

ISOFLAVONAS EN *ECHINOSPARTUM BARNADESII* (GRAELLS) ROTHM. I. ESTUDIO PRELIMINAR

por

PAULINA BERMEJO, M.^a EMILIA CARRETERO & TERESA ORTEGA *

Resumen

BERMEJO, P., M.^a E. CARRETERO & T. ORTEGA (1986). Isoflavonas en *Echinospartum barnadesii* (Graells) Rothm. I. Estudio preliminar. *Anales Jard. Bot. Madrid* 43(1): 113-119.

De la sumidad florida del *Echinospartum barnadesii* (Graells) Rothm. se aíslan dos isoflavonas libres: la genisteína y la formononetina. Su caracterización se realiza por TLC y HPLC. Su identificación se realiza por técnicas de espectrofotometría vis-u.v., según las técnicas usuales.

Palabras clave: *Leguminosae*, *Echinospartum*, isoflavonas, fitoquímica.

Abstract

BERMEJO, P., M.^a E. CARRETERO & T. ORTEGA (1986). Isoflavones in *Echinospartum barnadesii* (Graells) Rothm. I. Preliminary study. *Anales Jard. Bot. Madrid* 43(1): 113-119 (in Spanish).

Two free isoflavones (genistein and formononetin) have been isolated from the leaves and stems of *Echinospartum barnadesii* (Graells) Rothm. They have been characterized by TLC and HPLC. Their identification has been carried out by vis-u.v. spectrophotometric methods.

Key words: *Leguminosae*, *Echinospartum*, isoflavones, phytochemistry.

INTRODUCCIÓN

El género *Echinospartum* (Spach) Rothm. está integrado por cuatro especies, de las que tres son endémicas de la Península Ibérica: *E. boissieri* (Spach) Rothm. (\equiv *Genista boissieri* Spach), *E. barnadesii* (Graells) Rothm. (\equiv *Genista barnadesii* Graells) y *E. lusitanicum* auct. Por último, *E. horridum* (Vahl) Rothm., del Pirineo Central, parece alcanzar también el SO de Francia.

Los diferentes táxones del género *Echinospartum* han sufrido un proceso de diversificación muy acusado debido al aislamiento geográfico de las distintas poblaciones. Su peculiar ecología, unida a su área de distribución, permite utilizarlos para delimitar unidades corológicas (RIVAS MARTÍNEZ, 1975).

* Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 28040 Madrid.

La taxonomía del género ha sido tratada por numerosos autores. Particularmente el grupo de *E. lusitanicum* ha sido objeto de minuciosos estudios, tanto taxonómicos como nomenclaturales (RIVAS MARTÍNEZ, 1974; LÓPEZ GONZÁLEZ, 1982).

En el presente trabajo nos referimos al taxon distribuido por los macizos central y oriental de la Sierra de Gredos: *E. barnadesii* (Graells) Rothm.

De la revisión bibliográfica realizada sobre el género *Echinopartum* y sobre el género *Genista* cabe reseñar los importantes trabajos de quimiotaxonomía realizados por FAUGERAS & PARIS (1965), fundamentados sobre todo en el contenido alcaloídico de numerosas especies de la tribu *Genisteeae*. Una parte importante de estos trabajos son los específicos del género *Echinopartum* (FAUGERAS & al., 1973), los cuatro táxones de este género demostraron una gran heterogeneidad, ya que se apreciaron diferencias profundas en la subsp. *barnadesii* con alcaloides similares a la mayoría de las genistas, mientras que la subsp. *lusitanicum* presenta un alcaloide específico, la lusitanina.

HARBORNE (1969) realizó, utilizando material de herbario, una revisión quimiotaxonomía de diferentes especies de la tribu *Genisteeae*, obteniendo resultados sobre la incidencia de isoflavonas simples en todo el grupo (daidzeina, genisteína, 5-o-metilgenisteína y formononetina, esta última menos frecuente). Asimismo, comprobó la existencia de luteolina, quercetol y kemferol. Es de resaltar que esta revisión no abarca ninguna de las especies del género *Echinopartum*.

La bibliografía consultada solo aportó datos sobre los componentes flavónicos de *E. horridum*, en el que caracterizan las cuatro isoflavonas anteriores y otras dos nuevas: biochamina A y su 5-o-metileter, sustancia registrada como producto natural a partir de su aislamiento en la citada especie (GRAYNER-BARKMEIJER & al., 1978).

Se aborda en este trabajo los primeros resultados obtenidos en las investigaciones sobre isoflavonas libres en la parte aérea de *E. barnadesii* (Graells) Rothm., continuando de este modo con los estudios fitoquímicos iniciados en nuestro Departamento sobre esta planta (ABAD, 1977).

MATERIAL Y MÉTODOS

La población estudiada procede de la provincia de Ávila, donde se conoce con el nombre de "cambrión", Puerto de Mijares, 1580 m, piornales supramediterráneos con cambriones: *Genistenion floridae*, *Genistion floridae* Rivas Martínez 1974, VII-1985, P. Bermejo & D. Sánchez-Mata, MAF 124407.

Los estudios fitoquímicos se han realizado sobre sumidad florida desecada convenientemente y pulverizada.

La extracción se ha realizado a partir de 400 g de material. En primer lugar, se desengrasa la droga con éter de petróleo en aparato Soxhlet, y a continuación se extrae con metanol hasta agotamiento. Los líquidos metanólicos reunidos se concentran a baja presión hasta residuo siruposo, y éste se suspende en agua hirviendo. Una vez filtrados y fríos, los líquidos acuosos se fraccionan por extracción con éter etílico y acetato de etilo sucesivamente.

El extracto Et₂O en éter etílico (ext. I) contiene las geninas libres, mientras que en el extracto del EtOAc existen fundamentalmente las formas heterosídicas.

El estudio cromatográfico fue realizado usando CP y CCD (celulosa y silica-gel) tanto en la técnica monodimensional como bidimensional. Como disolventes de desarrollo: n-butanol-ácido acético-agua (40 : 10 : 50, fase superior); t-butanol-ácido acético-agua (3 : 1 : 1); ácido acético 2%, 15%, 30% y 60%; cloroformo-metanol (10 : 1, 20 : 1); cloroformo-ácido acético (9 : 1); cloroformo-ácido acético-agua (10 : 9 : 1) y n-propanol-ácido acético-agua (1 : 1 : 1).

La separación de los componentes del extracto I se realizó por CP preparativas con papel Whatmann número 3 MM, y como disolvente de desarrollo, ácido acético 3%. El depósito de estos cromatogramas (I_b) fue extraído con metanol y convenientemente concentrado, fraccionado por cromatografías preparativas en ácido acético al 60%. Las bandas desarrolladas se recogieron con metanol. Se purifican por CCD silicagel CL_3CH : MeOH (20 : 1).

La pureza de las separaciones se comprobó por CCD en celulosa, bidimensionales (primero, BWA, y segundo, OHAc 60%).

La identificación de las geninas se realizó por estudios del comportamiento espectrofotométrico vis-uv frente a los reactivos usuales en este tipo de sustancias, siguiendo en todo ello las especificaciones de MABRY & *al.* (1970); este estudio se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 402.

En orden a corroborar la identificación de las sustancias aisladas, se utilizó la técnica de HPLC sobre columna C_{18} en fase reversa, y como solventes, metanol : agua (70 : 30).

Se dispuso de isoflavonas patrones: genisteína, formononetina y biochanina A, así como de las flavonas, luteolina y apigenina y de los flavonoles quercetol y kemferol, sustancias que fueron utilizadas para el seguimiento cromatográfico y la identificación espectrofotométrica.

RESULTADOS

En el extracto Et_2O se caracterizan por cromatografía bidimensional al menos 16 componentes.

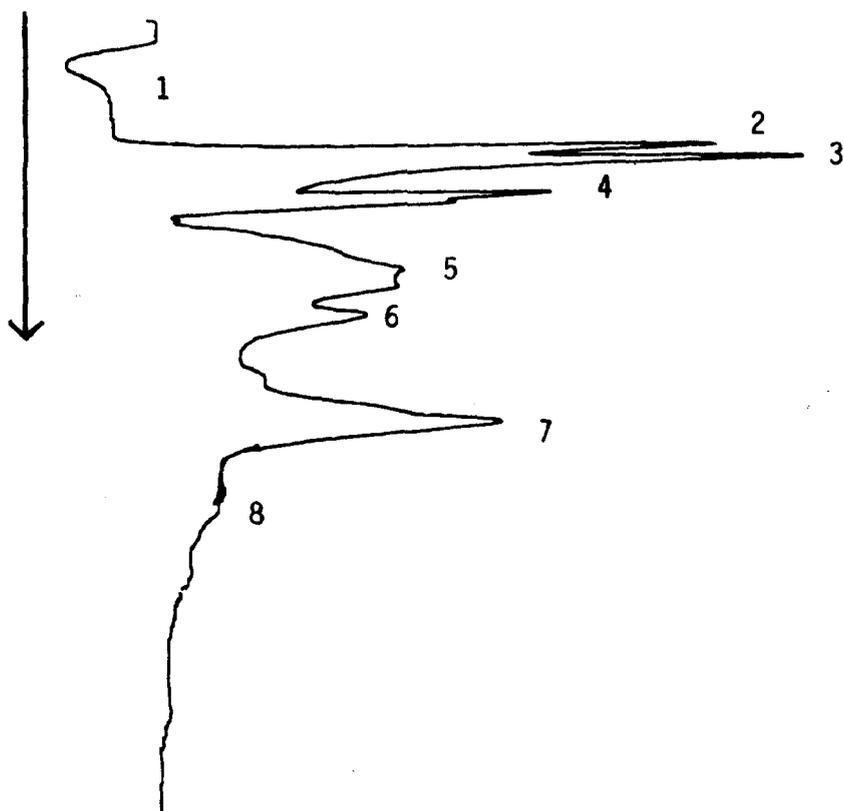
Se logran separar de este extracto I los flavonoides (I_D), que permanecen en el depósito, de los ácidos fenólicos y cumarinas, que se desarrollan en los cromato-

TABLA I

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DE LOS FLAVONOIDES LIBRES EN *ECHINOSPARTUM BARNADESII* (GRAELLS) ROTHM.

Reveladores	Flavonoides libres									
	1a	1b	2a	2b	3	4	5	6	7	8
U.V.	Os	Os	Os	Am	—	Bl	Os	Bl	Bl	Am
U.V./NH ₃	Os	Ve	Na	Am	Ro	Bl	Os	Bl	Az	Am
U.V./AlCl ₃	Ve	Ve	Am	Am	Am	Bl	Bl	Bl	Bl	Ve
U.V./Na ₂ CO ₃	Ve	Ve	Na	Na	Ro	—	—	—	Bl	—

Os = Oscuro; Am = Amarillo; Bl = Blanco; Ve = Verde; Ro = Rosa; Na = Naranja.



Flujo: 0,50 70% metanol, 30% agua LKB System

Chromatopac C-R3A File 1

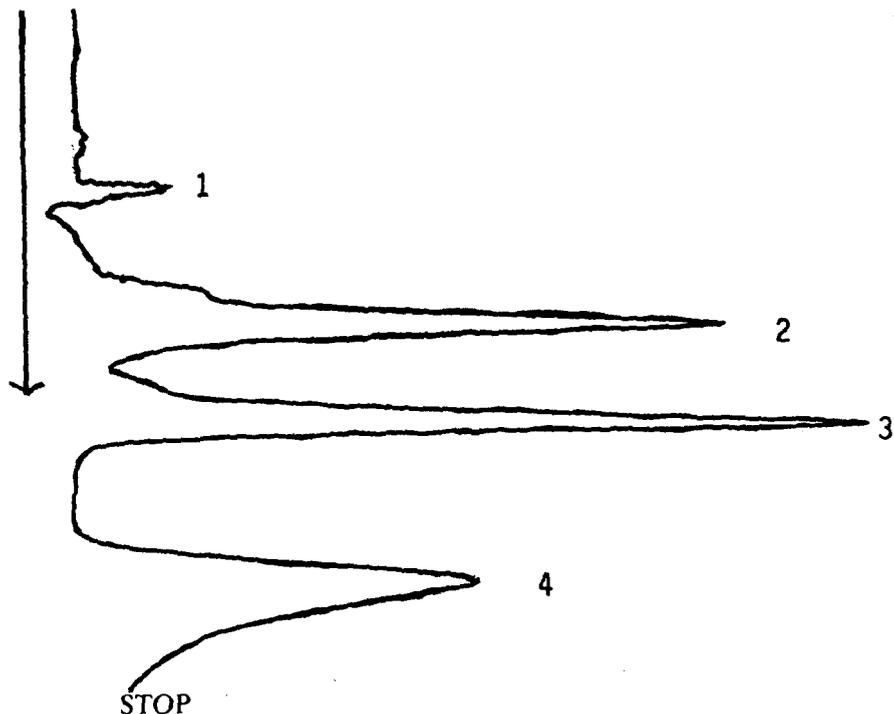
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.967	107112			2.6901	
2	3.367	372628			9.3585	
3	3.667	573032			14.3916	
4	4.5	341039			8.5651	
5	6.4	955181			23.9892	
6	7.533	427421			10.7346	
7	10.333	1010244			25.3721	
8	12.333	195052			4.8987	
Total		3981708			100	

Fig. 1.—Cromatograma (HPLC) del extracto I_D.

gramas preparativos en ácido acético al 3 %. En esta fracción flavónica (I_D) se hacen patentes, por bidimensionales, al menos ocho sustancias. Las reacciones de color y fluorescencia de estas sustancias se adjuntan en la tabla 1.

Dos de éstas coinciden en R_f con patrones de genisteína y formononetina, la mancha 1a y la 7, respectivamente.

Estos dos compuestos aislados por CP preparativas en acético al 60 % se purifican en CCD silicagel $Cl_3CH : MeOH (20 : 1)$, dando R_f de 0,21 para la genisteína y de 0,40 para la formononetina.



Chromatogram 4 Memorized

Chromatopac C-R3A File 1

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.42	188761	V		2.9707	
2	7.705	2201207			34.6418	Genisteína
3	10.092	1926015	V		30.3109	Formononetina
4	13.93	2038216			32.0767	Biochamina A
Total		6354199			100	

Fig. 2.—Cromatograma (HPLC) de isoflavonas patrones.

Los resultados del estudio espectrofotométrico fueron:

Sustancia 1a: max (nm) MeOH 260, 325 sh; NaOMe 274, 325 sh; Al₃Cl 274, 307 sh, 370; Al₃Cl/HCl 274, 307 sh, 370; NaOAc 270, 325; NaOAc/H₃BO₃ 260, 328.

Compuesto 7: max (nm) MeOH 248, 257 sh, 309; NaOMe 250, 273, 335; Al₃Cl 248, 260 sh, 301; Al₃Cl/HCl ídem; NaOAc 250, 312 sh, 235; NaOAc/BO₃H₃ 260 sh, 301.

Estos resultados coinciden con los dados por MABRY & al. (l. c.) para la genisteína (1a) y la formononetina (7), coincidiendo asimismo los valores de R_f en ácido acético al 15 % y TWA en CP descendente: genisteína OHAc 0,30; TWA 0,80; formononetina OHAc 0,35; TWA 0,85.

Para corroborar la identificación de estas sustancias, se realizaron separaciones por HPLC.

El cromatograma del extracto (I_D), así como los resultados de esta separación aparecen en la figura 1.

Si tenemos en cuenta el cromatograma de las tres isoflavonas patrones (fig. 2), puede pensarse en la existencia de genisteína (aproximadamente = 10%) y de formononetina (aproximadamente = 25%). Este hecho se comprobó realizando los cromatogramas de la sustancia 1a y 7 solas y con patrón interno, obteniéndose un tiempo de retención igual al de los patrones para las dos sustancias aisladas.

CONCLUSIONES

E. barnadesii (Graells) Rothm. es una especie muy rica en isoflavonas, tanto libres como combinadas en forma heterosídica.

En este estudio se pone a punto un método de trabajo con isoflavonas y se comienza el estudio de estos componentes en un género tan controvertido como *Echinopartum*.

De las ocho geninas libres que se caracterizan se aíslan dos, coincidiendo por su comportamiento cromatográfico y espectrofotométrico con la genisteína (5,7,4' trihidroxiisoflavona) y con la formononetina (7 hidroxí 4' metoxiisoflavona).

A pesar de ser la formononetina la menos frecuente dentro de la tribu *Genisteae*, en este caso es mayoritaria, encontrándose en una proporción aproximadamente de un 25 % y la genisteína aproximadamente en un 10 %.

A diferencia de *E. horridum* (Vahl) Rothm., no se caracteriza biochammina A (5,7 dihidroxí 4' metoxiflavona) como genina libre.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Sánchez Mata, del Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia de Madrid, la ayuda en la determinación y recolección del material, así como la orientación del estudio botánico del género *Echinopartum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, I. (1977). *Estudio fitoquímico del E. lusitanicum* (L.) Rothm. subsp. *barnadesii* (Graells) C. Vicioso Tesina de licenciatura (inéd.). Universidad Complutense, Madrid.

- FAUGERAS, G. & R. PARIS (1965). Chimiotaxonomie des Papilionacées-Génistées. *Mem. Soc. Bot. France*, 75-102.
- FAUGERAS, G., E. VALDÉS BERMEJO & R. PARIS (1973). Alcaloides et polyphénols des Legumineuses XXVII. Distribution des alcaloides chez diverses Genistées d'Espagne et du Portugal appartenant aux genres *Cytisus*, *Genista*, *Echinopartum*, *Stanracanthus* et *Adenocarpus*. *Pl. Méd. Phytoterap.* 7(1) 68-76.
- GRAYER-BARKMEIJER, R. J., J. L. INGHAM & P. M. DEWICK (1978). 5-O-Methylbiochanin A, a new isoflavone from *Echinopartum horridum*. *Phytochemistry* 17: 829-830.
- HARBORNE, J. B. (1969). Chemosystematics of the Leguminosae. Flavonoid and Isoflavonoid Patterns in the tribe Genisteae. *Phytochemistry* 8: 1449-1456.
- LÓPEZ GONZÁLEZ, G. (1982). Sobre la correcta identificación de *Genista lusitanica* L. (*Echinopartum lusitanicum* (L.) Rothm.). *Anales Jard. Bot. Madrid* 39(1): 49-52.
- MABRY, T. J., K. R. MARKHAM & M. B. THOMAS (1970). *The systematic identification of flavonoids*. Springer Verlag, Berlín.
- RIVAS MARTÍNEZ, S. (1974). *Echinopartum lusitanicum* (L.) Rothm., amplo sensu. *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.* 72: 13-18.
- RIVAS MARTÍNEZ, S. (1975). Mapa de vegetación de la provincia de Ávila. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 32(2): 1493-1556.

Aceptado para publicación: 7-V-86