

119
2ey



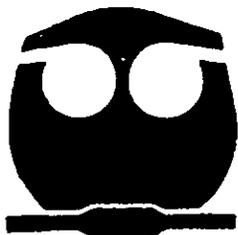
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO PRELIMINAR
DE LA ESPECIE *Epidendrum boothii* Lindley
(ORCHIDACEAE)”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JAQUELINE SOSA CLIMACO



MEXICO, D. F.

1998

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

264337

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Prof. Yolanda Caballero Arroyo
VOCAL: Prof. Rachel Mata Essayag
SECRETARIO: Prof. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
PRIMER SUPLENTE: Prof. Perla Carolina Castañeda López
SEGUNDO SUPLENTE: Prof. Jose Fausto Rivero Cruz

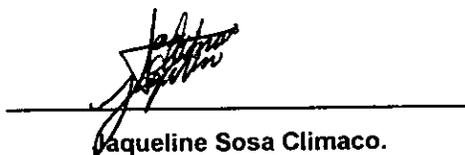
Sitio donde se desarrolló el tema:

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

Asesor:


Dra. Rachel Mata Essayag.

Sustentante:


Jacqueline Sosa Climaco.

AGRADECIMIENTOS.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos DGAPA IN205197 (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) y CONACyT (Convenio 400313-5-2576 PM).

También se agradece a las siguientes personas e instituciones por facilitar de alguna forma el desarrollo del siguiente trabajo:

Al SNI (Sistema Nacional de Investigadores), por la beca de ayudante de investigador nacional.

Al biólogo Gustavo Carmona Díaz, por la colecta e identificación del material vegetal utilizado en el presente trabajo.

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

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz, al Q. Hector Ríos y Rubén Gabiño de los Laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

Al I.Q. Luis Velasco y al M. en C. Javier Pérez del Laboratorio de Espectroscopía 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 de la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación), de la Facultad de Química, por realizar los análisis de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de 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 de la nidemina.

A la Dra. Rachel Mata, por sus valiosos comentarios durante el proceso de revisión de este trabajo.

A la M. en C. Laura Acevedo, por su valiosa asesoría técnica y a la Dra. Perla C. Castañeda y a la M. en C. Susana Rojas, por su cooperación durante la revisión del manuscrito de tesis.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Mitzi, Maricarmen, y Fausto por sus valiosos consejos.

DEDICATORIAS.

A mis padres:

Crisóforo Sosa y Francisca Climaco.

*Por que sin su apoyo no habría logrado ser lo que soy y porque
gracias a su esfuerzo y dedicación hoy hago realidad uno de mis
mayores anhelos.*

A mis hermanos:

Alvaro

Pedro

Enrique

Reyna

Adrian

*Por que cada día me dan un ejemplo de superación y por el cariño
que siempre me han brindado.*

A mis sobrinos:

*Por que cada uno de ellos es un nuevo estímulo para lograr mis
objetivos.*

Por ser lo que son y sobre todo por su amistad a:

Claudia

Mariana

Norma

Emma

Magdalena.

gracias.

Muy especialmente agradezco a la Dra. Rachel Mata, por su confianza, por dedicarme parte de su tiempo y sus conocimientos y por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por que me permitió formar parte de sus aulas.

A todas las personas que han formado parte de mi desarrollo personal y profesional.

*Hay hombres que luchan un día
y son buenos,
hay otros que luchan un año
y son mejores,
hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos,
pero hay quienes luchan toda la vida
esos son los imprescindibles.*

Bertolt Brecht.

ÍNDICE

| | Página |
|-------------------------|--------|
| LISTA DE CUADROS. | I |
| LISTA DE TABLAS. | II |
| LISTA DE FIGURAS. | III |
| LISTA DE GRÁFICAS. | III |
| LISTA DE ESPECTROS. | IV |
| LISTA DE ESQUEMAS. | V |
| LISTA DE CROMATOGRAMAS. | VI |
| LISTA DE ABREVIATURAS. | VII |

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Generalidades sobre la familia Orchidaceae. | 1 |
| 1.2 Generalidades acerca de <i>Epidendrum boothii</i> (Lindley) Schltr. | 11 |
| II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 14 |
| III. PARTE EXPERIMENTAL | 18 |
| 3.1 Material vegetal. | 18 |
| 3.2 Procedimientos generales. | 18 |
| 3.2.1 Análisis cromatográficos. | 18 |
| 3.2.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados. | 20 |
| 3.2.3 Análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. | 21 |
| 3.3 Evaluaciones biológicas. | 21 |
| 3.3.1 Determinación de la actividad fitoinhibidora. | 21 |
| 3.3.1.1 Método en caja Petri. | 21 |
| 3.3.1.2 Método bioautográfico. | 23 |
| 3.3.2 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> . | 23 |
| 3.4 Extracción de la planta entera <i>Epidendrum boothii</i> . | 24 |
| 3.5 Fraccionamiento preliminar del extracto total. | 24 |
| 3.6 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias de <i>Epidendrum boothii</i> . | 27 |
| 3.6.1 Aislamiento y purificación del estigmasterol (23) de la fracción primaria NB-E. | 27 |
| 3.6.2 Aislamiento y purificación del triterpenoide nidemina (20) de la fracción secundaria NB-B5. | 27 |

3.6.3 Aislamiento y purificación de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9-(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9-(11),25-dien-3 β -ol (22), de la fracción secundaria NB-D8 bajo la forma de sus derivados acetilados 21a y 22a respectivamente. 28

IV. RESULTADOS Y DISCUSION 33

4.1 Determinación del potencial fitotóxico de *Epidendrum boothii*. 33

4.2 Aislamiento y caracterización de los triterpenoides del extracto íntegro de *Epidendrum boothii*. 35

4.3 Caracterización de los constituyentes aislados. 41

4.3.1 Caracterización de la nidemina (20). 42

4.3.2 Caracterización del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22) bajo la forma de su derivado monoacetilado 22a. 65

4.3.3 Caracterización del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) bajo la forma de su derivado monoacetilado 21a. 81

4.3.4 Caracterización del estigmasterol (23). 85

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES 91

VI. BIBLIOGRAFÍA 92

LISTA DE CUADROS

| | | Página |
|-----------------|--|--------|
| Cuadro 1 | Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae. | 3 |
| Cuadro 2 | Sistemas de elución utilizados para los análisis cualitativos en capa fina. | 19 |
| Cuadro 3 | Cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina. | 19 |
| Cuadro 4 | Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la planta entera <i>Epidendrum boothii</i> . | 26 |
| Cuadro 5 | Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción NB-B de <i>Epidendrum boothii</i> . | 28 |
| Cuadro 6 | Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción NB-D de <i>Epidendrum boothii</i> . | 30 |
| Cuadro 7 | Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>Epidendrum boothii</i> . | 40 |

LISTA DE TABLAS

| | | Página |
|----------------|---|--------|
| Tabla 1 | Evaluación del potencial fitotóxico de las fracciones primarias derivadas del extracto MeOH-CHCl ₃ (1:1) de <i>Epidendrum boothii</i> . | 38 |
| Tabla 2 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la nidemina (20). | 43 |
| Tabla 3 | Datos de RMN- ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la nidemina (20). | 44 |
| Tabla 4 | Datos de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la nidemina (20). | 45 |
| Tabla 5 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22). | 66 |
| Tabla 6 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 67 |
| Tabla 7 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a). | 82 |
| Tabla 8 | Datos de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22), del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 83 |
| Tabla 9 | Datos de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22), del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 84 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|----------|---|--------|
| Figura 1 | <i>Epidendrum boothii</i> Lindley (Orchidaceae). | 13 |
| Figura 2 | Núcleos de triterpenos tetracíclicos más comunes. | 48 |
| Figura 3 | Espectro de HMBC de la nidemina (20). | 50 |
| Figura 4 | Espectro de HMBC de la nidemina (20). | 51 |
| Figura 5 | Espectro de HMBC de la nidemina (20). | 52 |
| Figura 6 | Espectro de HMBC de la nidemina (20). | 54 |
| Figura7 | Vista estereoscópica de la nidemina (20). | 55 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | | Página |
|-----------|---|--------|
| Gráfica 1 | Inhibición del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> inducido por el extracto total de la orquídea <i>Epidendrum boothii</i> . | 34 |
| Gráfica 2 | Inhibición del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> inducido por las fracciones primarias de <i>Epidendrum boothii</i> . | 36 |
| Gráfica 3 | Inhibición del crecimiento radicular de <i>E. crusgalli</i> inducido por las fracciones primarias de <i>Epidendrum boothii</i> . | 37 |

LISTA DE ESPECTROS

| | | Página |
|--------------------|--|--------|
| Espectro 1 | Espectro en el IR de la nidemina (20). | 56 |
| Espectro 2 | Espectro de EMIE de la nidemina (20). | 57 |
| Espectro 3 | Espectro de RMN- ¹³ C de la nidemina (20). | 58 |
| Espectro 4 | Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT de la nidemina (20). | 59 |
| Espectro 5 | Espectro de RMN- ¹ H de la nidemina (20). | 60 |
| Espectro 6 | Espectro COSY de la nidemina (20). | 61 |
| Espectro 7 | Espectro NOESY de la nidemina (20). | 62 |
| Espectro 8 | Espectro HMQC de la nidemina (20). | 63 |
| Espectro 9 | Espectro HMBC de la nidemina (20). | 64 |
| Espectro 10 | Espectro en el IR de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22). | 70 |
| Espectro 11 | Espectro de EMIE del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21). | 71 |
| Espectro 12 | Espectro de EMIE del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22). | 72 |
| Espectro 13 | Espectro de RMN- ¹³ C de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22). | 73 |
| Espectro 14 | Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22). | 74 |
| Espectro 15 | Espectro de RMN- ¹ H de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22). | 75 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Espectro 16 | Espectro en el IR del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 76 |
| Espectro 17 | Espectro de EMIE del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 77 |
| Espectro 18 | Espectro de RMN- ¹³ C del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 78 |
| Espectro 19 | Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 79 |
| Espectro 20 | Espectro de RMN- ¹ H del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 80 |
| Espectro 21 | Espectro en el IR del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a). | 86 |
| Espectro 22 | Espectro de EMIE del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a). | 87 |
| Espectro 23 | Espectro de RMN- ¹³ C del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 88 |
| Espectro 24 | Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 89 |
| Espectro 25 | Espectro de RMN- ¹ H del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a). | 90 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | Pagina |
|--|--------|
| Esquema 1 Proceso de extracción de la planta entera <i>Epidendrum boothii</i> . | 25 |

LISTA DE CROMATOGRAMAS

| | | Página |
|-----------------------|---|-----------|
| Cromatograma 1 | Cromatograma de CG-EM de la mezcla del 24 - metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22). | 31 |
| Cromatograma 2 | Cromatograma de CG-EM de la mezcla del 24 - metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22). | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| 2,4-D | Acido 2,4-diclorofenoxiacético |
| cm | Centímetro |
| cm ³ | Centímetro cúbico |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| CL ₅₀ | Concentración letal 50 |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| COSY | Correlated spectroscopy |
| HETCOR | Heteronuclear correlation |
| ccf | Cromatografía en capa fina |
| CG-EM | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas |
| DEPT | Distortionless Enhancement Polarization Transfer |
| δ | Desplazamiento químico |
| <i>dd</i> | Doblete de doblete |
| <i>d</i> | Doblete |
| EMIE | Espectrometría de masas por impacto electrónico |
| °C | Grados centígrados |
| g | Gramos |
| Hex | Hexano |
| HMBC | Heteronuclear Multiple-bond Connectivity |
| HMQC | Heteronuclear Multiple-quantum Coherence |
| IR | Infrarrojo |
| Int rel | Intensidad relativa |
| L | Litro |
| MHz | Megahertz |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |
| <i>m</i> | Multiplete |
| m ³ | Metros cúbicos |

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuación).

| | |
|----------------------|--|
| NOESY | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy |
| ppm | Partes por millón |
| p.f. | Punto de fusión |
| RMN- ¹³ C | Resonancia magnética nuclear de carbono 13 |
| RMN- ¹ H | Resonancia magnética nuclear protónica |
| s | Singulete |
| sa | Singulete ancho |
| TMS | Tetrametilsilano |
| uma | Unidades de masa atómica. |

I. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES SOBRE LA FAMILIA ORCHIDACEAE.

La familia Orchidaceae incluye alrededor de 35 000 especies agrupadas en 750 géneros, 5 subfamilias y 19 tribus (Dressler, 1993). La mayoría de las orquídeas son epífitas (73%) y las restantes son terrestres; su crecimiento vegetativo puede ser monopoidal o simpoidal. En general, presentan raíces adventicias, fibrosas o carnosas y algunas veces tuberosas; el rizoma o tallo primario es generalmente reducido; las hojas son radiales enteras y la mayoría de las veces son alternadas, presentando una gran variabilidad en su forma, espesor y arreglo; la inflorescencia termina en espiga o en racimo; las flores son bilateralmente simétricas, presentan un ovario inferior con uno o tres lóbulos y, en la flor pedicelada, el pedicelo aparentemente incluye un pedicelo como tal y un ovario no desarrollado (Dressler, 1993).

Las orquídeas son una familia cosmopolita, se alinean desde el norte de Suecia y Alaska, a Tierra del fuego y la isla Macquarie. Las orquídeas epífitas están limitadas a ambientes tropicales y subtropicales, al igual que otras epífitas vasculares de otras familias de plantas. Las orquídeas son muy escasas en ambientes desérticos, aunque pueden encontrarse en los oasis y en los cañones desérticos (Dressler, 1981).

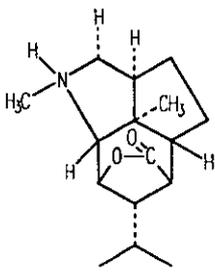
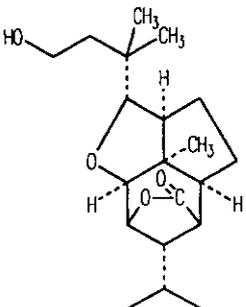
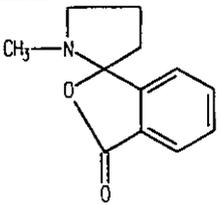
Las orquídeas son mucho más diversas en el cinturón tropical que en el norte o sur de éste, aunque dentro de los trópicos las especies no se encuentran distribuidas uniformemente. Así mismo, las orquídeas son más abundantes y diversas en hábitats que sobrepasan más de 2.5 m³ de lluvia anual; en

consecuencia, estas plantas son muy escasas en los bosques secos (Holttum, 1960). Los países de América, que poseen la mayor diversidad de orquídeas son Venezuela, México, Panamá y Brasil. En América Central, las orquídeas se encuentran principalmente en los bosques premontanos húmedos o en bosques húmedos de 1000 a 2000 m de elevación (Dressler, 1981).

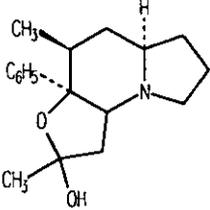
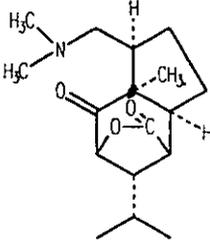
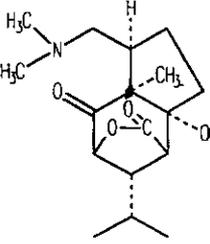
Desde el punto de vista químico, los estudios que se han realizado sobre varias especies de esta familia han permitido el aislamiento y la caracterización de compuestos de tipo estilbenoide (bibencilos y fenantrénicos), piranos (Gorham, 1989; Baxter, 1995; Leong *et al.*, 1997), terpenoides de la más diversa naturaleza, (Holmand y Heimermann, 1973; Kadota *et al.*, 1987; Majumder y Pal, 1990; Majumder y Kar, 1989), compuestos aromáticos simples (Kaiser, 1993; Whitten y Williams, 1993; Bergstrom *et al.*, 1992), lignanos, cromanos (Bai *et al.*, 1997) aldehídos y alcoholes alifáticos, carotenoides (Stoessl *et al.*, 1984; Bergstrom 1992; Hausen, 1984) y alcaloides, principalmente de naturaleza picrotoxano, aunque también se han encontrado algunos de los tipos pirrazolidínicos (Luning, 1964; Slator, 1977), indólicos, isoquinotínicos y fenilalquilaminas (Maille *et al.*, 1974; Hardegger *et al.*, 1963a, 1963b; Urech *et al.*, 1963). En el Cuadro 1 se muestran ejemplos representativos de los metabolitos secundarios aislados de especies selectas de orquídeas.

La importancia económica de la mayoría de las orquídeas se encuentra dirigida principalmente a la industria floral. Una excepción a esta situación es la *Vanilla planifolia*, la cual es de gran importancia económica como un condimento alimenticio y en la industria de la perfumería. En consecuencia, esta planta

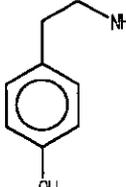
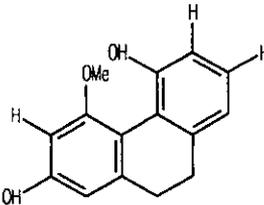
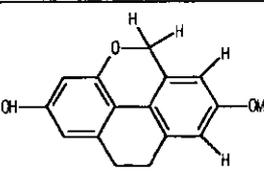
Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae.

| ALCALOIDES | | |
|-----------------------------|---|--|
| FUENTE NATURAL | COMPUESTO | REFERENCIA |
| <i>Dendrobium nobile</i> |  <p>Dendrobina (1)</p> | Slayter, 1977 |
| <i>Dendrobium wardianum</i> |  <p>Dendrowardina (2)</p> | Blomqvist <i>et al.</i> , 1972 |
| <i>Dendrobium lohohense</i> |  <p>Shihunina (3)</p> | Inubushi <i>et al.</i> , 1964, 1968 |

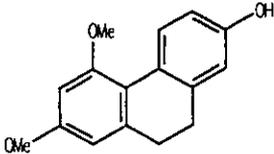
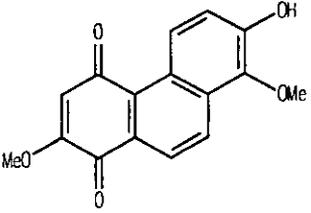
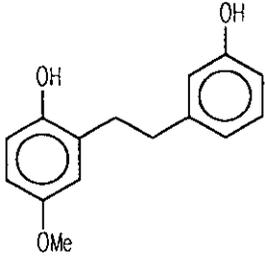
Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae (continuación).

| ALCALOIDES | | |
|------------------------------|--|---------------------------------|
| FUENTE NATURAL | COMPUESTO | REFERENCIA |
| <i>Dendrobium crepidatum</i> |  <p>Isocrepidamina (4)</p> | Elander <i>et al.</i> , 1973 |
| <i>Dendrobium nobile</i> |  <p>Nobilonina (5)</p> | Yamamura y Hirata, 1964 |
| |  <p>6-hidroxinobilonina (6)</p> | |

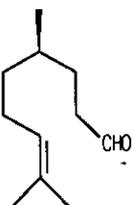
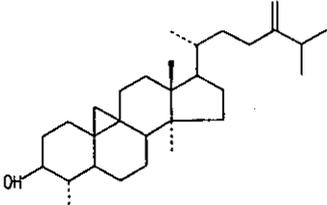
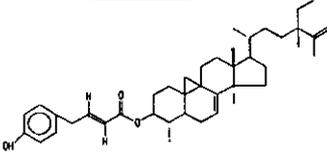
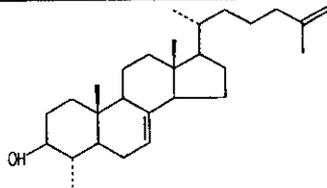
Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae (continuación).

| ALCALOIDES | | |
|----------------------------------|--|----------------------------------|
| FUENTE NATURAL | COMPUESTO | REFERENCIA |
| <i>Catleya sp.</i> |  <p>Tiramina (7)</p> | Maille <i>et al.</i> , 1974 |
| COMPUESTOS DEL TIPO ESTILBENOIDE | | |
| <i>Oroglossum hircinum</i> |  <p>Hircinol (8)</p> | Urech <i>et al.</i> , 1963 |
| <i>Dendrobium pierardii</i> |  <p>Flavinidina (9)</p> | Majumder <i>et al.</i> , 1982 |

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae (continuación).

| COMPUESTOS DEL TIPO ESTILBENOIDE | | |
|----------------------------------|--|----------------------------|
| FUENTE NATURAL | COMPUESTO | REFERENCIA |
| <i>Orchis militaris</i> |  <p>Orcinol (10)</p> | Bevan <i>et al.</i> , 1965 |
| <i>Cypripedium calceolus</i> |  <p>Cripredina (11)</p> | Schmalle y Hausen, 1979 |
| <i>Dendrobium densiflorum</i> |  <p>Batatasina III (12)</p> | Veeraju, 1989 |

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae (continuación).

| TERPENOIDES | | |
|----------------------------|---|------------------------------|
| FUENTE NATURAL | COMPUESTO | REFERENCIA |
| <i>Ophrys splendida</i> |  <p>Citronelal (13)</p> | Karin <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Nervilia purpurea</i> |  <p>Cicloeucaleanol (14)</p> | Kikuchi <i>et al.</i> , 1985 |
| <i>Coelogina uniflora</i> |  <p>Uniflorina (15)</p> | Majumder y Pal, 1990 |
| <i>Eria convalarioides</i> |  <p>Erianol (16)</p> | Majumder y Kar, 1989 |

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae (continuación).

| LIGNANOS | | |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| FUENTE NATURAL | COMPUESTO | REFERENCIA |
| <i>Pleione bulbocodioides</i> | <p>Sanjidiina B (17)</p> | Bai <i>et al.</i> , 1997 |
| CROMANOS | | |
| <i>Pleione bulbocodioides</i> | <p>Plaionina (18)</p> | Bai <i>et al.</i> , 1997 |
| COMPUESTOS AROMÁTICOS SIMPLES | | |
| <i>Vanilla planifolia</i> | <p>Vanilina (19)</p> | Hausen, 1984 |

se cultiva y se procesa en grandes cantidades para estos propósitos (Hausen, 1984). Cabe mencionar que la propiedad saborizante de las cápsulas de *Vanilla planifolia* se conoce desde épocas antiguas (Jackson, 1875; Busse, 1899). Durante la cosecha, las cápsulas de *V. planifolia* no son fragantes, debido a que los compuestos aromáticos presentes en ella se encuentran bajo la forma de glucósidos. Después de un proceso de fermentación, se generan compuestos como la vanilina (un aldehído) (19), el alcohol vanilínico, y algunos ésteres aromáticos (Arana, 1944; Garros-Patin y Hahn, 1954; Arctander, 1969).

La vanilina (19), obtenida sintéticamente o de fuentes naturales, se utiliza como un agente saborizante en la industria alimentaria, principalmente en la industria del chocolate y del helado. También se emplea en perfumería para la elaboración de jabones, cremas y lociones. Por último, cabe hacer notar el uso de este aldehído (19), como un agente enmascarante de olores en productos industriales tales como el rubor y el azúcar dietética (Arctander, 1969).

Muchas especies de orquídeas son de interés en algunos lugares del mundo como remedios populares para aliviar dolores de cabeza y dentales, para el tratamiento de la diarrea y como agentes vermífugos, tónicos, analgésicos y antipiréticos (Hausen, 1984). Así por ejemplo, *Nervilia purpurea* se usa en medicina tradicional para el tratamiento de heridas e hipertensión (Kikuchi *et al.*, 1985). *Nervilia aragoana*, se utiliza para la cura de enfermedades viscerales e hipertensión (Kikuchi *et al.*, 1985). *Cypripedium reginae* y probablemente *Cypripedium calceolus*, se utilizan en América del Norte por sus propiedades

tranquilizantes. La droga cruda se conoce comúnmente como valeriana americana (MacDougal, 1985).

La orquídea *Dendrobium nobile*, se ha utilizado en China como un tónico y un agente antipirético. La planta originalmente se denominó con los nombres de Chin-Shih-hu y Sekkoku en China y en Japón, respectivamente. Estudios posteriores demostraron que sólo uno de los alcaloides aislados de la especie, la dendrobina (**1**), es la responsable de las propiedades medicinales de la planta (Chen, 1935a, 1935b). Este alcaloide produce también una moderada hiperglicemia y disminuye la actividad cardíaca; cuando se administra en grandes dosis, la presión sanguínea disminuye y se suprime la respiración; también puede producir convulsiones (Chen and Rose, 1936).

De la familia Orchidaceae se han aislado numerosas fitoalexinas de tipo fenantrénico. Las fitoalexinas son sustancias antifúngicas (Arditti, 1966; Bernard, 1909a, 1909b, 1911; Fisch *et al.*, 1972), que se producen *de novo* en las plantas cuando se presenta alguna infección por especies fúngicas (Müller y Börger, 1940). El primero de estos compuestos, obtenido de una orquídea, fue el orcinol (**10**), sustancia cristalina biosintetizada por *Orchis militaris* (Boller *et al.*, 1957). La segunda fitoalexina de mayor importancia, por la concentración en que se genera, es el loroglosol obtenido de *Loroglossum hircinum* (Hardegger *et al.*, 1963).

Muchas orquídeas producen efectos tóxicos, así por ejemplo, se ha descrito que las personas expuestas a una especie de *Aracchnis* sufren una inflamación severa en los ojos (conjuntivitis). Esta reacción se desarrolla aproximadamente a la hora de la exposición y desaparece dos días después.

Posiblemente, esta irritación es debida a alguna sustancia no conocida, la cual, puede actuar como fungicida o insecticida en la orquídea (Hausen, 1984).

La especie *Corymborchis longiflora*, utilizada en la India y la Península Malaya, causa vómitos y envenenamiento cuando se mastica y cuando se deglute el jugo (Miller, 1959).

De igual modo, la especie *Vanilla planifolia* produce dermatitis severas, (Layet, 1883). Esta dermatitis se presenta en los trabajadores que manejan las cápsulas de la planta durante el cultivo, la cosecha y la fermentación. A esta intoxicación se le llama vanilismo (Hitchinson, 1892/93; Drevon, 1899). También se han detectado casos de reacciones alérgicas inmediatas como rinitis alérgica, asma bronquial, complicaciones gastrointestinales y urticaria. El consumo de la vainilla en helados, pasteles, licuados y otras bebidas, ha causado erupciones e inflamaciones en las manos y la cara, o bien, malestar generalizado, dolor de cabeza y náuseas en personas sensibles (Millan, 1936).

Afortunadamente, la exposición a especies ornamentales consideradas como tóxicas, así como su distribución y venta, se encuentran restringidas (Hausen, 1984).

1.2 GENERALIDADES ACERCA DE *Epidendrum boothii* (Lindley) Schltr. (Sin. *Nidema boothii*).

El género *Epidendrum*, es el género neotropical de orquídeas con el mayor número de especies. Se encuentra distribuido desde el suroeste de Carolina del

Norte, al oeste de Lousiana en las costas del Golfo, atravesando México, América Central hasta Argentina (Ames y Correll, 1952).

Epidendrum boothii es una planta epífita que habita en los árboles del bosque tropical denso de 1350 m de elevación. Se encuentra distribuida desde México hasta Panamá; también es posible encontrarla en Cuba y la Guayana Holandesa (Ames y Correll, 1952).

En las prácticas medicinales populares de la región de los Tuxtlas, la especie *E. boothii*, se utiliza para el tratamiento de cólicos estomacales. Desde el punto de vista químico esta especie no ha sido objeto de estudio alguno.

En el libro epífitas de Veracruz, se hace la siguiente descripción de la planta: "Rizoma rastrero, corto, plantas viejas formando agrupaciones grandes y densas con cientos de tallos, pseudolobulos elipsoides cilindricos, algo comprimidos, 2-4 cm de largo, 1.5-2.5 cm de ancho, 1 ó 2 hojas en el ápice. Hojas lineares (lanceoladas) de 10-20 cm de largo, aproximadamente 1 cm de ancho, lámina delgada. Inmunofluorescencia de 7-15 cm de largo con pocas flores. Flores blanquecinas, sépalos y pétalos lanceolados acuminados, sépalos de aproximadamente 15-20 mm, pétalos de 13 mm de largo y 3-4 mm de ancho."

En la figura 1 se muestra una fotografía de la planta descrita.



Figura 1. *Epidendrum boothii* Lindley (Orchidaceae).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las orquídeas constituyen un recurso terapéutico muy valioso en diversas regiones del mundo (Kikuchi *et al.*, 1986; MacDougal, 1985; Chen y Rose, 1936; Baxter y Harborne, 1995; Harborne, 1994). Sin embargo, los estudios realizados conducentes a la obtención de agentes pesticidas y fármacos con interés comercial a partir de estos vegetales, son escasos.

Por tal motivo, en fechas recientes se inició un proyecto de naturaleza multidisciplinaria, cuyo objetivo primordial es determinar el potencial espasmolítico y alelopático de diversas especies de orquídeas mexicanas y así, contribuir al descubrimiento de nuevos agentes útiles para el desarrollo de agentes medicinales y agroquímicos, respectivamente.

En este sentido, cabe destacar que la variedad y abundancia de las orquídeas mexicanas ofrecen un marco ideal para el desarrollo de este tipo de proyectos.

Un estudio etnobotánico reciente, realizado en la región de los Tuxtlas, Estado de Veracruz, zona de gran concentración de orquídeas dentro del territorio nacional, permitió la preselección de varias especies medicinales de orquídeas, las cuales podrían constituir una fuente valiosa de principios activos. Una de las especies preseleccionadas fue *Epidendrum boothii* (Lindley) Schltr. (sin. *Nidema boothii*), orquídea utilizada para el tratamiento de cólicos estomacales (Carmona, 1996).

Posteriormente, durante la realización de ensayos biológicos de selección, se comprobó que esta planta contiene principios activos capaces de modificar la contractilidad del íleon aislado de rata (Estrada, 1998). Sin embargo, a la fecha no se han realizado los estudios conducentes a determinar la potencialidad herbicida de esta especie vegetal. Por otra parte, tampoco se ha realizado el fraccionamiento biodirigido del extracto espasmolítico, para determinar cuales fracciones son las responsables de la actividad antiespasmolítica previamente demostrada, de tal forma, que posteriormente puedan aislarse los principios activos espasmolíticos. La determinación de la actividad espasmolítica de las fracciones resultantes y el aislamiento de los principios activos correspondientes, serán objeto de otra propuesta de tesis, la cual, se está desarrollando de manera paralela al presente estudio (Estrada, 1998).

Con relación al primer punto, es importante mencionar, que el interés por la búsqueda de herbicidas naturales se ha incrementado en las últimas décadas, debido a los daños ocasionados por el uso frecuente de los herbicidas sintéticos. En contraste con los herbicidas de origen sintético de mayor uso en la actualidad, los productos naturales ofrecen las siguientes ventajas:

- a) Son menos tóxicos para el hombre y los animales.
- b) Presentan una mayor selectividad, dañando sólo a las malezas que provocan pérdidas en los cultivos de mayor importancia económica.
- c) Su tiempo de permanencia en el ambiente es menor, es decir, son biodegradables y por lo tanto ocasionan un menor daño en los distintos ecosistemas.

- d) Por último, pueden servir como prototipos estructurales para la síntesis de compuestos que actúen como inhibidores y/o reguladores del desarrollo, de otras especies vegetales (Duke, 1991).

Con base en las consideraciones anteriores, el presente proyecto tiene como objetivos primordiales:

1. Determinar el potencial herbicida de la especie *Epidendrum boothii*, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas.
2. Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto espasmolítico, con la finalidad de determinar posteriormente, qué fracciones concentran los compuestos con esta actividad biológica.
3. Realizar el estudio químico de las fracciones no espasmolíticas, con el propósito de contribuir al conocimiento del metabolismo secundario de esta especie medicinal.

Para el cumplimiento de los objetivos generales, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Preparar el extracto de la planta *Epidendrum boothii*, empleando como disolvente de extracción una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1).
- Determinar la potencialidad fitotóxica del extracto, mediante la evaluación de su efecto, sobre el crecimiento radicular y la germinación de semillas de dos especies vegetales *Amaranthus hypochondriacus* (Amarantaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Gramineae), mediante el método en caja de Petri.
- Realizar el fraccionamiento del extracto total, mediante un proceso de cromatografía en columna abierta.

- Determinar el potencial fitotóxico de cada una de las fracciones resultantes.
- Separar y purificar los principios de las fracciones primarias fitotóxicas y/o no espasmolíticas.
- 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) utilizado en el presente estudio, se recolectó en el Rancho El Naranjillo, Catemaco, Estado de Veracruz, México, en el mes de Octubre de 1996. La recolección y clasificación botánica de esta especie, estuvo a cargo del Biólogo Gustavo Carmona Díaz. Un ejemplar de referencia se depositó en el herbario del Instituto de Ecología AC. (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 en capa fina, se emplearon placas de aluminio con un espesor de 0.25 mm (Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck). Se utilizaron diversos sistemas de elución y agentes cromógenos, los cuales se resumen 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-Éter | Diversas |
| B | Hexano-CHCl ₃ | Diversas |
| C | Hexano-AcOEt | Diversas |
| D | Hexano-Benceno | Diversas |
| E | Benceno-CHCl ₃ | Diversas |
| F | CHCl ₃ -Éter | Diversas |
| G | CHCl ₃ -AcOEt | Diversas |
| H | CHCl ₃ -MeOH | Diversas |
| I | AcOEt-MeOH | Diversas |

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

| REACTIVO | 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* | 90mL 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 en el 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 en película.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- ^1H) y de Carbono-13 (RMN- ^{13}C), se generaron en un aparato Varian VXR-300S, 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 (HETCOR).

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

El análisis de difracción de rayos X se realizó en un difractómetro Siems P4/PC.

Todos los análisis antes indicados se efectuaron en el Instituto de Química de la U.N.A.M.

3.2.3 Análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Los análisis mediante cromatografía de gases (CG-EM), se realizaron en un cromatógrafo de gases HP acoplado a un espectro de masas modelo Jeol JMS-AX505HA, mediante la inyección de 0.2 μ L de cada una de las muestras de prueba en una columna capilar PAS-1701-Tested Silicone HP. Se utilizó helio como gas acarreador, a una presión manométrica de 0.6 Kg/cm² y con un flujo de 2 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo en 260 °C; la temperatura inicial fue de 150 °C y se programó para alcanzar una temperatura de 260 °C con un calentamiento gradual de 10 °C/min.

Para los registros de los espectros de masas, se utilizaron como condiciones experimentales las siguientes: un voltaje de 70 eV para el impacto electrónico. Cada uno de los espectros se registró con un barrido de 33 a 630 unidades de masa/carga (m/z) por segundo.

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

3.3 EVALUACIONES BIOLÓGICAS.

3.3.1 Determinación de la actividad fitoinhibidora.

3.3.1.1 Método en caja de Petri.

La actividad fitotóxica del extracto y de las fracciones de *Epidendrum boothii*, se evaluó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de 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 las muestras de prueba (extracto o fracciones) se prepararon disoluciones con $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (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 de 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 *A. hypochondriacus* y 48 horas después en el caso de *E. crusgalli*. Se trabajaron tres réplicas por tratamiento de las muestras de prueba y de los controles.

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

3.3.1.2 Método bioautográfico.

El método bioautográfico se realizó sobre placas cromatográficas de 5x20 cm recubiertas con gel de sílice. En cada placa se sembraron 5 mg del extracto; posteriormente, se efectuó la elución utilizando un sistema apropiado de disolventes. Al cabo del proceso de elución, se evaporó el disolvente y las cromatoplasas se cubrieron con 20 mL de una suspensión de agar al 1%; para todos los casos se realizaron dos réplicas. Paralelamente, dos placas sin muestra problema se eluyeron con el sistema de elución correspondiente; estas se utilizaron como un control negativo. Posteriormente, cada una de las placas cromatográficas se cubrió completamente con la semilla de *Amaranthus hypochondriacus* y/o *Physalis ixocarpa*. Las placas con la semilla se incubaron a 28 °C durante 24 horas en una atmósfera húmeda.

Transcurrido el tiempo de incubación, se observó la zona de inhibición (Inoue, 1992). Este último procedimiento se realizó por comparación con una placa conteniendo la muestra, eluida en las mismas condiciones y revelada con el agente cromógeno apropiado.

3.3.2 Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* L.

La determinación de la toxicidad para *Artemia salina* del extracto, se realizó mediante la metodología convencional (Anderson *et al.*, 1991).

Se pesaron 20 mg del extracto, y se disolvieron en 2 mL del disolvente apropiado. Se transfirieron a tres viales de manera independiente 500, 50, y 5 μ L, de estas disoluciones; los volúmenes transferidos correspondieron a

concentraciones de 1000, 100, y 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; posteriormente, el disolvente se evaporó a sequedad.

Después de haber desarrollado los crustáceos en un medio salino artificial durante 48 horas, se transfirieron diez crustáceos a cada uno de los viales, aforando posteriormente a 5 mL con agua salada; 24 horas después, se registraron el número de organismos sobrevivientes para calcular de este modo el % de mortalidad. Los resultados se procesaron mediante un análisis probit, para calcular la concentración letal cincuenta (CL_{50}). El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración de prueba.

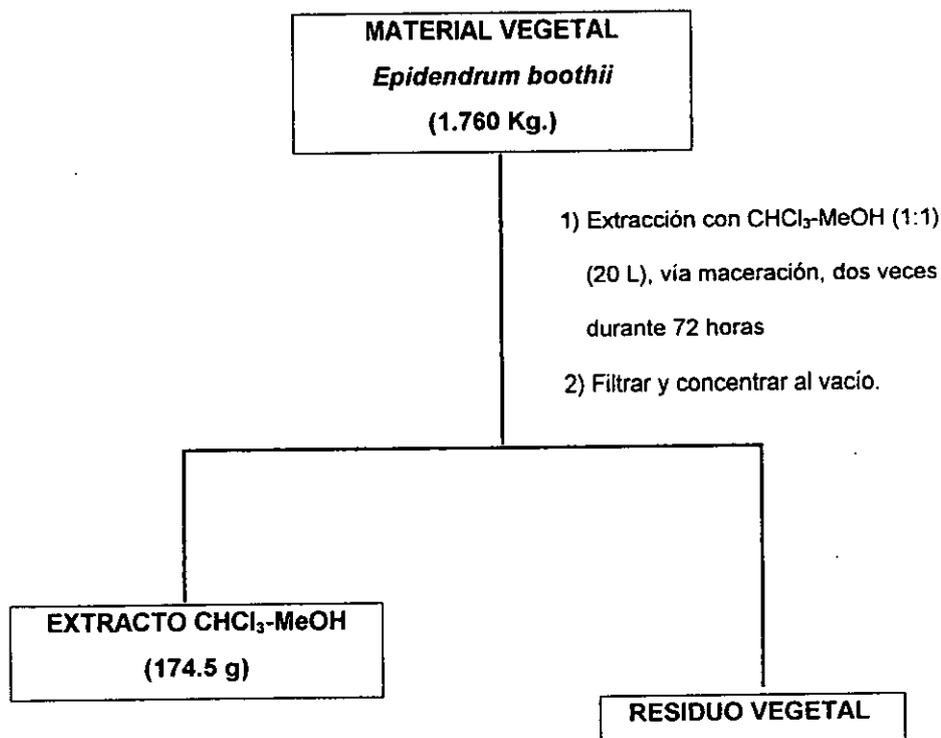
3.4 EXTRACCIÓN DE LA PLANTA ENTERA *Epidendrum boothii*.

El material seco y molido (1.760 Kg), se extrajo mediante un proceso de maceración con 20 litros de una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1); este proceso permitió la obtención de 174.5 g de extracto crudo. En el Esquema 1, se resume el procedimiento empleado.

3.5 FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO TOTAL.

El extracto total (174.5 g), se fraccionó en una columna cromatográfica abierta, utilizando como adsorbente 800 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, mezcla de hexano-acetato de etilo (diversas proporciones), acetato de etilo y mezcla de acetato de etilo-metanol (diversas proporciones). Se recolectaron 554 fracciones de 500 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas

fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares; este proceso generó un total de 17 fracciones primarias. En el Cuadro 4, se resume el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto total de la planta entera de *Epidendrum boothii*. Cada una de las fracciones resultantes se evaluó mediante los bioensayos indicados en el inciso 3.3.



Esquema 1. Proceso de extracción de la planta entera *Epidendrum boothii*.

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

| Eluyente | Proporción (%) | Fracciones | Fracciones combinadas | Clave | Peso (g) |
|------------|----------------|------------|-----------------------|-------|----------|
| Hexano | 100 | 1-17 | 1-22 | NB-A | 0.2784 |
| Hex-AcOEt | 95-05 | 18-47 | 23-26 | NB-B | 5.5996 |
| | 92-08 | 48-53 | 27-44 | NB-C | 4.5693 |
| | 90-10 | 54-134 | 45-74 | NB-D | 2.2518 |
| | 85-15 | 135-171 | 75-84 | NB-E | 0.9925 |
| | 80-20 | 172-210 | 85-160 | NB-F | 1.4359 |
| | 75-25 | 211-233 | 161-182 | NB-G | 1.2364 |
| | 70-30 | 234-263 | 183-219 | NB-H | 4.4870 |
| | 65-35 | 264-274 | 220-250 | NB-I | 0.1211 |
| | 60-40 | 275-286 | 251-282 | NB-J | 2.4876 |
| | 50-50 | 287-321 | 283-300 | NB-K | 7.4796 |
| | 45-55 | 322-336 | 301-399 | NB-L | 13.1359 |
| | 40-60 | 337-351 | 400-429 | NB-M | 2.8630 |
| 30-70 | 352-412 | | | | |
| 20-80 | 413-423 | | | | |
| AcOEt | 100 | 424-450 | 430-464 | NB-N | 10.0914 |
| AcOEt-MeOH | 90-10 | 451-535 | 465-519 | NB-O | 30.5990 |
| | 85-15 | 536-543 | 520-548 | NB-P | 41.1030 |
| | 75-25 | 544-548 | 549-554 | NB-Q | 11.3915 |
| | 50-50 | 549-554 | | | |

3.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS DE *Epidendrum boothii*.

3.6.1 Aislamiento y purificación del estigmasterol (23) de la fracción primaria NB-E.

De la fracción primaria NB-E, cristalizaron espontáneamente 1.2 g de un sólido cristalino de color blanco, con punto de fusión 149-150 °C, el cual se identificó como el estigmasterol por comparación con una muestra auténtica.

3.6.2 Aislamiento y purificación del triterpenoide nidemina (20) de la fracción secundaria NB-B5.

La fracción primaria NB-B (5.5996 g) (Cuadro 4), se recromatografió en una columna abierta, utilizando como adsorbente 72 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-CHCl₃ (diversas proporciones), CHCl₃ y acetato de etilo. Se recolectaron un total de 198 fracciones de 30 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 siete fracciones secundarias; en el Cuadro 5 se resume este procedimiento.

De la fracción secundaria NB-B5 (Cuadro 5), precipitó un sólido blanco; el producto se purificó por sucesivas recristalizaciones en AcOEt generando 0.6859 g de un sólido cristalino, con un punto de fusión de 127-129 °C.

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción NB-B de *Epidendrum boothii*

| Eluyente | Proporción (%) | Fracciones | Fracciones combinadas | Clave | Peso (g) |
|-----------------------|----------------|------------|-----------------------|-------|----------|
| Hexano | 100 | 1-14 | 1-11 | NB-B1 | 0.3312 |
| Hex-CHCl ₃ | 95-05 | 15-46 | 12-22 | NB-B2 | 0.0505 |
| | 90-10 | 47-131 | 23-41 | NB-B3 | 0.0200 |
| | 80-20 | 132-156 | 42-47 | NB-B4 | 0.0643 |
| | 75-25 | 157-168 | 48-168 | NB-B5 | 1.8074 |
| | 70-30 | 169-175 | | | |
| CHCl ₃ | 100 | 176-190 | 169-190 | NB-B6 | 0.8940 |
| AcOEt | 100 | 191-198 | 191-198 | NB-B7 | 1.0358 |

3.6.3 Aislamiento y purificación de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11), 25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22), de la fracción secundaria NB-D8, bajo la forma de sus derivados acetilados 21a y 22a.

La fracción primaria NB-D (2.2518 g) (Cuadro 4), se recromatografió en una columna abierta utilizando como adsorbente 96 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-CHCl₃ (diversas proporciones), CHCl₃-acetato de etilo (diversas proporciones) y acetato de etilo. Se recolectaron un total de 285 fracciones de 50 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este procedimiento generó un total de 23 fracciones secundarias; en el Cuadro 6 se resume este proceso.

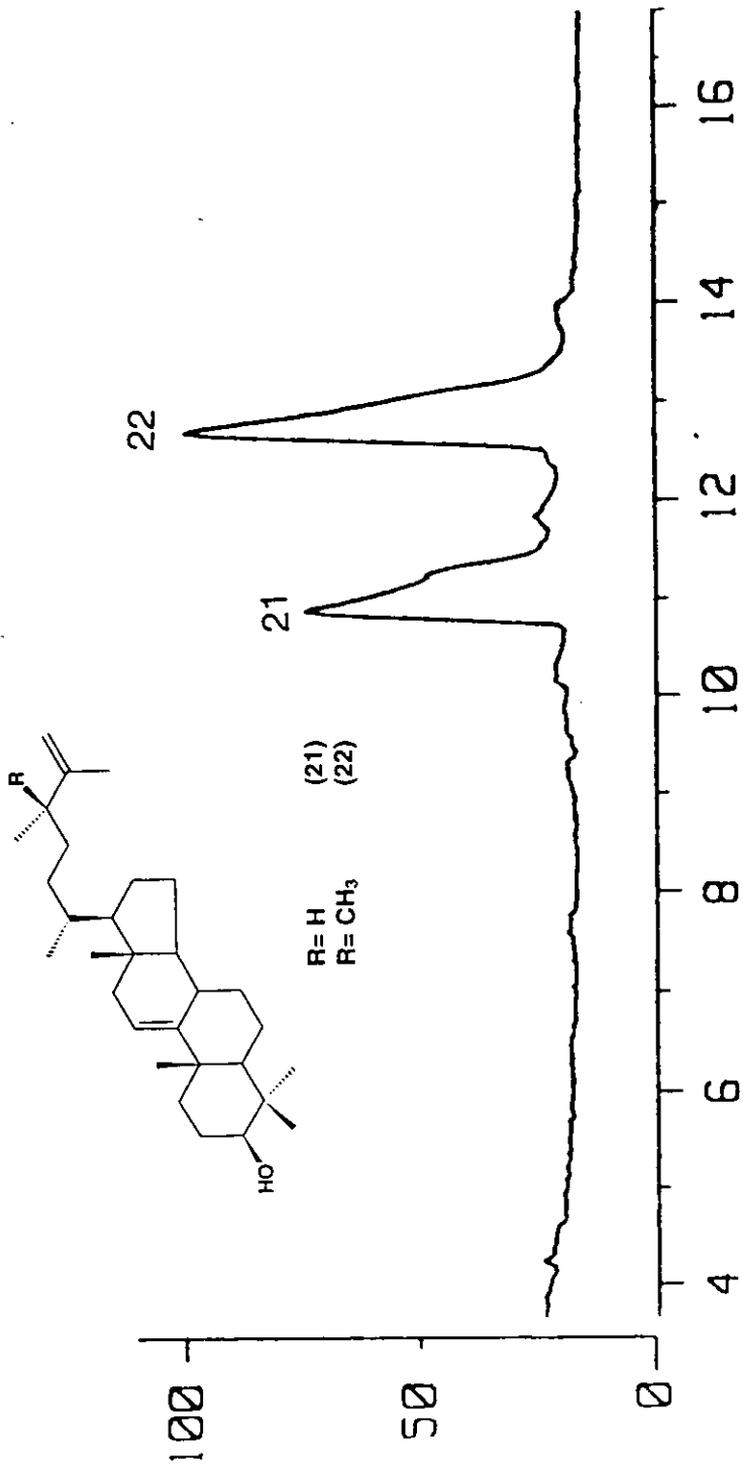
De las fracciones secundarias NB-D8 (Cuadro 6), precipitó un sólido blanco; el producto se purificó por sucesivas recristalizaciones con CHCl_3 . Al cabo del proceso de purificación, se obtuvieron 0.2985 g de un sólido cristalino, con un punto de fusión de 207-208 °C.

De acuerdo al análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, el polvo estaba constituido por una mezcla (M-I) de dos productos (Cromatograma 1). Para separarlos se procedió a preparar los derivados acetilados.

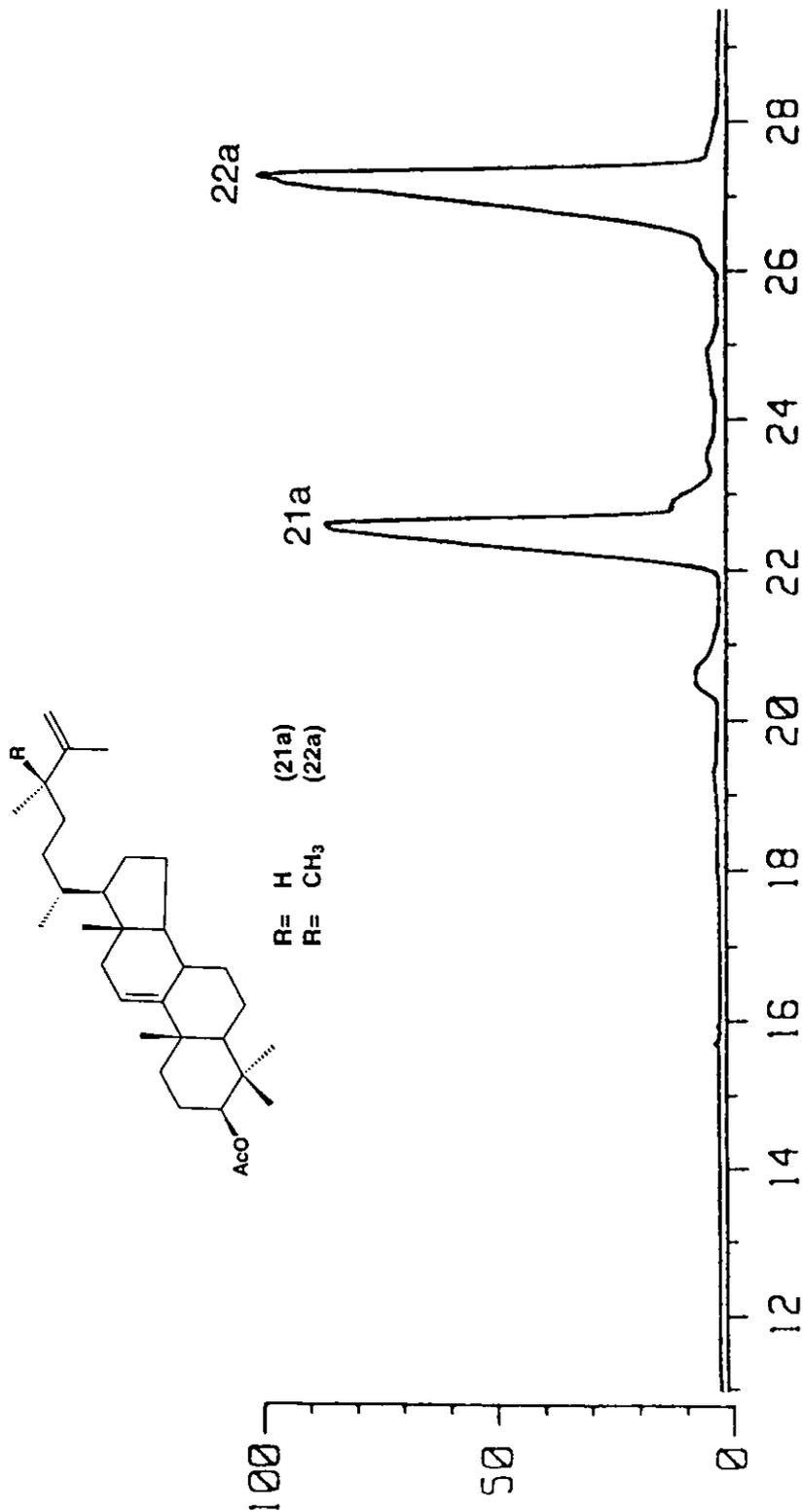
Para obtener el derivado acetilado de los compuestos 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (**21**), y 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (**22**), presentes en la mezcla M-I, se utilizó 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 horas y al término de este tiempo los productos acetilados se separaron de la manera convencional (Pavia *et al.*, 1995; Shriner *et al.*, 1980). De nueva cuenta, el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (Cromatograma 2), indicó que el producto de acetilación estaba constituido por dos productos. La separación de cada uno de los constituyentes, se logró por sucesivas cromatografías en capa delgada sobre gel de sílice impregnado con AgNO_3 . La fase móvil utilizada fue benceno-hexano (1:5). Este proceso permitió la obtención de 70.4 mg y 211.2 mg de los productos **21a** y **22a** respectivamente.

Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción NB-D de *Epidendrum boothii*

| Eluyente | Proporción (%) | Fracciones | Fracciones combinadas | Clave | Peso (g) |
|--------------------------|----------------|------------|-----------------------|--------|----------|
| Hexano | 100 | 1-10 | 1-56 | NB-D1 | 0.0323 |
| Hex-CHCl ₃ | 91-10 | 11-22 | 57-62 | NB-D2 | 0.0031 |
| | 80-20 | 23-33 | 63-84 | NB-D3 | 0.0127 |
| | 70-30 | 34-43 | 85-90 | NB-D4 | 0.0034 |
| | 60-40 | 44-53 | 91-95 | NB-D5 | 0.0073 |
| | 50-50 | 54-84 | 96-98 | NB-D6 | 0.0152 |
| | 40-60 | 85-92 | 99-104 | NB-D7 | 0.0865 |
| | 30-70 | 93-196 | 105-110 | NB-D8 | 0.3185 |
| | 20-80 | 197-210 | 111-115 | NB-D9 | 0.0770 |
| | 10-90 | 211-258 | 116-122 | NB-D10 | 0.0515 |
| | | | 123-128 | NB-D11 | 0.0569 |
| | | | 129-134 | NB-D12 | 0.0023 |
| | | | 135-146 | NB-D13 | 0.2383 |
| | | | 147-158 | NB-D14 | 0.1034 |
| | | | 159-188 | NB-D15 | 0.0946 |
| | | 189-206 | NB-D16 | 0.1500 | |
| | | 207-218 | NB-D17 | 0.6531 | |
| | | 219-230 | NB-D18 | 0.0244 | |
| | | 231-254 | | | |
| | | 255-258 | | | |
| CHCl ₃ | 100 | 259-265 | 259-263 | NB-D19 | 0.0057 |
| CHCl ₃ -AcOEt | 90-10 | 266-274 | 264-266 | NB-D20 | 0.0391 |
| | 50-50 | 275-282 | 267-274 | NB-D21 | 0.0835 |
| | | | 275-279 | NB-D22 | 0.0398 |
| AcOEt | 100 | 283-285 | 280-285 | NB-D23 | 0.0366 |



Cromatograma 1. Cromatograma de gases de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22).



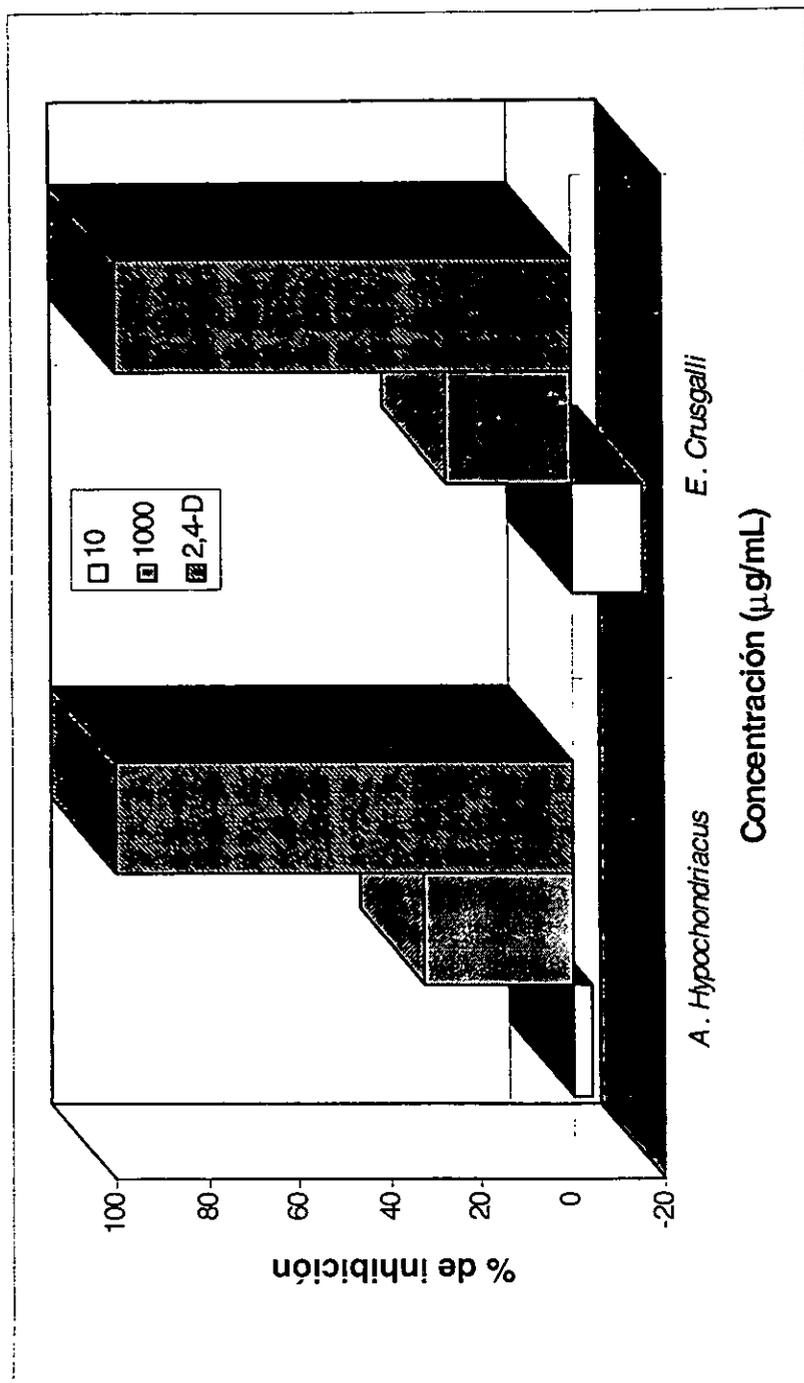
Cromatograma 2. Cromatograma de gases de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE *Epidendrum boothii*.

La selección primaria de la especie *Epidendrum boothii*, se realizó con base en el criterio etnomédico, el cual ha demostrado en varias ocasiones, ser de gran importancia para la detección de especies vegetales, que constituyen una fuente potencial de principios activos. Posteriormente, como se indicó en la sección de justificación y objetivos, durante la realización de los ensayos biológicos preliminares conducentes a determinar el potencial espasmolítico del extracto total, se comprobó que la especie contiene principios activos capaces de modificar la contractilidad del músculo liso (Estrada, 1998).

Con la finalidad de explorar la potencialidad herbicida del extracto de la orquídea, en el presente trabajo se evaluó el efecto del mismo sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. En la gráfica 1 se ilustran los resultados obtenidos de estas determinaciones. De los mismos, se infiere que el extracto inhibe de manera moderada el crecimiento radicular y la germinación de las dos semillas de prueba a una concentración de 1000 µg/mL. En el caso de *A. hypochondriacus* el crecimiento radicular se inhibió en un 35%, en tanto que en el caso de *E. crusgalli* la inhibición fue de un 27%. A la concentración de 10 µg/mL el extracto estimuló el crecimiento radicular de las dos semillas de prueba, sin embargo, las diferencias no fueron significativas con respecto al



Gráfica 1. Inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* inducida por el extracto total de la orquídea *Epidendrum boothii*.

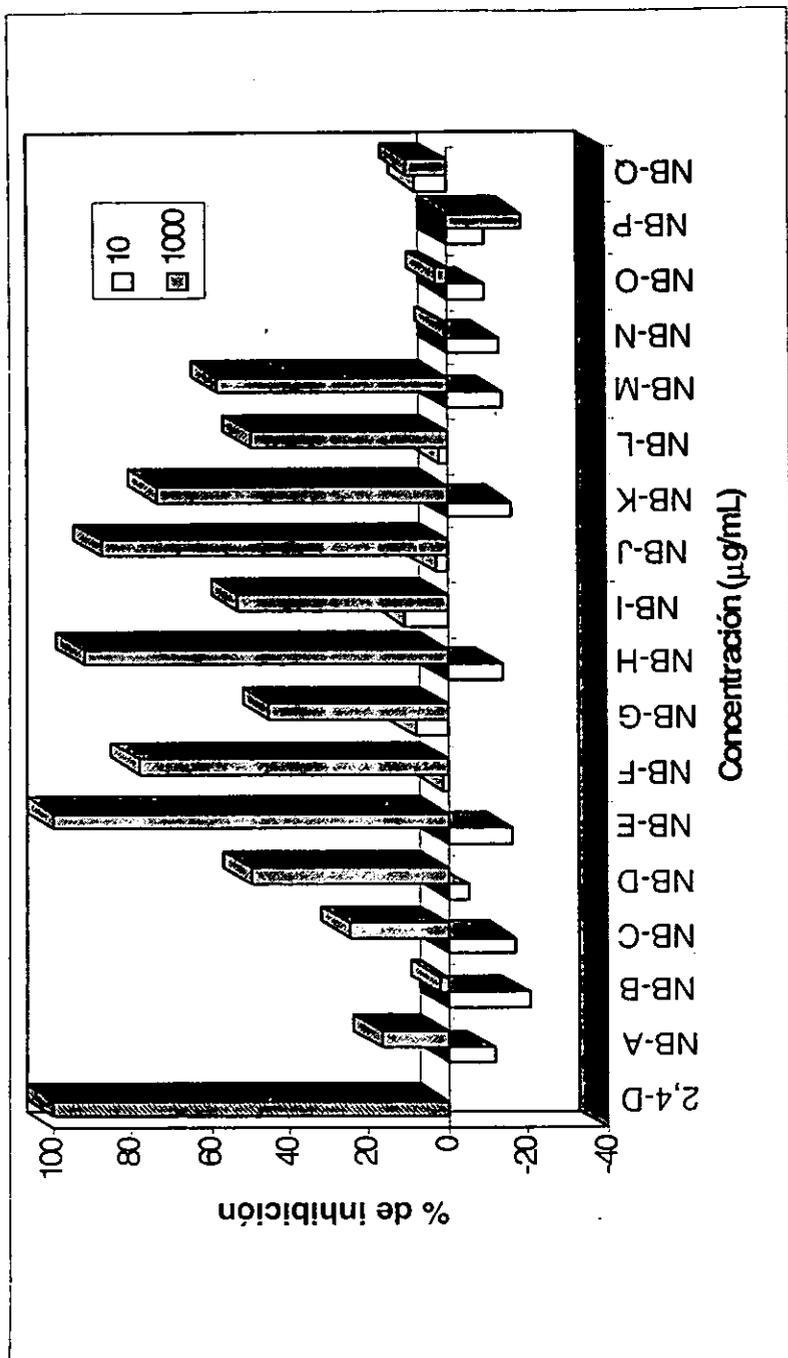
control. El proceso de germinación se vió afectado de manera moderada sólo en el caso de *A. hypochondriacus*.

Por último, se determinó la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina*. La realización de este ensayo tiene la finalidad de predecir otras actividades biológicas potenciales tales como la citotóxica, la antihelmíntica y la antipalúdica, entre otras (Anderson *et al.*, 1991). Muchas de las actividades antes mencionadas han demostrado una correlación acertada con este bioensayo. Como resultado de esta determinación se encontró una CL_{50} de 3.03 mg/mL; en consecuencia, el extracto de *E. boothii* no es tóxico para el crustáceo *A. salina*.

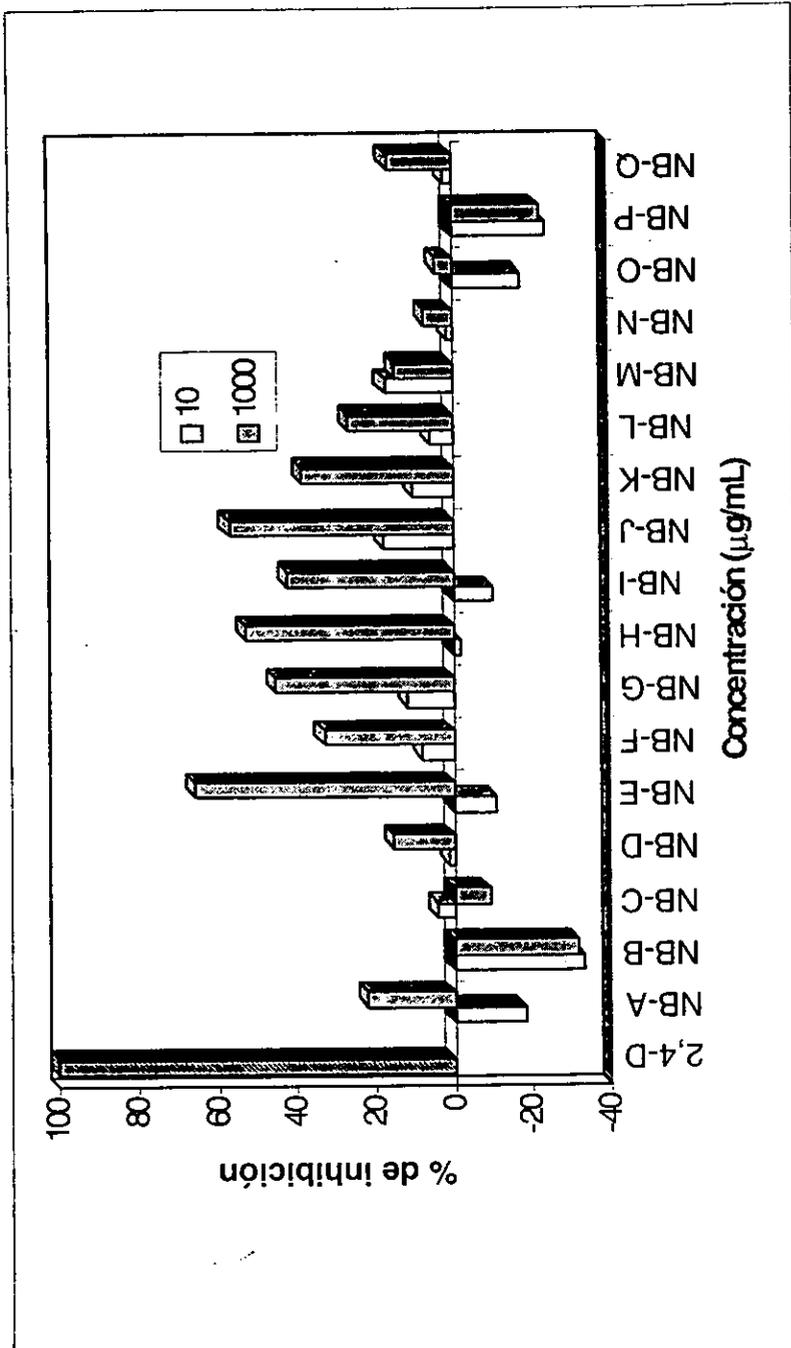
4.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS TRITERPENOIDES DEL EXTRACTO DE *Epidendrum boothii*.

La preparación del extracto total se realizó mediante un proceso de maceración (inciso 3.4). Posteriormente, el extracto se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (sección experimental 3.2.1). Este proceso permitió la obtención de 17 fracciones primarias (Cuadro 4).

Todas las fracciones primarias se evaluaron nuevamente para determinar si la actividad fitotóxica sobre las especies *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* se veía incrementada a nivel de las fracciones primarias (sección experimental 3.3.1.1). Los resultados de estas determinaciones se resumen en las Gráficas 2 y 3 y en la Tabla 1. Como se desprende de los resultados indicados, ninguna de



Gráfica 2. Inhibición del crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* inducida por las fracciones primarias de *Epidendrum boothii*.



Gráfica 3. Inhibición del crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* inducida por las fracciones primarias de *Epidendrum boothii*

Tabla1. Evaluación del potencial fitotóxico de las fracciones primarias derivadas del extracto MeOH:CHCl₃ (1:1) de *Epidendrum boothii*.

| Fracción | Concentración (µg/mL) | % de inhibición | |
|----------|-----------------------|---------------------------|---------------------|
| | | <i>A. hypochondriacus</i> | <i>E. crusgalli</i> |
| NB-A | 10 | * | * |
| | 1000 | 16.8 | 22.3 |
| NB-B | 10 | * | * |
| | 1000 | 2.3 | * |
| NB-C | 10 | * | * |
| | 1000 | 25 | 4.2 |
| NB-D | 10 | * | 1.4 |
| | 1000 | 49.9 | 15.3 |
| NB-E | 10 | * | * |
| | 1000 | 99.8 | 65.5 |
| NB-F | 10 | 1.4 | 7.7 |
| | 1000 | 78.2 | 33 |
| NB-G | 10 | 8.0 | 11.9 |
| | 1000 | 45.1 | 45.5 |
| NB-H | 10 | * | * |
| | 1000 | 92 | 52.9 |
| NB-I | 10 | 10.5 | * |
| | 1000 | 53 | 42.5 |
| NB-J | 10 | 2.8 | 17.4 |
| | 1000 | 87.9 | 56.7 |
| NB-K | 10 | * | 10.3 |
| | 1000 | 74 | 38.8 |
| NB-L | 10 | 2.2 | 5.8 |
| | 1000 | 49.6 | 26.7 |
| NB-M | 10 | * | 17.2 |
| | 1000 | 58 | 14.8 |
| NB-N | 10 | * | 1 |
| | 1000 | 0.6 | 7.3 |
| NB-O | 10 | * | * |
| | 1000 | 3 | 4.4 |
| NB-P | 10 | * | * |
| | 1000 | * | * |
| NB-Q | 10 | 7.7 | 1.7 |
| | 1000 | 9.9 | 16.5 |

* Estimulación del crecimiento radicular

las fracciones demostró una actividad inhibitoria significativa a la concentración de 10 µg/mL. Sin embargo, a 1000 µg/mL las fracciones NB-E, NB-F, NB-G, NB-H, NB-I, NB-J, NB-K, NB-L y NB-M inhiben de manera significativa el crecimiento radicular de las dos especies de prueba. Cabe señalar que estas fracciones demostraron también un efecto espasmolítico. En consecuencia, y de acuerdo a los objetivos planteados para el presente trabajo, se procedió al estudio fitoquímico de las fracciones no espasmolíticas de menor polaridad, con la única finalidad de contribuir al conocimiento de la química de esta especie medicinal. El conocimiento del contenido metabólico de las plantas medicinales, es de importancia para los procesos de control de calidad de las materias primas, en el caso de lograrse la comercialización de las mismas. Por otro lado, permite establecer la presencia o ausencia de sustancias tóxicas conocidas.

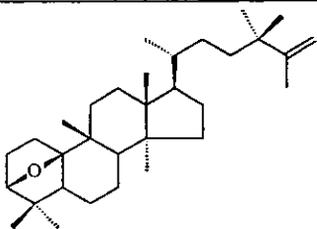
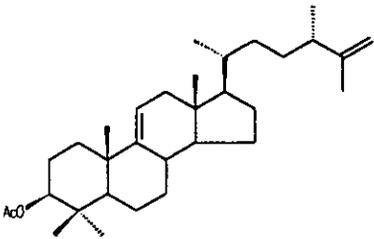
Para cumplir con el objetivo antes indicado, las fracciones NB-B, NB-C, y NB-D se sometieron a diversos procedimientos cromatográficos (inciso 3.2.1), lo cual permitió el aislamiento de cuatro metabolitos secundarios de origen mevalónico: el estigmasterol (**23**), la nidemina (**20**), el 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (**21**) y el 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (**22**); los compuestos (**21**) y (**22**) se aislaron en forma pura bajo la forma de sus monoacetil derivados (**21a**) y (**22a**), respectivamente.

Es importante mencionar que la separación de estos compuestos como productos naturales (bajo la forma de alcohol), no fue posible por los métodos cromatográficos de columna abierta y capa delgada. La separación exitosa de los

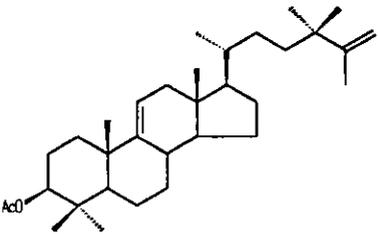
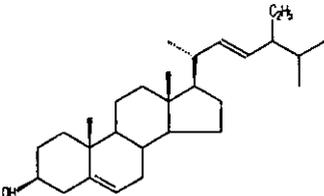
mismos se logró bajo la forma de sus derivados acetilados, mediante la aplicación de la técnica de argentación del soporte, utilizando la cromatografía en capa delgada.

En el Cuadro 7 se indican las estructuras de los compuestos aislados y sus rendimientos correspondientes.

Cuadro 7. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Epidendrum boothii*.

| COMPUESTO | FRACCIÓN | RENDIMIENTO (%) |
|--|----------|-----------------|
|  <p>nidemina (20)</p> | NB-5 | 0.095 |
|  <p>24-metil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-acetoxi (21a)</p> | NB-D8 | 0.004 |

Cuadro 7. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Epidendrum boothii* (continuación).

| COMPUESTO | FRACCIÓN | RENDIMIENTO (%) |
|--|----------|-----------------|
|  <p>24,24-dimetil-5α-lanosta-9(11),25-dien-3β-acetoxi (22a)</p> | NB-D8 | 0.012 |
|  <p>estigmasterol (23)</p> | NB-E | 0.068 |

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES AISLADOS.

Los compuestos aislados se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales, así como por métodos químicos. En el caso de la nidemina (**20**), la estructura se confirmó mediante un análisis de difracción de Rayos X.

El estigmasterol (**23**), se caracterizó por comparación con una muestra auténtica y mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas en la literatura.

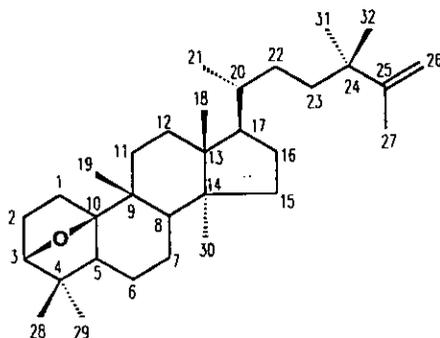
4.3.1 Caracterización de la nidemina (**20**).

La nidemina (**20**) se obtuvo de la fracción secundaria NB-B5 (Cuadro 5), como un sólido cristalino blanco. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del nuevo producto natural se resumen en las Tablas 2-4.

Su espectro en el infrarrojo (Espectro 1), presenta absorciones asociadas con la presencia de funciones éter (1007 cm^{-1}) y doble ligadura (1641 y 891 cm^{-1}). El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ion molecular en una relación m/z de 454 uma (Espectro 2), correspondiente a una fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}$; esta fórmula permite seis grados de insaturación. Otros fragmentos importantes se incluyen en la Tabla 2.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN del producto (**20**) (Espectros 3 y 5) y (Tablas 2-4), permiten establecer que el producto natural es un triterpenoide muy similar a los lanostanos previamente obtenidos de otras especies de orquídeas (Kadota *et al.*, 1987; Kikuchi *et al.*, 1986; Kikuchi *et al.*, 1985; Majumder y Pal, 1990). El espectro de RMN- ^1H (Espectro 5, Tabla 3) presenta un sistema AB asignable a los protones de un metileno vinílico (δ_{HA} 4.66 y δ_{HB} 4.72); estas señales correlacionan en el espectro bidimensional homonuclear

Tabla 2. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la nidemina (20).



| | |
|--|--|
| FM | C ₃₂ H ₅₄ O |
| PM | 454 |
| p.f. | 127-129 °C |
| IR Vmax (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 1) | 2995, 2951, 2877, 1465, 1379, 1007, 891 |
| EMIE m/z (int rel) (Espectro 2) | 454[M ⁺] (8), 439 (100), 425 (4), 372 (1), 355 (2), 287 (4), 273 (5), 259 (3), 163 (4), 137 (31), 95 (16), 55 (18), 41 (10) |

Tabla 3. Datos de RMN-¹H (500 MHz) de la nidemina (20).

| Protón | δ_H |
|--------|--|
| H-3 | 3.64 (<i>d</i> , 5.5) |
| H-5 | 2.07 (<i>dd</i> , 4.5, 11) |
| H-18 | 0.84 (<i>s</i>) |
| H-19 | 1.28 (<i>s</i>) |
| H-21 | 0.87 (<i>d</i> 6.5) |
| H-26 | 4.72 (<i>sa</i>) 4.66 (<i>dd</i> , 0.5, 2) |
| H-27 | 1.68 (<i>sa</i>) |
| H-28 | 0.91 (<i>s</i>) |
| H-29 | 1.021 (<i>s</i>) |
| H-30 | 0.848 (<i>s</i>) |
| H-31 | 1.01 (<i>s</i>) |
| H-32 | 1.01 (<i>s</i>) |

Los desplazamientos químicos (relativos al TMS), están dados en ppm y las constantes de acoplamiento (en paréntesis) en Hz. las asignaciones se realizaron por una combinación de COSY y HETCOR y por comparación de los desplazamientos químicos con aquellos asignados a compuestos relacionados.

Tabla 4. Datos de RMN-¹³C (125 MHz) de la nidemina (20).

| Carbóno | δ_c |
|---------|------------|
| C-1 | 34.10 |
| C-2 | 26.37 |
| C-3 | 82.65 |
| C-4 | 44.22 |
| C-5 | 54.30 |
| C-6 | 20.40 |
| C-7 | 30.89 |
| C-8 | 44.10 |
| C-9 | 35.43 |
| C-10 | 91.70 |
| C-11 | 22.54 |
| C-12 | 34.69 |
| C-13 | 45.91 |
| C-14 | 48.73 |
| C-15 | 33.79 |
| C-16 | 31.67 |
| C-17 | 50.93 |
| C-18 | 15.27 |
| C-19 | 35.50 |
| C-20 | 36.69 |
| C-21 | 18.82 |
| C-22 | 27.61 |
| C-23 | 37.40 |
| C-24 | 38.70 |
| C-25 | 152.40 |
| C-26 | 109.29 |
| C-27 | 19.38 |
| C-28 | 23.40 |
| C-29 | 25.16 |
| C-30 | 17.83 |
| C-31 | 27.23 |
| C-32 | 27.49 |

Los desplazamientos químicos están dados en ppm. Las asignaciones se realizaron con base en el análisis de los espectros DEPT, HETCOR, HMBC, HMQC y por comparación de los desplazamientos químicos con aquellos asignados a compuestos relacionados.

COSY (Espectro 6). La presencia de estas señales tipo vinílico es congruente con la existencia de una doble ligadura terminal en la molécula. En el espectro de RMN-¹H (Espectro 5), se observan también: (i) ocho singuletes atribuibles a ocho grupos metilo sobre carbonos cuaternarios, uno de los cuales debe corresponder a un metilo sobre doble ligadura, si se considera su desplazamiento químico en δ_H 1.68 (sa); (ii) un doblete en δ_H 0.87 ($J= 6.5$ Hz) asignable a un metilo sobre un carbono terciario; (iii) por último, en δ_H 3.64 ($J= 5.5$) se observa un doblete atribuible al hidrógeno geminal de una función oxigenada.

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 3), presenta señales para 32 átomos de carbono en congruencia con la fórmula molecular calculada. El espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT (Espectro 4), indica que estas señales corresponden a nueve grupos metilo, once grupos metileno, cinco grupos metino y siete carbonos cuaternarios. Los desplazamientos químicos de uno de los carbonos cuaternarios [δ_C 152.41 (C-25)] y de uno de los metilenos [δ_C 109.30 (C-26)] presentes en el espectro de RMN-¹³C, proporcionan una evidencia adicional de la presencia de una doble ligadura disustituida en la molécula. La ausencia en el espectro de otras señales asociadas con la presencia de dobles ligaduras o grupos carbonilo, indica entonces que la molécula es de naturaleza pentacíclica. De esta forma, se satisfacen los requerimientos de la fórmula molecular en cuanto al número de insaturaciones se refiere. Por otro lado, las señales en δ_C 82.65 (C-3) y δ_C 91.70 (C-10), indican la presencia de dos carbonos unidos a funciones oxigenadas. Sin embargo, la fórmula molecular contiene sólo un oxígeno, lo cual permite inferir que la molécula contiene un anillo heterocíclico, donde el heteroátomo debe ser el

oxígeno. De esta forma, se explica la presencia de dos carbonos unidos a oxígeno en el espectro de RMN-¹³C. El resto de los ciclos presentes en la molécula son homocíclicos.

En general, los triterpenoides presentan en sus núcleos ocho grupos metilo, los cuales se pueden encontrar en diferentes estados de oxidación (Torsell, 1983; Manitto, 1981; Herbert, 1981). En el caso del producto natural 20 aislado de la especie *Epidendrum boothii*, los espectros de RMN evidencian un total de nueve metilos. Considerando que el metileno vinílico representa un grupo metilo transformado, el producto cuenta entonces con diez grupos metilo en total, es decir, contiene dos metilos más de los que se encuentran presentes normalmente en los triterpenos.

En síntesis, los elementos estructurales evidenciados hasta el momento, permiten proponer que el producto es un triterpenoide con un esqueleto hidrocarbonado tetracíclico y que contiene además un anillo heterocíclico y dos metilos adicionales a los del esqueleto triterpenoide base.

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 tirucalano, lanostano, cicloartano, eufano y dammarano (Figura 2) (Asakawa *et al.*, 1977; Pinto *et al.*, 1980; Das y Mahato, 1983; Fattorusso *et al.*, 1985; Rao *et al.*, 1986; De Pascual Teresa *et al.*, 1986; Guang *et al.*, 1988; Grag *et al.*, 1988; Tori *et al.*, 1988; Mahato *et al.*, 1992).

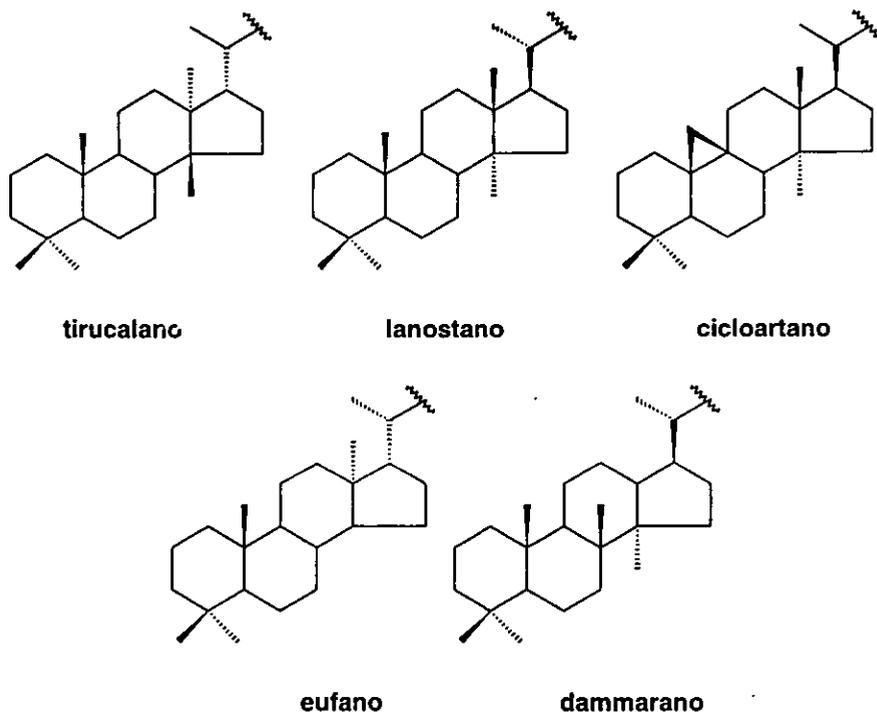


Figura 2. Núcleos de triterpenoides tetracíclicos.

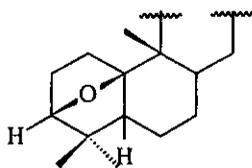
Este estudio comparativo sugirió *a priori*, que el compuesto posee un núcleo del tipo lanostano modificado. Posteriormente, el análisis del espectro HMBC permitió confirmar esta propuesta. Los aspectos más importantes del análisis cuidadoso del espectro HMBC se resumen a continuación:

a) En primer lugar, el metino asignable a H-5 (δ_H 2.1) correlaciona con las señales en δ_C 23.4 y δ_C 25.16, asignables a los carbonos de los metilos en C-28 y C-29, respectivamente. Por otro lado, los hidrógenos de los metilos atribuibles a H-28 (δ_H 0.915) y H-29 (δ_H 1.021), correlacionan con el carbono del oximetino

en δ_C 82.65 (C-3). A su vez, el metino en δ_H 3.64, con un valor para la constante de acoplamiento de 5.5 Hz (H-3), correspondiente a la función oxigenada, muestra una clara correlación con el carbono cuaternario oxigenado en δ_C 91.7 (C-10).

b) En segundo lugar, la correlación observada entre los hidrógenos del metilo en δ_H 1.28 (H-19) y el carbono cuaternario δ_C 91.70 (C-10), indican que el metilo angular, habitualmente ubicado en C-10 del núcleo lanostano, migra al carbono C-9 (δ_C 35.43). Es importante destacar que los hidrógenos de este metilo correlacionan también con el carbono asignable a C-8 (δ_C 44.10). Esta última señal, a su vez, muestra una clara interacción con los hidrógenos del metilo en δ_H 0.84 (H-30). Por último, la señal en δ_H 0.84 (H-18) correlaciona con el C-17 (δ_C 50.93). Las correlaciones antes descritas se resumen en las Figuras 3-5.

Los dos grupos de correlaciones antes descritas permitieron establecer la estructura parcial **a** que se indica a continuación:



a

La estructura parcial **a**, indica, que el anillo A del triterpeoide **20** es un biciclo.

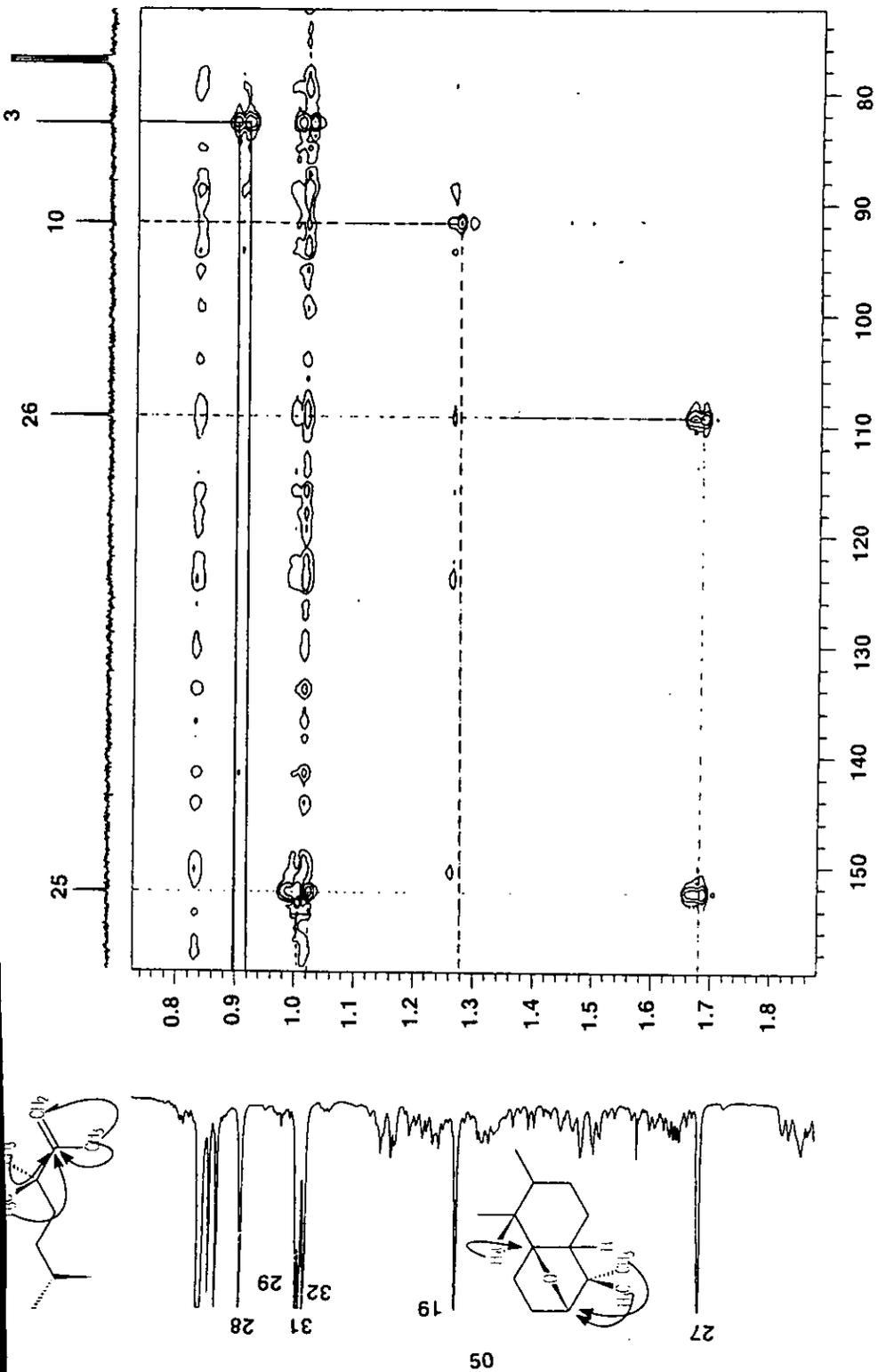


Figura 3. Espectro de HMBC de la nidemina (20).

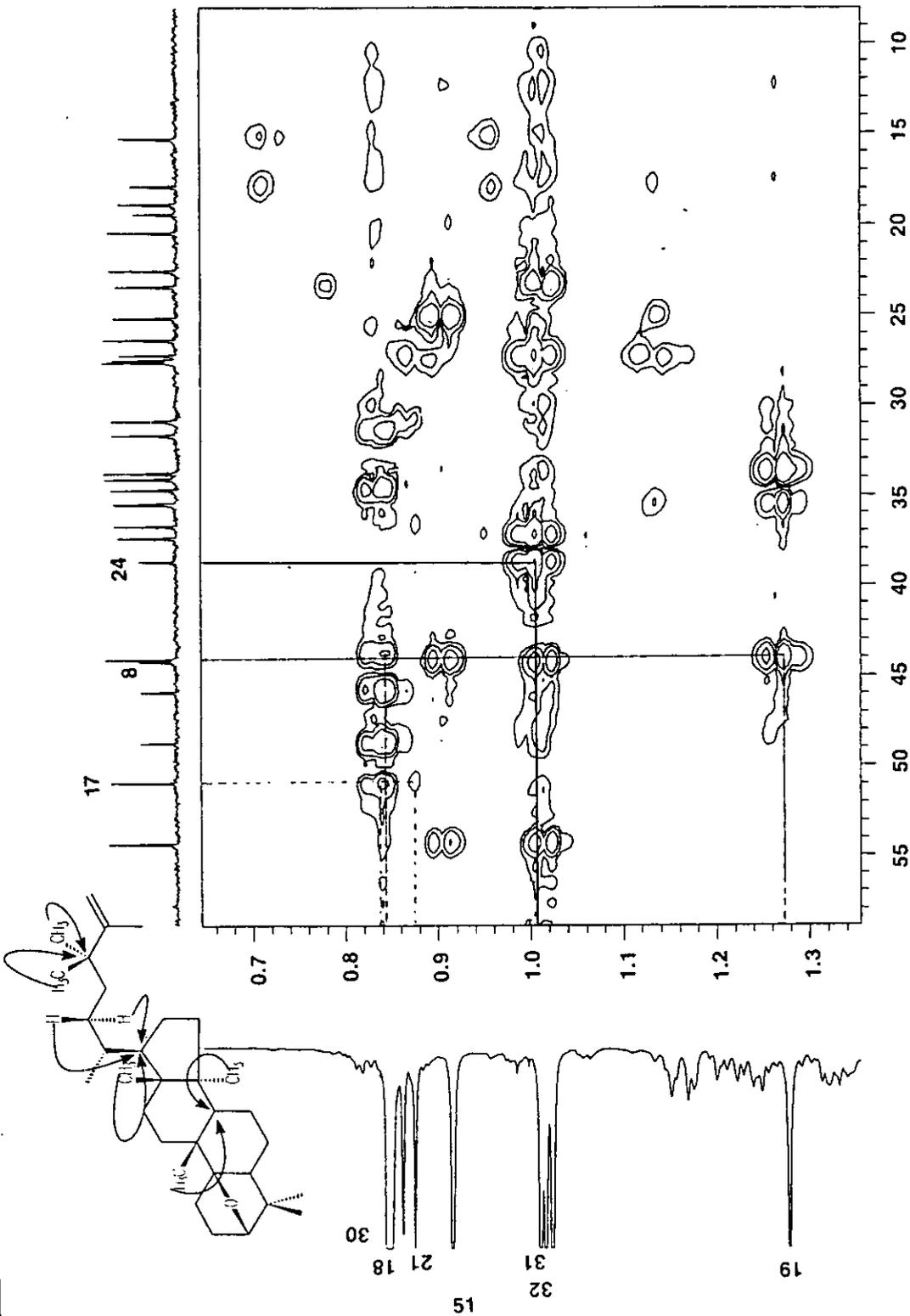


Figura 4. Espectro de HMBC de la nidemina (20).

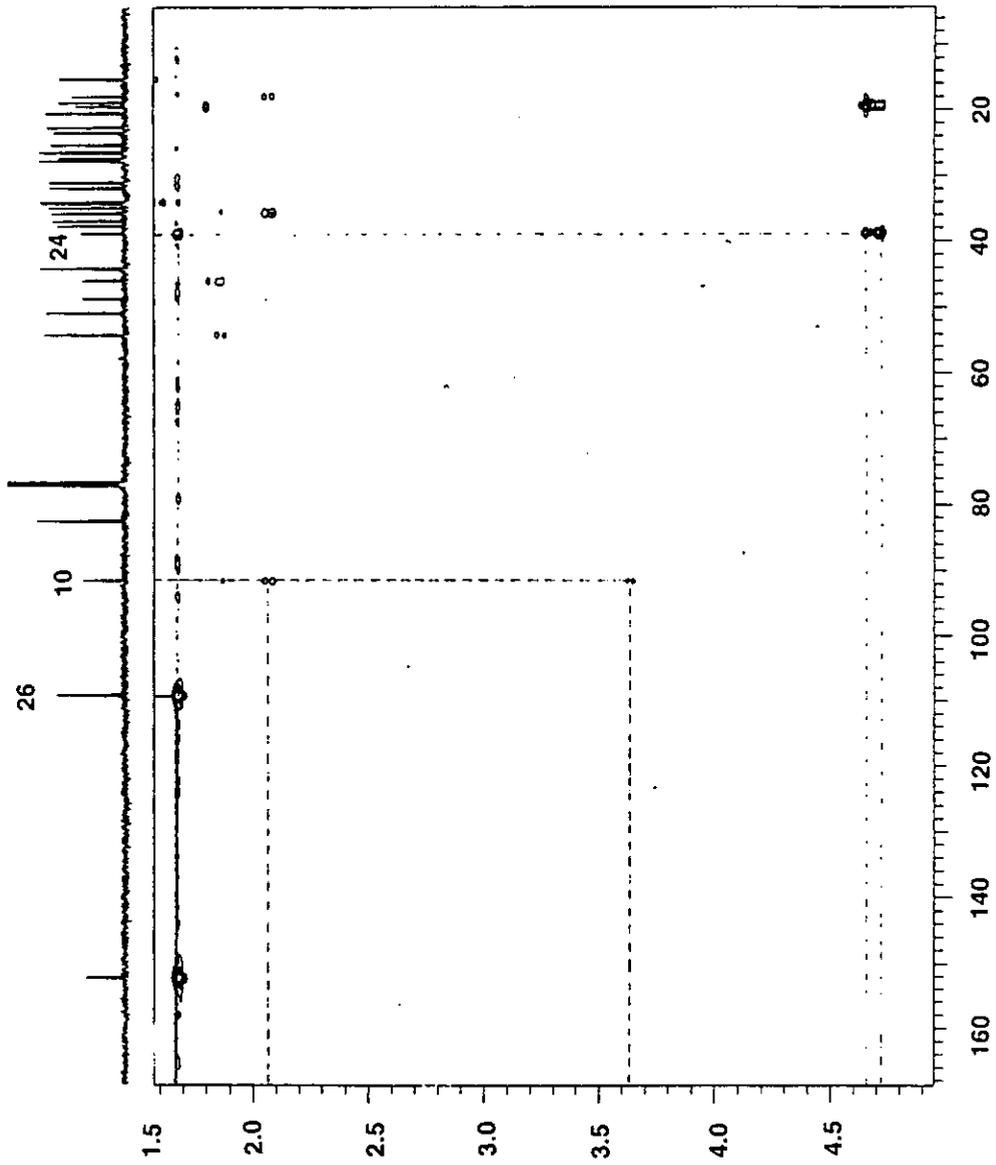
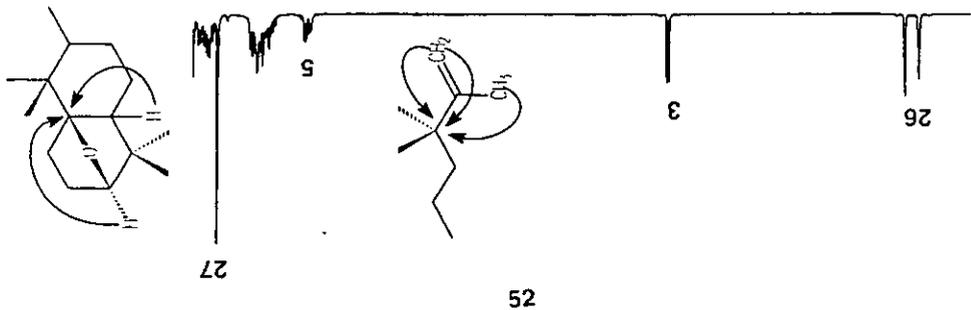


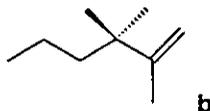
Figura 5. Espectro de HMBC de la nidemina (20).

En conclusión, con base en el análisis anterior, se estableció que el núcleo del producto **20** corresponde al de un lanostano modificado y que además el anillo A se encuentra formando un biciclo de naturaleza heterocíclica.

Una vez establecido el núcleo estructural del compuesto **20**, el siguiente paso consistió en determinar la estructura de la cadena lateral, la cual debía contener la doble ligadura terminal y los dos metilos adicionales. Para ello, el análisis del espectro HMBC (Espectro 9, Tabla 3) fue también de gran importancia.

En primer término, las correlaciones de los hidrógenos vinílicos en δ_H 4.66 (H-26) y δ_H 4.72 (H-26') y del metilo en δ_H 1.68 (H-27) con el carbono vinílico δ_C 152.40 (C-25), permiten ubicar a la doble ligadura entre los carbonos C-25 y C-26.

Por otro lado, las correlaciones observadas entre los hidrógenos en δ_H 1.01 (H-31) y δ_H 1.01 (H-32) y el carbono cuaternario olefínico en δ_C 152.40 (C-25), permiten ubicar los dos metilos adicionales en la posición C-24 (δ_C 38.70). Las correlaciones antes señaladas se resumen en las Figuras 3-6. Con base en las designaciones previas, la estructura de la cadena lateral se estableció como se indica en la estructura parcial **b**.



Es importante mencionar que, los desplazamientos químicos que se observan para los carbonos de la cadena lateral en el espectro de RMN, son

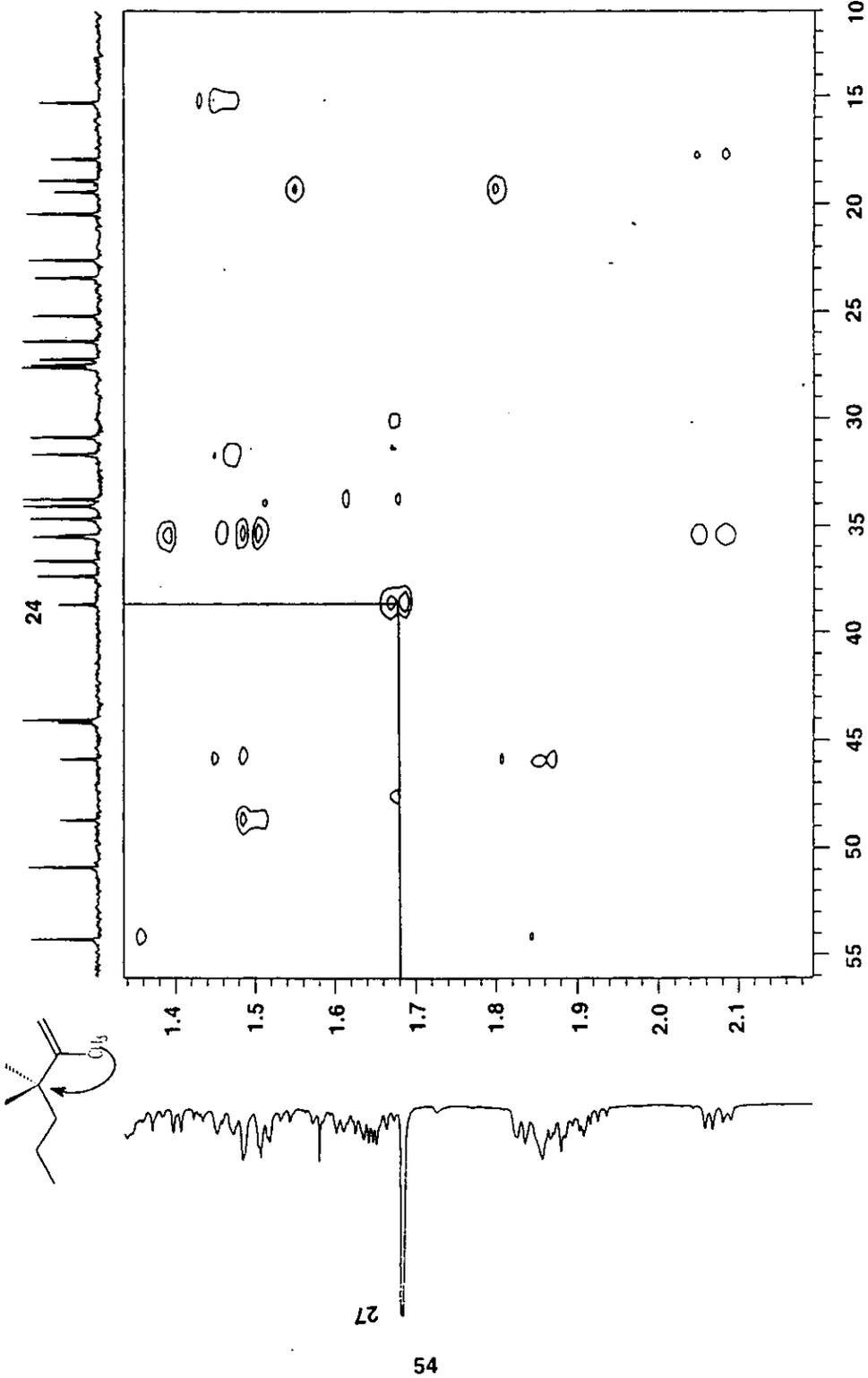


Figura 6. Espectro de HMBC de la nidemina (20).

idénticos a los del 24,24-dimetil-lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol, producto natural aislado de la especie *Bridelia tormentosa* Bl. (Euphorbiaceae) (Bates *et al.*, 1990).

Con base en el análisis detallado presentado anteriormente, se propone la estructura **20** para el nuevo producto natural aislado de *Epidendrum boothii*, mismo que se designó con el nombre trivial de nidemina (**20**).

Posteriormente, la estructura del compuesto **20** se comprobó mediante un análisis de difracción de Rayos X. En la Figura 7 se muestra una vista estereoscópica de la nidemina (**20**).

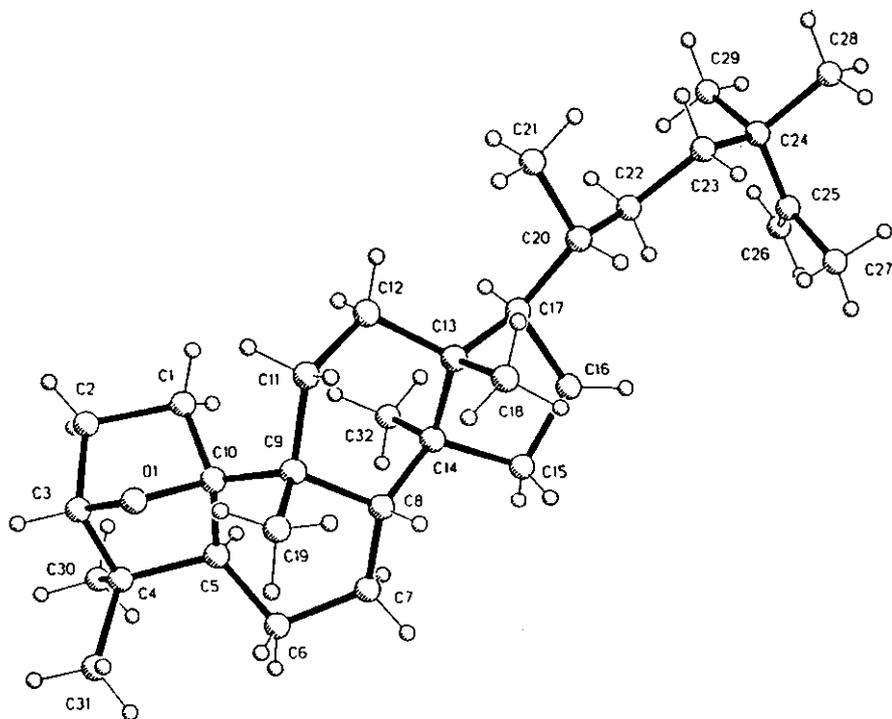
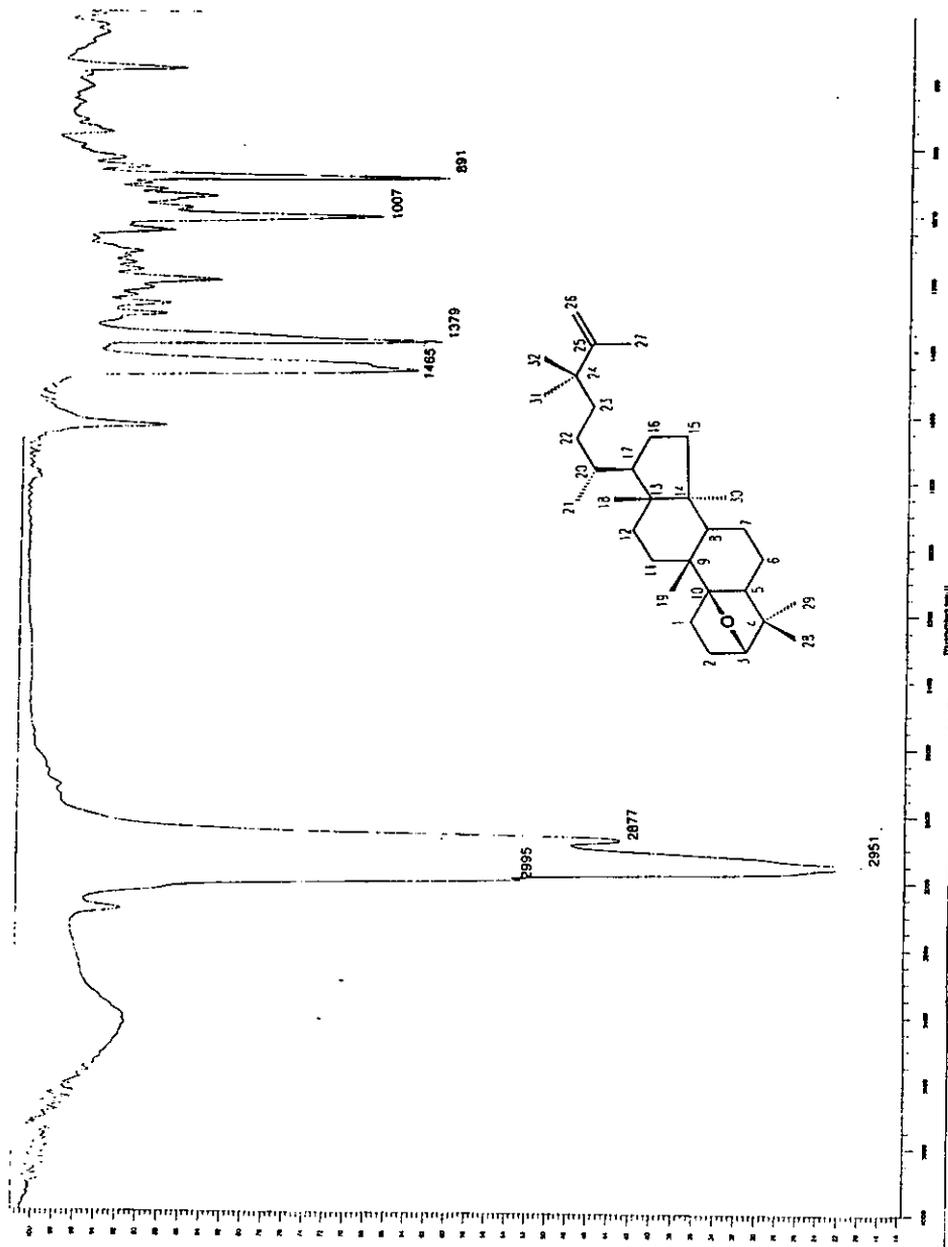
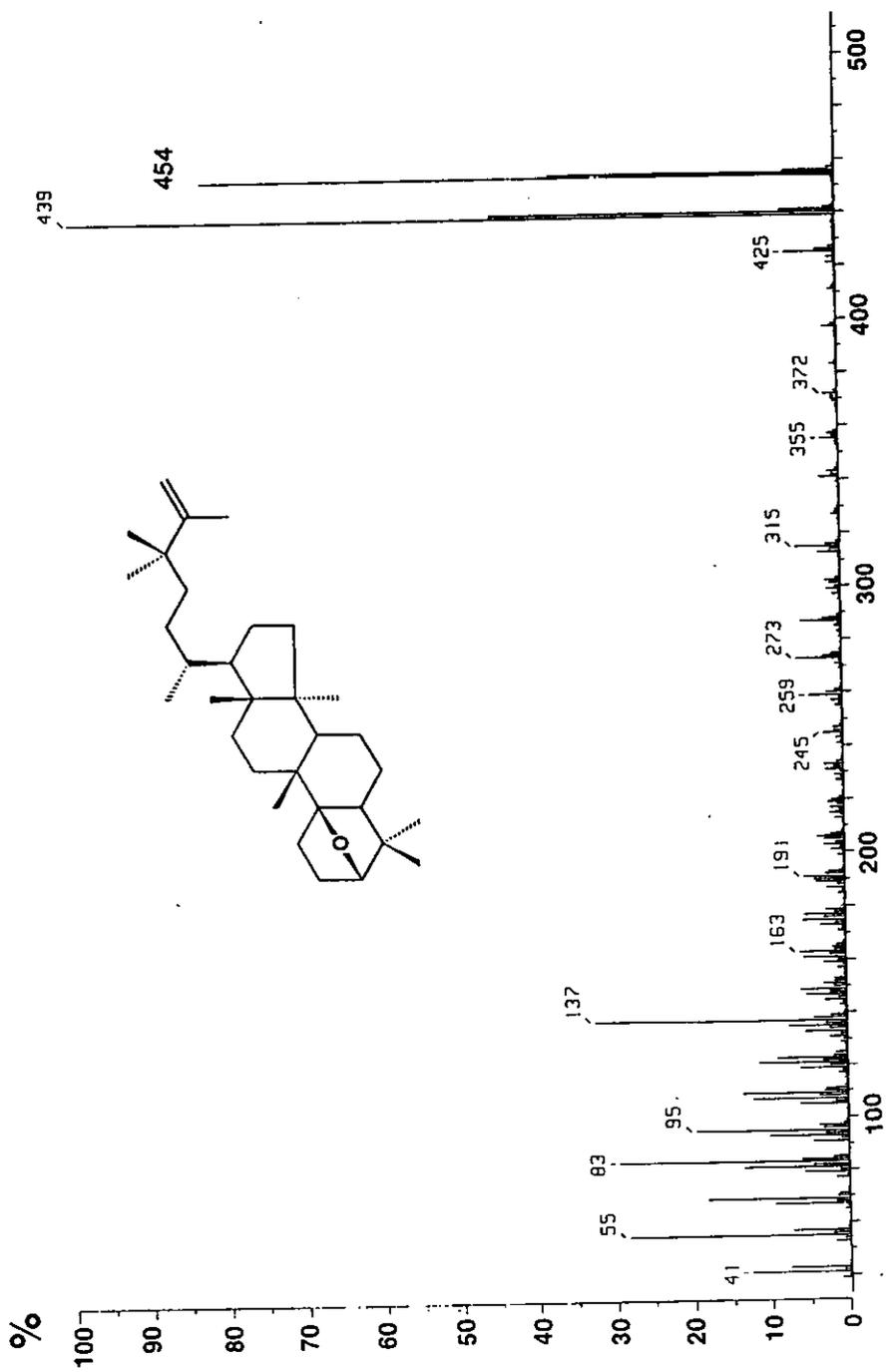


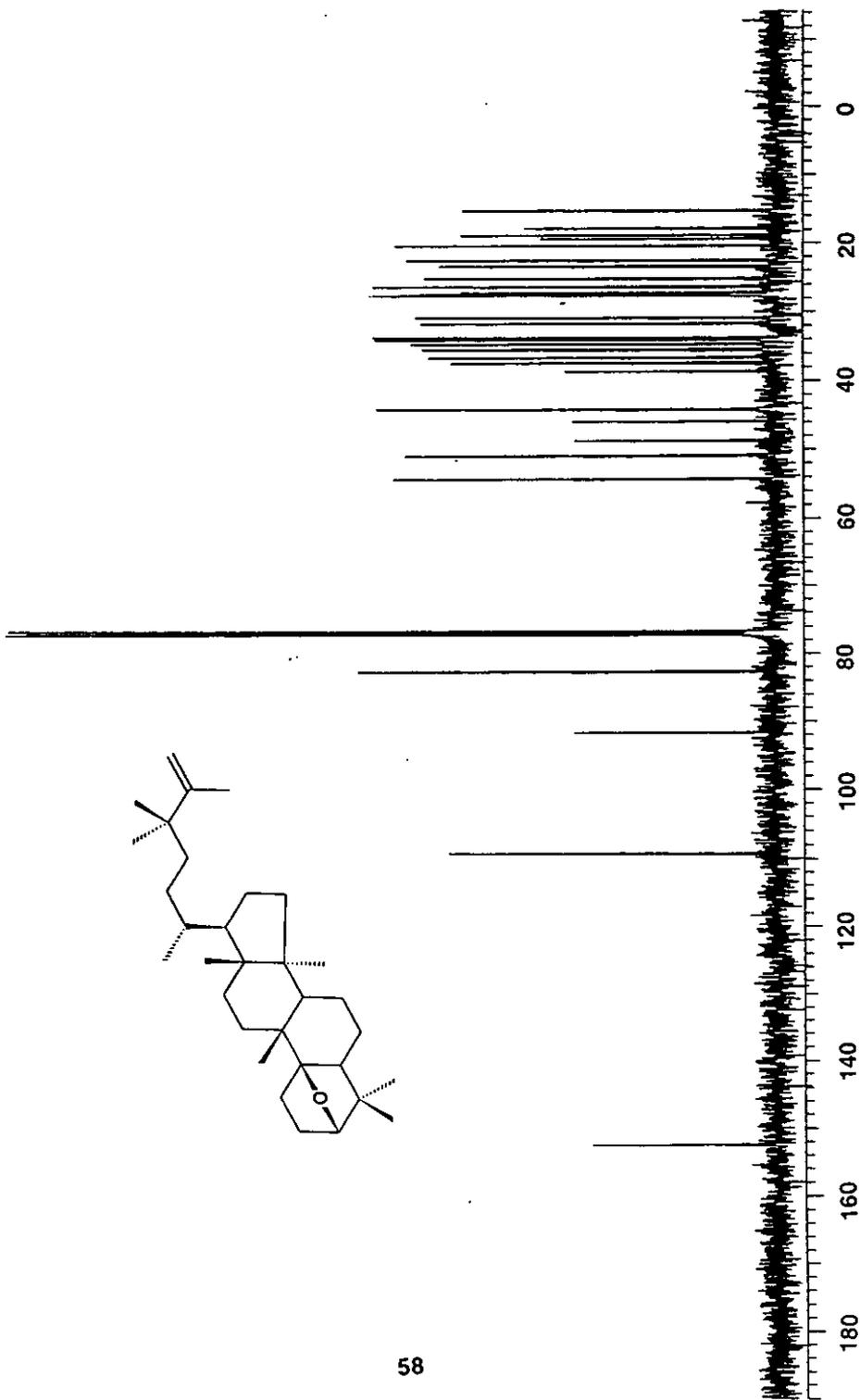
Figura 7. Vista estereoscópica de la nidemina (**20**).



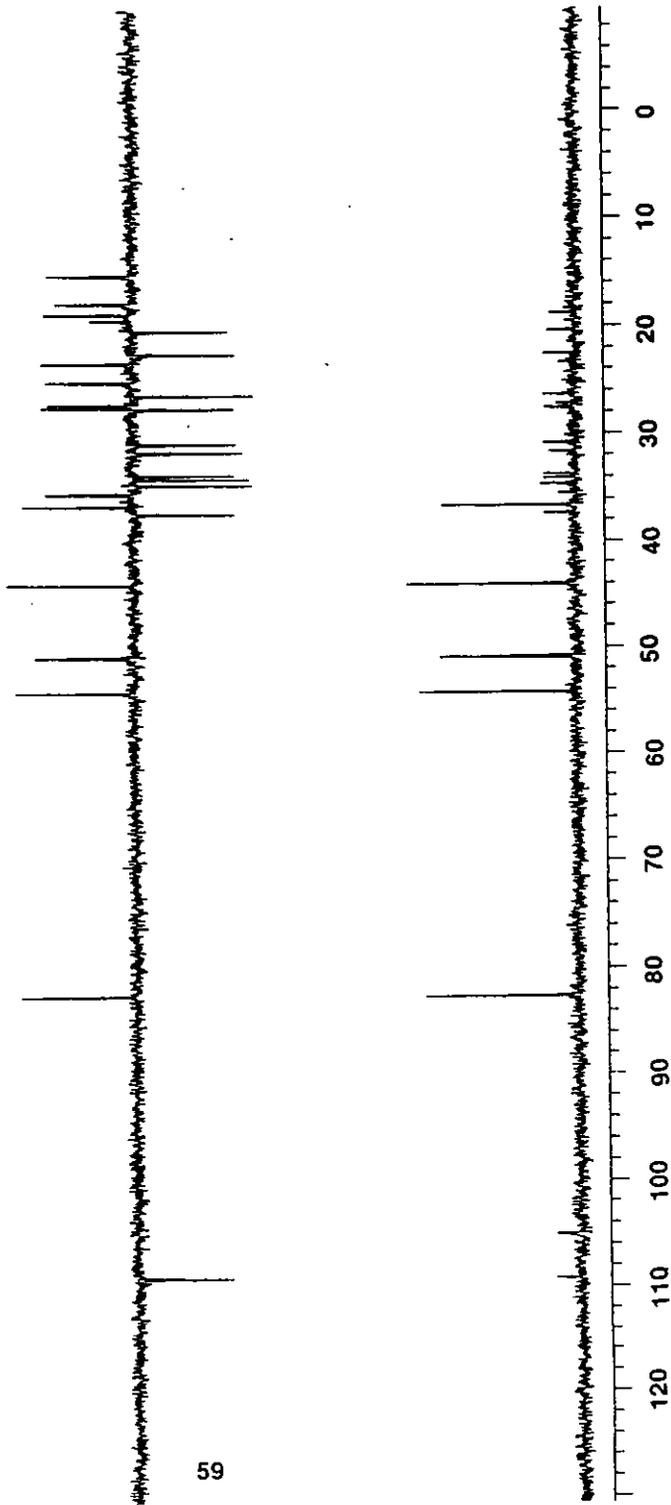
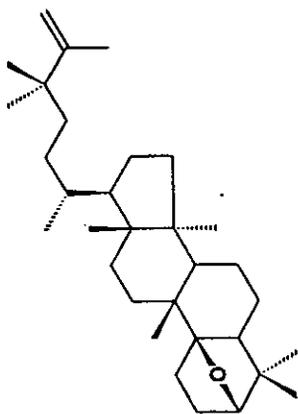
Espectro 1. Espectro en el IR de la nidemina (20).



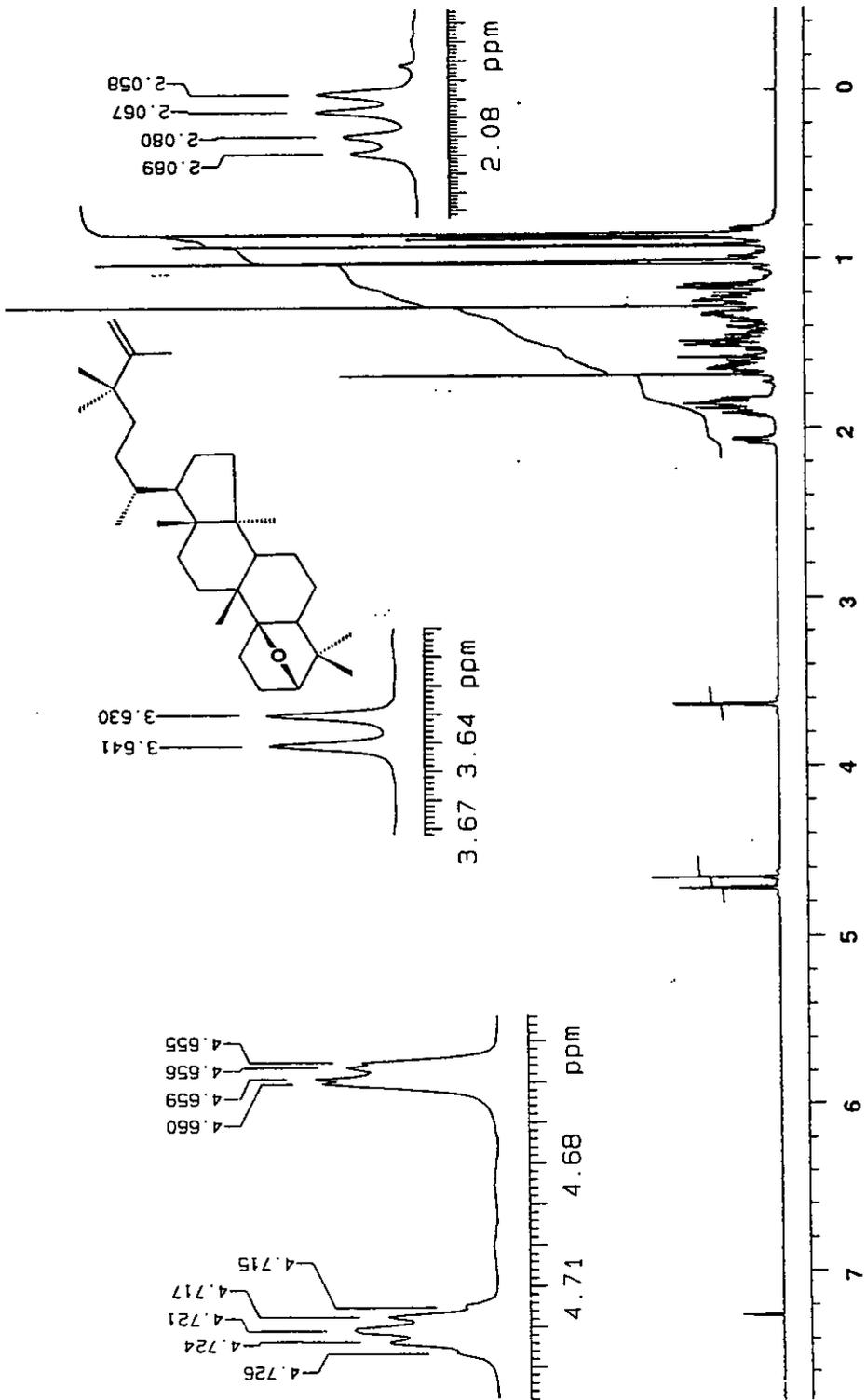
Espectro 2. Espectro de EMIE de la nidemina (20).



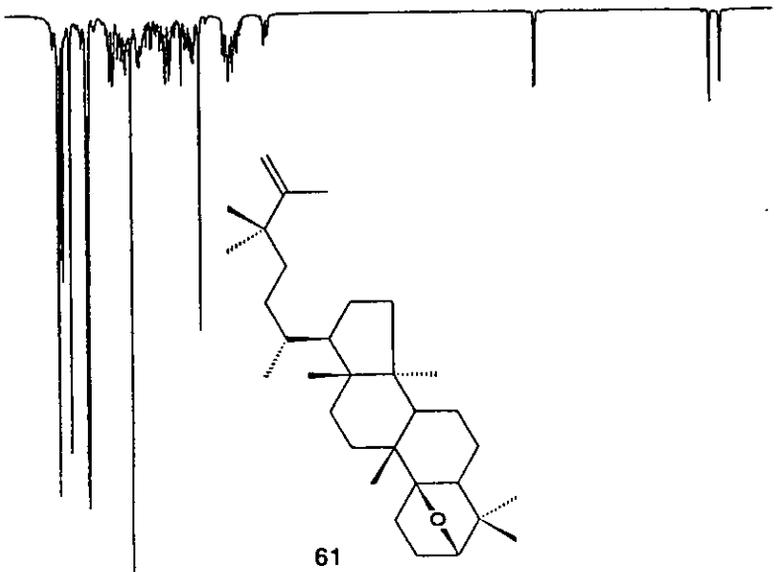
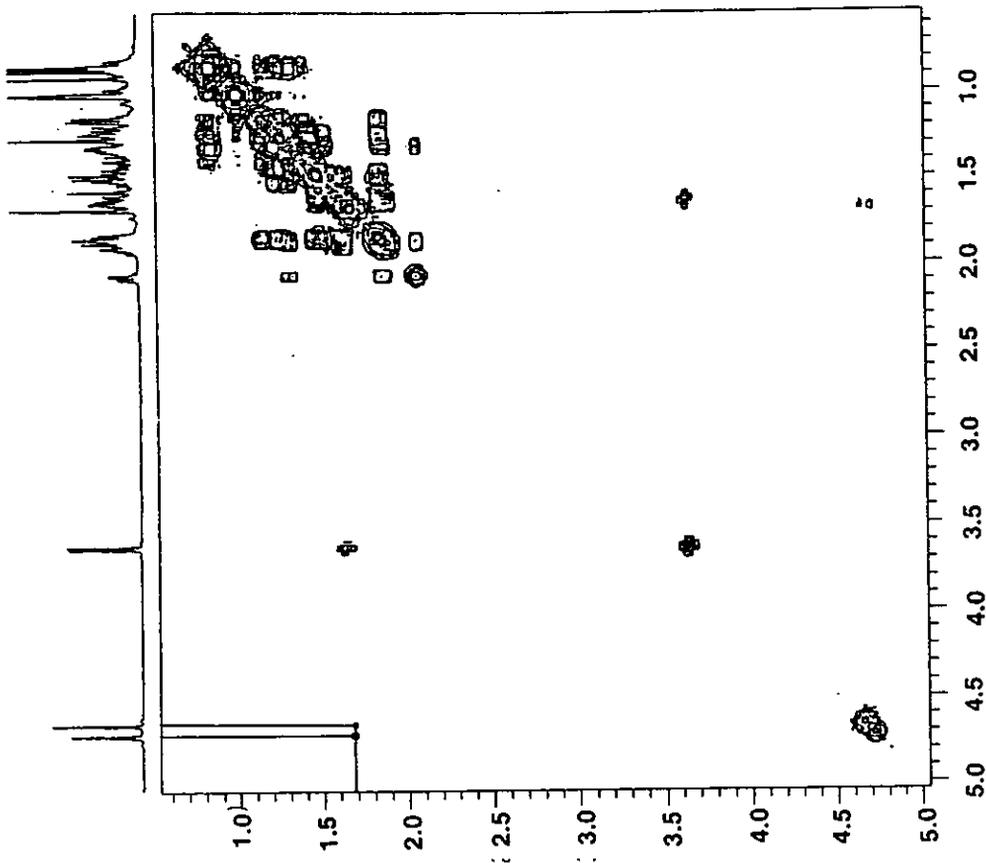
Espectro 3. Espectro de RMN- ^{13}C de la nidemina (20).



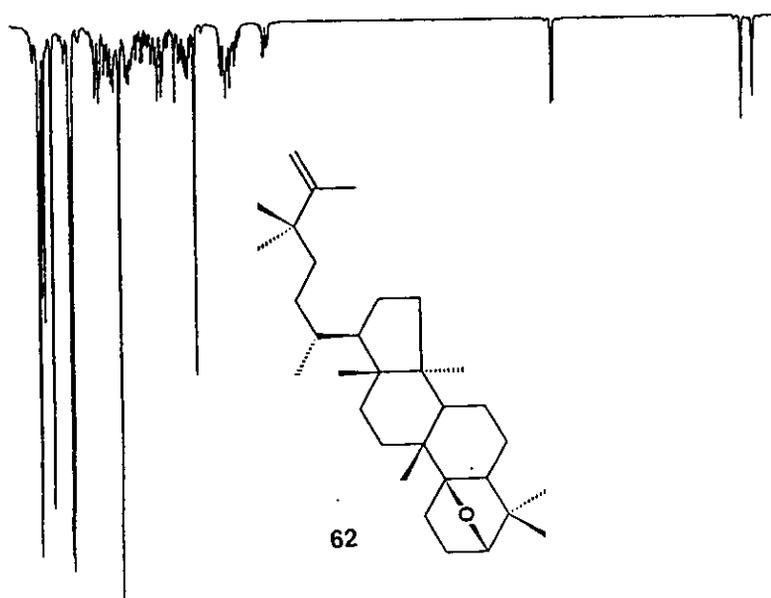
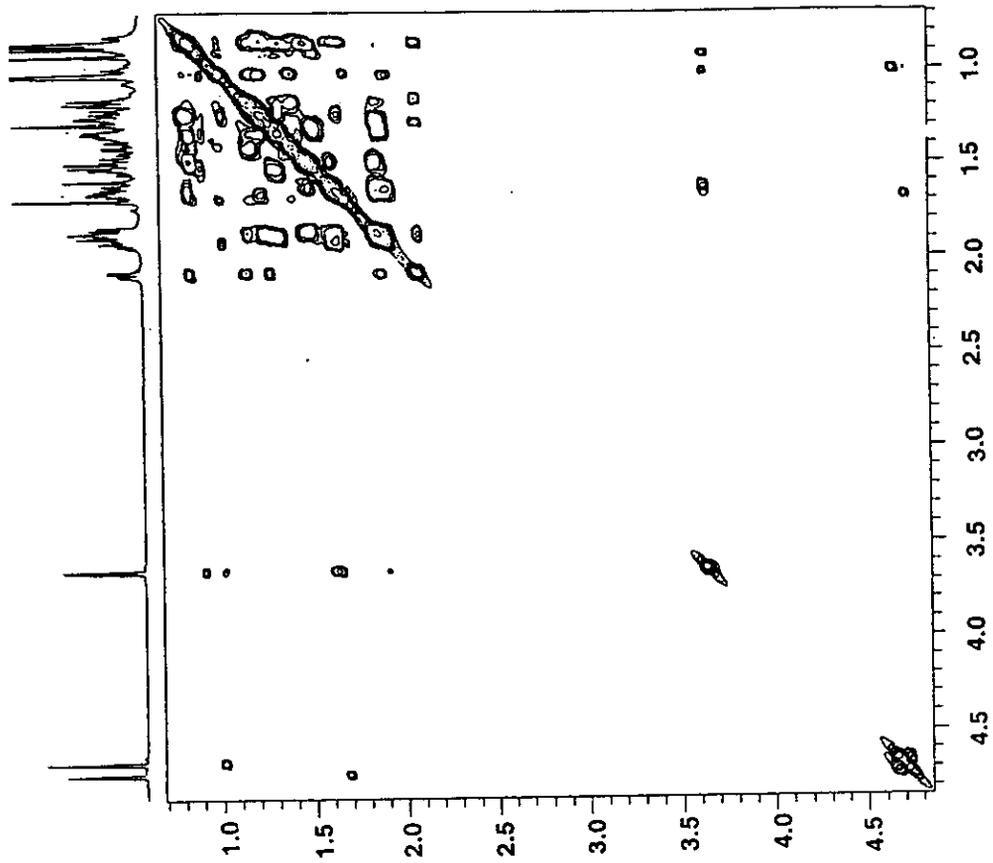
Espectro 4. Espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT de la nidemina (20).



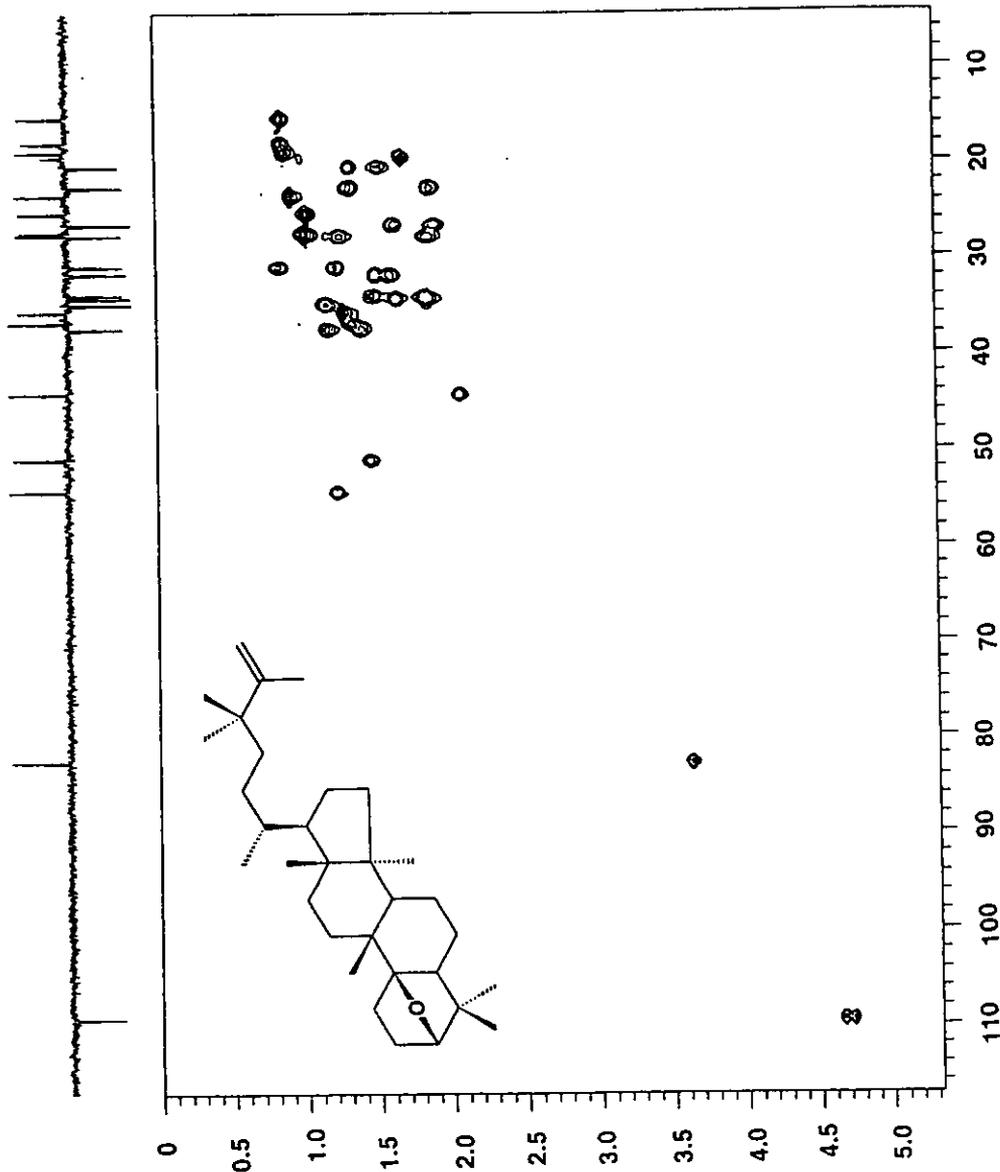
Espectro 5. Espectro de RMN- ^1H de la nidemina (20).



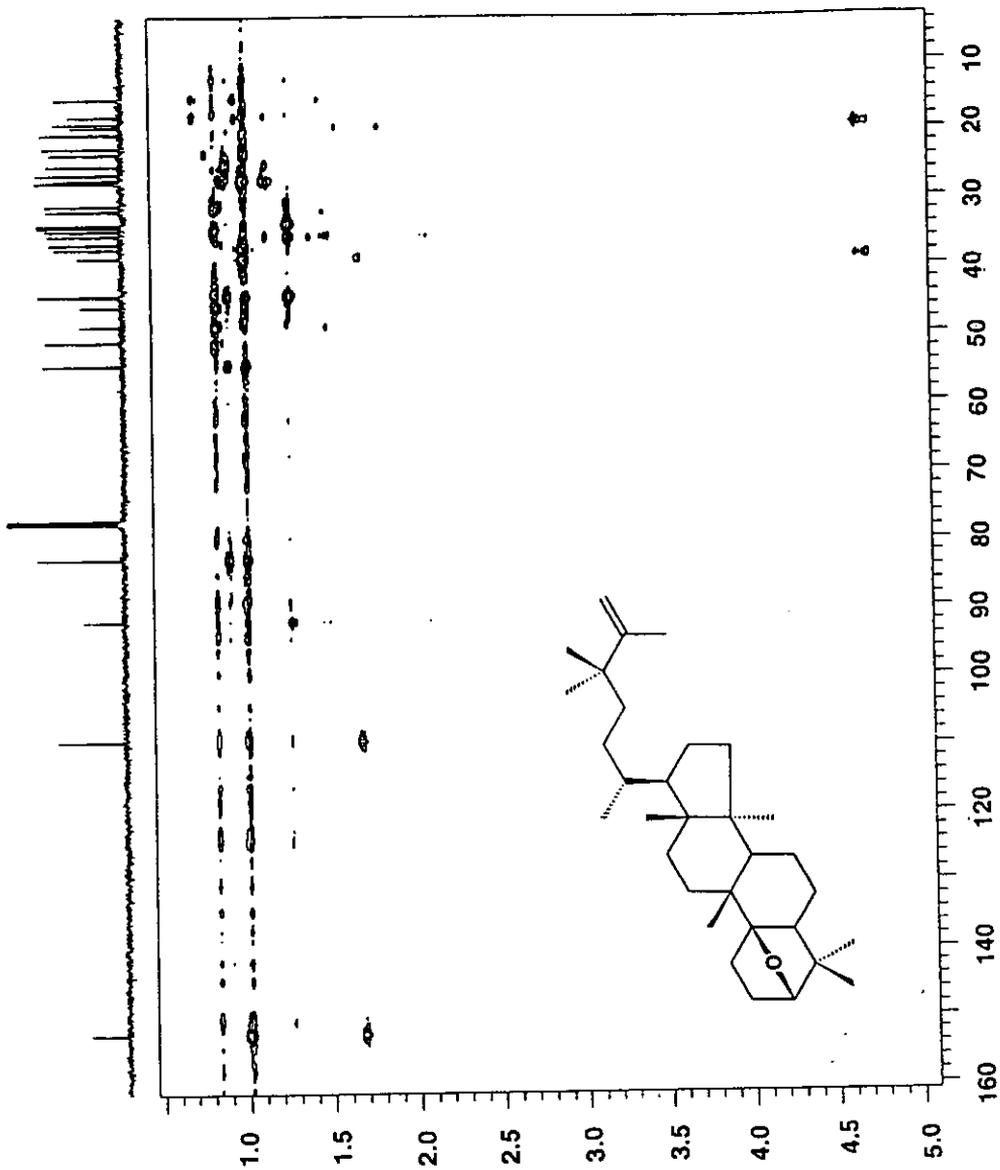
Espectro 6. Espectro COSY de la nidemina (20).



Espectro 7. Espectro NOESY de la nidemina (20).



Espectro 8. Espectro de HMQC de la nidemina (20).



Espectro 9. Espectro de HMBC de la nidemina (20).

4.3.2 Caracterización del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22) bajo la forma de su derivado monoacetilado 22a.

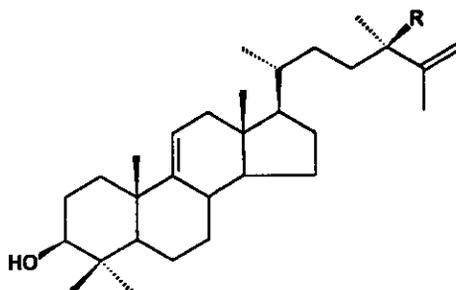
El siguiente producto se caracterizó como el 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22), el cual se aisló de la fracción secundaria NB-D8 (Cuadro 4), bajo la forma de su derivado acetilado 22a. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto 22a se resumen en las Tablas 6, 8 y 9, y en las Tablas 5, 8 y 9 se indican las correspondientes a la mezcla de alcoholes 21 y 22.

El espectro en el infrarrojo (Espectro 16), presenta absorciones asociadas con la presencia de grupos carbonilo de éster (1734, 1245 cm^{-1}) y doble ligadura (1641 y 890 cm^{-1}). En el caso de la mezcla original, además de las señales para doble ligadura, se observa la señal correspondiente al grupo hidroxilo (3290 cm^{-1}).

El espectro de masas (Espectro 17) generado por este compuesto, permite observar el ion molecular en una relación m/z 496 uma, la cual corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_2$; como era de esperarse, el ion molecular presenta un incremento (en relación al producto natural), asociado a la presencia del grupo acetato. Otros picos importantes se presentan a una relación m/z de 481, 421, 355 (pico base), 316, 283, 255, 215, 175, entre otros.

La información proporcionada por la espectrometría de masas (Espectro 17) y el análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 18 y 20) del producto 22a, permiten establecer que este es un triterpenoide de tipo lanostano.

Tabla 5. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22).

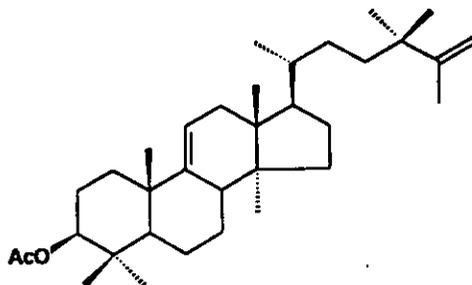


R= H (21)

R= CH₃ (22)

| | |
|---|---|
| FM | |
| Compuesto 21 | C ₃₁ H ₅₂ O |
| Compuesto 22 | C ₃₂ H ₅₄ O |
| PM | |
| Compuesto 21 | 440 |
| Compuesto 22 | 454 |
| p.f. | 207-208 °C |
| IR Vmax (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 10) | 3294, 2923, 2867, 1374, 1640, 1459, 1041, 892 |
| EMIE m/z (int rel) (Espectro 11) compuesto 21. | 440 [M ⁺] (32), 425 (100), 407 (39), 313 (68), 273(16), 259 (11), 215 (11), 187 (13), 173(18), 159 (18), 135 (18), 109 (18), 95 (26), 69 (26) |
| EMIE m/z (int rel) (Espectro 12) compuesto 22. | 454 [M ⁺] (63), 439 (100), 425 (39), 341(11), 313 (95), 274 (26), 259 (11), 215 (11), 187 (11), 173 (21), 159 (21), 135 (26), 109 (24), 95 (32), 83 (39) 69(24), 55(16) |

Tabla 6. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del derivado acetilado del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22a).



| | |
|---|---|
| FM | C ₃₄ H ₅₆ O ₂ |
| PM | 496 |
| p.f. | 226-227 °C |
| IR Vmax (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 16) | 2970, 2943, 2869, 1734, 1641, 1449, 1373, 1245, 1032, 979, 890 |
| EMIE m/z (int rel) (Espectro 17) | 496 [M ⁺] (34), 481 (63), 421 (60) 355(100), 316 (24), 283 (16), 255 (13), 215 (13), 175 (18), 119 (21), 95(26) 69(18) |

De este modo, el espectro de RMN-¹³C (Espectro 18) del derivado acetilado **22a**, presenta señales para 34 carbonos en congruencia con la fórmula molecular establecida mediante la espectrometría de masas (Espectro 17). El espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT (Espectro 19), indica que de las 34 señales, 10 corresponden a metilos, otras 10 corresponden a metilenos, seis a metinos y ocho a carbonos cuaternarios. Las señales en δ_c 109.30, 150.19 y en δ_c 115.18, 148.12, indican la presencia de una doble ligadura terminal y de otra trisustituída, respectivamente. La señal en δ_c 80.88 es congruente con la presencia de la función éster en la molécula.

De acuerdo al espectro de RMN-¹H (Espectro 20), siete de los metilos se encuentran unidos a carbonos cuaternarios (δ_H 0.63, 0.87, 0.88, 0.72, 1.01, 1.06 y 1.01), otro a una doble ligadura (δ_H 1.6), y el noveno a un carbono terciario (δ_H 0.87); por último, a diferencia del espectro de RMN-¹H de la mezcla de alcoholes **21** y **22** (Espectro 15), este espectro presenta una señal asociada con el grupo funcional acetato (δ_H 2.04). En este espectro, también se observa la señal correspondiente al hidrógeno geminal a la función éster en δ_H 4.48; esta absorción se observa como un doblete de doblete ($J=4.8, 10.8$ Hz); en la mezcla de alcoholes esta señal aparece desplazada diamagnéticamente en δ_H 3.22 ($J=4.8, 11.0$ Hz). Por último, se observan dos absorciones vinílicas asignables a una doble ligadura terminal en δ_H 4.71 y 4.66; ambas señales aparecen como singuletes anchos.

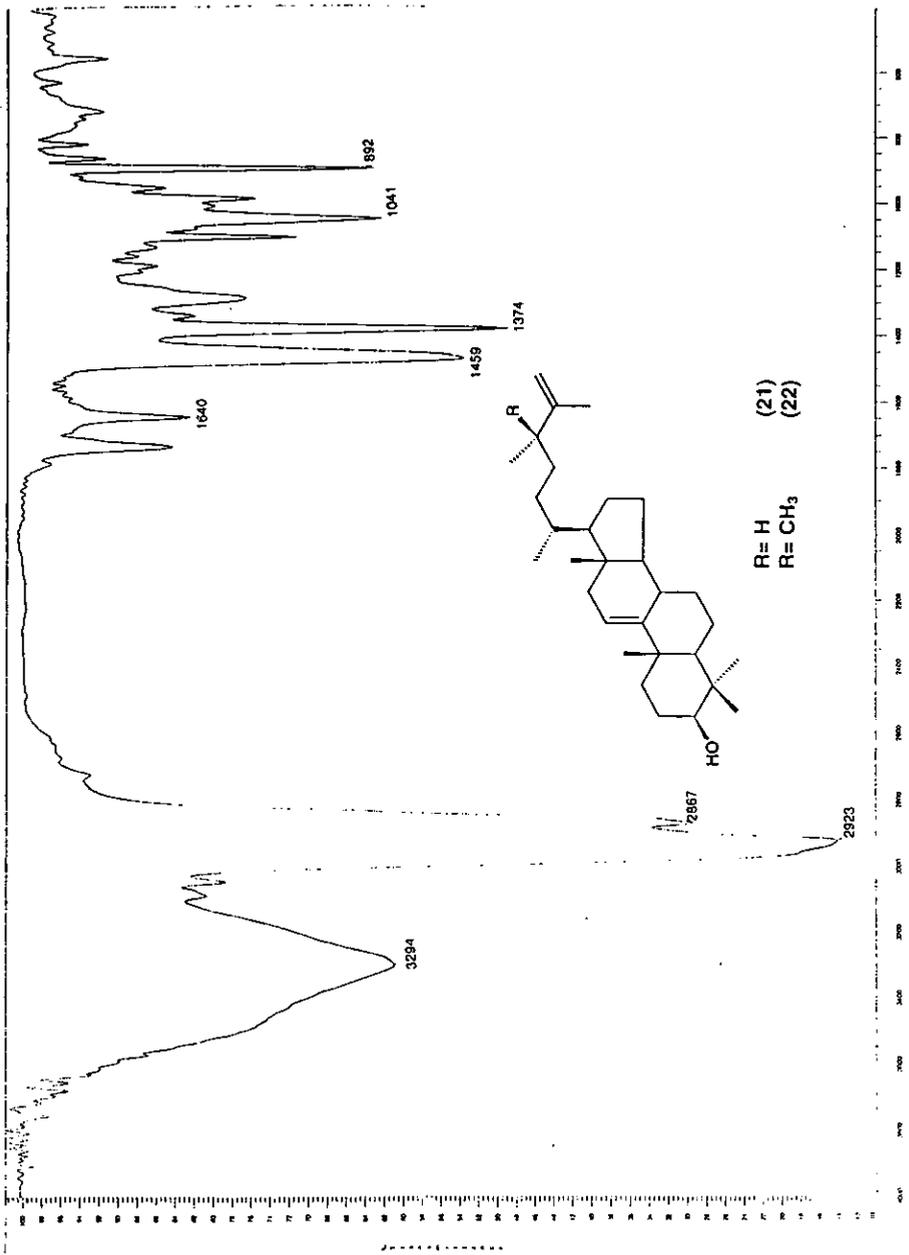
En el espectro de masas del compuesto **22**, al igual que en el caso de la nidemina (**20**), el fragmento observado en una relación m/z de 496 una (Espectro 17), es congruente con la presencia de dos metilos en C-24 de la cadena lateral.

Las características espectroscópicas analizadas hasta el momento, permiten concluir que el producto natural es un lanostano con una doble ligadura terminal entre las posiciones 25 y 26, una doble ligadura trisustituida, una función carbonílica secundaria y dos grupos metilo adicionales en la cadena lateral.

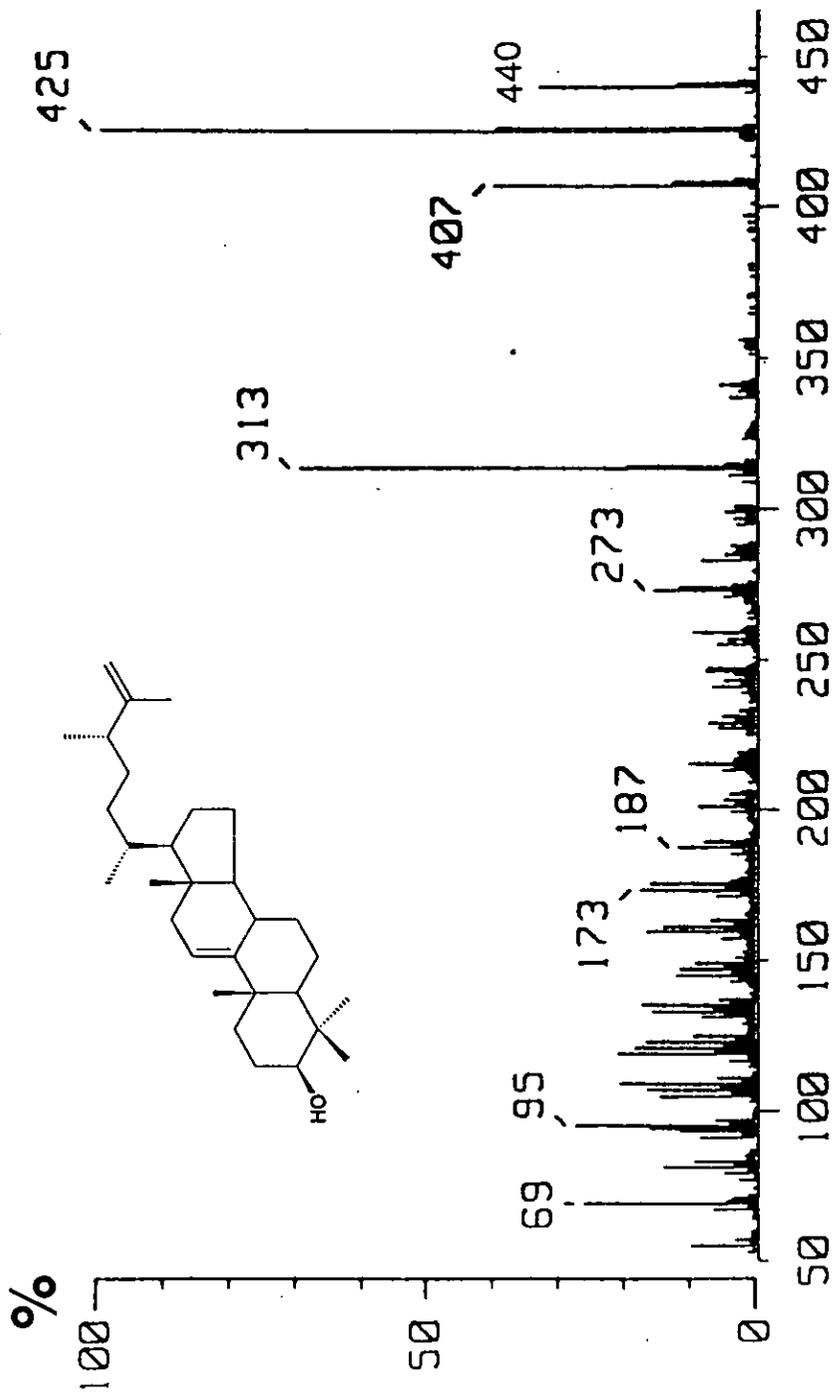
La comparación cuidadosa de los desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN- ^{13}C , con la de una serie de lanostanos aislados previamente de la familia Orchidaceae, permitieron comprobar que la función acetato del compuesto **22a** se encontraba en C-3, y en consecuencia, también la función alcohólica de la mezcla M-1, constituida por los compuestos **21** y **22**.

Por otro lado, este análisis permitió comprobar que la doble ligadura trisustituida se encontraba entre C-9 y C-11 y que los dos metilos adicionales de la cadena lateral se encontraban en C-24, al igual que en el caso del compuesto **20**.

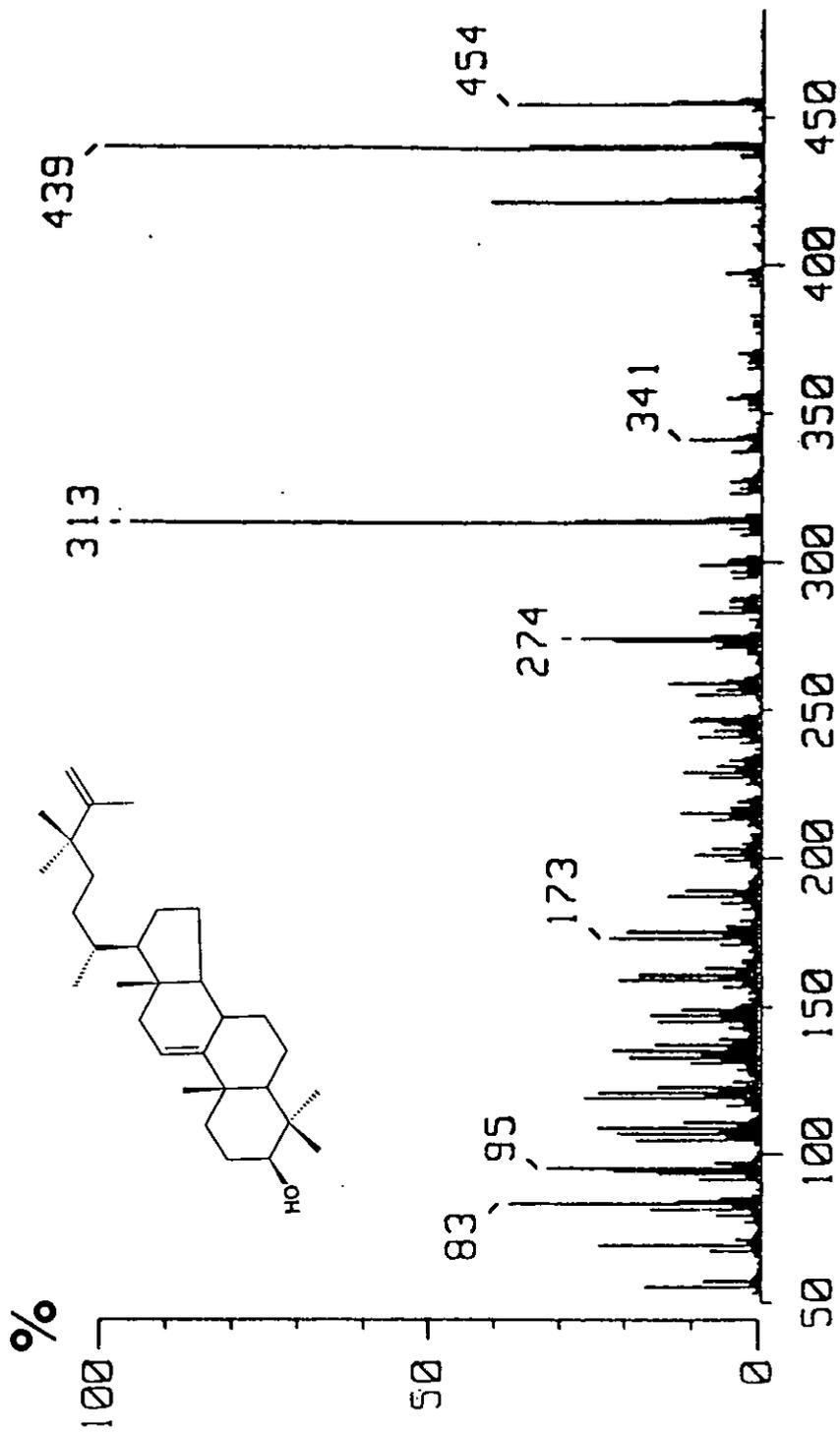
La estereoquímica del grupo acetoxi en C-3, y por lo tanto del hidroxilo en el producto natural **22**, se determinó como β con base en el patrón de acoplamiento observado para el hidrógeno geminal de la función acetoxi. Esta señal se observa en el espectro de RMN- ^1H como un doblete de doblete ($J=4.8, 10.8$) característico de un hidrógeno axial α orientado.



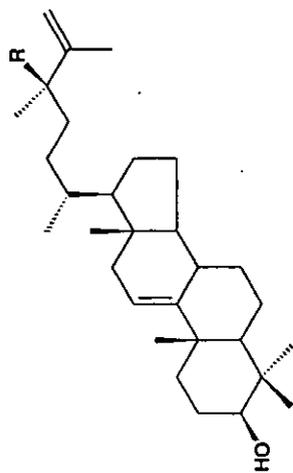
Espectro 10. Espectro en el IR de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22).



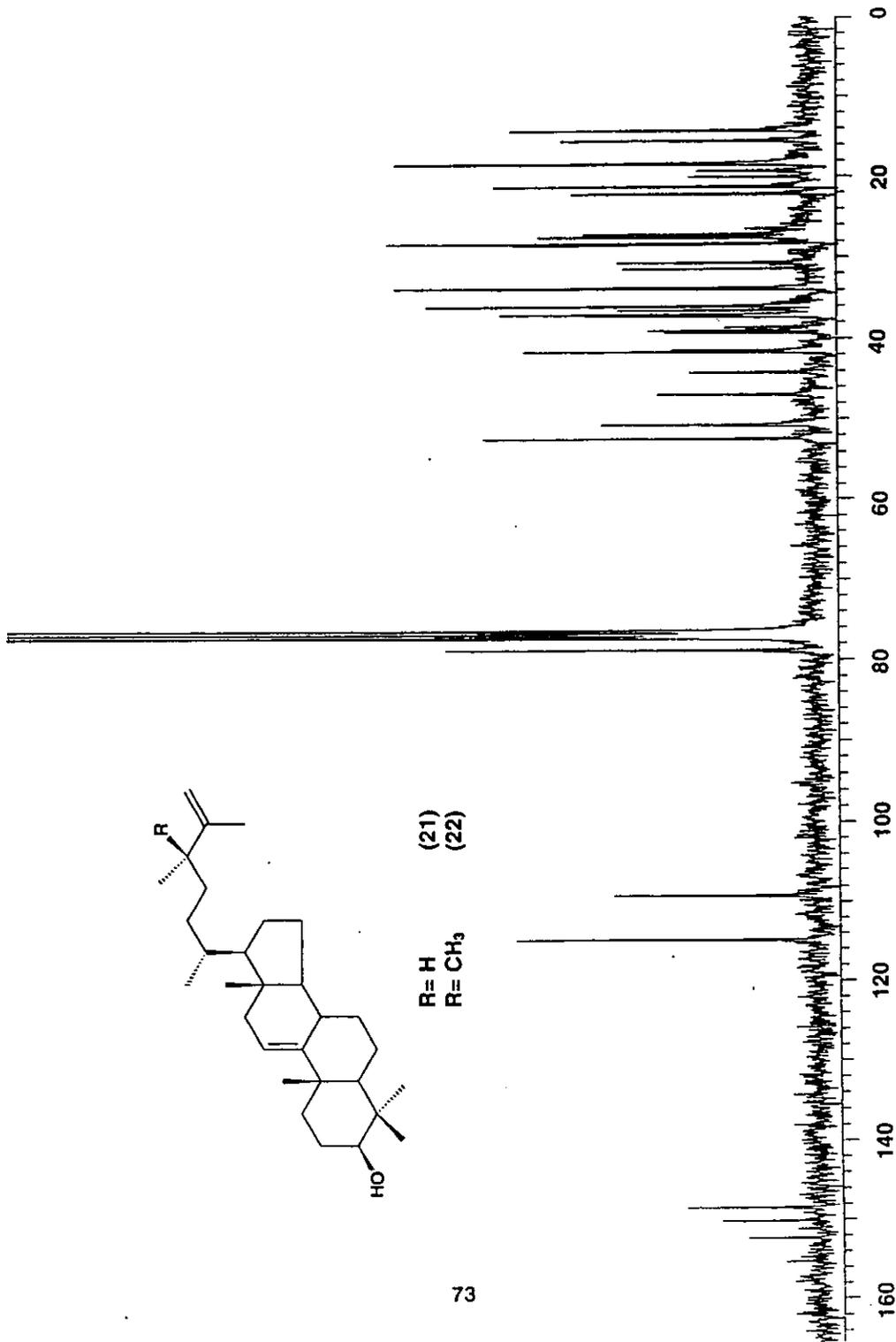
Espectro 11. Espectro de EMIE del 24-metil-5α-ianosta-9(11),25-dien-3β-ol (21).



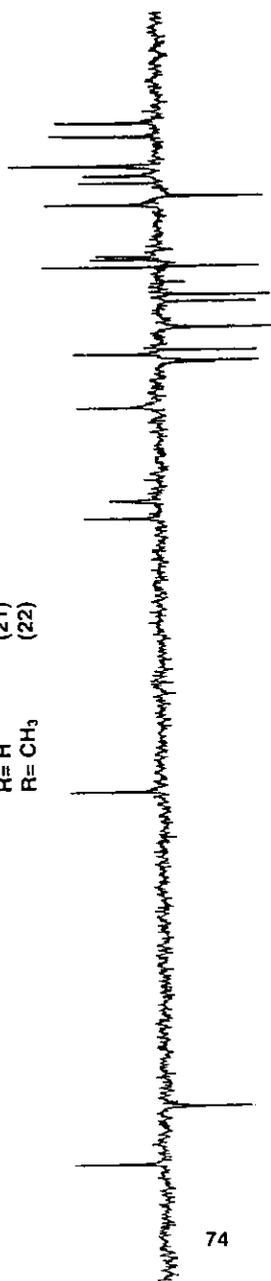
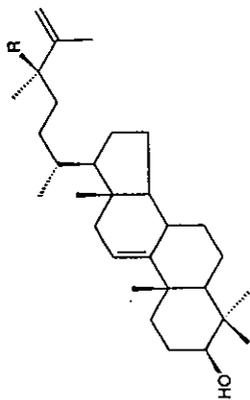
Espectro 12. Espectro de EMIE del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22).



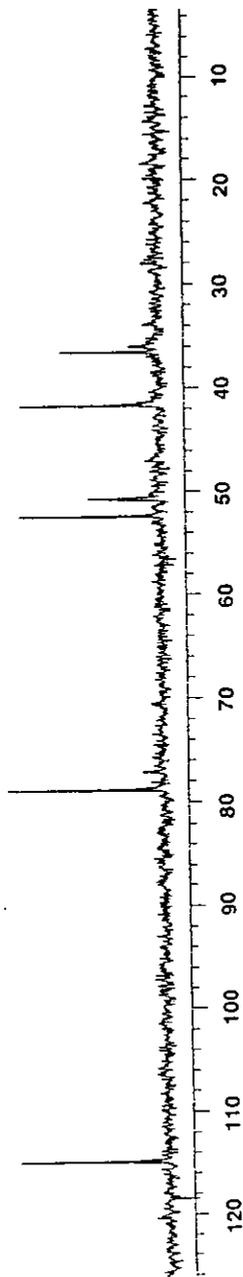
R= H (21)
R= CH₃ (22)



Espectro 13. Espectro de RMN-¹³C de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22).

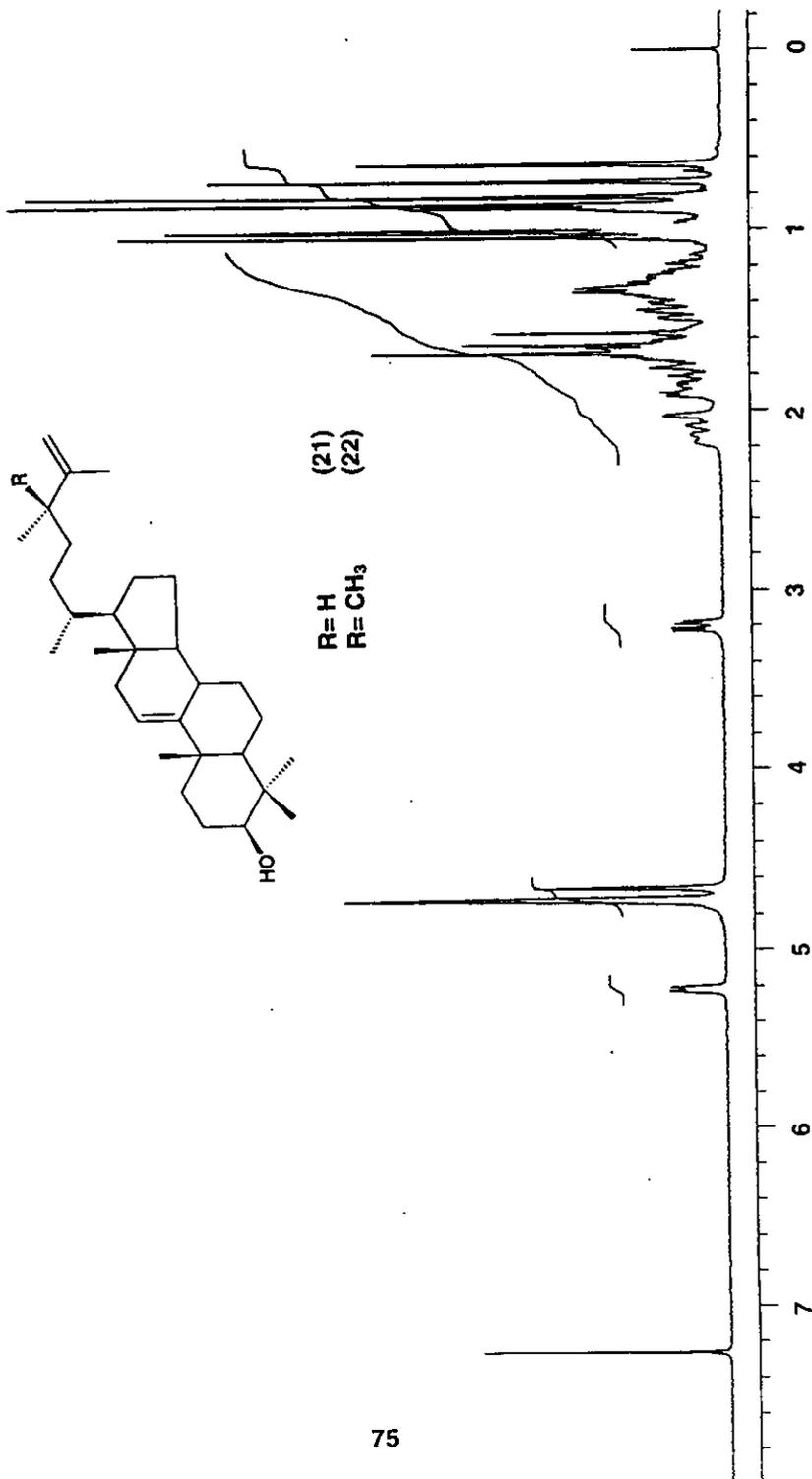


74

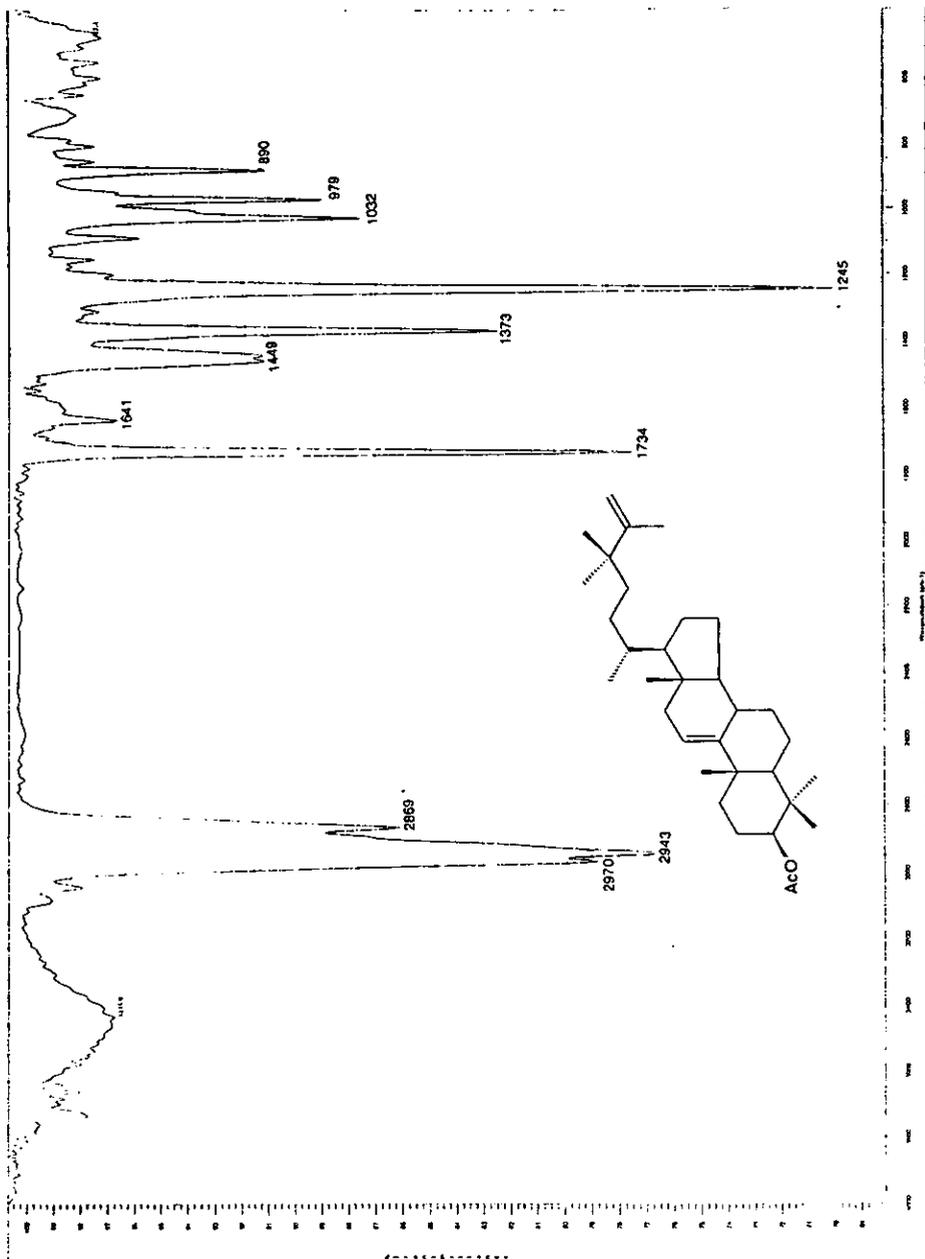


Espectro 14. Espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del

24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22).



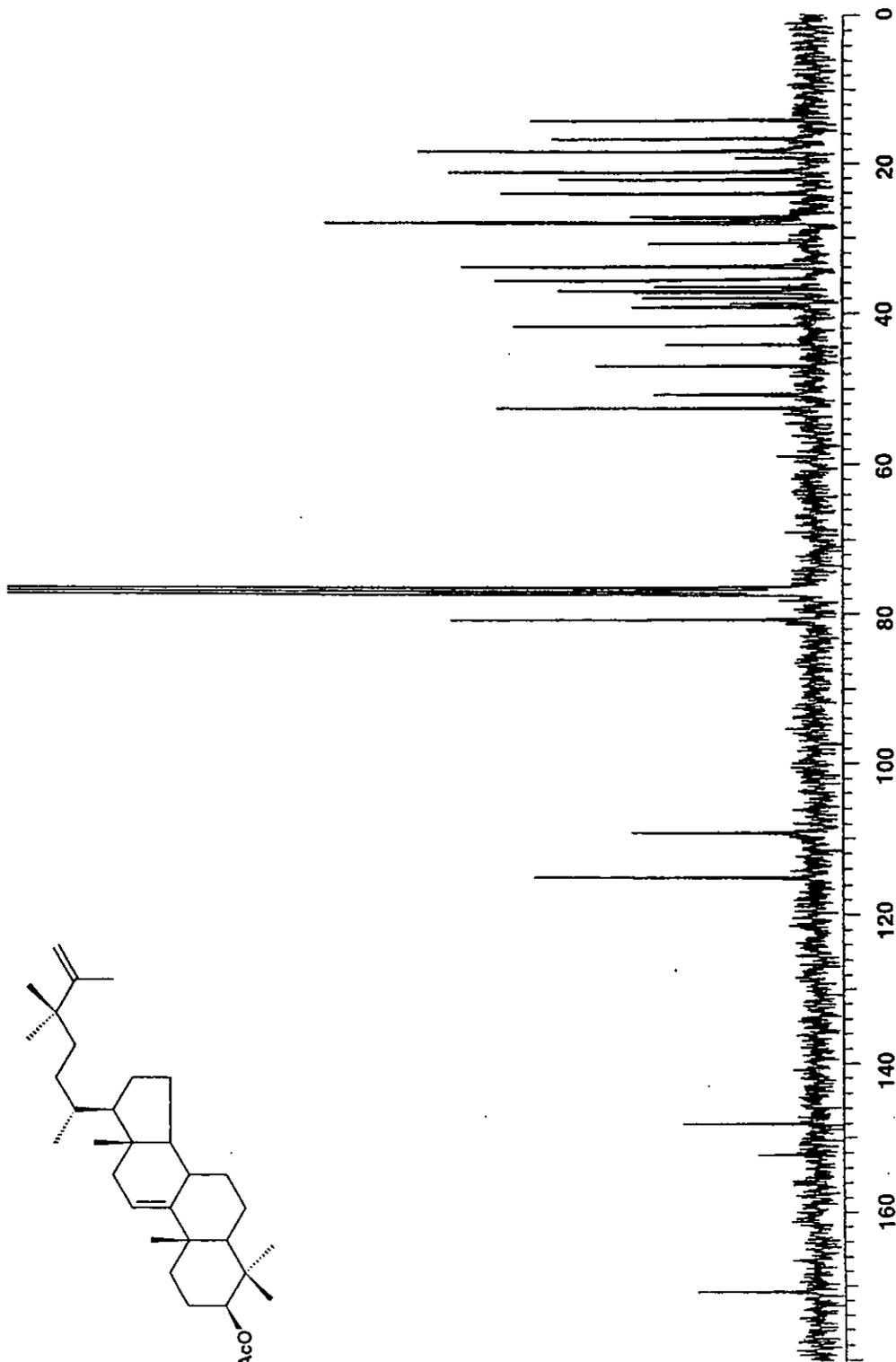
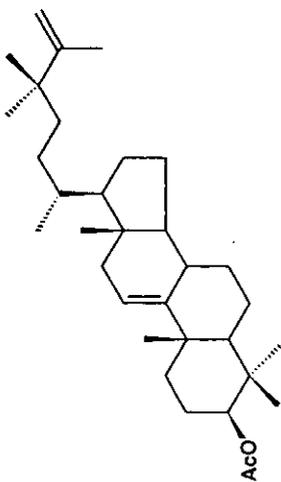
Espectro 15. Espectro de RMN-¹H de la mezcla del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21) y del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22).



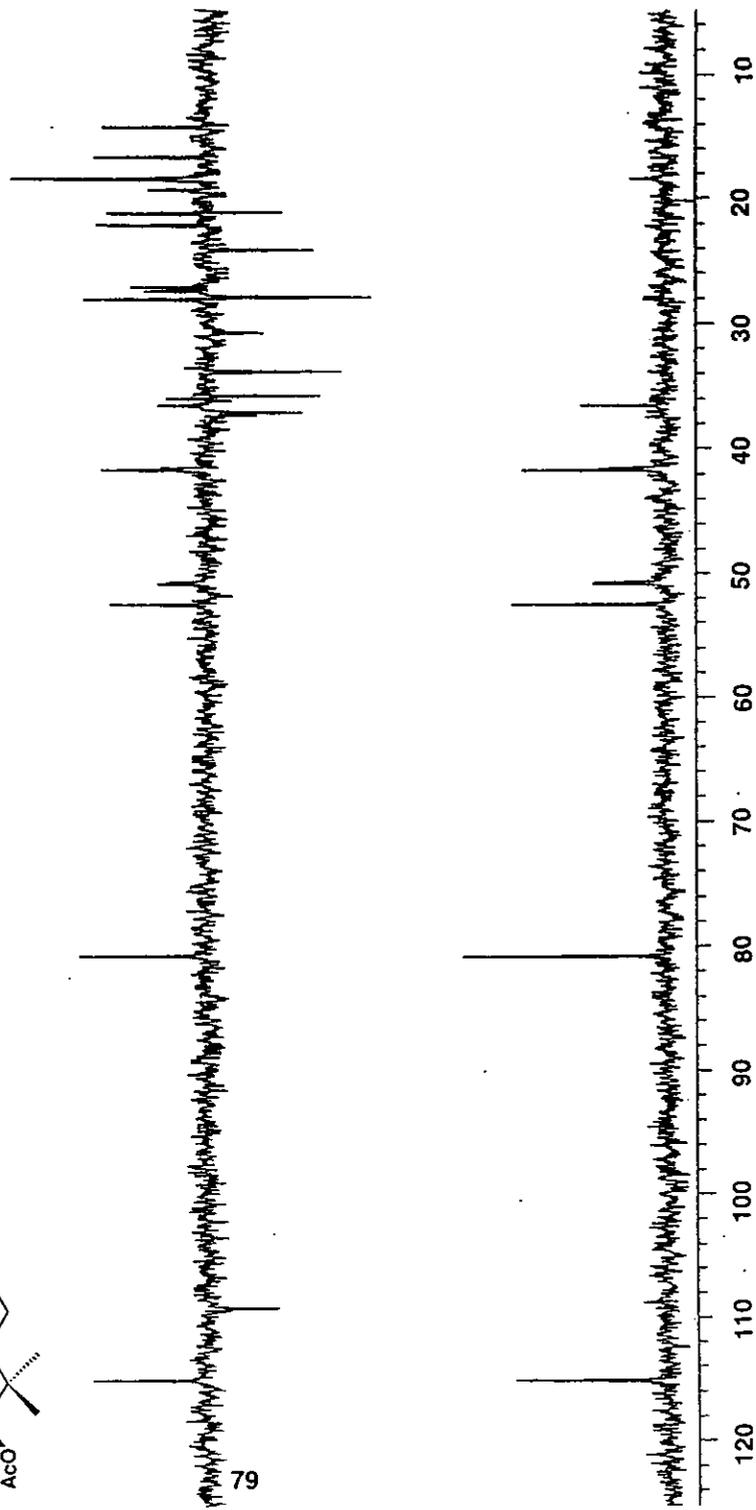
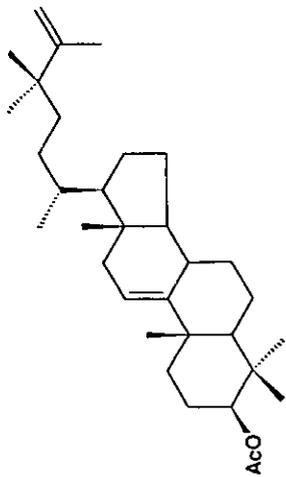
Espectro 16. Espectro en el IR del 24,24-dimeti-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a).



Espectro 17. Espectro de EMIE del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a).

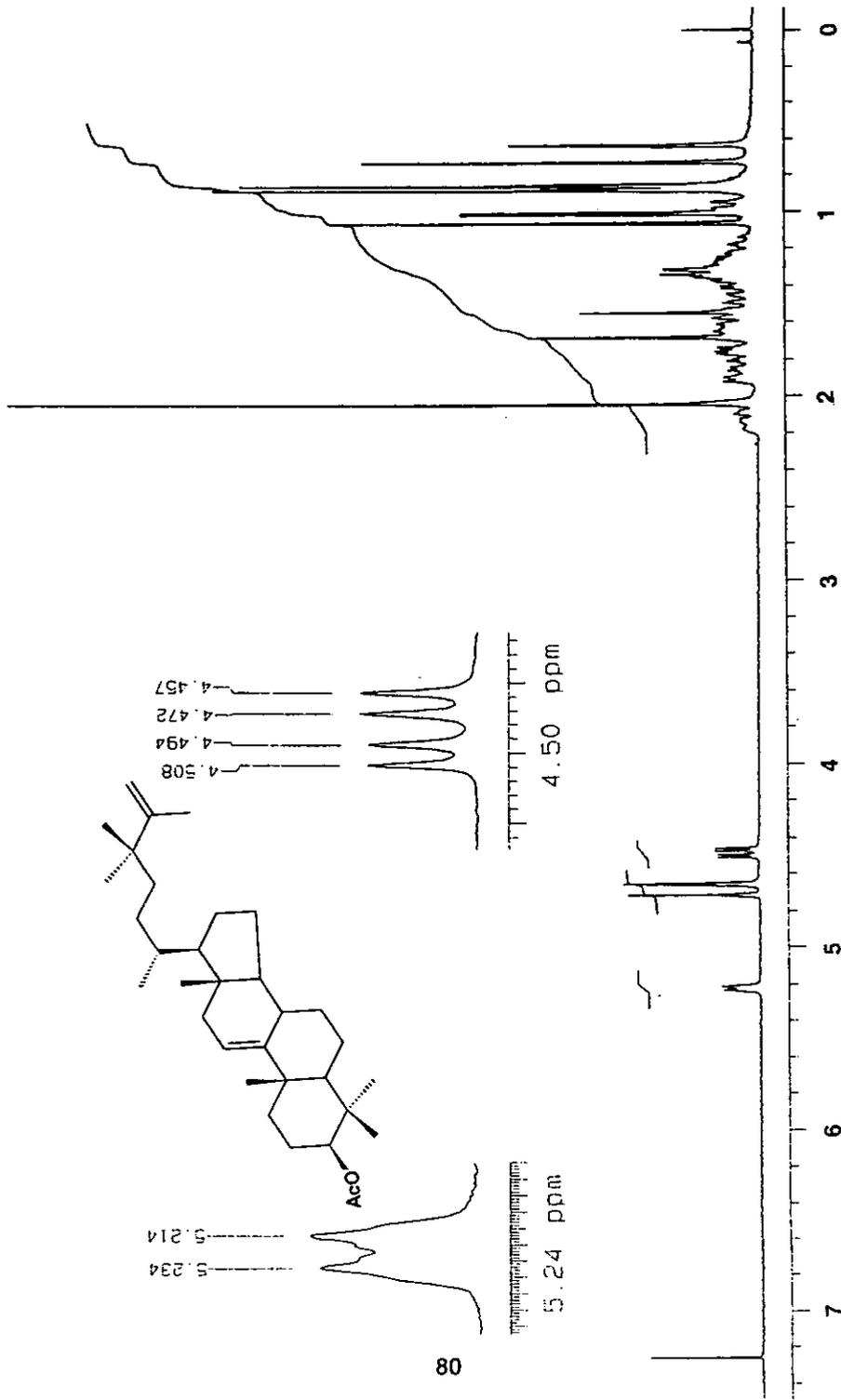


Espectro 18. Espectro de RMN- ^{13}C del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a).



Espectro 19. Espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT del 24,24-dimeti-5 α -ianostia-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a).

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



Espectro 20. Espectro de RMN-¹H del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (22a).

4.3.3 Caracterización del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25 dien 3 β -ol (21) bajo la forma de su derivado monoacetilado (21a).

El derivado monoacetilado **21a** se aisló como un sólido blanco cristalino. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto **21a** se muestran en las tablas 7-9.

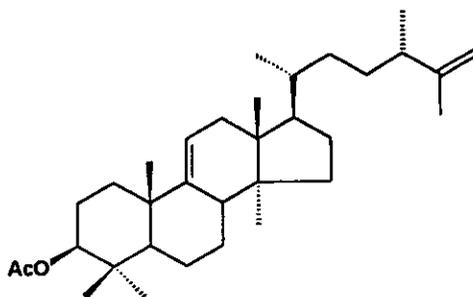
En general, las características espectroscópicas y espectrométricas del producto **21a** fueron muy similares a las del producto **22a**. El espectro en el IR (Espectro 21), presentó también absorciones asociadas con la presencia de dobles ligaduras ($1642, 890 \text{ cm}^{-1}$) y carbonilo de éster ($1731, 1246 \text{ cm}^{-1}$). El espectro de masas (Espectro 22), presentó un ion molecular en una relación m/z de 482 uma. La diferencia de 14 unidades observada entre los iones moleculares de los productos **21a** y **22a**, indica que el compuesto **21a** contiene un grupo metilo menos que el metabolito **22a**.

El análisis comparativo de los espectros de RMN (Espectros 18, 20 y 23, 25) y del patrón de fragmentación de masas de los productos **21a** y **22a**, indicó también que el compuesto **21a** presentaba un metilo menos en la cadena lateral que el producto **22a**.

Las diferencias más importantes observadas en los espectros de RMN se resumen a continuación:

1. En el caso del espectro de RMN- ^1H del producto **21a**, en lugar de las dos señales de la función vinílica en $\delta_{\text{H}} 4.66$ y $\delta_{\text{H}} 4.72$ (H-26), presentes en el espectro del producto **22a** (Espectro 20), sólo se observa una señal en δ_{H}

Tabla 7. Contantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del derivado acetilado del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21a).



| | |
|---|---|
| FM | C ₃₃ H ₅₄ O ₂ |
| PM | 482 |
| p.f. | 226-227 °C |
| IR ν_{\max} (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 21) | 2941, 2870, 1642, 1443, 1372, 1246, 1033, 979, 890. |
| EMIE m/z (int rel) (Espectro 22) | 482 (43), 467 (81), 407 (84), 355(100), 316 (14), 283 (22), 255 (14) 215 (11), 175 (19), 119 (22), 95 (30), 69 (27) |

Tabla 8. Datos de RMN-¹H (300 MHz) de la mezcla del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22) y del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21), del derivado acetilado del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22a) y del derivado acetilado del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21a).

| Protón | Mezcla 21 y 22 | 21a | 22a |
|--------|--|------------------------------|--|
| H-3 | 3.22 (<i>dd</i> , 11.0,4.8) | 4.48 (<i>dd</i> , 4.8,10.8) | 4.48 (<i>dd</i> , 4.8,10.8) |
| H-11 | 5.22 (<i>da</i> , 6) | 5.21 (<i>da</i> ,6) | 5.21 (<i>da</i> ,6) |
| H-18 | 0.64 (<i>s</i>) | 0.63 (<i>s</i>) | 0.63 (<i>s</i>) |
| H-19 | 1.04 (<i>s</i>) | 1.05 (<i>s</i>) | 1.05 (<i>s</i>) |
| H-21 | 0.87 (<i>d</i> , 6.3) | 0.87 (<i>d</i> , 6.5) | 0.87 (<i>d</i> , 6.5) |
| H-26 | 4.72 (<i>sa</i>) 4.66 (<i>sa</i>) | 4.66 (<i>m</i>) | 4.66 (<i>sa</i>) 4.72 (<i>sa</i>) |
| H-27 | 1.69 (<i>sa</i>) 1.64 (<i>sa</i>) | 1.64 (<i>s</i>) | 1.69 (<i>d</i> , 0.5) |
| H-28 | 0.86 (<i>s</i>) | 0.85 (<i>s</i>) | 0.85 (<i>s</i>) |
| H-29 | 1.015 (<i>s</i>) | 0.88 (<i>s</i>) | 0.88 (<i>s</i>) |
| H-30 | 0.73 (<i>s</i>) | 0.72 (<i>s</i>) | 0.72 (<i>s</i>) |
| H-31 | 1.01 (<i>s</i>) 1.00 (<i>m</i>) | 1.00 (<i>d</i> , 7.6) | 1.01 (<i>s</i>) |
| H-32 | 1.01 | | 1.01 (<i>s</i>) |
| AcO | | 2.04 | 2.04 |

Los desplazamientos químicos (relativos al TMS) están dados en ppm y las constantes de acoplamiento (en parentesis) en MHz. Las asignaciones se realizaron por una combinación de COSY y HETCOR y por comparación de los desplazamientos químicos con aquellos asignados a compuestos relacionados.

Tabla 9. Datos de RMN-¹³C (75 MHz) de la mezcla del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22) y del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21), del derivado acetilado del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (22a) y del derivado acetilado del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (21a).

| Carbón | Mezcla 21 y 22 | 21a | 22a |
|--------|----------------|---------------|---------------|
| C-1 | 36.13 | 35.79 | 35.79 |
| C-2 | 27.82 | 24.16 | 24.16 |
| C-3 | 78.93 | 80.88 | 80.88 |
| C-4 | 39.11 | 38.02 | 38.02 |
| C-5 | 52.52 | 52.56 | 52.56 |
| C-6 | 21.39 | 21.25 | 21.25 |
| C-7 | 28.13 | 28.01 | 28.01 |
| C-8 | 41.82 | 41.76 | 41.76 |
| C-9 | 148.54 | 148.12 | 148.12 |
| C-10 | 39.39 | 39.23 | 39.23 |
| C-11 | 114.54 | 115.18 | 115.18 |
| C-12 | 37.14 | 37.11 | 37.11 |
| C-13 | 44.28 | 44.25 | 44.25 |
| C-14 | 47.01 | 47.01 | 47.01 |
| C-15 | 33.91 | 33.92 | 33.92 |
| C-16 | 27.98 | 28.01 | 28.01 |
| C-17 | 50.79, 50.91 | 50.89 | 50.75 |
| C-18 | 14.35 | 14.38 | 14.38 |
| C-19 | 22.26 | 22.29 | 22.29 |
| C-20 | 36.62, 36.12 | 36.05 | 36.62 |
| C-21 | 18.5 | 18.50 | 18.50 |
| C-22 | 30.8, 33.91 | 33.92 | 30.79 |
| C-23 | 37.33, 31.48 | 31.47 | 37.30 |
| C-24 | 38.71, 41.60 | 41.60 | 38.71 |
| C-25 | 152.38, 150.19 | 150.19 | 152.41 |
| C-26 | 109.26, 109.35 | 109.30 | 109.30 |
| C-27 | 19.39, 18.50 | 18.50 | 19.43 |
| C-28 | 28.22 | 28.18 | 28.18 |
| C-29 | 15.64 | 16.82 | 16.82 |
| C-30 | 18.50 | 18.5 | 18.5 |
| C-31 | 27.24, 20.16 | 20.17 | 27.27 |
| C-32 | 27.84 | | 27.54 |
| AcO | | 21.36, 170.99 | 21.36, 170.99 |

Los desplazamientos químicos están dados en ppm. 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.

4.66 que integraba para dos hidrógenos. En otras palabras, en el caso del compuesto **21a**, los hidrógenos del metileno terminal son equivalentes.

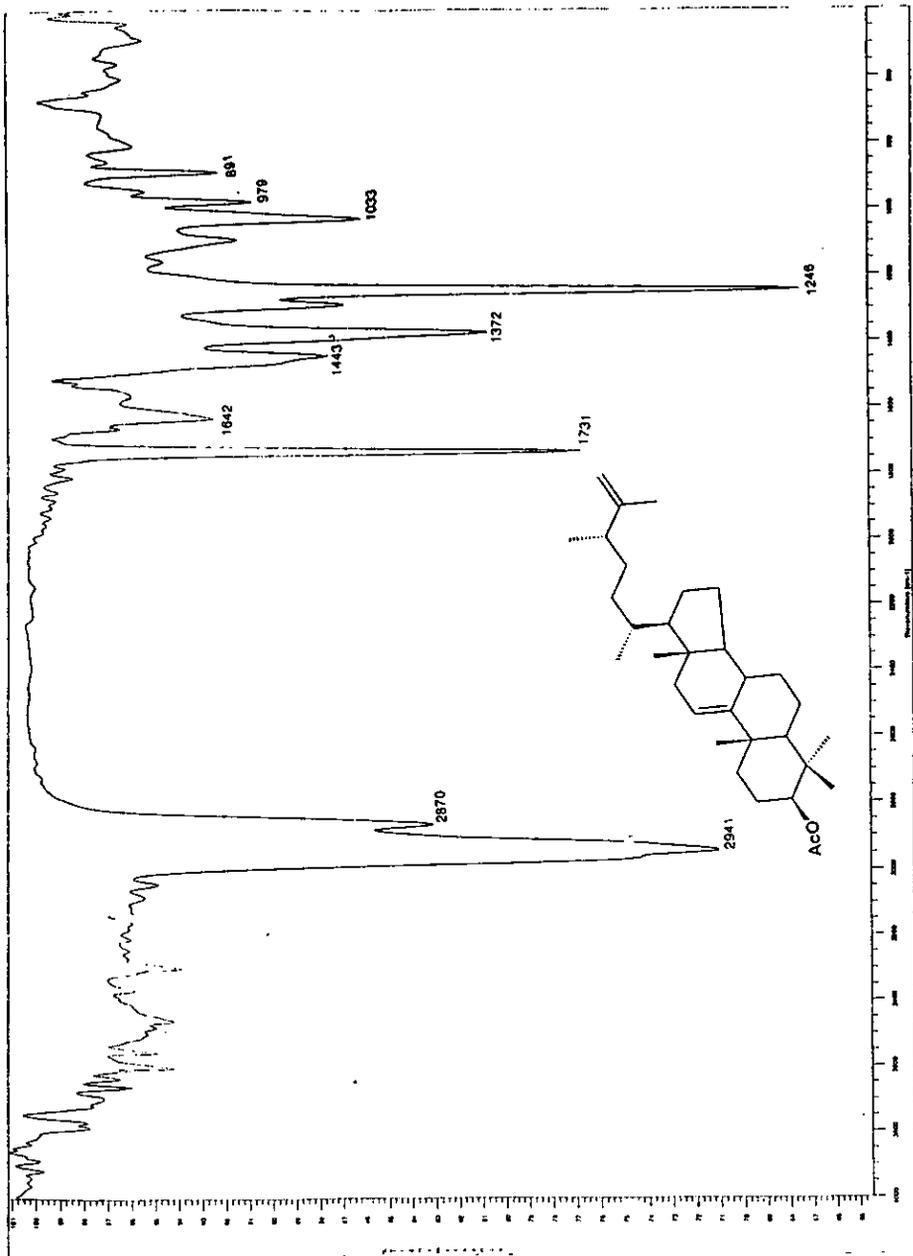
2. En lugar del singulete en δ_H 1.01 (H-31 y H-32) presente en el espectro de RMN- 1H del compuesto **22a** (Espectro 20), el espectro equivalente del producto **21a**, presenta un doblete con una constante de acoplamiento de 7 Hz en δ_H 1.00 (Espectro 25), asignable a H-31.

3. En el espectro de RMN- ^{13}C del producto **21a** (Espectro 23), no aparece la señal del carbono cuaternario en δ_C 38.71 (C-24) presente en el espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **22a** (Espectro 18) y en su lugar se observa un metino adicional en δ_C 41.60 (C-24).

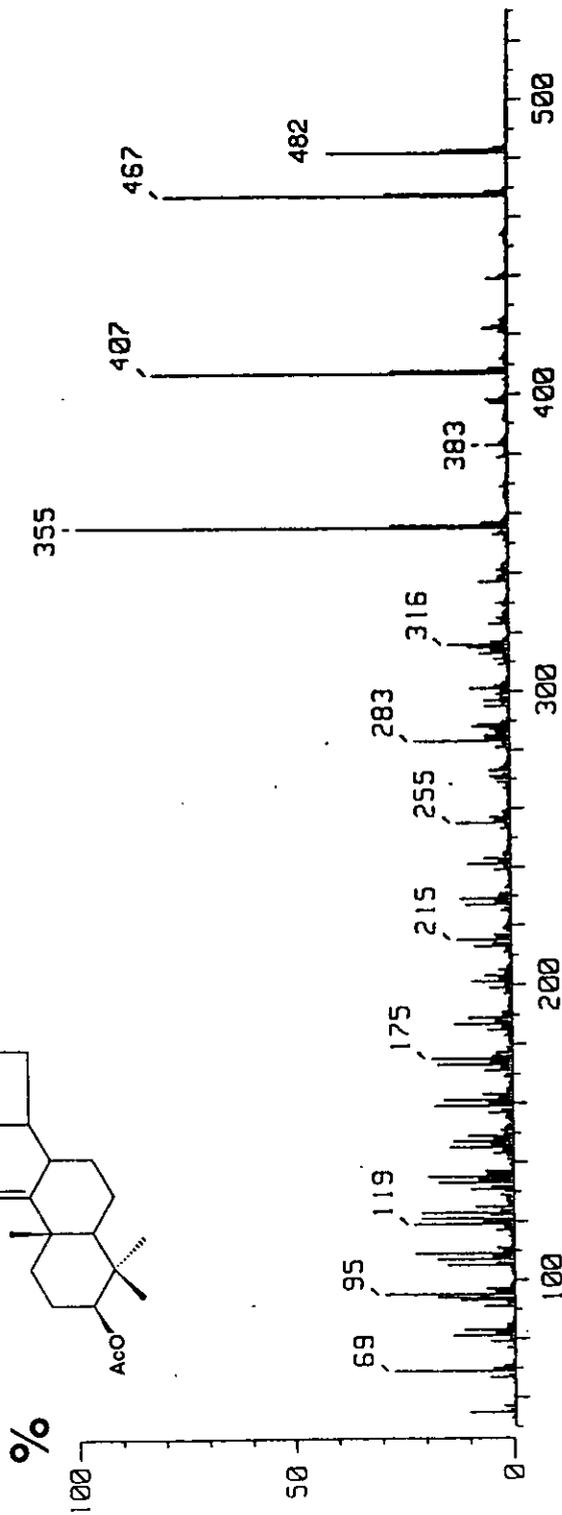
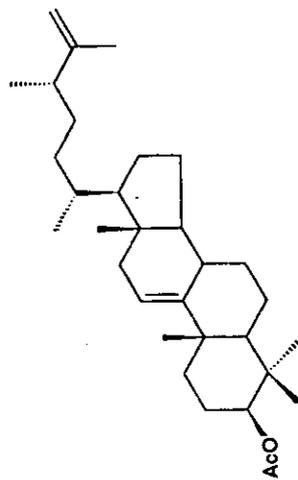
4. Por último, en el espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT del compuesto **21a** (Espectro 24), se observa una señal menos en la zona de los metilos.

Con base en el análisis anterior el producto **21**, se caracterizó como el 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol.

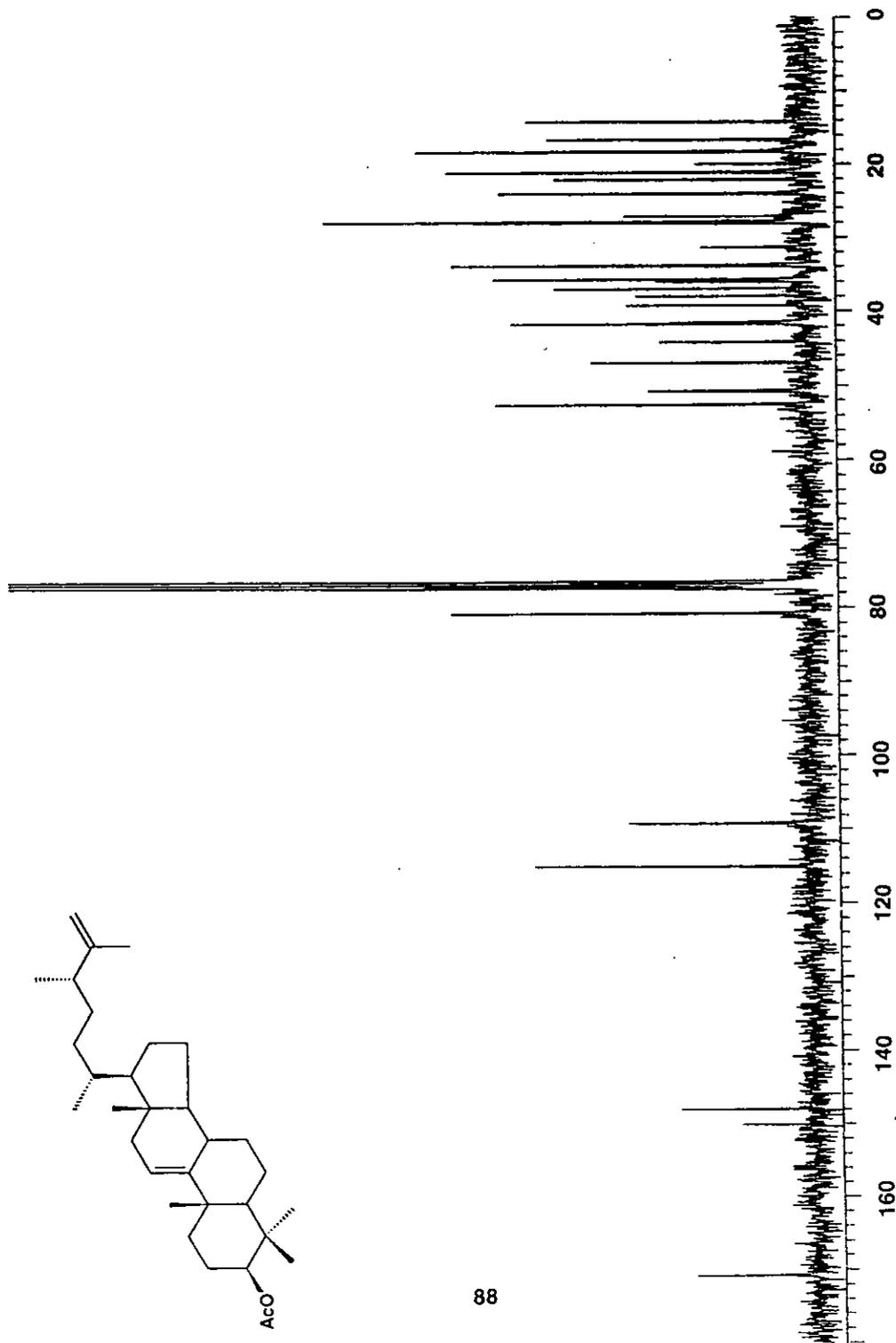
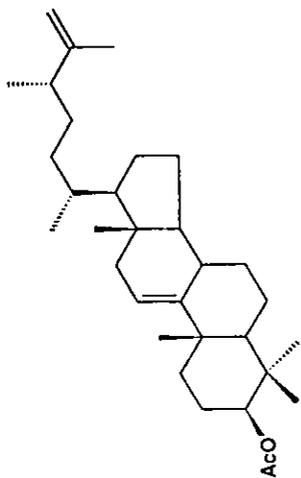
Los compuestos **21** y **22**, se han obtenido previamente de otras fuentes naturales (Chakravarty *et al.*, 1996, Majumder y Kar, 1989).



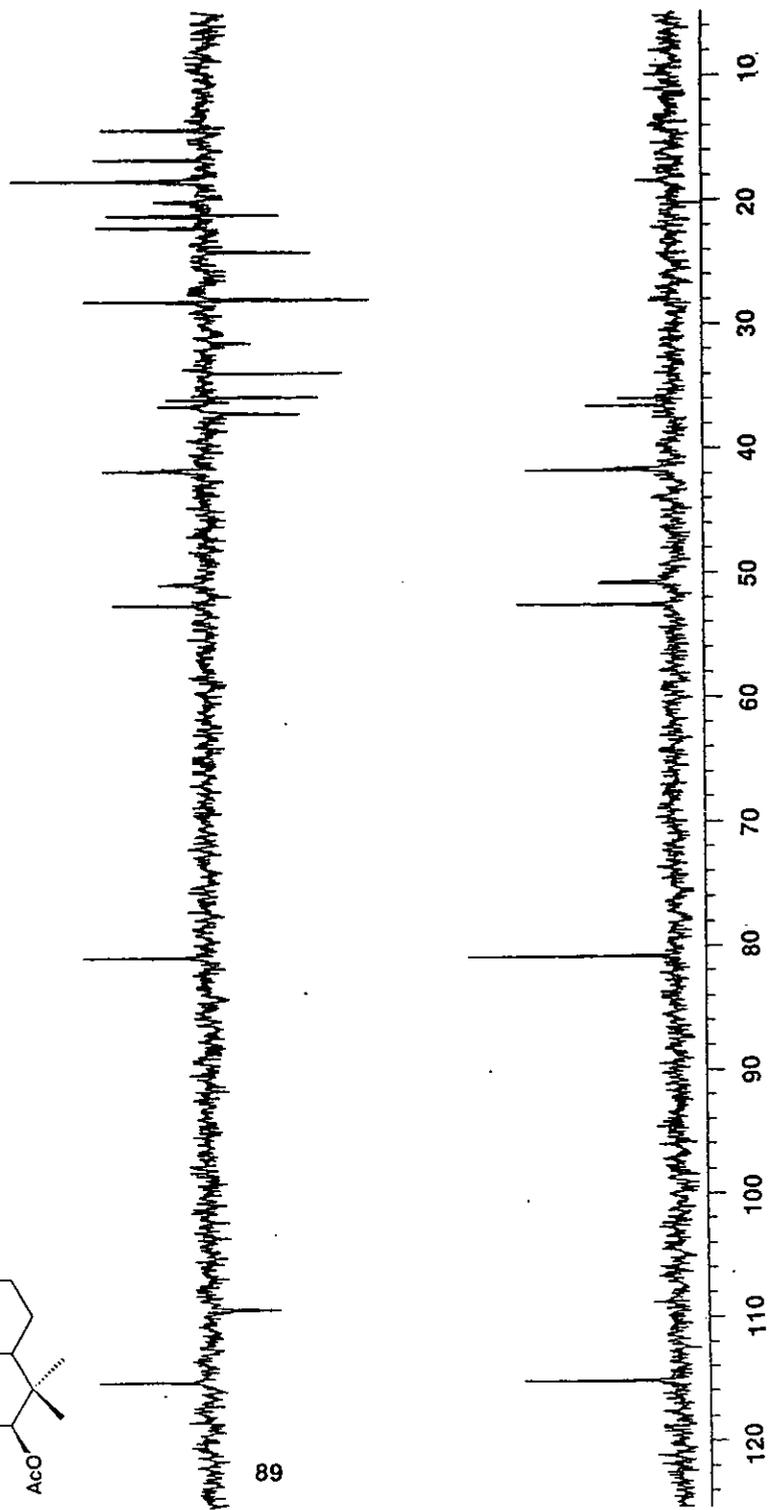
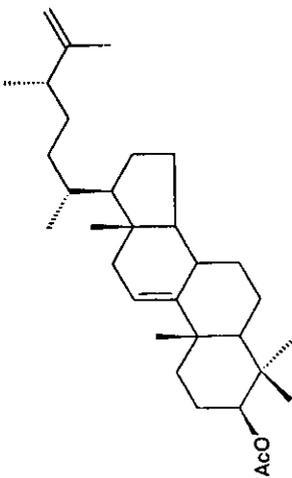
Espectro 21. Espectro en el IR del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a).



Espectro 22. Espectro de EMIE del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a).

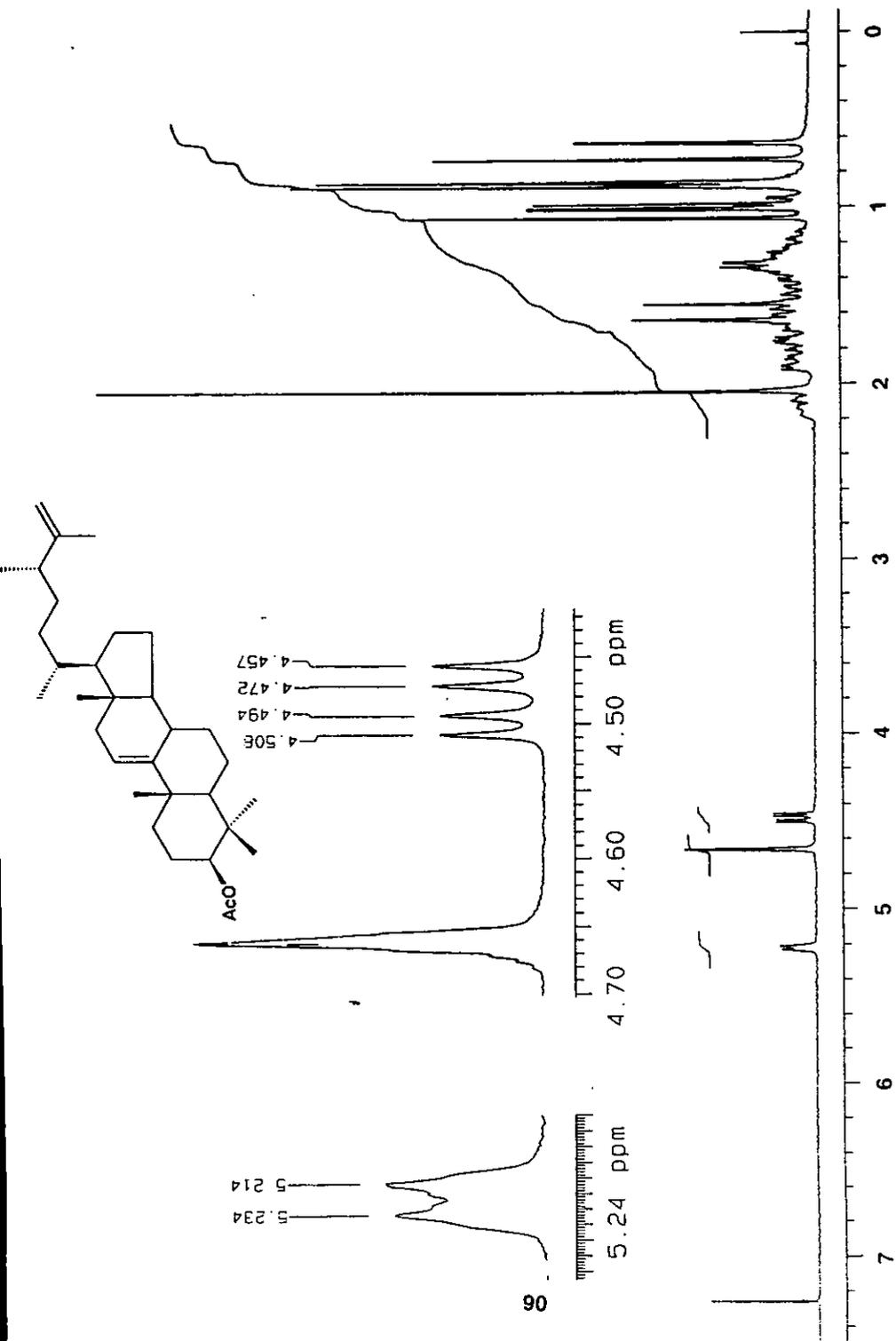


Espectro 23. Espectro de RMN. ^{13}C del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a).



89

Espectro 24. Espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT del 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a).



Espectro 25. Espectro de RMN- ^1H del 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -acetoxi (21a).

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. En el presente estudio, se determinó el potencial fitotóxico del extracto total y de las fracciones derivadas del fraccionamiento primario del extracto obtenido de la especie *Epidendrum boothii*, mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la inhibición del crecimiento radicular y de la germinación de *Amaranthus hypochondriacus* (Amarantaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Gramineae). Los resultados permitieron establecer que la especie *Epidendrum boothii* no constituye una fuente natural apropiada para la obtención de herbicidas potenciales.
2. El estudio fitoquímico de las fracciones no espasmolíticas del extracto total de esta orquídea, permitió el aislamiento y la caracterización de tres triterpenoides y un estero. Dos de los triterpenoides son de tipo lanostano y se caracterizaron como el 24,24-dimetil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (**22**) y como el 24-metil-5 α -lanosta-9(11),25-dien-3 β -ol (**21**); el tercero es un lanostano modificado y constituye un nuevo producto natural; este último compuesto se designó con el nombre trivial de nidemina (**20**) y su estructura se comprobó mediante un análisis de difracción de rayos X. Cabe señalar que esta es la primera descripción de lanostanos modificados en la familia Orchidaceae. El estero se caracterizó como estigmasterol (**23**).
3. El estudio químico de las fracciones no activas constituye una contribución adicional para el conocimiento del perfil metabólico secundario de la familia Orchidaceae, así como de la flora medicinal mexicana.

VI. BIBLIOGRAFIA.

Ajurell, S., Granelli, Y., Leander, K., Luning, B. y Rosenblom, J. (1974). Studies on Orchidaceae alkaloids XXXIX. Isolation of (-)-cryptostyline I, II, III and two quaternary salts from *Cryptostylis erythroglossa*. Hayata Biosynthetic studies of (-)-cryptostyline I. *Acta Chem. Scand.* **B28**, 239-243.

Ames, O. y Correll, D. S., (1952). Orchids of Guatemala. *Fieldiana Botany.* **26**, 290-309.

Anaya, A. L., Calera, M., Mata, R. y Pereda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. of Chem. Ecol.* **16**, 2145-2152.

Anaya, A. L., Ramos, O. R. L., Cruz, O. R. y Hernandez, J. (1987). Studies on allelopathy in México. En: 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. y Suffness, M. (1991). A blind comparison of simple bench top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as tumor prescreens. *Phytochemistry Analysis.* **2**, 107-111.

Arana, F. E. (1944). Vanilla curing. Vanilla chemistry. *Puerto Rico Agric. Exprim. Stat. Bull.* **42**, 1-17.

Arctander, S. (1969). Perfume and flavour chemicals. 2 vols. Montclair. N. J.

Arditti, J. (1966). The production of fungal growth regulating compounds by orchids. *Orchid Digest.* **30**, 88-90.

Asakawa, J., Kasai, R., Yamasaki, K. y Tanki, O. (1977). ¹³C-NMR study of Ginsen sapogenins and their related dammarane type triterpenes. *Tetrahedron*. **33**, 1935-1939.

Bai, L., Yamaki, M. y Takagi, S. (1997). Lignans and bichroman from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*. **44**, 341-343.

Bates, R.B., Caldera, S., Suvannachut, t. (1990). A new triterpenoid from *Bridelia tormentosa*. *J. Nat. Prod.* **53**, 209-211.

Baxter, H. y Harborne, J. B. (1995). Stilbenoids. *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor and Francis, Washington, D.C. pp. 509-518.

Bergstrom, G., Bigersson, G. y Groth, I. (1992). Floral fragrance disparity between three taxa of lady's slipper *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). *Phytochemistry*. **31**, 2315-2319.

Bernard, N. (1909a). Remarque sur l'immunité chez les plantes. *Bull. Inst. Pasteur*. **7**, 369-386.

Bernard, N. (1909b). L'évolution dans la symbiose, les orchidées et leurs champignons commensaux. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, Series 9. **9**, 1-196.

Bernard, N. (1911). Sur la fonction fungicide des bulbes d'ophrydées. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, Series 9. **14**, 221-235.

Bevan, C. W. L., Ekong, D. E. O. y Taylor, A. H. (1965). Extractives from west African members of the family Melliaceae. *Nature*. **26**, 1323-1325.

Block, J. H. y Constantine, G. H. (1972). Revised structure of a steroid oxide from *Rhododendrom macrophyllum*. *Phytochemistry*. **11**, 3279-3282.

Blomqvist, L., Leander, K., Lüning, B. y Rosenblom, J. (1972). Studies on Orchidaceae alkaloids, XXIX. The absolute configuration of dendroprimine an alkaloid from *Dendrobium primulinum* Lindl. *Acta Chem. Scand.* **26**, 3203-3206.

Boller, A., Corrodi, H., Gäumann, E., Hardegger, E., Kern, H. y Winterhald-Wild. (1957). Über induzierte abwehrstoffe bei Orchideen. Pt. 1. *Helv. Chim. Acta.* **40**, 1062-1066.

Busse, W. (1899). Vanille. *Arb. Kaiserl. Gesundheitsamt.* **15**, 1-113.

Carmona, G. (1997). Comunicación personal.

Castañeda, P., Garcia, M. R., Hernandez-Bautista, B., Torres, B. A., Anaya, A. L. y Mata, R. (1992). Effects of some compounds isolated from *Celaenodendrom meicanum* Tandl. (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *J. Chem. Ecol.* **7**, 1025-1037.

Chakravarty, A. J., Das, B.; Masuda, K. y Ageta, H. (1996). Tetracyclic triterpenoids from *Glycosmis arborea*. *Phytochemistry*. **42**, 1109-1113.

Chen, K. K. y Chen, A. L. (1935a). The alkaloid of Chin-Shih-hu. *J. Biol. Chem.* **111**, 653-658.

Chen, K. K., y Chen, A. L. (1935b). The pharmacological action of dendrobine, the alkaloids of Chin-shih-hu. *J. Pharmacol. Expert. Therap.* **55**, 319-325.

Chen, K. K. y Rose, C. L. (1936). Detoxification of dendrobine by "Sodium amytal." *Proc. Soc. Experim. Biol. Med.* **34**, 553-554.

Das, M. C., Mahato, S. B. (1983). Triterpenoids: Review. *Phytochemistry.* **22**, 1071-1095.

De Pascual Teresa, J., Bellido, I. S., González, M. S. y Vicente, S. (1986). Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivatives from *Santolina oblongifolia*. *Phytochemistry.* **25**, 185-190.

Dressler, L. R. (1981). *The orchis natural history and classification*. Harvard University Press. London. pp. 50-159.

Dressler, L. R. (1993). Phylogeny and classification of the orchid family, Discorides Press. pp. 13-57

Drevon. (1899). Vanillisme. *Ann. d'Hyg. Méd. Colon.* **2**, 529-532.

Duke, S. O. (1991). Plant. terpenoids as pesticides. En: Richard F. Keeler; Anthony, T. Tu (Eds). *Handbook of Natural Toxins*, 6. Marcel Dekker. Inc. N.Y., pp. 269-291.

Duke, S. O. (1988). Herbicide chemistry, degradation and mode of action. En: Kearney, P. C. y Kaufmann, D. D. (eds.), *Allelopathy: Organisms, processes and application*. Marcel Dekker Inc. New York. ACS Symposium Series 582, 311-329.

Elander, M., Leander, K., Rosenblom, J. y Ruusa, E. (1973). Studies on Orchideaceae alkaloids. XXXII: Crepidine, crepidamine and dendrocrepine, three new alkaloids from *Dendrobium crepidatum* Lindl. *Acta Chem. Scand.* **27**, 1907-1913.

Estrada, S. S. E., Rojas, A., Mathison, Y., Montenegro, R., Israel, A. y Mata, R. (1998). Nitric oxido/cGMP mediate the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Medica*, sometido para su publicación.

Fattorusso, E., Santacroce, C. y Xaasan, C. F. (1985). Dammarane triterpenes from the resin of *Boswellia freerana*. *Phytochemistry*. **27**, 2283-2286.

Fisch, M. H. y Arditti, J. (1972). Orchid phytoalexins. *Amer. J. Bot.* **59**, 672.

Fisch, M. H.; Flick y Arditti, J. (1973). Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol. *Phytochemistry*. **12**, 437-441.

Garros-Patin, J. y Hahn, J. (1954). La chimie de la vanille. En: (ed.). Le vanillier et la vanille dans le monde. G. Bouriquet Paul. Lechevalier, Paris.

Gorham, J. (1989). En: Dey, P. M. and Harborne, J. B. (eds.), *methods in plant biochemistry*. Vol 1 Plant Phenolics. pp. 159-196.

Gray, A. I., Bhandan, P. y Waterman. P. G. (1988). New protolimonoids from the fruits of *Phellodendrum chinese*. *Phytochemistry*. **27**, 1805-1808.

Guang-Yi, Li., Gray, A. I. y Waterman, P. G. (1988). Tirucallane and oleanane triterpenes from the resin of *Aucoumea klaineana*. *Phytochemistry*. **27**, 2283-2286.

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

- Hardegger, E., Biland, H. R. y Corrodi, H. (1963a). Synthese von 2,4-dimethoxy-6-hydroxiphenanthren und konstitution des Orchinols. *Helv. Chim. Acta.* **46**, 1354-1360.
- Hardegger, E., Schellenbaum, M. y Corrodi, H. (1963b). Über induzierte abwehrstoffe bei orchiden. *Helv. Chim. Acta.* **46**, 1171-1181.
- Hausen, B.M. (1984). Toxic and allergenic orchids. En: *Orchid Biology Reviews and Perspectives III*, Cornell University. p.p. 262-282.
- Herbert, R. B. (1981). *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Chapman and Hal London. pp. 63-66.
- Hietz, P. y Hietz-Seifort, V. (1994). *Epífitas de Veracruz*. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas Ver. Instituto de Ecología A.C. 1a edición.
- Holman, R. T. y Heimermann, W. H. (1973). Identification of components of orchid fragances by gas chromatography-mass spectrometry. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* **42**, 678-682.
- Hutchinson, J. (1892/93). An eruption caused by vanilla. *Arch. Surgery.* **4**, 49-50.
- Inoue, M., Nishimura, H., Li, H.-H. y Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachalinense*. F. R. SCHM (Polygonaceae). *J. Chem. Ecol.* **18**, 1833-1840.
- Inubushi, Y., Tsuda, Y., Konita, T. y Matsumoto, S. (1964). Shihunine. A new phthalide- pyrrolidine alkaloid. *Chem. Pharm. Bull.* **12**, 749-750.

Inubushi, Y., Tsuda, Y., Konita, T. y Matsumoto, S. (1968). The structure of shihunine, a new phthalide-pyrrolidine alkaloid. *Chem. Pharm. Bull.* **16**, 1014-1018.

Jackson, J. R. (1875). Vanilla. *Pharmacist.* **8**, 168-170.

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

Kaiser, R. (1993). *The scents of orchids: olfactory and chemical investigations.* Elsevier, Amsterdam.

Karin, A., Karlson, B. y Groth, I. (1986). Volatiles from the flowers of four species in the sections Arachnitiformes and Araneiferae of genus *Ophrys* as insect mimetic attractants. *Phytochemistry.* **25**, 1297-1299.

Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. y 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**, 1914-1929.

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

Layet, A. (1883). Étude sur le vanillisme, ou accidents causés par la vanille. *Rév. d'Hyg. Police Sanitaire*. **5**, 711-724.

Leong, Y. W., Kang, C. C., Harrison, L. J. y Powell, A. D. (1997). Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the Orchid *Bulbophyllum vaginatum*. *Phytochemistry*. **44**, 157-165.

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

Lüning, B. (1964). Studies on Orchidaceae alkaloids. I. Screening of species for alkaloids 1. *Acta Chem. Scand.* **18**, 1507-1516.

MacDougal, D.T. (1895). On the poisonous influence of *Cypripedium spectabile* and *Cypripedium pubescens*. *Minnesota Bot. Stud.* **1**, 32-36.

Mahato, S. B. y Kundu, A. P. (1994). ¹³C-RMN spectra of pentacyclic triterpenoids. A compilation and some salient features. *Phytochemistry*. **37**, 1517-1575.

Maille, M., Morel, G. y Gautheret, R. (1974). Mise en évidence d'une amine phénolique dans diverses Orchidées du genre *Cattleya* *Compt. Rend. Acad. Sci., ser. D.* **278**, 2217-2218.

Majumder, P., Bandyopadhyay, D. y 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. y Chakrabarty, J. (1982). Isoflavidinin and isooxoflavidinin, two 9,10-dihydrophenanthrenes from the orchid *Pholidota articulata*, *Otochilus porrecta* and *Otochilus fusca*. *Phytochemistry*. **21**, 2713-2716.

Majumder, P.; Datta, W.; Sarkar, A. K. y Chakrabarti, 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. y Kar, A. (1989). Erianol, 4 α -methyl sterol from the orchid *Eria convallarioides*. *Phytochemistry*. **28**, 1487-1490.

Majumder J. L. y Pal S. (1990). A Steroidal ester from *Coelogyne uniflor.* *Phytochemistry*. **29**, 2717-2720.

McVaugh, R. (1985). Flora novogaliciana. *A descriptive account of the vascular Plants of Western Mexico*. The University of Michigan Press. vol. 16, pp 1-5.

Millan, G. (1936). Dermatoses artificielles d'origine végétale, En: *Nouvelle pratique dermatologique*, vol. 4. Masson, Paris. pp. 791-803, 855, 857-859.

Miller, M. A. (1959). Orchids of economic use. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* **28**, 157-162, 268-271, 351-354.

Mo, F., Anthonsen, T. y Bruun, T. (1972). Revised Structure of the Triterpenoid *Baccharis oxide*. *Acta Chem. Scand.* **26**, 1287-1288.

Muller, K. O. (1959). The phytoalexin concept and its methodological significance. *Recent Adv. Bot.* **1**, 396-400.

Pal, R., Kulshreshtha, D. K. y Rastogi, R. P. (1975). Mallotin-A new C₃₂ triterpenoid from *Mallotous Stenanthus*, *Phytochemistry*. **14**, 2253-2255.

Pavia, D. L., Lapman, G. M., Kris, G. S. y Engel, R. (1995). *Organic laboratory techniques a microscale approach*. Ed. Saunder W. B., Saunder. Co. Philadelphia. Pag 345

Pinto, A. C., Baker, P. M., Gilber, B., Pinchin, R., Reis, F., Waineraich, M. S. y Zocher, D. (1980). Vellozone, a tetracyclic triterpene from *Vellozia stipitata*. *Phytochemistry*. **19**, 2486-2487.

Rao, K. L., Ramraj, S. K., Nath, A. R., Rao, S. y Sundaramaiah, T. (1986). Cycloart-25-en-3 β -ol from *Euphorbia nivulia*. *Phytochemistry*. **25**, 277-278.

Schmalle, H. y Hausen, B. M. (1979). A new sensiting quinone from lady slipper (*Cypripedium calceolus*) *Naturwiss.* **66**, 527-528.

Shriner, R. L., Fuson, R. C. y Curtin, D. Y. (1980). *Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos*. Ed. Limusa.

Slyter M. B. (1977). The distribution and chemistry of alkaloids in the Orchidaceae. *Orchid Biology Reviews and Perspectives I*. Cornell University Press. 310 p, pp. 95-115.

Stoessl, A. y Arditti, J. (1984). Orchid phytoalexins. *Orchid biology reviews and perspectives III*. Cornell University Press 432p, pp.152-175.

Tori, M., Matsuda, R., Sono, M. y Asaka, Y. (1988). ¹³C-NMR assignament of dammarane triterpenes and dendropanoxido, application of 2D long range ¹³C-¹H correlation spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **26**, 581-590.

Torii, T., Tachibana, K., Yamada, S., Tsuyuki, T. y Takahashi, T. (1975). The synthesis of dendropanoxide from friedelin, *Tetrahedron Letters*. **27**, 2283-2286.

Torssell, K. B. (1983). *Natural Products Chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism*. John Wiley and Sons Limited, Great Britain. pp. 197-204.

Urech, J., Fechtig, B., Nüesch y Vischer, E. (1963). Hircinol, eine antifungisch wirksame substanz aus knollen von *Loroglössum hircinum*. (L) Rich. *Helv. Chim. Acta*. **46**, 2758-2766.

Veeraju, P. (1989). Bibenzils and phenanthrenoids of some species of Orchidaceae. *Phytochemistry*. **28**, 3031-3034.

Whitten, W. H. y Williams, N. H. (1993). Proc. 10th Annual Meeting, International Soc. Chem. Ecol. Tampa Florida.

Yamamura, S. y Hirata, Y. (1964). Structures of nobiline and dendrobine. *Tetrahedron Letters*. 79-87.