

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Estilbenoides Espasmolíticos de *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr (Orchidaceae) y *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae). Efecto del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo sobre el sistema óxido nítrico/GMP cíclico”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

(F A R M A C I A)

P R E S E N T A:

Q. F. B. SAMUEL ENOCH } ESTRADA SOTO

MEXICO, D.F.

282218

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

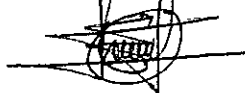
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Leovigildo Quijano
Primer vocal: Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Segundo vocal: Dr. Rafael Villalobos Molina
Tercer vocal: Dra. Alejandra Rojas Molina
Secretario: Dr. Rogelio Pereda Miranda
Primer suplente: Dr. Andrés Navarrete Castro
Segundo suplente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Sustantante:



Q. F. B. Samuel Enoch Estrada Soto.

Asesor:



Dra. Rachel Mata Essayag.

SITIOS DE REALIZACION DE LA TESIS.

Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

Departamento de Farmacología y Toxicología del CINVESTAV-IPN.

AGRADECIMIENTOS.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: DGAPA (Dirección de General de Asuntos del Personal Académico) IN205197; CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) convenio 27978N y PADEP (Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado) Nos. 207337 y 108308.

A la DGAPA y al CONACyT por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dra Alejandra Rojas, Profesor-Investigador de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, por su valiosa colaboración y enseñanza para la determinación de la actividad espasmolítica. Así mismo, agradezco las recomendaciones y comentarios durante la realización del trabajo farmacológico sobre *S. livida* y durante el proceso de revisión del presente manuscrito de tesis.

Al Dr Rafael Villalobos, investigador de la sección de Terapéutica Experimental del CINVESTAV-IPN, por su colaboración durante la realización de las actividades correspondientes a la determinación de la actividad farmacológica de los productos activos aislados de *S. livida* y *M. densa*. Le agradezco de manera muy especial sus recomendaciones y la oportunidad que me brindó de trabajar en su laboratorio durante el tiempo crítico que vivió la UNAM

A la Dra. Anita Israel, Profesora de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, por su interés en el presente proyecto de tesis y por su invaluable colaboración en la determinación del efecto de los estilbenoides activos sobre la producción de GMPc.

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

Al Dr. Andrés Navarrete Castro miembro de mi comité tutorial por sus valiosos comentarios que enriquecieron el trabajo farmacológico de este proyecto de investigación.

A Juan Javier López Guerrero y al Dr. Maximiliano Ibarra del Departamento de Farmacología y Toxicología del CINVESTAV-IPN, por la ayuda técnica brindada y por sus recomendaciones durante la determinación del efecto relajante de los compuestos **12** y **39** sobre la contracción inducida por la noradrenalina en anillos de aorta de rata.

A las Maestras Laura Acevedo Arteaga (Facultad de Química, UNAM) e Isela Rojas Molina (Facultad de Química, UAQ) por el apoyo técnico brindado durante la realización del presente trabajo de Investigación.

A los miembros de mi comité tutorial integrado por los doctores Andrés Navarrete Castro, Rogelio Pereda Miranda y Raul Enríquez Habib por el estímulo y recomendaciones brindados durante la realización de este proyecto de tesis.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones. Agradezco de manera muy especial al Dr. Rogelio Pereda Miranda, por sus comentarios y observaciones, que sin duda enriquecieron la versión final de esta tesis.

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

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

A la Q. F. B. Rocío Patiño del Instituto de Química de la UNAM, por los registros de los espectros de IR y UV.

A las Q. F. B. Graciela Chávez y Marisela Gutiérrez de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de algunos espectros de IR y UV.

A la Q. Georgina Duarte Lisci y el M. en C. José Luis Gallegos Pérez de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de algunos espectros de masas.

A la M. en C. Nuria Esturau Escofet, la Q. F. B. Rosa Isela del Villar Morales y el Q. F. B. Oscar S. Yáñez Muñoz de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de algunos espectros de RMN.

De manera muy especial, quiero agradecer a la Dra. Rachel Mata Essayag por la dirección de este proyecto de tesis, por despertar en mí el sentido de la responsabilidad y por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo.

DEDICATORIAS.

A Italivi Linares, mi amada esposa

Por darme la felicidad que no esperaba, por compartir estos últimos años conmigo y que gracias a tu apoyo y comprensión estoy terminando una de las etapas más difíciles de mi vida.

Te amo

A mis padres

Por ser un ejemplo de fortaleza, lucha y tenacidad. Por todo el amor, la confianza y el apoyo incondicional que me han brindado, y que gracias a ustedes he logrado todas mis metas.

A mis hermanos

Pepe, Rolando, Sandra, Marina, Jorge, Ricardo y Cris por el invaluable cariño que me han dado, a quienes les deseo lo mejor en la vida. Porque ustedes representan el tesoro máspreciado que puedo tener.

A todos mis sobrinos y cuñados

Porque son el resto de mi familia que nunca olvido y que quiero tanto, y por los maravillosos momentos que hemos compartido.

A mi otra familia

Nallely Linares, Itayé Linares, Dra Beatriz Zenteno, Efraín Linares y Rogelio Ibarra, por permitirme pertenecer a su familia y por el apoyo brindado en los momentos difíciles.

A mis grandes amigos

Zenón, Sally, Alejandro F., José Luis T., Alicia, Teresa G., Andrés N., y Socorro A., porque muy poca gente tiene la dicha de contar con este tipo de amigos.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio 124

Susana, Martha, Laura, Isabel, Blanca, Fausto, Ileana, Daniel C., María del Carmen, Emma, Elena, Norma, Janet, Perlita y Lupita, por los momentos compartidos.

A mis amigos y compañeros del Departamento de la sección de Terapéutica Experimental del CINVESTAV-IPN

Max, Juan Javier, Miguel, Lupita y Vero, por su ayuda y por aceptarme como amigo y compañero de trabajo.

A la Dra. Rachel Mata

Con cariño y respeto, por su gran profesionalismo y dedicación, por brindarme su amistad, por sus consejos y regaños (que no fueron pocos) y por enseñarme a que no hay imposibles en la vida.

INDICE

Resumen.....	i
Abstract.....	iv
Lista de abreviaturas.....	vi
Lista de Cuadros.....	ix
Lista de Esquemas.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Espectros.....	xiv
I. ANTECEDENTES.....	1
1 1. ESTILBENOIDES DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE.....	2
1 2. ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES <i>Scaphyglottis livida</i> (Lindley) Schltr Y <i>Maxillaria densa</i> Lindley.....	34
1.3. EL REINO VEGETAL COMO UNA FUENTE DE AGENTES ANTIESPASMÓDICOS.....	36
II. JUSTIFICACION, HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	45
2.1. JUSTIFICACION.....	46
2.2. HIPOTESIS.....	47
2.3. OBJETIVO GENERAL.....	48
2.4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	48
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	49
3 1. MATERIAL VEGETAL.....	50
3.2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS EN PEQUEÑA ESCALA PARA LA DETERMINACION DEL POTENCIAL ESPASMOLITICO DE LAS ESPECIES <i>Scaphyglottis livida</i> Y <i>Maxillaria densa</i>	50
3 3. ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	50
3.3.1. Determinación del efecto espasmolítico de extractos, fracciones y productos puros obtenidos de <i>Scaphyglottis livida</i> y <i>Maxillaria densa</i> sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.....	50
3.3.1.1. Aislamiento del íleon.....	51

3.3.1.2. Sistema de registro..	51
3.3.1.3. Evaluación del efecto relajante.....	52
3.3.2. Caracterización farmacológica preliminar de los compuestos activos aislados de la especie <i>Scaphyglottis livida</i>	53
3.3.3. Caracterización farmacológica preliminar de los compuestos activos aislados de la especie <i>Maxillaria densa</i>	54
3.3.4. Determinación de la formación de GMP cíclico (GMPc) en anillos de íleon o de aorta de rata inducido por los compuestos 12 y 39 aislados de <i>Scaphyglottis livida</i>	55
3.3.5. Determinación del efecto relajante de 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12) y del efemerantol B (39) obtenidos de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre la contracción inducida por noradrenalina (NA) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio.....	56
3.3.5.1 Obtención de la aorta torácica.....	56
3.3.5.2. Sistema de registro.....	56
3.3.5.3. Evaluación del efecto de las muestras de prueba.....	57
3.3.6. Determinación del efecto relajante de los compuestos 12 y 39 obtenidos de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre la contracción inducida por noradrenalina (NA) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio en presencia de azul de metileno y L-NAME.....	57
3.4. ESTUDIO FITOQUIMICO DE LAS ESPECIES <i>Scaphyglottis livida</i> Y <i>Maxillaria densa</i>	58
3.4.1. Análisis cromatográficos.....	58
3.4.2. Equipos utilizados para el análisis de difracción de rayos X y el registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	59
3.4.3. Estudio de la especie <i>Scaphyglottis livida</i>	60
3.4.3.1. Extracción y fraccionamiento preliminar de <i>Scaphyglottis livida</i>	60
3.4.3.2. Aislamiento y purificación de la batatasina III (1), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12) y la lusiantridina (82) presentes en la fracción primaria activa F-5 de <i>Scaphyglottis livida</i>	61

3.4.3.3. Aislamiento y purificación del efemerantol B (39) y del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54) presentes en la fracción primaria activa F-6 de <i>Scaphyglottis livida</i>	63
3.4.3.4. Aislamiento y purificación del <i>trans-p</i> -hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165) y del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (166) presentes en la fracción primaria activa F-4 de <i>Scaphyglottis livida</i>	65
3.4.4 Estudio de la especie <i>Maxillaria densa</i>	66
3.4.4.1. Extracción y fraccionamiento preliminar de <i>Maxillaria densa</i>	66
3.4.4.2. Aislamiento y purificación del nudol (41), de la gimnopusina (42), del fimbriol A (63), de la eriantridina (84), del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167) y del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168) presentes en la fracción primaria activa F-6.	68
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	71
4.1 SELECCION DE LAS ESPECIES <i>Scaphyglottis livida</i> Y <i>Maxillaria densa</i> COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE PRINCIPIOS ESPASMOLITICOS.....	72
4.2. OBTENCION DE LOS PRINCIPIOS ESPASMOLITICOS DE <i>Scaphyglottis livida</i>	74
4.3 OBTENCION DE LOS PRINCIPIOS ESPASMOLITICOS DE <i>Maxillaria densa</i>	77
4.4 ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS DE <i>Scaphyglottis livida</i> Y <i>Maxillaria densa</i>	80
4.4.1. Elucidación estructural de los compuestos 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167) y del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).....	81
4.4.2. Elucidación estructural de los compuestos 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12) y 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (1).....	93
4.4.3. Elucidación estructural del <i>trans-p</i> -hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165) y del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (166).....	98

4 5. EVALUACION DEL POTENCIAL ESPASMOLITICO DE LOS METABOLITOS AISLADOS DE <i>Scaphyglottis livida</i> Y <i>Maxillaria densa</i>	104
4 5.1. Evaluación de la batatasina III (1), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12), el efemerantol B (39), el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54) y la lusiantridina (82) aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.....	104
4 5.2. Caracterización farmacológica preliminar de la batatasina III (1), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12), el efemerantol B (39), el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54) y la lusiantridina (82) aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre la contracción inducida por diferentes espasmógenos en el íleon aislado de rata.....	106
4 5.3. Evaluación del nudol (41), la gimnopusina (42), el fimbriol A (63), la eriantridina (84) y el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167) aislados de <i>Maxillaria densa</i> sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata....	118
4 6. EFECTO DEL 3,4'-DIHIDROXI-3',5-DIMETOXIBIBENCIO (12) Y DEL EFEMERANTOL B (39) AISLADOS DE <i>Scaphyglottis livida</i> SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR NORADRENALINA (NA) EN ANILLOS DE AORTA DE RATA.....	123
V. CONCLUSIONES.....	128
VI. PERSPECTIVAS.....	131
VII. REFERENCIAS.....	133
VIII. ANEXO I.....	154
IX. ANEXO II.....	213

RESUMEN

Como parte de un estudio de orquídeas mexicanas como una fuente de agentes espasmolíticos, el presente proyecto de tesis doctoral describe la investigación química y la evaluación del potencial espasmolítico de los productos naturales aislados de *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr y *Maxillaria densa* Lindley. Ambas especies fueron recolectadas en la región de los Tuxtlas, estado de Veracruz.

La selección de las especies objeto de estudio se realizó con base en un criterio etnomédico. Posteriormente, se determinó el efecto espasmolítico de los extractos orgánicos totales de cada especie sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata. Los extractos de las dos especies de prueba mostraron un efecto relajante significativo dependiente de la concentración.

El fraccionamiento biodirigido de los extractos activos de *S. livida* y *M. densa* permitió el aislamiento de 11 estilbenoides y de dos triterpenoides de tipo cicloartano. Estos compuestos se caracterizaron como la batatasina III (1), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12), el efemerantol B (39), el nudol (41), la gimnopusina (42), el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54), el fimbriol A (63), la lusiantridina (82), la eriantridina (84), el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167), el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168), el *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165) y el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (166). Los productos 165, 167 y 168 constituyen productos naturales novedosos. La elucidación estructural de estos compuestos se realizó mediante la aplicación de diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas. En el caso de los productos 41,

84 y 167 las estructuras se establecieron de manera inequívoca mediante su análisis de difracción por rayos X.

El potencial espasmolítico de los estilbenoides aislados de *S. livida* y *M. densa* se determinó mediante la evaluación del efecto relajante de las contracciones espontáneas del íleon aislado de rata. En general, todos los compuestos mostraron una actividad espasmolítica significativa y dependiente de la concentración.

Con el objetivo de establecer el mecanismo de acción de los estilbenoides de prueba, se realizó una caracterización farmacológica preliminar utilizando diferentes espasmógenos (acetilcolina, histamina, cloruro de bario y L-NAME). En general, estas evaluaciones permitieron establecer que el efecto espasmolítico no involucra un efecto anticolinérgico, antihistaminérgico o un bloqueo de la entrada de calcio al interior de las células del músculo liso. De manera adicional, se estableció que algunos de estos compuestos inhibían de manera significativa las contracciones inducidas por el éster metílico de la N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), un inhibidor no selectivo de las distintas isoformas de la óxido nítrico sintetasa.

La aplicación de técnicas de radioinmunoensayo permitió comprobar que el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (**12**) incrementa significativamente los niveles de GMPc intracelular en anillos de íleon aislado de rata de manera dependiente de la concentración. Este efecto fue dependiente del calcio extracelular. Al realizar el mismo análisis en presencia de L-NAME y 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-ona (ODQ), un inhibidor específico de la guanilato ciclasa soluble, el incremento de los niveles de GMPc intracelular inducido por el compuesto **12** no fue significativo. De tal forma que se

estableció que el efecto relajante mostrado por el producto **12** es mediado por el sistema NO/GMPc.

Los compuestos **12** y **39** aislados de *S. livida* mostraron un efecto relajante no dependiente de endotelio sobre la contracción inducida por noradrenalina en anillos de aorta de rata. El efecto fue también dependiente de la concentración. En el mismo modelo farmacológico se comprobó que los estilbenoides en presencia de L-NAME y azul de metileno (inhibidor inespecífico de la guanilato ciclasa soluble) inhiben de manera no competitiva la contracción inducida por noradrenalina.

Los compuestos **12** y **39** estimularon de manera significativa la producción de GMPc intracelular en anillos de aorta de rata cuando fueron evaluados a una concentración de 100 µg/mL.

ABSTRACT

As part of our research of Mexican Orchids as source of spasmolytic agents, the whole plant of *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr and *Maxillaria densa* Lindley were chemically and pharmacologically investigated.

The CHCl₃:MeOH (1:1) extracts of both species displayed a significant concentration-dependent inhibition of spontaneous contractions of rat ileum.

Bioassay-guided fractionation of the spasmolytic extracts from *S. livida* and *M. densa* allowed the isolation of thirteen compounds. These metabolites were characterized by spectroscopic methods as batatasin III (**1**), 3,4'-dihydroxy-3',5-dimethoxybibenzyl (**12**), ephemeranthol-B (**39**), nudol (**41**), gymnopusin (**42**), 3,7-dihydroxy-2,4,8-trimethoxyphenanthrene (**54**), fimbriol A (**63**), lusianthridin (**82**), erianthridin (**84**), 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (**167**), 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene (**168**), 24,24-dimethyl-9,19-cyclo-lanost-25-en-3 β -yl *trans-p*-hydroxycinnamate (**165**) and 24,24-dimethyl-9,19-cyclo-lanost-25-en-3 β -yl (**166**). The structure of the stilbenoids **41**, **84** and **167** were unambiguously assigned by X-ray analysis. Compounds **165**, **167** and **168** are new natural products.

The stilbenoids from *S. livida* and *M. densa* demonstrated a noted concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of the rat ileum.

In order to establish the mode of action of the stilbenoids, their effect on the contractions induced by different spasmogens (acetylcholine, histamine, barium chloride and L-NAME) was investigated. In general, the results suggested that the relaxant

activity of the products does not involve a direct anticholinergic or antihistaminergic mode of action or an interference with calcium influx into the smooth muscle cells.

The relaxation evoked by compounds **1**, **12**, **39** y **82** was blocked by L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase. It was also demonstrated that bibenzyl **12** increased cyclic GMP content in rat ileum rings. Compound **12** induced elevation of cGMP was inhibited by L-NAME and ODQ, inhibitors of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase, respectively. These results indicate that nitric oxide/cGMP formation constitute the signaling pathway in the spasmolytic action of compound **12**.

Compound **12** and **39**, stimulated cGMP generation in the rat whole aorta rings at a concentration of 100 µg/mL.

Stilbenoids **12** and **39** demonstrated a significant concentration-dependent inhibition of the contractions induced by noradrenaline in rat aortic rings. The vasorelaxant effect was endothelium-independent. When these metabolites were evaluated in the presence of L-NAME and methylene blue, the concentration-response curves were shifted to the right, suggesting a noncompetitive antagonistic effect.

LISTA DE ABREVIATURAS.

A°	Amstrong
ABC	Área bajo la curva
Ach	Acetilcolina
AcOEt	Acetato de etilo
AM	Azul de metileno
BaCl ₂	Cloruro de bario
°C	Grado centígrado
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetros
d	Doblete
dd	Doble de doble
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSOd ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
D ₂ O	Agua deuterada
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EGTA	Etilenglicol bis(β-aminoetiléter)
Emax	Efecto máximo
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
eNOs	Oxido nítrico sintetasa endotelial
eV	Electrón Volts
g	Gramos
GC	Guanilato ciclasa

GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
h	Horas
Hex	Hexano
HCl	Acido clorhídrico
His	Histamina
iNOs	Oxido nítrico sintetasa inducible
IR	Infrarrojo
iPrOH	Isopropanol
J	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
KH	Krebs-Henseleit
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
Kg	Kilogramo
KR	Krebs Ringer
L	Litro
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N ^G -monometilarginina
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginina
M	Molar
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Militros
mM	Milimolar
mm	Milimetro
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato reducido

NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
nm	Nanómetro
NO	Oxido nítrico
NOs	Oxido nítrico sintetasa
nNOs	Oxido nítrico sintetasa neuronal
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona
OMS	Organización Mundial de la Salud
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C-DEPT	Resonancia magnética nuclear de carbono trece con desacoplamiento de los núcleos de hidrógeno
RMN ¹ H- ¹³ C-HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear múltiple (¹ H- ¹³ C)
RMN ¹ H-COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear (¹ H- ¹ H)
RMN ¹ H-NOESY	Espectroscopía bidimensional por efecto nuclear de Overhauser (¹ H- ¹ H)
SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
SNE	Sistema Nervioso Entérico
SNC	Sistema Nervioso Central
TMS	Tetrametilsilano
tR	Tiempo de retención
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
UV	Ultra violeta

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1.	Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los bibencilos aislados de especies de la familia Orchidaceae.....	4
Cuadro 2.	Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae.....	8
Cuadro 3.	Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae.....	16
Cuadro 4.	Bibencilos, fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos aislados de diferentes especies de orquídeas con actividad biológica.....	32
Cuadro 5.	Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies de plantas..	37
Cuadro 6.	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	58
Cuadro 7.	Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de <i>Scaphyglottis livida</i>	61
Cuadro 8.	Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de <i>Maxillaria densa</i>	68
Cuadro 9.	Determinación de la actividad espasmolítica de los extractos CHCl ₃ :MeOH (1:1) de las especies <i>S. livida</i> y <i>M. densa</i> sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.....	74
Cuadro 10.	Fragmentos presentes en los espectros de masas de los fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos obtenidos de <i>S. livida</i> y <i>M. densa</i>	82
Cuadro 11.	Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos de RMN- ¹³ C para los fenantrenos aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> y <i>Maxillaria densa</i>	83
Cuadro 12.	Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos de RMN- ¹ H para los fenantrenos aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> y <i>Maxillaria densa</i>	84
Cuadro 13.	Correlaciones observadas en los espectros de RMN ¹ H-NOESY y RMN ¹ H- ¹³ C-HMBC del compuesto 167.....	87
Cuadro 14.	Desplazamientos químicos (ppm) en RMN- ¹ H y ¹³ C para los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> y <i>Maxillaria densa</i>	89

Cuadro 15.	Fragmentos presentes en los espectros de masas de los bibencilos obtenidos de <i>Scaphyglottis livida</i>	94
Cuadro 16	Desplazamientos químicos (ppm) en RMN- ¹ H y ¹³ C para los compuestos bibencilicos 12 y 1	95
Cuadro 17	Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN- ¹ H y ¹³ C para el <i>trans-p</i> -hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ilo (165) y el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ol (166).....	99
Cuadro 18.	Actividad inhibitoria demostrada por los compuestos aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre la contracción espontánea de íleon aislado de rata.....	106
Cuadro 19.	Efecto de los compuestos 12 y 39 sobre la generación de GMPc en anillos de íleon de rata. Producción de GMPc del compuesto 12 en presencia de L-NAME, ODQ y en ausencia de calcio.....	117
Cuadro 20.	Actividad inhibitoria demostrada por los compuestos aislados de <i>Maxillaria densa</i> sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.....	119
Cuadro 21.	Actividad inhibitoria demostrada por los compuestos 12 y 39 aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre la contracción inducida por noradrenalina en anillos de aorta de rata.....	125
Cuadro 22	Efecto de los compuestos 12 y 39 sobre la generación de GMPc en anillos de aorta de rata.....	127

LISTA DE ESQUEMAS.

Esquema 1.	Rutas biogénicas propuestas para la formación de los estilbenoides.....	29
Esquema 2a.	Reacción de condensación de Perkin para la síntesis de la batatasina I.....	30
Esquema 2b.	Reacción de condensación de Wittig para la formación de la batatasina III.....	31

Esquema 3.	Extracción y fraccionamiento primario del extracto total cloroformo:metanólico (1:1) de la planta entera <i>Scaphyglottis livida</i> ..	60
Esquema 4	Separación de los compuestos 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12), batatasina III (1) y lusiantridina (82) a partir de la fracción primaria activa F-5.....	62
Esquema 5.	Separación de los compuestos efemerantol B (39) y 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54) a partir de la fracción primaria activa F-6.....	64
Esquema 6.	Cromatograma de líquidos de la fracción F-6-IIIi para la separación de los compuestos 39 y 54.....	65
Esquema 7.	Extracción y fraccionamiento primario del extracto total cloroformo:metanólico (1:1) de la planta entera <i>Maxillaria densa</i>	67
Esquema 8.	Cromatograma de líquidos de la mezcla de compuestos 167 y 168 obtenida de la fracción secundaria F-6-I.....	69
Esquema 9a.	Fragmentos derivados de la ruptura bencílica del bibencilo 12.....	97
Esquema 9b.	Fragmentos derivados de la ruptura bencílica del bibencilo 1.....	98
Esquema 10.	Fragmentos más importantes observados en el espectro de masas generado por IE del compuesto 165.....	103
Esquema 11.	Proceso de relajación del músculo liso intestinal inducido por el NO a través de la formación de GMPc intracelular.....	111
Esquema 12.	Sistema de transducción de señal del NO/GMPc en los vasos sanguíneos.....	112

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.	<i>Scaphyglottis livida</i> (Lindley) Schltr.....	35
Figura 2	<i>Maxillaria densa</i> Lindley.....	36
Figura 3.	Curva concentración-respuesta de los extractos CHCl ₃ :MeOH (1:1) de <i>Scaphyglottis livida</i> y <i>Maxillaria densa</i>	73
Figura 4.	Actividad espasmolítica de las fracciones primarias derivadas del extracto CHCl ₃ :MeOH (1:1) de <i>Scaphyglottis livida</i>	75

Figura 5.	Compuestos aislados de la especie de <i>Scaphyglottis livida</i>	76
Figura 6	Actividad espasmolítica de las fracciones primarias derivadas del extracto CHCl ₃ :MeOH (1:1) de <i>Maxillaria densa</i>	78
Figura 7.	Compuestos aislados de la especie <i>Maxillaria densa</i>	79
Figura 8a.	Espectro de RMN ¹ H-NOESY del compuesto 167	85
Figura 8b	Espectro parcial de RMN ¹ H-NOESY del compuesto 167	85
Figura 9a.	Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMBC del compuesto 167	86
Figura 9b	Espectro parcial de RMN ¹ H- ¹³ C-HMBC del compuesto 167	86
Figura 10.	Correlaciones importantes observadas en los espectros bidimensionales de RMN ¹ H-NOESY y ¹ H- ¹³ C-HMBC del compuesto 167	87
Figura 11	Vista estereoscópica del compuesto 167 obtenida por difracción de rayos X.....	88
Figura 12.	Espectro de RMN ¹ H-NOESY del compuesto 168	90
Figura 13.	Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMBC del compuesto 168	91
Figura 14.	Correlaciones importantes observadas en los espectros de RMN ¹ H-NOESY y ¹ H- ¹³ C-HMBC del compuesto 168	91
Figura 15a.	Vista estereoscópica del nudol (41) obtenida por difracción de rayos X.....	92
Figura 15b.	Vista estereoscópica de la eriantridina (84) obtenida por difracción de rayos X.....	93
Figura 16.	Espectro de RMN ¹ H-NOESY del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12).....	96
Figura 17.	Curvas concentración-respuesta que muestra el efecto relajante del extracto y de los compuestos 1 , 12 , 39 , 54 y 82 obtenidos de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.....	105
Figura 18a.	Efecto de los metabolitos secundarios aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre las contracciones inducidas por Acetilcolina.....	107
Figura 18b.	Efecto de los metabolitos secundarios aislados de <i>Scaphyglottis livida</i> sobre las contracciones inducidas por his y BaCl ₂	108

Figura 19.	Efecto de los compuestos activos 1 , 12 , 39 y 82 aislados de <i>Scaphyglottis livi'ca</i> sobre las contracciones inducidas por el L-NAME.....	114
Figura 20.	(A) Registro que muestra la respuesta relajante inducida por el compuesto 12 (1.6 µg/mL) el cual fue revertido en presencia de L-NAME (5 x 10 ⁻³ M). (B) Registro que muestra el efecto relajante del compuesto 12 después de ser tratado con L-NAME.....	115
Figura 21	Efecto del compuesto 12 sobre la producción de GMPc en anillos de íleon aislado de rata.....	116
Figura 22.	Curvas concentración-respuesta que muestra el efecto relajante del extracto y de los compuestos 41 , 42 , 63 , 84 y 167 obtenidos de <i>Maxillaria densa</i> sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.....	118
Figura 23.	Curvas concentración-respuesta acumulativas que muestran el efecto relajante de los compuestos 41 , 42 y 63 sobre la contracción inducida por histamina, cloruro de bario y L-NAME.....	121
Figura 24.	Curvas concentración-respuesta acumulativas que muestran el efecto relajante de los compuestos 84 y 167 sobre la contracción inducida por histamina, cloruro de bario y L-NAME.....	122
Figura 25.	Curvas concentración-respuesta de la actividad relajante de los compuestos 12 y 39 sobre la contracción inducida por noradrenalina en anillos de aorta de rata.....	124
Figura 26.	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los compuestos 12 y 39 sobre la contracción inducida por noradrenalina en presencia de L-NAME y AM en anillos de aorta de rata con y sin endotelio.....	126

LISTA DE ESPECTROS.

Espectro 1.	Espectro en el IR del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).....	155
Espectro 2.	Espectro en el UV del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).....	156
Espectro 3.	Espectro de masas modalidad IE del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).....	157
Espectro 4.	Espectro de RMN- ¹ H del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).....	158
Espectro 5.	Espectro de RMN- ¹³ C del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).....	159
Espectro 6.	Espectro en el IR del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).....	160
Espectro 7.	Espectro en el UV del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).....	161
Espectro 8.	Espectro de masas modalidad IE del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).....	162
Espectro 9.	Espectro de RMN- ¹ H del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).....	163
Espectro 10.	Espectro de RMN- ¹³ C del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).....	164
Espectro 11.	Espectro en el IR del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12).....	165
Espectro 12.	Espectro en el UV del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12).....	166
Espectro 13.	Espectro de masas modalidad IE del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12).....	167
Espectro 14.	Espectro de RMN- ¹ H del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12).	168
Espectro 15.	Espectro de RMN- ¹³ C del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12).....	169
Espectro 16.	Espectro en el IR de la batatasina III (1).....	170
Espectro 17.	Espectro en el UV de la batatasina III (1).....	171
Espectro 18.	Espectro de masas modalidad IE de la batatasina (1).....	172
Espectro 19.	Espectro de RMN- ¹ H de la batatasina III (1).....	173
Espectro 20.	Espectro de RMN- ¹³ C de la batatasina III (1).....	174

Espectro 21.	Espectro en el IR del <i>trans-p</i> -hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165).....	175
Espectro 22.	Espectro de masas modalidad IE del <i>trans-p</i> -hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165).....	176
Espectro 23.	Espectro de RMN- ¹ H del <i>trans-p</i> -hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165).....	177
Espectro 24.	Espectro de RMN- ¹³ C del <i>trans-p</i> -hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165).....	178
Espectro 25.	Espectro de RMN- ¹³ C modalidad HMQC del <i>trans-p</i> -hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165).....	179
Espectro 26.	Espectro en el IR del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (166).....	180
Espectro 27.	Espectro de masas modalidad IE del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (166).....	181
Espectro 28.	Espectro de RMN- ¹ H del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (166).....	182
Espectro 29.	Espectro de RMN- ¹³ C del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (166).....	183
Espectro 30.	Espectro de RMN- ¹ H del ácido <i>trans-p</i> -hidroxicinámico (169).....	184
Espectro 31.	Espectro en el IR del efemerantol B (39).....	185
Espectro 32.	Espectro de masas modalidad IE del efemerantol B (39).....	186
Espectro 33.	Espectro de RMN- ¹ H del efemerantol B (39).....	187
Espectro 34.	Espectro de RMN- ¹³ C del efemerantol B (39).....	188
Espectro 35.	Espectro en el IR del nudol (41).....	189
Espectro 36.	Espectro de masas modalidad IE del nudol (41).....	190
Espectro 37.	Espectro de RMN- ¹ H del nudol (41).....	191
Espectro 38.	Espectro de RMN- ¹³ C del nudol (41).....	192
Espectro 39.	Espectro en el IR de la gimnopusina (42).....	193
Espectro 40.	Espectro de masas modalidad IE de la gimnopusina (42).....	194

Espectro 41.	Espectro de RMN- ¹ H de la gimnopusina (42).....	195
Espectro 42.	Espectro de RMN- ¹³ C de la gimnopusina (42).....	196
Espectro 43.	Espectro en el IR del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54).....	197
Espectro 44.	Espectro de masas modalidad IE del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54).....	198
Espectro 45.	Espectro de RMN- ¹ H del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54).....	199
Espectro 46.	Espectro de RMN- ¹³ C del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54).....	200
Espectro 47.	Espectro en el IR del fimbriol A (63).....	201
Espectro 48.	Espectro de masas modalidad IE del fimbriol A (63).....	202
Espectro 49.	Espectro de RMN- ¹ H del fimbriol A (63).....	203
Espectro 50.	Espectro de RMN- ¹³ C del fimbriol A (63).....	204
Espectro 51.	Espectro en el IR de la lusiantridina (82).....	205
Espectro 52.	Espectro de masas modalidad IE de la lusiantridina (82).....	206
Espectro 53.	Espectro de RMN- ¹ H de la lusiantridina (82).....	207
Espectro 54.	Espectro de RMN- ¹³ C de la lusiantridina (82).....	208
Espectro 55.	Espectro en el IR de la eriantridina (84).....	209
Espectro 56.	Espectro de masas modalidad IE de la eriantridina (84).....	210
Espectro 57.	Espectro de RMN- ¹ H de la eriantridina (84).....	211
Espectro 58.	Espectro de RMN- ¹³ C de la eriantridina (84).....	212

I. ANTECEDENTES

1.1. ESTILBENOIDES DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE.

La familia Orchidaceae es probablemente la más abundante del reino vegetal y se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de todo el planeta. Sin embargo, la mayoría de las especies se encuentran localizadas con una mayor abundancia y diversidad en los trópicos, especialmente en las zonas montañosas entre los 1, 000 y 2, 000 metros de altura sobre el nivel del mar (Hausen, 1984). Se estima que el 73% de las orquídeas son epifitas, el resto de las especies pueden ser terrestres, semiacuáticas o saprofiticas (Dressler, 1993).

Desde el punto de vista taxonómico las 35, 000 especies de la familia se encuentran agrupadas en cinco subfamilias, nueve tribus y 800 géneros (Dreesler, 1981; Dressler, 1993; Mc Vaugh, 1985).

Muchas especies de esta vasta familia son económicamente importantes. Así, algunas son utilizadas con fines ornamentales; otras, como la *Vanilla planifolia*, contienen aceites esenciales que les confieren propiedades aromáticas de gran utilidad en las industrias de alimentos y perfumería (McVaugh, 1985). Otras, se utilizan en las prácticas médicas tradicionales con fines curativos atribuyéndoseles diversas propiedades medicinales tales como analgésicas, antidiarréicas, vermífugas, tónicas, antipiréticas, antiinflamatorias, antibacterianas y anticancerígenas, por tan solo mencionar algunas (Hausen, 1984; Yoshikawa, *et. al.*, 1998; Yamaki y Honda, 1996; Bai, *et. al.*, 1996; Lee, *et. al.*, 1995; *inter alia*).

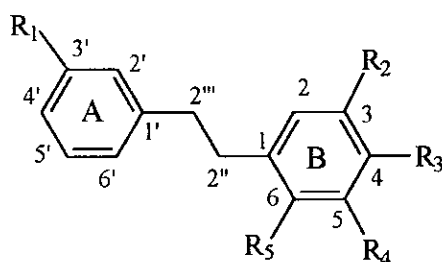
Los primeros estudios fitoquímicos sobre orquídeas se realizaron a fines del siglo XIX y a principios del siglo XX. Posteriormente, durante la década de los 60's el aislamiento de alcaloides del tipo de la dendrobina a partir de la especie *Dendrobium nobile* estimuló de manera definitiva el estudio de una gran variedad de especies de orquídeas. De tal forma que a la fecha se han aislado un número apreciable de metabolitos secundarios

con una gran diversidad estructural a partir de varias especies de esta familia. Los principales metabolitos secundarios aislados de las orquídeas incluyen alcaloides de los tipos picrotoxano, pirrolizidínicos y fenilalquilaminas (Slaytor, 1977; Okamoto, *et. al.*, 1966; Onaka, *et. al.*, 1965), triterpenoides de los grupos del cicloartano y lanostano (Kikuchi *et. al.*, 1985; Kikuchi *et. al.*, 1981; Kadota *et. al.*, 1987; *inter alia*), esteroides (Majumder y Pal, 1990; Kadota *et. al.*, 1987; Kikuchi, *et. al.*, 1986; Majumder y Chakraborti, 1985; *inter alia*), flavonoides (Williams *et. al.*, 1994; Williams, 1979), cumarinas (Wrigley, 1960), compuestos aromáticos simples (Harborne *et. al.*, 1994; Bergstrom, *et. al.*, 1992) y estilbenoides. Este último grupo de compuestos constituye quizá los productos naturales más representativos de esta familia de plantas.

Los estilbenoides son un grupo de compuestos aromáticos del tipo $C_6-C_2-C_6$, generalmente de naturaleza fenólica. Su origen biogenético mixto involucra las rutas del ácido siquímico y acetato malonato. Estos productos naturales son metabolitos característicos de algunas familias de plantas. De tal forma que estos productos han sido aislados de Briofitas, principalmente de la familia de las hepáticas, que se caracteriza por biosintetizar compuestos de tipo bibencilo. De las Gimnospermas se han aislado una gran diversidad de estilbenos simples y sus glicósidos a partir de diferentes especies de los géneros *Pinus*, *Picea* y *Gnetum*. En las Angiospermas se producen una amplia variedad de estilbenoides, dichos compuestos han sido aislados de diferentes especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas. En este último grupo de plantas destacan especies de las familias Dioscoreaceae, Liliaceae, Moraceae, Combretaceae y Orchidaceae, entre otras (Gorham, 1995). Desde el punto de vista estructural, los estilbenoides se clasifican en cuatro grandes grupos: los estilbenos, los fenantrenos, los bibencilos y los 9,10-dihidrofenantrenos.

De acuerdo a una revisión bibliográfica realizada durante el desarrollo de este trabajo, a la fecha se han descrito 144 estilbenoides en la familia Orchidaceae. De éstos, 35 son bibencilos, 44 fenantrenos y 65 son 9,10-dihidrofenantrenos. En los Cuadros 1, 2 y 3 se describen las estructuras, nombres químicos y las fuentes naturales de estos compuestos

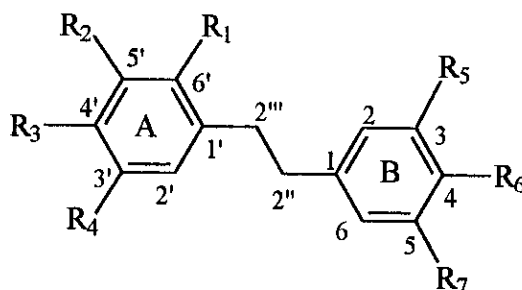
Cuadro 1 Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los bibencilos aislados de especies de la familia Orchidaceae.



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_1=R_2= \text{OH}, R_4= \text{OMe}, R_3=R_5= \text{H}$	Batatasina III (3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo) (1)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> , <i>Cymbidium aloifolium</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997; Juneja, <i>et. al.</i> , 1987; <i>inter alia</i>)
$R_1= R_2= R_4= \text{OMe}, R_3=R_5= \text{H}$	Batatasina III dimetiléter (3,3',5-trimetoxibibencilo) (2)	<i>Pleione bulbocodioides</i> y <i>Bletilla striata</i> (Bai, <i>et. al.</i> , 1997; Yamaki <i>et. al.</i> , 1991)
$R_2= \text{OH}, R_1= R_4=\text{OMe}, R_3=R_5= \text{H}$	3'-O-metilbatatasina III (3-hidroxi-3',5-dimetoxibibencilo) (3)	<i>Pleione bulbocodioides</i> , <i>Coelogyne ovalis</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1997; Sachdev y Kulshreshtha, 1986; <i>inter alia</i>)
$R_1= \text{OH}, R_2= \text{OMe}, R_4= \text{O-Glu}, R_3=R_5= \text{H}$	Batatasina III O-glucósido (4)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1997)
$R_1=R_2= \text{OMe}, R_4= \text{O-Glu}, R_3=R_5= \text{H}$	3'-O-metilbatatasina III O-glucósido (5)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1997)
$R_1=R_3= \text{OH}, R_2=R_4= \text{OMe}, R_5= \text{H}$	Aloifol I (3',4-dihidroxi-3,5-dimetoxibibencilo) (6)	<i>Bulbophyllum protractum</i> y <i>Cymbidium aloifolium</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1997; Juneja <i>et. al.</i> , 1987)
$R_1=R_5= \text{OH}, R_2=R_4= \text{OMe}, R_3= \text{H}$	Bulbofilidina (3',6-dihidroxi-3,5-dimetoxibibencilo) (7)	<i>Bulbophyllum protractum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1997)

Cuadro 1. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los bibencilos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

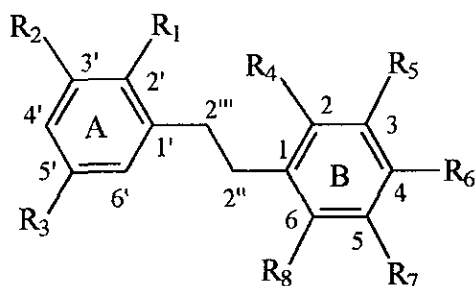
Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_1=R_5= \text{OH}$, $R_2=R_3=$ metilendioxi, $R_4= \text{OMe}$	Bulbofilina (3',6-dihidroxi-3,4- metilendioxi-5-metoxibibencilo) (8)	<i>Bulbophyllum protractum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1997)
$R_1=R_4= \text{OMe}$, $R_2=R_3=$ metilendioxi, $R_5= \text{H}$	3,4-metilendioxi-3',5- dimetoxibibencilo (9)	<i>Bulbophyllum protractum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1997)
$R_1=R_4= \text{OH}$, $R_2=R_3=$ metilendioxi, $R_5= \text{H}$	Cirropetalinina (3',5-dihidroxi-3,4- metilendioxi-bibencilo) (10)	<i>Cirrhopetalum andersonii</i> (Majumder y Basak, 1991)
$R_2=R_4= \text{OMe}$, $R_1=R_3=$ $R_5= \text{H}$	3,5-dimetoxibibencilo (11)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1991)



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_3=R_5= \text{OH}$, $R_4=R_7=$ OMe , $R_1=R_2= R_6= \text{H}$	3,4'-dihidroxi-3',5- dimetoxibibencilo (12)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> , <i>Lusia</i> <i>volucris</i> , <i>Catasetum barbatum</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997; Majumder y Lahiri, 1990; Shimizu <i>et. al.</i> , 1988; <i>inter alia</i>)
$R_5= \text{OH}$, $R_3=R_4= R_7=$ OMe , $R_1=R_2= R_6= \text{H}$	3'-O-metilgigantol (3-hidroxi- 3',4',5-trimetoxibibencilo) (13)	<i>Dendrobium plicatile</i> y <i>Ephemerantha lonchophylla</i> (Yamaki y Honda, 1996; Tezuka <i>et. al.</i> , 1991)
$R_4=R_5= \text{OH}$, $R_3=R_7=$ OMe , $R_1=R_2= R_6= \text{H}$	Gigantol (3',3-dihidroxi-4',5- dimetoxibibencilo) (14)	<i>Ephemerantha lonchophylla</i> y <i>Epipactis palustris</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1991; Gehlert y Kindl, 1991)
$R_3=R_6= \text{OH}$, $R_4=R_5=R_7=$ OMe , $R_1=R_2= \text{H}$	Moscetilina o Aloifol II (4,4'- dihidroxi-3,3',5- trimetoxibibencilo) (15)	<i>Agrostophyllum khasianum</i> , <i>Cymbidium aloifolium</i> y <i>Dendrobium moscatum</i> (Majumder y Sen, 1987; Juneja <i>et.</i> <i>al.</i> , 1987; Majumder <i>et. al.</i> , 1996)
$R_3=R_5=R_7= \text{OH}$, $R_4=$ OMe , $R_1=R_2=R_6= \text{H}$	Tristina (3,4',5-trihidroxi-3'- metoxibibencilo) (16)	<i>Bulbophyllum triste</i> (Majumder y Pal, 1993)
$R_3= \text{OH}$, $R_4=R_5=R_6=R_7=$ OMe , $R_1=R_2= \text{H}$	Crepidatina (4'-hidroxi-3,3',4,5- tetrametoxibibencilo) (17)	<i>Dendrobium crepidatum</i> (Majumder y Chatterjee, 1989)

Cuadro 1. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los bibencilos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_4 = \text{OH}$, $R_3 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{OMe}$, $R_1 = R_2 = \text{H}$	Erianina (3'-hidroxi-3,4,4',5'-tetrametoxibibencilo) (18)	<i>Eria carinata</i> (Majumder y Joardar, 1984)
$R_4 = R_5 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = R_6 = R_7 = \text{OMe}$, $R_1 = \text{H}$	Cumulatina (3',3'-dihidroxi-4,5,4',5'-tetrametoxibibencilo) (19)	<i>Dendrobium cumulatum</i> (Majumder y Pal, 1993)
$R_3 = R_5 = R_7 = \text{OH}$, $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = \text{H}$	Dihidroresveratrol (3,4',5'-trihidroxibibencilo) (20)	<i>Bulbophyllum triste</i> (Majumder y Pal, 1993)
$R_3 = R_5 = \text{OH}$, $R_5 = \text{OMe}$, $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = \text{H}$	3,4'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (21)	<i>Bulbophyllum triste</i> (Majumder y Pal, 1993)



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_1 = R_7 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_5 = R_6 = \text{metilendioxi}$, $R_3 = R_4 = R_8 = \text{H}$.	Cirropetalidina (2',5'-dihidroxi-3'-metoxi-3,4-metilendioxibibencilo) (22)	<i>Cirropetalum andersonii</i> (Majumder y Basak, 1991)
$R_1 = R_7 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OMe}$, $R_5 = R_6 = \text{metilendioxi}$, $R_2 = R_4 = R_8 = \text{H}$.	Cirropetalidinina (2',5'-dihidroxi-5'-metoxi-3,4-metilendioxibibencilo) (23)	<i>Cirropetalum andersonii</i> (Majumder y Basak, 1991)
$R_2 = R_5 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{p-hidroxibencilo}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_1 = R_3 = R_6 = R_8 = \text{H}$.	Bulbocol [5-hidroxi-3,3'-dimetoxi-2-(p-hidroxibencil) bibencilo] (24)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998)
$R_2 = R_7 = \text{OH}$, $R_5 = \text{OMe}$, $R_6 = \text{p-hidroxibencilo}$, $R_1 = R_3 = R_4 = R_8 = \text{H}$.	Arundinina [3',5'-dihidroxi-3-metoxi-4-(p-hidroxibencil) bibencilo] (25)	<i>Pleione bulbocodioides</i> , <i>Arundina bambusifolia</i> y <i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998; Majumder y Ghosal, 1993; Bai <i>et. al.</i> , 1993)
$R_2 = R_7 = \text{OH}$, $R_4 = \text{p-hidroxibencilo}$, $R_5 = \text{OMe}$, $R_1 = R_3 = R_6 = R_8 = \text{H}$.	Isoarundinina I [3',5'-dihidroxi-3-metoxi-2-(p-hidroxibencil) bibencilo] (26)	<i>Pleione bulbocodioides</i> , <i>Arundina bambusifolia</i> y <i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998; Majumder y Ghosal, 1994; Bai <i>et. al.</i> , 1993)

Cuadro 1. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los bibencilos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₂ =R ₅ = OH, R ₄ = p-hidroxibencilo, R ₇ = OMe, R ₁ = R ₃ =R ₆ =R ₈ = H.	Isoarundinina II [3,3'-dihidroxi-5-metoxi-2-(p-hidroxibencil) bibencilo] (27)	<i>Pleione bulbocodioides</i> , <i>Arundina bambusifolia</i> y <i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998; Majumder y Ghosal, 1994; Bai <i>et. al.</i> , 1993)
R ₄ =R ₈ = p-hidroxibencilo, R ₅ = OH, R ₇ = OMe, R ₁ = R ₂ =R ₃ =R ₆ = H.	Arundina [3-hidroxi-5-metoxi-2,6-bis-(p-hidroxibencil) bibencilo] (28)	<i>Arundina bambusifolia</i> (Majumder y Ghosal, 1993)
R ₂ =R ₅ =R ₇ = OH, R ₄ =R ₈ = p-hidroxibencilo, R ₁ = R ₃ =R ₆ = H.	Shanciguol [3,3',5-trihidroxi-5-metoxi-2,6-bis-(p-hidroxibencil) bibencilo] (29)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1996)
R ₂ =R ₅ = OH, R ₄ =R ₈ = p-hidroxibencilo, R ₇ = OMe, R ₁ = R ₃ =R ₆ = H.	3,3'-dihidroxi-5-metoxi-2,6-bis-(p-hidroxibencil) bibencilo (30)	<i>Bletilla striata</i> (Takagi <i>et. al.</i> , 1983)
R ₂ =R ₇ = OMe, R ₄ =R ₈ = p-hidroxibencilo, R ₅ = OH, R ₁ = R ₃ =R ₆ = H.	3-hidroxi-3',5-dimetoxi-2,6-bis-(p-hidroxibencil) bibencilo (31)	<i>Bletilla striata</i> (Takagi <i>et. al.</i> , 1983)
R ₂ =R ₇ = OH, R ₄ =R ₆ = p-hidroxibencilo, R ₅ = OMe, R ₁ = R ₃ =R ₈ = H.	Bulbocodina C [3',5-dihidroxi-3-metoxi-2,4-bis-(p-hidroxibencil) bibencilo] (32)	<i>Pleione bulbocodioides</i> y <i>Arundina bambusifolia</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998; Majumder y Ghosal, 1993)
R ₂ =R ₅ = OH, R ₄ =R ₆ = p-hidroxibencilo, R ₇ = OMe, R ₁ = R ₃ =R ₈ = H.	Bulbocodina D [3,3'-dihidroxi-5-metoxi-2,4-bis-(p-hidroxibencil) bibencilo] (33)	<i>Pleione bulbocodioides</i> y <i>Arundina bambusifolia</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998; Majumder y Ghosal, 1993)
R ₁ =R ₅ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₈ = p-hidroxibencilo, R ₇ = OMe, R ₂ = R ₆ = H.	Bulbocodina [2',3-dihidroxi-5-metoxi-2,5',6-tri-(p-hidroxibencil) bibencilo] (34)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998)
R ₂ =R ₅ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₈ = p-hidroxibencilo, R ₇ = OMe, R ₁ = R ₆ = H.	3,3'-dihidroxi-5-metoxi-2,5',6-tri-(p-hidroxibencil) bibencilo (35)	<i>Bletilla striata</i> (Takagi <i>et. al.</i> , 1983)

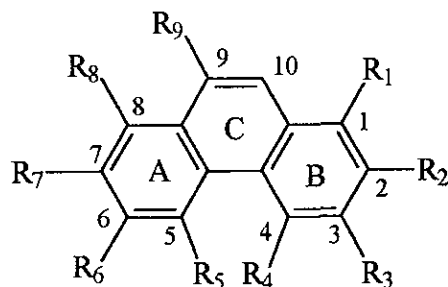
Como se desprende de la información presentada en el Cuadro 1 la principal diferencia entre los bibencilos aislados de la familia Orchidaceae, radica en el grado de sustitución y en la naturaleza de los sustituyentes oxigenados (grupos hidroxilo, metoxilo y metilendioxi) presentes en los anillos A y B. En otros casos, los hidroxilos fenólicos se

encuentran formando combinaciones glicosídicas, donde el azúcar es siempre la glucosa (compuestos 4 y 5). Por último, en algunos de estos bibencilos se observa la presencia de uno o más grupos bencilos adicionales en la estructura, tal es el caso de los compuestos 24-

35

Cuadro 2. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae.

a) Fenantrenos simples



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₂ =R ₇ = OH, R ₄ = OMe R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₈ =R ₉ = H	Flavantrina (2,7-dihidroxi-4-metoxifenantreno) (36)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> y <i>Eria flava</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997; Majumder y Banerjee, 1990)
R ₂ = OMe, R ₄ =R ₇ = OH, R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₈ =R ₉ = H	Lusiantrina (4,7-dihidroxi-2-metoxifenantreno) (37)	<i>Lusia indivisa</i> (Majumder y Lahiri, 1990)
R ₂ =R ₄ =R ₇ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₈ =R ₉ = H	2,4,7-trimetoxifenantreno (38)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1991)

Cuadro 2. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₂ =R ₄ = OMe, R ₃ =R ₇ = OH, R ₁ = R ₅ =R ₆ =R ₈ =R ₉ = H	Efemerantol B (3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno) (39)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> , <i>Dendrobium plicatile</i> , <i>Eria flava</i> y <i>Eulophia nuda</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997; Yamaki y Honda, 1996; Majumder y Banerjee, 1990; Tuchinda <i>et. al.</i> , 1988)
R ₂ =R ₃ = OMe, R ₄ =R ₇ = OH, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₈ =R ₉ = H	4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxifenantreno (40)	<i>Ephemerantha lonchophylla</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1991)
R ₂ =R ₇ = OH, R ₃ =R ₄ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₈ =R ₉ = H	Nudol (2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno) (41)	<i>Eria convallarioides</i> , <i>Eulophia nuda</i> , <i>Oncidium cebolleta</i> , <i>inter alia</i> (Majumder y Kar, 1989; Bhandari <i>et. al.</i> , 1985; Stermitz <i>et. al.</i> , 1983; <i>inter alia</i>)
R ₂ =R ₇ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₉ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₈ = H	Gimnopusina (2,7-dihidroxi-3,4,9-trimetoxifenantreno) (42)	<i>Bulbophyllum gymnopus</i> (Majumder y Banerjee, 1989)
R ₂ =R ₃ = metilendioxi, R ₄ = OMe, R ₇ = OH, R ₁ =R ₅ =R ₆ = R ₈ =R ₉ = H	Cirropetalina (7-hidroxi-2,3-metilendioxi-4-metoxifenantreno) (43)	<i>Cirrhopetalum andersonii</i> (Majumder y Basak, 1990)
R ₁ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₂ =R ₇ = OH, R ₄ = OMe, R ₃ =R ₅ =R ₆ = R ₈ =R ₉ = H	2,7-dihidroxi-1-(<i>p</i> -hidroxibencil)-4-metoxifenantreno (44)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1990)
R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₇ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₆ = R ₈ =R ₉ = H	2,3,4,7-tetrametoxifenantreno (45)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1991)
R ₂ =R ₇ = OH, R ₃ =R ₅ = OMe, R ₁ =R ₄ =R ₆ =R ₈ =R ₉ = H	2,7-dihidroxi-3,5-dimetoxifenantreno (46)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997)
R ₁ =R ₅ = OMe, R ₂ =R ₇ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₆ =R ₈ =R ₉ = H	2,7-dihidroxi-1,5-dimetoxifenantreno (47)	<i>Eulophia nuda</i> (Tuchinda <i>et. al.</i> , 1988)
R ₂ =R ₄ =R ₇ = OMe, R ₆ = OH, R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₈ =R ₉ = H	Batatasina I (6-hidroxi-2,4,7-trimetoxifenantreno) (48)	<i>Lusia volucris</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1995)
R ₂ =R ₄ =R ₆ =R ₇ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₈ =R ₉ = H	Calosumina (2,4,6,7-tetrametoxifenantreno) (49)	<i>Agrostophyllum callosum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996)

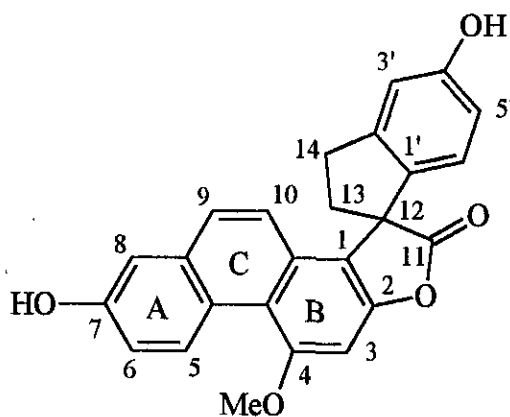
Cuadro 2. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₂ =R ₇ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₆ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₈ =R ₉ = H	2,7-dihidroxi-3,4,6-trimetoxifenantreno (50)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> , <i>Dendrobium rotundatum</i> , <i>Bulbophyllum gymnopus</i> y <i>Oncidium cebolleta</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997; Majumder y Pal, 1992; Majumder y Banerjee, 1988; Stermitz <i>et. al.</i> , 1983)
R ₂ =R ₃ =R ₇ = OH, R ₄ =R ₆ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₈ =R ₉ = H	2,3,7-trihidroxi-4,6-dimetoxifenantreno (51)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997)
R ₂ =R ₇ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₈ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₉ = H	Confusarina (2,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxifenantreno (52)	<i>Catasetum barbatum</i> , <i>Bulbophyllum gymnopus</i> y <i>Eria confusa</i> (Shimizu <i>et. al.</i> , 1988; Majumder y Banerjee, 1988; Majumder y Kar, 1987)
R ₂ =R ₃ = OH, R ₄ =R ₇ =R ₈ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₉ = H	2,3-dihidroxi-4,7,8-trimetoxifenantreno (53)	<i>Oncidium cebolleta</i> (Stermitz <i>et. al.</i> , 1983)
R ₂ =R ₄ =R ₈ = OMe, R ₃ =R ₇ = OH, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₉ = H	3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54)	<i>Cymbidium pendulum</i> (Majumder y Sen, 1991)
R ₁ =R ₈ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₂ =R ₇ = OH, R ₄ = OMe, R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₉ = H	2,7-dihidroxi-1,8-bi-(<i>p</i> -hidroxibencil)-4-metoxifenantreno (55)	<i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1991)
R ₂ =R ₆ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₇ = R ₈ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₉ = H	Confusaridina (2,6-dihidroxi-3,4,7,8-trimetoxifenantreno) (56)	<i>Eria confusa</i> (Majumder y Kar, 1987)
R ₂ =R ₄ =R ₆ =R ₇ =R ₈ = OMe, R ₃ = OH, R ₁ =R ₅ =R ₉ = H	Pendulina (3-hidroxi-2,4,6,7,8-pentametoxifenantreno) (57)	<i>Cymbidium pendulum</i> (Majumder y Sen, 1991)
R ₂ =R ₅ = OH, R ₄ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₆ =R ₇ =R ₈ =R ₉ = H	Moscatina (2,5-dihidroxi-4-metoxifenantreno) (58)	<i>Dendrobium rotundatum</i> y <i>Dendrobium moscatum</i> (Majumder y Pal, 1992; Majumder y Sen, 1987)
R ₂ =R ₅ = OH, R ₄ =R ₉ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₆ =R ₇ = R ₈ = H	2,5-dihidroxi-4,9-dimetoxifenantreno (59)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997)
R ₂ =R ₃ =R ₅ = OH, R ₄ = OMe, R ₁ =R ₆ =R ₇ =R ₈ = R ₉ = H	Fimbriol B (2,3,5-trihidroxi-4-metoxifenantreno) (60)	<i>Dendrobium vaginatum</i> y <i>Ephemerantha fimbriata</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997; Tezuka <i>et al.</i> , 1993)

Cuadro 2. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₂ =R ₄ = OMe, R ₃ =R ₅ = OH, R ₁ =R ₆ =R ₇ =R ₈ = R ₉ = H	Bulbofilantrina (3,5-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno) (61)	<i>Bulbophyllum leopardium</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1985)
R ₂ =R ₃ =R ₄ = OMe, R ₅ = OH, R ₁ =R ₆ =R ₇ =R ₈ = R ₉ = H	5-hidroxi-2,3,4-trimetoxifenantreno (62)	<i>Bulbophyllum leopardium</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1985)
R ₂ =R ₅ =OH, R ₃ =R ₄ = R ₉ = OMe, R ₁ =R ₆ =R ₇ =R ₈ = H	Fimbriol A (2,5-dihidroxi-3,4,9-trimetoxifenantreno) (63)	<i>Ephemerantha fimbriata</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1993)

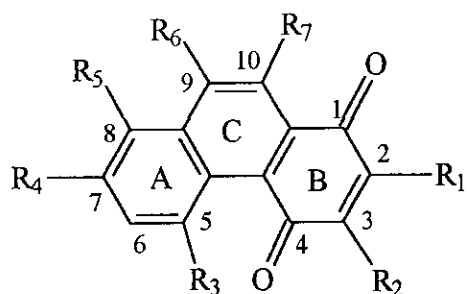
b) Fenantreno con anillo de espirolactona



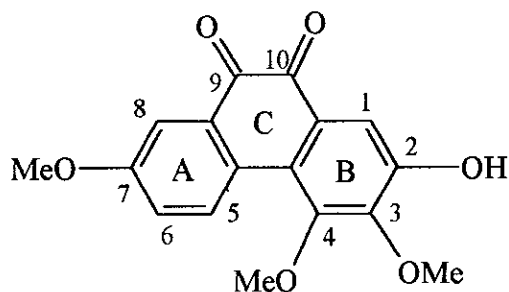
Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
	Blespirol (64)	<i>Bletilla striata</i> , (Yamaki <i>et. al.</i> , 1993)

Cuadro 2. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

c) Fenantroquinonas



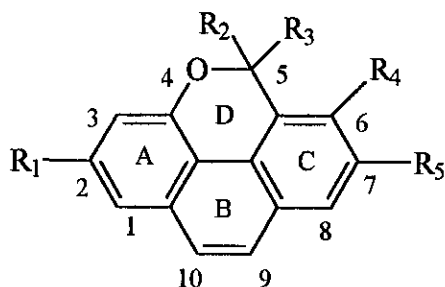
Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_2=R_4= \text{OMe}$, $R_3= \text{OH}$, $R_1=R_5=R_6=R_7= \text{H}$	Denbinobina (5-hidroxi-3,7-dimetoxifenantreno-1,4-quinona) (65)	<i>Dendrobium nobile</i> (Lee <i>et. al.</i> , 1995; Talapra <i>et. al.</i> , 1982; <i>inter alia</i>)
$R_1= \text{OMe}$, $R_4= \text{OH}$, $R_2=R_3=R_5= \text{H}$, $R_6=R_7=$ dihidro	Efemerantroquinona (7-hidroxi-2-metoxi-9,10-dihidrofenantreno-1,4-quinona) (66)	<i>Ephemerantha lonchophylla</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1991)
$R_1= \text{OMe}$, $R_4= \text{OH}$, $R_5=$ isopentenil, $R_2=R_3= \text{H}$, $R_6=R_7=$ dihidro	Espirantoquinona (7-hidroxi-2-metoxi-8-isopentenil-9,10-dihidrofenantreno-1,4-quinona) (67)	<i>Spiranthes sinensis</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1990)



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
	Bulbofilantrona (2-hidroxi-3,4,7-trimetoxifenantreno-9,10 quinona) (68)	<i>Bulbophyllum odoratissimum</i> (Majumder y Sen, 1991)

Cuadro 2. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

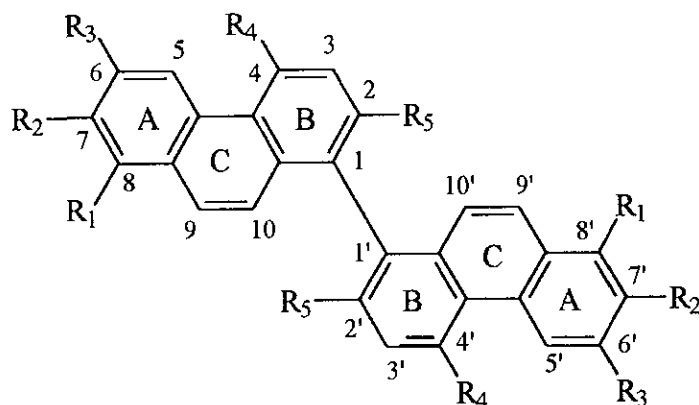
d) Fenantropiranos



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₁ =R ₄ = OMe, R ₅ = OH, R ₂ =R ₃ = H	Agrostofilina (7-hidroxi-2,6-dimetoxi-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (69)	<i>Agrostophyllum khasiyanum</i> y <i>Agrostophyllum callosum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Majumder y Sabzabadi, 1988)
R ₁ =R ₂ =R ₄ = OMe, R ₅ = OH, R ₃ = H	Agrostofiloxidina (7-hidroxi-2,5,6-trimetoxi-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (70)	<i>Agrostophyllum khasiyanum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996)
R ₁ =R ₄ = OMe, R ₂ =R ₃ = O R ₅ = OH	Agrostofilona (7-hidroxi-2,6-dimetoxi-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (71)	<i>Agrostophyllum khasiyanum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996)
R ₁ =R ₄ =R ₅ = OMe, R ₂ =R ₃ = O	Agrostofiloxina (2,6,7-trimetoxi-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (72)	<i>Agrostophyllum khasiyanum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996)
R ₁ =R ₄ = OH, R ₂ =R ₃ = O R ₅ = OMe,	Flaccidinina (2,6-dihidroxi-7-metoxi-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (73)	<i>Agrostophyllum khasiyanum</i> , <i>Agrostophyllum callosum</i> y <i>Coelogyne flaccida</i> , (Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Majumder y Maiti, 1989)
R ₁ =R ₅ = OH, R ₂ =R ₃ = O R ₄ = OMe	Isoflaccidinina (2,7-dihidroxi-6-metoxi-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (74)	<i>Agrostophyllum khasiyanum</i> , <i>Coelogyne flaccida</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Majumder y Maiti, 1991)

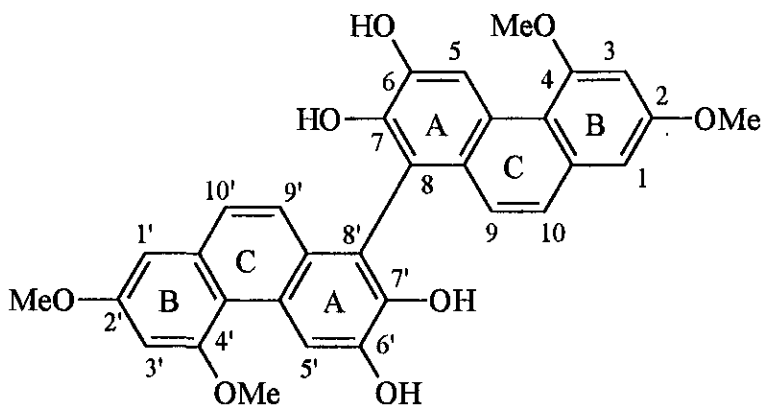
Cuadro 2. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

e) Dímeros de fenantrenos



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_2=R_5= \text{OH}$, $R_4= \text{OMe}$, $R_1=R_3= \text{H}$	Blestriareno C o Cirropetalantrina (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4'-dimetoxi-1,1'-bifenantreno) (75)	<i>Cirrhopetalum maculosum</i> y <i>Bletilla striata</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1990; Yamaki <i>et. al.</i> , 1989)
$R_2=R_5= \text{OH}$, $R_3=R_4= \text{OMe}$, $R_1= \text{H}$	Agrostonina (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4',6,6'-tetrametoxi-1,1'-bifenantreno) (76)	<i>Agrostophyllum khasiyanum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1998)
$R_2=R_4= \text{OMe}$, $R_3=R_5= \text{OH}$, $R_1= \text{H}$	Agrostonidina (2,2',6,6'-tetrahidroxi-4,4',7,7'-tetrametoxi-1,1'-bifenantreno) (77)	<i>Agrostophyllum callosum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1998)
$R_1=R_4= \text{OMe}$, $R_2=R_5= \text{OH}$, $R_3= \text{H}$	2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4',8,8'-tetrametoxi-1,1'-bifenantreno (78)	<i>Eulophia nuda</i> (Tuchinda <i>et. al.</i> , 1988)

Cuadro 2. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los fenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

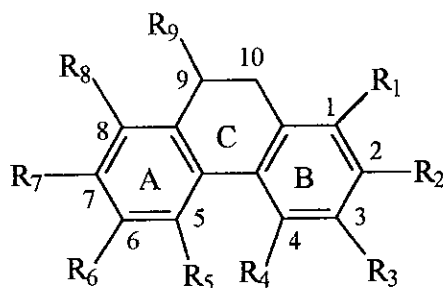


Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
	Volucrina (6,6',7,7'-tetrahidroxi-2,2',4,4'-tetrametoxi-8,8'-bifenantreno) (79)	<i>Lusia volucris</i> (Majumder y Lahiri, 1990)

Los fenantrenos obtenidos de las orquídeas se clasifican en fenantrenos simples, fenantrenos con anillo de espirolactona, fenantroquinonas, fenantropiranos y fenantrenos diméricos. En general, los anillos A y B de los fenantrenos presentan también sustituyentes oxigenados; el patrón de sustitución y el tipo de sustituyentes son similares a los descritos para los bibencilos. Esta observación no resulta sorprendente debido a que se ha propuesto que los fenantrenos se derivan biogenéticamente de los bibencilos a través de un acoplamiento fenólico (Bewick, 1997; Herbert, 1989). Dentro de este grupo de compuestos destacan el fenantreno blespirol (64) que presenta en su estructura un anillo de espirolactona y los productos 75-79 de naturaleza dimérica que posiblemente se generan por un acoplamiento fenólico a partir de los monómeros correspondientes.

Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae.

a) 9,10-dihidrofenantreno: simples



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_2=R_7= \text{OH}$, $R_4= \text{OMe}$, $R_1=R_3=R_5=R_6=R_8= \text{H}$, $R_9= \text{H}_2$	Coelonina (2,7-dihidroxi-4-metoxi-9,10-dihidrofenantreno) (80)	<i>Eulophia nuda</i> , <i>Cymbidium aloifolium</i> , <i>Coelogyne ochracea</i> , <i>Coelogyne elata</i> , <i>inter alia</i> (Tuchinda <i>et. al.</i> , 1988; Juneja <i>et al.</i> , 1987; Majumder <i>et. al.</i> , 1982; <i>inter alia</i>)
$R_2=R_4= \text{OMe}$, $R_7= \text{OH}$, $R_1=R_3=R_5=R_6=R_8= \text{H}$, $R_9= \text{H}_2$	Orchinol (7-hidroxi-2,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (81)	<i>Agrostophyllum callosum</i> , <i>Spiranthes sinensis</i> y <i>Orchis militaris</i> (Majumder <i>et al.</i> , 1996; Tezuka <i>et. al.</i> , 1989; Stoessl, 1984)
$R_2= \text{OMe}$, $R_4=R_7= \text{OH}$, $R_1=R_3=R_5=R_6=R_8= \text{H}$, $R_9= \text{H}_2$	Lusiantridina (4,7-dihidroxi-2-metoxi-9,10-dihidrofenantreno) (82)	<i>Dendrobium plicatile</i> , <i>Lusia indivisa</i> , <i>Bletilla striata</i> , <i>inter alia</i> (Yamaki y Honda, 1996; Majumder y Lahiri, 1990; Takagi <i>et. al.</i> , 1983; <i>inter alia</i>)
$R_2=R_4=R_7= \text{OMe}$, $R_1=R_3=R_5=R_6=R_8= \text{H}$, $R_9= \text{H}_2$	2,4,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (83)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1991)
$R_2=R_7= \text{OH}$, $R_3=R_4= \text{OMe}$, $R_1=R_5=R_6=R_8= \text{H}$, $R_9= \text{H}_2$	Eriantridina (2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (84)	<i>Ephemerantha lonchophylla</i> , <i>Catasetum barbatum</i> , <i>Eria carinata</i> , <i>Eria stricta</i> , <i>inter alia</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1991; Shimizu <i>et. al.</i> , 1988; Majumder y Joardar, 1985; <i>inter alia</i>)

Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación)

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₂ =R ₃ =R ₇ = OH, R ₄ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	2,3,7-trihidroxi-4-metoxi-9,10-dihidrofenantreno (85)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997)
R ₂ =R ₃ = OMe, R ₄ =R ₇ = OH, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Efemerantol-A (4,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (86)	<i>Ephemerantha lonchophylla</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1991)
R ₂ =R ₄ = OMe, R ₃ =R ₇ = OH, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Efemerantol-B o Flavantridina (3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (87)	<i>Ephemerantha lonchophylla</i> y <i>Eria flava</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1991; Majumder y Banerjee, 1990)
R ₂ =R ₃ = metilendioxi, R ₄ =R ₇ = OH, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Cirropetalantridina (4,7-dihidroxi-2,3-metilendioxi-9,10-dihidrofenantreno) (88)	<i>Cirropetalum andersonii</i> (Majumder y Basak, 1991)
R ₁ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₂ = OMe, R ₄ =R ₇ = OH, R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Shancidina (4,7-dihidroxi-2-metoxi-1-(<i>p</i> -hidroxibencil)-9,10-dihidrofenantreno) (89)	<i>Pleione bulbocodioides</i> y <i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1996; Takagi <i>et. al.</i> , 1983)
R ₂ =R ₇ = OH, R ₃ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₄ =OMe, R ₁ =R ₅ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	2,7-dihidroxi-4-metoxi-3-(<i>p</i> -hidroxibencil)-9,10-dihidrofenantreno (90)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1990)
R ₁ = <i>p</i> -hidroxibenzoil, R ₂ =R ₇ = OH, R ₄ = OMe, R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₈ =H, R ₉ = H ₂	2,7-dihidroxi-4-metoxi-1-(<i>p</i> -hidroxibenzoil)-9,10-dihidrofenantreno (91)	<i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1993)
R ₁ =R ₃ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₂ =R ₇ = OH, R ₄ = OMe, R ₅ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	2,7-dihidroxi-4-metoxi-1,3-bi-(<i>p</i> -hidroxibencil)-9,10-dihidrofenantreno (92)	<i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1993)
R ₂ =R ₇ = OH, R ₄ =R ₆ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	6-metoxicoelonina (2,7-dihidroxi-4,6-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (93)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> , <i>Agrostophyllum callosum</i> y <i>Cymbidium aloifolium</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997; Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Juneja <i>et. al.</i> , 1987)
R ₂ =R ₆ = OH, R ₄ =R ₇ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Calosina (2,6-dihidroxi-4,7-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (94)	<i>Agrostophyllum callosum</i> y <i>Coelogyne flaccida</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Majumder <i>et. al.</i> , 1995)

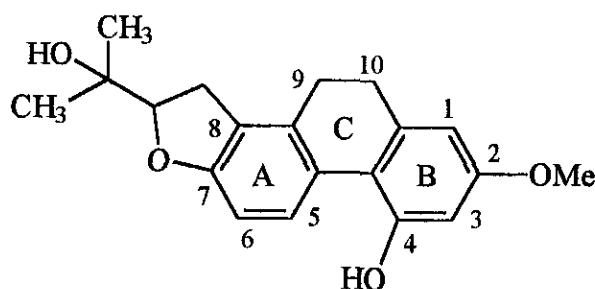
Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₁ =R ₇ = OH, R ₂ =R ₅ = OMe, R ₃ =R ₄ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	1,7-dihidroxi-2,5-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (95)	<i>Epipactis palustris</i> y <i>Eulophia nuda</i> (Gehlert y Kindl, 1991; Turchinda <i>et. al.</i> , 1988)
R ₁ =R ₅ = OH, R ₂ =R ₇ = OMe, R ₃ =R ₄ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Eulofiol (1,5-dihidroxi-2,7-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (96)	<i>Eulophia nuda</i> (Bhandari y Kapadi, 1983)
R ₂ =R ₄ =R ₆ =R ₇ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Calosumina (2,4,6,7-tetrametoxi-9,10-dihidrofenantreno) (97)	<i>Agrostophyllum callosum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996)
R ₁ =R ₇ = OH, R ₅ = OMe, R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	1,7-dihidroxi-5-metoxi-9,10-dihidrofenantreno (98)	<i>Epipactis palustris</i> (Gehlert y Kindl, 1991)
R ₂ =R ₇ = OH, R ₃ =R ₄ =R ₆ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	2,7-dihidroxi-3,4,6-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (99)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> , <i>Oncidium cebolleta</i> , <i>Coelogyne ovalis</i> , <i>inter alia</i> (Leong <i>et. al.</i> , 1997; Stermitz <i>et. al.</i> , 1983; Majumder y Laha, 1981; <i>inter alia</i>)
R ₂ =R ₃ =R ₇ = OH, R ₄ =R ₆ = OMe, R ₁ =R ₅ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	2,3,7-trihidroxi-4,6-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (100)	<i>Bulbophyllum vaginatum</i> , (Leong <i>et. al.</i> , 1997)
R ₁ =R ₆ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₂ =R ₇ = OH, R ₄ = OMe, R ₃ =R ₅ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	2,7-dihidroxi-4-metoxi-1,6-bi-(<i>p</i> -hidroxibencil)-9,10-dihidrofenantreno (101)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1990)
R ₂ =R ₄ = OMe, R ₃ =R ₅ =R ₇ = OH, R ₁ =R ₆ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Calafenantrenol (3,5,7-trihidroxi-2,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (102)	<i>Calanthe discolor</i> y <i>Calanthe liukiensis</i> (Yoshikawa <i>et. al.</i> , 1998)
R ₂ =R ₅ = OH, R ₄ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₆ =R ₇ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Hircinol (2,5-dihidroxi-4-metoxi-9,10-dihidrofenantreno) (103)	<i>Loroglossum hircinum</i> (Stoessl, 1984)
R ₂ =R ₄ = OMe, R ₅ = OH, R ₁ =R ₃ =R ₆ =R ₇ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Loroglosol (5-hidroxi-2,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno) (104)	<i>Loroglossum hircinum</i> (Stoessl, 1984)
R ₂ =R ₃ =R ₅ = OH, R ₄ = OMe, R ₁ =R ₆ =R ₇ =R ₈ = H, R ₉ = H ₂	Efemerantol-C (2,3,5-trihidroxi-4-metoxi-9,10-dihidrofenantreno) (105)	<i>Ephemerantha fimbriata</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1993)

Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura:	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₂ =R ₅ =R ₉ = OH, R ₄ = OMe, R ₁ =R ₃ =R ₆ =R ₇ = R ₈ = H	Rotundatina (2,5,9-trihidroxi-4-metoxi-9,10-dihidrofenantreno) (106)	<i>Dendrobium rotundatum</i> (Majumder y Pal, 1992)
R ₂ = OMe, R ₄ =R ₇ = OH, R ₈ = isopentenil, R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ = H, R ₉ = H ₂	Espirantol-A (4,7-dihidroxi-2-metoxi-8-isopentenil-9,10-dihidrofenantreno) (107)	<i>Spiranthes sinensis</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1989)
R ₂ =R ₄ = OMe, R ₇ = OH, R ₈ = isopentenil, R ₃ =R ₅ =R ₆ = H, R ₉ = H ₂	Espirantol-B (7-hidroxi-2,4-dimetoxi-8-isopentenil-9,10-dihidrofenantreno) (108)	<i>Spiranthes sinensis</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1989)
R ₁ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₂ = OMe, R ₄ =R ₇ = OH, R ₈ = isopentenil, R ₃ =R ₅ =R ₆ = H, R ₉ = H ₂	Espirasineol-A (4,7-dihidroxi-2-metoxi-1-(<i>p</i> -hidroxibencil)-8-isopentenil-9,10-dihidrofenantreno) (109)	<i>Spiranthes sinensis</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1989)

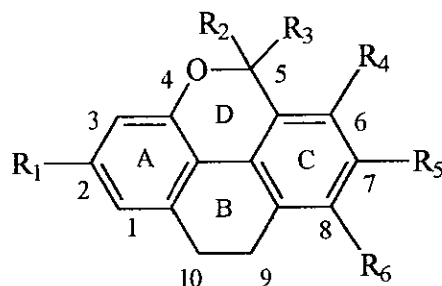
b) 9,10 dihidrofenantrofurano



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
	Espirantol C (110)	<i>Spiranthes sinensis</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1990)

Cuadro 3 Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

c) 9,10 -dihidrofenantropiranos

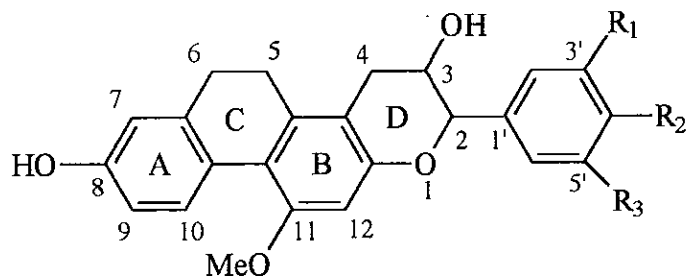


Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_1=R_5= \text{OH}, R_2=R_3=$ $R_4=R_6= \text{H}$	Flavidina (2,7-dihidroxi-9,10-dihidro-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (111)	<i>Bulbophyllum protractum</i> , <i>Coelogyne ovalis</i> , <i>Otochilus fusca</i> , <i>Pholidota articulata</i> , <i>Coelogyne flavida</i> , <i>inter alia</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1997; Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Majumder <i>et. al.</i> , 1982; <i>inter alia</i>)
$R_1= \text{OH}, R_5= \text{OMe},$ $R_2=R_3=R_4=R_6= \text{H}$	Flavidinina (2-hidroxi-7-metoxi-9,10-dihidro-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (112)	<i>Coelogyne flavida</i> y <i>Coelogyne ovalis</i> (Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Majumder y Datta, 1982)
$R_1= \text{OMe}, R_5= \text{OH},$ $R_2=R_3=R_4=R_6= \text{H}$	Isoflavidinina (7-hidroxi-2-metoxi-9,10-dihidro-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (113)	<i>Otochilus fusca</i> , <i>Pholidota articulata</i> y <i>Otochilus porecta</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1982)
$R_1=R_5= \text{OH}, R_4= \text{OMe},$ $R_2=R_3=R_6= \text{H}$	Imbricatina (2,7-dihidroxi-6-metoxi-9,10-dihidro-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (114)	<i>Agrostophyllum callosum</i> , <i>Coelogyne ovalis</i> , <i>Pholidota imbricata</i> , <i>inter alia</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Majumder y Sarkar, 1982; <i>inter alia</i>)

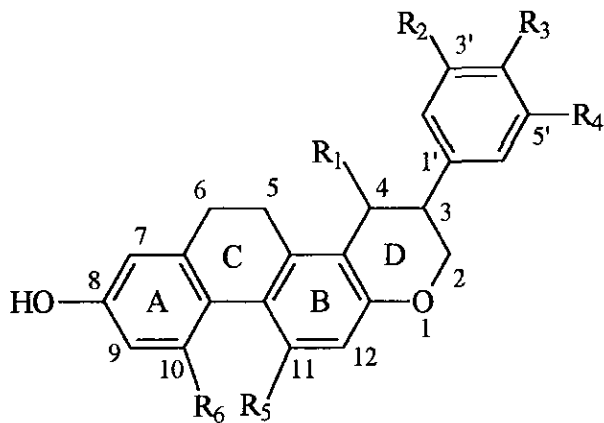
Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₁ =R ₄ = OH, R ₅ = OMe, R ₂ =R ₃ =R ₆ = H	Flaccidina o Amoenumina (2,6-dihidroxi-7-metoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (115)	<i>Agrostophyllum callosum</i> , <i>Dendrobium amoemun</i> y <i>Coelogyne flaccida</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Veerraju <i>et. al.</i> , 1989; Majumder y Maiti, 1988)
R ₁ =R ₄ = OMe, R ₅ = OH, R ₂ =R ₃ =R ₆ = H	Agrostofilidina (7-hidroxi-2,6-dimetoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (116)	<i>Agrostophyllum khasiyanum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996)
R ₁ =R ₄ =R ₅ = OMe, R ₂ =R ₃ =R ₆ = H	Calosinina (2,6,7-trimetoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (117)	<i>Agrostophyllum callosum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996)
R ₁ =R ₅ = OH, R ₂ = Oet, R ₄ = OMe, R ₃ =R ₆ = H	Calosumidina (2,7-dihidroxi-5-etoxi-6-metoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (118)	<i>Agrostophyllum callosum</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996)
R ₁ =R ₄ = OH, R ₅ =R ₆ = OMe, R ₂ =R ₃ = H	Coelogina (2,6-dihidroxi-7,8-dimetoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (119)	<i>Coelogyne ovalis</i> y <i>Coelogyne cristata</i> (Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Majumder <i>et. al.</i> , 1982)
R ₁ =R ₅ = OH, R ₂ =R ₃ = O, R ₄ =R ₆ = H	Oxoflavidina (2,7-dihidroxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (120)	<i>Coelogyne elata</i> (Majumder y Datta, 1984)
R ₁ = OH, R ₂ =R ₃ = O, R ₅ = OMe, R ₄ =R ₆ = H	Oxoflavidinina (2-hidroxi-7-metoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (121)	<i>Coelogyne flavida</i> (Majumder y Datta, 1982)
R ₁ = OMe, R ₂ =R ₃ = O, R ₅ = OH, R ₄ =R ₆ = H	Isooxoflavidinina (7-hidroxi-2-metoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (122)	<i>Otochilus purecta</i> y <i>Pholidota articulata</i> . (Majumder <i>et. al.</i> , 1982)
R ₁ =R ₄ = OH, R ₂ =R ₃ = O, R ₅ = OMe, R ₆ = H	Oxoflaccidina (2,6-dihidroxi-7-metoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (123)	<i>Agrostophyllum callosum</i> y <i>Coelogyne flaccida</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Majumder y Maiti, 1989)
R ₁ =R ₅ = OH, R ₂ =R ₃ = O, R ₄ = OMe, R ₆ = H	Isooxoflaccidina (2,7-dihidroxi-6-metoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (124)	<i>Agrostophyllum callosum</i> y <i>Coelogyne flaccida</i> (Majumder <i>et. al.</i> , 1996; Majumder y Maiti, 1991)
R ₁ =R ₄ = OH, R ₂ =R ₃ = O, R ₅ =R ₆ = OMe	Coeloginina (2,6-dihidroxi-7,8-dimetoxi-9,10-dihidro-5H-fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-piran-5-ona) (125)	<i>Coelogyne ovalis</i> y <i>Coelogyne cristata</i> (Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Majumder <i>et. al.</i> , 1982)

Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).



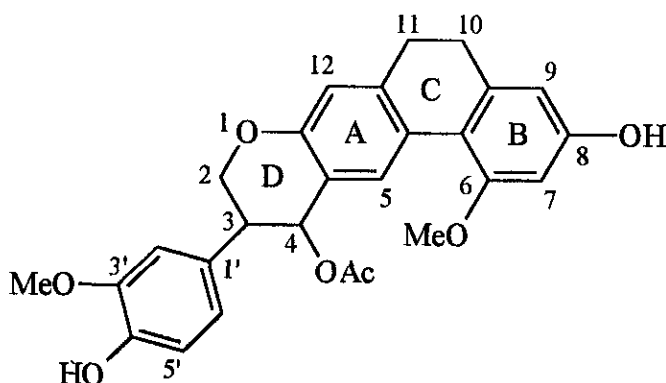
Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$	Shanciol (3,8-dihidroxi-11-metoxi-2-[4'-hidroxi-3'-metoxifenil]-3,4,5,6-tetrahidro-4H-fenantro-[2,1-b]-pirano) (126)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1996)
$R_1 = R_3 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$,	Shanciol E (3,8-dihidroxi-11-metoxi-2-[4'-hidroxi-3',5'-dimetoxifenil]-3,4,5,6-tetrahidro-4H-fenantro-[2,1-b]-pirano) (127)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998)



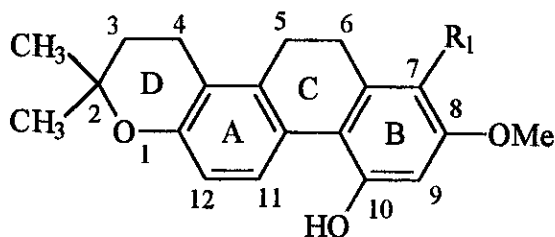
Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_1 = R_3 = \text{OH}$, $R_2 = R_5 = \text{OMe}$, $R_4 = R_6 = \text{H}$	Shanciol F (3,8-dihidroxi-11-metoxi-3-[4'-hidroxi-3'-metoxifenil]-3,4,5,6-tetrahidro-2H-fenantro-[2,1-b]-pirano) (128)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1998)

Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₁ = OAc, R ₂ =R ₄ =R ₅ = OMe, R ₃ = OH, R ₆ = H	Bletilol A (4-acetoxi-8-hidroxi-11-metoxi-3-[4'-hidroxi-3',5'-dimetoxifenil]-3,4,5,6-tetrahidro-2H-fenantro-[2,1-b]-pirano) (129)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1993)
R ₁ = OAc, R ₂ =R ₅ = OMe, R ₃ = OH, R ₄ =R ₆ = H	Bletilol B (4-acetoxi-8-hidroxi-11-metoxi-3-[4'-hidroxi-3'-metoxifenil]-3,4,5,6-tetrahidro-2H-fenantro-[2,1-b]-pirano) (130)	<i>Pleione bulbocodioides</i> y <i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1996; Yamaki <i>et. al.</i> , 1993)



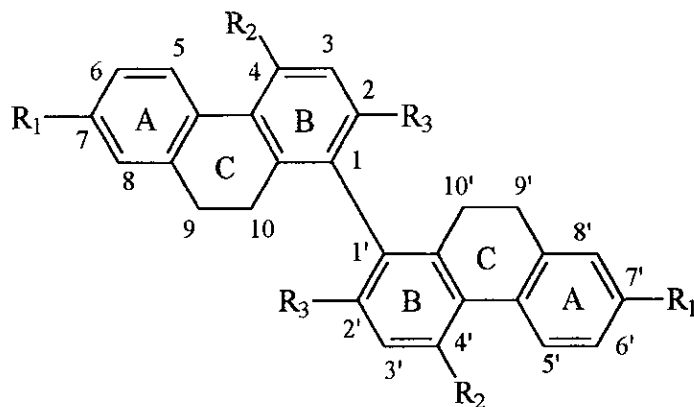
Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
	Bletilol C (4-acetoxi-8-hidroxi-6-metoxi-3-[4'-hidroxi-3'-metoxifenil]-3,4,10,11-tetrahidro-2H-fenantro-[2,3-b]-pirano) (131)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1993)



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₁ = <i>p</i> -hidroxibencilo	Espirasineol B (132)	<i>Spiranthes sinensis</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1990)

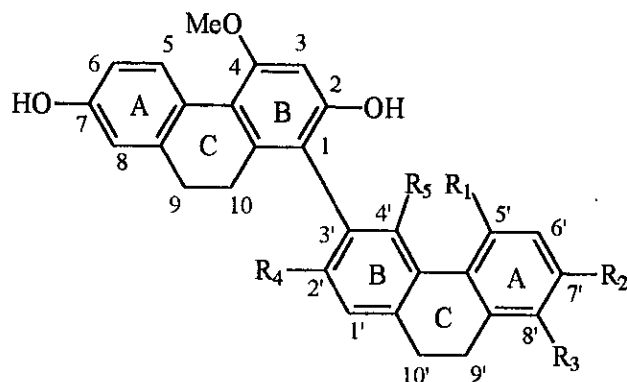
Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de especies de la familia Orchidaceae (Continuación).

d) Dímeros de 9, 10-dihidrofenantrenos

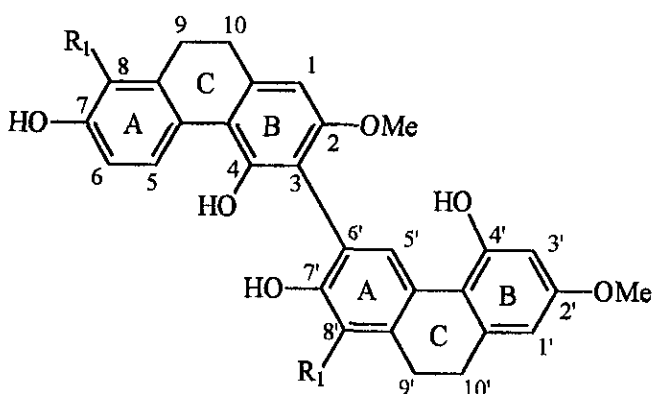


Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
$R_1=R_3= OH, R_2= OMe$	Flavantrina o Blestriareno A (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4'-dimetoxi-9,9',10,10'-tetrahidro-1,1'-bifenantreno) (133)	<i>Arundina bambusifolia</i> , <i>Bletilla striata</i> y <i>Eria flava</i> (Majumder y Ghosal, 1993; Yamaki <i>et. al.</i> , 1989; Majumder y Banerjee, 1988)
$R_1=R_3= OH, R_2= OMe, 9',10'$ dehidro	Blestriareno B (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4'-dimetoxi-9,10-dihidro-1,1'-bifenantreno) (134)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki <i>et. al.</i> , 1989)
$R_1=R_2= OH, R_3= OMe,$	4,4',7,7'-tetrahidroxi-2,2'-dimetoxi-9,9',10,10'-tetrahidro-1,1'-bifenantreno (135)	<i>Dendrobium plicatile</i> (Yamaki y Honda, 1996)

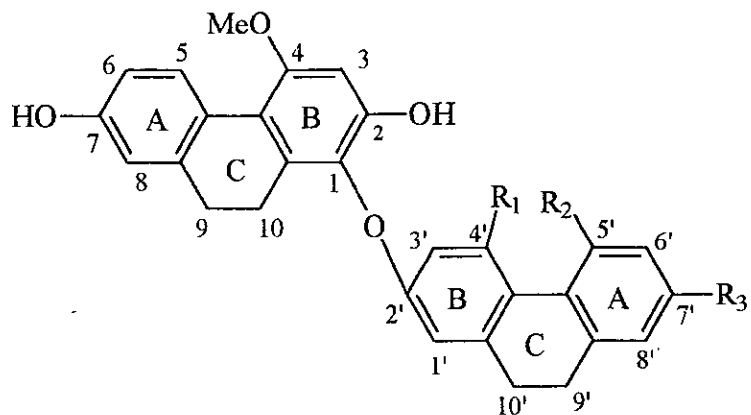
Cuadro 3. Estructuras, nombres químicos y fuentes naturales de los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de varias especies de orquídeas (Continuación).



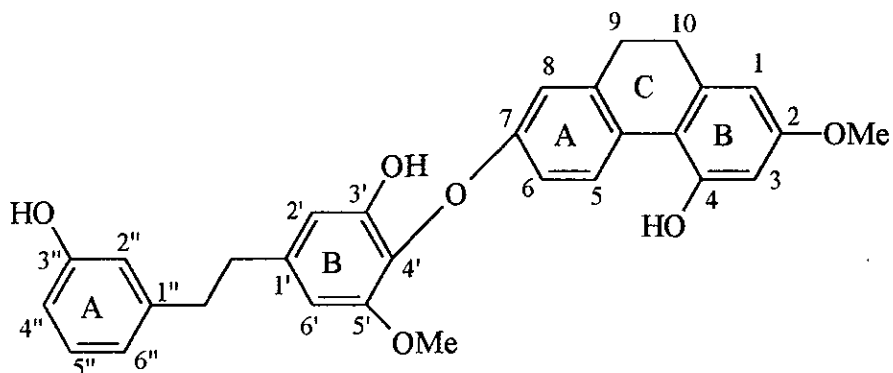
Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₂ =R ₄ = OH, R ₅ = OMe, R ₁ =R ₃ = H	Blestrianol A (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4'-dimetoxi-9,9',10,10'-tetrahidro-1,3'-bifenantreno) (136)	<i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1991)
R ₁ = OMe, R ₂ =R ₄ = OH, R ₃ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₅ = H	Blestrianol B (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,5'-dimetoxi-8'-(<i>p</i> -hidroxibencil)-9,9',10,10'-tetrahidro-1,3'-bifenantreno (137)	<i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1991)
R ₁ = OMe, R ₂ =R ₄ = OH, R ₃ = <i>p</i> -hidroxibencilo, R ₅ = H, 9,10 dehidro	Blestrianol C (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,5'-dimetoxi-8'-(<i>p</i> -hidroxibencil)-9',10'-dihidro-1,3'-bifenantreno (138)	<i>Bletilla striata</i> (Bai <i>et. al.</i> , 1991)



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₁ = Isopentenil	Espirantesol (4,4',7,7'-tetrahidroxi-2,2'-dimetoxi-8,8'-bi-(isopentenil)-9,9',10,10'-tetrahidro-3,6'-bifenantreno) (139)	<i>Spiranthes sinensis</i> (Tezuka <i>et. al.</i> , 1990)



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
R ₁ = OMe, R ₂ = H, R ₃ = OH	Blestrina A (140)	<i>Bletilla striata</i> (Bai et., al., 1990)
R ₁ = H, R ₂ = OH, R ₃ = OMe	Blestrina B (141)	<i>Bletilla striata</i> (Bai et., al., 1990)
R ₁ = OMe, R ₂ = H, R ₃ = OH, 9,10 dehidro	Blestrina C (142)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki et., al., 1992)
R ₁ = H, R ₂ = OMe, R ₃ = OH, 9,10 dehidro	Blestrina D (143)	<i>Bletilla striata</i> (Yamaki et., al., 1992)



Estructura	Nombre del compuesto	Fuente natural y Referencia
	Shancilina 7-O-[4'-(3',3''- dihidroxi-5'-metoxibencil)]-4- hidroxi-3-metoxi-9,10- dihidrofenantreno (144)	<i>Pleione bulbocodioides</i> (Bai et., al., 1996)

Los 9,10-dihidrofenantrenos (Cuadro 3), como su nombre lo indica, son dihidroderivados de los fenantrenos. Estos productos se clasifican en 9,10-dihidrofenantrenos simples, 9,10-dihidrofenantrofuranos, 9,10-dihidrofenantropiranos y 9,10-dihidrofenantrenos diméricos. De nueva cuenta, la naturaleza de los sustituyentes y el patrón de sustitución de los 9,10-dihidrofenantrenos son similares a los fenantrenos. Por lo raro de sus estructuras, en este grupo destacan los 9,10-dihidrofenantropiranos (**111-132**). Estos compuestos presentan el anillo pirano fusionado a los anillos A o B del núcleo fenantreno o bien entre los anillos A y B. En los dos primeros casos, el anillo piránico es de origen mevalónico. En el tercer caso se genera por la reducción de la fenantrolactona correspondiente. Los 9,10-dihidrofenantrenos diméricos presentan una variedad estructural amplia y esto es debido a que la unión entre los monómeros correspondientes puede ser de tipo carbono-carbono (compuestos **133-139**) o bien de tipo carbono-oxígeno (tipo éter) como es el caso de los compuestos **140-144**. En este último grupo de compuestos destaca la shancilina (**144**), que posee un monómero derivado del bibencilo batatasina III (**1**) y el otro corresponde al 9,10-dihidrofenantreno lusiantridina (**82**).

Los estilbenoides de orquídeas se obtienen como sólidos amorfos o cristalinos y pueden ser coloridos o incoloros. La naturaleza fenólica de algunos de estos compuestos es fácil de determinar debido a las coloraciones violeta y azul características que presentan frente a los reactivos FeCl_3 y ácido fosfomolibdico, respectivamente.

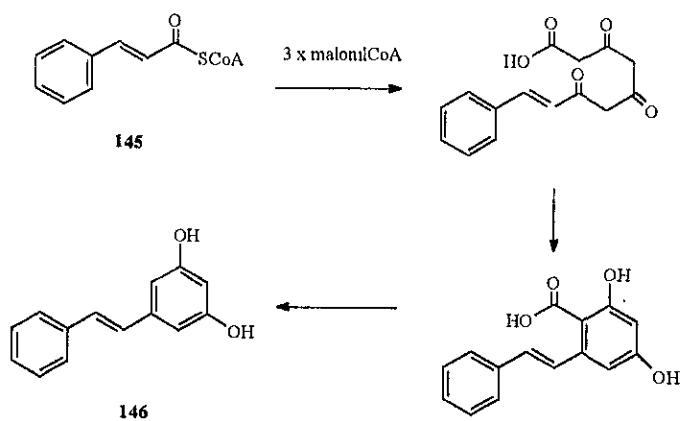
La elucidación estructural de los estilbenoides requiere de la aplicación de diferentes técnicas espectrométricas y espectroscópicas. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en sus diferentes modalidades, es el método espectroscópico de mayor utilidad debido a que genera la información más relevante durante el proceso de elucidación estructural. En algunos casos, la aplicación de la técnica de difracción por rayos X ha

permitido corroborar de manera inequívoca las estructuras moleculares establecidas mediante otros procedimientos (Estrada *et. al.*, 1999; Bai, *et. al.*, 1996; Stermitz *et. al.*, 1983; *inter alia*).

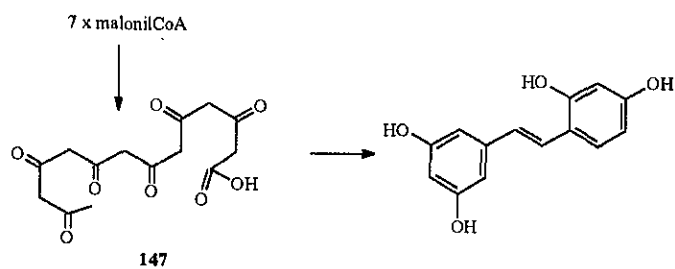
En la literatura se han descritos tres posibles rutas biogénicas que conducen a la formación de los estilbenoides (Bewick, 1997; Herbert, 1989; Gorham, 1995). La primera fue propuesta por Birch y Donovan (1953) y considera que estos productos son de biogénesis mixta (Esquema 1a), generándose a través de las rutas acetato-malonato y ácido siquímico. Así, una molécula de cinamoil CoA (**145**) (unidad iniciadora) y tres unidades de malonil-CoA se condensan para generar el estilbeno **146**. Posteriormente, Robinson y colaboradores (1955) propusieron una segunda hipótesis, según la cual estos compuestos se generan por la ruta acetato-malonato a partir del policétido **147**, proveniente de la condensación de acetil-CoA y seis unidades de malonil CoA (Esquema 1b). Por último, la tercera hipótesis propuesta por Seshadri (1957), considera que los estilbenoides se generan a través de la condensación aldólica de una molécula de ácido fenilacético (**149**) y otra de ácido ftálico (**148**) (Esquema 1c).

El empleo de precursores marcados con isótopos radioactivos permitió establecer que la hipótesis propuesta por Birch y Donovan es la correcta. De manera adicional, se estableció que la fenilalanina era el fenilpropanoide que mejor se incorporaba a las estructuras de los estilbenoides biosintetizados (Ibrahim y Towers, 1960; Kindl, 1985; Gorham *et. al.*, 1995). La biosíntesis de los fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos aun no ha sido demostrada experimentalmente, sin embargo, se especula que estos se derivan a partir de los bibencilos mediante un acoplamiento fenólico.

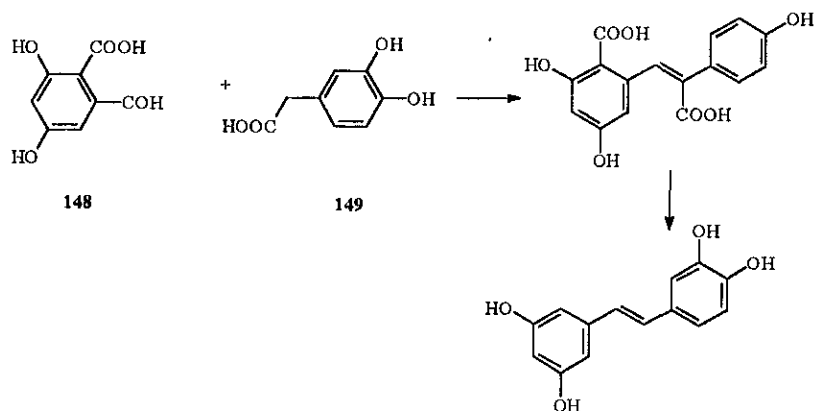
a) Hipótesis de Birch-Donovan



b) Hipótesis de Robinson

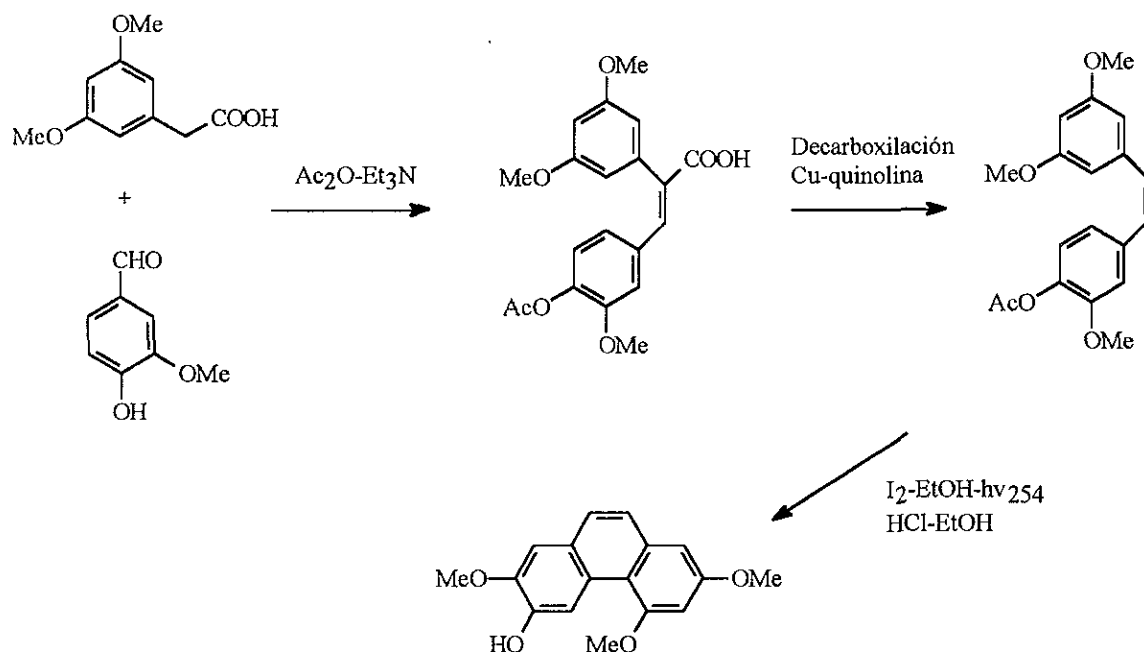


c) Hipótesis de Seshadri

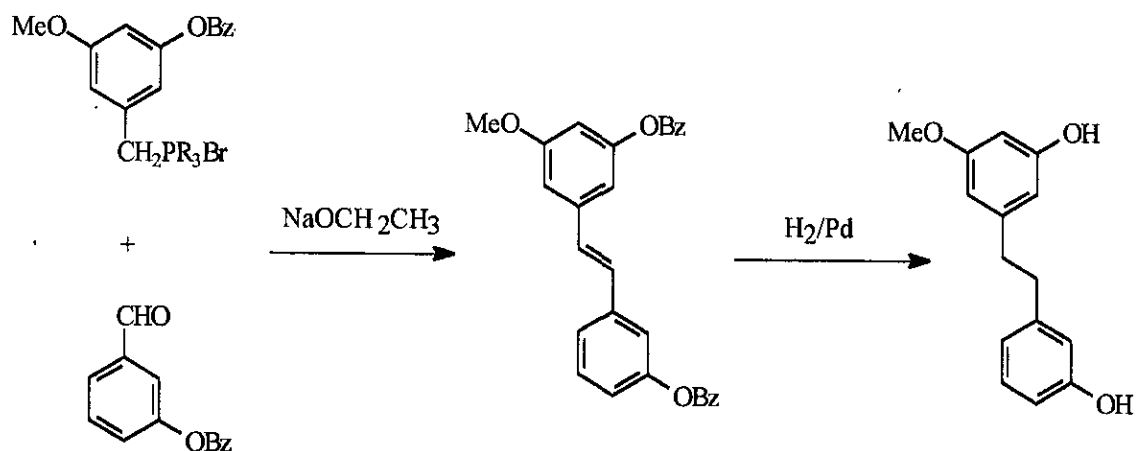


Esquema 1. Rutas biogénicas propuestas para la formación de los estilbenoides.

Para la síntesis de los estilbenoides se utilizan varias estrategias y las más importantes involucran la condensación de Perkin y la reacción de Wittig (Esquema 2). En el primer caso, el estilbenoide se genera mediante la condensación de un análogo del ácido fenilacético (bajo la forma de sal) con un análogo del benzaldehído. Esta reacción genera los isómeros *cis* y *trans* del estilbeno. La fotociclización posterior de esta mezcla permite la obtención de los fenantrenos correspondientes (Esquema 2a). En la segunda estrategia, un análogo del benzaldehído reacciona con un haluro de benciltrifenilfosfonio (reactivo de Wittig) para así generar los isómeros *cis* y *trans* de los estilbenos. La reducción posterior con H₂/Pd permite la obtención de los bibencilos (Esquema 2b). Mediante la aplicación de estas estrategias generales se ha logrado la síntesis de una serie de estilbenoides, dentro de los cuales podemos mencionar a la batatasina I y III, el gigantol, las combrestatinas B-3 y B-4, la gimnopusina, entre otros (Letcher, 1973; Letcher, *et. al.*, 1972; Hashimoto y Hasegawa, 1974; Petit *et. al.*, 1988; Bhandari *et. al.*, 1985; *Inter alia*).



Esquema 2a. Reacción de condensación de Perkin para la síntesis de la batatasina I.



Esquema 2b. Reacción de condensación de Wittig para la formación de la batatasina III.

Es importante destacar que a pesar del gran número de compuestos de tipo fenantreno y bibencilo aislados de diferentes especies de la familia Orchidaceae, los estudios tendientes a demostrar la actividad biológica de los mismos son escasos. La mayoría de las investigaciones se han centrado principalmente en la determinación de la actividad antimicrobiana de estos productos. De manera adicional, algunos reportes aislados describen las propiedades citotóxicas, antitumorales y antiinflamatorias de algunos estilbenoides (Lee *et. al.*, 1995; Tezuka *et. al.*, 1990; Yamaki *et. al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1988; Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Takagi *et. al.*, 1983; *Inter alia*). En el Cuadro 4 se presentan los bibencilos, fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos obtenidos de diferentes especies de orquídeas con actividad biológica.

Cuadro 4. Bibencilos, fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos aislados de diferentes especies de orquídeas con actividad biológica.

Compuesto	Actividad biológica	Referencia
3'- <i>O</i> -metilbatatasina III (5-hidroxi-3,3'- dimetoxibibencilo) (3)	Actividad antibacteriana en contra de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus mutans</i>	Yamaki <i>et al.</i> , 1989
3,4'-dihidroxi-5,5'- dimetoxibibencilo (12)	Actividad Antiinflamatoria	Shimizu <i>et al.</i> , 1988
3,3'-dihidroxi-5-metoxi- 2,6-bis-(<i>p</i> -hidroxibencil) bibencilo (30)	Actividad antibacteriana en contra de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. Cereus</i> , <i>Nocardia gardneri</i> y <i>S. aureus</i> . Actividad antimicótica en contra de <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Takagi <i>et. al.</i> , 1983
3-hidroxi-3',5-dimetoxi- 2,6-bis-(<i>p</i> -hidroxibencil) bibencilo (31)		
3,3'-dihidroxi-5-metoxi- 2,5',6-tri-(<i>p</i> - hidroxibencil) bibencilo (35)		
Nudol (2,7-dihidroxi- 3,4-dimetoxifenantreno) (41)	Actividad antiinflamatoria Inhibidor específico no competitivo de las contracciones inducidas por histamina en íleon de cobayo	Shimizu <i>et al.</i> , 1988
Orchinol (7-hidroxi-2,4- dimetoxi-9,10- dihidrofenantreno) (81)	Actividad antimicótica en contra de <i>Candida lipolytica</i> , <i>Phytophthora infestans</i> y <i>Monilinia fruticola</i> .	Baxter, 1994
Lusiantridina (4,7- dihidroxi-2-metoxi-9,10- dihidrofenantreno) (82)	Actividad antitumoral en ratón Actividad citotóxica in vitro (A-549 carcinoma de pulmón, SK-DV-3 carcinoma de ovario y HL-60 leucemia humana) Actividad antibacteriana	Lee <i>et. al.</i> , 1995
Hircinol (2,5-dihidroxi- 4-metoxi-9,10- dihidrofenantreno) (103)	Actividad antimicótica en contra de <i>Aspergillus niger</i>	Baxter, 1994
Loroglosol (5-hidroxi- 2,4-dimetoxi-9,10- dihidrofenantreno) (104)	Actividad antimicótica en contra de <i>Phytophthora infestans</i>	Baxter, 1994
Espirantol-A (4,7- dihidroxi-2-metoxi-8- isopentenil-9,10- dihidrofenantreno) (107)	Actividad antibacteriana en contra de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. Cereus</i> , <i>Nocardia gardneri</i> y <i>S. aureus</i> . Actividad antimicótica en contra de <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Tezuka <i>et al.</i> , 1990

Cuadro 4. Bibencilos, fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos aislados de diferentes especies de orquídeas con actividad biológica (continuación).

Compuesto	Actividad biológica	Referencia
Espirasineol-A (4,7-dihidroxi-2-metoxi-1-(<i>p</i> -hidroxibencil)-8-isopentenil-9,10-dihidrofenantreno) (109)	Actividad antibacteriana en contra de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. Cereus</i> , <i>Nocardia gardneri</i> y <i>S. aureus</i> . Actividad antimicótica en contra de <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Tezuka <i>et al.</i> , 1990
Denbinobina (5-hidroxi-3,7-dimetoxifenantreno-1,4-quinona) (65)	Actividad antitumoral en ratón Actividad citotóxica in vitro (A-549 carcinoma de pulmón, SK-DV-3 carcinoma de ovario y HL-60 leucemia humana). Actividad antibacteriana	Lee <i>et. al.</i> , 1995
Flavidina (2,7-dihidroxi-9,10-dihidro-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (112)	Actividad espasmolítica sobre las contracciones inducidas por BaCl ₂ en íleon de cobayo	Sachdev y Kulshreshtha, 1986
Coelogina (2,6-dihidroxi-7,8-dimetoxi-9,10-dihidro-5 <i>H</i> -fenantro-[4,5- <i>bcd</i>]-pirano) (119)		
Blestriareno C ó Cirropetalantrina (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4'-dimetoxi-1,1'-bifenantreno) (75)	Actividad antibacteriana en contra de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus mutans</i>	Yamaki <i>et al.</i> , 1989
Flavantrina ó Blestriareno A (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4'-dimetoxi-9,9',10,10'-tetrahidro-1,1'-bifenantreno) (133)		
Blestriareno B (2,2',7,7'-tetrahidroxi-4,4'-dimetoxi-9,10-dihidro-1,1'-bifenantreno) (134)	Actividad antibacteriana en contra de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus mutans</i>	Yamaki <i>et al.</i> , 1989
Espirantesol (4,4',7,7'-tetrahidroxi-2,2'-dimetoxi-8,8'-bi(isopentenil)-9,9',10,10'-tetrahidro-3,6'-bifenantreno) (139)	Actividad citotóxica <i>in vitro</i>	Tezuka <i>et al.</i> , 1990

1.2. ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr Y *Maxillaria densa* Lindley.

Scaphyglottis livida (Lindley) Schltr (Figura 1) es una planta erecta, con tallos ramificados y cada rama posee un pseudobulbo fusiforme, delgado y costado; los pseudobulbos llegan a medir hasta 10 cm de largo por 8 mm de diámetro y contienen 2 hojas. Las hojas son angostas y lineares de 4 a 12 cm de largo y de 3 a 4 mm de ancho. Las flores son escasas de pétalos y contienen sépalos de aproximadamente 2 mm. La especie tiene por habitat la selva alta y los bosques secos premontañosos y mesófilos de montañas, a una altitud de 600 a 1500 m sobre el nivel del mar (Hietz y Hietz-Seifert, 1994). Esta planta se distribuye ampliamente en México (principalmente en los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Guerrero), Guatemala y Honduras (Ames y Correll, 1952). Los habitantes de la región de los Tuxtlas, Veracruz designan a la especie con el nombre vulgar de “parásita” y emplean la planta entera para el tratamiento de heridas, evitar el aborto, como repelente de insectos y para el tratamiento de cólicos estomacales (Carmona, 1995).

Hietz y Hietz-Seifert en su libro *Epífitas de Veracruz. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas, Veracruz*, hacen la siguiente descripción de *Maxillaria densa* Lindley (Figura 2) “planta colgante; el rizoma y la base del pseudobulbo se encuentran cubiertos por vainas café; los pseudobulbos viejos se encuentran desfoliados. Los pseudobulbos son elípticos u ovalados, comprimidos y carinados. Las hojas son solitarias, lineares a lineares-oblongadas, delgadas y coriáceas y miden de 10 a 30 cm de largo y de 1.5 a 4 cm de ancho; el ápice es obtuso algo retuso y la base conduplicada. La base posee muchos pedúnculos cortos con una flor, saliendo de la vaina que parcialmente cubre el pseudobulbo. La flor es amarillo verdosa a rosa, y cerca de la vena central de los sépalos y pétalos es violeta clara; el labelo es morado, y los sépalos miden

aproximadamente 1 cm de largo”. *M. densa* habita principalmente en la selva alta, y el bosque algo seco premontano a bosque mesófilo de montaña a una altitud de 600 a 1450 m. sobre el nivel del mar. Esta especie se encuentra distribuida en México (principalmente en los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Guerrero) Guatemala y Honduras (Ames y Correll, 1952). *M. densa* es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de cólicos estomacales. También se le conoce con el nombre común de “parásita” (Carmona, 1996).

Es importante destacar que ninguna de estas especies ha sido objeto de estudios biológicos o químicos previos.



Figura 1. *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr



Figura 2. *Maxillaria densa* Lindley

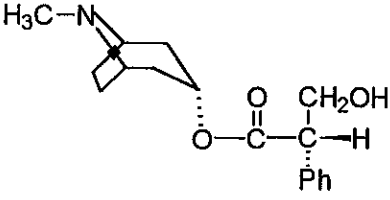
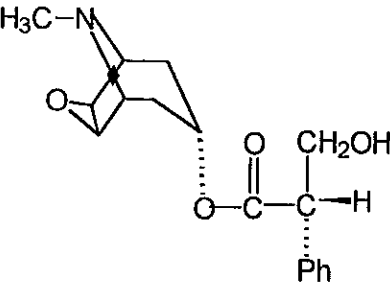
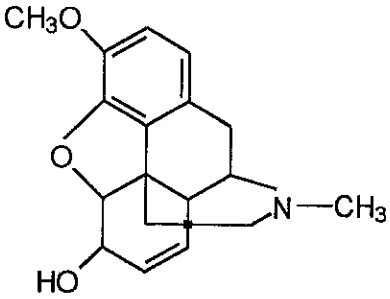
1.3. EL REINO VEGETAL COMO UNA FUENTE DE AGENTES ANTIESPASMÓDICOS.

Un agente espasmolítico es un compuesto que al inducir relajación, inhibe los espasmos musculares. Estos agentes son también conocidos como antiespasmódicos.

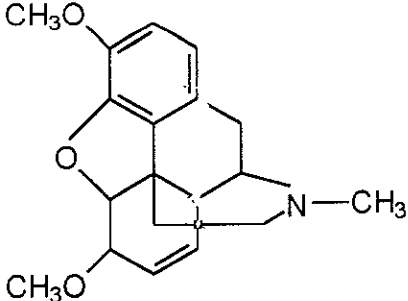
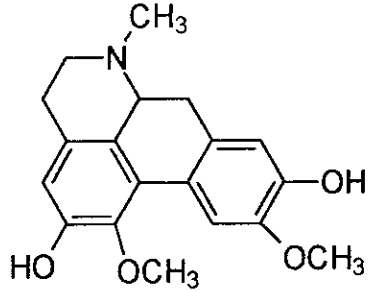
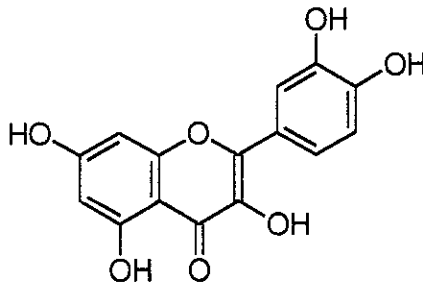
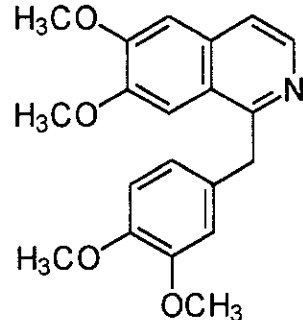
Los antiespasmódicos empleados para el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales son sustancias que disminuyen la actividad motora del músculo liso del tracto digestivo (Gilman *et. al.*, 1996) Muchos de estos medicamentos se utilizan en la terapéutica para el tratamiento de cólicos, dispépsia, ulceración y diarrea (Williamson *et al.*, 1996). Los antiespasmódicos naturales presentan una gran diversidad estructural y

pertencen principalmente a las siguientes categorías de compuestos: alcaloides, flavonoides, terpenoides y cumarinas. En el Cuadro 5 se indican ejemplos selectos de antiespasmódicos naturales, especificándose sus estructuras químicas, mecanismos de acción y algunas de sus fuentes naturales.

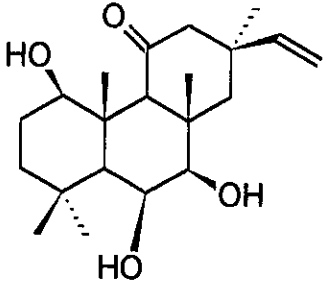
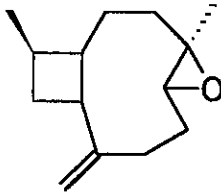
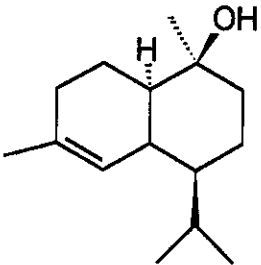
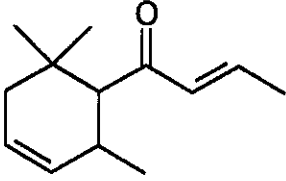
Cuadro 5. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies de plantas.

Fuente Natural	Compuesto	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Hyosциamus niger</i> (Solanaceae) <i>Atropa belladona</i> (Solanaceae)</p>	 <p>Atropina (150)</p>	<p>Antagonista colinérgico muscarínico</p>	<p>Dewick, 1997</p>
<p><i>Datura fastuosa</i> (Solanaceae) <i>H. niger</i> (Solanaceae) <i>A. belladona</i> (Solanaceae)</p>	 <p>Escopolamina (151)</p>	<p>Antagonista colinérgico muscarínico</p>	<p>Tyler <i>et. al.</i>, 1989</p>
<p><i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)</p>	 <p>Morfina (152)</p>	<p>Agonista de los receptores neuropéptidos opiodes</p>	<p>Tyler <i>et. al.</i>, 1989</p>

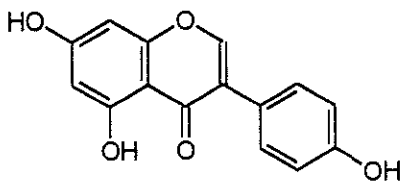
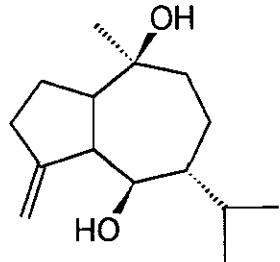
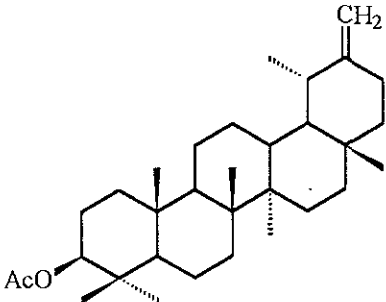
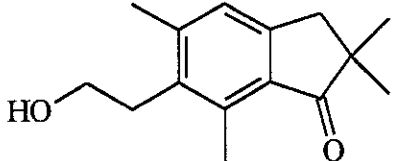
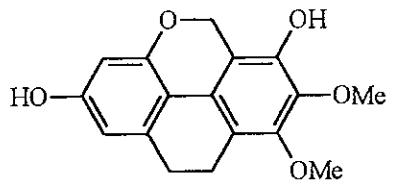
Cuadro 5. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies de plantas (continuación).

Fuente Natural	Compuesto	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)</p>	 <p>Codeína (153)</p>	<p>Agonista de los receptores neuropéptidos opiodes</p>	<p>Tyler <i>et. al.</i>, 1989</p>
<p><i>Peumus boldus</i></p>	 <p>Boldina (154)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca²⁺</p>	<p>Speisky <i>et. al.</i>, 1991</p>
<p><i>Matricaria chamomilla</i> (Asteraceae)</p>	 <p>Quercetina (155)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca²⁺</p>	<p>Achterrath-Tukermann <i>et. al.</i>, 1980</p>
<p><i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)</p>	 <p>Papaverina (156)</p>	<p>Inhibidor de la AMPc fosfodiesterasa</p>	<p>Bolton, 1979</p>

Cuadro 5. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies de plantas (continuación).

Fuente Natural	Compuesto	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Coleus forskohli</i> (Lamiaceae)</p>	 <p>Forskolina (157)</p>	<p>Activador de la adenilato ciclasa</p>	<p>Den Hertog <i>et al.</i>, 1985</p>
<p><i>Conyza filaginoides</i> (Asteraceae)</p>	 <p>epoxi-β-cariofileno (158)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca²⁺ en íleon aislado de rata</p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Commiphora guidottii</i> (Burseraceae)</p>	 <p>T-cadinol (159)</p>	<p>Antagonista de calcio en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Zygmunt <i>et al.</i>, 1993 Andersson <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Ipomoea pes-caprae</i> (Convolvulaceae)</p>	 <p>β-damacenona (160)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por histamina en el íleon aislado de cobayo</p>	<p>Pongprayon <i>et al.</i>, 1992</p>

Cuadro 5. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies de plantas (continuación).

Fuente Natural	Compuesto	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Genista tridentata</i> (Papilionaceae)</p>	 <p>Genisteína (161)</p>	<p>Produce un aumento en los niveles de AMPc en íleon de cobayo</p>	<p>Herrera <i>et al.</i>, 1992</p>
<p><i>Commiphora guidotti</i> (Burseraceae)</p>	 <p>6β,10β-dihidroxi-4(15)-guaiano (162)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por KCl en anillos de aorta de rata</p>	<p>Zygmunt <i>et al.</i>, 1993 Andersson <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Scolymus hispanicus</i> (Compositae)</p>	 <p>Taraxasteril acetato (163)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por Ach en íleon de rata</p>	<p>Kirimer <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Pteridium aquilinum</i> (Pteridaceae)</p>	 <p>Pterosin Z (164)</p>	<p>Bloqueador de canales de calcio en íleon de cobayo</p>	<p>Sheridan <i>et al.</i>, 1999</p>
<p><i>Coelogyne ovalis</i> (Orchidaceae)</p>	 <p>Coelogina (119)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por BaCl₂ en íleo de cobayo</p>	<p>Sachdev y Kulshreshtha, 1987</p>

De acuerdo a su mecanismo de acción, los compuestos espasmolíticos naturales se pueden clasificar de la siguiente manera: antagonistas colinérgicos muscarínicos, agonistas de neuropéptidos endógenos, bloqueadores de canales de Ca^{2+} , inhibidores de 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) fosfodiesterasa y los activadores de adenilato ciclasa (Gilman *et. al.*, 1996; Katzung, 1992; Rojas, 1995; *inter alia*). Es importante hacer notar, que existen muchos metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades espasmolíticas comprobadas cuyo mecanismo de acción no ha sido caracterizado aún.

Los antagonistas colinérgicos muscarínicos incluyen los alcaloides tropánicos atropina, escopolamina y hiosciamina, así como un gran número de derivados semisintéticos de este grupo, obtenidos a partir de especies vegetales de la familia Solanaceae. La atropina y la escopolamina (Cuadro 5) son bloqueadores competitivos de los receptores muscarínicos localizados en los órganos efectores inervados por el sistema nervioso autónomo parasimpático y de los receptores muscarínicos neuronales y ganglionares localizados en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) y en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Gilman *et al.*, 1996).

El grupo de los agonistas opiodes incluye principalmente a los alcaloides del opio: morfina y codeína (Cuadro 5). Estos metabolitos secundarios son agonistas directos de neuropéptidos opiodes, cuya distribución celular y función se localiza principalmente en el SNC y en el tracto gastrointestinal. La morfina y la codeína, al igual que todos los agonistas opiodes actúan principalmente en los receptores opiodes tipo μ y tal vez en los κ y δ . Estos compuestos en el tracto gastrointestinal actúan disminuyendo la secreción gástrica, biliar, pancreática e intestinal y originan un aumento en el tono basal. Los agonistas opiodes constituyen los medicamentos básicos para el tratamiento farmacológico inespecífico de la

diarrea, los cuales producen una disminución en la motilidad intestinal y contrarrestan la secreción excesiva que acompaña a algunas formas de diarrea (Gilman *et al.*, 1996).

Se han aislado un gran número de metabolitos secundarios a partir de plantas que tienen la propiedad de bloquear, específica o inespecíficamente, canales de Ca^{2+} . Los bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} constituyen un grupo muy heterogéneo de compuestos químicos que actúan principalmente a través de interacciones con sitios específicos en la subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L. Estas sustancias bloqueadoras de canales Ca^{2+} inhiben el influjo de Ca^{2+} en las células excitables de músculo liso, esquelético y cardíaco (Godfrain *et al.*, 1986).

Los bloqueadores de canales de Ca^{2+} de origen natural mejor caracterizados son los alcaloides benciltetrahidroisoquinolínicos y bisbenciltetrahidroisoquinolínicos (Cuadro 5) aislados de diversas fuentes vegetales. Estos compuestos actúan uniéndose a la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente tipo L, modulando alostéricamente las propiedades del canal. Los flavonoles y algunas flavonas constituyen otro grupo de metabolitos secundarios a los que se les ha demostrado una actividad relajante de la musculatura lisa, asociado a un bloqueo de canales de Ca^{2+} . Entre los flavonoides que se les ha comprobado su actividad antiespasmódica se encuentran: la quercetina (Cuadro 5), el kaempferol, la sakuranetina, por tan solo mencionar algunos (Morales y Lozoya, 1994; Bergendorff y Sterner, 1995; Rojas *et al.*, 1996).

Dentro del grupo de los Inhibidores de la adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) fosfodiesterasa, se encuentra la papaverina (Cuadro 5) que representa el compuesto más importante de este grupo de antiespasmódicos, y se considera como el prototipo de los denominados relajantes musculares inespecíficos, ya que no interactúa con ningún tipo de

receptor membranal (Bolton, 1979). La papaverina es uno de los alcaloides bencilisoquinolínicos del opio; a diferencia de la morfina y la codeína, no interacciona con los receptores a péptidos opiodes y por lo tanto carece de las acciones narcóticas y analgésicas de aquellos. El modo de acción de la papaverina, consiste en la inhibición de la adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) fosfodiesterasa con la subsecuente acumulación de adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) en la célula muscular.

El producto natural más importante del grupo de los activadores de la adenilato ciclasa es la forskolina (Cuadro 5), diterpeno aislado a partir de las raíces de *Coleus forskohli*. Esta sustancia produce relajación de la musculatura lisa mediante la activación de la adenilato ciclasa, posiblemente estimulando directamente el componente catalítico de la enzima (Bhat *et al.*, 1993). El efecto relajante inducido por la forskolina se debe a la acumulación de AMPC en el sarcoplasma, mediante los mecanismos ya descritos para explicar la acción de la papaverina. Se ha propuesto también que la forskolina estimula directamente una Ca^{2+} -ATPasa, cuya acción es regulada por fosforilación mediante la acción de una proteína cinasa dependiente de AMPC. La estimulación de la Ca^{2+} -ATPasa, estimula el transporte de Ca^{2+} al espacio extracelular, disminuyendo por lo tanto la concentración citoplasmática de Ca^{2+} (Den Hertog *et al.*, 1985).

La mayoría de los metabolitos secundarios enlistados en el Cuadro 5 se han aislados a partir de plantas medicinales mediante la realización de estudios fitoquímicos biodirigidos. Esta estrategia implica las siguientes etapas:

- 1) Preselección del material vegetal utilizando principalmente un criterio de tipo etnomédico.
- 2) Selección del material vegetal a estudiar mediante la realización de ensayos biológicos apropiados.

- 3) Preparación de los extractos y obtención de los principios activos mediante un fraccionamiento de tipo biodirigido.
- 4) Elucidación estructural de los compuestos bioactivos.
- 5) Determinación del modo de acción de los compuestos activos.
- 6) Otros estudios conducentes, si el caso lo amerita, al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Para la selección del material vegetal y la obtención de los metabolitos secundarios activos mediante la implementación de un estudio de tipo biodirigido existen muchos modelos animales, los cuales permiten determinar la actividad de extractos y metabolitos secundarios derivados de plantas (Rojas *et. al.*, 1995; Mata *et. al.*, 1997; Samuelsson, *et al*, 1991; Williamson, 1996; *inter alia*). Los ensayos con los distintos modelos animales permiten determinar la actividad antiespasmódica de las materias primas de manera preliminar y así seleccionar los candidatos apropiados para la obtención de los principios espasmolíticos. Los modelos que comunmente se utilizan para la realización de estos bioensayos *in vitro* son el íleon aislado de rata o de cobayo, duodeno de rata y yeyuno de conejo (Samuelsson, *et al*, 1991; Williamson, 1996). Una vez que se determina el efecto antiespasmódico de los extractos vegetales, se procede al aislamiento y caracterización química de los principios bioactivos. Posteriormente, se realizan estudios conducentes a determinar el modo de acción de los productos con propiedades relajantes de la musculatura lisa.

***II. JUSTIFICACION, HIPOTESIS
Y OBJETIVOS***

2.1. JUSTIFICACION.

En México las enfermedades gastrointestinales representan uno de los principales problemas de salud pública. Según datos estadísticos proporcionados por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA), el número de casos acumulados de enfermedades gastrointestinales hasta mediados de 1999 asciende a 1, 900, 000. Estas enfermedades comprenden dos grupos generales de padecimientos. El primer grupo incluye las diarreas de diversa etiología, acompañada invariablemente de una disfunción del peristaltismo. En el segundo, se encuentran los trastornos que alteran la motilidad de la musculatura lisa gastrointestinal, entre los que se pueden mencionar: los cólicos intestinales, la emésis, el íleon adinámico y la constipación, entre otros. Las plantas medicinales constituyen el principal recurso terapéutico empleado por la población mexicana para el tratamiento de estos padecimientos, estimándose que aproximadamente el 38% del total de las plantas utilizadas en la herbolaria medicinal mexicana se emplean para tratar diferentes tipos de desórdenes gastrointestinales (Aguilar y Camacho, 1984; Lozoya, *et. al.*, 1987). Sin embargo, en el ámbito nacional, la mayoría de estas especies vegetales no han sido objeto de estudios que permitan la comprobación farmacológica de su uso en la terapéutica tradicional y mucho menos la caracterización de los principios activos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Esta situación resulta lamentable ya que en múltiples ocasiones la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto a los países en vías de desarrollo que estudien los recursos utilizados en las prácticas médicas tradicionales, de tal forma que se valoren científicamente las propiedades terapéuticas de estas plantas y así sea posible incorporarlas en la terapéutica oficial. Por otro lado, el estudio de las plantas utilizadas en la medicina popular permite el descubrimiento de nuevos prototipos para el desarrollo de nuevos agentes medicinales. En este contexto, la literatura científica contiene

numerosos ejemplos de fármacos descubiertos a partir de especies utilizadas en las prácticas médicas populares (Trease y Evans, 1991; Bruneton, 1999). A manera de ejemplo se pueden mencionar los agentes antitumorales vincristina, vinblastina, podofilotoxina y camptotecina (Trease y Evans, 1991; Dewick, 1997). Específicamente, en el campo de los agentes espasmolíticos los tan conocidos alcaloides del opio y de la belladona se descubrieron a partir de especies con un reconocido uso medicinal (Tyler, 1989; Bruneton, 1999).

En nuestro país, donde existe una gran tradición en el uso de plantas con fines curativos, es evidente que existe una gran probabilidad de encontrar principios activos novedosos que pueden ser utilizados como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos agentes espasmolíticos. Además, el grado de desarrollo de las ciencias en nuestro país permite la implementación de los estudios multidisciplinarios necesarios para realizar este tipo de estudios. Por tanto, con base en la información previamente establecida, la presente propuesta pretende descubrir nuevos agentes espasmolíticos a partir de dos especies de orquídeas utilizadas en las prácticas médicas populares para el tratamiento de cólicos estomacales.

2.2. HIPOTESIS.

La hipótesis del presente trabajo considera que el criterio de selección etnomédico, en conjunto con los resultados de las evaluaciones farmacológicas preliminares de los extractos de orquídeas selectas sobre el efecto relajante de la musculatura lisa, constituye un indicador adecuado para la detección de materias primas que proporcionen principios activos espasmolíticos útiles para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales.

2.3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la potencialidad espasmolítica de algunas especies medicinales de la familia Orchidaceae de la República mexicana, con la finalidad de obtener principios antiespasmódicos con posible aplicación en la terapéutica de los desórdenes gastrointestinales.

2.4. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1 Identificar orquídeas de la flora de la región de los Tuxtlas, Veracruz, con un uso popular como agentes antiespasmódicos.
- 2 Evaluar la potencialidad espasmolítica de los extractos totales mediante la determinación del efecto de los extractos crudos sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.
3. Preparar los extractos orgánicos a gran escala de las especies seleccionadas.
4. Realizar el fraccionamiento biodirigido de los extractos mediante métodos cromatográficos.
- 5 Aislar los productos naturales responsables de la actividad espasmolítica a partir de las fracciones primarias activas.
6. Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de diversas técnicas espectrométricas, espectroscópicas y de difracción de rayos X.
7. Iniciar la caracterización farmacológica de los metabolitos secundarios activos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAL VEGETAL.

Las especies *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr y *Maxillaria densa* Lindley se recolectaron en el ejido Ruíz Cortínez, Catemaco, Veracruz, en Mayo de 1995 y Julio de 1996, respectivamente. La recolección de los especímenes estuvo a cargo del Biólogo Gustavo Carmona Díaz. En cada caso un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología (XAL), Xalapa, Veracruz (Vouchers G. Carmona-Díaz 116 AMO y Carmona 96-1 AMO, respectivamente).

El proceso de desecación de la planta entera de ambas especies se realizó a temperatura ambiente y se fragmentó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4.

3.2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS EN PEQUEÑA ESCALA PARA LA DETERMINACION DEL POTENCIAL ESPASMOLITICO DE LAS ESPECIES *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa*.

Para la determinación de la actividad espasmolítica de las orquídeas se prepararon los extractos cloroformo-metanólicos (1:1) vía maceración a partir de 200 g de material vegetal desecado. Cada uno de los extractos se concentró a sequedad al vacío.

3.3. ENSAYOS BIOLOGICOS.

3.3.1. Determinación del efecto espasmolítico de extractos, fracciones y productos puros obtenidos de *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.

El efecto relajante de los extractos, fracciones y compuestos puros obtenidos de *S. livida* y *M. densa* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata se determinó de

acuerdo a un diseño experimental previamente establecido y que se describe con detalle en los incisos siguientes (Rojas *et. al.*, 1995; Rojas *et. al.*, 1996; Seitz *et. al.*, 1997; Trute *et. al.*, 1997).

i

3.3.1.1. Aislamiento del íleon.

Para la obtención del tejido, se utilizaron ratas macho adultas (200-300 g) de la cepa Wistar alimentadas *ad libitum* con Purina Chow y mantenidas en un bioterio con libre acceso al agua. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una disección en el abdomen del animal que permitió aislar el íleon, el cual se colocó en una solución Ringer Krebs-Henseleit (Ringer KH), con la siguiente composición (mM): NaCl 119, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.5, NaHCO₃ 20 y glucosa 11.4. La solución se preparó con agua destilada, el pH se ajustó a 7.4 y se mantuvo constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (19:1). El íleon aislado se limpió y se cortó en segmentos de 1 cm.

3.3.1.2. Sistema de registro.

Para determinar el efecto sobre la contracción espontánea de las muestras de prueba, se empleó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. Para ello, los segmentos de íleon se colocaron en una cámara de incubación con 20 mL de solución Ringer KH burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa al 5% de CO₂ en O₂ a una temperatura de 37° C (mantenida mediante un baño recirculador). En estas condiciones, el tejido se sujetó de un extremo al piso de la cámara y del otro a un transductor de fuerza Grass Modelo FT 03, el cual registra constantemente las señales mecánicas de las contracciones y las envía a un polígrafo Grass modelo 7D de cuatro canales o a un sistema

BIOPAC. La fuerza de tensión empleada para el tejido fue de 10 mN (1 g), lo que corresponde a 2 cm del desplazamiento de la pajilla.

3.3.1.3. Evaluación del efecto relajante.

Con la finalidad de estabilizar el tejido a las condiciones *in vitro*, cada segmento del mismo se incubó y mantuvo en solución Ringer KH durante un período de 30 min con una tensión constante de aproximadamente un gramo. Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de las muestras de prueba, en primer lugar se registró la actividad espontánea del tejido durante un periodo de 10 min, el cual fue considerado como control (100 % de actividad).

La evaluación del efecto de las diferentes concentraciones del extracto, fracciones y compuestos puros obtenidos de *S. livida* y de los controles positivos se registró inmediatamente después de transcurrido el periodo control. Para ello, se adicionó al baño las muestras de prueba a diferentes concentraciones [disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) o agua destilada] en un volumen de 50 μ L (una concentración por cada segmento de íleon) y el efecto de cada muestra se registró durante 10 min.

El registro del efecto del extracto, fracciones y metabolitos secundarios aislados de *M. densa* y de los controles positivos se realizó una vez transcurrido el periodo control, adicionándose de manera acumulativa las diferentes concentraciones de las muestras de prueba (disueltas en DMSO o agua destilada) en un volumen de 100 μ L. Después de realizar cada experimento, los tejidos fueron lavados tres veces con solución Ringer KH para permitir su recuperación a la acción de las muestras estudiadas.

Los efectos de las muestras de prueba de *S. livida* y de los controles positivos (no acumulativos) sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata, se determinaron

por comparación de las áreas bajo la curva (ABC) registradas por la frecuencia y la amplitud de las contracciones antes y después de la aplicación de los materiales de estudio. Para ello, se utilizó un “software” computacional diseñado para tal fin (Rojas *et. al.*, 1995).

Para determinar los efectos de los extractos, fracciones y compuestos puros obtenidos de *M. densa* y del control positivo se construyeron curvas concentración-respuesta acumulativas, determinándose el efecto relajante mostrado después del tratamiento con cada concentración. Para ello, se utilizó el programa Acknowledge (BIOPAC, CO., USA) diseñado para tal fin.

3.3.2. Caracterización farmacológica preliminar de los compuestos activos aislados de la especie *Scaphyglottis livida*.

La caracterización farmacológica preliminar de la batatasina III (**1**), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (**12**), el efemerantol B (**39**), el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**54**) y la lusiantridina (**82**), compuestos activos aislados de *S. livida*, se realizó midiendo el efecto de los mismos sobre la contracción inducida por acetilcolina (Ach, 1×10^{-4} M), histamina (His, 1×10^{-3} M) y cloruro de bario (BaCl_2 3×10^{-4} M) en el íleon aislado de rata. De manera adicional, se estudió el efecto de los metabolitos secundarios activos **1**, **12**, **39** y **82** en presencia del éster metílico de la N^G-nitro-L-arginina (L-NAME, 5×10^{-3} M), un inhibidor específico de la enzima óxido nítrico sintetasa.

Estas evaluaciones se realizaron adicionando a la cámara de incubación (con el tejido previamente estabilizado) los compuestos **1**, **12**, **39**, **54** y **82** a una concentración equivalente a las de la CI₅₀ del extracto determinada durante las evaluaciones iniciales. El efecto de estos metabolitos secundarios se registró por un periodo de tiempo de 10 min.

Posteriormente, los espasmógenos (Ach, His y BaCl₂) fueron adicionados al baño y la respuesta se registró durante 10 min.

El efecto de los compuestos **1**, **12**, **39** y **82** en presencia de L-NAME, se determinó siguiendo dos estrategias diferentes. En la primera, el L-NAME se adicionó al baño y 10 min después se agregó el compuesto objeto de estudio registrándose su efecto durante 10 min. En la segunda, los compuestos **1**, **12**, **39** y **82** se adicionaron en primer lugar dejándolos actuar durante 10 min; posteriormente, el L-NAME se agregó al baño y de nueva cuenta el efecto del mismo se registró durante 10 min.

El efecto de los compuestos puros se determinó comparando el ABC de las contracciones registradas en presencia de Ach, His, BaCl₂ y L-NAME y el ABC de las contracciones obtenidas en presencia de los metabolitos secundarios estudiados. En todos los experimentos se utilizó un segmento de íleon independiente para cada repetición.

3.3.3. Caracterización farmacológica preliminar de los compuestos activos aislados de la especie *Maxillaria densa*.

La caracterización farmacológica de los fenantrenos activos nudol (**41**), gimnopusina (**42**), fimbriol A (**63**), eriantridina (**84**) y 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (**167**) se determinó midiendo su efecto sobre la contracción inducida por His (1×10^{-4} M), L-NAME (1×10^{-5} M) y cloruro de bario (BaCl₂ 1×10^{-5} M) en el íleon aislado de rata. Este estudio se realizó adicionando a la cámara de incubación (con el tejido previamente estabilizado) His, L-NAME o BaCl₂ según fuera el caso, dejándolos actuar durante un periodo de 10 min. Posteriormente, se adicionó a la cámara de incubación de manera acumulativa las diferentes concentraciones de cada una de las muestras, determinándose el efecto relajante inducido por las mismas después de aplicar cada tratamiento.

3.3.4. Determinación de la formación de GMP cíclico (GMPc) en anillos de íleon o de aorta de rata inducido por los compuestos 12 y 39 aislados de *Scaphyglottis livida*.

La técnica experimental que se utilizó para la determinación de la formación de GMPc es la descrita previamente por Mathison e Israel (1998).

Ratas Sprague-Dawley (220-280 g), mantenidas con periodos alternos de luz y oscuridad, con libre acceso al agua y comida, se sacrificaron mediante decapitación entre las 9:00 y 10:00 h. Los anillos de íleon o de aorta se extrajeron inmediatamente bajo control estereomicroscópico y mantenidos en buffer Krebs-Ringer (KR) con la siguiente composición (en mM): NaCl, 125; KCl, 3.5; KH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 0.75; NaHCO₃, 25.0; glucosa, 10.0 y teofilina, 1.6, constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (19:1). Los anillos de íleon o de aorta se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 200 µL de solución KR y teofilina, preincubándose por 30 min a 37°C en presencia o ausencia de L-NAME (0.1 µM), 1*H*-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-*a*] quinoxalin-1-ona (ODQ, 1µM) y calcio. Posteriormente, los compuestos objeto de estudio o DMSO (20 µL, muestra control) se adicionaron y se incubaron por un periodo de 20 min a 37°C. La reacción fue detenida mediante la adición de 20 µL de EDTA (166 mM, pH 7.5) y calentamiento a 90°C durante 3 min. Las muestras fueron mantenidas en hielo y posteriormente sometidas a sonicación. Se tomó una alícuota de 100 µL para la determinación de la formación de GMPc. Este segundo mensajero se determinó mediante un método de radioinmunoensayo (Steiner *et. al.*, 1972) utilizando un kit comercial para tal fin (Amersham Corp). Las proteínas se determinaron mediante el método de Lowry empleando albúmina sérica bovina como patrón (Lowry, *et. al.*, 1951).

3.3.5. Determinación del efecto relajante del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12) y del efemerantol 'B (39) obtenidos de *Scaphyglottis livida* sobre la contracción inducida por noradrenalina (NA) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio.

El diseño experimental que se utilizó para la determinación del efecto inhibitorio de los compuestos 12 y 39 sobre la contracción inducida por noradrenalina (NA) en anillos de aorta de rata fue el descrito por Villalobos-Molina e Ibarra (1996) y se describe a continuación.

3.3.5.1. Obtención de la aorta torácica.

Se sacrificaron ratas macho Wistar (300-400 g, mantenidas de la misma forma indicada en el inciso 3.3.1.1.) por una sobredosis de éter etílico en una cámara. Posteriormente, se obtuvo la aorta abdominal y se liberó del tejido remanente cuidadosamente para evitar un daño del endotelio (cuando el experimento lo requería, fue necesario remover el endotelio). La arteria se cortó en segmentos de aproximadamente 3-5 mm de largo y éstos se colocaron en una cámara de incubación con 10 mL de solución Krebs (NaCl, 118.0 mM; KCl, 4.7 mM; CaCl₂, 2.5 mM; MgSO₄, 1.2 mM; KH₂PO₄, 1.2 mM; NaHCO₃, 25.0 mM; EDTA, 0.026 y glucosa, 11.1 mM) constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (19:1), a una temperatura de 37°C y a un pH de 7.4.

3.3.5.2. Sistema de registro.

Para valorar el efecto de las muestras de prueba en aorta de rata se empleó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. El tejido objeto de estudio se sujetó a la parte inferior de la cámara y a un transductor de fuerza isométrico modelo Grass

FT03 conectado a un polígrafo Grass modelo 7D o a un sistema BIOPAC. Los anillos de aorta fueron sujetos a una tensión inicial de 3 g. Posteriormente y antes de realizar la evaluación de los compuestos, el tejido se estimuló con NA cuatro veces a intervalos de 30 min. Después de cada estimulación el tejido se lavó con solución de Krebs. En todos los casos, la presencia o ausencia de endotelio en cada tejido se confirmó mediante la aplicación de una concentración de acetilcolina (Ach, 1×10^{-6} M) inmediatamente después de la estimulación inicial con NA.

3.3.5.3. Evaluación del efecto de las muestras de prueba.

Para determinar el efecto relajante de las muestras de prueba, el tejido fue precontraído con una concentración de 1×10^{-7} M o 1×10^{-6} M de NA para los anillos sin endotelio y anillos con endotelio, respectivamente. Posteriormente, se construyeron curvas concentración-respuesta acumulativas de los compuestos objeto de estudio, determinándose el efecto relajante demostrado después de aplicarse cada concentración de prueba. Para ello, se utilizó el programa Acknowledge (BIOPAC, CO., USA) diseñado para tal fin.

3.3.6. Determinación del efecto relajante de los compuestos 12 y 39 obtenidos de *Scaphyglottis livida* sobre la contracción inducida por noradrenalina (NA) en anillos de aorta de rata con y sin endotelio en presencia de azul de metileno y L-NAME.

Para determinar el efecto relajante de los compuestos 12 y 39 sobre la contracción inducida por NA en anillos de aorta de rata con y sin endotelio, se utilizó el siguiente procedimiento. En primer lugar, se estimularon los anillos de aorta con o sin endotelio con NA. Posteriormente, se incubaron por un periodo de 10 min con azul de metileno [inhibidor inespecífico de la enzima guanilato ciclasa (1×10^{-7} M)] o con L-NAME (1×10^{-5} M).

Después de este periodo de incubación, se construyen las curvas concentración-respuesta acumulativas de cada una de las muestras de prueba, determinándose el efecto relajante mostrado después de ser aplicada cada concentración. Para ello, se utilizó el programa Acknowledge (BIOPAC).

3.4. ESTUDIO FITOQUIMICO DE LAS ESPECIES *Scaphyglottis livida* Y *Maxillaria densa*.

3.4.1. Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina (ccf) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck), utilizando varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos (Cuadro 6). Para la realización de las cromatografías preparativas (ccfp) se utilizaron placas de 20 x 20 cm de 1 o 2 mm de espesor. Para efectuar la cromatografía de adsorción en columna abierta se utilizó gel de sílice Kieselgel 60 Merck (0.2 a 0.5 mm, 30-70 mesh).

Cuadro 6 Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente revelador	Composición		Referencia
Sulfato cérico	Sulfato cérico amoniacal	12.0 g	Stahl, 1969
	Acido sulfúrico concentrado	22.5 mL	
	Hielo picado	350.0 g	
Acido sulfúrico al 10%	Acido sulfúrico concentrado	10.0 mL	Stahl, 1969
	H ₂ O destilada	90.0 mL	
Reactivo de Dragendorff	Carbonato de Bismuto	2.6 g	Stahl, 1969
	Yoduro de Sodio	7.0 g	
	Acido acético	25.0 mL	
	Acetato de etilo	80.0 mL	
	Agua	0.5 mL	

Para el desarrollo de la coloración fue necesario calentar durante 2 min a aproximadamente 110° C.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography División, Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de diodos (996). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Millennium 2000 (Waters). La purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 125 A°, tamaño de partícula 100 μ M) de 19 mm de diámetro y 300 mm de longitud. La detección se ajustó entre 230-274 nm.

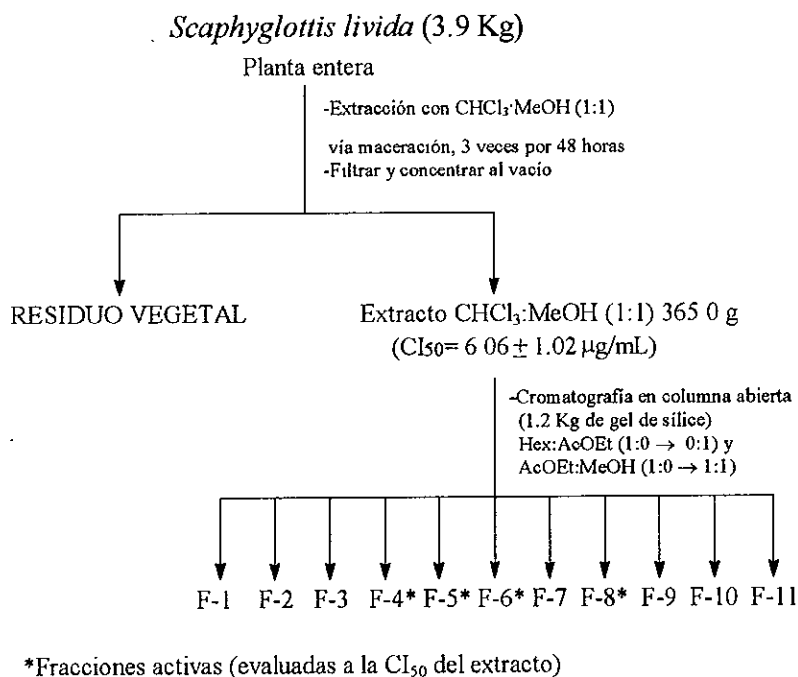
3.4.2. Equipos utilizados para el análisis de difracción de rayos X y el registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

- Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.
- Los espectros en el IR se obtuvieron en pastillas de KBr (compuestos aislados de *M. densa*) o película (compuestos aislados de *S. livida*) utilizando un espectrómetro Perkin-Elmer 599 B.
- Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Shimadzu 160 en MeOH.
- Los espectros de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), COSY, NOESY, HMBC y HMQC se determinaron en un aparato Varian UNITY PLUS 500 utilizando CDCl_3 o $\text{DMSO-}d_6$ como disolventes y TMS como referencia interna.
- Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron utilizando un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA con una energía de ionización de 70 eV.
- Los análisis de difracción de rayos X se realizaron en un difractómetro Siemens P4/PC.

3.4.3. Estudio de la especie *Scaphyglottis livida*.

3.4.3.1. Extracción y fraccionamiento preliminar de *Scaphyglottis livida*.

El material vegetal seco y molido (3.9 Kg) se extrajo con una mezcla cloroformo-metanol (1:1). El extracto resultante fue concentrado al vacío obteniéndose un total de 365.0 g de residuo ($CI_{50} = 6.06 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$), el cual se sometió a un proceso de fraccionamiento primario biodirigido por cromatografía en columna abierta. Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de Hexano:AcOEt (1:0→0:1) y AcOEt:MeOH (1:0→1:1). Se recolectaron un total de 235 fracciones (1 L) que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose un total de 11 fracciones primarias. En el Esquema 3 se resume el proceso de extracción y el fraccionamiento primario del extracto total de *S. livida*.



Esquema 3. Extracción y fraccionamiento primario del extracto total cloroformo-metanólico (1:1) de la planta entera *Scaphyglottis livida*.

En el Cuadro 7 se resume el fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna del extracto total de la planta entera de *S. livida* y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos, fracciones combinadas y la actividad inhibitoria de cada fracción sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata (la actividad de cada fracción se determinó a la CI_{50} del extracto).

Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de *Scaphyglottis livida*.

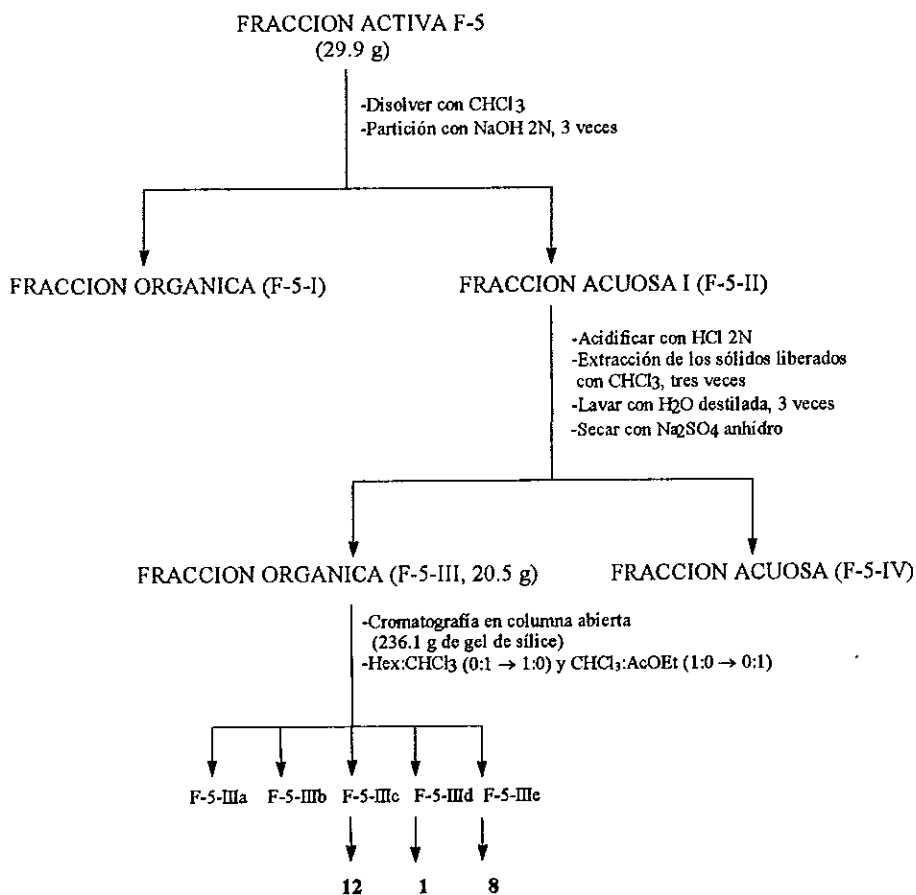
Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fracciones combinadas	% de inhibición*
Hex	100	1-6	F-1 (1-7)	24.92 ± 5.04
Hex-AcOEt	95:5	7-23	F-2 (8-23)	34.89 ± 3.27
Hex-AcOEt	90:10	24-74	F-3 (24-26)	43.87 ± 4.00
Hex-AcOEt	85:15	75-105	F-4 (27-75)	66.03 ± 7.30
Hex-AcOEt	80:20	106-138	F-5 (76-103)	90.36 ± 4.09
Hex-AcOEt	70:30	139-154	F-6 (104-124)	78.47 ± 8.20
Hex-AcOEt	60:40	155-162	F-7 (125-139)	50.69 ± 4.58
Hex-AcOEt	50:50	163-181	F-8 (140-157)	65.48 ± 5.62
Hex-AcOEt	25:75	182-189	F-9 (158-169)	53.2 ± 5.70
AcOEt	100	190-204	F-10 (170-181)	30.88 ± 2.78
AcOEt-MeOH	90:10	205-212	F-11 (182-235)	24.35 ± 3.25
AcOEt-MeOH	80:20	213-220		
AcOEt-MeOH	70:30	221-226		
AcOEt-MeOH	50:50	227-235		

*Determinada a la concentración de 6.06 µg/mL, que corresponde a la CI_{50} del extracto.

3.4.3.2. Aislamiento y purificación de la batatasina III (1), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12) y la lusiantridina (82) presentes en la fracción primaria activa F-5 de *Scaphyglottis livida*.

La fracción activa F-5 (29.9 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante un proceso de partición ácido-base de acuerdo al procedimiento que se resume en

el Esquema 4. Este fraccionamiento permitió la separación de los constituyentes fenólicos presentes en la fracción F-5. La fracción orgánica F-5-I no presentó actividad espasmolítica a la CI_{50} del extracto original; en tanto que la fracción orgánica F-5-III inhibió el 95% de la contracción espontánea del íleon aislado de rata a la concentración de $6.06 \mu\text{g/mL}$. La mezcla fenólica resultante (F-5-III, 20.15 g) se sometió a un fraccionamiento terciario por cromatografía sobre gel de sílice (236.12 g) en columna abierta. Como eluyentes se utilizaron mezclas de disolventes con incrementos de polaridad [Hex:CHCl₃ (1:0→0:1) y CHCl₃:AcOEt (1:0→0:1)]. Este proceso generó un total de 5 fracciones terciarias (F-5-IIIa – F-5-IIIe) reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica.



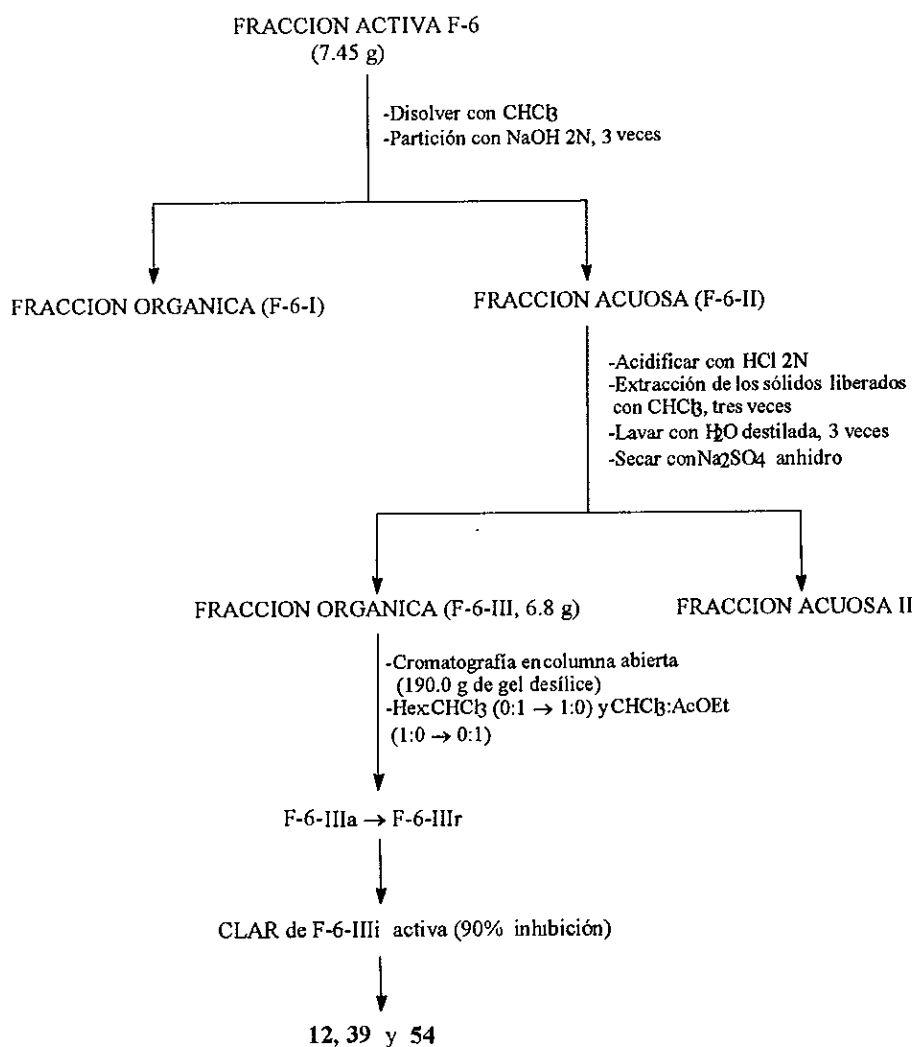
Esquema 4. Separación de los compuestos 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12), batatasina III (1) y lusiantridina (82) a partir de la fracción primaria activa F-5.

Sucesivas cromatografías en capa delgada de las fracciones F-5-IIIc, F-5-III d y F-5-IIIe permitieron el aislamiento de los compuestos 3,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxibencilo (**12**), batatasina III (**1**) y lusiantridina (**82**). En todos los casos se usó como sistema de elución una mezcla de CHCl₃:AcOEt (95:5). El compuesto 3,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxibencilo (**12**, 345.3 mg) fue aislado como un sólido amorfo de color rojo con apariencia de cera. La batatasina III (**1**, 53.8 mg) se purificó como un sólido amorfo de color amarillo y la lusiantridina (**82**, 59.3 mg), también se separó como un sólido amorfo de color rojo.

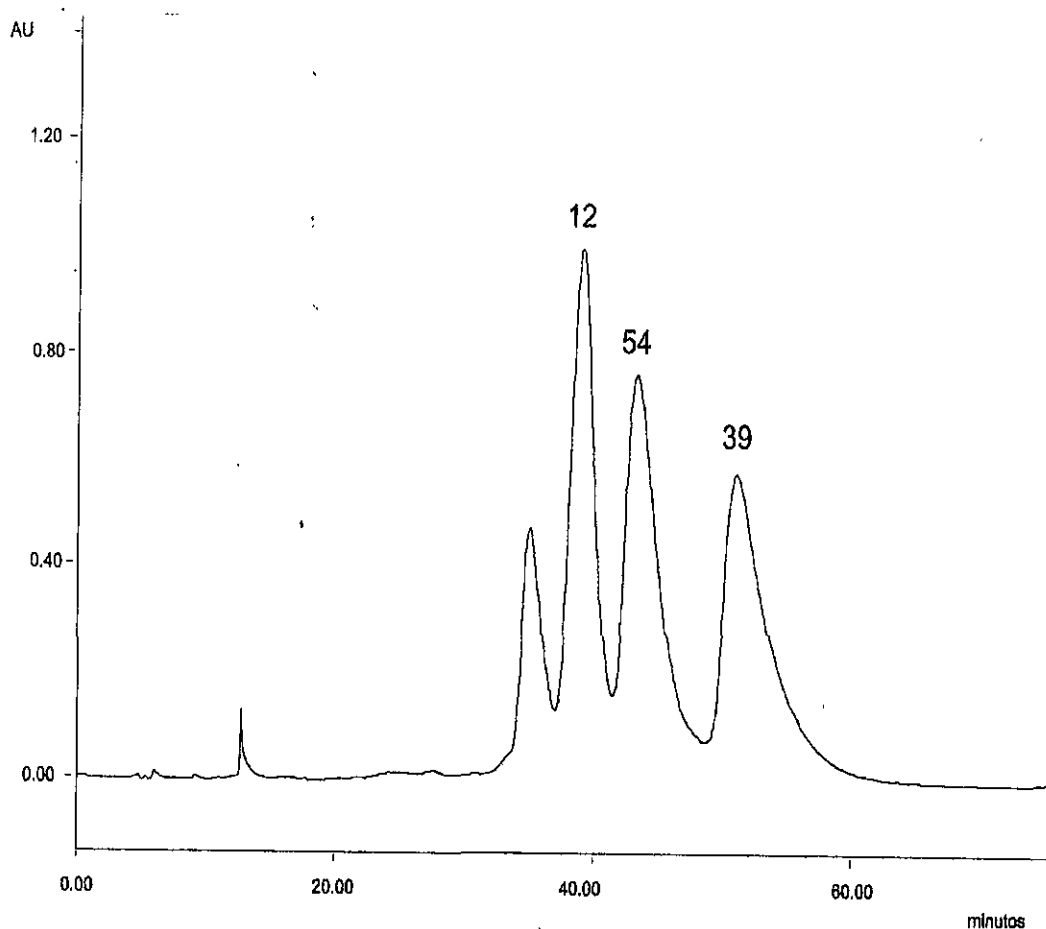
3.4.3.3. Aislamiento y purificación del efemerantol B (39) y del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54) presentes en la fracción primaria activa F-6 de *Scaphyglttis livida*.

Los principios biodinámicos de la fracción activa F-6 (7.45 g) se aislaron mediante la aplicación del mismo procedimiento utilizado para la resolución de la fracción activa F-5 (ver Esquema 5). La fracción fenólica activa F-6-III (6.8 g) se sometió a un fraccionamiento terciario por cromatografía sobre gel de sílice (190 g) en columna abierta. Como eluyentes se utilizaron diferentes mezclas de disolventes con incremento gradual de polaridad [Hex:CHCl₃ (1:0→0:1) y CHCl₃:AcOEt (1:0→0:1)]. El fraccionamiento terciario condujo a la obtención de 19 fracciones (F6-I a F6-XIX) reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica. Posteriormente, la separación de los fenantrenos **39** y **54** a partir de la fracción terciaria F6-IX se realizó mediante la aplicación de la técnica CLAR (Esquema 6). Para ello se empleó una columna empacada con gel de sílice utilizando un flujo de 5.7 mL/min y como fase móvil una mezcla ternaria constituida por hexano-*i*PrOH-MeOH en

las proporciones 94:3:3. La detección se realizó a una longitud de onda (λ) de 270 nm. Este procedimiento permitió el aislamiento y la purificación de los metabolitos secundarios efemerantol B (**39**) y 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**54**). El efemerantol B (**39**, 24.4 mg) se aisló como un sólido amorfo de color café con un tiempo de retención de 51.6 min. De la misma forma, el metabolito secundario 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**54**, 28.3 mg) se purificó como un sólido amorfo de color café con un tiempo de retención de 44 min



Esquema 5. Separación de los compuestos efemerantol B (**39**) y 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**54**) a partir de la fracción primaria activa F-6.



Esquema 6. Cromatograma de líquidos de la fracción F-6-IIIi para la separación de los compuestos 39 y 54.

3.4.3.4. Aislamiento y purificación del *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165) y del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (166) presentes en la fracción primaria activa F-4 de *Scaphyglottis livida*.

La fracción activa F-4 se sometió a un fraccionamiento secundario en columna abierta sobre gel de sílice, utilizándose diferentes mezclas de disolventes con un incremento de polaridad [Hex:CHCl₃ (1:0 → 0:1) y CHCl₃:AcOEt (1:0 → 0:1)]. Este procedimiento condujo a la obtención de 4 fracciones secundarias (F4-I a F4-IV). De la fracción

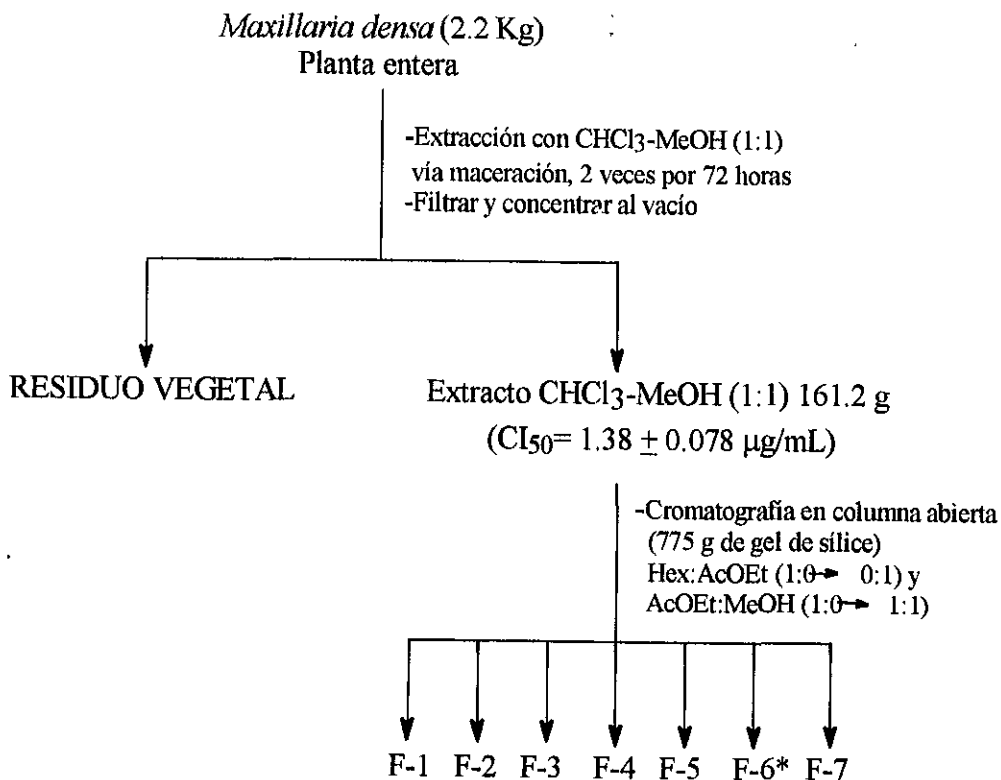
secundaria F4-III precipitaron de manera espontánea 1.3 g de un sólido cristalino incoloro con un punto de fusión (pf) de 250-253°C, el cual fue caracterizado como el trans-*p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (**165**). A partir de la fracción F4-IV precipitó un sólido cristalino constituido por dos productos. Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada (CHCl₃:AcOEt 95:5) de esta mezcla permitió la obtención de cantidades adicionales de **165** (325.1 mg) y 225.2 mg de un compuesto cristalino de color blanco con un pf de 207-210°C, el cual se caracterizó como el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (**166**). De manera adicional, el estudio de la fracción secundaria F4-II mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa fina, permitió el aislamiento de cantidades adicionales de 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (**12**, 50 mg).

3.4.4. Estudio de la especie *Maxillaria densa*.

3.4.4.1. Extracción y fraccionamiento preliminar de *Maxillaria densa*.

El material vegetal seco y molido (2.2 Kg) se extrajo con una mezcla cloroformo-metanol (1:1). El extracto resultante fue concentrado al vacío obteniéndose un total de 161.2 g de extracto seco (CI₅₀ = 1.38 \pm 0.078 μ g/mL). El extracto íntegro se sometió a un proceso de fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta, los eluyentes empleados consistieron en mezclas de disolventes con un incremento de polaridad [Hex:AcOEt (1:0 \rightarrow 0:1) y AcOEt:MeOH (1:0 \rightarrow 1:1)]. Se recolectaron un total de 215 fracciones (600 mL) que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose un total de 7 fracciones primarias. En el Esquema 7 se resume el proceso de extracción y el fraccionamiento primario del extracto total de *M. densa*. En el Cuadro 8 se

resume el fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna del extracto total y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos, fracciones combinadas y la actividad inhibitoria de cada fracción sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata (la actividad de cada fracción se determinó a la CI_{50} del extracto).



* Fracción activa (evaluada a la CI_{50} del extracto).

Esquema 7. Extracción y fraccionamiento primario del extracto total cloroformo-metanólico (1:1) de la planta entera *Maxillaria densa*.

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de *Maxillaria densa*.

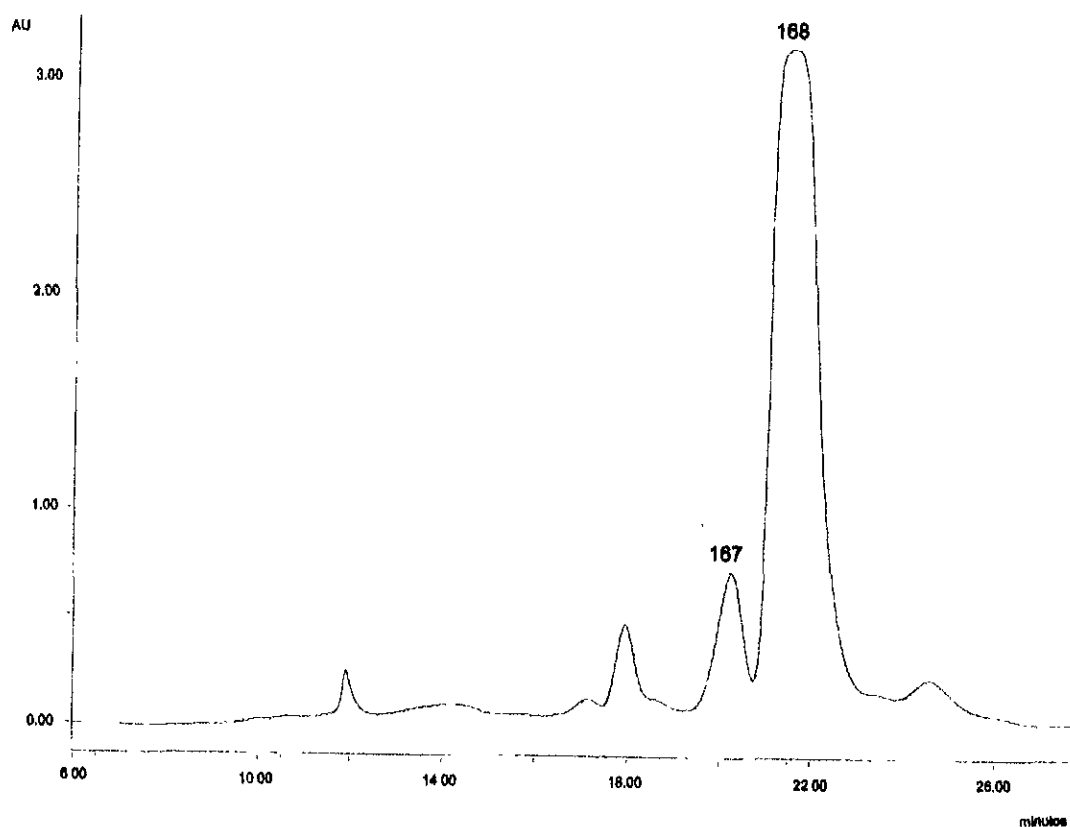
Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fracciones combinadas	% de inhibición*
Hex	100	1-10	F-1 (1-28)	10.00 ± 2.1
Hex-AcOEt	95:5	11-32	F-2 (29-36)	5.20 ± .58
Hex-AcOEt	90:10	35-56	F-3 (37-48)	15.30 ± 3.3
Hex-AcOEt	85:15	57-108	F-4 (49-62)	25.50 ± 4.6
Hex-AcOEt	80:20	109-126	F-5 (63-71)	10.20 ± 1.3
Hex-AcOEt	75:25	127-129	F-6 (72-126)	80.01 ± 3.2
Hex-AcOEt	70:30	130-151	F-7 (127-215)	35.40 ± 2.3
Hex-AcOEt	60:40	152-168		
Hex-AcOEt	50:50	169-184		
Hex-AcOEt	40:60	185-191		
Hex-AcOEt	30:70	192-198		
Hex-AcOEt	20:80	199-204		
AcOEt	100	205-210		
AcOEt-MeOH	50:50	211-215		

*Evaluados a la concentración de $1.38 \pm 0.078 \mu\text{g/mL}$, que corresponde a la CI_{50} del extracto.

3.4.4.2. Aislamiento y purificación del nudol (41), de la gimnopusina (42), del fimbriol A (63), de la eriantridina (84), del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167) y del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168) presentes en la fracción primaria activa F-6.

La fracción primaria activa F-6 (17.31 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía sobre gel de sílice (759.0 g) en columna abierta. Como eluyentes se utilizaron mezclas de disolventes con incrementos de polaridad [Hex:AcOEt (1:0→0:1)] Se recolectó un total de 170 fracciones (100 mL) que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose un total de 4 fracciones secundarias (F6-I a F6-IV).

El estudio de la fracción secundaria F6-I mediante cromatografía preparativa en capa fina [CHCl_3 :AcOEt (9:1)] permitió el aislamiento y la purificación del compuesto 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno [**167** (205.2 mg)] como cristales de color amarillo en forma de rombo con un pf de 118-119 °C y una mezcla de fenantrenos formada por **167** y 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**168**). La separación de la mezcla de los fenantrenos **167** y **168** obtenida de la fracción secundaria F6-I, se realizó mediante CLAR (Esquema 8) en una columna empacada con gel de sílice utilizando un flujo de 6.7 mL/min y como fase móvil una mezcla ternaria constituida por hexano-*i*PrOH-MeOH en las proporciones 94:3:3. De nueva cuenta la detección se realizó a una λ de 230 nm.



Esquema 8. Cromatograma de líquidos de la mezcla de compuestos **167** y **168** obtenida de la fracción secundaria F6-I.

Este procedimiento permitió el aislamiento y la purificación de los metabolitos secundarios 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno [**167** (15 mg)] y 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno [**168** (25 mg)] El compuesto **168** se aisló y purificó como un sólido de color amarillo con un pf de 123-124° C.

La fracción secundaria F6-II se sometió a una serie de cromatografías preparativas en capa fina [CHCl₃:AcOEt (80:20)] que permitió la obtención de la eriantridina [**84** (1.27 g)], dicho metabolito secundario se separó bajo la forma de cristales incoloros con un pf de 138-140 °C.

El estudio de la fracción secundaria F6-III mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, utilizándose mezclas de disolventes con incrementos de polaridad [Hex:AcOEt (1:0→0:1)], permitió la obtención de 150 fracciones (100 mL) que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en 10 fracciones terciarias (F6-IIIa a F6-IIIj). De las fracciones F-6III d, F-6III e y F-6III g precipitaron en forma espontánea el nudol (**41**), la gimnopusina (**42**) y el fimbriol A (**63**), respectivamente, al ser eluída la columna con las diferentes mezclas de Hex:AcOEt (8:2, 7:3 y 6:4, respectivamente). Estos compuestos fueron purificados mediante la recristalización por par de disolventes (mezclas de Hex y CHCl₃). El nudol [**41** (150.0 mg)] se aisló como cristales incoloros con un pf de 189-191 °C; la gimnopusina [**42** (1.85 g)] fue aislada como un polvo de color blanco con un pf de 193-195 °C; por último, el fimbriol A [**63** (1.55 g)] se purificó como un polvo de color blanco con un pf de 182-184°C.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. SELECCION DE LAS ESPECIES *Scaphyglottis livida* Y *Maxillaria densa* COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE PRINCIPIOS ESPASMOLITICOS.

El primer paso en el desarrollo de las actividades del presente proyecto de investigación fue la selección primaria de las especies de orquídeas objeto de estudio. El criterio de selección primaria utilizado fue el etnomédico, según este criterio las plantas con un uso reconocido en la medicina tradicional (Cox y Balick, 1994) representan candidatos idóneos para el descubrimiento de compuestos activos con un potencial terapéutico. De tal forma que mediante la aplicación de este criterio se seleccionaron las orquídeas *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr y *Maxillaria densa* (Lindley) como posibles fuentes de principios espasmolíticos. Estas especies son comunes en la región de los Tuxtlas, estado de Veracruz, zona donde se circunscribió el proceso de selección primario, y de acuerdo a observaciones de campo realizadas por el biólogo recolector, estas dos especies son empleadas por los habitantes de la región para el tratamiento de cólicos estomacales.

Una vez que se efectuó la selección primaria, el siguiente paso consistió en demostrar el potencial espasmolítico de los extractos de las dos especies, utilizando un ensayo biológico apropiado. Para ello, se prepararon los extractos CHCl₃:MeOH (1:1) en pequeña escala y se evaluó el efecto de los mismos sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata. Esta preparación fue seleccionada debido a que el Sistema Nervioso Entérico (SNE) contiene diversas terminales nerviosas, neurotransmisores y receptores, que le confieren una gran versatilidad para la caracterización de compuestos con actividad farmacológica. Además, la relativa facilidad del bioensayo y el requerimiento de pequeñas cantidades de muestras de prueba para inducir un efecto en el íleon, hacen que este modelo sea apropiado para la evaluación preliminar de la actividad farmacológica de los extractos

de plantas y para el monitoreo de la misma durante el proceso de aislamiento de los principios activos (Williamson *et. al.*, 1996).

La evaluación de los extractos de las especies seleccionadas con este bioensayo, permitió determinar que los mismos inducen una disminución en el tono y la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon de rata. En los dos casos el efecto fue dependiente de la concentración (Figura 3).

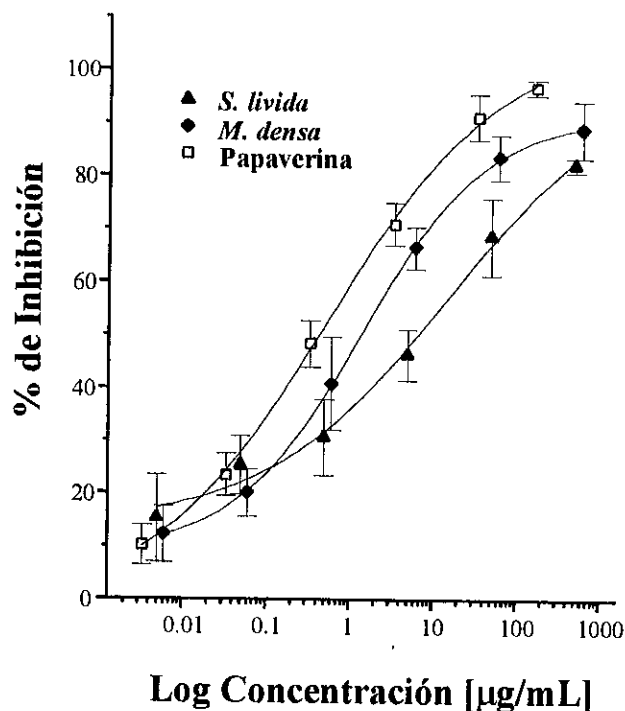


Figura 3. Curva concentración-respuesta de los extractos CHCl_3 :MeOH (1:1) de *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa*.

De acuerdo con los resultados presentados en el Cuadro 9 y en la Figura 3, los extractos totales de las dos especies demostraron una actividad espasmolítica significativa

con respecto al control. La potencia fue menor a la de la papaverina, antiespasmódico inespecífico utilizado como un control positivo. Con base en estos resultados, se estableció que las especies *S. livida* y *M. densa* representaban candidatos idóneos para la obtención de los compuestos espasmolíticos.

Cuadro 9. Determinación de la actividad espasmolítica de los extractos CHCl₃:MeOH (1:1) de las especies *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa* sobre la contracción espontánea del ileon aislado de rata.

Extracto	CI ₅₀ (µg/mL)	Potencia (γ)	E _{max} (%)
<i>M. densa</i>	1.38 ± 0.078	0.3825	91.36 ± 0.7053
<i>S. livida</i>	6.06 ± 2.1	0.0871	82.10 ± 3.2
Papaverina	0.5279 ± 0.12	1	96.70 ± 5.02

La potencia de los extractos se determinó mediante la siguiente fórmula: CI₅₀ papaverina (µg/mL)/CI₅₀ extracto (µg/mL).

4.2. OBTENCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ESPASMOLÍTICOS DE *Scaphyglottis livida*.

Para la obtención de los compuestos bioactivos de *S. livida* se preparó el extracto en gran escala a partir de 3.9 Kg del material vegetal utilizando el mismo procedimiento descrito para la fase de selección. El extracto activo (365.0 g) se sometió a un fraccionamiento vía una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 11 fracciones primarias (F-1 a F-11). El estudio del efecto de estas fracciones sobre la contracción espontánea del ileon aislado de rata permitió establecer que la actividad espasmolítica se concentraba en las fracciones primarias F-4, F-5, F-6 y F-8

(Figura 4), de tal forma que se procedió a la obtención de los principios activos de las fracciones más potentes (F-4, F-5 y F-6).

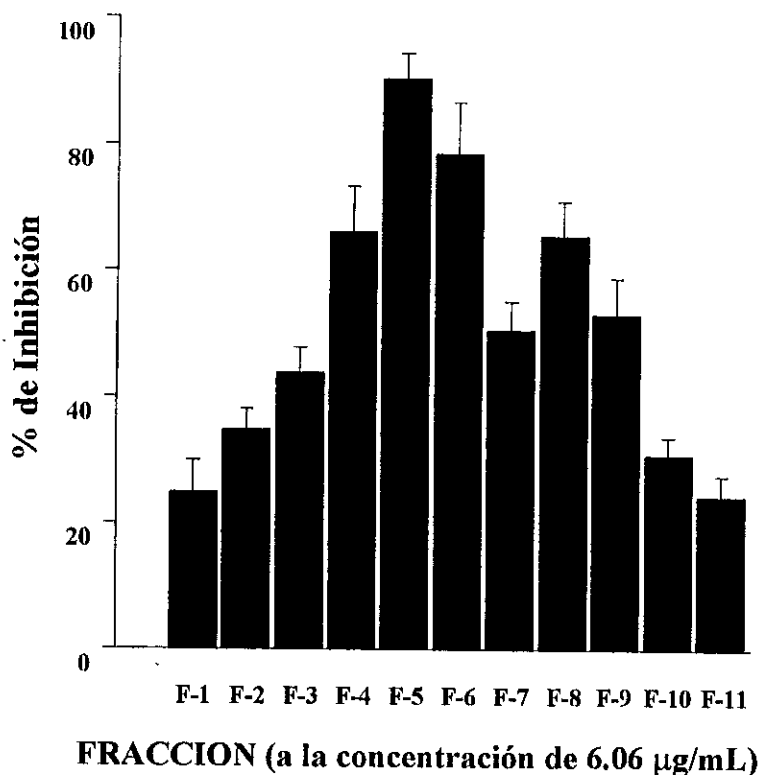


Figura 4. Actividad espasmolítica de las fracciones primarias derivadas extracto CHCl_3 :MeOH (1:1) de *Scaphyglottis livida*.

El estudio de las fracciones primarias activas F-4 (66.03 ± 7.30 % de inhibición), F-5 (90.36 ± 4.09 % de inhibición) y F-6 (78.47 ± 8.20 % de inhibición) utilizando técnicas químicas y cromatográficas permitió el aislamiento y la purificación del 3,3'-dihidroxi-5-metoxibencilo (batatasina III, **1**), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (**12**), el 4,7-dihidroxi-2-metoxi-9,10-dihidrofenantreno (lusiantridina, **82**), el 3,7-dihidroxi-2,4-

dimetoxifenantreno (efemerantol B, **39**), el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**54**), el trans-*p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (**165**) y el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (**166**). El rendimiento en peso seco con relación al material vegetal para cada uno de los compuestos fue de 0.0088%, 0.0013%, 0.0014%, 0.00062%, 0.00073%, 0.041% y 0.0057%, respectivamente.

Los metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias activas F-4, F-5 y F-6 fueron identificados por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos (IR, UV, RMN y EMIE) con los previamente descritos en la literatura. Cabe destacar que el compuesto **165** constituye un nuevo producto natural. En la Figura 5 se presentan las estructuras químicas de cada uno de estos productos naturales.

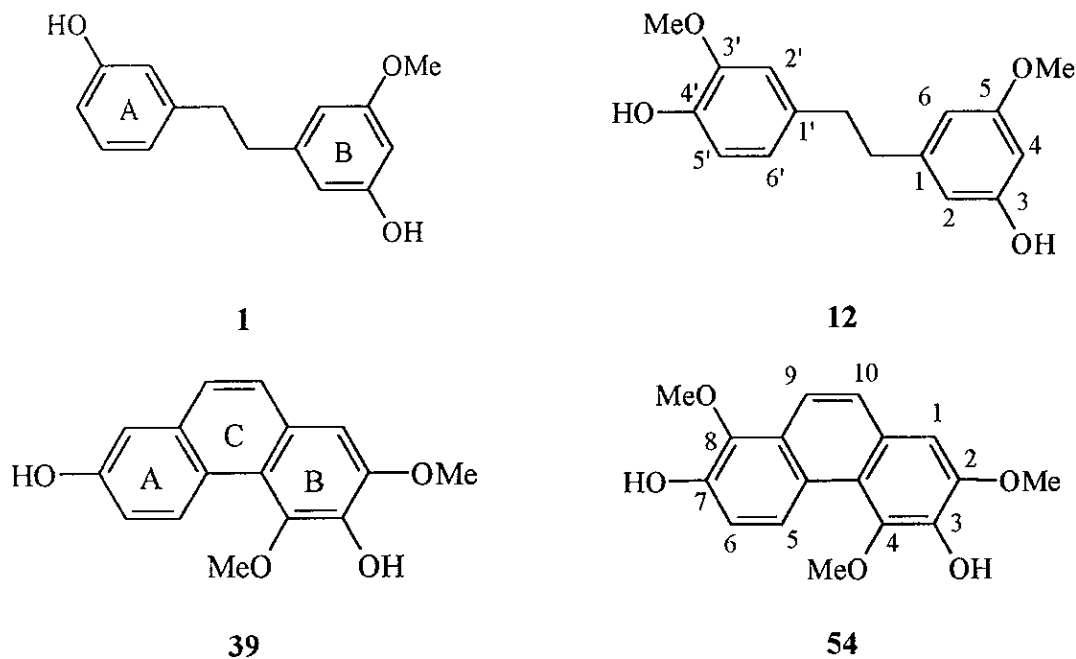


Figura 5. Compuestos aislados de la especie *Scaphyglottis livida*.

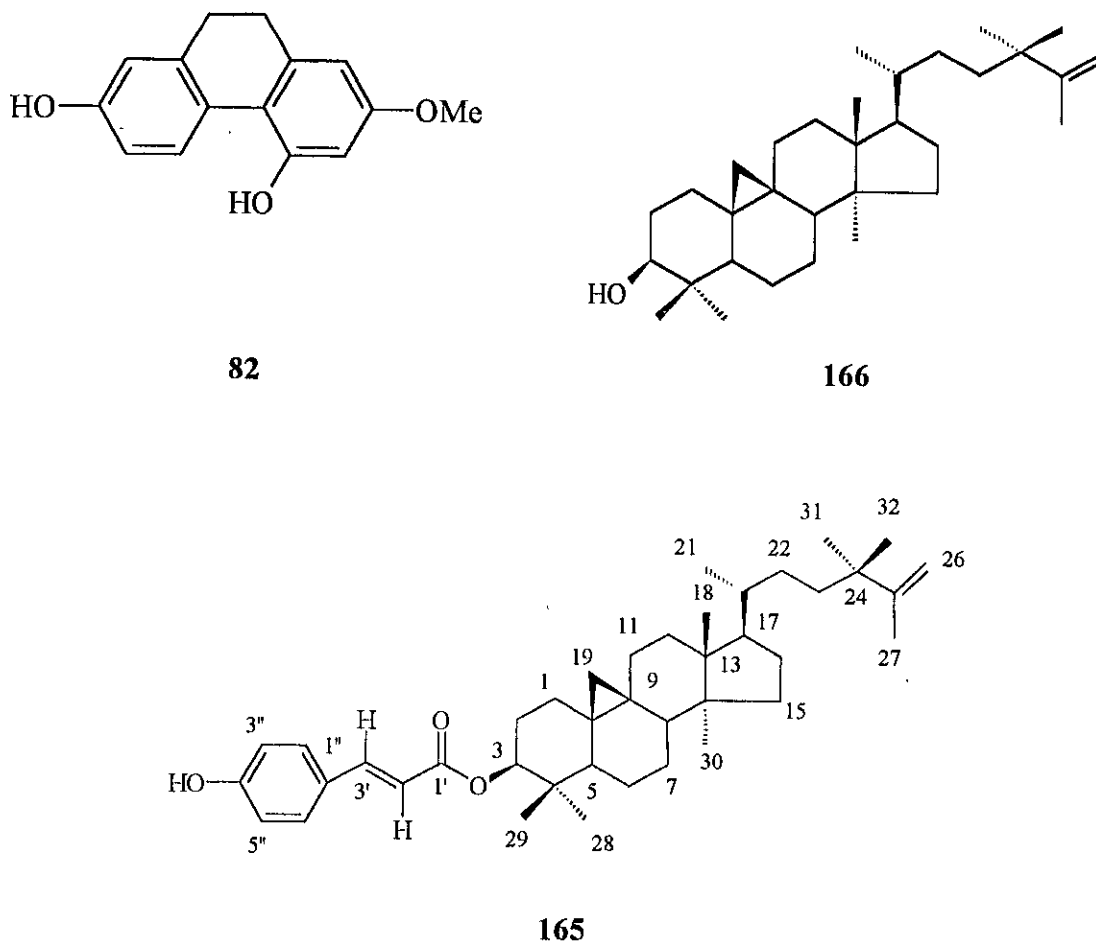


Figura 5. Compuestos aislados de la especie *Scaphyglottis livida* (continuación).

4.3. OBTENCION DE LOS PRINCIPIOS ESPASMOLITICOS DE *Maxillaria densa*.

Para la obtención de los compuestos biodinámicos de *M. densa* se preparó el extracto en gran escala a partir de 2.2 Kg del material vegetal utilizando el mismo procedimiento descrito para la fase de selección. El extracto activo (161.2 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice como fase estacionaria. Este proceso permitió la obtención de siete fracciones primarias (F-1 a F-7). El efecto de las siete fracciones primarias sobre la contracción espontánea del íleon aislado

de rata se evaluó a una concentración equivalente a la CI_{50} del extracto original. De acuerdo con los resultados observados en la Figura 6, se determinó que la actividad se concentraba en la fracción primaria F-6 (80.01 ± 3.2 % de inhibición).

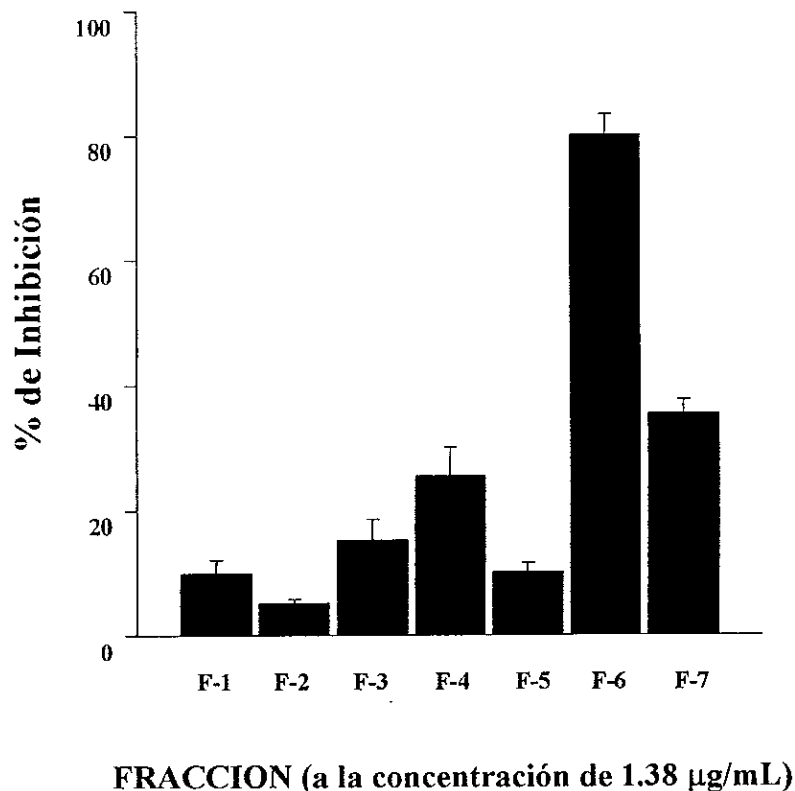


Figura 6. Actividad espasmolítica de las fracciones primarias derivadas del extracto $CHCl_3$ /MeOH (1:1) de *Maxillaria densa*.

La aplicación de diversos procedimientos cromatográficos (CC, CCFP y CLAR) a la fracción activa F-6 permitió la obtención de seis compuestos de naturaleza fenantrénica: el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (**167**), el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**168**), el 2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (nudol, **41**), el 2,7-

dihidroxi-3,4,9-trimetoxifenantreno (gimnopusina, **42**), el 2,5-dihidroxi-3,4,9-trimetoxifenantreno (fimbriol A, **63**) y el 2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (eriantridina, **84**). El rendimiento de los compuestos **167**, **168**, **41**, **42**, **63** y **84** con base en el peso seco de la planta fue de 0.010 %, 1.13×10^{-3} %, 6.81×10^{-3} %, 0.084 %, 0.070 % y 0.057 %, respectivamente. Los metabolitos secundarios **167** y **168** representan nuevos productos naturales. En la Figura 7 se presentan las estructuras de los compuestos obtenidos de *M. densa*.

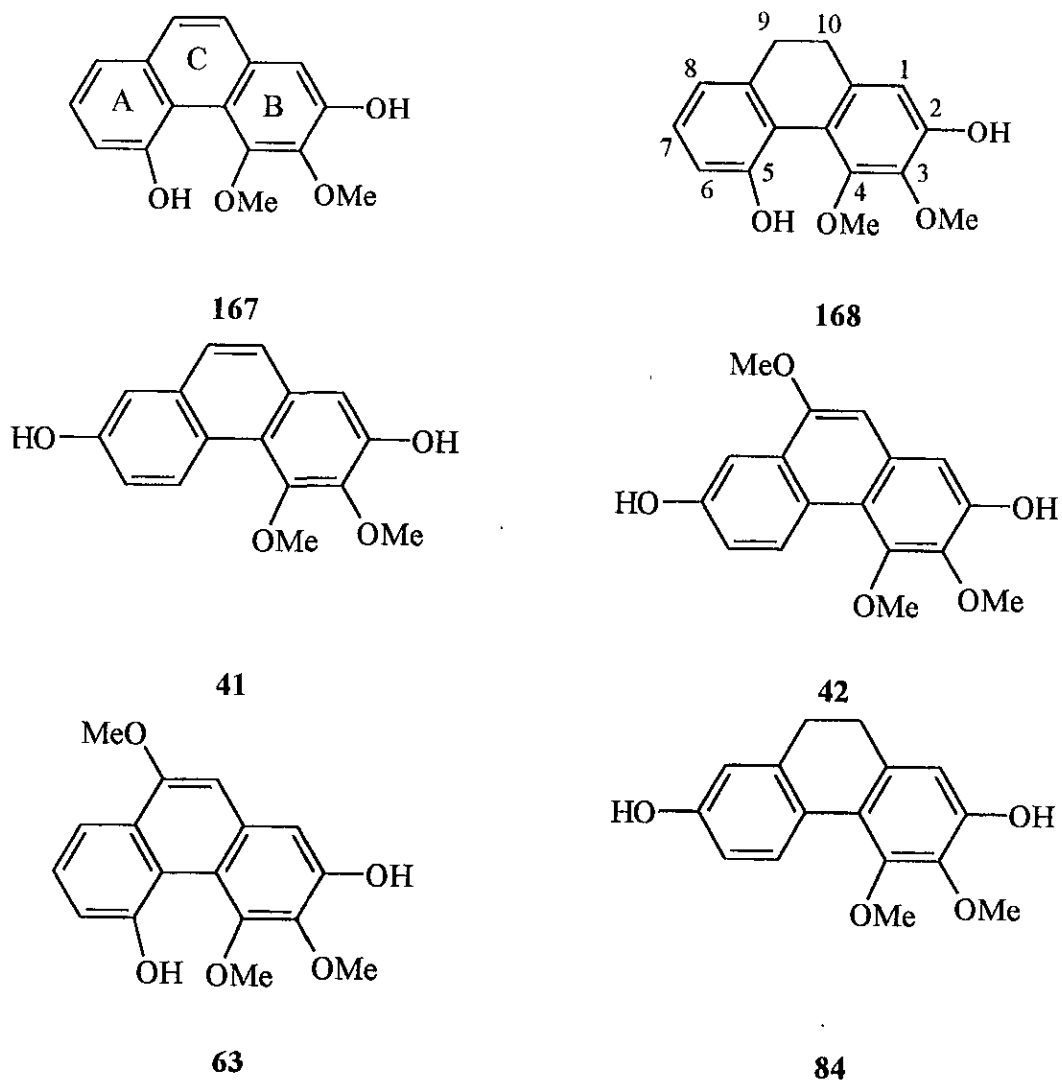


Figura 7. Compuestos aislados de la especie *Maxillaria densa*.

4.4. ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS DE *Scaphyglottis livida* Y *Maxillaria densa*.

De los 13 metabolitos secundarios obtenidos de las especies *S. livida* y *M. densa* en la presente investigación (Figuras 5 y 7), dos pertenecen al grupo de los bibencilos (**1** y **12**), seis son compuestos fenantrénicos (**3**, **41**, **42**, **54**, **63** y **167**), tres son 9,10-dihidrofenantrenos (**82**, **84** y **168**) y los dos últimos son triterpenoides de tipo cicloartano (**165** y **166**). Los bibencilos aislados difieren entre sí en el número de sustituyentes oxigenados presentes en el anillo A. Por otra parte, los compuestos de origen fenantrénico difieren entre sí en la disposición relativa y el número de sustituyentes presentes en los anillos A-C.

La elucidación estructural de los compuestos aislados de las dos especies de orquídeas se realizó mediante la aplicación de diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas. En los casos de los compuestos **41**, **84** y **167** las estructuras se confirmaron de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X.

De los 13 productos naturales aislados, tres constituyen análogos novedosos de fenantrenos, 9,10-dihidrofenantrenos o cicloartanos de estructura conocida. Estos productos se caracterizaron como el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (**167**), el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**168**) y el trans-*p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (**165**). En las secciones siguientes se discutirá solo la elucidación estructural de los fenantrenos novedosos, del cicloartano **165** y de los bibencilos **1** y **12**. Los espectros de los compuestos restantes se incluyen en el anexo I y en todos los casos los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en la literatura.

4.4.1. Elucidación estructural de los compuestos 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167) y 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).

Como se indicó anteriormente, los compuestos **167** y **168** resultaron análogos novedosos de fenantrenos de estructura conocida y en la presente sección se discutirá la elucidación estructural de ambos productos. Cabe mencionar que en los Cuadros 10, 11, 12 y 14 se incluyen los datos espectrométricos y espectroscópicos de todos los fenantrenos aislados en el presente estudio, de tal forma que los datos generados en esta tesis puedan ser utilizados con fines comparativos.

El fenantreno **167** se aisló como un sólido amarillo y cristalino, mientras que el compuesto **168** fue aislado como un polvo amarillento. Los espectros en el IR (Espectros 1 y 6) presentan bandas para grupos hidroxilos (3528 y 3388 cm^{-1}) y aromaticidad [(1622 , 1603 y 1564 cm^{-1}) y (1614 , 1581 cm^{-1})]. Los máximos de absorción en 258 , 280 , 300 , 310 y 330 nm para el metabolito **167** y en 272 , 280 , 296 y 304 nm para el producto **168** en los espectros de UV (Espectros 2 y 7) son típicos para derivados de fenantreno y 9,10-dihidrofenantrenos, respectivamente (Stermitz *et. al.*, 1983; Majumder y Joardar, 1985; Tezuka *et. al.*, 1993; Majumder y Sen, 1991; *inter alia*). La fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ para el compuesto **167** y $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ para **168** con base en los espectros de RMN- ^{13}C (Espectros 5 y 10) y masas (Espectros 3 y 8). En los espectros de masas de ambos compuestos (Cuadro 10) los iones moleculares se observan en una relación masa carga (m/z) de 270 y 272 , respectivamente.

Los espectros de RMN de los compuestos **167** y **168** (Espectros 4, 5, 9 y 10, Cuadros 11, 12 y 14) permitieron evidenciar que estos productos naturales son de naturaleza fenantrénica y dihidrofenantrénica, respectivamente (Tezuka *et. al.*, 1993; Leong *et. al.*, 1997; Majumder *et. al.*, 1996; *inter alia*).

Cuadro 10. Fragmentos presentes en los espectros de masas de los fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos obtenidos de *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa*.

Compuesto	Fragmentos
3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (Efemerantol B, 39)	270 (100), 255 (34), 237 (12), 212 (35), 184 (10), 155 (14), 135 (5), 127 (12), 95 (4).
2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (Nudol, 41)	270 (100), 255 (42), 237 (4), 223 (11), 212 (41), 184 (10), 155 (13), 135 (7), 127 (9)
2,7-dihidroxi-3,4,9-trimetoxifenantreno (Gimnopusina, 42)	300 (100), 285 (68), 257 (18), 242 (35), 227 (12), 199 (10), 129 (12), 97 (13), 83 (14), 69 (17), 57 (24), 43 (20)
3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54)	300 (100), 285 (45), 257 (12), 227 (35), 199 (12)
2,5-dihidroxi-3,4,9-trimetoxifenantreno (Fimbriol A, 63)	300 (100), 285 (83), 257 (22), 242 (55), 227 (16), 199 (12), 150 (10)
4,7-dihidroxi-2-metoxi-9,10- dihidrofenantreno (Lusiantridina, 82)	242 (100), 227 (42), 181 (10), 137 (18), 121 (2)
2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10- dihidrofenantreno (Eriantridina, 84)	272 (100), 257 (40), 239 (15), 225 (38), 212 (10), 197 (25), 183 (5), 169 (15), 153 (5), 141 (7).
2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167)	270 (100), 255 (28), 237 (9), 227 (31), 212 (48), 184 (9), 155 (15), 139 (13), 128 (10)
2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10- dihidrofenantreno (168)	272 (100), 257 (32), 239 (11), 225 (38), 212 (8), 197 (22), 183 (3), 169 (12), 153 (3), 141 (4)

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 5, Cuadro 11) del compuesto **167** presenta señales para 16 átomos de carbono, en concordancia con la fórmula molecular establecida. Dos de estas señales se asignaron a los grupos metoxilos de la molécula (δ_c 62.0 [(OMe-3) y 62.5, (OMe-4)], ocho a carbonos cuaternarios aromáticos, cuatro de las cuales corresponden a carbonos unidos a funciones oxigenadas [(δ_c 147.1 (C-2), 140.7 (C-3), 148.1 (C-4) y 153.7 (C-5)] y las restantes (δ_c 116.7, 117.9, 134.2 y 130.9) a los carbonos 4a, 4b, 8a y 10a del núcleo base, respectivamente. Por último, el espectro contiene seis señales asignables a metinos aromáticos [δ_c 109.9 (C-1), 116.2 (C-6), 127.3 (C-7), 120.6 (C-8), 128.1 (C-9) y 125.9 (C-10)].

Cuadro 11. Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN-¹³C para fenantrenos aislados de *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa*.

Carbono	Compuesto					
	167	39	41	42	54	63
1	109.9	104.8	109.1	108.1	104.9	108.6
2	147.1	146.6	150.9	150.8	146.8	148.3
3	140.7	139.2	141.9	139.9	139.3	138.8
4	148.1	143.9	149.1	149.2	144.0	147.2
4a	116.7	118.9	117.3	113.1	119.0	112.9
4b	117.9	123.7	122.4	123.4	124.2	119.2
5	153.7	128.5	127.4	127.4	124.0	153.9
6	116.2	116.3	116.9	117.0	116.0	117.1
7	127.3	153.5	154.7	151.7	145.6	127.2
8	120.6	111.6	111.4	105.2	140.8	114.0
8a	134.2	126.0	128.5	126.9	125.7	128.7
9	128.1	127.4	126.5	154.6	117.9	153.6
10	125.9	124.9	125.9	102.2	127.4	101.7
10a	130.9	133.7	132.9	129.0	126.5	131.6
OMe-2		56.1			56.1	
OMe-3	62.0		60.4*	59.5		62.2
OMe-4	62.5	59.8	59.7*	55.3	59.8	62.6
OMe-8					61.9	
OMe-9				60.3		55.5

*Señales intercambiables.

Las consideraciones más relevantes derivadas del estudio del espectro de RMN-¹H (Espectro 4, Cuadro 12) del compuesto 167 se presentan a continuación:

1. En δ_H 7.53 y 7.39 se observan dos dobletes ($J= 9.0$ Hz) atribuibles a H-9 y H-10.
2. En δ_H 7.25 (dd, $J= 7.8$ y 1.5 Hz), 7.38 (dd, $J= 7.8$ y 1.5 Hz) y 7.47 (dd, $J= 8.0$ y 7.5 Hz) se aprecia un sistema ABX asignable a los hidrógenos H-6, H-7 y H-8, respectivamente.
3. En δ_H 7.22 se observó una señal simple correspondiente a H-1.

4. Por último, en δ_H 10.32 y 6.41 se observan dos señales atribuibles a dos grupos hidroxilos y en δ_H 4.10 y 3.79 las señales correspondientes a los grupos metoxilos evidenciados en el espectro de RMN- ^{13}C .

Cuadro 12 Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN- 1H para los fenantrenos aislados de *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa*.

Protón	Compuesto					
	167	39	41	42	54	63
H-1	7.22 s (1H)	7.07 s (1H)	7.08 s (1H)	7.00 s (1H)	7.09 s (1H)	7.15 s (1H)
H-5		9.33 d (1H, 9.0)	9.15 d (1H, 9.0)	9.15 d (1H, 9.0)	9.16 d (1H, 9.0)	
H-6	7.25 dd (1H, 7.8, 1.5)	7.18 dd (1H, 9.0, 3.0)	7.10 dd (1H, 9.0, 2.5)	7.11 dd (1H, 9.2, 2.5)	7.30 d (1H, 9.3)	7.27 dd (1H, 12.5, 2.5)
H-7	7.47 dd (1H, 8.0, 7.5)					7.52 dd (1H, 13.0, 13.0)
H-8	7.38 dd (1H, 7.8, 1.5)	7.21 d (1H, 3.0)	7.14 d (1H, 2.5)	7.53 d (1H, 3.0)		7.95 dd (1H, 13.0, 2.5)
H-9	7.53 d (1H, 9.0)	7.57 d (1H, 9.0)	7.49 d (1H, 8.5)		7.82 d (1H, 9.0)	
H-10	7.39 d (1H, 9.0)	7.48 (1H, 9.0)	7.47 d (1H, 9.0)	6.91 s (1H)	7.63 d (1H, 8.7)	6.74 s (1H)
OH-2	6.41 sa (1H)		9.63* sa (1H)	9.44* sa (1H)		5.99 s (1H)
OH-3		5.98 s (1H)			6.00* s (1H)	
OH-5	10.32 s (1H)					10.16 s (1H)
OH-7		5.00 sa (1H)	9.62* sa (1H)	9.56* sa (1H)	5.78* s (1H)	
OMe-2		4.05 s (3H)			4.05 s (3H)	
OMe-3	4.10 s (3H)		3.88 s (3H)	3.86 s (3H)		4.13 s (3H)
OMe-4	3.79 s (3H)	3.95 s (3H)	3.89 s (3H)	3.87 s (3H)	3.95 s (3H)	3.80 s (3H)
OMe-8					3.98 s (3H)	
OMe-9				3.97 s (3H)		4.03 s (3H)

*Señales intercambiables.

El análisis detallado de los espectros bidimensionales de RMN de tipo ^1H -NOESY (Figura 8) y ^1H - ^{13}C -HMBC (Figura 9) permitió establecer la ubicación de los sustituyentes oxigenados en los anillos A y B del fenantreno **167**.

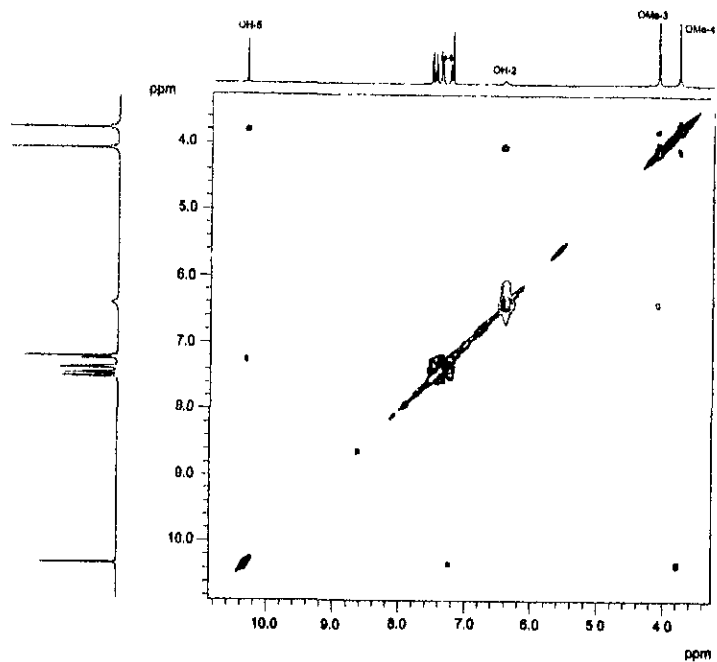


Figura 8a. Espectro de RMN ^1H -NOESY del compuesto **167**.

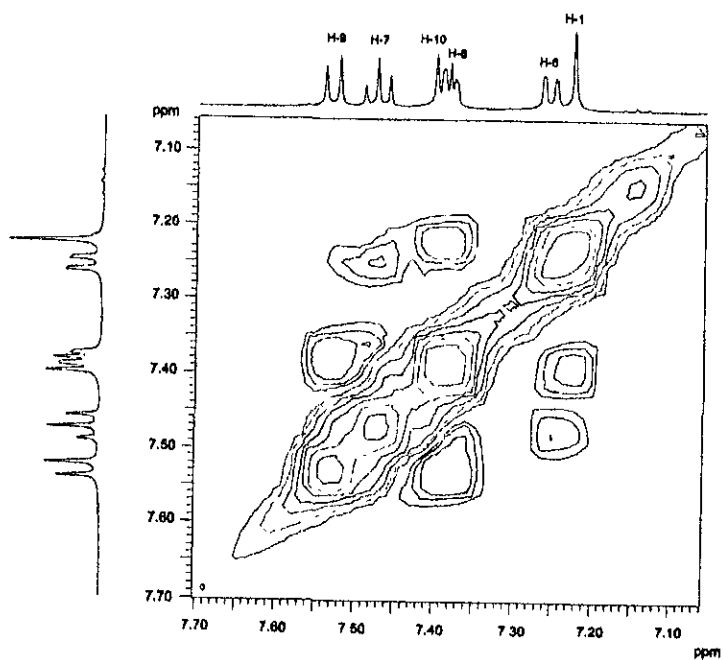


Figura 8b. Espectro parcial de RMN ^1H -NOESY del compuesto **167**.

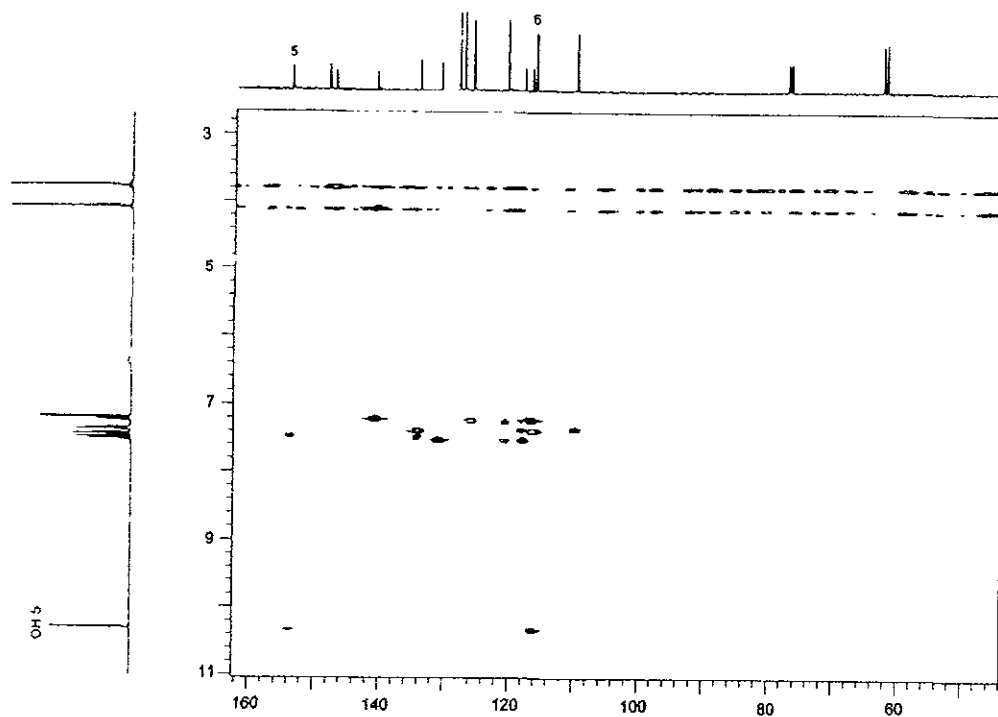


Figura 9a. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto **167**.

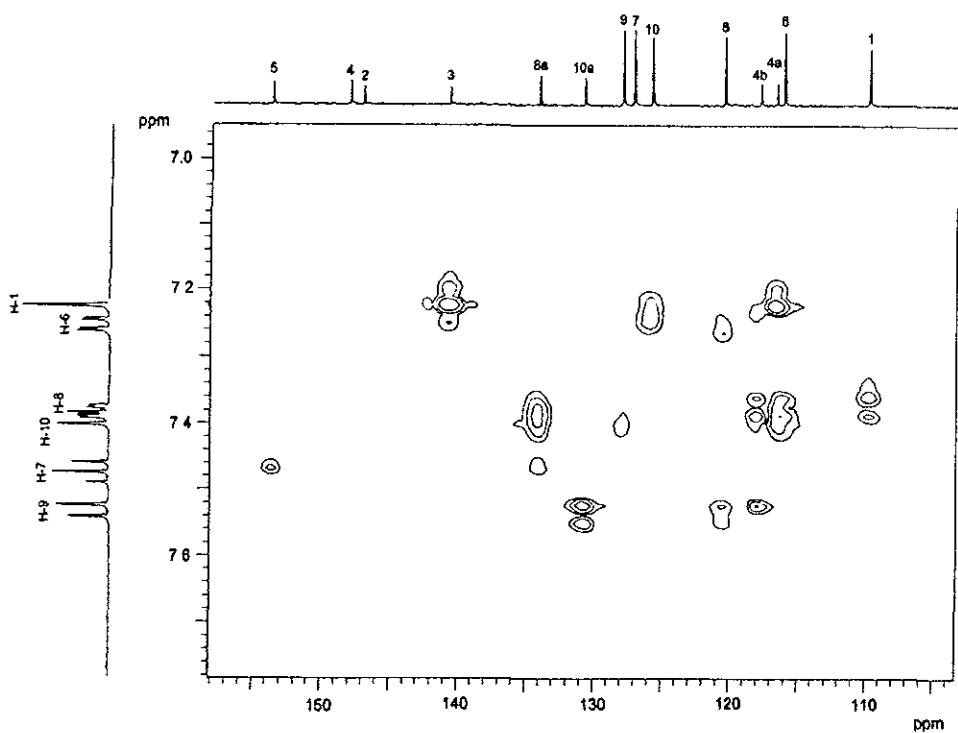


Figura 9b. Espectro parcial de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto **167**.

En el Cuadro 13 se resumen las correlaciones más importantes observadas en los espectros bidimensionales. Así mismo, en la Figura 10 se muestran las correlaciones que apoyan claramente la propuesta de la disposición de los grupos hidroxilos y metoxilos en el fenantreno.

Cuadro 13. Correlaciones observadas en los espectros de RMN ^1H -NOESY y ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto 167.

Protón	NOESY (Correlaciones ^1H - ^1H)	HMBC (Correlaciones ^1H - ^{13}C)
H-1	H-10	C-3, C-4a
H-6	H-7, OH-5	C-8
H-7	H-6, H-8	C-5, C-8a
H-8	H-7	
H-9	H-10	C-8, C-10a, C-4b
H-10	H-9, H-1	C-8a, C-4a, C-1
OH-2	OMe-3	
OH-5	OMe-4, H-6	C-5, C-6
OMe-3	OMe-4, OH-2	
OMe-4	OMe-3, OH-5	

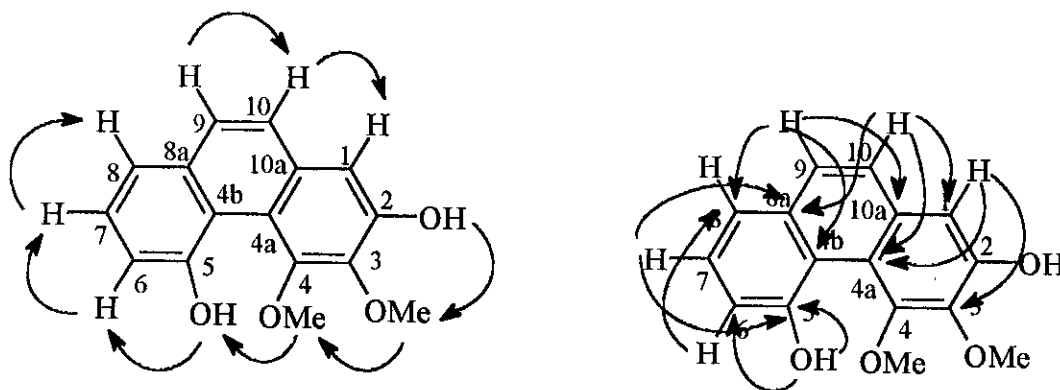


Figura 10. Correlaciones importantes observadas en los espectros bidimensionales de RMN ^1H -NOESY y ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto 167.

El análisis por difracción de rayos X (Figura 11) de los cristales del producto **167** nos permitió confirmar de manera inequívoca que su estructura corresponde al compuesto 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno.

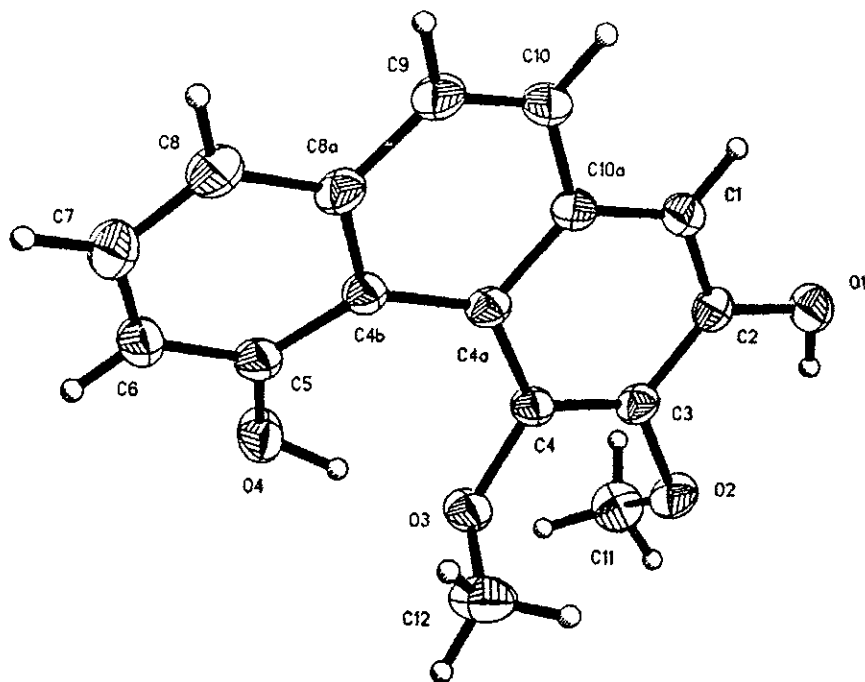


Figura 11. Vista estereoscópica del compuesto **167** obtenida por difracción de rayos X.

El ión molecular observado en el espectro de EMIE del producto **168** permitió determinar que dicho compuesto presenta dos unidades de masas más que el fenantreno **167** (Espectro 8). Los espectros de RMN del compuesto **168** (Espectros 9 y 10, Cuadro 14) permitieron evidenciar que este producto corresponde al 9,10-dihidroderivado de **167**. Así, los espectros de RMN del compuesto **168** presentan dos señales en δ_H 2.71 (2H, m) y δ_H 2.64 (2H, m) en el espectro de RMN- 1H y en δ_C 31.1 y 30.7 en el espectro de RMN- ^{13}C atribuibles a los grupos metilenos en C-9 y C-10 de un dihidrofenantreno. De manera adicional, los desplazamientos químicos de los hidrógenos y carbonos de los anillos A y C

en el metabolito **168** (Cuadro 14), se observan desplazados diamagnéticamente con respecto a los del producto **167**.

Cuadro 14. Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN-¹H y ¹³C para los 9,10-dihidrofenantrenos aislados de *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa*.

Posición	Compuesto					
	168		82		84	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	6.77 s (1H)	111.6	6.42 d (1H, 2.5)	106.5	6.56 s (1H)	110.0
2		148.9		158.1		147.8
3		138.6	6.34 d (1H, 2.5)	100.1		139.7
4		148.1		153.3		150.5
4a		118.8		114.8		120.2
4b		120.1		125.4		128.4
5		153.6	7.94 d (1H, 9.3)	127.2	8.06 d (1H, 9.2)	128.5
6	6.96 dd (1H, 8.3, 1.3)	118.1	6.75 dd (1H, 9.25, 3.0)	115.1	6.62 dd (1H, 9.2, 3.0)	114.4
7	7.15 dd (1H, 7.2, 7.2)	128.2		153.7		153.8
8	6.85 dd (1H, 7.3, 1.3)	119.1	6.74 d (1H, 3.0)	113.2	6.75 d (1H, 3.0)	113.2
8a		140.5		140.9		134.8
9	2.71 m	31.1	2.72 m (4H)	30.5	2.62 m (4H)	30.0
10	2.64 m	30.7	2.72 m (4H)	29.9	2.62 m (4H)	29.9
10a		137.4		141.1		126.2
OH-2	5.65 sa				5.69 s (1H)	
OH-4			5.38 s (1H)			
OH-5	8.51 sa					
OH-7			4.85 s (1H)	55.3	4.97 s (1H)	
OMe-2			3.79 s (3H)			
OMe-3	3.99 s	61.7			3.91 s (3H)	61.0
OMe-4	3.75	62.1			3.69 s (3H)	60.0

Al igual que en el caso del fenantreno **167**, la disposición de los sustituyentes en la molécula del 9,10-dihidrofenantreno **168** se realizó mediante el análisis detallado de los

espectros NOESY y HMBC (Figuras 12, 13 y 14). De tal forma que las correlaciones entre el H-1 (δ_H 6.77)/CH₂-10 (δ_H 2.64) y H-1/OH-2 (δ_H 5.65) en el espectro de NOESY permitió establecer que uno de los grupos hidroxilo se encuentra en C-2. De manera adicional, las correlaciones observadas entre CH₂-9 (δ_H 2.71)/ H-8 (δ_H 6.85), H-8/H-7 (δ_H 7.15), H-7/H-6 (δ_H 6.96), H-6/OH-5 (δ_H 8.51), OH-5/OMe-4 (δ_H 3.75) y OMe-4/OMe-3 (δ_H 3.99), indicaron que el segundo hidroxilo y los grupos metoxilos se encuentran localizados en C-5, C-3 y C-4, respectivamente.

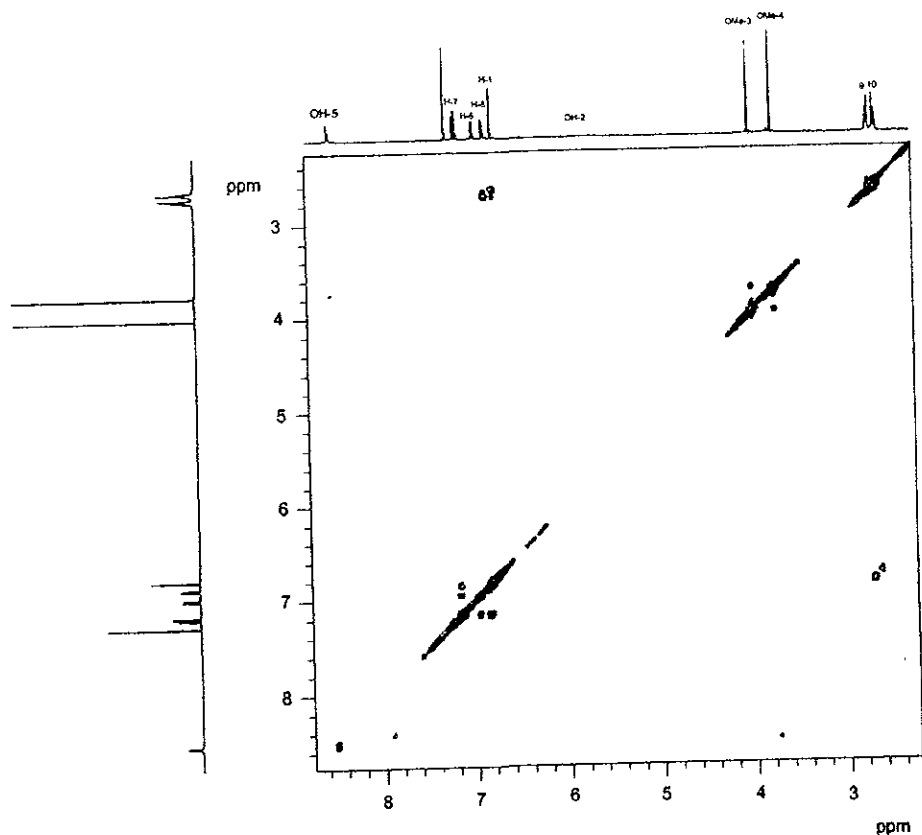


Figura 12. Espectro de RMN ¹H-NOESY del compuesto 168.

Las correlaciones observadas entre C-5/H-6, C-5/H-7, C-6/OH-5, C-1/OH-2, C-2/H-1, C-3/H-1, C-3/OMe-3 y C-4/OMe-4 en el espectro de RMN ¹H-¹³C-HMBC, permitieron

confirmar las posiciones de los grupos funcionales. Así, con base en las evidencias antes discutidas, el producto **168** se caracterizó como el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno.

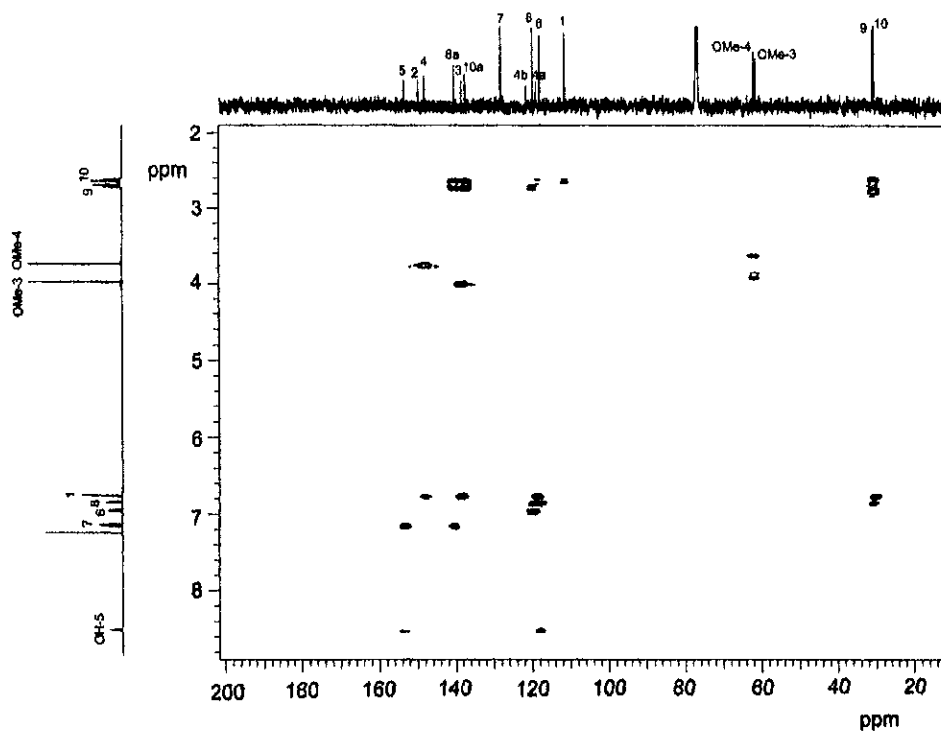


Figura 13. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto **168**.

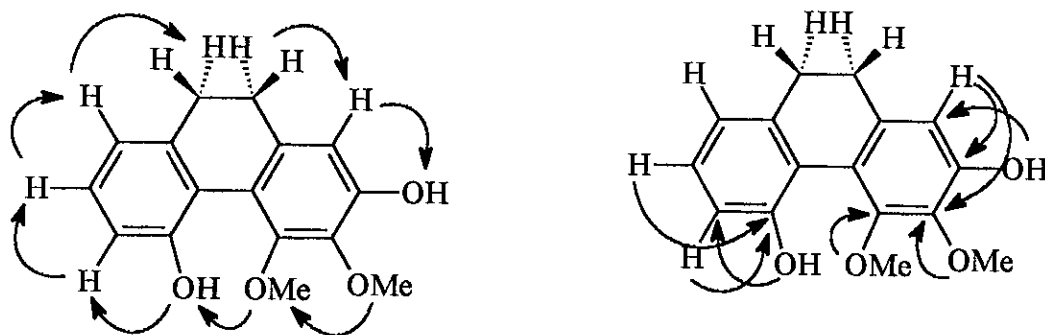


Figura 14. Correlaciones importantes observadas en los espectros de RMN ^1H -NOESY y ^1H - ^{13}C -HMBC del compuesto **168**.

Durante la realización del presente estudio fue posible comprobar de manera inequívoca las estructuras de los fenantrenos nudol (**41**) y eriantridina (**84**) mediante un análisis por difracción de rayos X. El fenantreno **41** se aisló con anterioridad de las especies *Eria convallarioides*, *Eutophia nuda*, *Oncidium cebolleta*, entre otras (Majumder y Kar, 1989; Bhandari *et. al.*, 1985; Stermitz *e. al.*, 1983; *inter alia*), mientras que el compuesto **84** se obtuvo previamente a partir de las especies *Ephemerantha lonchophylla*, *Catasetum barbatum*, entre otras (Tezuka *et. al.*, 1991; Shimizu *et. al.*, 1988; Majumder y Joardar, 1985, *inter alia*). En las Figuras 15a y 15b se presentan las vistas estereoscópicas de ambos compuestos.

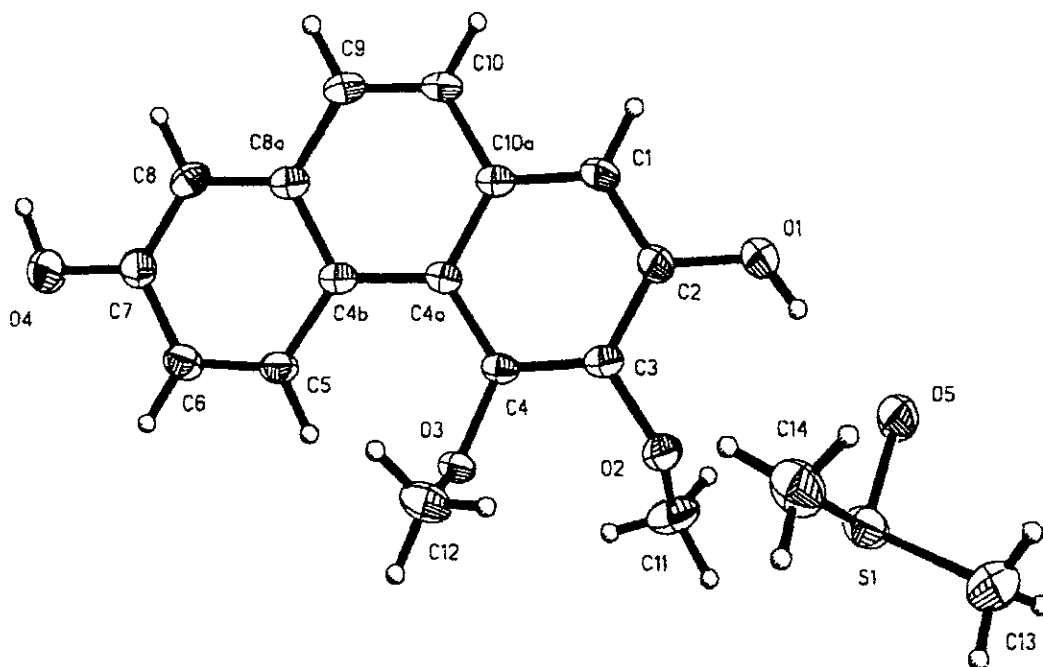


Figura 15a. Vista estereoscópica del nudol (**41**) obtenida por difracción de rayos X.

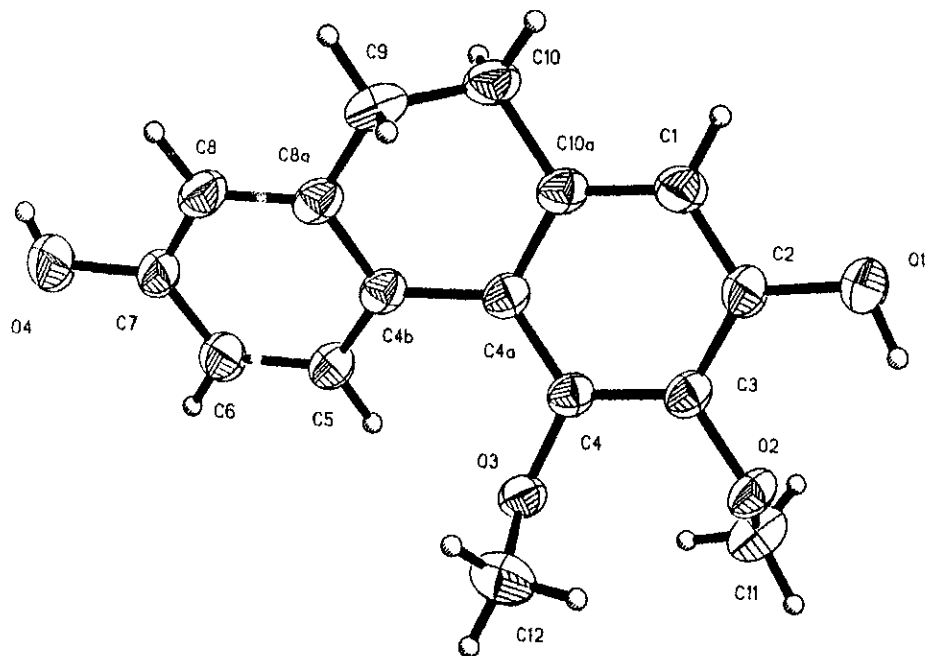


Figura 15b. Vista estereoscópica de la eriantridina (**84**) obtenida por difracción de rayos X.

4.4.2. Elucidación estructural de los compuestos 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (**12**) y 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (**1**).

Los compuestos **12** y **1** se aislaron como sólidos amorfos de color rojo y amarillo, respectivamente. Los espectros en el IR (Espectros 11 y 16) presentan bandas diagnósticas para grupos fenoles [(3685, 1610 y 1595 cm^{-1}) y (3595, 1613, 1599 y 1514 cm^{-1}), respectivamente]. Los máximos de absorción en los espectros de UV (Espectros 12 y 17) confirmaron el carácter aromático de los productos. La fórmula molecular de los compuestos **12** y **1** se estableció como $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$ y $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$, respectivamente, mediante espectrometría de masas por impacto electrónico (EMIE, Espectro 13 y 18) y Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C (RMN- ^{13}C , Espectro 15 y 20). En los espectros de masas de ambos compuestos (Espectros 13 y 18, Cuadro 15) los iones moleculares se observan en una relación masa carga (m/z) de 274 y 244, respectivamente.

Cuadro 15. Fragmentos presentes en los espectros de masas de los bibencilos obtenidos de *Scaphyglottis livida*.

Compuesto	Fragmentos (ir tensidad relativa)
3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (1)	244 (76), 213 (4), 137 (100), 107 (35), 77 (10)
3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12)	274 (80), 257 (6), 241 (5), 213 (4), 137 (100), 122 (15), 107 (7)

Los espectros de RMN-¹H y ¹³C (Espectros 14, 15, 19 y 20) de estos productos presentan el perfil típico de compuestos de tipo bibencilo (Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Majumder y Basak, 1991; Tezuka *et. al.*, 1991; Majumder y Pal, 1993; Majumder *et. al.*, 1997, *inter alia*). El espectro de RMN-¹³C (Espectro 15, Cuadro 16) del compuesto 12 presenta señales para 16 átomos de carbono en concordancia con la fórmula molecular establecida. Este espectro permite evidenciar la existencia de seis carbonos cuaternarios aromáticos [δ_c 133.6 (C-1'), 144.5 (C-4'), 146.3 (C-3'), 144.0 (C-1), 156.5 (C-3) y 160.8 (C-5)], seis metinos aromáticos [δ_c 114.2 (C-6'), 121.0 (C-5'), 111.2 (C-2'), 106.8 (C-2), 99.1 (C-4) y 108.0 (C-6)], dos grupos metoxilo unidos a carbonos aromáticos [δ_c 55.2 (OMe-5) y 55.8 (OMe-3')] y dos metilenos (δ_c 37.2 y 38.2). En el espectro de RMN-¹H (Espectro 14, Cuadro 16) se observan señales en δ_H 6.62 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.67 (1H, dd, J=8.2, 2.1 Hz) y 6.81 (1H, d, J=8.1) asignables a H-2', H-6' y H-5', respectivamente. Las señales para estos tres hidrógenos aromáticos se encuentran formando un sistema ABX. De manera adicional, se observan señales para tres hidrógenos aromáticos en δ_H 6.24 (2H, dd, J=18 Hz), asignables a H-2 y H-6, y en δ_H 6.31 (1H, d, J=2.0 Hz) atribuible a H-4. El patrón de acoplamiento de H-2, H-6 y H-4 indica su disposición *meta*. Los dos metoxilos evidenciados en el espectro de RMN-¹³C aparecen en el espectro de RMN-¹H en δ_H 3.75 (s,

OMe-5) y 3.84 (s, OMe-3'), mientras que las señales para los metilenos absorben en δ_H 2.82 (4H, ma). Por último, la presencia de dos grupos hidroxilos se confirma mediante las señales en δ_H 4.88 y 5.45, las cuales desaparecen en el experimento de intercambio con agua deuterada (D₂O).

Cuadro 16. Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN-¹H y ¹³C para los compuestos bibencilicos 12 y 1.

Compuesto	Desplazamientos químicos (ppm)
3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12)	RMN- ¹ H δ (300 MHz, CDCl ₃): 6.81 (1H, d, 8.1, H-5'), 6.67 (1H, dd, 8.2 y 2.0, H-6'), 6.62 (1H, d, 2.0, H-2'), 6.31 (1H, dd, 1.8, 1.8, H-4), 6.24 (2H, m, 1.8, 1.8, H-2, H-6), 5.45 (1H, sa, OH-4'), 4.88 (1H, sa, OH-3), 3.84 (3H, s, OMe-3'), 3.75 (3H, s, OMe-5), 2.80 (4H, m, 2CH ₂)
	RMN- ¹³ C δ (75 MHz, CDCl ₃): 160.8 (C-5), 156.6 (C-3), 146.3 (C-3'), 144.5 (C-4'), 143.7 (C-1), 133.6 (C-1'), 121.0 (C-5'), 114.2 (C-6'), 111.2 (C-2'), 108.1 (C-2), 106.8 (C-6), 99.1 (C-4), 55.9 (OMe-3'), 55.2 (OMe-5), 38.2 (CH ₂), 37.2 (CH ₂)
3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (1)	RMN- ¹ H δ (300 MHz, CDCl ₃): 7.13 (1H, dd, 7.5, 8.1, H-5'), 6.74 (1H, d, 7.5, H-6'), 6.65 (2H, m, 8.1, H-2', H-4'), 6.31 (1H, t, H-4), 6.25 (2H, m, H-2, H-6), 5.12 (2H, sa, 2OH), 3.74 (3H, s, OMe-5), 2.83 (4H, m, 2CH ₂)
	RMN- ¹³ C δ (75 MHz, CDCl ₃): 160.8 (C-5), 156.5 (C-3), 155.5 (C-3'), 144.4 (C-1), 143.5 (C-1'), 129.5 (C-5'), 120.9 (C-6'), 115.4 (C-2'), 112.9 (C-4'), 108.0 (C-2), 106.8 (C-2), 99.1 (C-4), 55.3 (OMe-5), 37.6 (CH ₂), 37.2 (CH ₂)

Para establecer la disposición relativa de los sustituyentes en los anillos A y B, se analizó los cuadros de conectividad observados para cada uno de los hidrógenos aromáticos

en el espectro de RMN- ^1H bidimensional por efecto nuclear de Overhauser ^1H - ^1H (NOESY). De tal forma que las interacciones H-2/CH₂-7, CH₂-7/H-6, H-6/OMe-5 y OMe-5/H-4, permiten establecer que uno de los grupos hidroxilo se encuentra en la posición 3 y uno de los grupos metoxilo en la posición 5 del anillo A. De igual forma, la ubicación del segundo hidroxilo en C-4' y del restante metoxilo en C-3', ambos en el anillo B, se estableció con base en las siguientes interacciones H-6'/CH₂-7', CH₂-7'/H-2' y H-2'/OMe-3' (Figura 16).

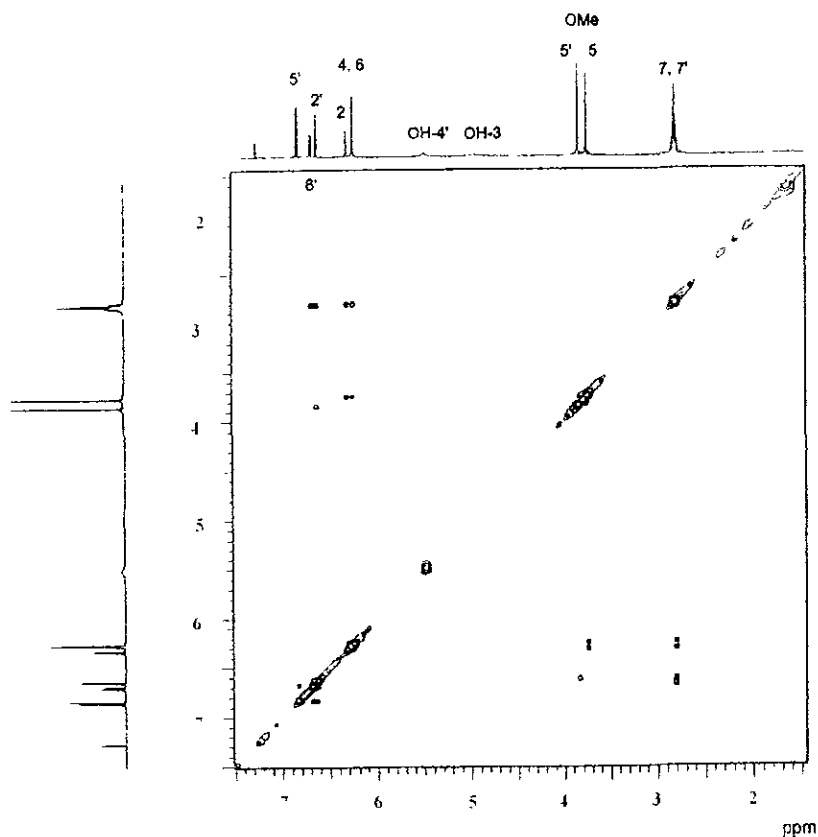
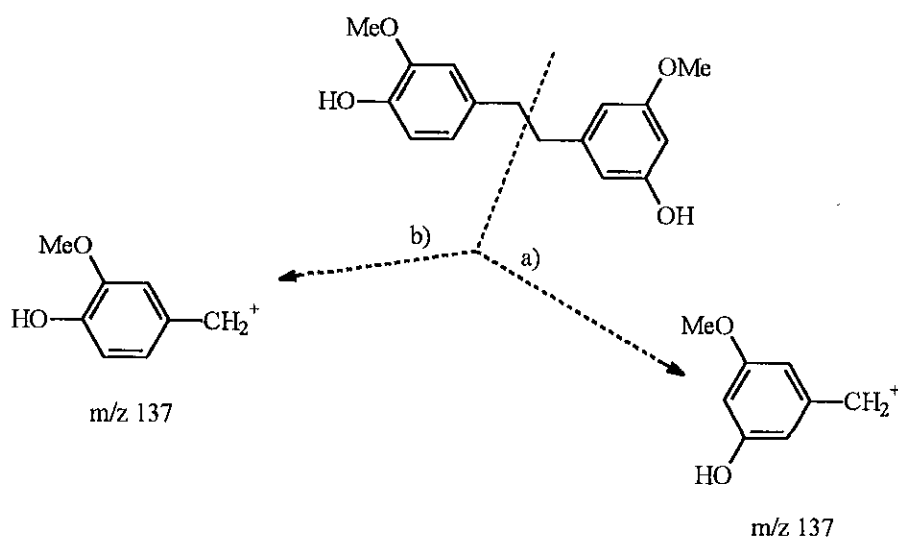


Figura 16 Espectro de RMN ^1H -NOESY del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (**12**).

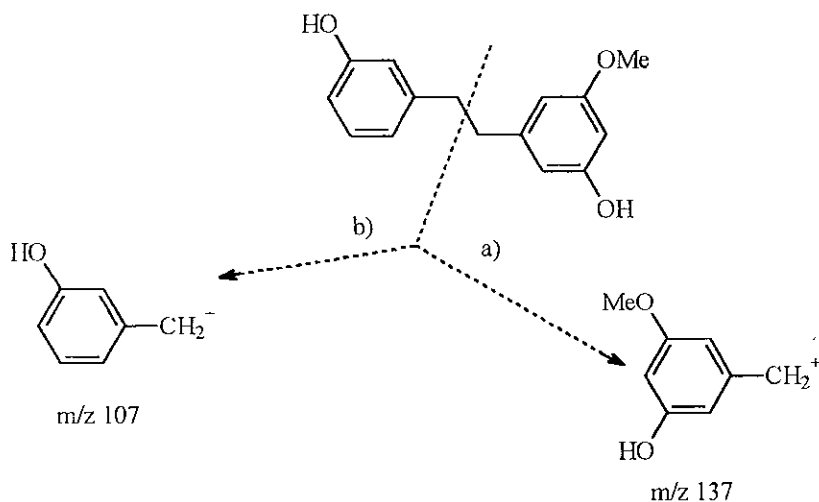
Los espectros de RMN del compuesto **1** (Espectros 19 y 20) resultaron muy similares a los registrados para el bibencilo **12**. La principal diferencia observada en el espectro de RMN- ^1H del compuesto **1** (Espectro 19, Cuadro 16) se encuentra asociada con el número

de sustituyentes en el anillo A. Así, en lugar del sistema ABX presente en el espectro de RMN-¹H del producto **12**, el espectro de **1** presenta un sistema ABCX constituido por cuatro hidrógenos aromáticos cuyas señales se observan en δ_H 7.13 [1H, dd, J=7.5 y 8.1 Hz (H-5')] 6.74 [1H, d, J=7.5 Hz (H-6')], 6.65 [1H, m, J=8.1 Hz (H-4')] y 6.21 [1H, m, (H-2')]. De tal forma que H-5' se encuentra en disposición *orto* a H-4' y H-6'. De manera adicional, se estableció que H-2', H-4' y H-6' se encuentran en una disposición *meta*.

La diferencia en el grado de sustitución del anillo A de los compuestos **1** y **12** se reflejó también en los espectros de masas. En el caso del compuesto **12** el espectro presenta dos fragmentos en una relación *m/z* 137 (pico base), resultantes de las rupturas bencílicas características de este tipo de compuestos (Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Majumder y Basak, 1991; Tezuka *et. al.*, 1991; Majumder y Pal, 1993; Majumder *et. al.*, 1997; *inter alia*). En el espectro de masas del compuesto **1**, los fragmentos derivados de la ruptura bencílica se observan en una *m/z* de 107 y 137 (pico base), confirmándose así la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo A (Esquema 9).



Esquema 9a. Fragmentos derivados de la ruptura bencílica del bibencilo **12**.



Esquema 9b. Fragmentos derivados de la ruptura bencílica del bibencilo **1**.

Con base en las evidencias espectroscópicas y espectrométricas descritas anteriormente, los productos activos se caracterizaron como el 3,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxibibencilo (**12**) y el 3,3'-dihidroxi-5-metoxibibencilo (**1**). Es importante señalar que ambos compuestos ya fueron aislados previamente de otras especies de orquídeas (Leong, *et. al.*, 1997; Majumder y Lahiri, 1990; Shimizu *et. al.*, 1988; Juneja *et. al.*, 1987; *inter alia*)

4.4.3. Elucidación estructural del *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (**165**) y del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (**166**).

El compuesto **165** se aisló bajo la forma de cristales incoloros en forma de agujas. El espectro en el IR (Espectro 21) presenta señales asociadas con grupos hidroxilo (3477 cm^{-1}) y carbonilo conjugado (1693 cm^{-1}). Su fórmula molecular se determinó como

C₄₁H₆₀O₃ mediante los espectros de EMIE y RMN-¹³C (Espectros 22 y 24). En el EMIE el ión molecular se observa en una relación *m/z* de 600 (Espectro 22).

Los espectros de RMN (Espectros 23 y 24, Cuadro 17) presentan el perfil típico de un triterpeno del tipo del 3β-hidroxicicloartano en el cual el hidroxilo se encuentra formando un éster con el ácido *trans p*-hidroxicinámico (Majumder y Pal, 1985; Majumder y Pal, 1990; Majumder y Chakraborti, 1985; Talapra, *et. al.*, 1983).

Cuadro 17. Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN ¹H y ¹³C para el *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ilo (165) y el 24, 24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3β-ol (166).

Posición	Compuesto 166		Compuesto 165	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	30.36		30.71	
2	26.06		26.50	
3	78.85	3.28 (1H α , dd, J= 11.0 y 4.5 Hz)	80.60	4.67 (1H α , dd, J= 17.1 y 3.0 Hz)
4	31.93		31.48	
5	48.78		48.79	
6	21.09		20.93	
7	28.09		28.10	
8	47.95		47.87	
9	19.98		19.98	
10	40.46		39.69	
11	25.99		25.82	
12	35.55		35.54	
13	45.22		45.23	
14	47.10		47.20	
15	32.84		32.83	
16	26.47		26.93	
17	52.13		52.15	
18	17.95	0.95 (3H, s)	17.95	0.96 (3H, s)
19	29.87	0.32 (1H, d, J= 4.0 Hz) y 0.55 (1H, d, 4.0 Hz)	29.789	0.36 (1H, d, J= 4.2 Hz) y 0.59 (1H, d, 4.2 Hz)
20	36.57		36.59	

Cuadro 17. Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C para el *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (**165**) y el 24, 24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (**166**) (continuación).

Posición	Compuesto 166		Compuesto 165	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
21	18.43	0.85 (3H, d, J= 6.5 Hz)	18.44	0.86 (3H, d, J= 6.3 Hz)
22	30.71		31.63	
23	37.35		37.32	
24	38.70		38.71	
25	152.43		152.41	
26	109.27	4.67 (sa), 4.72 (m)	109.29	4.67 (sa), 4.72 (m)
27	19.36	1.68 (3H, d, J= 1.2 Hz)	20.16	1.69 (3H, s)
28	25.41	0.81 (3H, s)	25.48	0.89 (3H, s)
29	13.97	0.96 (3H, s)	15.33	0.99 (3H, s)
30	19.29	0.88 (3H, s)	19.30	0.89 (3H, s)
31	27.49	1.02 (3H, s)	27.54	1.06 (3H, s)
32	27.21	1.01 (3H, s)	27.23	1.02 (3H, s)
1'			167.18	
2'			115.81	6.32 (1H, d, J= 15.6 Hz)
3'			143.83	7.61 (2H, d, J= 15.9 Hz)
1''			127.65	
2'', 6''			129.90	6.84 (2H, d, J= 8.4 Hz)
3'', 5''			116.46	7.45 (2H, d, J= 8.4 Hz)
4''			157.43	
OH-4''				5.19 (1H, s)

Los espectros de RMN (Espectro 23 y 24, Cuadro 17) presentan dos grupos de señales, el primero es atribuible al grupo *trans p*-hidroxicinamoilo y el segundo al núcleo triterpénico de tipo cicloartano. Las resonancias del primer grupo se observan de la siguiente manera:

- 1) En δ_{H} 6.32 (1H, d, J=15.6 Hz) y 7.61 (1H, d, J= 15.9 Hz), aparecen dos señales dobles correspondientes a los protones olefinicos H-2' y H-3', respectivamente; el valor de la constante de acoplamiento es congruente con una estereoquímica *trans*

de la doble ligadura. Estas señales correlacionan en el espectro de HMQC con las absorciones en δ_C 115.8 y 143.8, respectivamente.

- 2) En δ_H 6.84 (2H, d, J= 8.4 Hz) y 7.45 (2H, d, J= 8.4 Hz) se observa la presencia de dos dobletes (un sistema A_2X_2) atribuibles a los hidrógenos del anillo aromático (H-2'', H-6'' y H-3'', H-5'', respectivamente). En el espectro de RMN- ^{13}C las señales correspondientes se observan en δ_C 129.9 y 116.5.
- 3) En δ_H 5.19 (1H, s) aparece una señal asignable al hidroxilo en C-4''. Esta asignación se confirmó debido a que dicha señal desaparece del espectro al realizar el experimento de intercambio con D_2O .
- 4) En δ_C 167.2 se observa la señal asignable a un carbonilo conjugado (C-1').
- 5) Por último, en δ_C 157.4 aparece la señal correspondiente al carbono cuaternario unido a un hidroxilo fenólico y en δ_C 127.6 se aprecia la señal para el carbono cuaternario *ipso* a la cadena propanoide.

Las señales correspondientes al núcleo triterpénico se observan como se describe a continuación:

- 1) En δ_H 0.36 y 0.59 aparecen dos dobletes (J= 4.2 Hz) atribuibles al grupo ciclopropanoide, las cuales correlacionan con la señal en δ_C 29.8 en el espectro HMQC (Aria *et. al.*, 1989; Majumder y Pal, 1985; Majumder y Pal, 1990; Majumder y Chakraborti, 1985; Talapra, *et. al.*, 1983).
- 2) En δ_H 4.67 (sa) y 4.72 (m) y δ_C 109.3 aparecen las señales asignables a la función olefínica terminal ubicada en C-26.
- 3) En δ_H 4.67 aparece la señal correspondiente a H-3; esta señal se observa sobrepuesta con la correspondiente a la de uno de los protones olefínicos en C-26

(Majumder y Pal, 1985; Majumder y Pal, 1990)]. La señal del carbono se observa en δ_C 80.6.

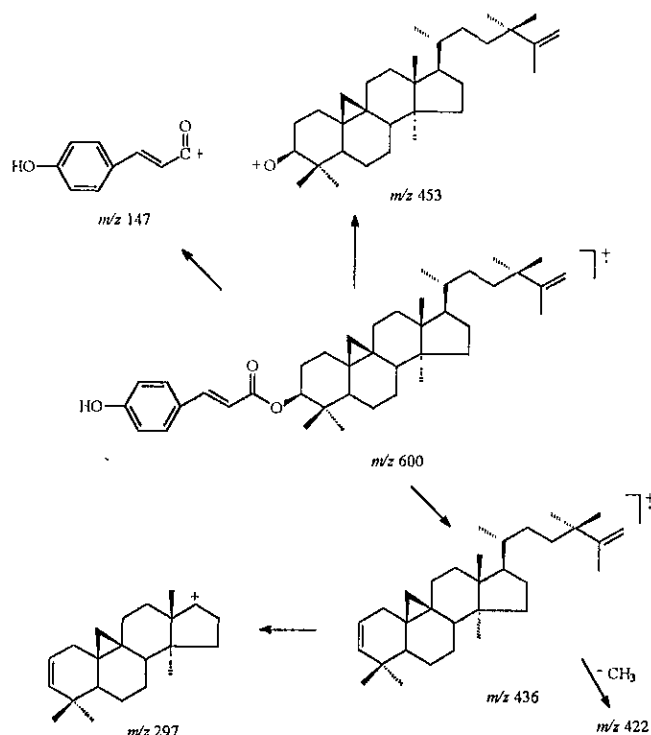
- 4) En δ_H 0.89, 0.90, 0.96, 0.99, 1.02, 1.06 y 1.69 aparecen siete singuletes atribuibles a siete metilos sobre carbonos cuaternarios; una de estas señales corresponde a un metilo sobre doble ligadura (δ_H 1.69, H₃-27). Por último, en δ_H 0.86 se observa la presencia de un doblete ($J= 6.3$ Hz) correspondiente a un metilo sobre un carbono terciario (CH₃-21). Este último grupo de señales muestra correlaciones con las señales en δ_C 25.5, 19.3, 17.9, 15.3, 27.2, 27.5, 20.1 y 18.4, respectivamente.

Con la finalidad de caracterizar con mayor detalle la porción triterpénica de la molécula se procedió a la saponificación del compuesto **165**. Este proceso químico permitió la obtención del ácido *p*-hidroxicinámico (**169**, Espectros 30) y del 24, 24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (**166**), este último obtenido también en el presente estudio. Los productos de la reacción se caracterizaron mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas en la literatura (Aria *et. al.*, 1989; Majumder y Pal, 1985; Majumder y Pal, 1990; Majumder y Chakraborti, 1985; Talapra, *et. al.*, 1983). En el Cuadro 17 se resumen las constantes espectroscópicas del triterpenoide **166**.

Es importante señalar que el patrón de acoplamiento (dd, $J= 11.0$ y 4.5 Hz) de la señal en δ_H 3.28 correspondiente al protón geminal a una función carbinólica secundaria (H-3), permite establecer la estereoquímica β del hidroxilo en C-3 en el producto **166** y la disposición β del residuo *trans-p*-hidroxicinamoilo en el producto **165**.

Por otro lado, los desplazamientos químicos observados para los carbonos del anillo A y para los metilos sobre C-4 del triterpeno **166** proporcionan una evidencia adicional para la localización de la función alcohólica en C-3.

Los fragmentos con una relación m/z 147 y 453 presentes en el espectro de masas del compuesto **165** (Esquema 10), son consistentes con las porciones del ácido *p*-hidroxicinámico (**169**) y del 24, 24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (**166**), respectivamente. Los fragmentos más importantes evidenciados en el espectro de masas (Espectro 22) del producto natural **165**, se resume en el esquema 10 y nos confirman la propuesta estructural establecida para dicho compuesto.



Esquema 10. Fragmentos más importantes observados en el espectro de masas generado por IE del compuesto **165**.

Con las evidencias presentadas anteriormente el compuesto **165** se caracterizó como el *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo y el producto **166** se caracterizó como el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol. Es importante mencionar que el producto **165** constituye un nuevo producto natural.

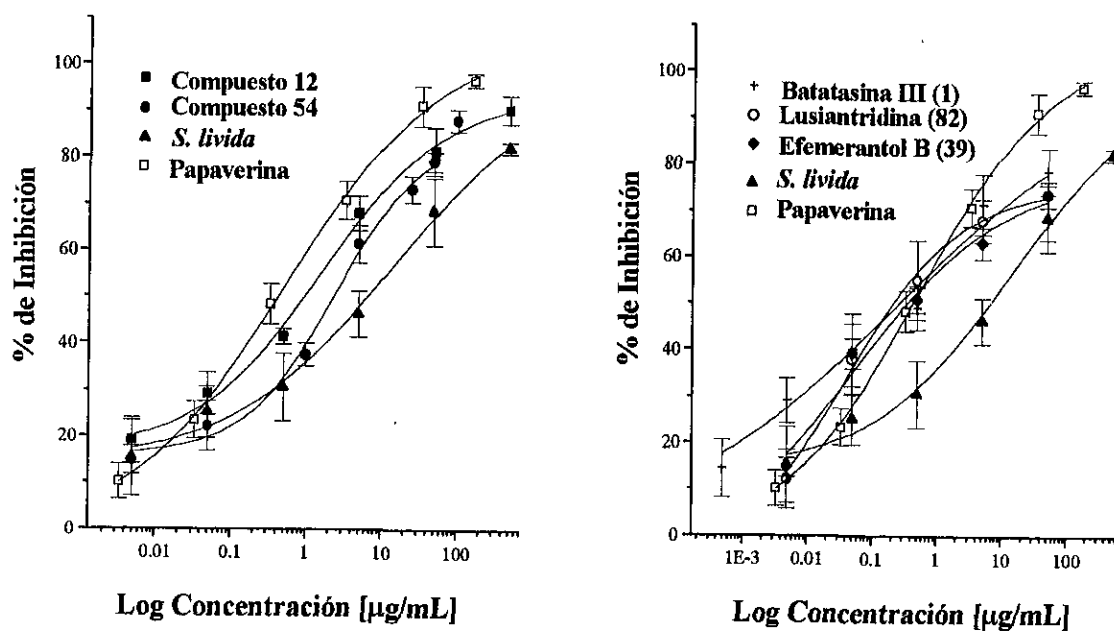
4.5. EVALUACION DEL POTENCIAL ESPASMOLITICO DE LOS METABOLITOS AISLADOS DE *Scaphyglottis livida* Y *Maxillaria densa*.

De acuerdo con la estrategia establecida para el desarrollo del presente proyecto de investigación, se realizaron los ensayos biológicos conducentes a determinar el efecto espasmolítico de los compuestos aislados. Para ello, se evaluó en primer lugar la actividad relajante de los metabolitos obtenidos de *S. livida* y *M. densa* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata. Posteriormente, se evaluó el efecto de estos productos sobre la contracción inducida por diferentes neurotransmisores o inhibidores enzimáticos (Ach, hist, BaCl₂ y L-NAME) en el íleon aislado de rata. Este segundo grupo de ensayos biológicos se realizó con la finalidad de iniciar la caracterización farmacológica de los productos activos. De manera adicional, se determinó el efecto de los compuestos activos **12** y **39** sobre la producción de GMPc en anillos de íleon aislados de rata.

4.5.1. Evaluación de la batatasina III (1), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12), el efemerantol B (39), el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54) y la lusiantridina (82) aislados de *Scaphyglottis livida* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.

En general, los compuestos **1**, **12**, **39**, **54** y **82** presentaron una actividad espasmolítica significativa sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata. Como se muestra en la Figura 17, el efecto inhibitorio de estos metabolitos fue dependiente de la concentración. En el Cuadro 18, se muestra el efecto máximo (E_{max}), la concentración inhibitoria media (CI₅₀) y la potencia (γ) de cada uno de los compuestos ensayados. En general, todos estos productos fueron más potentes que el extracto crudo de *S. livida*. La

batatasina III (**1**) y el efemerantol B (**39**) presentaron una actividad inhibitoria dos veces más potente que la papaverina, seguidos por la lusiantridina (**82**) que presentó una potencia 1.5 veces mayor que el control positivo. Por último, los compuestos **12** y **54** demostraron una actividad relajante de la musculatura lisa menos potente que la del control positivo. El efecto espasmolítico demostrado por los compuestos **1**, **12**, **39**, **54** y **82**, fue revertido al lavar el tejido con solución ringer KH. Esta observación indica que el efecto relajante no está relacionado con un efecto tóxico de los compuestos sobre el tejido de prueba.



Valores están expresados en medias \pm E.E.M.; n=6; $p < 0.05$.

Figura 17. Curvas concentración-respuesta que muestra el efecto relajante del extracto y de los compuestos **1**, **12**, **39**, **54** y **82** obtenidos de *Scaphyglottis livida* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.

Cuadro 18. Actividad inhibitoria mostrada por los compuestos aislados de *Scaphyglottis livida* sobre la contracción espontánea del ileon aislado de rata.

Compuesto	E _{max} (%)	CI ₅₀ (M)	Potencia
Papaverina	96.70 ± 5.02	1.55 x 10 ⁻⁶ ± 0.12	1
Extracto	82.10 ± 6.02	6.06 ± 1.02*	--
Batatasina III (1)	85.20 ± 2.08	7.37 x 10 ⁻⁷ ± 0.07	2.1031
3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12)	93.50 ± 3.02	5.83 x 10 ⁻⁶ ± 0.55	0.2658
Efemerantol B (39)	83.59 ± 1.3	6.66 x 10 ⁻⁷ ± 0.01	2.3273
3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54)	88.05 ± 1.8	7.13 x 10 ⁻⁶ ± 0.42	0.2173
Lusiantridina (82)	80.00 ± 1.98	9.50 x 10 ⁻⁷ ± 0.03	1.6315

*La concentración del extracto está expresada en µg/mL.

Valores están expresados en medias ± E.E.M.; n=6; p< 0.05.

Potencia fue obtenida por la fórmula: CI₅₀ (M) de la papaverina/CI₅₀ (M) del compuesto, asumiéndose un valor de 1.00 para la papaverina.

E_{max} indica el porcentaje de inhibición máxima mostrada por las muestras de prueba.

4.5.2. Caracterización farmacológica preliminar de la batatasina III (1), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (12), el efemerantol B (39), el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54) y la lusiantridina (82) aislados de *Scaphyglottis livida* sobre la contracción inducida por diferentes espasmógenos en el ileon aislado de rata.

Con la finalidad de iniciar los estudios conducentes a establecer el mecanismo de acción mediante el cual los productos activos 1, 12, 39, 54 y 82 ejercen su efecto espasmolítico, en primer lugar se evaluó el efecto de estos sobre la contracción inducida por Ach, histamina y BaCl₂ en el ileon aislado de rata. Los dos primeros espasmógenos fueron seleccionados debido a que tienen una participación importante en el control de la motilidad de la musculatura lisa (Williamson *et. al.*, 1996; Katzung, 1992; Kating y Trevor, 1998). De manera adicional, la población de receptores para estos neurotransmisores es alta en el tejido seleccionado. Por último, cabe destacar que en casi todos los protocolos experimentales empleados para el descubrimiento de nuevos agentes espasmolíticos, estos

son los espasmógenos más utilizados. Evidentemente el empleo de algunos de estos espasmógenos conllevaría al descubrimiento de nuevos antiespasmódicos con un mecanismo de acción igual al de los agentes de mayor uso en la terapéutica contemporánea (Samuelsson *et. al.*, 1991; Katzung, 1992; Mata *et. al.*, 1997; Rojas *et. al.*, 1996; *Inter. alia*). El cloruro de bario se seleccionó para comprobar la posible interferencia de los compuestos en el transporte y/o metabolismo del calcio en la célula muscular, debido a que se ha determinado que el bario, de manera semejante al calcio, activa las proteínas contráctiles del músculo. Así mismo, se sabe que el cloruro de bario ocasiona una despolarización en la membrana celular del músculo, originando la activación de canales de calcio voltaje-dependientes con el subsecuente aumento en la entrada de calcio al interior de la célula. De manera adicional, este aumento en la concentración intracelular de calcio provoca un incremento en la liberación de calcio a partir del retículo sarcoplásmico (Van Den Broucke y Lemli, 1982; Capasso, *et. al.*, 1991; *Inter alia*).

En todos los casos el efecto de los compuestos se determinó a la CI₅₀ calculada. Con base en los resultados que se muestran en la Figura 18a ninguno de los compuestos mostró un efecto antagonista significativo sobre la contracción inducida por Ach (1 x 10⁻⁴ M).

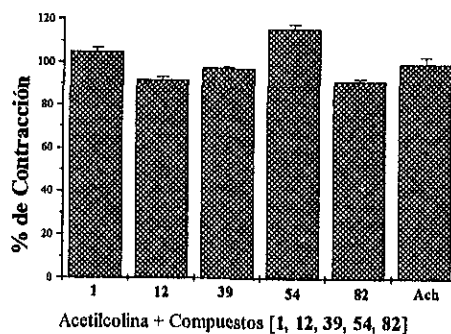


Figura 18a. Efecto de los metabolitos secundarios aislados de *Scaphyglottis livida* sobre las contracciones inducidas por Acetilcolina. *p < 0.05 (ANADEVA).

En el caso de los experimentos con histamina (1×10^{-3} M) y BaCl_2 (1×10^{-4} M), los principios activos presentaron respuestas distintas (Figura 18b). De tal forma que los estilbenoides **12** y **54** antagonizaron de manera significativa las contracciones inducidas por histamina, mientras que la batatasina III (**1**), el efemerantol B (**39**) y la lusiantridina (**82**), no presentaron actividad significativa alguna.

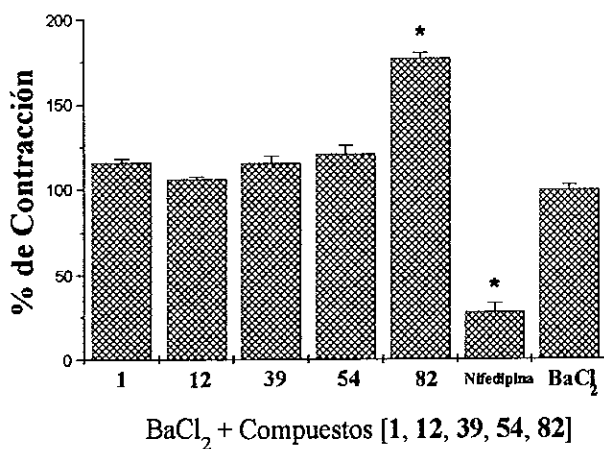
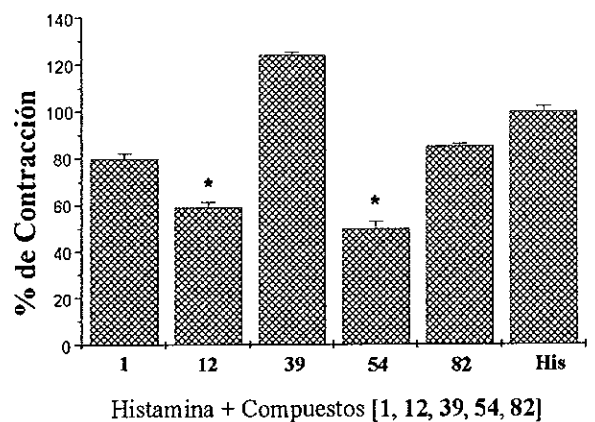


Figura 18b. Efecto de los metabolitos secundarios aislados de *S. livida* sobre las contracciones inducidas por histamina y BaCl_2 . * $p < 0.05$ (ANADEVA).

De manera adicional, los compuestos **1**, **12**, **39** y **54** no presentaron una respuesta inhibitoria sobre las contracciones inducidas por BaCl₂; en tanto que la lusiantridina (**82**) aumentó de manera significativa las contracciones inducidas por este espasmógeno.

Estos resultados sugieren, de manera general, que el efecto relajante inducido por los principios activos no se encuentra relacionado directamente con un modo de acción anticolinérgico o con una interferencia en el flujo de calcio al interior de las células musculares. Es importante mencionar que en el caso del compuesto **82**, es necesario realizar otros experimentos para explicar su efecto sobre las contracciones inducidas por BaCl₂. Por último, el efecto antihistaminérgico provocado por los productos **12** y **54** podría estar relacionado con su efecto espasmolítico. Este efecto antihistaminérgico podría estar mediado por los receptores H₁ (Katzung, 1992).

Posteriormente, se determinó si el efecto relajante se encontraba mediado por el sistema óxido nítrico (NO)/Guanosina Monofosfato Cíclico (GMPc). En este contexto, antes de discutir los resultados experimentales se harán unas breves consideraciones acerca del papel del óxido nítrico (NO) como un neurotransmisor periférico.

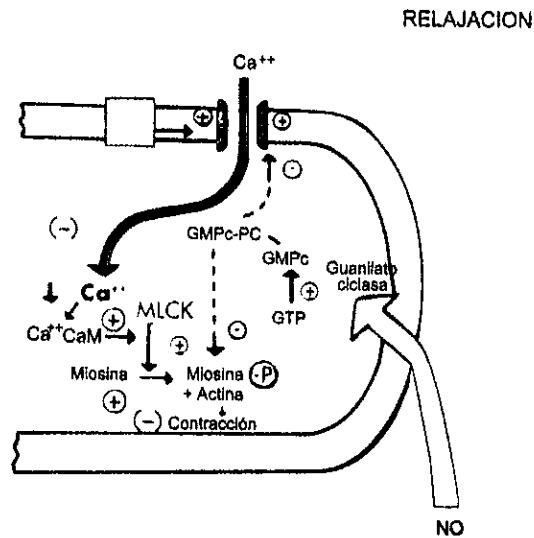
El NO es un gas lábil, incoloro, que tiene un tiempo de vida media muy corto en fluidos biológicos (Conner y Grisham, 1995; Michel y Feron, 1997; Lloyd-Jones y Bloch, 1996, 1996). La estructura química del NO le confiere una variedad de propiedades que facilitan su papel como mensajero biológico. Así, la carga neutral de esta molécula permite su difusión a través de las membranas celulares. El NO tiene un electrón desapareado, lo cual lo convierte en un radical altamente reactivo (Lloyd-Jones y Bloch, 1996; Conner y Grisham, 1995).

En los mamíferos el NO regula numerosos procesos fisiológicos incluyendo, entre otros, la contractilidad del músculo liso, la agregación plaquetaria, reduce la adherencia de

leucocitos al endotelio, suprime la proliferación de las células del músculo liso y se le relaciona con la actividad bactericida y antitumoral de los macrófagos ((Hobbs *et. al.*, 1999; Conner y Grisham, 1995; Fleming y Busse, 1999; Papapetropoulos *et. al.*, 1999; Kodja y Harrison, 1999) De tal forma que numerosas enfermedades o desórdenes patológicos están asociados con las deficiencias en la síntesis, inactivación o liberación del NO. Así, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus, la hipertensión, la isquemia cerebral, el shock séptico, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la migraña, son ejemplos de algunas de las enfermedades asociadas con la producción anómala del NO (Cooke *et. al.*, 1997; Ferro y Webb, 1997; Lloyd-Jones y Bloch, 1996; *Inter alia*).

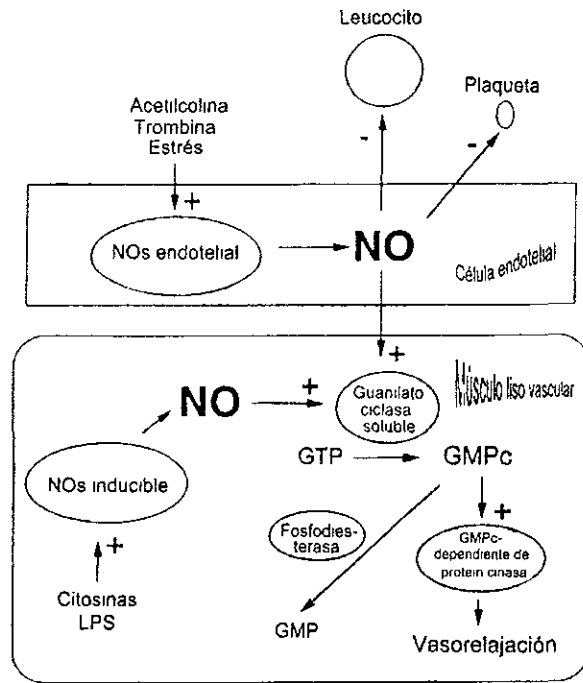
El óxido nítrico es uno de los neurotransmisores más importantes en el proceso de relajación no adrenérgica y no colinérgica (NANC) del músculo liso del tracto gastrointestinal (Moncada *et al.*, 1991; Sanders and Ward, 1992; Olgart *et. al.*, 1997; *inter alia*). De tal forma que el NO generado en las neuronas del plexo mientérico del intestino, difunde hacia las células blanco donde se une al centro activo de la guanilato ciclasa soluble, provocando un cambio tridimensional en la forma de la enzima y así inducir un incremento en la producción de GMPc. Este aumento en los niveles de GMPc trae como consecuencia la relajación del músculo liso intestinal a través de una proteína cinasa dependiente de GMPc, que al fosforilar a la cadena ligera de la miosina, la inactiva inhibiendo el proceso de fosforilación de la miosina, que es necesario para activar la actividad ATPasa del complejo miosina-actina indispensable para la contracción muscular (Esquema 11, Olgart, *et. al.*, 1997; Barthó y Lefebvre, 1995; Kanada, *et. al.*, 1992). Cabe destacar que el efecto regulador ejercido por el NO sobre la motilidad intestinal es complejo. De acuerdo a las evidencias experimentales acumuladas a la fecha, este neurotransmisor tiene efecto tanto excitatorio como inhibitorio sobre la motilidad intestinal.

El efecto excitatorio es mediado por neuronas motoras colinérgicas, en tanto que el efecto inhibitorio se traduce en la relajación del músculo liso de acuerdo con el mecanismo antes explicado (Holzer *et. al.*, 1997; Olgart *et. al.*, 1997).



Esquema 11. Proceso de relajación del músculo liso intestinal inducido por el NO a través de la formación de GMPc intracelular (Olgart *et. al.*, 1997).

Como se indicó anteriormente, el NO también se ha descrito como un neurotransmisor involucrado en la regulación del tono de los vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos son dilatados por la acción de neurotransmisores que como la acetilcolina favorecen la relajación del músculo liso. La interacción de la Ach con sus receptores endoteliales estimula la formación del NO, el cual se difunde del endotelio a las células musculares adyacentes e induce la formación de GMPc, segundo mensajero que se encarga de desencadenar el proceso de relajación a través del mecanismo que se resume en el esquema 12 (Snyder y Bredt, 1995; Harrison, 1997; Conner y Grisham, 1995; Shah *et. al.*, 1999; Hobbs *et. al.*, 1999).



Esquema 12 Sistema de transducción de señal del NO/GMPc en los vasos sanguíneos (Lloyd y Bloch, 1999)

La enzima óxido nítrico sintetasa (NOs) que cataliza la biosíntesis del NO a partir de L-arginina, existe en tres isoformas: la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOs) y la inducible (iNOs) (Hobbs *et. al.*, 1999, Papapetropoulos *et. al.*, 1999; Andrew y Mayer, 1999) Las cuáles difieren en su estructura y función. Todas las isoformas de NOs tienen aproximadamente el 60% de los aminoácidos idénticos y una estructura primaria muy similar. La eNOS y la nNOS son enzimas constitutivas y su actividad es dependiente de Ca^{2+} y calmodulina, aunque la eNOs puede ser activada de manera independiente de Ca^{2+} . La NOs inducible es expresada en altos niveles y solamente después de la inducción por citocinas u otros agentes inflamatorios como las que se generan en presencia de infecciones bacteriales. La iNOs requiere para su función a la proteína calmodulina como subunidad, pero no requiere de la presencia de Ca^{2+} (Andrew y Mayer, 1999; Hobbs *et. al.*, 1999).

Todas las NOs poseen en su estructura dos dominios, conocidos como el dominio de la reductasa (porción C-terminal) y el dominio de la oxigenasa (porción N-terminal). En la porción C-terminal se unen el NADPH, la flavina adenina dinucleótido (FAD), la flavina mononucleótido (FMN) y la calmodulina, mientras que el dominio de la oxigenasa tiene sitios de unión para grupos hemo, L-arginina y tetrahidrobiopterina (BH₄). Durante la síntesis de NO, el NADPH transporta electrones desde el dominio de la reductasa a través del FAD hasta el grupo hemo localizado en el dominio de la oxigenasa, este último se une a O₂ y cataliza los pasos para la síntesis de NO a partir de L-arginina (Fleming y Busse, 1999; Hobbs et. al., 1999).

En los últimos diez años, se han investigado muy extensamente los compuestos que inhiben la producción de óxido nítrico. Estos compuestos son generalmente análogos de L-arginina e interfieren de manera competitiva con la unión del sustrato a la NOs (Hobbs *et. al.*, 1999). El primer inhibidor de la NOs descrito fue el N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), el cual se constituyó como el inhibidor prototipo para realizar los diferentes estudios farmacológicos en diferentes modelos experimentales. De manera adicional, se han descrito otros inhibidores de la NOs que son equipotentes a L-NMMA, como son la N^G-nitro-L-arginina (L-NA), el éster metílico de la N^G-nitro-L-arginina (L-NAME) y algunos análogos de la citrulina, entre otros. Estos compuestos son inhibidores inespecíficos de las diferentes isoformas de la NOs. Sin embargo, recientemente se describió que el 7-nitroindazol es un inhibidor relativamente selectivo de la NOs neuronal que se expresa en diferentes tejidos (Heinemann y Holzer, 1999).

Con la finalidad de determinar si la actividad antiespasmódica de la batatasina III (1), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12), el efemerantol B (39) y la lusiantridina (82) está mediada por el sistema NO/GMPc, se decidió, en primer lugar, evaluar el efecto

de los cuatro compuestos sobre la contracción inducida por el L-NAME [(5 x 10⁻³ M) (efecto comprobado experimentalmente)]. Para ello, en primer término se adicionó directamente al baño las sustancias activas a una concentración equivalente a sus concentraciones inhibitorias medias. En todos los casos se observó que la respuesta contráctil inducida por el L-NAME era inhibida significativamente (Figura 19). La adición directa de L-NAME (5 x 10⁻³ M) al baño con el tejido previamente tratado con los principios activos, revirtió el efecto relajante demostrado por los mismos. Como un ejemplo, el efecto inducido por el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (**12**) se muestra en la Figura 20. Estos resultados permitieron inferir que el efecto de los compuestos **1**, **12**, **39** y **82** está mediado por el sistema NO/GMPc.

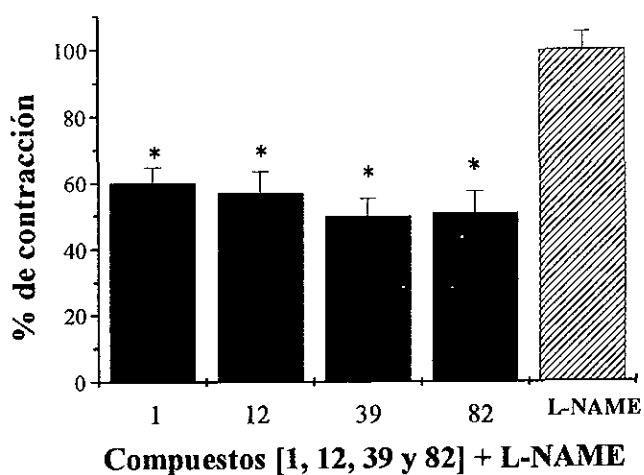


Figura 19. Efecto de los compuestos activos **1**, **12**, **39** y **82** aislados de *Scaphyglottis livida* sobre las contracciones inducidas por el L-NAME. *P< 0.05 (ANADEVA).

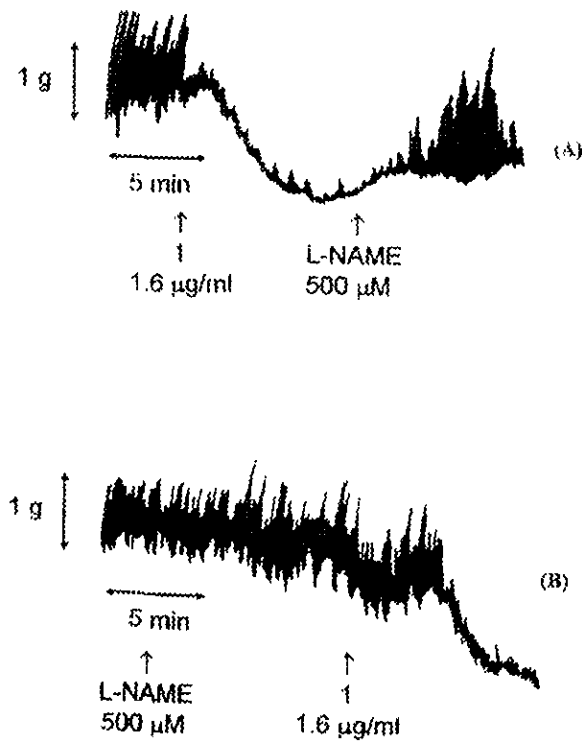


Figura 20. (A) Registro que muestra la respuesta relajatoria inducida por el compuesto 12 (1.6 µg/mL) el cual fue revertido en presencia de L-NAME (5×10^{-3} M). (B) Registro que muestra el efecto relajante del compuesto 12 después de ser tratado con L-NAME.

Con el objeto de comprobar esta hipótesis, se investigó si los productos 12 y 39 inducían un aumento de los niveles de GMPc en anillos de íleon de rata. Para ello se utilizó una técnica de radioinmunoensayo. Esta es una técnica altamente específica que combina el uso de anticuerpos y GMPc marcado con tritio y se fundamenta en la competencia de GMPc no marcado y de GMPc marcado que se une a los anticuerpos. La cantidad de GMPc marcado es inversamente proporcional a la cantidad de GMPc no marcado presente en la muestra ensayada (Steiner *et. al.*, 1972; Mathison e Israel, 1998).

Mediante la aplicación de esta metodología se determinó que el bibencilo **12** aumenta significativamente la producción de GMPc (Figura 21, Cuadro 19). Sin embargo, el compuesto **39** no provocó ningún aumento significativo en la producción de GMPc (Cuadro 18).

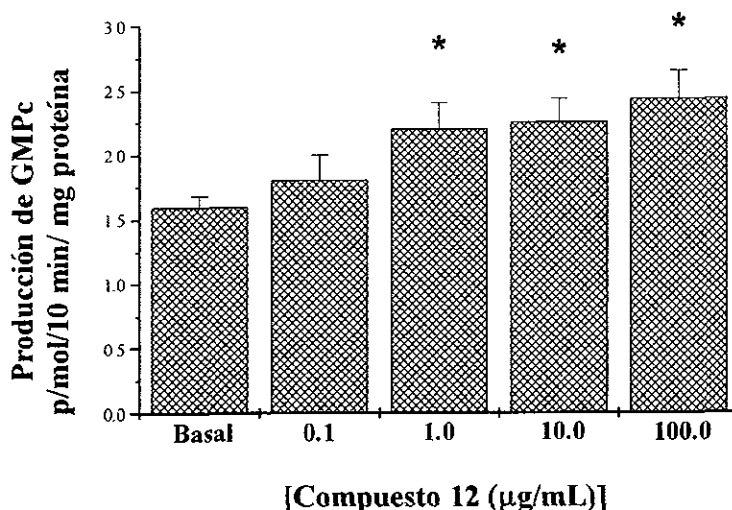


Figura 21. Efecto del compuesto **12** sobre la producción de GMPc en anillos de íleon aislado de rata.

Por otra parte, cuando los anillos de íleon fueron tratados con una sola concentración del producto **12** (100 µg/mL) en presencia de L-NAME o 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-*a*]quinoxalin-1-ona (ODQ, 1 µM) un potente inhibidor específico de la guanilato ciclasa soluble (Garthwaite *et. al.*, 1995; Moro *et. al.*, 1996), se inhibió la producción de GMPc (Cuadro19). El conjunto de resultados recién descritos indica claramente que el mecanismo de relajación del bibencilo **12** involucra la participación del sistema NO/cGMP.

Cuadro19. Efecto de los compuestos **12** y **39** sobre la generación de GMPc en anillos de íleon de rata. Producción de GMPc del compuesto **12** en presencia de L-NAME, ODQ y en ausencia de calcio.

Producción de GMPc inducido por los compuestos 12 y 39 (fmol/10 min/mg proteína)	
Basal (n=26)	1620.85 ± 8.6
Compuesto 12 (n=24)	2260.18 ± 8.8*
Basal (n= 5)	1330.0 ± 10.9
Compuesto 39 (n= 5)	1322.0 ± 6.6
L-NAME (n=16)	1760.62 ± 14.6
Compuesto 12 + L-NAME (n=18)	2090.53 ± 12.4
ODQ (n=11)	1770.25 ± 20.9
Compuesto 12 + ODQ (n=11)	1480.4 ± 19.4
Basal (-Ca ²⁺) (n=18)	1900.63 ± 18.8
Compuesto 12 (-Ca ²⁺) (n=11)	1430.49 ± 15.8

p< 0.01 comparado con la basal. Concentración de cada compuesto 100 µg/mL.

Debido al importante papel que juega el calcio extracelular como cofactor de la NOs neuronal en la producción de NO (Hobbs *et. al.*, 1999; Andrew y Mayer, 1999; *Inter. alia*), se decidió estudiar la relación de este segundo mensajero con la producción de GMPc inducida por el bibencilo **12**. Para ello, los anillos de íleon de rata fueron preincubados con solución buffer KR libre de calcio durante 10 min (sin adicionar CaCl₂ y en presencia de 2 nM de EGTA). De acuerdo con los resultados descritos en el Cuadro 19, la producción de GMPc inducida por el compuesto **12** fue completamente dependiente del calcio extracelular, ya que la ausencia de este catión en el medio y la adición simultanea de un exceso de EGTA provocó un bloqueo de la acumulación de GMPc inducida por el dihidroestilbeno **12**.

4.5.3. Evaluación del nudol (41), la gimnopusina (42), el fimbriol A (63), la eriantridina (84) y el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167) aislados de *Maxillaria densa* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.

Los estilbenoides 41, 42, 63, 84 y 167 aislados de *M. densa* también mostraron un efecto espasmolítico significativo. Como se muestra en la Figura 22, la actividad relajante de la musculatura lisa de estos metabolitos fue dependiente de la concentración. En el Cuadro 20, se resumen el efecto máximo (Emax), la concentración inhibitoria media (CI₅₀) y la potencia (γ) de cada uno de los compuestos.

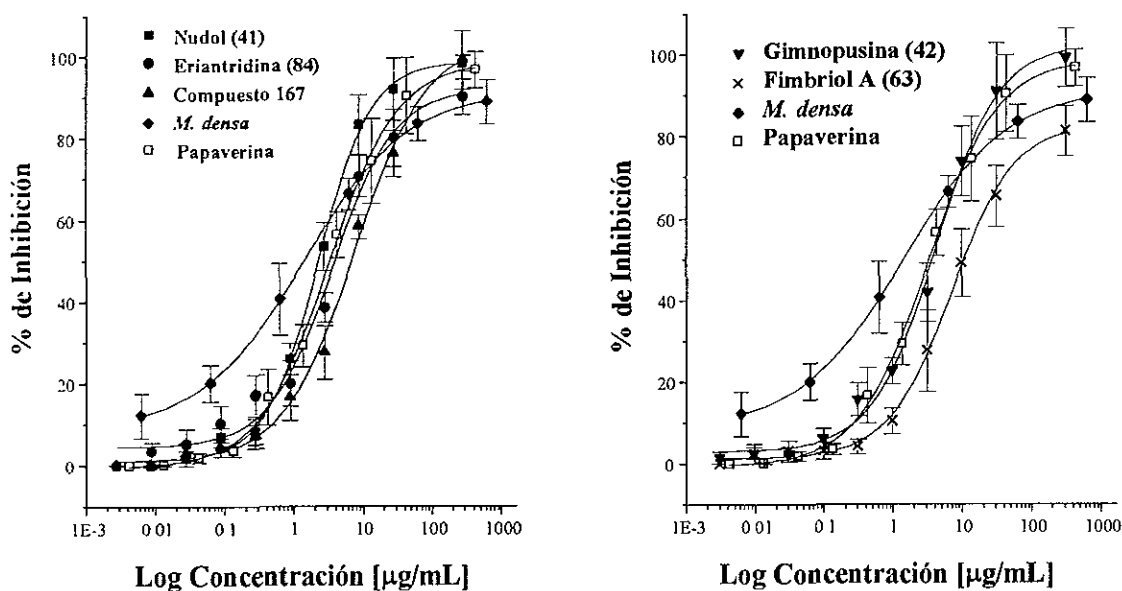


Figura 22 Curvas concentración-respuesta que muestra el efecto relajante del extracto y de los compuestos 41, 42, 63, 84 y 167 obtenidos de *Maxillaria densa* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.

Cuadro 20. Actividad inhibitoria demostrada por los compuestos aislados de *Maxillaria densa* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.

Compuesto	E _{max} (%)	CI ₅₀ (M)	Potencia
Papaverina	96.70 ± 5.02	1.55 x 10 ⁻⁶ ± 0.12	1
Extracto	82.10 ± 6.02	1.38 ± 0.078*	--
Nudol (41)	85.20 ± 2.08	7.37 x 10 ⁻⁷ ± 0.07	2.1031
Gimnopusina (42)	93.50 ± 3.02	5.83 x 10 ⁻⁶ ± 0.55	0.2658
Fimbriol A (63)	83.59 ± 1.3	6.66 x 10 ⁻⁷ ± 0.01	2.3273
Eriantridina (84)	88.05 ± 1.8	7.13 x 10 ⁻⁶ ± 0.42	0.2173
2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167)	80.00 ± 1.98	9.50 x 10 ⁻⁷ ± 0.03	1.6315

*La concentración del extracto está expresada en µg/mL.

Valores están expresados en medias ± S.E.M.; n=6; p< 0.05.

Potencia fue obtenida por la fórmula: CI₅₀ (M) de la papaverina/CI₅₀ (M) del compuesto, asumiéndose un valor de 1.00 para la papaverina.

E_{max} indica el porcentaje de inhibición máxima demostrada por las muestras de prueba.

Todos estos productos resultaron ser menos potentes que el extracto crudo de *M. densa* y en general, equipotentes con respecto a la papaverina, utilizada de nueva cuenta como un control positivo. El hecho de que el extracto íntegro de *M. densa* sea más potente que los compuestos aislados, puede deberse a un posible efecto sinérgico de los metabolitos presentes en el extracto o quizá a la existencia en el extracto de algún compuesto minoritario cuya actividad sea mayor que la demostrada por los compuestos separados.

Para la caracterización farmacológica preliminar de los metabolitos aislados de *M. densa* se utilizó un protocolo similar al descrito para los estilbenoides aislados de *S. livida*. La principal diferencia entre estos protocolos radica en que el efecto de los compuestos sobre las contracciones inducidas por el L-NAME, la histamina y el cloruro de bario se

determinó a varias concentraciones, de tal forma que fue posible construir las curvas concentración-respuesta acumulativas en todos los casos.

Cabe destacar que el efecto antagonista de los estilbenoides sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina no fue significativo, por tanto, estos resultados no se presentan. Con base en los resultados que se muestran en las Figuras 23 y 24 todos los compuestos presentaron un efecto inhibitorio importante sobre las contracciones inducidas por histamina (1×10^{-4} M), BaCl_2 (1×10^{-5} M) y L-NAME (1×10^{-5} M) en el íleon aislado de rata. El efecto fue dependiente de la concentración.

Estos resultados indicaron claramente que el efecto relajante mostrado por los compuestos es inespecífico y que no se encuentra relacionado directamente con un modo de acción anticolinérgico, antihistaminérgico, nitrérgico o con una interferencia en el flujo del calcio al interior de las células. Es importante destacar que los experimentos con L-NAME no permiten descartar un efecto estimulante de los compuestos sobre la actividad de la guanilato ciclasa.

A fin de establecer el mecanismo de acción específico de los estilbenoides de *M. densa* será necesario realizar experimentos con otros neurotransmisores con un efecto sobre otros receptores membranales (serotonina y prostaglandinas) y con inhibidores enzimáticos como el ODQ (inhibidor específico de la guanilato ciclasa) y cafeína (inhibidor de la AMPc fosfodiesterasa).

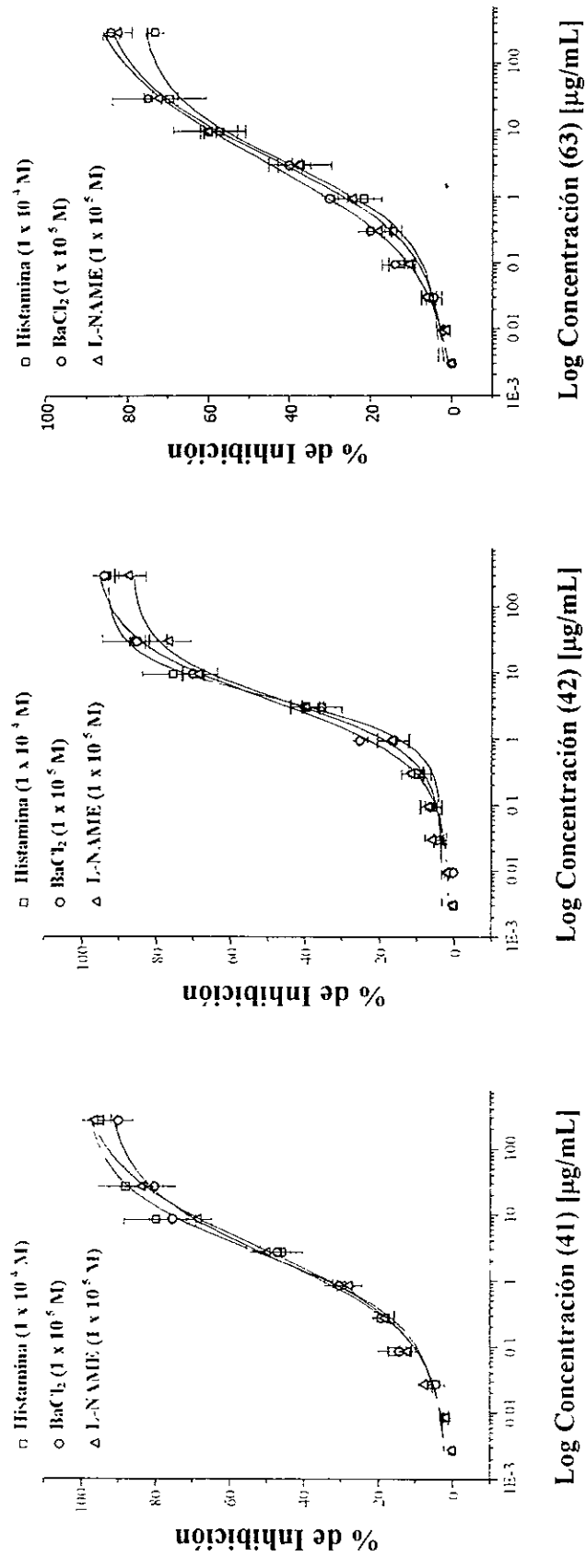
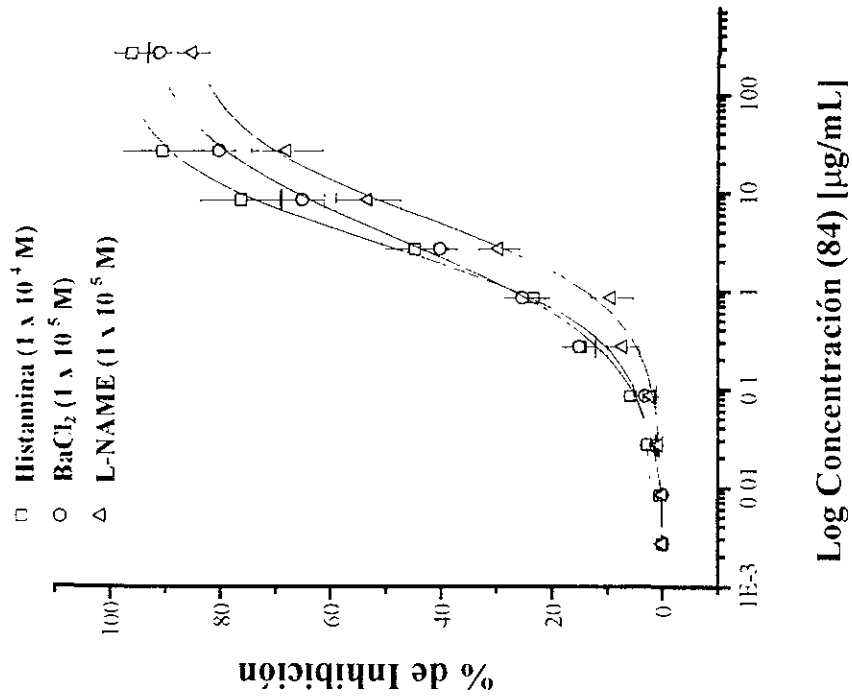
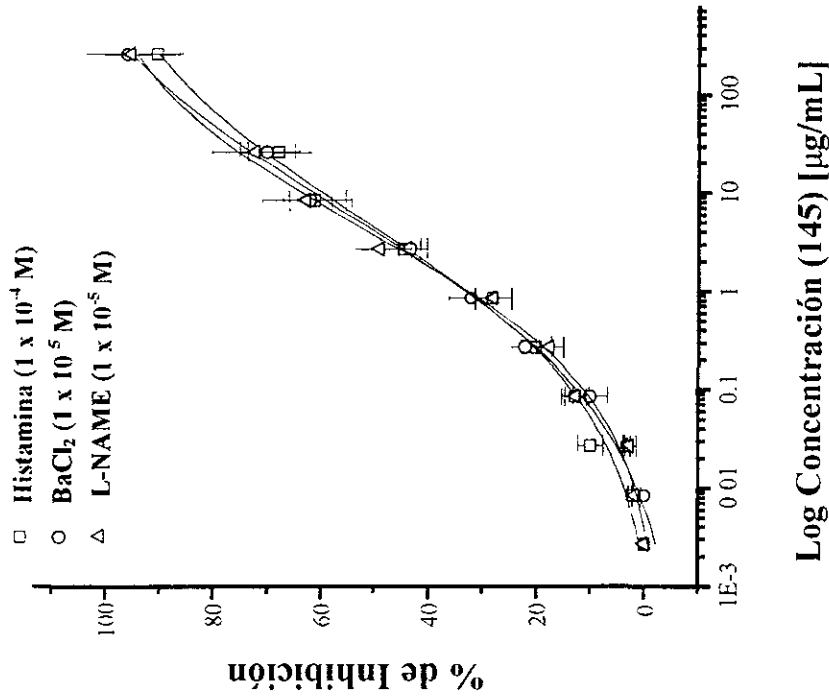


Figura 23. Curvas concentración-respuesta acumulativas que muestran el efecto relajante de los compuestos 41, 42 y 63 sobre la contracción inducida por histamina, cloruro de bario y L-N-NAME.



Log Concentración (84) [µg/mL]



Log Concentración (145) [µg/mL]

Figura 24 Curvas concentración-respuesta acumulativas que muestran el efecto relajante de los compuestos **84** y **167** sobre la contracción inducida por histamina, cloruro de bario y L-NAME.

4.6. EFECTO DEL 3,4'-DIHIDROXI-3',5-DIMETOXIBIBENCILO (12) Y DEL EFEMERANTOL B (39) AISLADOS DE *Scaphyglottis livida* SOBRE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR LA NORADRENALINA (NA) EN ANILLOS DE AORTA DE RATA.

Las evidencias experimentales generadas en el presente trabajo permitieron concluir que el compuesto **12** provoca su efecto espasmolítico en íleon de rata, en parte a través de un mecanismo nitrérgico. Considerando que el óxido nítrico también promueve la relajación no adrenérgica-no colinérgica en el músculo liso vascular como un resultado de la expresión de la NOs neuronal en las neuronas periféricas (Rand y Li, 1995; Andrew y Mayer, 1999), se decidió investigar el efecto del bibencilo **12** en las contracciones inducidas por noradrenalina (NA) en anillos de aorta torácica de rata. De manera adicional, se exploró con fines comparativos, el efecto del fenantreno **39** en el mismo modelo farmacológico.

El protocolo utilizado incluyó dos series de experimentos. En la primera serie, se evaluó el efecto de los compuestos **12** y **39** utilizando anillos de aorta con endotelio. En el segundo, se emplearon anillos de aorta sin endotelio. Los experimentos de la segunda serie permiten discriminar si el efecto vasodilatador provocado por un compuesto está relacionado con el sistema NO/GMPc endotelial.

De acuerdo con los resultados presentados en el Cuadro 21 y la Figura 25, los productos **12** y **39** inducen una vasodilatación dependiente de la concentración en anillos de aorta de rata previamente estimulados con NA en presencia y ausencia de endotelio.

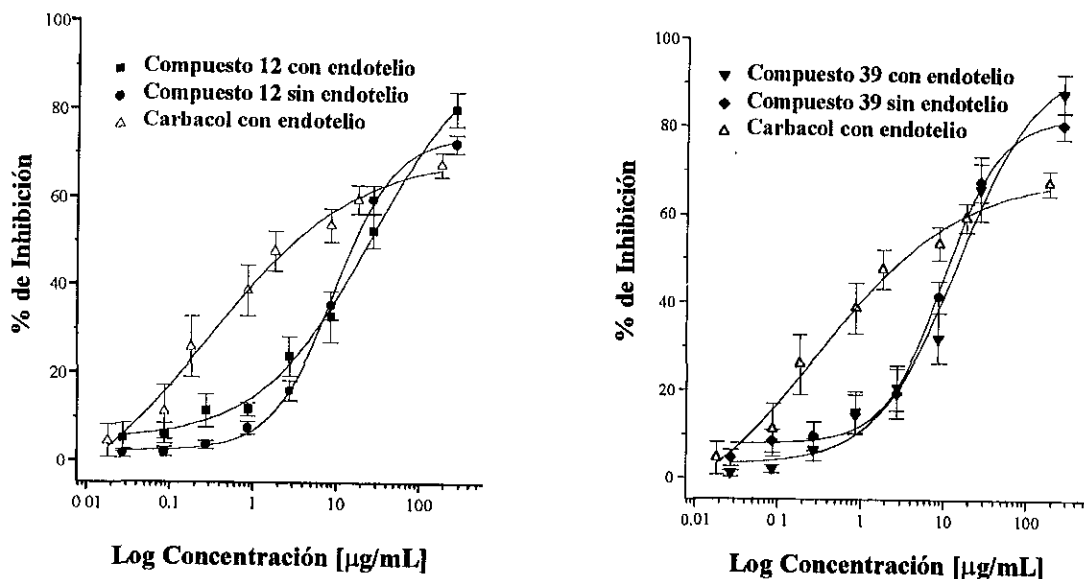


Figura 25. Curvas concentración-respuesta de la actividad relajante de los compuestos 12 y 39 sobre la contracción inducida por la noradrenalina en anillos de aorta de rata.

Estos resultados sugieren que el efecto relajante mostrado por los principios activos 12 y 39, no se encuentra relacionado con la producción de NO y GMPc en las células endoteliales de la aorta, de tal forma que el mecanismo de relajación de éstos compuestos no es dependiente de endotelio. La relajación provocada por estos productos puede ser resultado de la activación de una NOs neuronal que se expresa en las neuronas periféricas del músculo liso vascular (Andrew y Mayer, 1999; Rand y Li, 1995; Boulanger *et. al.*, 1998), o bien, a la estimulación directa de la enzima guanilato ciclasa soluble. También podría ser consecuencia de algún otro mecanismo de acción que involucre una interferencia con los receptores a NA, principales responsables de mediar la contracción en la aorta de rata.

Cuadro 21. Actividad inhibitoria demostrada por los compuestos **12** y **39** aislados de *S. livida* sobre la contracción inducida por noradrenalina en anillos de aorta de rata.

Compuesto	E_{max} (%)	CI_{50} (M)
Carbacol (aorta de rata con endotelio)	69.53 ± 5.95	1.68 x 10 ⁻⁶ ± 0.052
Compuesto 12 (aorta de rata con endotelio)	96.41 ± 9.07	9.43 x 10 ⁻⁵ ± 1.02
Compuesto 12 (aorta de rata sin endotelio)	74.00 ± 1.35	5.10 x 10 ⁻⁵ ± 0.55
Eferantol B (39) (aorta de rata con endotelio)	95.43 ± 9.20	5.42 x 10 ⁻⁵ ± 0.75
Eferantol B (39) (aorta de rata sin endotelio)	82.32 ± 3.0	3.57 x 10 ⁻⁵ ± 0.30

Valores están expresados en medias ± S.E.M.; n=6; p< 0.05

E_{max} indica el porcentaje de inhibición máxima demostrada por las muestras de prueba.

Con la finalidad de explorar con más detalle el mecanismo de acción de estos metabolitos, se decidió repetir los experimentos anteriores en presencia de L-NAME y azul de metileno (AM), inhibidores inespecíficos de la NOs y de la guanilato ciclasa, respectivamente. Los resultados que se muestran en la Figura 26 indican que ambos productos, en presencia de L-NAME o AM, inhiben la contracción inducida por NA en anillos de aorta de rata con y sin endotelio y son congruentes con un mecanismo de acción nitrérgico que involucra la activación de la NOs neuronal al igual que en el caso del ileon. La actividad relajante demostrada por los dos compuestos en estas condiciones fue dependiente de la concentración.

Las curvas concentración-respuesta de los metabolitos activos **12** y **39** se desplazaron a la derecha cuando fueron evaluados en presencia de L-NAME y AM. De manera adicional, la potencia de ambos compuestos disminuye considerablemente. Este comportamiento nos permitió establecer claramente que la inhibición provocada por los estilbenoides **12** y **39** es de tipo antagonista no competitivo. Este efecto fue mas claro en el

caso del producto **39**, requiriéndose una mayor cantidad del mismo para producir la actividad relajante.

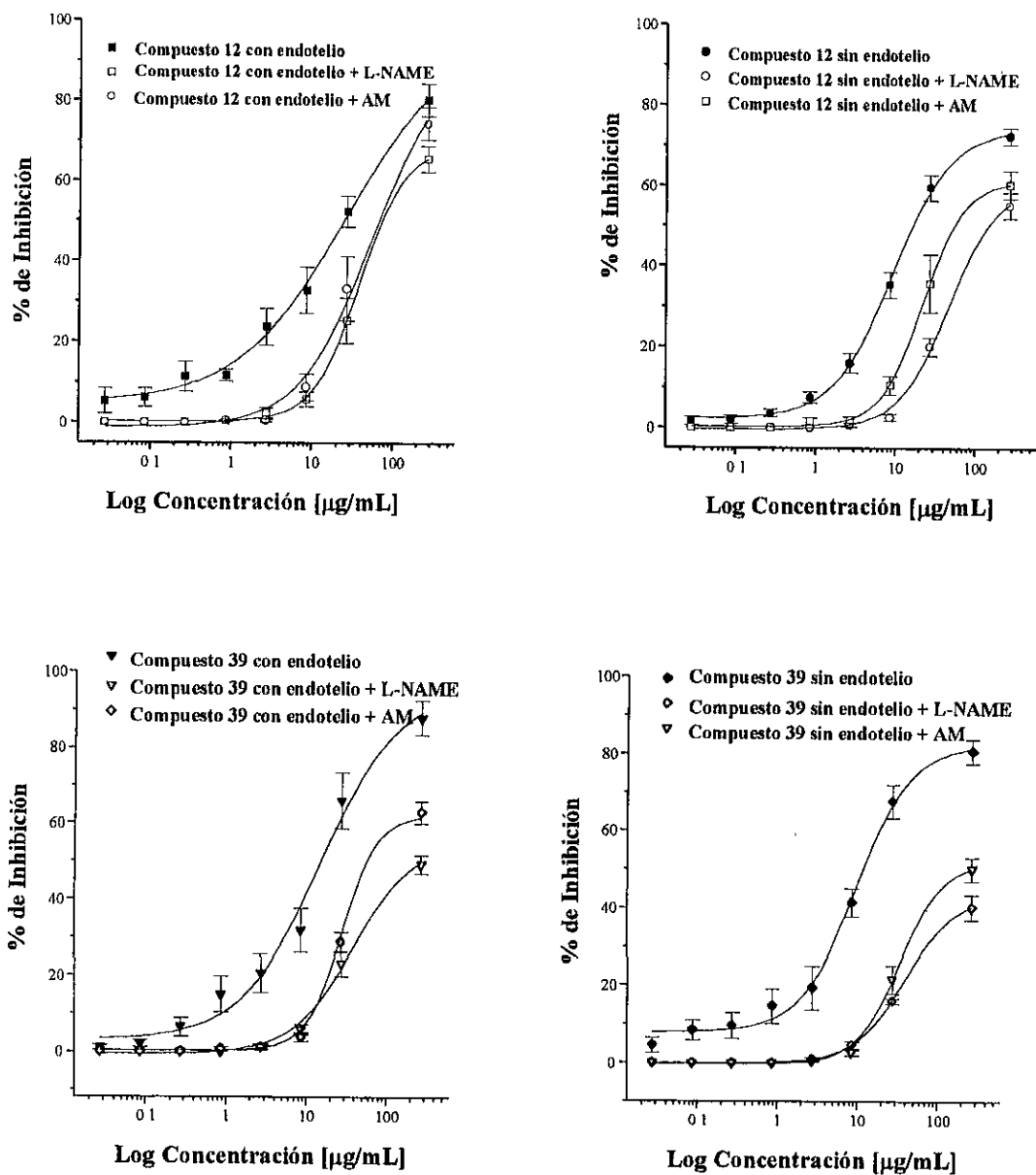


Figura 26. Curvas concentración respuesta del efecto relajante de los compuestos **12** y **39** sobre la contracción inducida por NA en presencia de L-NAME y AM en anillos de aorta de rata con y sin endotelio.

Posteriormente, se determinó el efecto de los compuestos **12** y **39** sobre la producción de GMPc en anillos de aorta de rata (Cuadro 22). Para ello, se utilizó el mismo procedimiento de radioinmunoensayo descrito para determinar la producción de GMPc en anillos de ileon de rata. Los resultados de estas evaluaciones permitieron establecer que los compuestos **12** y **39** estimulan de manera significativa la producción de GMPc intracelular, cuando fueron evaluados a la concentración de 100 µg/mL.

Cuadro 22. Efecto de los compuestos **12** y **39** sobre la generación de GMPc en anillos de aorta de rata.

Producción de GMPc inducido por los compuestos 12 y 39 (fmol/10 min/mg proteína)	
Basal (n= 7)	9908.57 ± 189.0*
Compuesto 12 (n= 9)	13314.44 ± 133.1
Basal (n= 4)	8 875.00 ± 231
Compuesto 39 (n= 4)	12606.00 ± 102.7*

P<0.01 comparado con la basal.

Con base en estos resultados se puede establecer que el efecto relajante de los estilbenoides **12** y **39** sobre la contracción inducida por NA en anillos de aorta de rata, está mediado, al menos parcialmente por el sistema NO/GMPc probablemente vía la activación de una NOs neuronal o bien a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble que se encuentra en las células musculares de los vasos sanguíneos.

V. CONCLUSIONES

1. Los resultados experimentales obtenidos en el presente estudio permitieron comprobar la hipótesis de trabajo, ya que la selección de las especies *Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa* a través de un criterio etnomédico y de los resultados preliminares de las evaluaciones farmacológicas conducentes a determinar su potencial espasmolítico, indicaron que ambas especies constituían una fuente importante de agentes antiespasmódicos. Posteriormente, el fraccionamiento biodirigido de los extractos activos condujo al aislamiento de dos triterpenoides y de once estilbenoides espasmolíticos con una potencia mayor o similar a la papaverina, agente antiespasmódico inespecífico utilizado como un control positivo.
2. Los compuestos aislados en el presente estudio se caracterizaron como: la batatasina III (**1**), el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (**12**), el efemerantol B (**39**), el nudol (**41**), la gimnopusina (**42**), el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**54**), el fimbriol A (**63**), la lusiantridina (**82**), la eriantridina (**84**), el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (**167**), el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**168**), el *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (**165**) y el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ol (**166**). La elucidación estructural de los productos antes mencionados se realizó mediante la utilización de diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los metabolitos **165**, **167** y **168** son productos naturales novedosos.
- 3 La caracterización farmacológica preliminar de los compuestos activos, utilizando diferentes espasmógenos (Ach, his y BaCl₂), permitió establecer que el modo de acción de éstos compuestos no involucra un efecto anticolinérgico o un bloqueo en la entrada de calcio al interior de la célula muscular. Los compuestos **12** y **54** presentan un efecto antihistaminérgico significativo.

4. La aplicación de la técnica de radioinmunoensayo permitió determinar que el 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo (**12**) incrementa de manera significativa los niveles de GMPc intracelular. Este efecto fue dependiente del calcio extracelular. De manera adicional, se estableció que el compuesto **12** en presencia del ODQ (inhibidor específico de la guanilato ciclasa soluble) y L-NAME (inhibidor inespecífico de las diferentes isoformas de la óxido nítrico sintetasa) no incrementa significativamente la producción de GMPc intracelular. Con base en estas evidencias, se estableció que el efecto relajante demostrado por el producto **12** es mediado por el sistema NO/GMPc.
5. El efecto relajante de los estilbenoides **12** y **39** sobre la contracción inducida por noradrenalina en anillos de aorta de rata, está mediado por el sistema NO/GMPc probablemente vía la activación de la NOs neuronal o bien mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble que se encuentra en las células musculares de los vasos sanguíneos.
6. Los bibencilos aislados de *S. livida* representan un nuevo prototipo estructural de compuestos con propiedades espasmolíticas y podrían ser de utilidad para el desarrollo de agentes medicinales novedosos con posible utilidad en la terapéutica de trastornos gastrointestinales y vasculares.
7. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, proporcionan las bases científicas del uso tradicional de estas dos especies como agentes antiespasmódicos en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

VI. PERSPECTIVAS

- 1 Completar la caracterización farmacológica de los metabolitos activos aislados de *S. livida* y *M. densa* mediante:
 - i) La determinación de su efecto en presencia de otros espasmógenos como la serotonina y la prostaglandina
 - ii) La evaluación de su efecto sobre la producción de GMPc en anillos de íleon y aorta de rata.
- 2 Con la finalidad de comprobar si el mecanismo de acción de los estilbenoides **12** y **39** involucra una estimulación de la NOs neuronal, sería pertinente realizar experimentos de tipo funcional en presencia de un inhibidor enzimático selectivo como el 7-nitroindazol.
3. Evaluar el efecto de los compuestos **12** y **39** directamente sobre la actividad de las enzimas óxido nítrico sintetasa y guanilato ciclasa soluble, y así establecer si su mecanismo de acción involucra la estimulación directa de estas enzimas.
- 4 Proponer rutas de síntesis que permitan obtener análogos estructurales del compuesto **12** con la finalidad de realizar estudios de relación estructura química-actividad biológica. Esta actividad permitiría encontrar análogos idóneos para el desarrollo de nuevos agentes espasmolíticos con posible aplicación en la terapéutica.
- 5 Continuar con el estudio sistemático de especies de orquídeas Mexicanas, con el objeto de obtener compuestos estilbenoides con una mejor actividad espasmolítica que la demostrada por los productos activos obtenidos en la presente investigación.

VII. REFERENCIAS

- Aguilar, A. y Camacho, J. R (1984) La herbolaria como recurso básico. Estadísticas nacionales En: *Medicina tradicional y Herbolaria. Materiales para su estudio*. Publicación del IMSS, México, 10-12.
- Achterrath-Tuckerman, U., Kunde, R., Flaskamp, E., Isacc, O. and Thiemer, K. (1980). Investigation on the spasmolytic effect of compounds of chamomile and kamisollan on the isolated guinea-pig ileum. *Planta Medica*, **39**, 38-50.
- Ames, O. and Correl, D. (1952). *Orchids of Guatemala*. Fieldiana Botany Chicago Natural History Museum, **26**, 12.
- Andersson, M., Bergendorff, O., Shan, R., Zygmunt, P. and Sterner, O. (1997). Minor components with smooth muscle relaxing properties from Scented Myrrh (*Commiphora guidotti*). *Planta Medica*, **63**, 251-254.
- Andrew, P. J. and Meyer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*, **43**, 521-531.
- Aria, Y , Shiojima, K. and Ageta, H. (1989). Fern constituents: cyclopodmenyl acetate, a cycloartanoid having a new 33-carbons skeleton, isolated from *Polypodium vulgare*. *Chem. Pharm. Bull* **37**, 560-562.
- Bai, L., Yamaki, M., Inoue, K. and Takagi, S. (1990). Blestrin A and B, bis (dihydrophenanthrene) ethers from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **29**, 1259-1260.
- Bai, L., Kato, T., Inoue, K., Yamaki, M. and Takagi, S. (1991). Blestrianol, A, B and C, biphenanthrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **30**, 2733-2735.
- Bai, L., Kato, T., Inoue, K., Yamaki, M. and Takagi, S. (1993). Stilbenoids from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **33**, 1481-1483.

- Bai, L., Yamaki, M., Yamagata, Y. and Takagi, S. (1996). Shanciol, a dihydrophenanthropyran from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **41**, 625-628.
- Bai, L., Yamaki, M. and Takagi, S. (1996). Stilbenoids from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **42**, 853-856.
- Bai, L., Masukawa, N., Yamaki, M. and Takagi, S. (1997). Two bibenzyl glucosides from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **44**, 1565-1567.
- Bai, L., Masukawa, N., Yamaki, M. and Takagi, S. (1998). A polyphenol and two bibenzyls from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **47**, 1637-1640.
- Bai, L., Masukawa, N., Yamaki, M. and Takagi, S. (1998). Four stilbenoids from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **48**, 327-331.
- Barthó, L. and Lefebvre, R. A. (1995). Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle. *Arch. Int. pharmacodyn*, **329**, 53-66.
- Baxter, H. (1994). Stilbenoids. En: *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. Ed. Taylor and Francis. London. 509-518.
- Bergendorff, O. and Sterner, O. (1995). Spasmolytic flavonols from *Artemisia abronatum*. *Planta Medica*, **61**, 370-371.
- Bergstrom, G., Birgersson, G., Groth, I. and Nilsson, A. (1992). Floral fragrance disparity between three taxa of lady's slipper *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). *Phytochemistry*, **31**, 2315-2319.
- Bewick, P. M. (1997). *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*. John Wiley and Sons. 71-72.
- Bhandari, S. R. and Kapadi, A. H. (1983). A 9,10-dihydrophenanthrene from tubers of *Eulophia nuda*. *Phytochemistry*, **22**, 747-748.

- Bhandari, S. R., Kapadi, A. H., Majumder, P. L., Joardar, M. and Shoolery, J. N. (1985). Nudol, a phenanthrene of the Orchids *Eulophia nuda*, *Eria carinata* and *Eria stricta*. *Phytochemistry*, **24**, 801-804.
- Bhat, S. V. Minale, L., Riccio, R. and Zollo, F. (1993) Forskolin and congeners. En: *Progress in the chemistry of organic natural products*. **62**, 3-61.
- Bolton, T. B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and others substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* **59**, 606-718.
- Boulanger, Ch. M., Heymes, C., Benessiano, J., Geske, R. S., Levy, B. I. and Vanhoutte, P. M. (1998). Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **83**, 1271-1278.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosy. Phytochemistry medicinal plants*. Lavoisier Publishing, Paris, second edition.
- Capasso, A., Pinto, A., Mascolo, N. Autore, G. and Capasso, F. (1991). Reduction of agonista-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother. Res.*, **5**, 85-87.
- Carmona, G. (1995 y 1996). Comunicación personal.
- Conner, E. M. and Grisham, M. B. (1995). Nitric oxide: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. En: *Methods: A companion to methods in enzymology*, **7**, 3-13.
- Cooke, J. P., Dzau, V. J. (1997). Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Annu. Rev. Med.*, **48**, 489-509.
- Cox, P. A. and Balick, M. J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, june, 82-87.

- Den Hertog, A., Pielkenrood, J. and Van Den Akker, J. (1985). The effect of forskolin on smooth muscle cells of guinea-pig. *Taenia cacci. Eur. J. Pharmacol.*, **106**, 181-184.
- Dewick, P. M. (1997). *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*. John Wiley and Sons, England.
- Dressler, L.R. (1981). *The orchis. Natural history and classification*. Harvard University press. London, 50-159.
- Dressler, L. R. (1993). *Phylogeny and classification of the Orchid family*. Discorides Press., 13-57.
- Estrada, S., Toscano, R. A. and Mata, R. (1999). New phenanthrene derivatives from *Maxillaria densa*. *J. Nat. Prod.*, **62**, 1175-1178.
- Evans, W. C. (1991). Trease y Evans, *Farmacognosia*. Interamericana-McGraw Hill, 13a edición.
- Ferro, C. J. and Webb, D. J. (1997). Endothelial dysfunction and hypertension. *Drugs*, **53**, 30-41.
- Fleming, I. and Busse, R. (1999). Signal transduction of eNOs activation. *Cardiovascular research*, **43**, 532-541.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B. Schmidt, K. and Mayer, B. (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4] oxadiazolo -[4, 3a] quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*, **48**, 184-188.
- Gehlert, R. and Kindl, H. (1991). Induced formation of dihydrophenanthrenes and bibenzyls synthase upon destruction of Orchid mycorrhiza. *Phytochemistry*, **30**, 457-460.

- Gilman, A. G , Rall, T W., Niles, A. S. y Taylor, P. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed. Panamericana. México, D. F.
- Godfrain, T., Miller, R. and Wibo, M. (1986) Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharm. Rev.*, **38**, 321-415.
- Gorham, J. (1995). *The Biochemistry of the stilbenoids*. Chapman and Hall, first edition, London.
- Harrison, D. G. (1997). Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthases. *J. Clin. Invest.* **100**, 2153-2157.
- Harborne, J. B. and Williams, C A (1994). Recent advances in the chemosystematics of the monocotyledons. *Phytochemistry*, **37**, 3-18.
- Hashimoto, T. and Hasegawa, K. (1974). Structure and synthesis of batatasins, dormancy-inducing substances of yam bulbils. *Phytochemistry*, **13**, 2849-2852.
- Hausen, B. M. (1984). Toxic and allergenic Orchids. En: *Orchid Biology Reviews and Perspective III*. Cornell University Press., **6**, 262-282.
- Heinemann, A. and Holzer, P. (1999). Intestinal motor depression by 7-nitroindazole through an action unrelated to nitric oxide synthase inhibition. *Pharmacology*, **59**, 310-320
- Herbert, R. B. (1989). *The biosynthesis of secondary metabolites*. Second edition, Chapman and Hall, London, 97-119.
- Herrera, M. D., Marhuenda, E. and Gibson, A. (1992). Effects of genistein, an isoflavone isolated from *Genista tridentata*, on isolated guinea-pig ileum and guinea-pig ileal myenteric plexus. *Planta Medica*, **58**, 314-316.

- Hietz, P. and Hietz-Seifert, V. (1994). *Epífitas de Veracruz. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas, Ver.* Instituto de Ecología A. C. 1ª edición.
- Hobbs, A. J., Higgs, A. and Moncada, S. (1999). Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 191-220.
- Holzer, P., Lippe, I., Tabrizi, A. L., Lenard, L. and Barthó, L. (1997). Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine. *J. Pharm. and Exp. Therap.*, **280**, 154-161.
- Ibrahim, R. K. and Towers, G. H. N. (1960). Studies of hydrangenol in *Hydrangea macrophylla* Ser. I. Isolation, identification and biosynthesis from C14-labelled components. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **38**, 627-634.
- Juneja, R. K., Sharma, S. C. and Tandon, J. S. (1987). Two substituted bibenzyls and a dihydrophenanthrene from *Cymbidium aloifolium*. *Phytochemistry*, **26**, 1123-1125.
- Kadota, S., Shima, T. and Kikuchi, T. (1987). Studies on the constituents of Orchidaceous plants VII. The C-24 stereochemistry of cyclohomonervilol and 24-isopropenylcholesterol, non-conventional side chain triterpene and sterol, from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 200-210.
- Kanada, A., Hata, F., Suthamnatpong, N., Maehara, T., Ishii, T., Takeuchi, T., Yagasaki, O. (1992). Key roles of nitric oxide and cyclic GMP in nonadrenergic and noncholinergic inhibition in rat ileum. *Europ. J. Pharm.*, **216**, 287-292.
- Kating, B. G. and Trevor, A. J. (1998). *Examination and board review. Pharmacology.* Appleton and Lange, Stanford, Conneticut, fifth edition.
- Katzung, B. G. (1992). *Basic and clinical pharmacology.* Appleton and Lange, fifth edition.

- Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. and Namba, T. (1981). New triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter, and Orchidaceous plant structures of cyclonervilol and cyclohomonervilol and chemical correlation with cycloeucalenol. *Tetrahedron Lett* , **22**, 465-468.
- Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. and Shima, T. (1985). Studies on the constituents of Orchidaceous plants II. Isolation, structures, and stereochemistry of cyclohomonervilol, and dihydrocycloeucalenol C-24 epimers, new triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1914-1929.
- Kikuchi, T., Kadota, S., Matsuda, S. and Suehara, H. (1986). Studies on the constituents of Orchidaceous plants V. Isolation, structure, and C-13 signal assignments of novel methylsterols from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3183-3201.
- Kindl, H. (1985). Biosynthesis of stilbenes. En: *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*. Academic Press, New York, pp. 349-377.
- Kirimer, N., Tunalier, Z., Baser, K. and Cingi, I. (1997). Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and taraxasteryl acetate on isolated ileum preparations. *Planta Medica*, **63**, 556-558.
- Kodja, G. and Harrison, D. (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular research*, **43**, 562-571.
- Lee, Y. H., Park, J. D., Baek, N. I., Kim, S.I. and Ahn, B. Z. (1995). *In vitro* and *in vivo* antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta medica*, **61**, 178-180.

- Leong, Y. W., Kang, C. C., Harrison, L. J. and Powell, A. D. (1997). Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the Orchid *Bulbophyllum vaginatum*. *Phytochemistry*, **44**, 157-165.
- Lloyd-Jones, D. M. and Bloch, K.D. (1996). The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu. Rev. Med.*, **47**, 365-375.
- Letcher, R. M., Nhamo, R. M. and Gumiro, I. T. (1972). Chemical constituents of the Combretaceae. Part II. Substituted phenanthrenes and 9,10-dihydrophenanthrenes and a substituted bibenzyl from the Heartwood of *Combretum molle*. *J. C. S., Perkin I*, 206-210.
- Letcher, R. M. (1973). Structure and synthesis of the growth inhibitor batatasin I from *Dioscorea batatas*. *Phytochemistry*, **12**, 2789-2790.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951). Protein enzymation with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lozoya, X., Aguilar, A. y Camacho, J. R. (1987). Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional Mexicana. *Rev. Med. IMSS (Mex)*, **25**, 283-291.
- Majumder, P. L. and Laha, S. (1981). Occurrence of 2,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene in *Coelogyne ovalis*, a high altitude Himalayan Orchid: application of C-13 NMR Spectroscopy in structure elucidation. *J. Indian Chem. Soc.*, **43**, 928-929.
- Majumder, P. L., Bandyopadhyay, D. and Joardar, S. (1982). Coelogin and coeloginin: two novel 9,10-dihydrophenanthrene derivatives from the Orchid *Coelogyne cristata*. *J. C. S. Perkin I*, 1131-1136.

- Majumder, P. L. and Datta, N. (1982). Structures of flavidin and oxoflavidin, two new modified 9,10-dihydrophenanthrenes of the Orchid *Coelogyne flavida* *Indian J. Chem* , **21B**, 534-536.
- Majumder, P. L., Datta, N., Sarkar, A. K. and Chakraborti, J. (1982). Flavidin, a novel 9,10-dihydrophenanthrene derivative of the Orchids *Coelogyne flavida*, *Pholidota articulata* and *Otochilus fusca*. *J. Nat. Prod.*, **45**, 730-732.
- Majumder, P. L., Laha, S. and Datta, N. (1982). Coelonin, a 9,10-dihydrophenanthrene from the Orchids *Coelogyne ochracea* and *Coelogyne elata*. *Phytochemistry*, **21**, 478-480.
- Majumder, P. L. and Sarkar, A. K. (1982). Imbricatin, a new modified 9,10-dihydrophenanthrene derivative of the Orchid *Pholidota imbricata*. *Indian J. Chem.*, **21B**, 829-831.
- Majumder, P. L., Sarkar, A. S. and Chakraborti, J. (1982). Isoflavidin and iso-oxoflavidin, two 9,10-dihydrophenanthrenes from the Orchids *Pholidota articulata*, *Otochilus porecta* and *Otochilus fusca*. *Phytochemistry*, **21**, 2713-2716.
- Majumder, P. L. and Datta, N. (1984). Structure of oxoflavidin, a 9,10-dihydrophenanthropyrone from *Coelogyne elata*. *Phytochemistry*, **23**, 671-673.
- Majumder, P. L. and Joardar, M. (1984). Structure of erianin, a new bibenzyl derivative from the Orchid *Eria carinata*. *Indian J. Chem.*, **23B**, 1040-1042.
- Majumder, P. L. and Chakraborti, J. (1985). Structures of cyclootochilone and otochilone, two novel steroidal ketones of the Orchids *Otochilus porecta* and *Otochilus fusca*. *Tetrahedron*, **41**, 4973-4978.

- Majumder, P. L. and Joardar, M. (1985). Erianthridin, a new 9,10-dihydrophenanthrene derivative from the Orchids *Eria carinata* and *Eria stricta*. *Indian J. Chem.* **24B**, 1192-1194.
- Majumder, P. L. and Pal, A. (1985). 24-methylene cycloartanyl-*p*-hydroxycinnamate from the orchid *Cirrhopetalum elatum*. *Phytochemistry*, **24**, 2120-2122.
- Majumder, P. L., Kar, A. and Shoolery, J. N. (1985). Bulbophyllanthrin, a phenanthrene of the Orchid *Bulbophyllum leopardium*. *Phytochemistry*, **24**, 2083-2087.
- Majumder, P. L. and Kar, A. (1987). Confusarin and confusaridin, two phenanthrene derivatives of the Orchid *Eria confusa*. *Phytochemistry*, **26**, 1127-1129.
- Majumder, P. L. and Sen, R. C. (1987). Structure of moscatin-a new phenanthrene derivative from the Orchid *Dendrobium moscatum*. *Indian J. Chem.*, **26B**, 18-20.
- Majumder, P. L. and Sen, R. C. (1987). Moscatilin, a bibenzyl derivative from the Orchid *Dendrobium moscatum*. *Phytochemistry*, **26**, 2121-2124.
- Majumder, P. L. and Banerjee, S. (1988). A ring-B oxygenated phenanthrene derivative from the Orchid *Bulbophyllum gymnopus*. *Phytochemistry*, **27**, 245-248.
- Majumder, P. L. and Banerjee, S. (1988). Structure of flavanthrin, the first dimeric 9,10-dihydrophenanthrene derivative from the Orchid *Eria flava*. *Tetrahedron*, **44**, 7303-7308.
- Majumder, P. L. and Maiti, D. C. (1988). Flaccidin, a 9,10-dihydrophenanthropyran derivative from the Orchid *Coelogyne flaccida*. *Phytochemistry*, **27**, 899-901.
- Majumder, P. L. and Sabzabadi, E. (1988). Agrostophyllin, a naturally occurring phenanthropyran derivative from *Agrostophyllum khasiyanum*. *Phytochemistry*, **27**, 1899-1901.

- Majumder, P. L. and Banerjee, S. (1989). Revised structure of gymnopusin, a ring-B oxygenated phenanthrene derivative isolated from the Orchid *Bulbophyllum gymnopus*. *Indian J. Chem.*, **28B**, 1085-1088.
- Majumder, P. L. and Chatterjee, S. (1989). Crepidatin, a bibenzyl derivative from the Orchid *Dendrobium crepidatum*. *Phytochemistry*, **28**, 1986-1988.
- Majumder, P. L. and Kar, A. (1989). Erianol, a 4 α -methylsterol from the Orchid *Eria convallarioides*. *Phytochemistry*, **28**, 1487-1490.
- Majumder, P. L. and Maiti, D. C. (1989). Flaccidin and oxoflaccidin, two phenanthrene derivatives of the Orchid *Coelogyne flaccida*. *Phytochemistry*, **28**, 887-890.
- Majumder, P. L. and Banerjee, S. (1990). Two stilbenoids from the Orchid *Eria flava*. *Phytochemistry*, **29**, 3052-3055.
- Majumder, P. L. and Basak, M. (1990). Cirrhopetalin, a phenanthrene derivative from *Cirrhopetalum andersonii*. *Phytochemistry*, **29**, 1002-1004.
- Majumder, P. L. and Lahiri, S. (1990). Lusianthrin and lusianthridin, two stilbenoids from the Orchid *Lusia indivisa*. *Phytochemistry*, **29**, 621-624.
- Majumder, P. L. and Lahiri, S. (1990). Volucrin, a new dimeric phenanthrene derivative from the Orchid *Lusia volucris*. *Tetrahedron*, **46**, 3621-3626.
- Majumder, P. L. and Pal, S. (1990). A steroidal ester from *Coelogyne uniflora*. *Phytochemistry*, **29**, 2717-2720.
- Majumder, P. L., Pal, A. and Joardar, M. (1990). Cirrhopetalanthrin, a dimeric phenanthrene derivative from the Orchid *Cirrhopetalum maculosum*. *Phytochemistry*, **29**, 271-274.

- Majumder, P. L. and Basak, M. (1991). Two bibenzyl derivatives from the Orchid *Cirrhopetalum andersonii*. *Phytochemistry*, **30**, 321-324.
- Majumder, P. L. and Basak, M. (1991). Two stilbenoids from the Orchid *Cirrhopetalum andersonii*. *Phytochemistry*, **30**, 3429-3432.
- Majumder, P. L. and Maiti, D. C. (1991). Isoflaccidin and isooxoflaccidin, stilbenoids from *Coelogyne flaccida*. *Phytochemistry*, **30**, 971-974.
- Majumder, P. L. and Sen, R. C. (1991). Bulbophyllanthrone, a penanthraquinone from *Bulbophyllum odoratissimum*. *Phytochemistry*, **30**, 2092-2094.
- Majumder, P. L. and Sen, R. C. (1991). Pendulin, a polyoxygenated phenanthrene derivative from the Orchid *Cymbidium pendulum*. *Phytochemistry*, **30**, 2432-2434.
- Majumder, P. L. and Pal, S. (1992). Rotundatin, a new 9,10-dihydrophenanthrene derivative from *Dendrobium rotundatum*. *Phytochemistry*, **31**, 3225-3228.
- Majumder, P. L. and Ghosal, S. (1993). Two stilbenoids from the Orchid *Arundina bambusifolia*. *Phytochemistry*, **32**, 439-444.
- Majumder, P. L. and Pal, S. (1993). Cumulatin and tristin, two bibenzyl derivatives from the Orchids *Dendrobium cumulatum* and *Bulbophyllum triste*. *Phytochemistry*, **32**, 1561-1565.
- Majumder, P. L. and Ghosal, S. (1994). Two stilbenoids from the Orchid *Arundina bambusifolia*. *Phytochemistry*, **35**, 205-208.
- Majumder, P. L., Banerjee, S., Maiti, D. C. and Sen, S. (1995). Stilbenoids from the Orchids *Agrostophyllum callosum* and *Coelogyne flaccida*. *Phytochemistry*, **39**, 649-653.

- Majumder, P. L., Lahiri, S. and Mukhoti, N. (1995). Chalcone and dihydrochalcone derivatives from the Orchid *Lusia volucris*. *Phytochemistry*, **40**, 271-274.
- Majumder, P. L., Banerjee, S. and Sen, S. (1996). Three stilbenoids from the Orchid *Agrostophyllum callosum*. *Phytochemistry*, **42**, 847-852.
- Majumder, P. L., Lahiri, S. and Mukhoti, N. (1996) Four stilbenoids from the Orchid *Agrostophyllum khasiyanum*. *Phytochemistry*, **42**, 1157-1161.
- Majumder, P. L., Roychowdhury, M. and Chakraborty, S. (1997). Bibenzyl derivatives from the Orchid *Bulbophyllum protractum*. *Phytochemistry*, **44**, 167-172.
- Majumder, P. L., Banerjee, S., Lahiri, S., Mukhoti, N. and Sen, S. (1998). Dimeric phenanthrenes from two *Agrostophyllum* species. *Phytochemistry*, **47**, 855-860.
- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, I., Bye, R. and Linares, E. (1997). Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Medica*, **63**, 31-36.
- Mathison, Y. and Israel, A. (1998). Endothelin ET (B) receptor subtype mediates nitric oxide/cGMP formation in rat adrenal medulla. *Brain Res. Bull.* **45**, 15-19.
- McVaugh, R. (1985). *Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of western México*. The University of Michigan press., **16**, 1-5.
- Michel, T. and Feron, O. (1997). Perspective series: Nitric oxide and Nitric Oxide synthases. Nitric oxide synthases: Which, where, how and why?. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2146-2152.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.

- Morales, M. A. y and Lozoya, X. (1994). Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle. *Planta Medica*, **60**, 313-317.
- Moro, M. A., Russell, R. J., Celtek, S., Lizasoain, I., Su, Y., Darley-USmar, V. M., Radomski, M. W. and Moncada, S. (1996). CGMP mediates de vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 1480-1485.
- Okamoto, T., Natsume, M., Onaka, T., Uchimaru, F. and Shimizu, M. (1966). The structure of dendroxine. The third alkaloid from *Dendrobium nobile*. *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 672-675.
- Olgart, C., Wiklund, N. P. and Gustafsson, L. E. (1997). Blockade of nitric oxide evoked smooth muscle contractions by an inhibitor of guanylyl cyclase. *Neuro Report*, **8**, 3355-3358.
- Onaka, T., Kamata, S., Maeda, T., Kawazoe, Y., Natsume, M., Okamoto, T., Uchimaru, F. and Shimizu, M. (1965). The structure of nobilonine. The second alkaloid from *Dendrobium nobile*. *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 745-747.
- Papapetropoulos, A., Rudic, R. D. and Sessa, W. C. (1999). Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*, **43**, 509-520.
- Petit, G. R. Singh, S. B. and Schmidt, J. M. (1988). Isolation, structure, synthesis and antimitotic properties of combretastatins B-3 and B-4 from *Combretum cafferum*. *J. Nat. Prod.*, **51**, 517-527.
- Pongprayoon, U., Baeckstrom, P., Jacobson, U., Lindstrom, M., and Bohlin, L. (1992). Antispasmodic activity of β -damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica*, **58**, 19-21.

- Rand, M. J. and Li, C. G. (1995). Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: Nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 659-682
- Rojas, A. (1995). Tesis de doctorado Determinación de los agentes relajantes de la musculatura lisa de la planta medicinal *Dodonea viscosa* (L.) JACQ. (Sapindaceae). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rojas, A., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R., Linares, E. and Mata, R. (1995). Spasmolytic potential of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, **2**, 51-55.
- Rojas, A., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R., Linares, F. and Mata, R. (1996). Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonea viscosa*. *Planta Medica*, **62**, 154-155.
- Sachdev, K. and Kulshreshtha, K. (1986). Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis*. *Phytochemistry*, **25**, 499-502.
- Samuelsson, G. (1991). Assay for pharmacological activity: Non specific assays. En: *Methods in Plant biochemistry*, **6**, 261-268.
- Sanders, K. M. and Ward, S. M. (1992). Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Amer. J. Physiol.*, **262**, G679-G392.
- Seitz, U., Ameri, A., Pelzer, H., Gleitz, J. and Peters, T. (1997). Relaxation of evoked contractil activity of isolated guinea-pig ileum by (\pm) kavain. *Planta medica*, **63**, 303-306.
- Shah, A. M., Vallance, P. and Harrison, D. (1999). NO in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*, **43**, 507-508.

- Sheridan, H. Frankish, N. and Farrell, R. (1999). Smooth muscle relaxant activity of pterozin Z and related compounds. *Planta Medica*, **65**, 271-272.
- Shimizu, M., Shogawa, H., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I. and Berganza, L. H. (1988). Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs III. Constituents and anti-inflammatory effect of paraguayan crude drug "Tamandá cuná" (*Catasetum barbatum* Lindle). *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4447-4452.
- Slaytor, M. B. (1977). The distribution and chemistry of alkaloids in the Orchidaceae. En: *Orchid biology reviews and perspectives I*. Cornell University press. **4**, 96-114.
- Snyder, S. H. and Bredt, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, May, 68-77.
- Speisky, H., Squella, J. and Núñez-Vergara, L. J. (1991). Activity of boldine on rat ileum. *Planta Medica*, **57**, 519-522.
- Stahl, E. (1969). *Thin layer chromatography*. Academic Press Inc. New York.
- Steiner, A. Pagliara, A. S., Chase, L. R. and Kipnis, D. M. (1972). Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids *J. Biol. Chem.*, **247**, 1114-1120.
- Stermitz, F. R., Suess, T. R., Schauer, C. K. and Anderson, O. P. (1983). New and old phenanthrene derivatives from *Oncidium cebolleta*, a peyote-replacement plant. *J. Nat. Prod.* **46**, 417-423.
- Stoessl, A. and Arditti, J. (1984). Orchid phytoalexins. En: *Orchid biology reviews and perspectives III*. Cornell University Press. **3**, 152-175.

- Takagi, S., Yamaki, M. and Inoue, K. (1983). Antimicrobial agents from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **22**, 1011-1015.
- Talapra, B., Mukhopadhyay, P., Chaudhury, P. and Talapra, S. K. (1982). Denbinobin, a new phenanthroquinone from *Dendrobium nobile* Lindl (Orchidaceae). *Indian J. Chem.* **21B**, 386-387.
- Tezuka, Y., Ueda, M. and Kikuchi, T. (1989). Studies on the constituents of Orchidaceous plants VIII. Constituents of *Spiranthes sinensis* (PERS.) AMES var. Amoena (M. BIEBERSON) HARA (1). Isolation and structure elucidation of spiranthol-A, spiranthol-B, and spirasineol-A, new isopentenylidihydrophenanthrenes. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3195-3199.
- Tezuka, Y., Ji, L., Hirano, H., Ueda, M., Nagashima, K. and Kikuchi, T. (1990). Studies on the constituents of Orchidaceous plants IX. Constituents of *Spiranthes sinensis* (PERS.) AMES var. amoena (M. BIEBERSON) HARA. (2). Structures of spiranthesol, spiranthoquinone, spiranthol-C, and spirasineol-B, new isopentenylidihydrophenanthrenes. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 629-635.
- Tezuka, Y., Hirano, H., Kikuchi, T. and Xu, G. J. (1991). Constituents of *Ephemerantha lonchophylla*; isolation and structure elucidation of new phenolic compounds, ephemeranthol-A, ephemeranthol-B, and ephemeranthoquinone, and of a new diterpene glucoside, ephemeranthoside. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 593-598.
- Tezuka, Y., Yoshida, Y., Kikuchi, T. and Xu, G-J. (1993). Constituents of *Ephemerantha fimbriata*. Isolation and structure elucidation of two new phenanthrenes, fimbriol A and fimbriol B, and a new dihydrophenanthrene, ephemeranthol-C. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1346-1349.

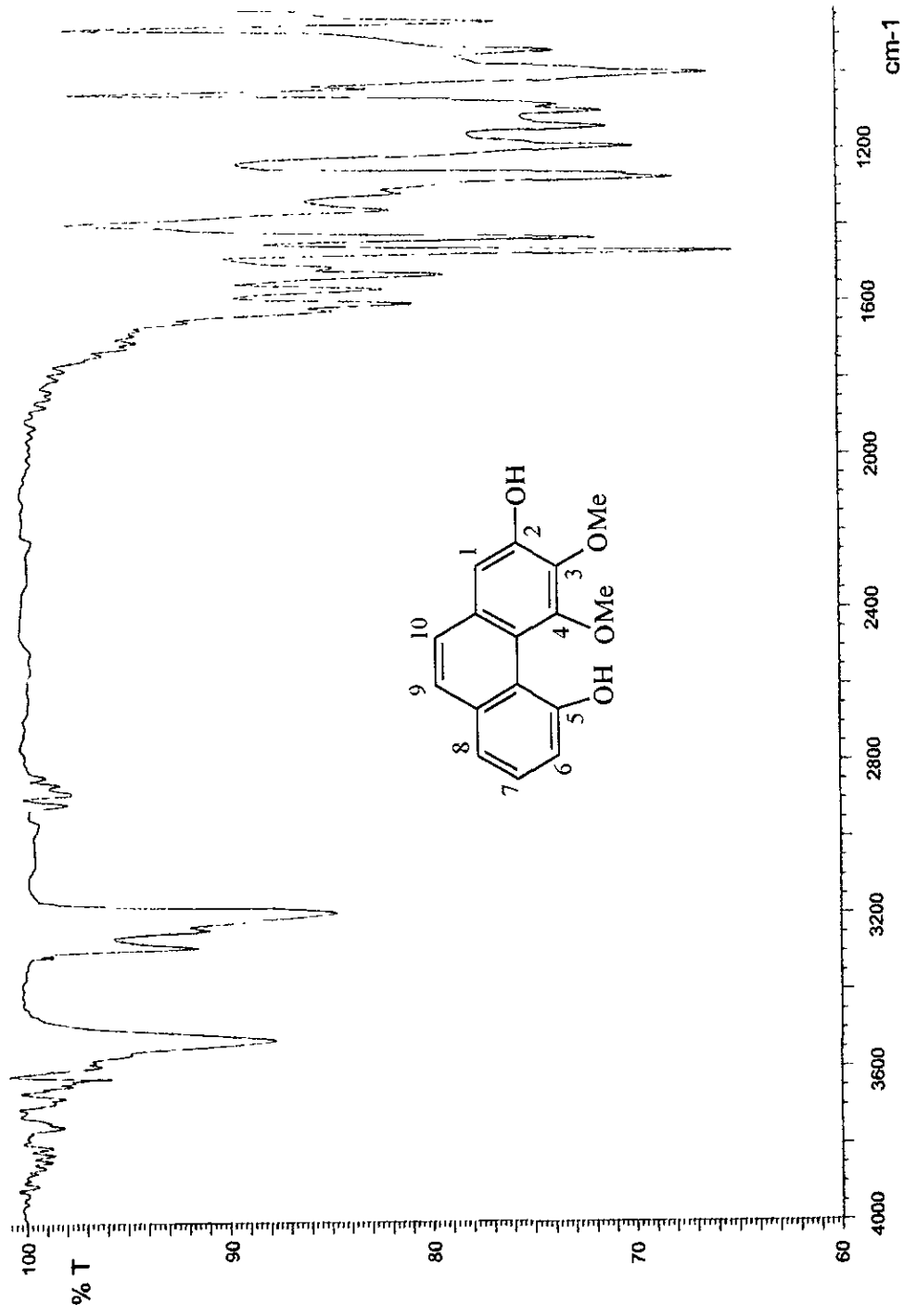
- Trute, A., Gross, J., Muts, E. and Nahrsteat, A. (1997). *In vitro* antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta medica*, **63**, 125-129.
- Tuchinda, P., Udchachon, J., Khumtaveeporn, K., Taylor, W. C., Engelhardt, L. M. and White, A. H. (1988). Phenanthrenes of *Eulophia nuda*. *Phytochemistry*, **27**, 3267-3271.
- Tyler, V. E. (1989). *Pharmacognosy*. 8a. ed. Editorial Lea and Fegiber, USA.
- Van Den Broucke, C. O. And Lemli, J. A. (1982). Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. *Planta Medica*, **45**, 188-190.
- Veerraju, P., Prakasa Rao, N. S., Jaganmohana Rao, L., Jagannadha Rao, K. V. and Mohana Rao, P. R. (1989). Amoenumin, a 9,10-dihydro-5*H*-phenanthro- (4,5-*b,c,d*)-pyran from *Dendrobium amoenum*. *Phytochemistry*, **28**, 950-951.
- Veerraju, P., Prakasa Rao, N. S., Jaganmohana Rao, L., Jagannadha Rao, K. V. and Mohana Rao, P. R. (1989). Bibenzyls and phenanthrenoids of some species of Orchidaceae. *Phytochemistry*, **28**, 3031-3034.
- Villalobos-Molina, R. and Ibarra, M. (1996). α_1 -adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the α_{1D} or α_{1A} subtypes. *Europ. J. Pharmacol.*, **298**, 257-263.
- Williams, C. A. (1979). The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry*, **18**, 803-813.
- Williams, C. A. Toscano de Brito, A. L. Harborne, J. B., Eagles, J. and Waterman, P. G. (1994). Methylated C-glycosylflavones as taxonomic markers in Orchids of the subtribe Ornithocephalinae. *Phytochemistry*, **37**, 1045-1053.

- Williamson, M. E., Ukpako, T. D. and Evans, J. F. (1996). Pharmacological methods in phytotherapy research. Selection, preparation, and Pharmacological evaluation of plant material. John Wiley and Sons, New York, 1-46.
- Wrigley, T. C. (1960). Ayapin, scopoletin, and 6,7-dimethoxy-coumarin from *Dendrobium thyrsiflorum* *Nature*, **188**, 1108-1115.
- Yamaki, M., Bai, L., Inoue, K. and Takagi, S. (1989). Biphenanthrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **28**, 3503-3505.
- Yamaki, M., Bai, L., Inoue, K. and Takagi, S. (1990). Benzylphenanthrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **29**, 2285-2287.
- Yamaki, M., Kato, T., Bai, L., Inoue, K. and Takagi, S. (1991). Methylated stilbenoids from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **30**, 2759-2760.
- Yamaki, M., Bai, L., Kato, T., Inoue, K., Takagi, S., Yamagata, Y. and Tomita, K-I. (1992). Bisphenanthrene ethers from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **31**, 3985-3987.
- Yamaki, M., Bai, L., Kato, T., Inoue, K., Takagi, S., Yamagata, Y. and Tomita, K-I. (1993). Blespirol, a phenanthrene with a spirolactone ring from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **33**, 1497-1498.
- Yamaki, M., Bai, L., Kato, T., Inoue, K. and Takagi, S. (1993). Three dihydrophenanthropyrans from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **32**, 427-430.
- Yamaki, M. and Honda, C. (1996). The stilbenoids from *Dendrobium plicatile*. *Phytochemistry*, **43**, 207-208.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Sakurama, T., Matsuda, H., Nomura, M., Matsuda, H. and Kubo, M. (1998). Novel indole *S,O*-bisdesmoside, calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin and isatin, with increasing skin blood

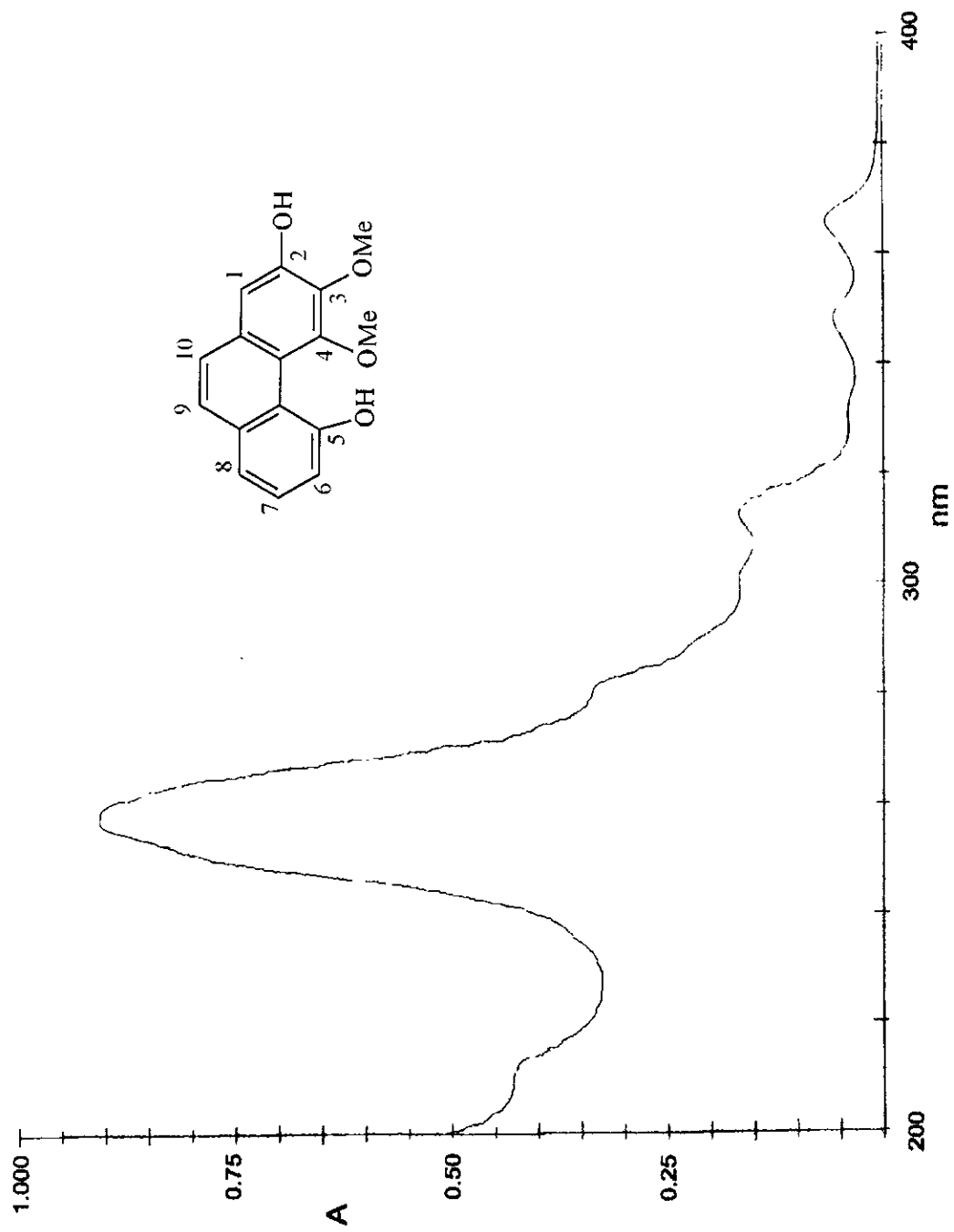
flow promoting effects, from two *Calanthe* species (Orchidaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 886-888.

- Zygmunt, P. M., Larsson, B., Sterner, O., Vinge, E. and Hogestatt, E. (1993). Calcium antagonistic properties of the sesquiterpene T-cadinol and related substances: Structure-activity studies. *Pharmacognosy and Toxicology*, **73**, 3-9.

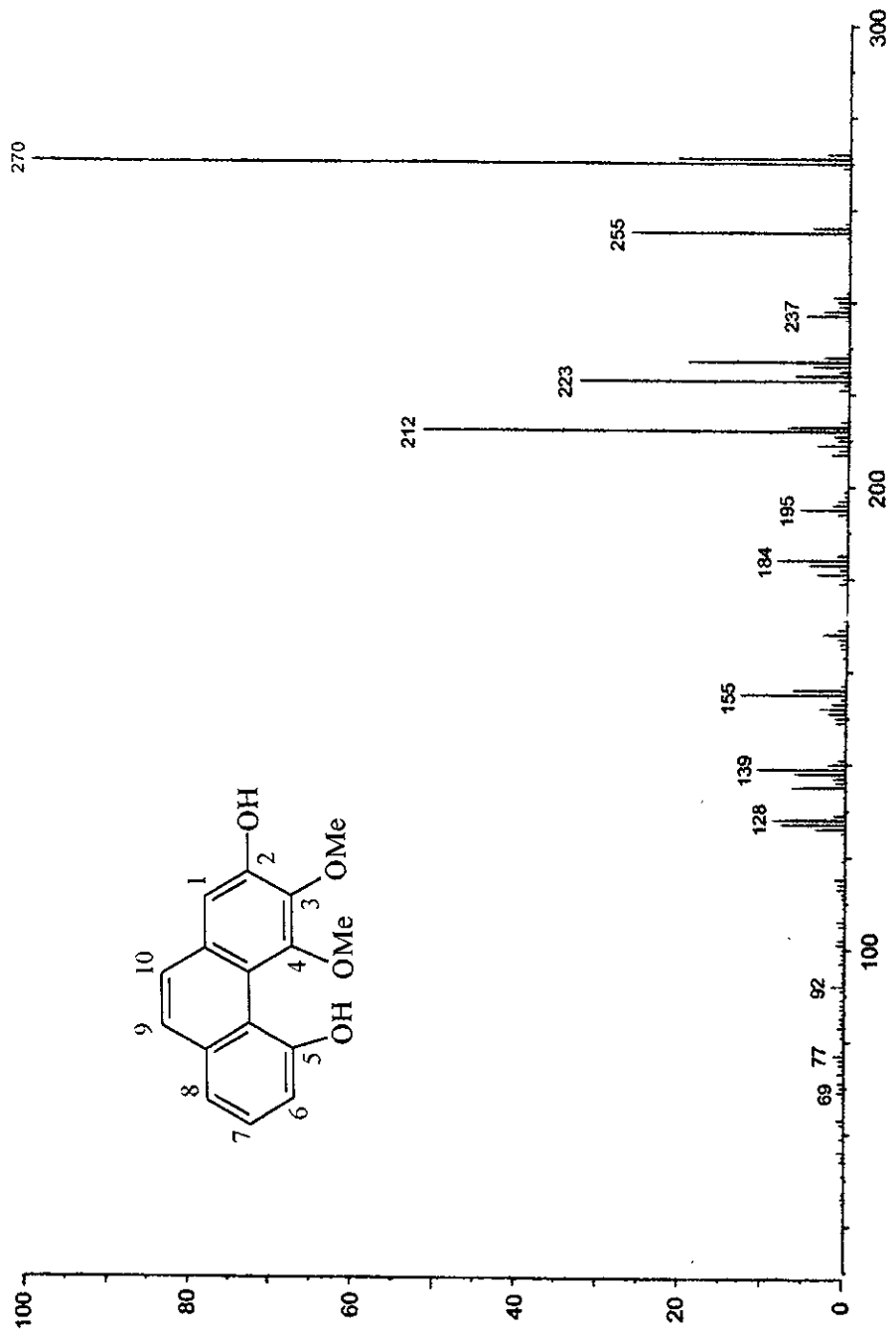
ANEXO I



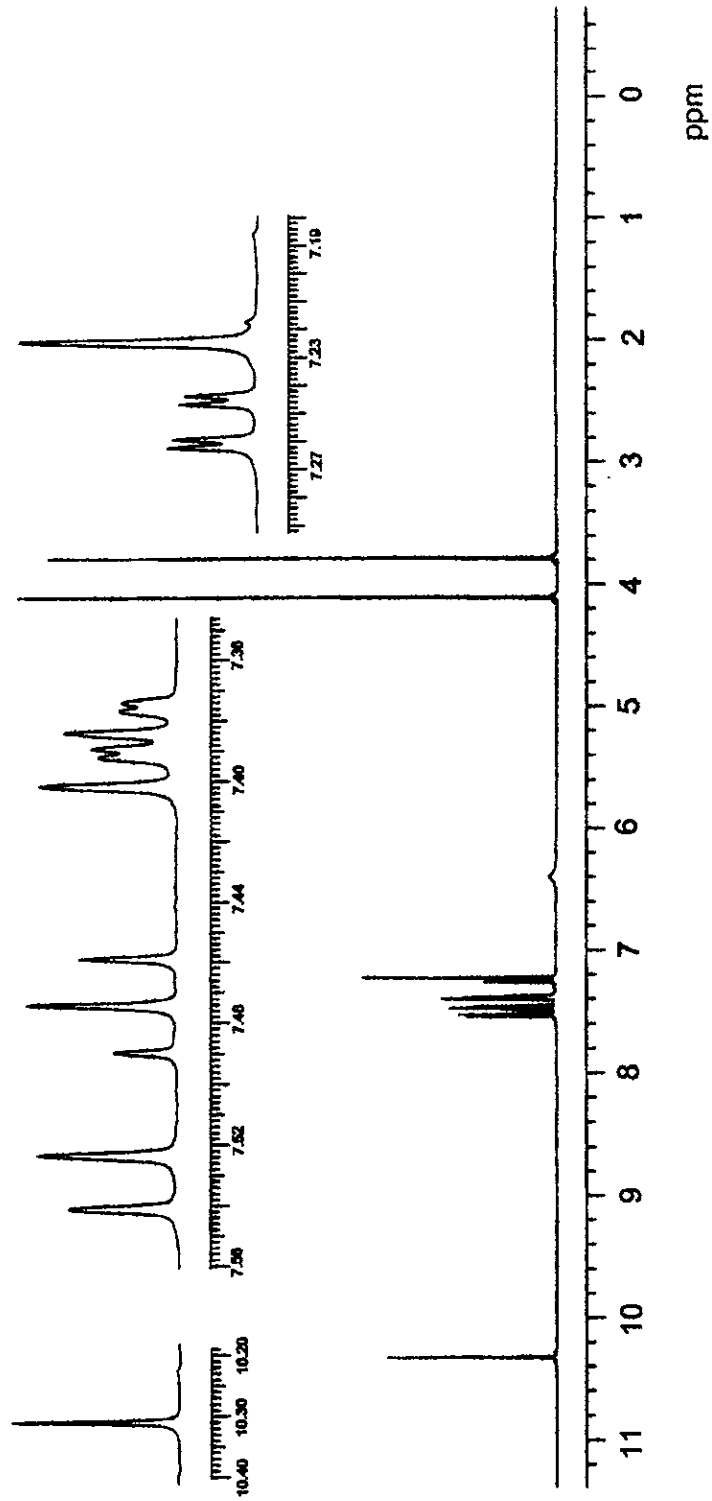
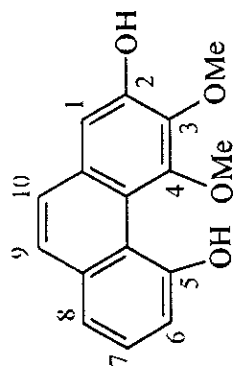
Espectro 1. Espectro en el IR del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).



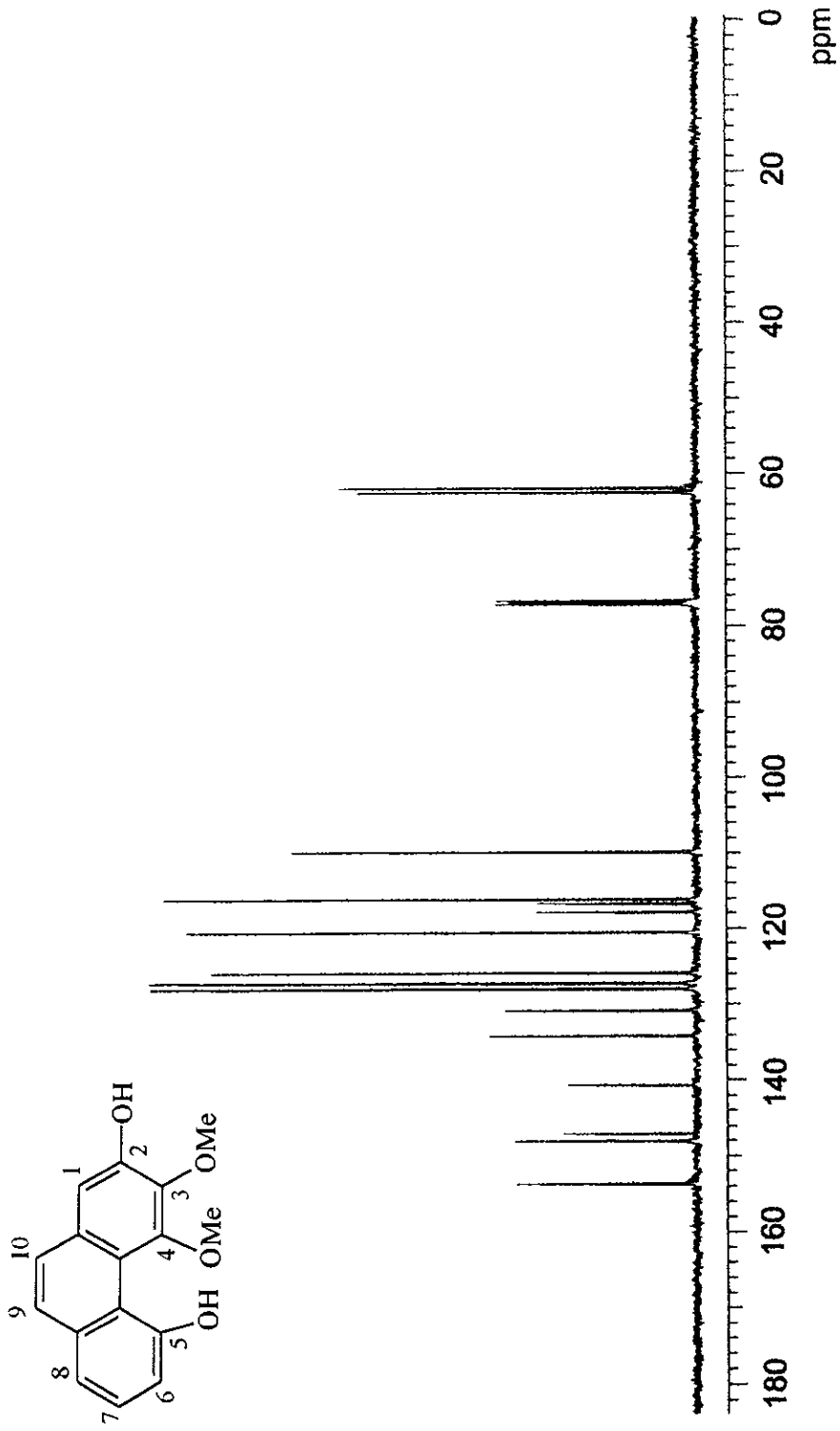
Espectro 2. Espectro en el UV del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).



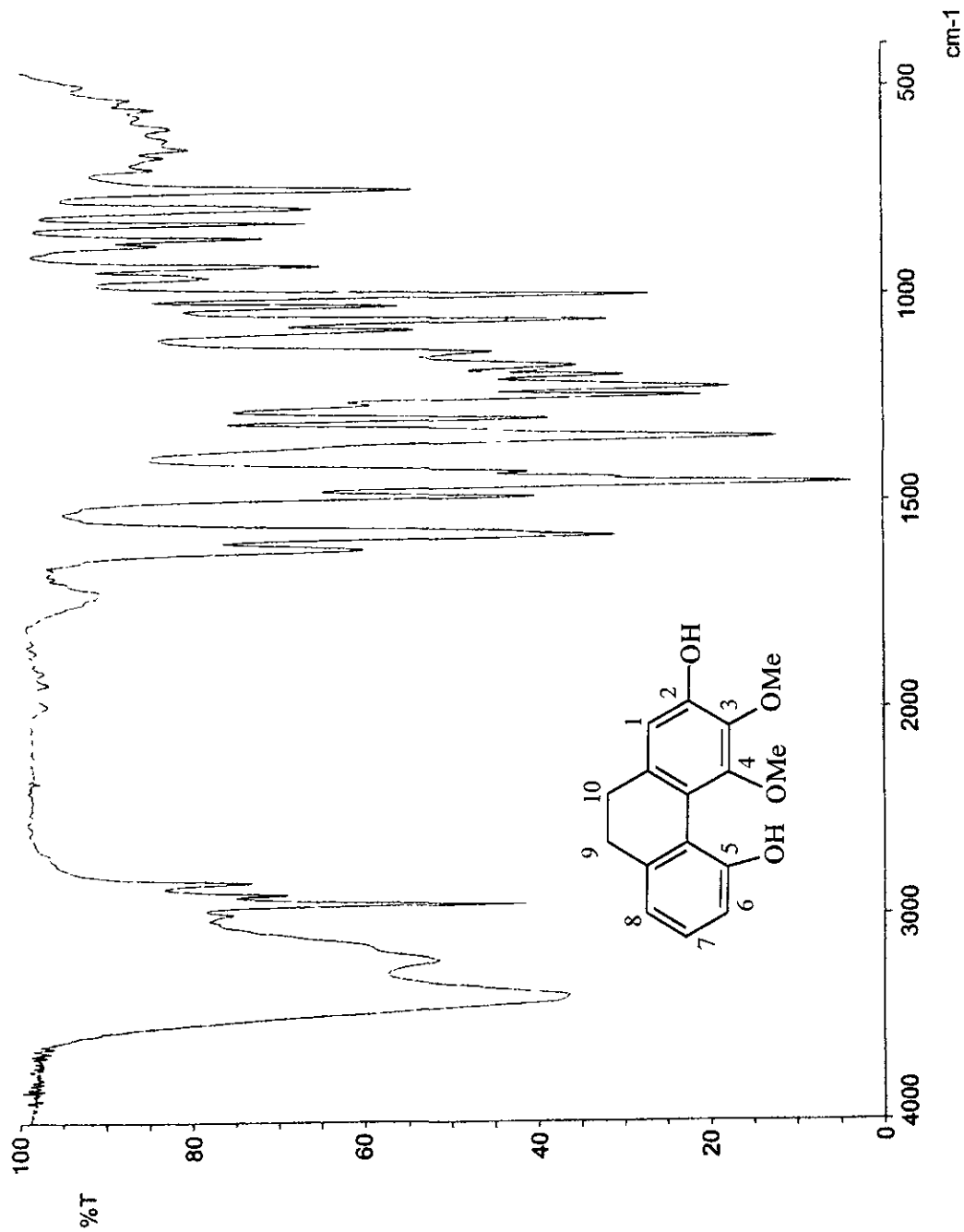
Espectro 3. Espectro de masas modalidad IE del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).



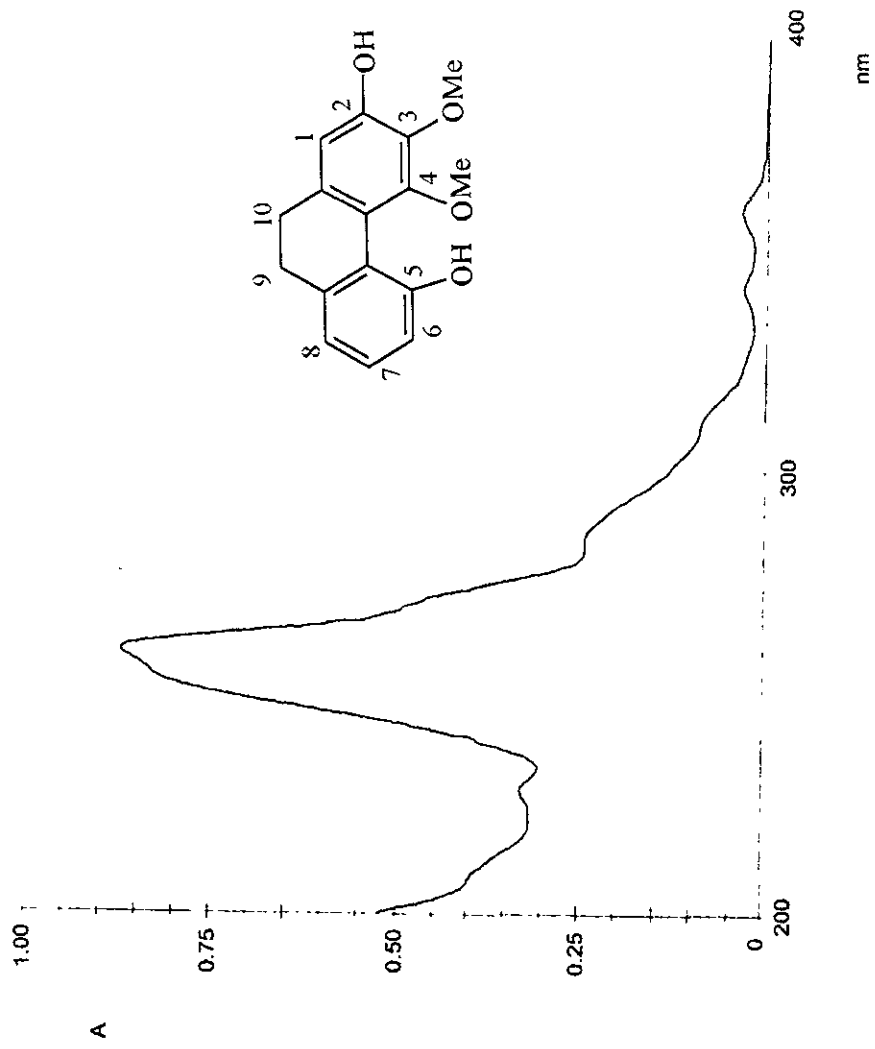
Espectro 4. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).



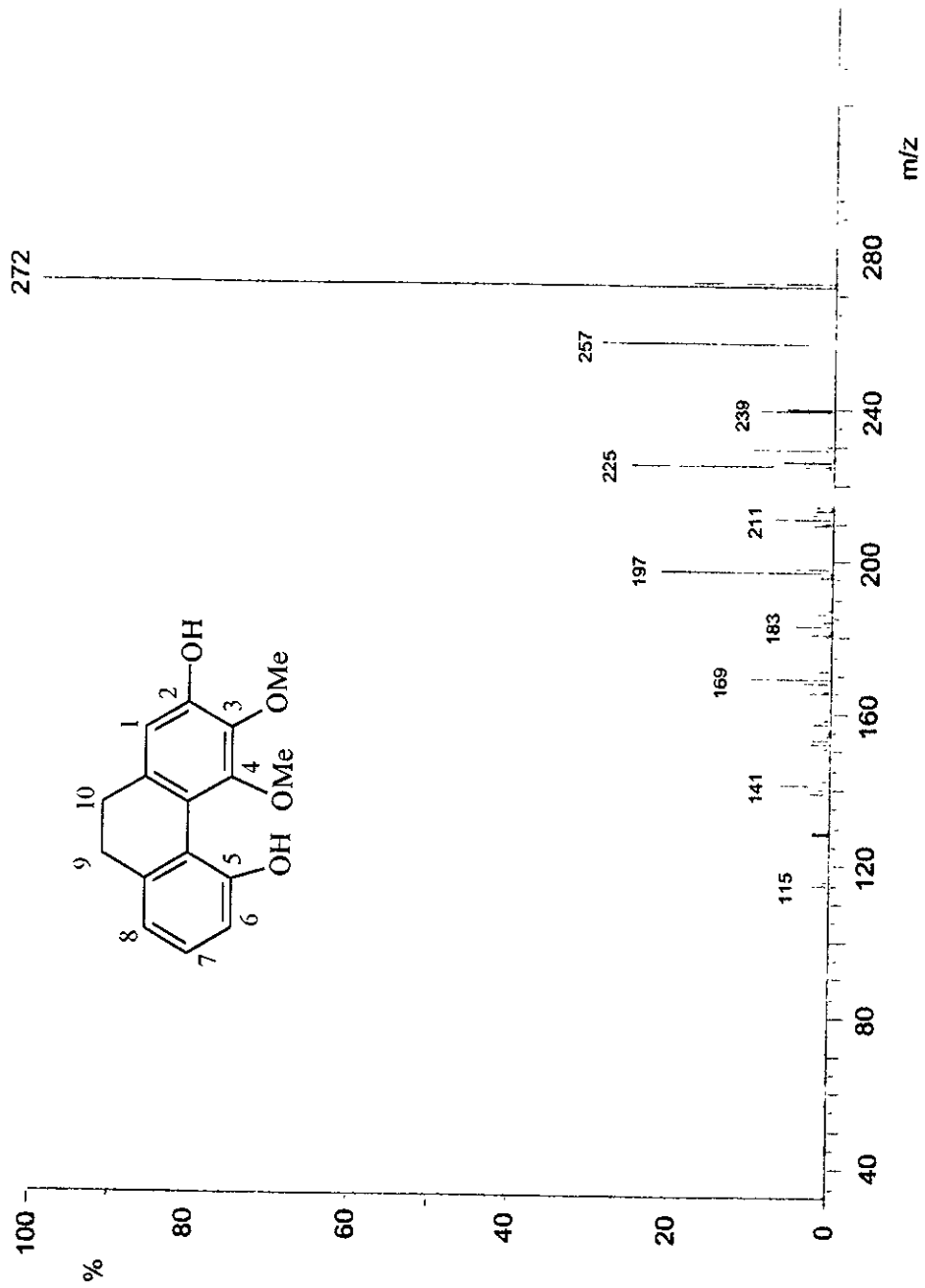
Espectro 5. Espectro de RMN- ^{13}C del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (167).



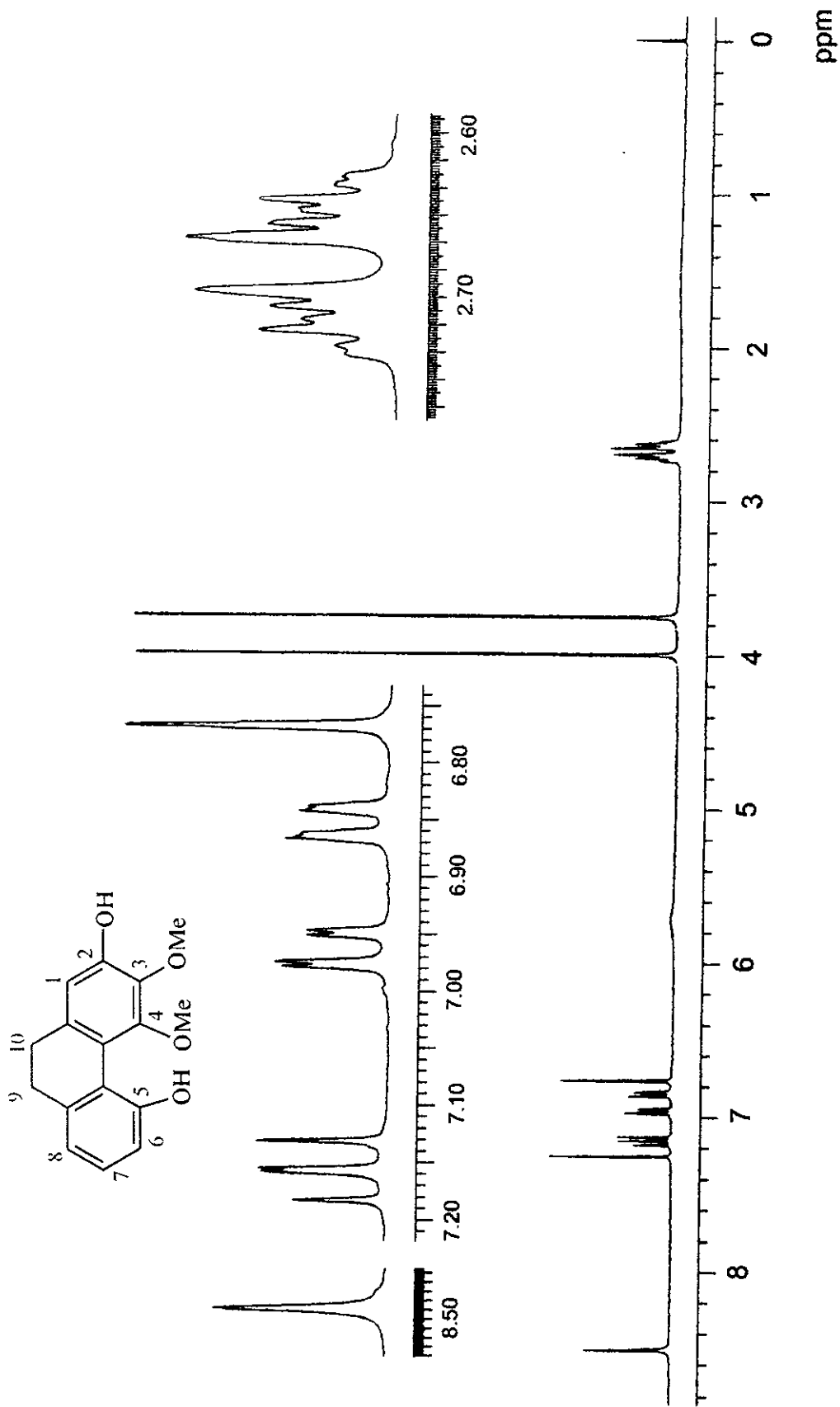
Espectro 6. Espectro en el IR del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).



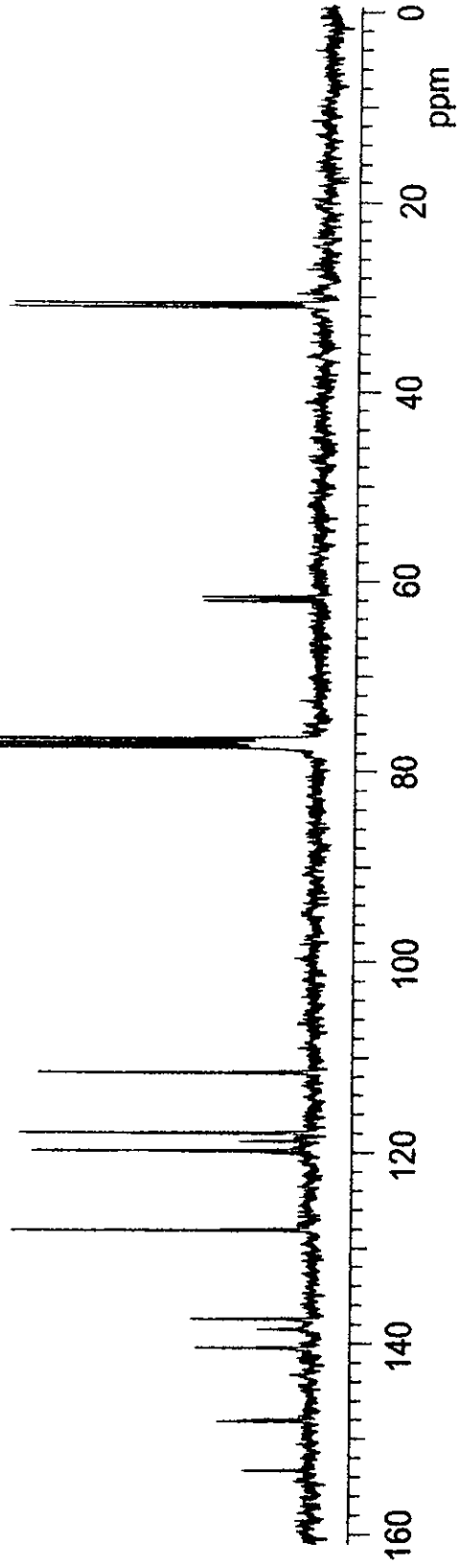
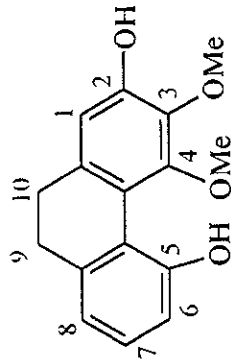
Espectro 7. Espectro en el UV del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).



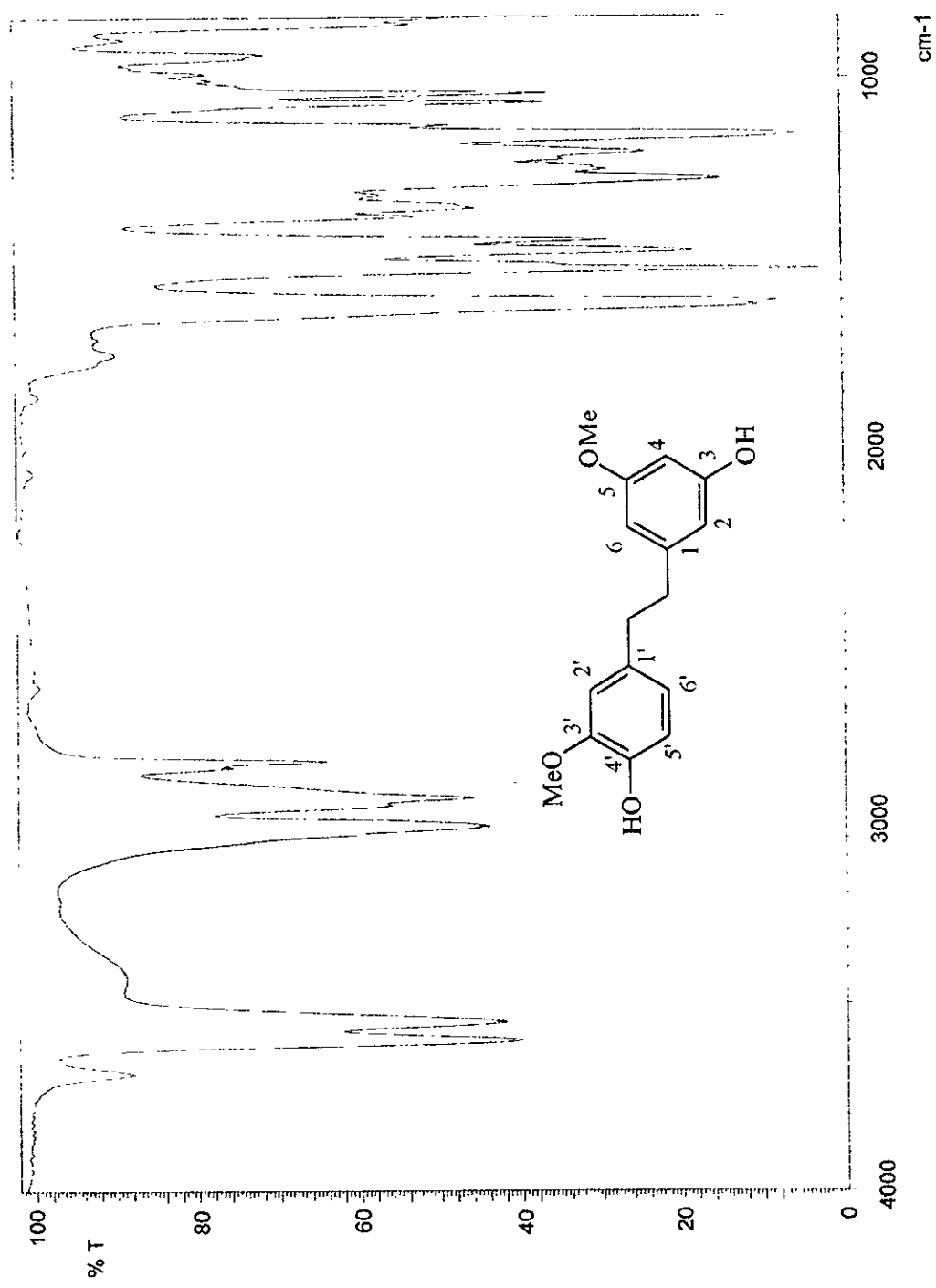
Espectro 8. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).



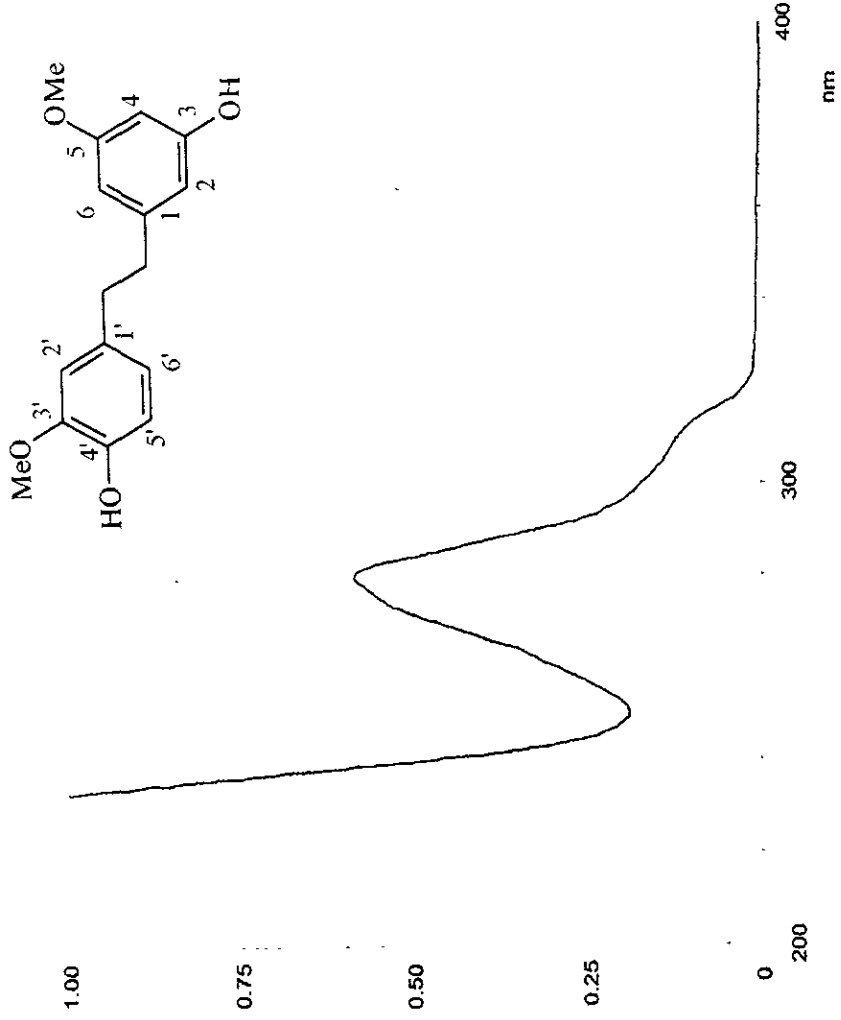
Espectro 9. Espectro de RMN-¹H del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).



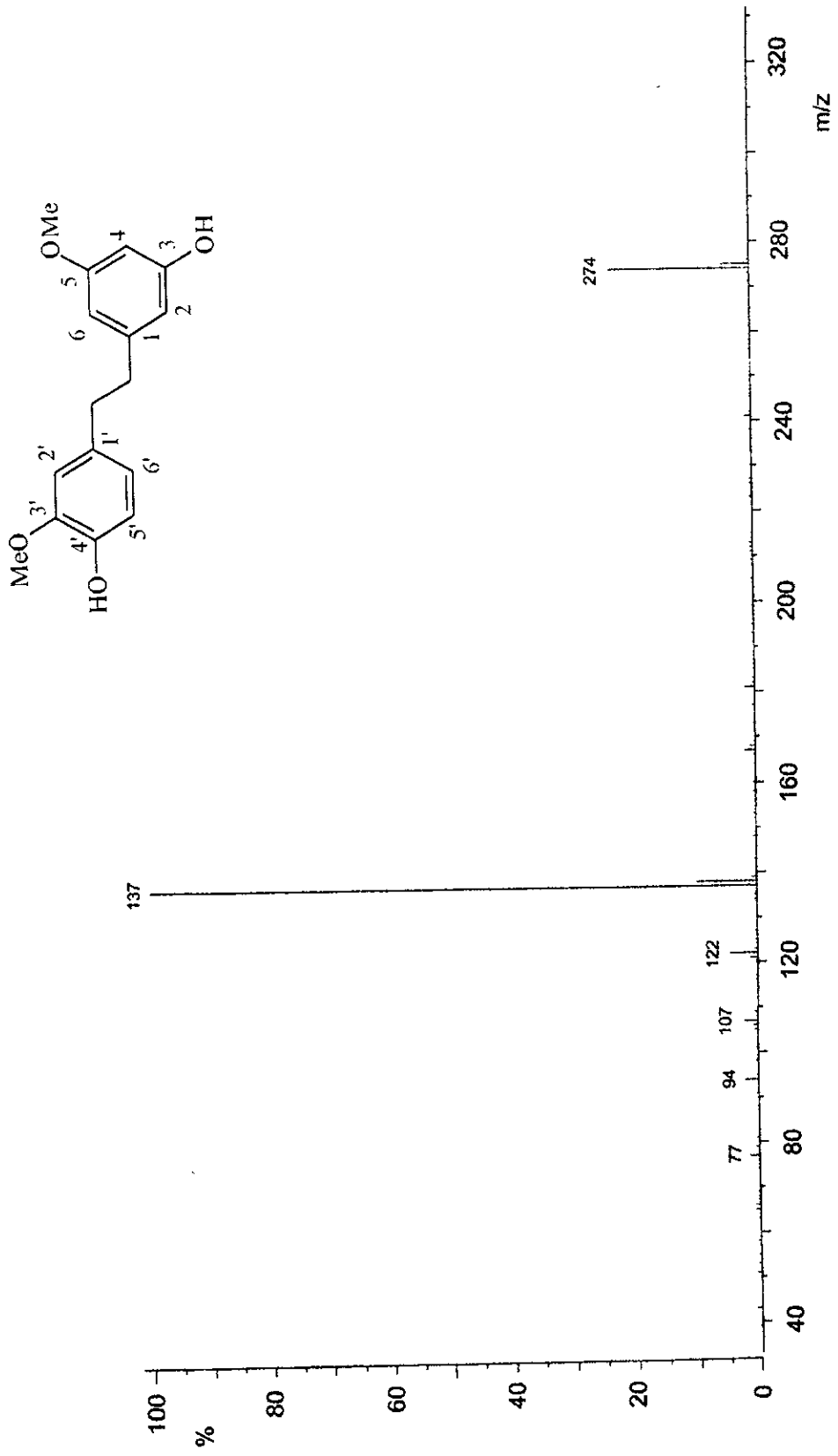
Espectro 10. Espectro de RMN- ^{13}C del 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (168).



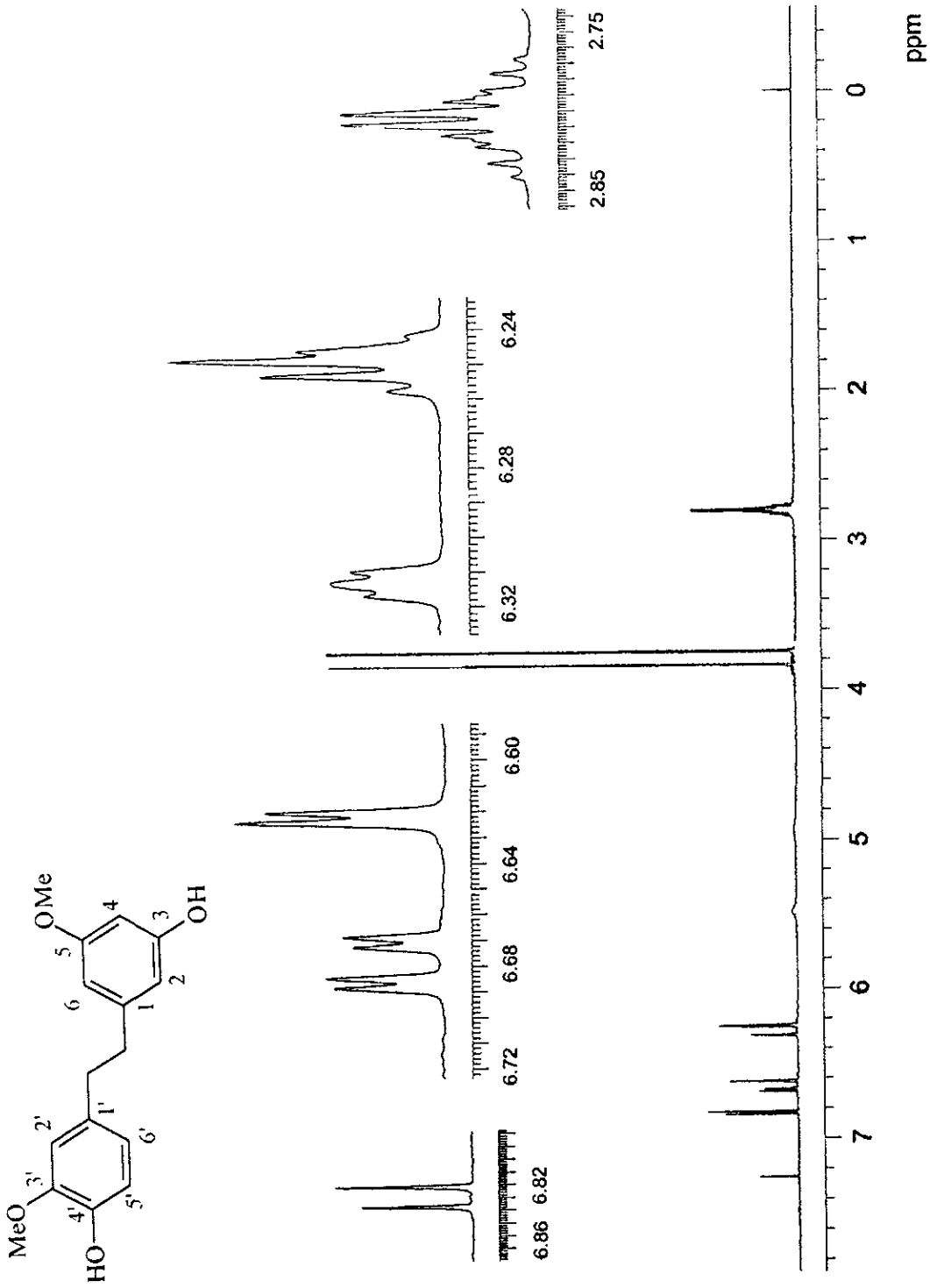
Espectro 11. Espectro en el IR del 3,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxibibencilo (12).



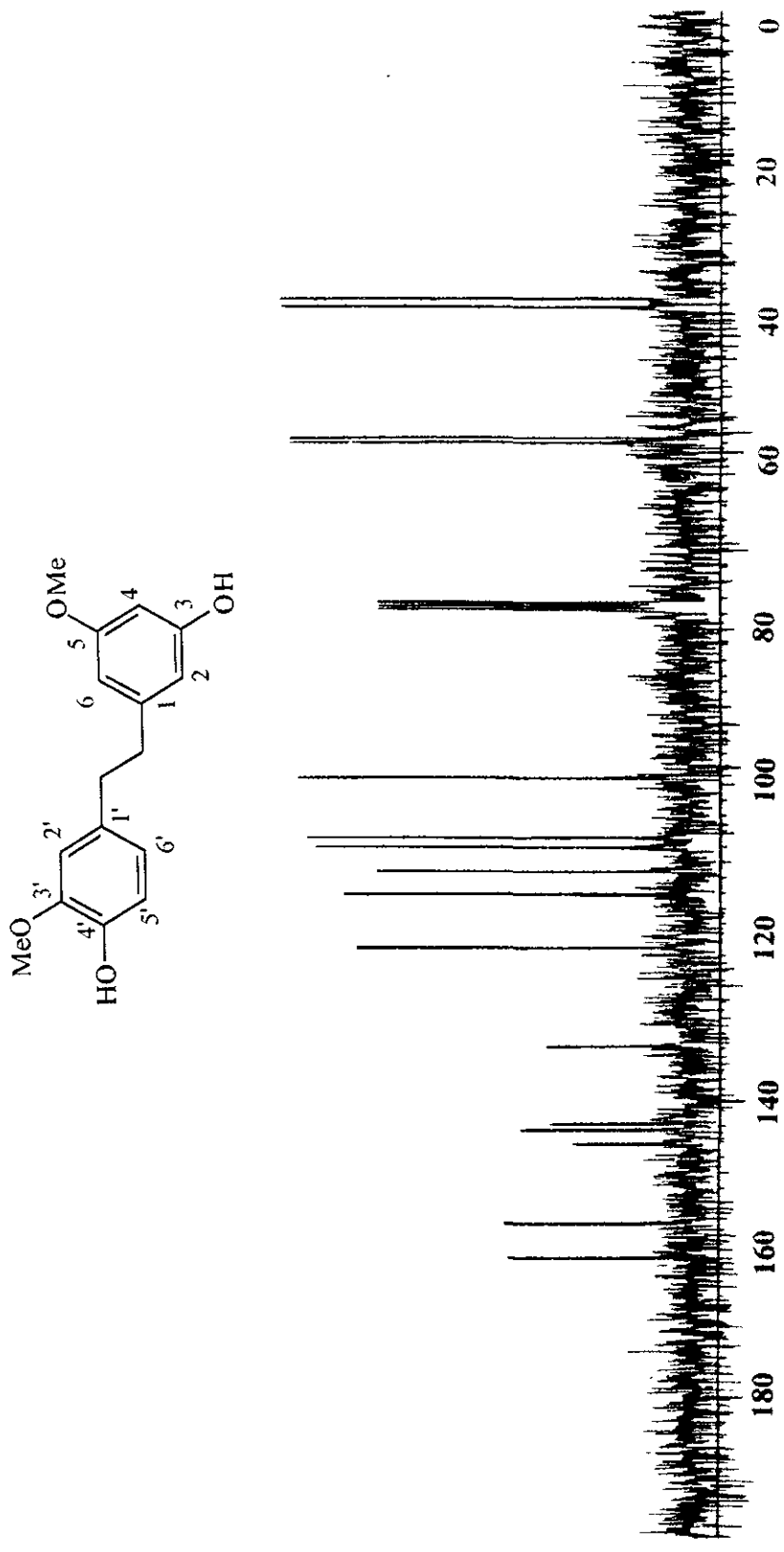
Espectro 12. Espectro en el UV del 3,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxibibencilo (12).



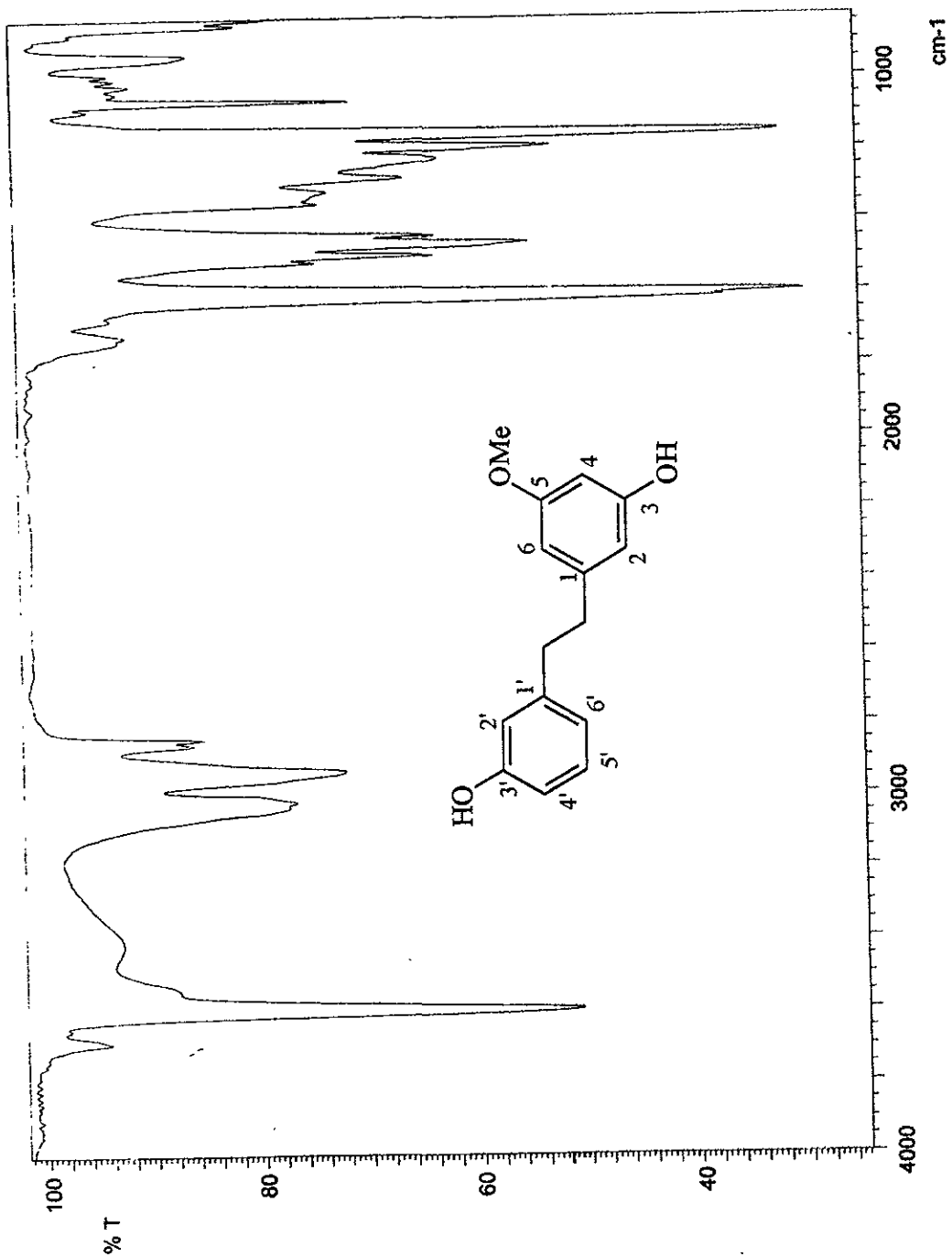
Espectro 13. Espectro de masas modalidad IE del 3,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxibencilo (12).



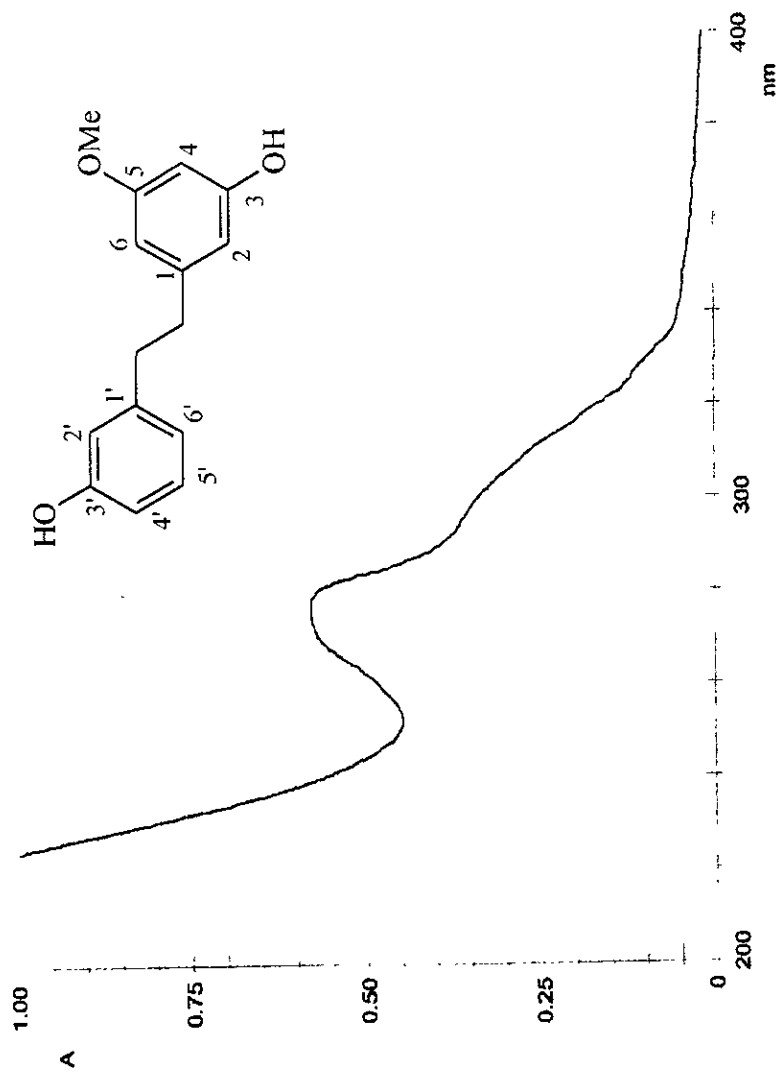
Espectro 14. Espectro de RMN- ^1H del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo (12).



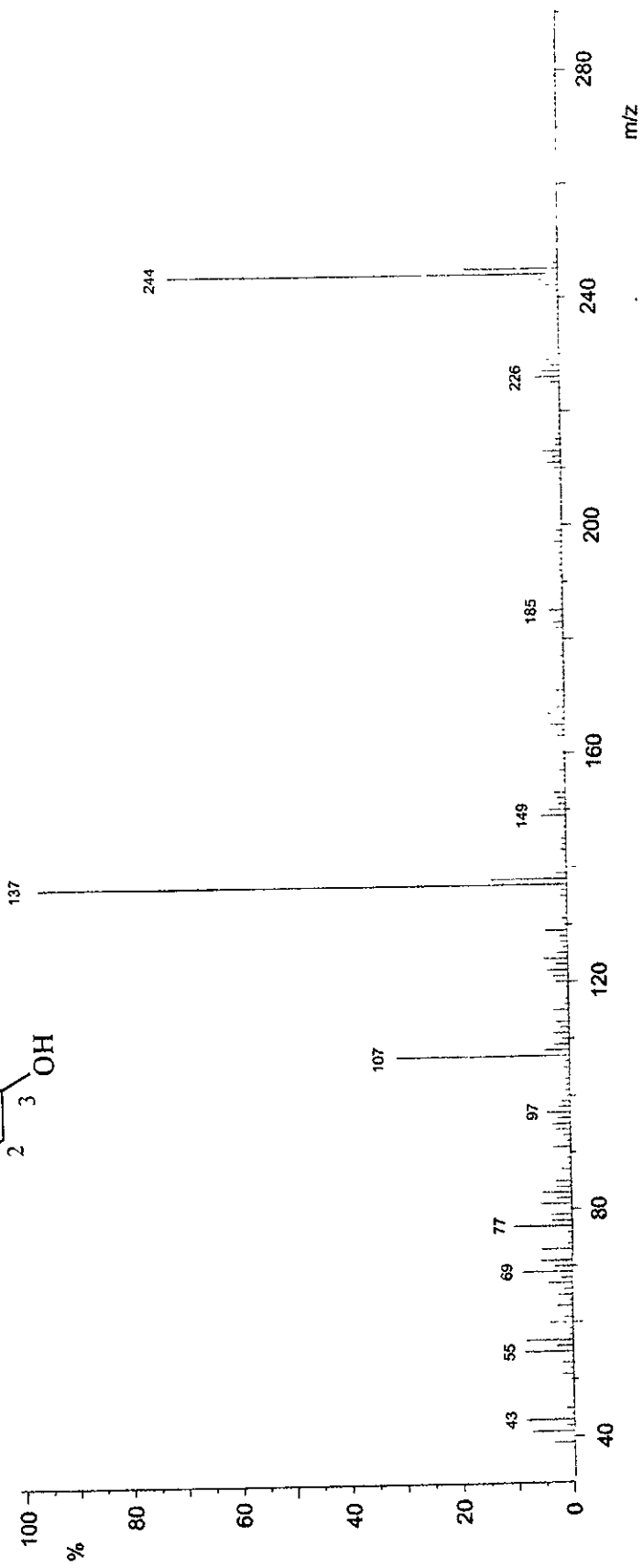
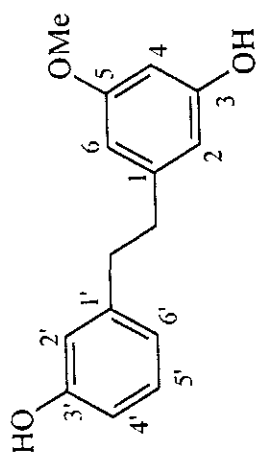
Espectro 15. Espectro de RMN- ^{13}C del 3,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxibibencilo (12).



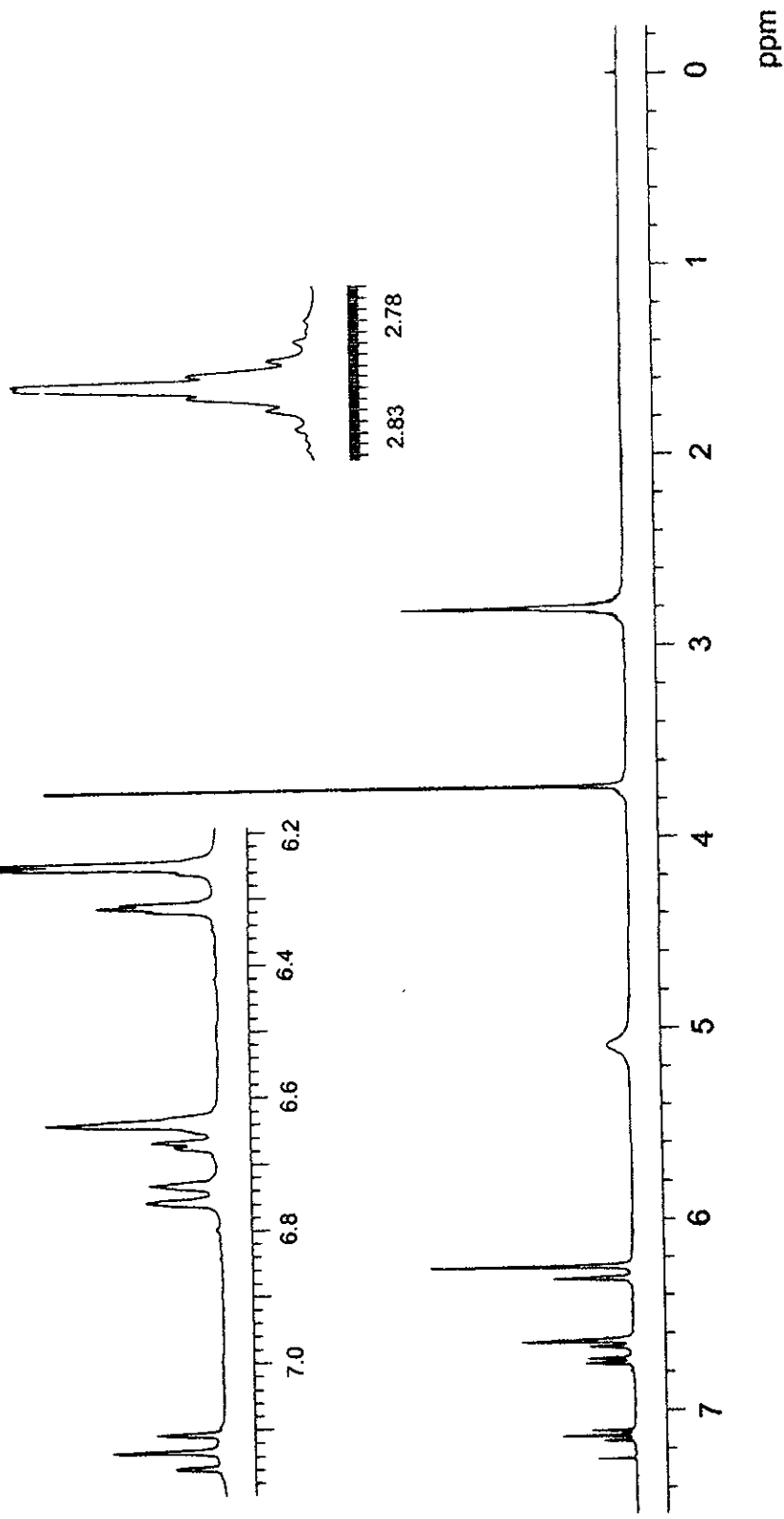
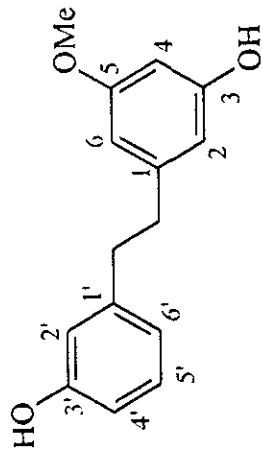
Espectro 16. Espectro en el IR de la batatasina III (I).



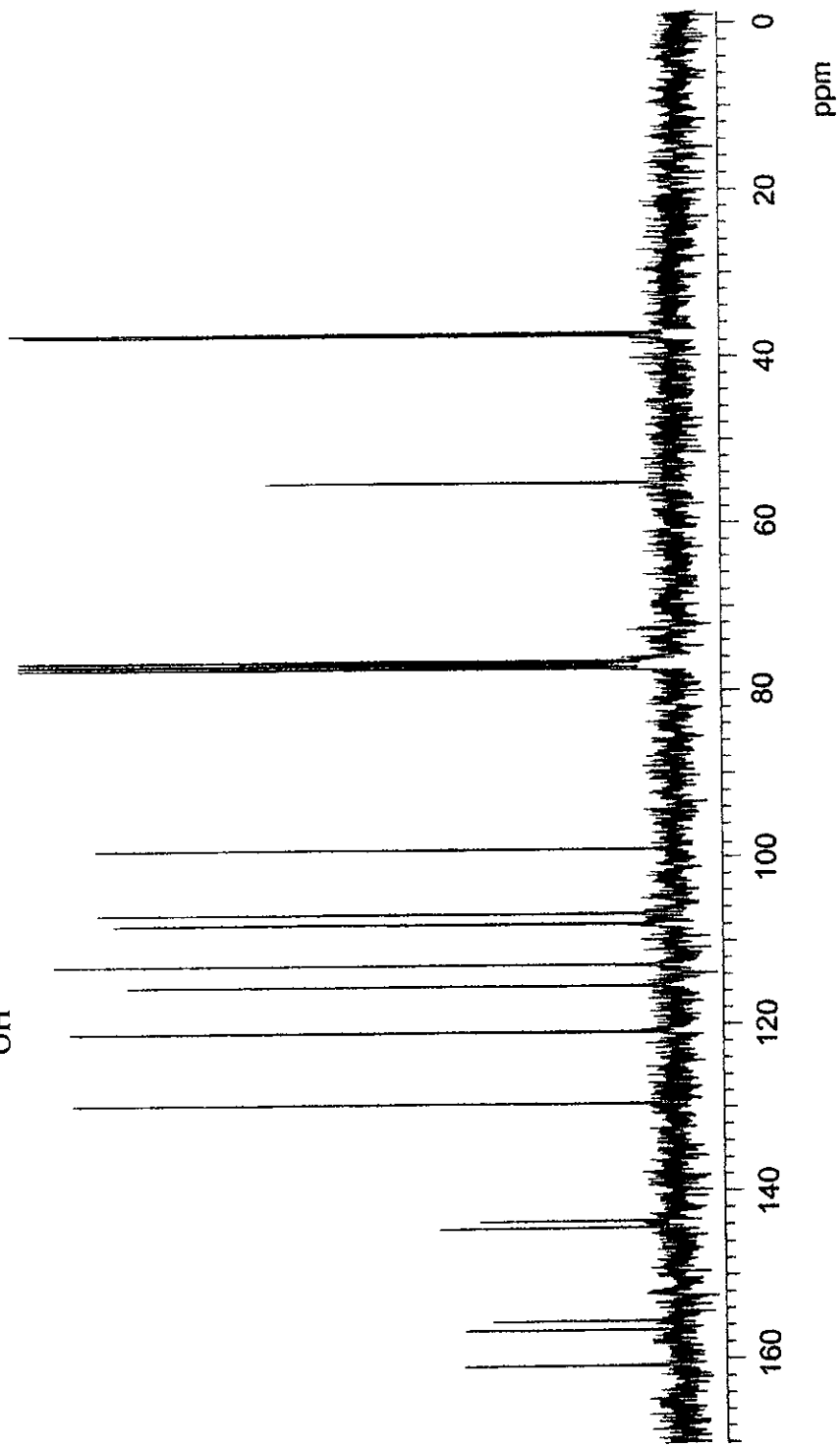
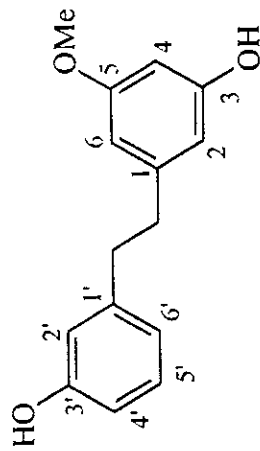
Espectro 17. Espectro en el UV de la batatasina III (1).



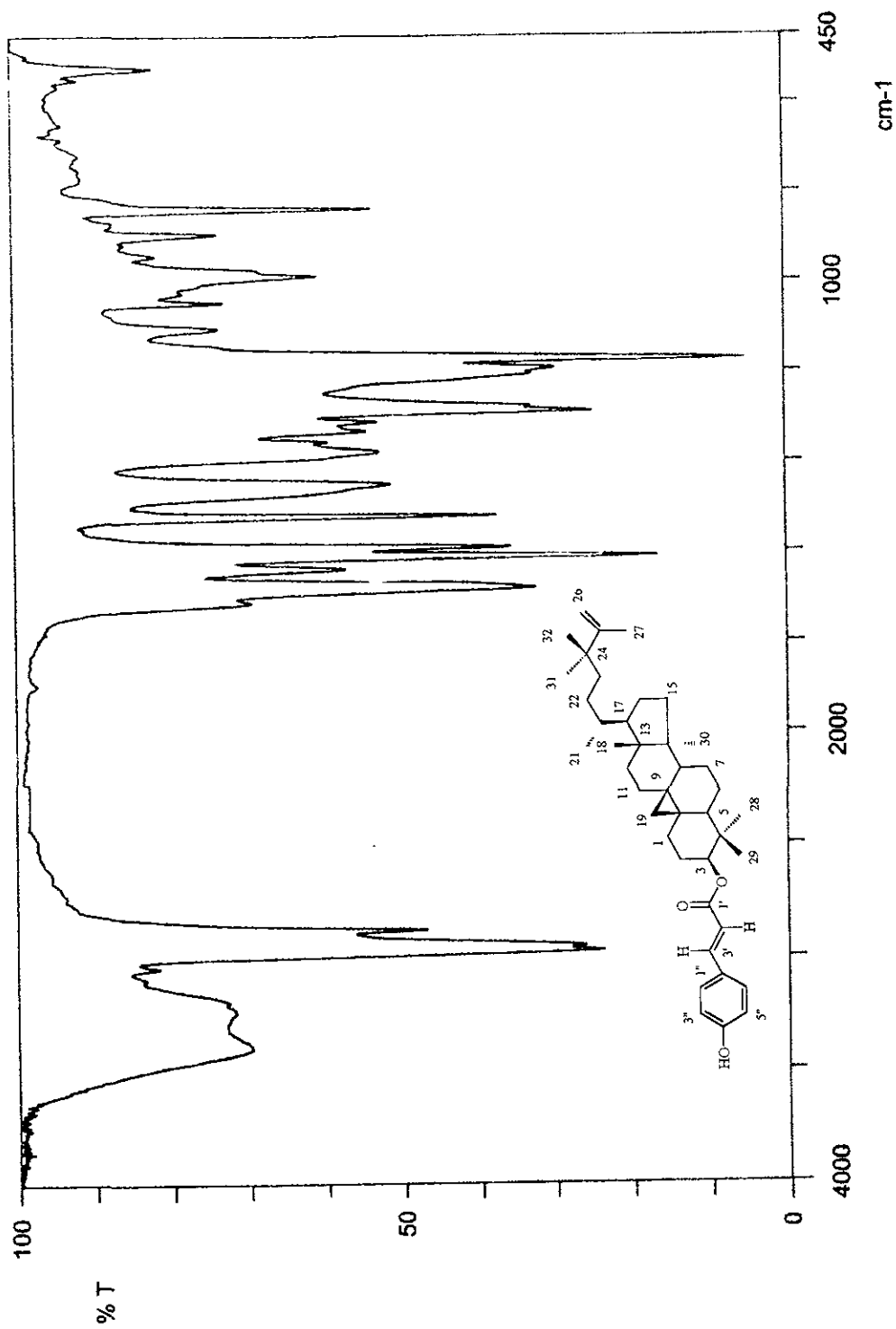
Espectro 18. Espectro de masas modalidad IE de la batatasina III (I).



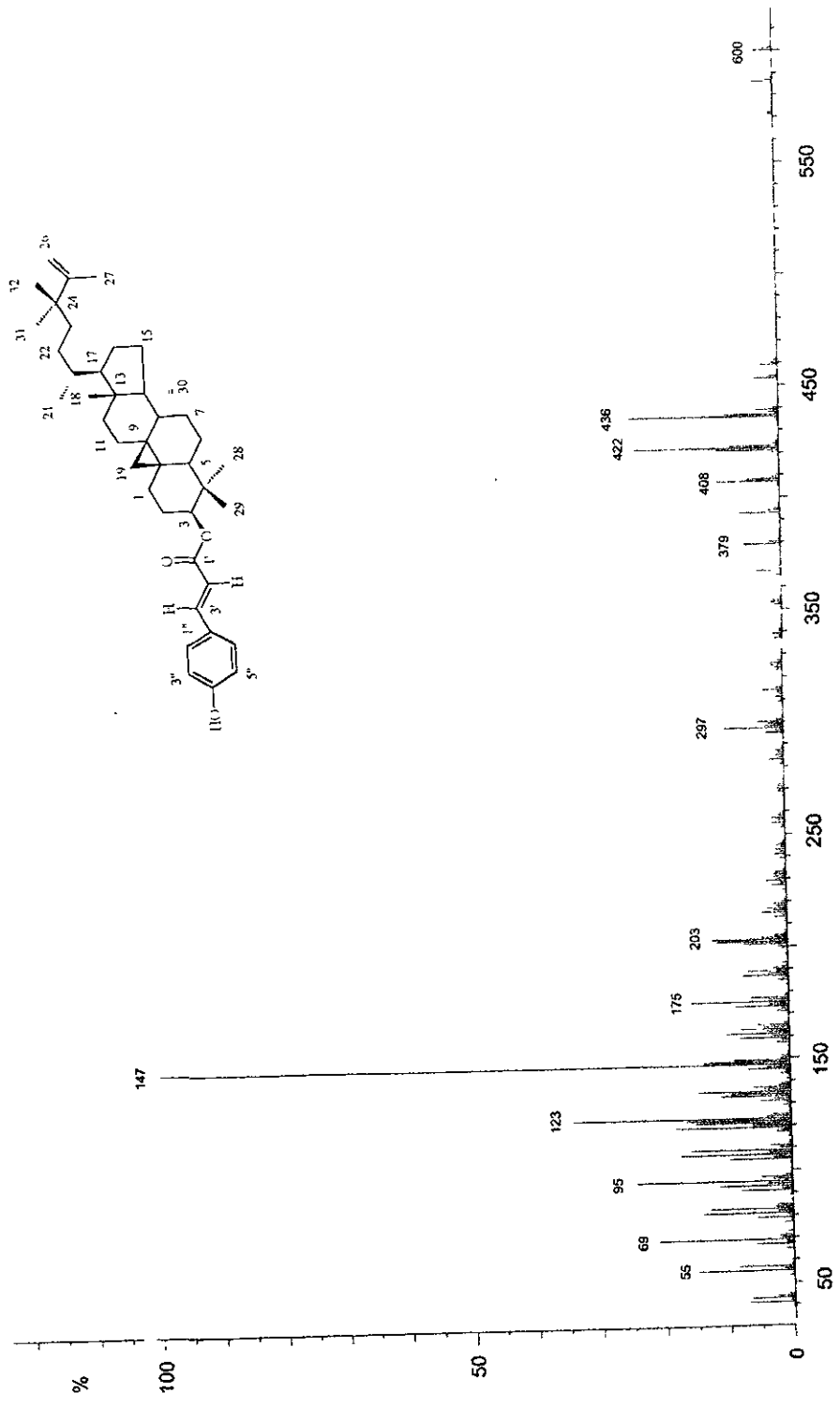
Espectro 19. Espectro de RMN- ^1H de la batatasina III (1).



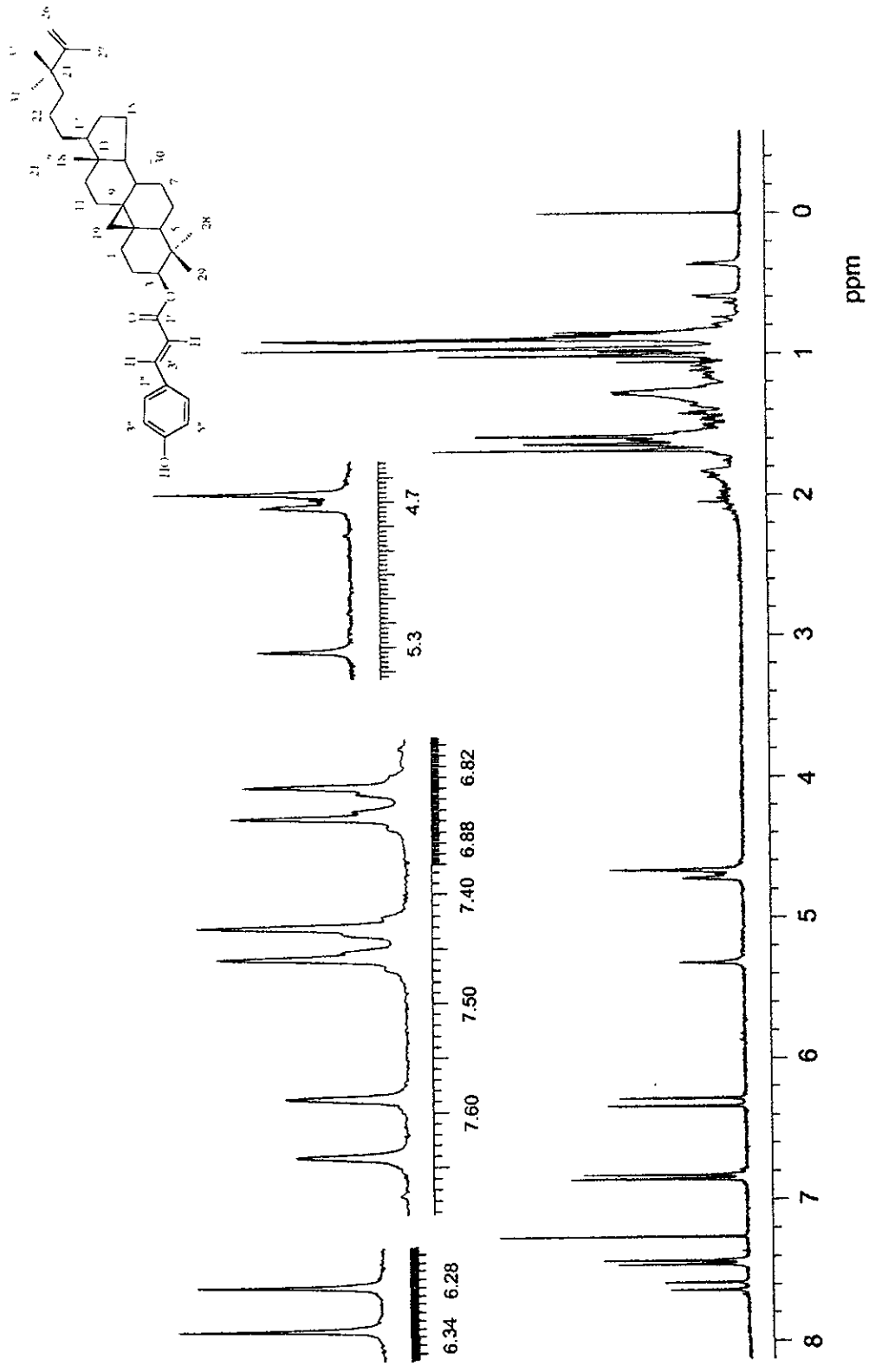
Espectro 20. Espectro de RMN- ^{13}C de la batatasina III (I).



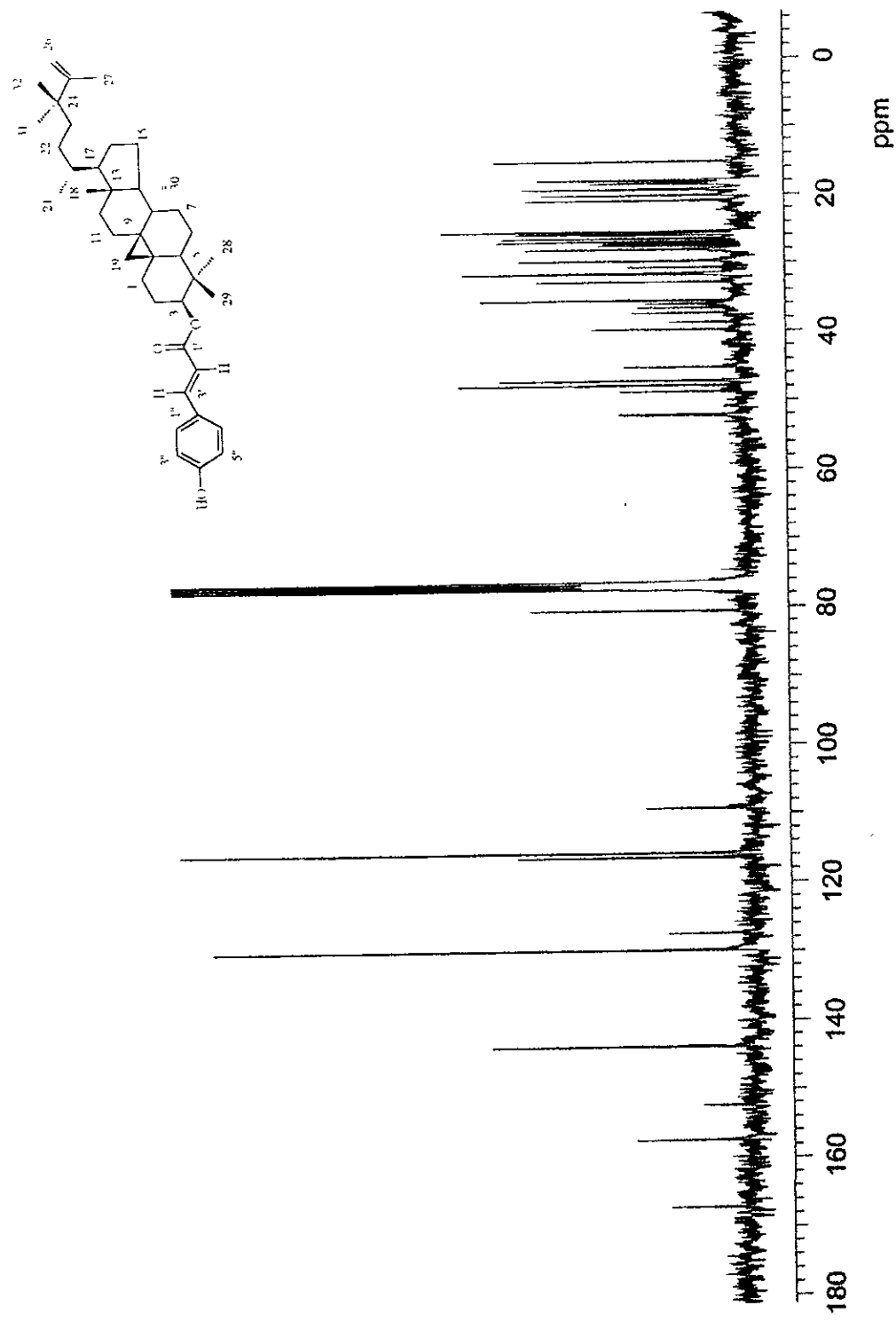
Espectro 21. Espectro en el IR del *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclocanosta-25-3 β -ilo (165).



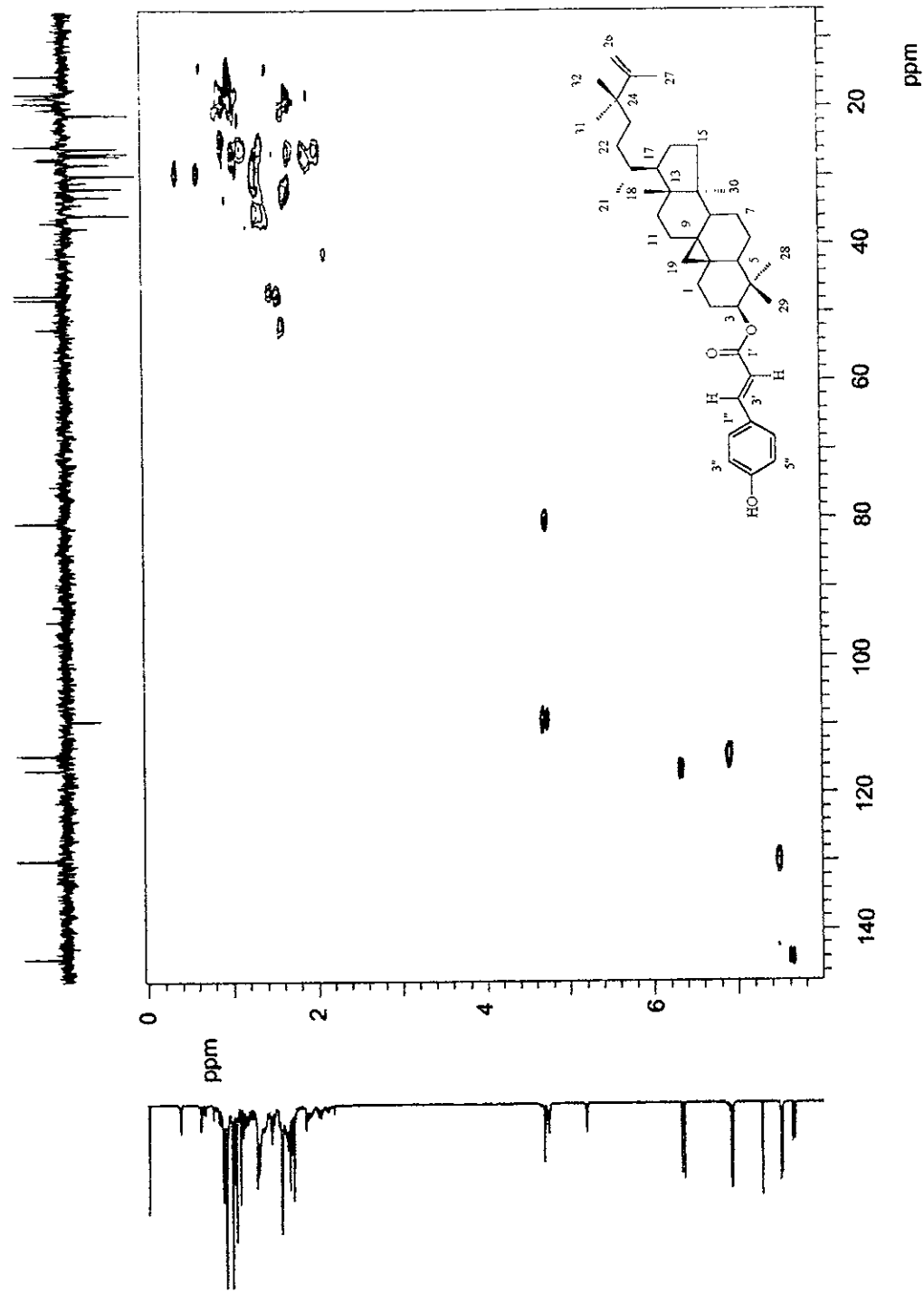
Espectro de masas modalidad IE del *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3 β -ilo (165).



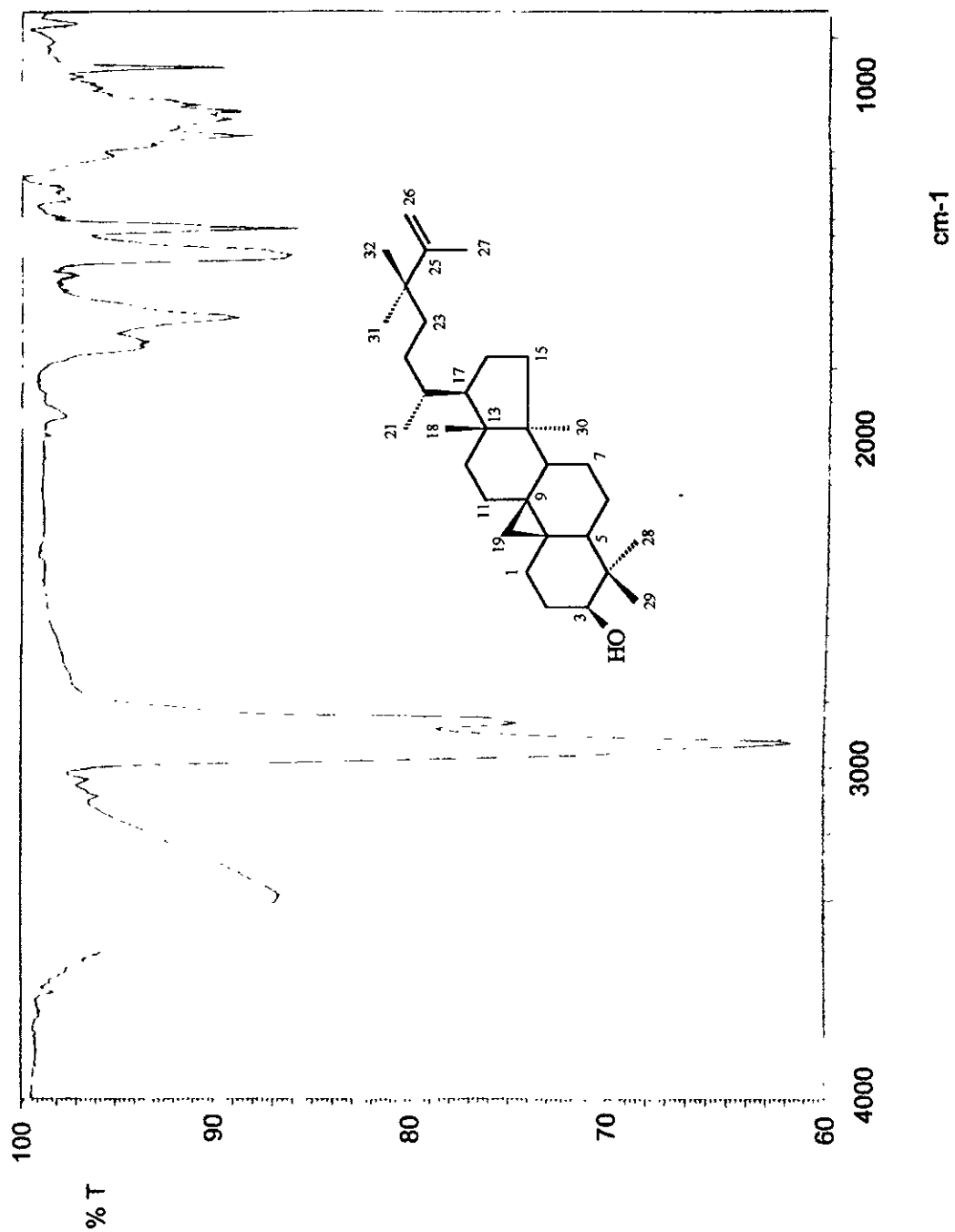
Espectro 23. Espectro de RMN-¹H del *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-cicloolanosta-25-en-3β-ilo (165).



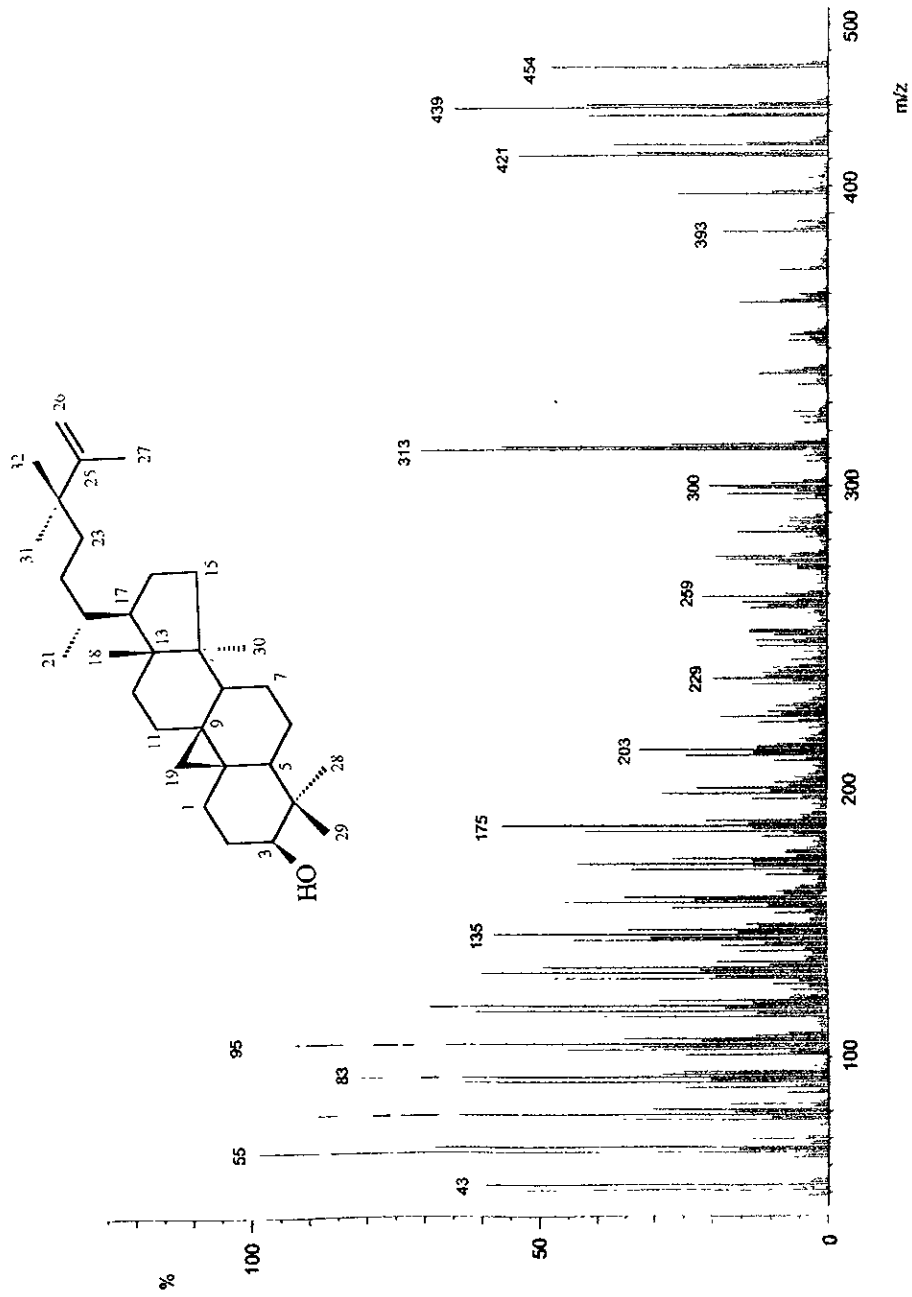
Espectro 24. Espectro de RMN-¹³C del *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-ciclanosta-25-en-3β-ilo (165).



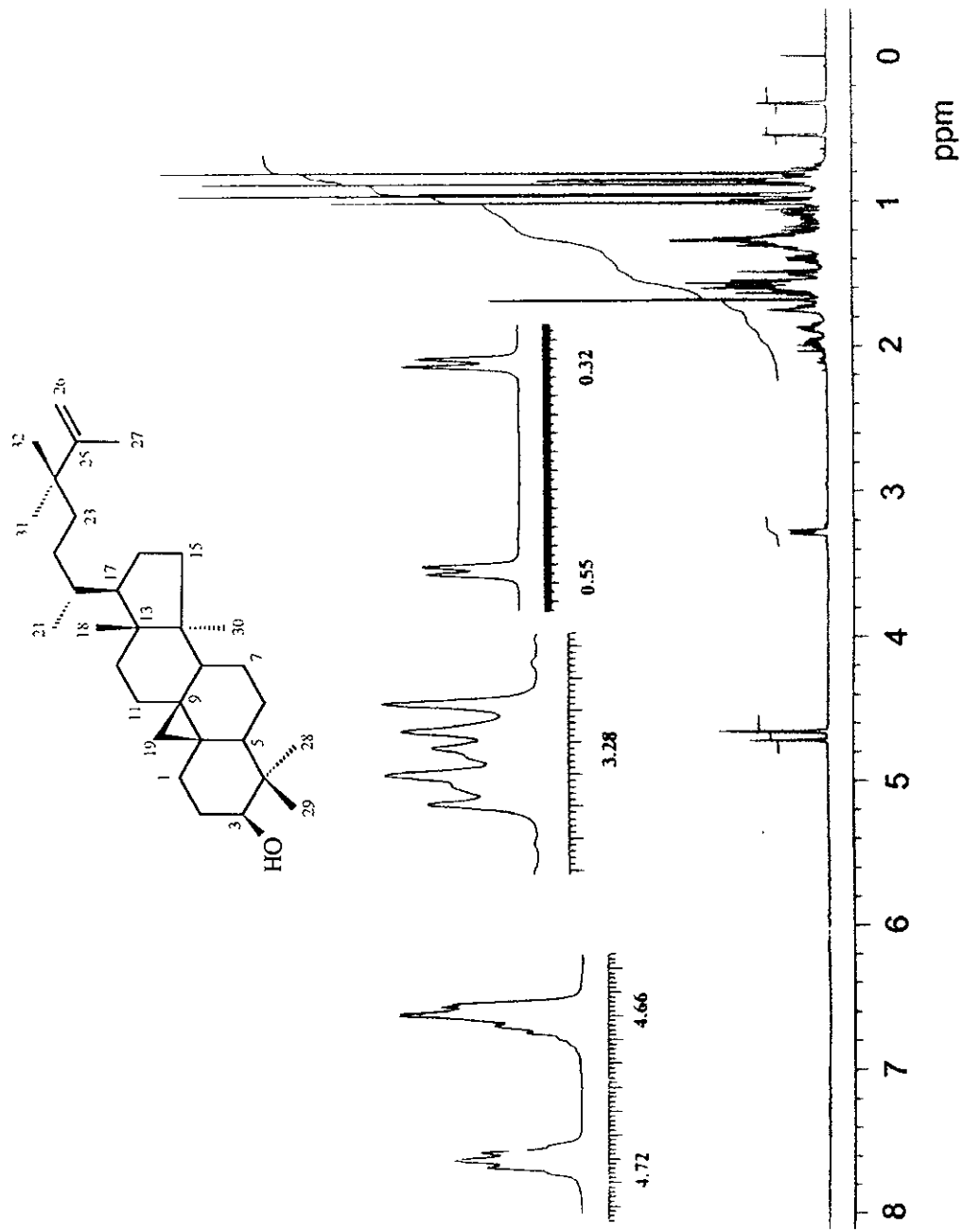
Espectro 25. Espectro de RMN ^{13}C -HMQC del *trans-p*-hidroxicinamato de 24,24-dimetil-9,19-ciclocanosta-25-en-3 β -ilo (165).



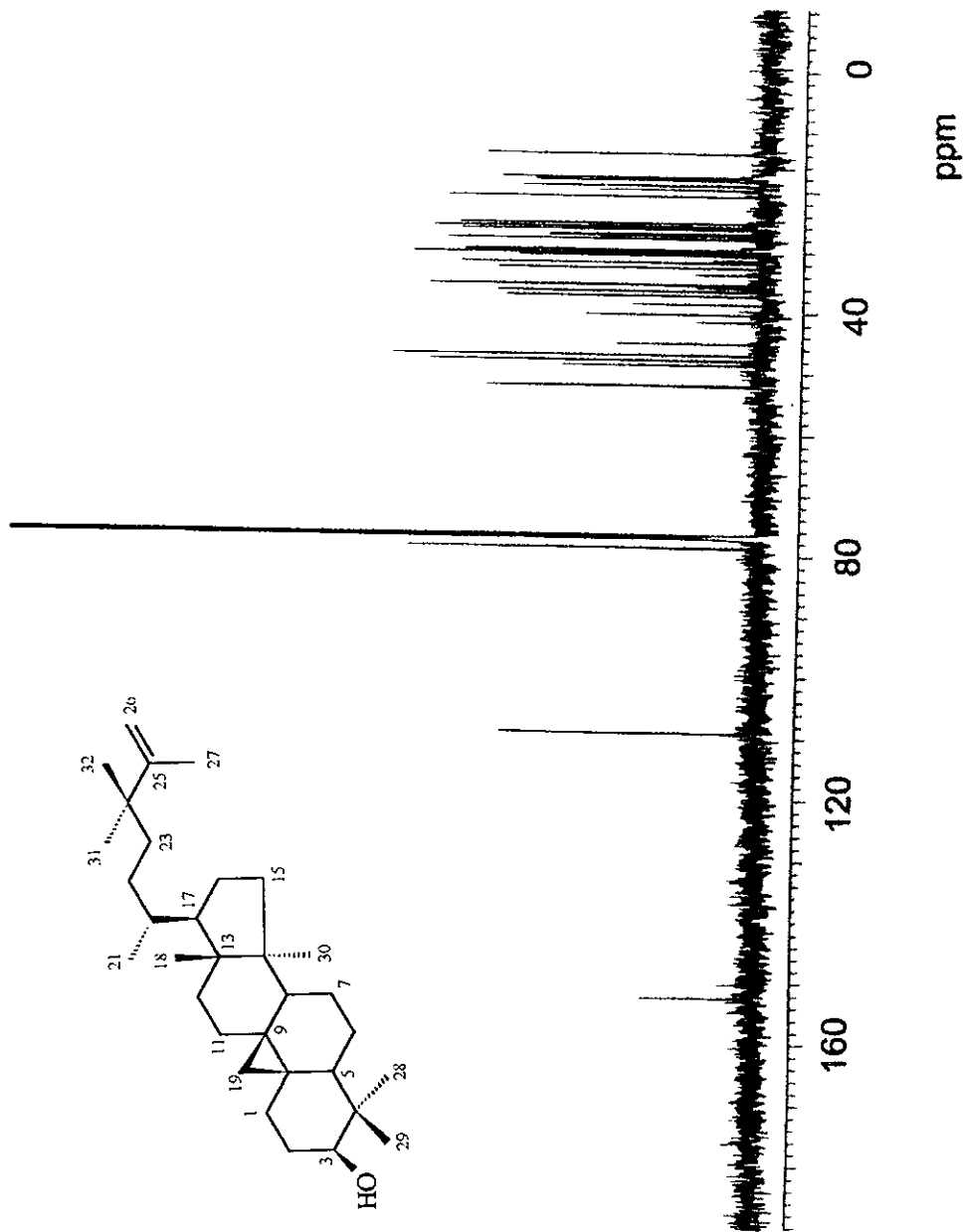
Espectro 26. Espectro en el IR del 24,24-dimetil-9,19-ciclolano-25-en-3 β -ol (166).



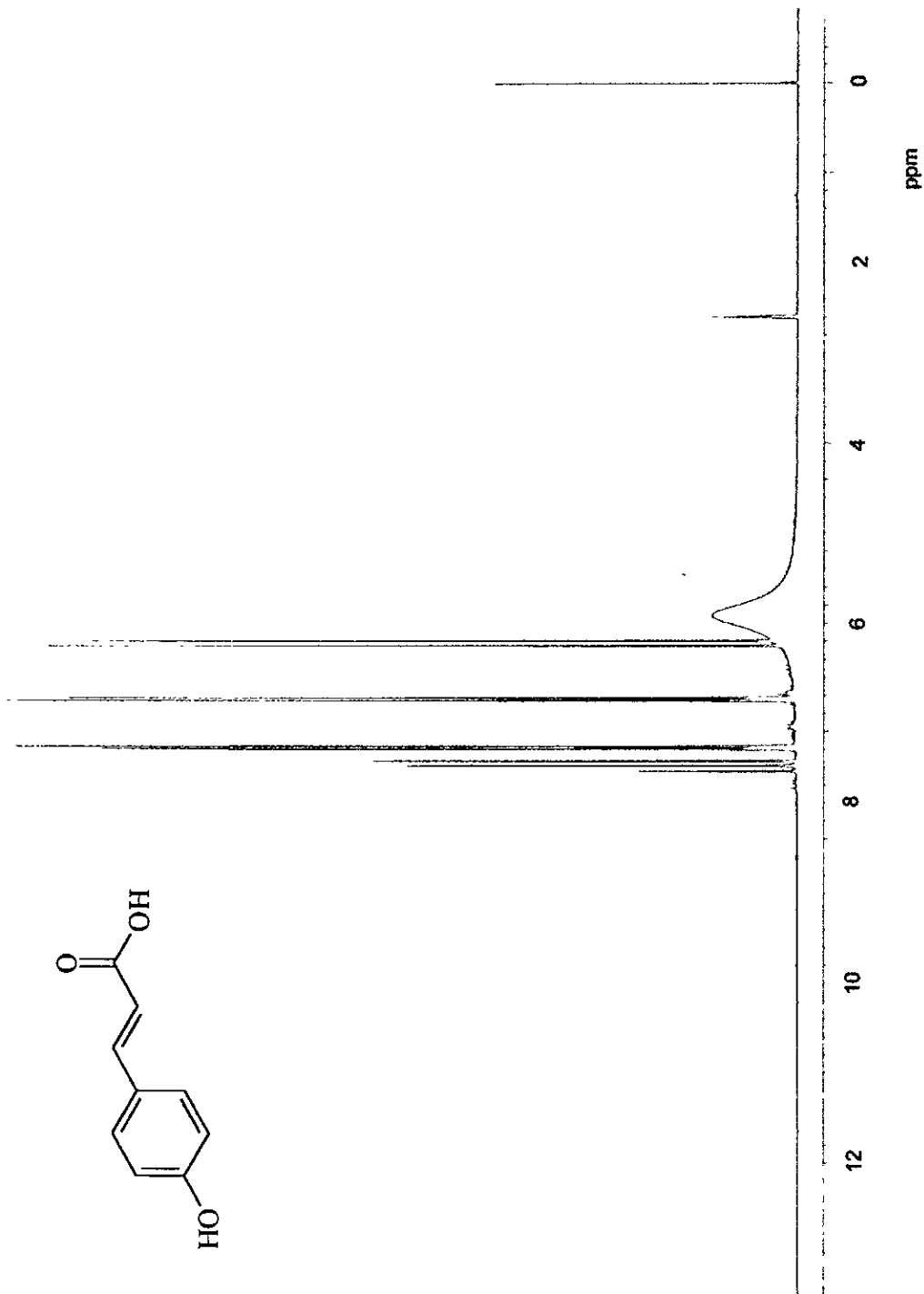
Espectro 27. Espectro de masas modalidad IE del 24,24-dimetil-9,19-ciclolano-25-en-3 β -ol (166).



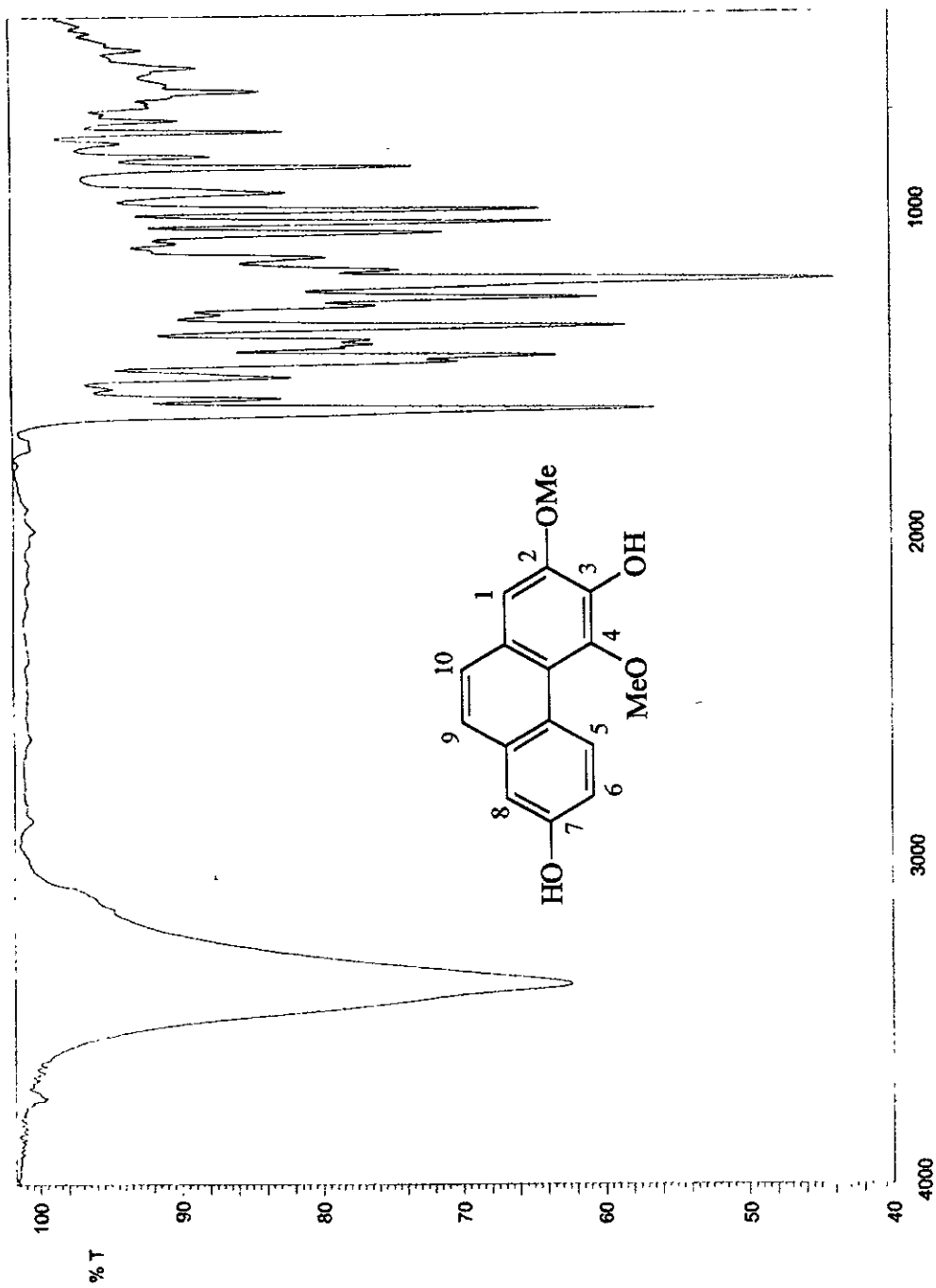
Espectro 28. Espectro de RMN- ^1H del 24,24-dimetil-9,19-ciclanosta-25-en-3 β -ol (166).



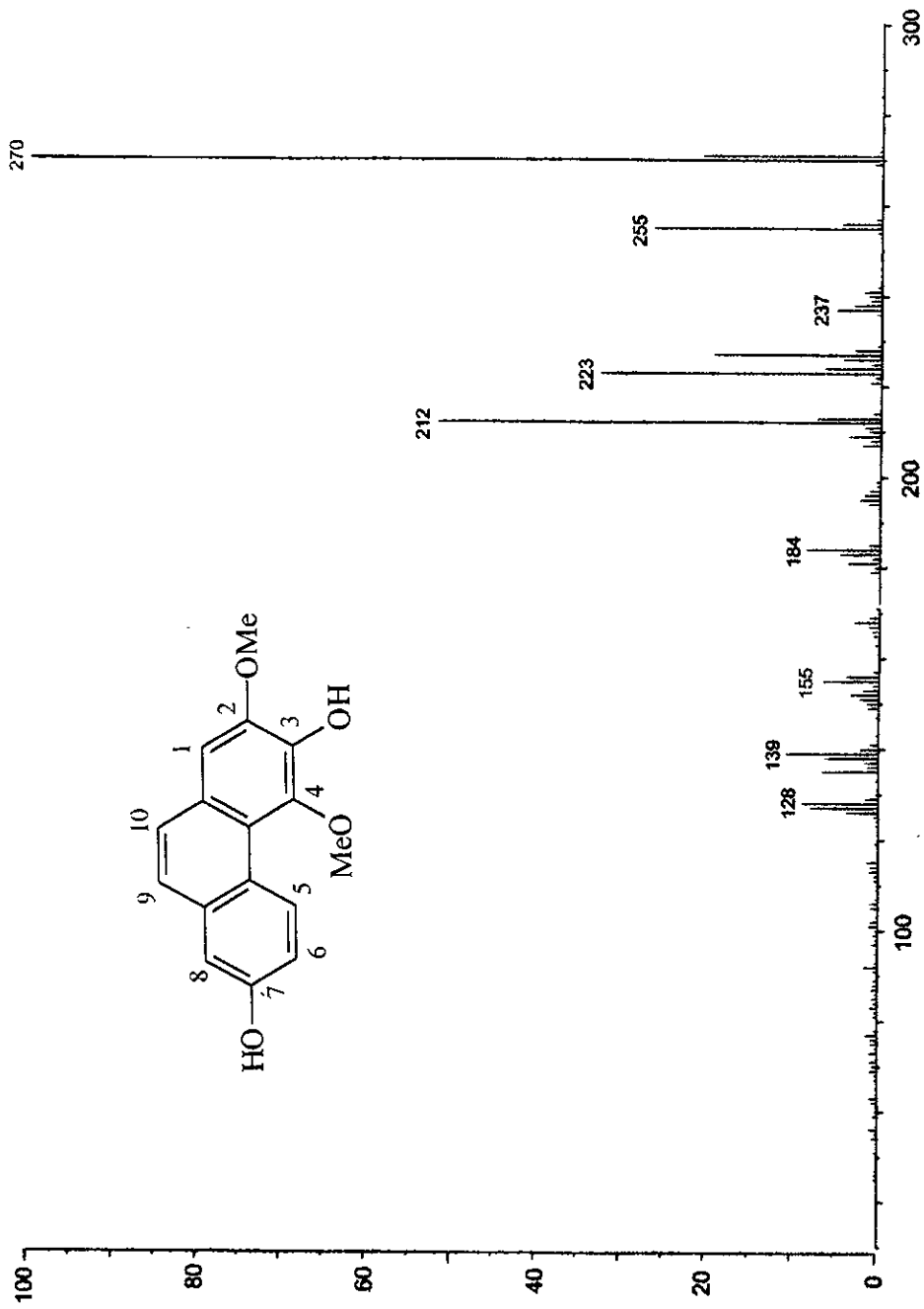
Espectro 29. Espectro de RMN- ^{13}C del 24,24-dimetil-9,19-ciclanosta-25-en-3 β -ol (166).



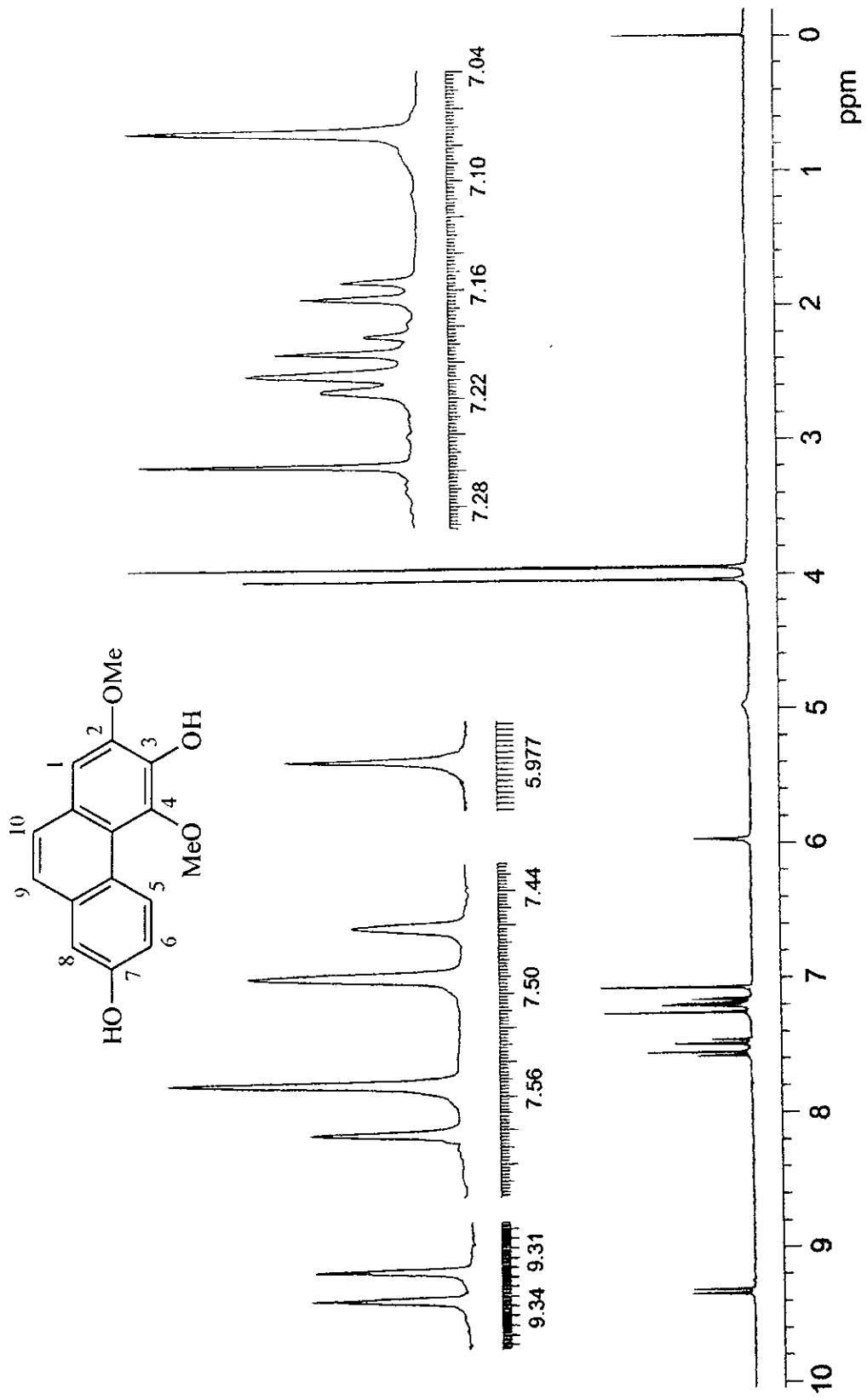
Espectro 30. Espectro de RMN-¹H del ácido *trans-p*-hidroxicinámico (169).



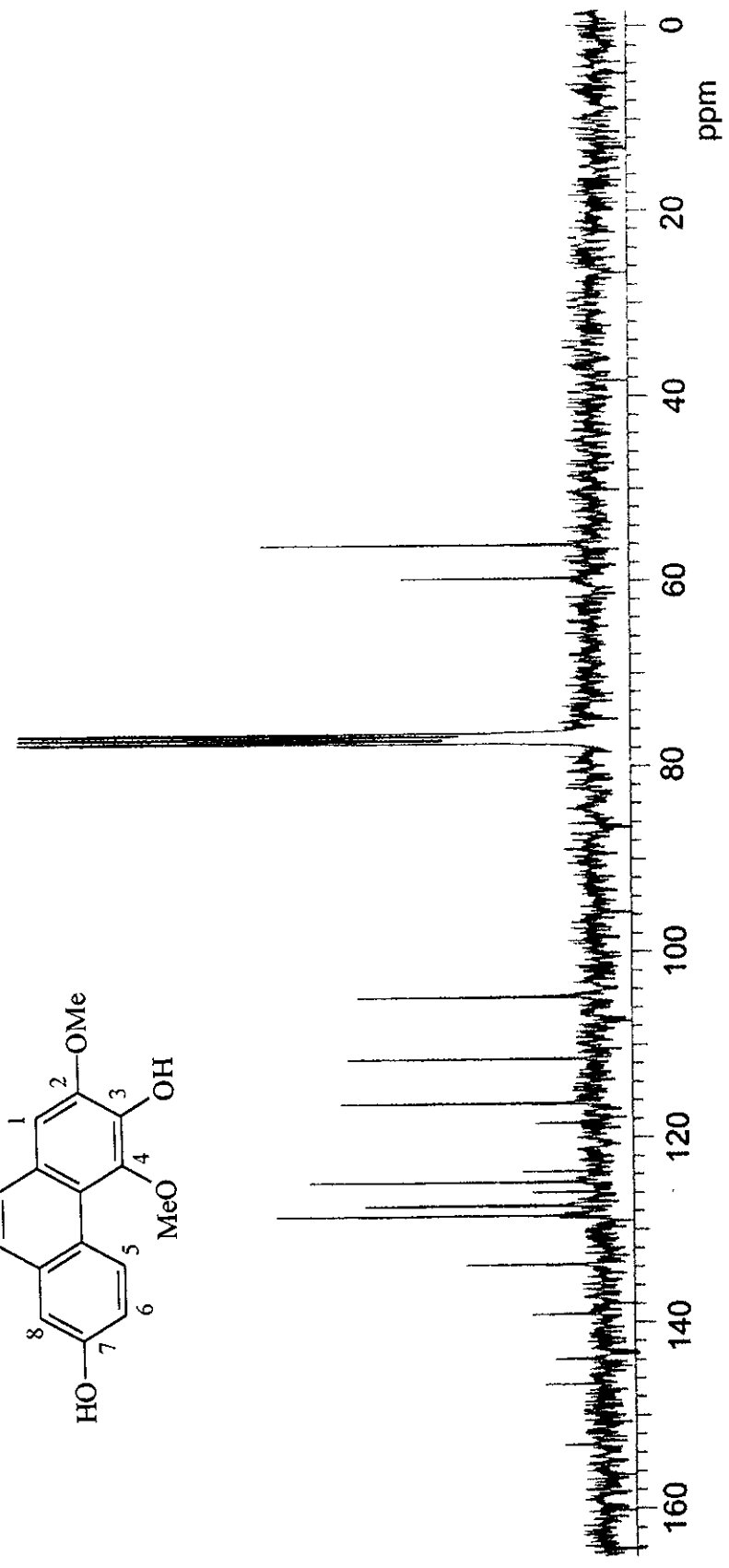
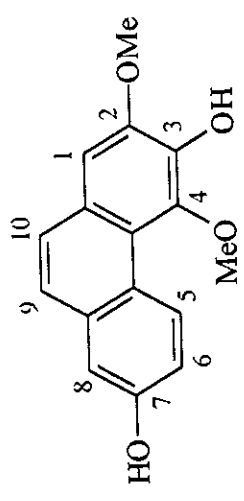
Espectro 31. Espectro en el IR del efemerantol B (39).



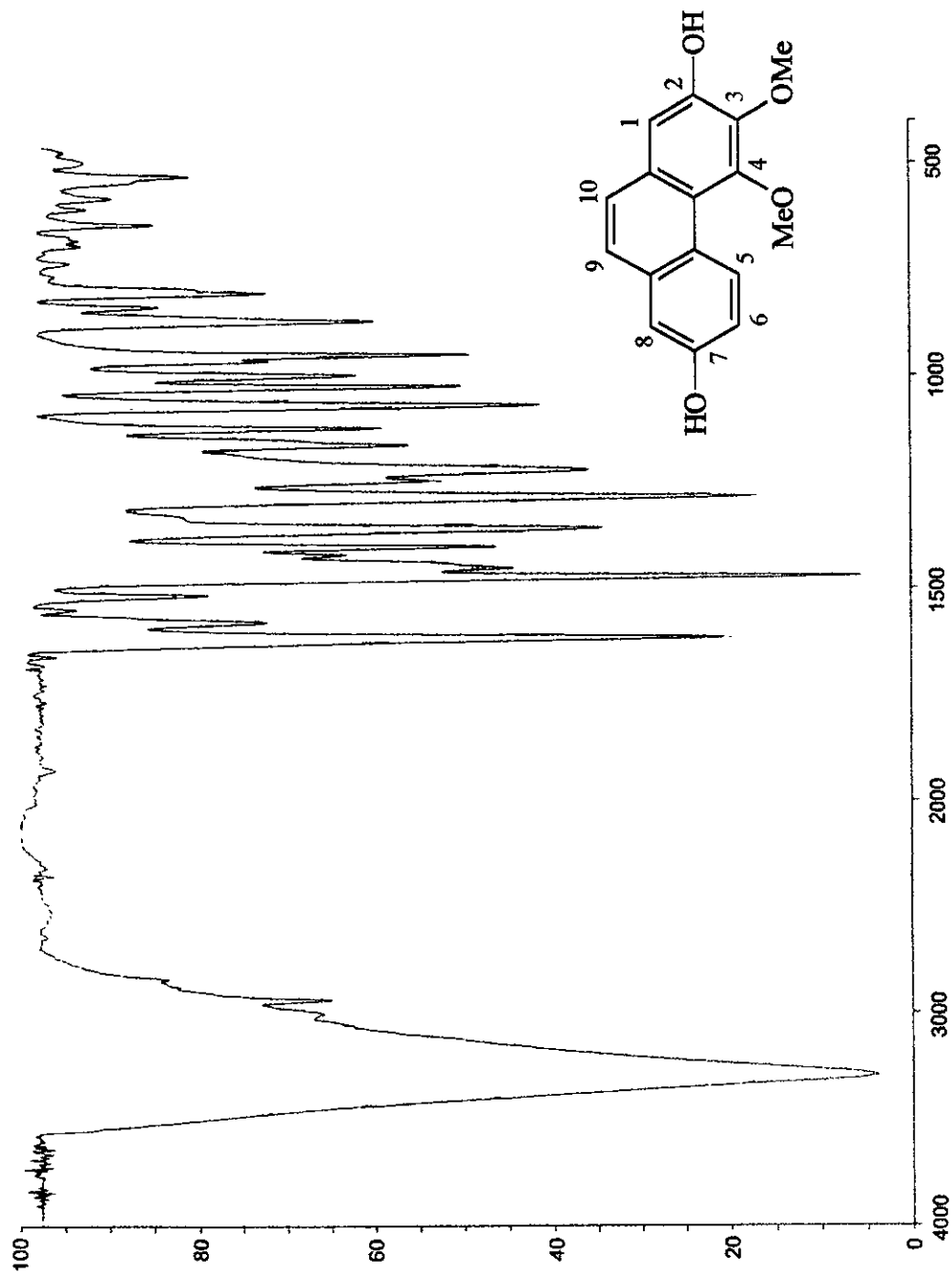
Espectro 32. Espectro de masas modalidad IE del efemerantol B (39).



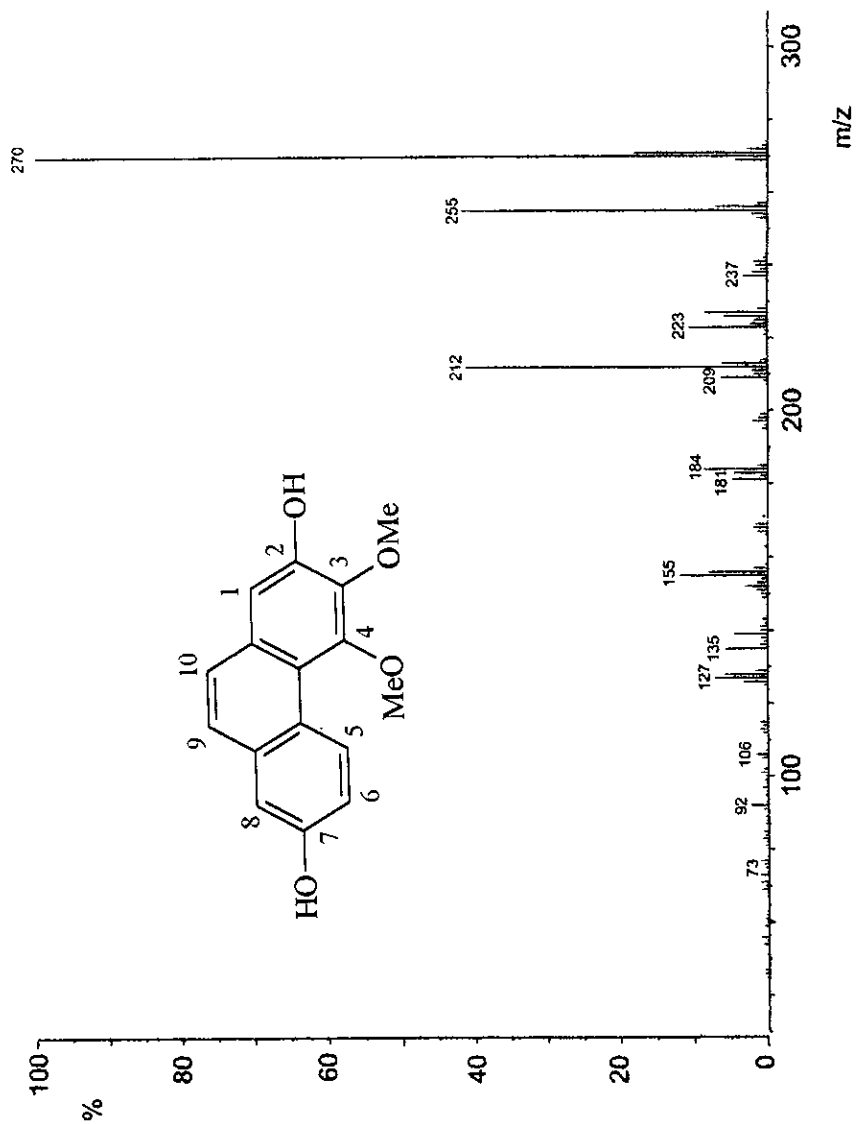
Espectro 33. Espectro de RMN-¹H del efemerantol B (39).



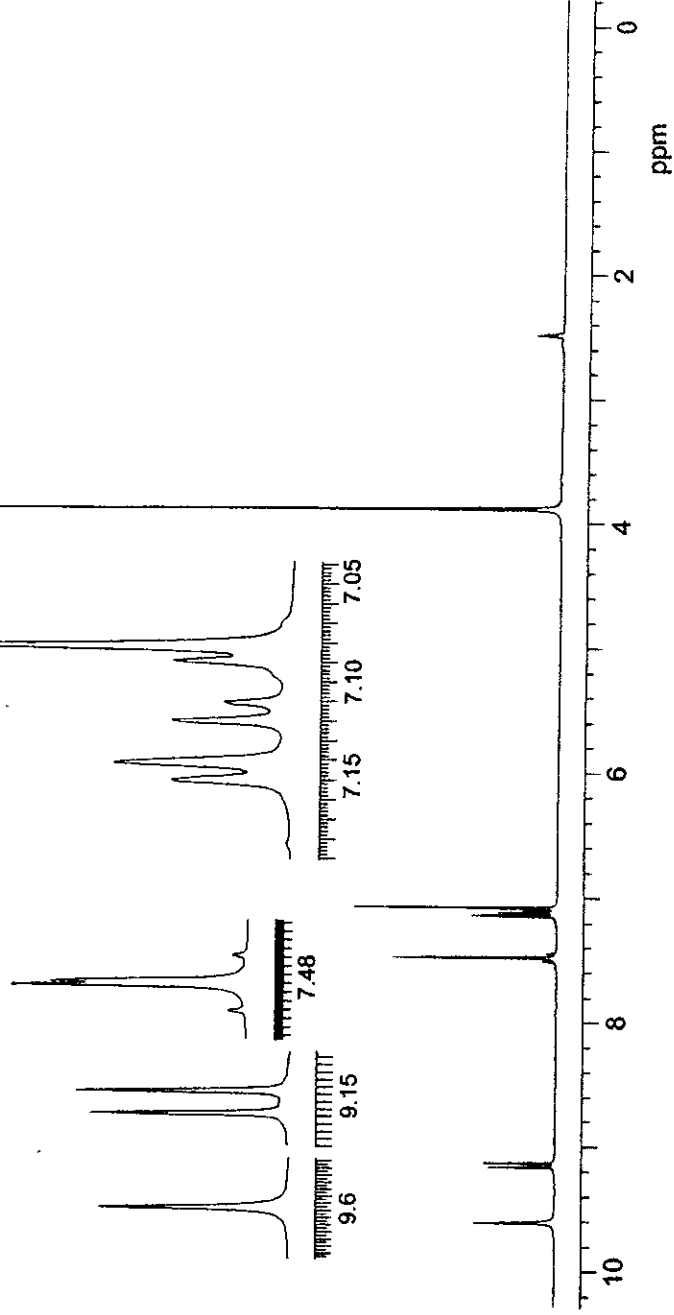
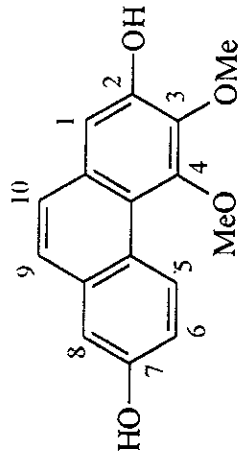
Espectro 34. Espectro de RMN- ^{13}C del efemerantol B (39).



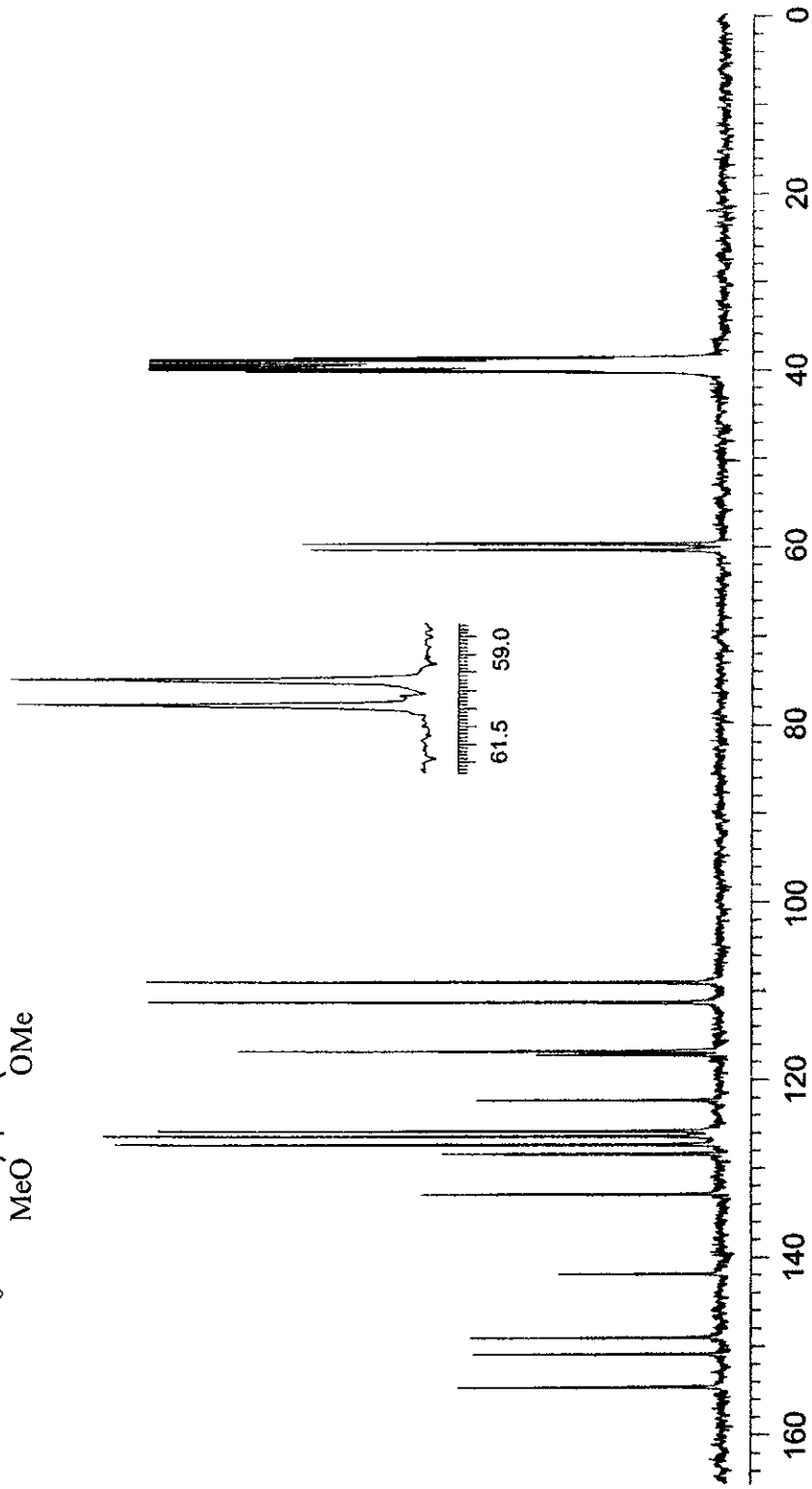
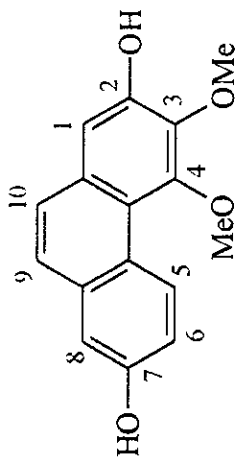
Espectro 35. Espectro en el IR del nudol (41).



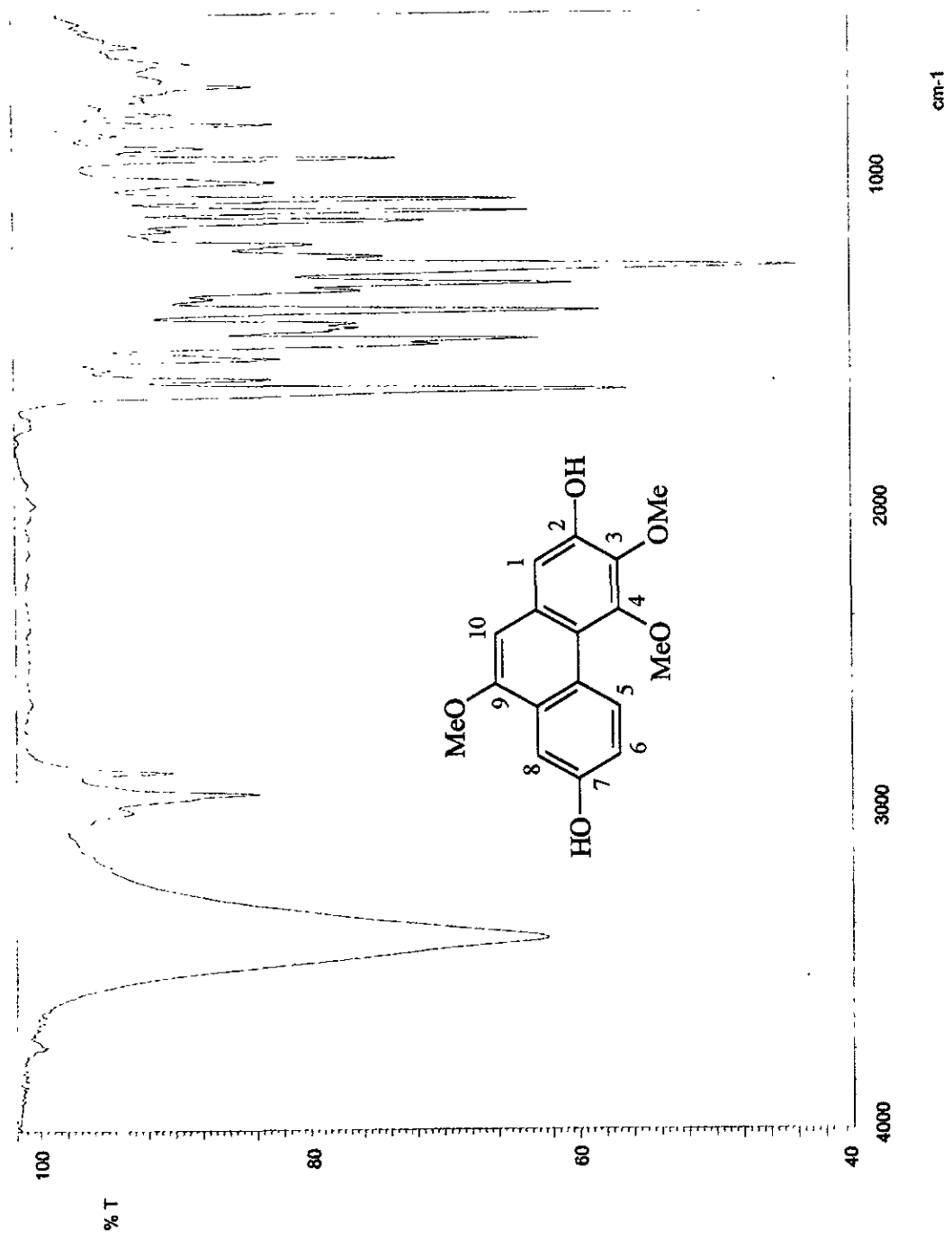
Espectro 36. Espectro de masas modalidad IE del nudol (41).



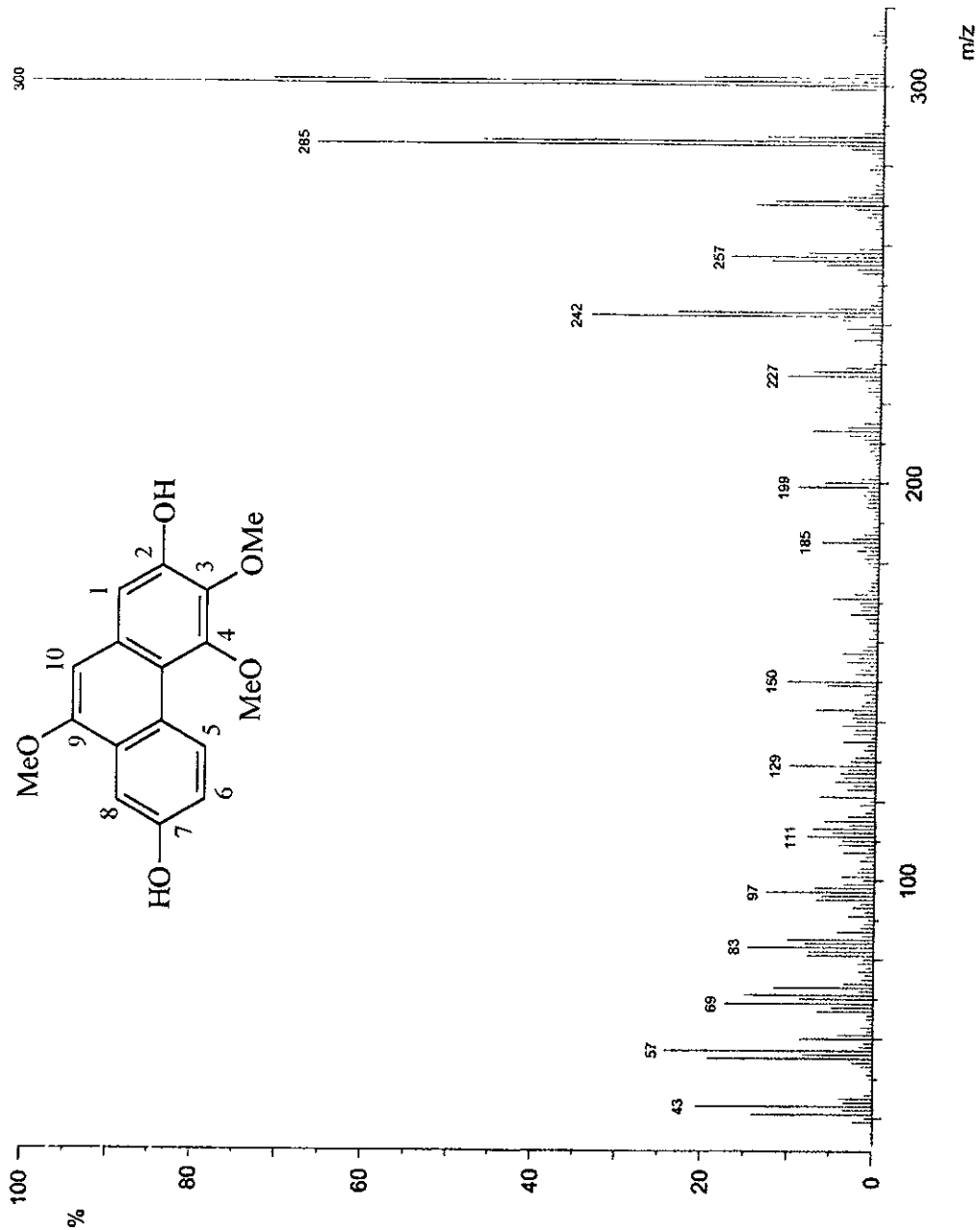
Espectro 37. Espectro de RMN- ^1H del nudol (41).



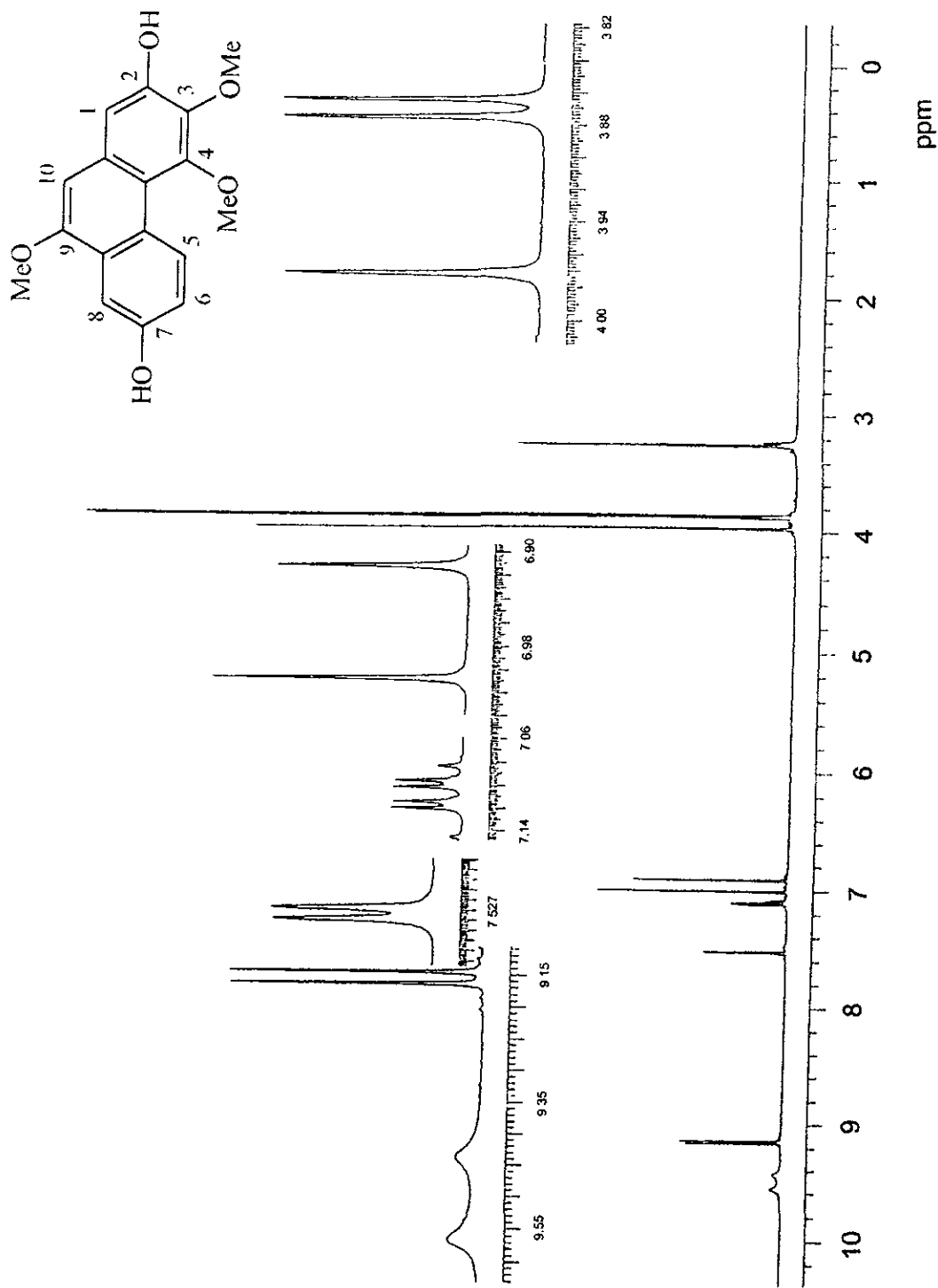
Espectro 38. Espectro de RMN- ^{13}C del nudol (41).



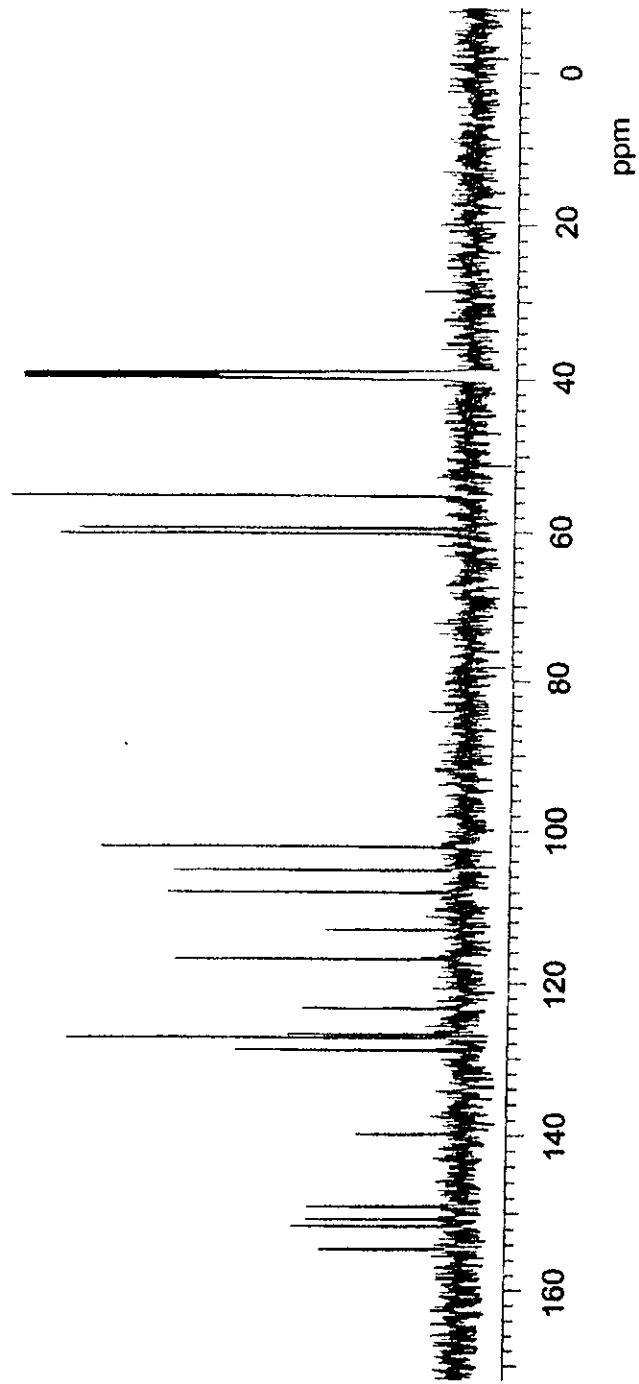
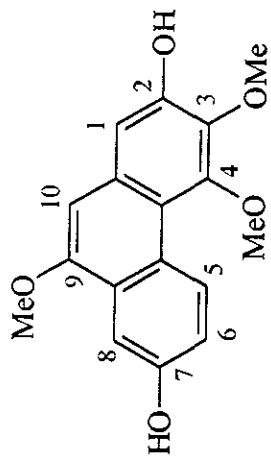
Espectro 39. Espectro en el IR de la gymnopusina (42).



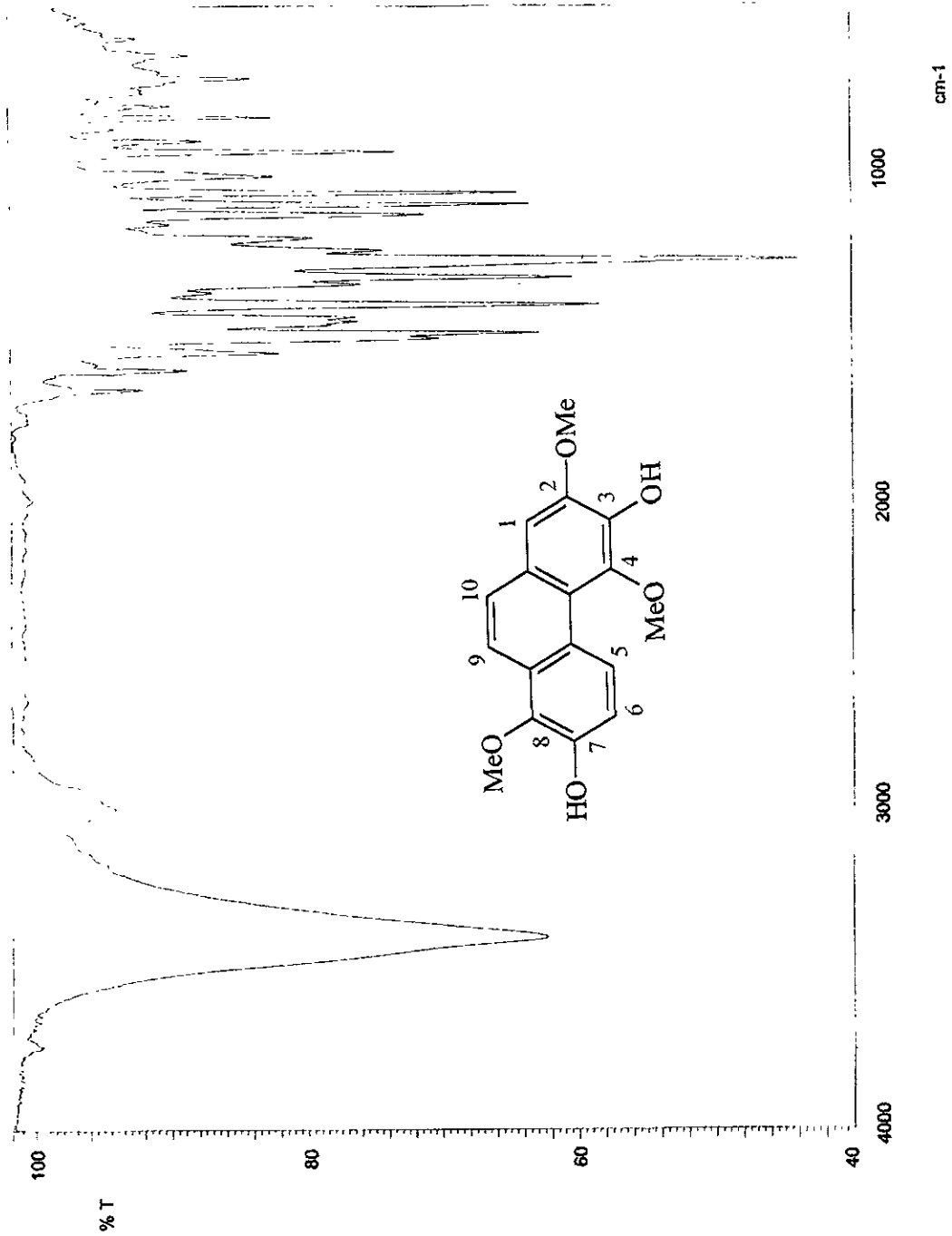
Espectro 40. Espectro de masas modalidad IE de la ginnoposina (42).



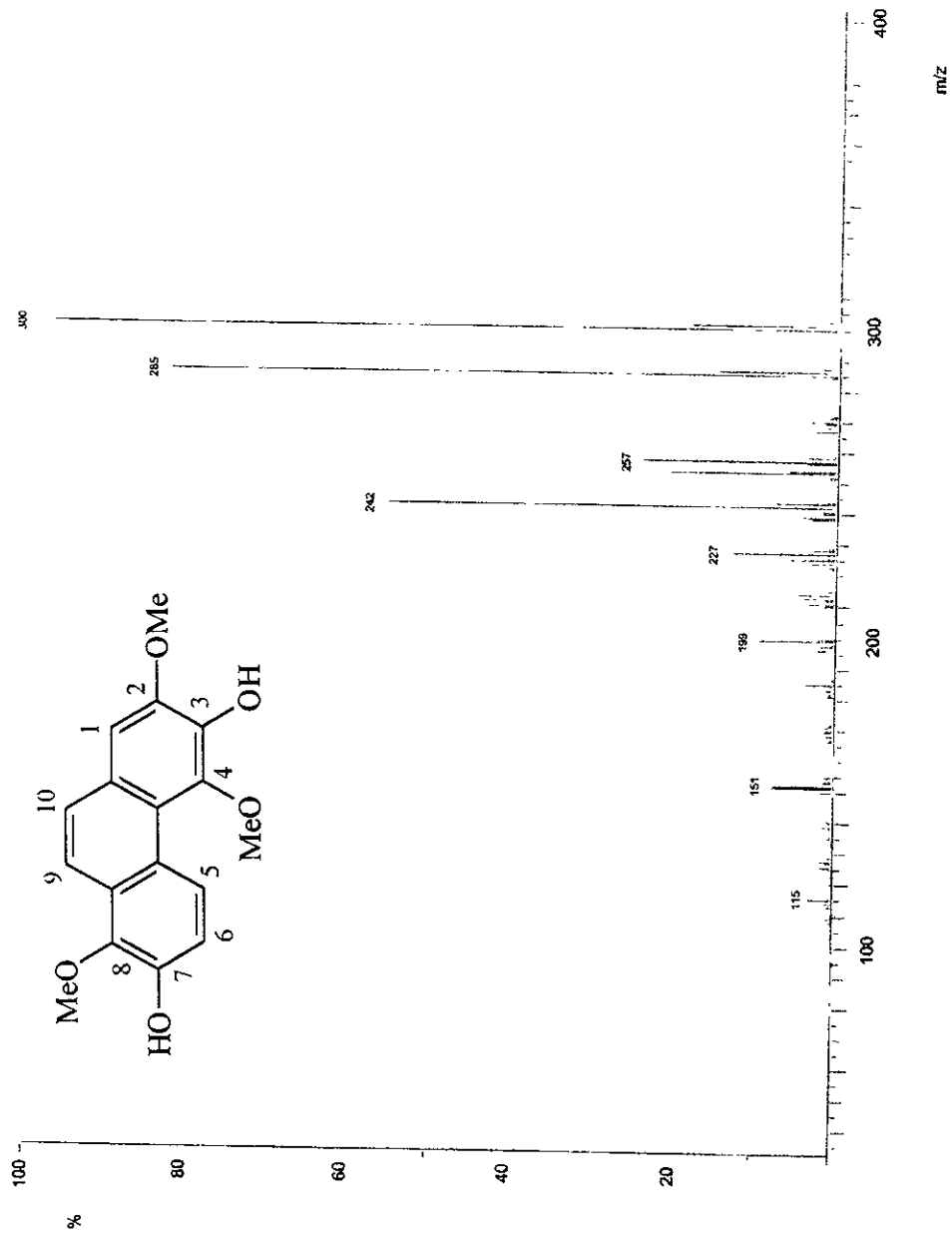
Espectro 41. Espectro de RMN-¹H de la ginnoposina (42).



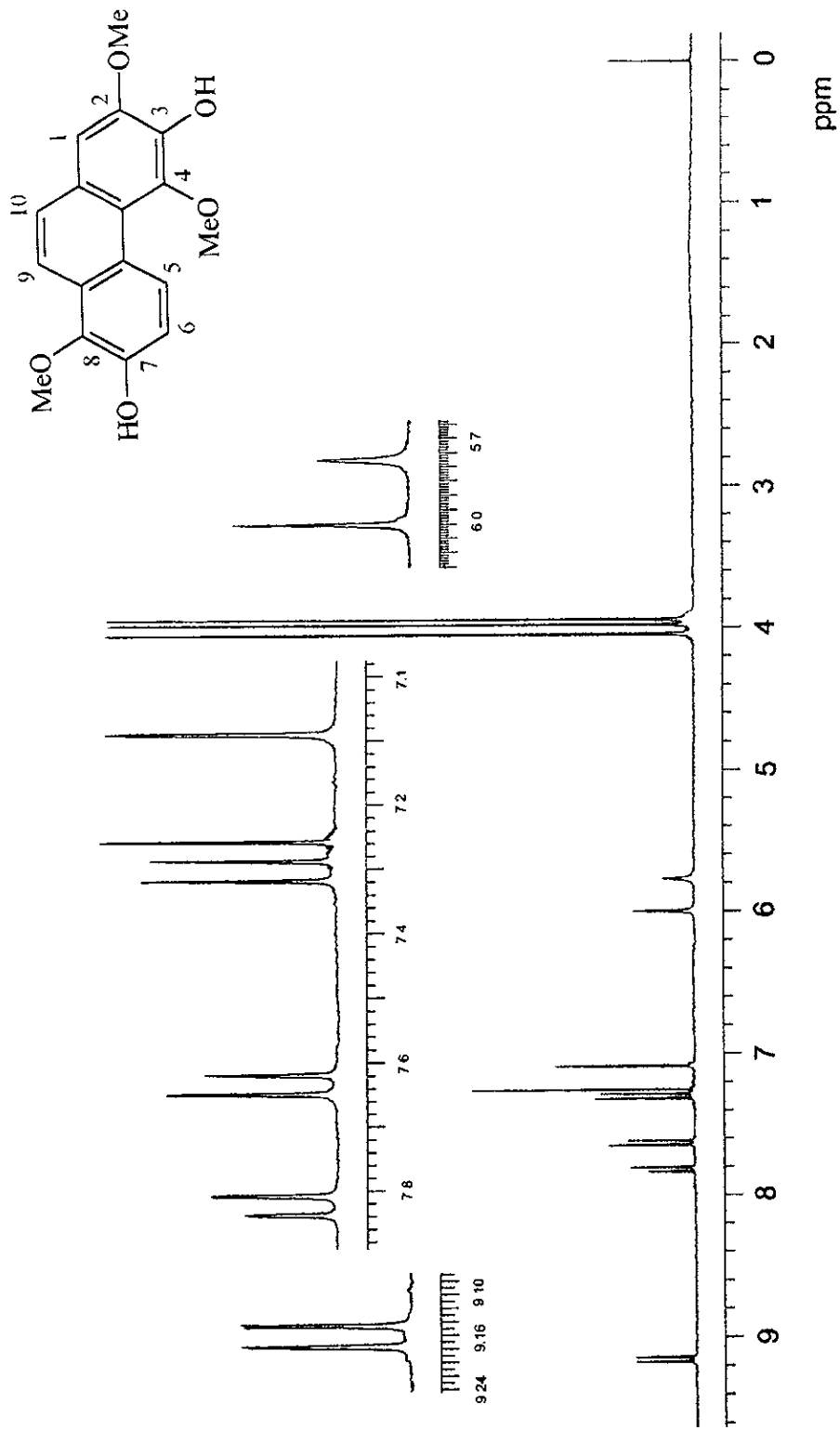
Espectro 42. Espectro de RMN- ^{13}C de la ginnopusina (42).



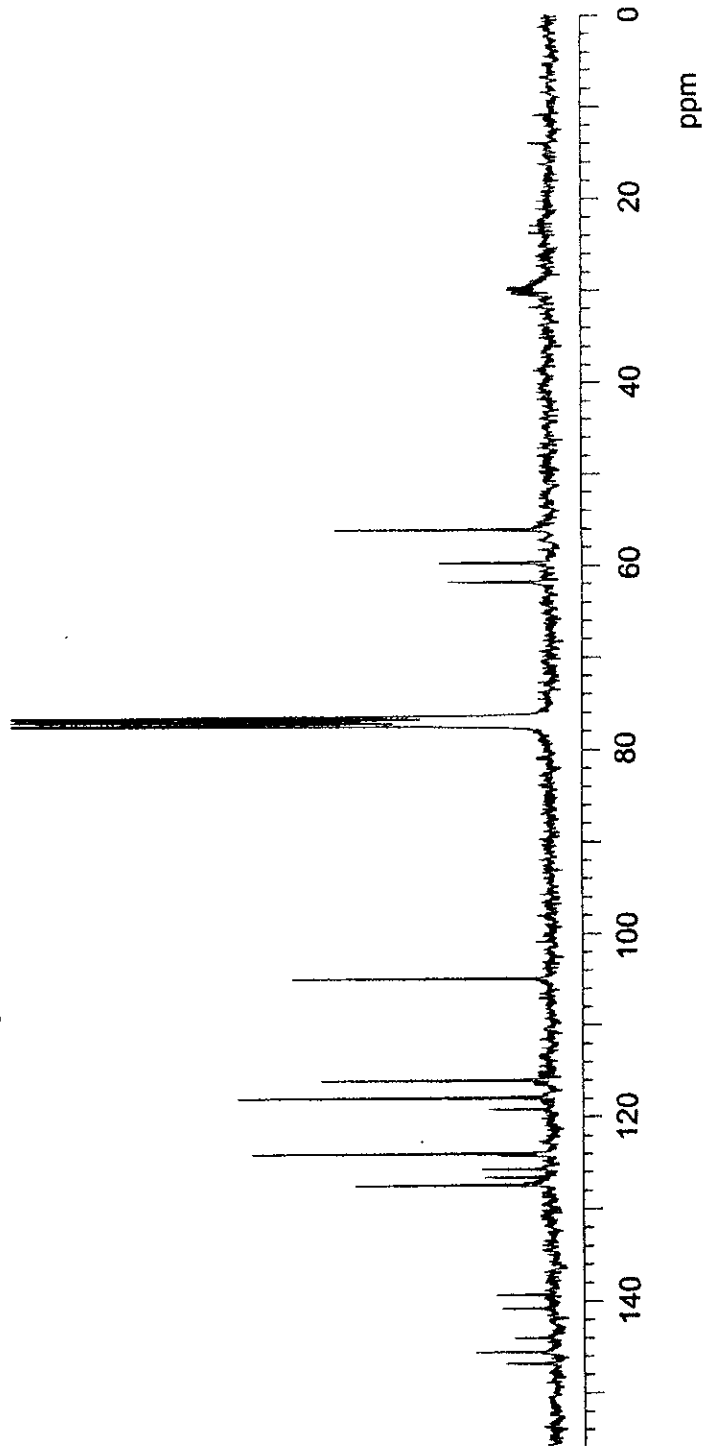
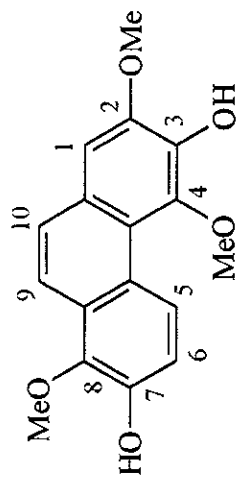
Espectro 43. Espectro en el IR del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54).



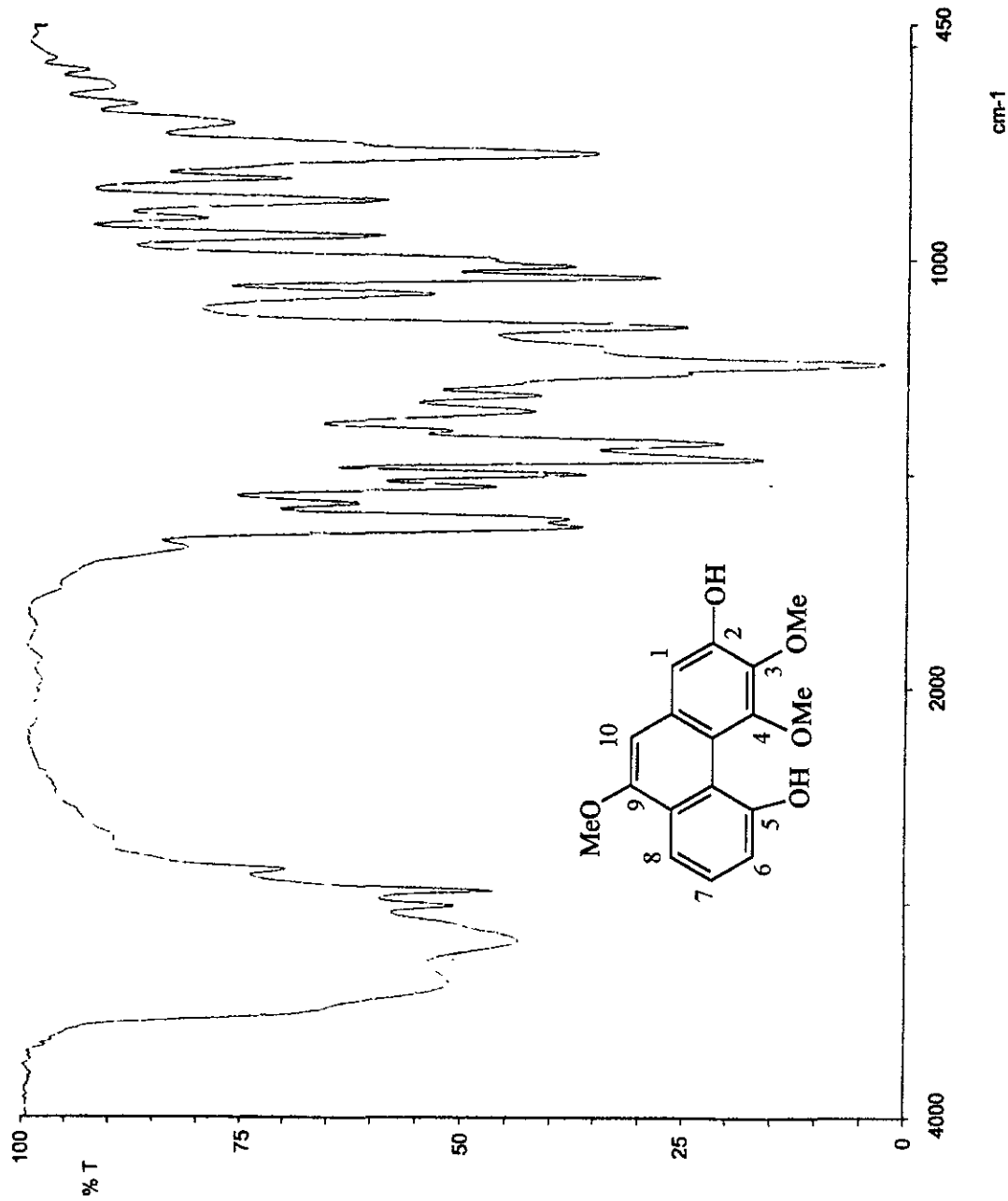
Espectro 44. Espectro de masas modalidad IE del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54).



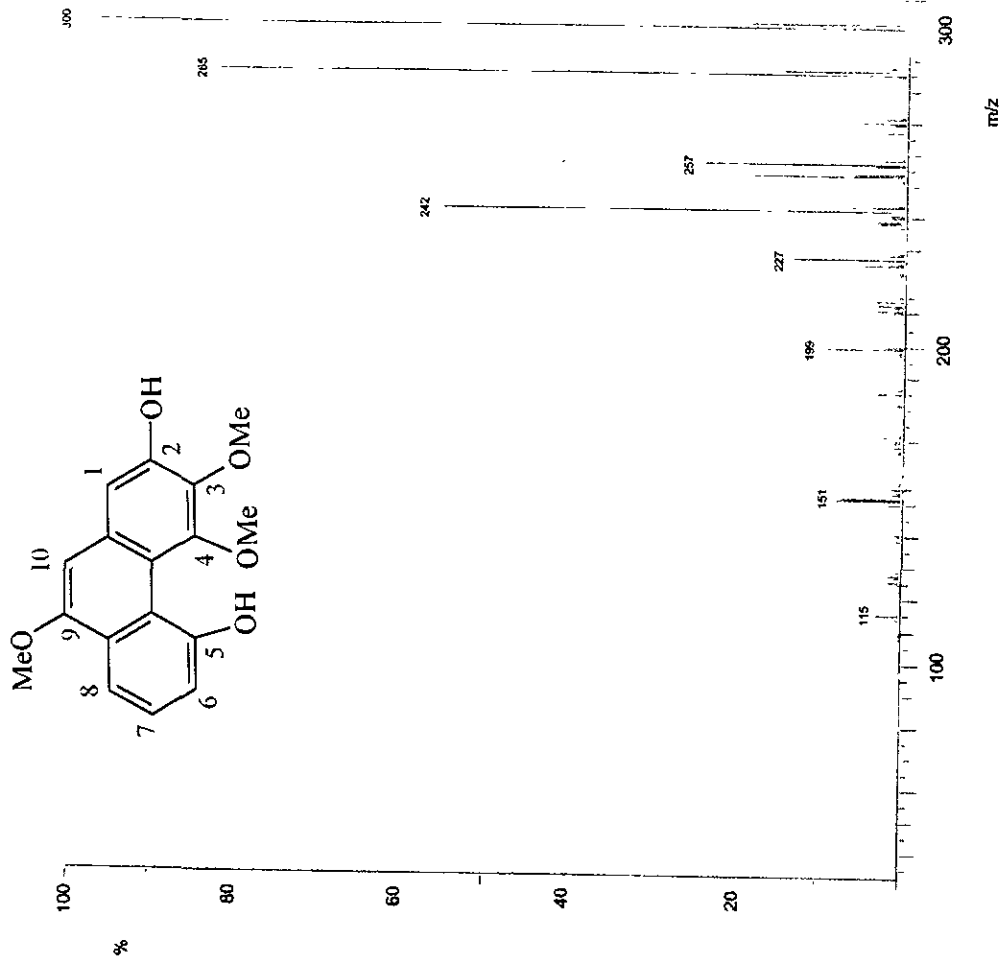
Espectro 45. Espectro de RMN-¹H del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54).



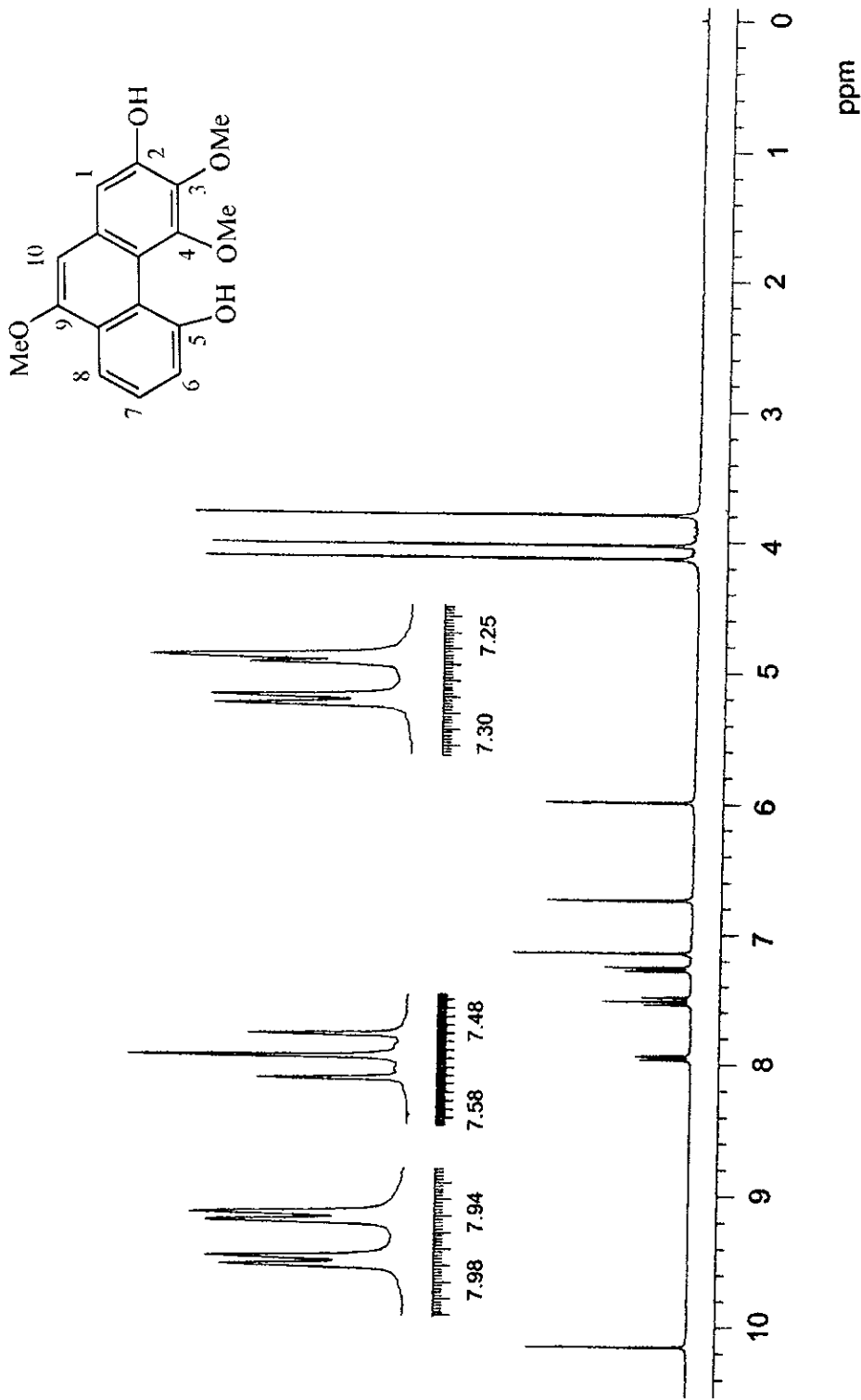
Espectro 46. Espectro de RMN- ^{13}C del 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (54).



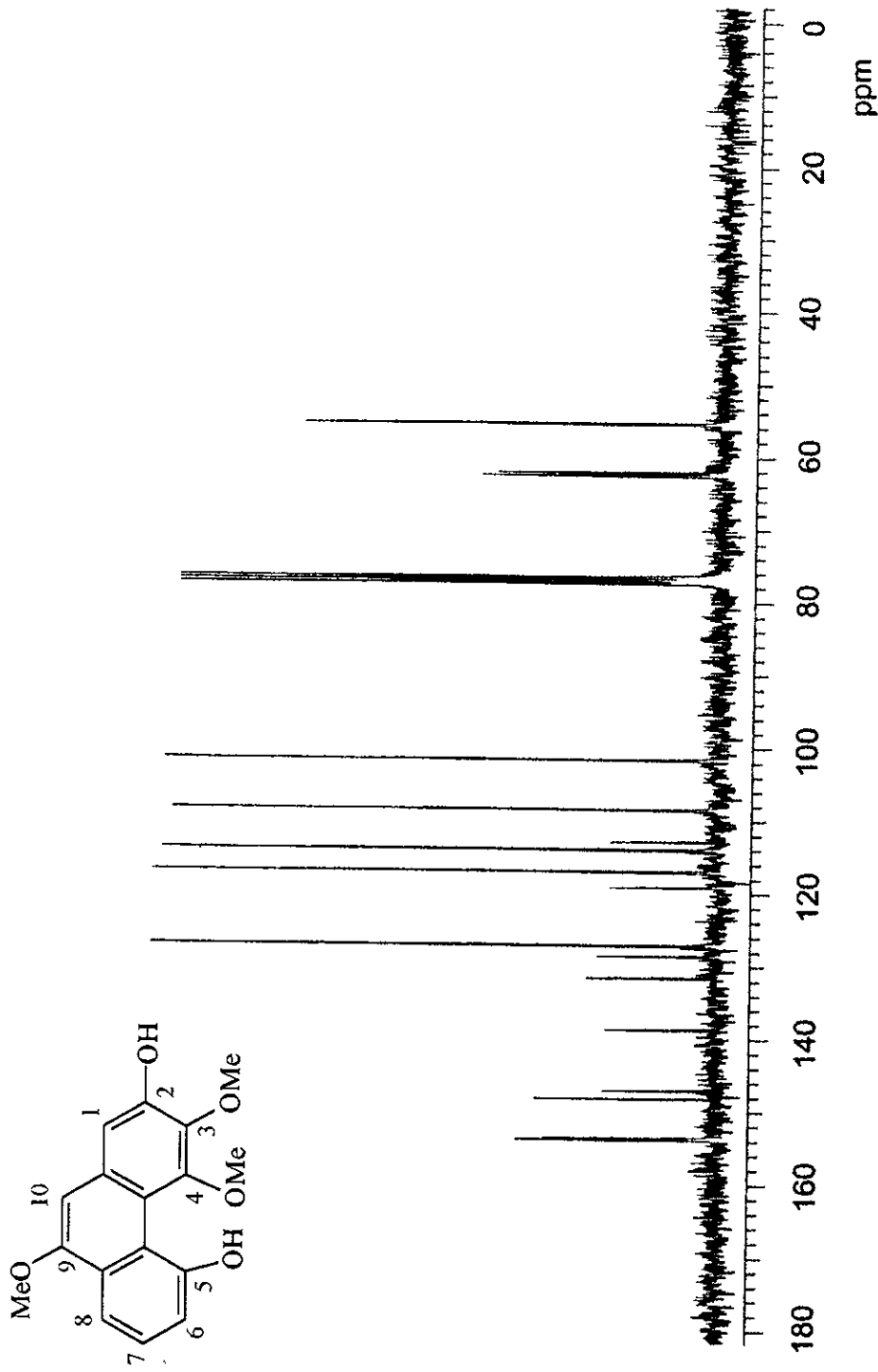
Espectro 47. Espectro en el IR del fimbriol A (63).



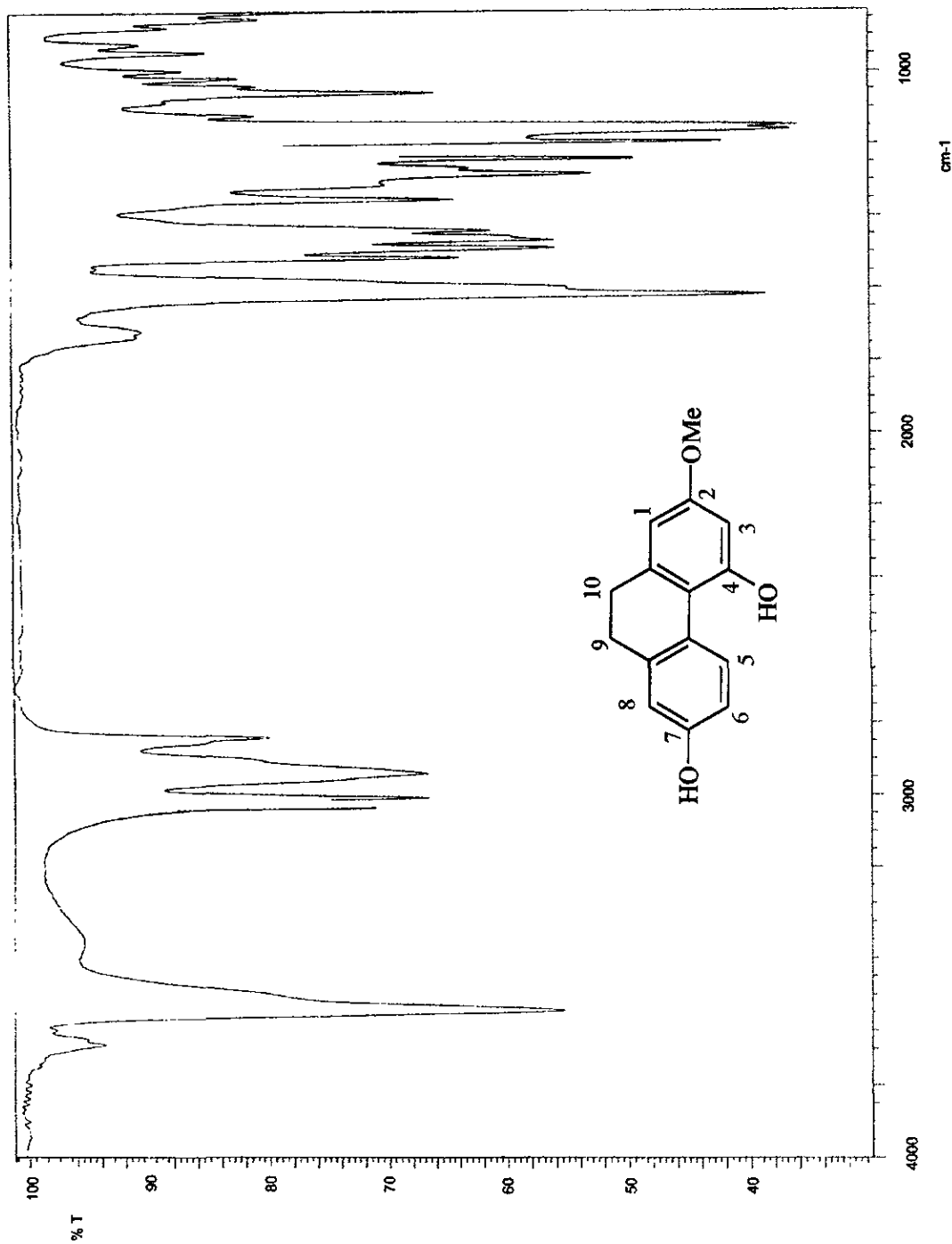
Espectro 48. Espectro de masas modalidad IE del fimbriol A (63).



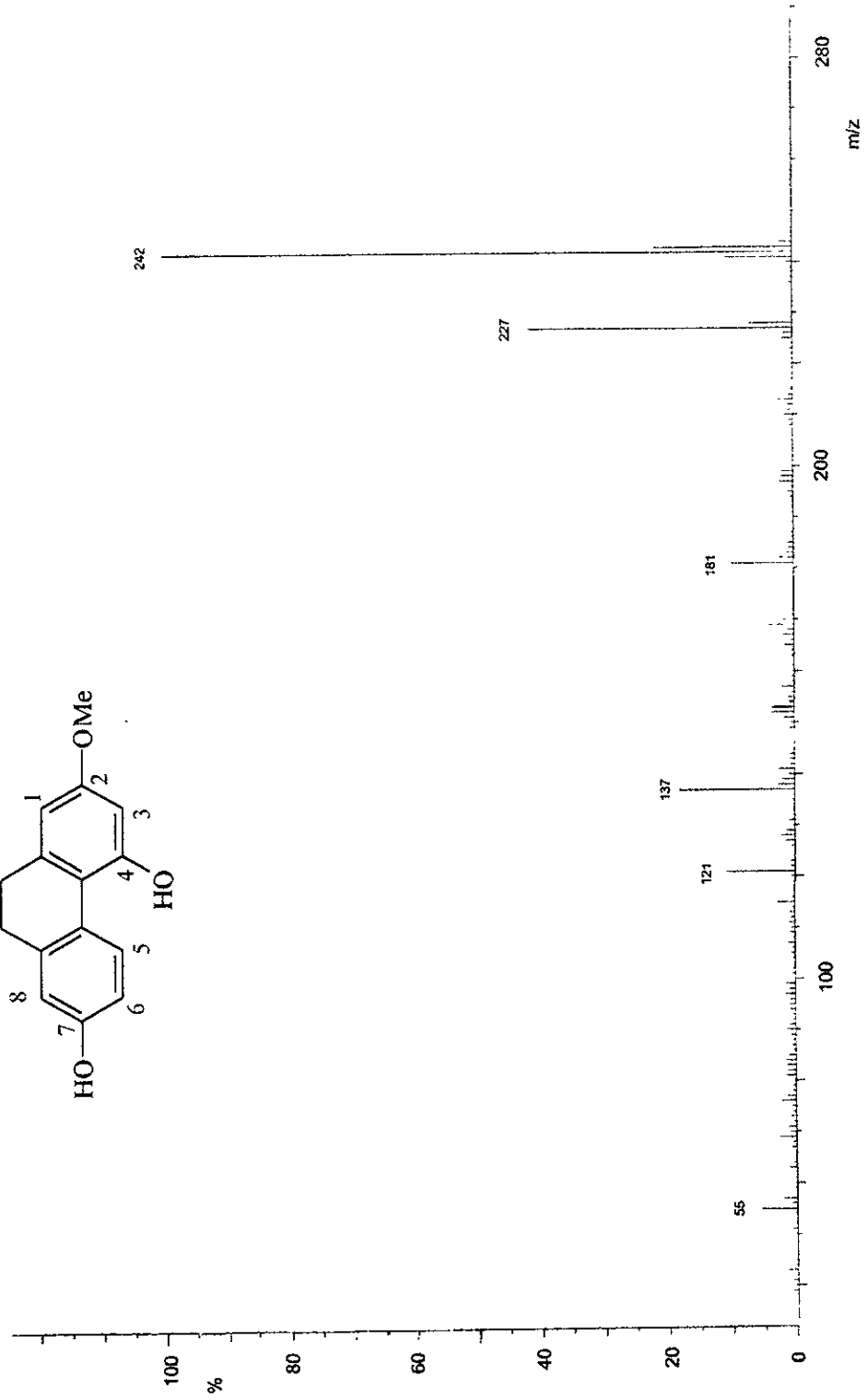
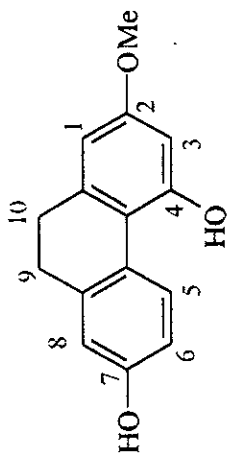
Espectro 49. Espectro de RMN- ^1H del fimbriol A (63).



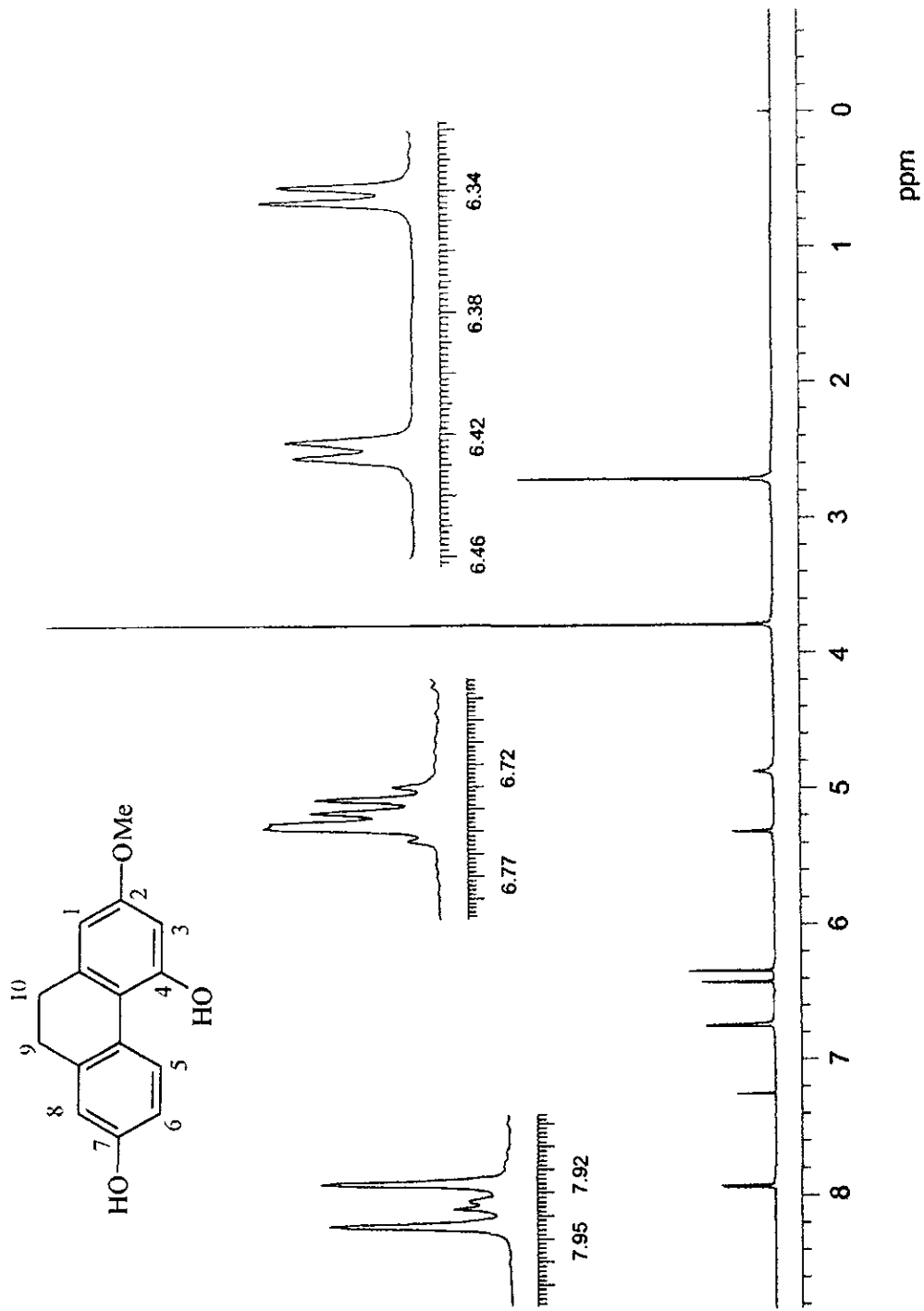
Espectro 50. Espectro de RMN-¹³C del fimbriol A (63).



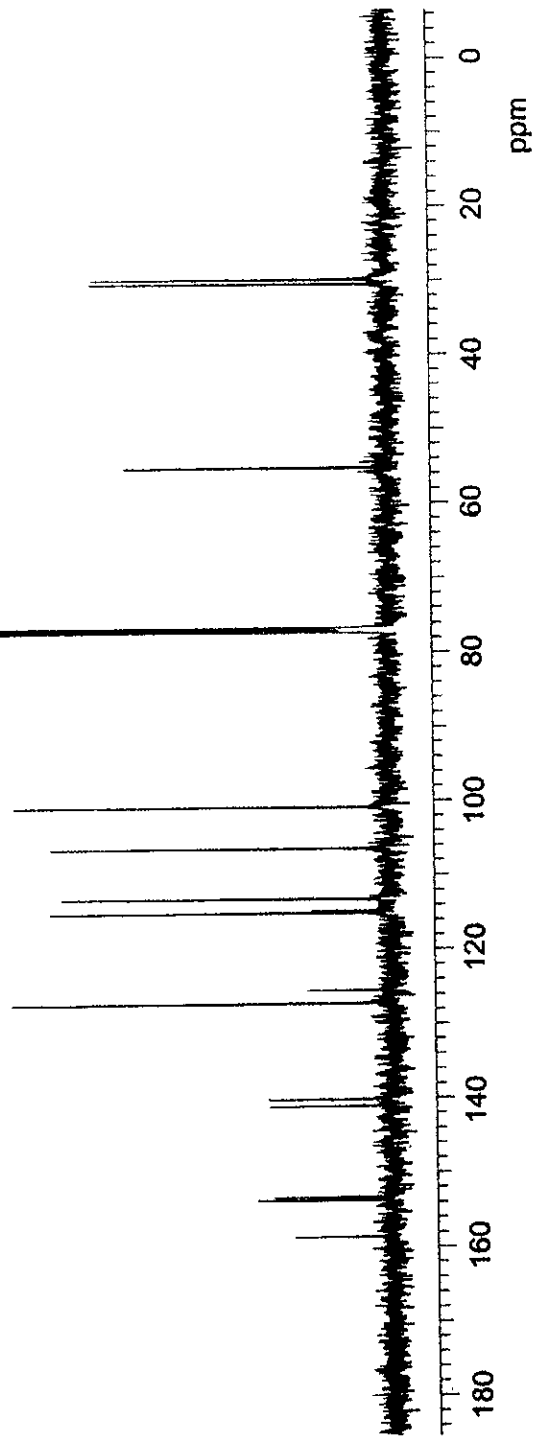
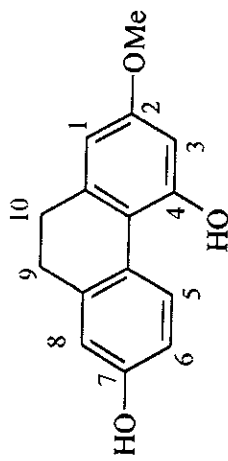
Espectro 51. Espectro en el IR de la lusiatriquina (82).



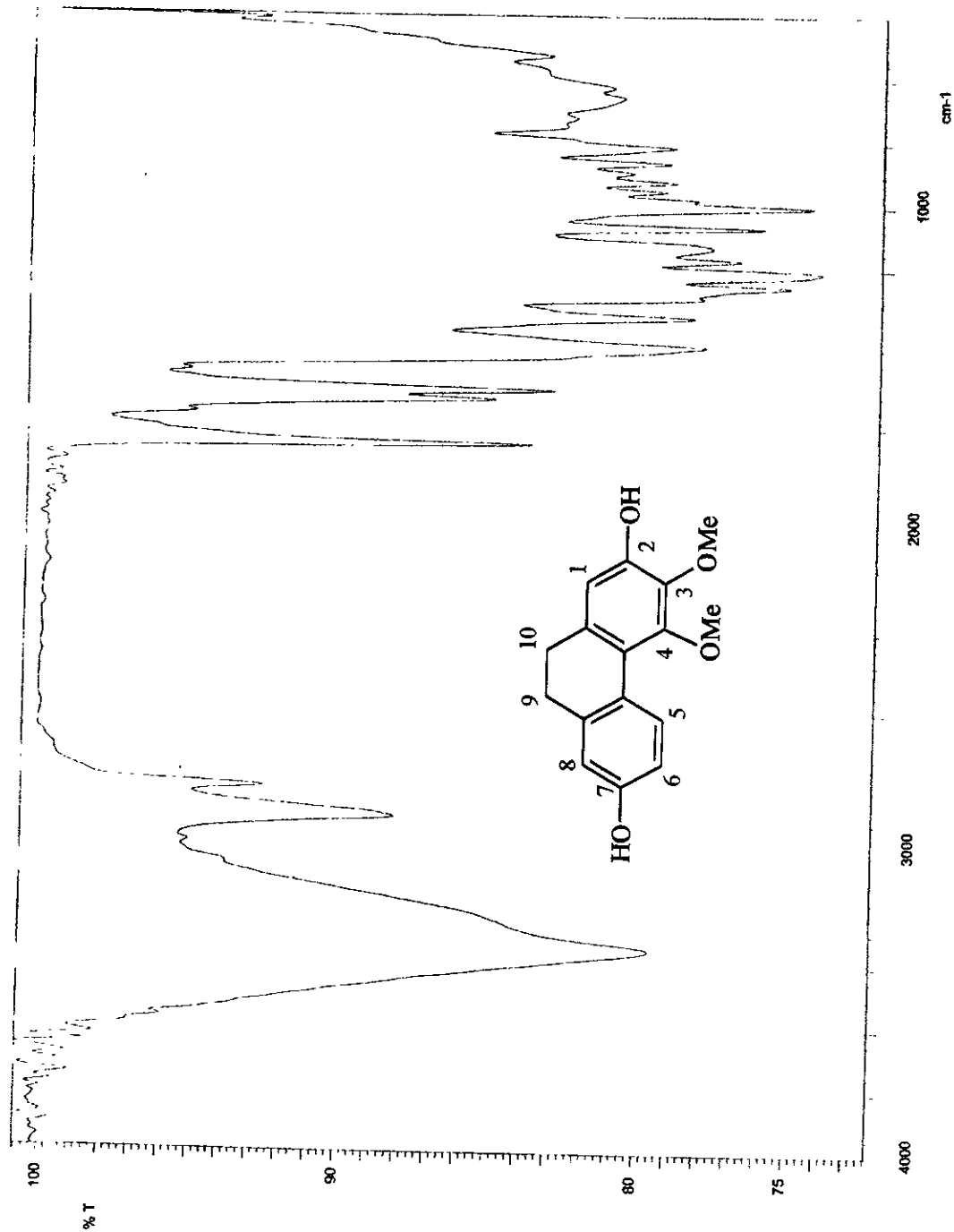
Espectro 52. Espectro de masas modalidad IE de la lusantridina (82).



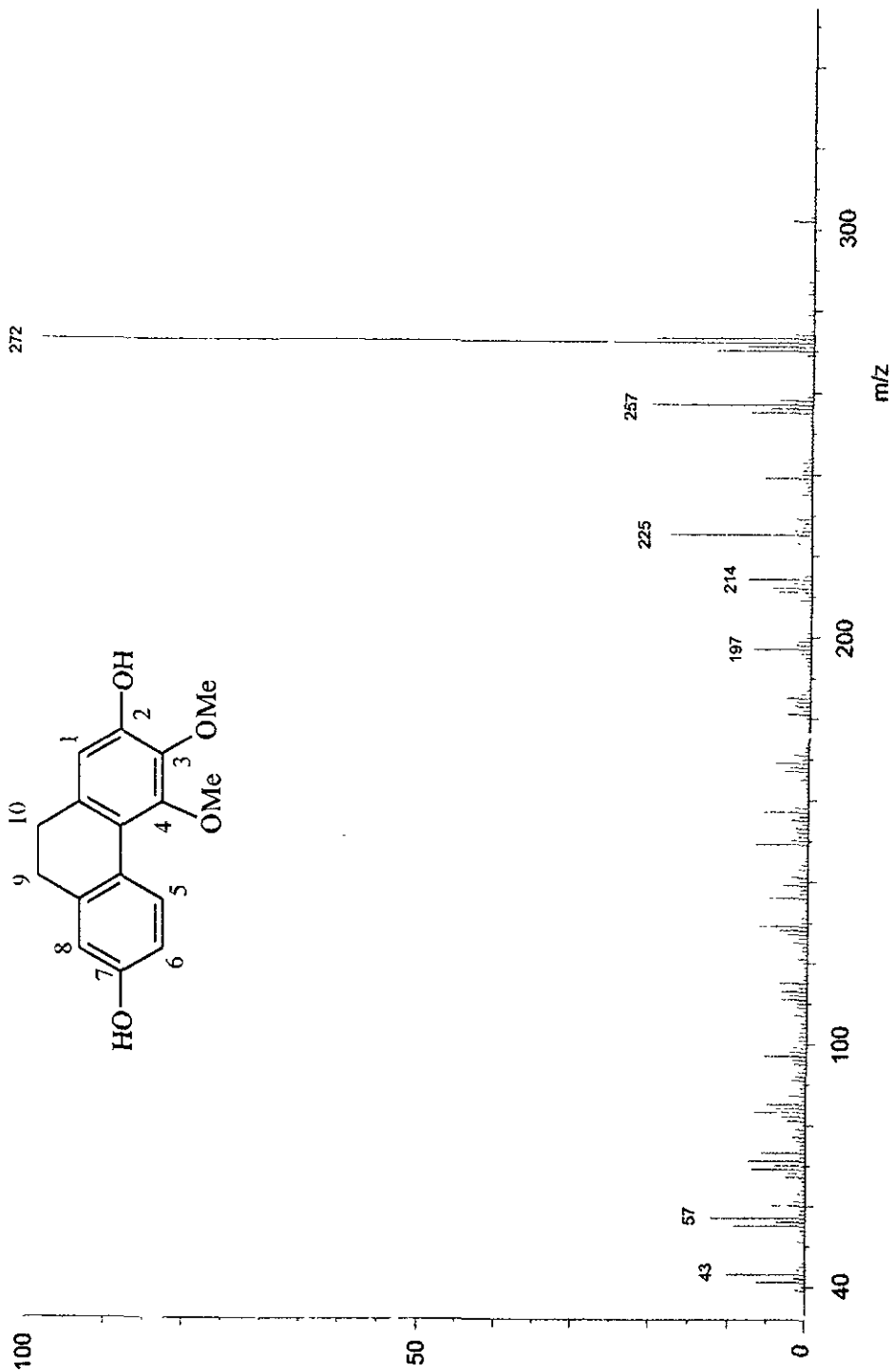
Espectro 53. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de la lusiantridina (82).



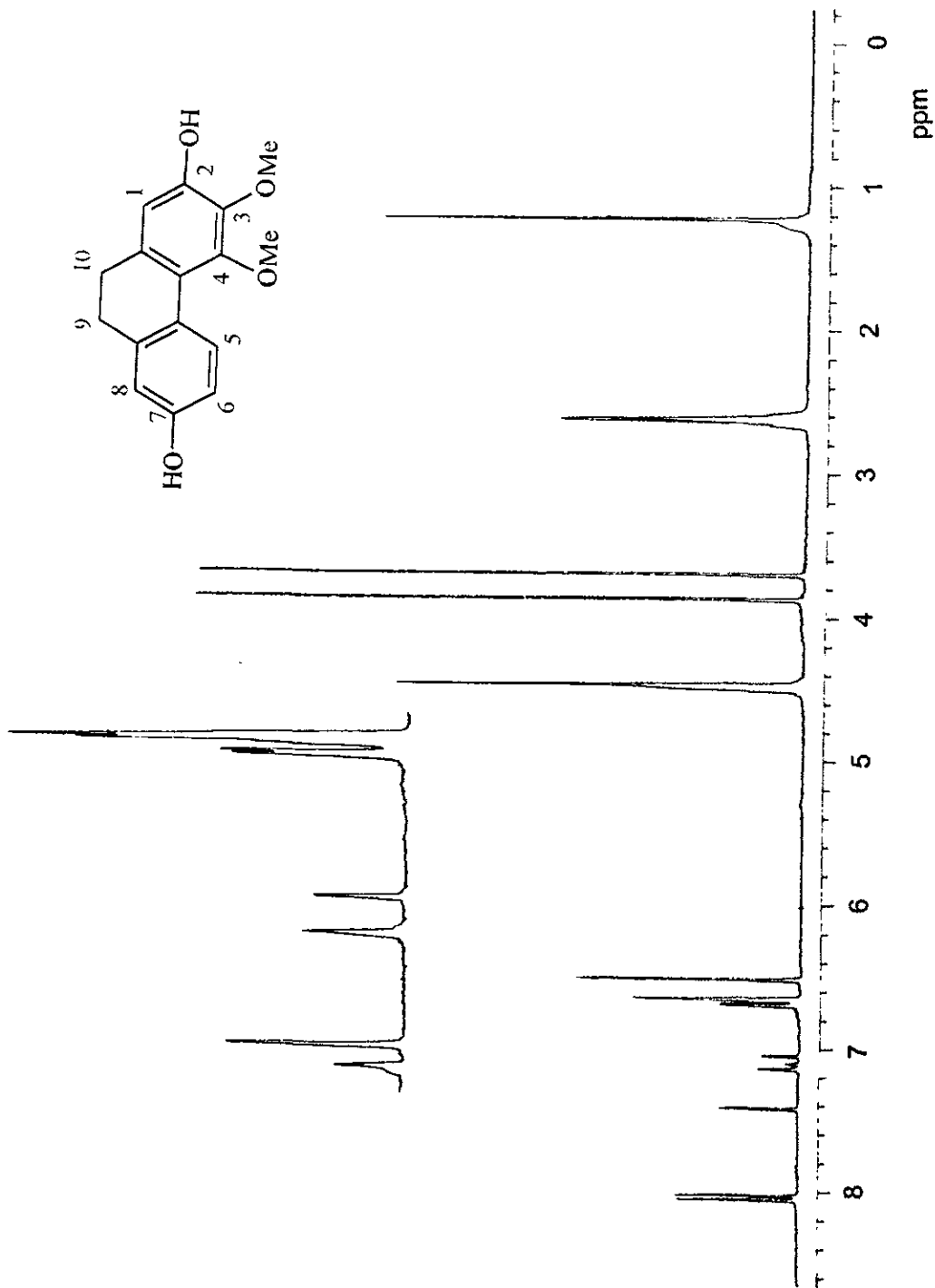
Espectro 54. Espectro de RMN- ^{13}C de la lusiantridina (82).



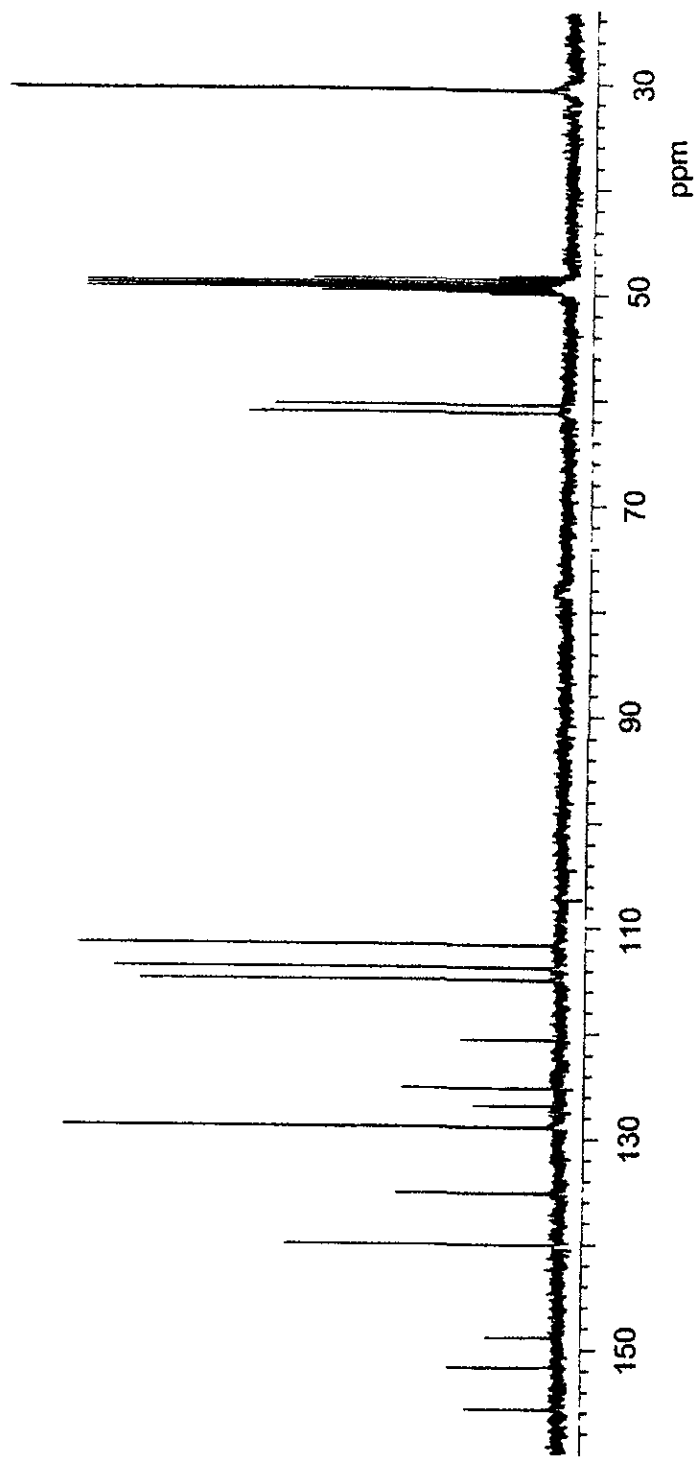
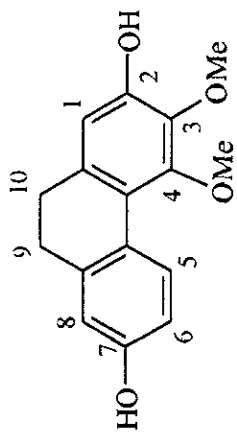
Espectro 55. Espectro en el IR de la eriantridina (84).



Espectro 56. Espectro de masas modalidad IE de la eriantridina (84).



Espectro 57. Espectro de RMN- ^1H de la eriantridina (84).



Espectro 58. Espectro de RMN- ^{13}C de la eriantridina (84).

ANEXO II



Planta Medica

Natural Products and Medicinal Plant Research

Editor

Adolf Nahrstedt, Münster

Co-Editors

Wolfgang Barz, Münster

Rudolf Bauer, Dusseldorf

Nikolaus H. Fischer, Baton Rouge, Louisiana

Gerhard Franz, Regensburg

Walter E. Müller, Frankfurt/M.

Otto Sticher, Zurich

Editorial Advisory Board

Yoshinori Asakawa, Tokushima

Gotz Harnischfeger, Salzgitter

Werner Herz, Tallahassee

Manfred Hesse, Zürich

Kurt Hostettmann, Lausanne

Pierre Potier, Gif-sur-Yvette

Varro E. Tyler, West Lafayette

Pieter A. van Zwieten, Amsterdam

Reprint

Nitric Oxide/cGMP Mediates the Spasmolytic Action of 3,4'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida***

Samuel Estrada¹, Alejandra Rojas², Yaira Mathison^{3,4}, Anita Israel⁴, and Rachel Mata^{1,*}

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de Investigación en Plantas Medicinales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México

² Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

³ Facultad de Medicina José María Vargas and

⁴ Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Received: May 15, 1998; Revision accepted: July 26, 1998

Abstract: Five aromatic compounds, 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl (**1**), batatasin III (**2**), coelonin (**3**), 3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene (**4**), and 3,7-dihydroxy-2,4,8-trimethoxyphenanthrene (**5**) were isolated from the orchid *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr. Compounds **1**–**5** induced a concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of the rat ileum with potencies comparable or higher to that of papaverine. The relaxation evoked by compounds **1**–**4** was blocked by α -NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase. It was also demonstrated that **1** increased cyclic GMP content in rat ileum rings. Compound **1**-induced elevation of cGMP was inhibited by α -NAME and ODQ, inhibitors of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase, respectively. These results indicate that nitric oxide/cGMP formation constitute the signaling pathway in the spasmolytic action of compound **1**.

Key words: *Scaphyglottis livida*, Orchidaceae, phenanthrenes, dihydrostilbenes, smooth muscle relaxation, nitric oxide, α -NAME, ODQ, soluble guanylyl cyclase.

Introduction

In our search for new potential spasmolytic agents (**1**, **2**) from Mexican medicinal plants, we have now investigated *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr., an epiphytic orchid widely distributed along the tropical forest of the State of Veracruz, Mexico. To the best of our knowledge, this species has not been the subject of phytochemical or pharmacological studies. Indigenous people refer to the orchid as "parasita" and employ the whole plant medicinally (**3**). The ground herb is applied topically to the body of humans to eliminate ectoparasites. On the other hand, the decoction is employed for the treatment of stomach aches and to avoid abortion. These popular uses suggested the presence of smooth muscle relaxant agents in the species. To validate this hypothesis, the ability of the crude extract, fractions and pure compounds from *S. livida* to relax the spontaneous rat ileum contractions was investigated in the present study. In addition, the effect of the isolates on cholinergic, histaminergic, nitrenergic, and ion induced-smooth muscle contractions was analyzed. Finally, the possible involvement of the nitric oxide/cGMP system in

the relaxatory response induced by the major active principle, namely 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl (**1**), was investigated by using a radioimmunoassay procedure.

Materials and Methods

General experimental procedures

IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer 599B spectrophotometer. UV spectra were registered on a Shimadzu 160 UV apparatus in MeOH solutions. ¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C-NMR (125 MHz) spectra were recorded in a Varian UNITY PLUS 500 Spectrometer in CDCl₃ using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. EI-MS were obtained on a JEOL JMS-AX505SHA spectrometer, at an ionization energy of 70 eV. HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with Waters UV photodiode array detector (900) set at 274 nm, using a silica gel column (19 mm id × 300 mm). Control of the equipment, data acquisition, processing and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters). CC: Silica gel 60 (Merck, 30–70 mesh). TLC: Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck).

Plant material

Scaphyglottis livida (whole plant) was collected in Catemaco, State of Veracruz, in May 1995. A voucher specimen (G. Carmona-Díaz 116 AMO) has been deposited at the Instituto de Ecología Herbarium (XAL), Xalapa, Veracruz.

Extraction and isolation

The air-dried plant material (3.9 kg) was ground into powder and extracted exhaustively by maceration at room temperature with a mixture of MeOH-CHCl₃ (1:1). After filtration, the extract was concentrated in vacuo to yield 365 g of residue. The concentrated extract was subjected to column chromatography over silica gel (1.2 kg) and eluted with a gradient of hexane/EtOAc/MeOH: hexane (61); hexane-EtOAc, 9.5:0.5 (171); hexane-EtOAc, 9:1 (501); hexane-EtOAc, 8.5:1.5 (301); hexane-EtOAc, 8:2 (321); hexane-EtOAc, 7:3 (151); hexane-EtOAc, 6:4 (71); hexane-EtOAc, 1:1 (181);

hexane-EtOAc, 2.5 : 7.5 (71); EtOAc (141); EtOAc-MeOH, 9 : 1 (141); EtOAc-MeOH, 8 : 2 (71); EtOAc-MeOH, 7 : 3 (51); EtOAc-MeOH, 1 : 1 (81). Two hundred and thirty five fractions (11 each) were collected and combined to produce eleven pooled fractions (F-I to F-IX), based on their TLC profiles. The most active fractions according to the pharmacological testing were F-V and F-VI.

Active fraction F-V (29.9 g) was partitioned between CHCl_3 and 2 N aq. NaOH solution. The aq. alkaline solution was acidified with 2 N aq. HCl solution and the liberated solids extracted with CHCl_3 . The resulting organic fraction was washed with H_2O , dried over Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo to yield 20.5 g of a phenolic mixture. The mixture was chromatographed on a silica gel column (236 g) using hexane with increasing amounts of CHCl_3 and CHCl_3 enriched with EtOAc. Fractions 97–112 (eluted with CHCl_3 -EtOAc, 95 : 5) yielded compound **1** (345 mg); from fractions 113–118, also eluted with CHCl_3 -EtOAc, 95 : 5, were obtained 53.8 mg of **2**; finally, fractions 119–130 (eluted with CHCl_3 -EtOAc, 90 : 10) afforded 59 mg of **3**. All the compounds were isolated as glassy solids. Spectroscopy data of these compounds (IR, UV, MS, and NMR) corresponded with those in the literature for 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl (**4**), batatasin III (**5**), and coelonin (**6**), respectively.

F-VI (7.45 g) was worked up following the same procedure used for F-V. The phenolic mixture (6.8 g) was chromatographed over a silica gel column (190 g) and eluted with hexane, hexane- CHCl_3 , CHCl_3 , CHCl_3 -EtOAc, and EtOAc mixtures of increasing polarity to yield nineteen tertiary fractions (FVI-1 to FVI-19). HPLC purification of fraction FVI-9 (eluted with CHCl_3 -EtOAc 95 : 5) on a normal phase silica column [6.7 ml/min, hexane-*i*-PrOH-MeOH (94 : 3 : 3)] afforded compounds **4** (24.4 mg) and **5** (10.3 mg), which were also isolated as glassy solids. The spectroscopic parameters of both compounds were identical to those previously described for 3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene (**7**) and 3,7-dihydroxy-2,4,8-trimethoxyphenanthrene (**8**), respectively.

Pharmacological evaluation

Isolated rat ileum test: Male Wistar rats (200–250 g) were used. The animals were killed by cervical dislocation. The ileum was dissected out and placed in Krebs-Henseleit (KH) solution, pH 7.4, with the following composition (in mM): NaCl 119, KCl 4.6, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, CaCl_2 1.5, NaHCO_3 20, and glucose 11.4. Strips (1 cm long) were dissected and mounted in organ baths containing KH solution gassed with a mixture of 5% CO_2 and 95% O_2 and continuously recorded for isometric tension with a Grass FTO3 force-displacement transducer and registered on a Grass 7D polygraph as previously described (9). After a stabilization time of 30 min, a 10 min control period was recorded. The test substances (extract, chromatographic fractions, and compounds), dissolved in DMSO or water, were added to the bath in a volume of 50 μl at different concentrations (one concentration was used per ileum segment). All the responses were recorded during 10 min. After this, the tissues were washed (three times) with KH solution to check the reversibility of the effect induced by compounds **1–5**. Moreover, the contractions induced by histamine (Hist, 1×10^{-3} M) was thereafter recorded for 30 min to observe tissue recovery. The effect of the extract,

fractions, isolated compounds, and positive controls was determined by comparing the areas under the curve (AUC) inscribed by the frequency and the amplitude of the ileum contractions before and after the application of the test materials. Areas were calculated from the polygraph tracing, using an analog-digital tablet (CPLAB-10) and a specially designed software.

The effect of pure compounds **1–5** on rat ileum contractions induced by acetylcholine (Ach, 1×10^{-4} M), Hist (1×10^{-3} M), and BaCl_2 (3×10^{-4} M) was studied. In order to carry out these evaluations, the isolates were added to the bath at the concentration corresponding to their IC_{50} for the inhibition of ileum spontaneous contractions. The active principles from *S. livida* were allowed to act on the ileum for 10 min. After this time, the spasmogens were added, and the responses were recorded during 10 min. Moreover, the activity of compounds **1–4** was tested in the presence of *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 5×10^{-3} M). The last set of experiments was performed using two different experimental approaches. In the first one, the L-NAME was allowed to act on the ileum and after 10 min the active principles were added and the responses recorded during 10 min. In the second one, compounds **1–4** were added to the bath and, after 10 min L-NAME was added; once more, the responses were recorded during 10 min. The effects of pure compounds were determined by comparing the average of the AUC of the ileum contractions obtained in the presence and absence of the compounds. In all the experiments with Ach, Hist, BaCl_2 and L-NAME one independent ileum segment was used for each repetition.

Data and statistical analysis: All the results are expressed as the mean of six experiments \pm SEM. Concentration responses curves (CRC) for the extract and pure compounds were plotted and the experimental data from the CRC were adjusted by the nonlinear, curve fitting program (ORIGIN 4.0). The statistical significance ($p < 0.05$) of differences between means was assessed by an analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's test (10, 11).

The following drugs were used as positive controls: atropine, papaverine, and nifedipine all from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

Assay of cyclic GMP content

Male Sprague-Dawley rats (220–280 g) were housed under alternate periods of dark and light and were given water and chow ad libitum. The animals were killed by decapitation between 9:00 and 10:00 h. Ileum rings were dissected immediately under a stereomicroscope and kept in ice-cold Krebs-Ringer buffer (KRB) with the following composition (in mM): NaCl 125, KCl 3.5, KH_2PO_4 1.25, MgSO_4 1.2, CaCl_2 0.75, NaHCO_3 25, glucose 10, and theophylline 1.6, and gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 . Cyclic GMP (cGMP) formation was assessed as accumulation of cGMP in whole tissue in the presence of phosphodiesterase inhibition (12). Ileum rings were transferred into individual 1.5 ml Eppendorf tubes containing 200 μl of KRB buffer and were preincubated for 30 minutes at 37 °C with or without the correspondent antagonist (L-NAME, 0.1 μM or 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one, ODQ, 1 μM). In previous experiments, it was established that compound **1**-induced cGMP formation was

linear with time for at least 15 minutes. Thus, bibenzyl **1** or DMSO (20 μ l, for control samples) were added, and the tissues were stimulated for 10 min at 37 °C. The incubation was terminated by adding 20 μ l of EDTA (166 mM, pH 7.5); the samples were boiled in a 90 °C bath during 3 min and then transferred to ice. Tissue was sonicated on ice. An aliquot of 100 μ l was used for analysis of cGMP formation. Tissue protein content was determined using bovine serum albumin as standard (13). The amount of cGMP formed was determined by a radioimmuno-antibody procedure (14) using kits purchased from Amersham Corp, MA. Theophylline and ODQ were purchased from Research Biochemical International, Natick, MA and L-NAME from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

Data and statistical analysis: One way analysis of variance (ANOVA) and the Bonfferoni test was used for statistical analysis of the data (11). The results were expressed as means \pm SEM. Guanylyl cyclase activity is reported as pmol or fmol of cGMP formed/10 min/mg protein.

Results and Discussion

The CHCl₃-MeOH (1:1) extract of *Scaphyglottis livida* displayed a significant inhibition of the tone and amplitude of the spontaneous contractions of the rat ileum. The effect was concentration dependent and the calculated IC₅₀ was 6.06 \pm 2.1 μ g/ml (Figs. 1 and 2 and Table 1). Bioactivity-guided fractionation of the active extract by column chromatography over silica gel yielded eleven primary fractions (F-I to F-XI).

Chemical and chromatographic fractionation of the most active fractions FV and FVI allowed the isolation of five aromatic compounds: two dihydrostilbenoids (**1** and **2**) and three phenanthrene derivatives (**3**–**5**). These secondary metabolites were identified by comparison of their IR, UV, NMR and MS data with those previously described for 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl (**1**), batatasin III (**2**), coelonin (**3**), 3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene (**4**), and 3,7-dihydroxy-2,4,8-trimethoxyphenanthrene (**5**) (4–8).

Compounds **1**–**5** also induced noted concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of rat ileum.

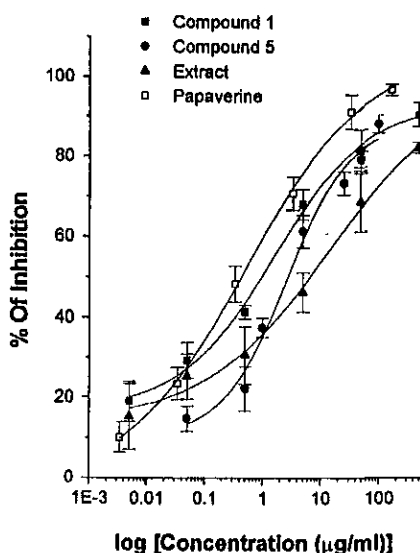


Fig. 1 Concentration-response curves showing the relaxatory effects of the extract and compounds **1** and **5** from *Scaphyglottis livida* on isolated rat ileum. Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile responses calculated as the mean from six data \pm S.E.M., $p < 0.05$.

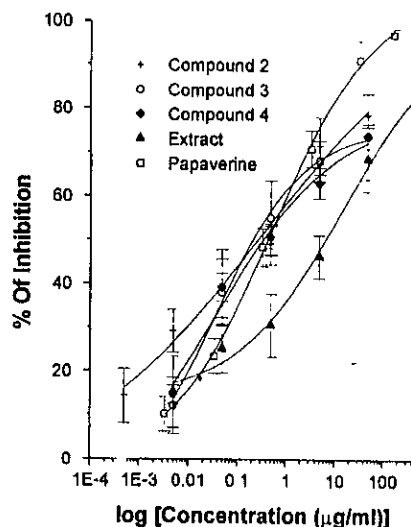


Fig. 2 Concentration-response curves showing the relaxatory effects of the extract and compounds **2**–**4** from *Scaphyglottis livida* on isolated rat ileum. Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile responses calculated as the mean from six data \pm S.E.M., $p < 0.05$.

Table 1 Inhibition of the spontaneous contraction of isolated rat ileum induced by the extract and compounds from *S. livida*.

Substance	E _{max}	IC ₅₀ (M)	Potency
Papaverine	96.70 \pm 5.02	1.55 $\times 10^{-6}$ \pm 0.12	1
Extract	82.10 \pm 6.02	6.06 \pm 1.02*	–
Compound 1	93.50 \pm 3.02	5.83 $\times 10^{-6}$ \pm 0.55	0.2658
Compound 2	85.20 \pm 2.08	7.37 $\times 10^{-7}$ \pm 0.07	2.1031
Compound 3	80.00 \pm 1.98	9.50 $\times 10^{-7}$ \pm 0.03	1.6315
Compound 4	83.59 \pm 1.3	6.66 $\times 10^{-7}$ \pm 0.01	2.3273
Compound 5	88.05 \pm 1.8	7.13 $\times 10^{-6}$ \pm 0.42	0.2173

* The IC₅₀ of the extract is expressed in μ g/ml.

Values as means \pm S.E.M.; n = 6; $p < 0.05$.

Potency was obtained by the formula: IC₅₀ (M) papaverine/IC₅₀ (M) compound, assuming a value of 1.00 for papaverine.

E_{max} indicates the percentage of maximum inhibition.

Figures 1 and 2 show the CRC for these phytochemicals and Table 1 indicates the corresponding IC₅₀, E_{max}, and the relative order of potency values. All the isolates were more potent than the crude extract. The highest inhibitory activities were observed for compounds **2**, **4** (2 times more potent than papaverine), and **3** (1.5 fold more potent than papaverine). Compounds **1** and **5**, however, were weaker smooth muscle relaxant agents than papaverine. The relaxant effect caused by **1**–**5** could be reversed after thoroughly washing the ileum preparations with fresh KH solution. Furthermore, complete tissue recovery was observed after contraction with Hist (1 $\times 10^{-3}$ M).

The influence of compounds **1**–**5** on cholinergic, histaminergic, and ion-induced (15) smooth muscle contraction was investigated. According to the results summarized in Figure 3, none of the isolates (tested at the concentration required to inhibit by 50% the spontaneous contractions of the rat ileum) exhibited a significant antagonistic effect on the contractions evoked by Ach (1 $\times 10^{-4}$ M). In the case of the experiments with Hist (1 $\times 10^{-3}$ M) and BaCl₂ (3 $\times 10^{-4}$ M), the active principles showed different responses. Thus, **1** and **5** significantly antagonized the contractions induced by Hist, while

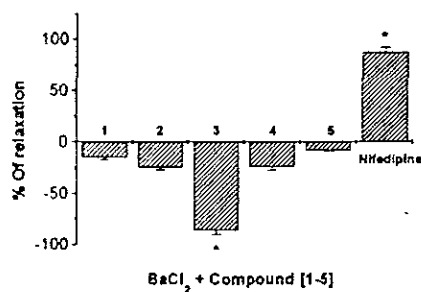
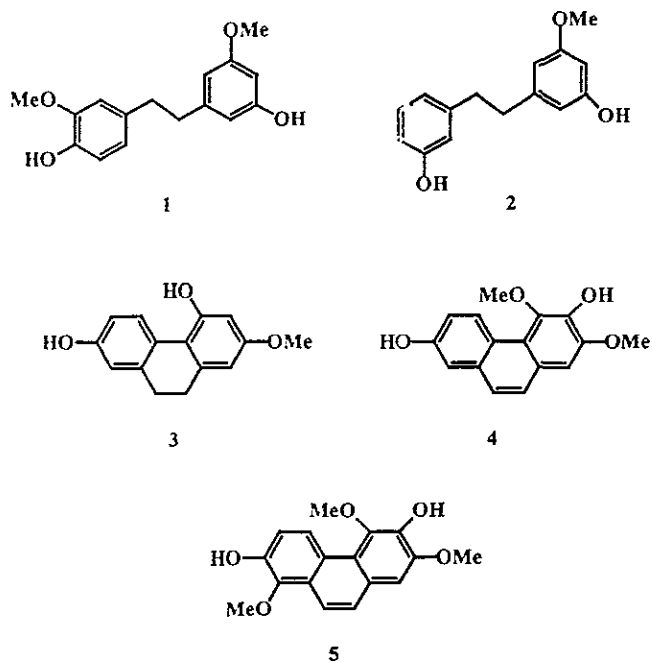


Fig. 3 Effect of the isolated compounds 1–5 from *Scaphyglottis livida* on the contractions induced by Ach, Hist and BaCl₂. *p < 0.05 (ANOVA).

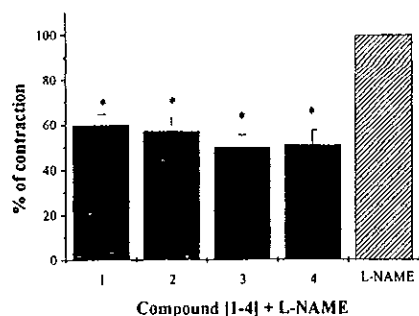
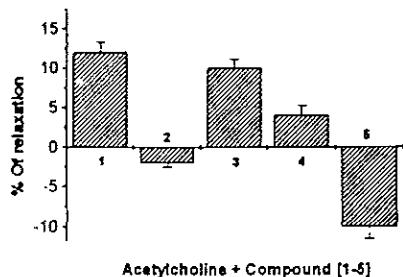
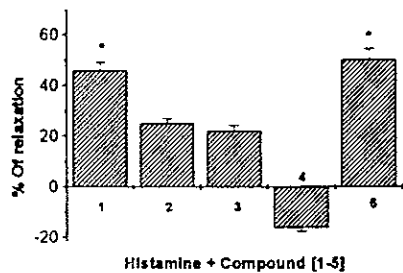


Fig. 4 Effect of the isolated compounds 1–4 from *Scaphyglottis livida* on the contractions induced by L-NAME. *p < 0.05 (ANOVA).

2–4 did not. On the other hand, 1, 2, 4, and 5 elicited a poor inhibition of the contraction evoked by BaCl₂, however, phenanthrene 3 enhanced the contractions elicited by this compound. These results suggested that the relaxant activity of the isolates does not involve a direct anticholinergic mode of action or an interference with calcium influx in the smooth muscle cells, in the case of natural products 1, 2, 4, and 5. The behavior of 3 in the experiments with BaCl₂ requires further investigation. Finally, the moderate antihistaminergic effect exhibited by 1 and 5 could be related with the antispasmodic response exerted by these compounds.

Since it has been demonstrated that a nitric oxide synthase is present in the myenteric plexus, nitric oxide (NO) has become a most likely candidate for mediating the nonadrenergic-noncholinergic smooth muscle relaxation through the gastrointestinal tract (16–21). Therefore, we decided next to explore if the antispasmodic activity displayed by compounds 1–4 was mediated by the nitric oxide/cGMP system. Thus, addition of 1–4 directly to the organ bath inhibited the

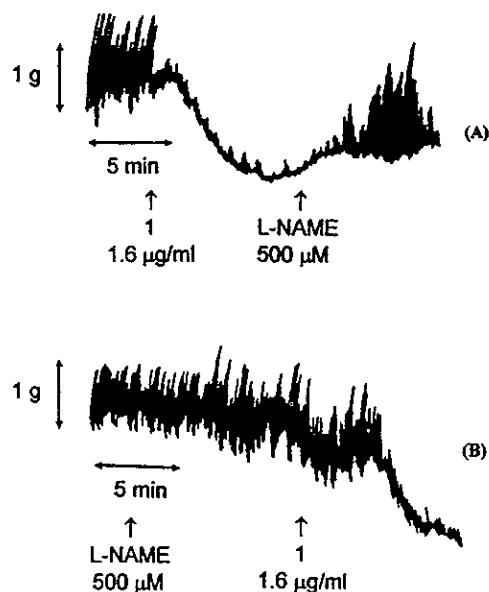


Fig. 5 (A) Tracing of rat ileal muscle showing that the relaxatory response induced by compound 1 (1.6 µg/ml) was reversed in the presence of L-NAME (5 × 10⁻³ M). (B) Tracing of rat ileal muscle showing the relaxatory response evoked by compound 1 (1.6 µg/ml) after treatment with L-NAME (5 × 10⁻³ M) during 10 min. The arrows indicate the treatments added to the bathing fluid.

contractile response (Fig. 4) exerted by L-NAME (5×10^{-3} M), an inhibitor of nitric oxide synthase. Furthermore, addition of L-NAME (5×10^{-3} M) to the KH solution reverted the relaxatory effect evoked by 1–4. As an example, the effects induced by dihydrostilbenoid 1 are shown in Figure 5. Thus, the relaxatory response elicited by natural products 1–4 is probably mediated by neuronal release of NO.

NO-evoked relaxation is generally mediated by an elevation of intracellular cGMP (22). To assess this hypothesis and thus to establish the signaling pathway which mediates the relaxing effect of 1, the major active principle isolated, we measured compound 1-provoked NO/cGMP formation in rat whole ileum rings by using a radio-immunoassay procedure (14). The results shown in Figure 6 reveal that compound 1 induces cGMP generation in a concentration-dependent manner. Furthermore, when the ileum rings were stimulated with a single concentration of compound 1 (100 μ g/ml) in the presence of L-NAME, compound 1-induced cGMP production was abolished (Table 2). This experiment provides additional evidence for the involvement of NO in the inhibition of the spontaneous contractions of the rat ileum elicited by compound 1. Evidence suggests that nitrergic transmission operate via stimulation of the soluble guanylyl cyclase, leading to increases in cyclic GMP levels (22). Therefore, ODQ, a potent selective inhibitor of the soluble guanylyl cyclase (23) was used to investigate the role of this enzyme in the signaling transduction of the spasmolytic action of dihydrostilbenoid 1. ODQ inhibited the increases in cyclic GMP concentrations induced by compound 1 (Table 2), indicating that compound 1 exerts its relaxing action through the stimulation of nitric oxide synthase and the generation of cGMP.

The role of extracellular calcium on compound 1-induced cGMP production was also studied. Ileum tissues were preincubated in calcium-free KBR for 10 min (without added CaCl_2 in presence of 2 nM EGTA). According to the data shown in Table 2, the stimulation of cGMP formation induced by compound 1 was almost completely dependent on the presence of the extracellular calcium. Removal of this cation from the medium and the simultaneous addition of an excess of EGTA resulted in a blockade of compound 1-induced cGMP accumulation.

In conclusion, our results suggest that the major active principle isolated from *S. livida* induced the production of

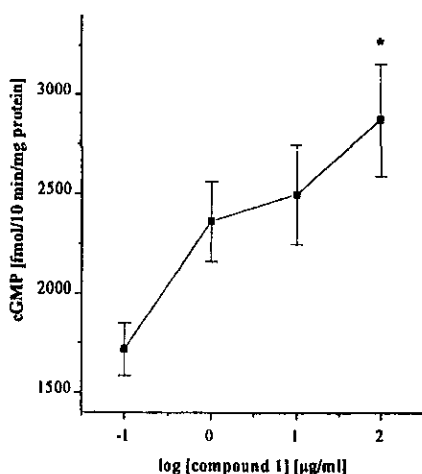


Fig. 6 Concentration-response curve showing compound 1-induced cGMP generation in rat whole ileum rings. Results are means \pm SEM of $n = 8$. * $p < 0.01$ compared with basal value.

Table 2 Effect of compound 1-induced cGMP generation in the presence of L-NAME and ODQ, and in the absence of calcium.

Compound 1-induced cGMP production (fmol/10 min/mg protein)	
Basal ($n = 26$)	1620.85 \pm 86
Compound 1 ($n = 24$)	2260.18 \pm 88*
L-NAME ($n = 16$)	1760.62 \pm 146
Compound 1 + L-NAME ($n = 18$)	2090.53 \pm 124
ODQ ($n = 11$)	1770.25 \pm 209
Compound 1 + ODQ ($n = 11$)	1480.4 \pm 194
Basal ($- \text{Ca}^{2+}$) ($n = 18$)	1900.63 \pm 188
Compound 1 ($- \text{Ca}^{2+}$) ($n = 11$)	1430.49 \pm 158

Concentration of compound 1: 100 μ g/ml. $p < 0.01$ compared to basal.

nitric oxide in ileal tissue, which in turn provoked relaxation of ileal muscles by elevating the cyclic GMP content. The nature and location of the initial factor that mediates nitric oxide production remains an open question. Currently further work is in process to evaluate the effect of the other phytochemicals isolated from *S. livida* on the NO/cGMP system. In addition, it will be interesting to explore the activity of these compounds on calmodulin and other calmodulin-dependent enzymes such as adenylyl cyclase and phosphodiesterase.

The findings of the present investigation provide also pharmacological support for the employment of *S. livida* to alleviate stomach aches and to avoid abortion in ethnomedical practices. Finally, it is important to point out that aromatic compounds 1–5 represent new leads for the development of smooth muscle relaxing agents of therapeutic interest.

Acknowledgements

This study was financed by a grant of DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM), Project IN205197. The authors thank M. en C. Isabel Chávez, M. en C. Beatriz Quiroz, Biol. Héctor Rios, I. Q. Luis Velasco-Ibarra, M. en C. Javier Pérez-Flores, Q. F. B. Rocío Patiño, Q. F. B. Graciela Chávez, Q. Marisela Gutiérrez, M. en C. Nuria Esturau, Q. F. B. José Luis Gallegos and Q. Georgina Duarte (Instituto de Química and Facultad de Química, UNAM) for recording the NMR, mass, UV and IR spectra. Special thanks are due to M. en C. Juana Isela Rojas, Q. F. B. Laura Acevedo-Arteaga and Miss Rosangel Montenegro for technical assistance. The authors are also grateful to M. en C. J. Fausto Rivero-Cruz for his helpful collaboration while performing the computer work and to Dr. Andrés Navarrete-Castro for valuable discussions. S. Estrada acknowledges a graduate student fellowship awarded by DGAPA, UNAM.

References

- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, I., Bye, R. (1997) *Planta Med.* 63, 31–35.
- Rojas, A., Cruz, S., Ponce-Monter, H., Mata, R. (1996) *Planta Med.* 62, 184–189.

- ³ Hietz, P., Hietz-Seifert, U. (1994) in: *Epiphytes of Veracruz. An illustrated guide for the regions of Xalapa and los Tuxtlas*, Veracruz, p. 57. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz, México.
- ⁴ Shimizu, M., Shogawa, H., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoskizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I., Berganza, L. H. (1988) *Chem. Pharm. Bull.* 36, 4447–4452.
- ⁵ Hashimoto, T., Hasegawa, K., Yamaguchi, H., Saito, M., Ishimoto, S. (1974) *Phytochemistry* 13, 2849–2852.
- ⁶ Majumder, P. L., Laha, S., Datta, N. (1982) *Phytochemistry* 21, 478–481.
- ⁷ Yuan-Wah, L., Chiang-Cheong, K., Harrison, L., Powell, A. D. (1997) *Phytochemistry* 44, 157–165.
- ⁸ Tuchinda, P., Udchachon, J., Khumtaveeporn, K., Taylor, W. C., Engelhardt, L. M., White, A. H. (1988) *Phytochemistry* 27, 3267–3271.
- ⁹ Rojas, A., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (1995) *Phytomedicine* 2, 51–55.
- ¹⁰ Bailey, N. T. J. (1995) *Statistical Methods in Biology*, pp. 234–236, Cambridge University Press, Cambridge.
- ¹¹ Daniel, W. W. (1987) *Bioestadística*, pp. 306–309, Limusa, México.
- ¹² Mathison, Y., Israel, A. (1998) *Brain Res. Bull.* 45, 15–19.
- ¹³ Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- ¹⁴ Steiner, A., Parker, C., Kipnis, D. M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1106–1113.
- ¹⁵ Williamson, M. E., Ukpako, T. D., Evans, J. F. (1996) *Pharmacological Methods in Phytotherapy Research. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*, pp. 1–46, John Wiley and Sons, New York.
- ¹⁶ Li, C. G., Rand, M. J. (1990) *Europ. J. Pharmacol.* 191, 303–309.
- ¹⁷ Hata, F., Ishii, T., Kanada, A., Yamano, N., Kataoka, T., Takeuchi, T., Yagasaki, O. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 1400–1408.
- ¹⁸ Konturek, S. K., Konturek, P. C. (1995) *Digestion* 56, 1–13.
- ¹⁹ Makhlouf, G. M., Grider, J. R. (1993) *NIPS* 8, 195–199.
- ²⁰ Stark, M. E., Szurszewski, J. H. (1992) *Gastroenterology* 103, 1928–1949.
- ²¹ Conner, E. M., Grisham, M. B. (1995) in: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 7, pp. 3–13, Academic Press, New York.
- ²² Bowman, A., Drummond, A. H. (1984) *Br. J. Pharmacol.* 81, 665–674.
- ²³ Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B., Schmidt, K., Mayer, B. (1995) *Mol. Pharmacol.* 48, 184–188.

Dr. Rachel Mata

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
Coyoacán, 04510
México City
México
E-mail: rachel@servidor.unam.mx
Fax: +52-5-622 53 29

Dr. Anita Israel

Facultad de Farmacia
Universidad Central de Venezuela
Caracas
Venezuela
E-mail: asteru@hotmail.com
Fax: +582-9790025

**New Phenanthrene Derivatives from
*Maxillaria densa***

Samuel Estrada, Rubén A. Toscano, and Rachel Mata

Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Instituto de
Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
Coyoacán 04510, México D.F., México

**JOURNAL OF
NATURAL
PRODUCTS®**

Reprinted from
Volume 62, Number 8, Pages 1175–1178

New Phenanthrene Derivatives from *Maxillaria densa* ¹

Samuel Estrada,[†] Rubén A. Toscano,[‡] and Rachel Mata^{*1}

Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., México

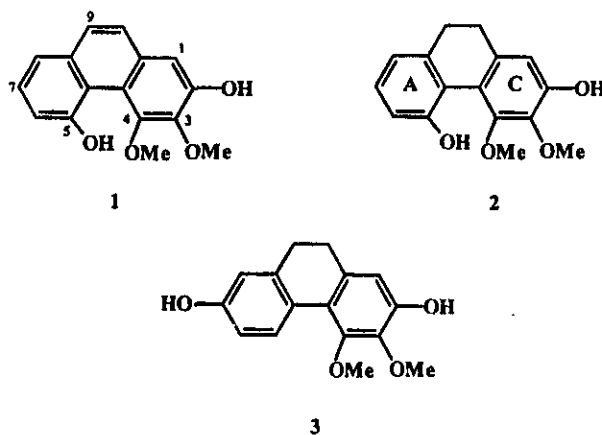
Received February 17, 1999

Two new phenanthrene derivatives, 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (1) and 9,10-dihydro-2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (2), were isolated from an extract prepared from the whole plant of the orchid *Maxillaria densa* with spasmolytic activity. In addition, four known compounds, namely 2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene, 9,10-dihydro-2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (3), 2,5-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene, and 2,7-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene, were obtained. The structures of the isolated compounds were elucidated by spectroscopic methods. In the case of phenanthrene derivatives 1 and 3, the structures were unambiguously assigned by X-ray analysis.

As part of our effort to discover natural products with potential use as spasmolytic agents, we have reported that some phenanthrenes and stilbenoids from *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr. (Orchidaceae) possess significant smooth-muscle relaxing properties.² Furthermore, pharmacological and radioimmunoassay evidence indicated that their spasmolytic activity was mediated by the system nitric oxide/cGMP.² Subsequently, we have screened several Mexican orchid extracts for their ability to relax the spontaneous rat ileum contraction and accordingly have selected *Maxillaria densa* Lindley for fractionation. The present report describes the isolation and structure elucidation of several phenanthrene derivatives, including the new natural products 1 and 2, from a pharmacologically active extract of this epiphytic orchid.³

After the initial observation of the significant inhibition of the spontaneous rat ileum contractions induced by a CHCl₃-MeOH (1:1) extract (IC₅₀, 0.62 ± 0.13 μg/mL) prepared from the whole plant of *M. densa*, large-scale extraction and fractionation was undertaken. Altogether six phenanthrene derivatives were isolated and characterized from this bioactive extract, comprised by 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (1), 9,10-dihydro-2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (2), 2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene,⁴ 9,10-dihydro-2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (3),⁵ 2,5-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene,⁶ and 2,7-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene.⁷ Compounds 1 and 2 are new natural products. The structures of the known compounds were ascertained by comparison of their physical and spectroscopic properties with those reported in the literature. In the case of compounds 1 and 3, the structures were unambiguously assigned by X-ray analysis.

Compound 1 was obtained as yellow crystals. EIMS and ¹³C NMR spectroscopy established its molecular formula as C₁₆H₁₄O₄. The IR spectrum contained bands for hydroxyl groups (3528 and 3180 cm⁻¹) and the UV spectrum showed absorptions typical for phenanthrene derivatives.⁴⁻¹² The NMR spectra of compound (1) (Table 1) were similar to those of other 2,3,4,5-tetrasubstituted phenanthrenes.^{6,10} As in fimbriol B,⁶ the ¹H NMR spectrum of 1 exhibited two doublets (*J* = 9.0 Hz) at δ_H 7.53 and 7.39 attributable to H-9 and H-10, respectively, as diagnostic signals. An ABX



system [δ_H 7.47 (dd, *J* = 8.0 and 7.5 Hz, H-7), 7.38 (dd, *J* = 7.8 and 1.5 Hz, H-8) and 7.25 (dd, *J* = 7.8 and 1.5 Hz, H-6)] and a singlet for an isolated benzene proton at δ_H 7.22 (s, H-1) were also observed. In addition, resonances for two hydroxyl (δ_H 10.32 and 6.41) and two methoxyl (δ_H 4.10 and 3.79) groups were observed. The ¹³C NMR data and HMQC correlations supported the above assignments. A detailed analysis of the NOESY (Table 1) and HMBC spectra confirmed the position of the methoxyl and hydroxyl groups on the phenanthrene skeleton. A subsequent study by X-ray crystallography confirmed the proposed structure (Figure 1). Compound 1 crystallized with two chemically identical but crystallographic different molecules. The methoxyl groups are oriented in opposite directions in order to minimize steric repulsion. The most striking feature of this compound resides in the notable deviation from planarity of the phenanthrene moiety (angle between the least-squares planes of the lateral benzene rings: molecule A = 17.0°; molecule B = 18.7°). The phenanthrene backbone seems to be stabilized by an intramolecular hydrogen bond between the hydroxyl [O-4 (O-24)] and the methoxyl groups [O-3 (O-23)] on both molecules, although with different strengths judging by the H...O distance (Table 4). In the crystal, the molecules are arranged into tetramers by forming hydrogen bonds, alternating molecules A and B in a cyclic fashion (Figure 2).

Compound 2 had the composition C₁₆H₁₆O₄, as determined by MS and ¹³C NMR, differing from 1 by two mass units. This observation as well as the UV⁷ and NMR data (Table 1) suggested that 2 was the 9,10-dihydro derivative

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +1 (525) 622-5289. Fax: +1 (525) 622-5329. E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

[†] Departamento de Farmacia, Facultad de Química.

[‡] Instituto de Química.

Table 1. ^1H (500 MHz, CDCl_3 , J (Hz)) and ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) Data of Compounds 1 and 2^a

position	1			2		
	^1H	^{13}C	NOESY ^b	^1H	^{13}C	NOESY ^b
1	7.22 (s)	109.9	H-10	6.77 (s)	111.6	CH_2 -10
2		147.1			148.9	
3		140.7			138.6	
4		148.1			148.1	
4a		116.7			118.8	
4b		117.9			120.1	
5		153.7			153.6	
6	7.25 (dd, 7.8, 1.5)	116.2	H-7, OH-5	6.96 (dd, 8.3, 1.3)	118.1	H-7, OH-5
7	7.47 (dd, 8.0, 7.5)	127.3	H-6, H-8	7.15 (dd, 7.2, 7.2)	128.2	H-8, H-6
8	7.38 (dd, 7.8, 1.5)	120.6	H-7	6.85 (dd, 7.3, 1.3)	119.1	CH_2 -9, H-7
8a		134.2			140.5	
9	7.53 (d, 9.0)	128.1	H-10			
10	7.39 (d, 9.0)	125.9	H-9, H-1			
CH_2 -9				2.71 (m) ^c	31.1	H-8, CH_2 -10
CH_2 -10				2.64 (m)	30.7	H-1, CH_2 -9
10a		130.9			137.4	
OH-2	6.41 (brs)		OMe-3	5.65 (brs)		
OH-5	10.32 (s)		OMe-4, H-6	8.51 (brs)		H-6, OMe-4
OMe-3	3.79 (s)	62.0	OMe-4, OH-2	3.99 (s)	61.7	OMe-4
OMe-4	4.10 (s)	62.5	OMe-3, OH-5	3.75 (s)	62.1	OH-5, OMe-3

^a Assigned by HMQC, HMBC, and DEPT spectra. ^b Key ^1H - ^1H correlations. ^c

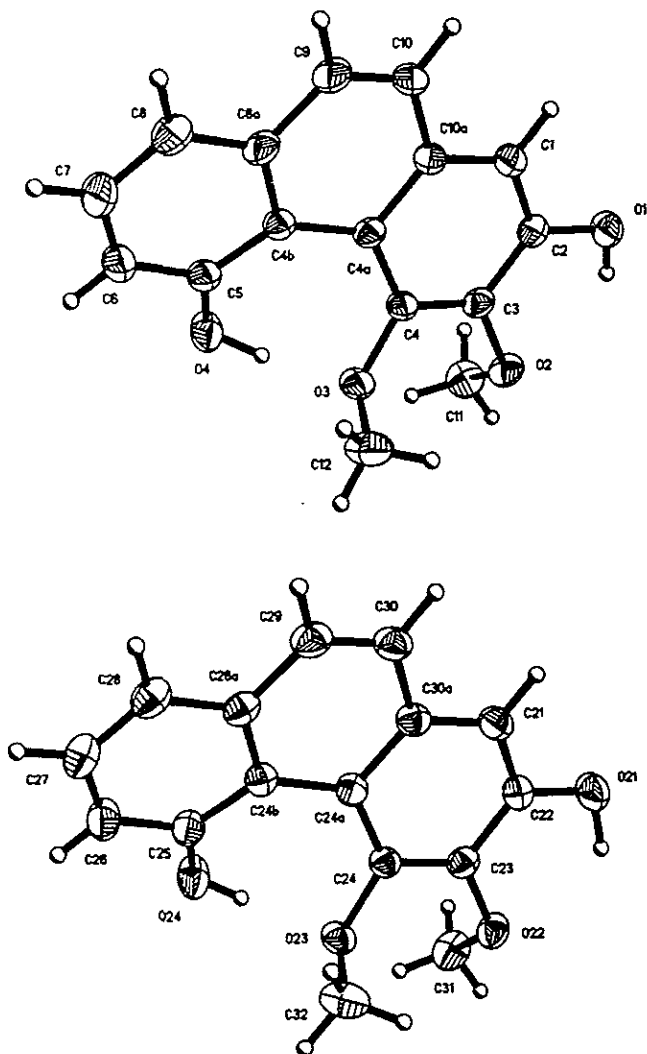


Figure 1. ORTEP diagrams for compound 1 (30% probability ellipsoids) showing two crystallographically independent molecules with atom numbering scheme.

of compound 1. The most obvious differences between the NMR spectra of the two compounds resulted from the presence of two methylene signals in 1 [δ_{H} 2.71 (2H, m, H-9) and 2.64 (2H, m, H-10) in the ^1H NMR spectrum; δ_{C}

31.1 (C-9) and 30.7 (C-10) in the ^{13}C NMR spectrum], instead of the aromatic resonances attributed to H-9/C-9 and H-10/C-10 in 2. In addition, the chemical shift values for the aromatic protons and carbons of rings A and C in 2 (Table 1) were shifted diamagnetically in comparison to those in 1. As in the case of compound 1, the position of the substituents in the dihydrophenanthrene core was deduced from the NOESY (Table 1) and HMBC data. Thus, the cross-peaks between H-1 (δ_{H} 6.77)/ CH_2 -10 (δ_{H} 2.64), and H-1 (δ_{H} 6.77)/OH-2 (δ_{H} 5.65) in the NOESY spectrum allowed the placement of one hydroxyl group at C-2. On the other hand, the correlations CH_2 -9 (δ_{H} 2.71)/H-8 (δ_{H} 6.85), H-8/H-7 (δ_{H} 7.15), H-7/H-6 (δ_{H} 6.96), H-6/OH-5 (δ_{H} 8.51), OH-5/OMe-4 (δ_{H} 3.75), and OMe-4/OMe-3 (δ_{H} 3.99) indicated that the second hydroxyl and the methoxyl groups were located at C-5, C-3, and C-4, respectively. Furthermore, the HMBC correlations C-5/H-6, C-5/H-7, C-6/OH-5, C-1/OH-2, C-2/H-1, C-3/H-1, C-3/OMe-3, and C-4/OMe-4 confirmed the allocations for these functional groups.

The structure of compound 3 was also assigned unequivocally as 9,10-dihydro-2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene by X-ray crystallography. The molecular structure of 3 is illustrated in Figure 3. This dihydro compound deviates considerably from planarity (angle between the least-squares planes of the lateral benzene rings: 25.6°), mainly due to the twisted-boat conformation of the central six-member ring (Cremer and Pople parameters:¹³ $Q = 0.491 \text{ \AA}$, $\theta = 110.3^\circ$, $\phi = 29.31^\circ$). In the crystal, helical ribbons are formed by hydrogen bonds between the hydroxyl group attached to C-2 and the methoxyl group at C-3 of the symmetrically related molecule, extended and inter-linked by interaction between the hydroxyl groups at C-7 (Figure 3b).

The spasmolytic activity and the mode of action of the isolated compounds will be described elsewhere.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were determined using a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained using KBr disks on a Perkin-Elmer 599 B spectrophotometer. UV spectra were registered on a Shimadzu 160 UV apparatus in MeOH solution. NMR spectra including COSY spectra, NOESY, HMBC and HMQC experiments were recorded on a Varian UNITY PLUS 500

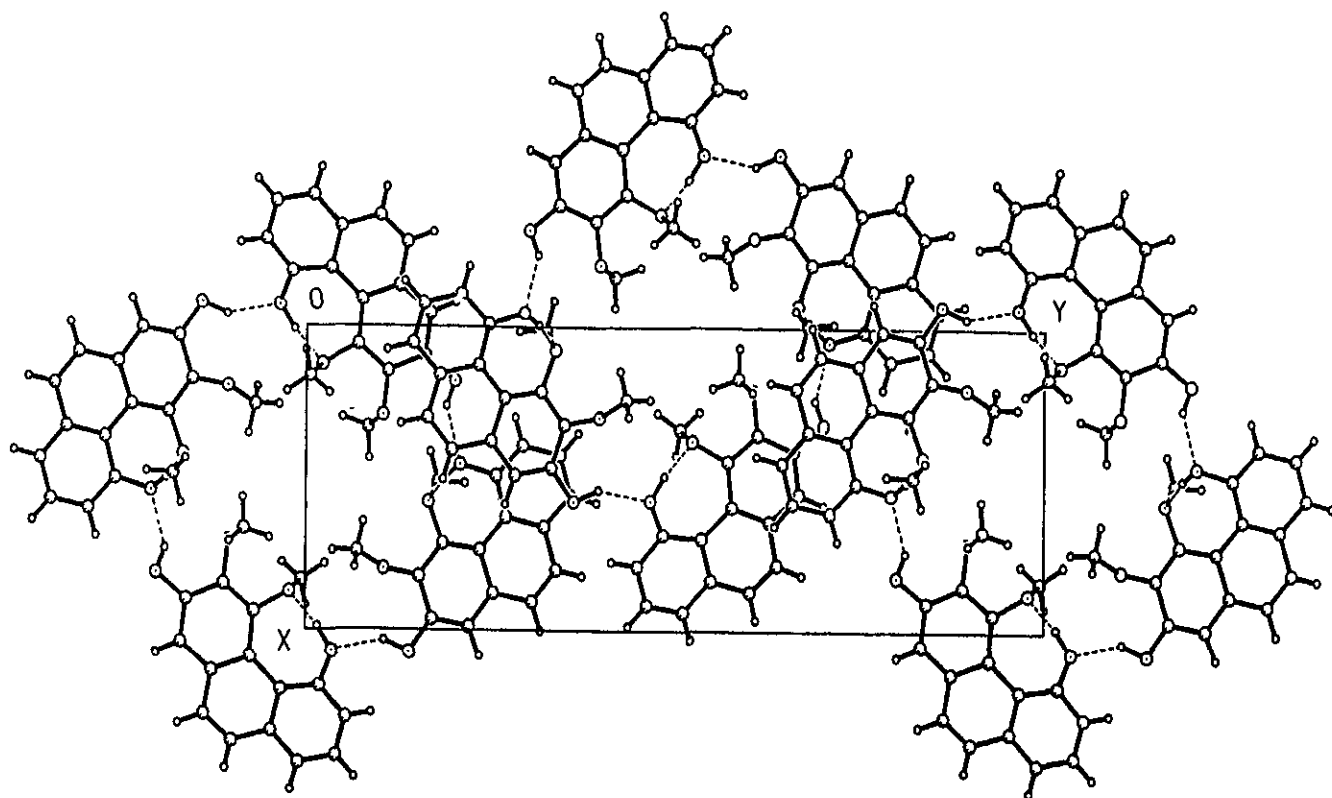


Figure 2. Unit cell viewed down the *c* axis for compound 1.

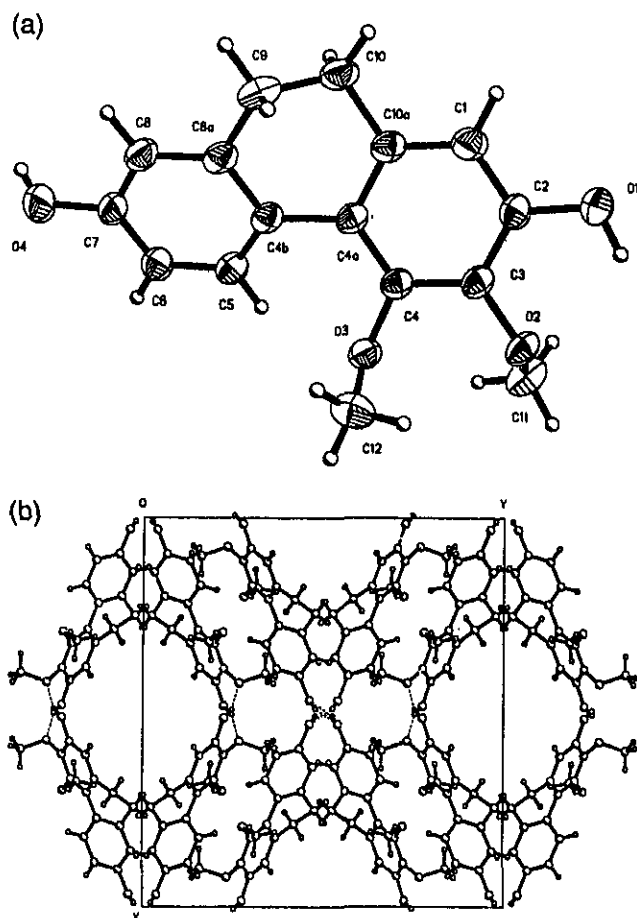


Figure 3. (a) ORTEP diagram for compound 3 (30% probability ellipsoids) showing the crystallographic atom numbering scheme. (b) Unit cell viewed down the *c* axis.

spectrometer in CDCl_3 or DMSO-d_6 either at 500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C), using tetramethylsilane (TMS) as an internal

standard. EIMS were performed using a JEOL JMS-AX505 HA spectrometer, at an ionization energy of 70 eV. HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with Waters UV photodiode array detector (900) set at 230 nm, using a silica gel column (19 mm id X 300 mm) at a flow rate of 6.7 mL min^{-1} . Control of the equipment, data acquisition, processing and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters). Column chromatography: silica gel 60 (Merck, 30–70 mesh). TLC: silica gel 60 F_{254} (Merck).

Plant Material. Whole plants of *M. densa* Lindley (Orchidaceae) were collected in July 1996 from Ejido Ruiz Cortínez, Catemaco, State of Veracruz, México. A voucher specimen (Carmona 96-1) is preserved at the Instituto de Ecología Herbarium (XAL), Xalapa, Veracruz.

Extraction and Isolation. The air-dried plant material (2.2 kg) was ground and extracted exhaustively by maceration at room temperature with a mixture of MeOH-CHCl_3 (1:1). After filtration, the extract was concentrated in vacuo to yield 161.2 g of residue. The concentrated extract was fractionated by column chromatography on silica gel (775 g), eluting with *n*-hexane, followed by a gradient of hexane/EtOAc (10:0→0:10) and finally with EtOAc/MeOH (10:0→5:5). Altogether, 215 fractions (600 mL each) were collected and pooled based on their TLC profiles to yield seven major fractions (FI to FVII). According to a pharmacological evaluation,² fraction VI was the most active, and induced 80% inhibition of the spontaneous contractions of the rat ileum, when tested at the IC_{50} of the original extract ($0.62 \mu\text{g/mL}$).

Fraction FVI (17.31 g) was further chromatographed on a Si gel column (759 g) and eluted with a gradient of hexane/EtOAc (10:0→0:10). This procedure led to the isolation of compounds 1 (205.2 mg), 2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (150 mg), 3 (1.27 g), 2,5-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene (1.55 g), 2,7-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene (1.85 g), and a mixture of compounds 1 and 2 (45 mg). Compounds 1 and 3 as well as the mixture of 1 and 2 were obtained from the fractions eluted with hexane-AcOEt 7:3. The remaining compounds were isolated from the fractions eluted with hexane-AcOEt 6:4. The mixture was resolved by

HPLC (the eluants were 94% hexane, 3% *i*-PrOH, and 3% MeOH) to yield additional amounts of **1** (15 mg) and **2** (25 mg).

2,5-Dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (1). Yellow crystals; mp 118–119 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 258 (4.78), 280 (4.36), 300 (4.19), 310 (4.19), 330 sh (3.60) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3528, 3180, 1622, 1603, 1564, 1526, 1467, 1431, 1355, 1272, 1095, 997, 938, 862 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (Table 1); EIMS m/z 270 $[\text{M}]^+$ (100), 255 (28), 237 (9), 227 (31), 212 (48), 184 (9), 155 (15), 139 (13), 128 (10).

9,10-Dihydro-2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (2). Yellow powder; mp 123–124 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 272 (3.45), 280 (3.35), 296 sh (3.24), 304 (3.45) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3388, 2942, 1614, 1581, 1486, 1456, 1345, 1298, 1244, 1224, 1059, 999, 927, 823 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (Table 1); EIMS m/z 272 $[\text{M}]^+$ (100), 257 (32), 239 (11), 225 (38), 212 (8), 197 (22), 183 (3), 169 (12), 153 (3), 141 (4), 115 (2).

The identification of the known compounds obtained in this investigation was accomplished by comparison of their spectral data (UV, MS, ^1H and ^{13}C NMR) with those previously described for 2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene,⁴ 9,10-dihydro-2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (**3**),⁵ 2,5-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene,⁶ and 2,7-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene.⁷

X-ray Crystallographic Analysis of Compounds 1 and 3. The molecular structures of compounds **1** and **3** were analyzed by X-ray diffraction crystallography following very similar procedures. The crystal data for the two samples and details of the experimental results are shown in Table 2.¹⁴ For each sample, crystals were mounted, in air, on glass fibers. Accurate cell parameters were determined by refinement from the setting of 25 reflections and diffraction intensities measured at 293 K using an ω - θ scan method on a Siemens P4/PC diffractometer equipped with graphite-monochromated radiation. The intensities of three standard reflections, recorded every 100 collected reflections, showed no changes. All data sets were corrected for Lorentz-polarization effects but no absorption corrections were applied.

The structure of each compound was determined by direct methods (SIR92)¹⁵ and refined by full-matrix least-squares methods using SHELXTL97.¹⁶ Hydrogen atoms attached to carbon atoms were set to ride on the parent C atoms, and for those bonded to O atoms their positional parameters were refined, on both cases an isotropic temperature factor 1.2 times the U_{eq} of the parent atom was used. The non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters.

Pharmacological Testing. The smooth muscle relaxant effect of the extract and fractions was demonstrated using the

isolated rat ileum test.² Papaverine (IC_{50} $((1.55 \pm 0.12) \times 10^{-6}$ M) was used as positive control.

Acknowledgment. This work was supported by grants from CONACyT (27978N), DGAPA (IN205197), UNAM, and PADEP (207337). We thank Isabel Chávez, Beatriz Quiroz, Luis Velazco-Ibarra, Javier Pérez-Flores, and Rocío Patiño, Instituto de Química, UNAM, for recording the NMR, MS, UV, and IR spectra. We are also grateful to Gustavo Carmona-Díaz for collecting the plant material and to Laura Acevedo for technical assistance. S.E. acknowledges a fellowship awarded by DGAPA, UNAM, to carry out graduate studies.

Supporting Information Available: Tables of crystal data and experimental crystallographic details, of atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters, and hydrogen bond schemes for compounds **1** and **3**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Taken in part from the Ph.D. Thesis of S. Estrada. Part XLII in the series "Chemical Studies on Mexican Plants used in Traditional Medicine."
- (2) Estrada, S.; Rojas, A.; Mathison, Y.; Israel, A.; Mata, R. *Planta Med.* **1999**, *65*, 109–114.
- (3) Hietz, P.; Hietz-Seifert, V. *Epifitas de Veracruz. Guía Ilustrada para las Regiones de Xalapa y los Tuxtlas*; Veracruz Instituto de Ecología, A. C.: Veracruz, México, 1994; p 48.
- (4) Sternitz, F. R.; Suess, T. R.; Schauer, C. K.; Anderson, O. P. *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 417–423.
- (5) Majumder, P. L.; Joardar, M. *Indian J. Chem.* **1985**, *24B*, 1192–1194.
- (6) Tezuca, Y.; Yoshida, Y.; Kikuchi, T.; Xu, G.-J. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1346–1349.
- (7) Hughes, A. B.; Sargent, M. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, 1787–1791.
- (8) Majumder, P. L.; Sen, R. C. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2432–2434.
- (9) Majumder, P. L.; Lahiri, S. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 621–624.
- (10) Leong, Y.-W.; Kang, C.-C.; Harrison, L. J.; Powell, A. D. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 157–165.
- (11) Sekine, T.; Fukasawa, N.; Murakoshi, I.; Ruangrunsi, N. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 763–764.
- (12) Anton, H.; Kraut, L.; Mues, R.; Morales, M. I. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1069–1075.
- (13) Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354–1358.
- (14) Crystallographic data for the structures reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK [Fax: +44 (0)1223-336033 or E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk].
- (15) Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Burla, M. C.; Polidori, G.; Camalli, M. *J. Appl. Cryst.* **1994**, *27*, 435.
- (16) Sheldrick, G. M. *SHELXTL97: Program for Refinement of Crystal Structures*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.

NP990061E