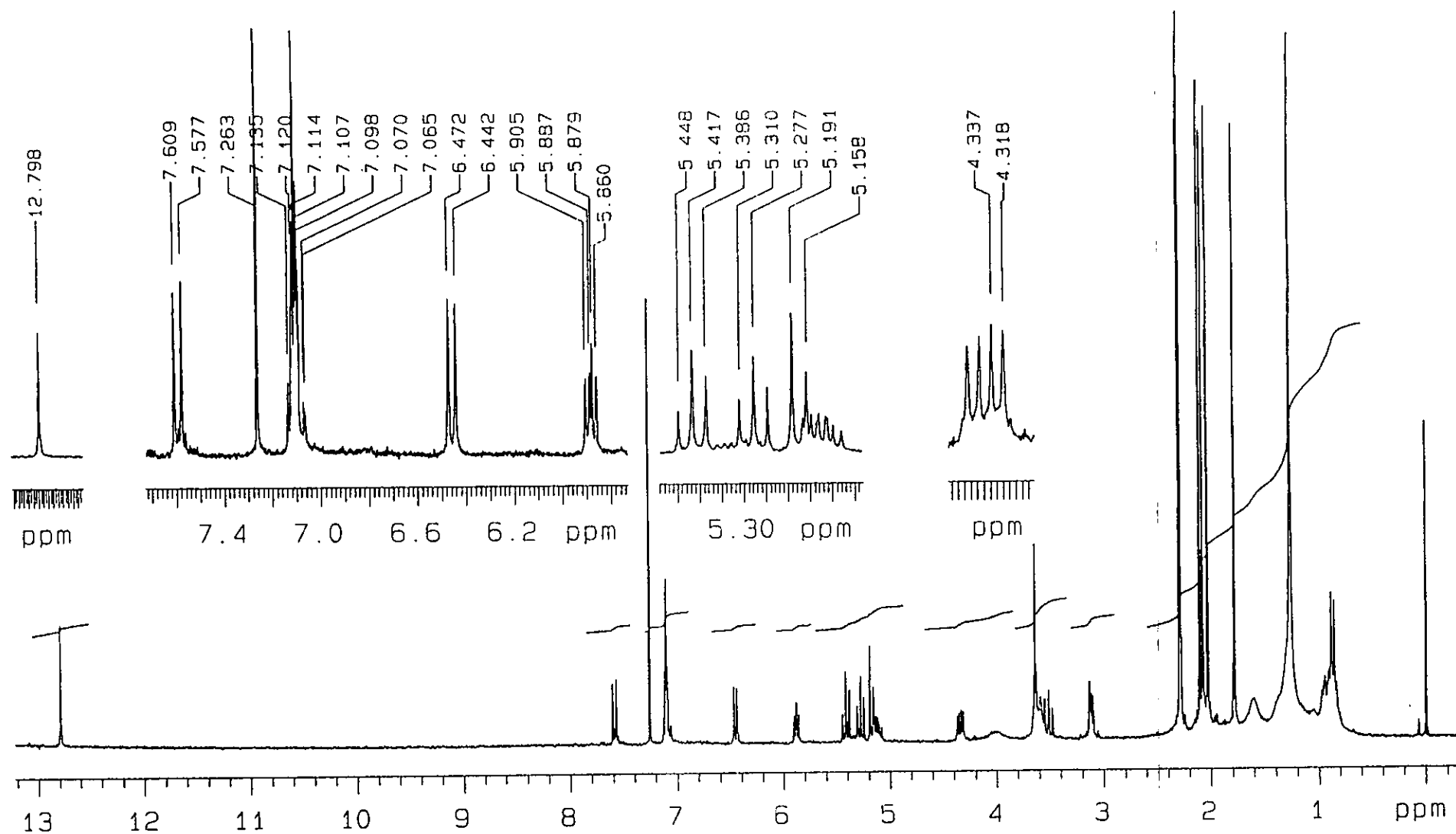




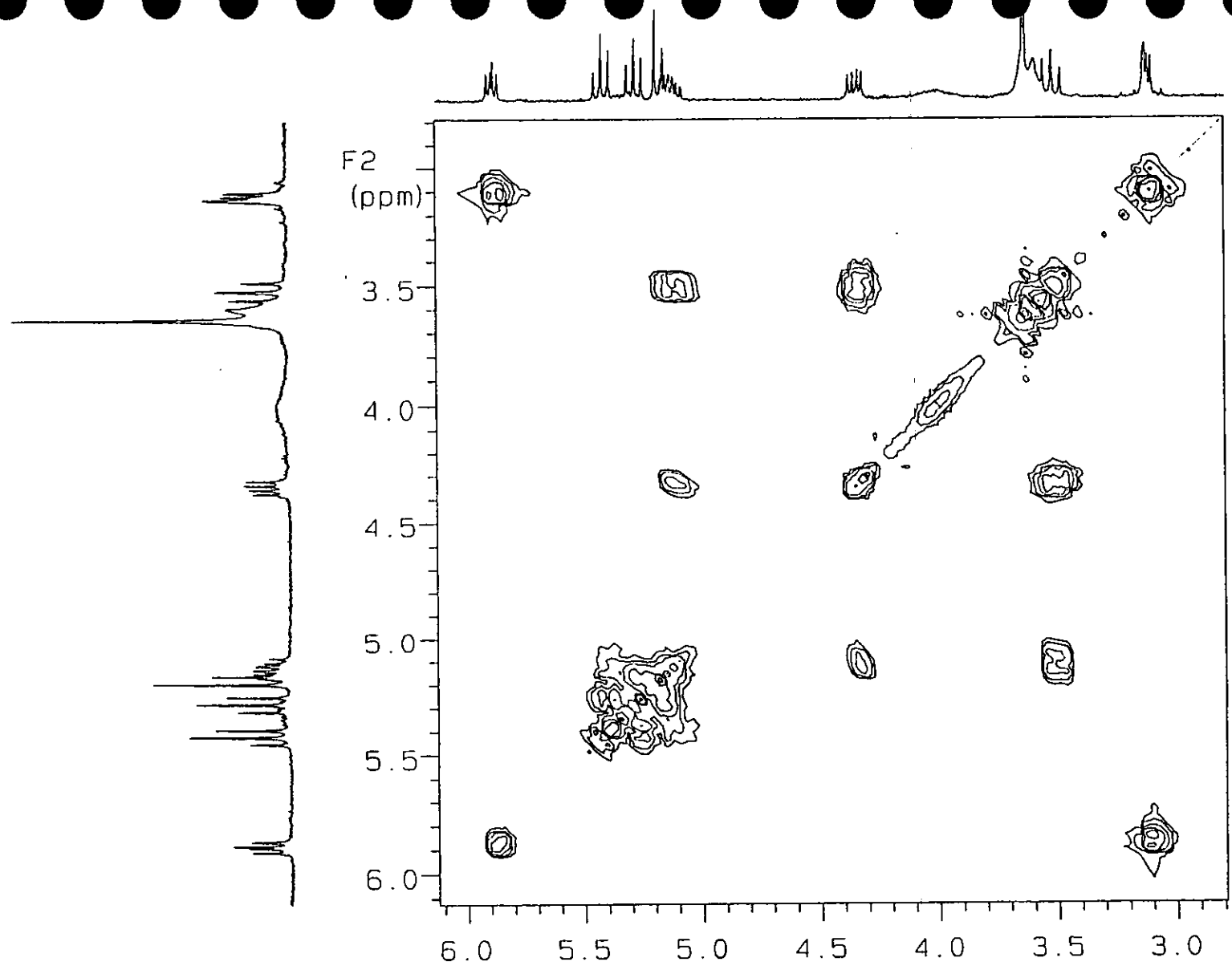
Espectro 28. Espectro de correlación  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HETCOR, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la  $(\alpha R)$ -3'- $\text{C}$ - $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha, 2', 3, 4, 4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (93)



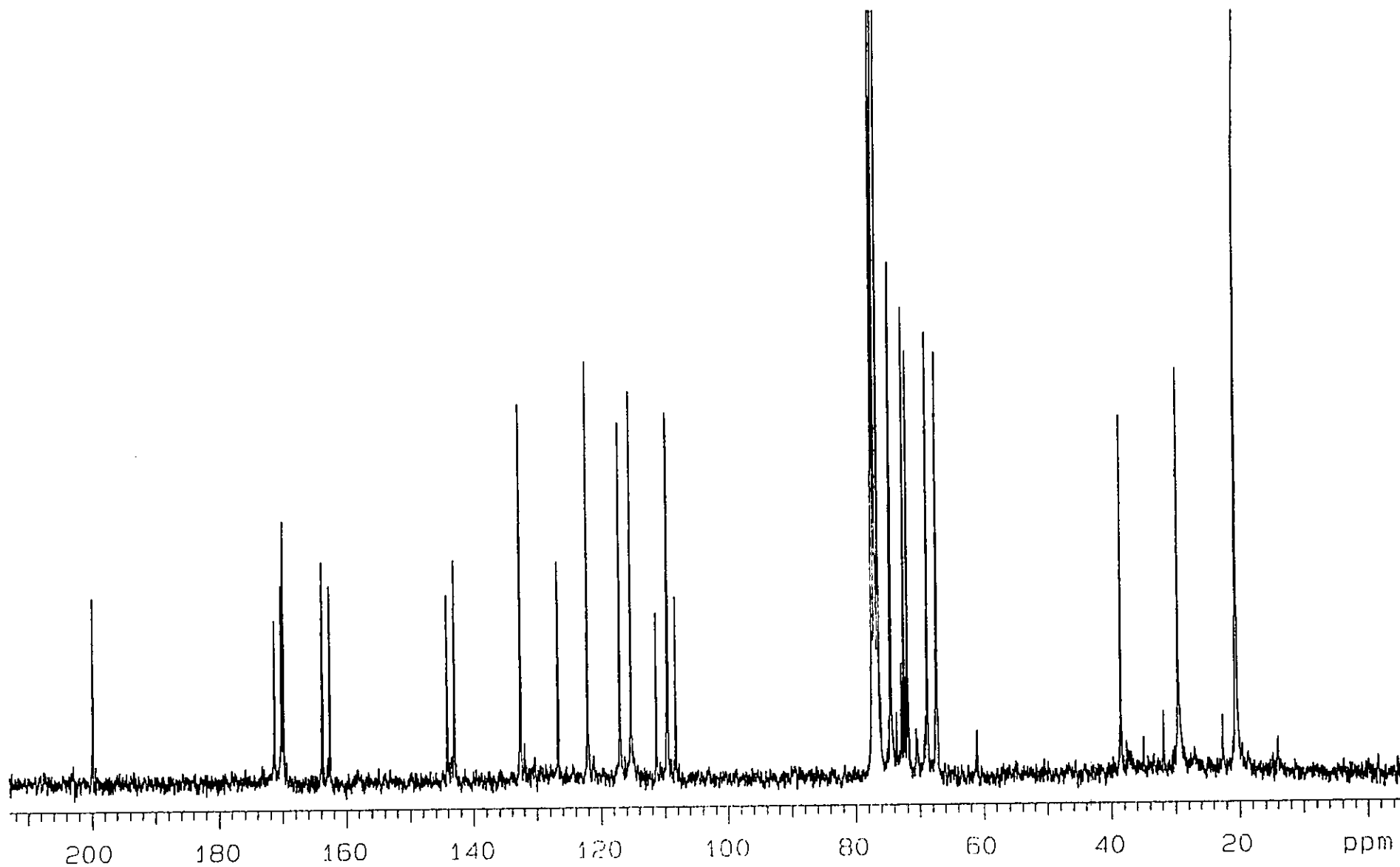
Espectro 29. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (93)



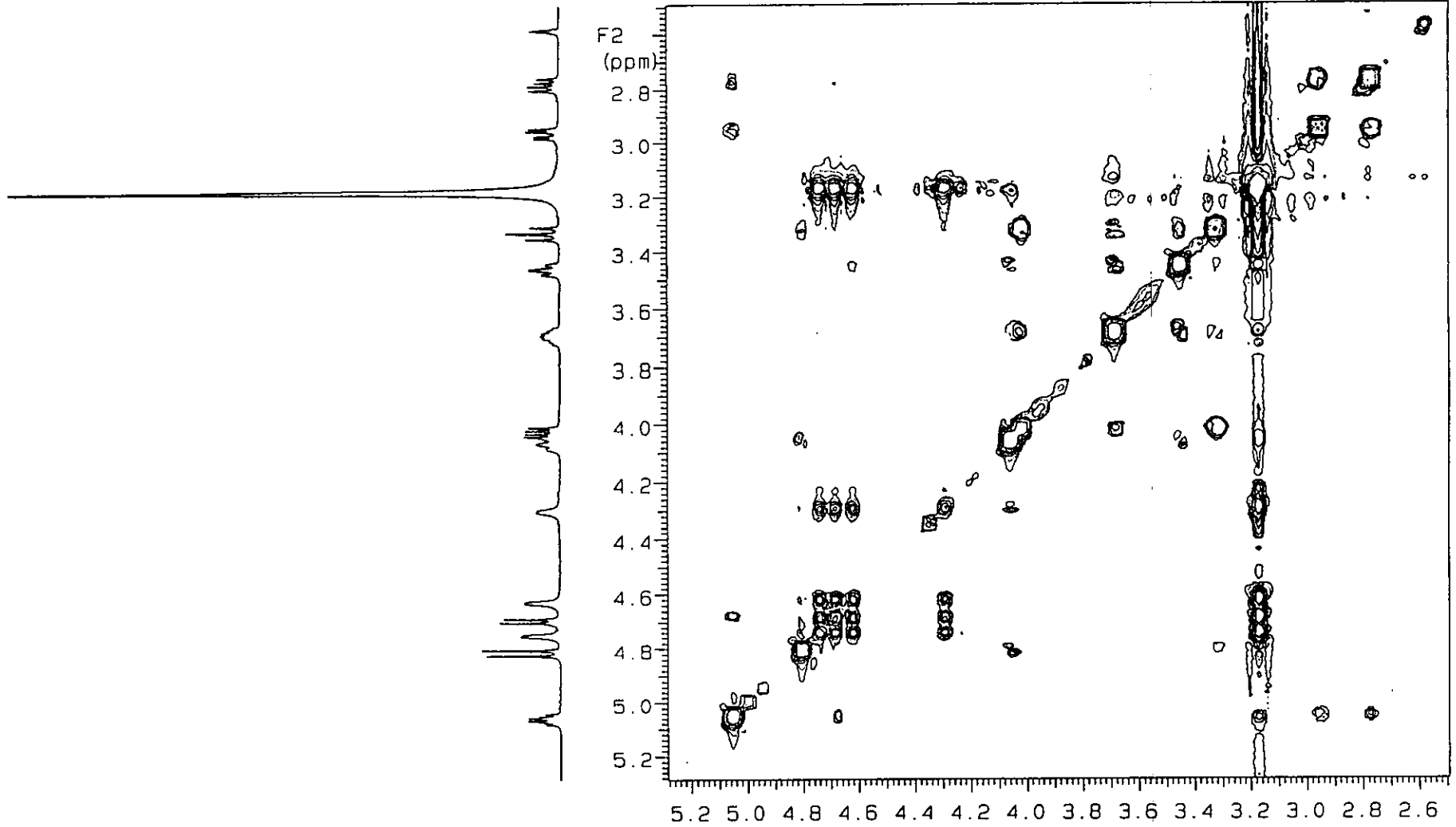
Espectro 30. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la  $(\alpha R)$ -3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona peracetilada (93a)



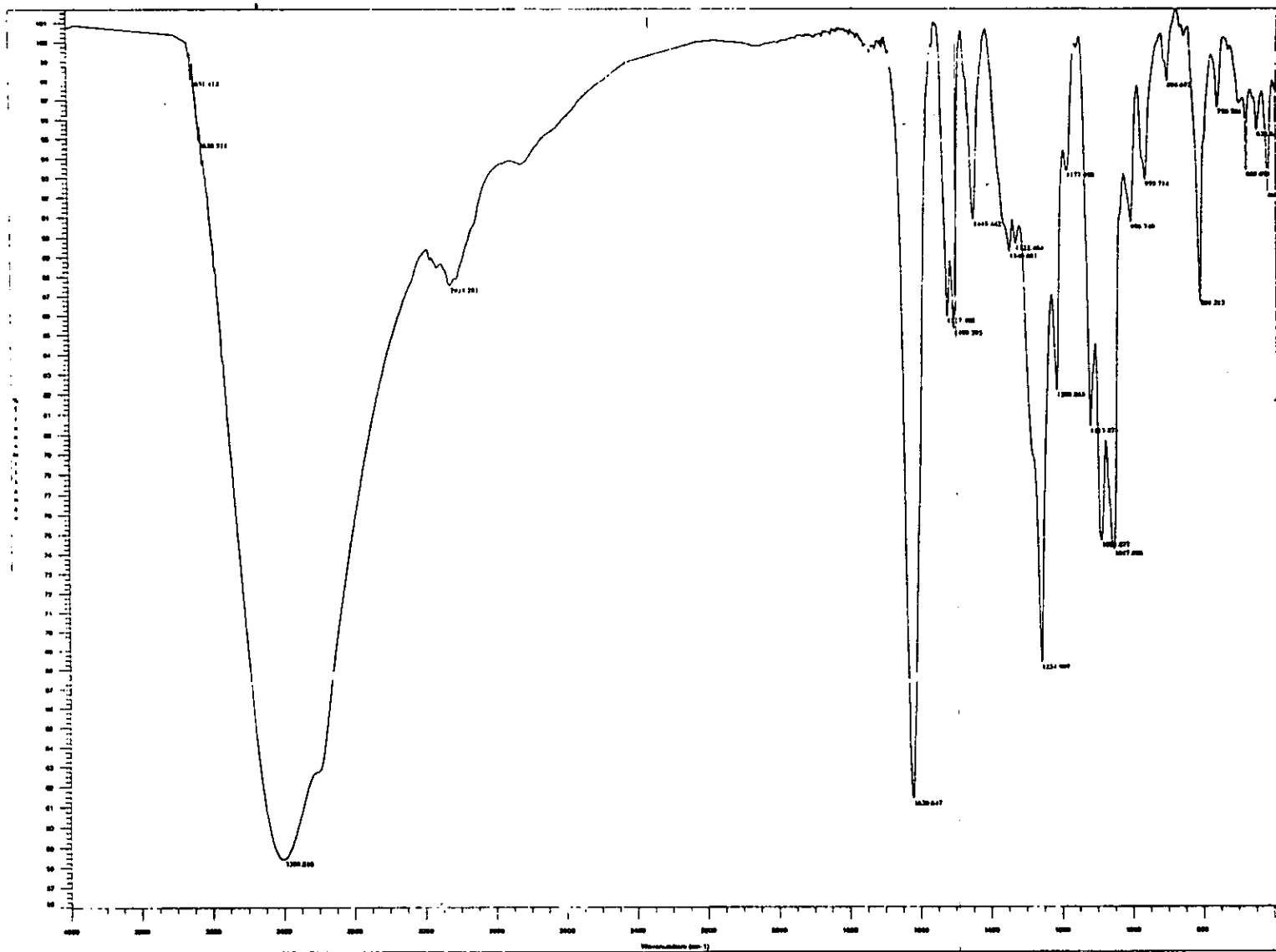
Espectro 31. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la ( $\alpha$ R)-3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona peracetilada (93a)



Espectro 32. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la  $(\alpha R)$ -3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahydroxidihidrochalcona peracetilada (93a)



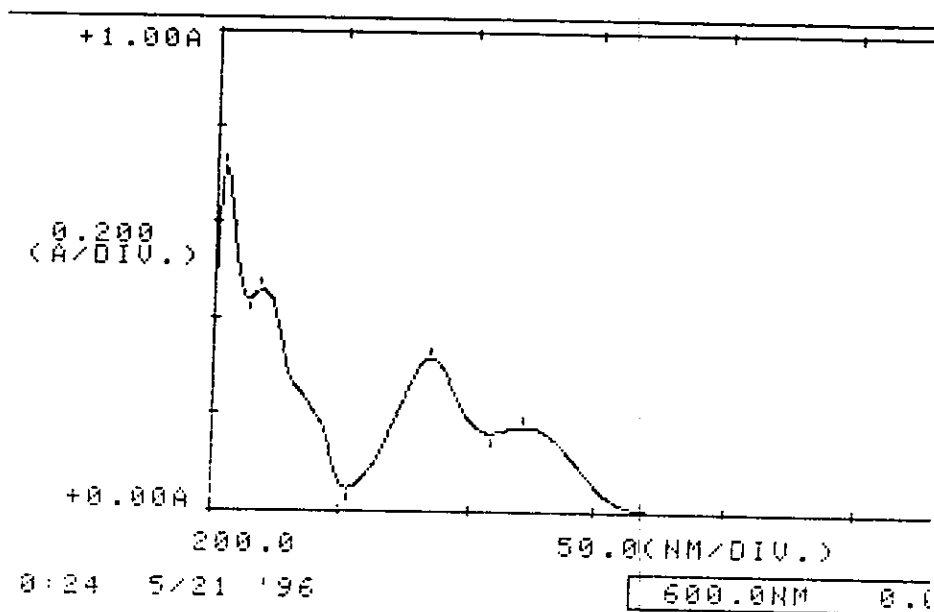
Espectro 33. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (NOESY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la  $(\alpha R)$ -3'-C- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (93)



Espectro 34. Espectro de IR (KBr) de la ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (94)

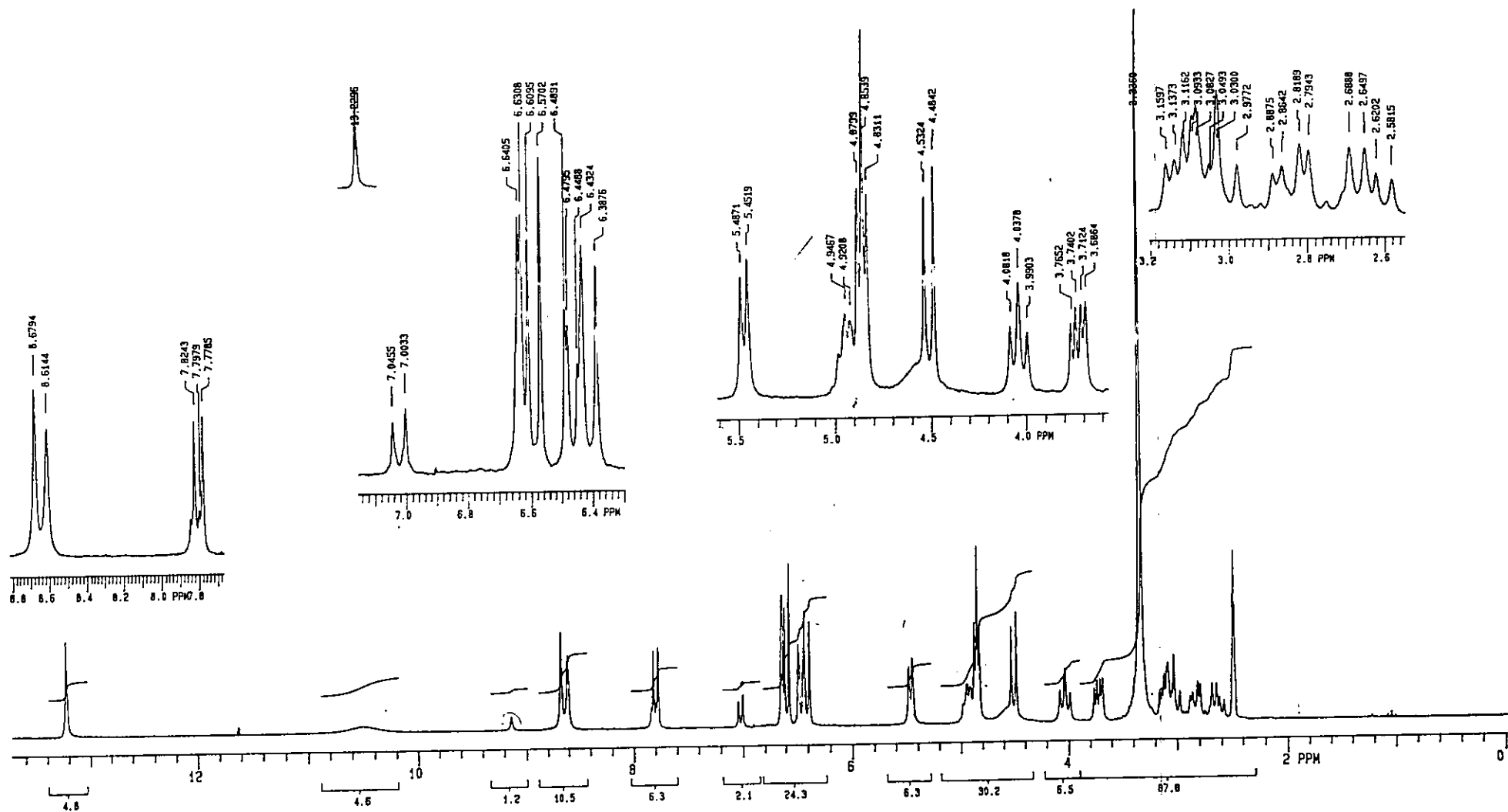
\*\*\* PEAK-PICK \*\*\*

-- PEAK --		-- VALLEY --	
$\lambda$	ABS	$\lambda$	ABS
321.5	0.174	309.0	0.161
285.0	0.316	253.5	0.048
218.0	0.457	213.5	0.438
203.5	0.712		



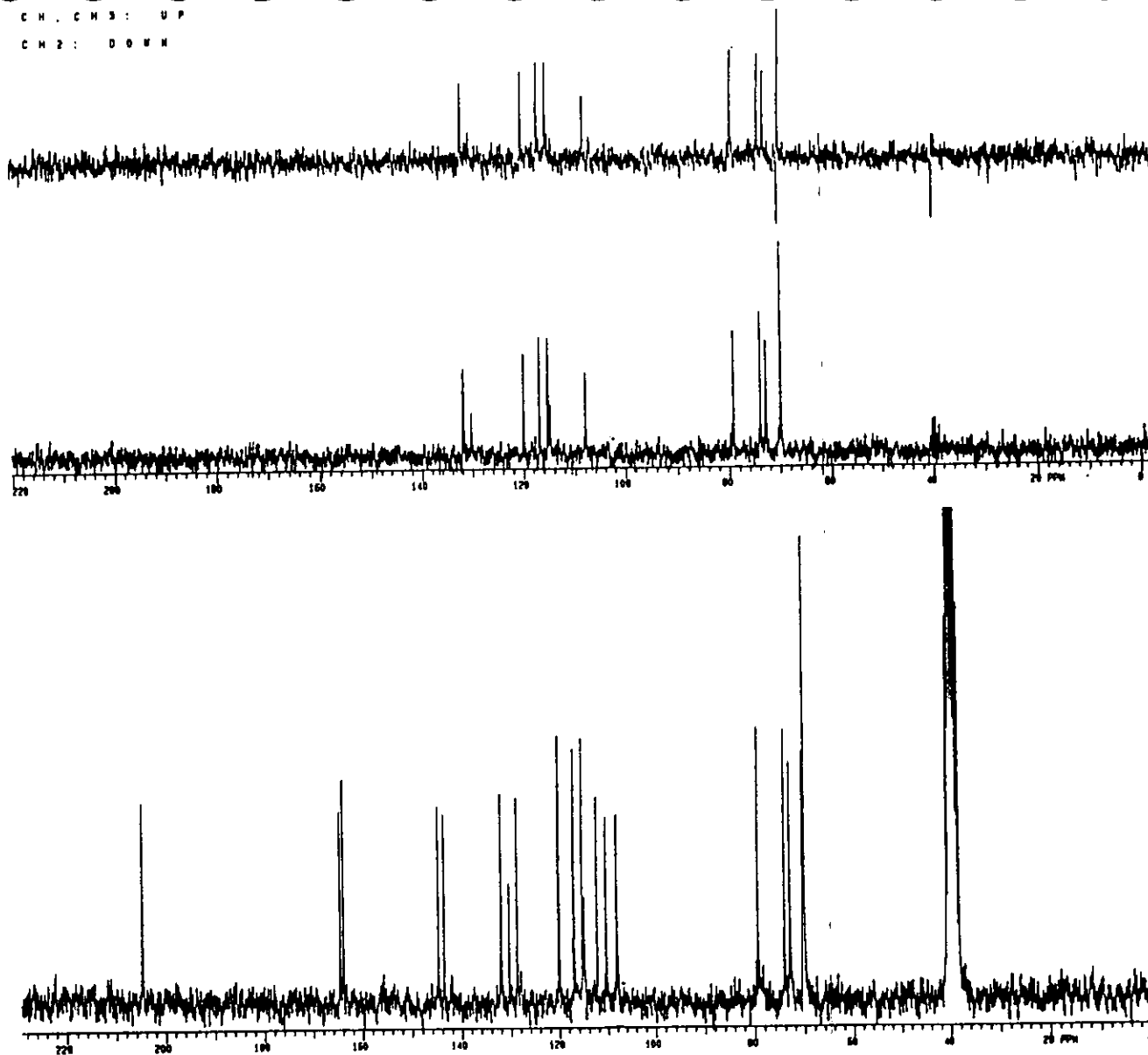
Espectro 35. Espectro de UV (MeOH) de la ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (94)



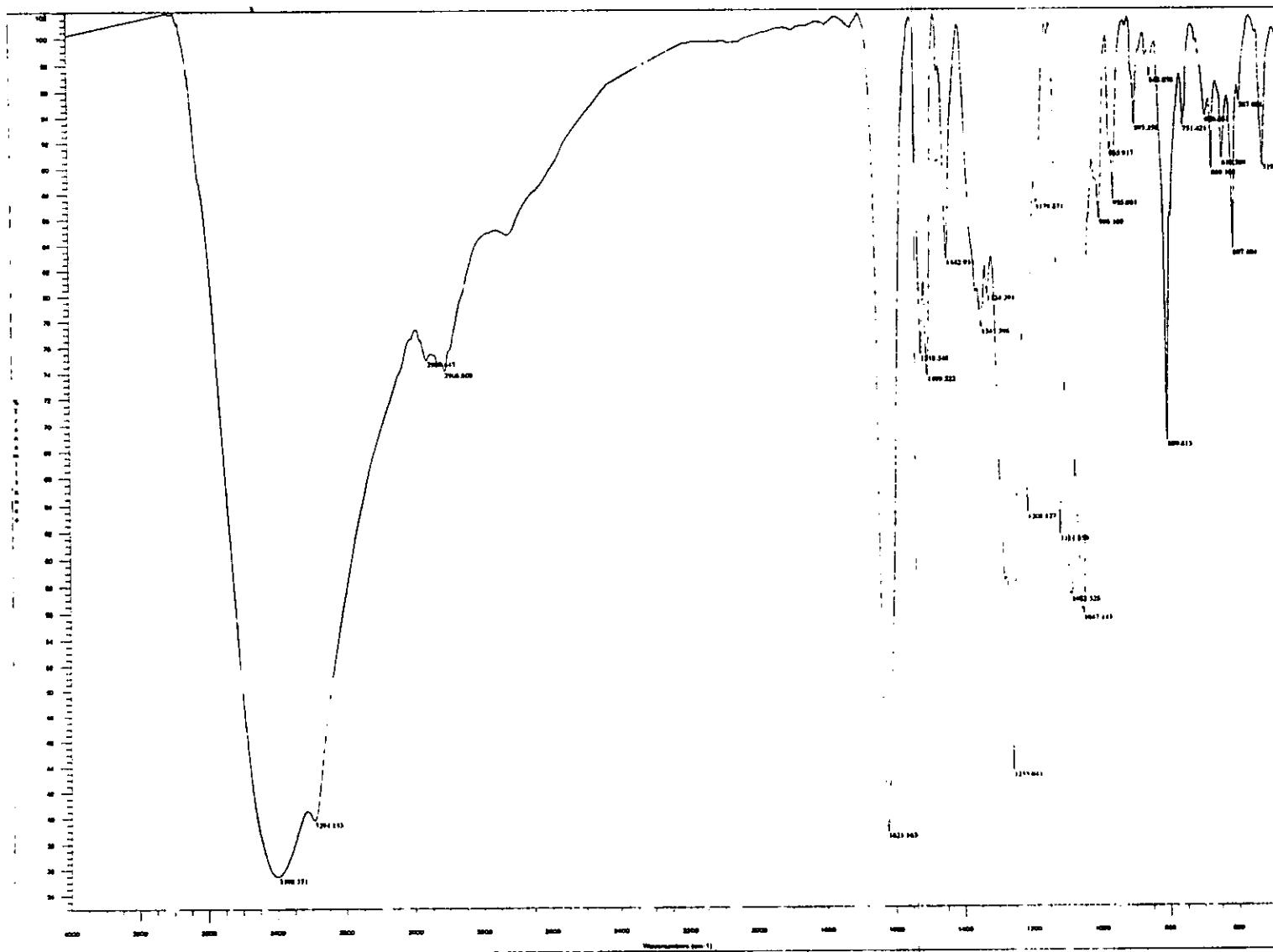


Espectro 36. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>-DMSOd<sub>6</sub>) de la (αR)-3'-O-β-xilopiranosil-α,2',3,4,4'-pentahidroxiidihidrochalcona (94)

CH, CH3: UP  
CH2: DOWN



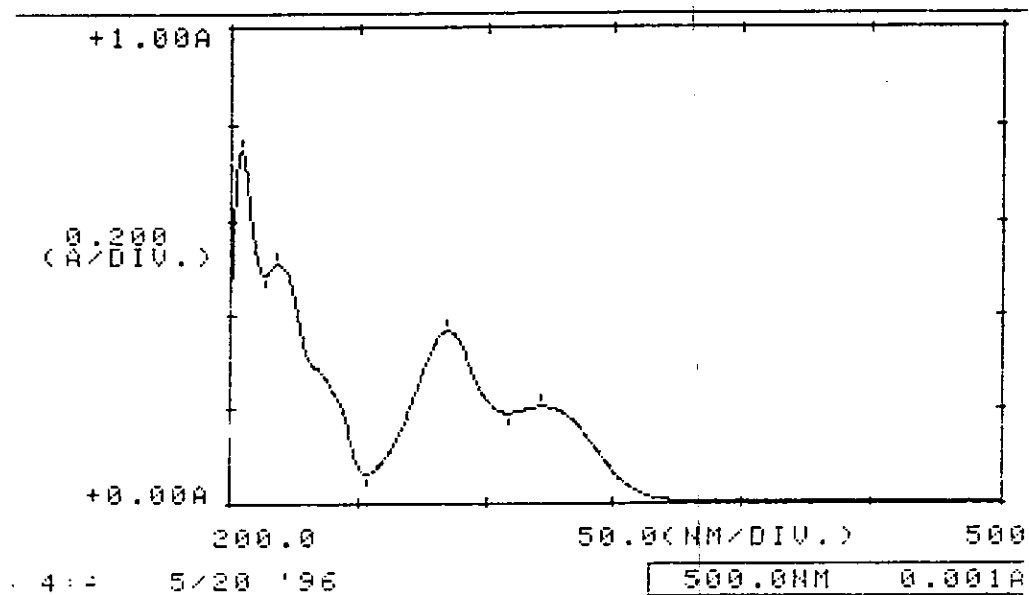
Espectro 37. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-O- $\beta$ -xilopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (94)



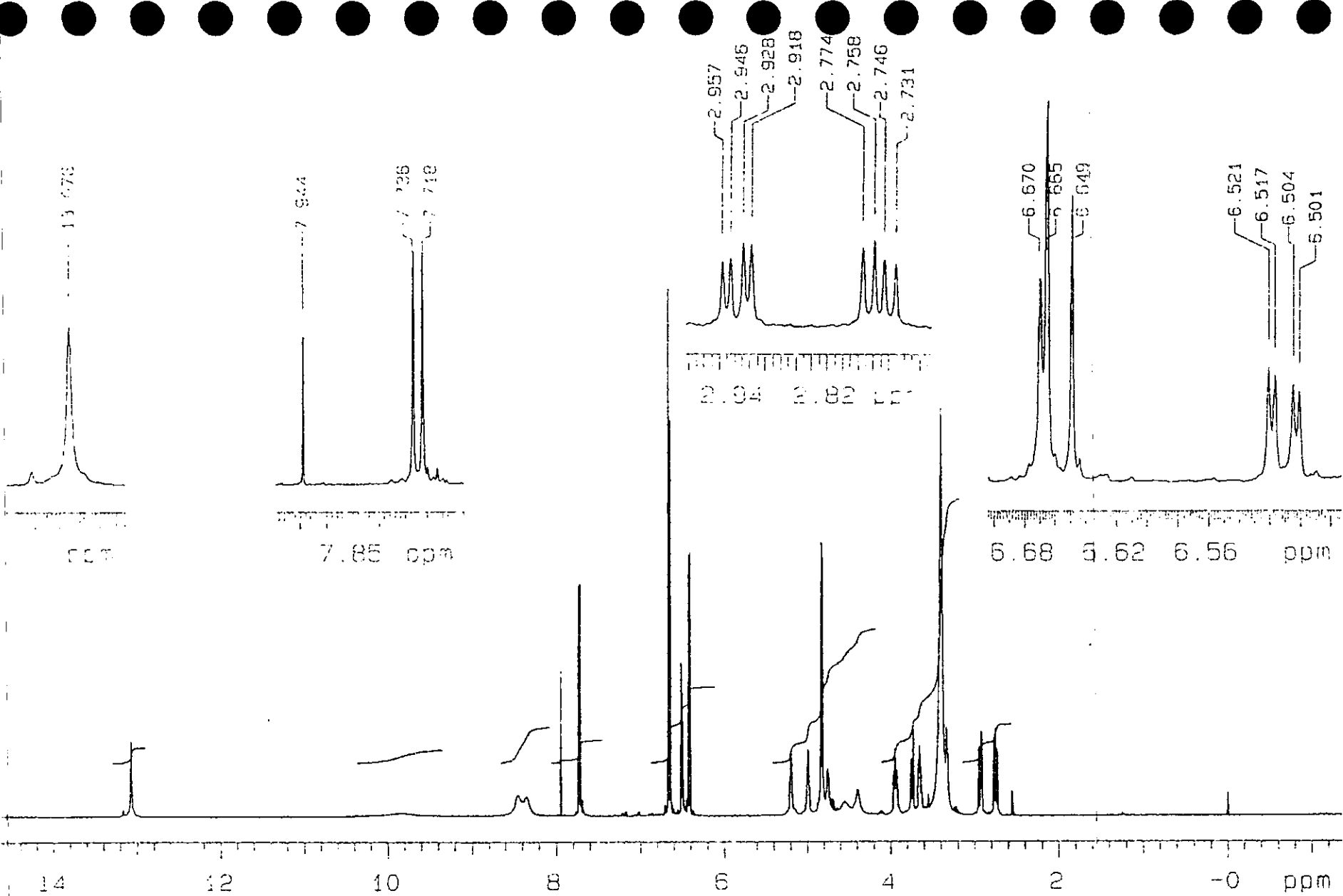
Espectro 38. Espectro de IR (KBr) de la( $\alpha$ R)-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (33)

\*\*\* PEAK-PICK \*\*\*

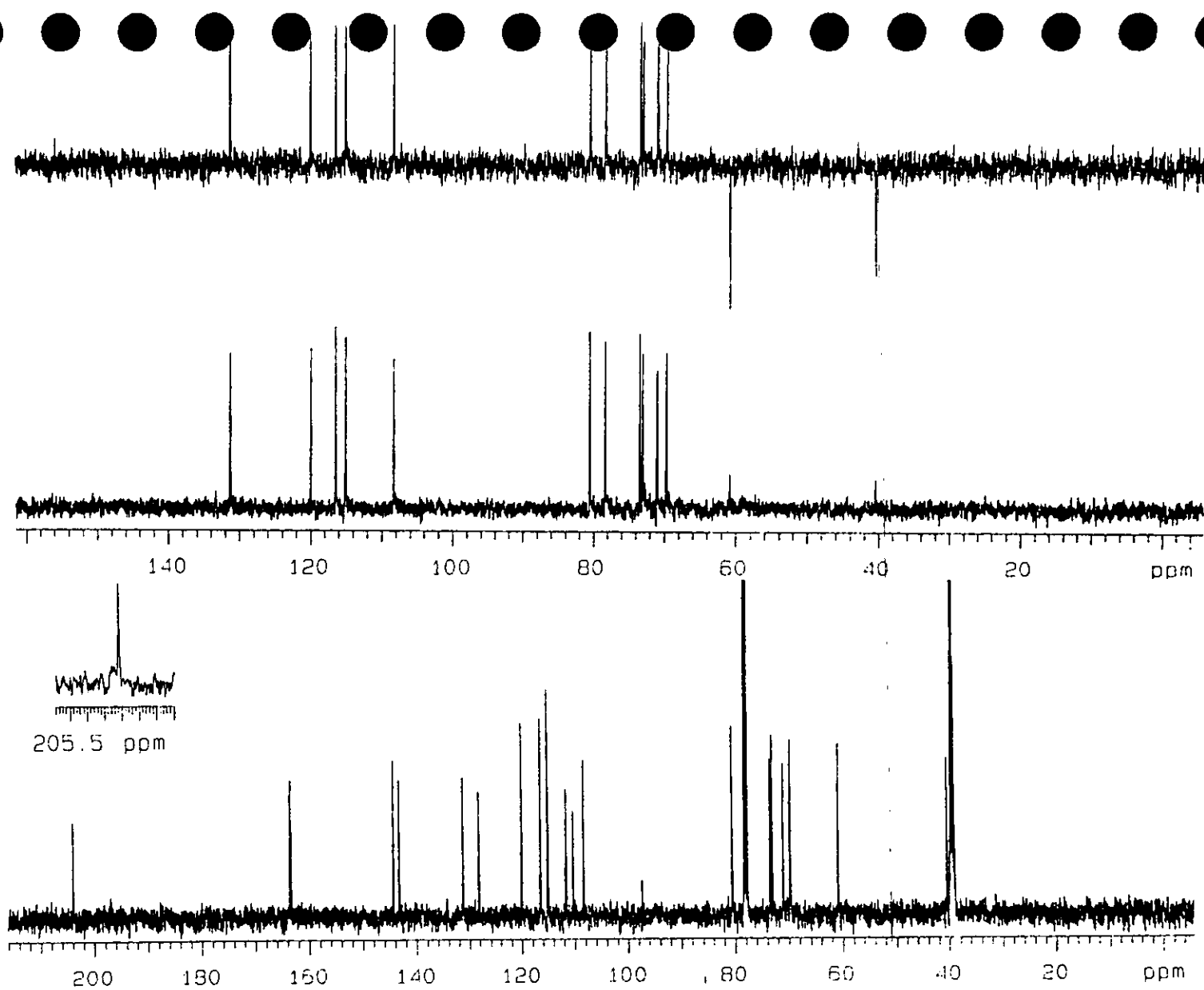
--- PEAK ---	--- VALLEY ---
$\lambda$	$\lambda$
ABS	ABS
321.5	309.0
0.204	0.189
284.5	253.5
0.364	0.063
218.0	213.5
0.507	0.484
204.0	0.750



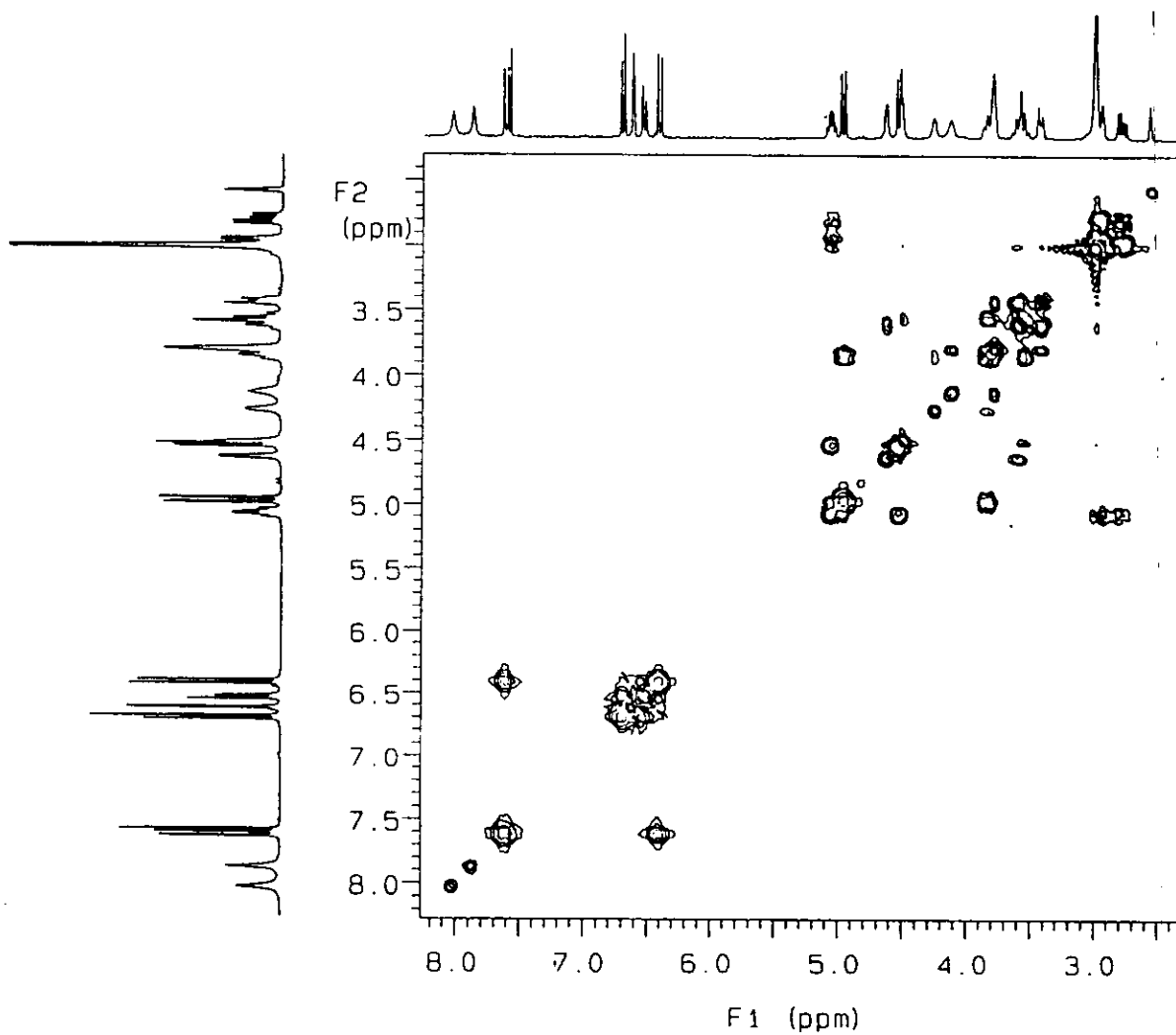
Espectro 39. Espectro de UV (MeOH) de la( $\alpha$ R)-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (33)



Espectro 40. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxi-dihidrochalcona (**33**)

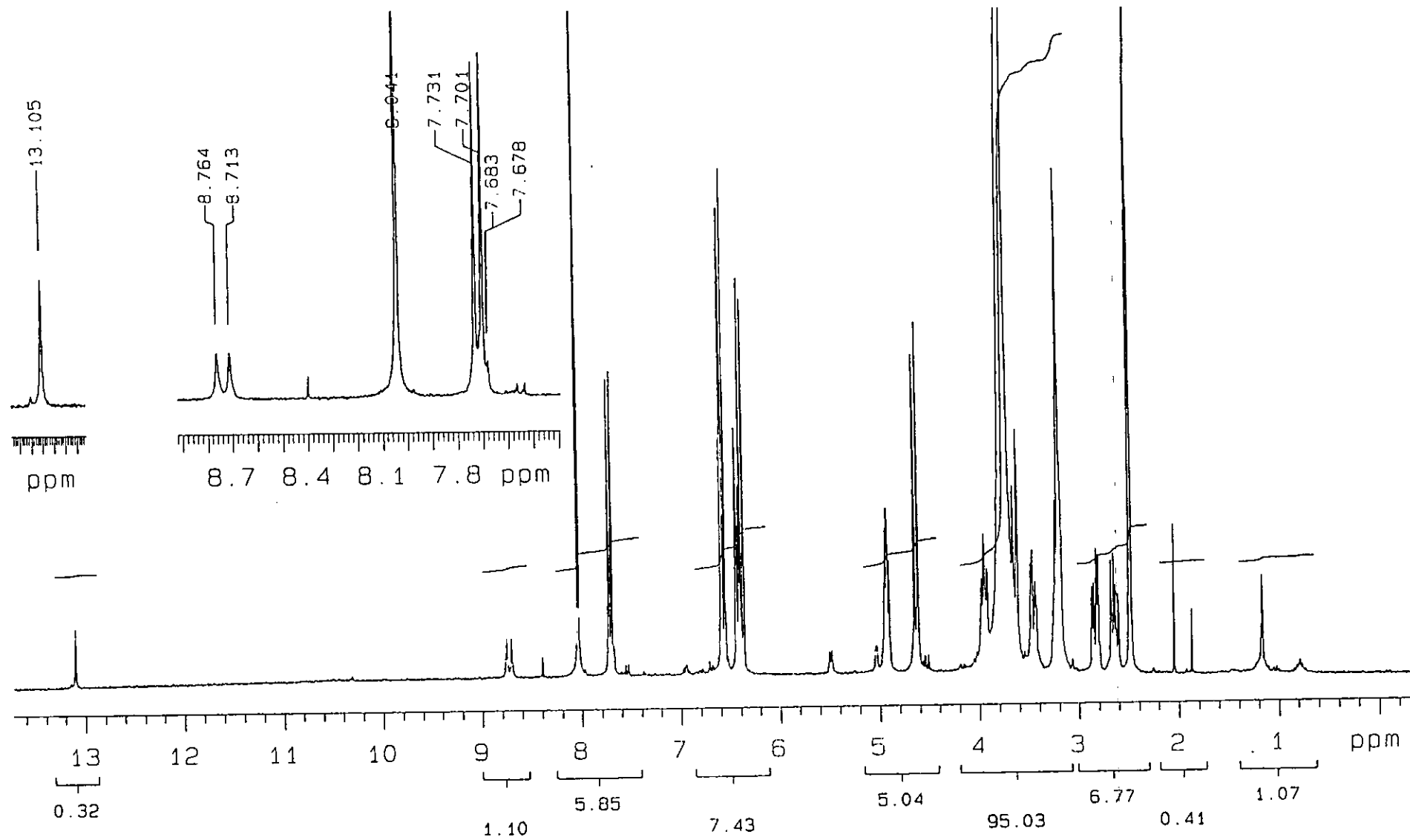


Espectro 41. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}_d_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (33)



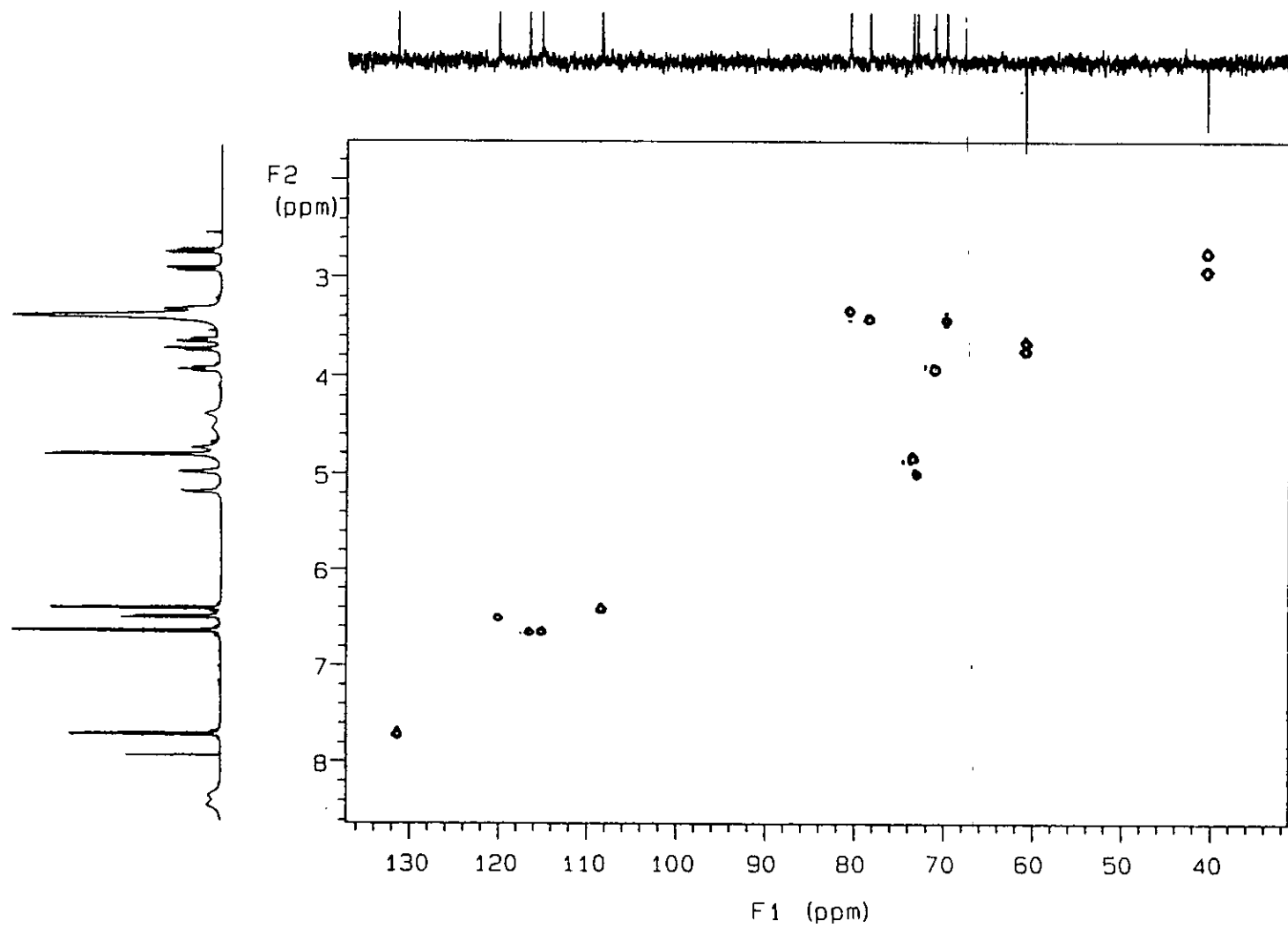
Espectro 42. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de la  $(\alpha R)$ -3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (33)

ESTA TERCERA PAGINA NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

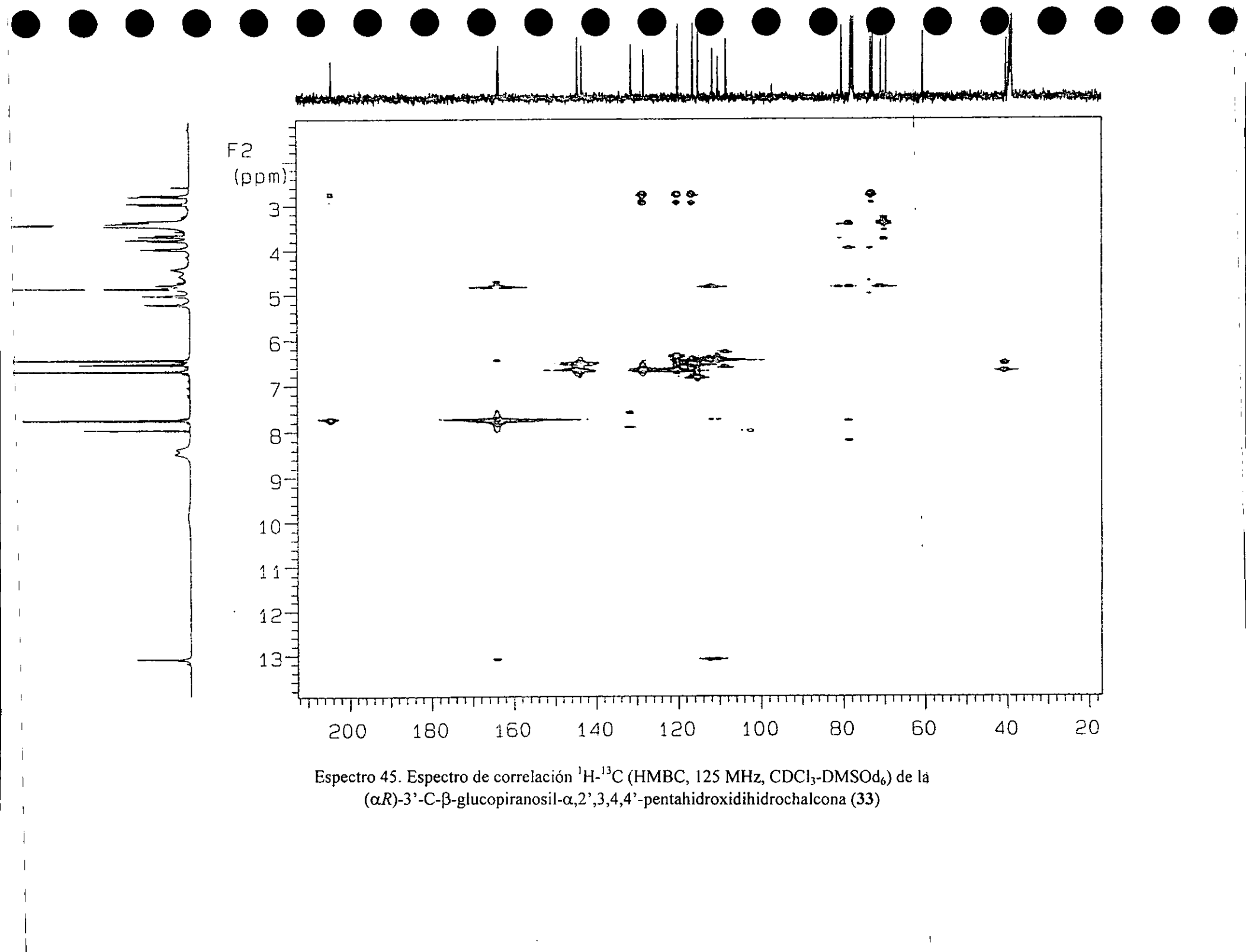


Espectro 43. Espectro RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}_6\text{-D}_2\text{O}$ ) de la  
 $(\alpha R)\text{-}3'\text{-C-}\beta\text{-glucopiranosil-}\alpha,2',3,4,4'\text{-pentahidroxi}$ hidrochalcona (33)

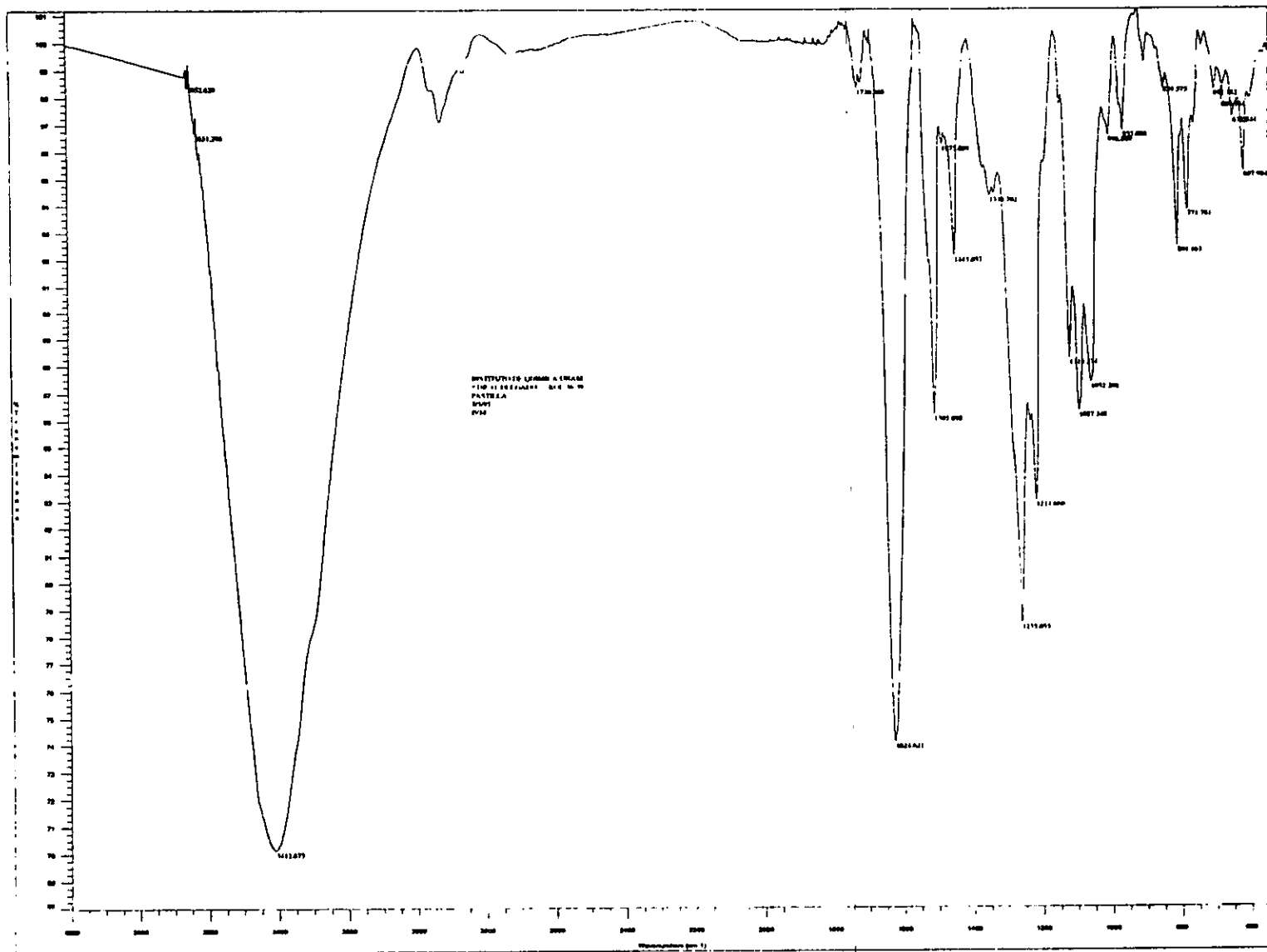




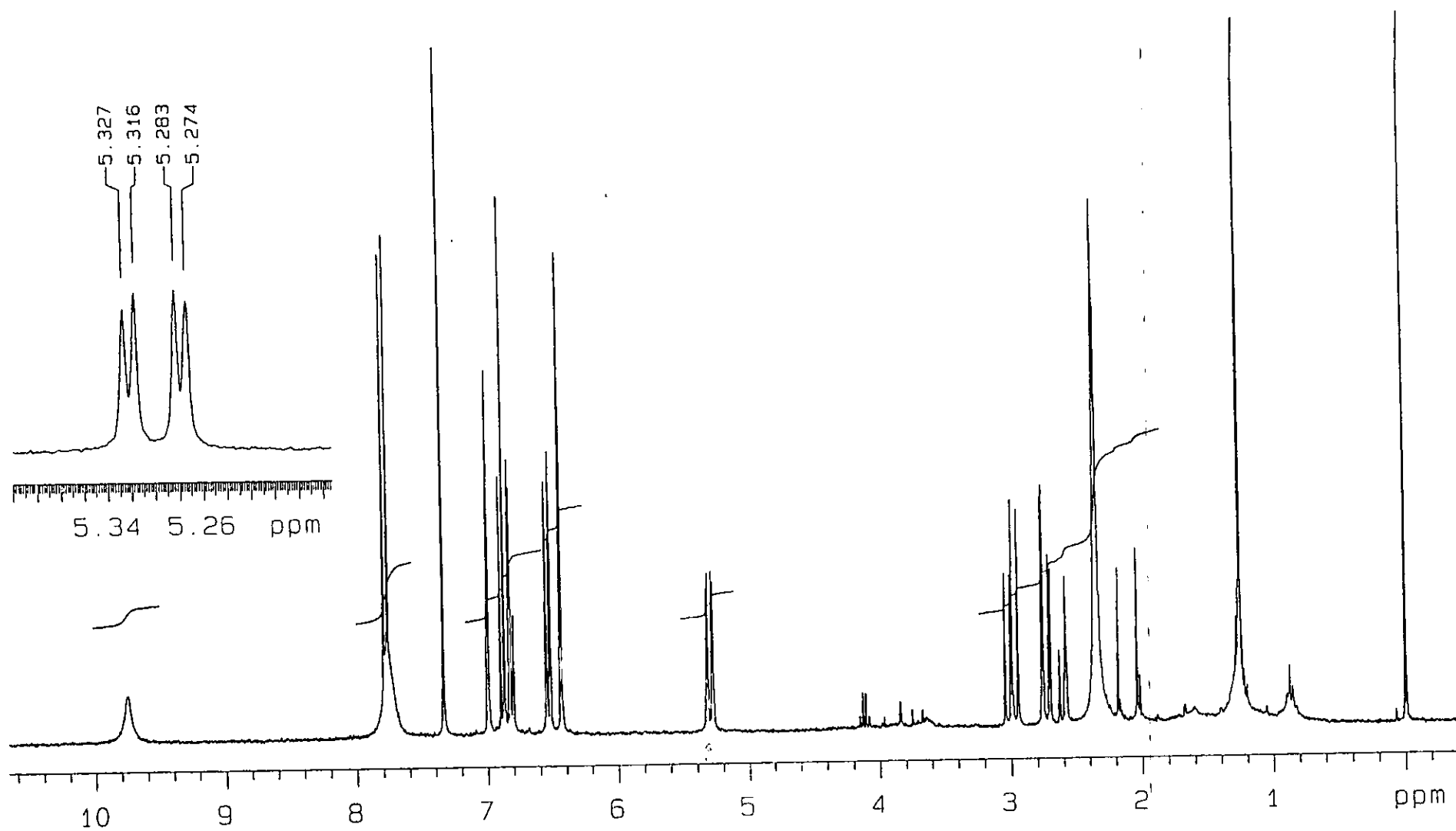
Espectro 44. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (33)



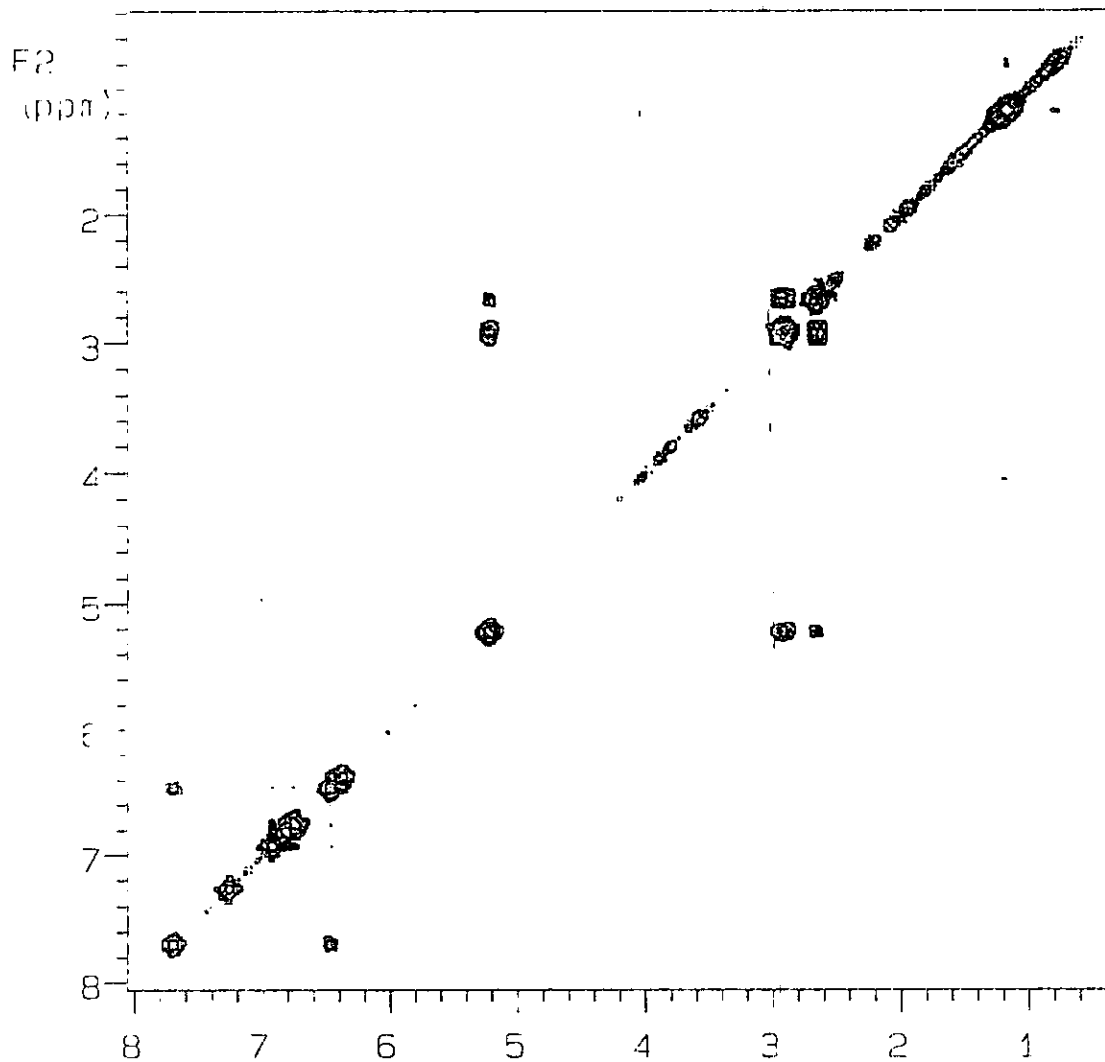
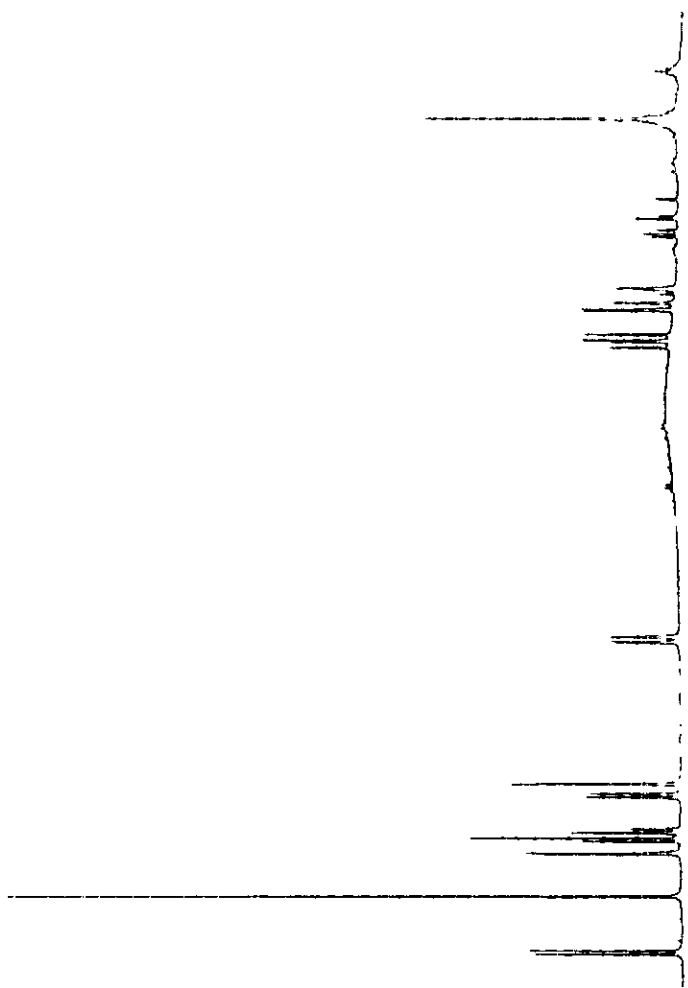
Espectro 45. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )-3'-C- $\beta$ -glucopiranosil- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxidihidrochalcona (33)



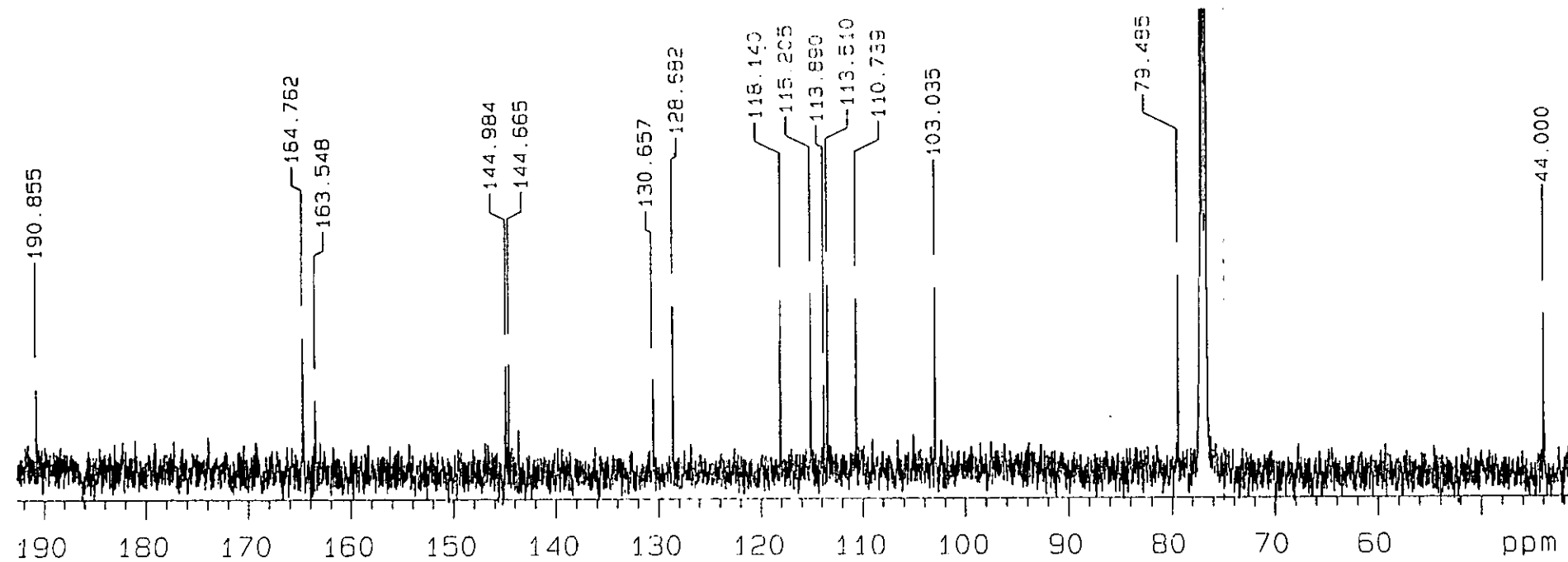
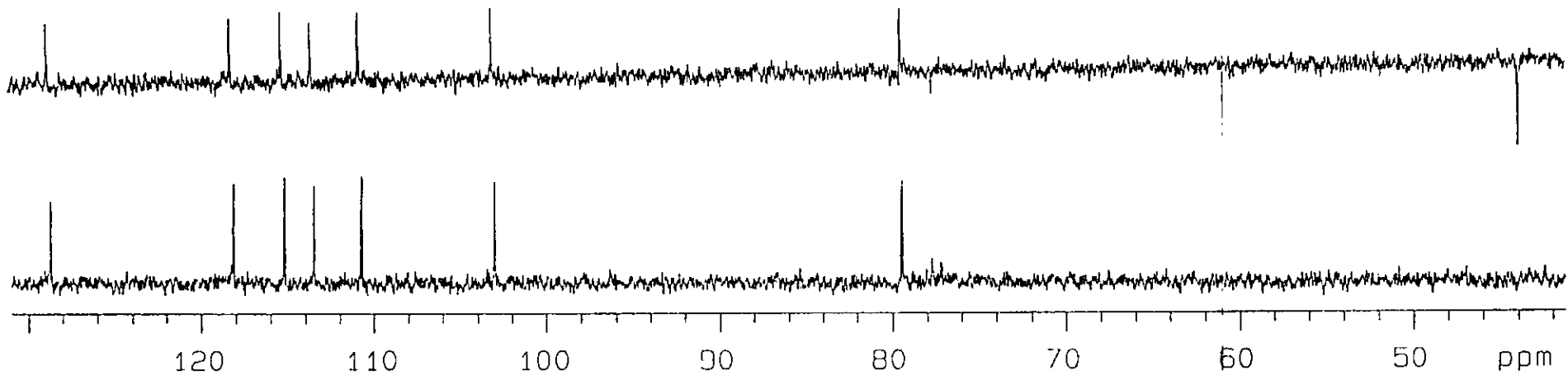
Espectro 46. Espectro de IR (película) de la ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (92)



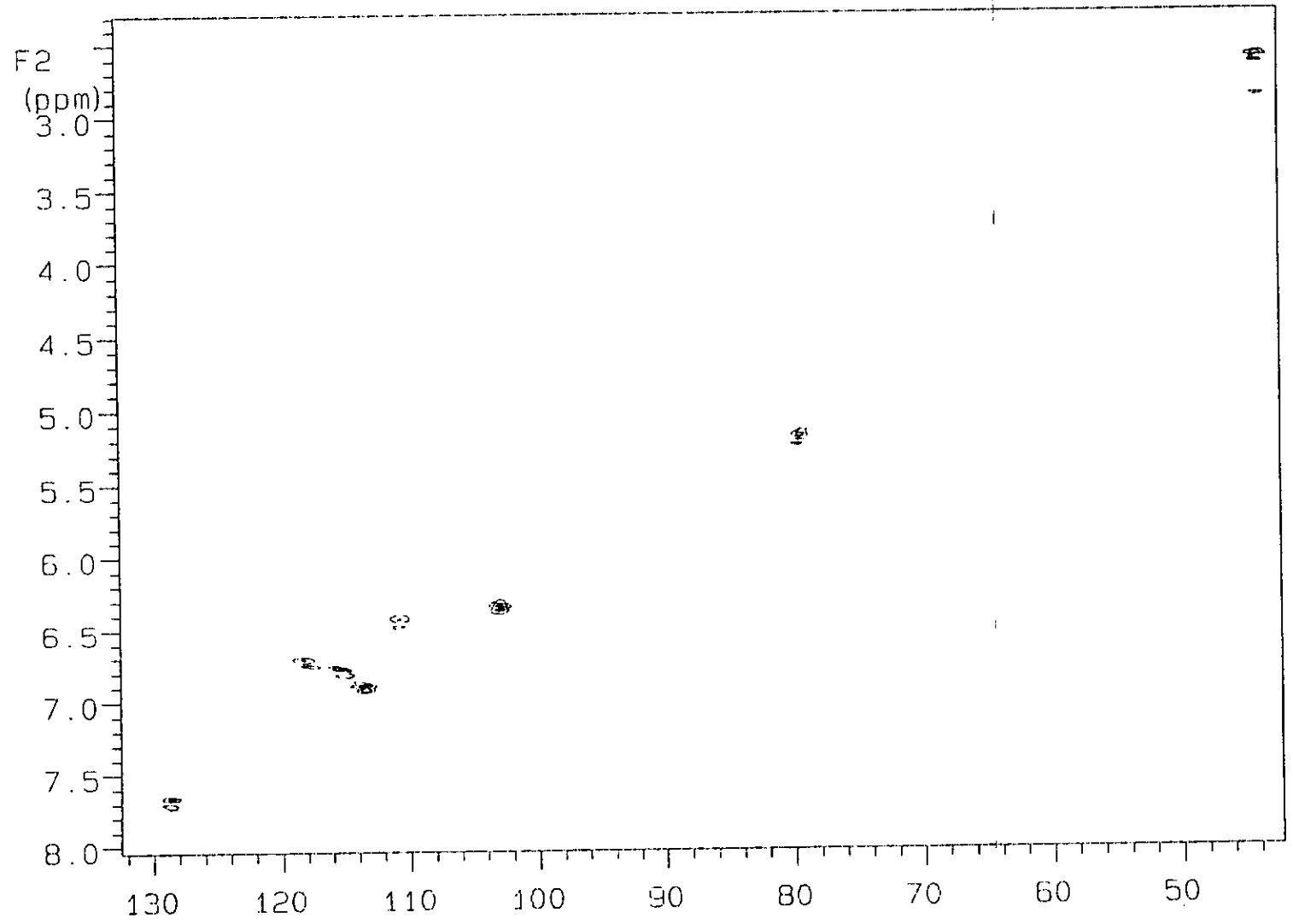
Espectro 47. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}_d_6$ ) de la  
( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxiidihidrochalcona (92)



Espectro 48. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxi dihidrochalcona (92)



Espectro 49. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>) de la ( $\alpha$ R)- $\alpha$ ,2',3,4,4'-pentahidroxiidihidrochalcona (92)



Espectro 50. Espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de la ( $\alpha R$ )- $\alpha,2',3,4,4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (92)