



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRUEBAS SELECTAS DE IDENTIDAD, EFICACIA Y SEGURIDAD  
PRECLÍNICAS DE *CYRTOPODIUM MACROBULBON* Y  
*SCAPHYGLOTTIS FASCICULATA* (ORCHIDACEAE)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR(A) EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. VIRIDIANA MORALES SÁNCHEZ**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG, FACULTAD DE  
CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA, FACULTAD DE  
CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ, INSTITUTO DE  
BIOLOGÍA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/722/14

ASUNTO: Oficio de Jurado

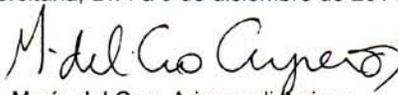
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **1ro., de septiembre de 2014**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **MORALES SÁNCHEZ VIRIDIANA** con número de cuenta **98092606** con la tesis titulada: "**Pruebas selectas de identidad, eficacia y seguridad preclínicas de *Cyrtopodium macrobulbon* y *Scaphyglottis fasciculata* (Orchidaceae)**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**:

Presidente:	DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal:	DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA
Secretario:	DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA
Suplente:	DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ
Suplente	DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 9 de diciembre de 2014.

  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/grf\*

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por los apoyos recibidos para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de este proyecto, así como el apoyo de Becas Complementarias para la realización de una estancia académica internacional en la Universidad de British Columbia (Vancouver, Canadá).

A la Dra. Rachel Mata Essayag, de la Facultad de Química de la UNAM, por la dirección de este proyecto de tesis, por su apoyo, paciencia y por la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Rogelio Pereda, de la Facultad de Química de la UNAM, por su apoyo, por todos sus comentarios y correcciones durante el desarrollo del proyecto, en cada evaluación tutorial y en la escritura de la tesis.

Al Dr. Gerardo Salazar, del Instituto de Biología de la UNAM, por el apoyo para la obtención del código de barras de *C. macrobulbon*. Por los contactos para la recolección del material vegetal en campo. Por sus observaciones y comentarios sobre la parte botánica de este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isabel Rivero por su colaboración y apoyo para la obtención del método analítico por HPLC y su validación.

A la Dra. Araceli Pérez, técnico académico del laboratorio 124-E, por todo su apoyo y asesoría técnica.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa y a las Dras. Martha Macías y Martha Juana Martínez por sus observaciones y correcciones al manuscrito de tesis.

Al Dr. Guillermo Laguna Hernández por su apoyo para la obtención de los cortes, tinciones y descripción histológica del material vegetal, así como las imágenes de microscopía.

A la M. en C. Berenit Garfias por su apoyo para la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido en el Instituto de Biología de la UNAM.

A la M. en C. Ma. Eugenia Muñoz Díaz de León por el servicio de las estufas de secado del taller de Plantas II de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A las técnicas Georgina Duarte y Rosa Isela del Villar de la USAI, Facultad de Química.

Al Geógrafo Héctor Huerta por su ayuda para la elaboración de los mapas de distribución de las especies *C. macrobulbon* y *S. fasciculata*.

A los compañeros del laboratorio 124-E, Sol, Abraham, Krutzkaya, Berenice, Guadalupe y Harry, por su ayuda en la parte experimental y las pruebas de eficacia de este proyecto.

**ÍNDICE**

Lista de Cuadros	IV
Lista de Figuras	VI
Lista de Espectros	IXI
Lista de Abreviaturas	X
Rsumen	XII
Abstract	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Monografías de plantas medicinales	3
2.2 Uso de orquídeas con fines medicinales en México	10
2.3 <i>Cyrtopodium macrobulbon</i> (La Llave & Lex.) G. Romero & Carnevali	21
2.4 <i>Scaphyglottis fasciculata</i> Hooker	24
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
5. METODOLOGÍA	29
5.1 <i>Cyrtopodium macrobulbon</i>	29
5.1.1 Pruebas de identidad química	29
5.1.1.1 Material vegetal	29
5.1.1.2 Procedimientos generales	32
5.1.1.3 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas	33
5.1.1.4 Obtención de los extractos	33
5.1.1.5 Análisis cromatográficos	35
5.1.1.6 Caracterización de los principales compuestos presentes En el extracto orgánico de <i>C. macrobulbon</i>	39
5.1.1.7 Validación de un método analítico para la cuantificación del efemerantol B ( <b>40</b> ) por CLAR	43
5.1.1.8 Identificación de los compuestos volátiles de <i>C. macrobulbon</i>	45

5.1.2 Pruebas de identidad botánica	48
5.1.3 Pruebas de identidad genética	50
5.1.4 Pruebas de seguridad	52
5.1.4.1 Toxicidad aguda	52
5.1.5 Pruebas de eficacia	53
5.1.5.1 Determinación del potencial antimicrobiano	53
5.1.5.2 Determinación del potencial antinociceptivo	54
5.1.6 Mapa de distribución potencial	55
5.2 <i>Scaphyglottis fasciculata</i>	57
5.2.1 Pruebas de identidad química	57
5.2.1.1 Material vegetal	57
5.2.1.2 Obtención de los extractos	57
5.2.1.3 Análisis cromatográficos	58
5.2.1.3 Identificación de los compuestos volátiles de <i>S. fasciculata</i>	61
5.2.2 Pruebas de identidad botánica	61
5.2.3 Pruebas de seguridad	61
5.2.3.1 Toxicidad aguda	61
5.2.4 Mapa de distribución potencial	62
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
6.1 <i>Cyrtopodium macrobulbon</i>	63
6.1.1 Pruebas de identidad química	63
6.1.1.1 Caracterización de los principales compuestos presentes en el extracto orgánico de <i>C. macrobulbon</i>	63
6.1.1.2 Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de efemerantol B ( <b>40</b> ) por CLAR	65
6.1.1.3 Identificación de los compuestos volátiles presentes de <i>C. macrobulbon</i>	72
6.1.2 Pruebas de identidad botánica	74
6.1.3 Pruebas de identidad genética	77
6.1.4 Pruebas de seguridad	77

6.1.5 Pruebas de eficacia	78
6.1.5.1 Potencial antimicrobiano de <i>C. macrobulbon</i>	78
6.1.5.2 Potencial antinociceptivo de <i>C. macrobulbon</i>	79
6.1.6 Mapa de distribución potencial	84
6.2 <i>Scaphyglottis fasciculata</i>	86
6.2.1 Pruebas de identidad química	86
6.2.1.1 Identificación de los principales compuestos presentes en la fracción orgánica de la infusión de <i>S. fasciculata</i>	87
6.2.1.2 Identificación de los compuestos volátiles de <i>S. fasciculata</i>	88
6.2.2 Pruebas de identidad botánica	89
6.2.3 Mapa de distribución potencial	91
7. CONCLUSIONES	93
8. BIBLIOGRAFÍA	95
9. ANEXOS	105
ANEXO I	106
ANEXO II	117
ANEXO III	121

## Lista de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas.....	13
<b>Cuadro 2.</b> Diferentes sistemas de elución ensayados en CCF con el extracto orgánico y fracción orgánica de la infusión de <i>C. macrobulbon</i> .....	36
<b>Cuadro 3.</b> Resumen del fraccionamiento primario por CCA a partir del extracto orgánico de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de <i>C. macrobulbon</i> .....	39
<b>Cuadro 4.</b> Condiciones de trabajo en CLAR en fase normal para el extracto orgánico de <i>C. macrobulbon</i> .....	42
<b>Cuadro 5.</b> Condiciones de análisis para la identificación de compuestos volátiles en las muestras de las especies <i>C. macrobulbon</i> y <i>S. fasciculata</i> .....	47
<b>Cuadro 6.</b> Condiciones de trabajo en CLAR en fase normal para la fracción orgánica de la infusión de <i>S. fasciculata</i> .....	61
<b>Cuadro 7.</b> Resultados experimentales de las curvas de calibración del efemerantol B (40) para evaluar la linealidad del sistema. ....	67
<b>Cuadro 8.</b> Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del sistema del efemerantol B (40). ....	70
<b>Cuadro 9.</b> Resultados experimentales de la curva de calibración del efemerantol B (40) para evaluar la linealidad y exactitud del método. ....	71
<b>Cuadro 10.</b> Compuestos volátiles identificados en los pseudobulbos de <i>C. macrobulbon</i> . 73	
<b>Cuadro 11.</b> Evaluación de la actividad antibacteriana de la infusión y su fracción orgánica de <i>C. macrobulbon</i> . ....	79

**Cuadro 12.** Compuestos volátiles mayoritarios identificados en las partes aéreas de *S. fasciculata*..... 88

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Epidendrum pastoris</i> , La Llave & Lex. Mencionada en Historia de las Plantas de la Nueva España. ....	12
<b>Figura 2.</b> <i>Cyrtopodium macrobulbon</i> (La Llave & Lex) G. Romero & Carnevali. ....	23
<b>Figura 3.</b> <i>Scaphyglottis fasciculata</i> Hooker.....	26
<b>Figura 4.</b> A) Colecta de <i>C. macrobulbon</i> Chilpancingo, Guerrero. Venta de <i>C. macrobulbon</i> en el mercado de Sonora (B) y en el pasaje Zócalo-Catedral del Distrito Federal (C y D). ....	30
<b>Figura 5.</b> Ejemplar de herbario de <i>C. macrobulbon</i> MEXU (1372213).....	31
<b>Figura 6.</b> Obtención del extracto orgánico a partir de la droga cruda de <i>C. macrobulbon</i> . ....	34
<b>Figura 7.</b> Obtención del extracto acuoso y fracción orgánica de <i>C. macrobulbon</i> . ....	35
<b>Figura 8.</b> Cromatograma del fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>C. macrobulbon</i> . ....	37
<b>Figura 9.</b> Esquema del fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de <i>C. macrobulbon</i> . ....	38
<b>Figura 10.</b> Sitio de colecta en Xalapa, Veracruz. <i>Scaphyglottis fasciculata</i> . ....	59
<b>Figura 11.</b> Ejemplar de herbario de <i>S. fasciculata</i> (MEXU 13722311). ....	60
<b>Figura 12.</b> Principales compuestos aislados a partir del extracto orgánico de los pseudobulbos de <i>C. macrobulbon</i> . ....	64
<b>Figura 13.</b> Perfiles cromatográficos por CLAR correspondientes al extracto orgánico de <i>C. macrobulbon</i> . A) Material vegetal comprado en mercados del DF (CM-2). B) Muestra de material colectado en campo (CM-1).....	68

**Figura 14.** Principales compuestos volátiles identificados en los pseudobulbos de *C. macrobulbon*. ..... 73

**Figura 15.** Pseudobulbo: A (barra de escala, 50  $\mu$ ), corte transversal; cutícula (c), epidermis (e), haces vasculares (hv) distribuidos en el córtex siguiendo la forma del pseudobulbo. B (barra de escala 100  $\mu$ ), corte paradermal; células crenadas (cc) con pared celular engrosada. C (barra de escala 80  $\mu$ ), corte paradermal, células crenadas (cc). D (barra de escala 200  $\mu$ ). E (barra de escala 200  $\mu$ ). F (barra de escala 50  $\mu$ ). G (barra de escala 50  $\mu$ ). H (barra de escala 50  $\mu$ ). I (barra de escala 200  $\mu$ ) (MEB); paredes celulares (pc) engrosadas. .... 75

**Figura 16.** Efecto antinociceptivo de la infusión de *C. macrobulbon*. Modelo de placa caliente. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MOR: morfina (5 mg/kg). Cada barra representa el promedio + EEM para los animales de cada grupo ( $n=8$ ) \* $p < 0.05$ . .... 80

**Figura 17.** Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *C. macrobulbon*. Modelo de placa caliente. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MOR: morfina 5 (mg/kg). Cada barra representa el promedio + EEM para los animales de cada grupo ( $n=8$ ) \*\*\* $p < 0.05$ . ..... 81

**Figura 18.** Efecto antinociceptivo de la infusión de *C. macrobulbon* en el modelo de estiramiento abdominal. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MET: metamizol (100 mg/kg). Los datos representan + SEM ( $n=6$ ) \* $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.001$ . ..... 82

**Figura 19.** Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *C. macrobulbon* en el modelo de estiramiento abdominal. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MET: metamizol (100 mg/kg). Los datos representan + SEM ( $n=6$ ) \* $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . ..... 83

<b>Figura 20.</b> Mapa de distribución potencial (Maxent, ABC=0.944) para <i>C. macrobulbon</i> . Los puntos amarillos corresponden a los registros de presencia de la especie. El área morada corresponde a las zonas de posible distribución con base en sus características bióticas y abióticas.....	85
<b>Figura 21.</b> Principales compuestos identificados en la fracción orgánica de la infusión de <i>S. fasciculata</i> .....	87
<b>Figura 22.</b> Cromatograma de la fracción orgánica obtenida a partir de la infusión de <i>S. fasciculata</i> . Los compuestos corresponden a: confusarina (39), gigantol (2), efemerantol B (40) y batatasina III (15).....	87
<b>Figura 23.</b> Principales compuestos volátiles identificados en los pseudobulbos de <i>S. fasciculata</i> .....	89
<b>Figura 24.</b> Micrografías de pseudobulbo de <i>S. fasciculata</i> bajo diferentes técnicas de tinción. A corte transversal (barra de escala 100 $\mu$ ), cutícula engrosada con contenido lipídico. B corte transversal (barra de escala 200 $\mu$ ), epidermis (e), córtex (co). C (barra de escala 40 $\mu$ ), rafidios (ra). D (barra de escala 300 $\mu$ ), haces vasculares (hv). E (barra de escala 100 $\mu$ ), haz vascular (hv) rodeado por idioblastos (i). F (barra de escala 100 $\mu$ ) elemento de vaso (v) con punteaduras. G (barra de escala 40 $\mu$ ), idioblastos (i). H (barra de escala 100 $\mu$ ), idioblastos (i).....	90
<b>Figura 25.</b> Mapa de distribución potencial (Maxent, ABC=0.984) para <i>S. fasciculata</i> . Los puntos verdes corresponden a los registros de presencia de la especie con coordenadas verificadas. Las zonas marcadas en color rojo corresponden a las áreas de distribución potencial para la especie, con base en sus características bióticas y abióticas. ....	92

## Lista de Espectros

<b>Espectro 1.</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN del <i>n</i> -octacosil- <i>trans-p</i> -cumarato (34).....	106
<b>Espectro 2.</b> Espectro $^{13}\text{C}$ RMN del <i>n</i> -octacosil- <i>trans-p</i> -cumarato (34). .....	107
<b>Espectro 3.</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN del alcohol 4-metoxi-bencílico (36). .....	108
<b>Espectro 4.</b> Espectro $^{13}\text{C}$ RMN del alcohol 4-metoxi-bencílico (36).....	109
<b>Espectro 5.</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN del 4-hidroxibenzaldehído (37).....	110
<b>Espectro 6.</b> Espectro $^{13}\text{C}$ RMN del 4-hidroxibenzaldehído (37).....	111
<b>Espectro 7.</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN del 1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (38)..	112
<b>Espectro 8.</b> Espectro $^{13}\text{C}$ RMN del 1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (38).	113
<b>Espectro 9.</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN de la confusarina (39).....	114
<b>Espectro 10.</b> Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de la confusarina (39).....	115
<b>Espectro 11.</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN del efemerantol B (40). .....	116
<b>Espectro 12.</b> Espectro $^{13}\text{C}$ RMN del efemerantol B (40). .....	117

## Lista de Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
Ca <sup>2+</sup>	Ión Calcio
CaM	Calmodulina
CAR	Carboxen
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
DMSO	Dimetil sulfóxido
DVB	Divinilbenceno
EM	Espectrometría de masas
EM-IE	Espectrometría de masas modalidad impacto electrónico
FAA	Formaldehído
Hex	Hexano
IR	Espectroscopía en el Infrarrojo
KBr	Bromuro de Potasio
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MCC	Microscopía de campo claro
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MeOH	Metanol
MET	Metamizol
MH	Müller-Hinton
mL	Mililitros
μL	Microlitros
mm	Milímetros
m	Metros
MOR	Morfina
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio anhidro
NO/GMPc	Óxido Nítrico/Guanosin monofosfato cíclico
PDMS	Polidimetilsiloxano

PVP	Polivinil pirilidona
RMN	Resonancia magnética nuclear
<sup>13</sup> C RMN	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
<sup>1</sup> H RMN	Resonancia magnética nuclear protónica
rpm	Revoluciones por minuto
SIG	Sistemas de información geográfica
SPME	Micro extracción en fase sólida
SSI	Solución salina isotónica
TMS	Tetrametilsilano
UV	Espectroscopía en el Ultravioleta
VEH	Vehículo

---

**RESUMEN**

*Cyrtopodium macrobulbon* “cañaveral o caña de jabalí” entre otros, es una orquídea terrestre que se utiliza en México para el tratamiento de diversas afecciones, entre ellas el “mal de orín”, para lo cual se vende y se recomienda en el mercado de Sonora de plantas medicinales y en el pasaje Zócalo-Catedral en la Ciudad de México. En el presente trabajo se establecieron las pruebas selectas de identidad química, botánica y genética, así como de eficacia y seguridad de la droga cruda de esta especie. De manera adicional, se estableció un mapa de su distribución potencial en nuestro país.

La aplicación de técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas permitió la identificación de una mezcla de derivados del ácido-*trans-p*-cumárico que corresponden al *n*-hexacosil-*trans-p*-cumarato, *n*-octacosil-*trans-p*-cumarato, y *n*-triacontil-*trans-p*-cumarato (33-35), así como del alcohol 4-metoxi-bencílico (36); 4-hidroxibenzaldehído (37); 5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (38); confusarina (39); gigantol (2); batatasina III (15) y efemerantol B (40). Este último se utilizó como marcador y con él se logró el establecimiento y la validación de un método analítico por CLAR que resultó ser lineal, preciso y exacto, el cual podrá ser utilizado en las pruebas de control de calidad de la droga cruda. Además se identificó al eucaliptol (41), hexanal (42), Z-2-heptenal (43), formiato de isobornilo (44), 1-nonen-3-ol (45), 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (46) y eicosano (47) como los principales compuestos volátiles, presentes en los pseudobulbos de *C. macrobulbon*.

En cuanto a las pruebas de eficacia, la evaluación del potencial antinociceptivo en la prueba de estiramiento abdominal, se observó una disminución en las contorsiones al administrar la infusión de los pseudobulbos de *C. macrobulbon* a las dosis de 100 y 360

mg/kg y a la dosis de 100 mg/kg con el extracto orgánico. Este efecto positivo puede deberse a la presencia de compuestos de tipo estilbenoide como el gigantol (**2**), efemerantol B (**40**), batatasina III (**15**) y monoterpenoides como el eucaliptol (**41**), con actividad antinociceptiva demostrada, los cuales pueden ser los responsables de la efectividad para contrarrestar los síntomas del mal de orín. En este sentido se estableció la seguridad en el consumo de *C. macrobulbon* ya que no representa un peligro de toxicidad aguda puesto que resultó inocuo según el método de Lorke.

Se describieron por vez primera las características anatómicas e histológicas de los pseudobulbos de *C. macrobulbon*, reconociendo la presencia de células epidérmicas crenadas, lo cual constituye el primer reporte de este tipo celular en orquídeas. En cuanto a la identidad genética, mediante el uso de técnicas moleculares actuales, se logró el reconocimiento del material vegetal de campo y de mercado como perteneciente a la especie *C. macrobulbon*.

De manera adicional, se estableció que su distribución potencial en nuestro país es amplia, lo cual aunado a su hábito terrestre y de fácil propagación, permitiría el uso de esta orquídea con fines medicinales sin poner en riesgo a las poblaciones silvestres, siempre y cuando se lleve a cabo un manejo racional.

En cuanto a la especie *Scaphyglottis fasciculata*, se completaron las pruebas de identidad química, y se logró la identificación de gigantol (**2**), batatasina III (**15**), efemerantol B (**40**) y confusarina (**39**) como los compuestos mayoritarios del extracto orgánico y de la fracción orgánica de la infusión. De manera adicional se estableció que el linalol (**49**), el óxido de *cis*-linalol (**50**), nonanal (**51**), (*E*)-5,9-undecadien-2-ona,6,10-dimetil (**52**), benzaldeído (**53**), salicilato de metilo (**54**), acetofenona (**55**), *p*-ment-1-en-8-ol

(56) y formiato de isobornilo (44) son los principales compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de esta especie y que se encuentran tanto en la droga cruda como en el aceite esencial derivado de ella.

Con respecto a las pruebas de identidad botánica se describieron por primera vez las características histológicas de los pseudobulbos. Además, se generó su mapa de distribución potencial, lo cual permitirá la integración de un documento tipo farmacopeico de esta orquídea medicinal.

Finalmente, bajo la premisa de atender las recomendaciones de la OMS a los países en vías de desarrollo, acerca de las plantas medicinales utilizadas en sus sistemas de medicina tradicional, y dada la historia de uso de estos recursos en México, el presente trabajo representa una contribución sustancial al establecimiento de los parámetros de identidad, eficacia y seguridad preclínicos de dos especies de orquídeas medicinales utilizadas y expandidas en nuestro país para atender diversas afecciones.

---

**ABSTRACT**

*Cyrtopodium macrobulbon* “cañaveral o caña de jabalf” is a terrestrial orchid sold in the Sonora Market and in the Zócalo-Catedral passage in Mexico City for the treatment of different diseases including "mal de orín". In this work different identity (botanical, genetical and chemical) tests useful for quality control of the plant were developed. In addition, the efficacy of the plant as antinociceptive agent and the lack of acute toxicity were determined. The potential distribution map was made also.

The application of chromatographic, spectroscopic and spectrometric techniques allowed the identification of a mixture of derivatives of *trans-p*-coumaric acid including *n*-hexacosil-*trans-p*-coumarate, *n*-octacosil-*trans-p*-coumarate, and *n*-triacontil-*trans-p*-coumarate (**33-35**); 4-methoxy-benzyl alcohol (**36**); 4-hydroxybenzaldehyde (**37**); 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthren-2,6-diol (**38**); confusarin (**39**); gigantol (**2**); batatasin III (**15**) and ephemeranhol B (**40**) were also isolated and identified. Compound **40** was selected as the marker for the development of an analytical HPLC method, which was validated in terms of precision, accuracy and linearity. The method can be applied for quality control of the crude drug of *C. macrobulbon*. Eucalyptol (**41**), hexanal (**42**), (*Z*)-2-heptenal (**43**), isobornyl formate (**44**), 1-nonen-3-ol (**45**), 6,10,14-trimethyl, 2-pentadecanone (**46**) and eicosane (**47**) were identified as the major volatile compounds from *C. macrobulbon* pseudobulbs.

A decrease in the abdominal stretches was observed after administration of an infusion (100 and 360 mg/kg) or organic extract of *C. macrobulbon* (100 mg/kg) to mice during a Writhing assay. The presence of stilbenoids such as gigantol (**2**), ephemeranhol B (**40**), batatasin III (**15**) and eucalyptol (**41**) could account for the activity. The

antinociceptive action may be responsible for the effectiveness of the plant against “mal de orín” symptoms. The human consumption of *C. macrobulbon* is not dangerous, because of it was harmless according to Lorke’s toxicity method.

On the other hand, the anatomical and histological characteristics of the pseudobulbs of *C. macrobulbon* are described in the present study. The presence of epidermal crenate cells was remarkable, being the first report of this cell type in orchids. Field and market materias were analyzed using current molecular recognition techniques; the results revealed that the market samples are authentic.

It is important to point out that the wide potential distribution of *C. macrobulbon* in Mexico, its terrestrial condition and its capability for vegetative propagation, allow the rational use of this orchid without endangering its wild populations.

HPLC chromatographic profiles for *Scaphyglottis fasciculata* were also developed. Gigantol (2), batatasin III (15), confusarine (39) and ephemeranthal B (40) are the main compounds presents in both aqueous and organic extracts. Linalool (49), *cis*-linalol oxide (50), nonanal (51), (*E*)-5,9-undecadien-2-one-6,10-dimethyl (52), benzaldehyde (53), methyl salicylate (54), acetophenone (55), *p*-menth-1-en-8-ol (56) and isobornyl formate (44) were identified as a major volatile compounds presents in the aerial parts of this orchid as determined by HS-SPME. The most relevant histological features of the pseudobulbs of the plant were also determined by electronic scan microscopy. Finally the potential distribution map was generated.

Altogether the information generated during this work will be useful for the development of pharmacopeic documents for both medicinal orchids.

### 1. INTRODUCCIÓN

*Cyrtopodium macrobulbon* (La Llave & Lex.) G. Romero & Carnevalli es una orquídea con usos medicinales descritos para el sur, este y centro de México. Sus pseudobulbos se utilizan con fines medicinales. Por ejemplo, en Yucatán se emplean para tratar abscesos (Arellano *et al.*, 2003) y se considera balsámico (Monroy, 2013). Berlín (1974) reporta su uso para el tratamiento de enfermedades de la espalda. En los mercados del D.F. se venden para el tratamiento del “mal de orín” y las afecciones renales (Salazar, 2009). Lo anterior sugiere que la especie presenta un efecto analgésico y/o antibiótico potencial; sin embargo, se desconoce la identidad de los compuestos, posiblemente responsables de dichas actividades y tampoco se han realizado las investigaciones que permitan determinar su inocuidad y su eficacia preclínica y clínica.

A la fecha, no se cuenta con estudios químicos o botánicos conducentes a establecer las pruebas de identidad y composición para su control de calidad como droga cruda. Por lo tanto, los análisis mediante diferentes técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas del extracto orgánico y la fracción orgánica de la infusión obtenidos a partir de la droga cruda, permitieron el establecimiento del perfil fitoquímico de esta especie. En este sentido se realizó el desarrollo y validación de un método analítico que sirviera como herramienta para el control de calidad de la droga cruda de *C. macrobulbon*.

Para complementar las pruebas de calidad, se estableció la descripción de las principales características anatómicas e histológicas de las partes aéreas de la planta y se elaboró su mapa de distribución, de modo que los resultados generados en el curso de esta investigación son inéditos.

## 1. Introducción

---

En cuanto a *Scaphyglottis fasciculata* Hooker, es una especie de amplia distribución en México (principalmente en los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Guerrero), Guatemala y Honduras. Los habitantes de la región de Los Tuxtlas (Veracruz) emplean la planta completa para el tratamiento de heridas, para evitar el aborto, como repelente de insectos y para el tratamiento de cólicos estomacales (Carmona, 1995).

Desde el punto de vista farmacológico, *S. fasciculata* ha sido objeto de varios estudios en los cuáles se ha evaluado la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria tanto de extractos como de compuestos aislados (Estrada *et al.*, 1999 y 2006, Déciga-Campos *et al.*, 2005 y 2007). En cuanto a estudios fitoquímicos se ha reportado la presencia de estilbenoides, bibencilos, triterpenoides y fenantrenos (Estrada *et al.*, 1999 y 2002). Sin embargo, faltaba establecer el perfil fitoquímico que permitiera determinar la identidad de los principales compuestos activos, presentes en el extracto orgánico. En lo referente a las pruebas de identidad botánica, a la fecha no se contaba con la descripción detallada de los principales caracteres anatómicos e histológicos, los cuales se establecieron en el presente trabajo.

Por otro lado, los ensayos de mutagenicidad y de toxicidad aguda sugieren la inocuidad del extracto orgánico íntegro de la planta (Déciga *et al.*, 2007) y las pruebas farmacológicas, a las cuales se sometieron al extracto y a los metabolitos mayoritarios de la especie, permitieron establecer sus propiedades espasmolíticas, analgésicas y antiinflamatorias, mismas que probablemente contribuyen al efecto terapéutico de *S. fasciculata* para el tratamiento de cólicos estomacales.

## 2. ANTECEDENTES

### *2.1 Monografías de plantas medicinales*

Las plantas medicinales tienen un papel clave en el mantenimiento de la salud en la mayor parte de la población mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente el 80% de los habitantes de los países en vías de desarrollo, depende esencialmente de las plantas medicinales para el cuidado inmediato de su salud, debido a la falta de acceso a la medicina moderna por factores socioeconómicos y culturales. De tal modo, se calcula que en el mundo actual se utilizan alrededor de 10,000 especies vegetales con fines medicinales, la mayor parte en sistemas médicos alternativos (Cañigueral, 2002). Sin embargo, en Latinoamérica y particularmente en México, pocas han sido estudiadas científicamente con fines de valorar su seguridad y eficacia, así como para establecer los parámetros que garanticen su calidad (Calixto, 2005).

Ante este panorama y el creciente interés global por consumir productos herbolarios eficaces, seguros y de calidad, la OMS ha solicitado a sus países miembros, la generación de monografías que garanticen el uso racional de sus recursos vegetales medicinales de mayor consumo, principalmente aquellos utilizados en las prácticas médicas alternativas y complementarias. Así, en la octava Conferencia Internacional de Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA, por sus siglas en inglés) celebrada en 1996, se presentaron 28 monografías que a la postre conformaron el primer volumen de monografías de plantas medicinales en el año 1999.

Con la finalidad de auxiliar a sus países miembros en esta labor, la OMS ha publicado varias guías y cuatro volúmenes de monografías de plantas medicinales ampliamente utilizadas a nivel global; World Health Organization (WHO, 1998, 1999,

2002, 2007, 2009) y un volumen especial con 30 monografías de plantas empleadas en los estados europeos de independencia reciente y que fue publicada en 2010.

Las monografías tipo OMS están conformadas por dos partes. En la primera se hace un resumen farmacopeico cuyo objetivo es el aseguramiento de la calidad y que incluye información botánica, pruebas de identidad, pureza, ensayos químicos y principales constituyentes químicos. La segunda parte está integrada por una revisión extensa de la literatura científica, la descripción de estudios farmacológicos, toxicológicos y aplicaciones clínicas de las plantas, así como información detallada sobre advertencias de uso, contraindicaciones, precauciones, reacciones adversas y dosificación. Adicionalmente, se incluyen índices acumulativos de todas las monografías publicadas con los nombres científicos y comunes y los principales constituyentes químicos de las plantas.

### *Situación global*

A nivel mundial el panorama es diverso. En China, por ejemplo, la Farmacopea Herbolaria China (2004) enlista 300 plantas de amplio uso, formulaciones y dosificaciones para diversos padecimientos. La Farmacopea Herbolaria India comprende 52 monografías de plantas medicinales que sobresalen por sus procedimientos de aseguramiento de calidad, confirmando a este país como uno de los principales productores de extractos y productos fitoquímicos estandarizados (WHO, 2011).

Por su parte, la Farmacopea Herbolaria Africana de 2010, desarrollada por la Asociación de Estándares de Plantas Medicinales Africanas, cuenta con 50 monografías de las plantas más importantes de ese continente, en la cual destacan los análisis

## 2. Antecedentes

---

micromorfológicos, mapas de distribución, marcadores cromatográficos y sustancias adulterantes (WHO, 2011).

En Europa, el reconocimiento oficial y el desarrollo a la par de la medicina alopática, ha permitido la publicación de farmacopeas herbolarias que establecen los estándares de calidad y seguridad de las plantas medicinales y preparados fitoterapéuticos. Cabe resaltar el caso de Alemania, cuyo Ministerio de Salud estableció en 1978 la Comisión E, un órgano constituido por expertos encargados de la evaluación de la seguridad y la eficacia de los preparados herbolarios disponibles en farmacias. El análisis de más de 300 preparados condujo a la publicación de 300 monografías y 81 revisiones en 1983, y que a la fecha constituyen una de las fuentes de información más confiables sobre fitomedicamentos del mundo (American Botanical Council, 2011).

Los trabajos de la Comisión E pusieron de manifiesto la amplia variedad de preparados disponibles en los mercados europeos. En respuesta, 15 países de Europa Occidental fundaron en 1989 la ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), que de 1997 a 2010 ha publicado 108 monografías divididas en volúmenes o fascículos de 10 monografías cada uno. Las monografías ESCOP tratan principalmente aspectos terapéuticos de los fitomedicamentos como usos, efectos secundarios y contraindicaciones, así como información adicional dirigida a profesionales de la salud (ESCOP, 2011).

La Farmacopea Herbolaria Británica de 1996 contiene monografías que brindan estándares de calidad de 169 plantas y que indican técnicas de identificación cromatográfica y acciones farmacológicas (British Herbal Medicine Association, 2011).

## 2. Antecedentes

---

En Estados Unidos, la Farmacopea Herbolaria Americana ha publicado 29 monografías de tipo cualitativo y terapéutico en las que se incluyen algunas plantas representativas de la medicina china y ayurvédica de mayor uso en ese país (American Herbal Pharmacopeia, 2011). En el caso de Canadá, los medicamentos herbarios están reglamentados como medicamentos y se ajustan a los requisitos de la Ley de Alimentos y Medicamentos, además cumplen con las guías establecidas por la OMS para la valoración de medicamentos herbolarios.

En Argentina, en 1993, un Ministro de regulación de Salud determinó el registro obligatorio de las hierbas medicinales. La Farmacopea Nacional Argentina estableció el control sobre la existencia de extractos crudos, fracciones de composición química compleja y principios activos puros. Existen cerca de 89 monografías de las cuáles 56 describen sólo drogas crudas y 33 describen extractos o fracciones (Calixto, 2000).

En Chile, en 1992 se creó la Unidad de Medicina Tradicional, con el objetivo de incorporar a los sistemas de salud la medicina tradicional con eficacia comprobada y contribuir al establecimiento de su práctica. En Colombia, para el año 1990, una resolución publicada por el Ministerio de Salud enumeró 17 plantas, sus nombres comunes y botánicos, las partes usadas y su uso tradicional (Calixto, 2000).

A pesar de que Brasil es uno de los países de América Latina que genera más información científica sobre el uso de plantas medicinales, aún no cuenta con una Farmacopea Herbolaria oficial. En 1994 el Ministerio de Salud creó una comisión para evaluar la situación de los agentes fitoterapéuticos de ese país. La comisión propuso una directiva basada principalmente en las regulaciones de Alemania y Canadá y en los lineamientos de la OMS para drogas herbales (Calixto, 2000).

### *El caso de México*

En nuestro país el uso de especies vegetales con fines curativos se remonta a la época prehispánica y está bien documentado, tanto en fuentes históricas, como en publicaciones actuales, que abordan su estudio, desde muy diferentes áreas como la antropología, la biología, la química, la economía, etc.

Para finales de los 90s, se tenía registrado en México alrededor de 4,000 especies con atributos medicinales (cerca del 15% de la flora total) (Huerta, 1997). A pesar de todo el acervo cultural implicado en el uso de plantas con fines terapéuticos o medicinales en el país, las autoridades de salud han hecho poco para garantizar su uso racional y no fue sino hasta años recientes, y quizás como una respuesta a las demandas de la OMS, que la Secretaría de Salud publicó en el Diario Oficial de la Federación algunos reglamentos en los que se especifican las condiciones de registro, autorización y venta que requieren algunos productos herbolarios para ser comercializados. También, se publicó en el mismo documento oficial una lista de las plantas prohibidas para la elaboración de remedios herbolarios.

Posteriormente, en el 2001, se publicó la primera edición de la “Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos” tomando en consideración la recomendación emitida por la OMS, la cual incluye aspectos de seguridad, preparación y almacenamiento de plantas medicinales y derivados. Esta edición se conforma por 20 monografías de análisis específicos, 41 monografías de plantas y 23 monografías de aceites esenciales, así como índices etnobotánicos de usos de muchas plantas altamente valoradas en la medicina tradicional mexicana. Actualmente, ya se cuenta con la segunda edición.

### *Parámetros de calidad de las drogas vegetales*

Ante las recomendaciones de la OMS es necesario realizar la investigación científica que permita el establecimiento de los parámetros de calidad, identidad, eficacia y seguridad que deben ser incluidos en los documentos farmacopeicos de cada país. El control de calidad de las drogas vegetales y sus derivados, pretende garantizar su identidad, pureza (ausencia de contaminantes, falsificaciones y adulteraciones) y contenido en principios activos o marcadores (Cañigueral y Vila, 2005).

Las **pruebas de identidad** permiten la correcta identificación de las especies con base en pruebas químicas, botánicas (anatómicas e histológicas) y genéticas. Así, el establecimiento de dichos parámetros permitirá el uso racional de las especies botánicas medicinales y evitará las adulteraciones y sustituciones que pongan en riesgo la salud de los consumidores.

Las pruebas de **identidad química** están enfocadas a la detección de compuestos marcadores y a la obtención de perfiles cromatográficos característicos, aplicando métodos analíticos de vanguardia. Los **compuestos marcadores** se definen como constituyentes químicamente definidos, útiles para fines analíticos, y no necesariamente deben ser activos (EMEA, 2006).

En la actualidad, los tipos de marcadores que pueden ser identificados en las drogas crudas o preparados herbolarios se especifican en las monografías y farmacopeas. Los métodos más utilizados para la generación de los perfiles cromatográficos son: cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y cromatografía de gases (CG) (Liang *et al.*, 2004).

## 2. Antecedentes

---

Las pruebas de **identidad botánica**, permiten discriminar entre especies que contengan los principios activos para los que se recomienda su uso, y aquellas que puedan ser vendidas como sustituyentes o adulterantes. Para estos fines se utilizan técnicas histológicas, histoquímicas y de microscopía, las cuales permiten la observación, el reconocimiento y la descripción de caracteres anatómicos, muchos de ellos específicos para cada especie.

En años recientes las pruebas de **identidad genética** han complementado las estrategias clásicas para la evaluación de la identidad de las plantas medicinales. Dichas pruebas consisten en el análisis de marcadores moleculares, los cuáles son únicos, estables y específicos para cada especie, y no están influenciados por la edad, las condiciones fisiológicas ni los factores ambientales. La identificación inequívoca es un paso crítico en el proceso de control de calidad. La huella digital genética o código de barras genético, permite discriminar entre especies y es una herramienta para la detección de homogeneidad en las muestras y la presencia de adulterantes. La generación de códigos de barras de plantas medicinales representa una contribución muy importante al uso racional de estos recursos (Sucher y Carles, 2008).

En cuanto a los **parámetros de seguridad**, el uso de plantas medicinales en los sistemas de medicina tradicional proporciona cierta garantía de su inocuidad; sin embargo, es necesario establecer pruebas que demuestren la ausencia de efectos tóxicos crónicos y agudos, reacciones secundarias, efectos adversos, interacciones, contraindicaciones etc. (Cañigüeral y Vila, 2005). En lo que respecta a las **pruebas de eficacia** existen diferentes parámetros que contribuyen a su demostración, entre ellos el conocimiento de los principios activos de la droga cruda, es decir las estructuras químicas responsables de una determinada

actividad, lo cual establece una relación directa causa-efecto, y puede ser útil para explicar los mecanismos de acción. Sin embargo, la actividad de una droga cruda no va a ser exactamente igual que la de sus principios activos aislados, y los efectos de ciertas drogas pueden deberse a la coexistencia de varios de sus constituyentes químicos, que en conjunto serán responsables de su actividad (Cañigueral y Vila, 2005).

Por su parte, las evaluaciones farmacológicas deben incluir ensayos *in vivo* e *in vitro*, tendientes a evaluar las potenciales actividades de la droga cruda en cuestión; así como pruebas preclínicas y clínicas.

### 2.2 *Uso de orquídeas con fines medicinales en México*

La familia Orchidaceae es una de las dos más grandes familias de Angiospermas y cuenta con cerca de 25,000 especies (Chase, 2005). Las orquídeas son particularmente diversas en las regiones tropicales y muy escasas en regiones polares o desérticas (Chase, 2005). México alberga una notable riqueza de orquídeas y se estima que existen 170 géneros con 1260 especies (Hágsater *et al.*, 2005).

En México, el uso de orquídeas con fines medicinales, se remonta a la época prehispánica y los primeros reportes etnomédicos se encuentran en fuentes de importancia histórica como el Códice Florentino o Historia General de las cosas de la Nueva España (Sahagún, 1540), donde se menciona el uso de las especies *Bletia coccínea* La Llave & Lex (*tonalxochitl* o *tonacaxochitl*), *Epidendrum vanilla* L. (*tlilxochitl* “flor negra”); *Epidendrum vitellinum* Lindl. (*tonalxochitl* o *tonacaxochitl*); *Stanhopea tigrina* Batem (*tzontecomaxochitl*); *Vanilla fragans* Ames y *Vanilla planifolia* Andr. (Estrada, 1989),

Otra fuente histórica es Historia de las Plantas de la Nueva España de Francisco Hernández (1946), digitalizada en 2004 por el Instituto de Biología de la Universidad

## 2. Antecedentes

---

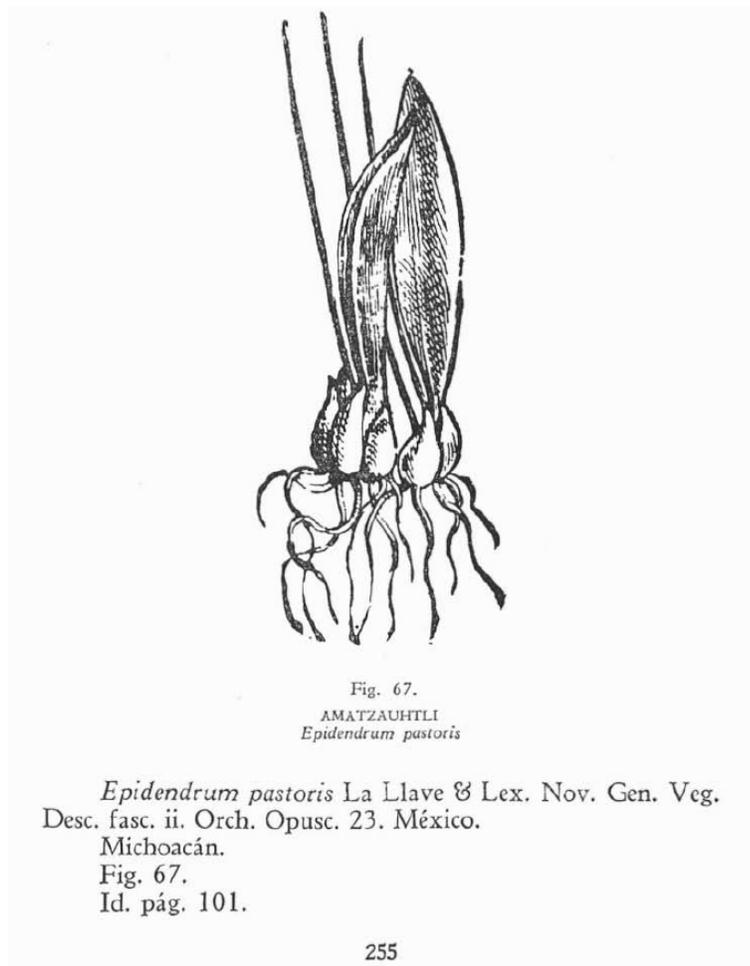
Nacional Autónoma de México ([www.ibiología.unam.mx/plantasnuevaspana/index.html](http://www.ibiología.unam.mx/plantasnuevaspana/index.html)), (**Figura 1**), en donde se mencionan las especies *Blettia campanulata* Lex; *Blettia coccinea* Lex; *Catleya citrina* (nombre válido: *Prosthechea citrina* (Lex.) W. E. Higgins); *Prosthechea vitelina* Lindl; *Epidendrum pastoris* Lex. (nombre válido *Prosthechea pastoris* (La Llave & Lex.) Schltr); *Epidendrum vitellinum* Lindl. (nombre válido: *Prosthechea vitelina* Lindl.); *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl; así como *Stanhopea tigrina* Bateman ex Lindl. Por su parte, en el Códice De la Cruz-Badiano (De la Cruz, 1552) se registra el uso de *Vanilla* spp. Mill.

En 1976, el Instituto Médico para el Estudio de Plantas Medicinales (IMEPLAM) (Díaz, 1976) edita el libro “Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México” el cual incluye a las especies *Arpophyllum spicatum* Lex; *Blettia campanulata* Lex; *Cattleya citrina* (nombre válido: *Prosthechea citrina* (Lex.) W. E. Higgins); *Cranichis speciosa* Lex; *Epidendrum pastoris* (nombre válido: *Prosthechea pastoris* (La Llave & Lex.) Schltr); *Laelia autumnalis* (Lex.); *Stanhopea tigrina* Bateman ex Lindl; y *Vanilla planifolia* Andrews.

Finalmente, la fuente histórica más reciente es el Herbario de Plantas Medicinales, editado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (Aguilar, 1994), que describe el uso de las especies *Catasetum* sp Rich. ex Kunth; *Laelia anceps* Lindl; *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr; *Schomburgkia tibicinis* (Bateman) Bateman (nombre válido: *Myrmecophila tibicinis* Bateman) y *Vanilla planifolia* Andrews.

## 2. Antecedentes

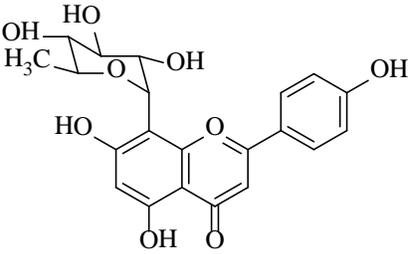
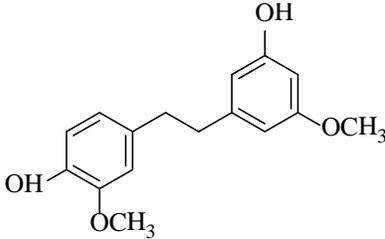
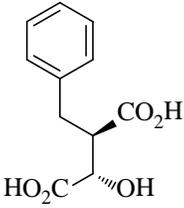
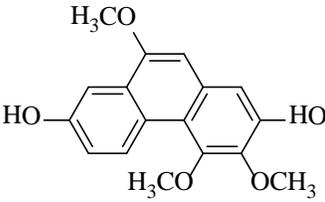
No obstante la riqueza de esta familia botánica, los estudios farmacológicos y fitoquímicos son escasos. Bajo un panorama de investigación actual, las especies objeto de estudio han sido *Encyclia michuacana* (La Llave & Lex.) Schltr; *Epidendrum rigidum*. Jacq; *Laelia anceps* Lindl; *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl; *Maxillaria densa* Lindl; *Nidema boothii* (Lindl.) Schltr; *Scaphyglottis fasciculata* Hook. y *Prosthechea michuacana* (La Llave & Lex.) W.E. Higgins. En el **Cuadro 1** se resumen las especies estudiadas, las actividades evaluadas y en su caso, los compuestos identificados.



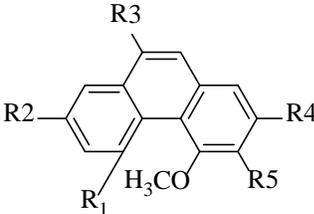
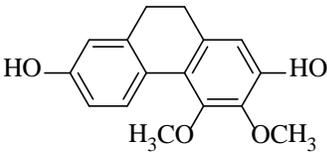
**Figura 1.** *Epidendrum pastoris*, La Llave & Lex. Mencionada en Historia de las Plantas de la Nueva España.

## 2. Antecedentes

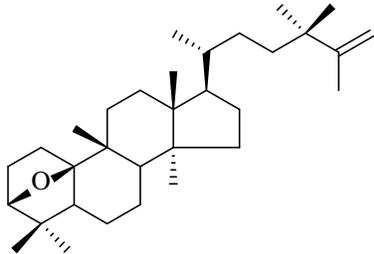
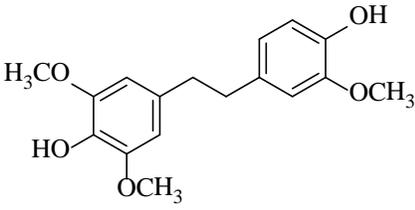
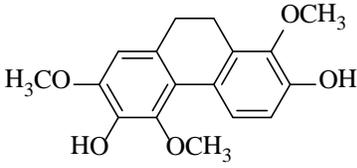
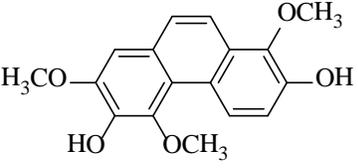
**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas

Especie	Compuesto	Actividad biológica
<i>Encyclia michuacana</i> (La Llave & Lex.) Schltr.	 <p data-bbox="565 680 1062 716">6<sup>-</sup>desoxi β<sup>-</sup>D<sup>-</sup>glucopiranosido de apigenina (1)</p>	Tovar-Gijón <i>et al.</i> , 2006
	 <p data-bbox="740 1083 867 1121">gigantol (2)</p>	
	 <p data-bbox="621 1461 1003 1499">ácido 2-(4 hidroxibencil) málico (3)</p>	
<i>Laelia anceps</i> Lindl.	 <p data-bbox="581 1793 1045 1829">2,7<sup>-</sup>dihidroxi 3,4,9<sup>-</sup>trimetoxifenantreno (4)</p>	Vasorrelajante e hipertensivo (Vergara-Galicia <i>et al.</i> , 2010)

**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas (*continuación*)

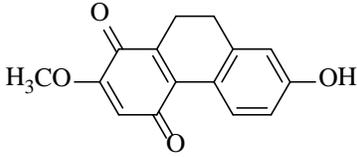
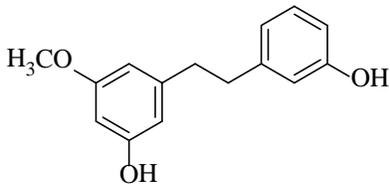
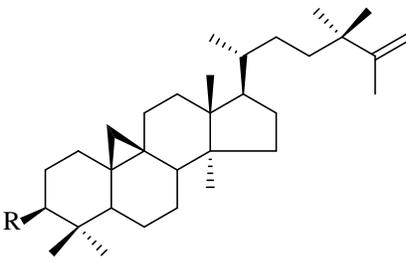
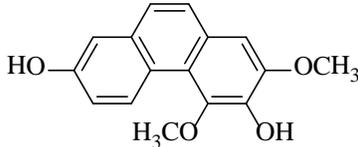
Especie	Compuesto	Actividad biológica																													
<i>Laelia autumnalis</i> (La Llave & Lex.) Lindl.	Extracto metanólico de pseudobulbos y raíces cultivados <i>in vitro</i>	Vasorrelajante (Vergara-Galicia <i>et al.</i> , 2010)																													
<i>Maxillaria densa</i> Lindl.		Antinociceptivo (Estrada, 2004; Déciga-Campos <i>et al.</i> , 2007)																													
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R1</th> <th>R2</th> <th>R3</th> <th>R4</th> <th>R5</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="435 1037 695 1108">2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (5)</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 1146 591 1178">fimbriol A (6)</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> <td>OH</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 1215 532 1247">nudol (7)</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 1285 618 1316">gymnopusina (8)</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> <td>OH</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> </tr> </tbody> </table>	R1	R2	R3	R4	R5	2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (5)	OH	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	fimbriol A (6)	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	nudol (7)	H	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	gymnopusina (8)	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Vasorrelajante (Rendón-Vallejo <i>et al.</i> , 2012)
R1	R2	R3	R4	R5																											
2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (5)	OH	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>																										
fimbriol A (6)	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>																										
nudol (7)	H	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>																										
gymnopusina (8)	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>																										
		eriantridina (9)																													

**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas (*continuación*)

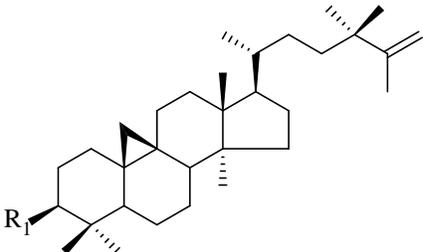
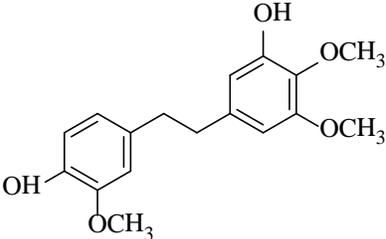
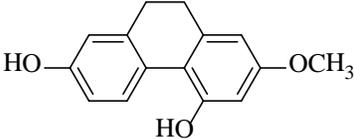
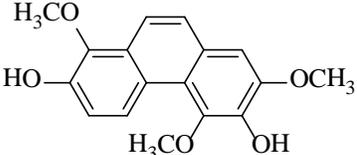
Especie	Compuesto	Actividad biológica
<p><i>Niidema boothii</i> Lindl. Schltr.</p>	 <p style="text-align: center;">nidemina (10)</p>	<p>Estrada <i>et al.</i>, 2002</p> <p>Hernandez-Romero <i>et al.</i>, 2004</p>
	 <p style="text-align: center;">aloifol II (11)</p>	
	 <p style="text-align: center;">1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (12)</p>	
	 <p style="text-align: center;">1,5,7-trimetoxifenantren-2,6-diol (13)</p>	

## 2. Antecedentes

**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas (*continuación*)

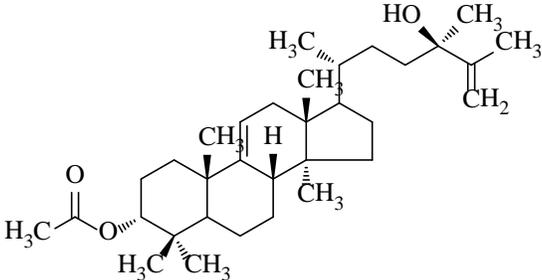
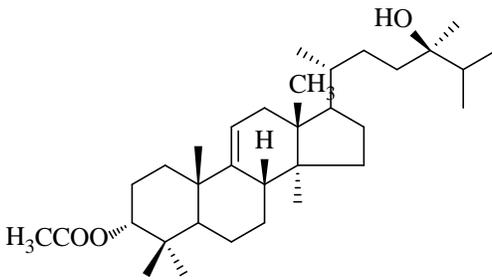
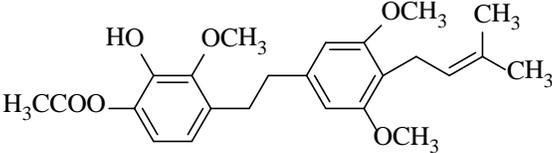
Especie	Compuesto	Actividad biológica
<i>Nidema boothii</i> (Lindl.) Schltr.	 <p>efemerantroquina (14)</p>	Estrada <i>et al.</i> , 2002 Hernandez-Romero <i>et al.</i> , 2004
<i>Scaphyglottis fasciculata</i> Hook.	 <p>batatasina III (15)</p>	Antinociceptivo (Estrada <i>et al.</i> , 1999a, 2002 y 2006) Vasorrelajante (Déciga-Campos <i>et al.</i> , 2005 y 2007)
<i>Scaphyglottis fasciculata</i> Hook.	 <p>24,24-dimetil-19-ciclojanosta-25-en-3β-ilo (16)</p> <p>R = <i>trans</i>-p-hidroxifenamilo</p>	Antinociceptivo (Estrada <i>et al.</i> , 1999a, 2002 y 2006) Vasorrelajante (Déciga-Campos <i>et al.</i> , 2005 y 2007)
<i>Scaphyglottis fasciculata</i> Hook.	 <p>3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (17)</p>	

**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas (*continuación*)

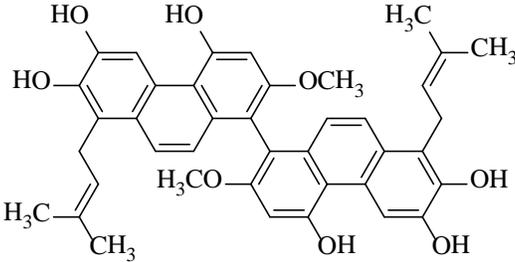
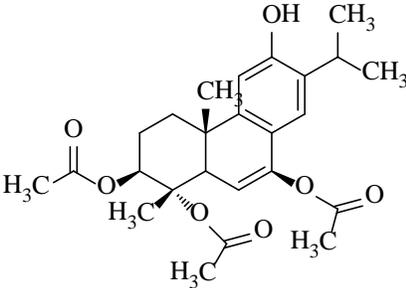
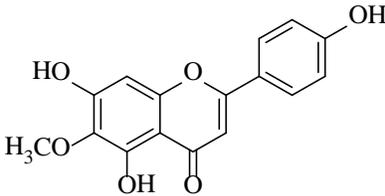
Especie	Compuesto	Actividad biológica	
<i>Scaphyglottis fasciculata</i> Hook.		Antinociceptivo (Estrada <i>et al.</i> , 1999a, 2002 y 2006)	
	24,24-dimetil-5-lanosta-9(11), 25-dien-3-ol (LDD) ( <b>18</b> )	R1	Vasorrelajante (Déciga-Campos <i>et al.</i> , 2005 y 2007)
	24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-9(11), 25-dien-3-ona (cicloolanona) ( <b>19</b> )	=OH	
			
	3,4-dihidroxi-3',4',5-trimetoxibibencilo (DTB) ( <b>20</b> )		
			
	coeponina ( <b>21</b> )		
			
	3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno ( <b>22</b> )		

## 2. Antecedentes

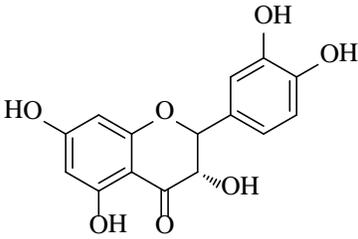
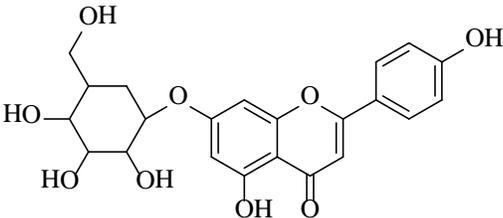
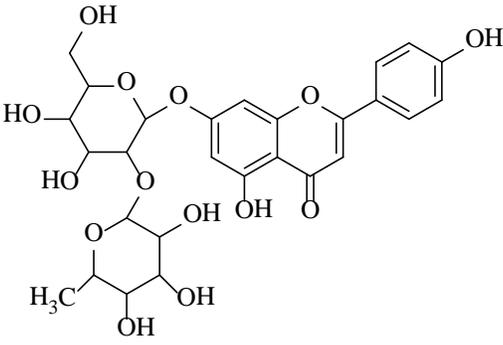
**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas (*continuación*)

Especie	Compuestos	Actividad biológica
<i>Scaphyglottis fasciculata</i> Hook.	gigantol (2)	Antinociceptivo (Estrada <i>et al.</i> , 1999a, 2002 y 2006)
	batatasina III (15)	
<i>Prosthechea michuacana</i> (Llave & Lex.) W.E. Higgins.		Potencial antiinflamatorio, antidiabético, nefroprotector, antioxidante, hepatoprotector, (Pérez <i>et al.</i> , 2009b, 2010b, 2011a, 2011b)
	3 $\alpha$ -acetoxi-24-hidroxi-24-metil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11),25-dieno (23)	
		
	3 $\alpha$ -acetoxi-24-hidroxi-24-metil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11)eno (24)	
		
	dihidro-3,5,2-trimetoxi-3-hidroxi-4-acetil-4-isopentenilstilbeno (25)	

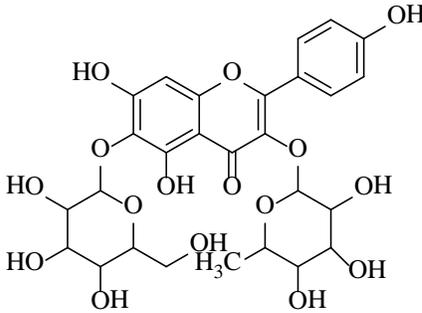
**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas (*continuación*)

Especie	Compuestos	Actividad biológica
<p><i>Prosthechea michuacana</i> (La Llave &amp; Lex.) W.E. Higgins.</p>		<p>Potencial antiinflamatorio, antidiabético, nefroprotector, antioxidante, hepatoprotector, (Pérez <i>et al.</i>, 2009b, 2010b, 2011a, 2011b)</p>
	<p>4,6,7-trihidroxí-2-metoxi-8-(metilbut-2-enil)fenantreno (26) 1,4,6,7-trihidroxí-2-metoxi-8-(metilbut-2-enil)fenantreno (26)</p>	
		
	<p>12-hidroxí-3,7,18-triacetoxi-8,11,13-abietatrieno (27)</p>	
		
	<p>6-éter metílico de la esculetina (28)</p>	

**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas (*continuación*)

Especie	Compuestos	Actividad biológica
<p><i>Prosthechea michuacana</i> (La Llave &amp; Lex.) W.E. Higgins.</p>	 <p>dihidroquercetina (29)</p>	<p>Potencial antiinflamatorio, antidiabético, nefroprotector, antioxidante, hepatoprotector, (Pérez <i>et al.</i>, 2009b, 2010b, 2011a, 2011b)</p>
	 <p>7-O-glucósido de apigenina (30)</p>	
	 <p>7-neohesperidosido de apigenina (31)</p>	

**Cuadro 1.** Principales compuestos aislados de orquídeas de uso medicinal en México y actividades farmacológicas evaluadas (*continuación*)

Especie	Compuestos	Actividad biológica
<p><i>Prosthechea michuacana</i> (La Llave &amp; Lex.) W.E. Higgins.</p>	 <p data-bbox="618 766 1040 835">6<sup>-</sup>O<sup>-</sup>β<sup>-</sup>D<sup>-</sup>glucopiranosil<sup>-</sup>3<sup>-</sup>O<sup>-</sup> α<sup>-</sup>L<sup>-</sup>rarnnopiranosido de apigenina (32)</p>	<p>Potencial antiinflamatorio, antidiabético, nefroprotector, antioxidante, hepatoprotector, (Pérez <i>et al.</i>, 2009b, 2010b, 2011a, 2011b)</p>

### 2.3 *Cyrtopodium macrobulbon* (La Llave & Lex.) G. Romero & Carnevali

El género *Cyrtopodium* tiene una distribución neotropical, desde el sur de Florida hasta el norte de Argentina, siendo Brasil el país con casi el 90% de las especies. Hasta 1999 *C. macrobulbon* había sido identificada como *C. punctatum*; sin embargo, los estudios taxonómicos de Romero y Carnevali (1999) permitieron clasificarla como una especie diferente. Las características principales para esta separación incluyen la descripción morfológica del labelo, el cual tiene numerosas vesículas (o verrugas) en la parte apical del lóbulo medio, en todo el callo y a lo largo del margen anterior de los lóbulos laterales; además, el lóbulo medio del labelo es más estrecho. En cuanto al hábitat de la planta, *C. macrobulbon* es una especie terrestre, en tanto que *C. punctatum* es epífita (Romero & Carnevali, 1999).

## 2. Antecedentes

---

*C. macrobulbon* (**Figura 2**) se distribuye desde México hasta Panamá y posiblemente se encuentre en Colombia y Venezuela. La orquídea tiene pseudobulbos fusiformes, alargados de hasta 60 cm o más de longitud; hojas lineal-lanceoladas y largamente acuminadas. Su inflorescencia en panícula amplia; contiene flores con pétalos similares a los sépalos dorsales, usualmente más amplios y más cortos; labio trilobado, cortamente adnado al pie columnar; el lóbulo lateral amplio, erecto o extendido; el labio medio entero. Sus sépalos están libres, extendidos, desiguales del borde a la base y algunos adnados al pie columnar; ambos pétalos y sépalos son ondulados, amarillos, con manchas de color pardo. El fruto es una cápsula de forma oblonga (Carnevali *et al.*, 2001).

*Cyrtopodium macrobulbon* se conoce en México con los nombres comunes de Ch'itku'uk (Yucatán), ch'it-och (Yucatán), chacalleztle (Oaxaca), chocolpextle (Oaxaca), shoyo (Chontal, Oaxaca), caña de jabalí, cuerno de vaca y cañaverl (región central) (Arellano *et al.*, 2003; Martínez, 1979; Salazar, 2009).

Los pseudobulbos de *C. macrobulbon* se utilizan con fines medicinales. Así, en Yucatán se emplean para tratar abscesos (Arellano *et al.*, 2003) y se considera balsámico (Monroy *et al.*, 2013). En su amplio estudio sobre los Tzeltales de Chiapas, Berlín (1974) reporta su uso para el tratamiento de enfermedades de la espalda. En los mercados del D.F. se venden para tratar afecciones renales (Salazar, 2009) y “mal de orín” lo cual sugiere el uso de la especie como agente analgésico y antibiótico.

El “mal de orín” es una afección del aparato renal-urinario que se presenta porque el individuo se "sienta en lugares calientes" en forma reiterada; al sentarse sobre estos lugares, tales como la tierra o una piedra, el calor "se le mete al cuerpo" y origina la enfermedad.



**Figura 2.** *Cyrtopodium macrobulbon* (La Llave & Lex) G. Romero & Carnevali.

Ciertos especialistas refieren que también se debe al continuo consumo de alimentos picantes, los cuales son considerados de calidad caliente. El “mal de orín” se manifiesta con dolor en los ovarios o en los testículos, según sea el caso, además de escozor intenso al orinar, y una sensación de querer orinar con frecuencia (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional).

A pesar del uso, la distribución e importancia biológica de *C. macrobulbon*, a la fecha, no se cuenta con estudios químicos o botánicos conducentes a establecer las pruebas de identidad y composición para su control de calidad como droga cruda. Tampoco se han realizado las investigaciones que permitan determinar su inocuidad y su eficacia preclínica y clínica. Por lo tanto, los resultados que generados en el curso de esta investigación son inéditos.

### 2.4 *Scaphyglottis fasciculata* Hooker

*Scaphyglottis fasciculata* Hooker es una especie erecta, con tallos de 2 a 3 veces ramificados. Tiene un pseudobulbo fusiforme, delgado, que llega a medir hasta 10 cm de largo, 8 mm de diámetro y presenta dos hojas. Las hojas son angostas, lineales, de 4 a 12 cm de largo, 3 a 5 mm de ancho. Las flores son escasas en el pseudobulbo terminal, con pequeños ovarios cortos, color crema verdoso, con líneas violetas, pétalos y sépalos de aproximadamente 2 mm de largo (**Figura 3**). *S. fasciculata* crece en la selva alta, como epífita sobre los árboles de sombra de los cafetales, así como en los bosques (seco premontano y mesófilo de montaña) entre los 600 y 1500 m de altura.

Se distribuye en México (principalmente en los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Guerrero), Guatemala y Honduras. Los habitantes de la región de Los Tuxtlas,

## 2. Antecedentes

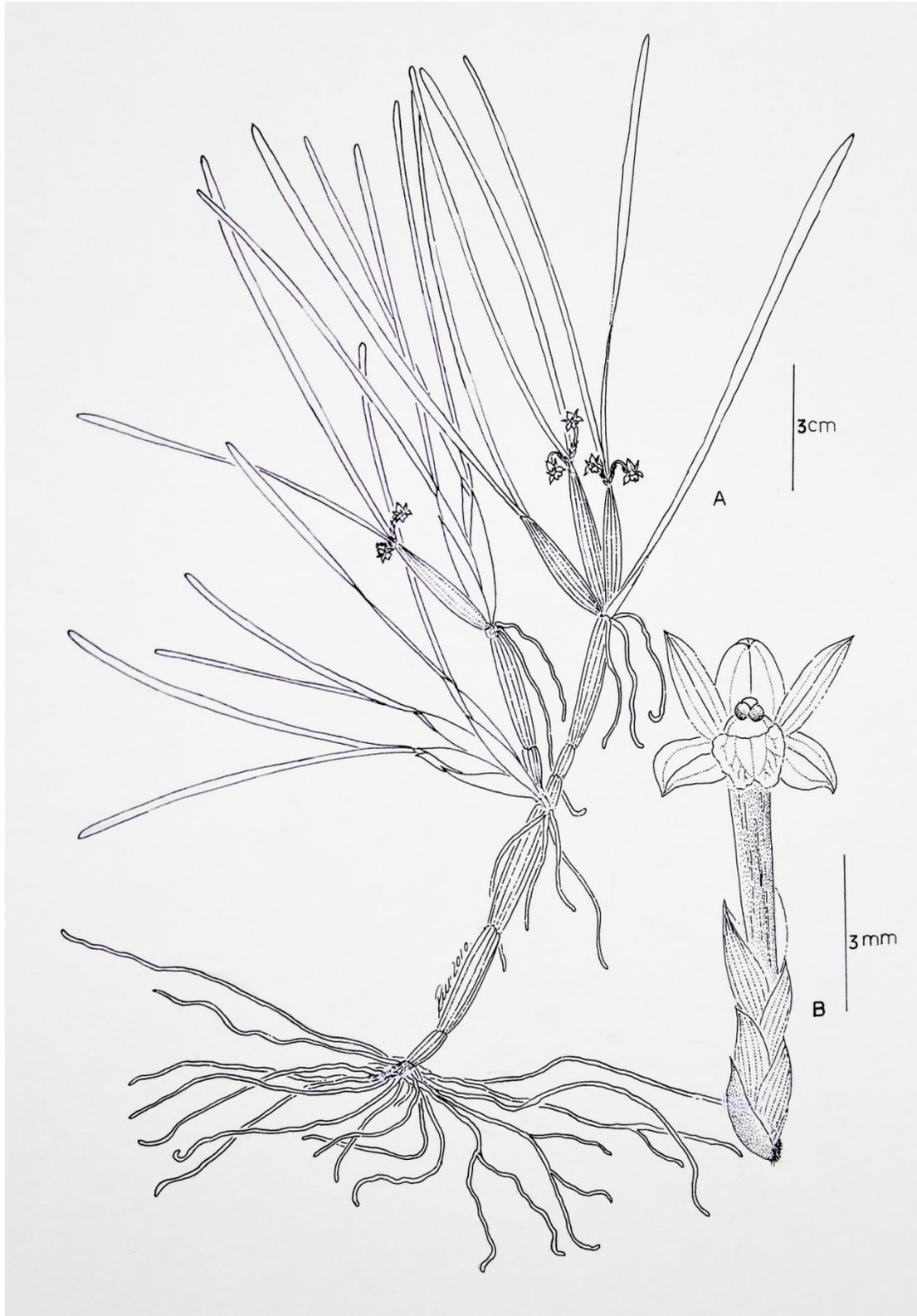
---

Veracruz, emplean la planta completa para el tratamiento de heridas, para evitar el aborto, como repelente de insectos y para el tratamiento de cólicos estomacales (Carmona, 1995).

Desde el punto de vista farmacológico, *S. fasciculata* ha sido objeto de varios estudios, en los cuales se ha evaluado la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria, tanto de extractos como de compuestos aislados (Estrada *et al.*, 1999 y 2006, Déciga-Campos *et al.*, 2005 y 2007). En cuanto a estudios fitoquímicos, se ha reportado la presencia de estilbenoides, bibencilos, triterpenoides, y fenantrenos (Estrada *et al.*, 1999 y 2002). Sin embargo, aún falta establecer el perfil fitoquímico que permita establecer la identidad de los principales compuestos activos, presentes tanto en el extracto orgánico como en el acuoso.

Los ensayos de mutagenicidad y de toxicidad aguda sugieren la inocuidad del extracto orgánico íntegro de la planta. Las pruebas farmacológicas a las cuales se sometió el extracto y los metabolitos mayoritarios de la especie, permitieron establecer las propiedades espasmolíticas, analgésicas y antiinflamatorias, mismas que posiblemente contribuyen al efecto terapéutico de *S. fasciculata* para el tratamiento de cólicos estomacales (Déciga *et al.*, 2007).

Bajo este panorama, los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron complementar la información antes descrita para la especie *S. fasciculata*, con la finalidad de integrar un documento farmacopeico tipo OMS para esta orquídea medicinal.



**Figura 3.** *Scaphyglottis fasciculata* Hooker.

### 3. HIPÓTESIS

Aunque el presente proyecto se realizó de acuerdo a los lineamientos de la OMS es factible establecer la siguiente hipótesis:

-Los usos populares medicinales de la especie *C. macrobulbon* para el tratamiento de diversas afecciones, entre ellas el “mal de orín”, sugieren que los metabolitos secundarios que forman parte de la infusión y el extracto orgánico de los pseudobulbos, presentan actividad antiséptica, antinociceptiva y antiinflamatoria.

### 4. OBJETIVOS

#### Objetivo general

1.- Establecer los parámetros de identidad, calidad, eficacia y seguridad preclínicos de las especies *C. macrobulbon* y *S. fasciculata* con la finalidad de integrar la información científica necesaria para elaborar sus monografías científicas (OMS y farmacopeica) y así contribuir al uso racional de estas especies.

Para cumplir con este objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

#### Objetivos particulares

➤ Recopilar y analizar la información bibliográfica existente para las especies *C. macrobulbon* y *S. fasciculata*. con la finalidad de recabar los aspectos históricos y el diseño de los estudios experimentales.

➤ Llevar a cabo una revisión de los ejemplares de herbario y establecer sus mapas de distribución.

### 3. Hipótesis y 4.Objetivos

---

- Caracterizar los compuestos marcadores de *C. macrobulbon* y *S. fasciculata*, evaluando su utilidad para el establecimiento de las pruebas de identidad química y composición.
- Obtener los perfiles cromatográficos de diferentes extractos de la droga cruda de ambas especies, mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAR) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) de los volátiles obtenidos por microextracción en fase sólida (HS-SPME), con la finalidad de completar las pruebas de identidad química.
- Caracterizar anatómica e histológicamente los pseudobulbos de ambas especies con la finalidad de establecer las pruebas de identidad botánica.
- Establecer los parámetros de eficacia de los extractos obtenidos a partir de la droga cruda de *C. macrobulbon*, por medio de la evaluación de su efecto antinociceptivo, utilizando las pruebas de placa caliente y estiramiento abdominal; así como de su posible actividad antimicrobiana.
- Establecer los principios activos responsables de las actividades comprobadas para *C. macrobulbon*.
- Validar un método analítico que permita cuantificar al menos un principio activo o un compuesto marcador, con la finalidad de establecer una prueba de composición para evaluar la calidad de la droga cruda de *C. macrobulbon*.
- Obtener el código de barras genético para *C. macrobulbon*, como prueba de identidad genética.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 *Cyrtopodium macrobulbon*

#### 5.1.1 Pruebas de identidad química

##### 5.1.1.1 Material vegetal

El material vegetal se recolectó en el estado de Guerrero (Chilpancingo de los Bravo y Acahuizotla) con la colaboración de la Dra. Coyolxauhqui Figueroa, en Marzo del 2011 (**Figura 4**). Se depositaron muestras en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología de la UNAM (MEXU 1372213, 1372214 y 1372215) (**Figura 5**). Se logró la recolección de 40 kg (aprox.) de material vegetal fresco, principalmente pseudobulbos. Esta muestra se manejó con la clave CM-1.

Dado que los pseudobulbos de *C. macrobulbon* se venden en el Distrito Federal, se adquirió también material vegetal en el mercado de Sonora del D.F., y en el local “Las plantas medicinales de América”, que se ubica en el pasaje Zócalo-Catedral (MEXU, 1372213) (**Figura 4**). Esta última muestra se manejó como CM-2. Ambas muestras se fragmentaron y se pusieron a secar en estufas de secado de la Facultad de Ciencias (UNAM) con la colaboración de la M. en C. Ma. Eugenia Muñoz Díaz de León. El material ya seco se fragmentó en un molino de cuchillas tipo Willey.



**Figura 4.** A) Colecta de *C. macrobulbon* Chilpancingo, Guerrero. Venta de *C. macrobulbon* en el mercado de Sonora (B) y en el pasaje Zócalo-Catedral del Distrito Federal (C y D).



Figura 5. Ejemplar de herbario de *C. macrobulbon* MEXU (1372213).

### 5.1.1.2 Procedimientos generales

#### **Análisis cromatográficos**

Para los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice (0.25mm; 60 F<sub>254</sub>, Merck) ® y se ensayaron diversos sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó con luz UV ( $\lambda$  corta 254 nm;  $\lambda$  larga 365 nm) y con el reactivo cromógeno [sulfato cérico amoniacal (12 g)-ácido sulfúrico (22.5 mL) y hielo (350 g)] (Stahl, 1969); para el desarrollo del color fue necesario calentar a 110 °C durante un minuto.

#### **Cromatografía en columna abierta (CCA)**

Se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades, empacadas con gel de sílice (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm) (70-230 mesh Merck)® o Sephadex (Sephadex LH20, Pharmacia)®.

#### **Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)**

Se realizó en un cromatógrafo de líquidos Waters 2487 que consiste en una bomba cuaternaria (Waters 600), inyector manual (volumen de inyección 20  $\mu$ L), un detector dual de luz UV/Visible (2487) y el software Empower versión 2.0 fue utilizado para el control del equipo, la adquisición de datos y el procesamiento de la información. Todos los análisis se realizaron en una columna Nova-Pack HR 7  $\mu$ m sílica (3.9  $\times$  300 mm). La longitud de onda utilizada para la detección fue 280 nm.

### 5.1.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y se reportaron sin corregir. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$  RMN) y de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$  RMN) se registraron en los aparatos Varian Unity Inova (operado a una frecuencia de 400 MHz para  $^1\text{H}$  RMN y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  RMN) y JEOL ECA-500 (operado a una frecuencia de 500 MHz para  $^1\text{H}$  RMN y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$  RMN) empleando  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  o  $\text{DMSO}-d_6$  como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

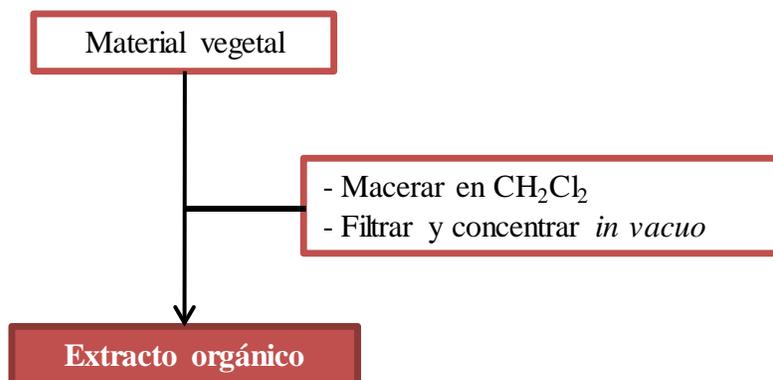
Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm. Para el análisis de los espectros de RMN mono y bidimensionales se utilizó el programa MestreNova® versión 6. Los espectros de masas se registraron en los equipos JEOL SX 103 y LTQ Orbitrap XL System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) utilizando como métodos de ionización las técnicas de bombardeo de átomos acelerados (MS-FAB) en modo positivo, con alcohol nitrobenzílico (ANB) como matriz e ionización por electrospray (ESI) modo positivo.

### 5.1.1.4 Obtención de los extractos

Con la finalidad de establecer las pruebas de identidad química de las plantas que se comercializan en el D.F. y las plantas colectadas en campo, se prepararon los extractos orgánicos a partir de la droga cruda, así como infusión, ya que es como se recomienda su uso por parte de los vendedores.

### Extracto orgánico

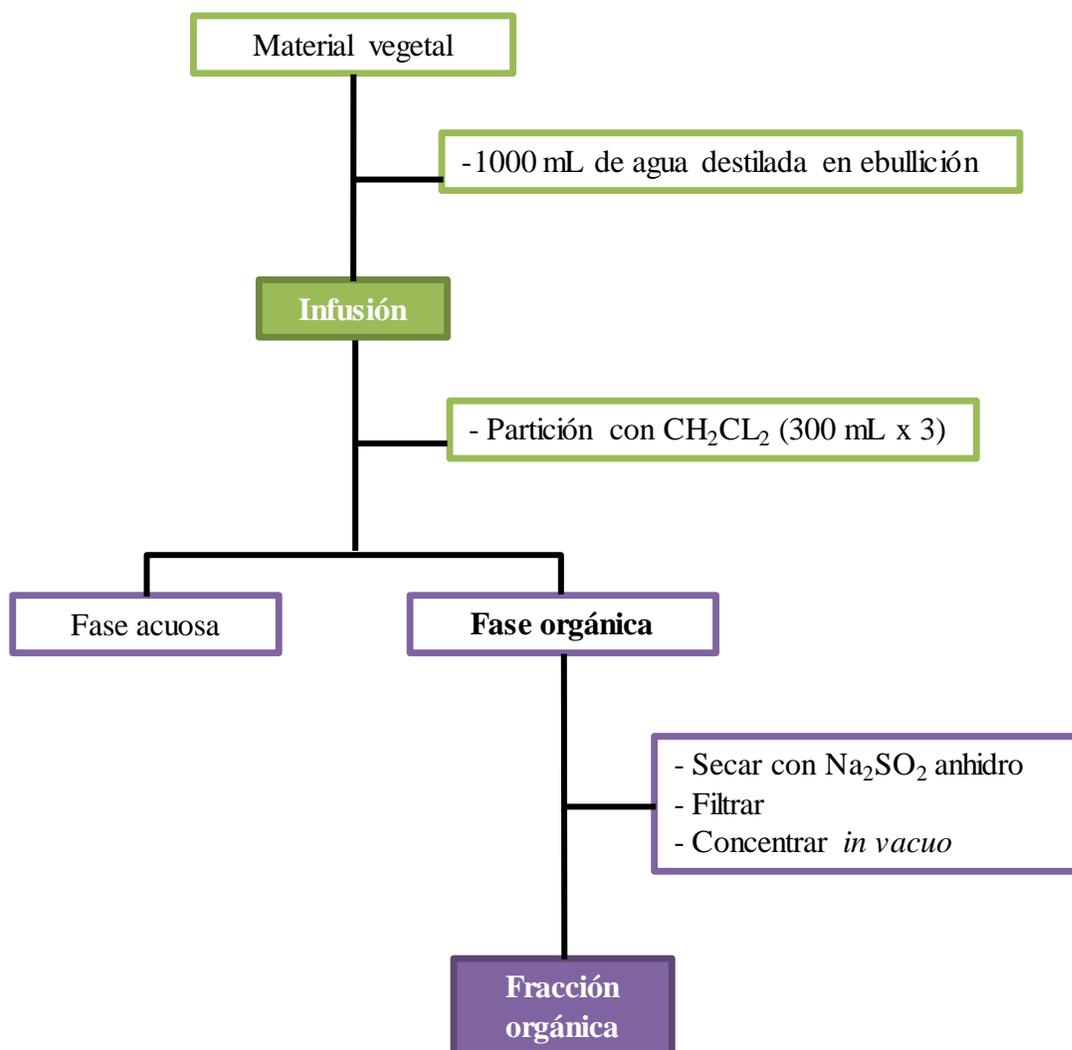
El extracto orgánico se preparó vía maceración a partir de 900 g de material vegetal seco en 13 L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (**Figura 6**) obteniéndose 15 g de extracto orgánico, es decir, 1.35%.



**Figura 6.** Obtención del extracto orgánico a partir de la droga cruda de *C. macrobulbon*.

### Infusión

Por otra parte, se preparó 1 L de infusión, la cual se filtró y se sometió a un proceso de reparto exhaustivo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $300 \text{ mL} \times 3$ ). La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró *in vacuo* para generar 5.3 g (**Figura 7**).



**Figura 7.** Obtención del extracto acuoso y fracción orgánica de *C. macrobulbon*.

### 5.1.1.5 Análisis cromatográficos

#### Cromatografía en capa fina (CCF)

Con el extracto orgánico y la fracción orgánica de la infusión de *C. macrobulbon* se realizaron placas cromatográficas en capa fina (CCF), utilizando varias mezclas de elución para establecer el mejor sistema de análisis (**Cuadro 2**).

**Cuadro 2.** Diferentes sistemas de elución ensayados en CCF con el extracto orgánico y fracción orgánica de la infusión de *C. macrobulbon*.

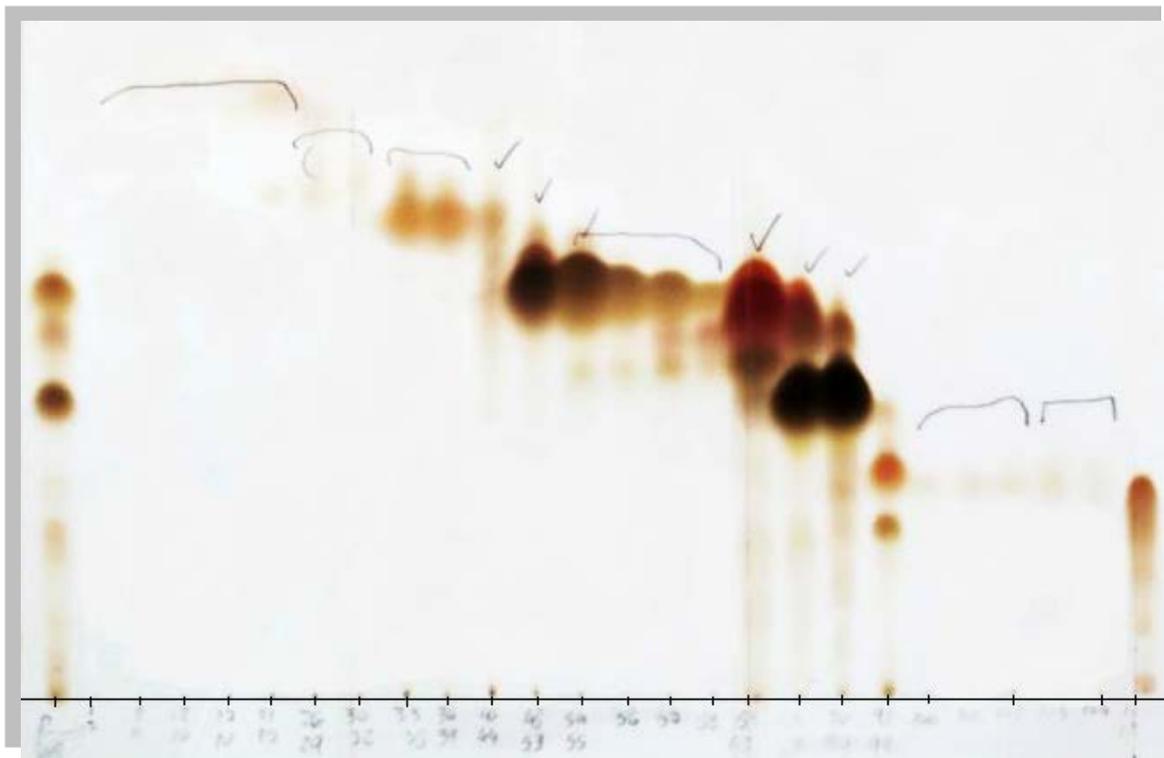
Sistema de elución	Proporción
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	9:1
Hex-AcOEt-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4:3:2
	6:4:1
	2:5:3
	4:4:1
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	5:5:0.5

### Cromatografía en columna abierta (CCA). Fraccionamiento primario

Se utilizaron 10 g del extracto orgánico para llevar a cabo un fraccionamiento primario en columna abierta en gel de sílice (200 g); la elución se realizó con gradiente de hexano–AcOEt (100:0→0:100) y AcOEt–MeOH (100:0→50:50) para obtener un total de 229 fracciones, las cuáles se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica para generar finalmente 12 conjuntos de fracciones primarias F<sub>1</sub>–F<sub>12</sub> (**Cuadro 3, Figura 8**). En la **Figura 9** se resume el método del fraccionamiento primario descrito.

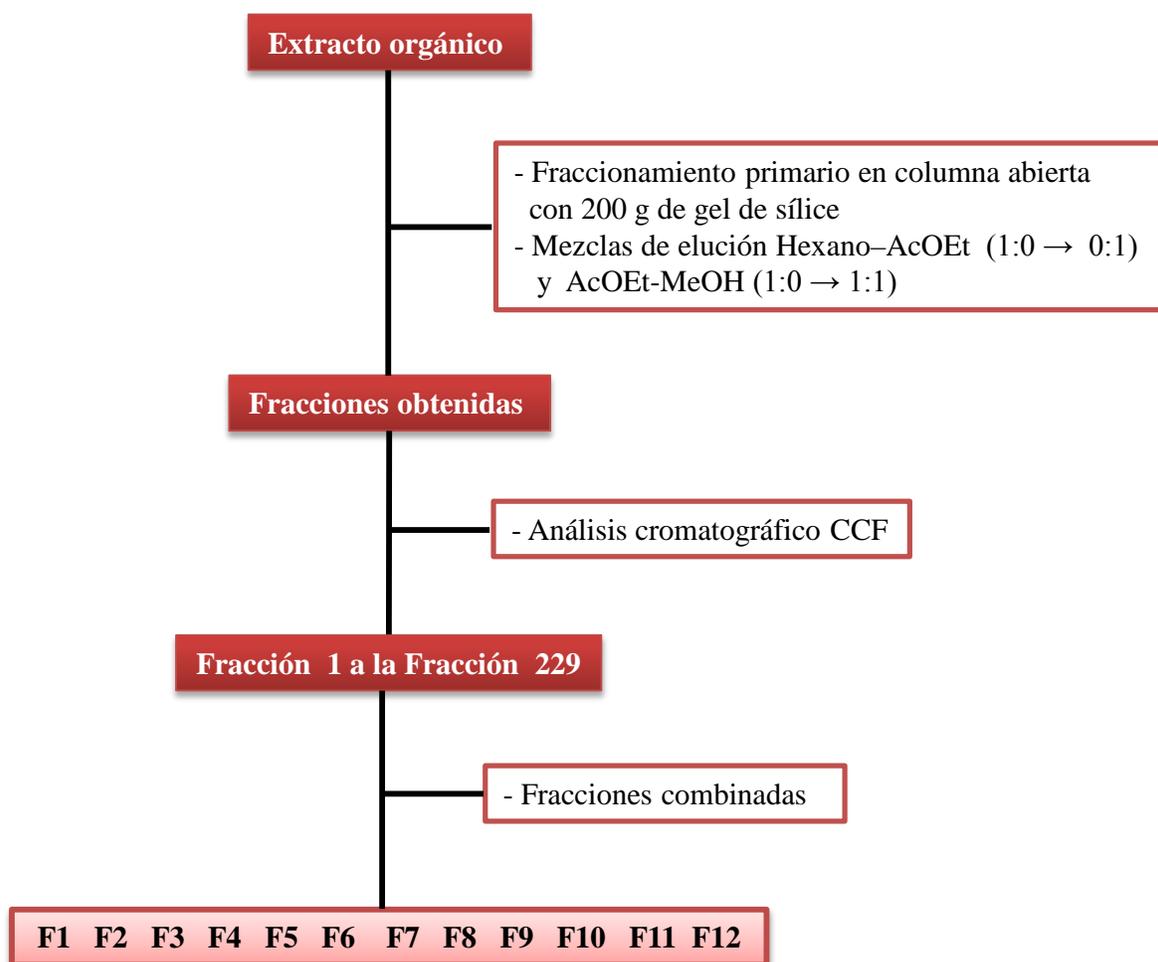
De la fracción primaria F<sub>2</sub> (1.8 g) eluída con hexano-AcOEt (95:5) se obtuvo una mezcla de ésteres derivados de ácido *n*-alquil-*trans*-*p*-cumárico. Dicha mezcla estaba compuesta por *n*-hexacosil-*trans*-*p*-cumarato, *n*-octacosil-*trans*-*p*-cumarato, y *n*-triacontil-*trans*-*p*-cumarato (**33–35**), en una proporción 1:2:1 de acuerdo a los análisis de cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) (Jinfeng y Xiaozhang 2000; Shu *et al.*, 2004). De la fracción F<sub>4</sub> eluída con hexano-AcOEt (90:10) se aislaron 10 mg del alcohol 4-metoxi-bencílico (**36**) (Machado *et al.*, 2008).

Por otro lado, el análisis por CLAR de la fracción F<sub>6</sub> [2.7 g; hexano-AcOEt (90:10) permitió el aislamiento y la identificación del 4-hidroxibenzaldehído [**37**; 32 mg,  $T_R$ : 18.5 min, Jeoung-Hee *et al.*, 2000] y 1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno-2,6-diol [**38**; 34 mg,  $T_R$ : 20.9 min, Hernández-Romero *et al.*, 2004)].



**Figura 8.** Cromatograma del fraccionamiento primario del extracto orgánico de *C. macrobulbon*.

El análisis por CCF [Sistema de elución: hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (50:50:0.5)] a nivel preparativo de la F<sub>7</sub> [100 mg; hexano-AcOEt (87:13)] y F<sub>8</sub> permitió el aislamiento de 54 mg de confusarina (**39**) (Majumder y Kar, 1987) y 25 mg de gigantol (**2**) ( $R_F$ : 0.47), respectivamente.



**Figura 9.** Esquema del fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *C. macrobulbon*.

El análisis de la fracción  $\text{F}_9$  [30 mg; hex-AcOEt (85:15)] por CCF a nivel preparativo permitió la separación de un sólido cristalino identificado como la batatasina III (**15**) ( $R_F$ : 0.40; 7.5 mg). Los compuestos **2** y **15** fueron identificados mediante la comparación de sus constantes físicas con muestras auténticas obtenidas previamente de *Nidema boothii* (Hernández-Romero *et al.*, 2004).

Finalmente, de la fracción F<sub>10</sub> [1.4 g; hex-AcOEt (80:20)] se obtuvieron 50 mg de efemerantol B (**40**) (p.f. 189°C) por CCF [hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (50:50:0.5)] (Kazuko *et al.*, 2012).

**Cuadro 3.** Resumen del fraccionamiento primario por CCA a partir del extracto orgánico de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *C. macrobulbon*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones combinadas
Hexano	100	F <sub>1</sub> (1-11)
Hex-AcOEt	95:5	F <sub>2</sub> (12-38)
Hex-AcOEt	93:7	F <sub>3</sub> (39-64)
Hex-AcOEt	90:10	F <sub>4</sub> (65-69)
Hex-AcOEt	90:10	F <sub>5</sub> (70-100)
Hex-AcOEt	90:10	F <sub>6</sub> (24-25)
Hex-AcOEt	87:13	F <sub>7</sub> (101-129)
Hex-AcOEt	85:15	F <sub>8</sub> (130-142)
Hex-AcOEt	85:15	F <sub>9</sub> (143-171)
Hex-AcOEt	80:20	F <sub>10</sub> (172-189)
Hex-AcOEt	50:50	F <sub>11</sub> (190-212)
Hex-AcOEt	50:50	F <sub>12</sub> (213-229)

### 5.1.1.6 Caracterización de los principales compuestos presentes en el extracto orgánico de *C. macrobulbon*

Todos los compuestos se caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos mediante el análisis comparativo de las constantes espectroscópicas registradas en el presente estudio (ANEXO I), con las descritas previamente en la literatura.

***n*-Hexacosil-*trans*-*p*-cumarato (**33**).**- IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 2917, 2848, 1573, 1602, 833, 642; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  7.62 (d, *J* = 16 Hz, H-1'), 7.43 (d, *J* = 8 Hz, H-

2,H-6), 6.84 (d,  $J = 8$  Hz, H-3,H-5), 6.30 (d,  $J = 16$  Hz, H-2'), 4.19 (dd, 4 y 8 Hz, H-1''), 1.69 (dd,  $J = 7.2$  Hz, H-25''), 1.3 (s, H-2''-H-24''), 0.88 (dd,  $J = 5.6$  y 7.2 Hz, H-26'');  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  167.5 (C-3'), 157.5 (C-4), 144.10 (C-1'), 129.9 (C-2, C-6), 127.89 (C-1), 115.89 (C-3, C-5), 64.7 (C-1''), 29.4 (C-2''-C-24''), 22.7 (C-25''), 14.1 (C-26''); EMIE  $m/z$  528 [ $\text{M}^+$ ], 164 (100).

***n*-Octacosil-*trans*-*p*-cumarato (34).**- IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2917, 2848, 1573, 1602, 833, 642;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  7.62 (d,  $J = 16$  Hz, H-1'), 7.43 (d,  $J = 8$  Hz, H-2,H-6), 6.84 (d,  $J = 8$  Hz, H-3,H-5), 6.30 (d,  $J = 16$  Hz, H-2'), 4.19 (dd, 4 y 8 Hz, H-1''), 1.69 (dd,  $J = 7.2$  Hz, H-25''), 1.3 (s, H-2''-H-24''), 0.88 (dd,  $J = 5.6$  y 7.2 Hz, H-26'');  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  167.5 (C-3'), 157.5 (C-4), 144.10 (C-1'), 129.9 (C-2, C-6), 127.89 (C-1), 115.89 (C-3, C-5), 64.7 (C-1''), 29.4 (C-2''-C-24''), 19.0 (C-25''), 14.1 (C-26''); EMIE  $m/z$  556 [ $\text{M}^+$ ], 164 (100).

***n*-Triacontil-*trans*-*p*-cumarato (35).**- IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2917, 2848, 1573, 1602, 833, 642;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  7.62 (d,  $J = 16$  Hz, H-1'), 7.43 (d,  $J = 8$  Hz, H-2,H-6), 6.84 (d,  $J = 8$  Hz, H-3,H-5), 6.30 (d,  $J = 16$  Hz, H-2'), 4.19 (dd, 4 y 8 Hz, H-1''), 1.69 (dd,  $J = 7.2$  Hz, H-25''), 1.3 (s, H-2''-H-24''), 0.88 (dd,  $J = 5.6$  y 7.2 Hz, H-26'');  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  167.5 (C-3'), 157.5 (C-4), 144.10 (C-1'), 129.9 (C-2, C-6), 127.89 (C-1), 115.89 (C-3, C-5), 64.7 (C-1''), 29.4 (C-2''-C-24''), 19.0 (C-25''), 14.1 (C-26''); EMIE  $m/z$  584 [ $\text{M}^+$ ], 556 (16), 528 (14), 164 (100).

**Alcohol 4-metoxi-bencílico (36).**- IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3274, 2915, 1064;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  7.20 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-3,H-5), 6.78 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-2,H-6), 5.23 (s,

OH), 4.39 (s, H-1'), 3.37 (s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 155.3 (C-1), 133.5 (C-4), 129.7 (C-2,C-6), 115.2 (C-3,C-5), 74.4 (C-1'), 57.7 (OCH<sub>3</sub>); EMIE *m/z* 138 [M<sup>+</sup>].

**4-Hidroxibenzaldehído (37).**- <sup>1</sup>H RMN (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 9.88 (s, CHO), 7.82 (d, *J* = 8.6 Hz, H-2,H-6), 6.95 (d, *J* = 8.6 Hz, H-3,H-5), 5.36 (s, OH); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 191.3 (CHO), 164.5 (C-4), 132.7 (C-2,C-6), 129.7 (C-1), 116.2 (C-3,C-5); EMIE *m/z* 122 [M<sup>+</sup>].

**1,5,7-Trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (38).**- <sup>1</sup>H RMN (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 9.0 (s, OH), 8.0 (s, OH), 7.98 (d, *J* = 8.7 Hz, H-4), 6.88 (d, *J* = 8.7 Hz, H-3), 6.59 (s, H-8), 3.92 (s, OCH<sub>3</sub>-7), 3.81 (s, OCH<sub>3</sub>-1), 3.70 (s, OCH<sub>3</sub>-5), 2.80 (m, H-9), 2.69 (m, H-10); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 147.3 (C-1), 145.8 (C-7), 144.8 (C-5), 143.6 (C-2), 137.7 (C-9<sup>a</sup>), 130.0 (C-4<sup>a</sup>), 129.9 (C-10<sup>a</sup>), 125.8 (C-6), 123.9 (C-4), 117.9 (C-4b), 113.1 (C-3), 106.8 (C-8), 59.3 (OCH<sub>3</sub>-1), 59.6 (OCH<sub>3</sub>-5), 56.1 (OCH<sub>3</sub>-7), 29.4 (C-9), 22.5 (C-10); EMIE *m/z* 302 [M<sup>+</sup>].

**Confusarina (39).**- <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 9.37 (d, *J* = 9.2 Hz, H-5), 8.05 (d, *J* = 9.1 Hz, H-9), 7.65 (d, *J* = 9.2 Hz, H-10), 7.40 (s, H-1), 7.36 (d, *J* = 9.2 Hz, H-6), 4.01 (s, OCH<sub>3</sub>-4), 3.95 (s, OCH<sub>3</sub>-8), 3.93 (s, OCH<sub>3</sub>-3); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 150.2 (C-4), 147.2 (C-2), 144.9 (C-7), 142.5 (C-3,C-8), 128.2 (C-10<sup>a</sup>), 126.7 (C-10), 125.7 (C-8<sup>a</sup>), 124.3 (C-4b), 123.4 (C-5), 118.8 (C-9), 118.1 (C-4<sup>a</sup>), 115.6 (C-6), 110.6 (C-1), 61.4 (OCH<sub>3</sub>-8), 60.7 (OCH<sub>3</sub>-3), 59.2 (OCH<sub>3</sub>-4), 29.4 (C-9), 22.5 (C-10); EMIE *m/z* 300 [M<sup>+</sup>].

**Efemerantol B (40).**- p.f. 189°C, <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 9.33 (d, *J* = 9.1 Hz, H-4), 7.57 (d, *J* = 9.1 Hz, H-9), 7.48 (d, *J* = 9.1 Hz, H-10), 7.21 (d, *J* = 2.7 Hz, H-8), 7.18 (dd, *J* = 9.1, 2.8 Hz, H-3), 4.05 (s, OCH<sub>3</sub>-5), 3.90 (s, OCH<sub>3</sub>-7); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 153.0 (C-2), 146.7 (C-7), 143.6 (C-5), 139.5 (C-6), 133.7 (C10a), 128.5 (C-8<sup>a</sup>),

125.9 (C-9), 124.8 (C-10), 123.8 (C-4b), 118.7 (C-1), 116.4 (C-4b), 111.4 (C-3), 104.8 (C-8), 61.4 (OCH<sub>3</sub>-5), 59.2 (OCH<sub>3</sub>-7). EMIE  $m/z$  270 [M<sup>+</sup>].

### **Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal (CLAR)**

Se llevó a cabo el desarrollo de un método analítico por CLAR con el objetivo de caracterizar y separar los compuestos mayoritarios presentes en el extracto orgánico de *C. macrobulbon*, para lo cual se realizaron múltiples ensayos en fase normal, con diferentes fases estacionarias (columnas cromatográficas) y diferentes fases móviles (mezclas de elución). En el **Cuadro 4** se muestra el resumen de las condiciones de análisis óptimas para obtener el perfil cromatográfico adecuado.

**Cuadro 4.** Condiciones de trabajo en CLAR en fase normal para el extracto orgánico de *C. macrobulbon*.

<b>Columna</b>	Nova Pack HR Sílica 3.9 × 300 mm
<b>Eluyente</b>	Hexano-AcOEt (85:20 → 75:25)
<b>Flujo</b>	0.6 mL/min
<b>Volúmen de inyección</b>	20 µL
<b>Detección</b>	280 nm
<b>Temperatura</b>	Ambiente

A partir de las condiciones establecidas en CLAR se procedió a la validación del método analítico. A partir de la fracción combinada F<sub>10</sub> (216 mg) se realizó un fraccionamiento secundario en columna abierta con Sephadex como soporte, y hexano–AcOEt (100:0 → 50:50) como fase móvil, del cual se obtuvieron 16 subfracciones.

En las subfracciones 7, 8 y 9 se observó un precipitado color blanco, el cual se aisló y se analizó por CLAR para confirmar su identidad como efemerantol B (**40**) y poder utilizarlo como estándar la validación del método analítico.

### **5.1.1.7 Validación de un método analítico para la cuantificación de efemerantol B (**40**) por CLAR**

Los criterios establecidos por las normas de Armonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos [ICH Q2 (R1), 2002] sirvieron como base para la validación del método analítico. Los parámetros de calidad evaluados para dicho método se describen a continuación.

#### ***Linealidad del sistema***

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración de acuerdo al siguiente procedimiento. Se utilizaron 6 mg de estándar de efemerantol B (**40**). Se disolvieron 5 mg/0.5 mL en una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt (9:1). A partir de esta solución de referencia se realizaron las diluciones necesarias para obtener soluciones con concentraciones entre 0.5 y 10 µg/mL. El área bajo la curva (ABC) del efemerantol B (**40**) se graficó con respecto a la concentración de referencia en cada solución.

El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios:  $b_0 = 0$ ;  $b_1 \neq 0$ ;  $r \geq 0.99$ ;  $r^2 \geq 0.98$  e IC ( $\beta_1$ ) no incluye el cero. Se analizaron seis réplicas por cada nivel de concentración.

### ***Linealidad y exactitud del método***

La linealidad del método se determinó mediante la adición de diferentes concentraciones del estándar (50 y 750 mg/mL) a la matriz de trabajo. Se evaluaron nueve réplicas por concentración, obteniéndose así los valores correspondientes del ABC, que se interpolaron en la curva de calibración desarrollada para evaluar la linealidad del sistema.

Los resultados obtenidos (concentración adicionada vs concentración recuperada) fueron analizados para determinar sus parámetros estadísticos ( $b_0 = 0$ ;  $b_1 \neq 0$ ;  $R \geq 0.99$ ;  $R^2 \geq 0.98$  y  $CV_{y/x} \leq 2\%$ ) mediante un análisis de regresión lineal simple. La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros: promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional [IC (B1)] del porcentaje de recobro.

### ***Precisión del método (Repetibilidad)***

La repetibilidad se estableció mediante el análisis de siete réplicas de una solución de estándar de efemerantol B (40) a una concentración de 750 mg/mL. El análisis se realizó en dos días distintos por diferentes analistas. Los resultados obtenidos se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

### ***Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)***

La evaluación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de una curva de calibración basada en la desviación estándar de los blancos. Se prepararon muestras que contenían 1mg/mL de extracto orgánico de *C. macrobulbon* (matriz de trabajo), diluidas con una mezcla de  $CH_2Cl_2$ -MeOH (9:1). Se

evaluaron diez réplicas y el área bajo la curva del pico (ABC), que corresponde al efemerantol B (**40**) de cada réplica, sirvió para el cálculo de los límites, que fueron determinados de acuerdo a las ecuaciones siguientes:

$$LD = \frac{3.3 \times S_b}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_b}{b_1}$$

### *Cuantificación de efemerantol B (**40**) presente en el extracto orgánico de C. macrobulbon*

Para la cuantificación de efemerantol B (**40**) en el extracto orgánico de *C. macrobulbon*, se disolvieron 10 mg de la muestra en 1 mL de una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1). El compuesto **40** se cuantificó registrando su perfil cromatográfico, utilizando las condiciones cromatográficas señaladas anteriormente (**Cuadro 4**).

La determinación del área bajo la curva se realizó con el software del equipo y la cantidad en miligramos de cada muestra se calculó por medio de la interpolación en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración diseñada en la evaluación de la linealidad del sistema.

#### **5.1.1.8 Identificación de los compuestos volátiles de C. macrobulbon**

La identificación de los componentes volátiles se realizó de acuerdo a los lineamientos de la OMS (WHO, 1998; Gaedcke *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2004). El método empleado para el análisis de los volátiles obtenidos por microextracción en fase sólida en fase gaseosa (HS-SPME) fue el de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de

masas (CG-EM) (Perraudin *et al.*, 2006). Esta técnica implica el empleo de fibras (fases sólidas) de diferente polaridad. En este caso se utilizaron fibras con empaque de Polidimetilsiloxano (PDMS), Divinilbenceno (DVB), Carboxeno (CAR) o sus respectivas combinaciones (Supelco) ®.

### ***Muestreo***

El muestreo por HS-SPME es una técnica que arroja resultados en corto plazo, no se utilizan disolventes que pudieran alterar la composición de la mezcla de compuestos volátiles y disminuye la cantidad de analito. En el caso de *S. fasciculata* se analizó también una muestra de aceite esencial por CG-EM.

Para la obtención de las muestras la droga cruda (250 mg) se colocó en un vial de 5 mL, con 2 mL de agua y NaCl (para saturar la fase acuosa), en baño maría a 45-50°C y agitación constante. Posteriormente, se colocó la jeringa (portafibra) con la debida precaución de que al exponerla, ésta no quedara en contacto directo con la muestra. Una vez estabilizada la agitación, el tiempo de extracción fue de 90 minutos. Al término de este tiempo, la fibra se contrajo y se colocó de inmediato en el cromatógrafo de gases. Las fibras para SPME-HS se adquirieron con Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA).

### ***Análisis***

El análisis de CG-EM se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases equipado con una columna de sílica HP-5 (60 m × 0.25 mm; 0.25 nm de grosor de película) acoplado a un espectrómetro de masas (5973- Hewlett-Packard), con una temperatura programada

de 40-300°C. Las condiciones de muestreo y análisis para ambas especies se resumen en el

### Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Condiciones de análisis para la identificación de compuestos volátiles en las muestras de las especies *C. macrobulbon* y *S. fasciculata*.

---

<b>Muestreo</b>	HS-SPME
	DVB/CAR/PDMS
<b>Fibras</b>	CAR/PDMS
	PDMS
<b>Tiempo de exposición de las fibras</b>	90 min
<b>Temperatura</b>	45-50°C
<b>Posición de la fibra</b>	En la fase de vapor
<b>Columna capilar</b>	HP-5 (60 m × 0.25 mm; 0.25 nm de grosor de película)
<b>Temp. análisis</b>	40°C (1 min); 20°C/min; hasta 300°C (5 min)

---

Polidimetilsiloxano (PDMS), Divinilbenceno (DVB), Carboxeno (CAR).

---

Los compuestos fueron identificados comparando los índices de retención experimentales con aquellos descritos en la librería del equipo, y con los datos citados en la literatura; así como el análisis comparativo de los patrones de fragmentación de los espectros de masas obtenidos con los de las librerías del National Institute of Standards and Technology (NIST) y del Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Los

índices de retención fueron calculados para todos los compuestos volátiles, utilizando una serie homóloga de *n*-alcanos.

### 5.1.2 Pruebas de identidad botánica

#### *Estudios anatómicos e histológicos*

La caracterización anatómica de ambas especies de orquídeas se realizó mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB). La caracterización histológica se llevó a cabo por medio de cortes y diversas técnicas de tinción e histoquímicas (López-Curto *et al.*, 2005), así como microscopía de campo claro (MCC).

#### *Deshidratación del material vegetal*

Las muestras de material vegetal fresco se fijaron en FAA (Formaldehído). Enseguida, se enjuagaron tres veces con agua corriente (30 minutos cada enjuague). A continuación, se deshidrataron mediante una serie de cambios de alcohol etílico durante dos horas, para cada una de las diferentes concentraciones utilizadas (30, 50, 70, 85, 96 y 100%). Posteriormente, el material se incluyó en una mezcla de alcohol absoluto-xilol (1:1) por espacio de 30 minutos. Finalmente, se mantuvieron en xilol absoluto por 20 minutos (López-Curto *et al.*, 2005).

#### *Inclusión del material vegetal*

Para realizar los cortes histológicos, el material vegetal previamente deshidratado se sometió a un proceso de inclusión; para ello, la muestra vegetal se envolvió en una mezcla

de xilol-parafina (Paraplast®) en diferentes proporciones (2:1, 1:1 y 1:2) por espacio de 30 minutos en cada caso. Por último, el material se mantuvo en parafina pura por 24 horas, en una estufa a 65°C, para permitir la penetración adecuada del hidrocarburo al tejido vegetal.

### *Obtención de cortes anatómicos*

El material vegetal ya incluido en parafina absoluta se colocó en bloques de madera de 1 × 1 cm. A partir de dichos bloques se formó una pirámide alrededor de la muestra y antes de realizar los cortes se colocaron en refrigeración durante 10 minutos. Para el corte se utilizó un micrótopo de rotación *American Optical*, modelo 820, con el cual se estableció el grosor del corte en 12 micras de espesor. Se utilizó un baño de flotación con agua a 40°C, con gelatina bovina como adhesivo. Estos se extendieron en la superficie del agua y se colocaron sobre un portaobjetos (López Curto *et al.*, 2005).

### *Técnicas de tinción*

Las técnicas de tinción utilizadas fueron las siguientes:

- ⊗ Cuádruple de Johansen
- ⊗ Azul negro de naftol-APS
- ⊗ Rojo O de aceite

### *Microscopía de campo claro (MCC)*

Las preparaciones obtenidas se analizaron mediante las técnicas de microscopía de campo claro, con la finalidad de identificar y describir los caracteres anatómicos y estructurales, tanto de hojas como de pseudobulbos de *C. macrobulbon*. Para ello se utilizó

un microscopio Olympus BX52 (Japón) y las micrografías se tomaron utilizando el programa Image Pro Plus versión 6.1, acoplado a una cámara Evolution ® LC Kit 5.0.

### *Microscopía electrónica de barrido (MEB)*

Para observar las muestras mediante microscopía electrónica de barrido fue necesario deshidratar el material vegetal mediante tratamiento con etanol (30-100%); una vez deshidratadas se cubrieron con baño de oro (Loza-Cornejo y Terrazas, 2003) y finalmente se examinaron en un microscopio JEOL-53C, en el laboratorio de microscopía electrónica a cargo de la M. en C. Berenit Garfias en el Instituto de Biología de la UNAM.

### **5.1.3 Pruebas de identidad genética**

#### *Código de barras genético*

El establecimiento del código de barras se realizó mediante la secuenciación del ADN de dos marcadores; uno del cloroplasto *matK* y otro de las regiones nucleares ribosomales *rbcL*.

#### *Muestreo de los ejemplares*

Se utilizaron dos muestras para cada especie. Una proveniente de material herborizado y otra de material fresco. La de material herborizado se limpió para retirar el polvo. La de material fresco se limpió para retirar restos de sustrato. Se utilizaron muestras de hoja y pseudobulbo de un tamaño aproximado a 1 cm<sup>2</sup>, que fueron colocadas en bolsas pequeñas con sílica gel para deshidratarlas, utilizando 20 veces el volumen de gel con respecto al volumen del tejido (Chase y Hills, 1991).

### *Procesamiento de las muestras*

La extracción del ADN se realizó en el Laboratorio de Sistemática Molecular del departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. Para la secuenciación se utilizó el servicio comercial HTGU (High-Throughput Genomics Unit, University of Washington, Seattle, USA.).

### *Extracción y purificación de ADN*

El ADN se obtuvo mediante el procedimiento de 2 × Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) descrito por Doyle y Doyle (1987), modificado mediante la adición al tampón de extracción de 2% (peso/volumen) de polivinilpirrolidona (PVP). Dentro de un microtubo se molió con un pistilo pequeño cerca de 0.5 g de tejido vegetal con nitrógeno líquido, hasta su pulverización. Al microtubo se le adicionaron 500 µL del tampón CTAB, precalentado a 65°C, al cual se le habían agregado previamente 4% de 2-mercaptoetanol. El extracto obtenido se incubó a 65°C durante 30min.

La extracción se realizó con 500 µL de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) por espacio de 30 min, mezclando suavemente. Posteriormente el extracto se centrifugó a 9000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, al término de este tiempo la fase acuosa se transfirió a un microtubo limpio.

La precipitación de ADN se realizó adicionando el equivalente a 2/3 del volumen del extracto de 2-propanol pre-enfriado a -20°C y posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min. Se decantó el alcohol y el precipitado se lavó mediante la adición de 500 µL de etanol al 70%. Después, se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. El alcohol

fue descartado y el precipitado, una vez limpio, fue secado mediante centrifugación al vacío durante 6 min, y resuspendido en 50  $\mu$ L de tampón TRIS/EDTA. El extracto de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio para confirmar la presencia de material genético en el extracto.

### ***Amplificación de ADN***

Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) consistieron en 2 min de pre-desnaturalización a 94°C; 35 ciclos con 30 segundos de desnaturalización a 94°C; 40 segundos de unión de los primers a 48°C; 40 segundos de extensión a 72°C; y 5 min de extensión final a 72°C. Los productos de la PCR se evaluaron en un gel de agarosa para confirmar la amplificación de un fragmento del peso molecular esperado y fueron enviados a secuenciar en placas de reacción de 96 pozos.

### ***Edición y alineamiento***

Los electroferogramas obtenidos se editaron con el programa Sequencher, versión 4.8 (Gene Cods Corp. Ann Arbor Michigan). El alineamiento se revisó y se corrigió manualmente.

## **5.1.4 Pruebas de seguridad**

### **5.1.4.1 Toxicidad aguda**

Como parte de las pruebas de seguridad, se estableció la dosis letal media 50 (DL<sub>50</sub>) del extracto acuoso de *C. macrobulbon*.

### ***Establecimiento de la DL<sub>50</sub>***

Se determinó la DL<sub>50</sub> de la infusión y de la fracción orgánica de *C. macrobulbon*. En una primera etapa se administraron las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg. En la segunda etapa se administraron las dosis de 1900, 2600 y 5000 mg/kg. La administración se realizó vía oral (*p.o*) y de acuerdo al método descrito por Lorke (1983).

### **5.1.5 Pruebas de Eficacia**

#### **Ensayos biológicos**

Los usos etnomédicos reportados para los pseudobulbos de *C. macrobulbon*, sugieren su potencial actividad antimicrobiana y analgésica. Con la finalidad de evaluar dichas propiedades, se llevaron a cabo bioensayos de actividad antibacteriana y antinocicepción, los cuales se describen a continuación.

#### **5.1.5.1 Determinación del potencial antimicrobiano**

La actividad antibacteriana de la infusión y su fracción orgánica, se determinó empleando el método de microdilución con el colorante bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Appendino *et al.*, 2008), contra bacterias Gram positivo [(*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus subtilis* ATCC 6633)] y Gram negativo [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Salmonella typhi* (ATCC 9992)]. Todos los microorganismos fueron proporcionados por el Cepario de

la Facultad de Química, UNAM. Como medio de cultivo se utilizó caldo Müeller-Hinton (MH). Este caldo se esterilizó en una autoclave a 121°C y 15 lb/cm<sup>2</sup>, durante 20 min.

Los ensayos se realizaron en placas de Elisa de 96 pozos. A cada pozo se adicionaron 125 µL de medio Müeller-Hinton (MH) estéril y 125 µL de una suspensión del microorganismo de prueba en solución salina, ajustada al 0.5% ( $1 \times 10^8$  células/mL) del estándar turbidimétrico de McFarland del microorganismo (Gibbons, 2003). Los pozos de las filas A- J contenían, además, 250 µL de los extractos a evaluar a las concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 y 1024 µg/mL, disueltas en DMSO (12.5 %). Las filas 11 y 12 se utilizaron como control positivo y/o control de crecimiento, respectivamente.

Las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada como la menor concentración en la que no se observó crecimiento de bacterias. Como control positivo se utilizó ampicilina.

### **5.1.5.2 Determinación del potencial antinociceptivo de la infusión y la fracción orgánica de *C. macrobulbon***

#### ***Ensayo de estiramiento abdominal (Writhing)***

Para la prueba de estiramiento abdominal se utilizaron ratones ICR macho, de entre 25-30 g. Los tratamientos se administraron vía oral (*p.o*). Una vez cumplido el tiempo de absorción (30 minutos), se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal (*i.p*), 0.2 mL/10 g de peso, una solución de ácido acético al 0.6 %. Inmediatamente después, los animales se

colocaron en una caja de plástico transparente y se observaron las contracciones acumuladas en lapsos de 5 min, durante 30 min.

En este caso, la nocicepción se manifestó por estiramientos abdominales (en algunas ocasiones se pueden observar contracciones); por lo tanto, se registró el número de los estiramientos de las patas traseras y flexión del cuerpo hacia atrás. El efecto antinociceptivo se determinó con base en la disminución del número de estiramientos de los animales tratados con relación al lote blanco (Tween al 2% en solución salina vía oral (*p.o.*). Se utilizó metamizol (MET) como control positivo a la dosis de 100 mg/kg.

### ***Ensayo de placa caliente***

Se utilizaron ratones de la cepa ICR con un peso entre 25 y 30 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de bioterio. Antes de los ensayos, los animales se dividieron en grupos de ocho y se mantuvieron en ayuno por 12 horas, con libre acceso al agua (*ad libitum*). Se evaluó el efecto de la infusión y el extracto orgánico. Las dosis ensayadas fueron las siguientes: 31.6 mg/kg, 100 mg/kg y 316 mg/kg. La administración de los extractos y control negativo se realizó por vía oral, 30 minutos antes de colocarlos sobre la placa a  $55 \pm 0.5$  °C. Como blanco se empleó una solución salina isotónica (SSI) (*p.o.*) y como control positivo morfina a la dosis de 1.5 mg/kg, administrada por vía intraperitoneal (*i.p.*).

### **5.1.6 Mapa de distribución potencial**

#### ***Base de datos***

Se consultaron diversas fuentes de información con el objetivo de contar con la mayor cantidad de registros documentados de la especie *C. macrobulbon*. Se revisaron bases de datos de distintas colecciones biológicas, como los herbarios MEXU (Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México), Asociación Mexicana de Orquideología (AMO, Instituto Chinoín, A.C), la cual se complementó con información de las bases de datos en formato electrónico de acceso público como la Unidad de Informática de la Biodiversidad (UNIBIO, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, <http://unibio.unam.mx>), MBG-Tropicos (Missouri Botanical Garden, <http://www.tropicos.org>), Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB), Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, [http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/clave\\_remib.cgi?lengua=es-MX](http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/clave_remib.cgi?lengua=es-MX)), Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://www.gbif.org> y notas de campo).

De esta consulta se armó una base con 92 registros, la cual se depuró para eliminar los duplicados y se confirmaron las georreferencias de cada ejemplar. Para la realización de los modelos de distribución, se emplearon las coberturas climáticas y topográficas de WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005), disponibles en formato digital y listas para emplearse en sistemas de información geográfica (SIG).

### ***Utilización del modelo predictivo Maxent***

La modelación de las especies se realizó con el algoritmo Maxent y se seleccionó el mejor modelo en función de la evaluación estadística (valor ABC).

### 5.2 *Scaphyglottis fasciculata*

#### 5.2.1 Pruebas de identidad química

Para la especie *S. fasciculata* se llevaron a cabo las pruebas de identidad química, las cuales incluyen el establecimiento de un perfil cromatográfico de la fracción orgánica de la infusión; la identificación de compuestos volátiles por HS-SPME; la descripción de caracteres anatómicos e histológicos, (identidad botánica), utilizando los mismos procedimientos descritos para *C. macrobulbon*. Por tanto solo se detallarán las variaciones a éstos.

##### 5.2.1.1 Material vegetal

Se utilizó el material vegetal recolectado en campo del 18 al 20 de Febrero de 2010 en Coatepec, Veracruz (**Figura 10**), con la colaboración de los Biólogos José Vicon y David Jimeno. El material se recolectó en tres cafetales: El primero en la estación de tren “El Piojito”, Hacienda Zimpizahua; el segundo en la entrada a San Marcos, Parador turístico “Las Puentes” y el tercero en el camino hacia la cascada de Texolo (MEXU 13722311) (**Figura 11**).

##### 5.2.1.2 Obtención de los extractos

###### Extracto acuoso (infusión) y su fracción orgánica

Para elaborar la infusión, los pseudobulbos frescos se deshidrataron en estufas de secado en el taller de Biología de Plantas II de la Facultad de Ciencias a cargo de la M. en C. Ma. Eugenia Díaz de León. Dicho material se molió en un molino de cuchillas tipo

Wiley. Se utilizaron 20 g de material vegetal seco y molido. La metodología para la obtención de los extractos fue la misma que se empleó en el caso de *C. macrobulbon* y se resume en la **Figura 7**.

### 5.2.1.3 Analisis cromatográficos

Con la finalidad de completar los estudios fitoquímicos previos de la especie *S. fasciculata*, se buscó establecer un perfil cromatográfico por CLAR, para identificar los principales compuestos presentes en la fracción orgánica de la infusión de dicha especie.

#### Cromatografía en capa fina (CCF)

Con la fracción orgánica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) obtenida a partir de la infusión de *S. fasciculata* se realizaron placas cromatográficas en capa fina (CCF), comparando las mismas mezclas de elución que en el caso de *C. macrobulbon* (**Cuadro 2**).

#### Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en fase normal

A partir de la fracción orgánica se estableció un método analítico para caracterizar los compuestos mayoritarios presentes en dicha fracción, obtenida a partir de la infusión de *S. fasciculata*; esto con la finalidad de establecer las pruebas de identidad química de la droga cruda. Con este objetivo, se realizaron múltiples ensayos con diferentes fases estacionarias y mezclas de elución en fase normal. En el **Cuadro 6** se resumen las condiciones óptimas establecidas, bajo las cuales se obtuvo el mejor perfil cromatográfico.



**Figura 10.** Sitio de colecta en Xalapa, Veracruz. *Scaphyglottis fasciculata*.



**Figura 11.** Ejemplar de herbario de *S. fasciculata* (MEXU 13722311).

**Cuadro 6.** Condiciones de trabajo en CLAR en fase normal para la fracción orgánica de la infusión de *S. fasciculata*.

---

<b>Eluyente</b>	CHCl <sub>3</sub> -AcOEt (100:0→90:10)
<b>Flujo</b>	0.6 mL/min
<b>Volúmen de inyección</b>	20 µL
<b>Detección</b>	254 y 280 nm
<b>Temperatura</b>	Ambiente

---

### 5.2.1.3 Identificación de los compuestos volátiles de *S. fasciculata*

Para establecer la identidad de los compuestos volátiles presentes en hojas y pseudobulbos de *S. fasciculata*, se empleó la metodología ya descrita para *C. macrobulbon*, con sus respectivas modificaciones (**Cuadro 4**).

### 5.2.2 Pruebas de identidad botánica

#### Estudios anatómicos e histológicos

La caracterización anatómica e histológica de *S. fasciculata* se realizó mediante las técnicas antes descritas para *C. macrobulbon*; sin embargo, en este caso no se realizaron micrografías por MEB.

### 5.2.3 Pruebas de seguridad

#### Toxicidad aguda

La toxicidad aguda en ratones se determinó de acuerdo al método de Lorke como se describió para *C. macrobulbon*.

### **5.2.4 Mapa de distribución potencial**

El mapa de distribución potencial se elaboró siguiendo la misma metodología descrita para *C. macrobulbon*.

# 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 6.1 *Cyrtopodium macrobulbon*

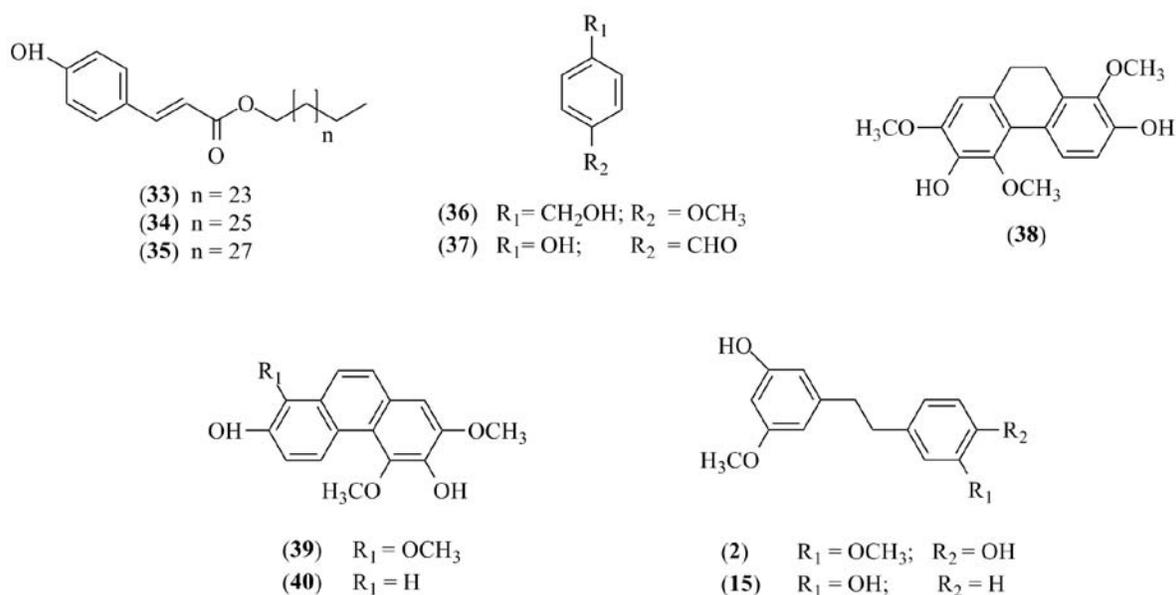
### 6.1.1 Pruebas de identidad química

#### Análisis cromatográficos

El estudio fitoquímico convencional de *C. macrobulbon*, aplicando diversas técnicas cromatográficas permitió aislar, separar y establecer la identidad de los principales compuestos presentes en el extracto orgánico e infusión de la droga cruda de la planta objeto de estudio. También fue posible aislar una cantidad suficiente de efemerantol B (**40**), el cual se utilizó como estándar en la validación de un método analítico por CLAR y que eventualmente se pueda utilizar como prueba de composición de esta orquídea.

#### 6.1.1.1 Caracterización de los principales compuestos presentes en el extracto orgánico de *C. macrobulbon*

Los compuestos aislados se identificaron empleando diferentes técnicas espectroscópicas (IR, <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN y UV) y espectrométricas (EM) de la siguiente forma: una mezcla de ésteres derivados de ácido-*n*-alquil-*trans-p*-cumárico formada por *n*-hexacosil-*trans-p*-cumarato, *n*-octacosil-*trans-p*-cumarato, y *n*-triacontil-*trans-p*-cumarato (**33-35**); alcohol 4-metoxi-bencílico (**36**); 4-hidroxibenzaldehído (**37**); 5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (**38**); confusarina (**39**); gigantol (**2**); batatasina III (**15**) y efemerantol B (**40**). Las estructuras de los compuestos aislados se muestran en la **Figura 12**.



**Figura 12.** Principales compuestos aislados a partir del extracto orgánico de los pseudobulbos de *C. macrobulbon*.

### Perfil cromatográfico por CLAR de *C. macrobulbon*

Una vez caracterizados los compuestos mayoritarios, se procedió a establecer el perfil cromatográfico del extracto orgánico de la planta. Después de ensayar diferentes columnas (fase estacionaria, tanto normal como reversa) y diferentes mezclas de elución (fase móvil), tanto en gradiente como isocráticas, se estableció que las mejores condiciones para la separación e identificación de los compuestos mayoritarios del extracto orgánico de los pseudobulbos de *C. macrobulbon* fueron las siguientes: columna Nova-Pack HR Sílica ( $3.9 \times 300$  mm) como fase estacionaria y una mezcla de Hexano-AcOEt (85:20  $\rightarrow$  75:25) en gradiente, como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min con un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ . La longitud de onda para la detección fue de 280 nm.

## 6. Resultados y discusión

---

Los principales compuestos presentes en el extracto orgánico de los pseudobulbos de *C. macrobulbon* se encuentran también en la fracción orgánica obtenida a partir de la infusión, los cuáles se obtuvieron del material vegetal comprado en el D. F. Por otro lado, al comparar la fracción orgánica de la infusión, tanto de la muestra de mercado (**CM-2**) como de la muestra de campo (**CM-1**) observamos que ambas presentan los mismos compuestos principales (**Figura 13**) con tiempos de retención similares.

Los números corresponden a los compuestos: *trans-p*-cumarato de *n*-hexacosilo, *trans-p*-cumarato de *n*-octacosilo, y *trans-p*-cumarato de *n*-triacontilo, (**33-35**,  $T_R$  7.56 min), alcohol 4-metoxi-bencílico (**36**,  $T_R$  13.93 min), 4-hidroxi-benzaldehído (**37**,  $T_R$  18.48 min), 1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidroxifenantreno-2,6-diol (**38**,  $T_R$  20.88 min), confusarina (**39**,  $T_R$  22.55 min), gigantol (**2**,  $T_R$  24.5 min), batatasina III (**15**,  $T_R$  36 min), y efemerantol B (**40**,  $T_R$  40.25 min).

### 6.1.1.2 Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de efemerantol B (**40**) por CLAR

Se ajustó e identificó la señal correspondiente al compuesto marcador **40** mediante la técnica de coelución. Los resultados de este análisis permitieron establecer una concentración para la solución de referencia de la matriz de trabajo en 0.25 µg/mL. El método analítico fue validado en términos de linealidad, precisión y exactitud.

El desarrollo del método analítico se realizó mediante ensayo y error, utilizando diversas condiciones cromatográficas hasta obtener la mejor resolución de las señales de los principales componentes presentes en el extracto orgánico de la droga cruda. Las condiciones óptimas de separación fueron obtenidas en una fase normal de gel de sílice

NovaPak HR, utilizando como fase móvil un sistema gradiente entre hexano (A) y AcOEt (B): 0 min (20%B); 30 min (15%B). Este análisis generó el cromatograma que se ilustra en la **Figura 13** donde los picos correspondientes a los compuestos **33-35, 36, 37, 38, 39, 2, 15** y **40** representan el 5, 6, 5, 6, 5, 6, 5 y 2.7 %, respectivamente, del total del área cuantificada en el cromatograma.

Enseguida se desarrollo un protocolo para validar el método analítico para cuantificar al componente mayoritario, el efemerantol B (**40**) utilizando los siguientes parámetros de desempeño: linealidad del sistema, linealidad del método, exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación, de acuerdo con las Normas de la International Conference on Harmonisation Guidelines referentes a la Validación de Métodos Analíticos [ICH Q2 (R1), 2002].

### ***Linealidad del sistema***

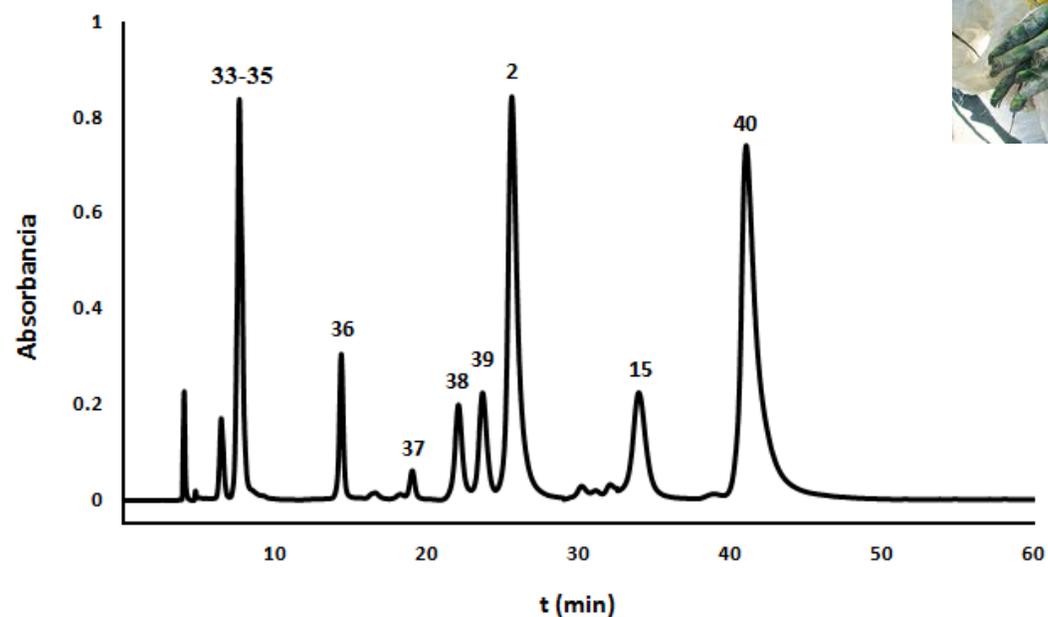
La linealidad de un sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración de un analito se ajustan a un modelo matemático en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica. La linealidad del sistema se evaluó mediante la construcción de tres curvas de calibración con cinco diferentes niveles de concentración del analito (**Cuadro 7**).

## 6. Resultados y discusión

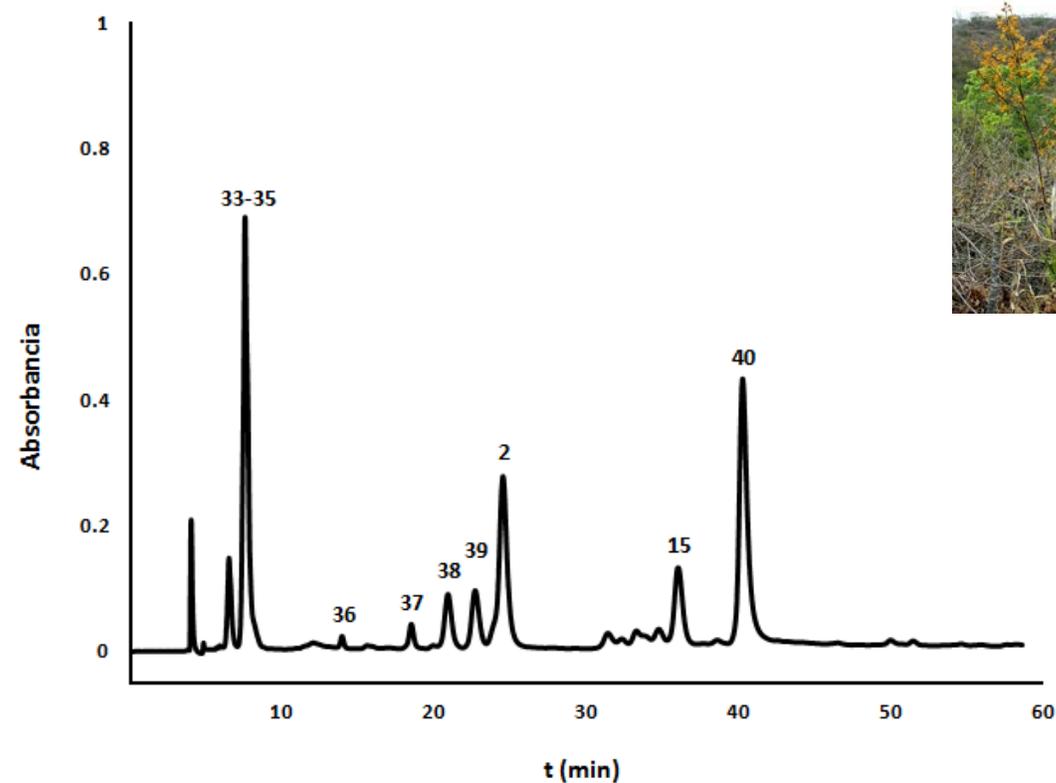
**Cuadro 7.** Resultados experimentales de las curvas de calibración del efemerantol B (40) para evaluar la linealidad del sistema.

Réplica	µg/mL	ABC
1	0.5	2081206
2	0.5	2453551
3	0.5	2570955
4	0.5	2617563
5	0.5	3178209
6	0.5	3229713
1	1	5078551
2	1	5405720
3	1	5355916
4	1	5862321
5	1	6235664
6	1	5907583
1	2.5	16130256
2	2.5	13162283
3	2.5	15572351
4	2.5	14587989
5	2.5	15384315
6	2.5	15015769
1	5	30022534
2	5	30648484
3	5	30722704
4	5	29926813
5	5	31626706
6	5	31037711
1	7.5	46352793
2	7.5	44933457
3	7.5	47774108
4	7.5	50934411
5	7.5	48230225
6	7.5	44536876
1	10	59289211
2	10	61244440
3	10	62419987
4	10	62300468
5	10	62892024
6	10	59748550

## (A) Muestra de mercado



## (B) Muestra de campo



**Figura 13.** Perfiles cromatográficos por CLAR correspondientes al extracto orgánico de *C. macrobulbon*. A) Material vegetal comprado en mercados del DF (CM-2). B) Muestra de material colectado en campo (CM-1).

El análisis estadístico de los datos, mediante un modelo de regresión lineal, permitió estimar el siguiente modelo matemático:

$$\text{Área (y)} = 6234082.326x - 465213.1359$$

Para evaluar la calidad del ajuste del modelo se calcularon los coeficientes de correlación y de determinación. Como se indica en el **Cuadro 8** el coeficiente de correlación es de 0.9967, lo que demuestra que existe una relación lineal entre las variables.

Por otra parte, el coeficiente de determinación calculado permite inferir que el 99.3% de los datos se encuentran explicados por el modelo propuesto; por último, el intervalo de confianza calculado para la ordenada al origen incluye el cero, mientras que el intervalo para la pendiente no lo contiene. Con base en estos resultados se concluyó que el sistema es lineal en el rango de concentraciones evaluado.

### ***Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)***

El límite de detección de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables. Ambos parámetros se determinaron a partir de una curva de calibración utilizando una serie de diluciones preparadas a partir de una solución estándar con una concentración de 10 µg/mL y cinco muestras blanco. Los valores de LD y LC calculados fueron de 0.78 y 2.58 µg/mL, respectivamente.

### *Linealidad del método y exactitud*

La linealidad del método se evaluó a partir de las curvas de calibración preparadas utilizando tres diferentes concentraciones del estándar que se adicionó a la matriz de trabajo, que se encontraban en el intervalo entre 0.5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ; que representan el 50–150% de los analitos ensayados. En el **Cuadro 9** se muestran los resultados obtenidos al evaluar la exactitud del método.

**Cuadro 8.** Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del sistema del efemerantol B (**40**).

Estadístico	Efemerantol B ( <b>40</b> )
pendiente ( <b>b1</b> )	6234082.326
ordenada al origen ( <b>b0</b> )	-465213.1359
coeficiente de correlación ( <b>r</b> )	0.99672
coeficiente de determinación ( <b>r<sup>2</sup></b> )	0.9934
IC ( <b><math>\beta_1</math></b> )	6109442.3 - 6358722.4

Los parámetros determinados en las curvas de regresión ajustada fueron  $1 \times 10^8 x - 3 \times 10^6$ ,  $y = 0.9912x + 1.7047$ ,  $r^2 = 0.9994$ . Estos resultados indican que el método desarrollado es lineal y cumple con los criterios de aceptación ( $\beta_0 = 0$ ,  $\beta_1 \neq 0$ ,  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.998$  y  $CV_{y/x} \leq 3\%$ ) establecidos en la norma internacional ICHQ 2R1 (2005).

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de concentración del analito en la matriz enriquecida, obtenido experimentalmente, y el valor

## 6. Resultados y discusión

de referencia. Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en el **Cuadro 9**.

Estos resultados se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%). Por lo tanto, el método es lineal dentro del rango de concentraciones analizadas. La pendiente calculada es diferente de cero y el coeficiente de determinación de los datos, se encuentran explicado por el modelo de regresión lineal.

**Cuadro 9.** Resultados experimentales de la curva de calibración del efemerantol B (40) para evaluar la linealidad y exactitud del método.

réplica	nivel	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	recobro (%)
1	150	375	51252224.5	379.4	101.2
2	150	375	50608943.5	374.6	99.9
3	150	375	50062129.5	370.4	98.8
4	150	375	50486985.5	373.6	99.6
5	150	375	50062129.5	370.4	98.8
6	150	375	50486985.5	373.6	99.6
1	100	250	34343734.5	252.1	100.9
2	100	250	34522629.5	253.5	101.4
3	100	250	33680936.5	247.2	98.9
4	100	250	33764873.5	247.8	99.1
5	100	250	33786897.5	248.0	99.2
6	100	250	33416360.5	245.2	98.1
1	50	125	17721320.5	127.0	101.6
2	50	125	17820464.5	127.8	102.2
3	50	125	17328745.5	124.1	99.3
4	50	125	17552127.5	125.8	100.6
5	50	125	17503397.5	125.4	100.3
6	50	125	17482266.5	125.2	100.2

### ***Precisión***

La precisión del método analítico se determinó mediante diferentes experimentos conducentes a evaluar la precisión del sistema (repetitividad), es decir, la fidelidad de los valores experimentales de un mismo parámetro medidos bajo idénticas condiciones experimentales, la precisión del método y la precisión intermedia (reproducibilidad). Esta última se refiere a la fidelidad de los valores experimentales de una misma cuantificación, medida bajo diferentes condiciones experimentales. El valor calculado de DER para el compuesto **40** es igual a 1.29 (menor al 2.0%), por lo tanto el sistema es preciso.

Finalmente, la reproducibilidad del método se evaluó mediante el análisis por triplicado de tres diferentes soluciones homogéneas que contenían al compuesto **40**. Este análisis se realizó por dos analistas, en dos diferentes días. En todos los casos, la DER fue menor al 1.5%. El conjunto de resultados descritos permite concluir que el método desarrollado es preciso.

### **6.1.1.3 Identificación de los compuestos volátiles de *C. Macrobulbon***

Con la finalidad de completar el perfil químico de la droga cruda de *C. macrobulbon*, se identificaron los principales compuestos volátiles mediante la técnica de CG-EM, los cuáles se extrajeron por HS-SPME. Esta técnica permite el análisis de muestras pequeñas, y no requiere el uso de disolventes, lo cual permite tener un perfil más completo o complementario de los compuestos volátiles presentes en el material vegetal, ya sea fresco o seco. Los compuestos volátiles de *C. macrobulbon* más afines a cada una de las fases sólidas utilizadas en esta prueba corresponden al: eucaliptol (**41**), hexanal (**42**), Z-2-

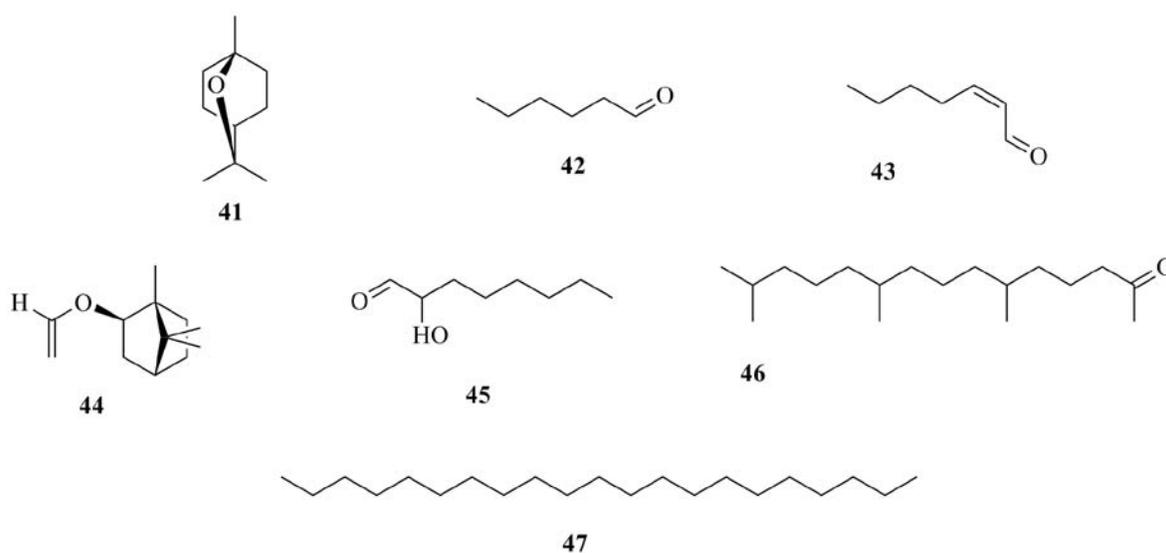
## 6. Resultados y discusión

heptenal (**43**), formiato de isobornilo (**44**), 1-nonen-3-ol (**45**), 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (**46**) y eicosano (**47**) (**Cuadro 10, Figura 14**).

**Cuadro 10.** Compuestos volátiles identificados en los pseudobulbos de *C. macrobulbon*.

COMPUESTO	IR <sup>a</sup>	Fase sólida		
		DVB/CAR/PDMS	CAR/PDMS	PDMS
		Porcentaje de área <sup>b</sup>		
Eucaliptol ( <b>41</b> )	946	42.3		
Hexanal ( <b>42</b> )	902	11.3	45.50	
2-Heptenal-Z- ( <b>43</b> )	933	9.8		
Formiato de isobornilo ( <b>44</b> )	1301		15.6	29.59
1-Nonen-3-ol ( <b>45</b> )	850		13.64	
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona ( <b>46</b> )	1866			60.80
Eicosano ( <b>47</b> )	934			9.63

<sup>a</sup> Índice de retención de los compuestos determinado en una columna DB-5  
<sup>b</sup> Los porcentajes fueron calculados mediante el análisis del ABC de los cromatogramas obtenidos para cada análisis



**Figura 14.** Principales compuestos volátiles identificados en los pseudobulbos de *C. macrobulbon*.

### 6.1.2 Pruebas de identidad botánica

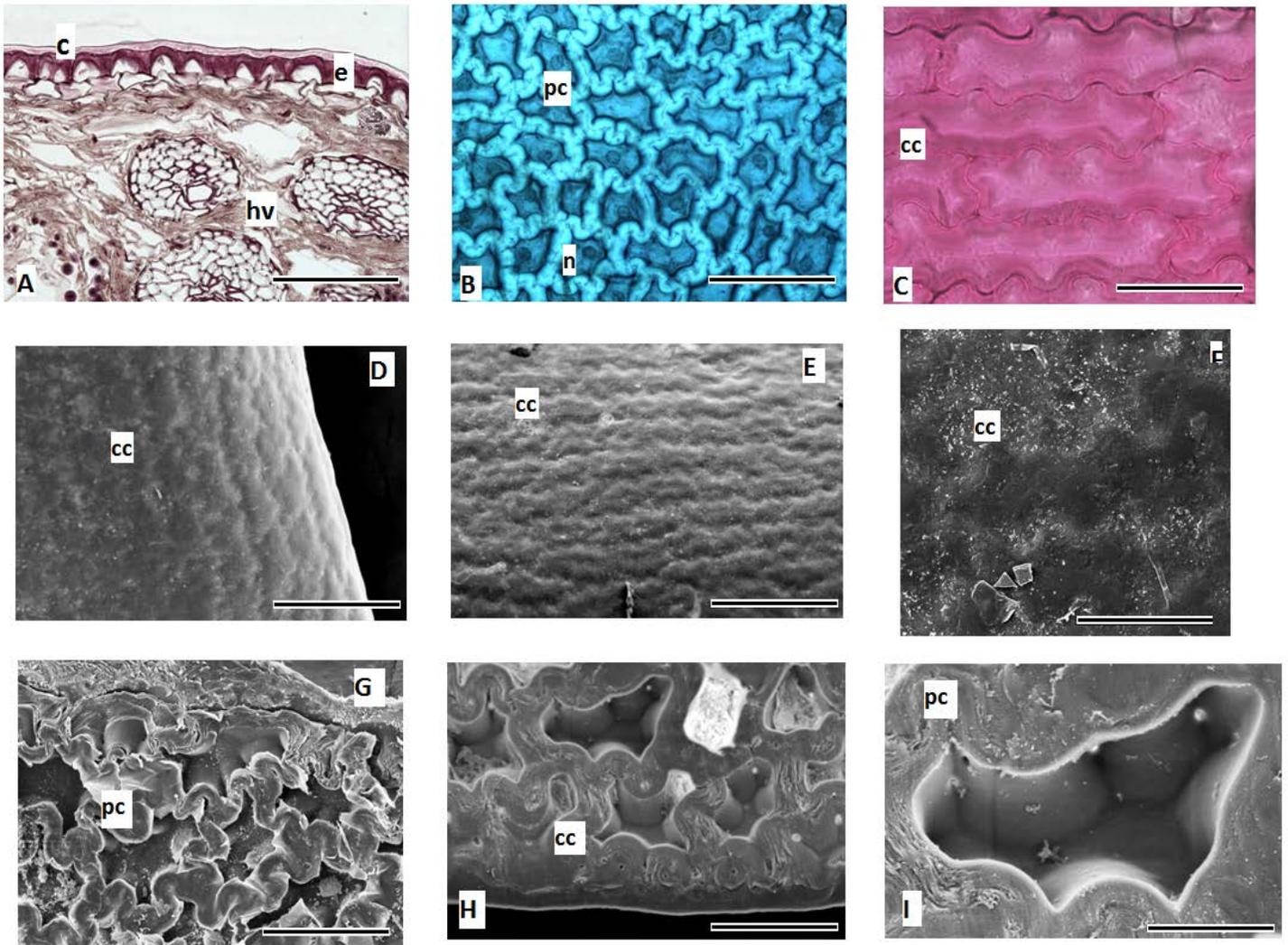
#### **Anatomía de *C. macrobulbon***

Parte de los parámetros de calidad es el establecimiento de la identidad botánica de las drogas crudas vegetales, por lo que es de gran importancia reconocer y describir los caracteres anatómicos e histológicos que permitan reconocer y diferenciar una especie genuina de una especie contaminante, sustituyente y/o adulterante. Es por eso que mediante la aplicación de técnicas histológicas y de microscopía se reconocieron las principales características para las partes aéreas de *C. macrobulbon*, que a continuación se describen.

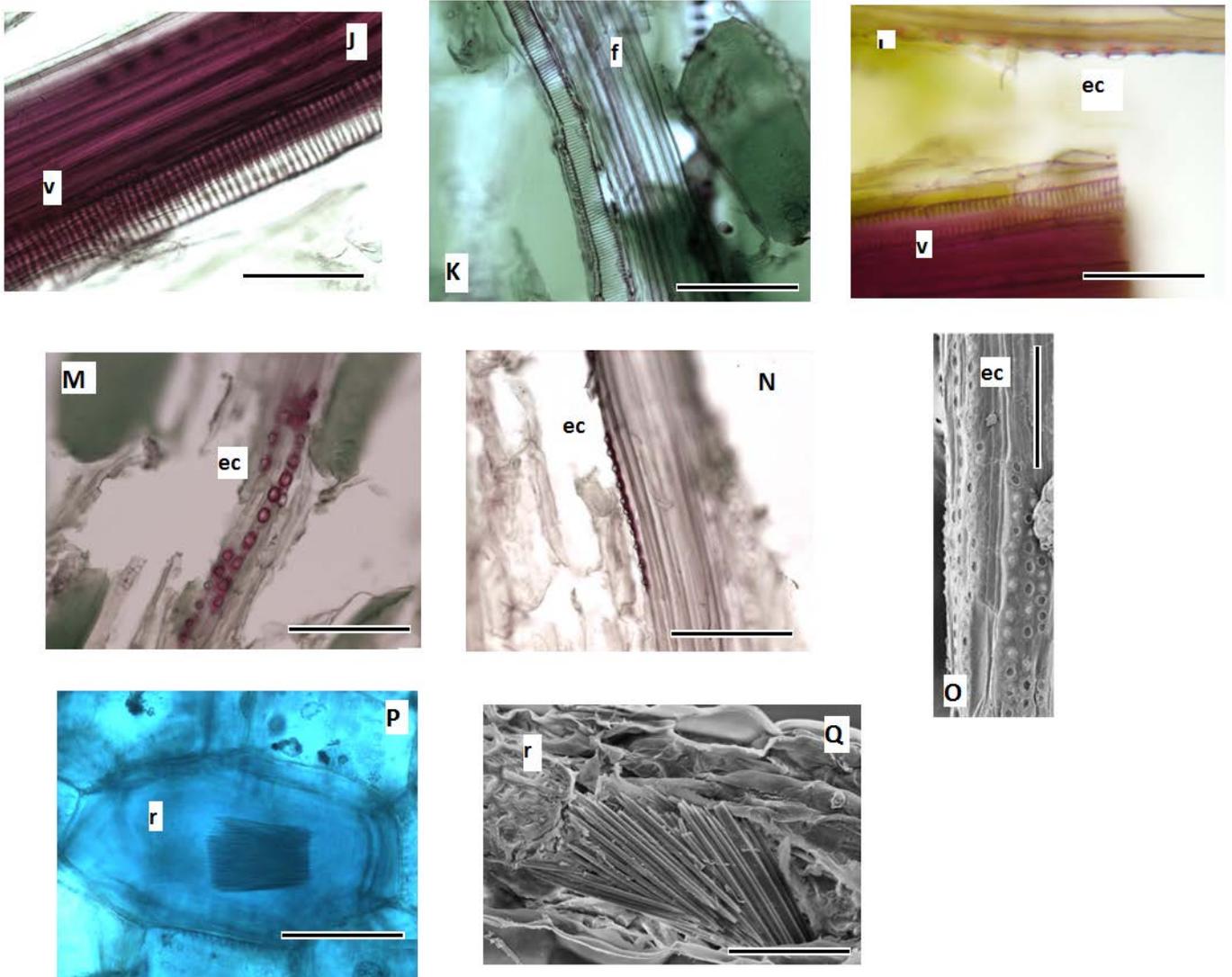
#### **Caracterización anatómica e histológica**

Los pseudobulbos de *C. macrobulbon* presentan cutícula gruesa, epidermis con paredes engrosadas y células crenadas que se hacen más evidentes en un corte en fresco y tinción con azul de metileno. Este tipo de células no habían sido descritas anteriormente para el género *Cyrtopodium*. Los pseudobulbos de *C. macrobulbon* también presentan estomas anomocíticos, y cámara estomática amplia. En el córtex se encuentran haces vasculares dispersos, con vasos de ornamentación helicoidal y fibras asociadas a idioblastos (estegmatos cónicos). Las hojas presentan cutícula delgada, células epidérmicas aplanadas, mesófilo indiferenciado, haces vasculares colaterales, con fibras asociadas a idioblastos (**Figura 15**).

La presencia y descripción por vez primera de células epidérmicas crenadas, representa una aportación de gran importancia en la caracterización anatómica e histológica de la especie *C. macrobulbon*, lo cual será una herramienta de gran utilidad en el establecimiento de las pruebas de calidad de su droga cruda.



**Figura 15.** Pseudobulbo: **A** (barra de escala, 50  $\mu$ ), corte transversal; cutícula (c), epidermis (e), haces vasculares (hv) distribuidos en el córtex siguiendo la forma del pseudobulbo. **B** (barra de escala 100  $\mu$ ), corte paradermal; células crenadas (cc) con pared celular engrosada. **C** (barra de escala 80  $\mu$ ), corte paradermal, células crenadas (cc). **D** (barra de escala 200  $\mu$ ). **E** (barra de escala 200  $\mu$ ). **F** (barra de escala 50  $\mu$ ). **G** (barra de escala 50  $\mu$ ). **H** (barra de escala 50  $\mu$ ). **I** (barra de escala 200  $\mu$ ) (MEB); paredes celulares (pc) engrosadas.



**Figura 15.** (continuación). **J, K, L, M, N** (barra de escala 50  $\mu$ ), corte longitudinal; fibras (f), vasos (v) con ornamentación helicoidal y estegmatos cónicos (ec). **O** (MEB), estegmatos cónicos (ec) y la base de las células de donde se desprenden. **P** corte longitudinal, rafidios (r). **Q** (barra de escala 50  $\mu$ ) (MEB) rafidios (r).

### 6.1.3 Pruebas de identidad genética

#### Código de barras genético

El uso de marcadores moleculares para establecer la identidad genética de las plantas medicinales es una herramienta de reciente aplicación y de gran importancia para el control de calidad de los recursos vegetales medicinales. Para el presente trabajo resultó exitoso el uso de los genes de cloroplasto *matK* y *rbcL* (que codifica para la subunidad grande de la enzima RuBisCO) que permitieron la confirmación del material vegetal como perteneciente a la especie *C. macrobulbon*, tanto de la muestra de campo (**CM-1**) como de la muestra de mercado (**CM-2**).

El empleo de estos genes de cloroplasto permite la correcta identificación a nivel de especie, con base en la suficiente variación que presentan, tal como lo reportan Lahaye *et al.*, 2008; Ford *et al.*, 2009; y Newmaster *et al.*, 2009, para angiospermas. Las secuencias de ambos genes (Apéndice II) se depositaron en la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática [EMBL por sus siglas en inglés (ebi.ac.uk)].

### 6.1.4 Pruebas de seguridad

#### Inocuidad de las especies *C. macrobulbon* y *S. fasciculata*

Las pruebas de inocuidad son de suma importancia en la investigación de productos naturales. El hecho de que los humanos consuman plantas medicinales, puede implicar un riesgo ya sea a corto o a largo plazo, que puede ir desde una intoxicación leve hasta la muerte en los casos más extremos. Por lo tanto, una prueba preclínica fundamental es el

establecimiento de los parámetros de seguridad de las drogas crudas, con el fin de brindar seguridad a los consumidores.

Los resultados obtenidos en el establecimiento de la inocuidad, tanto de la fracción orgánica de *C. macrobulbon* como de la infusión de *S. fasciculata* demuestran que ambas drogas crudas son inocuas hasta la dosis más alta evaluada (5000 mg/kg). Por lo tanto, el consumo de estas plantas no representa un peligro potencial de intoxicación aguda según lo descrito por Lorke (1986).

### 6.1.5 Pruebas de eficacia

#### 6.1.5.1 Potencial antimicrobiano de *C. macrobulbon*

Los usos etnomédicos de *C. macrobulbon* sugieren su potencial actividad antibimicrobiana, la cual se evaluó contra una batería de organismos Gram positivos y Gram negativos mediante la técnica de microdilución con el reactivo de color MTT (Appendino *et al.*, 2008). Los resultados muestran que la fracción orgánica de la infusión de *C. macrobulbon* es la única que presenta actividad inhibitoria de crecimiento contra organismos Gram + (*B. subtilis* y *S. aureus*), con una CMI de 512 µg/mL (**Cuadro 11**).

Estos resultados muestran una baja actividad antibacteriana del extracto orgánico de *C. macrobulbon* y nula en el caso de la infusión. Por lo tanto, la eficacia para el tratamiento del “mal de orín” no se explicaría en función de un efecto antibacteriano de la especie *C. macrobulbon*. Cabe destacar que en los antecedentes de los estudios de esta planta no se ha comprobado la actividad antibacteriana de los principales compuestos presentes en el extracto orgánico de la especie en cuestión.

**Cuadro 11.** Evaluación de la actividad antibacteriana de la infusión y su fracción orgánica de *C. macrobulbon*.

Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Infusión	Fracción orgánica
<i>B. subtilis</i>	NA	512
<i>S. aureus</i>	NA	512
<i>E. coli</i>	NA	NA
<i>S. typhi</i>	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA

NA= No activo

### 6.1.5.2 Potencial antinociceptivo de *C. macrobulbon*

El uso de *C. macrobulbon* para el tratamiento de “mal de orín” sugiere un potencial efecto antinociceptivo. Para evaluar esta actividad se debe seleccionar un modelo que cumpla con ciertas características como especificidad, sensibilidad, validez, confiabilidad y reproducibilidad (Le Bars *et al.*, 2001).

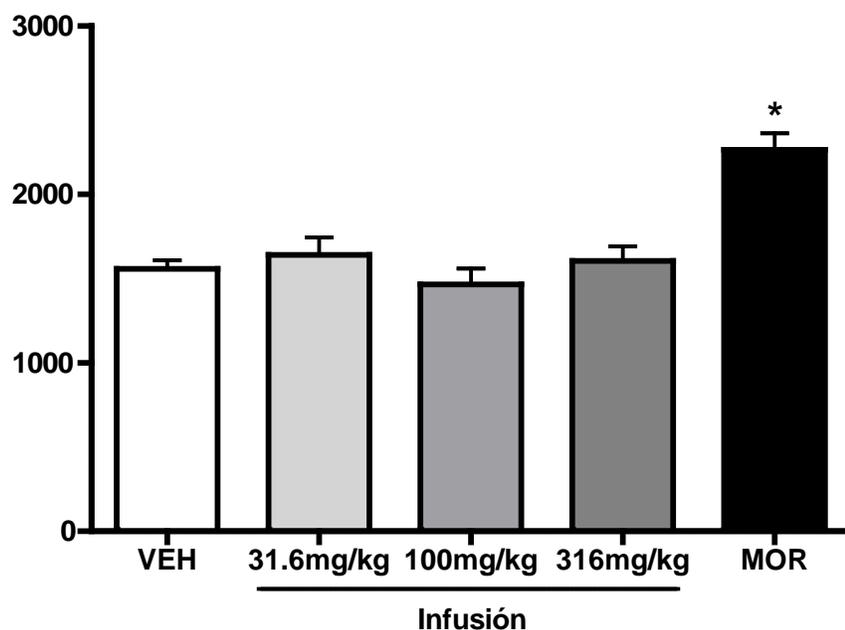
En el presente estudio se evaluó el potencial antinociceptivo asociado con dolor de tipo central y periférico de la droga cruda de *C. macrobulbon* utilizando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal, respectivamente y de manera complementaria.

#### Modelo de placa caliente

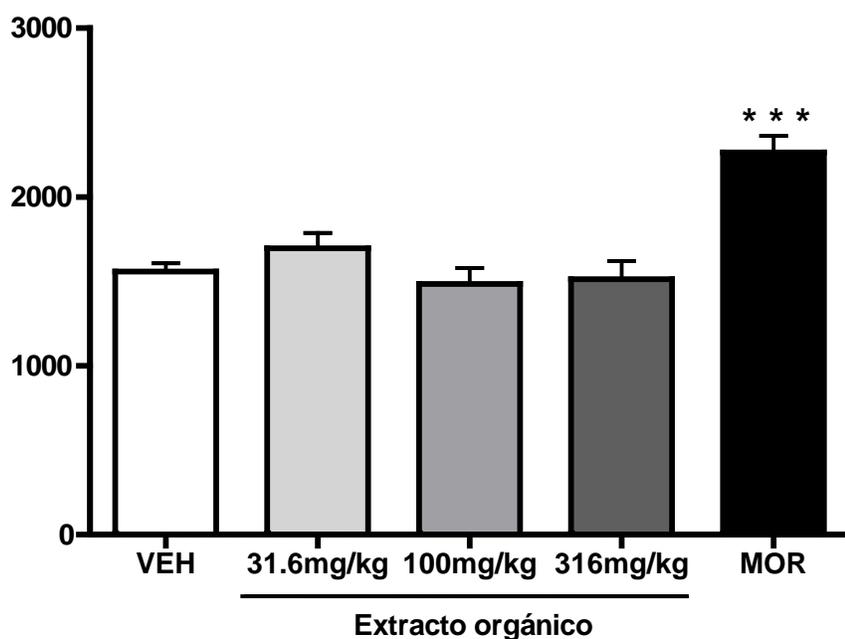
En este bioensayo la aplicación de un estímulo térmico a los ratones, produce una respuesta que se caracteriza por el levantamiento o lamedura de una o ambas patas traseras y/o un brinco hacia afuera del sistema cilindro-placa caliente. Estas respuestas son de origen supraespinal (Le Bars *et al.*, 2001).

## 6. Resultados y discusión

La administración de extracto orgánico e infusión de la droga cruda de *C. macrobulbon* a las dosis de 10.0, 31.6, 100, 316 y 600 mg/kg (*p.o.*), no provocó un efecto antinociceptivo importante con respecto al control positivo morfina (MOR) ( $*p < 0.05$ ) (Figuras 16 y 17). Estos resultados indican que los principales compuestos presentes en los pseudobulbos de *C. macrobulbon*, no tienen una actividad analgésica a nivel de sistema nervioso central.



**Figura 16.** Efecto antinociceptivo de la infusión de *C. macrobulbon*. Modelo de placa caliente. **VEH:** solución salina isotónica (NaCl 0.9%), **MOR:** morfina (5 mg/kg). Cada barra representa el promedio + EEM para los animales de cada grupo ( $n=8$ )  $*p < 0.05$ .



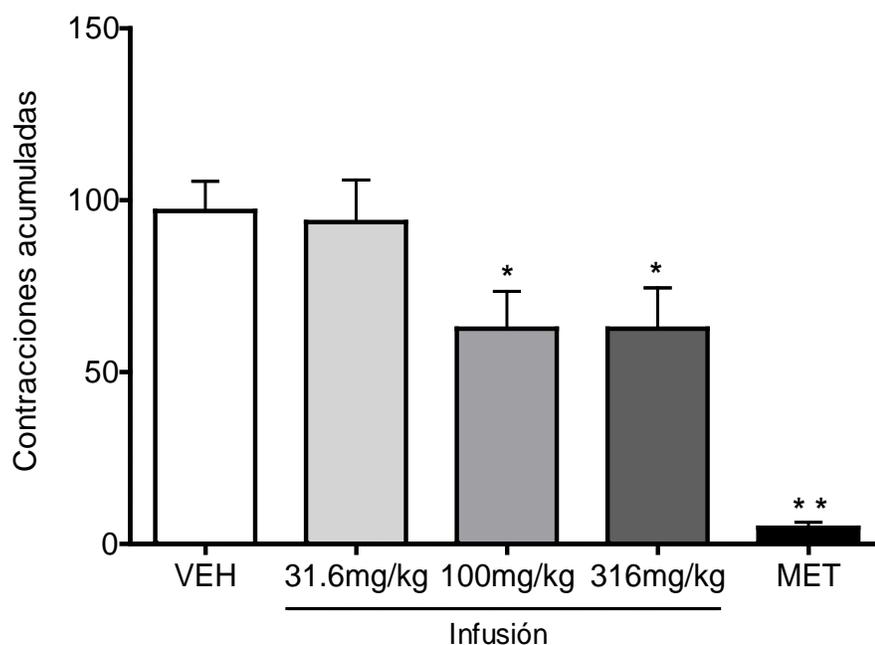
**Figura 17.** Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *C. macrobulbon*. Modelo de placa caliente. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MOR: morfina 5 (mg/kg). Cada barra representa el promedio + EEM para los animales de cada grupo ( $n=8$ ) \*\*\* $p < 0.05$ .

### Modelo de estiramiento abdominal

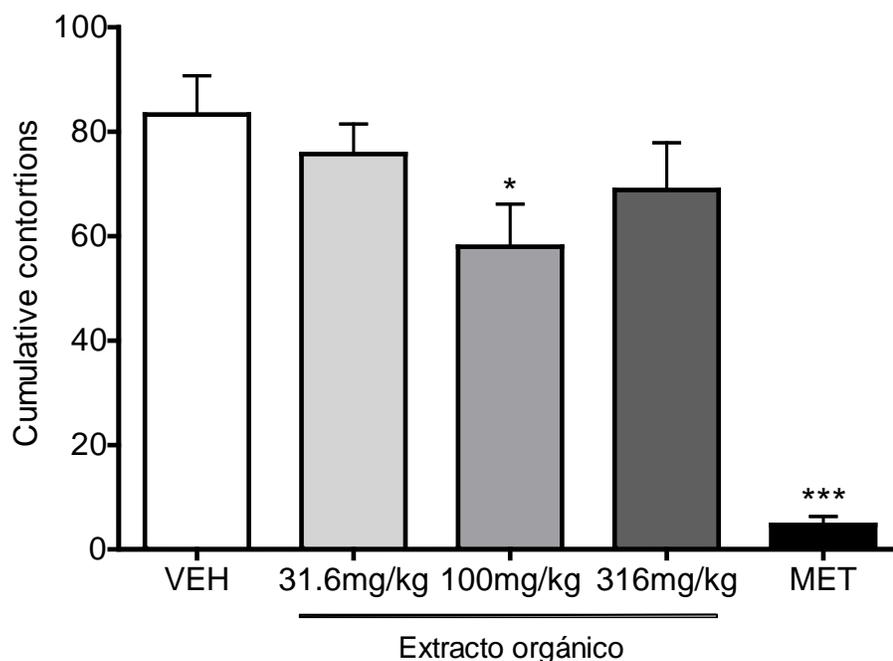
Esta prueba mide el potencial de los tratamientos para contrarrestar la irritación provocada por la administración de una solución de ácido acético (0.6% v/v) a los ratones. La solución algésica induce una reacción inflamatoria caracterizada por contracciones de la musculatura abdominal, extensiones de las extremidades inferiores y el estiramiento del cuerpo. Los estiramientos abdominales generados por la administración intraperitoneal de agentes químicos que irritan las membranas serosas, se consideran actos reflejos que evidencian dolor peritoneo visceral e inflamación, y permiten la evaluación del efecto producido por sustancias analgésicas a nivel periférico.

## 6. Resultados y discusión

Aunque el modelo es inespecífico, es sensible y las dosis efectivas medias que con él se calculan, pueden extrapolarse a humanos (Atta y El-Sooud, 2004). Los resultados obtenidos en este bioensayo permiten observar que el extracto acuoso inhibe las contracciones a las dosis de 100 y 316 mg/kg (35% de actividad inhibitoria de cada uno) con respecto al control positivo metamizol (MET) (**Figura 18**). Para el extracto orgánico se observó un efecto importante a la dosis de 100 mg/kg (30% de actividad inhibitoria) con respecto al control positivo (MET) (**Figura 19**).



**Figura 18.** Efecto antinociceptivo de la infusión de *C. macrobulbon* en el modelo de estiramiento abdominal. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MET: metamizol (100 mg/kg). Los datos representan  $\pm$  SEM ( $n=6$ ) \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$ .



**Figura 19.** Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *C. macrobulbon* en el modelo de estiramiento abdominal. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MET: metamizol (100 mg/kg). Los datos representan  $\pm$  SEM ( $n=6$ ) \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

Los resultados positivos al evaluar antinocicepción con el método de estiramiento abdominal permitieron observar un efecto positivo por un mecanismo de tipo periférico a diferencia del modelo de placa caliente que lo evalúa sobre sistema nervioso central y para el que se obtuvieron resultados negativos. La administración de ácido acético vía *i.p.* provoca un cambio en el pH intracelular, lo que conlleva a una despolarización celular y un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula. De modo tal que al haber más  $\text{Ca}^{2+}$  se favorece la formación del complejo calcio-calmodulina (CaM) lo que se traduce en estiramientos de la zona abdominal.

La disminución en el número de estiramientos provocada por la administración de los extractos de *C. macrobulbon*, podría explicarse, en parte, por la presencia de los

compuestos mayoritarios como el gigantol (**2**), la batatasina (**15**) y el efemerantol B (**40**), así como el monoterpenoide 1,8-cineol (**41**). Estos compuestos poseen actividad antinociceptiva y antiinflamatoria previamente reportadas (Déciga-Campos, *et al.*, 2007; Kanekar *et al.*, 2013; Silva, *et al.*, 2003).

De manera particular, el gigantol (**2**) posee un efecto relajante de músculo liso mediado por el sistema (óxido nítrico) NO/GMP cíclico y por regulación de la proteína calmodulina (Hernández-Romero *et al.*, 2004). Dicha actividad inhibitoria de la calmodulina podría estar actuando en dos vías; por un lado evitando la respuesta de estiramiento abdominal y por el otro, favoreciendo la relajación del musculo liso entérico (Harvey, 2011).

Cabe mencionar que el compuesto marcador **40** posee actividad antioxidante, la cual podría contrarrestar procesos pro-inflamatorios activados por citoquinas tales como 1L-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y lipopolisacaridos (Kanekar *et al.*, 2013).

El efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *C. macrobulbon* aún no se ha determinado, sin embargo los resultados sugieren que la eficacia para contrarrestar la sintomatología del mal de orín, pudiera estar relacionada con la actividad antinociceptiva demostrada en el presente trabajo.

### 6.1.6 Mapa de distribución potencial

La mayor parte de las plantas medicinales que se venden en nuestro país son de origen silvestre, así que un aspecto importante que forma parte del uso racional es el conocimiento de su abundancia y distribución en territorio mexicano. A este respecto, una importante contribución fue la generación de los mapas de distribución de las especies *C.*

## 6. Resultados y discusión

*macrobulbon* y *S. fasciculata*. Con este fin se utilizó una base de datos obtenida luego de una depuración taxonómica, así como la validación de las coordenadas geográficas, la cual estuvo constituida por 92 registros de esta especie, los que a su vez se obtuvieron de diferentes fuentes, tanto de herbario como de bases de datos electrónicas de acceso público.

El resultado fue la generación de un mapa (**Figura 20**) que permite observar que la especie *C. macrobulbon* es de amplia distribución en nuestro país, (en 16 de los 32 estados federales) incluso en áreas donde no ha sido colectada, pero que presentan condiciones abióticas similares a los lugares donde si existen colectas de herbario que confirman su presencia. Por otro lado, el uso del algoritmo predictivo Maxent resultó de gran utilidad para inferir las áreas de distribución potencial de la especie con un valor ABC de 0.944.



**Figura 20.** Mapa de distribución potencial (Maxent, ABC=0.944) para *C. macrobulbon*. Los puntos amarillos corresponden a los registros de presencia de la especie. El área morada corresponde a las zonas de posible distribución con base en sus características bióticas y abióticas.

### 6.2 *Scaphyglottis fasciculata* Hook.

#### 6.2.1 Pruebas de identidad química

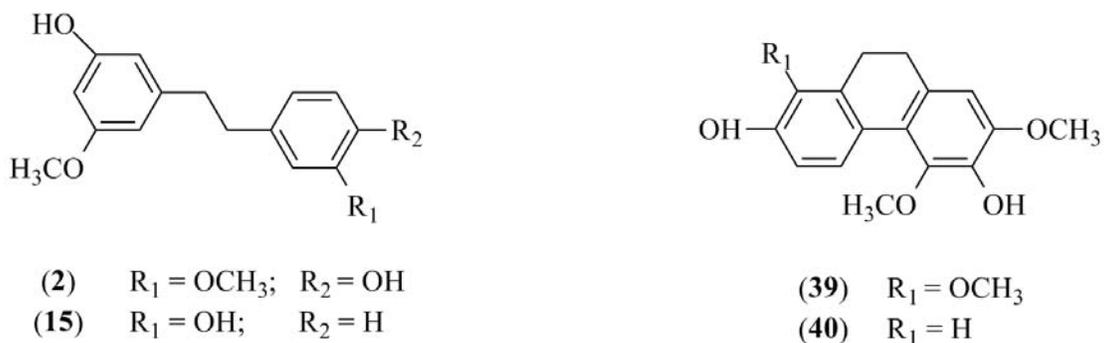
##### Análisis cromatográficos

Para la especie *S. fasciculata* se buscó establecer el perfil cromatográfico por CLAR e identificar los principales compuestos presentes en el extracto orgánico de la especie, así como identificar los principales compuestos volátiles de la droga cruda. Esto con la finalidad de complementar los estudios previamente realizados en nuestro grupo de trabajo.

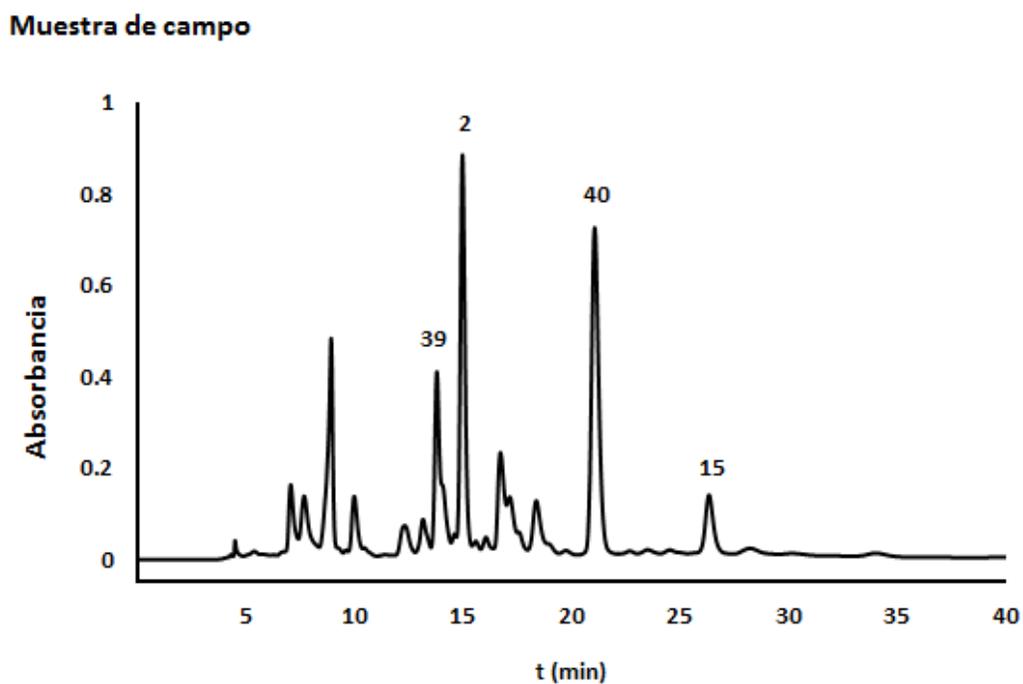
##### 6.2.1.1 Identificación de los principales compuestos presentes en la fracción orgánica de la infusión de *S. fasciculata*

Se estableció un método óptimo para la correcta separación e identificación de los principales compuestos presentes en la fracción orgánica de la infusión de *S. fasciculata* que corresponden a confusarina (**39**,  $T_R$  13. min), gigantol (**2**,  $T_R$  14.98 min), efemerantol B (**40**,  $T_R$  21.6 min) y batatasina III (**15**,  $T_R$  26.3 min), (**Figura 21**).

Los principales compuestos presentes en la fracción orgánica de la infusión corresponden a los reportados por Estrada (1999) y Déciga-Campos (2007), lo que permite proponer un método cromatográfico por CLAR en fase normal como una herramienta de gran utilidad para el establecimiento de las pruebas de identidad química para la droga cruda de *S. fasciculata*. El cromatograma obtenido se muestra en la **Figura 22**.



**Figura 21.** Principales compuestos identificados en la fracción orgánica de la infusión de *S. fasciculata*.



**Figura 22.** Cromatograma de la fracción orgánica obtenida a partir de la infusión de *S. fasciculata*. Los compuestos corresponden a: confusarina (39), gigantol (2), efemerantol B (40) y batatasina III (15).

6.2.1.2 Establecimiento de los compuestos volátiles de *S. fasciculata*

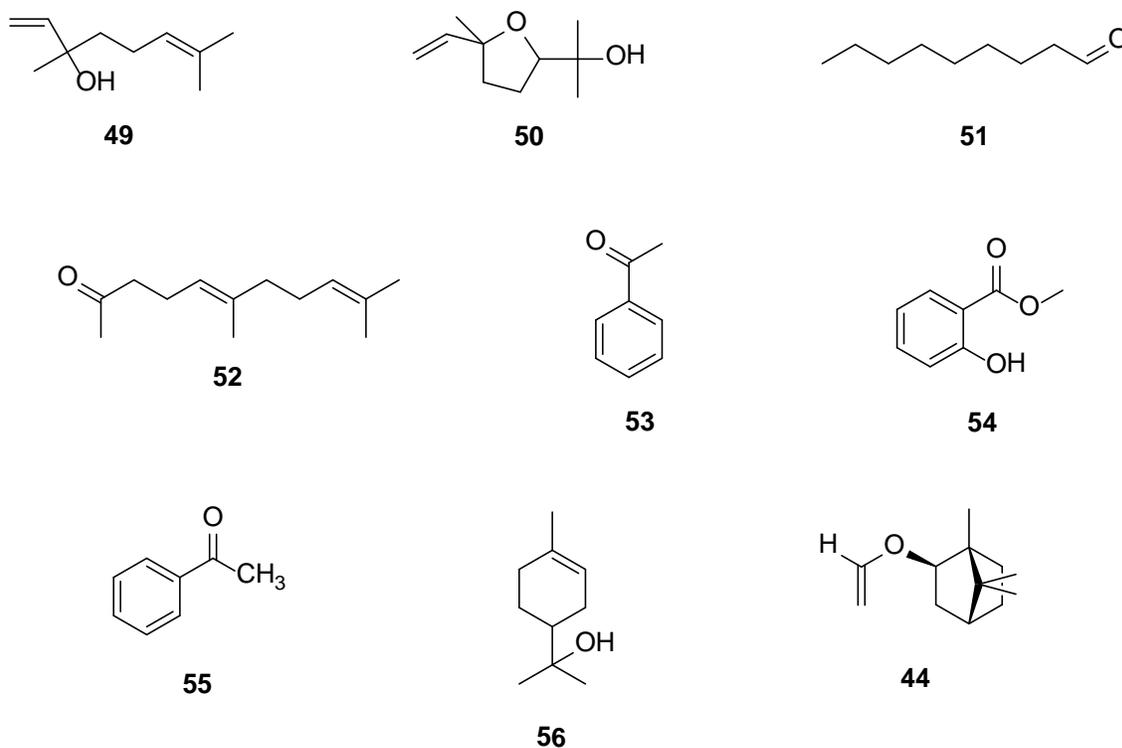
Los principales compuestos volátiles identificados en las partes aéreas de *S. fasciculata* por medio de la técnica de HS-SPME así como el análisis del aceite esencial, corresponden a: linalool (**49**), óxido de *cis*-linalol (**50**), nonanal (**51**), (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona (**52**), benzaldehído (**53**), salicilato de metilo (**54**), acetofenona (**55**), *p*-ment-1-en-8-ol (**56**) y formiato de isobornilo (**44**) (**Cuadro 12**, **Figura 23**). La identificación de los compuestos volátiles de *S. fasciculata* permitió complementar las pruebas de identidad química, previamente establecidas en nuestro grupo de trabajo.

**Cuadro 12.** Compuestos volátiles mayoritarios identificados en las partes aéreas de *S. fasciculata*.

	IR <sup>a</sup>	Fase sólida		
		Aceite esencial	PDMS	DVB/CAR/PDMS
		Porcentaje de área <sup>b</sup>		
Linalol ( <b>49</b> )	908	6.02		11.63
<i>cis</i> -Linalolóxido ( <b>50</b> )	847	5.41	4.9	
Nonanal ( <b>51</b> )	922	4.62		5.6
( <i>E</i> )-6,10-Dimetil-5,9-undecadien-2-ona ( <b>52</b> )	919	4.16	25.6	6.21
Benzaldehído ( <b>53</b> )	937	2.86		25.48
Salicilato de metilo ( <b>54</b> )	885	1.41		
Acetofenona ( <b>55</b> )	960	1.36		
<i>p</i> -menth-1-en-8-ol ( <b>56</b> )				12.49
Formiato de isobornilo ( <b>44</b> )				1.03

<sup>a</sup> Índice de retención de los compuestos determinado en una columna DB-5

<sup>b</sup> Los porcentajes fueron calculados mediante el análisis del ABC de los cromatogramas obtenidos para cada análisis



**Figura 23.** Principales compuestos volátiles identificados en los pseudobulbos de *S. fasciculata*.

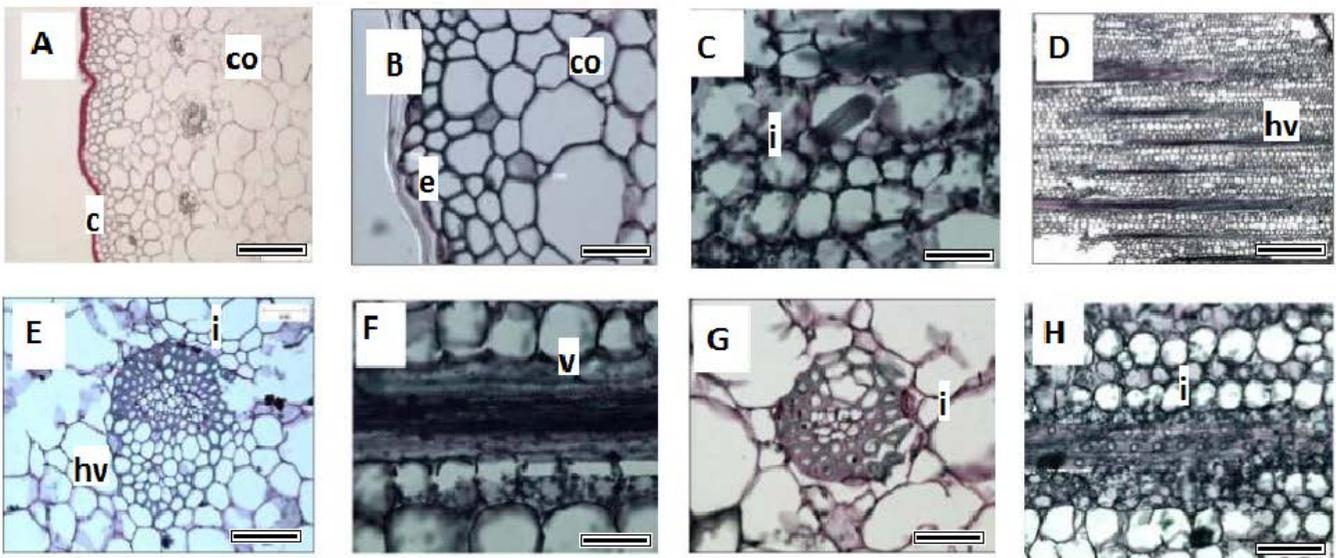
### 6.2.2 Pruebas de identidad botánica

#### Anatomía de *S. fasciculata*

El establecimiento de las pruebas de identidad botánica de la especie *S. fasciculata* fue otro de los objetivos de este proyecto, con la finalidad de complementar las pruebas de calidad (identidad). Las principales características histológicas de los pseudobulbos de esta orquídea se describen a continuación.

### Caracterización anatómica e histológica de los pseudobulbos de *S. fasciculata*

El pseudobulbo presenta una cutícula engrosada con gran contenido de lípidos, de un grosor aproximado a 10  $\mu\text{m}$ . Epidermis con células isodiamétricas de diferentes tamaños. Córtex con células parenquimáticas de paredes delgadas y espacios intercelulares. Cristales tipo rafidios en células de parénquima. Haces vasculares colaterales (floema abaxial y xilema adaxial) dispersos. Elementos de vasos con punteaduras. Fibras acompañantes del floema con paredes engrosadas. Idioblastos (estegmatos cónicos) rodeando a los haces vasculares (**Figura 24**).



**Figura 24.** Micrografías de pseudobulbo de *S. fasciculata* bajo diferentes técnicas de tinción. **A** corte transversal (barra de escala 100  $\mu$ ), cutícula engrosada con contenido lipídico. **B** corte transversal (barra de escala 200  $\mu$ ), epidermis (e), córtex (co). **C** (barra de escala 40  $\mu$ ), rafidios (ra). **D** (barra de escala 300  $\mu$ ), haces vasculares (hv). **E** (barra de escala 100  $\mu$ ), haz vascular (hv) rodeado por idioblastos (i). **F** (barra de escala 100  $\mu$ ) elemento de vaso (v) con punteaduras. **G** (barra de escala 40  $\mu$ ), idioblastos (i). **H** (barra de escala 100  $\mu$ ), idioblastos (i).

### 6.2.3 Mapa de distribución

#### Mapa de distribución potencial

En el presente trabajo se estableció también un mapa de distribución potencial de *S. fasciculata* mediante una base de datos de 130 registros, los cuales se obtuvieron de la consulta de herbarios (MEXU y AMO) y bases electrónicas de acceso público. Los resultados muestran una distribución restringida a los estados de Veracruz, Oaxaca y Chiapas lo cual coincide con las características de hábito de esta planta que es epífita de los árboles de sombra en los cafetales, entre ellos la especie *Inga vera*; así como zonas de distribución potencial en regiones altas de Colima, Guerrero y Michoacán.

En el mapa (**Figura 25**) podemos observar que los puntos verdes corresponden a los registros de ejemplar de herbario con coordenadas verificadas. Las zonas marcadas en color rojo corresponden a las áreas de distribución potencial para la especie, las cuáles cuentan con características bióticas y abióticas similares a aquellas donde se registra su presencia.



**Figura 25.** Mapa de distribución potencial (Maxent, ABC=0.984) para *S. fasciculata*. Los puntos verdes corresponden a los registros de presencia de la especie con coordenadas verificadas. Las zonas marcadas en color rojo corresponden a las áreas de distribución potencial para la especie, con base en sus características bióticas y abióticas.

### 7. CONCLUSIONES

∅ En el presente trabajo se logró el establecimiento de pruebas selectas de calidad, eficacia y seguridad de la orquídea medicinal *C. macrobulbon*.

∅ Mediante la aplicación de técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas se logró el establecimiento de las pruebas de identidad química del extracto orgánico y la fracción orgánica de la infusión de la especie de *C. macrobulbon*.

∅ Los compuestos mayoritarios presentes en el extracto orgánico son: *n*-hexacosil-*trans-p*-cumarato, *n*-octacosil-*trans-p*-cumarato, y *n*-triacontil-*trans-p*-cumarato (**33-35**), alcohol 4-metoxi-bencílico (**36**), alcohol 4-metoxi-bencílico (**37**), 5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (**38**), confusarina (**39**), gigantol (**2**), batatasina III (**15**) y efemerantol B (**40**).

∅ Se logró el establecimiento y validación de un método analítico por CLAR, que resultó válido en términos de linealidad, precisión y exactitud. De modo tal que será una herramienta de gran utilidad en el control de calidad de la especie *C. macrobulbon* vendida en mercados del Distrito Federal.

∅ La presencia de estilbenoides como el gigantol (**2**), efemerantol B (**40**), batatasina III (**15**) y compuestos volátiles como el eucalipto (**41**), con actividad antinociceptiva demostrada, pueden ser los responsables de la actividad para contrarrestar los síntomas del “mal de orín”.

∅ Se describieron por vez primera las características anatómicas e histológicas de los pseudobulbos de *C. macrobulbon*, reconociendo la presencia de células epidérmicas crenadas, lo cual constituye el primer reporte de este tipo celular en orquídeas.

## 7. Conclusiones

---

- ∅ Mediante técnicas moleculares actuales se logró el reconocimiento del material vegetal de campo y de mercado como perteneciente a la especie *C. macrobulbon*.
- ∅ Se estableció que la distribución potencial de *C. macrobulbon* es amplia, lo cual aunado a su fácil propagación, permitiría el uso de esta orquídea con fines medicinales sin poner en riesgo las poblaciones silvestres, siempre y cuando se lleve a cabo un correcto manejo.
- ∅ Se estableció la seguridad preclínica de las especies *C. macrobulbon* y *S. fasciculata*, dado que ambas son inocuas según el método de Lorke.
- ∅ Se logró complementar las pruebas de identidad química de *S. fasciculata*, así como la descripción de sus características anatómicas e histológicas y su mapa de distribución potencial, lo cual permitirá la integración de un documento tipo farmacopeico de esta orquídea medicinal.
- ∅ Bajo la premisa de la importancia de atender a las recomendaciones de la OMS a los países en vías de desarrollo, acerca de las plantas medicinales utilizadas en sus sistemas de medicina tradicional, el presente trabajo representa una contribución muy importante al establecimiento de los parámetros de identidad, eficacia y seguridad preclínicos de dos especies de orquídeas medicinales utilizadas e incluso expandidas en nuestro país para atender diversas afecciones.

### 8. BIBLIOGRAFÍA

#### A

- Aguilar, C. A., Camacho, J. R., Chino, S., Jácquez, P., López, M. E. 1994. Plantas Medicinales del Herbario IMSS. Cuadros Básicos por Aparatos y Sistemas del Cuerpo Humano. IMSS.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., Rahman, M. M. 2008. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *Journal of Natural Products* 71, 1427–30.
- Arellano, R. J. A., Flores, J. S., Tun, G. J., Cruz, B. M. M., 2003. Nomenclatura, Forma de Vida, Uso, Manejo y Distribución de las Especies Vegetales de la Península de Yucatán. *Etnoflora Yucatanense*, Fascículo 20. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida. p. 464.
- Atta, A. H., and El-Sooud, K. A. 2004. The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 95(2), 235–238.

#### B

- Berlin, B., Breedlove, O. E., Raven, P. H. 1974. Principles of Tzeltal Plant Classification. Academic Press, New York, London, p.659.

#### C

- Calixto, J. B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 179–189.

- Calixto J. B., 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 131–134.
- Cañigüeral, S. La Fitoterapia ¿una terapéutica para el tercer milenio? 2002. *Revista de Fitoterapia*, 2, 101–121.
- Cañigüeral, S. y Vila. R. 2005. La Fitoterapia como herramienta terapéutica. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 6, 43–51.
- Carnevali, G., Tapia-Muñoz, J. L., Jiménez-Machorro, R., Sánchez-Saldaña, L., León Ibarra-González, L., Ramírez, I., Gómez, 2001. M. Notes on the flora of the Yucatan peninsula II: A synopsis of the orchid flora of the mexican Yucatan peninsula and a tentative checklist of the Orchidaceae of the Yucatan peninsula biotic province. *Harvard Papers in Botany* 5(2), 383–466.
- Chase, M. W y H. H. Hills. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40 (2), 215–220.
- Chase, M.W., 2005. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. *Curtis's Botanical Magazine* 22, 2–7.

### D

- De la Cruz M. 1991. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*. Manuscrito azteca de 1552. Según traducción latina de Juan Badiano. Fondo de Cultura Económica/Instituto Mexicano del Seguro Social. Facsímil. México.
- Deciga-Campos, M., González-Trujano, E., Navarrete, A., and Mata, R. 2005. Antinociceptive Effect of Selected Mexican Traditional Medicinal Species. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 48 70–72.

- Déciga-Campos, M., Palacios-Espinosa, J. F., Reyes-Ramírez, A., Mata, R., 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. *Journal of Ethnopharmacology* 114, 161–168.
- Díaz, J. L. 1976. Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. IMEPLAM.
- Doyle, J. & Doyle, J. 1987. A rapid isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11–15.

### E

- Estrada Lugo, E., I., J., Hernandez-Xolocotzi, E. 1988. Codice Florentino: su información etnobotánica. *Agrociencia*.
- Estrada, S., Acevedo, L., Rodríguez, M., Toscano, R., Mata, R., 1999a. New triterpenoids from the orchids *Scaphyglottis livida* and *Nidema boothii*. *Natural Product Letters* 16, 81–86.
- Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A., Mata, R., 1999b. NitricOxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,40-dihydroxy-5,50-dimethoxybibenzyls from *Scaphyglottis livida*. *Planta Medica* 65, 109–114.
- Estrada, S., Acevedo, L., Rodríguez, M., Toscano, R., Mata, R. 2002. New triterpenoids from the orchids *Scaphyglottis livida* and *Nidema boothii*. *Natural Product Letters*. 16 (2), 81–86.
- Estrada-Soto, S., López-Guerrero, J., Villalobos-Molina, R., Mata, R. 2006. Endothelium-independent relaxation of aorta rings by two stilbenoids from the orchids *Scaphyglottis livida*. *Fitoterapia* 77, 236–239.

### F

- Ford, C., Ayres, K., Toomey, N., Haider, N., van Alphen Stahl, J., Kelly, L., Wikström, N., Hollingsworth, P., Joel Duff R., Hoot, S., Cowan, R., Chase, M., Wilkinson, M. 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159, 1–11.

### G

- García-Peña, M., Peña, M., 1981. Uso de las orquídeas en México, desde la época Prehispánica hasta nuestros días. *Orquídea* 8, 59–75.

- Gaedcke, F., Steinhoff, B., 2003. Herbal Medicinal Products. Medpharm Gmb H Scientific Publishers, Stuttgartp, p. 200.

- Gibbons, S., Oluwatuyi, M., Veitch, N. C., & Gray, A. I. 2003. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Phytochemistry* 62(1), 83–87.

### H

- Hágsater, E., Soto, A. M. A., Salazar, C. G. A., Jiménez, M. R., López, R. M. A., Dressler, R. L., 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México D.F p. 104.

- Harvey, R. A., Ferrier, D. R. 2011. Bioquímica. 5ª Edición. 147–151.

- Hernández-Romero, Y., Rojas, J. I., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R., 2004. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Niidema boothii*. *Journal of Natural Products* 67, 160–167.

- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P.G., Jarvis, A., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25, 1965–1978.

- Huerta, C. 1997. La herbolaria: Mito o realidad. CONABIO. *Biodiversitas* 12, 1–7.

### I

- International Conference of Harmonization, (ICH), 2005. Text on Validation of Analytical Procedures. Harmonized Tripartite Guideline [Q2 (R1)]. In: Proceedings of International Conference on Harmonization: Geneva. 1–13.

### J

- Jeoung-Hee, H., Dong-Ung, L., Jae-Tae, L., Jin-Sook, K., Chul-Soon, Y., Jung-Ae, K., Jung-Sang, H., Keun, H., 2000. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1, is active in the antioxidation and GABA-ergic neuromodulation of the rat brain. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 329–333.

- Jinfeng, H., Xiaozhang, F., 2000. Triterpenoids, *p*-coumaric acid esters and flavonoids from *Artemisia igniaria*. *Planta Medica* 66, 684–686.

- Johansen, D.A., 1940. Plant Microtechnique. McGraw–Hill, New York. 88–89.

### K

- Kanekar, Y., Basha, K., Duche, S., Gupte, R., Kapat, A., 2013. Regio selective synthesis of phenanthrenes and evaluation of their anti-oxidant based anti-inflammatory potential. *European Journal of Medicinal Chemistry* 67, 454–463.

### L

- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T., Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (8), 2923–2928.

- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. W. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews* 53 (4), 597–652.

- Liang, Y., Z., Xie, P., Chan, K. 2004. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B* 812 (1–2), 53–70.
- Liang, X., M., Jin, Y., Wang, Y., P., Jin, G., W., Fu, Q., Xiao, Y., S. 2009. Qualitative and Quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A* 1216 (11), 2033–2044.
- Lorke, D., 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.
- Lopez-Curto, L., Márquez, G. J., Murguía, S. G., 2005. Técnicas para el estudio de angiospermas: libro de laboratorio. Facultad de Ciencias. UNAM, México D.F p. 178.
- Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). *Journal of Plant Research* 116, 27–35.

### M

- Machado, L., Monte, F. J., De Oliveira, M., De Mattos, M., Lemos, T., Gotor-Fernández, V., De Gonzalo, G., Gotor, V., 2008. Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* 54, 130–133.
- Majumder, P. L., Kar, A., 1987. Confusarin and confusarinidin, two phenanthrene derivatives of the orchid *Eria confusa*. *Phytochemistry* 26, 1127–1129.
- Martínez, M., 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México D.F p.1061.
- Monroy-Ortiz, C., García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., Sánchez-Quintanar, C., Luna-Cavazos, M., Uscanga-Mortera, E., Flores-Guido, J. S., González-Romero, V., 2013. Plants of local interest for medicinal and conservation purposes in Morelos, Mexico. *Ethnomedicine* 7, 13–26.

### N

- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., Ragupathy, S. 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Botany* 84(3), 335–341.

### P

- Pérez, R. M., Vargas, S, R. 2009a. Relaxant and antispasmodic effects of extracts of the orchid *Enciclya michuacana*: on isolated guinea pig ileum. *Journal of Natural Medicine* 63, 65–68.

- Pérez, R. M., Vargas, S. R. 2009b. Anti-inflammatory and wound healing potential of *Prosthechea michuacana* in rats. *Pharmacognosy Magazine*, 5, 19 219–225.

- Pérez, R.M., 2010. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 592–638.

- Perez, R.M., Neira-Gonzalez, A., Garcia, E., Lugardo, D. S. 2010b. Studies on the constituents of bulbs of the orchid *Prosthechea michuacana* and antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 46, 4 554–561.

- Pérez, R.M., Anaya, S. I., Hoyo V. C., Cruz, V. T. 2011a. Effect of flavonoids from *Prosthechea michuacana* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharmaceutical Biology*. 49, 11 1121–1127.

- Pérez, R., Hoyo-Badillo, C. 2011b. Anti-diabetic activity of an hexane extract of *Prosthechea muchuacana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 10, 6 570–580.

- Perraudin, F., J. Popovici, and C. Bertrand. 2006. Analysis of headspace-solid microextracts from flowers of *Maxillaria tenuifolia* Lindl. by GC–MS. *Electronic Journal of Natural Substances* 1, 1–5.

### R

- Romero, G. and Carnevali, 1999. Notes on the species of *Cyrtopodium* (Cyrtopodinae, Orchidaceae) from Florida, the Greater Antilles, Mexico, central and northern south America. *Harvard Papers in Botany* 4 (1), 327–341.
- Rendón-Vallejo, P., Hernández-Abreu, O., Vergara-Galicia, J., Millán-Pacheco, C. Mejía, A., Ibarra-Barajas, M., Estrada-Soto, S. 2012. *Ex vivo* study of the vasorelaxant activity induced by phenanthrene derivatives isolated from *Maxillaria densa*. *Journal of Natural Products* 75, 2241–2245.

### S

- Sahagún, B. *Historia general de las cosas de la Nueva España. Primera versión íntegra del texto castellano del manuscrito conocido como Códice Florentino.* Estudio introductorio, paleografía, glosario y notas de Alfredo Lopez Austin y Josefina Garcia Quintana. 2 vols. Alianza Editorial Quinto Centenario. Madrid, 1988.
- Silva, J., Abebeb, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machadoc, M. I. L., Matos, F. J. A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 277–283.
- Shu,-Y., Guo, S., Chen, X., Wang, C.H., Yang, J., 2004. Studies on chemical constituents of *Dendrobium nobile*. *Chinese Pharmaceutical Journal* 39, 421–422.
- Sucher N.J., Carles M.C. 2008. Genome-Based Approaches to the Authentication of Medicinal Plants. *Planta Medica* 74, 603–623.

### T

- Tovar-Gijón, C., Hernández-Carlos, B., Burgueño-Tapia, E., Cedillo-Portugal, E., Joseph-Nathan, P. 2006. A new C-Glycosylflavone from *Encyclia michuacana*, *Journal of Molecular Structure* 783 (1–3), 96–100.

### V

- Vergara-Galicia, J., Ortiz-Andrade, R., Rivera-Leyva, J., Castillo-España, O., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Gallardo-Ortiz, I., Estrada-Soto, S. 2010. Vaso relaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism. *Fitoterapia* 81,350–357.

- Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., Castillo-España, P., Arroyo-Mora, A., López-Escamilla L., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S. 2010. Micropropagation and vasorelaxant activity of *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Natural Product Research* 24, 106–114.

### W

- World Health Organization (1998) WHO, *Quality control methods for medicinal plant materials*. WHO, Geneva.

- World Health Organization (1999) WHO *Monographs on selected medicinal plants*. Volume 1. WHO, Geneva.

- World Health Organization (2002) WHO *Monographs on selected medicinal plants*. Volume 2. WHO, Geneva.

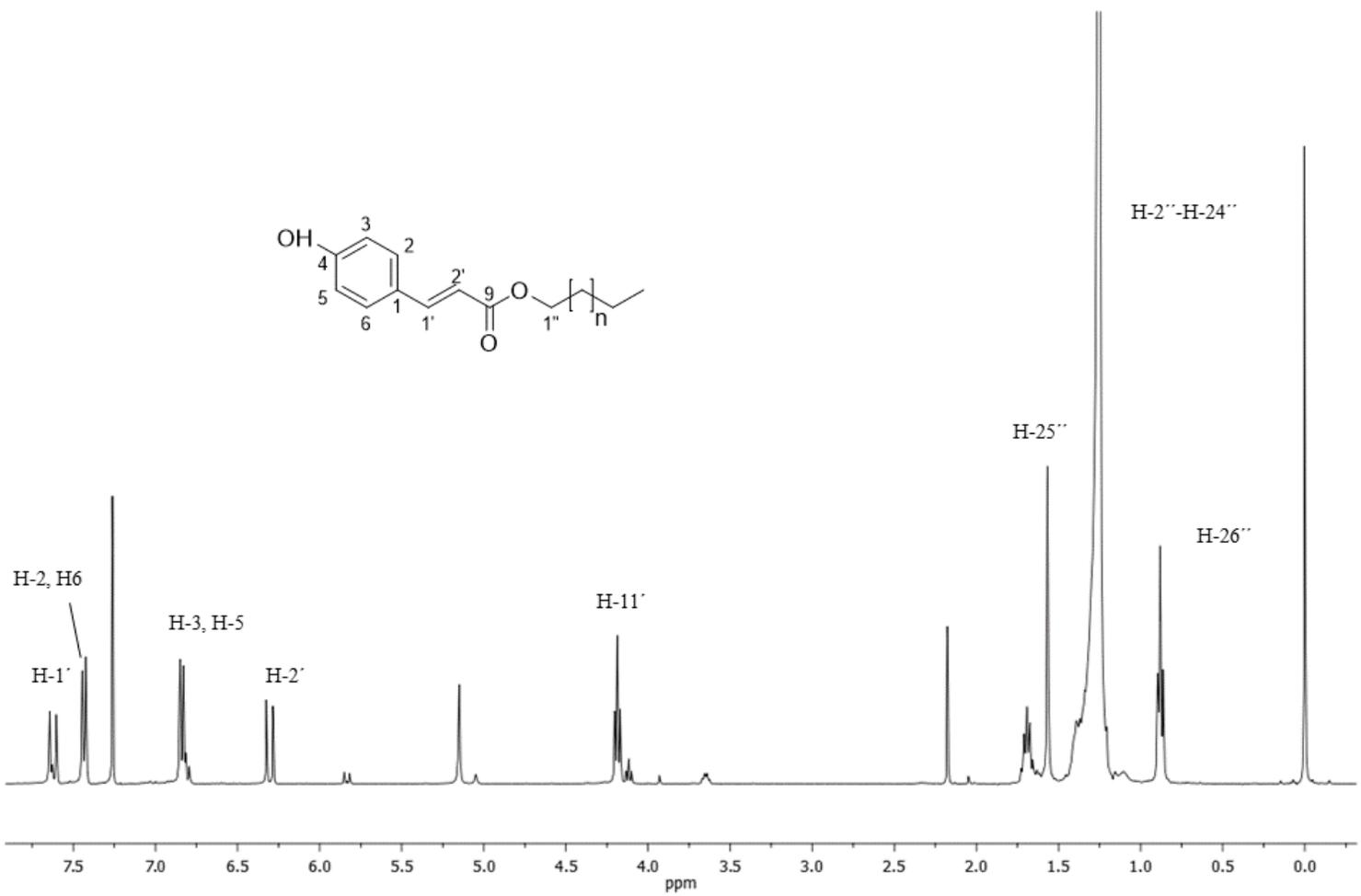
- World Health Organization (2007) WHO *Monographs on selected medicinal plants*. Volume 3. WHO, Geneva.

### RECURSOS ELECTRÓNICOS

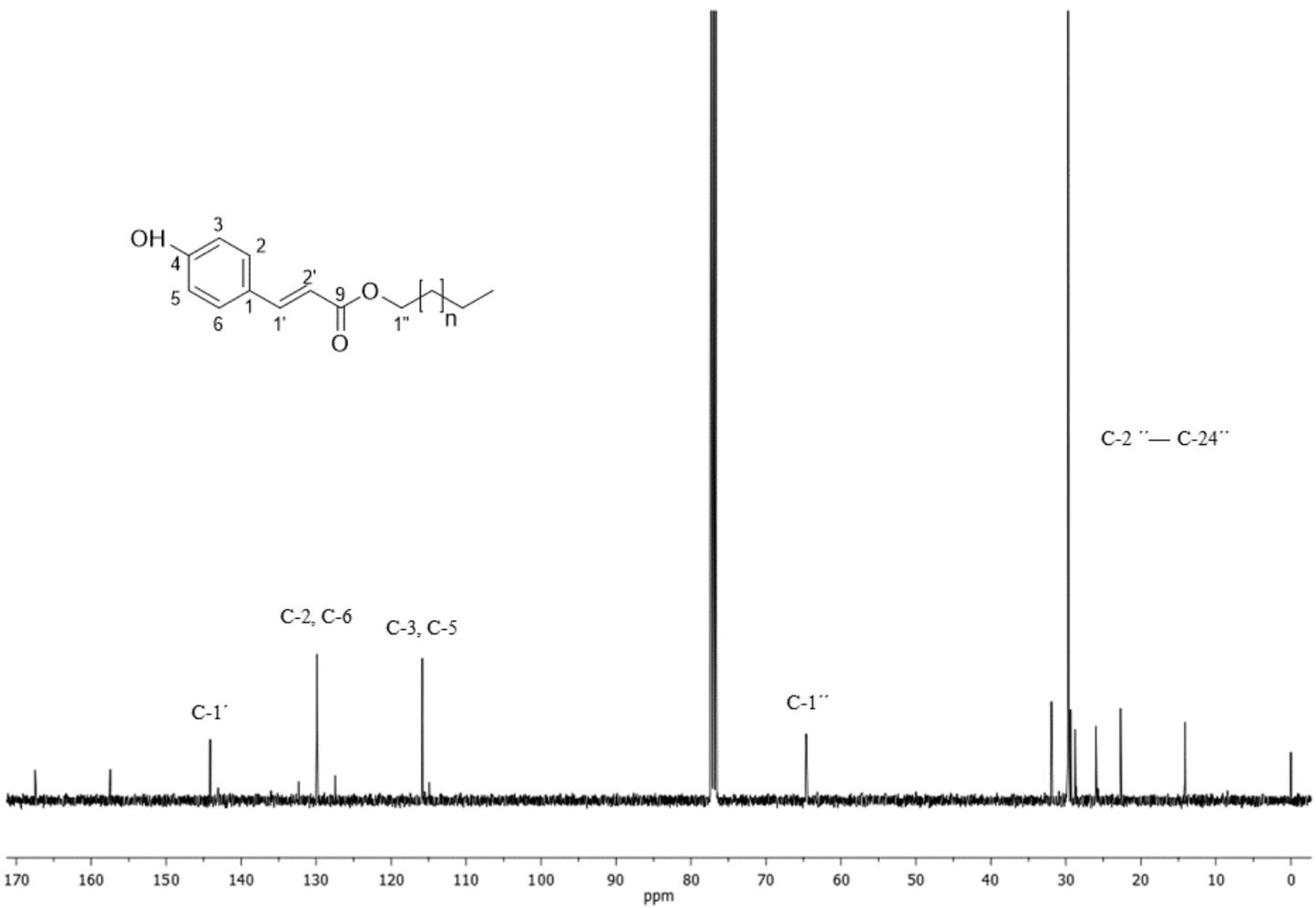
- American Botanical Council:  
[http://cms.herbalgram.org/press/2014/HerbClip\\_500th\\_Issue.html?ts=1413499882&signature=783ece31ed80d099e92114a339e18868](http://cms.herbalgram.org/press/2014/HerbClip_500th_Issue.html?ts=1413499882&signature=783ece31ed80d099e92114a339e18868).
- American Herbal Pharmacopeia: <http://www.herbal-ahp.org/>
- British Herbal medicine Association: <http://bhma.info/index.php/british-herbal-compendium-vol-2/>
- Historia de las Plantas de la Nueva España  
([www.ibiología.unam.mx/plantasnuevaespana/index.html](http://www.ibiología.unam.mx/plantasnuevaespana/index.html)).
- WHO:<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js17534en>  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Other/2010/02/WC500070829.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2010/02/WC500070829.pdf)
- UNIBIO, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México,  
<http://unibio.unam.mx>)
- MBG-Tropicos (Missouri Botanical Garden, <http://www.tropicos.org>)
- Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB)  
<http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/REMIB.html>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)  
[http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/clave\\_remib.cgi?lengua=es-MX](http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/clave_remib.cgi?lengua=es-MX))
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF), <http://www.gbif.org>

## 9. ANEXOS

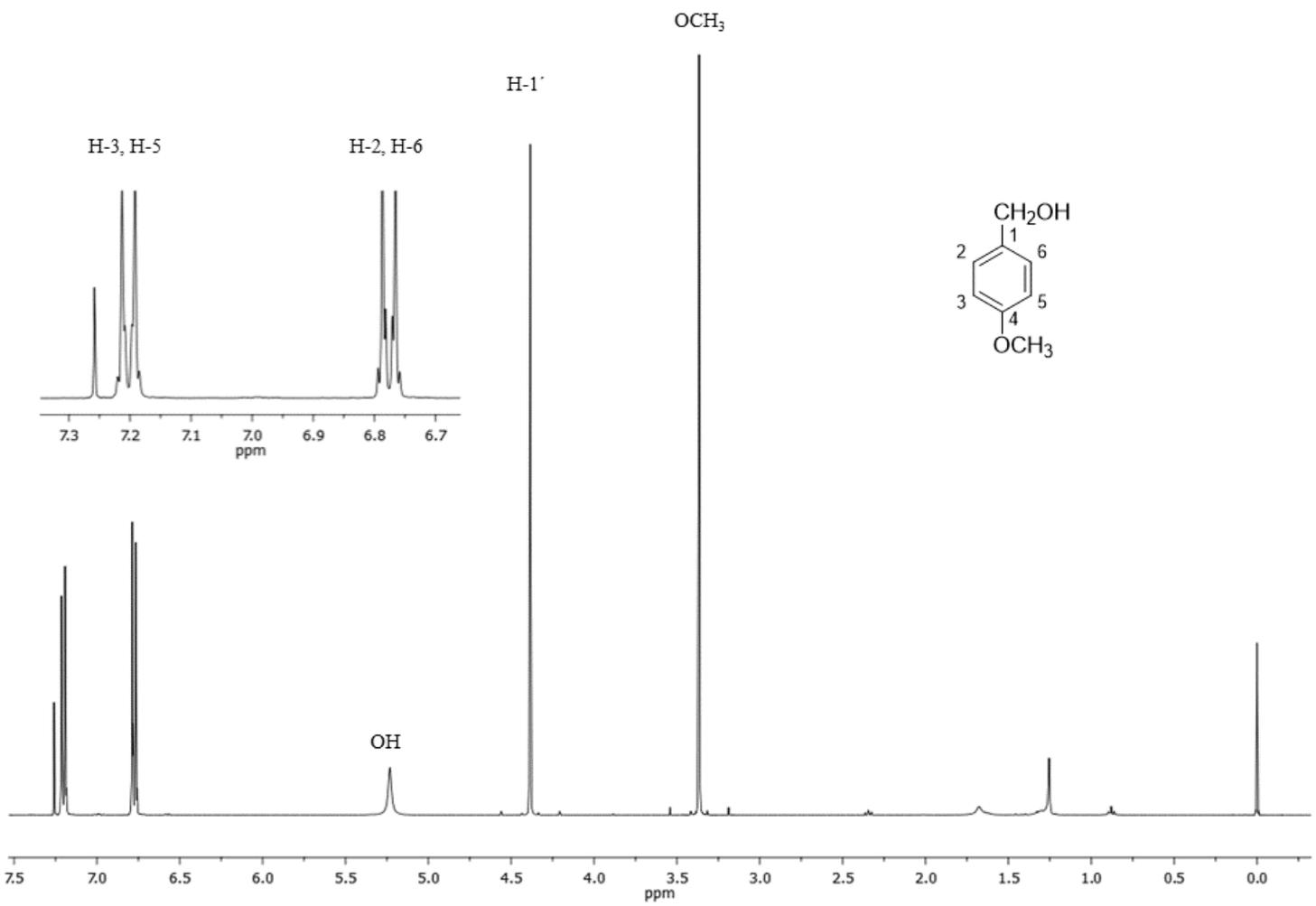
## ANEXO I



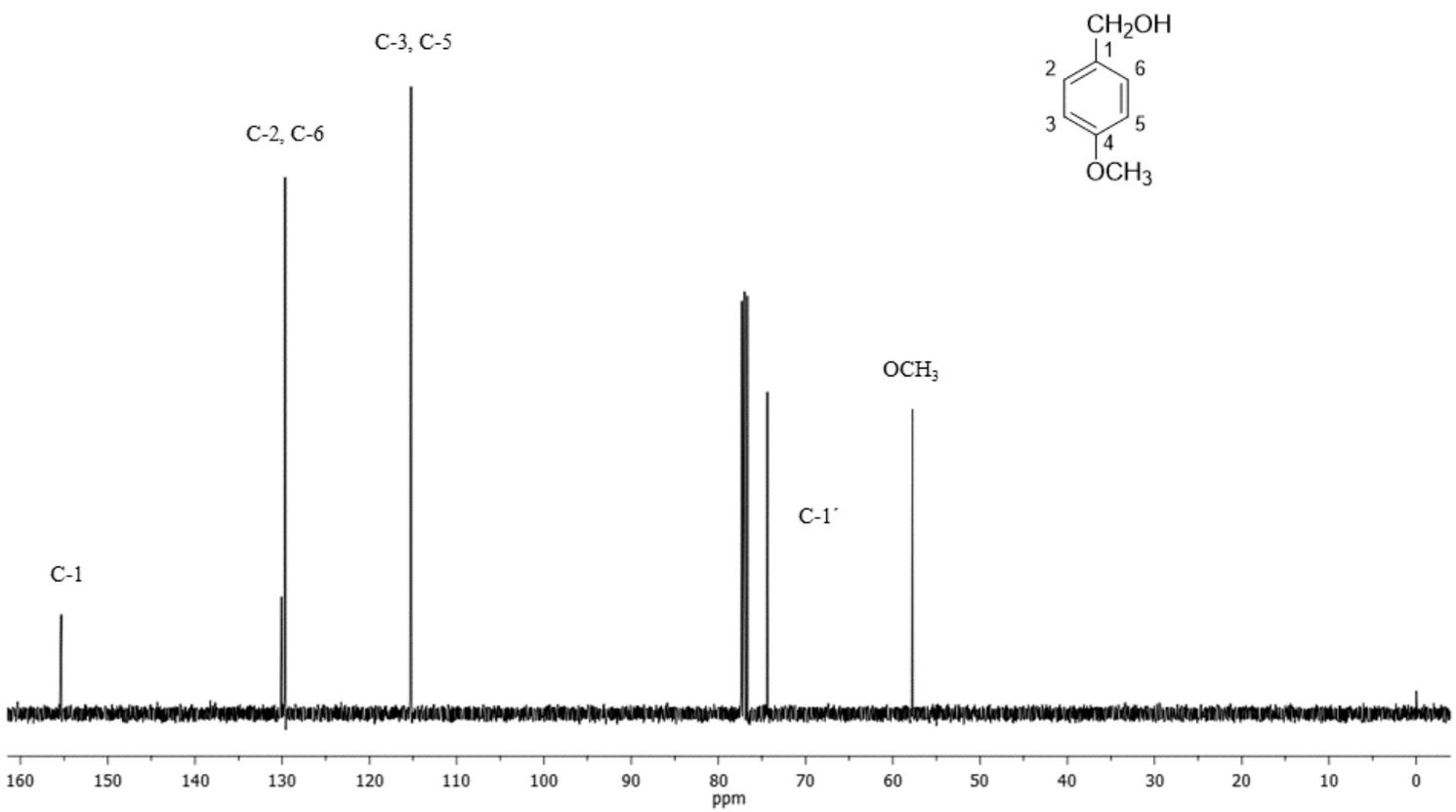
**Espectro 1.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN del *n*-octacosil-*trans*-*p*-cumarato (34).



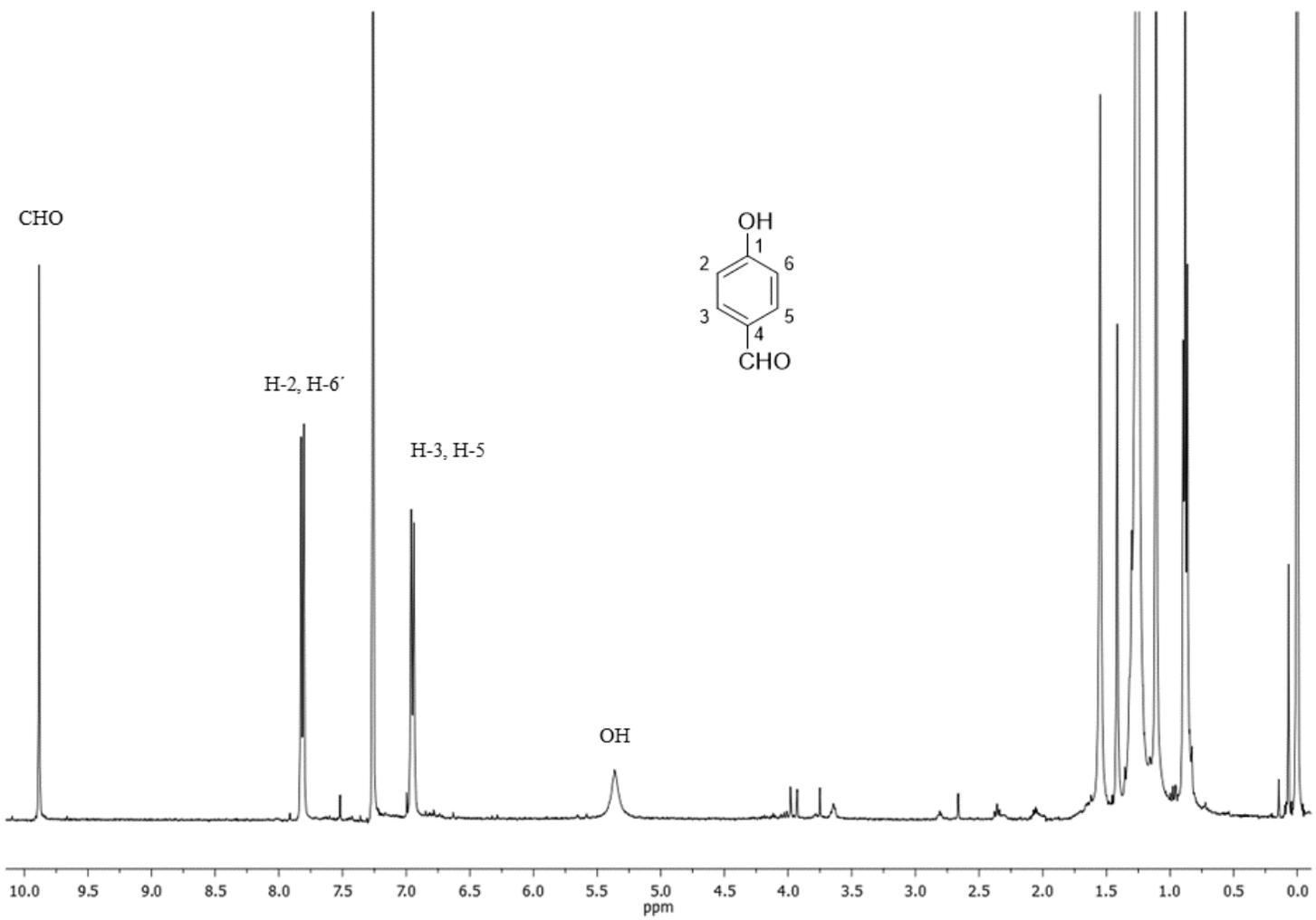
**Espectro 2.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del *n*-octacosil-*trans*-*p*-cumarato (34).



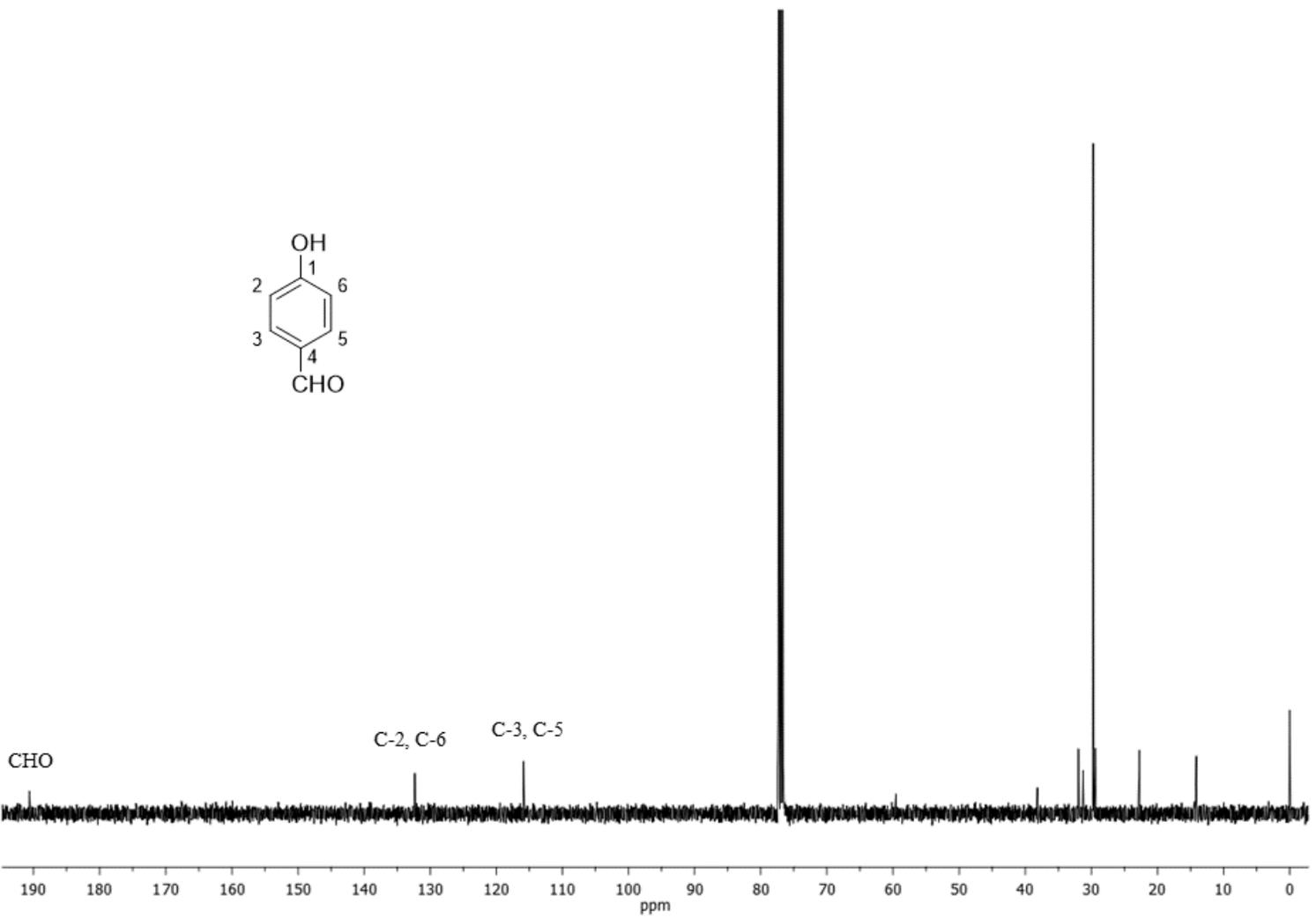
**Espectro 3.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN del alcohol 4-metoxi-bencílico (36).



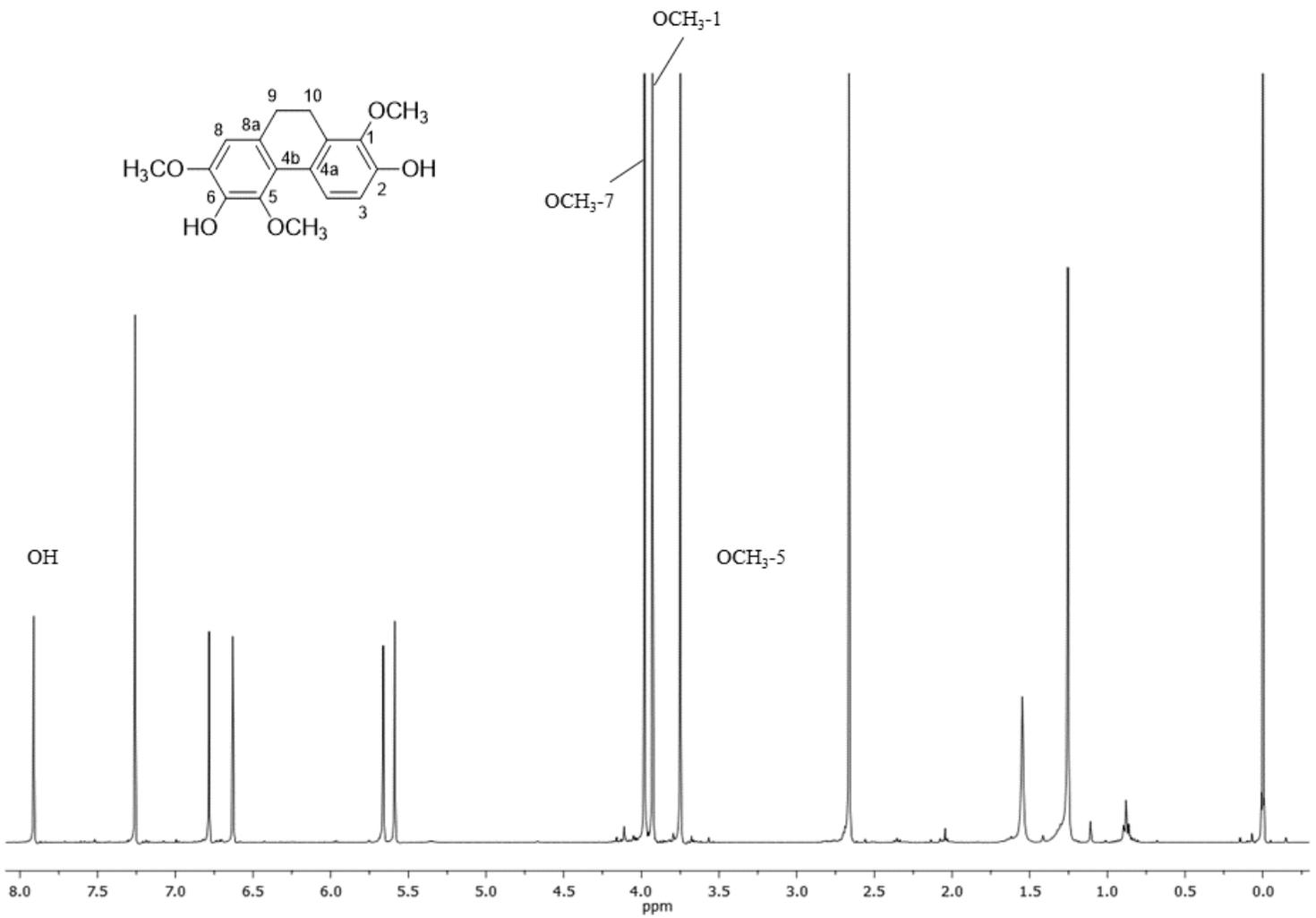
**Espectro 4.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del alcohol 4-metoxi-bencilico (36).



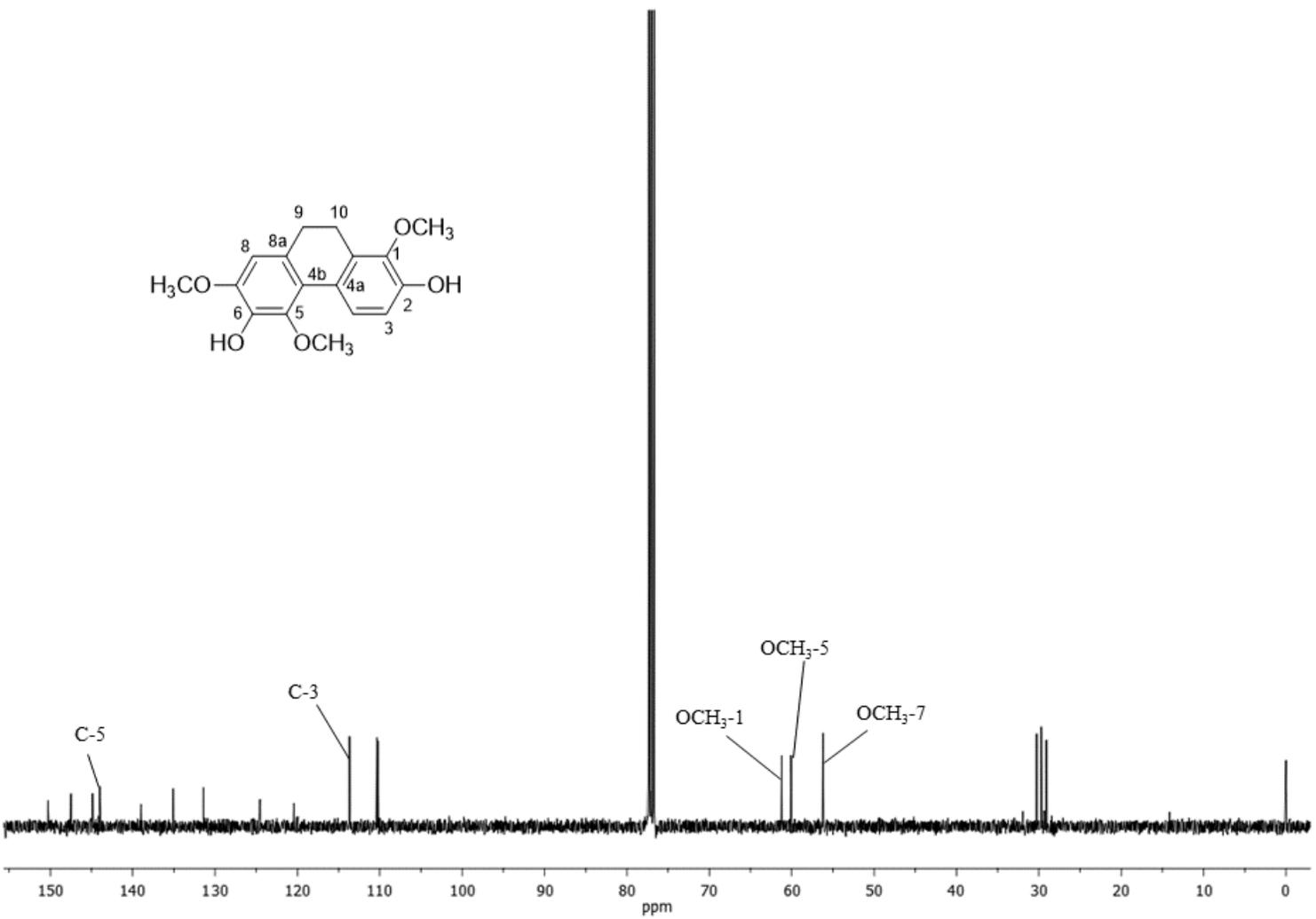
**Espectro 5.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN del 4-hidroxibenzaldehído (37).



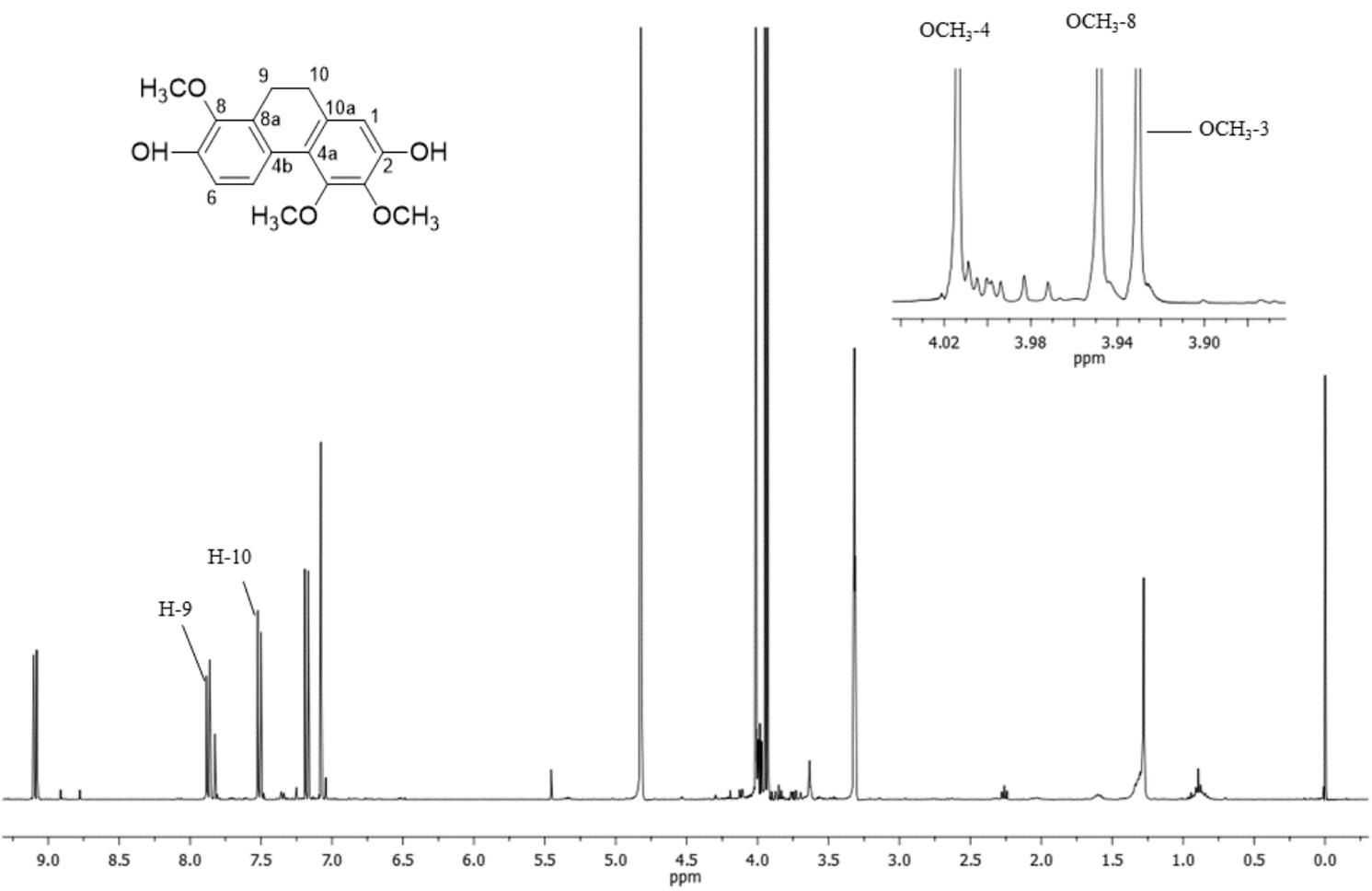
Espectro 6. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del 4-hidroxibenzaldehído (37).



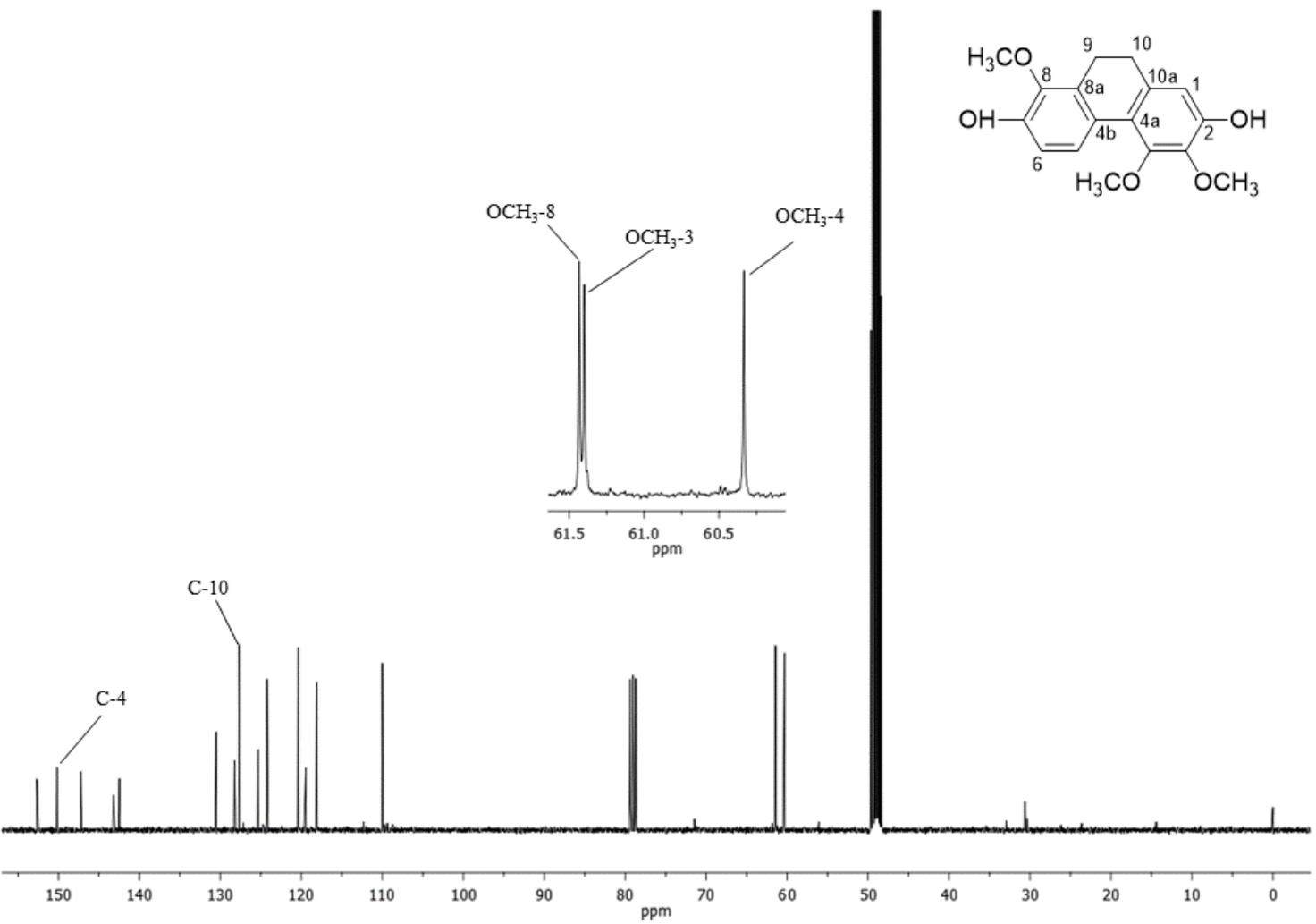
**Espectro 7.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN del 1,5,7,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (**38**).



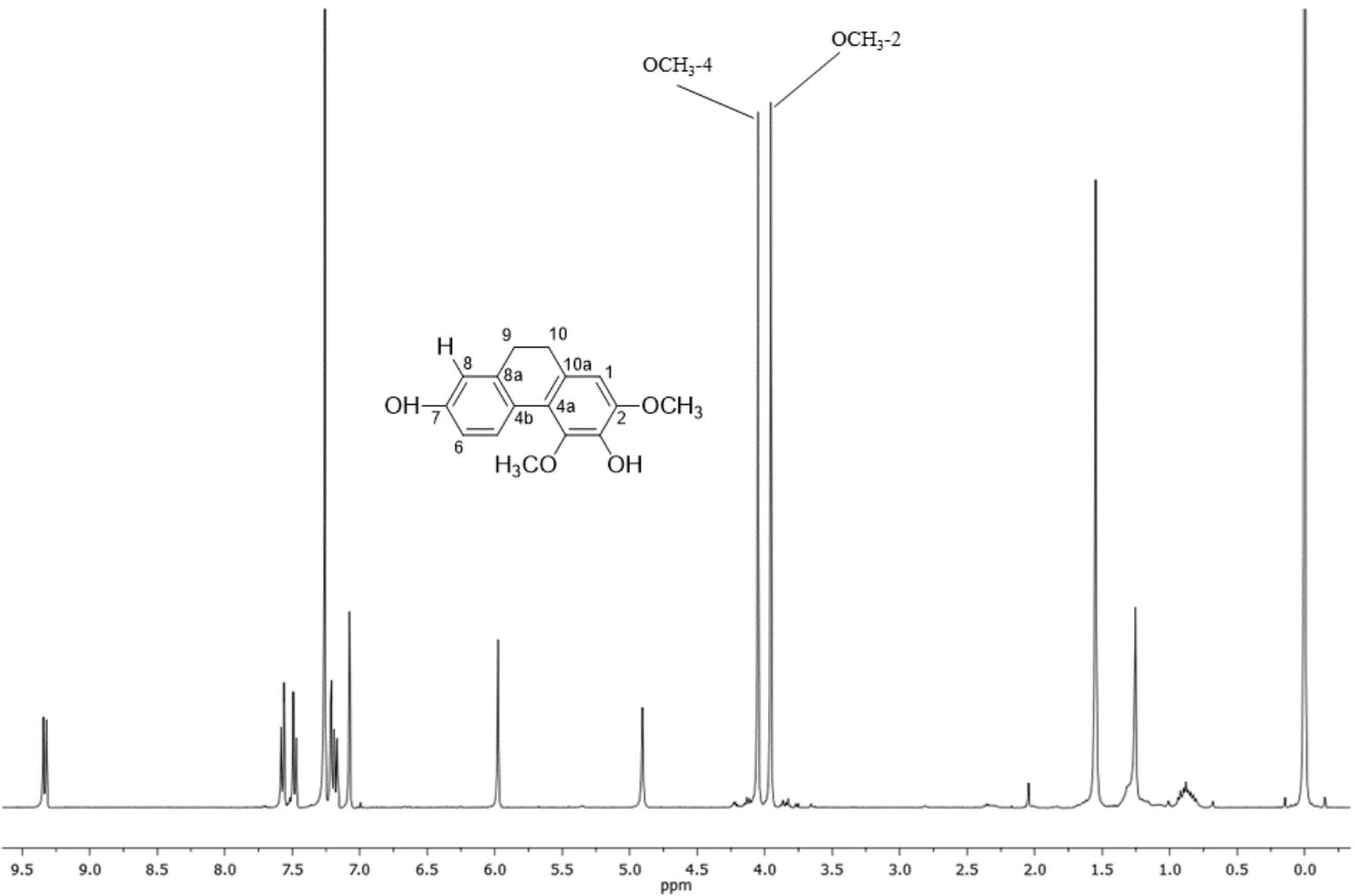
**Espectro 8.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del 1,5,7-trimetoxi-9,10-dihidrofenantren-2,6-diol (38).



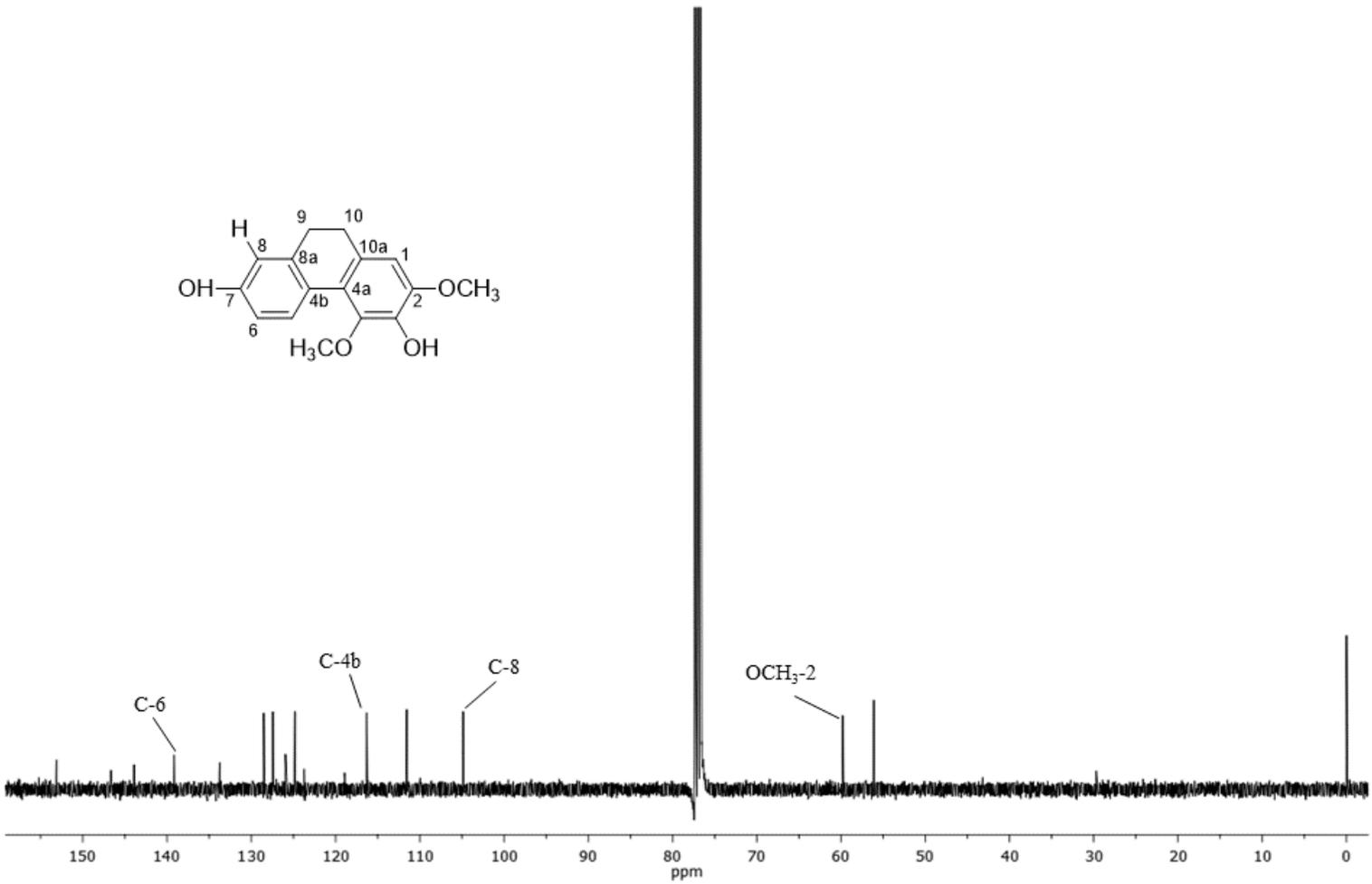
**Espectro 9.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de la confusarina (**39**).



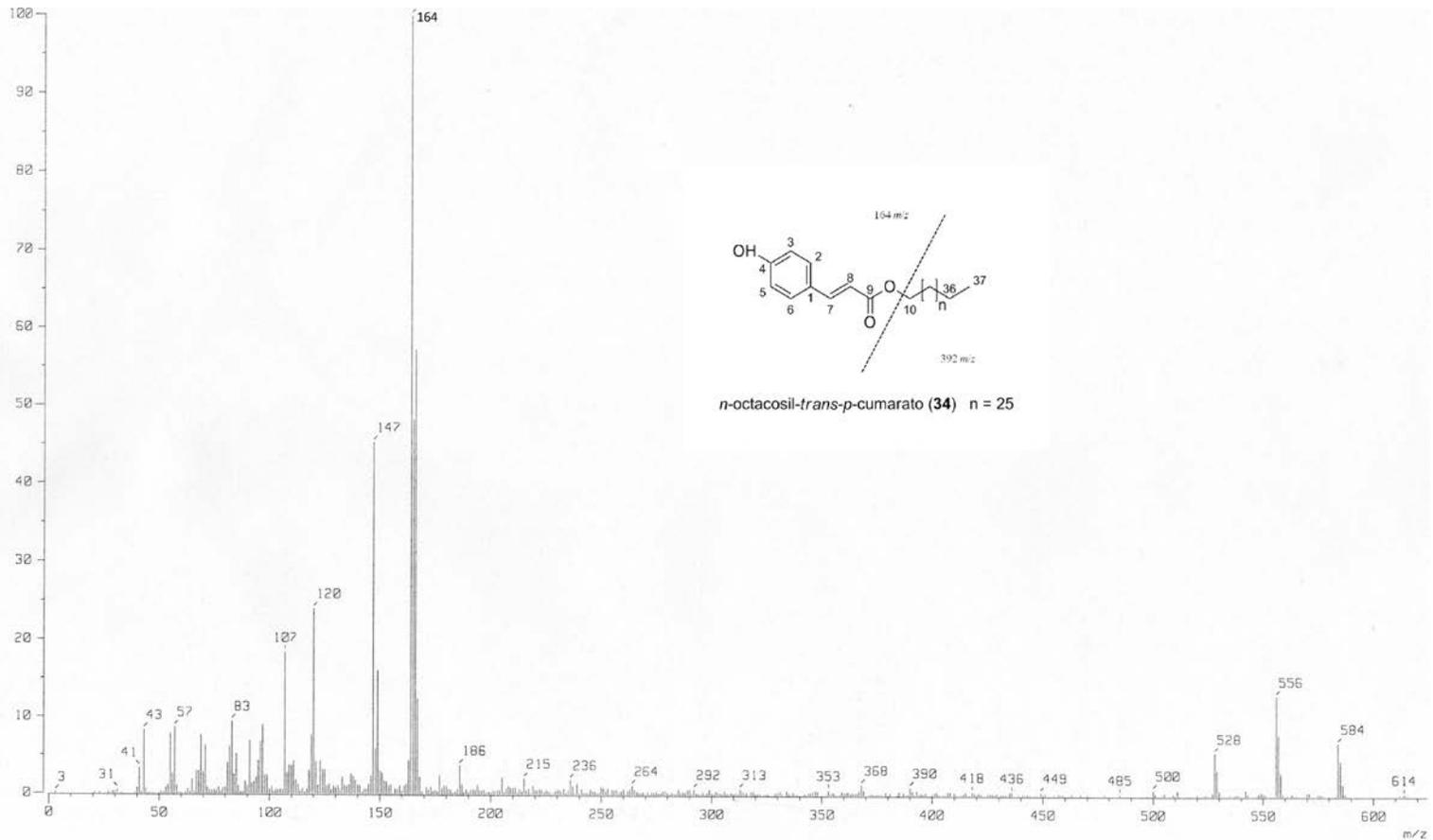
**Espectro 10.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN de la confusarina (**39**).



**Espectro 11.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN del efemerantol B (40).



**Espectro 12.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del efemerantol B (40).



Cromatograma de Gases acoplado a espectrometría de masas

---



---

## ANEXO II

**rbcL**

>*Cyrtopodium\_macrobulbon\_Morales\_3* (CM-2)

AAGCGTTGGATTTAAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCC  
 TGACTACGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCA  
 ACCAGGAGTTCCGCCCGAAGAAGCGGGGGCTGCGGTAGCAGCCGAATCTTCTA  
 CTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACA  
 AAGGACGATGCTACCACATCGAGGCCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATT  
 GCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGT  
 TTACTIONCATTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGTCT  
 GGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACCTTCCAAGGTCCGCCTCA  
 TGGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCTTATTGG  
 GATGTACTATTAAACCAAATTGGGATTATCCGCAAAAAACTATGGTAGAGCG  
 GTTTATGAATGTCTAC

>*Cyrtopodium\_macrobulbon\_Figueroa\_sn* (CM-1)

AAGCGTTGGATTTAAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCC  
 TGACTACGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCA  
 ACCAGGAGTTCCGCCCGAAGAAGCGGGGGCTGCGGTAGCAGCCGAATCTTCTA  
 CTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACA  
 AAGGAGGATGCTACCACATCGAGGCCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATT  
 GCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGT  
 TTACTIONCATTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGTCT  
 GGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACCTTCCAAGGTCCGCCTCA  
 TGGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCTTATTGG  
 GATGTACTATTAAACCAAATTGGGATTATCCGCAAAAAACTATGGTA

**matK**

>*Cyrtopodium\_macrobulbon\_Morales\_3* (CM-2)

TATCATTTTCATAACACAAGAAGTGCCTCCCTTTTTTGGATTACAGTATAAATGTA  
 TTTAAATGGCAGAATTACAAGTATATTTAGATTTAAAAAAGATAGATTTTGTC  
 AAAAACTTCCTCTATCCGCTACTCCTCAGGAGTATATTTACTCACTTGCTCAT  
 TATCATAGCTTCAATAGTTTGGATTTTTTATGAACCTGTGGAAATTATCGATTATG  
 ACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAAC  
 AGAAATATTTGATTTCTTCGGTGAATGATTTTAAACAAAAATGGATTTTGGGGTC  
 ACAAGAATTCCTTTCTTCTCATTTTTCTTATAAAATGGTATCAGAAGGTTTGG  
 AGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCATCGCGATTAGTATCTTCCCTTGAAGAAAA  
 AAGAATACCAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATCTTCCCTTTTTA  
 GAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGTGTCAGATCTACTAATACCCTATCCC  
 ATCCACCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCCT  
 TCTTTGCATTTCTTGGCATTGTTTTCCACGAATCTCCTAATTTGAATAATCTCA  
 TTATTTCAAATAAATCTATTTACGTCTTTTCAA AAAAGAAACAAAAAATCTTTT  
 GGTTCCCTACATAATTCTTATGTATATGAATTCGAATATCTATTCCTGTTTATTCG  
 TAAACAGTCTTCTTATTACGATCAATATCTTCTGGAGTATTTCTTGAGCGAAC

ACATTTCTATGAAAAAATAGAATATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATTCTTTTCA  
GAGGATCCTATGGTTCCTCAAAGATACTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGG  
AAAAGCGATTTTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAGAAATGGAAAT  
TTCATCTTGTAATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAA  
GATCCATATAAAACAATTACCTAACTATTCCTTCTCTTTTCTGGGGTATTTTTCA  
AGTGTACTAAAAAACCTTTGGTAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATT  
TCTAATAAATACTCTGACTAGGAAATTATATAACATAGTCCCAGTTATTTCTCT  
TATTGGATCATTGTTCGAAAGCTAAATTTTGTACTGTATTGGGTCATCCTATTAGT  
AAACCGATCTGGACCGATTTATCGGATTCTGATATTCTTGATCGATTTTGTCCG  
ATATGTAGAAATCTTTGTCGTTATCACAGCGGATCCTCAAAGAAGCAGGTTTTG  
TATCGTATAAAGTATATACTTCGACTTTCGTGTGCTAGAACTTTGGCTCGTAAA  
CATAAAAGTACAGTACGAACTTTTATGCGAAGATTAGGTTCCGGGATTCTTAGA  
AGAATTTTTTTTTGGAAAAAGAACAATCTCTTTCTTTAATCTTCCCTCCAAAAAAT  
CCCTTTTATTTTACACGGATTACATAGAGAACATATTTGGTATTTGGACATTATC  
CGTATCAATGATCTGGTGGATCATTGATGATACTTTTTTCATTTTCATGAAAAAA  
AAAAAGATTCATGAATTTATATTCTGAAATGCTCATATATCATCATATTTGTGG  
TGAGATTGTCAAATTTCTTAGACTTTCTTCTCGATATATATGTAATTCTTTTTTA  
TTTTTGATTGATATACATAGGGAAAGCCGTGTGCAATGAAAACCTGCAAGCA  
CGGTTTGGGGAGAGATCTTTTCTT

>*Cyrtopodium\_macrobulbon\_Figueroa\_sn* (CM-1)

TATCATTTTCATAACACAAGAAGTGCCTCCCTTTTTTGGATTACAGTATAAATGTA  
TTTTAAATGGCAGAATTACAAGTATATTTAGATTTAAAAAAGATAGATTTTGTCA  
ACAAAACCTTCCTCTATCCGCTACTCCTCAGGAGTATATTTACTCACTTGCTCAT  
TATCATAGCTTCAATAGTTTGGATTTTTTATGAACCTGTGGAAATTATCGATTATG  
ACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAAC  
AGAAATATTTGATTTCTTCGGTGAATGATTTTAAACAAAAATGGATTTTGGGGTC  
ACAAGAATTTCTTTTTCTTCTCATTTTTTCTTATAAAATGGTATCAGAAGGTTTTGG  
AGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCATCGCGATTAGTATCTTCCCTTGAAGAAAA  
AAGAATACCAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATCTTTCCCTTTTTA  
GAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGTGTCAGATCTACTAATACCCTATCCC  
ATCCACCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCCT  
TCTTTGCATTTCTTGCATTTGTTTTCCACGAATCTCCTAATTTGAATAATCTCA  
TTATTTCAAATAAATCTATTTACGTCTTTTCAA AAAAGAAACAAAAAATTTCTTTT  
GGTTCCTACATAATTCTTATGTATATGAATTCGAATATCTATTCCCTGTTTATTCG  
TAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTATTTCTTGAGCGAAC  
ACATTTCTATGAAAAAATAGAATATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATTCTTTTCA  
GAGGATCCTATGGTTCCTCAAAGATACTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGG  
AAAAGCGATTTTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAGAAATGGAAAT  
TTCATCTTGTAATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAA  
GATCCATATAAAACAATTACCTAACTATTCCTTCTCTTTTCTGGGGTATTTTTCA  
AGTGTACTAAAAAACCTTTGGTAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATT  
TCTAATAAATACTCTGACTAGGAAATTATATAACATAGTCCCAGTTATTTCTCT  
TATTGGATCATTGTTCGAAAGCTAAATTTTGTACTGTATTGGGTCATCCTATTAGT  
AAACCGATCTGGACCGATTTATCGGATTCTGATATTCTTGATCGATTTTGTCCG  
ATATGTAGAAATCTTTGTCGTTATCACAGCGGATCCTCAAAGAAGCAGGTTTTG

TATCGTATAAAGTATATACTTCGACTTTCGTGTGCTAGAACTTTGGCTCGTAAA  
CATAAAAGTACAGTACGAACTTTTATGCGAAGATTAGGTTCCGGGATTCTTAGA  
AGAATTTTTTTTTGGAAAAAGAACAATCTCTTTCTTTAATCTTCCTCCAAAAAAT  
CCCTTTTATTTTACACGGATTACATAGAGAACATATTTGGTATTTGGACATTATC  
CGTATCAATGATCTGGTGGATCATTGATGATACTTTTTTCATTTTCATGAAAAAA  
AAAAAAGATTCATGAATTTATATTTTCTGAAATGCTCATATATCATCATATTTG  
TGGTGGAGATTGTCAAATTTCTTAGACTTTCTTCTCGATATATATGTAATTCTTT  
TTTATTTTTGATTGATATATACATAGGGAAAGCCGTGTGCAATGAAAAGTCAA  
GCACGGTTTGGGGAGAGATCTTTTCTT

## **ANEXO III**

Chemical composition, potential toxicity, and quality control procedures of the crude drug of *Cyrtopodium macrobulbon*.



## Chemical composition, potential toxicity, and quality control procedures of the crude drug of *Cyrtopodium macrobulbon* <sup>☆</sup>



Viridiana Morales-Sánchez <sup>a</sup>, Isabel Rivero-Cruz <sup>a</sup>, Guillermo Laguna-Hernández <sup>b</sup>, Gerardo Salazar-Chávez <sup>c</sup>, Rachel Mata <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Mexico City 04510, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Mexico City 04510, Mexico

<sup>c</sup> Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 March 2014

Received in revised form

5 May 2014

Accepted 5 May 2014

Available online 10 May 2014

#### Keywords:

*Cyrtopodium macrobulbon*

Orchideaceae

Antinociceptive

Ephemeranthol B

Crenate cells

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Cyrtopodium macrobulbon* (“cañaveral”) has been long used in Mexican traditional medicine for the treatment of painful urinary ailments (“mal de orin”) in men. This study was conducted (i) to establish the potential acute toxicity and the antinociceptive activity of some preparations of *Cyrtopodium macrobulbon*, in order to demonstrate its preclinical efficacy for treating symptoms of “mal de orin”; and (ii) to determine the chemical composition and quality control parameters of this medicinal orchid.

**Materials and methods:** The antinociceptive effect was assessed using the acetic acid-induced writhing and the hot-plate tests. Investigation of the acute toxicity was accomplished by the Lorke method. The organic extract (OE) was subjected to conventional phytochemical study using chromatographic conventional procedures. The volatile components profile of the species was accomplished via GC–MS analysis of HS–SPME-adsorbed compounds. Furthermore, an HPLC method to quantify ephemeranthol B (**10**) was developed and validated according to the International Conference on Harmonization Guidelines. Microscopic anatomy studies were performed using light and scanning electron microscopies. Finally, a potential distribution map was generated using the MaxEnt modeling method.

**Results:** AE and OE were not toxic to mice since the LD<sub>50</sub> was higher than 5000 mg/kg. OE was only active in the acetic acid-induced writhing assay at the doses of 100 and 316 mg/kg. Conventional phytochemical analysis of OE led to the isolation and characterization of *n*-hexacosyl-*trans*-*p*-coumarate (**1**), *n*-octacosyl-*trans*-*p*-coumarate (**2**), *n*-triacontyl-*trans*-*p*-coumarate (**3**), 4-methoxy-benzyl alcohol (**4**), 4-hydroxybenzaldehyde (**5**), 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol (**6**), confusarin (**7**), gigantol (**8**), batatasin III (**9**), and ephemeranthol B (**10**). The major volatile components identified by HS–SPME analysis were 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone, eucalyptol (**11**), and isobornyl formate. An HPLC analytical method for the quantification of compound **10** in the plant was developed and fully validated for selectivity, accuracy, and precision. The microscopic studies revealed that the epidermal tissue displayed a layer of enlarged, crenate and cell thin-walled cells with a thickened cuticle; these cells are described for first time for this species. The potential distribution map generated revealed that this species is widespread in Mexico from Sinaloa to Merida states.

**Conclusions:** The results of the pharmacological studies tend to support the traditional use of *Cyrtopodium macrobulbon* for “mal de orin”; the presence of compounds **8**, **9**, and **11** with known antinociceptive activity might be related with the pharmacological effect demonstrated. The HPLC and microscopic analyses developed in this work will be valuable tools for quality control purposes for this plant.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The Orchidaceae family is one of the most important among the angiosperms with near to 25,000 species (Chase, 2005). Recent ethnopharmacological reports have shown that orchids are used around the world for treating different illnesses (Bulpitt,

<sup>☆</sup>This paper is taken in part from the Ph.D. thesis of Morales-Sánchez.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5289; fax: +52 55 5622 5329.

E-mail address: [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx) (R. Mata).

2005; Bulpitt et al., 2007; Kong et al., 2003; Pérez, 2010; Singh et al., 2012). The most relevant active compounds identified in these species belong to the stilbenoids, alkaloids, and flavonoids categories (Kong et al., 2003; Kovács et al., 2008; Singh et al., 2012; inter alia).

Mexico shelters about 1260 species (Hágsater et al., 2005) many of which are used medicinally since Pre-Hispanic times, nevertheless only nine have been subjected to pharmacological and chemical studies (Déciga-Campos et al., 2007; Estrada et al., 1999a; Estrada et al., 1999b; Estrada et al., 1999c; Pérez and Solis, 2009; Vergara-Galicia et al., 2009; inter alia). The pseudobulbs of *Cyrtopodium macrobulbon* Lindley, known with the common names of ch'itku'uk (Yucatan), chocolpextle (Oaxaca), and cañaveral (central region) (Arellano et al., 2003; Martínez, 1979), are employed medicinally in several regions of Mexico. Thus, in Morelos (Monroy-Ortiz et al., 2013) and Yucatan, they are topically applied for the treatment of abscesses and as a balsamic agent (Arellano et al., 2003). In Mexico City, they are commercialized in the famous Sonora Market, the most important supplier of medicinal plants in the city, and in the store "Las Plantas Medicinales de América" for treating painful urinary ailments in men ("mal de orin"). In their widespread study about the Tzeltales from Chiapas, Berlin et al. (1974) reported the use of the plant for treating the "cakal", a painful illness that affect the wing back. In addition, the gum extracted from the pseudobulbs is used as an adhesive for bookbinding and handicraft (García-Peña and Peña, 1981).

In this scenario, the present work was initially undertaken to establish the potential acute toxicity and the antinociceptive activity of *Cyrtopodium macrobulbon*, in order to provide pharmacological basis for its use for treating "mal de orin". A second major goal was to establish identity (botanical and chemical) and composition parameters useful for quality control of the crude drug of the plant. Altogether, the results will provide the foundation for the rational use of this popular orchid.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The pseudobulbs of *Cyrtopodium macrobulbon* (CM-1) were collected in Acahuizotla, Guerrero, Mexico in March 2011. Authenticated vouchers of the plant were deposited in the Herbario Nacional de México, Instituto de Biología, UNAM (MEXU 1372213, 1372214 and 1372215). Two additional commercial samples were purchased at the Sonora Market (CM-2, MEXU 1372212) and the store "Las plantas Medicinales de América" (CM-3) both in Mexico City, in April 2011, both samples were characterized by G.A. Salazar. CM-3 was purchased grounded.

### 2.2. Microscopic anatomy studies

#### 2.2.1. Light microscopy

Fresh fragments of pseudobulbs (CM-1–CM-3) were fixed in FAA (5% formalin, 5% acetic acid, 50% alcohol) for at least 24 h (Lopez-Curto et al., 2005), dehydrated and included in Paraplast<sup>®</sup> cubes. Transverse sections (12 µm thick) were obtained with an American Optical 829 rotary microtome and were stained with Johansen's quadruple technique (Johansen, 1940). Stained sections were mounted within synthetic resin. Fresh sections were also stained with naphthol blue black. Observations were made with an Olympus BX51 (Japan) photomicroscope and photomicrographs were taken using the Image Pro Plus version 6.1 Program plugged to an Evolution<sup>®</sup> LC Kit 5.0 camera.

#### 2.2.2. Scanning electron microscopy

Tissue blocks of pseudobulbs (CM-1–CM-3) were cut and dehydrated with ethanol (30 to 100%) series, washed with 100% ethanol, critical point dried, sputter-coated, and finally examined in a JEOL JSM-35C SEM microscope (Loza-Cornejo and Terrazas, 2003).

### 2.3. Phytochemical studies

#### 2.3.1. General procedures

Electron impact (EI) mass spectra (MS) were obtained on a JEOL SX 102 mass spectrometer. Open column chromatography: Silica gel 60 (0.063–0.200 mm), 70–230 mesh (Merck). TLC analyses were carried out on silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck) using a ceric sulfate solution in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%, p/v) as color reagent. HPLC analyses were performed on a Waters 2487 liquid chromatographic system consisting of a quaternary pump with a degasser, manual injector (loop, 20 µl), UV/vis dual detector (2487), and Empower 2 software for data acquisition (Milford, Massachusetts, USA). All analyses were carried out on Nova-Pak HR 7 µm silica (3.9 × 300 mm<sup>2</sup>) column. The detector wavelength was set at 280 nm. Manual SPME fiber holder and coated fibers were purchased from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA).

#### 2.3.2. Isolation of major compounds

Fifteen kg of fresh material (CM-2) were dried in a controlled temperature (35 °C) oven to yield 900 g of crude drug. The dried material was fragmented in a Wiley mill model 4 and macerated with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13 L × 2) for 15 d. The resulting extract was concentrated under reduced pressure to afford a brownish residue (15 g; OE). Ten grams of this material was subjected to open-column chromatography on silica gel (200 g), eluting with gradients of Hex-AcOEt (100:0→0:100) and AcOEt-MeOH (100:0→50:50) to yield 12 primary fractions (F<sub>1</sub>–F<sub>12</sub>). From F<sub>2</sub> (1.8 g), eluted with Hex-AcOEt (95:5), 80 mg of *n*-alkyl-*trans*-*p*-coumaric acid esters derivatives were isolated and identified; the mixture was composed by *n*-hexacosyl-*trans*-*p*-coumarate, *n*-octacosyl-*trans*-*p*-coumarate, and *n*-triacontyl-*trans*-*p*-coumarate (**1**–**3**) in a ratio of 1:2:1 according to the MS analysis (Jinfeng and Xiaozhang, 2000; Shu et al., 2004). From F<sub>4</sub> eluted with Hex-AcOEt (90:10) 10 mg of 4-methoxy-benzyl alcohol (**4**) were isolated (Machado et al., 2008). HPLC analysis of F<sub>6</sub> [2.7 g; Hex-AcOEt (90:10)]; using a Nova-Pak HR silica column and a gradient elution consisting of Hex (A) and AcOEt (B); 0 min (20% B), 30 min (25% B), afforded 4-hydroxybenzaldehyde [**5** (Jeoung-Hee et al., 2000); 32 mg; R<sub>f</sub>: 18.5 min] and 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol [**6** (Hernández-Romero et al., 2004); 32 mg; R<sub>f</sub>: 20.9 min]. Extensive TLC [Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (50:50:0.5)] of F<sub>7</sub> [100 mg; Hex-AcOEt (87:13)] yielded 54 mg of confusarin (**7**) (Majumder and Kar, 1987). From F<sub>8</sub>, 25 mg of gigantol (**8**) were isolated as an oily residue (R<sub>f</sub>: 0.47) using the same TLC conditions. TLC of fraction F<sub>9</sub> [30 mg; Hex-AcOEt (85:15)] afforded a glassy solid (batatasin III (**9**); R<sub>f</sub>: 0.40; 7.5 mg). Compounds **8** and **9** were compared with authentic samples previously obtained from *Nidema boothii* (Hernández-Romero et al., 2004). Finally, from F<sub>10</sub> [1.4 g; Hex-AcOEt (80:20)], 50 mg of ephemeranthol B (**10**; m.p. 189 °C) were obtained by means of TLC [Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (50:50:0.5)] (Kazuko et al., 2012). The structures of the isolates are depicted in Fig. 1.

The aqueous extract (AE) of *Cyrtopodium macrobulbon* (CM-2) was prepared from dry powdered plant material (80 g) using 1 L of boiling water during 30 min. After filtration, the infusion was evaporated to dryness under reduced pressure to give 2.0 g of a pale brown solid residue.

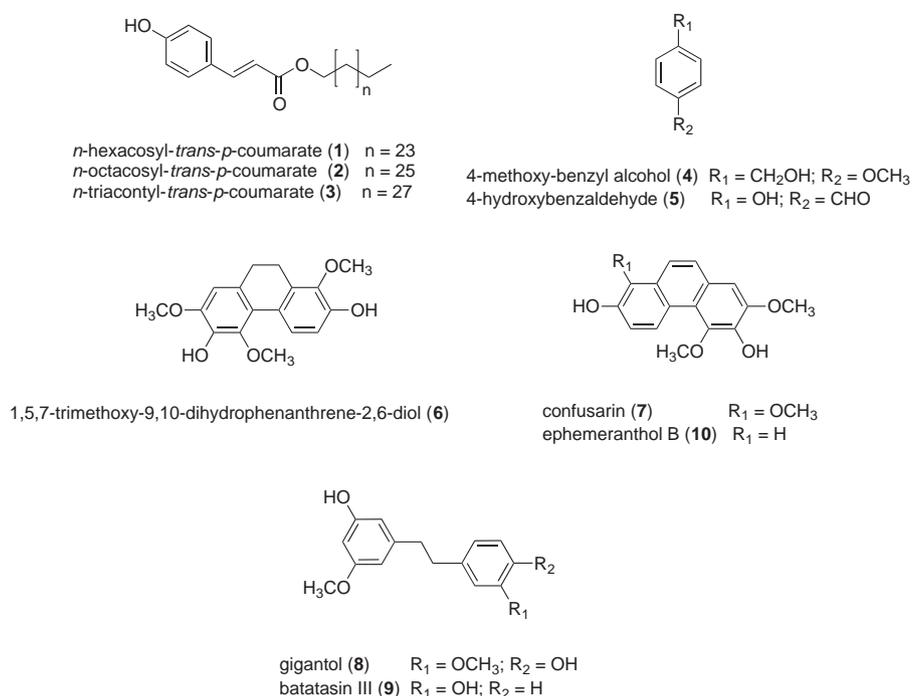


Fig. 1. Secondary metabolites isolated from the organic extract of *Cyrtopodium macrobulbon*.

### 2.3.3. Quantification of ephemeranthol B (10) in the crude drug

2.3.3.1. *Preparation of samples.* Determinations were performed using ground dried orchid samples (2.5 g, CM-2) extracted with 36 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . After three separate extractions, the resulting extracts were dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated to dryness under reduced pressure to yield ~42 mg of crude dried extract. Then, 0.2 mg of the dried organic extract were dissolved in 2 ml of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1) and filtered through Acrodisc<sup>®</sup> nylon membrane (0.45  $\mu\text{m}$ ) prior to HPLC analysis. The stock standard solution for the calibration curves of ephemeranthol B (10) were prepared by stepwise dilution of the stock solution with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (90:10) at five concentration levels within the range of 25 to 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

2.3.3.2. *HPLC conditions.* Several flow rates, modifiers and binary solvent systems in either isocratic or gradient mode were experimented with to compare the separation efficiency of the major components of OE. After a number of trials, a mobile phase composed by Hex-AcOEt was found to be the best. The flow rate and the injection volume were 0.6 mL/min and 20  $\mu\text{l}$ , respectively. Elution was carried out using the gradient between Hex (A) and AcOEt (B): 0 min (20% B); 30 min (15% B). The column was equilibrated during 20 min at the starting conditions before each injection. The detection was monitored at 280 nm.

2.3.3.3. *Validation.* The developed HPLC method was validated in terms of precision, accuracy, and linearity according to International Conference on Harmonization Guidelines (ICH, 2005). Standard calibration curves for quantifying ephemeranthol B (10) were obtained by plotting concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) against the area under the curve (AUC). The linearity of these curves was evaluated by least squares fit and the correlation coefficient using the software Origin 8.0 (Origin Laboratory, Massachusetts, USA). The lowest concentration solution was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (90:10) to a series of appropriate concentrations for determination of the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively (ICH, 2005). A recovery

test was used to evaluate the accuracy of the method. Briefly, the sample matrix was spiked with known concentrations of ephemeranthol B (10) and then, the recovery was assessed. In order to evaluate the linearity, three calibration curves correlating recovery concentrations versus added concentrations of the standards were constructed. Each sample was analyzed six times (ICH, 2005).

Precision was determined by analyzing six replicated injections of the standard reference of ephemeranthol B (10) in one and two different days to define intra- and inter-day precision, respectively. For repeatability of the assay, six identical samples were analyzed according to the method described. The relative standard deviation (RSD) was calculated for each determination and taken as a measure of precision and repeatability (ICH, 2005).

### 2.3.4. HS-SPME

2.3.4.1. *Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME).* Volatile constituents of *Cyrtopodium macrobulbon* (CM-2) were identified using solid-phase microextraction (SPME) system (Rubiolo et al., 2006; Yousif et al., 2000). One centimeter long coated fibers [carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), carboxen/divinylbenzene/polydimethylsiloxane (CAR/DVB/PDMS) and polydimethylsiloxane (PDMS) (100  $\mu\text{m}$ ; Supelco Technology, St. Louis, Missouri, USA)], were used for this analysis as complementary for determining the principal light volatile components of the plant. The fibers were conditioned in a GC injection port at 250  $^{\circ}\text{C}$  for 2 h, prior to use. The extraction procedure was conducted as follows: the sample phases containing 50 mg of dried material, 75 mg of NaCl, and 5 ml of distilled water were placed on suitable vials; then, the needles of the SPME device were pierced through the septum of the vials to the headspace during 40 min at 40  $^{\circ}\text{C}$  for obtaining the sample. Once the equilibrium was reached, the fibers were withdrawn into the needle and transferred to the injection port of the GC. The needle of the SPME device penetrated the septum of the GC inlet and the fibers exposed for subsequent chromatographic analysis using an Agilent 6890N series gas chromatograph equipped with a LECO MS-TOF instrument (Agilent Technology). After sampling, the SPME fiber was directly inserted into the GC injector port and the fiber thermally desorbed. A desorption time of 2 min at 250  $^{\circ}\text{C}$  was

used. Before GC–MS analysis, the fiber was conditioned in the injector of the GC system, according to the instructions provided by the manufacturer. All samples were analyzed by triplicate and the relative proportions of individual components adsorbed to the fibers under these conditions was calculated based on the total ion chromatogram (TIC) peak areas as a percentage of the sum of all peak areas.

**2.3.4.2. GC–MS analysis.** Analyses by GC–MS were carried out in an Agilent 6890 N series gas chromatograph equipped with a LECO time-of-flight mass spectrometer detector (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, California, USA). Compounds were separated on a 5% diphenyl–95% dimethyl polysiloxane (10 m × 0.18 mm, film thickness 0.18 µm) capillary column (Bellefonte, Pennsylvania, USA). The oven temperature was set at 40 to 260 °C at 4 °C/min, held for 20 min, and finally rose to 340 °C at 4 °C/min for 20 min isothermally. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 ml/min. Diluted samples were injected (2 µl) in the split mode (ratio 1:20). The ionization electron energy was 70 eV and the mass range scanned was 40–400 m/z. Injector and MS transfer line temperatures were set at 200 and 300 °C, respectively. Compounds were identified by comparing the retention times of the chromatographic peaks with those of authentic compounds run under the same conditions; by co-injection of the sample with a solution containing the homologous series of *n*-alkanes (C<sub>8</sub>–C<sub>20</sub>) in order to establish the retention indexes (Kovats indexes); and by comparing their MS fragmentation patterns with those of pure compounds, the spectral database of the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS or from literature data (Adams, 2007). All determinations were performed by triplicate.

#### 2.4. GIS and niche modeling

A map of *Cyrtopodium macrobulbon* potential distribution was assembled from a database of 92 verified herbarium records taxonomically georeferenced. The information was obtained mainly from the two major collections of Mexican Orchidaceae, namely the herbaria AMO and MEXU (acronyms according to Index Herbariorum; <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/>), plus additional records from Unidad de Informática de la Biodiversidad, Instituto de Biología, UNAM (<http://unibio.ibiologia.unam.mx>), the Red Mundial de Información sobre Biodiversidad, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (<http://www.conabio.gob.mx/>) and the Tropicos portal of the Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org/>). The Maximum Entropy modeling method, as implemented in the software MaxEnt version 3.3.1 available at <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent>, was used to develop models of habitat suitability for the species (Phillips et al., 2006). The environmental variable layers used consisted of four topographic data (U.S. Geological Survey; <http://edcdaac.usgs.gov/topo30/hydro>) and 19 bioclimatic parameters (including precipitation and temperature variables) with a spatial resolution of 30 arc sec (~1 km<sup>2</sup>) from WorldClim (Hijmans et al., 2005). Model performance was assessed by means of the Receiver Operating Characteristic (ROC; Phillips et al., 2006).

#### 2.5. Bioassays

##### 2.5.1. Animals

ICR male mice (20–25 g) were purchased from Centro UNAM-Harlan (Harlan Mexico, S.A. de C.V.). All animals were randomly housed in a climate- and light-controlled room with a 12 h light/dark cycle and maintained on standard pellet diet and clean water ad libitum. Twelve hours prior to performing the experiments, the animals were food withheld and had free access to drinking water.

After the experiments, all animals were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber.

##### 2.5.2. Ethical aspects

All experimental procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with the international rules on care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize the number of animals used (*n*=6) as well as any discomfort (Zimmerman, 1983).

##### 2.5.3. Drugs and treatments

Morphine (MOR) and metamizol (MET) used as central and peripheral analgesic agents, respectively, were prepared in vehicle (2% Tween-80<sup>®</sup> in saline solution; 10 ml/kg) and administered to mice at 5 and 100 mg/kg intraperitoneally (i.p). The vehicle at the same volume was administered orally to the control groups. The aqueous (AE) and organic (OE) extracts (31.6, 100, and 316 mg/kg body weight) of *Cyrtopodium macrobulbon* (CM-2) were suspended in vehicle for administration to mice.

##### 2.5.4. Acute toxicity test

Mice were divided into control and test groups (*n*=3) and treated in two phases. In the first, test groups received intragastric doses of 10, 100, and 1000 mg/kg body weight of AE and OE. In the second, the animals received doses of 1600, 2900, and 5000 mg/kg body weight, according to the Lorke method (1983). The control group received the vehicle. In each phase, mice were observed daily during 14 days for mortality, toxic effects and/or changes in behavioral pattern. At the end of the each phase the animals were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber and the main organs were compared versus those of the control group (Lorke, 1983).

##### 2.5.5. Antinociceptive activity

**2.5.5.1. Acetic acid-induced writhing test.** The peripheral antinociceptive activity of AE and OE was studied by acetic acid-induced writhing test according to previously described protocols. Briefly, mice were divided into control, reference drug and test groups (*n*=6). After 30 min of oral administration of the treatments or vehicle, each mouse received acetic acid (0.6%; i.p). The reference drug was administered 15 min before injection of acetic acid. Writhings (abdominal contraction, elongation of body, and extension of the hind limb) were counted cumulatively during 30 min (Al-Chaera and Traubb, 2002; Arendt-Nielsen and Chen, 2003).

**2.5.5.2. Hot-plate test.** The hot-plate test was performed using a conventional thermal apparatus (Le 7406, Panlab Technology Bioresearch). Mice were placed into an acrylic cylinder on the heated surface (55.5 ± 0.2 °C); the time between placements of a mouse in the platform and shaking/licking of the paws or jumping was recorded as the latency period. Mice were treated by oral administration with vehicle, samples (AE and OE) or the reference drug (MOR) 30 min before the thermal noxious stimuli and the latency period was recorded at 0, 30, 60, 90, 120, and 150 min following treatments (*n*=6). A cut-off of period 30 s was maintained to avoid injury to the paw of mice.

##### 2.5.6. Statistical analysis

All results are presented as the mean ± SEM (*n*=6). The statistical significance among the groups was assessed using the one way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc* test using GraphPad software.

### 3. Results and discussion

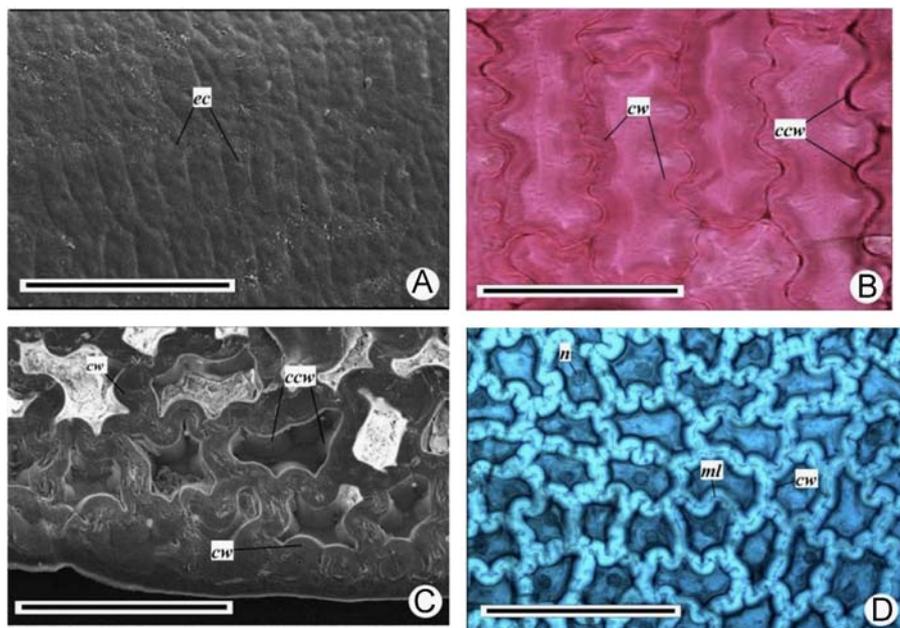
#### 3.1. Microscopic anatomy studies

Transverse sections of pseudobulbs (12  $\mu\text{m}$  thick) stained with Johansen's quadruple technique (Johansen, 1940) showed similar structural features as previously described by Stern and Judd (2001) for the related species *Cyrtopodium punctatum*. The only difference was observed in epidermal tissue, which in the case of *Cyrtopodium macrobulbon* displayed a layer of enlarged, crenate and cell thin-walled cells with a thickened cuticle. These particular structures were highlighted using both the Johansen's Safranin and Naphthol Blue Black staining techniques, and confirmed by SEM (Fig. 2). These wall cells are described for the first time for this botanical species therefore they will be valuable for microscopic identification of *Cyrtopodium macrobulbon* and will preclude substitution or

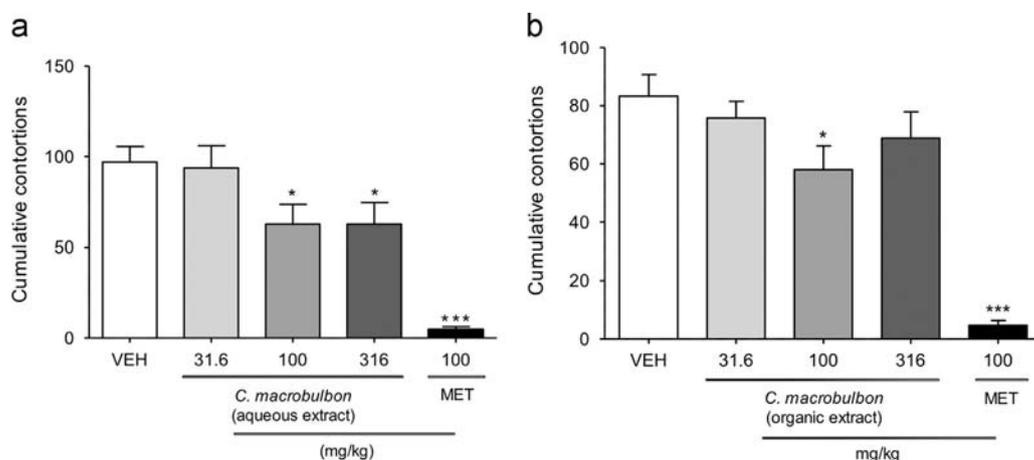
adulteration with related species. Noteworthy, botanical samples CM-1 – CM-3 showed identical microscopic anatomic features.

#### 3.2. Acute toxicity studies

The Lorke's method is perhaps the most widely used approach for investigating the acute toxicity of herbal drugs, since the experiments are carried out with a minimum number of experimental animals (Lorke, 1983). Oral administration of AE or OE, at doses in the range of 10 – 5000 mg/kg did not produce visible toxic effects, changes on behavior or body weight of treated mice after 14 days. Furthermore, no lesions or bleedings were observed in macroscopic morphology on internal organs such as lungs, kidneys, liver, heart, and stomach. Since no animal damage or death was observed throughout the experiment, the plant can be regarded as harmless for mice; the estimated  $\text{LD}_{50}$  was higher than



**Fig. 2.** Structural characters of epidermal cells in *Cyrtopodium macrobulbon*. **A** and **C** [Scanning Electron Microscope (SEM)]. **B** and **D** [Light Microscopy (LM)]. **(A)** General aspect of epidermal cells (*ec*) of *Cyrtopodium macrobulbon* scale bar 200  $\mu\text{m}$ . **(B)** Wall cells (*cw*) thickening and creases cell (*cc*) scale bar 50  $\mu\text{m}$ . **(C)** Detail of thickening of wall cells (paradermal section) and creases cell (*cc*); scale bar 50  $\mu\text{m}$ . **(D)** Fresh stain showed thickenings in cell wall (*cw*), middle lamella (*ml*) and cell nuclei (*n*); scale bar 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3.** Antinociceptive activity of *Cyrtopodium macrobulbon* herbal preparations: aqueous extract (AE, panel A) and organic extract (OE, panel B) on writhing reflex of mice in the acetic acid-induced writhing test. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ , Dunnett's *post hoc* test compared with control group.

5000 mg/kg for both extracts tested. These results along with the persistence of the plant in Mexican markets provide primary evidences about the innocuousness of the plant.

### 3.3. Antinociceptive properties

The use of *Cyrtopodium macrobulbon* for treating painful urinary ailments in men (“mal de orin”) prompted us to assess its potential analgesic action employing two well-known pharmacological models. The first one, the acetic acid-induced writhing test, is a classical visceral pain test useful to detect painful complaints associated to inflammatory disorders (Al-Chaera and Traubb, 2002). On the other hand, the hot-plate test is a suitable method for to evaluate central antinociceptive activity. In addition, this model measures animal behavior and has good sensitivity and specificity (Arendt-Nielsen and Chen, 2003). The effects of AE and OE from *Cyrtopodium macrobulbon* on the writhing response in mice are shown in Fig. 3. The best effect for AE was obtained at the doses of 100 and 316 mg/kg (35% of inhibitory activity each one). For OE an important effect was achieved at the dose of 100 mg/kg (30% of activity). None of the extracts showed activity in the hot-plate assay. Thus, the antinociceptive properties associated with peripheral mechanisms in animal models were demonstrated for both preparations of *Cyrtopodium macrobulbon*; the mechanism underlying this effect, however, remains an open question. The main outcomes of this finding provide rational evidence for the use of *Cyrtopodium macrobulbon* to treat some painful disorders in Mexican folk medicine.

### 3.4. Phytochemical analysis

Conventional phytochemical analysis of the organic extract from the pseudobulbs of *Cyrtopodium macrobulbon* led to the isolation and characterization of *n*-hexacosyl-*trans*-*p*-coumarate (1), *n*-octacosyl-*trans*-*p*-coumarate (2), *n*-triacontyl-*trans*-*p*-coumarate (3), 4-methoxy-benzyl alcohol (4), 4-hydroxybenzaldehyde (5), 1,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,6-diol (6), confusarin (7), gigantol (8), batatasin III (9), and ephemeranthol B (10). The structures of the isolates are showed in Fig. 1. The compounds were characterized by comparison of their spectroscopic and spectrometric properties with those previously described. With the exception of the *n*-alkyl-*p*-coumarate derivatives 1–3, the remaining compounds belong to the stilbenoid family which is common in orchids. The presence of gigantol (8), ephemeranthol B (10) and 1,8-cineol (11) with known antinociceptive and anti-inflammatory properties could partially account for the activity of the extracts, and in turn with the efficacy of the plant (Déciga-Campos et al., 2007; Kanekar et al., 2013). Moreover, compounds 7, 8 and 10 possesses potential activity for trapping ROS (Reactive Oxygen Species), which are implicated in a number of pro-inflammatory signal transduction cascades activated by cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and lipopolysaccharide (Masateru et al., 1995; Kanekar et al., 2013).

### 3.5. Identification of the volatile components obtained by HS-SPME

The volatile components profile of *Cyrtopodium macrobulbon* was accomplished via GC–MS analysis of HS-SPME-adsorbed compounds of the aerial parts of the plant. Three different fibers were used, namely CAR/PDMS, CAR/DVB/PDMS, and PDMS. For this analysis seven components (Table 2) were identified in the plant and the major components were 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone, eucalyptol (11), and isobornyl formate. Others metabolites identified were: hexanal, 2-Z-heptanal, 1-nonen-3-ol, and eicosane. The presence of eucalyptol (11) might be also related with the antinociceptive properties of the plant (Silva et al., 2003).

**Table 1**  
Regression parameters, LOD, LOQ, accuracy, and precision for ephemeranthol B (10) in *Cyrtopodium macrobulbon* crude drug.

Parameter	LC/DAD method ephemeranthol B (10)
$R^2$ (n=6) <sup>a</sup>	0.9934
Regression equation	6234082.3 $\times$ -465213.1
Working range, $\mu$ g/ml	25 – 500
LOD, $\mu$ g/ml (n=10) <sup>b</sup>	78.1
LOQ, $\mu$ g/ml (n=10) <sup>c</sup>	257.8
Average recovery, % (n=6)	98.8 – 100.9
Repeatability RSD, % (n=6)	1.8

<sup>d</sup>RSD=Relative standard deviation.

<sup>a</sup>  $R^2$ =Determination coefficient.

<sup>b</sup> LOD=Limit of determination,  $3.3 \times$  (SD of the response/slope of the calibration curve).

<sup>c</sup> LOQ=Limit of quantification,  $10 \times$  (SD of the response/slope of the calibration curve).

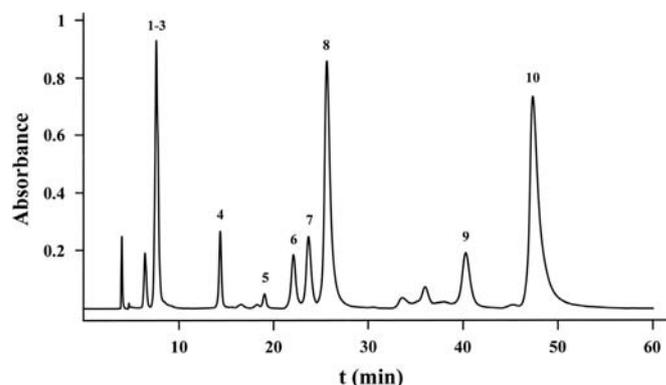
**Table 2**

Headspace volatile compounds identified from *Cyrtopodium macrobulbon* pseudobulbs by HS-SPME using CAR/DVB/PDMS, CAR/PDMS and PDMS-coated fibers.

Component	RI <sup>a</sup>	CAR/DVB/PDMS %Area <sup>b</sup>	CAR/PDMS	PDMS
Hexanal	946	42.3		
Eucalyptol (10)	902	11.3	45.50	
2-Z-Heptanal	933	9.8		
Isobornyl formate	1301		15.6	29.59
1-Nonen-3-ol	850		13.64	
6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	1866			60.80
Eicosane	934			9.63

<sup>a</sup> RI of the compounds determined on a DB-5 column.

<sup>b</sup> The percentages were calculated from the GC-flame ionization detector (FID) chromatograms.



**Fig. 4.** Typical chromatogram of the organic extract (OE) obtained from *Cyrtopodium macrobulbon*.

### 3.6. Development of a suitable HPLC method for quantifying ephemeranthol B (10)

A suitable HPLC method was developed to quantify ephemeranthol B (10), which was selected as the active marker compound considering its chemical stability and abundance (Gaedcke and Steinhoff, 2003; Zhang et al., 2012). Gigantol (8) chemically decompose in solution upon standing at room temperature during the different analyses. The optimal HPLC separation conditions were achieved with a Nova Pak HR silica ( $3.9 \times 300$  mm<sup>2</sup>) column

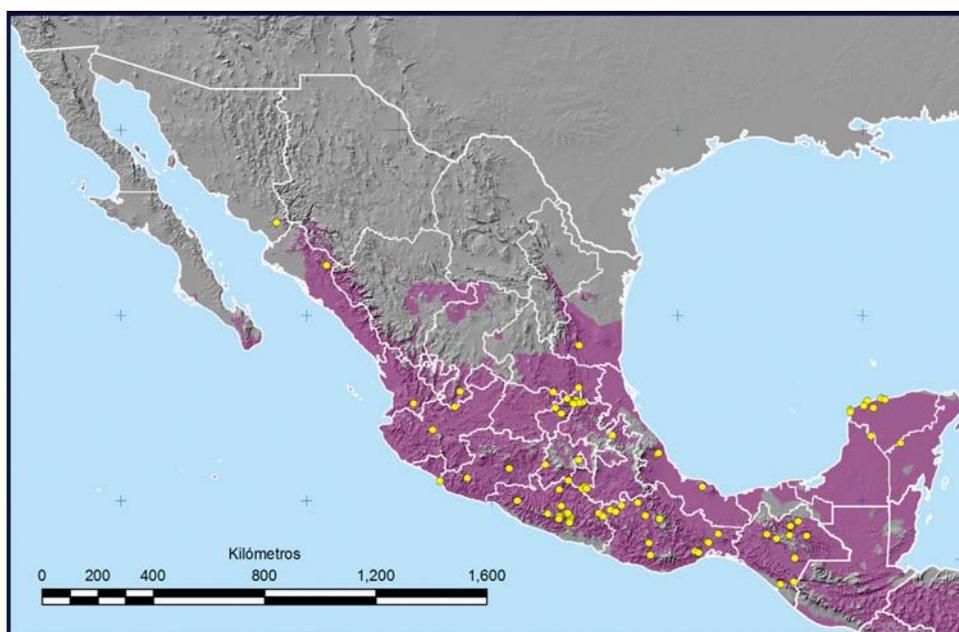


Fig. 5. Potential distribution models (MaxEnt) for *Cyrtopodium macrobulbon* (purple areas; AUC=0.944). Yellow dots indicate the 92 individual localities records used to model the species' distribution.

and mobile phase composed by Hex-AcOEt (Fig. 4). Then, the HPLC method was fully validated (Table 1) according to International Conference on Harmonization (ICH) guidelines (ICH, 2005). The linearity of the system was tested in the concentration range between 25 and 500  $\mu\text{g/ml}$ . The CV was less than 1.84% at each concentration level analyzed. LOD value was 78.1  $\mu\text{g/ml}$  whereas the LOQ value was 257.8  $\mu\text{g/ml}$ . The linearity of the method was tested by recovery assay. The recovery ranges for the standard were expressed as the concentration detected as a percentage of the expected concentration and were found to be 98.8–100.9. The reproducibility and repeatability of the analytical method were evaluated in terms of the intermediate precision by analyzing three replicates of six samples of stock solution (25  $\mu\text{g/ml}$ ) in 3 different days. The relative standard deviation (RSD;  $n=6$ ) was calculated for each sample evaluated. In conclusion, the fast and reliable HPLC-DAD method for quantifying the content of ephemeranthol (**10**) as marker compound in the organic extract (CM-2) prepared from the pseudobulbs of *Cyrtopodium macrobulbon* was developed and fully validated. Finally, the content of **10** in *Cyrtopodium macrobulbon* was quantified, in three batches (CM-1–CM-3) analyzed, with a mean concentration of 2.21, 1.37 and 6.52 mg/g of dry matter, respectively.

### 3.7. Potential distribution map

The potential distribution map obtained for *Cyrtopodium macrobulbon* (Fig. 5) agrees with the records available in the Mexican herbaria examined and the public databases consulted, although there seems to be large areas with suitable abiotic conditions in which the species has not been recorded (e.g. most of the Yucatan Peninsula). Thus, *Cyrtopodium macrobulbon* is one of the most widely distributed species among the Mexican Orchidaceae.

## 4. Conclusions

The extracts and stilbenoids from *Cyrtopodium macrobulbon* have shown antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant actions, which could be beneficial in the management of inflammatory diseases such as “mal de orin”. In this work, an

analytical HPLC method for quantifying ephemeranthol B (**10**) was established and validated; compound **10** is one of the active principles of the species selected as marker compound on the basis of its chemical stability and availability. This method will valuable as a composition test for the crude drug and standardized preparations of *Cyrtopodium macrobulbon*. Chemical and botanical identity tests for quality control of this orchid were also developed. Altogether these analyses will be suitable for the pharmacopeic monograph of this valuable species. The potential distribution map obtained clearly indicated that these species is widespread in Mexico. This observation, along with the easy vegetative propagation of the pseudobulbs, secures the supply and protection of the wild populations of the orchid.

## Acknowledgments

This work was supported by grants of Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, IN–212913) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 150966). The authors thank the technical assistance of Araceli Pérez-Vasquez, Teresa Terrazas, Héctor Huerta, Berenitt Mendoza-Garfias, Georgina Duarte, and Rosa Isela del Villar. V.M. acknowledges to Posgrado en Ciencias Biológicas-UNAM and a fellowship from CONACyT to pursue graduate studies.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.006>.

## References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy, fourth ed. Allured Publishing Corporation, Chicago.
- Al-Chaera, E.D., Traubb, R.J., 2002. Biological basis of visceral pain: recent developments. Pain 96, 221–225.
- Arendt-Nielsen, L., Chen, A.C.N., 2003. Lasers and other thermal stimulators for activation of skin nociceptors in humans. Neurophysiologie Clinique 33, 259–268.

- Arellano, R.J.A., Flores, J.S., Tun, G.J., Cruz, B.M.M., 2003. Nomenclatura, Forma de Vida, Uso, Manejo y Distribución de las Especies Vegetales de la Península de Yucatán. Etnoflora Yucatanense, Fascículo 20. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida p. 464.
- Berlin, B., Breedlove, O.E., Raven, P.H., 1974. Principles of Tzeltal Plant Classification. Academic Press, New York, London p. 659.
- Bulpitt, C.J., 2005. The uses and misuses of orchids in medicine. Q. J. Med. 98, 625–631.
- Bulpitt, C.J., Li, Y., Bulpitt, P.F., Wang, J., 2007. The use of orchids in Chinese medicine. J. R. Soc. Med. 100, 558–563.
- Chase, M.W., 2005. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. Curtis's Bot. Mag. 22, 2–7.
- Déciga-Campos, M., Palacios-Espinosa, J.F., Reyes-Ramírez, A., Mata, R., 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. J. Ethnopharmacol. 114, 161–168.
- Estrada, S., Acevedo, L., Rodríguez, M., Toscano, R., Mata, R., 1999a. New triterpenoids from the orchids *Scaphyglottis livida* and *Nidema boothii*. Nat. Prod. Lett. 16, 81–86.
- Estrada, S., Toscano, R., Mata, R., 1999b. New phenanthrene derivatives from *Maxillaria densa*. J. Nat. Prod. 62, 1175–1178.
- Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A., Mata, R., 1999c. Nitric Oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyls from *Scaphyglottis livida*. Planta Med. 65, 109–114.
- García-Peña, M., Peña, M., 1981. Uso de las orquídeas en México, desde la época Prehispánica hasta nuestros días. Orquídea 8, 59–75.
- Gaedcke, F., Steinhoff, B., 2003. Herbal Medicinal Products. Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart p. 200.
- Hágsater, E., Soto, A.M.A., Salazar, C.G.A., Jiménez, M.R., López, R.M.A., Dressler, R.L., 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México D.F p. 104.
- Hernández-Romero, Y., Rojas, J.L., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R., 2004. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. J. Nat. Prod. 67, 160–167.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Int. J. Climatol. 25, 1965–1978.
- International Conference of Harmonization, (ICH), 2005. Text on Validation of Analytical Procedures. Harmonized Tripartite Guideline [Q2(R1)]. In: Proceedings of International Conference on Harmonization: Geneva. pp. 1–13.
- Jeoung-Hee, H., Dong-Ung, L., Jae-Tae, L., Jin-Sook, K., Chul-Soon, Y., Jung-Ae, K., Jung-Sang, H., Keun, H., 2000. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1, is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. J. Ethnopharmacol. 73, 329–333.
- Jinfeng, H., Xiaozhang, F., 2000. Triterpenoids, *p*-coumaric acid esters and flavonoids from *Artemisia igniaria*. Planta Med. 66, 684–686.
- Johansen, D.A., 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill, New York, pp. 88–89.
- Kanekar, Y., Basha, K., Duché, S., Gupte, R., Kapat, A., 2013. Regioselective synthesis of phenanthrenes and evaluation of their anti-oxidant based anti-inflammatory potential. Eur. J. Med. Chem. 67, 454–463.
- Kong, J.M., Goh, N.K., Chia, L.S., Chia, T.F., 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. Acta Pharmacol. Sin. 24, 7–21.
- Kovács, A., Vasas, A., Hohmann, J., 2008. Natural phenanthrenes and their biological activity. Phytochemistry 69, 1084–1110.
- Lorke, D., 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. Arch. Toxicol. 54, 275–287.
- Lopez-Curto, L., Márquez, G.J., Murguía, S.G., 2005. Técnicas para el estudio de angiospermas: libro de laboratorio. Facultad de Ciencias. UNAM, México D.F p. 178.
- Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). J. Plant Res. 116, 27–35.
- Machado, L., Monte, F.J., De Oliveira, M., De Mattos, M., Lemos, T., Gotor-Fernández, V., De Gonzalo, G., Gotor, V., 2008. Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 54, 130–133.
- Majumder, P.L., Kar, A., 1987. Confusarin and confusarinidin, two phenanthrene derivatives of the orchid *Eria confusa*. Phytochemistry 26, 1127–1129.
- Martínez, M., 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo del Cultura Económica, México D.F p. 1061.
- Masateru, O., Yasuyuki, I., Chikako, M., Hideharu, K., Toshihiro, N., 1995. Antioxidative constituents from *Dendrobii herba* (Stems of *Dendrobium* spp.). Food Sci. Technol. Int., 15–120.
- Monroy-Ortiz, C., García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., Sánchez-Quintanar, C., Luna-Cavazos, M., Uscanga-Mortera, E., Flores-Guido, J.S., González-Romero, V., 2013. Plants of local interest for medicinal and conservation purposes in Morelos, Mexico. Ethnomedicine 7, 13–26.
- Pérez, R.M., 2010. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. J. Med. Plants Res. 4, 592–638.
- Pérez, R.M., Solís, R., 2009. Relaxant and antispasmodic effects of extracts of the orchid *Enciclya michuacana*: on isolated guinea pig ileum. J. Nat. Med. 63, 65–68.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E., 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. Ecol. Model. 190, 231–259.
- Rubiolo, P., Belliardo, F., Cordero, C.H., Liberto, E., Sgorbini, B., Bicchi, C., 2006. Headspace-solid phase microextraction fast GC in combination with principal component analysis as a tool to classify different chemotypes of chamomile flower-heads *Matricaria recutita* L. Phytochem. Anal. 17, 217–225.
- Silva, J., Abebeb, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machadoc, M.I.L., Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. J. Ethnopharmacol. 89, 277–283.
- Shu, Y., Guo, S., Chen, X., Wang, C.H., Yang, J., 2004. Studies on chemical constituents of *Dendrobium nobile*. Chin. Pharm. J. 39, 421–422.
- Stern, W.L., Judd, W.S., 2001. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). Bot. J. Linn. Soc. 136, 153–178.
- Singh, S., Kumar-Singh, A., Kumar, S., Kumar, M., Kumar-Pandey, P., Kumar-Singh, M.C., 2012. Medicinal properties and uses of orchids: a concise review. Elix. Appl. Bot. 52, 11627–11634.
- Vergara-Galicia, J., Ortiz-Andrade, R., Rivera-Leyva, J., Castillo-España, O., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Gallardo-Ortiz, I., Estrada-Soto, S., 2009. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism. Fitoterapia 81, 350–357.
- Yousif, A.N., Durance, T.D., Scaman, C.H., Girard, B., 2000. Headspace volatiles and physical characteristics of vacuum-microwave, air, and freeze-dried oregano (*Lippia berlandieri* Schauer). J. Food Sci. 65, 926–930.
- Zhang, J., Wider, B., Shang, H., Li, X., Ernst, E., 2012. Quality of herbal medicines: challenges and solutions. Complement. Ther. Med. 20, 100–106.
- Zimmerman, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16, 109–110.