

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**EFFECTO ESPASMOLÍTICO, SÍNTESIS DE ANÁLOGOS Y MECANISMOS  
DE ACCIÓN DE LOS ESTILBENOIDES DE *NIDEMA BOOTHII* (LINDLEY) SCHLTR.  
(ORCHIDACEAE)**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. en C. YANET MICAHELA HERNÁNDEZ ROMERO



**Ciencias  
Químicas**

DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

2004.



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

### ***JURADO ASIGNADO:***

Presidente:	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Primer Vocal:	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Segundo Vocal:	Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa
Tercer Vocal:	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
Secretario:	Dra. María Luisa Villareal Ortega
Primer Suplente:	Dr. Enrique Angeles Anguiano
Segundo Suplente:	Dra. María Eva González Trujano

### ***LUGARES DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:***

En el laboratorio 124, Departamento de Farmacia, edificio "E", Facultad de Química , UNAM.

En el laboratorio 122, Departamento de Farmacia, edificio "E", Facultad de Química , UNAM.

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Yaret Mischela Hernández

Romero

FECHA: 6 de agosto 2009

FIRMA: Jeniffer

## ***AGRADECIMIENTOS:***

El trabajo experimental de la Tesis se realizó, mediante distintos apoyos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (39951-Q), la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) (IN200902) y la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) a través de los proyectos del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (208305 y 208309)

Agradezco a la Dirección General de Intercambio Académico de la DGEP y Al Sistema Nacional de Investigadores (SEP-CONACYT), por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Investigador de la Facultad de Química, por su invaluable asesoría durante el trabajo de síntesis orgánica y por las facilidades otorgadas para la realización de esta parte experimental en su laboratorio.

Asi mismo, agradezco, de manera especial a la Dra. Alejandra Rojas Molina y a la M. en C. Juana Isela Rojas Molina por su valiosa colaboración en la determinación de la actividad espasmolítica de los productos naturales y los análogos sintéticos.

A los Investigadores miembros de mi comité tutorial, el Dr. Leovigildo Quijano, del Instituto de Química, a la Dra. Alejandra Rojas, Investigador de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, y al Dr. Rafael Bocanegra por los valiosos comentarios y recomendaciones otorgados durante mis estudios de doctorado, que sin duda enriquecieron en gran medida a la versión final de la presente tesis doctoral.

A las Maestras Laura Acevedo Arteaga e Isabel Rivero Cruz, por el apoyo técnico durante la realización del presente trabajo de investigación.

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

A la Q. Georgina Duarte, de la USAI (Facultad de Química) por el registro de los espectros de masas.

A la Q.F.B. Marisela Gutiérrez, de la USAI (Facultad de Química) por el registro de los espectros de IR, UV y rotación óptica.

Al Dr. Carlos Cerda, investigador del CINVESTAV, por su valiosa colaboración en el registro de parte de los espectros de RMN.

Al M. en C. Oscar Yáñez Muñoz de la USAI (Facultad de Química) por el registro de la mayor parte de los espectros de RMN presentados en este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio 124 por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencias, que fueron de valiosa ayuda para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

De manera muy especial, agradezco a la Dra. Rachel Mata Essayag por la dirección de este proyecto de tesis, por su apoyo, su paciencia y por brindarme la magnífica oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Así mismo, por todas sus enseñanzas y consejos que han contribuido de manera importante a mi formación profesional.

*DEDICATORIAS*

# ÍNDICE

	Página
<i>LISTA DE CUADROS</i>	VIII
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	X
<i>LISTA DE ESQUEMAS</i>	XII
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	XIV
<i>RESUMEN</i>	XIX
<i>ABSTRACT</i>	XXII
<b>I. ANTECEDENTES</b>	
1.1. EL USO DE ORQUÍDEAS COMO MEDICINA HERBOLARIA	1
1.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS ESTILBENOIDES DE ORQUÍDEAS	4
1.3. ESPECIES DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE COMO FUENTE POTENCIAL DE AGENTES ESPASMOLITICOS	8
1.4. GENERALIDADES DE <i>Nidema boothii</i> (Lindley) Schltr	11
1.5. SÍNTESIS DE BIBENCILOS	13
1.6. PROCESO DE CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VISCERAL	15
1.6.1 Sistema Nervioso Entérico	15
1.6.2 Fases del Proceso de Contracción del Músculo Liso	15
1.6.3 Transducción de Señales	17
1.6.3.1 Transducción de Señales Durante la Fase Inicial de la Contracción Muscular	21
1.6.3.2 Transducción de Señales Durante la Relajación Sostenida del Músculo Liso	22
1.6.3.3 Transducción de Señales Durante la Relajación del Músculo Liso	22
1.6.3.3.1 Relajación Inducida por Agonistas del NO	24
1.7. ESPASMOLÍTICOS DE ORIGEN VEGETAL	27

	Página
<b>II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>50</b>
2.1 HIPÓTESIS	50
2.2 OBJETIVOS GENERALES	50
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>53</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL	53
3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO EN PEQUEÑA ESCALA PARA LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ESPASMOLÍTICO DE LA ESPECIE <i>Nidema boothii</i> .	53
3.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS	
3.3.1 Determinación del efecto relajante de extractos, fracciones y productos puros obtenidos de <i>Nidema boothii</i> sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.	53
3.3.1.1 Aislamiento del íleon	53
3.3.1.2 Sistema de registro	54
3.3.1.3 Evaluación del efecto relajante	54
3.3.1.4 Efecto relajante del gigantol (2) y la batatasina III (14) en presencia del L-NAME, ODQ y clorpromazina	55
3.3.2 Electroforesis desnaturalizante de CaM de cerebro de bovino en presencia de los productos naturales y análogos sintéticos	55
3.3.3 Efecto de los productos naturales y algunos derivados sintéticos sobre la enzima PDE1 dependiente de CaM.	57
3.3.4 Evaluación de la actividad citotóxica de los bibencilos 5, 2, 14, 145, 146, 151-155 y 157.	58
3.4 ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA ESPECIE <i>Nidema boothii</i>	58
3.4.1 Análisis cromatográficos	58
3.4.2 Equipos utilizados para el registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	59

	<b>Página</b>
3.4.3 Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de <i>Nidema boothii</i>	60
3.4.4 Aislamiento y purificación de los productos activos de las fracciones primarias de <i>Nidema boothii</i>	62
<b>3.5 SÍNTESIS DE LOS ANÁLOGOS DE LA BATATASINA III (14) Y EL GIGANTOL (2)</b>	<b>64</b>
3.5.1 Síntesis de los Compuestos Intermediarios (25, 128-130 y 134).	65
3.5.1.1 4-benciloxi-3-metoxibenzaldehído (128)	65
3.5.1.2 3-benciloxi-4-metoxibenzaldehído (129)	65
3.5.1.3 3,4-dibenciloxibenzaldehído (130)	66
3.5.1.4 3-benciloxibenzaldehído (134)	67
3.5.1.5 4-benciloxibenzaldehído (25)	68
3.5.2 Síntesis de las Sales de Wittig	68
3.5.2.1 Reacción de metilación del alcohol 3, 5 dihidroxibencílico (135)	68
3.5.2.2 Reacción de bencilación del alcohol 3-hidroxi-5-metoxibencílico (136)	69
3.5.2.3 Obtención del Bromuro de 3-benciloxi-5-metoxibencilo (137)	70
3.5.2.4 Obtención del bromuro de 3-benciloxi-5-metoxibenciltrifenilfosfonio (138)	71
3.5.2.5 Reacción de bencilación del alcohol 3, 5 dihidroxibencílico (139).	71
3.5.2.6 Obtención del Bromuro de 3-5-dibenciloxibencilo (140)	72
3.5.2.7 Obtención del bromuro de 3,5-dibenciloxibenciltrifenilfosfonio (141)	73
3.5.2.8 Obtención del Bromuro de 3-5-dimetoxibencilo (142)	73
3.5.2.9 Obtención del bromuro del 3,5-dimetoxibenciltrifenilfosfonio (143)	74
3.5.2.10 Obtención del bromuro de benciltrifenilfosfonio (144)	75
3.5.3 Síntesis de Bibencilos	75
3.5.3.1 4'-metoxi-3,3',5-trihidroxibibencilo (148)	75
3.5.3.2 3',4',5-tetrahidroxibibencilo (150)	77
3.5.3.3 3,4',5-trihidroxibibencilo (155)	77

	Página
3.6 CÁLCULOS DE MODELADO MOLECULAR	77
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
4.1 SELECCIÓN DE LA ESPECIE <i>Nidema boothii</i> COMO FUENTE POTENCIAL DE PRINCIPIOS ESPASMOLÍTICOS	81
4.2 OBTENCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ESPASMOLÍTICOS DE <i>Nidema boothii</i>	82
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS NOVEDOSOS AISLADOS DE <i>Nidema boothii</i> .	82
3.5.1 Elucidación estructural de la nidemona (124)	82
3.5.2 Elucidación estructural del compuesto 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (125)	90
4.4 EVALUACION DEL POTENCIAL ESPASMOLÍTICO DE LOS METABOLITOS AISLADOS DE <i>Nidema boothii</i>	94
4.5 SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ANÁLOGOS DE LOS BIBENCILOS GIGANTOL (2) Y BATATASINA (14)	96
4.6 EVALUACION DEL EFECTO RELAJANTE DE LOS COMPUESTOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS (145-157) SOBRE LA CONTRACCIÓN ESPONTÁNEA DEL ÍLEON DE COBAYO	104
4.7 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE 2 Y 14	105
4.7.1 Efecto Espasmolítico de 2 y 14 en Presencia de ODQ y L-NAME	105
4.8 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL GIGANTOL (2), LA BATATASINA III (14) Y SOBRE LA ACTIVIDAD MODULADORA DE LA CALMODULINA	106
4.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS ESTILBENOIDES (2, 5 Y 14) AISLADOS DE <i>Nidema. boothii</i> Y DE LOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS (145, 146, 151-155, 157)	111
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>115</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS</b>	<b>116</b>

	Página
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	117
<b>APENDICE I</b>	
<b>Espectro 1.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la nidemona (124)	131
<b>Espectro 2.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la nidemona (124)	132
<b>Espectro 3.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del aloifol II (5)	133
<b>Espectro 4.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del aloifol II (5)	134
<b>Espectro 5.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi 9,10-dihidrofenantreno (125)	135
<b>Espectro 6.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (125)	136
<b>Espectro 7.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (16).	137
<b>Espectro 8.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (16)	138
<b>Espectro 9.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la efemerantoquinona (126)	139
<b>Espectro 10.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H -NOE diferencial de la efemerantoquinona (126)	140
<b>Espectro 11.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del gigantol (2)	141
<b>Espectro 12.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del gigantol (2)	142
<b>Espectro 13.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del efemerantol B (127)	143
<b>Espectro 14.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del efemerantol B (127)	144
<b>Espectro 15.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (15).	145
<b>Espectro 16.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (15).	146
<b>Espectro 17.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la lusiantridina (11).	147
<b>Espectro 18.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la lusiantridina (11).	148
<b>Espectro 19.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la batatasina III (14).	149
<b>Espectro 20.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la batatasina (14).	150

	Página
<b>Espectro 21.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 4'-Hidroxi-3,3',5-trimetoxibencilo (145)	151
<b>Espectro 22.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 4'-Hidroxi-3,3',5-trimetoxibencilo (145)	152
<b>Espectro 23.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,3',4',5-tetrametoxibencilo (146).	153
<b>Espectro 24.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,3',4',5-tetrametoxibencilo (146).	154
<b>Espectro 25.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,3'-dihidroxi-4',5-dimetoxibencilo (147)	155
<b>Espectro 26.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,3'-dihidroxi-4',5-dimetoxibencilo (147).	156
<b>Espectro 27.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 4'-metoxi-3,3',5-trihidroxibencilo (148)	157
<b>Espectro 28.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 4'-hidroxi-3,3',5-trimetoxibencilo (148).	158
<b>Espectro 29.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3-Hidroxi-3',4',5-trimetoxibencilo (149).	159
<b>Espectro 30.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3-Hidroxi-3',4',5-trimetoxibencilo (149).	160
<b>Espectro 31.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,3',4',5-tetrahidroxibencilo (150).	161
<b>Espectro 32.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,3',4',5-tetrahidroxibencilo (150).	162
<b>Espectro 33.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,4'-dihidroxi-5-metoxibencilo (151).	163
<b>Espectro 34.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,4'-dihidroxi-5-metoxibencilo (151).	164
<b>Espectro 35.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la 3'-O-metilbatatasina III (152)	165
<b>Espectro 36.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3'-O-metilbatatasina III (152)	166
<b>Espectro 37.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,3',5-trihidroxibencilo (153)	167
<b>Espectro 38.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,3',5-trihidroxibencilo (153)	168
<b>Espectro 39.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,4',5-trimetoxibencilo (154)	169

	Página
<b>Espectro 40.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,4',5-trimetoxibibencilo (154)	170
<b>Espectro 42.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,4',5-trihidroxibibencilo (155)	171
<b>Espectro 41.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,4',5-trihidroxibibencilo (155)	172
<b>Espectro 43.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3,5-dihidroxibibencilo (156)	173
<b>Espectro 44.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3,5-dihidroxibibencilo (156).	174
<b>Espectro 45.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3-hidroxi-4-metoxibibencilo (157).	175
<b>Espectro 46.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 3-hidroxi-4-metoxibibencilo (157).	176

### ***APENDICE II***

SPASMOLYTIC EFFECTS, MODE OF ACTION, AND STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF STILBENOIDS FROM *NIDEMA BOOTHII*

### ***APENDICE III***

EVALUACIÓN DEL EFECTO FITOTÓXICO DE LOS PRODUCTOS 2, 5 y 14 NATURALES Y DE LOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS 145, 146, 151-155.

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Ejemplos selectos de compuestos bioactivos aislados de diferentes especies de la familia Orchidaceae	5
<b>Cuadro 2.</b> Inhibición de la contracción espontánea del íleon aislado de rata mostrada por el extracto y los compuestos aislados de <i>Scaphyglottis livida</i>	10
<b>Cuadro 3.</b> Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales	30
<b>Cuadro 4</b> Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones utilizadas para realizar el experimento de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE al 12%)	56
<b>Cuadro 5</b> Fraccionamiento preliminar del extracto obtenido a partir la especie <i>Nidema boothii</i> .	60
<b>Cuadro 6</b> Resumen de las condiciones de reacción empleadas para la obtención de los análogos sintéticos <b>145-147</b> , <b>149</b> , <b>151-154</b> , <b>156</b> y <b>157</b> .	78
<b>Cuadro 7</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la nidemona ( <b>124</b> )	82
<b>Cuadro 8</b> Correlaciones observadas en los espectros de RMN $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC y RMN $^1\text{H}$ -NOESY del compuesto ( <b>124</b> ) en $\text{CDCl}_3$ .	84
<b>Cuadro 9</b> Distancias interatómicas entre los protones H4 y H5' para los conformeros de mínima energía de la alternativa estructural <b>158</b> .	90
<b>Cuadro 10</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno ( <b>125</b> )	90
<b>Cuadro 11</b> Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN- $^1\text{H}$ para 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno ( <b>125</b> ) y 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno ( <b>16</b> ) de <i>Nidema boothii</i>	91
<b>Cuadro 12</b> Correlaciones observadas en el espectro RMN $^1\text{H}$ -NOESY del compuesto 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno ( <b>125</b> )	92

	Página
<b>Cuadro 13</b> Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN- <sup>1</sup> H para los fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos aislados de <i>Nidema boothii</i>	93
<b>Cuadro 14</b> Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN- <sup>13</sup> C para los fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos aislados de <i>Nidema boothii</i>	94
<b>Cuadro 15</b> Inhibición de la contracción espontánea del ileon aislado de cobayo mostrada por los compuestos aislados de <i>Nidema boothii</i>	96
<b>Cuadro 16.</b> Desplazamiento químico (ppm) obtenidos en RMN- <sup>1</sup> H para los bibencilos aislados de <i>Nidema boothii</i> y los análogos sintéticos	98
<b>Cuadro 17.</b> Desplazamiento químico (ppm) obtenidos en RMN- <sup>13</sup> C para los bibencilos aislados de <i>Nidema boothii</i> y los análogos sintéticos	101
<b>Cuadro 18</b> Inhibición de la contracción espontánea del ileon aislado de cobayo por el gigantol ( <b>2</b> ) y sus análogos sintéticos	104
<b>Cuadro 19</b> Inhibición de la contracción espontánea del ileon aislado de cobayo por la batatasina III ( <b>14</b> ) y sus análogos sintéticos.	105
<b>Cuadro 20</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>Nidema boothii</i> y de los análogos sintéticos sobre la Clorpromazina	10

## LISTA DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b>	Metabolitos aislados de la <i>Scaphyglottis livida</i>	9
<b>Figura 2.</b>	Metabolitos aislados de <i>Maxillaria densa</i>	11
<b>Figura 3.</b>	<i>Nidema boothii</i> (Lindley) Schltr.	12
<b>Figura 4.</b>	Organización de las estructuras que constituyen la pared de las vías gastrointestinales	16
<b>Figura 5:</b>	Estructura de los filamentos delgados del músculo liso.	18
<b>Figura 6.</b>	Proceso de contracción del músculo liso	19
<b>Figura 7.</b>	Transducción de señales en el músculo liso visceral	21
<b>Figura 8.</b>	Mecanismo de relajación del músculo liso visceral	23
<b>Figura 9.</b>	Relajación no adrenérgica-no colinérgica (NANC) del músculo liso visceral	26
<b>Figura 10.</b>	Cromatograma de líquidos de alta resolución de la fracción FV-8	63
<b>Figura 11.</b>	Curva concentración-respuesta del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1) de <i>Nidema boothii</i> (CI <sub>50</sub> =6.2620±2.5 µg/mL).	80
<b>Figura 12.</b>	Compuestos aislados de la especie <i>Nidema boothii</i>	81
<b>Figura 13.</b>	Estructuras parciales de la nidemona	83
<b>Figura 14.</b>	Correlaciones importantes observadas en el espectro bidimensional de <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-HMBC del compuesto (124)	84
<b>Figura 15.</b>	Estructuras de mínima energía de la nidemona (124) donde se ilustran las correlaciones NOESY más relevantes	85
<b>Figura 16.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H-NOESY del compuesto 124.	86
<b>Figura 17.</b>	Espectro de dicroísmo circular del compuesto 124	87
<b>Figura 18.</b>	Alternativa estructural para el compuesto 124.	88
<b>Figura 19.</b>	Estructuras de mínima energía para la estructura alterna 158.	89

	<b>Página</b>
<b>Figura 19</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H-NOESY del compuesto <b>125</b>	<b>92</b>
<b>Figura 20.</b> Curvas concentración respuesta que muestra el efecto relajante de los compuestos <b>2, 5, 11, 14, 16, 125</b> y <b>126</b> aislados de la especie <i>Nidema boothii</i> .	<b>95</b>
<b>Figura 22.</b> Curvas concentración-repuesta que muestran el efecto relajante de los compuestos <b>2</b> y <b>14</b> sobre el ileon aislado de cobayo en presencia del ODQ, L-NAME y clorpromazina.	<b>106</b>
<b>Figura 23.</b> Electroforetograma SDS-PAGE de calmodulina de bovino después del tratamiento con los compuestos naturales y los análogos sintéticos.	<b>108</b>
<b>Figura 24.</b> Efecto de los compuestos <b>2, 14</b> y <b>154</b> sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de CaM de cerebro de bovino	<b>110</b>
<b>Figura 25.</b> Curvas concentración-respuesta del gigantol ( <b>6</b> ) y la batatasina III ( <b>10</b> ) en presencia de clorpromazina.	<b>111</b>
<b>Figura 26.</b> Estructura de la cannabispirona	<b>114</b>

## ***LISTA DE ESQUEMAS***

	<b>Página</b>
<b>Esquema 1.</b> Síntesis de la lunularina (23) mediante el método de condensación de Perkin.	<b>13</b>
<b>Esquema 2.</b> Síntesis del 3-hidroxi-2-metoxibencilo (28) mediante la reacción de Wittig	<b>14</b>
<b>Esquema 3.</b> Aislamiento y purificación de los productos activos de las fracciones primarias de <i>Nidema boothii</i> .	<b>61</b>
<b>Esquema 4.</b> Esquema general de la síntesis de los compuestos análogos (145-157) del gigantol (2) y la batasina III (14).	<b>64</b>
<b>Esquema 5.</b> Síntesis del compuesto 128	<b>65</b>
<b>Esquema 6.</b> Síntesis del compuesto 129	<b>65</b>
<b>Esquema 7.</b> Síntesis del compuesto 130	<b>66</b>
<b>Esquema 8.</b> Síntesis del compuesto 134	<b>67</b>
<b>Esquema 9.</b> Síntesis del compuesto 25	<b>68</b>
<b>Esquema 10.</b> Síntesis del compuesto 135	<b>69</b>
<b>Esquema 11.</b> Síntesis del compuesto 136	<b>69</b>
<b>Esquema 12.</b> Síntesis del compuesto 137	<b>70</b>
<b>Esquema 13.</b> Síntesis del compuesto 138	<b>71</b>
<b>Esquema 14.</b> Síntesis del compuesto 139	<b>71</b>
<b>Esquema 15.</b> Síntesis del compuesto 140	<b>72</b>
<b>Esquema 16.</b> Síntesis del compuesto 141	<b>73</b>
<b>Esquema 17.</b> Síntesis del compuesto 142	<b>73</b>
<b>Esquema 18.</b> Síntesis del compuesto 143	<b>74</b>
<b>Esquema 19.</b> Síntesis del compuesto 144	<b>75</b>
<b>Esquema 20.</b> Síntesis del compuesto 148	<b>76</b>

	<b>Página</b>
<b>Esquema 21.</b> Hidrólisis enzimática del AMPc	<b>109</b>
<b>Esquema 22.</b> Ruta biogénica propuesta para el compuesto <b>124</b> .	<b>113</b>

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

A°	Amstrong
AA	Acido araquidónico
ABC	Línea bajo la curva
ACh	Acetilcolina
AcOEt	Acetilcolina
ADP	Difosfato de adenosina
ADPRc	ADP ribosa cíclica
AMPc	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
BaCl <sub>2</sub>	Cloruro de bario
°C	Grado centígrado
Ca <sup>+2</sup>	Calcio
[Ca <sup>+2</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CaM	Calmodulina
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
DC	Dicroismo circular
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CO	Monóxido de carbono
cm	Centímetros
d	Doblete
dd	Doble de doble
DAG	Diacilglicerol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido

DMSO <sub>d</sub> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada
E.E.M	Error estándar de la media
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EGTA	Etilenglicol bis(β-aminoéter)
E <sub>máx</sub>	Efecto máximo
EMIE	Espectrometría de masa por impacto electrónico
eNOS	Oxido nítrico sintetasa endotelial
EtOH	Etanol
eV	Electrón Volts
g	Gramos
GABA	Acido gamma-amino butírico
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GDP	Difosfato de guanosina
GI	Tracto gastrointestinal
GMPc	Guanosina-3',5'-monofosfato cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
h	Horas
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
Hex	Hexano
HBr	Acido bromhídrico
HCl	Acido clorhídrico
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
iNOS	Oxido nítrico sintetasa inducible
IP <sub>3</sub>	1,4,5-trifosfato de inositol
iPrOH	Isopropanol
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
K <sup>+</sup>	Potasio
KBr	Bromuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio

*Lista de abreviaturas*

KH	Krebs-Henseleit
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
KR	Krebs Ringer
L	Litro
LiAlH <sub>4</sub>	Hidruro de litio y aluminio
L-NAME	1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-ona
M	Molar
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
MeOH	Metanol
mg	miligramo
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina dependiente de calmodulina
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
m/z	Relación masa carga
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Dinucleótido de adenina y nicotinamina fosfato reducido
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NANC	No adrenérgica-no colinérgica
NaOH	Hidróxido de sodio
NaOCH <sub>3</sub>	Metóxido de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio

nm	Nanómetro
NO	Oxido nítrico
NO/GMPc	Sistema óxido nítrico/guanilato ciclasa soluble
NOS	Oxido nítrico sintetasa
nNOS	Oxido nítrico sintetasa neuronal
NSAID	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
-OH	Hidroxilo
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-ona
PA	Acido fosfatídico
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa
PC-PLC	Fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina
PDP	Fosfatidil 4,5-bifosfato
Pd/C	Paladio sobre carbono
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC- $\beta$	Fosfolipasa C- $\beta$
PLD	Fosfolipasa D
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
pf	Punto de fusión
Pi	Fosfato inorgánico
PKC	Proteína cinasa C
PPh <sub>3</sub>	Trifenilfosfina
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
REL	Retículo endoplásmico liso
RhoGEF	Factor de intercambio de guanina
RLC	Cadenas ligeras regulatorias de la miosina
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece

*Lista de abreviaturas*

RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN <sup>13</sup> C-DEPT	Resonancia magnética nuclear de carbono trece con desacoplamiento de los núcleos de hidrógeno
RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear múltiple ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
RMN <sup>1</sup> H-COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)
RMN <sup>1</sup> H-NOESY	Espectroscopía bidimensional por efecto nuclear de Overhauser ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)
Ser	Serina
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNE	Sistema nervioso entérico
SNC	Sistema nervioso central
TMS	Tetrametilsilano
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
VIP	Polipéptido vasoactivo intestinal
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrometro
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
λ <sub>máx</sub>	Longitud de onda máxima

## RESUMEN

La presente disertación forma parte de un estudio sistemático de orquídeas mexicanas como fuente de compuestos espasmolíticos y describe la investigación realizada para determinar la actividad espasmolítica, así como el mecanismo de acción de los estilbenoides aislados de *Nidema boothii* (Lindl.) Schltr. (Orchidaceae) y de una serie análogos sintéticos.

La selección de la especie objeto de estudio se realizó con base en el criterio quimiotaxonómico, debido a que estudios anteriores realizados con otras especies de orquídeas (*Scaphyglottis livida* y *Maxillaria densa*) permitieron el descubrimiento de estilbenoides espasmolíticos (Estrada *et al.*, 1999a, 1999b, 2000).

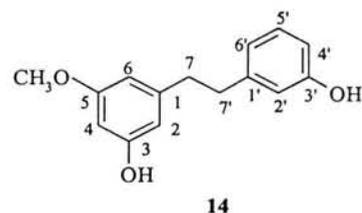
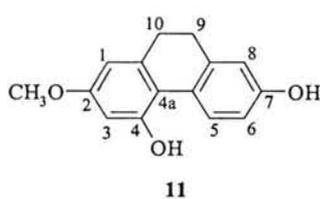
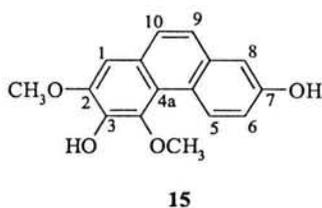
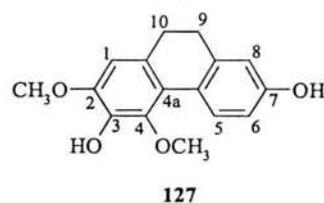
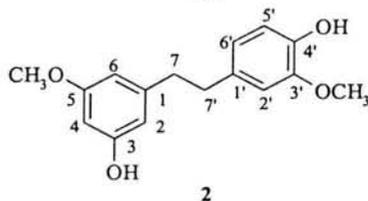
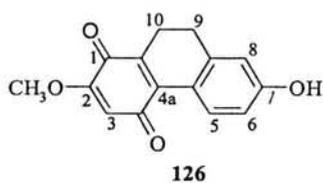
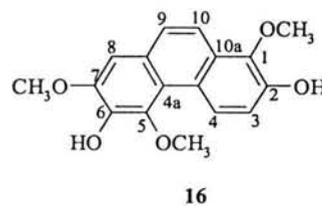
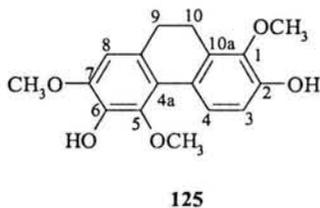
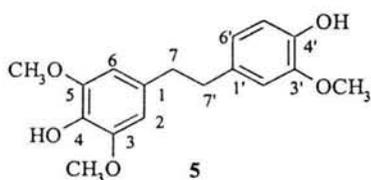
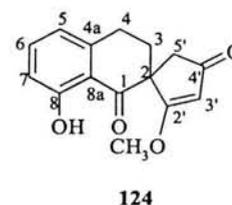
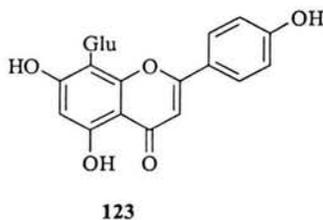
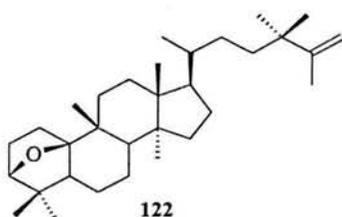
La evaluación biológica del extracto orgánico CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *N. boothii* inhibió significativamente las contracciones espontáneas del íleon de cobayo. Posteriormente, el fraccionamiento biodirigido del extracto activo permitió el aislamiento de dos estilbenoides novedosos: un compuesto de tipo espiro, designado con el nombre trivial de nidemona (**124**) y el compuesto **125**, un dihidrofenantreno, caracterizado como el 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno. De manera adicional, se aislaron otros estilbenoides como el aloifol II (**5**), el 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (**16**), la efemerantoquinona (**126**), el gigantol (**2**), el efemerantol B (**127**), el 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**15**); la lusiantridina (**11**), la batatasina (**14**), un triterpenoide, la nidemina (**122**), y un flavonoide glucosilado, la vitexina (**123**). La elucidación estructural de los mismos se realizó mediante la aplicación de diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

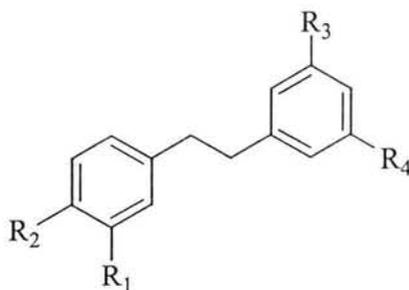
Los compuestos **2**, **5**, **11**, **14**, **16**, **124**, **125** y **126** mostraron una actividad espasmolítica significativa sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo de una manera dependiente de la concentración, con valores de CI<sub>50</sub> en un rango de 0.14 a 2.36 μM. Con la finalidad de obtener más información con relación al mecanismo de acción de los bibencilos **2** y **14** se realizaron estudios de tipo funcional y enzimático para determinar el efecto de los mismos sobre la proteína reguladora calmodulina (CaM). También se analizó su efecto sobre la contracción espontánea del íleon de cobayo en presencia del 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-α]quinoxalin-1-ona (ODQ) y 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-α]quinoxalin-1-ona (L-NAME), inhibidores de la enzima guanilato

## Resumen

ciclasa soluble (GCs) y de la óxido nítrico sintetasa (NOS), respectivamente. Los resultados generados de este estudio, indicaron que además del mecanismo nitrérgico, los bibencilos podrían ejercer su efecto espasmolítico a través de la proteína reguladora CaM, ya que estos productos modificaron *in vitro* las propiedades reguladoras enzimáticas de esta proteína

Por otra parte se realizó la síntesis de los compuestos **145-149**, **151-154**, **156** y **157**, análogos de los productos naturales gigantol (**2**) y batatasina III (**14**), mediante la reacción de Wittig y se evaluó su potencial espasmolítico con la finalidad de establecer la influencia de la posición y la naturaleza de los sustituyentes en los anillos aromáticos en el efecto farmacológico. Los resultados obtenidos indicaron que para la máxima actividad espasmolítica es necesario la presencia de grupos oxigenados en ambos anillos aromáticos ya que la potencia espasmolítica de los productos **156** y **157** que carecen de sustituyentes oxigenados en los anillos aromáticos, es mucho menor. Por otro lado, la metilación de los grupos hidroxilos libres o el incremento de los grupos oxigenados con relación a los compuestos **2** y **14** disminuye la actividad espasmolítica.

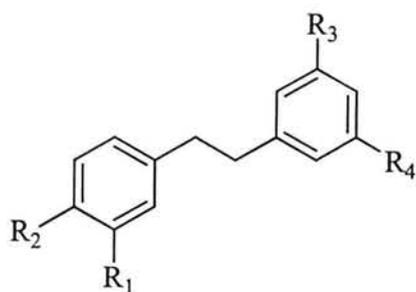




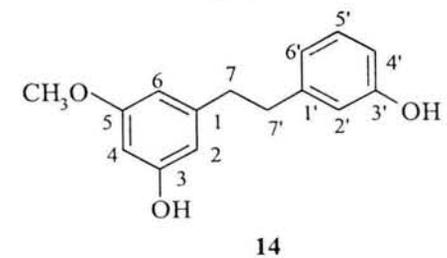
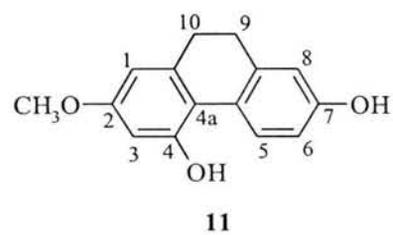
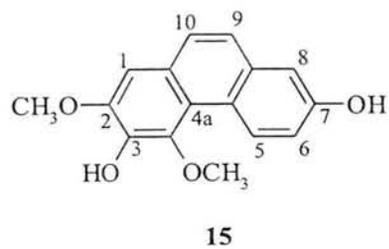
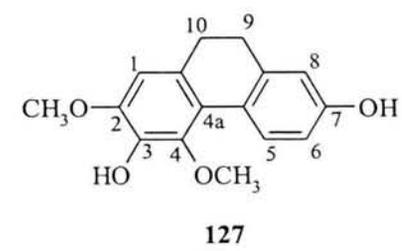
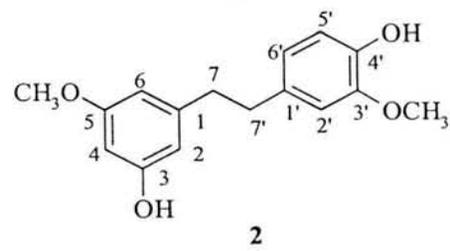
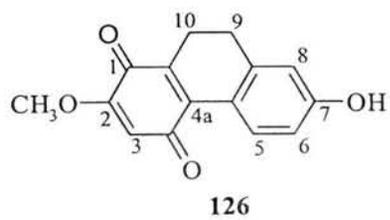
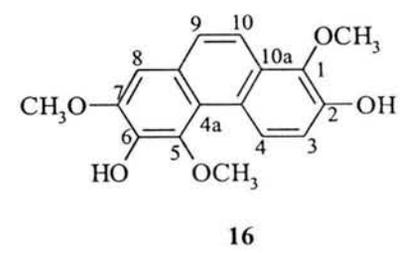
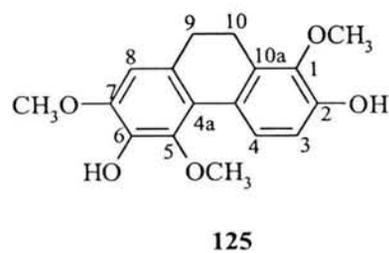
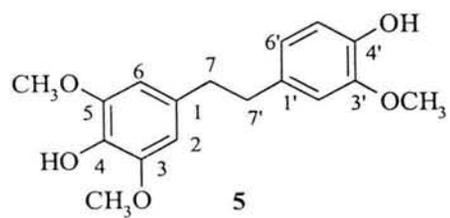
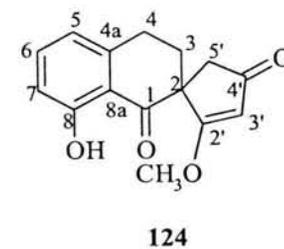
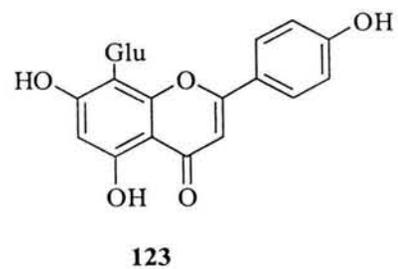
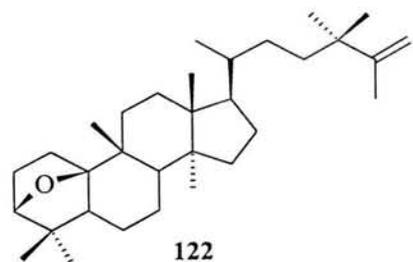
- 145** R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OMe, R<sub>2</sub> = OH  
**146** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OMe  
**147** R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> = OH; R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> = OMe  
**148** R<sub>2</sub> = OMe; R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH  
**148** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> = OMe; R<sub>3</sub> = OH  
**150** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH  
**151** R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = OMe  
**152** R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> = OMe; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = OH  
**153** R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H  
**154** R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OMe; R<sub>2</sub> = H  
**155** R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH  
**156** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH  
**157** R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OMe; R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H

## ABSTRACT

A CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) extract prepared from the whole plant of *Nidema boothii* inhibited spontaneous contractions (IC<sub>50</sub> = 6.26 ± 2.5 µg/mL) of the guinea-pig ileum. Bioassay-guided fractionation of the active extract led to the isolation of the novel spiro compound **124**, which was given the trivial name nidemone, and the new dihydrophenanthrene **125**, characterized as 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol. In addition, the known stilbenoids aloifol II (**5**), 1,5,7-trimethoxyphenanthrene-2,6-diol (**16**), ephemerantheroquinone (**126**), gigantol (**2**), ephemerantherol B (**127**), 2,4-dimethoxyphenanthrene-3,7-diol (**15**), lusianthridin (**11**), and batatasin III (**14**) were obtained. The isolates were characterized structurally by spectroscopic data interpretation. Compounds **2**, **5**, **11**, **14**, **16**, **124**, **125** and **126** induced notable concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of the guinea-pig ileum with IC<sub>50</sub> values that ranged between 0.14 and 2.36 µM. Bibenzyls analogs **145-157** were synthesized and tested pharmacologically. The results indicated that for maximum spasmolytic activity the bibenzyls should have oxygenated substituents on both aromatic rings; on the other hand, methylation of free hydroxyl groups as well as the increment of oxygenated groups in relation to compounds **2** and **14** decreased the smooth muscle relaxant activity. It was also demonstrated that bibenzyls **2** and **14** might exert their spasmolytic action not only by a nitrenergic mechanism but also by inhibiting CaM mediated processes.



- 145** R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OMe, R<sub>2</sub> = OH  
**146** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OMe  
**147** R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> = OH; R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> = OMe  
**148** R<sub>2</sub> = OMe; R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH  
**148** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> = OMe; R<sub>3</sub> = OH  
**150** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH  
**151** R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = OMe  
**152** R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> = OMe; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = OH  
**153** R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H  
**154** R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OMe; R<sub>2</sub> = H  
**155** R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH  
**156** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH  
**157** R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OMe; R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H



## ***I. ANTECEDENTES***

### **1.1 EL USO DE ORQUÍDEAS COMO MEDICINA HERBOLARIA**

Las orquídeas constituyen una de las familias botánicas más grandes y ampliamente distribuidas en el mundo, ya que incluye alrededor de 35,000 especies organizadas en 750 géneros, cinco subfamilias y nueve tribus (Dressler, 1993). La mayor parte de las especies de orquídeas se encuentran localizadas en las regiones tropicales (Williams, 1979; Hietz, 1994), especialmente en la zona montañosa entre los 1,000 y 2,000 metros de altura sobre el nivel del mar (Hausen, 1984); encontrándose el mayor número de especies en México, Guatemala, Honduras, Colombia, Venezuela y Brasil (Dressler, 1981). En México, las orquídeas se distribuyen principalmente en cuatro estados: Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero. Otros estados con una cifra considerable de especies son: Morelos, México, Michoacán y las regiones bajas de Puebla y San Luis Potosí (Hietz, 1994).

Debido a la belleza de sus flores algunas especies de orquídeas, por ejemplo las del género *Phalaenopsis*, son utilizadas como plantas de ornato (Hietz, 1994; Tatsuzawa *et al.*, 1997). Por otro lado, las orquídeas son importantes en la industria de alimentos y perfumería. En varias culturas orientales los tubérculos de ciertas especies del género *Orchis* se emplean para la producción de harinas con propiedades reconstituyentes y analépticas (Stoessl y Arditti, 1984). En la India, Turquía y el Tíbet, algunas especies de este mismo género se agregan al vino como alimento y se ha demostrado que poseen propiedades afrodisíacas (Zimmemann, 1959). A partir de la especie *Vainilla planifolia* se obtiene la esencia de vainilla, la cual se emplea como un condimento y como agente saborizante, principalmente en la manufactura de chocolate y helado. También se emplea en elaboración de jabones, cremas y perfumes (McVaugh, 1985). El aldehído vainillina es el principio responsable del aroma y sabor de la esencia de vainilla (Trease y Evans, 2002).

Otras especies de orquídeas son utilizadas en la medicina tradicional debido a que poseen propiedades curativas. Así, las flores de la especie *Angracum fragans* empleadas como agente sedante, diaforético, digestivo y expectorante (Zimmemann, 1959). Algunas especies de *Catteya* son útiles en el tratamiento de la hipotensión, ya que poseen un alto contenido de tiramina (Stoessl y Arditti, 1984). Las raíces de *Cypripedium reginae*

## 1. Antecedentes

(valeriana americana) son apreciadas en América del Norte por sus propiedades tranquilizantes (Stoessl y Arditti, 1984).

*Dendrobium nobile* se usa desde tiempos ancestrales en China como tónico y antipirético; también es de utilidad para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales y anorexia (Onaka *et al.*, 1965; Miyazawa *et al.*, 1997). *D. nobile* es una de las especies más utilizadas para la preparación de la droga china “Shih-hu”, empleada como un tónico y para impartir longevidad, tratar la dismenorrea, el reumatismo, la impotencia y la leucorrea (Kong *et al.*, 2003). Recientemente, se descubrió que el extracto metanólico de esta orquídea posee actividad antimutagénica, y se demostró que los principios activos son los bibencilos gigantol y moscatilina (aloifol II) (Miyazawa *et al.*, 1997, 1999). De esta especie también se han aislado otros compuestos con diversas propiedades, incluyendo la: citotóxica, antifúngica e inmunomoduladora.

Otras especies del género *Dendrobium* han sido objeto de numerosos estudios fitoquímicos y farmacológicos. Así, se encontró que algunos compuestos aislados del extracto metanólico de *Dendrobium loddigessi* [moscatilina (aloifol II), moscatina y el diacetato de moscatilina] inhiben la agregación plaquetaria inducida por el ácido araquidónico o colágeno. En otro estudio farmacológico se comprobó que sus alcaloides shihunidina y shihunina son potentes inhibidores de la actividad de la enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa aislada de riñón de rata (Kong *et al.*, 2003).

Los tubérculos de *Gastrodia elata* se emplean en el Tibet, Japón y China como alimento. Además esta orquídea es parásita del hongo *Amillaria melea* (hongo dulce); esta asociación contribuye además al control biológico del hongo, ya que el mismo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y compite con muchas plantas por los nutrientes necesarios para su crecimiento (Kong *et al.*, 2003). El rizoma de *G. elata* se usa en la medicina China para la cura de dolores de cabeza. Los tubérculos y rizomas, cocidos o secos, de esta orquídea se conocen en China con el nombre de “Tienma” y se prescriben para el tratamiento de migraña, reumatismo, parálisis, convulsiones infantiles, fiebre y numerosas afecciones (Noda *et al.*, 1995, Kong *et al.*, 2003); también se emplea para dar fuerza y virilidad, promover la circulación sanguínea e incrementar la memoria. En Korea, los tubérculos de la especie se utilizan para el tratamiento de desórdenes nerviosos, para prevenir el resfriado común y como un tónico. *G. elata* se emplea en Taiwán como un

fortificador, para tratar el sistema nervioso debilitado y dolores de cabeza. En la medicina tradicional de Japón la planta seca es útil para tratar el vértigo, dolores de cabeza y enfermedades nerviosas, especialmente en niños. Estudios farmacológicos recientes sugieren que el extracto crudo de esta orquídea posee efectos sedantes y analgésicos, y ocasiona un incremento del flujo sanguíneo del corazón y cerebro, disminuyendo así la resistencia de los vasos sanguíneos. Además, el extracto crudo induce resistencia a la hipoxia y en la práctica clínica se utiliza para el síndrome neurastémico y el dolor de cabeza vasoneuronal (Wu *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1995). Por último, Wu y colaboradores (1996) comprobaron que el extracto acuoso de esta especie posee actividades antioxidantes y secuestradoras de radicales libres, en tanto que, el extracto metanólico presenta poco efecto sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Algunos autores han señalado que su acción antiepiléptica puede atribuirse a la actividad antioxidante de los constituyentes de la planta (Noda *et al.*, 1995; Kong, *et al.*, 2003).

Otra orquídea que se usa en la medicina tradicional China es *Bletilla striata*, (Dai chi o Baiji). Los tubérculos de esta especie se emplean para el tratamiento de tuberculosis, úlceras gástrica y duodenal, así como también para mejorar la piel agrietada en pies y manos (Kong *et al.*, 2003). Otros usos en China, Mongolia y Japón incluyen la purificación de la sangre y fortalecimiento de pulmones; también se emplea para el tratamiento de abscesos, tumores malignos, cáncer de mama, flatulencia, dispepsia, disentería, fiebre, úlceras malignas, desórdenes gastrointestinales, hemorroides, ántrax, malaria, enfermedades de los ojos, ciertas micosis, daños traumáticos, tos, dolor de pecho, tuberculosis, sangrados internos, inflamación, y como un agente expectorante. Las raíces pulverizadas de la planta se mezclan con aceite y la mezcla se aplica externamente para aliviar quemaduras y enfermedades de la piel, en tanto que preparaciones de la planta entera se utilizan para curar la leucorrea y la tos purulenta y como tónico (Kong *et al.*, 2003).

*Nervilia purpurea* se emplea en la medicina tradicional de Taiwan (I-Tiam-hong) para el tratamiento de heridas y de la hipertensión. La especie relacionada *N. aragoana* se usa para el tratamiento de la crisis visceral, enfermedades pulmonares e hipertensión (kikuchi *et al.*, 1985a, 1985b). Los tubérculos de *Pleione bulbocodioides* (“Shan ci-gu”)

## 1. Antecedentes

son efectivos para el tratamiento de tumores en las prácticas médicas populares de China (Bai *et al.*, 1996 y 1997, Kong *et al.*, 2003).

La especie mexicana *Scaphyglottis livida* aplicada de manera tópica se utiliza para eliminar ectoparásitos. La decocción de la planta entera se emplea para aliviar dolores de estómago y para evitar el aborto. Así mismo, la especie *Maxillaria densa* se emplea para el tratamiento de cólicos. Como se explicará en detalle más adelante, un estudio reciente de estas especies proporcionó evidencias científicas que sustentan su uso popular como agentes antiespasmódicos, ya que el extracto íntegro preparado a partir de las plantas enteras y algunos de sus metabolitos secundarios inhiben las contracciones espontáneas del ileon de rata (Estrada *et al.*, 1999a, 1999b, Estrada 2000).

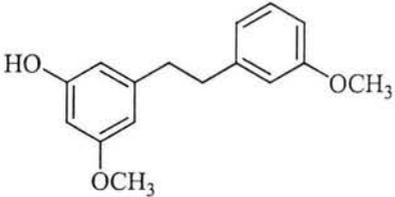
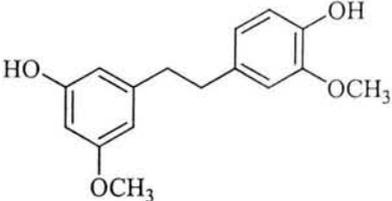
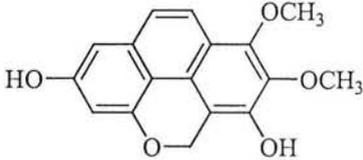
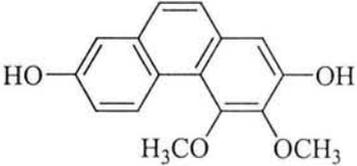
Otra orquídea mexicana con un uso tradicional entre las comunidades indígenas es *Oncidium cebolleta*. Los Indios Tarahumaras de Chihuahua la emplean como un agente alucinógeno en ceremonias mágico-religiosas, probablemente como un sustituto temporal del peyote o “hikuri” (*Lophophora williamsii*) (Stermitz *et al.*, 1983).

## 1.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS ESTILBENOIDES DE ORQUÍDEAS

Los estilbenoides son metabolitos secundarios del tipo  $C_6-C_2-C_6$  de biogénesis mixta, de tal forma que la unidad  $C_6C_2$  se genera a partir de un derivado del ácido cinámico; mientras que el otro anillo aromático se genera a partir del malonil-CoA. Estos productos se encuentran principalmente en especies de orquídeas y Briofitas, aunque también se han descrito en Moráceas, Cannabináceas y Poligonáceas, por tan sólo mencionar algunas familias de Angiospermas que biosintetizan este tipo de productos (Gorham, 1995). Desde el punto de vista químico se dividen en cuatro grandes grupos: estilbenos, bibencilos, fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos, cada uno con sus subgrupos. Los compuestos de interés para este trabajo pertenecen a los tres últimos grupos. Además de la actividad relajante de la musculatura lisa comprobada en el trabajo de Estrada y colaboradores (1999a, 1999b, 2000), en la literatura científica se describe que algunos bibencilos poseen propiedades antisépticas (Takagi *et al.*, 1983) antimutagénicas (Miyazawa *et al.*, 1997, 1999) y antiinflamatorias (Shimizu *et al.*, 1998). En tanto que los fenantrenos y los 9,10-dihidrofenantrenos poseen propiedades espasmolíticas (Sachdev y

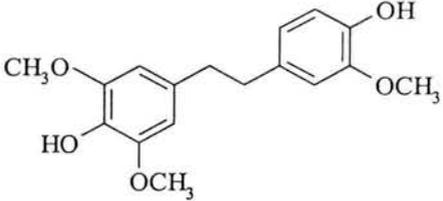
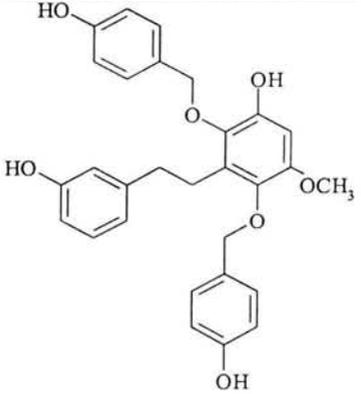
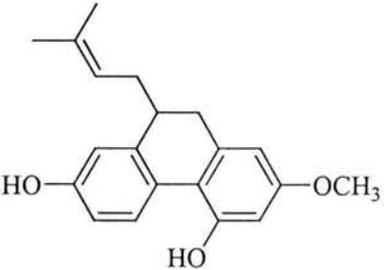
Kulshreshtha, 1986, Estrada, *et al.*, 1999a), antiinflamatorias (Shimizu *et al.*, 1988), antifúngicas (Baxter, 1994), fitotóxicas (Valencia-Islas *et al.*, 2002) y antitumorales (Lee *et al.*, 1995, Gorham 1995). En el Cuadro 1 se indican ejemplos selectos de estilbenoides biodinámicos.

**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de compuestos bioactivos aislados de diferentes especies de la familia Orchidaceae

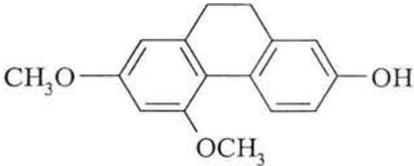
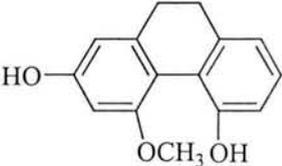
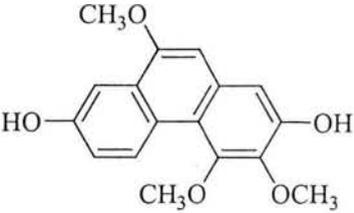
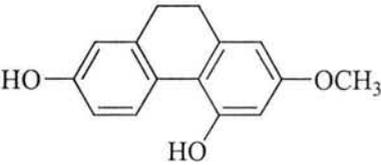
Fuente natural	Compuesto	Actividad biológica
<i>Coelogyne ovalis</i>	 <p>3'-O-metilbatastatina III (1)</p>	Antibacterial contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> (Yamaki <i>et al.</i> , 1989)
<i>Bulbophyllum vaginatum</i> , <i>Lusia volucris</i> , <i>Catasetum barbatum</i> <i>Dendrobium nobile</i>	 <p>gigantol (2)</p>	Antiinflamatorio (Shimizu <i>et al.</i> , 1988) Antimutagénico (Miyazawa <i>et al.</i> , 1997)
<i>Coelogyne ovalis</i> y <i>Coelogyne cristata</i>	 <p>coelogina (3)</p>	Espasmolítico Bloqueador de canales de Ca <sup>2+</sup> en íleon de cobayo (Sachdev y Kulshreshtha, 1986)
<i>Eria convallarioides</i> , <i>Eulophia nuda</i> , <i>Oncidium cebolleta</i>	 <p>nudol (4)</p>	Antiinflamatorio Inhibidor específico no competitivo de las contracciones inducidas por histamina (Shimizu <i>et al.</i> , 1988)

I. Antecedentes

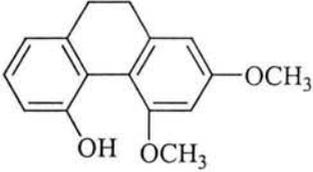
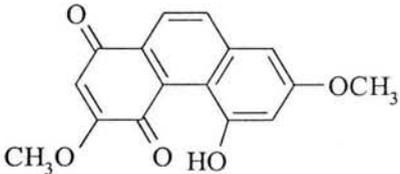
**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de compuestos bioactivos aislados de diferentes especies de la familia Orchidaceae (continuación)

Fuente natural	Compuesto	Actividad biológica
<p><i>Dendrobium loddigessi</i> <i>Dendrobium nobile</i></p>	 <p>aloifol II (5, moscatilina)</p>	<p>Inhibidor de la agregación plaquetaria (Kong <i>et al.</i>, 2003) Antimutagénico (Miyazawa <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p><i>Bletilla striata</i></p>	 <p>3,3'-dihidroxi-5-metoxi-2,6-bis-(<i>p</i>-hidroxibencil) bibencilo (6)</p>	<p>Antibacterial contra <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. Cereus</i>, <i>Nocardia gardneri</i> y <i>S. aureus</i> (Takagi <i>et al.</i>, 1983)</p>
<p><i>Spiranthes sinensis</i></p>	 <p>espirantol-A (7)</p>	<p>Actibacterial contra <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. Cereus</i>, <i>Nocardia gardneri</i> y <i>S. aureus</i> Antifúngico contra <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Tezuka <i>et al.</i>, 1990)</p>

**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de compuestos bioactivos aislados de diferentes especies de la familia Orchidaceae (continuación)

Fuente natural	Compuesto	Actividad biológica
<p><i>Orchis militaris</i>, <i>Agrostophyllum callosum</i>, <i>Spiranthes sinensis</i></p>	 <p>orcinol (8)</p>	<p>Antifúngico contra el moho <i>Candida lipolytica</i>, <i>Phytophthora infestans</i> y <i>Monilinia fructicola</i> (Baxter, 1994)</p>
<p><i>Loroglossum hircinum</i></p>	 <p>hircinol (9)</p>	<p>Antifúngico contra de <i>Aspergillus niger</i> (Baxter, 1994)</p>
<p><i>Maxillaria densa</i></p>	 <p>gimnopusina (10)</p>	<p>Actividad fitotóxica (Valencia-Islas <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p><i>Dendrobium plicatile</i>, <i>Lusia indivisa</i>, <i>Bletilla striata</i></p>	 <p>lusiantridina (11)</p>	<p>Antitumoral en ratón, Agente citotóxico <i>in vitro</i> (A-549 carcinoma de pulmón, SK-DV-3 carcinoma de ovario y HL-60 leucemia humana) (Lee <i>et al.</i>, 1995)</p>

**Cuadro 1.** Ejemplos de compuestos bioactivos aislados de diferentes especies de la familia Orchidaceae (continuación)

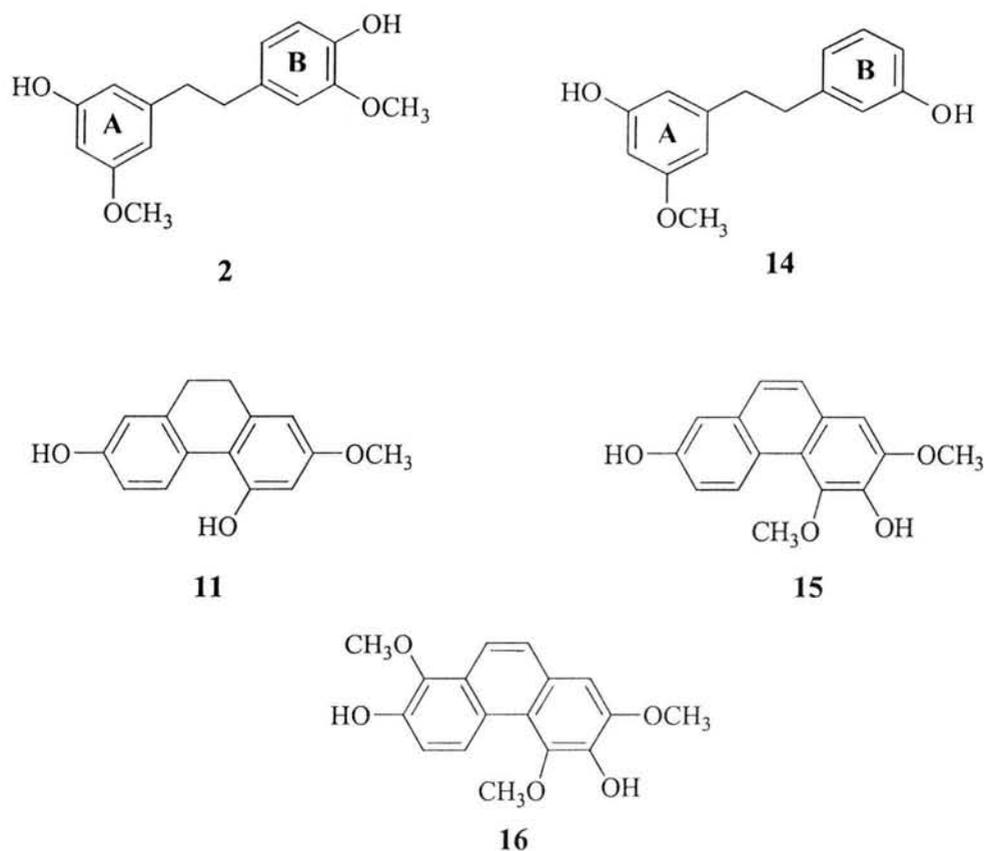
Fuente natural	Compuesto	Actividad biológica
<i>Loroglossum hircinum</i>	 <p>loroglosol (12)</p>	Antifúngico contra <i>Phytophthora infestans</i> (Baxter, 1994)
<i>Dendrobium nobile</i>	 <p>denbinobin (13)</p>	Antitumoral (Lee <i>et al.</i> , 1995)

### 1.3 ESPECIES DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE AGENTES ESPASMOLITICOS.

En la búsqueda de productos naturales con actividad espasmolítica a partir de especies pertenecientes a la familia Orchidaceae, se tiene como antecedente los trabajos realizados por Estrada y colaboradores (1999a, 1999b, 2000) sobre las orquídeas mexicanas *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr., y *Maxillaria densa* (Lindley). La elección de estas orquídeas medicinales como fuentes de agentes espasmolíticos fue el resultado de un estudio etnobotánico realizado en la región de los Tuxtlas, Veracruz, donde ambas especies gozan de reputación folklórica como agentes antiespasmódicos.

En los estudios conducidos por Estrada y colaboradores (1999a, 1999b, 2000) se demostró que los extractos  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1) de las orquídeas *S. livida* y *M. densa* provocan una disminución significativa del tono y la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon de rata. Posteriormente, el estudio biodirigido de los extractos activos permitió el aislamiento de una serie de estilbenoides biodinámicos. De la especie *S. livida*

se aislaron el gigantol (**2**), la batatasina III (**14**), la lusiantridina (**11**), el 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**15**) y el 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**16**), indicados en la Figura 1. De *M. densa* se obtuvieron el nudol (**4**), el 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (**17**), 9,10-dihidro-2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (**18**) y eriantridina (**19**) indicados en la Figura 2. Estos estilbenoides también provocaron la relajación de las contracciones espontáneas del ileon de rata de una manera dependiente de la concentración. La potencia demostrada por los compuestos fue en la mayoría de los casos mayor o igual a la de la papaverina, alcaloide espasmolítico utilizado como un control positivo. A manera de ejemplo en el Cuadro 2 se indica el efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ), las concentraciones inhibitorias media ( $CI_{50}$ ) y la potencia de los metabolitos aislados de *S. livida*. De acuerdo a los resultados indicados en el Cuadro 2, los productos más activos fueron **14** y **15**.



**Figura 1.** Metabolitos aislados de la *Scaphyglottis livida* (Estrada *et al.*, 1999a)

**Cuadro 2.** Inhibición de la contracción espontánea del ileon aislado de rata mostrada por el extracto y los compuestos aislados de *Scaphyglottis livida* (Estrada *et al.*, 1999a)

Sustancia	E <sub>max</sub>	CI <sub>50</sub> (M)	Potencia
Papaverina	96.70±5.02	1.55 x 10 <sup>-6</sup> ±0.12	1
Extracto	82.10±6.02	6.06±1.02*	-
<b>2</b>	93.50±3.02	5.83 x 10 <sup>-6</sup> ±0.55	0.2658
<b>14</b>	85.20±2.08	7.37 x 10 <sup>-7</sup> ±0.07	2.1031
<b>11</b>	80.00±1.98	9.50 x 10 <sup>-7</sup> ±0.03	1.6315
<b>15</b>	83.59±1.3	6.66 x 10 <sup>-7</sup> ±0.01	2.3273
<b>16</b>	88.05±1.8	7.13 x 10 <sup>-6</sup> ±0.42	0.2173

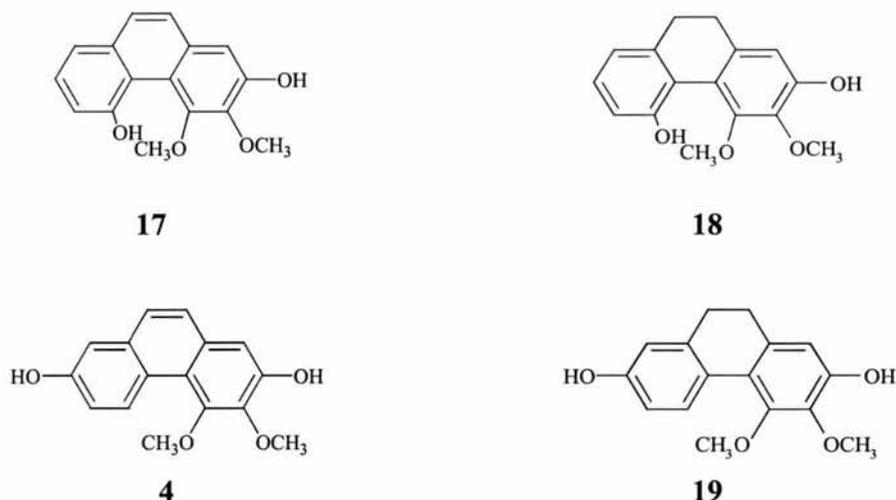
La CI<sub>50</sub> del extracto se expresa en µg/ml

Los valores están expresados en medias ± E.E.M; n=6; p<0.05. La potencia fue obtenida por la fórmula: CI<sub>50</sub> (M) de la papaverina/ CI<sub>50</sub> (M) del compuesto, asumiéndose un valor de 1.00 para la papaverina. E<sub>máx</sub> indica el % de inhibición máxima.

Con la finalidad de iniciar la caracterización farmacológica de los metabolitos activos, se realizaron una serie de experimentos con diferentes espasmógenos tales como acetilcolina (ACh), BaCl<sub>2</sub> e histamina. Estos experimentos consistieron en evaluar el efecto de los productos espasmolíticos sobre las contracciones inducidas por los espasmógenos seleccionados. Los resultados indicaron que en general el modo de acción de los compuestos no involucra un efecto anticolinérgico o una interferencia con la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula del músculo liso. En el caso del compuesto **2** se obtuvo un efecto antagónico significativo de las contracciones inducidas por histamina.

Por último, se demostró que los compuestos **2**, **11**, **14-16** antagonizaban las contracciones provocadas por 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-α]quinoxalin-1-ona (L-NAME), un inhibidor de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Estos resultados permitieron establecer la hipótesis de que el mecanismo de relajación de los cuatro estilbenoides estaba mediado por el sistema óxido nítrico/monofosfato-3',5'-de guanosina [NO/GMPc]. En el caso del compuesto **2** esta hipótesis se comprobó mediante un radioinmunoensayo, mismo

que permitió demostrar que el gigantol provoca un incremento de los niveles de GMPc en anillos de íleon de rata (Estrada *et al.*, 1999).



**Figura 2.** Metabolitos aislados de *Maxillaria densa* (Estrada *et al.*, 1999b)

Evidentemente el trabajo sobre la especie *S. livida* dejó un buen número de perspectivas que se abordarán en diferentes proyectos. Así, en el caso del compuesto **2**, considerando que su mecanismo de acción involucra el sistema NO/GMPc resultaría interesante demostrar si este efecto se debe a una estimulación directa de las enzimas NOS y/o guanilato ciclasa soluble (GCs). En el caso del compuesto **14** dada su potencia sería conveniente, completar el estudio de su mecanismo de acción. Por último; sería pertinente establecer la influencia de la naturaleza de los sustituyentes de los anillos A y B en el efecto farmacológico. Para ello es necesario realizar la síntesis de análogos que difieran en la posición y naturaleza (fenol vs. éter metílico) de los sustituyentes en los anillos A y B.

#### 1.4 GENERALIDADES DE *Nidema boothii* (Lindley) Schltr

La orquídea *N. boothii* fue descrita por vez primera por John Lindley, quien la ubicó en el género *Epidendrum* con el nombre de *Epidendrum boothii* Lindley. Posteriormente, en 1922, Schlechter la reclasificó en el género *Nidema*. Esta orquídea (Figura 3) se encuentra ampliamente distribuida en Centroamérica (desde México hasta

### *I. Antecedentes*

Panamá), Cuba y Surinam. Habita en los bosques húmedos tropicales a una altitud de 1,500 m sobre el nivel del mar. En México es particularmente abundante en el estado de Veracruz

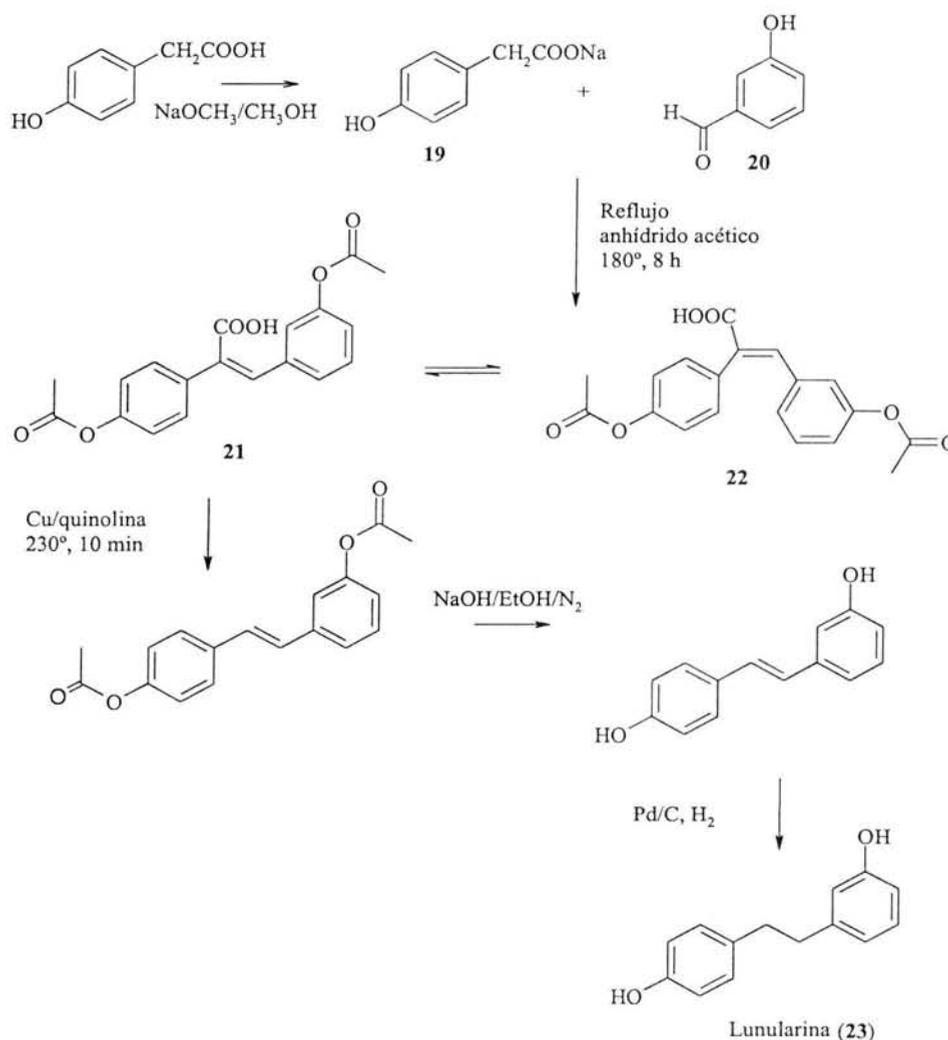


**Figura 3.** *Nidema boothii* (Lindley) Schltr.

La planta consta de un rizoma trepador corto, con pseudobulbos elipsoide-cilíndricos, algo comprimidos, de 2.5-6 cm de largo y 1.5-2.5 cm de ancho, con 1 o 2 hojas en el ápice. Presenta hojas lineares (lanceoladas) de 10-20 cm de largo, aproximadamente y de 1 cm de ancho con lámina delgada. Las flores son blanquecinas, los sépalos y pétalos son lanceolados, acuminados; los sépalos miden aproximadamente 15-20 mm y los pétalos ~13 mm de largo y ~3-4 mm de ancho. Su época de floración es de enero a julio (Hietz y Hietz-Seifert, 1994). Desde el punto de vista químico, un estudio previo permitió el aislamiento y caracterización de un triterpenoide novedoso denominado nidemina (Estrada *et al.*, 2002).

## 1.5 SÍNTESIS DE BIBENCILOS

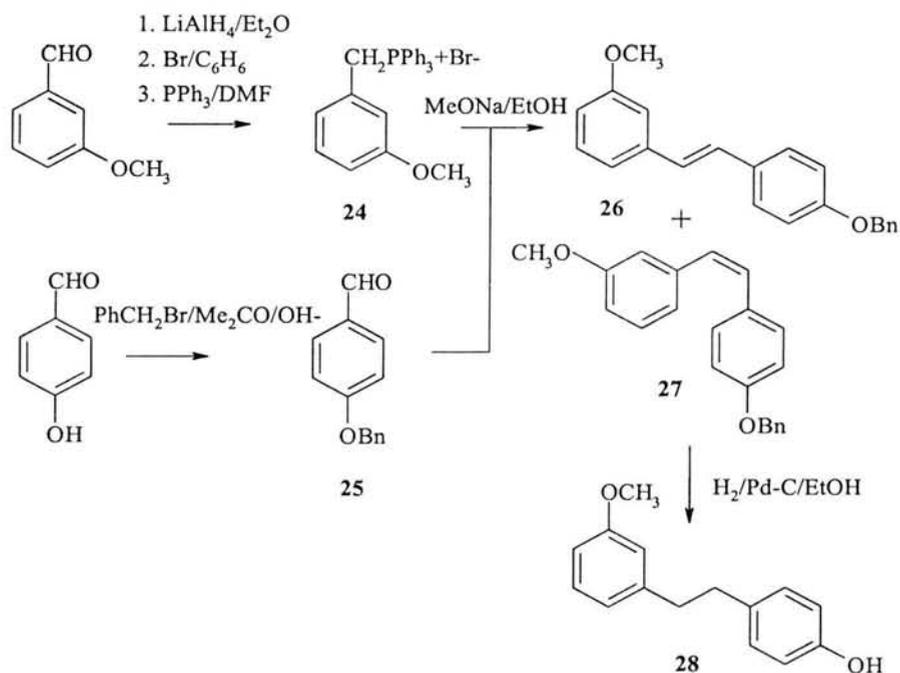
Las estrategias de síntesis de bibencilos más exitosas involucran la aplicación de la reacción de Perkin y la condensación de Wittig. En el primer caso la sal de sodio de un derivado del ácido fenilacético (**19**) se condensa con un benzaldehído (**20**) para generar una mezcla de isómeros geométricos (Z y E) del estilbeno correspondiente (**21** y **22**) (Gorham *et al.*, 1995). Esta última mezcla se somete sucesivamente a una descarboxilación y a una reducción catalítica para formar el bibencilo correspondiente (**23**). Es importante mencionar que si los precursores contienen grupos fenólicos libres, la protección de los mismos es necesaria. A manera de ejemplo, en el Esquema 1, se indica la síntesis de la lunularina (**23**) (Maryanoff y Reitz, 1988; Hwang *et al.* 1999).



**Esquema 1.** Síntesis de la lunularina (**23**) mediante el método de condensación de Perkin.

## 1. Antecedentes

Desde su descubrimiento a principios de los años 50's (Wittig y Geissler, 1953; Wittig y Schollkopf, 1954), la reacción de Wittig ha sido extensamente estudiada y altamente reconocida por su sencillez y eficiencia (Jiann-Jyh, *et al.*, 1999). La reacción de Wittig es un método general de síntesis de alquenos, a partir de compuestos carbonílicos e iluros de fosfonio (Crombie y Jamieson, 1982). Para la obtención de compuestos bibencílicos mediante este método, primero se condensa un iluro de bencil trifenilfosfonio (**24**) con un derivado del benzaldehído apropiado. Posteriormente la mezcla de estilbenos **25** y **26** (isómeros Z- y E) se somete a una reacción de hidrogenación catalítica utilizando como catalizador Pd/C. Los grupos hidroxilos (-OH) fenólicos pueden ser protegidos durante la reacción mediante la formación de éteres y ésteres de distinta naturaleza (Crombie y Jamieson, 1980; Reinmann, 1971). Posteriormente, la reacción de desprotección (hidrogenólisis) de los grupos hidroxilos se realiza durante el proceso de hidrogenación catalítica, que conlleva a la formación de los bibencilos a partir de la mezcla de estilbenos. A manera de ejemplo, en el Esquema 2, se presenta el esquema de síntesis aplicado a la obtención del 3-hidroxi-2-metoxibibencilo (**28**).



**Esquema 2.** Síntesis del 3-hidroxi-2-metoxibibencilo (**28**) mediante la reacción de Wittig (Gorham *et al.*, 1995)

## **1.6 PROCESO DE CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VISCERAL**

### **1.6.1 Sistema Nervioso Entérico**

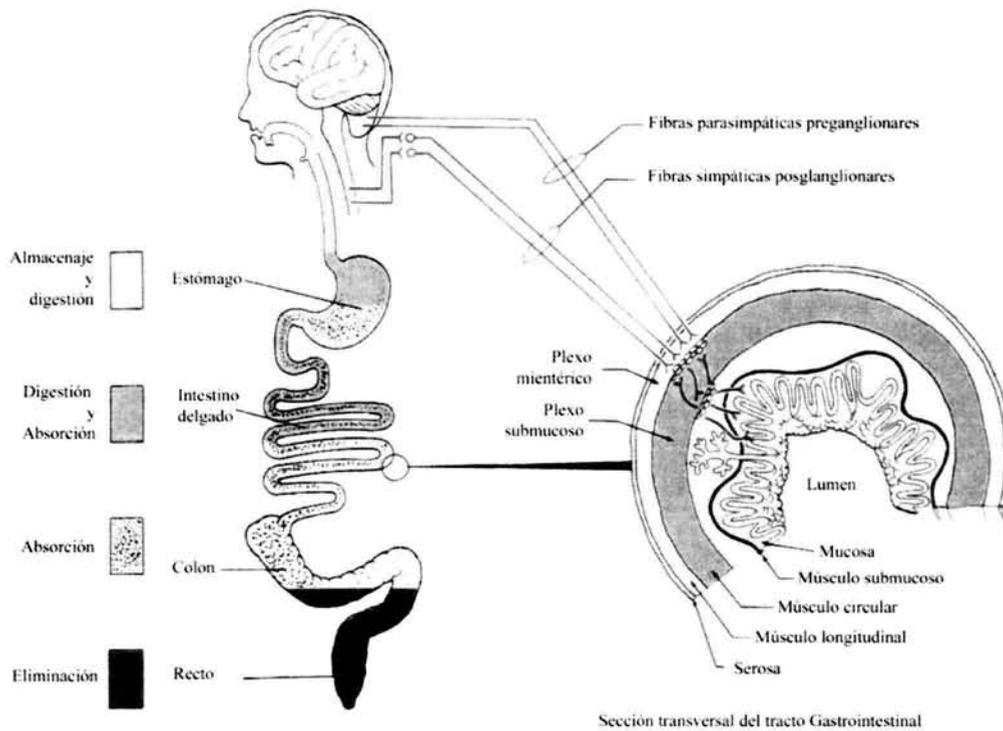
La actividad del músculo liso del tracto gastrointestinal (GI) genera la fuerza necesaria para mezclar y procesar los alimentos y para la propulsión de la materia digestiva a lo largo del intestino. Las células del músculo liso del estómago y del intestino están organizadas en dos capas ortogonalmente opuestas. Una capa longitudinal en la cual las células musculares se distribuyen a lo largo del eje del intestino y una capa circular interna en la cual las células musculares se localizan paralelamente a la circunferencia del intestino (Makhlouf y Murthy 1997; Vogalis, 2001). La fuerza de las contracciones generadas por estas capas depende de la amplitud, duración y frecuencia del potencial de acción, que se regula por el rápido influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células del músculo liso (Vogalis, 2001).

El tracto gastrointestinal se encuentra innervado por el sistema nervioso entérico (SNE), el cual se considera la tercera división del sistema nervioso autónomo, y se conecta al sistema nervioso central (SNC) mediante fibras simpáticas y parasimpáticas. A través de la innervación parasimpática (colinérgica) por lo general se incrementa la actividad del músculo liso intestinal, y por medio de la innervación simpática (adrenérgica) disminuye su actividad. Independientemente de esta doble innervación extrínseca, el SNE es capaz de funcionar de manera autónoma (Ganon, 2000).

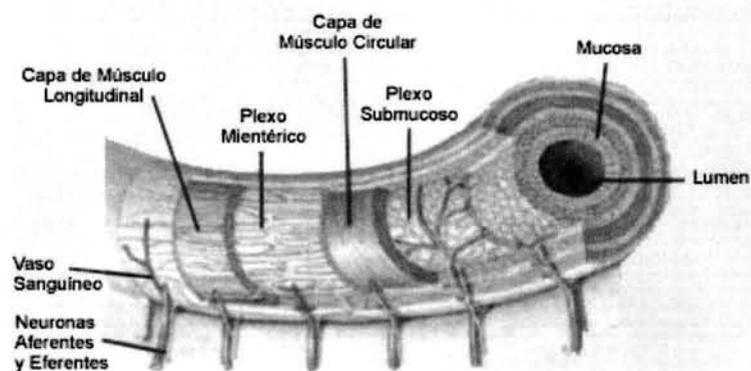
El SNE presenta dos redes principales de fibras nerviosas: el plexo mientérico o de Auerbach y el plexo submucoso o de Meissner (Figura 4). El plexo mientérico se localiza entre las capas musculares longitudinal externa y circular media, y regula principalmente la actividad peristáltica. Por otra parte, el plexo submucoso se encuentra entre la capa circular media y la mucosa e inerva el epitelio glandular, las células intestinales endócrinas y los vasos sanguíneos de la submucosa, además está involucrado en el control de la secreción intestinal (Ganon, 2000, Gershon, 1994). Las neuronas del sistema nervioso entérico se pueden clasificar de acuerdo a su función en: i) neuronas motoras que innervan al músculo liso y son tanto excitatorias como inhibitorias, por lo que liberan neurotransmisores que provocan contracción o relajación muscular; ii) neuronas secromotoras que regulan las secreciones endócrinas y exócrinas de la mucosa; iii) neuronas sensitivas que responden al estiramiento, tonicidad, glucosa o aminoácidos; e iv) interneuronas que forman cadenas que

## 1. Antecedentes

interconectan a las neuronas motoras musculares con las neuronas secromotoras. La transducción de señales en las neuronas del SNE como se explicará más adelante está mediada principalmente por receptores acoplados a proteínas G (Makhlouf y Murthy, 1997).



## Intestino



**Figura 4.** Organización de las estructuras que constituyen la pared de las vías gastrointestinales

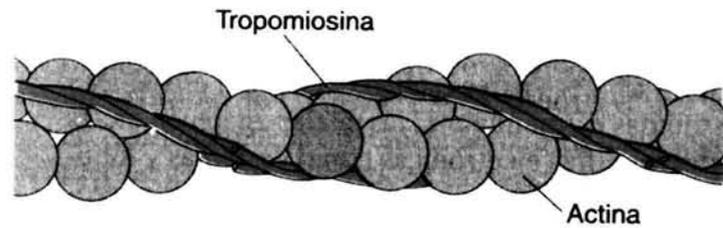
A la fecha se han identificado más de 30 neurotransmisores en el SNE (Hansen, 2003), entre los que se encuentran la acetilcolina, las aminas noradrenalina y serotonina, el aminoácido ácido gamma-aminobutírico (GABA), el trifosfato de adenosina (ATP), los gases NO y CO, así como muchos péptidos (encefalinas, dinorfinas y endorfinas) y polipéptidos [sustancia P, polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)]. Algunos de éstos péptidos actúan de manera parácrina y otros ingresan al torrente sanguíneo en el que se convierten en hormonas (Ganon, 2000; Hansen, 2003).

### **1.6.2 Fases del Proceso de Contracción del Músculo Liso**

Las células del músculo liso están constituidas por las proteínas contráctiles actina, miosina y tropomiosina. Las dos primeras son los componentes mayoritarios del músculo, y contribuyen en un 65% y 23%, respectivamente a la proteína muscular total (Lodish, 2002).

La miosina es una compleja proteína fijadora de actina. La isoforma del músculo corresponde a la miosina II, con dos cabezas globulares. La miosina II es la principal proteína de los filamentos gruesos de la célula del músculo liso y está constituida por seis cadenas polipeptídicas altamente conservadas: dos cadenas pesadas (~200 KDa) y cuatro cadenas ligeras diferentes, dos de ellas fosforilables y dos alcalinas (~20 KDa). Las cadenas ligeras y las porciones N-terminales de las cadenas pesadas se combinan para formar las cabezas globulares, cada una rodeada de dos cadenas ligeras de miosina: una regulatoria de 20 KDa y la otra de 17 KDa. Estas cabezas contienen un sitio para el enlace con la actina y, uno catalítico el cual hidroliza el ATP. (Ganon, 2000; Lodish, 2002, Bitar, 2003).

Los filamentos delgados corresponden a polímeros constituidos por dos cadenas de actina. La actina es una proteína globular ubicua de 42 KDa (G-actina) que contiene dos filamentos gruesos entrelazados en forma de una doble hélice (F-actina). Las moléculas de tropomiosina consisten en filamentos delgados y largos localizados, en las hendiduras presentes entre las dos cadenas de la actina (Ganon, 2000; Bitar, 2003) (Figura 5).

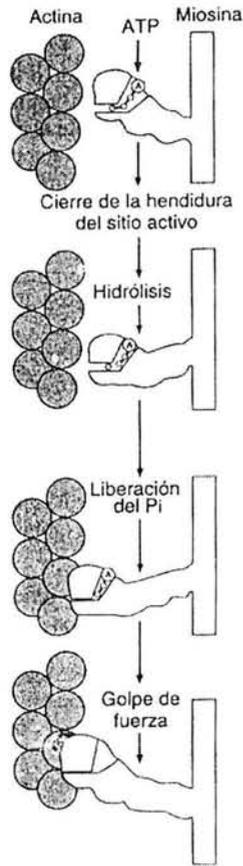


**Figura 5:** Estructura de los filamentos delgados del músculo liso.

Durante la contracción muscular, los filamentos gruesos (miosina) y los filamentos delgados (actina y tropomiosina) se deslizan traslapándose entre ellos como se puede observar en la Figura 6 (Voet, 2002).

El rápido incremento en la concentración citosólica de iones calcio  $[Ca^{2+}]_i$  es el principal activador para la contracción muscular. La contracción del músculo liso está regulada por un acoplamiento electromecánico, que involucra la despolarización de la membrana y diversos mecanismos de transducción de señales, a través de los cuales los agonistas inducen contracción sin despolarización de la membrana plasmática (Bitar, 2003).

La contracción del músculo liso gastrointestinal consta de dos fases; la inicial y la de contracción sostenida. En la fase inicial, la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular se incrementa rápidamente mediante la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  membranales. En los filamentos gruesos, el  $Ca^{2+}$  de la cadena ligera de la miosina (MLC) se une a la proteína calmodulina (CaM); el complejo  $Ca^{2+}$ -CaM resultante activa a la proteína cinasa de la cadena ligera de la miosina dependiente de CaM (MLCK) promoviendo así la fosforilación del residuo serina de la posición 19 (Ser-19) de las cadenas ligeras regulatorias de miosina (RMLC). Esta fosforilación provoca la interacción entre la actina y la miosina, estimula la actividad ATPasa (con la correspondiente hidrólisis del ATP como suministro de energía) e induce la formación de enlaces (o puentes) cruzados entre la miosina y la actina (Voet, 2002; Woodrum y Brophy, 2001). Entonces la CaM juega un papel importante durante la fase inicial de la contracción del músculo liso.



a) El ATP se une a la cabeza de la miosina en los filamentos gruesos.

b) El ATP es hidrolizado por la  $Mg^{2+}$ -ATPasa de la MLC y los productos de la hidrólisis ADP y el fosfato inorgánico permanecen unidos a la miosina. La energía liberada en la reacción de hidrólisis se almacena en la miosina como el enlace de alta energía miosina-ADP-Pi.

c) En el momento de la estimulación muscular, el complejo miosina-ADP-Pi se une a la actina.

d) La interacción actina-miosina activa la liberación secuencial de Pi y ADP de la cabeza de la miosina y produce como resultado el golpe de fuerza

**Figura 6.** Proceso de contracción del músculo liso

Durante la fase de la contracción sostenida, la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  y el grado de fosforilación de las RLC disminuyen a valores suprabasales, esto último debido a la desfosforilación de RLC, regulada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). La tensión muscular se mantiene, al parecer por un mecanismo de puente de aldaba o cerrojo para los puentes, mediante este mecanismo, los puentes cruzados de la miosina permanecen adheridos a la actina, aún después de la disminución de los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ , provocando una contracción sostenida con poco gasto de energía (Woodrum y Brophy, 2001).

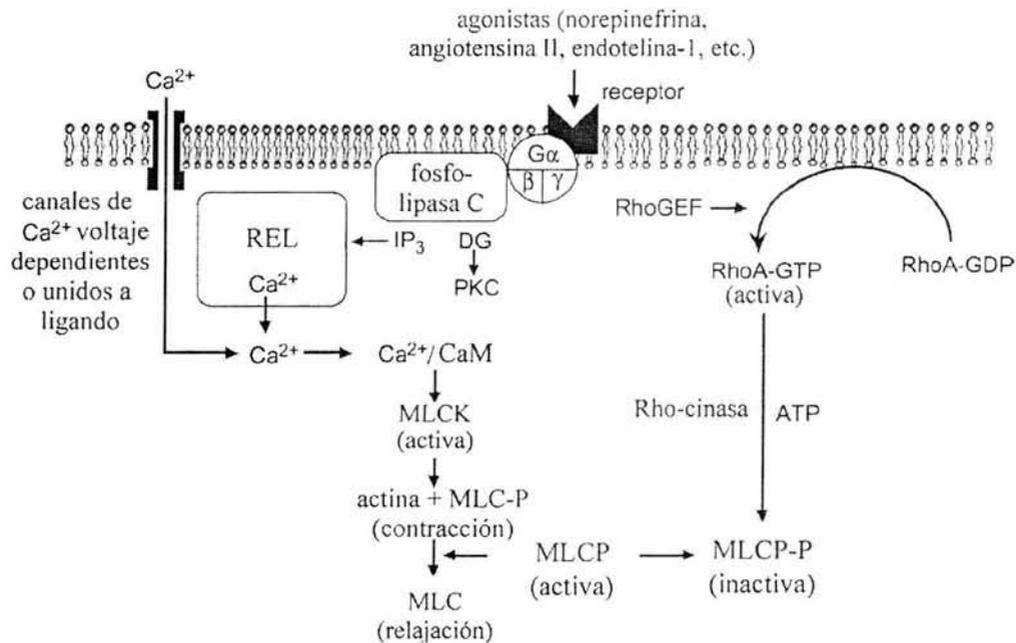
## 1. Antecedentes

Las proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  que interactúan con la actina constituyen un segundo control sobre la contracción sostenida. Así, la caldesmona del músculo liso, proteína alargada de aproximadamente 75 nm de longitud, en ausencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  se une a los filamentos de la actina y restringe la capacidad de la miosina de unirse a la actina, con la consiguiente disminución de la actividad ATPasa de la actina-miosina. Por otro lado, un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provoca la unión del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM a la caldesmona y ésta se libera de la actina. La miosina queda libre para deslizarse sobre la actina y así producir la contracción muscular (Woodrum y Brophy, 2001; Huang *et al.*, 2003). Entonces, el  $\text{Ca}^{2+}$  afecta tanto a las cabezas de la miosina como a los filamentos de la actina. Este control dual permite a la célula regular la duración y la frecuencia de las contracciones y la tensión generada durante cada período de contracción (Hori y Karaki, 1998). Cabe mencionar que la relajación del músculo liso tiene lugar en el momento en que finaliza la disociación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, o cuando entra en juego algún otro mecanismo (Ganon 2000).

### 1.6.3 Transducción de Señales

La transducción de señales en el músculo liso gastrointestinal es regulada principalmente a través de la interacción de diversos agonistas con receptores acoplados a proteína G (hormonas, neurotransmisores o sustancias autacoides) e involucra la activación de varias enzimas efectoras (ver Figura 7). Así, los agonistas excitatorios activan cuatro enzimas efectoras capaces de hidrolizar los fosfolípidos de la membrana: i) La fosfolipasa C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ), que hidroliza específicamente al fosfatidilinositol; esta enzima se activa principalmente durante la fase inicial de la contracción del músculo liso; ii) la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC); iii) la fosfolipasa D (PLD); y iv) la fosfolipasa  $\text{A}_2$  (PLA $_2$ ). Las tres últimas isoformas se activan principalmente durante la fase sostenida de la contracción muscular, tanto en las capas longitudinales como en las circulares (Makhlouf, y Murthy, 1997; Lecci *et al.*, 2002).

Los agonistas inhibitorios activan principalmente a la enzima adenilato ciclasa y a dos neurotransmisores homólogos, el VIP y el péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) (Dick y Lefebvre, 2000; Kurjak *et al.*, 2001, Lecci *et al.*, 2002). La activación de estas enzimas efectoras aunque es diferente en las células del músculo circular y longitudinal, provoca la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y la producción de segundos mensajeros en cada una de las etapas de la contracción muscular (Makhlouf, y Murthy, 1997; Web, 2003).



**Figura 7.** Transducción de señales en el músculo liso visceral

### 1.6.3.1 Transducción de Señales Durante la Fase Inicial de la Contracción Muscular.

La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo circular durante la fase inicial de la contracción muscular es inducida principalmente por el 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ); este segundo mensajero al igual que el diacilglicerol (DAG) se produce durante la hidrólisis del fosfatidil 4,5-difosfato (PDP) membranar por la acción de la enzima PLC- $\beta$ . El  $\text{IP}_3$  es una molécula hidrosoluble pequeña capaz de difundirse con rapidez. Las moléculas  $\text{IP}_3$  formadas en la membrana difunden hacia el interior del citoplasma y se enlazan a un receptor  $\text{IP}_3$  específico localizado en la superficie del retículo endoplásmico liso (REL), sitio de almacenamiento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Lecci *et al.*, 2002). El receptor del  $\text{IP}_3$  también es un canal tetramérico de  $\text{Ca}^{2+}$ , y cuando el segundo mensajero se une a su receptor en el REL se estimula la difusión de iones  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma (Makhlouf y Murphy, 1997; Hori y Karaki, 1998).

## *1. Antecedentes*

La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo longitudinal durante la fase inicial de la contracción muscular involucra la estimulación de un receptor acoplado a una proteína G que activa a la  $\text{PLA}_2$ ; esta enzima hidroliza el ácido araquidónico (AA) de la membrana. El AA induce la activación de canales de  $\text{Cl}^-$  provocando una despolarización de la membrana, y en consecuencia un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes. El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provoca a su vez la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del REL por activación del receptor de rianodina. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de su almacenaje intracelular estimula la formación de ADP ribosa cíclica (ADPRc), que incrementa  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , de manera similar a la rianodina (Makhlouf y Murphy, 1997; Web, 2003)

### **1.6.3.2 Transducción de Señales Durante la Contracción Sostenida del Músculo**

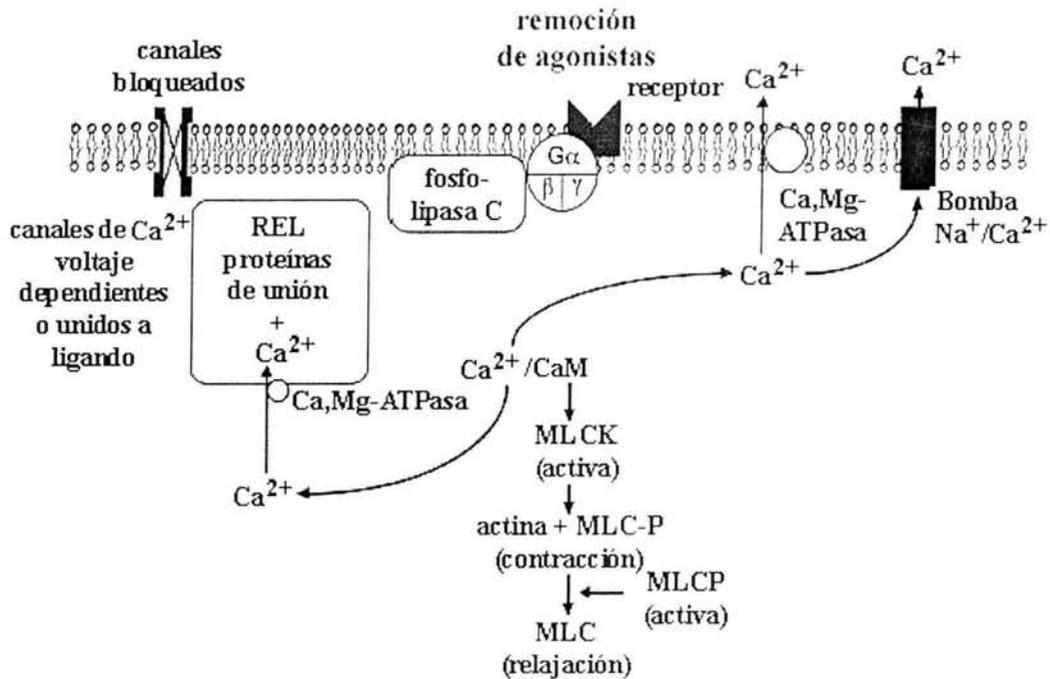
#### **Liso.**

La fase de contracción sostenida en el músculo liso circular y longitudinal es regulada principalmente por la activación de cinco enzimas; las fosfolipasas ( $\text{PLC-}\beta$ ,  $\text{PC-PLC}$  y  $\text{PLD}$ ); una fosfohidrolasa, que convierte el ácido fosfatídico (PA) a DAG, y la DAG-cinasa, que cataliza la conversión de DAG a PA (Makhlouf y Murphy, 1997).

El DAG es una molécula lipídica que permanece en la membrana plasmática después de su formación y su principal función es activar la proteína cinasa C. Esta enzima además requiere para su activación la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (de ahí la C en su nombre). Normalmente, la proteína cinasa C en su forma inactiva es una proteína citosólica soluble. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son los que causan que esta enzima se una a la membrana citoplasmática, donde puede ser activada por el DAG (Makhlouf y Murphy, 1997). La proteína cinasa C modula la fase de contracción sostenida, posiblemente regulando lentamente la MLCK en los ciclos de puentes entrecruzados.

### **1.6.3.3 Transducción de Señales Durante la Relajación del Músculo Liso.**

La relajación del músculo liso ocurre cuando se elimina el estímulo contráctil o por acción directa de una sustancia que estimula la inhibición del mecanismo contráctil (ver Figura 8); en cualquiera de estos casos, el proceso de relajación requiere la disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y el incremento de la actividad de la MLCP (Webb, 2003).



**Figura 8.** Mecanismo de relajación del músculo liso visceral.

Los agentes relajantes de la musculatura lisa actúan promoviendo la formación de AMPc y/o GMPc, mediante la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y/o de la enzima GCs respectivamente, lo que trae como consecuencia la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y/o de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). Ambas enzimas inducen la relajación del músculo liso, debido, en primer lugar, a un decremento en la afinidad de unión de la MLCK por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, probablemente debido a la activación de la MLCP (Katzung, 2002; Carvajal *et al.*, 2000) y en segundo lugar, por la disminución en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  mediante cualquiera de los siguientes mecanismos (Lucas *et al.*, 2000; Makhlof y Murphy, 1997):

- Disminución en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , por inhibición de la formación  $\text{IP}_3$  y de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del REL dependiente de  $\text{IP}_3$
- Reducción del influjo  $\text{Ca}^{2+}$  por inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes tipo L, dañando directamente la actividad del canal o

## 1. Antecedentes

indirectamente por estimulación de canales de  $K^+$ . Así la membrana plasmática se hiperpolariza y los canales de  $Ca^{2+}$  se activan.

- c) Incremento en el eflujo de  $Ca^{2+}$  por activación de dos canales iónicos: la bomba  $Ca^{2+}$ -ATPasa y el intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$ .
- d) Incremento en la captación de los iones  $Ca^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico, vía la activación de la bomba ATPasa del REL (el mecanismo es regulado exclusivamente por la PKG).

Evidentemente existen otros mecanismos independientes de  $Ca^{2+}$  que modulan la “sensibilización” o “desensibilización” a este ión en el sistema contráctil. Estos mecanismos involucran la participación de diversas cinasas, por ejemplo, la Rho cinasa, que fosforila las RMLC sin la intervención del  $Ca^{2+}$  (Andrew *et al.*, 2003), o la PKG que aumenta la actividad de la MLCP, disminuyendo el grado de fosforilación de la miosina.

### 1.6.3.3.1 Relajación Inducida por Agonistas del NO.

El NO es un neurotransmisor involucrado en la regulación de diversos procesos fisiológicos como: la contractilidad del músculo liso, la agregación plaquetaria, la neurotransmisión central y periférica; y las acciones citotóxicas del sistema inmune, por mencionar algunas (Wendehenne *et al.*, 2001).

La síntesis del NO es catalizada endógenamente por la enzima NOS. Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del nitrógeno guanidinio terminal de la L-arginina para formar NO y L-citrulina, en una relación estequiométrica 1:1. A la fecha, se han identificado tres isoformas de esta enzima con un 50 a 60% de homología aproximadamente en su secuencia de aminoácidos. Dos de las isoformas se expresan constitutivamente en las neuronas (nNOS) y tejido endotelial (eNOS), principalmente. Estas enzimas son activadas por el complejo  $Ca^{2+}$ -CaM y generan pequeñas cantidades de NO mismas que mantienen la homeostasis tanto en el sistema vascular, como en el sistema nervioso central (SNC) (Kuber y McCafferty, 2000).

La tercera isoforma es inducible (iNOS) por la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) que es independiente de  $Ca^{2+}$  y se expresa en presencia de endotoxinas o citocinas. La enzima promueve la formación de altas concentraciones de NO para proteger el tejido de la invasión de microorganismos, matándolos mediante una respuesta inflamatoria local de corta duración; es de hacer notar que la exposición prolongada al NO

debido a una respuesta inflamatoria sistémica ejerce efectos citotóxicos (Janero, 2000). El exceso de NO puede causar daño tisular, ya sea potenciando un mecanismo normal o incitando estrés nitrosante a través de reacciones (nitrosación) o procesos degenerativos. Los desórdenes causados por un exceso de NO incluyen, entre otros, enfermedades neurológicas y broncopulmonares agudas, tumorigénesis, isquemia cardíaca y artritis.

Las propiedades químicas del NO son cruciales para definir sus funciones biológicas. El NO posee una carga neutra que permite su libre difusión a través de las membranas celulares. La vida media del NO es muy corta en fluidos biológicos (6-10 s), por lo que una vez sintetizado, actúa sobre sus blancos de acción en células vecinas (mensajero parácrino). Debido a que el NO tiene un electrón desapareado, es un radical libre altamente reactivo. En los sistemas biológicos el NO reacciona rápidamente con el oxígeno molecular ( $O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y metales de transición, formando metabolitos y productos altamente tóxicos, induciendo así importantes efectos patofisiológicos (Yun *et al.*, 1997).

El NO participa en la relajación no adrenérgica-no colinérgica (NANC) del músculo liso visceral actuando directamente sobre las células del músculo liso, o indirectamente, modulando los reflejos neurales; por ejemplo: regulando selectivamente la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas entéricas (Kurjak *et al.*, 2001; Lecci *et al.*, 2001). El NO generado en las neuronas del sistema entérico, se difunde rápidamente a través de las membranas de las células blanco (Figura 9), donde se une al grupo hemo de la enzima GCs e induce un cambio conformacional que activa a la enzima, promoviendo así un incremento en la producción del segundo mensajero GMPc. El GMPc produce la relajación muscular mediante la activación de una MLCP de la MLC dependiente de GMPc. Esta enzima desfosforila a la RMLC, inhibiendo así la actividad ATPasa del complejo actina-miosina indispensable para la contracción muscular (Wendehenne *et al.*, 2001, Holzer *et al.*, 1997; Olgart *et al.*, 1997).

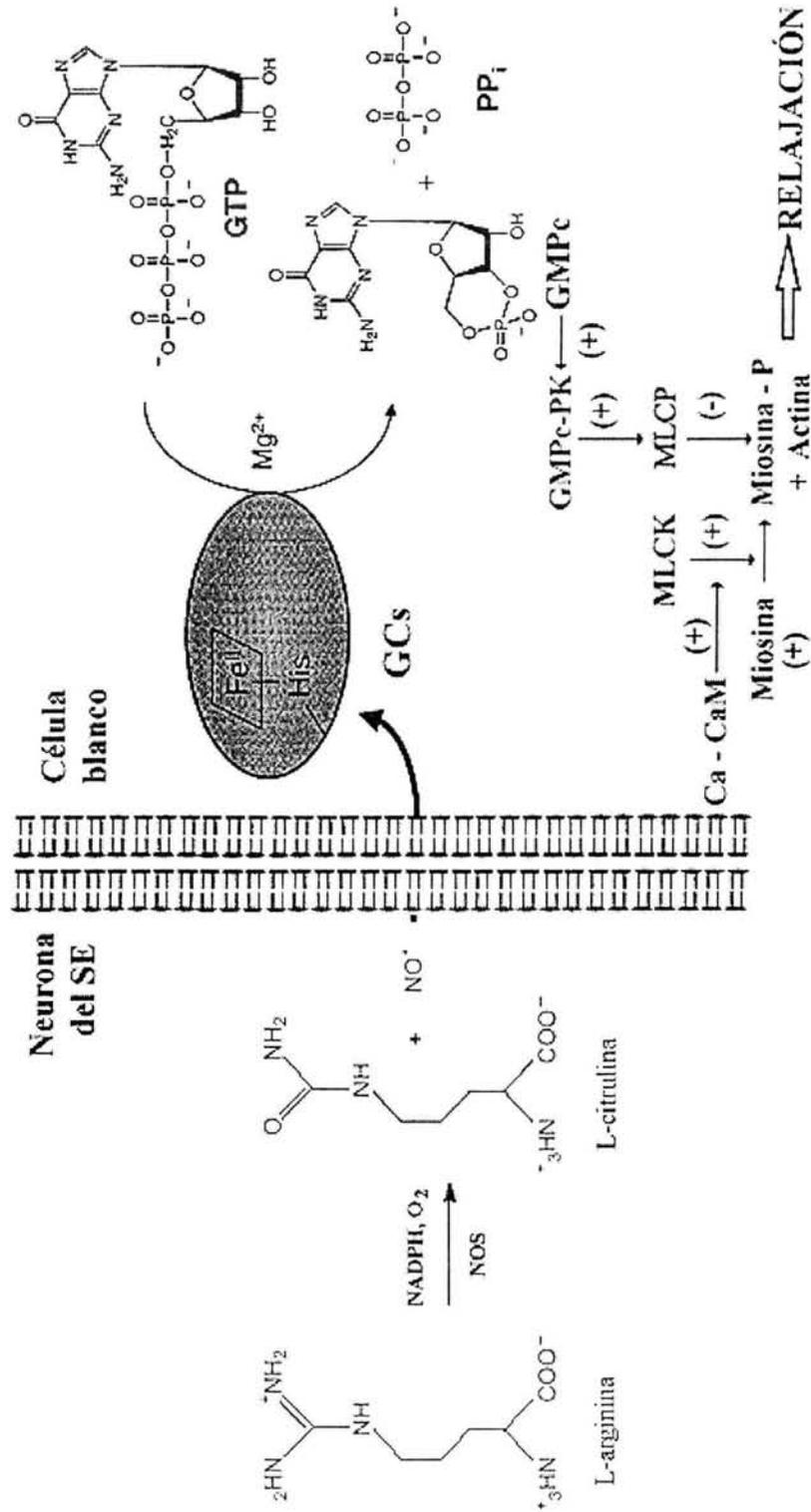


Figura 9. Relajación no adrenérgica-no colinérgica (NANC) del músculo liso visceral

Se ha demostrado también que el NO es capaz de estimular la liberación de VIP de los nervios entéricos (Kurjak *et al.*, 2001; Lecci *et al.*, 2001). El VIP es otro neurotransmisor inhibitorio importante, que actúa relajando el músculo liso mediante la regulación de la actividad de la enzima adenilato ciclasa (Dick, J. y Lefebvre, 2000). Esta enzima cataliza la formación del AMPc que a su vez activa a su vez a la PKA, promoviendo, por un lado una desensibilización del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en el sistema contráctil, y por el otro, una disminución en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , mediante los mecanismos mencionados anteriormente (ver 1.6.3.3.1).

### **1.7 ESPASMOLÍTICOS DE ORIGEN VEGETAL.**

Los compuestos antiespasmódicos, llamados también espasmolíticos o carminativos, son compuestos que al inducir relajación inhiben los espasmos musculares. Los antiespasmódicos empleados en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales son sustancias que disminuyen la función motora del músculo liso del tracto gastrointestinal. Muchos de estos medicamentos se utilizan en la terapéutica principalmente para aliviar espasmos del intestino (cólicos), flatulencias y la dispepsia (indigestión). Aquellos compuestos que tienen un efecto importante sobre la peristalsis, son exitosos para el tratamiento de la diarrea, como los alcaloides del opio morfina y codeína.

Los fármacos de origen vegetal constituyen una parte muy importante en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y presentan una gran diversidad estructural. De acuerdo a su mecanismo de acción, los compuestos espasmolíticos naturales se pueden clasificar de la siguiente forma: (i) antagonistas colinérgicos muscarínicos; (ii) agonistas de neuropéptidos endógenos; (iii) bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ; (iv) inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc; (v) activadores de la adenilato ciclasa; y (vi) agonistas del sistema NO/GMPc (Katzung 2002; Rojas, 1995; *inter alia*).

Los antagonistas colinérgicos muscarínicos, son fármacos que bloquean competitivamente la transducción de señales de la acetilcolina en las terminaciones nerviosas parasimpáticas posganglionares. Los metabolitos secundarios más importantes de este grupo son los alcaloides tropánicos atropina, y escopolamina. También se han descrito algunos alcaloides del tipo acudano con propiedades anticolinérgicas (El-Shafae y Soliman, 1998). Todos estos compuestos son antagonistas mixtos de los receptores  $M_1$  y  $M_2$  y se emplean como antiespasmódicos en diarreas, disenterías suaves y diverticulitis;

## 1. Antecedentes

también se utilizan en el tratamiento de cólicos biliares y renales asociados con analgésicos (Katzung, 2002).

El grupo de los agonistas opioides incluye principalmente a los alcaloides del opio: morfina y codeína. Estos metabolitos secundarios son agonistas directos de neuropéptidos opioides, 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 opioides actúan principalmente sobre los receptores opioides tipo  $\mu$ . Aunque la morfina es relativamente selectiva por los receptores  $\mu$ , puede interactuar con los receptores  $\kappa$  y  $\delta$ , en particular en dosis altas. En el tracto gastrointestinal, estos compuestos actúan disminuyendo la secreción gástrica, biliar, pancreática e intestinal, originando un aumento en el tono basal. Los agonistas opioides constituyen los medicamentos básicos para el tratamiento inespecífico de la diarrea (Goodman y Gilman, 2001). En el SNC, los agonistas opioides inhiben la liberación de transmisores excitatorios a partir de eferentes primarios e inhiben de manera directa las neuronas transmisoras de dolor, de este modo ejercen un poderoso efecto analgésico, de manera directa sobre la espina dorsal.

Los bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen un grupo muy heterogéneo de compuestos químicos que actúan principalmente a través de las interacciones con sitios específicos con la subunidad  $\alpha_1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes del tipo L. Estas sustancias bloqueadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  de las células excitables del músculo liso, esquelético y cardíaco. Los metabolitos secundarios a los que se les ha demostrado actividad antiespasmódica asociada a un bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  pertenecen a las categorías de flavonoides como la quercetina (Ajay *et al.*, 2003), la hispidulina (Hazekamp *et al.*, 2001) y la genisteína (Herrera *et al.*, 1992); fenilpropanoides (Damiani *et al.*, 2003), diterpenoides (Torres *et al.*, 2000), triterpenoides (Orisadipe *et al.*, 2001; Begum, 2002a y 2002b), por tan sólo mencionar algunos.

Con relación a los inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc, el compuesto más importante de este grupo es la papaverina, antiespasmódico musculotrópico presente en el opio. La papaverina alivia los espasmos musculares sin actuar sobre receptores colinérgicos y se emplea en la terapéutica para el tratamiento de espasmos arteriales asociados a la oclusión vascular (Katzung, 2002). Se ha demostrado que la relajación de la musculatura lisa vascular inducida por la papaverina se debe a la inhibición de la fosfodiesterasa del AMPc y/o del GMPc con la subsecuente acumulación del AMPc y/o GMPc. (Kaneda *et al.*,

1998). También se comprobó que este alcaloide inhibe la contracción del músculo liso intestinal, a través de una disminución de la respiración mitocondrial. Asimismo, existen evidencias de que la papaverina interfiere de manera inespecífica con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células musculares (Kaneda *et al.*, 1998).

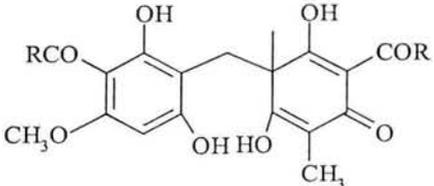
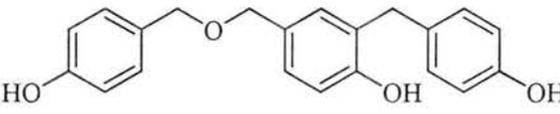
El producto más importante del grupo de activadores de la enzima adenilato ciclasa es la forskolina, diterpenoide aislado a partir de las raíces de *Coleus forskohli*. Esta sustancia produce relajación de musculatura lisa, probablemente estimulando directamente el componente catalítico de la enzima. El efecto relajante inducido por la forskolina se debe a la acumulación del 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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, cuya acción es regulada por fosforilación de una cinasa dependiente de AMPc. La estimulación de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, estimula el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular, disminuyendo así la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  y provocando en consecuencia su efecto relajante de la musculatura lisa (Goodman y Gilman, 2001).

Los agonistas del sistema NO/GMPc empleados en la práctica clínica son los donadores de NO, y se utilizan principalmente para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión o la aterosclerosis (Janero, 2000; Burgaud *et al.*, 2002). Los donadores del NO son compuestos que liberan NO y que actúan por activación de la GCs, provocando un incremento en los niveles de GMPc intracelulares y la relajación del músculo liso. Los donadores de NO pueden clasificarse en nitratos (como la nitroglicerina) que requieren de una biotransformación enzimática para liberar NO (Megson, 2000; Janero, 2000); y los no nitratos (como el nitroprusiato de sodio y *S*-nitroso-*N*-acetilpenicilamina), que generan NO espontáneamente en solución acuosa en presencia de luz, en pH alcalino y en presencia de agentes reductores (Megson, 2000). Otros fármacos donadores de NO se emplean para el tratamiento de la disfunción eréctil como los derivados nitrosotioles de la yohimbina (NMI-187) y moxisilito (NMI-221), que además actúan como antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Janero, 2000). Otra aplicación terapéutica de los fármacos donadores de NO es la de mejorar la seguridad y/o eficacia de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), ya que el NO disminuye los efectos tóxicos de los NSAID en el tracto gastrointestinal pues mantiene la integridad de la mucosa, regulando capilarmente el flujo sanguíneo en la pared gastrointestinal, actuando como un agente

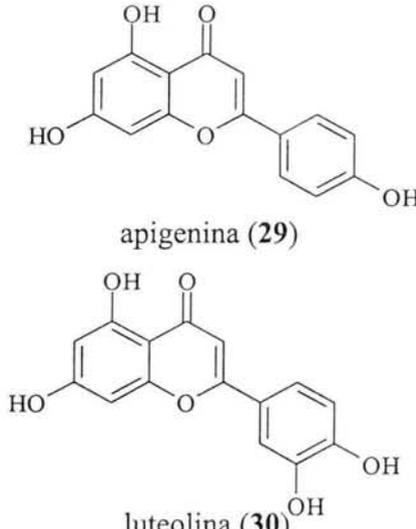
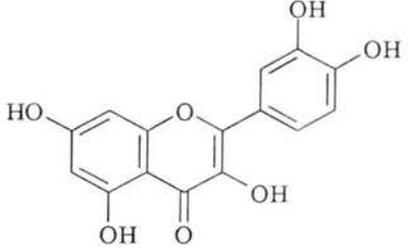
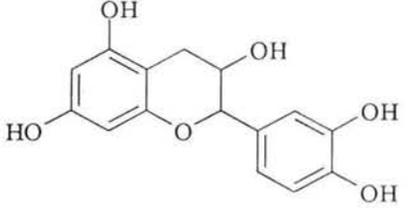
1. Antecedentes

antiinflamatorio. A manera de ejemplo en el Cuadro 3, se indican los principales agentes espasmolíticos descritos en la literatura especializada. En esta revisión no se incluyen los componentes de los aceites esenciales espasmolíticos de muchas especies medicinales.

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales.

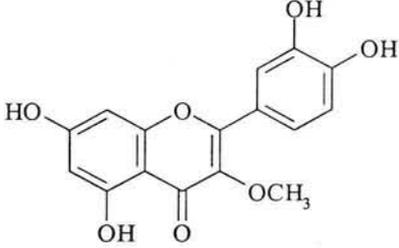
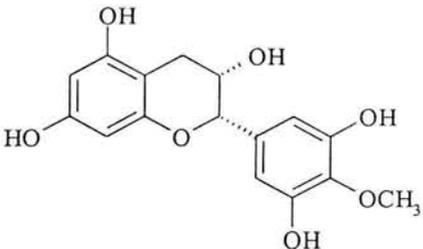
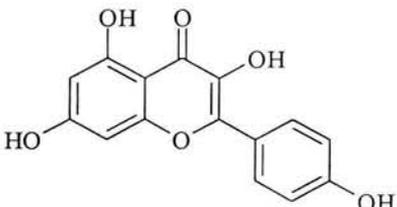
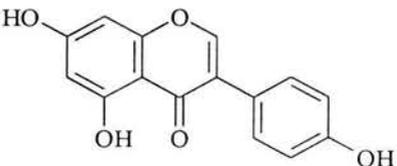
Fuente Natural	Compuesto (fenólico)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Hagenia abyssinica</i> (Rosaceae)</p>	 <p>kosotoxina (29) (mezcla de homólogos)</p> <p>R = -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o R = -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></p>	<p>Inhibió las contracciones espontáneas en yeyuno de conejo y las contracciones inducidas por ACh, histamina y BaCl<sub>2</sub> en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Bogale <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>Gastrodia elata</i> Blume (Orchidaceae)</p>	 <p>gastrol (30)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh en íleon de cobayo</p>	<p>Hayashi <i>et al.</i>, 2002</p>

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

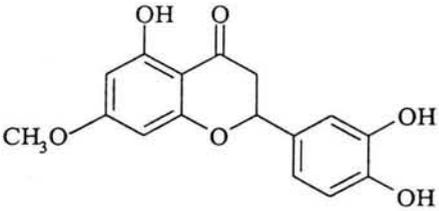
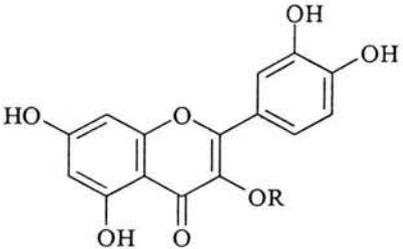
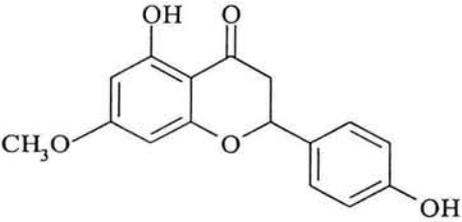
Fuente Natural	Compuesto (flavonoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Matricaria chamomilla</i> (Asteraceae)</p>	 <p>apigenina (29)</p> <p>luteolina (30)</p>	<p>Actividad espasmolítica musculotrópica como la papaverina en preparaciones de íleon de cobayo</p>	<p>Achterrath-Tuckermann <i>et al.</i>, 1980</p>
<p><i>Matricaria chamomilla</i> (Asteraceae)</p> <p><i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)</p>	 <p>quercetina (31)</p>	<p>Actividad espasmolítica musculotrópica</p> <p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en íleon de cobayo</p>	<p>Achterrath-Tuckermann <i>et al.</i>, 1980</p> <p>Morales <i>et al.</i>, 1994; Ajay <i>et al.</i> 2003</p>
<p><i>Elaeodendron balae</i> (Celastraceae)</p>	 <p>3,3',5,5',7-pentahidroxi-4'-metoxi-2,3-cis-flavona (32)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente en íleon de cobayo</p>	<p>Weeratunga <i>et al.</i>, 1984</p>

I. Antecedentes

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

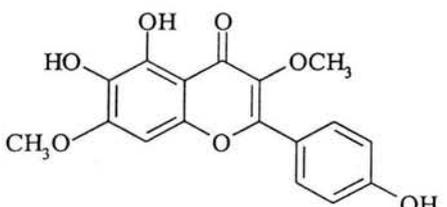
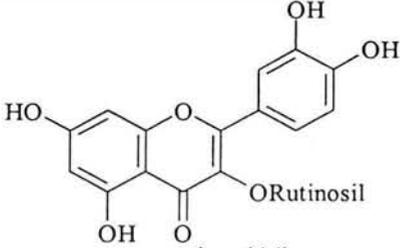
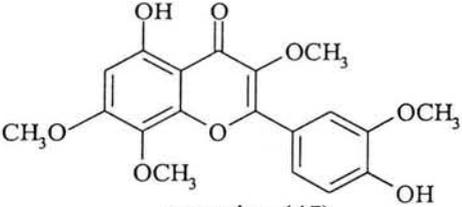
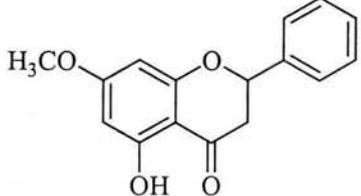
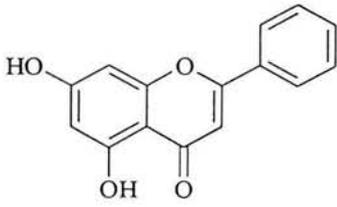
Fuente Natural	Compuesto (flavonoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Achyrocline satureioides</i> (Asteraceae)</p>	 <p>3-metilquercetina (33)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh, histamina, noradrenalina y BaCl<sub>2</sub> en íleon aislado de cobayo (actividad espasmolítica no específica)</p>	<p>Simões <i>et al.</i>, 1988</p>
<p><i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)</p>	 <p>curcumina (34)</p>	<p>Actividad espasmolítica no específica en preparaciones de íleon aislado de cobayo</p>	<p>Ammon y Wahl, 1991</p>
	 <p>camferol (35)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente y por BaCl<sub>2</sub> y ACh en íleon de cobayo</p>	<p>Capasso <i>et al.</i>, 1991</p>
<p><i>Genista tridentata</i> (Papilionaceae)</p>	 <p>genisteína (36)</p>	<p>Produce un incremento en los niveles de AMPc en íleon de cobayo</p>	<p>Herrera <i>et al.</i>, 1992</p>

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

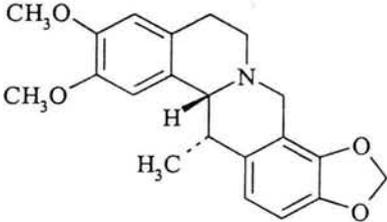
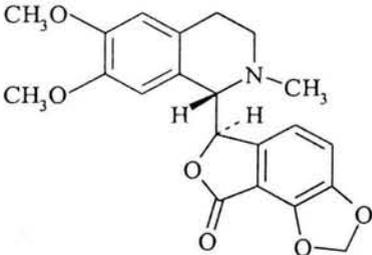
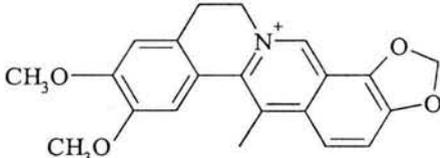
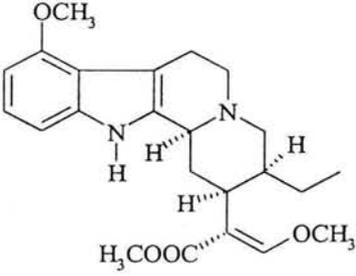
Fuente Natural	Compuesto (flavonoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Artemisia monosperma</i> (Asteraceae)</p>	 <p>7-O-metileriodictiol (37)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh y oxitocina en íleon aislado de rata</p>	<p>Abu-Niaaj <i>et. al.</i>, 1993.</p>
<p><i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)</p>	 <p>R = <math>\alpha</math>-L-arabinosil (guajavarina, 38)  R = <math>\beta</math>-D-glucosil (isoquercetina, 39)  R = <math>\beta</math>-D-galactosil (hiperina, 40)  R = <math>\beta</math>-L-ramnosil (quercitrina, 41)</p>	<p>Inhiben las contracciones espontáneas en preparaciones de íleon de cobayo</p>	<p>Lozoya <i>et al.</i>, 1994</p>
<p><i>Dodonaea viscosa</i> (Sapindaceae)</p>	 <p>sakuranetina (42)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh, histamina y BaCl<sub>2</sub> en íleon de cobayo</p>	<p>Rojas <i>et al.</i>, 1996</p>

I. Antecedentes

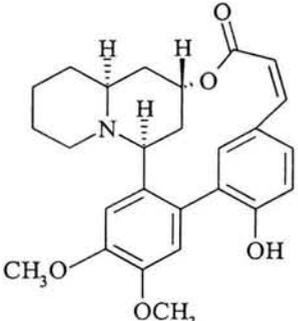
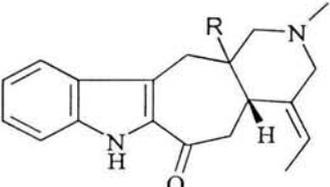
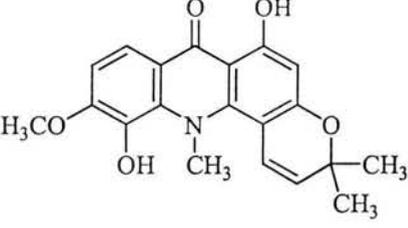
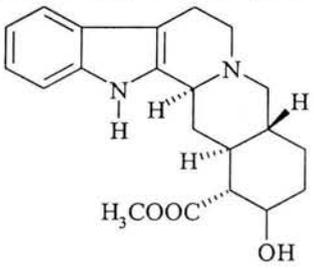
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (flavonoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Dodoneaea viscosa</i> (Sapindaceae)</p>	 <p>3,7-dimetoxi-5,6,4'-trihidroxi flavona (43)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente en íleon de cobayo</p>	<p>Rojas <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>Conyza filaginoides</i> (Asteraceae)</p>	 <p>rutina (44)</p>	<p>Inhibe las contracciones espontáneas en íleon de rata</p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Egletes viscosa</i> (Asteraceae)</p>	 <p>ternatina (45)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por varios espasmógenos en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Rao <i>et al.</i>, 1997  Lima <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>Teloxys graveolens</i> (Chenopodiaceae)</p> <p><i>Conyza filaginoides</i> (Asteraceae)</p>	 <p>pinostrobin (46)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en preparaciones de íleon de cobayo</p> <p>Inhibe las contracciones espontáneas en íleon de rata</p>	<p>Meckes <i>et al.</i>, 1998  Mata <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Teloxys graveolens</i> (Chenopodiaceae)</p>	 <p>crisina (47)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en preparaciones de íleon de cobayo</p>	<p>Meckes <i>et al.</i>, 1998</p>

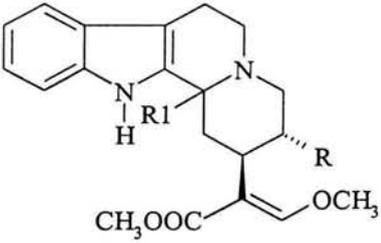
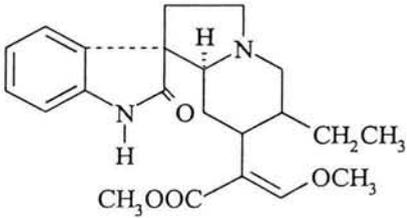
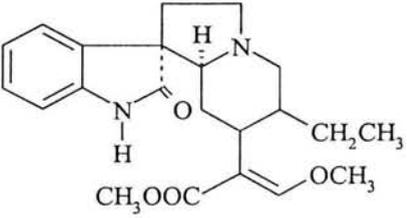
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (alcaloide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Corydalis meifolia</i> (Fumariaceae)</p>	 <p>cavidina (48)</p>  <p>corlumina (49)</p>  <p>dehidrocavidina (50)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas por ACh, histamina serotonina y BaCl<sub>2</sub> (Actividad espasmolítica no específica) en ileon aislado de cobayo</p>	<p>Bhakuni y Chaturvedi, 1983</p>
<p><i>Corydalis meifolia</i> (Fumariaceae)</p> <p><i>Chelidonium majus</i> (Papaveraceae)</p>	 <p>protopina (51)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh, histamina, serotonina y BaCl<sub>2</sub> en ileon de cobayo. Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente y por BaCl<sub>2</sub> en ileon de cobayo.</p>	<p>Bhakuni y Chaturvedi, 1983</p> <p>Hiller <i>et al.</i>, 1998.</p>

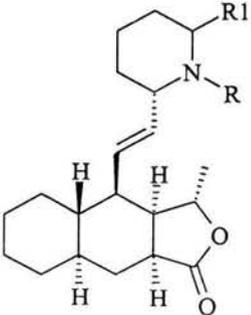
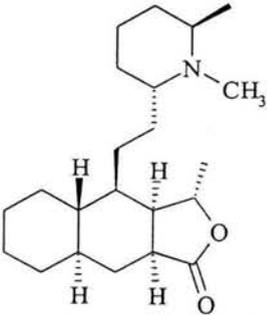
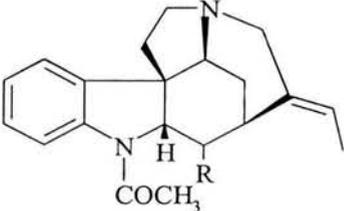
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (alcaloide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Phyllanthus sellowianus</i> (Euphorbiaceae)</p>	 <p>Alc-1 (52)</p>	<p>Bloqueador de canales de <math>Ca^{2+}</math> en preparaciones de íleon de cobayo</p>	<p>Calixto <i>et al.</i>, 1984</p>
<p><i>Pterotaberna incospicua</i> (Apocynaceae)</p>	 <p>R = <math>\beta</math>-H (metuenina, 53) R = <math>\alpha</math>-H (16-epimetuenina, 54)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas por ACh e histamina en íleon de cobayo</p>	<p>Bakana <i>et al.</i>, 1985</p>
<p><i>Citrus deliciosa</i> (Rutaceae)</p>	 <p>2',2'-dimetil(pirano-5',6':3:4)-1,5-dihidroxi-6-metoxi,10-metilacridona (55)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh en intestino de conejo</p>	<p>El-Shafae y Soliman, 1988.</p>
<p><i>Amsonia alliptica</i> (Apocynaceae)</p>	 <p>yohimbina (56)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh en íleon de cobayo</p> <p>Bloqueador de los receptores <math>\alpha</math>-adrenérgicos en intestino de ratón</p>	<p>Del Tacca <i>et al.</i>, 1988</p> <p>Ozaki, 1989</p>

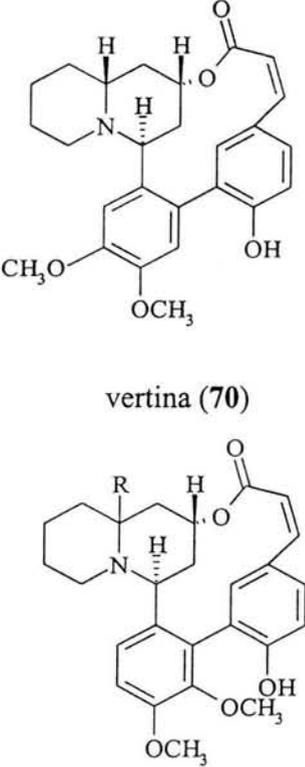
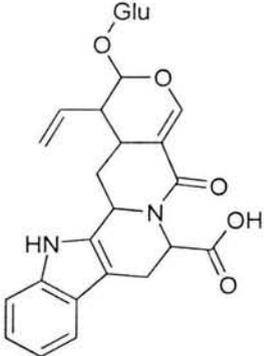
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (alcaloide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Uncaria rhynchophylla</i> (Rubiaceae)</p>	 <p>R = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> R<sub>1</sub> = β-H (hirsutina, <b>57</b>)</p> <p>R = -CH<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>1</sub> = α-H (corinanteína, <b>58</b>)</p> <p>R = -CH<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>1</sub> = β-H (hirsuteína, <b>59</b>)</p> <p>R = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> R<sub>1</sub> = α-H (dihidrocoringanteína, <b>60</b>)</p>	<p>Bloqueadores de los receptores α- adrenérgicos en intestino de ratón</p>	<p>Ozaki, 1989</p>
	 <p>rincofilina (<b>61</b>)</p>		
	 <p>isorincofilina (<b>62</b>)</p>		

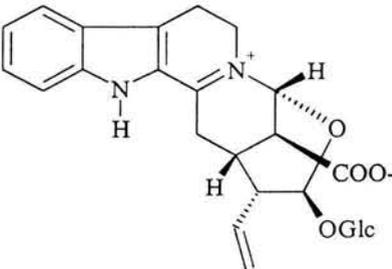
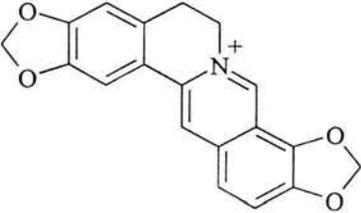
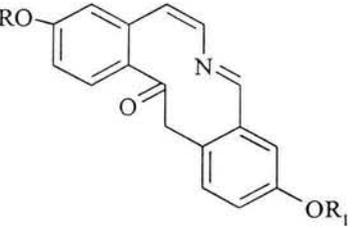
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (alcaloide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p>Especies del género <i>Galbulimina</i></p>	 <p>R = CH<sub>3</sub> R<sub>1</sub> = β-CH<sub>3</sub> (himbacina, <b>63</b>)  R = H R<sub>1</sub> = β-CH<sub>3</sub> (himbelina, <b>64</b>)  R = CH<sub>3</sub> R<sub>1</sub> = α-CH<sub>3</sub> (N-metilhimandravina, <b>65</b>)  R = H R<sub>1</sub> = α-CH<sub>3</sub> (himandravina, <b>66</b>)</p>  <p>dihidrohimbacina (<b>67</b>)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas por ACh en íleon de cobayo</p>	<p>Darroch <i>et al.</i>, 1990.</p>
<p><i>Strychnos henningsii</i> (Loganiaceae)</p>	 <p>R = α-CH<sub>2</sub>OH (retulina, <b>68</b>)  R = β-CH<sub>2</sub>OH (isoretulina, <b>69</b>)  producto semisintético</p>	<p>La isoretulina inhibe las contracciones inducidas por histamina y bradiquinina</p>	<p>Tits <i>et al.</i>, 1991</p>

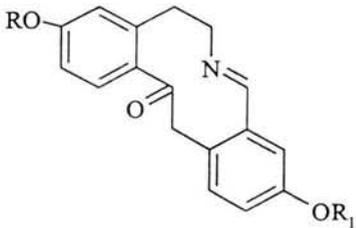
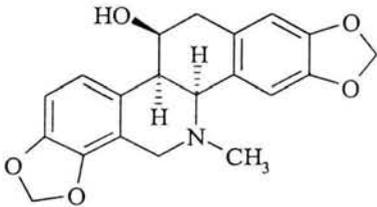
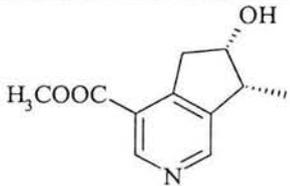
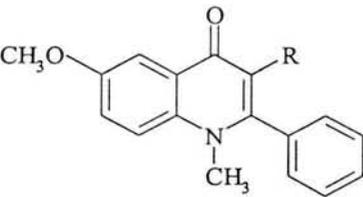
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (alcaloide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Heimia salicifolia</i> (Lythraceae)</p>	 <p>vertina (70)</p> <p>nesodina (71)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas por ACh en íleon de cobayo</p>	<p>Malone y Rother, 1994</p>
<p><i>Sickingina williamsii</i> (Rubiaceae)</p>	 <p>sickingina (72)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Aquino <i>et al.</i>, 1996</p>

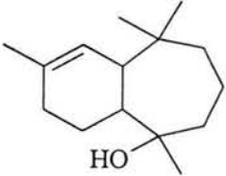
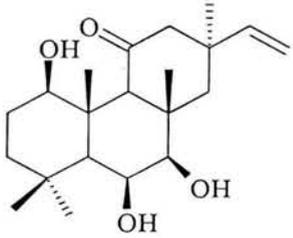
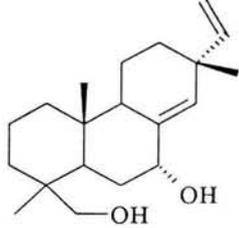
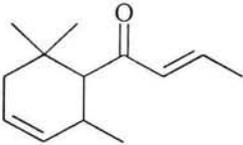
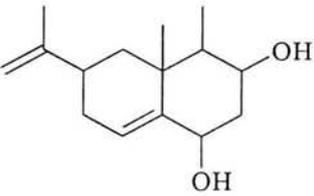
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (alcaloide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Sickingina williamsii</i> (Rubiaceae)</p>	 <p>opiorina B (73)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Aquino <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>Corydalis lutea</i> (Papaveraceae)</p> <p><i>Chelidonium majus</i> (Papaveraceae)</p>	 <p>coptisina (74)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh en íleon de rata</p> <p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente y por BaCl<sub>2</sub> en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Boegge <i>et al.</i>, 1996</p> <p>Hiller <i>et al.</i>, 1998</p>
<p><i>Aristolochia constricta</i> (Aristolochiaceae)</p>	 <p>R = H      R<sub>1</sub> = H (constrictosina, 75)</p> <p>R = CH<sub>3</sub>    R<sub>1</sub> = H (3-<i>O</i>-metilconstrictosina, 76)</p> <p>R = CH<sub>3</sub>    R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> (3,10-di-<i>O</i>-metilconstrictosina, 77)</p>		<p>Rastrelli <i>et al.</i>, 1997</p>

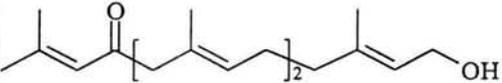
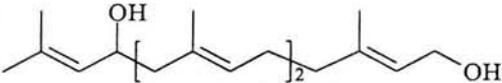
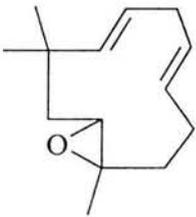
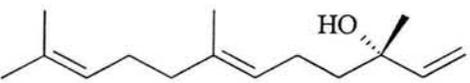
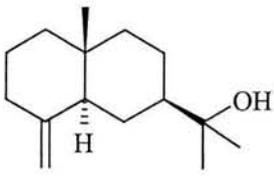
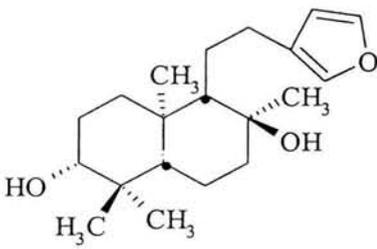
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (alcaloide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Aristolochia constricta</i> (Aristolochiaceae)</p>	 <p>R = H      R<sub>1</sub> = H (5,6-dihidro-constrictosina, <b>78</b>)</p> <p>R = CH<sub>3</sub>      R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> (5,6-dihidro-3,10-di-O-dimetilconstrictosina, <b>79</b>)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas eléctricamente y por ACh e histamina en íleon de cobayo</p>	<p>Rastrelli <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Chelidonium majus</i> (Papaveraceae)</p>	 <p>queldonina (<b>80</b>)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente y por BaCl<sub>2</sub> en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Hiller <i>et al.</i>, 1998</p>
<p><i>Strychnos trinervis</i> (Loganiaceae)</p> <p><i>Orixa japonica</i> (Rutaceae)</p>	 <p>cantleyina (<b>81</b>)</p>  <p>R = H      (eludina, <b>82</b>)</p> <p>R = OCH<sub>3</sub> (japonina, <b>83</b>)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje dependiente en preparaciones de íleon de cobayo</p> <p>Inhiben las contracciones espontáneas en yeyuno de rata</p>	<p>Da Silva <i>et al.</i>, 1999</p> <p>Funayama <i>et al.</i>, 2001</p>

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

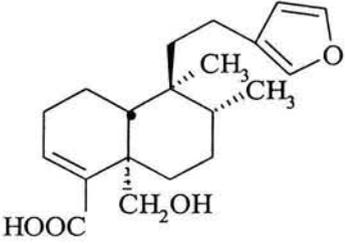
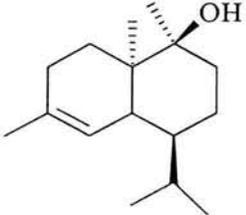
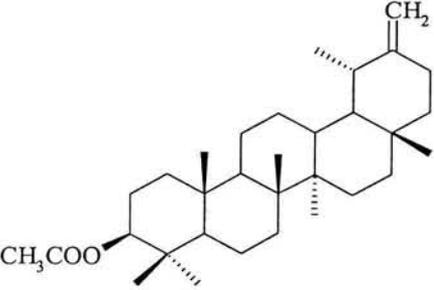
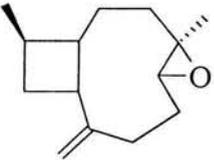
Fuente Natural	Compuesto (terpenoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<i>Cedrus deodara</i> (Pinaceae)	 <p>himachalol (84)</p>	Inhibe los espasmos inducidos por diversos agonistas en preparaciones de íleon de cobayo y yeyuno de conejo	Kar <i>et al.</i> , 1975
<i>Coleus forskohlii</i> (Lamiaceae)	 <p>forskolina (coleonol, 85)</p>	Presenta actividad espasmolítica no específica sobre el músculo liso del tracto gastrointestinal de varias especies. Activador de la enzima adenilato ciclasa	Dubey <i>et al.</i> , 1981  De Hertog <i>et al.</i> , 1985
<i>Tetradenia riparia</i> (Lamiaceae)	 <p>8(14),15-sandaracopimaradieno-7<math>\alpha</math>,18-diol (86)</p>	Inhibe las contracciones inducidas por metacolina, histamina, BaCl <sub>2</sub> en íleon de cobayo	Van Puyelde <i>et al.</i> , 1987
<i>Ipomoea pescaprae</i> (Convolvulaceae)	 <p>β-damacenona (87)</p>	Inhibe las contracciones inducidas por histamina en íleon de cobayo	Pongprayon <i>et al.</i> , 1992
<i>Nicotiana silvestris</i> (Solanaceae)	 <p>capsidiol (88)</p>	Inhibe las contracciones inducidas por ACh, histamina, bradikinina y BaCl <sub>2</sub> en íleon de cobayo	Nasiri <i>et al.</i> , 1993

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

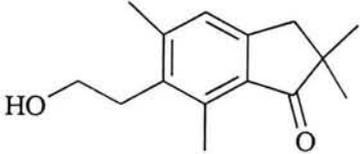
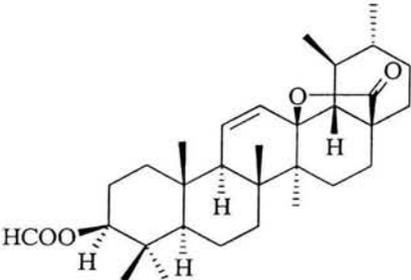
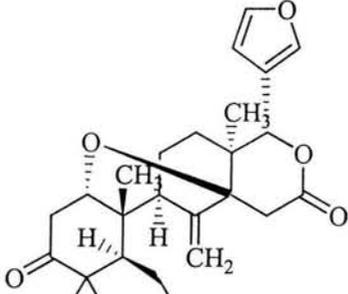
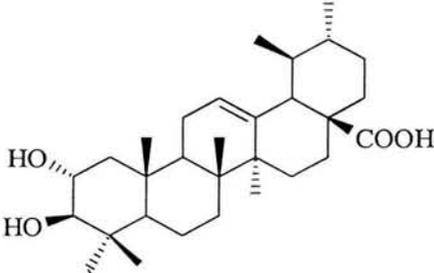
Fuente Natural	Compuesto (terpenoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Cystoseira brachycarpa</i> (Cystoseiraceae)</p>	 <p>eleganolona (89)</p>  <p>eleganolol (90)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas por ACh e histamina en preparaciones de íleon de cobayo.</p>	<p>Della Pieta <i>et al.</i>, 1993.y 1995</p>
<p><i>Alpinia japónica</i> (Zingiberaceae)</p> <p><i>Alpinia speciosa</i> (Zingiberaceae)</p>	 <p>epóxido de humeleno (91)</p>  <p>nerodiol (92)</p>  <p><math>\beta</math>-eudesmol (93)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas por histamina y BaCl<sub>2</sub> en íleon de cobayo</p>	<p>Morita <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>Dodoneaea viscosa</i> (Sapindaceae)</p>	 <p><i>ent</i>-15,16-epoxi-9<math>\alpha</math>H-labda-13(16)14-dieno-3<math>\beta</math>,8<math>\alpha</math>-diol (94)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh, histamina y BaCl<sub>2</sub> en íleon de cobayo</p>	<p>Rojas <i>et al.</i>, 1996</p>

I. Antecedentes

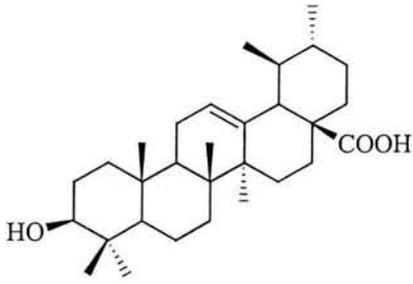
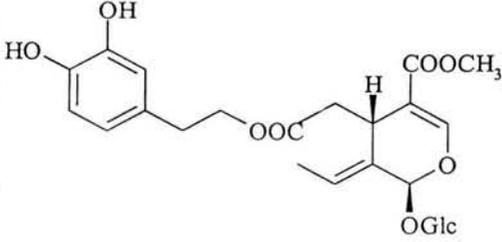
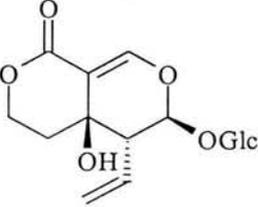
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (terpenoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Dodoneaea viscosa</i> (Sapindaceae)</p>	 <p>ácido hautriwaico (95)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente en íleon de cobayo</p>	<p>Rojas <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>Commiphora guidottii</i> (Burseraceae)</p>	 <p>T-cadinol (96)</p>	<p>Antagonista de Ca<sup>2+</sup> en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Anderson <i>et al.</i>, 1997  Zygmunt <i>et al.</i>, 1993</p>
<p><i>Scolymus hispanicus</i> (Compositae)</p>	 <p>acetato de taraxasterilo (97)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por Ach en íleon de rata</p>	<p>Kirimer <i>et al.</i>, 1997.</p>
<p><i>Coniza filaginoides</i> (Asteraceae)</p>	 <p>epoxi-cariofileno (98)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en íleon de rata</p>	<p>Mata, <i>et al.</i>, 1997</p>

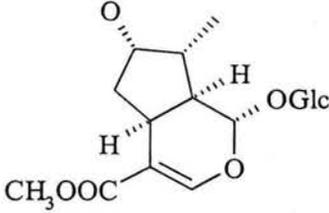
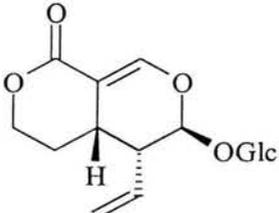
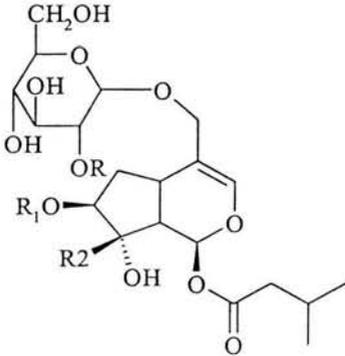
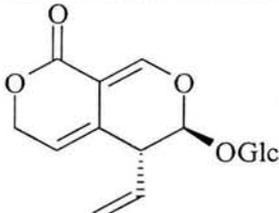
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación)

Fuente Natural	Compuesto (terpenoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Pteridium aquilinum</i> (Pteridaceae)</p>	 <p>pterosina Z (99)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Sheridan <i>et al.</i>, 1999</p>
<p><i>Eucalyptus camaldulensis</i> (Myrtaceae)</p>	 <p>camaldulina (100)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en yeyuno de cobayo</p>	<p>Begum <i>et al.</i>, 2000</p>
<p><i>Entandrophragma angolense</i> (Melicaceae)</p>	 <p>metil angolensato (101)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por serotonina en íleon de rata</p>	<p>Orisadipe <i>et al.</i>, 2001</p>
<p><i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)</p>	 <p>ácido asiático (102)</p>	<p>Inhibe las contracciones espontáneas en preparaciones de yeyuno de conejo</p>	<p>Begum <i>et al.</i>, 2002a</p>

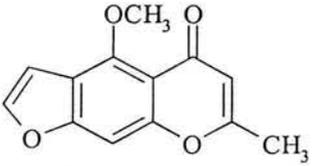
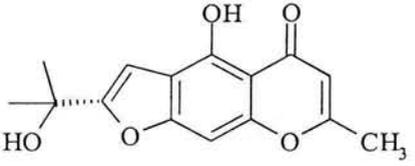
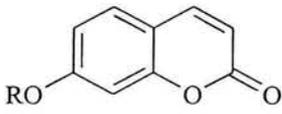
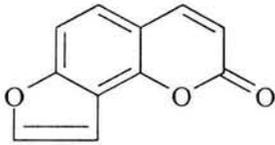
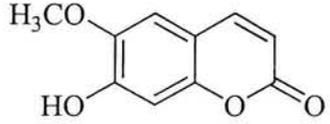
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación).

Fuente Natural	Compuesto (terpenoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Eucalyptus camaldulensis</i> (Myrtaceae)</p>	 <p>acido eucaliptanólico (103)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en yeyuno de conejo</p>	<p>Begum <i>et al.</i>, 2002b</p>
<p>Fuente Natural</p>	<p>Compuesto (iridoide)</p>	<p>Mecanismo de acción</p>	<p>Referencia</p>
<p><i>Olea europaea</i> (Oleaceae)</p>	 <p>oleuropeina (104)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh, nicotina, histamina, serotonina y BaCl<sub>2</sub> en preparaciones de ileon</p>	<p>Petkov y Manolov 1972</p>
<p><i>Swertia Japonica</i> (Gentianaceae)</p>	 <p>swertiamarina (105)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh en intestino de rata</p>	<p>Yamahara <i>et al.</i>, 1991</p>

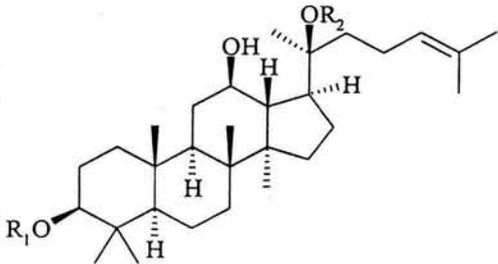
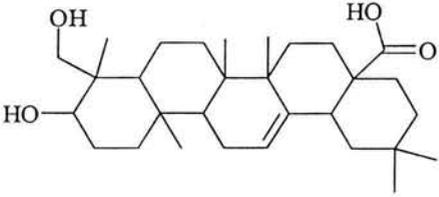
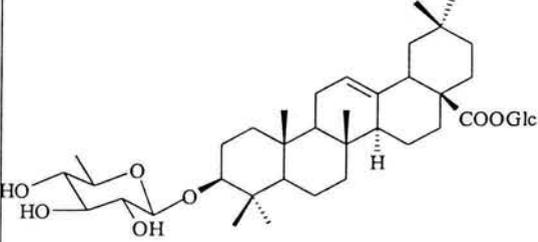
**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación)

Fuente Natural	Compuesto (iridoide)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Sickingia williamsii</i> (Rubiaceae)</p>	 <p>loganina (106)</p>  <p>swerosida (107)</p>	<p>Inhíbe las contracciones inducidas eléctricamente en íleon de cobayo</p>	<p>Aquino <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>Viburnum tinus</i> (Caprofoliaceae)</p>	 <p>R = OCCH<sub>3</sub>   R<sub>1</sub> = OCCH<sub>3</sub>   R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> (viburtinósido I, 108)</p> <p>R = trans/cis-para-cumaril R<sub>1</sub> = H   R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>OOCCH<sub>3</sub> (viburtinósido II/III, 109/110)</p>	<p>Inhíbe las contracciones inducidas por ACh en yeyuno aislado de conejo</p>	<p>Cometa <i>et al.</i>, 1998</p>
<p><i>Gentiana spathacea</i> (Gentianaceae)</p>	 <p>gentiopirina (111)</p>	<p>Bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en íleon aislado de cobayo</p>	<p>Rojas <i>et al.</i>, 2000</p>

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación)

Fuente Natural	Compuesto (cumarina)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Cimicifuga dahurica</i> (Ranunculaceae)</p>	 <p>visnagina (112)</p>  <p>visamminol (113)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas por ACh, histamina y BaCl<sub>2</sub> en yeyuno de cobayo</p>	<p>Ito <i>et al.</i>, 1976</p>
<p><i>Matricaria chamomilla</i> (Asteraceae)</p>	 <p>R = H (umbelliferona, 114) R = CH<sub>3</sub> (herniarina, 115)</p>	<p>Actividad espasmolítica musculotrópica como la papaverina en preparaciones de íleon de cobayo</p>	<p>Achterrath-Tuckermann <i>et al.</i>, 1980</p>
<p><i>Heracleum thomsoni</i> (Apiaceae)</p>	 <p>angelicina (116)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por diferentes espasmógenos en íleon y yeyuno de cobayo</p>	<p>Patnaik <i>et al.</i>, 1987</p>
<p><i>Brunfelsia hoipeana</i> (Solanaceae)</p>	 <p>escopoletina (117)</p>	<p>Inhibe la movilización de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares</p>	<p>Oliveira <i>et al.</i>, 2001</p>

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad espasmolítica comprobada, obtenidos de diferentes especies vegetales (continuación)

Fuente Natural	Compuesto (saponina)	Mecanismo de acción	Referencia
<p><i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)</p>	 <p>ginsenósido</p> <p><math>\beta 1 \rightarrow 2</math>      <math>\beta 1 \rightarrow 6</math>  <math>R_1 = \text{Glc-Glc-}</math>    <math>R_2 = \text{Glc-Glc}</math>  (gingenósido <b>R<sub>b-1</sub></b>, <b>118</b>)</p> <p><math>R_1 = \text{Glc-Glc-}</math>    <math>R_2 = \text{Ara(piranososa)-Glc}</math>  (gingenósido <b>R<sub>b-2</sub></b>, <b>119</b>)</p> <p><math>R_1 = \text{Glc-Glc-}</math>    <math>R_2 = \text{Ara(furanosa)-Glc}</math>  (gingenósido <b>R<sub>c</sub></b>, <b>120</b>)</p>	<p>Inhiben las contracciones inducidas por ACh, histamina, serotonina y nicotina en ileon aislado de cobayo</p>	<p>Takagi <i>et al.</i>, 1972</p>
<p><i>Hedera helix</i> (Araliaceae)</p>	 <p>hederagenina (<b>121</b>)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas por ACh en ileon de cobayo</p>	<p>Trute <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>Zygophyllum gaetulum</i> (Zygophyllaceae)</p>	 <p>Zigofilósido M (<b>122</b>)</p>	<p>Inhibe las contracciones inducidas eléctricamente y con morfina en preparaciones de ileon de cobayo</p>	<p>Capasso <i>et al.</i>, 1998</p>

## **II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 HIPÓTESIS**

Las hipótesis en que se sustenta el presente trabajo son las siguientes:

a) El criterio quimiotaxonómico de preselección de materias primas para el descubrimiento de principios activos en conjunto con los resultados derivados de evaluaciones farmacológicas preliminares durante un proceso de selección, constituyen indicadores apropiados para la detección de orquídeas que proporcionen nuevos principios espasmolíticos útiles para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos de origen natural.

b) La interacción entre los principios activos con sus receptores biológicos dependerá de la naturaleza de los grupos farmacofóricos los cuales son esenciales para el reconocimiento del sitio activo de los receptores.

c) Si el mecanismo de acción del gigantol (**2**) y la batatasina III (**14**) involucra una estimulación de la enzima GCs, el efecto espasmolítico provocado por estos compuestos debe de abatirse en presencia del 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-ona (ODQ) un inhibidor específico de la GCs.

d) Si el mecanismo de acción de los compuestos gigantol (**2**) y la batatasina III (**14**) involucra la proteína moduladora CaM es factible que su efecto farmacológico se modifique en presencia de inhibidores de CaM. Además los bibencilos podrían alterar las propiedades reguladoras enzimáticas de la proteína *in vivo*.

### **2.2 OBJETIVOS GENERALES**

2.2.1 Continuar con el estudio sistemático de orquídeas selectas mexicanas como una fuente potencial de estilbenoides espasmolíticos y así contribuir al desarrollo de nuevos agentes de utilidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades asociadas con trastornos de la motilidad gastrointestinal.

2.2.2 Continuar con el estudio del mecanismo de acción espasmolítico de los compuestos gigantol (**2**) y batatasina III (**14**) aislados de *S. livida* mediante la aplicación de métodos enzimáticos y/o funcionales.

- 2.2.3 Sintetizar una serie de análogos de los bibencilos **2** y **14** con la finalidad de estudiar la influencia de la naturaleza y posición de los sustituyentes en los anillos A y B (fenol vs éter metílico de fenol) en la actividad espasmolítica.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- 2.3.1 Obtener los extractos orgánicos en pequeña escala de la especie seleccionada con la finalidad de evaluar su potencial antiespasmódico mediante la evaluación de su efecto sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.
- 2.3.2 Preparar el extracto orgánico más activo a mediana escala de la especie activa y realizar el estudio fitoquímico biodirigido. Esta actividad permitirá obtener los metabolitos secundarios en forma pura y en cantidades suficientes para su posterior caracterización química y evaluación biológica.
- 2.3.3 Determinar el potencial espasmolítico *in vitro* de los compuestos aislados, mediante la evaluación de su efecto sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.
- 2.3.4 Determinar la estructura molecular de los metabolitos secundarios activos mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- 2.3.5 Determinar el efecto espasmolítico del gigantol (**2**) y batatasina III (**14**) en presencia del ODQ (un inhibidor específico de la guanilato ciclasa soluble), o L-NAME (un inhibidor inespecífico de la óxido nítrico sintetasa neuronal). Esta actividad permitirá determinar mediante ensayos funcionales si el mecanismo de acción de estos compuestos involucra una estimulación de las enzimas óxido nítrico sintetasa y/o guanilato ciclasa soluble, respectivamente.
- 2.3.6 Determinar el efecto del gigantol (**2**) y la batatasina III (**14**) sobre la movilidad electroforética de la CaM, mediante una electroforesis desnaturizante, con la finalidad de determinar una posible interacción de los bibencilos con la proteína reguladora CaM.
- 2.3.7 Evaluar el efecto del gigantol (**2**) y la batatasina III (**14**) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) *in vitro* en presencia de CaM de cerebro de bovino. Esta actividad permitirá conocer si los bibencilos modifican la actividad reguladora enzimática de la proteína CaM.

## *II. Hipótesis y Objetivos*

- 2.3.8 Determinar el efecto espasmolítico del gigantol (**2**) y la batatasina III (**14**) en presencia de la clorpromazina (un inhibidor de la CaM). Esta actividad permitirá determinar si el mecanismo de acción de los bibencilos involucra una interacción con la proteína CaM.
- 2.3.9 Sintetizar una serie de compuestos análogos diseñados de manera empírica de los productos naturales gigantol (**2**) y batatasina III (**14**), mediante la aplicación de la condensación de Wittig y evaluar su potencial espasmolítico. Esta actividad permitirá establecer la influencia de la posición y naturaleza química de los sustituyentes oxigenados (OH vs OCH<sub>3</sub>) en el efecto farmacológico.

### **III. SECCIÓN EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MATERIAL VEGETAL**

La especie *Nidema boothii* se recolectó en el Rancho El Naranjillo, Catemaco, estado de Veracruz, México, en el mes de Octubre de 1996. La recolección la planta estuvo a cargo del biólogo Gustavo Carmona Díaz y un ejemplar de referencia se depositó en Herbario del Instituto de Ecología (XAL), Jalapa, Veracruz (Voucher G. Carmona-Díaz 96-2).

El proceso de desecación de la planta entera se realizó a temperatura ambiente, y la fragmentación se llevó a cabo en un molino Willey Modelo 4.

#### **3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO EN PEQUEÑA ESCALA PARA LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ESPASMOLÍTICO DE LA ESPECIE *Nidema boothii*.**

Para la determinación de la actividad espasmolítica de la especie *Nidema boothii* se prepararon los extractos hexánico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> vía maceración a partir de 200 g de material vegetal desecado. En cada caso los extractos se concentraron al vacío.

#### **3.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS.**

##### **3.3.1 Determinación del efecto relajante de extractos, fracciones y productos puros obtenidos de *Nidema boothii* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.**

El efecto relajante de los extractos, fracciones y compuestos puros obtenidos de *Nidema boothii* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo se determinó de acuerdo a un diseño experimental previamente establecido y que continuación se describe a detalle (Rojas *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1996; Seitz *et al.*, 1997; Trute *et al.*, 1997;; Estrada *et al.*, 1999).

##### **3.3.1.1 Aislamiento del íleon.**

Para la obtención del tejido, se utilizaron cobayos macho adultos (200-300 g) alimentadas *ad libitum* y mantenidas en un bioterio con libre acceso al agua. Los

### III. Sección Experimental

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,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1.5,  $\text{NaHCO}_3$  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  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (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 del íleon se colocaron en una cámara de incubación con 20 mL de solución Ringer KH burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa al 15% de  $\text{CO}_2$  en  $\text{O}_2$  a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , que se mantuvo 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 que se empleó para el tejido fue de 10 mN (1g), 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 durante un período de 10 min, el cual se consideró como el control (100% actividad).

El efecto de diferentes concentraciones del extracto, fracciones y compuestos puros obtenidos de la especie de *Nidema boothii*, y del control positivo se registró inmediatamente después de transcurrido el período control. Para ello, se adicionó al baño las muestras de prueba a diferentes concentraciones [disueltas de dimetilsulfóxido (DMSO) o agua destilada] en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  (una concentración por cada segmento del íleon) y el efecto de cada muestra se registró durante 10 min. Después de

cada experimento, los tejidos se lavaron tres veces con solución Ringer KH para permitir su recuperación de la acción de las muestras estudiadas.

Los efectos de las muestras de prueba y del control positivo sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo, 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).

#### **3.3.1.4 Efecto relajante del gigantol (2) y la batatasina III (14) en presencia de L-NAME, ODQ y clorpromazina.**

En este caso el experimento se realizó de forma similar al descrito en el inciso 3.3.1.3. De manera inicial el órgano aislado se encubó con ODQ (100  $\mu\text{M}$ ), L-NAME (500  $\mu\text{M}$ ) o clorpromazina (100  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente se adicionaron a la cámara de incubación los compuestos 2 y 14 en diferentes concentraciones, y se registró el efecto espasmolítico en presencia de los agonistas. Los valores se expresaron como porcentajes de inhibición de la respuesta contráctil calculada como la media de seis datos  $\pm$  S.E.M.,  $p < 0.05$ .

#### **3.3.2 Electroforesis desnaturalizante de CaM de cerebro de bovino en presencia de los productos naturales y análogos sintéticos.**

La posible interacción de los compuestos puros con la proteína CaM de cerebro de bovino se determinó a través de un método electroforético en condiciones desnaturalizantes. Para realizar las evaluaciones, los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO y se prepararon disoluciones con una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Posteriormente, se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de cada disolución con 10  $\mu\text{g}$  de CaM de bovino (Sigma) y 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  1 mM, el volumen final de la mezcla se llevó a 30 mL con agua desionizada. A continuación, la mezcla se incubó durante 90 minutos a 30°C. Al término de la incubación, las muestras fueron sometidas a ebullición durante 5 minutos con la finalidad de facilitar la interacción de los compuestos con la proteína CaM. A continuación, las mezclas se enfriaron a temperatura ambiente y, finalmente, se adicionó a cada una 10  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (Liao, *et al.*, 1996). Por último se llevó a cabo la electroforesis desnaturalizante, en forma vertical descendiente (SDS-PAGE al 12%)

### III. Sección Experimental

para determinar si la CaM tratada experimentaba algún cambio en la movilidad electroforética. La composición de los geles y de las disoluciones utilizadas se indican en el Cuadro 4 (Sambrook, 1989). Es importante mencionar que en todos los casos se utilizó clorpromazina como control positivo (Nishino *et al.*, 1984). Cada determinación se realizó por triplicado.

**Cuadro 4.** Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones utilizadas para realizar el experimento de electroforesis desnaturante (SDS-PAGE al 12%)

Geles y disoluciones	Composición	Cantidad
Gel sellador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08	4 mL
	TEMED 100 %	2 $\mu$ L
	APS 10%	10 $\mu$ L
l separador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08	5.6 mL
	TRIS 3 M, pH 8.8	1.6 mL
	SDS 10 %	140 $\mu$ L
	Agua	6.5 mL
	TEMED 100 %	15 $\mu$ L
	Persulfato de amonio 10%	105 $\mu$ L
Disolución de corrida	Trizma	6.00 g
	Glicina	28.50 g
	SDS 10%	2.00 g
	Agua	2.00 L
	PH 8.3	
Buffer de carga	TRIS-HCl 1 M, pH 6.8	0.6 mL
	Glicerol 50 %	5 mL
	SDS 10 %	2 mL
	2-mercaptoetanol	0.5 mL
	Azul de bromofenol 1 %	10 mL
	Agua	0.9 mL

### 3.3.3 Efecto de los productos naturales y algunos derivados sintéticos sobre la enzima PDE1 dependiente de CaM.

La actividad de PDE1 se presencia de CaM se determinó a través de la cuantificación de la cantidad de fosfato producido como resultado de la reacción de hidrólisis de AMPc catalizada por la enzima (Leung *et al.*, 1984). Los ensayos correspondientes se llevaron a cabo adicionando a una disolución que contenía 0.015 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino (Sigma), de 2  $\mu$ M de CaM de cerebro de bovino (Sigma), 15  $\mu$ L de una disolución de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* (Sigma) [0.3 unidades] preparada en un buffer constituido por Tris-HCl 10 mM y acetato de magnesio 0.5 mM, a pH 7 y 800  $\mu$ L de un buffer de reacción constituido por Tris-HCl 45 mM, acetato de magnesio 5.6 mM, imidazol 45mM y CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, a pH 7 y diferentes concentraciones de la muestra a evaluar. En cada caso la mezcla de reacción se incubó durante 30 min. a 30°C. Transcurrido este tiempo, a cada una de las muestras se les adicionó 100  $\mu$ L de AMP cíclico 10.8 mM y se mantuvieron nuevamente a 30°C durante 30 min. Al término de este segundo período de incubación, a cada muestra se le adicionaron 100  $\mu$ L de ácido trifluoroacético al 55% (m/v) para detener la reacción.

A continuación se cuantificó la cantidad de fosfato producido durante la reacción de hidrólisis del AMPc, utilizando un método espectrofotocolorimétrico de Sumner de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación (Ovadi, 1989). A una mezcla de 500  $\mu$ L de la mezcla de reacción anterior se le adicionaron 800  $\mu$ L de heptamolibdato de amonio al 6.6 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.75 N y 200  $\mu$ L de FeSO<sub>4</sub> al 10%. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se determinó la actividad óptica en cada una de ellas a 660 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva estándar de fosfato monobásico de potasio para determinar la concentración de fosfato obtenido en cada tratamiento. La curva estándar se construyó a partir de una disolución 50 mM de fosfato monobásico de potasio (Sigma), tomando las alícuotas necesarias para obtener 50 catorce concentraciones diferentes en un intervalo de 50 a 700 nM. A cada alícuota se adicionaron 800  $\mu$ L de heptamolibdato de amonio al 6.6% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.75 N, 200  $\mu$ L de FeSO<sub>4</sub> al 10% y agua desionizada hasta obtener un volumen final de 1500  $\mu$ L. La

### III. Sección Experimental

densidad óptica de las muestras se determinó a 660 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman Du 650.

#### 3.3.4 Evaluación de la actividad citotóxica de los bibencilos 2,5, 14, 145, 146, 151-155 y 157.

El potencial citotóxico de los bibencilos 2, 5, 14, 145, 146, 151-155 y 157 se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Shier y colaboradores (1991). Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes: MDCK (células de riñón de perro Mandin-Darby); H4TG (células de hematoma de rata resistentes a tioguanina); NIH3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón suizo del National Institute of Health) y KA31T (cepa Kirsten de células 3T3 transformadas por el virus del sarcoma).

La sensibilidad de cada una de las líneas celulares hacia los compuestos puros se determinó a las concentraciones de 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 y 1  $\mu$ M. Cada compuesto se evaluó por triplicado y como control positivo se utilizó adriamicina. Los valores promedio de las absorbancias y los errores estándar se emplearon para evaluar el crecimiento después de cinco días. La  $CI_{50}$  se determinó mediante el análisis de varianza del mínimo cuadrado de las medias del porcentaje de inhibición para cada tratamiento respecto a los controles sin tratamiento.

### 3.4 ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA ESPECIE *Nidema boothii*.

#### 3.4.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales en placa de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck), utilizando varios sistemas de elución y sulfato cérico como cromógeno. 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).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de diodos (996). El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y manipulación de la

información se realizaron utilizando el programa Millenium 2000 (Waters). La purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de gel de sílice (Waters,  $\mu$ porasil, 125 Å, tamaño de partícula 100  $\mu$ M) de 19 mm de diámetro y 300 mm de longitud, con un flujo de 8.3 mL/min. La detección se ajustó entre 230-274 nm.

#### **3.4.2 Equipos utilizados para el registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.**

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fischer-Jonhs y se reportan sin corregir. El espectro de dicroísmo circular de la nidemona se registró en un espectropolarímetro JASCO 720 a 25°C en MeOH. Los espectros en el IR se obtuvieron en pastillas de KBr y se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer FT 1650. Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Lambda II UV en MeOH. Los Espectros RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), COSY, NOESY, HMBC y HMQC se determinaron en un espectrómetro Varian UNITY PLUS 500 utilizando  $\text{CDCl}_3$  ó  $\text{DMSO}_d_6$  como disolventes y TMS como referencia interna. Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron utilizando un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV.

**3.4.3 Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de *Nidema boothii***

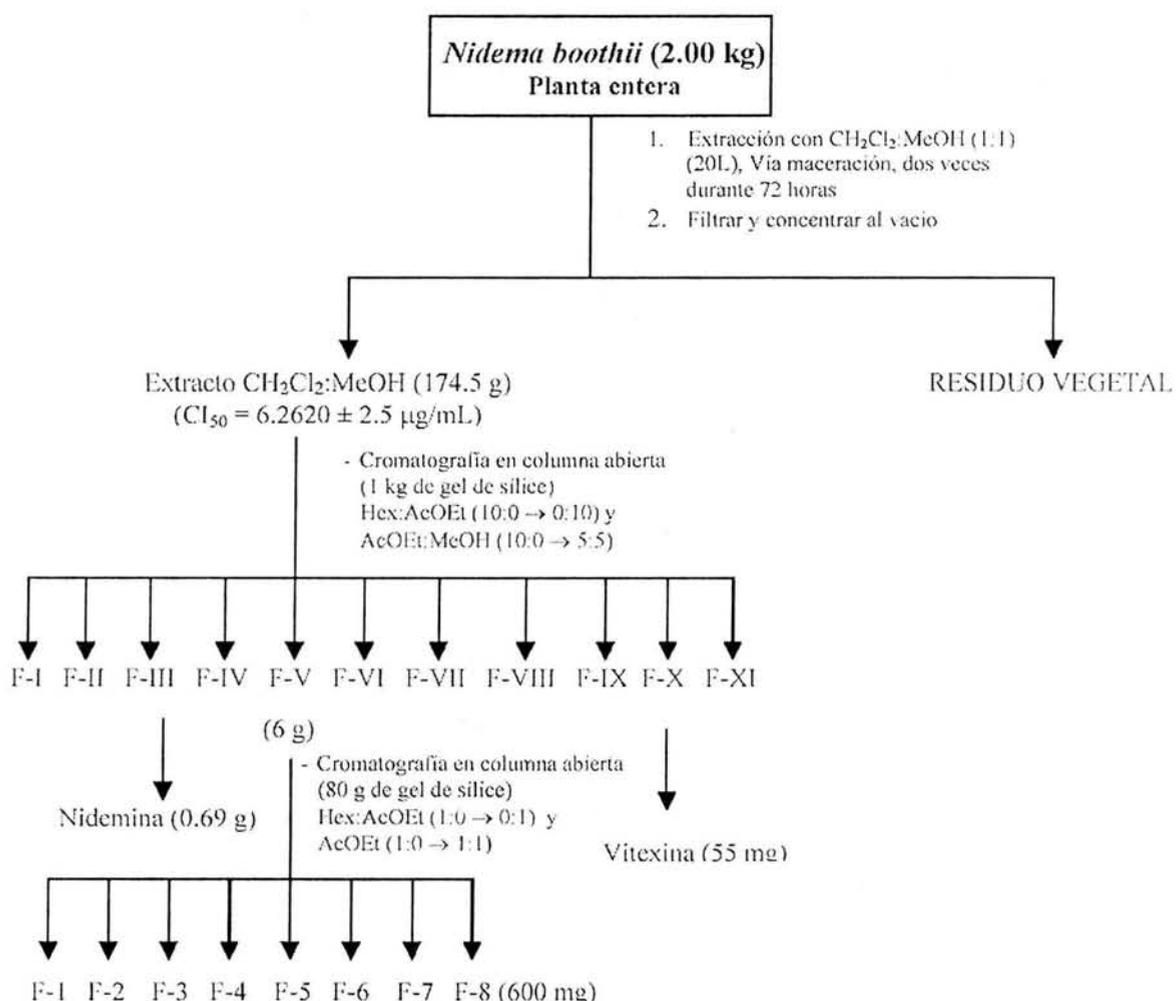
El material vegetal seco y molido (2 kg) se extrajo vía maceración con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) a temperatura ambiente. El extracto resultante fue concentrado al vacío obteniéndose un total de 174.5 g de un residuo (CI<sub>50</sub> = 6.2620±2.5 µg/mL) color café. El extracto total se sometió a un proceso de fraccionamiento biodirigido utilizando una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (1 kg).

**Cuadro 5.** Fraccionamiento preliminar del extracto obtenido a partir la especie *Nidema boothii*

Eluyente	Proporción(%)	Fracciones	Fracciones combinadas	% de inhibición
Hexano	100	1-8	1-38 (F-I)	38.16±2.91
	91:1	9-23	39-42 (F-II)	58.59±3.66
	92:6	24-26	43-80 (F-III)	58.89±3.58
	90:10	27-67	81-95 (F-IV)	43.21±2.04
	85:15	68-85	96-125 (F-V)	99±3.86
	80:20	86-105		
Hexano:AcOEt	75:25	106-116	126-150 (F-VI)	41.13±6.24
	70:30	117-131		
	65:35	132-137		45.98±2.96
	60:40	138-143		
	50:50	144-160		
	45:55	161-168	151-214 (F-VII)	
	40:60	169-175		
	30:70	176-206		
AcOEt	20-80	207-211		
	100	212-225	215-234 (F-VIII)	32.21±2.75
	90:10	226-267	235-259 (F-IX)	31.81±5.71
AcOEt:MeOH	85:15	268-271	260-274 (F-X)	35.43±1.85
	75:25	272-274		
	50:50	275-300	275-300 (F-XI)	37.20±6.27

El proceso de elución se efectuó con un gradiente de elución de hexano:AcOEt (1:0→0:1) y AcOEt:MeOH (1:0→0:1). Se recolectaron 300 fracciones de 1 L cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este proceso generó un total de 11 fracciones primarias (Cuadro 5).

Cada una de las fracciones resultantes se evaluó mediante el bioensayo indicado en el inciso 3.3.1.3. En el Esquema 3 se resume el proceso de extracción y fraccionamiento primario del extracto total de *N. boothii*.



**Esquema 3.** Aislamiento y purificación de los productos activos de las fracciones primarias de *Nidema boothii*.

### 3.4.4 Aislamiento y purificación de los productos activos de las fracciones primarias de *Nidema boothii*

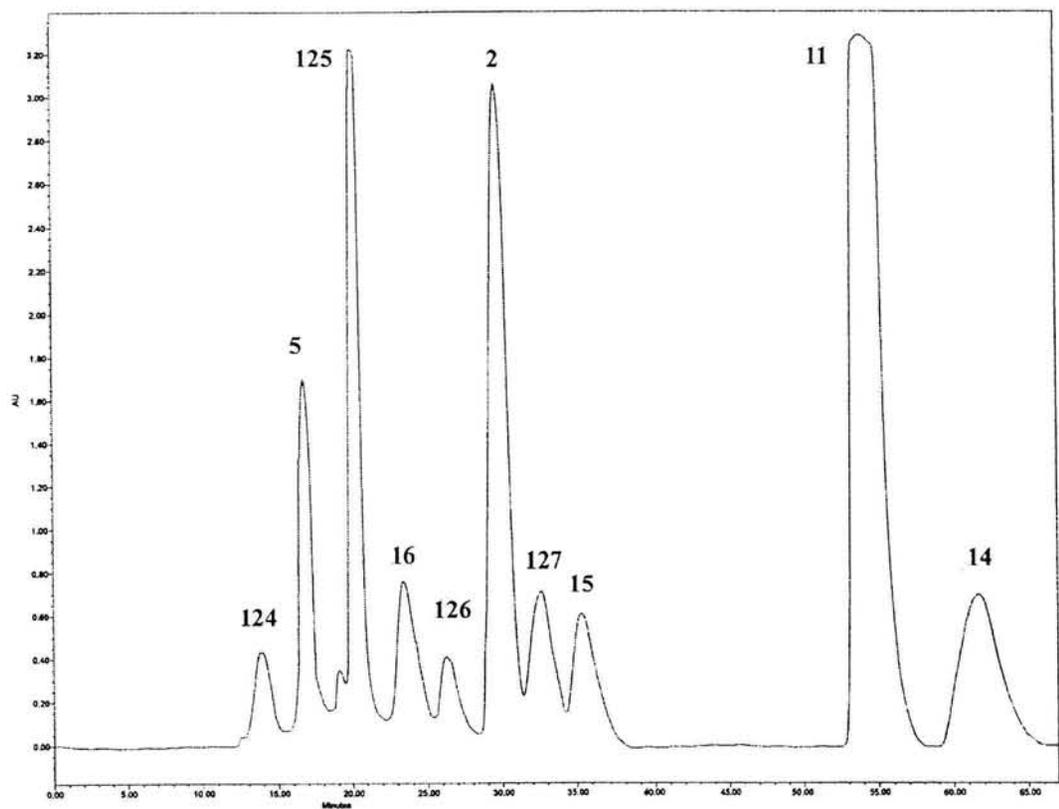
De la fracción primaria activa F-3, cristalizaron espontáneamente 0.68 g de un sólido cristalino, con punto de fusión 127-129°C, el cual se identificó como el triterpeno nidemina (**122**, 0.69 g) por comparación con una muestra auténtica (Estrada *et al.*, 2002).

De la fracción primaria F-10 precipitó espontáneamente un sólido de color amarillo pálido el cual se identificó como el flavonoide C-glucosilado vitexina (**123**, 55 mg), por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados previamente en la literatura (Wollenweber y Diez, 1981)

La fracción activa F-5 (6.0 g) se recromatografió sobre una columna de gel de sílice (80 g). El proceso de elución se efectuó con diferentes mezclas de hexano:AcOEt (1:0→0:1). Este procedimiento condujo a la obtención de 8 fracciones secundarias (FV-1 a FV-8), reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica. La fracción más activa (600 mg) fue la FV-8 (100 % de inhibición de la contracción espontánea del íleon), eluida con hexano:AcOEt (8:2).

A continuación la fracción activa FV-8, se resolvió en sus componentes individuales mediante la aplicación de la CLAR utilizando una columna de gel de sílice, un flujo de 8.3 mL/min, un sistema de elución isocrático y una mezcla cuaternaria de disolventes [hexano:CHCl<sub>3</sub>:*i*-PrOH:MeOH (75:23:1:1)] como fase móvil (Figura 10).

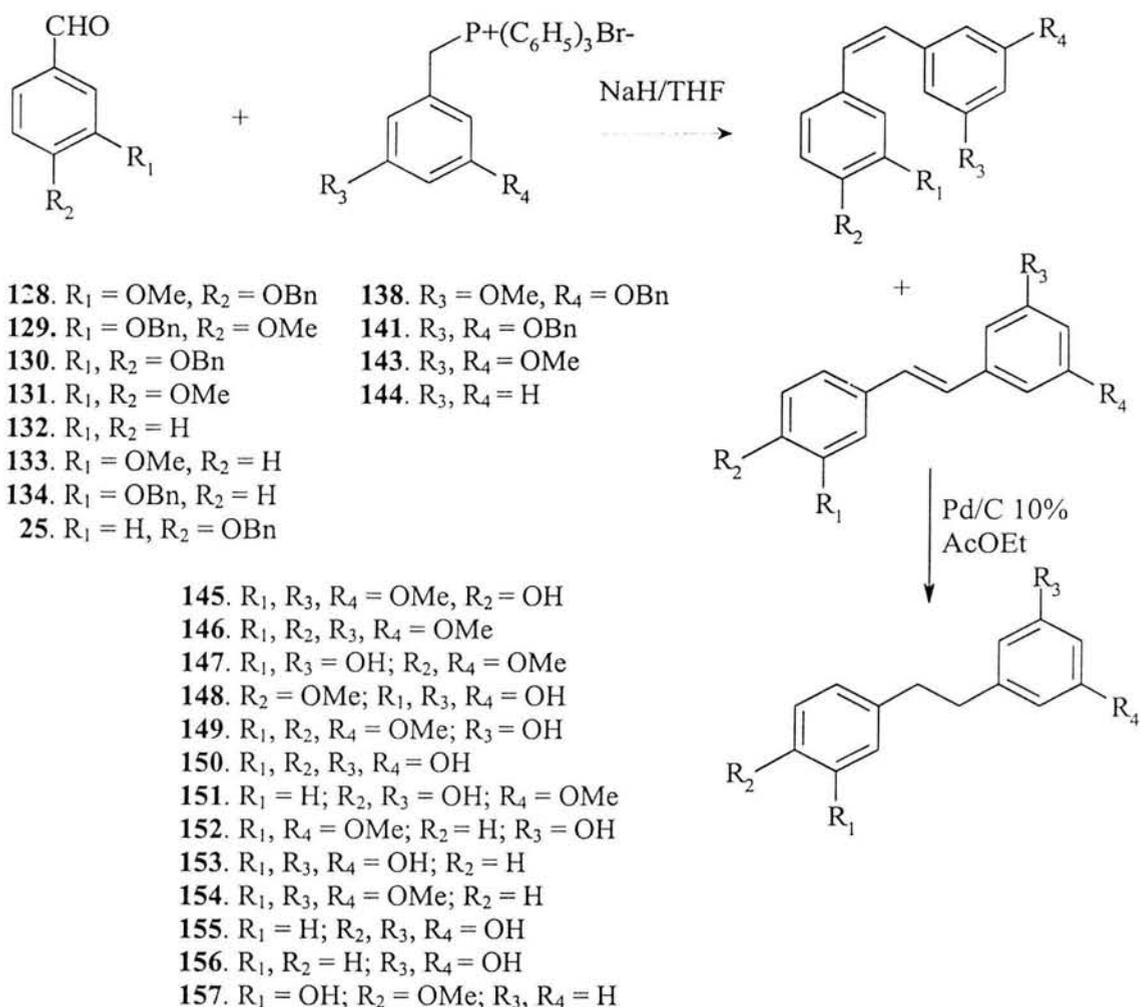
Este proceso de purificación permitió el aislamiento de los metabolitos secundarios: nidemona (**124**, 4 mg, T<sub>R</sub> 14.2 min), aloifol II (**5**, 22 mg, T<sub>R</sub> 18 min), 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**125**, 25 mg, T<sub>R</sub> 19 min), 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (**16**, 8 mg, T<sub>R</sub> 23 min), efemerantoquinona (**126**, 5.7 mg, T<sub>R</sub> 26 min), gigantol (**2**, 32 mg, T<sub>R</sub> 30 min), efemerantol B (**127**, 4 mg, T<sub>R</sub> 32 min), 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**15**, 3 mg, T<sub>R</sub> 35 min); lusiantridina (**11**, 55 mg, T<sub>R</sub> 50 min) y batatasina III (**14**, 19 mg, T<sub>R</sub> 62 min).



**Figura 10.** Cromatograma de líquidos de alta resolución de la fracción FV-8. La separación y purificación de los compuestos 2, 5, 11, 14-16, 124-127 se realizó en una columna preparativa de gel de sílice, con un flujo de 8.3 mL/min, empleando un sistema de elución isocrático y una mezcla cuaternaria de disolventes [Hex:CHCl<sub>3</sub>:*i*-PrOH:MeOH (75:23:1:1)] como fase móvil.

### 3.5 SÍNTESIS DE LOS ANÁLOGOS DE LA BATATASINA III (14) Y EL GIGANTOL (2).

La síntesis de los análogos del gigantol (2) y la batatasina III (14) se realizó utilizando el método de Wittig. Las estructuras de los productos finales e intermediarios sintetizados, así como las reacciones involucradas en el proceso se resumen en el Esquema 4. Los compuestos 131-133 se adquirieron comercialmente.

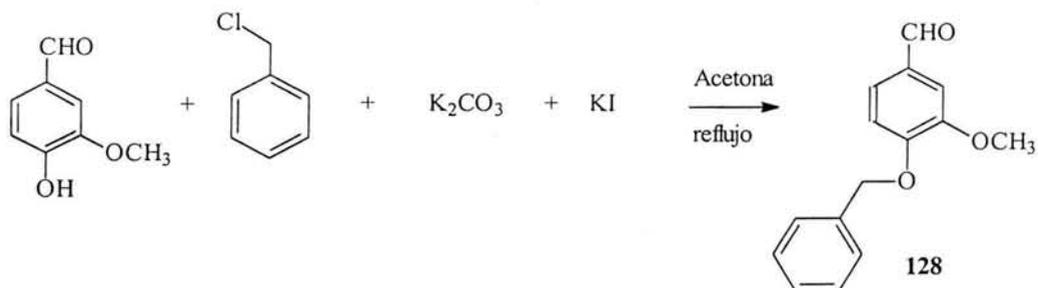


**Esquema 4.** Esquema general de la síntesis de los compuestos 2, 14 y de sus análogos.

Nota: los compuestos 150 y 155 son productos semisintéticos.

## 3.5.1 Síntesis de los Compuestos Intermediarios (25, 128-130 y 134).

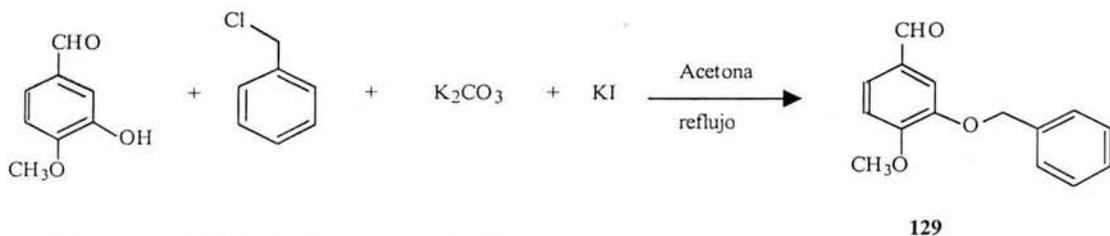
## 3.5.1.1. 4-benciloxi-3-metoxibenzaldehído (128)



Esquema 5. Síntesis del compuesto 128

En un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, embudo de adición y una trampa anhidra, se disolvieron 5 g (0.033 mol) del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, 6.8 g (1.5 mol) de  $K_2CO_3$  y cantidades catalíticas de KI (0.0055 mol, 0.906 g) en 150 mL de acetona. Posteriormente se adicionó a la mezcla de reacción, gota a gota, 3.77 mL (4.15 g, 0.0328 mol) de cloruro de bencilo y se agitó vigorosamente. Terminada la adición se retiró el embudo y se colocó sobre el matraz de reacción un condensador de agua. La mezcla se reflujo durante 21 hr. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo en repetidas ocasiones con AcOEt. Los extractos reunidos se lavaron con agua y solución sobresaturada de NaCl. Posteriormente el extracto orgánico se secó sobre  $Na_2SO_4$ , anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo **128** se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta, en 150 g de sílica gel empleando como fase móvil  $CH_2Cl_2$ . (2.78 g, 35 % de rendimiento).

## 3.5.1.2 3-benciloxi-4-metoxibenzaldehído (129)



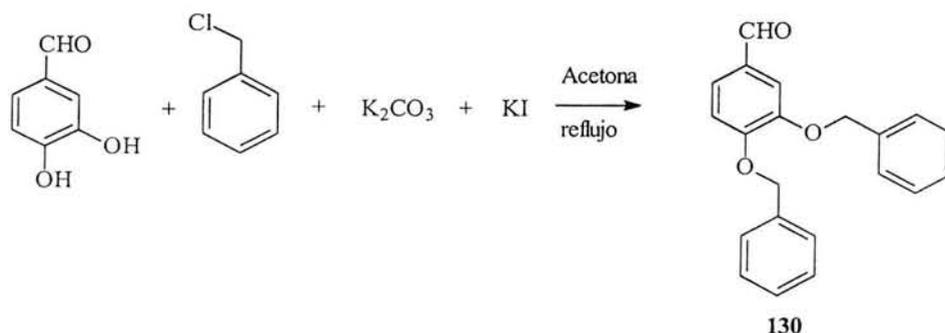
Esquema 6. Síntesis del compuesto 129

### III. Sección Experimental

En un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, embudo de adición y una trampa anhidra, se disolvieron 5 g (0.033 mol) del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en 150 mL de acetona anhidra en presencia de 5 g (0.036 mol) de  $K_2CO_3$  y cantidades catalíticas de KI (0.913 g, 0.0055 mol).

Posteriormente se adicionó, gota a gota, 4.1 mL (4.57 g, 0.036 mol) de cloruro de bencilo a la mezcla de reacción y se agitó vigorosamente. Terminada la adición la mezcla de reacción se sometió a un reflujo por 21 hr. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo en repetidas ocasiones con AcOEt. Los extractos reunidos se lavaron con agua y solución sobresaturada de NaCl. Posteriormente el extracto orgánico se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo **129** se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta, en 150 g de sílica gel empleando como fase móvil  $CH_2Cl_2$  al 100% (7.3 g, 92 % de rendimiento). P.f. 61-62°. IR (KBr)  $\nu_{max}$  2811.15, 2717.26, 1677.76, 1259.48  $cm^{-1}$ ; RMN- $^1H$  ( $C_3D_6O$ )  $\delta$  3.97 (3H, s); 5.2 (2H, s, H-Bn); 6.99 (1H, d, J=9 Hz, H-5); 7.46 (7H, m, H-Ar); 9.81 (1H, 1s, CHO); EMIE  $m/z$  242 [ $M^+$ , (40)]; 91 (100), 65 (17).

#### 3.5.1.3. 3,4-dibenciloxibenzaldehído (**130**)

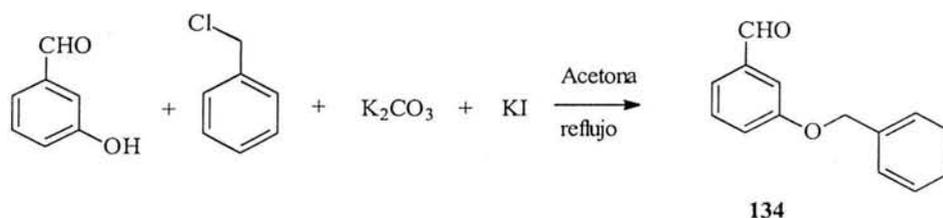


Esquema 7. Síntesis del compuesto **130**

En un matraz bola de 250 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum y un embudo de adición y una trampa anhidra, se disolvieron 10 g (0.072 mol) del 3,4-dihidroxibenzaldehído en 150 mL de acetona anhidra. Posteriormente se agregaron gota a gota 18.3 mL (20.16 g, 0.16 mol) de cloruro de bencilo a la mezcla de reacción en presencia de 22 g (0.159 mol) de  $K_2CO_3$  y cantidades catalíticas de KI (2 g, 0.012 mol) y se agitó vigorosamente. Terminada la adición se retiró el embudo y se colocó sobre el matraz de reacción un condensador de agua y se

reflujó por 21 hr. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo en repetidas ocasiones con AcOEt. Los extractos reunidos se lavaron con agua y solución sobresaturada de NaCl, posteriormente el extracto se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo **130** (8.76 g, 38 % de rendimiento) se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (50 g) empleando como fase móvil fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. P.f. 77°C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3025, 2818, 2726, 1676, 1511, 1283, 1269, 1134, 1022 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)  $\delta$  5.23 (4H, s, H-Bn); 7.0 (2H, m, J=8.1 Hz, H-5); 7.42 (12H, m, H-Ar); 9.85 (1H, 1s, CHO); EMIE *m/z* 318 [M<sup>+</sup>, (20)]; 227 (60); 181 (24); 91 (100), 65 (18).

#### 3.5.1.4. 3-benciloxibenzaldehído (134)



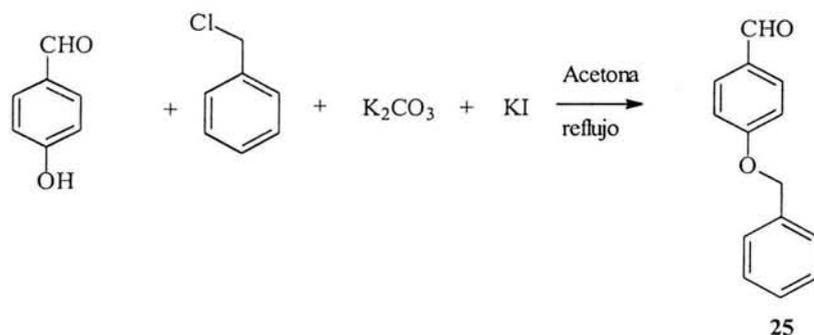
Esquema 8. Síntesis del compuesto **134**

En un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, un embudo de adición y una trampa anhidra, se disolvieron 5 g (0.041 mol) del 3-hidroxibenzaldehído en 100 mL de acetona anhidra en presencia de 6.79 g (0.049 mol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y cantidades catalíticas de KI (1.135 g, 0.0068 mol). Posteriormente se adicionó, gota a gota, 5.2 mL (5.7 g, 0.045 mol) de cloruro de bencilo a la mezcla de reacción y se agitó vigorosamente. Terminada la adición, la mezcla se refluó por 21 hr. El producto se filtró, y las aguas madres se extrajeron en repetidas ocasiones con AcOEt. Los extractos reunidos se lavaron con agua y solución sobresaturada de NaCl; posteriormente el extracto se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo **134** (5.4 g, 62 % de rendimiento) se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (150 g) empleando como fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  2737, 1668, 1581, 1283 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)  $\delta$  5.3 (2H, s, H-Bn); 7.15 (1H, d, H-2); 7.38 (8H, m, H-Ar); 9.94 (1H, 1s, CHO); EMIE *m/z* 212 [M<sup>+</sup>, (15)]; 91 (100), 65 (18).

### III. Sección Experimental

#### 3.5.1.5. 4-benciloxibenzaldehído (25)

En un matraz bola de 250 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, embudo de adición y una trampa anhidra, se disolvieron 10 g (0.081 mol) del 4-hidroxibenzaldehído en 150 mL de acetona anhidra en presencia de 13.5 g (0.098 mol) de  $K_2CO_3$  y cantidades catalíticas de KI (2.26 g, 0.0135 mol).



#### Esquema 9. Síntesis del compuesto 25

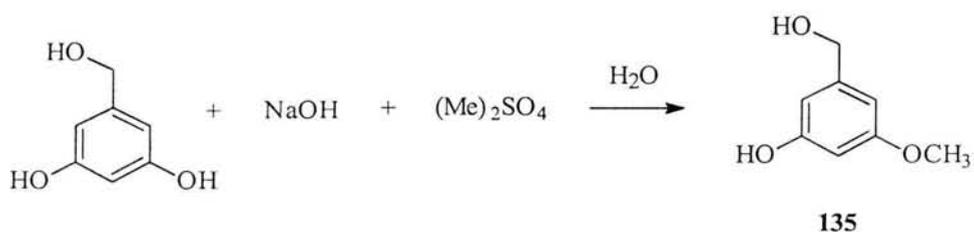
Posteriormente se agregó, gota a gota, 10.36 mL (11.4 g, 0.09 mol) de cloruro de bencilo a la mezcla de reacción y se agitó vigorosamente. Terminada la adición la mezcla se reflujo por 21 hr. Al cabo de este tiempo la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo en repetidas ocasiones con AcOEt. Los extractos reunidos se lavaron con agua y una solución sobresaturada de NaCl. Posteriormente el extracto se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo **25** (12.5 g, 72 % de rendimiento) se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta, se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (150 g) empleando como fase móvil  $CH_2Cl_2$ . IR (KBr)  $\nu_{max}$  2737, 1668, 1581, 1283  $cm^{-1}$ ; RMN- $^1H$  ( $C_3D_6O$ )  $\delta$  5.15 (2H, s, H-Bn); 7.08 (2H, m, H-3, H-5); 7.4 (5H, m, H-Ar); 7.8 (2H, m, H-2, H-6); 9.89 (1H, 1s, CHO); EMIE  $m/z$  212 [M $^+$ ].

#### 3.5.2 Síntesis de las Sales de Wittig

##### 3.5.2.1 Reacción de metilación del alcohol 3, 5 dihidroxibencilico (135)

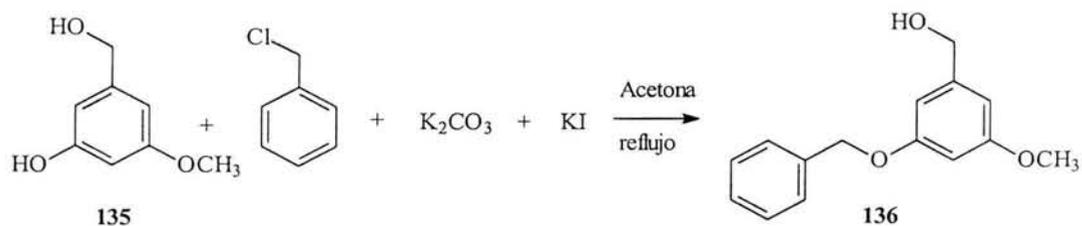
En un vaso de precipitados de 50 mL, equipado con agitación magnética y termómetro, se colocaron 5 g de NaOH (0.125 mol) en 50 ml de agua. La mezcla resultante se agitó hasta completa disolución de los sólidos. La mezcla de reacción se enfrió por medio de un baño de hielo y agua y se agitó mientras se fueron incorporando

14 g del alcohol 3,5 dihidroxibencílico (0.1 mol); la adición se realizó de tal manera que la temperatura no pasara de 15°. Al término de la adición la mezcla se agitó hasta completa disolución de los sólidos y se retiró el baño de hielo. Posteriormente se le agregó a la mezcla de reacción, gota a gota, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (9.46 g, 0.1 mol) empleando un embudo de adición. La reacción procedió durante 20 min a temperatura ambiente. Después de comprobar la completa conversión de la materia prima por ccp, el pH de la solución se ajustó a 5.0 con HCl 1 N y a continuación se extrajo con AcOEt (3 X 250 mL). El extracto orgánico se lavó con solución sobresaturada de NaCl y agua y posteriormente se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a vacío. El producto crudo (15.9 g) se sometió a una purificación por cromatografía de abierta, empleando 400 g de gel sílice (1:25) y un gradiente de elución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt como fase móvil. El compuesto **135** eluyó de la columna con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: AcOEt (95:5), el rendimiento fue de 4.58 g (90%). IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3337, 2939, 2842, 1599, 1154 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)  $\delta$  3.66 (3H, s, OMe); 4.35 (2H, s, H-Bn); 6.15 (1H, dd, H-6); 6.31 (2H, dd, H-2, H-4); 9.28 (1H, s, intercambio con D<sub>2</sub>O). EMIE *m/z* 154[M<sup>+</sup>, (100)], 153 (35), 125 (85), 65 (33).



**Esquema 10.** Síntesis del compuesto **135**

### 3.5.2.2 Reacción de bencilación del alcohol 3-hidroxi-5-metoxibencílico (136)

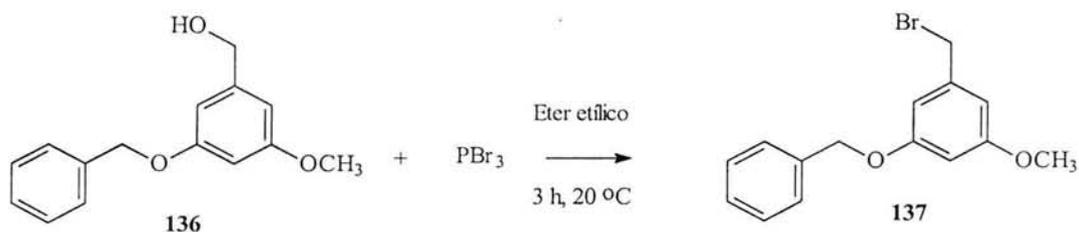


**Esquema 11.** Síntesis del compuesto **136**

### III. Sección Experimental

En un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, un embudo de adición y una trampa anhidra, se disolvieron 4.28 g (0.028 mol) del compuesto **135** en 100 mL de acetona anhidra en presencia de 4.5 g (0.32 mol) de  $K_2CO_3$  y cantidades catalíticas de KI (0.77 g, 0.005 mol). Posteriormente se adicionó a la mezcla, gota a gota, 3.5 mL (3.87 g, 0.03 mol) de cloruro de bencilo a la mezcla de reacción y se agitó vigorosamente. Terminada la adición se reflujo por 21 hr. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo en repetidas ocasiones con AcOEt. Los extractos reunidos se lavaron con agua y una solución sobresaturada de NaCl; posteriormente el extracto se secó con  $Na_2SO_4$ , se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo **136** (6.6 g) se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta, sobre 150 g de gel de sílice y como fase móvil  $CH_2Cl_2$ . (3.47 g, 52% de rendimiento). 244[M<sup>+</sup>(100)], 213 (28); 91(95), 65(24).

#### 3.5.2.3 Obtención del Bromuro de 3-benciloxi-5-metoxibencilo (**137**)

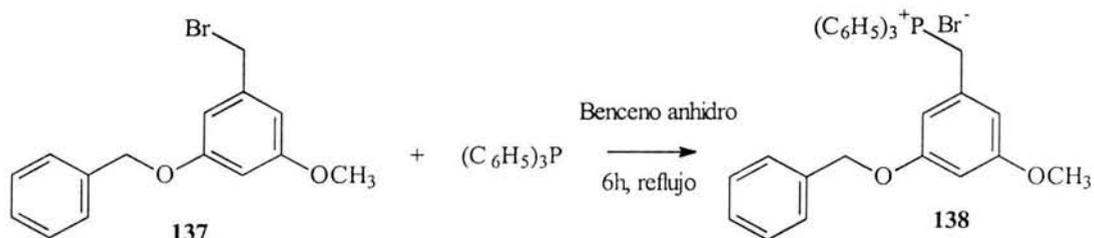


#### Esquema 12. Síntesis del compuesto **137**

En un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, embudo de adición y con trampa anhidra, se colocaron 3.4467 g (0.014 mol) del producto **136** y 60 mL de éter seco. A continuación se agregó, gota a gota,  $PBr_3$  (4.6g, 0.017 mol) cuidando que la temperatura no pasara de 4°C. Una vez terminada la adición, se retiró el baño de hielo y se agitó vigorosamente por 3 hr. Se comprobó el consumo total de la materia prima por CCF y la mezcla se vertió cuidadosamente sobre hielo. La mezcla se extrajo con AcOEt, se lavó posteriormente con agua y solución sobresaturada de NaCl. Finalmente la solución conteniendo el

producto (**137**) se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró al vacío (3.31 g, 73% de rendimiento). (Jurd y Rolle, 1958)

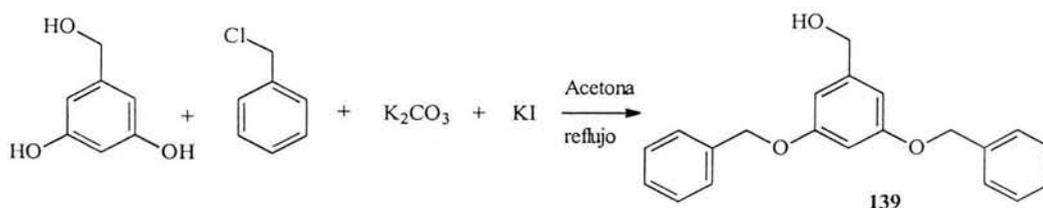
### 3.5.2.4 Obtención del bromuro de 3-benciloxi-5-metoxibenciltrifenilfosfonio (**138**).



#### Esquema 13. Síntesis del compuesto **138**

En un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, condensador de agua, y una trampa anhidra, se colocó el producto crudo **137** (3.31 g) en benceno seco (60 mL), y se agitó hasta completa disolución. Una vez terminada la agitación, se adicionaron 3.24 g (0.012 mol) de trifenilfosfina. La mezcla de reacción se agitó y se reflujo por 6 hr. Al cabo de este tiempo, la mezcla se dejó en reposo hasta la aparición de un precipitado blanco (**138**, 4.5 g, 90% de rendimiento), el cual se separó por filtración al vacío y se lavó con éter de petróleo tibio, en repetidas ocasiones p.f.. (Lit 199.5-201°C, Crombie y Jamieson, 1982). IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3033, 2851, 2780, 1594, 1436, 1151, 1109, 1056  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ )  $\delta$  2.53 (2H, m, H-Bn); 3.5 (3H, s, OMe); 4.8 (2H, s, H-Bn); 5.02 (2H, d, H-Bn); 6.19 (2H, d, H-Ar); 6.48 (1H, m, H-Ar); 7.33 (15H, m, H-Ar); 7.77 (5H, m, H-Ar). EMIE  $m/z$  412 (90), 262 (100), 183 (81).

### 3.5.2.5 Reacción de bencilación del alcohol 3, 5 dihidroxibencílico (**139**).

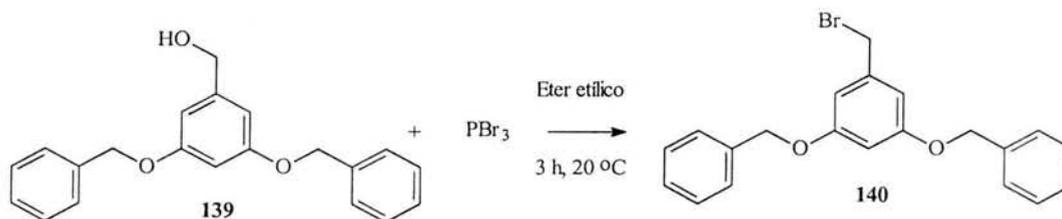


#### Esquema 14. Síntesis del compuesto **139**

### III. Sección Experimental

En un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, embudo de adición y una trampa anhidra, se disolvieron 5 g (0.036 mol) del alcohol 3, 5 dihidroxibencílico en 175 mL de acetona anhidra, en presencia de 11.83 g (0.086 mol) de  $K_2CO_3$  y cantidades catalíticas de KI (0.987 g, 0.006 mol). Posteriormente se agregó, gota a gota, 8.0 mL (8.83 g, 0.07 mol) de cloruro de bencilo y la mezcla se agitó vigorosamente. Terminada la adición, la mezcla se reflujo por 21 hr. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo en repetidas ocasiones con AcOEt. Los extractos reunidos se lavaron con agua y solución sobresaturada de NaCl. Por último, el extracto se secó sobre  $Na_2SO_4$ , anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo (6.6 g) se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta, sobre 150 g de sílica gel empleando como fase móvil  $CH_2Cl_2$ . (**139**, 3.1g, 27.2 rendimiento). IR (KBr)  $\nu_{max}$  3265, 3028, 2903, 2864, 1593, 1285, 1159, 1024  $cm^{-1}$ . RMN- $^1H$  ( $C_3D_6O$ )  $\delta$  4.63 (2H, s, H-Bn); 5.04 (4H, s, H-Bn); 6.55 (1H, t, H-4); 6.62 (2H, m, H-2, H-6), 7.37 (10H, m, H-Ar). EMIE  $m/z$  320 [ $M^+$  (100)]; 289 (15); 181 (78) 180 (32); 91 (3), 65 (31).

#### 3.5.2.6 Obtención del Bromuro de 3-5-dibenciloxibencilo (**140**).

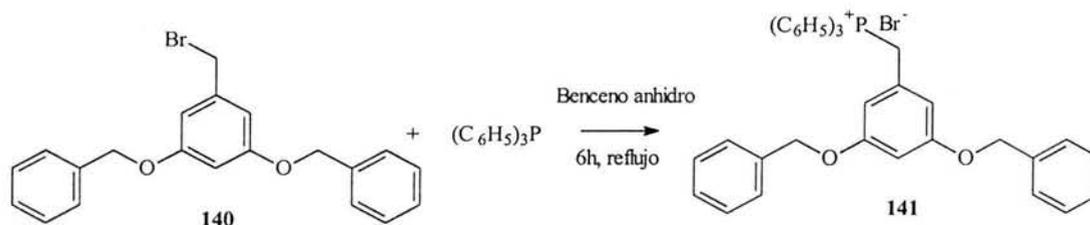


#### Esquema 15. Síntesis del compuesto **140**

En un matraz de bola de 125 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, embudo de adición y una trampa anhidra, se colocaron 1.38 g del producto **139** y 24 mL de éter seco. A continuación se agregó gota a gota una solución de  $PBr_3$  (1.4g, 0.005 mol) cuidando que la temperatura no pasara de  $4^\circ C$ . Una vez terminada la adición, se retiró el baño de hielo y se agitó vigorosamente por 3 hr. Al cabo de este tiempo, la mezcla se vertió cuidadosamente sobre hielo, y se realizaron

repetidas extracciones con AcOEt. Posteriormente el extracto orgánico se lavó posteriormente con agua y solución sobresaturada de NaCl. El producto crudo se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró al vacío. Como resultado de esta reacción se obtuvieron 1.575 g de **140** (94.6 % de rendimiento)

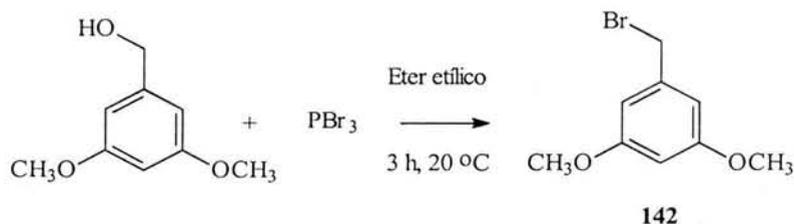
### 3.5.2.7 Obtención del bromuro de 3,5-dibenciloxibenciltrifenilfosfonio (**141**)



Esquema 16. Síntesis del compuesto **141**

En un matraz bola de 50 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, condensador de agua y una trampa anhidra, se colocaron 1.57 g del producto **140** (5  $\mu\text{mol}$ ) en benceno seco (25 mL). La mezcla se agitó hasta completa disolución de los sólidos. Una vez terminada agitación, se adicionaron 1.29 g (0.005 mol) de trifenilfosfina. La mezcla de reacción se agitó y se reflujo por 6 hr. Al cabo de la reacción se formó un precipitado blanco (**141**, 2.1 g, 91% de rendimiento), el cual se separó por filtración al vacío. El producto se lavó con éter de petróleo tibio, en repetidas ocasiones. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3033, 2916, 2849, 2777, 1590, 1437, 1152, 1047  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ )  $\delta$  2.54 (2H, m, H-Bn); 5.0 (2H, d, H-Bn); 4.79 (2H, s, H-Bn); 6.24 (2H, m, H-Ar); 6.58 (1H, m, H-Ar) 7.25 (15H, m, H-Ar); 7.8 (10H, m, H-Ar).. EMIE  $m/z$  412 (90), 262 (100), 183 (81).

### 3.5.2.8 Obtención del Bromuro de 3-5-dimetoxibencilo (**142**).

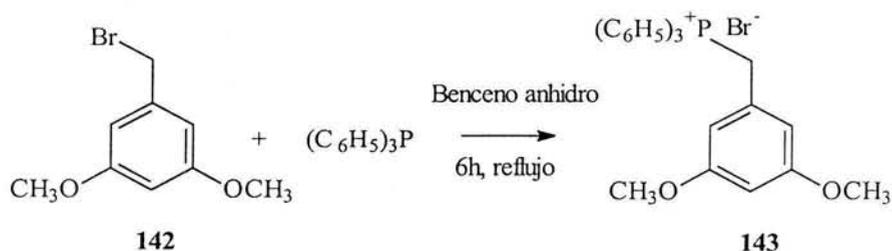


Esquema 17. Síntesis del compuesto **142**

### III. Sección Experimental

En un matraz bola de 500 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, embudo de adición y una trampa anhidra, se colocaron 9 g (0.053 mol) del alcohol 3,5-dimetoxibencilico y 180 mL de éter seco. A continuación se añadió, gota a gota  $\text{PBr}_3$  (31.3g, 0.12 mol) cuidando que la temperatura no pasara de  $4^\circ\text{C}$ . Una vez terminada la adición, se retiró el baño de hielo y se agitó vigorosamente por 3 hr. A continuación la mezcla se vertió cuidadosamente sobre hielo y se realizaron repetidas extracciones con AcOEt. La fase orgánica, se lavó posteriormente con agua y solución sobresaturada de NaCl. El producto crudo se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró al vacío. Se obtuvieron 21.7 g del compuesto **142**. El producto sin caracterización se utilizó para la siguiente reacción.

#### 3.5.2.9 Obtención del bromuro del 3,5-dimetoxibenciltrifenilfosfonio (**143**).

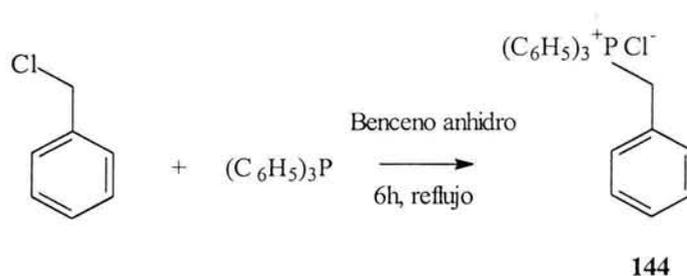


Esquema 18. Síntesis del compuesto **143**.

En un matraz bola de 500 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, condensador de agua y una trampa anhidra, se colocaron 21.7 g del producto **142** crudo en benceno seco (325 mL), y se agitó hasta completa disolución. Una vez terminada agitación, se adicionaron 27.08 g (0.103 mol) de trifetilfosfina, a la mezcla de reacción, la cual se reflujo con agitación durante 6 hr. Al cabo de este tiempo, se formó un precipitado blanco (**143**, 36 g, 95 % de rendimiento), el cual se separó por filtración al vacío y se lavó con éter de petróleo tibio en repetidas ocasiones. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3052, 2893, 2790, 1593, 1437, 1344, 1148, 1111  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ )  $\delta$  2.17 (2H, m, H-Bn); 3.52 (6H, s, OMe); 5.24 (2H, d, H-Bn); 6.3 (3H, m, H-Ar); 7.71 (15H, m, H-Ar). EMIE  $m/z$  412 (90), 262 (100), 183 (81).

### 3.5.2.10 Obtención del bromuro de benciltrifenilfosfonio (144)

En un matraz bola de 125 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, condensador de agua y una trampa anhidra, se colocaron 4.05 de cloruro de bencilo en benceno seco (50 mL), y se agitó hasta completa disolución. Una vez terminada agitación se le adicionaron 12.6 g (0.032 mol) de trifenilfosfina. La mezcla de reacción se agitó y se refluxó por 6 hr. De la mezcla de reacción precipitó espontáneamente un sólido blanco (11 g, 98 % de rendimiento), el cual se separó por filtración al vacío y se lavó con éter de petróleo tibio en repetidas ocasiones. El producto sin caracterización se utilizó para la siguiente reacción.



**Esquema 19.** Síntesis del compuesto **144**

### 3.5.3 Síntesis de Bibencilos

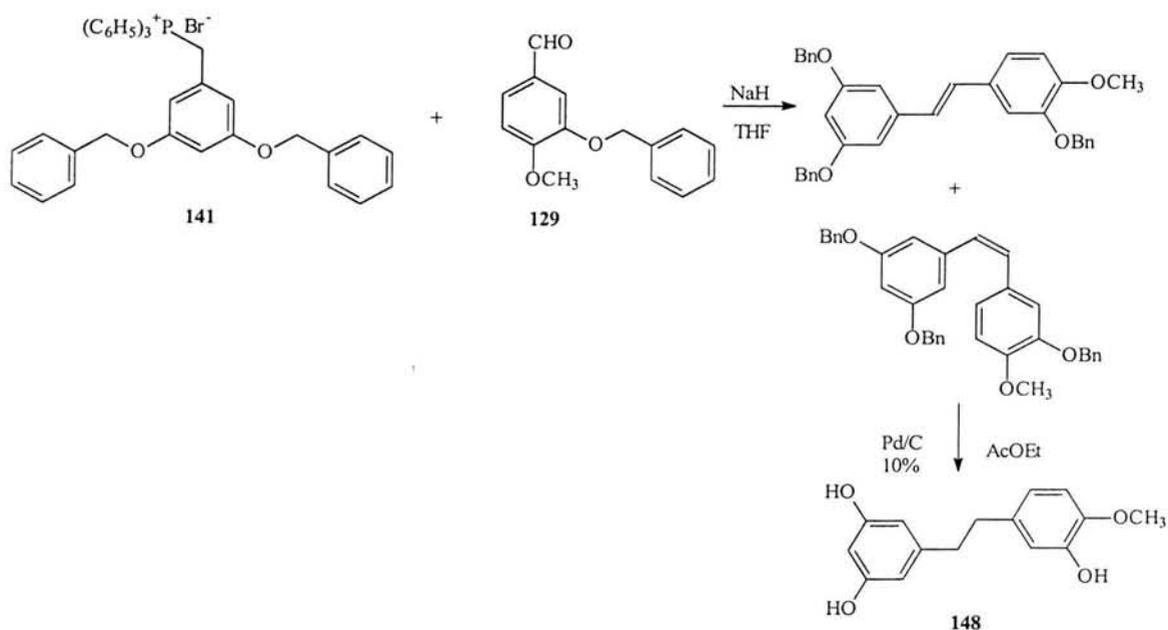
En esta sección se describe de manera general la síntesis completa del compuesto **148** y las reacciones semisintéticas empleadas para la obtención de los compuestos **148**. Posteriormente en el Cuadro 6, se resume las condiciones de reacción utilizadas para la obtención de los bibencilos **145-147,149**, **151-154**, **156** y **157**, así como los rendimientos correspondientes.

#### 3.5.3.1 4'-metoxi-3,3',5-trihidroxibibencilo (148)

En un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, embudo de adición y septum, bajo una atmósfera de  $N_2$  se colocaron 1 g (0.002 mol) del compuesto **141** en 15 ml de THF anhidro y NaH al 10% en aceite (0.0814 g, 0.002 mol) y se adicionó a la mezcla de reacción el compuesto **129** (0.0814 g, 0.002 mol). La mezcla de reacción se agitó continuamente por 30 min. Posteriormente se comprobó el consumo total de la materia prima por ccf y la mezcla se vertió cuidadosamente sobre hielo. La mezcla resultante se extrajo repetidamente con AcOEt y la fase orgánica se lavó posteriormente con agua y solución sobresaturada de NaCl. La mezcla se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se filtró y se concentró al vacío, para así,

### III. Sección Experimental

generar un aceite (1.4 g). El producto crudo de reacción se purificó empleando cromatografía en columna abierta usando como eluyente Hex:AcOEt (98:2). Este proceso permitió la obtención de 0.56 g de una mezcla de estilbenos (55 % de rendimiento). A continuación, en una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se colocó la mezcla de estilbenos, Pd/C al 10% y AcOEt. La botella se acopló al hidrogenador, se llenó con hidrógeno hasta 35-40 lb/in<sup>2</sup> y se succionó con vacío; finalmente se llenó con 60 lb/in<sup>2</sup> y se agitó, durante un lapso de 3 hr. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró con succión empleando doble papel filtro Whatman No. 2. El filtrado se llevó a sequedad a presión reducida en el rotaevaporador. El producto (**148**) se purificó por HPLC, en una columna  $\mu$ porasil, empleando como fase móvil un sistema de ternario de CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (98:1:1). El rendimiento fue de 0.22 g (27% de rendimiento). IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3350, 1600, 1590, 1450, 1320, 1295, 965 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)  $\delta$  8.10 (2H, s, intercambio con D<sub>2</sub>O, -OH), 7.40 (1H, s, intercambio con D<sub>2</sub>O, -OH), 6.81 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.72 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 6.63 (1H, dd,  $J = 8.1, 2.1$  Hz, H-6'), 6.22 (2H, d  $J = 2.4$ , Hz, H-2 y H-6), 6.18 (1H, dd,  $J = 2.4$ , Hz, H-4), 3.78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.71 (4H, m, H-7 y H-7'); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)  $\delta$  159.2 (C-3, C-5), 147.2 (C-4'), 146.5 (C-3'), 145.1 (C-1), 135.8 (C-1'), 120.0 (C-6'), 116.1 (C-2'), 112.4 (C-5'), 107.7 (C-2, C-6), 101.2 (C-4), 56.7 (-CH<sub>3</sub>O), 38.7 (C-7), 37.6 (C-7'); EMIE  $m/z$  260 [M<sup>+</sup>(100)].



Esquema 20. Síntesis del compuesto **148**

### 3.5.3.2 3,3',4',5-tetrahidroxibibencilo (150)

En una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se colocaron 50 mg de piceatanol, 0.5 mg de Pd/C al 10 % y 50 mL de AcOEt. La botella se acopló al hidrogenador e inicialmente se purgó la línea con hidrógeno (35-40 lb/in<sup>2</sup>) y se succionó con vacío; a continuación, la cámara se saturó de H<sub>2</sub> (40 lb/in<sup>2</sup>) y la mezcla se agitó durante un lapso de 1 hr. La mezcla de reacción se filtró con succión empleando doble papel filtro Whatman No. 2. El filtrado se llevó a sequedad a presión reducida en el rotaevaporador. El producto crudo se purificó por CLAR, en una columna  $\mu$ porasil, empleando como fase móvil un sistema de ternario de CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (98:1:1). Se obtuvieron 0.22 g del compuesto **150** (27% de rendimiento).

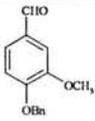
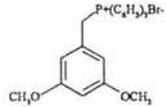
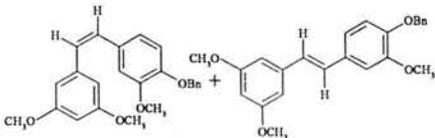
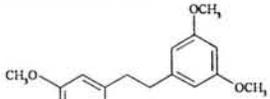
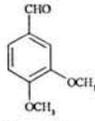
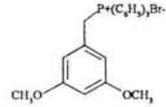
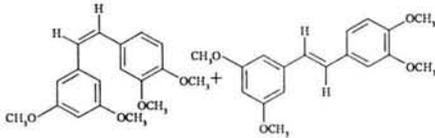
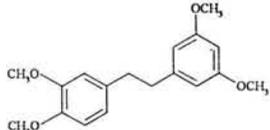
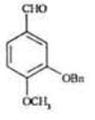
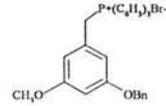
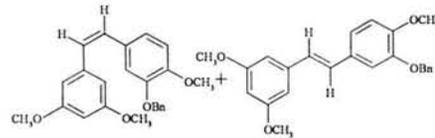
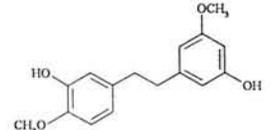
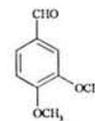
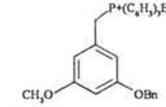
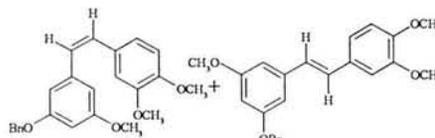
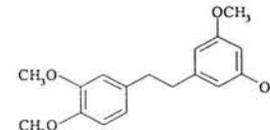
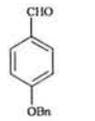
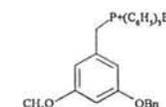
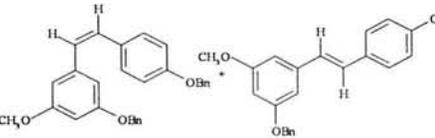
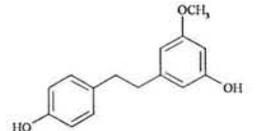
### 3.5.3.3 3,4',5-trihidroxibibencilo (155)

En una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se colocaron 25 mg de resveratrol, 0.25 mg de Pd/C al 10 % y 30 mL de AcOEt. La botella se acopló al hidrogenador e inicialmente se purgó la línea con hidrógeno (35-40 lb/in<sup>2</sup>) y se succionó con vacío. A continuación, la cámara se saturó de H<sub>2</sub> (40 lb/in<sup>2</sup>) y la mezcla se agitó durante un lapso de 1 hr. La mezcla de reacción se filtró con succión empleando doble papel filtro Whatman No. 2. El filtrado se llevó a sequedad a presión reducida en el rotaevaporador. El producto crudo se purificó por CLAR, en una columna  $\mu$ porasil, empleando como fase móvil un sistema de ternario de CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (90:5:5). Se obtuvieron 23 g del compuesto **155** (91% de rendimiento).

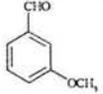
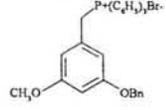
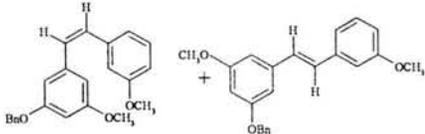
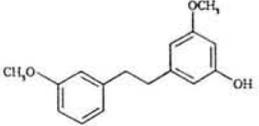
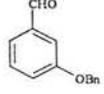
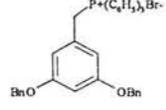
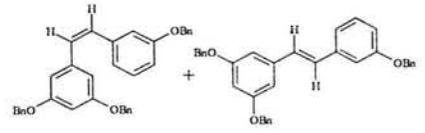
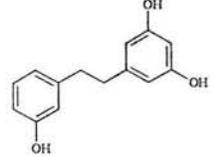
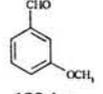
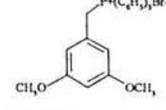
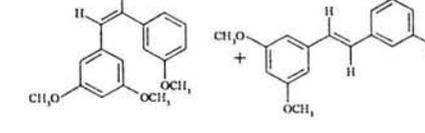
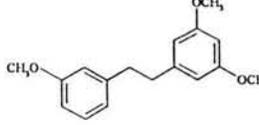
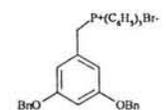
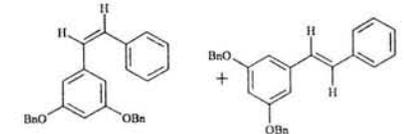
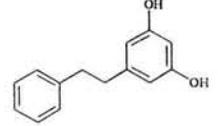
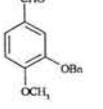
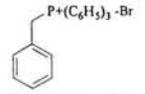
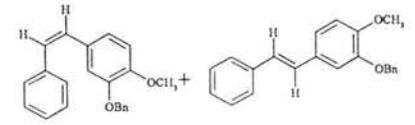
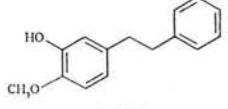
## 3.6 CÁLCULOS DE MODELADO MOLECULAR.

Las estructuras de mínima energía y la búsqueda conformacional para el compuesto **124** fueron generadas usando el campo de fuerza de MMFF94 del programa de modelaje molecular Spartan'02 (Wavefunction, Inc.), Irvine, CA.

Cuadro 6. Resumen de las condiciones de reacción empleadas para la obtención de los análogos sintéticos 145-147, 149, 151-154, 156 y 157.

ALDEHIDO	SAL DE FOSFONIO	ESTILBENOS	BIBENCILO	RENDIMIENTO (%)
 <p>128, 1 g, 0.002 <math>\mu</math>mol</p>	 <p>143, 0.53 g, 0.002 <math>\mu</math>mol</p>		 <p>145</p>	35
 <p>131, 1.1 g, 6.6 mmol</p>	 <p>143, 4.8 g, 8.66 mmol</p>		 <p>146</p>	38
 <p>129, 0.2 g, 8 <math>\mu</math>mol</p>	 <p>0.52 g 138, 1.07 <math>\mu</math>mol</p>		 <p>147</p>	45
 <p>131, 0.170 g, 1.0 <math>\mu</math>mol</p>	 <p>0.6 g 138, 1.2 <math>\mu</math>mol</p>		 <p>149</p>	39
 <p>25, 0.053 g, 1 <math>\mu</math>mol</p>	 <p>138, 0.65, 1.3 <math>\mu</math>mol</p>		 <p>151</p>	27

**Cuadro 6.** Resumen de las condiciones de reacción empleadas para la obtención de los análogos sintéticos **145-147**, **149**, **151-154**, **156** y **157**.

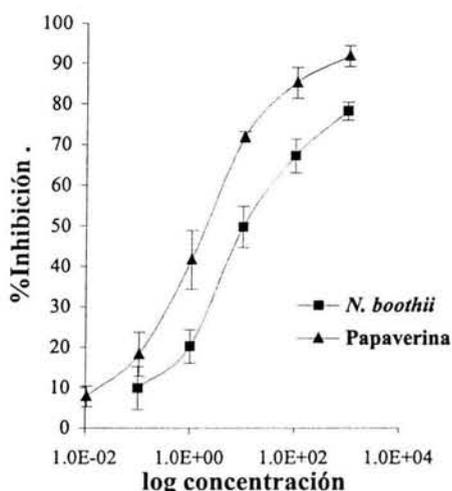
ALDEHIDO	SAL DE FOSFONIO	ESTILBENOS	BIBENCIOLO	RENDIMIENTO (%)
 <b>133</b> , 0.150 g 1 μmol	 <b>138</b> , 0.650 g 1.3 μmol		 <b>152</b>	75
 <b>134</b> , 0.336 g 1.6 μmol	 <b>141</b> , 1.166 g 2 μmol		 <b>153</b>	34
 <b>133</b> , 1 g 2.4 μmol	 <b>143</b> , 0.329 g, 2.4 μmol		 <b>154</b>	60.9
 <b>132</b> , 0.05 g, 0.09 μmol	 <b>141</b> , 0.64 g, 0.011 μmol		 <b>156</b>	41
 <b>129</b> , 0.329 g, 2.4 μmol	 <b>144</b> , 0.230 g, 0.65 μmol		 <b>157</b>	58

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 SELECCIÓN DE LA ESPECIE *Nidema boothii* COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE PRINCIPIOS ESPASMOLÍTICOS

La preselección de la especie *Nidema boothii* se realizó con base en el criterio quimiotaxonómico, debido a que estudios anteriores realizados con otras especies de orquídeas (*S. livida* y *M. densa*) permitieron el descubrimiento de compuestos espasmolíticos (Estrada *et al.*, 1999a, 1999b, 2000). Este criterio constituye uno de los de mayor importancia para la selección de materias primas destinadas al descubrimiento de sustancias con actividad biológica (Cutler, 1999).

Una vez que se efectuó la selección primaria, el siguiente paso consistió en determinar el efecto de los extractos sobre la contracción espontánea del íleon de cobayo. Los resultados permitieron determinar que el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1) de *N. boothii* induce una relajación significativa de las contracciones espontáneas del íleon de cobayo, y como se puede observar en la Figura 11, este efecto fue dependiente de la concentración. La CI<sub>50</sub> del extracto fue 6.2620±2.5 µg/mL. Con base en este resultado, se estableció que la especie *Nidema boothii* representaba una fuente apropiada para la obtención de compuestos con actividad espasmolítica.



**Figura 11.** Curva concentración-respuesta del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1) de *Nidema boothii* (CI<sub>50</sub>=6.26±2.5 µg/mL).

#### 4.2 OBTENCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ESPASMOLÍTICOS DE *Nidema boothii*.

Para la obtención de los compuestos activos de *N. boothii* se preparó un extracto en mediana escala a partir de 2 kg de material vegetal seco y molido. El fraccionamiento biodirigido del extracto permitió el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios que se indican en la Figura 12 y que incluyen a la nidemona (**124**, 4 mg), el aloifol II (**5**, 22 mg), el 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**125**, 25 mg), del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (**16**, 8 mg), la efemerantoquinona (**126**, 5.7 mg), el gigantol (**2**, 32 mg), el efemerantol B (**127**, 4 mg), el 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**15**, 3 mg); la lusiantridina (**11**, 55 mg) y la batatasina (**14**, 19 mg). De manera adicional, de algunas fracciones inactivas cristalizaron espontáneamente el triterpenoide nidemina (**122**), y el flavonoide C-glucosilado vitexina (**123**).

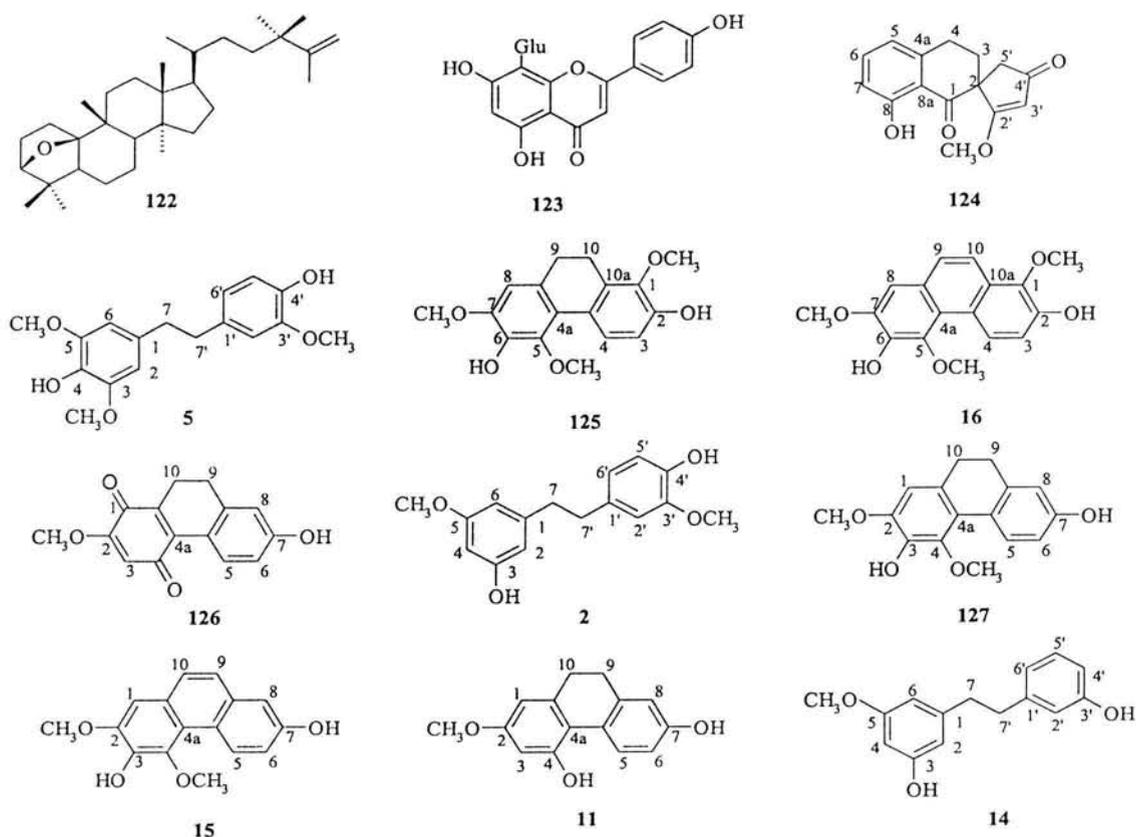


Figura 12. Compuestos aislados de la especie *Nidema boothii*

### 4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS NOVEDOSOS AISLADOS DE *Nidema boothii*.

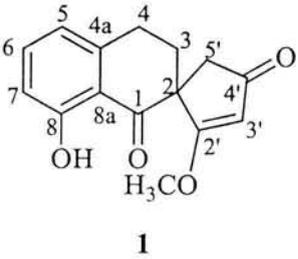
La elucidación estructural de los compuestos aislados de la orquídea se realizó mediante diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas. De los 13 compuestos aislados, los estilbenoides **124** y **125** constituyen metabolitos secundarios novedosos, por lo que en esta sección se discutirá en detalle la caracterización de estos productos. Los espectros de los compuestos restantes se incluyen en el Apéndice 1 y en todos los casos sus datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en la literatura: [**5** (Min *et al.*, 1987); **16** (Estrada *et al.*, 1999a); **126** (Jujena *et al.*, 1987); **2** (Estrada *et al.*, 1999a), **127** (Tezuka *et al.*, 1991); **15** (Tuchinda *et al.*, 1998); **11** (Majumder y Lahiri, 1990); **14** (Hashimoto *et al.*, 1974); vitexina (**123**) (Wollenweber y Dietz, 1981) y nidemina (**122**) (Estrada *et al.*, 2002)].

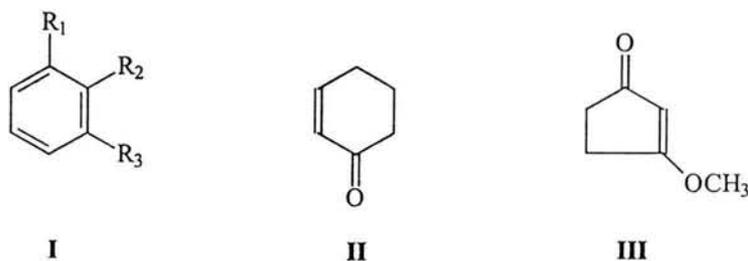
#### 4.3.1 Elucidación estructural de la nidemona (**124**)

El compuesto **124** se aisló como un sólido vítreo de color amarillo, ópticamente activo. El espectro de masas de alta resolución permitió establecer una fórmula molecular de C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>, la cual permite un índice de deficiencia de hidrógeno de nueve. En el Cuadro 7 se resumen las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de **124**.

El análisis detallado de sus espectros de RMN permite establecer las estructuras parciales **I-III** que se indican en la Figura 13.

**Cuadro 7.** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la nidemona (**124**).

 <p style="text-align: center;"><b>1</b></p>	<p>Sólido vítreo color amarillo</p> <p><math>[\alpha]_D^{25}:-114</math> (c 1.6, MeOH)</p> <p><b>CD (MeOH) <math>\Delta\epsilon</math> (nm)</b> <math>-1.96 \times 10^6</math> (221), <math>-6 \times 10^5</math> (246), <math>9.3 \times 10^5</math> (265), <math>-1 \times 10^6</math> (290), <math>-6 \times 10^5</math> (326)</p> <p><b>UV (MeOH): <math>\lambda_{max}</math> (log <math>\epsilon</math>)</b> 343 (3.54), 296 (3.10), 226 (4.30)</p> <p><b>IR (KBr): <math>\nu_{max}</math></b> 1692, 1626, 1596, 1452, 1420, 1358, 1158, 992 <math>\text{cm}^{-1}</math></p> <p><b>EIMS: <math>m/z</math> (int. rel.)</b> 258 [<math>M^+</math>(78)], 241 (12), 229 (10), 226 (15), 215 (30), 186 (100), 173 (13), 134 (14)</p>
---	--



**Figura 13.** Estructuras parciales de la nidemona

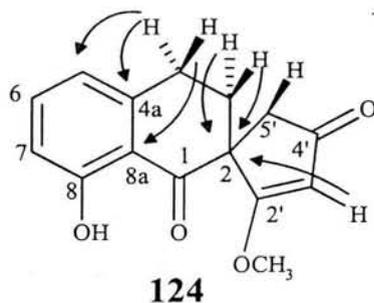
La primera de las estructuras parciales corresponde a un anillo bencénico trisustituido, ya que en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se aprecia en la zona de protones aromáticos un sistema ABC: en  $\delta_{\text{H}}$  6.80 (dddd, 8.4, 1.9, 0.6, 0.6, H-5); 7.39 (ddd, 8.3, 7.5, 0.6, H-6) y 6.72 (ddd, 7.4, 1.9, 1.2, H-7). Estas señales correlacionan con las observadas en  $\delta_{\text{C}}$  118.9 (C-5), 137.0 (C-6) y 115.8 (C-7), respectivamente en el espectro HETCOR. De manera adicional, se observa una señal en  $\delta_{\text{H}}$  12.23 que corresponde a un grupo hidroxilo fenólico quelatado.

La segunda estructura parcial se estableció como la de una ciclohexenona con base en el análisis del espectro HMBC (ver Cuadro 8). La banda de absorción observada en  $1692\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de IR y la señal en  $\delta_{\text{C}}$  202.7 en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , atribuibles a una cetona conjugada, apoyaron esta propuesta.

La tercera estructura parcial consiste en una ciclopentanona ( $\delta_{\text{C}}$  202.3) con un doble enlace conjugado altamente polarizado ( $\delta_{\text{C}}$  189.6 y 101.9), y un grupo metoxilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.91 y  $\delta_{\text{C}}$  59.1). El carbono vinílico a campo más alto ( $\delta_{\text{C}}$  101.9) está asociado con un protón en  $\delta_{\text{H}}$  5.27 (H-3'), mientras que el otro, a campo más bajo ( $\delta_{\text{C}}$  189.6), se encuentra unido al grupo metoxilo. Todas estas evidencias definieron al sistema conjugado como vinílogo de un éster metílico de un ácido carboxílico, lo que explica la alta polarización del doble enlace (Furness *et al.*, 1999; Demir y Sesenoglu, 2002).

La conexión de estas tres estructuras parciales se hizo con base en el análisis del cuadro de correlaciones observadas en el espectro HMBC (ver el Cuadro 8 y la Figura 14). Así, las correlaciones observadas entre los hidrógenos metilénicos de C-4 y los carbonos aromáticos en  $\delta_{\text{C}}$  118.9 (C-5), 145.4 (C-4a) y 116.4 (C-8a) indican claramente que el anillo de la ciclohexenona se encuentra fusionado con el anillo bencénico. De manera similar, las correlaciones a larga distancia de las señales en  $\delta_{\text{H}}$

2.47 (H-3A), 2.20 (H-3B), 5.20 (H-3'), 2.48 (H-5'B) y 3.29 (H-5'A) con la señal en  $\delta_C$  59.2 (C-2/1'), conectan el anillo de la ciclohexenona con el sistema de la ciclopentenona a través de un carbono espiro.

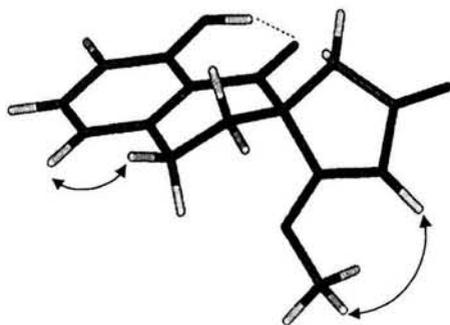


**Figura 14.** Correlaciones importantes observadas en el espectro bidimensional de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC del compuesto (**124**)

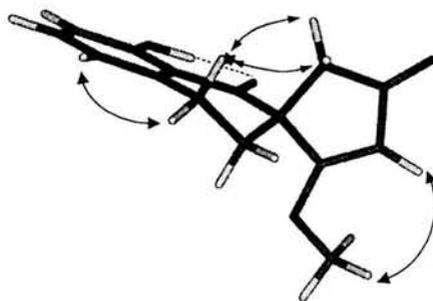
**Cuadro 8.** Correlaciones observadas en los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC y RMN  $^1\text{H}$ -NOESY del compuesto (**124**) en  $\text{CDCl}_3$ .

C/H no	$\delta_{\text{H}}^a$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}^b$	HMBC <sup>c</sup>	NOESY
1	-	207.7	3, 5'	-
2	-	59.2	3, 4, 3', 5'	-
3A	2.47 ddd (14, 7.4, 4.0)	25.6	4, 5'	3B, 4A, 4B, 5'A
3B	2.20 ddd (13.8, 9.3, 4.8)			3A, 4A, 4B
4B	3.48 brddd (16.7, 9.4, 5.0)	32.1	3, 5	3A, 3B, 4A, 5
4A	2.87 ddd (16.8, 5.8, 5.8)			3A, 3B, 4B, 5'A, 5'B
4a	-	145.4	3, 4, 6	-
5	6.72 brdd (7.5, 1)	118.9	3, 4, 7	4A, 4B
6	7.39 dd (7.5, 7.5)	137.0	5, 7	5, 7
7	6.80 dd (7.5, 1)	115.8	5, 6	6
8	-	163.4	6	-
8a	-	116.4	5, 7	-
2'	-	189.6	3, 3', 5', -OCH <sub>3</sub>	-
3'	5.27 t (1.2)	101.9	5'	-OCH <sub>3</sub>
4'	-	202.3	3', 5'	-
5'A	3.29 dd (17.5, 1.5)	39.7	3, 3'	3A, 4A, 5'B
5'B	2.48 dd (17.5, 1.5)			4A, 5'A
-OCH <sub>3</sub>	3.91 s	59.1	-	3'
-OH-8	12.23 d (0.6)	-	-	-

Con la finalidad de analizar con mayor detalle esta propuesta estructural y corroborar las correlaciones observadas en el espectro NOESY (ver Figura 16), se realizó la búsqueda conformacional sistemática para el compuesto **124** empleando el programa de modelado molecular Spartan'02. Los cálculos de mecánica molecular revelaron dos conformaciones de mínima energía (**124a** y **124b**), representadas en la Figura 15, con  $E_{\text{MMX}}=39.38$  y  $39.96$  kcal/mol, respectivamente.



124a



124b

**Figura 15.** Estructuras de mínima energía de la nidemona (**124**) donde se ilustran las correlaciones NOESY más relevantes.

En la estructura **124b** el anillo de seis miembros adopta una conformación de sobre, y se observa que las distancias interatómicas entre H4A-H5'A y H4A-H5'B son 2.4084 y 3.1162 Å, respectivamente; estos resultados son consistentes con las fuertes correlaciones NOESY observadas entre H4A-H5'A y H4A-H5'B (Cuadro 8) y apoyan la propuesta estructural para el compuesto **124**.

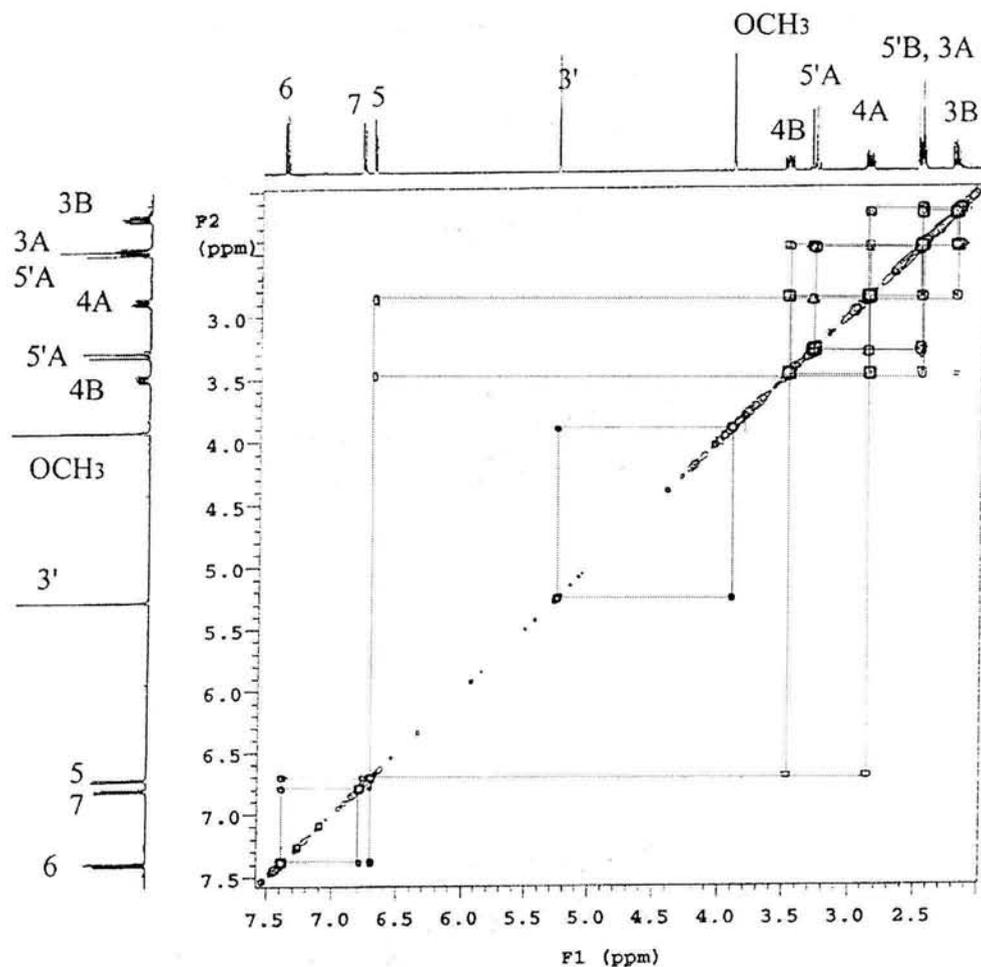
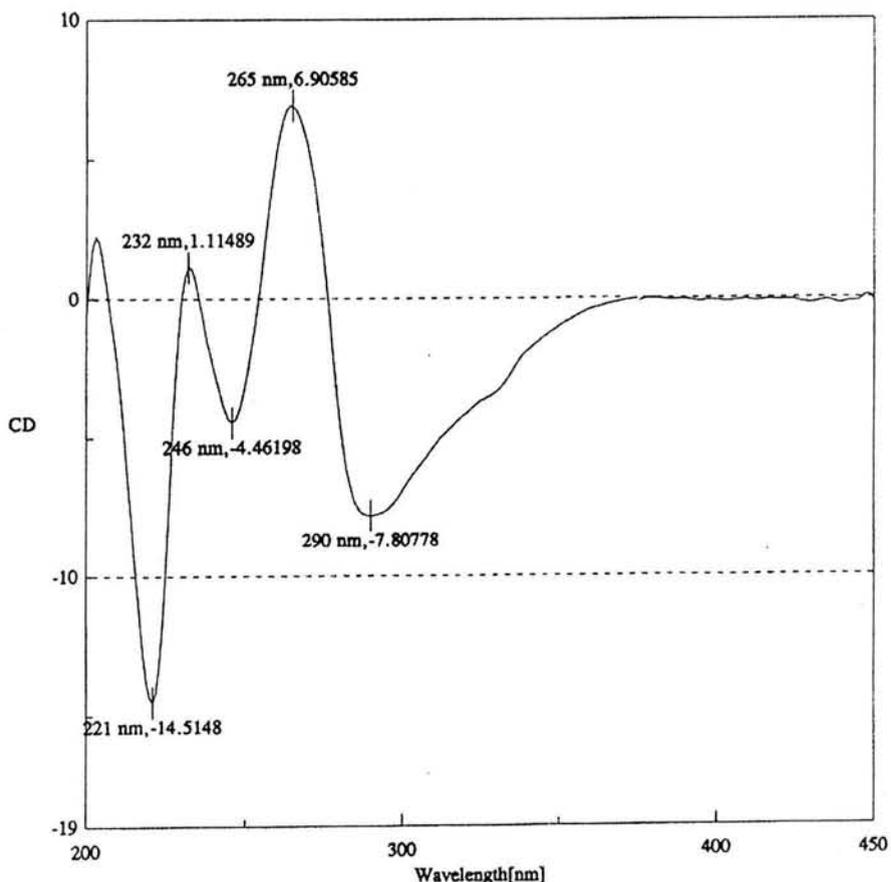


Figura 16. Espectro de RMN  $^1\text{H}$ -NOESY del compuesto 124.

El último paso en la elucidación estructural de la nidemona fue la determinación de la configuración absoluta con base en el análisis de los datos de dicroísmo circular de este compuesto. Los espectros de dicroísmo circular de cetonas  $\alpha$ - $\beta$  insaturadas (incluyendo los de cetonas aromáticas), presentan de tres a cuatro efectos Cotton entre 185 y 360 nm (Lightner y Gurst, 2000). De esta manera, la banda de absorción débil en la región de 320-350 nm corresponde al grupo carbonilo de las cetonas y se debe a la excitación  $n \rightarrow \pi^*$  (banda R). Alrededor de 230 nm se observa una banda que corresponde a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  (banda K), y enseguida una segunda banda traslapándose con la anterior que cae en la región de 200-220 nm (ver Figura 17).



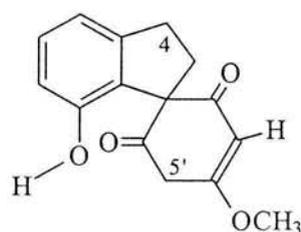
**Figura 17.** Espectro de dicroísmo circular del compuesto **124**

Finalmente se observa una banda de absorción más energética en 188 nm correspondiente a una transición  $n \rightarrow \sigma^*$  (Lightner y Gurst, 2000). Las dos primeras bandas son las más importantes en la determinación de la estereoquímica absoluta, en particular cuando la molécula posee un cromóforo inherentemente disimétrico, como es el caso del compuesto **124**.

El cromóforo  $C=C-C=O$  en el sistema de la ciclopentenona, no es planar, y de acuerdo a la regla de helicidad de Sneath: “Una ciclopentenona posee una helicidad (-) si el espectro de dicroísmo circular despliega un efecto Cotton (+) para la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  y un efecto Cotton (-) para la transición  $n \rightarrow \pi^*$  (Lightner y Gurst, 2000; Sneath, 1965). De esta manera el espectro de dicroísmo circular del compuesto **124** exhibió un efecto Cotton (+)

alrededor de 265 nm y un efecto Cotton (-) en 320 nm, lo cual correlaciona con una helicidad (-), por lo tanto posee una estereoquímica absoluta S en C-2.

Durante el proceso de caracterización de la nidemona, se propuso otra alternativa estructural **158** (ver Figura 18), misma que se descartó, entre otros argumentos, con base en el análisis de las distancias interatómicas observadas en los distintos conformeros para el compuesto **158**, obtenidos mediante cálculos de mecánica molecular.



**158**

**Figura 18.** Alternativa estructural para el compuesto **124**.

El estudio conformacional obtenido mediante los cálculos de mecánica molecular para la estructura alterna de la nidemona, dio como resultado seis conformaciones de mínima energía, las cuales se muestran en la Figura 19. En el Cuadro 9, se indican los datos de las distancias interatómicas entre los protones bencílicos (H4) y los protones del metileno  $\alpha$  al doble enlace (H5'), para cada uno de los conformeros obtenidos. En todos los casos, las distancias intramoleculares son mayores a 5 Å, por lo que no es posible observar un efecto nuclear Overhauser entre estos hidrógenos. Para observar este efecto, la distancia máxima entre los núcleos no debe exceder de 4 Å (Lambert, *et al.*, 1998). En consecuencia, se descartó la estructura **158**.

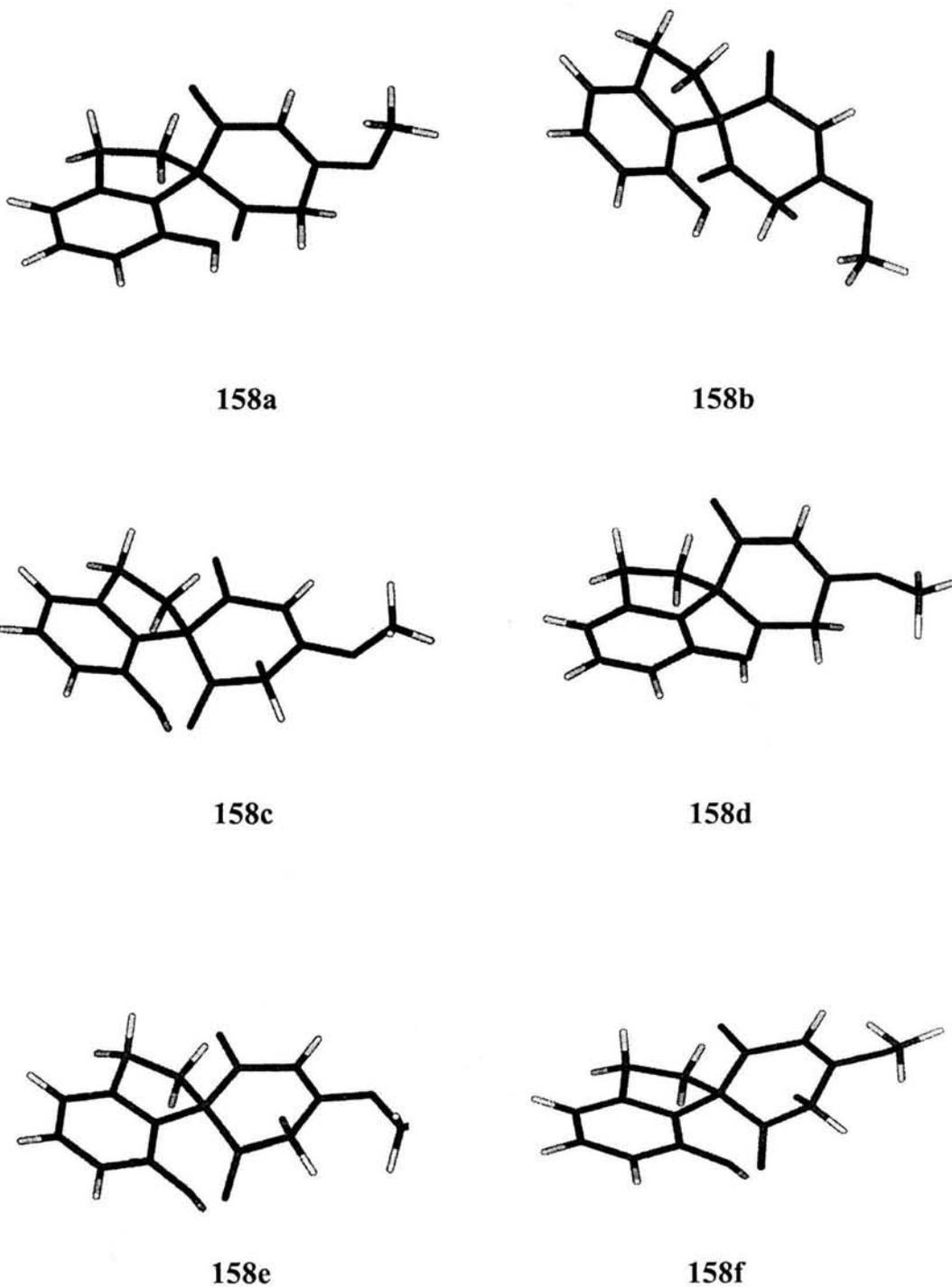


Figura 19. Estructuras de mínima energía para la estructura alterna 158

**Cuadro 9.** Distancias interatómicas entre los protones H4 y H5' para los conformeros de mínima energía de la alternativa estructural **158**.

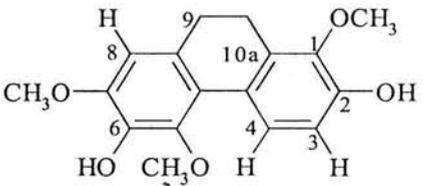
Conformero	Energía Kcal/mol	Distancia interatómica (Å)			
		H4-A, H5'A	H4-A, H5'B	H4-B, H5'A	H4-B, H5'B
<b>158a</b>	41.0591	6.3444	6.4550	6.1803	6.3477
<b>158b</b>	42.3942	6.1575	6.3695	6.3202	6.4611
<b>158c</b>	42.7462	6.1811	5.0198	6.2643	5.0255
<b>158d</b>	43.1347	6.2173	6.2985	6.3787	6.4343
<b>158e</b>	44.9730	6.1875	5.0250	6.2692	5.0313
<b>158f</b>	45.0061	6.1863	5.0455	6.2794	5.0367

#### 4.3.2 Elucidación estructural del compuesto 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**125**)

El compuesto **125** se aisló como un sólido vítreo café. La fórmula molecular del compuesto se estableció como C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub> mediante espectrometría de masas y por el espectro de RMN <sup>13</sup>C. En el Cuadro 10 se resumen sus constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas.

Esta información indica que el compuesto **125** difiere del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (**16**) por 2 unidades de masa. El espectro de RMN <sup>1</sup>H mostró las señales características de los 9,10-dihidrofenantrenos (Leung *et al.*, 1999) y permitió evidenciar que este compuesto era el 9,10-dihidroderivado del compuesto **16**.

**Cuadro 10.** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**125**).

 <p style="text-align: center;"><b>125</b></p>	<p>Sólido vítreo color café</p> <p><b>UV (MeOH):</b> <math>\lambda_{\max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 265 (3.42), 279 (3.30), 300 (2.44).</p> <p><b>IR (KBr):</b> <math>\nu_{\max}</math> 3407, 2928, 1614, 1580, 1503, 1480, 1458, 1363, 1213, 1104, 1047, 995 cm<sup>-1</sup>.</p> <p><b>EIMS:</b> <math>m/z</math> (rel. int.) 302 [M<sup>+</sup>(100)], 287 (15), 255 (23), 244 (5).</p>
---	---

Las diferencias más obvias entre los espectros de RMN (ver Cuadro 11) de los dos compuestos fueron la presencia de dos señales para los metilenos C9 y C10 [ $\delta_H/\delta_C$  2.8 (2H, m, H-10)/22.5 (C-10) y 2.69 (2H, m, H-9)/29.4 (C-9)], en lugar de las señales aromáticas en  $\delta_H/\delta_C$  7.82 (1H, d, H-10)/117.9 (C-10) y 7.63 (1H, d, H-9)/127.4 (C-9).

En el Cuadro 12 y la Figura 20, se resumen las correlaciones más importantes observadas en el espectro bidimensional NOESY. El análisis de los mismos permitió corroborar que el compuesto **125** es el del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno.

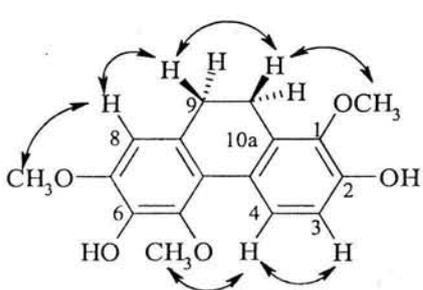
**Cuadro 11.** Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN- $^1\text{H}$  para el 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**125**) y el 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (**16**) aislados de *Nidema boothii*.

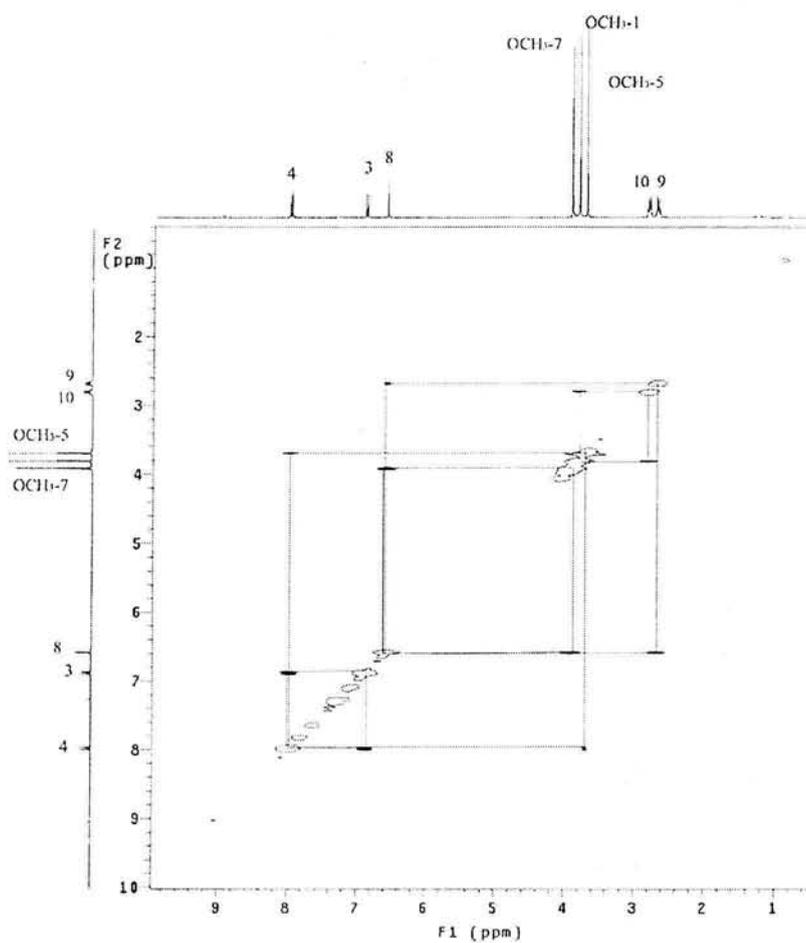
C/H no	Compuesto			
	$^{125}\delta_H^a$ (J en Hz)	$^{125}\delta_C^b$	$^{16}\delta_H^a$ (J en Hz)	$^{16}\delta_C^b$
1		147.3		140.8
2		143.6		145.6
3	6.88 d (1H, 8.7)	113.1	7.30 d (1H, 9.3)	116.0
4	7.98 d (1H, 8.7)	123.9	9.16 d (1H, 9.0)	124.0
4a		130.0		124.2
4b		117.9		119.0
5		144.8		144.0
6		125.8		139.3
7		145.8		146.8
8	6.59 s(1H)	106.8	7.09 s(1H)	104.9
8a		137.6		126.5
9	2.69 m,(2H)	29.4	7.63 d (1H, 8.7)	127.4
10	2.8 m (2H)	22.5	7.82 d (1H, 9.0)	117.9
10a		129.0		125.7
-OH-2	9* s (1H)		5.78*s (1H)	
-OH-6	9.08* s (1H)		6.00*s (1H)	
-OCH <sub>3</sub> -1	3.81 s (3H)	60.7	3.98 s (3H)	61.9
-OCH <sub>3</sub> -5	3.7 s (3H)	60	3.95 s (3H)	59.8
-OCH <sub>3</sub> -7	3.92 s (3H)	56	4.05 s (3H)	56.1

\*Señales intercambiables con D<sub>2</sub>O.

IV. Resultados y Discusión

**Cuadro 12.** Correlaciones observadas en el espectro RMN  $^1\text{H}$ -NOESY del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihydrofenantreno (**125**).

Compuesto	Protón	NOESY (Correlaciones $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )
 <p style="text-align: center;"><b>125</b></p>	3	H-4
	4	H-3, OCH <sub>3</sub> -5
	8	H-9, OCH <sub>3</sub> -7
	9	H-8, H-9', H-10
	10	OCH <sub>3</sub> -1, H-9, H-10'
	-OCH <sub>3</sub> -5	H-4
	-OCH <sub>3</sub> -7	H-8
	-OCH <sub>3</sub> -1	H-10



**Figura 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$ -NOESY del compuesto **125**

En los cuadros 13 y 14 se incluyen los datos espectroscópicos del resto de los fenantrenos, y dihidrofenantrenos aislados de *Nidema boothii*, de tal forma que todos los datos generados en esta tesis puedan ser utilizados para fines comparativos.

**Cuadro 13.** Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN-<sup>1</sup>H para los fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos aislados de *Nidema boothii*

Protón	Compuesto			
	11	15	126	127
H-1	6.42 d (1H, 2.5)	7.07 s (1H)		6.57 s (1H)
H-3	6.34 d (1H, 2.5)		5.92 s (1H)	
H-5	7.94 d (1H, 9.3)	9.33 d (1H, 9.0)	7.96 d (1H, 9.3)	8.16 d (1H, 8)
H-6	6.75 dd (1H, 9.25, 3.0)	7.18 dd (1H, 9.0, 3.0)	6.77 m (1H, 2.5)	6.74 dd (1H, 8, 3)
H-8	6.74 d (1H, 3.0)	7.21 d (1H, 3.0)	6.77 m (1H, 2.5)	6.71 d (1H, 3)
H-9	2.72 m (2H)	7.57 d(1H, 9.0)	2.73 m (2H)	2.72 m (2H)
H-10	2.72 m (2H)	7.48 d(1H, 9.0)	2.61 m (2H)	2.72 m (2H)
OH-3		5.98 s (1H)		5.58 s (1H)
OH-7	4.85 s (1H)	5.0 sa(1H)		4.8 s (1H)
OCH <sub>3</sub> -2	3.79 s (3H)	4.05 s (3H)	3.85 s(3H)	3.91 s (3H)
OCH <sub>3</sub> -3				
OCH <sub>3</sub> -4		3.95 s (3H)		3.70 s (3H)
OCH <sub>3</sub> -7				

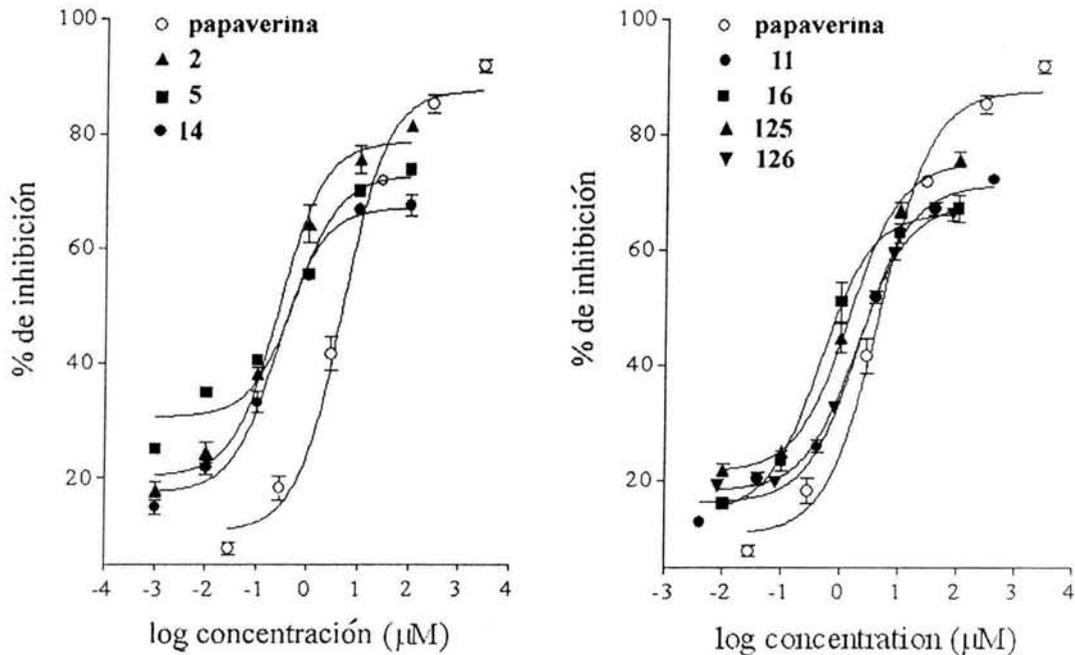
**Cuadro 14.** Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN-<sup>13</sup>C para los fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos aislados de *Nidema boothii*.

Carbono	Compuesto		
	11	15	127
1	106	104.8	102.8
2	158.1	146.6	149.2
3	100.1	139.2	133.4
4	153.3	143.9	146.3
4a	114.8	118.9	114.5
4b	125.4	123.7	123.8
5	127.2	128.5	128.1
6	115.1	116.3	112.6
7	153.7	153.5	153.9
8	113.2	111.6	114.0
8a	140.9	126.0	138.3
9	30.5	127.4	29.8
10	29.9	124.9	29.8
10a	141.1	133.7	133.8
OCH <sub>3</sub> -1		56.1	55.2
OCH <sub>3</sub> -7	55.3	59.8	60.3

#### 4.4 EVALUACION DEL POTENCIAL ESPASMOLÍTICO DE LOS METABOLITOS AISLADOS DE *Nidema boothii*.

El potencial espasmolítico de los metabolitos secundarios aislados a partir de las fracciones activas de *Nidema boothii*, se determinó mediante la evaluación de su efecto sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. En la Figura 21 se muestran las curvas dosis-respuesta de los compuestos **2**, **5**, **11**, **14**, **16**, **125** y **126**. En

general todos los compuestos mostraron un efecto espasmolítico significativo, dependiente de la concentración.



**Figura 21.** Curvas concentración respuesta que muestra el efecto relajante de los compuestos **2**, **5**, **11**, **14**, **16**, **125** y **126** aislados de la especie *Nidema boothii*.

En el Cuadro 15 se indican el efecto máximo ( $E_{max}$ ), la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) y la potencia de cada uno de los compuestos aislados *Nidema boothii*. Todos los compuestos evaluados fueron más potentes que el extracto crudo ( $CI_{50} = 6.26 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$ ) y que la papaverina ( $CI_{50} = 4.23 \pm 0.68 \mu\text{M}$ ). Los compuestos **14** ( $CI_{50} = 0.24 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ), **2** ( $CI_{50} = 0.26 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ), **11** ( $CI_{50} = 0.41 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ) y **16** ( $CI_{50} = 0.45 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ), fueron los más potentes. No fue posible evaluar los compuestos **15**, **124** y **127** debido a que la poca cantidad de muestra obtenida.

**Cuadro 15.** Inhibición de la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo mostrada por los compuestos aislados de *Nidema boothii*.

Compuesto	E <sub>max</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)	Potencia relativa a la papaverina
<b>2</b>	81.30±1.84	0.26±0.10	16.26
<b>5</b>	73.63±1.18	0.56±0.20	7.65
<b>11</b>	72.27±1.49	0.41±0.03	10.31
<b>14</b>	67.5±4.76	0.24±0.11	17.62
<b>16</b>	67.23±5.53	0.45±0.027	9.40
<b>125</b>	66.30±2.645	2.23±0.038	1.89
<b>126</b>	75.59±3.19	1.24±0.055	3.41
<b>Papaverina</b>	91.76±2.65	4.23±0.68	1

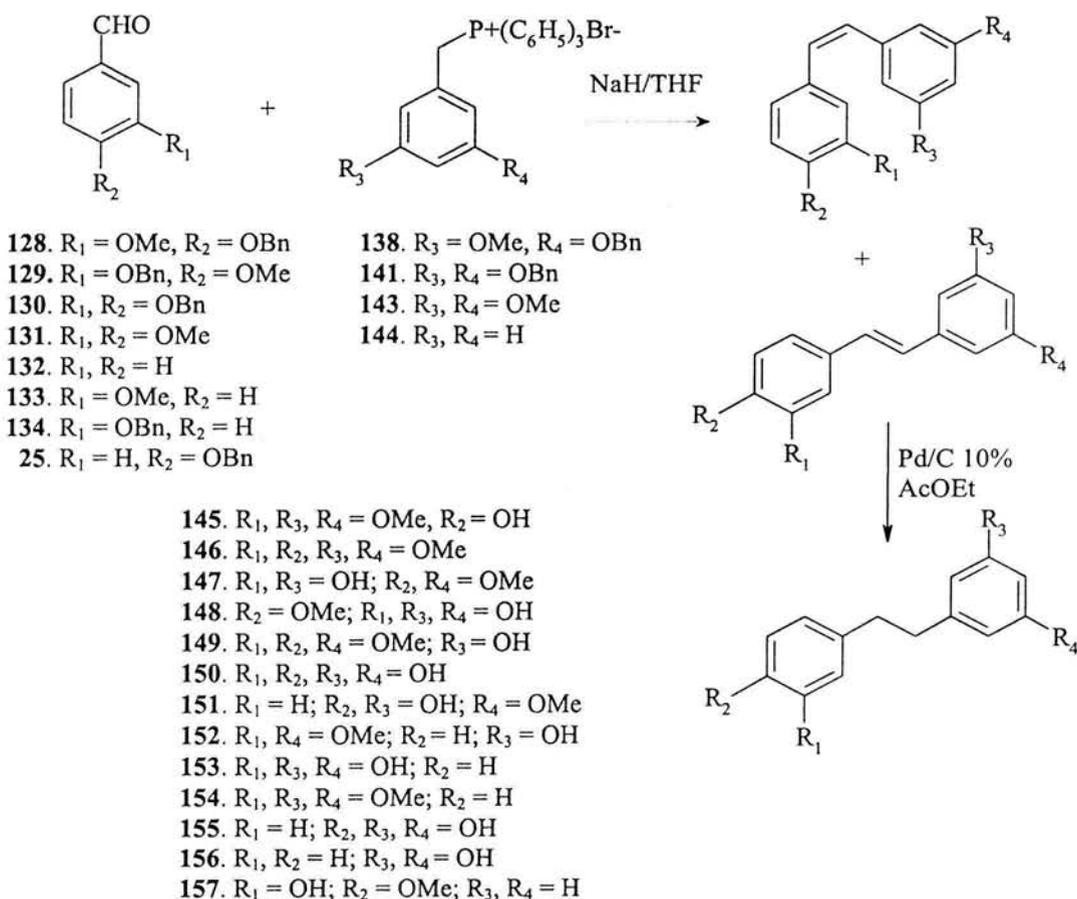
Los valores están expresados en medias ± E.E.M; n=6; p<0.05. La potencia fue obtenida por la CI<sub>50</sub> (μM) de la papaverina/ CI<sub>50</sub> (μM) del compuesto, asumiéndose un valor de 1.00 para la papaverina. E<sub>max</sub> indica el porcentaje de máxima inhibición.

#### 4.5 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ANÁLOGOS DE LOS BIBENCILOS GIGANTOL (2) Y BATATASINA III (14)

Los compuestos **145-157**, análogos de los bibencilos **2** y **14** se sintetizaron, con la finalidad de estudiar la influencia de la naturaleza y posición de los sustituyentes en los anillos A y B (fenol vs éter metílico de fenol) en la actividad espasmolítica. Con excepción de los productos **150** y **155** los demás bibencilos se sintetizaron aplicando la reacción de Wittig. Aunque en el Esquema 4 se indica el esquema general de reacción de los compuestos sintetizados (**145-157**), éste se repetirá a continuación con la finalidad de facilitar la discusión de los resultados.

Los compuestos **150** y **155** se sintetizaron por reducción catalítica del resveratrol y piceatanol, respectivamente. La síntesis de los bibencilos **145**, **147**, **150** y **151** (Crombie y Jamieson, 1982) se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente en la literatura, y sus datos espectroscópicos fueron idénticos a los reportados anteriormente.

La síntesis del compuesto **153** se reporta por vez primera; este producto se aisló previamente de la orquídea *Dendrobium plicatile*. Los compuestos **147** (Crombie y Jamieson, 1982), **149** (Tezuka *et al.*, 1991), **150** (Inamori *et al.*, 1991), **151** (Crombie y Jamieson, 1982), **152** (Sachdev y Kulshreshdtha, 1986) y **155** (El-Feraly, 1984) también se han aislado de fuentes naturales, mientras que los compuestos **148** y **154** se obtuvieron previamente por reducción catalítica de la rapontigenina y metilación de la *O* metilbatatasina III, respectivamente (Honda, 2001; Sachdev y Kulshreshdtha, 1986). La síntesis de los compuestos **156** y **157** también se describió con anterioridad (Asakawa *et al.*, 1991; Takasugi *et al.*, 1987 y Scheline, 1974).



**Esquema 4.** Esquema general de la síntesis de los compuestos análogos (**145-157**) del gigantol (**2**) y la batasina III (**14**).

#### IV. Resultados y Discusión

En los Cuadros 16 y 17 se incluyen los datos espectroscópicos de los bibencilos aislados de *Nidema boothii* y de los análogos sintéticos, de tal forma que todos los datos generados en esta tesis puedan ser utilizados para fines comparativos.

**Cuadro 16.** Desplazamiento químico (ppm) obtenidos en RMN-<sup>1</sup>H para los bibencilos aislados de *Nidema boothii* y los análogos sintéticos

<sup>1</sup> H POSICION	COMPUESTO				
	2	5	14	145	146
2	6.24 m, 1.8	6.38, s	6.25 m	6.32 d, 2.1	6.34 d, 2.1
4	6.24 m, 1.8		6.25 m	6.31 dd, 2.1, 2.1	6.31 dd, 2.1, 2.1
6	6.34 d, 1.8	6.38, s	6.31 dd	6.34 d, 2.1	6.34 d, 2.1
7	2.82 s	2.81, s	2.83 m	2.831 m	2.849 m
2'	6.62 d, 2	6.61, d, 2.1		6.64 d, 1.8	6.64 d, 1.8
4'			6.65 dd		
5'	6.8 d, 8.2	6.81, d, 8.1	7.13 t	6.8 d, 7.8	6.8 d, 8.1
6'	6.68 dd, 8.2, 2	6.68, dd, 8.1, 2.1	6.74 d	6.7 dd, 7.8, 1.8	6.71 dd, 8.1, 1.8
7'	2.82 m	2.81, s	2.83 m	2.831 m	2.849 m
-OMe-3		3.85, s		3.76 s	3.76 s
-OMe-5	3.75 s	3.85, s		3.76 s	3.76 s
-OMe-3'	3.84 s			3.84 s	3.85 s
-OMe-4'		3.84, s			3.83

**Cuadro 16.** Desplazamiento químico (ppm) obtenidos en RMN-<sup>1</sup>H para los bibencilos aislados de *Nidema boothii* y los análogos sintéticos (continuación)

<sup>1</sup> H POSICION	COMPUESTO				
	147	148	149	159	151
2	6.25, d, 2.4	6.22, d, 2.4	6.26 d, 2	6.19, d, 2.1	6.25 m
4	6.33, m, 2.1, 2.4	6.18, dd, 2.4	6.26 dd, 2, 1.6	6.21 dd, 2.1, 2.1	6.25 s
6	6.27, d, 2.1	6.22	6.32 d, 2	6.19, d, 2.1	6.312 dd
7	2.8, m	2.71, m	2.82 m	2.7 m	2.8 m
2'	6.79, d, 2.1	6.72 d, 2.1	6.66 d, 2	6.69, d, 2.1	7.035 dd
3'					6.75 dd
4'					
5'	6.76, d, 8.1	6.81, d, 8.1	6.79 d, 8	6.55 d, 8.1	6.75 dd
6'	6.65, dd, 8.1, 2.1	6.63, dd, 8.1, 2.1	6.72 dd, 8, 2	6.54, dd, 8.1, 2.1	7.035 dd
7'	2.8 m	2.71, m	2.82 m	2.7 m	2.8 m
-OMe-3		3.78, s			
-OMe-5	3.77 s		3.75 s		
-OMe-3'			3.85 s		
-OMe-4'	3.83	3.78, s	3.86 s		

**Cuadro 16.** Desplazamiento químico (ppm) obtenidos en RMN-<sup>1</sup>H para los bibencilos aislados de *Nidema boothii* y los análogos sintéticos (continuación)

<sup>1</sup> H Posición	COMPUESTO					
	152	153	154	155	156	157
2	6.2 dt, 1.8	6.07, dd, 1.5, 1.5	6.35, d, 2.4	6.22. d 2.4	6.2, dd, 2.1, 2.4	7.22, m
3						7.22, m
4	6.2, dt, 1.8	6.01, dd, 1.5	6.31, dd, 2.4, 2.4	6.18, dd 2,4, 2.1	6.24, d, 2.1	7.22, m
5						7.22, m
6	6.328, t, 1.8	6.07, dd, 1.5, 1.5	6.35, d, 2.4	6.22. d 2.4	6.2, dd, 2.1, 2.4	7.22, m
7	2.8, m	2.63, m	2.8, m	2.78, m	2.85, m	2.5, m
2'	6.76, dd, 2.4, 0.8	6.57, m	6.76- 6.73, m	7.02, dd, 2.1	7.24, m	6.64, d, 2.1
3'				6.74 dd 2.1	7.24, m	
4'	6.73, m	6.57, m	6.76- 6.73, m		7.24, m	3.7
5'	7.2, td, 8, 0.8	7.4, dd, 7.8. 7.8	7.2, dd, 8.4, 7.8	6.74 dd 2.1	7.24, m	6.59, d, 8.4
6'	6.78, d, 7.6	6.57, m	6.79, d, 8.1	7.02, dd, 2.1	7.24, m	6.78, dd, 2.1 y 8.4
7'	2.8, m	2.63, m	2.8, m	2.78, m	2.85, m	2.5, m
-OMe-3			3.74, s			
OMe-4'						3.7, s
OMe-3'	3.78, s		3.76, s			
OMe-5	3.75, s		3.74, s			

**Cuadro 17.** Desplazamiento químico (ppm) obtenidos en RMN-<sup>13</sup>C para los bibencilos aislados de *Nidema boothii* y los análogos sintéticos

<sup>13</sup> C	COMPUESTO				
	2	5	14	145	146
1	143.7		144.4	143.71	144.16
2	108.1	105.1	106.8	106.51	106.54
3	156.6	146.8	156.5	160.655	160.69
4	106.8		99.1	97.83	97.85
5	160.8	146.8s	160.8	160.65	160.69
6	99.1	105.1		106.51	106.54
7	38.2	38.5	37.6	38.54	38.43
1'	133.6		143.5	133.61	134.32
2'	111.2	111.2	108.0	111.07	111.12
3'	146		155.5	146.21	148.67
4'	144		112.9	144.43	147.21
5'	114.2	114.12	129.5	114.13	111.80
6'	121.0	121.042	120.9	120.92	120.20
7'	37.2	37.9	37.2	37.37	37.28
-OMe-3		56.2		55.22	55.77
-OMe-4					
-OMe-5	55.2	56.2	55.3	55.22	55.77
-OMe-3'	55.9	55.8		55.316	55.9
-OMe-4'	56				55.77

IV. Resultados y Discusión

**Cuadro 17.** Desplazamiento químico (ppm) obtenidos en RMN-<sup>13</sup>C para los bibencilos aislados de *Nidema boothii* y los análogos sintéticos (continuación)

<sup>13</sup> C	COMPUESTO				
	147	148	149	150	151
1	144.5	145.1	144.46	133.75	144.4
2	107	107.7	107.9	106.83	107.9
3	156	101.2	156.63	157.8	156.6
4	99	107.7	106.72	100.4	99.0
5	160	159.2	160.79	157.8	160.8
6	107	107.7	98.96	106.83	106.6
7	38	38.7	38.16	37.8	37.81
1'	135	135.8	134.3	133.75	143.3
2'	114	116.1	11.79	114.95	114.2
3'	144.5	146.5	148.62	144.07	159.5
4'	146	147.3	147.16	143.97	114.2
5'	112	112.4	111.13	115.31	129.3
6'	120	120.0	120.22	119.53	
7'	37	37.6	37.13	36.59	37.6
-OMe-3					
-OMe-4		56.7			
-OMe-5	55		55.22		
-OMe-3'			55.76		
-OMe-4'			55.88		

**Cuadro 17.** Desplazamiento químico (ppm) obtenidos en RMN-<sup>13</sup>C para los bibencilos aislados de *Nidema boothii* y los análogos sintéticos (continuación)

<sup>13</sup> C POSICION	COMPUESTO					
	152	153	154	155	156	157
1	144.44	143.3	144.0	145.2	144.9	135.2
2	107.9	106.21	106.4	107.1	108.1	110.5
3	156.6	157.9	160.6	157.9	156.6	144.8
4	99.03	100	97.9	100.7	100.4	145.4
5	160.8	157.9	160.6	157.9	156.6	114.6
6	106.65	106.21	106.4	107.7	108.1	119.7
7		37.0	38.2	38.4	37.7	38.0
1'	143.3	142.9	143.2	133.2	141.5	141.85
2'	114.2	115.0	114.1	129.9	128.3	128.0
3'	159.5	157.0	159.5	115.8	128.4	128.4
4'	111.3	112.6	129.2	154.8	125.9	125.86
5'	129.3	128.9	120.7	115.8	128.4	128.4
6'	120.8	118.8	111.2	129.9	128.3	128.3
7'		36.8	37.8	37.3	37.4	37.3
-OMe-3			55.2			
-OMe-4'						56.0
-OMe-5	55.2		55.2			
-OMe-3'	55.1		55.1			

#### 4.6 EVALUACION DEL EFECTO RELAJANTE DE LOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS 145-157 SOBRE LA CONTRACCIÓN ESPONTÁNEA DEL ILEON DE COBAYO.

De manera general, los resultados derivados de la evaluación farmacológica de los compuestos **145-157** (Cuadros 18 y 19), indicaron que todos los análogos son potentes inhibidores de la contracción espontánea del íleon de cobayo con  $CI_{50}$ 's en el intervalo de 0.14-2.36  $\mu$ M. Con base en estos resultados se puede establecer que para la máxima actividad espasmolítica es necesario la presencia de grupos oxigenados en ambos anillos aromáticos ya que la potencia espasmolítica de los productos **156** y **157** que carecen de oxígeno en un carbono de los anillos es mucho menor. Por otro lado, la metilación de los grupos hidroxilos libres o el incremento de los grupos oxigenados con relación a los compuestos **2** y **14** disminuye la actividad espasmolítica.

**Cuadro 18.** Inhibición de la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo mostrada por el gigantol (**2**) y sus análogos sintéticos.

Compuesto	$E_{max}$	$CI_{50}(\mu M)$	Potencia relativa al gigantol ( <b>2</b> )	Potencia relativa a la papaverina
<b>2</b>	81.30±1.84	0.26±0.10	1	16.26
<b>145</b>	76.40±4.76	1.39±0.52	0.19	3.05
<b>146</b>	84.94 ±5.38	0.62±0.03	0.42	6.82
<b>147</b>	66.55±1.30	0.14±0.08	1.86	31.33
<b>148</b>	51.78±6.06	0.70±0.05	0.37	5.99
<b>149</b>	66.00±1.30	0.58±0.08	0.45	7.32
<b>150</b>	53.65±6.73	0.85±0.04	0.31	4.94
<b>156*</b>	83.28±4.09	1.49±0.39	0.17	2.84
<b>157*</b>	82.22±2.50	1.29±0.36	0.20	3.28
<b>Papaverina</b>	91.76±2.65	4.23±0.68	0.06	1

Los valores están expresados en medias  $\pm$  E.E.M; n=6; p<0.05. La potencia fue obtenida por la fórmula:  $CI_{50}(\mu M)$  del gigantol/  $CI_{50}(\mu M)$  del compuesto o  $CI_{50}(\mu M)$  de la papaverina/  $CI_{50}(\mu M)$  del compuesto, asumiéndose un valor de 1.00 para el gigantol y la papaverina, respectivamente.  $E_{max}$  indica el % de inhibición máxima. \* Aunque estos compuestos no son parte de la serie del gigantol, sus datos se emplean en la tabla para fines comparativos.

En la serie del gigantol (2) el compuesto más activo fue el compuesto 147 (1.86 veces más potente que 6); en el compuesto 147 la localización de los grupos hidroxilo fenólico y metoxilo es opuesta a la del compuesto 2.

**Cuadro 19.** Inhibición de la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo por la batatasina III (14) y sus análogos sintéticos.

Compuesto	E <sub>max</sub>	CI <sub>50</sub> (μM)	Potencia relativa a la batatasina III (14)	Potencia relativa a la papaverina
14	67.5±4.76	0.24±0.11	1	17.62
151	85.00±1.79	0.14±0.04	1.71	30.85
152	58.59±0.81	1.28±0.4	0.19	3.30
153	78.50±1.27	2.36±0.77	0.10	1.78
154	75.57±0.213	0.96±0.121	0.25	4.41
155	64.10±3.62	1.75±0.17	0.14	2.42
156*	83.28±4.09	1.49±0.39	0.16	2.84
157*	82.22±2.50	1.29±0.36	0.19	3.28
Papaverina	91.76±2.65	4.23±0.68	0.06	1

Los valores están expresados en medias ± E.E.M; n=6; p<0.05. La potencia fue obtenida por la fórmula: CI<sub>50</sub> (μM) de la batatasina III/ CI<sub>50</sub> (μM) del compuesto o CI<sub>50</sub> (μM) de la papaverina/ CI<sub>50</sub> (μM) del compuesto, asumiéndose un valor de 1.00 para la batatasina III y la papaverina, respectivamente. E<sub>max</sub> indica el % de inhibición. \*Aunque estos compuestos no son parte de la serie del batatasina III, sus datos se emplean en la tabla para fines comparativos.

En la serie de la batatasina III (14), el compuesto 151 que posee un grupo hidroxilo fenólico en el C-4 fue el más activo (1.71 veces más potente que 14).

#### 4.7 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DEL GIGANTOL (2) Y LA BATATASINA III (14)

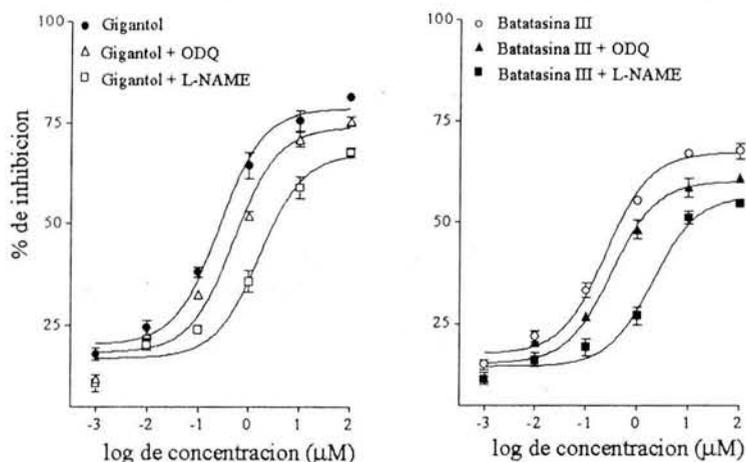
##### 4.7.1 Efecto Espasmolítico de 2 y 14 en Presencia de ODQ y L-NAME.

Con la finalidad de comprobar mediante ensayos funcionales si los bibencilos 2 y 14 inhiben el efecto de las enzimas NOS y/o GCs, en el presente estudio se evaluó el efecto espasmolítico de los productos 2 y 14 en presencia del ODQ y del L-NAME .

Los resultados de estos experimentos (Figura 22) indicaron que, en presencia del ODQ (100 μM) y L-NAME (500 μM), las curvas concentración-respuesta de ambos compuestos se desplazan a la derecha. En consecuencia los bibencilos ejercen su efecto

#### IV. Resultados y Discusión

espasmolítico a través del sistema NO/GMPc, estimulando las enzimas NOS y GCs. El efecto fue más pronunciado en presencia del L-NAME.



**Figura 22.** Curvas concentración-repuesta que muestran el efecto relajante de los compuestos **2** y **14** sobre el íleon aislado de cobayo en presencia del ODQ, L-NAME y clorpromazina.

#### 4.8 DERMINACIÓN DEL EFECTO DEL GIGANTOL (**6**), LA BATATASINA III (**14**) Y SOBRE LA ACTIVIDAD MODULADORA DE LA CALMODULINA.

Considerando que la CaM juega un papel central en los procesos de regulación de la contracción muscular y que esta proteína modula la actividad de la NOS, se decidió explorar si el efecto espasmolítico de los productos **2** y **14** involucraba a esta proteína.

La CaM es una proteína eucariótica ubicua de bajo peso molecular (~16 680 Da), constituida por 148 aminoácidos, que carece de actividad enzimática propia, sin embargo su participación es importante en la transducción de señales reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel celular (Hook y Means, 2001)

La CaM al unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  sufre un cambio conformacional, y el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM resultante se une a diversas proteínas regulando así sus propiedades enzimáticas, incluyendo las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ATPasa), las proteínas cinasas (fosforilasa cinasa, cinasa I y II), NOS, fosfodiesterasas del AMPc (PDE) y GCs entre otras (Ovadi, 1989; Hook y Means, 2001; Cantabrana, 1995).

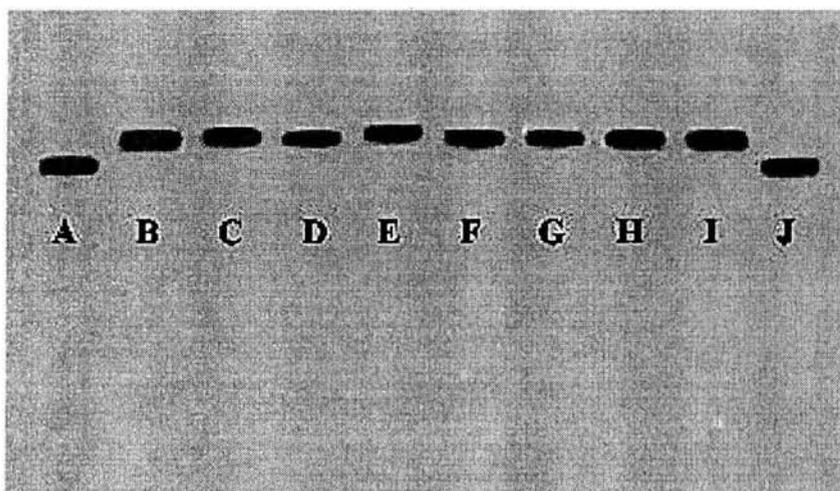
La actividad reguladora de la CaM se inhibe en presencia de ciertos fármacos y numerosos metabolitos secundarios. Entre los fármacos más importantes se encuentran los antipsicóticos derivados de la fenotiazina como la clorpromazina y la trifluoperazina. Otros fármacos que interactúan con la CaM son los antimicóticos derivados del miconazol. El alcaloide vinblastina y sus congéneres antitumorales, así como el antibiótico polimixina B también son potentes antagonistas de la CaM (Hegemann *et al.*, 1991; Vertessy *et al.*, 1998).

Además de la vincristina y melitina, numerosos productos naturales, incluyendo una gran variedad de metabolitos secundarios, interactúan con la CaM, modificando su actividad moduladora. Quizás uno de los más estudiados es la ofiobolina A, un sesterpenoide biosintetizado por hongos del género *Bipolaris*. La interacción de esta fitotoxina con la CaM se demostró mediante métodos enzimáticos, electroforesis, métodos espectroscópicos y técnicas de fluorescencia (Au *et al.*, 2000 y referencias ahí citadas). En general, los métodos enzimáticos consisten en determinar la actividad de enzimas dependientes de CaM en presencia del compuesto prueba. La enzima fosfodiesterasa del AMPc (PDE1), en particular la de cerebro de bovino, es quizás la enzima más utilizada para detectar inhibidores de CaM. Las fosfodiesterasas son las enzimas que catalizan la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc (ver Esquema 21). Se conocen por lo menos 11 familias de fosfodiesterasas, que incluyen más de 30 isoformas, pero sólo las enzimas del tipo PDE1 son dependientes de CaM. Las isoenzimas poseen propiedades cinéticas e inmunológicas similares, pero se diferencian, entre otras características, por su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM (Essayan, 2001). Otras enzimas dependientes de CaM utilizadas para detectar antagonistas de la proteína son la MLCK, la adenilato ciclasa y la proteína fosfatasa (calcineurina).

Así, con la finalidad de demostrar *in vitro* si los compuestos **2** y **14** interactúan con la CaM se realizaron tres tipos de experimentos: una electroforesis desnaturalizante, un experimento enzimático con la PDE y un experimento de tipo funcional. En primer lugar, se determinó el efecto de los bibencilos **2** y **14** sobre la movilidad electroforética de la CaM en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante un gel de electroforesis sobre poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), utilizando las condiciones mencionadas en la sección experimental. La interacción de cualquier compuesto con esta proteína, ocasiona alteraciones en su estructura, mismas que se ven reflejadas en cambios en su movilidad electroforética.

#### IV. Resultados y Discusión

En la Figura 23 se observan los resultados de estas determinaciones y en general todos los compuestos retardaron la movilidad electroforética de la CaM de cerebro de bovino. Los efectos observados en estas evaluaciones permiten concluir que estos compuestos interactúan con la CaM y que posiblemente modifican sus propiedades reguladoras.

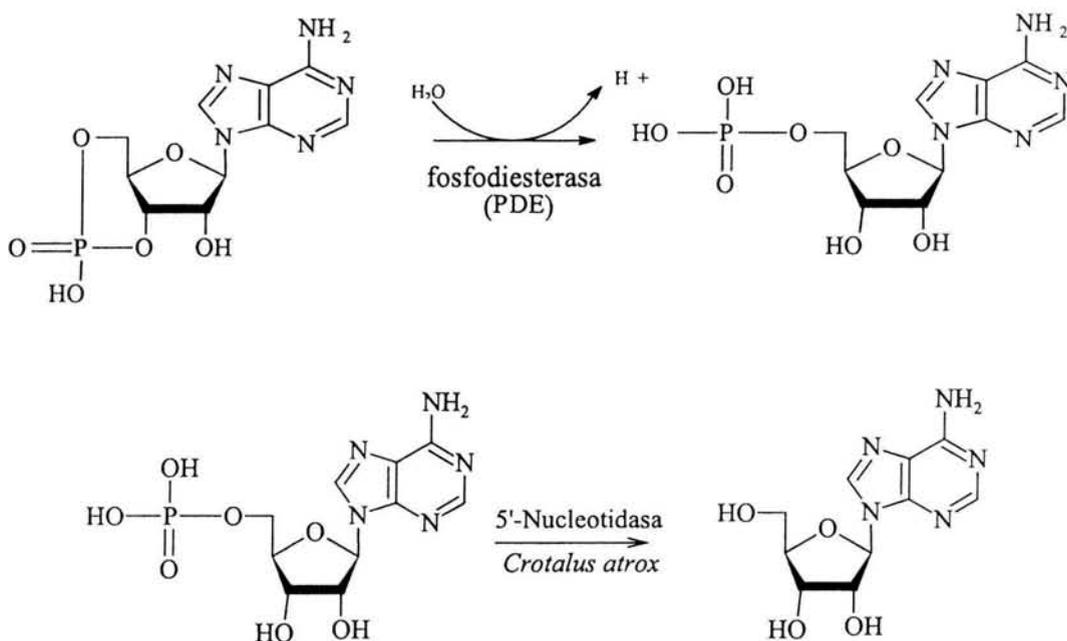


**Figura 23.** ElectroforetoGRAMA SDS-PAGE de calmodulina de bovino después del tratamiento con los compuestos naturales y los análogos sintéticos. Electroforesis de 2  $\mu\text{g}$  de calmodulina de cerebro de bovino en presencia de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30°C. (A) CaM; (B) control positivo (10 mL clorpromazina en DMSO); (C) 124; (D) 126; (E) 2; (F) 14; (G) 147; (H) 151; (I) 156 y (J) CaM en DMSO. En todos los casos se aplicaron 0.33 mg de los compuestos prueba en DMSO.

En segundo lugar, con la finalidad de demostrar si la interacción de los bibencilos con la CaM afecta sus propiedades moduladoras enzimáticas, se determinó su efecto sobre la actividad de la PDE del AMPc *in vitro*. Como se mencionó anteriormente, esta enzima se utiliza ampliamente como herramienta para descubrir inhibidores de la CaM, y en general para demostrar la actividad de la CaM en estudios bioquímicos.

La actividad de la PDE se determinó utilizando un método espectrofotocolorimétrico, en el que se mide la actividad enzimática mediante la cuantificación de fosfato inorgánico generado en la hidrólisis del AMPc en presencia de

CaM de cerebro de bovino (Sharma y Wang, 1979; Leung et al., 1984) acoplada a la reacción de la enzima 5'-nucleotidasa de *Crotalus atrox* (Esquema 21).

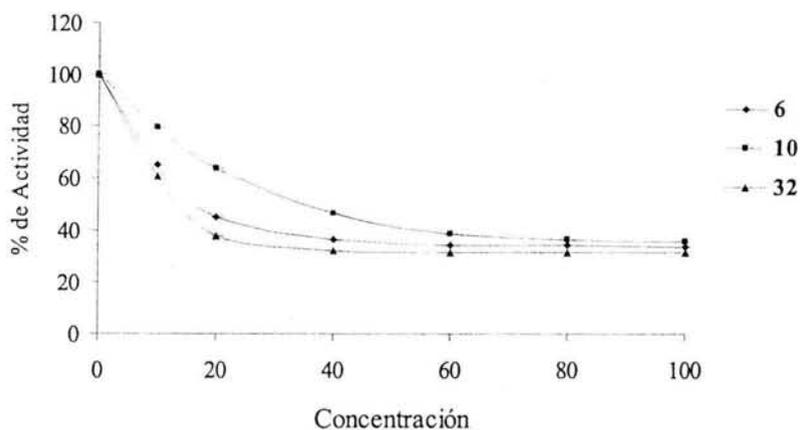


**Esquema 21.** Hidrólisis enzimática del AMPc

Los resultados de estas determinaciones indican que los compuestos ensayados inhibieron la activación de la PDE en presencia de CaM con valores de  $CI_{50}$  comprendidos entre 3.18 a 21.19. En general, el efecto fue mayor o comparable al de la clorpromazina (Ovadi, 1998; Hook y Means, 2001; Cantabrana *et al.*, 1995) un inhibidor de la CaM empleado como control (+). En el Cuadro 20 la actividad enzimática obtenida para los compuestos. En la Figura 24 se muestran las curvas de inhibición para los compuestos **124**, **126**, **2**, **14**, **147**, **151**, **156** y **157**.

**Cuadro 20.** Efecto de los compuestos aislados de *Nidema boothii* y de los análogos sintéticos

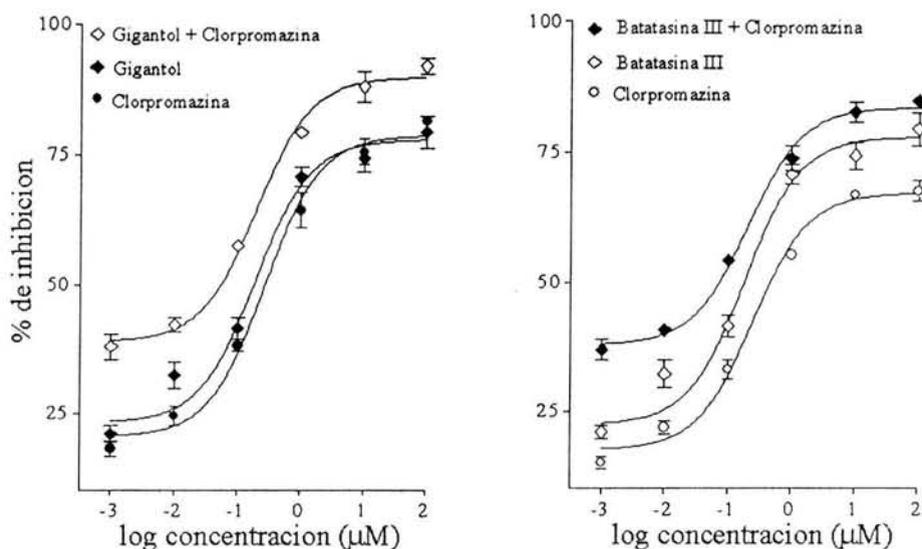
Compuesto	CI <sub>50</sub> μM
Clorpromazina*	10.27±0.39
124	3.18±0.23
126	10.87±0.36
2	6.51±0.69
14	13.30±0.54
147	9.24±0.19
148	10.08±0.37
156	36.58±2.16
157	21.19±1.06



**Figura 24.** Efecto de los compuestos **2**, **14** y **154** sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de CaM de cerebro de bovino

Por último se decidió efectuar un experimento funcional para evaluar el efecto espasmolítico de **2** y **14** en presencia de clorpromazina. En la Figura 25, se indican las curvas concentración-respuesta del gigantol (**2**) y la batatasina III (**14**) en presencia de

la clorpromazina. Las curvas de la clorpromazina y los productos naturales se desplazan a la izquierda, lo cual indica que **2** y **14** son agonistas de la clorpromazina. Todos estos resultados indican que es posible que la proteína CaM constituya un blanco de acción en el proceso de relajación de los bibencilos.



**Figura 25.** Curvas concentración-respuesta del gigantol (**2**) y la batatasina III (**14**) en presencia de clorpromazina.

#### 4.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS ESTILBENOIDES (**2**, **5** Y **14**) AISLADOS DE *Nidema. boothii* Y DE LOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS (**145**, **146**, **151-155** Y **157**)

Se evaluó el potencial citotóxico *in vitro* de los bibencilos naturales y los análogos sintéticos sobre un panel de cuatro líneas celulares derivadas de tumores de mamíferos.

Las líneas celulares empleadas para este ensayo incluyeron las siguientes: dos líneas celulares normales [MDCK, células caninas de riñón Mandin-Darby y NIH3T3 (NIH fibroblastos embrionarios de ratón suizo)] y por dos tumorales [KA31T (células transformadas 3T3 por virus de sarcoma, cepa Kirsten) y H4TG (células de hematoma resistentes a tioguanina)]. Cabe destacar que la evaluación de citotoxicidad *in vitro* de fármacos potenciales se realiza, hoy día, de manera rutinaria antes de su evaluación *in*

#### IV. Resultados y Discusión

*vivo*. Los resultados de estas evaluaciones nos proporcionan información valiosa acerca de la inocuidad de estos agentes. Así mismo, también nos puede llevar al descubrimiento de nuevos agentes biodinámicos o compuestos prototipo que se pueden emplear como posibles anticancerígenos o antitumorales, en el caso que presenten una citotoxicidad significativa y/o selectiva sobre las líneas celulares tumorales.

Los resultados de estas evaluaciones revelaron que los compuestos ensayados no ejercen una citotoxicidad significativa debido a que los valores de  $CI_{50}$  calculados, en la mayor parte de los casos, se encontraron por arriba de 25  $\mu$ M. El único compuesto que presentó una citotoxicidad marginal fue el aloifol II (**5**) con valores de  $CI_{50}$  entre 3.2 y 7  $\mu$ M. En consecuencia, lo más probable es que estos productos sean inocuos para animales, y por lo tanto candidatos aceptables para el desarrollo de nuevos compuestos espasmolíticos. Claro esta, es necesario realizar aún los estudios de toxicidad aguda pertinentes.

**Cuadro 21.** Citotoxicidad *in vitro* de los productos naturales(**2**, **5** y **14**) y de los análogos sintéticos (**145**, **146**, **151-154** y **157**)

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)			
	NIH3T3	MDCK	KA31T	H4TG
<b>2</b>	25.8	35.9	57.3	75.0
<b>5</b>	3.2	4.9	6.8	6.5
<b>14</b>	14.7	81.9	49.4	123.7
<b>145</b>	94.2	97.5	141.6	76.5
<b>146</b>	>200	>200	108.5	195.6
<b>151</b>	29.3	79.6	22.3	83.8
<b>152</b>	60.6	107.1	45.0	126.2
<b>153</b>	32.3	74.2	57.2	118.1
<b>154</b>	>200	>200	>200	>200
<b>155</b>	65.1	78.3	43.9	165.8
<b>157</b>	111.1	126.2	103.5	>200

## V. CONCLUSIONES

- 5.1 Los resultados experimentales obtenidos en el presente estudio permitieron comprobar la hipótesis de trabajo, ya que la selección de la especie *Nidema boothii* a través de un criterio quimiotaxonómico permitió descubrir nuevos estilbenoides con propiedades espasmolíticas. Así, el fraccionamiento biodirigido del extracto activo de *N. boothii* condujo al aislamiento de 12 metabolitos secundarios caracterizados mediante la utilización de diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los compuestos se caracterizaron como nidemina (**122**), vitexina (**123**), aloifol II (**5**), 2,6-dihidro-1,5,7-trimetoxifenantreno (**16**), efemerantoquinona (**126**), gigantol (**2**), efemerantol B (**127**), 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**15**), lusiantridina (**11**) y batatasina III (**14**). También se caracterizaron dos nuevos productos naturales, uno de tipo espiro, al que se le dio el nombre trivial de nidemona (**124**) y el 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (**3**).
- 5.2 La estructura de la nidemona constituye una estructura carbocíclica novedosa para un producto natural. Sin embargo, en la literatura se ha reportado un producto de síntesis con un esqueleto carboxílico similar, el espiro[ciclopentano-1,2'(1'H-naftaleno)]. Este producto se obtuvo mediante de la condensación de la tetralona con el 1,4-dibromobutano (Ranu y Jana, 1999).
- 5.3 La coexistencia de bibencilos, fenantrenos y compuestos de tipo espiro se ha descrito con anterioridad en *Cannabis sativa* (Crombie y Crombie, 1982). Sin embargo, los compuestos espiro encontrados en *C. sativa* poseen un arreglo estructural inverso de los anillos de 5 y 6 miembros, como se puede observar en la estructura de la cannabispirona que se presenta en la Figura 26. Los compuestos espiro en *C. sativa* se cree que se biosintetizan por un acoplamiento fenólico directo de un bibencilo precursor (Crombie y Crombie, 1982). En el caso del compuesto **124** este mecanismo no sería factible y se propone que el compuesto **124**, se obtiene mediante la contracción del anillo aromático de un dihidrofenantreno adecuado (ver Esquema 22). Esta propuesta biogenética se basa principalmente en el hecho de que una de las varias rutas metabólicas para generar anillos de ciclopentano a partir de compuestos aromáticos es vía una reacción biológica oxidativa de tipo Baeyer-Villiger (Dewick, 2000).

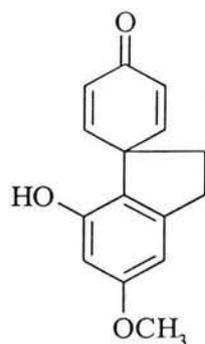
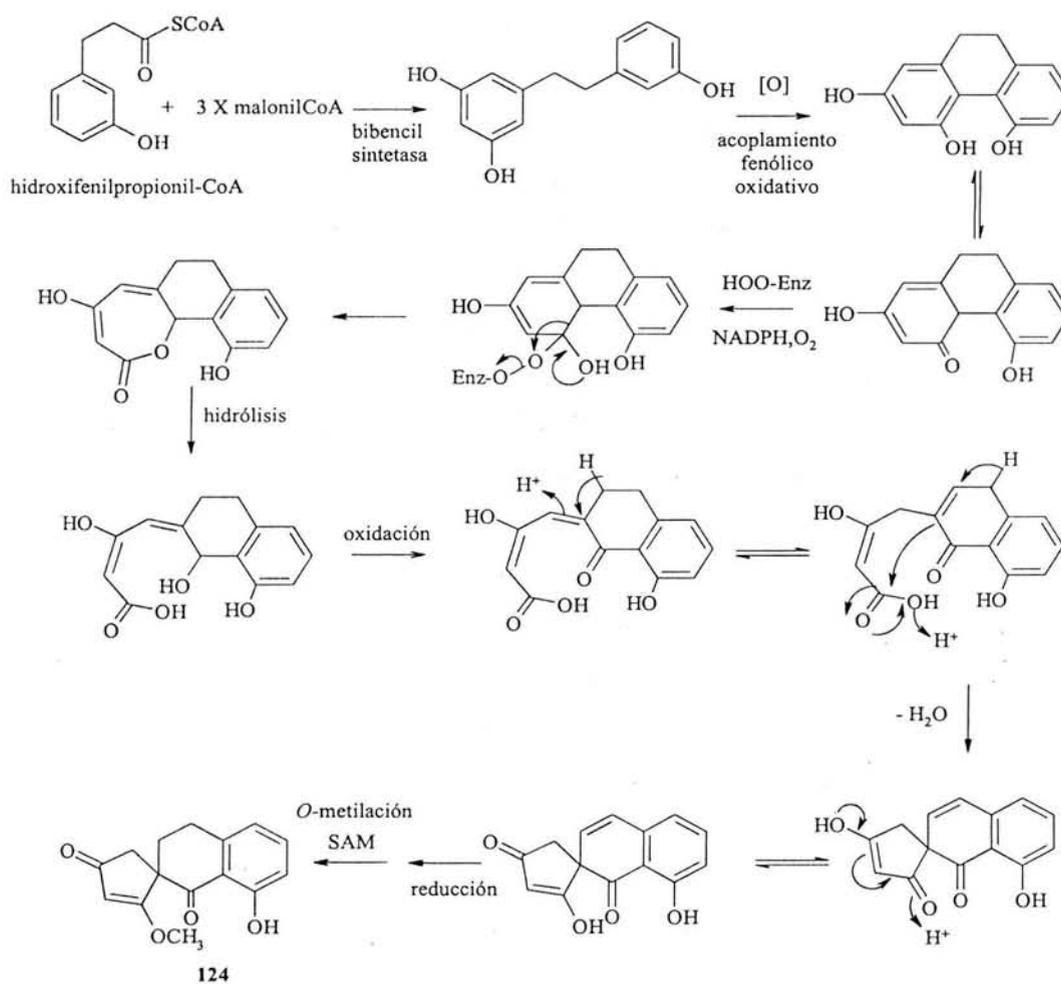


Figura 26. Estructura de la cannabispirona



Esquema 22. Ruta biogénica propuesta para el compuesto 124.

- 5.4 Los compuestos estilbenoides aislados de *N. boothii* y los análogos sintéticos, mostraron una actividad espasmolítica significativa con una potencia mayor o similar a la papaverina, agente antiespasmódico inespecífico utilizado como control positivo. Para una máxima actividad espasmolítica los bibencilos deben de tener sustituyentes oxigenados en ambos anillos aromáticos. La metilación de los grupos hidroxilos libres, así como el incremento en los grupos oxigenados con relación a los compuestos **2** y **14**, disminuyen la actividad relajante del músculo liso.
- 5.5 Los resultados generados en este estudio indican que además del mecanismo nitrérgico, los bibencilos podrían ejercer su efecto espasmolítico a través de la proteína reguladora CaM, ya que estos productos modifican *in vitro* las propiedades reguladoras enzimáticas de la proteína PDE. En este caso se encontró que los bibencilos inhiben la activación de la enzima PDE. De manera adicional se comprobó mediante un experimento de tipo funcional que los bibencilos se comportan como agonistas de la clorpromazina en la inhibición de la CaM. Queda por demostrarse si ambos mecanismos están relacionados.
- 5.6 Los compuestos **2**, **5**, **14**, **145**, **146**, **151-154** y **157** no ejercen una citotoxicidad significativa. Lo más probable es que estos productos sean inocuos para animales, y por lo tanto candidatos aceptables para el desarrollo de nuevos compuestos espasmolíticos.

## **VI. PERSPECTIVAS.**

1. Continuar con el estudio sistemático de especies de orquídeas mexicanas, con el objetivo de obtener compuestos estilbenoides con una mejor actividad espasmolítica.
2. Evaluar el efecto de los compuestos **2** y **14** directamente sobre actividad de las enzimas óxido nítrico sintetasa y guanilato ciclasa soluble, con la finalidad de determinar si el mecanismo de acción espasmolítico involucra la estimulación directa de estas enzimas.
3. Realizar un estudio de relación cuantitativa estructura actividad (QSAR), mediante un diseño racional de análogos sintéticos, con el objetivo de encontrar un modelo matemático capaz de describir la actividad espasmolítica de una serie de compuestos estilbenoides de forma tal que se pueda predecir la estructura de nuevos fármacos con una mejor actividad espasmolítica.
4. Profundizar el estudio sobre el potencial herbicida de los bibencilos determinando su efecto en pruebas de invernadero y posteriormente sobre su mecanismo de acción.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Niaaj, L., Abu-Zarga, M., Sabri, S., Abdalia, S., Isolation and biological effects of 7-O-methylerythrodioleone, a flavonone isolated from *Artemisia monosperma*, on rat isolated smooth muscles. *Planta Med.*, **59**, 42-45 (1993).
- Achterrath-Tuckermann, U., Kunde, R., Flaskamp, E., Isaac, O., Thiemer, K. Pharmacological investigations with compounds of chamomile and kamillosan on the isolated guinea pig ileum. *Planta Med.*, **39**, 38-50 (1980).
- Ajay, M., Gilani, A. A., y Mustafa, M. R. Effects on Flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.*, **74**, 603-612 (2003).
- Ammon, H. P. T., Wahl, M. A. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.*, **57**, 1-7 (1991).
- Andrew, P., Somlyo, A. P., y Somlyo, A. V. Calcium sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.*, **83**, 1325-1358 (2003).
- Au, T. K., Chick, W. S., Leung, P. C. Initial kinetics of the inactivation of calmodulin by the fungal toxin ophiobolin A. *J. Biochem. Cell. Biol.*, **32**, 1173-1182 (2000).
- Aquino, R., Cappaso., De Simone F., Garofalo, L., Pizza, C., Sorrentino, L. Inhibiting activity of some glucoindolizidines and iridoids from *Sickingia williamsii* on electrically induced contractions of isolated guinea-pig ileum. *Phytother. Res.* **10**, 161-166 (1996).
- Asakawa, Y., Kondo, K., Tori, M., Hashimoto, T., y Ogawa, S. Prenyl bibenzyls from the liverwort *Radula kojana*. *Phytochemistry*, **30**, 219-234 (1991).
- Bai, L., Kato, T., Inoue, K., Yamaki, M., y Takagi, S. Blestrianol A, B and C, biphenanthrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **30**, 2733-2735 (1991).
- Bai, L., Yamaki, M., y Takagii, S. Lignans and bichroman from *Pleione bulbucoides*. *Phytochemistry*, **44**, 341-343 (1996).
- Bai, L., Masukawa, N., Yamaki, M., y Takagii, S. Two bibenzyl glucosides from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*. **44**, 1565-1567 (1997).
- Bajad, S., Bedi, K. L., Singla, A. K., Johri, R. K. Antidiarrhoeal activity of piperine in mice. *Planta Med.*, **67**, 284-287 (2001).

## Referencias Bibliográficas

- Bakana, P., Laekeman, G. M., Totte, J., Herman, A. G., Vlietinck, A. J. Stereochemical considerations in relation to the pharmacological activity of *Pterotaberna* alkaloids. *J. Nat. Prod.*, **63**, 1265-1268 (1985).
- Baxter, H., y Harbone, J. B. *Stilbenoids. Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Taylor and Francis, Washington, D.C. pp 509-518 (1994).
- Begum, S., Farhat, I., Siddiqui, B. S., Shaheen, F., Giliani, A. H. Spasmolytic constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusata* leaves. *J. Nat. Prod.*, **63**, 1265-1268 (2000).
- Begum, S., Hassan, S. I, Siddiqui, B. S., Shaheen, F., Ghayur, M. N., y Gilani, A. H. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry*, **61**, 399-403 (2002a).
- Begum, S., Sultana, I., Siddiqui, B. S., Shaheen, F., y Gilani, A. H. Structure and spasmolytic activity of eucalyptanoic acid from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusata* y synthesis of its active derivative from oleanolic acid. *J. Nat. Prod.* **65**, 1939-1941 (2002b).
- Bhakuni D. S., y Chaturvedi, R. The alkaloids of *Corydalis meifolia*. *J. Nat. Prod.*, **46**, 466-470 (1983).
- Bitar, K. N. Function of gastrointestinal smooth muscle: from signaling to contractile proteins. *Am. J. Med.*, **115 (3A)**, 15S-23S (2003).
- Boegge, S. C., Kesper, S., yVerspohl, E. J., Nahrsted, A. Reduction of Ach-induced contraction of rat isolated ileum by coptisine, (+)-caffeoylmalic acid, *Chelidonium majus*, and *Corydalis lutea* extracts. *Planta Med.* **62**, 173-174 (1996).
- Bogale, M., Dagne, E., Izzo, A. A., Capasso, N., Mascolo, N. Spasmolytic activity of kosotoxin in the guinea-pig ileum and rabbit jejunum *in vitro*. *Phytother. Res.*, **10**, S112-S113 (1996).
- Burgaud, J. L. Riffaud, J. P., y Soldato, D. Nitric-oxide releasing molecules: a new class of Drugs with several major indications. *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 201-213 (2002).
- Calixto, J. B., Yunes, R. A. Neto, A. S., Valle, R. M. Rae, G. A. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverin. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **17**, 313-321 (1984).
- Capasso, A., Pinto, A., Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F. Reduction of agonist-induced contraction of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother. Res.*, **5**, 85-87 (1991).

- Capasso, A., Safir, O., Tetouani-Fkih, S., Sorrentino, L., Aquino, R. Properties and effects on isolated guinea-pig ileum of *Zygophyllum gaetulum.*, species endemic in Moroccan Sahara. *Pharm. Biol.*, **36**, 320-326 (1998).
- Carvajal, J. A., Germain, A. M., Huidobro-Toro J. P., y Weiner, C. P. Molecular Mechanism of cGMP-Mediated Smooth Muscle Relaxation. *J. Cell Physiol*, **184**, 409-420 (2000).
- Cantabrana, B., Vallina, J. R. P., Menendes, L., e Hidalgo, A. Spasmolytic and calmodulin inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs *in vitro*. *Life Sci.*, **57**, 1333-1341 (1995).
- Cometa, M.,F., Mazzanti, G., Tomassini, L. Sedative and Spasmolytic effects of *Viburnun tinus* L. and its major pure compounds. *Phytother. Res.*, **12**, S89-S91 (1998).
- Crombie, L., y Jamieson, S. Dihydrostilbenes of *Cannabis*. synthesis of canniprene. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1263-1270 (1982).
- Crombie, L., y Crombie, M. L. Natural products of Thailand high  $\Delta^1$ -TCH-strain *Cannabis*. Bibenzyl-spiran-dihydrophenanthrene group: relations with cannabinoids and canniflavones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1455-1466 (1982).
- Damiani, C. E. N., Rossoni, L. V., y Vassallo V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. *Vascul. Pharmacol.*, **20**, 59-66 (2003).
- Da Silva, T. M., Da Silva, B. A. Mukherjee R. The monoterpene alkaloid cantleyine from *Strychnos trinervis* root and its spasmolytic properties. *Phytomedicine*, **6**, 169-176 (1999).
- Darroch, S. A., Taylor, W. C., Choo, L. K., Mitchelson, F. Structure-activity relationships of some Galbulimima alkaloids related to himbacine. *Eur. J. Pharmacol.*, **182**, 131-136, (1990).
- Del Tacca, M., Tadini, P., Blandizzi, C., Bernardini, M. C. Excitatory and inhibitory cholinergic effects of yohimbine on isolated guinea-pig small intestine. *Pharmacol. Res. Commun.* **20**, 673-684 (1988).
- Della-Pieta, F., Breschi, M. C. Scatizzi, R., Cinelli, F. Relaxing activity of two linear diterpenes from *Cystoseira brachycarpa* var. *Valearica* on the contractions of intestinal preparations. *Planta Med.*, **61**, 493-496 (1995).
- Demir, A. S., y Sesenoglu, O. A new and efficient chemoenzymatic access to both enantiomers of 4-hydroxycyclopent-2-en-1-one. *Tetrahedron Asymm.*, **13**, 667-670 (2002).

## Referencias Bibliográficas

- Den Hertog, A., Pielkenrood, J and Van Den aller, J. The effect of foskolin on smooth muscle cells of guinea-pig *Taenia cacxi*. *Eur. J. Pharmacol.* **106**, 181-184 (1985)
- Dewick, P. M. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. John Wiley and Sons, New York, pp 26 y 74-77 (2000).
- Dick, J., y Lefebvre, R. A. Interplay between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the pig gastric fundus smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **397**, 389-397 (2000).
- Dressler, L. R. *The Orchids Natural History and Classification*. Harvard University Press. London, pp 150-159 (1981).
- Dressler, L. R. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Discorides press. pp 7-9 (1993).
- Dubey; M. P., Srimal, R. C., Nityanad, S., Dhawan, B. N. Pharmacological studies on coleonol, a hypotensive diterpene from *Coleus forskohlii*. *J. Ethnopharmacol.*, **3**, 1-13 (1981).
- El-Feraly, F. S. *J. Nat. Prod.*, **47**, 89-92 (1984).
- El-Shafae, A. M., y Soliman, A. S. A pyranocumarine and two alkaloids (one with antispasmodic effect) from *Citrus delicious*. *Pharmazie*, **53**, 641-643 (1998).
- Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A., y Mata, R. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3, 4'-dihydroxy-5.5'-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Med.*, **65**, 109-114 (1999a)
- Estrada, S. E., Toscano, R. A., y Mata, R. New phenantrene derivates from *Maxillaria densa*. *J. Nat. Prod.*, **62**, 1175-1178 (1999b)
- Estrada, S. E. Tesis Doctoral *Estilbenoides espasmolíticos de Scaphyglottis livida (Lindley) Schltr (Orchidaceae) y Maxillaria densa Lindley (Orchidaceae). Efecto del 3,4'-dihidroxí-3',5-dimetoxibencilo sobre el sistema óxido nítrico/GMP cíclico*. (2000).
- Estrada, S., Acevedo, L., Rodríguez, M., Toscano, R. A., Mata, R. New triterpenoids from the orchids *Scaphyglottis livida* y *Nidema boothii*. *Nat. Prod. Lett.*, **16**, 81-86 (2002).
- Essayan D. M. Cyclic nucleotides phosphodiesterase. *J. Allergy Clin Immunol*, **108**, 671-680 (2001).

- Furness, M. S., Robinson, T. P., Goldsmith, J., y Bowen, J. P. An efficient synthesis of 2-aryl and 2-alkenyl-3-alkoxy-cyclohexenones by a modified Stille reaction *Tetrahedron Lett.*, **40**, 459-462 (1999).
- Ganon, W. F. En: Fisiología Médica. Manual Moderno. México, D. F. 90-92 (2000)
- Gershon, M. D., Kirshgessner, A. L., y Wade, P. R. Functional anatomy of the enteric nervous system. In: Johnson, L. R., Alpers, D. H., Jacobson, E. E., Walsh, J. H. (Eds.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 381-422. (1994)
- Gorham, J. *The Biochemistry of the Stilbenoids*. Chapman & Hall: London, pp. 128-133 (1995).
- Goodman L. S., Lee, E. L., Perry B. M., Raymond, W. R., Gilman, A. G. Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10a. Edition. McGraw Hill (2001).
- Hansen, M. B. The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.*, **92**, 105-113 (2003).
- Harborne, J. B., y Williams, C. A. Recent advances in the chemosystematics of the monocotyledons. *Phytochemistry*, **37**, 3-18 (1994).
- Hashimoto, T.; Hasegawa, K. Structure and synthesis of batatasins, dormacy-induced substances of yam bulbils. *Phytochemistry*, **13**, 2849-2852 (1974).
- Hayashi, J., Sekine, T., Deguchi, S., Lin, Q., Horie, S., Tsuchiya, S., Yano, S., Watanabe, K., y Ikegami, F. Phenolic compounds from *Gastrodia* rhizoma and relaxant effects of relative compounds on isolated smooth muscle preparation. *Phytochemistry*, **59**, 513-519 (2002).
- Hazekamp, A., Verpoorte, R., y Panthong, A. Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. *J. Ethnopharmacol.*, **78**, 45-49 (2001).
- Herrera, M. D. Marhuenda, E., Gibson, A., 1992. Effects of genistein, an isoflavone isolated from *Genista tridentate*, on isolated guinea-pig ileum and guinea pig ileal myenteric plexus. *Planta Med.*, **58**, 314-316 (1992).
- Hegemann, L., van Rooijen, L. A., Traber, J., Schmidt, B. H. Polymyxin B is a selective and potent antagonist of calmodulin. *J. Pharmacol.*, **207**, 17-22 (1991).
- Hietz, P., y Hietz-Seifert, V. *Epífitas de Veracruz (Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas, Ver)*. Instituto de Ecología, A. C. 1a. Edición. (1994).

## Referencias Bibliográficas

- Hiller, K. O. Ghosbani, M., Schilcher, H. Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine and coptisine, and *Chelidonium majus* extracts on isolated guinea-pig ileum. *Planta Med.*, **64**, 758-760 (1998).
- Holzer, P., Lippe, I., Tabrizi, A. L., Lenard, L., y Barthó, L. Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine. *J. Pharm. and Exp. Therap.*, **280**, 154-161 (1997).
- Honda, C., y Yamaki, M. The stilbenoids from *Dendrobium plicatile*. *Natural Med.*, **55**, 68-70 (2001).
- Hook, S., y Means, A. R. Ca<sup>2+</sup>/CaM-Dependent kinases: from activation to funtion. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 471-505 (2001).
- Hori, M., y Karaki, H. Regulatory mechanism of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. *Life Sci.*, **62**, 1629-1633 (1998).
- Huang, R., Li, L., Guo, H., y Wang, A. Caldesmon binding to actin is regulated by calmodulin and phosphorylation via different mechanisms. *Biochemistry*, **42**, 2513-2523 (2003).
- Hwang, J. H., Lin, R. L, Shieh, R. L., y Jwo, J. J. Study of the Wittig reacion of benzyltriphenylphosphonium salt and benzaldehyde via ylide-mediated phase-transfer catalysis substituent and solvent effects, *J. of Mol. Cat. A: Chem.* **142**, 125-139 (1999).
- Inamori, Y., Ogawa, M., Tsujibo, H., Baba, K., Kozawa, M., y Nakamura, H. Inhibitory effects of 3,3',4,5'-tetrahydroxystilbene and 3,3',4,5'-tetrahydroxybibenzyl, the constituents of *Cassia garrettiana* on antigen-induced histamine release *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 3353-3354 (1991).
- Ito, M., Kondo, Y., Takemoto, T. Spasmolytic substances from *Cimicifuga dahurica* Maxim. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 580-583 (1976).
- Janero, D. R. Nitric Oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1495-1506 (2000).
- Jiann-Jyh, H., Ruey-Linh, L., Ruey-Lone, S., y Jing-Jer, J. Study of the Witting reaction of benzyltriphenylphosphonium salt and benzaldehyde via ylide-mediated phase-trasnfer catalysis substituent and solvents effects. *J. of Mol. Cat. A: Chem* **142**, 125-139 (1999).
- Jujena, R. K.; Sharma, S. C., y Tandon, J. S. Two substituted bibenzyls and a dihydrophenanthrene from *Cymbidium Aloifolium* *Phytochemistry*, **26**, 1123-1126 (1987).

- Kaneda, T., Shimizu, K., Nakajyo, S., y Urakawa, N., The difference in the inhibitory mechanism of papaverine on vascular and intestinal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **355**, 149-157 (1998).
- Kar, K., Puri, V. N. Patnaik, G. K. Sur, R. N. Dhawan, B. N. Kulshrestha, D. K. Rastogi, R. P. Spasmolytic constituents of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud: Pharmacological evaluation of himachalol. *J. Pharm. Sci.*, **64**, 258-262 (1975).
- Katzung, B. G. *Farmacología Básica y Clínica*, Manual Moderno, México, D. F. (2002).
- Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H., y Shima, T. Estudios on the constituents of *Orchidaceus* plants II. Isolation structures and stereochemistry of ciclonevivilol, cyclohomonevivilol and dihidrocycloeucaenol C-24 epimers, new triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1914-1929 (1985a).
- Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H., y Shima, T. Studies on the constituents of *Orchidaceous* plants III. Isolation of non-conventional side chains sterols from *Nervilia purpurea* Schelechter and structure determination of nervisterol. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2235-2242 (1985b).
- Kirimer, N., Tunalier, Z., Bassar, K. H., Cingi, I. Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and taraxasteryl acetate on isolated ileum preparations. *Planta Med.*, **63**, 556-558 (1997).
- Kong, J. M., Ngoh-Khang, G., Lian-Sai, C. y Tet-Fatt, C. Recent advances in traditional plant drugs and orchid. *Acta Pharmacol Sin*, **24**, 7-21 (2003).
- Kubes, P., McCafferty, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. *J. Am. Med.*, **109**, 150-158 (2000).
- Kurjak, M., Fritsch, R., Saur, D., Schusdziarra, V., y Allescher. Functional coupling between nitric oxide synthesis and vip release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5. *J. Physiol*, **534**, 827-836 (2001).
- Lambert, J. B., Shurvell, H. F., Lightner, D. A., Cooks, R. G. *Organic Structural Spectroscopy*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey (1998).
- Lecci, A., Santicioli, P., y Maggi, A. Pharmacology of transmisión to gastrointestinal muscle. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2**, 630-641 (2002).
- Lee, S. H., Johnson, J. D., Walsh, M. P., Van Leirop, J. E., Sutherland, C., Xuş, A., Snedden, W. A., Kosk-Kosicka, D., Fomm, H., Narayananş, N., Cho, M. J. Differential regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca<sup>2+</sup>/concentration. *Biochem. J.*, **350**, 299-304 (2000).

## Referencias Bibliográficas

- Lee, Y. H., Park, J. D., Baek, N. I., Kim, S. I., y Ahn, B. Z. *In vitro* and *in vivo* antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med.*, **61**, 178-180 (1995).
- Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H., y Tripton, C. L. Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2742-2747 (1984).
- Liao, B., Gawienowski, M. C., y Zielinski, R. E. Differential stimulation of NAD kinase and binding of peptide substrates by wild-type and mutant plant calmodulin isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 53-60 (1996).
- Lima, M. A. S., Silveira, E. R., Marques, M. S. L., Santos, R. H. A., Gambardela, M. T. P. Biologically active flavonoids and terpenoids from *Egletes viscosa*. *Phytochemistry*, **41**, 217-223 (1996).
- Lightner D. A.; Gurst J. E. *Organic Conformational Analysis and Stereochemistry from Circular Dichroism Spectroscopy*; Wiley-VCH: New York, pp 337-393 (2000).
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J. E. *Molecular Cell Biology*. Fourth edition. W. H. Freeman and Co., New York (2002).
- Lozoya, X., Meckes, M., Abou-Zaid, M., Tortoriello, J., Nozzolillo, C., Arnason, J. T., Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch. Med. Res.*, **25**, 11-15 (1994).
- Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J. Schulz, S., Chepenik, K., y Waldman, S. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharm. Rev.*, **52**, 375-413 (2000).
- Majumder, P.L., y Lahiri, S. Volucrin, as new dimeric phenanthrene derivative from the orchid *Lusia volucris*. *Tetrahedron*, **46**, 3621 (1990).
- Makhlof, G. M., y Murthy K. S. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell Signal*, **9**, 269-276 (1997).
- Malone, M. H., Rother, A., *Heimia salicifolia*: a phytochemical and phytopharmacologic review. *J. Ethnopharmacol.* **42**, 135-159 (1997).
- Maryanoff, B., y Reitz, A. The Wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects. *Chem. Rev.*, **89**, 863 (1989).
- Mata. R., Rojas, A., Acevedo, I., Estrada, S., Calzada, R., Rojas, I., Bye, R., Linares., E. Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Med.*, **63**, 31-35 (1997).

- McVaugh, R. Flora Novo-Galiciana. En: *A descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico*. The University of Michigan Press. Vol. **16**, pp 1-5 (1985).
- Meckes, M., Paz, D., Acosta J., y Mata, R. The Effects of Chrysin and Pinostrobin, Two flavonoids isolated from *Teloxys graveolens* leaves, on isolated guinea-pig ileum. *Phytomedicine*, **5**, 459-463 (1998).
- Megson, I. L., Nitric oxide donor drugs. *Drugs of the future.*, **25**, 701-715 (2000).
- Min, Z-D., Tanaka, T., Inuma, M., Mizuno, M. Volucrin, a new dimeric phenanthrene derivative from the orchid *Lusia volucris*. *J. Nat. Prod.*, **50**, 1189 (1987).
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S., y Kameoka, H. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 2849-2853 (1997).
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S., Sugiura W., Kosaka, H., y Kameoka, H. Moscatilin from *Dendrobium nobile*, a naturally occurring bibenzyl compound with potential antimutagénica activity. *J. Agric. Food. Chem.*, **47**, 2163-22167 (1999).
- Morales M. A., Tortoriello, J., Meckes., M., Paz, D., Lozoya, X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Arch. Med. Res.*, **25**, 17-21 (1994).
- Morita, M., Nakanishi, H., Morita, H., Mihashi, S., y Itokawa, H. Structures and spasmolytic activities of derivatives from sesquiterpernes of *Alpinia speciosa* and *Alpinia japonica*. *Chem. Pharm. Bull.*, **44** (8), 1604-1606 (1996).
- Müller, S., Tirapelli, C. R., Oliveira, A. M. Murillo, R., Castro V., y Merfort, I. Studies of *ent*-kaurano diterpenes from *Oyedaea verbesinoides* for their inhibitory activity on vascular smooth muscle contraction. *Phytochemistry*, **63**, 391-396 (2003).
- Nasiri, A., Holth, A., Bjork, L. Effects of the sesquiterpenes capsidiol on isolated guinea-pig ileum and trachea, and on prostaglandin synthesis *in vitro*. *Planta Med.*, **59**, 203-206 (1993).
- Noda, N., Kobayashi, Y., Miyahara, K., y Fukahori, S. 2,4-Bis(4-hidroxibenzyl) phenol from *Gastrodia elata*. *Phytochemistry*, **39**, 1247-1248 (1995).
- Olgart, C., Wiklund, N. P., y Gustafsson, L. E. Blockade of nitric oxide evoke smooth muscle contractions by an inhibitor of guanylyl cyclase. *Neuro Report*, **8**, 3355-3358 (1997).

## Referencias Bibliográficas

- Oliveira, E. J., Romero, M. A., Silva, M. S., y Madeiros, I. A. Intracellular calcium mobilization as a target for the spasmolytic action of scopoletin. *Planta Med.* **67**, 605-608 (2001).
- Onaka, T., The structure of Nobolonine. The second alkaloids from *Dendrobium nobile*. *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 745-747 (1965).
- Orasadipe, A., Amos, S., Adesomoju, A., Binda, L., Emeje, M., Okogun, J., Wambebe, C., y Gamaniel, K. Spasmolytic activity of methyl angolensate: a triterpenoid isolated from *Entandrophragma angolense*. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 364-367 (2001).
- Ovadi J. Effect of drugs on calmodulin-mediated enzymatic actions. En *Progress in Drug Research*, Jucker, E., Ed.; Birkhauser Verlag, Basel, Germany, Vol. 33, p 353-395 (1989).
- Ozaki, Y., Pharmacological studies of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Ansonia elliptica* Roem. Et Schult. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **94**, 17-26 (1989).
- Patnaik, G. K. Banaudha, K. K. Khan, K. A. Shoeb, A., Dhawan, B. N., Spasmolytic activity of angelicin: a coumaric from *Heracleum thomsoni*. *Planta Med.*, **53**, , 517-520 (1987).
- Petkov, V., Manolov, P. Pharmacological analysis of the iridoid oleuropein. *Arzneimittelforschung*, **22**, 1476-1486 (1972).
- Pongprayoon, U., Baekström, P., Jacobson, U., Lindström, M., Bohli, L., Antispasmodic activity of  $\beta$ -damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Med.*, **58**, 19-21 (1992).
- Rao, V. S., Santos, F. A., Sobreira, T. T., Souza, M. F., Melo, C. L., Silveira, R. E. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med.* **63**, 146-149 (1997).
- Ranu, B. C., y Jana, U. A new redundant rearrangement of aromatic ring fused cyclic-hydroxydithiane derivatives. synthesis of aromatic ring fused cyclic 1,2-diketones with one-carbon ring expansion. *J. Org. Chem.*, **64**, 6380-6386 (1999).
- Rastrelli, L., Capasso, A., Pizza, C., De Tommasi, N., y Sorrentino, L., Newprotopine and benzyltetrahydroprotoberberine alkaloids from *Aristolochia constricta* and their activity on isolated guinea-pig ileum. *J. Nat. Prod.* **60**, 1065-1069 (1997).
- Reinmann, E. Natural stilbenes II. Synthesis of polyhydroxystilbenes. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **750**, 109-127 (1971).

- Rojas, A., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R., Linares, E., y Mata, R. Spasmolytic potencial of some plants used in mexical tradicional medicine of the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, **2**, 57-66 (1995).
- Rojas, A., Cruz, S., Ponce-Monter, H., y Mata, R. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonea viscosa*. *Planta Med.*, **62**, 154-155 (1996).
- Rojas, A., Bah, M., y Rojas J. I. Gutierrez, D. M. Smooth muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from *Gentiana spathacea*. *Planta Med.* **66**, 765-767 (2000).
- Sachdev, K., y Kulshreshtha, K. Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis*. *Phytochemistry*, **25**, 499-502. (1986).
- Sachdev, K., y Kulshreshtha, K. Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis*. *Phytochemistry*, **25**, 499-502. (1986).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes. In: *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18.47-18.59 (1989).
- Scheline, R. R. Polyhidroxylated metabolites of trans-stilbene in the rat. *Experientia*, **30**, 880-881 (1974).
- Seitz, U., Ameri, A.; Pelzer, H.; Gleitz, J. and Peters, T. Relaxation of evoked contractile activity of isolated Guinea-pig ileum by ( $\pm$ ) *Kavain*. *Planta Med.* **63**, 303-306 (1997).
- Sharma, R. K., y Wang, J. H. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*; Greengard, P.; Robinson G.A., Eds.; Raven Press, New York, Vol. **10**, pp 187-198 (1979).
- Shier, W. T., Abbas, H. K., y Mirocha, C. J. Toxicity of the mycotoxins fumonisins B1 and B2 and *Alternaria alternata* f. sp *lycopersici* toxin (AAL) in cultured mammalian cells. *Mycopathologica* **116**, 97-104 (1991).
- Shimizu, M., Shogawa, H., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I., y Berganza, L. H. Anti-inflammatory constituents of tropical applied crude drugs III. Constituents and anti-inflammatory effect of paraguayan crude drug "Tamandá cuná" (*Catasetum barbatum* Lindley). *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4447-4452 (1988).
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Bauer, L., Langeloh, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM) D. C. Compositae. *J. Ethnopharmacol.*, **22**, 281-293 (1988).
- Snetzke, G. Circular dichroismus—IX : Modifizierung der octantenregel für  $\alpha,\beta$ -ungesättigte ketone: transoide enone. *Tetrahedron*, **21**, 421-438 (1965).

## Referencias Bibliográficas

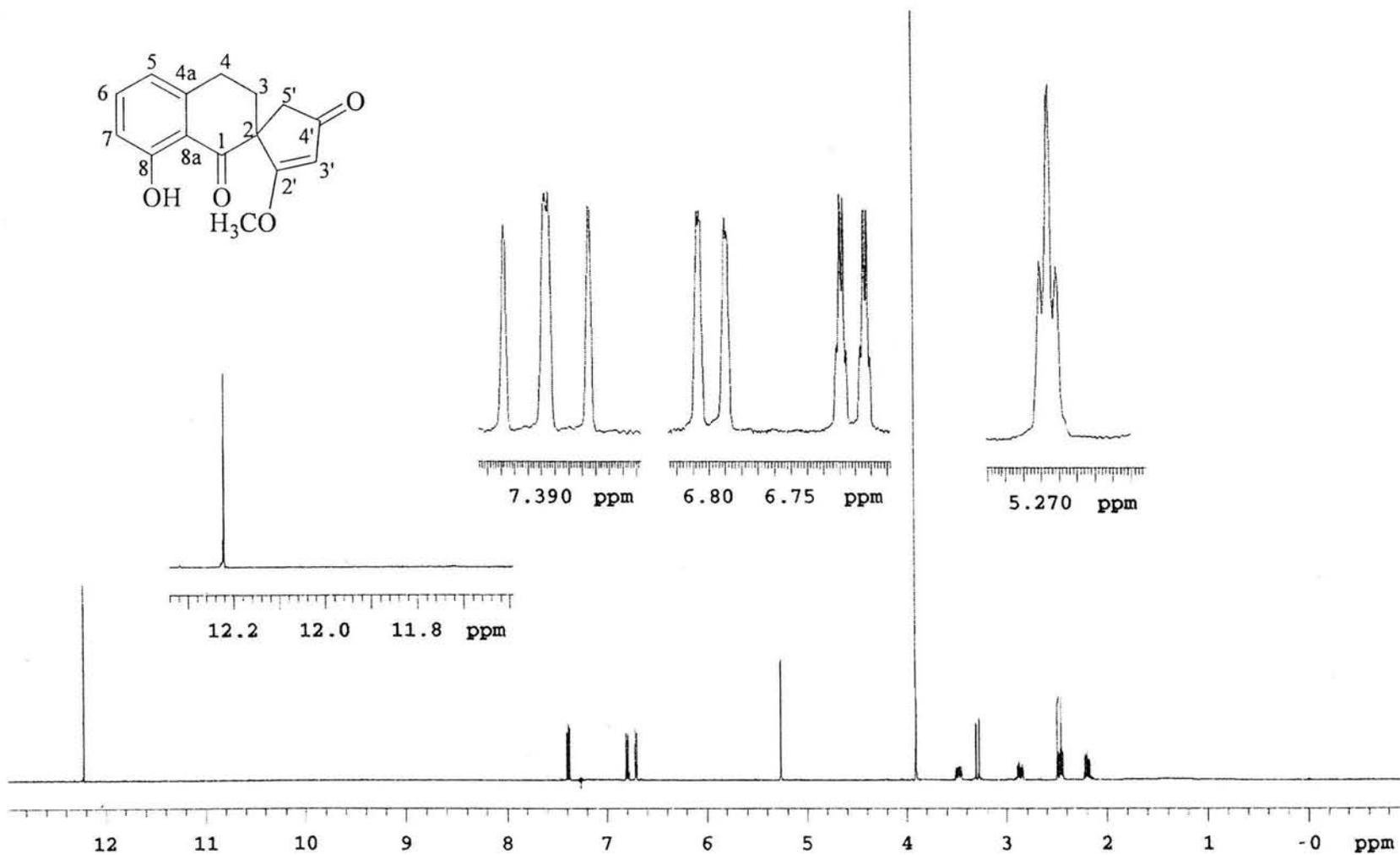
- Stermitz, F. R., Suess, T. R., Schauter, C. K., y Anderson, P. O. New and old phenanthrene derivatives from *Oncidium cebolleta*, a peyote-replacement plant. *J. Nat. Prod.*, **63**, 417-423 (1983).
- Stoessl, A., y Arditti, J. Orchid Phytoalexins. En: *Orchid Biology Reviews and Perspectives III*, Arditti, J. (ed.), Cornell University Press. 153-175. (1984).
- Takagi, K., Saito, H., Nabata, H. Pharmacological studies of Panax ginseng root: estimation of pharmacological actions of *Panax ginseng*. *Jpn J. Pharmacol.*, **22**, 245-249 (1972).
- Takagi, S., Yamaki, M., y Inoue, K. Antimicrobial agents from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **22**, 1011-1015. (1983).
- Takasugi, M., Kawashima, S., Monde, K., Katsui, N., Masamune, T., y Shirata, A. Antifungal compounds from *Dioscorea batatas* inoculated with *Pseudomonas cichorii*. *Phytochemistry*, **26**, 371-375 (1987).
- Tanaka, T., Abbas, H., Duke, S. Structure-dependent phytochemistry of fumonisins on related compound in a duckweed bioassay. *Phytochemistry*, 779-785 (1993).
- Tatsuzawa, F., Saito, N., Seki, H., Hara, R., Yokio, M., y Honda, T. Acylated cyanidin glycosides in the red-purple flowers of *Phalaenopsis*. *Phytochemistry*, 173-177 (1997).
- Tekuza, Y., Ji, L., Hirano, H., Ueda, M., Nagashima, K., y Kikuchi, T. Studies on the constituents of Orchidaceous plants IX. Constituents of *Spiranthes sinensis* (PERS.) AMES var. *amoena* (M. BIEBERSON) HARA. (2). Structures of Spiranthosol, spiranthoquinone, spiranthol-C y spirasineol-B, new isopentenylidihydrophenanthrenes. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 6 29-635. (1990).
- Tezuka, Y., Hirano, H., Kikuchi, T., y Xu, G. J. 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 (1991).
- Tits, M., Damas, J., Quetin-Leclercq, J., Angenot, L., From ethnobotanical uses of *Strychnos henningsii* to antiinflammatories, analgesics and antispasmodics. *J. Ethnopharmacol.*, **34**, 261-267 (1991).
- Torres, L. M. B., Gamberini, M. T., Roque, N. F., Lima-Landman, M. T., Souccar, C., y Antonio, J. L. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, **55**, 617-619 (2000).

- Evans, W. C., Trease, G. E., Evans, D. Trease and Evans Pharmacognosy, Edinburgh, New York, W. B. Saunders (2002).
- Trute, A., Gross, J., Muts, E., y Nahrsteat, A. *In vitro* antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta Med.*, **63**, 125-129 (1997).
- Tuchinda, P., Udchachon, J., Khumtaveeporn, K., Taylor, W. C., Engelhardt, L. M., y White, A. H. Phenanthrenes of *Eulophia nuda*. *Phytochemistry*, **27**, 3267-3271 (1988).
- Valencia-Islas, N. Paul, R. N. Shier, W. T., Mata, R., y Habbas, H. Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed frond and roots tissue. *Phytochemistry*, **61**, 141-148 (2002).
- Van Puyelde, L., Lefebvre, R., Mugabo, P., De Kimpe, N., Schamp, N. Active principles of *Tetradenta riparia*. II. Antispasmodic activity of 8(14),15-sandaracopimaradiene-7 $\alpha$ ,18-diol. *Planta Med.*, **53**, 156-158 (1987).
- Vertessy, B. G., Harmat, V., Bocskei, Z., Naray-Szabo, G., Orosz, F., Ovadi, J. Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry*, **34**, 15300-15310 (1998).
- Voet, D., Pratt, C., Voet, J. G. Fundamentals Biochemistry Uptade. Wiley and Sons (2002).
- Vogalis, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. *J. Auton. Pharmacol.*, **20**, 207-219 (2001).
- Webb R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Edu.*, **27**, 201-206 (2003).
- Weeratunga, G., Bohlin, L., Sandberg, F., Kumar, V. A muscle-relaxant catechin derivative from *Elaeodendron bala* (Celastraceae). *Acta Pharm. Suec.*, **21**, 73-76 (1984).
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F., y Durner, J. O. Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.*, **6**, 177-183 (2001).
- Williams, C. A. The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry*, **18**, 803-813 (1979).
- Williamson, M. E., Ukpako, T. D., y Evans, J. F. Pharmacological methods in phytotherapy research. En: *Selection, Preparation, and Pharmacological Evaluation of Plant Material*. John Wiley and Sons, New York, pp. 1-46. (1996).

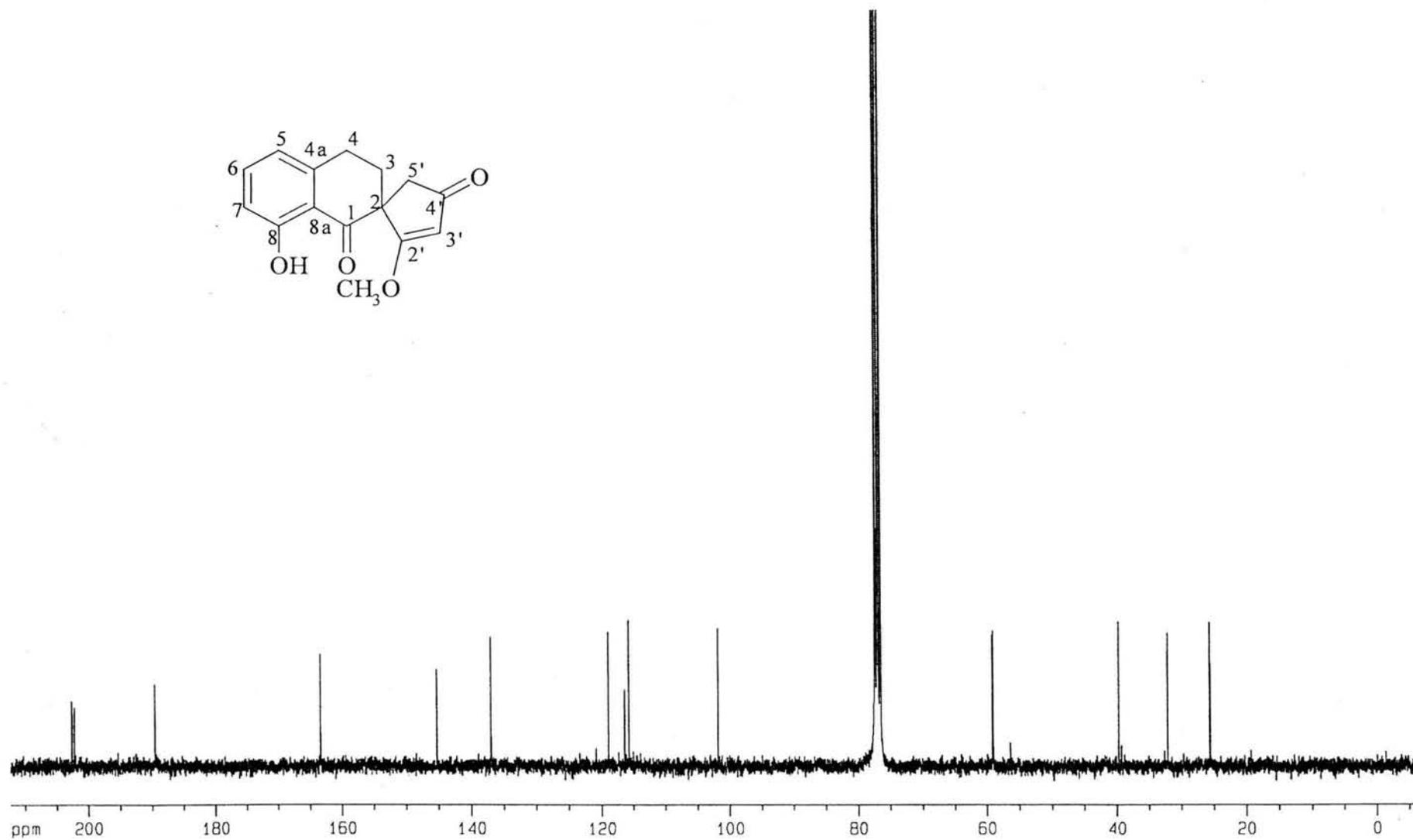
## Referencias Bibliográficas

- Wittig, G., y Geissler, G. Zur Reaktionsweise der Pentaphenyl-phosphors und einiger Derivate. *Liebigs Ann. Chem.*, **580**, 44 (1953).
- Wittig, G., Scholkopf, U. *Chem. Ber.*, **87**, 1318 (1954).
- Wollenweber, E.; Dietz, V. H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry*, **20**, 869-932 (1981).
- Woodrum, D. A., y Brophy, C. M. The Paradox of the smooth muscle physiology. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **177**, 135-143 (2001).
- Wu, Ch. R., Itsich, M. T., Huang, S. Ch., Peng, W. H., Chang, Y. S., y Chem, C. F. Effects of *Gastrodia elata* and its constituents on scopolamine induced amnesia in rats. *Planta Med.*, **62**, 317-321 (1996).
- Yamahara, J., Kobayashi, M., Matsuda, H., Auki, S. Anticholinergic actino of *Swertia japonica* and active constituents. *J. Ethnopharmacol.* **33**, 31-35 (1991).
- Yamaki, M., Bai, L., Inoue, K., y Takagi, S. Biphenanthrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **28**, 3503-3505 (1989).
- Yu, H-Y., Dawson, V. L., y Dawson, T. M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol. Psych.* **2**, 300-310 (1997).
- Zhang, L., and Lu., Y. T. Calmodulin-binding protein in plants. *Trends Plant Sci.*, **8**, 123-127 (2003).
- Zimmemann, A. y Dougoud, R. C. (eds.) *Orchidées Exotiques, Deelachaux, Neuchatel; Beutes de la nature.* (1959).

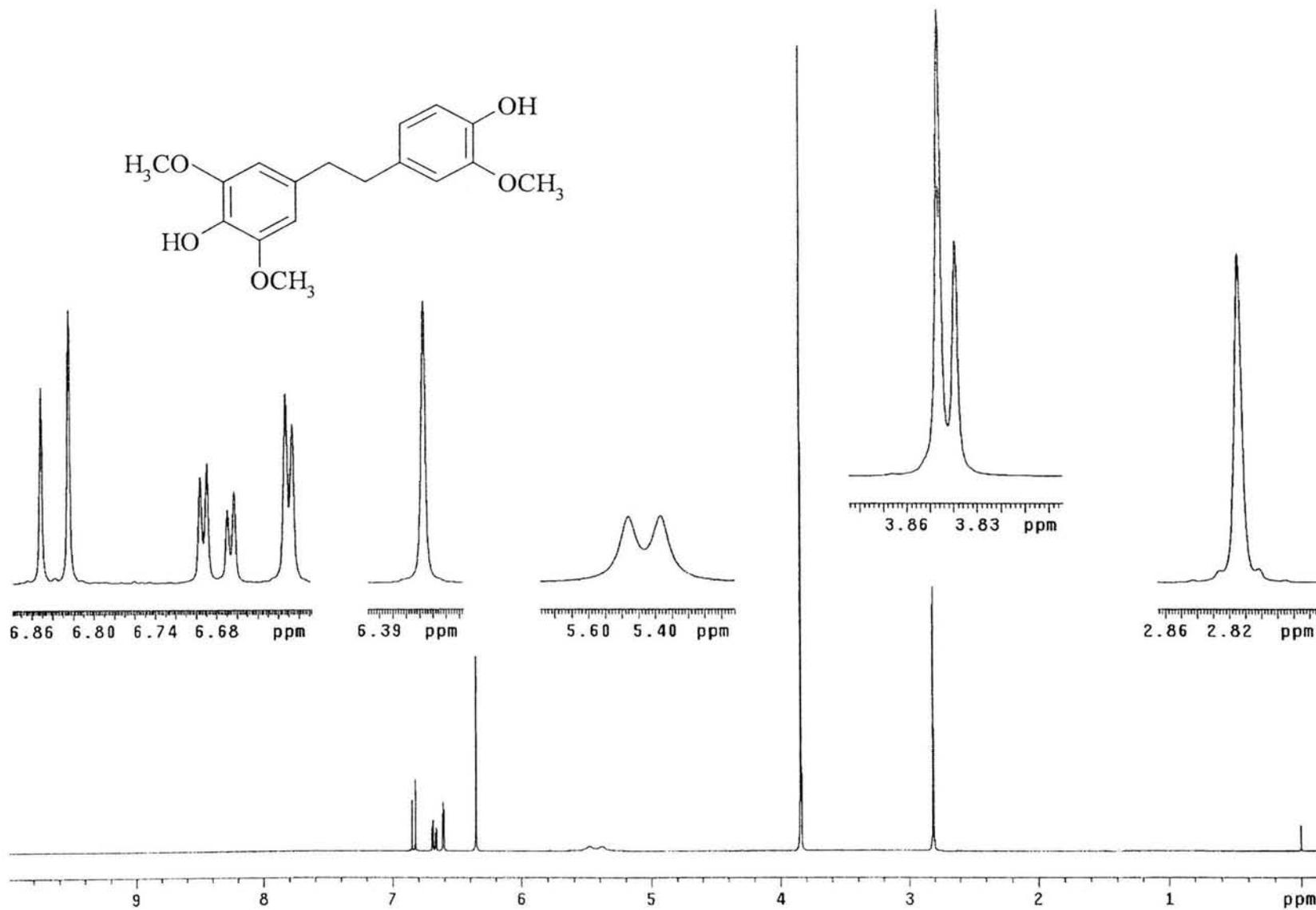
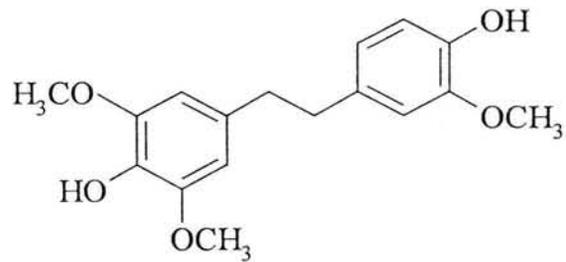
*APENDICE I*



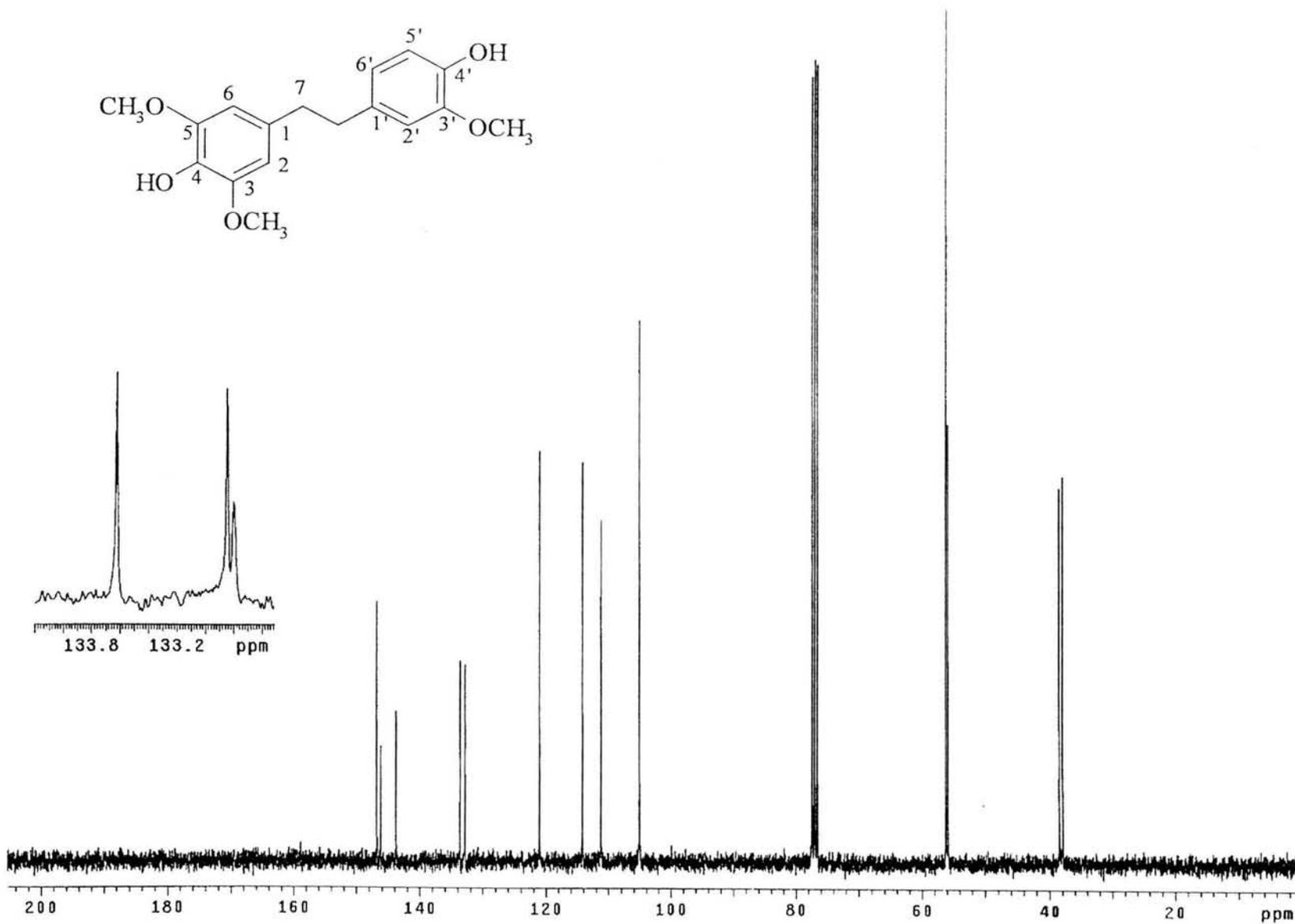
Espectro 1. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la nidemona (124)

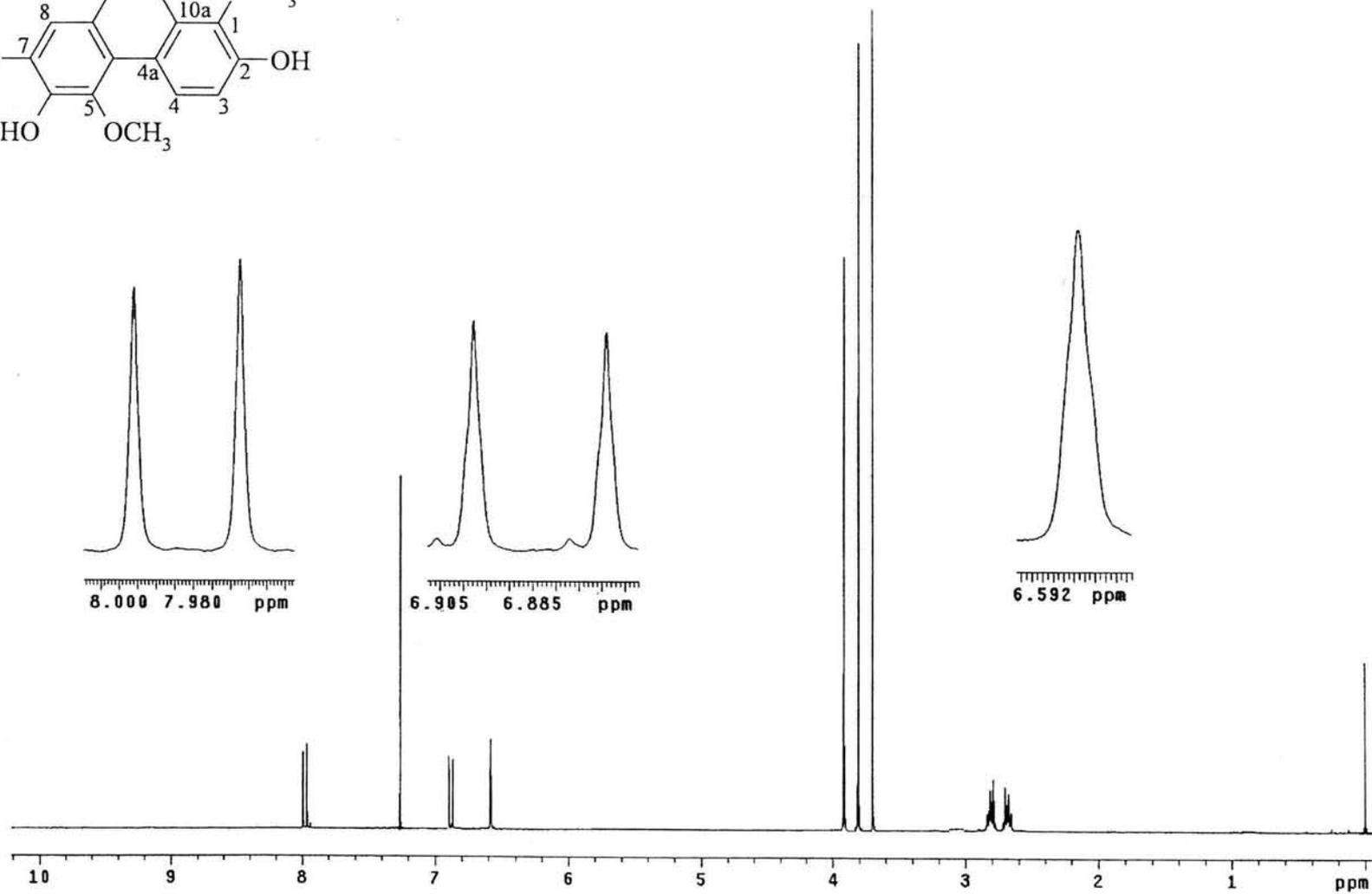
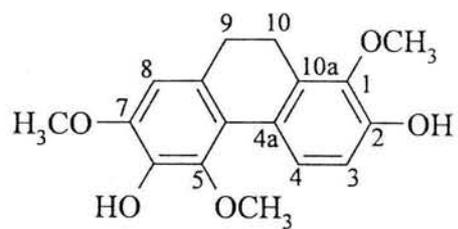


**Espectro 2.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la nidemona (124)

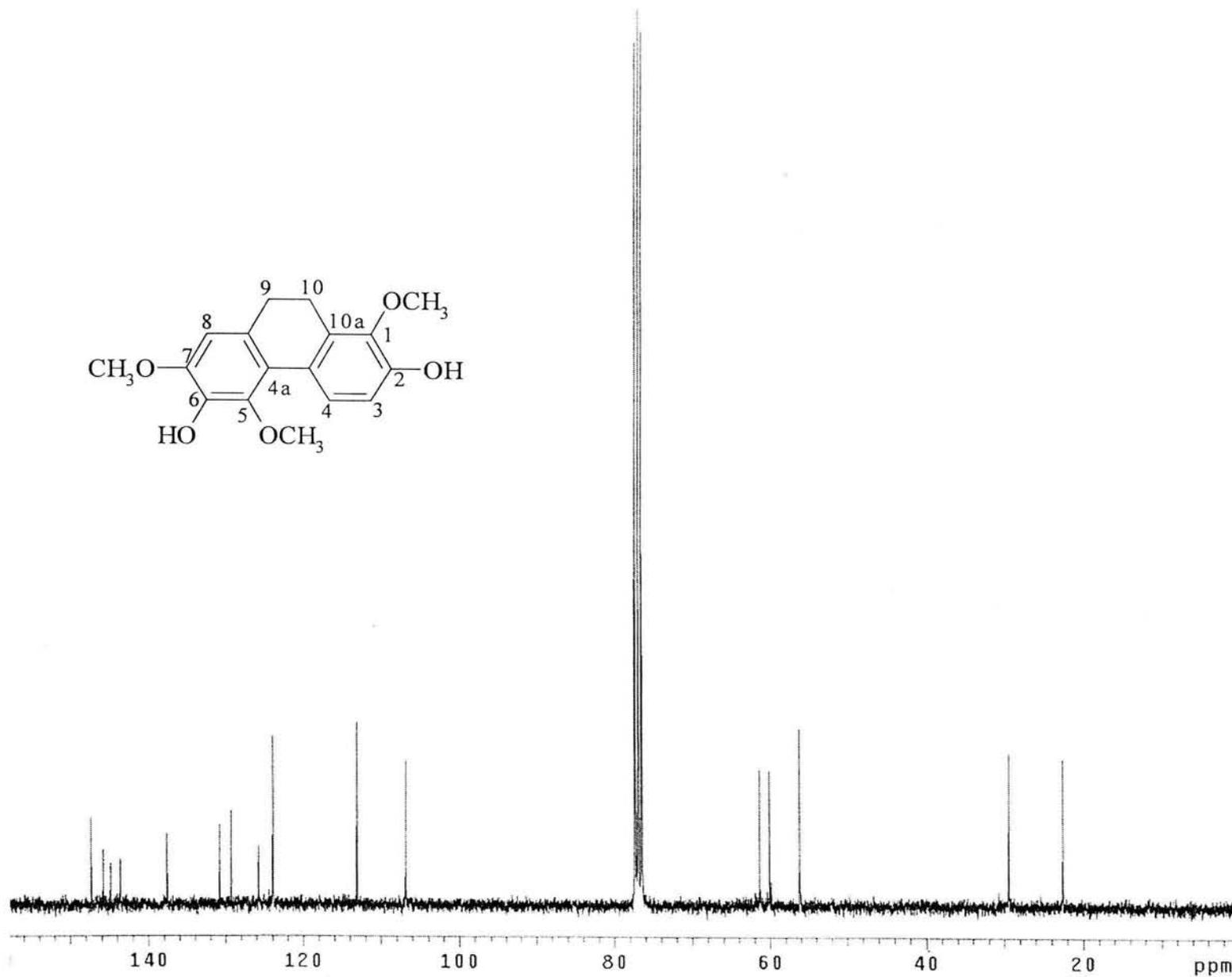


**Espectro 3.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del aloifol II (5)

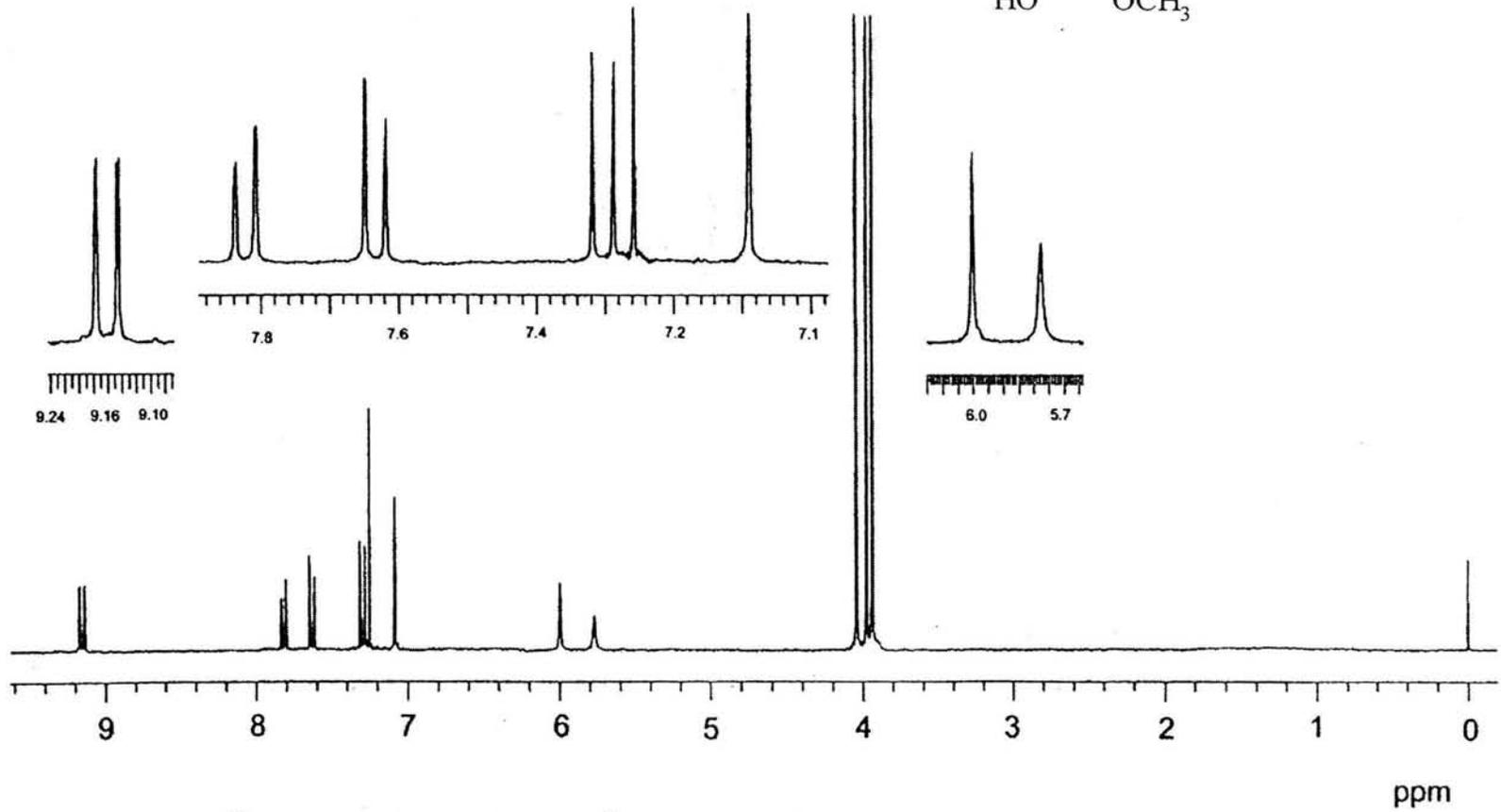
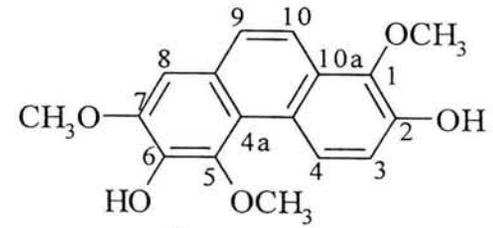
Espectro 4. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del aloifol II (5)



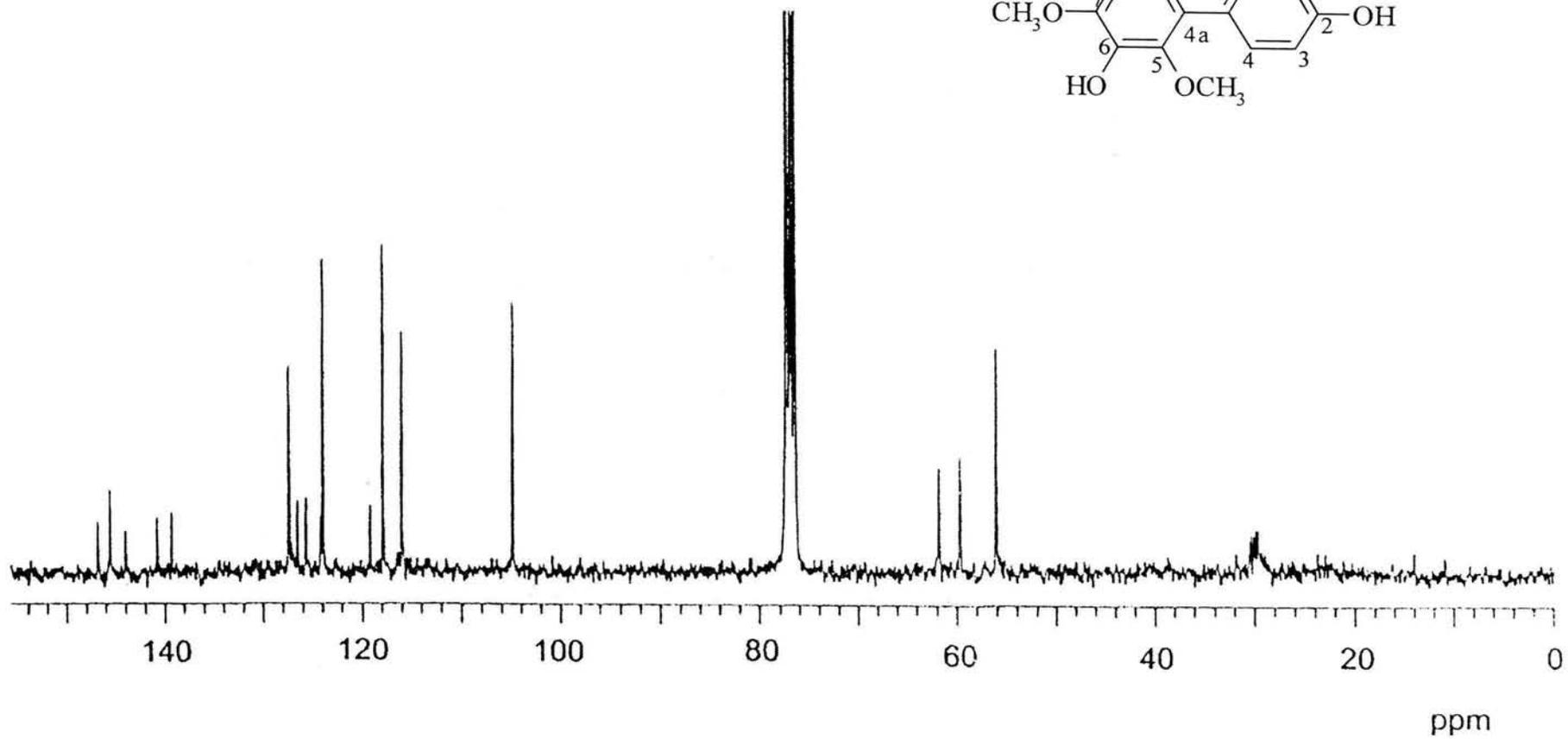
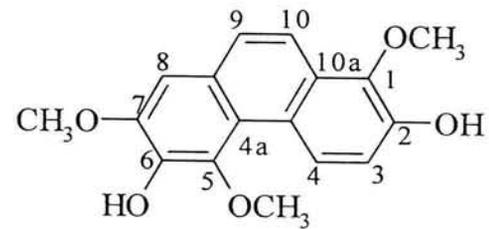
**Espectro 5.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (125)



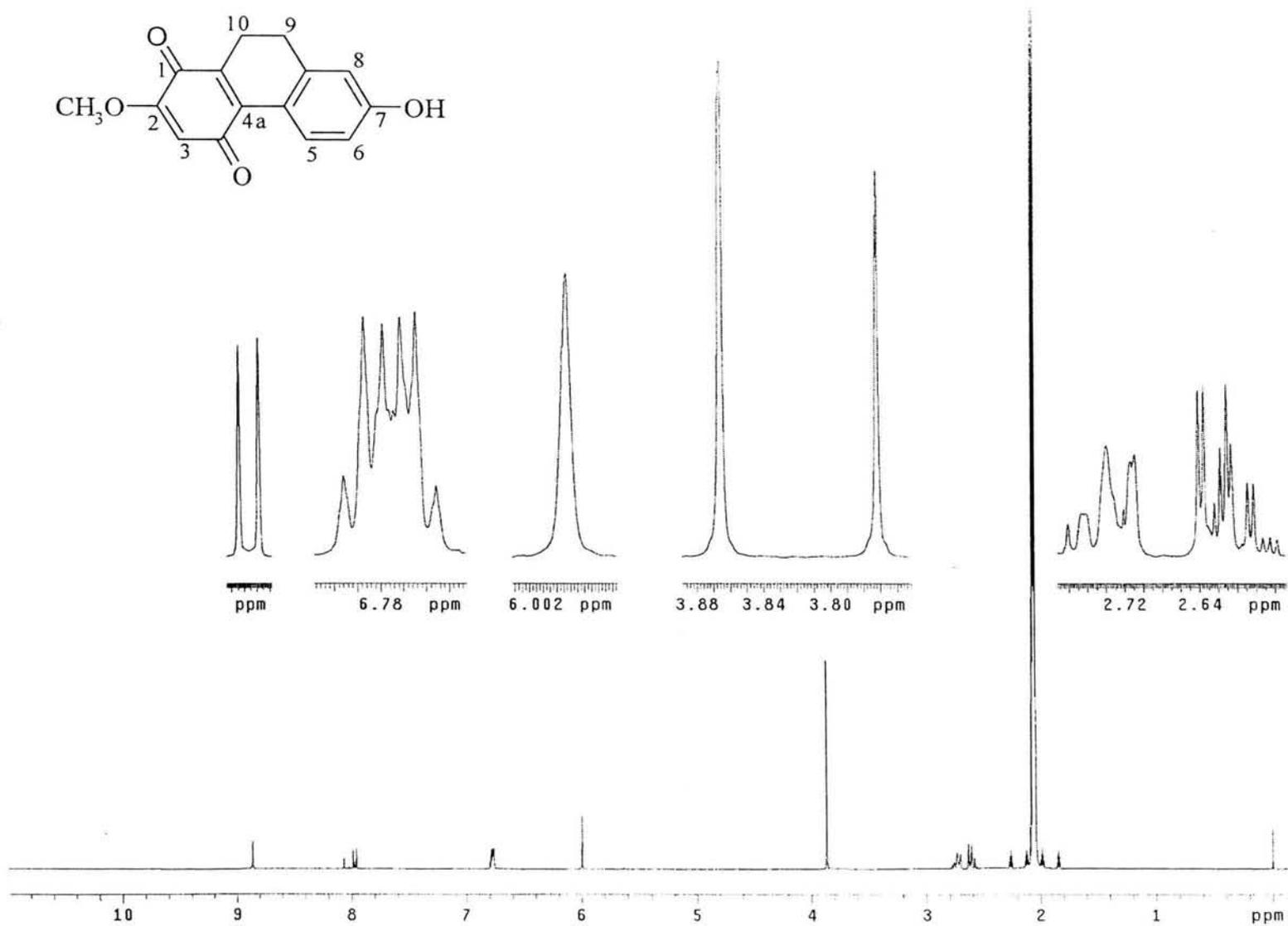
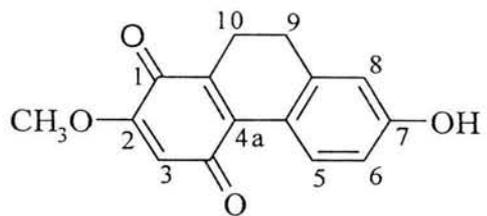
**Espectro 6.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno (125)



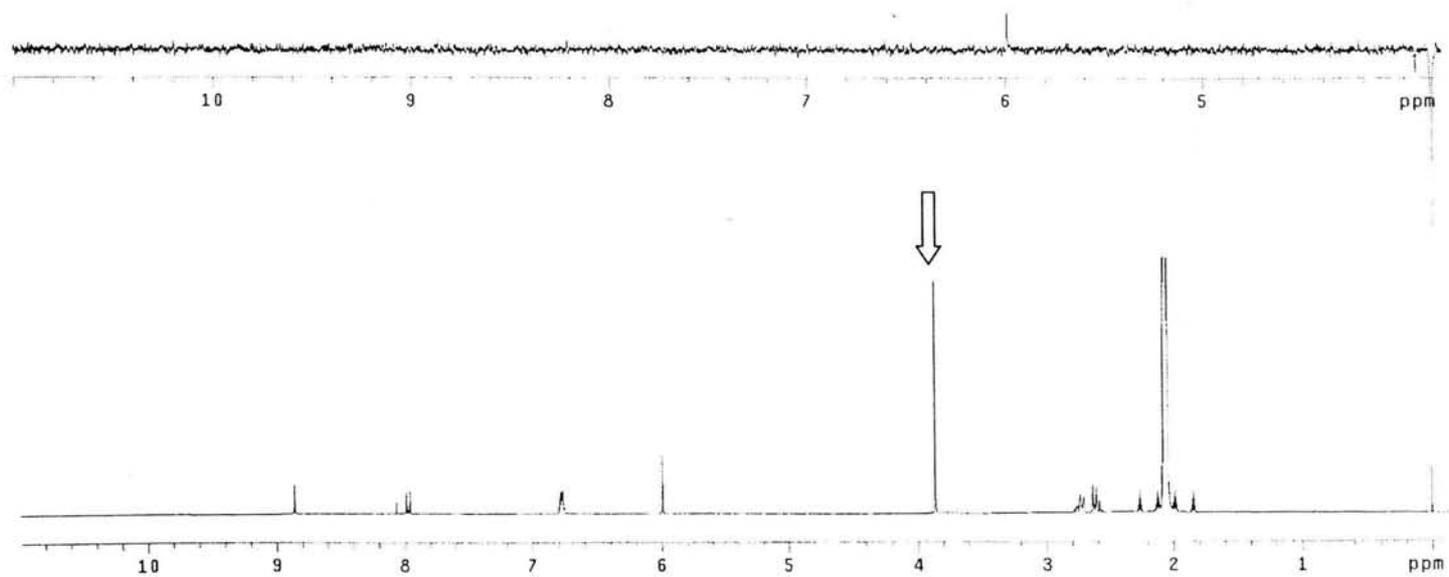
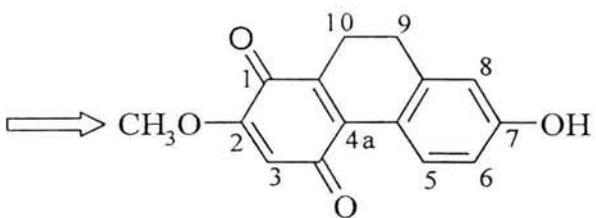
**Espectro 7.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (16).



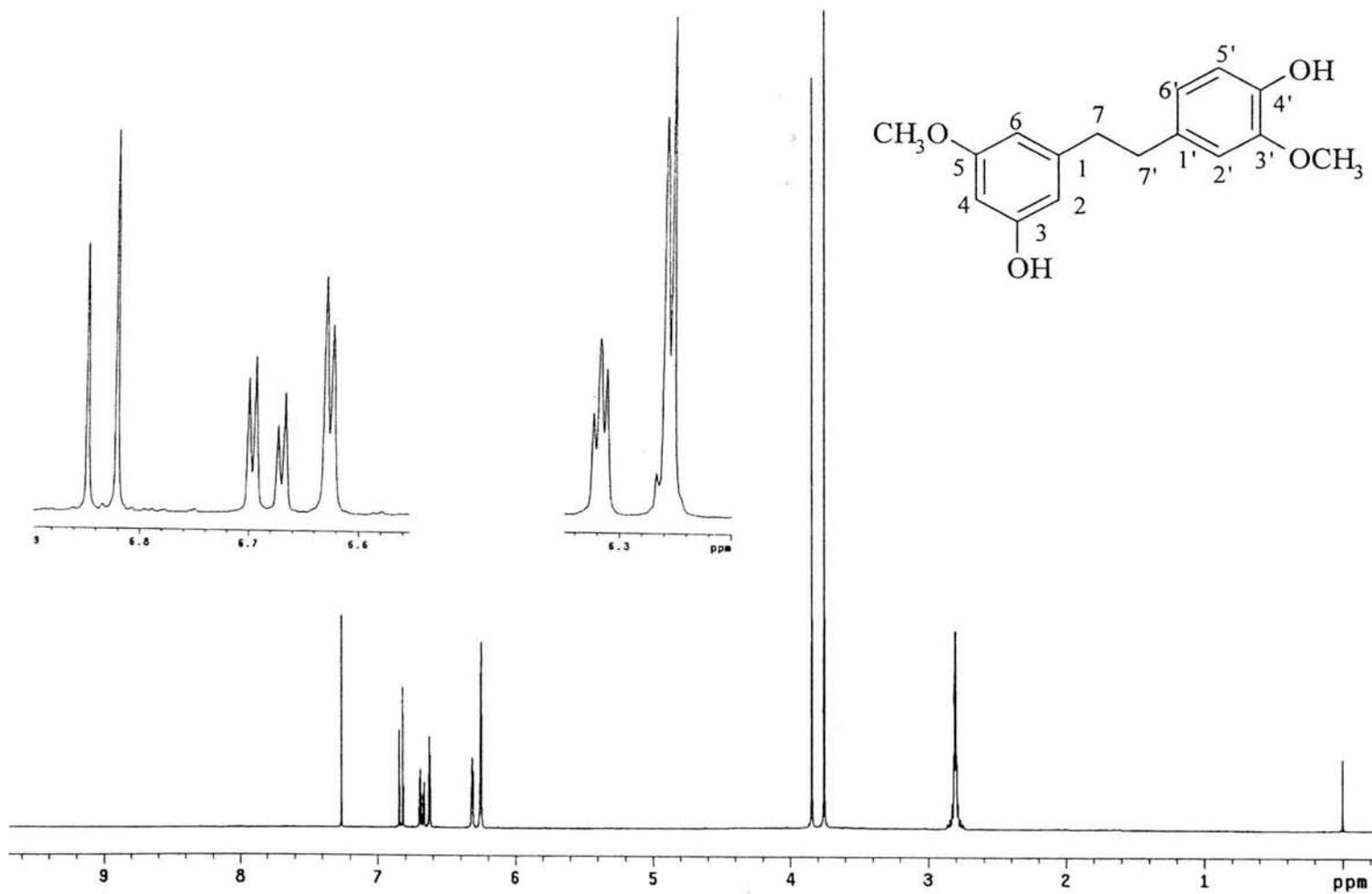
**Espectro 8.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del 2,6-dihidroxi-1,5,7-trimetoxifenantreno (16)



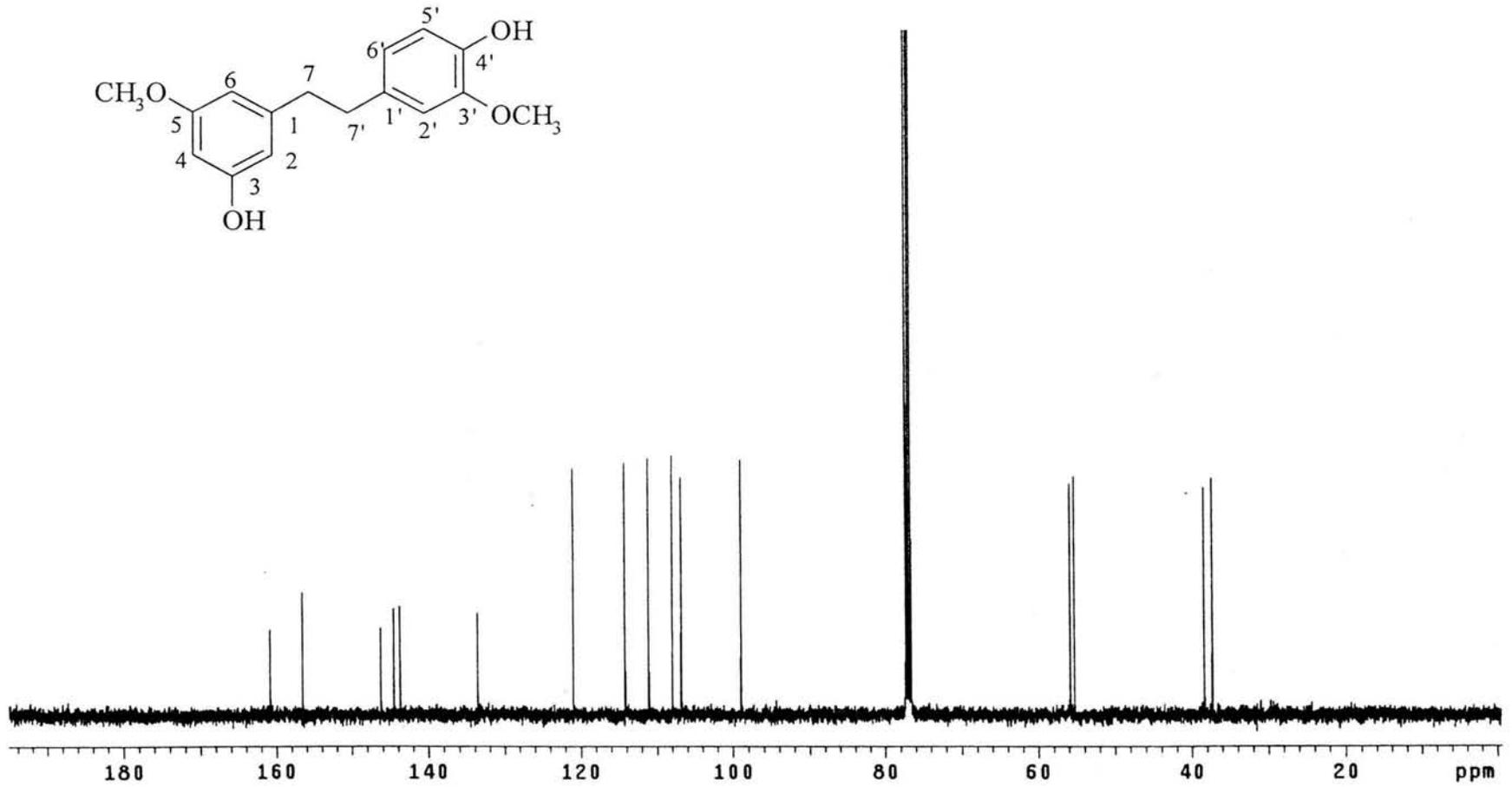
**Espectro 9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la efemerantochinona (126)

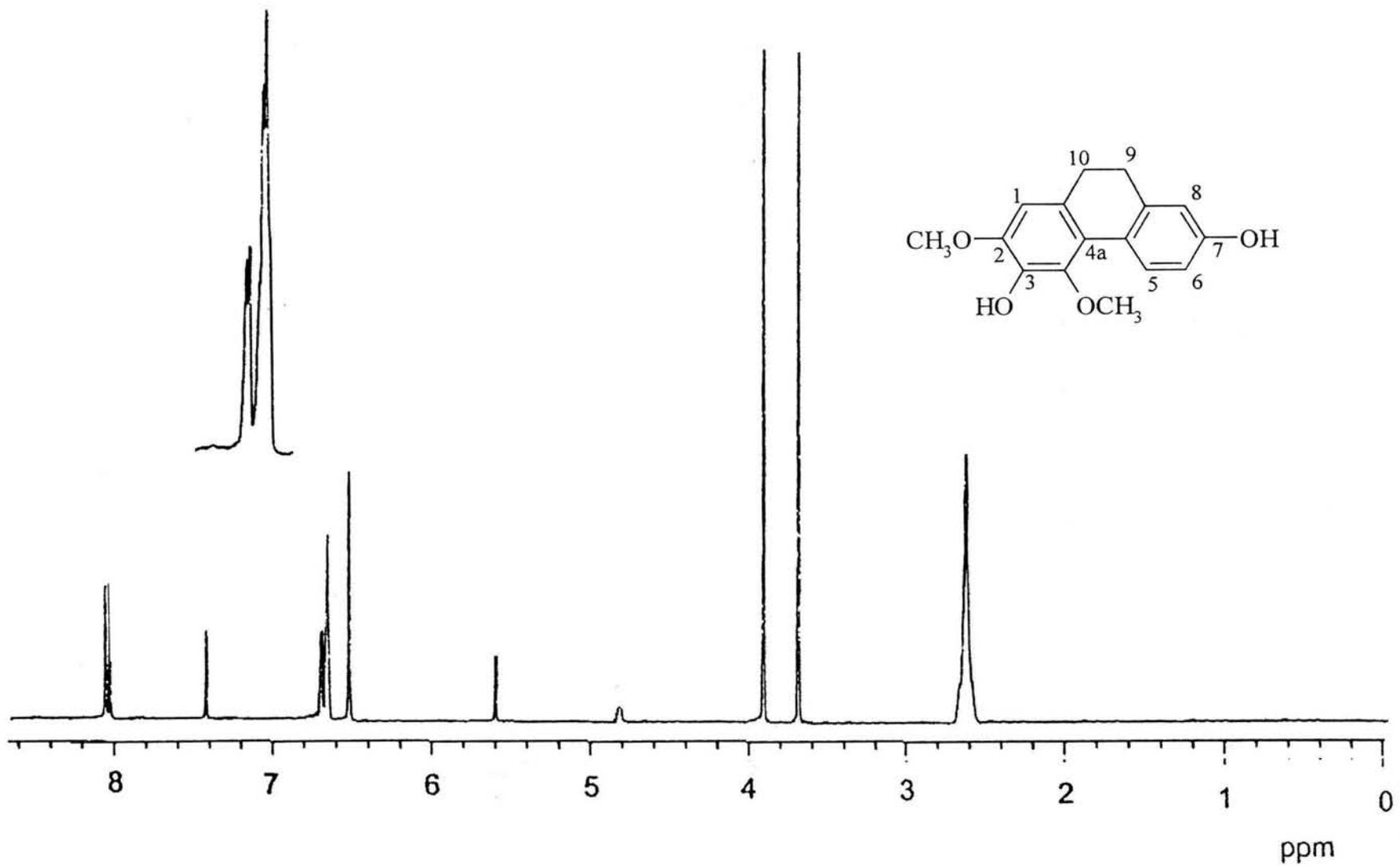


**Espectro 10.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  -NOE diferencial de la efemerantoquinona (126)

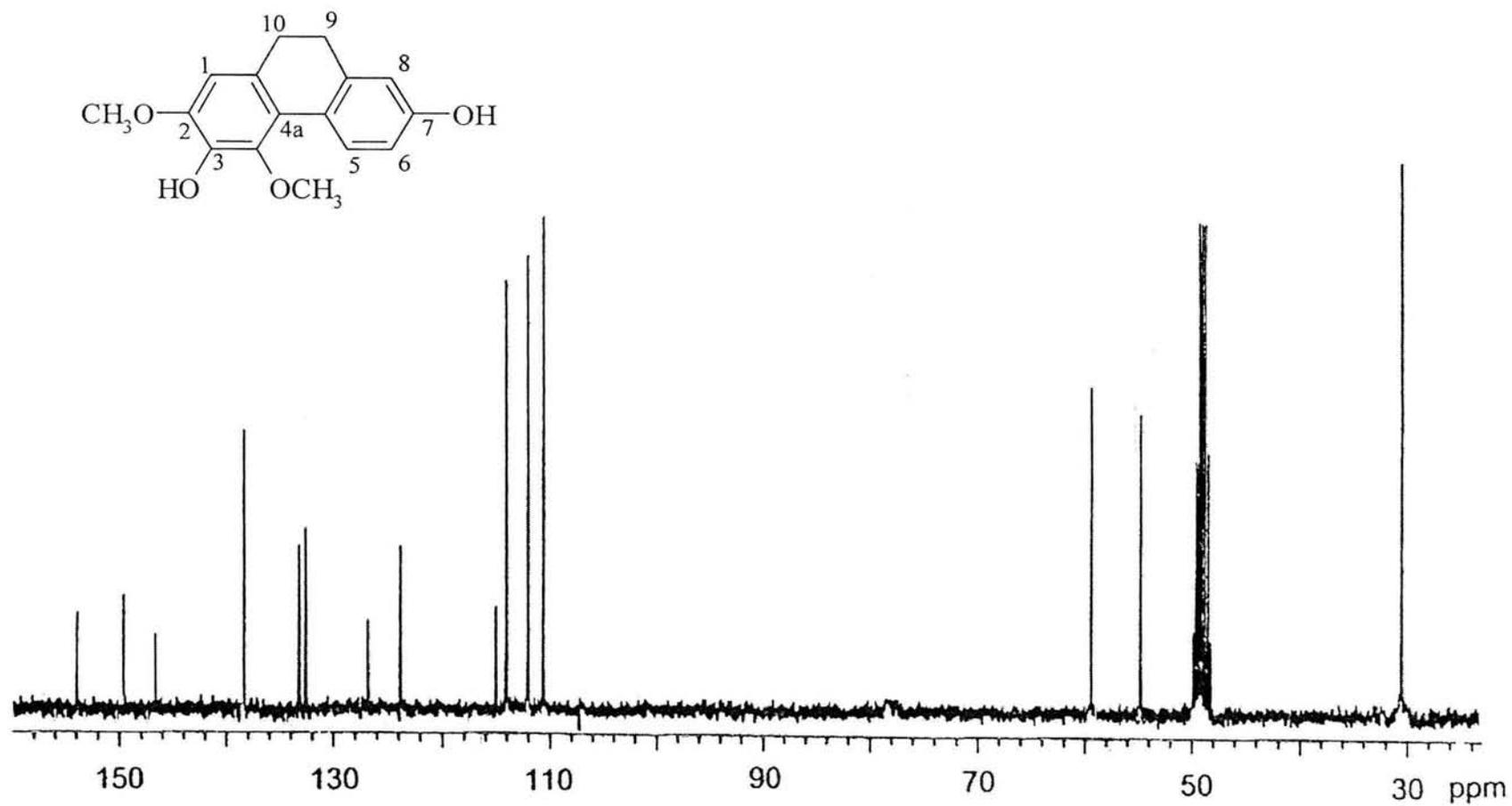


**Espectro 11.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del gigantol (2)

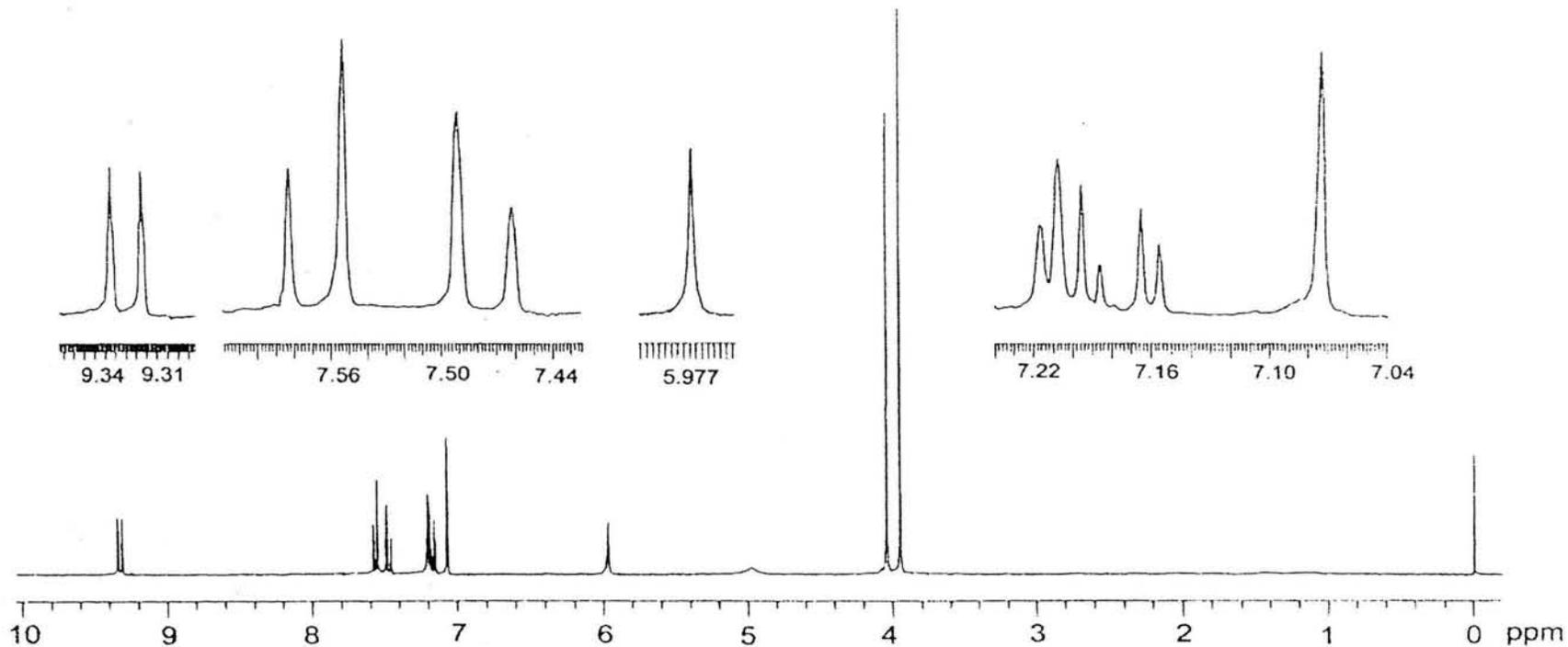
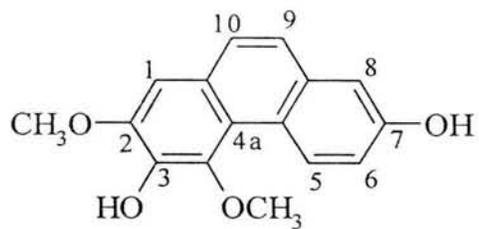
Espectro 12. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del gigantol (2)



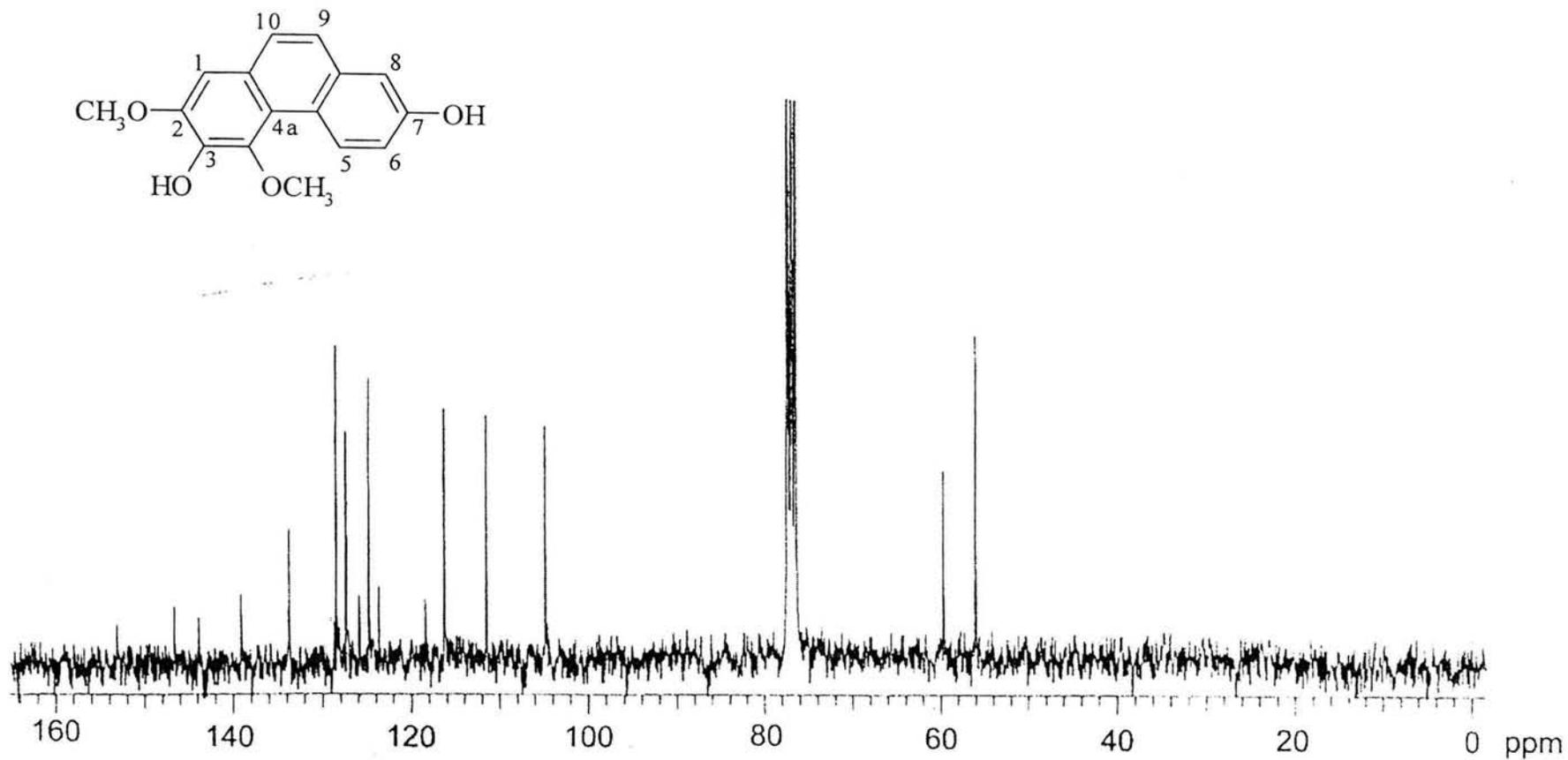
**Espectro 13.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del efemerantol B (127).



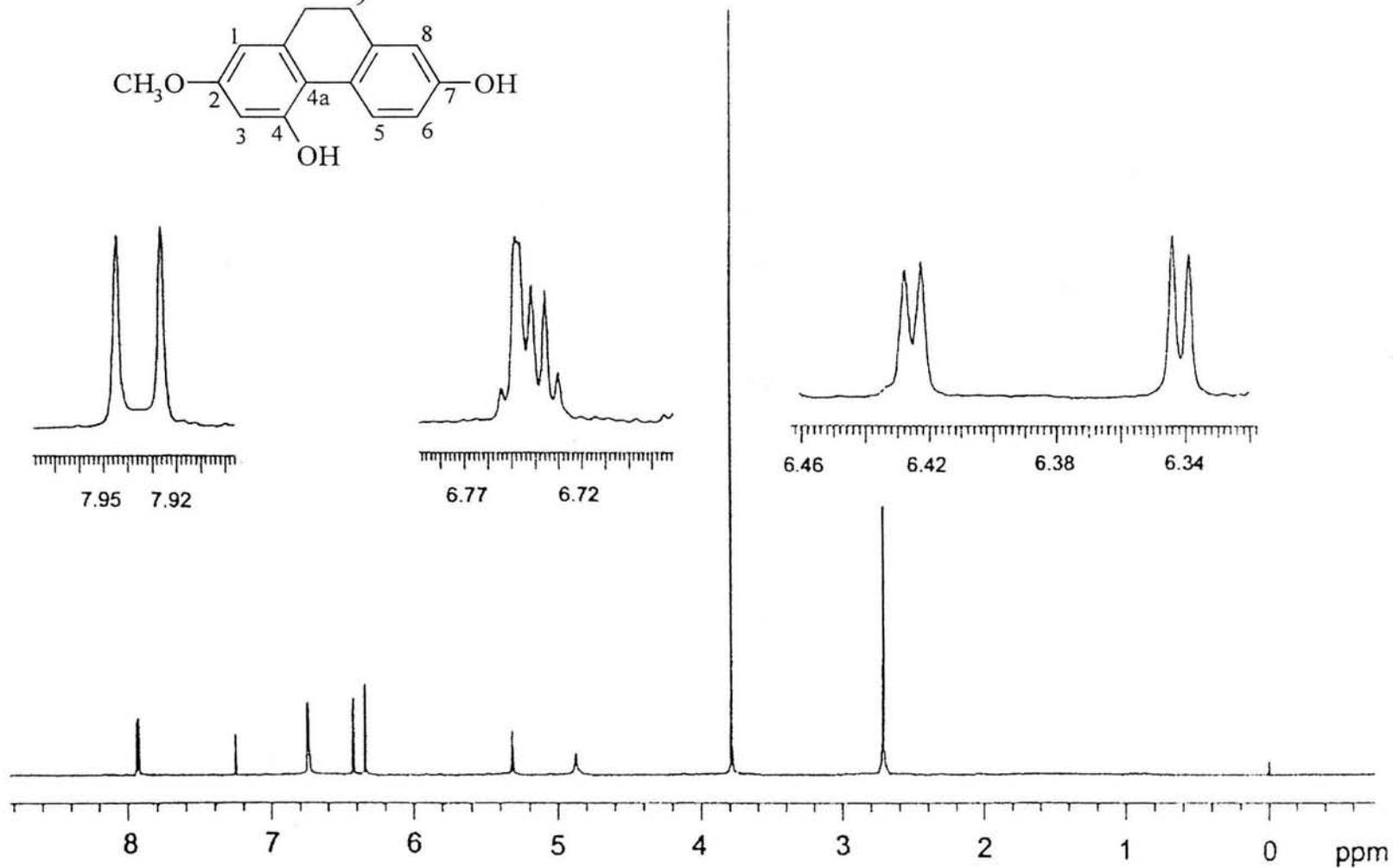
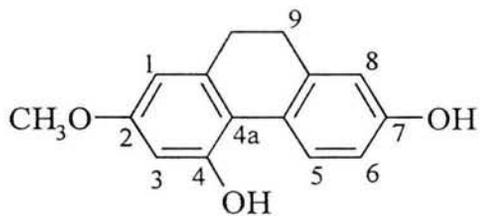
Espectro 14. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del efemerantol B (127).



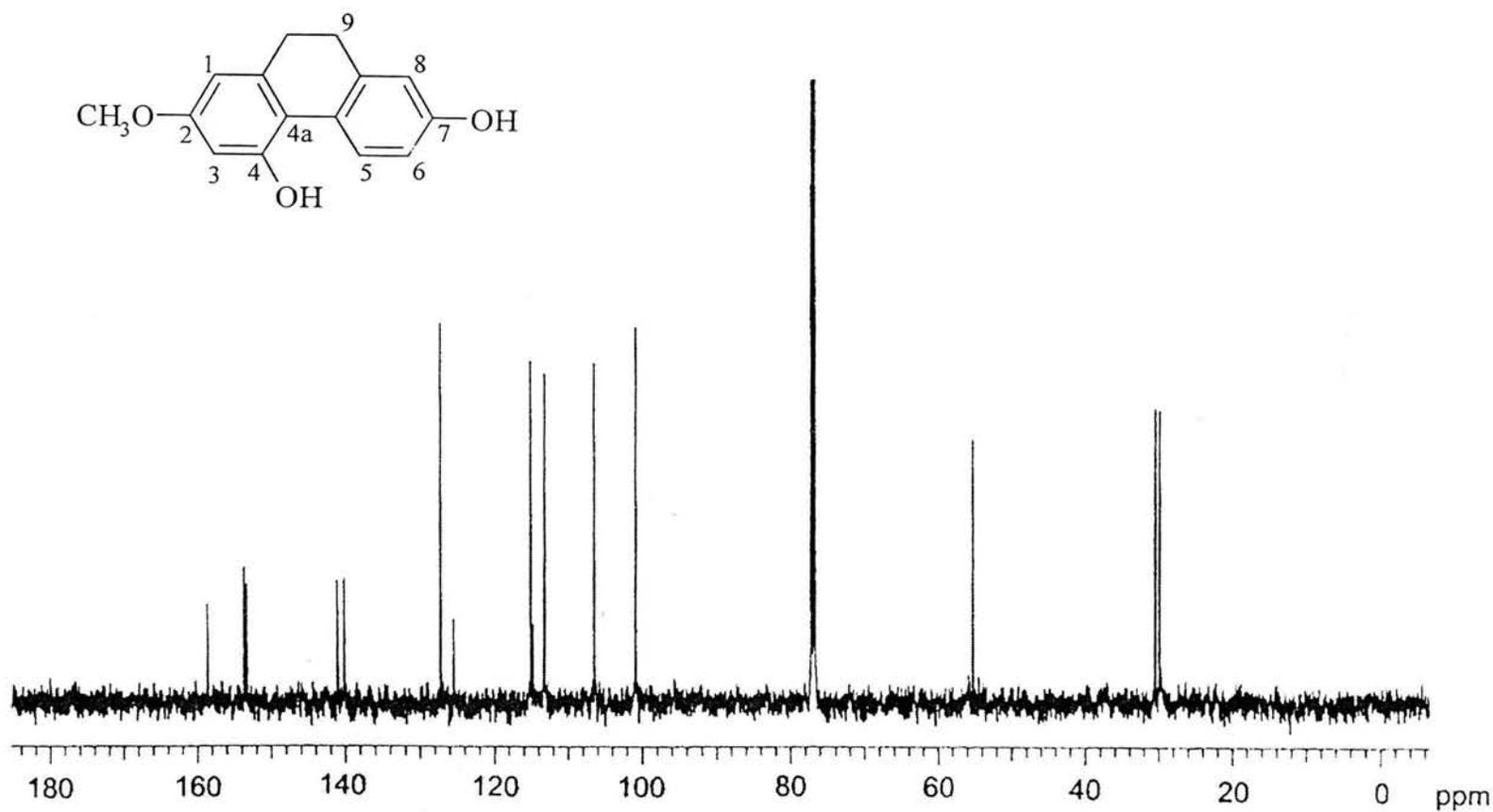
**Espectro 15.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**15**).



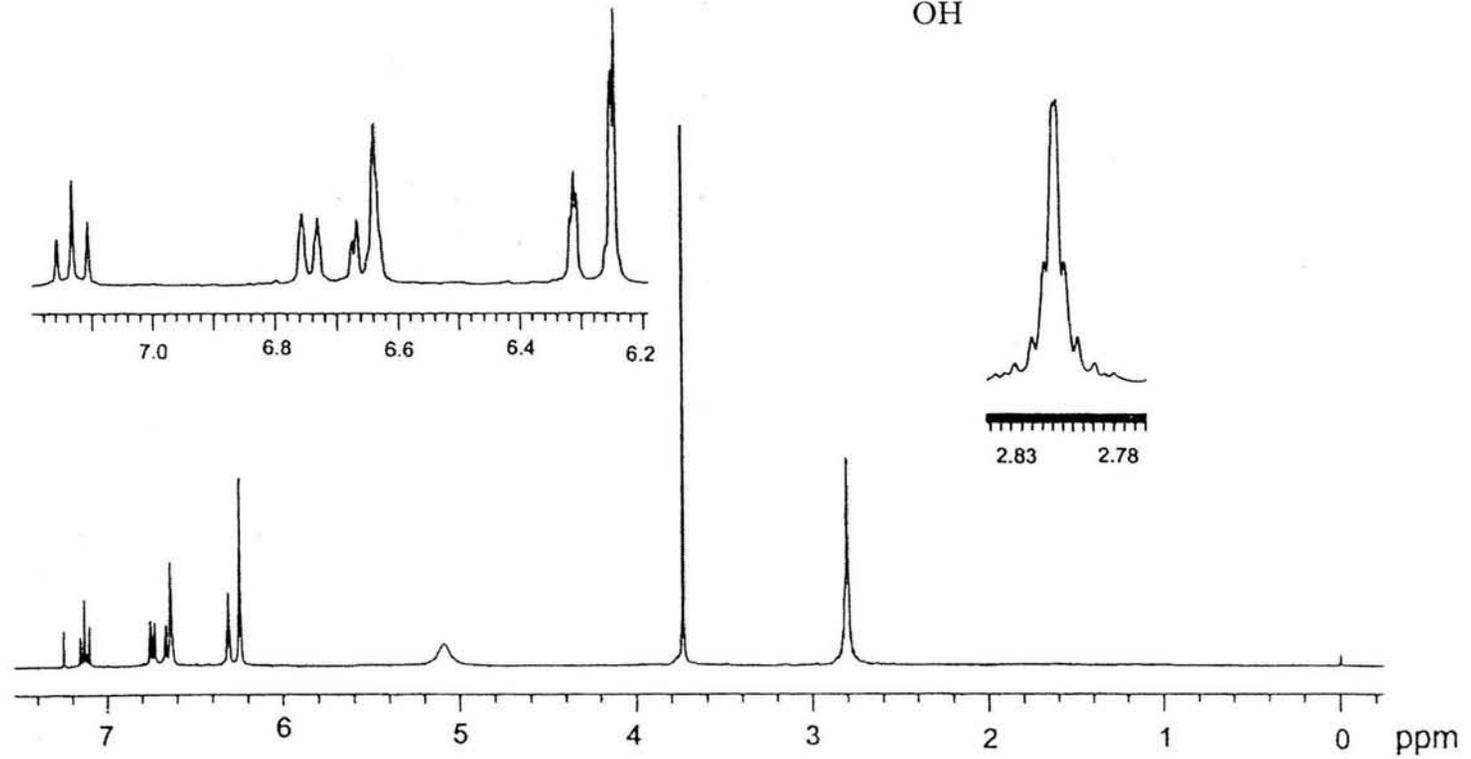
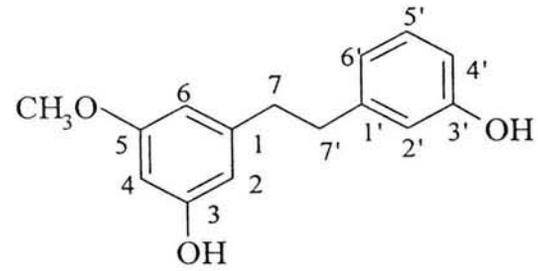
**Espectro 16.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (15).



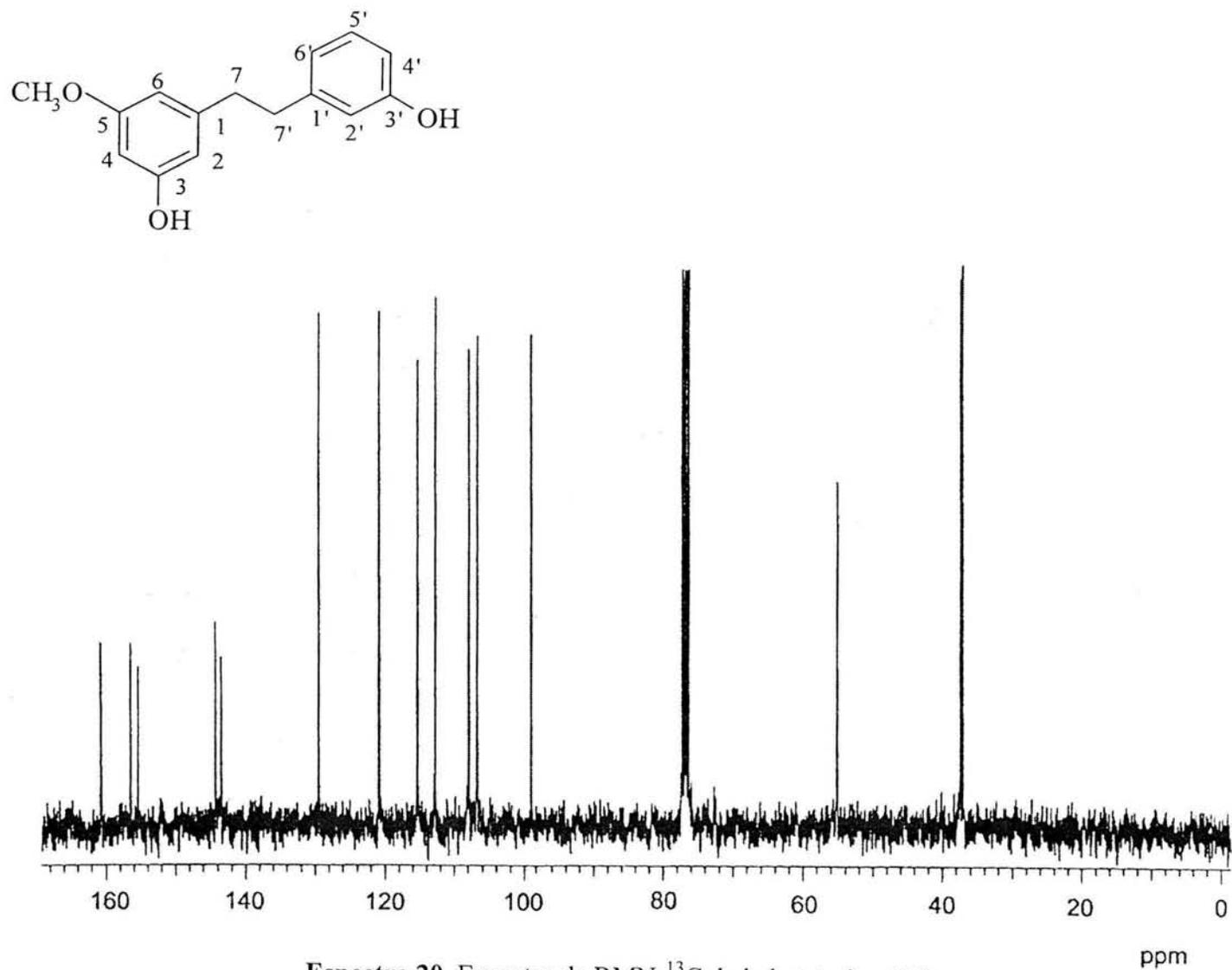
Espectro 17. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la lusiantridina (11).

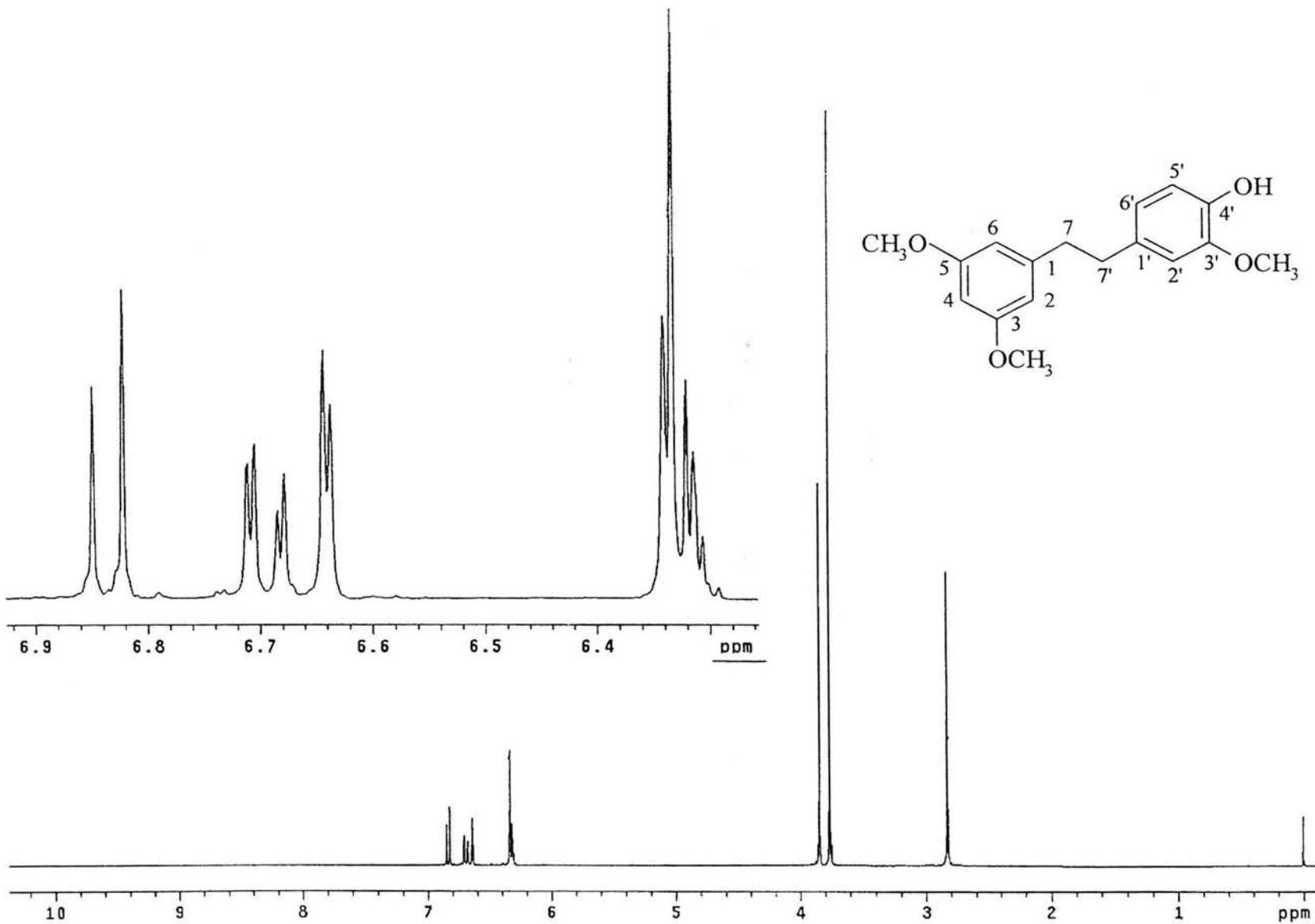


Espectro 18. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la lusiantridina (11).

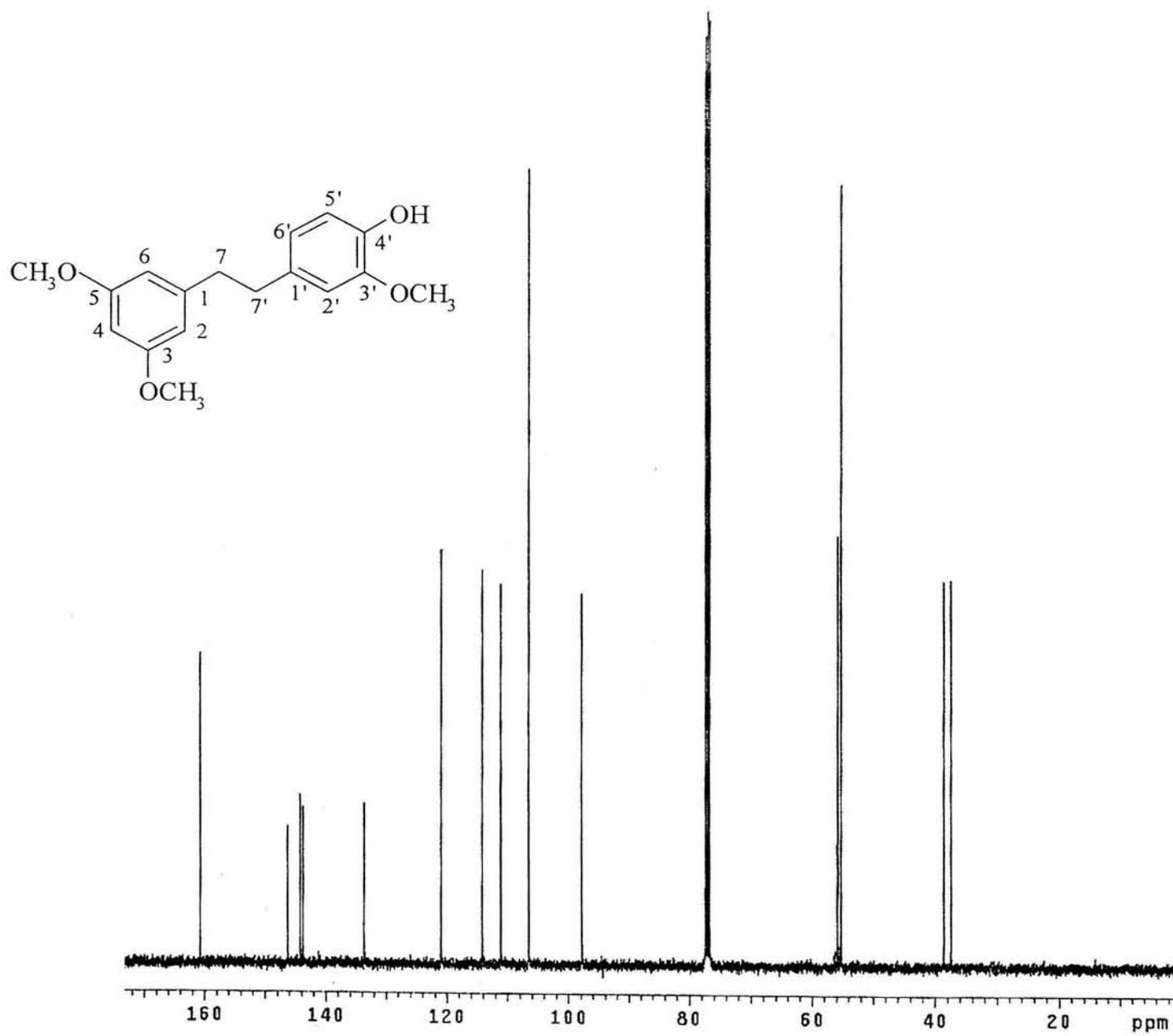


**Espectro 19.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la batatasina III (14).

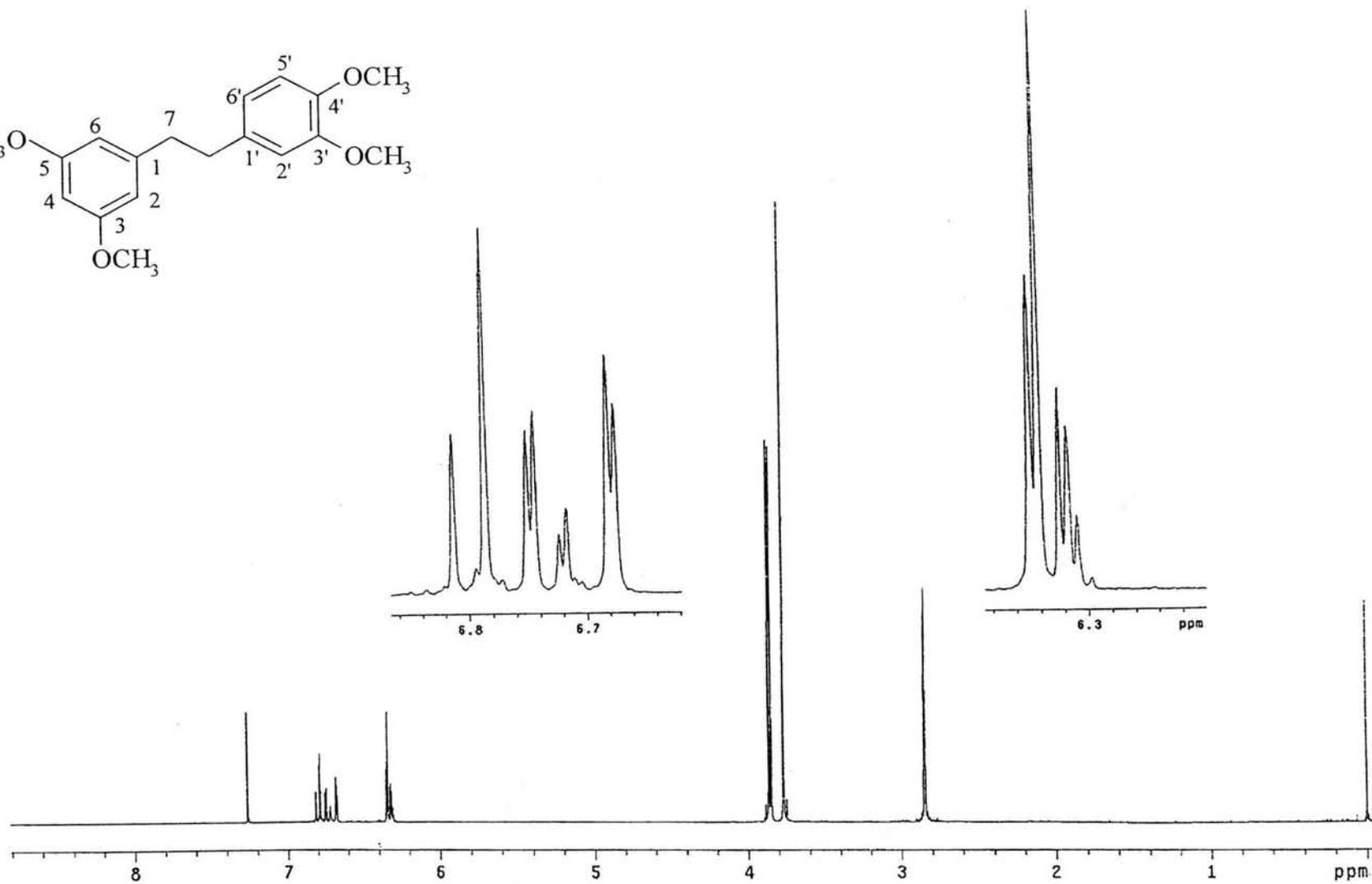
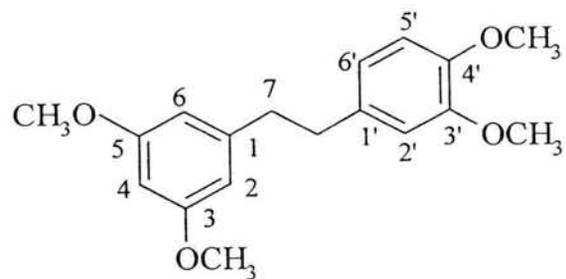




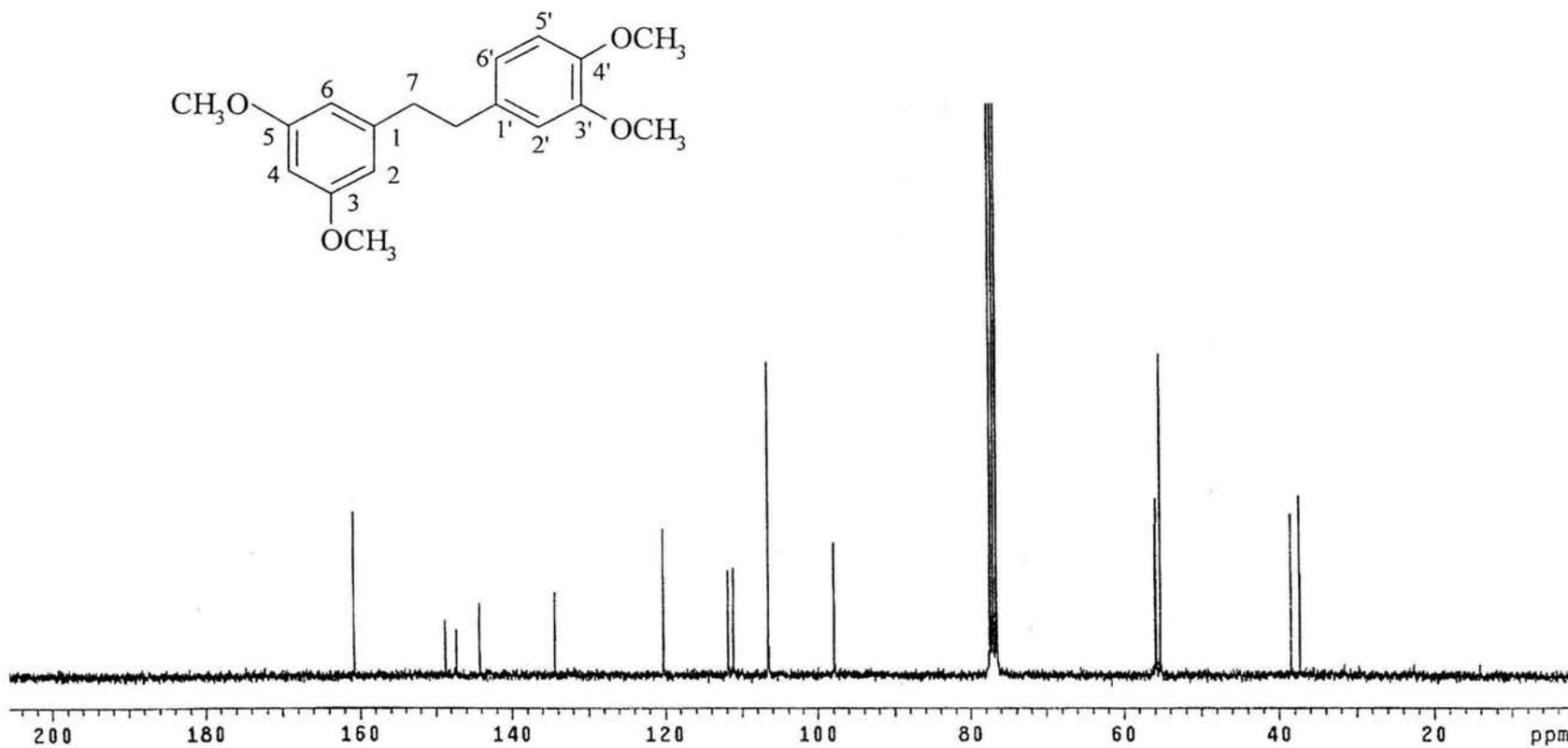
**Espectro 21.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 4'-Hidroxi-3,3',5-trimetoxibibencilo (145)



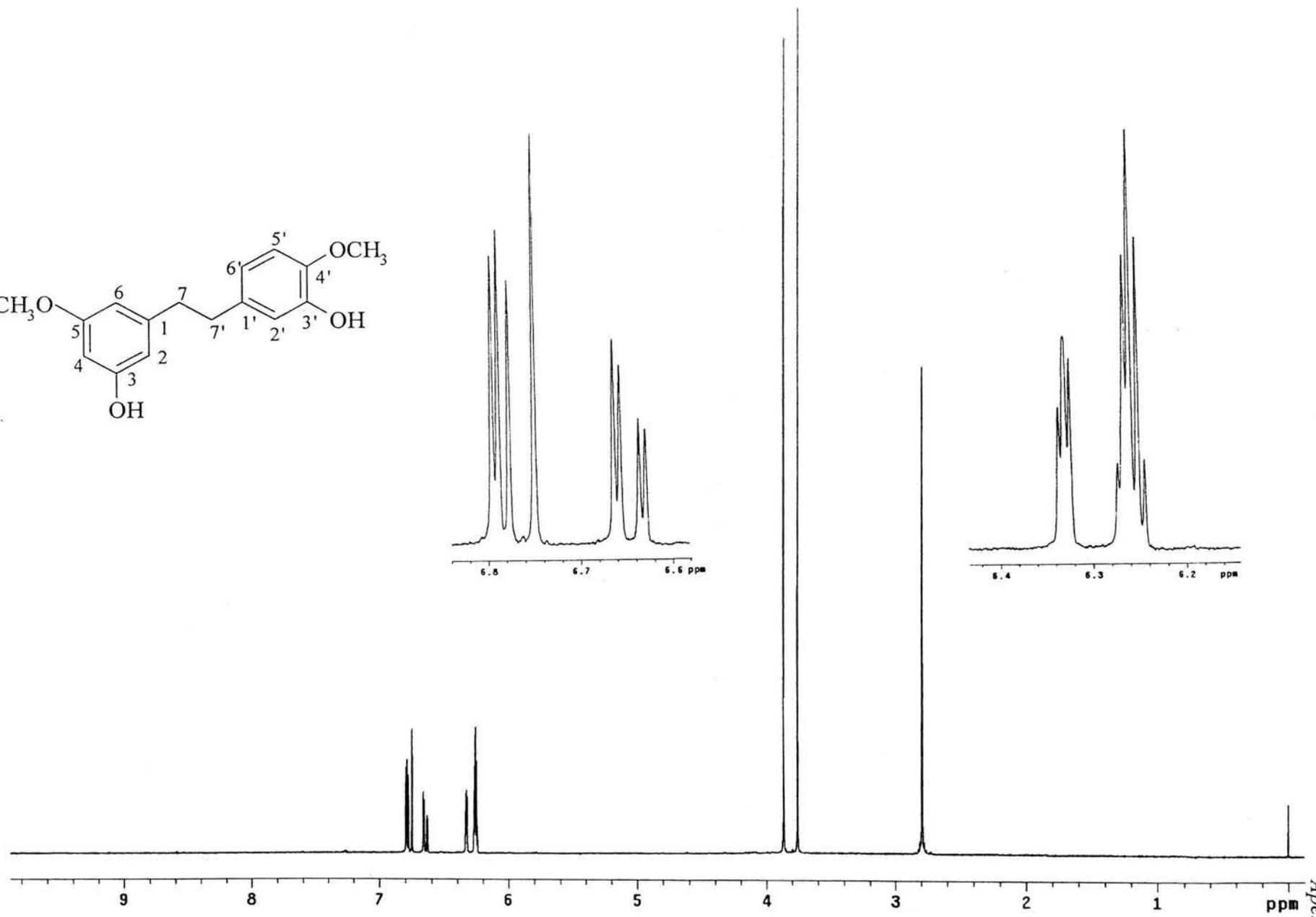
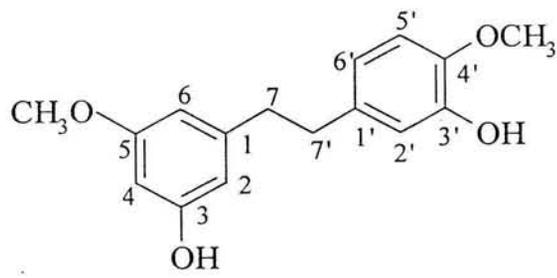
Espectro 22. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 4'-Hidroxi-3,3',5-trimetoxibencilo (145)



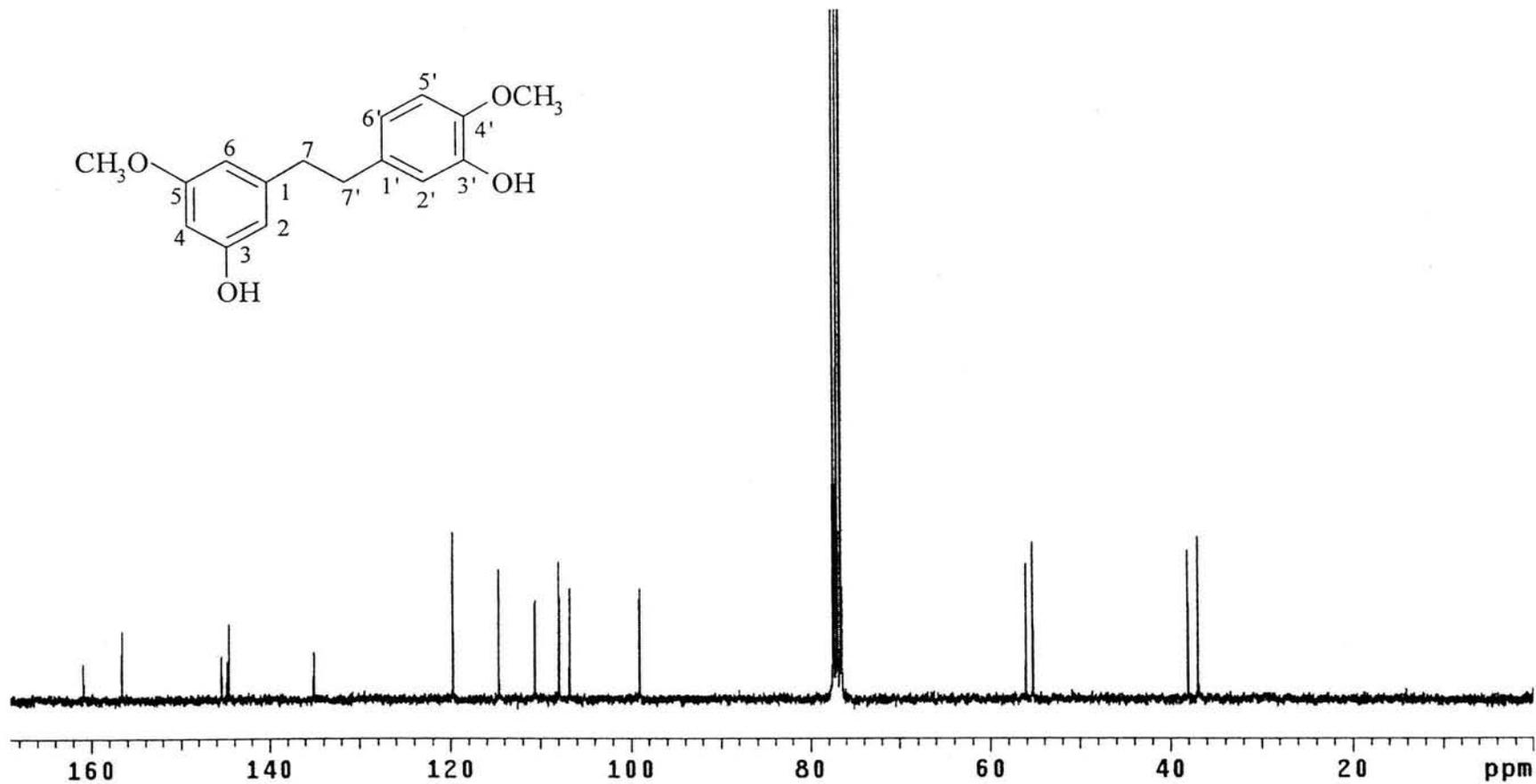
**Espectro 23.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3,3',4',5-tetrametoxibencilo (156).



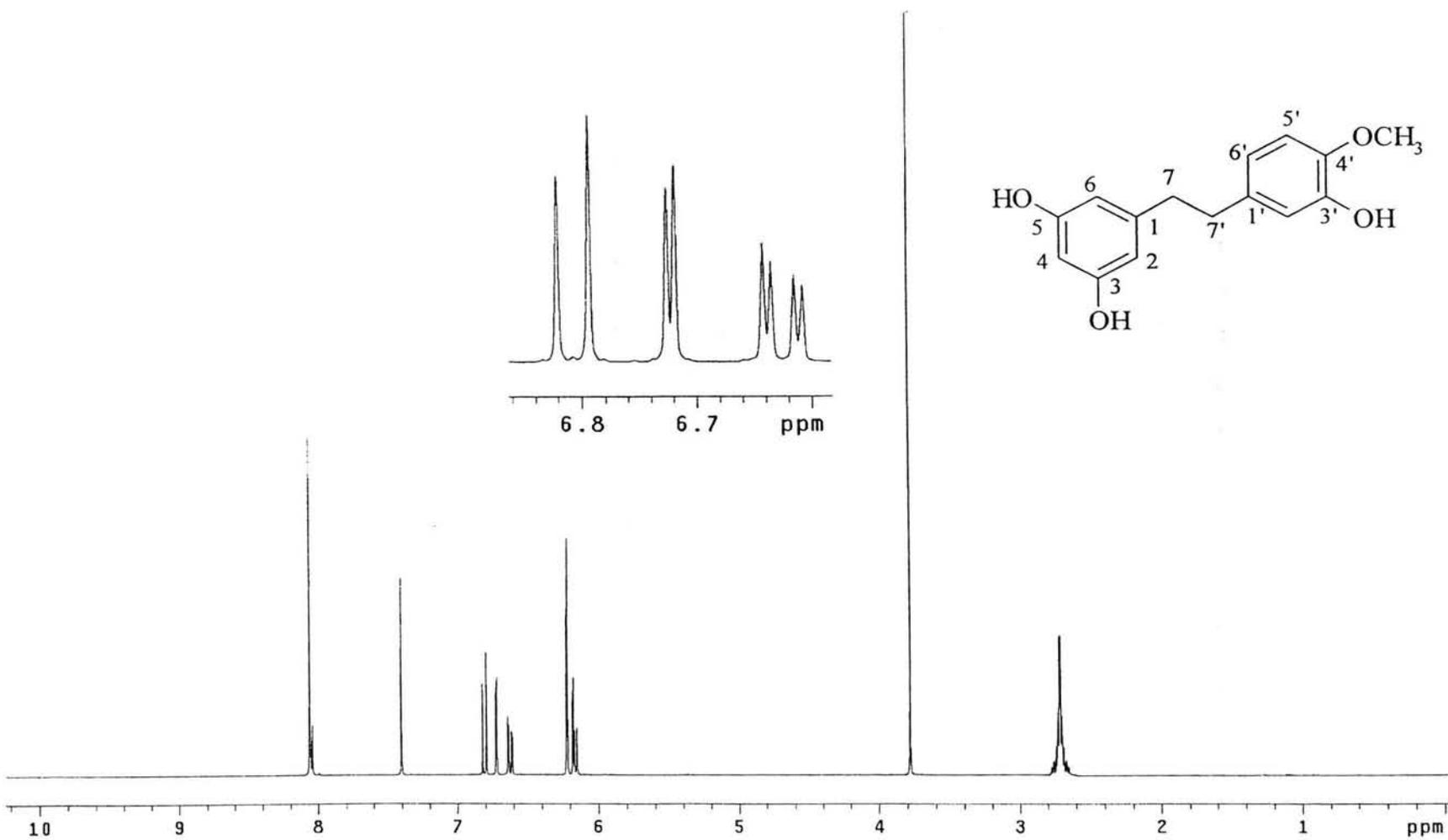
Espectro 24. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,3',4',5-tetrametoxibencilo (146).



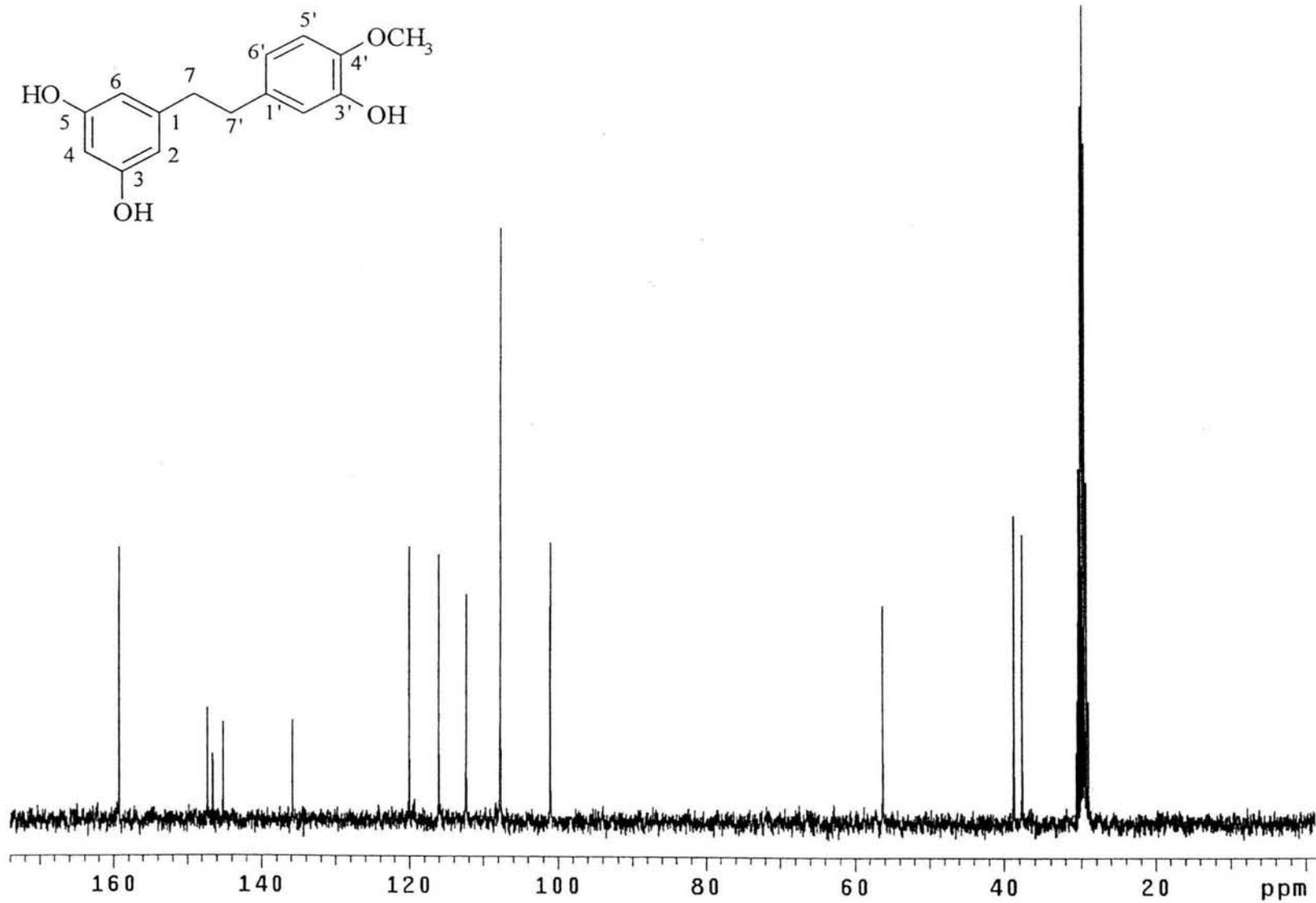
**Espectro 25.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3,3'-dihidroxi-4',5-dimetoxibencilo (147)



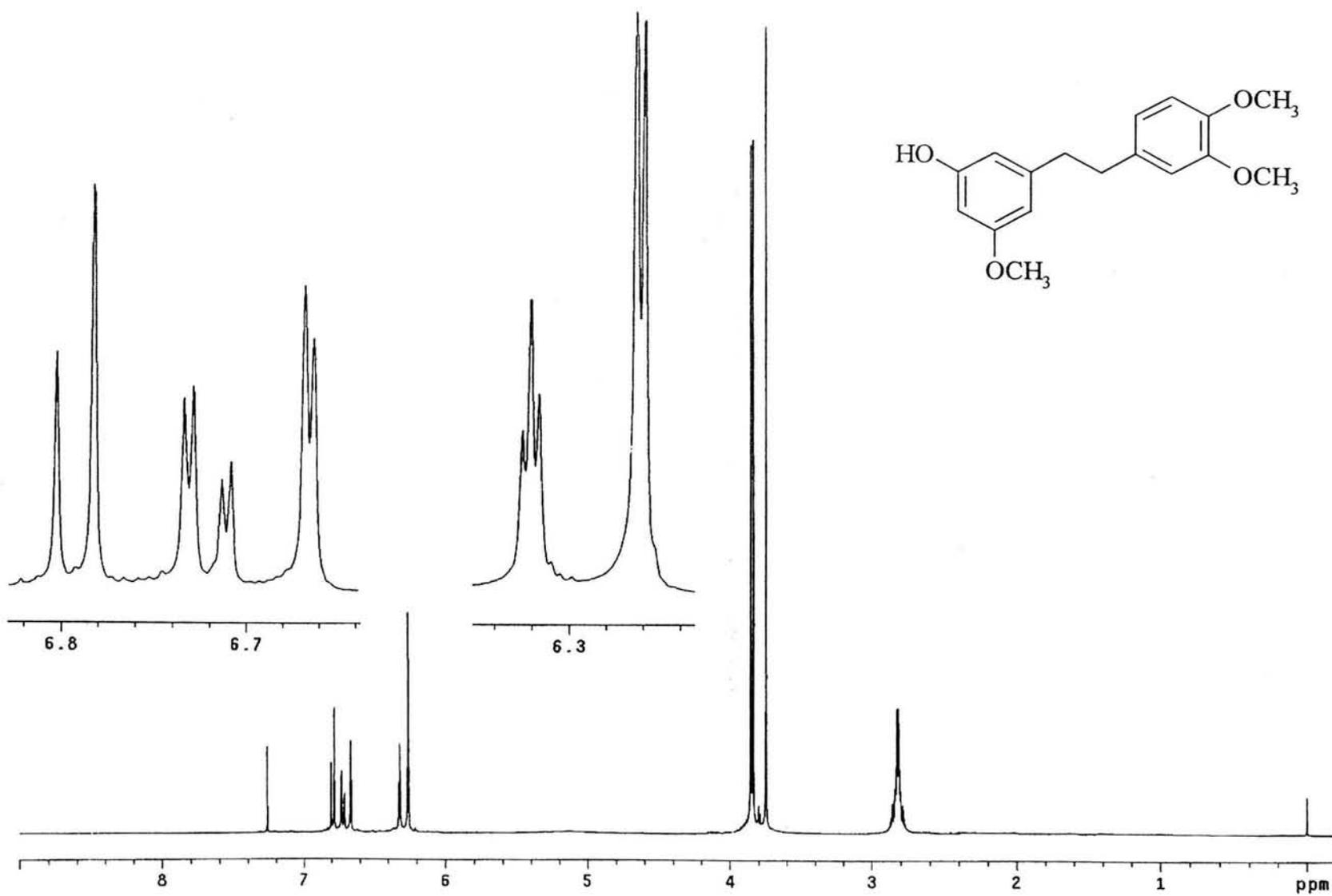
**Espectro 26.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,3'-dihidroxi-4',5-dimetoxibencilo (147).



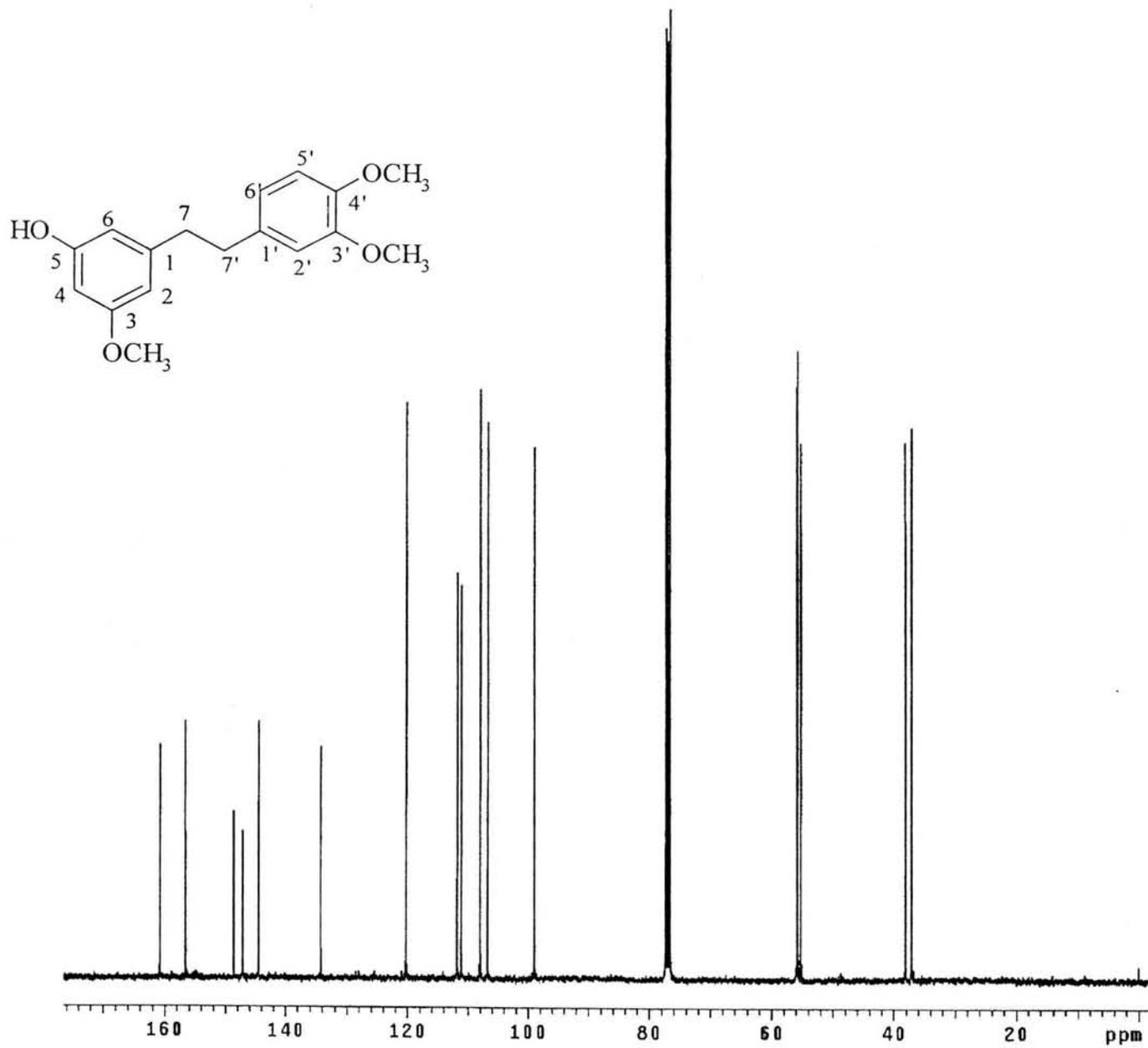
**Espectro 27.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 4'-metoxi-3,3',5-trihidroxibencilo (148)



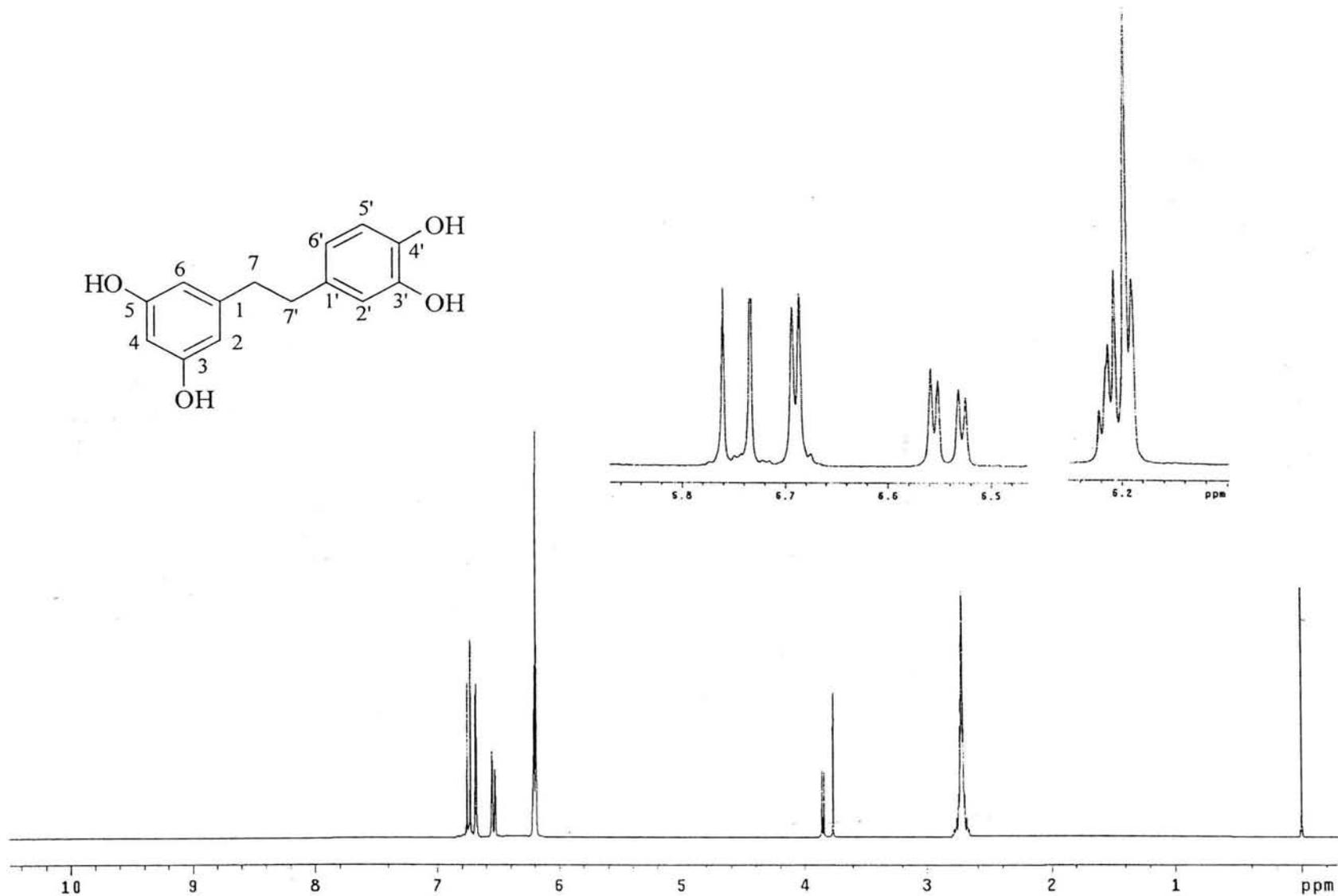
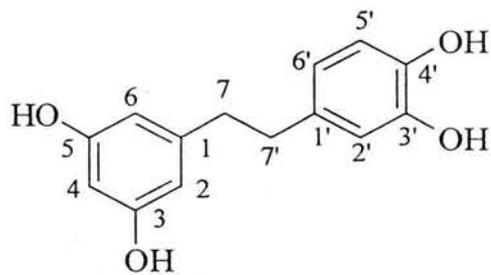
Espectro 28. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 4'-hidroxi-3,3',5-trimetoxibibencilo (148).



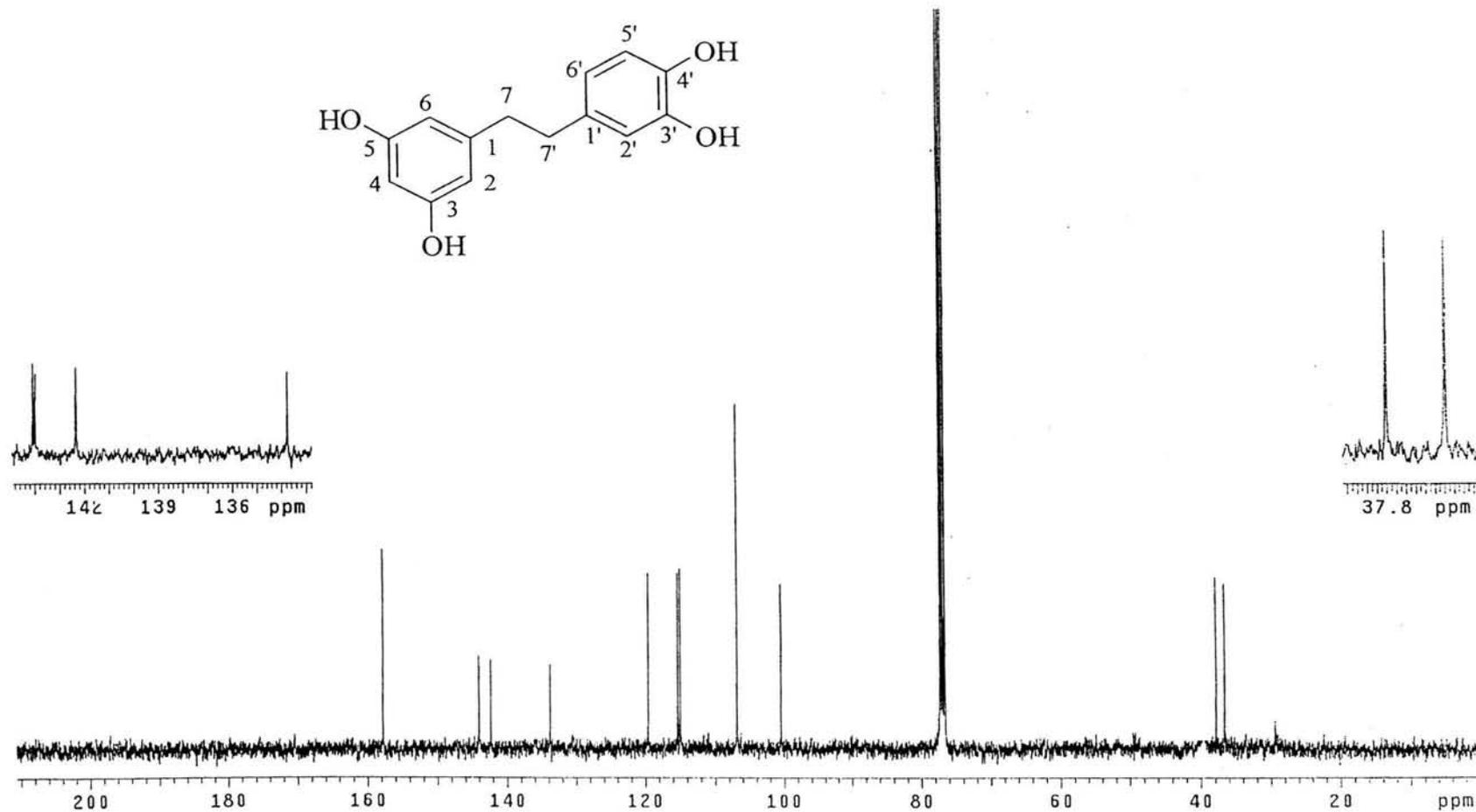
Espectro 29. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3-Hidroxi-3',4',5-trimetoxibencilo (149).



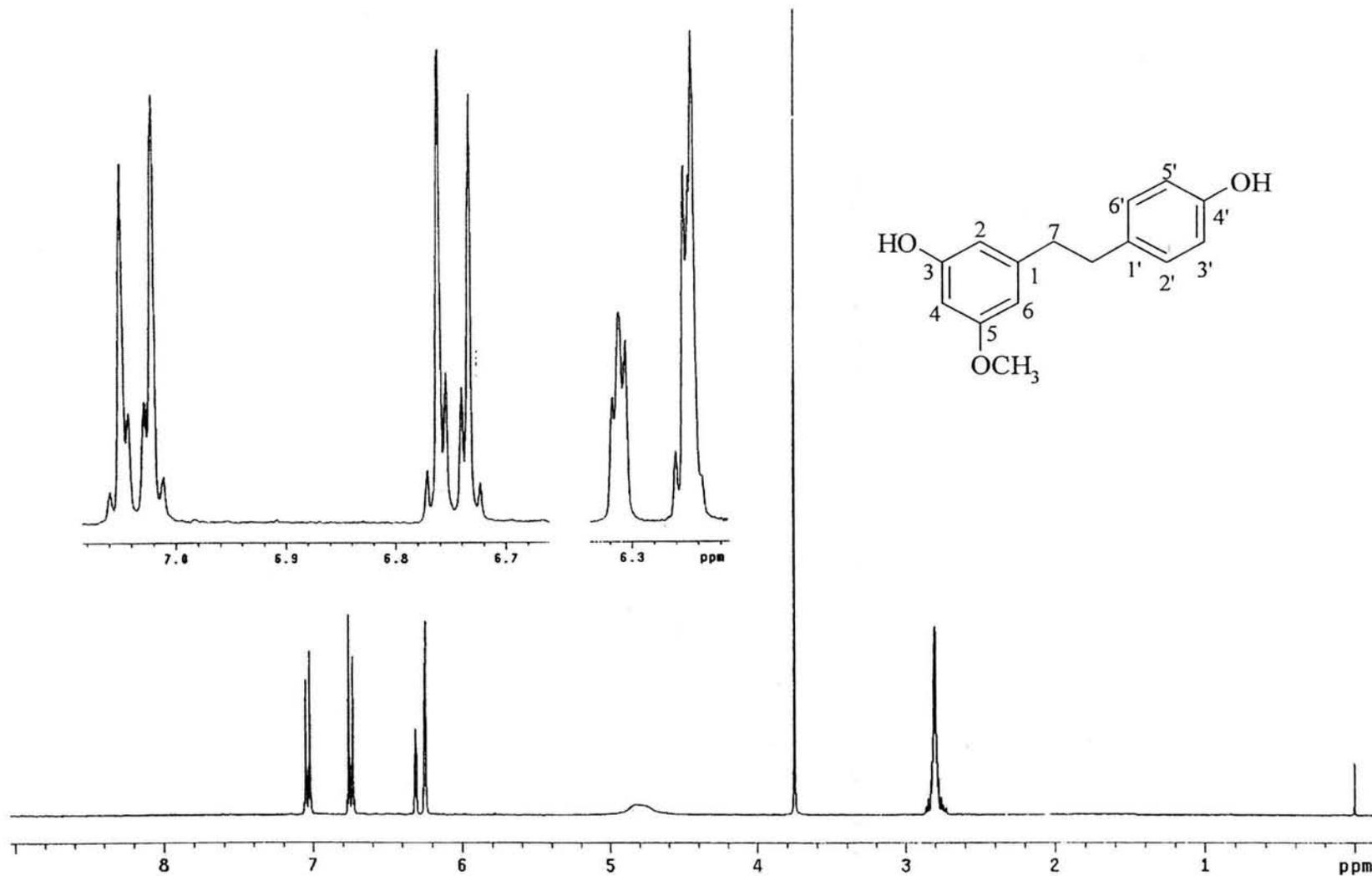
Espectro 30. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3-Hidroxi-3',4',5-trimetoxibencilo (149).



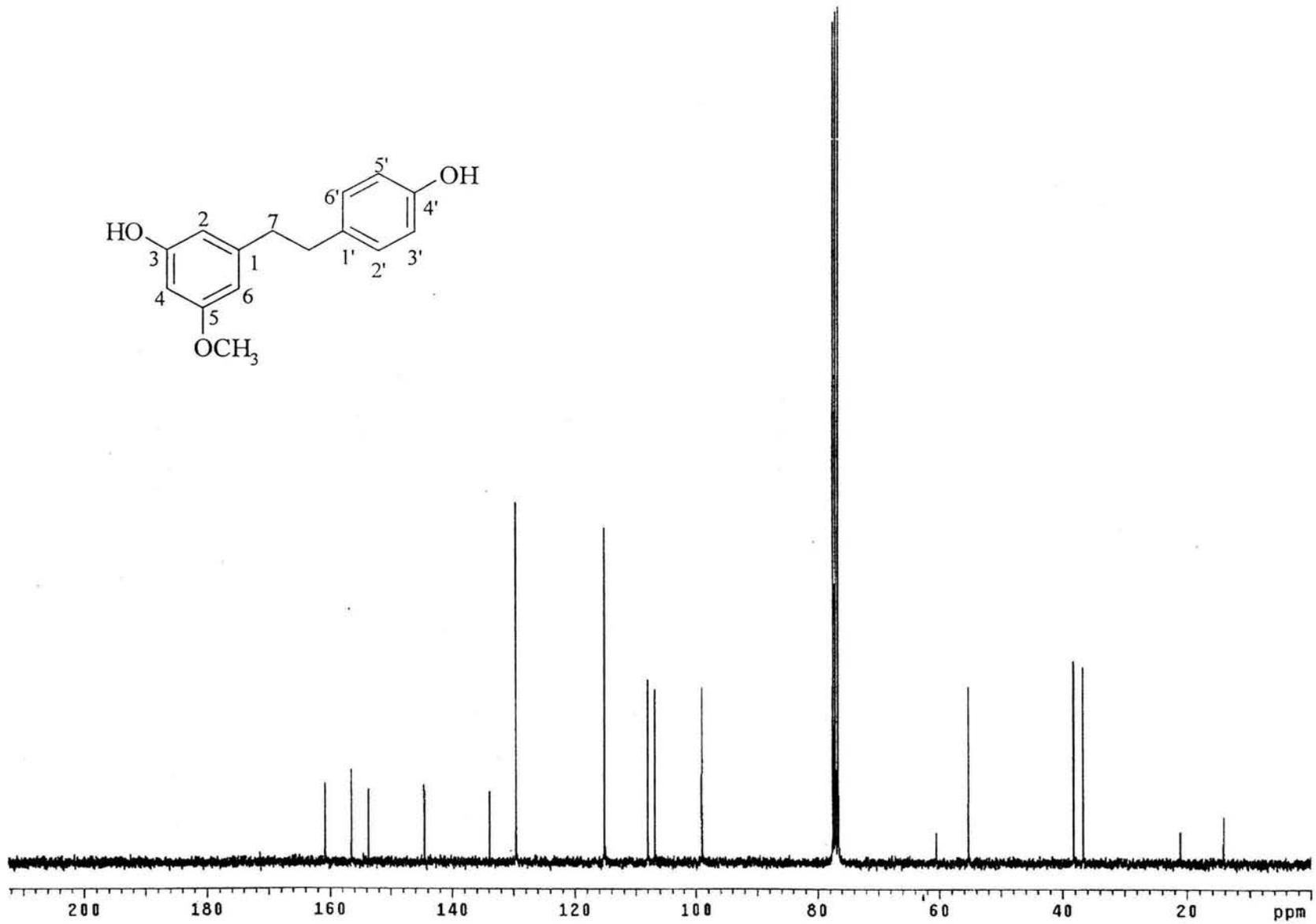
**Espectro 31.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3,3',4',5-tetrahidroxibibencilo (**150**).



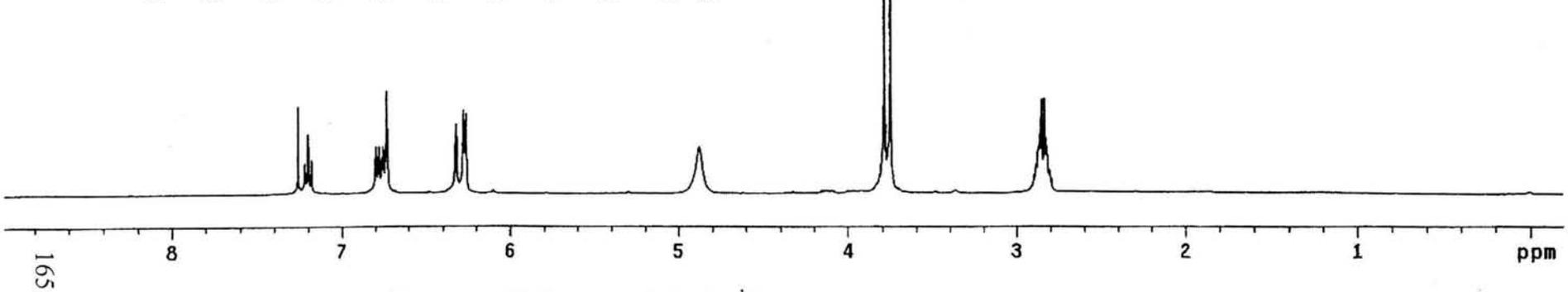
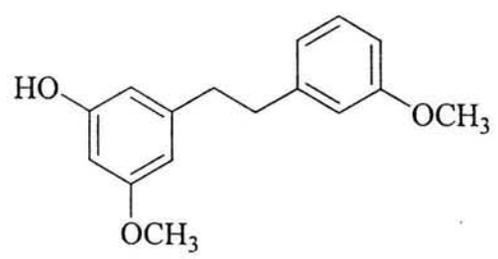
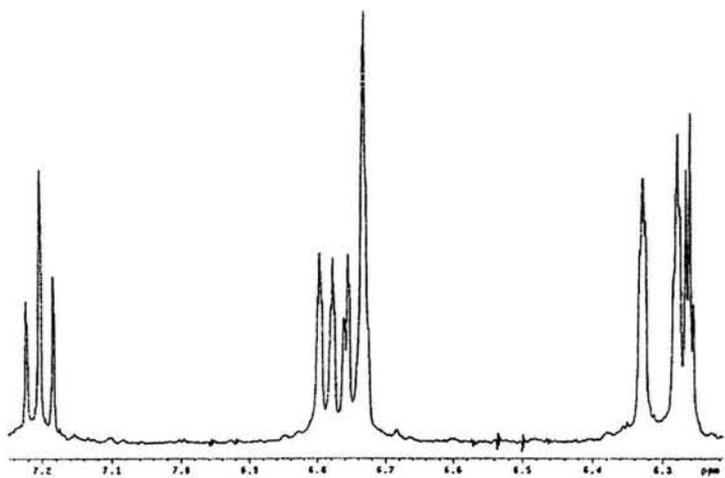
Espectro 32. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,3',4',5-tetrahidroxibibencilo (150).



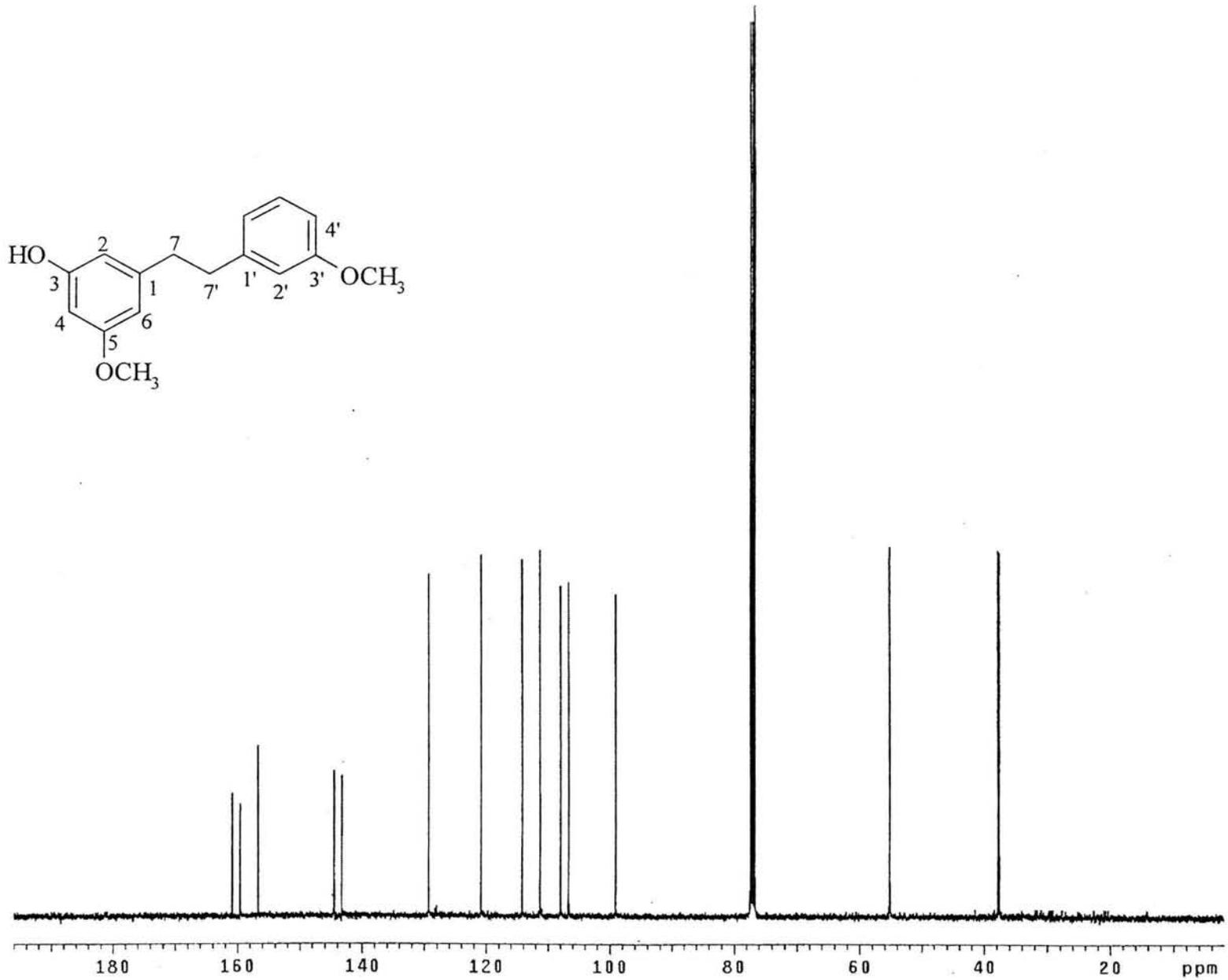
**Espectro 33.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3,4'-dihidroxi-5-metoxibencilo (151).



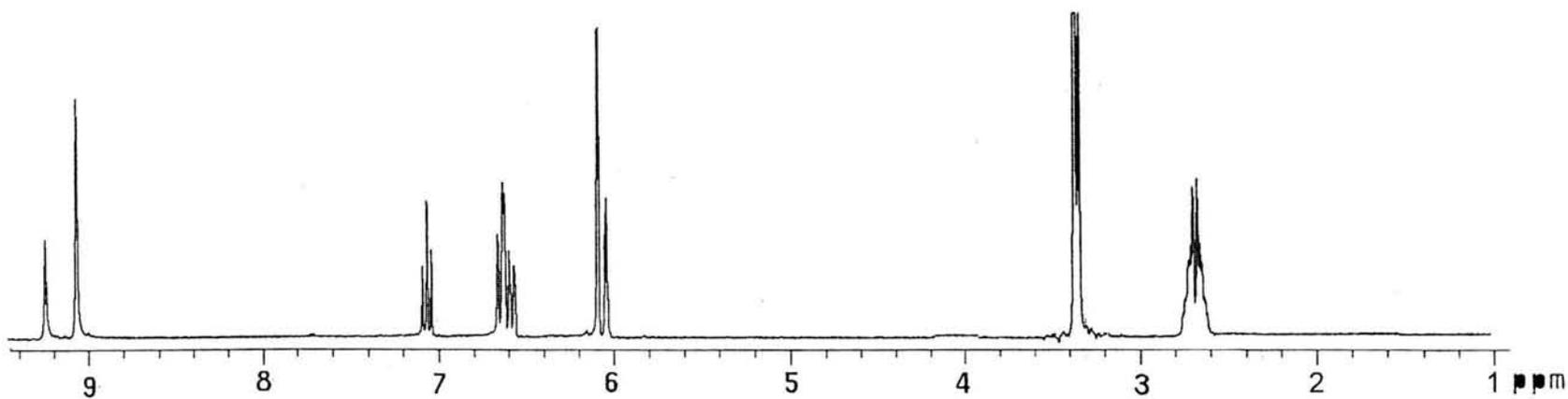
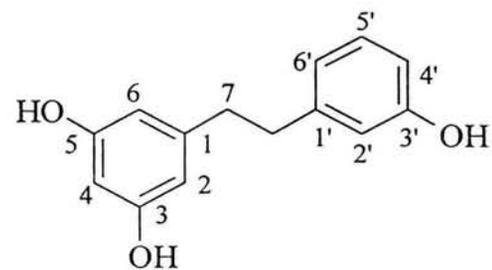
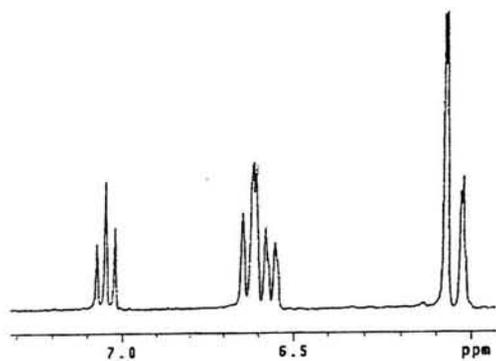
**Espectro 34.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,4'-dihidroxi-5-metoxibencilo (151).



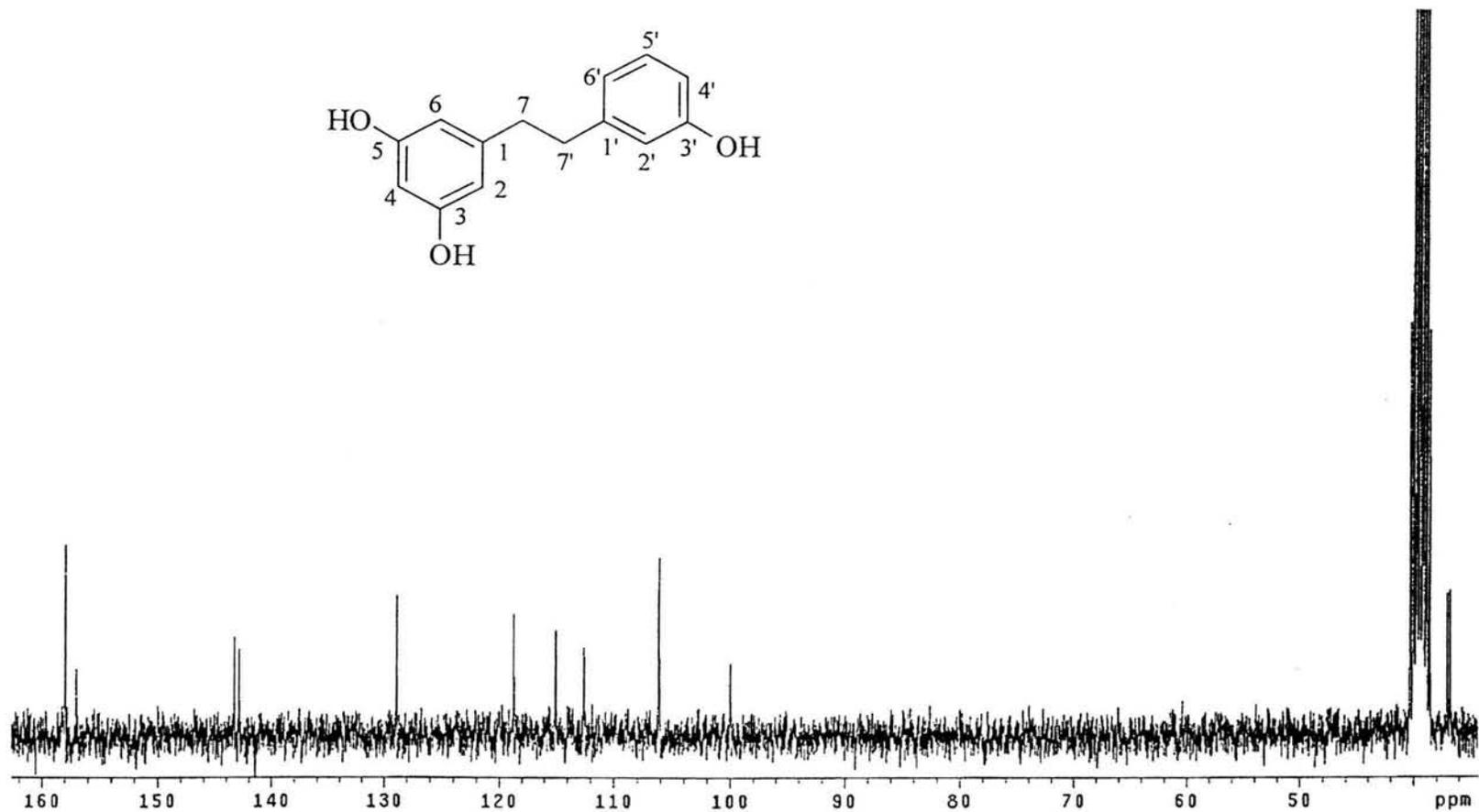
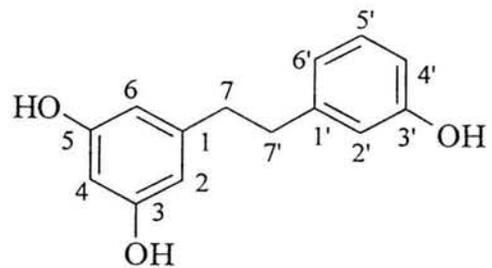
**Espectro 35.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la 3'-O-metilbatatasina III (152)



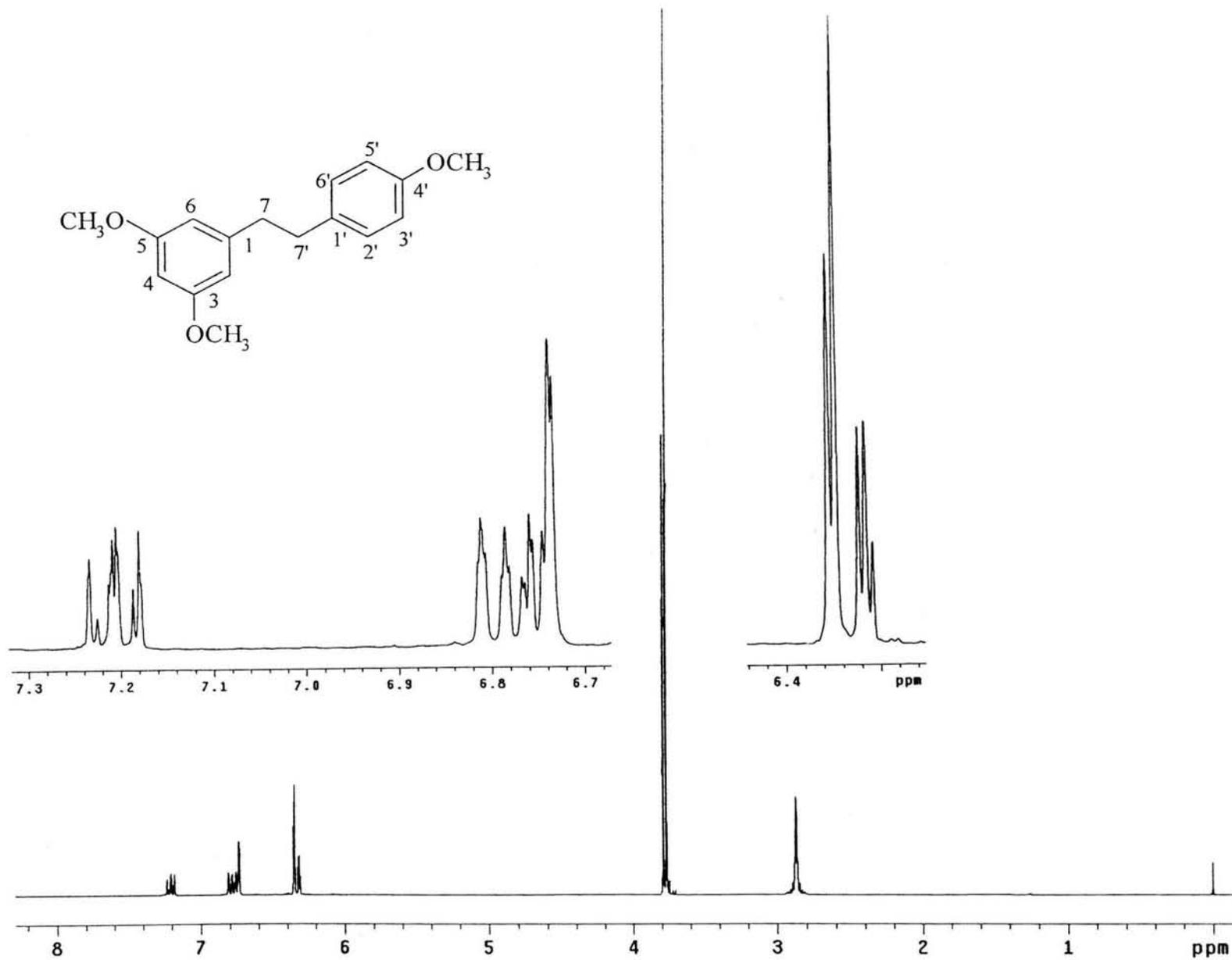
Espectro 36. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3'-O-metilbatatasina III (152)



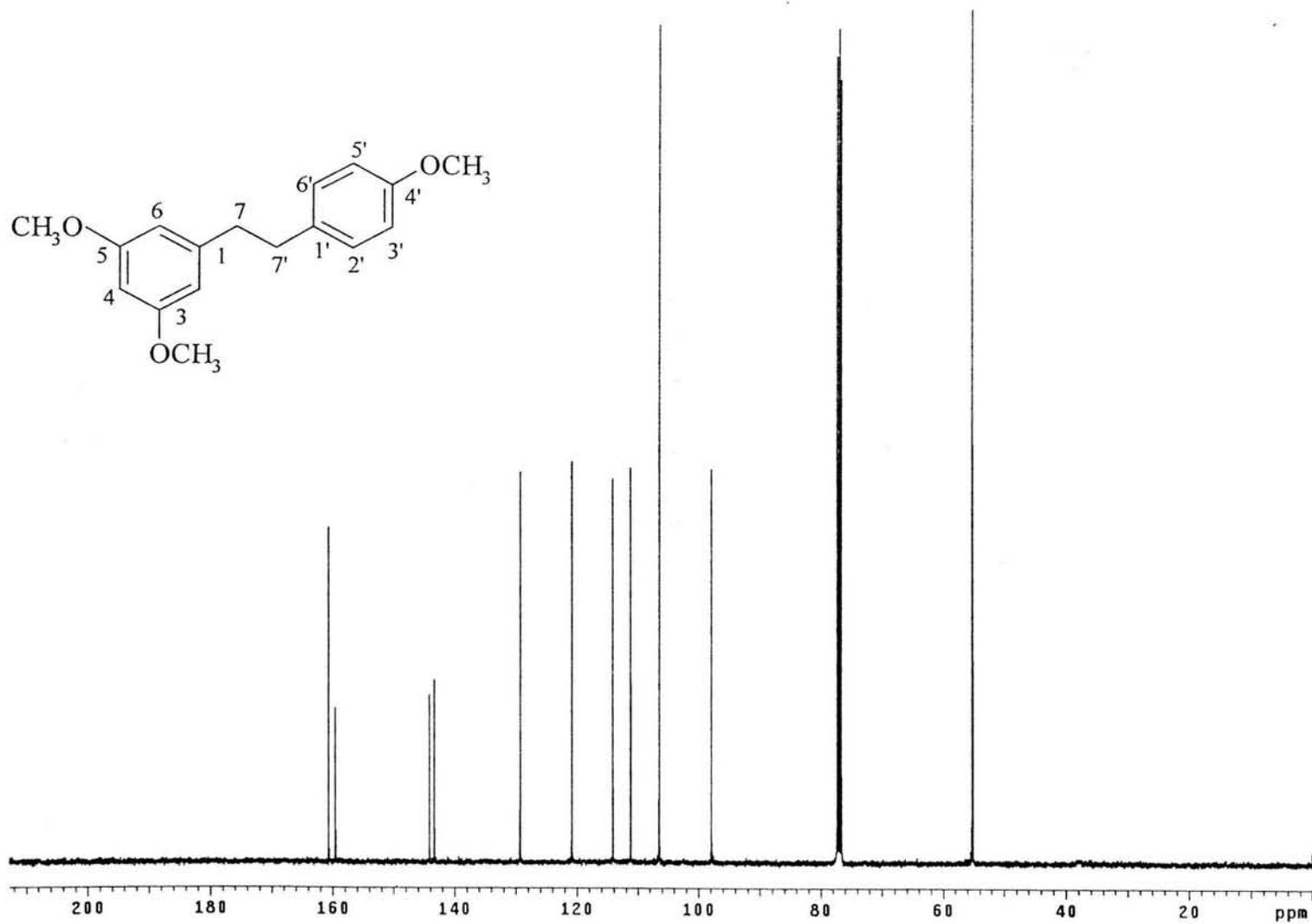
**Espectro 37.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3,3',5-trihidroxibibencilo (153)



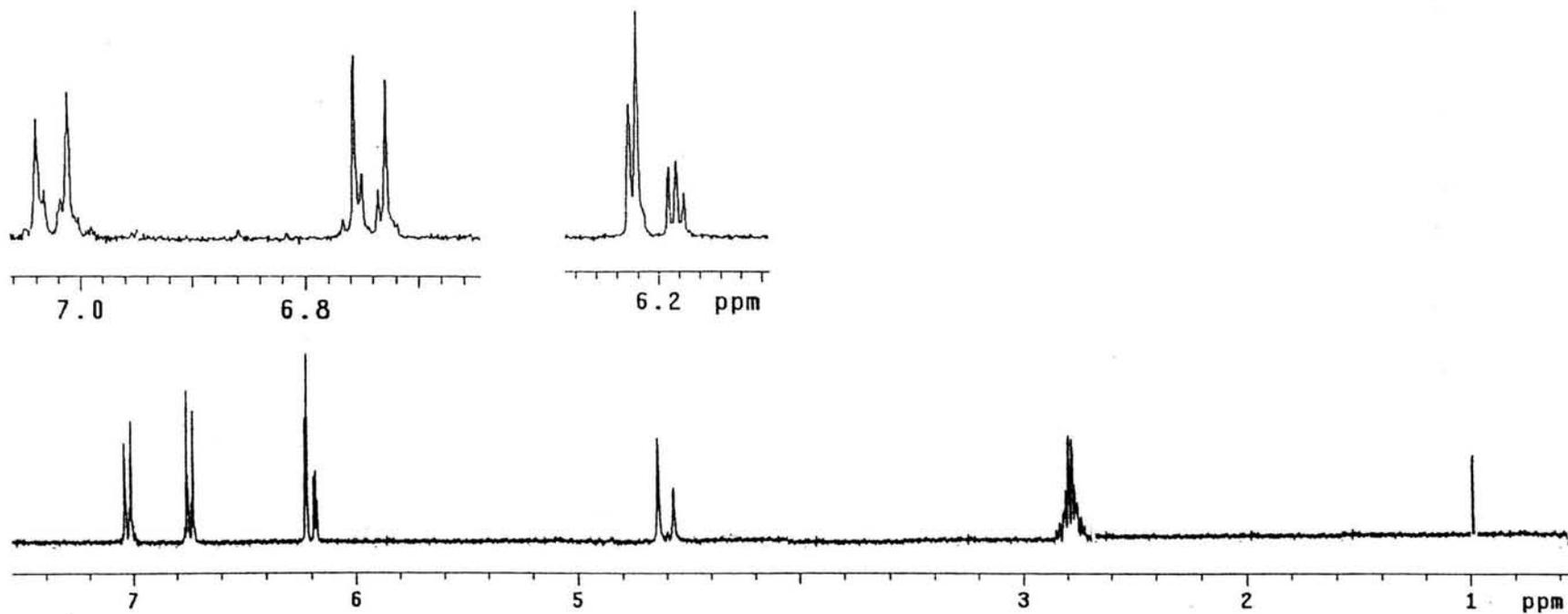
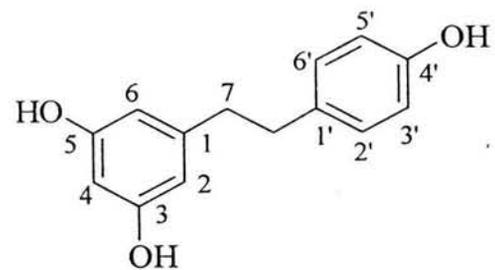
**Espectro 38.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,3',5-trihidroxibibencilo (153)



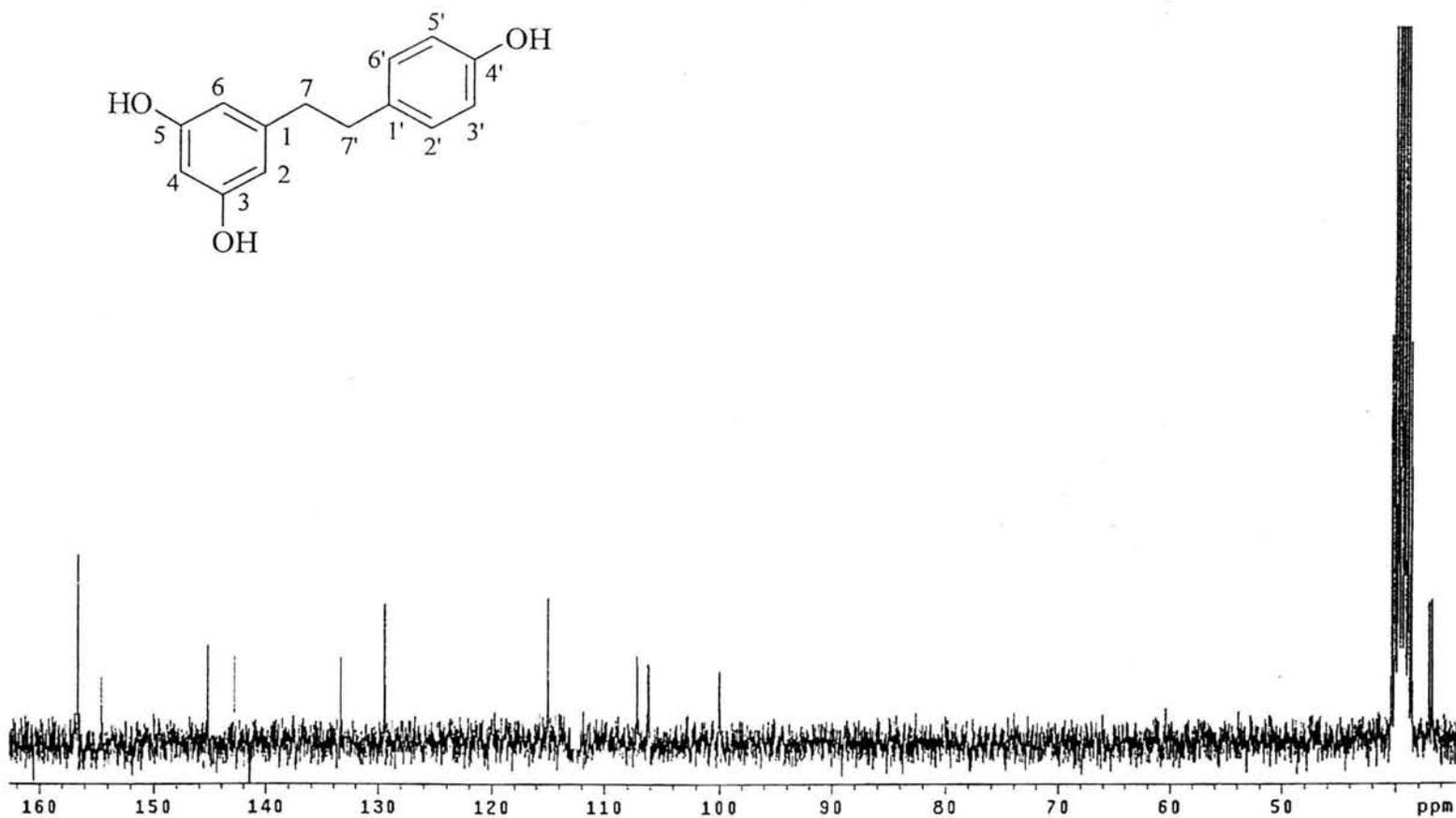
**Espectro 39.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3,4',5-trimetoxibencilo (154).



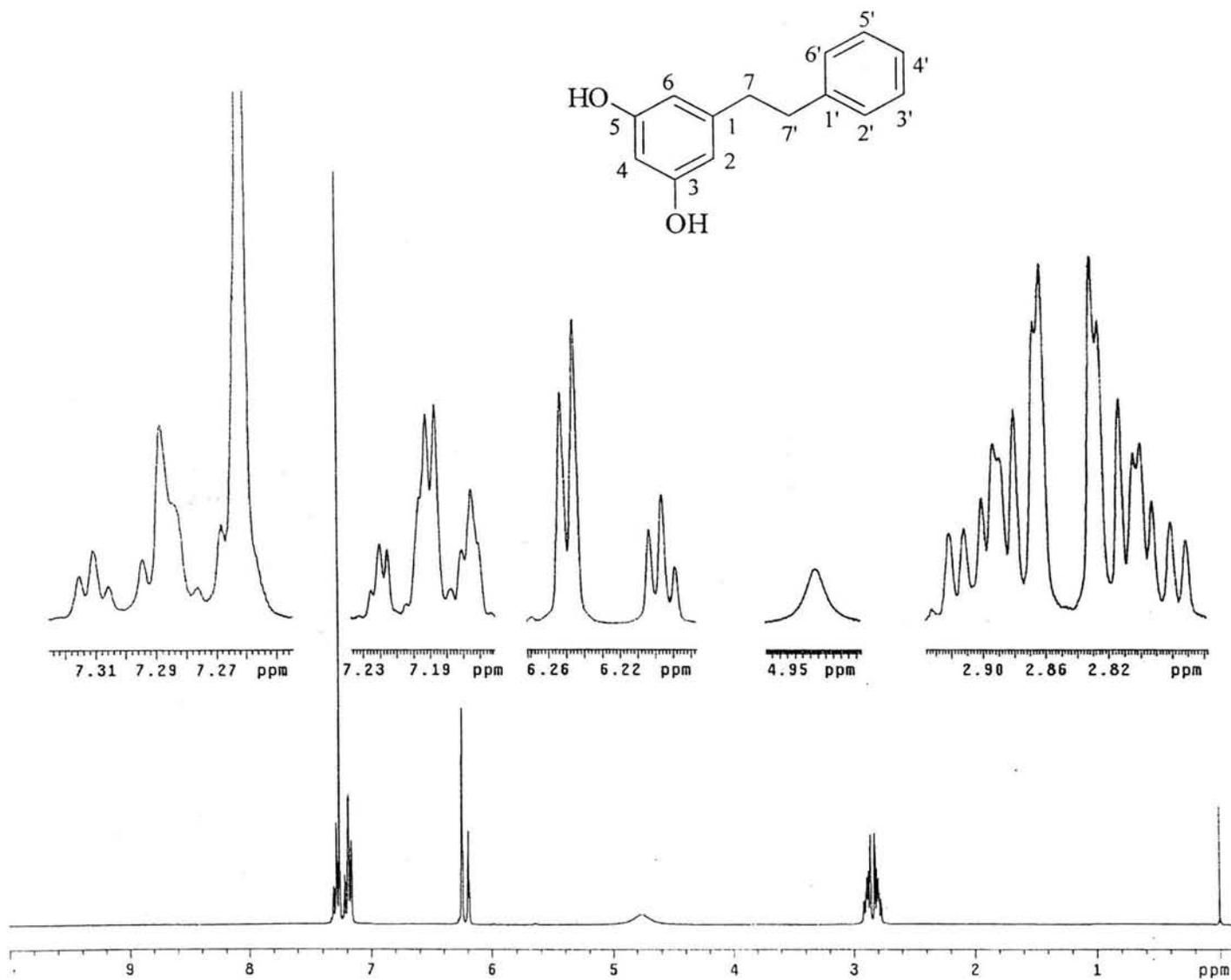
**Espectro 40.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,4',5-trimetoxibibencilo (154).



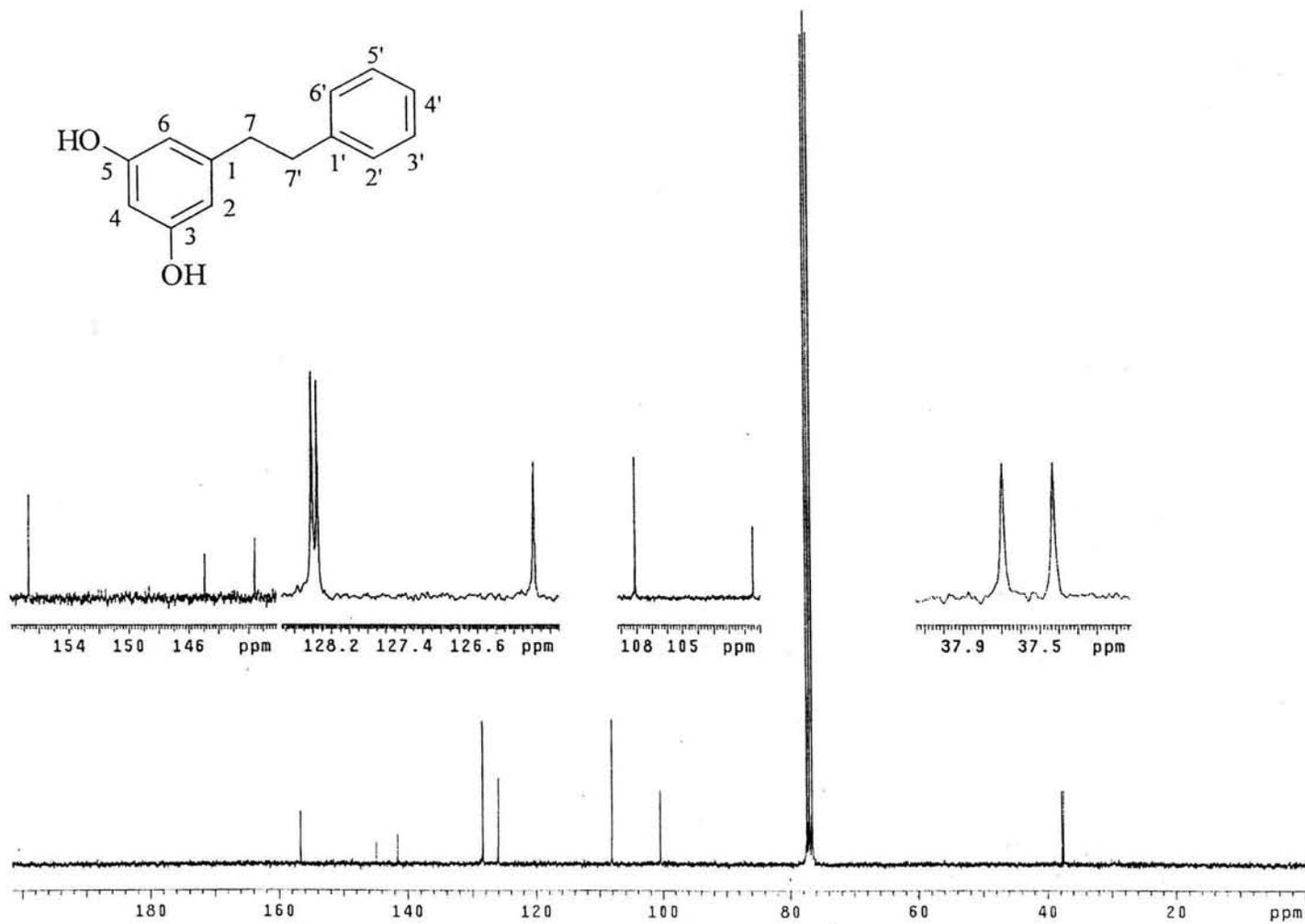
Espectro 41. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3,4',5-trihidroxibibencilo (155)



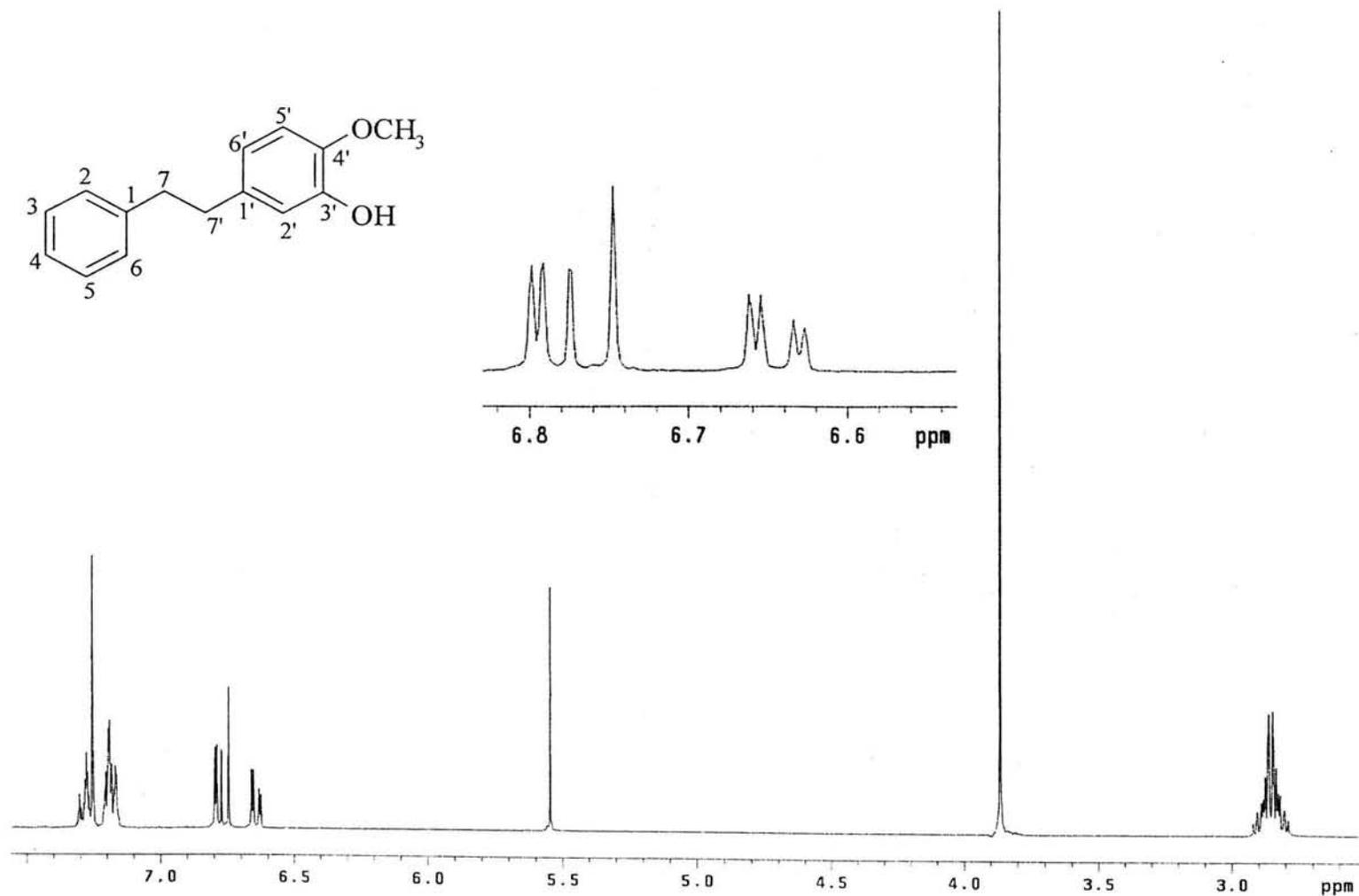
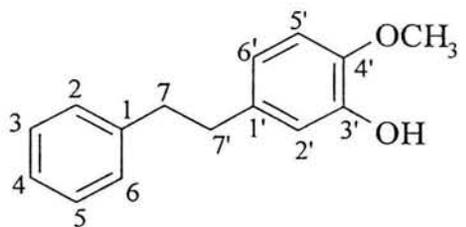
Espectro 42. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,4',5-trihidroxi-bencilo (155)



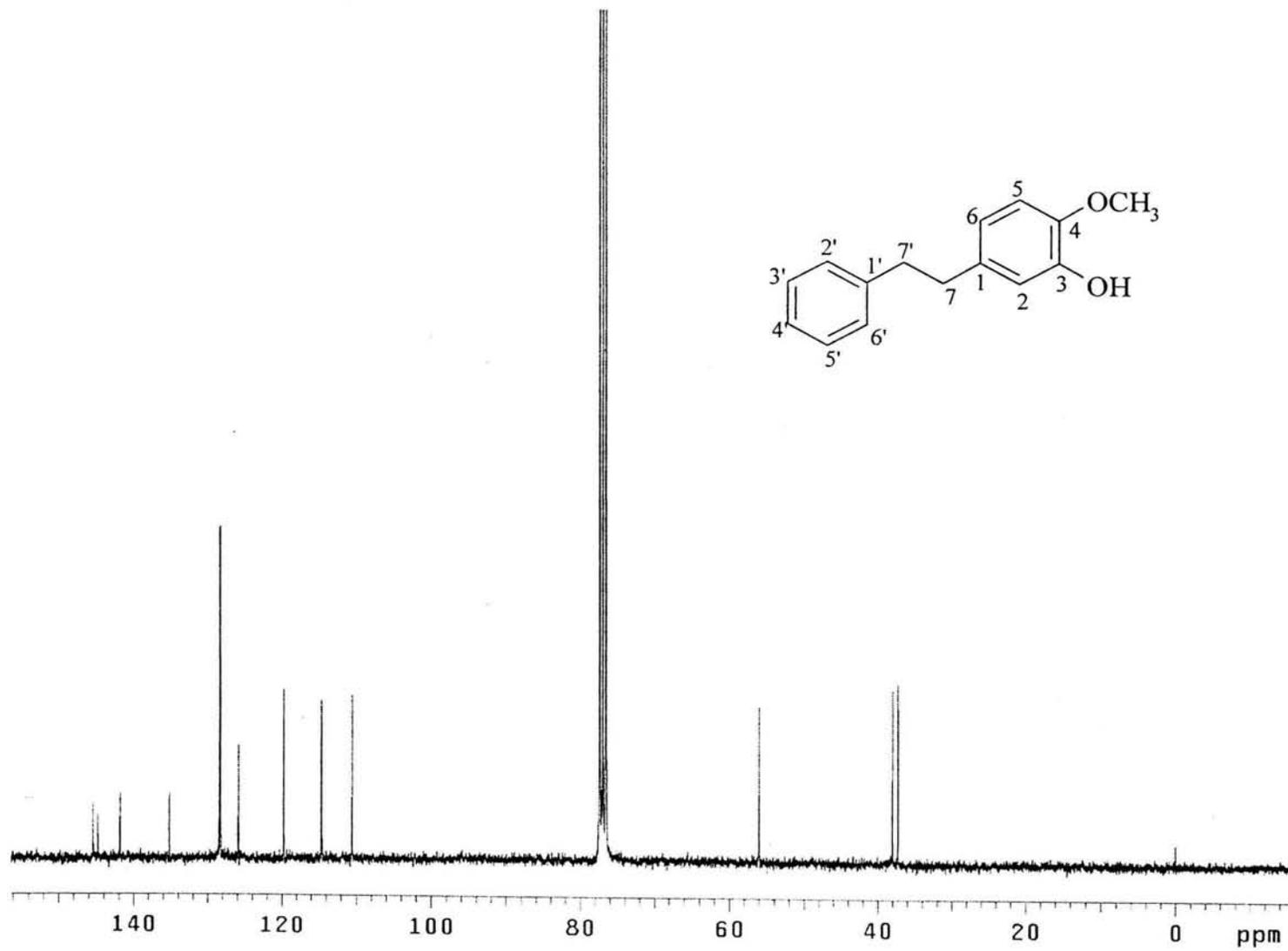
**Espectro 43.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3,5-dihidroxi-bencilo (156)



**Espectro 44.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3,5-dihidroxi**bencilo (156)**.



**Espectro 45.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3-hidroxi-4-metoxibencilo (157).



Espectro 46. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3-hidroxi-4-metoxibencilo (157).

## *APENDICE II*

SPASMOLYTIC EFFECTS, MODE OF ACTION, AND STRUCTURE-  
ACTIVITY RELATIONSHIPS OF STILBENOIDS FROM *NIDEMA BOOTHII*

## Spasmolytic Effects, Mode of Action, and Structure–Activity Relationships of Stilbenoids from *Nidema boothii*<sup>†,‡</sup>

Yanet Hernández-Romero,<sup>‡</sup> Juana-Isela Rojas,<sup>§</sup> Rafael Castillo,<sup>‡</sup> Alejandra Rojas,<sup>§</sup> and Rachel Mata<sup>\*†</sup>

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, D.F 04510, México, and Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario 7610, Querétaro, México

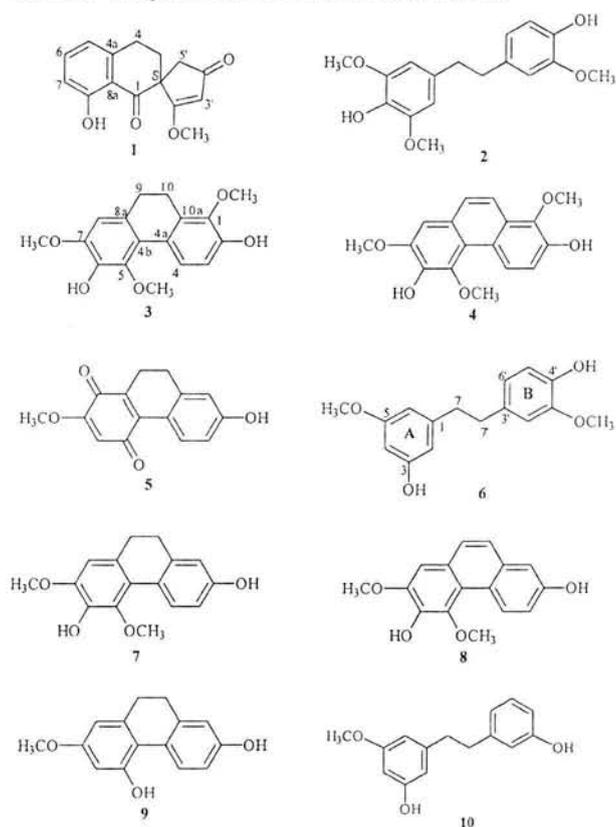
Received July 1, 2003

A CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (1:1) extract prepared from the whole plant of *Nidema boothii* inhibited spontaneous contractions (IC<sub>50</sub> = 6.26 ± 2.5 μg/mL) of the guinea-pig ileum. Bioassay-guided fractionation of the active extract led to the isolation of the novel spiro compound **1**, which was given the trivial name nidemone, and the new dihydrophenanthrene **3**, characterized as 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol. In addition, the known stilbenoids aloifol II (**2**), 1,5,7-trimethoxyphenanthrene-2,6-diol (**4**), ephemeroanthoquinone (**5**), gigantol (**6**), ephemeroanthol B (**7**), 2,4-dimethoxyphenanthrene-3,7-diol (**8**), lusianthridin (**9**), and batatasin III (**10**) were obtained. The isolates were characterized structurally by spectroscopic data interpretation. Compounds **2–6**, **9**, and **10** induced notable concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of the guinea-pig ileum with IC<sub>50</sub> values that ranged between 0.14 and 2.36 μM. Bibenzyl analogues **23–35** were synthesized and tested pharmacologically. The results indicated that for maximum spasmolytic activity the bibenzyls should have oxygenated substituents on both aromatic rings; on the other hand, methylation of free hydroxyl groups as well as the increment of oxygenated groups in relation to compounds **6** and **10** decreased the smooth muscle relaxant activity. It was also demonstrated that bibenzyls **6** and **10** might exert their spasmolytic action not only by a nitrenergic mechanism but also by inhibiting CaM-mediated processes.

*Nidema boothii* (Lindl.) Schltr. (Orchidaceae), also known as *Epidendrum boothii* (Lindl.) L.O. Williams, is an orchid found from Mexico to Panama, Cuba, and Surinam, and its habitat is in tropical moist forests up to 1500 m elevation. A previous phytochemical study on this species resulted in the isolation and characterization of a novel rearranged tetracyclic triterpene named nidemin after the genus of the plant.<sup>1</sup> *N. boothii* is not used as a traditional or alternative remedy; however, the related species *Scaphyglottis livida* (Lindl.) Schltr. and *Maxillaria densa* Lindl. are employed for the treatment of stomachache in the State of Veracruz, Mexico.<sup>2,3</sup> Furthermore, bioactivity-guided fractionation of the spasmolytic extracts prepared from these orchids resulted in the isolation and characterization of several stilbenoids, including 1,5,7-trimethoxyphenanthrene-2,6-diol (**4**), gigantol (**6**), 2,4-dimethoxyphenanthrene-3,7-diol (**8**), lusianthridin (**9**), and batatasin III (**10**) (Chart 1), among others.<sup>2,3</sup> These natural products induce a concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of the rat ileum with a potency higher than or comparable to that of papaverine.<sup>2</sup> It was also demonstrated that the spasmolytic effect of **6** was mediated by the nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) system.<sup>2</sup>

In the present investigation *N. boothii* was selected initially as potential source of spasmolytic compounds following a chemotaxonomic approach. Thereafter, a pharmacological test, using the guinea-pig ileum system,<sup>2</sup> of a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (1:1) extract of the plant confirmed this hypothesis. Thus, the first aim of the present study was to

Chart 1. Compounds Isolated from *Nidema boothii*



isolate the spasmolytic principles of *N. boothii*. In addition, this investigation was designed to provide more information about the mode of action of bibenzyls **6** and **10**, also isolated from *N. boothii*, by evaluating (i) their in vitro activity on the regulatory protein calmodulin (CaM) and

<sup>†</sup> Taken in part from the Ph.D. Thesis of Y.H.-R., Posgrado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.

<sup>‡</sup> Dedicated to the late Dr. Monroe E. Wall and to Dr. Mansukh C. Wani of Research Triangle Institute for their pioneering work on bioactive natural products.

\* Corresponding author. Tel: (525)-55-622-5289. Fax: (525)-55-622-5329. E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

<sup>‡</sup> Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>§</sup> Universidad Autónoma de Querétaro.

**Table 1.** NMR Spectral Data for Nidemone (**1**) in CDCl<sub>3</sub>

position	$\delta_{\text{H}}^a$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}^b$	HMBC <sup>c</sup>	NOESY
1		202.7	3, 5	
2		59.2	3, 4, 3', 5	
3A	2.47 ddd (14, 7.4, 4.0)	25.6	4, 5	3B, 4A, 4B, 5'
3B	2.20 ddd (13.8, 9.3, 4.8)			3A, 4A, 4B
4B	3.48 brddd (16.7, 9.4, 5.0)	32.1	3, 5	3A, 3B, 4A, 5
4A	2.87 ddd (16.8, 5.8, 5.8)			3A, 3B, 4B, 5'A, 5'
4a		145.4	3, 4, 6	
5	6.72 brdd (7.5, 1)	118.9	3, 4, 7	4A, 4B
6	7.39 dd (7.5, 7.5)	137.0	5, 7	5, 7
7	6.80 dd (7.5, 1)	115.8	5, 6	6
8		163.4	6	
8a		116.4	5, 7	
2'		189.6	3, 3', 5', -OCH <sub>3</sub>	
3'	5.27 t (1.2)	101.9	5'	-OCH <sub>3</sub>
4'		202.3	3', 5'	
5'A	3.29 dd (17.5, 1.5)	39.7	3, 3'	3A, 4A, 5'B
5'B	2.48 dd (17.5, 1.5)			4A, 5'A
-OCH <sub>3</sub>	3.91 s	59.1		3'
-OH-8	12.23 d (0.6)			

<sup>a</sup> Recorded at 300 MHz. <sup>b</sup> Recorded at 75 MHz. <sup>c</sup> Protons showing long-range correlation with indicated carbon.

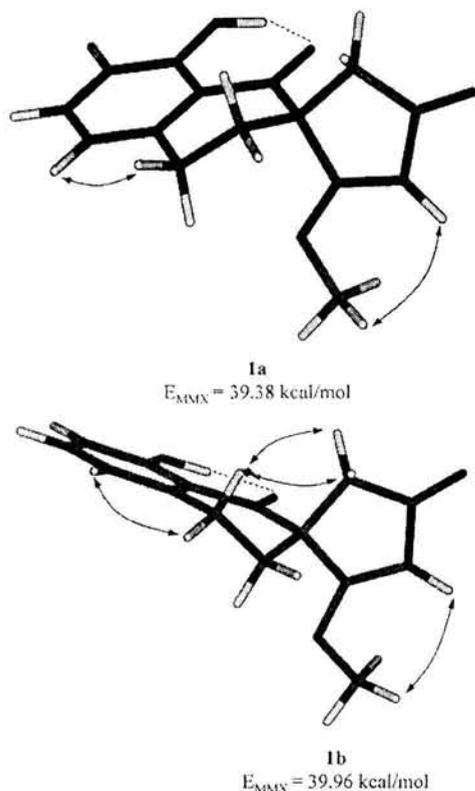
(ii) their effects on the spontaneous contraction of the guinea-pig ileum in the presence of 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one (ODQ) and *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (*L*-NAME), inhibitors of the enzymes guanylate cyclase and nitric oxide synthase (NOS), respectively, and finally to evaluate the spasmolytic effect of several natural and synthetic analogues of bibenzyls **6** and **10**, in an attempt to establish the influence of the oxygenated substituents on the pharmacological effects of both these lead compounds.

## Results and Discussion

A CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) extract prepared from the whole plant of *N. boothii* inhibited spontaneous contractions (IC<sub>50</sub> = 6.26 ± 2.5 µg/mL) of the guinea-pig ileum when tested in vitro. Accordingly, this spasmolytic extract was selected for bioassay-guided fractionation. This process led to the isolation of the novel spiro-compound **1**, which was given the trivial name nidemone, and the new dihydrophenanthrene **3**, characterized as 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol (Chart 1). The known stilbenoids **2** and **4**–**10** (Chart 1) were also obtained from the active fraction, and their spectral data were in agreement with those reported previously.<sup>2,4–8</sup> In addition, vitexin<sup>9</sup> and nidemin<sup>1</sup> spontaneously crystallized from some inactive fractions.

Compound **1** was isolated as an optically active glassy yellow solid. Its molecular formula was established as C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub> by HREIMS. The nine degrees of unsaturation in this formula could be partially accounted for by two carbonyls, a benzene ring, and one double bond; hence compound **1** was tricyclic. Three partial structures could be constructed that fully accounted for all the atoms in nidemone (**1**). First, a trisubstituted benzene ring moiety was apparent from the <sup>1</sup>H NMR spectrum data (Table 1), which showed an ABC system [ $\delta_{\text{H}}$  6.72, br dd, *J* = 7.5, 1 Hz (H-5); 7.39 dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz (H-6); and 6.80, dd, *J* = 7.5, 1 Hz (H-7)]; these protons correlated with the signals at  $\delta_{\text{C}}$  118.9 (C-5), 137.0 (C-6), and 115.8 (C-7), respectively. Additionally, a hydrogen-bonded phenolic hydroxyl group was determined from the signal at  $\delta_{\text{H}}$  12.23 in the <sup>1</sup>H NMR spectrum. The second partial structure was defined by HMBC (Table 1) as a cyclohexenone, as suggested from absorptions in the IR (1692 cm<sup>-1</sup>) and <sup>13</sup>C NMR spectra ( $\delta_{\text{C}}$  202.7, C-1) for a conjugated carbonyl. The third partial structure consisted of a conjugated cyclopentenone

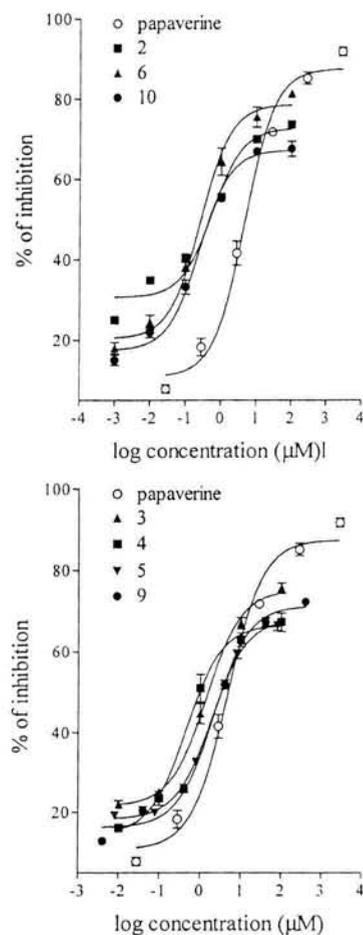
( $\delta_{\text{C}}$  202.3) system with a polarizable double bond ( $\delta_{\text{C}}$  189.6 and 101.9) bearing a methoxyl group ( $\delta_{\text{H}}$  3.91 s/ $\delta_{\text{C}}$  59.1). According to the HMQC experiment, the vinyl carbon resonating at higher field (C-3') was associated with a proton resonating at  $\delta_{\text{H}}$  5.27 (H-3'), while the lower one (C-2',  $\beta$ -carbon of the enone) was found to bear this methoxyl group. This evidence defined the conjugated system as a vinylogous carboxylic acid methyl ester and explained the unusual polarization of the double bond.<sup>10,11</sup> The connection between the three partial structures in **1** was made on the basis of the analysis of the HMBC data (Table 1). Thus, the HMBC correlations observed between the C-4 methylene hydrogens and the aromatic carbons at  $\delta_{\text{C}}$  118.9 (C-5), 145.4 (C-4a), and 116.4 (C-8a), as well as those between the C-3 methylene hydrogens and C-4a and C-1, clearly indicated that the cyclohexenone unit was fused to the benzene ring. Similarly, the long-range correlations of the signals at  $\delta_{\text{H}}$  2.47 (H-3A), 2.20 (H-3B), 5.20 (H-3'), 2.48 (H-5'B), and 3.29 (H-5'A) with the signal at  $\delta_{\text{C}}$  59.2 (C-2/1') connected the cyclohexenone and cyclopentenone systems through a spiro-carbon. The NOESY correlations (Table 1) for H-4A, H-4B, H-5, H-5'A, H-5'B, and H-3' provided further support to this proposal. A systematic conformational search for compound **1** using the Spartan'02 molecular modeling program revealed the two minimum energy conformations **1a** and **1b** depicted in Figure 1 (*E*<sub>MMX</sub> = 39.38 and 39.96 kcal/mol, respectively). In **1b**, the six-membered ring adopts an envelope conformation, with the interatomic distances between H4A–H5'A and H4A–H5'B being 2.4084 and 3.1162 Å, respectively. This result is consistent with the strong NOESY correlations observed between H-4A–H-5'A and H-4A–H-5'B (Table 1). Finally, the absolute configuration of compound **1** was proposed as depicted on the basis of the CD data. The CD spectra of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones, including aromatic ketones, typically exhibit not just two, but three and sometimes four Cotton effects between 185 and 360 nm. Thus, a weak red-shifted ketone carbonyl due to an *n* →  $\pi^*$  excitation is observed at ~320–350 nm, and this excitation is followed by one or more  $\pi$  →  $\pi^*$  transitions with one corresponding to the typical UV band between 230 and 260 nm, and a second often overlapping with the first and lying in the 200–220 nm range; in the particular case of aromatic ketones a strong band around ~290 nm (B band) is also observed. Finally, another, more energetic band is found near 188 nm, and it is thought to involve a *n* →  $\sigma^*$



**Figure 1.** Minimum energy structures of nidemone (**1**) showing relevant NOESY correlations.

transition.<sup>12</sup> The first two sets of bands are the most useful for determining absolute stereochemistry, in particular when inherently dissymmetric chromophores are present in a given molecule. Compound **1** possesses such a chromophore since the cyclopentenone system is nonplanar. According to the Sznatzke's helicity rules,<sup>12,13</sup> a cyclopentenone system has a negative helicity if the CD spectrum displays a positive Cotton effect for the  $\pi \rightarrow \pi^*$  transition and a negative Cotton effect for the  $n \rightarrow \pi^*$ . The CD spectrum of **1** exhibited a strong positive Cotton effect around 265 nm and a negative one at 326 nm, correlating with a negative helicity and thus with an *S* absolute stereochemistry at C-2.<sup>13</sup> Furthermore, optical rotations of nidemone (**1**) and (*S*)-4-hydroxycyclopent-2-en-1-one<sup>11</sup> showed a negative sign, suggesting that both compounds have the same absolute configuration.

Compound **3** had the composition  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$  as determined by its MS and  $^{13}\text{C}$  NMR data, differing from phenanthrene **4** by two mass units. The NMR spectra of **3** (see Experimental Section) showed the characteristic signals of a 9,10-dihydrophenanthrene<sup>3</sup> and suggested that **3** is the 9,10-dihydro derivative of compound **4**.<sup>2</sup> The most obvious differences between the NMR spectra of the two compounds resulted from the presence of two methylene signals in **3** [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  2.8 (2H, m, H-10)/22.5 (C-10) and 2.69 (2H, m, H-9)/29.4 (C-9)] instead of the aromatic resonances attributed to H-9/C-9 and H-10/C-10 in **4**. In addition, the chemical shift values for the aromatic protons and carbons were shifted diamagnetically in comparison to those in **4**. Finally, the HMBC and NOESY correlations supported the position of the substituents along the dihydrophenanthrene core. Thus, in the NOESY spectrum the correlations H-8/OCH<sub>3</sub>-7 and H-9, H-4/OCH<sub>3</sub>-5 and H-3, and H-10/OCH<sub>3</sub>-1 and H-9 were consistent with the placement of the methoxyl groups at C-7, C-5, and C-1 and the hydroxyl at C-2



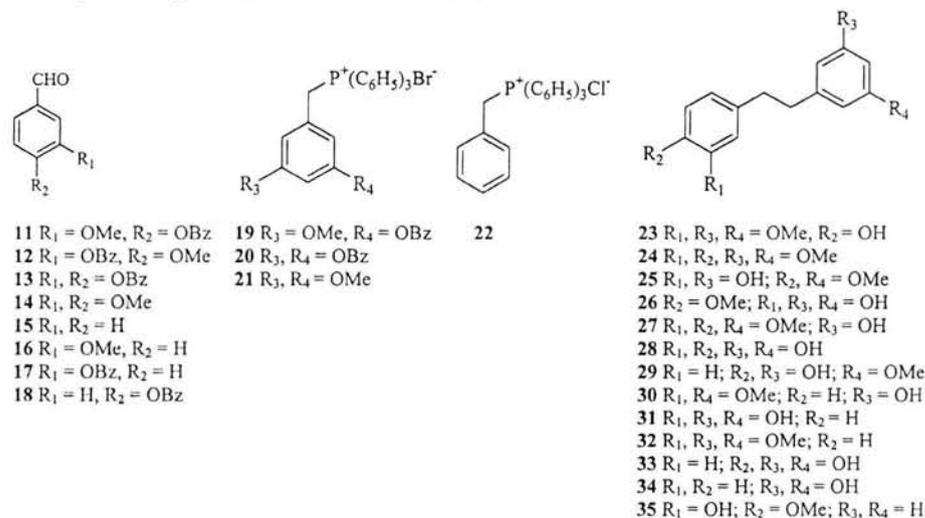
**Figure 2.** Concentration–response curves showing the relaxant effects of compounds **2–6**, **9**, and **10** from *Nidema boothii* on the isolated guinea-pig ileum. Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile responses calculated as the mean from six data  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ .

and C-6. On the other hand, the correlations C-9/H-8, C-4b/H-4, C-4a/H-4, C-1/OMe-1, and C-5/OMe-5 observed in the HMBC spectrum further supported this proposal. On the basis of this evidence, stilbenoid **3** was identified as 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol.

Compounds **2–6**, **9**, and **10** induced notable concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of the guinea-pig ileum. Figure 2 shows the concentration–response curves for these compounds. All the isolates were more potent than the crude extract ( $\text{IC}_{50} = 6.26 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$ ) and papaverine ( $\text{IC}_{50} = 4.23 \pm 0.68 \mu\text{M}$ ). The greatest inhibitory activities were observed for compounds **10** ( $\text{IC}_{50} = 0.24 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ), **6** ( $\text{IC}_{50} = 0.26 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ), **9** ( $\text{IC}_{50} = 0.41 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ), and **4** ( $\text{IC}_{50} = 0.45 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ). Natural products **1**, **7**, and **8** were not tested due to scarcity of the samples; however, the spasmolytic property of compound **8** was described previously.<sup>2</sup>

To establish the influence of the nature (phenolic vs phenolic methyl ether) and location of the oxygenated substituents along the bibenzyl core on the pharmacological effects of **6** and **10**, compounds **23–35** (Chart 2) were synthesized and tested pharmacologically. All compounds but **28** and **33** were obtained using the Wittig reaction, a method widely used for the synthesis of bibenzyls.<sup>14–16</sup> Analogues **28** and **33** were synthesized by catalytic reduction of resveratrol and piceatannol, respectively.<sup>17,19</sup> Bibenzyls **23**, **25**, **28**, and **29** were synthesized as previously described, and their spectral data were in agreement with

Chart 2. Synthetic Analogues of Gigantol (6) and Batatasin III (10)

Table 2. Inhibition of the Spontaneous Contraction of Isolated Guinea-Pig Ileum Induced by Gigantol (6), Batatasin III (10), and Related Compounds<sup>a</sup>

substance	E <sub>max</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)	potency relative to papaverine
2	73.63 ± 1.18	0.56 ± 0.20	7.65
6	81.30 ± 1.84	0.26 ± 0.10	16.26
10	67.50 ± 4.76	0.24 ± 0.11	17.62
23	76.40 ± 4.76	1.39 ± 0.52	3.05
24	84.94 ± 5.38	0.62 ± 0.03	6.82
25	66.55 ± 1.30	0.14 ± 0.08	31.33
26	51.78 ± 6.06	0.70 ± 0.05	5.99
27	66.00 ± 1.30	0.58 ± 0.08	7.32
28	53.65 ± 6.73	0.85 ± 0.04	4.94
29	85.00 ± 1.79	0.14 ± 0.04	30.85
30	58.59 ± 0.81	1.28 ± 0.40	3.30
31	78.50 ± 1.27	2.36 ± 0.77	1.78
32	75.57 ± 0.21	0.96 ± 0.12	4.41
33	64.10 ± 3.62	1.75 ± 0.17	2.42
34	83.28 ± 4.09	1.49 ± 0.39	2.84
35	82.22 ± 2.50	1.29 ± 0.36	3.28
papaverine	91.76 ± 2.65	4.23 ± 0.68	1
chlorpromazine	81.80 ± 2.30	0.18 ± 0.12	23.50

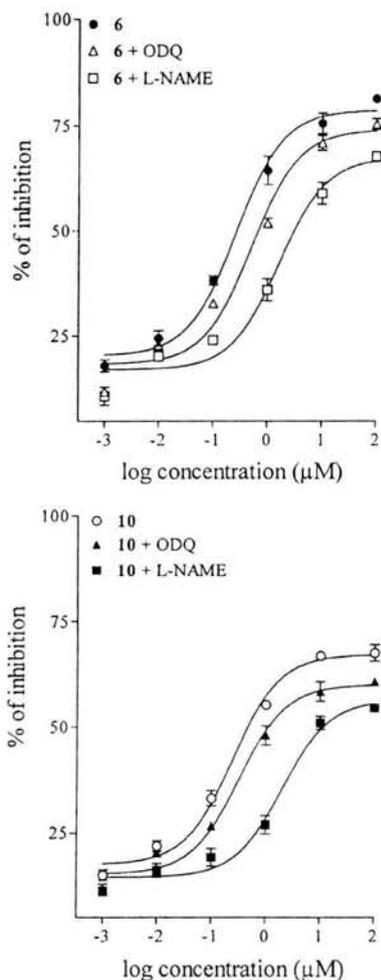
<sup>a</sup> Values as means ± SEM; n = 6; p < 0.05. Potency was obtained by the formula IC<sub>50</sub> (μM) papaverine/IC<sub>50</sub> (μM) compound assuming a value of 1.00 for papaverine. E<sub>max</sub> indicates the percentage of maximum inhibition.

those reported.<sup>15–19</sup> Compound 31 was newly synthesized, but it was previously isolated as a natural product from *Dendrobium plicatile*,<sup>20</sup> compounds 25,<sup>21</sup> 27,<sup>22</sup> 28,<sup>23</sup> 29,<sup>21</sup> 30,<sup>24</sup> and 33<sup>25</sup> have also been described as natural products, while bibenzyls 26 and 32 were previously obtained using catalytic reduction and methylation of rhapontigenin and *O*-methylbatatasin III, respectively. The <sup>1</sup>H NMR data of 26,<sup>20</sup> 32,<sup>24</sup> obtained by the Wittig reaction in the present investigation, and 31,<sup>26</sup> as well as the complete spectral data for compounds 34<sup>27,28</sup> and 35,<sup>29</sup> were in agreement with those previously described. The data presented in Table 2 show that all analogues are potent inhibitors of the spontaneous contractions of the guinea-pig ileum, with IC<sub>50</sub>'s ranging between 0.14 and 2.36 μM. However, structural differences influenced the potency of this inhibition. Thus, methylation of one or more of the free hydroxyl groups and the presence of additional oxygenated groups in relation to the lead compounds decreased the smooth muscle relaxant activity. Compounds 29, possessing a free hydroxyl group at C-4, and 25, in which the location of the hydroxyl and methoxyl groups in ring B is the opposite of

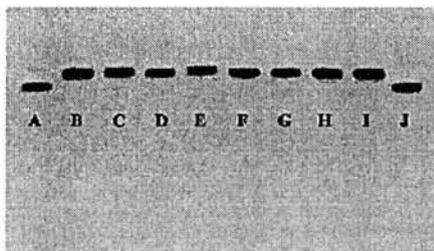
gigantol (6), were the most potent. Furthermore, the absence of oxygenated substituents in one of the aromatic rings of the stilbenoid moiety, as in the case of compounds 34 and 35, induced the highest decrease in activity. Hence, it could be inferred that the presence of oxygenated substituents in both aromatic rings is essential for activity within this compound class.

In our initial studies regarding the mode of action of compounds 6 and 10 it was demonstrated that their smooth muscle relaxant effect was blocked by L-NAME when tested at their IC<sub>50</sub>'s.<sup>2</sup> It was also demonstrated, using a radio-immunoassay procedure, that compound 6 increased cGMP content in rat ileal rings. Compound 6-induced elevation of cGMP has been reported to be inhibited by L-NAME and ODQ, suggesting that its spasmolytic effect was mediated by the NO/cGMP system.<sup>2</sup> However, on that occasion, the influences of ODQ and different concentrations of L-NAME on the spasmolytic effect of both compounds were not assessed. The results shown in Figure 2 indicated that in the presence of ODQ (100 μM) and L-NAME (500 μM) the concentration–response curves of both compounds were shifted to the right (Figure 3), thus confirming indeed that they modify the nitrenergic system.

To provide more information on the mode of action of bibenzyls 6 and 10, their effect on the regulatory protein calmodulin (CaM) was investigated. CaM is a major Ca<sup>2+</sup>-binding protein implicated in a variety of cell functions through the regulation of CaM-dependent enzymes, such as cAMP phosphodiesterases (PDEs), protein phosphatase, NOS, phosphorylase kinase, kinase I and II, among others.<sup>30,31</sup> Accordingly, CaM influences a number of important biological events, and such agents that inhibit its activity should have profound pharmacological effects. Indeed, certain antipsychotic drugs, smooth muscle relaxants,<sup>30,32</sup> α-adrenergic blocking agents, cytoprotective compounds, and neuropeptides inhibit CaM.<sup>30–32</sup> To study the effect of the bibenzyls on CaM, a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis<sup>33</sup> was first carried out. The results showed that both natural products retarded the mobility of bovine-brain CaM in the presence of Ca<sup>2+</sup>, suggesting that they are CaM inhibitors. The synthetic analogues 23–35 provoked the same electrophoretic effect, and, as an example, Figure 4 illustrates the electrophoretogram showing the activity of compounds 6, 10, 25, 29, and 34. Thereafter, to demonstrate if the binding of the bibenzyls with CaM affected its enzyme



**Figure 3.** Concentration–response curves showing the relaxant effects of compounds **6** and **10** on the isolated guinea-pig ileum in the presence of ODQ (100  $\mu\text{M}$ ) and L-NAME (500  $\mu\text{M}$ ). Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile responses calculated as the mean from six data  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ .



**Figure 4.** SDS-PAGE of bovine-brain CaM after treatment with compounds **1**, **5**, **6**, **10**, **25**, **29**, **34**, and **35**. Electrophoresis of 2  $\mu\text{g}$  samples of bovine-brain CaM in the presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Pre-treatment of the CaM samples: 1.5 h at 30  $^\circ\text{C}$  in the presence of  $\text{CaCl}_2$  (A); chlorpromazine in DMSO (B); **1** (C); **5** (D); **6** (E); **10** (F); **25** (G); **29** (H); **34** (I); and CaM in DMSO (J). In all cases, 0.33  $\mu\text{g}$  of the tested compounds in DMSO was applied.

regulatory properties *in vitro*, their effect on the activity of CaM-dependent PDE was investigated. CaM-sensitive PDE catalyzes the hydrolysis of cyclic nucleotides to nucleotide monophosphates. Since CaM-sensitive PDE is widely used as a tool to discover CaM inhibitors, and in general to demonstrate the activity of CaM in biochemical studies, we assessed the effect of **6**, **10**, the analogues **25**, **29**, and **34**, and **35** on this enzyme using the method of Sharma and Wang,<sup>34</sup> with the modifications reported by

**Table 3.** Effect of Selected Stilbenoids on CaM-Dependent PDE in the Presence of 0.2  $\mu\text{g}$  of Bovine-Brain CaM

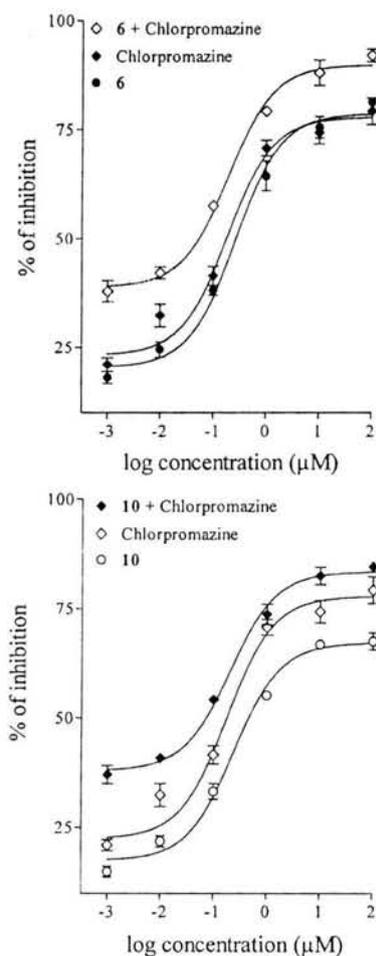
compound	IC <sub>50</sub> , $\mu\text{M}$
chlorpromazine <sup>a</sup>	10.3
<b>1</b>	3.2
<b>5</b>	10.9
<b>6</b>	7.0
<b>10</b>	13.3
<b>25</b>	9.0
<b>29</b>	10.1
<b>34</b>	36.6
<b>35</b>	21.2

<sup>a</sup> Positive control.

Leung and co-workers.<sup>35</sup> The PDE reaction was coupled to the 5'-nucleotidase reaction, and the amount of inorganic phosphate released represented the activity of the PDE; the phosphate produced in the assay was measured by the method of Sumner.<sup>36</sup> Bovine-brain CaM was used as activator of the enzyme. The results summarized in Table 3 indicated that the compounds tested inhibited the activation of PDE in the presence of CaM with IC<sub>50</sub> values ranging between 3.2 and 36.6  $\mu\text{M}$ . The effect was higher than or comparable to that of chlorpromazine (IC<sub>50</sub> = 10.3  $\mu\text{M}$ ), a well-known CaM inhibitor.<sup>30–32</sup> Therefore the bibenzyls tested are CaM inhibitors. Furthermore, when the smooth muscle relaxant effect of compounds **6** and **10** was determined in the presence of chlorpromazine (0.1  $\mu\text{M}$ ), their concentration–response curves (Figure 5) were significantly shifted to the left. These results are consistent with chlorpromazine and bibenzyls **6** and **10** being agonists. Since CaM regulates NOS activity in the myenteric plexus, it is highly probable that the nitrenergic and the CaM-smooth muscle relaxant effects demonstrated in this investigation are related. Further work is in progress to confirm this hypothesis.

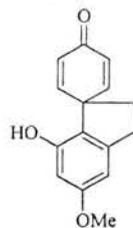
Compounds **1** and **5** were also evaluated as potential CaM inhibitors. The natural products not only modified the electrophoretic mobility of bovine-brain CaM (Figure 4) but also inhibited the activity of CaM-dependent PDE with IC<sub>50</sub> values of 3.2 and 10.9  $\mu\text{M}$ , respectively. In the case of compound **5** this effect could be also involved in its spasmolytic effect.

To our knowledge the carbocyclic skeleton of nidemone (**1**) is new for a naturally occurring product. However, the 4'-oxo-3'-hydro derivative spiro[cyclopentane-1,2'(1'*H*)-naphthalene], which possesses a similar structural core, has been obtained through the condensation of tetralone with 1,4-dibromobutane.<sup>37</sup> The coexistence of spiro-type natural products with bibenzyls and phenanthrenes has been previously described in *Cannabis sativa* L., although, the spiro-compounds found in *Cannabis* possess an inverse arrangement of the five- and six-membered rings,<sup>38</sup> as the structure of cannabispiradienone (**36**) shows in Chart 3. It has been proposed that the *C. sativa* spirans originate by a direct oxidative phenol coupling (*p-o* fashion) of an appropriate bibenzyl.<sup>38</sup> In the case of compound **1** such a mechanism is not possible. However, it can be envisaged that nidemone (**1**) arises by an oxidative contraction of an aromatic ring of a suitable dihydrophenanthrene. This proposal is supported by the fact that one of the several routes to generate cyclopentane rings from aromatic compounds can be rationalized as an oxidative biological Bayer–Villiger type of reaction. The overall results seem to indicate that the orchid bibenzyls exert their spasmolytic action by inhibiting CaM-mediated processes and/or by a nitrenergic mechanism. Whether both effects are related remains to be determined. For maximum spasmolytic



**Figure 5.** Concentration–response curves showing the relaxant effects of compounds **6** and **10** on the isolated guinea-pig ileum in the presence of chlorpromazine (0.1  $\mu\text{M}$ ). Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile responses calculated as the mean from six data  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ .

**Chart 3.** Structure of Cannabispiradienone (**36**)



activity, the bibenzyls should have oxygenated substituents on both aromatic rings; methylation of free hydroxyl groups as well as the increment of oxygenated groups in relation to compounds **6** and **10** decreases the resultant smooth muscle relaxant activity.

## Experimental Section

**General Experimental Procedures.** Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were taken on a Perkin-Elmer 241 polarimeter. UV spectra were obtained on a Lambda II UV spectrometer in MeOH solution. IR spectra were obtained using KBr disks on a Perkin-Elmer FT 1605 spectrophotometer. The CD spectrum of nidemone (**1**) was recorded on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25 °C in MeOH solution. NMR spectra including COSY spectra, NOESY, HMBC, and HMQC experi-

ments were recorded in  $\text{CDCl}_3$  on a Varian Unity Plus 500 spectrometer either at 500 ( $^1\text{H}$ ) or 125 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz, using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Electron-impact mass spectra were registered on a JEOL SX 102 mass spectrometer. Open column chromatography was carried out on silica gel 60 (70–230 mesh, Merck). Analytical and preparative TLC were performed on precoated silica gel 60 F254 plates (Merck). HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with Waters 996 UV photodiode array detector (900) set at 209–214 nm, using a  $\mu\text{Porasil}$  column (19 mm i.d.  $\times$  300 mm) at a flow rate of 8.3 mL/min. Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters). In all cases purification was achieved using hexane– $\text{CHCl}_3$ –*i*-PrOH–MeOH (75:23:1:1) as mobile phase.

**Plant Material.** The whole plant was collected in Catemaco, State of Veracruz, Mexico, in October 1996. An authenticated voucher specimen (G. Carmona-Díaz-96-2) is preserved at the Instituto de Ecología Herbarium (XAL), Xalapa, Veracruz.

**Extraction and Isolation.** The air-dried plant material (2 kg) was ground into a powder and extracted exhaustively by maceration at room temperature with a mixture of MeOH– $\text{CHCl}_3$  (1:1). After filtration, the extract was concentrated in vacuo to yield 174 g of a brown residue. The extract was subjected to column chromatography over silica gel (1 kg) and eluted with a gradient of hexane–EtOAc (10:0  $\rightarrow$  0:10) and EtOAc–MeOH (10:0  $\rightarrow$  5:5). Three hundred fractions (1 L each) were collected and combined to produce 11 pooled fractions (F-I to F-XI) based on their TLC profiles. According to the pharmacological testing, F-V was the only fraction that inhibited (99%) the spontaneous contraction of the guinea-pig ileum when tested at the  $\text{IC}_{50}$  of the original extract.

Active fraction F-V (6.0 g, eluted with hexane–EtOAc 8:2) was chromatographed on a silica gel column (80 g) using a gradient of hexane–EtOAc (10:0  $\rightarrow$  0:10) to yield eight secondary fractions (FV-1 to FV-8). The most active fraction was FV-8 (600 mg) (100% of inhibition of the spontaneous ileum contraction) eluted with hexane–EtOAc (8:2). HPLC purification (hexane– $\text{CHCl}_3$ –*i*-PrOH–MeOH, 75:23:1:1) of active fraction FV-8 afforded nidemone (**1**, 4 mg,  $t_{\text{R}}$  14.2 min); aloifol II<sup>7</sup> (**2**, 22 mg,  $t_{\text{R}}$  18 min); 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol (**3**, 25 mg,  $t_{\text{R}}$  19 min); 1,5,7-trimethoxyphenanthrene-2,6-diol<sup>2</sup> (**4**, 8 mg,  $t_{\text{R}}$  23 min); ephemeroanthoquinone<sup>22</sup> (**5**, 5.7 mg,  $t_{\text{R}}$  26 min); gigantol<sup>2</sup> (**6**, 32 mg,  $t_{\text{R}}$  30 min); ephemeroanthol B<sup>22</sup> (**7**, 4 mg,  $t_{\text{R}}$  32 min); 2,4-dimethoxyphenanthrene-3,7-diol<sup>6</sup> (**8**, 3 mg,  $t_{\text{R}}$  35 min); lusianthridin<sup>8</sup> (**9**, 55 mg,  $t_{\text{R}}$  50 min); and batatasin III<sup>16</sup> (**10**, 19 mg,  $t_{\text{R}}$  62 min). From inactive fraction III crystallized the known triterpenoid nidemin, identical to a standard sample.<sup>1</sup> Finally, from inactive fraction X spontaneously crystallized a yellow powder characterized (IR, NMR, MS) as vitexin.<sup>9</sup>

**Nidemone (1):** vitreous solid;  $[\alpha]_{\text{D}} -114^\circ$  ( $c$  1.6, MeOH); CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm)  $-1.96 \times 10^6$  (221),  $-6 \times 10^5$  (246),  $9.3 \times 10^5$  (265),  $-1 \times 10^6$  (290),  $-6 \times 10^5$  (326); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 343 (3.54), 296 (3.10), 226 (4.30); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  1692, 1626, 1596, 1452, 1420, 1358, 1158, 992  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR (see Table 1); EIMS  $m/z$  258 [ $\text{M}^+$ (78)], 241 (12), 229 (10), 226 (15), 215 (30), 186 (100), 173 (13), 134 (14); HREIMS  $m/z$  258.2694 (calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ , 258.2693).

**3,5,7-Trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol (3):** glassy solid; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 265 (3.42), 279 (3.30), 300 (2.44); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3407, 2928, 1614, 1580, 1503, 1480, 1458, 1363, 1213, 1104, 1047, 995  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.00 (1H, s,  $\text{D}_2\text{O}$  exchange, –OH), 8.00 (1H, s,  $\text{D}_2\text{O}$  exchange, –OH), 7.98 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-4), 6.88 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3), 6.59 (s, H-8), 3.92 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O-7}$ ), 3.81 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O-1}$ ), 3.70 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O-5}$ ), 2.80 (2H, m, H-9), 2.69 (2H, m, H-10);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  147.3 (C-1), 145.8 (C-7), 144.8 (C-5), 143.6 (C-2), 137.6 (C-9a), 130.0 (C-4a), 129.0 (C-10a), 125.8 (C-6), 123.9 (C-4), 117.9 (C-4b) 113.1 (C-3), 106.8 (C-8), 29.4 (C-9), 22.5 (C-10); EIMS  $m/z$  302 [ $\text{M}^+$ (100)], 287 (15), 255 (23), 244 (5); HREIMS  $m/z$  302.3217 (calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$ , 302.3218).

**Synthetic Intermediates.** Resveratrol, piceatannol, 3,4-dimethoxybenzaldehyde (**14**), benzaldehyde (**15**), and *m*-anisaldehyde (**16**) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). 4-Benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde (**11**), 3-benzyloxy-4-methoxybenzaldehyde (**12**), 3,4-dibenzoyloxybenzaldehyde (**13**), 3-benzyloxybenzaldehyde (**17**), 4-benzyloxybenzaldehyde (**18**), 3-benzyloxy-5-methoxybenzyltriphenylphosphonium bromide (**19**), 3,5-dibenzoyloxybenzyltriphenylphosphonium bromide (**20**), 3,5-dimethoxybenzyltriphenylphosphonium bromide (**21**), and benzyltriphenylphosphonium chloride (**22**) were prepared as previously described.<sup>15–17</sup>

**Bibenzyls 23–25, 28, 29, and 33.** 4'-Hydroxy-3,3',5-trimethoxybibenzyl (**23**), 3,3',4',5-tetramethoxybibenzyl (**24**), 3,3'-dihydroxy-4',5-dimethoxybibenzyl (**25**), 3,4'-dihydroxy-5-methoxybibenzyl (**29**), 3,3',4',5-tetrahydroxybibenzyl (**28**), and 3,4',5-trihydroxybibenzyl (**33**) were prepared as previously described.<sup>15–19</sup> In all cases, the spectroscopic properties of the synthetic materials were identical to those described in the literature.<sup>15–19</sup>

**4-Methoxy-3,3',5-trihydroxybibenzyl (26).** Compound **20** (1 g, 2  $\mu$ mol) was dissolved in dry tetrahydrofuran (15 mL) under a N<sub>2</sub> atmosphere; NaH (0.0814 g, 2  $\mu$ mol) and **11** (0.591 g, 1.86  $\mu$ mol) were added to the mixture, which was stirred during 3 h. After this period of time, water was added and the product extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and water, dried, and evaporated to give an oil (1.4 g), which was purified by open column chromatography [silica gel (30 g), hexane–EtOAc (98:2)] to give a mixture (not purified) of *Z*- and *E*-stilbenes (0.54 g, 55%). The mixture was directly hydrogenated at 45 lb/in.<sup>2</sup> (30 °C) in EtOAc (25 mL) over 10% palladium on carbon for 3 h. Then the catalyst was filtered off and the filtrate evaporated. The final product was purified by HPLC [CHCl<sub>3</sub>–MeOH–*i*-PrOH (98:1:1)] to yield **26** as a viscous solid (0.22 g, 27%): IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3350, 1600, 1590, 1450, 1320, 1295, 965 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)  $\delta$  8.10 (2H, s, D<sub>2</sub>O exchange, –OH), 7.40 (1H, s, D<sub>2</sub>O exchange, –OH), 6.81 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.72 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 6.63 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, H-6'), 6.22 (2H, d, *J* = 2.4, Hz, H-2 and H-6), 6.18 (1H, dd, *J* = 2.4, Hz, H-4), 3.78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.71 (4H, m, H-7 and H-7'); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O)  $\delta$  159.2 (C-3, C-5), 147.2 (C-4'), 146.5 (C-3'), 145.1 (C-1), 135.8 (C-1'), 120.0 (C-6'), 116.1 (C-2'), 112.4 (C-5'), 107.7 (C-2, C-6), 101.2 (C-4), 56.7 (–CH<sub>3</sub>O), 38.7 (C-7), 37.6 (C-7'); EIMS *m/z* 260 [M<sup>+</sup>(100)].

**3-Hydroxy-3',4',5-trimethoxybibenzyl (27).** Condensation of Wittig salt **19** (0.6 g, 1.2  $\mu$ mol), aldehyde **14** (0.170 g, 1  $\mu$ mol), and NaH (1.2  $\mu$ mol) gave, after chromatographic workup [open silica gel column, hexane–EtOAc (98:2)], the corresponding *Z*- and *E*-stilbene mixture (0.239 g, 52%), which upon hydrogenation and purification as described for compound **26** yielded **27** as a viscous solid (0.12 g, 39%). The spectral data were consistent with those found in the literature.<sup>19</sup>

**3'-O-Methylbatatasin III (30).** Phosphonium salt **19** (0.650 g, 1.3  $\mu$ mol), **16** (0.150 g, 1  $\mu$ mol), and NaH (0.053 g, 1  $\mu$ mol) were condensed to yield the mixture of stilbenes (75% yield, 0.285 g), which was similarly hydrogenated and purified to afford **30** (0.117 g, 41%) as a vitreous solid. The spectral properties were consistent with those of the natural product isolated from *Coelogyne ovalis*.<sup>24</sup>

**3,3',5-Trihydroxybibenzyl (31).** Wittig reaction using **12** (1.16 g, 2  $\mu$ mol), **17** (0.336 g, 1.6  $\mu$ mol), and NaH (0.063 g, 1.6  $\mu$ mol) as described for **26** gave compound **31** as a white powder (0.124 g, 34%): mp 155 °C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3350, 1600, 1590, 1450, 1320, 1295, 965 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.22 (1H, s, D<sub>2</sub>O exchange, –OH), 9.04 (2H, s, D<sub>2</sub>O exchange, –OH), 7.04 (1H, dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, H-5'), 6.64–6.55 (3H, m, H-2', H-4', H-6'), 6.07 (dd, *J* = 1.5, 1.5 Hz, H-2, H-6), 6.0 (1H, dd, *J* = 1.5 Hz, H-4), 2.63 (4H, m, H-7, H-7'); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  157.9 (C-5, C-3), 157.0 (C-3'), 143.3 (C-1), 142.9 (C-1'), 128.9 (C-5'), 118.8 (C-6'), 115.0 (C-2'), 112.6 (C-4'), 106.21 (C-2, C-6), 100.0 (C-4), 37.0 (C-7), 36.8 (C-7'); EIMS *m/z* 230 [M<sup>+</sup>(100)], 212 (10), 123 (80), 107 (83), 77 (20).

**3,3',5-Trimethoxybibenzyl (32).** Wittig reaction using **21** (1 g, 2.4  $\mu$ mol), **16** (0.329 g, 2.4  $\mu$ mol), and NaH (0.057 g, 2.4  $\mu$ mol) and applying the same general strategy as for **26** gave bibenzyl **32** (0.397 g, 60.9%): IR (KBr)  $\nu_{\max}$  1600, 1594, 1454,

1204, 1150, 1067, 831 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.2 (1H, dd, *J* = 8.4, 7.8, Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-6), 6.76–6.73 (2H, m, H-2', H-4'), 6.35 (2H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2, H-6), 6.31 (1H, dd, *J* = 2.4, 2.4 Hz, H-4), 3.76 (3H, s, OMe-3'), 3.74 (6H, s, OMe-3, OMe-5), 2.8 (4H, m, H-7, H-7'); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  160.6 (C-5, C-3), 159.5 (C-3'), 144.0 (C-1), 143.2 (C-1'), 129.2 (C-4'), 120.7 (C-5'), 114.1 (C-2'), 111.2 (C-3'), 106.4 (C-2, C-6), 97.9 (C-4), 55.2 (OMe-3, OMe-5), 55.1 (OMe-3'), 38.2 (C-7), 37.8 (C-7'); EIMS *m/z* 272 [M<sup>+</sup>(100)].

**3,5-Dihydroxybibenzyl (34).** Compounds **20** (0.64 g, 0.011  $\mu$ mol) and **15** (0.05 g, 0.09  $\mu$ mol) were condensed in the presence of NaH (0.026 g, 0.011  $\mu$ mol) to yield a mixture of the corresponding *Z*- and *E*-stilbene (3.29 g, 65%), which upon catalytic hydrogenation as described for **26** gave **34** (0.05 g, 41%). The spectral data of **34** were consistent with those reported in the literature.<sup>27</sup>

**3-Hydroxy-4-methoxybibenzyl (35).** Wittig reaction using as starting materials **22** (0.230 mg, 0.65  $\mu$ mol), **12** (0.329 g, 2.4  $\mu$ mol), and NaH (0.0156 g, 0.65) and applying the same general strategy as for **26** gave compound **35** (0.067 g, 58%).<sup>29</sup>

**Pharmacological Testing.** The pharmacological tests employing the guinea-pig ileum model were performed using two different types of experiments, as previously described.<sup>2,39</sup> In the first one, the crude extract, primary fractions, and natural and synthetic compounds were evaluated for their ability to relax spontaneous ileal contractions. In the second, the effect of **6** and **10** on the contractions of the ileum in the presence of L-NAME (500  $\mu$ M), ODQ (100  $\mu$ M), and chlorpromazine (100  $\mu$ M) was investigated. Male guinea-pigs (600–800 g) were used. The animals were sacrificed by cervical dislocation. The ileum was dissected and placed in Krebs-Henseleit (KH) solution, pH 7.4, with the following composition (in mM): NaCl 119, KCl 4.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.5, NaHCO<sub>3</sub> 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<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> and continuously recorded for isometric tension with a Grass 7D polygraph, as previously described.<sup>39</sup> After a stabilization time of 30 min, a 10 min control period was recorded. The test substances (extract, chromatographic fractions, and compounds), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), were added to the bath in a volume of 50  $\mu$ L at different concentrations (one concentration was used per ileum segment). All the responses were recorded for a 10 min period. The effects of the plant crude extract, fractions, pure compounds, and positive controls were determined by comparing the areas under the curve (AUC) inscribed by the frequency and the amplitude of the test materials. Areas were calculated from the polygraph tracings, using an analog-digital tablet (CPLAB-10) and specially designed software. All the results are expressed as the mean of six experiments  $\pm$  SEM. Concentration–response curves for the extract and pure compounds were plotted and the experimental data adjusted by the nonlinear curve-fitting program (PRISMA). The statistical significance (*p* < 0.05) of differences between means was assessed by an analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's test.<sup>39,40</sup>

**Interaction of Compounds with Bovine-Brain CaM.** The interaction of the stilbenoids (natural and synthetics) with bovine-brain CaM (Sigma) was performed using a denaturing homogeneous electrophoresis (SDS-PAGE) procedure. The experiment was carried out according to a previously described procedure<sup>30</sup> using a 15% polyacrylamide gel. The interaction of the compounds with CaM was evaluated by observing the difference in electrophoretic mobility in the presence of Ca<sup>2+</sup>. Each electrophoretic run was done in triplicate, and chlorpromazine was used as positive control. The experimental conditions are described in the legend of Figure 3.

**PDE Assay.** A PDE assay in the presence of bovine-brain CaM was performed using a modification of the method described by Sharma and Wang.<sup>31</sup> Bovine-brain CaM (0.2  $\mu$ g) was incubated with 0.015 units of CaM-deficient-CaM-dependent PDE from bovine brain (Sigma) for 3 min in 800  $\mu$ L of assay solution containing 0.3 units of 5'-nucleotidase (from *Crotalus atrox* venom, Sigma), 45 mM Tris-HCl, 5.6 mM Mg-(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 45 mM imidazole, and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0. The

test compounds were then added to the assay medium at 10, 20, 40, 60, 80, and 100  $\mu\text{M}$  in DMSO, and the samples were incubated for 30 min. Then, 100  $\mu\text{L}$  of 10.8 mM cAMP, pH 7.0, was added to start the assay. After 30 min, the assay was stopped by the addition of 100  $\mu\text{L}$  of 55% trichloroacetic acid solution. All of the above steps were carried out at 30 °C. The PDE reaction was coupled to the 5'-nucleotidase reaction, and the amount of inorganic phosphate released represented the activity of the PDE. The phosphate produced in the assay was measured by the method of Sumner.<sup>30</sup> The wavelength used for the phosphate assay was 660 nm using a CINTRA 5 spectrophotometer. Chlorpromazine was used as a positive control ( $\text{IC}_{50} = 10.2 \mu\text{M}$ ). The results are expressed as  $\text{IC}_{50}$  values that were determined from the analysis of the concentration-effect (inhibition of the enzyme activity) curves, where each point is the mean ( $\pm\text{SEM}$ ) of at least three experiments. The concentration-response graphics were analyzed using a curve-fitting program (Microcal Origin 6.0, Professional Software).

**Molecular Modeling Calculations.** Geometry optimizations and conformational search were carried out using the MMFF94 force-field calculations as implemented in the Spartan'02 molecular modeling software from Wavefunction, Inc. (Irvine, CA).

**Acknowledgment.** This work was supported by a grant of DGAPA-UNAM and CONACyT. We wish to thank Marisela Gutiérrez for the IR and UV spectra, and Georgina Duarte and Oscar Yañez for recording the MS and NMR spectra, respectively. The technical assistance of Isabel Rivero-Cruz and Laura Acevedo is also acknowledged. We are grateful to Dr. Carlos Cerda-García-Rojas for valuable suggestions. Y.H.-R. acknowledges fellowships from Sistema Nacional de Investigadores (SEP-CONACyT) and Dirección General Intercambio Académico (DGEP-UNAM) to carry out graduate studies.

## References and Notes

- Estrada, S.; Acevedo, L.; Rodríguez, M.; Toscano, R. A.; Mata, R. *Nat. Prod. Lett.* **2002**, *16*, 81–86.
- Estrada, S.; Rojas, A.; Mathison, Y.; Israel, A.; Mata, R. *Planta Med.* **1999**, *65*, 109–114, and references therein.
- Estrada, S.; Toscano, R. A.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1175–1178.
- Tezuka, Y.; Hirano, H.; Kikuchi, T.; Xu, G. J. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 593–598.
- Jujena, R. K.; Sharma, S. C.; Tandon, J. S. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1123–1126.
- Tuchinda, P.; Udchachon, J.; Khumtaveeporn, K.; Taylor, W. C.; Engelhardt, L. M.; White, A. H. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3267–3271.
- Min, Z.-D.; Tanaka, T.; Iinuma, M.; Mizuno, M. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 1189.
- Majumder, P. L.; Lahiri, S. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 621–624.
- Wollenweber, E.; Dietz, V. H. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 869–932.
- Furness, M. S.; Robinson, T. P.; Goldsmith, J.; Bowen, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 459–462.
- Demir, A. S.; Sesenoglu, O. *Tetrahedron Asymm.* **2002**, *13*, 667–670.
- Lightner D. A.; Gurst J. E. *Organic Conformational Analysis and Stereochemistry from Circular Dichroism Spectroscopy*, Wiley-VCH: New York, 2000; pp 337–393.
- Snatzke, G. *Tetrahedron* **1965**, *21*, 421–438.
- Gorham, J. *The Biochemistry of the Stilbenoids*; Chapman & Hall: London, 1995; pp 128–133.
- Crombie, L.; Jamieson, S. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1982**, 1467–1475.
- Hashimoto, T.; Hasegawa, K. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 2849–2852.
- Reimann, E. *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 2881–2888.
- Senyavina, L. B.; Sheichenko, V. I.; Sheinker, Y. N.; Dombrovskii, A. V.; Shevchuk, M. I.; Barsukov, L. I.; Bergelson, L. D. *Z. Obshchei Khim.* **1967**, *37*, 499–506.
- Mannila, E.; Talvitie, A.; Kolehmainen, E. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 813–816.
- Honda, Ch.; Yamaki, M. *Nat. Med.* **2001**, *55*, 68–70.
- Crombie, L.; Jamieson, S. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1982**, 1455–1466.
- Yasuhiro, T.; Hiroyuki, H.; Tohru, K.; Guojun, X. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 593–598.
- Yishihiko, I.; Masafumi, O.; Hiroshi, T.; Kimiye, B.; Mitsugi, K.; Hideo, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 3353–3354.
- Sachdev, K.; Kulshreshtha, D. K. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 499–502.
- El-Ferally, F. S. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 89–92.
- Matsuda, H.; Morikawa, T.; Toguchida, I.; Park, J.-Y.; Harima, S.; Yoshikawa, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 41–50.
- Asakawa, Y.; Kondo, K.; Tori, M.; Hashimoto, T.; Ogawa, S. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1, 219–234.
- Takasugi, M.; Kawashima, S.; Monde, K.; Katsui, N.; Masamune, T.; Shirata, A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 37–376.
- Schelline, R. R. *Experientia* **1974**, *30*, 880–881.
- Ovadi J. In *Progress in Drug Research*; Jucker, E., Ed.; Birkhauser Verlag: Basel, 1989; Vol. 33, pp 353–395.
- Hook, S.; Means, A. R. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 471–505.
- Cantabrana, B.; Vallina, J. R. P.; Menendes, L.; Hidalgo, A. *Life Sci.* **1995**, *57*, 1333–1341.
- Macías, M.; Ulloa, M.; Gamboa, A.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 757–758.
- Sharma, R. K.; Wang, J. H. In *Advances in Cyclic Nucleotide Research*; Greengard, P., Robinson G. A., Eds.; Raven Press: New York, 1979; Vol. 10, pp 187–198.
- Leung, P. C.; Taylor, W. A.; Wang, J. H.; Tripton, C. L. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2742–2747.
- Sumner, J. B. *Science* **1944**, *100*, 413–415.
- Ranu, B. C.; Jana, U. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6380–6386.
- Crombie, L.; Crombie, M. L. *J. Chem Soc., Perkin Trans. I* **1982**, 1455–1466.
- Rojas, A.; Cruz, S.; Rauch, V.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. *Phytomedicine* **1995**, *2*, 51–55.
- Bailey, N. T. J. *Statistical Methods in Biology*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1995; pp 234–236.

NP030303H

### ***APENDICE III***

EVALUACIÓN DEL EFECTO FITOTÓXICO DE LOS PRODUCTOS NATURALES GIGANTOL (2), BATATASINA III (14) Y DE LOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS 145, 146, 151-155.

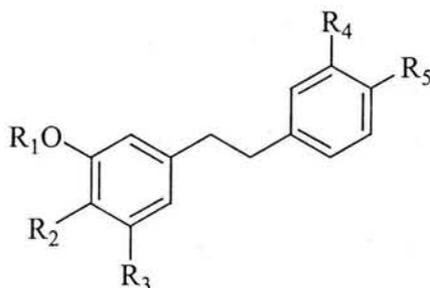
**Evaluación del efecto fitotóxico de los productos naturales y de los análogos sintéticos.**

Una de las conclusiones importantes de la presente disertación doctoral fue que los bibencilos podrían ejercer su efecto espasmolítico a través de la proteína reguladora CaM, ya que estos productos retardaron la movilidad electroforética de la CaM de cerebro de bovino y modificaron *in vitro* las propiedades reguladoras enzimáticas de la proteína PDE (inhibiendo su activación).

Como se mencionó anteriormente (sección 4.8), la CaM es una proteína eucariótica ubicua, que carece de actividad enzimática propia, sin embargo su participación es importante en la transducción de señales reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel celular (Hook y Means, 2001).

La CaM juega un papel muy importante en la transducción de señales en plantas durante los procesos de germinación y crecimiento vegetal (Zhang L. y Lu, Y.-T., 2003), al modular la actividad de varias enzimas importantes tales como la NAD-cinasa, la glutamato descarboxilasa y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa; por lo que la CaM y/o las enzimas que ésta modula podrían ser blancos de acción importantes *in vivo* para muchas fitotoxinas (Lee *et al.*, 2000). En base a estas consideraciones y con la finalidad de explorar el potencial herbicida de los compuestos estilbenoides, se determinó el efecto fitotóxico de los productos naturales gigantol (**2**) y batatasina III (**14**), y los análogos sintéticos (**145**, **146**, **151-155**), de acuerdo a la metodología descrita por Tanaka y colaboradores (1993), mediante la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento e integridad celular de la arvense acuática *Lemna pausicosta*. De esta manera en diversas colonias de *Lemna* se evaluó la pérdida de electrolitos al medio de cultivo y la inhibición del crecimiento durante 72 h de exposición a diferentes diluciones (de 32 a 1000  $\mu\text{M}$ ) de los compuestos estilbenoides. En la Tabla 1 se indican las  $\text{CI}_{50}$  de los compuestos.

**Tabla 1.** Fitotoxicidad *in vitro* de los productos naturales gigantol (**2**) y batatasina III (**14**), y de los análogos sintéticos (**145**, **146**, **151-155**) sobre cultivos\* de *Lemna pausicostata* a las 72 h.



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	CI <sub>50</sub> (μM)	
						Liberación de electrolitos	Inhibición del crecimiento
<b>2</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	166	180
<b>14</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	H	145	159
<b>145</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	116	89.9
<b>146</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	148	117
<b>151</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	OH	144	169
<b>152</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	89.9	94.7
<b>153</b>	H	H	OH	OH	H	725	985
<b>154</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	>1000	>1000
<b>155</b>	H	H	OH	OH	OH	>1000	>1000

\*Los resultados son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Los compuestos exhibieron una fitotoxicidad significativamente mayor ( $P < 0.005$ , prueba t-student no pareada) que el control (medio de cultivo; incremento de la conductividad,  $0.00 \pm 15.7 \mu\text{mho/cm}$ ; inhibición del crecimiento,  $0.00 \pm 4.3\%$ )

Todos los compuestos causaron inhibición del crecimiento y pérdida de electrolitos celular de una manera dependiente de la concentración. Los análogos sintéticos con R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> (**2**, **14**, **145**, **146**, **151**, **152** y **154**) presentaron una fitotoxicidad significativa en contraste con los compuestos donde R<sub>1</sub> = H (**153** y **155**), que exhibieron poca o nula toxicidad.