

113



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

“ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO PRELIMINAR DE *Epidendrum rigidum* Jaqc. (ORCHIDACEAE).”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: QUIMICA - FARMACEUTICA - BIOLOGA (FARMACIA)

P R E S E N T A : SANDRA ALICIA SANTILLAN HERNANDEZ

25036



MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

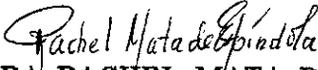
## JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE:** DRA. YOLANDA CABALLERO ARROYO  
**VOCAL:** DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
**SECRETARIO:** DRA. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ  
**PRIMER SUPLENTE:** M. en C. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ  
**SEGUNDO SUPLENTE:** M. en C. IRMA SUSANA ROJAS TOMÉ

## SITIO DE REALIZACIÓN DE LA TESIS:

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO 124 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM.

**ASESOR:**

  
DRA. RACHEL MATA DE ESPÍNDOLA.

**ASESOR TÉCNICO:**

  
M. en C. LAURA ALICIA ACEVEDO ARTEAGA.

**SUSTENTANTE:**

  
SANDRA ALICIA SANTILLÁN HERNÁNDEZ.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo económico otorgado a través del proyecto 27978N, que permitió la realización del trabajo experimental de esta tesis.

A la Coordinación de Superación Académica de la Facultad de Química, por la beca de Ayudante de Profesor B (Subprograma 127), proporcionada durante la realización de esta investigación.

Al Biólogo Gustavo Carmona por la recolección e identificación del material vegetal utilizado en este estudio.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz de los laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

A los siguientes profesores por el registro de los espectros de masas: I.Q. Luis Velasco Ibarra, M. en C. Javier Pérez Flores (Instituto de Química, UNAM) y a la Q. Georgina Duarte Lisci (USAI, Facultad de Química, UNAM).

A la Q.F.B. Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM) por el registro de los espectros de IR.

A la M en C. Laura Acevedo por su asesoría técnica proporcionada a lo largo de todo el presente trabajo de tesis.

A Olga y a Magdalena (prestadoras de servicio social) por su participación en la realización de la parte experimental de este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio 124, en especial a Tere, Mary Carmen, Samuel y Mitzi por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencia durante el desarrollo de mi trabajo de tesis. También les agradezco su apoyo y su valiosa ayuda.

A todos los miembros de mi jurado por sus observaciones y comentarios.

A la Dra. Rachel Mata, por haber aceptado la asesoría de mi tesis, brindándome su incondicional e invaluable ayuda en la realización de la misma. Con admiración y respeto le doy mi más grande y profundo agradecimiento.

## DEDICATORIAS

### ***A mi Mamá:***

Por todo el apoyo que me has brindado a lo largo de todos estos años de estudio. También te agradezco el ejemplo que siempre me has dado, ya que me has enseñado a que por medio de la tenacidad y la paciencia es posible alcanzar cualquier meta que me proponga.

### ***A mi Papá:***

Por que tu me has ayudado a forjar mi carácter y a soportar cualquier situación, por difícil que ésta sea.

### ***A mi hermana:***

Por tu entusiasmo y por todos los momentos que pasamos juntas.

### ***Angel:***

Por creer en mi y siempre apoyarme de manera incondicional durante los buenos y los malos tiempos. También agradezco tu amistad, así como la confianza y el cariño que me has proporcionado a lo largo de todos estos años.

***A mi abuelita***

Dedico mi tesis de licenciatura a la memoria de mi abuelita, que aunque no se encuentra físicamente presente, sé que me está apoyando ahora y que estará conmigo siempre.

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>Lista de Cuadros</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Espectros</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Esquemas</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xi</b>

## CONTENIDO

<b>I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b> Antecedentes generales de la familia Orchidaceae	<b>5</b>
<b>2.2</b> Generalidades sobre <i>Epidendrum rigidum</i> .	<b>5</b>
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b> Material vegetal.	<b>18</b>
<b>3.2</b> Procedimientos generales.	<b>18</b>
<b>3.2.1</b> Análisis cromatográficos.	<b>18</b>
<b>3.2.2</b> Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel analítico.	<b>20</b>
<b>3.2.3</b> Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo.	<b>20</b>
<b>3.2.4</b> Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.	<b>21</b>
<b>3.3</b> Evaluaciones biológicas.	<b>21</b>
<b>3.3.1</b> Evaluación del potencial fitotóxico.	<b>22</b>
<b>3.3.2</b> Método bioautográfico.	<b>23</b>
<b>3.3.3</b> Evaluación del efecto del compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi- bibencilo y el extracto íntegro de <i>E. rigidum</i> sobre la producción de biomasa en plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> .	<b>24</b>
<b>3.3.4</b> Determinación de la toxicidad para <i>Artemia salina</i> Leach.	<b>25</b>
<b>3.4</b> Estudio fitoquímico de <i>Epidendrum rigidum</i> .	<b>25</b>

3.4.1 Extracción de la planta.	25
3.4.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total.	26
3.4.3 Aislamiento y purificación de los compuestos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1), 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (batatasina II) [2] y el 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) a partir de la fracción primaria activa ER-VII.	28
3.4.4 Aislamiento y purificación del alcohol triacontánico (4) de la fracción primaria activa ER-IX.	33
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	<b>34</b>
4.1 Aislamiento de los productos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1), 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (batatasina II) [2], 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) y el alcohol triacontánico (4).	34
4.2 Caracterización de los productos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1), 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (batatasina II) [2], 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) y el alcohol triacontánico (4).	42
4.2.1 Caracterización del compuesto 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	42
4.2.2 Caracterización del compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1).	58
4.2.3 Caracterización del compuesto 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (2).	68
4.2.4 Caracterización del alcohol triacontánico (4).	75
4.4 Actividad biológica de los compuestos aislados de <i>Epidendrum rigidum</i> .	83

<b>V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.</b>	<b>86</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS.</b>	<b>87</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>88</b>

## LISTA DE CUADROS

Página

<b>Cuadro 1.</b> Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae.	10
<b>Cuadro 2.</b> Sistemas de elución utilizados en los análisis en capa fina.	19
<b>Cuadro 3.</b> Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la planta entera <i>Epidendrum rigidum</i> .	27
<b>Cuadro 4.</b> Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria ER-VII.	29
<b>Cuadro 5.</b> Fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción secundaria ER-VIII.	31
<b>Cuadro 6.</b> Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta del precipitado primario ER-IX-2b.	33
<b>Cuadro 7.</b> Efecto de fitoinhibición a nivel pre-emergente del extracto crudo de <i>E. rigidum</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> .	35
<b>Cuadro 8.</b> Efecto de fitoinhibición a nivel post-emergente del extracto crudo de <i>E. rigidum</i> sobre el crecimiento radicular y la producción de biomasa de la arvense <i>A. hypochondriacus</i> .	37
<b>Cuadro 9.</b> Efecto de toxicidad del extracto crudo de <i>Epidendrum rigidum</i> en el crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach.	38

## LISTA DE CUADROS (continuación)

Página

<b>Cuadro 10.</b> Efecto fitotóxico de las fracciones obtenidas de <i>E. rigidum</i> sobre el crecimiento radicular de la arvense <i>A. hypochondriacus</i> .	39
<b>Cuadro 11.</b> Metabolitos aislados de la especie <i>Epidendrum rigidum</i> .	41
<b>Cuadro 12.</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 4,7-dihidroxi-2,3- dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	43
<b>Cuadro 13.</b> Datos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δH) del producto 3.	44
<b>Cuadro 14.</b> Datos de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δC) del producto 3.	45
<b>Cuadro 15.</b> Correlaciones más importantes en el espectro de HMBC del producto 3.	49
<b>Cuadro 16.</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1).	58
<b>Cuadro 17.</b> Datos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δH) del producto 1.	59
<b>Cuadro 18.</b> Datos de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δC) del producto 1.	60
<b>Cuadro 19.</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del del compuesto 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (2).	68
<b>Cuadro 20.</b> Datos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δH) del producto 2.	69

## LISTA DE CUADROS (continuación)

	Página
Cuadro 21. Datos de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δC) del producto 2.	70
Cuadro 22. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del alcohol triacortanílico (4).	75
Cuadro 23. Datos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δH) del producto 4.	76
Cuadro 24. Inhibición del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> inducido por los compuestos 1 y 3.	83
Cuadro 25. Efecto de fitoinhibición a nivel post-emergente del compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo sobre el crecimiento y la producción de biomasa de la arvense <i>A. hypochondriacus</i> .	85

## LISTA DE ESPECTROS

	Página
<b>Espectro 1.</b> Espectro en el IR del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	50
<b>Espectro 2.</b> Espectro de masas del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	51
<b>Espectro 3.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	52
<b>Espectro 4.</b> Espectro COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	53
<b>Espectro 5.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	54
<b>Espectro 6.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C modalidad DEPT del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	55
<b>Espectro 7.</b> Espectro de HMBC del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	56
<b>Espectro 8.</b> Espectro de HMQC del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).	57
<b>Espectro 9.</b> Espectro en el IR del 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1).	64
<b>Espectro 10.</b> Espectro de masas del 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1).	65

## LISTA DE ESPECTROS (continuación)

	Página
<b>Espectro 11.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1).	66
<b>Espectro 12.</b> Espectro de HMBC del 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1).	67
<b>Espectro 13.</b> Espectro en el IR del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (2).	71
<b>Espectro 14.</b> Espectro de masas del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (2).	72
<b>Espectro 15.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (2).	73
<b>Espectro 16.</b> Espectro NOESY del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (2).	74
<b>Espectro 17.</b> Espectro en el IR del alcohol triacontanílico (4).	78
<b>Espectro 18.</b> Espectro de masas del alcohol triacontanílico (4).	79
<b>Espectro 19.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del alcohol triacontanílico (4).	80
<b>Espectro 20.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del alcohol triacontanílico (4).	81
<b>Espectro 21.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C modalidad DEPT del alcohol triacontanílico (4).	82

## LISTA DE ESQUEMAS

Página

**Esquema 1.** Proceso de extracción de la planta entera de *Epidendrum rigidum*. 26

## LISTA DE FIGURAS

Página

**Figura 1.** Distribución del género *Epidendrum* en América. 16

**Figura 2.** *Epidendrum rigidum* Jaqc. 17

**Figura 3.** Bioautografía de la fracción primaria ER-VII. 28

**Figura 4.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción activa ER-VIII(7). 32

**Figura 5.** Efecto herbicida post-emergente del extracto sobre las plántulas de *A. hypochondriacus*. 36

**Figura 6.** Correlaciones observadas en el espectro NOESY para el compuesto 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihydrofenantreno. 48

**Figura 7.** Correlaciones observadas en el espectro NOESY para el compuesto 3,4- dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo. 63

**Figura 8.** Efecto herbicida post-emergente del compuesto 1 ( $10^{-3}$  M) sobre las plántulas de *A. hypochondriacus*. 84

## LISTA DE ESQUEMAS

Página

**Esquema 1.** Proceso de extracción de la planta entera de *Epidendrum rigidum*. 26

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Distribución del género *Epidendrum* en América. 16
- Figura 2.** *Epidendrum rigidum* Jaqc. 17
- Figura 3.** Bioautografía de la fracción primaria ER-VII. 28
- Figura 4.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción activa ER-VIII(7). 32
- Figura 5.** Efecto herbicida post-emergente del extracto sobre las plántulas de *A. hypochondriacus*. 36
- Figura 6.** Correlaciones observadas en el espectro NOESY para el compuesto 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno. 48
- Figura 7.** Correlaciones observadas en el espectro NOESY para el compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo. 63
- Figura 8.** Efecto herbicida post-emergente del compuesto 1 ( $10^{-3}$  M) sobre las plántulas de *A. hypochondriacus*. 84

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
ANOVA	Análisis de varianza
cm	Centímetro
CL <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Correlated spectroscopy
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
$\delta$	Desplazamiento químico
DEPT	Distortionless enhancement polarization transfer
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doblete de doblete
Ev	Electrovolts
EM	Espectrometría de masas
°C	Grados centígrados
g	Gramos
Hz	Hertz

## **LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)**

<b>HETCOR</b>	<b>Heteronuclear correlation</b>
<b>HMBC</b>	<b>Heteronuclear multiple bond connectivity</b>
<b>HMQC</b>	<b>Heteronuclear multiple quantum coherence</b>
<b>Hex</b>	<b>Hexano</b>
<b>h</b>	<b>Horas</b>
<b>IR</b>	<b>Infrarrojo</b>
<b>[M<sup>+</sup> ]</b>	<b>Ión molecular</b>
<b>IPA</b>	<b>Isopropanol</b>
<b>Kg</b>	<b>Kilogramo</b>
<b>L</b>	<b>Litro</b>
<b>λ</b>	<b>Longitud de onda</b>
<b>MHz</b>	<b>Megahertz</b>
<b>MeOH</b>	<b>Metanol</b>
<b>Mv</b>	<b>Metilviológeno</b>
<b>μg</b>	<b>Microgramo</b>
<b>μL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramo</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

<b>mm</b>	<b>Milímetro</b>
<b>m</b>	<b>Multiplete</b>
<b>nm</b>	<b>Nanómetro</b>
<b>NOESY</b>	<b>Nuclear overhauser effect spectroscopy</b>
<b>p.f.</b>	<b>Punto de fusión</b>
<b>ppm</b>	<b>Partes por millón</b>
<b><i>m/z</i></b>	<b>Relación masa-carga</b>
<b>RMN</b>	<b>Resonancia magnética nuclear</b>
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	<b>Resonancia magnética nuclear de carbono-13</b>
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	<b>Resonancia magnética nuclear protónica</b>
<b><i>s</i></b>	<b>Singulete</b>
<b><i>se</i></b>	<b>Singulete ancho</b>
<b>TMS</b>	<b>Tetrametilsilano</b>
<b><i>t<sub>r</sub></i></b>	<b>Tiempo de retención</b>
<b>uma</b>	<b>Unidad de masa atómica</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>

## 1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

Los herbicidas son agentes capaces de controlar o eliminar aquellas plantas perjudiciales a la salud y economía humanas. Estos agentes indudablemente han jugado un papel importante en la protección de los cultivos de importancia hortícola, agrícola y forestal (Cremlyn, 1991; Worsham, 1989; Terry, 1991; Klocke, 1985). Los agentes herbicidas de uso actual, en su mayoría sintéticos, son de amplio espectro y por lo tanto son eficaces contra una amplia variedad de plantas nocivas. Desafortunadamente, estos productos ocasionan severos daños ecológicos debido a sus altos índices de persistencia. También debido a su poca selectividad, resultan tóxicos para los organismos blanco, el hombre y animales. Por último, el uso recurrente de los herbicidas contemporáneos ha ocasionado la aparición de numerosas especies de plagas resistentes a los tratamientos.

Considerando los severos y diversos problemas toxicológicos, ambientales y de salud ocasionados por el uso de los herbicidas sintéticos, recientemente se han propuesto estrategias alternas con la finalidad de proteger los cultivos de importancia económica. Estas estrategias implican, entre otras, el uso de herbicidas de origen natural (Benner, 1993; Pillmoor, 1993; Rodgers, 1993).

Con la finalidad de encontrar estos herbicidas naturales en los últimos años se ha intensificado la investigación de los productos naturales, tanto de origen vegetal como microbiano. En este contexto, cabe recordar que las plantas biosintetizan y acumulan una gran cantidad de metabolitos secundarios (semioquímicos) que les sirven como mecanismo de defensa contra el ataque de insectos, microorganismos y plantas nocivas.

En comparación con los insecticidas verdes, el número de metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad herbicida que ha alcanzado un desarrollo de tipo comercial es mínimo. Las plantas constituyen fuentes limitadas de agentes herbicidas que de insecticidas debido a que en primer lugar, la presión de selección ejercida por otras plantas en un mismo ecosistema es a menudo mucho menor que la presión ocasionada por microorganismos e insectos; por lo tanto, la biosíntesis de compuestos herbicidas no confiere tanto beneficio a las plantas de ese mismo ecosistema como la producción de metabolitos insecticidas. En segundo lugar, cualquier planta productora de un herbicida potencial debe ser inmune a los efectos del mismo.

A pesar de las consideraciones anteriores, muchos autores han postulado que las interacciones alelopáticas en un ecosistema particular, pueden constituir la base para el descubrimiento de aleloquímicos de utilidad para el desarrollo de herbicidas (Benner, 1993; Duke y Abbas, 1995; Macías, 1996; *inter alia*). De ahí, que la búsqueda de agentes herbicidas a partir del reino vegetal se encuentre también justificada.

Entre los aleloquímicos de origen vegetal que han demostrado una mayor actividad fitotóxica figuran una gran variedad de terpenoides (Macías, 1995; Fischer, 1985; Duke, 1991). Quizá el más importante de estos productos es el 1,8-cineol, descubierto en 1964 por Muller y Muller. Este herbicida es poco tóxico y no se acumula en el medio ambiente, además es altamente efectivo para combatir pastos nocivos. Tanto el 1,8-cineol como su derivado semisintético inhiben el proceso de la respiración.

Los compuestos aromáticos también han constituido aleloquímicos útiles para el desarrollo de agentes herbicidas y quizás el más importante a la fecha es el ácido benzoico,

el cual permitió el desarrollo comercial del cloramben, el dicamba y el picloram, por tan solo mencionar algunos ejemplos. Otros compuestos aromáticos con una buena actividad inhibidora del crecimiento vegetal incluyen la hypericina, la juglona, el DIBOA, algunos derivados de los ácidos cinámico y salicílico y compuestos de naturaleza cumarínica (Duke y Abbas, 1995). También varias quinonas fenólicas como la sorgoleona, la juglona y la lawsona destacan por sus propiedades fitotóxicas significativas (Duke y Lyndon, 1987; Einhellig y Souza, 1992).

Con base en las consideraciones anteriores los objetivos del presente proyecto son los siguientes:

- 1.- Establecer el potencial herbicida de la especie *Epidendrum rigidum* mediante la determinación del efecto pre y post emergente del extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1) de la planta entera.
- 2.-Aislar y caracterizar algunos de los constituyentes que presenten actividad fitotóxica pre-emergente y postemergente, con la finalidad de obtener compuestos de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.
- 3.-Contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas y del contenido metabólico secundario de orquídeas mexicanas, que a pesar de su gran abundancia en el territorio mexicano, han sido objeto de pocos estudios científicos.

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

1.- Preparar el extracto vegetal en gran escala de la planta entera de *E. rigidum*, mediante un proceso de maceración, empleando una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) como disolvente de extracción.

2.-Determinar la potencialidad fitotóxica del extracto crudo de *E. rigidum* mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radicular y la germinación de semillas de las especies vegetales *Amaranthus hypochondriacus* (Amarantaceae) y *Echinochloa crusgali* (Gramineae) utilizando el método de la caja Petri.

3.- Evaluar el efecto del extracto íntegro sobre la producción de biomasa de *A. hypochondriacus*.

4.-Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto crudo mediante un proceso de cromatografía en columna abierta, empleando el bioensayo indicado en el inciso 2 y un método bioautográfico.

5.-Separar y purificar los compuestos activos de alguna de las fracciones más activas, mediante el empleo de técnicas cromatográficas convencionales.

6.-Determinar la fitotoxicidad de los compuestos puros, por medio de la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento radicular y la germinación de *A. hypochondriacus* (Amarantaceae) y *E. crusgali* (Gramineae) utilizando el método de caja Petri.

7.-Realizar la elucidación estructural de los compuestos activos aislados mediante el empleo de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes generales de la familia Orchidaceae.

La familia Orchidaceae constituye la más numerosa de todo el reino vegetal ya que incluye alrededor de treinta y cinco mil especies agrupadas en setecientos cincuenta géneros, cinco subfamilias y 19 tribus. Originalmente estas se clasificaron en la familia Liliaceae, aunque estudios posteriores permitieron su agrupación como una familia independiente (Dressler, 1993).

Las orquídeas se pueden clasificar en terrestres, epífitas, litofíticas, semiacuáticas o subterráneas, dependiendo del lugar donde se desarrollan. Las epífitas son plantas que crecen sobre otras plantas hospederas, por lo general árboles, pero sin tener un contacto directo con los haces vasculares de las mismas. En consecuencia, las epífitas falsamente llamadas parásitas, no extraen agua ni nutrientes de sus hospederos (Dressler, 1981).

Aunque la familia Orchidaceae se distribuye a través de todo el mundo, la mayor parte de las especies de orquídeas se encuentran en las regiones tropicales (Williams, 1979; Hietz, 1994) o subtropicales del mundo, por lo que la mayor concentración de orquídeas se encuentra en las montañas, a 20 grados del ecuador. La concentración de estas especies en

7.-Realizar la elucidación estructural de los compuestos activos aislados mediante el empleo de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes generales de la familia Orchidaceae.

La familia Orchidaceae constituye la más numerosa de todo el reino vegetal ya que incluye alrededor de treinta y cinco mil especies agrupadas en setecientos cincuenta géneros, cinco subfamilias y 19 tribus. Originalmente estas se clasificaron en la familia Liliaceae, aunque estudios posteriores permitieron su agrupación como una familia independiente (Dressler, 1993).

Las orquídeas se pueden clasificar en terrestres, epífitas, litófitas, semiacuáticas o subterráneas, dependiendo del lugar donde se desarrollan. Las epífitas son plantas que crecen sobre otras plantas hospederas, por lo general árboles, pero sin tener un contacto directo con los haces vasculares de las mismas. En consecuencia, las epífitas falsamente llamadas parásitas, no extraen agua ni nutrientes de sus hospederos (Dressler, 1981).

Aunque la familia Orchidaceae se distribuye a través de todo el mundo, la mayor parte de las especies de orquídeas se encuentran en las regiones tropicales (Williams, 1979; Hietz, 1994) o subtropicales del mundo, por lo que la mayor concentración de orquídeas se encuentra en las montañas, a 20 grados del ecuador. La concentración de estas especies en

los trópicos americanos varía con la altitud, encontrándose el mayor número de especies en México, Guatemala, Honduras, Colombia, Venezuela y Brasil (Dressler, 1981).

En México las orquídeas se distribuyen principalmente en cuatro estados: Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero. Otros estados con una cifra considerable de especies son: el estado de México, Morelos, Michoacán y las regiones más bajas de Puebla y San Luis Potosí (Ames y Correll, 1952). A nivel mundial se pueden encontrar desde el Norte de Suecia y Alaska, a Tierra de Fuego y la Isla Macquarie. Las orquídeas son muy escasas en ambientes desérticos, aunque se pueden encontrar en oasis y cañones desérticos (Dressler, 1981).

Debido a la belleza de sus flores, las orquídeas son apreciadas en todo el mundo. Su importancia económica entonces, radica en su uso ornamental. Un ejemplo lo constituyen las orquídeas del género *Phalaenopsis*, procedentes de Asia y Australasia, (Tatsuzawa, *et al.*, 1997).

A pesar de su gran abundancia, sólo algunas especies han sido empleadas con otros fines. En algunas culturas orientales se ha reportado el uso de los tubérculos de ciertas especies del género *Orchis* para la producción de harinas (salep) con propiedades reconstituyentes y analépticas (Ames y Correll, 1952; Stoessl y Arditti, 1984). En la India, Turquía y el Tíbet algunas especies de este mismo género se agregan al vino como alimento y se ha demostrado que poseen propiedades afrodisiacas (Zimmermann, 1959).

Además existen otras especies que son utilizadas en la medicina tradicional, debido a que poseen propiedades curativas; tal es el caso de las flores de la especie *Angraecum fragans* las cuales se han utilizado como calmante, diaforético, digestivo y expectorante

(Zimmermann, 1959). Algunas especies de *Cattleya*, se emplean en el tratamiento de hipotensión ya que poseen un alto contenido de tiramina (Stoessi y Arditti, 1984).

Las raíces de *Cypripedium reginae* (Valeriana Americana) se utilizan en América del Norte, por sus propiedades tranquilizantes (Stoessi y Arditti, 1984). La especie *Dendrobium nobile* ha sido utilizada desde tiempos ancestrales en China como tónico, antipirético, y para el tratamiento de desordenes gastrointestinales y de la anorexia (Onaka *et al.*, 1965; Miyazawa *et al.*, 1997). Recientemente se descubrió que el extracto metanólico de *D. nobile* posee actividad antimutagénica ya que inhibe los efectos del mutágeno furofuramida (Miyazawa *et al.*, 1997). Además, la especie *D. plicatile* Lindl. es utilizada para la obtención de la droga cruda china "Shi Hu", la cual también es utilizada como tónico y antipirético (Yamaki y Honda, 1996).

El rizoma de *Gastrodia elata* se usa en la medicina China para promover la circulación sanguínea y para la cura de dolores de cabeza. Los tubérculos cocidos y secos de ésta orquídea se conocen con el nombre de "Tianma" en China y se prescriben para el tratamiento del reumatismo y la parálisis (Noda *et al.*, 1995). Estudios farmacológicos recientes sugieren que el extracto crudo de esta especie posee efectos sedativos y analgésicos, ocasionando un incremento del flujo sanguíneo del corazón y del cerebro, disminuyendo así la resistencia de los vasos sanguíneos. Además el extracto induce resistencia a la hipoxia. En la práctica clínica se utiliza para curar la neurastenia, el síndrome neurasténico y el dolor de cabeza vasoneuronal (Wu *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1995). También se ha demostrado que el extracto acuoso de *G. elata* posee actividad antioxidante y

que su extracto metanólico presenta un efecto moderado sobre los procesos de aprendizaje y memoria (Wu et al., 1996).

*Nervilia purpurea* se emplea en la medicina tradicional de Taiwan (I-tiam-hong), para el tratamiento de heridas y de la hipertensión; por otro lado *N. aragoana* se usa para el tratamiento de la crisis visceral, enfermedades pulmonares e hipertensión (Kikuchi et al., 1985). Los tubérculos de *Pleione bulbocodioides* (Shan-ci-gu) se utilizan en la medicina popular china para el tratamiento de tumores (Bai et al., 1996 y 1997).

La especie mexicana *Scaphyglottis livida* aplicada de manera tópica es utilizada para eliminar ectoparásitos. La decocción de la planta entera se emplea para aliviar dolores de estómago y evitar el aborto. Un estudio farmacológico reciente de esta especie permitió validar su uso popular como un agente antiespasmódico, ya que el extracto íntegro y algunos de sus metabolitos inhiben las contracciones espontáneas del íleon de rata, así como las inducidas por diversos antagonistas. En este estudio se encontró que algunos fenantrenos (Coelonina, 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno y 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno) y estilbenoides (3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo y batatasina III) inhiben las contracciones espontáneas del íleon de rata; el efecto de los compuestos aislados es dependiente de la concentración y la potencia comparable o mayor a la de la papaverina. Evidencias farmacológicas y bioquímicas indicaron que la actividad espasmolítica de los productos naturales se encuentra mediada por el sistema óxido nítrico/ GMPc (Estrada et al., 1999a).

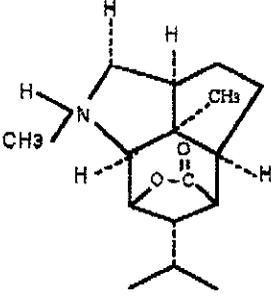
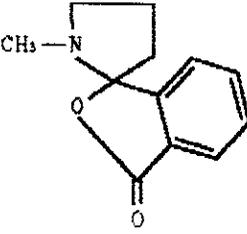
Finalmente a partir de la especie *Vainilla planifolia* se obtiene la esencia de vainilla, la cual se emplea como un condimento y como un agente saborizante, en la industria alimenticia, principalmente en la manufactura de chocolate y de helado. También se emplea

en la industria de la perfumería para la elaboración de jabones, cremas y perfumes (Mc Vaugh, 1985). El aldehído vanilina es el principio aromatizante y saborizante presente en el extracto de vainilla (Arctander, 1969). Un inconveniente de la manipulación de las cápsulas de *Vainilla planifolia* consiste en que produce una intoxicación conocida como vanillismo (Hutchinson, 1892/93; Drevon, 1899) la cual se caracteriza por la aparición de una dermatitis severa (Layet, 1883). Por otra parte, el consumo de la vainilla puede ocasionar, en personas sensibles, erupciones, inflamaciones de manos y cara, malestar generalizado, dolor de cabeza y náuseas (Millan, 1936).

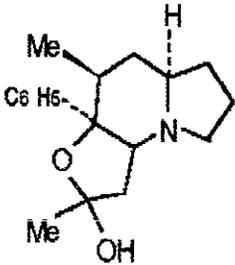
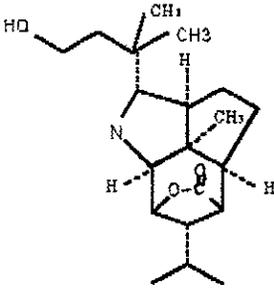
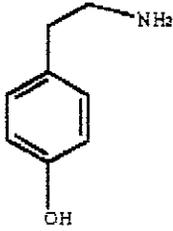
Los estudios relacionados con el metabolismo secundario de la familia Orchidaceae son relativamente escasos. A pesar de esto se han podido aislar compuestos aromáticos simples (Harborne y Williams, 1994), estilbenoides (Majumder *et al.*, 1997), fenantrenos (Majumder y Laha, 1981; Majumder *et al.*, 1982a, 1982b, 1982c ; Majumder y Maiti, 1987; Veerajju, 1989; Tezuka *et al.*, 1991; Harborne y Williams, 1994; Leong *et al.*, 1997; *inter alia*), alcaloides (Brandange *et al.*, 1971; Brandange *et al.*, 1973; Luning *et al.*, 1966; Blomqvist *et al.*, 1972; Lindstrom *et al.*, 1969; Hemscheidt, 1993; Onaka *et al.*, 1965; Okamoto *et al.*, 1966; *inter alia*), triterpenoides (Afza *et al.*, 1989; Govardham *et al.*, 1984; Kikuchi *et al.*, 1981, 1982, 1985a, 1985b; Kadota *et al.*, 1987; Mahato *et al.*, 1992; Majumder y Kar, 1989; Majumder y Pal, 1985a, 1990; Das *et al.*, 1983; *inter alia*), flavonoides (Williams, 1979; Williams *et al.*, 1994; Kuehnle *et al.*, 1997), pirenos (Anuradha *et al.*, 1995;), lignanos y cromanos (Bai *et al.*, 1996).

En el cuadro 1 se muestran ejemplos selectos de los distintos tipos de metabolitos presentes en las orquídeas.

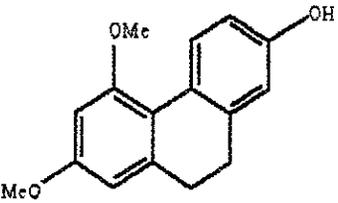
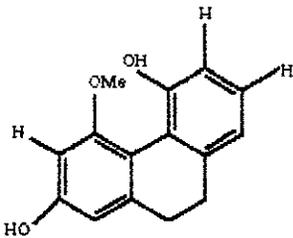
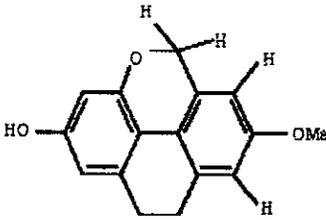
**Cuadro 1 . Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de la familia Orchidaceae.**

<b>ALCALOIDES</b>		
<b>Fuente natural</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Referencia</b>
<i>Dendrobium nobile</i>	 <p style="text-align: center;"><b>Dendrobina</b></p>	Slayter, 1977
<i>Dendrobium lotohense</i>	 <p style="text-align: center;"><b>Shihunina</b></p>	Inubushi <i>et al.</i> , 1964, 1968

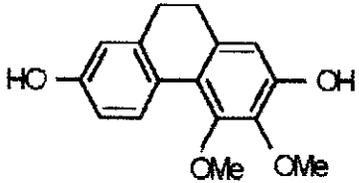
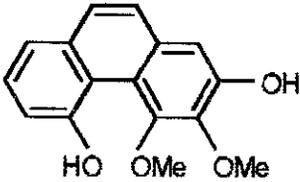
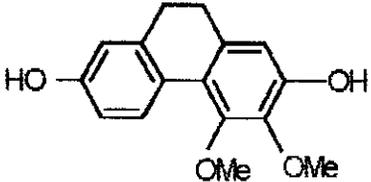
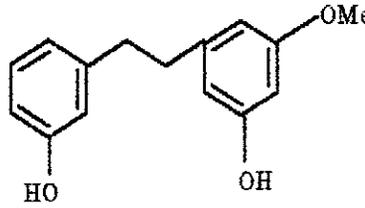
ALCALOIDES

Fuente natural	Compuesto	Referencia
<p><i>Dendrobium crepidatum</i></p>	 <p>Isorepidamina</p>	<p>Elander, 1973</p>
<p><i>Dendrobium wardianum</i></p>	 <p>Dendrowardina</p>	<p>Blomqvist <i>et al.</i>, 1972</p>
<p><i>Catleya sp.</i></p>	 <p>Tiramina</p>	<p>Maille <i>et al.</i>, 1974</p>

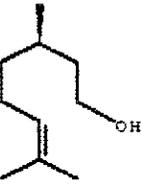
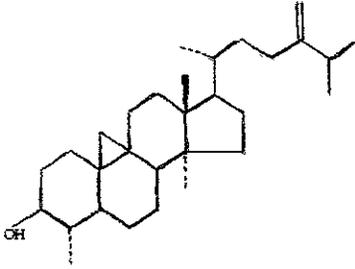
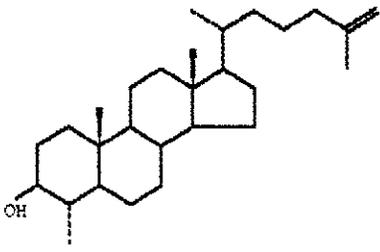
**COMPUESTOS DEL TIPO FENANTRENO**

Fuente natural	Compuesto	Referencia
<i>Orchis militaris</i>	 <p align="center">Orcinol</p>	Bevan <i>et al.</i> , 1965
<i>Oroglossum hircinum</i>	 <p align="center">Hircinol</p>	Urech <i>et al.</i> , 1963
<i>Dendrobium pierardii</i>	 <p align="center">Flavinidina</p>	Majumder <i>et al.</i> , 1982

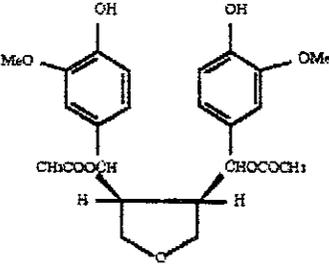
**COMPUESTOS DEL TIPO FENANTRENO**

Fuente natural	Compuesto	Referencia
<i>Maxilaria densa</i>		Estrada <i>et al.</i> , 1999b
<i>Maxilaria densa</i>		Estrada <i>et al.</i> , 1999b
<i>Maxilaria densa</i>		Estrada <i>et al.</i> , 1999b
<i>Dendrobium densiflorum</i>	 <p align="center"><b>Batatasina III</b></p>	Veeraju, 1989

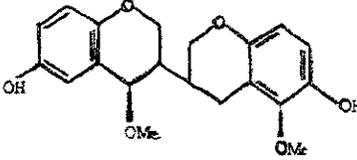
TERPENOIDES

Fuente natural	Compuesto	Referencia
<i>Ophrys splendida</i>	 <p>Citronelal</p>	Karin <i>et al.</i> , 1986
<i>Nerilia purpurea</i>	 <p>Ciceucalenol</p>	Kikuchi <i>et al.</i> , 1985
<i>Eria convalarioides</i>	 <p>Erianol</p>	Majumder y Kar, 1989

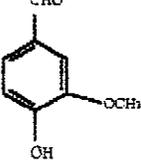
## LIGNANOS

Fuente natural	Compuesto	Referencia
<i>Pleione bulbocodioides</i>	 <p style="text-align: center;">Sanjidina B</p>	Bai <i>et al.</i> , 1997

## CROMANOS

Fuente natural	Compuesto	Referencia
<i>Pleione bulbocodioides</i>	 <p style="text-align: center;">Pleionina</p>	Bai <i>et al.</i> , 1997

## COMPUESTOS AROMATICOS SIMPLES

Fuente natural	Compuesto	Referencia
<i>Vanilla planifolia</i>	 <p style="text-align: center;">Vanillina</p>	Hausen, 1984

## 2.2. Generalidades sobre *Epidendrum rigidum*.

El género *Epidendrum* L se encuentra constituido por plantas epífitas, que crecen en rocas o son terrestres; sus tamaños varían desde muy pequeñas hasta largas y robustas ( 3 m o más largas), con o sin un rizoma conspicuo. Las ramas pueden ser delgadas o pseudobulbos cilíndricos que poseen hojas sólo en la cima, con más o menos hojas, simples o muy ramificadas. La forma de las hojas varía de lineal a oval. Estas plantas presentan comúnmente inflorescencia terminal, raramente lateral. Los pétalos son usualmente más estrechos que los sépalos (Ames y Correl, 1952).

El género *Epidendrum* es el más grande de las orquídeas neotropicales y comprende aproximadamente 800 especies, ampliamente dispersas desde el sureste de Carolina del Norte hasta el Oeste de Luisiana en la Costa del Golfo, a través de México, América Central hasta Argentina (Fig 1).



Figura 1. Distribución del género *Epidendrum* en América.

*Epidendrum rigidum* Jacq. es una epífita de hasta 30 cm de alto que crece en los árboles de los bosques tropicales y en áreas donde crecen cipreses, a una altitud de 1400 m. Se distribuye desde el estado de Florida en Estados Unidos hasta Venezuela; en México es particularmente abundante (Ames y Correl, 1952; Wright, 1958). La planta consta de un rizoma trepador frecuentemente ramificado, tallos comprimidos y hojas alternas. La espiga es dística y las hojas son articuladas, de oblongas elípticas a oblongas lineales, miden de 2.5 a 12.5 cm de largo y de 6 a 22 mm de ancho.

Las flores se encuentran formando racimos de pocos o muchos miembros esparcidos, de más de 15 cm de largo. La mayoría de las flores miden de 9 a 25 mm de largo y de 7 a 10 mm de ancho en la base cuando se propaga y su color varía de verde a verde amarillento (Ames *et al.*, 1952); florece de mayo a noviembre (Ibarra-Manríquez y Sinaca Colín, 1996) (Fig. 2).



Figura 2. *Epidendrum rigidum* Jacq.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material vegetal

El material vegetal *Epidendrum rigidum* se recolectó en el Ejido Ruiz Cortínez, Catemaco Veracruz, México, en Marzo de 1997 (Voucher: Carmona 97:1).

Los procesos de recolección e identificación del material vegetal estuvieron a cargo del Biólogo Gustavo Carmona Díaz. Un ejemplar de referencia se encuentra depositado en el herbario del Instituto de Ecología A.C. (XAL), Jalapa, Veracruz. La desecación del material vegetal se realizó a temperatura ambiente, y su fragmentación se efectuó utilizando un molino Willey Modelo 4.

#### 3.2. Procedimientos generales.

##### 3.2.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en columna abierta se realizaron siguiendo la técnica convencional, utilizando para ello columnas de vidrio de diferentes capacidades, las cuales se empacaron con gel de sílice Merck 60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM.

En los análisis cromatográficos cualitativos en capa delgada se emplearon placas de aluminio con un espesor de 0.25 mm (sílica gel 60 F254 Merck). Para los análisis cromatográficos preparativos se usaron placas de vidrio de 20x20 cm recubiertas con gel de sílice, con un espesor de 0.25 mm (sílica gel 60 F254 Merck).

En los tres casos se utilizaron los sistemas de elución enlistados en el siguiente cuadro:

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

Sistema de eluyentes	Composición	Proporción
A	Hexano-cloroformo	Diversas
B	Hexano-AcOEt	Diversas
C	Cloroformo-AcOEt	Diversas
D	Cloroformo-MeOH	Diversas
E	AcOEt-MeOH	Diversas

En los análisis cromatográficos en capa fina, las placas se visualizaron primero con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm) y se revelaron utilizando sulfato cérico como agente cromógeno. Para el desarrollo de color fue necesario calentar unos segundos, utilizando una parrilla eléctrica.

Para realizar los análisis en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), se utilizó un cromatógrafo Waters equipado con una bomba 600E con un sistema de entrega de disolventes múltiple y un sistema de bombeo de gradiente a baja presión, provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i. Para visualizar los compuestos se empleó un detector de Ultravioleta/Visible 996. El equipo está acoplado a una computadora Venturis 575 y consta de un sistema administrador Millennium 2010 con un software de arreglo de fotodiodos (PDA), el sistema adquiere datos y controla el detector y la bomba. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

### **3.2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel analítico.**

El método de cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel analítico conduce a la optimización de las condiciones instrumentales necesarias para lograr la máxima resolución de la mezcla objeto de análisis y separar posteriormente a nivel preparativo los constituyentes individuales de la misma. Los análisis se realizaron en una columna empacada con gel de sílice  $\mu$ porasil con un tamaño de partícula de 10  $\mu$ m y un tamaño de poro de 125  $\text{Å}$ . El diámetro interno de la columna es de 3.9 mm y la longitud de 300 mm. La concentración de las muestras problema utilizadas en estos análisis fue de 0.5 mg en un volumen inyectado de 20  $\mu$ L. La elución se realizó con un sistema de gradiente y la fase móvil consistió en una mezcla ternaria constituida por hexano-metanol-isopropanol. La velocidad de flujo fue de 0.35 ml/min. La longitud de onda determinada para UV fue 266 nm.

### **3.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo.**

Una vez determinadas las condiciones a nivel analítico, se realizó el escalamiento a nivel preparativo lo que permitió la separación y purificación de los constituyentes de la fracción terciaria activa ER-VIII(7).

Se utilizó una columna preparativa empacada con gel de sílice  $\mu$ porasil con un tamaño de partícula de 10  $\mu$ m y un tamaño de poro de 125  $\text{Å}$ . El diámetro interno de la columna es de 19 mm y la longitud de 300 mm. Para todas las separaciones se utilizó el sistema de disolventes indicado en el inciso anterior. En todos los casos se recurrió a la técnica de corte

de núcleo y reciclado de muestra que consiste en someter a los picos mayoritarios a un corte, eliminando la contaminación causada por los componentes minoritarios eluidos antes y después del pico de interés (Hostettmann, 1986).

#### **3.2.4. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.**

El punto de fusión de los compuestos se determinó en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros en el IR se registraron en los espectrofotómetros de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599-B o Nicolet FT-5X, utilizando la técnica de pastilla de KBr.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de Carbono-13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) se generaron en un aparato Varian VXR-3005 a una frecuencia de 300 ó 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 75 ó 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Los espectros se obtuvieron utilizando como disolvente  $\text{CDCl}_3$  y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades de desplazamiento (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Hewlett-Packard 5890-B serie II. El voltaje utilizado para el registro de los espectros de masas fue de 70 Ev. Todos estos análisis se realizaron en el Instituto de Química, UNAM.

### **3.3. Evaluaciones biológicas.**

### 3.3.1 Evaluación del potencial fitotóxico.

La determinación del potencial fitotóxico del extracto, de cada una de las fracciones primarias y de los compuestos obtenidos, se realizó mediante los bioensayos de germinación de semillas y crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* (Amarantaceae) y *E. crusgalli* (Gramineae), siguiendo la metodología 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. Las muestras (extracto, fracciones y compuestos) se disolvieron en el disolvente apropiado y se prepararon disoluciones para obtener las concentraciones finales de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Un mililitro de cada una de estas disoluciones conteniendo las concentraciones apropiadas se adicionó en las cajas de Petri sobre un disco de papel filtro (Whatman No. 1) y se dejó evaporar el disolvente por medio de una corriente de aire.

Una vez evaporado el disolvente, se adicionaron 3 mL de agua destilada sobre el papel de filtro y se colocaron 10 semillas de cada una de las especies vegetales de prueba en cada caja. Las cajas de Petri se incubaron a 30°C y la actividad fitotóxica se registró calculando el porcentaje de germinación y midiendo la longitud de las radículas a las 24 horas en el caso de *A. hypochondriacus* y a las 48 horas en el caso de *E. crusgalli*.

Se utilizó al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como un control positivo (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Como controles negativos se emplearon agua destilada y el disolvente

utilizado en la preparación de las soluciones de las muestras objeto de evaluación. La concentración inhibitoria media se calculó por medio de un análisis Probit a partir de los porcentajes de inhibición calculados.

### 3.3.2. Método bioautográfico.

El método bioautográfico se realizó sobre placas cromatográficas de 20x5 cm recubiertas con gel de sílice. En cada placa se sembraron 10 mg del extracto; posteriormente se efectuó la elución utilizando la mezcla de disolventes apropiada. Al cabo del proceso de elución se evaporó el disolvente y las cromatoplasmas se cubrieron con 20 mL de una suspensión de agar al 1%; se realizaron dos réplicas en todos los casos. Paralelamente se eluyeron dos placas sin muestra problema las cuales se utilizaron como testigo. Posteriormente, cada una de las placas cromatográficas se cubrió completamente con las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgali*. Las placas con las semillas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas (*A. hypochondriacus*) ó 48 horas (*E. crusgali*) en una atmósfera húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la zona de inhibición y se midió su correspondiente Rf (Inohue, 1992). Este último procedimiento se realizó por medio de la comparación con una placa conteniendo la muestra eluida en las mismas condiciones y revelada con el agente cromógeno apropiado.

Esta prueba es cualitativa y se utiliza para determinar cual o cuales compuestos presentes en una fracción poseen actividad fitoinhibidora.

### 3.3.3. Evaluación del efecto del compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo y el extracto íntegro de *E. rigidum* sobre la producción de biomasa en plántulas de *A. hypochondriacus*.

Para realizar este bioensayo se emplearon seis semillas de la arvense *A. hypochondriacus* y se colocaron en recipientes conteniendo tierra. Las plantas se desarrollaron durante tres semanas en una cámara de crecimiento a 28°C y un ciclo de 12 h de luz-oscuridad ( $236\mu\text{Em}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ). Transcurrido este tiempo, se trasladaron a una segunda cámara, para completar su ciclo de crecimiento. Las condiciones de temperatura y fotoperiodo fueron 17-20°C y 16x8 (5:30x 21:30), respectivamente.

Después de una semana de adaptación de las plantas a las condiciones antes descritas, se aplicaron las muestras objeto de estudio mediante un isopo. El extracto se evaluó a concentraciones de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  y el compuesto puro a concentraciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M.

Para determinar la producción de biomasa, las plántulas se removieron de la tierra y las raíces se lavaron con agua destilada hasta eliminar por completo los residuos de tierra. Una vez lavadas se procedió a determinar el peso fresco de cada una de las plántulas. También se realizó la medición de la longitud de los tallos (Hoagland, 1996).

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se emplearon Tween 80 (0.1mL/L) y H<sub>2</sub>O como controles negativos para cada caso. El metilviológeno (paraquat) se utilizó como un control positivo a una concentración de  $10^{-3}$  M.

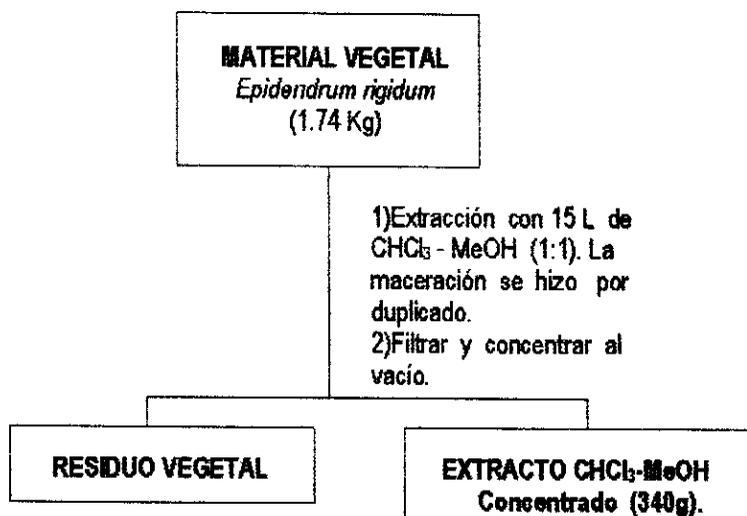
### **3.3.4 Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* Leach.**

Los huevecillos del crustáceo *Artemia salina* se incubaron en un medio salino artificial por 48 horas. Al término de este tiempo los crustáceos se encuentran en disposición de ser utilizados para el bioensayo. Cada una de las muestras se prepararon disolviendo 20 mg de la muestra de prueba (extracto, fracciones y compuestos) en 2 mL del disolvente apropiado. De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500  $\mu\text{L}$  a frascos viales de manera independiente y por triplicado. El disolvente se evaporó a sequedad a temperatura ambiente o al vacío. Diez crustáceos se transfirieron a cada frasco vial con las muestras de prueba y se aforó con un medio salino artificial a 5 ml para obtener las concentraciones finales de 1000, 100 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Los frascos se mantuvieron con iluminación artificial durante 24 horas; transcurrido este tiempo se procedió a contar el número de crustáceos sobrevivientes. Para el cálculo de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) se utilizó el programa de análisis de probabilidad de Finney. Para que un extracto o fracción se considere activo, la  $CL_{50}$  debe ser menor a 1000  $\mu\text{g/mL}$  y en el caso de un compuesto puro, la  $CL_{50}$  debe ser menor a 200  $\mu\text{g/mL}$  (Anderson *et al.*, 1991).

## **3.4. Estudio fitoquímico de *Epidendrum rigidum*.**

### **3.4.1. Extracción de la planta.**

El material seco y molido (1.74 Kg) se extrajo por medio de un proceso de maceración con 15 litros de una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1). Este proceso permitió la obtención de 340 g de extracto crudo. En el **esquema 1** se resume el procedimiento empleado.



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

### **3.4.2. Fraccionamiento preliminar del extracto total.**

El extracto total (340 g) se fraccionó en una columna cromatográfica de vidrio, utilizando como adsorbente 800 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetato de etilo (diversas proporciones), acetato de etilo, y acetato de etilo-metanol (diversas proporciones). Se recolectaron 41 fracciones de 1000 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose las que son cromatográficamente similares. Este proceso generó 13 grupos de fracciones primarias (ER-I - ER-XIII). El proceso cromatográfico antes descrito se resume en el Cuadro 3.

Cada una de las fracciones primarias se evaluaron mediante el bioensayo descrito en el inciso 3.3.1, resultando activas las fracciones ER-V a ER -IX.

**Cuadro 3. Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la planta entera *Epidendrum rigidum*.**

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-8	1-11	ER-I	6.7140
Hexano- AcOEt	95:05	9-15	12-15	ER-II	3.5037
	90:10	16-17	16-17	ER-III	3.4744
	80:20	18-21	18	ER-IV	8.3811
	70:30	22-24	19	ER-V *	2.0794
	60:40	25-27	20-21	ER-VI *	6.8106
	50:50	28-29	22-23	ER-VII*	8.1414
	40:60	30-31	24	ER-VIII*	5.2731
	30:70	32-33	25-31	ER-IX *	31.8849
AcOEt	100	34-35	32-36	ER-X	22.1340
AcOEt-	90:10	36-37	37-38	ER-XI	10.7145
MeOH	50:50	38-39	39-40	ER-XII	1.2091
MeOH	100	40-41	41	ER-XIII	3.0404

\* Fracciones activas.

3.4.3. Aislamiento y purificación de los compuestos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1), 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (batatasina III) [2] y el 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) a partir de la fracción primaria activa ER-VII.

El fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa ER-VII (8.1414g) (Cuadro 3) se realizó utilizando una columna cromatográfica de vidrio, y como adsorbente 200 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetato de etilo (diversas proporciones) y acetato de etilo. Se recolectaron 420 fracciones de 80 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose las que son cromatográficamente similares. Este proceso generó 12 grupos de fracciones secundarias (ER-VIIa –ER-VIII). De acuerdo al análisis bioautográfico (Figura 3) la actividad fitotóxica se concentró en las fracciones secundarias ER-VIII y ER-VIIg.

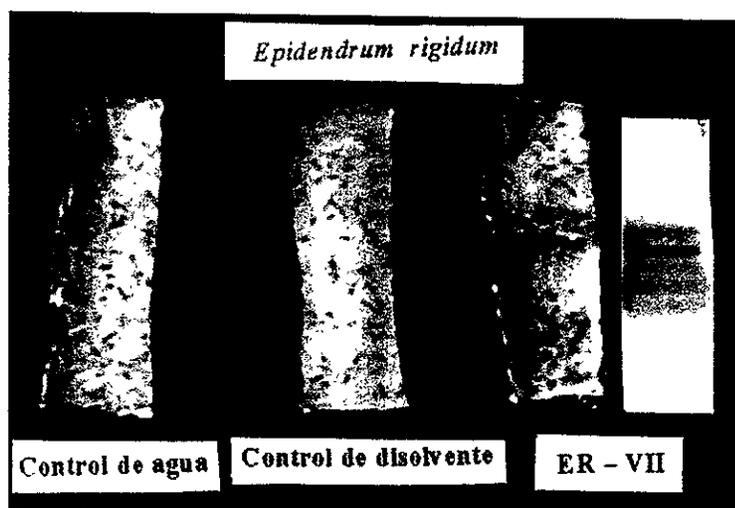


Figura 3. Bioautografía de la fracción primaria ER-VII.

**Cuadro 4. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria ER-VII.**

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-20			
Hexano- AcOEt	95:5	21-44	1-26	ER-VIIa	27.4
	90:10	45-327	27-49	ER-VIIb	6.9
	85:15	328-355	50	ER-VIIc	1.0
	80:20	356-379	51-74	ER-VII d	30.5
	70:30	380-395	75-79	ER-VIIe	2.7
	50:50	396-400	80-104	ER-VII f	93.3
			105-187	ER-VII g	712.7
			188-223	ER-VII h	213.8
			224-287	ER-VII i	1149.5
			288-319	ER-VII j	97.1
		320-397	ER-VII k	811.8	
AcOEt	100	401-410	398-410	ER-VIII	212.0

De la fracción secundaria ER-VIIg precipitó de manera espontánea un producto incoloro y cristalino (6 mg), con un punto de fusión de 162-163°C. (**Cuadro 4**). Cabe destacar que el resto de la fracción contenía fundamentalmente este producto.

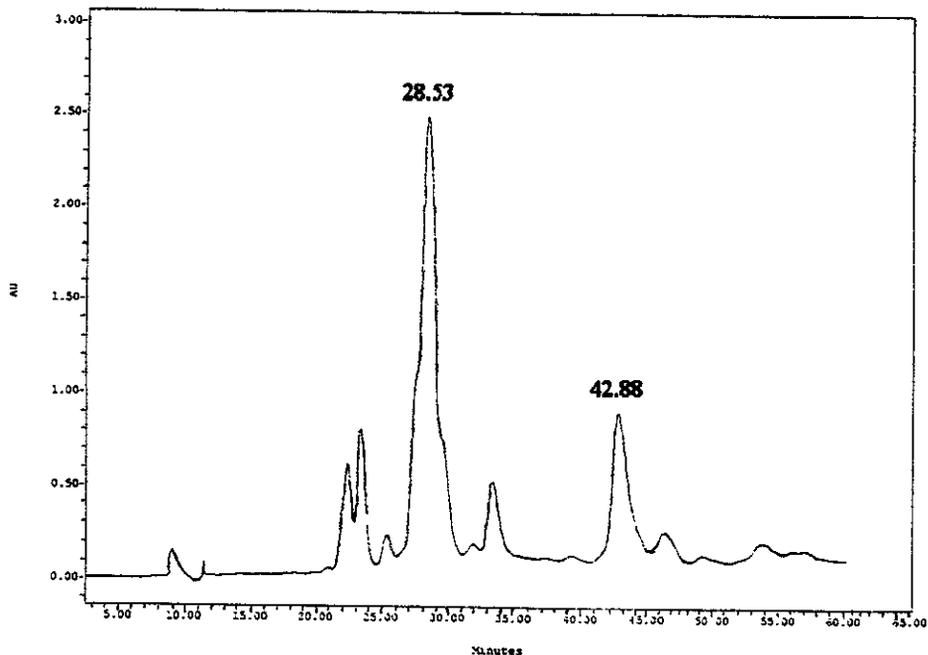
Posteriormente la fracción activa secundaria ER-VIII (1.1495 g) se sometió a un fraccionamiento terciario, utilizando de nueva cuenta una cromatografía en columna sobre gel de sílice (15 g). El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-cloroforno (diversas proporciones), cloroforno, cloroforno-acetato de etilo (diversas proporciones) y acetato de etilo. Se recolectaron 410 fracciones de 6 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose las similares y generando 15 grupos de fracciones terciarias (ER-VIII(1) a ER-VIII(15)). A partir de este fraccionamiento se obtuvo la fracción terciaria activa VIII(7) (60.7 mg) bajo la forma de un aceite rojo constituido por dos productos mayoritarios (**Cuadro 5**). La separación de estos productos se realizó mediante la aplicación de la CLAR.

Para realizar la resolución de la fracción activa ER-VIII(7), primero se determinaron las condiciones a nivel analítico. Posteriormente, se realizó el escalamiento a nivel preparativo.

El cromatograma resultante se observa en la **figura 4**. La purificación de los residuos que corresponden a los picos mayoritarios (1-2) permitió la obtención de los compuestos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo ( $t_R$  de 28.53 min.) y 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo ( $t_R$  de 42.88 min.).

**Cuadro 5. Fraccionamiento terciario via cromatografia en columna abierta de la fracción secundaria ER-VIII.**

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-18			
Hexano- CHCl <sub>3</sub>	99:1	19-28	1-96	ER-VIII(1)	6.6
	80:20	29-41	97-109	ER-VIII(2)	8.4
	70:30	42-52	110-120	ER-VIII(3)	2.5
	60:40	53-63	121-133	ER-VIII(4)	2.9
	50:50	64-75	134-138	ER-VIII(5)	1.2
	40:60	76-85	139-153	ER-VIII(6)	28.9
	30:70	86-247	154-198	ER-VIII(7)	60.7
	20:80	248-267	199-208	ER-VIII(8)	3.3
	10:90	268-281			
CHCl <sub>3</sub>	100	282-302	209-303	ER-VIII(9)	15.1
CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	99:01	303-320	304-316	ER-VIII(10)	2.0
	90:10	321-364	317-325	ER-VIII(11)	19.6
	80:20	365-373	326-364	ER-VIII(12)	8.9
	70:30	374-384	365	ER-VIII(13)	1.9
	60:40	385-393	366-387	ER-VIII(14)	20.3
	50:50	394-402	388-410	ER-VIII(15)	22.9
AcOEt	100	403-410			



**Figura 4.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo que muestra la separación de la fracción activa ER-VIII(7), utilizando las siguientes condiciones: Detector de UV/visible, fase normal,  $\lambda = 266$  nm, Flujo de 8.3 mL/min. La elución fue con un sistema de gradiente de Hexano - MeOH/IPA 90:10 [1-10 min.], Hexano - MeOH / IPA 85:15 [11-20 min.] y Hexano - MeOH/IPA 83:17 [21-30 min.], utilizando la curva 6. La concentración de la muestra fue de 11mg/ 100  $\mu$ l.

### 3.4.4. Aislamiento y purificación del alcohol triacontanílico (4) de la fracción primaria activa IX.

A partir de la fracción primaria activa ER-IX precipitó de manera espontánea un polvo café. Posteriormente, el polvo (ER-IX-2, 700 mg) se cromatógrafió en una columna de vidrio, utilizando como adsorbente 25 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con cloroforno, cloroforno-acetato de etilo (diversas proporciones) y acetato de etilo. Se recolectaron 186 fracciones de 10 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose las que son cromatográficamente similares. Este proceso generó 10 grupos de fracciones secundarias (ER-IX-2a – ER-IX-2j). A partir de este fraccionamiento (fracción secundaria ER-IX-2b) precipitó de manera espontánea un sólido blanco nacarado (19.7 mg), con un punto de fusión de 84°C (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta del precipitado primario ER- IX-2b.**

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
CHCl <sub>3</sub>	100	1-88	1-3	ER-IX-2a	45.1
	99:1	89-105	4 -23	ER-IX-2b	19.7
	95:5	106-123	24	ER-IX-2c	20.2
CHCl <sub>3</sub> -	90:10	124-134	25-26	ER-IX-2d	81.2
AcOEt	80:20	135-152	27-56	ER-IX-2e	618.7
	70:30	153-165	57-94	ER-IX-2f	64.6

**Cuadro 6. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta del precipitado primario ER- IX-2b (continuación).**

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	60:40	166-174	95-105	ER-IX-2g	17.1
	50:50	175-177	106-163	ER-IX-2h	70.9
			164-177	ER-IX-2i	35.3
AcOEt	100	178-186	178-186	ER-IX-2j	42.3

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

**4.1 Aislamiento de los productos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1), 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (batatacina III) [2], 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) y el alcohol triacontanílico (4).**

La pre-selección de la especie *Epidendrum rigidum* se realizó con base en el criterio quimiotaxonómico, debido a que estudios anteriormente realizados con otras especies de orquídeas, permitieron el descubrimiento de compuestos biológicamente activos, incluyendo fitotóxicos (Estrada *et al.*, 1999a y Rodríguez, 1998). Este criterio constituye uno de los de mayor importancia para la selección de materias primas vegetales destinadas al descubrimiento de sustancias biológicamente activas.

**Cuadro 6. Fraccionamiento secundario via cromatografia en columna abierta del precipitado primario ER- IX-2b (continuación).**

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	60:40	166-174	95-105	ER-IX-2g	17.1
	50:50	175-177	106-163	ER-IX-2h	70.9
			164-177	ER-IX-2i	35.3
AcOEt	100	178-186	178-186	ER-IX-2j	42.3

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

**4.1 Aislamiento de los productos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1), 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (batatasina III) [2], 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) y el alcohol triacontanílico (4).**

La pre-selección de la especie *Epidendrum rigidum* se realizó con base en el criterio quimiotaxonómico, debido a que estudios anteriormente realizados con otras especies de orquídeas, permitieron el descubrimiento de compuestos biológicamente activos, incluyendo fitotóxicos (Estrada *et al.*, 1999a y Rodríguez, 1998). Este criterio constituye uno de los de mayor importancia para la selección de materias primas vegetales destinadas al descubrimiento de sustancias biológicamente activas.

Una vez realizado el proceso de selección primaria se preparó el extracto de la orquídea en gran escala mediante un proceso de maceración, como se indica en la sección experimental (**Inciso 3.1**). El extracto resultante se evaluó para determinar su efecto sobre la germinación y el crecimiento vegetal (a nivel pre-emergente y post-emergente) utilizando como especie de prueba la arvense *Amaranthus hypochondriacus*.

Con respecto al estudio de fitoinhibición pre-emergente (**sección experimental 3.3.1**), se comprobó que el extracto contiene sustancias capaces de modificar el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. Los resultados obtenidos de esta determinación se resumen en el **Cuadro 7**. De los mismos se infiere que el extracto crudo inhibe de manera significativa el crecimiento radicular de la especie *A. hypochondriacus*.

**Cuadro 7. Efecto de fitoinhibición a nivel pre-emergente del extracto crudo de *E. rigidum* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.**

Concentración (ppm)	% Inhibición de <i>A. hypochondriacus</i> .
10	10.7
100	16.4
1000	42.1
Control positivo 2,4-D (5µg/mL)	85.4

Durante el estudio de fitoinhibición post-emergente (**sección experimental 3.3.3**), se determinó que el extracto posee compuestos con la capacidad de disminuir, de manera

significativa, la producción de biomasa de la arvense *A. hypochondriacus* y que también afecta de manera significativa, aunque sólo a la concentración de 1000 ppm, el crecimiento de la planta (Figura 5). Los resultados se indican en el Cuadro 8.

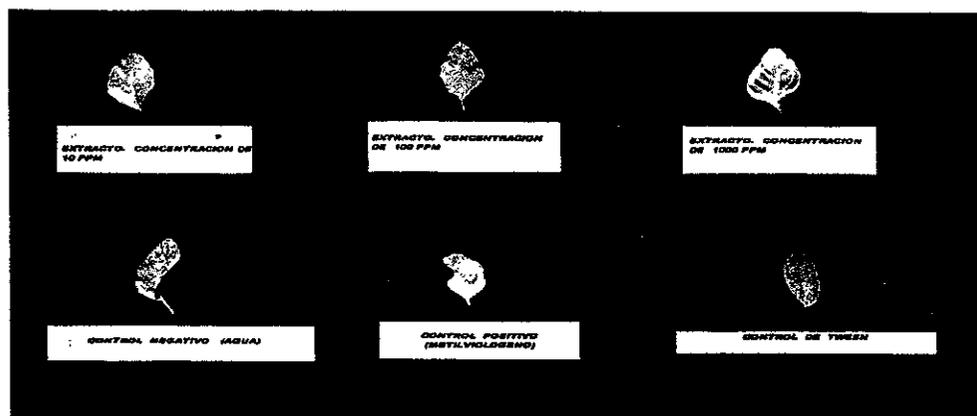
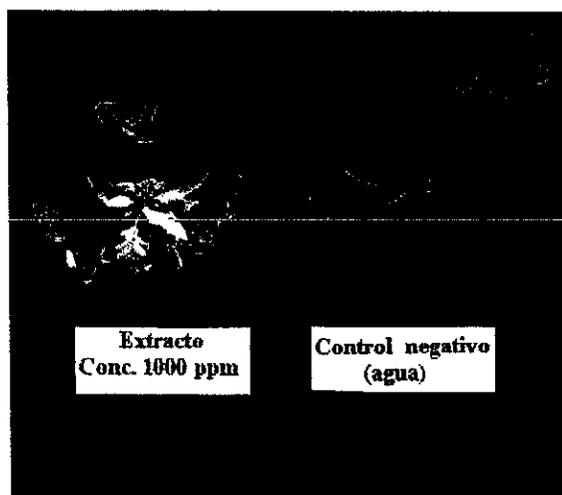


Figura 5. Efecto herbicida post-emergente del extracto sobre las plántulas de *A. hypochondriacus*.

**Cuadro 8. Efecto de fitoinhibición a nivel post-emergente del extracto crudo de *E. rigidum* sobre el crecimiento radicular y la producción de biomasa de la arvense *A. hypochondriacus*.**

Concentración (ppm)	% de pérdida de peso (biomasa)	% de disminución de la longitud del tallo.	Observaciones
10	7.97	0	Hojas de aspecto normal. Crecieron más que el control de agua
100	24.91	0	Bordes de las hojas quemados. Crecieron más que el control de agua.
1000	70.96	67.04	Necrosis mayor a la observada con el mv.
Surfactante Tween 80 (0.1 mL/L)	7.73	5.60	Hojas de color rojizo.
Control positivo (metilviológeno $10^{-4}$ M)	20.21	18.60	Necrosis de las hojas. Pérdida de biomasa y disminución de la longitud. Bordes quemados.

También se evaluó el efecto tóxico del extracto crudo para el crustáceo *Artemia salina* Leach (sección experimental 3.3.4); los resultados se muestran en el Cuadro 9. A partir de estos se concluye que el extracto crudo de la planta entera de *E. rigidum* no posee actividad tóxica significativa para *A. salina*.

**Cuadro 9. Efecto de toxicidad del extracto crudo de *Epidendrum rigidum* en el crustáceo *Artemia salina* Leach.**

Concentración (ppm) .	% de mortalidad.
10	0
100	7.7
1000	35.3

Con base en los resultados de las evaluaciones biológicas preliminares, se decidió realizar el estudio fitoquímico de *E. rigidum* con la finalidad de llevar a cabo el aislamiento de los principios activos responsables de la actividad fitotóxica pre-emergente, post-emergente y también contribuir al estudio del contenido metabólico de las orquídeas mexicanas.

El fraccionamiento primario, se realizó mediante un proceso cromatográfico en columna abierta sobre gel de sílice generando 13 grupos de fracciones primarias. Cada una de las fracciones se evaluó para determinar su efecto sobre el crecimiento radicular de la especie *A. hypochondriacus* a 1000 ppm. Los resultados se resumen en el **Cuadro 10**.

**Cuadro 10. Efecto fitotóxico de las fracciones obtenidas de *E. rigidum* sobre el crecimiento radicular de la arvense *A. hypochondriacus*.**

Fracción	% de Inhibición (1000ppm)	% de Inhibición (500 ppm)
ER-I	13.43	—
ER-II	15.67	—
ER-III	42.50	—
ER-IV	49.25	—
ER-V	76.80	54.35
ER-VI	71.60	63.99
ER-VII	84.00	48.62
ER-VIII	100	56.25
ER-IX	100	58.34
ER-X	33.30	—
ER-XI	34.20	—
ER-XII	36.90	—
ER-XIII	30.60	—

Las fracciones con un porcentaje de fitoinhibición mayor al 50%, se evaluaron para determinar su efecto a una concentración menor (500 ppm). Los resultados de estas determinaciones se resumen también en el **Cuadro 10**.

De acuerdo con los resultados indicados en el **Cuadro 10**, se concluye que las fracciones ER-V a ER-IX demostraron efectos significativos a 500 ppm.

La bioautografía de la fracción activa ER-VII (**Inciso 3.3.2**), permitió establecer que la actividad fitotóxica se concentraba en las fracciones ER-VIII y ER-VIIg. Posteriormente la fracción secundaria ER-VIII se sometió a un fraccionamiento terciario, a partir de la cual se obtuvo la fracción terciaria activa ER-VIII(7). Esta fracción se encontraba constituida principalmente por dos compuestos mayoritarios (3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo y 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo). Por medio de la técnica de CLAR (**incisos 3.2.2 y 3.2.3**), se logró la separación de los dos bibencilos. Por otro lado, de la fracción secundaria activa ER-VIIg, precipitaron de manera espontánea 6.0 mg del compuesto 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3). En síntesis, se aislaron tres metabolitos a partir de la fracción primaria activa ER-VII.

Por otro lado de la fracción activa ER-IX se obtuvo el alcohol triacontanílico (4).

En el **Cuadro 11** se indican las estructuras de los compuestos aislados y sus rendimientos correspondientes.

**Cuadro 11. Metabolitos aislados de la especie *Epidendrum rigidum*.**

Compuesto	Estructura	Fracción Primaria	Rendimiento*
3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1)		ER-VII	0.01
3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (2)		ER-VII	2.84 x 10 <sup>-3</sup>
4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3)		ER-VII	1.76 x 10 <sup>-3</sup>
Alcohol triacontánico (4)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>27</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> OH	ER-IX	5.79 x 10 <sup>-3</sup>

\* Expresado en porciento con relación al peso del material vegetal seco.

Cabe señalar que los compuestos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1), 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (2) y 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) se encuentran presentes en otras especies de orquideas (Estrada *et al.*, 1999a y 1999b; Leong *et al.*, 1996;

Majumder *et al.*, 1996). Con respecto al 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno, este compuesto se aisló por primera vez a partir de la orquídea *Ephemerantha lonchophylla* (Tezuka *et al.*, 1991). Por lo tanto, su aislamiento a partir de *E. rigidum* constituye el segundo reporte de este producto.

**4.2. Caracterización de los productos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1), 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (batatasina III) [2], 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) y el alcohol triacontanílico (4).**

Los productos 1-4 se caracterizaron por medio de la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. A continuación se describirá de manera breve la elucidación estructural de los compuestos aislados.

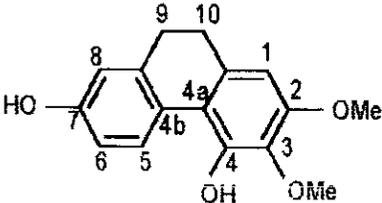
**4.2.1. Caracterización del compuesto 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).**

El compuesto 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno se obtuvo a partir de la fracción primaria activa ER-VII.

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de este compuesto se resumen en los cuadros 12 - 15.

**Cuadro 12. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto**

**4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).**

<p>Compuesto</p> <p><b>4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno.</b></p>	
<p>Fórmula molecular</p>	<p><math>C_{15}H_{15}O_4</math></p>
<p>Punto de fusión</p>	<p>162-163°C</p>
<p>Peso molecular</p>	<p>272 g/mol</p>
<p>IR <math>\sqrt{\text{max}}</math> KBr <math>\text{cm}^{-1}</math></p> <p>(Espectro 1)</p>	<p>3437, 3340, 3010, 1614, 1460, 1238, 1135</p>
<p>EMIE <math>m/z</math> (int. rel.)</p> <p>(Espectro 2)</p>	<p>272[M+, (100)], 257(16), 225(11), 197(9)</p>

**Cuadro 13. Datos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) del producto 3.**

Protón	δH ( <i>mu</i> , J)
H-1	6.37 ( <i>s</i> )
H-5	8.19 ( <i>d</i> , 8.0)
H-6	6.75 ( <i>dd</i> , 8.5 y 2.5)
H-8	6.70 ( <i>d</i> , 2.5)
H(9-10)	2.71 ( <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub>	3.88 ( <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub>	3.90 ( <i>s</i> )
OH	6.99 ( <i>s</i> )
OH	8.54 ( <i>s</i> )

J= Constante de acoplamiento en Hz. ; *mu* = multiplicidad.

**Cuadro 14. Datos de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) del producto 3**

Carbón	δC
C-2	149.2
C-3	133.4
C-4	146.3
C-4a	114.5
C-4b	123.8
C-5	128.1
C-6	112.6
C-7	154.72
C-8	114.0
C-8a	138.3
C-9	29.8
C-10	29.5
C-10a	133.8
OCH <sub>3</sub>	55.19
OCH <sub>3</sub>	60.30

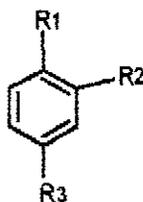
El espectro de masas que genera este compuesto presenta el ión molecular en una relación de  $m/z$  de 272 una, que corresponde a la fórmula molecular  $C_{16}H_{16}O_4$  que permite 9 grados de insaturación. El espectro también presenta fragmentos importantes en  $m/z$  257, 239, 225, 211, 197, 157 y 136.

Su espectro en el IR presenta absorciones características asociadas con la presencia de grupos hidroxilo ( $3437$  y  $3340\text{ cm}^{-1}$ ) y aromaticidad ( $1600$ -  $1500\text{ cm}^{-1}$ ).

Por medio del análisis detallado de los espectros de RMN del compuesto, se estableció que se trata de un compuesto de naturaleza dihidrofenantrénica ( Tezuka *et al.*, 1991; Sternitz *et al.*, 1983; Leong *et al.*, 1997; Estrada *et al.*, 1999a y 1999 b).

Las características más importantes del espectro de RMN- $^1\text{H}$  se resumen a continuación:

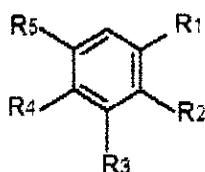
- a) En la zona de absorción de los hidrógenos aromáticos se aprecia un sistema ABX típico para un compuesto simple trisustituído como se indica en la siguiente estructura parcial A:



**Estructura parcial A**

Las señales del sistema ABX aparecen en  $\delta$ H 6.70 [d, J=2.5 Hz (H-8)], 6.75[dd, J=2.5, 8.25 Hz (H-6)] y H 8.19 [d, J=8.0 Hz (H-5)]. Cada una de estas señales integra para un hidrógeno.

En  $\delta$ H 6.37 aparece un singlete que integra para un hidrógeno, lo que sugiere la presencia de un anillo aromático pentasustituído. Por lo tanto, el segundo anillo aromático presenta el patrón de sustitución mostrado en la estructura parcial B:



**Estructura parcial B**

- b) En  $\delta$ H 8.54 y 6.99 se aprecian dos singletes que integran para un hidrógeno que evidencian la presencia de dos grupos hidroxilo. Estas dos señales desaparecen al equilibrar con D<sub>2</sub>O.
- c) En  $\delta$ H 3.90 y 3.88 se observan dos singletes que integra cada uno para tres hidrógenos y que se atribuyen a dos grupos metoxilo.
- d) En la zona donde absorben los hidrógenos alifáticos se observa en  $\delta$ H 2.71 un singlete que integra para 4 hidrógenos, los cuales corresponden a dos grupos metílenos (H-9 y H-10), cada uno unido a un anillo aromático.

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C indica la presencia de 16 átomos de carbono, en congruencia con la fórmula molecular. El espectro DEPT indica claramente que doce de estos carbonos corresponden a cuatro metinos aromáticos, dos metoxilos y dos metilenos alifáticos. Por lo tanto, la molécula contiene cuatro carbonos cuaternarios.

Para determinar la disposición relativa de los sustituyentes en el anillo aromático, el análisis del espectro NOESY (figura 6) fue de gran utilidad. Su revisión cuidadosa permitió establecer las correlaciones indicadas en la figura 6.

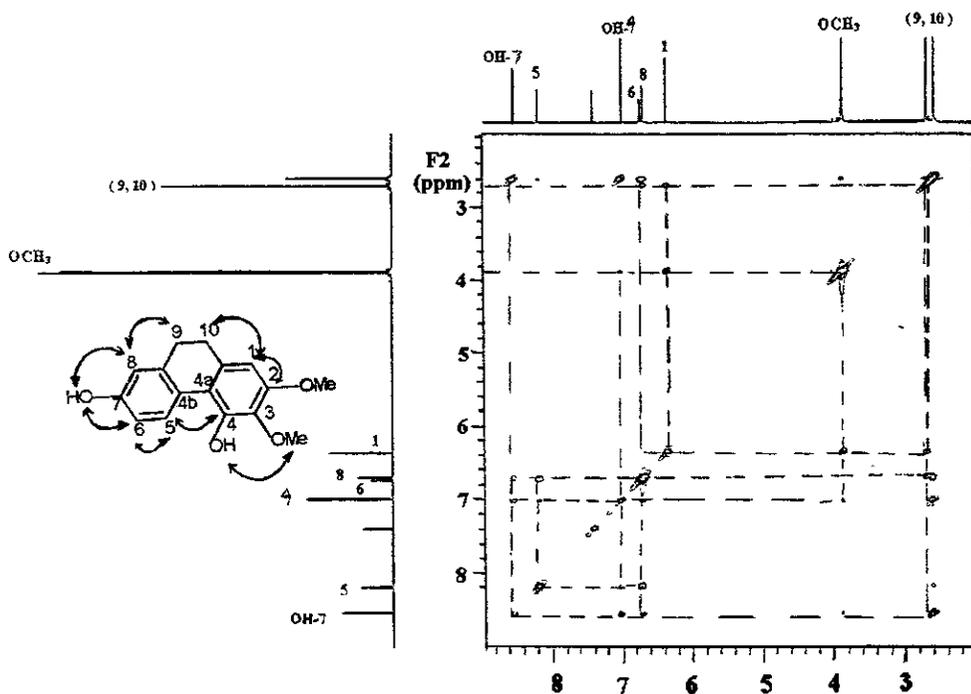


Figura 6. Correlaciones observadas en el espectro NOESY para el compuesto 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3).

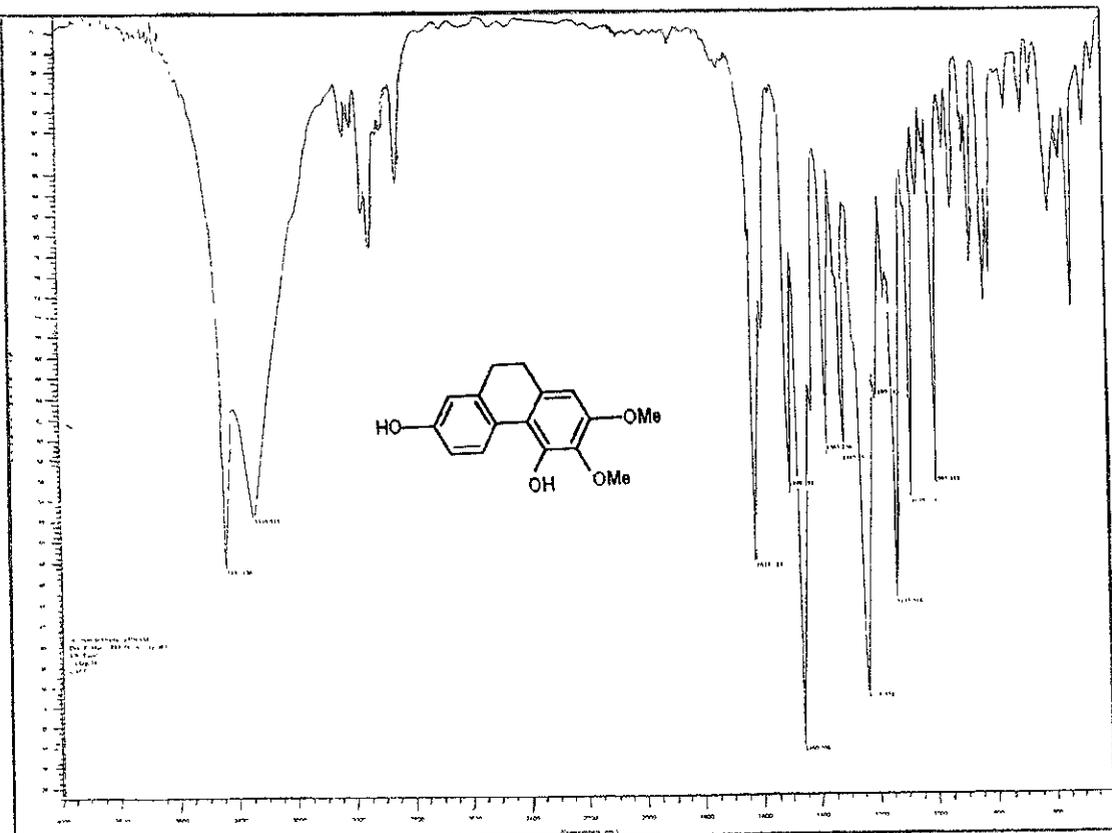
Las correlaciones indicadas en la figura 6 permitieron entonces establecer que dos hidroxilos se encontraban en C-4 y C-7 y que los metoxilos se ubicaban en C-2 y C-3.

Las correlaciones más importantes observadas en el espectro de HMBC proporcionan una evidencia adicional a favor de la estructura propuesta. Estas correlaciones se pueden observar en el siguiente cuadro:

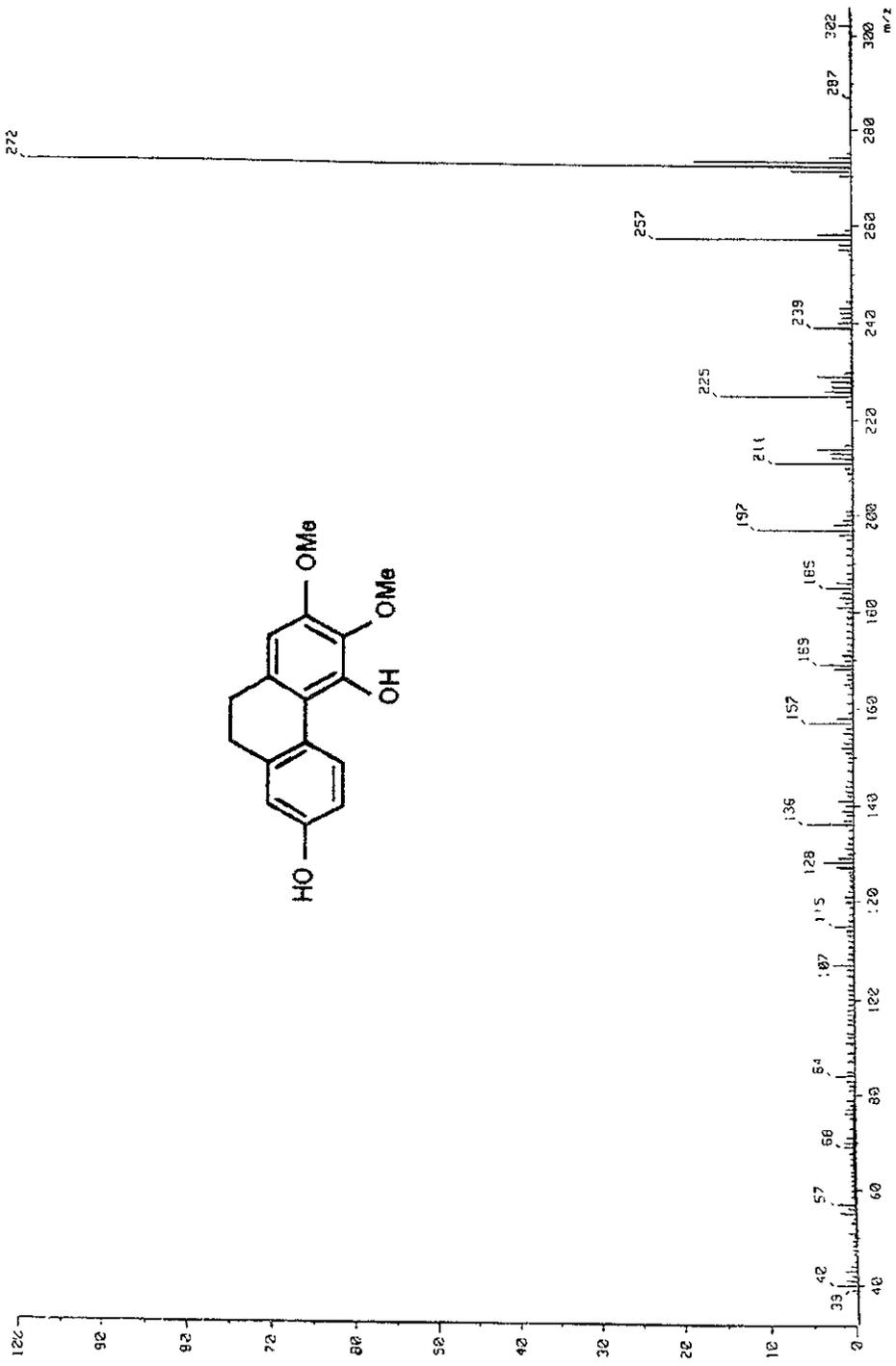
**Cuadro 15. Correlaciones más importantes en el espectro de HMBC para el producto 3.**

<b>Carbono (<math>\delta</math>C)</b>	<b>Protón (<math>\delta</math>H)</b>
C-1 (102.782)	H-10 (2.71) y OCH <sub>3</sub> (3.87)
C-2 (149.20)	OCH <sub>3</sub> (3.87) y H-1 (6.37)
C-3 (133.4)	OCH <sub>3</sub> (3.89), H-1 (6.37), OH (6.99)
C-4 (146.3)	H-4 (6.99)
C-4a (114.5)	H-10 (2.71), H-1 (6.37), OH-4 (6.99)
C-4b (123.8)	H-9 (2.71), H-8 (6.70), H-6 (6.74)
C-6 (112.623)	OH-7 (8.54) y H-8 (6.70)
C-7 (154.7)	H-5 (8.19), OH-7 (8.54)
C-8 (114.020)	OH-7 (8.54), H-6 (6.74) y H-9 (2.71)
C-8a (138.30)	H-5 (8.19)
C-9 (29.834)	H-8 (6.70)
C-10 (29.470)	H-1 (6.37)
C-10a (133.4)	H-1 (6.37)

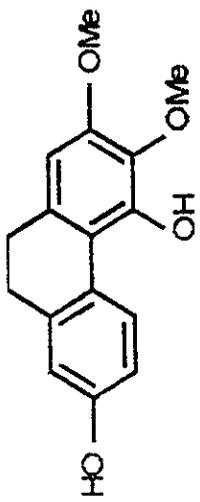
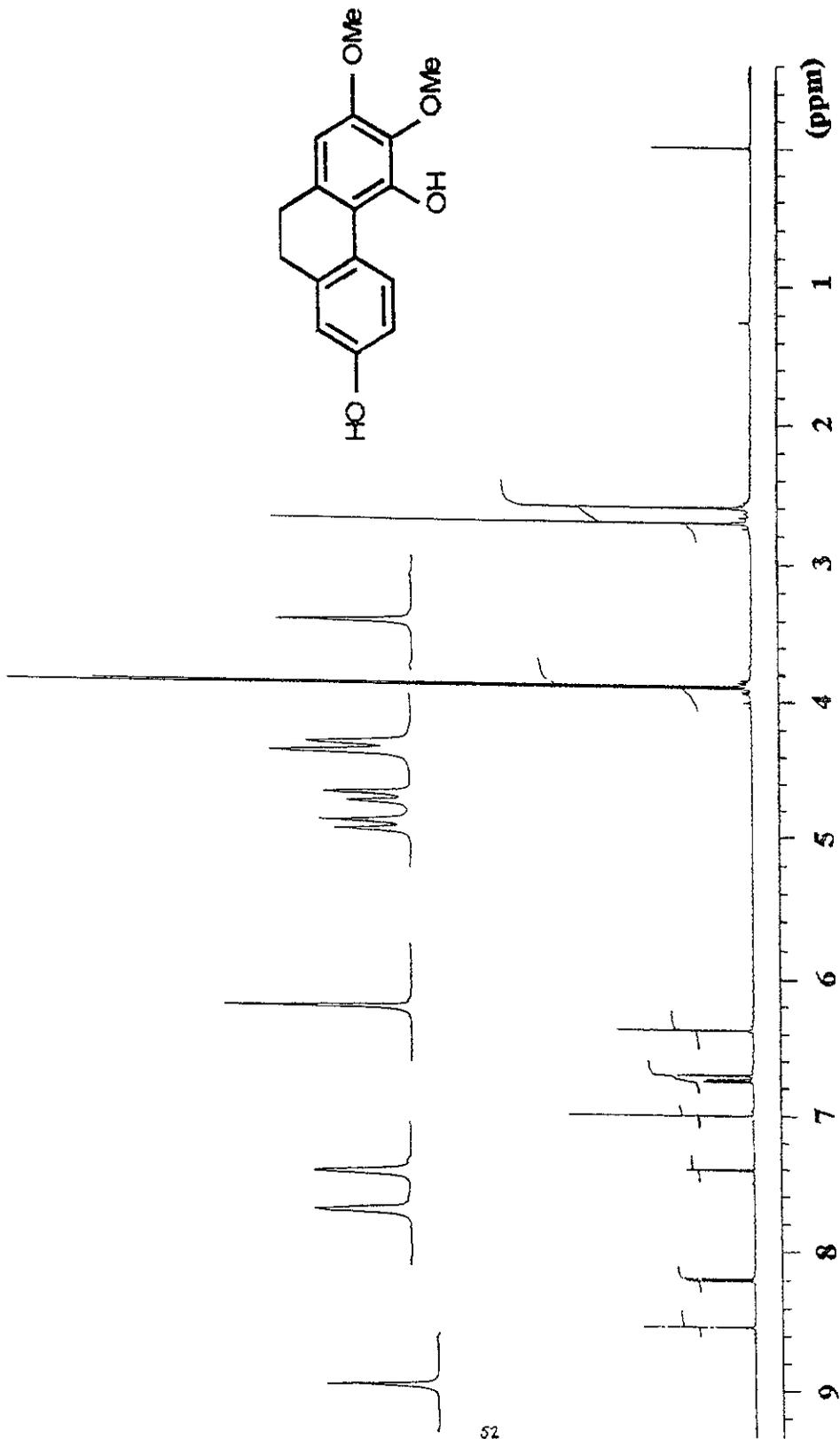
Con base en las evidencias presentadas, el producto se identificó como el 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno.



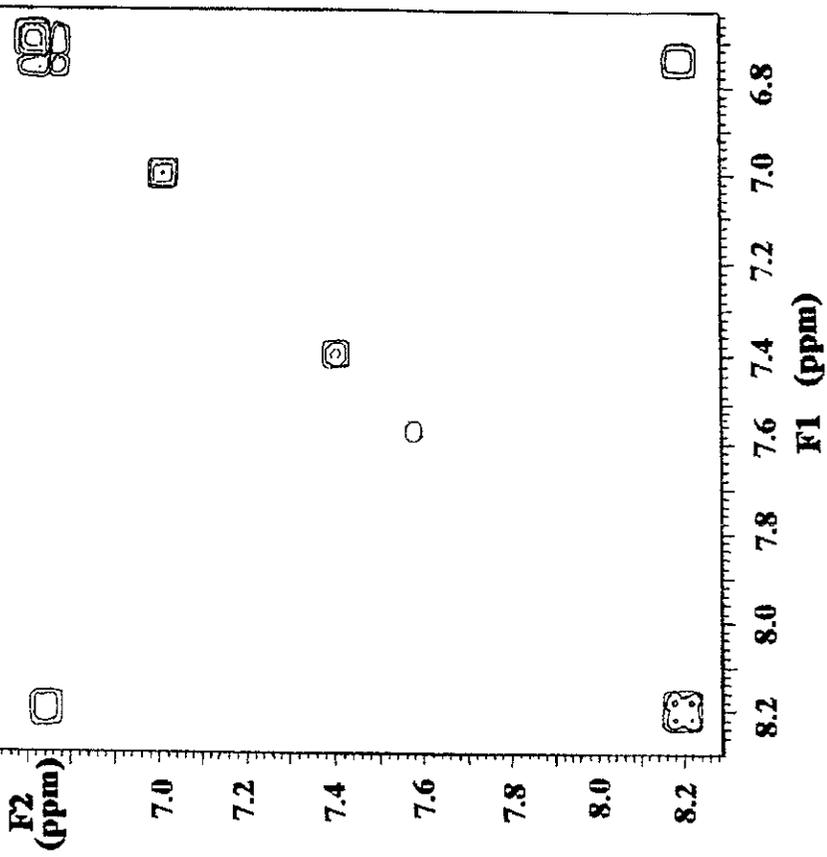
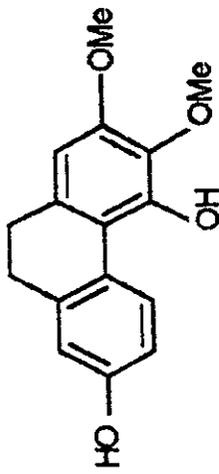
**Espectro 1.** Espectro en el IR del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3)



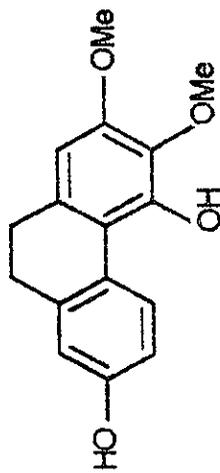
**Espectro 2. Espectro de masas del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3)**



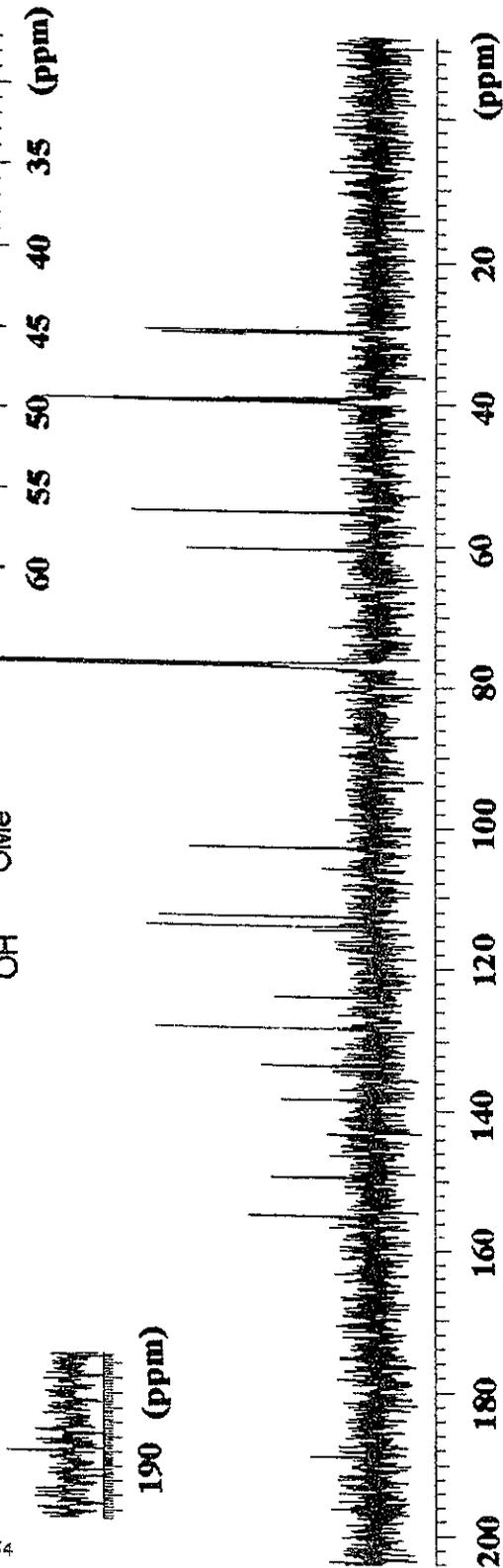
Espectro 3. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3)



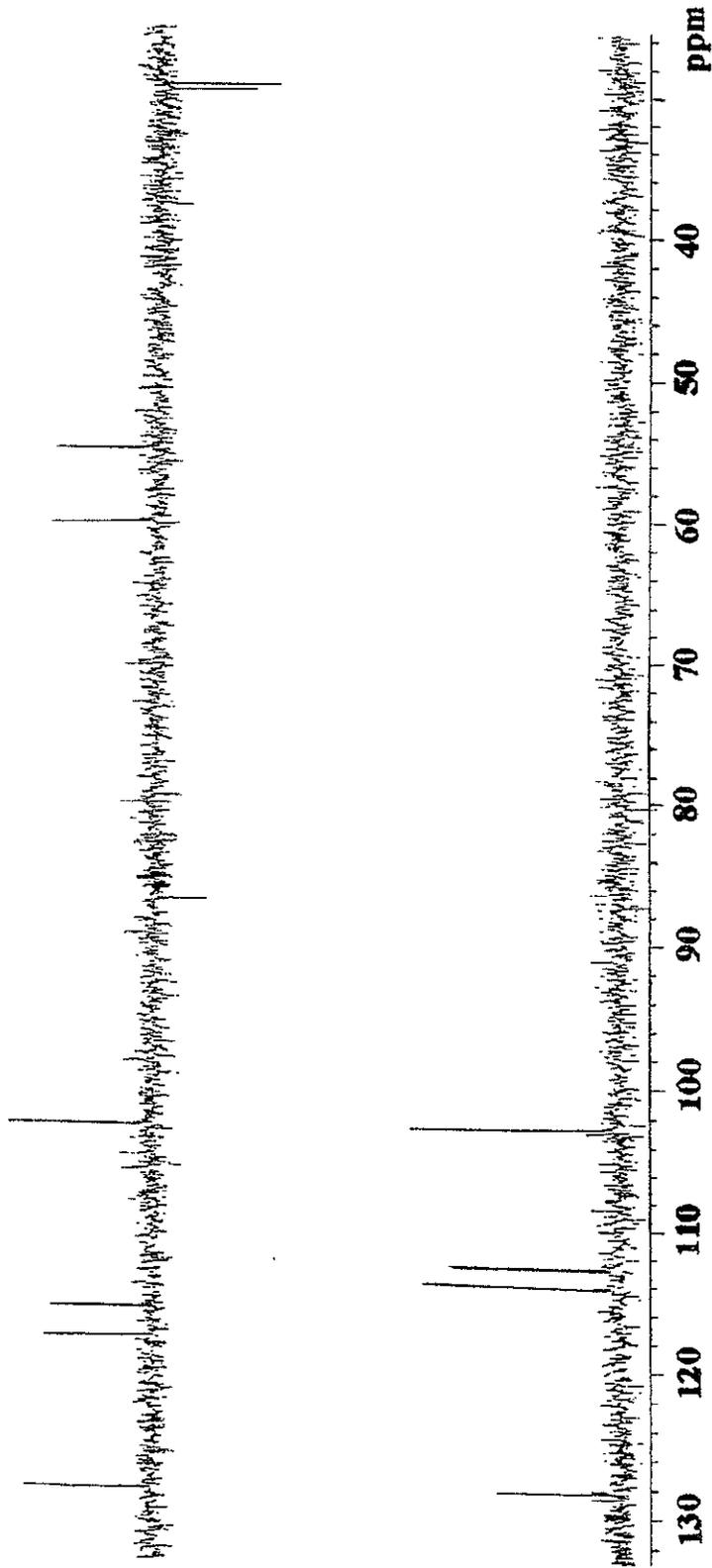
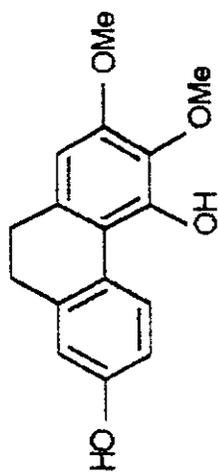
Espectro 4. Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3)



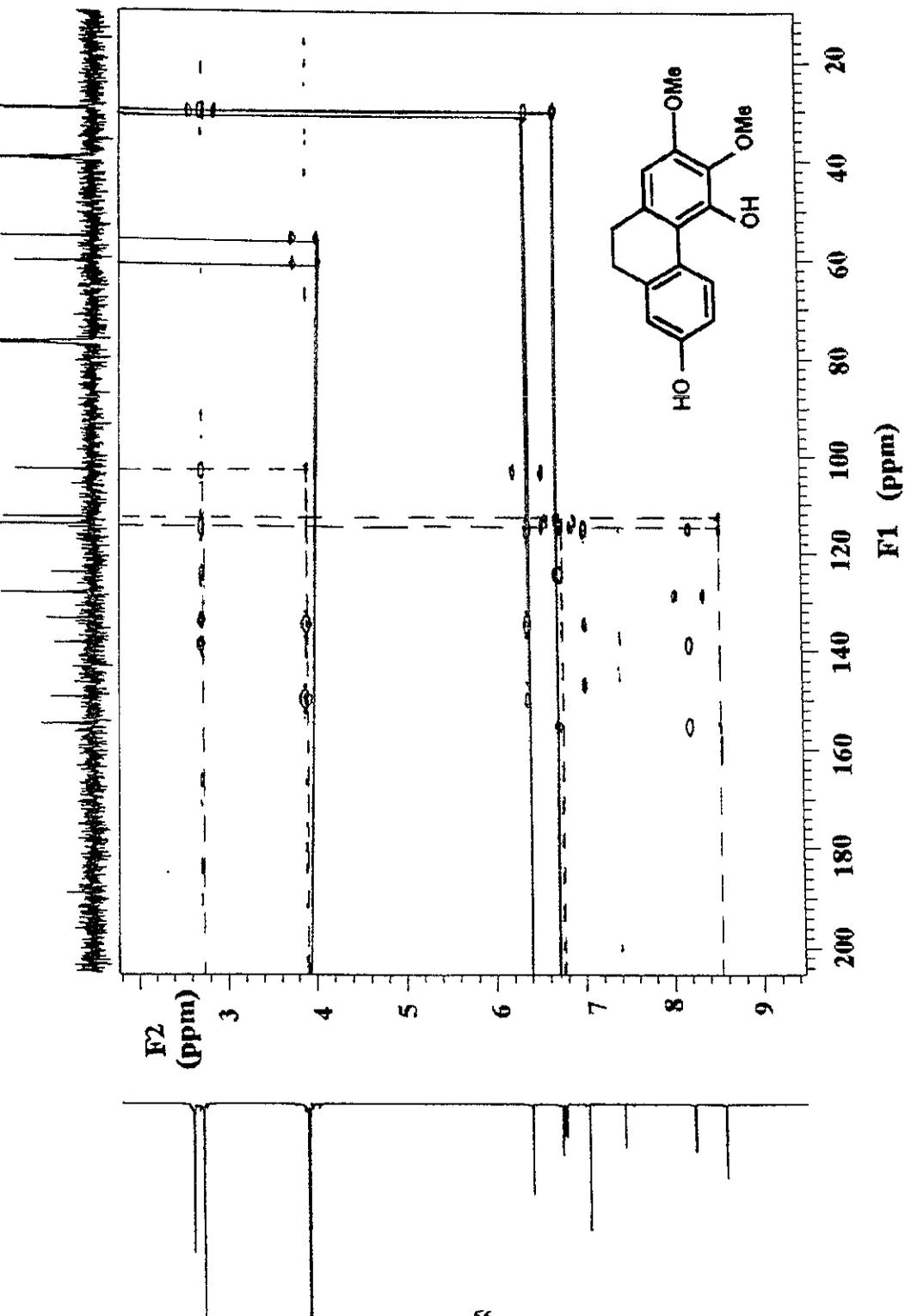
54



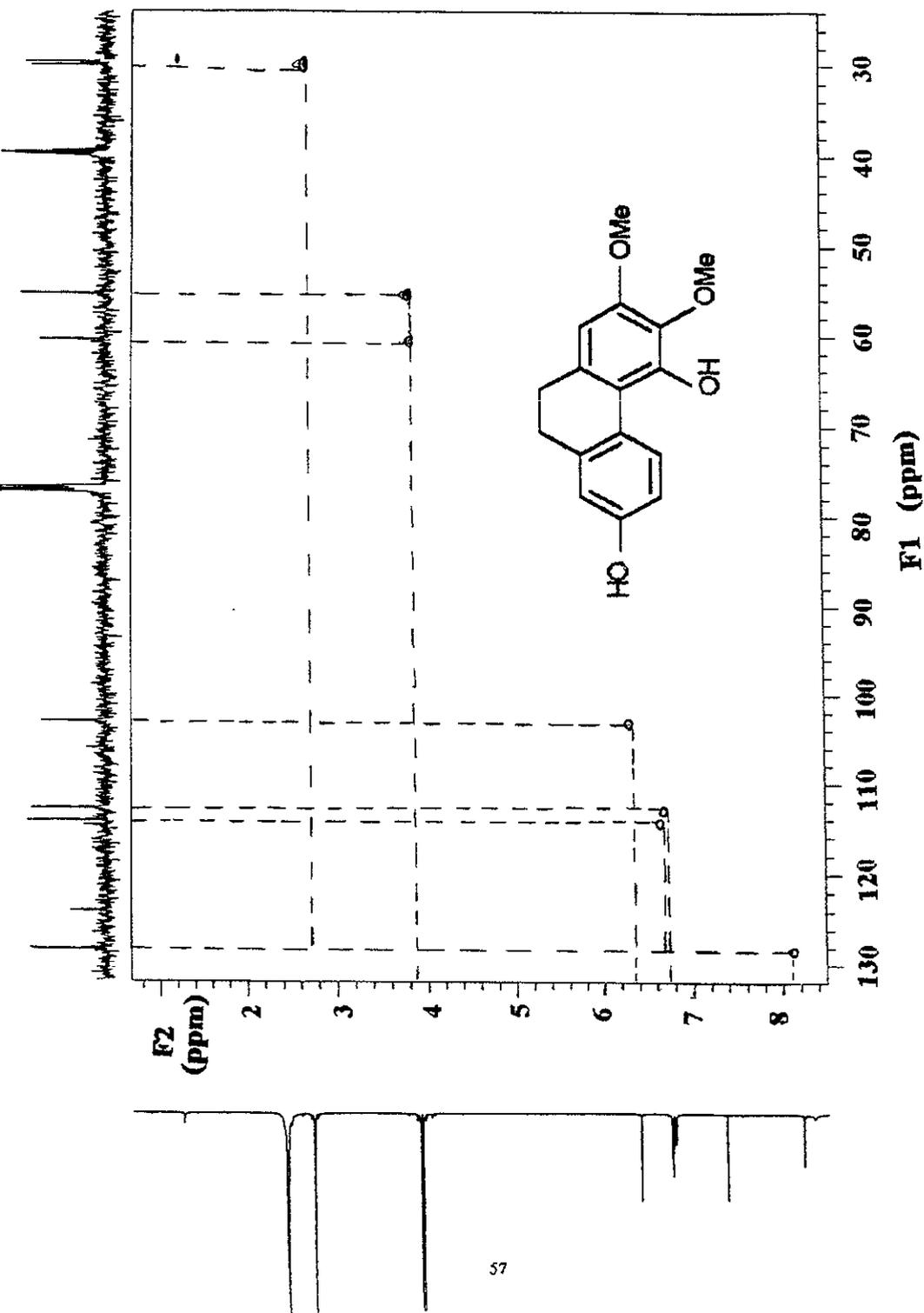
Espectro 5. Espectro RMN-<sup>13</sup>C del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3)



Espectro 6. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C modalidad DEPT del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3)



Espectro 7. Espectro de HMBC del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3)



Espectro 8. Espectro de HMQC del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10- dihidrofenantreno (3)

#### 4.2.2. Caracterización del compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1).

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto 1 se resumen en los cuadros 16-18.

**Cuadro 16. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1).**

<p>Compuesto</p> <p><b>3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo.</b></p>	
Fórmula molecular	$C_{16}H_{14}O_4$
Peso molecular	274 g/mol
IR $\sqrt{\text{max KBr cm}^{-1}}$ (Espectro 9)	3685, 3593, 3545, 2963, 2942, 2843, 1614, 1600, 1515.
EMIE m/z (int. rel.) (Espectro 10)	274[M+(80)], 257[6, M+(-7)], 241[5, M+(-20H)], 213[4, M+ (- 2OMe)], 137[[100, M+(-137)], 122 (15) y 107(7)]

**Cuadro 17. Datos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δH) del producto 1.**

Protón	δH ( <i>mu</i> , J)
H-6'	6.62 ( <i>d</i> , 2.0)
H-3'	6.81 ( <i>d</i> , 8.1)
H-2'	6.67 ( <i>dd</i> , 8.2 y 2.0)
H-2, H-4	6.24 ( <i>m</i> )
H-6	6.31 ( <i>dd</i> , 2)
2OH	4.88 y 5.45 ( <i>sa</i> )
2OCH <sub>3</sub>	3.75, 3.84 ( <i>s</i> )
2CH <sub>2</sub>	2.82 ( <i>m</i> )

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz. : *mu* = multiplicidad.

**Cuadro 18. Datos de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) del producto 1.**

<b>Carbón</b>	<b>δC</b>
C-1	143.75
C-2	108.06
C-3	146.27
C-4	94.05
C-5	160.85
C-6	106.83
C-1'	133.63
C-2'	114.21
C-3'	121.0
C-4'	144.31
C-5'	156.61
C-6'	111.21
CH <sub>2</sub>	37.21
CH <sub>2</sub>	38.23
OCH <sub>3</sub>	55.24
OCH <sub>3</sub>	55.88

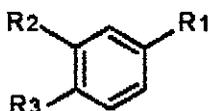
El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ión molecular en una  $m/z$  de 274 una, y permitió calcular la fórmula molecular  $C_{16}H_{16}O_4$ . Esta fórmula permite ocho grados de insaturación. El espectro también presenta fragmentos importantes en  $m/z$  257, 241, 213, 137, 122 y 107.

Su espectro en el IR presenta absorciones asociadas con la presencia de grupos hidroxilo ( $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ ) y aromaticidad ( $1515, 1600\text{ cm}^{-1}$ ).

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN del compuesto permiten establecer que se trata de un compuesto de naturaleza dihidroestilbenoide (Bai *et al.*, 1997; Majumder *et al.*, 1996; Leong *et al.*, 1997; Miyazawa *et al.*, 1997).

Las características más importantes del espectro de RMN- $^1\text{H}$  se resumen a continuación:

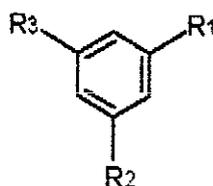
- a) En la zona donde absorben los hidrógenos aromáticos se observan dos conjuntos de señales. En primer lugar se aprecia un sistema ABX típico para un anillo aromático trisustituído como se indica en la estructura parcial C:



#### Estructura parcial C

Las señales del sistema ABX aparecen en  $\delta\text{H}$  6.81 (*d*,  $J=8.1\text{ Hz}$ , H-3'),  $\delta\text{H}$  6.67 (*dd*,  $J=8.2$  y  $2.0\text{ Hz}$ , H-2') y  $\delta\text{H}$  6.62 (*d*,  $J=2.0\text{ Hz}$ , H-6') y cada una integra para un hidrógeno.

En segundo lugar se observa en  $\delta_H$  6.31 ( $J=2.0$  Hz, H-6) un doblete de doblete que integra para un hidrógeno y en  $\delta_H$  6.24 (H-2, H-4) se aprecia un multiplete que integra para dos hidrógenos. El patrón de acoplamiento demostrado por la señal en  $\delta_H$  6.31 indica que el mismo presenta dos acoplamientos meta. Por lo tanto el segundo anillo aromático debe presentar el patrón de sustitución que se indica en la estructura parcial siguiente:



**Estructura parcial D**

- b) En  $\delta_H$  4.88 y 5.45 se aprecian dos singuletes anchos característicos de dos grupos hidroxilo. Ambas señales desaparecen al equilibrar con  $D_2O$ .
- c) En  $\delta_H$  3.75 y 3.84 se observan dos singuletes correspondientes a dos grupos metoxilo.
- d) Por último, en la zona donde absorben los hidrógenos alifáticos se observa en  $\delta_H$  2.82 un multiplete ancho que integra para cuatro hidrógenos, los cuales se atribuyeron a dos grupos  $CH_2$  (H-7 y H-7'). Esta absorción es congruente con la presencia de dos grupos metilenos, unidos cada uno a los anillos aromáticos previamente evidenciados.

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C indica la presencia de 16 átomos de carbono en congruencia con la fórmula molecular. El espectro DEPT indica claramente que estas señales corresponden a dos grupos metilenos, dos metoxilos y seis metinos aromáticos. En consecuencia la molécula contiene seis carbonos cuaternarios.

Al igual que en el caso del compuesto 3, la disposición relativa de los sustituyentes en los anillos aromáticos, se realizó con base en el análisis cuidadoso del espectro NOESY.

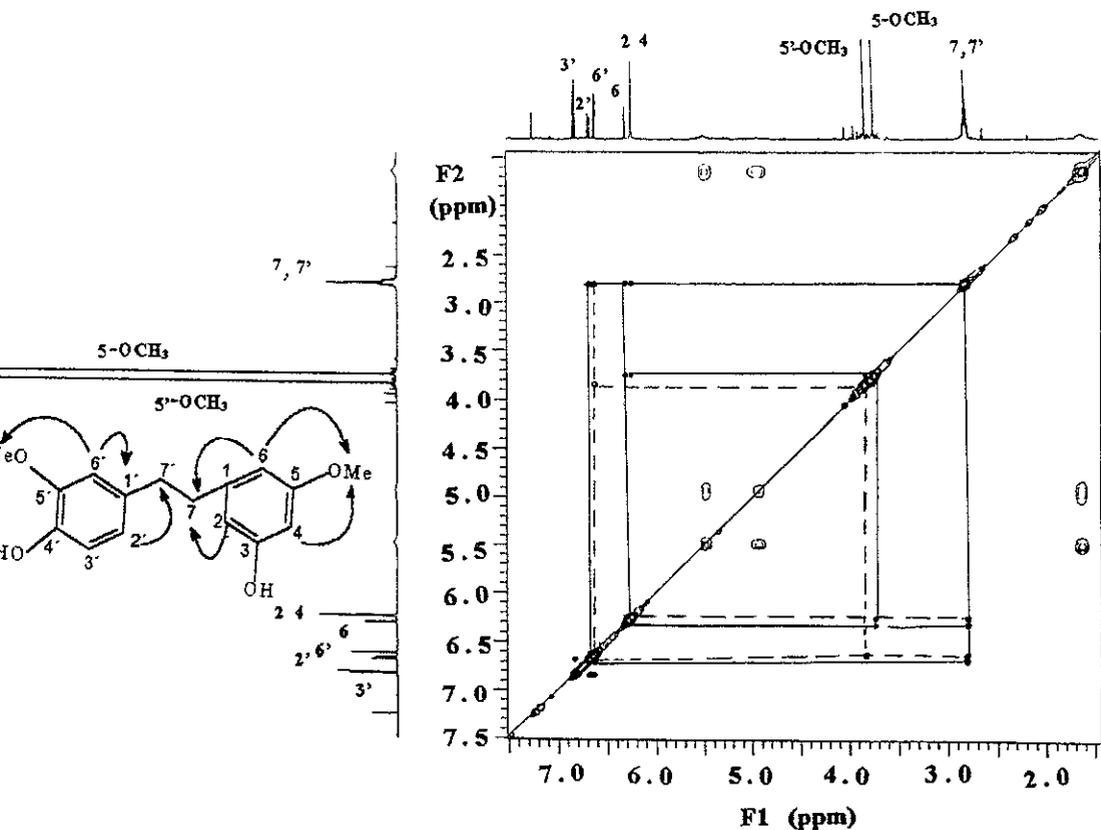
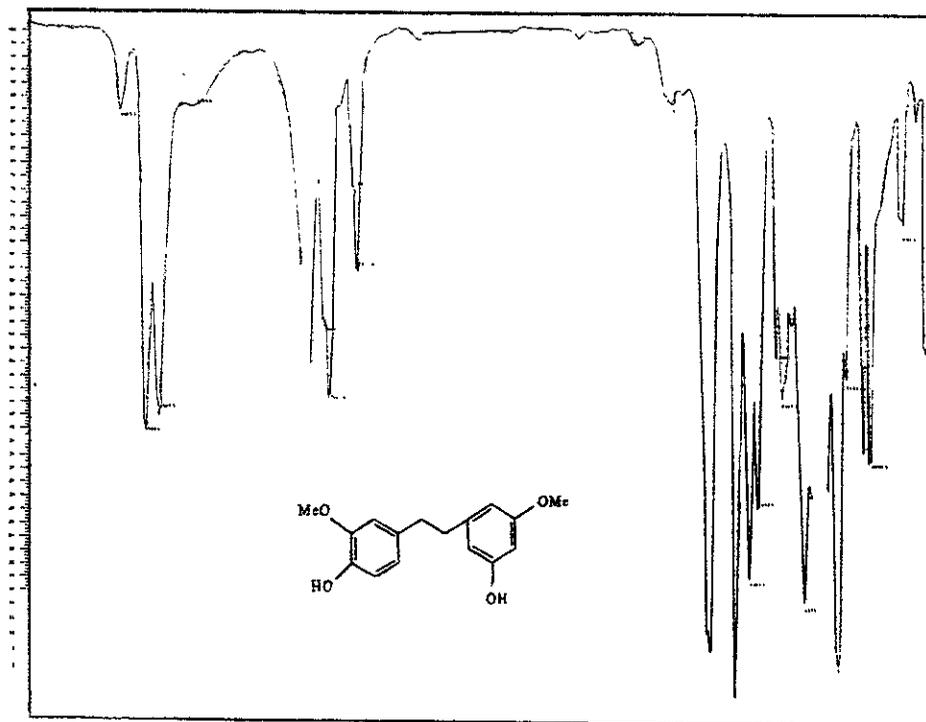


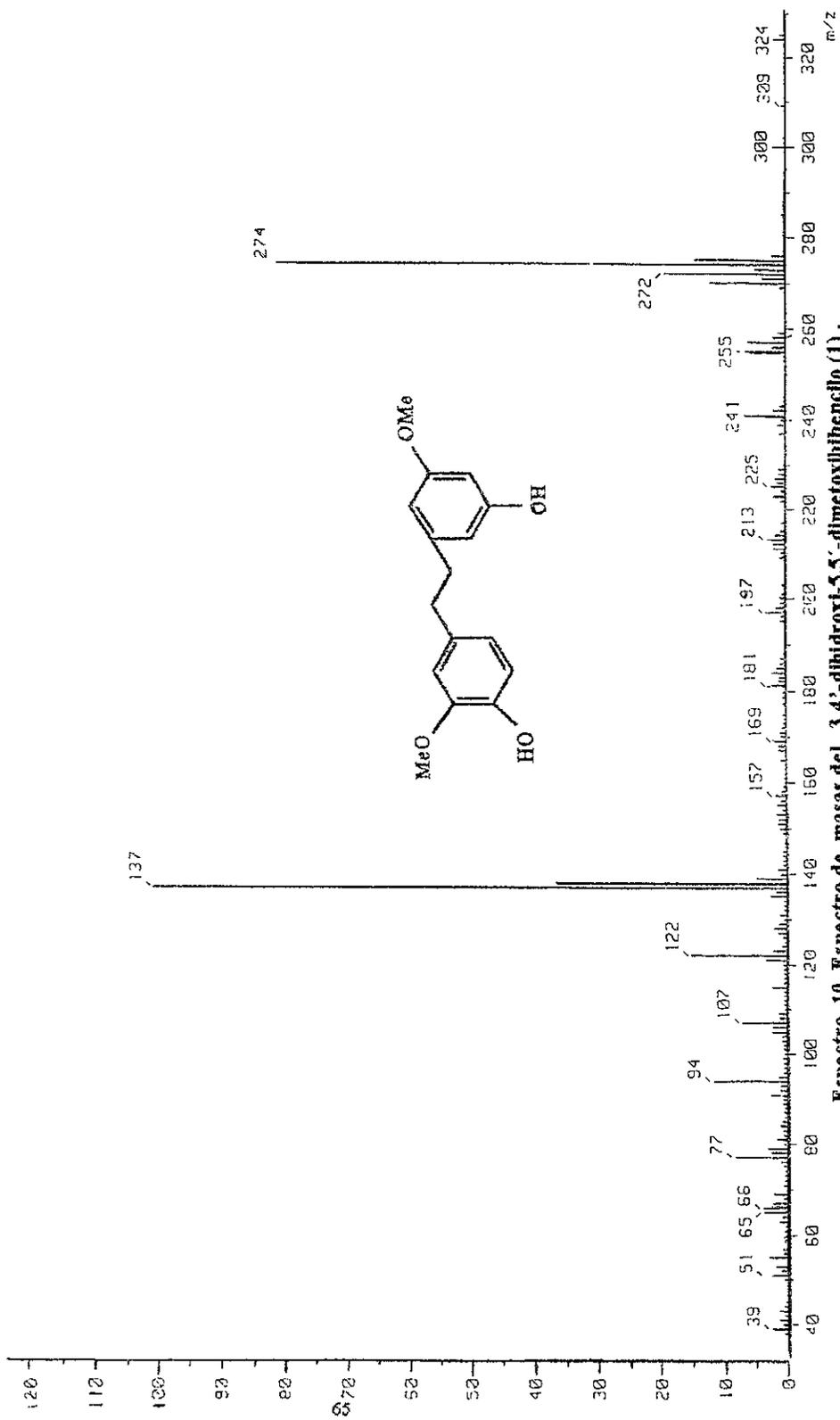
Figura 7. Correlaciones observadas en el espectro NOESY para el compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1).

En la figura 7 se indican las correlaciones más importantes y las mismas indicaron claramente que los grupos metoxilo se encontraban sobre los carbonos C-5 y C-3', en tanto que los grupos hidroxilos en C-3 y C-4'.

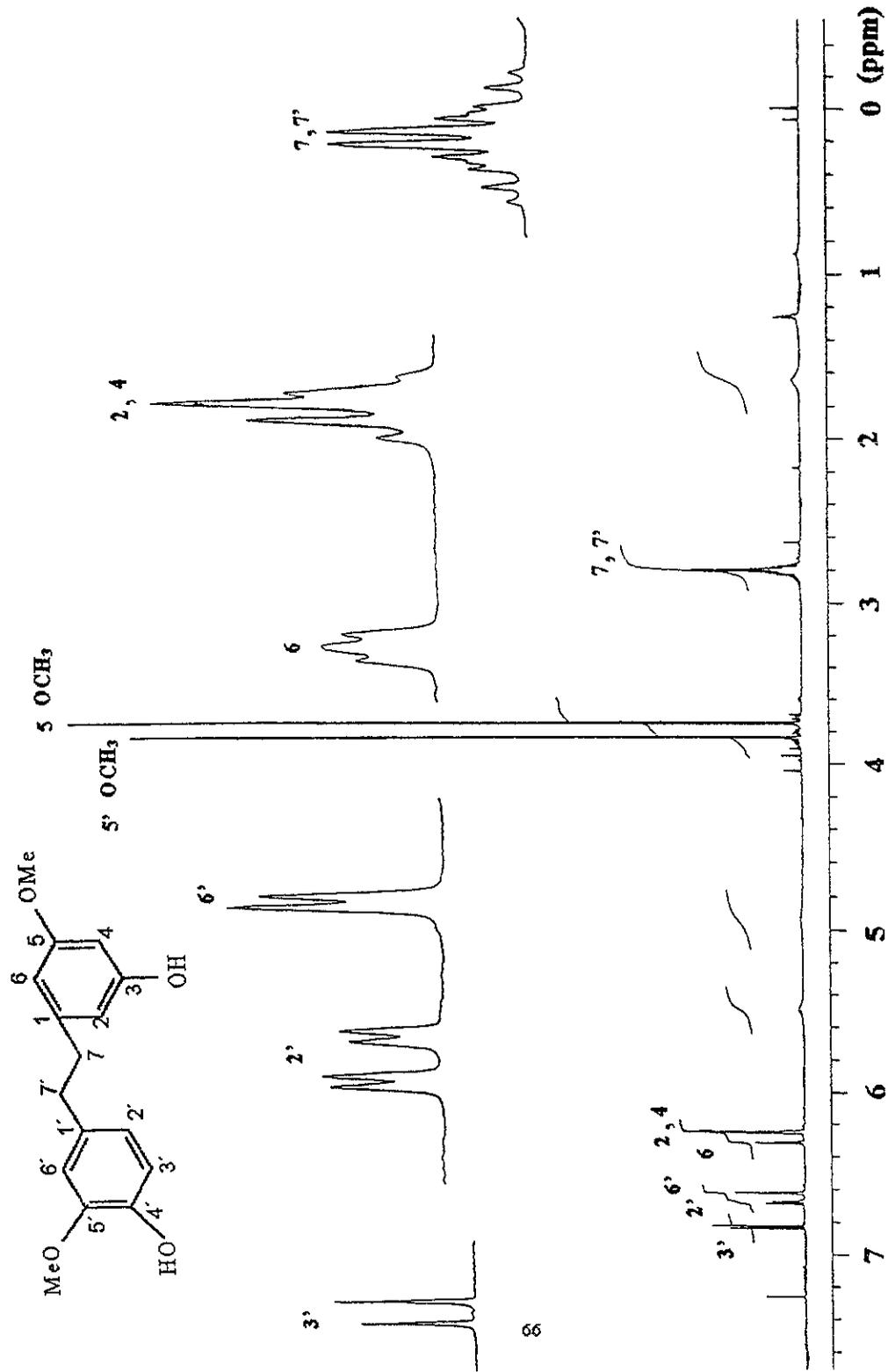
Con base en las consideraciones anteriores, el compuesto se caracterizó como el 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo. La identidad del compuesto se comprobó inequívocamente por comparación con una muestra auténtica aislada de *S. livida* (Estrada *et al.*, 1999a).



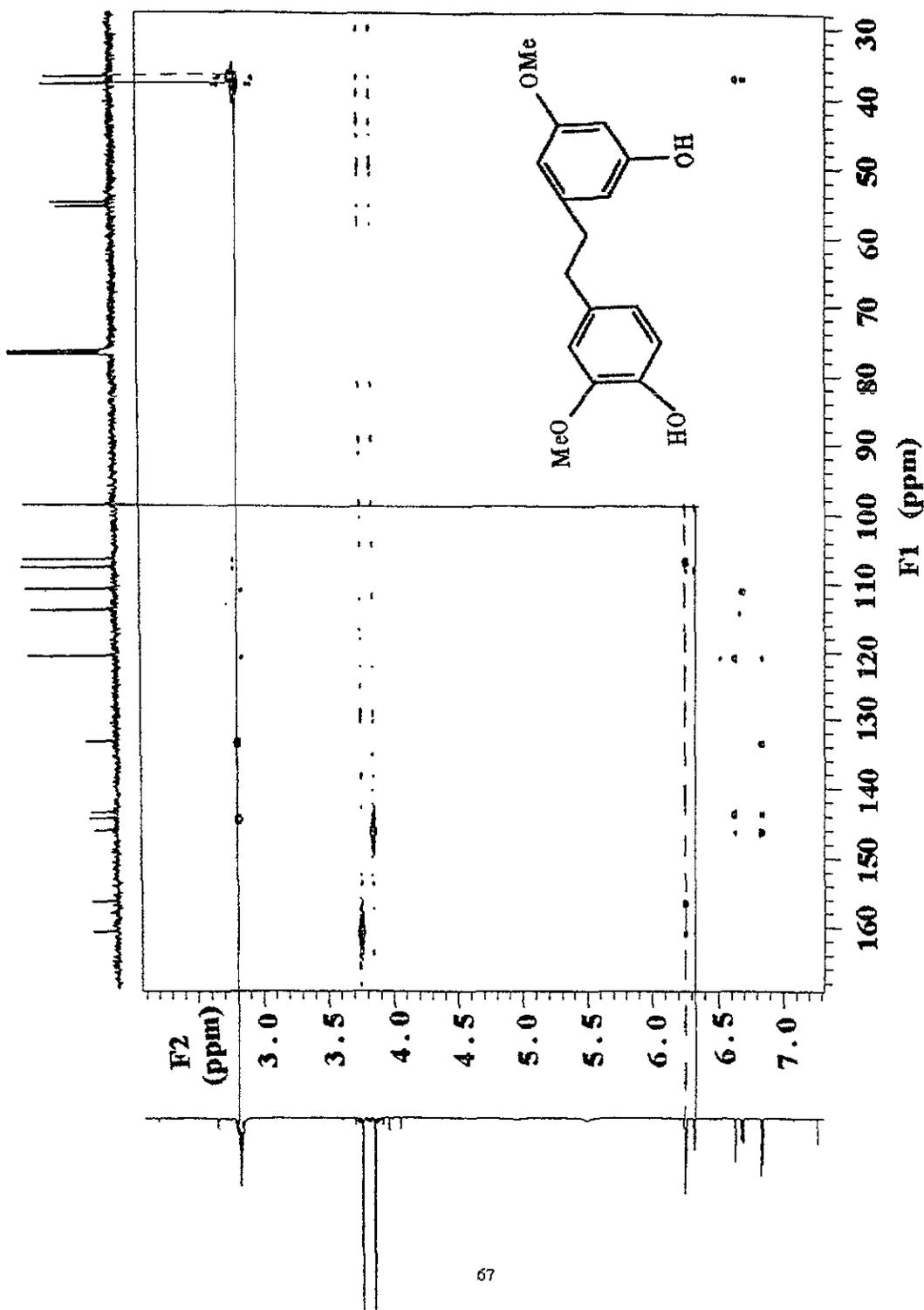
**Espectro 9.** Espectro en el IR del 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1)



**Espectro 10. Espectro de masas del 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibifenilo (1).**



Espectro 11. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibenlo(1).



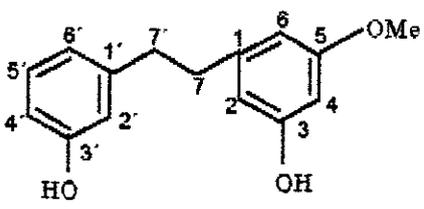
Espectro 12. Espectro de HMBC del 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1).

#### 4.2.3. Caracterización del compuesto 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (2).

El compuesto 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo se obtuvo a partir de la fracción primaria activa ER-VII.

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de este compuesto se resumen en los cuadros 19 - 21.

**Cuadro 19. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (2).**

Compuesto <b>3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo.</b>	
Fórmula molecular	$C_{15}H_{16}O_3$
Punto de fusión	89.5-90.5°C
Peso molecular	244.11 g/mol
IR $\sqrt{\text{max}}$ KBr $\text{cm}^{-1}$ (Espectro 13)	3599, 2933, 1599, 1467, 1380.
EMIE $m/z$ (int. rel.) (Espectro 14)	244[M <sup>+</sup> , (80)], 137(100), 107(36)

**Cuadro 20. Datos de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δH) del producto 2.**

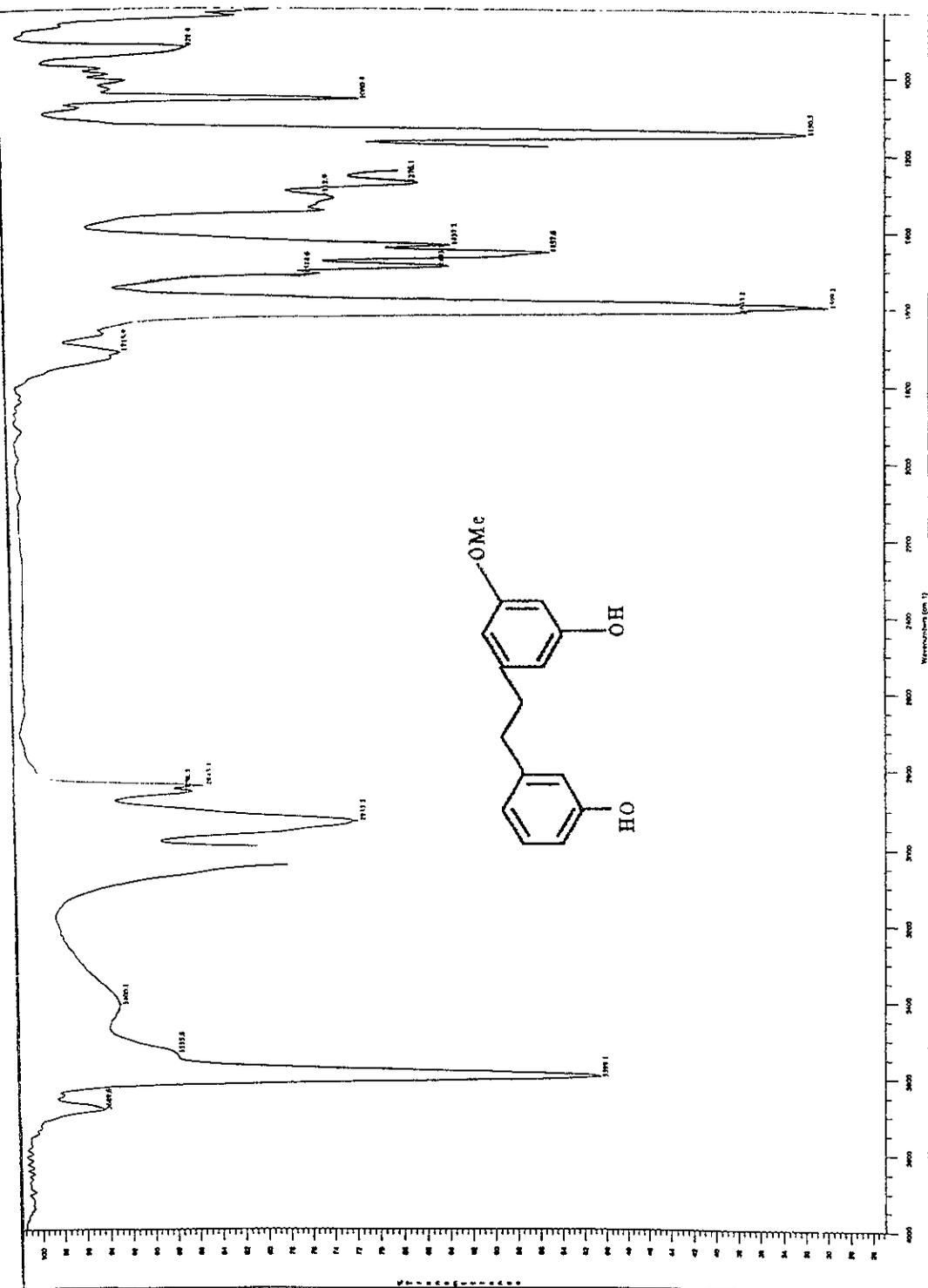
Protón	δH (mv, J)
H-6'	6.75 (da, 7.5)
H-5'	7.15 (dd, 8.0)
H-4', H-2'	6.65 (m)
H-4	6.32 (t, 1.5)
H-2, H-6	6.25 (m)
2OH	5.52 y 5.60 (sa)
OCH <sub>3</sub>	3.75 (s)
2CH <sub>2</sub>	2.84 (m)

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz. ; mv = multiplicidad.

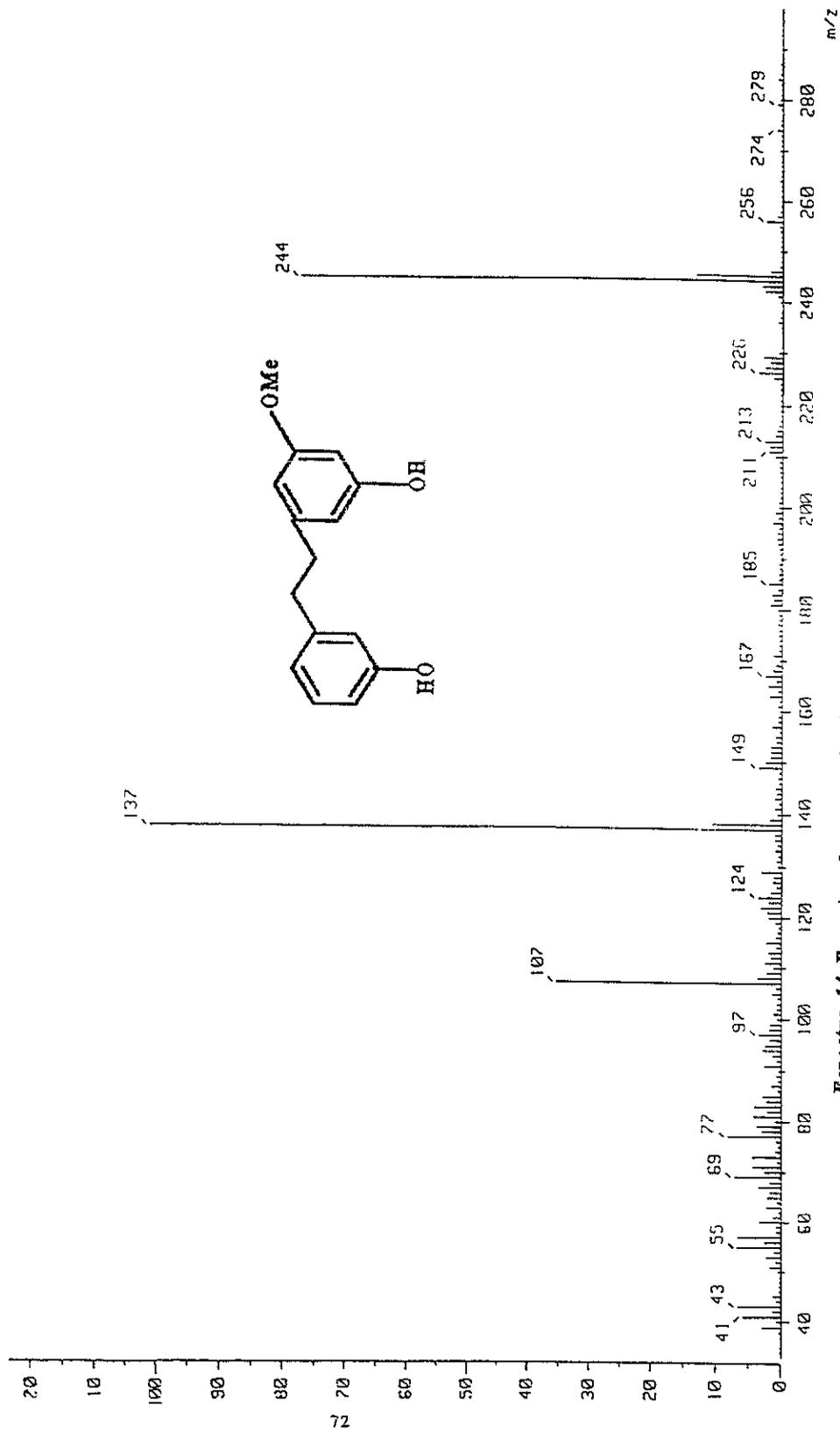
**Cuadro 21. Datos de RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δc) del producto 2.**

<b>Carbón</b>	<b>δc</b>
C-1	145.0
C-2	106.3
C-3	159.2
C-4	99.9
C-5	161.9
C-6	108.8
C-1'	144.3
C-2'	116.2
C-3'	158.2
C-4'	113.6
C-5'	130.0
C-6'	120.4
CH <sub>2</sub>	37.3
CH <sub>2</sub>	36.9
OCH <sub>3</sub>	55.6

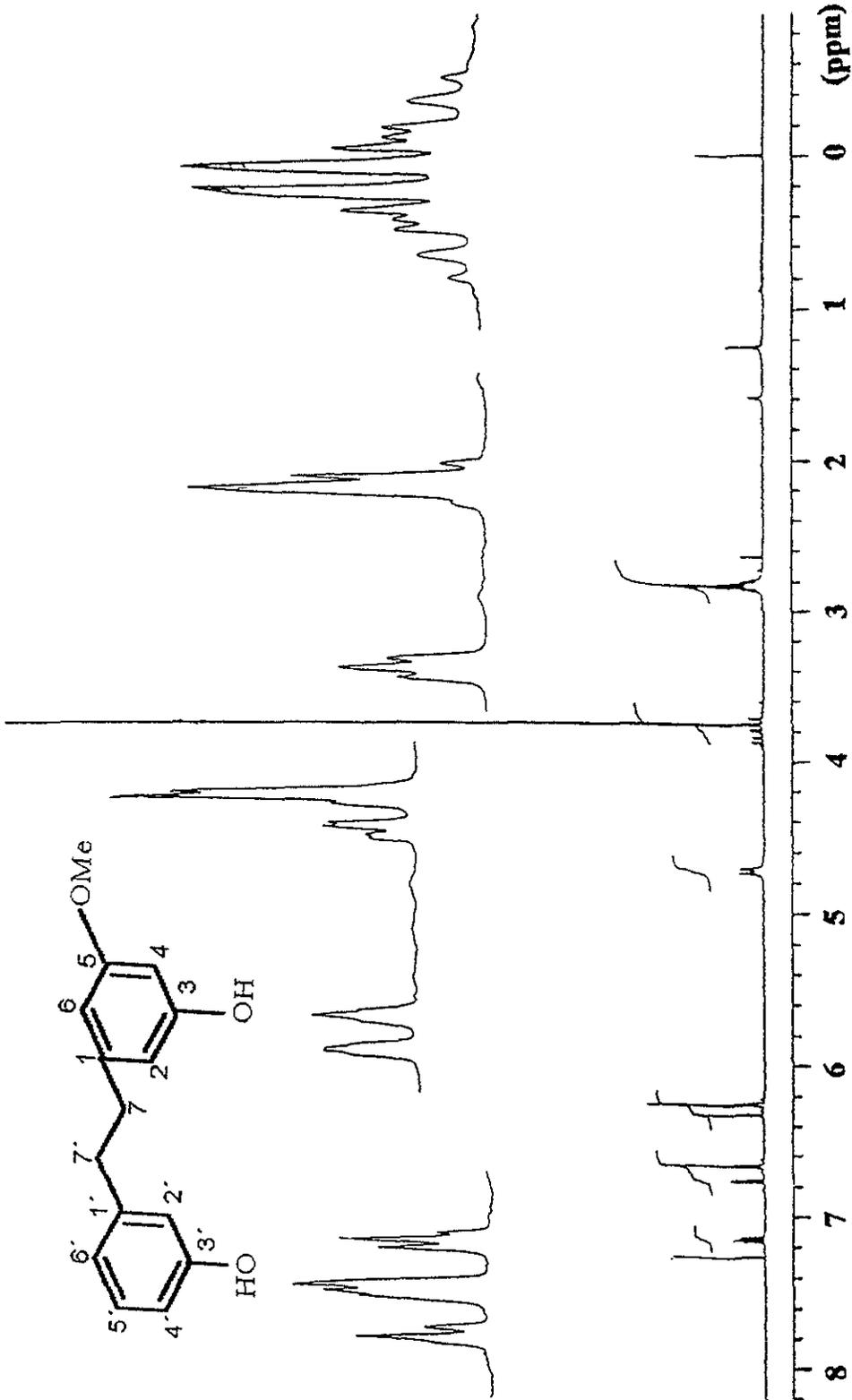
Para caracterizar el 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (2) se llevó a cabo un análisis similar al descrito para el compuesto anterior y su estructura se comprobó por comparación con una muestra auténtica, también aislada de la especie *S. fivida* (Estrada *et al.*, 1999a).



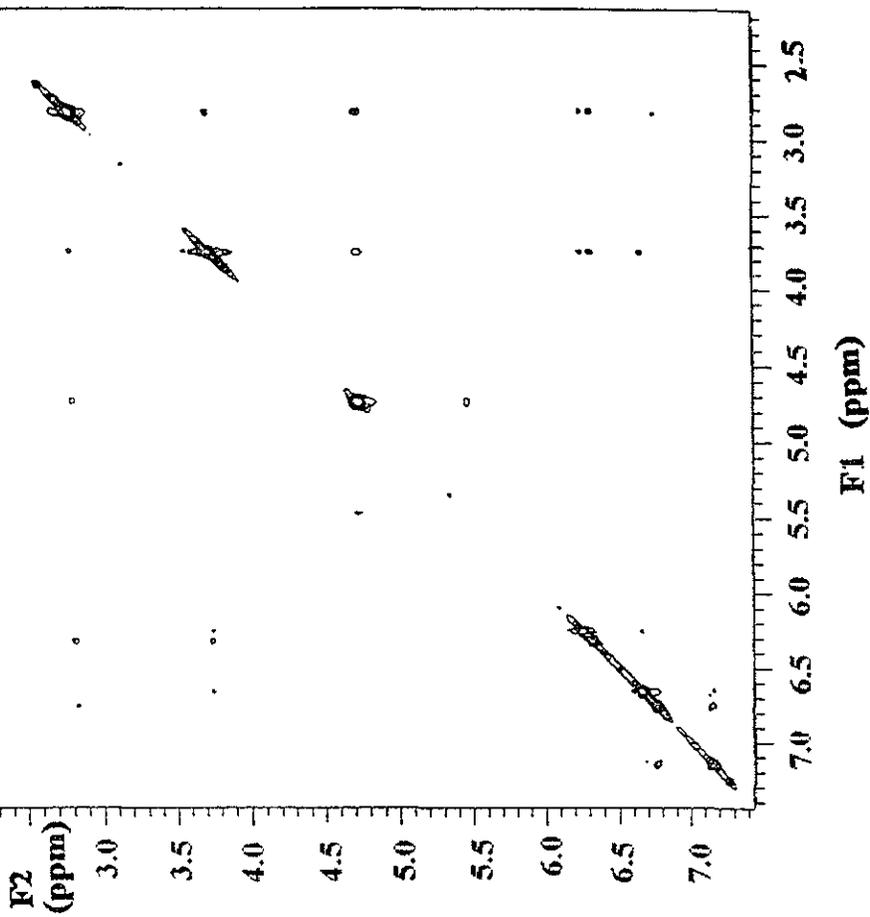
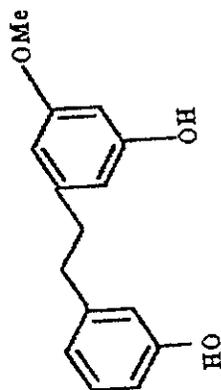
Espectro 13. Espectro en el IR del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (2)



Espectro 14. Espectro de masas del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibenclo (2)



Espectro 15. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (2)



Espectro 16. Espectro NOESY del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (2)

**4.2.4 Separación del alcohol triacontanílico (4) a partir del precipitado primario obtenido de la fracción primaria activa ER-IX.**

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas utilizadas para la identificación del compuesto 4 se resumen en los cuadros 22 y 23.

**Cuadro 22 . Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del alcohol triacontanílico (4) .**

Compuesto <b>Alcohol triacontanílico</b>	$\begin{array}{c} 30 \qquad 2 \quad 1 \\ \text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{27}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH} \end{array}$
Fórmula molecular	$\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}$
Punto de fusión	84°C
Peso molecular	438 g/mol
IR $\sqrt{\text{max}}$ KBr $\text{cm}^{-1}$ (Espectro 17)	3322, 2917, 2848, 1472, 1462.
EMIE $m/z$ (int. rel.) (Espectro 18)	420[M+H <sub>2</sub> O (25)], 392(28), 155(35), 139(60), 125(80), 111(80), 97(78), 83(70), 55(80), 43(100)

Cuadro 23. Datos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δH) del producto 4.

Protón	δH ( <i>mu</i> , J)
H-1	3.63 ( <i>t</i> , 6.9)
H-2	1.56 ( <i>m</i> )
H(3-29)	1.25 ( <i>s</i> )
H-30	0.88 ( <i>t</i> , 6.9)

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz. ; *mu* = multiplicidad.

Su espectro en el IR, presenta absorciones asociadas con la presencia de un grupo hidroxilo (3322 cm<sup>-1</sup>), metilenos alifáticos (2925, 2850 cm<sup>-1</sup>) y metilos (1472, 1462 cm<sup>-1</sup>).

El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ion molecular en una relación de *m/z* 438 *uma*, que corresponde a la fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>O. Esta fórmula corresponde a un alcohol alifático. El espectro de masas también presenta fragmentos importantes en 420 (*M*-H<sub>2</sub>O), 392, 155, 139, 125, 111, 97, 83, 55 y 43.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN del compuesto permite establecer que se trata de un alcohol primario alifático.

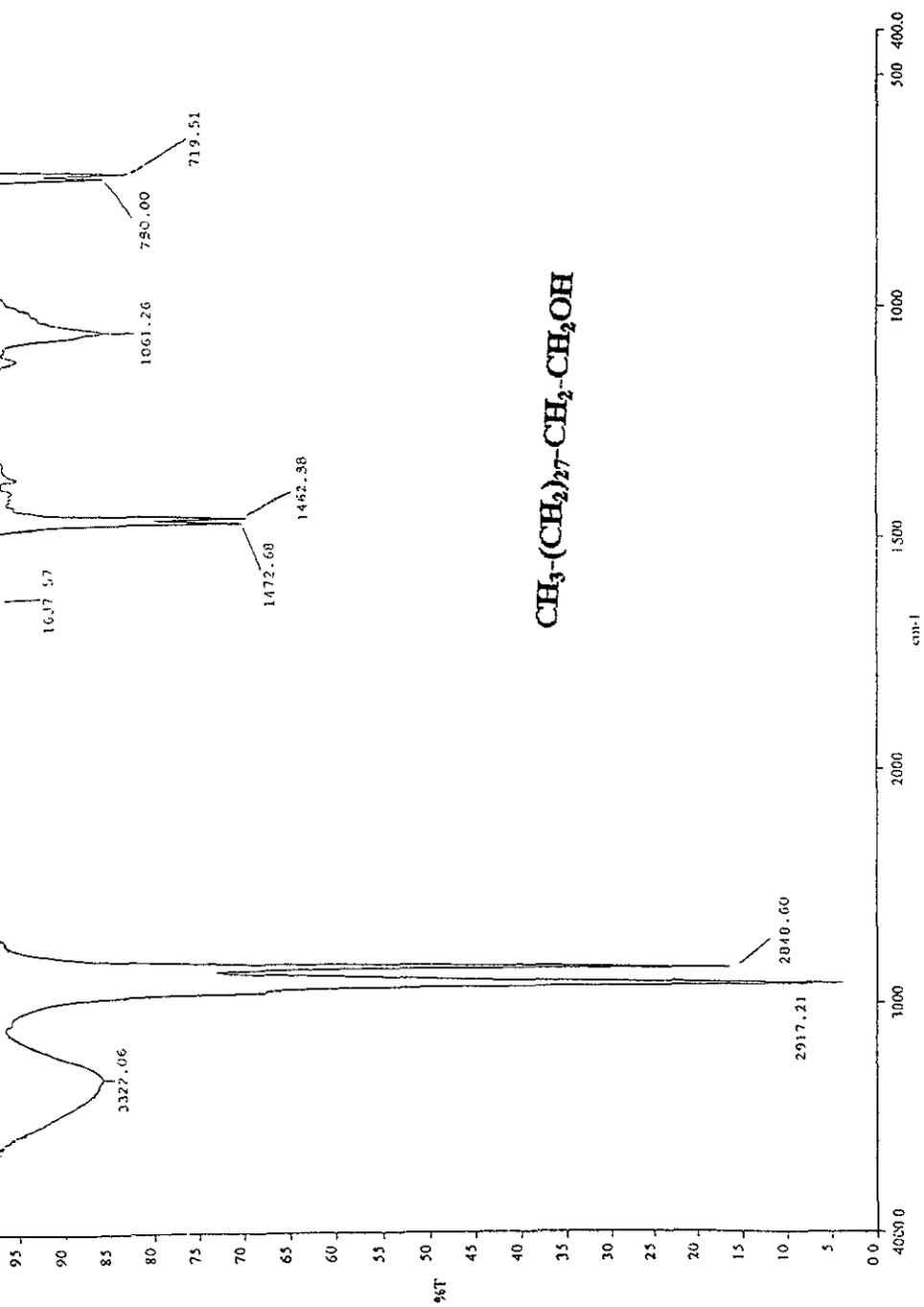
Las características más importantes del espectro de RMN-<sup>1</sup>H se resumen a continuación.

En la zona donde absorben los hidrógenos alifáticos se observan:

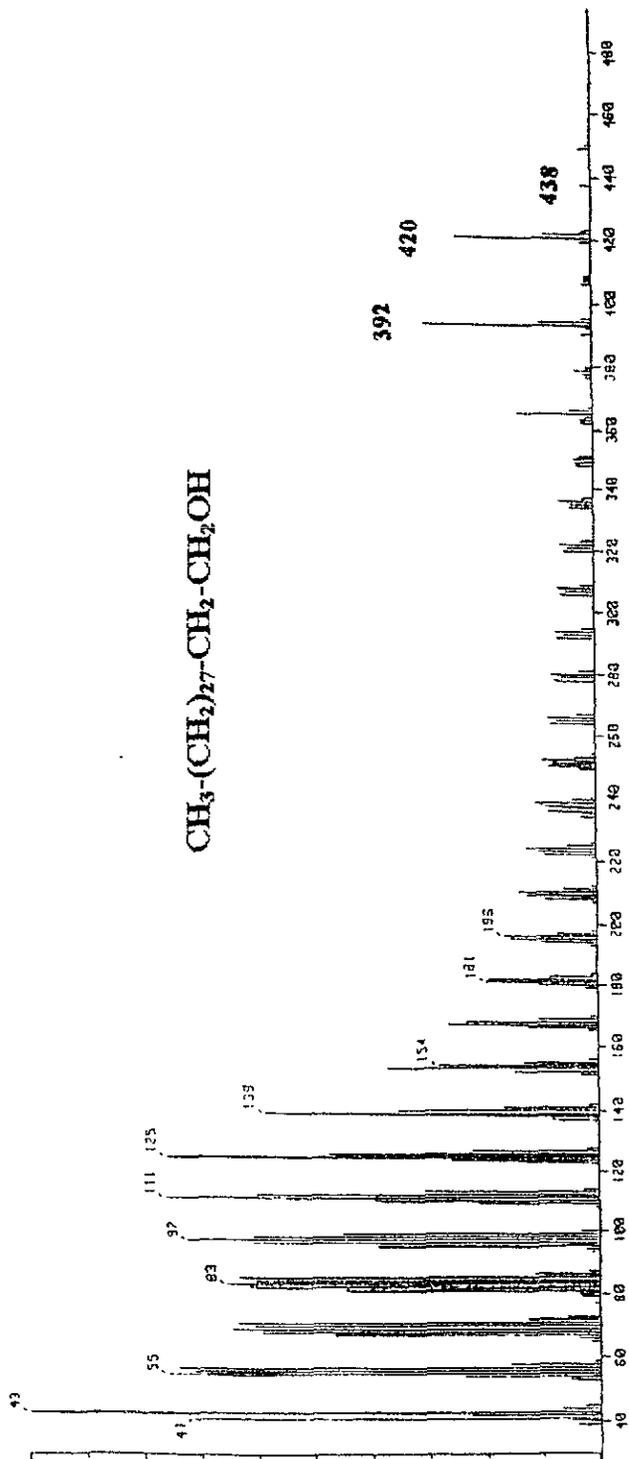
- a) Un triplete en  $\delta H$  3.63 (*t*,  $J=6.9$  Hz) que debido a su desplazamiento químico corresponde a un grupo metileno unido a un grupo hidroxilo.
- b) Un multiplete en  $\delta H$  1.56 (*m*) que corresponde a un grupo metileno.
- c) Un singulete ancho que integra para varios hidrógenos en  $\delta H$  1.25 (*s*) que evidencia la presencia de una cadena alifática.
- d) En  $\delta H$  0.88 (*t*,  $J=6.9$  Hz) se observa un triplete que corresponde a un metilo terminal de una cadena alifática lineal.

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C proporcionó evidencias adicionales que permitieron caracterizar al compuesto como el alcohol triacontanílico. Así, en  $\delta C$  63.1 se observó el metileno inicial unido a la función carbinólica. En  $\delta C$  14.053 se observó la señal atribuida al metilo terminal de la cadena; las demás señales corresponden a los metilenos restantes presentes en la molécula.

Con base en todas las evidencias presentadas el compuesto se caracterizó como el alcohol triacontanílico.

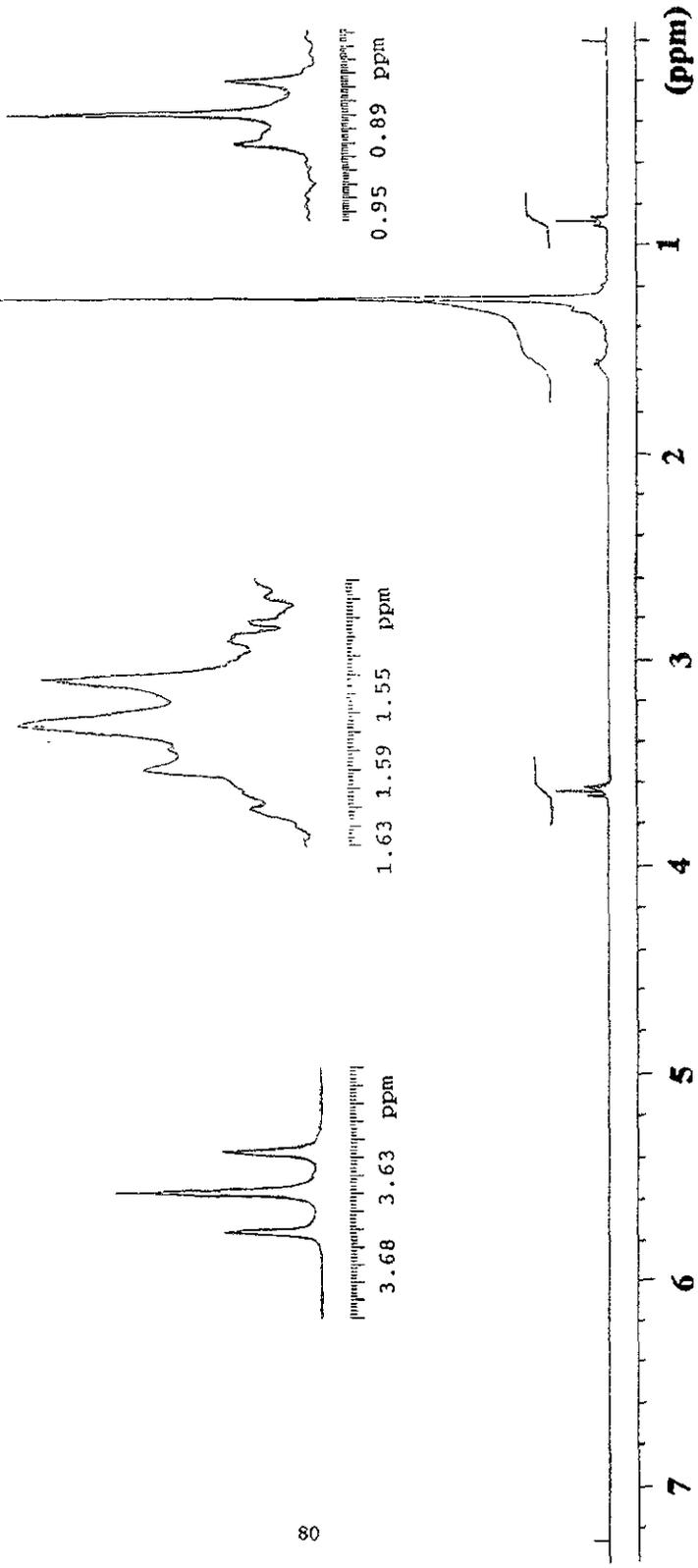


**Espectro 17.** Espectro en el IR del alcohol triacontanílico (4)

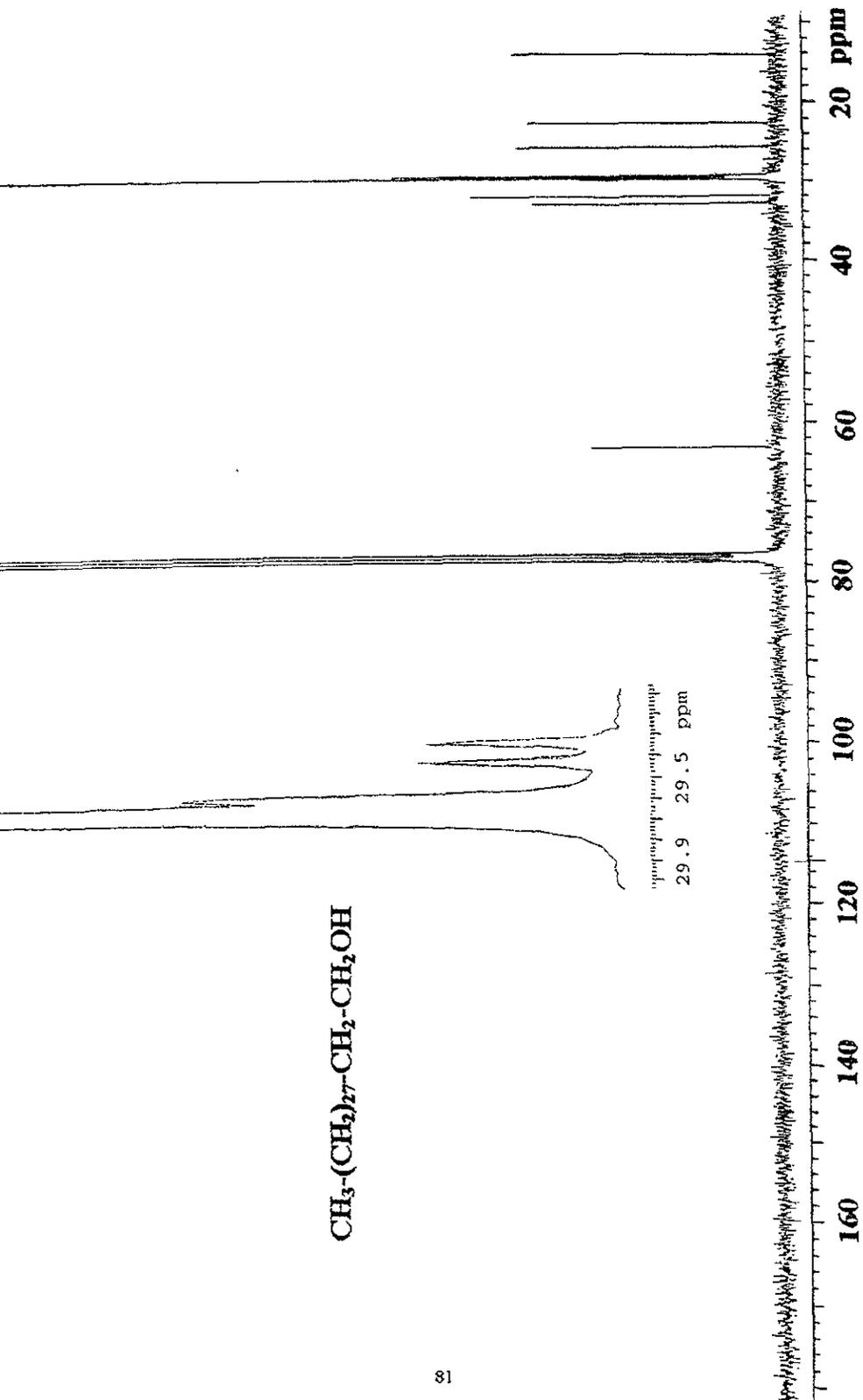


Espectro 18. Espectro de masas del alcohol triacontanílico (4)

ESTA TESTS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



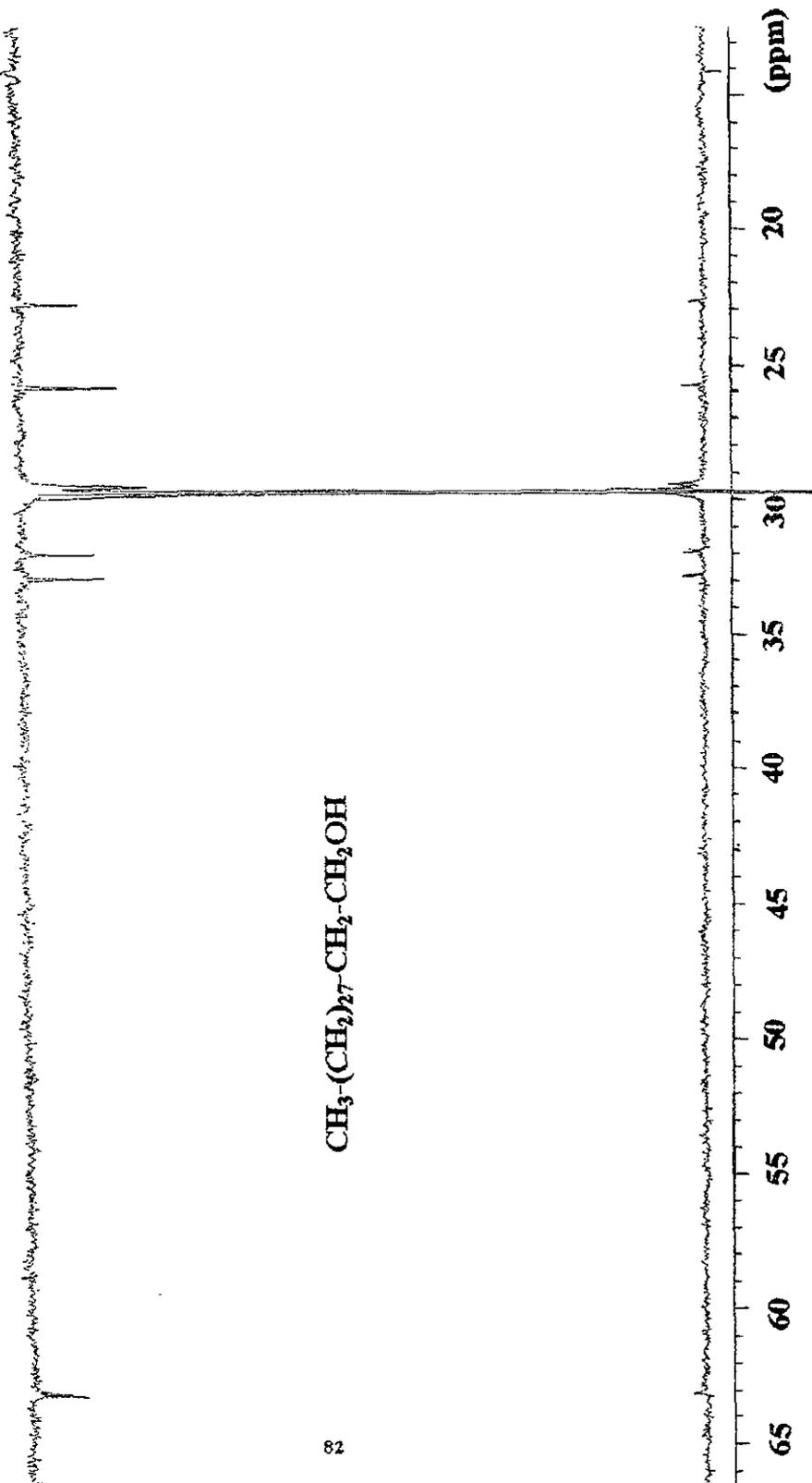
**Espectro 19.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del alcohol triacontanlico (4)



Espectro 20. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del alcohol triacontanlico (4)



82



Espectro 21. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT del alcohol triacontílico (4)

## 4.2 Actividad biológica de los compuestos aislados de *Epidendrum rigidum*.

De acuerdo con el diseño experimental planteado en esta investigación, se determinó el potencial de fitoinhibición a nivel pre-emergente, en semillas de *A. hypochondriacus* de los compuestos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1) y el 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (2). Las concentraciones utilizadas fueron de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados se encuentran expresados como porcentajes de inhibición del crecimiento radicular a las distintas concentraciones de prueba y como  $\text{Cl}_{50}$  en el Cuadro 24.

**Cuadro 24. Inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* inducido por los compuestos 1 y 3.**

Concentración (ppm)	Compuesto	
	1	3
10	5.33	4.10
100	32.90	65.23
1000	100	100
$\text{Cl}_{50}$ (M)	$6.49 \times 10^{-4}$	$1.16 \times 10^{-4}$
2,4-D $\text{Cl}_{50}$ (M)	$1.92 \times 10^{-4}$	$1.92 \times 10^{-4}$

Los compuestos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo (1) y el 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) demostraron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento

radicular de la especie de prueba. El compuesto 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (3) demostró la mayor potencia inhibidora. Ninguno de los compuestos afecta significativamente el proceso de germinación.

El compuesto 3,4'-dihidroxy-5,5'-dimetoxibencilo (1) también se evaluó a nivel post-emergente. Los resultados derivados de este bioensayo se muestran en el Cuadro 25, y están expresados como porcentajes de pérdida de peso (biomasa) y de disminución de la longitud del tallo de la arvense *A. hypochondriacus*, las concentraciones de prueba fueron  $10^{-3}$ M,  $10^{-4}$ M y  $10^{-5}$ M. Como se desprende de los resultados obtenidos, el producto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1) afecta el crecimiento de las plantas sólo a la concentración de  $10^{-3}$  M. En consecuencia el producto es más activo a nivel pre-emergente (Figura 8).

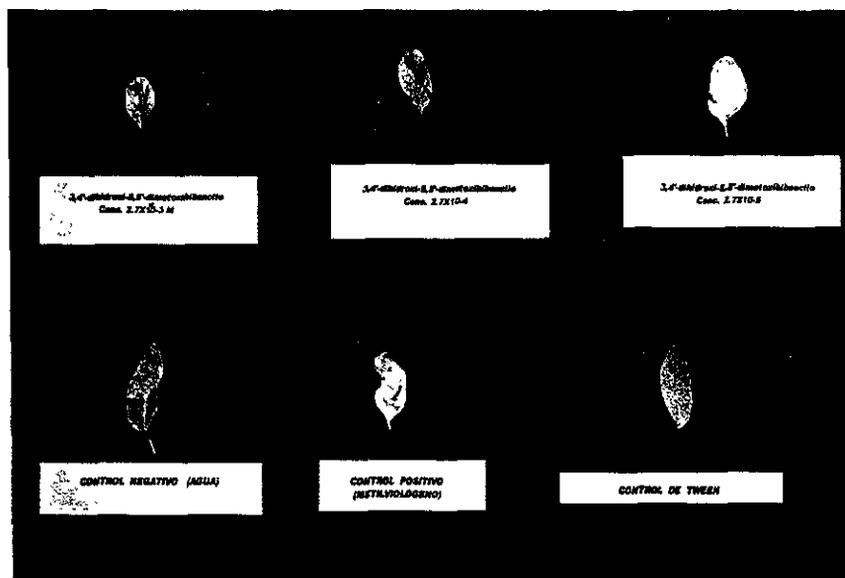


Figura 8. Efecto herbicida post-emergente del compuesto 1 sobre las plántulas de *A. hypochondriacus*.

**Cuadro 25. Efecto de fitoinhibición a nivel post-emergente del compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencilo (1) sobre el crecimiento y la producción de biomasa de la arveja *A. hypochondriacus*.**

Concentración (M)	% de pérdida de peso (biomasa)	% de disminución de longitud del tallo	Observaciones
10 <sup>-5</sup>	0	0	Hojas de aspecto normal. Sin pérdida de biomasa. Crecieron más que el control de agua.
10 <sup>-4</sup>	20.41	0	Partes dañadas. Pérdida de biomasa. Crecieron más que el control de agua.
10 <sup>-3</sup>	53.55	68.73	Necrosis de la hoja y partes de color café, dañadas. Menor longitud y pérdida de biomasa.
Surfactante Tween 80 (0.1 mL/L)	7.73	5.60	Hojas de color rojizo.
Control positivo (metilviológeno 10 <sup>-4</sup> M)	20.21	18.60	Necrosis de las hojas. Pérdida de biomasa y disminución de la longitud. Bordes quemados.

## V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

a) En este estudio se determinó el potencial fitotóxico pre-emergente del extracto total y de las fracciones primarias de la especie *Epidendrum rigidum* mediante la evaluación de su efecto sobre la inhibición del crecimiento radicular y la germinación de la arvense *Amaranthus hypochondriacus* (Amarantaceae). También se evaluó el efecto post-emergente del extracto crudo sobre plántulas de *A. hypochondriacus*. Los resultados indicaron que el extracto posee propiedades fitotóxicas tanto a nivel pre-emergente como post-emergente.

b) El estudio fitoquímico biodirigido del extracto fitotóxico de *Epidendrum rigidum* utilizando como prueba de monitoreo el ensayo a nivel pre-emergente, permitió el aislamiento y caracterización de un alcohol alifático y tres compuestos aromáticos. Los compuestos aromáticos incluyen dos bibencilos y un dihidrofenantreno. Los bibencilos se caracterizaron como el 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo y el 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (Batatasina III). El dihidrofenantreno se caracterizó como el 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihydrofenantreno. La caracterización de los compuestos se realizó por métodos espectroscópicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C) y espectrométricos (espectrometría de masas).

c) Los productos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo y el 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihydrofenantreno demostraron un efecto significativo inhibitor sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*. El efecto fue comparable al del 2,4-D, utilizado como un control positivo.

d) El compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo también demostró propiedades fitotóxicas a nivel post-emergente inhibiendo significativamente la producción de biomasa y el crecimiento de plántulas de la especie de *A. hypochondriacus*.

e) Este estudio constituye la primera descripción de propiedades fitotóxicas de bibencilos y fenantrenos, por lo tanto estos productos pueden constituir nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de agentes herbicidas.

## VI PERSPECTIVAS

1) Aislar y caracterizar los metabolitos con actividad fitotóxica pre-emergente presentes en las fracciones primarias activas ER-V, ER-VI, ER-VIII y ER-IX, por medio de la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y de otras técnicas cromatográficas.

2) Evaluar el efecto post-emergente del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10- dihirofenantreno, del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo y de los otros compuestos que se aislarán de las fracciones fitotóxicas.

3) Determinar el efecto pre- y post-emergente de los compuestos fitotóxicos aislados sobre otras especies de arvenses.

d) El compuesto 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibibencilo también demostró propiedades fitotóxicas a nivel post-emergente inhibiendo significativamente la producción de biomasa y el crecimiento de plántulas de la especie de *A. hypochondriacus*.

e) Este estudio constituye la primera descripción de propiedades fitotóxicas de bibencilos y fenantrenos, por lo tanto estos productos pueden constituir nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de agentes herbicidas.

## VI. PERSPECTIVAS

1) Aislar y caracterizar los metabolitos con actividad fitotóxica pre-emergente presentes en las fracciones primarias activas ER-V, ER-VI, ER-VIII y ER-IX, por medio de la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y de otras técnicas cromatográficas.

2) Evaluar el efecto post-emergente del 4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10- dihirofenantreno, del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo y de los otros compuestos que se aislarán de las fracciones fitotóxicas.

3) Determinar el efecto pre- y post-emergente de los compuestos fitotóxicos aislados sobre otras especies de arvenses.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Afza, N., Khan, A.Q., Malik A. & Badar, Y. Cyclocaducinol, a cycloartane type triterpene from *Euphorbia caducifolia*. *Phytochemistry* **28**, 1982-1984 (1989).
2. Ames, O. & Correll, D. (eds.). *Orchids of Guatemala*, Fieldiana Botany Chicago Natural History Museum **26** (1952).
3. Anaya, A.L., Ramos, O.R.L., Cruz, O.R. & Hernández, J. Studies on allelopathy in Mexico (Waller G.R., ed. *Allelochemicals: Role in agriculture and forestry*). ACS. Symposium Series 330, Washington, D.C. 89-101. (1987).
4. Anaya, A.L., Calera, M., Mata, R. & Pereda, R. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*. **16**, 2145-2152 (1990).
5. Anderson, J.E., Goetz, C.M., Mc Laughlin, J. & Suffness, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as tumor prescreens. *Phytochemical Analysis* **2**, 107-111 (1991).

6. Anuradha, V., Prakasa, N.S. & Udayabhaskar, M. Ochrolone, a pyrene from *Coelogyne ochracea*. *Phytochemistry* **39**, 1429-1431 (1995).
7. Arctander, S. *Perfume and flavour chemicals*. Vol. 2. Montclair N.J. (1969).
8. Bai, L., Yamaki, M. & Takagi, S. Lignans and bichroman from *Pleione bulbocoides*. *Phytochemistry* **44**, 341-343 (1996).
9. Bai, L., Masukawa, N., Yamaki, M. & Takagi, S. Two bibenzyl glucosides from *Pleione bulbocoides*. *Phytochemistry* **44**, 1565-1567 (1997).
10. Benner, J.P. Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticide Science* **39**, 95-102 (1993).
11. Bevan, C.W.L., Ekong, D.E.U. & Taylor, A.H. Extractives from west African members of the family Meliaceae. *Nature* **26**, 1323-1325 (1965).
12. Blomqvist, L., Leander, K., Luning, B. & Rosenblom, J. Studies on Orchidaceae alkaloids XXIX. The absolute configuration of Dendroprimine, an alkaloid from *Dendrobium primulinum* Lindl. *Acta Chem. Scand.* **26**, 3203-3206 (1972).

13. Bohmann, F., Knauk, W., Grenz, M. & Lane, M.A. Ein neues diterpen aus *Xanthocephalum linearifolium*. *Phytochemistry* **18**, 2040-2042 (1979).
14. Brandange, S., Luning, B., Moberg, C. & Sjostrand, E. Studies on Orchidaceae alkaloids XXIV. A pyrrolizidine alkaloid from *Phalaenopsis cornu-cervi* Rehb. f. *Acta Chem. Scand.* **25**, 349-350 (1971).
15. Brandange, S., Luning, B. & Lundin, C. Studies on Orchidaceae alkaloids XXXI. Synthesis of 1-ethoxycarbonyl- $\Delta^{1,9}$ -dehydropyrrolizidine and some other pyrrolizidine derivatives. *Acta Chem. Scand.* **27**, 433-438 (1973).
16. Breitmair, E. & Voeter, W. (eds.) 13 C NMR spectroscopy of organic compounds. *High resolution methods and application in organic chemistry and biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed., VCH, Holand. 183-186 (1994).
17. Bye, R., Linares, E & Estrada, E. Phytochemistry of medicinal plants (Amason, J.T., Romeo, J.T. & Mata, R., eds., *Recent advances in Phytochemistry*). Plenum Press, Nueva York **29**, 65-82 (1995).
18. Castañeda, P., García, M.R., Hernández-Bautista, B., Torres, B.A., Anaya, A.L. & Mata, R. Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* Tendl.

- (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *Journal of Chemical Ecology* **7**, 1025-1037 (1992).
19. Cremlyn, R.J. (ed.) *Agrochemicals preparation and mode of action*. John Wiley & Sons, England. 217-220 (1991).
20. Das, M.C., Mahato, S.B. Triterpenoids: Review. *Phytochemistry* **22**, 1071-1095 (1983).
21. Dressler, L.R. (ed.) *The orchids natural history and classification*. Harvard University Press. London. 50-159 (1981).
22. Dressler, L.R. (ed.) *Phylogeny and classification of the orchid family*, Dioscorides Press. 13-57 (1993).
23. Drevon. Vanillisme. *Ann. d'Hyg. Méd. Colon.* **2**, 529-532 (1899).
24. Duke, S.O. Herbicide chemistry, degradation and mode of action. (Kearney, P.C., & Kaufman, D.D., EDS., *Allelopathy: Organisms, processes and application*). Marcel Dekker Inc. New York. ACS Symposium Series 582. 311-329 (1988).
25. Duke, S.O. Plants terpenoids as pesticides. (Keeler, R.F. & Tu, A.T., (eds.) *Handbook of natural toxins*). Marcel Dekker. Inc. N.Y. **6**, 269-291 (1991).

26. Duke, S.O. & Abbas, H. K. En: Inderjit, K.M.M. Dakshini y Einhellig, F. A. Allelopathy organisms, processes and applications. Natural products with potential use as herbicides. ACS. 348-362 (1995).
27. Elander, M., Leander, K., Rosenblom, J. & Ruusa, E. Studies on Orchidaceaealkaloids XXXI: Crepidine, crepidamine and dendrocrepine, three new alkaloids from *Dendrobium crepidatum* Lindl. *Acta Chem. Scand.* 27, 1907-1913 (1973).
28. Estrada, S.E., Rojas, A., Mathison, Y., Montenegro, R., Israel, A. & Mata, R. Nitric oxide/cGMP mediate the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybiphenyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Médica* 65, 1-6 (1999a).
29. Estrada, S.E., Toscano, R.A. & Mata, R. New phenanthrene derivatives from *Maxillaria densa*. *J. Nat. Prod.* 62, 1175-1178 (1999b).
30. Fischer, N. & Quijano, L. Allelopathic agents from common weeds: *Amaranthus palmeri*, *Ambrosia artemisiifolia* and related weeds. *Am. Chem. Soc. Sym. Ser.* 268, 133-147 (1985).
31. Ghisalberti, E. Detection and isolation of bioactive natural products. (Colegate, S. & Molyneux, R., eds., *Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination*). CRC Press, U.S.A. 10-49 (1993).

32. Govardham, Ch., Prasad, R. & Sundararamaiah, T. 3-epi-cyclolaudenol and known triterpenes from *Euphorbia caudicifolia*. *Phytochemistry* **23**, 411-413 (1984).
33. Harbone, J.B. & Williams, C.A. Recent advances in the chemosystematics of the monocotyledons. *Phytochemistry* **37**, 3-18 (1994).
34. Hausen, B.M. Toxic and allergenic orchids (Arditti, J., ed. *Orchid Biology Reviews and Perspectives III*). Cornell University Press. 263-282 (1984).
35. Hemscheidt, T. Biosynthesis of anosmine: Incorporation of the intact six-carbon chain of lysine and of piperolic acid. *Journal of natural products* **8**, 207-208 (1993).
36. Hietz, P. & Hietz-Seifort, V. (eds.) Epifitas de Veracruz, Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas Ver. Instituto de Ecología A.C. Primera edición (1994).
37. Hoagland, R.E. Herbicidal properties of the antibiotic monesin. *J. Sci. Food Agric.* **70**, 373-379 (1996).
38. Hostettmann, K. & Hamburger, M. Search for new lead compounds of natural origin. *Perspect. Med. Chem.* 475-488 (1993).
39. Hutchinson, J. An eruption caused by vanilla. *Arch. Surgery* **4**, 49-50 (1892/93).

40. Ibarra-Manríquez, G. & Sinaca Colín, S. Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México: Lista florística comentada (*Mimosaceae* a *Verbenaceae*). *Rev. Biol. Trop.* **44**, 41-60 (1996).
41. Inoue, M., Nishimura, H., Li, H.H. & Mizutani, J. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* FR. SCHM. (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology* **18**, 1833-1840 (1992).
42. Inubushi, Y., Teuda, Y., Konita, T. & Matsumoto, S. Shihunine. A new phthalide-pyrrolidine alkaloid. *Chem. Pharm. Bull.* **12**, 749-750 (1964).
43. Karin, A., Karlson, B. & Groth, I. Volatiles from the flowers of four species in the sections Arachnitiiformes and Araneiferæ of genus *Ophrys* as insect mimetic attractants. *Phytochemistry* **25**, 1297-1299 (1986).
44. Kikuchi, T., Kadota, S., Hanagaki, S., Suehara, H., Namba, T., Lin, Ch., & Kan, W., Studies on the constituents of Orchidaceous plant I. Constituents of *Nervilia purpurea* Schlechter and *Nervilia aragoana* Gaud. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 2073-2078 (1981).
45. Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. & Namba, T. Occurrence of nonconventional side chain sterols in Orchidaceous plant, *Nervilia purpurea* Schlechter and structure of nervisterol. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 370-373 (1982).

46. Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. & Shima, T.. Studies on the constituents of Orchidaceous plants II. Isolation structures and stereochemistry of ciclonevriol, cyclohomonevriol and dihidrocicloeucaolol C-24 epimers, new triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1914-1929 (1985a)
47. Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. & Shima, T.. Studies on the constituents of Orchidaceous plants III. Isolation of non-conventional side chains sterols from *Nervilia purpurea* Schlechter and structure determination of nervisterol. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 2235-2242 (1985b).
48. Klocke, J.A., Balandrin, M.F., Adaos, R.P. y Kingsford, E. Insecticidal chromenes from the volatile oil of *H. fitchii*. *J. Chem. Ecol.* **6**, 701-712 (1985).
49. Kuehule, A.R., Lewis, D.H., Markham, K.R., Mitchell, K.A., Davies, K.M. & Jordan, B.R. Floral flavonoids and pH in *Dendrobium* an *Orchis* species and hybrids. *Euphytica* **95**, 187-194 (1997).
50. Layet, A. Étude sur le vanillisme, ou accidents causées par la vanille. *Rév. d'Hyg. Police sanitaire* **5**, 711-724 (1883).

51. Leong, Y.W., Kang, Ch., Harrison, L.J. & Powell, A.P. Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the orchid *Bulbophyllum vaginatum*. *Phytochemistry* **44**, 157-165 (1997).
52. Lindstrom, B. & Luning, B. Studies on Orchidaceae alkaloids XIII A new alkaloid, labumine acetate, from *Vanda cristata* Lindl. *Acta Chem. Scand.* **23**, 3352-3354 (1969).
53. Lowery, C. (ed.). Reagent Chemicals. *American Chemical Society Specification*, Washington, D.C. 90-91 (1993).
54. Luning, B., Trankner, H. & Brandange, S. Studies on Orchidaceae alkaloids V. A new alkaloid from *Phalaenopsis amabilis* Bl. *Acta Chem. Scand.* **20**, 2011 (1966).
55. Luning, B. Studies on Orchidaceae alkaloids IV. Screening of species for alkaloids 2. *Phytochemistry* **6**, 857-861 (1967).
56. Macías, M.L. Determinación del potencial herbicida de los principios fitotóxicos de *Esenbekia yaxhoob* y *Stauranthus perkoratus*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM (1996).
57. Mahato, S.B., Nandy, A.K. & Roy, G. Triterpenoid: Review. *Phytochemistry* **31**, 2199-2249 (1992).

58. Maille, M., Morel, G. & Gautheret, R. Mise en evidence d'une amine phénolique dans diverses Orchidées du genre *Cattleya* *Compt. Rend. Acad. Sci. Ser. D.* **278**, 2217-2218 (1974).
59. Majumder, P.L. & Laha, S. Occurrence of 2,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene in *Coelogyne ovals*, a high altitud Himalayan Orchis application of C-13 RMN Spectroscopy in structure elucidation. *J. Indian Chem. Soc.* **58**, 928-929 (1981).
60. Majumder, P.L., Bandyopadhyay, D. & Joardar, S. Coelogin and coeloginin: two novel 9,10-dihydrophenanthrene derivatives from the orchid *Coelogyne cristata*. *J. Chem. Soc. Perkin 1*, 1131-1136 (1982a).
61. Majumder, P.L., Sarkar, A.K. & Chakraborty, J. Isoflavidinin and isoxoflavidinin, two 9,10-dihydrophenanthrenes from the orchis *Pholidota articulata*, *Otochilus porecta* and *Otochilus fusca*. *Phytochemistry* **21**, 2713-2716 (1982b).
62. Majumder, P.L., Datta, W., Sarkar, A.K. & Chakraborty, J. Flavidin, a novel 9,10-dihydrophenanthrene derivatives of the orchis *Coelogyne flavida*, *Pholidota articulata* and *Otochilus fusca*. *J. Nat. Prod.* **45**, 730-732 (1982c).

63. Majumder, P.L. & Pal, A. 2, 4-methylene cycloartanyl p-hydroxycinnamate from the orchid *Cirrhopetalum elatum*. *Phytochemistry* 24, 2120-2122 (1985a).
64. Majumder, P.L. & Chakraborti, J. Structures of cyclootochilone and otochilone, two novel steroidal ketones of the orchids *Otochilus porrecta* and *Otochilus fusca*. *Tetrahedron* 41, 4973-4978 (1985b).
65. Majumder, P.L. & Maiti, D.C., Flaccidin, a 9,10-dihydrophenanthropyran derivate from the orchid *Coelogyne flaccida*. *Phytochemistry* 27, 899-901 (1987).
66. Majumder, P.L. & Kar, A. Erianol, 4a-methylsterol from the orchid *Eria convallarioides*. *Phytochemistry* 28, 1487-1490 (1989).
67. Majumder, P.L. & Pal, S. A steroidal ester from *Coelogyne uniflora*. *Phytochemistry* 29, 2717-2720 (1990).
68. Majumder, P.L., Roychowdhury, M., & Chakraborty, S. Bibenzyl derivatives from the orchid *Bulbophyllum protractum*. *Phytochemistry* 44, 167-172 (1997).
69. McVaugh, R. (ed.) *Flora novogaliciana*. A descriptive account of the vascular plants of western México. The University of Michigan Press 16, 1-5 (1985).

70. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobse, L.B., Nichols, D.E. & McLaughlin, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**, 31-34 (1982).
71. Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S. & Kameoka, H. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *J.Agric. food. Chem.* **45**, 2849-2853 (1997).
72. Moreland, D.E. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**, 597-638 (1980).
73. Noda, N., Kobayashi, Y., Miyahara, K. Fukahori, S. 2,4-Bis(4-hydroxybenzil) phenol from *Gastrodia elata*. *Phytochemistry* **39**, 1247-1248 (1995).
74. Okamoto, N. The structure of dendroxine. The third alkaloids from *Dendrobium nobile*. *Chem. Pharm. Bull.* **14**, 672-675 (1966).
75. Onaka, T., The structure of Nobilonine. The second alkaloid from *Dendrobium Nobile*. *Chem. Pharm. Bull.* **13**, 745-747 (1965).
76. Pavia, D.L., Lapman, G.M., Kris, G.S. & Engel, R. (eds.) *Organic laboratory techniques a microscale approach*. Saunder, W.B., Saunder, Co. Philadelphia. 345 (1995).

77. Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A.L., Wickramaratne, D.B., Pezzuto, J. & Kinghorn, D. Tricolorin A, mayor phyto growth inhibitor from *Ipomea tricolor*. *J. Nat. Prod.* **56**, 571-582 (1993).
78. Pilmoor, J.B., Wright, K. & Terry, A.S. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pestic. Sci.* **39**, 131-140 (1993).
79. Rodgers, B.P. Potential of biopesticides in agriculture. *Pesticide Science* **39**, 117-129 (1993).
80. Rodríguez, L.M., Obtención de compuestos fitotóxicos de *Maxilaria densa* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM (1998).
81. Shriner, R.L., Fuson, R.C. & Curtin, D.Y. (eds.) *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*, Limusa, México (1980).
82. Slayter, M.B. The distribution and chemistry of alkaloids in the Orchidaceae. (Arditti, J. (ed.) *Orchid Biology Reviews and Perspectives* 1). Cornell University Press, 95-115 (1977).

83. Sternitz, F.R., Suess, T.R., Schauer, C.K. & Anderson, O.P. New and old phenanthrene derivatives from *Oncidium cebollata*, a peyote replacement plant. *Journal of natural products* **46**, 417-423 (1983).
84. Stoessl, A. & Arditti, J. Orchid Phytoalexins. (Arditti, J. (ed.) *Orchid Biology Reviews and Perspectives* #1). Cornell University Press, 153-175 (1984).
85. Tanira, M.O., Bashir, A.K., Dib, R., Goodwin, C.S., Wasfi, I.A. & Banna, N.R. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. *Journal of Ethnopharmacology* **41**, 201-205 (1994).
86. Tatsuzawa, F., Saito, N., Seki, H., Hara, R., Yokoi, M. & Honda, T. Acylated cyanidin glycosides in the red-purple flowers of *Phalaenopsis*. *Phytochemistry* **173-177** (1997).
87. Terry, P. Grassy weeds. A general overview. En: Tropical grassy weeds. Baker, F.W. y Terry, P. J. (eds.) CAB International for CASAFA Gran Bretaña, 5-38 (1991).
88. Tezuka, Y., Hirano, H., Kikuchi, T., & Xu, L. Constituents of *Ephemerantha lonophylla*, Isolation and structure elucidation of new phenolic compound, ephemeranthol-A, ephemeranthol-B, and ephemeranthoquinone and of a new diterpene glucoside, ephemeranthoside. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 593-598 (1991).

89. Veeraju, P. Bibenzils and phenanthrenoids of some species of Orchidaceae. *Phytochemistry* **28**, 3031-3034 (1989).
90. Williams, C.A., Toscano, A.L., Harborne, J.B., Eagles, J. & Waterman, P.J. Methylated C-glycosylflavones as taxonomic markers in orchids of the subtribe Ornithocephalinae. *Phytochemistry* **37**, 1045-1053 (1994).
91. Williams, C.A. The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry* **18**, 803-813 (1979).
92. Worsham, A.D. Current and potential techniques using allelopathy as an aid in weed management. In: *Phytochemical ecology: allelochemicals, mycotoxins and insect pheromones and alomones*. C.H. Chou, G.R. Waller (eds.). Institute of Botany Academia Sinica Monograph Series No. 9. (1989).
93. Wright, N.P. (ed.) *Orquídeas de México*. Fournier, México, 9-16 (1958).
94. Wu, Ch. R., Itsich, M.T., Huang, S. Ch., Peng, W.H., Chang, Y.S. & Chen, Ch.F. Effects of *Gastrodia elata* and its active constituents on scopolamine induced amnesia in rats. *Planta Medica* **62**, 317-321 (1996).

95. Yamaki, M. & Honda, C. The stilbenoids from *Dendrobium plicatile*. *Phytochemistry* **43**, 207-208 (1996).
96. Zimmermann, A. & Dougoud, R.C. (eds.) *Orchidées Exotiques*, Deelachaux, Neuchatel; Beutes de la nature. (1959).