

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE, ANTIOXIDANTE Y
FITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL DE HOJAS DE
Cattleya warscewiczii sanderiana.**

EDITH CONSUELO MUÑOZ ORDOÑEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS (QCB)
POPAYÁN
2019**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE, ANTIOXIDANTE Y
FITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL DE HOJAS DE
*Cattleya warscewiczii sandariana***

EDITH CONSUELO MUÑOZ ORDOÑEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial
Para optar al título de Químico

Director

JUAN CARLOS ARGOTI BURBANO Ph.D.

Profesor departamento de Química

Asesor

FERNANDO HERNANDEZ BLANCO Ph.D.

Profesor departamento de Química

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS (QCB)
POPAYÁN
2019**

Nota de Aceptación

Director _____

Juan Carlos Argoti Burbano Ph.D

Jurado 1 _____

Paola Gómez Buitrago Ph.D

Jurado 2 _____

Jaime Martin Franco Ph.D

Popayán, 29 de Octubre de 2019

DEDICATORIA

A Dios por proveerme la vida para lograr alcanzar este logro. “Porque todas las cosas proceden de él y existen por él y para él. A él sea la gloria por siempre”. Rom 11:36.

A mi padre Marco Aurelio Muñoz, quien me enseñó antes de partir de este mundo el amor por la naturaleza y la sencillez del corazón. Gracias por su cultivo de orquídeas.

A mi madre Gloria Ordoñez, el mayor regalo de mi vida, por ser un apoyo incondicional en todo momento.

A Oveli Muñoz por su dedicación y cuidado a mí y a las orquídeas en el Valle del Cauca.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de Investigación de Química de productos Bioactivos QCB, por su acogida y colaboración para llevar a cabo el presente desarrollo experimental.

Al Doctor Juan Carlos Argoti Burbano, por su dirección en el presente trabajo de investigación.

A los doctores Fabio Antonio Cabezas, Fernando Hernandez por sus asesorías y enseñanzas en el desarrollo del trabajo investigativo.

Al profesor Emersón Rengifo por enseñarme el maravilloso mundo de la Química computacional.

A mis compañeros de laboratorio, Arley Jimenez, Yesica Zuñiga y Jorge Luis Parra por su compañía y colaboración en algunas pruebas experimentales.

Al grupo de investigación ASUBAGROIN de la Facultad de Ciencias agrarias de la Universidad del Cauca, por su colaboración en el desarrollo de la prueba de Rancimat.

Al grupo de investigación de la Universidad del Valle por el préstamo de las instalaciones, equipos y reactivos en el desarrollo de la prueba anticoagulante con veneno de serpiente.

A mis compañeros de carrera Lina Idrobo, Alejandra Sarasty, Diego Tulcan, Juan Carlos Ortiz, Lina Ortiz, Santiago Cordoba, Jhoana Marcela Samboní, por su grata compañía y apoyo a lo largo de la carrera.

A Frank Carmona por su constante apoyo, dedicación y acompañamiento en momentos de gran dificultad en mi vida.

A todos los profesores del Departamento de Química de la Universidad del Cauca que me formaron como persona y profesional.

CONTENIDO

ITEM	Pag
1. INTRODUCCIÓN	22
2. MARCO TEÓRICO	23
2.1 Principales características de las orquídeas	23
2.2 Clasificación botánica de la planta empleada en el desarrollo experimental	25
2.3 Distribución geográfica	25
2.4 Actividad antioxidante	28
2.5 Determinación de la actividad fitotóxica con <i>Allium cepa</i> .	36
2.6 Determinación de la actividad citotóxica- con <i>A. franciscana</i>	37
2.7 Determinación de la actividad anticoagulante frente al veneno de <i>Bothrops asper</i> .	38
3. ESTADO DEL ARTE	40-44
3.1 Tamizaje fitoquímico	40
3.2 Actividad antioxidante en la familia Orchidacea	40
3.3 Actividad fitotóxica	41
3.4 Actividad citotóxica	42
3.5 Identificación de fenoles en la familia Orchidacea	43
3.6 Cálculos de mecánica molecular en Orchidaceae	44
4. PROBLEMA CIENTIFICO	45
5. OBJETIVOS	46
5.1 Objetivo general	46
5.2 Objetivos específicos	
6. METODOLOGÍA	47-57
6.1 Materiales y Equipos	47
6.2 Recolección del material vegetal	48
6.3 Obtención de Extractos etanólicos totales	49
6.4 Tamizaje Fitoquimico.	49

6.5 Actividad Antioxidante	49
6.6 Determinación de la actividad fitotóxica con <i>Allium cepa</i> .	53
6.7 Determinación de la actividad citotóxica frente a <i>A. franciscana</i>	54
6.8 Determinación de la actividad anticoagulante frente al veneno de <i>Bothrops asper</i>	55
6.9 Aislamiento en identificación de compuestos fenólicos en <i>C.</i> <i>warscewiczii</i> .	56
6.10 Cálculos de mecánica molecular	57
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58-85
7.1 Obtención de material vegetal	58
7.2 Tamizaje fitoquímico	58
7.3 Actividad Antioxidante	59
7.4 Determinación de la actividad fitotóxica frente a <i>Allium cepa</i>	69
7.5 Determinación de la actividad citotóxica frente a <i>A. franciscana</i>	71
7.6 Determinación de la actividad anticoagulante frente al veneno de <i>Bothrops asper</i>	72
7.7 Caracterización de fenoles en <i>C. warscewiczii</i> por GC-MS	75
7.8 Cálculos teóricos de mecánica molecular	81
8. CONCLUSIONES	86-87
9. RECOMENDACIONES	88
10. BIBLIOGRAFÍA	89-99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flores de diferentes especies de la familia Orchidaceae. Arriba. Izquierda: *Cattleya warscewiczii* sanderiana. Centro: *Phalaenopsis*. Derecha: *Oncidium*. Abajo. Izquierda: *Cymbidium*. Centro: *Dendrobium*. Derecha: *Odontoglossum*.

Figura 2. Esquema del proceso de oxidación y reducción en un átomo.

Figura 3. Reacción general Radicalaria

Figura 4. Antioxidantes .Arriba: Izquierda, Ácido p-cumárico; Centro, Ácido protocatecúico; derecha, Ácido felúrico. Abajo: Izquierda, Butilhidroxianisol (BHA); derecha, Butilhidroxitolueno (BHT).

Figura 5. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.

Figura 6. Formación del radical ABTS y la reacción con antioxidantes.

Figura 7. Equipo de Rancimat. Izquierda: Diseño interno del equipo; Derecha: Equipo empleado en el desarrollo experimental.

Figura 8. Reacción de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Figura 9a. Reacción en la determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio, paso 1, Oxidación.

Figura 9b. Reacción en la determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio, paso 2, Nitrosilación.

Figura 9c. Reacción en la determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio-continuación, paso 3 formación del complejo colorido.

Figura 10. Estadios del ciclo de vida de la *A. franciscana*. Arriba: Izquierda: huevos; Centro: rotura de la membrana; Derecha: Estadio de gota (membrana de eclosión unida al corion). Abajo: Izquierda: nauplio; Centro: metanauplio 24-horas; Derecha: metanauplio 48-horas.

Figura 11. Especie *Bothrops asper*

Figura 12. Curva de DPPH, para la determinación del rango de concentraciones de la solución empleada en el desarrollo experimental.

Figura 13. Resultados de la actividad antioxidante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* por el método de DPPH.

Figura 14. Curva de calibración del ABTS para la determinación del rango de concentraciones de la solución empleada en el desarrollo experimental.

Figura 15. Resultados de actividad antioxidante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* por medio del ensayo de ABTS.

Figura 16. Resultados de curva de calibración de Ácido Gálico para el ensayo de Fenoles totales.

Figura 17. Resultados de la cuantificación de Fenóles totales en hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*

Figura 18. Resultados de la cuantificación de Fenóles totales en hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 19. Resultados de hojas, raíz y bulbos para *C. warscewiczii* en el ensayo de Rancimat.

Figura 20. Resultados de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* para el ensayo de *Allium cepa*.

Figura 21 Resultados del ensayo de A. franciscana para hojas, raíces y bulbos de *C. warscewiczii*

Figura 22. Resultados de actividad anticoagulante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii*

Figura 23 . Cromatograma del compuesto fenólico encontrado para hojas de *C.warscewiczii*.

Figura 24.a Espectro de masas para Agidol-2 en hojas de *C. warscewiczii*.

Figura 24.b Mecanismo de fragmentación del Agidol 2 :ión molecular y pico base.

Figura 24.c Mecanismo de fragmentación del Agidol 2 para $m/z = 91$

Figura 24.d Mecanismo de fragmentación del Agidol 2 para $m/z = 163$.

Figura 24.e Mecanismo de fragmentación del Agidol 2 para $m/z = 133$

Figura 24.f Mecanismo de fragmentación del Agidol 2 para $m/z = 15$ y 57

Figura 25. Resultado de la optimización de la estructura del Agidol-2 en el programa Gabedit 2.4.10.

Figura 26. Resultados de los cálculos de docking molecular entre Agidol 2 y Trombina. y aminoácidos de mayor interacción.

Figura 27. . Resultados de los cálculos de docking molecular entre Agidol 2 y Acetilcolinesterasa. y aminoácidos de mayor interacción.

Figura 28. . Resultados de los cálculos de docking molecular entre Agidol 2 y Monoaminoxidasa B. y aminoácidos de mayor interacción.

Figura 29. *Cattleya warscewiczii* Sanderiana. Tomado por Oveli Muñoz, Vereda el Progreso, Jamundí – Valle del Cauca. 2018

Figura 30. Resultados de Flavonoides (Izquierda) y Saponinas (Derecha) de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 31. Resultados de tamizaje fitoquímico para alcaloides: Arriba izquierda wagner, Derecha: Dragendorf. Abajo Mayer para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 32. Resultados de tamizaje fitoquímico para derivados antracenicos libres para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 33. Resultados de tamizaje fitoquímico para cardiotonicos- Lieberman-buckman para de hojas, raíz y bulbos de *C warscewiczii*.

Figura 34. Resultados de tamizaje fitoquímico para cardiotonicos Keller Killani para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 35. Resultados de tamizaje fitoquímico para cardiotonicos- Salkowasky para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 36. Resultados de tamizaje fitoquímico para cardiotonicos Baljet para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 37. Resultados de tamizaje fitoquímico para reacción de Salkowki para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*

Figura 38. Resultados de tamizaje fitoquímico para taninos para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*

Figura 39. Curva de Ácido Ascórbico en el ensayo del DPPH

Figura 40. Curva de α -tocoferol en el ensayo del DPPH

Figura 41. Curva de Trolox con DPPH

Figura 42. Hojas de *C.warcewiczii* en el ensayo de DPPH

Figura 43. Montaje experimental por triplicado para la determinación de la absorbancia a 515 nm de *C.warscewizii*-Hojas.

Figura 44. Raíz de *C.warcewiczii* en el ensayo de DPPH

Figura 45. Bulbos de *C.warcewiczii* en el enayo de DPPH

Figura 46. Resultados de variacion de absorbancia del romero en el enayo de DPPH

Figura 47. Equipo Uv- Vis Genesys 6 utilizado para las lecturas espectrofotométricas de los ensayos de DPPH, ABTS, Fenoles y Flavonoides totales.

Figura 48. Resultados de variacion de absorbancia para α tocoferol con ABTS.

Figura 49.Resultados de variacion de absorbancia de romero con ABTS

Figura 50.Resultados de variacion de absorbancia curva de Trolox con ABTS.

Figura 51. Resultados de variacion de absorbancia para el acido ascorbico con ABTS

Figura 52. Curva de EET de hojas de *C. warscewiczii* con ABTS.

Figura 53. Curva de *C. warscewiczii* -Raíz con ABTS

Figura 54. Curva de *C. warscewiczii* -Bulbos con ABTS.

Figura 55. Curva aceite de Coco a 110°C en el ensayo de Rancimat con tiempo de inducción 0.02h.

Figura 56. Soluciones de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* en el ensayo de Rancimat, con aceite de coco.

Figura 57. Montaje experimental en el desarrollo del ensayo con *Allium cepa*. Izquierda: Cebollas empleadas para el ensayo; Derecha: Cebollas en el ensayo.

Figura 58.Variación del porcentaje de crecimiento de hojas de *C. warscewiczii* en el ensayo de *Allium cepa*.

Figura 59.Variación del porcentaje de Crecimiento de raíz de *C. warscewiczii* en el ensayo de *Allium cepa*.

Figura 60. Variación del porcentaje de Crecimiento de bulbos de *C. warscewiczii* en el ensayo de *Allium cepa*.

Figura 61. Montaje experimetal en el ensayo de *A. franciscana*.

Figura 62. Respuesta de *Artemia salina* a EET de: arriba izquierda.hojas , arriba derecha .raíz Abajo. bulbos de *C. warcewiczii*.

Figura 63. cormatogrâma para raíz de *C. warscewiczii*.

Figura 64. Espectro de masas para Agidol 2, extraido de la raíz de *C.warscewiczii*.

Figura 65. Comparación entre espectro de masas experimental y de la base de datos NIST para raíz de *C.warscewiczii*.

Figura 66. cromatogrâma de Bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 67. Espectro de masas para el Agidol 2, extraido de bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 68.Comparación entre espectro de masas experimental y de la base de datos NIST para bulbos de *C.warscewiczii*.

Figura 69. Espectro teórico del Agidol-2, tomado de la base de datos NIST. Consultado en Agosto de 2019.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Cattleya warscewiczii* sanderiana.
- Tabla 2.** Especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN). (Ugartondo, 2009)
- Tabla 3.** Clasificación de radicales libres y sus principales características
- Tabla 4.** Clasificación de ensayos para determinar la capacidad antioxidante
- Tabla 5.** Reactivos empleados en el desarrollo experimental.
- Tabla 6.** Equipos empleados en el desarrollo experimental.
- Tabla 7.** Condiciones del equipo para análisis en GC-MS
- Tabla 8.** Resultados de tamizaje fitoquímico para hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.
- Tabla 9.** Resumen de resultados de la actividad antioxidante para hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*
- Tabla 10.** Correlación entre Fenoles totales y ensayos de DPPH y ABTS para hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii*
- Tabla 11.** Resultados experimentales obtenidos en el ensayo de Rancimat
- Tabla 12.** Resultados de la actividad anticoagulante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* frente al veneno de serpiente.
- Tabla 13.** Resultados de extracción y cuantificación del Agidol-2 en hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.
- Tabla 14.** Resultados de Energía obtenida del docking molecular para Agidol-2 y diversas proteínas.
- Tabla 15.** Resultados de absorbancia para la curva del DPPH.
- Tabla 16.** Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del ácido ascórbico frente al radical DPPH.
- Tabla 17.** Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del α -tocoferol frente al radical DPPH.
- Tabla 18.** Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del trolox frente al radical DPPH.
- Tabla 19.** Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición para las hojas de *C. warscewiczii*. frente al radical DPPH.

Tabla 20. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de la raíz de *C. warscewiczii* frente al radical DPPH.

Tabla 21. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de los bulbos de *C. warscewiczii* frente al DPPH.

Tabla 22. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del romero frente al radical DPPH.

Tabla 23. Resultados de absorbancia para la curva de ABTS

Tabla 24. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del α -tocoferol frente al radical ABTS.

Tabla 25. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del romero frente al radical ABTS.

Tabla 26. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del trolox frente al radical ABTS.

Tabla 27. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del ácido ascórbico frente al radical ABTS.

Tabla 28. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de las hojas de *C. warscewiczii* frente al radical ABTS.

Tabla 29. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de la raíz de *C. warscewiczii* frente al radical ABTS.

Tabla 30. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de los bulbos *C. warscewiczii* frente al radical ABTS.

Tabla 31. Resultados experimentales del ensayo de *Allium cepa* con hojas de *C. warscewiczii*.

Tabla 32. Resultados experimentales del ensayo de *Allium cepa* con raíz de *C. warscewiczii*.

Tabla 33. Resultados experimentales del ensayo de *Allium cepa* con bulbos de *C. warscewiczii*.

Tabla 34. Clasificación de toxicidad según CYTED

Tabla 35. Resultado experimental de *A. franciscana* para hojas de *C. warscewiczii*

Tabla 36. Resultado experimental de *A. franciscana* para raíz de *C. warscewiczii*

Tabla 37. Resultado experimental de *A. franciscana* para bulbos de *C. warscewiczii*

Tabla 38. Resultado experimental de fenoles totales con ácido gálico en el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Tabla 39. Valores de Energía mínima luego de la optimización de la geometría molecular de ligandos con el programa Gabedit.

LISTA DE ABREVIATURAS

A*	Radical derivado
A545	Linea celular empleada en ensayos de laboratorio
ABTS	Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfonico
AH	Antioxidante
Arg	Arginina
Asp	Asparagina
BEL-7402	Linea celular empleada en ensayos de laboratorio
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CL ₅₀	Concentración Letal al 50%
CPZ	Cloropromazina
CUPRAC	Capacidad de reducción antioxidante del Cobre
CYTED	Ciencia y tecnología para el desarrollo
DMPP	N,N-dimetil-p-fenilendiamina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EET	Extracto Etanólico Total
ERBr	Especies Reactivas de Bromo
ERCl	Especies Reactivas de Cloro
ERN	Especies reactivas de Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ET	Tranferencia de electrónes
F-C	Folin- Ciocalteu
FP	Factor de Protección
FRAP	Poder de reducción antioxidante del Hierro
g ES	Gramos de Extracto Seco
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a masas
Glu	Glutamina
HAT	Tranferencia de atomos de hidrógeno
His	Histidina

HL-60	Línea celular empleada en ensayos de laboratorio
HTPB	Polibutadieno terminado en hidroxilo
IUPAC	Unión internacional de Química Pura y Aplicada
K562	Línea celular empleada en ensayos de laboratorio
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Lys	Lisina
mg AG	Miligramos de Ácido Gálico
MCF-7	Línea celular empleada en ensayos de laboratorio
MDA-MB	Línea celular empleada en ensayos de laboratorio
ORAC	Capacidad de absorción del radical Oxígeno
PAL	Fenilalanina aminoliasa
PBS	Solución Buffer de Fosfato
Phe	Fenilalanina
QCB	Química de compuestos bioactivos
R*	Especie radical
RAW 264	Línea celular empleada en ensayos de laboratorio
RH	Especie más estable
RMS	Root-Mean-Square (Valor cuadrático medio)
SGC-7901	Línea celular empleada en ensayos de laboratorio
TFP	Trifluoroperazina
Ti	Tiempo de inducción
Tic	Tiempo de inducción con antioxidante
Tis	Tiempo de inducción sin antioxidante
TPC	Compuestos fenólicos totales

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de Tamizaje fitoquímico.

Anexo 2. Resultados de Actividad antioxidante frente al radical DPPH

Anexo 3. Resultados de la actividad antioxidante frente al radical ABTS

Anexo 4. Ensayo de Rancimat

Anexo 5 Ensayo de *Allium cepa*

Anexo 6. Resultados para ensayo con *A. franciscana*

Anexo 7. Calculos realizados para fenoles totales y flavonoides totales.

Anexo 8. Caracterización de compuestos fenólicos por GC-MS

Anexo 9. Mecánica molecular

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo el análisis de los posibles constituyentes del EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* sandariana perteneciente a la familia Orchidaceae a través del tamizaje fitoquímico. El estudio de la actividad antioxidante se llevó a cabo utilizando los métodos de DPPH, ABTS, Rancimat, complementado con la determinación cuantitativa de fenoles y flavonoides totales. También se estudió la actividad fitotóxica, con el ensayo de *Allium cepa*, la actividad citotóxica, por medio del ensayo con *Artemia. franciscana*, la actividad anticoagulante de los extractos etanólicos frente a la coagulación del plasma sanguíneo con veneno de la serpiente *Bothrops asper*, se realizó la identificación cromatográfica para fenoles, empleando la técnica de GC-MS y cálculos teóricos de mecánica molecular (docking molecular) para predecir las posibles dianas terapéuticas donde puedan ser empleados estos compuestos.

En los ensayos de tamizaje fitoquímico se identificó la presencia de alcaloides, flavonoides, triterpenos y/o esteroides y cardiotónicos en los EET de *C. warscewiczii*. En el ensayo frente al radical DPPH se encontró un valor de IC₅₀ de 117.44 ± 4.72 ppm; 151.04 ± 6.20 ppm y 253.94 ± 6.45 ppm para los EET de raíz, bulbos y hojas respectivamente. De modo similar en el ensayo de actividad antioxidante frente al radical ABTS se obtuvo un valor de IC₅₀ = 1124.28 ± 15 ppm para bulbos, IC₅₀ = 1212.75 ± 124.74 ppm para raíz y IC₅₀ = 2091.0 ± 6808 ppm para hojas. El contenido fenólico por medio del ensayo de Folin-Ciocalteu indicó 1730.95 ± 2.75 mg AG/g ES, para el EET de la raíz de *C. warscewiczii*, seguido de los bulbos con 1478.57 ± 12.60 mg AG/g ES y las hojas con 1216.17 ± 15.31 mg AG/g ES, con el mismo comportamiento en el ensayo para flavonoides con 1947.78 ± 48.47 mg Q/g ES en raíz, 1678.68 ± 64.12 mg Q/g ES en los bulbos y 1666.52 ± 60.56 mg Q/g ES en las hojas.

En el ensayo de Rancimat hubo un factor de protección mayor para los EET de hojas y bulbos de *C. warscewiczii* y no se presentó ninguna variación en el caso del EET de la raíz respecto al aceite de coco virgen empleado. En el ensayo de fototóxicidad con *Allium cepa* se obtuvo un IC₅₀ = 188.08 ± 5.24; 217.43 ± 7.10 y 267.24 ± 5.91 ppm respectivamente para raíz, hojas y bulbos de la especie estudiada. Así mismo para el ensayo de citotóxico

con *A. franciscana* dió valores de CL₅₀ de 85.27 ± 22 ppm en raíz, 211.37±26.46 ppm para bulbos y 344.17 ± 21.48 ppm en hojas.

En el caso de la actividad anticoagulante de los EET de raíz y bulbos de *C. warscewiczii* fué mayor que la presentada por las hojas a una concentración de 1000 ppm, respecto al veneno de *B.asper*. A nivel espectral se logró la identificación del compuesto Agidol 2 con l técnic de GC-MS, presente en hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* y se observó una buena interacción de éste con las proteínas Acetilcolinesterasa, Protombina y Monoaminoxidasa B.

Palabras clave: *Cattleya warscewiczii* sandariana, Orchidaceae, Antioxidantes, Citotoxicidad, DPPH, ABTS, *Bothops asper*. Docking molecular.

ABSTRACT

In the present work of investigation was carried out the analysis of the possible constituents of the EET of root leaves and bulbs of *C. warscewiczii* sanderiana belonging to the family Orchidaceae through phytochemical screening. The study of the antioxidant activity by the methods of DPPH, ABTS, Rancimat, complemented with the quantitative determination of phenols and total flavonoids. The phytotoxic activity was also studied, with the *A. cepa* assay, the cytotoxic activity, by means of the *A. franciscana* test, the anticoagulant activity of the ethanolic extracts against the coagulation of the blood plasma with snake venom *B. asper*, was carried out the chromatographic identification for phenols, using the GC-MS technique and the subsequent theoretical calculations of molecular mechanics (molecular docking) to predict the possible therapeutic targets where these compounds can be used.

Among the most relevant results in phytochemical screening, the presence of alkaloids, flavonoids, triterpenes and / or stereotypes and cardiotonics was identified in TSEs of *C.warscewiczii*. In the assay against the DPPH radical, an IC_{50} value of 117.44 ± 4.72 ppm was found; 151.04 ± 6.20 ppm and 253.94 ± 6.45 ppm for root test, bulbs and leaves respectively. Similarly, in the assay of antioxidant activity against the ABTS radical, an IC_{50} value = 1128.28 ± 15 ppm was obtained for bulbs, $IC_{50} = 1212.75 \pm 124.74$ ppm for root and $IC_{50} = 2091.0 \pm 6808$ ppm for leaves. The phenolic content by means of the Folin-Ciocalteu test indicated 1730.95 ± 2.75 mg AG / g ES, for the EET of the root of *C.warscewiczii*, followed by the bulbs with 1478.57 ± 12.60 mg AG / g ES and the leaves with 1216.17 ± 15.31 mg AG / g ES, with the same behavior in the test for flavonoids with 1947.78 ± 48.47 mg Q / g ES in root, 1678.68 ± 64.12 mg Q / g ES in the bulbs and 1666.52 ± 60.56 mg Q / g ES in leaves.

In the Rancimat test, there was a higher protection factor for the EET of leaves and bulbs of *C. warscewiczii* and there was no variation in the case of the EET of the root with respect to the virgin coconut oil used. In the phototoxicity test with *A. cepa* an $IC_{50} = 188.08 \pm 5.24$ was obtained; 217.43 ± 7.10 and 267.24 ± 5.91 ppm respectively for root, leaves and bulbs of the species studied. Likewise, for the cytotoxic assay with *A.franciscana*, it gave CL_{50} values of 85.27 ± 22 ppm in the root, 211.37 ± 26.46 ppm for bulbs and 344.17 ± 21.48 ppm in leaves.

In the case of the anticoagulant activity of the EET of root and bulbs of *C.warscewiczii*, it was greater than that presented by the leaves at a concentration of 1000 ppm, with respect to the *B.asper* venom. At the spectral level, the identification of the compound Agidol 2 with the tecnic GC-MS, present in leaves, root and bulbs of *C. warscewiczii* was achieved and a good interaction of this was observed with the proteins Acetylcholinesterase, Protombine and Monoaminoxidase B.

Key words: *Cattleya warscewiczii* sanderiana, Orchidaceae, Antioxidants, Cytotoxicity, DPPH, ABTS, Bothops asper.

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el uso de plantas con propiedades medicinales ha generado un notable interés por el estudio de la actividad biológica de múltiples especies vegetales en todo el mundo, con el fin de encontrar nuevas alternativas que logren contrarrestar o eliminar de forma permanente los efectos causados por diversas enfermedades o que mejoren un problema específico que afecte a una población determinada. Debido a la diversidad de plantas existentes en la flora terrestre, el análisis de una sola especie puede extenderse incluso a varios años, para lograr identificar y caracterizar aquellos metabolitos secundarios responsables de su actividad biológica.

En las últimas décadas por ejemplo se han presentado importantes estudios de propiedades curativas de diversas especies de la familia *Orchidaceae*. En Colombia existe una gran variedad de orquídeas y la mayor parte de ellas se concentra en la región Andina, seguida de la región Pacífica, Amazónica y Caribe. (Minambiente. Colombia. 2015)

Tradicionalmente las orquídeas se han empleado con fines ornamentales en la decoración de espacios abiertos, debido al llamativo color de sus flores y a sus agradables aromas. , también han sido empleadas en rituales y ceremonias para atraer la felicidad, y en el campo medicinal en general los fito-constituyentes obtenidos de las orquídeas han mostrado potencial como anti-reumático, anti-inflamatorio, anti-cancerígeno, anti-convulsivo, neuroprotector, anti-tumoral, anti-viral y con propiedades de anti-envejecimiento. Por ejemplo la *Ansellia. africana* tiene una potente actividad anti-acetilcolinesterasa y se puede usar como una fuente importante de diversas biomoléculas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o también la actividad antimicrobiana de *B. cattleya* contra cepas sensibles a los antibióticos. (Chinzamy, M ., Finiie, J., Van Staden, J, 2013) Motivo por el cual se esperaría que la especie *Cattleya warscewiczii* sanderiana también presente propiedades biológicas de interés en el campo medicinal.

2. MARCO TEÓRICO

Las plantas con propiedades medicinales han sido ampliamente estudiadas a lo largo de la historia, utilizándose en forma de infusiones, cataplasmas e incluso llegando hasta el aislamiento, identificación y aplicación de los metabolitos encontrados.

Algunas especies han sido poco estudiadas ya que su mayor atractivo se ha concentrado principalmente en el uso ornamental, éste es el caso de las Orquídeas, las cuales presentan características físicas muy llamativas, pero que también tienen propiedades medicinales importantes.

2.1 Principales características de las orquídeas

Las orquídeas son plantas monocotiledóneas, es decir, no generan tejido leñoso, tienen crecimiento herbáceo, poseen raíces aéreas, sus estructuras florales vienen en números de tres y tienen una venación paralela en sus hojas. (Ibarra, J., Rincón, C., Rincón, A., Cely, N. y Rojas, 2018) Según el lugar donde crecen las orquídeas se pueden clasificar en: Epífita (crecen sobre los árboles, pero no son parásitas), Litófitas (crecen en o sobre las rocas) y terrestres, (crecen donde hay acumulación de material orgánico) (Duarte, D., Gómez, S., Monsalve, H., Medina, G., Montenegro, Olga., Mendez, 2015) Las Flores de las orquídeas son en su mayoría hermafroditas (ambos sexos en la misma flor), zigomorfas (con un solo plano de simetría), y trímeras (al tener tres sépalos y tres pétalos). En el caso de los tallos, estos pueden ser delgados, cilíndricos, redondos o engrosados como los pseudobulbos. Las hojas pueden brotar desde la base del tallo, desde su parte apical o por todo el tallo, las raíces, pueden ser tuberosas o carnosas y presentan una capa blanquecina llamada velamen, que protege la epidermis y cuya función es absorber la humedad del ambiente e impedir la pérdida de agua. Después del velamen, en la capa del cortex de la raíz, pueden encontrarse hongos micorrízicos, que les aportan a las orquídeas diferentes nutrientes para crecer. (Ibarra, J., Rincón, C., Rincón, A., Cely, N. y Rojas, 2018). Algunos ejemplares de la familia orchidaceae se presentan en la figura 1, donde se pueden notar la características mencionadas con anterioridad.

Por otro lado, en el presente desarrollo experimental se evaluó la actividad biológica de la *Cattleya warscewiczii* sanderiana, esta especie de orquídea se caracteriza por su exuberante color púrpura en la flor el cual es más intenso en los pétalos centrales y va acompañado de una ligera mancha amarilla central, dicho color púrpura se vuelve más tenue en la parte externa de la flor. Las hojas de esta especie son alargadas, verdes y ricas en agua. Contienen bulbos que también son de color verde con unas pequeñas grietas verticales y son de aproximadamente 10 cm. La parte de la raíz es de color blanco y normalmente se encuentra muy bien arraigada al lugar donde está sembrada, tal como se puede observar en la primer imagen de la figura 1.

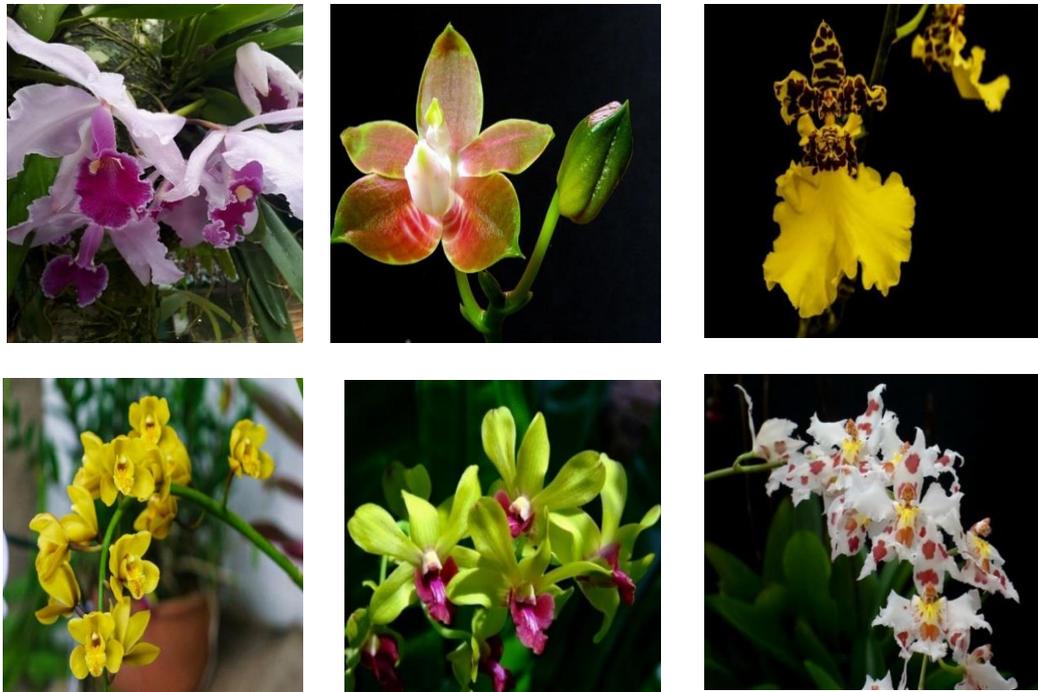


Figura 1. Flores de diferentes especies de la familia Orchidaceae. Arriba. Izquierda: *Cattleya warscewiczii* sanderiana. Centro: *Phalaenopsis*. Derecha: *Oncidium*. Abajo. Izquierda: *Cymbidium*. Centro: *Dendrobium*. Derecha: *Odontoglossum*.

2.2 Clasificación botánica de la planta empleada en el desarrollo experimental

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de la planta estudiada en el presente trabajo de investigación.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Cattleya warscewiczii* sanderiana.

Característica	Clasificación
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Epidendreae
Genero	Cattleya
Especie	warscewiczii sanderiana

2.3 Distribución geográfica

Respecto a la distribución geográfica, se considera que la familia Orchidaceae es probablemente la más amplia de las plantas con flor y se estima que existen hace 60 millones de años. (Ruíz, N., Vilcapoma, 2010) La diversidad y ecología de la familia Orchidaceae en Colombia se ve favorecida por la multiplicidad de ecosistemas, actualmente existen 4.010 especies, agrupadas en 260 géneros, concentrados en la región Andina (87,2%), Pacífica y Amazónica (10,6%) y las regiones del Caribe y la Orinoquia que presentan valores más bajos en términos de riqueza y abundancia (5% y 4%, respectivamente). (Palacios, 2014)

2.4 Actividad antioxidante

Dentro de la parte experimental desarrollada se determinó la capacidad antioxidante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* por lo cual es importante conocer o recordar algunos conceptos teóricos empleados a lo largo del documento.

2.4.1 Oxidación: La oxidación de un compuesto es la pérdida de electrones como aparece en la parte izquierda de la figura 2, la pérdida de átomos de hidrógenos o la ganancia de oxígeno.

2.4.2 Reducción: Es la ganancia de electrones como se ilustra en la figura 2, de hidrógenos o la pérdida de oxígeno. En tal sentido, un agente oxidante es una molécula que se reduce al reaccionar con la molécula a la cual oxida. Este par óxido-reductor es necesario químicamente y esencial para entender la biología de las óxido-reducciones en el organismo (Hossain, 2011).

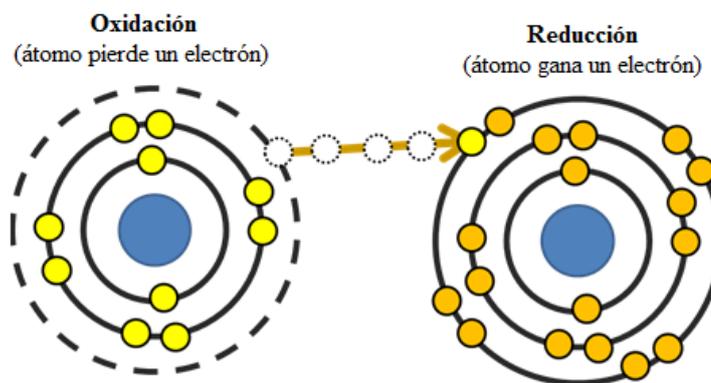


Figura 2. Proceso de oxidación y reducción.

2.4.3 Radicales libres: Los radicales libres son especies químicas que contienen en su última orbita uno o más electrones desapareados, los cuales le otorgan a estas un carácter paramagnético haciéndolas muy inestables y altamente reactivas con capacidad para combinarse inespecíficamente, con las diferentes moléculas que integran la estructura celular y los derivados de estas, y con la capacidad de atacar cualquier tipo de biomolécula. (Corrales, L., Muñoz, 2012)

En los sistemas vivos se generan varios tipos de radicales como los mencionados en la tabla 2, siendo los más conocidos, los de oxígeno. Se emplea el termino Especies

Reactivas de Oxígeno (ERO) para referirse a las especies radicalarias derivadas del oxígeno, junto con las especies que no son radicales y que son agentes oxidantes fácilmente convertibles en radicales. De forma análoga existen especies reactivas de Nitrógeno (ERN), de cloro (ERCl) y bromo (ERBr). En la siguiente tabla se presentan las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN). (Ugartondo, 2009)

	ERO	Símbolo	ERN	Símbolo
Radicales	Anión superóxido	$O_2^{\circ-}$	Óxido nítrico	NO°
	Hidróxido	OH°	Dióxido de nitrógeno	NO_2°
	Alcóxido	RO°		
	Peróxido	ROO°		
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Peroxinitrito	$ONOO$
	Ácido hipocloroso	$HClO$	Ácido nitroso	HNO_2
	Ozono	O_3	Catión nitrosilo	NO^+
	Oxígeno singulete	1O_2	Anión nitroxilo	NO^-
			Peroxinitritos alquilo	$ROONO$

2.4.4 Antioxidantes: Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, los cuales al ser átomos o grupos de átomos con un electrón desapareado, son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. (Bustamante, 2015)

Un antioxidante con función biológica se define como aquella sustancia que está presente en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable que disminuye o evita la oxidación del sustrato. En bioquímica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción. (Hicks, J., Torres, Y., Sierra, 2006) ejerciendo de esta manera una actividad antirradicalaria al donar electrones o hidrógenos a la especie radical y formar una especie derivada del radical la cual es más estable. En la figura 3, se presenta el esquema general para una reacción radicalaria, donde el antioxidante (AH) al reaccionar con la especie radical (R^*) genera una nueva especie de mayor estabilidad (RH) junto a un radical derivado (A^*).

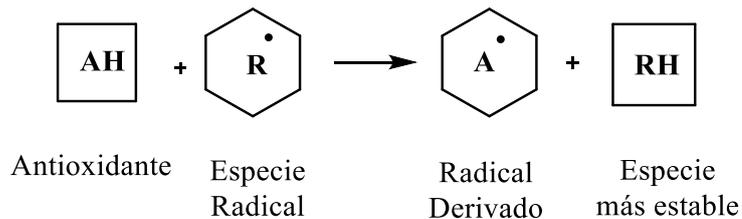


Figura 3. Reacción general Radicalaria

Por ejemplo el bambú presenta compuestos antioxidantes como los ácidos *p*-cumárico, 3,4-dihidroxibenzoico y felúrico cuyas estructuras se pueden observar en la figura 4.(Nirmala, C., Bisht, M., Bajwa, H., Santosh, 2018) es decir, son antioxidantes naturales, en cambio el BHA (Butilhidroxianisol) y el BHT (butilhidroxitolueno) se consideran antioxidantes sintéticos comúnmente hallados en los alimentos.(Salvador, A.,Ferreira, 2014).

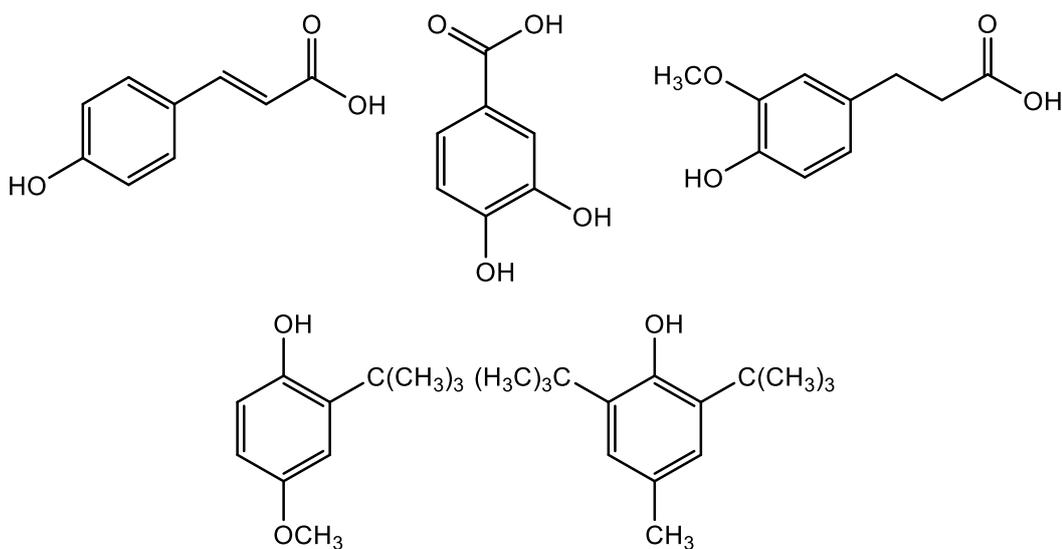


Figura 4. Antioxidantes .Arriba: Izquierda, Ácido *p*-cumárico; Centro, Ácido 3,4-dihidroxibenzoico; derecha, Ácido felúrico.Abajo: Izquierda, Butilhidroxianisol (BHA); derecha, Butilhidroxitolueno (BHT).

2.4.5 Clasificación de los Antioxidantes:

Los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios y terciarios como se puede apreciar en la siguiente tabla:(Tovar, 2013).

Tabla 3. Clasificación de radicales libres y sus principales características.

Radical	Características
Primarios	Los llamados antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas ERO. Esto se consigue convirtiendo las ERO en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas.
Secundarios	Los antioxidantes secundarios capturan los radicales y evitan las reacciones en cadena. Ejemplos de ellos son la vitamina E y C, β -caroteno y sustancias endógenas con capacidad antioxidante, entre las cuales se encuentran glutatión urato, bilirrubina y ubiquinona.
Terciarios	Los antioxidantes terciarios son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas endonucleasa apurínica/apirimidínica y polimerasa β , reparadoras del ADN y la metionína sulfóxido reductasa.

2.4.6 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, que pueden ser *in vitro* o *in vivo*. En el caso de los métodos *in vitro*, se busca determinar la actividad antioxidante del compuesto, mezcla o alimento de interés frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical. Se considera que la pérdida de color es proporcional a la concentración. Es importante resaltar que las determinaciones *in vitro*, tan solo nos dan una idea aproximada de lo que puede ocurrir en sistemas mas complejos *in vivo*.

En una mezcla por ejemplo la capacidad antioxidante depende de la suma de las capacidades antioxidantes individuales de cada compuesto presente por lo cual no existe un método universal para la determinación de dicha actividad, también depende del microambiente donde se encuentra el compuesto puesto que se pueden generar

interacciones sinérgicas o inhibitorias (Kuskoski,E.,Asuero,A.,Troncoso,A., Mancini-Filho & Fett, 2005).

Como se observa en la tabla 4, los ensayos de capacidad antioxidante se pueden clasificar en ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y los ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET).

Tabla 4. Clasificación de ensayos para determinar la capacidad antioxidante.

Ensayo	Categoría
Acido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS ⁺ *) (ET/HAT)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*) (ET/HAT)	
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC).	Ensayo basado en la transferencia de átomos de Hidrógeno (HAT)
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)	
Inhibición de la oxidación de ácido linoleico	
Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)	

Los ensayos de tipo ET involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. Por su parte, la mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de la muestra.(Huang, D., Ou, B. Prior, 2005)

A continuación se describen algunos de los métodos para la determinación de la actividad antioxidante desarrollados en el presente trabajo de investigación:, cabe mencionar que algunos métodos ampliamente utilizados como el ABTS y DPPH están fundamentados

en la estabilización de radicales libres sintéticos, metaestables, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente. Sin embargo, se ha mostrado que estos radicales pueden ser estabilizados tanto por mecanismos TAH como TE, por lo cual los patrones de reactividad y el mecanismo son difíciles de interpretar cuando no se conoce la estructura química del antioxidante evaluado. (Londoño, J.2012).

2.4.7 Método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este ensayo fue propuesto originalmente por Brand–Williams. El DPPH* es uno de los pocos radicales orgánicos estable el cual presenta una fuerte coloración violeta. El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH*, esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 515 nm. La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo de TE, con un aporte marginal de TAH.

Los resultados se suelen expresar como IC₅₀, es decir, la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del radical DPPH* inicial. (Londoño, J.2012).

Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes (Tovar, 2013).

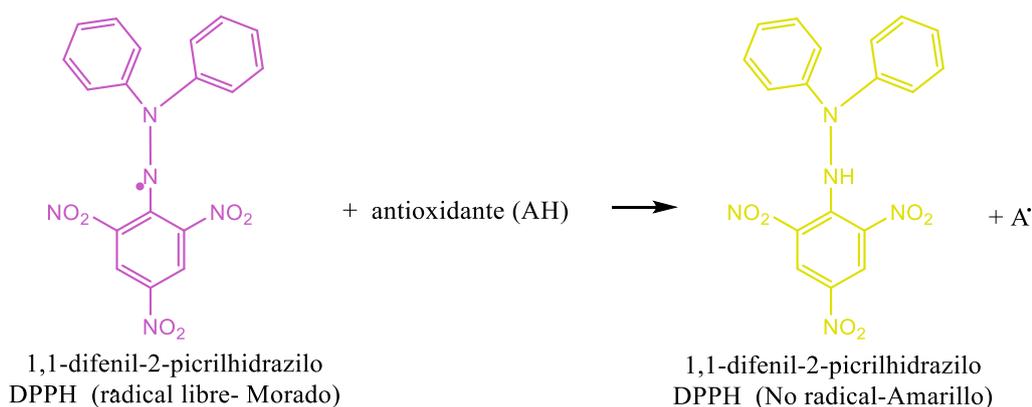


Figura 5. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.

2.4.8 Ensayo ABTS^{•+} (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfonico)

En el ensayo del ABTS, inicialmente se lleva a cabo la producción directa del cromóforo ABTS^{•+} de color verde-azul a través de la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS, de esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS^{•+} está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones (Tovar, 2013). La figura 6 muestra el mecanismo en la generación del radical ABTS y su reacción con los antioxidantes.

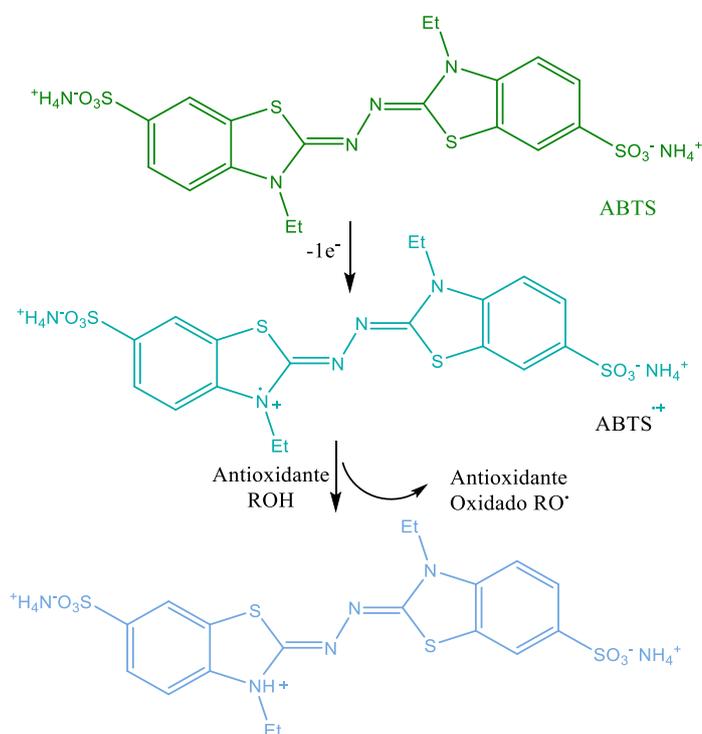


Figura 6. Formación del radical ABTS y la reacción con antioxidantes.

2.4.9 Método de Rancimat

Esta prueba evalúa el grado en el que un aceite se oxida cuando pasa una corriente de aire a través de él. El ácido fórmico que es obtenido como producto, es conducido hacia 60 mL de agua destilada que se encuentran en una celda plástica. El instrumento monitorea en forma continua la conductividad eléctrica del agua y en el momento en que dicha conductividad aumenta de forma aguda será el final de la prueba y el equipo se detiene y genera el reporte de resultados. En éste método se determina la **estabilidad oxidativa** de un aceite la cual se define como: El tiempo en horas necesario para que la reacción de oxidación alcance el punto de inflexión en la representación gráfica de la conductividad Vs. Tiempo.

La figura 7 muestra las principales partes del equipo Rancimat al igual que el modelo empleado en el presente trabajo de investigación.

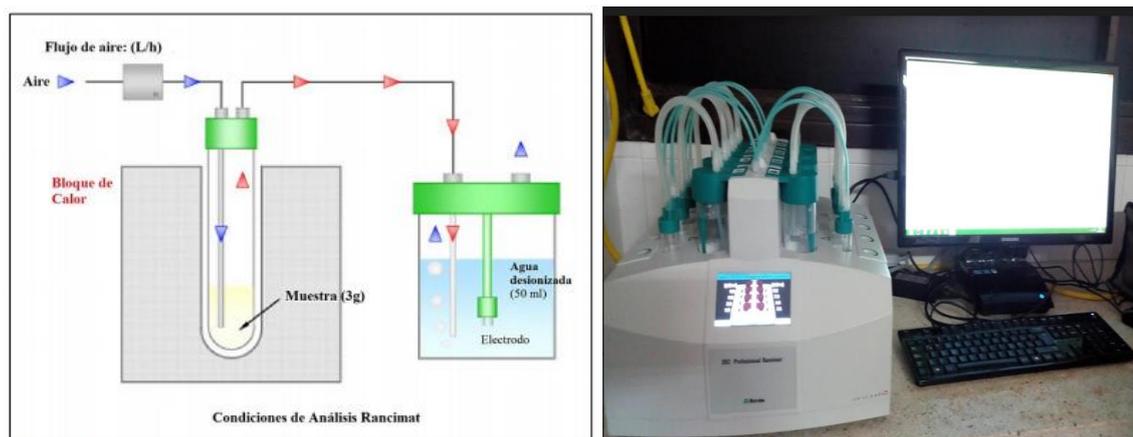


Figura 7. Equipo de Rancimat. Izquierda: Diseño interno del equipo; Derecha: Equipo empleado en el desarrollo experimental.

2.4.10 Determinación del contenido total de fenoles

Teniendo en cuenta que se considera existe una estrecha relación entre la actividad antioxidante de un compuesto o una mezcla de ellos y el contenido de fenoles presente, se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C). Este es un ensayo complementario a los mencionados anteriormente ya que valora únicamente los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos (Aramburu, 2001).

El ensayo espectrofotométrico fué desarrollado por Folin-Ciocalteu y es utilizado para determinar los compuestos fenólicos totales (TPC: compuestos fenólicos totales) de una muestra determinada. Se fundamenta en una reacción de oxidación / reducción que utiliza el reactivo de Folin, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que a través de la oxidación de los fenoles, es reducida a óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), respectivamente. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo F-C bajo condiciones alcalinas (ajustadas por la solución de carbonato de sodio a $pH > 10$). La disociación del protón fenólico permite la formación del ión fenolato, el cual es capaz de reducir el reactivo F-C, lo que apoya la idea de que la reacción ocurre a través del mecanismo de transferencia de electrones. (Valenzuela, P. 2015)

La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una λ de 765 nm, siendo la intensidad de absorción de luz a esa longitud de onda proporcional a la concentración de fenoles. El ácido gálico es usualmente utilizado como estándar para producir la curva de calibración. El contenido fenólico total se expresa en miligramos equivalentes de ácido gálico (mAG) sobre gramos de extracto seco (gES). (Amaya, L., Portillo, 2013).

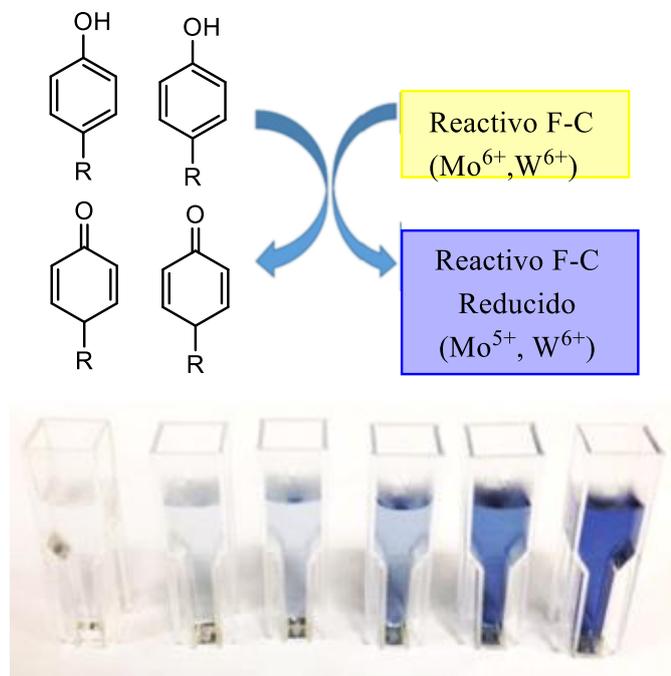


Figura 8. Reacción de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

2.4.11 Determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio

Al igual que el ensayo de Folin-Ciocalteu, este ensayo es complementario a las pruebas de actividad antioxidante previamente realizadas pero se enfoca en el contenido de flavonoides en la muestra, ya que son moléculas que se considera también están estrechamente relacionadas con la actividad antioxidante.

El principio de este método se basa en la reacción de los iones de aluminio con los flavonoides en medio alcalino formando un complejo color rojizo que al medir la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm es posible determinar la concentración de flavonoides totales. En la primera etapa de la reacción que se observa en la figura 9a, los grupos hidroxilo del anillo B en las posiciones C_{2'} y C_{3'}, en presencia de NaNO₂ sufren una oxidación convirtiéndose en carbonilos. Como producto de reacción se genera HNO₂ el cual en la segunda etapa indicada en la figura 9b, en presencia de AlCl₃ promueve una nitrosilación del anillo B en C_{5'}. Adicionalmente, el aluminio se enlaza con el oxígeno en C_{4'} y se coordina con el grupo carbonilo del C_{3'} como se manifiesta en la figura 9c. En esta etapa la muestra adquiere un color amarillo. Finalmente con la adición de NaOH se reduce el oxígeno del grupo nitrosilo y la muestra adquiere el color rojo característico de esta prueba (Cruz, J. 2012) que busca también evitar la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. (Amaya, L., Portillo, 2013)

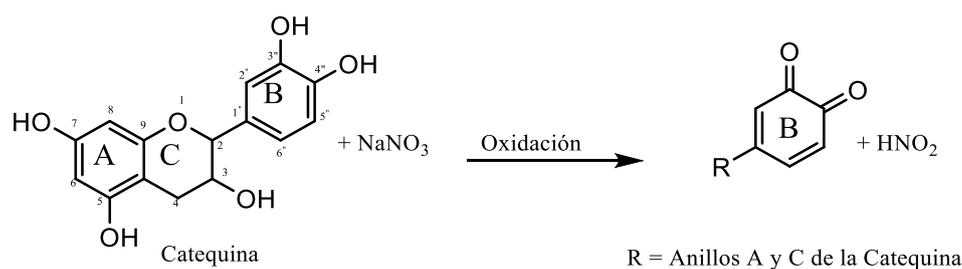


Figura 9a. Reacción en la determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio, paso 1, Oxidación.

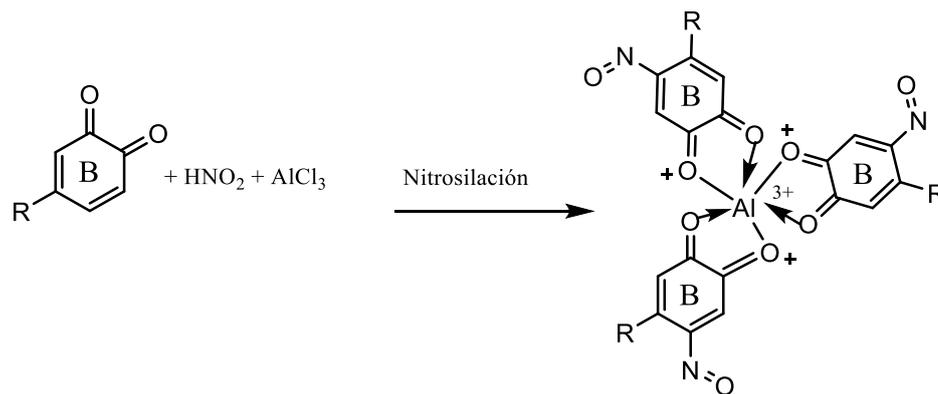


Figura 9b. Reacción en la determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio, paso 2, Nitrosilación.

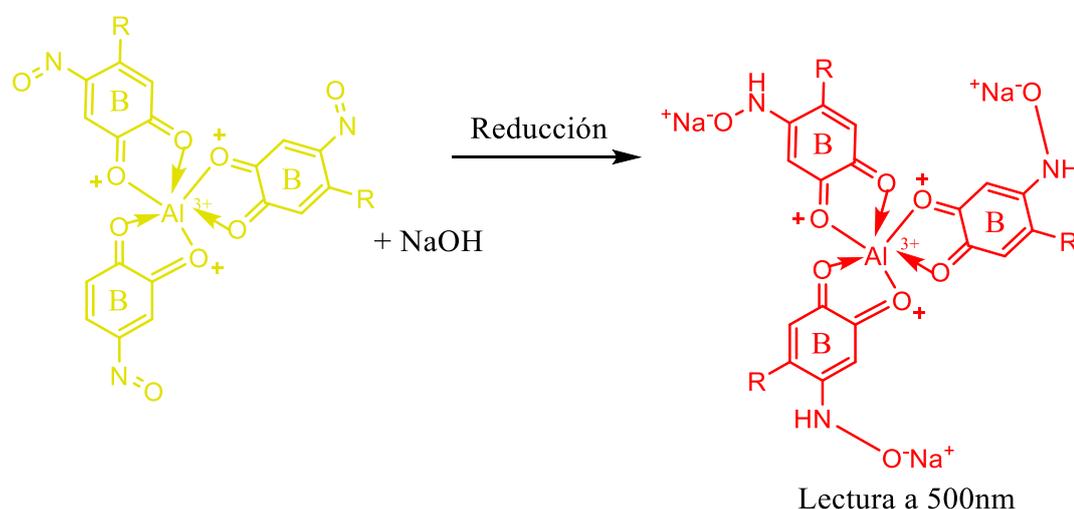


Figura 9c. Reacción en la determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio-continuación, paso 3 formación del complejo colorido.

2.5 Determinación de la actividad fitotóxica con *Allium cepa*

El principio de la prueba para determinar la actividad fitotóxica utilizando *Allium cepa* es que cuando un bulbo de cebolla, se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz, y por tanto su elongación. El efecto puede determinarse en forma

indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de las cebollas expuestas al compuesto tóxico contra las cebollas no expuestas, luego de un período de 72 horas de prueba. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control. (Díaz, M., Ronco, A., Granados, 2004).

2.6 Determinación de la actividad citotóxica- con *Artemia franciscana*

Este es un bioensayo de toxicidad que tiene por objeto clasificar las sustancias de acuerdo con su peligrosidad el cual permite obtener la concentración letal al 50% (CL₅₀), como un indicativo para determinar la capacidad tóxica de muchas sustancias, razón por la cual, para este ensayo fue empleada la especie *A. franciscana*, que gracias a sus condiciones fisiológicas y de desarrollo, favorece su uso en estudios de toxicidad. (Gómez, 2011)

En el ensayo se busca obtener una curva concentración/efecto a partir de la cual se puede calcular el CL₅₀ de la muestra analizada frente a pequeños organismos de *A. franciscana* que se encuentran habitualmente en condiciones de elevada salinidad. Tras la eclosión de estos organismos, se seleccionan estadios larvales tempranos y se exponen por triplicado a una serie de diluciones de la muestra a ensayar (soluciones etanólicas de *C. warszewiczii* en este caso). Esta exposición se lleva a cabo durante un periodo de 24 horas a 25 ± 1 °C y en ausencia de luz. Luego de este período se cuenta y registra el número de larvas inmobilizadas en cada concentración, y se calcula el CL₅₀ mediante análisis estadístico de los datos. (Cabrera, n.d.) En la figura 10, se puede observar el ciclo de vida de *A. franciscana* desde su estado inicial en huevos, hasta la formación de los nauplios empleados para el presente ensayo.

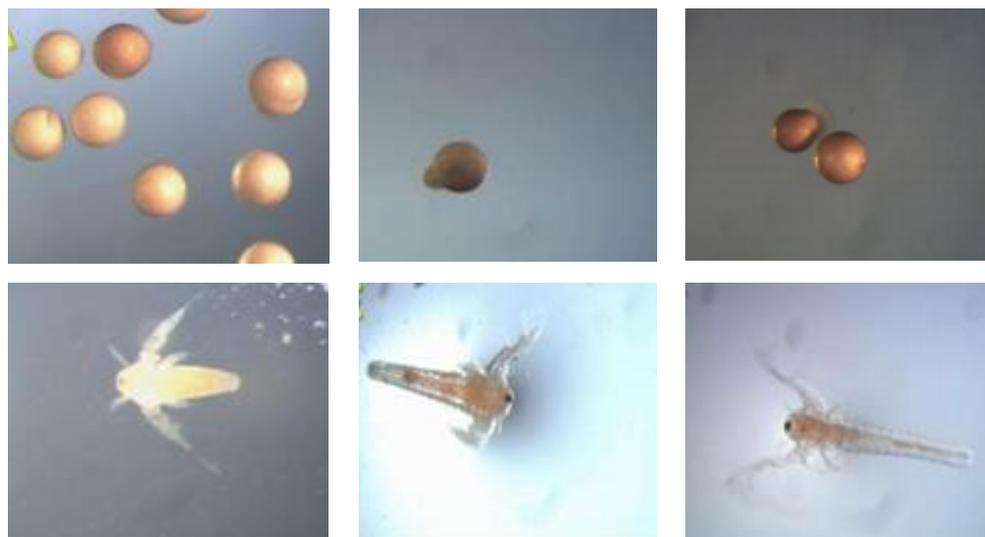


Figura 10. Estadios del ciclo de vida de la *A. franciscana*. Arriba: Izquierda: huevos; Centro: rotura de la membrana; Derecha:Estadío de gota (membrana de eclosión unida al corión). Abajo: Izquierda: nauplio; Centro:metanauplio 24-horas; Derecha: metanauplio 48-horas.

2.7 Determinación de la actividad anticoagulante frente al veneno de *Bothrops asper*.

El fundamento del método es considerar la neutralización de la actividad coagulante del veneno de serpiente por parte un antiveneno, para lo cual se incubaba una cantidad constante del veneno y diversas diluciones del antiveneno de interés y posteriormente se determinan los tiempos de coagulación obtenidos al agregar las respectivas alícuotas de estas mezclas a una cantidad establecida de plasma sanguíneo o a una solución de fibrinógeno.(Instituto Clodomiro Picado, n.d.)

En el caso puntual del presente ensayo, el veneno empleado fue el de la serpiente *Bothrops asper* y como antiveneno fueron usadas las diferentes concentraciones los extractos etanolicos totales (EET) de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*. Donde se toma como punto de referencia o control positivo, el tiempo de coagulación observado en los tubos con veneno pero sin antiveneno, es decir sin adicionar extractos, estableciendose la dosis mínima a la que el tiempo de coagulación sea 3 veces el del control positivo.(Instituto Clodomiro Picado, n.d.) de este modo se puede establecer si los EET de las hojas,raíz y los bulbos de *C.warscewiczii* tienen o no propiedades anticogulantes.



Figura 11. Especie *Bothrops asper*.

Como se mencionó anteriormente el veneno usado en este análisis corresponde a la *Bothrops asper*, la cual es una especie de serpiente perteneciente a la familia Viperidae. Se trata de una de las más grandes y venenosas especies que habitan la selva neotropical que pueden alcanzar una longitud de hasta 2.5 m con una cabeza de 4 cm de ancho, siendo las hembras hasta 50 cm más largas que los machos. Presentan distintas coloraciones de marrón a lo largo de su cuerpo conformando un patrón en forma de diamante y en la parte inferior de la cabeza tienen un color amarillo pálido, ésta a su vez es grande y en forma de lanza. Sus marcas se confunden con el entorno en el que habita y su apariencia es como la indicada en la figura 11. Su veneno está compuesto de una hemotoxina que causa coagulos en la sangre y ocasiona el necrosamiento de los tejidos adyacentes a la herida. Usualmente una mordedura de terciopelo como también es conocida esta serpiente, deja secuelas permanentes y si no es tratada correctamente puede causar la muerte.(Fonseca, n.d.) Debido a las condiciones climáticas del departamento del Cauca, ésta especie se encuentra en la hojarasca de las zonas vegetales (Ramírez,E.,Solari, 2014) facilitando la captura y obtención del veneno por parte del personal experto, el cual posteriormente puede ser empleado en análisis experimentales como el actualmente expuesto.

3 ESTADO DEL ARTE

A nivel experimental se han realizado diversos estudios de los metabolitos secundarios para la familia orchidaceae, de los cuales se hablará en breve buscando de este modo conocer los avances científicos más recientes de ésta familia y predecir la posible actividad para *C.warscewiczii*.

3.1 Tamizaje fitoquímico

En el caso del tamizaje fitoquímico recientemente en el año 2018 se realizó el estudio de 35 especies de orquídeas de los géneros *Caucaea*, *Epidendrum* y *Oncidium*, las cuales presentaron una reacción positiva para flavonoides y triterpenos en mayor cantidad, y específicamente en el caso de las muestra del género *Epidendrum* presentaron saponinas en un 100 % (Mencias,H.,Salazar, 2018). En ese mismo año en la *Vanilla planifolia* se identificaron diferentes tipos de metabolitos secundarios en los extractos de metanol y cloroformo con la presencia de flavonoides, saponinas y terpenoides. La vaina de esta especie presentó la concentración mayor de fenoles totales (749.608 mg 100 g-1) y taninos totales (102.141 mg 100 g-1), la hoja tuvo la concentración mayor de flavonoides de (127.023 mg 100 g-1) y taninos condensados (40.992 mg 100 g-1) (Delgado, Herrera, Arévalo, & Caso, L., Andrade., L, 2018) En el año en curso se encontró que los análisis fitoquímicos de los extractos de *Brasolia*, *Elleanthus* y *Sobralia* revelaron la presencia de tres grupos principales de metabolitos secundarios: derivados fenólicos, glucósidos flavonoides y saponinas triterpenoides (Rykaczewski et al., 2019).

3.2 Actividad antioxidante en la familia Orchidacea

Respecto a la actividad antioxidante en 2002 se ha reportado que las especies de la familia Orchidaceae son utilizadas como fuentes ricas de aromáticos, como bibencilos, fenantrenos, fluorenonas, ácidos aromáticos simples y ésteres con actividad antitumoral, antioxidante y antimutagénica (Chen, Liu, Jiang, Zhang, & Yin, 2008) Además en el caso específico de la orquídea *Habenaria edgeworthii* el contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu varió entre 10,33 y 14,30 mg de equivalente de ácido gálico (mAG)

por g de peso seco (gES) , que en comparación con el control de 10,17 mAG /gES se ha asociado con una buena respuesta antioxidante frente a los radicales de ABTS y DPPH (Kumar, V.,Lemos, M.,Sharma & Shriram, 2013).

En este mismo año luego de la realización de estudios de la actividad antioxidante, se confirmó que *Eulophia nuda* es una orquídea rica en fenoles, flavonoides, vitamina C y carotenoides y sus extractos metanólicos mostraron las actividades antioxidantes más altas en comparación con otros solventes, como lo demuestra la eliminación máxima de ABTS (98%), DPPH (87%) y radicales OH (99%) a una concentración de 1 ppm. (Mencias,H.,Salazar, 2018).

Para el año 2018, en el análisis de la actividad antioxidante con la metodología del DPPH para 35 especies de orquídeas de los géneros *Caucaea*, *Epidendrum* y *Oncidium*, sobresalió *Epidendrum nocturnum*, que necesitó una concentración de tan solo 3,50 ppm para inhibir el 50 % de los radicales libres de DPPH presentes en una solución de ensayo. Así mismo en el estudio de cuatro especies de *Dendrobium*, (Sonia, Sonia Pink, Snow Rabbit y Shavin White), el extracto de Shavin White (5.34 ± 0.30 mgGAE g⁻¹) mostró el contenido fenólico total más alto seguido por los de Sonia y Sonia Pink (4.01 ± 0.12 mgGAE g⁻¹), además que el extracto de Sonia Pink mostró el mayor contenido total de flavonoides y el extracto de Shavin White también mostró actividades antioxidantes más fuertes que Sonia Pink, Snow Rabbit y Sonia.(Kongkatitham et al., 2018)

También se puede destacar que en *Dendrobium parishii* se encontraron diversos metabolitos entre los cuales el dendrosignatol, derivado del bibencildihidrofenantreno, indicó las actividades antioxidantes más altas en los ensayos químicos ORAC, DPPH y desoxirribosa. Por lo tanto, fue seleccionado para la evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria en células de macrófagos murinos RAW264.7(Kongkatitham et al., 2018).

3.3 Actividad fitotóxica

Son escasos los estudios fitotóxicos en la familia Orchidaceae , sin embargo se reporta en la orquídea *Maxillaria densa* que los compuestos Gymnopusina (2,7-dihidroxi-3,4,9-trimetoxifenantreno) y erianthridin (9,10-dihidro-2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno) inhibieron el alargamiento de la radícula de plántulas de *A. hypochondriacus* con valores

de IC₅₀ de 330 y 58.2 μM, respectivamente La fitotoxicidad de los dos derivados de fenantreno también se evaluó en la lenteja de agua (*Lemna pausicostata*), los cuales causaron fugas de electrolitos, pérdida de clorofila y foto blanqueo (Valencia-Islas, Paul, Shier, Mata, & Abbas, 2002).

3.4 Actividad citotóxica

Desde el año 2008 se reporta la actividad citotóxica para los compuestos aislados de la orquídea *Bulbophyllum odoratissimum* que se evaluarón *in vitro* para determinar su capacidad inhibitoria frente al crecimiento de líneas celulares de leucemia humana K562 y HL-60, adenocarcinoma de pulmón humano A549, hepatoma humano BEL-7402 y cáncer de estómago humano SGC-7901. Donde el Densiflorol B el cual es el compuesto más activo mostró valores de IC₅₀ de 0.08–3.52 ppm frente a las cinco líneas celulares analizadas. (Chen, Y.Xu, J., Yu, H., Qing, C., Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Wang, 2008) En el 2009: por otra parte un derivado de fenantreno 9,10-dihidro-2,5-dimetoxifenantreno-1,7-diol aislado de *Eulophia nuda* se identificó como un agente citotóxico prometedor contra las líneas celulares de cáncer humano MCF-7 (13% de supervivencia celular) y MDA-MB. -231 (19% de supervivencia celular) a una concentración de 100 ppm (Shriram et al., 2010).

Ya en el 2014 la investigación química guiada por bioensayo de los tallos de *Dendrobium fimbriatum* Hook condujo al aislamiento de siete dímeros de bibencilo, junto con un nuevo derivado de dihidrofenantreno 2,4,5,9-tetrahidroxi-9,10-dihidrofenantreno. La evaluación biológica de los derivados de bibencilo frente a cinco líneas celulares humanas indicó que siete de esos compuestos mostrarón actividades citotóxicas con valores de IC₅₀ que van desde 2.2 hasta 21.2 μM. También se observó que la citotoxicidad disminuyó a medida que disminuía el número de grupos con oxígeno en la estructura de cada uno de estos compuestos (Xu et al., 2014).

En el 2017 se identificó en la planta *Dendrobium chrysotoxum*, un nuevo compuesto, el 1,4,5-trihidroxi-7-metoxi-9.H-fluoren-9-ona, junto con dos fluorenonas conocidas, la dendroflorina y la denchrysan, a estos compuestos aislados se les evaluó su capacidad inhibitoria *in vitro* contra el crecimiento de las líneas celulares de leucemia humana K562 y HL-60, adenocarcinoma de pulmón humano A549, hepatoma humano BEL-7402 y

cáncer de estómago humano SGC-7901. Las tres fluorenonas mostraron citotoxicidad selectiva contra las células BEL-7402 con IC₅₀ de 1.49, 0.97 y 1.38 ppm, respectivamente.(Chen, Li, et al., 2008)

Y en el 2018 en *Bletilla ochracea* se identificaron compuestos derivados de fenantreno y bibencilo los cuales mostraron una actividad citotóxica notable contra líneas celulares HL-60, A-549 y MCF-7 con valores de CI₅₀ de 0.24 ± 0.03 , 3.51 ± 0.09 y 3.30 ± 0.99 μM respectivamente.(Li et al., 2018)

3.5 Identificación de fenoles en la familia Orchidaceae

Respecto a los compuestos fenólicos en la familia Orchidaceae en 2008 se reportó que el extracto de acetato de etilo de *Bulbophyllum odoratissimum* produjo nueve compuestos fenólicos, identificados como moscatina, 7-hidroxi-2,3,4-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno, coelonina, densiflorol B, gigantol, batatasina III, tristina, ácido vanílico y siringaldehído (Chen, Xu, et al., 2008).

Además en el año 2014 de la orquídea *Bletilla formosana* se aislaron dos compuestos fenólicos, la curvularina y la deshidrocurvularina. La curvularina mostró una actividad antioxidante significativa y también estuvo presente en una concentración alta (0,373 mg / mg de muestra de extracto) (Dong et al., 2014).

Al igual que para la orquídea *Bletilla striata* se identificó 6 compuestos fenólicos: ácido protocatéquico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cafeico, p-hidroxibenzaldehído, 3-Ácido hidroxicinámico y ácido ferúlico empleados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.(Song et al., 2017).

En el año 2017 para *Dendrobium wardianum* se aislaron de los tallos, derivados de bibencilo como la dendrocandina, guardianianumina y once compuestos conocidos incluidos los fenantrenos : denbinobin, 9,10-dihidro-denbinobin, mostatina, loddigesiinole A. También los bibencilos: moscatilina, 5-hidroxi-3,4'-dimetoxibibencilo, 3,4-dihidroxi-5,4'-dimetoxi bibencilo, dendrocandina A, gigantol, dendrocandina U y un alcaloide (dihidroxihunina) los cuales mostraron actividades citotóxicas contra cinco líneas celulares de cáncer humano (HL-60, A-549, SMMC-7721, MCF-7 y SW-480) con IC₅₀ de 2,33-38,48 μM .(Cong, Z., Shou-Jin, L., et al, 2017).

3.6 Cálculos de mecánica molecular en Orchidaceae acoplamiento y/o coordinación con metales

En el caso de ensayos *in silico* con metabolitos de la familia Orchidaceae son pocos los reportes sin embargo, en el 2011 se sintetizaron varios análogos de giganol 1 el cual es un compuesto comunmente encontrado en las diferentes especies de la familia Orchidaceae, y se evaluó su efecto sobre complejos de Calmodulina. Los estudios de modelación molecular indicaron que los derivados del giganol se unieron a los complejos Calmodulina en el mismo sitio que los inhibidores clásicos como la trifluoperazina (TFP) y la clorpromazina (CPZ). Por lo cual algunos de estos análogos podrían ser candidatos dignos para desarrollar nuevos antitumorales, anestésicos locales, antidepresivos, antipsicóticos o relajantes de músculo liso (Reyes et al., 2011).

En la orquídea *Vanda coerulea*, se estudio la enzima fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y como se vé afectada la modificación transcripcional al ser sometida a diferentes tipos de estrés con ensayos *in vitro* los resultados fueron comparados con ensayos *in silico* que mostraron que la actividad de la enzima presenta el nivel de expresión más alto para estar presente en las muestras de hojas y raíces además que se pudo encontrar una correlación positiva entre la actividad de la enzima y la acumulación de fenilpropanoides como el contenido total de fenólicos y flavonoides. La alineación de secuencia múltiple mostró que la proteína PAL tenía una identidad del 81% con la de la orquídea *Vanda coerulea* después de que los tejidos fueron sometidos a condiciones de salinidad y con la presencia de algunas heridas con lo que se registró un aumento de 1.7 veces de la actividad enzimática en los tejidos de la hoja expuestos a las condiciones de salinidad establecidas (Nag & Kumaria, 2018).

4 PROBLEMA CIENTIFICO

En la actualidad, múltiples enfermedades afectan a la humanidad con un notable deterioro de su salud por lo cual se hace indispensable investigar compuestos bioactivos que puedan contrarrestar los efectos adversos ocasionados por estas. En los últimos años se han realizado diversas investigaciones que revelan como los productos naturales no sólo fueron el origen de muchos fármacos en el pasado, sino que todavía se pueden seguir considerando una fuente de moléculas activas con una importante aproximación en el descubrimiento de nuevos fármacos. Ya que han presentado usos terapéuticos comunes que van desde el control de afectaciones leves en la salud como las ocasionadas en un simple resfiado hasta incluso el mejoramiento de la actividad mental en pacientes con Alzheimer.

En este orden de ideas, hasta la fecha no se encuentran reportes de estudio de la actividad biológica de la orquídea Colombiana *Cattleya warscewiczii* sanderiana, motivo por el cual en el presente trabajo de investigación se pretende obtener el extracto etanólico total (EET) de hojas, raíz y bulbos de esta especie y evaluar su potencial anticoagulante frente al efecto generado por el veneno de serpiente (*Bothrops asper*), al igual que evaluar su actividad antioxidante mediante los métodos: DPPH, ABTS, Rancimat y contenido total de fenoles totales, junto con la actividad citotóxica y fitotóxica mediante los ensayos de *Artemia franciscana* y *Allium cepa* respectivamente.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la actividad biológica *in vitro* (antioxidante, citotóxica, fitotóxica y antocagulante) del EET y de *C. warscewiczii*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* mediante los ensayos de DPPH, ABTS Rancimat de hojas de *C. warscewiczii*.

5.2.2 Realizar el estudio de la actividad citotóxica *in vitro* del EET de hojas de *C. warscewiczii* mediante el ensayo de *Artemia. franciscana* y actividad fitotóxica a través del ensayo de *Allium cepa*.

5.2.3 Determinar la actividad anticoagulante *in vitro* de hojas de *C. warscewiczii* sobre el plasma sanguíneo afectado por veneno de serpiente (*Bothrops asper*).

6 METODOLOGÍA

6.1 Materiales y Equipos

Tabla 5. Reactivos empleados en el desarrollo experimental.

Reactivo	Especificaciones
Etanol, eter etílico, hexano, acetato de etilo, cloroformo, butanol, metanol, acetonitrilo, Dimetilsulfoxido y Dicromato de Potasio.	J.T Baker (Xalostoc, México)
Ácido(+)-tartárico, ácido clorhídrico, ácido acético glacial, ácido pícrico, tricloruro de antimonio, vainillina, tricloruro de aluminio, nitrito de sodio	Merck (Darmstadt, Alemania)
Nitrato de bismuto III pentahidratado, persulfato de potasio, hidróxido de sodio, ácido cítrico, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, yoduro de potasio, ácido bórico, Cloruro de sodio, fosfato dihidrógeno de potasio, fosfato de sodio dibásico, cloruro de potasio, persulfato potásico	Carlo Erba (Val de Reuil, Francia)
Ácido sulfúrico concentrado, cloruro férrico anhidro, sulfato ferroso heptahidratado	Fisher Scientific (Nueva York, USA)
Gelatina	Difco (Le Point de Claix, Francia)
Ácido 3,5-dinitrobenzoico, Acetato de plomo (II)	Alfa Aesar (Nueva York, USA) Laboratorios Biocroma (Cali, Colombia).

DPPH. (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), ABTS (sal diamónica del ácido 2,2-azino- bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), BHT (Butilhidroxitolueno), DL- α -tocoferol, polietilenglicol, y quercetina	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ácido ascórbico, carbonato de sodio Folin-Ciocalteau, ácido gálico	Mol Labs (Bogotá, Colombia) Panreac (Barcelona, España)
Huevos de <i>A. franciscana</i> , sal marina	Veterinaria Perros, Pajaros y Peces (Cali, Colombia)

Tabla 6. Equipos empleados en el desarrollo experimental.

Equipo	Modelo	Marca
Espectrofotómetro de Uv-vis	Genesis 6	Thermo Scientific (Texas, USA)
Rotaevaporador	Laborota 4003	Heidolph Instruments Gmbh Co (Schwabach, Alemania)
Balanza Analítica	Ohaus-AR0640	Adventure
Cámara Ambiental	Biotronettelab line 846	Virginia USA
Rancimat	892	METROHM

6.2 Recolección del material vegetal

El material vegetal empleado para llevar a cabo el estudio de la actividad biológica de *C. warscewiczii* sanderiana fué recolectado de la vereda el progreso perteneciente al corregimiento de Jamundi-Valle del Cauca, entre 3°07'51.7"N latitud norte y 76°36'01.0"W longitud oeste. A 900 msnm con una temperatura entre los 30 a 37 °C. La planta fué identificada por el taxónomo Bernardo Ramírez del Departamento de Biología de la Universidad del Cauca cuyo espécimen fué depositado en el herbario de esta misma Universidad con la siguiente especificación” Valle del Cauca: Municipio Jamundí;

Corregimiento de Robles, Vereda el progreso. Altura, 1000 m.; 28 de Agosto de 2017. Edith Consuelo Muñoz O.03 (CAUP)”.

6.3 Obtención de Extractos etanólicos totales

Las hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* se sometieron a un proceso de lavado y limpieza con agua para retirar impurezas o tierra presente. Posteriormente se cortaron en pequeños trozos y se depositaron sobre papel periódico para llevar a cabo el proceso de secado a temperatura ambiente por un período de 20 días para las hojas, 12 días para las raíces y 25 días para los bulbos, esto se realizó hasta obtener un peso constante. Luego se realizó el proceso de extracción con el métodos Soxhlet, para lo cual se pesó respectivamente 10 g secos del material vegetal triturado de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* que fueron depositados sobre un cartucho de celulosa y sometidos a la extracción sólido-líquido durante 48 horas utilizando 500 mL etanol al 98%. Al completar el tiempo de extracción, los extractos fueron concentrados a presión reducida en un rotaevaporador a 80 rpm y 40 °C, finalmente se obtuvo el EET de cada parte de la planta.

6.4 Tamizaje Fitoquímico

La identificación de los metabolitos secundarios presentes en los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* se llevó a cabo según el método descrito por Sanabria et al. Los detalles de la metodología empleada en el desarrollo de cada uno de los ensayos de tamizaje fitoquímico se encuentra en el anexo 1.

6.5 Actividad Antioxidante

6.5.1 Determinación de Fenoles totales por el metodo de Folin-Ciocalteu

Para la determinación de Fenoles totales en *C. warscewiczii* se llevó a cabo la metodología propuesta por Singleton y Rosi para lo cual se tomó 1.2 mL de la solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu (0.2 N) diluida 10 veces a partir del reactivo original 2 N, se mezcló en una celda plastica desechable de 1 cm de paso y se adicionó 0.4 mL de una

solución metanólica de cada uno de los extractos etanólicos previamente preparados. (Singleton , V., Rossi, J. 1965).

Se utilizó ácido Gálico como compuesto fenólico de referencia con el cual se realizó una curva de calibración con soluciones metanólicas de este reactivo en el rango de concentraciones de 15 a 75 ppm. También se realizó la preparación por triplicado de las muestras con los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* teniendo en cuenta el valor máximo de la absorbancia obtenida con la curva de calibración del ácido Galico. La lectura se realizó a una longitud de onda de 765 nm y los resultados se expresarán en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mAG/ gES) utilizando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{cV}{m} \quad (1)$$

Donde C= Concentración en equivalentes de Ácido Gálico; c=Concentración de Ácido Gálico obtenido a partir de la regresión lineal (ppm); V=Volumen de muestra analizada; m=Masa de extracto seco (g).

6.5.2 Determinación de flavonoides totales por el método de tricloruro de Aluminio

La cuantificación de flavonoides totales se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Zhishen et al.(Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, 1999) donde se preparó una curva de calibración de Catequina partiendo de una solución madre de 300 ppm (3 mg estandar/ 10 mL de metanol). Posteriormente se preparó las soluciones diluidas de 8, 15, 30, 50, 100, 150, 200 y 250 ppm. Se tomó 140 μ L de cada una de las concentraciones y se adicionó 52,5 μ L de NaNO₂ al 5% y 805 μ L de agua desionizada, se mezcló y se dejó reposar durante 5 minutos. A continuación, se adicionó 210 μ L de AlCl₃ al 2,5 %, y se dejó durante 6 minutos y finalmente se agregó 350 μ L de agua desionizada y 350 μ L NaOH 1M, se agitó y se midió a 500 nm exactamente 5 minutos después de agregar NaOH. El tratamienmto de las muestras se llevó cabo a las mismas condiciones que el estándar de Catequina. Los ensayos se realizarón por triplicado y los resultados se expresan en mg equivalentes de Catequina por gramo de muestra seca (mg EQ /g ES).

6.5.3 Determinación de la capacidad captadora de Radicales libres por el método de DPPH

Para el desarrollo de este método se siguió el procedimiento estandarizado en el grupo de investigación QCB teniendo en consideración los ensayos reportados por (Brand, W. et al. 1995) y (Peréz, M. et al. 2006). Inicialmente se construyó una curva del DPPH para lo cual se pesó 5 mg de este reactivo y se diluyó con 100 mL de etanol para conseguir una solución de color púrpura de 50 ppm (5mg de DPPH/100 mL de MeOH) de la cual se sacó los volúmenes necesarios para obtener concentraciones de 7, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 ppm respectivamente.

Posteriormente se preparó una disolución de DPPH• en metanol de absorbancia 0.800 ± 0.020 (a 515 nm), pesando 2.9 mg de DPPH• que se disolvieron en 30 mL de MeOH, esta solución se trasladó a un balón aforado de 100 mL y se completó cuidadosamente hasta la línea de aforo y se midió la absorbancia con un valor de 0.800 ± 0.020 .

Para las medidas puntuales de actividad antioxidante se depositó en una cubeta de 1 cm de paso óptico, 2.4 mL de la disolución metanólica de DPPH• anteriormente preparada y se mezcló con 1.2 mL de disolución metanólica de muestra y después de agitar, e incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos y se efectuó la medida de la absorbancia, de este mismo modo se realizó por triplicado para el ácido ascórbico, α -tocoferol, trólox, y los EET de romero y hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii*. Posteriormente se graficó la respectiva curva de regresión que relaciona la absorbancia de la muestra Vs concentración dada en ppm. Teniendo los valores del blanco de cada curva (DPPH + etanol) y el promedio de la absorbancia en cada punto, se determinó el porcentaje de inhibición y se encontró el valor de IC_{50} para cada sustancia analizada. El porcentaje de inhibición del radical libre DPPH se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% I = \left[\frac{AB - AA}{AB} \right] \times 100 \quad (2)$$

Dónde: AB =absorbancia del DPPH inicial a (t = 0 min) y AA = absorbancia de la muestra a (t= 15 minutos).

6.5.4 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método de ABTS

Para el desarrollo de este método se siguió el procedimiento estandarizado en grupo de investigación QCB tomando como referencia los ensayos realizados por (Pérez, M. et al. 2006) y (Exarchou, V. et al. (2006) para lo cual se preparó una solución buffer de fosfato (PBS Solución A) disolviendo 820 mg de NaCl, 26 mg de KH_2PO_4 , 140 mg de Na_2HPO_4 y 14 mg de KCl en 1 L de agua ultrapura. Una disolución de persulfato de potasio $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (solución B) en PBS disolviendo 0.8 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en 1 L de PBS de lo cual resulta una concentración de 2.959 mM (Mr de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8= 270.32$ g/mol).

Estas dos disoluciones son estables en el tiempo y a partir de ellas se preparó la disolución madre de ABTS (C) con 110 mg de ABTS comercial, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de diamonio), en 90 mL de disolución (A) y 10 mL de disolución (B). Esta disolución se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 16h, lograndose un cambio de color de azul a verde esmeralda. Posteriormente se diluyó la solución madre de ABTS (D) para realizar las correspondientes mediciones tomando una porción de 8 mL de disolución madre de ABTS (C), 82.8 mL de disolución A y 9.2 mL de MeOH para completar 100 mL y se controló una absorción en el espectrofotómetro de 0.800 ± 0.030 a 734 nm.

Se realizó una curva de calibración con el ABTS para lo cual se preparó una solución madre de 300 ppm de ABTS* disueltos en una solución Buffer de fosfato más persulfato de potasio. Posteriormente se midió la absorbancia para concentraciones de 20, 30, 40, 50, 60 y 70 ppm a una longitud de onda de 734 nm. Se estableció la absorbancia de la solución en un rango entre 0.800 ± 0.030 .

Para la medida de la actividad con las muestras se midió 990 μL de la disolución (D) se mezcló en una cubeta de plástico desechable con una disolución metanólica (10 μL) de la muestra a evaluar, se agitó y mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5 minutos antes de tomar la medida de absorbancia en un espectrofotómetro a 734 nm. El blanco se preparó a partir de 990 μL de disolución (D) y 10 μL de la solución de PBS.

Se realizaron las curvas de calibración para el α -tocoferol (10-65) ppm, trolox (10-90) ppm, ácido ascórbico (10-65) ppm y para los extractos etanólicos de romero (100-800)

ppm y *C. waescewiczii* (hojas, raíz y bulbos) relacionando en cada caso el respectivo valor de absorbancia obtenido a 734 nm en función de la concentración en ppm con lo cual se determinó el porcentaje de inhibición (PI) para cada concentración empleando la ecuación 2 del DPPH salvo que: AB =absorbancia del ABTS inicial (t = 0 min) y AA = absorbancia de la muestra a (t= 5 minutos) con lo cual se calculó posteriormente el valor de IC₅₀ de cada analito.

6.5.5 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de Rancimat

En el ensayo de Rancimat se determinó el tiempo de oxidación del aceite de coco virgen (tiempo de inducción), para lo cual se pesó 3.0000 g de éste y se introdujo en el equipo de Rancimat a una temperatura de 110 grados Celcius para ser oxidado con un flujo de aire de 20 L/h. De igual manera se determinó el tiempo de oxidación del aceite de coco mezclado con 3mg de los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* respectivamente para obtener una concentración de 1000 ppm, la temperatura del método creado para el análisis de las muestra también fué de 110°C con igual flujo de aire. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en términos del factor de protección (FP) empleando la siguiente fórmula:

$$FP = \left[\frac{TIC}{TIS} \right] \quad (3)$$

Dónde: TIC = tiempo de inducción en horas del aceite de coco con antioxidante y TIS= tiempo de inducción en horas del aceite de coco sin antioxidante.

6.6 Determinación de la actividad fitotóxica con *Allium cepa*

Para la determinación de la actividad fitotóxica de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* se llevó a cabo el ensayo de *Allium cepa* siguiendo el procedimiento estandarizado en grupo de investigación QCB según lo reportado por (Diaz, M., Ronco, A., Granados, P. 2004) para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Se escogió cebollas de tamaño similar y se les realizó una adecuada limpieza en la parte de la raíz, eliminando todas las impureza y material vegetal muerto. Posteriormente cada

una de estas cebollas se puso en contacto con agua destilada por un periodo de 72 h en tubos de ensayo de vidrio forrados con papel aluminio para evitar la radiación de luz directamente sobre la raíz, cumplido este tiempo las cebollas fueron retiradas cuidadosamente del agua y limpiadas nuevamente quitandoles todas las posibles raíces que hayan nacido en este período. Posteriormente se procedió a depositar las cebollas con tamaño homogéneo y que presentarón un crecimiento similar de las raíces en las primeras 72 horas, sobre diferentes concentraciones del EET de hojas, raíz o bulbos de *C. warscewiczii* sanderiana y se determinó la longitud final de las nuevas raíces al cabo de otras 72 horas. El mismo procedimiento se llevó a cabo para un blanco con agua y también un blanco que contenía Dimetilsulfoxido (DMSO) puesto que el EET de la especie estudiada no fue completamente soluble en agua. Se realizó un gráfico que relaciona el crecimiento de las raíces de las cebollas dada en milímetros, en función de la concentración de cada extracto con el que estas tuvieron contacto, y se determina el valor de IC₅₀ en ppm utilizando la regresión lineal por mínimos cuadrados.

6.7 Determinación de la actividad citotóxica frente a *Artemia franciscana*

Para llevar a cabo el ensayo de *A. franciscana* se siguió el procedimiento estandarizado en grupo de investigación QCB teniendo en cuenta los fundamentos de la prueba propuestos por la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales del Instituto Nacional de Ecología (Ramírez, P., Mendoza, A. 2008) y los estudios de actividad larvicida (Saraza, K., Burbano, D. 2015) y en productos naturales (Pino, O., Lazo, F. 2010). Para lo cual se realizó la incubación de los huevos de *A. franciscana*, durante 30 horas en un medio salino hasta la producción óptima de nauplios. Posteriormente se tomó al azar 10 nauplios y se adicionaron en tubos de ensayo pequeños que contenían diferentes concentraciones de los EET de hojas, raíz o bulbos de *C. warscewiczii* según el caso, completandose hasta un volumen de 5 mL con agua salina. Se revisó periódicamente el número de nauplios muertos hasta completar 24 horas y se determinó el valor de IC₅₀ dado en ppm utilizando el programa Graphpad prism 6.

Vale la pena mencionar que inicialmente se realizó un barrido general con 4 concentraciones de cada extracto (1, 10, 100,1000) ppm preparadas a partir de una solución madre de 50.000 ppm de EET (hojas, raíz, bulbos) utilizando un blanco con

Dimetilsulfoxido (DMSO) y otro con agua destilada. y se determinó un valor aproximado de IC₅₀ con lo cual posteriormente se realizó un nuevo ensayo con concentraciones de los EET alrededor del valor de IC₅₀ determinado previamente. Teniendo como control positivo soluciones de diferente concentración de dicromato de potasio.

6.8 Determinación de la actividad anticoagulante frente al veneno de *Bothrops asper*

Para la determinación de la actividad anticoagulante de los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* en el plasma sanguíneo frente al veneno de la serpiente *Bothrops asper*, se empleó el método propuesto por el instituto Clodomiro Picado (Instituto Clodomiro Picado, n.d.).

Inicialmente se obtuvo la muestra de sangre de la cual se aisló el plasma sanguíneo luego de centrifugar por un periodo de 15 minutos a 3500 rpm. Posteriormente se prepararon las soluciones de EET para hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* con el doble de la concentración en la cual se deseó observar la actividad anticoagulante, puesto que cuando se adiciona el volumen de veneno, la solución queda con la mitad de la concentración inicialmente preparada, por ejemplo para analizar la respuesta anticoagulante del EET a una concentración de 250 ppm se preparó una solución inicial de 500 ppm, así como soluciones con concentraciones de 1000 y 2000 ppm para observar la respuesta anticoagulante a 500 y 1000 ppm, respectivamente. Luego de esto se aforó con solución salina, para lo cual se tomaron 25 µL de la muestra preparada, se adicionaron 25 µL de solución de veneno con concentración de 1000 ppm, se incubaron por 15 minutos a 37°C y se tomaron los 50 µL de dicha solución, la cual se le adicionó a 200 µL de plasma sanguíneo previamente puesto en un tubo ependorf y se determinó el tiempo de coagulación con cada concentración preparada, teniendo como control positivo el veneno de *B. asper* en solución salina con DMSO siendo este último empleado para garantizar la solubilidad total del extracto etanólico inicial.

6.9 Aislamiento en identificación de compuestos fenólicos en *C. warscewiczii*

Teniendo en cuenta los resultados de la actividad antioxidante y de Folin-Ciocalteu se llevó a cabo el aislamiento de los compuestos fenólicos para los EET de *C. warscewiczii* basándose en el procedimiento descrito por (Mitsuo Miyazawa et.al, 1997) con algunas modificaciones ya que se partió desde el EET de hojas, raíz y bulbos respectivamente, en lugar de partir desde el material seco.

El EET fue re-extraído con hexano y la fracción obtenida se pasó por silica C-18 utilizando como eluyente una relación de hexano:acetato de etilo 8:2, seguida de una relación 6:4 y finalmente solo metanol.

La fracción obtenida de la relación 6:4 del paso anterior se pasó nuevamente por C-18 usando esta vez como eluyente una relación de solventes hexano:acetato de etilo 7:3, de la cual se obtuvieron 3 fracciones, se tomó la tercer fracción, se le adicionó NaOH al 5% y diclorometano, con lo cual se obtuvieron dos fases una fase acuosa y una fase orgánica. La fase acuosa se acidificó con HCl diluido y se adicionó diclorometano para obtener la fracción donde se encontraban los compuestos fenólicos.(Miyazawa, Shimamura, Nakamura, & Kameoka, 2002). Este mismo procedimiento se realizó para los EET de raíz y bulbos de *C. warscewiczii*, se secó y se determinó el porcentaje de rendimiento. Posteriormente se empleó la técnica de GC-MS para la identificación cromatográfica de los compuestos fenólicos en *C. warscewiczii* utilizando las condiciones descritas en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones para análisis en GC-MS

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
Temperatura del horno de Columna	45 °C	Diametro	0.250 mm
Temperatura de inyección	220 °C	MS Temperatura de linea de transferencia	230 °C
Modo de inyección	Split	Temperatura de fuente de iones	230 °C
Modo de control de flujo	Velocidad lineal	Rango de masas (amu)	100-400
Flujo de purga	8.00 mL/min	Tiempo de estabilización del horno	10.00 min
Flujo dividido	50.0 mL /min	Retraso	0.50 min
Relación de división	50	Columna	HP5-MS
Tiempo de gas portador	1.50 min	Longitud	30 m
Tiempo de pre-corrida	10.00 min		

6.10 Cálculos de mecánica molecular

Con base a los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico, se realizaron cálculos de mecánica molecular para determinar las interacciones con proteínas implicadas en el desarrollo de algunas de las enfermedades actuales como el Alzheimer, Parkinson y problemas de Coagulación sanguínea y de este modo poder predecir posibles aplicaciones farmacéuticas a futuro de los compuestos bioactivos de *C.warscewiczii*, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Primero se realizó la optimización de la geometría molecular de 10 ligandos incluido el Agidol-2, para lo cual se utilizó el programa Gabedit 2.4.10 (opción-optimización), posteriormente con la estructura optimizada, se calentó hasta 1000K para descartar un mínimo local. Esto generó 10 puntos de barrido energético de los cuales se escogió la estructura de más baja energía y se guardó en formato pdb para realizar los posteriores cálculos.

Luego se descargó de la página Protein Data Bank las estructuras de las proteínas de interés (Acetilcolinesterasa, Monoaminoxidasa B y Protombina en este caso). Se empleó el programa Hex Protein Doking 8.0 para la realización de los cálculos de acoplamiento molecular, usando como receptor cada una de las proteínas de interés con los ligandos respectivos. Antes de correr el cálculo se eliminó el agua y los heteroátomos de las proteínas. (Opción-Controls –Hetero- Enable hetero y Enable solvent) y se activó la opción para calcular el docking molecular (Opción Controls-Docking-Activate) y se guardó el fichero generado con la información de la energía para 2000 posibles acoplamientos, en este caso la energía que apareció en la pantalla al finalizar los cálculos fue la más alta negativa que se empleó para comparaciones posteriores (Opción-File-Save-Summary- escoger la carpeta donde se guardará-OK). Luego de esto se guardó el docking molecular en formato pdb. (Opción-File – Save- Both- Escoger carpeta de destino-OK) y en el programa Ras-MOL se ajustaron los colores y contornos para identificar los aminoácidos que presentaron una mayor interacción con cada ligando estudiado, teniendo en cuenta la secuencia enumerada que se indica en la ventana emergente del programa RasMol. Este mismo procedimiento se realizó con cada uno de los ligandos y las diversas proteínas haciendo las comparaciones energéticas respectivas que se presentarán posteriormente en la sección 7.8 de análisis y resultados.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de extractos vegetales

El EET de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*, se obtuvo mediante extracción por Soxhlet por un periodo de 48 horas y posteriormente se secó bajo presión reducida en rotaevaporador, lograndose un rendimiento de 7.30% para hojas, 5.77% para raíz y 5.17% para bulbos, con los cuales se llevó a cabo la totalidad del desarrollo experimental de presente trabajo como se puede observar en la Tabla 9.

7.2 Tamizaje Fitoquímico

En el análisis de un extracto vegetal es indispensable llevar a cabo un screening o tamizaje fitoquímico, con el fin de conocer sus posibles constituyentes y realizar estudios posteriores de la actividad biológica.

La tabla 8 muestra los resultados obtenidos luego de realizar el tamizaje fitoquímico a los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* sandariana.

En terminos generales se destaca principalmente la presencia de alcaloides para las tres partes de la planta, flavonoides identificados solamente en la raíz, la presencia de triterpenos y /o esteroides en el ensayo de Rieberman-Buckman y Salkowaski y cardiotónicos en el ensayo de Baljet y Kedde. En este caso no se evidenció la presencia de cumarinas volátiles , saponinas, taninos ni derivados antracénicos libres.

En el caso de los alcaloides en la familia orchidaceae, se ha comprobado su presencia y efectos farmacológico en especies de orquídeas como *Dendrobium crepidatum* contra la lesión pulmonar aguda (Hu, Y., Ren, J., Wang, L., Zhao, X., Zhang, M., Shimizu, K., Zhang, 2018) al igual que la caracterización de alcaloides en cuatro especies de *Pleurothallis* (Orchidaceae) (Borba, E., Trigo & Semir, 2001). Por su parte, los estudios de identificación de flavonoides reportados para la familia orchidaceae son realmente escasos, sin embargo, se há encontrado la presencia de glucósidos de flavona C y flavonoles como constituyentes más comunes (Williams, 1979). En 9 generos de la especie *Caucacea* se identificó la presencia de triterpenos (Mencias,H.,Salazar, 2018),

además de la presencia de algunos cardiotónicos en hojas, raíz y bulbos de *Genus pholidota* (Bandi & Lee, 2011) que pertenece también a la misma familia.

Tabla 8. Resultados de tamizaje fitoquímico para hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Tipo de prueba	Hojas	Raíz	Bulbos
1.0 Alcaloides			
1.1 Dragendorff	++	+	++
1.2 Mayer	-	-	-
1.3 Wagner	++	+	+
2. Cumarinas Volátiles	-	-	-
3. Saponinas	-	-	-
4. Flavonoides	-	+	-
5. Derivados antracénicos Libres	-	-	-
6. Taninos	-	-	-
7.0 Triterpenos y/o esteroides			
7.1 R-B	++	-	+
7.2 Salkowaski	+++	+	++
8. Cardiotónicos	+	+	+
8.1 Baljet	+	+	+
8.2 Kedde	-	-	-
8.3 Raymon	-	-	-
8.4 Keller	+	++	++
8.5 Lieberman	+	-	-
8.6 Salkowaski	++	+	+

7.3 Actividad Antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de hojas, raíz y bulbos de *C.warcewiczii* se realizaron los ensayos de evaluación de la capacidad captadora de radicales DPPH y ABTS, el ensayo de Rancimat para determinar la actividad antioxidante de los EET en aceite de coco y como pruebas complementarias se determinó el contenido de fenoles totales por medio del ensayo de Folin Ciocalteu y el contenido de flavonoides totales con el ensayo de tricloruro de aluminio. La tabla 9 muestra un resumen de los valores experimentalmente encontrados, los cuales se discutirán en las secciones respectivas a lo largo del documento.

Tabla 9. Resultados de la actividad antioxidante para hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*

Parte de la planta	Fenoles Totales ^a	Rendimientos de extracción *	Flavonoides Totales ^b	Actividad captadora DPPH ($IC_{50}(ppm)$)	Actividad captadora ABTS $IC_{50}(ppm)$	Actividad protectora Rancimat
Hojas	1216.17 ± 15.31	7.30%	1666.52 ± 60.56	253.94 ± 6.45	2091.00 ± 68.08	1.17 ± 0.35
Raíz	1730.95 ± 2.75	5.77%	1947.78 ± 48.47	117.44 ± 4.72	1213.75 ± 124.74	1.00 ± 0.00
Bulbos	1478.57 ± 12.60	5.17%	1678.68 ± 64.12	151.04 ± 6.20	1124.28 ± 15.64	1.17 ± 0.00
Romero	-		-	31.03 ± 0.94	1715.00 ± 25.48	1.00 ± 0.00
Ácido Ascórbico	-		-	7.85 ± 0.13	240.00 ± 4.54	-
Alfa-tocoferol	-		-	14.00 ± 0.47	622.86 ± 14.29	-
Trolox	-		-	11.31 ± 0.22	346.65 ± 13.45	
BHT	-		-	-	-	1.00 ± 0.00
Aceite de Coco						1.00 ± 0.00

^a valores expresados como $\frac{mg\ AG}{g\ ES}$; ^b valor esepresado como $\frac{mg\ Q}{g\ ES}$: * Obtenido como (g Extrácto seco/gramos material vegetal inicial)x100

7.3.1 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método de DPPH

En el análisis de la capacidad antioxidante de hojas, raíz y bulbos de *C. warcewiczii* se llevó a cabo la evaluación de la capacidad captadora de radicales DPPH°, para lo cual se elaboró inicialmente una curva de calibración con una solución etanólica diluida de DPPH° como se muestra en la figura 12. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la regresión lineal y el rango óptimo de absorbancia para el desarrollo del ensayo (0.800 ± 0.003) se puede decir que las concentraciones de la solución de DPPH° estuvieron entre 35.00 ppm hasta 35.26 ppm, estos cálculos se pueden encontrar en el anexo 2 al final del presente documento.

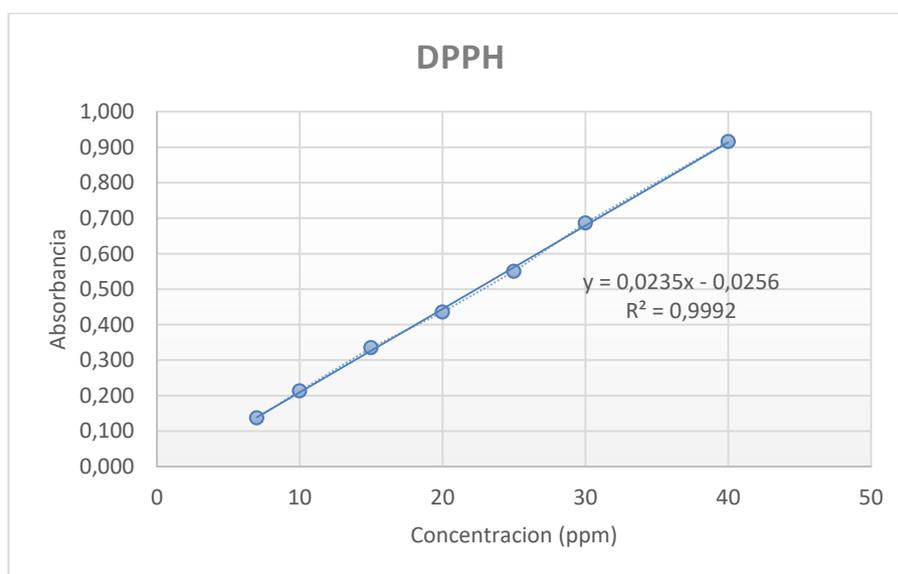


Figura 12. Curva de DPPH, para la determinación del rango de concentraciones de la solución empleada en el desarrollo experimental.

Como se puede observar en la figura 13, la parte de la planta con mayor capacidad captadora de radicales libres DPPH° fue la raíz ya que presentó un valor más bajo de $IC_{50} = 117.44 \pm 4.72$ ppm, seguido de los bulbos con 151.04 ± 6.20 ppm y finalmente las hojas con un IC_{50} de 253.94 ± 6.45 ppm, por su parte los valores del IC_{50} para los estándares de ácido ascórbico, alfa tocoferol y trólox, fueron de 7.85 ± 0.13 ; 14.00 ± 0.47 y 11.31 ± 0.22 ppm respectivamente, los cálculos para la determinación de los valores de IC_{50} también pueden ser consultados en el anexo 2. Para las muestras vegetales de *C. warscewiczii*, se tomó como referencia al romero, el cual presenta una elevada capacidad captadora de

radicales libres (Abuashwashi, 2018) y tuvo un IC_{50} de 31.027 ± 0.94 ppm. De este modo se puede afirmar hasta el momento que el IC_{50} del EET de las raíces de *C. warscewiczii* fue aproximadamente 15 veces más elevado que el del estándar con el menor IC_{50} que en este caso corresponde al ácido ascórbico y alrededor de 4 veces mayor al IC_{50} del romero.

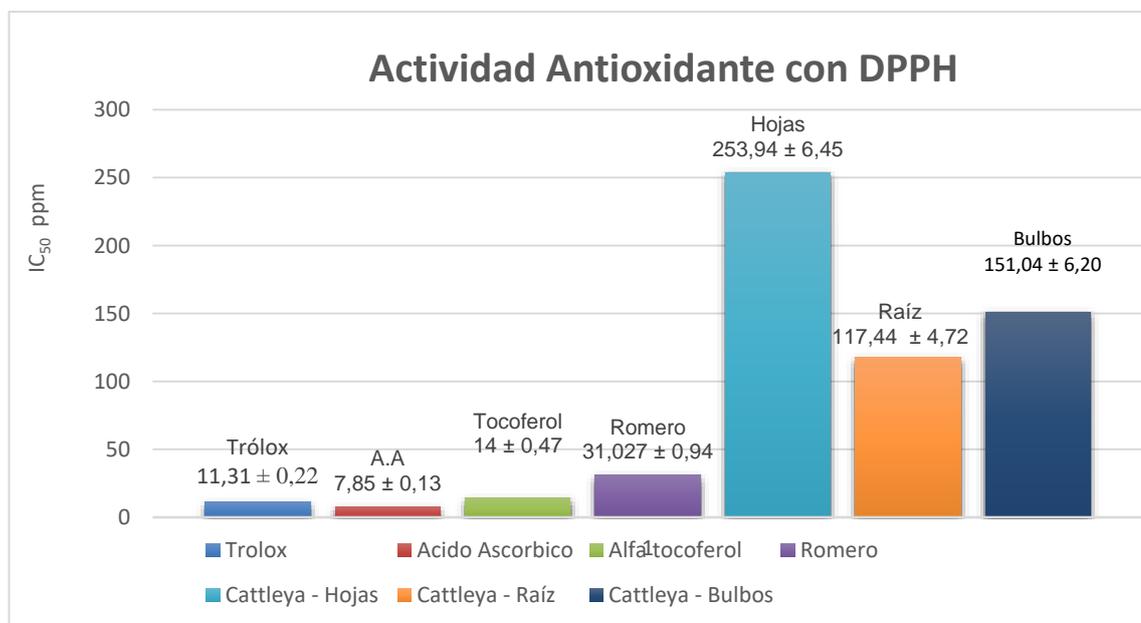


Figura 13. Resultados de la actividad antioxidante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* por el método de DPPH.

Además que *C. warscewiczii* presentó una mejor actividad antioxidante comparada con otras especies de la familia orchidaceae como *Dendrobium spp* de la cual se reporta un $IC_{50} = 463.08 \pm 15.68$ ppm en hojas (Athipornchai, A., Jullapo, 2018) es decir, aproximadamente el doble del valor encontrado para *C. warscewiczii*. En el caso explícito de la raíz el resultado obtenido para *C. warscewiczii* fue un poco inferior que el reportado para *Malaxis rheedii* con un IC_{50} de 124.68 ppm (Haridas, R., Thekkan, S., Manorama, 2016).

También se ha reportado para el extracto etanólico de las hojas de *Eria pseudoclavicaulis* un IC_{50} con el ensayo de DPPH superior a 600 ppm (Shibu, S., Moin, S., Servin, W., Chitra Devi, 2012) por lo cual se puede decir que el EET de hojas de *C. warscewiczii* que tuvo un IC_{50} de 253.94 ± 6.45 ppm manifiesta una actividad un poco mayor al doble de la que presentó *E.pseudoclavicaulis* lo cual es muy favorable para posteriores análisis de actividad antioxidante.

7.3.2 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método de ABTS

En este ensayo se realizó una curva de calibración empleando una solución diluida de ABTS^{o+} de manera similar a como se realizó en el ensayo de DPPH, teniendo en cuenta que el rango de absorbancia en el que se trabajó fue de 0.800 ± 0.030 se especifica que las concentraciones del ABTS estuvieron entre (50.16 -53.86) ppm, estos cálculos se pueden encontrar en el anexo 3 al final del presente documento.

Como se observa en la figura 14 el valor de IC₅₀ para la raíz y los bulbos de *C. warszewiczii* manifiestan una mayor capacidad captadora de radicales libres ABTS^{o+} que para el romero con valores de IC₅₀ de 1212.75 ± 124.74 y 1124.28 ± 15 ppm respectivamente mientras que un IC₅₀= 1715.00 ± 25.45 ppm en el caso de este último, por su parte las hojas de *C.warszewiczii* presentaron una capacidad captadora de radicales libres disminuida 363 veces respecto al romero, es decir, un IC₅₀ = 2091.00 ± 68.08 ppm.

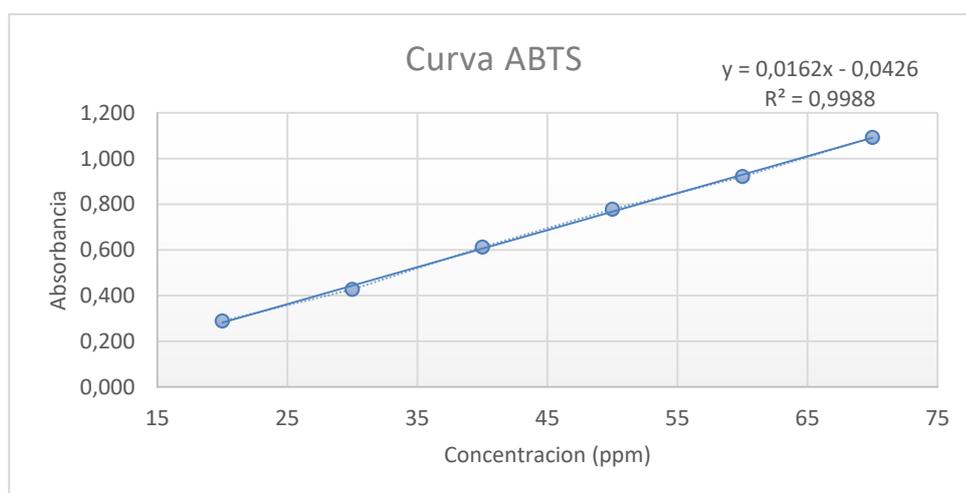


Figura 14. Curva de calibración del ABTS para la determinación del rango de concentraciones de la solución empleada en el desarrollo experimental.

Para los patrones empleados se encontró que el trólox presentó un IC₅₀= $346.65. \pm 13.45$ ppm seguido del ácido ascórbico con un IC₅₀= 240.00 ± 4.54 ppm y el alfa tocoferol cuyo IC₅₀ fué de 622.86 ± 14.29 ppm, los cálculos para la determinación de los valores de IC₅₀ también se pueden consultar en el anexo 3. En comparación con el estándar de ácido ascórbico que presentó el IC₅₀ más bajo, el EET de bulbos de *C. warszewiczii* estuvo aumentado alrededor de 815 veces.

Por otra parte en el estudio realizado a una especie de orquídea llamada *Dendrobium ochreatum* se reportó un comportamiento similar al obtenido en el presente ensayo aunque con valores de IC₅₀ inferiores a los encontrados para *C. warscewiczii* siendo el IC₅₀ para la raíz 123.21 ppm y para hojas IC₅₀ 815.54 ppm. (Banerjee, Dey, Khanal, & Dahal, 2015).

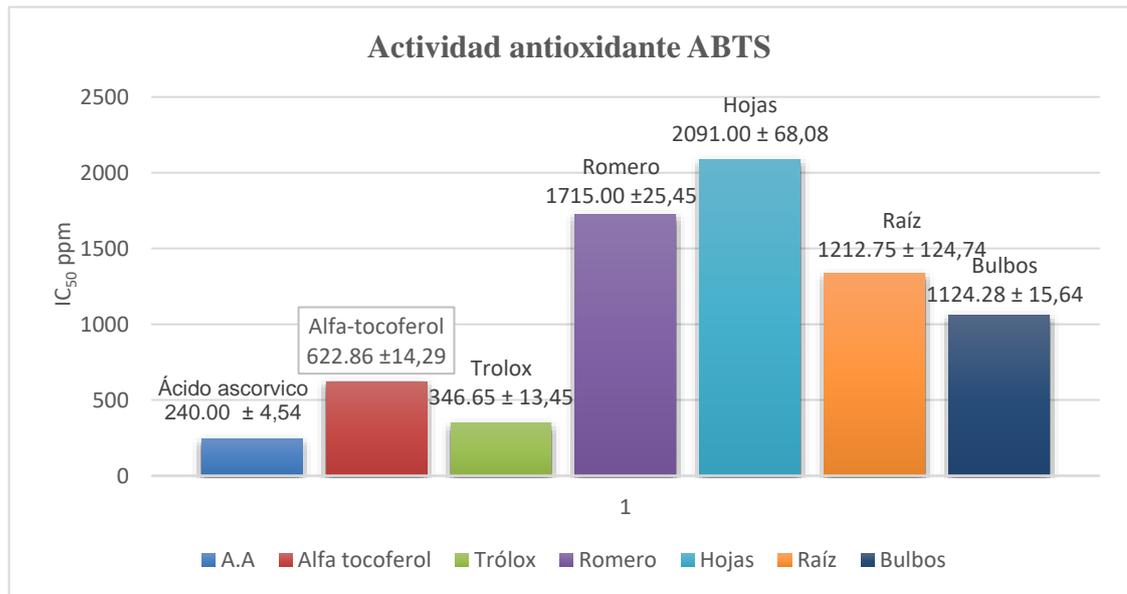


Figura 15. Resultados de actividad antioxidante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* por medio del ensayo de ABTS.

De la figura 15 también se puede observar que el valor de IC₅₀ para los bulbos fué disminuido 273 veces respecto al IC₅₀ de las raíces de *C. warscewiczii*, es decir, en este caso se presentó una mayor respuesta captadora de radicales libres que para los bulbos lo cual podría ser debido a la presencia de flavonoides que no contienen grupos hidroxilo en el anillo B así como compuestos que contengan ácidos aromáticos con un solo grupo hidroxilo, los cuales no reaccionan con el radical DPPH pero sí con el radical ABTS (Neira, 2009).

7.3.3 Ensayo de Fenoles totales por el metodo de Folin Ciocalteu

Experimentalmente se determinó el contenido de fenoles totales en hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* por medio del ensayo de Folin Ciocalteu, como método complementario a los ensayos realizados de DPPH y ABTS, empleando un patrón de ácido gálico para realizar la curva de calibración y llevar a cabo una posterior cuantificación, la curva se puede observar en la figura 16.

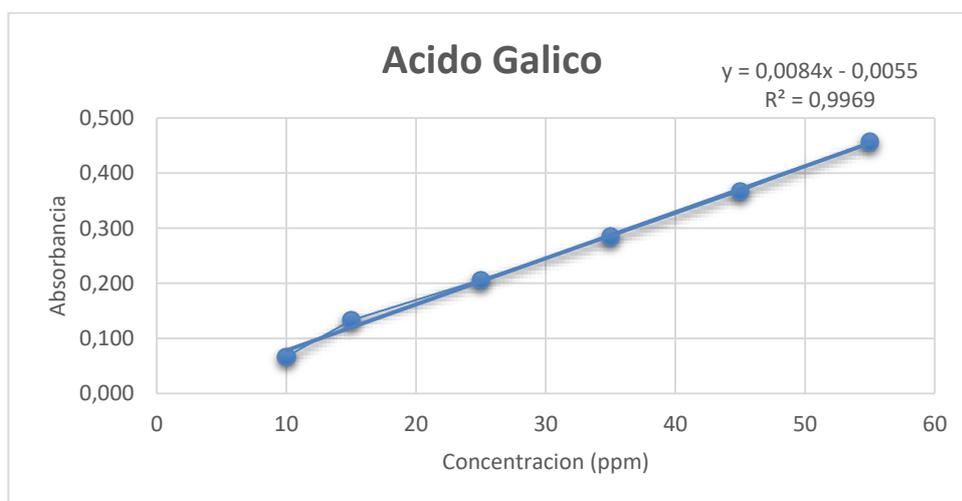


Figura 16. Resultados de curva de calibración de Ácido Gálico para el ensayo de Fenoles totales.

A nivel experimental se obtuvo un mayor contenido fenólico en la raíz de *C. warscewiczii* con 1730.95 ± 2.75 mg AG/g ES, seguido de los bulbos 1478.57 ± 12.60 mg AG/g ES y finalmente las hojas con 1216.17 ± 15.31 mg AG/g ES (los cálculos se pueden consultar en el anexo 7) por lo cual se podría esperar una mayor actividad antioxidante por parte del EET de raíz seguido de Bulbos y finalmente de hojas de *C.warscewiczii*, como ocurrió por ejemplo en el ensayo del DPPH, es decir, que probablemente el mayor contenido de fenoles en la raíz de *C. warscewiczii* en comparación con las demás partes de la planta podría ser una posible explicación de su mayor capacidad captadora de radicales libres DPPH°.

De la literatura se puede resaltar que dentro de la familia orchidaceae se han encontrado diversos compuestos fenólicos como por ejemplo en *Bulbophyllum odoratissimum* donde se identificó y aisló al moscatin; 7-hidroxi-2,3,4-trimetoxi-9,10-dihidrofenantreno;

coelonin; densiflorol B; gigantol, batatasin III; tristin , ácido vanílico y siringaldehido, los cuales se evaluarón *in vitro* para determinar su capacidad inhibitoria frente al crecimiento de las líneas celulares de leucemia humana. (Chen, Y.Xu, J., Yu, H., Qing, C., Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Wang, 2008) , esto da solidéz a los resultados obtenidos para *C.warscewiczii* que como ya mencionó también manifiestan la presencia de compuesto fenólicos.

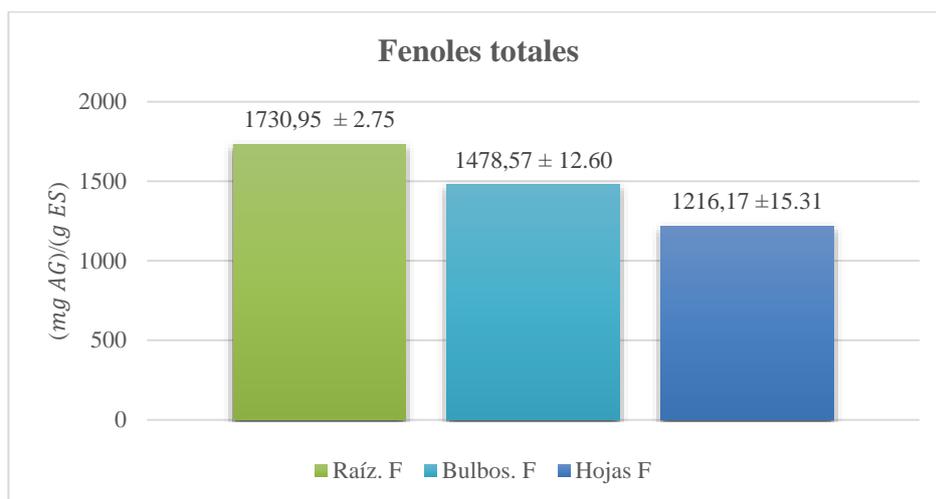


Figura 17. Resultados de la cuantificación de Fenóles totales en hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*

7.3.4 Determinación de flavonoides totales por el método de tricloruro de Aluminio

La determinación de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio realizado a las hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* indicó un comportamiento similar al obtenido en el ensayo de fenoles totales del item anterior con un valor de 1947.78 ± 48.47 mg Q/g ES para la raíz, 1678.68 ± 64.12 mg Q/g ES en los bulbos y 1662.52 ± 60.56 mQ/g ES en el caso de las hojas (los cálculos se pueden consultar en el anexo 7) es decir, que probablemente gran parte de los fenoles presentes en cada uno de los extractos analizados y los responsables de la actividad biológica de la planta se deban a su contenido de flavonoides o compuestos con estructura similar que logran formar complejos con el aluminio. Realizando una comparación cuantitativa entre los flavonoides encontrados para *C. warscewiczii* y otras especies de orquídea como *Vanilla planifolia* con 94.24 mg Q/g ES (Mencias,H.,Salazar, 2018) se puede decir que en el caso de la orquídea estudiada

su contenido de flavonoides supera en gran medida al de la *V.planifolia*, lo cual podría indicar los resultados de actividad antioxidante obtenidos previamente en los ensayos de ABTS y DPPH.

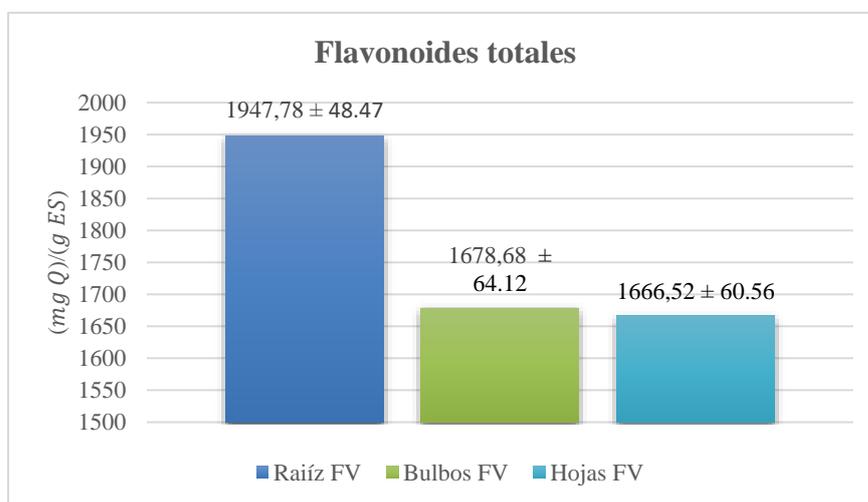


Figura 18. Resultados de la cuantificación de Fenoles totales en hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*

7.3.5 Correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales

En la tabla 10 se muestra que la correlación de Pearson entre los resultados obtenidos en el ensayo de Folin-Ciocalteu y el ensayo de evaluación de la capacidad captadora de radicales DPPH son positivas para los tres extractos de la planta, esto quiere decir que el 98.18%; 96.11% y 99.18% de la actividad evaluada para los extractos de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* respectivamente resultan de la presencia de compuestos fenólicos. Al tratarse de un valor positivo, indica que a medida que aumenta el contenido de fenoles en la muestra analizada, también incrementará su porcentaje de inhibición frente a los radicales DPPH.

De forma análoga la correlación de Pearsón entre los resultados de absorbancia obtenidos en el ensayo de Folin-Ciocalteu y ABTS, fueron respectivamente para hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* 99.53%, 94.48% y 99.48% de este modo con este ensayo tambien se puede concluir que la actividad antioxidante detectada, aumenta con el incremento de los compuestos fenólicos.

Tabla 10. Correlación entre Fenoles totales y ensayos de DPPH y ABTS para hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii*.

Correlación	r ²		
	Hojas	Raíz	Bulbos
Folin-Ciocalteu-DPPH	0.9818	0.9815	0.9918
Folin-Ciocalteu-ABTS	0.9953	0.9448	0.9948

7.3.6 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de Rancimat

Experimentalmente el tiempo de inducción (t_i) para el aceite de coco sin antioxidantes fue de 0.02 h, para el cual se obtuvo un factor de protección de 1.00 ± 0.00 empleando la ecuación 3, este valor incrementó en 0.017 unidades cuando se adicionaron los extractos de hojas y bulbos de *C. warscewiczii* a una concentración de 1000 ppm en el aceite de coco, mientras que en caso del EET de raíz no se presentó ningún tipo de variación respecto al aceite de coco virgen como se observa en la tabla 11, del mismo modo para el BHT a una concentración de 200 ppm no se presentó variación del tiempo de inducción respecto al aceite de coco sin antioxidantes y su valor también fue de 1.00 ± 0.00 al igual que para el romero a 1000 ppm.

A pesar de la alta estabilidad reportada para el aceite y grasa de coco (Anant, D., Aiqian, Ye., Harjinder, 2019) se observó experimentalmente que el tiempo de inducción determinado por el método de rancimat fue bajo 0,02h lo cual pudo haber sucedido por un mayor contenido de ácidos grasos insaturados que pueden haber sido oxidados y a su vez esto generar una mayor variación en la conductividad del agua debido a la formación del ácido fórmico.

Tabla 11. Resultados experimentales obtenidos en el ensayo de Rancimat

Sustancia estudiada	t ₁ (h)	t ₂ (h)	t ₃ (h)	FP ₁	FP ₂	FP ₃	FP P	SD
ACV	0.02	0.02	0.02	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
AC-BHT	0.02	0.02	0.02	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
AC- Romero	0.02	0.02	0.02	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
AC-Hojas*	0.02	0.02	0.03	1.00	1.00	1.50	1.17	0.35
AC-Raíz*	0.02	0.02	0.02	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
AC-Bulbos*:	0.02	0.02	0.03	1.00	1.00	1.50	1.17	0.35

Donde AC: Aceite de coco; ACV: Aceite de coco virgen; FP: Factor de protección; * de *C. warscewiczii*.

En la literatura se ha reportado que en el caso del análisis de Rancimat realizado con el aceite de Chia en presencia de BHT a 110 °C se presentó un factor de protección de 1.30 ± 0.30 es decir, 0.30 unidades superior al resultado experimental obtenido con el aceite de coco, sin embargo, el factor de protección para hojas y bulbos de *C. warscewiczii* fúe superior al reportado para el antioxidante sintético BHA(butilhidroxianisol) y el antioxidante natural Fortium, con valores respectivos de 1.09 ± 0.002 a una temperatura de 110 °C. (Villanueva, E., Rodríguez, G; Aguirre, E; Castro, Rodríguez, Aguirre, & Castro, 2017), por tal motivo se puede decir que los EET de hojas y bulbos de *C.warscewiczii* presentan una activa respuesta antioxidante. Dicha afirmación adquiere más fuerza al traer a colación los resultados obtenidos en el ensayo de ABTS, en el cual el EET de los bulbos fué el que presentó un valor de $IC_{50} = 1069.09 \pm 15.64$ más bajo, es decir una mejor capacidad captadora de radicales libres $ABTS^{\circ+}$.

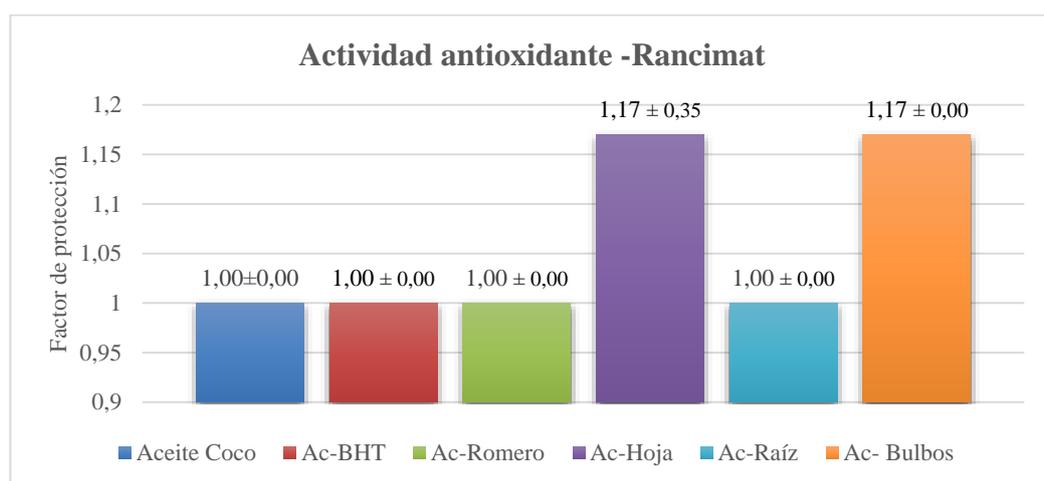


Figura 19. Resultados de hojas, raíz y bulbos para *C. warscewiczii* en el ensayo de Rancimat.

7.4 Determinación de la actividad fitotóxica frente a *Allium cepa*

Experimentalmente se encontró que de los EET de *C. warscewiczii* analizados, las raíces fuerón las que presentarón un IC_{50} más bajo, siendo este 188.08 ± 5.24 ppm seguido del EET de bulbos con 217.43 ± 7.10 ppm y 50 unidades de concentración por encima de este valor, estuvo el IC_{50} del EET de las hojas con 267.53 ± 5.91 ppm como se observa en la figura 20 (los cálculos para la determinación de los valores de IC_{50} se pueden consultar

en el anexo 5 al final del presente documento), esto se traduce a que en las raíces de *C. warscewiczii* al presentar un valor más bajo de IC₅₀ generan una mayor inhibición en el crecimiento celular y elongación de la zona radicular de *A. cepa* debido a su mayor toxicidad (Romero, P., Mendoza, 2008). De este modo se puede decir que el EET de la raíz de *C. warscewiczii* generó mayor inhibición y muerte celular que los EET de hojas y bulbos, siendo estas las células meristemáticas las cuales son inhibidas antes de llegar a la fase mitótica (Liman, R., İbrahim, H., Gökçe, 2018). Son pocos los estudios realizados en orquídeas respecto a la fitotóxicidad, sin embargo en el caso de *Epidendrum rigidum* la actividad fitotóxica es atribuida a derivados de bibencilos y en *Maxilaria densa* y *Nidema boothii* a los estilbenos (Cervantes, 2008). Por otra parte en la evaluación del extracto acuoso de hojas de *Physalis peruviana* que tiene diversas propiedades medicinales, entre ella su poder antioxidante, presentó en el ensayo de *Allium cepa* un IC₅₀ de alrededor de 30.000 ppm, por lo cual se puede decir que los extractos de *C. warscewiczii* contiene compuestos que elevan su toxicidad (Cruz-I et al., 2019).

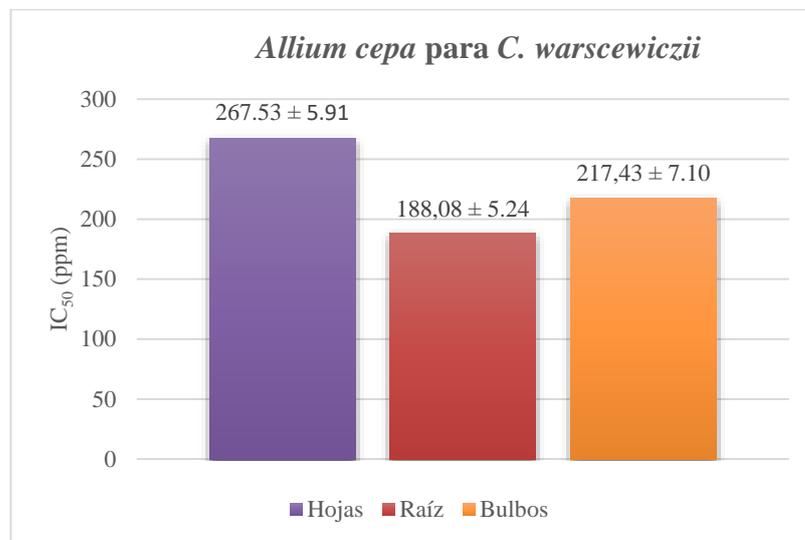


Figura 20. Resultados de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* para el ensayo de *Allium cepa*.

7.5 Determinación de la actividad citotóxica frente a *Artemia franciscana*

En la figura 20, se observan los resultados obtenidos en el ensayo de *A. franciscana*, para los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warszewiczii* con valores de CL_{50} de 344.17 ± 21.48 ppm; 185.27 ± 22.82 y 211.37 ± 26.46 ppm respectivamente. De este modo se puede decir que la parte de la planta que presentó un mayor nivel de toxicidad fueron las raíces, sin embargo, según la escala de clasificación de toxicidad del CYTED (ver anexo 6) este extracto se clasifica como moderadamente tóxico al igual que para el extracto de hojas y bulbos. Vale la pena mencionar que se realizó un control solo con la solución salina en el cual no se reportaron nauplios muertos luego de las 24 hora, al igual que un control con una solución de DMSO que fue empleado para solubilizar las muestras de los EET lograndose comprobar que éste no afectó los resultados del presente ensayo. Al igual que un ensayo con Dicromato de potasio comunmente utilizado como control positivo (González, Y., Aportela P. 2001).

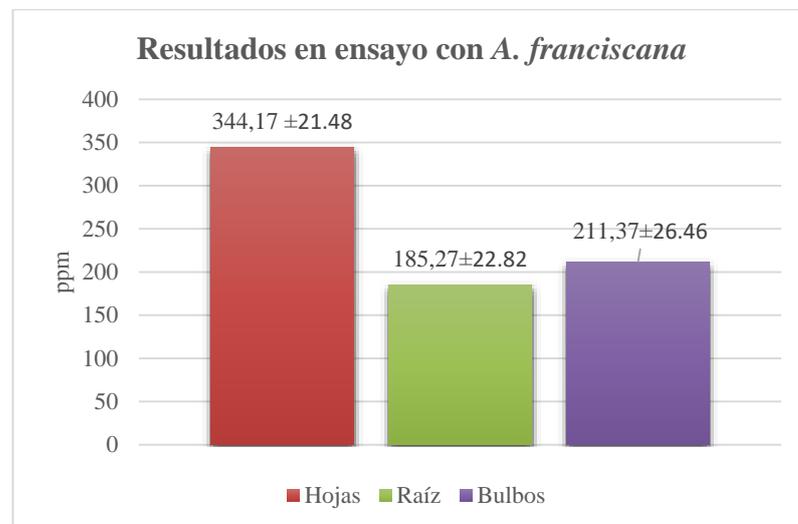


Figura 21 Resultados del ensayo de *A. franciscana* para hojas, raíces y bulbos de *C. warszewiczii*

En el ensayo de *A. cepa* se presentó una mayor toxicidad para las raíces de *C. warszewiczii* seguida de los bulbos y las hojas, un comportamiento que coincide con los resultados del presente ensayo con *A. franciscana* y teniendo en cuenta que las artemias son organismos filtradores que incorporan y almacenan en sus tejidos los minerales presentes en el medio

de cultivo lo cual se ve reflejados en las células embrionarias de los quistes y nauplios (Castro, T., Castro, J., Miramontones, 2003), se puede decir que el medio proporcionado por el extracto de raíces de *C. warscewiczii* fue más letal para los nauplios en comparación con las demás partes de la planta que fueron analizadas. Por ejemplo para distintas especies de Anonáceas de la familia de las angiospermas se atribuye la toxicidad a la presencia de alcaloides y acetogeninas, (Galvis, Ocampo, Ocampo, & Gutiérrez, 2012), de este modo se podría decir que la actividad de los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* en el presente ensayo, pueden ser debido a la existencia de alcaloides que se identificaron en el tamizaje fitoquímico o a los flavonoides en el ensayo de tricloruro de Aluminio discutidos previamente. Además en la orquídea *Cypripedium macranthos* se reportó que la elevada toxicidad y actividad antifúngica se debe a la presencia del estilbenoide Lusiantrin y la flavona Crisin (Shimura H , M., Takada, K. 2007), esto nos afirma la idea de pensar que en este caso la presencia de compuestos con estructuras similares a los encontrados en *Cypripedium macranthos* podrían encontrarse también en *C.warscewiczii* generando efecto similares.

7.6 Determinación de la actividad anticoagulante frente al veneno de *Bothrops asper*

Experimentalmente los resultados de la actividad anticoagulante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* frente al plasma sanguíneo empleando veneno de la serpiente *B. asper*, indicó leves incrementos en el tiempo de coagulación del plasma a concentraciones de los EET de 250 y 500 ppm, sin embargo se observó una diferencia significativa a 1000 ppm para los extractos de bulbos y raíz donde se presentó un efecto anticoagulante muy marcado que en promedio fue 5 veces mayor (62.01 y 56.77 s respectivamente) al tiempo de coagulación del control positivo (12.39 s), como se observa en la figura 22.

Por otra parte se estima que las plantas con propiedades anti-inflamatorias también disminuyen los efectos de la mordedura de serpientes y se tienen diversos reportes que ratifican el hecho de actividades anti-inflamatorias en la familia Orchidaceae, como el extracto de raíz de *A. Africana* que presenta una excelente actividad antiinflamatoria en un ensayo de ciclooxigenasas basado en enzimas.(Chinsamy, Finnie, & Van Staden, 2014). De tal manera que la actividad anticoagulante de los bulbos y raíz de *C.warscewiczii*

puede estar correlacionada también con una posible actividad anti-inflamatoria de esta especie.

Por su parte los compuestos fenólicos son bien conocidos por su capacidad para unirse con proteínas, especialmente los complejos polifenoles conocidos colectivamente como taninos. Se ha demostrado que el tanino de caqui, el fruto de *Diospyros kaki* (Ebenaceae) inhibe la hinchazón producida en los pies de los ratones por el veneno de serpiente (Houghton., Osibogun, 1993). De este modo se podría decir que la actividad anticoagulante presentada por los extractos de las raíces y bulbos de *C.warscewiczii* pueden ser debido a la presencia de compuestos fenólicos, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el ensayo de Folin-Ciocalteu en el que estas dos partes de la planta fueron las que presentaron una mayor concentración de fenoles.

Además se debe tener en cuenta la capacidad de los flavonoides de quelar iones metálicos como el hierro y cobre y que la actividad hemorrágica de los venenos de serpiente es consecuencia de la acción enzimática de metaloproteinasas dependientes de zinc varias de las cuales han sido caracterizadas en el veneno de *B. asper*. Por lo cual se podría pensar que los flavonoides presentes en los extractos evaluados podrían haber inhibido la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* mediante una acción quelante.

Por otra parte, no se debe descartar la posible acción de los taninos condensados, ya que estos compuestos, siendo formas poliméricas derivadas de la catequina y la epicatequina, también podrían interferir con el zinc ubicado en el sitio activo de las metaloproteinasas hemorrágicas además que se ha descrito que estos compuestos disminuyen la fragilidad capilar y tienen acciones antiinflamatorias. (Castro, O., Gutiérrez, J., Barrios, M., Castro, I., Romero, M., & Umaña, E. 1999).

Tabla 12. Resultados de la actividad anticoagulante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii*

Parte de la planta	Concentración (μg Veneno/ mL Slon)	$t_1(s)$	$t_2(s)$	$t_3(s)$	$t_{prom}(s)$	S
Hojas	250	12.38	14.39	13.08	13.28	1.0203
	500	13.53	15.10	13.15	13.93	1.0337
	1000	18.42	16.08	16.31	16.94	1.2897
Raíz	250	12.78	11.37	11.91	12.02	0.7114
	500	15.30	14.10	15.70	15.03	0.8327
	1000	61.52	61.69	62.83	62.01	0.7123
Bulbos	250	10.41	11.96	12.66	11.68	1.1514
	500	14.50	14.08	15.99	14.86	1.0037
	1000	56.87	55.62	57.82	56.77	1.1034
Control		12.01	12.80	12.36	12.39	0.3959

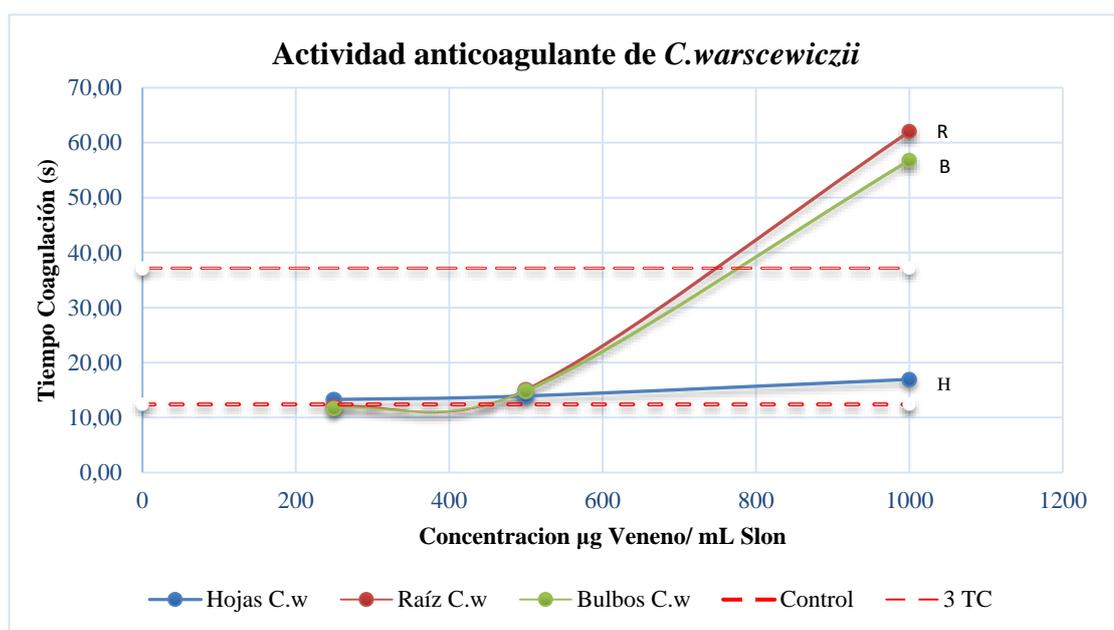


Figura 22. Resultados de actividad anticoagulante de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii*.

7.7 Caracterización de fenoles en *C. warscewiczii* por GC-MS

Mediante el procedimiento descrito en la sección 6.9 y la técnica de GC-MS se logró aislar e identificar un compuesto presente en los tres EET de la planta *C.warscewiczii* con una probabilidad mayor al 95.5% y con un tiempo de elución del 31.6 minutos.

Este compuesto corresponde al Agidol 2 cuya fórmula y peso molecular son respectivamente $C_{23}H_{32}O_2$ y 340.25 g/mol, su nombre IUPAC es 2 – terc – butil – 6 - [(3 – terc - butil – 2 – hidroxil – 5 - metilfenil) metil] – 4 –metilfenol, también conocido comercialmente como Calco 2246 (National Center for Biotechnology Information 2019) y comunmente utilizado como antioxidante para estabilizar los elastómeros derivados del polibutadieno terminado con hidroxilo (HTPB) para evitar su endurecimiento (Villar; D., Sbegue, L., Rezende, C. 2008) su estructura química se puede observar en la figura 23.

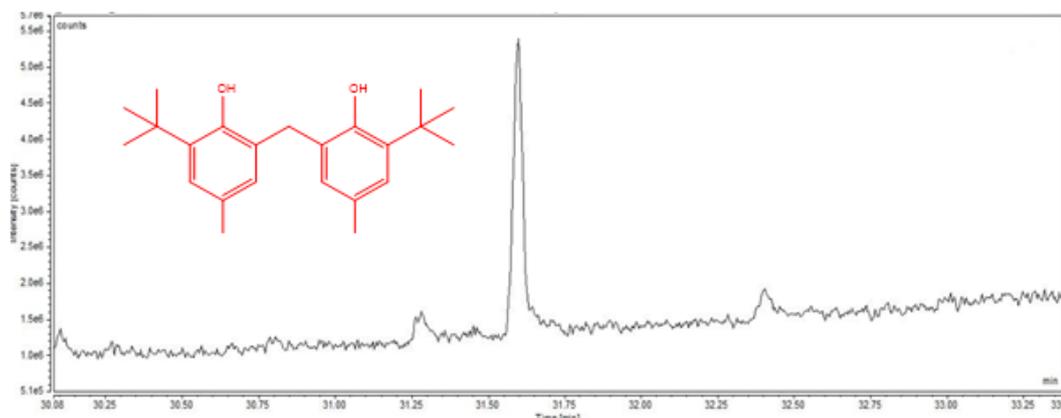


Figura 23 . Cromatograma del compuesto fenólico encontrado para hojas de *C.warscewiczii*.

Por otra parte, en la tabla 13 se indican los porcentajes de extracción del compuesto Agidol-2 a partir de cada uno de los EET de *C.warscewiczii*, en el caso de las hojas este valor fué de 7.2×10^{-3} % puesto que se partió de 50 g del respectivo EET y se obtuvo 3.6 mg de Agidol 2, por su parte tanto en las raíces como los bulbos, el porcentaje de extracción fué de 16.5×10^{-3} % ya que de 20 g del EET se obtuvo 3.3 mg de Agidol 2. Así mismo se encontró que el área obtenida para el extracto de la raíz de *C.warscewiczii* fue mayor en comparación al área de los bulbos y hojas para una concentración de 1100 ppm en los tres casos (1.1 mg Agidol-2 en 1 mL de diclorometano). Este comportamiento podría indicar la mayor actividad biológica para las raíces de *C.warscewiczii* obtenida en

los ensayos de actividad antioxidante, fototóxica, citotóxica y anticoagulante mencionados previamente. Además de ello, los EET no fueron solubles en agua por lo cual se debió usar dimetilsulfoxido para su solubilización y una de las características del Agidol 2 según la literatura es precisamente su baja solubilidad en agua (0.02 mg/L) y una elevada solubilidad en solventes orgánicos (National Center for Biotechnology Information 2019) lo cual es un indicio cualitativo de su presencia en los extractos.

Tabla 13. Resultados de extracción y cuantificación del Agidol-2 en hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*

Parte de la planta	%Extracción	Concentración analizada en el GC-MS (ppm).	Area obtenida en el GC-MS
Hojas	7.2×10^{-3}	1100	29468.75
Raíz	16.5×10^{-3}	1100	105637.36
Bulbos	16.5×10^{-3}	1100	66770.32

Por otra parte, el espectro de masas de la figura 24.a indica la relación masa/carga de los fragmentos obtenidos luego del impacto electrónico con la técnica de GC-MS.

Como se puede observar de la figura 24.b, el pico del ión molecular para este compuesto presenta un valor de $m/z = 340$ con una intensidad cercana al 40 %, este catión radical a su vez puede sufrir una ruptura homolítica sobre el grupo terc-butilo ubicado en la posición alfa respecto al grupo OH y generar una pérdida de 56 unidades de masa correspondiente al isobuteno, lo cual produce el pico que se observa a $m/z = 284$.

Por otra parte el pico observado a $m/z = 177$ corresponde al ión tropilo formado luego de una ruptura homolítica en la posición bencílica del compuesto Agidol-2 y un posterior rearrreglo para formar esta especie de 7 miembros de carbono, el cual es de gran estabilidad y cuando se forma, generalmente representará el pico base en el espectro de masas, siendo este caso un claro ejemplo de ello con una abundancia de 100% (Morrison, R., Boyd, R. 1998). A su vez el ión tropilo puede continuar fragmentandose y es muy común en los fenoles, las pérdidas de 28 unidades correspondientes al grupo CO (Silverstein, R., Webster, F., Kiemle, D. 2005) en este caso puntual, esto genera la señal con una $m/z = 149$.

Otra ruta de fragmentación muestra que también se puede llevar a cabo un rearrreglo de Mc-Lafferty con la posterior pérdida del grupo terc-butilo, que genera un alqueno neutro y un catión tropilo de $m/z=121$.

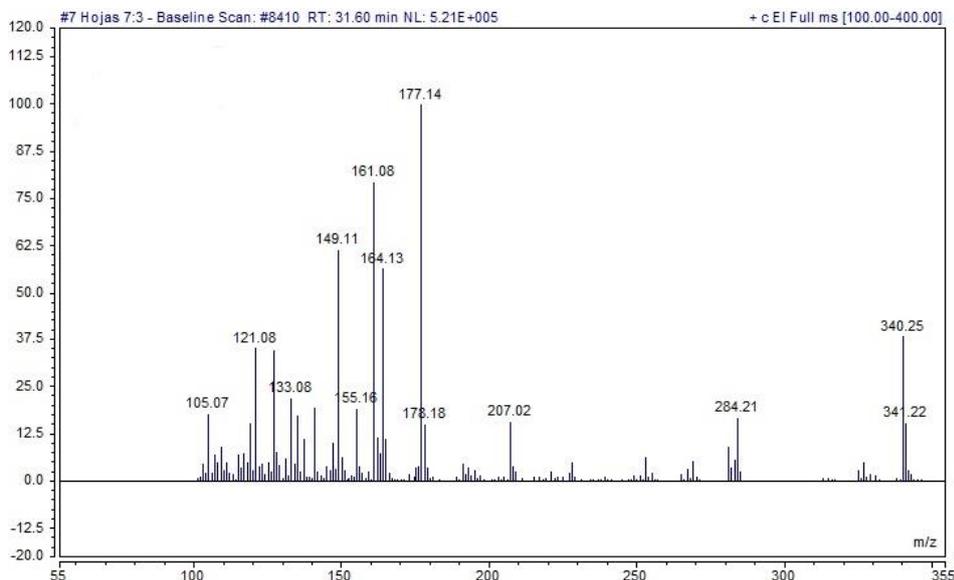


Figura 24.a Espectro de masas para Agidol-2 en hojas de *C. warszewiczii*.

El fragmento con $m/z = 121$ puede continuar su fragmentación con la eliminación de CO, lo que conlleva a formar un anillo de 6 miembros, luego de lo cual hay pérdida de H₂ y se forma de nuevo el anillo aromático que tiene un valor de $m/z = 91$ como se indica en la figura 24.c, este valor no se observa en el espectro experimental de la figura 24.a debido a que el rango de masas en el cual se trabajó fue de 100-400 uma, pero si se logra identificar en el espectro de masas teórico obtenido de la base de datos NIST que se encuentra en la figura 69 del anexo 8.

Por otro lado la figura 24.d muestra la propuesta de fragmentación para el ión con un valor de $m/z=161$ luego de un arreglo de McLafferty utilizando el hidrógeno en la posición β respecto al grupo hidroxilo en uno de los anillos aromáticos, generandose el benzino como molécula neutra y el respectivo catión radical en el que se restablece nuevamente el anillo aromático y posteriormente con la pérdida del radical metilo y una molécula de H₂ se genera un doble enlace en la ramificación alquílica del anillo aromático dando de este modo la señal cromatográfica correspondiente.

Por otra parte continuando con la fragmentación del catión con $m/z = 163$ generado de la ruptura bencílica del ión molecular y de igual manera como se mencionó anteriormente, una pérdida de CO y luego de H₂ se genera el catión de $m/z= 133$ con una intensidad

menor al 25%. Finalmente en la figura 24.e se indica la formación de dos picos que se encuentran en el espectro de masas teórico uno con un valor de $m/z = 15$ que corresponde al catión metilo, y un valor de $m/z = 57$ para el ión terbutilo (remitirse a la figura 69 del anexo 8).

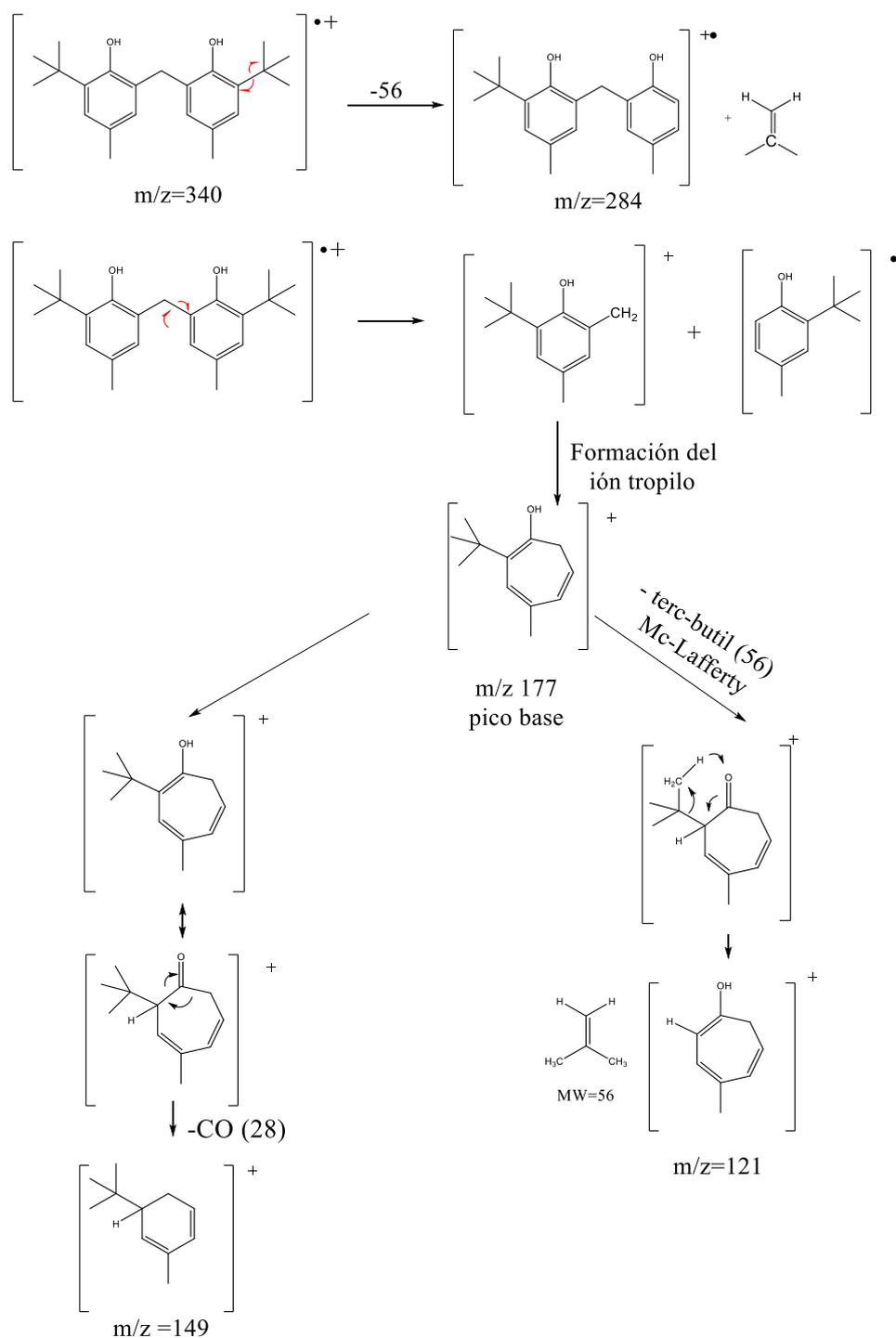


Figura 24.b Propuesta del mecanismo de fragmentación del Agidol 2 :ión molecular y pico base.

Continuando desde el fragmento de $m/z = 121$ se tiene:

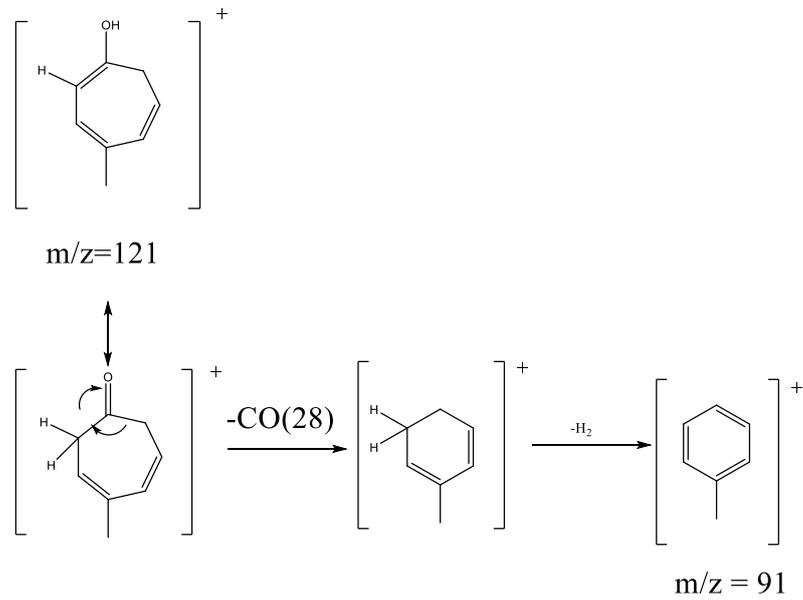


Figura 24.c Propuesta del mecanismo de fragmentación del Agidol 2 para $m/z = 91$

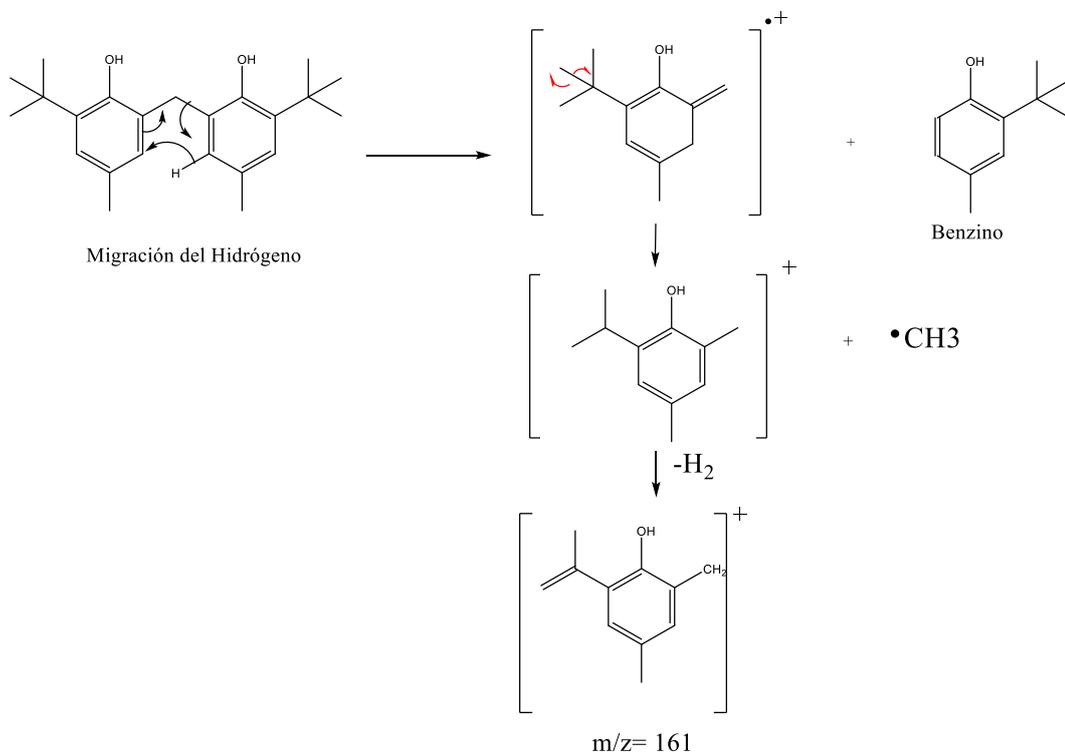


Figura 24.d Propuesta del mecanismo de fragmentación del Agidol 2 para $m/z = 161$.

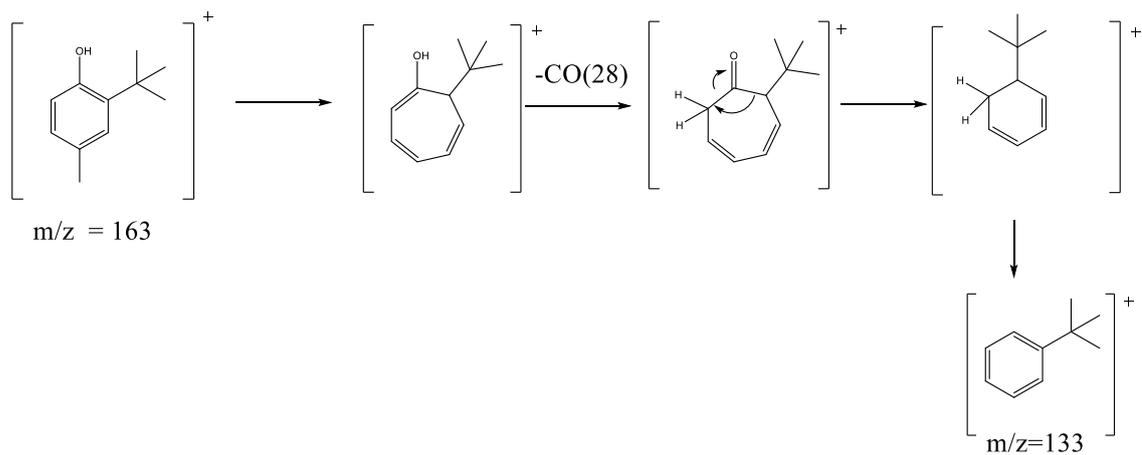


Figura 24.e Propuesta del mecanismo de fragmentación del Agidol 2 para $m/z = 133$

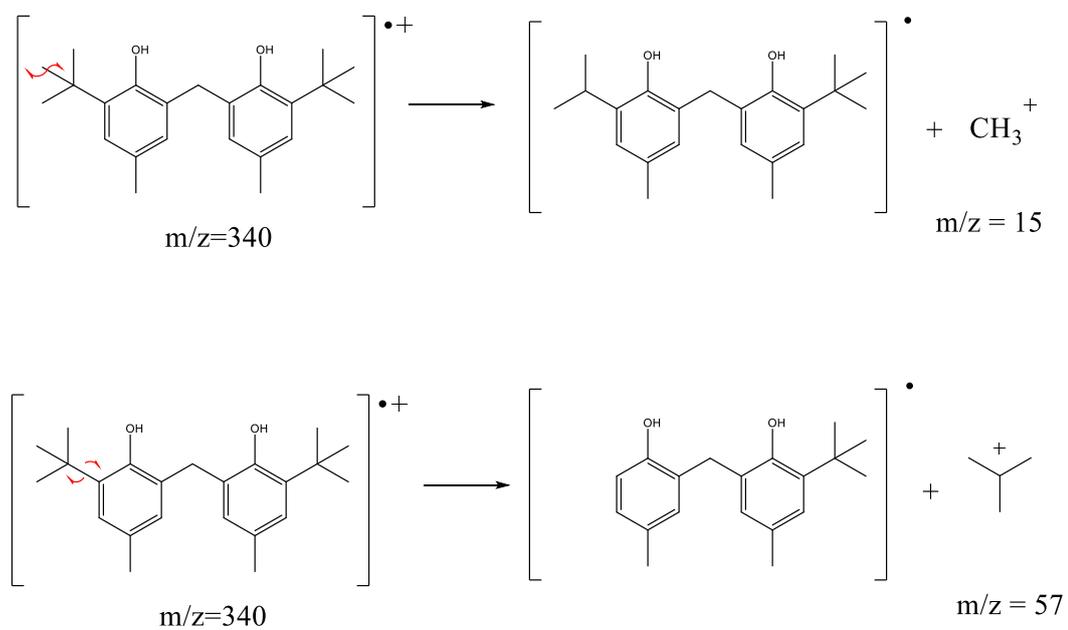


Figura 24.f Propuesta del mecanismo de fragmentación del Agidol 2 para $m/z = 15$ y 57

7.8 Cálculos teóricos de mecánica molecular

Con el ánimo de explicar el posible efecto farmacológico del compuesto Agidol 2, identificado en la planta *C.wascewiczii* sanderiana, se escogieron tres proteínas que están implicadas en diversos procesos biológicos dentro de la manifestación de algunas enfermedades. Tal es el caso de la Acetilcolinesterasa, implicada principalmente en los procesos de pérdida de la memoria en el Alzheimer (Cacabelos, R. 2001), la Trombina, relacionada con los procesos de coagulación sanguínea (Bustelo, B., Giraldo, G & Cruz, J. 2010) y la Aminooxidasa B, asociada con la enfermedad del Parkinson (Escobar, G. 2015).

De este modo, se realizaron cálculos computacionales de docking molecular, una herramienta predictiva, que permite acercarse a la realidad y establecer si una reacción va a ocurrir o no y conocer cómo interaccionan las proteínas con diversos fármacos (Sanchez, J.2016). En este procedimiento las proteínas se conocen como receptor, ya que es la especie que recibe al ligando, siendo este último el compuesto o fármaco del cual se desea conocer su actividad biológica.

Para llegar hasta la realización del docking molecular, primero se realizó la optimización estructural del ligando Agidol 2 al igual que de 9 ligandos adicionales que son empleados en la actualidad para el tratamiento del Alzheimer, Parkinson o problemas de coagulación sanguínea. En la figura 25 se observa la estructura de menor energía para el agidol 2, es decir, la más estable según los resultados generados por el programa Gabedit 2.4.10 (los valores de energía calculados se pueden consultar en la tabla 39 del anexo 9), en esta estructura uno de los grupos fenilo junto con sus sustituyentes alquílicos se encuentran en el mismo plano, pero el otro anillo aromático se encuentra con un ángulo de desviación alejando los grupos OH, este mismo procedimiento se realizó para cada uno de los ligandos de interés, optimizándose así su estructura antes de la realización del docking molecular.

Los resultados obtenidos a partir de la interacción de las proteínas Acetilcolinesterasa, Trombina y monoaminooxidasa B con los ligandos se muestran en la tabla 14 obtenidos con el programa Hex Protein Docking 8.0, encontrándose que en el caso de la interacción del agidol 2 con la acetilcolinesterasa, este solo estuvo 61 unidades por debajo de la

energía de interacción que presentó el Paration el cual es un plaguicida organofosforado que inhibe la enzima acetilcolinesterasa pero presenta una elevada toxicidad (Ferrer, A. 2003) por lo cual no es empleado como fármaco.

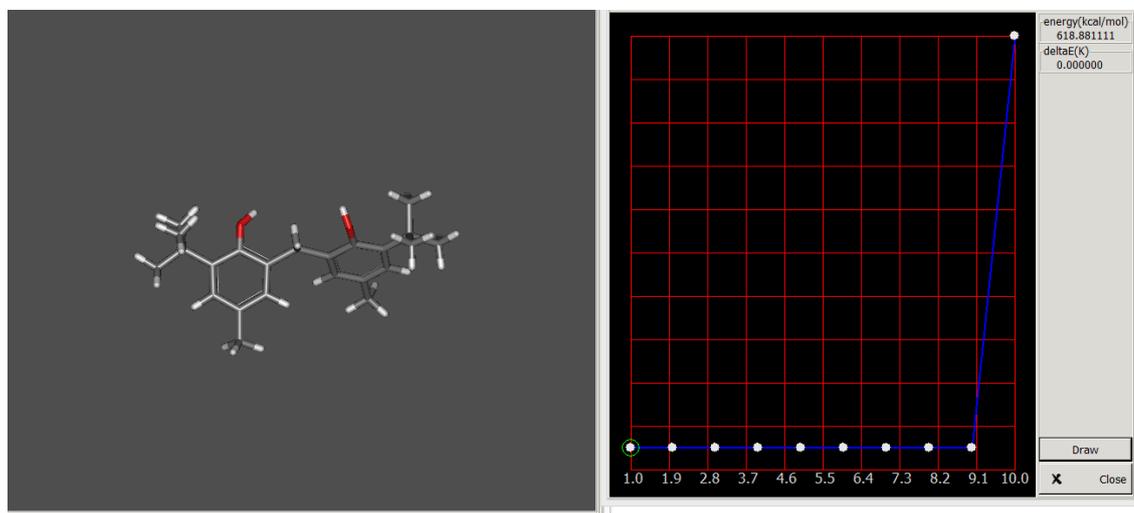


Figura 25. Resultado de la optimización de la estructura del Agidol-2 en el programa Gabedit 2.4.10.

Por su parte la interacción del Agidol- 2 con la Trombina indica que podría tener aplicaciones en este contexto ya que luego de realizar el docking molecular la energía de interacción fué incluso mejor,(es decir, más negativa), que la obtenida con la warfarina con valores de 281.70 KJ/mol y -267.17 KJ/mol respectivamente, este hecho puede ser uno de los motivos por el cual la actividad anticoagulante frente al veneno de *B.asper* fué eficaz a una concentración de 1000 ppm como se mencionó en la sección 7.6.

Finalmente los resultados de docking molecular entre el Agidol-2 y la monoaminoxidasa B, indican que éste fué el que presentó la mejor respuesta, dando un valor de energía mas bajo -295.58 KJ/mol en comparación con algunos fármacos empleados en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad del Parkinson, de este modo se predice una posible aplicación en esta patología.

Vale la pena mencionar que para calculos computacionales como el que se llevó a cabo, el algoritmo del software debe presentar valores de RMS (Root-Mean-Square) inferiores a 2Å (Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., & Vivas, R. 2013), recordemos que este valor corresponde a la raíz cuadrática media, es decir, los cuadrados de las

distancias entre los sitios de interacción de tal modo que no haya ni solapamiento de van der Waals ni repulsión electrostática entre el fragmento y los átomos del receptor (Gago, F. 2013).

En el presente estudio, el valor RMS en todos los casos fue de 1.00Å por lo cual se puede considerar que estos cálculos teóricos tendrían una buena aproximación con ensayos experimentales llevados a cabo en el laboratorio de manera *in vitro* o *in vivo*.

Tabla 14. Resultados de Energía obtenida del docking molecular para Agidol-2 y diversas proteínas

Proteína (Receptor)	Ligando	Energía – Docking molecular. Hex Protein Docking 8.0.0 (KJ/mol)
Acetilcolinesterasa (Alzheimer)	Paration	-261.08
	Galantamina	-247.48
	Tacrina	-217.34
	Agidol 2	-200.78
Trombina (Coagulación sanguinea)	Dabigatrán	-360.81
	Heparina	-313.95
	Agidol 2	-281.70
	Warfarina	-267.17
Monoaminoxidasa B (Parkinson)	Agidol 2	-295.58
	Ledopa	-281.96
	Ropinirol	-270.12
	Selegilina	-195.73

Teniendo en cuenta que algunos compuestos fenolicos pueden presentar actividad anticoagulante (Yarlequé, M. 2016) y considerando los resultados obtenidos en el ensayo de Folin-Ciocalteu y la identificación cromatográfica de fenoles en los EET de *C.warszewiczii* puede entonces decirse que la actividad anticoagulante frente al veneno de la serpiente *B.asper* así como los resultados del docking molecular con la Trombina, se deban en parte a la presencia del compuesto Agidol-2.

De manera similar, también se ha reportado una estrecha relación entre los efectos que los anticoagulantes causan en personas con la enfermedad del Parkinson, donde se

describe que estos ayudan en el control y prevención de la enfermedad (Friberg, L., Rosenqvist, M. 2018).

De este modo se puede ver que en el caso de los resultados computacionales del Agidol-2 frente a la Monoaminoxidasa B existió una interacción mayor que con la Levodopa, probablemente debido a la similitud estructural puesto que en ambos casos existe un anillo aromático y grupos OH.

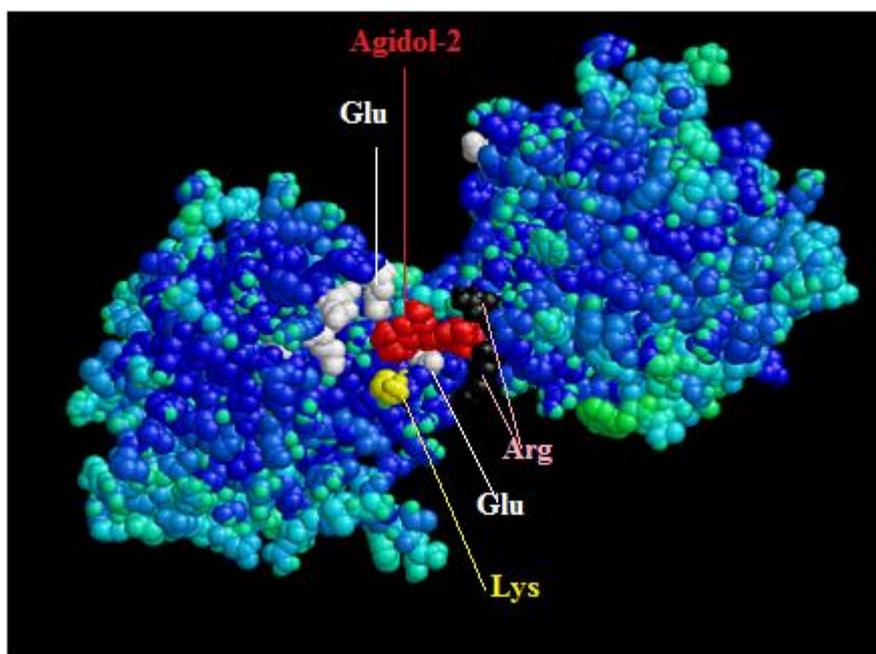


Figura 26. Resultados de los cálculos de docking molecular entre Agidol 2 y Trombina. y aminoácidos de mayor interacción.

Por otro lado, luego de realizar el docking molecular para determinar la interacción entre el ligando Agidol 2 y la Protombina se puede decir que luego la mayor interacción de este ligando se presenta con los aminoaciidos : Glu 186,14 (blanco);Lys 186(amarillo); Arg 175,173(negro) de la proteína como se observa en la figura 26.

En el caso de la interacción del Agidol 2 con la acetilcolinesterasa, los aminoacidos que interaccionan con este después de realizar el docking molecular son : Tyr 121,334,70 (amarillo);Phe 331,330 (verde) ; Asp 72(blanco), tal como se puede apreciar en la figura 27. Y en el caso de la interacción en la monoaminoxidasa B con el Agidol 2, los aminoacidos mas cercanos a este último luego de realizar el docking son:Glu 141,350 (blanco);Lys 351(purpura);Arg 350 (amarillo); His 178(rosa), figura 28.

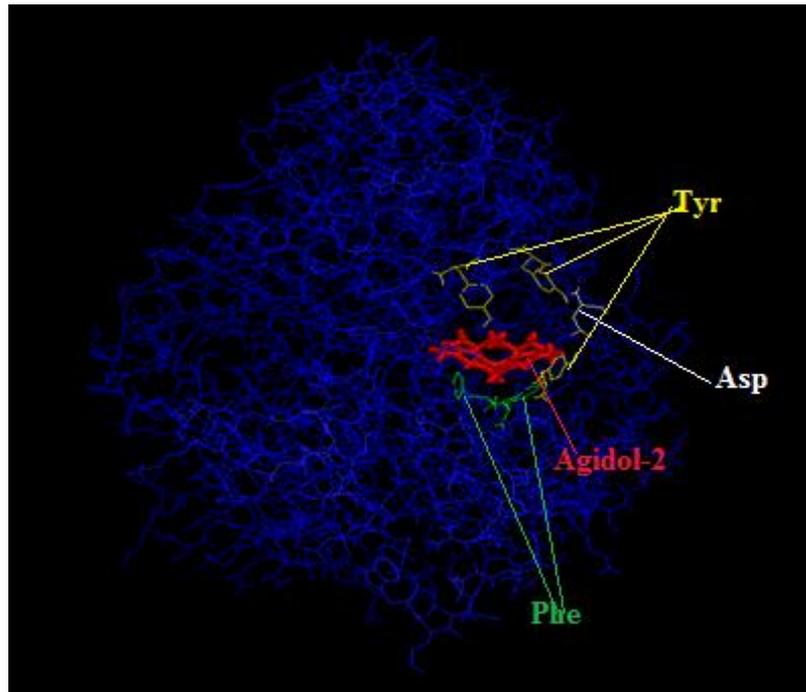


Figura 27. . Resultados de los cálculos de docking molecular entre Agidol 2 y Acetilcolinesterasa. y aminoácidos de mayor interacción.

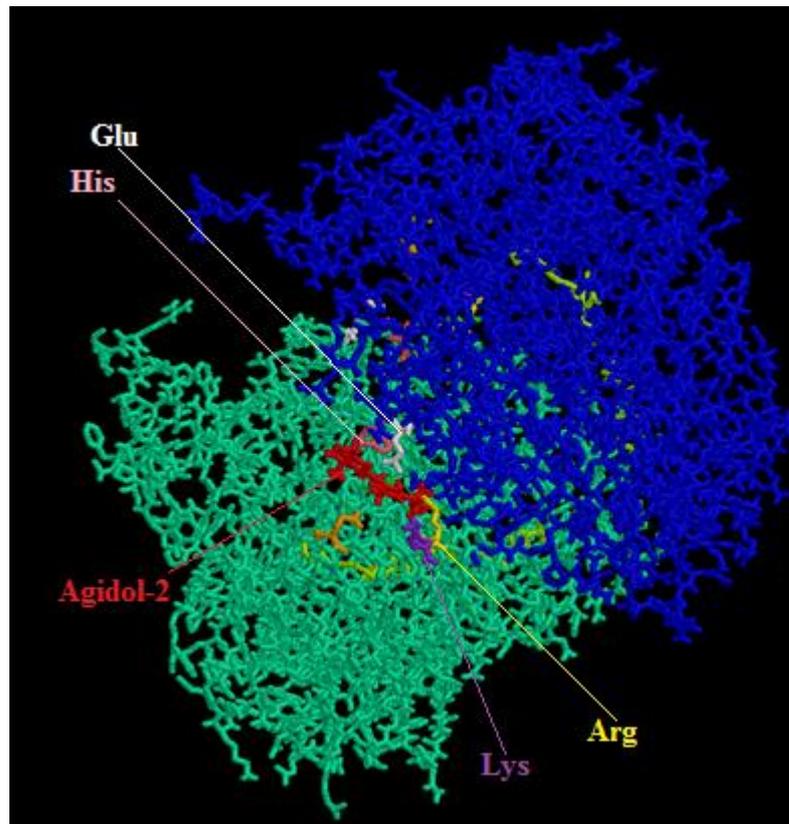


Figura 28. . Resultados de los cálculos de docking molecular entre Agidol 2 y Monoaminoxidasa B. y aminoácidos de mayor interacción.

8.CONCLUSIONES

1. Los resultados de tamizaje fitoquímico para los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* indican la presencia de alcaloides, triterpenos y/o esteroides, flavonoides y cardiotónicos.
2. Se determinó que el EET de la raíz de *C. warscewiczii* tuvo una mejor respuesta respecto al atrapamiento del radical DPPH respecto a las demás partes de la planta estudiadas, con un valor de $IC_{50} = 117.44 \pm 4.72$ ppm , seguida de los bulbos con 151.04 ± 6.20 ppm y finalmente las hojas con un IC_{50} de 253.94 ± 6.45 ppm.
3. Se determinó una mayor capacidad captadora del radical ABTS para el EET de los bulbos de *C.warscewiczii* con un valor de $IC_{50} = 1124.28 \pm 15$ ppm , seguida de la raíz con $IC_{50} = 1212.75 \pm 124.74$ ppm y hojas un $IC_{50} = 2091.0 \pm 6808$ ppm.
4. A nivel experimental se obtuvo un mayor contenido fenólico en la raíz de *C. warscewiczii* con 1730.95 ± 2.75 mg AG/g ES, seguido de los bulbos con 1478.57 ± 12.60 mg AG/g ES y finalmente las hojas con 1216.17 ± 15.31 mg AG/g ES.
5. El método de tricloruro de Aluminio indicó un mayor contenido de flavonoides en la raíz de *C. warscewiczii* con 1947.78 ± 48.47 mg Q/g ES seguido de los bulbos 1678.68 ± 64.12 mg Q/g ES y hojas con 1666.52 ± 60.56 mg Q/g ES, lo cual podría ser una explicación de la capacidad captadora de radicales libres DPPH y ABTS.
6. La correlación de Pearsón indicó que el 98.18%; 96.11% y 99.18% de la actividad de los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* frente al radical DPPH para resulta de la presencia de compuestos fenólicos. Además que para hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* el 99.53%, 94.48% y 99.48% de la actividad antioxidante frente al radical ABTS también aumenta con el incremento de los compuestos fenólicos.

7. En el ensayo de Rancimat se encontró un factor de protección mayor para los EET de hojas y bulbos de *C. warscewiczii* a una concentración de 1000 ppm con el aceite de coco, mientras que en caso de del EET de raíz no se presentó ningún tipo de variación en el factor de protección respecto al aceite de coco vírgen.
8. El EET de raíz de *C. warscewiczii* fue el que presentó una actividad fitotóxica mayor con un $IC_{50}=188.08\pm 5.24$ ppm seguido del EET de bulbos con 217.43 ± 7.10 ppm y hojas con 267.24 ± 5.91 ppm.
9. El ensayo de *A. franciscana* indicó una mayor citotoxicidad para el EET de la raíz de *C. warscewiczii* con un valor de $CL_{50}=185.27\pm 22$ ppm. Seguida de la actividad de los bulbos con 211.37 ± 26.46 ppm y finalmente la hojas con 344.17 ± 21.48 ppm.
10. La actividad anticoagulante de los EET de raíz y bulbos de *C. warscewiczii* fue mayor que la presentada por el EET de los bulbos a una concentración de 1000 ppm, respecto al veneno de se *B. asper*. Se infiere que dicha actividad se debe en parte por el contenido fenólico determinado en el ensayo de (F-C) , ya que los fenóles están relacionados con una respuesta anticoagulante.
11. Se logró la identificación por medio de la técnica de cromatografía de gases acoplado a masas, del compuesto Agidol-2, presente en hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* con un tiempo de elucion de 31.60 minutos, con una mayor concentración en la raíz de esta planta.
12. Se observó una buena interacción entre el Agidol-2 y las proteínas Acetilcolinesterasa, Protombina y Monoaminoxidasa B respecto a fármacos empleados comercialmente . Siendo de este modo el Agidol -2 un compuesto que probablemente se pueda emplear con fines anticoagulantes o para el control de enfermedades del sistema nervioso central como el Alzheimer y el Parkinson.

11. RECOMENDACIONES

Luego de llevar a cabo los diversos ensayos de actividad biológica con los EET de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* se sugieren las siguientes recomendaciones para posteriores análisis de esta especie.

1. Despigmentar los extractos empleados previamente a la realización del tamizaje fitoquímico para lograr apreciar de una mejor manera los resultados colorimétricos obtenidos.
2. En los ensayos de actividad antioxidante empleando soluciones de DPPH y ABTS se debe garantizar que la luz no incida sobre dichas soluciones, puede emplearse papel aluminio para cubrir las soluciones preparadas.
3. Emplear una mínima cantidad de metanol que garantice la solubilidad de los EET antes de ser mezclados con el aceite de coco en el ensayo de Rancimat.
4. Indagar sobre la presencia de más compuestos activos en *C. warscewiczii* con posible actividad farmacéutica.
5. Complementar los estudios de docking molecular para proteínas adicionales a las ya mencionadas en el presente documento.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abuashwashi, M. (2018). *Estudio analítico y de la actividad antioxidante de Rosmarinus officinalis L. de la península Ibérica*. Madrid.
- Amaya, L., Portillo, C. (2013). *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melasa, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de Espectrofotometría Uv-Vis*. San Salvador, El Salvador, Centro América. Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5311/1/16103410.pdf>
- Anant, D., Aiqian, Ye., Harjinder, S. (2019). Structural and interfacial characteristics of oil bodies in coconuts (*Cocos nucifera L.*). *Food Chemistry*, 276, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.125>
- Aramburu, A. (2001). *Estudio de extractos tánicos obtenidos a partir de hojas de Zumaque (Rhus coriaria L.)*. Alcacete. Retrieved from [https://ruidera.uclm.es/xmLui/bitstream/handle/10578/2273/TESIS Zalacain Aramburu.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://ruidera.uclm.es/xmLui/bitstream/handle/10578/2273/TESIS%20Zalacain%20Aramburu.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Athipornchai, A., Jullapo, N. (2018). Tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of Orchid (*Dendrobium spp.*). *South African Journal of Botany*, 119, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.003>
- Bandi, A., & Lee, D. (2011). Chemical Constituents and Bioactivities of Plants from the Genus *Pholidota*. *Chemistry & Biodiversity*, 8(8), 1400–1409. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000187>
- Banerjee, J., Dey, B., Khanal, H., & Dahal, B. (2015). Phytochemical Screening and Evaluation of Anti Oxidant Activities of Different Parts of *Dendrobium ochreatum*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), 1824–1834.
- Borba, E., Trigo, J., & Semir, J. (2001). Variation of diastereoisomeric pyrrolizidine alkaloids in *Pleurothallis* (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00023-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00023-5).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 28, 25-30.
- Bustamante, D. (2015). *Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de Ugni molinae turcz.* Santiago, Chile. Retrieved from

<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/134044/Evaluacion-de-la-actividad-antioxidante-y-determinacion-del-contenido-de-fenoles-totales-y-flavonoides.pdf;sequence=1>.

Bustelo, B., Giraldo, G & Cruz, J. (2010). Trastornos de la hemostasia durante la gestación. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 36(3), 440-461. Recuperado en 14 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138600X2010000300014&lng=es&tlng=es.

Cabrera, J. (n.d.). *Estudio sobre la toxicidad de los vertidos en Huelva*. Retrieved from http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/70180/fichero/4_MÉTODOS+DE+ENSAYO.pdf

Cacabelos, R. (2001). Enfermedad de Alzheimer presente terapéutico y retos futuros. *Revista Colombiana de Psiquiatría*. 30(4), 323-350. Recuperado el 12 de agosto de 2019 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74502001000400002&lng=en&tlng=es.

Castro, O., Gutiérrez, J., Barrios, M., Castro, I., Romero, M., & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 47(3), 605-616. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003477441999000300036&lng=en&tlng=es.

Castro, T., Castro, J., Miramontones, B. (2003). Microelementos en nauplios de *A. franciscana* (Kellog, 1906) de seis poblaciones mexicanas y su relación con peces y crustáceos. *Hidrobiológica*, 4, 4.

Cervantes, M. (2008). *Evaluación Farmacológica de Poscosecha michuacana (Orchidaceae), especie de potencial agronómico*. Mexico. Retrieved from <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/2695/CIIDIROAXcervantesreyes.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Chen, Y., Xu, J., Yu, H., Qing, C., Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Wang, J. (2008). Cytotoxic phenolics from *Bulbophyllum odoratissimum*. *Food Chemistry*, 107(1), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.077>

- Chen, Y., Li, Y., Qing, C., Zhang, Y., Wang, L., & Liu, Y. (2008). 1,4,5-Trihydroxy-7-methoxy-9H-fluoren-9-one, a new cytotoxic compound from *Dendrobium chrysotoxum*. *Food Chemistry*, *108*(3), 973–976.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.12.007>
- Chen, Y., Liu, Y., Jiang, J., Zhang, Y., & Yin, B. (2008). Dendronone, a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum*. *Food Chemistry*, *111*(1), 11–12. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.03.017>
- Chen, Y., Xu, J., Yu, H., Qing, C., Zhang, Y., Wang, L., ... Wang, J. (2008). Cytotoxic phenolics from *Bulbophyllum odoratissimum*. *Food Chemistry*, *107*(1), 169–173.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.07.077>
- Chinsamy, M., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2014). Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterase activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. *South African Journal of Botany*, *91*, 88–98.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.12.004>
- Cong, Z., Shou-Jin, L., Liu., Ming-Yan., Y., Jin-Yu L., Bo H., Cong, Z., Shou-Jin, L., Liu., Ming-Yan., Y., Jin-Yu L., Bo H., Hong-Mei L., Xing-Zhi Y., Chang-Chun, D., Jiang-Miao, H. (2017). Sesquiterpene amino ether and cytotoxic phenols from *Dendrobium wardianum* Warner. *Fitoterapia*, *122*(August), 76–79.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.08.015>
- Corrales, L., Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, *10*(1794–2470), 13. Retrieved from
<http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>
- Cruz-I, C. S., Paredes, C., Universitaria, C. P.-C., Ii, J. P., Universitaria, C., & Cruz, S. (2019). Efecto citotóxico y genotóxico del extracto acuoso de hojas de *Physalis peruviana* L. (Aguaymanto) sobre células meristemáticas de *Allium cepa* (cebolla), *15*(1), 137–145.
- Cruz, J. (2012). Relación flavonoides totales-actividad antidiabética (*in vitro* por difusión de glucosa) en extractos de colubrina elíptica. (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México.
- Delgado, G., Herrera, A., Arévalo, B., & Caso, L., Andrade., L, G. (2018). Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex

- Andrews de la Huasteca Hidalguense, México. *Agrociencia*, 52(1), 55–66.
Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952018000100055&script=sci_arttext
- Díaz, M., Ronco, A., Granados, P. (2004). *Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla Allium cepa mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces*. Canada. Retrieved from <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap2.pdf>
- Dong, J., Zhao, L., Cai, L., Fang, H., Chen, X., & Ding, Z. (2014). Antioxidant activities and phenolics of fermented *Bletilla formosana* with eight plant pathogen fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(4), 396–399.
<https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2014.03.003>
- Duarte, D., Gómez, S., Monsalve, H., Medina, G., Montenegro, Olga., Mendez, P. (2015). *Orquídeas* (1st ed.). Cundinamarca, Colombia: Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. Retrieved from www.car.gov.co.
- Escobar, G. (2015). Las propiedades farmacocinéticas de la ayahuasca. *Liberabit*. 21(2), 313-319. Recuperado en 14 de agosto de 2019, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-48272015000200013&lng=es&tlng=es.
- Exarchou, V., Fiamegos, Y., Van Beek, T., Nanos, C., Vervoort, J.(2006). Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants). *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006) 293–302.
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(1), 155-171. Recuperado en 18 de agosto de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113766272003000200009&lng=es&tlng=es.
- Fonseca, J. (n.d.). Serpiente terciopelo, *Bothrops asper*. Retrieved March 12, 2019, from <https://reptiles.paradise-sphinx.com/ofidios/serpiente-terciopelo.htm>.
- Friberg, L., Rosenqvist, M. (2018) Less dementia with oral anticoagulation in atrial fibrillation. *European Heart Journal*. Volume 39, Issue 6, 07 February 2018, Pages 453–460. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx579>.
- Gago, F.(2013). Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos

- Universidad de Alcalá de Henares, Madrid. Recuperado de http://www3.uah.es/farmamol/Public/PDF_files/RAF_1993.pdf
- Galvis, J., Ocampo, D., Ocampo, R., & Gutiérrez, P. (2012). Actividad Tóxica de los extractos de la corteza de Tallo de *Annona cherimolioides* (Annonaceae) sobre *Artemia Salina*. *Boletín Científico Centro de Museos*, 2, 6. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v16n2/v16n2a02.pdf>
- Gómez, J. (2011). *Determinación de la toxicidad aguda (CL₅₀) del extracto de polvillo de carbón frente a larvas de A. franciscana*. Cartagena. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/4320/1/598923.2011.pdf>.
- González, Y., Aportela P. (2001). Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología*. 1(1):104-8.
- Haridas, R., Thekkan, S., Manorama, S. (2016). Determination of total antioxidant activity of *Malaxis rheedii* Sw (Orchidaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), 132–135.
- Hicks, J., Torres, Y., Sierra, M. (2006). Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 14, 223–226. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2006/er064b.pdf>
- Hossain, M. M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances — An overview. *Fitoterapia*, 82(2), 102–140. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>
- Houghton., Osibogun, I. (1993). Flowering plants used against snakebite. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90047-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(93)90047-9)
- Hu, Y., Ren, J., Wang, L., Zhao, X., Zhang, M., Shimizu, K., Zhang, C. (2018). Protective effects of total alkaloids from *Dendrobium crepidatum* against LPS-induced acute lung injury in mice and its chemical components. *Phytochemistry*, 149, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.006>
- Huang, D., Ou, B. Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Ibarra, J., Rincón, C., Rincón, A., Cely, N. y Rojas, C. (2018). *Aprovechamiento comercial de orquídeas: Contexto socioeconómico en San Antonio de Tequendama y Fusagasugá*. (G. Castellanos-Castro, C y Torres, Ed.). Cundinamarca, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt,

Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “Jose Celestino Mutis.”

- Instituto Clodomiro Picado. (n.d.). *Determinación de actividades Tóxicas de Venenos de Serpientes y Neutralización por Antivenenos*. (U. de C. Rica, Ed.). Costa Rica.
- Kongkatitham, V., Muangnoi, C., Kyokong, N., Thaweesest, W., Likhitwitayawuid, K., Rojsitthisak, P., & Sritularak, B. (2018). Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of new bibenzyl derivatives from *Dendrobium parishii* in hydrogen peroxide and lipopolysaccharide treated RAW264.7 cells. *Phytochemistry Letters*, 24, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.01.006>
- Kumar, V., Lemos, M., Sharma, M., & Shiram, V. (2013). Antioxidant and DNA damage protecting activities of *Eulophia nuda* Lindl. *Free Radicals and Antioxidants*, 3(2), 55–60. <https://doi.org/10.1016/J.FRA.2013.07.001>
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en Pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 726–732. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27642.pdf>
- Li, J., Kuang, M., Yang, L., Kong, Q.-H., Hou, B., Liu, Z.-H., ... Zhou, J. (2018). Stilbenes with anti-inflammatory and cytotoxic activity from the rhizomes of *Bletilla ochracea* Schltr. *Fitoterapia*, 127, 74–80. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2018.02.007>
- Liman, R., İbrahim, H., Gökçe, S. (2018). Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 444–449. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.022>
- Londono, J. (2012). Serie Desarrollo y Transversalidad Lasallista Investigación y Ciencia: Antioxidantes importancia biológica y métodos para medir su actividad. Corporación Universitaria Lasallista. <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/handle/10567/133>
- Mencias, H., Salazar, T. (2018). *Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros Epidendrum, Oncidium y Caucaceae*. Quito, Ecuador. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15932/1/UPS-QT13094.pdf>

- Ministerio del Medio Ambiente. (2015). Colombia, país con mayor número de especies de orquídeas en el mundo. <http://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/1772-colombia-pais-con-mayor-numero-de-especies-de-orquideas-en-el-mundo>
- Mitsuo, M., Shimamura, H., Nakamura, S., Kameoka, H. Antimutagenic Activity of Gigantol from *Dendrobium nobile*. (1997). *J. Agric. Food Chem.* 45, 2849-2853.
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S., & Kameoka, H. (2002). Antimutagenic Activity of Gigantol from *Dendrobium nobile*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2849–2853. <https://doi.org/10.1021/jf9603902>.
- Morrison, R., Boyd, R. (1998). Química orgánica versión en español. Xochimilco. México. Pearson.
- National Center for Biotechnology Information (2019). Compound summary 2,2'-Methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol). Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8398>.
- Nag, S., & Kumaria, S. (2018). In silico characterization and transcriptional modulation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) by abiotic stresses in the medicinal orchid *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. *Phytochemistry*, 156, 176–183. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2018.09.012>
- Neira, A. (2009). *Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto clorofórmico de la orquídea comestible Prosthechea michuacana*. Mexico D.F. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Aislamiento+e+I+identificación+de+los+compuestos+con+actividad+antioxidante+del+extracto+de+cloroforno+de+la+orquídea+comestible+Prosthechea+michuacana#0>
- Nirmala, C., Bisht, M., Bajwa, H., Santosh, O. (2018). Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science and Technology*, 77, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.003>
- Palacios, H. (2014). *Inventario taxonómico de especies de la familia Orchidaceae en un área de bosque andino del predio la Sierra, santuario de Fauna y Flora Guanentá alto rio Fonce*. Duitama.

- Pérez-Bonilla, M., Salido, S., Van Beek, T., Linares-Palomino, P., Altarejos, J., Noguera, M., Sánchez, A. (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *J. Chromatogr. A*, 111(2), 311-318.
- Pino, O., Lazo, F. (2010). Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1), 34-43. De http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000100008&lng=es&tlng=es.
- Ramírez, E., Solari, S. (2014). Comunicación corta : Bothrops ayerbei y Bothrops rhomboatus. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 18(1), 138–141. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-30682014000100009.
- Ramírez, P., Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México*. Coyocán Mexico. Sermanat.
- Reyes, A., Leyte, M., Figueroa, M., Serrano-Alba, T., González-Andrade, M., & Mata, R. (2011). Synthesis, biological evaluation, and docking studies of gigantol analogs as calmodulin inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(7), 2699–2708. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2011.03.057>
- Romero, P., Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México* (1st ed.). Mexico: Instituto Nacional de Ecología.
- Ruíz, N., Vilcapoma, K. (2010). *Estudio de la Diversidad de la familia Orchidaceae en el Pajonal de Chontabamba-Oxapampa*. Huancayo-Perú. Retrieved from http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/2591/Velita_Ruiz_Vilcapoma_Olivera.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rykaczewski, M., Krauze-Baranowska, M., Żuchowski, J., Krychowiak-Maśnicka, M., Fikowicz-Krośko, J., & Królicka, A. (2019). Phytochemical analysis of *Brasolia*, *Elleanthus*, and *Sobralia*. Three genera of orchids with antibacterial potential against *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry Letters*, 30, 245–253. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2019.01.008>
- Salvador, A., Ferreira, S. (2014). *Actividad antioxidante y perfil de los ácidos extraídos*

de la torta de noz pecã (Carya illinoensis) obtendré un extra supercrítica.

Florianópolis.

- Sanchez, J.(2016). Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results. *An Real Acad Farm.*Vol. 82, N° 2 (2016), pp. 168-184.
- Saraza, K., Burbano, D. (2015). Estudio de la actividad larvicida frente a *Artemia salina* (Artemiidae) e insecticida sobre *Corythucha gossypii* (tingidae) del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* (Annonaceae). (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Peréira. Peréira.
- Shibu, S., Moin, S., Servin, W., Chitra Devi, B. (2012). Preliminary phytochemical screening, antibacterial and antioxidant activity of *Eria pseudoclavicaulis* Blatt. - An endemic orchid of Western Ghats. *American Journal of Pharmtech Research*, 2(6), 518–525.
- Shimura H, M., Takada, K. (2007). An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). 68 (10): 1442-7. DOI: 10.1016 / j.phytochem.2007.03.006
- Shriram, V., Kumar, V., Kishor, P. B. K., Suryawanshi, S. B., Upadhyay, A. K., & Bhat, M. K. (2010). Cytotoxic activity of 9,10-dihydro-2,5-dimethoxyphenanthrene-1,7-diol from *Eulophia nuda* against human cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 251–253.
<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2009.12.031>.
- Singleton V L & Rossi J A Jr. (1965.) Colorunetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.
- Silverstein, R ., Webster, F., Kiemle, D. (2005). *Espectrometric Identification of Organic Compounds*. New York. Estados Unidos. John Wiley & Sons, Inc.
- Song, Y., Zeng, R., Hu, L., Maffucci, K. G., Ren, X., & Qu, Y. (2017). In vivo wound healing and *in vitro* antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 451–461.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.06.079>
- Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera*. Pereira, Colombia. Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3636/54763T736.pdf;j>

sessionid=94DDF683384ABD5EB4D2DE4F92BCE6F3?sequence=1

- Ugartondo, V. (2009). *Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares*. Barcelona. Retrieved from http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41765/2/01.VUC_INTRODUCCION.pdf
- Valencia-Islas, N., Paul, R., Shier, W. ., Mata, R., & Abbas, H. . (2002). Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna paucicostata*) frond and root tissues. *Phytochemistry*, *61*(2), 141–148. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00220-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00220-0)
- Valenzuela, P. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae turcz*. Universidad de Chile. Santiago de Chile.
- Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., & Vivas, R. (2013). Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*, *42*(1), 101-124. Revisado 18, 2019, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012028042013000100007&lng=en&tlng=es.
- Villanueva, E., Rodríguez, G; Aguirre, E; Castro, V., Rodríguez, E. ; Aguirre, G. ; & Castro, E. ; (2017). Influencia de antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite de chia (*Salvia hispanica* L.) por rancimat. *Scientia Agropecuaria*, *8*(1), 19–27. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.02>.
- Villar; D., Sbegue; L., Rezende, C. (2008). Evaluation of antioxidants on the accelerated aging of htpb/ipdi polyurethane. Recuperado de [http:// metallum.com.br](http://metallum.com.br).
- Williams, C. (1979). The leaf flavonoids of the orchidaceae. *Phytochemistry*, *18*(5), 803–813. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80019-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80019-9)
- Xu, F.-Q., Xu, F.-C., Hou, B., Fan, W.-W., Zi, C.-T., Li, Y., Hu, J.-M. (2014). Cytotoxic bibenzyl dimers from the stems of *Dendrobium fimbriatum* Hook. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *24*(22), 5268–5273. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2014.09.052>.
- Yarlequé, M. (2016). Aislamiento y caracterización bioquímica de compuestos fenólicos con actividad anticoagulante del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea*

Aiton “chupasangre”.(Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

ANEXOS



Figura 29. *Cattleya warscewiczii* Sanderiana. Tomado por Oveli Muñoz, Vereda el Progreso, Jamundí – Valle del Cauca. 2018

Anexo 1. Tamizaje Fitoquímico para hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*

Metodología del tamizaje fitoquímico

Alcaloides : Llevar a sequedad, 30 mL del extracto etanólico de la planta, adicionar 5 mL de HCl (10%) y calentar por 10 min. Enfriar, filtrar, dividir el filtrado en tres tubos de ensayo y agregar unas gotas de los reactivos de reconocimiento. Dragendorff, Mayer y Wagner. Una leve turbidez o precipitado (rojo a naranja, blanco a crema y marrón) evidencia la posible presencia de los mismos.

Cardiotónicos : A 10 mL del extracto etanólico de la planta, adicionar 5 mL de solución de acetato de plomo al 10% y 4 mL de agua destilada. Calentar la mezcla a baño María durante 10 minutos. Filtrar. Agitar el filtrado con 20 mL de CHCl₃, separar la capa clorofórmica en 6 tubos de ensayo, llevar a sequedad. Adicionar:

Al primer tubo 1 mL del reactivo de Baljet. (Coloración roja, naranja-rojiza o violeta con cardenólidos).

Al segundo tubo 1 mL del reactivo de Kedde. (Coloración rosa o azul –violeta a visible indican cardenólidos, los bufadienólidos no reaccionan. El color se atenúa en pocos minutos.

Al tercer tubo 1 mL de del reactivo de Raymond-Marthoud (anillo lactónico de los cardenólidos). Igual coloración que el reactivo de Baljet.

En el cuarto tubo, realizar la reacción de Keller-Killani (ácido acético glacial, 1 gota de cloruro de hierro al 5% en metanol y ácido sulfúrico concentrado). Coloraciones intensas.

En el quinto tubo realizar la reacción de Liebermann-Burcard (1 mg de muestra/ pocas gotas de HOAc + 3 mL de Ac₂O/H₂SO₄ (50:1). Coloración verde, via rojo al azul.

En el sexto tubo realizar la reacción de Salkowaki (núcleo esteroidal). Coloración amarilla – rojo sangre.

Cumarinas volátiles: En un tubo de ensayo colocar 2 mL del extracto etanólico de la planta, tapar con papel filtro impregnado en solución diluida de NaOH y llevar a baño de agua a 100°C por algunos minutos.

Remover el papel filtro y examinarlo bajo la luz UV, siendo la fluorescencia amarilla indicativa de la presencia de cumarinas.

Flavonoides: Colocar a 2 mL del extracto etanólico, algunos fragmentos de Mg y agregar, por las paredes del tubo, unas gotas de HCl diluido. Observar la coloración, que varía para las diferentes estructuras.

Taninos: Evaporar 5 mL del extracto etanólico de la planta y disolver el residuo en 10 mL de agua destilada. Filtrar. A 3 mL del extracto acuoso, adicionar 1 o 2 gotas de solución de cloruro férrico al 10%. Coloración azul indica posible presencia de taninos hidrolizables y coloración verde de taninos condensados.

Confirmación: se divide el resto del extracto acuoso en tres partes iguales y adicionar en cada uno, solución de gelatina, solución de gelatina y sal y solución salina. La aparición de precipitado blanco en los tubos con soluciones de gelatina y de gelatina-sal son resultados positivos para el test de taninos. Si también aparece en la solución salina se considera negativo.

Saponinas: evaporar 5 mL del extracto etanólico de la planta y retomar en agua hirviendo. Enfriar y agitar vigorosamente, dejar reposar 15 a 20 minutos. Clasificar la presencia de saponinas por la altura de formación la altura de espuma.

Triterpenos y / o esteroides: llevar a sequedad 10 mL del extracto de la planta, adicionar 10 mL de cloroformo, filtrar, dividir en dos porciones el filtrado. En cada uno de los tubos realizar, la reacción de Liebermann-Buchard y la reacción de Salkowski.

Derivados antracénicos libres: Colocar en un tubo de ensayo, 0.20 g de planta y adicionar 5 mL de cloroformo, agitar, dejar 15 minutos en reposo.

Recoger la fase clorofórmica y dividirla en dos tubos de ensayo, en el primer tubo agregar a 1 mL de solución de NaOH al 5% en agua. Coloración rojiza en la fase acuosa, indica la presencia de antraquinonas (reacción de Bomtraeger). En el segundo tubo adicionar 1 mL de solución de acetato de magnesio al 0.5 % en metanol, una coloración roja indica la presencia de antraquinonas libres.

1.2 Resultados de Tamizaje Fitoquímico para hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*



Figura 30. Resultados de Flavonoides (Izquierda) y Saponinas (Derecha) de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

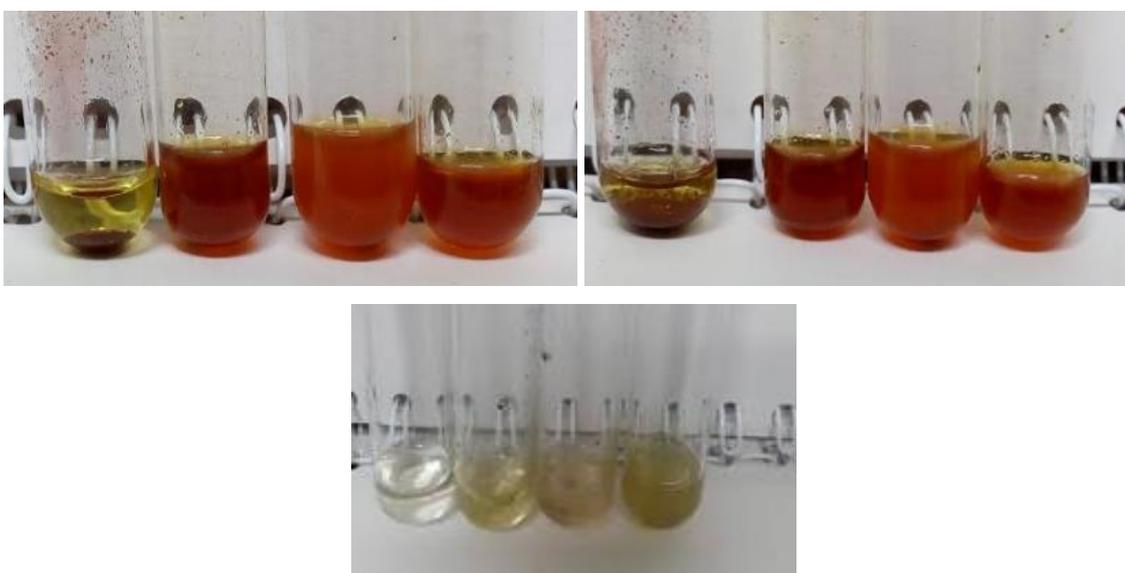


Figura 31. Resultados de tamizaje fitoquímico para alcaloides: Arriba izquierda wagner, Derecha: Dragendorf. Abajo Mayer para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.



Figura 32. Resultados de tamizaje fitoquímico para derivados antracenicos libres para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.



Figura 33. Resultados de tamizaje fitoquímico para cardiotonicos- Lieberman-buckman para de hojas, raíz y bulbos de *warscewiczii*.

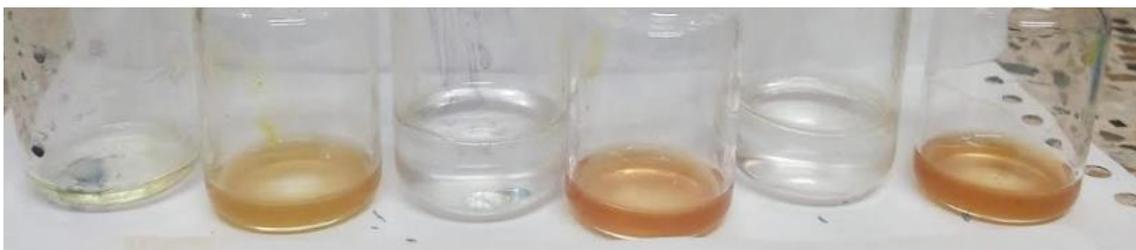


Figura 34. Resultados de tamizaje fitoquímico para cardiotonicos Keller Killani para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.



Figura 35. Resultados de tamizaje fitoquímico para cardiotonicos- Salkowsky para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.



Figura 36. Resultados de tamizaje fitoquímico para cardiotonicos Baljet para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.



Figura 37. Resultados de tamizaje fitoquímico para reacción de Salkowki para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.



Figura 38. Resultados de tamizaje fitoquímico para taninos para de hojas, raíz y bulbos de *C.warscewiczii*.

Anexo 2. Resultados de Actividad antioxidante – DPPH

Tabla 15. Resultados de absorbancia para la curva del DPPH.

Concentración ppm	Absorbancia			Promedio de Abs
7	0.14	0.14	0.132	0.137
10	0.212	0.222	0.205	0.213
15	0.337	0.335	0.333	0.335
20	0.432	0.437	0.437	0.435
25	0.546	0.55	0.554	0.550
30	0.685	0.691	0.683	0.686
40	0.915	0.917	0.916	0.916

Rango de concentraciones de la solución de DPPH empleada :

$$Y = 0.02335x - 0.0256 \rightarrow X = (Y + 0.0256)/0.0235$$

$$\text{donde } X_1 = (0.797 + 0.0256)/0.0235 = 35.00 \text{ ppm}$$

$$X_2 = (0.803 + 0.0256)/0.0235 = 35.26 \text{ ppm}$$

Tabla 16. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición para del ácido ascórbico frente al radical DPPH.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Inhibición	SD	CV
2	0.551	0.519	0.563	0.5443	0.0417	0.0227	0.0418
4	0.481	0.439	0.504	0.4747	0.1643	0.033	0.0694
6	0.379	0.371	0.375	0.3750	0.3398	0.004	0.0107
8	0.274	0.271	0.282	0.2757	0.5147	0.0331	0.1074
10	0.191	0.19	0.191	0.1907	0.6643	0.0006	0.003
12	0.027	0.049	0.025	0.0337	0.8568	0.0211	0.2601

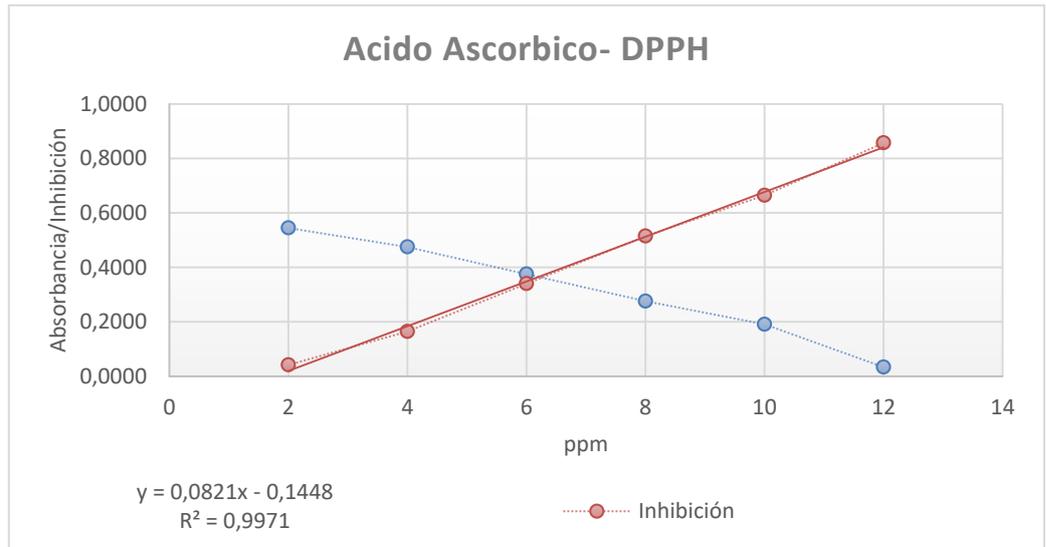


Figura 39. Curva de Ácido Ascórbico en el ensayo del DPPH

Cálculo del IC₅₀ del ácido ascórbico

$$y = 0.0821 x - 0.1448$$

$$x = \frac{y + 0.1448}{0.0821}$$

$$x = \frac{0.5 + 0.1448}{0.0821} = 7.85 \text{ ppm}$$

Tabla 17. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del α -tocoferol frente al radical DPPH.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia Promedio	Porcentaje de inhibición	S	CV
5	0.443	0.438	0.414	0.4317	0.1778	0.0155	0.0359
10	0.329	0.318	0.387	0.3447	0.3435	0.0371	0.1075
15	0.259	0.247	0.249	0.2517	0.5206	0.0064	0.0255
20	0.142	0.134	0.166	0.1473	0.7194	0.0167	0.1131
25	0.031	0.032	0.051	0.0380	0.9276	0.0113	0.2966

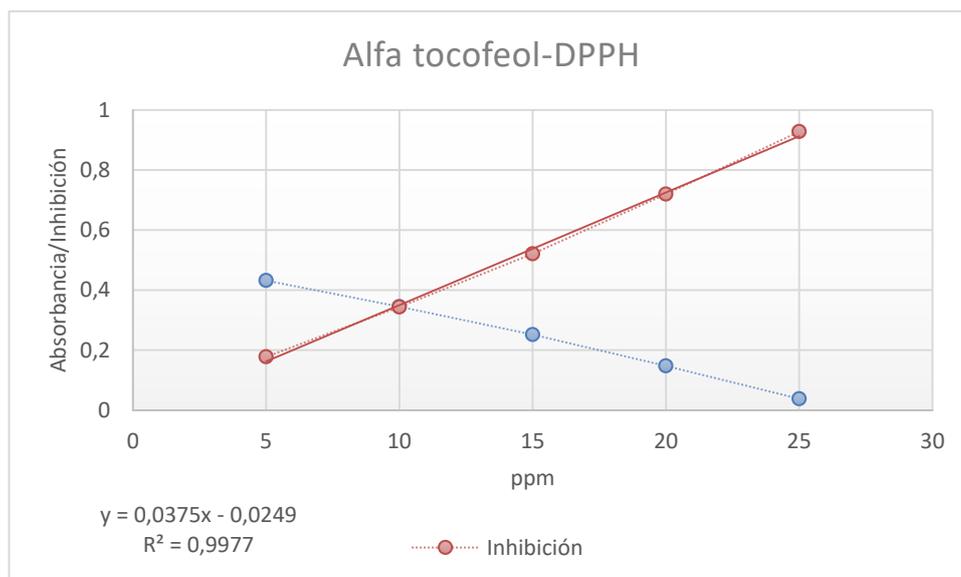


Figura 40. Curva de α -tocoferol en el ensayo del DPPH

Cálculo del IC_{50} del α -tocoferol con DPPH

$$y = 0.0375 x - 0.0249$$

$$x = \frac{y + 0.0249}{0.0375}$$

$$x = \frac{0.50 + 0.0249}{0.0375} = 14.00 \text{ ppm}$$

Tabla 18. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del trolox frente al radical DPPH.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Inhibición	S	CV
6.5	0.373	0.366	0.383	0.374	0.2957	0.0085	0.0228
7.5	0.355	0.344	0.35	0.35	0.3415	0.0055	0.0157
10	0.316	0.302	0.327	0.315	0.4068	0.0125	0.0398
15	0.18	0.184	0.182	0.182	0.6573	0.0020	0.0110
20	0.062	0.043	0.043	0.049	0.9071	0.0110	0.2239

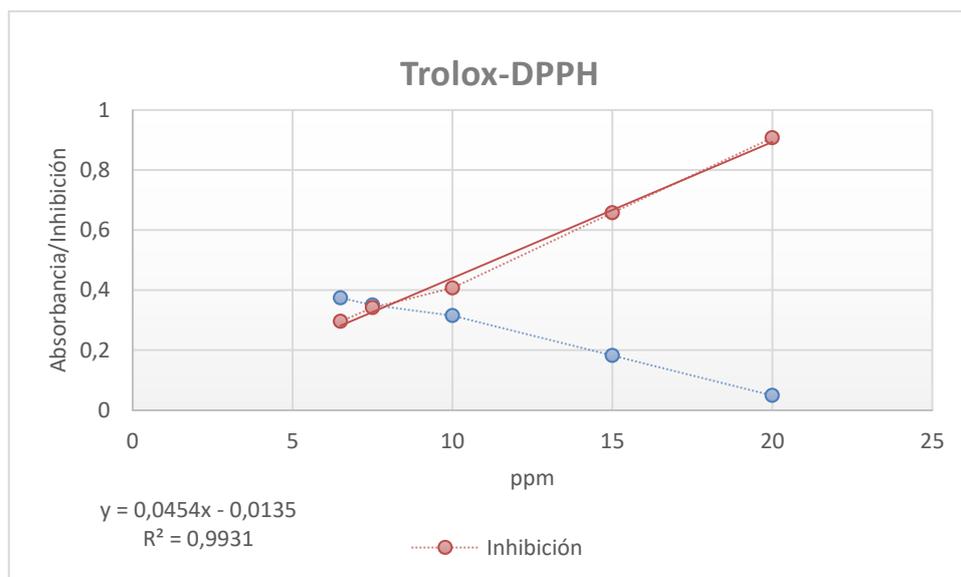


Figura 41. Curva de Trolox con DPPH

Cálculo del IC₅₀ del Trolox con DPPH

$$y = 0.0454 x - 0.0135$$

$$x = \frac{y + 0.0135}{0.0454}$$

$$x = \frac{0.50 + 0.0135}{0.0454} = 11.31 \text{ ppm}$$

Tabla 19. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de las hojas de *C. warszewiczii* frente al radical DPPH.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia Promedio	Inhibición	S	CV
50	0.437	0.450	0.467	0.4513	0.1420	0.0150	0.03 33
100	0.400	0.409	0.383	0.3973	0.2446	0.0132	0.0332
150	0.345	0.342	0.349	0.3453	0.3435	0.0035	0.0102
200	0.304	0.310	0.304	0.3060	0.4183	0.0035	0.0113
250	0.267	0.274	0.27	0.2703	0.4861	0.0035	0.0130

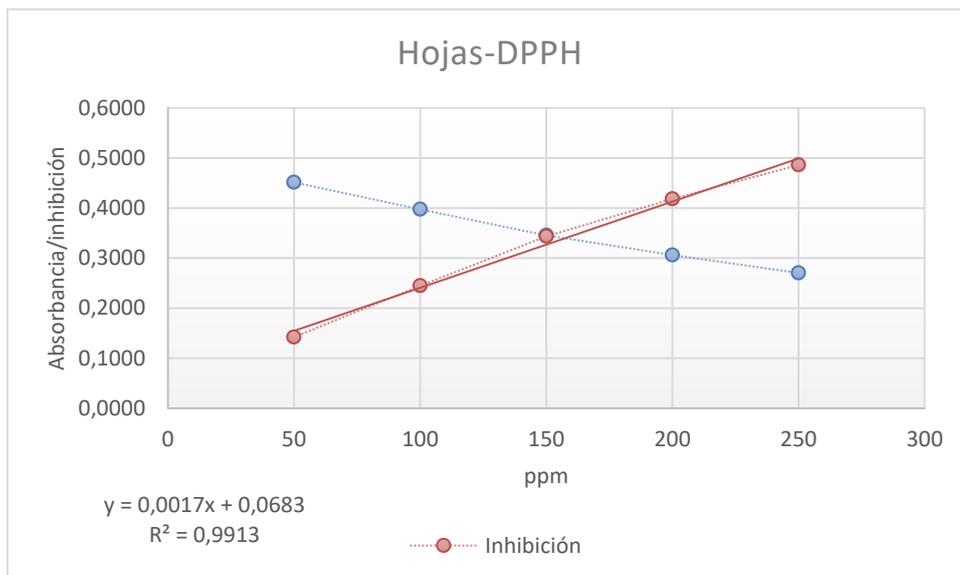


Figura 42. Hojas de *C.warscewiczii* en el ensayo de DPPH

Cálculo del IC₅₀ del EET de hojas de *C.warscewiczii* con DPPH

$$y = 0.0017 x + 0.0683$$

$$x = \frac{y - 0.0683}{0.0017}$$

$$x = \frac{0.50 - 0.0683}{0.0017} = 253.94 \text{ ppm}$$

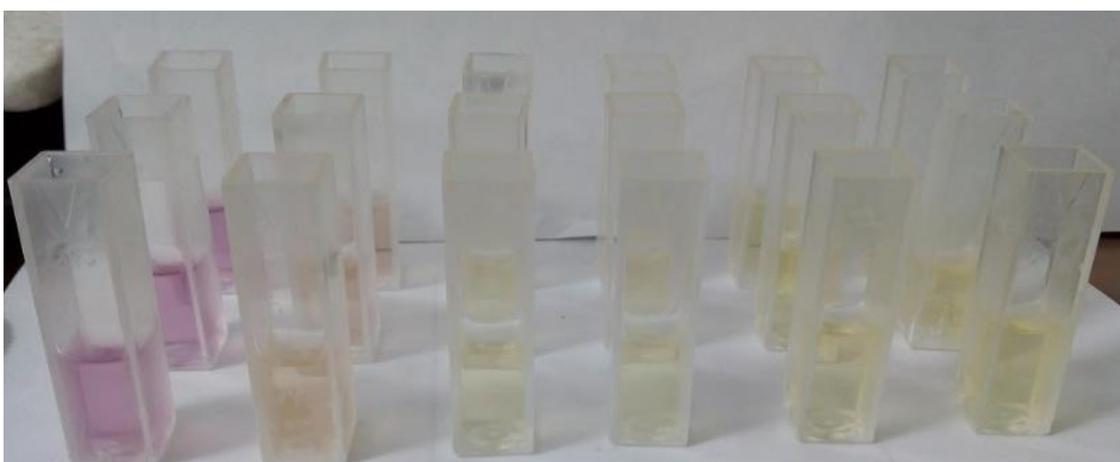


Figura 43. Montaje experimental por triplicado para la determinación de la absorbancia a 515 nm de *C.warscewiczii*-Hojas.

Tabla 20. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de la raíz de *C. warszewiczii* frente al radical DPPH.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Inhibición	S	CV
50	0.344	0.371	0.385	0.3667	0.3095	0.0208	0.0568
100	0.282	0.284	0.282	0.2827	0.4677	0.0012	0.0041
150	0.222	0.219	0.227	0.2227	0.5807	0.0040	0.0182
200	0.157	0.142	0.155	0.1513	0.7150	0.0081	0.0538
250	0.11	0.109	0.101	0.1067	0.7991	0.0049	0.0462

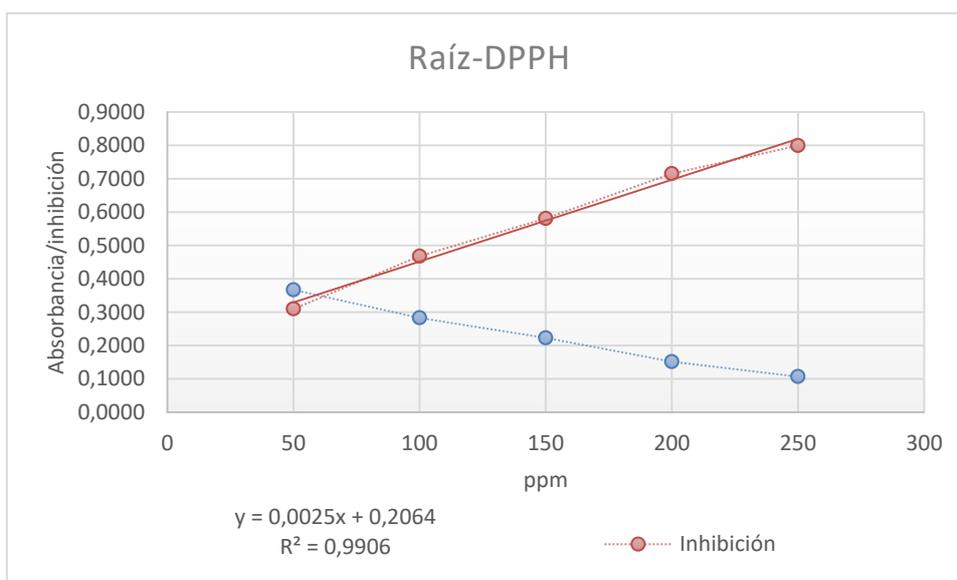


Figura 44. Raíz de *C.warszewiczii* en el ensayo de DPPH

Cálculo del IC₅₀ del EET de raíces de *C.warszewiczii* con DPPH

$$y = 0.0025 x + 0.2064$$

$$x = \frac{y - 0.2064}{0.0025}$$

$$x = \frac{0.50 - 0.2064}{0.0025} = 117.44 \text{ ppm}$$

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia Promedio	Inhibición	S	CV
50	0.402	0.431	0.413	0.4153	0.2178	0.0146	0.0352
100	0.334	0.331	0.35	0.3383	0.3628	0.0102	0.0302
150	0.265	0.272	0.278	0.2717	0.4884	0.0065	0.0239

200	0.17	0.178	0.223	0.1903	0.6416	0.0286	0.1501
250	0.14	0.137	0.133	0.1367	0.7426	0.0035	0.0257

Tabla 21. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de los bulbos de *C. warszewiczii*.-Bulbos frente al radical DPPH.

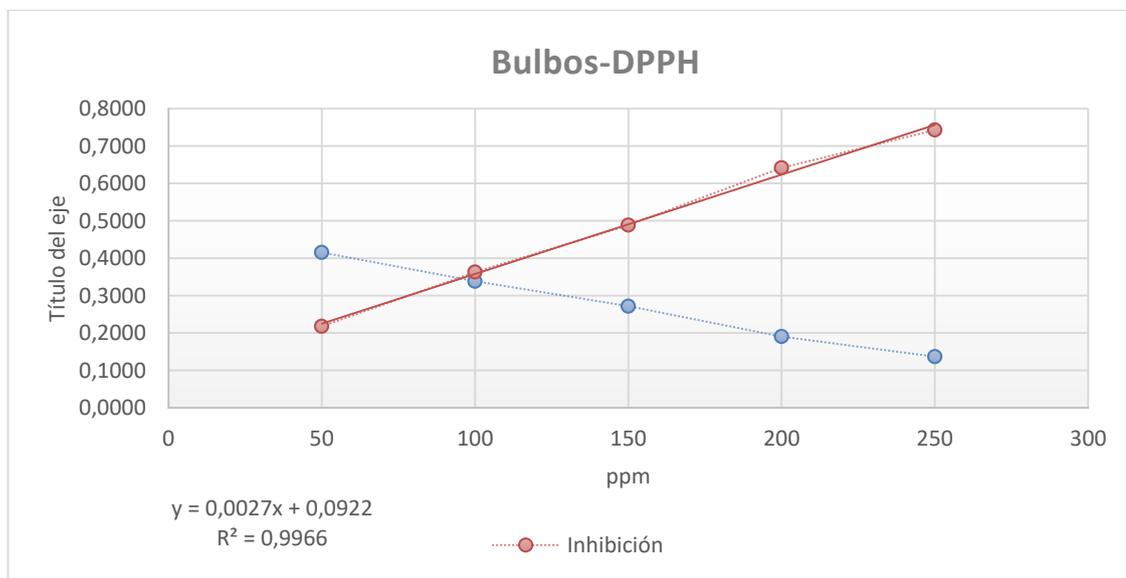


Figura 45. Bulbos de *C.warszewiczii* en el enayo de DPPH

Cálculo del IC₅₀ del EET de bulbos de *C.warszewiczii* con DPPH

$$y = 0.0027 x + 0.0922$$

$$x = \frac{y - 0.0922}{0.0027}$$

$$x = \frac{0.50 - 0.0922}{0.0027} = 151.04 \text{ ppm}$$

Tabla 22. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del romero frente al radical DPPH.

Concentración ppm	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia Promedio	Inhibición	S	CV
10	0.459	0.438	0.433	0.443	0.1760	0.0138	0.0311
20	0.35	0.348	0.350	0.349	0.3507	0.0012	0.0033
30	0.278	0.280	0.283	0.280	0.4789	0.0025	0.0090
40	0.196	0.140	0.200	0.179	0.6679	0.0335	0.1878
50	0.128	0.122	0.124	0.125	0.7683	0.0031	0.0245
60	0.058	0.050	0.050	0.053	0.9021	0.0046	0.0877

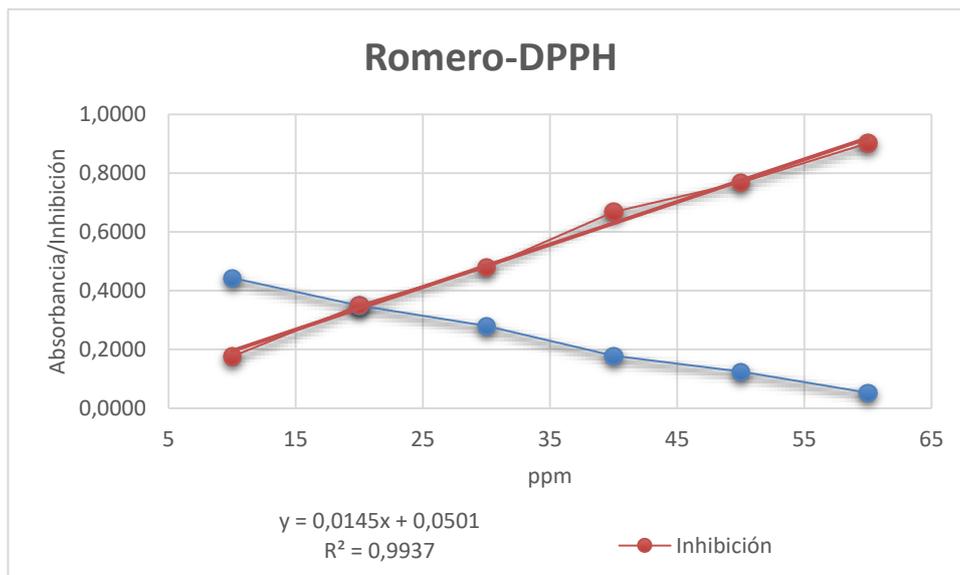


Figura 46. Resultados de variación de absorbancia del romero en el ensayo de DPPH

Cálculo del IC₅₀ del EET romero de *C.warszewiczii* con DPPH

$$y = 0.0145x + 0.0501$$

$$x = \frac{y - 0.0501}{0.0145}$$

$$x = \frac{0.50 - 0.0501}{0.0145} = 31.03 \text{ ppm}$$



Figura 47. Equipo Uv- Vis Genesys 6 utilizado para las lecturas espectrofotométricas de los ensayos de DPPH, ABTS, Fenoles y Flavonoides totales.

Anexo 3. Resultados de la actividad antioxidante por ABTS

Tabla 23. Resultados de absorbancia para la curva de ABTS.

Concentración (ppm)	Absorbancia			A promedio
20	0.293	0.28	0.291	0.288
30	0.424	0.427	0.430	0.427
40	0.622	0.614	0.600	0.612
50	0.775	0.781	0.778	0.778
60	0.936	0.927	0.900	0.921
70	1.100	1.088	1.089	1.092

Rango de concentraciones de la solución de ABTS empleada :

$$Y = 0.0162x - 0.0426 \rightarrow X = (Y + 0.0426)/0.0162$$

$$\text{donde } X_1 = (0.830 + 0.0426)/0.0162 = 53.86 \text{ ppm}$$

$$X_2 = (0.770 + 0.0426)/0.0162 = 50.16 \text{ ppm}$$

Tabla 24. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del α -tocoferol frente al radical ABTS.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia Promedio	Inhibición	S	CV
350	0.571	0.56	0.563	0.565	0.296	0.0057	0.0101
450	0.494	0.499	0.512	0.502	0.374	0.0093	0.0185
550	0.441	0.441	0.436	0.439	0.452	0.0029	0.0066
650	0.397	0.404	0.401	0.401	0.500	0.0035	0.0088
750	0.333	0.336	0.335	0.335	0.583	0.0015	0.0046
850	0.292	0.291	0.283	0.289	0.640	0.0049	0.0171

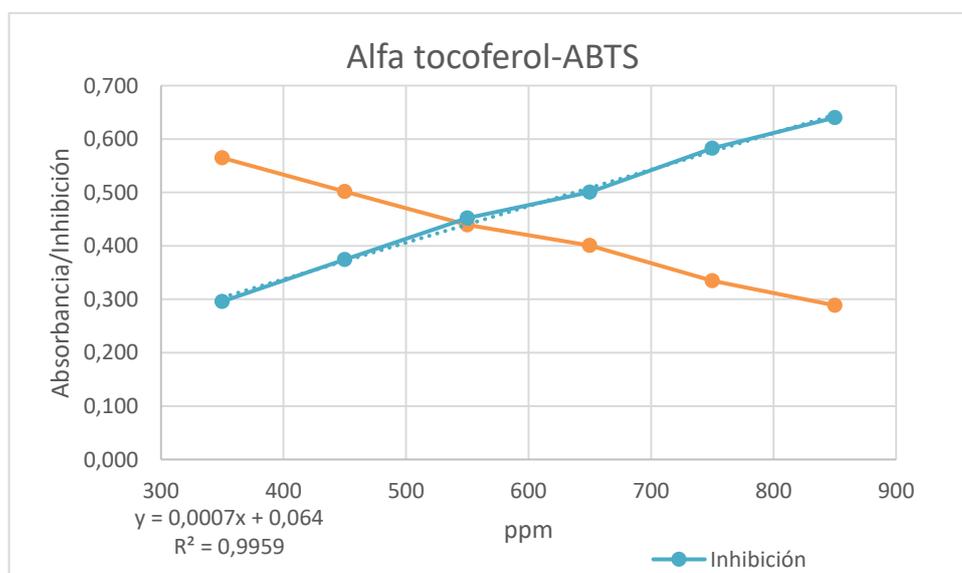


Figura 48. Resultados de variación de absorbancia para α tocoferol con ABTS.

Cálculo del IC₅₀ del α tocoferol con ABTS.

$$y = 0.0007 x + 0.064$$

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Inhibición	S	CV
500	0.688	0.679	0.67	0.679	0.098	0.0090	0.0133
600	0.647	0.642	0.643	0.644	0.145	0.0026	0.0041
700	0.627	0.617	0.613	0.619	0.178	0.0072	0.0116
800	0.611	0.601	0.598	0.603	0.199	0.0068	0.0113
900	0.597	0.563	0.582	0.581	0.229	0.0170	0.0293
1200	0.522	0.535	0.512	0.523	0.305	0.0115	0.0221
1300	0.506	0.523	0.515	0.515	0.317	0.0085	0.0165
1500	0.438	0.448	0.483	0.456	0.394	0.0236	0.0518
1800	0.486	0.397	0.367	0.417	0.447	0.0619	0.1485
2000	0.358	0.375	0.375	0.369	0.510	0.0098	0.0266

$$x = \frac{y - 0.064}{0.0007}$$

$$x = \frac{0.50 - 0.064}{0.0007} = 622.86 \text{ ppm}$$

Tabla 25. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del romero frente al radical ABTS.

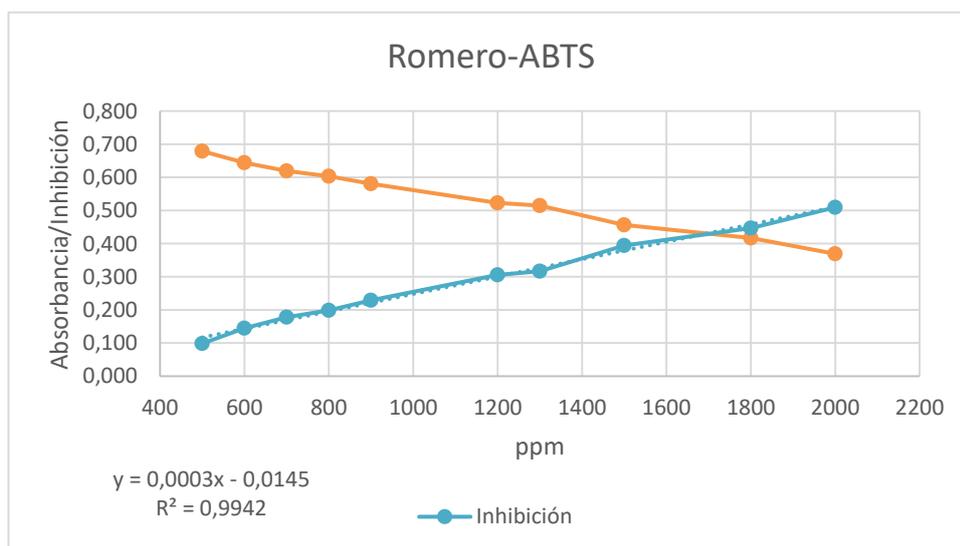


Figura 49. Resultados de variación de absorbancia de romero con ABTS.

Cálculo del IC₅₀ del romero con ABTS.

$$y = 0.0003 x - 0.0145$$

$$x = \frac{y + 0.0145}{0.0003}$$

$$x = \frac{0.50 + 0.145}{0.0003} = 1715 \text{ ppm}$$

Tabla 26. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del trolox frente al radical ABTS.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Inhibición	S	CV
250	0.582	0.541	0.512	0.545	0.276	0.0352	0.0645
300	0.449	0.485	0.432	0.455	0.395	0.0271	0.0594
350	0.395	0.394	0.397	0.395	0.475	0.0015	0.0039
400	0.299	0.293	0.289	0.294	0.610	0.0050	0.0171
450	0.201	0.197	0.197	0.198	0.737	0.0023	0.0116

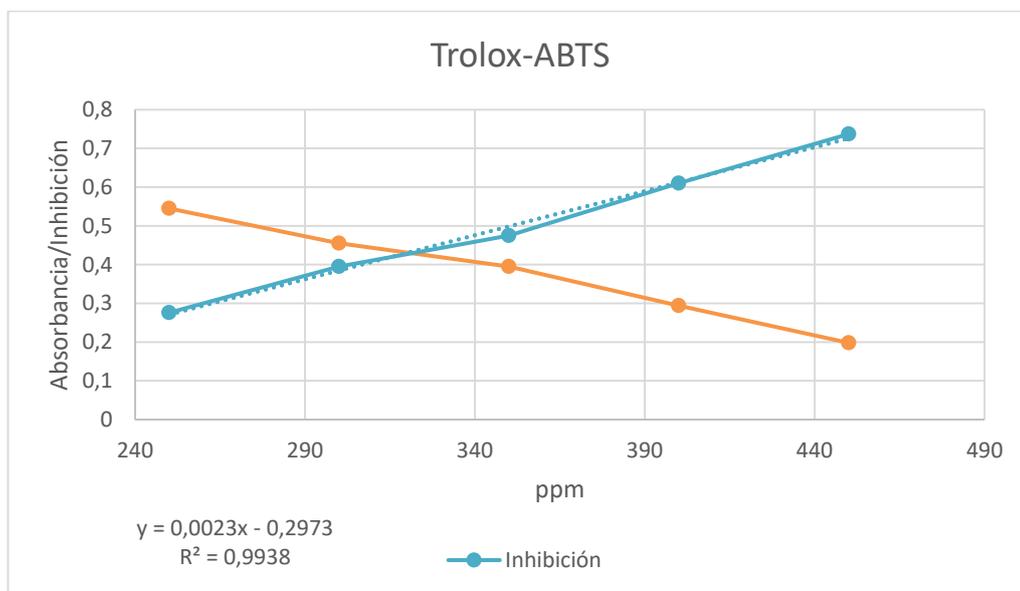


Figura 50. Resultados de variación de absorbancia curva de Trolox con ABTS.

Cálculo del IC₅₀ del Trólox con ABTS.

$$y = 0.0023 x - 0.2973$$

$$x = \frac{y + 0.2973}{0.0023}$$

$$x = \frac{0.50 + 0.2973}{0.0023} = 346.65 \text{ ppm}$$

Tabla 27. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición del ácido ascórbico frente al radical ABTS.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Inhibición	S	CV
10	0.767	0.767	0.768	0.767	0.015	0.0006	0.0008
20	0.738	0.736	0.735	0.736	0.055	0.0015	0.0021
30	0.723	0.72	0.724	0.722	0.073	0.0021	0.0029
40	0.692	0.702	0.701	0.698	0.104	0.0055	0.0079
50	0.66	0.674	0.664	0.666	0.145	0.0072	0.0108
65	0.655	0.658	0.663	0.659	0.154	0.0040	0.0061
130	0.56	0.559	0.554	0.558	0.284	0.0032	0.0058
160	0.544	0.517	0.506	0.522	0.329	0.0196	0.0374
190	0.469	0.46	0.455	0.461	0.408	0.0071	0.0154
210	0.449	0.459	0.436	0.448	0.425	0.0115	0.0257
240	0.392	0.415	0.415	0.407	0.477	0.0133	0.0326
270	0.342	0.352	0.334	0.343	0.560	0.0090	0.0263
300	0.275	0.287	0.357	0.306	0.607	0.0443	0.1446

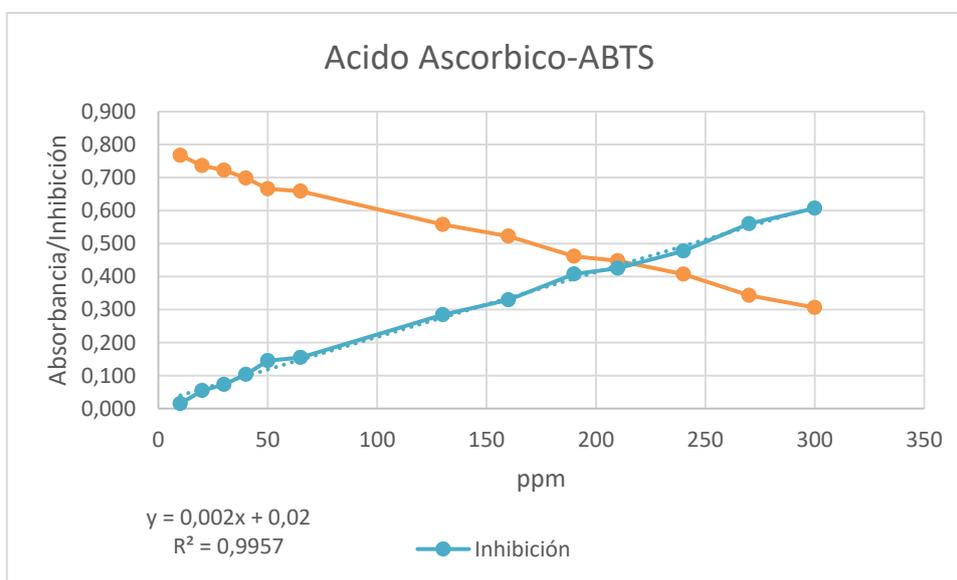


Figura 51. Resultados de variación de absorbancia para el ácido ascórbico con ABTS

Cálculo del IC₅₀ del romero con ABTS.

$$y = 0.002 x + 0.02$$

$$x = \frac{y - 0.02}{0.002}$$

$$x = \frac{0.50 - 0.02}{0.002} = 240 \text{ ppm}$$

Tabla 28. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de las hojas de *C. warscewiczii* frente al radical ABTS.

Constracción (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	Inhibición	S	CV
900	0.567	0.558	0.569	0.565	0.242	0.0059	0.0104
1200	0.546	0.503	0.499	0.516	0.308	0.0261	0.0505
1300	0.494	0.538	0.493	0.508	0.318	0.0257	0.0506
1400	0.499	0.47	0.473	0.481	0.355	0.0159	0.0332
1500	0.466	0.486	0.487	0.480	0.356	0.0118	0.0247
1800	0.427	0.438	0.435	0.433	0.419	0.0057	0.0131
2000	0.401	0.38	0.42	0.400	0.463	0.0200	0.0500
2300	0.359	0.362	0.36	0.360	0.517	0.0015	0.0042
2500	0.322	0.335	0.321	0.326	0.563	0.0078	0.0240
3000	0.275	0.284	0.276	0.278	0.627	0.0049	0.0177

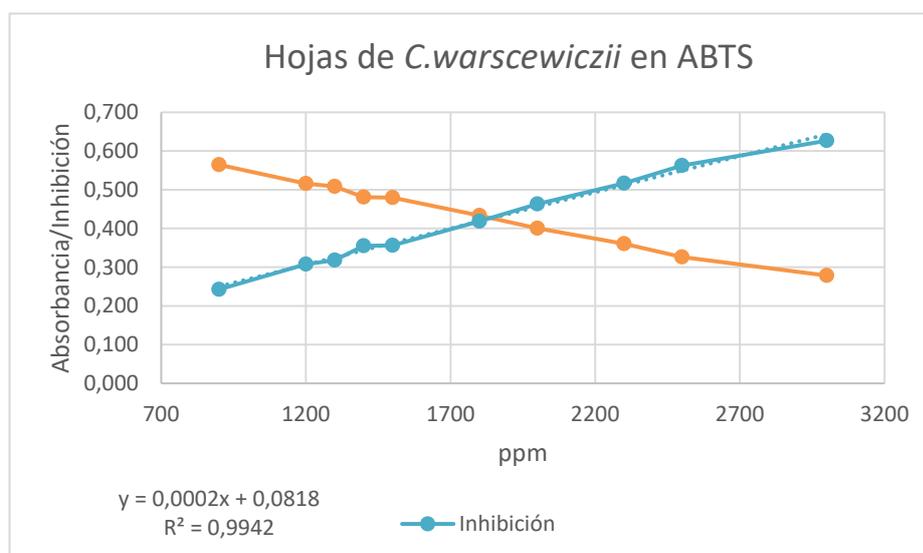


Figura 52. Curva de EET de hojas de *C. warscewiczii* con ABTS.

Cálculo del IC₅₀ del EET de hojas de *C.warscewiczii* con ABTS.

$$y = 0.0002 x + 0.0818$$

$$x = \frac{y - 0.0818}{0.0002}$$

$$x = \frac{0.50 - 0.0818}{0.0002} = 2091 \text{ ppm}$$

Tabla 29. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de las raíces de *C. warscewiczii* frente al radical ABTS.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	PI	S	CV
900	0.518	0.483	0.494	0.498	0,331	0.0179	0.0359
1200	0.403	0.405	0.402	0.403	0,459	0.0015	0.0038
1300	0.382	0.379	0.377	0.379	0,491	0.0025	0.0066
1500	0.347	0.339	0.327	0.338	0,547	0.0101	0.0298
1600	0.311	0.318	0.309	0.313	0,581	0.0047	0.0151
1800	0.242	0.258	0.242	0.247	0,668	0.0092	0.0373

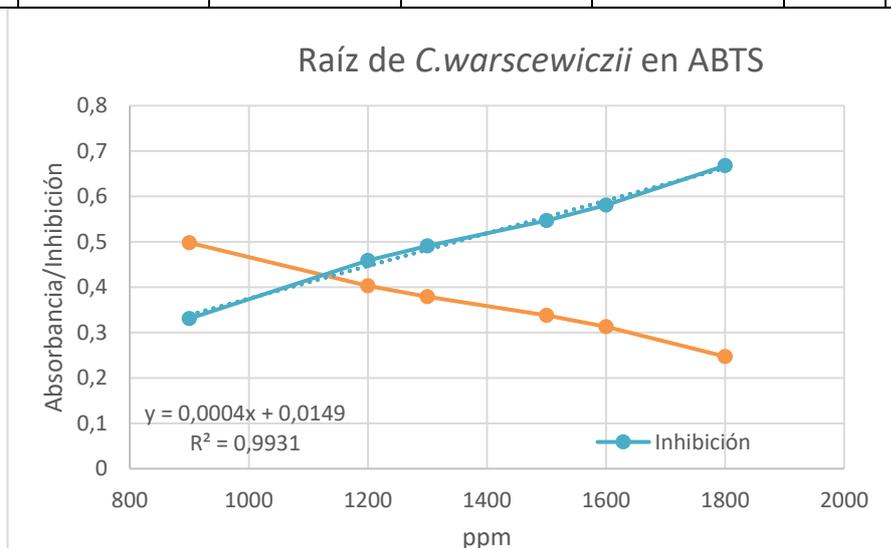


Figura 53. Curva de *C. warscewiczii* -Raíz con ABTS

Cálculo del IC₅₀ del EET de raíz de *C.warscewiczii* con ABTS.

$$y = 0.0004 x + 0.0149$$

$$x = \frac{y - 0.0149}{0.0004}$$

$$x = \frac{0.50 - 0.0149}{0.0004} = 1212.75 \text{ ppm}$$

Tabla 30. Resultados de absorbancia y porcentaje de inhibición de los bulbos de *C. warscewiczii* frente al radical ABTS.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia promedio	PI	S	CV
500	0.663	0.669	0.657	0.663	0.110	0.0060	0.9050
600	0.61	0.615	0.609	0.611	0.180	0.0032	0.0053
700	0.566	0.576	0.592	0.578	0.225	0.0131	0.0227
800	0.514	0.517	0.543	0.525	0.296	0.0159	0.0304
1000	0.425	0.432	0.428	0.428	0.425	0.0035	0.0082
1100	0.361	0.368	0.365	0.365	0.511	0.0035	0.0096
1300	0.256	0.258	0.242	0.252	0.662	0.0087	0.0346

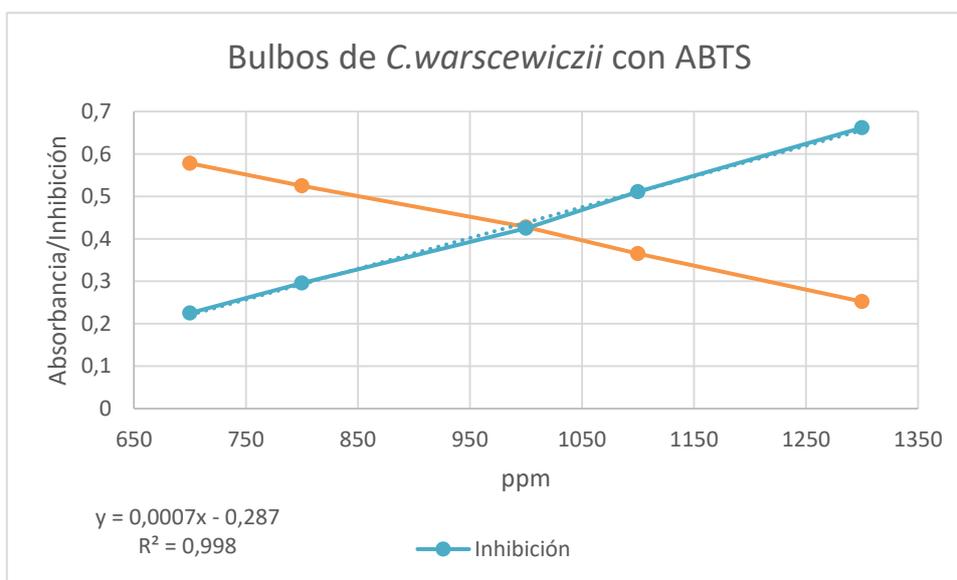


Figura 54. Curva de *C. warscewiczii* -Bulbos con ABTS.

Cálculo del IC₅₀ del EET de bulbos de *C.warscewiczii* con ABTS.

$$y = 0.0007 x - 0.287$$

$$x = \frac{y + 0.287}{0.0007}$$

$$x = \frac{0.50 + 0.287}{0.0007} = 1124.28 \text{ ppm}$$

Anexo 4. Ensayo de Rancimat

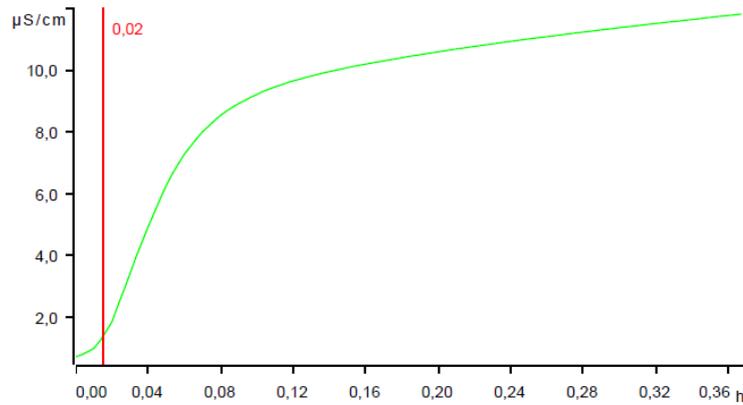


Figura 55. Curva aceite de Coco a 110°C en el ensayo de Rancimat con tiempo de inducción 0.02h.



Figura 56. Soluciones de hojas, raíz y bulbos de *C. warscewiczii* en el ensayo de Rancimat, con aceite de coco.

Anexo 5 –*Allium cepa*



Figura 57. Montaje experimental en el desarrollo del ensayo con *Allium cepa*. Izquierda: Cebollas empleadas para el ensayo; Derecha: Cebollas en el ensayo.

Tabla 31. Resultados experimentales del ensayo de *Allium cepa* con las hojas de *C. warscewiczii*.

Concentración (ppm)	Medición 1 (mm)	Medición 2 (mm)	Medición 3 (mm)	Promedio (mm)	S	CV	%Crecimiento
120	15.50	16.30	16.00	15.83	0.29	0.02	83.33
180	12.70	13.30	11.00	12.83	0.42	0.03	67.54
250	9.50	10.50	10.00	10.00	0.50	0.05	52.63
320	8.40	7.00	7.70	7.57	0.51	0.07	39.82

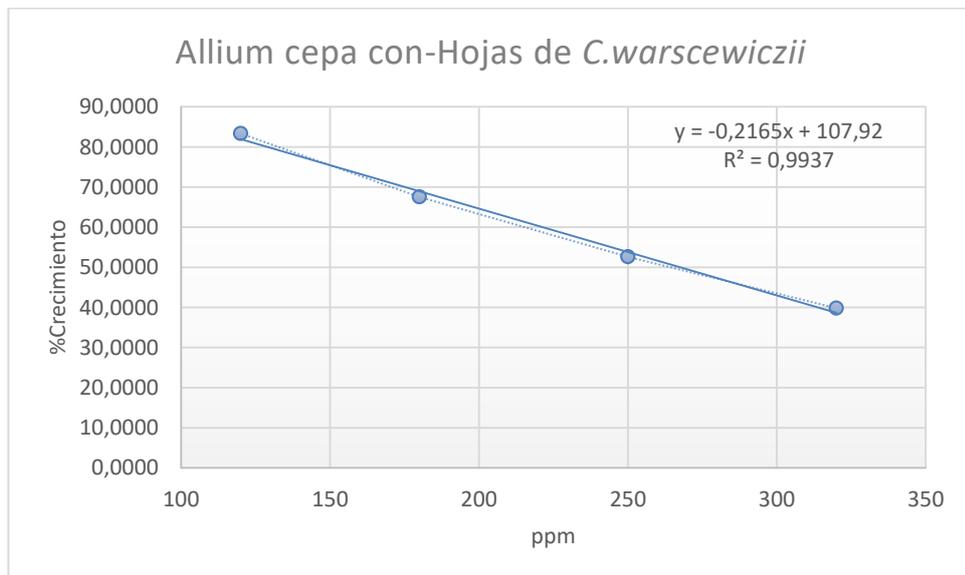


Figura 58. Variación del porcentaje de crecimiento de hojas de *C. warscewiczii* en el ensayo de *Allium cepa*.

Cálculo del IC₅₀ del EET de hojas de *C.warscewiczii* con *A.cepa*

$$y = -0.2165 x + 107.92$$

$$x = \frac{107.92 - y}{0.2165}$$

$$x = \frac{107.92 - 50}{0.2165} = 267.53 \text{ ppm}$$

Tabla 32. Resultados experimentales del ensayo de *Allium cepa* con la raíz de *C. warscewiczii*.

Raiz 2	Medición 1 (mm)	Medición 2 (mm)	Medición 3 (mm)	Promedio	S	CV	%Crecimiento
60	16.00	15.50	16.40	15.97	0.45	0.03	84.04
120	13.00	12.50	12.00	12.50	0.50	0.04	65.79
180	9.80	9.50	9.30	9.53	0.25	0.03	50.18
250	7.00	7.00	6.50	6.83	0.29	0.04	35.96

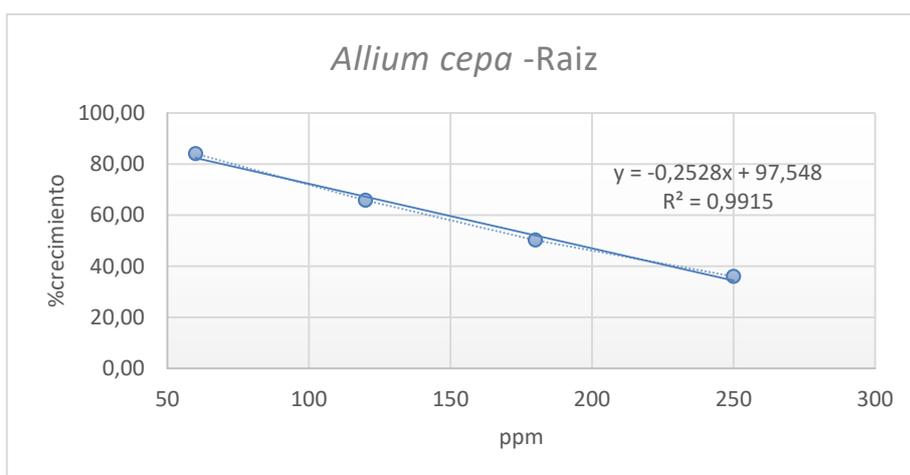


Figura 59. Variación del porcentaje de Crecimiento de raíz de *C. warscewiczii* en el ensayo de *Allium cepa*.

Cálculo del IC₅₀ del EET de bulbos de *C.warscewiczii* con *A.cepa*

$$y = -0.2528 x + 97.548$$

$$x = \frac{97.548 - y}{0.2528}$$

$$x = \frac{97.548 - 50}{0.2528} = 188.08 \text{ ppm}$$

Tabla 33. Resultados experimentales del ensayo de *Allium cepa* con los bulbos de *C.warscewiczii*.

Concentración (ppm)	Medición 1 (mm)	Medición 2 (mm)	Medición 3 (mm)	Promedio (mm)	S	CV	% Crecimiento
120	12.00	12.50	12.30	12.27	0.25	0.02	64.56
180	10.70	10.50	10.00	10.40	0.36	0.03	54.74
250	9.00	8.70	8.80	8.83	0.15	0.02	46.49
320	6.50	7.00	6.00	6.50	0.50	0.08	34.21

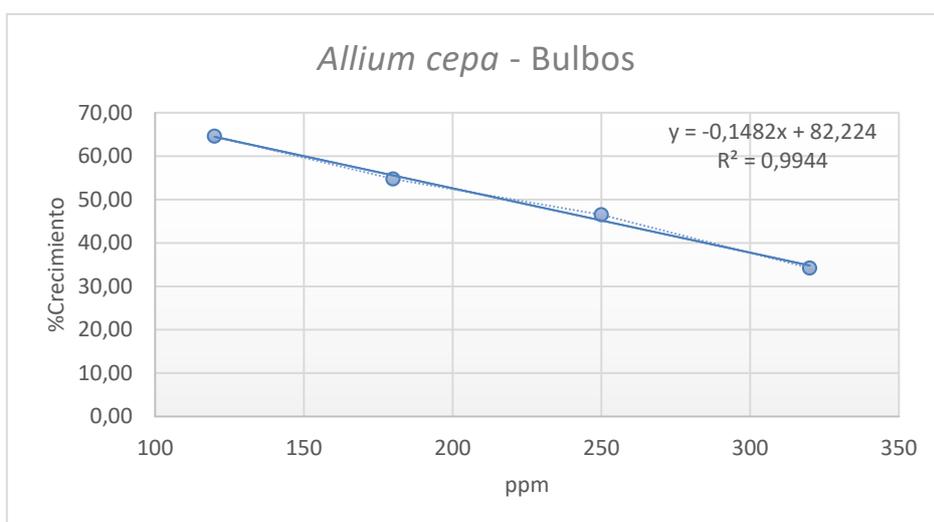


Figura 60. Variación del porcentaje de Crecimiento de bulbos de *C. warscewiczii* en el ensayo de *Allium cepa*.

Cálculo del IC₅₀ del EET de bulbos de *C.warscewiczii* con *A. cepa*

$$y = -0.1482 x + 82.224$$

$$x = \frac{82.224 - y}{0.1482}$$

$$x = \frac{82.224 - 50}{0.1482} = 217.44 \text{ ppm}$$

Anexo 6. Resultados para ensayo con *A. franciscana*

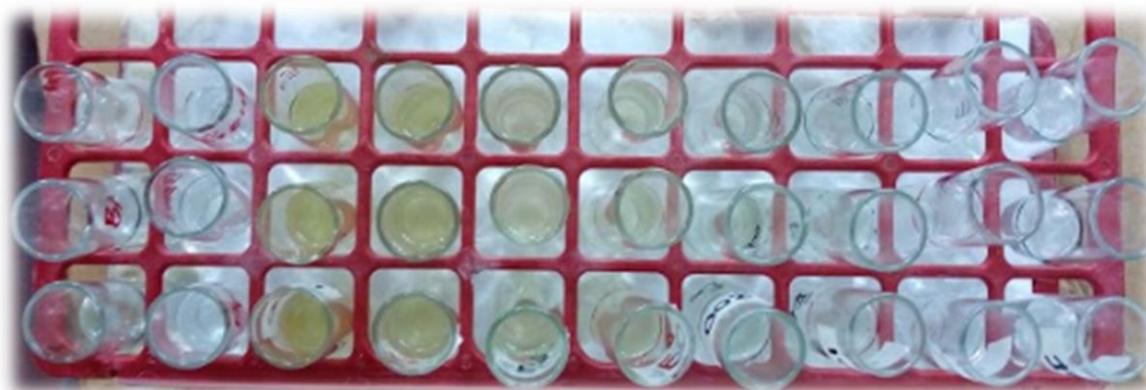


Figura 61. Montaje experimental en el ensayo de *A. franciscana*.

Tabla 34. Clasificación de toxicidad según CYTED

N°	Categoría	$Cl_{50} (\mu \frac{g}{mL})$
I	Extremadamente tóxico	1 -10
II	Altamente Tóxico	10 -100
III	Moderadamente tóxico	100- 500
IV	Ligeramente tóxico	500- 1000
V	Prácticamente no tóxico	1000 -1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

Tabla 35. Resultado experimental de *A. franciscana* para las hojas de *C. warscewiczii*.

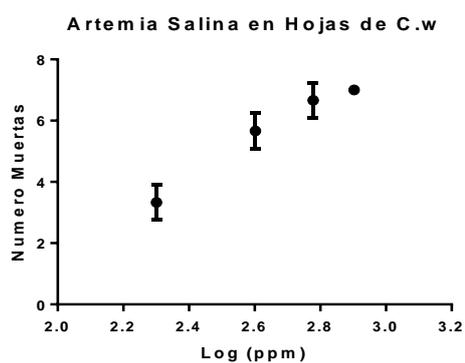
Concentración (ppm)	# Muertos medición 1	# Muertos medición 2	# Muertos medición 3	. # Muertos Promedio	S
200	3	3	4	3.33	0.58
400	5	6	6	5.67	0.58
600	6	7	7	6.67	0.58
800	7	7	7	7.00	0.00

Tabla 36. Resultado experimental de *A. franciscana* para la raíz de *C. warscewiczii*.

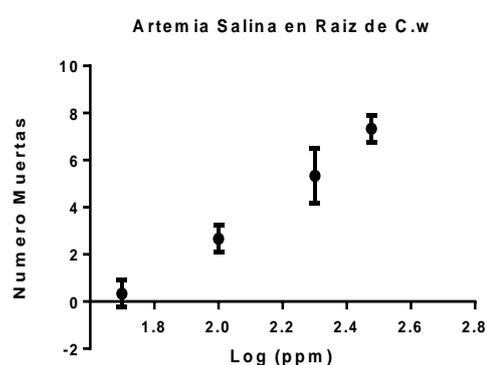
Concentración (ppm)	# Muertos medición 1	# Muertos medición 2	# Muertos medición 3	# Muertos Promedio	S
50	0	1	0	0.33	0.58
100	3	2	3	2.67	0.58
200	4	6	6	5.33	1.15
300	7	8	7	7.33	0.578

Tabla 37. Resultado experimental de *A. franciscana* para los bulbos de *C. warscewiczii*.

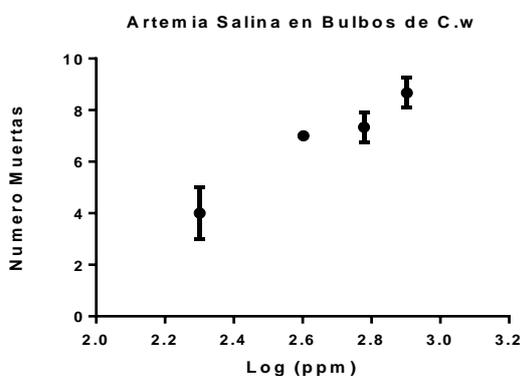
Concentración (ppm)	# Muertos medición 1	# Muertos medición 2	# Muertos medición 3	# Muertos promedio	S
200	4	3	5	4.000	1.0000
400	7	7	7	7.000	0.0000
600	7	8	7	7.333	0.5774
800	9	8	9	8.667	0.5774



$$IC_{50} = 334.17 \pm 21.41 \text{ ppm}$$



$$IC_{50} = 185.27 \pm 22.82 \text{ ppm}$$



$$IC_{50} = 211.37 \pm 26.46 \text{ ppm}$$

Figura 62. Respuesta de *Artemia salina* a EET de: arriba izquierda. hojas , arriba derecha .raíz Abajo. bulbos de *C. warscewiczii*.

Anexo 7. Calculos realizados para fenoles totales y flavonoides totales.

Tabla 38. Resultado experimental de fenoles totales con Ácido Gálico en el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Concentración (ppm)	Absorbancia			Absorbancia Promedio
10	0.063	0.07	0.067	0.067
15	0.133	0.13	0.136	0.133
25	0.212	0.205	0.202	0.206
35	0.296	0.273	0.285	0.285
45	0.371	0.374	0.357	0.367
55	0.458	0.453	0.458	0.456

Fenoles totales

Por otra parte el valor promedio experimental de la absorbancia de *C. warscewiczii* a una concentración de 250 ppm fue de 0.250, 0.358 y 0.305 para hojas, raíz y bulbos respectivamente, y empleando el resultado de la ecuación de regresión lineal del ácido gálico y se procede a encontrar el contenido de fenoles totales (mg AG/g EET) en las muestras estudiadas.

Para el caso de las hojas de *C. warscewiczii* se tiene que:

Absorbancia promedio de *Cattleya* = 0.392

$$\frac{0.250+0.0055}{0.0084} = 30.42 \text{ ppm De ácido gálico en la muestra de 250 ppm}$$

$$C = c \frac{V}{m}$$

Donde C= Concentración en equivalentes de Ácido Gálico; c=Concentración de Ácido Gálico obtenido a partir de la regresión lineal (ppm); V=Volumen de muestra analizada (L); m=Masa de extracto seco (g).

$$C = \left(\frac{(AEET - b)}{m_{ac}} \right)$$

$$C = \frac{(AEET - b)}{m_{ac}} * \frac{V}{m}$$

Se preparó una solución de *C. Warszewiczii* de 1000ppm de la cual se preparó una dilución de 250 ppm de la cual se tomó 200 microlitros para llevar a cabo el desarrollo

experimental, obteniéndose los siguientes resultados para la cuantificación de Fenoles totales.

Calculo de Gramos de Extracto seco empleado Hojas.

$$0.2\text{mL} * \frac{250\text{ mg}}{1000\text{mL}} * \frac{1\text{ gES}}{1000\text{mg ES}} = 5.0 \times 10^{-5}\text{g ES}$$

$$\text{Fenoles Totales} = \left(\frac{0.250 + 0.0055}{0.0084} \right) \frac{\text{mg Eq} - \text{AG}}{\text{L}} * \frac{2.0 \times 10^{-3}\text{L}}{5.0 \times 10^{-5}\text{g ES}}$$

$$= 1216.67 \frac{\text{mg AG}}{\text{g ES}}$$

Calculo de Gramos de Extracto seco empleado Raíz.

$$0.2\text{mL} * \frac{250\text{mg}}{1000\text{mL}} * \frac{1\text{ gES}}{1000\text{mg ES}} = 5.0 \times 10^{-5}\text{g ES}$$

$$\text{Fenoles Totales} = \left(\frac{0.358 + 0.0055}{0.0084} \right) \frac{\text{mg Eq} - \text{AG}}{\text{L}} * \frac{2.0 \times 10^{-3}\text{L}}{5.0 \times 10^{-5}\text{g ES}}$$

$$= 1730.95 \frac{\text{mg AG}}{\text{g ES}}$$

Calculo de Gramos de Extracto seco empleado Bulbos.

$$0.2\text{mL} * \frac{250\text{ mg}}{1000\text{mL}} * \frac{1\text{ gES}}{1000\text{mg ES}} = 5.0 \times 10^{-5}\text{g ES}$$

$$\text{Fenoles Totales} = \left(\frac{0.305 + 0.0055}{0.0084} \right) \frac{\text{mg Eq} - \text{AG}}{\text{L}} * \frac{2.0 \times 10^{-3}\text{L}}{5.0 \times 10^{-5}\text{g ES}}$$

$$= 1478.57 \frac{\text{mg AG}}{\text{g ES}}$$

Flavonoides totales

Calculo de Gramos de Extracto seco empleado Hojas.

$$0.14\text{mL} * \frac{250 \text{ mg}}{1000\text{mL}} * \frac{1 \text{ gES}}{1000\text{mg ES}} = 3.5 \times 10^{-5} \text{ g ES}$$
$$\text{Flavonoides Totales} = \left(\frac{0.0763 + 0.0031}{0.0026} \right) \frac{\text{mg Eq} - Q}{L} * \frac{1.91 \times 10^{-3} L}{3.5 \times 10^{-5} \text{ g ES}}$$
$$= 1666.52 \frac{\text{mg Q}}{\text{g ES}}$$

Calculo de Gramos de Extracto seco empleado Raíz.

$$0.14\text{mL} * \frac{250 \text{ mg}}{1000\text{mL}} * \frac{1 \text{ gES}}{1000\text{mg ES}} = 3.5 \times 10^{-5} \text{ g ES}$$
$$\text{Flavonoides Totales} = \left(\frac{0.0897 + 0.0031}{0.0026} \right) \frac{\text{mg Eq} - Q}{L} * \frac{1.91 \times 10^{-3} L}{3.5 \times 10^{-5} \text{ g ES}}$$
$$= 1947.78 \frac{\text{mg Q}}{\text{g ES}}$$

Calculo de Gramos de Extracto seco empleado Bulbos.

$$0.14\text{mL} * \frac{250 \text{ mg}}{1000\text{mL}} * \frac{1 \text{ gES}}{1000\text{mg ES}} = 3.5 \times 10^{-5} \text{ g ES}$$
$$\text{Flavonoides Totales} = \left(\frac{0.0773 + 0.0031}{0.0026} \right) \frac{\text{mg Eq} - Q}{L} * \frac{1.91 \times 10^{-3} L}{3.5 \times 10^{-5} \text{ g ES}}$$
$$= 1678.68 \frac{\text{mg Q}}{\text{g ES}}$$

Anexo 8. Caracterización de compuestos fenólicos por GC-MS

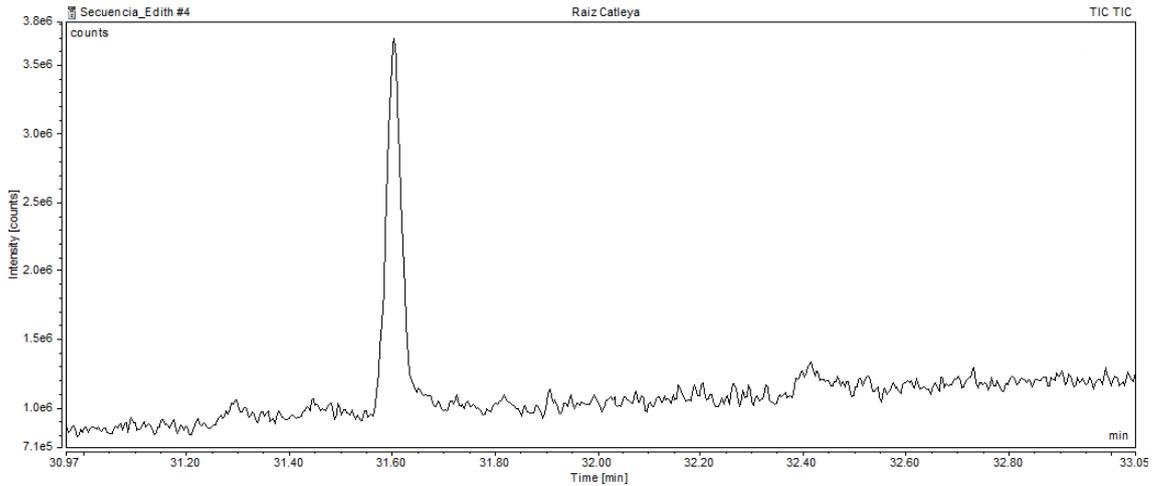


Figura 63. cromatograma para raíz de *C. warszewiczii*.

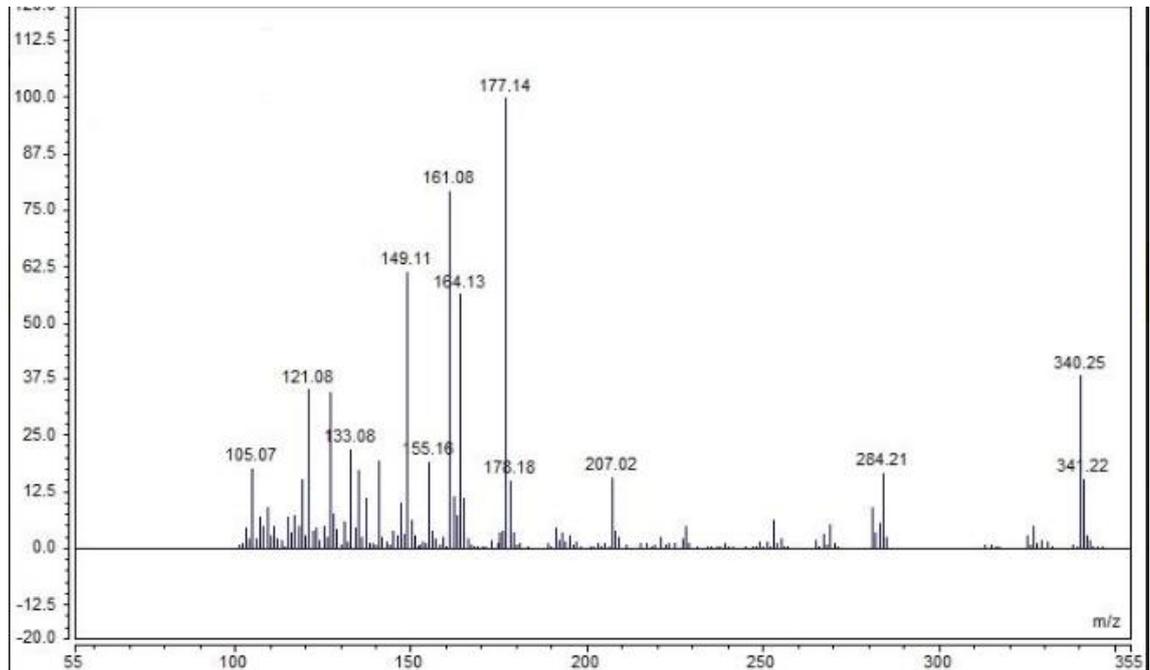


Figura 64. Espectro de masas para Agidol 2, extraído de la raíz de *C.warszewiczii*.

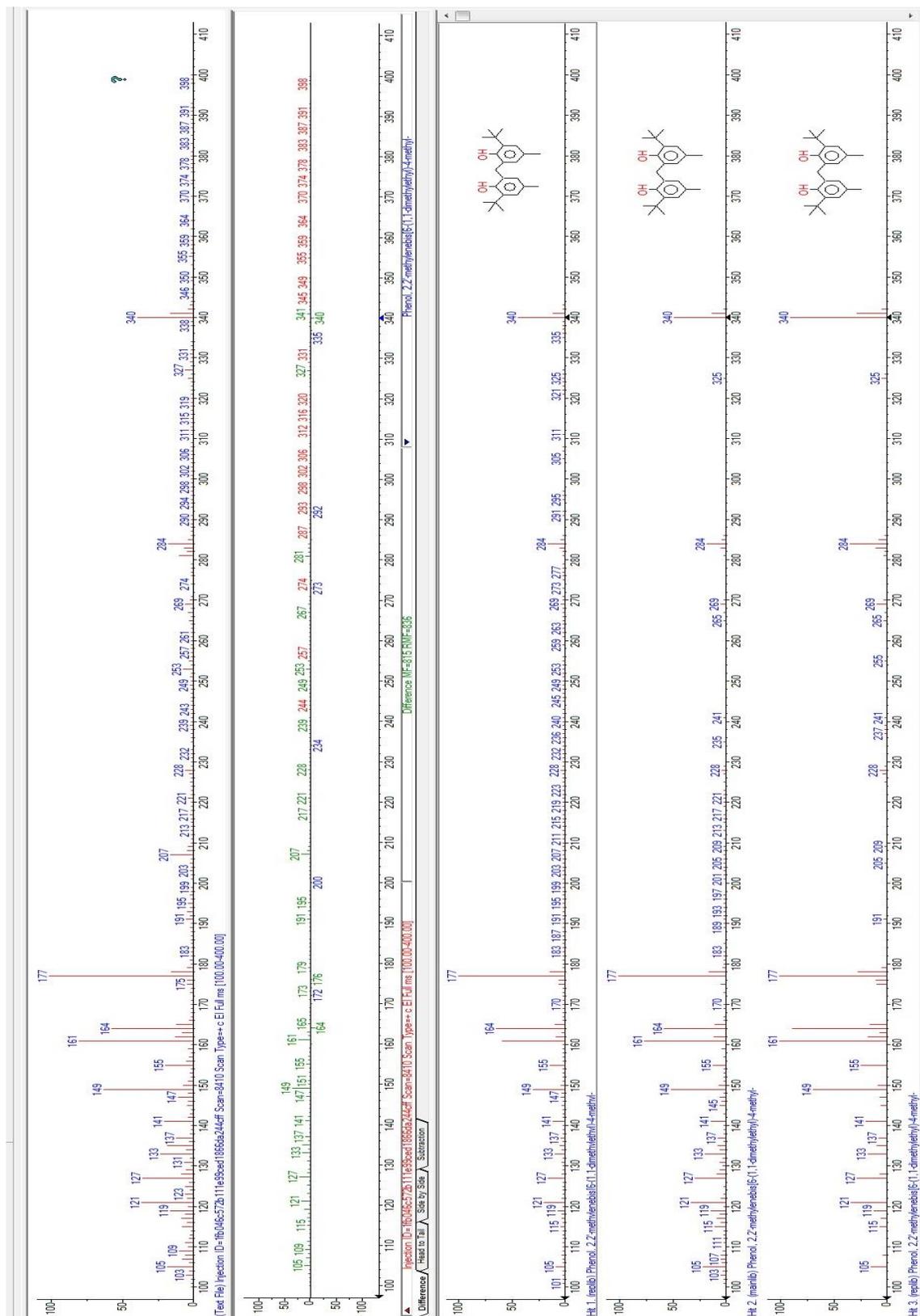


Figura 65. Comparación entre espectro de masas experimental y de la base de datos NIST para raíz de C.warszewiczii.

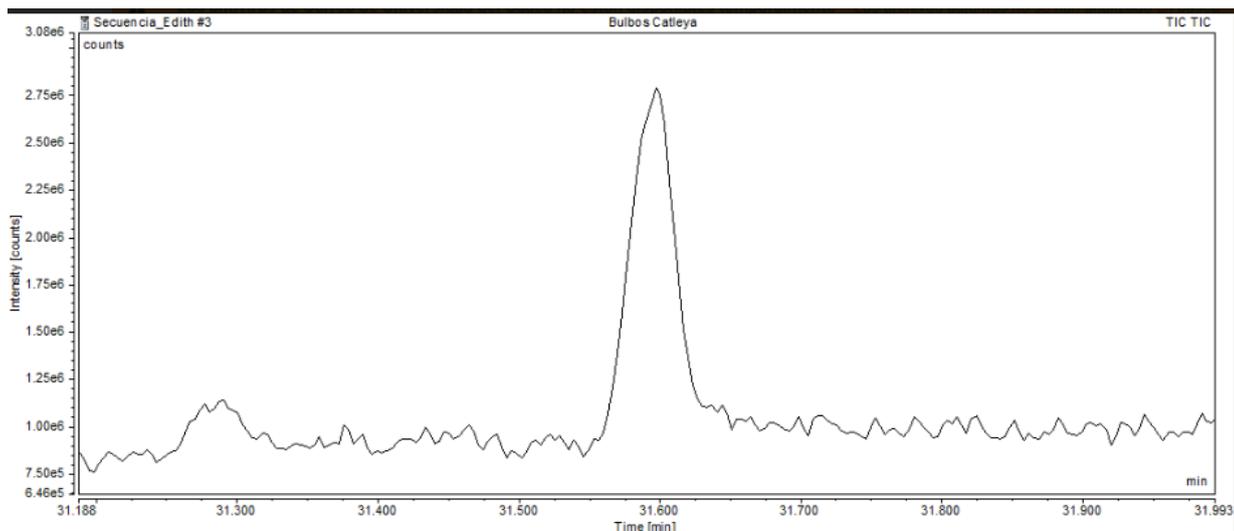


Figura 66. cromatograma de Bulbos de *C.warscewiczii*.

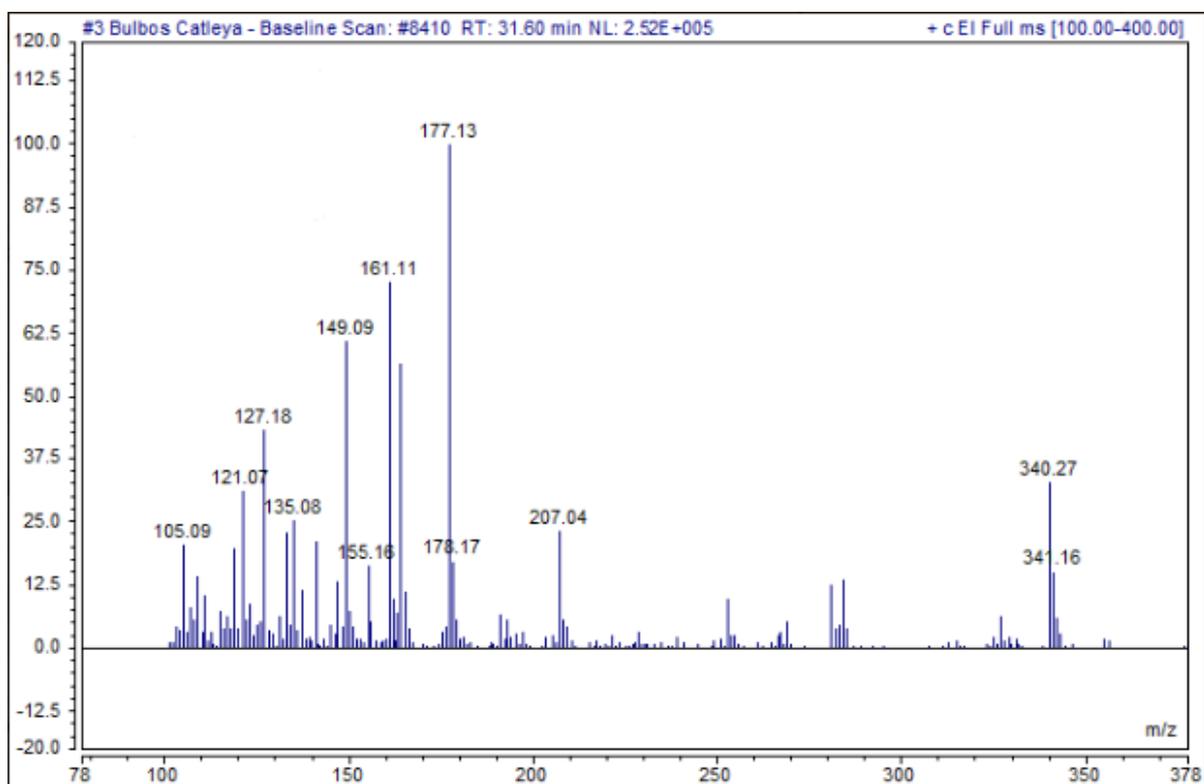


Figura 67. Espectro de masas para el Agidol 2, extraído de bulbos de *C.warscewiczii*.

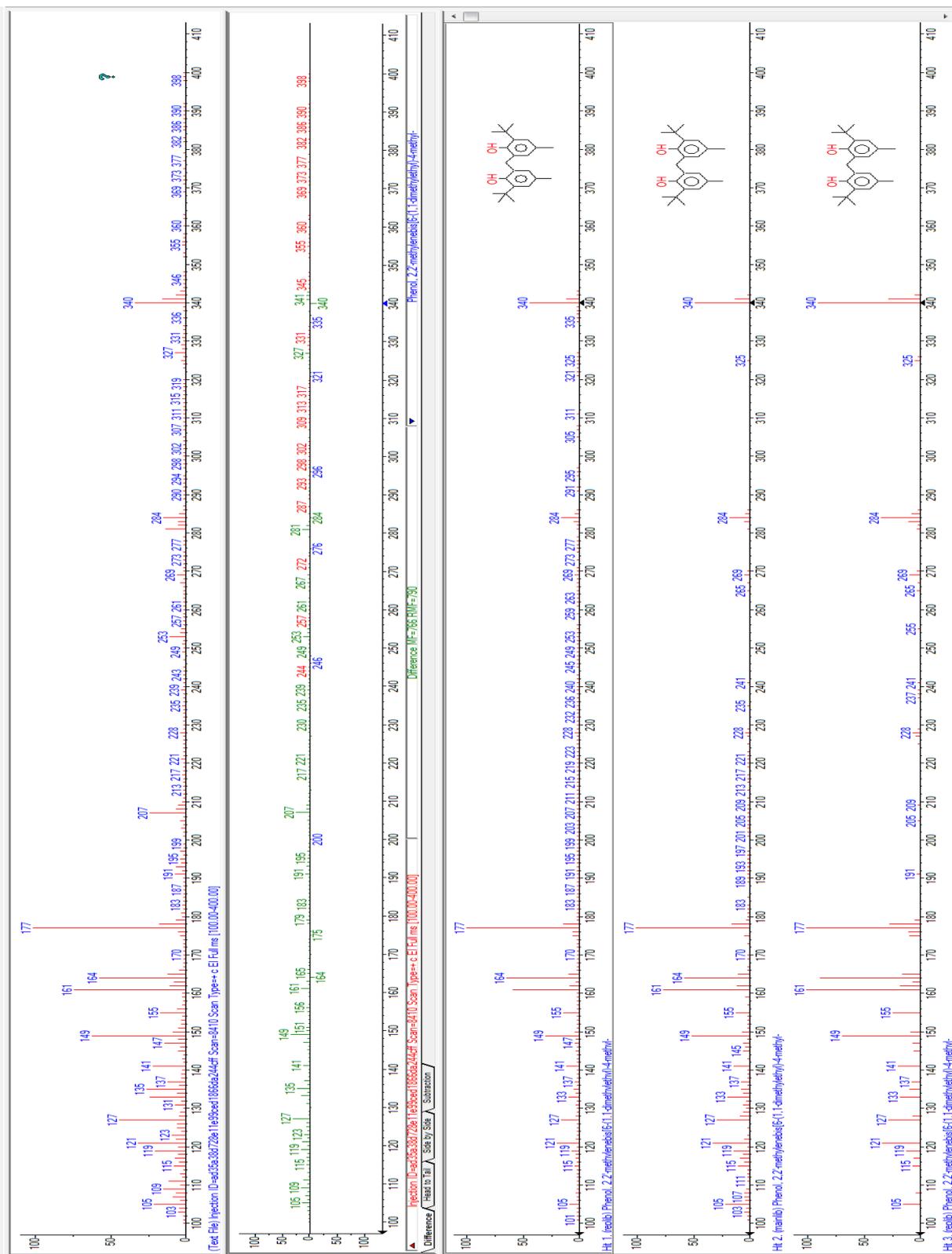


Figura 68. Comparación entre espectro de masas experimental y de la base de datos NIST para bulbos de *C.warszewiczii*.

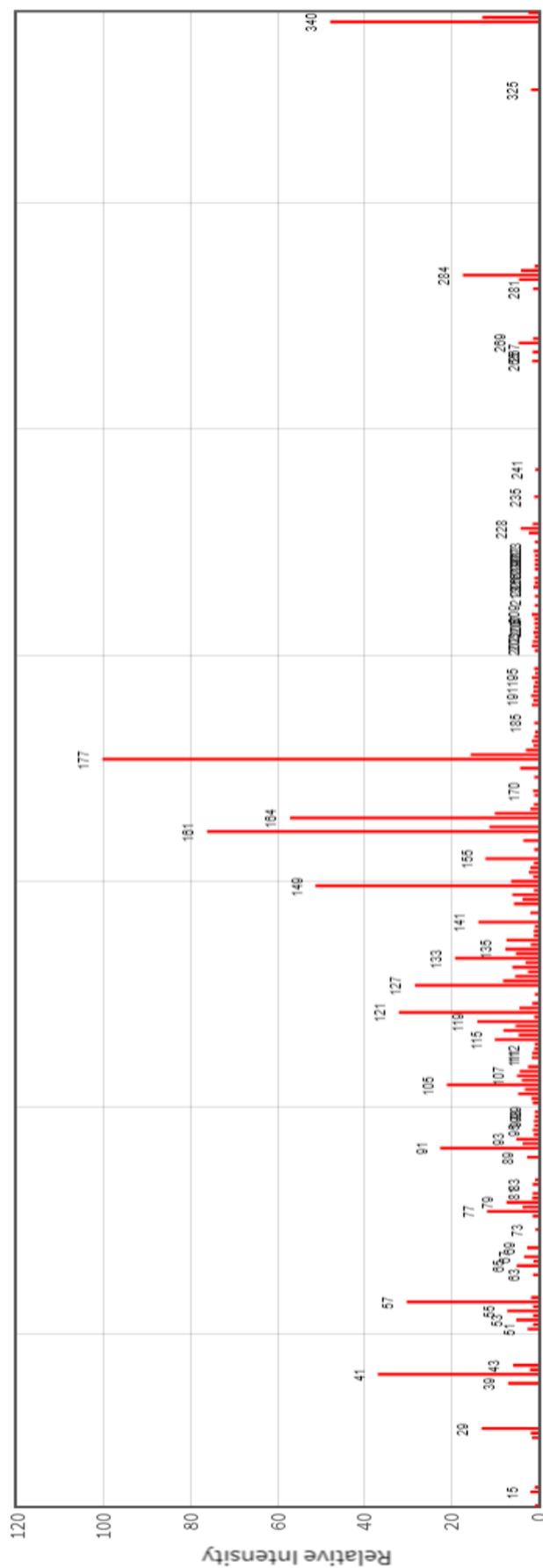


Figura 69. Espectro teórico del Agidol-2, tomado de la base de datos NIST. Consultado en Agosto de 2019.

Anexo 9 Cálculos de mecánica molecular

Tabla 39. Valores de Energía mínima luego de la optimización de la geometría molecular de ligandos con el programa Gabedit.

Ligando	Energía mínima estructural del ligando. Gabedit (Kcal/mol)
Paration	66.74
Galantamina	29.79
Tacrina	25.50
Agidol 2	618.88
Dabigatrán	118.80
Heparina	115.86
Agidol 2	618.88
Warfarina	82.63
Agidol 2	618.88
Ledopa	41.05
Ropinirol	62.94
Selegilina	25.50