



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**

**Maestría en Ciencias en Conservación y
Aprovechamiento de los Recursos Naturales
(Ingeniería)**

**ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS FRAGANCIAS PRODUCIDAS POR
LAS ORQUÍDEAS *Prosthechea varicosa* y *Prosthechea
karwinskii* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS
VOLÁTILES**

T e s i s

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

PANTALEÓN BAUTISTA XOCHITL

Dirección de tesis:

Dra. Lagunez Rivera Luicita

Dr. Solano Gómez Aniceto Rodolfo

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Diciembre de 2011



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 25 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: **“Análisis químico de las fragancias producidas por las orquídeas *Prosthechea varicosa* y *Prosthechea karwinskii* para la identificación de compuestos volátiles”**

Pantaleón

Apellido paterno

Bautista

materno

Xochitl

nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	5	0	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Luidita Lagunez Rivera

Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez

Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez

Dr. Pedro Montes García

Dr. Francisco Castellanos León

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Juan Rodríguez Ramírez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 25 del mes noviembre del año 2011, el (la) que suscribe **Pantaleón Bautista Xóchitl** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B091504**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Luicita Lagunez Rivera y Aniceto Rodolfo Solano Gomez y cede los derechos del trabajo titulado: **“Análisis químico de las fragancias producidas por las orquídeas *Prosthechea varicosa* y *Prosthechea karwinskii* para la identificación de compuestos volátiles”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoox@ipn.mx ó xpb_81@live.com.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Pantaleón Bautista Xóchitl



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA

RESUMEN

Los compuestos volátiles juegan un papel muy importante en los mecanismos de interacción de las plantas con insectos polinizadores y con el medio ambiente que las rodea, debido a la importancia de estos compuestos en este trabajo se extrajo la fragancia de las orquídeas *Prosthechea varicosa* y *P. karwinskii* mediante la técnica headspace-microextracción en fase sólida (HS-SPME) y posteriormente se identificaron los volátiles mediante GC-MS. Se analizaron muestras de flores de *P. varicosa* colectadas en cuatro localidades diferentes de Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Puebla. En ellas se identificaron dieciséis compuestos en común, siendo los mayoritarios α -pinene; 2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene; ipsdienol; ipsenone. Las muestras de *P. karwinskii* analizadas fueron obtenidas de ejemplares usados como adorno en la celebración de la Semana Santa en Zaachila, Oaxaca. En estas muestras se identificaron trece compuestos, siendo los mayoritarios nerol oxido, nerol, shisofuran, ipsdienol. La fragancia de ambas flores está constituida principalmente por monoterpenos los cuales le confieren un aroma floral agradable y fresco. A pesar de que las dos especies pertenecen al mismo género la composición de sus fragancias fue muy diferente, pues el único compuesto que compartieron fue el ipsdienol, un monoterpeno cuya actividad biológica es la atracción de insectos polinizadores, principalmente abejas euglosinas macho. La actividad biológica de las orquídeas ha sido poco estudiada, en la fragancia de *P. varicosa* y *P. karwinskii* se identificaron compuestos que presentan un potencial biológico, por lo que esto abre un campo muy amplio de investigación en torno a la fitoquímica de estas especies para poder determinar su potencial o uso biológico.

ABSTRACT

Volatile compounds play an important role in the mechanisms of interaction of plants with pollinators and with the environment around them, because of the importance of these compounds in this work was extracted fragrance of orchids *Prosthechea varicose* and *P. karwinskii* using the technique headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and subsequently identified by GC-MS volatile. Samples of flowers of *P. varicose* collected in four different locations in Chiapas, Oaxaca, Veracruz and Puebla. They identified sixteen compounds in common, being the major α -pinene, 2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, ipsdienol, ipsenone. Samples of *P. karwinskii* analyzed were obtained from specimens used as decoration in the celebration of Easter in Zaachila, Oaxaca. These samples were identified thirteen compounds, with the majority nerol oxide, nerol, shisofuran, ipsdienol. The fragrance from both flowers consists mainly of monoterpenes which gives it a nice floral aroma and fresh. Although the two species belong to the same genus fragrance composition was very different, the only compound that was shared ipsdienol, a monoterpene whose biological activity is the attraction of insect pollinators, bees mainly male euglossine. The biological activity of orchids has been little studied, in the fragrance of *P. varicose* and *P. karwinskii* compounds were identified which have potential biological, so this opens a wide field of research on the phytochemistry of these species to determine their potential or biological use.

CONTENIDO

CAPITULO 1. PRESENTACIÓN

- 1.1 Introducción
- 1.2 Planteamiento del problema
- 1.3 Antecedentes
- 1.4 Objetivos
 - General
 - Específicos
- 1.5 Justificación
- 1.6 Hipótesis
- 1.7 Literatura citada

CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 ORQUÍDEAS

- 2.1.1. Generalidades
- 2.1.2. Diversidad en México y Oaxaca
- 2.1.3. Usos e importancia
- 2.1.4. Conservación
- 2.1.5. Mecanismos de polinización

2.2 FRAGANCIAS FLORALES

- 2.2.1. Diversidad química de compuestos volátiles
- 2.2.2. Rutas biosintéticas

2.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS

- 2.3.1 Técnicas de extracción
- 2.3.2 Técnicas de análisis

2.4 LITERATURA CITADA

CAPITULO 3. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN LA FRAGANCIA FLORAL DE *Prosthechea varicosa*

3.1 Introducción

3.2 Material y métodos

3.3 Resultados

3.4 Discusión

3.5 Conclusiones

3.6 Literatura citada

CAPITULO 4. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN LA FRAGANCIA FLORAL DE *Prosthechea karwinskii*

4.1 Introducción

4.2 Material y métodos

4.3 Resultados

4.4 Discusión

4.5 Conclusiones

4.6 Literatura citada

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Partes de una flor de orquídea

Fig. 2. Representación esquemática de a) las interacciones ecológicas en el mimetismo, y b) las bases moleculares del mimetismo floral, lo que indica la participación de los diferentes rasgos y señales en los alimentos y el engaño sexual.

Fig. 3. Esquema para la producción de aromas florales

Fig. 4. Factores que afectan las emisiones de volátiles.

Fig. 5. Sustratos comunes para la biosíntesis de algunos terpenos

Fig. 6. Rutas biosintéticas para la obtención de compuestos volátiles

Fig.7 Extracción con solventes

Fig. 8 Destilación por arrastre de vapor

Fig. 9 Diagrama de la colecta empleando Dynamic Headspace

Fig. 10 Modos de extracción en SPEM a) Modo directo, b) En el espacio de cabeza

Fig. 11 Dispositivo para la microextracción en fase sólida SPEM

Fig. 12 Flores de *Prosthechea varicosa*

Fig. 13 Ubicación de las zonas de estudio de *Prosthechea varicosa*

Fig. 14 Preparación y almacenamiento de muestras (*P. varicosa*)

Fig. 15 Extracción de compuestos volátiles de *P. varicosa* (Técnica HS-SPEM)

Fig. 16 Cromatógrafo de gases Agilent 6890 N, equipado con un detector de masas de tiempo de vuelo (TOF) LECO Pegasus 4D.

Fig. 17 Espectro de masas del α -pinene obtenido a través de la biblioteca del equipo LECO Pegasus 4D

Fig. 18 Espectro de masas del α -pinene obtenido a través de búsqueda bibliográfica

Fig. 19 Datos del α -pinene obtenidos a través de la búsqueda bibliográfica.

Fig. 20 Perfil cromatográfico de la muestra del Volcán Tacana, Chiapas

Fig. 21 Perfil cromatográfico de la muestra de Santa María Huitepec, Oaxaca

Fig. 22 Perfil cromatográfico de la muestra de Ixhuacan, Veracruz

Fig. 23 Perfil cromatográfico de la muestra de Chilchotla, Puebla

Fig. 24 Flores de *Prosthechea karwinskii*

Fig. 25 Ubicación de la zona de estudio de *P. karwinskii*

Fig. 26 Perfil cromatográfico de la muestra ZACH 1

Fig. 27 Perfil cromatográfico de la muestra ZACH 2

Fig. 28 Perfil cromatográfico de la muestra ZACH 3

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Compuestos encontrados en fragancias florales

Tabla 2. Aplicaciones de *SPME*, según el tipo de recubrimiento de la fibra.

Tabla 3. Compuestos volátiles identificados en la muestra del Volcán Tacana, Chiapas

Tabla 4. Compuestos volátiles identificados en la muestra de Santa María Huitepec, Oaxaca

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en la muestra de Ixhuacán, Veracruz

Tabla 6. Compuestos volátiles identificados en la muestra de Chilchotla, Puebla

Tabla 7. Compuestos comunes presentes en las cuatro poblaciones de *Prosthechea varicosa*.

Tabla 8. Compuestos volátiles identificados en las muestras de *Prosthechea karwinskii*

CAPÍTULO 1

PRESENTACIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

Las flores poseen estructuras especializadas donde se almacenan mezclas de sustancias químicas volátiles en determinadas concentraciones estequiométricas (Knudsen *et al.*, 1993), responsables de sus fragancias. Estas fragancias son de gran importancia en la industria del perfume, cosmética y aromaterapia, en donde, actualmente se tiene una demanda de productos naturales, que cumplan con los estándares de calidad y pureza.

Desde hace más de dos décadas se ha reconocido la influencia que ejercen los aromas sobre numerosas interacciones biológicas en relación con funciones ecológicas, fisiológicas y más recientemente, atmosféricas. Generalmente estas mezclas están constituidas por terpenos, derivados de ácidos grasos y compuestos aromáticos.

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae, la cual es la más rica en especies entre las plantas con flores con unas 25,000 conocidas, han sido plantas admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones. Algunas especies han sido empleadas en la medicina, pero muchos de estos usos se han ido perdiendo y actualmente se utilizan principalmente como flores ornamentales y como elementos ceremoniales en cultos religiosos, de acuerdo a lo reportado por Hagsater *et al.*, (2005).

Las fragancias producidas por diversos géneros de orquídeas han sido objeto de estudio en varias partes del mundo encontrando una gran diversidad de compuestos volátiles como ácidos grasos derivativos, benzenoides, fenilpropanoides, isoprenoides.

Actualmente se han desarrollado varias técnicas para la extracción de los diferentes componentes volátiles presentes en las flores. Las técnicas de espacio de cabeza (headspace) son las más utilizadas debido a que es una técnica no destructiva y a la flexibilidad para poder trabajar en campo o laboratorio. Dentro de estas técnicas se encuentra la microextracción en fase sólida (SPME) en modo headspace, introducida por Arthur y Pawliszyn en 1989, debido a su simplicidad y rendimiento, la SPME despertó un gran interés como técnica de extracción teniendo aplicaciones en diferentes campos, incluyendo el medioambiental, el farmacéutico, el biomédico y el agroalimentario (Cháfer, 2006).

México cuenta con una inmensa y poco estudiada diversidad de especies de orquídeas, Mazo Cancino y Damon (2006) identificaron los compuestos volátiles presentes en la fragancia de especies del género *Prosthechea* y *Encyclia* de la región del Soconusco, Chiapas empleando la técnica de espacio de cabeza. Debido a la importancia y aplicaciones variadas que tienen los compuestos volátiles, en este trabajo se identifican los compuestos que constituyen las fragancias florales de *Prosthechea varicosa* una orquídea de flores pequeñas y fragantes, conocida desde México hasta Panamá y *Prosthechea karwinskii* una especie endémica de México, con flores fuertemente fragantes con un aroma cítrico; como un primer paso para obtener información que lleve a su potencial aprovechamiento en aromaterapia, farmacología o medicina tradicional. Se identifican los volátiles mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), empleando para la extracción la técnica de espacio de cabeza-microextracción en fase sólida (HS-SPEM)

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas producen y emiten numerosos compuestos volátiles en el aroma de sus flores, el cual es considerado como atrayente de los polinizadores específicos, en la mayoría de los casos insectos. Pero estos compuestos no solo serían importantes en el proceso de la polinización, también influyen en funciones fisiológicas y ecológicas de la planta y por otro lado, podrían tener un uso terapéutico.

El análisis químico de las fragancias producidas por orquídeas ha revelado que hay variación en la producción de sus compuestos volátiles y tomando en cuenta su volatilidad y posible degradación térmica, es importante emplear un método que permita conocer de manera rápida y completa su composición en la fragancia, aquel que pueda reproducir la clase y relación de compuestos emitidos por la planta *in vivo* y facilitar la evaluación de diferentes especies en el tiempo más corto posible.

Actualmente en México se cuentan con muy pocos trabajos donde se analice la composición química de las fragancias emitidas por las orquídeas, por lo que no se puede establecer si existe una variación en la emisión de compuestos volátiles que esté influenciada por la ubicación geográfica de las especies, y que por ello pueda tener un valor taxonómico al proporcionar información para determinar si hay variaciones entre sus poblaciones o bien, entre especies relacionadas.

1.3 ANTECEDENTES

Las orquídeas culturalmente han sido muy importantes en muchas regiones del mundo debido a la belleza de sus flores y, desde mediados del siglo XIX, han tenido un lugar muy importante en el comercio de plantas ornamentales por las fragancias y variedad de colores de sus flores.

En México se conocen 168 géneros y cerca de 1300 especies, pero la mayor parte de esta riqueza (casi el 60%) se encuentra en las zonas montañosas del país. En Oaxaca la flora de orquídeas incluye 150 géneros (85% del total nacional), 715 especies y seis subespecies; lo cual representa un poco más de la mitad de las orquídeas conocidas para México (Salazar, 2011).

Se ha estimado que hasta 75% de todas las orquídeas emiten compuestos químicos volátiles detectables al olfato humano cuya mezcla constituye su fragancia o aroma floral. Las fragancias producidas por estas plantas han sido objeto de estudio en varias partes del mundo, encontrando una gran variedad de compuestos volátiles, como ácidos grasos derivativos, benzenoides, fenilpropanoides e isoprenoides.

Los pocos estudios disponibles hasta ahora indican que hay diferencias en las fragancias producidas por especies del mismo género, como en *Encyclia* y *Prosthechea* (Cancino y Damon, 2006).

Se ha sugerido que la variación cualitativa y cuantitativa en la producción de fragancias de las orquídeas es una estrategia para atraer a sus polinizadores (Kaiser, 1993). Por ejemplo, las flores de los géneros *Catasetum*, *Gongora* y *Stanhopea* entre otros, producen compuestos aromáticos que atraen a los machos de una clase particular de abeja que recolectan sus fragancias (Hagsater *et al.*, 2005; Williams y Whitten, 1999). En *Platanthera stricta* (Patt *et al.*, 1988), *Bulbophyllum* sp. (Silva *et al.*, 1999), especies Maxillariinae (Flach *et al.*, 2004) y *Dendrobium sinense* (Brondmann *et al.*, 2009) también se ha encontrado compuestos presentes en sus fragancias que son responsables de atraer a sus polinizadores.

La concentración de algunos compuestos presentes en las fragancias florales puede variar durante el transcurso del día, como lo reportaron para Damon *et al.* (2002) para *Stelis quadrifida*, donde el (Z)-caryophyllene tuvo una concentración mayor en la noche a diferencia del α -pineno, longifoleno y limoneno que presentaron una concentración mayor en el día. Por su parte, Huber *et al.*, (2005) encontraron que *Gymnadenia conopsea* emite significativamente más benzaldeído, fenilacetaldeído, bencil acetato y menos bencil benzoato durante la noche; mientras que *Gymnadenia odoratissima*

emite significativamente más fenilacetaldeido, benzil benzoato y menos benzaldeido y eugenol durante la noche.

La composición del aroma floral ha sido determinada para un gran número de plantas, a menudo de varias especies pertenecientes al mismo género. Los estudios que reportan una variación en la composición química del aroma floral representan un paso importante en la comprensión de la dinámica de adaptaciones de los polinizadores en las plantas. El análisis químico de compuestos volátiles de plantas implica: (1) toma de muestras de compuestos volátiles, (2) la separación de compuestos en las mezclas, (3) la identificación de los compuestos. Además, estas medidas deben ser complementadas por los estudios de variación natural y pruebas biológicas (de comportamiento) de la actividad de los compuestos individuales y mezclas de estos (Knudsen *et al.*, 1993).

En cuanto a las técnicas empleadas para la extracción de los componentes volátiles presentes en las fragancias florales se incluyen (1) extracción con disolventes, (2) destilación por arrastre de vapor, y (3) las técnicas de espacio de cabeza o headspace. Las técnicas de espacio de cabeza dinámico fueron introducidas por Swinnerton *et al.* y consisten en arrastrar los compuestos volátiles de la muestra, sometida a una temperatura determinada, mediante un gas inerte. Los compuestos volátiles son retenidos posteriormente en una trampa adsorbente, que a continuación se somete a desorción mediante un disolvente y se inyecta para su separación por cromatografía de gases. Estas técnicas son las más utilizadas por ser una técnica no destructiva y con flexibilidad para poder trabajar en campo o laboratorio. En general, las técnicas de análisis en modo Headspace se pueden agrupar en dinámicas (“dynamic headspace”) y estáticas (“static headspace”).

El muestreo en el espacio de cabeza (headspace) es una técnica fundamental para caracterizar la fracción volátil de las plantas aromáticas y medicinales. La caracterización de la muestra de acuerdo con el perfil de concentración en el espacio de cabeza (headspace) está sujeta a los sesgos impuestos por el método de muestreo (disolvente utilizado, las pérdidas debidas a una alta volatilidad, adsorción preferente) (E. Stashenko y R. Martínez, 2007), debido a esto es importante utilizar un método que permita eliminar estos sesgos. En los años 80 los químicos analíticos dieron mucha importancia a las técnicas de preparación de muestras sin disolventes, las cuales se basaban en la extracción por sorción sobre una base de goma. En 1989, Arthur y Pawliszyn desarrollaron un método de microextracción basado en la sorción sobre polidimetilsiloxano (PDMS) al que llamaron microextracción en fase sólida (Arthur y

Pawliszyn, 1990), la cual se puede realizar en tres diferentes modos: extracción directa (inmersión), extracción del espacio de cabeza (HS), y extracción con la protección de la membrana. SPME se ha desarrollado para facilitar la preparación de muestras de manera rápida en el laboratorio y en campo (Lord,y Pawliszyn, 2000).

HS-SPME es una especie de puente entre el espacio de cabeza estático y dinámico, ya que es reproducible y fácil de automatizar, también es sensible, por el factor de concentración alcanzado por la fibra, y selectiva, debido a los diferentes materiales de revestimiento disponibles (Bicchi *et al.*, 2000). Cuando se analizan muestras complejas, HS-SPME facilita el logro de una mayor selectividad que el modo de muestreo directo. La falta de contacto con la muestra impide la contaminación o descomposición del recubrimiento de la fibra y reduce la influencia de la matriz. La duración de la etapa de extracción es generalmente más corto en HS-SPME, en comparación con el muestreo directo, debido a la difusión más rápida de los compuestos volátiles en el aire (Stashenko y Martínez, 2007).Debido a su simplicidad y rendimiento, la SPME despertó un gran interés como técnica de extracción teniendo aplicaciones en diferentes campos, incluyendo el medioambiental, el farmacéutico, el biomédico y el agroalimentario (Cháfer, 2006).

1.4 OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar químicamente las fragancias producidas por las orquídeas *Prosthechea varicosa* y *Prosthechea karwinskii* para identificar sus compuestos volátiles.

Objetivos Específicos

- 1.- Extraer los compuestos volátiles presentes en las fragancias de las dos especies de orquídeas mediante la técnica HS-SPME.
- 2.- Identificar los compuestos volátiles que constituyen las fragancias emitidas de estas dos especies de orquídeas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- 3.- Determinar la diferencia en la composición de las fragancias emitidas por la especie *Prosthechea varicosa* de acuerdo a su ubicación geográfica.

1.5 JUSTIFICACIÓN

Los volátiles de las plantas se han usado para perfumes e incienso desde la antigüedad. Hoy en día, la industria del perfume incorpora una amplia investigación sobre los compuestos volátiles de las plantas.

El uso de aromas atractivos de las plantas no solo se limita a los seres humanos, estos también son utilizados por los insectos como un mecanismo de comunicación insecto-insecto o insecto-planta. La identificación química precisa de los compuestos volátiles e información sobre sus usos por los insectos, desde un punto fisiológico y ecológico, es de gran importancia para la ciencia básica y aplicada. Además los compuestos volátiles de algunas plantas pueden tener propiedades estimulantes o relajantes, para poder ser utilizados en aromaterapia o presentan propiedades biológicas que permiten su aplicación en la medicina.

Debido a la importancia y aplicaciones variadas que tienen los compuestos volátiles, el análisis de la fragancia floral de *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa* representa la primera fase para el desarrollo de proyectos en diversas áreas, por ejemplo:

- 1.- Estudios en donde se busque relacionar los compuestos presentes con los insectos polinizadores.
- 2.- En la fitoquímica, ya que a través de la identificación de los compuestos volátiles se puede determinar si la orquídea presenta algún tipo de actividad biológica, medicinal o puede ser utilizada en aromaterapia.
- 3.- En la taxonomía, para proporcionar caracteres fitoquímicos de utilidad en la clasificación de las orquídeas (Karin, 1999).
- 4.- En el futuro se puede pensar en la elaboración de perfumes, como una alternativa de aprovechamiento de un recurso forestal no maderable para las comunidades donde se encuentren estas especies.

1.6 HIPÓTESIS

La composición química de las fragancias emitidas por *P. varicosa* presentará variación que dependerá de la localidad geográfica de las poblaciones.

Las fragancias de las dos especies de orquídeas estarán constituidas principalmente por terpenos como mono y sesquiterpenos los cuales le proporcionan el aroma agradable.

1.7 LITERATURA CITADA

Bicchi Carlo, Drigo Stefania, Rubiolo Patrizia (2000). Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 892: 469–485

Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., Rubiolo, P. (2008). Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *Journal of Chromatography A*, 1184: 220–233.

Brodmann, J., Twele, R., Francke, W., Yi-bo, L., Xi-qiang S., Ayasse, M. (2009). Orchid Mimics Honey Bee Alarm Pheromone in Order to Attract Hornets for Pollination *Elsevier Current Biology*, 19: 1368–1372.

C. Kite Geoffrey, A. Salazr Gerardo (2008). Chemical composition of the inflorescence odor of *Malaxis rzedowskiana* (Orchidaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*.

Cancino del Mazo, A., Damon, A. (2006). Comparison of floral fragrance components of species of *Encyclia* and *Prosthechea* (Orchidaceae) from Soconusco, southeast México. *ECOSUR Lankesteriana*, 6(3): 83-89.

Damon, A. A., Santiesteban, H. A., Rojas, J. C. (2002). Analysis of thre fragrance produced by the epiphytic orchid *Anathallis* (Pleurothallis) *racemiflora* (Orchidaceae) in the soconusco región, Chiapas, México. *ECOSUR Lindleyana*, 17(2): 93-97.

E. Stashenko Elena, R. Martínez Jairo (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*. 70:235-242

Flach, A. Dondon, R. C., Singer, R. B., Koehler, S., Amaral, M. do Carmo E., Marsaioli, A. J. (2004). The chemistry of pollination in selected Brazilian Maxillariinae Orchids: floral rewards and fragrance. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1045-1056.

Hagsater, E., Soto, A. M.A., Salazar, C. G. A., Jimenez, M. R., López, R. M. A. y Dressler, R. I. (2005). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.

Kaiser R. A. J. (1993) On the Scent of Orchids. American Chemical Society. In Bioactive Volatile Compounds from Plants; *Teranishi, R., et al.; ACS Symposium Series*.

K. Huber Franz, Kaiser Roman, Sauter Willi, P. Schiestl Florian. (2005). Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Plant Animal Interactions Oecologia*, 142: 564–575.

Knudsen Jeite T., Tollsten Lars y Bergstrom I. Gunnar (1993). Floral scents-a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33: 253-28.

Lord Heather, Pawliszyn Janusz (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885: 153–193.

Patt, J. M., Rhoades D. F., Corkill J. A. (1988). Analysis of the floral fragrance of *Platanthera stricta*. *Journal Phytocemistry*, 27: 91-95.

Perraudin Fanny, Popovici Jean, Bertrand Cédric. (2006). Analysis of headspace-solid microextracts from flowers of *Maxillaria tenuifolia* Lindl. by GC-MS. *Electronic Journal of Natural Substances* 1: 1-5.

Silva, U. F., Borbac, E. L., Semir J., Marsaioli, A. J. a (1999) A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) volatiles. *Journal Phytochemistry*, 50: 31-34.

Soto, A. M. A., Salazar, G. A. (2004). Orquídeas En: A.J. García Mendoza, M.J. Ordoñez y M. Briones-Salas (eds), Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología.

Williams, N. H., Whitten, W. M. (1999). Molecular phylogeny and floral fragrances of male euglossine bee-pollinated orchids: A study of *Stanhopea* (Orchidaceae) *Society for the Study of Species Biology, Plant Species Biology*, 14: 129-136.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 ORQUÍDEAS

2.1.1 Generalidades

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae, la cual es la más rica en especies entre las plantas con flores con unas 25,000 conocidas. Culturalmente han sido muy importantes en muchas regiones del mundo debido a la belleza de sus flores y, desde mediados del siglo XIX han tenido un lugar muy importante en el comercio de plantas ornamentales y de flor cortada por las fragancias y diversidad de colores de sus flores.

La mayoría de estas plantas son epífitas, especialmente en las zonas tropicales. El epifitismo es un hábito de crecimiento en el cual las orquídeas utilizan como sustrato a otras plantas que generalmente es un árbol. Los encinos favorecen su crecimiento, por el contrario los pinos no la favorecen debido a la estructura de la corteza. Otras orquídeas crecen en el suelo y se les llama terrestres, hábito que es común en ambientes templados o muy áridos donde la vegetación arbórea no está bien desarrollada. Otras más son rupícolas, es decir, crecen sobre rocas pero encima de la capa de suelo o materia orgánica que se acumula en ellas.

Hay muchas características que son comunes entre la mayoría de las orquídeas, pero la siguiente combinación de rasgos es lo que identifica a una orquídea (Populin, 2005):

- 1.- Los estambres no están dispuestos simétricamente, sino que se encuentran todos en un mismo lado de la flor.
- 2.- Los estambres y el pistilo están por lo menos en parte fusionados en una única estructura, llamada columna.
- 3.- Las semillas son pequeñas, numerosas y carecen del tejido que nutre al embrión durante la germinación, el endospermo
- 4.- Las flores poseen generalmente un labio, o labelo que es un pétalo modificado.
- 5.- El ovario con frecuencia sufre un enrollamiento y coloca la flor en una posición diferente a la original donde el labelo está dirigido hacia la parte inferior, este fenómeno toma el nombre de resupinación.
- 6.- Parte del estigma (el rostelo) está involucrado en la transferencia del polen de una flor a otra. Es probable que este factor haya jugado un papel fundamental en la evolución de las orquídeas.
- 7.- El polen se encuentra normalmente reunido en pocas masas, denominadas polinios. Esta característica, muy peculiar de las Orchidaceae, está íntimamente relacionada con un mecanismo de polinización más eficiente.

8.- Cuando una semilla germina no forma una plántula como en el resto de especies de plantas, sino una estructura cuyos tejidos no se encuentran totalmente diferenciados y que se llama protocormo.

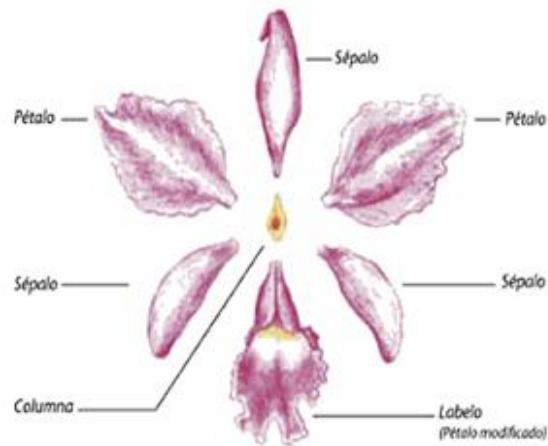


Fig 1. Partes de una flor de orquídea (Tomado de Freuler, 2008)

Todas las orquídeas presentan un tejido esponjoso formado por células muertas que cubre las raíces, denominado velamen, el cual actúa como una esponja para absorber y retener los nutrientes y el agua (Roberts y Dixon, 2008).

Los nutrientes y el agua son almacenados por las orquídeas durante largos períodos en estructuras adaptadas para esa función, como el tallo y las hojas que suelen ser bastante suculentos, permitiendo a la planta sobrevivir durante las temporadas secas.

Si algo caracteriza a las orquídeas en conjunto es la complejidad de sus interacciones con otros seres vivos, sean éstos hongos micorrízicos, polinizadores, árboles hospederos u hormigas; de hecho son, por mucho, el grupo de plantas que ha podido colonizar con más éxito las copas de los árboles y varias de sus adaptaciones más notables están asociadas de manera directa al epifitismo o a su capacidad de establecerse en otros ambientes restrictivos (Hagsater *et al.*, 2005).

Las orquídeas son consideradas una familia cosmopolita ya que están en todas partes del mundo, excepto en zonas cubiertas por nieves perpetuas y en los desiertos más secos. Las orquídeas crecen prácticamente en todos los continentes donde exista vegetación, pero su distribución no es uniforme, sino que están especialmente concentradas en las regiones tropicales del planeta (Populin, 2005).

2.1.2 Diversidad en México y Oaxaca

En México se conocen 168 géneros y cerca de 1300 especies de orquídeas, la mayor parte de esta riqueza (casi el 60%) se encuentra en las zonas montañosas donde se establece el bosque de neblina, que en conjunto abarcan apenas el 1% de la superficie del país. El 40% de ellas crecen sólo en el país, es decir, son endémicas. En México la mayor riqueza de orquídeas se presentan en las regiones de mayor diversidad biológica de la parte sur del país, las cuales son consideradas prioritarias para la conservación de la biodiversidad.

Oaxaca alberga la mayor diversidad biótica de México y también más orquídeas que cualquier otro estado del país. Las orquídeas de Oaxaca han sido recolectadas y estudiadas durante casi dos siglos. La flora de orquídeas de Oaxaca incluye 144 géneros (85% del total nacional), 692 especies y cuatro subespecies; esto representa un poco más de la mitad de las orquídeas conocidas para México (Soto Arenas y Salazar, 2004). La riqueza de orquídeas de Oaxaca es mayor a la de cualquier otro estado del país e igual o mayor a la de países de Norteamérica, las Antillas.

2.1.3 Usos e importancia

Las orquídeas han sido de las plantas más admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones. Se sabe que Antes de Cristo los Chinos cultivaron algunas especies del género *Cymbidium*; también los Griegos las conocían pues fue Teofrasto, discípulo de Aristóteles, quien le dio el nombre de Orquídeas (orchis=testículo) debido a la forma de sus pseudobulbos.

Algunas especies de orquídeas son colectadas para usos etnobotánicos, por ejemplo, los pseudobulbos de las especies de *Dendrobium* se utilizan en la medicina china, mientras que los tubérculos de orquídeas terrestres se recolectan en el este de sub-Sahara de África para la producción de un pastel llamado chikanda. Análogamente, en Turquía y el cercano oriente, los tubérculos de orquídeas terrestres se utilizan para hacer un extracto conocido como salep que se utiliza en la fabricación de helados (Roberts y Dixon, 2008).

En México Prehispánico también se conocían y utilizaban estas plantas. Se reporta que desde el reinado Azteca de Itzcoatl (1427-1440) se utilizó la vainilla para aromatizar la bebida de chocolate. Durante los reinados de Moctezuma Ilhuicamina (1440-1469) y Axacayatl (1469-14820) la vainilla fue un tributo impuesto a la población

tononaca. Moctezuma II (1502-1520) aromatizaba la bebida "Chocolatl" a base de cacao con el fruto maduro de esta orquídea y miel de abeja.

Se conocen reportes del uso de algunas especies de orquídeas como plantas medicinales, por ejemplo, *Arpophyllum spicatum* se usó para curar o atenuar disentería y *Encyclia citrina* para curar heridas infectadas.

El uso de varias clases de orquídeas, de las que sobresale *Encyclia venosa* para la obtención de mucílagos o "tzacuhtli", fue importante para elaborar adhesivos. En el México precortesiano se usaron también diversas especies como ornamentales, de los géneros *Stanhopea* y *Laelia*.

Actualmente las orquídeas no son tan utilizadas en la medicina tradicional como otras plantas, se utilizan principalmente como flores ornamentales para cultos religiosos de acuerdo a lo reportado por Hagsater *et al.*, (2005). Durante el periodo de Semana Santa en la Mixteca Oaxaqueña se prepara el "agua de gloria" con los pétalos de *Prosthechea karwinskii*, los cuales se ponen en agua durante algunas horas y esta agua fragante es utilizada durante las procesiones. *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* es cultivada por los triquis al sur de Oaxaca y se utiliza en la celebración de la Virgen de Juquila. La flor de los muertos o de Todos los Santos, *Laelia autumnalis*, es utilizada para adornar las iglesias durante esta temporada, principalmente en los estados de Michoacán, Morelos y la zona de Ocuilan y Amecameca, en el Estado de México.

2.1.4 Conservación

México es un país mega-diverso con graves problemas ambientales y sociales que ponen en peligro una parte importante de su biodiversidad. La alteración que muestran los ambientes naturales del país por la presión humana ejercida sobre ellos, por el mal uso y el abuso de los recursos naturales es muy notoria.

Soto Arenas *et al.*, en el 2007 realizaron un estudio en donde identificaron que los factores que ponen en riesgo la conservación de las orquídeas son: Factores biológicos intrínsecos y pérdida del hábitat como los más importantes, los factores biológicos intrínsecos combinados con factores antropogénicos como la agricultura, ganadería e incendios forestales también representan un riesgo. Estas amenazas van seguidas de la colectas de especies de orquídeas para abastecer la demanda como adornos o para horticultura.

Dentro de la legislación para proteger las especies silvestres de flora y fauna nacional, la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2001, enlistó 182 de orquídeas para el

país, de ellas en Oaxaca se presentan ocho especies en peligro de extinción, 30 en la categoría de amenazadas y 38 bajo protección especial. La mayor concentración de especies con problemas de conservación está en los distritos de Juquila (San Juan Lachao), Pochutla (Región de Pluma Hidalgo), Choapan (San Juan Lalana-Teotacingo), Mixe y Juchitán (Chimalapas-Sierra Atravesada). (Soto y Salazar, 2004).

La preservación de las orquídeas oaxaqueñas implica el diseño de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*. La conservación *in situ* continuará siendo posible sólo si se asegura la permanencia de los hábitats en las regiones críticas y diversas. Por distintas causas no existen en Oaxaca suficientes áreas naturales protegidas y la única reserva de la biosfera, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, presenta hábitats que no favorecen el establecimiento de las orquídeas.

Por otra parte la conservación *ex situ* debe ser fomentada mediante el cultivo, uso, aprovechamiento racional y comercialización de especímenes propagados, sobre todo de las especies que ya no pueden sobrevivir en sus hábitats. También debe considerar programas adecuados de reintroducción de aquellas especies muy amenazadas cuyas poblaciones ya no son viables en su hábitat.

2.1.5 Mecanismos de polinización

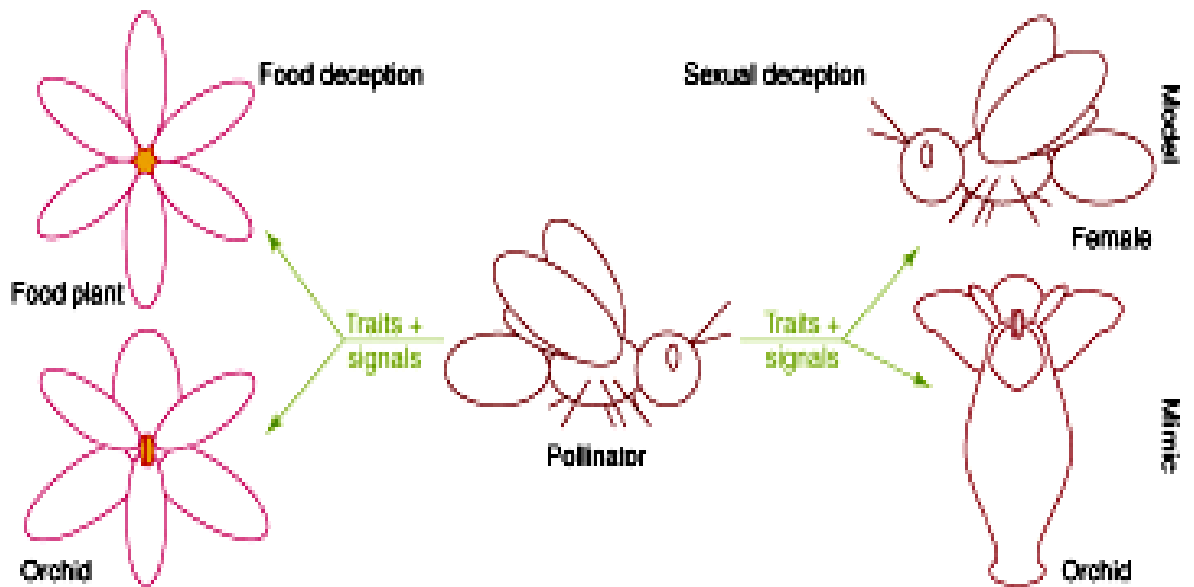
La polinización es fundamental para la persistencia de las poblaciones de plantas al asegurar la reproducción sexual de sus individuos. Para atraer a los polinizadores específicos, en la mayoría de los casos insectos, las flores de orquídeas hacen uso de diferentes formas, colores y, sobre todo, de olores. De hecho, la enorme diversidad en el aroma de las orquídeas se puede considerar como un reflejo de la diversidad relacionada con los principios de polinización que se encuentran en esta familia (Kaiser, 1993).

Todas las orquídeas que no se autopolinizan son polinizadas por animales, sobre todo por insectos como abejas, avispas, diversas clases de moscas y mariposas diurnas y nocturnas, además de aves como colibríes. Las flores presentan un conjunto de atributos relacionados con la atracción y guía del polinizador, conocidos como síndromes de polinización. Los polinizadores visitan a las flores de orquídeas en busca de recompensas potenciales, estas pueden incluir néctar, aceites, aromas florales, polen o incluso sitios para refugio, el néctar floral es la recompensa más común. A cambio, las orquídeas reciben como beneficio el movimiento de polen entre las flores (Roberts y Dixon, 2008). Por ejemplo, las flores de *Habenaria* y *Platanthera* suelen

tener un nectario alargado o espolón en la base del labelo, cuyo fondo contiene néctar que es consumido por las polillas que las polinizan. Las flores de los géneros *Catasetum*, *Gongora* y *Stanhopea* entre otros, producen compuestos aromáticos que atraen a los machos de una clase particular de abeja, los cuales recolectan las fragancias. (Hagsater *et al.*, 2005).

Sin embargo, en la mayoría de los casos la polinización se lleva a cabo mediante diversos engaños, que pueden involucrar sólo un parecido general en la forma de las flores con las de otras especies que sí otorgan una recompensa o modificaciones espectaculares, como la imitación casi perfecta del aspecto y olor de una hembra de insecto, que induce al insecto macho de esa especie a tratar de aparearse con la flor (Fig. 2). Otras veces la flor imita un sitio que parece ofrecer alimento o un lugar para la deposición de los huevecillos de los insectos que suelen ser sus polinizadores, El mimetismo floral es particularmente común en las orquídeas, donde la forma, color y olor juegan un papel clave para engañar a los polinizadores. (Schlüter y Schiestl, 2008).

(a) Ecological interaction



(b)

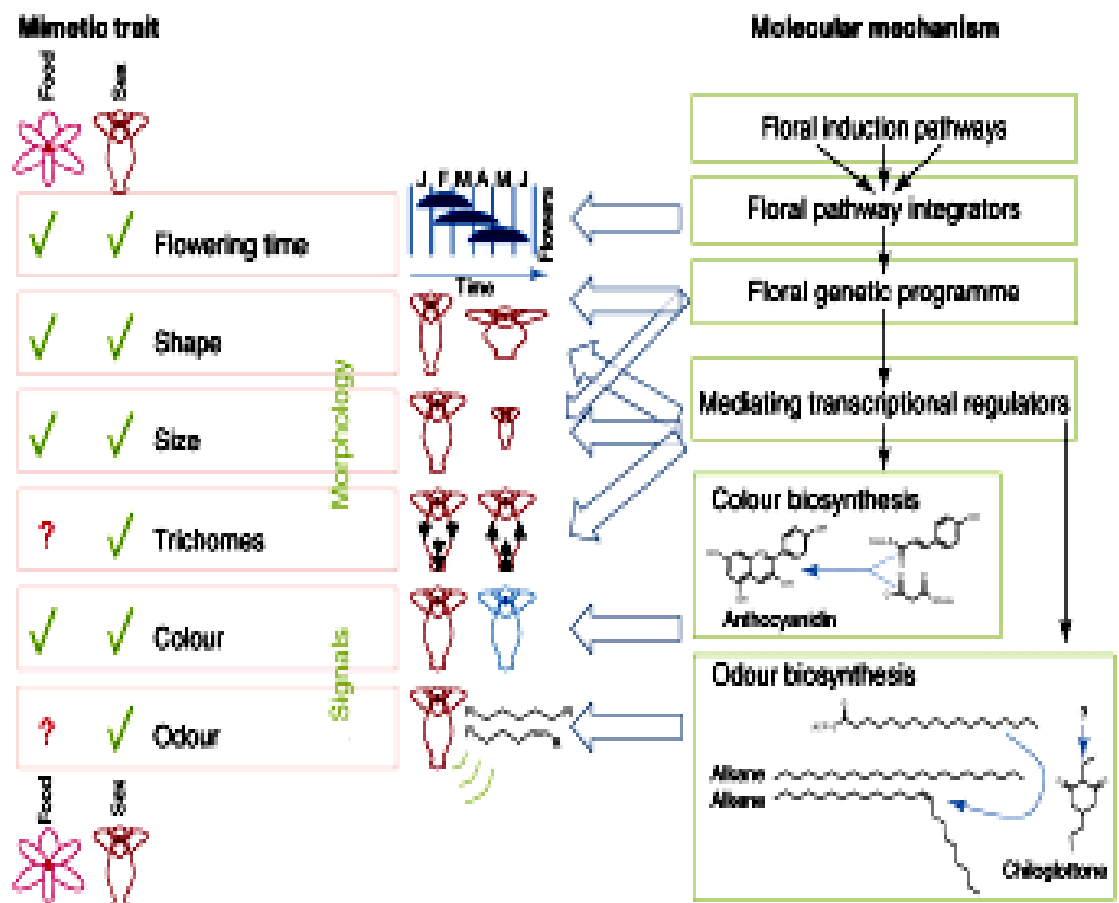


Fig.2 Representación esquemática de a) las interacciones ecológicas en el mimetismo, y b) las bases moleculares del mimetismo floral, lo que indica la participación de los diferentes rasgos y señales en los alimentos y el engaño sexual (Tomado de Schlüter y Schiestl, 2008).

2.2 FRAGANCIAS FLORALES

Las fragancias emitidas por las plantas están constituidas por una mezcla de numerosos compuestos volátiles. Desde hace más de dos décadas se ha establecido la influencia que estos ejercen sobre numerosas interacciones ecológicas y fisiológicas. Actualmente, se conocen en promedio 1800 volátiles (Adams, 2004) y cerca de 1700 compuestos volátiles y semivolátiles emanados por las plantas, que se han estudiado e identificado en 990 especies (90 familias) (MCGarvey y Croteau, 1995). Generalmente estas mezclas están formadas por terpenoides, fenilpropanoides, bencenoides y derivados de ácidos grasos, con carácter lipofílico y de bajo peso molecular derivados de ácidos grasos y compuestos aromáticos.

Los aromas florales son metabolitos secundarios de las plantas, lo que indica que no son esenciales para su crecimiento y desarrollo. Sin embargo juegan un papel fundamental para mantener la reproducción sexual (que genera recombinación genética) entre los individuos de una población, reduciendo así los efectos de endogamia. A pesar de que es obvio que el aroma floral es importante para la atracción de polinizadores, parece sorprendente lo poco que se conoce acerca del papel de algunos compuestos específicos.

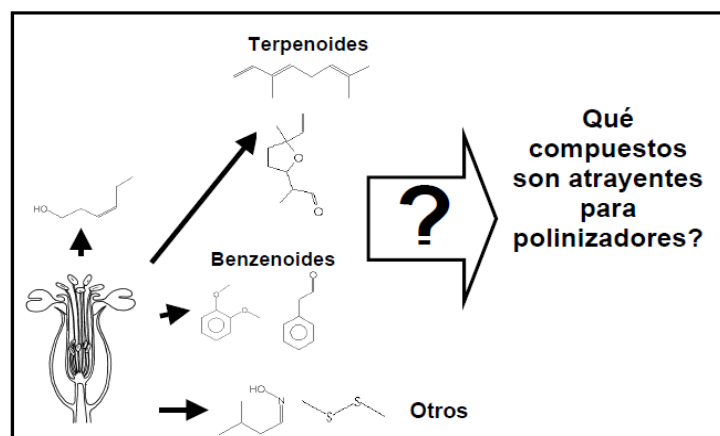


Fig 3. Esquema para la producción de aromas (Tomado de Dötterl, 2006)

Los compuestos volátiles emitidos por las plantas son conocidos también como aceites esenciales, aceites volátiles o esencias, por lo general son sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular, cuya volatilidad se debe a que se evaporan al ser expuestos al aire o temperatura ambiente, por lo que sus presiones de vapor son altas (Vaughn, 2001; Pichersky, 2004; Dudareva y Negre, 2005). Estos compuestos son

producidos principalmente en las flores, pero también se encuentran en los frutos, tallos, hojas y raíz. Las esencias florales varían ampliamente entre especies, número, identidad y cantidades relativas de sus constituyentes.

Debido a la variabilidad en cantidades, tiempos y tejidos de emisión de volátiles es de suponer que las plantas poseen mecanismos de control que regulan cuando, donde y cuales sustancias producir (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

Las emisiones resultan de la difusión de los volátiles a través de un gradiente de presión de vapor, desde los compartimentos celulares, donde hay relativamente altas concentraciones, al aire que rodea la hoja donde la concentración es relativamente baja (Peñuelas y Llusía, 2003).

La tasa de emisión de volátiles por la flor está influenciada en mayor o menor grado por factores que pueden alterar la síntesis, la presión de vapor o su difusión a la atmósfera. Estos factores son clasificados en dos grupos: a) Genéticos y Bioquímicos, y b) Externos, subdivididos estos a su vez en bióticos y abióticos (Fig. 4). Los del primer grupo determinan la producción y emisión de volátiles porque regulan los niveles de las enzimas responsables del paso final en la biosíntesis y la disponibilidad del sustrato en la célula, y hacen que las emisiones sean altamente específicas y regidas por el desarrollo de la planta; generalmente es en los estadios tempranos de la planta cuando hay más emisión; en las flores a punto de ser polinizadas, en las hojas jóvenes y en los frutos maduros (Dudareva y Negre, 2005).

Entre los factores externos abióticos se encuentran la temperatura, luz, disponibilidad de agua, humedad y ozono; otros factores son el viento, granizo, y la operación de cosecha. Los factores externos bióticos son ocasionados por la interacción con animales, plantas y microorganismos, ya que los compuestos producidos son empleados para la defensa, disuasión o atracción de los polinizadores (Dudareva y Negre, 2005).

La compleja red de factores, sus interacciones y las diferentes respuestas inducidas con los volátiles conducen a una amplia variabilidad cualitativa y cuantitativa, espacial y temporal de las emisiones (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

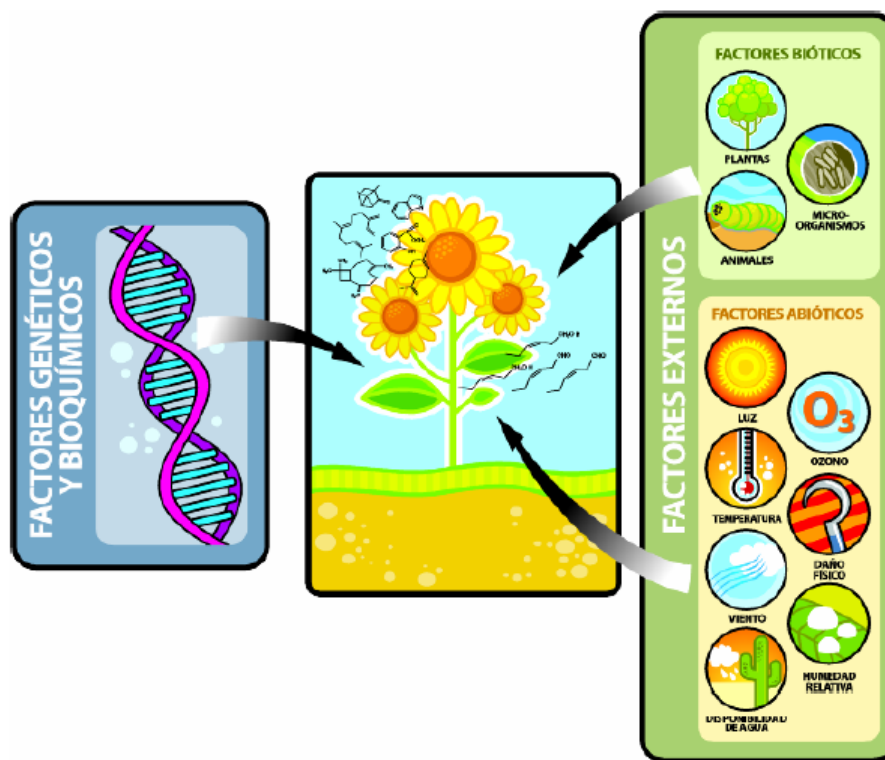


Fig 4. Factores que afectan las emisiones de volátiles (Tomado de Marín-Loaiza y Céspedes, 2007)

2.2.1 Diversidad química de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles emitidos por plantas generalmente son mezclas complejas de muchos compuestos orgánicos que representan pequeñas cantidades respecto al peso total de la planta (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). Los compuestos aromáticos florales abarcan todo el rango de polaridades, la mayoría incluye en sus estructuras oxígeno, lo cual los hace moderadamente polares. Los compuestos pueden contener heteroátomos (nitrógeno, azufre y/u oxígeno), siendo probable encontrar aminas, oximas, sulfuros, furanos y piranos.

Knudsen *et al.*, (1993) reportan que los componentes del aroma floral se distribuyen en tres grupos: ácidos grasos derivados, benzenoides e isoprenoides. Los compuestos que se encuentran en el mayor número de plantas son benzenoides e isoprenoides. Los más comunes entre los benzenoides son: metil-2-hidroxibenzoato, benzaldehído, benzil alcohol, benzil acetate, 2-feniletanol y metil benzoato y entre los isoprenoides limoneno, myrceno, linalool, pinenos, ocimenos y 1,8-cineole. En la tabla 1 se muestran los principales grupos de compuestos encontrados en fragancias florales.

Entre los derivados de ácidos grasos saturados e insaturados, son bastante comunes los: aldehídos, alcoholes y cetonas. Los ácidos son menos comunes, mientras que los ésteres tienen el mayor número de estructuras químicas diferentes. Un gran grupo estructuralmente distinto son los fenilpropanoides entre los que se encuentran sustancias comunes como el eugenol y los derivados del ácido cinámico.

Los isoprenoides son divididos en cuatro grupos: terpenos irregulares, monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. Los monoterpenos son un grupo grande y aromático los componentes típicos son limoneno, β -ocimeno, β -mirceno, linalol, α -pineno, β -pineno (Maffei, 2010). Los monoterpenos hidrocarbonados originan la presencia de un aroma picante o a resina y los monoterpenos oxigenados originan un olor dulce o cítrico.

Los sesquiterpenos también son comunes pero tienden a ser descuidados a causa de las dificultades para identificar el gran número de estructuras posibles. Cariofileno y α -farneseno se encuentran comúnmente tanto en aromas florales como en el olor de las partes verdes de plantas. Muy pocos diterpenos se reportan en aromas florales, esto puede ser debido a su baja volatilidad (Knudsen *et al.*, 1993).

Los compuestos identificados en las fragancias de orquídeas son muy variados encontrándose desde compuestos pertenecientes al grupo de benzenoides, ácidos grasos hasta isoprenoides como mono y sesquiterpenos.

Tabla 1. Compuestos encontrados en fragancias florales (Tomado de Knudsen et al; 1993)

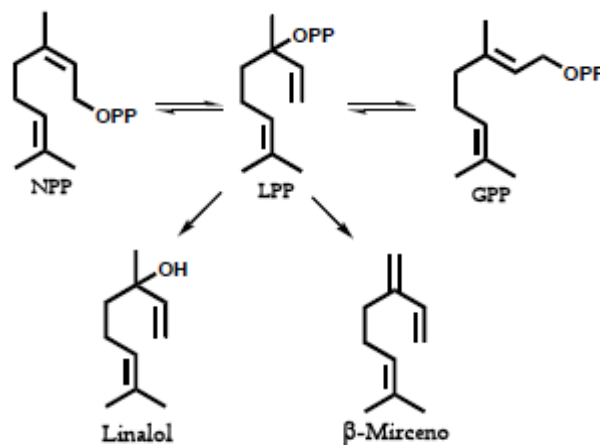
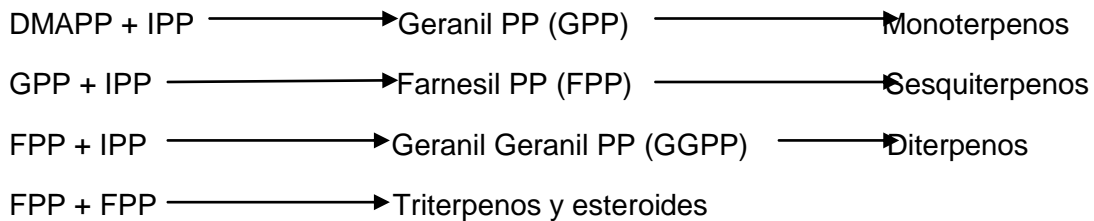
Sustrato	Grupo	Compuesto	Tipo	Número
Mevalonato y metileritritol fosfato	Terpenoides	Monoterpenos	Cíclicos	295
			Acíclicos	136
		Sesquiterpenos	Cíclicos	114
			Acíclicos	44
		Diterpenos	Cíclicos	2
			Acíclicos	4
		Terpenos irregulares		108
Aminoácidos de cadena lateral	Compuestos ramificados de C5		Saturados	40
			Insaturados	53
	Con nitrógeno		Cíclicos	19
			Acíclicos	42
	Con azufre		Cíclicos	4
			Acíclicos	37
	Sin agrupar		Carbocíclicos	60
			Heterocíclicos	51
Ácidos grasos	Alifáticos	$C_1 - C_{25}$		528

2.2.2 Rutas biosintéticas

Las rutas biosintéticas se agrupan en: a. Biosíntesis de terpenos volátiles; b. Biosíntesis de derivados de ácidos grasos volátiles y, c. Biosíntesis de fenilpropanoides/bencenoides volátiles.

a) Biosíntesis de terpenos volátiles. Los terpenos o isoprenoides son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno (o 2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de cinco átomos de carbono. Los más comunes son monoterpenos y sesquiterpenos. Existen dos vías de síntesis de los terpenos: La vía

del ácido mevalónico y la vía del 3-PGA/piruvato. En la vía del ácido mevalónico, tres moléculas de acetil-CoA (Ac-CoA) forman una molécula de ácido mevalónico. El ácido mevalónico es pirofosfatado, descarboxilado y deshidratado para dar lugar al isopentenil pirofosfato (IPP) o isopreno activo. A partir del IPP y su isómero “dimetil alil pirofosfato (DMAPP)” se construyen todos los terpenos (figura). La única diferencia entre ellos es el número de unidades de isopreno.



LPP: Linaloldifosfato; GPP: Geranildifosfato; NPP: Nerildifosfato.

Fig 5. Sustratos comunes para la biosíntesis de algunos terpenos (Tomado de García Ríos, 2008)

b) Biosíntesis de derivados de ácidos grasos volátiles. Alcoholes, aldehídos y ésteres de cadena corta, son la segunda clase de volátiles florales más abundantes. En su mayoría, son compuestos originados en la membrana lipídica, derivados de ácidos grasos de C18 (Véase Figura 6), transformados a hidroperóxido y, luego, fragmentados a C12 y C6 por hidroperoxiliasas, como productos de la ruta de la lipoxigenasa. A través de esta ruta se producen 3-cis-hexenal y/o hexanol, comunes en los aceites florales.

c) Biosíntesis de fenilpropanoides/bencenoides volátiles. La condensación de fosfoenol piruvato y D-eritrosa-4-fosfato, en la ruta del ácido shikímico, forma la

estructura base para la construcción de derivados fenilpropanoides y bencenoides, procesos catalizados por fenilalaninamonio liasa (PAL), fenilpiruvato y ácido fenilláctico. La mayoría de compuestos aromáticos son no volátiles, por lo tanto, deben ser reducidos en la posición C9 u oxidados, para hacerlos más volátiles.

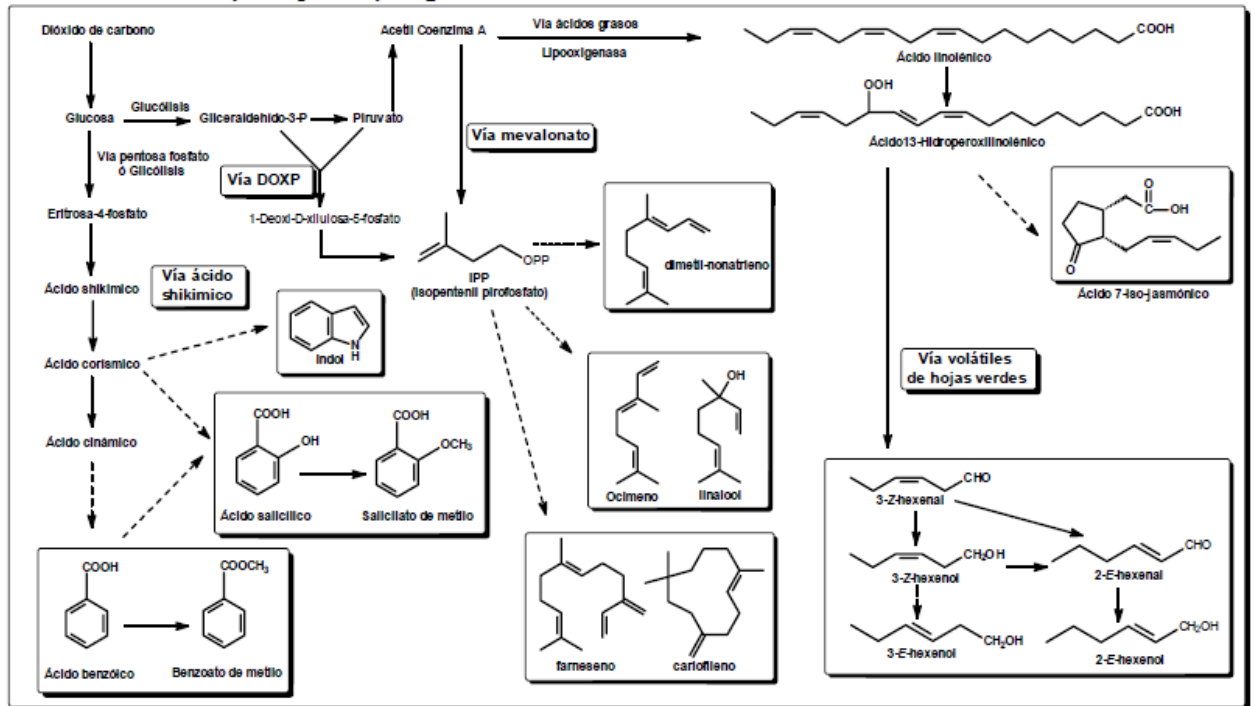


Figura 6. Rutas biosintéticas para la obtención de compuestos volátiles (Tomado de Marín Loaiza y Céspedes, 2007)

2.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS

2.3.1 Técnicas de extracción

Para el aislamiento de los compuestos volátiles, se usan principalmente los siguientes métodos: (A) extracción con solventes, (B) destilación por arrastre de vapor, y (C) las técnicas de espacio de cabeza. Hay tres tipos de técnicas de espacio de cabeza que son de uso común: (1) recolección directa del aroma, sin acumulación, (2) adsorción, y (3) trampa fría (Knudsen *et al.*, 1993). Los métodos A y B pueden generar la extracción de compuestos no volátiles originando que la mezcla sea más compleja de lo esperado. El muestreo de espacio de cabeza es una técnica no destructiva, que puede ser usado en las plantas vivas ya sea en el laboratorio o en el campo, y permite que la

toma de muestras pueda ser repetida en diferentes tiempos con el mismo individuo. Es el método más utilizado en la mayoría de los estudios de componentes del aroma.

A) Extracción con solventes: Existen varios tipos de aparatos con los cuales se puede llevar a cabo la extracción con solventes. Uno de los más utilizados es el extractor Soxhlet. Sin embargo, el material vegetal puede ser simplemente macerado con un solvente orgánico; los más usados son éter de petróleo, etanol, pentano, hexano, tolueno, benceno, iso-propanol, acetona, acetato de etilo, acetato de metilo o éter dietílico. Este método requiere de la concentración posterior del aceite, seguido de la evaporación del solvente. Esta es, por supuesto, una parte delicada de la operación y deben tomarse precauciones para evitar pérdidas por evaporación de los demás compuestos volátiles (Sandra, 1987).



Fig.7 Extracción con solventes

B) Destilación por arrastre de vapor: La destilación por arrastre con vapor o destilación con vapor seco, que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste, en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor. En esta técnica el vapor de agua ligeramente sobrecalentado, proveniente de un generador, se hace llegar hasta el recipiente que contiene la planta, de donde arrastra los componentes

volátiles que luego se condensan obteniéndose así una mezcla de agua y aceite, de la cual el aceite esencial se separa fácilmente por simple decantación.

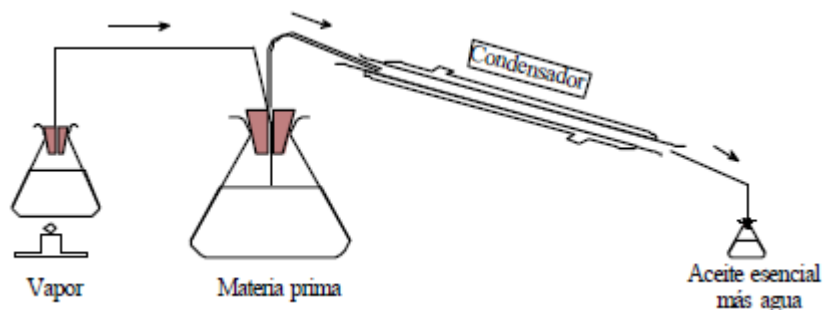


Fig. 8 Destilación por arrastre de vapor (Tomado de Vásquez Ribeiro *et al.*; 2001)

C) Técnicas de espacio de cabeza headspace (HS): El análisis de los volátiles extraídos en modo HS, permite una mejor identificación de los compuestos emitidos por la planta, en comparación con la extracción por solventes (Cuevas_Glory, *et al.*, 2007). En la actualidad, las técnicas de HS son las más empleadas para determinar los compuestos volátiles de plantas, ya que, con estas técnicas se busca mejorar el método de extracción. En general, las técnicas de análisis en modo Headspace se pueden agrupar en dinámicas (“dynamic headspace”) y estáticas (“static headspace”).

- Headspace dinámico: La técnica de muestreo D-HS se basa generalmente en dos enfoques principales: (a) uno llamado de purga y trampa (P & T), donde la fracción volátil se acumula en la corriente del flujo de gas despojada a través de la matriz en un medio de captura adecuado, como una trampa fría, un absorbente, un adsorbente o un reactivo específico o disolvente para una determinada clase de compuesto, (b) un enfoque dinámico, donde los analitos son muestreados de la corriente del flujo de gas pasado por la matriz (Bicchi *et al.*, 2008). Los compuestos volátiles se recuperan generalmente por la elución en solvente o más a menudo por desorción térmica en un sistema de cromatografía de gases (GC) o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Los largos tiempos de muestreo, la posibilidad de contaminación por el aire empleado, la necesidad de solventes, el requerimiento de temperatura o existencia de artefactos, debido al adsorbente o trampa empleada, son las principales limitaciones de esta clase de muestreo.

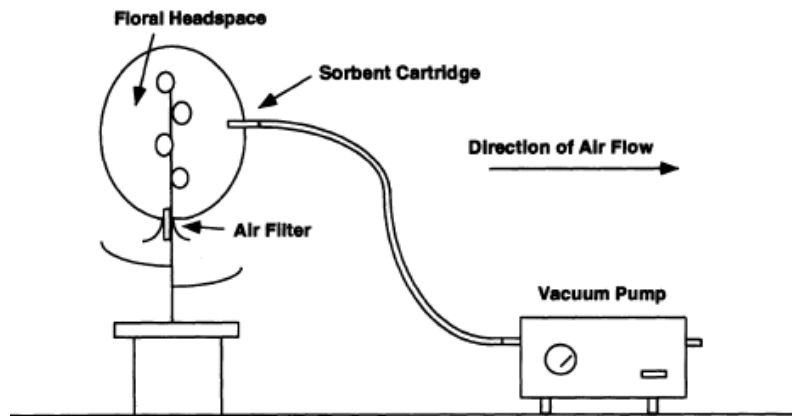


Fig. 9 Diagrama de la colecta empleando Dynamic Headspace (Tomado de Raguso y Pellmyr, 1998)

-Headspace estático: La principal ventaja de HS estático, es la rápida extracción y concentración de analitos. Entre las técnicas que se basa el HS estático (Cavalli *et al.*, 2003; Kaiser, 2000), las principales son: headspace estático (S-HS), microextracción en fase sólida (SPME) y microextracción en una gota de solvente (SDME). De todas estas técnicas, el desarrollo de SPME es el más relevante para HS estático. Dada su importancia, su versatilidad y su creciente aplicación en el análisis de compuestos orgánicos volátiles.

La técnica de microextracción en fase sólida fue introducida por J. Pawliszyn y colaboradores (Zhang y Pawliszyn, 1993; Pawliszyn, 1997). Existen básicamente dos modos de extracción posibles en SPME, el modo directo en donde se introduce la fibra directamente en la muestra o bien en el espacio de cabeza o headspace (HS/SPME)(Fig. 10). HS / SPME es el modo más utilizado, por varias razones. Esta modificación de la microextracción en fase sólida como método (SPME) reduce el tiempo de extracción y facilita la aplicación de este método para el análisis de muestras sólidas, presenta un bajo costo, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y generalmente no precisa del uso de disolventes orgánicos; además facilita el logro de una mayor selectividad que el modo de muestreo directo. La falta de contacto con la muestra evita la contaminación o descomposición de la capa de fibra y reduce la influencia de la matriz. La duración de la etapa de extracción es generalmente más corto, en comparación con el muestreo directo, debido a la difusión más rápida de los compuestos orgánicos volátiles (Pawliszyn, 1997; Bicchi *et al.*, 2000; Zu-Guang Li *et al.*, 2006; Stashenko y Martínez, 2007).

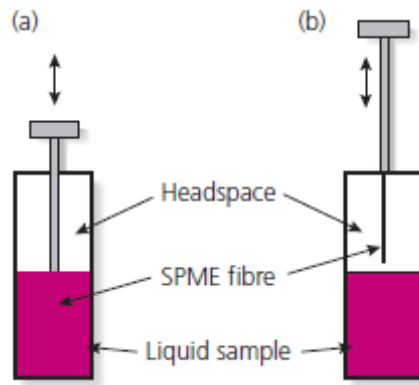


Fig. 10 Modos de extracción en SPME a) Modo directo, b) En el espacio de cabeza (Tomado de Hinshaw, 2003)

El dispositivo empleado consta de una fibra de sílice fundida, cubierta con un sorbente. La fibra está protegida por una jeringa que además permite la penetración del septum del vial usado para muestrear, así como el del puerto de inyección del equipo cromatográfico (Fig. 11).

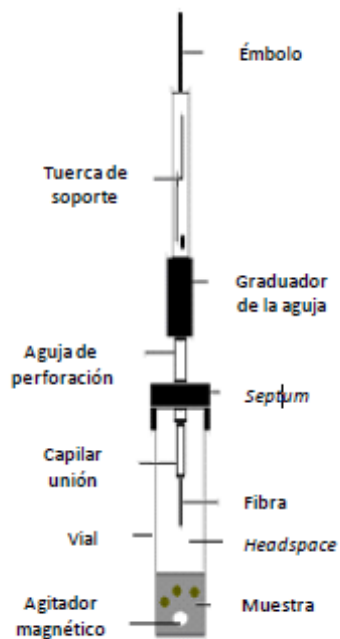


Figura 11. Dispositivo para la microextracción en fase sólida SPME (Tomado de Arthur y Pawliszyn, 1990)

Ventajas de SPME:

1.- En el proceso de preparación de la muestra no se requieren solventes. Los procedimientos que comprende son de sorción y desorción.

- 2.- Es compatible con el sistema analítico cromatográfico [Setkova, 2007].
- 3.- El dispositivo para hacer el muestreo es portátil, lo que permite hacer monitoreos en campo [Musteata, 2007].
- 4.- Se necesita poca cantidad de muestra.
- 5.- Puede ser empleada para extraer sustancias orgánicas semivolátiles en muestras de aguas y matrices biológicas.
- 6.- Permite el análisis de compuestos a nivel de trazas [Mester, 2001].

Tabla 2. Aplicaciones de *SPME*, según el tipo de recubrimiento de la fibra (Marín Solano y Ordoñez Calderon, 2008).

Recubrimiento de la fibra	Espesor (µm)	Aplicaciones
Polydimethyl siloxane (PDMS)	100	GC para volátiles
PDMS	30	GC/HPLC para semivolátiles no polares
PDMS	7	GC/HPLC para compuestos no polares de alto peso molecular.
PDMS/Divinylbenzene(PDMS/DVB)	65	GC/HPLC para volátiles, aminas, nitro aromáticos
Polyacrilate (PA)	85	GC/HPLC para semivolátiles polares
Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB)	65,70	GC/HPLC para alcoholes y compuestos polares
Carboxen/PDMS	75,85	GC para gases y compuestos de bajo peso molecular
PDMS/DVB	60	HPLC para aminas y compuestos polares
Carbowax/Templated resin	50	HPLC para surfactantes

2.3.2 Técnicas de análisis

Para poder realizar la identificación de los compuestos presentes en las fragancias se utiliza la técnica de espectrometría de masas. Para que esta técnica se pueda aplicar y obtener una buena especificación estructural de los compuestos se requiere que la muestra posea cierto grado de pureza. Para ello se deberán emplear métodos de separación, entre los más utilizados se encuentran los cromatográficos, que comprenden la cromatografía de papel, de capa fina, de columna, gaseosa y líquido-líquido.

Cromatografía. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), se define cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes, para ser separados, se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra, fase móvil, se mueve en una dirección definida. Según el estado físico de la fase móvil, se puede hacer una clasificación de la cromatografía así: cromatografía líquida (LC) y cromatografía de gases (GC).

Cromatografía líquida. En LC, la fase móvil es un líquido; el poder de esta técnica, reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, físico-químicamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores. Los diferentes tipos de LC, se clasifican según las interacciones que se producen entre la fase estacionaria y el soluto. Según ello, se denominan, cromatografías de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico o de filtración en gel [Rubinson, 2000].

Un tipo de LC, la cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC*), es una de las técnicas cromatográficas más empleadas en la actualidad, la cual permite trabajar en régimen de alta presión. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ingeniería y para la sociedad en general, como, por ejemplo, proteínas, oligosacáridos, triglicéridos, vitaminas, fármacos, muestras medioambientales, entre otras.

Cromatografía de gases. En esta técnica los analitos se eluyen por el flujo de una fase móvil de gas inerte. El primer trabajo en el que se hace pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna data de 1951, dando lugar a la técnica conocida como cromatografía de gases. Esta técnica, descrita por Martin y James en 1952, es

en la actualidad en método usado ampliamente para la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra (Gutierrez y Droguet, 2002).

Los analitos para cromatografía de gases, deben tener puntos de ebullición menores que 350°C y no descomponerse por debajo de esta temperatura; estas muestras pueden ser gases, líquidos o sólidos (estos últimos deben ser vaporizados). Las muestras de compuestos volátiles extraídos de las plantas que pueden ser ciertamente complejas, requieren métodos de separación de alta resolución; considerando esto, cromatografía de gases es la técnica de separación más apropiada.

Con el propósito de realizar una identificación de los diferentes compuestos, se emplean los índices de retención de Kovàts, los cuales se utilizan para determinar la retención de un compuesto, comparándolo con los tiempos de retención de n-alcános, analizados bajo las mismas condiciones operacionales (Rubinson, 2000).

Espectrometría de masas. La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc (Gutierrez y Droguet, 2002). Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa: permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt e incluso ppq.
- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para la plena identificación de los compuestos presentes en una mezcla compleja de sustancias volátiles, es conveniente acoplar la cromatografía de gases con una técnica espectroscópica, como la espectrometría de masas, que es considerada uno de los instrumentos de análisis químico más funcional e importante

Hasta 1957, la cromatografía de gases y la espectrometría de masas avanzaron por caminos diferentes aunque paralelos en el campo del análisis orgánico. Sin embargo, debido al gran potencial demostrado desde los primeros intentos de combinación de ambas técnicas y a su rápido desarrollo, actualmente, la combinación directa cromatografía gaseosa-espectrometría de masa, se reconoce como uno de los sistemas más eficaces a disposición del químico para el estudio e identificación de mezclas compuestas de productos orgánicos volatilizables.

2.4 LITERATURA CITADA

Adams, R.P.(2004). Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Ed. Allured, Illinois.

Arthur, C.; and Pawliszyn, J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62, :2145-2148.

Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., Rubiolo, P. (2008). Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *Journal of Chromatography A*, 1184: 220–233.

Brodmann, J., Twele, R., Francke, W., Yi-bo, L., Xi-qiang S., Ayasse, M. (2009). Orchid Mimics Honey Bee Alarm Pheromone in Order to Attract Hornets for Pollination *Elsevier Current Biology*, 19: 1368–1372.

Cancino del Mazo, A., Damon, A. (2006). Comparison of floral fragrance components of species of *Encyclia* and *Prosthechea* (Orchidaceae) from Soconusco, southeast México. *ECOSUR Lankesteriana*, 6(3): 83-89.

Cavalli, J-F.; Fernandez, X.; Lizzani-Cuvelier, L.; Loiseau, A.M. (2003). Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of french olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 51:7709-7716.

Cuevas-Glory, I.F.; Pino, J.A.; Santiago, I.S.; Sauriduch, E.(2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem.*, 103:1032–1043.

C. Arthur, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 62 (1990) 2145

Damon, A. A., Santiesteban, H. A., Rojas, J. C. (2002). Analysis of thre fragrance produced by the epiphytic orchid *Anathallis* (*Pleurothallis*) *racemiflora* (Orchidaceae) in the soconusco región, Chiapas, México. *ECOSUR Lindleyana*, 17(2): 93-97.

Dötterl Stefan, Wolfe Lorne M., Jürgens Andreas. (2005). Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. *Phytochemistry* 66: 203–213

Dötterl, S. (2006). El aroma floral como atrayente para polillas y abejas. II Jornadas de polinización en plantas hortícolas.

Dudareva, N., Negre, F. (2005). Practical aplications of research into the regulation of plant volatile emission. *Plant Biology*, 8: 113-118.

Flach, A. Dondon, R. C., Singer, R. B., Koehler, S., Amaral, M. do Carmo E., Marsaioli, A. J. (2004). The chemistry of pollination in selected Brazilian Maxillariinae Orchids: floral rewards and fragrance. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1045-1056.

Freuler, M. (2008). Orquideas. Editorial Albatros

Feulner Martin, Schuhwerk Franz, Dötterl Stefan (2009). Floral scent analysis in *Hieracium* subgenus *Pilosella* and its taxonomical implications. *Flora* 204: 495–505.

Hagsater, E., Soto, A. M.A., Salazar, C. G. A., Jimenez, M. R., López, R. M. A. y Dressler, R. I. (2005). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.

Jakobsen H.B. y Olsen C.E. (1994) Influence of climatic factor son emission of flower volátiles in situ. *Revista Planta* 192: 365-371.

Knudsen Jeite T., Tollsten Lars y Bergstrom I. Gunnar (1993). Floral scents-a checklist of volatile compounds isolatedby head-space techniques. *Phytochemistry* 33: 253-28

Kaiser R. A. J. (1993) On the Scent of Orchids. American Chemical Society. In Bioactive Volatile Compounds from Plants; *Teranishi, R., el al.; ACS Symposium Series*.

Kaiser, R.(2000). Scents from rain forests. *Chimia*, 54: 346-363.

Levin Rachel A., Raguso Robert A., McDade Lucinda A. (2001) Fragrance chemistry and pollinator affinities in Nyctaginaceae. *Phytochemistry* 58: 429–440.

MCGarvey, D.J. y Croteau, R.(1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7:1015-1026.
Maffei, M.E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*.

Marín-Loaiza, J. C., Céspedes, C. L. (2007). Compuestos volátiles de plantas, origen, emisión, efectos, análisis y aplicación. *Fitotécnia México*, 30(4): 327-351.

Matich Adam J., Young Harry, Allen John M., Wang Mindy Y., Fielder Simon, McNeilage Mark A., MacRae Elspeth A. (2003). *Actinidia arguta*: volatile compounds in fruit and flowers. *Phytochemistry* 63: 285–301.

Mester, Zoltan; Sturgeon, Ralph; Pawliszyn, Janusz (2001). Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochim. Acta, Part B* 56, 56:233-260.

Musteata, Marcel, F; Pawliszyn. (2007), *In vivo* sampling with solid phase microextraction. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 70:181–193.

Patt, J. M., Rhoades D. F., Corkill J. A. (1988). Analysis of the floral fragrance of *Platanthera stricta*. *Journal Phytocemistry*, 27: 91-95.

Pawliszyn J., (1997). Solid phase microextraction. *The chemical educador*, 2: 1-7.

Peñuelas J, J. Llusià (2003). BVCOs: plant defense against climate warming?. *Trends Plant Sci*. 8:105-108.

Populin, F. (2005). Conservacion de orquídeas: una guia para autoridades administrativas.

Roberts, D. L., Dixon, K. W. (2008). Orchid. *Magazine Current Biology*, 18: 325-329.

Rubinson, K.; Rubinson, J.(2000). Análisis instrumental, Prentice Hall, Madrid, pp. 636, 704-705.

Sandra, P.; Bichhi C.(1987). Capillary gas chromatographic in essential oil analysis,

Ed. Huethig Verlag, Heidelberg, pp. 20-23.

Schlüter, P. M., Schiestl, F. P. (2008). Molecular mechanisms of floral mimicry in orchids. *Elsevier Trends in Plant Science*, 13: 228-235.

Setkova, Lucie; Risticvic, Sanja; Pawliszyn, Janusz. (2007). Rapid headspace solidphase microextraction–gas chromatographic–time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction I. Method development and optimization, *J. Chromatogr. A*, 1147: 213–223.

Silva, U. F., Borbac, E. L., Semir J., Marsaioli, A. J. a (1999) A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) volatiles. *Journal Phytochemistry*, 50: 31-34.

Skoog, D., James, H. F., Niemann, T. A. (1992). Principios de análisis instrumental McGraw Hill

Soto, A. M. A., Salazar, G. A. (2004). Orquídeas En: A.J. García Mendoza, M.J. Ordoñez y M. Briones-Salas (eds), Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología.

Theis, A. L., Waldack, A. J., Hansen, S. M., Jeannot, M. A. (2001). Headspace Solvent Microextraction. *American Chemical Society Analytical Chemistry*, 73: 5651-5654

Williams, N. H., Whitten, W. M. (1999). Molecular phylogeny and floral fragrances of male euglossine bee-pollinated orchids: A study of *Stanhopea* (Orchidaceae) *Society for the Study of Species Biology, Plant Species Biology*, 14: 129-136.

Zhang, Z., Pawliszyn, J. (1993). Headspace Solid-Phase Microextraction. *American Chemical Society. Anal. Chem.*, 65: 1843-1852.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN LA FRAGANCIA FLORAL DE *Prosthechea varicosa*

3.1 Introducción

Prosthechea varicosa es una hierba epífita, a veces terrestre o rupícola, de 20 a 50 cm de alto, con pseudobulbos ovoides cuya parte apical se proyecta en un “cuello largo”, cada uno provisto de 2-3 hojas y una inflorescencia apical que consiste en un racimo de 4-25 flores que abren en sucesión; las flores son pequeñas, fragantes, con sépalos y pétalos de color pardo-rojizo hasta chocolate negruzco, labelo crema-verdoso o crema-amarillento, a veces con rayas rojo-pardas en los lóbulos laterales, con el lóbulo medio densamente verrugoso-papiloso (Dressler y Pollard, 1974).



Fig. 12 Flores de *Prosthechea varicosa*

Es una orquídea mesoamericana que se conoce desde México hasta Panamá. En nuestro país está ampliamente distribuida en la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur y Sierra Madre de Chiapas, en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Jalisco, Veracruz, Michoacán, Hidalgo, Guerrero, México, Puebla, Morelos y Oaxaca (García, *et al.*, 2003).

Se establece entre 1500 a 2800 metros de elevación en el bosque mesófilo de montaña y en bosques de encino y de pino-encino, en zonas húmedas y con neblinas frecuentes; a veces crece en bosques algo más abiertos y secos.

Esta especie de orquídea presenta una fragancia floral agradable a la percepción del olfato humano, sin embargo no se ha encontrado reporte alguno en el cual sea objeto de estudio; por tal motivo en este trabajo se dedica un apartado para analizar e

identificar los compuestos volátiles presentes, la variación que presentan las fragancias de acuerdo a la ubicación geográfica de las poblaciones de orquídeas y encontrar de acuerdo a datos bibliográficos que usos potenciales pueden tener algunos compuestos volátiles presentes en la fragancia que le permitan a esta especie de orquídea ser utilizada en la medicina, aromaterapia o industria de la perfumería.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Recolección y preparación de las muestras



Fig. 13 Ubicación de las zonas de estudio de *P. varicosa*

Se colectaron o consiguieron plantas de *Prosthechea varicosa* en cuatro diferentes localidades: 1) Volcán Tacaná, Chiapas; 2) Santa María Huitepec, Oaxaca; 3) Chilchotla, Puebla y 4) Ixhuacán, Veracruz. Estas localidades presentan bosque mesófilo, neblinas frecuentes, temperaturas templadas y son zonas de relieve accidentado.

De las plantas de cada zona de estudio se colectaron flores frescas, completamente abiertas y que no habían sido polinizadas entre Noviembre de 2010 y Febrero de 2011. Se prepararon ejemplares de respaldo de estas plantas y fueron depositados en la colección del Herbario AOX. De cada localidad se tomaron 4 flores las cuales fueron depositadas en un vial de vidrio con capacidad de 40 mL y septa de teflón de 22 mm, conteniendo 10 mL de agua desionizada y una pizca de NaCl; los viales con muestra

fueron debidamente identificados y cerrados para mantenerlos en refrigeración a una temperatura de 4-5°C hasta su análisis (máximo una semana) (Fig. 14).



Fig. 14 Preparación y almacenamiento de muestras (*P. varicosa*)

3.2.2 Extracción de compuestos volátiles

Para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó la técnica de headspace microextracción en fase sólida (HS-SPME). Las muestras contenidas en los viales fueron introducidas en un baño maría con agitación constante durante 5 min, a una temperatura de 45-50 °C, con el fin de lograr la etapa de pre-equilibrio entre la muestra y el espacio de cabeza (Fig. 15). Después de concluida la etapa de pre-equilibrio, se procedió a exponer la fibra para SPME (DVB/Carboxen/PDMS 2cm-50/30 um marca SUPELCO) en el espacio de cabeza del vial, por un tiempo de 30 min, manteniendo la agitación constante del vial y la temperatura de 45 a 50°C en el baño maría. Una vez transcurrido este tiempo, la fibra se retiró del vial que contenía la muestra y se llevó al puerto de inyección del equipo cromatográfico, para realizar la desorción de los compuestos y su respectivo análisis.

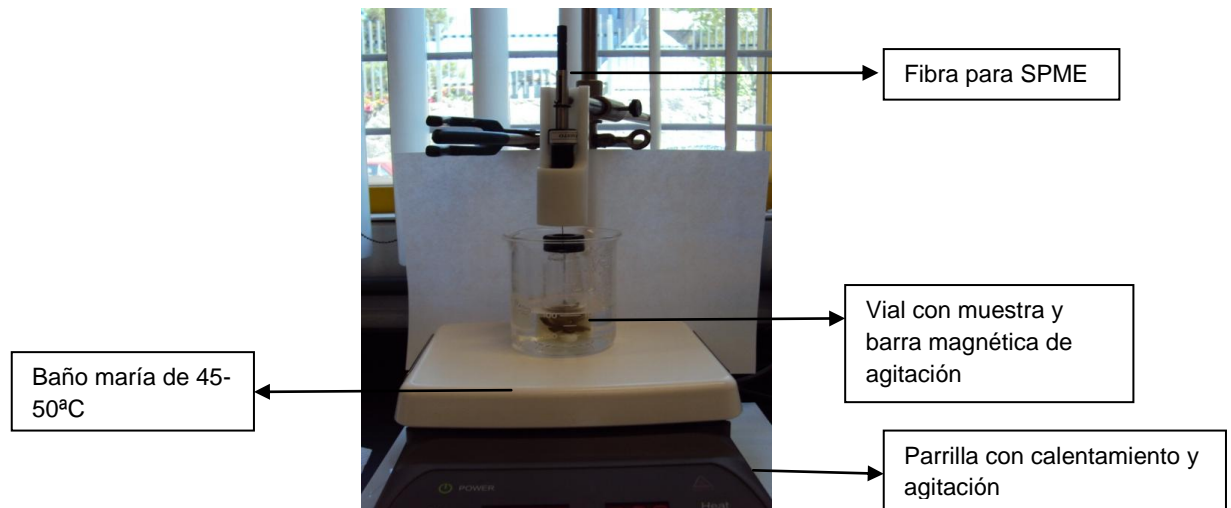


Fig. 15 Extracción de compuestos volátiles de *P. varicosa* (Técnica HS-SPME)

3.2.3 Análisis e identificación de compuestos volátiles

El análisis e identificación de los volátiles se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890 N, equipado con un detector de masas de tiempo de vuelo (TOF) modelo LECO Pegasus 4D. (Fig. 16)



Fig. 16 Cromatógrafo de gases Agilent 6890 N, equipado con un detector de masas de tiempo de vuelo (TOF) LECO Pegasus 4D.

Las muestras fueron analizadas utilizando una columna capilar DB-5 (10m x 0.18mm x 0.18mm); el tiempo de desorción de la fibra en el inyector fue de 3 minutos; el gas acarreador fue Helio con un flujo de 1 ml/min y la temperatura del inyector fue de 300°C. La programación de la temperatura al inicio fue de 40°C por 3 min con una

rampa de 20°C/min hasta alcanzar una máxima de 300°C, la cual se mantuvo durante 5 min. El analizador másico tiempo de vuelo (TOF) con una adquisición espectral de 20 espectros/s. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250°C; con un tipo de ionización por impacto de electrones (IE). Los compuestos volátiles fueron identificados por comparación con el Índice de Kovacs y la biblioteca NIST del equipo versión 2.0.

Los espectros de los compuestos obtenidos en el análisis de masa fueron buscados a través de bibliografía realizando una comparación de estos para corroborar los datos obtenidos. En la Figura 17 se muestra el espectro de masas correspondiente al α -pinene obtenido de la biblioteca NIST del equipo, se realiza la comparación de este con el obtenido en la búsqueda de bibliografía (Figura 18).

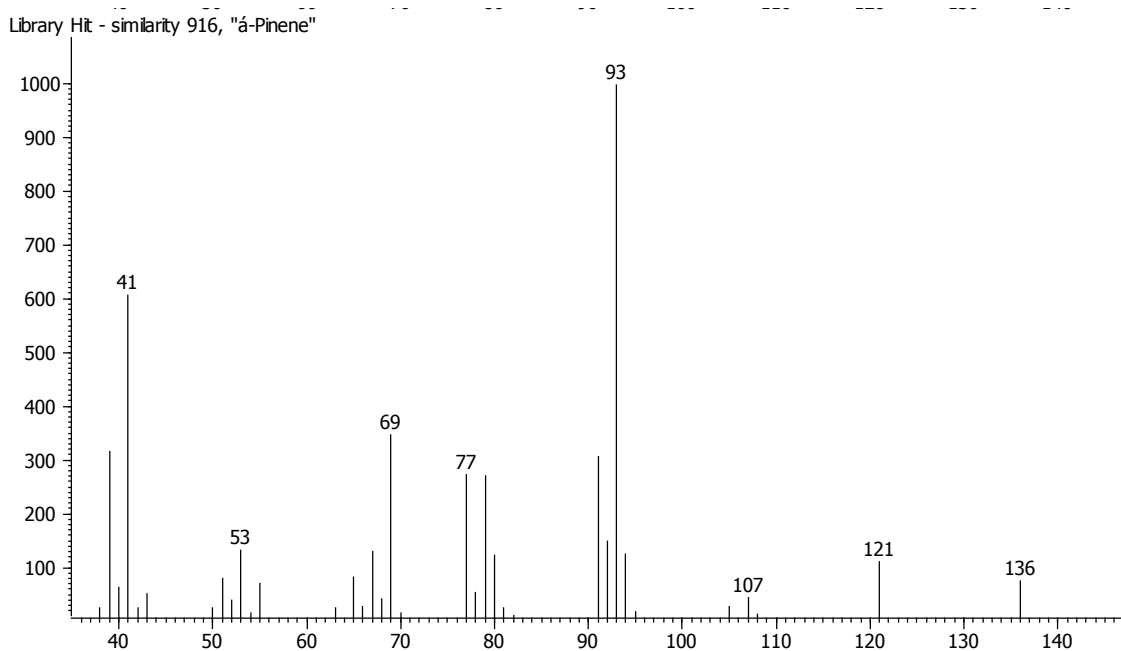


Fig. 17 Espectro de masas del α -pinene obtenido a través de la biblioteca del equipo LECO Pegasus 4D

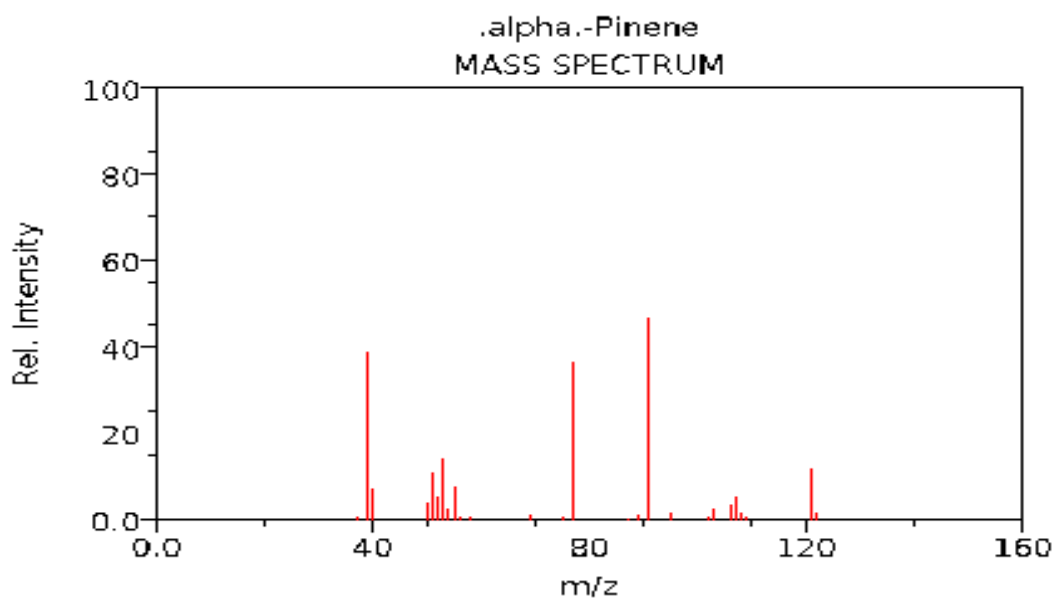


Fig. 18 Espectro de masas del α -pinene obtenido a través de búsqueda bibliográfica

Durante la búsqueda bibliográfica se obtienen los datos mostrados en la Fig. 19, los cuales son comparados con los obtenidos a través del analizador másico:

α -Pinene

- **Fórmula:** $C_{10}H_{16}$
- **Peso molecular:** 136.2340
- **IUPAC InChI Estándar:**
 - InChI=1S/C10H16/c1-7-4-5-8-6-9(7)10(8,2)3/h4,8-9H,5-6H2,1-3H3
 - [Descarga el identificador en un archivo..](#)
- **IUPAC InChIKey Estándar:** GRWFGVWFFZKLTJ-UHFFFAOYSA-N
- **Número de registro CAS:** 80-56-8
- **Estructura química:**

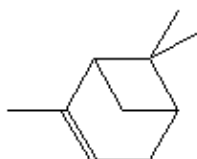


Fig. 19 Datos del α -pinene obtenidos a través de la búsqueda bibliográfica.

3.3 Resultados

La lista de compuestos, su clasificación, nombre común y porcentaje de área en los cromatogramas obtenidos en muestras de las cuatro localidades de *Prosthechea varicosa* se muestran en las Tablas 1-4.

En la Tabla 3 se muestran los 22 compuestos identificados en esta muestra proveniente del Volcán Tacaná, Chiapas; siendo los mayoritarios **2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene (33,43%)** y **2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene (ipsdienol) (25,04%)**. Los compuestos volátiles presentes en esta fragancia fueron principalmente monoterpenos, alcoholes y sesquiterpenos.

Los compuestos que hacen la diferencia con respecto a las otras localidades fueron: **Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl) (4,96%)**; **Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl (3,52)**; **3,6-Nonadien-1-ol, (E,Z) (3,02%)**; **Benzyl Alcohol (2,18%)**; **Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) (1,02%)**.

Tabla 3. Compuestos volátiles identificados en la muestra del Volcán Tacana, Chiapas

	Compuesto	Grupo	Sub-grupo	Sinónimo	Area %
1	Hexane	acido graso derivativo	alcano		0,21
2	1-Butanol, 2-methyl-, (ñ)-	acido graso derivativo	alcohol		0,89
3	α-Pinene	Isoprenoide	monoterpeno		2,68
4	3-Octanol	acido graso derivativo	alcohol		1,14
5	2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E-	Isoprenoide	monoterpeno		33,42
6	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	Isoprenoide	monoterpeno	o-cymene	0,3
7	2-Propyl-1-pentanol		alcohol		0,12
8	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-	Isoprenoide	monoterpeno	cis-ocimene	0,49
9	Benzyl Alcohol	Benzenoides	alcohol		2,18
10	Bicyclo[3.2.1]oct-2-ene, 3-methyl-4-methylene-				1,08
11	7-Octen-4-ol, 2-methyl-6-methylene-, (S)-	Isoprenoide	monoterpeno	ipsenone	8,55
12	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	Isoprenoide	monoterpeno	linalool	8,15
13	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl-				3,52
14	Phenylethyl Alcohol	Benzenoides	alcohol		0,95
15	2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene-, (S)-	Isoprenoide	monoterpeno	ipsdienol	25,04
16	2,6-Nonadienal, (E,Z)-		aldehido		0,34
17	3,6-Nonadien-1-ol, (E,Z)-				3,02
18	Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)-				4,96
19	2-Decanone				0,04
20	Caryophyllene	Isoprenoide	sesquiterpeno		0,67
21	α-Farnesene	Isoprenoide	sesquiterpeno		0,42
22	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-				1,02

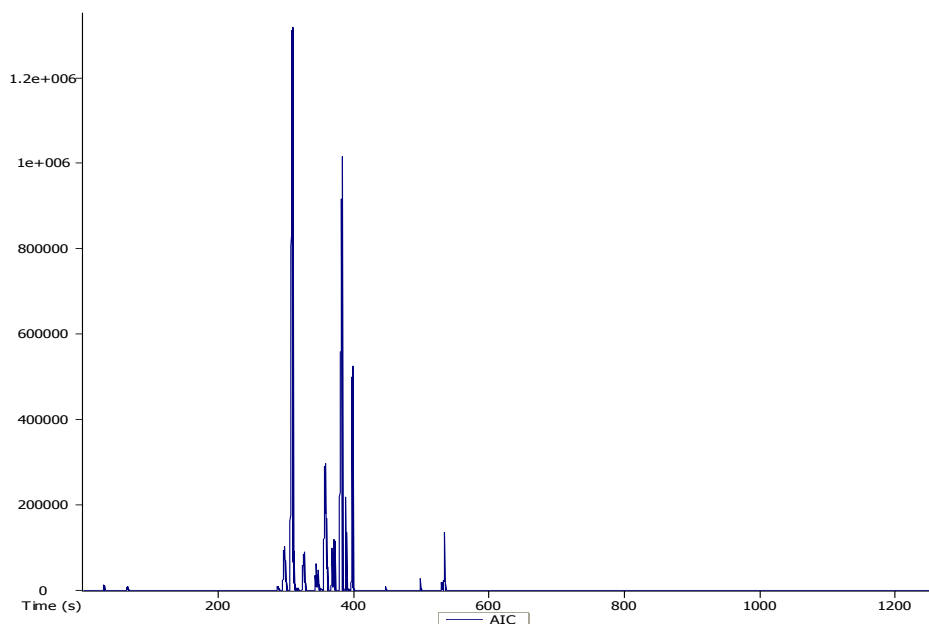


Fig. 20 Perfil cromatográfico de la muestra del Volcán Tacana, Chiapas

En la muestra perteneciente a Santa María Huitepec, Oaxaca se identificaron 21 compuestos (Tabla 4), de los cuales los mayoritarios fueron: **2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene (ipsdienol) (29,11%)**; **3,7-Octadien-2-ol, 2-methyl-6-methylene (isomyrcenol) (14,58%)**; **4-Bromobenzoic acid methyl ester (11,82%)**; **2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene (10,34%)**. Esta fragancia está constituida principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos.

Los compuestos que hacen la diferencia con respecto a las otras localidades fueron: **Carveol (fr.1) (7,25%)**; **cis-4-Nonene (2,78%)**; **1,3-Cyclohexadiene, 1,3,5,5-tetramethyl (2,51%)**.

Tabla 4. Compuestos volátiles identificados en la muestra de Santa María Huitepec, Oaxaca

	Compuesto	Grupo	Subgrupo	Sinónimo	Area %
1	Dimethyl ether	Benzenoide	Eter		0,05
2	2-methoxybenzyl acetate	Benzenoide	Ester		0,15
3	α -Pinene	Isoprenoide	monoterpeno		5,70
4	Oxime-, methoxy-phenyl-				0,10
5	3,7-Octadien-2-ol, 2-methyl-6-methylene-, (E)-			isomyrcenol	14,58
6	4-Bromobenzoic acid methyl ester				11,82
7	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	Isoprenoide	monoterpeno	o-cymene	0,75
8	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-	Isoprenoide	monoterpeno	cis-ocimene	3,63
9	1,2-Ethanediol, 1,2-diphenyl-				0,29
10	cis-4-Nonene				2,78

11	Carveol (fr.1)	Isoprenoide	monoterpeno		7,25
12	1,3-Cyclohexadiene, 1,3,5,5-tetramethyl-				2,51
13	2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E-	Isoprenoide	monoterpeno		10,34
14	2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene-, (S)-	Isoprenoide	monoterpeno	ipsdienol	29,11
15	p-menth-1-en-8-ol	Isoprenoide	monoterpeno	α -terpineol	3,85
16	1-verbenone	Isoprenoide	monoterpeno		2,78
17	p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol				0,47
18	Caryophyllene	Isoprenoide	sesquiterpeno		0,36
19	Dihydro- β -ionone	Isoprenoide	terpeno irregular		2,71
20	β -ionone	Isoprenoide	terpeno irregular		0,55
21	α -Farnesene	Isoprenoide	sesquiterpeno		0,20

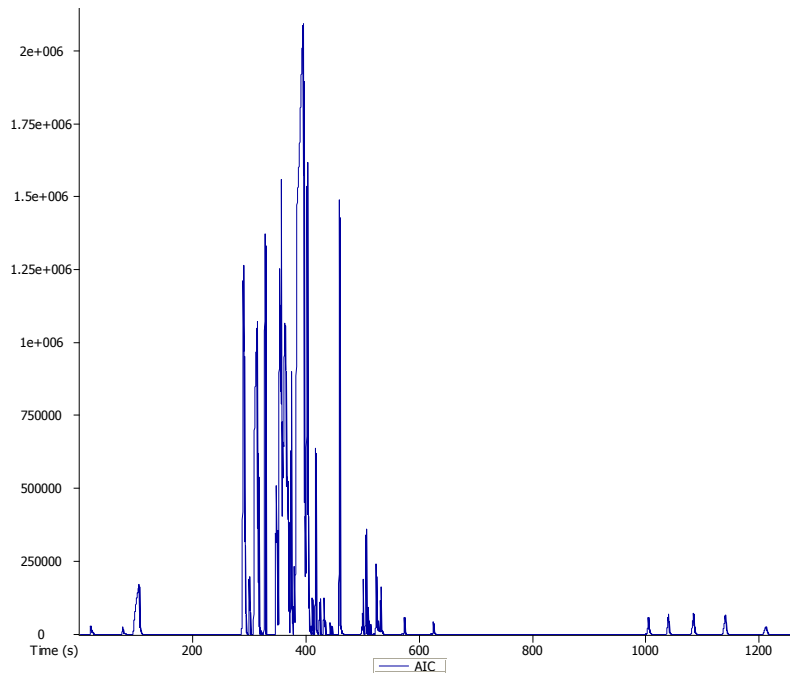


Fig. 21 Perfil cromatográfico de la muestra de Santa María Huitepec, Oaxaca

En la muestra de Ixhuacán, Veracruz, se identificaron 22 volátiles (Tabla 5), de los cuales los mayoritarios fueron **7-Octen-4-ol, 2-methyl-6-methylene (18,21%)**; **5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl- (13,38%)**; **2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene (13,22%)**; **2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene (10,69%)**. Esta fragancia estuvo constituida principalmente por monoterpenos.

Los compuestos que hacen la diferencia con respecto a las otras localidades fueron **2,2-Dimethyl-3-heptanone (8,18%)**; **Benzene, 1-ethyl-4-(1-methylethyl) (3,74%)**; **Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl (4,32%)**; **Butanoic acid, 3-methyl-, 2-hexenyl ester (1,27%)**; **5-Undecene (2,47%)**; **Benzene, (3,3-dimethylbutyl) (2,68)**; **3-Carene (1,66%)**.

3-Carene es un compuesto que ha sido identificado en otras orquídeas empleando la técnica de headspace (Knudsen, 1993), en los géneros de epífitas *Epidendrumy Stanhopea*, así como en terrestres de los géneros *Ophrys*, *Orchis* y *Platanthera*.

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en la muestra de Ixhuacán, Veracruz

	Compuesto	Grupo	Subgrupo	Sinónimo	Area %
1	α -Pinene	Isoprenoide	monoterpeno		6,57
3	D-Limonene	Isoprenoide	monoterpeno		0,50
4	3-Carene	Isoprenoide	monoterpeno		1,66
5	Phenol, 2-(2-methylpropyl)-				0,83
6	Benzene, (3,3-dimethylbutyl)-				2,68
7	2,2-Dimethyl-3-heptanone				8,18
8	5-Undecene	acido graso derivativo	alqueno		2,47
9	7-Octen-4-ol, 2-methyl-6-methylene-, (S)-	Isoprenoide	monoterpeno	ipsenone	18,21
10	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	Isoprenoide	monoterpeno	linalool	6,79
11	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	Isoprenoide	monoterpeno	allo-ocimene	0,51
12	2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E-				13,22
13	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (E)-				13,38
14	2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene-, (S)-	Isoprenoide	monoterpeno	ipsdienol	10,69
15	Cyclopropane, pentyl-				0,51
16	4-Octanone, 5-hydroxy-3,6-dimethyl-				0,14
17	Benzene, 1-ethyl-4-(1-methylethyl)-				3,74
18	Butanoic acid, 3-methyl-, 2-hexenyl ester, (E)-				1,27
19	p-menth-1-en-8-ol	Isoprenoide	monoterpeno	α -terpineol	0,32
20	Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl-				4,32
22	Dihydro- β -ionone	Isoprenoide	terpeno irregular		4,03

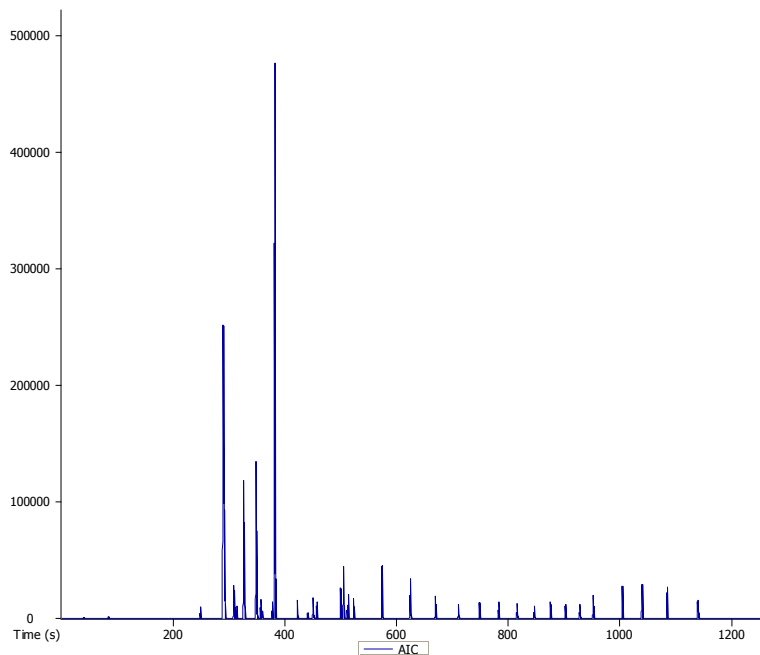


Fig. 22 Perfil cromatográfico de la muestra de Ixhuacan, Veracruz

En la muestra de Chilchota, Puebla, se identificaron 15 compuestos volátiles (Tabla 6). Los compuestos mayoritarios presentes en esta fragancia fueron **Eugenyl isovalerate (22,18)**; **α -Pinene (19,38)**; **5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl (13,53)**; **β -ionone (10,21)**. La fragancia estuvo constituida principalmente por monoterpenos.

Los compuestos que hacen la diferencia con respecto a las otras localidades son **p-Mentha-1,4(8)-dien-3-one (1,34)**; **Eicosane (1,09)**. El Eicosane es un alcano que ha sido identificado en orquídeas del género *Ophrys* mediante la técnica Dynamic headspace (Knudsen, 1993).

Es importante resaltar la muestra de esta localidad se colectó cuando las flores tenía un día de haber iniciado la antesis (apertura floral), mientras que las flores de las plantas de las otras tres localidades ya tenían 3 días de haber iniciado la antesis cuando fueron tomadas las muestras.

Tabla 6. Compuestos volátiles identificados en la muestra de Chilchotla, Puebla

	Compuesto	Grupo	Subgrupo	Sinónimo	Área %
1	α -Pinene	Isoprenoide	monoterpeno		19,38
2	D-Limonene	Isoprenoide	monoterpeno		3,73
3	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-	Isoprenoide	monoterpeno	cis-ocimene	0,58
4	Phenol, 2-(2-methylpropyl)-				0,14
5	7-Octen-4-ol, 2-methyl-6-methylene-, (S)-	Isoprenoide	monoterpeno	ipsonone	7,52

6	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	Isoprenoide	monoterpeno	allo-ocimene	1,60
7	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (Z)-				13,53
8	Eugenyl isovalerate				22,18
9	Phenol, 2-methyl-6-(2-propenyl)-				0,72
10	1-verbenone	Isoprenoide	monoterpeno		8,27
11	p-Mentha-1,4(8)-dien-3-one				1,34
12	Dihydro- β -ionone	Isoprenoide	terpeno irregular		8,74
13	α -Caryophyllene	Isoprenoide	sesquiterpeno		0,98
14	β-ionone	Isoprenoide	terpeno irregular		10,21
15	Eicosane	acido graso derivativo	alcano		1,09

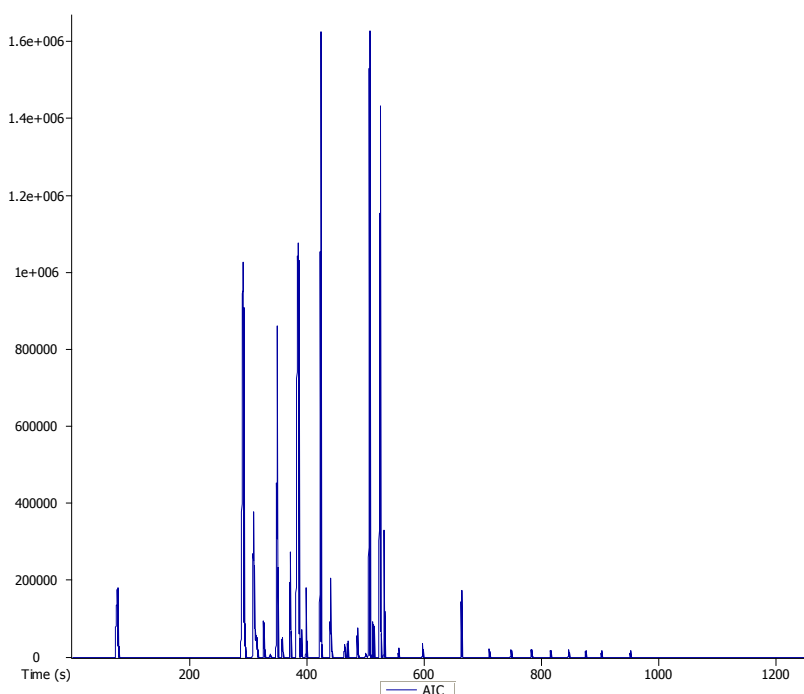


Fig. 23 Perfil cromatográfico de la muestra de Chilchotla, Puebla

Los siguientes compuestos Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl); α -Pinene; 2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene; 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl; 2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene; p-menth-1-en-8-ol; 2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl; 7-Octen-4-ol, 2-methyl-6-methylene; 5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl; Phenol, 2-(2-methylpropyl); 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl; 1-verbenone; Dihydro- β -ionone; β -ionone; Caryophyllene; α -Farnesene. están presentes en otras poblaciones de *P. varicosa* (Tabla 7). El α -pinene se presenta en las localidades de Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Puebla, mientras que 2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene; 2,7-octadien-4-ol, 2-methyl-6-

methylene fue identificado en las muestras de Chiapas, Oaxaca y Veracruz; 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl se encuentra en Chiapas, Oaxaca y Puebla; -7-Octen-4-ol, 2-methyl-6-methylene está en las muestras de Chiapas, Veracruz y Puebla; Dihydro- β -ionone se encuentra en las muestras de Oaxaca, Veracruz y Puebla; el resto de los compuestos están presentes solo en dos localidades.

Tabla 7. Compuestos volátiles de la fragancia floral que se comparten en las poblaciones de *Prosthechea varicosa*.

	COMPUESTOS	SINONIMO	SUB-GRUPO	LOCALIDADES			
				CHIAP	OAX	VER	PUEB
1	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	o-cymene	monoterpeno	0,3	0,75		
2	α -Pinene		monoterpeno	2,68	5,7	6,57	19,38
3	2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E-		monoterpeno	33,42	10,34	13,22	
4	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-	cis-ocimene	monoterpeno	0,49	3,63		0,58
5	2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene-,	ipsdienol	monoterpeno	25,04	29,11	10,69	
6	p-menth-1-en-8-ol	α -terpineol	monoterpeno		3,85	0,32	
7	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	Allo-ocimene	monoterpeno			0,51	1,6
8	7-Octen-4-ol, 2-methyl-6-methylene-, (S)-	ipenone	monoterpeno	8,55		18,21	7,52
9	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (E)-					13,38	13,53
10	Phenol, 2-(2-methylpropyl)-					0,83	0,14
11	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	linalool	monoterpeno	8,15		6,79	
12	1-verbenone		monoterpeno		2,78		8,27
13	Dihydro- β -ionone		terpeno irregular		2,71	4,03	8,74
14	β -ionone		terpeno irregular		0,55		10,21
15	Caryophyllene		sesquiterpeno	0,67	0,36		
16	α -Farnesene		sesquiterpeno	0,42	0,2		

CHIAP= Chiapas, OAX= Oaxaca, VER=Veracruz, PUEB=Puebla.

3.4 Discusiones

Las orquídeas del género *Prosthechea* han sido muy poco estudiadas, Mazo Cancino y Damon (2006) analizaron la fragancia de *Prosthechea cochleata*, *P. baculus*, *P. chacaoensis* y *P. radiata* pertenecientes a la región del Soconusco Chiapas empleando la técnica "Dynamic headspace", fueron identificados de manera común los compuestos e-ocimeno, α -farneseno, p-metil anisol, oxoformo y benzoato de bencilo. En las muestras analizadas en este trabajo, el α -farneseno fue identificado en las poblaciones de *P. varicosa* ubicadas en Chiapas y Oaxaca con porcentajes de 0.42 y

0,20. En su estudio Mazo Cancino y Damon (2006) identificaron por primera vez el compuesto *allo-ocimene* en la especie *Prosthechea radiata* (0.71%) y *Prosthechea chacaoensis* (0,77%) dicho compuesto también fue identificado en las poblaciones de Puebla (1,6%) y Veracruz (0,51%).

De los 16 compuestos que se encuentran de manera común en las poblaciones de *P. varicosa* localizadas en las cuatro diferentes localidades el α -pinene (Tabla 5), es el único compuesto que está presente en las cuatro localidades, este ha sido identificado en las fragancias de *Platanthera stricta* (Patt *et al.*, 1988) y *Stelis quadrifida* (Damon *et al.*, 2002) como uno de los compuestos mayoritarios extraído mediante la técnica de "Dynamic headspace", en las poblaciones de *P. varicosa* el α -pinene se encuentra en la muestra de Chilchotla, Puebla como un compuesto mayoritario teniendo un porcentaje de 19,38%. Este compuesto ha sido identificado en la fragancia de una gran variedad de plantas angiospermas y gimnospermas empleando la técnica Dynamic-Headspace (Knudsen *et al.*, 1993).

En relación con la actividad biológica de las orquídeas se cuentan con muy pocos estudios realizados, en las muestras de *P. varicosa* se encuentra presente el α -pinene un monoterpeno obtenido del aceite esencial de plantas aromáticas como *Rosemary* y *Vitex agnus-castus* L. cuya actividad antifúngica y antimicrobiana fue evaluada (Jiang *et al.*, 20011; Stojkovic *et al.*, 2011). L. Matsuo *et al.*, (2011) presentan el primer trabajo en el cual demuestran que el α -pinene aislado de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) induce una muerte celular y confiere protección antimetastásica en un melanoma maligno. La identificación de este compuesto en la fragancia de *P. varicosa* es el primer paso para iniciar una amplia investigación en torno a la fitoquímica de esta especie, la cual promete encontrar actividad biológica para ser utilizada en la medicina, aromaterapia, agricultura, etc.

El ipsdienol es el único compuesto que está presente en las dos especies de orquídeas, se encuentra en las muestras de *P. varicosa* de Chiapas, Oaxaca y Veracruz, así como en *P. karwinskii*; es un monoterpeno cuya actividad biológica sirve para atraer polinizadores, este compuesto se ha encontrado en orquídeas de los géneros *Gongora*, *Cirrhaea*, *Stanhopea*, *Huntleya*, *Notylia*, *Clowesia* y *Catasetum* con porcentajes del 20 al 90; cuyo polinizador abejas euglosinas macho son atraídos por este compuesto (Whitten *et al.*, 1988). En las muestras de *P. varicosa* de Chiapas y Oaxaca los porcentajes de este compuesto son del 25,04% y 29,11%,

Otro compuesto que presentan en común las muestras de *P. varicosa* de Chiapas, Veracruz y Puebla con porcentajes altos es el ipsenone del cual no se han encontrado

reportes que haya sido identificado en otros géneros de orquídeas. Este compuesto fue identificado por primera vez en el aceite esencial de *Lippia multifloral* (Lamaty *et al.*; 1990) con porcentajes de 3,0% y 12,5%, la infusión preparada con hojas de esta planta es utilizada en el Congo como una bebida refrescante, en Ghana se utiliza para el tratamiento de hipertensión arterial. Los porcentajes de este compuesto presente en la fragancia son de 7,52%, 8,55% y 18,21% (ver tabla 5), sería de suma importancia determinar si este compuesto también se encuentra presente en el aceite esencial.

El α -terpineol es un compuesto aromático usado en cosméticos, fragancias finas, champús, jabones de tocador y otros artículos, así como en limpiadores para el hogar y detergentes. Su uso en todo el mundo está en la región de 100-1000 toneladas métricas por año. El máximo nivel empleado en fórmulas para perfumes es del 5,7% (IFRA, 2004), en el 97,5% de las fórmulas empleadas para cosméticos se utilizó un 2,85% (IFRA, 2004) de este compuesto (Bhatia, *et al.*, 2008). Este compuesto se ha encontrado en las poblaciones de Oaxaca (3,85%) y Veracruz (0,32%). Sobre la actividad biológica de este compuesto se tienen muy pocos reportes; el potencial antioxidante y el efecto antiproliferativo en nueve líneas de células cancerosas del α -terpineol han sido evaluados. Los resultados obtenidos en el efecto antiproliferativo fomentan futuros estudios *in vivo* para el terpineol, ya que este monoterpeno presenta efecto citostático en contra de seis líneas celulares, especialmente para el adenocarcinoma de mama y la leucemia mieloide crónica, en un rango de 181-588 ml. (Bicas *et al.*, 2011).

Otro compuesto utilizado en la industria de la perfumería y cosmetología es el linalool, el cual se puede encontrar en las fragancias utilizadas en los cosméticos, fragancias finas, champús, jabones de tocador y otros artículos de tocador, así como en productos tales como limpiadores para el hogar y detergentes, su uso en todo el mundo es mayor a 1.000 toneladas métricas por año. El máximo nivel utilizado en perfumes de lujo es del 4,3% (IFRA, 1998), y el nivel utilizado en cosméticos es del 12,7% (IFRA, 1998), que daría lugar a una exposición máxima diaria en la piel de 0,32 mg / kg para los usuarios de gama alta de estos productos. (Letizia *et al.*, 2003). Este compuesto se encuentra en las poblaciones de Chiapas (8,15%) y Veracruz (6,79%).

3.5 Conclusiones

La fragancia de *Prosthechea varicosa* presenta diferencias cualitativas que se ven influenciadas por la ubicación geográfica de cada una de las poblaciones, a pesar que

las condiciones climatológicas son similares desarrollan diferentes compuestos. Se presentaron dieciséis compuestos comunes en las cuatro localidades: las poblaciones de Chiapas y Oaxaca presentan más compuestos en común, entre los cuales se encuentran los compuestos mayoritarios 2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene y el ipsdienol seguido del α -pinene.

La fragancia de *P. varicosa* está constituida principalmente por monoterpenos, dentro de los cuales el α -pinene, ipsdienol, ipsenone, α -terpineol presentan actividad antifúngica, antimicrobiana, anticancerígena dichos compuestos han sido identificados en aceites esenciales de plantas aromáticas, la presencia de ellos en la fragancia de la orquídea analizada abre un campo muy amplio de investigación en torno a la fitoquímica y determinar el uso potencial que esta pueda tener. La presencia de los monoterpenos α -terpineol y linalool le confieren a esta orquídea un uso potencial en la industria de la perfumería y cosmetología.

CAPÍTULO 4

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN LA FRAGANCIA FLORAL DE *Prosthechea karwinskii*

4.1 Introducción

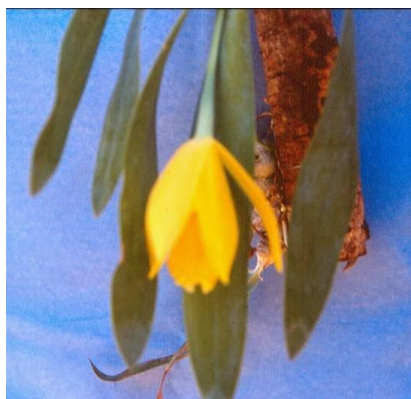


Fig. 24 Flores de *Prosthechea karwinskii*

Prosthechea karwinskii es una orquídea epífita endémica de México, crece en la Sierra Madre del Sur y el Eje Volcánico Transversal, en los estados de Michoacán, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Puebla y posiblemente Veracruz. Se establece en bosques de encino y pino-encino, relativamente secos pero ventilados, en sitios de topografía accidentada, de clima subhúmedo, con lluvias en verano, generalmente con una temperaturas media anual entre 14 y 18°C y una precipitación anual entre 650 y 1400 mm. Las plantas crecen exclusivamente sobre los encinos. Al igual que muchas otras orquídeas epífitas, esta especie tiene un periodo de crecimiento activo durante la temporada lluviosa de mayo a noviembre. La floración se presenta entre abril y junio.

Es una especie culturalmente importante en México, donde es una de las orquídeas más distintivas de la flora nacional, ha sido muy apreciada en horticultura, tanto en el país como en el extranjero, debido a la vistosidad, color y tamaño de sus flores y el aroma que emiten éstas. La fragancia de *P. karwinskii* es muy agradable y altamente estimada por las etnias de México establecidas en su área de distribución. Las flores producen un aroma cítrico que desaparece en la noche y es mucho más fuerte bajo luz solar directa.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Recolección y preparación de la muestra

El material vegetal se obtuvo en la Villa de Zaachila, ubicada en la región de los Valles Centrales de Oaxaca y a 17 km al sur de la capital de este estado, a una altura de 1,520 metros sobre el nivel del mar. La población católica de Zaachila usa las flores de *P. karwinskii* para adornar sus iglesias y calles durante la conmemoración de la Semana Santa, siendo esta una tradición que se remonta a varias décadas atrás (Solano et al., 2010). Se solicitó a los organizadores de los festejos el permiso de coleccionar ejemplares (abril de 2011) con flores en buen estado de *P. karwinskii*, los cuales fueron trasladados al laboratorio donde fueron preparados para los análisis posteriores.

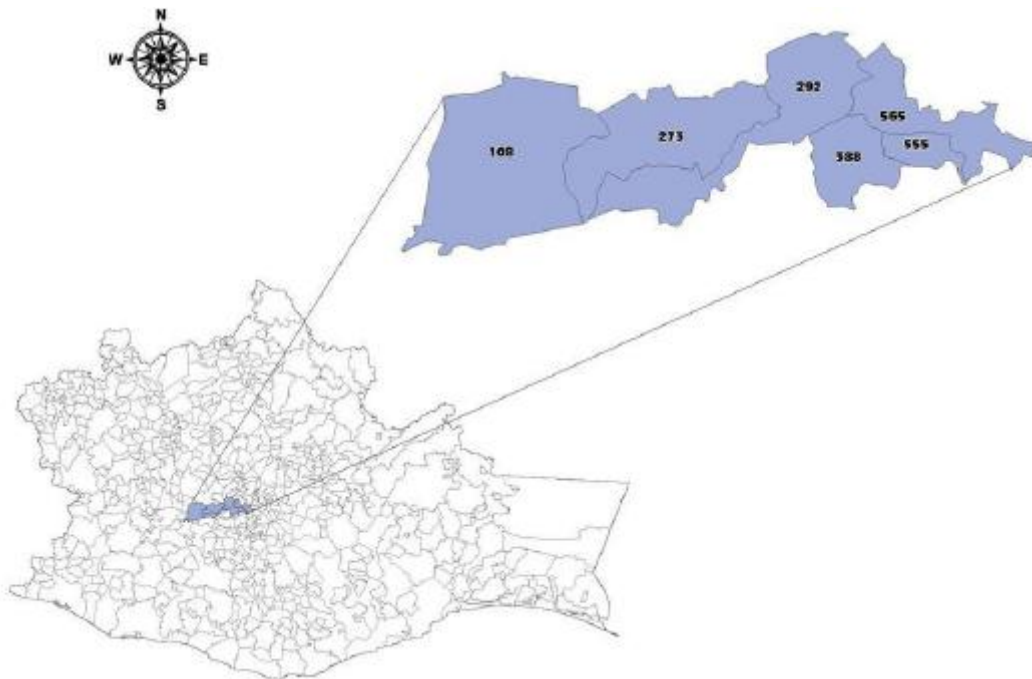


Fig. 25 Ubicación de la zona de estudio de *P. karwinskii*

De cada planta se colectaron flores frescas, completamente abiertas y sin haber sido polinizadas. Debido al tamaño de la flor para este análisis se tomó solo una, la cual fue partida en pequeños pedazos y depositados en un vial de vidrio con capacidad de 40 mL y septa de teflón de 22 mm, conteniendo 10 mL de agua desionizada y una pizca de NaCl; los viales con muestra fueron debidamente identificados y cerrados para mantenerlos en refrigeración a una temperatura de 4-5°C hasta su análisis (máximo una semana).

4.2.2 Extracción de compuestos volátiles

Para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó la técnica de headspace microextracción en fase sólida (HS-SPME). A las muestras contenidas en los viales se les realizó una pre-extracción durante 30 minutos. Después de concluida la etapa de pre-extracción, se procedió a exponer la fibra para SPME (DVB/CAR/PDMS 65 um marca SUPELCO) en el espacio de cabeza del vial para realizar la extracción de los compuestos, por un tiempo de 30 min y una temperatura de 30°C. Una vez transcurrido este tiempo, la fibra se retiró del vial que contenía la muestra y se llevó al puerto de inyección del equipo cromatográfico, para realizar la desorción de los compuestos y su respectivo análisis.

4.2.3 Análisis e identificación de compuestos volátiles

El análisis e identificación de los volátiles se llevó a cabo en un equipo GC/MS Perkin Elmer Clarus 500 (Shelton, CT, USA). Las muestras fueron analizadas utilizando una Columna AT-5ms (30m x 0.25mm, espesor de la película (fase estacionaria): 0.5 µm); con una temperatura en el inyector de 250°C en modo split/splitless por 2 min; el gas acarreador fue Helio UAP (99.9998 %) con un flujo de 1 ml/min. La programación de la temperatura al inicio fue de 40°C por 2 min con una rampa de 4°C/min hasta alcanzar la temperatura máxima de 250°C la cual se mantuvo durante 5.5 min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250°C, El analizador másico empleado tiene un scan de 35-400 uma con un tipo de ionización por impacto de electrones (IE) 70 eV

4.3 Resultados

En este apartado se muestran los compuestos volátiles obtenidos en las tres muestras analizadas de *P. karwinskii*, en las cuales se identificaron trece compuestos volátiles (Tabla 8). La fragancia de esta orquídea está constituida principalmente por monoterpenos los cuales le proporcionan la fragancia agradable que caracteriza a esta especie.

Tabla 8. Compuestos volátiles identificados en las muestras de *Prosthechea karwinskii*

				ZACH 1	ZACH 2	ZACH 3
	Compound	Grupo	Sub-grupo	% Area	% Area	% Area
1	Etanol	acido graso derivativo	Alcohol	5,3	24,13	3,87
2	Isobutanol	acido graso derivativo	Alcohol	0	0	
3	Styrene			11,70	1,74	0
4	Limonene	isoprenoide	monoterpeno	0,29	0,23	0,44
5	2-methoxyphenol			0,84	0	0
6	Linalool	isoprenoide	monoterpeno	7,86	2,86	1,42
7	2-phenylethanol (phenethyl alcohol)	Benzenoide	Alcohol	2,65	1,03	12,74
8	Ipsdienol	isoprenoide	monoterpeno	4,67	0,71	20,23
9	nerol oxido			32,04	16,27	9,68
10	Shisofuran			28,81	3,48	3,40
11	Nerol	isoprenoide	monoterpeno	0,45	46,91	39,16
12	geranyl formate	isoprenoide	monoterpeno	5,05	1,19	1,17
13	(E)-caryophyllene (b-caryophyllene)	isoprenoide	sesquiterpeno	0,35	1,44	7,90

ZACH= Zaachila

En la muestra ZACH 1 se presentan como compuestos mayoritarios el nerol oxido (32.04%), shisofuran (28.81%), styreno (11.70%) y el linalool (7.86%). En la muestra ZACH 2 los compuestos mayoritarios son nerol (46.91%), etanol (24.13%) y nerol oxido (16.27%). La muestra ZACH 3 tiene los siguientes compuestos mayoritarios nerol (39.16%), ipsdienol (20.23%), 2-phenylethanol (12.74%), nerol oxido (9.68%) y β -caryophyllene (7.90%).

Los trece compuestos se encuentran presentes en las tres muestras analizadas, la diferencia que existe es en el porcentaje de cada compuestos, el nerol oxido es un compuestos mayoritario que esta presente de manera común en las tres muestras, el nerol solo esta presente como compuesto mayoritario en la muestra ZACH 2 y ZACH 3, en la muestra ZACH 1 tiene un porcentaje menor al 1%.

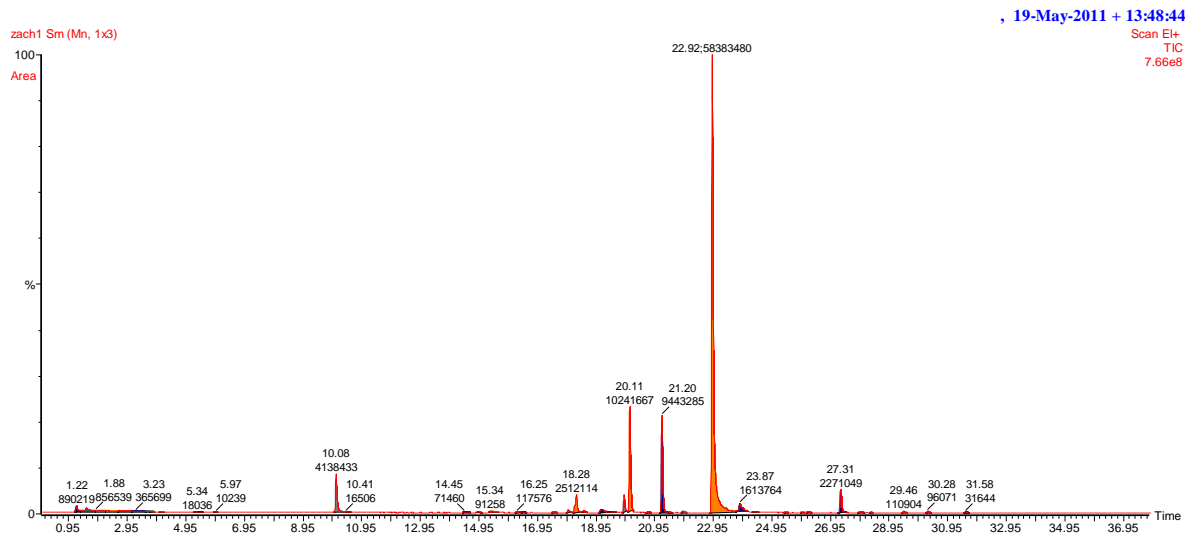


Fig. 26 Perfil cromatográfico de la muestra ZACH 1

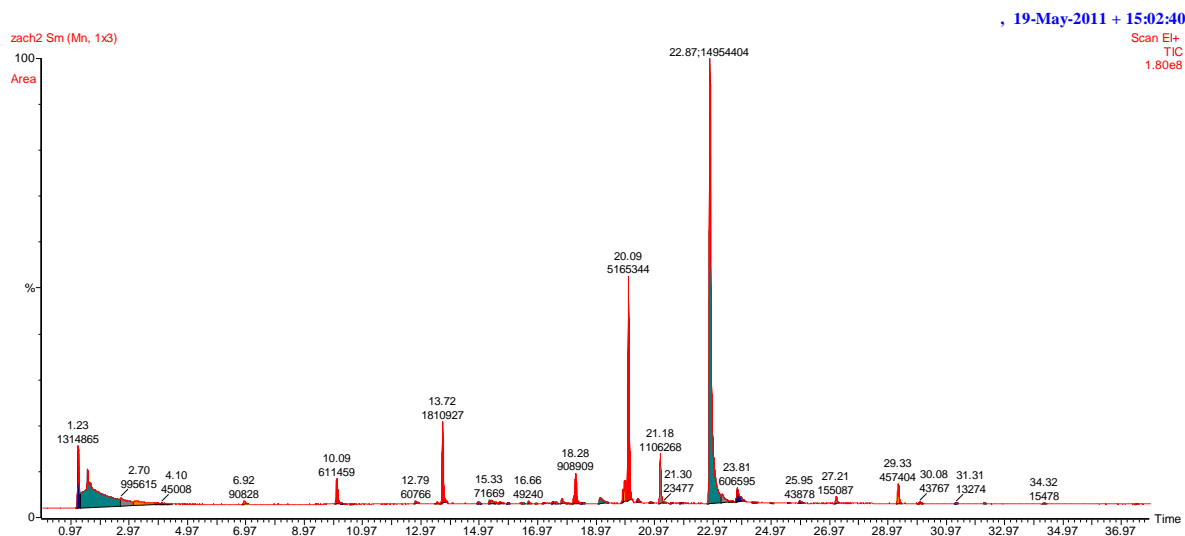


Fig. 27 Perfil cromatográfico de la muestra ZACH 2

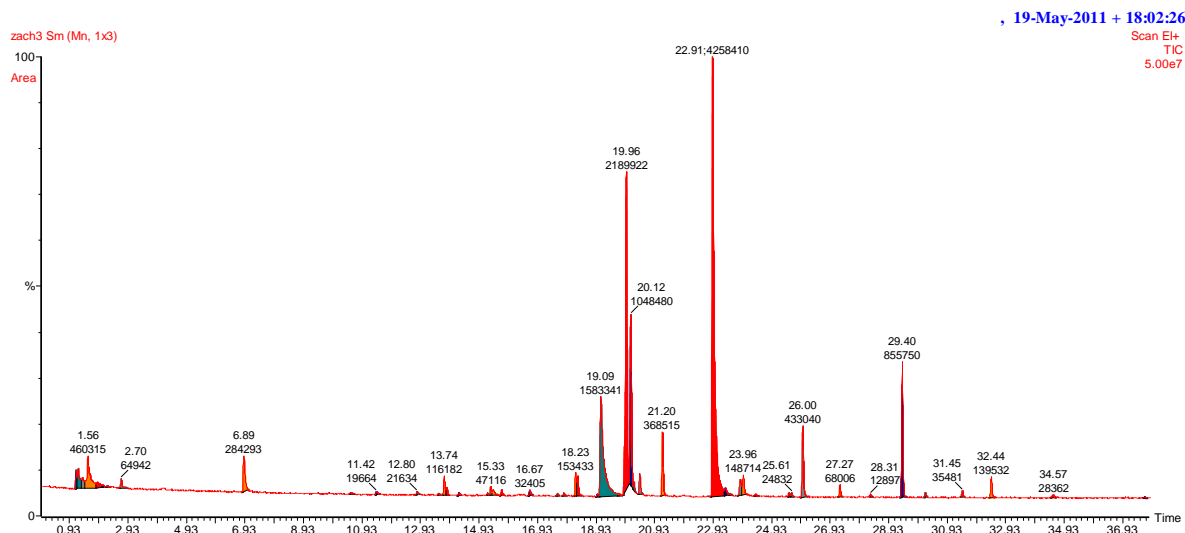


Fig. 28 Perfil cromatográfico de la muestra ZACH 3

4.4 Discusión

En la fragancia de *P. karwinskii* se identificaron compuestos como el limonene, linalool, 2-phenylethanol (phenethyl alcohol), ipsdienol, nerol; los cuales fueron reportados por Kaiser (1993) en la fragancia de *Encyclia citrina* una orquídea muy similar a *P. karwinskii*.

Los compuestos que presentan una actividad biológica son: el ipsdienol, el cual sirve para la atracción de insectos y también se encontró en la especie de *P. varicosa* cuyos porcentajes son 25,04% y 29,11%, en la muestra de *P. karwinskii* el porcentaje es del 20,23% por lo que futuras investigaciones podrían realizarse en torno a este punto y determinar si este compuesto es el responsable de atraer a los insectos polinizadores que en este caso serían abejas euglosinas.

El nerol es un compuesto muy empleado en la industria del perfume, su uso es de 100-1000 toneladas métricas por año con un porcentaje máximo de 1,12% en la formulación de perfumes (IFRA 2003) y un porcentaje de 2,19% en cosméticos (IFRA 2003) (Lapczynski *et al.*, 2008); este compuesto está presente en la fragancia de *P. karwinskii* con porcentajes del 46,91% y 39,16%. La presencia del linalool α -terpinol y nerol abren un campo de investigación para la utilización de *P. varicosa* y *P. karwinskii* en la industria de la perfumería y cosmetología. El linalool es otro compuesto que se encuentra de presente también en la fragancia de *P. varicosa*, este compuesto es empleado en la industria de la perfumería, por lo que la presencia de esos compuestos

podrían representar un campo muy grande de investigación en torno al potencial de esta orquídea para ser utilizada en perfumería o aromaterapia.

4.5 Conclusiones

La fragancia de *P. karwinskii* está constituida por trece compuestos, de los cuales se identifico que la mayoría son monoterpenos que presentan una actividad biológica, principalmente para ser utilizados en la industria de la perfumería, lo cual abre un campo muy amplio de investigación en torno a este punto. Además de que esta orquídea es empleada en la medicina tradicional en algunas regiones de Oaxaca, este trabajo representa la primer fase de la cual se derivarían una gran cantidad de investigación en torno a la fitoquímica de *P. karwinskii* así como un aporte para abrir nuevos campos de investigación en torno al potencial biológico que esta especie pueda llegar a desarrollar.