

106
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"TRITERPENOIDES DE LAS ESPECIES *Maxillaria densa* LINDLEY (ORCHIDACEAE) Y *Scaphyglottis livida* (LINDLEY) SCHITR. (ORCHIDACEAE)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MITZI RODRIGUEZ LIZANA



MEXICO, D. F.

1998

263825

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.


JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Rachel Mata Essayag
VOCAL: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
SECRETARIO: Dra. Perla Carolina Castañeda López
1er. SUPLENTE: M. en C. José Fausto Rivero Cruz
2o. SUPLENTE: M. en C. Daniel Chávez Velasco

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 6, Unidad de Investigación en Plantas Medicinales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesora

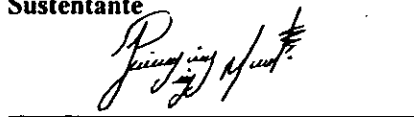

Dra. Rachel Mata Essayag

Supervisor Técnico



Q.F.B. Samuel Enoch Estrada Soto

Sustentante


Mitzi Rodríguez Lizana

*Nous sommes les filles du feu secret,
Du feu qui circule dans les entrailles de la terre;
Nous sommes les filles de l'aurore et de la rosée;
Nous sommes les filles de l'air;
Nous sommes les filles de l'eau;
Mais nous sommes avant tout les filles du ciel.
Les hommes nous souillent et nous tuent en nous aimant.
Nous tenons à la terre par un fil.
Ce fil, c'est notre racine, c'est-à-dire notre vie.
Mais nous levons le plus haut que nous pouvons nos bras vers le ciel.
C'est que le ciel est notre patrie,
Notre véritable patrie, puisque de lui vient notre âme;
Puisqu' à lui retourne notre âme:
Notre âme, c'est-à-dire notre parfum.*

P. MARCAY

DEDICATORIAS

Si en el balance final de tu actuación las luces son más poderosas que las sombras, es cosa de vocación, de inclinación interior, de proyecto de vida...

O quizá de amor.

PABLO LATAPÍ

A mis Padres:

Por haberme enseñado a enfrentar la vida
con coraje y dedicación para alcanzar mis metas.
Metas que hoy se cumplen, gracias a su amor
y comprensión.

Gracias.

A la Dra. Rachel Mata:

Por el ejemplo a seguir de su persona,
apoyo incondicional e invaluable
dirección en el presente trabajo.

Gracias.

A mi Hermano:

Por compartir nuestras vidas en
este tiempo y espacio.

A mi Familia:

A mis abuelitos Mari y
especialmente a ti *Flaco*
aunque ya no estés conmigo.
Gracias por todo tu amor.
A la Familia Salas Lizana y
Rodríguez Espejo, por disfrutar
y padecer conmigo todo momento
de mi vida.

A mis Amigos:

Con cariño a todos mis grandes amigos
y compañeros incondicionales,
con los que he convivido
a lo largo de este gran peregrinar,
apoyándome en todo momento,
y alentándome a seguir siempre adelante.
Especialmente a Laura, Manuel, Juliana,
Ingrid y Dulce.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química y a todos los profesores que dejaron huella en mi con sus enseñanzas, tanto escolares como de la vida.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA), por su apoyo financiero a través del proyecto de IN205197.

Al Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación" de la Facultad de Química de la UNAM, por el apoyo recibido como ayudante de Profesor durante la realización de esta investigación.

Al Biol. Gustavo Carmona Díaz, por la recolección y clasificación de las especies vegetales de estudio de este proyecto.

A los M. en C. Isabel Chávez, Rubén Gaviño, Beatriz Quiroz y al Biol. Héctor Ríos de los Laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

A la Q.F.B. Rocío Patiño del Laboratorio de Espectroscopía IR del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de IR.

Al I.Q. Luis Velasco y M. en C. Javier Pérez del Laboratorio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de Masas.

Al M. en C. José Luis Gallegos Pérez del Laboratorio de masas de la USAI, en la Facultad de Química de la UNAM, por la obtención de los espectros Gases-Masas.

Al M. en C. Rubén Toscano del Laboratorio de Rayos X del Instituto de Química de la UNAM, por el análisis de difracción de Rayos X.

A la Dra. Rachel Mata, al Dr. Rogelio Pereda y a la Dra. Perla Castañeda, por sus valiosos comentarios durante el proceso de revisión de este trabajo.

A la M. en C. Laura Acevedo, por su valiosa instrucción técnica.

A todos mis compañeros de laboratorio por su ayuda, especialmente a Fausto, Daniel y Jaqueline.

A todos mis amigos que contribuyeron de diferentes formas, ayudándome a alcanzar esta meta *Gracias*.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes de <i>Maxillaria densa</i> Lindley (Orchidaceae) y <i>Scaphyglottis livida</i> (Lindley) Schlechter (Orchidaceae).	1
1.2 Triterpenoides de la familia Orchidaceae.	12
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	19
III. PARTE EXPERIMENTAL	23
3.1 Material vegetal.	23
3.2 Procedimientos generales.	23
3.2.1 Análisis cromatográficos.	23
3.2.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.	25
3.3 Obtención de los derivados de los compuestos aislados: Preparación de los derivados acetilados.	27
3.4 Evaluaciones biológicas.	27
Determinación de la actividad fitoinhibidora. Método de caja de Petri.	
3.5 Estudio fitoquímico de <i>Maxillaria densa</i> .	29
3.5.1 Extracción de la planta entera.	29
3.5.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total.	30

	Página
3.5.3 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias.	30
3.5.3.1 Aislamiento y purificación del (24<i>S</i>)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17) y 24,24-dimetil-5α-lanosta 9(11),25-dien-3β-ol (18), bajo la forma de sus acetil derivados (17a) y (18a) de la fracción primaria MD-E.	30
3.5.3.2 Detección del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de eicosilo (19), 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de uneicosilo (20), 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21) y 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de tetraeicosilo (22) en la fracción primaria MD-F.	34
3.5.3.3 Aislamiento y purificación de 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21) de la mezcla MD-F1.	34
3.5.3.4 Aislamiento del sitosterol (23) de la fracción primaria MD-G.	36
3.6 Estudio fitoquímico de <i>Scaphyglottis livida</i>.	36
3.6.1 Extracción de la planta entera.	36
3.6.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total.	36

	Página
3.6.3 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias.	39
3.6.3.1 Aislamiento y purificación del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ol (24) (cicloneolitsol) bajo la forma de su acetil derivado (24a) de la fracción primaria SL-D.	39
3.6.3.2 Aislamiento y purificación del (24<i>S</i>)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17) y 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (18), bajo la forma de sus acetil derivados (17a) y (18a) de la fracción secundaria SL-D12.	41
3.6.3.3 Aislamiento y purificación de la mezcla de triterpenoides SL-E1 de la fracción primaria SL-E.	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	44
4.1 Estudio fitoquímico de <i>Maxillaria densa</i>.	44
4.1.1 Caracterización del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	51
4.1.2 Caracterización del (24<i>S</i>)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17) y del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (18).	70

	Página
4.2 Estudio fitoquímico de <i>Scaphyglottis livida</i>.	109
4.2.1 Caracterización del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24).	113
4.3 Actividades biológicas de los constituyentes aislados de <i>Maxillaria densa</i> y <i>Scaphyglottis livida</i>.	131
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	134
VI. PERSPECTIVAS	136
VII. BIBLIOGRAFIA	137

INDICE

Lista de Cuadros.....	I
Lista de Esquemas.....	II
Lista de Figuras.....	III
Lista de Gráficas.....	IV
Lista de Tablas.....	V
Lista de Espectros.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	XII

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Clasificación de la familia Orchidaceae según Dressler.	2
2	Sistemas de elución utilizados para los análisis cualitativos en capa fina.	24
3	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	24
4	Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la planta entera <i>Maxillaria densa</i> .	32
5	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción MD-E de <i>Maxillaria densa</i> .	33
6	Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la planta entera <i>Scaphyglottis livida</i> .	38
7	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción SL-D de <i>Scaphyglottis livida</i> .	40
8	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción SL-E de <i>Scaphyglottis livida</i> .	43
9	Metabolitos aislados de la especie <i>Maxillaria densa</i> .	49

LISTA DE CUADROS (continuación).

Cuadro	Contenido	Página
10	Tiempo de retención y porcentaje de los componentes de la fracción secundaria MD-F1, de acuerdo al análisis CG-EM.	50
11	Metabolitos aislados de la especie <i>Scaphyglottis livida</i> .	112

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Contenido	Página
1	Proceso de extracción de la planta entera <i>Maxillaria densa</i> .	29
2	Proceso de extracción de la planta entera <i>Scaphyglottis livida</i> .	37

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Regiones geográficas con mayor concentración de orquídeas.	5
2	Distribución del género en México, Centro y Sud América.	6
3	Zonas de la República Mexicana donde crecen el mayor número de orquídeas.	6
4	<i>Maxillaria densa</i> Lindley.	9
5	<i>Scaphyglottis livida</i> (Lyndley) Schlechter.	11
6	Cromatograma de los contituyentes presentes en la mezcla MD-F1, obtenido por el análisis de CG-EM.	35
6a	Cromatograma del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doecosilo (21), obtenido por HPLC.	35
7	Espectro de RMN- ¹ H COSY del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doecosilo (21.)	57
8	Espectro de RMN-HMQC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doecosilo (21).	58
9	Cromatograma obtenido por la técnica de CG-EM del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -lo (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -lo (18).	70
10	Fragmentos de masas observados en el espectro del acetato del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -lo (17a).	78
11	Fragmentos de masas observados en el espectro del acetato del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -lo (18a).	84
12	Vista estereoscópica del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -lo (17) obtenida por difracción de Rayos X.	101

LISTA DE FIGURAS (continuación).

Figura	Contenido	Página
13	Vista estereoscópica del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11), 25-en-3 β -lo (18) obtenida por difracción de Rayos X.	108
14	Fragmentos observados en el espectro de masas del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta,25-en-3 β -lo (24).	118

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Contenido	Página
1	Inhibición del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crugalli</i> inducido por el extracto crudo de <i>M. densa</i> .	45
2	Inhibición del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> inducido por las fracciones primarias de <i>M. densa</i> .	47
3	Inhibición del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crugalli</i> inducido por el extracto crudo de <i>S. livida</i> .	110
4	Inhibición del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crugalli</i> inducido por el extracto crudo de <i>M. densa</i> .	132
5	Inhibición del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> inducido por el extracto crudo de <i>S. livida</i> .	133

LISTA DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Triterpenoides aislados de la familia Orchidaceae.	13
2	Efecto fitotóxico del extracto crudo de <i>M. densa</i> , sobre el crecimiento radicular de las arvenses <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> .	45
3	Efecto fitotóxico de las fracciones obtenidas de <i>M. densa</i> sobre el crecimiento radicular de la arvense <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	46
4	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docicosilo (21).	52
5	Datos de RMN- ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , ppm) del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docicosilo (21).	53
6	Datos de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , ppm) del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docicosilo (21).	54
7	Correlaciones más importantes observadas en el espectro HMBC, para el compuesto 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docicosilo (21).	60
8	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18).	73
9	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del acetato de (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a).	74

LISTA DE TABLAS (continuación).

Tabla	Contenido	Página
10	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del acetato de 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18a).	75
11	Datos de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , ppm) de los compuestos 17, 18, 17a y 18a.	76
12	Datos de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , ppm) de los compuestos 17, 18, 17a y 18a.	77
13	Comparación de los desplazamientos químicos del metilo vinílico H ₃ -27, para establecer la estereoquímica del carbono quiral en C-24.	82
14	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , ppm) de los compuestos 17a y 18a.	85
15	Comparación de los datos de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , ppm) de los compuestos 17a y 18a.	86
16	Efecto fitotóxico del extracto crudo de <i>S. livida</i> sobre el crecimiento radicular de las arvenses <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> .	109
17	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24).	114

LISTA DE TABLAS (continuación).

Tabla		Página
18	Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas del acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24a).	115
19	Datos de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , ppm) del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24) y del acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24a).	116
20	Datos de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , ppm) del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24) y del acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24a).	117
21	Efecto fitotóxico de los compuestos aislados de <i>M. densa</i> sobre el crecimiento radicular de la arvense <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	132
22	Efecto fitotóxico de los compuestos aislados de <i>S. livida</i> sobre el crecimiento radicular de la arvense <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	133

LISTA DE ESPECTROS

Espectro	Contenido	Página
1	IR del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	61
2	Espectrometría de masas por impacto electrónico del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	62
3	RMN- ¹ H del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	63
4	RMN- ¹³ C del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	64
5	RMN- ¹³ C modalidad DEPT del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	65
6	RMN-NOESY del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	66
7	RMN-HMBC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	67
8	RMN-HMBC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	68
9	RMN-HMBC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).	69
10	IR de la mezcla del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18).	88

LISTA DE ESPECTROS (continuación).

Espectro	Contenido	Página
11	Espectrometría de masas por impacto electrónico del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11), 25-dien-3 β -ol (17).	89
12	Espectrometría de masas por impacto electrónico del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11), 25-en-3 β -ol (18).	90
13	RMN- ¹ H de la mezcla del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18).	91
14	RMN- ¹³ C de la mezcla del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18).	92
15	RMN- ¹³ C modalidad DEPT de la mezcla del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18).	93
16	IR del acetato del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a).	94
17	Espectrometría de masas por ionización química del acetato del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a).	95
18	RMN- ¹ H del acetato del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a).	96
19	RMN- ¹ H modalidad COSY del acetato del (24 <i>S</i>)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a).	97

LISTA DE ESPECTROS (continuación)

Espectro	Contenido	Página
20	RMN- ¹³ C del acetato del (24 <i>S</i>)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17a).	98
21	RMN- ¹³ C modalidad DEPT del acetato del (24 <i>S</i>)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17a).	99
22	RMN-HETCOR del acetato del (24 <i>S</i>)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17a).	100
23	IR del acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18a).	102
24	Espectrometría de masas por ionización química del acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18).	103
25	RMN- ¹ H del acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18a).	104
26	RMN- ¹ H modalidad COSY del acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18a).	105
27	RMN- ¹³ C del acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18a).	106
28	RMN- ¹³ C DEPT del acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18a).	107
29	IR del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta,25-en-3β-ol (24).	121
30	Espectrometría de masas por impacto electrónico del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta, 25-en-3β-ol (24).	122

LISTA DE ESPECTROS (continuación)

Espectro	Contenido	Página
31	RMN- ¹ H del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta,25-en-3β-ol (24).	123
32	RMN- ¹³ C del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta,25-en-3β-ol (24).	124
33	RMN- ¹³ C DEPT del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta,25-en-3β-ol (24).	125
34	IR del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta,25-en-3β-ol (24a).	126
35	Espectrometría de masas por impacto electrónico del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta,25-en-3β-ol (24a).	127
36	RMN- ¹ H del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta, 25-en-3β-ol (24a).	128
37	RMN- ¹³ C del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta, 25-en-3β-ol (24a).	129
38	RMN- ¹³ C modalidad DEPT del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta,25-en-3β-ol (24a).	130

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
ANOVA	Análisis de varianza
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa
CI ₅₀	Concentración inhibidora media
cm	Centímetro
cm	Centimetro
COSY	Correlated spectroscopy
δ	Desplazamiento químico
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doblete de doblete
DEPT	Distortionless enhancement polarization transfer
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EMIQ	Espectrometría de masas por ionización química
eV	Electro volts
g	Gramos
g	Gramo
h	Hora
HETCOR	Heteronuclear Correlation
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond connectivity

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación).

HMQC	Heteronuclear multiple-quantum coherence
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Hz	Hertz
Int rel	Intensidad relativa
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
L	Litros
λ	Longitud de onda
[M ⁺]	Ión molecular
M	Micro
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa carga
μ g	Microgramo
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milimetro
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación).

RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica .
<i>s</i>	Singlete
<i>sa</i>	Singlete ancho
TMS	Tetrametilsilano
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta

I. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES DE *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae) y *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schlechter (Orchidaceae)

Las orquídeas, con más de quince mil especies agrupadas en setecientos cincuenta géneros, constituyen la familia más numerosa de todo el reino vegetal. Las orquídeas originalmente se clasificaron en la familia Liliaceae, sin embargo, estudios posteriores permitieron su agrupación como una familia independiente. En el Cuadro 1 se resume la clasificación taxonómica de las orquídeas propuesta por Dressler (Dressler, 1993). Esta clasificación es una de las más aceptadas hoy día.

Las orquídeas se pueden clasificar en terrestres, epífitas, litófiticas, semiacuáticas o subterráneas, dependiendo del lugar donde se desarrollan.

Las epífitas son plantas que crecen sobre otras plantas hospederas, por lo general árboles, pero sin tener un contacto directo con los haces vasculares de las mismas. En consecuencia las epífitas, falsamente llamadas parásitas, no extraen agua ni nutrientes de sus hospederos.

Las especies de la familia de las orquídeas tienen por hábitat las regiones tropicales o subtropicales del mundo; por lo que la mayor concentración de orquídeas se encuentra en las montañas, a 20 grados del Ecuador (Figura 1).

Cuadro 1. Clasificación de la familia Orchidaceae según Dressler (Dressler, 1993).

Subfamilia	Tribu	Subtribu	Géneros	Especies
Apostasioideae			2	16
Cypripedioideae			4	122
Spiranθοideae	Diceratostealeae		1	1
	Tropidieae		2	43
	Cranichideae	Goodyerrinae	35	476
		Prescottinae	7	99
		Spiranthinae	40	409
		Manniellinae	1	1
		Pachyplectroninae	1	2
Cranichidinae	9	152		
Orchidoideae	Diurideae	Chloraeinae	6	80
		Caladeniinae	10	121
		Drakaeinae	5	21
		Pterostylidinae	1	100
		Acianthinae	5	147
		Cryptostylidinae	2	16
		Diuridinae	3	41
		Thelymitrinae	2	75
		Rhizanthellinae	1	2
		Prasophyllinae	3	99
	Orchideae	Orchidinae	34	371
		Habenariinae	23	932

Cuadro 1. Clasificación de la familia Orchidaceae según Dressler (continuación).

Subfamilia	Tribu	Subtribu	Géneros	Especies
Orchidoideae	Diseae	Huttonaeinae	1	5
		Disinae	5	143
		Satyriinae	3	103
		Coryciinae	5	107
Epidendroideae	Gastrodieae	Gastrodiinae	5	36
		Epipogiinae	3	5
		Wulfschlaegeliinae	1	2
	Nervilieae		1	65
	Malaxideae		6	960
	Calypsoeae		9	35
	Cymbidieae	Goveniinae	1	20
		Branheadiiinae	1	12
		Eulophiinae	6	264
		Thecostelinae	2	4
		Cyrtopodiinae	12	139
		Acriopsidinae	1	6
		Catesetinae	5	194
	Maxillarieae	Cryptarrheninae	1	7
		Zygopetalinae	30	331
		Lycastinae	8	127
		Maxillariinae	8	472
		Stanhopeinae	22	248
		Telipoyoninae	4	126
		Ornithocephalinae	14	76
Oncidiinae		14	1232	

Cuadro 1. Clasificación de la familia Orchidaceae según Dressler (continuación).

Subfamilia	Tribu	Subtribu	Géneros	Especies
Epidendroideae	Arethuseae	Arethusinae	2	3
		Bletiinae	21	388
		Chysiinae	1	7
	Coelogyneae	Thuniinae	1	5
		Coelogyginae	20	285
	Epidendreae I	Sobraliinae	4	219
		Arpophyllinae	1	5
		Meiracylliinae	1	2
		Coeliinae	1	5
		Laeliinae	43	1466
		Pleurothallidiinae	28	3021
	Epidendreae II	Glomerinae	7	230
		Adrohizinae	2	3
		Polystachyinae	4	154
	Podochileae	Eriinae	10	701
		Podochilinae	6	140
		Thelasiinae	6	234
		Ridleyellinae	1	1
	Dendrobieae	Dendrobiinae	6	1147
		Bulbophyllinae	15	1116
	Vandaeae	Aeridinae	103	1253
Angraecinae		19	408	
Aerangidinae		36	307	

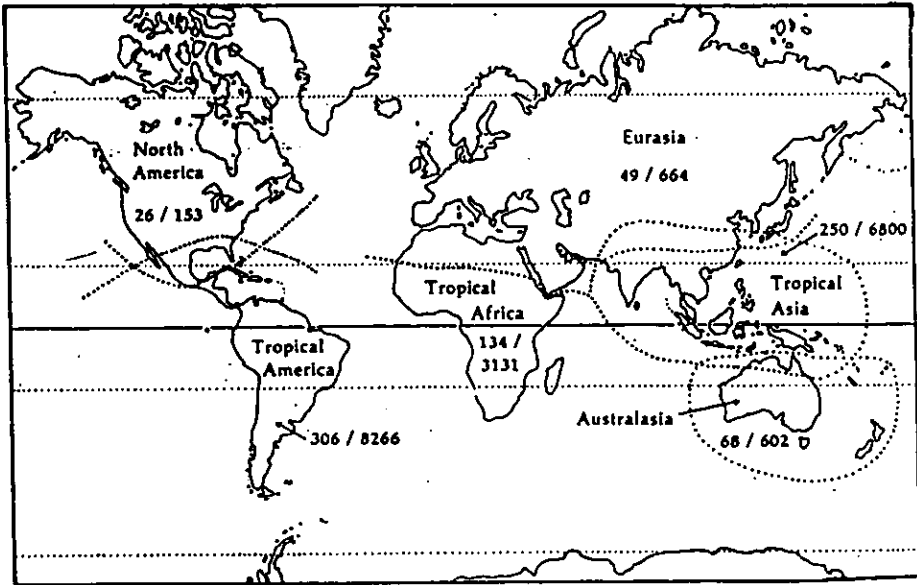


Figura 1. Regiones geográficas con mayor concentración de orquídeas.

La concentración de estas especies en los trópicos americanos varía con la altitud, encontrándose el mayor número de especies en México, Guatemala, Honduras, Colombia, Venezuela y Brasil (Figura 2).

En México las orquídeas se distribuyen principalmente en cuatro estados: Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero. Otros estados con una cifra considerable de especies son: Morelos, México, Michoacán y las regiones más bajas de Puebla y San Luis Potosí (Figura 3) (Wright, 1958).

La importancia económica de las orquídeas, radica en su uso ornamental debido a la belleza de sus flores apreciadas en todo el mundo.

A pesar de su gran abundancia, solo algunas especies han sido empleadas con otros fines. Así por ejemplo la vainilla (*Vainilla planifolia*), se utiliza ampliamente en la industria de alimentos y en la perfumería (Mc. Vaugh, 1985), debido a su alto contenido de principios aromáticos. En algunas culturas orientales se ha reportado el uso de los tubérculos de ciertas especies del género *Orchis* para la producción de harinas (salep) con propiedades reconstituyentes y analépticas (Ames y Correll, 1952; Zimmermann, 1959; Stoessl y Arditti, 1984). En la India, Turquía y el Tíbet, algunas especies de este mismo género se agregan al vino como alimento y por sus propiedades afrodisiacas (Zimmermann, 1959).

Otras especies son apreciadas por sus propiedades curativas; tal es el caso de *Angracum fragans* cuyas flores se han utilizado como calmante, diaforético, digestivo y expectorante (Zimmermann, 1959).

Las raíces de *Cypripedium reginae* (Valeriana Americana) se han utilizado desde mediados de siglo en América del Norte, por sus propiedades tranquilizantes (Stoessl y Arditti, 1984). *Nervilia purpurea* se emplea en la medicina tradicional de Taiwan (I-tiam-hong), para el tratamiento de heridas e hipertensión y *N. aragoana* para el tratamiento de crisis visceral, enfermedades pulmonares e hipertensión (Kikuchi *et al*, 1985).

El rizoma de *Gastrodia elata* se usa en la medicina China para promover la circulación sanguínea y para la cura de dolores de cabeza (Wu *et al.*, 1996). Los tubérculos de *Pleione bulbocodioides* se usan también en la medicina tradicional China para el tratamiento de tumores (Bai *et al.*, 1997).

La especie *Dendrobium nobile* ha sido utilizada desde tiempos ancestrales en China como tónico, antipirético, desordenes gastrointestinales (Onaka *et al.*, 1965; Miyazawa *et al.*, 1997) y para el tratamiento de la anorexia. Por último, algunas especies de *Cattleya*, con un alto contenido de tiramina (amina fenólica), se emplean en el tratamiento de hipotensión (Stoessl y Arditti, 1984).

En México algunas orquídeas gozan también de reputación folklórica como agentes medicinales. Entre estas especies se encuentran *Maxillaria densa* y *Scaphyglottis livida*. Ambas especies se utilizan para el tratamiento de dolores estomacales en la región de los Tuxtlas, Veracruz (Carmona, 1995).

Maxillaria densa (Lindley) (Sin: *Ornithidium densum* Lindley) (Figura 4) es una epífita que se distribuye en Guatemala, Honduras y México (Ames y Correll, 1952). En nuestro país se encuentra principalmente en la zona de los Tuxtlas, Estado de Veracruz.

El género *Maxillaria* Ruiz & Pavón, incluye además otras 249 especies distribuidas principalmente en México, Guatemala, Colombia, Brasil, Venezuela y la India (Ames y Correll, 1952). La especie *M. densa* es una planta algo colgante; el rizoma y la base del seudobulbo cubiertos por vainas café; los seudobulbos viejos están desfoliados. Los seudobulbos son elípticos u ovalados, comprimidos y carinados.

Las hojas solitarias, lineares a lineares-oblongadas, delgadas y coriáceas miden de 10 a 30 cm de largo y de 1.5 a 4 cm de ancho; el ápice es obtuso algo retuso y la base conduplicada.



Figura 4. *Maxillaria densa* Lindley.

La base posee muchos pedúnculos cortos con una flor, saliendo de la vaina que parcialmente cubre el seudobulbo. La flor es amarillo verdosa a rosa, y cerca de la vena central de los sépalos y pétalos es violeta clara; el labelo es morado, y los sépalos miden aproximadamente 1 cm de largo. Esta especie en particular tiene por hábitat la selva alta, y el bosque algo seco premontano a bosque mesófilo de montaña, a una altitud de 600 a 1450 m (Hietz y Hietz-Seifert, 1994).

Desde el punto de vista químico y biológico esta especie no ha sido objeto de estudio alguno.

Scaphyglottis livida (Lindley) (Figura 5) es una epífita que se distribuye en Guatemala, Honduras y México. Desde el punto de vista químico y biológico esta especie tampoco ha sido objeto de estudio alguno.

El género *Scaphyglottis* Poeppig & Endlicher incluye además otras 19 especies distribuidas en los trópicos de América (Ames y Correll, 1952). La especie *S. livida* se describe como una planta erecta, con tallos 2 a 3 veces ramificados, y cada rama con un seudobulbo fusiforme, delgado y costado; los seudobulbos llegan a medir hasta 10 cm de largo por 8 mm de diámetro y con 2 hojas. Las hojas son angostas y lineares, y miden de 4 a 12 cm de largo y de 3 a 4 mm de ancho, con ápice retuso. Las flores son escasas en el seudobulbo terminal y pequeñas con ovarios cortos de color verdoso-crema con líneas violetas.

Los pétalos y sépalos miden aproximadamente 2 mm de largo. Tiene por hábitat principalmente la selva alta y el bosque seco premontañero a bosque mesófilo de montaña, a una altitud de 600 a 1500 m (Hietz y Hietz-Seifert, 1994).



Figura 5. *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schlechter.

1.2 TRITERPENOIDES DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE

Los estudios relacionados con el metabolismo secundario de la familia de las orquídeas son relativamente escasos, y han permitido el aislamiento y la caracterización de compuestos aromáticos simples (Harborne y Williams, 1994), estilbenos y sus derivados biogénicos, principalmente los de tipo fenantreno, (Majumder y Laha, 1981; Majumder *et al.*, 1982; Majumder y Maiti, 1987; Veerajau, 1989; Harborne y Williams, 1994; Leong *et al.*, 1997, *inter alia*), alcaloides (Onaka *et al.*, 1965; Okamoto, *et al.*, 1966;), flavonoides (Williams, 1979; Williams *et al.*, 1994; Kuehnle *et al.*, 1997) lignanos, cromanos (Bai *et al.*, 1997) y triterpenoides (Kikuchi *et al.*, 1986; Kadota *et al.*, 1987; Majumder y Kar, 1989; Majumder y Pal, 1990; *inter alia*). De manera adicional, se ha determinado la composición de los aceites esenciales de algunas especies (Borg-Karlson y Groth, 1985; Bergstrom *et al.*, 1992).

De los compuestos antes mencionados quizás los más estudiados son los alcaloides, los estilbenoides y los triterpenoides.

Debido a que la mayoría de los metabolitos aislados en el presente trabajo son triterpenoides, se realizó una investigación bibliográfica detallada acerca de la distribución y variación estructural de este tipo de metabolitos presentes en las orquídeas. En la Tabla 1 se ilustran las estructuras de los distintos terpenoides aislados de orquídeas a la fecha.

Tabla 1. Triterpenoides aislados de la familia Orchidaceae.

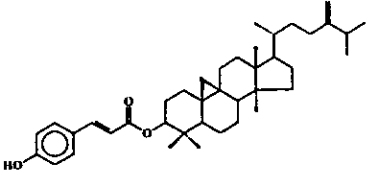
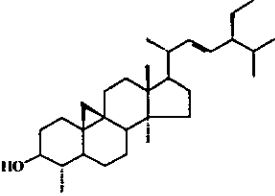
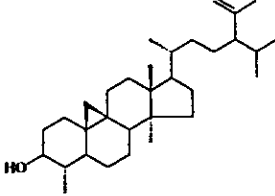
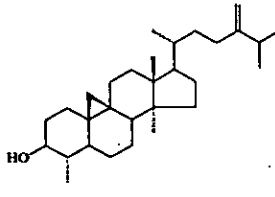
Especie	Compuesto	Referencia
<i>Cirrhopetalum elatum</i>	 <p data-bbox="494 467 635 502">Folidotin (1)</p>	Majumder y Pal; 1985
<i>Nervilia purpurea</i>	 <p data-bbox="475 770 660 804">Cyclonervilol (2)</p>	Kikuchi <i>et al.</i> , 1985
	 <p data-bbox="448 1077 689 1111">Cyclohomonervilol (3)</p>	
	 <p data-bbox="473 1376 672 1410">Cycloeucalenol (4)</p>	

Tabla 1. Triterpenoides aislados de la familia Orchidaceae (continuación).

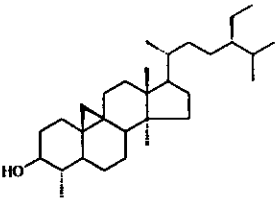
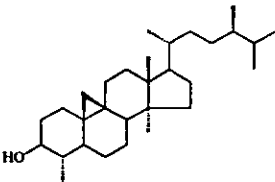
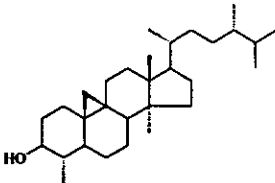
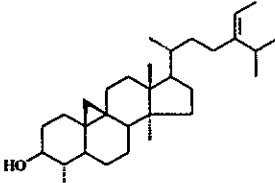
Especie	Compuesto	Referencia
<i>Nervilia purpurea</i>	 <p data-bbox="448 508 708 543">Dihidrociclonervilol (5)</p>	Kikuchi <i>et al.</i> , 1985
	 <p data-bbox="395 804 765 838">24(<i>R/α</i>)-dihidrocicloeucaenol (6)</p>	
	 <p data-bbox="395 1103 765 1137">24(<i>S/α</i>)-dihidrocicloeucaenol (7)</p>	
	 <p data-bbox="465 1402 691 1436">Ciclofuntumienol (8)</p>	

Tabla 1. Triterpenoides aislados de la familia Orchidaceae (continuación).

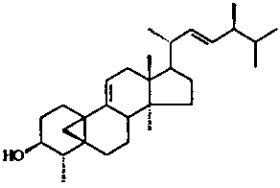
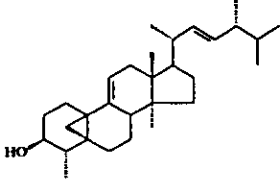
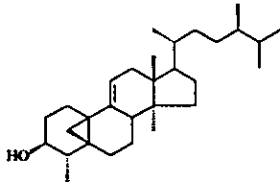
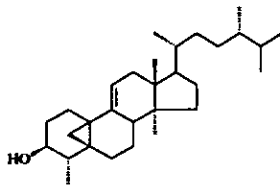
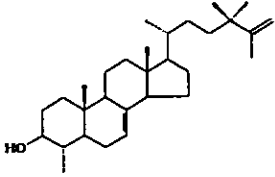
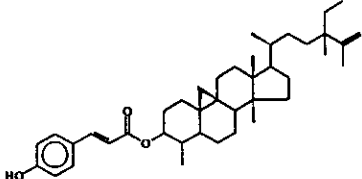
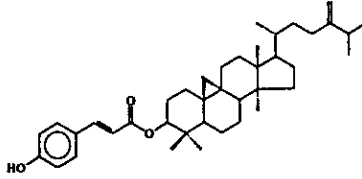
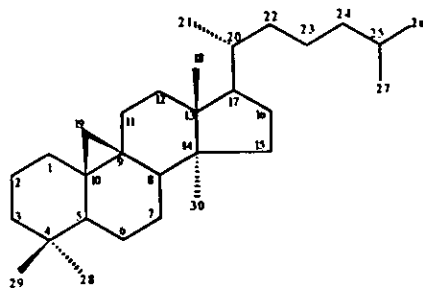
Especie	Compuesto	Referencia
<i>Nervilia purpurea</i>	 <p data-bbox="462 503 696 538">Cyclonervilasterol (9)</p>	Kikuchi <i>et al.</i> , 1986
	 <p data-bbox="418 794 745 828">24-<i>epi</i>-cyclonervilasterol (10)</p>	
	 <p data-bbox="449 1084 714 1118">Dihidrocyclonervila (11)</p>	
	 <p data-bbox="381 1383 782 1417">24-<i>epi</i>-dihidrocyclonervilasterol (12)</p>	

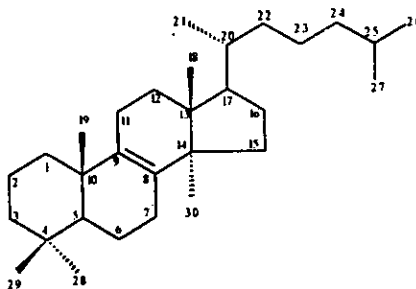
Tabla 1. Triterpenoides aislados de la familia Orchidaceae (continuación).

Especie	Compuesto	Referencia
<i>Eria convallarioides</i>	 <p data-bbox="514 491 650 526">Erianol (13)</p>	Majumder y Kar, 1989
<i>Coelogina uniflora</i>	 <p data-bbox="502 782 671 816">Uniflorina (14)</p>  <p data-bbox="517 1067 659 1101">Folidotin (1)</p>	Majumder y Pal, 1990

Como se desprende de las estructuras presentadas en la Tabla 1 los triterpenoides aislados de orquídeas tienen como núcleo base un cicloartano (15) o un lanostano (16).



Ciclolanostano (15)



Lanostano (16)

En ambos casos la modificación más común de estos núcleos es la sustitución de los hidrógenos del metileno en C-24 de la cadena lateral por uno ó dos grupos alquílicos saturados o insaturados. Estos grupos incluyen metilos (compuestos 6, 7, 9-13); etilos (compuestos 2, 5, 14); metilenos (compuestos 1 y 4); etilenos (compuesto 8); e isopropilenos (compuesto 3). En el caso de una monosustitución la configuración absoluta en C-24 puede ser *R* ó *S*.

Otra modificación que se presenta con bastante frecuencia es la pérdida de uno de los metilos geminales en C-4. En todos los casos descritos se pierde el metilo β orientado (axial). Esta modificación estructural recién descrita corresponde a los compuestos 2 al 14 de la Tabla 1.

Como en la mayoría de los triterpenoides, los de las orquídeas presentan un grupo hidroxilo en la posición C-3, β orientado. En ocasiones este hidroxilo se encuentra esterificado por un residuo de ácido *p*-hidroxi-cinámico (compuestos 1 y 14).

Estos compuestos también pueden presentar una porción insaturada tanto en el núcleo tetracíclico como en la cadena lateral. En el tetraciclo las insaturaciones se pueden encontrar en las posiciones 7(8) (compuesto 13) ó 9(11) (compuestos 9-12). En la cadena lateral las dobles ligaduras se encuentran entre 25(26) (compuestos 13 y 14) ó 22(23) (compuestos 2, 9 y 10).

Por último, cabe mencionar que se han descrito ejemplos en los cuales el ciclopropilo se establece entre los carbonos 5,19, en lugar de 9,19; (compuestos 9-12).

Los triterpenoides de las orquídeas se encuentran presentes como mezclas de difícil separación. Generalmente se aíslan como sólidos cristalinos blancos y ópticamente activos.

Para la elucidación estructural de estos triterpenoides se han utilizado principalmente métodos espectroscópicos y químicos. Los métodos espectroscópicos y espectrométricos han demostrado ser la mejor herramienta para la caracterización de los mismos. De manera particular, la resonancia magnética nuclear de alta resolución (RMN), unidimensional y bidimensional, son las técnicas más utilizadas (Kikuchi *et al.*, 1985; Majumder y Pal; 1985; Majumder y Pal, 1990; *inter alia*).

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Las plantas utilizadas en las prácticas medicinales populares de diversas regiones del mundo, constituyen un punto de partida importante para el descubrimiento de nuevos principios activos de interés en la terapéutica y en la industria agroquímica (Ghisalberti, 1993; Hosttetmann y Hamburger, 1993; Cox y Balick, 1994; Tanira *et al.*, 1994; Kinghorn *et al.*, 1995).

De acuerdo a un inventario reciente realizado por investigadores del Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH), en México existen alrededor de 3015 especies medicinales, las cuales son utilizadas por la población para tratar la sintomatología de los padecimientos más comunes (Bye y Estrada, 1995). Sin embargo, un porcentaje mínimo de esas especies ha sido objeto de estudios químicos y biológicos conducentes al aislamiento de principios activos de interés medicinal o agroquímico (Bye y Estrada, 1995).

De lo anterior se desprende que, el potencial que ofrecen las plantas usadas en las prácticas médicas populares de México como una fuente de nuevos y/o conocidos principios activos, aún no se ha explorado adecuadamente. Afortunadamente, hoy día el interés científico por el estudio de las plantas medicinales ha cobrado fuerza en México y es cada vez más notable la incorporación del esquema de trabajo multidisciplinario en los programas de estudio que se conducen en los distintos centros de investigación del país.

En este contexto, recientemente se demostró la potencialidad espasmolítica de una serie de extractos derivados de orquídeas mexicanas medicinales, mediante la evaluación *in vitro* del efecto de las mismas sobre la contractilidad espontánea del íleon aislado de rata. *Maxillaria densa* y *Scaphyglottis livida* son dos de las especies que demostraron una actividad espasmolítica significativa. En ambos casos se realizó el estudio biodirigido de los extractos activos. Este proceso condujo al aislamiento de una serie de compuestos de naturaleza estilbenoide como los principios activos responsables de la actividad biológica demostrada (Estrada *et al.*, 1998).

Sin embargo, a la fecha no se ha explorado otras actividades biológicas de los extractos crudos de estas orquídeas. Tampoco se han realizado estudios tendientes a investigar de manera detallada el contenido metabólico de estas especies.

Con base en estas consideraciones el presente proyecto de tesis pretende, por una parte, determinar el potencial alelopático de las orquídeas *Maxillaria densa* y *Scaphyglottis livida* con la intención de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas verdes, en el caso de demostrar la presencia de principios fitotóxicos en las orquídeas mencionadas. Por otra parte, este proyecto pretende estudiar desde el punto de vista fitoquímico las fracciones no espasmolíticas detectadas en investigaciones previas, con la finalidad de contribuir al conocimiento del contenido metabólico secundario de las orquídeas mexicanas.

El conocimiento del contenido metabólico de las plantas medicinales, es de gran importancia para el desarrollo de procedimientos de control de la calidad de materias primas, y para determinar la presencia de sustancias tóxicas diferentes a los principios activos responsables de los efectos terapéuticos útiles.

Referente al primer objetivo general, es importante destacar que la búsqueda de herbicidas verdes se encuentra ampliamente justificada ya que, si bien es cierto que el uso de herbicidas sintéticos ha sido una herramienta eficiente para el control de las plantas nocivas que afectan a los cultivos económicamente importantes, también es cierto que estos productos han ocasionado daños enormes e irreversibles a los ecosistemas naturales y agroecosistemas. Los daños más importantes son su alta toxicidad, los altos índices de persistencia y la inducción de un gran número de especies resistentes (Duke, 1988; Cremllyn, 1991). En contraste, los productos naturales son biodegradables, presentan mecanismos de acción más específicos y son efectivos a bajas concentraciones (Benner, 1993; Rodgers, 1993; Macías, 1996). En consecuencia, la búsqueda de nuevos herbicidas de origen natural se encuentra ampliamente justificado.

Los objetivos particulares planteados para el desarrollo del presente trabajo se indican a continuación:

- 1.- Preparar los extractos de las plantas enteras de *Maxillaria densa* y *Scaphyglottis livida*, empleando como disolvente CHCl_3 -MeOH (1:1).
- 2.- Determinar la potencialidad fitotóxica de los extractos crudos mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radicular y la germinación de semillas de dos especies vegetales [*Amaranthus hypochondriacus* (*Amararantaceae*) y *Echinochloa crusgalli* (*Gramineae*)], utilizando el método de la caja Petri.
- 3.- Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto crudo mediante un proceso de cromatografía en columna abierta. Para determinar la actividad herbicida se seguirá el mismo procedimiento indicado en el inciso 2.
- 4.- Separar y purificar los compuestos de menor polaridad (no espasmolíticas) de las fracciones fitotóxicas.
- 5.- Identificar los compuestos aislados mediante el empleo de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal (planta entera) correspondiente a *Scaphyglottis livida* se recolectó en el Ejido Ruiz Cortínez, Catemaco estado de Veracruz, México, en el mes de mayo de 1995..

En el caso de *Maxillaria densa*, el material vegetal se recolectó en el mismo lugar durante el mes de julio de 1996. La clasificación botánica de estas especies y la recolección estuvo a cargo del Biólogo Gustavo Carmona Díaz. Ejemplares de referencia se depositaron en el herbario del Instituto de Ecología A.C. (XAL), Jalapa, Veracruz.

El proceso de desecación del material vegetal se realizó a temperatura ambiente, y la fragmentación del mismo se llevó a cabo en un molino Willey Modelo 4.

3.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES

3.2.1 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en columna abierta se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice Merck 60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM. Para los análisis cromatográficos cualitativos y preparativos en capa fina, se emplearon placas de aluminio con un espesor de 0.25 mm (Silica gel 60 F₂₅₄ Merck) y placas de vidrio

(20x20 cm) recubiertas de gel de sílice de 2.0 ó 0.25 mm de espesor (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck), respectivamente. En ambos casos se utilizaron diversos sistemas de elución y agentes cromógenos, los cuales se enlistan en los Cuadros 2 y 3 respectivamente.

Cuadro 2. Sistemas de elución utilizados para los análisis cualitativos en capa fina.

Sistema de eluyentes	Composición	Proporción
A	Hexano-CHCl ₃	Diversas
B	Hexano-AcOEt	Diversas
C	Benceno-CHCl ₃	Diversas
D	Benceno-AcOEt	Diversas
E	CHCl ₃ -AcOEt	Diversas
F	CHCl ₃ -MeOH	Diversas
G	AcOEt-MeOH	Diversas

Cuadro 3. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Reactivos	Agente cromógeno	Referencia
Sulfato cérico*A	12.0 g de sulfato cérico 22.2 mL de ácido sulfúrico concentrado 350 g de hielo picado.	Lowery <i>et al.</i> , 1993
Acido sulfúrico*	90 mL de agua destilada 10 mL de H ₂ SO ₄ (conc.)	Bevan <i>et al.</i> , 1965

* En todos los casos antes de revelar con el cromógeno A, se procedió a visualizar las placas con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm); para el desarrollo del color fue necesario calentar por dos minutos a 110 °C aproximadamente.

3.2.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599-B o en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr o película.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- ^1H) y de Carbono-13 (RMN- ^{13}C) se generaron en un aparato Varian VXR-3005, el cual se operó a una frecuencia de 300 ó 500 MHz, respectivamente. Los espectros se obtuvieron utilizando como disolvente CDCl_3 y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear (^1H - ^1H COSY) y heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR).

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Hewlet-Packard 5890-B mediante introducción directa a 70 eV.

Los análisis de difracción de Rayos X se realizaron en un difractómetro Siemens P4/PC.

Todos los análisis antes indicados se efectuaron en el Instituto de Química de la UNAM.

Los análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), se realizaron en un cromatógrafo de gases HP acoplado a un espectro de masas medelo Jeol JMS-SX 102 A, mediante la inyección de 0.1 μL de cada una de las muestras de prueba en una columna capilar PAS-1701-Tested Silicone HP5. Se utilizó helio como gas acarreador a una presión manométrica de 0.4 Kg/cm^2 y con un flujo de 1 mL/min . La temperatura del inyector se mantuvo en 280 $^{\circ}\text{C}$; la temperatura inicial de la columna fue de 150 $^{\circ}\text{C}$ y se programó para alcanzar una temperatura de 260 $^{\circ}\text{C}$ con un calentamiento gradual de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Para los registros de los espectros de masas para el impacto electrónico se utilizaron como condiciones experimentales un voltaje de 70 eV. Cada uno de los espectros se registró con un barrido de 50 a 800 unidades de masa/carga (m/z) por segundo.

Los estudios de CG-EM se efectuaron en la Unidad de Servicios en Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM.

3.3 OBTENCION DE LOS DERIVADOS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Preparación de los derivados acetilados

Para obtener los derivados acetilados de los compuestos, se utilizaron 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 horas y al término de este tiempo los productos acetilados fueron separados de la manera convencional (Shriner *et al.*, 1980; Pavia *et al.*, 1995).

3.4 EVALUACIONES BIOLOGICAS

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FITOINHIBIDORA

Método de caja de Petri

La actividad fitotóxica de los extractos, compuestos puros y derivados se determinó midiendo el efecto de los mismos sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (*Amarantaceae*) y *Echinochloa crusgalli* (*Gramineae*), de acuerdo a la metodología previamente descrita en la literatura (Anaya *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1992).

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro interno. De cada una de las muestras de prueba (extracto o compuesto) se prepararon disoluciones con CHCl_3 o CHCl_3 -MeOH (1:1) de forma tal de obtener concentraciones finales de 1000, 100, y 10 $\mu\text{g/mL}$; 1 mL de cada una de estas

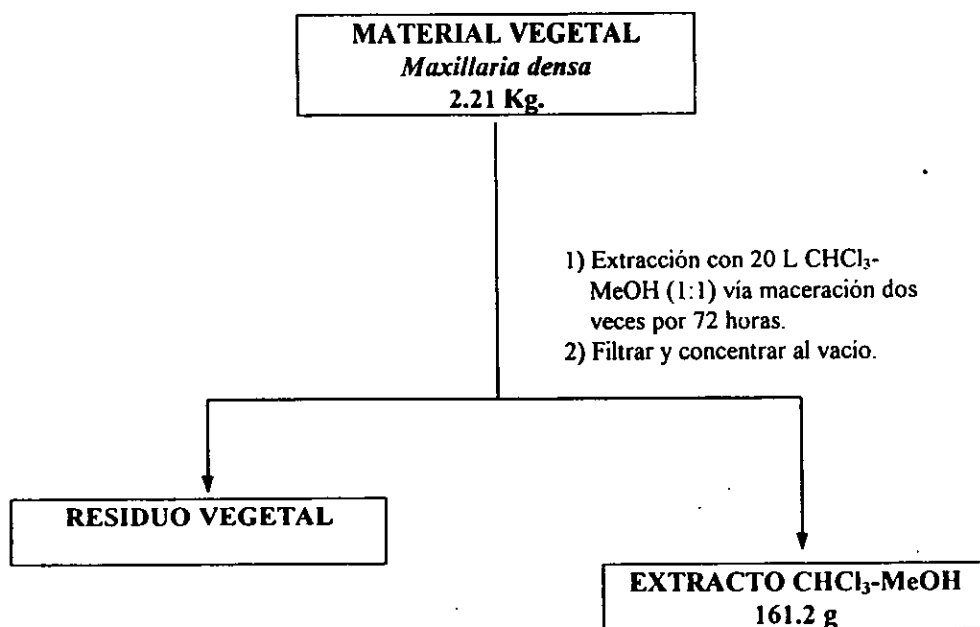
disoluciones se vertieron en las cajas de Petri sobre un disco de papel filtro (Whatman N° 1). El disolvente se evaporó mediante una corriente de aire. Posteriormente, se inició la germinación de 10 semillas de la especie vegetal de prueba, humedeciendo el papel filtro con 3 mL de agua destilada. El mismo procedimiento se utilizó para los controles negativos que contenían únicamente el disolvente y agua destilada y para el control positivo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Sigma). Las cajas Petri se mantuvieron en la oscuridad a 30 °C, y la actividad fitotóxica se registró midiendo la inhibición de la germinación y la longitud de las radículas después de 24 horas de incubación en el caso de *Amaranthus hypochondriacus* y 48 horas después en el caso de *Echinochloa crusgalli*. Se trabajaron tres réplicas por tratamiento en las muestras de prueba y en los controles.

Los resultados obtenidos, se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA, ($p < 0.05$). Los valores de la concentración inhibidora media (CL_{50}) se determinaron mediante un análisis Probit a partir de los porcentajes de inhibición calculados.

3.5 ESTUDIO FITOQUIMICO DE *Maxillaria densa*

3.5.1 EXTRACCION DE LA PLANTA ENTERA

El material seco y molido fue de 2.21 Kg los cuales se extrajeron mediante un proceso de maceración con 20 litros de una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). Este proceso permitió la obtención de 161.2 g de extracto crudo. En el Esquema 1 se resume el procedimiento empleado.



Esquema 1. Proceso de extracción de la planta entera *Maxillaria densa*.

3.5.2 FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO TOTAL

El extracto total (161.2 g) se fraccionó en una columna cromatográfica de vidrio, utilizando como adsorbente 775.0 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetato de etilo (diversas proporciones), acetato de etilo, y acetato de etilo-metanol (diversas proporciones). Se recolectaron 215 fracciones de 600 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este proceso generó un total de 16 fracciones primarias. En el Cuadro 4 se resume el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto total de la planta entera de *Maxillaria densa*. Cada una de las fracciones resultantes se evaluó mediante los bioensayos indicados en el inciso 3.4.

3.5.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS

3.5.3.1 Aislamiento y purificación del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18) bajo la forma de sus acetil derivados (17a) y (18a) de la fracción primaria MD-E

De la fracción primaria MD-E (1.80 g)(Cuadro 4) precipitaron de manera espontánea 1.9 g de un sólido blanco, con un punto de fusión de 115-124 °C. El producto cristalino resulto una mezcla constituida por dos compuestos mayoritarios de acuerdo al análisis por cromatografía de masas acoplado a espectrometría de

masas (CG-EM). Para intentar la separación de los dos compuestos mayoritarios presentes en la mezcla se trataron 550.0 mg de la misma con anhídrido acético y piridina de acuerdo al procedimiento descrito en el inciso 3.3.2. Como resultado de este proceso se obtuvieron 811 mg de mezcla acetilada. Posteriormente, la mezcla se recromatografió en una columna abierta de gel de sílice (60 g) impregnada al 10 % con nitrato de plata (AgNO_3). El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano-cloroformo (diversas proporciones), cloroformo y acetato de etilo. Se recolectaron un total de 173 fracciones de 25 mL cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que presentaron homogeneidad cromatográfica. El proceso generó un total de 13 grupos de fracciones secundarias. En el Cuadro 5 se resume este proceso cromatográfico.

De la fracción secundaria MD-E8 precipitaron de manera espontánea 150.2 mg de un sólido cristalino de color blanco con un punto de fusión de 200-205 °C. Sucesivas cromatografías de este sólido en capa delgada de gel de sílice impregnadas con nitrato de plata, permitieron la separación del acetato del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ilo (17a) y del acetato del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ilo (18a), en forma cristalina. Posteriormente ambos compuestos se sometieron a un análisis de difracción por Rayos X.

Cuadro 4. Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la planta entera *Maxillaria densa*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-10	1-14	MD-A	1.24
Hexano-AcOEt	95-05	11-32	15-28	MD-B	1.92
	90-10	33-56	29-34	MD-C	0.44
	85-15	57-108	35-36	MD-D	1.02
	80-20	109-126	37-48	MD-E	1.80
	75-25	127-129	49-52	MD-F	1.42
	70-30	130-151	53-62	MD-G	6.25
	60-40	152-168	63-71	MD-H	4.29
	50-50	169-184	72-84	MD-I	1.80
	40-60	185-191	85-95	MD-J	5.78
	30-70	192-198	96-112	MD-K	5.20
	20-80	199-204	113-126	MD-L	4.53
			127-146	MD-M	9.60
		147-170	MD-N	12.05	
AcOEt	100	205-210	171-209	MD-O	31.39
AcOEt-MeOH	50-50	211-215	210-215	MD-P	58.66

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción MD-E de *Maxillaria densa*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-18	1-31	MD-E1	6.1
Hexano-CHCl ₃	95-05	19-31	32-47	MD-E2	1.6
	90-10	32-48	48-55	MD-E3	7.5
	85-15	49-93	56-62	MD-E4	9.1
	80-20	94-130	63-75	MD-E5	12.1
	70-30	131-148	76-86	MD-E6	7.3
			87-108	MD-E7	150.2
			109-130	MD-E8	18.0
			131-141	MD-E9	5.0
			142-148	MD-E10	6.0
	CHCl ₃	100	149-165	149-155	MD-E11
156-164				MD-E12	33.3
AcOEt	100	166-173	165-173	MD-E13	42.3

3.5.3.2 Detección del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de eicosilo (19); 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de uneicosilo (20); 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21) y 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de tetraeicosilo (22) en la fracción primaria MD-F

De la fracción primaria MD-F (1.42 g) (Cuadro 4), precipitaron de manera espontánea 61.1 mg de un sólido blanco (mezcla MD-F1). El análisis por CG-EM indicó que el sólido está constituido por cuatro compuestos que se caracterizaron como el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de eicosilo (19); el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de uneicosilo (20); el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21) y el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de tetraeicosilo (22).

3.5.3.3 Aislamiento y purificación del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21) de la mezcla MD-F1

La separación y purificación del producto mayoritario se realizó mediante la aplicación de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando un sistema cromatográfico Waters integrado a una bomba modelo 600, un detector de luz ultravioleta (214 nm) y una columna preparativa de fase normal (μ Porasil; 3.9 x 300 mm, diámetro de partícula igual a 10 mm, irregular). En este análisis la fase móvil estuvo constituida por hexano-metanol (9:1), con un flujo de 0.25 mL/min. durante 25 min. (Figura 6a). Este proceso permitió la obtención del producto 21, con un punto de fusión de 60-63°C.

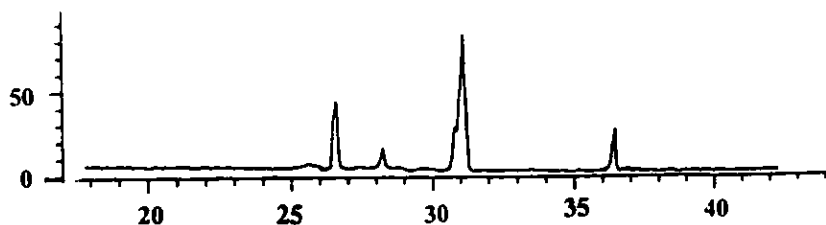


Figura 6. Cromatograma de gases de la mezcla MD-F1.

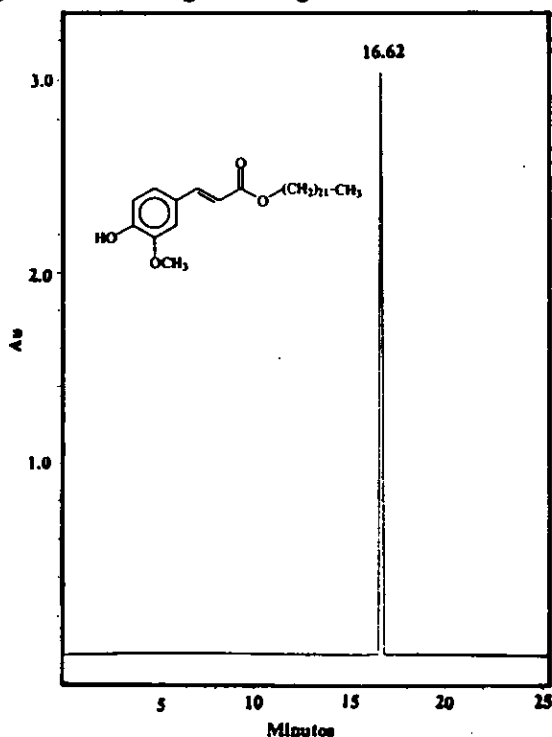


Figura 6a. Cromatograma obtenido por HPLC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doecisilo (21). (Detector de luz ultravioleta, columna preparativa de fase normal (μ Porasil; 3.9 x 300 mm, diámetro de partícula igual a 10 mm, irregular) y flujo de 0.25 mL/min.)

3.5.3.4 Aislamiento del sitosterol (23) de la fracción primaria MD-G

De la fracción primaria MD-G (6.25 g) (Cuadro 4), cristalizaron espontáneamente 57.8 mg de un sólido cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 140-143 °C, identificado como sitosterol por comparación con una muestra auténtica.

3.6 ESTUDIO FITOQUIMICO DE *Sacaphyglottis livida*

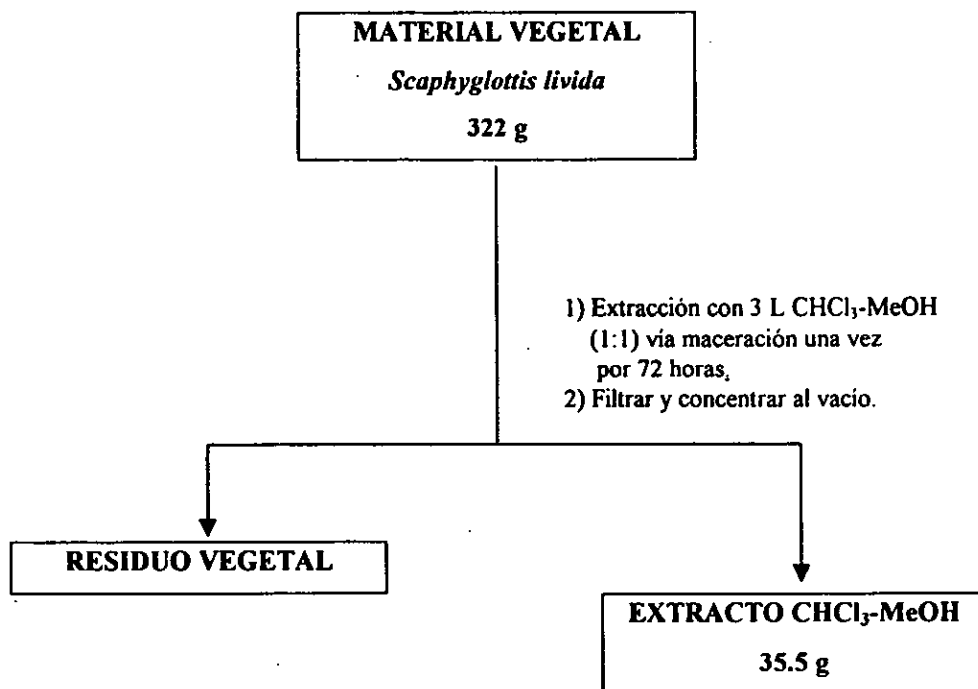
3.6.1. EXTRACCION DE LA PLANTA ENTERA

El material seco y molido (322 g) se extrajo mediante un proceso de maceración con 3 litros de una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). Este proceso permitió la obtención de 35.5 g de extracto crudo. En el Esquema 2 se resume el procedimiento empleado.

3.6.2 FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO TOTAL

Al igual que en el caso de *Maxillaria densa* el extracto total (35.5 g) se fraccionó en una columna cromatográfica abierta, utilizando como adsorbente 120 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetato de etilo (diversas proporciones), acetato de etilo, y acetato de etilo-metanol (diversas proporciones). Se recolectaron 235 fracciones de 100 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose todas aquellas que resultaron

cromatográficamente similares. Este proceso generó un total de 8 fracciones primarias. En el Cuadro 6 se resume el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto total de la planta entera de *Scaphyglottis livida*. Cada una de las fracciones resultantes se evaluó mediante los bioensayos indicados en el inciso 3.4.



Esquema 2. Proceso de extracción de la planta entera *Scaphyglottis livida*.

Cuadro 6. Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la planta entera *Scaphyglottis livida*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
Hexano	100	1-6	1-7	SL-A
Hexano-AcOEt	95-05	7-23	8-11	SL-B
	90-10	24-74	12-23	SL-C
	85-15	75-105	24-26	SL-D
	80-20	106-138	27-42	SL-E
	70-30	139-154	43-191	SL-F
	60-40	155-162		
	50-50	163-181		
	25-75	182-189		
AcOEt	100	190-204	192-209	SL-G
AcOEt-MeOH	90-10	205-212	210-235	SL-H
	80-20	213-220		
	70-30	221-226		
	50-50	227-235		

3.6.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS

3.6.3.1 Aislamiento y purificación del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24) (cicloneolitsol) de la fracción primaria SL-D

De la fracción primaria SL-D (0.40 g) (Cuadro 6), precipitaron espontáneamente 24.9 mg de un sólido cristalino el cual se caracterizó como el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24). Adicionalmente precipitaron 180 mg de un sólido amorfo de color blanco, constituido por tres compuestos mayoritarios de acuerdo al análisis por CG-EM. Con la finalidad de separar los compuestos presentes en este último, siguiendo un razonamiento similar al expuesto para el caso de la fracción MD-E de *M. densa*, se decidió derivatizar los productos presentes por un tratamiento de la mezcla 150 mg con anhídrido acético y piridina, de acuerdo al procedimiento descrito en el inciso 3.3.2. Como resultado de este proceso se obtuvieron 220 mg de mezcla acetilada.

Posteriormente, la mezcla se recromatografio en una columna abierta de gel de sílice (60 g) impregnada al 10 % con nitrato de plata (AgNO₃). El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano-cloroformo (diversas proporciones), cloroformo y acetato de etilo. Se colectaron un total de 243 fracciones de 25 mL cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares en el análisis por cromatografía en capa fina. El proceso generó un total de 13 grupos de fracciones secundarias. En el Cuadro 7 se resume este proceso cromatográfico.

Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción SL-D de *Scaphyglottis livida*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-19	1-49	SL-D1	6.6
Hexano-CHCl ₃	98-02	20-38	50-57	SL-D 2	5.5
	96-04	39-51	58-74	SL-D3	1.9
	92-08	52-78	75-80	SL-D4	0.1
	90-10	79-198	81-94	SL-D5	9.8
	87-13	199-222	95-103	SL-D6	2.5
	85-15	223-234	104-112	SL-D7	0.7
			113-124	SL-D8	3.5
			125-127	SL-D9	14.8
			128-141	SL-D10	
			142-166	SL-D11	55.6
			167-193	SL-D12	
	CHCl ₃	100	235-239	194-243	SL-D13
AcOEt	100	240-243			

De la fracción SL-D10, cristalizaron adicionalmente de manera espontánea 13.6 mg de un producto cristalino de color blanco con un punto de fusión de 142-144 °C, el cual se caracterizó como el acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24a).

3.6.3.2 Aislamiento y purificación del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18) bajo la forma de sus acetil derivados (17a) y (18a) de la fracción secundaria SL-D12

De la fracción secundaria SL-D12 (Cuadro 7), precipitó de manera espontánea 19.1 mg de un sólido cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 203-205 °C. El análisis por CG- EM indicó que el sólido está conformado por dos constituyentes que se caracterizaron como: el acetato del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ilo (17a) y el acetato del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ilo (18a), por comparación con los constituyentes aislados de *Maxillaria densa* en el presente estudio.

3.6.3.3 Aislamiento y purificación de la mezcla de triterpenoides SL-E1 de la fracción primaria SL-E

La fracción primaria SL-E (1.5 g) (Cuadro 6) se recromatografió en una columna abierta sobre 20 g de gel de sílice. El procedimiento de elución se llevó a cabo con hexano, hexano-cloroformo (diversas proporciones), cloroformo, cloroformo-acetato de etilo (diversas proporciones), y acetato de etilo. Se obtuvieron un total de 237 fracciones de 10 mL cada una, uniéndose aquellas cromotográficamente similares. El proceso generó 14 grupos de fracciones secundarias en el Cuadro 8 se resumen los resultados obtenidos de este procedimiento cromatográfico.

De la fracción secundaria SL-E9, precipitaron espontáneamente 25.8 mg de un sólido de color amarillento, con un punto de fusión de 250-253 °C. El análisis por CG-EM indicó que el sólido está constituido por dos metabolitos secundarios de naturaleza triterpenoide. La separación y purificación de los productos se encuentra en proceso y para ello, se está utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción SL-E de *Scaphyglottis livida*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
Hexano	100	1-14	1-22	SL-E1
Hexano-CHCl ₃	90-10	15-27	23-29	SL-E2
	80-20	28-42	30-40	SL-E3
	70-30	43-55	41-55	SL-E4
	60-40	56-90	56-64	SL-E5
	50-50	91-108	65-89	SL-E6
	40-60	109-126	90-107	SL-E7
	30-70	127-139	108-133	SL-E8
	20-80	140-149	134-165	SL-E9
CHCl ₃	100	150-171	166-171	SL-E10
CHCl ₃ -AcOEt	95-05	172-183	172-189	SL-E11
	90-10	184-193	190-225	SL-E12
	80-20	194-203	226-227	SL-E13
	70-30	204-214	228-235	SL-E14
	60-40	215-222		
	50-50	223-229		
	25-75	230-234		
AcOEt	100	235-237		

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

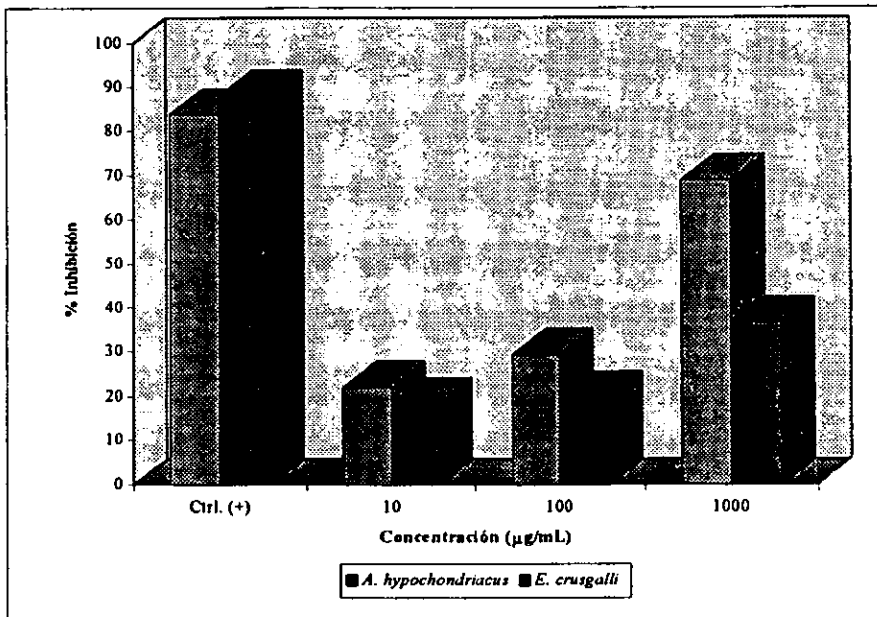
4.1 Estudio fitoquímico de *Maxillaria densa*

La preselección de la especie *Maxillaria densa* se realizó con base en el criterio etnomédico el cual, constituye uno de los criterios más importantes para seleccionar materias primas destinadas al descubrimiento de sustancias biológicamente activas. Posteriormente, durante la realización de los ensayos biológicos preliminares conducentes a la determinación de la potencialidad inhibidora del crecimiento vegetal del extracto crudo de la planta entera de *M. densa*, se comprobó que el mismo contiene sustancias capaces de modificar el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Los resultados obtenidos de la determinación del efecto del extracto crudo se resumen en la Tabla 2 y Gráfica 1. De los mismos se infiere que, el extracto crudo de *M. densa* inhibe de manera significativa el crecimiento radicular de la especie *A. hypochondriacus* y en un menor grado, pero de manera importante el de *E. crusgalli*.

Con base en los resultados de las evaluaciones biológicas preliminares, se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico de *M. densa* con la finalidad de aislar los principios activos responsables de la actividad fitotóxica, además de contribuir con los estudios referentes al contenido metabólico de las orquídeas mexicanas.

Tabla 2. Efecto fitotóxico del extracto crudo de *M. densa* sobre el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Concentración (ppm)	% Inhibición	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
10	22.0	18.5
100	29.5	20.1
1000	69.0	36.5
Control positivo 2,4-D (5 µg/mL)	83.6	88.0
CL ₅₀	271.1 ppm	>1000 ppm



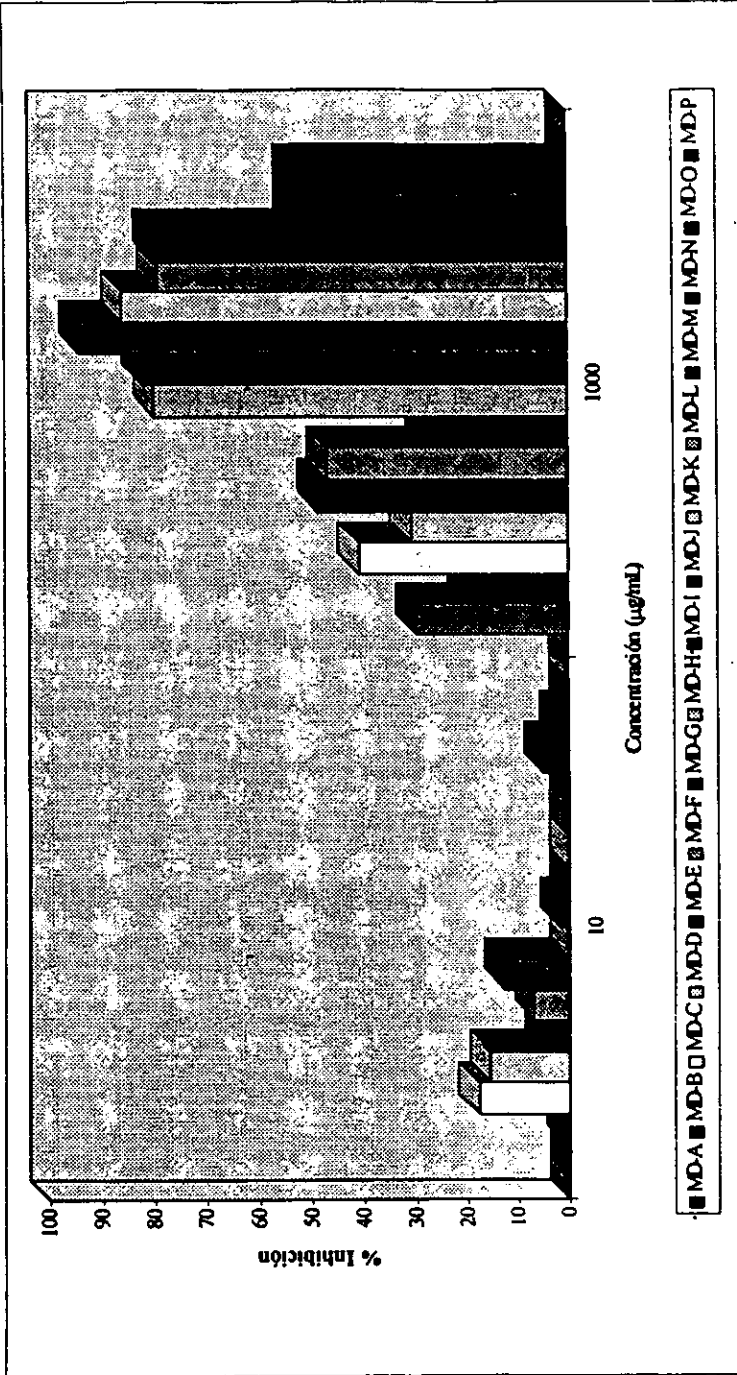
Gráfica 1. Inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* inducido por el extracto crudo de *M. densa*.

La preparación del extracto en gran escala, se realizó mediante un proceso de maceración tal como se indica en la sección experimental (Inciso 3.6.1). Posteriormente, el extracto se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 16 fracciones primarias (Cuadro 4).

Las fracciones primarias se evaluarón nuevamente para monitorear la actividad inhibidora del crecimiento vegetal (sección experimental 3.4.1). Los resultados de estas determinaciones se resumen en la Tabla 3 y Gráfica 2.

Tabla 3. Efecto fitotóxico de las fracciones obtenidas de *M. densa* sobre el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus*.

Fracción	% Inhibición	
	10 ppm	1000 ppm
MD-A	0	30
MD-B	1	20
MD-C	18	41
MD-D	16	31
MD-E	5	49
MD-F	7	47
MD-G	13	28
MD-H	0	80
MD-I	2	82
MD-J	0	94
MD-K	0	86
MD-L	0	79
MD-M	0	80
MD-N	5	53
MD-O	2	53
MD-P	0	0
Control positivo 2,4-D (5µg/mL)	82.0	



Gráfica 2. Inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* inducido por las fracciones primarias de *M. densa*.

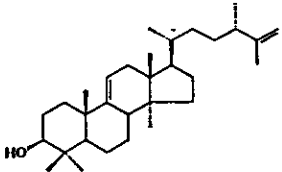
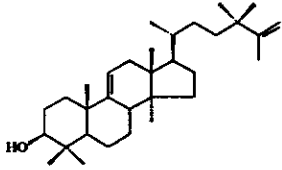
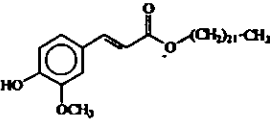
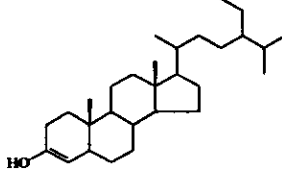
Algunas de las fracciones activas (MD-E y MD-F) derivadas del fraccionamiento primario, se sometieron a diversos procedimientos cromatográficos (Inciso 3.2.1), lo cual permitió el aislamiento de dos compuestos de naturaleza triterpenoide [(24S)-24metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17), 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18)] y un fenil propanoide [4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21)].

Los triterpenoides se aislaron bajo la forma de sus acetyl derivados 17a y 18a, respectivamente. Cabe destacar que el fenil propanoide aislado constituye un nuevo producto natural.

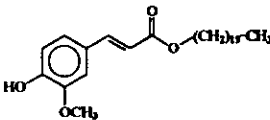
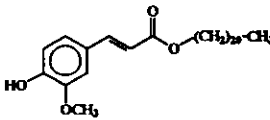
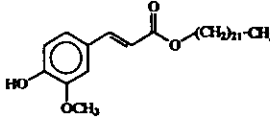
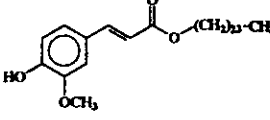
En el Cuadro 9 se indican las estructuras de los compuestos aislados y sus rendimientos correspondientes.

De manera adicional, el análisis de la fracción secundaria MD-F1 (Cuadro 5) mediante el método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), permitió la detección de 3 metabolitos adicionales de tipo fenil propanoide. Los cuatro compuestos se identificaron mediante el análisis de los espectros de masas como el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de eicosilo (19), el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de uneicosilo (20), el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21), y el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de tetraeicosilo (22). En el Cuadro 10 se indican sus tiempos de retención y rendimientos.

Cuadro 9. Metabolitos aislados de la especie *Maxillaria densa*.

Compuesto	Fracción	Rendimiento
 <p>(24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17)</p>	MD-E	0.33 %
 <p>24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (18)</p>	MD-E	0.35 %
 <p>4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docicosilo (21)</p>	MD-F1	0.06 %
 <p>Sitosterol (23)</p>	MD-G	0.26 %

Cuadro 10. Tiempo de retención y porcentaje de los componentes de la fracción secundaria MD-F1, de acuerdo al análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Compuesto	Tiempo de retención (min).	Rendimiento
 <p>4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de eicosilo (19)</p>	26.45	0.06 %
 <p>4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de unicosilo (20)</p>	28.00	0.008 %
 <p>4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docosilo (21)</p>	30.2	0.1 %
 <p>4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de tetracosilo (22)</p>	36.58	0.04 %

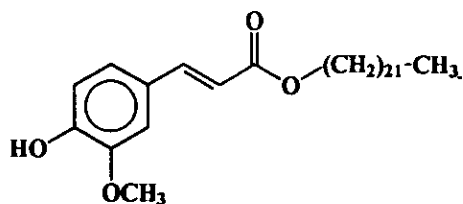
El espectro de masas generado por el metabolito de tiempo de retención en 30.2 min resultó idéntico al compuesto 21, separado posteriormente de esta fracción mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), como se indicó en la sección experimental (inciso 3.6.3.3). Cabe destacar que el resto de los metabolitos detectados en la fracción MD-F1, al igual que el compuesto 21, constituyen nuevos productos naturales.

En general, los compuestos aislados se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectrométricas y espectroscópicas convencionales, así como de métodos químicos. En el caso de los dos triterpenoides (24*S*)-24metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18), sus estructuras se confirmaron inequívocamente mediante un análisis de difracción de Rayos X de los derivados acetilados.

4.1.1 Caracterización del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21)

El 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21) se obtuvo de la fracción activa MD-F1 mediante la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Es importante mencionar que este fue el único metabolito posible de separar de la fracción MD-F1. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del nuevo producto natural se resumen en las Tablas 4-6.

Tabla 4. Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).



Fórmula molecular	C ₃₂ O ₄ H ₅₄
Peso molecular	502
Punto de fusión	60-63 °C
IR $\nu_{\text{máx}}$ KBr cm^{-1} (Espectro 1)	3430, 2925, 2854, 1712, 1633, 1471, 1270, 1161, 725
EMIE m/z (int. rel.) (Espectro 2)	502 [M ⁺ (100)], 501 (16), 474 (5), 405 (3), 331 (3), 282 (3), 223 (4), 194 (10), 177 (13), 150 (5)

Tabla 5. Datos de RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃, ppm) del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doceosilo (21).

Protón	4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doceosilo (21)
H ₃ -22'	0.88 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.0 Hz)
H ₂ -1'	4.19 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.0 Hz)
H ₂ -2'	1.69 (<i>m</i> , <i>J</i> =7.2 Hz)
H ₂ (3'-21')	1.25 (<i>Sa</i>)
H-2	7.03 (<i>d</i> , <i>J</i> =2.5 Hz)
H-5	6.91 (<i>d</i> , <i>J</i> =8.5 Hz)
H-6	7.07 (<i>dd</i> , <i>J</i> =1.8 y 8.5 Hz)
H-α	7.60 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.0 Hz)
H-β	6.29 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.0 Hz)
OCH ₃	3.93 (<i>s</i>)
OH	5.85 (<i>s</i>)

Los desplazamientos químicos son relativos al TMS y las asignaciones se realizaron por una combinación de COSY y HMBC.

Tabla 6. Datos de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃, ppm) del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).

Carbón	4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).
C-α	144.60
C-β	115.76
C-γ	167.39
C-1	127.12
C-2	109.34
C-3	146.79
C-4	147.94
C-5	114.72
C-6	123.04
C-1'	64.61
C-2'	28.79
C-3'	25.99
C(4'-17')	29.69
C-18'	29.34
C-19'	29.30
C-20'	31.92
C-21'	22.67
C-22'	14.09
OCH ₃	55.93

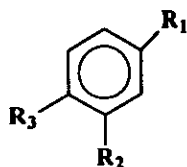
Las asignaciones se realizaron con base en el análisis de los espectros DEPT y HMBC y por comparación de los desplazamientos químicos con aquellos asignados a compuestos relacionados.

Su espectro en el IR (Espectro 1), presenta absorciones asociadas con la presencia de grupos hidroxilo (3430 cm^{-1}); carbonilo de éster ($1712, 1270\text{ cm}^{-1}$); doble ligadura conjugada ($1633, 1471\text{ cm}^{-1}$) y aromaticidad ($1590, 1610\text{ cm}^{-1}$). El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ion molecular en una relación de m/z de 502 uma (Espectro 2), correspondiente a la fórmula molecular $C_{32}O_4H_{54}$. Esta fórmula permite seis grados de insaturación. El espectro de masas presenta también fragmentos importantes en m/z 474, 405, 331, 282, 223, 194 y 177.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 3-9) del compuesto (21), permiten establecer que se trata de un éster derivado del ácido cafeico. (Bohlmann *et al.*, 1979; Barrero *et al.*, 1997)

Las características más importantes del espectro de RMN- ^1H (Espectro 3) se resumen a continuación:

a) En la zona donde absorben los hidrógenos aromáticos se observa un sistema ABX típico para un compuesto aromático simple trisustituido como se indica en la estructura parcial A.



Estructura A.

Las señales del sistema ABX, aparecen en δ_H 7.03 (H-2), δ_H 6.91 (H-5), y δ_H 7.07 (H-6), y cada una integra para un hidrógeno.

En esta zona se aprecian también dos dobletes ($J=16$ Hz), en δ_H 7.60 (H- α) y δ_H 6.29 (H- β), asignables a los hidrógenos de una doble ligadura con una estereoquímica *trans*. La magnitud del desplazamiento de la señal a campo más bajo (δ_H 7.60) es congruente con la conjugación de la doble ligadura. Las absorciones individuales de los dos conjuntos de señales recién descritos muestran una clara correlación en el espectro COSY (Figura 7).

b) En δ_H 4.19 (H₂-1') se aprecia un triplete ($J=7.0$ Hz) característico de un metileno terminal de una cadena alifática, unido a una función oxigenada.

c) En δ_H 3.93, se observa una señal para un grupo metoxilo y en δ_H 5.85, otra para un grupo hidroxilo. Esta última señal desaparece al equilibrar la muestra con D₂O.

d) Por último, en la zona donde absorben los hidrógenos alifáticos se observa un triplete ($J=7.0$ Hz), en δ_H 0.88 (H₃-22'), atribuible a un metilo terminal y, un singulete ancho δ_H 1.25 (H₂ 2'-21') asignable a varios grupos metileno. Este grupo de absorciones es congruente con la presencia de una cadena alifática lineal en la molécula.

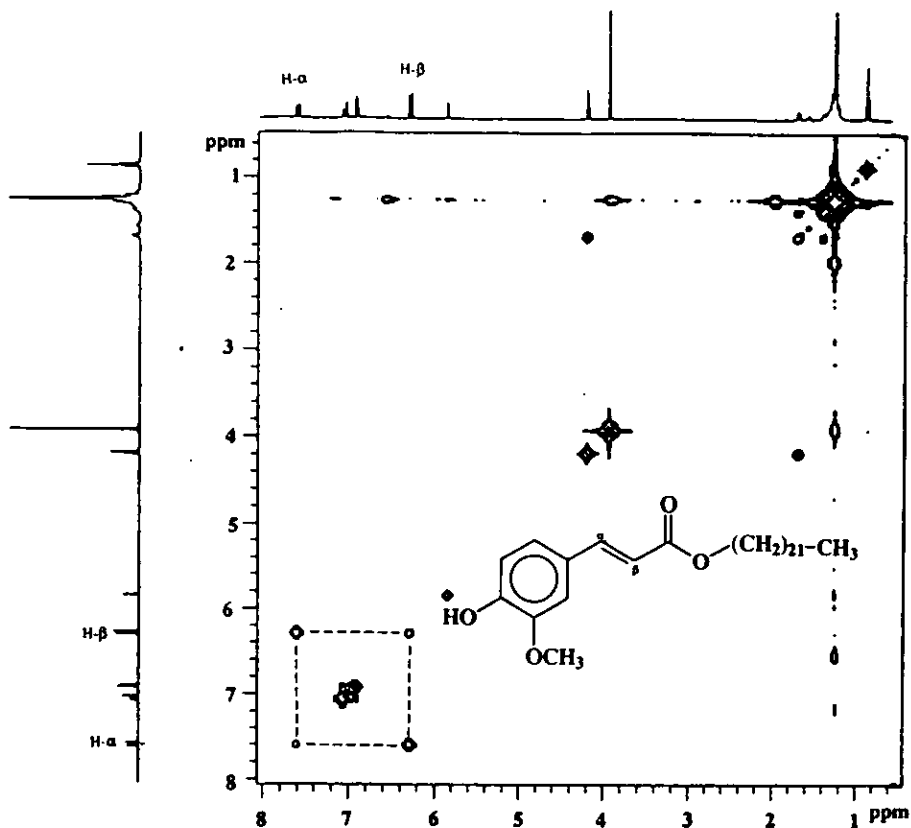


Figura 7. Espectro de RMN- ^1H COSY del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21).

El espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 4), presenta señales para 19 carbonos; lo cual indica que algunos de los carbonos presentes en la molécula son isocronos. El espectro de RMN- ^{13}C en su modalidad DEPT (Espectro 5) indica claramente que estas señales corresponden a un metilo, ocho metilenos, cinco metinos y cuatro carbonos cuaternarios.

Los metinos son de naturaleza aromática (δ_C 109.34, 114.72 y 123.04) y olefínica (δ_C 144.60 y 115.76) y muestran correlación en el espectro HMQC (Figura 8) con las señales previamente asignadas en el espectro de RMN- 1H a los hidrógenos aromáticos (H-2, H-5, H-6) y olefínicos (H- α , H- β).

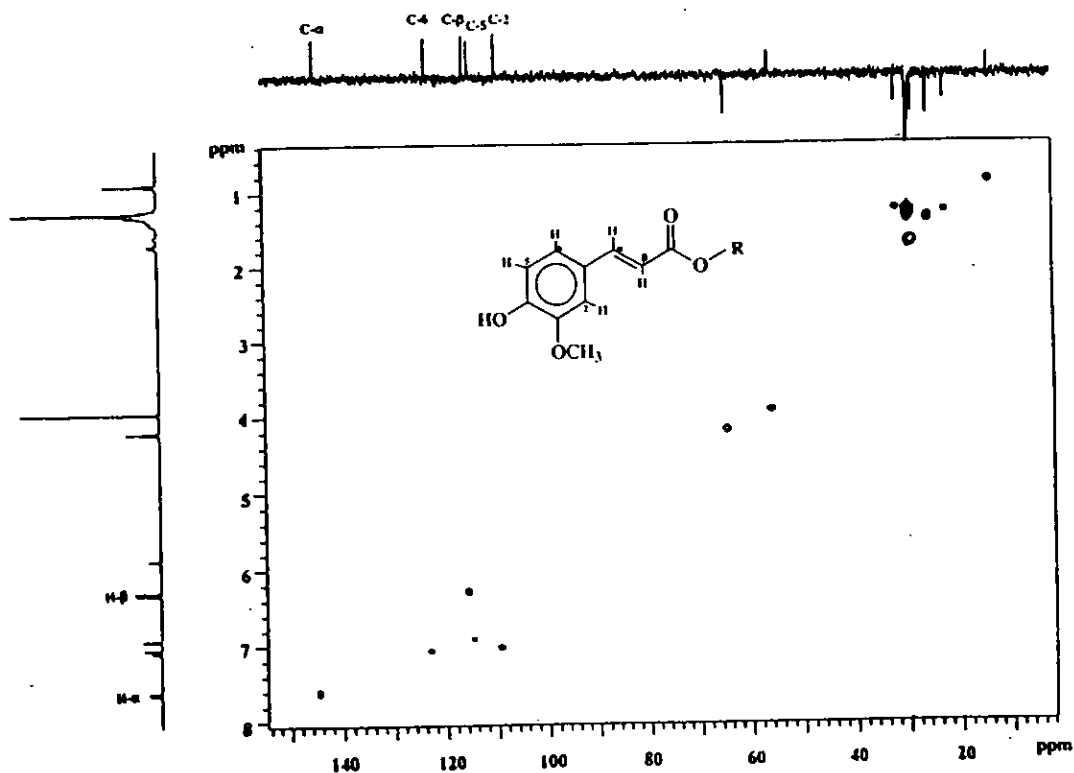


Figura 8. Espectro de RMN HMQC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docicosilo (21).

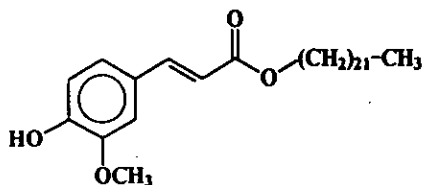
Las señales de los carbonos cuaternarios se discriminaron de la siguiente forma:

° La señal en δ_c 167.39, es asignable al carbonilo de la función éster evidenciado en el espectro de IR; los tres restantes corresponden a carbonos aromáticos, dos de ellos (δ_c 146.79 y δ_c 147.94) sustituidos con funciones oxigenadas. Estas funciones oxigenadas corresponden a los grupos hidroxilo y metoxilo ya detectados en el espectro de RMN- 1 H.

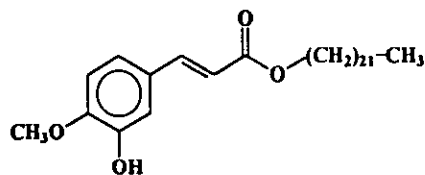
El resto de las señales corresponden a los metilenos de la cadena alifática evidenciada en el espectro de RMN- 1 H.

El análisis presentado hasta el momento de los espectros de IR, masas y RMN unidimensionales, así como de los tipos COSY y HMQC permiten proponer que el producto natural es un éster derivado del ácido cafeico y el alcohol alifático doeicosanol.

En un principio era factible proponer las estructuras B y C para el producto natural. Dichas estructuras solo difieren en la disposición relativa de los sustituyentes en el anillo aromático.



Estructura B



Estructura C

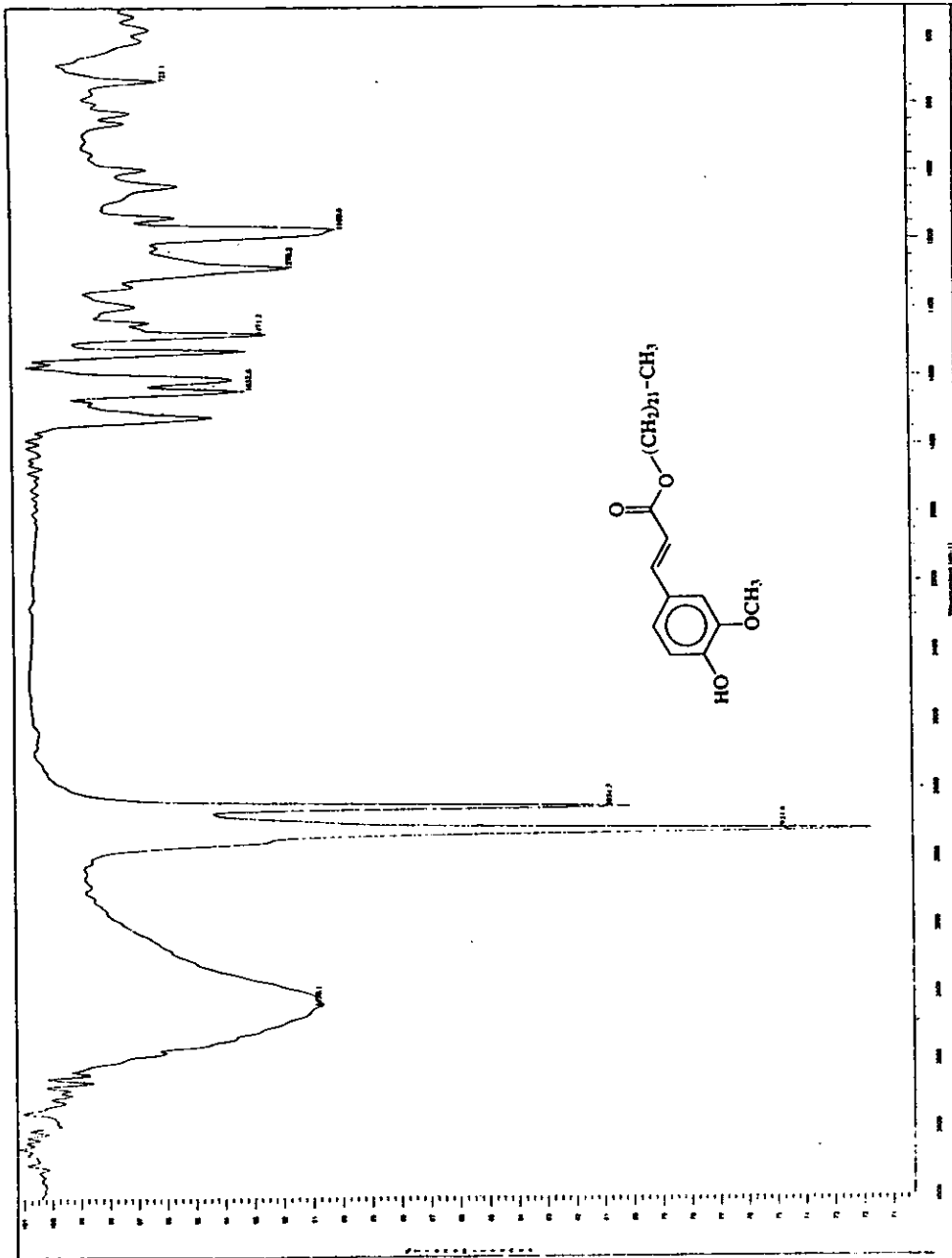
Para determinar la disposición relativa de los sustituyentes en el anillo aromático, el análisis de los espectros NOESY y HMBC fue de gran utilidad.

En primer lugar, la revisión cuidadosa del espectro NOESY (Espectro 6) indicó que el doblete ($J=2.5$ Hz) en δ_H 7.03 (H-2) correlacionaba con el metoxilo (δ_H 3.93) y con uno de los hidrógenos vinílicos de la cadena propanoide (δ_H 7.60). Por otro lado, el doblete de dobletes ($J=16$ Hz) en δ_H 7.07 correlacionaba con el hidrógeno vinílico en δ_H 7.60 (H- α) y con los hidrógenos aromáticos en δ_H 7.03 (H-2) y δ_H 6.91 (H-5). Las correlaciones recién descritas se encuentran en perfecta armonía con la estructura B.

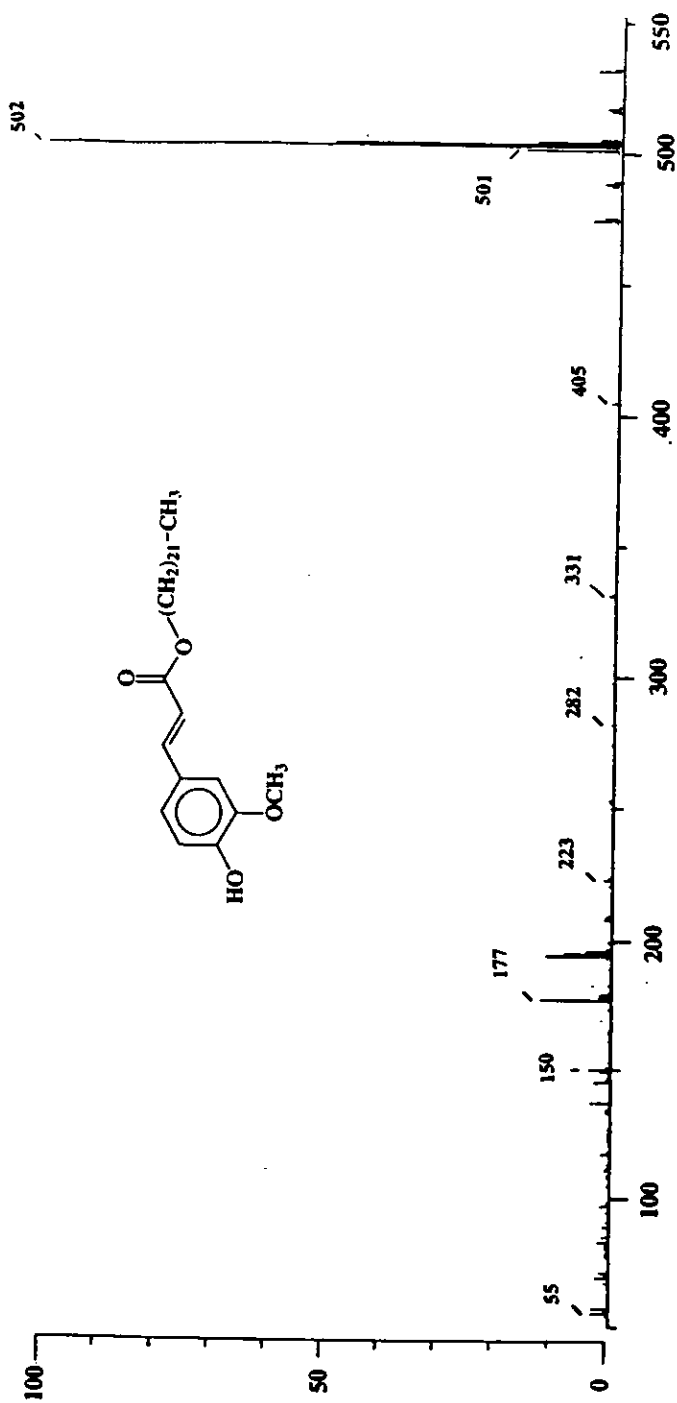
Las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Espectros 7-9) y que se resumen en la Tabla 7, proporcionan una evidencia adicional en favor de la estructura B. Con base en las evidencias presentadas el nuevo producto natural 21 se caracterizó como el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doecicosilo.

Tabla 7. Correlaciones más importantes observadas en el espectro HMBC, para el compuesto 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doecicosilo (21).

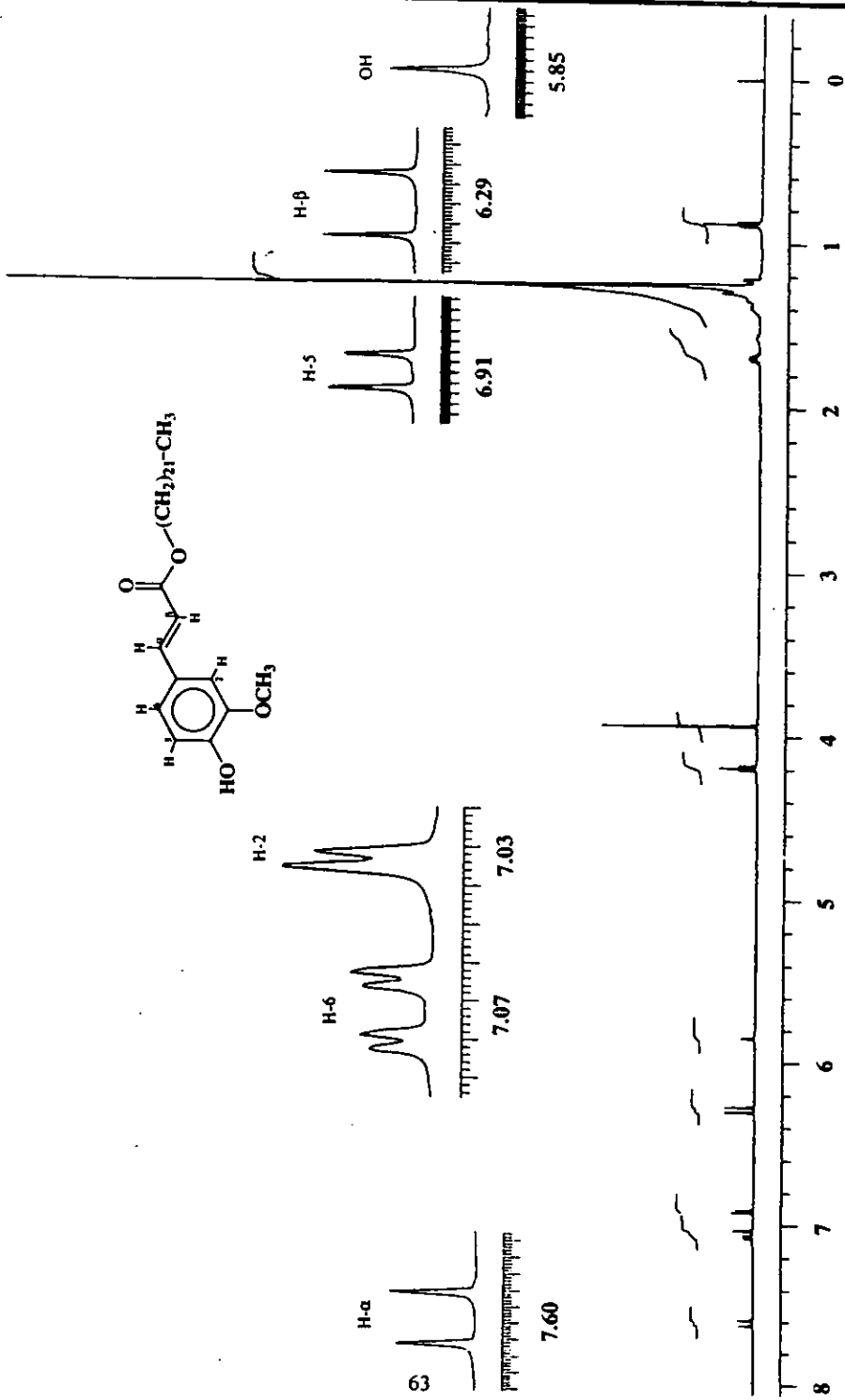
Protón (δ_H)	Carbono (δ_C)
H- α (7.60)	C- β (115.76), C- γ (167.39), C-2 (109.34), C-6 (123.04)
H- β (6.29)	C- γ (167.39), C-1 (127.12)
H-2 (7.03)	C-4 (147.94), C-6 (123.04)
H-5 (6.91)	C-1 (127.12), C-3 (146.79)
H-6 (7.07)	C- α (144.60), C-2 (109.34), C-5 (114.72)
OH (5.85)	C-5 (114.72)



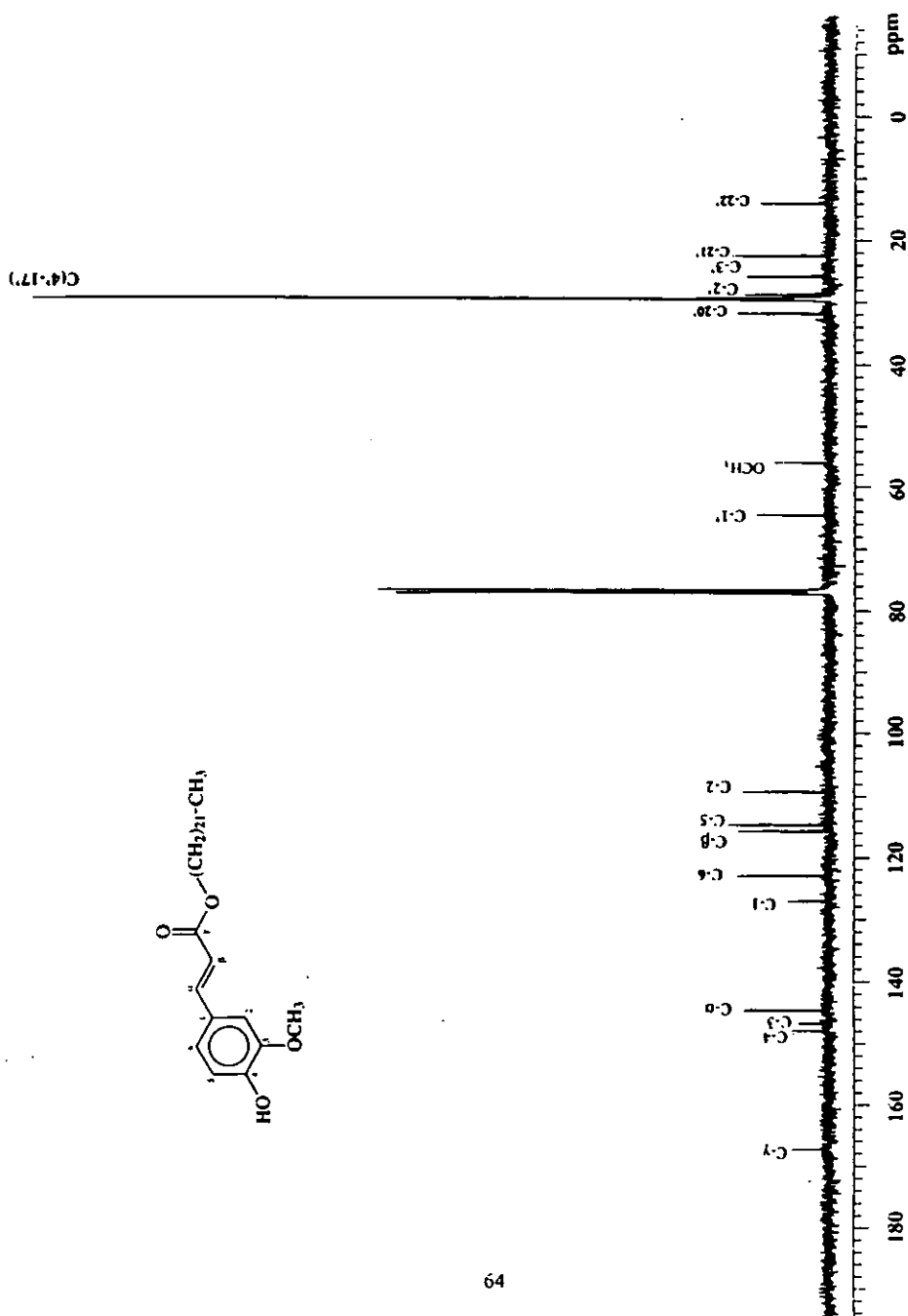
Espectro 1. IR del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docosilo (21).



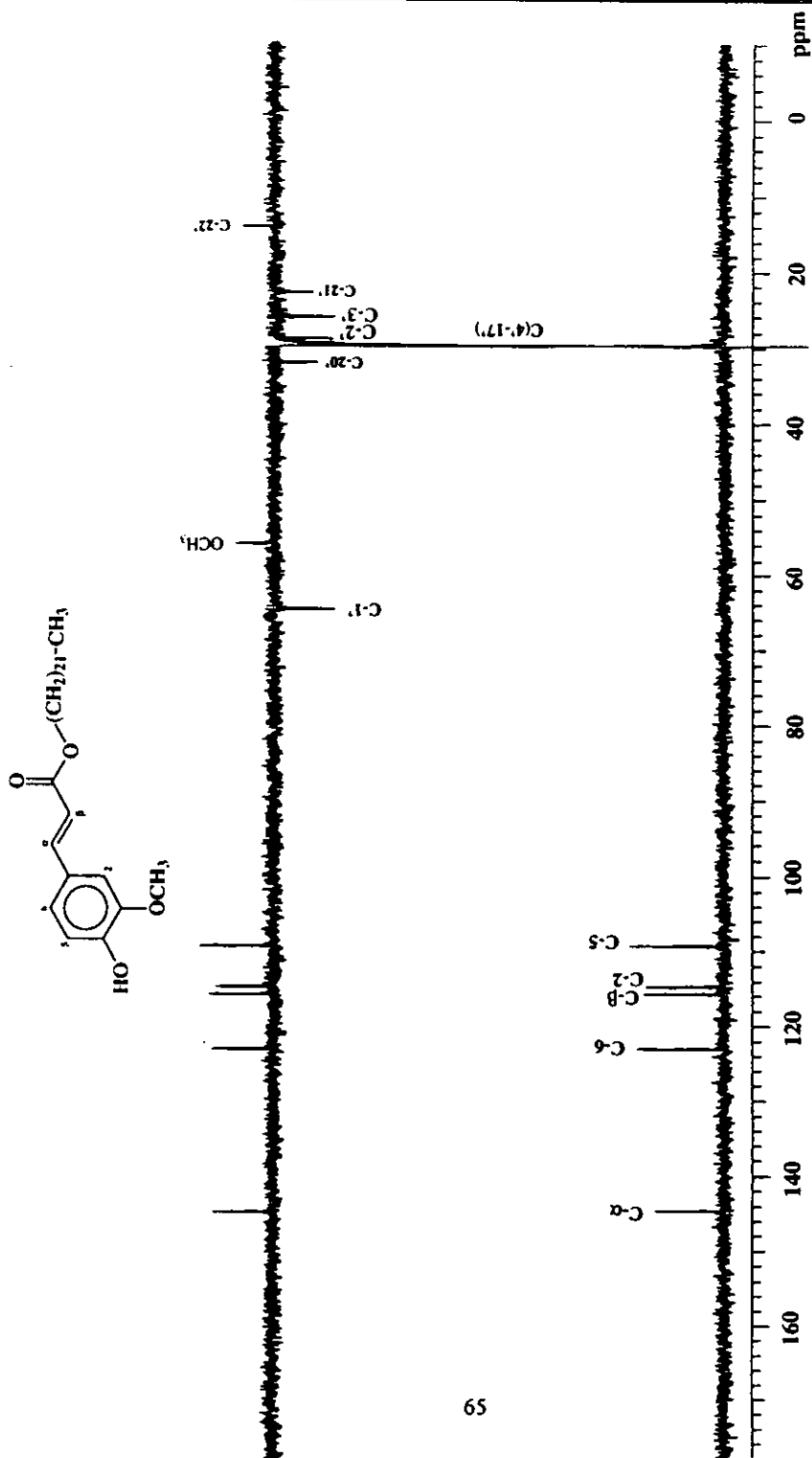
Espectro 2. Espectrometría de masas por impacto electrónico del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docosilo (21).



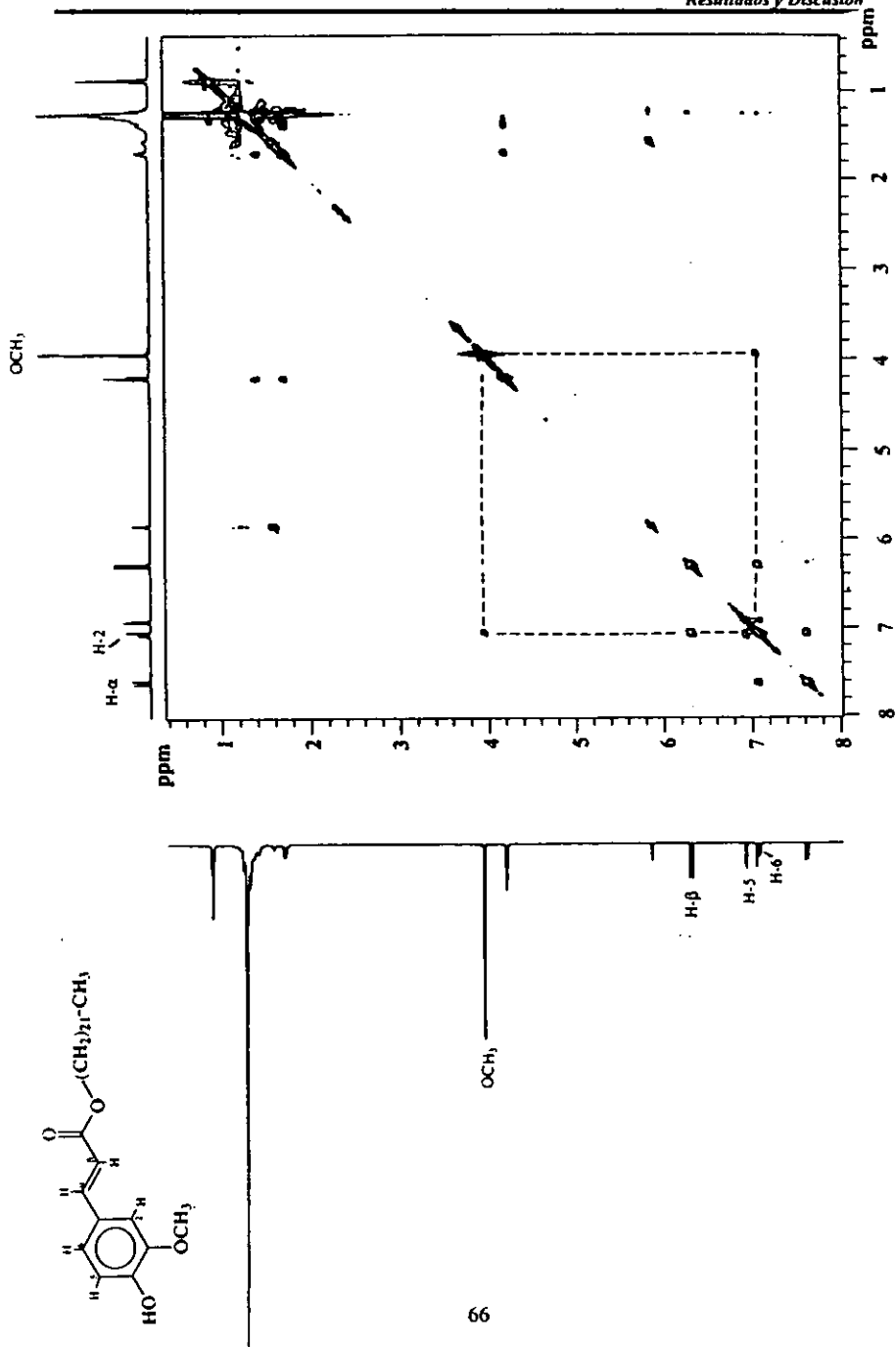
Espectro 3. RMN-¹H del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de dodecilo (21).



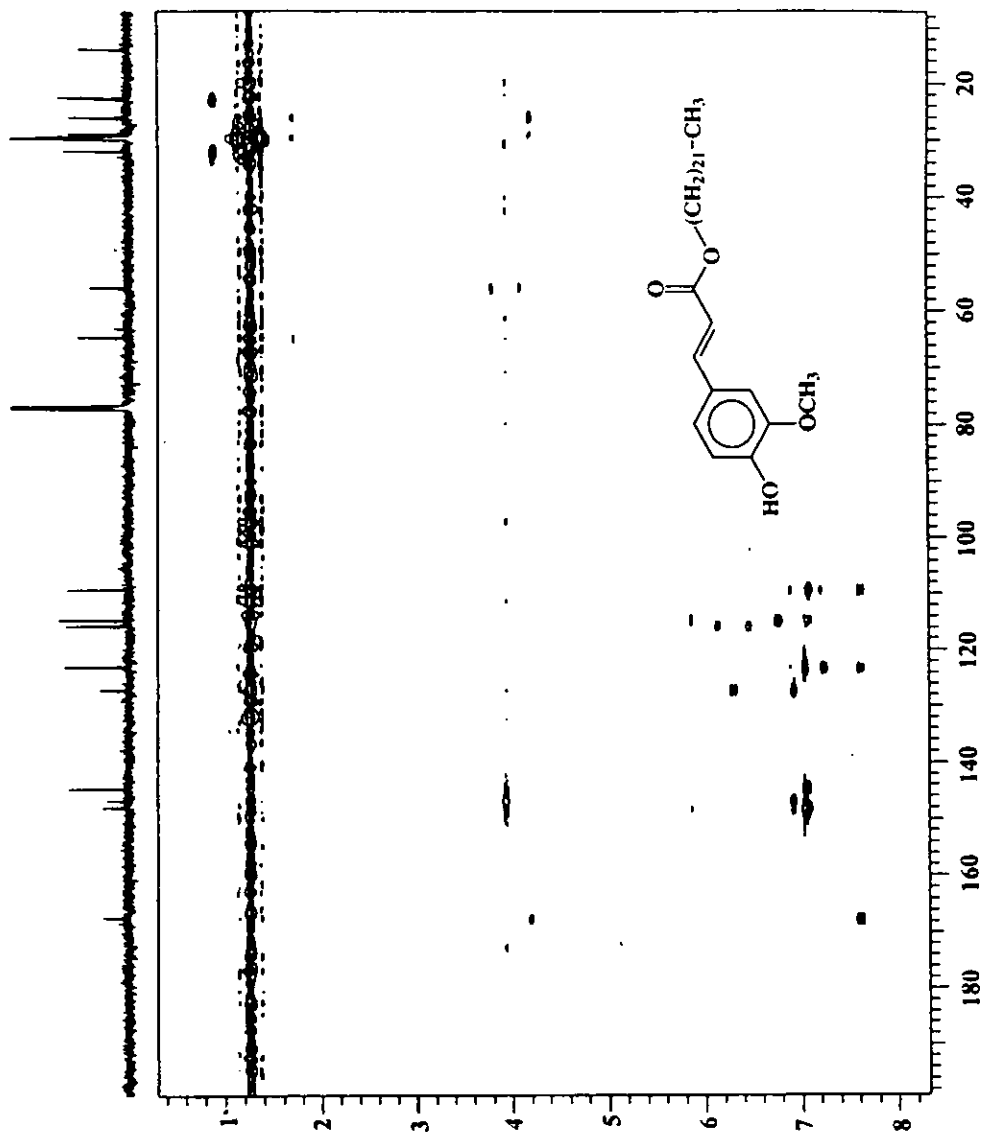
Espectro 4. RMN. ^{13}C del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docosicoilo (21).



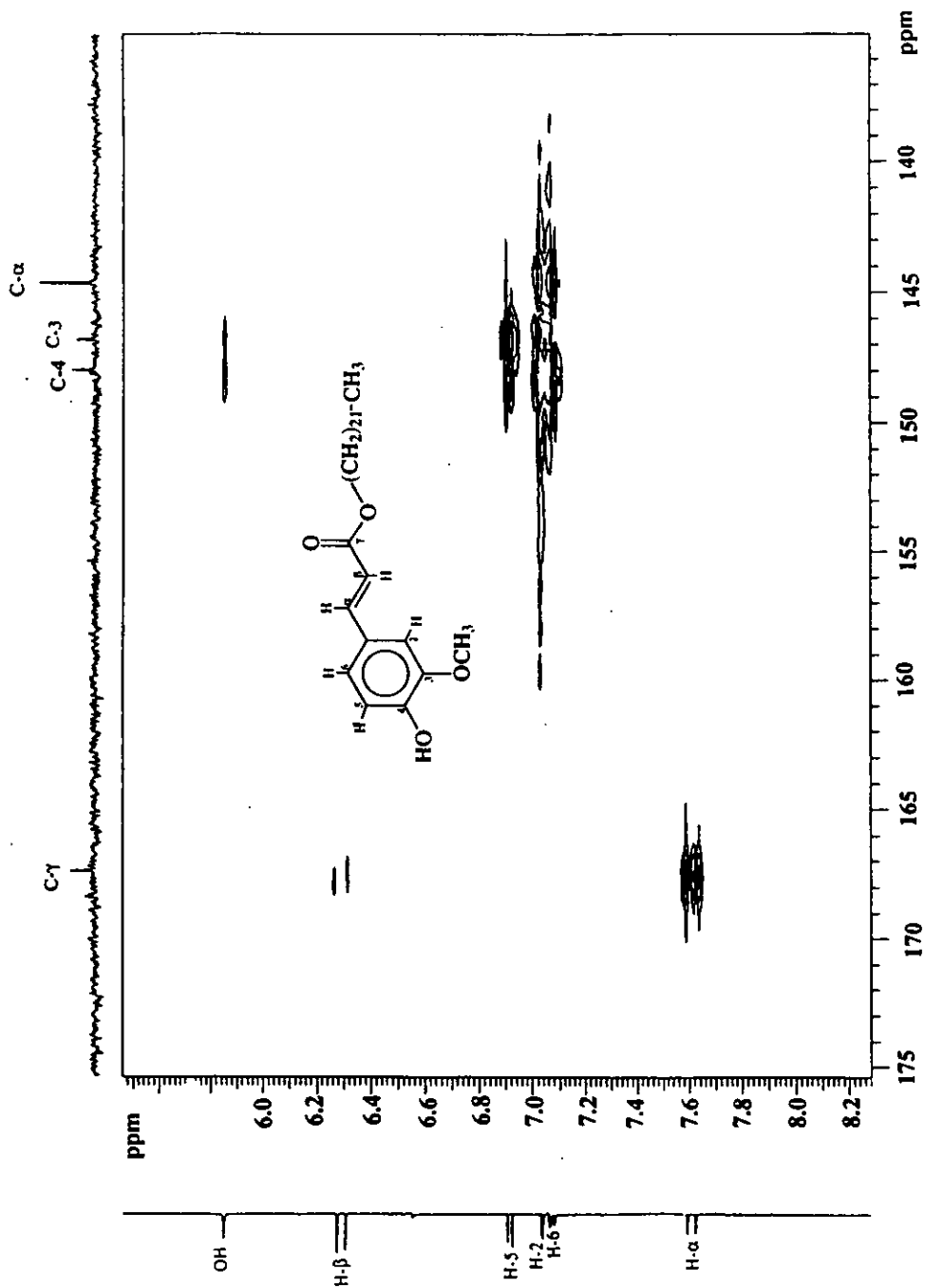
Espectro S. RMN-¹³C modalidad DEPT del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docesilo (21).



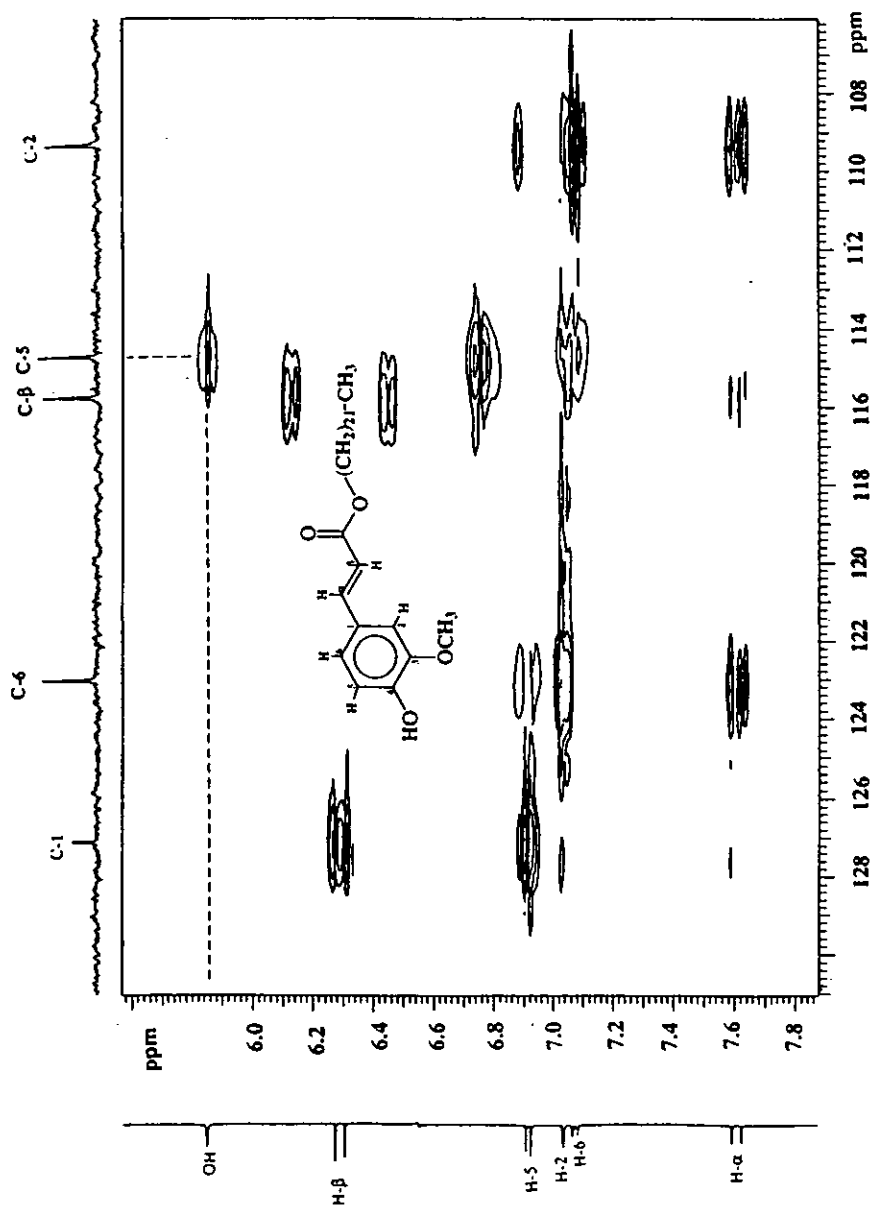
Espectro 6. RMN-NOESY del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docosilo (21).



Espectro 7. RMN-HMBC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docicosilo (21).



Espectro 8. RMN-HMBC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docesilo (21).



Espectro 9. RMN-HMBC del 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de dobercosilo (21).

4.1.2 Caracterización del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18)

De la fracción activa primaria MD-E cristalizaron espontáneamente unos cristales de color blanco. El análisis por el método de CG-EM (Figura 9), de los cristales indicó que era una mezcla de dos constituyentes en proporciones equivalentes.

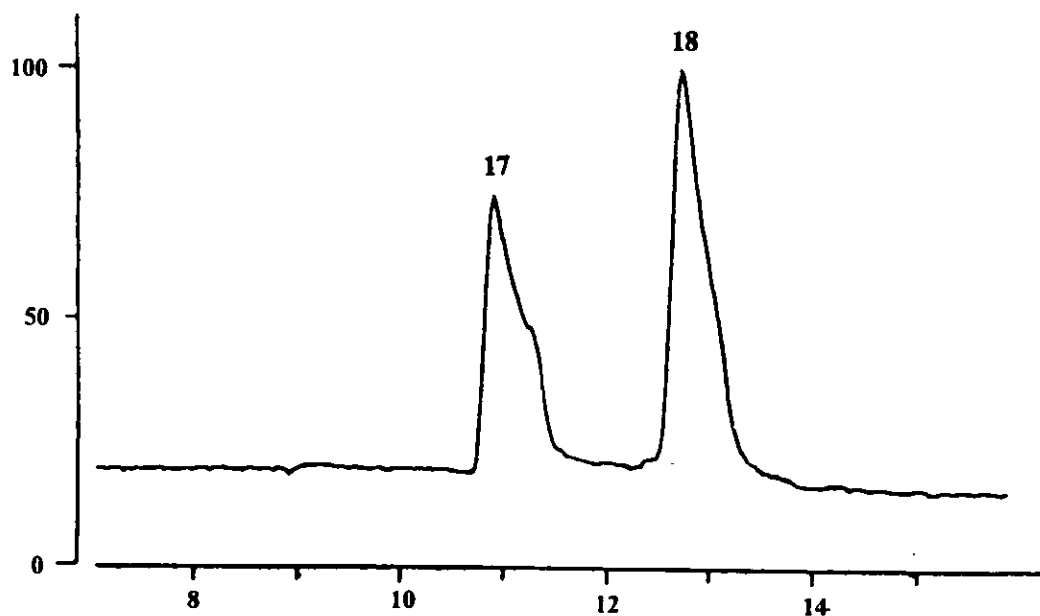


Figura 9. Cromatograma obtenido por la técnica de CG-EM del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18).

Los iones moleculares generados por cada uno de los componentes de la mezcla, fueron de 496 y 482 uma. La diferencia de los pesos moleculares de dichos compuestos es de 14 uma, lo cual indicaba que la diferencia era ocasionada por la presencia de un metilo o un metileno adicional en el compuesto de mayor peso molecular.

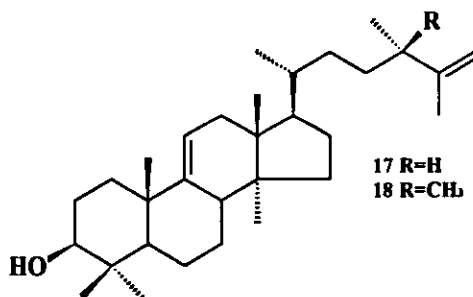
Los diferentes intentos por separar la mezcla binaria mediante la aplicación de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía en capa delgada, no fueron exitosos.

El espectro en el IR de la mezcla (Espectro 10), presenta absorciones asociadas con la presencia de grupos hidroxilo (3100 cm^{-1}), metileno (979 cm^{-1}) y metileno terminal (891 cm^{-1}). La presencia de grupos hidroxilo en los componentes de la mezcla se pudo corroborar también por la presencia en el espectro de RMN- ^1H (Espectro 17) de una señal en δ_{H} 3.21 (*dd*, $J=11.2$ y 4.8 Hz) y otra en δ_{H} 5.85, la cual desaparecía al equilibrar la muestra con D_2O . Una vez demostrada la presencia de grupos hidroxilo en al menos uno de los componentes de la mezcla, se procedió a preparar los derivados acetilados, con la finalidad de separar así los constituyentes individuales. Posteriormente, la mezcla acetilada se sometió a una cromatografía en columna abierta, utilizando la técnica de argenticación del adsorbente.

Este procedimiento tampoco permitió la separación de los constituyentes individuales. Sin embargo, sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice impregnadas con AgNO_3 , (Kikuchi *et al.*, 1981; Kikuchi *et al.*, 1982; Govardhan, *et al.*, 1984, Kikuchi *et al.*, 1985; Afza *et al.*, 1989), permitieron la separación de los constituyentes presentes en la mezcla. Estos compuestos se caracterizaron como los derivados monoacetilados del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18a), mediante el análisis de los espectros de masas, IR y RMN. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas se resumen en las Tablas 8-12. Por último, la identidad de los compuestos se confirmó mediante un análisis de difracción de Rayos X.

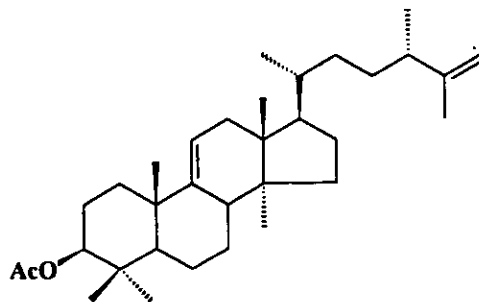
El ión molecular del acetato del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a), se observó en el espectro de masas en su modalidad de ionización química en una relación m/z de 482 ($\text{M}^+ \text{H}^+$) (Espectro 17). Así, la fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{33}\text{O}_2\text{H}_{54}$, la cual permite siete grados de insaturación. El espectro presenta también fragmentos importantes en m/z 407 (pico base), 355, 295 y 255. Estos fragmentos son congruentes con el patrón de fragmentación que se resume en la Figura 10.

Tabla 8. Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18).



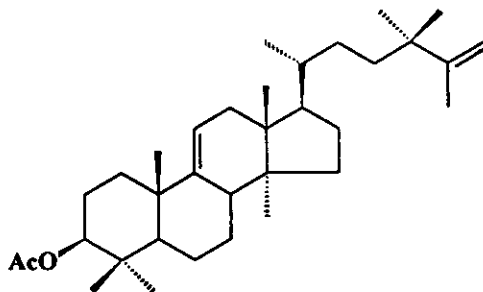
	Compuesto (17)	Compuesto (18)
Fórmula molecular	C ₃₁ H ₅₂ O	C ₃₂ H ₅₄ O
Peso molecular	440	454
Punto de fusión	207-210°C	207-210°C
IR $\nu_{\text{máx}}$ KBr cm⁻¹ (Espectro 10)	3430, 2938, 1640, 1467, 1372, 994	3430, 2938, 1640, 1467, 1372, 994
EMIE m/z (int. rel.) (Espectros 11 y 12)	440 [M ⁺ (33)], 425 (100), 407 (38), 313 (69), 257 (9), 242 (8), 232 (6), 218 (10), 204 (9), 175 (15)	454 [M ⁺ (48.7)], 439 (100), 423 (41), 313 (92), 298 (10), 258 (15), 242 (79), 232 (11), 218 (12), 200 (10), 175 (20)

Tabla 9. Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas del acetato del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a).



Fórmula molecular	C ₃₃ O ₂ H ₅₄
Peso molecular	482
Punto de fusión	200-205 °C
IR $\nu_{\text{máx}}$ KBr cm ⁻¹ (Espectro 16)	2971, 2947, 2869, 1734, 1641, 1449, 1373, 1245, 1033, 979, 891
EMIE <i>m/z</i> (int. rel.) (Espectro 17)	482 [M ⁺ (40)], 467 (67), 422 (3), 407 (82), 355 (100), 316 (13), 301 (16), 283 (30), 255 (14), 241 (16), 229 (17), 215 (15), 175 (22)

Tabla 10. Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas del acetato de 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18a).



Fórmula molecular	C ₃₄ O ₂ H ₅₆
Peso molecular	496
Punto de fusión	203-205 °C
IR ν_{\max} ^{KBr} cm⁻¹ (Espectro 23)	2967, 2941, 2870, 1731, 1638, 1443, 1372, 1246, 1033, 978, 891
EMIE m/z (int. rel.) (Espectro 24)	496 [M ⁺ (30)], 481 (40), 421 (57), 355 (100), 316 (27), 295 (12), 283 (22) 255 (13), 241 (20), 229 (18), 215 (15), 203 (7), 173 (24)

Tabla 11. Datos de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm) de los compuestos 17, 18, 17a y 18a.

Protón	Compuesto		
	Mezcla de (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18)	Acetato de (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a)	Acetato de 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18a)
H ₃ -18	0.64 (s)	0.64 (s)	0.63 (s)
H ₃ -19	1.04 (s)	1.07 (s)	1.06 (s)
H ₃ -21	0.87 (d, J=6.4 Hz)	0.87 (d, J=6.3 Hz)	0.87 (d, J=6.3 Hz)
H ₃ -27	1.64 (s), 1.69 (d, J=0.9 Hz)	1.64 (s)	1.68 (d, J=0.6 Hz)
H ₃ -28	0.86 (s)	0.86 (s)	0.86 (s)
H ₃ -29	1.01 (s)	0.89 (s)	0.89 (s)
H ₃ -30	0.73 (s)	0.73 (s)	0.73 (s)
H ₃ -31	1.00 (m)	1.00 (d, J=7.0 Hz)	1.01 (s)
H ₃ -32	1.01 (s)	----	1.01 (s)
H ₂ -26	4.66 (sa), 4.72 (m)	4.66 (sa)	4.66 (sa), 4.72 (m)
H-3	3.21 (dd, J=11.2 y 4.8 Hz)	4.48 (dd, J=11.0 y 4.3 Hz)	4.48 (dd, J=11.4 y 4.5 Hz)
H-11	5.22 (da, J=6.0 Hz)	5.22 (da, J=6.0 Hz)	5.22 (da, J=6.0 Hz)
AcO	----	2.05 (s)	2.05 (s)

Los desplazamientos químicos son relativos al TMS y las asignaciones se realizaron por una combinación de COSY y por comparación de los desplazamientos químicos con los asignados a compuestos relacionados.

Tabla 12. Datos de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm) de los compuestos 17, 18, 17a y 18a.

Protón	Compuesto		
	Mezcla de (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18)	acetato de (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a)	acetato de 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18a)
C-1	35.82	35.82	35.84
C-2	27.85	24.16	24.17
C-3	78.94	80.87	80.89
C-4	39.14	38.03	38.04
C-5	52.55	52.61	52.61
C-6	21.39	21.24	21.29
C-7	28.13	28.00	28.01
C-8	41.81	41.78	41.79
C-9	148.54	148.13	148.13
C-10	39.41	39.26	39.25
C-11	114.98	115.20	115.21
C-12	37.17	37.14	37.15
C-13	44.31	44.24	44.27
C-14	47.01	47.01	47.02
C-15	33.94	33.91	33.93
C-16	27.97	28.00	28.01
C-17	50.91, 50.82	50.89	50.80
C-18	14.41	14.38	14.40
C-19	22.28	22.28	22.31
C-20	36.06, 36.61	36.03	36.62
C-21	18.41, 18.50	18.50	18.50
C-22	33.94, 30.80	33.91	30.81
C-23	31.5, 37.35	31.48	37.36
C-24	41.63, 38.71	41.60	38.74
C-25	150.23, 152.38	150.20	152.40
C-26	109.35, 109.29	109.29	109.29
C-27	18.65, 19.42	18.50	19.41
C-28	28.25	28.19	28.18
C-29	15.67	16.78	16.80
C-30	18.50	18.50	18.50
C-31	20.16, 27.23	20.16	27.23
C-32	27.51	----	27.51
AcO	----	21.30, 170.92	21.30, 170.92

Las asignaciones se realizaron con base en el análisis de los espectros DEPT y HETCOR y por comparación de los desplazamientos químicos con aquellos asignados a compuestos relacionados.

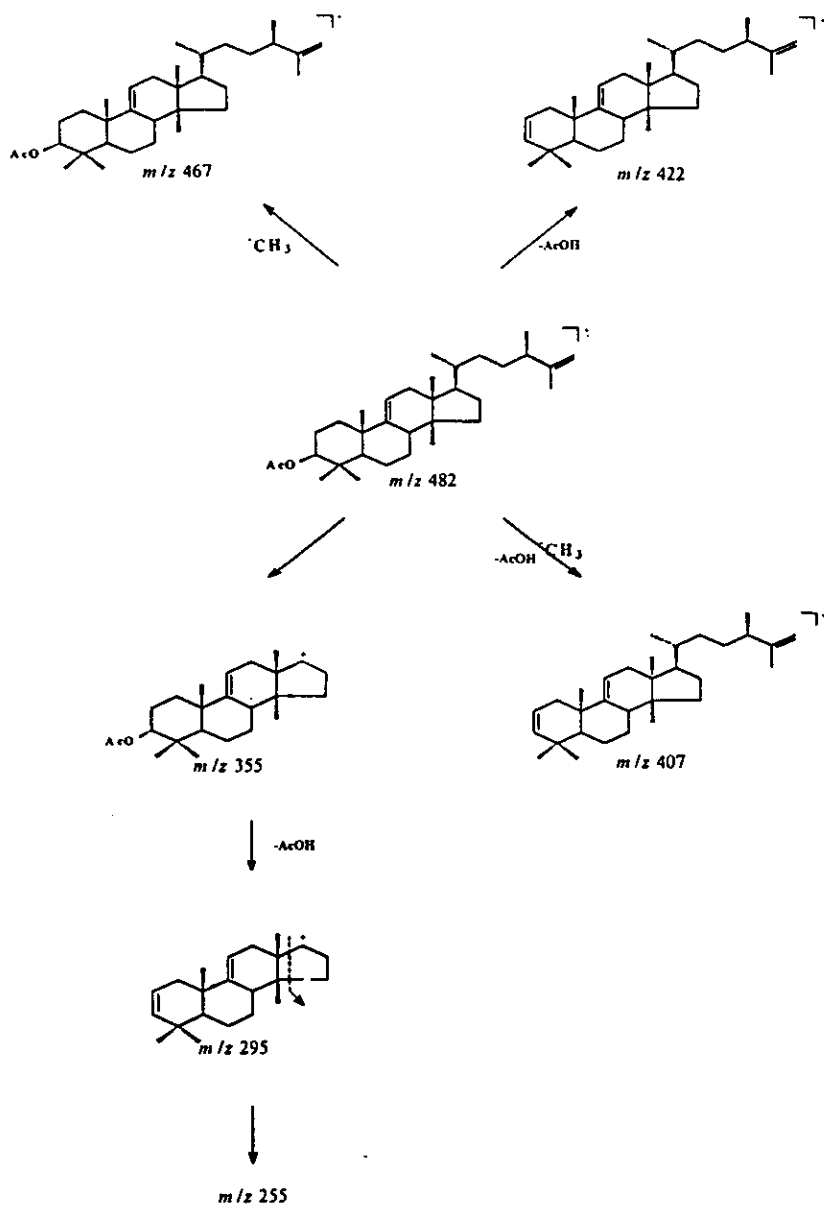


Figura 10. Fragmentos de masas observados en el espectro del acetato del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a).

En el espectro de RMN-¹H del producto 17a (Espectro 18), se observa una señal asignable a los protones de un metileno vinílico (δ_H 4.66). La presencia de esta señal, es congruente con la existencia de una doble ligadura terminal en la molécula. Se observan también, seis singuletes atribuibles a seis grupos metilo sobre carbonos cuaternarios (δ_H 0.64, 1.07, 1.64, 0.86, 0.89, 0.73), uno de los cuales corresponde a un metilo sobre una doble ligadura, considerando su desplazamiento químico en δ_H 1.64. Esta última señal mostró una clara correlación en el espectro COSY (Espectro 19) con las señales de los hidrógenos vinílicos en (δ_H 4.66); por otra parte, se observan dos dobletes en δ_H 0.87 ($J=6.3$ Hz) y δ_H 1.00 ($J=7.0$ Hz), asignables a grupos metilo sobre un carbono terciario. Por último, en δ_H 5.22 se observa un doblete ancho de un metino vinílico de una doble ligadura trisustituida y una señal doble de dobles en δ_H 4.48 ($J=11.0$ y 4.3 Hz) atribuible al hidrógeno geminal de una función éster.

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 20), presenta señales para 33 carbonos en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. El espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT (Espectro 21) indica claramente que estas señales corresponden a ocho metilos, once metilenos, seis metinos y ocho carbonos cuaternarios.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Cabe hacer notar que el número de metilenos y metilos que se observan en los espectros de RMN, así como el número de carbonos presentes en la molécula, permiten inferir que el producto natural es de naturaleza triterpenoide.

Los desplazamientos químicos del carbono cuaternario en δ_C 150.20 y del metileno en el δ_C 109.24 proporcionan una evidencia adicional de la presencia de la doble ligadura terminal en la molécula. La absorción vinílica evidenciada en el espectro de RMN- 1H en δ_H 4.66, muestra una clara correlación en δ_C 109.29 (C-26) en el espectro HETCOR (Espectro 22). Así mismo las señales, en δ_C 148.13 y 115.20 confirmaron la presencia de la doble ligadura trisustituída.

Por último, la señal en δ_C 80.87, que correlaciona con el hidrógeno en δ_H 4.48 en el espectro HETCOR, es consistente con la presencia de un metino unido a la función acetoxi. Las absorciones de este último grupo se observan en δ_C 21.30 y δ_C 170.92.

Los elementos estructurales antes mencionados satisfacen los dos oxígenos y tres de los siete grados de insaturación requeridos por la fórmula molecular. En consecuencia, para cumplir con los requisitos de la fórmula, en cuanto a insaturaciones se refiere, el núcleo triterpenoide debe ser tetracíclico. Así mismo, se detectó que el triterpenoide contiene un grupo metilo adicional al que normalmente presentan estos compuestos.

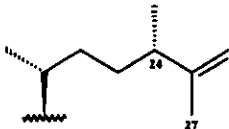
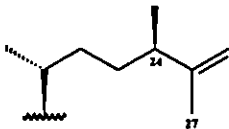
A fin de establecer la naturaleza del núcleo triterpenoide tetracíclico, se compararon los datos de RMN con los previamente descritos para varios triterpenoides de los tipos lanostano, cicloartano, tirucalano, eufano y dammarano (Mahato, *et al.*, 1992; Das y Mahato 1983; Mahato y Sen 1997).

Este análisis comparativo establece que, el compuesto posee un núcleo de tipo lanostano (Chakravarty *et al.*, 1996) y que la función oxigenada (el hidroxilo secundario en el caso del producto natural 17 y el acetoxi en el caso del derivado acetilado 17a) se encuentra en C-3 del núcleo base. La estereoquímica de la función oxigenada se determinó como β con base en el patrón de acoplamiento observado en el espectro de RMN- ^1H para la señal en δ_{H} 4.48 (*dd*, $J=11.0$ y 4.3 Hz). Si la estereoquímica hubiese sido α la señal se hubiese apreciado como un singlete ancho.

El análisis del patrón de fragmentación observado en el espectro de masas permitió establecer que el metilo adicional se encontraba en la cadena lateral del lanostano. Por otro lado la comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos asignables a la cadena lateral del compuesto permitió establecer que el metilo se encuentra ubicado en C-24 (Chakravarty *et al.*, 1996). Por último, la magnitud del desplazamiento del metilo sobre la doble ligadura permitió proponer que la estereoquímica del metilo es *S* (Chakravarty *et al.*, 1996).

En el caso de que la estereoquímica del metilo hubiese sido *R*, la señal del metilo sobre C-25, se hubiera observado en 1.65 (*s*). En la Tabla 13 se ilustran comparativamente los valores del desplazamiento químico de la señal H₃-27 cuando la estereoquímica en C-24 es *S* ó *R* (Chakravarty *et al.*, 1996).

Tabla 13. Comparación de los desplazamientos químicos del metilo vinílico H₃-27, para establecer la estereoquímica del carbono quiral en C-24 (Chakravarty *et al.*, 1996).

Cadena lateral	Desplazamiento químico H ₃ -27	Estereoquímica
	δ_H 1.63 Hz (<i>s</i>)	24 <i>S</i>
	δ_H 1.65 Hz (<i>s</i>)	24 <i>R</i>

La estructura del compuesto se corroboró inequívocamente mediante el análisis por difracción de Rayos X (Figura 12), el cual permitió comprobar la estereoquímica propuesta para el metilo en C-24.

El conjunto de evidencias presentadas en esta sección permitieron caracterizar el compuesto como el acetato del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a). Es importante mencionar que es la primera vez que se reporta la presencia de este compuesto en orquídea alguna. Previamente estos compuestos se aislaron de la especie *Glycosmis arborea* (Rutaceae) [Chakravarty *et al.*, 1996]. Cabe indicar que los dos datos espectroscópicos recién descritos para el compuesto 17a son idénticos a los reportadas en la literatura (Chakravarty *et al.*, 1996).

El compuesto 18a se caracterizó como el acetato del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol, el cual como ya se mencionó, se aisló en forma cristalina. En las Tablas 8-12 se resumen las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas. En general los espectros de IR, masas y RMN son muy similares a los del producto 17. El espectro de masas en su modalidad de ionización química generado por este compuesto, presenta el ion molecular en una relación de m/z de 496 uma (Espectro 24), correspondiendo a la fórmula molecular $C_{34}O_2H_{56}$, que permite siete grados de insaturación. Como ya se indicó previamente, la presencia en el espectro de masas de un ión molecular con 14 unidades de masas más que el del compuesto 17a indica que este compuesto presenta un metilo adicional con respecto al compuesto 17a. El fragmento de m/z 121 correspondiente a la cadena lateral permitió comprobar que efectivamente este es el caso. Otros fragmentos importantes observados en el espectro de masas se indican en la Figura 11.

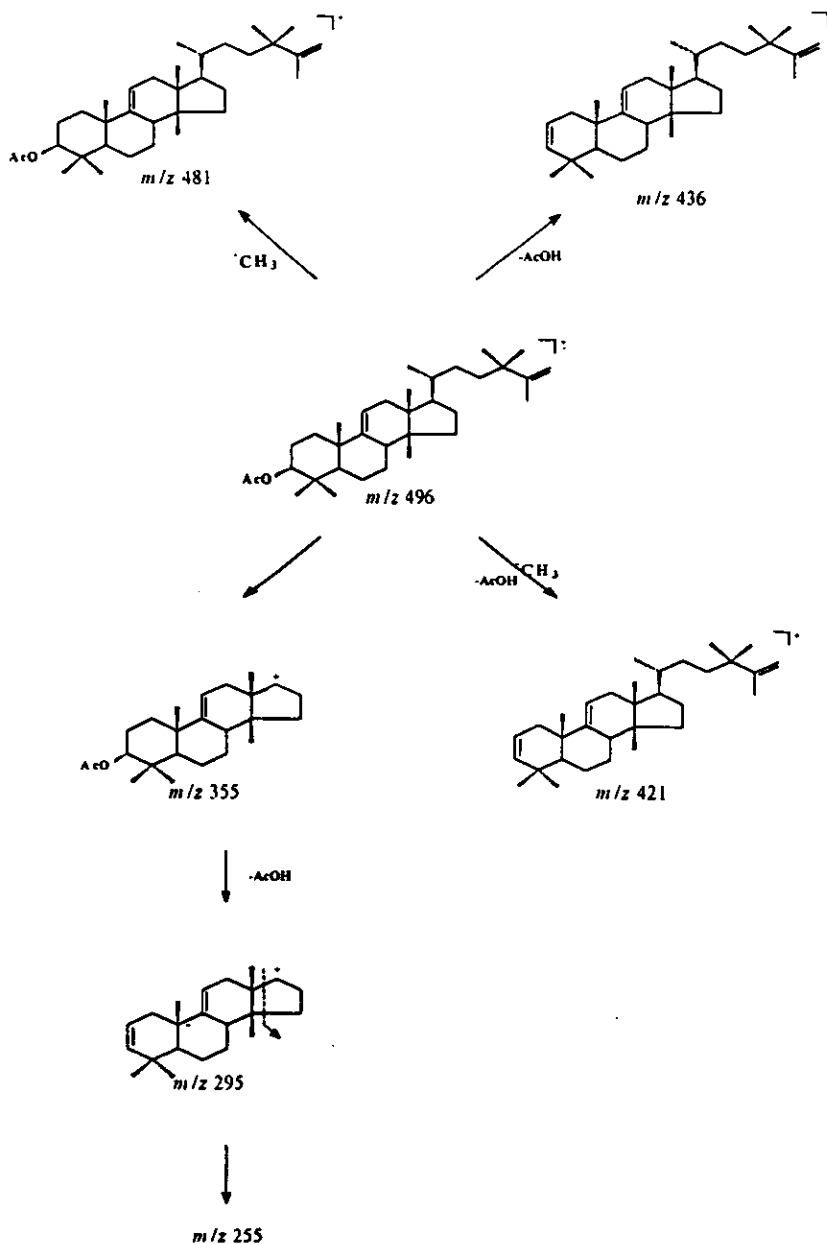
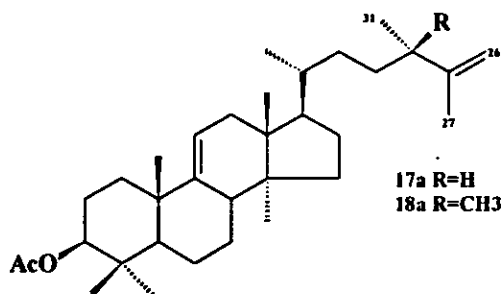


Figura 11. Fragmentos de masas observados en el espectro del acetato del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18a).

Los espectros de RMN (Espectros 25-28) para este compuesto resultaron muy similares a los del producto 17a, difiriendo fundamentalmente en la presencia de las señales para el grupo metilo como sustituyente adicional en C-24.

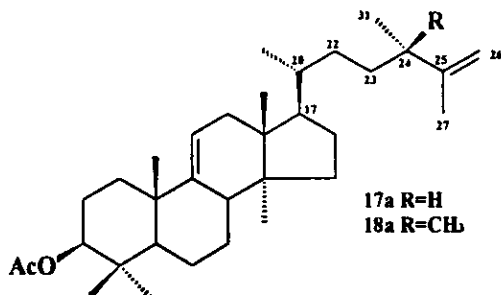
En las Tablas 14 y 15 se presentan las principales diferencias observadas entre los espectros de RMN del producto 17a y 18a.

Tabla 14. Comparación de los datos de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm) de los compuestos 17a y 18a.



Protón	Compuesto	
	Acetato del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ilo (17a)	Acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ilo (18a)
H ₃ -27	1.62 (s)	1.69 (d, J=0.6 Hz)
H ₃ -31	1.00 (d, J=7.0 Hz)	1.02 (s)
H ₃ -32	---	1.02 (s)
H ₂ -26	4.66 (sa)	4.66 (sa), 4.72 (m)

Tabla 15. Comparación de los datos de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm) de los compuestos 17a y 18a.

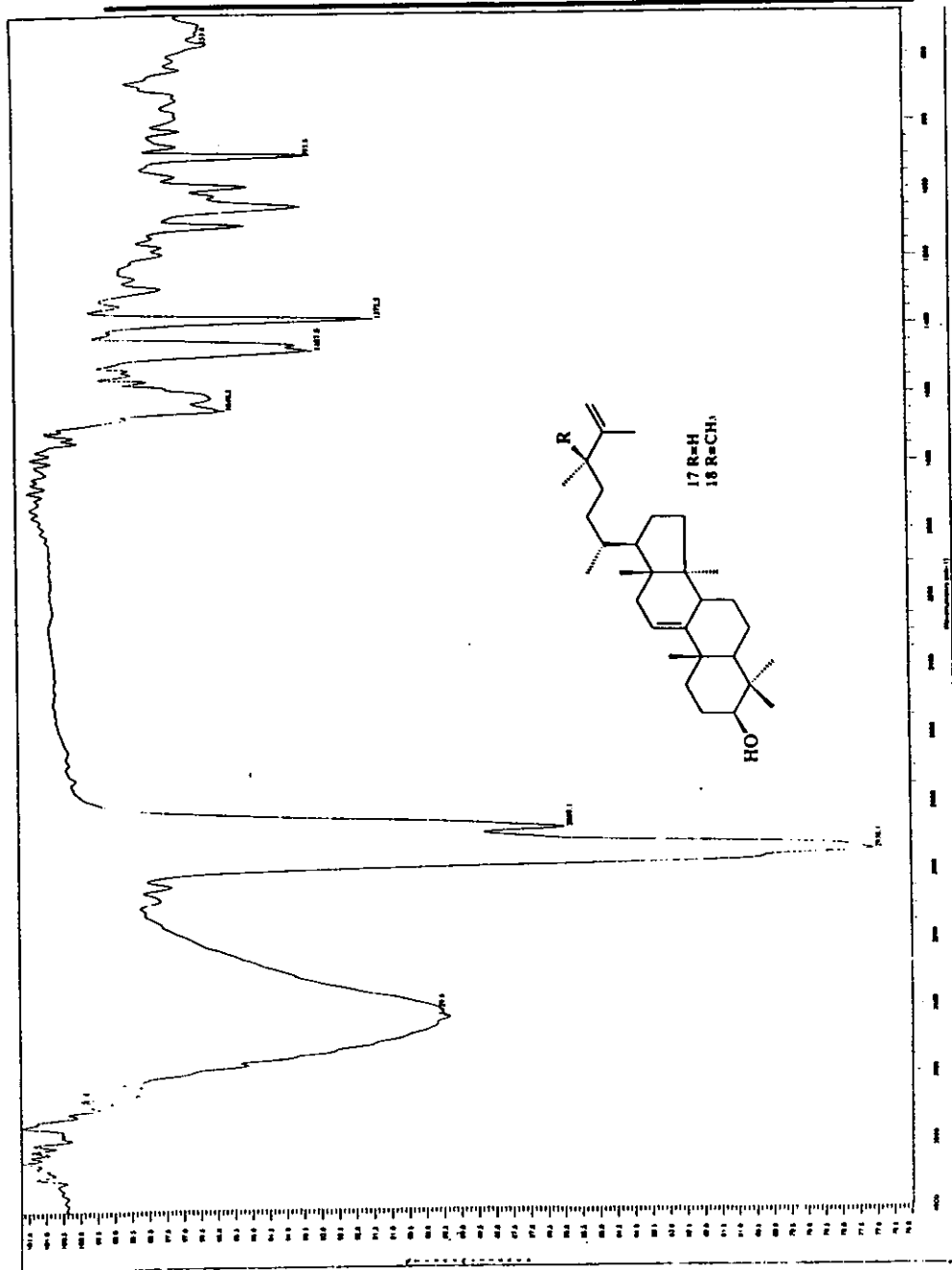


Protón	Compuesto	
	Acetato del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ilo (17a)	Acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ilo (18a)
C-17	50.89	50.79
C-20	36.03	36.62
C-22	33.91	30.80
C-23	31.48	37.35
C-24	41.60	38.71
C-25	150.20	152.38
C-27	18.50	19.39
C-31	20.16	27.24
C-32	----	27.51

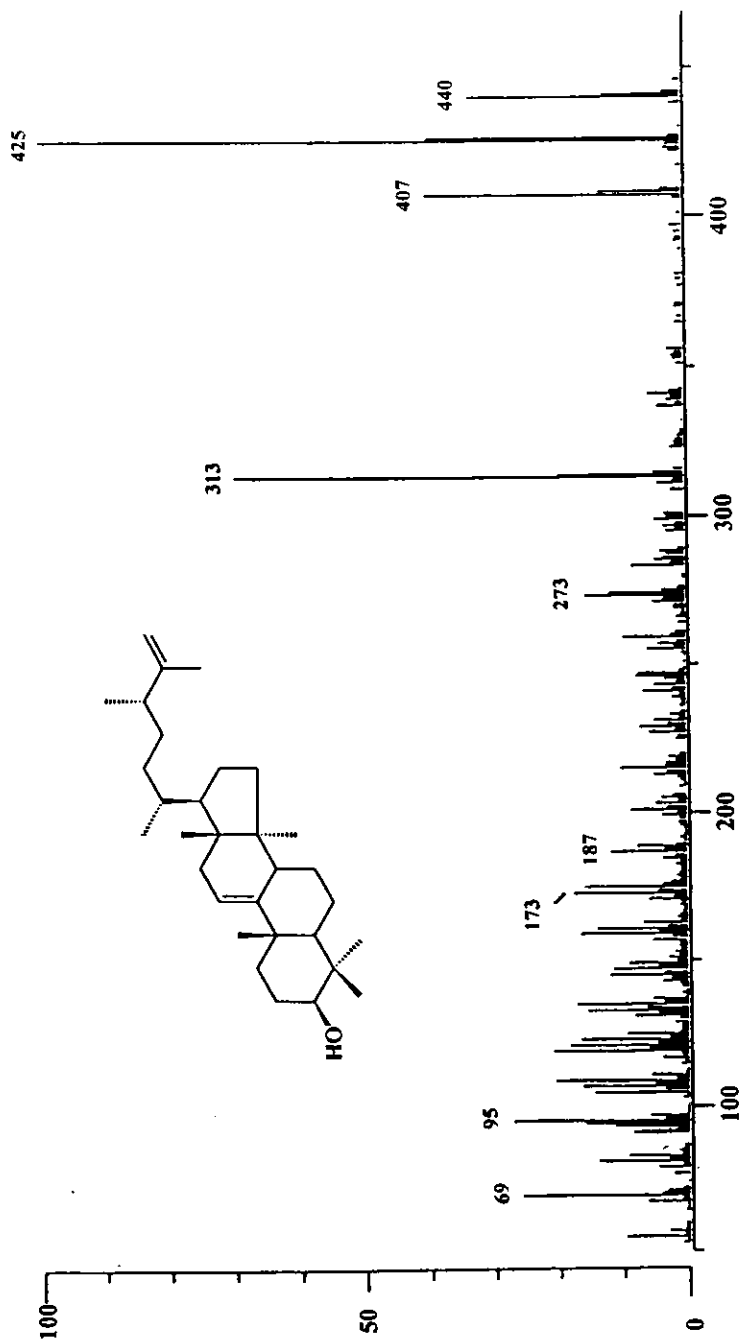
La principal diferencia observada en el espectro de RMN- ^{13}C , es que la señal para el metino asignado a C-24 en 17a se encuentra ausente. En su lugar, se observan señales para un metilo en δ_{H} 1.02 y un carbono cuaternario δ_{C} 38.71. Por otro lado, las principales diferencias en el espectro de RMN- ^1H se resumen a continuación:

- a) En lugar de una señal vinílica en δ_{H} 4.66 que integraba para dos hidrógenos, se observaron señales en δ_{H} 4.66 y en δ_{H} 4.72, integrando cada una para un hidrógeno.
- b) El metilo sobre la doble ligadura en C-25 aparece en este caso en δ_{H} 1.69.
- c) En lugar de la señal doble ($J=7.0$ Hz) en δ_{H} 1.00 se observó un singlete que integra para seis hidrógenos asignables a dos grupos metilo ($\text{H}_3\text{-31}$ y $\text{H}_3\text{-32}$) sobre carbono(s) cuaternario(s).

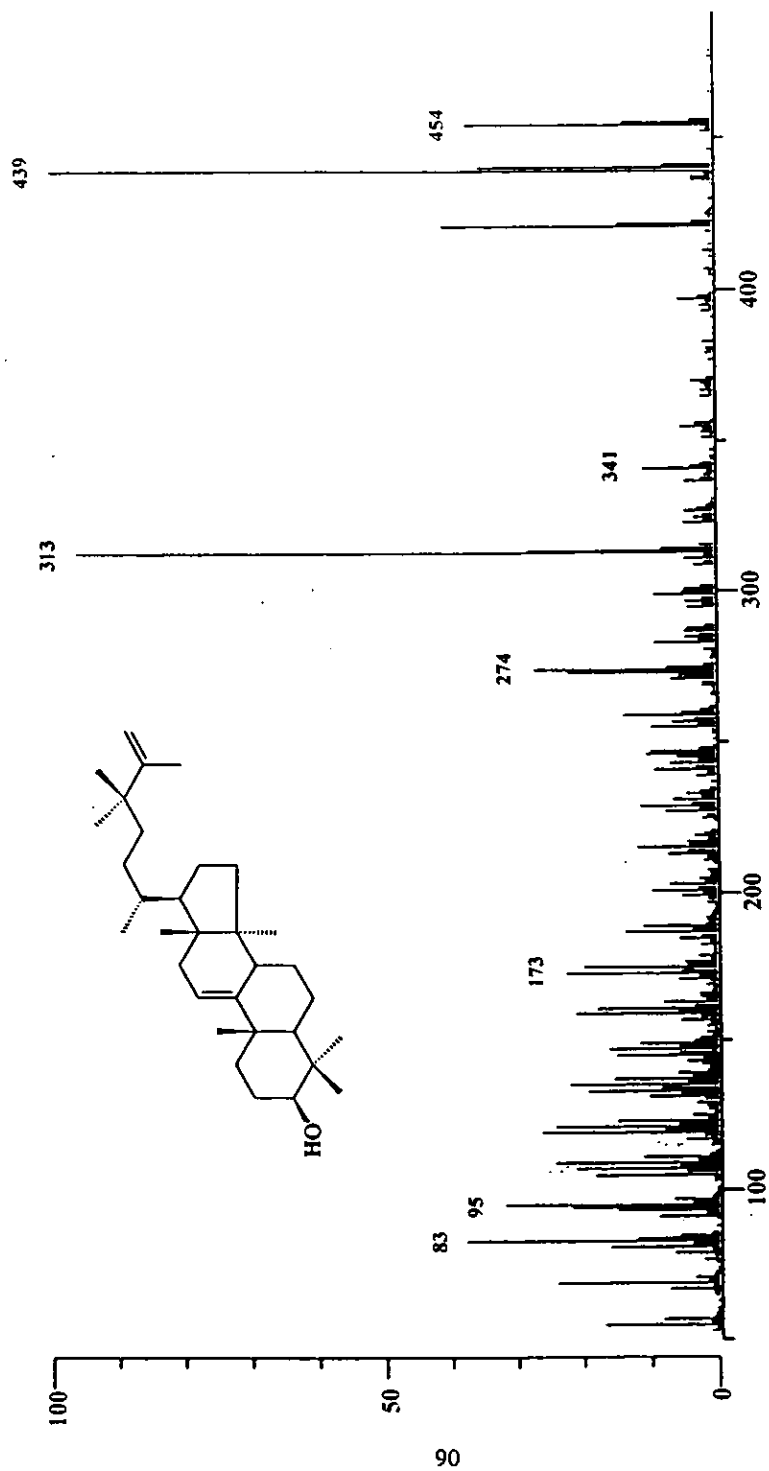
Estas diferencias y el patrón de fragmentación observado en el espectro de masas, indicaban claramente que el producto 18 contenía dos metilos en C-24, en lugar de uno. El conjunto de evidencias presentadas permitieron identificar al producto como el acetato del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ilo (18a). De nueva cuenta la estructura se confirmó por difracción de Rayos X (Figura 13).



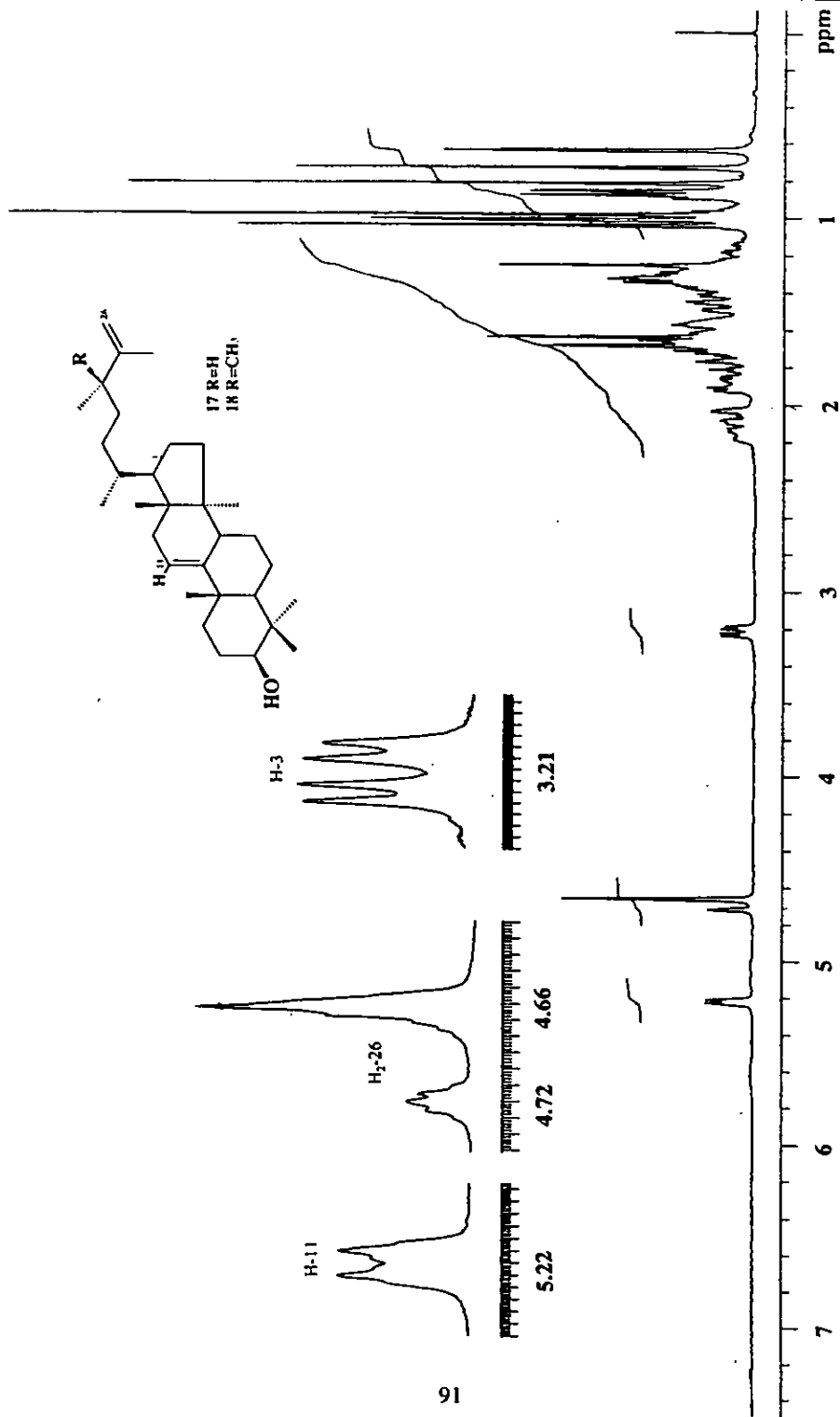
Espectro 10. IR de la mezcla del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18).



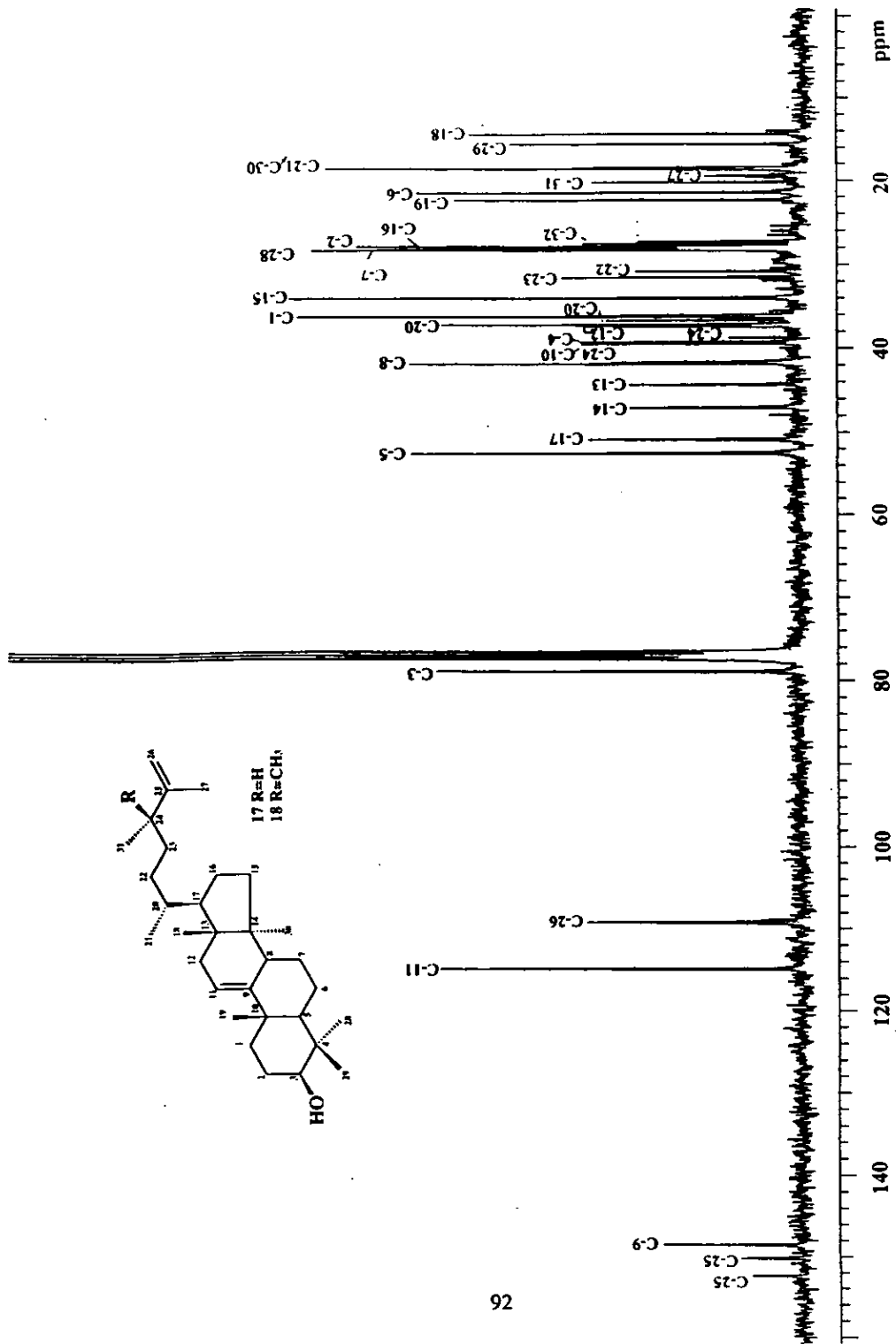
Espectro 11. Espectrometría de masas por impacto electrónico del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17).



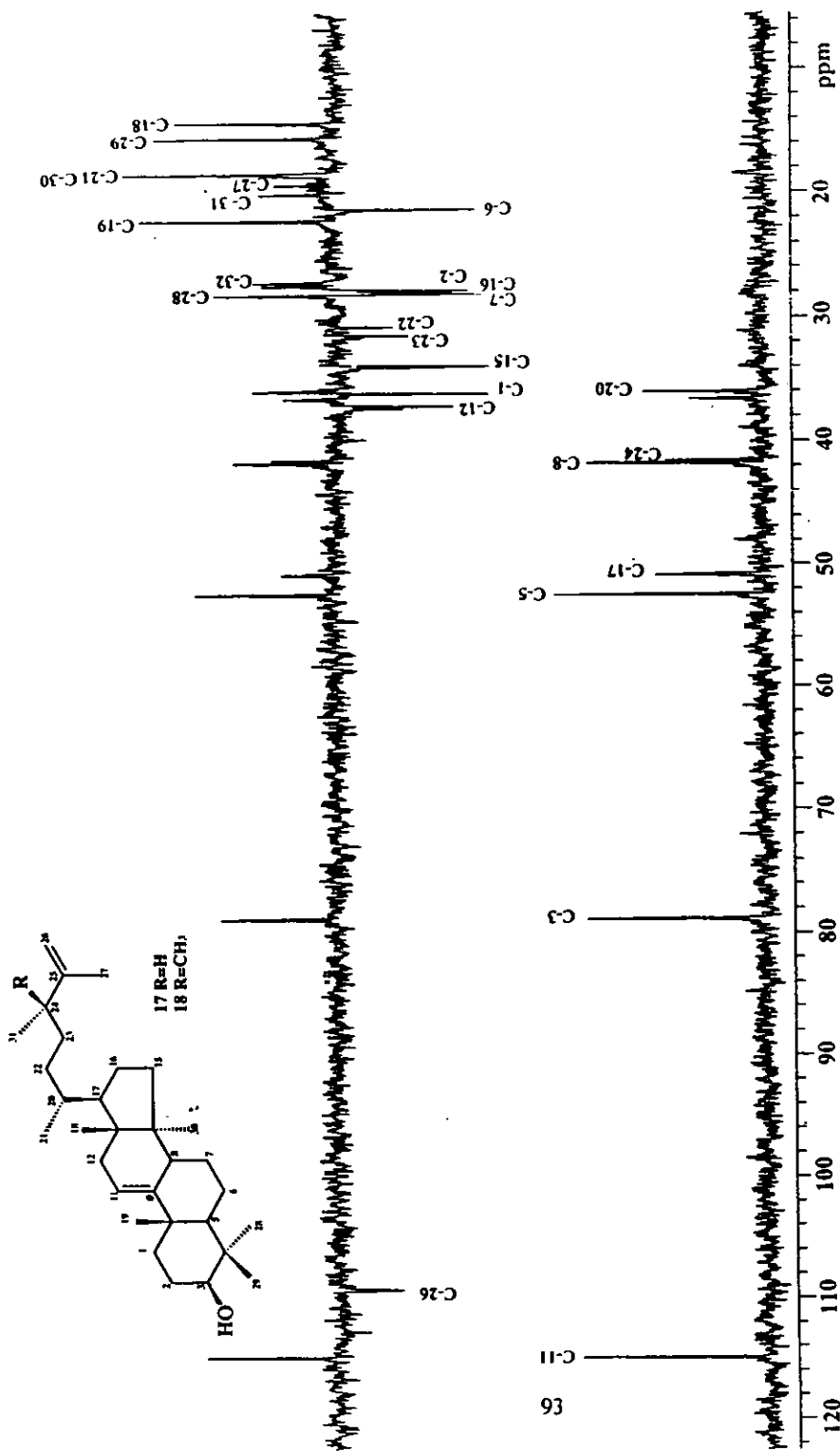
Espectro 12. Espectrometría de masas por impacto electrónico del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11), 25-en-3 β -ol (18).



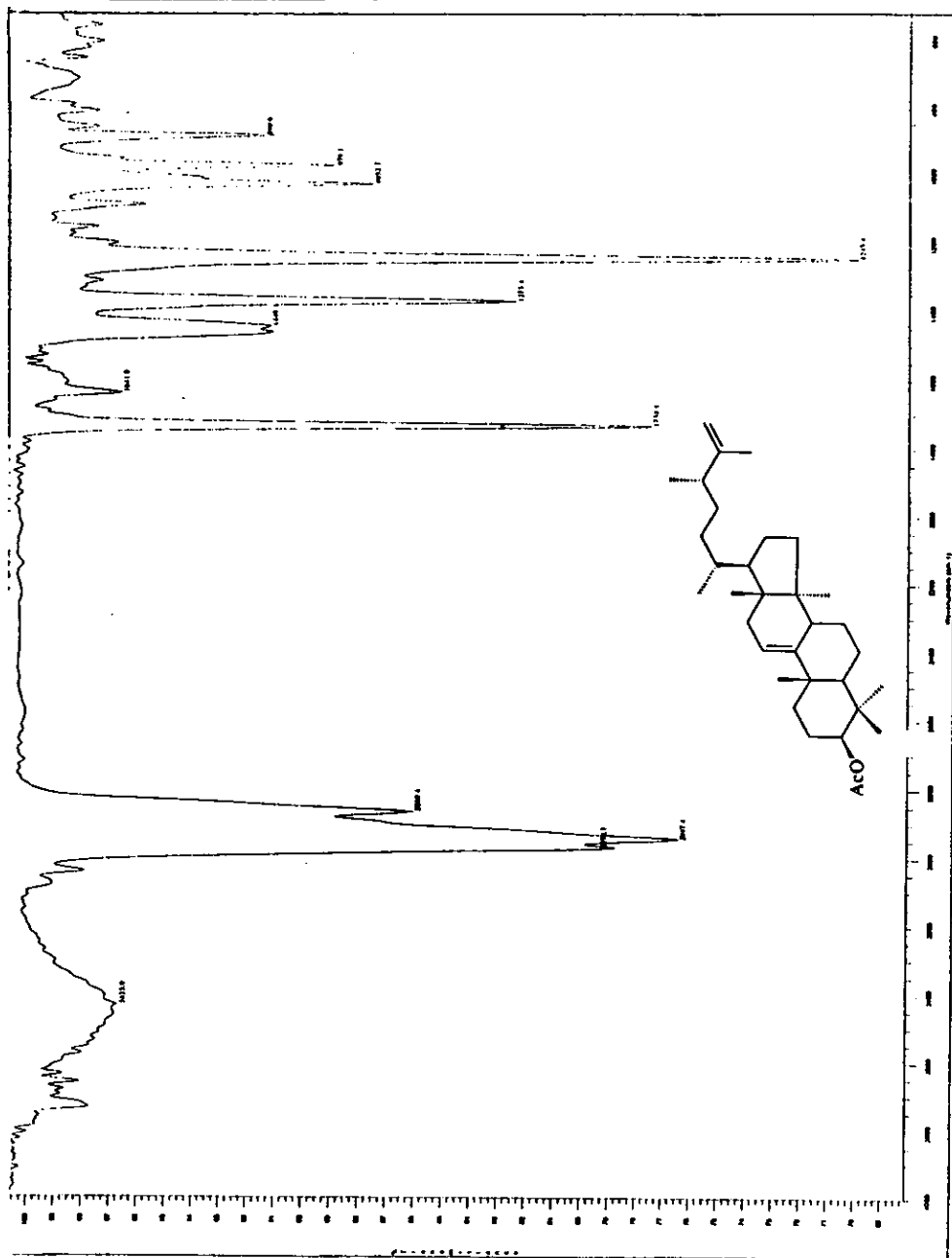
Espectro 13. RMN-¹H de la mezcla del (24*S*)-24-metil- α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil- α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18).



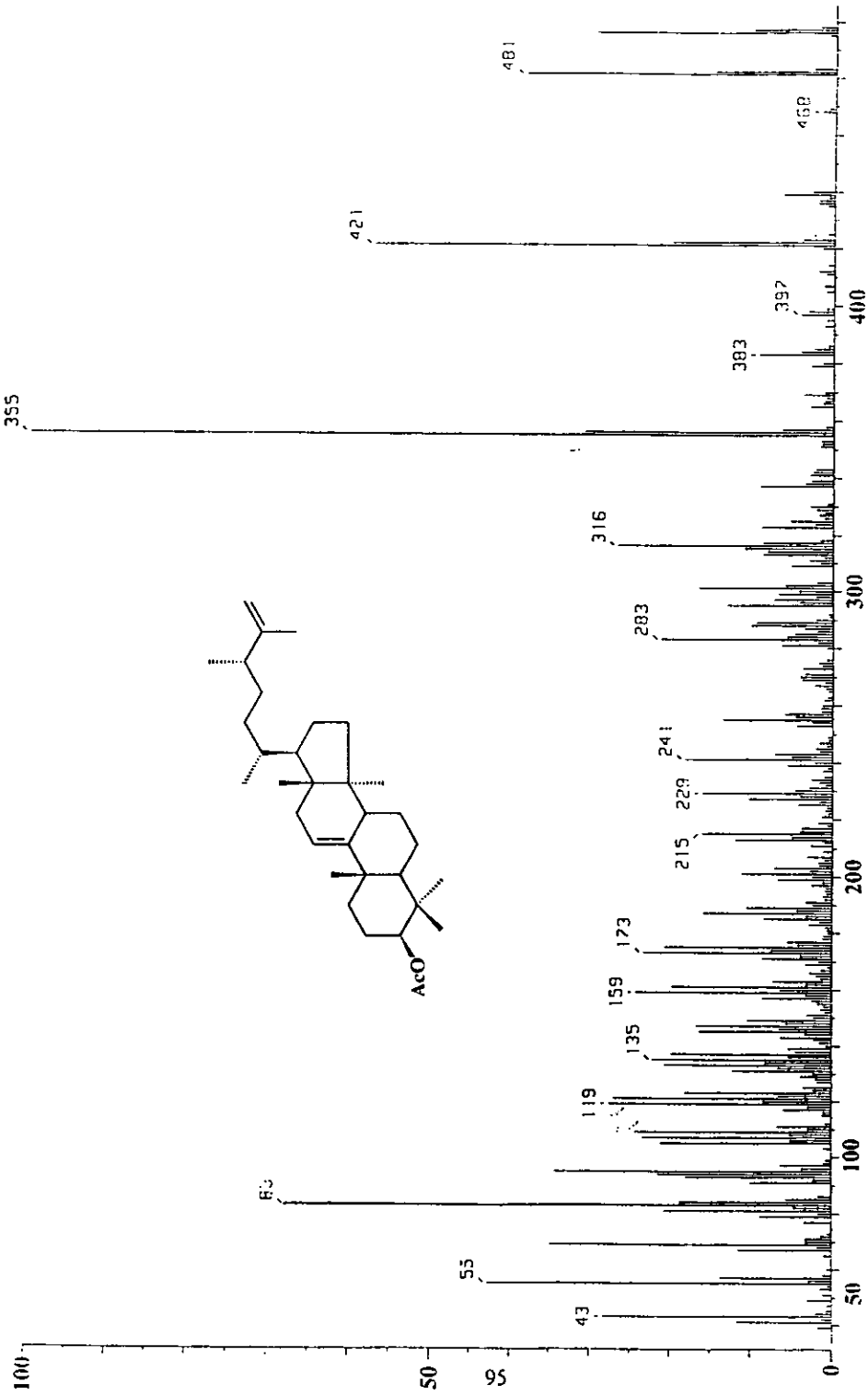
Espectro 14. RMN-¹³C de la mezcla del (24*S*)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17) y 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18).



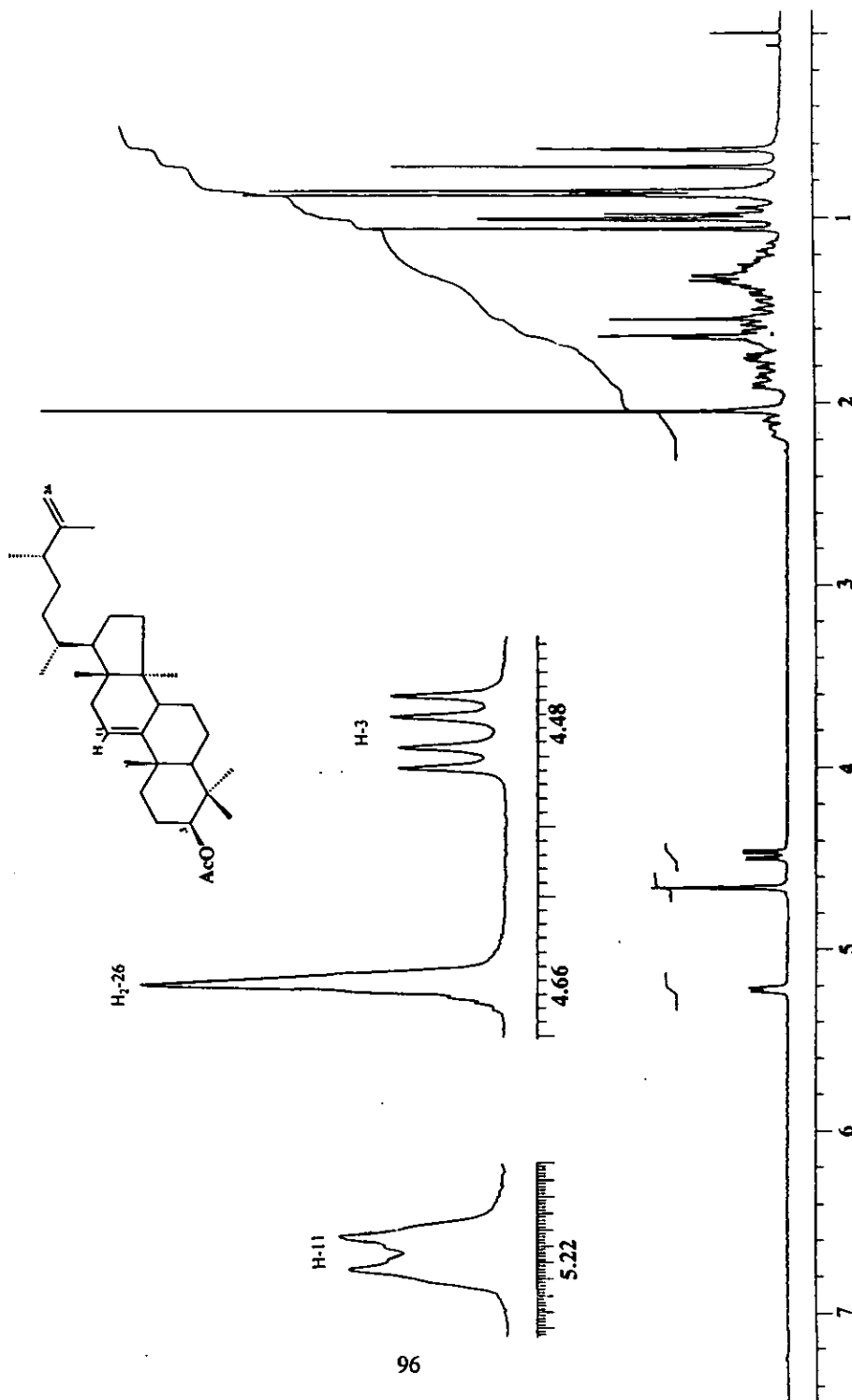
Espectro 15. RMN-¹³C modalidad DEPT de la mezcla del (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18).



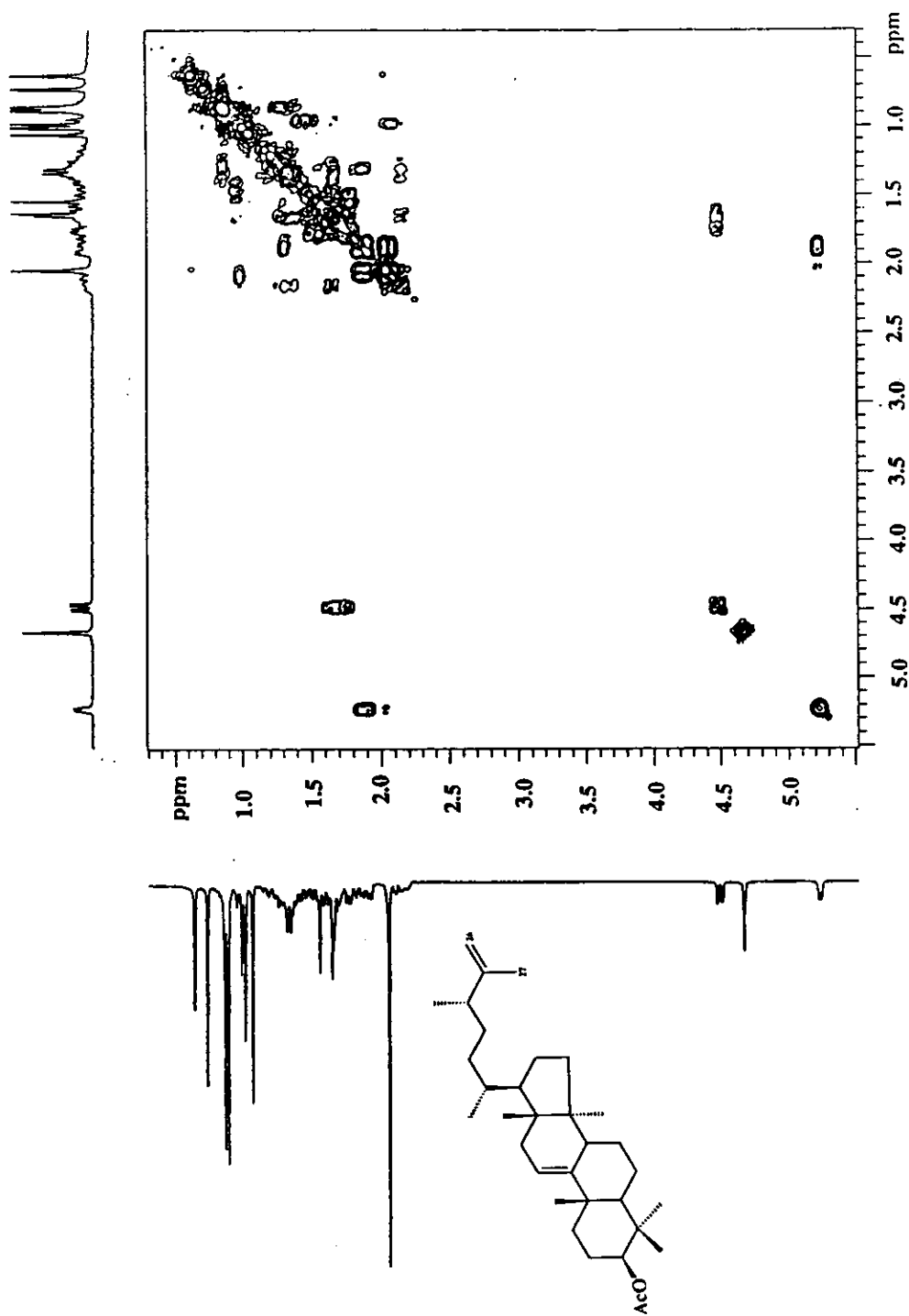
Espectro IR del acetato del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17a).



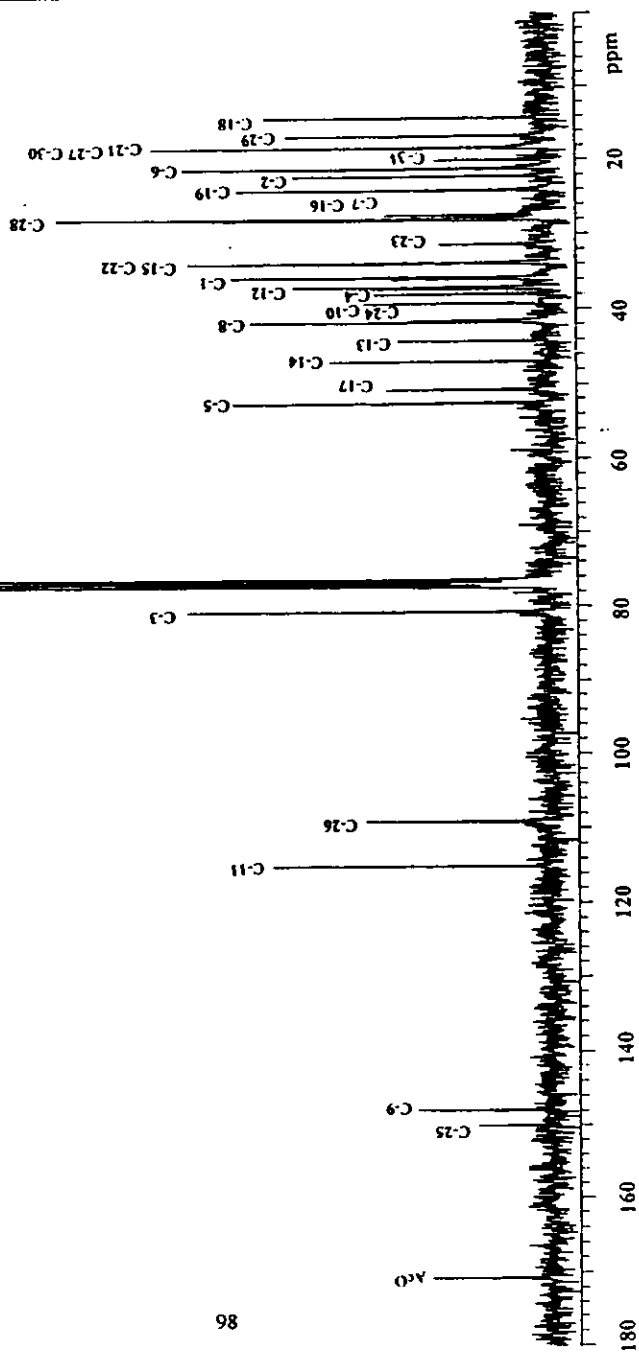
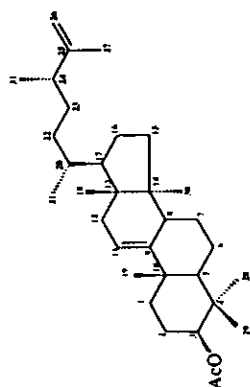
Espectro 17. Espectrometría de masas del acetato del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17a).



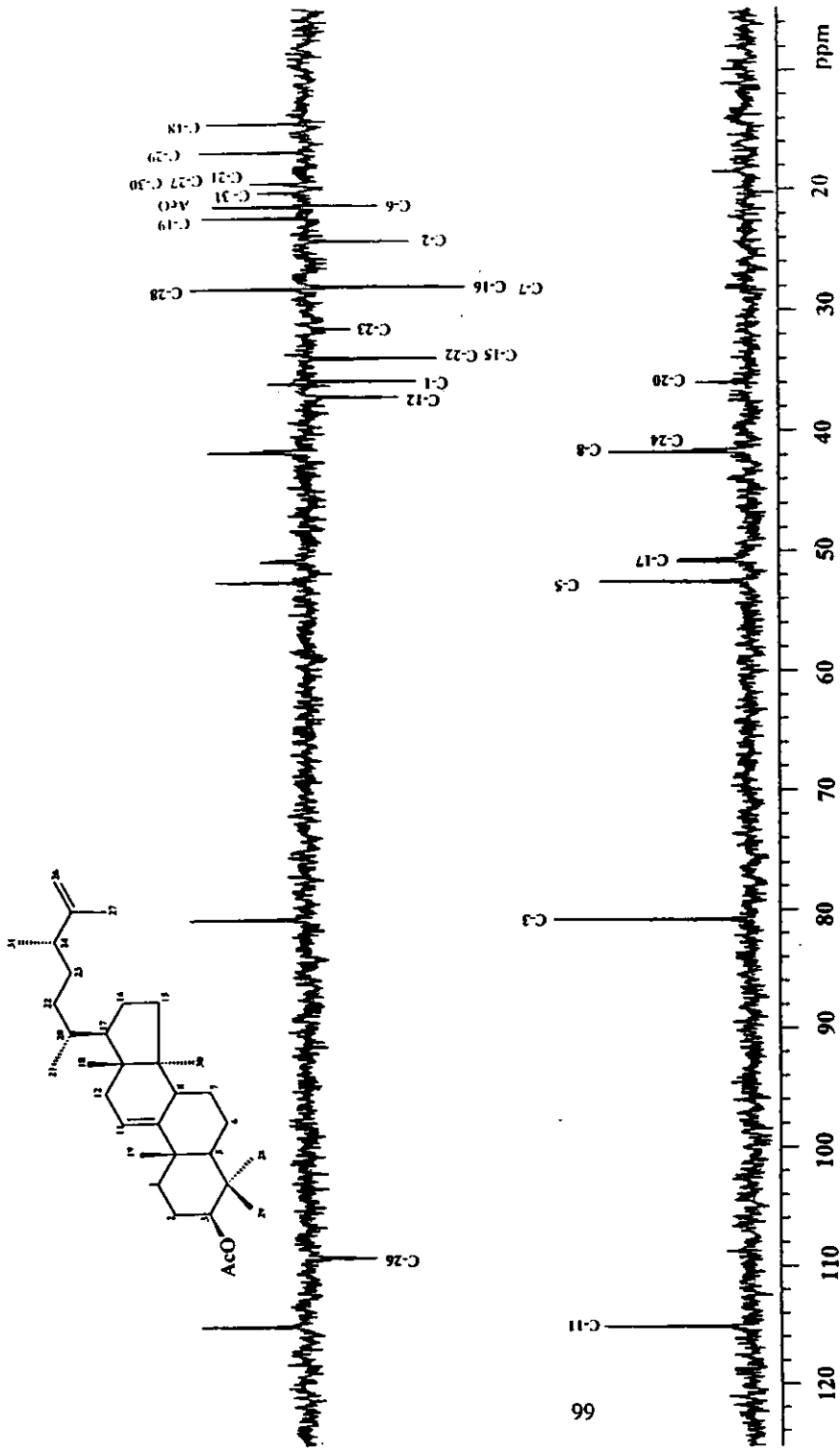
Espectro 18. RMN-¹H del acetato del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17n).



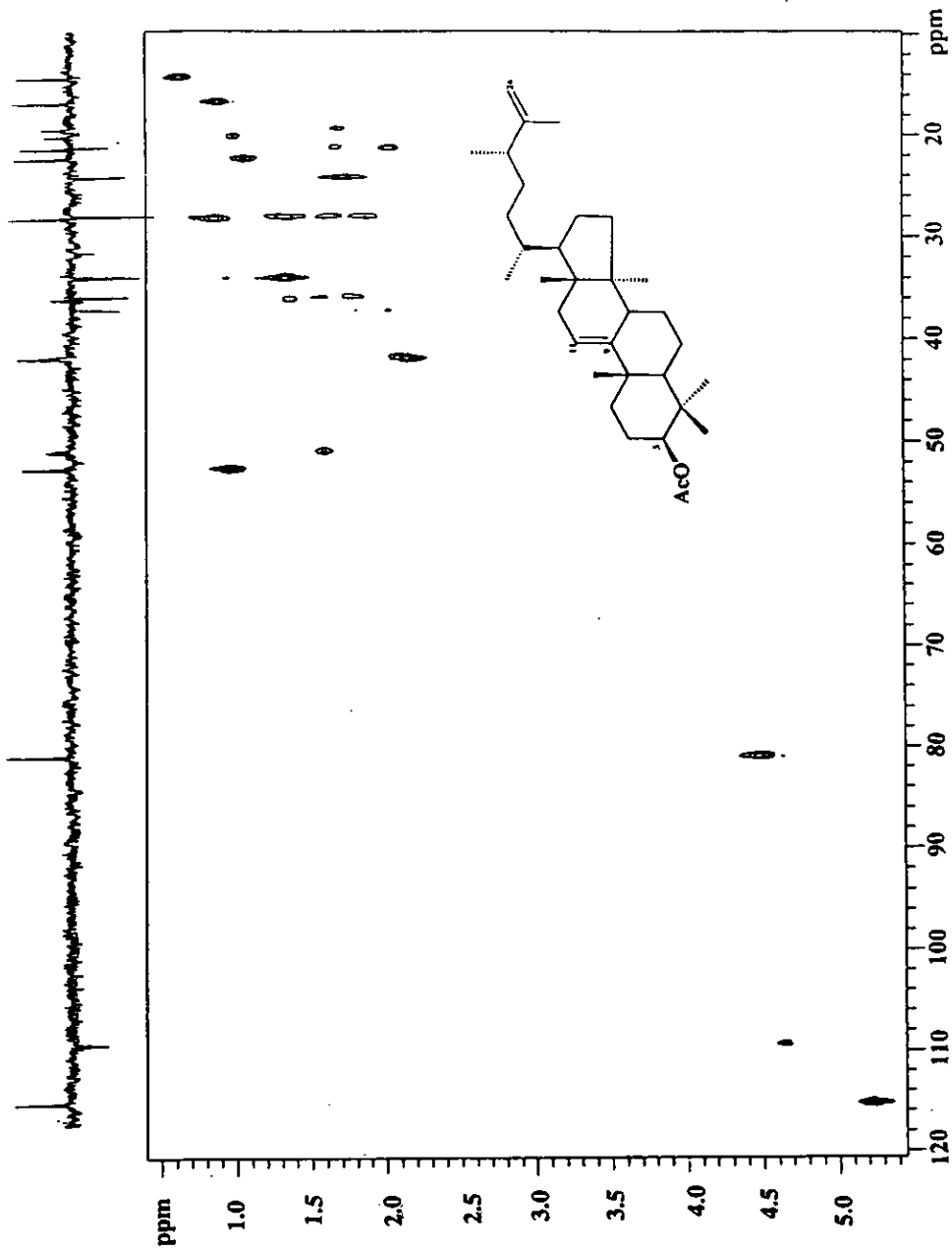
Espectro 19. RMN-¹H modalidad COSY del acetato del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17a).



Espectro 20. RMN-¹³C del acetato del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17a).



Espectro 21. RMN-¹³C modalidad DEPT del acetato del (24*S*)-24-metil-5α-ianosta-9(11),25-dien-3β-ol (17a).

Espectro 22. RMN-HETCOR del acetato del (24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a).

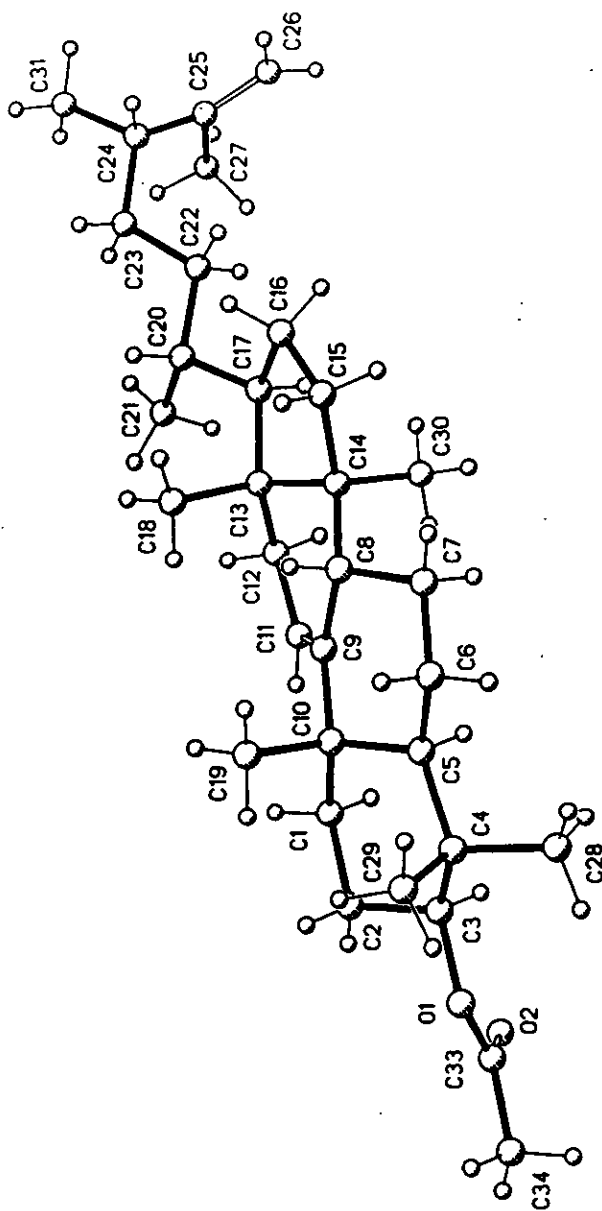
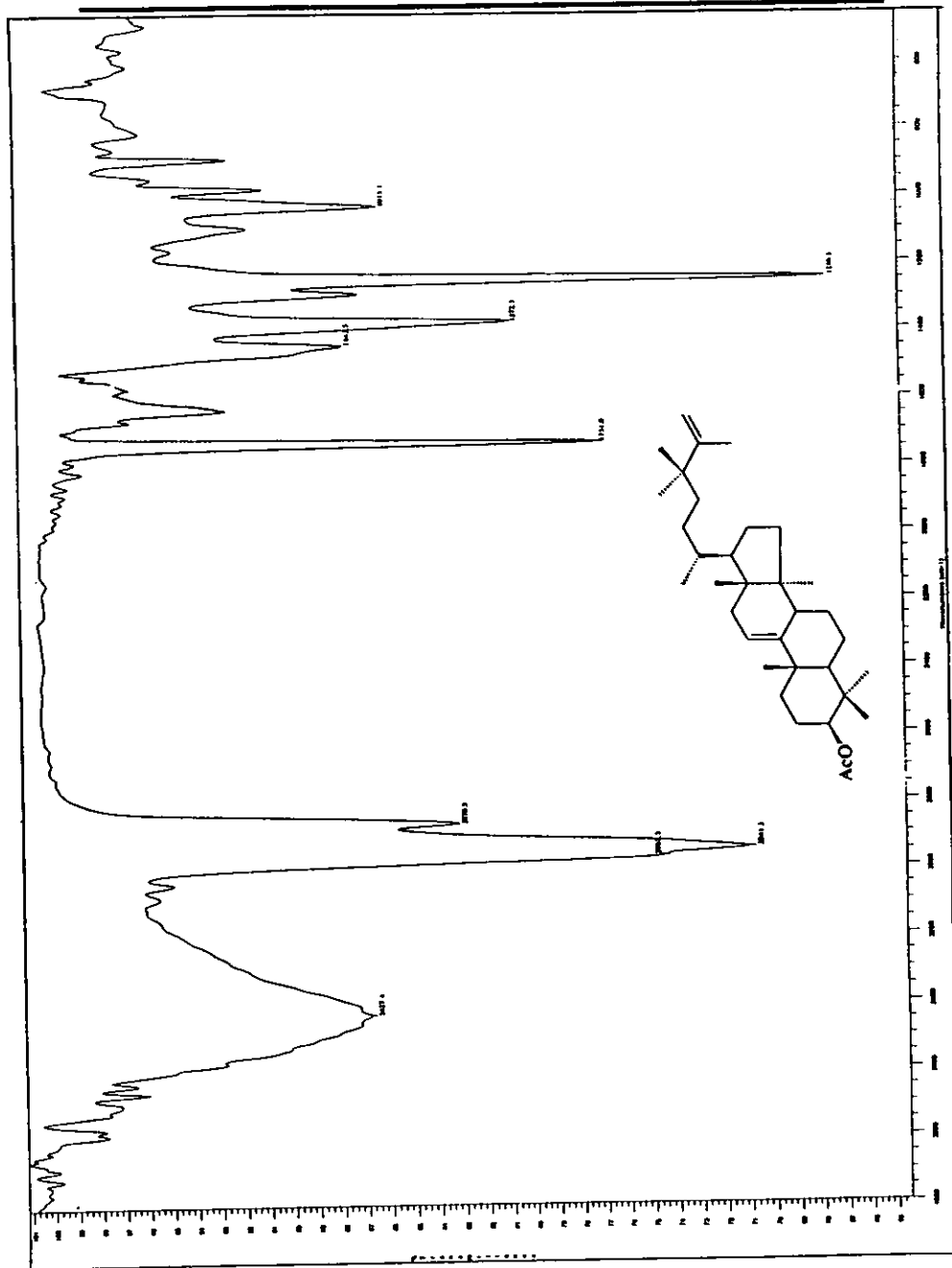
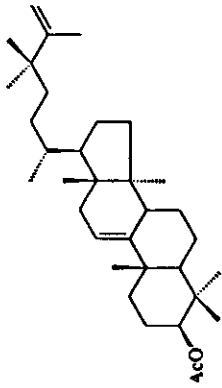
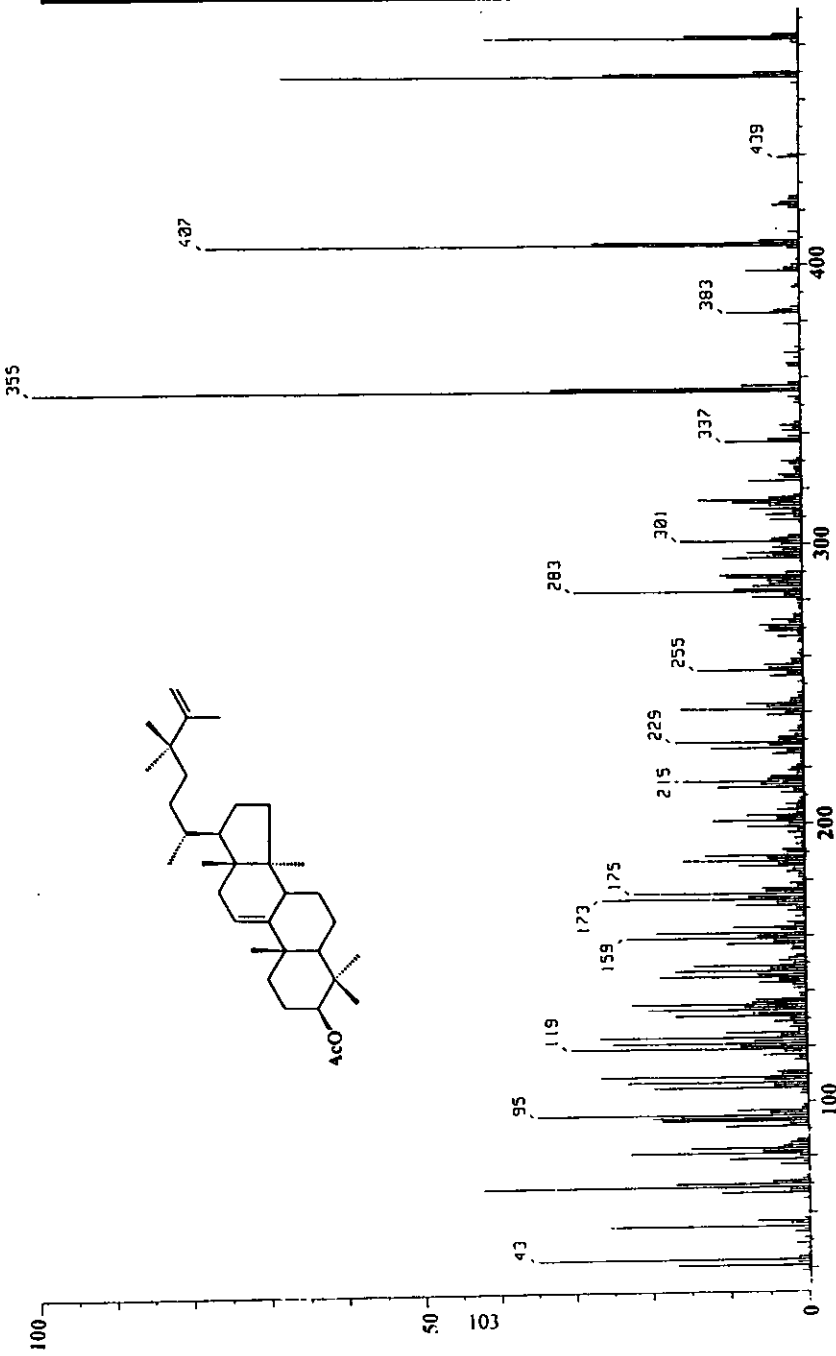


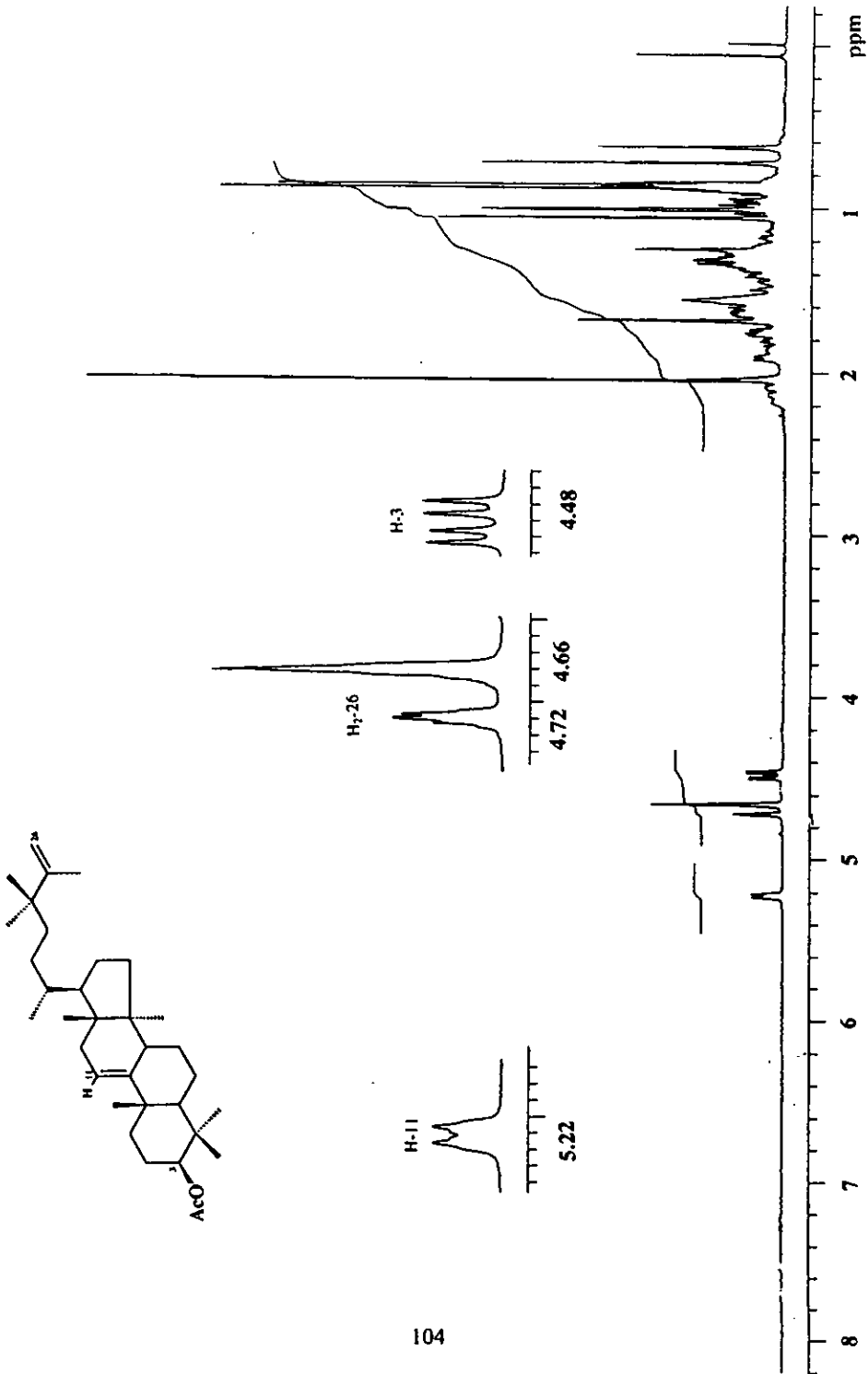
Figura 12. Vista estereoscópica del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17) obtenida por difracción de Rayos X.

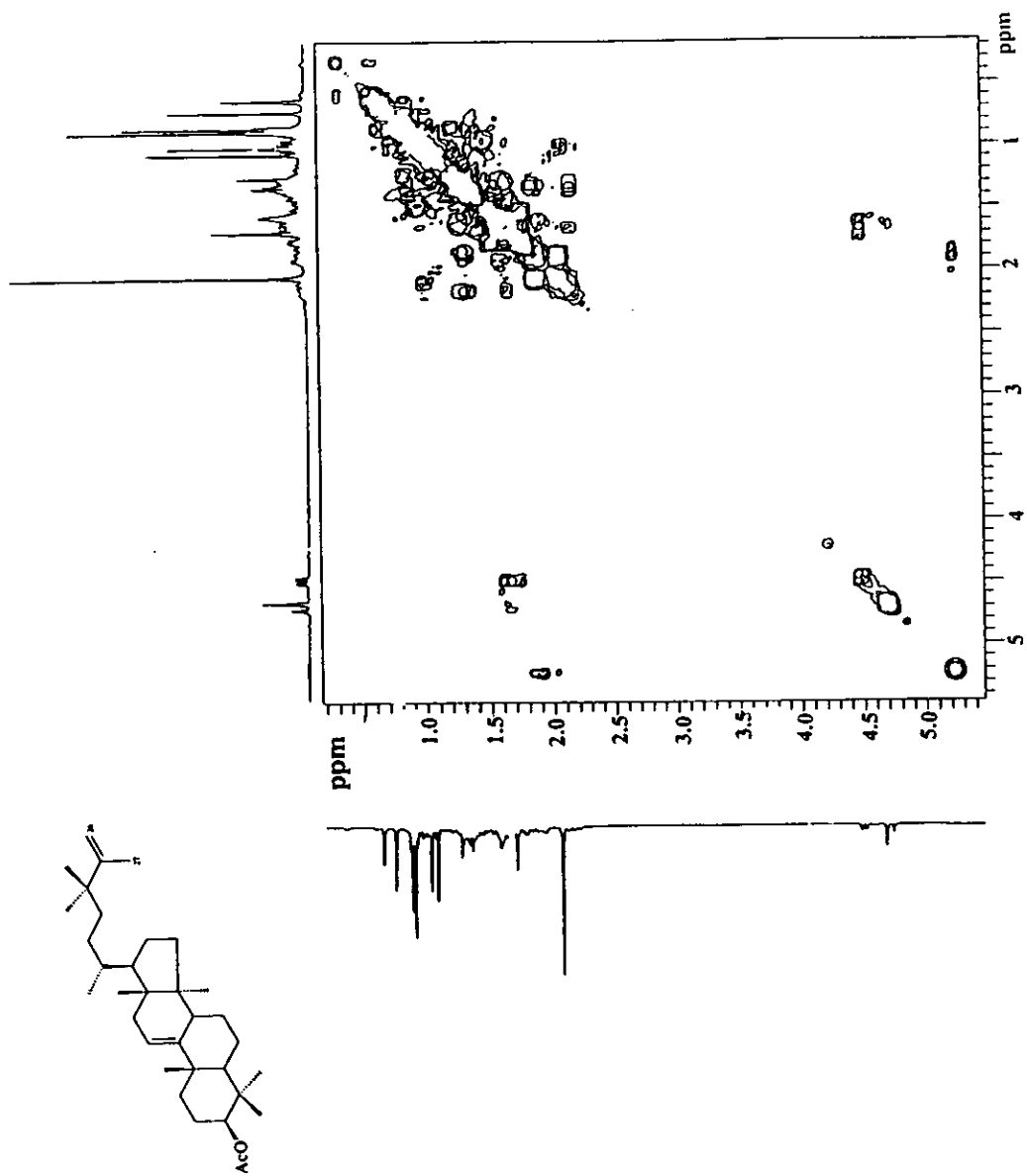


Espectro 23. IR del acetato del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18a).

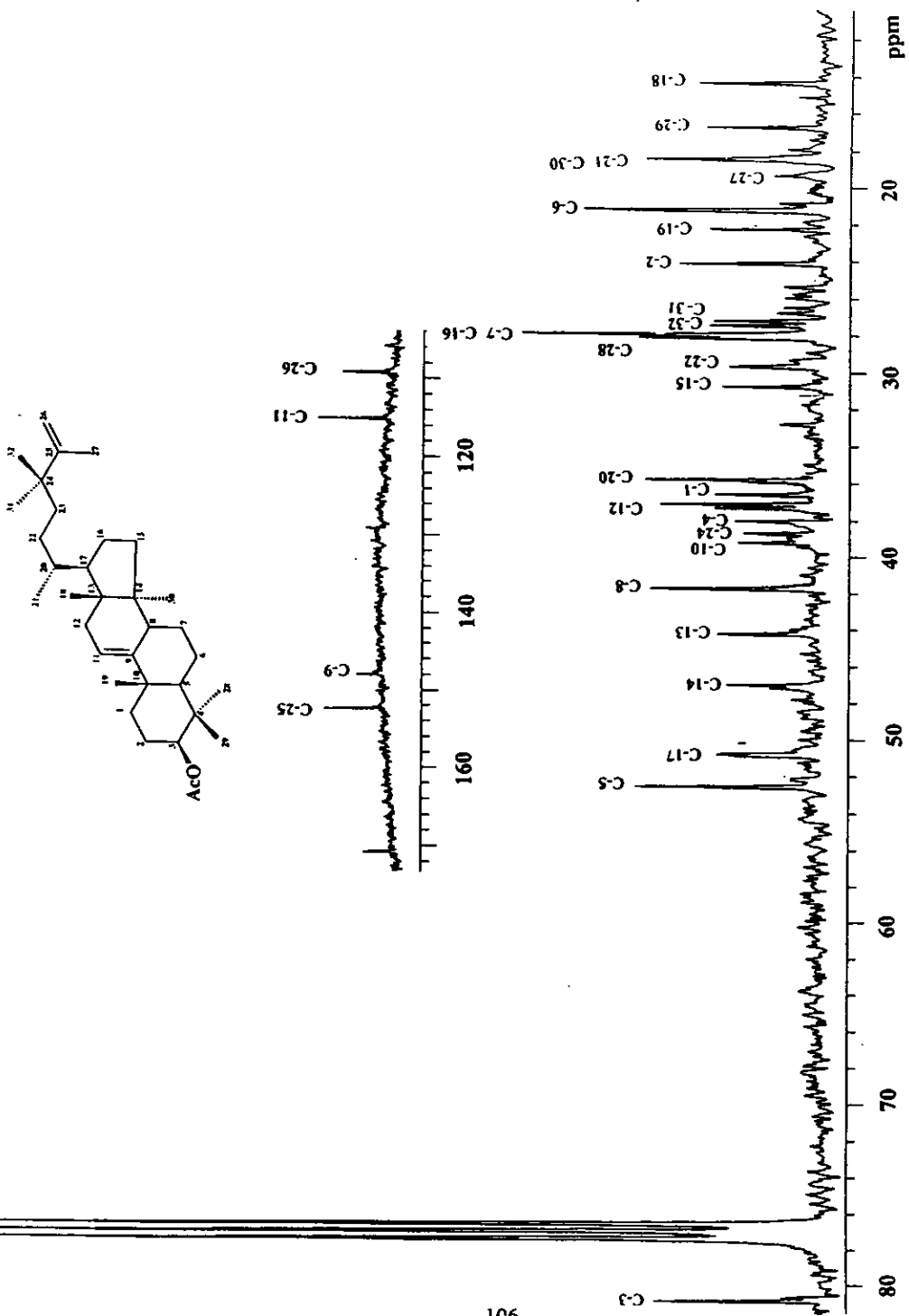


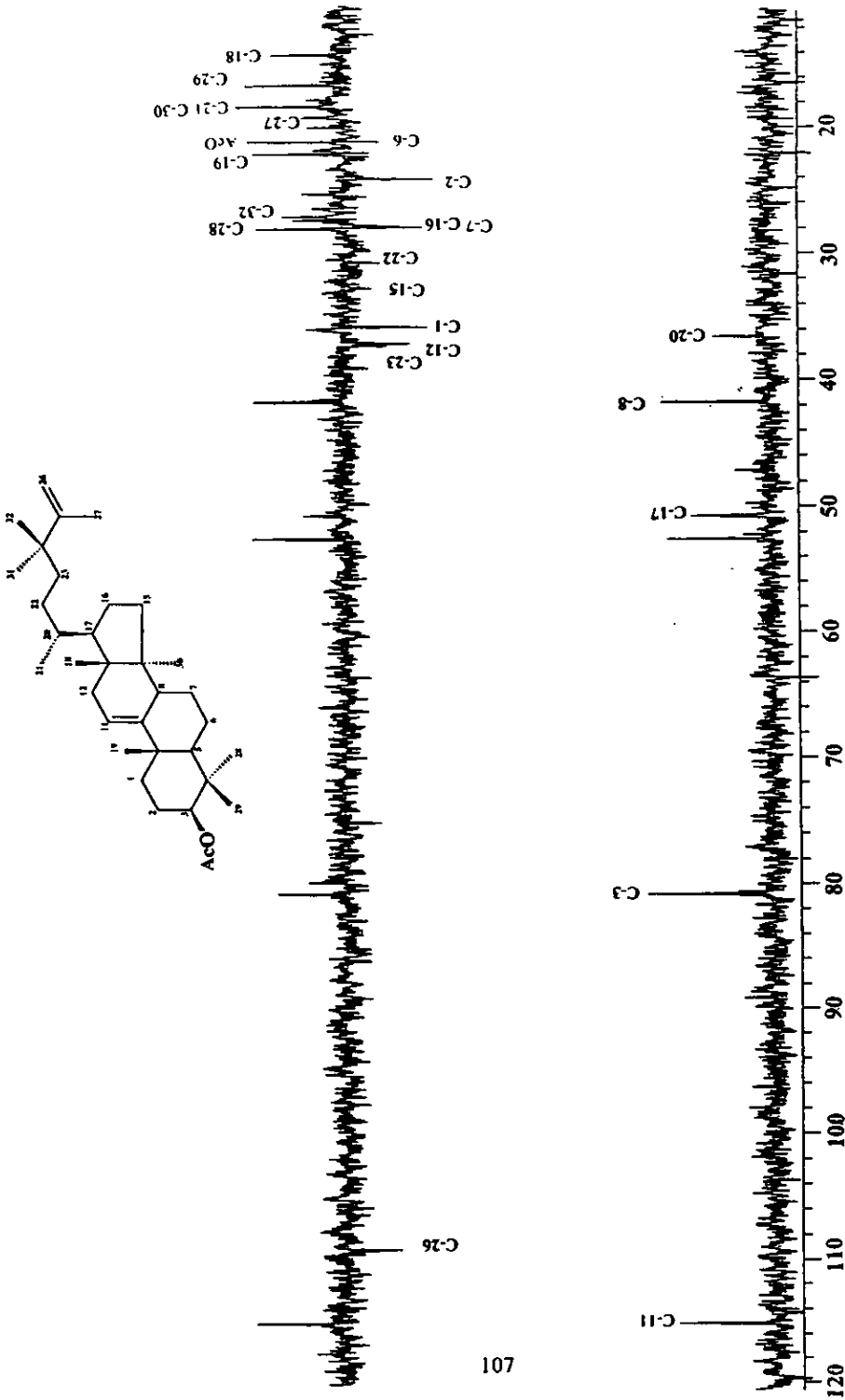
Espectro 24. Espectrometría de masas del acetato del 24,24-dimetil-Sa-lanosta-9(11), 25-en-3β-ol (18).

Espectro 25. RMN- ^1H del acetato del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18a).



Espectro 26. RMN-¹H modalidad COSY del acetato del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-en-3 β -ol (18a).

Espectro 27. RMN- ^{13}C del acetato del 24,24-dimetil-5 α -ianosta-9(11),25-en-3 β -ol (18a).



Espectro 28. RMN-¹³C DEPT del acetato del 2,4,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-en-3β-ol (18a).

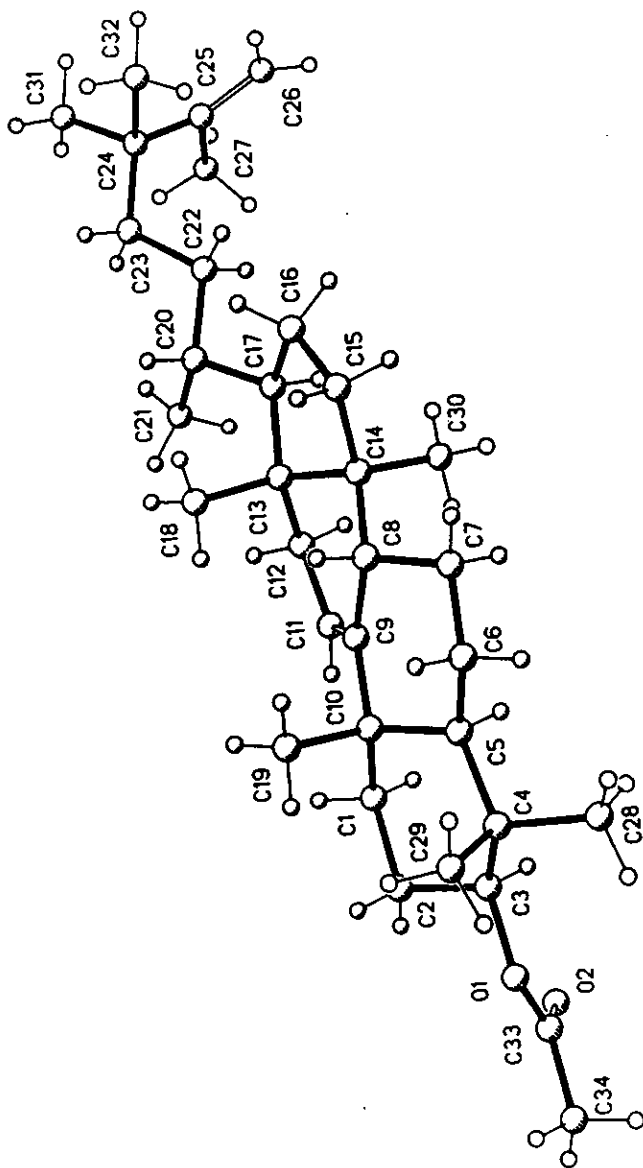


Figura 13. Vista estereoscópica del 24,24-dimetil-5 α -ianosta-9(11),25-en-3 β -ol (18) obtenida por difracción de Rayos X.

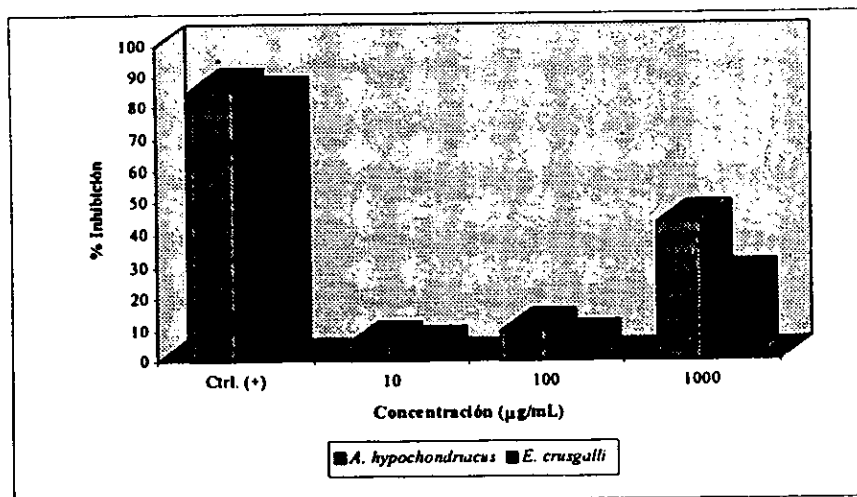
4.2 Estudio fitoquímico de *Scaphyglottis livida*

La preselección de la especie *Scaphyglottis livida* se realizó con base en el criterio etnomédico. Durante la realización de los ensayos biológicos preliminares conducentes a la determinación de la potencialidad inhibidora del crecimiento vegetal del extracto crudo de la planta *S. livida*, se determinó que el mismo no modifica significativamente el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochoa crusgalli*. Los resultados de la determinación del efecto del extracto crudo se resumen en la Gráfica 3.

No obstante a los resultados de las evaluaciones biológicas obtenidos para *S. livida*, se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico de las fracciones poco polares con la finalidad de contribuir con los estudios referentes al contenido metabólico de las orquídeas mexicanas.

Tabla 16. Efecto fitotóxico del extracto crudo de *S. livida* sobre el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochoa crusgalli*.

Concentración (ppm)	% Inhibición	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
10	5.6	4.0
100	9.8	6.3
1000	43.4	25.1
Control positivo 2,4-D (5 µg/mL)	85.5	83.0
CL ₅₀	>1000 ppm	>1000 ppm



Gráfica 3. Inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* inducido por el extracto crudo de *S. livida*.

La preparación del extracto se realizó mediante un proceso de maceración tal como se indica en la sección experimental (Inciso 3.6.1). Posteriormente, el extracto se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de ocho fracciones primarias (Cuadro 6).

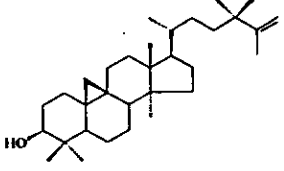
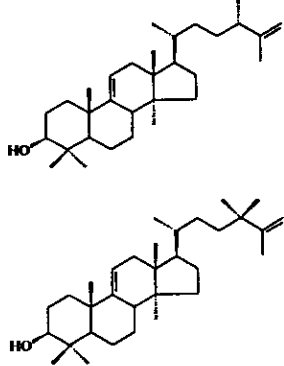
De la fracción primaria SL-D, precipitó de forma espontánea un sólido blanco el cual, mediante sucesivas cromatografías preparativas permitió la obtención de unos cristales amorfos, los cuales se caracterizaron como el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24).

Por otro lado, el análisis por CG-EM del remanente de la fracción SL-D permitió la detección de dos metabolitos adicionales. Por lo anterior, la fracción se sometió a diversos procedimientos químicos y cromatográficos (Inciso 3.2.1), lo cual permitió el aislamiento y posterior caracterización de los otros dos metabolitos también de tipo triterpenoide. Dichos compuestos se aislaron en mezcla bajo la forma de sus derivados monoacetilados y resultaron idénticos al (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y el 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18) obtenidos de la especie *M. densa*.

En el Cuadro 12 se indican las estructuras de los compuestos aislados y sus rendimientos correspondientes.

El producto 24 se caracterizó mediante la aplicación de técnicas espectrométricas y espectroscópicas convencionales, así como de métodos químicos. En el caso del compuesto (24*S*)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17a) y el 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18a) las estructuras se confirmaron por comparación de los datos espectroscópicos de la mezcla sin acetilar con los correspondientes a la mezcla sin acetilar de los mismos productos obtenidos de *M. densa*.

Cuadro 11. Metabolitos aislados de la especie *Scaphyglottis livida*.

Compuesto	Fracción	Rendimiento
 <p>24,24-dimetil-9,19-ciclanosta-9(11),25-dien-3β-ol (24)</p>	SL-D10	0.01 %
 <p>Mezcla del (24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17) y del 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (18)</p>	SL-D12	0.006 %

De manera adicional, los espectros de masas generados al analizar la mezcla acetilada por la técnica de gases masas, resultaron idénticos a los derivados monoacetilados de los productos 17a y 18a obtenidos de *M. densa*.

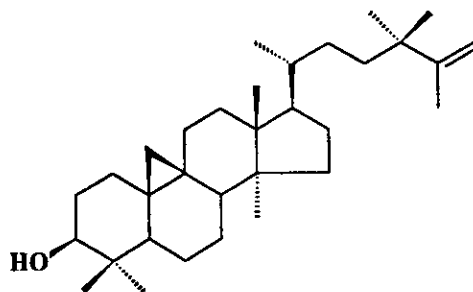
4.2.1 Caracterización del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24).

El compuesto 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24) se obtuvo de la fracción primaria SL-D en forma cristalina.

Su espectro de IR (Espectro 29), presenta absorciones asociadas con grupos hidroxilos y olefinicos. El tratamiento del producto 24 con anhídrido acético y piridina, proporcionó el derivado monoacetilado 24a, confirmando químicamente la presencia de un grupo hidroxilo en la molécula. En las Tablas 17-20 se resumen sus constantes espectroscópicas y espectrométricas.

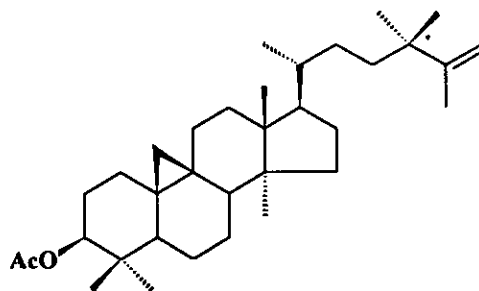
El ión molecular de este compuesto se observa en el espectro de masas en una relación m/z de 454 (Espectro 30), y corresponde a la fórmula molecular de $C_{32}OH_{52}$, la cual permite siete grados de insaturación. El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas generado por este compuesto se resume en la Figura 14.

Tabla 17. Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24).



Fórmula molecular	C ₃₂ H ₅₄ O
Peso molecular	454
Punto de fusión	207-210°C
IR $\nu_{\text{máx}}$ KBr cm ⁻¹ (Espectro 29)	3387, 2926, 2867, 1645, 1456, 1375, 889
EMIE m/z (int. rel.) (Espectro 30)	454 [M ⁺ (49)], 439 (60), 422 (39), 394 (27), 367 (21), 313 (100), 299 (20), 259 (25), 241 (15), 218 (12), 203 (38), 175 (68)

Tabla 18. Constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas del acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24a).



Fórmula molecular	C ₃₄ O ₂ H ₅₆
Peso molecular	496
Punto de fusión	144-146°C
IR $\nu_{\text{máx}}$ KBr cm ⁻¹ (Espectro 34)	2944, 2868, 1735, 1638, 1468, 1374, 1248, 1027, 980, 892
EMIE m/z (int. rel.) (Espectro 35)	496 [M ⁺ (26)], 481 (21), 436 (100), 421 (97), 367 (29), 355 (3), 314 (37), 297 (50), 255 (10), 241 (10), 229 (18), 215 (21), 203 (55), 175 (76)

Tabla 19. Datos de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm) del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ol (24) y acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ol (24a).

Protón	Compuesto	
	24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ol (24)	Acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ol (24a)
H ₃ -18	0.95 (s)	0.95 (s)
H ₃ -21	0.85 (d, J=6.5 Hz)	0.86 (d, J=6.3 Hz)
H ₃ -27	1.68 (d, J=1.2 Hz)	1.68 (d, J=1.2 Hz)
H ₃ -28	0.81 (s)	0.89 (s)
H ₃ -29	0.96 (s)	0.84 (s)
H ₃ -30	0.88 (s)	0.89 (s)
H ₃ -31	1.02 (s)	1.02 (s)
H ₃ -32	1.01 (s)	1.02 (s)
H ₂ -19	0.32 (d, J=4.0 Hz), 0.55 (d, J=4.0 Hz)	0.33 (d, J=4.2 Hz), 0.58 (d, J=4.2 Hz)
H ₂ -26	4.66 (sa), 4.72 (m)	4.66 (sa), 4.72 (m)
H-3α	3.28 (dd, J=11.0 y 4.5 Hz)	4.57 (dd, J=10.8 y 4.8 Hz)
AcO	---	2.04 (s)

Los desplazamientos químicos son relativos al TMS y las asignaciones se realizaron por una combinación de COSY y por comparación de los desplazamientos químicos con los asignados a compuestos relacionados.

Tabla 20. Datos de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm) del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24) y acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24a).

Carbón	Compuesto	
	24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24)	Acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24a)
C-1	30.36	31.63
C-2	26.06	26.83
C-3	78.85	80.70
C-4	31.93	39.47
C-5	48.78	47.19
C-6	21.09	20.91
C-7	28.09	28.11
C-8	47.95	47.78
C-9	19.98	20.18
C-10	40.46	26.01
C-11	25.99	25.81
C-12	35.55	35.54
C-13	45.22	45.27
C-14	47.10	48.82
C-15	32.84	32.86
C-16	26.47	26.53
C-17	52.13	52.15
C-18	17.95	17.91
C-19	29.87	29.74
C-20	36.57	36.62
C-21	18.43	18.46
C-22	30.71	30.77
C-23	37.35	37.43
C-24	38.70	38.74
C-25	152.43	152.41
C-26	109.27	109.25
C-27	19.36	19.40
C-28	25.41	25.43
C-29	13.97	15.14
C-30	19.29	19.28
C-31	27.49	27.50
C-32	27.21	27.23
AcO	---	21.29, 170.91

Las asignaciones se realizaron con base en el análisis de los espectros DEPT y HETCOR y por comparación de los desplazamientos químicos con aquellos asignados a compuestos relacionados.

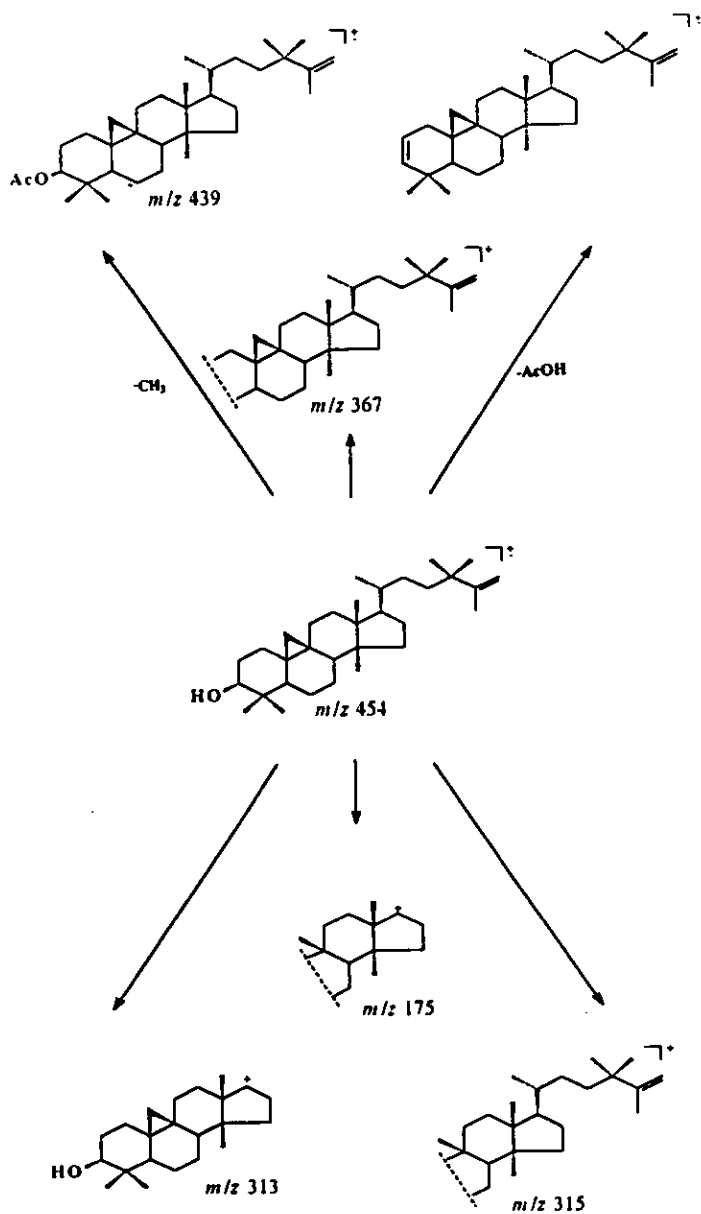


Figura 14. Fragmentos de masas observados en el espectro del acetato del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta,25-en-3 β -ol (24).

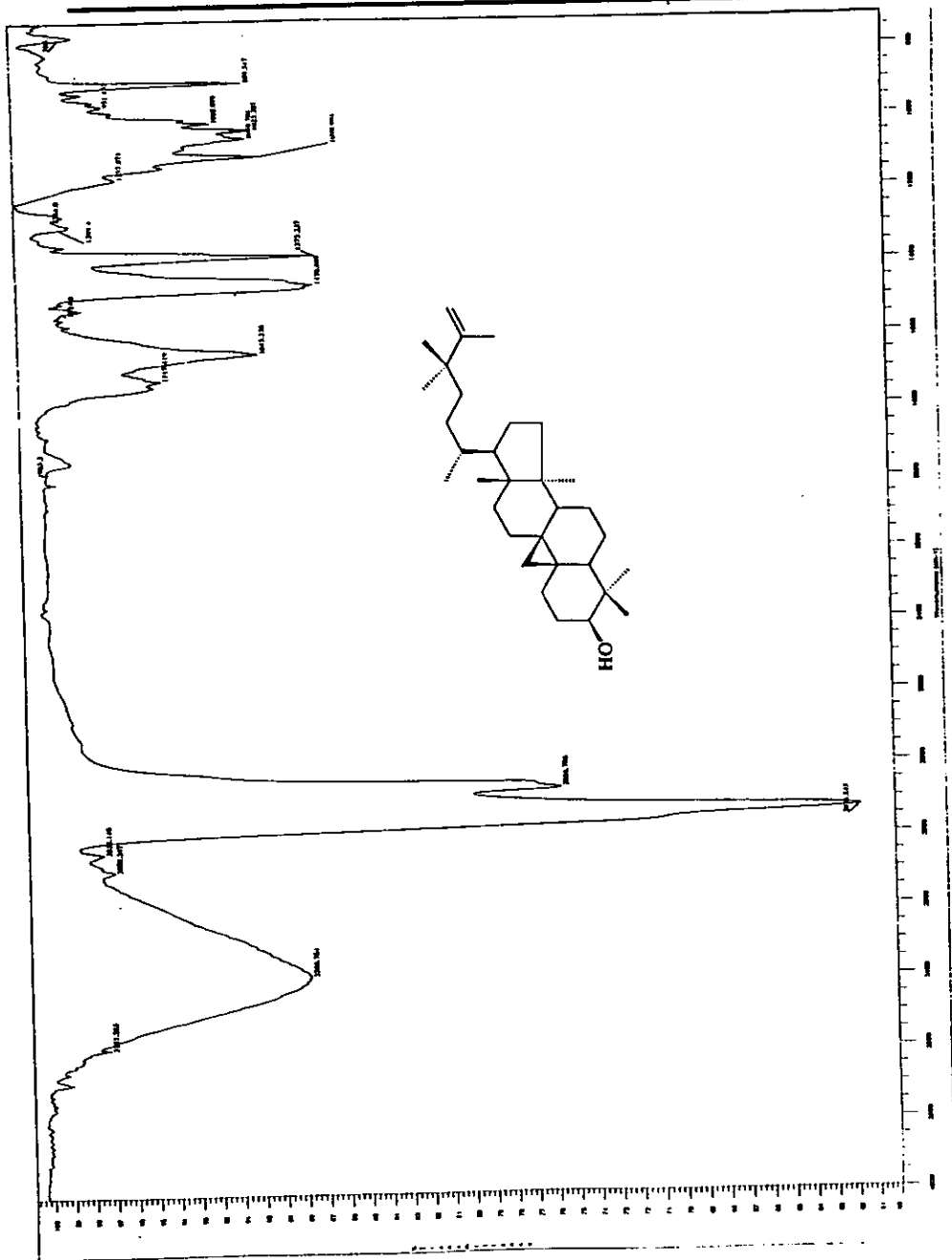
Los espectros de RMN mostraron el perfil típico de un triterpeno de tipo cicloartano (Kikuchi *et al.*, 1981; Govardhan *et al.*, 1984; Arai *et al.*, 1989; Majumder y Pal 1990; Audier *et al.*, 1996; *inter alia*).

Así, en el espectro de RMN-¹H (Espectro 31), se observan dos dobletes ($J=4.0$ Hz) en δ_H 0.32 y δ_H 0.55, atribuibles a la función ciclopropanoide, presente en los triterpenos de tipo cicloartano. También se observa una señal asignable a los protones de un metileno vinílico (δ_H 4.66). Al igual que en el caso de los productos 17 y 18, la presencia de esta señal es congruente con la existencia de una doble ligadura terminal en la molécula. Se observan también, seis singuletes atribuibles a seis grupos metilo sobre carbonos cuaternarios alifáticos (δ_H 0.95, 0.81, 0.96, 0.88, 1.02, 1.01), uno de los cuales corresponde al metilo sobre una doble ligadura, (considerando su desplazamiento químico en δ_H 1.68). Por otra parte, se observa un doblete en δ_H 0.85 ($J=6.3$ Hz), asignables a un grupo metilo sobre un carbono terciario y la señal doble de dobles en δ_H 3.28 ($J=11.0$ y 4.5 Hz) correspondiente al hidrógeno geminal a una función carbinólica secundaria. Esta señal se desplaza paramagnéticamente (δ_H 4.57) en el derivado monoacetilado 24a (Espectro 34).

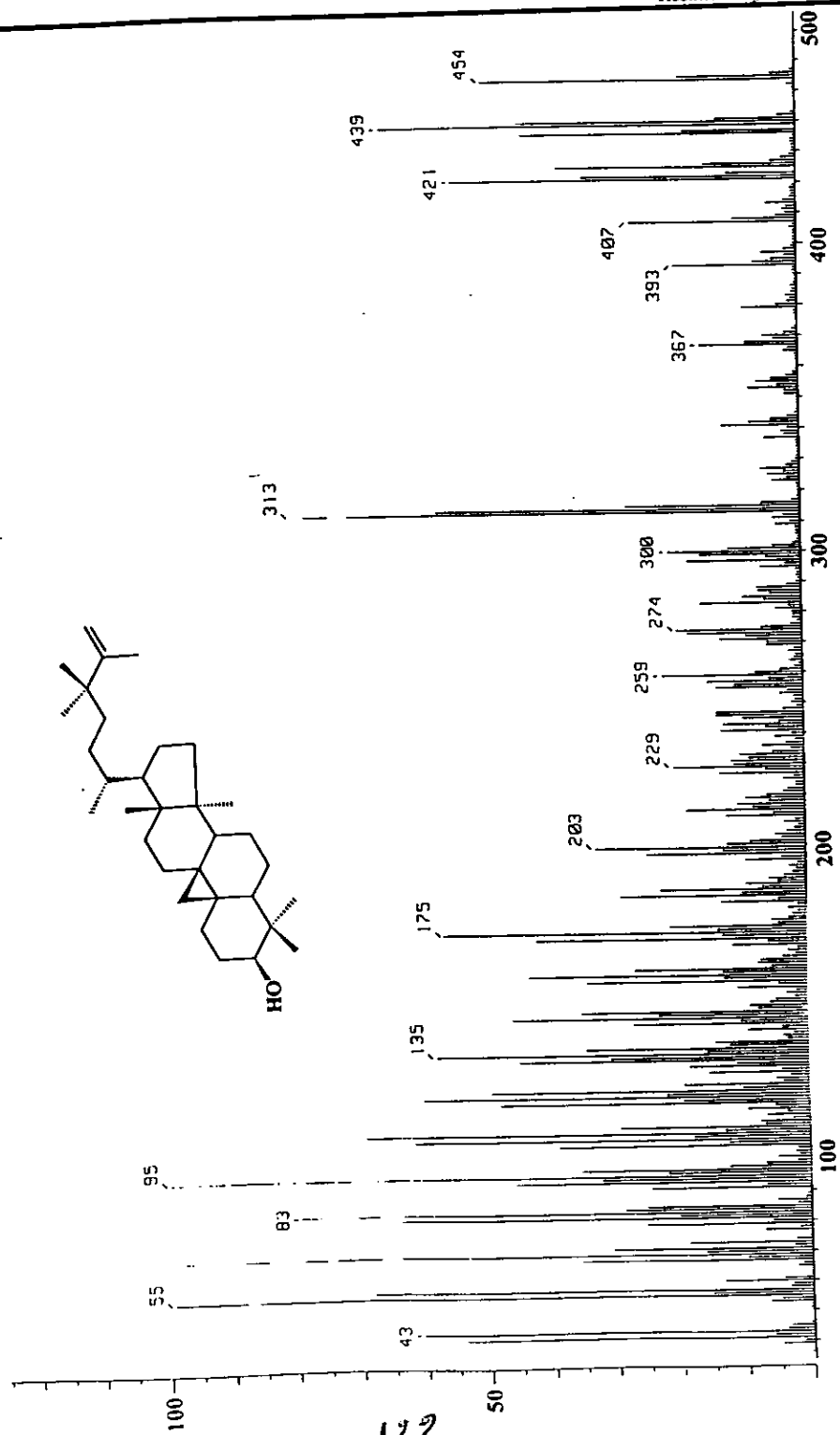
El espectro de RMN-¹³C (Espectro 32), presenta señales para 33 carbonos en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas.

El espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT (Espectro 33) indica claramente que las 33 señales presentes en el espectro corresponden a ocho metilos, doce metilenos, cinco metinos y ocho carbonos cuaternarios.

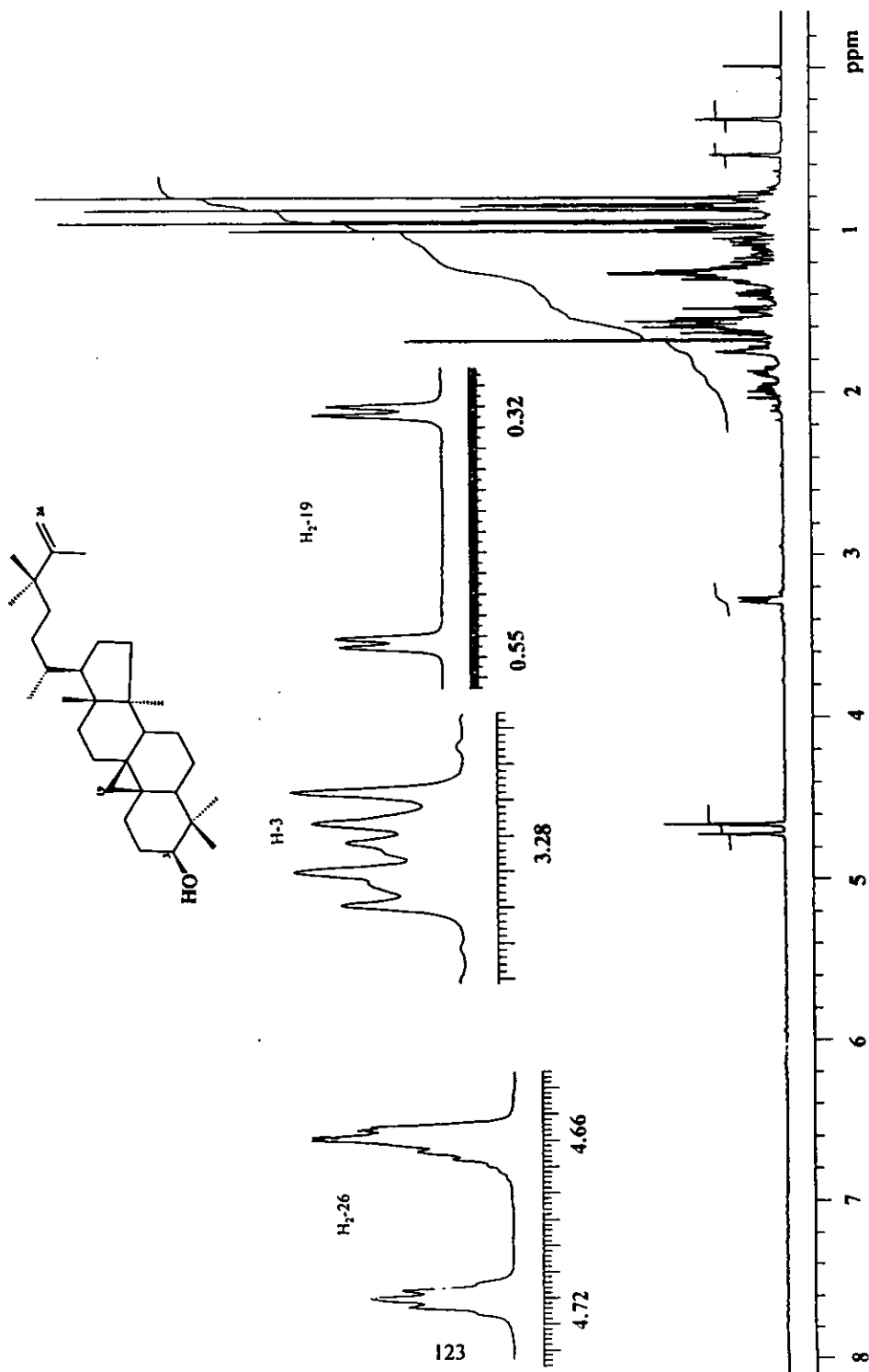
El análisis cuidadoso del espectro de RMN-¹³C (Tabla 21), permitió establecer que la cadena lateral del cicloartano 24, era idéntica a la de compuesto 18. El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas permitió confirmar esta propuesta. Por otro lado, los desplazamientos químicos observados para los carbonos del anillo A y para los metilos sobre C-4, permitieron establecer que la función alcohólica se encuentra en C-3. La apariencia de esta señal como un doblete de dobletes ($J=11.0$ y 4.5 Hz) en δ_H 3.28 permitió establecer la estereoquímica β del hidroxilo al igual que en el caso de los triterpenoides 17 y 18. El conjunto de evidencias presentadas en esta sección permitieron caracterizar el compuesto como el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (24). Cabe mencionar que esta es la primera descripción de este producto en la familia Orchidaceae. Sin embargo, el triterpenoidee se había aislado previamente de la especie *Polypodium vulgare* (Polypodiaceae) (Arai y Ageta, 1989).



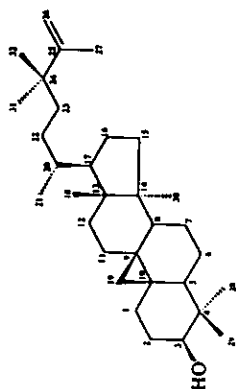
Espectro 29. IR del 24,24-dimetil-9,11-ciclanosta,25-en-3β-ol (24).



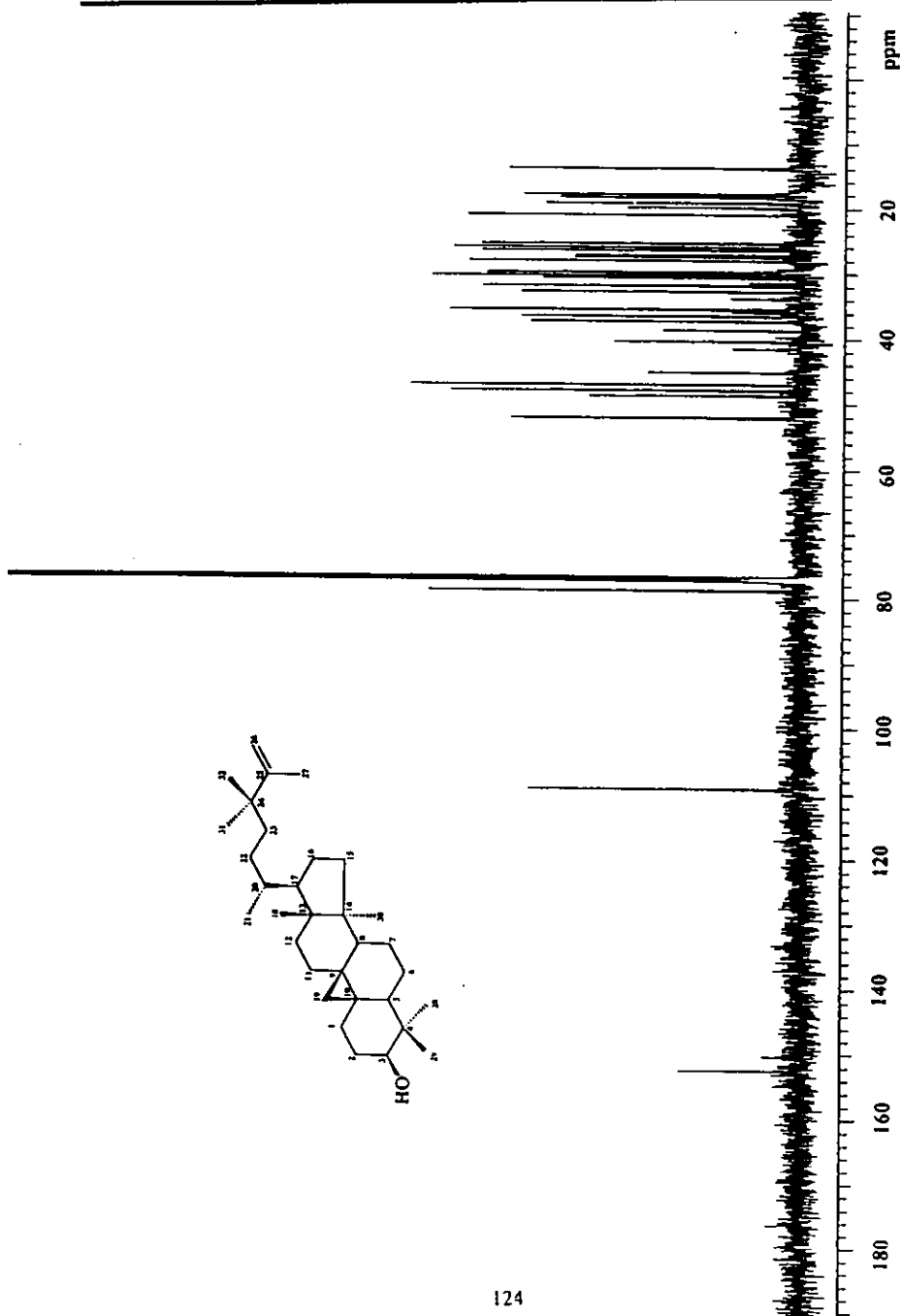
Espectro 30. Espectrometría de masas por impacto electrónico del 24,24-dimetil-9,11-cicloolanosta, 25-en-3β-ol (24).



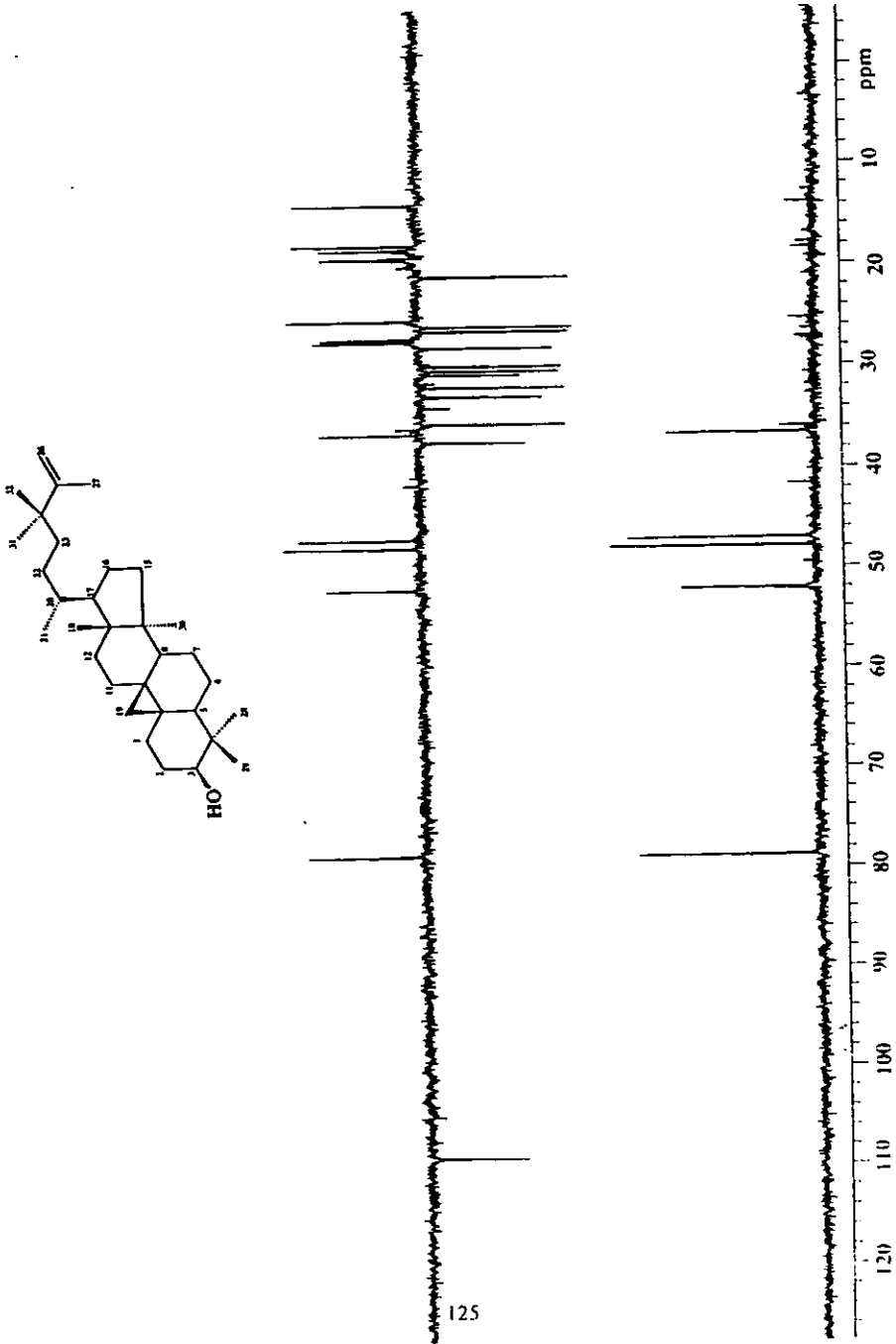
Espectro 31. RMN-¹H del 24,24-dimetil-9,11-ciclotriano[9,11]-ciclopentano[2,5]-en-3β-ol (24).



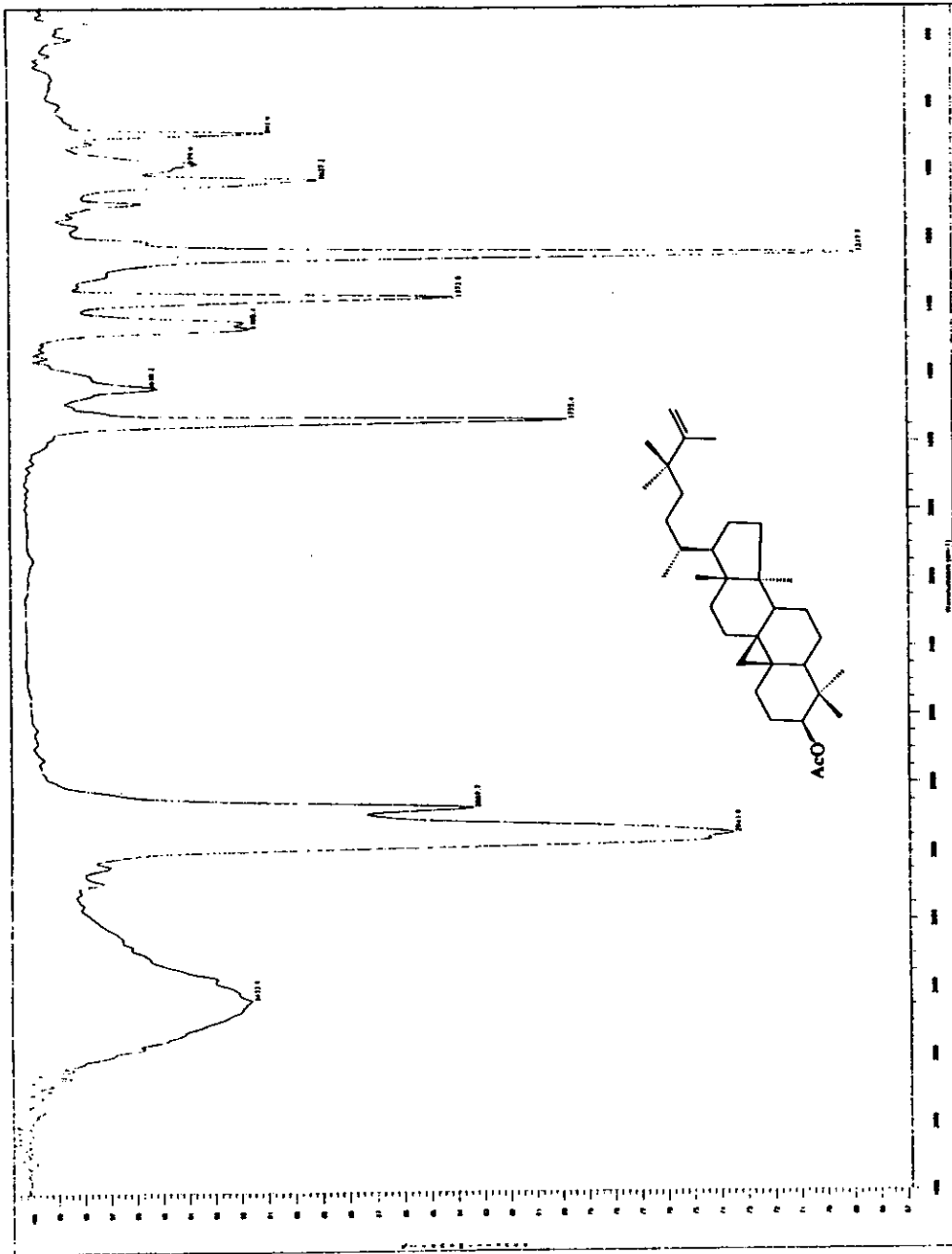
124



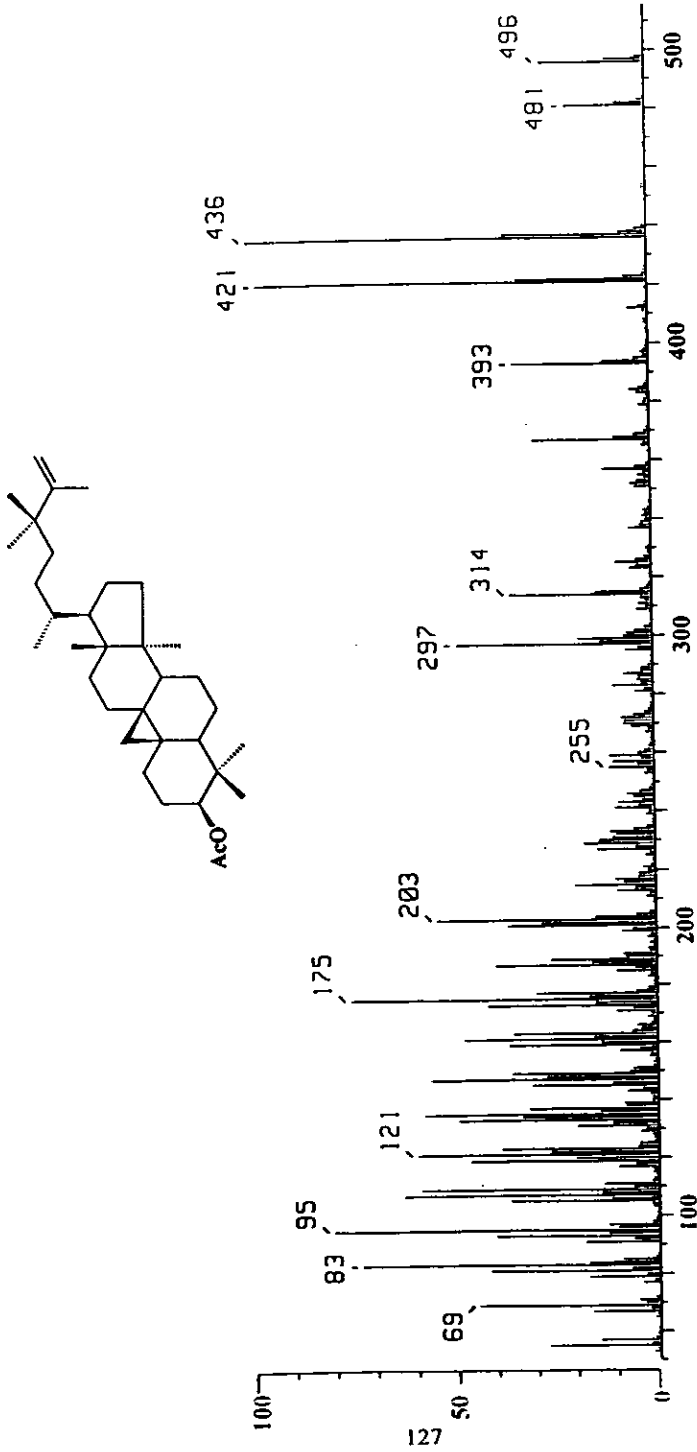
Espectro 32. RMN-¹³C del 24,24-dimetil-9,11-ciclanosta,25-en-3β-ol (24).



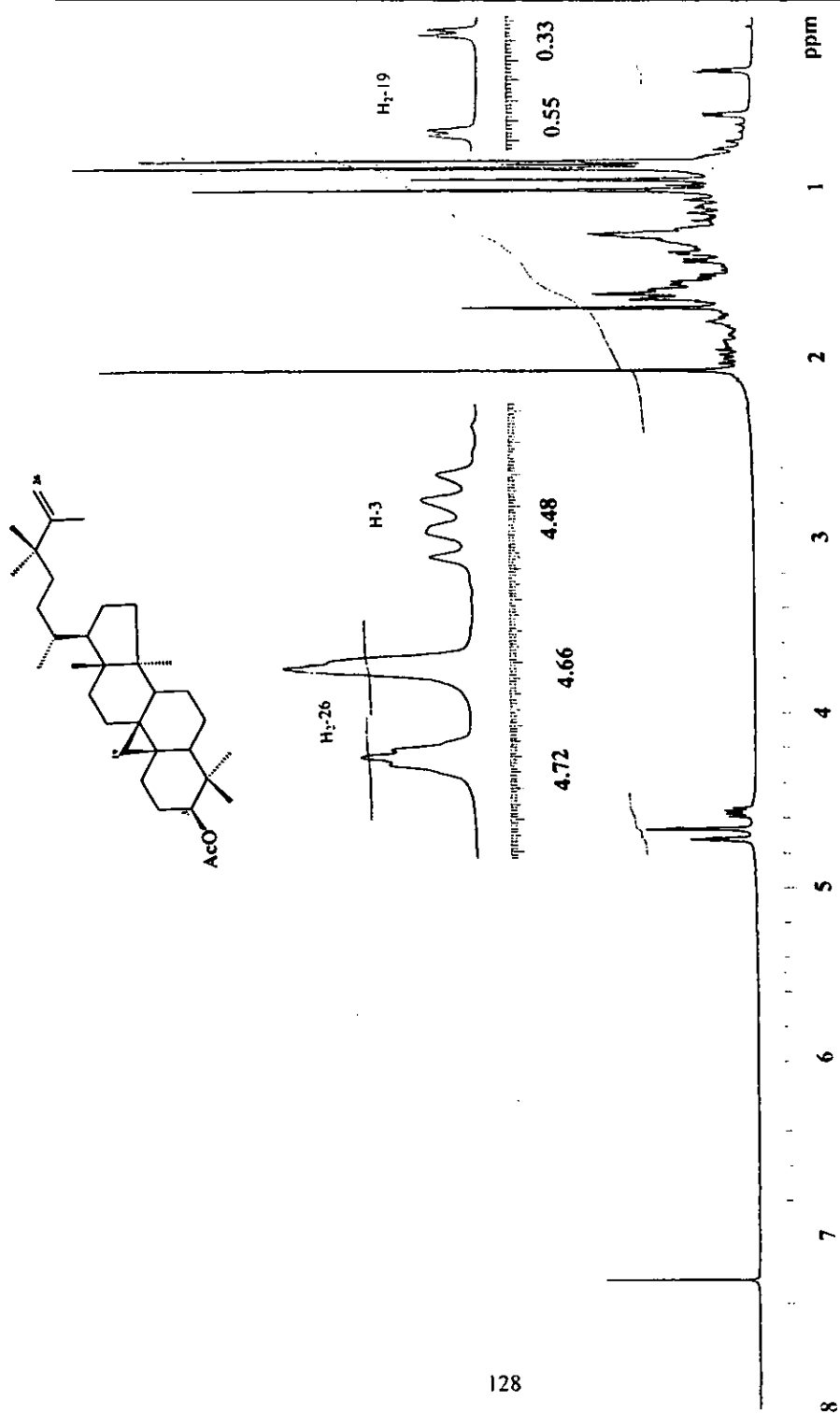
Espectro 35. RMN.¹³C DEPT del 24,24-dimetil-9,11-ciclanosta,25-en-3β-ol (24).



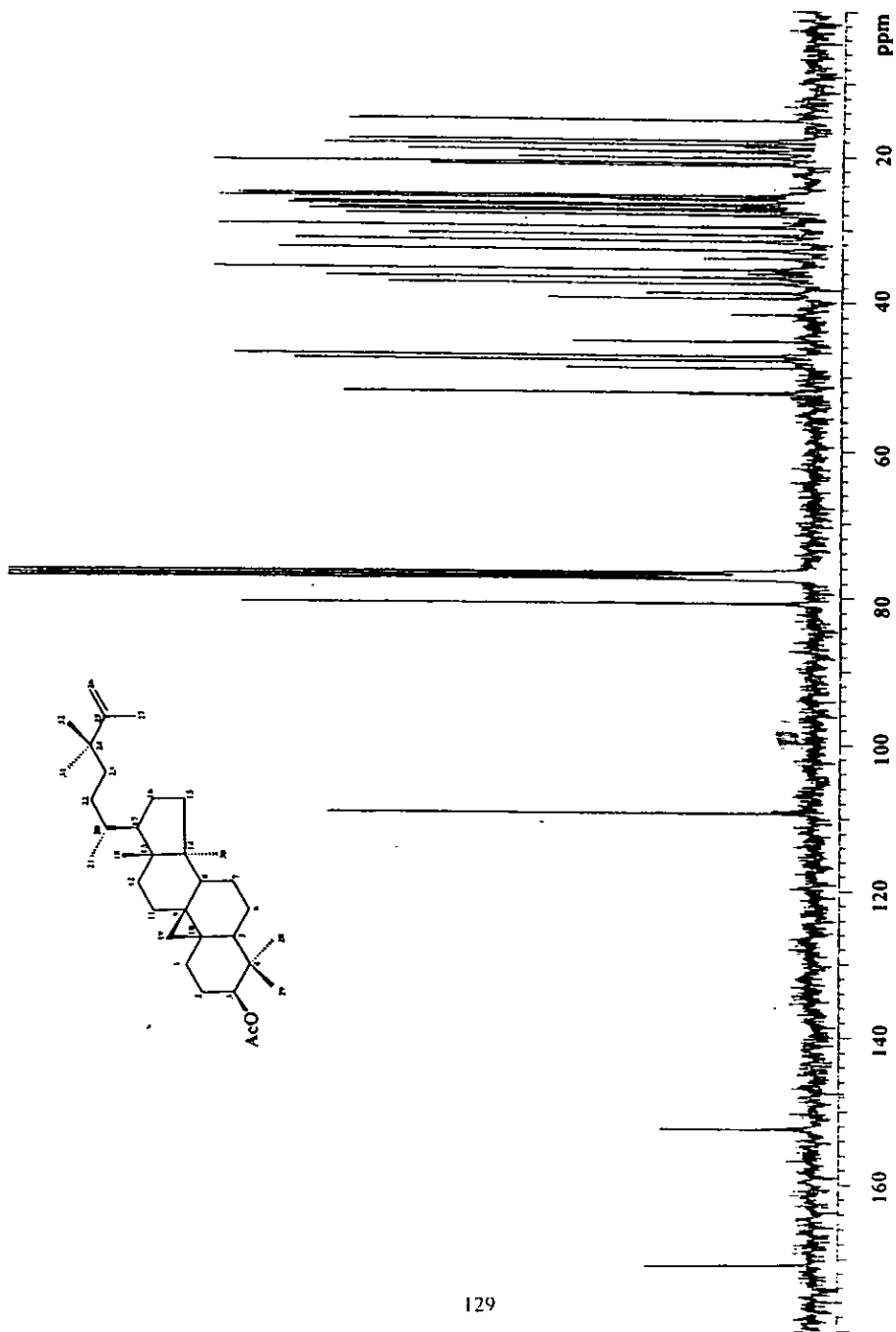
Espectro 34. IR del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclanosta,25-en-3β-ol (24a).



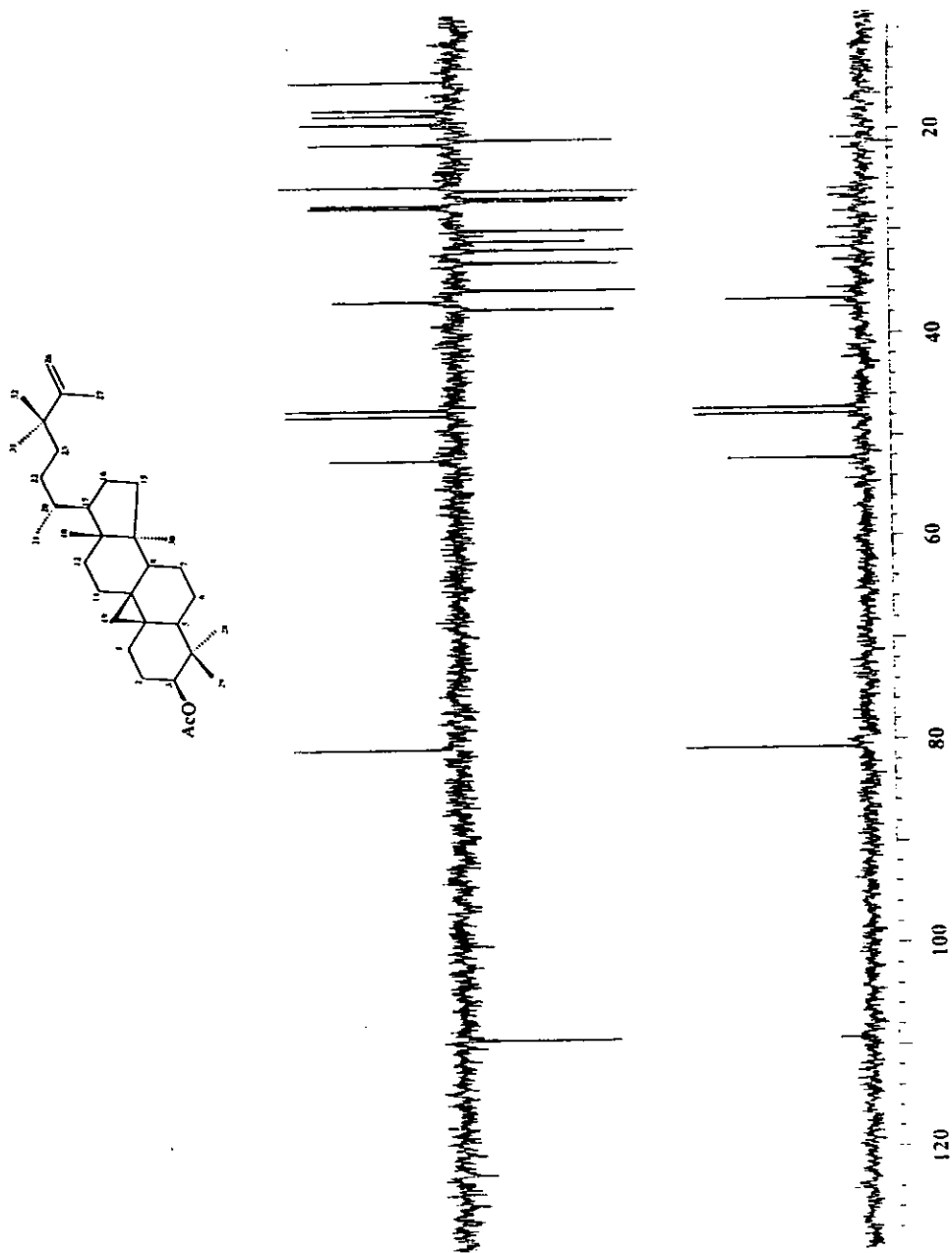
Espectro 33. Espectrometría de masas por impacto electrónico del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclolanosta: 25-en-3 β -ol (24a).



Espectro 36. RMN- ^1H del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclanosta, 25-en-3 β -ol (24a).



Espectro 37. RMN- ^{13}C del acetato del 24,24-dimetil-9,11-ciclanosta, 25-en-3 β -ol (24a).



Espectro 38. RMN-¹³C modalidad DEPT del acetato del 24,2,4-dimetil-9,11-ciclocanosta,25-en-3β-ol (24a).

4.3 Actividad biológica de los constituyentes puros aislados de *Maxillaria densa* y *Scaphyglottis livida*.

De acuerdo con el diseño experimental planteado en esta investigación, se realizaron los ensayos biológicos con la finalidad de determinar el potencial herbicida de los compuestos aislados de *Maxillaria densa* y *Scaphyglottis livida*.

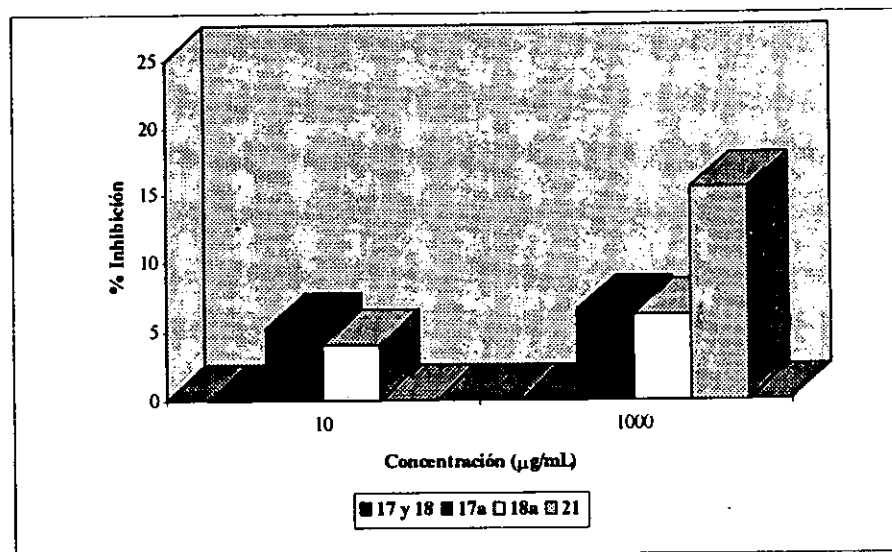
En el caso de la especie *M. densa*, los compuestos ensayados se obtuvieron de las fracciones fitotóxicas no espasmolíticas MD-E y MD-F, e incluyen los siguientes: la mezcla del (24S)-24-metil,5 α -lanosta-9(11),25-dien 3 β -ol (17) y del 24,24-dimetil,5 α -lanosta-9(11),25-dien 3 β -ol (18) y el 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de docosilo (21). De manera adicional, se evaluaron los derivados monoacetilados, 17a y 18a.

En todos los casos la concentración utilizada para las evaluaciones fue de 10 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de las evaluaciones conducidas con los productos antes señalados se muestran en la Tabla 21 y Gráfica 4. Los resultados se encuentran expresados como porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de la especie *A. hypochondriacus*. Ninguno de los productos demostró un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento radicular de la especie de prueba.

En consecuencia, el efecto inhibitor demostrado por las fracciones MD-E y MD-F1 se puede deber a un efecto sinergista de los compuesto presentes, o bien, a la presencia de compuestos activos minoritarios de difícil aislamiento.

Tabla 21. Efecto fitotóxico de los compuestos aislados de *M. densa* sobre el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus*.

Concentración (ppm)	% Inhibición			
	17 y 18	17a	18a	21
10	0	5.3	4.0	0
1000	0	6.6	6.2	15.6
Control positivo 2,4-D (5 µg/mL)	84.1			

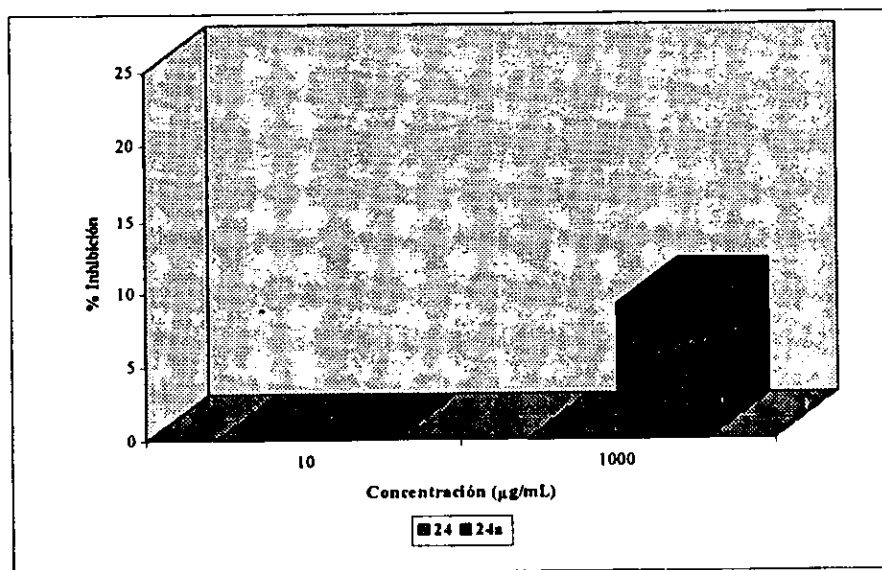


Gráfica 4. Inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crugalli* inducido por los compuestos aislados de *M. densa*.

De la especie *S. livida* se evaluó el efecto de los compuestos 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta,25-en 3β -ol (24) y su correspondiente derivado acetilado (24a), bajo las mismas condiciones experimentales antes señalados. Al igual que en el caso anterior el porcentaje de inhibición de ambos productos no fue significativo con respecto al control. Los resultados se resumen en la Tabla 22 y Gráfica 5.

Tabla 22. Efecto fitotóxico de los compuestos aislados de *S. livida* sobre el crecimiento radicular de la arvenses *Amaranthus hypochondriacus*.

Concentración (ppm)	% Inhibición	
	18	18a
10	0	0
1000	0	9.2
Control positivo 2,4-D (5 μ g/mL)	80.0	



Gráfica 5. Inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* inducido por los compuestos aislados de *S. livida*.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.- En el presente estudio se investigó el potencial herbicida de *Maxillaria densa* y *Scaphyglottis livida*, mediante la determinación del efecto de los extractos crudos de las plantas enteras sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. En el caso de la primera especie se encontró que el mismo contiene sustancias capaces de modificar el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus*. Sin embargo el extracto crudo de *S. livida* no modifica significativamente el crecimiento radicular de las arvenses de prueba.

2.- El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico (CHCl₃) de *Maxillaria densa*, utilizando las pruebas de crecimiento radicular, permitió el aislamiento y caracterización de un fenilpropanoide novedoso [4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de doeicosilo (21)], dos triterpenoides del tipo lanostano [(24S)-24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (17) y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (18)] y un esteroide [sitosterol (23)]. Así como, la detección de tres fenilpropanoides adicionales [4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de ecosilo (19), 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de unecosilo (20) y 4-hidroxi, 3-metoxi-cinamato de tetraecosilo (22)].

3.- El fraccionamiento convencional del extracto orgánico (CHCl₃) de *Scaphyglottis livida*, permitió el aislamiento y caracterización de un triterpenoide del tipo ciclolanostano [24,24-dimetil-9.19-ciclolanosta,25-dien-3β-ol (24)], y el aislamiento en forma de mezcla de dos triterpenoides del tipo lanostano [(24S)-24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (17) y 24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-ol (18)].

En general la caracterización de los productos naturales se realizó por métodos químicos y espectroscópicos.

En el caso de los triterpenoides 17 y 18 la determinación inequívoca de su estructura se realizó mediante un análisis de difracción de Rayos X de los derivados monoacetilados correspondientes.

4.- Se determinó el efecto inhibitor del crecimiento vegetal de los productos naturales aislados de las fracciones fitotóxicas de *M. densa*, encontrándose que dichos compuestos no inhiben de manera significativa el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. Estos resultados indican que el efecto inhibitor demostrado por las fracciones MD-E y MD-F1 se puede deber a un efecto sinergista de los compuestos presentes, o bien a la presencia de compuestos activos minoritarios de difícil aislamiento.

De manera adicional, se observó que la mayor actividad fitotóxica se concentra en las fracciones espasmolíticas de mayor polaridad y cuyo estudio constituye la propuesta de otro proyecto de tesis.

5.- Se contribuyó con el estudio del metabolismo secundario en orquídeas mediante la descripción de cuatro nuevos productos novedosos y tres conocidos. Este trabajo constituye la primera descripción de fenilpropanoides en orquídeas.

VI. PERSPECTIVAS

° Evaluar el potencial fitotóxico de los metabolitos presentes en las fracciones de mayor polaridad (fracciones fitotóxicas y espasmolíticas), obtenidas mediante el proceso de fraccionamiento del extracto crudo de *Maxillaria densa*; con la finalidad de completar el estudio fitotóxico de la especie y tratar de establecer el o los metabolitos responsables de dicha actividad.

° Aislar y caracterizar los metabolitos de naturaleza triterpenoide detectados por el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en la fracción SL-E de *Scaphyglottis livida*; mediante la aplicación de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con el propósito de contribuir al estudio del metabolismo secundario de dicha especie.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Afza, N., Khan, A.Q., Malik A. & Badar, Y. (1989) Cyclocaducinol, a cycloartane type triterpene from *Euphorbia caducifolia*. *Phytochemistry*, **28**(7), 1982-1984.
- Ames, O. & Correl, D. (eds.) (1952) *Orchids of Guatemala*, Fieldiana Botany Chicago Natural History Museum. **26**(12).
- Anaya, A.L., Calera, M., Mata, R. & Pereda, R. (1990) Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 2145-2152.
- Anaya, A.L., Ramos, O.R.L., Cruz, O.R. & Hernández, J. (1987) Studies on allelopathy in Mexico (Waller G.R., ed., *Allelochemicals: Role in agriculture and forestry*). ACS. Symposium Series 330, Washington, pp. 89-101.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., Mc Laughlin, J. & Suffness, M. (1991) A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as tumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, **2**, 107-111.
- Arai, Y., Shiojima, K. & Ageta, H. (1989) Fern constituents: cyclopodmenyl acetate, a cycloartanoid having a new 33-carbons skeleton, isolated from *Polypodium vulgare*. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**(2), 560-562.
- Bai, L., Masukawa N., Yamaki, M. & Takagii S. (1997) Two bibenzyl glucosides from *Pleione bulbocoioides*. *Phytochemistry*, **44**, 1565-1567.

- Bai, L., Yamaki, M. & Takagi, S. (1997) Lignans and a bichroman from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **44**, 341-343.
- Barrero, A.T., Arteaga P., Quilez, J.F., Rodríguez, I. & Herrador, M.M. (1997) Sesquiterpene glycosides and phenilpropanoid ester from *Phomus arborescens* (*Carthamus arborescens*). *J. Nat. Prod.*, **60**, 1026-1030.
- Benner, J.P. (1993). Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticide Science*, **39**, 95-102.
- Bergstrom, G., Bigersson, G. & Groth, I. (1992) Floral fragrance disparity between three taxa of ladys sliper *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). *Phytochemistry* **31**, 2315-2319.
- Bevan, C.W.L., Ekong, D.E.U. & Taylor, A.H. (1965) Extractives from west African members of the family Meliaceae. *Nature*, **26**, 1323-1325.
- Bohlmann, F., Knauk, W., Grenz, M. & Lane, M.A. (1979) Ein neues diterpen aus *Xanthocephalum linearifolium*. *Phytochemistry*, **18**, 2040-2042.
- Bohlmann, F., Zdero, (1981) *Phytochemistry* **20**, 1657-1663.
- Borg-Karlson, A.K. & Groth, I. (1985) Volatiles from the flowers of four species in the sections *Arachnitiiformes* and *Araneiferae* of the genus *Ophrys* as insect mimetic attractants. *Phytochemistry*, **25**, 1297-1299.

Breitmair, E. & Voeter, W. (eds.) (1994) ^{13}C NMR spectroscopy of organic compounds. *High resolution methods and application in organic chemistry and biochemistry*. 3rd ed., VCH. Holand 183-186.

Bye, R., Linares, E. & Estrada, E. (1995) Phytochemistry of medicinal plants. (Arnason, J.T., Romeo, J.T. & Mata, R., eds., *Recent advances in phytochemistry*). Plenum Press, Nueva York. 29, 65-82.

Carmona, G. (1995) Comunicación personal.

Castañeda, P., García, M.R., Hernandez-Bautista, B., Torres, B.A., Anaya, A.L. & Mata, R. (1992). Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* Tandl. (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *Journal of Chemical Ecology*, 7, 1025-1037.

Connolly, J.D., Hill, R.A. & Ngadjui, B.T. (1994) Triterpenoid. *Natural Product Reports*, 467-492.

Connolly, J.D., Hill, R.A. & Ngadjui, B.T., (1996) Triterpenoid. *Natural Product Reports*, 151-169.

Connolly, J.D., Hill, R.A., Ngadjui, B.T., Lian-niangi, L., Hong, X. & Kangouri, K. (1994) Triterpenoid. *Natural Product Reports*. 11, 92-117.

Cox, P.A. & Balick, M.J. (1994) The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, (June).

- Cremllyn R.J. (ed.) (1991) Agrochemicals preparation and mode of action. John Wiley & Sons, England.
- Chakravarty, A.J., Das, B., Masuda K. & Ageta, H. (1996) Tetracyclic triterpenoids from *Glycosmis arborea*. *Phytochemistry*. 42(4), 1109-1113.
- Das, M.C., Mahato, S.B. (1983) Triterpenoids: Review. *Phytochemistry*, 22, 1071-1095.
- Dressler, L.R. (ed.) (1981) *The orchis natural history and classification*, Harvard University Press. London. pp. 50-159.
- Dressler, L.R. (ed.) (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*, Discorides Press. pp. 13-57.
- Duke, S.O. (1991) Plant terpenoids as pesticides. (Keeler, R.F. & Tu, A.T., eds., *Handbook of natural toxins*). Marcel Dekker. Inc. N.Y. 6, 269-291.
- Duke, S.O., (1988) Herbicide chemistry, degradation and mode of action. (Kearney, P.C., & Kaufman, D.D., eds., *Allelopathy: Organisms, processes and application*). Marcel Dekker Inc. New York. ACS Symposium Series 582. 311-329.
- Estrada, S.E., Rojas, A., Mathison, Y., Montenegro, R., Israel, A. & Mata, R. (1998) Nitric oxide/cGMP mediate the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Médica*, (sometido para su publicación).

Ghisalberti, E. (1993) Detection and isolation of bioactive natural products. (Colegate, S. & Molyneux, R., eds., *Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination*). CRC Press, U.S.A. 10-49.

Govardham, Ch., Prasad, R. & Sundararamaiah, T. (1984) 3-epi-cyclolaudenol and known triterpenes from *Euphorbia caudicifolia*. *Phytochemistry*, 23(2), 411-413.

Harborne, J.B. & Williams C.A. (1994) Recent Advances in the chemosystematics of the monocotyledons. *Phytochemistry*, 37(1), 3-18.

Hausen, B.M. (1984) Toxic and Allergenic Orchis. (Arditti, J., ed. *Orchid Biology Reviews and Perspectives III*). Cornell University press. 263-282.

Hietz, P. & Hietz-Seifort, V. (eds.) (1994) *Epífitas de Veracruz, Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas Ver.* Instituto de Ecología A.C. 1ª edición.

Hostettmann, K. & Hamburger, M. (1993) Search for new lead compounds of natural origin. *Percept. Med. Chem.*, 475-488.

Kadota, S., Shima, T., & Kikuchi, T., (1987) Studies on the constituents of orchidaceous plants. VII. The stereochemistry of cyclohomonervilol and 2,4-isoprenylcholesterol, non-conventional side chain tritrpene and sterol, from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.*, 35(1), 200-210.

Kikuchi, T., Kadota, S, Matsuda, S. & Suehara, H. (1986) Studies on the constituents of orchidaceous plants V. Isolation, structure, and C-13 signal assignments of novel methylsterols for *Nervillia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.*, 34(8), 3183-3201.

Kikuchi, T., Kadota, S., Hanagaki, S., Suehara, H., Namba T., Lin, Ch. & Kan W. (1981) Studies on the constituents of Orchidaceous plant I. Constituents of *Nervilia purpurea* Schlechter and *Nervilia aragoana* Gaud. *Chem. Pharm. Bull.*, 29(7), 2073-2078.

Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. & Namba T. (1981) New triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter, an Orchidaceous plant structures of cyclonervilol and cyclohomonervilol and chemical correlation with cycloeucalenol. *Tetrahedron Letters*, 22, 465-468.

Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. & Namba T. (1982) Occurrence of non-conventional side chain sterols in Orchidaceous plant, *Nervilia purpurea* Schlechter and structure of nervisterol. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(1), 370-373.

Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. & Shima, T. (1985) Studies on the constituents of Orchidaceous plants III. Isolation of non-conventional side chain sterols from *Nervilia purpurea* Schlechter and structure determination of nervisterol *Chem. Pharm. Bull.*, 33(6), 2235-2242.

Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. & Shima, T. (1985) Studies on the constituents of Orchidaceous plants II. Isolation structures, and stereochemistry of ciclonevnilol, cyclohomonervilol, and dihidrocycloeucalenol C-24 epimers, new triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.*, 33(5), 1914-1929.

Kinghorn, A.D. (1995) Novel strategies for plant-derived anticancer agents. *International Journal of Pharmacognosy*, 33, 48-58.

Kuehule A.R., Lewis, D.H., Markham, K.R., Mitchell, K.A., Davies, K.M. & Jordan, B.R. (1997) Floral flavonoids and pH in *Dendrobium* a Orchis species and hybrids. *Euphytica*, **95**, 187-194.

Leong, Y.W., Kang Ch.Ch., Harrison, L.J. & Powell A.P. (1997) *Phytochemistry*. **44**(1), 157-165.

Lowery, C. (ed.) (1993) Reagent Chemicals. *American Chemical Society Specification*, Washington, D. C. pp. 90-91.

Macías M.L., (1996) Determinación del potencial herbicida de los principios fitotóxicos de *Esenbekia yaxhoob* y *Stauranthus perkoratus*. Tesis de Maestría Facultad de Química, UNAM.

Mahato S.B., Nandy, A.K. & Roy, G., (1992) Triterpenoid: Review. *Phytochemistry*, **31**(7), 2199-2249.

Mahato, S.B. & Sen, .S., (1997) Triterpenoid: Review. *Phytochemistry*, **44**, 1185-1236.

Majumder P.L. & Chakraborti, J. (1985) Structures of cyclootochilone and otochilone, two novel steroidal ketones of the orchids *Otochilus porecta* and *Otochilus fusca*. *Tetrahedron*, **41**, 4973-4978.

Majumder P.L. & Kar A. (1989) Erianol, 4a-methylsterol from the orchid *Eria convallarioides*. *Phytochemistry*. **28**(5), 1487-1490.

- Majumder P.L. & Pal A. (1985) 24-methylene cycloartanyl *p*-hidroxicinnamate from the orchid *Cirrhopetalum elatum*. *Phytochemistry*, **24**(9), 2120-2122.
- Majumder P.L. & Pal S. (1990) A steroidal ester from *Coelogyne uniflora*. *Phytochemistry*, **29**(8), 2717-2720.
- Majumder P.L., Bandyopadhyay, D. & Joardar, S. (1982) Coelogin and coeloginin: two novel 9-10-dihydrophenanthrene derivatives from the orchid *Coelogyne cristata*. *J. Chem. Soc. Perkin.*, **1**, 1131-1136.
- Majumder, P.; Sarkar, A.K. & Chakraborty, J. (1982) Isoflavidinin and isoxoflavidinin, two 9,10-dihydrophenantrenes from the orchis *Pholidota articulata*, *Otochilus porecta* and *Otochilus fusca*. *Phytochemistry*, **21**, 2713-2716.
- Majumder, P.L., Datta, W., Sarkar, A.K. & Chakraborti, J. (1982). Flavidin, a novel 9,10-dihydrophenanthrene derivative of the orchis *Coelogyne flavida*, *Pholidota articulata* and *Otochilus fusca*. *J. Nat. Prod.*, **45**, 730-732.
- Majumder, P.L. & Laha, S. (1981) Occurrence of 2,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene in *Coelogyne ovalis*, a high altitud Himalayan Orchis application of C-13 RMN spectroscopy in structure elucidation. *J. Indian Chem. Soc.*, **58**, 928-929.
- Majumder, P.L. & Maiti D.C. (1987) Flaccidin, a 9,10-dihydrophenanthropyran derivete from thee Orchid *coelogyne flaccida*. *Phytochemistry*, **27**, 899-901.
- McVaugh, R. (ed.) (1985) *Flora novogaliciana* A descriptive account of the vascular plants of western Mexico. The University of Michigan Press, 16, 1-5.

- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobse, L.B., Nichols, D.E. & Mc Laughlin, J.L. (1982) Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, **45**, 31-34.
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S. & Kameoka, H. (1997) Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *J. Agric. food. Chem.*, **45**, 2849-2853.
- Okamoto, N. (1966) The structure of dendroxinee. The third alkaloids from *Dendrobium nobile*. *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 672-675.
- Onaka, T. (1965). The structure of Nobiloninee. The second alkaloid from *Dendrobium nobile*. *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 745-747.
- Pavia, D.L., Lapman, G.M., Kris, G.S., & Engel, R. (eds.) (1995). *Organic laboratory techniques an microscale approach*. Saunder W.B., Saunder, Co. Philadelphia. 345.
- Rodgers, B.P. (1993) Potential of biopesticides in agriculture. *Pesticide Science*, **39**, 117-129.
- Shriner, R.L., Fuson, R.C. & Curtin, D.Y. (eds.) (1980). *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*, Limusa, México.
- Slaytor, M.B. (1977) The distribution and chemistry of alkaloids in the Orchidaceae. (Arditti, J., ed. *Orchid Biology Reviews and Perspectives I*). Cornell University press. 95-115.

- Stoessl, A. & Arditti, J. (1984) Orchid Phytoalexins. (Arditti, J., ed. *Orchid Biology Reviews and Perspectives III*). Cornell University press. 153-175.
- Tanira, M.O., Bashir, A.K., Dib, R., Goodwin, C.S., Wasfi, I.A. & Banna, N.R. (1994) Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. *Journal of Ethnopharmacology*, **41**, 201-205.
- Veeraju, P. (1989) Bibenzils and phenanthrenoids of some species of Orchidaceae. *Phytochemistry*, **28**, 3031-3034.
- Williams, C.A, Toscano A.L., Harborne, J.B, Eagles, J. & Waterman, P.J. (1994) Methylated C-glycosilflavones as taxonomic markers in Orchis of the subtribe Ornithocephaline. *Phytochemistry*, **37**, 1045-1053.
- Williams, C.A. (1979). The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry*, **18**, 803-813.
- Wright, N.P. (ed.) (1958) *Orquídeas de México*. Fournier, México. 9-16.
- Wu, Ch.R., Itsich, M.T., Huang, S.Ch., Peng, W.H., Chang, Y.S. & Chen, Ch.F. (1996) Effects of *Gastrodia elata* and its active constituents on scopolamine induced amnesia in rats. *Planta Médica*, **62**, 317-321.
- Zimmermann, A. & Dougoud, R.C. (eds.) (1959) *Orchidées Exotiques*, Deelachaux, Neuchatel; Beautés de la nature.