



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS DE *PROSTHECHEA KARWINSKII*  
(ORQUIDACEAE)

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. MARIA ISABEL SILVA ROBALINO

DR. E. GUILLERMO DELGADO LAMAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CDMX, JUNIO 2019



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**

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

**AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA  
MOLECULAR DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE  
*PROSTHECHEA KARWINSKII* (ORQUIDACEAE)**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**Q. MARIA ISABEL SILVA ROBALINO**



Ciudad de México,

2019

## ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Los resultados parciales de este trabajo fueron presentados en el Encuentro Académico QuimiUNAM, realizado el 7 de agosto del 2018, en modalidad de cartel con el título “Avances sobre el aislamiento y determinación de los metabolitos secundarios presentes en *Prosthechea karwinskii* (Orquidaceae)”.

## JURADO

Presidente. Dr. Manuel Jiménez Estrada.

Vocal. M. en C. Emma Maldonado Jiménez.

Vocal. Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

Vocal. Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia.

Secretario. Dr. José Fausto Rivero Cruz.

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio 1C del Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México, ubicado en la Ciudad de México, Coyoacán, México.

---

Q. Maria Isabel Silva Robalino

Sustentante

---

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

Tutor

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Química.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (becario 622264).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el apoyo a través del proyecto a DGAPA UNAM (PAPIIT IG200318).

Al Dr. Guillermo Delgado, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su enseñanza, paciencia y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Solano, Dra. Luicita Lagunez, Dr. Leovigildo Quijano y al Dr. Luis Demetrio Miranda por sus enseñanzas.

A los miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones en el desarrollo de este trabajo.

Al personal técnico del Instituto de Químico: a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, a la Q. Ma. de los Ángeles Peña González y a la Dra. Beatriz Quiroz García de los laboratorios de Resonancia Magnética Nuclear. A la Dra. María del Carmen García González, al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y al Ing. Q. Luis Velasco Ibarra del laboratorio de Espectrometría de Masas. Al M. en C. Antonio Nieto Camacho y a María Teresa Ramírez Apan, del laboratorio de pruebas biológicas.

A mis compañeros del Laboratorio 1-C, Dr. José Luis Rodríguez Chávez, M. en C. José Luis Ávila, M. en C. Fabiola López, M. en C. Luis Romero, M. en C. Olivia Pérez, M. en C. Luann Martínez y Q. A. Yesica Cruz, por las enseñanzas y risas compartidas.

A Marco Mijangos, David Atahualpa Contreras, Adriana Romo, Yoarhy Sánchez, Peter López, Raúl Romero, Daniel Zurita, Amanda Cevallos, Anita Yañez, Elí Sánchez, Andrés Pineda y Jimmy Enríquez por compartir sus conocimientos, por tener el gusto de contar con su apoyo y por las aventuras vividas.

Al pueblo mexicano, que con sus impuestos permiten que cómo yo, muchas personas puedan aspirar a una educación superior. Infinitas gracias.

***A mis abuelitos***

***porque son mi ejemplo de esfuerzo y dedicación***

***A mi mamá***

***por todo, nunca voy a cansarme de agradecerle a la vida por poderte llamar así***

***A mi papá***

***por apoyarme en hacer realidad mis sueños***

***A mi hermano***

***por esperarme siempre***

***A mi esposo, mi compañero de vida***

***por tenerme de tu mano y no soltarme. Eres mi hogar, mi casa.***

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Generalidades del género <i>Prosthechea</i> .....	3
2.2. Generalidades de <i>Prosthechea karwinskii</i> .....	4
2.3. Generalidades de estilbenos .....	7
3. JUSTIFICACIÓN .....	10
4. OBJETIVOS.....	12
4.1    Objetivos generales .....	12
4.2    Objetivos específicos .....	12
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	13
5.1.    Identificación y elucidación estructural de los compuestos aislados.....	13
5.1.1.    Germanicol ( <b>35</b> ).....	13
5.1.2.    Ferulatos de <i>n</i> -alquilo ( <b>36</b> ) .....	15
5.1.3. $\beta$ -Sitosterol ( <b>37</b> ) y estigmasterol ( <b>38</b> ).....	16
5.1.4.    9,10-Dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol ( <b>39</b> ).....	17
5.1.5.    Gigantol ( <b>4</b> ) .....	18
5.1.6.    Tristina ( <b>40</b> ).....	19
5.1.7. $\alpha$ -D-Glucopiranososa ( <b>41</b> ) y $\beta$ -D-glucopiranososa ( <b>42</b> ) .....	20
5.1.8.    Sacarosa ( <b>43</b> ) .....	21
5.2.    Actividades biológicas .....	22
5.2.1.    Evaluación de la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa .....	22
5.2.2.    Inhibición en el crecimiento de líneas celulares cancerosas humanas...	23
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	24
6.1.    Material vegetal.....	24
6.2.    Materiales y equipos.....	24
6.3.    Primera colecta .....	25
6.4.    Segunda colecta .....	29
6.5.    Resumen de productos naturales aislados.....	31
6.6.    Características físicas y espectroscópicas de los productos aislados .....	32
6.6.1.    Germanicol ( <b>35</b> ).....	32
6.4.2    Ferulatos de <i>n</i> -alquilo ( <b>36</b> ) .....	33
6.4.3 $\beta$ -Sitosterol ( <b>37</b> ) y estigmasterol ( <b>38</b> ).....	33
6.4.4    9,10-Dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol ( <b>39</b> ).....	34
6.4.5    Gigantol ( <b>4</b> ) .....	34
6.4.6    Tristina ( <b>40</b> ).....	35

6.4.7	$\alpha$ -D-Glucopiranososa (41) y $\beta$ -D-glucopiranososa (42).....	35
6.4.8	Sacarosa (43) .....	36
6.7.	Actividades biológicas .....	36
6.7.1.	Evaluación de la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa. ....	36
6.7.2.	Inhibición del crecimiento de líneas celulares cancerosas humanas.....	37
7.	CONCLUSIONES.....	39
8.	REFERENCIAS .....	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b>	<i>Prosthechea karwinskii</i> en floración <sup>7</sup> .....	5
<b>Figura 2.</b>	Cromatograma del extracto de <i>P. karwinskii</i> (320 nm); picos identificados: hidroxitirosol (18); tirosol (19); 7-O-glucopiranosido de apigenina (9); ácido caféico (20); vainillina (21); ácido <i>p</i> -cumárico (22) y ácido ferúlico (23). Adaptado de la referencia 18. ....	6
<b>Figura 3.</b>	Esquema de la biosíntesis del ácido lunulárico, como ejemplo de la biosíntesis de bibencilos. Adaptado de la referencia 21.....	8
<b>Figura 4.</b>	Esquema de la biosíntesis del hircinol (34), como ejemplo de la biosíntesis de dihidrofenantrenos. Adaptado de la referencia 21.....	9

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b>	Fracciones del extracto hexánico de la primera colecta que contenían productos naturales. ....	26
<b>Tabla 2.</b>	Fracciones reunidas del extracto acetónico de la primera colecta que contenían productos naturales. ....	27
<b>Tabla 3.</b>	Fracciones del extracto metanólico de la primera colecta que contenían productos naturales. ....	28
<b>Tabla 4.</b>	Fracciones reunidas del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1) de la segunda colecta que presentaron productos naturales. ....	31
<b>Tabla 5.</b>	Diferencias entre la primera y la segunda colecta .....	31

<b>Tabla 6.</b> Resumen de los productos naturales presentes en ambas colectas y su rendimiento. ....	32
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los extractos de ambas colectas y metabolitos secundarios aislados de <i>P. karwinskii</i> sobre la actividad de la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura y rata. ....	36
<b>Tabla 8.</b> Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de los compuestos gigantol ( <b>4</b> ) y tristina ( <b>40</b> ). ....	38

## LISTA DE ESPECTROS

<b>ESPECTRO 1.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de II6. ....	48
<b>ESPECTRO 2.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de II6. ....	49
<b>ESPECTRO 3.</b> Espectro de masas del pico $t_R = 35.96\text{min}$ correspondiente a germanicol ( <b>35</b> ) y sus posibles fragmentos. ....	50
<b>ESPECTRO 4.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{H}$ (700 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de germanicol ( <b>35</b> ). ....	51
<b>ESPECTRO 5.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (176 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de germanicol ( <b>35</b> ). ....	52
<b>ESPECTRO 6.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{H}$ (700 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de ferulatos de <i>n</i> -alquilo ( <b>36</b> ). .....	53
<b>ESPECTRO 7.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (176 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de ferulatos de <i>n</i> -alquilo ( <b>36</b> ). .....	54
<b>ESPECTRO 8.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de $\beta$ -sitosterol ( <b>37</b> ) y estigmasterol ( <b>38</b> ). ....	55
<b>ESPECTRO 9.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de $\beta$ -sitosterol ( <b>37</b> ) y estigmasterol ( <b>38</b> ). ....	56
<b>ESPECTRO 10.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol ( <b>39</b> ). ....	57
<b>ESPECTRO 11.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol ( <b>39</b> ). ....	58
<b>ESPECTRO 12.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de gigantol ( <b>4</b> ). ....	59
<b>ESPECTRO 13.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CCl}_3$ ) de gigantol ( <b>4</b> ). ....	60
<b>ESPECTRO 14.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) de tristina ( <b>40</b> ). ....	61
<b>ESPECTRO 15.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) de tristina ( <b>40</b> ). ....	62
<b>ESPECTRO 16.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{H}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de $\alpha$ -D-glucopiranososa ( <b>41</b> ) y $\beta$ -D-glucopiranososa ( <b>42</b> ). ....	63
<b>ESPECTRO 17.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de $\alpha$ -D-glucopiranososa ( <b>41</b> ) y $\beta$ -D-glucopiranososa ( <b>42</b> ). ....	64

<b>ESPECTRO 18.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de sacarosa ( <b>43</b> ) .....	65
<b>ESPECTRO 19.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de sacarosa ( <b>43</b> ) .....	66

## **LISTA DE CROMATOGRAMAS**

<b>CROMATOGRAMA 1.</b> Cromatograma CG-MS de la fracción II6 .....	67
--	----

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Prosthechea* pertenece a la familia Orchidaceae. Esta familia se encuentra ampliamente distribuida y se considera una de las familias más diversas y extensas de las Angiospermas, ya que se estima que incluye entre 30,000-35,000 especies distribuidas en 850 géneros.<sup>1</sup> Aunque es una familia cosmopolita, su presencia se limita a ambientes tropicales y subtropicales,<sup>2</sup> y ha destacado principalmente por sus flores debido a su aroma, forma, color y hábito de reproducción.<sup>3</sup>

En México, la familia Orchidaceae ocupa el tercer lugar a nivel nacional en lo referente a las familias de plantas con mayor diversidad taxonómica, siendo superadas sólo por Asteraceae y Fabaceae, ya que han sido registrados en el país alrededor de 1260 especies y 170 géneros, cuya importancia radica en que el 40% son endémicas.<sup>4</sup>

Oaxaca es uno de los estados con mayor diversidad de orquídeas, ya que cuenta con 144 géneros y 721 especies, de los cuales dos géneros y 56% de las especies son endémicas.<sup>5</sup> La importancia de las orquídeas de este estado de la República no se limita únicamente al aspecto botánico, sino a otros muchos aspectos. Pueden mencionarse los diferentes usos tradicionales como ornamento, medicina, ritos ceremoniales y comestibles que los habitantes de las etnias mixteca y triqui les han dados a estas plantas y actualmente forman parte de su patrimonio biocultural.<sup>6</sup>

*Prosthechea karwinskii* es una orquídea que se destaca en cuanto a la importancia cultural, ya que es empleada en la preparación de "agua de gloria", que se describe como un agua perfumada hecha con sus flores y suele utilizarse en procesiones durante la Pascua.<sup>6</sup> Además, durante la Semana Santa en varias ciudades de Oaxaca, las personas crean adornos efímeros utilizando *P. karwinskii* en conjunto con otras plantas como junco rojo (*Disocactus ackermannii*), disciplina (*Huperzia* sp.) y heno blanco (*Tillandsia usneoides*).

Este patrimonio cultural y botánico sirve de inspiración para emprender la exploración química de orquídeas endémicas, de modo que se plantea como propósito de este

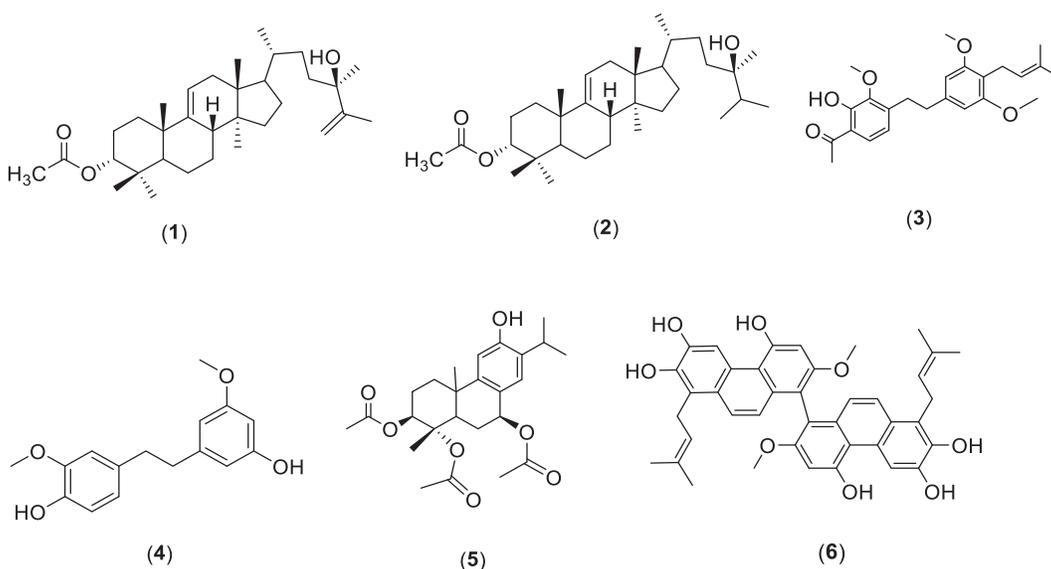
trabajo de investigación, la generación de conocimiento sobre los constituyentes químicos de este vegetal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades del género *Prosthechea*

*Prosthechea* es un género esencialmente centroamericano y con aproximadamente 90 especies,<sup>7</sup> aunque existen varios reportes botánicos de plantas pertenecientes a este género como *P. ionocentra*,<sup>8</sup> *P. moojenii*,<sup>9</sup> *P. cochleata*,<sup>10</sup> *P. radiata*,<sup>10</sup> entre otros, los reportes acerca del aislamiento de metabolitos secundarios son escasos.

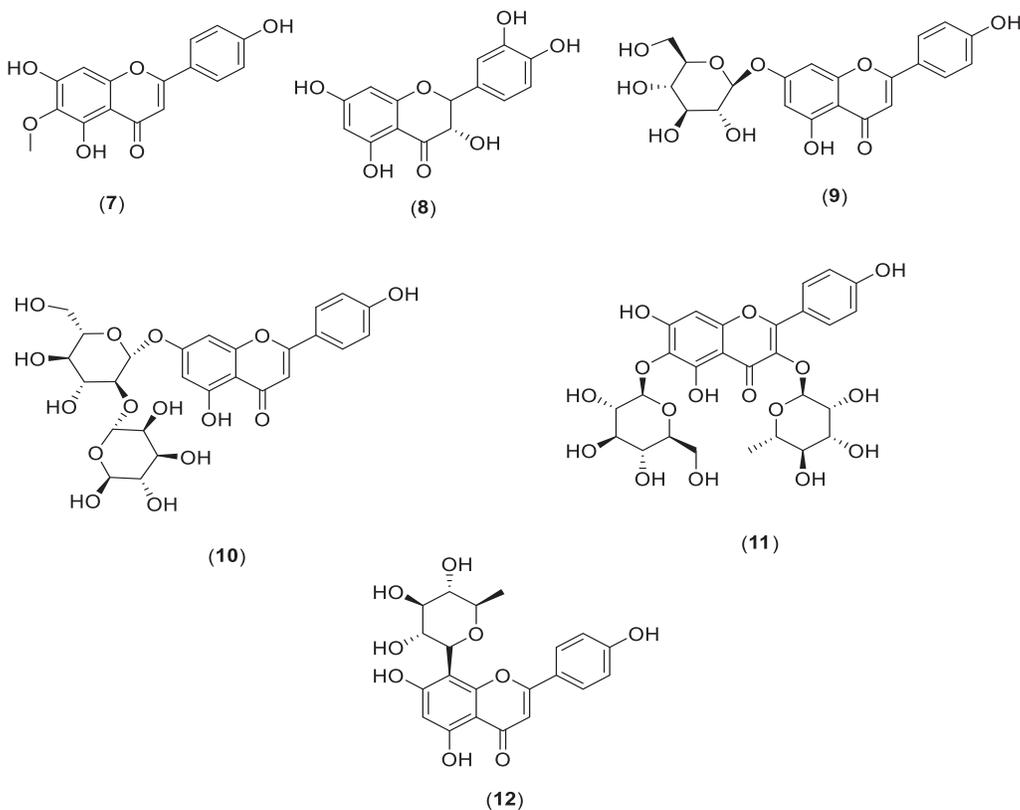
La orquídea *Prosthechea michuacana*, es la más estudiada en este género, de la cual se estudiaron el extracto clorofórmico de los pseudobulbos y obtuvieron productos naturales del tipo lanostano: 3 $\alpha$ -acetoxi-24-hidroxi-24-metil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11),25-dieno (**1**), 3 $\alpha$ -acetoxi-24-hidroxi-24-metil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11)-eno (**2**), dos dihidroestilbenos:  $\alpha,\alpha'$ -dihidro-3',5',2-trimetoxi-3-hidroxi-4-acetil-4'-isopentenilestilbeno (**3**) y gigantol (**4**), un diterpeno del tipo abietano: 12-hidroxi-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,18 $\alpha$ -triacetoxi-8,11,13-abietatrieno (**5**) y un fenantreno: 4,6,7-trihidroxi-2-metoxi-8-(metilbut-2-enil)fenantreno-1,1'-4',6',7'-trihidroxi-2'-metoxi-8'-(metilbut-2'-enil)fenantreno (**6**).<sup>11</sup>



Se estudió también el extracto metanólico de pseudobulbos y se obtuvieron los siguientes los flavonoides: éter 6-metilico de escutellareina (**7**), dihidroquercetina (**8**),

7-O-glucósido de apigenina (**9**), 7-neohesperidósido de apigenina (**10**) y el flavonol 6-O-β-D-glucopiranosil-3-O-α-L-ramnopiranosido-apigenina (**11**).<sup>12</sup>

Además, se reporta la presencia del flavonoide 8-C-β-D-quinovopiranosil apigenina (**12**) en tres plantas del género *Prosthechea*: *P. fragrance*, *P. vespa* y *P. caetensis*.<sup>13</sup>



## 2.2. Generalidades de *Prosthechea karwinskii*

*Prosthechea karwinskii* (Mart.) J.M.H. Shaw (Figura 1) es una orquídea endémica del sur de México, que crece en bosques de pino-encino y de forma exclusiva en árboles de encino como epífita.<sup>6</sup>



**Figura 1.-** *Prosthechea karwinskii* en floración.<sup>14</sup>

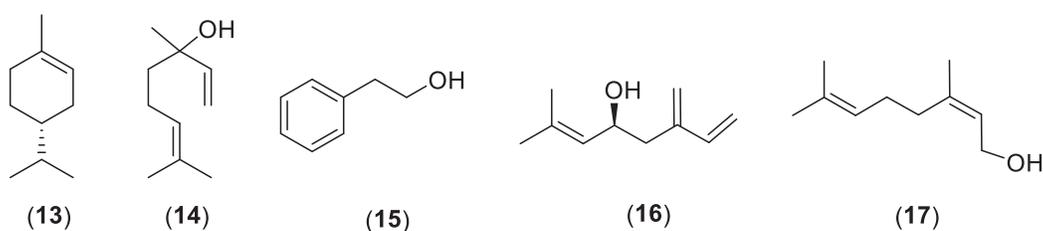
La orquídea lleva su nombre en honor al naturalista bávaro Wilhelm Friedrich Karwinski von Karwin (1780–1855) y debido a que posee flores vistosas, amarillas y aromáticas también se le conoce como “lirio amarillo”, “monja amarilla”, “flor castigada” e “ita nchaca cuan”<sup>15</sup> este el último nombre en mixteco. *Prosthechea karwinskii* suele encontrarse junto a otra orquídea *Laelia furfuracea*, razón por la cual esta última es conocida en la región mixteca como “ita ndeka morada”, por su flor morada característica, que se presenta durante de noviembre.<sup>15</sup>

Su uso etnomédico se encuentra documentado, en donde se mencionan el empleo de pseudobulbos en preparaciones para la tos, quemaduras y diabetes, las flores en preparaciones para la tos y para prevenir el aborto, finalmente las hojas, para la diabetes.<sup>6</sup>

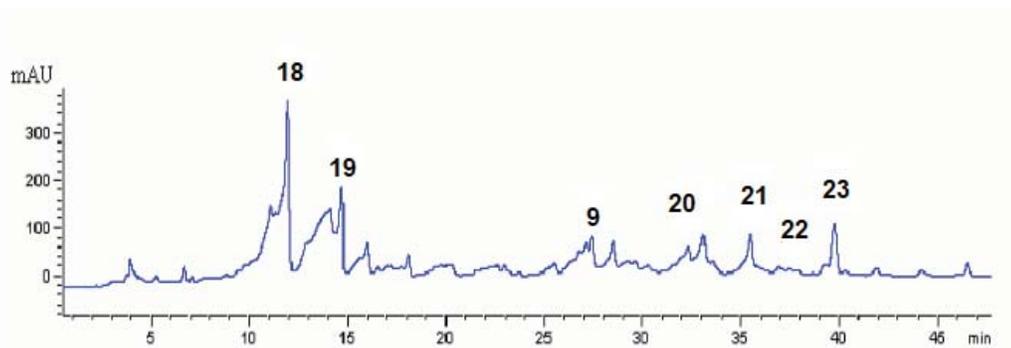
En cuanto a la fenología de *Prosthechea karwinskii*, la floración tiene lugar entre finales de febrero y principios de mayo. La maduración de los frutos y la dispersión de las semillas tiene lugar en marzo y principios de mayo. El desarrollo de los frutos toma entre 42 y 47 semanas a partir de abril. Entre la temporada de lluvias, y el inicio del invierno (mayo a diciembre) tiene lugar la fase de crecimiento vegetativo (la formación de nuevos

brotos). En invierno (enero a febrero) las plantas se encuentran en fase de latencia o dormancia (comunicación personal con el Dr. Rodolfo Solano del Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional Unidad Oaxaca, 2019).

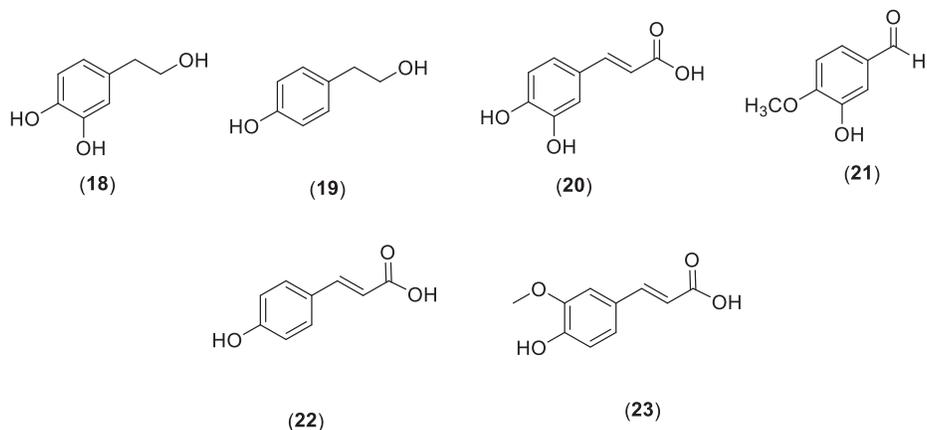
Acerca de los estudios químicos previos de esta orquídea, se han analizado los componentes volátiles de las flores de *P. karwinskii* mediante la técnica microextracción en fase sólida, y se identificaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas los compuestos: limoneno (**13**), linalool (**14**), 2-feniletanol (**15**), ipsdienol (**16**) y nerol (**17**),<sup>16</sup> las cuales también fueron reportados en los volátiles de *Encyclia citrina*.<sup>17</sup>



En otro estudio, se realizó la extracción de toda la planta con mezclas de etanol-agua sobrecalentado. Los compuestos presentes fueron identificados y cuantificados por comparación con estándares por CLAR-UV; el cromatograma se presenta en la Figura 2. Los analitos con mayor concentración presentes son: hidroxitirosol (**18**), tirosol (**19**), 7-O-glucósido de apigenina (**9**), ácido caféico (**20**), vainillina (**21**), ácido *p*-cumárico (**22**) y ácido ferúlico (**23**).<sup>18</sup>



**Figura 2.** Cromatograma del extracto de *P. karwinskii* (320nm); picos identificados: hidroxitirosol (**18**); tirosol (**19**); 7-O-glucopiranosido de apigenina (**9**); ácido caféico (**20**); vainillina (**21**); ácido *p*-cumárico (**22**) y ácido ferúlico (**23**). Adaptado de la referencia 18.



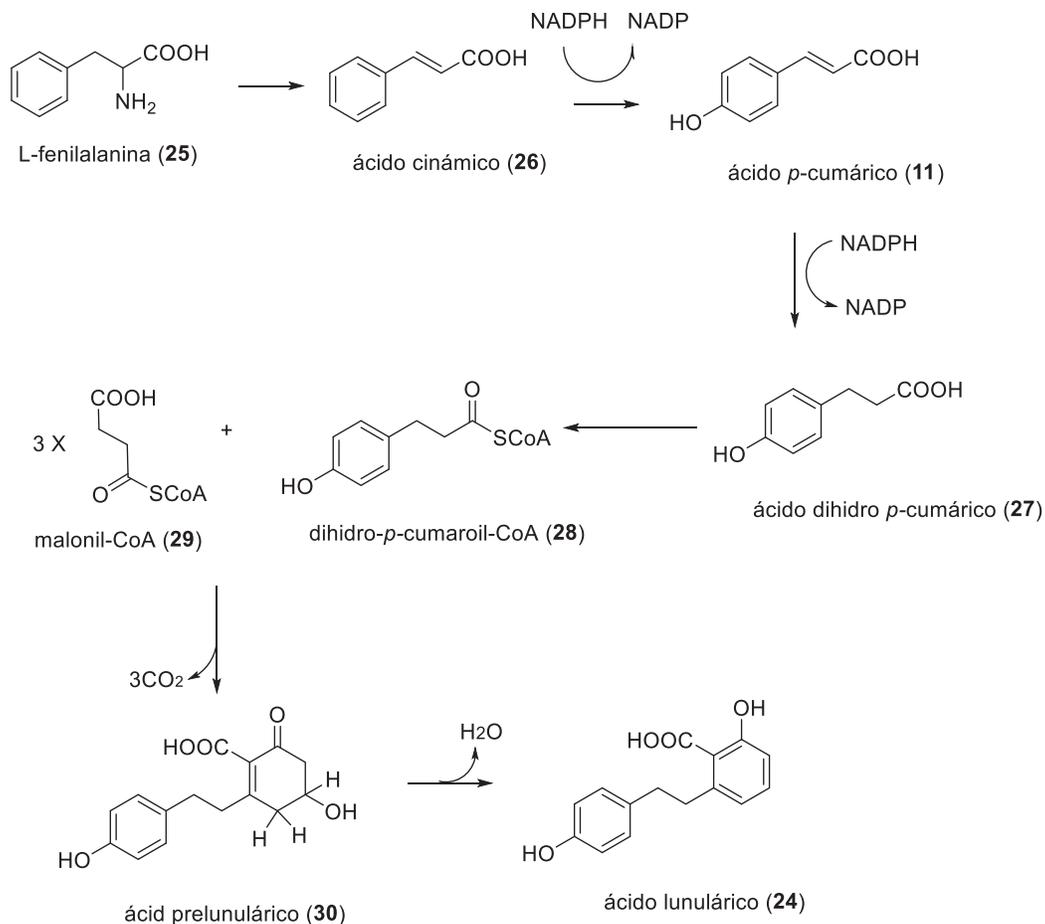
En cuanto a las actividades biológicas, se evaluó el efecto de los extractos de etanol:agua (1:1) de hojas (L), flores (F) y pseudobulbos (P) en la obesidad y dislipidemia de ratones Wistar. El efecto se evaluó determinando la disminución del tejido adiposo total de un grupo control y tres grupos tratados con el extracto. Los grupos tratados con el extracto experimentaron disminuciones significativas en el tejido adiposo total: 49% en el grupo P, 36% en el grupo L y 33% en el grupo F.<sup>19</sup>

Continuando con los estudios de actividades biológicas, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos hidroetanólicos (HE) e hidrometanólicos (HM) de hojas, flores y pseudobulbos. Los que tuvieron el mejor índice de actividad antioxidante fueron el extracto HM e HE de las hojas, por lo que posteriormente, se evaluó su capacidad de inhibición de crecimiento en líneas celulares cancerosas U251 (glioblastoma maligno), PC-3 (próstata), K562 (leucemia), HCT-15 (colon), MCF-7 (glándula mamaria) y SKLU-1 (pulmón) en concentraciones de (50 µg/ml). Los extractos tuvieron un porcentaje de inhibición del 13.8% (HE) y 13% (HM) en la línea MCF-7.<sup>20</sup>

### 2.3. Generalidades de estilbenos

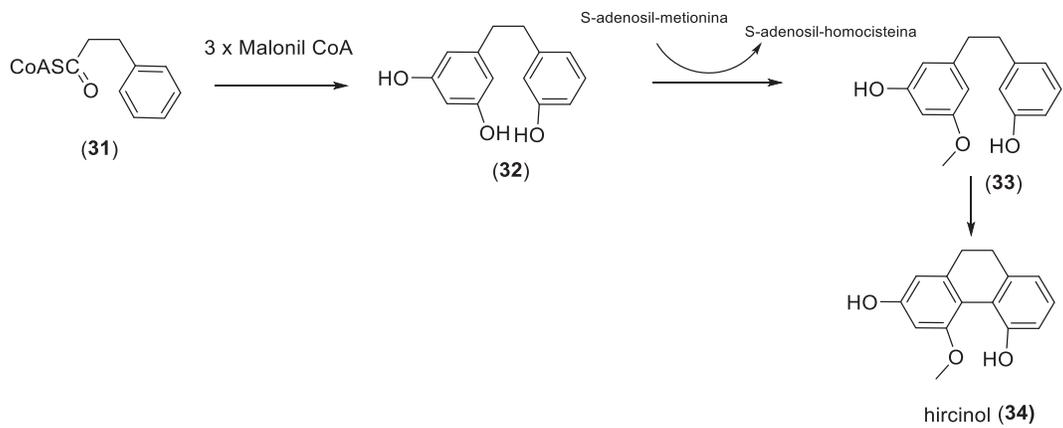
Los estilbenoides son una clase de fenoles que contienen unidades C6-C2-C6, usualmente con la presencia de 1,2-difeniletieno o núcleos de 1,2-difeniletano en sus estructuras. Se clasifican en cinco grupos: estilbenos, oligostilbenos, bibencilos, bibibencilos y fenantrenos. Los estilbenoides se han aislado solo en ciertos géneros específicos del reino vegetal, pero resaltan por su diversidad química, de acuerdo a diferentes sustituyentes.<sup>21</sup>

Con el fin de ilustrar la biosíntesis de los bibencilos, se tomará al ácido lunulárico (**24**) como ejemplo. Este bibencilo, se biosintetiza a través del acoplamiento de ácido dihidro-*p*-cumárico con tres unidades de malonil-CoA como se ilustra en la Figura 4.<sup>21</sup>



**Figura 3.** Esquema de la biosíntesis del ácido lunulárico, como ejemplo de la biosíntesis de bibencilos. Adaptado de la referencia 21.

En cuanto a la biosíntesis de los 9,10-dihidrofenantrenos, se considera que los bibencilos son sus intermedios bicíclicos como se detalla en la Figura 4 tomando como ejemplo al hircinol (**34**). En dicha figura se indica que es el acoplamiento oxidativo del intermedio bibencilo lo que conduce a la formación de fenantreno.<sup>21</sup>



**Figura 4.** Esquema de la biosíntesis del hircinol (34), como ejemplo de la biosíntesis de dihidrofenantrenos. Adaptado de la referencia 21.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe un amplio aprecio de la población hacia las orquídeas, tanto por su variedad como por su valor ornamental; sin embargo, también son relevantes desde el punto de vista ecológico, ya que existen múltiples interacciones planta-planta y planta-animal, entre las que destacan las interacciones generadas entre orquídeas y los organismos anfitriones en las que viven (árboles, arbustos), las generadas por los procesos de polinización entre orquídeas e insectos, así como las interacciones mutualistas entre insectos.<sup>1</sup> Es evidente que la comprensión de estos fenómenos, algunos de los cuales son mediados por los metabolitos secundarios, es necesaria para la conservación del hábitat natural.

En cuanto a la importancia en medicina tradicional, de entre las 25,000 y 30,000 especies de orquídeas, únicamente alrededor de 600 (2%) tienen registros de uso médico a nivel mundial, a excepción de China que reporta que el 20% de sus orquídeas nativas poseen uso medicinal. Tres orquídeas son notables en este aspecto: Tianma (*Gastrodia elata*), Shihu (varias especies de *Dendrobium*) y Baiji (*Bletillia striata*), las cuales se encuentran relatadas en el documento Shen Nong Ban Cao Jing o la materia Médica de Shen Nong.<sup>22</sup> y cuyo aprecio en la medicina tradicional ha motivado a investigadores asiáticos a llevar a cabo estudios de sus componentes químicos.<sup>23-25</sup>

El acervo de literatura con respecto a orquídeas asiáticas, es contrastante con lo reportado para orquídeas americanas, pese a que el continente americano posee la mayor diversidad de orquídeas del mundo, con 3,784 especies en Ecuador,<sup>26</sup> 3,264 en Colombia,<sup>26</sup> 2,600 especies en Brasil<sup>26</sup> y 1,200 especies en México.<sup>1</sup> Como sucede con la mayoría de las especies de plantas (o de otros reinos de la naturaleza), no se han investigado los aspectos referentes a las interacciones biológicas que suceden en la naturaleza, y en el caso particular de la familia Orchidaceae, los aspectos referentes a su conservación y al aprovechamiento racional de las propiedades biológicas que puedan poseer sus metabolitos secundarios.

Por lo anterior, resalta la importancia de llevar a cabo estudios químicos de orquídeas americanas, como *Prosthechea karwinskii*, una orquídea endémica de México, que es apreciada en la medicina tradicional, en diversas regiones del centro y sur del país,<sup>6</sup> y llevar a cabo bioevaluaciones de los extractos y metabolitos secundarios.<sup>19,20</sup> Por estos motivos se estima pertinente contribuir al conocimiento del contenido químico de esta especie.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Generar conocimiento original referente a la estructura molecular de los productos naturales presentes en la *Prosthechea karwinskii* y, de acuerdo a la disponibilidad de muestras puras, evaluar preliminarmente algunas de sus propiedades biológicas

### 4.2 Objetivos específicos

- Aislar los metabolitos secundarios presentes en los pseudobulbos de dos colectas de lirio amarillo (*Prosthechea karwinskii*).
- Elucidar las estructuras moleculares de los compuestos aislados mediante el análisis e integración de los datos espectroscópicos y espectrométricos, principalmente de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- Realizar algunas evaluaciones que eventualmente permitan ponderar algunas propiedades biológicas de las sustancias aisladas.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se llevaron a cabo dos colectas del material vegetal para el análisis químico. La primera se realizó en época de floración (de febrero a principios de mayo) y la segunda en época de crecimiento vegetativo (noviembre), y se procedió al estudio de ambas colectas.

En la primera colecta del material vegetal, mediante diferentes procesos cromatográficos realizados a los extractos hexánico, acetónico y metanólico de los pseudobulbos de *P. karwinskii*, se aislaron y caracterizaron varios metabolitos secundarios, los cuales se mencionarán en orden de polaridad creciente: germanicol (35),  $\beta$ -sitosterol (37), estigmasterol (38), gigantol (4), tristina (39),  $\alpha$ -D-glucopiranososa (41),  $\beta$ -D-glucopiranososa (42) y sacarosa (43).

En la segunda colecta del material vegetal, a partir del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1), se aislaron y caracterizaron las siguientes sustancias, los cuales se también se mencionarán en orden de polaridad creciente: germanicol (35), ferulatos de *n*-alquilo (36),  $\beta$ -sitosterol (37), estigmasterol (38), 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol (39), gigantol (4) y tristina (40).

A continuación, se describe la elucidación estructural de los compuestos obtenidos.

### 5.1. Identificación y elucidación estructural de los compuestos aislados

#### 5.1.1. Germanicol (35)

A partir del extracto hexánico de la primera colecta, se aisló un sólido ligeramente amarillo de la fracción II6 cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 1) mostró señales a campo alto entre  $\delta_{\text{H}}$  0.73 y 1.08 que insinúan la presencia de hidrógenos metílicos y metilénicos asignables presumiblemente a esteroides o triterpenos. La presencia de la señal intensa centrada en  $\delta_{\text{H}}$  1.25, es asignable a hidrógenos metilénicos, por lo que es probable que el producto natural se tratara de un éster de triterpeno, o bien, de un triterpeno en mezcla de alcoholes lípidos. La ausencia de la señal del carbonilo de éster (aproximadamente en  $\delta_{\text{C}}$  167<sup>27</sup>) o la señal de carbonilo de ácido en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 2) permite inferir que la señal en  $\delta_{\text{H}}$  1.25 sea asignable a hidrógenos metilénicos de un alcohol o varios alcoholes lipídicos.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la muestra resaltan las señales centradas en  $\delta_{\text{C}}$  142.9 y 129.8, correspondientes a un doble enlace trisustituido. La revisión en la literatura indica que tales señales son coincidentes para los carbonos olefinicos C18 y C19 de un triterpeno pentacíclico (ya que este grupo de sustancias son frecuentes en el reino vegetal), y específicamente a un triterpeno con esqueleto de oleanano.<sup>27-30</sup>

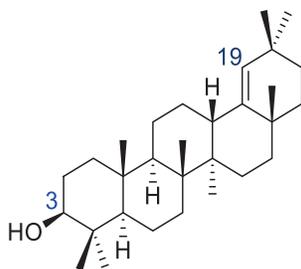
El análisis CG-MS (Cromatograma 1) permitió conocer que efectivamente, esta muestra es una mezcla constituida por un triterpeno ( $t_{\text{R}} = 35.96\text{min}$ ) y varios alcoholes de cadena larga ( $t_{\text{R}} = 27.93, 29.88, 31.74, 33.44\text{ min}$ ). El espectro de masas de los picos en  $t_{\text{R}} = 27.93, 29.88, 31.74, 33.44\text{ min}$ , revelan un patrón de fragmentación asignable a alcoholes de cadena alifática larga. Además, el espectro de masas del pico en  $t_{\text{R}} = 35.96\text{ min}$  permitió identificar a un triterpeno de ión molecular  $[\text{M}]^+ 426$  correspondiente a la fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ . El patrón de fragmentación (Espectro 3) corresponde a un triterpeno del tipo oleanano insaturado en C18-C19, ya que exhibe una pérdida pronunciada del metilo en C-17, al tener una activación alílica debido al doble enlace C18-C19 lo que permite estabilizar a los iones que contienen al anillo D y E.<sup>31</sup>

Finalmente, con el objetivo de aislar y purificar el triterpeno de la fracción II6, se realizó su separación mediante CC de sílice químicamente modificada, ( $\text{C}_{18}$ ) con la que se obtuvo el sólido II6D.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 4) del sólido II6D se observa la señal doble de dobles centrada en  $\delta_{\text{H}}$  3.21 asignable a un hidrógeno metínico  $\alpha$ -axial por la constante de acoplamiento  $J_{\text{ax-ax}}$  (11.6 Hz) con H2  $\beta$ -axial y  $J_{\text{ax-ec}}$  (4.8Hz) con H2  $\alpha$ -ecuatorial, lo que permitió concluir que el protón se encuentra geminal a un grupo hidroxilo en C3.

También se observa una señal asignable a un hidrógeno olefínico en  $\delta_{\text{H}}$  4.85 que es adjudicable a la insaturación en C18-C19. La comparación de los datos experimentales con los informados en la literatura permitió confirmar la identidad de esta sustancia con el triterpeno germanicol (**35**).<sup>28-31</sup>

El germanicol (**35**) ha sido aislado en otras plantas como en *Kleinia odora* (Asteraceae),<sup>32</sup> *Celtis sinensis* (Ulmaceae),<sup>33</sup> entre otras especies vegetales. Así, esta es la primera ocasión que se reporta esta sustancia en la familia Orchidaceae, donde es más común encontrar triterpenos con esqueleto de cicloartano tipo C-31 y C-32,<sup>34</sup> lanostano,<sup>11</sup> taraxano,<sup>25</sup> entre otros.



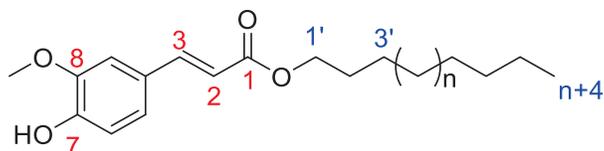
(35)

### 5.1.2. Ferulatos de *n*-alquilo (36)

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 7) de un sólido blanco obtenido del extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (1:1) se encuentran 18 señales, de las cuales 5 corresponden a señales de metino en  $\delta_{\text{C}}$  144.6, 123.1, 115.7, 114.7, 109.3 y 4 a carbonos cuaternarios  $\delta_{\text{C}}$  167.4, 147.9, 146.7, 127.1. Una señal destacable es la centrada en  $\delta_{\text{C}}$  167.4 asignable a un carbono carbonílico de éster que en conjunto con la señal intensa a campo alto de metilenos ( $\delta_{\text{C}}$  29.7) suele presentarse en ésteres de cadena alifática larga, los cuales se encuentran frecuentemente en los productos naturales.

Además, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 6) resaltan las señales 7.61 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H) y 6.29 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H) que por su acoplamiento son asignables a hidrógenos olefínicos con disposición *trans*. Esta señal presentó acoplamiento en el espectro HSQC con el carbono en  $\delta_{\text{C}}$  167.4 por lo que se deduce que el éster antes mencionado es  $\alpha$ - $\beta$  insaturado. Los desplazamientos químicos de los carbonos cuaternarios indican la presencia de un benceno con tres sustituyentes, que mediante el experimento HMBC se dedujo que los sustituyentes son un éster  $\alpha$ - $\beta$  insaturado, un fenol y un metoxilo.

El análisis de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los hidrógenos de los metinos aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  7.07 (dd,  $J = 8.2, 1.9$  Hz, 1H), 7.03 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H)) indican un patrón de acoplamiento ABX, que suele encontrarse en bencenos asimétricamente sustituidos<sup>35</sup> y según las constantes de acoplamiento corresponden a los hidrógenos de la posición 6 ( $\delta_{\text{H}}$  6.92,  $J_{\text{orto}}$ ), 5 ( $\delta_{\text{H}}$  7.07,  $J_{\text{orto y meta}}$ ) y 9 ( $\delta_{\text{H}}$  7.03,  $J_{\text{meta}}$ ). Los desplazamientos antes detallados concuerdan con lo mencionado en la literatura al describir la mezcla de ferulatos de *n*-alquilo (36) que se han presentado en otras orquídeas como *D. tosaense* y *D. moniliforme*.<sup>36</sup>



(36)

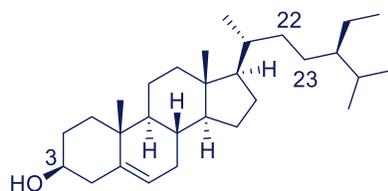
### 5.1.3. $\beta$ -Sitosterol (37) y estigmasterol (38)

En el proceso cromatográfico se obtuvo un sólido como se describe en la parte experimental. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 8) de este mostró señales a campo alto que sugieren la presencia de un esteroles, en particular por el conjunto de señales entre  $\delta_{\text{H}}$  1.02-0.69, que son las correspondientes a metilos, ya que estas sustancias contienen generalmente seis metilos con diferente multiplicidad. El análisis de esta región del espectro permitió identificar una señal doblete centrada  $\delta_{\text{H}}$  0.93 ( $J = 6.5$  Hz), asignable al metilo C21, el cual se encuentra unido al metino C20 de los esteroides, lo cual está de acuerdo con la suposición de que esta muestra es un esteroles (o una mezcla, como se describe a continuación). Adicionalmente, en  $\delta_{\text{H}}$  5.36 se observa una señal doble ( $J = 5.1$  Hz), asignable a un hidrógeno olefínico, el cual puede ubicarse en los carbonos C6, C7, o C11 del esqueleto de fitoesteroides, sin embargo, la mayoría de los esteroides posee el doble enlace entre C5-C6, por lo que lo más probable es que este hidrógeno corresponda a H6. Otra señal interpretable directamente es la señal múltiple centrada en  $\delta_{\text{H}}$  3.54 que puede atribuirse al hidroximetino H3, que es un fragmento estructural frecuente en fitoesteroides.

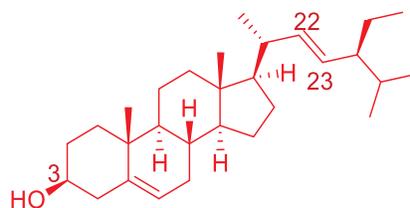
En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 9) se observan señales en  $\delta_{\text{C}}$  140.5 y 121.9, asignables a una olefina trisustituida, la cual que puede ubicarse entre C5-C6, dada la frecuencia de este fragmento entre los fitoesteroides. Estos datos son prácticamente idénticos a los informados para el  $\beta$ -sitosterol (37) y la comparación con muestras auténticas permitieron confirmar su identidad.

En los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se observaron señales que no corresponden al  $\beta$ -sitosterol. En particular, las dos señales de doblete de doblete en  $\delta_{\text{H}}$  5.16 ( $J = 15.18, 8.48$  Hz) y  $\delta_{\text{H}}$  5.02 ( $J = 15.19, 8.62$  Hz) son asignables a los hidrógenos H22 y H23 del doble enlace di-sustituido con configuración *trans* del estigmasterol. Así, es posible concluir que esta muestra es una mezcla (3:1) de  $\beta$ -sitosterol (37) y estigmasterol (38). Los datos descritos coinciden con los informados en la literatura<sup>37,38</sup> y la comparación por CCF de

esta muestra con las disponibles en el laboratorio permitieron confirmar la naturaleza de esta muestra.



(37)



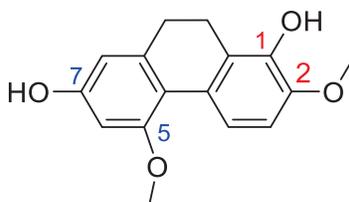
(38)

#### 5.1.4. 9,10-Dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol (39)

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 11) de un sólido blanco obtenido mediante procesos de purificación del extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (1:1) se encuentran 17 señales, 12 de ellas correspondientes a carbonos aromáticos, las cuales, de acuerdo con los experimentos DEPT 90 y 135, corresponden a 4 metinos ( $\delta_{\text{C}}$  120.2, 109.0, 108.2, 99.1), y 8 carbonos cuaternarios ( $\delta_{\text{C}}$  159.1, 157.6, 146.0, 142.9, 141.6, 127.6, 124.8, 116.3). El desplazamiento a campo bajo y el número de señales descritas concuerdan con lo mencionado en la literatura para la estructura de fenantrenos, los cuales son considerados marcadores taxonómicos de ciertos grupos de las familias Combretaceae, Discoraceae, Juncaceae y Orchidaceae, siendo esta última la fuente de la mayoría de los fenantrenos naturales.<sup>39</sup> En el experimento HSQC se observa correlación entre las señales a campo alto  $\delta_{\text{C}}$  31.0 y 22.2 y los protones  $\delta_{\text{H}}$  2.61 (m, 2H) y 2.74 (m, 2H) respectivamente, por lo que pueden asignarse a C9 y C10 de dihidrofenantrenos de acuerdo a la comparación con estructuras de compuestos aislados de la orquídea *Eulophia nuda*.<sup>40,41</sup>

Los desplazamientos de C1 ( $\delta_{\text{C}}$  142.9), C2 ( $\delta_{\text{C}}$  146.0), C5 ( $\delta_{\text{C}}$  159.10), C7 ( $\delta_{\text{C}}$  157.55), apoyan que el producto natural que se describe corresponde a un dihidrofenantreno sustituido. Esta afirmación concuerda con la información de la literatura,<sup>39</sup> donde se indica que todos los fenantrenos naturales se encuentran sustituidos, y la mayoría de los sustituyentes se encuentran en los carbonos C2 y C7. Por los desplazamientos presentados y los experimentos HMBC, HSQC y NOESY, se concluye que las sustituciones corresponden a dos metoxilos  $\delta_{\text{C}}$  56.2 (C-2) y 55.7 (C-5) y dos fenoles (carbonos *ipso* en  $\delta_{\text{C}}$  157.6 (C-7) y 143.0 (C-1)).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 10) se observa la presencia de dos señales con constantes de acoplamiento *orto*, centradas en  $\delta_{\text{H}}$  7.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H) y 6.78 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H) atribuibles a los hidrógenos en C4 y C3. También son observables dos señales de hidrógenos aromáticos en relación *meta*, centrados en  $\delta_{\text{H}}$  6.45 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.38 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H) que se ubican en las posiciones C6 y C8 del 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol. La comparación con los datos informados en la literatura permitió confirmar la identidad de esta sustancia.<sup>40-42</sup>



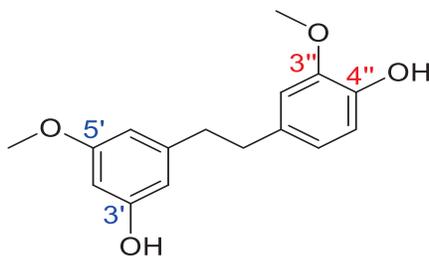
(39)

#### 5.1.5. Gigantol (4)

El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 13) de una sustancia de polaridad intermedia que se obtuvo como aceite, presenta 16 señales. Doce de ellas correspondientes a carbonos  $\text{sp}^2$  aromáticos, de las cuales, de acuerdo con los experimentos DEPT 90 y 135, corresponden a 6 carbonos cuaternarios ( $\delta_{\text{C}}$  160.8, 156.8, 146.4, 144.6, 143.6, 133.9) y 6 corresponden a metinos ( $\delta_{\text{C}}$  121.1, 114.4, 111.4, 108.3, 106.8, 99.2). Se observan también señales de dos metoxilos y de dos metilenos.

De acuerdo al número de carbonos y a su distribución en grupos de C6-C2-C6, se deduce que el producto natural que se describe es un dihidroestilbeno,<sup>21</sup> que es un tipo de producto natural frecuente en la familia Orchidaceae. La afirmación anterior está de acuerdo con la presencia de las dos señales de metilenos alifáticos observables en  $\delta_{\text{C}}$  38.3 y 37.3 (característicos para este tipo de sustancias), y con la comparación con estructuras similares ya reportadas en orquídeas de otros géneros, por ejemplo, de *Dendrobium*,<sup>43,44</sup> *Cymbidium*,<sup>45</sup> entre otras. Los desplazamientos de los carbonos cuaternarios bencénicos permiten deducir que el dihidroestilbeno posee sustituyentes correspondientes a dos metoxilos  $\delta_{\text{C}}$  56.0 (C3''-OCH<sub>3</sub>) y 55.4 (C5'-OCH<sub>3</sub>) y a dos fenoles 146.4 (*ipso* C4'') y 156.8 (*ipso* C3'). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 12) muestra señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.85, (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.68  $\delta_{\text{H}}$  (dd,  $J = 8.0, 1.9$  Hz, 1H) y 6.64  $\delta_{\text{H}}$  (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H) que indican un patrón de acoplamiento ABX, que suele encontrarse en

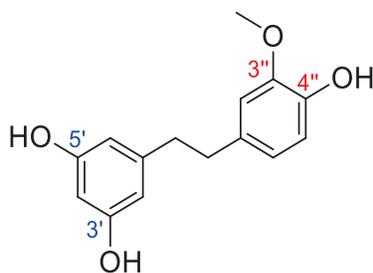
bencenos asimétricamente sustituidos.<sup>35</sup> Los desplazamientos anteriormente descritos corresponden con gigantol (**4**) que es un metabolito secundario caracterizado con anterioridad.<sup>45,46</sup>



(4)

#### 5.1.6. Tristina (**40**)

La aplicación de diversos procedimientos cromatográficos a los extractos de las dos colectas del vegetal analizadas permitió el aislamiento de una sustancia de mayor polaridad cuyo espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 15) mostró 13 señales espectro de <sup>13</sup>C, 10 de ellas correspondientes a carbonos bencénicos, que de acuerdo con los experimentos DEPT 90 y 135, corresponden a las señales de 5 carbonos cuaternarios ( $\delta_c$  159.1, 148.0, 145.3, 145.1, 134.1) y de 5 metinos ( $\delta_c$  121.5, 115.5, 112.8, 107.8, 101.0). Seguidamente se distingue la señal en  $\delta_c$  56.1 que corresponde al carbono del metoxilo de la posición 5'. Además, son observables señales de dos metilenos alifáticos en  $\delta_c$  31.9 y 38.9, lo cual indica que se trata de un dihidroestilbeno, con la particularidad de que la sustitución simétrica de uno de los bencenos permite registrar solo diez carbonos (de los doce que contiene la estructura), dada la equivalencia magnética de dos de ellos. Esta simetría permite concluir que esta estructura corresponde a la tristina (**40**), aislada anteriormente de la orquídea *Bulbophyllum triste*.<sup>47</sup> En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 14) confirma esta suposición, ya que se observan señales en  $\delta_H$  2.84 – 2.68 (4H, m) correspondientes a hidrógenos metilénicos y en  $\delta_H$  8.19 (s, 2H) y 7.37 (s, 1H) señales asignables a hidrógenos fenólicos en la posición 3', 5' y 4'' informados en la literatura.<sup>47,48</sup>



(40)

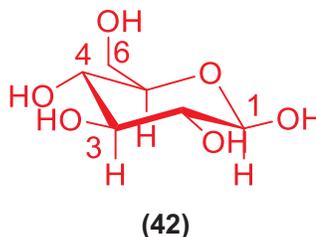
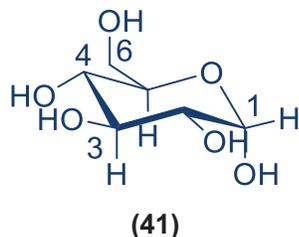
Un isómero de la tristina (40) es el dihidroestilbeno  $\alpha,\alpha'$ -dihidro-3,5,3'-trihidroxy-4'-metoxiestilbeno reportado en las hojas de *Glycyrrhiza glabra*,<sup>49</sup> en el cual los grupos metoxilo y el fenol se encuentran en posiciones contrarias. Esta última estructura también sería simétrica en el anillo bencénico con sustitución 1,3,5. Para distinguir ambas moléculas, fue necesario el experimento NOESY, en el cual se observaron acoplamientos de los hidrógenos en  $\delta_H$  3.78 (C3''-OCH<sub>3</sub>) y  $\delta_H$  6.79 (2'') y este último a su vez con los hidrógenos metilénico de C1 y C2, los cuales confirman que la estructura aislada en *P. karwinskii* es la tristina (40).

#### 5.1.7. $\alpha$ -D-Glucopiranososa (41) y $\beta$ -D-glucopiranososa (42)

A partir de los procedimientos cromatográficos al extracto metanólico de la primera colecta del vegetal analizado, se aisló una substancia de mayor polaridad cuyo espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 17) mostró 12 señales, 10 de ellas correspondientes metinos con  $\delta_C$  96.6, 92.8, 76.6, 76.4, 74.8, 73.4, 72.1, 72.1, 70.3, 70.3 y 2 de ellos a metilenos con desplazamiento en  $\delta_C$  61.4, 61.3. Las señales centradas en  $\delta_C$  96.6 y 92.8 se encuentran en el rango conocido como "región anomérica" de monosacáridos en  $\delta_C$  90-110<sup>50</sup> y al comparar sus desplazamientos con los ya informados, se deduce que pertenecen al C1 de  $\beta$ -D-glucopiranososa (39) ( $\delta_C$  96.6) y C1  $\alpha$ -D-glucopiranososa ( $\delta_C$  92.8).<sup>50</sup> La  $\alpha$ -piranososa y  $\beta$ -piranososa son dos de las formas más representativas que toman las aldohexosas en soluciones acuosas concentradas, con un porcentaje de 38% y 62%. Otras formas también son la  $\beta$ -furanosa (0.14%) y la forma aldehídica (0.002%).<sup>50</sup>

En cuanto al espectro de <sup>1</sup>H, sobresalen las señales con buena resolución centradas a campo bajo en 5.24 y 4.65 ppm, características de los hidrógenos anoméricos (cuyo rango de desplazamientos se encuentra entre 4.5 y 5.4 ppm).<sup>50</sup> Al cotejar los

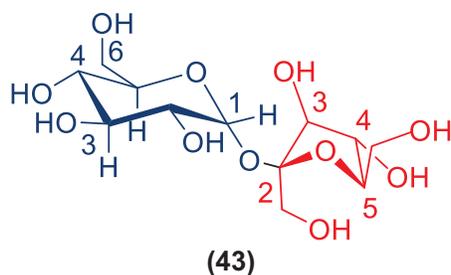
desplazamientos experimentales con los ya informados, se dedujo que la señal en  $\delta_H$  5.24 es adjudicable al hidrógeno anomérico de  $\alpha$ -D-glucopiranososa (H1 $\alpha$ ) y la señal de  $\delta_H$  4.65 es asignable al hidrógeno anomérico de la  $\beta$ -D-glucopiranososa (H1 $\beta$ ).



### 5.1.8. Sacarosa (43)

La continuación de los procedimientos cromatográficos del extracto metanólico de la primera colecta del vegetal, en las fracciones más polares permitió aislar una sustancia cuyo espectro de  $^1\text{H}$  (Espectro 18) mostró señales en el rango de desplazamiento químico de  $\delta_H$  3.4 - 4.2 asignables a hidrógenos en carbonos metínicos sustituidos con hidroxilos.<sup>48</sup> Al igual que en  $\alpha$ -D-glucopiranososa (41) y  $\beta$ -D-glucopiranososa (39) recién descritas (ver sección 5.1.7), en el producto natural que se describe, también se encuentran señales adjudicables a hidrógenos anoméricos en  $\delta_H$  5.4 que corresponde a la presencia de  $\alpha$ -D-glucopiranososa (41) (H1 $\beta$ ). Sin embargo, en el espectro de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 21) se observan dos los picos centrados en  $\delta_C$  103.7 y 92.2 que se encuentran en la región anomérica.<sup>51</sup> Esta información aunada al número de señales en  $^{13}\text{C}$  (12 señales) permite deducir que el producto natural que se detalla puede corresponder a un disacárido conformado por  $\alpha$ -D-glucopiranososa (41) y una cetosa. La magnitud de la constante de acoplamiento observada para el protón anomérico de glucopiranososa ( $J = 3.6$  Hz) confirma su disposición  $\alpha$ -ecuatorial (acoplamiento ecuatorial-axial) por lo que se deduce que es sacarosa.

Las señales dobles de dobles ("tripletes" con la misma  $J$ , pero con relación 1:2:1) observadas en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  centradas en  $\delta_H$  3.64 y 3.44, corresponden a  $\alpha$ -D-glucopiranososa (41). El triplete en  $\delta_H$  4.03 ( $J = 8.4$  Hz) corresponde al fragmento de la  $\beta$ -D-fructopiranososa (42) de la sacarosa. La comparación de estos datos con los informados en la literatura, permiten confirmar que esta estructura corresponde a la sacarosa (43).<sup>51</sup>



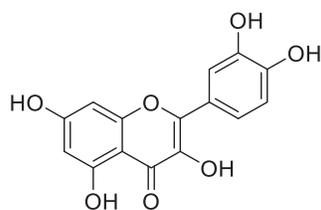
## 5.2. Actividades biológicas

### 5.2.1. Evaluación de la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa

Existen reportes del uso tradicional del lirio amarillo para el tratamiento de la diabetes, en el que se detalla su uso mediante la ingestión diaria de la infusión del pseudobulbo hasta que el nivel de glucosa se estabilice.<sup>6</sup> Tomando en cuenta este reporte, se evaluó la actividad de los metabolitos gigantol (**4**) y tristina (**40**) sobre la actividad enzimática de la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura y rata (Tabla 7) de acuerdo con el protocolo establecido, para determinar de manera preliminar su potencial como sustancias anti-hiperglucémicas.

Este ensayo se basa en la determinación de la concentración 4-nitrofenol mediante espectrofotometría. El 4-nitrofenol es producto de la hidrolisis del  $\alpha$ -D-glucopiranosido de 4-nitrofenilo por la enzima. La concentración es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima.

De acuerdo con los datos de la Tabla 5 detallada en la parte experimental, únicamente el extracto hexánico de la primera colecta y el extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (1:1) poseen un porcentaje de inhibición elevado y en comportamiento dosis respuesta. De los metabolitos aislados únicamente la tristina (**40**) mantiene un comportamiento de dosis respuesta en su actividad inhibitoria, su porcentaje de inhibición de 19.70% (concentración de 100  $\mu\text{M}$ ) es menor que el de la referencia: quercetina (**44**), que a la misma concentración inhibió en un 97.07% a la enzima. Por lo que la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por gigantol (**4**) y tristina (**40**) no puede considerarse relevante.



(44)

### 5.2.2. Inhibición en el crecimiento de líneas celulares cancerosas humanas

Debido a que en estudios anteriores de los extractos hidroetanólicos (HE) e hidrometanólicos (HM) de las hojas en el rastreo primario del porcentaje de inhibición contra las líneas celulares cancerosas humanas se reportaron valores de 13.8 (HE) y 13.0 (HM) en las líneas MCF-7,<sup>20</sup> se consideró pertinente realizar el experimento, en esta ocasión para los metabolitos aislados gigantol (**4**) y tristina (**40**). Los resultados se detallan en la Tabla 8 de la parte experimental.

Los resultados del experimento indicaron que ambas sustancias son inhibidores del crecimiento de la línea K562 (leucemia) con valores de 49.8% para gigantol (**4**) y 50.8% para tristina (**40**), y de la línea MES-SA (sarcoma uterino) con valores de 40.5% para gigantol (**4**) y 34.3% para tristina (**40**). Al no superar el 50% de inhibición, la bioactividad de este ensayo no puede considerarse como relevante.

## 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 6.1. Material vegetal

Los pseudobulbos de la especie vegetal *P. karwinskii* fueron recolectadas en dos ocasiones. La primera colecta fue realizada en marzo 2016 (período de floración) a partir del material vegetal usado en decoraciones de Semana Santa en Zaachila, Oaxaca provenientes de Santa María Sola y San Juan Bautista en el distrito de Sola de Vega<sup>52</sup> y fueron proporcionados por la Dra. Luicita Lagunez. El material fue secado por calor a convección hasta peso constante.

La segunda colecta, el material vegetal se realizó en El Molino en el municipio San Pedro y San Pablo Teposcolula, Oaxaca, en noviembre del 2018 (período de crecimiento vegetativo). Su ubicación geográfica corresponde a las coordenadas 17°33' N y 97°21' O. La muestra fue cortada en láminas finas y secada al aire libre a la sombra.

En ambas colectas, la determinación taxonómica de la planta fue realizada por el Dr. Rodolfo Solano y se depositó un ejemplar en el Herbario OAX del Instituto Politécnico Nacional con el registro Solano 4037.

### 6.2. Materiales y equipos

Los procesos cromatográficos fueron realizados utilizando como fase estacionaria gel de sílice (SiO<sub>2</sub>) de tamaños de malla 70-230 y 230-400 mesh (Merck®), además de sílice químicamente modificada (C-18) de tamaño de partícula 40-63 μm (Büchi).

Los disolventes que fueron empleados son hexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol, tolueno y acetonitrilo. El seguimiento de los procesos cromatográficos se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando cromatofolios de sílice gel de Merck® 60 F<sub>254</sub>. Con el fin de visualizar la CCF se empleó una lámpara de luz UV de λ de 254 y 365nm, además los reveladores: sulfato cérico amoniacal con ácido sulfúrico, ácido fosfomolibdico, vainillina con ácido sulfúrico y *p*-anisaldehído. Los puntos de fusión fueron determinados mediante un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron obtenidos en los equipos Bruker Avance III (700 MHz), Bruker Avance III (400 MHz), Bruker Fourier (300 MHz) y Jeol Eclipse (300 MHz).

Los disolventes deuterados empleados fueron cloroformo (Sigma-Aldrich), acetona (Sigma-Aldrich) y óxido de deuterio (Sigma-Aldrich). En el análisis de la mezcla de germanicol y alcoholes grasos, se empleó un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas Jeol, JSM-GC Mate II, una columna Agilent technologies 30m x 0.0320 mm. El análisis cromatográfico fue desarrollado en un rango de temperatura de 60-235 °C.

### 6.3. Primera colecta

En la primera colecta, el material vegetal seco y molido (186 g) fue macerado con hexano durante tres días. Se concentró el sobrenadante a presión reducida cada 24h. Se obtuvieron 1.77g de extracto. El residuo fue extraído nuevamente con acetona y metanol siguiendo el procedimiento descrito para el extracto hexánico y se obtuvieron 2.18 g y 15.70 g de residuo, respectivamente.

El extracto hexánico (1.77g) se absorbió en sílice (70-230) en una relación 1:1 y se aplicó a una columna de 3 cm de diámetro y 26 cm centímetros de longitud y se empacó con sílice (230-400). Se utilizaron mezclas de hexano: acetato de etilo en orden creciente de polaridad, un lavado de acetona y finalmente metanol. Las fracciones fueron reunidas en 12 fracciones (I-XII) de acuerdo a la similitud de su perfil cromatográfico para su posterior fraccionamiento.

Se realizó una separación de la fracción II (469.9 mg) mediante Sefadex LH-20 empleando  $\text{CHCl}_3$  y finalizando con MeOH. Se colectaron 38 eluatos de 10ml que fueron reunidos en 12 fracciones (II1-II12). La fracción II6 (24.1 mg) se observó como una sola mancha en CCF  $R_f$  0.47 hexano: acetato de etilo 8:2. La fracción fue analizada por RMN  $^1\text{H}$  y CG-EMIE donde los resultados describieron una mezcla de alcoholes de cadena larga con un triterpeno.

Finalmente se procedió a separar la fracción II6 mediante CC con sílice químicamente modificada (C-18) utilizando como fase móvil acetonitrilo (100%). Se obtuvieron 121 eluatos de 2 mL que fueron reunidos en 4 fracciones (II6A-II6D). En la fracción II6C (2.1 mg) se aisló un sólido blanco  $R_f$  0.55 (hexano: acetato de etilo 8:2) soluble en  $\text{CHCl}_3$  que corresponde a germanicol (**35**).

Continuando con el extracto hexánico, se realizó la separación de la fracción III mediante Sefadex LH-20 empleando mezclas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 64 eluatos de 10ml que fueron reunidos en 7 fracciones (IIIA-IIIG). En la

fracción IIID (18.6 mg) eluída con hexano:acetato de etilo 8:2, se aisló un sólido blanco en forma de agujas con *Rf* 0.41 (hexano: acetato de etilo 8:2), que fue recrystalizado con mezclas acetona: hexano que corresponde a la mezcla  $\beta$ -sitosterol (**37**) y estigmasterol (**38**).

En la Tabla 1, se resumen las fracciones de las que se aislaron productos naturales.

**Tabla 1.-** Fracciones del extracto hexánico acetónico de la primera colecta que contenían productos naturales.

Eluatos (25mL c/u)	Fracciones		Proporción (Hexano: AcOEt)	Compuesto aislado
	Nombre	Peso (mg)		
13-18	II	469.9	9:1	<b>35</b>
19-22	III	82.7	9:1	<b>37 y 38</b>

El extracto acetónico (2.18 g) se absorbió en sílice (70-230) en una relación 1:1 hasta la obtención de una mezcla homogénea, la cual fue colocada en una columna cromatográfica como se describió en la fracción del residuo hexánico. Se utilizaron mezclas hexano: acetato de etilo en orden creciente de polaridad y se realizaron lavados con acetona y finalmente metanol. Las fracciones fueron reunidas en 14 fracciones (A-N).

Se realizó una separación de la fracción ABC (292.1 mg) mediante Sefadex LH-20 empleando  $\text{CHCl}_3$  y finalizando con MeOH. Se colectaron 29 eluatos de 5 ml que fueron reunidos en 7 fracciones (ABC1-ABC7). Seguidamente, se realizó la separación de la fracción ABC4 (96.9 mg) mediante CC flash isocrática utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (9:1) obteniendo 124 eluatos de 10 ml reunidos en 8 fracciones (ABC4A-ABC4H). En la fracción ABC4B (1.9 mg) se observó una mancha *Rf* 0.55 (hexano: acetato de etilo 8:2) que fue comparada con la fracción II6C que corresponde a germanicol (**35**).

Se prosiguió con la separación de la fracción D mediante placa preparativa de sílice gel 60 F264 de 20 x 20 cm de dimensión, obteniendo 5 bandas (D1-D5), siendo la de interés la correspondiente a *Rf* 0.66 (hexano: acetato de etilo 7:3, con 0.1mL de ácido acético por cada 10ml de fase móvil).

La fracción D1 (17.9 mg) fue separada mediante una placa HPTLC de 20 x 10 cm de dimensión eluida dos veces con hexano: acetato de etilo 6:4, de la cual se obtuvieron 9 bandas (D1A-D1I), siendo la banda de interés la correspondiente a D1E con un  $R_f$  0.63, de la que se obtuvo un aceite rojo que corresponde a gigantol (**4**).

A continuación, la fracción H del extracto acetónico se separó mediante Sefadex LH-20 empleando mezclas  $\text{CHCl}_3$ : MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 19 eluatos de 5ml que fueron reunidos en 5 fracciones (H1-H5). De la fracción H4 (4.6 mg) se aisló un aceite rojo con  $R_f$  0.44 (hexano: acetato de etilo 1:1), que corresponde a tristina (**40**).

**Tabla 2.** Fracciones reunidas del extracto acetónico de la primera colecta que contenían productos naturales.

<b>Eluatos (25mL c/u)</b>	<b>Fracciones Nombre</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Proporción (Hexano: AcOEt)</b>	<b>Compuesto Aislado</b>
1-14	A	46.9	9:1	<b>(35)</b>
28-36	D	54.4	8:2	<b>(4)</b>
64-74	H	23.9	7:3	<b>(40)</b>

El extracto metanólico (15.70 g) se absorbió en sílice (70- 230) en una relación 1:1 hasta la obtención de una mezcla homogénea, la cual fue aplicada a una columna de 7 cm y 35 centímetros de longitud empacada con gel de sílice. La elución se inició hexano: acetato de etilo (3:7) para continuar en orden creciente de polaridad hasta acetato de etilo, para seguir con mezclas acetato de etilo: metanol (9:1) y continuó con mezclas de acetona: metanol. Las fracciones fueron reunidas en 16 fracciones (1-16).

Se realizó la separación de la fracción 1 mediante Sefadex LH-20 en mezclas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 28 eluatos de 25 mL que fueron reunidos en 9 fracciones (1A-1I). Seguidamente, se reunieron las fracciones 1H y 1I dando a lugar a la fracción 1H-I. Se realizó la separación de la fracción 1H-I (14.3 mg) mediante placa preparativa de sílice gel 60 F264 de 20 x 20 cm de dimensión,

utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (1:1) obteniendo 5 bandas (1H-I1-1H-I5). La banda de interés posee un  $R_f$  0.55, de la que se obtuvo un aceite rojo que corresponde a gigantol (**4**).

De la fracción 8 se aisló un sólido amarillo (47.2 mg) y se realizó una separación mediante Sephadex LH-20 empleando MeOH. Se colectaron 53 eluatos de 10 ml que fueron reunidos en 5 fracciones (8A-8E). De la fracción 8B (41.3 mg) se aislaron cristales blancos con  $R_f$  0.6 (acetona: MeOH 7:3) que corresponde a  $\alpha$ -D-glucopiranososa (**41**) y  $\beta$ -D-glucopiranososa (**42**).

En la fracción 14 (426.8 mg), se aisló un sólido ligeramente café (160.2 mg). Dicho sólido fue separado mediante Sephadex LH-20 empleando MeOH. Se colectaron 45 eluatos de 10ml que fueron reunidos en 5 fracciones conforme a su similitud por CCF (14A-14E). En la fracción 14B (140.2 mg) se aisló un cristal blanco con  $R_f$  0.4 (acetona: MeOH 7:3) que corresponde a sacarosa (**43**).<sup>51</sup>

**Tabla 3.** Fracciones del extracto metanólico de la primera colecta que contenían productos naturales.

Eluatos (25mL c/u)	Fracciones		Fase móvil	Compuesto Aislado
	Nombre	Peso (mg)		
1	1	116.7	AcOEt: Hex (7:3)	<b>(4)</b>
97	8	104.7	Acetona	<b>(41) y (42)</b>
114	14	423.9	MeOH	<b>(43)</b>

#### 6.4. Segunda colecta

En la segunda colecta, a partir de 5.7 kg de material fresco se obtuvieron 567 g de material vegetal seco y molido. En esta ocasión, considerando los resultados de la primera colecta, se decidió realizar un extracto total  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (1:1). El material fue extraído mediante maceración durante tres días con la mezcla de disolventes mencionada. Se concentró el sobrenadante a presión reducida cada 24 h, de los cuales se obtuvieron 52.4 g de residuo. El extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 1:1 (52.4 g) se adsorbió en sílice (70-230) en una relación 1:1 hasta la obtención de una mezcla homogénea, la cual se aplicó a una columna de 13 cm y 32 centímetros de longitud. Se utilizaron mezclas hexano: acetato de etilo en orden creciente de polaridad, posteriormente se eluyó con mezclas de acetato de etilo: metanol hasta concluir en metanol. Se colectaron 311 eluatos de 500 ml, que fueron reunidos en 41 fracciones. Las fracciones se reunieron con el siguiente orden y relación de disolventes: A'1-A'7 (100:0), B1-B3 (90:10), C1 (85:15), D1-D2 (85:15), E1-E4 (85:15), F1 (80:20), G1-G2 (80:20), H1-H5 (70:30), I1 (50:50), J1-J2 (50:50), K1-K2 (50:50), L1-L4 (30-70), M1-M4 (AcOEt), N1-N2 (AcOEt:MeOH (70:30)), O1 (MeOH).

Se realizó la separación de la fracción A'5 (93.9 mg) del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1) mediante Sefadex LH-20 empleando mezclas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 25 eluatos de 10 ml que fueron reunidos en 5 fracciones (A'5A-A'5E). La fracción A'5C (823.5 mg) fue separada nuevamente usando cromatografía flash con hexano:acetato de etilo 9:1, del cual se obtuvieron 49 eluatos reunidos en 11 fracciones (A'5C1-A'5C11).

Las fracciones A'5C6 a la A'5C9 se reunieron para dar lugar a la fracción A'5C6-9 (137.1 mg) que fue separada nuevamente con sílice químicamente modificada ( $\text{C}_{18}$ ) utilizando como fase móvil acetonitrilo. Se obtuvieron 109 eluatos de 2 ml que fueron reunidos en 5 fracciones (A'5C6-9A – A'5C6-9E). De la fracción A'5C6-9D (1.8 mg) se aisló un sólido blanco  $R_f$  0.55 (hexano: acetato de etilo 8:2) soluble en  $\text{CHCl}_3$  que corresponde a germanicol (**35**).

Posteriormente, se realizó la separación de la fracción A'7 mediante Sefadex LH-20 empleando gradiente de mezclas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y MeOH. Se colectaron 25 eluatos de 10 ml que fueron reunidos en 9 fracciones (A'7A-A'7I). Posteriormente, la subfracción A'7C (48.4 mg) se sometió a una CC flash isocrática con hexano:acetato de etilo (95:5), de la

cual se aisló un sólido blanco que se identificó como la mezcla de ferulatos de *n*-alquilo (**36**).<sup>36</sup>

A continuación, se procedió a reunir las fracciones B1-B3 dando lugar a la fracción B1-3. La fracción B1-3 se separó mediante Sefadex LH-20 empleando mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 21 eluatos de 10 ml que fueron reunidos en 5 fracciones (B1-3A- B1-3E). De la fracción B1-3D (25.9 mg) eluida con hexano:acetato de etilo 8:2, se aisló un sólido blanco en forma de agujas con *R*<sub>f</sub> 0.41 (hexano: acetato de etilo 8:2), que fue recristalizado con mezclas acetona: hexano cuya identidad corresponde a la mezcla β-sitosterol (**37**) y estigmasterol (**38**).<sup>37,38</sup>

Seguidamente, se realizó una separación de la fracción E3 mediante Sefadex LH-20 empleando mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 25 eluatos de 10 ml que fueron reunidos en 10 fracciones (E3A-E3J). Seguidamente, a partir de la subfracción E3J (10.6 mg) se realizó una CC de sílice gel, utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3), de la cual se aisló un sólido blanco que se identificó como 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol (**39**).<sup>40-42</sup>

La fracción F1 se separó mediante Sefadex LH-20 empleando mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 25 eluatos de 10 ml que fueron reunidos en 12 fracciones (F1A-F1L). La fracción F1L (1.0811 g) fue separada nuevamente usando cromatografía flash isocrática con hexano:acetato de etilo (6:4), del cual se obtuvieron 53 eluatos reunidos en 12 fracciones (F1L1-F1L12).

De la fracción F1L2 (680.9 mg), mediante una columna de sílice de lecho abierto, eluida con éter de petróleo: acetato de etilo (9:1), se obtuvo gigantol (**4**) como un aceite ligeramente amarillo soluble en CHCl<sub>3</sub>.

Posteriormente, se realizó la separación de la fracción I1 mediante Sefadex LH-20 empleando mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 36 eluatos de 10 ml que fueron reunidos en 11 fracciones (I1A-I1K). La fracción I1J (254.4 mg) fue separada mediante cromatografía flash con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9:1), de la cual se obtuvieron 35 eluatos reunidos en 14 fracciones (I1J1-I1J14).

La fracción I1J6 (246.7 mg) fue separada nuevamente mediante una columna sílice de lecho abierto eluida con éter de petróleo: acetato de etilo (3:1) obteniendo 5 fracciones I1J6A-I1J6D.

Finalmente, la fracción I1J6C fue recristalizada utilizando hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtener un sólido blanco en forma de agujas con *R<sub>f</sub>* 0.46 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1), que corresponde a la tritina (**40**).<sup>47,48</sup>

**Tabla 4.** Fracciones reunidas del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1) de la segunda colecta que presentaron productos naturales.

Eluatos (500 mL c/u)	Fracciones		Fase móvil	Compuesto aislado
	Nombre	Peso (g)		
78-86	A'5	5.5947	Hex	( <b>35</b> )
194-104	A'7	5.5947	Hex	( <b>36</b> )
105-125	B1-3	2.1632	Hex: AcOEt (9:1)	( <b>37</b> ) y ( <b>38</b> )
169-176	E3	0.5759	Hex: AcOEt (85:15)	( <b>39</b> )
183-193	F1	1.3658	Hex: AcOEt (80:10)	( <b>4</b> )
233-236	I1	0.9131	Hex: AcOEt (50:50)	( <b>40</b> )

## 6.5. Resumen de productos naturales aislados

Los materiales vegetales que fueron sujetos de este estudio poseen diferencias en los factores que se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Diferencias entre la primera y la segunda colecta

	Primera colecta	Segunda colecta
<b>Cantidad de planta seca</b>	186 g	5.7 kg
<b>Lugar y forma de colecta</b>	Proveniente de las decoraciones en Semana Santa en Zaachila, Oaxaca	Recolectados de árboles de encino del municipio San Pedro y San Pablo Teposcolula, Oaxaca
<b>Mes y estación del año</b>	Marzo	Noviembre
<b>Secado de la planta</b>	Calor a convección hasta peso constante	Secado a la sombra
<b>Extractos</b>	Hexano, acetona y metanol	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH

Estas diferencias hacen que se describa únicamente la presencia o ausencia de un producto natural y su rendimiento en función de la masa vegetal seca, como se menciona en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Resumen de los productos naturales aislados en ambas colectas y su rendimiento.

	<b>Primera colecta</b> <b>Período de</b> <b>floración</b>  <b>Marzo</b>	<b>Segunda colecta</b> <b>Período de</b> <b>crecimiento</b> <b>vegetativo</b> <b>Noviembre</b>
	<b>Rendimiento en</b> <b>planta seca (%)</b>	<b>Rendimiento en</b> <b>planta seca (%)</b>
<b>Germanicol (35)</b>	$1,13 \times 10^{-3}$	$4,39 \times 10^{-5}$
<b>Ferulatos de <i>n</i>-alquilo (36)</b>		$7,37 \times 10^{-5}$
<b><math>\beta</math>-Sitosterol (37) y estigmasterol (38)</b>	$1,00 \times 10^{-2}$	$3,61 \times 10^{-4}$
<b>9,10-Dihro-2,5dimetoxifentantreno-1,7-ol (39)</b>		$7,72 \times 10^{-5}$
<b>Gigantol (4)</b>	$3,92 \times 10^{-3}$	$4,56 \times 10^{-3}$
<b>Tristina (40)</b>	$2,47 \times 10^{-3}$	$8,86 \times 10^{-4}$
<b><math>\alpha</math>-D-Glucopiranososa (41) y <math>\beta</math>-D-glucopiranososa (42)</b>	$2,22 \times 10^{-2}$	
<b>Sacarosa (43)</b>	$3,79 \times 10^{-2}$	

## 6.6. Características físicas y espectroscópicas de los productos aislados

### 6.6.1. Germanicol (35)

Se informan los datos espectroscópicos de germanicol (35) los cuales fueron comparados con los descritos en la literatura.<sup>27-30</sup>

**RMN  $^1\text{H}$**  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  4.85 (s, 1H, H19), 3.21 (dd,  $J = 11.6, 4.8$  Hz, 1H, H3), 1.08 (s, 3H, H25), 1.02 (s, 3H, H28), 0.97 (s, 3H, H23), 0.94 (d,  $J = 2.2$  Hz, 6H, H30), 0.88 (s, 3H, H26), 0.77 (s, 3H, H24), 0.74 (s, 3H, H27).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (176 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  142.9 (C18), 129.9 (C19), 79.2 (C3), 55.7 (C5), 51.4 (C9), 43.5 (C14), 40.9 (C8), 39.1 (C13), 39.1 (C), 38.6 (C1), 37.9 (C16), 37.5 (C22), 37.4 (C10), 34.8 (C7), 34.5 (C17), 33.5 (C21), 32.5 (C20), 29.8 (C29), 29.4 (C30), 28.1 (C23), 27.7 (C15), 27.6 (C2), 26.4 (C12), 25.4 (C28), 21.3 (C11), 18.4 (C6), 16.9 (C26), 16.3 (C25), 15.6 (C24), 14.7 (C27).

#### 6.4.2 Ferulatos de *n*-alquilo (36)

Se informan los datos espectroscópicos de la mezcla de ferulatos de *n*-alquilo (36) los cuales fueron comparados con los descritos en la literatura.<sup>36</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 7.61 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H3), 7.07 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H6), 7.03 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H9), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H5), 6.29 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H2), 5.83 (s, 1H, OH-C1), 4.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H1'), 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-C8), 1.71 (t, *J* = 1.9 Hz, 2H, H2'), 1.25 (s, 39H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>), 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>(n+4)).

**RMN <sup>13</sup>C** (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 167.4 (C1), 147.9 (C7), 146.7 (C8), 144.6 (C3), 127.1(C4), 123.1 (C5), 115.7 (C8), 114.7 (C2), 109.3 (C9), 64.6 (C1'), 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 31.9(Cn+2), 31.6 (C2'), 29.7 ( (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>), 28.8 (Cn+4), 26.0 (C3'), 22.7 (Cn+3) , 14.1 (Cn+4).

#### 6.4.3 β-Sitosterol (37) y estigmasterol (38)

Sólido blanco en forma de agujas finas. Pf 132-134°C *Rf* 0.41 (hexano:acetato de etilo 8:2).

A continuación se detallan los datos espectroscópicos de β-sitosterol (37) los cuales fueron comparados con la literatura.<sup>37,38</sup>

*Rf* 0.41 (Hexano:acetato de etilo 8:2).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 5.36 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H6), 3.54 (tt, *J* = 10.9, 4.7 Hz, 1H-H3), 1.02 (s, 3H, H19), 0.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, H21), 0.69 (s, 3H, H18).

**RMN <sup>13</sup>C** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 140.9 (C5), 121.9 (C6) 72.0 (C3), 56.9 (C14), 56.2 (C17), 50.3 (C9), 46.0 (C24), 42.4 (C4), 39.9 (C12), 37.4 (C1), 36.6 (C10), 36.3 (C20), 34.1 (C22), 32.0 (C8), 31.78 (C7), 29.3 (C25), 28.4 (C16), 26.2 (C23), 24.5 (C15), 23.2 (C28), 21.2 (C11), 20.0 (C26), 19.5 (C19), 19.2 (C27), 18.9 (C21), 12.1 (C29), 12.0 (C18).

A continuación se detallan los datos espectroscópicos de estigmasterol (38) los cuales fueron comparados con los descritos en la literatura.<sup>37,38</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 5.36 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H6), 5.16 (*J* = 15.18, 8.48 Hz, H22) y δ<sub>H</sub> 5.02 (*J* = 15.19, 8.62 Hz, H23), 3.54 (tt, *J* = 10.9, 4.7 Hz, 1H, H3).

**RMN <sup>13</sup>C** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 140.9 (C5), 138.5 (C22), 129.40 (C23), 121.88 (C6), 72.0 (C3), 56.9 (C14), 56.2 (C17), 51.6 (C24), 50.3 (C9), 42.4 (C4), 40.6 (C20), 39.9 (C12), 37.4 (C1), 36.6 (C10), 32.0 (C7, C8, C25), 31.8 (C2), 29.3 (C25), 24.5 (C15), 21.4 (C26), 21.2 (C11, C21), 19.5 (C19), 19.2 (C27), 12.1 (C29), 12.0 (C18).

#### 6.4.4 9,10-Dihidro-2,5-dimetoxifenatreno-1,7-diol (39)

A continuación, se detallan los datos espectroscópicos de 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenatreno-1,7-diol (39) los cuales fueron comparados con los descritos en la literatura.<sup>40-42</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO) δ<sub>H</sub> 8.29 (s, 1H, OH-C7), 7.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H4), 7.24 (s, 1H, OH-C1), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H3), 6.45 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 6.38 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H8), 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-C2), 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-C5), 2.74 (m, 2H, H10), 2.61 (m, 2H, H9).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO) δ<sub>C</sub> 159.1 (C5), 157.6 (C7), 146.0 (C2), 143.0 (C1), 141.6 (C14), 127.6 (C12), 124.8 (C11), 120.2 (C4), 116.3 (C13), 109.0 (C3), 108.2 (C8), 99.1 (C6), 56.2 (CH<sub>3</sub>O-C2), 55.70 (CH<sub>3</sub>O-C5), 30.98 (C9), 22.17 (C10).

#### 6.4.5 Gigantol (4)

A continuación, se informan los datos espectroscópicos de gigantol (4) los cuales fueron comparados con los descritos en la literatura.<sup>43-45</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 6.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5''), 6.68 (dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H, H6''), 6.64 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H2''), 6.34 – 6.32 (m, 1H, H4'), 6.29 – 6.27 (m, 2H, H6' y 2'), 5.29 (s, 1H), 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-C3''), 3.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-C5'), 2.80 (h, *J* = 3.1 Hz, 4H, H1 y H2).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>c</sub> 160.8 (C5'), 156.8 (C3'), 146.4 (C4''), 144.6 (C1'), 143.6 (C3''), 133.9 (C1''), 121.1 (C6''), 114.4 (C5''), 111.4 (C2''), 108.3 (C2'), 106.8 (C6'), 99.2 (C4'), 56.0 (CH<sub>3</sub>O-C3''), 55.4 (CH<sub>3</sub>O-C5'), 38.3 (C1), 37.3 (C2).

#### 6.4.6 Tristina (40)

Sólido blanco en forma de agujas finas. *Rf* 0.46 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 9:1).

A continuación, se detallan los datos espectroscópicos de tristina (40) los cuales fueron comparados con los descritos en la literatura.<sup>47,48</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO), δ<sub>H</sub> 8.19 (s, 2H, OH-C5' y OH-C3'), 7.37 (s, 1H, OH-C4''), 6.79 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H2''), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5''), 6.65 (dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H, H6''), 6.25 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, H2' y H6'), 6.23 (t, *J* = 2.02 Hz, H4'), 3.78 (s, CH<sub>3</sub>O-C3''), 2.84 – 2.68 (m, 4H, H1 y H2)

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO), δ<sub>c</sub> 159.1 (C5' y C3'), 148.0 (C3''), 145.3 (C4''), 145.1 (C1'), 134.1 (C1''), 121.5 (C6''), 115.5 (C5''), 112.8 (C2''), 107.8 (C6' y C2'), 101.0 (C4'), 56.1 (CH<sub>3</sub>O-C3''), 38.9 (C1), 37.9 (C2).

#### 6.4.7 α-D-Glucopiranososa (41) y β-D-glucopiranososa (42)

Sólido blanco. *Rf* 0.6 (acetona: MeOH 7:3).

A continuación, se detallan los datos espectroscópicos de la mezcla α-D-glucopiranososa (41) y β-D-glucopiranososa (42) los cuales fueron comparados con los descritos en la literatura.<sup>50</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ<sub>H</sub> 5.24 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H1α), 4.65 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1β), 3.91 (dd, *J* = 12.3, 2.0 Hz, 2H, H2α, H2β), 3.54 (dd, *J* = 9.9, 3.7 Hz, 2H, H4α, H4β), 3.25 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 2H, H5α, H5β).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ<sub>c</sub> 96.6 (C1β), 92.8 (C1α), 76.6 (C5β), 76.4 (C3β), 74.8 (C2β), 73.4 (C3α), 72.1 (C2α), 72.1 (C5α), 70.3 (C4α), 70.3 (C4β), 61.4 (C6β), 61.3 (C6α).

### 6.4.8 Sacarosa (43)

Sólido blanco. *Rf* 0.4 (acetona: MeOH 7:3).

A continuación, se detallan los datos espectroscópicos de la sacarosa (43) los cuales fueron comparados con los descritos en la literatura.<sup>51</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ<sub>H</sub> 5.39 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, Hg1), 4.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Hf3), 4.03 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, Hf4), 3.90 – 3.82 (m, 2H, Hg5 y Hf5), 3.82 – 3.78 (m, 4H, CH<sub>2</sub>OH-g6 y CH<sub>2</sub>OH f6), 3.77 (dd, *J* = 9.20, 1H, Hg4), 3.65 (s, 2H, Hf1), 3.53 (dd, *J* = 9.9, 3.6 Hz, 2H, Hg2 y Hg2' ), 3.44 (dd, *J* = 9.2 Hz, 1H, Hg3).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ<sub>C</sub> 103.71 (Cf2), 92.18 (Cg1), 81.38(Cf5), 76.37 (Cf3), 73.99 (Cf4), 72.58 (Cg3), 72.41 (Cg5), 71.09 (Cg2), 69.24 (Cg4), 62.40 (Cf6), 61.35(Cf1), 60.14 (Cg6).

## 6.7. Actividades biológicas

### 6.7.1. Evaluación de la inhibición de la enzima α-glucosidasa.

Los extractos de ambas colectas y los productos naturales aislados gigantol (4) y tristina (40) se evaluaron mediante protocolos establecidos para la inhibición de esta enzima, utilizando soluciones con DMSO al 50% en concentraciones de 25 μL. El tiempo de reacción para generar el 4-nitrofenilo fue de 15 minutos.

**Tabla 7.** Efecto de los extractos de ambas colectas y metabolitos secundarios aislados de *P. karwinskii* sobre la actividad de la enzima α-glucosidasa de levadura y rata.

Sustancia	Concentración μg/mL (Ext) μM (Sustancias puras)	α-glucosidasa de levadura		α-glucosidasa de rata	
		D.O. 405 nm	Inhibición (%)	D.O. 405 nm	Inhibición (%)
Glucosidasa	100				
%		2,015		0,846	
Extracto	1	2,047	SA	0,838	0,87
hexánico (1era	10	1,581	21,57	0,831	1,69
colecta)	100	0,003	99,87	0,839	0,79
Extracto	1	2,021	SA	0,840	0,71
acetónico (1era	10	2,054	SA	0,859	SA
colecta)	100	1,270	36,98	0,828	2,05

Extracto metanólico (1era colecta)	1	2,083	SA	0,820	3,00
	10	2,106	SA	0,851	SA
	100	1,928	4,35	0,840	0,67
Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1) (2da colecta)	1	1,912	5,14	0,826	2,29
	10	1,910	5,21	0,860	SA
	100	0,316	84,30	0,840	0,67
Gigantol ( <b>4</b> )	1	1,601	20,58	0,844	0,20
	10	1,810	10,21	0,831	1,69
	100	1,646	18,33	0,822	2,76
Tristina ( <b>37</b> )	1	1,816	9,91	0,841	0,59
	10	1,747	13,31	0,831	1,77
	100	1,618	19,70	0,801	5,32
Acarbosa	1	1,428	18,43	0,629	25,66
	10	1,522	13,05	0,474	43,99
	100	1,577	9,90	0,372	55,97
Quercetina ( <b>44</b> )	1	0,579	66,94		
	10	0,053	96,97		
	100	0,051	97,07		

### 6.7.2. Inhibición del crecimiento de líneas celulares cancerosas humanas

Los compuestos aislados gigantol (**4**) y tristina (**40**) en concentraciones de 25  $\mu$ M y usando como vehículo DMSO fueron ponderadas en un cribado preliminar para evaluar su potencial inhibitorio del crecimiento de las siguientes líneas celulares: U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama, SKLU= pulmón, MES-SA= sarcoma uterino humano, COS-7: línea celular de riñón de mono (no cancerosa).

En la Tabla 8 se muestran los porcentajes de inhibición, la notación SA significa que los componentes analizados no tuvieron actividad en esa línea celular.

**Tabla 8.** Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de los compuestos gigantol (4) y tristina (40).

	Concentración	% de inhibición de la proliferación celular de los compuestos (4) y (40)							
		U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	MES-SA	COS7
Gigantol (4)	25 $\mu$ M	SA	12.9	49.8	SA	SA	4.6	40.5	SA
Tristina (40)	25 $\mu$ M	8.1	13.8	50.8	SA	SA	3.4	34.3	SA

## 7. CONCLUSIONES

El estudio químico de los pseudobulbos de dos colectas de *Prosthechea karwinskii*, contribuyó al conocimiento referente a su contenido metabólico, mediante el aislamiento y caracterización de 10 productos naturales: germanicol (**35**),  $\beta$ -sitosterol (**37**), estigmasterol (**38**), mezcla de ferulatos de *n*-alquilo (**36**), 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol (**39**), gigantol (**4**), tristina (**40**),  $\alpha$ -D-glucopiranososa (**41**),  $\beta$ -D-glucopiranososa (**42**) y sacarosa (**43**).

Los metabolitos secundarios aislados de *P. karwinskii* varían en cuanto a la orquídea del mismo género *P. michuacana*, siendo el gigantol (**4**) el único producto natural en el que coinciden. Ambas especies presentan triterpenos, en *P. michuacana* se aislaron del tipo lanostano y en *P. karwinskii* del tipo oleanano. Las dos especies presentan fenantrenos, en el caso de *P. karwinskii* es del tipo monomérico (9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol (**39**) y el de *P. michuacana* es dimérico (4,6,7-trihidroxi-2-metoxi-8-(metilbut-2-enil)-fenantreno-1,1'-4',6',7-trihidroxi-2'-metoxi-8'-(metilbut-2'-enil)fenantreno (**18**)).

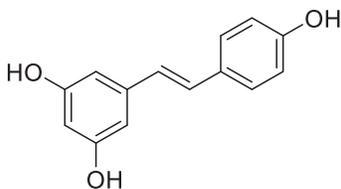
En cuanto a la comparación entre ambas colectas, el relativamente alto rendimiento  $\alpha$ -D-glucopiranososa y  $\beta$ -D-glucopiranososa (en comparación con los otros metabolitos secundarios) de la primera colecta (ver Tabla 6), podría correlacionarse con lo informado en la literatura donde se menciona que los pseudobulbos constituyen una importante fuente complementaria de carbohidratos.<sup>2</sup> En particular, se menciona que esto se debe para satisfacer una mayor demanda de carbono de la inflorescencia en el tiempo de floración. Se ha sugerido que esta demanda de carbono también sucede en el período de desarrollo de nuevos brotes<sup>2</sup> (período de latencia vegetativo de la segunda colecta), sin embargo, en la segunda colecta estudiada no se detectaron cantidades apreciables de los glucopiranósidos.

Mientras que, en la primera colecta,  $\alpha$ -D-glucopiranososa,  $\beta$ -D-glucopiranososa y sacarosa, fueron los productos naturales con mayor rendimiento, en la segunda colecta fueron los bibencilos gigantol (**4**) y tristina (**40**) los más abundantes (ver Tabla 6). Se encuentra reportado que la presencia de bibencilos y bisbibencilos poseen actividad antifúngica en las plantas, principalmente en briófitos, ya que son capaces de crecer en hábitats

húmedos sin ser dañados por hongos,<sup>21</sup> por lo que se recomienda realizar estudios posteriores que relacionen dicha actividad con los bibencilos gigantol (**4**) y tristina (**40**).

En cuanto al ensayo sobre la actividad enzimática de la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (ver Tabla 7), el alto porcentaje del extracto hexánico de la primera colecta y el extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (1:1), permiten suponer que los metabolitos secundarios menos polares son los responsables de dicha actividad, ya que gigantol (**4**) y tristina (**40**) no poseen relevancia en esta bioactividad. Por lo que se recomienda un nuevo experimento, esta vez con la presencia de germanicol (**35**), *n*-ferulatos de alquilo (**36**) que en esta ocasión no fueron ensayados por su bajo rendimiento (baja disponibilidad práctica).

Con respecto al experimento de actividad inhibitoria de la proliferación celular (ver Tabla 8), la baja toxicidad de gigantol (**4**) (40.5%) y tristina (**40**) (34.35%) en MES-SA permite deducir que si bien no pueden considerarse como agentes citotóxicos como tal, podrían ser parte de un ensayo futuro para comprobar su eficiencia como moduladores a la resistencia de células del sarcoma uterino. Esto debido a su baja toxicidad y semejanza estructural con el modulador resveratrol (**45**), un producto natural del tipo estilbeno.



(45)

## 8. REFERENCIAS

- (1) Maldonado-Miranda, J. J.; Alonso-Castro, A. J.; Martínez-Soto, D.; Castillo-Pérez, L. J.; Carranza-Álvarez, C. The endemic orchids of Mexico: a review. *Biologia*. **2018**, 74 (1), 1–13. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>.
- (2) Ng, C. K. Y.; Hew, C. S. Orchid pseudobulbs - “false” bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival. *Sci. Hortic.* **2000**, 83, 165–172. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00084-9).
- (3) Menchaca, A. *Manual para la propagación de orquídeas*, 1ª Edición.; Comisión Nacional Forestal: Zapopan, Jalisco, 2011.
- (4) Salazar, G. Orquídeas. En *Biodiversidad del ecosistema reserva ecológica del Pedregal de San Ángel*; Lot, A., Cano-Santana, Z., Eds.; Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria. Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F., **2018**; 153–169.
- (5) Angón, A.; Solís, S. *Estrategia para la conservación y el uso sustentable de la biodiversidad del estado de Oaxaca*, 1ª edición.; Melgarejo, E., Solís, S., Eds.; Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad: Ciudad de México, México, **2018**.
- (6) Cruz-García, G.; Solano-Gómez, R.; Lagunéz-Rivera, L. Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a mixtec community in Mexico. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2014**, 24 (2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.002>.
- (7) Hágsater, E.; García-Cruz, J. *Informe Final SNIB- CONABIO: estudio taxonómico-florístico de la familia Orchidaceae en el Bajío: tribus Epidendreae y Maxillariae*; México, CDMX, **1999**.
- (8) Bogarín, D.; Karremans, A. P. *Prosthechea tinukiana* Sp. Nov. (Orchidaceae: Laeliinae): an update of the *Prosthechea prismatocarpa* complex. *Turk. J. Botany*

2015, 39 (3), 499–505. <https://doi.org/10.3906/bot-1408-38>.

- (9) Seixas, F. de C.; Monteiro, S. H. N.; Silva, L. B. da; Leite, K. R. B. Leaf anatomy of *Prosthechea moojenii* (Pabst) W. E. Higgins and P. Silvana Cath. & V. P. Castro (Orchidaceae) as an approach to taxonomy of species occurring in biomes cerrado and atlantic forest of the Bahia. *Am. J. Plant Sci.* **2012**, 3 (12), 1752–1758. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.312214>.
- (10) Ray, H. A.; Stuhl, C. J.; Gillett-Kaufman, J. L. Floral fragrance analysis of *Prosthechea cochleata* (Orchidaceae), an endangered native, epiphytic orchid, in Florida. *Plant Signal. Behav.* **2018**, 13 (1), e1422461-4. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1422461>.
- (11) Perez Gutierrez, R. M.; Gonzalez, A. M. N.; Garcia Baez, E.; Lugardo Diaz, S. Studies on the constituents of bulbs of the orchid *Prosthechea michuacana* and antioxidant activity. *Chem. Nat. Compd.* **2010**, 46 (4), 554–561. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9674-6>. Algunas estructuras reportadas en esta publicación requieren revisión.
- (12) Perez Gutierrez, R. M.; Anaya Sosa, I.; Hoyo Vadillo, C.; Victoria, T. C. Effect of flavonoids from *Prosthechea michuacana* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharm. Biol.* **2011**, 49 (11), 1121–1127. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.570766>.
- (13) Bhattacharyya, J.; De, M.; De Oliveira Pires, F.; Felix, L. P.; Silva, T. M. S.; Majetich, G. F. Isolation and characterization of the “flavonoid crystals” of three species of *Prosthechea*: chemotaxonomic considerations of the genera *Prosthechea* and *Encyclia*. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, 2 (7), 755–758.
- (14) Orozco, O.; Solano, R. *Prosthechea karwinskii* en floración, Fotografía Tomada En Cineguilla, Municipio de Santo Domingo Yanhuitlan, Oaxaca; **2019**.
- (15) Solano, R. *Informe Técnico Final: Crecimiento, patrones de distribución y estructura de edades de Prosthechea karwinskii (Orchidaceae) en San Vicente Lachixío, Oaxaca, México; Oaxaca, México, 2009*.

- (16) Pantaleon-Bautista, X. Análisis químico de las fragancias producidas por las orquídeas *Prosthechea varicosa* y *Prosthechea karwinskii* para la identificación de compuestos volátiles, Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, **2011**.
- (17) Kaiser, R. *On the Scent of Orchids*; ACS Symposium Series, 1ª Ed.; New York, **1993**.
- (18) Mijangos-Ricardez, O.; López-Luna, J. Static–dynamic Superheated liquid extraction of phenols from *Prosthechea varicosa* and *Prosthechea karwinskii* (Orchids) prior to determination by LC–DAD. *Nat. Prod. J.* **2013**, 3 (3), 199–203. <https://doi.org/10.2174/22103155113039990008>.
- (19) Rojas, A.; Gómez, R. S.; Jiménez-estrada, M. Effect of *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) on obesity and dyslipidemia in Wistar rats. *Alexandria J. Med.* **2017**, 53 (4), 311-315. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2016.11.004>.
- (20) Rojas-Olivos, A.; Solano-Gómez, R.; Jiménez-Estrada, M.; Silva-Valeriano, B. Y.; Lagunez-Rivera, L. Antioxidant capacity of *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) extracts obtained by sonication. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* **2014**, 4 (5), 70-74.
- (21) Gopal, K.; Mérillon, J.-M. *Natural Products. Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, 1ª Edición.; Ramawat, K., Mérillon, J.-M., Eds.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Londres, **2013**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>.
- (22) Teoh, E. S. *Medicinal Orchids of Asia*, 1º Edición.; Springer International Publishing: Cham, **2016**. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3>.
- (23) Yang, L.; Wang, Z.; Xu, L. Phenols and a triterpene from *Dendrobium aurantiacum* Var. *Denneanum* (Orchidaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, 34 (8), 658–660. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.03.003>.
- (24) Reinecke, T.; Kindl, H. Characterization of bibenzyl synthase catalysing the biosynthesis of phytoalexins of orchids. *Phytochemistry* **1993**, 35 (1), 63-66. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90510-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90510-7).

- (25) Hayata, Y. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, 29 (1), 55-62. <https://doi.org/10.1248/cpb.29.55>
- (26) Dodson, C. H. Why are there so many orchid species? *Lankesteriana* **2016**, 3 (2), 99–103. <https://doi.org/10.15517/lank.v3i2.23028>.
- (27) Ragasa, C. Y.; Espineli, D. L.; Shen, C. C. Cytotoxic triterpene from *Barringtonia asiatica*. *Pharm. Chem. J.* **2014**, 48 (8), 529–533. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1144-1>.
- (28) Beierbeck, H.; Saunders, J. K.  $\beta$ -Carbon shielding effects in  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Can. J. Chem.* **2006**, 53 (9), 1307–1313. <https://doi.org/10.1139/v75-179>.
- (29) González, A. G.; Fraga, B.; Gonzalez, P.; Hernandez, M. G.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of olean-18-ene derivatives. *Phytochemistry* **1981**, 20, 1919–1921.
- (30) Ireland, R.; Baldwin, D.; Johnson, W. The total synthesis of an unsymmetrical pentacyclic triterpene. D-L-Germanicol. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92 (19), 5743–5746.
- (31) Budzikiewicz, H.; Wilson, J. M.; Djerassi, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (22), 3688–3699. <https://doi.org/10.1021/ja00905a036>.
- (32) Al-Massarani, S. M.; El Gamal, A. A.; Al Musayeib, N. M.; Ibrahim, S. R. M.; Mothana, R. A. Klodorone A and Klodorol A: new triterpenes from *Kleinia odora*. *Nat. Prod. Res.* **2014**, 28 (15), 1142–1146. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.915831>.
- (33) Kim, D. K.; Lim, J. P.; Kim, J. W.; Park, H. W.; Eun, J. S. Antitumor and antiinflammatory constituents from *Celtis sinensis*. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, 28 (1), 39–43.
- (34) Yang, L.; Peng, C.; Meng, C.; He, C. A New macrolide and six cycloartane triterpenoids from the tubers of *Bletilla striata*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2014**, 57, 238–

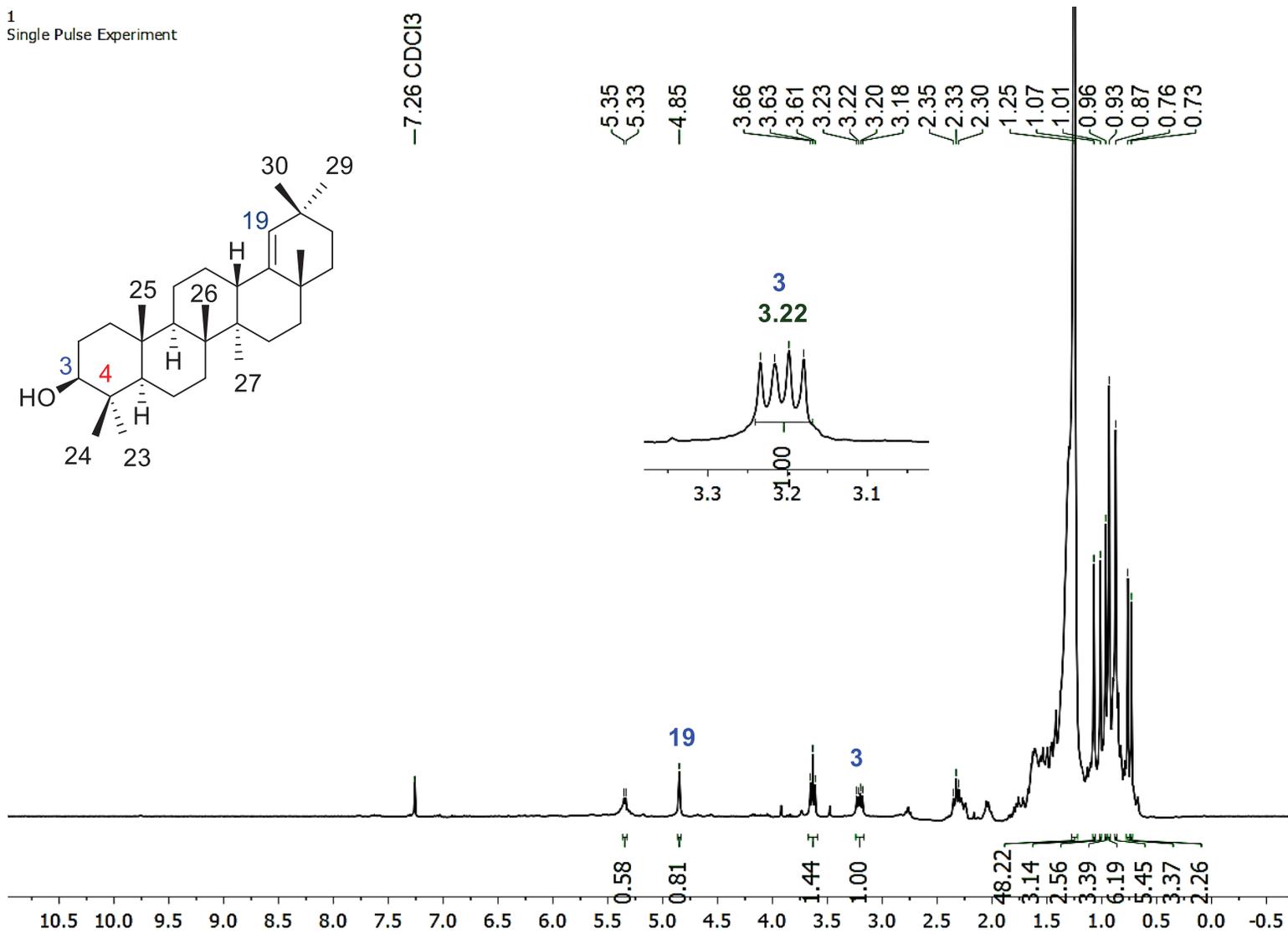
241. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.08.020>.

- (35) Nathan, P. J.; Diaz, E. *Introducción a la resonancia magnética nuclear*, 2<sup>da</sup> edición; Editorial Limusa: Ciudad de México, México, **1980**.
- (36) Lo, S.-F.; Mulabagal, V.; Chen, C.-L.; Kuo, C.-L.; Tsay, H.-S. Bioguided fractionation and isolation of free radical scavenging components from *in vitro* propagated chinese medicinal plants *Dendrobium tosaense* Makino and *Dendrobium moniliforme* SW. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (23), 6916–6919. <https://doi.org/10.1021/jf040017r>.
- (37) Nes, W. D.; Norton, R. A.; Benson, M. <sup>13</sup>C NMR Studies on sitosterol biosynthesized from [<sup>13</sup>C]mevalonates. *Phytochemistry* **1992**, *31* (3), 805–811. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80019-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80019-B).
- (38) Habib, M.; Nikkon, F.; Rahman, M.; Haque, Z.; Sci, M. K.-P. J. B.; 2007, U. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from methanolic extract of root. *Pak. J. Biol. Sci.* **2007**, *10* (22), 4174–4176.
- (39) Tóth, B.; Hohmann, J.; Vasas, A. Phenanthrenes: A promising group of plant secondary metabolites. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81* (3), 661–678. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00619>.
- (40) Tuchinda, P.; Udchachon, J.; Khumtaveeporn, K. Phenantrenes of *Eulophia nuda*. *Phytochemistry* **1988**, *27* (10), 3267–3271.
- (41) Tuchinda, P.; Udchachon, J. Benzylated phenantrenes from *Eulophia nuda*. *Phytochemistry* **1989**, *28* (9), 2463–2466.
- (42) Shriram, V.; Kumar, V.; Kishor, P. B. K.; Suryawanshi, S. B.; Upadhyay, A. K.; Bhat, M. K. Cytotoxic activity of 9,10-dihydro-2,5-dimethoxyphenanthrene-1,7-diol from *Eulophia nuda* against human cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128* (1), 251–253. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.031>.
- (43) Charoenrungruang, S.; Chanvorachote, P.; Sritularak, B.; Pongrakhananon, V. Gigantol, a bibenzyl from *Dendrobium draconis*, inhibits the migratory behavior of

- non-small cell lung cancer cells. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1359–1366. <https://doi.org/10.1021/np500015v>.
- (44) Wu, J.; Li, X.; Wan, W.; Yang, Q.; Ma, W.; Chen, D.; Hu, J.; Chen, C. Y. O.; Wei, X. Gigantol from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. binds and inhibits aldose reductase gene to exert its anti-cataract activity: an *in vitro* mechanistic study. **2017**, *198* (23), 255-261 . <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.026>.
- (45) Juneja, R.; Sharma, J.; Tandon, J. A substituted 1,2-diarylethane from *Cymbidium giganteum*. **1985**, *24* (2), 321–324. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83544-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83544-X)
- (46) Wu, J.; Lu, C.; Li, X.; Fang, H.; Wan, W.; Yang, Q. Synthesis and biological evaluation of novel gigantol derivatives as potential agents in prevention of diabetic cataract. Supporting Information. *PLoS One* **2015**, *10* (10), 1–13.
- (47) Majumder, P. L.; Pal (née Ray), S. Cumulatin and tristin, two bibenzyl derivatives from the orchids *Dendrobium cumulatum* and *Bulbophyllum triste*. *Phytochemistry* **1993**, *32* (6), 1561–1565. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85180-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85180-Y).
- (48) Chen, Y. G.; Yu, H.; Lian, X. Isolation of stilbenoids and lignans from *Dendrobium hongdie*. *Trop. J. Pharm. Res.* **2015**. *14* (11), 2055-2059. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v14i11.15>.
- (49) Biondi, D. M.; Rocco, C.; Ruberto, G. New dihydrostilbene derivatives from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* and evaluation of their antioxidant activity. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66* (4), 477–480. <https://doi.org/10.1021/np020365s>.
- (50) Roslund, M. U.; Tähtinen, P.; Niemitz, M.; Sjöholm, R. Complete assignments of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical Shifts and J<sub>H,H</sub> coupling constants in NMR Spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.008>.
- (51) Jacobsen, N. *NMR Spectroscopy Explained*, 1<sup>a</sup> Edición.; John Wiley & Sons, Inc: New Jersey, USA, **2007**.

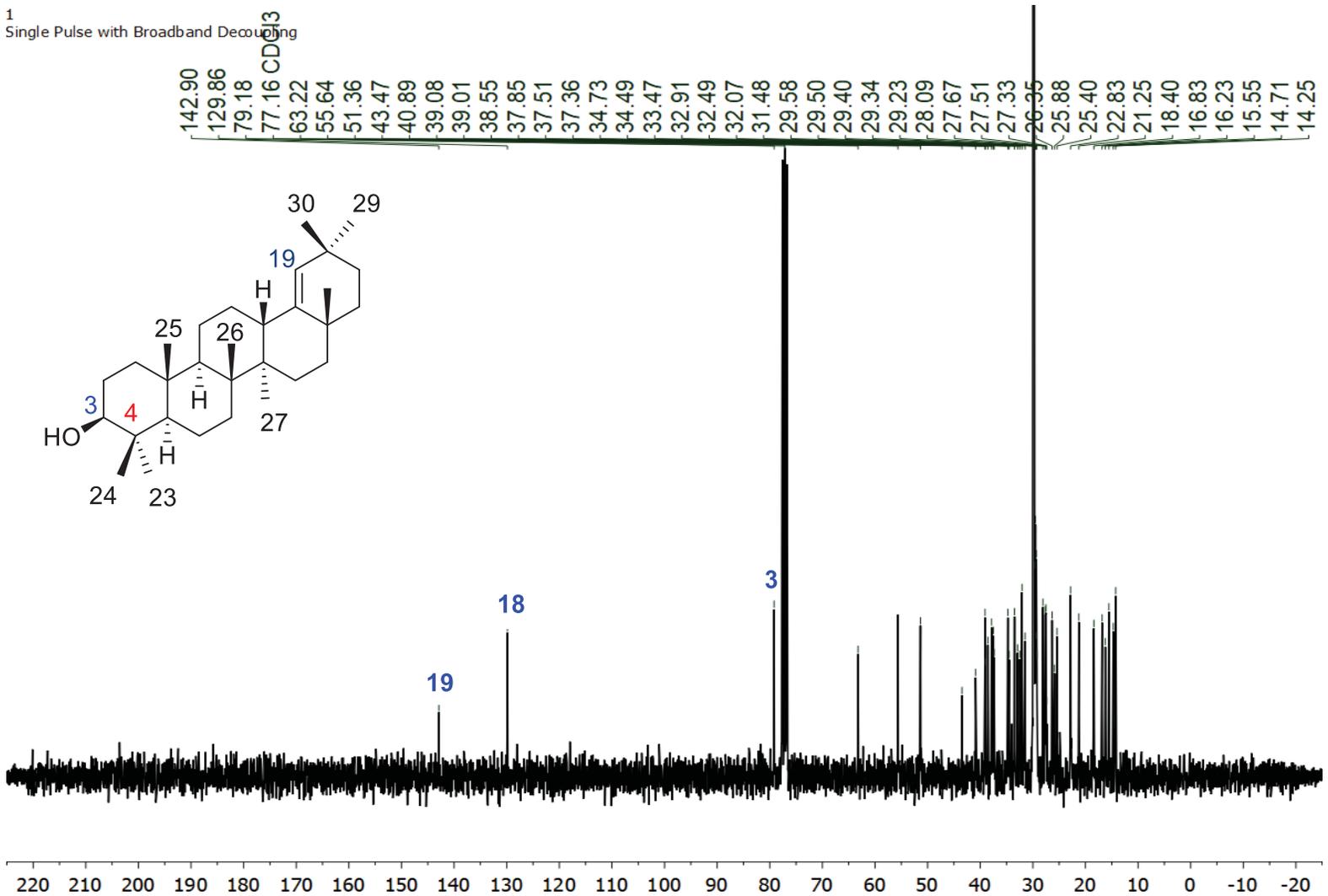
- (52) Solano-Gómez, R.; Cruz- Lustre, G.; Feria-Martínez, A.; Rivera-Lagunez, L. Plantas utilizadas en la celebración de la semana santa en Zaachila, Oaxaca, México. *Polibotánica* **2010**, 29, 263–279.

1  
Single Pulse Experiment

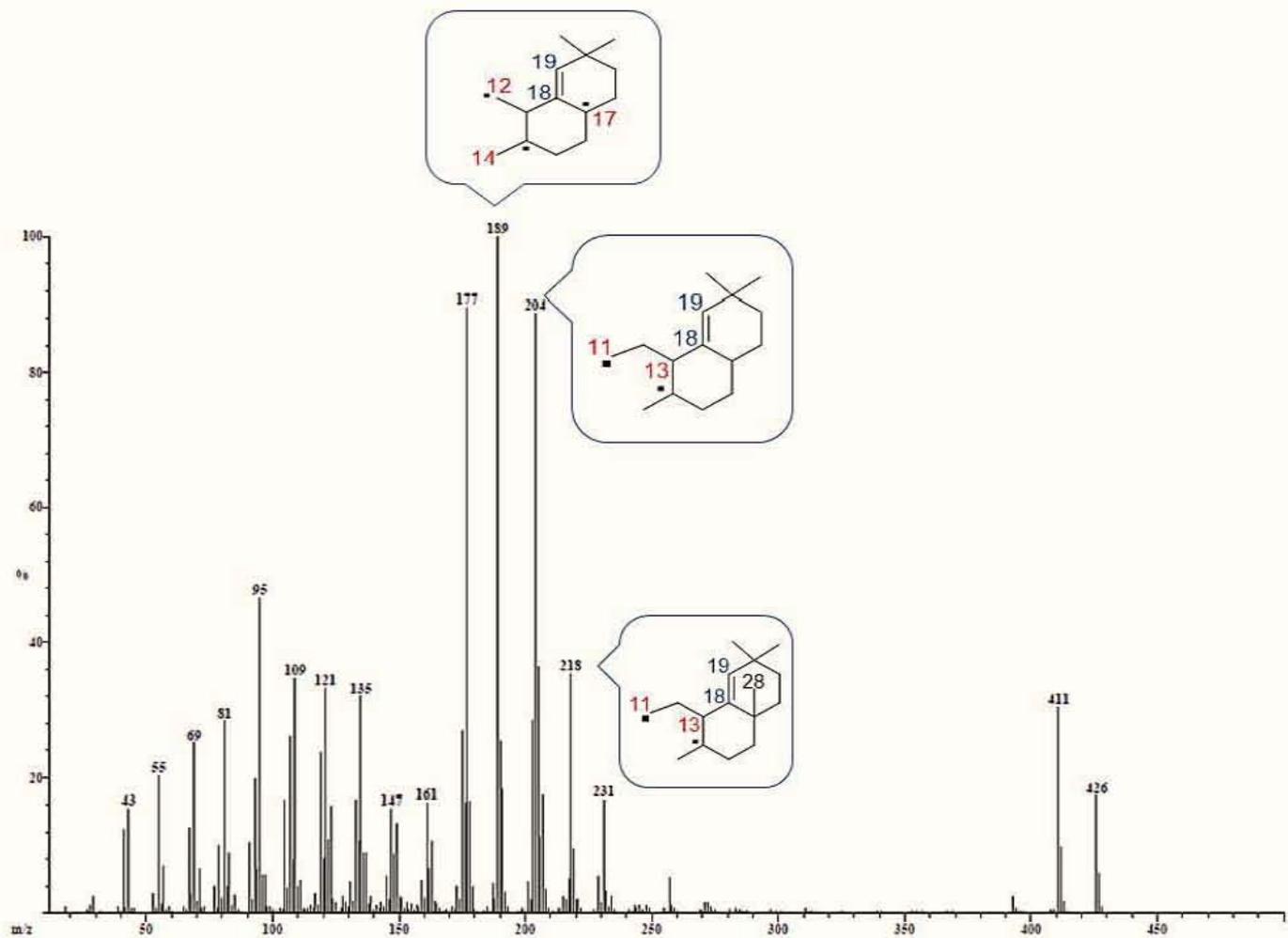


ESPECTRO 1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de II6.

1  
Single Pulse with Broadband Decoupling

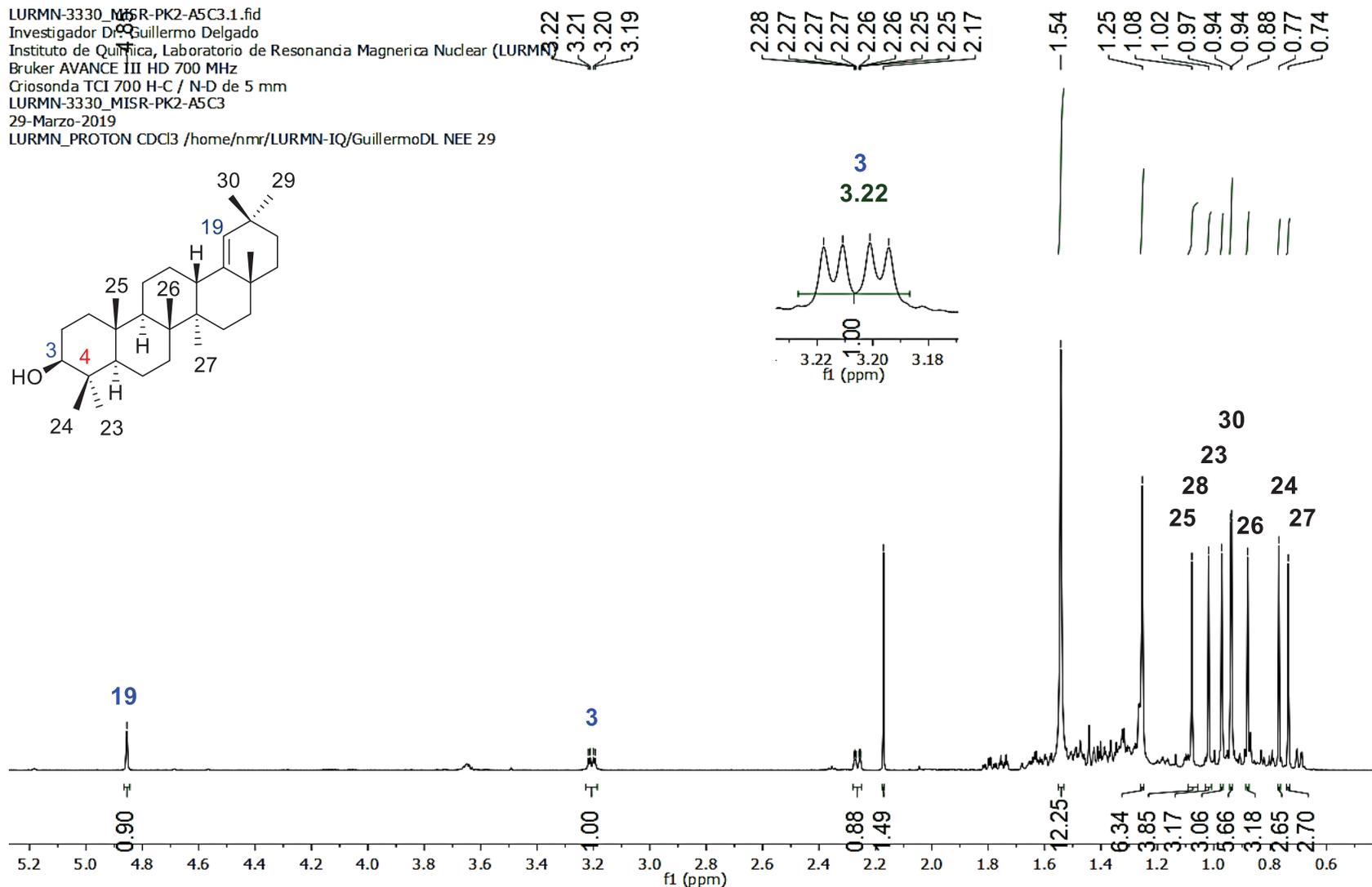
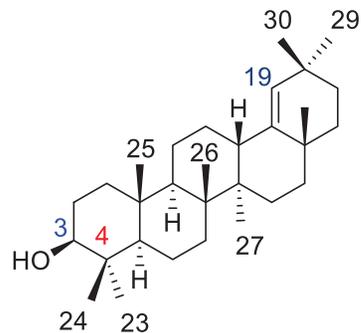


ESPECTRO 2. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de II6.



ESPECTRO 3. Espectro de masas del pico  $t_R=35.96\text{min}$  correspondiente a germanicol (35) y sus posibles fragmentos.

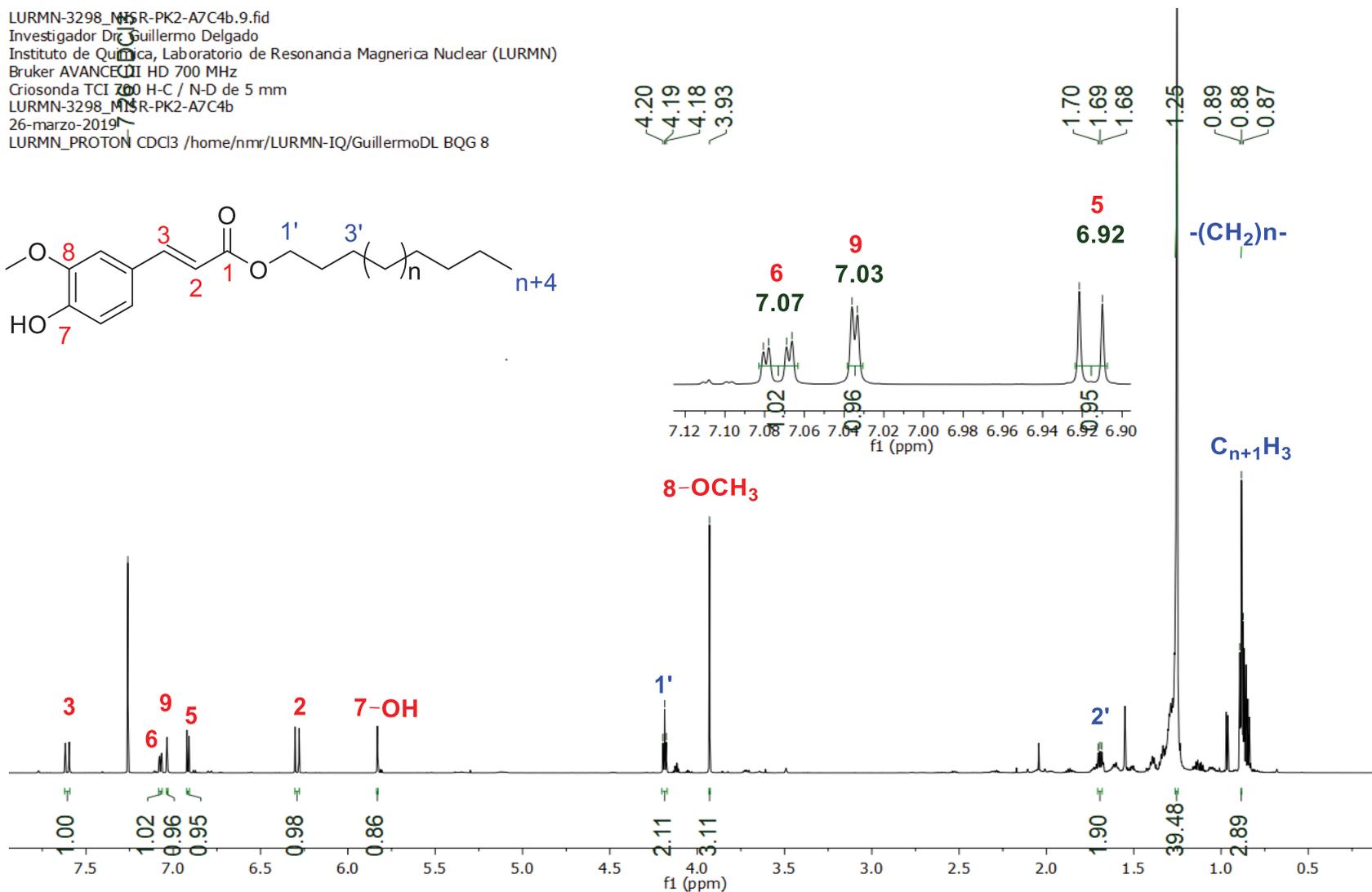
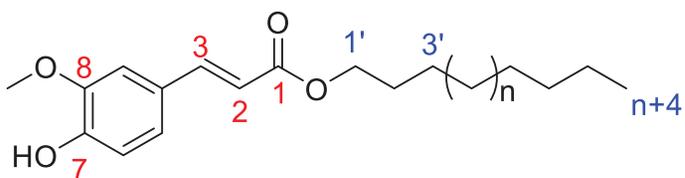
LURMN-3330\_MISR-PK2-A5C3.1.fid  
 Investigador Dr. Guillermo Delgado  
 Instituto de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN)  
 Bruker AVANCE III HD 700 MHz  
 Criosonda TCI 700 H-C / N-D de 5 mm  
 LURMN-3330\_MISR-PK2-A5C3  
 29-Marzo-2019  
 LURMN\_PROTON CDCl3 /home/nmr/LURMN-IQ/GuillermoDL NEE 29



ESPECTRO 4. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de germanicol (35).

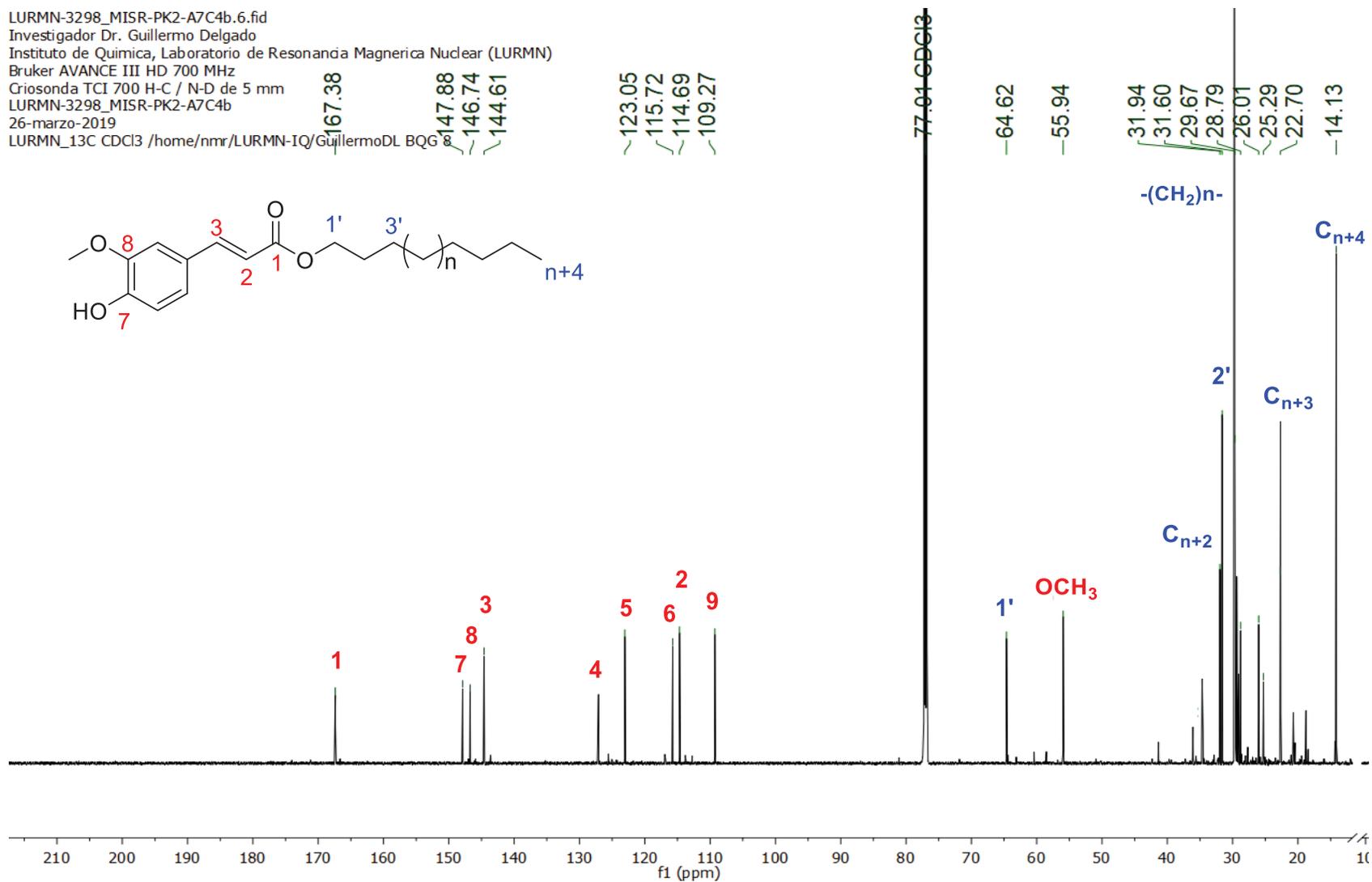
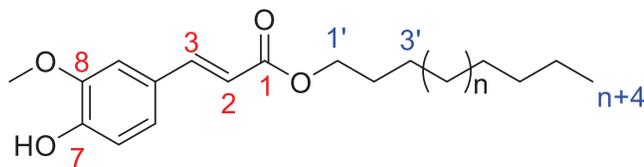


LURMN-3298\_MSR-PK2-A7C4b.9.fid  
 Investigador Dr. Guillermo Delgado  
 Instituto de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN)  
 Bruker AVANCE DD HD 700 MHz  
 Criosonda TCI 700 H-C / N-D de 5 mm  
 LURMN-3298\_MSR-PK2-A7C4b  
 26-marzo-2019  
 LURMN\_PROTON CDCl3 /home/nmr/LURMN-IQ/GuillermoDL BQG 8

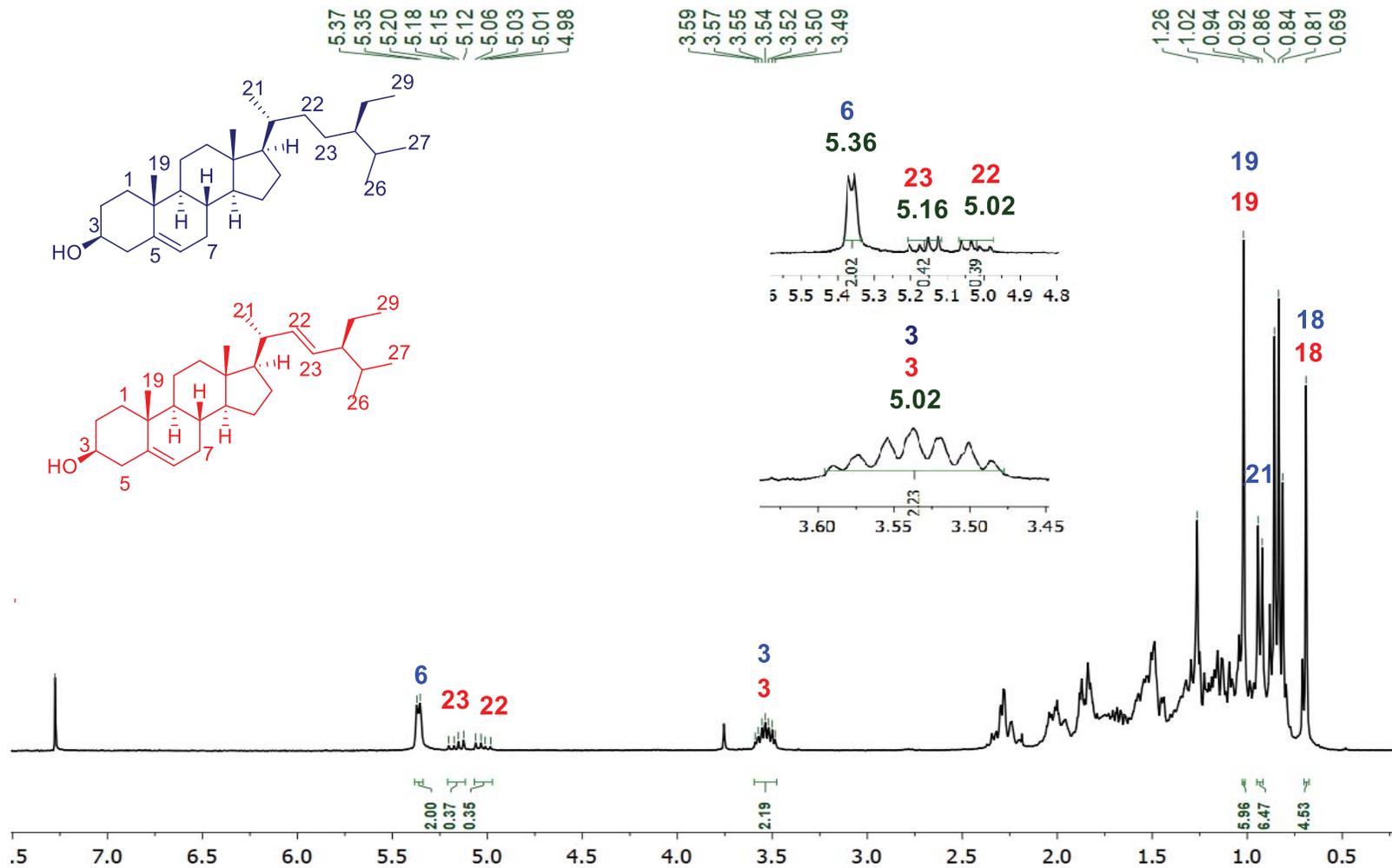


ESPECTRO 6. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de ferulatos de *n*-alquilo (36).

LURMN-3298\_MISR-PK2-A7C4b.6.fid  
 Investigador Dr. Guillermo Delgado  
 Instituto de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN)  
 Bruker AVANCE III HD 700 MHz  
 Criosonda TCI 700 H-C / N-D de 5 mm  
 LURMN-3298\_MISR-PK2-A7C4b  
 26-marzo-2019  
 LURMN\_13C CDCl3 /home/nmr/LURMN-IQ/GuillermoDL BQG

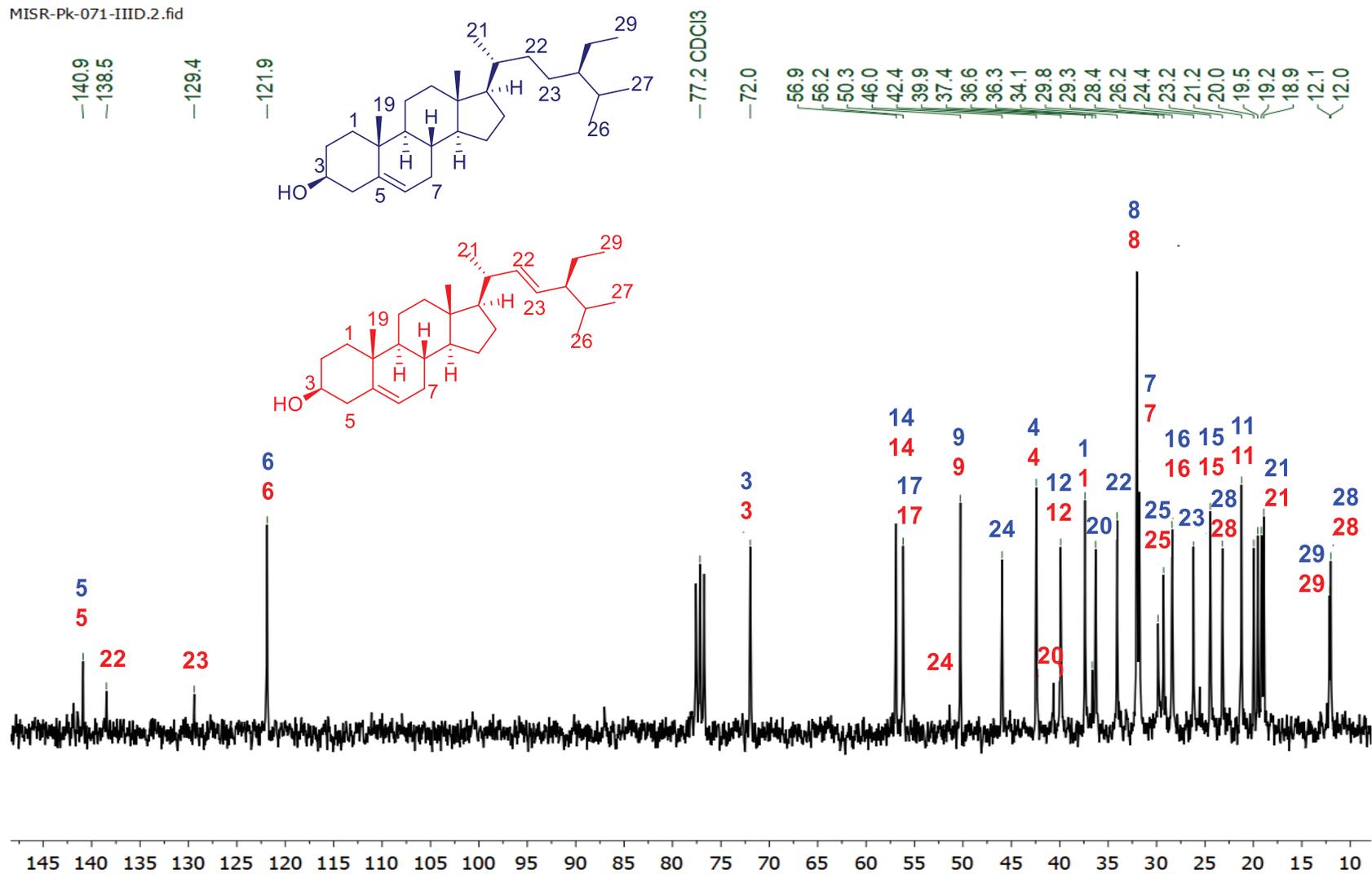


ESPECTRO 7. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de ferulatos de *n*-alquilo (36).



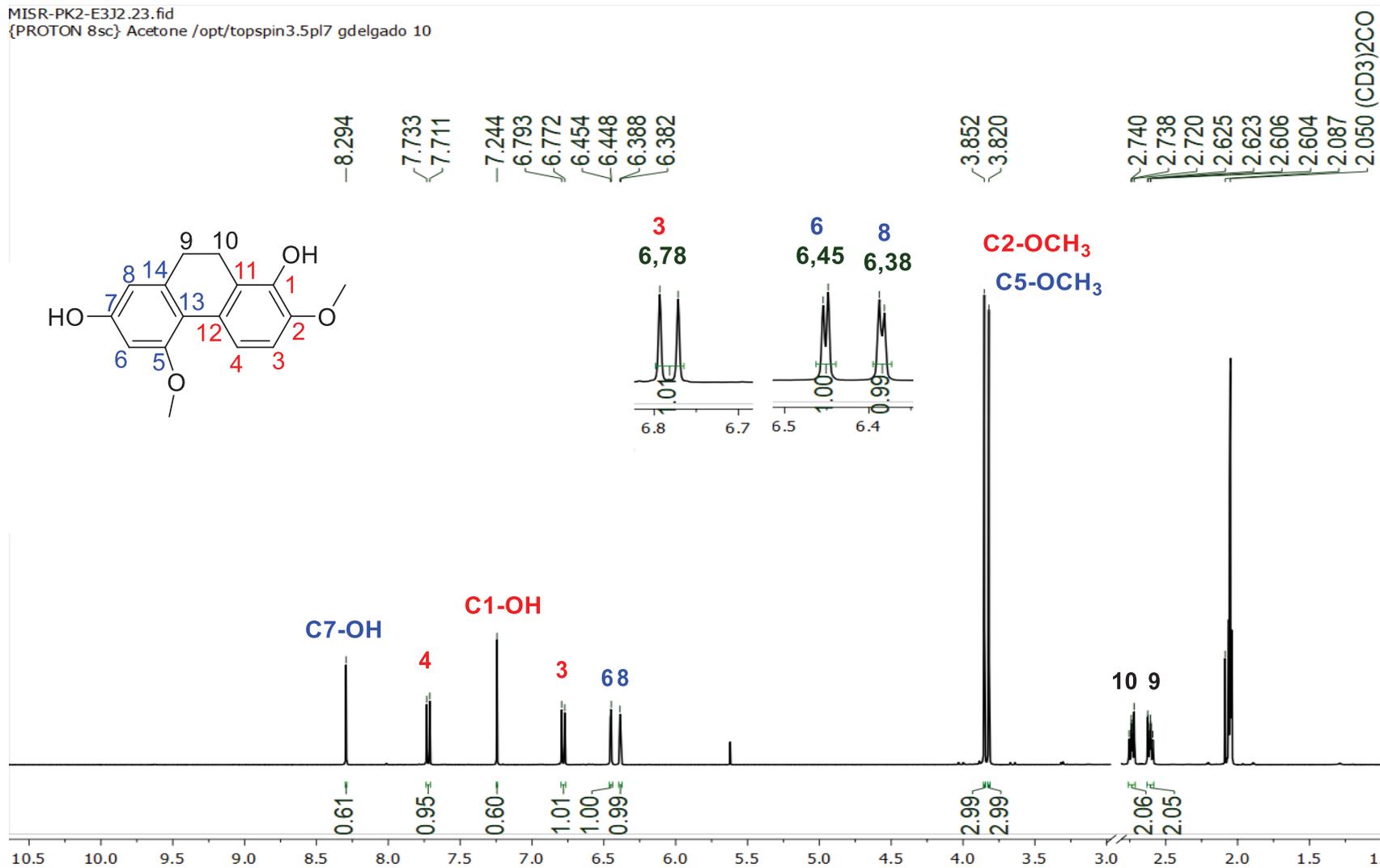
ESPECTRO 8. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de β-sitosterol (37) y estigmasterol (38).

MISR-Pk-071-IIID.2.fid



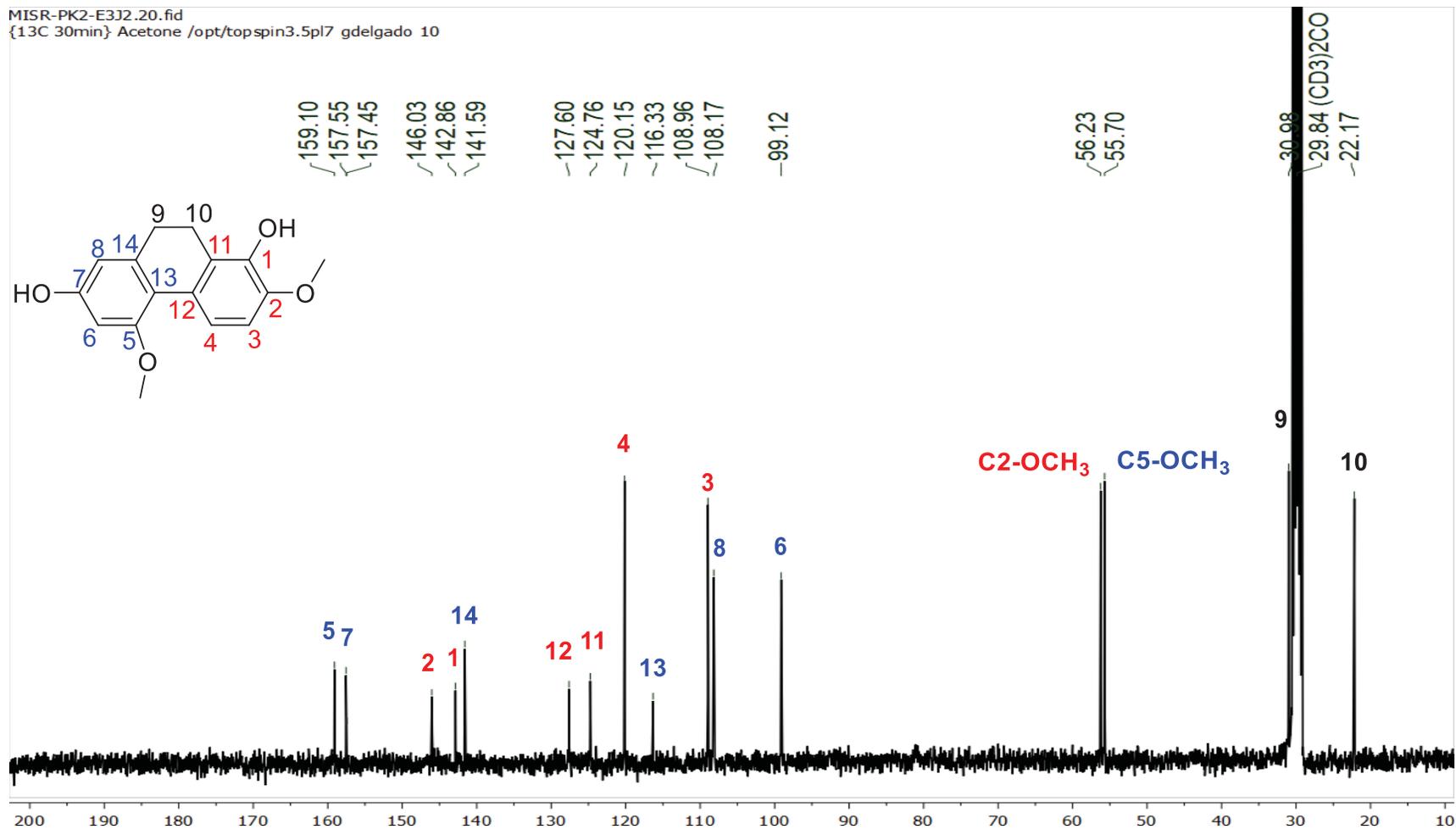
ESPECTRO 9. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de β-sitosterol (37) y estigmasterol (38).

MISR-PK2-E3J2.23.fid  
{PROTON 8sc} Acetone /opt/topspin3.5pl7 gdelgado 10



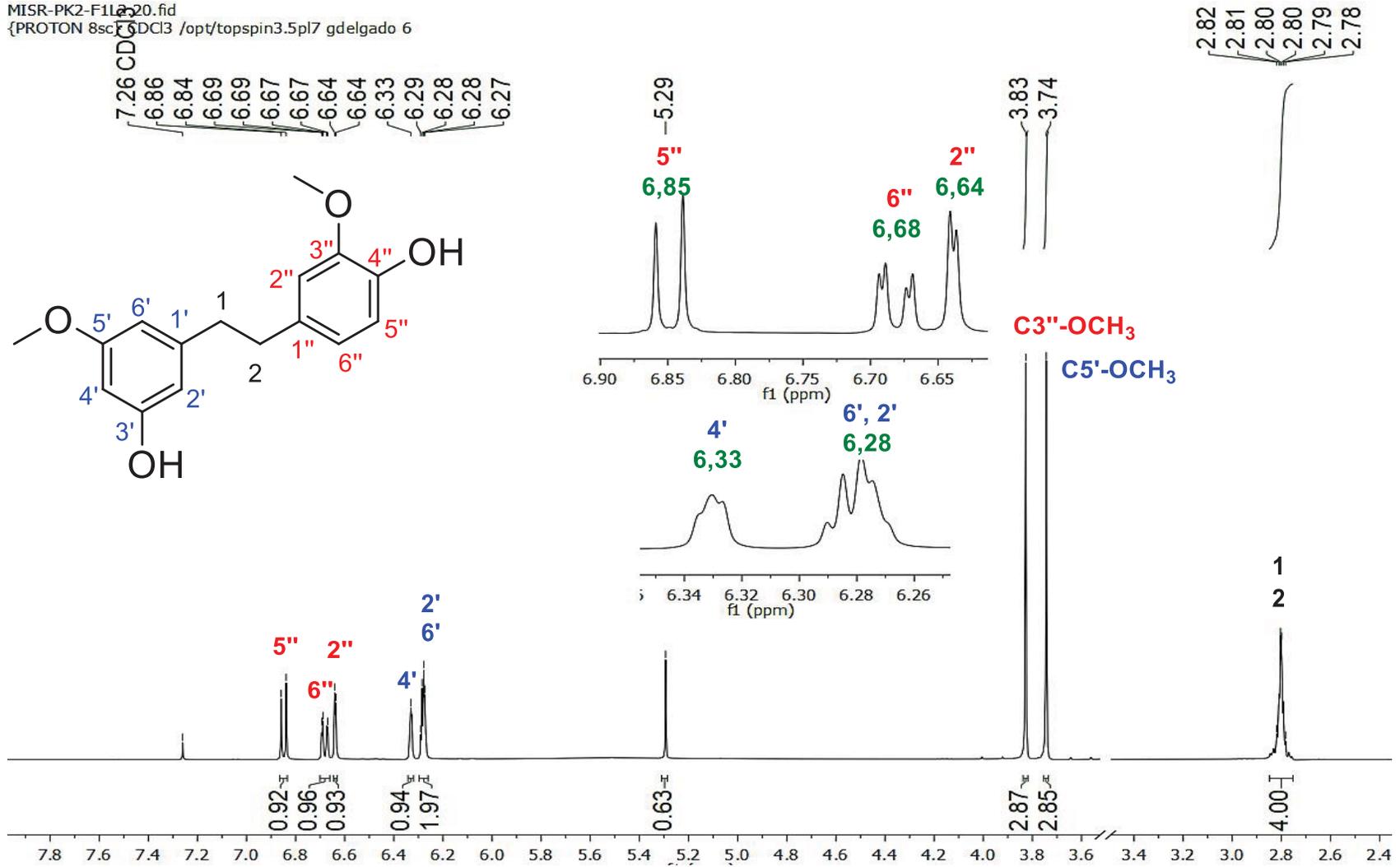
ESPECTRO 10. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO) de 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol (39).

MISR-PK2-E3J2.20.fid  
{13C 30min} Acetone /opt/topspin3.5pl7 gdelgado 10



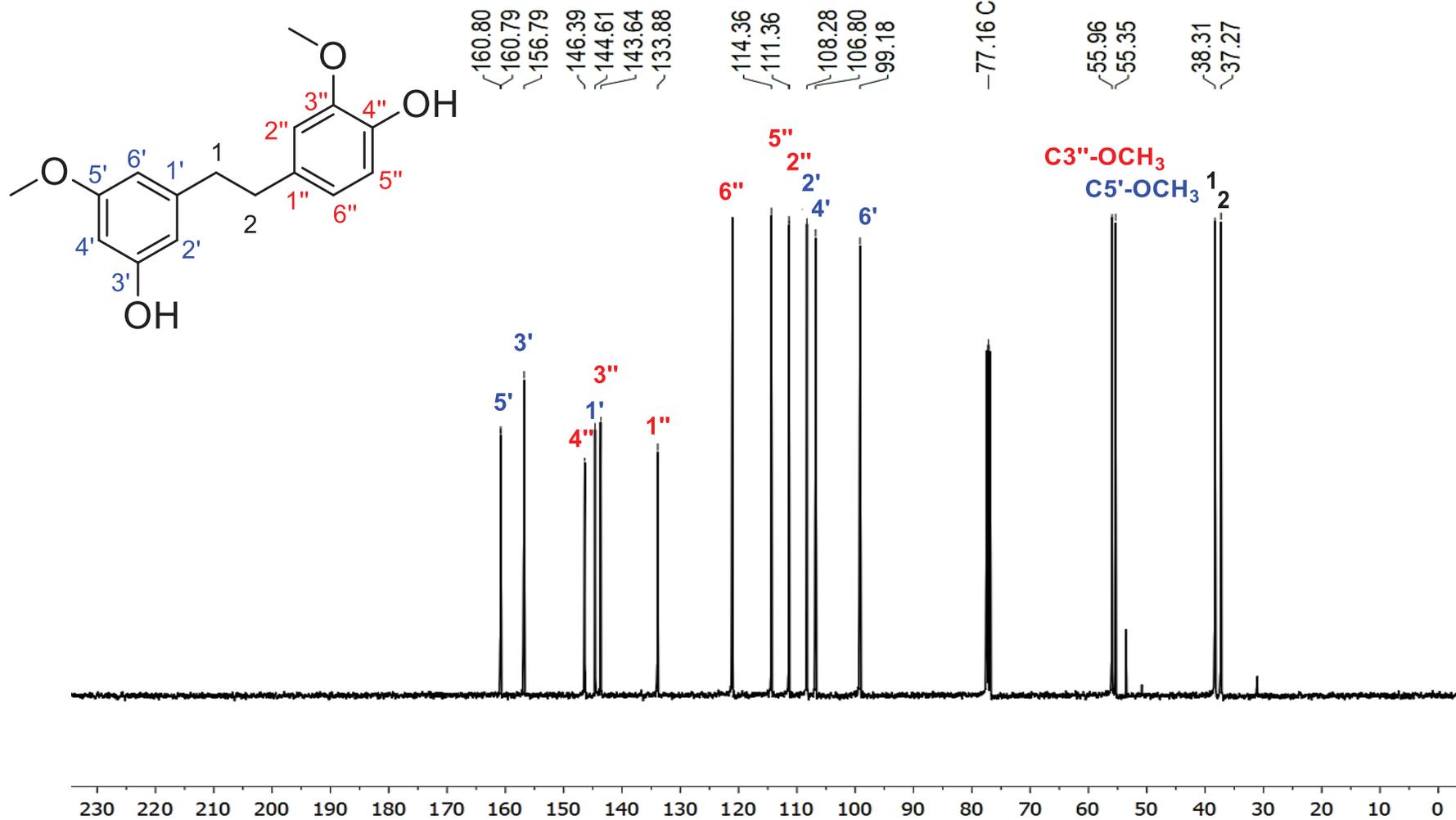
ESPECTRO 11. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) de 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol (39).

MISR-PK2-F11a20.fid  
 {PROTON 8sc} CDCl3 /opt/topspin3.5pl7 gdelgado 6



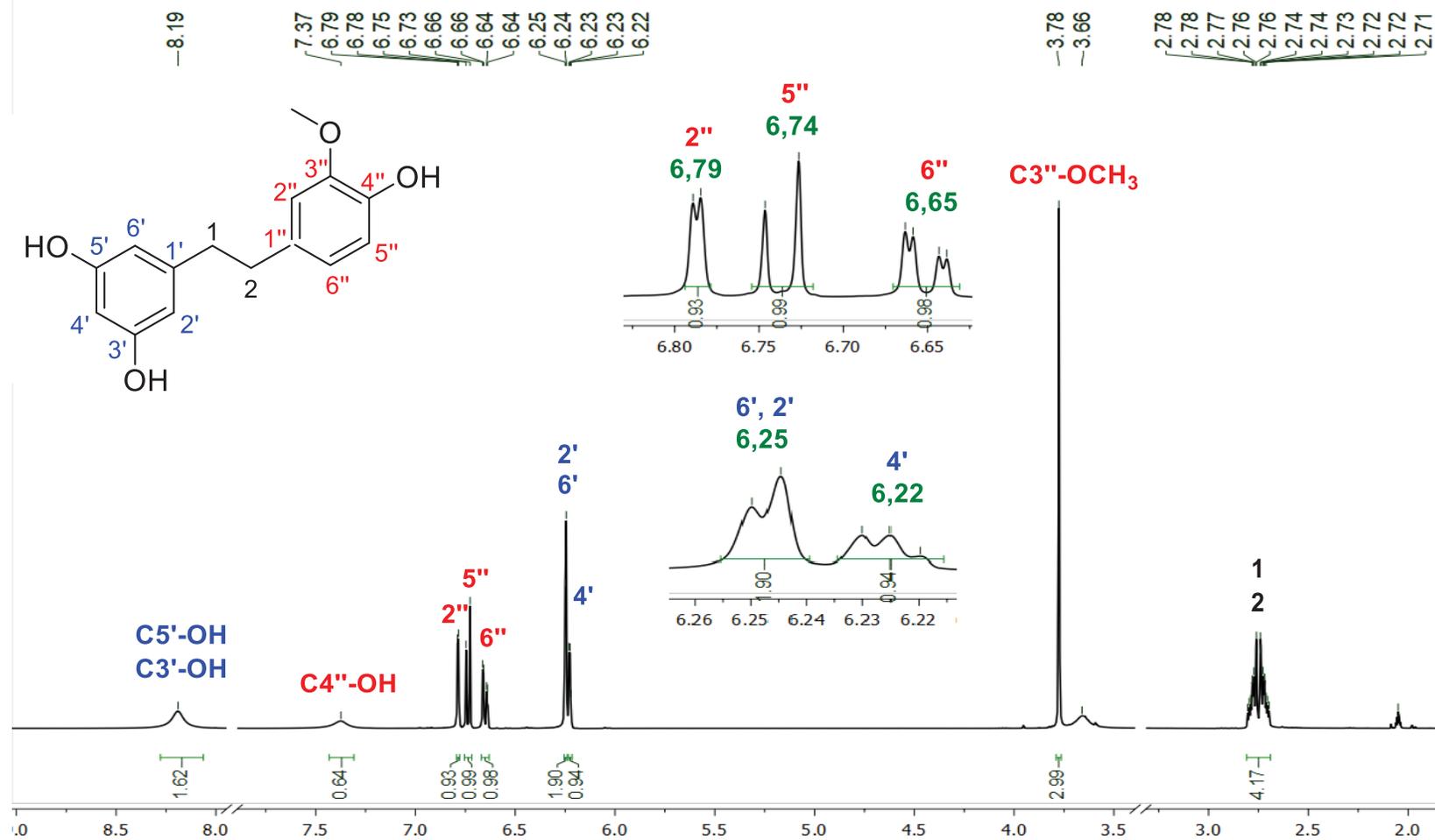
ESPECTRO 12. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de gigantol (4).

MISR-PK2-F1L2.21.fid  
{13C 20min} CDCl3 /opt/topspin3.5pl7 gdelgado 6



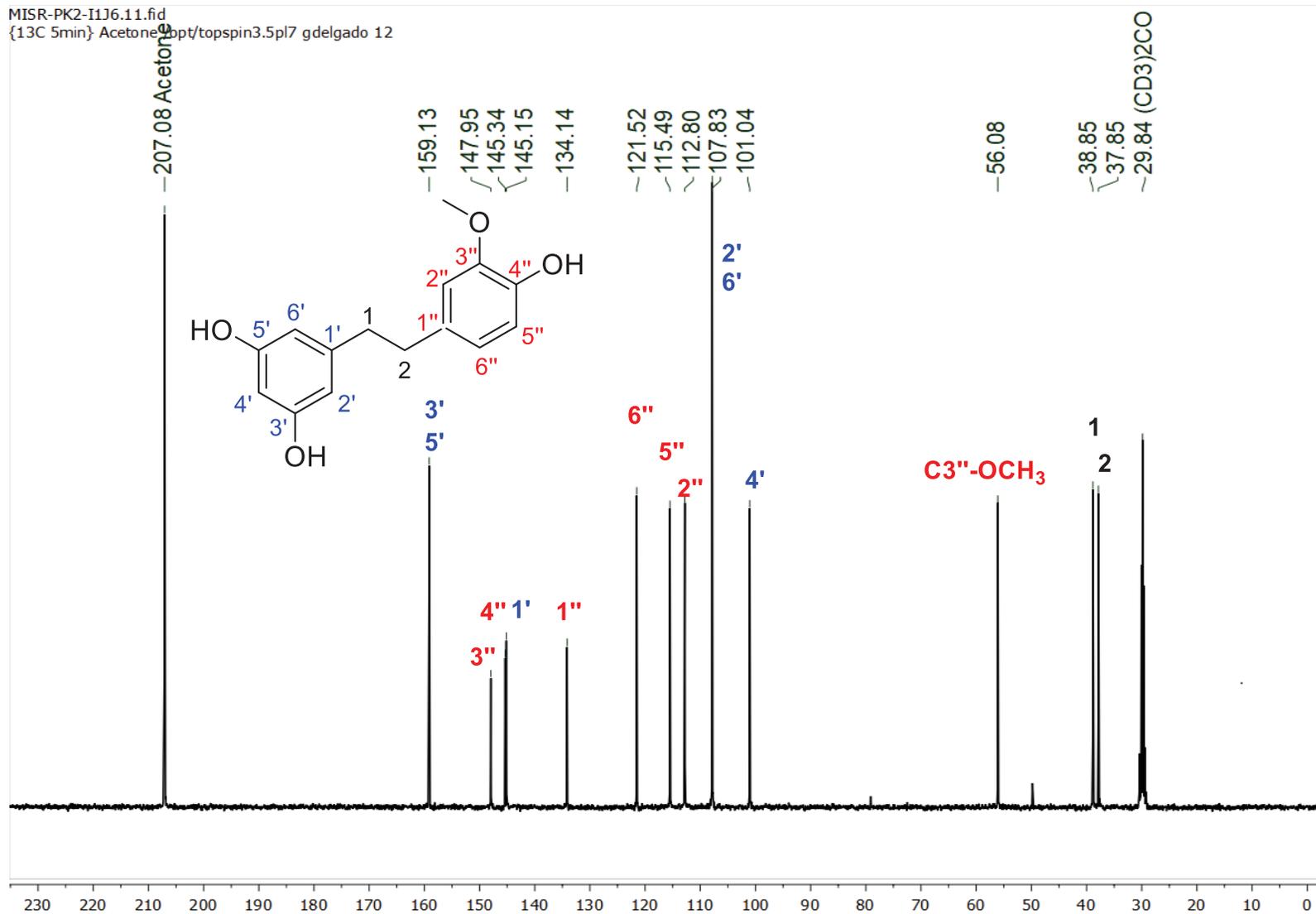
ESPECTRO 13. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CCl<sub>3</sub>) de gigantol (4).

MISR-PK2-11J6.30.fid  
{PROTON 8sc} Acetone /opt/topspin3.5pl7 gdelgado 10



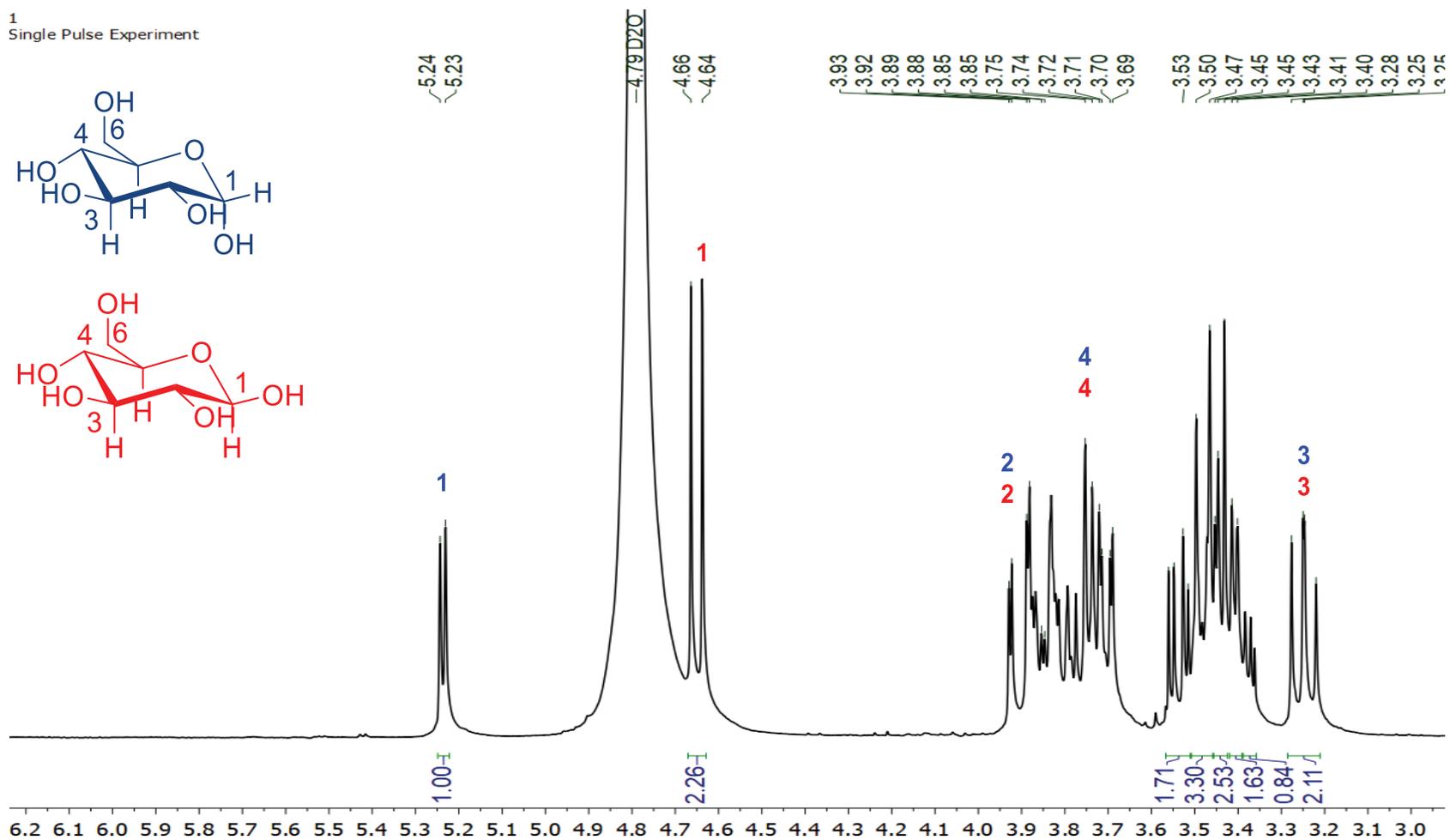
ESPECTRO 14. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO) de tristina (40).

MISR-PK2-I1J6.11.fid  
{13C 5min} Acetone



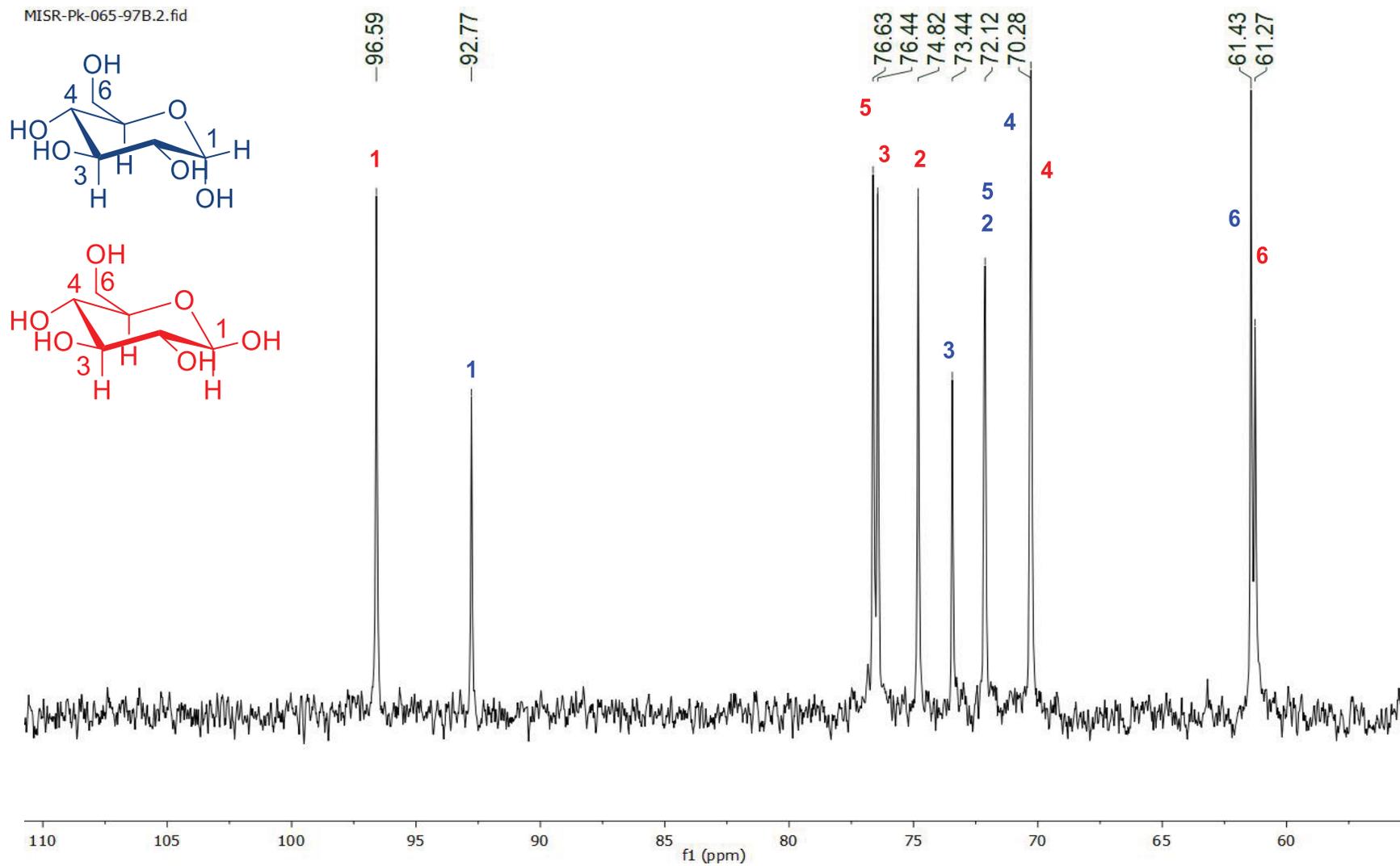
ESPECTRO 15. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) de tristina (40).

1  
Single Pulse Experiment



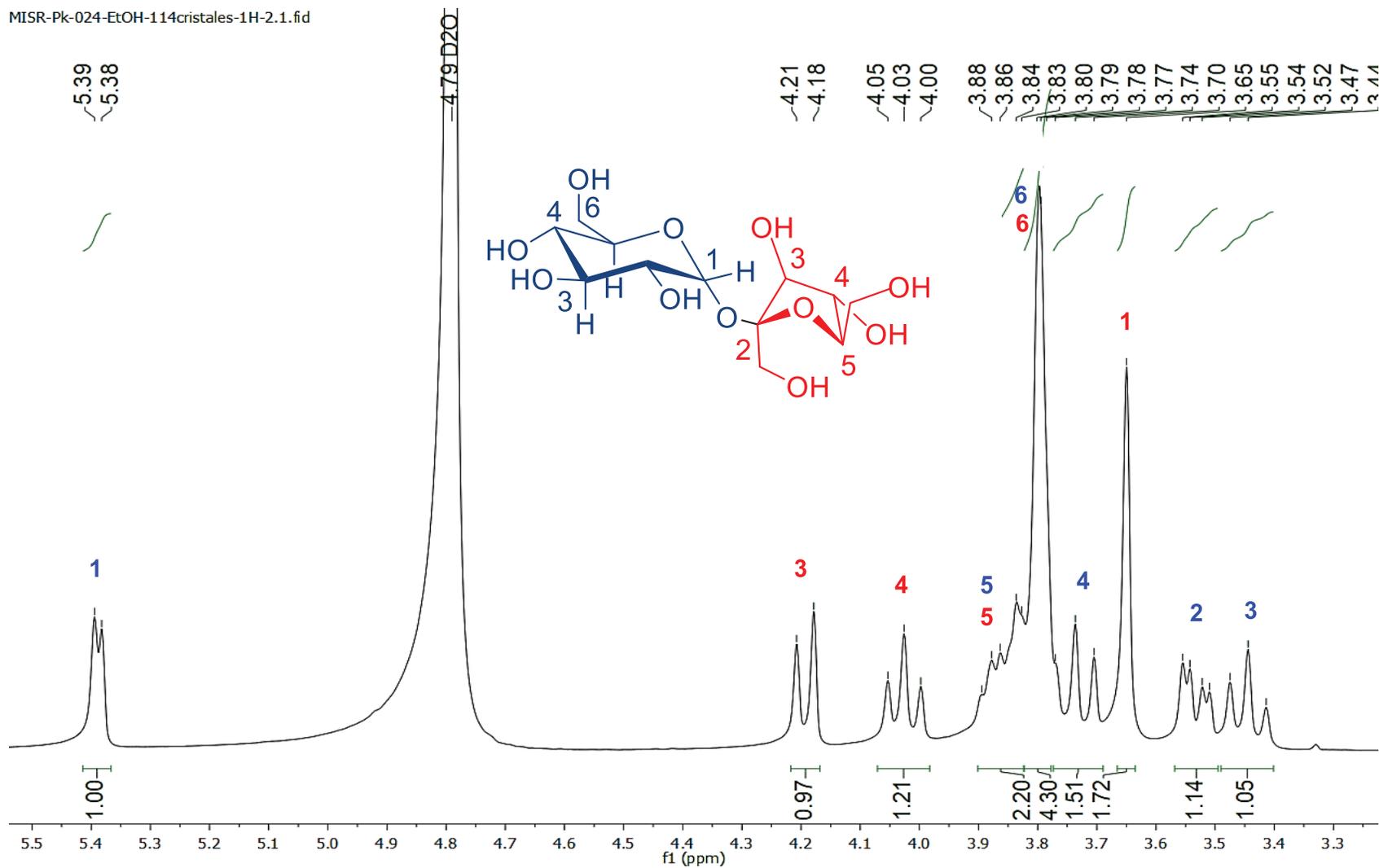
ESPECTRO 16. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de  $\alpha$ -D-glucopiranososa (41) y  $\beta$ -D-glucopiranososa (42).

MISR-Pk-065-97B.2.fid



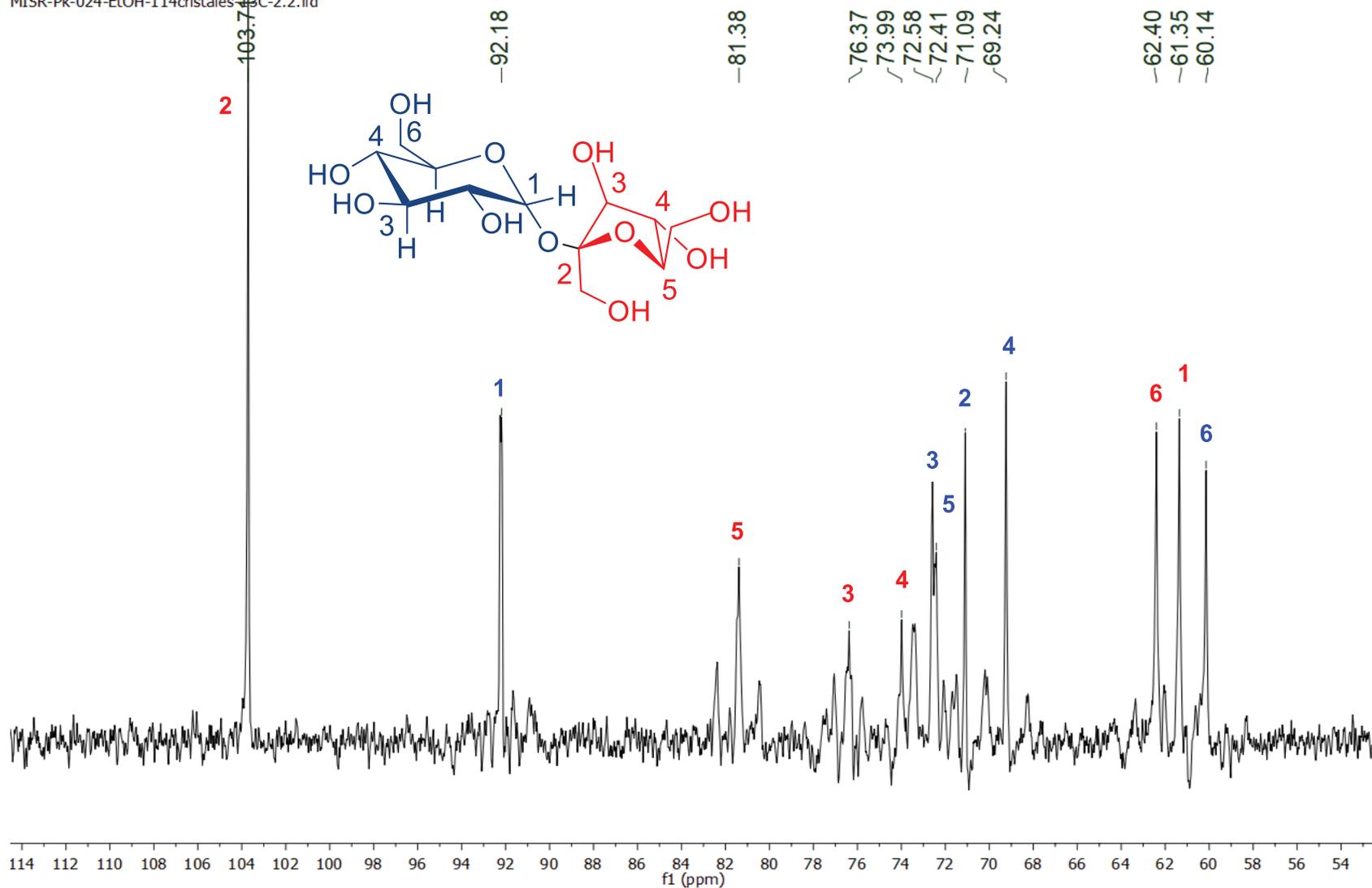
ESPECTRO 17. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de  $\alpha$ -D-glucopiranososa (41) y  $\beta$ -D-glucopiranososa (42)

MISR-Pk-024-EtOH-114cristales-1H-2.1.fid



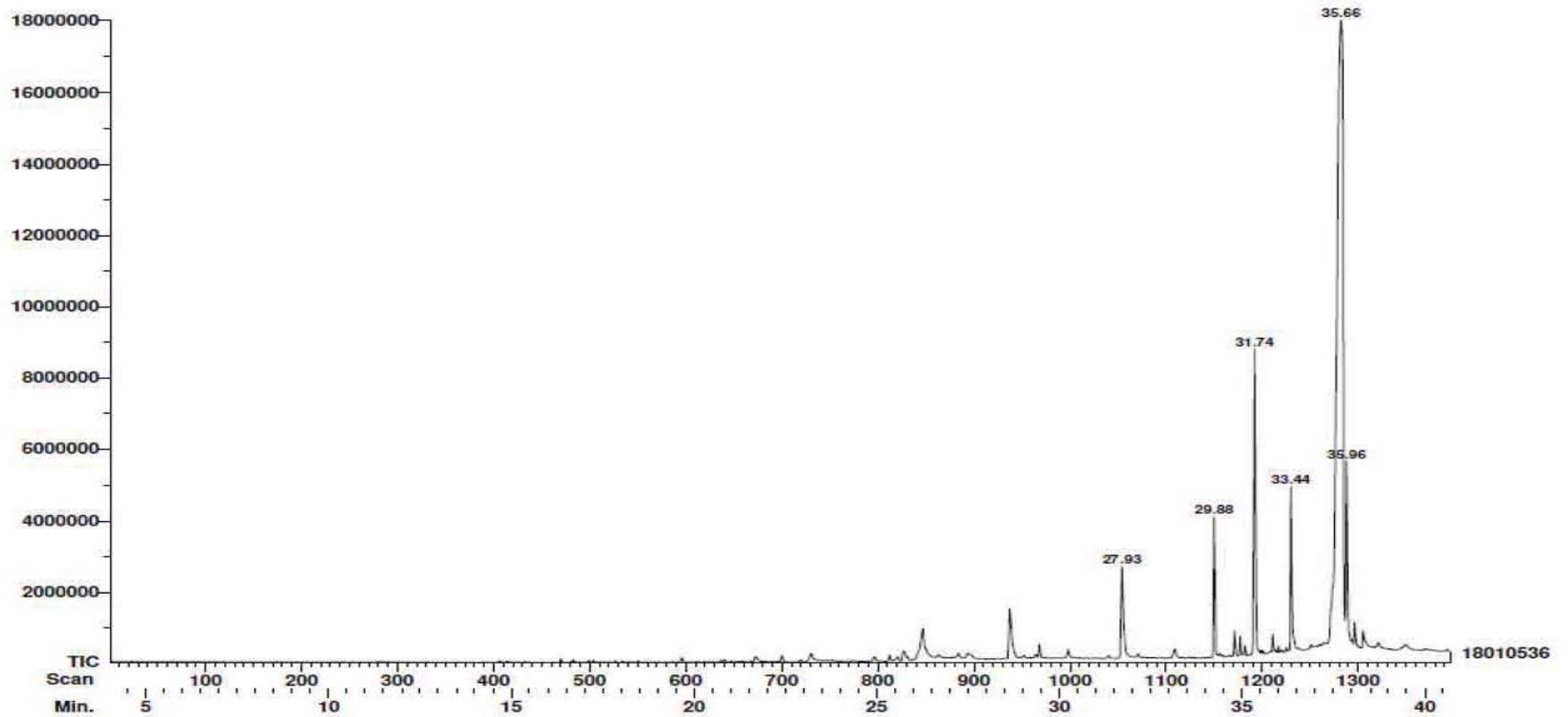
ESPECTRO 18. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) de sacarosa (43)

MISR-Pk-024-EtOH-114cristales-13C-2.2.fid



ESPECTRO 19. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) de sacarosa (43)

File: 2170 MISR-II6 Date Run: 10-10-2018 (Time Run: 10:45:32)  
Sample: Dr Delgado Guillermo Operador: Javier Perez  
Instrument: JEOL GCmate Ionization mode: EI+  
Inlet: My Inlet



CROMATOGRAMA 1. Cromatograma CG-MS de la fracción II6