

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE

QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

Estudio de las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género *Huntleya* (Orchidaceae) del Ecuador.

AUTORES:

CRISTIHAN DAVID QUINCHUELA BARAHONA

ISRAEL ALEJANDRO VACA ESTRELLA

TUTOR:

MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito, febrero de 2020

Cesión de derechos de autor

Nosotros Quinchuela Barahona Cristihan David, con documento de identificación N° 1720705647, y Vaca Estrella Israel Alejandro, con documento de identificación N° 1720455094, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Estudio de las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género *Huntleya (Orchidaceae)* del Ecuador”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Cristihan David Quinchuela Barahona: 1720705647: febrero de 2020.

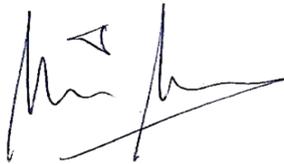


Israel Alejandro Vaca Estrella: 1720455094: febrero de 2020.

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“Estudio de las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género *Huntleya* (*Orchidaceae*) del Ecuador”, realizado por Cristihan David Quinchuela Barahona e Israel Alejandro Vaca Estrella, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero de 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Cerna', with a stylized flourish extending to the right.

Marco Fernando Cerna Cevallos

C.I: 0501872071

Dedicatoria

A mis padres, Gonzalo (+) que desde donde esta me cuida y me da fuerzas para luchar, Doris quien me enseñó a seguir adelante y no rendirme siempre cobijado con su inmenso amor. A mis hermanos; Gonzalo, mi segundo padre, quien jamás me dejo de apoyar, dándome consejos y cariño, Iván un gran amigo, apoyo incondicional y gran consejero, Mauricio quien siempre alegro nuestras vidas. A mi tía Barbarita por su gran cariño, apoyo y aliento en todo momento. A mis hermanas y sobrinas para que el lazo familiar nunca se rompa. A Shirley quien con cariño y de la mano me acompaño y me ayudo a mejorar. A mis grandes amigos.

Cristihan

A mis familiares y amigos más cercanos, por su apoyo y ánimos brindados en este recorrido, especialmente a mi madre Jimena Estrella que sin ella no habría llegado hasta aquí. Y por supuesto a Dios, fuente de toda sabiduría y quien ordena todas las cosas para bien.

Israel

Agradecimiento

A la Universidad Politécnica Salesiana y al grupo de Investigación NUNKUI WAKAN por hacer posible el financiamiento y ejecución del proyecto.

A nuestro tutor Marco Cerna PhD y Paco Noriega PhD, por su apoyo y sus conocimientos brindados para el desarrollo fitoquímico de la investigación y facilitar la culminación del proyecto.

A la ingeniera Elizabeth Yugsi y al ingeniero Byron Fuertes, quienes nos ayudaron con sus conocimientos y habilidades en el área molecular y química desarrollada en el presente proyecto.

Al laboratorio de Ciencias de la Vida de la carrera de Biotecnología y al personal que labora en el mismo.

A nuestros amigos y amigas Alejandra de la Cruz, Shirley Herrera, Diego Torres, Katherine Veliz, Victoria Sánchez, Jorge Romero, Ariel Arévalo, Martin Rojas, Adriana Mogrovejo, Yahaira Proaño, quienes desinteresadamente nos apoyaron para culminar.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
Marco Teórico	4
1.1 Generalidades de las Orquídeas	4
1.1.1 Morfología de las orquídeas	4
<i>1.1.2 Género Huntleya</i>	8
1.2 Análisis químico	9
1.2.1 Extractos fluidos	9
1.2.2 Percolación	10
1.2.3 Metabolitos secundarios	10
1.2.4 Fenoles	11
1.2.5 Flavonoides	11
1.2.6 Cuantificación de metabolitos secundarios	12
1.3 Actividad Antimicrobiana	12
1.3.1 Método para evaluar la actividad antimicrobiana	12
1.3.2 Bacterias nocivas	13
<i>1.3.3 Enterobacter cloacae</i>	13
<i>1.3.4 Enterobacter aerogenes</i>	13
<i>1.3.5 Staphylococcus aureus</i>	14
<i>1.3.6 Escherichia coli</i>	14
1.4 Actividad Antioxidante	14

1.4.1	Estrés oxidativo	14
1.4.2	Metodología DPPH	15
1.4.3	Metodología ABTS	16
1.5	Toxicidad	16
1.5.1	Estudio de toxicidad	16
1.5.2	<i>Artemia salina</i>	17
Capítulo 2		18
Marco Metodológico		18
2.1	Colección y almacenaje de muestras	18
2.2	Obtención de extractos hidroalcohólicos mediante percolación	18
2.3	Cuantificación de metabolitos secundarios	19
2.3.1	Cuantificación de fenoles totales	20
2.3.2	Cuantificación de flavonoides totales	22
2.4	Actividad antimicrobiana	23
2.4.1	Obtención de bacterias	23
2.4.2	Ensayos comparativos preliminares de actividad antimicrobiana	23
2.5	Evaluación de la actividad antioxidante	25
2.5.1	Actividad antioxidante con DPPH	25
2.5.2	Actividad antioxidante con ABTS	27
2.5.3	Análisis estadístico de la actividad antioxidante	29
2.6	Toxicidad	29
2.6.1	<i>Artemia salina</i>	29

2.6.2	Descapsulación	29
2.6.3	Incubación de huevos.....	30
2.6.4	Ensayo de toxicidad	31
2.6.5	Conteo de Nauplios muertos	31
2.6.6	Concentración letal 50 (CL50) y grado de toxicidad	32
Capítulo 3.....		33
Resultados y Discusión.....		33
3.1	Obtención de extractos hidroalcohólicos.....	33
3.2	Cuantificación de metabolitos secundarios.....	33
3.2.1	Cuantificación de fenoles totales.....	33
3.2.2	Cuantificación de flavonoides totales	35
3.3	Ensayos comparativos preliminares de actividad antimicrobiana	37
3.4	Evaluación de la actividad antioxidante.....	38
3.4.1	Actividad antioxidante con DPPH.....	38
3.4.2	Actividad antioxidante con ABTS	45
3.5	Toxicidad.....	52
Conclusiones		56
Recomendaciones		57
Referencias.....		58
Anexos		75

Índice de tablas

Tabla 1. Preparación de muestras para la curva de ácido gálico.....	20
Tabla 2. Preparación de muestras para determinar fenoles totales	21
Tabla 3. Preparación de muestras para la curva de quercetina	22
Tabla 4. Preparación de muestras para determinar flavonoides totales	23
Tabla 5. Preparación de muestras para actividad antioxidante con DPPH	26
Tabla 6. Preparación de muestras para actividad antioxidante con ABTS	28
Tabla 7. Grado de toxicidad en base a CL50	32
Tabla 8. Datos de obtención de extractos.....	33
Tabla 9. Datos de cuantificación de fenoles totales	34
Tabla 10. Datos de cuantificación de flavonoides totales	36
Tabla 11. Halos de inhibición de los extractos frente a cada bacteria	37
Tabla 12. Porcentaje de inhibición de DPPH para cada extracto.....	39
Tabla 13. IC50 con DPPH para cada uno de los extractos	44
Tabla 14. Porcentaje de inhibición de ABTS para cada extracto.....	46
Tabla 15. IC50 con ABTS para cada uno de los extractos.....	51
Tabla 16. Datos para determinar CL50	53

Índice de figuras

Figura 1. Raíces aéreas de orquídeas	5
Figura 2. Pseudobulbo de <i>Catasetum</i> sp.	5
Figura 3. Tipos de hojas de orquídeas.....	6
Figura 4. Esquema general de la flor de una orquídea.	7
Figura 5. Cápsula de orquídea.....	8
Figura 6. <i>Huntleya meleagris</i> , orquídea representativa del género.....	9
Figura 7. Obtención de extracto fluido mediante percolación.	19
Figura 8. Preparación de las soluciones para análisis en espectrofotómetro	21
Figura 9. Preparación del inóculo bacteriano en medio líquido TSB	24
Figura 10. Preparación de solución DPPH.....	25
Figura 11. Preparación de solución ABTS.....	27
Figura 12. Incubación de huevos descapsulados de <i>Artemia salina</i>	30
Figura 13. Conteo de Nauplios muertos mediante estereoscopio	31
Figura 14. Curva de calibración de ácido gálico.....	34
Figura 15. Curva de calibración de quercetina.....	35
Figura 16. Absorbancia DPPH vs Concentración de extracto de <i>H. burtii</i>	40
Figura 17. Absorbancia DPPH vs Concentración de extracto de <i>H. gustavi</i>	40
Figura 18. Absorbancia DPPH vs Concentración de extracto de <i>H. meleagris</i>	41
Figura 19. Absorbancia DPPH vs Concentración de extracto de <i>H. wallisii</i>	41
Figura 20. % inhibición DPPH vs Concentración de extracto de <i>H. burtii</i>	42
Figura 21. % inhibición DPPH vs Concentración de extracto de <i>H. gustavi</i>	42
Figura 22. % inhibición DPPH vs Concentración de extracto de <i>H. meleagris</i>	43
Figura 23. % inhibición DPPH vs Concentración de extracto de <i>H. wallisii</i>	43
Figura 24. Comparación de los valores de IC50 con DPPH	44

Figura 25. Absorbancia ABTS vs Concentración de extracto de <i>H. burtii</i>	47
Figura 26. Absorbancia ABTS vs Concentración de extracto de <i>H. gustavi</i>	47
Figura 27. Absorbancia ABTS vs Concentración de extracto de <i>H. meleagris</i>	48
Figura 28. Absorbancia ABTS vs Concentración de extracto de <i>H. wallisii</i>	48
Figura 29. % inhibición ABTS vs Concentración de extracto de <i>H. burtii</i>	49
Figura 30. % inhibición ABTS vs Concentración de extracto de <i>H. gustavi</i>	49
Figura 31. % inhibición ABTS vs Concentración de extracto de <i>H. meleagris</i>	50
Figura 32. % inhibición ABTS vs Concentración de extracto de <i>H. wallisii</i>	50
Figura 33. Comparación de los valores de IC50 con ABTS	51

Índice de Anexos

Anexo 1. Factura	75
Anexo 2. Factura	76
Anexo 3. Extractos frente a <i>E. cloacae</i>	77
Anexo 4. Extractos frente a <i>E. aerogenes</i>	77
Anexo 5. . Extractos frente a <i>S. aureus</i>	78
Anexo 6. Extractos frente a <i>E. coli</i>	78
Anexo 7. Datos utilizados para calcular IC50 con DPPH.....	79
Anexo 8. Datos obtenidos del análisis de varianza y prueba de Tukey para actividad antioxidante con DPPH.....	80
Anexo 9. Datos utilizados para calcular IC50 con ABTS.....	81
Anexo 10. Datos obtenidos del análisis de varianza y prueba de Tukey para actividad antioxidante con ABTS.	82
Anexo 11. Datos completos utilizados para cálculo de CL50	83
Anexo 12. Tabla de transformación de porcentaje a Probit usada para determinación de CL50.....	86

Resumen

En la presente investigación se tuvo como objetivo evaluar las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género *Huntleya* (*Orchidaceae*) del Ecuador, se partió de extractos fluidos de hojas de cada especie obtenidos con una solución 1:1 de etanol 96 ° y agua, para pruebas de bioactividad. Por espectrofotometría UV-Visible se cuantificó la cantidad de fenoles y flavonoides presentes en las muestras. La capacidad antibacteriana se analizó por la prueba de discos de Kirby-Bauer frente a diferentes cepas bacterianas. La capacidad antioxidante se determinó utilizando el método DPPH y ABTS para analizar la capacidad captadora de radicales libres. El nivel de toxicidad se evaluó frente a Nauplios de *Artemia salina* para determinar su Concentración Letal media (CL50).

Los resultados de cuantificación por espectrofotometría demostraron que las especies tienen presencia en bajas concentraciones de fenoles y flavonoides. Se demostró capacidad antibacteriana nula frente a *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*. En el análisis de la actividad antioxidante las especies con mayor capacidad para inhibir radicales libres son, *H. wallisii* para DPPH y *H. gustavi* para ABTS. Al trabajar la prueba con *Artemia salina* se demuestra que *H. burtii* y *H. gustavi* tienen un grado de toxicidad medianamente alto, mientras que *H. meleagris* y *H. wallisii* son inocuos para los organismos. Como conclusión se determinó que las especies *H. burtii* y *H. gustavi* tienen capacidad antioxidante y toxicidad con las cuales se debería probar su actividad anticancerígena en cultivos celulares.

Palabras claves: antioxidantes, antibacteriano, toxicidad, fenoles, flavonoides

Abstract

The aim of this research was to evaluate the antibacterial, antioxidant and toxicity properties of four species of the genus *Huntleya* (*Orchidaceae*) of Ecuador, based on fluid extracts of leaves of each species obtained with a 1:1 solution of 96 ° ethanol and water for bioactivity tests. The amount of phenols and flavonoids present in the samples was quantified by UV-Visible spectrophotometry. The antibacterial capacity was analyzed by the Kirby-Bauer disc test against different bacterial strains. The antioxidant activity was determined using the DPPH and ABTS methods to analyze the free radical scavenging capacity. The toxicity level was evaluated against *Artemia salina* Nauplii to determine its average Lethal Concentration (LC50).

The results of quantification by spectrophotometry showed that *Huntleya* species have phenols and flavonoids in low concentrations. Null antibacterial capacity was observed against *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. For the analysis of antioxidant activity, the species with the greatest capacity to inhibit free radicals were *H. wallisii* for DPPH and *H. gustavi* for ABTS. The toxicity evaluation using *Artemia salina* showed that *H. burtii* and *H. gustavi* have a moderately high degree of toxicity, while *H. meleagris* and *H. wallisii* are innocuous to organisms. In conclusion, it was determined that the species *H. burtii* and *H. gustavi* have antioxidant and toxicity properties, their anticancer activity should be further evaluated in cell cultures.

Keywords: antioxidants, antibacterial, toxicity, phenols, flavonoids

Introducción

Las orquídeas pertenecen a la familia *Orchidaceae*, presentan flores bastante llamativas, debido a su amplia gama de colores, diferentes formas y aromas; de momento se han detallado alrededor de 28000 especies y aproximadamente 900 géneros, que son ampliamente utilizadas en forma ornamental (Bhattacharyya, Kumaria, Job, & Tandon, 2015; Savaris et al., 2018, Cerna y otros. 2018). En países como China e India se han registrado usos medicinales que se remontan hace 2000 años a.C. (Arora, Kaur, Kahlon, Mahajan, & Sembi, 2017; Fang et al., 2018; Mishra et al., 2018; Qian et al., 2015; Singh et al., 2016; Suárez, Eguiguren, Herrera, 2016; Yan, Tang, & Liu, 2018).

En Ecuador, existen 4302 especies de orquídeas catalogadas, en un aproximado de 210 géneros, de los cuales más de 1700 son especies endémicas (Montalvo y Vargas, 2019), entre ellos, el género *Huntleya* en Ecuador registra siete especies (Jorgensen y León, 1999; Neill y Ulloa, 2011).

En la actualidad se enfrenta una creciente resistencia a fármacos antibacterianos comunes contra un gran número de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, responsables de una amplia gama de infecciones (Guo et al., 2016; Rykaczewski et al., 2019). Esta resistencia por lo general está dada por el mal uso de antibióticos, su uso excesivo y la automedicación (Quizhpe, Encalada, Andrade, Sacoto, y Muñoz, 2014), en la última década se determinó que existe una variación genética o mutación relacionada con la resistencia a antibióticos, que lleva a la aparición de bacterias más difícil de combatir (Alós, 2015). Normalmente, las bacterias infecciosas están asociadas con vías respiratorias, inflamación de la epidermis, dermis y tejidos subcutáneos, además de bacterias del sistema gastro intestinal (Penduka et al., 2018).

Los humanos necesitan oxígeno (O₂) para la producción normal de energía, sin embargo, la presencia excesiva de oxígeno en las células puede producir daños debido a la formación de especies reactivas generadas durante su oxidación (V. Sánchez & Méndez, 2013). La exposición a medioambiente cambiante, contaminantes, situaciones patológicas y estilo de vida pueden generar exceso y sobre acumulación de radicales libres, resultando esto en la aparición de estrés oxidativo, relacionado con el envejecimiento prematuro, varias enfermedades crónicas, además, que puede promover un alto índice de mortalidad (Gutiérrez, Reyes, Martínez, López, y Lazalde, 2018; Mendoza, Flores, Melendez, Marquez, y Matheus, 2019). Se conoce que un radical libre es una especie química (átomo, molécula o ion) con capacidad de reaccionar con diversas biomoléculas presentes en su entorno, normalmente lípidos o grasas, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos; ésta interacción da lugar a alteraciones de las propiedades estructurales y funcionales de las biomoléculas (Han et al., 2019; Ventura, Menchaca, Toledo, y Kromer, 2018). El radical libre más común es la especie reactiva del oxígeno (ERO), que es considerado como la causa de varias enfermedades al producir estrés oxidativo (Echeverría et al., 2016; Narkhede, Mahajan, Singh, Harsulkar, & Jagtap, 2016). Los efectos de las EROs son controlados por el mecanismo fisiológico de defensa antioxidante que evita el exceso de oxidación celular, previniendo que se vuelva crónico (Cai, Zhao, & Zhu, 2014; Chiang & Lin, 2018; Narkhede et al., 2016).

Para que una planta pueda utilizarse como medicamento, previamente se ha de determinar si posee efecto tóxico sobre un organismo con pruebas de laboratorio; se conoce que las plantas poseen metabolitos secundarios como alcaloides, polifenoles o saponinas que pueden incidir sobre la toxicidad de un extracto sobre un organismo modelo, donde uno de los más utilizados es *Artemia salina* (Jaramillo, Jaramillo,

Armas, Troccoli, y Rojas, 2016), para ello, la toxicología estudia el efecto tóxico de diversas sustancias sobre un organismo; sin embargo, los animales vertebrados han sido reemplazados por otros con menor costo de implementación y así evitar el daño o muerte de animales mayores, siendo los Nauplios de *A. salina* ideales para poder determinar la concentración letal media o CL50 de un extracto (Lozano, García, Alvariño, y Iannacone, 2017).

Hasta el momento, se dispone únicamente de descripciones botánicas de las especies del género *Huntleya*, de manera que se carece de investigaciones científicas, tanto a nivel nacional como internacional (Hirtz, 2019). En ciertas regiones de la Amazonía como Napo, Pastaza y Morona Santiago, se conoce el uso de especies de este género para curar heridas, golpes y tumores (Cerna, 2019) (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008). Por lo cual, ha sido preciso iniciar un estudio de las especies de este género encontradas en el país para determinar si las mismas pueden ser usadas en el área de la salud humana y obtención de nuevos metabolitos útiles en el campo farmacéutico, cosmético, entre otros; se propone destacar el potencial de recursos fitogenéticos de orquídeas del país.

En la presente investigación se planteó como objetivo, evaluar las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género *Huntleya* (*Orchidaceae*) del Ecuador, además, cuantificar fenoles y flavonoides presentes en extractos fluidos obtenidos por percolación de cuatro especies del género *Huntleya*, evaluar la actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de cuatro especies del género *Huntleya* y determinar la toxicidad de los extractos mediante la prueba Concentración Letal Media CL50.

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1 Generalidades de las Orquídeas

Las orquídeas son una familia de plantas con flores que se reconocen con gran facilidad, ya que muchos lo asocian con flores grandes, bellas y exóticas, muy apreciadas como regalo sofisticado en ocasiones notables, su tamaño es muy variado, las hay de unos pocos centímetros hasta plantas que llegan a medir 15 metros (Fuertes, Mallitasig, Cerna, & Gutiérrez, 2018; Baquero, Salazar, Molina, y Jauregui, 2015).

El nombre de esta familia proviene del vocablo griego “orkhis”, que significa testículos, por Teofrasto de Ereso (371 a.C - 286 a.C.) en su obra *De causis plantarum* para nombrar una planta de este grupo, el término hace alusión a la semejanza que presenta la pareja de pseudobulbos de muchas especies con aquellos órganos (Álvarez et al., 2015; Andalucía, 2016).

Las *Orchidaceae* son una de las familias más grandes de plantas con flores, y tal vez solo superadas por las *Asteraceae* (Cameron et al., 2015). Actualmente se reconocen 899 géneros en *Orchidaceae*, con 27801 especies aceptadas y 71391 nombres, muchos de ellos pueden ser híbridos o sinónimos de los registrados (The Plant List, 2019), nuevos géneros de orquídeas se están describiendo a una tasa de aproximadamente 13 por año, pero la gran mayoría de estos son segregados de especies de otros géneros y no se basan en taxones recién descubiertos (Ajithkumar, Rajendran, & Aswini, 2017).

1.1.1 Morfología de las orquídeas

1.1.1.1 Raíces

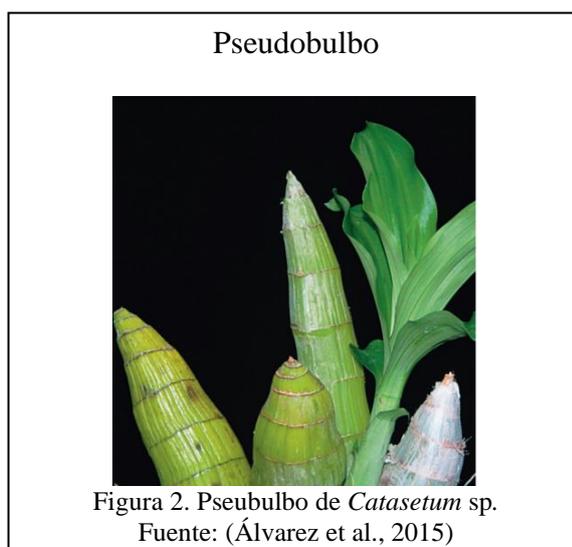
Las raíces de las orquídeas son alargadas, están cubiertas por un tejido esponjoso de color blanquecino llamado velamen (presente en orquídeas epífitas), este velamen

cumple la función de captar agua y nutrientes para su consumo; las características de la raíz varía según el tipo de crecimiento (epífitas con velamen, litófitas y terrestres sin velamen) (Vargas y Victorino, 2015).



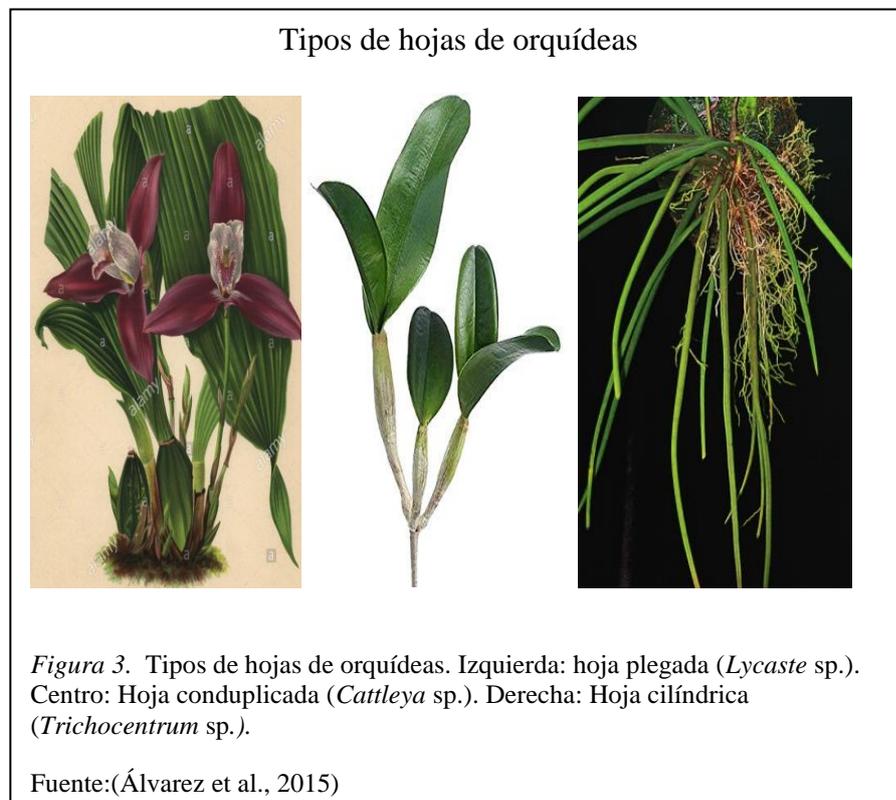
1.1.1.2 Pseudobulbos

El pseudobulbo es un tallo modificado, este puede ser alargado y estar constituido de varios entrenudos; están con o sin costillas y son lisos o arrugados, por lo general están cubiertos en el estado adulto parcialmente por brácteas (hojas modificadas), algunas orquídeas con pseudobulbo son: *Oncidium*, *Odonthoglossum*, *Cattleya*, *Catasetum* (Ruíz, Moreno, Salgado, y Olivera, 2016).



1.1.1.3 Hojas

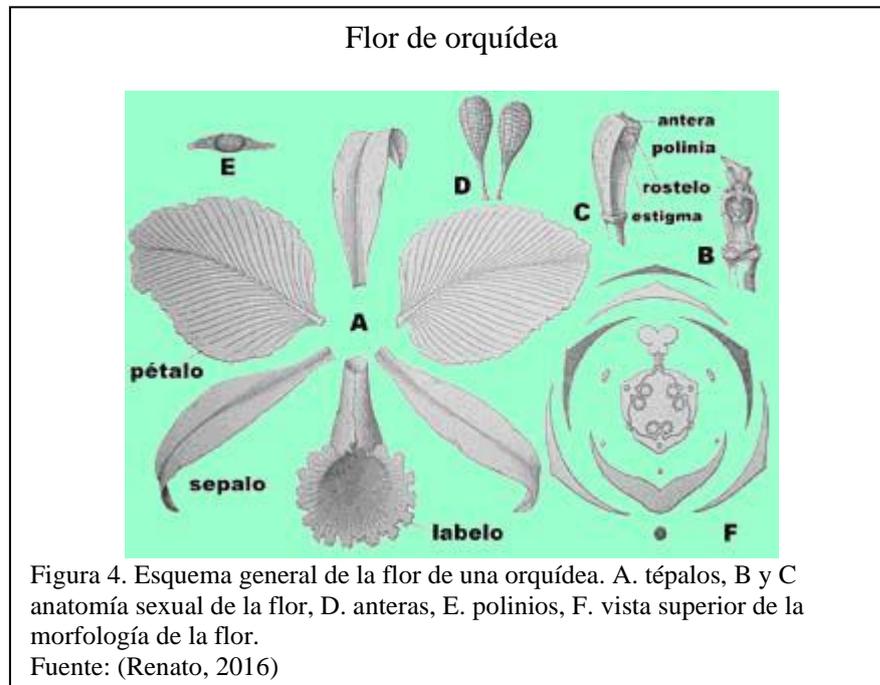
La mayoría de las orquídeas presentan hojas con venación paralela y algunas pueden presentar venación reticulada, sus bordes siempre son enteros, se puede observar por lo general tres tipos de hojas (Barragán et al., 2018). Hojas plegadas, con venación paralela y una vena central engrosada; hojas conduplicadas, tienen todas las venas del mismo tamaño o con una vena central principal, estas hojas son gruesas o coriáceas (consistencia parecida al cuero); hojas cilíndrica o terete, son hojas alargadas y cilíndricas (Tejeda, Téllez, y Trejo, 2017).



1.1.1.4 La flor

Es una de las estructuras más vistosas de las orquídeas y en ella radica su valor ornamental, este valor se sustenta muchas veces en sus variadas formas, colores, tamaños y fragancias (Álvarez et al., 2015). Todas las flores de las orquídeas se caracterizan por presentar cuatro estructuras muy notorias: 1) sépalos, 2) pétalos, 3)

columna y 4) antera y cavidad estigmática; pueden ser unifloras (una sola flor) o multifloras (muchas flores), pero, en general, todas poseen las mismas estructuras con variantes morfológicas y de color (Ruíz et al., 2016; Tejeda et al., 2017).



1.1.1.5 El fruto

Los frutos en las orquídeas son cápsulas, donde se encuentran contenidas las semillas, las cuales son muy pequeñas y se pueden encontrar hasta miles por cápsula, dependiendo del género (Holzer, 2016).

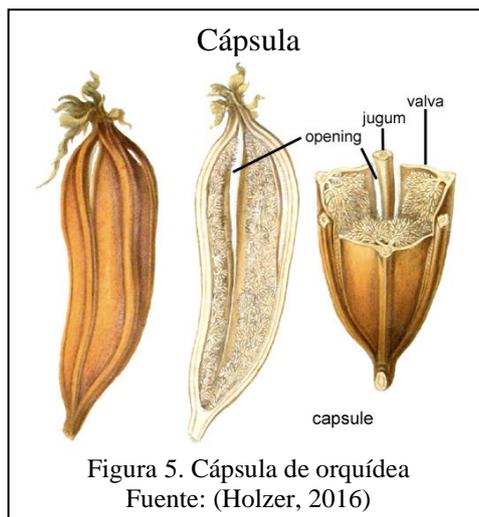


Figura 5. Cápsula de orquídea
Fuente: (Holzer, 2016)

1.1.2 Género *Huntleya*

Este género fue nombrado en honor al Reverendo J.T. Huntley, orquideólogo inglés; pertenece a la alianza *Chodrorhyncha*, de este grupo son las que tiene las flores más llamativas, al contrario de otros géneros, este se presenta implantado en un escapo erecto y fuerte (Muñera et al., 1993).

Las flores son carnosas de textura cerosa brillante, excepto el labelo el cual es opaco, tiene forma de estrella aplanada simétrica, presenta ocasionalmente verrugas que cubren la superficie de pétalos y sépalos, la columna apicalmente esta provista de aletas prominentes, el labelo se presenta dividido en un hipoquilo crestado erecto, con apéndices alargados unidos a la base pero separados en el ápice, que rozan la columna en su cara inferior, el epiquilo es arqueado con el ápice agudo, tiene cuatro polinios subiguales (Harding, 2008; Muñera et al., 1993).

En Ecuador existen siete especies del género *Huntleya* a una altura de 200 a 1000 msnm; su hábitat es epífita, sus hojas son grandes nervadas y dispuestas en abanico, presentan flores solitarias con apariencia de estrella, el labio no rodea la columna, está paralelo a ella, tiene un callo imbricado y no presenta pseudobulbo (Álvarez et al., 2015). En Ecuador se encuentran las especies *Huntleya Burtii* (Neill & Ulloa, 2011),

H. citrina, *H. fasciata*, *H. gustavi*, *H. lucida*, *H. meleagris*. y *H. wallisii*, las cuales están distribuidas en diversas provincias: Esmeraldas, El Oro, Pichincha, Cañar, Carchi, Chimborazo, Pastaza, Morona Santiago, Napo y Zamora Chinchipe (Sahuquillo, 2008).



1.2 Análisis químico

1.2.1 Extractos fluidos

Son extractos de plantas que generalmente contienen alcohol del 1 al 10 %, que se preparan por maceración, percolación y posterior evaporación (Charco, 2017). Como solventes se utilizan alcohol, agua y glicerina, o una combinación de ellos, la ventaja de esta técnica frente a otras es que los extractos contienen una mayor concentración de principios, no precipitan y no suelen necesitar preservantes ya que contienen una pequeña cantidad de alcohol (Ferraro, Martino, Bandoni, & Nadinic, 2016). Están

preparados de forma que una parte del extracto fluido corresponde a una o máximo dos partes de droga cruda (González, 2016).

1.2.2 Percolación

La palabra percolación se deriva etimológicamente de “per” (a través de) y de “colar” (hacer gota a gota), este proceso se realiza en aparatos de cuerpo cilíndrico o cónico que pueden ser de vidrio o aluminio, provistos de un grifo en la parte inferior para regular el flujo del solvente, que en este caso es alcohol o una mezcla hidroalcohólica para extraer componentes químicos de la planta pulverizada (Sharapin, 2000). La principal característica de este proceso es que el material debe estar debidamente compactado de modo que el disolvente fluya con cierta lentitud dando tiempo al mismo a tomar contacto con los tejidos y extraer los componentes deseados (González, 2016).

1.2.3 Metabolitos secundarios

Se trata de compuestos orgánicos que no tienen función directa en procesos como la fotosíntesis, respiración, síntesis proteica o asimilación de nutrientes; estos compuestos se encuentran con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas (Taiz & Zeiger, 2006).

Estas sustancias aportan una ventaja para responder a estímulos del entorno, ya sea como mecanismo de defensa contra predadores o como materia de almacenamiento, también se pueden sintetizar en respuesta al daño en algún tejido de la planta (Verde, González, y Rivas, 2016).

Las familias de metabolitos secundarios incluyen principalmente a Terpenoides, Cumarinas, Compuestos fenólicos, Flavonoides, Esteroles, Lignanós, Quinonas, Glicósidos cianogénicos, Iridoides, Glicósidos cardiotónicos, Alcaloides y Saponinas (Flor y Parra, 2017, Verde et al., 2016).

1.2.4 Fenoles

Su nombre se deriva de “feno”, una antigua forma de designar al benceno, se trata de compuestos que contienen uno o varios grupos OH unidos directamente al núcleo aromático (Beyer & Walter, 1987).

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de 10000 compuestos, tienen funciones diversas en las plantas como la defensa contra herbívoros o patógenos, soporte mecánico, atracción de polinizadores y dispersantes de frutos (Taiz & Zeiger, 2006).

Especies de orquídeas como *Dendrobium hainanense* (Hu, Fan, Dong, Miao, & Zhou, 2012), *Satyrium nepalense* (Mishra et al., 2018), *Tropidia curculioides* (Mishra et al., 2018), y *Bletilla striata* (Qian et al., 2015), poseen fenoles que les otorgan actividad antibacteriana.

1.2.5 Flavonoides

Se trata de un grupo de compuestos químicos que presentan al menos tres hidroxilos fenólicos, combinados generalmente con azúcares en forma de glicósidos o también como agliconas libres, son importantes para el normal desarrollo de las plantas y para su defensa frente a microorganismos, constituyen el principio activo de muchos medicamentos empleados en medicina tradicional (Tomás, Ferreres, Ortiz, y Fernández, 1994).

En especies de orquídeas como *Satyrium nepalense* (A. Mishra et al., 2018), *Brasolia cattleya*, *Elleanthus oliganthus* y *Sobralia powellii* se han encontrado flavonoides (Rykaczewski et al., 2019).

1.2.6 Cuantificación de metabolitos secundarios- Espectrofotometría de UV Visible

Esta técnica está basada en la absorción de radiación electromagnética por parte de los analitos en la zona ultravioleta y visible del espectro (Kuo, Chao, Chen, Shih, & Chang, 2019). Cuando la radiación de dicha zona del espectro incide en un compuesto, al tener la energía adecuada será absorbida por el compuesto y en efecto se producirá la promoción de un electrón a un nivel de energía superior, en otras palabras, la molécula pasa a un estado excitado de mayor energía (Gallego, Garcinuño, y Morcillo, 2013).

1.3 Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana es la habilidad específica o capacidad de un organismo de inhibir un microorganismo, bacteria Gram negativa o Gram positiva que puede ser determinada por medio de un método de análisis microbiológico (Robustelli et al., 2018).

1.3.1 Método para evaluar la actividad antimicrobiana- Difusión en agar

También denominado método de difusión en disco o Kirby-Bauer, es una prueba de susceptibilidad antimicrobiana en la cual se realiza la inoculación y siembra sobre la superficie de los agares *Mueller Hinton* (bacterias) y *Saboreaud-Dextrosa* (levadura), se lo realiza impregnando extractos, estándares y blancos en discos de papel filtro estériles, estos se colocan sobre la placa de agar inoculada previamente, siendo llevados a incubación a 37 °C y 24 horas para bacterias y 25 °C por siete días para hongos (González, 2016). Al determinar la capacidad antimicrobiana es recomendable medir los halos de inhibición, que guardan relación con el poder antimicrobiano de la sustancia evaluada (Sánchez, Castillo, y García, 2016).

1.3.2 Bacterias nocivas

Responsables de una amplia gama de infecciones y cada vez más resistentes a los fármacos antibacterianos comunes, están siendo una de las grandes preocupaciones a nivel mundial ya que la automedicación, el uso excesivo y sin control de medicamentos ha llevado a muchas de ellas a generar mutaciones, obligando a investigadores a buscar nuevos medicamentos para combatirlas, pueden encontrarse Gram positivas y Gram negativas en este grupo (Rykaczewski et al., 2019).

1.3.3 *Enterobacter cloacae*

Se trata de un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo que puede encontrarse en suelo, agua, microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano (Silva y Martínez, 2018). Se ha descrito resistencia a antibacterianos como cloranfenicol, aminoglucósidos, cotrimoxazol, aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación, lo cual lo convierte en un microorganismo alarmante (Silva y Martínez, 2018). Por otro lado, *E. cloacae* contribuye a la bacteriemia, artritis, endocarditis, osteomielitis, infecciones de la piel, tracto respiratorio, urinario e intraabdominal (Chico, 2018).

1.3.4 *Enterobacter aerogenes*

Es una bacteria Gram negativa que forma parte del grupo de Coliformes Totales, como indicadores de contaminación de aguas, que puede colonizar tuberías de agua y tanques de almacenamiento (Changanaquí, Alvarado, y Alarcón, 2019). Puede encontrarse en infecciones de pacientes hospitalizados (Domínguez et al., 2008). Se ha vuelto resistente a antibacterianos como cotrimoxazol (Silva y Martínez, 2018). Entre las infecciones más frecuentes ocasionadas por esta bacteria están las urinarias, respiratorias, herida quirúrgica, endocarditis y osteomielitis (Domínguez et al., 2008).

1.3.5 *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria comensal Gram positiva y patógeno humano, aproximadamente el 30 % de la población mundial está colonizada por *S. aureus*, es causante de bacteriemia y endocarditis infecciosa, así como infecciones osteoarticulares, de piel y tejidos blandos (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015).

1.3.6 *Escherichia coli*

Se trata de un bacilo Gram negativo aerobio y aerobio facultativo, mayormente encontrado en la materia fecal humana y de varias especies animales, estas se hospedan el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora intestinal y en calidad de saprobio no causa daño, las infecciones causadas por cepas patógenas están limitadas a mucosas, siendo los más comunes la infección de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica (Romero, 2007).

1.4 Actividad Antioxidante

1.4.1 Estrés oxidativo

Un radical libre desde un punto de vista químico, es cualquier especie (átomo, molécula o ion) que contenga al menos un electrón desapareado en su orbital más externo (Han et al., 2016), capaz de existir en forma independiente lo que le confiere una aumentada habilidad para reaccionar con otros átomos y/o moléculas presentes en su entorno, normalmente, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, la interacción entre radicales libres y estos dan lugar a alteraciones en las propiedades estructurales, y eventualmente funcionales de estos (Cai, Zhao, & Zhu, 2015). Uno de los radicales libres más comunes es la especie reactiva del oxígeno (ERO), como los radicales superóxidos, hidroxilo y peroxilo, que son generados por las vías metabólicas celulares, estas entidades químicas son consideradas como la causa de varias enfermedades; el desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad del sistema

de defensa antioxidante da como resultado el estrés oxidativo (Narkhede et al., 2016; Hoi et al., 2016).

Los efectos biológicos de las EROs son controlados en los seres vivos por mecanismos fisiológicos de defensa antioxidante, que involucran a un grupo de procesos encaminados a evitar el exceso de oxidación celular, que en definitiva, el que causa los trastornos, con el paso del tiempo este proceso se podría volver crónico y producir deterioro en tejidos, órganos y organismo completo, con lo que se presenta la enfermedad (Cai, Zhao, & Tao, 2015; Chiang & Lin, 2018).

El estrés oxidativo es un problema importante de salud, una manera de evitarlo o tratarlo es con la presencia de antioxidantes, donde, un antioxidante es una sustancia que puede retrasar o inhibir la oxidación de un sustrato cuando está presente (Echeverría et al., 2016).

1.4.2 Metodología DPPH (2,2-difenil-1picrilhidracilo)

(2,2-difenil-1picrilhidracilo) es un radical nitrogenado orgánico y estable, de un intenso color púrpura, que no necesita generación previa, sirve para determinar la capacidad antioxidante con base en la disminución de color al contacto con un compuesto con actividad antioxidante (Narkhede et al., 2016). El método DPPH desarrollado por Brand-Williams, se fundamenta en que este radical posee un electrón sin aparear y que al añadirle una sustancia antioxidante en diferentes concentraciones va a decolorarse hasta un tono amarillo pálido, entre mayor es la degradación del color mayor es su actividad antioxidante; esto se evalúa en un espectrofotómetro a 517 nm; el porcentaje de captación de radicales libres se lo obtiene de la diferencia de las absorbancias (Barragán et al., 2018).

1.4.3 Metodología ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

Esta metodología busca evaluar la capacidad antioxidante mediante la neutralización del radical ABTS, reaccionando con persulfato de potasio, de manera que, un extracto hidrofílico o lipofílico pueda ser evaluado su capacidad antioxidante (Guerrero y Pozo, 2016). ABTS cuenta con la ventaja de que su espectro presenta absorbancias a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, & Fett, 2005).

1.5 Toxicidad

Es de gran importancia conocer el potencial tóxico de una sustancia que esté generando un efecto adverso, para poder evaluar el peligro que representa para un organismo expuesto al mismo, el efecto tóxico es producido por uno o varios agentes sobre un organismo, población o comunidad que se manifiesta por cambios biológicos (Nieto y Viteri, 2015). Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración del agente tóxico, (Tapia y Armas, 2014).

1.5.1 Estudio de toxicidad

Son bioensayos empleados para evaluar los efectos de los contaminantes sobre organismos vivos, se puede utilizar tejido vivo, organismos o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa (Cruz y Gutiérrez, 2015).

Estos ensayos, consisten en la exposición a determinadas concentraciones del tóxico por un tiempo determinado, los organismos deben estar en buenas condiciones de salud, condiciones ambientales constantes, además, se dispone de grupos de control

(que no se exponen al tóxico), terminado el ensayo se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos tanto enfrentados con la sustancia a evaluar y control, se debe efectuar un análisis estadístico de los datos obtenidos (Castillo et al., 2004; Gamez y Ramirez, 2008).

Los efectos tóxicos a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento, alteración del comportamiento, etc.; se determinan distintas variables como, por ejemplo, la dosis letal 50 (DL 50), que es la concentración letal para el 50 % de los individuos expuestos, las condiciones de los cultivos y los ensayos deben estar altamente estandarizadas para permitir la comparación de los resultados (Hernández et al., 2017).

Los organismos empleados para los ensayos deben tener alta sensibilidad a los tóxicos, hay que tener en cuenta que distintas especies tienen diferente sensibilidad a distintas sustancias químicas, más de 150 especies desde bacterias hasta mamíferos se han usado como organismos para test, pero sólo unas 40 han tenido cierta aprobación oficial, conociéndolos como organismos modelos (Parada, Gualteros, y Sánchez, 2017).

1.5.2 Artemia salina

El crustáceo diminuto *A. salina* se ha utilizado para la preevaluación de extractos vegetales con compuestos antitumorales y así determinar una correlación positiva entre la mortalidad de larvas y citotoxicidad; debido a su disponibilidad, bajo costo y fácil almacenamiento, han sido usados en varios ensayos en varias partes del mundo (Leos, Rivas, y García, 2016).

Capítulo 2

Marco Metodológico

2.1 Colección y almacenaje de muestras

Las plantas fueron adquiridas en la empresa Mundiflora (Ver Anexo 1 y 2) ubicada en la ciudad de Cuenca, provincia de Azuay, el material vegetal para la preparación de extractos fue hojas frescas y libres de enfermedades según recomendaciones de Ruiz (2017).

Esta investigación se la realizó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida durante los meses de mayo de 2019 hasta diciembre de 2019, en la Universidad Politécnica Salesiana, Campus El Girón.

2.2 Obtención de extractos hidroalcohólicos mediante percolación

Se utilizó la técnica de percolación descrita por Sharapin (2000), para lo cual se limpiaron las hojas con una solución de etanol 70 °, se dejaron secar al ambiente por aproximadamente dos horas, se trituraron las hojas frescas a un tamaño aproximado de 0,5 cm², se pesó cada una de las hojas trituradas de las plantas y se colocaron en el percolador; se adicionó el solvente comprendido en una mezcla de 1:1 (etanol 96 ° y agua) hasta cubrir completamente el material vegetal, se realizó el recirculamiento del solvente manteniendo una temperatura constante superior a los 20 °C y sin exceder los 50 °C, en un tiempo de 5 horas (Guerra, 2005).

Percolación



Figura 7. Obtención de extracto fluido mediante percolación.
Fuente: Los Autores, 2020

Luego del tiempo mencionado, se recolectó el total de extracto, se tamizó con papel filtro para eliminar los residuos de hojas y se almacenó en la oscuridad en condiciones ambientales para evitar la degradación de las moléculas presentes en los extractos (Chaglla, 2015). El extracto obtenido se llevó a un proceso de concentración en un rotavapor *IKA (RV-10 Basic)* a presión reducida, 50 rpm y 40 °C hasta obtener una concentración igual al de material vegetal utilizado, es decir, una relación 1:1 de gramos de material vegetal utilizado y mililitros de extracto concentrado (Flor y Parra, 2017).

2.3 Cuantificación de metabolitos secundarios

La cuantificación de los metabolitos se realizó en espectrofotómetro *JASCO V-730* mediante el software *Spectra Manager™*, siguiendo la metodología de Aldana y Guayasamín (2014).

2.3.1 Cuantificación de fenoles totales

2.3.1.1 Preparación de la curva de calibración

Inicialmente se preparó una solución madre de ácido gálico, para lo cual se pesó 20 mg de ácido gálico y se aforó con etanol 96 ° hasta alcanzar un volumen de 10 mL, se prepararon cinco concentraciones de 100, 250, 500, 1000 y 2000 ppm partiendo de la solución madre disuelta en agua destilada, a las cuales se las denominó solución A, B, C, D y E respectivamente (Aldana y Guayasamín, 2014). En viales ámbar se prepararon cada una de las muestras conteniendo ácido gálico, agua destilada y reactivo de Folin Ciocalteu marca *Scharlau*, tal y como se muestra a continuación en la tabla 1:

Tabla 1.

Preparación de muestras para la curva de ácido gálico

Frasco	mL solución	mL agua destilada	mL reactivo Folin
1	-	4	0,2500
2	0,0500 solución A	3,9500	0,2500
3	0,0500 solución B	3,9500	0,2500
4	0,0500 solución C	3,9500	0,2500
5	0,0500 solución D	3,9500	0,2500
6	0,0500 solución E	3,9500	0,2500

Elaborado por: Los autores, 2020

Se esperó dos minutos para agregar 0,7500 mL de Na_2CO_3 al 20 % en cada uno de los viales, y se mantuvo en oscuridad por 2 horas; transcurrido el tiempo se leyó en espectrofotómetro a 765 nm (Ojeda y Gómez, 2016), cada muestra se trabajó por cuadruplicado.

2.3.1.2 Preparación de soluciones de extractos a analizar en espectrofotómetro

Para evaluar las muestras en los viales se procedió como se observa en la tabla 2:

Tabla 2.

Preparación de muestras de extractos para determinar fenoles totales

Frasco (extracto)	mL extracto	mL agua destilada	mL reactivo Folin
Blanco	-	4	0,2500
1	0,0500	3,9500	0,2500
2	0,0500	3,9500	0,2500
3	0,0500	3,9500	0,2500
4	0,0500	3,9500	0,2500

Elaborado por: Los autores, 2020

Se esperó 2 minutos para agregar 0,7500 mL de Na_2CO_3 al 20 % en cada uno de los viales, y se mantuvo en oscuridad por 2 horas; transcurrido el tiempo se leyó en espectrofotómetro a 765 nm; cada muestra se trabajó por cuadruplicado (Ojeda y Gómez, 2016).



Para calcular la cantidad de fenoles totales por cada gramo de droga, se utilizó los datos de la ecuación generada por regresión lineal de la curva de calibración.

2.3.2 Cuantificación de flavonoides totales

2.3.2.1 Preparación de la curva de calibración

Inicialmente se preparó una solución madre de quercetina, para lo cual se pesó 5 mg de quercetina y se aforó con etanol 96 ° hasta alcanzar un volumen de 5 mL; se prepararon cuatro soluciones de quercetina, donde se colocó 50, 100, 250 y 350 µL de la solución madre en 450, 400, 250 y 150 µL de etanol, respectivamente, denominándose solución A, B, C y D (Rojas, Jaramillo, y Lemus, 2015). En viales ámbar se prepararon cada una de las muestras conteniendo las soluciones, agua destilada, etanol 96 °, acetato de potasio y AlCl₃ al 10 %, tal y como se muestra a continuación en la tabla 3:

Tabla 3.

Preparación de muestras para la curva de quercetina

Frasco	mL solución	mL agua destilada	mL etanol 96 °	mL acetato de potasio	mL AlCl ₃ al 10 %
1	-	2,8000	2	0,1000	0,1000
2	0,0500 solución A	2,8000	1,5000	0,1000	0,1000
3	0,0500 solución B	2,8000	1,5000	0,1000	0,1000
4	0,0500 solución C	2,8000	1,5000	0,1000	0,1000
5	0,0500 solución D	2,8000	1,5000	0,1000	0,1000

Elaborado por: Los autores, 2020

Se esperó 30 minutos para leer en espectrofotómetro a 415 nm, cada muestra se trabajó por cuadruplicado (Ricco et al., 2011).

2.3.2.2 Preparación de soluciones de extractos a analizar en espectrofotómetro

Para las muestras a evaluar en los viales se procedió como se muestra en la tabla 4 a continuación:

Tabla 4.

Preparación de muestras de extractos para determinar flavonoides totales

Frasco (extracto)	mL extracto	mL agua destilada	mL etanol 96 °	mL acetato de potasio	mL AlCl₃ al 10 %
Blanco	-	2,8000	2	0,1000	0,1000
1	0,0500	2,8000	1,5000	0,1000	0,1000
2	0,0500	2,8000	1,5000	0,1000	0,1000
3	0,0500	2,8000	1,5000	0,1000	0,1000
4	0,0500	2,8000	1,5000	0,1000	0,1000

Elaborado por: Los autores, 2020

Se esperó 30 minutos para leer en espectrofotómetro a 415 nm, cada muestra se trabajó por cuadruplicado.

Para calcular la cantidad de flavonoides totales por cada gramo de droga, se utilizó los datos de la ecuación generada por regresión lineal de la curva de calibración (Chaglla, 2015).

2.4 Actividad antimicrobiana

2.4.1 Obtención de bacterias

Las cepas de *Enterobacter cloacae* ATCC 19606, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Escherichia coli* ATCC 25922 activadas fueron proporcionadas por la facultad de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

2.4.2 Ensayos comparativos preliminares de actividad antimicrobiana

Para evaluar cada extracto se empleó el método de difusión en agar Kirby-Bauer utilizado por Ibarra y Paredes (2013).

2.4.2.1 Inóculo bacteriano

De la caja Petri de bacteria se tomaron de dos a tres colonias y se inocularon en un tubo de ensayo con caldo TSB estéril, se incubó a 37 °C por 24 horas; transcurrido el tiempo cada tubo se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos, en cámara de flujo se desechó el sobrenadante, conservando en el fondo la biomasa de bacterias; a cada tubo se añadió 4 mL de suero fisiológico estéril y se agitó en vórtex por 3 minutos, se agregó poco a poco suero fisiológico hasta llegar visualmente a escala 0,5 McFarland (González, 2016); se corroboró la turbidez ideal leyendo en espectrofotómetro *JASCO V-730* mediante el software *Spectra Manager™* hasta alcanzar una absorbancia de 0,2000 a 655 nm, obteniendo así un inóculo de 10^6 UFC/mL (Ibarra y Paredes, 2013).



2.4.2.2 Inoculación en placa

Una vez ajustada la turbidez, se remojó un hisopo estéril en el inóculo, escurriendo el exceso en las paredes internas del tubo y se sembró en caja Petri con agar *Mueller Hinton* hasta saturar por completo toda la superficie del agar, haciendo giros de aproximadamente 60 °, se dejó secar por 5 minutos, se colocaron discos en blanco

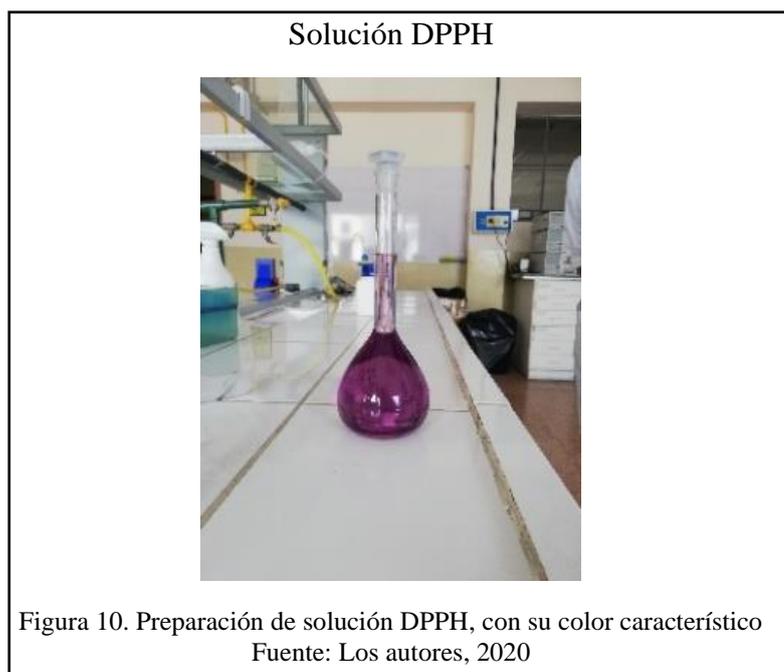
estériles marca *Oxoid Ltda*, sobre los cuales se añadió 10 μ L de cada extracto y como control positivo se utilizó discos de gentamicina (10 μ g) marca *Oxoid Ltda*, las cajas Petri se llevaron a incubación a 37 °C por 24 horas, cada muestra se trabajó por triplicado (Abhay Mishra et al., 2018; Rykaczewski et al., 2019).

2.5 Evaluación de la actividad antioxidante

2.5.1 Actividad antioxidante con DPPH

2.5.1.1 Preparación de la solución DPPH

Se pesó 10 mg de reactivo DPPH y se aforó con etanol 96 ° a un volumen de 250 mL; se llevó a oscuridad y refrigeración toda la noche (Narkhede, Mahajan, Singh, Harsulkar, & Jagtap, 2016).



2.5.1.2 Preparación del estándar de ácido ascórbico

Se pesó 5 mg de ácido ascórbico y se aforó con etanol 96 ° a un volumen de 50 mL; luego se llevó a refrigeración hasta el momento de su uso (Biswas et al., 2016).

2.5.1.3 Preparación de soluciones a analizar en espectrofotómetro

Cada una de las muestras se prepararon en viales ámbar conteniendo el extracto, etanol y la solución DPPH, lo mismo se realizó con el ácido ascórbico, como se muestra en la tabla 5:

Tabla 5.

Preparación de muestras para actividad antioxidante con DPPH

Frasco	μL extracto o ácido ascórbico	μL etanol 96 °	mL DPPH
1	0	100	2,9000
2	5	95	2,9000
3	10	90	2,9000
4	20	80	2,9000
5	50	50	2,9000
6	80	20	2,9000

Elaborado por: Los autores, 2020

Los viales se sometieron a agitación por 30 min, se leyó la absorbancia en espectrofotómetro *JASCO V-730* mediante el software *Spectra ManagerTM* a 517 nm (Rojas et al., 2015). Tanto muestras de extractos como de ácido ascórbico se trabajaron por cuadruplicado.

2.5.1.4 % inhibición DPPH

El porcentaje de inhibición del DPPH se calculó mediante la fórmula empleada por Veloz (2018):

$$\% \text{ inhibición DPPH} = \frac{A_b - A_a}{A_b} * 100$$

Dónde:

Ab: absorbancia del blanco o frasco 1.

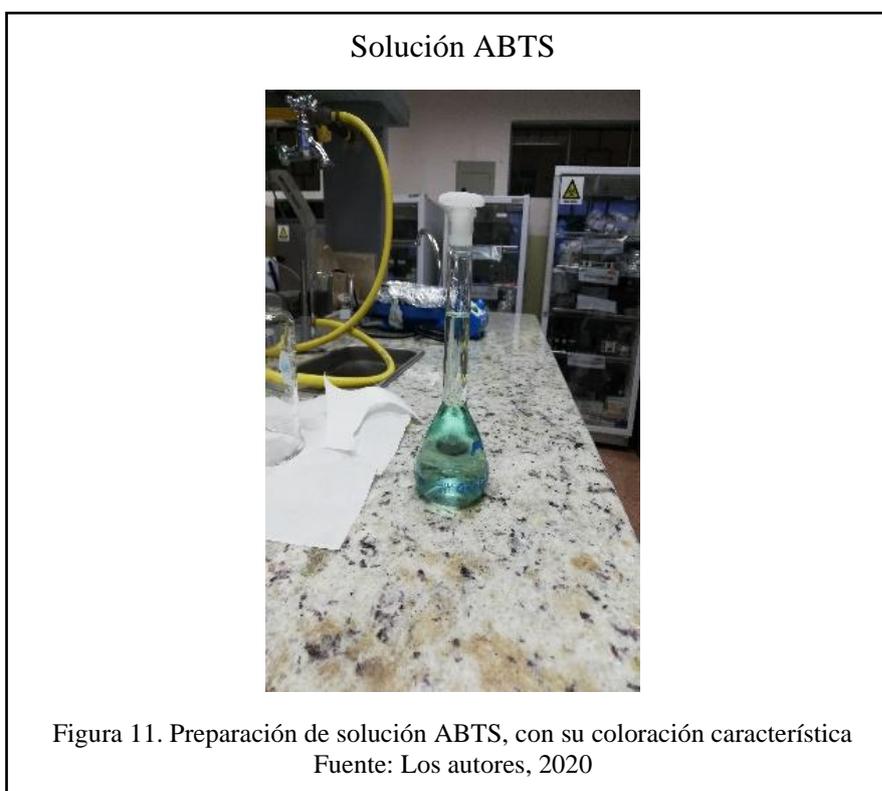
Aa: absorbancia de cada vial con el extracto.

De esta manera se puede obtener un gráfico de Concentración vs % inhibición, para poder expresar la actividad antioxidante por medio de IC_{50} , es decir, concentración en la cual se inhibe el 50 % de la capacidad captadora de radicales libres (Cerna et al., 2018).

2.5.2 Actividad antioxidante con ABTS

2.5.2.1 Preparación de solución madre de ABTS

Se pesó 27,5000 mg de ABTS y se aforó con agua destilada a un volumen de 25 mL (Robustelli et al., 2018).



2.5.2.2 Preparación de soluciones

Solución de $K_2S_2O_8$

Se pesó 188,2000 mg de $K_2S_2O_8$ y se aforó con agua bidestilada a un volumen de 10 mL (Aldana y Guayasamín, 2014).

Preparación de ABTS radicalizado

A la solución de ABTS se añadió 250 µL de la solución K₂S₂O₈, se agitó hasta homogenizar completamente y se llevó a oscuridad toda la noche hasta su utilización (Biswas et al., 2016).

2.5.2.3 Preparación del estándar de ácido ascórbico

Se pesó 5 mg de ácido ascórbico y se aforó con etanol 96 ° a un volumen de 50 mL; se llevó a refrigeración hasta el momento de su uso (Charco, 2017).

2.5.2.4 Preparación de soluciones a analizar en espectrofotómetro

Cada una de las muestras se prepararon en viales ámbar conteniendo el extracto y etanol, y lo mismo se realizó con el ácido ascórbico, tabla 6:

Tabla 6.

Preparación de muestras para actividad antioxidante con ABTS

Frasco	µL de extracto o ácido ascórbico	µL etanol 96 °
1	0	300
2	5	295
3	10	290
4	20	280
5	50	250
6	80	220

Elaborado por: Los autores, 2020

Previo a las lecturas espectrofotométricas, se añadieron 2 mL de ABTS radicalizado en 25 mL de etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0,7000 a 734 nm; se tomó 2,7000 mL de dicha solución, se añadió a cada vial previamente preparado, se agitó y se leyó a 734 nm (Aldana y Guayasamín, 2014). Tanto las muestras de los extractos como de ácido ascórbico se trabajaron por cuadruplicado.

2.5.2.5 % inhibición ABTS

El porcentaje de inhibición de ABTS se calculó mediante la fórmula empleada por Veloz (2018):

$$\% \text{ inhibición ABTS} = \frac{Ab-Aa}{Ab} * 100$$

Dónde:

Ab: absorbancia del blanco o frasco 1.

Aa: absorbancia de cada vial con el extracto

De esta manera se puede obtener un gráfico de Concentración vs % inhibición, para poder expresar la actividad antioxidante por medio de IC₅₀, es decir, concentración en la cual se inhibe el 50 % de la capacidad captadora de radicales libres (Veloz, 2018).

2.5.3 Análisis estadístico de la actividad antioxidante

Tanto para el método de DPPH como ABTS se realizó un análisis de varianza o ANOVA con método de comparación Tukey a un nivel de significancia de 0,05 en el programa *InfoStat*; se consideraron las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula: No existe diferencia estadística en el valor IC₅₀ entre extractos.

Hipótesis alternativa: Existe diferencia estadística en el valor IC₅₀ entre extractos.

2.6 Toxicidad

2.6.1 Artemia salina

Se utilizaron huevos de *Artemia salina* de la marca *Mackay Marine*®.

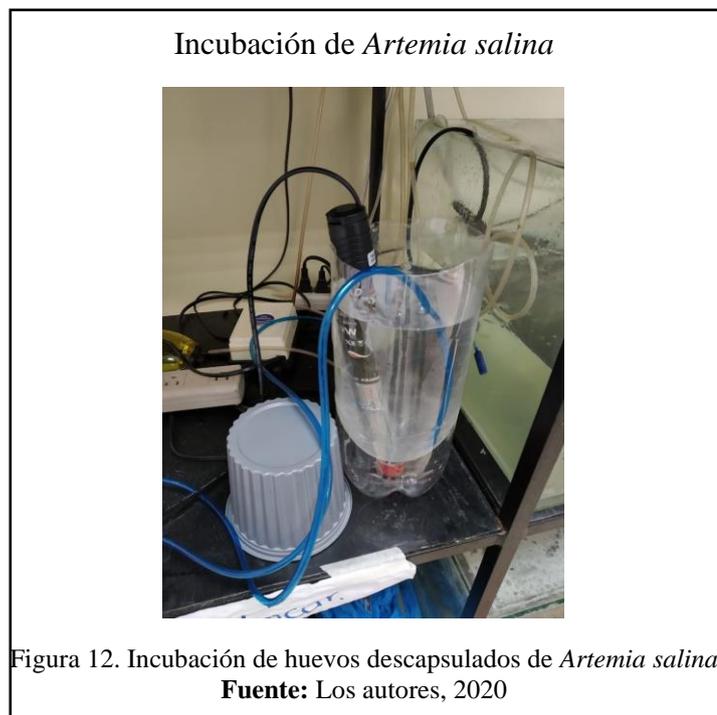
2.6.2 Descapsulación

Inicialmente se pesaron 2 g de huevos, en un matraz se hidrataron por 30 minutos en 1 L de agua; transcurrido este tiempo se agregaron 50 mL de hipoclorito de sodio al 5 % y mediante un aireador de pecera se homogenizó por 3 minutos; dicho paso se repitió cuatro veces más, hasta llegar a utilizar 250 mL de hipoclorito de sodio al 5 %, se filtró la solución para recuperar los huevos y se enjuagaron cinco veces con agua destilada sin cloro (Cruz y Gutiérrez, 2015). A continuación, se prepararon 300 mL de solución

salina al 2 %, en la cual se colocaron los huevos sin capsulas de recubrimiento, se conservaron en refrigeración a 2 °C (Nieto y Viteri, 2015).

2.6.3 Incubación de huevos

Para el proceso de incubación de los huevos se utilizó como guía la metodología empleada por Armas (2012), se cortó a la mitad una botella plástica de 3 L, utilizándose el pedazo que contiene la tapa como contenedor para el proceso de incubación; en el mismo se agregó 1500 mL de agua salina al 2 % con pH desde 8 hasta 8,5000; a dicha agua con la ayuda de una pipeta plástica de 3 mL se añadieron un total 25 mL de la solución salina con huevos sin capsula de recubrimiento preparada previamente, al contenedor se le agregó un burbujeador *JAD SC-7500* para mantener la oxigenación y se controló la temperatura a 24 °C mediante un calentador, el tiempo de incubación fue de 48 horas.



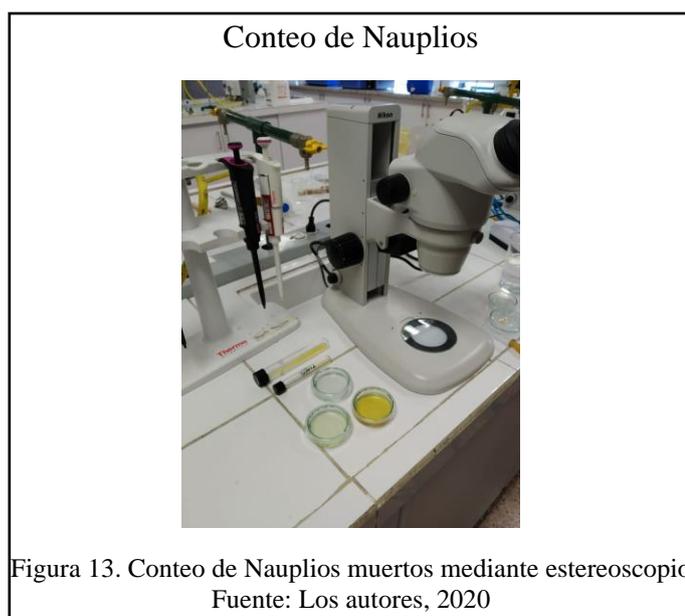
2.6.4 Ensayo de toxicidad

Se utilizó como guía la metodología empleada por Sánchez y otros (2016), una vez eclosionados los huevos, con la ayuda de una pipeta Pasteur se colocaron 10 Nauplios en una caja Petri pequeña con 5 mL de agua salina al 2 % y pH 8, se depositó 5, 10, 25, 50 y 100 μL ($\mu\text{g}/\text{mL}$ o ppm) de cada extracto, respectivamente, en cada caja. Para cada extracto se probaron cinco concentraciones, las cuales fueron realizadas por triplicado, posteriormente las cajas se llevaron a incubación en cámara de clima constante *BINDER KBF 240* a 24 °C y luz constante durante 24 horas (Sánchez y Neira, 2005).

Como control positivo se utilizó etanol 96 ° a las mismas concentraciones que los extractos, y como control negativo agua salina (Cruz y Gutiérrez, 2015).

2.6.5 Conteo de Nauplios muertos

Transcurridas 24 horas de incubación, se contabilizan los Nauplios muertos con la ayuda de un estereoscopio *NIKON SMZ745*, considerándose muertos aquellos que en un lapso de 20 segundos no presenten movimiento (Lozano y otros, 2017).



2.6.6 Concentración letal 50 (CL50) y grado de toxicidad

La CL50 se calculó mediante análisis estadístico PROBIT en el programa Excel 2016 referido por Sánchez y otros (2016); para expresar el grado de toxicidad se utilizó la escala descrita por Sinti y Torres (2017) la cual se resume en la tabla 7:

Tabla 7.

Grado de toxicidad en base a CL50

CL50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Grado de toxicidad
1-10	Extremadamente tóxico
10-100	Altamente tóxico
100-500	Moderadamente tóxico
500-1000	Ligeramente tóxico
1000-1500	Prácticamente no tóxico
> 1500	Relativamente inocuo

Fuente: (Sinti y Torres, 2017)

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos

Se obtuvieron cuatro extractos hidroalcohólicos en concentración 1:1, datos observados en la tabla 8:

Tabla 8.

Datos de obtención de extractos

Nombre de la muestra	Peso en g de hoja	Volumen de extracto recuperado (mL)	Volumen de extracto concentrado (mL)
<i>Huntleya burtii</i>	11,4010	35	11
<i>Huntleya gustavi</i>	4,6849	39	4
<i>Huntleya meleagris</i>	28,3710	62	28
<i>Huntleya wallisii</i>	12,2161	73	12

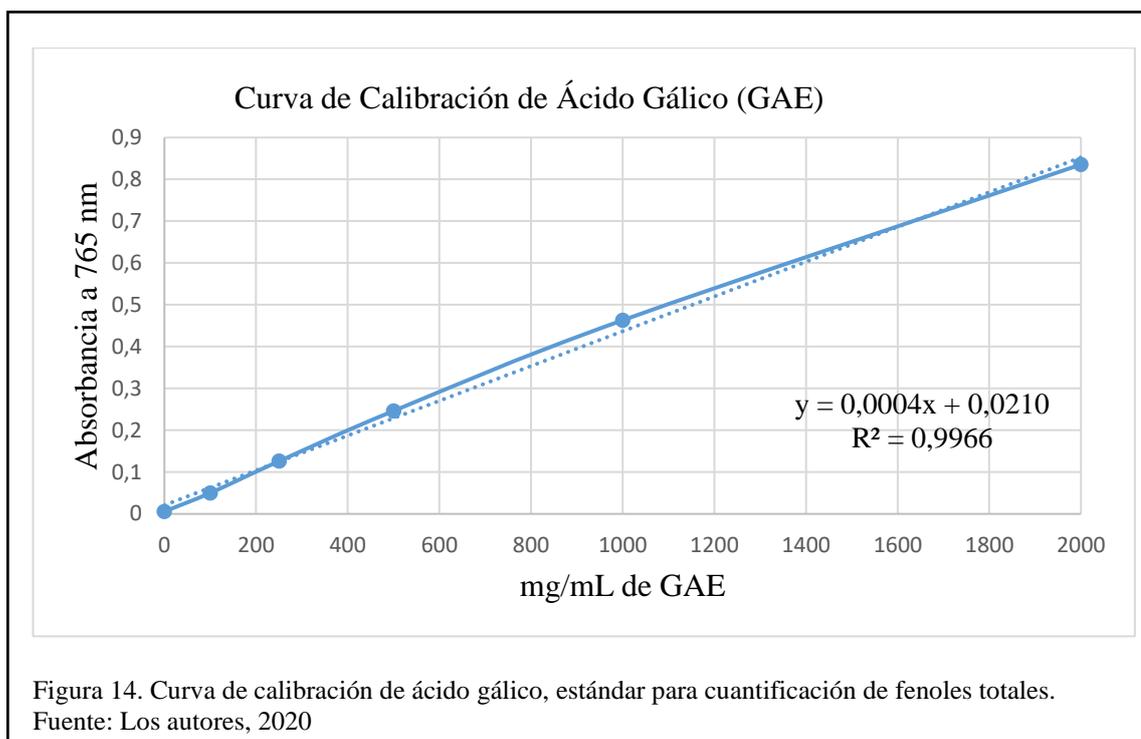
Fuente: Los autores, 2020

No se pudo realizar screening fitoquímico ya que se presentó como limitante la cantidad de extracto concentrado, como menciona Mejía (2019), para realizar el screening fitoquímico con el fin de determinar la presencia de metabolitos secundarios debemos tener 5 mL de extracto para cuantificar fenoles, flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides, conocido como screening fitoquímico básico según Dash (2016). Infante y otros (2015) recomiendan evitar la variación de temperaturas en el almacenamiento de los extractos ya que esto puede alterar su funcionalidad.

3.2 Cuantificación de metabolitos secundarios

3.2.1 Cuantificación de fenoles totales

Para el cálculo de fenoles totales por el método de *Folin-Ciocalteu*, se partió de la curva de calibración de ácido gálico, que es el principal estándar de referencia, en la figura 14 se muestra la curva y sus respectivos datos:



Se observa que la curva muestra un valor de R^2 de 0,9966 muy cercano a 1, esto quiere decir que tiene linealidad aceptable según Rojas y otros (2015), por tal motivo se puede usar la ecuación $y=0,0004x + 0,0210$, para obtener los datos de concentración de cada uno de los extractos a trabajar, estos datos son presentados en la tabla 9:

Tabla 9.

Datos de cuantificación de fenoles totales

MUESTRA	REPETICION				Absorbancia	mg GAE/mL de extracto
	1	2	3	4		
<i>H. burtii</i>	0,1480	0,1470	0,1500	0,1500	0,1489	0,3196
<i>H. gustavi</i>	0,8480	0,8480	0,8860	0,8860	0,8672	2,1154
<i>H. meleagris</i>	0,3960	0,3960	0,4400	0,4400	0,4181	0,9928
<i>H. wallisii</i>	0,5540	0,5540	0,5450	0,5450	0,5493	1,3207

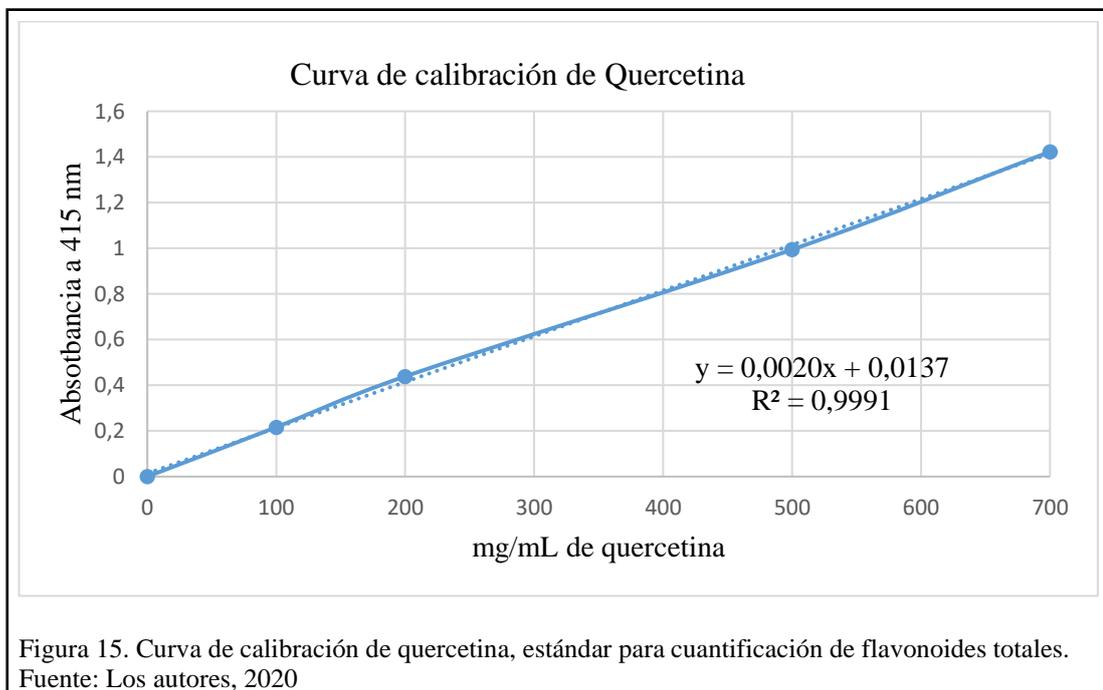
Fuente: Los autores, 2020

Los datos observados de mg/mL de extracto pueden ser llevados a gramos de droga ya que al tener un extracto fluido se conoce que 1 mL de extracto es equivalente a 1 g de droga cruda (Cerna y Rodríguez, 2013). El extracto que presentó mayor concentración de fenoles es *H. gustavi* con 2,1154 mg/mL de GAE, estos datos son bajos con

referencia a los encontrados por Bose y otros (2017), en *Malaxis acuminata*, trabajando con extractos fluidos de hojas y flores con una cuantificación de fenoles totales de $7,8200 \pm 0,2000$ mg GAE/g de droga, de la misma manera a los encontrados por Rykaczewski y otros (2019), que trabajaron con etanol como solvente para la obtención un extracto de hojas de *Sobralia powellii*, *Brasolia catleya* y *Elleanthus oliganthus* con fenoles totales de 10,2000; 5,3900 y 6,5600 mg GAE/mL de extracto respectivamente, estas plantas tienen un amplio uso en la medicina tradicional China e India, por ende la presencia de compuestos secundarios que ayudan en tratamientos médicos es elevada (Parveen, Ramesh, Mahmood, & Pallavi, 2018).

3.2.2 Cuantificación de flavonoides totales

Para el cálculo de flavonoides totales se partió de la curva de calibración de quercetina, como estándar de referencia, en la figura 15 se muestra la curva y sus respectivos datos:



Se observa que la curva muestra un valor de R^2 de 0,9991 muy cercano a 1, esto quiere decir que tiene linealidad aceptable como menciona Rojas y otros (2015), por ende, se

puede usar la ecuación $y=0,0002x + 0,0137$, para obtener los datos de concentración de cada uno de los extractos a trabajar, estos datos son presentados en la tabla 10:

Tabla 10.

Datos de cuantificación de flavonoides totales

MUESTRA	REPETICION				Absorbancia	mg quercetina/ mL de extracto
	1	2	3	4		
<i>H. burtii</i>	0,0960	0,0950	0,1080	0,1080	0,1017	0,0440
<i>H. gustavi</i>	0,1670	0,1670	0,1390	0,1380	0,1528	0,0700
<i>H. meleagris</i>	0,1430	0,1430	0,1460	0,1470	0,1449	0,0660
<i>H. wallisii</i>	0,5070	0,5060	0,5000	0,5000	0,5033	0,2450

Fuente: Los autores, 2020

El extracto que presenta mayor cantidad de flavonoides es *H. wallisii* con 0,2450 mg QE/mL de extracto, estos datos son muy parecidos a los encontrados por Narkhede y otros (2016), que trabajaron con varias especies del género *Eulophia* en la India, obteniendo como resultados más significativos en *E. andamanensis*, *E. bicallosa*, *E. promensis*, *E. zollingeri*, *E. herbacea*, *E. kamarupa*, con concentraciones de flavonoides totales de 0,0600; 0,0800; 0,3000; 0,2900; 0,0500 y 0,2200 mg QE/mL de extracto respectivamente, estos resultados son contrarios a los datos de Mishra y otros (2018), que trabajo con *Satyrium nepalense* obtenido una concentración de fenoles de 11,2000 mg QE/mL de extracto. Narkhede y otros (2016) concluyen que la presencia de pequeñas cantidades de flavonoides en plantas le confieren actividad antioxidante, que podría tener aplicaciones medicinales como es el caso de *S. nepalense*, usada ancestralmente para disminuir tumores y actualmente como suplemento alimenticio (Sarkar, Avasthi, & Ghosal, 2018).

3.3 Ensayos comparativos preliminares de actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *E. Coli* mediante el método de difusión en agar; en la tabla 11 se muestran los datos de los halos de inhibición generados, los cuales oscilaron entre 6 a 6,6700 mm, según menciona Armas (2012) dichos valores obtenidos hacen referencia a plantas que no presentan actividad antibacteriana, o las bacterias son altamente resistentes a los extractos evaluados. Cabe mencionar que en los valores se incluye los 6 mm del disco. Así mismo, desde la figura 16 a la 19 se presentan cada una de las cajas Petri en las que se realizó el ensayo.

Tabla 11.

Halos de inhibición de los extractos frente a cada bacteria (Para observar los resultados en placa ver Anexos del 3 al 6)

			Bacteria			
			<i>E. cloacae</i> ATCC 19606	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Halo de inhibición (mm)	<i>H. burtii</i>	R1	6	6	6	6
		R2	6	6	6,4000	6
		R3	6	6	6	6,9000
		Promedio	6	6	6,1300	6,3000
	<i>H. gustavi</i>	R1	6	6	7,0000	6,7000
		R2	6	6	7,0000	6,5000
		R3	6	6	6	6,2000
		Promedio	6	6	6,6700	6,4700
	<i>H. meleagris</i>	R1	6	6	7	6
		R2	6	6	6	6
		R3	6	6	6	6
		Promedio	6	6	6,3300	6
	<i>H. wallisii</i>	R1	6	6	6	6,3000
		R2	6	6	6,5000	6
		R3	6	6	6	6,3000
		Promedio	6	6	6,1700	6,2000
	Gentamicina (10 µg)	R1	17,1000	14,7000	20,2000	14,3000
		R2	14,8000	15,3000	20	14,8000
		R3	14,8000	14,8000	19,5000	14,6000
		Promedio	15,5700	14,9300	19,9000	14,5700

Fuente: Los autores, 2020

Cada uno de los extractos generó halos de inhibición frente a *S. aureus*, aunque superiores a 6 mm, se consideran insignificantes; lo mismo ocurrió frente a *E. coli*, salvo el caso de *H. meleagris* que presentó halos de 6 mm; hacia las demás bacterias hubo actividad nula; por tanto, los resultados obtenidos pueden deberse al bajo contenido de flavonoides de las cuatro especies, ya que según Rodríguez, Zarate y Sánchez (2017), metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y alcaloides son los responsables de la actividad antimicrobiana.

Resultados similares se han obtenido en otros géneros de orquídeas, por ejemplo, en el estudio de Mishra y otros (2018), el extracto metanólico de los bulbos de *Satyrium nepalense* generó halos de 8 y 7 mm frente a *E. coli* y *Enterobacter gergoviae* respectivamente, Sarkar y otros (2018), a partir del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de *Tropidia curculioides* obtuvieron halos de 7 mm frente a *S. aureus*.

Por otra parte, se han visto buenos resultados en varias orquídeas, Zhang y otros (2018), a partir del extracto etanólico de partes aéreas de *Dendrobium hainanense* evidenciaron halos de 22 mm frente a *S. aureus*, Guo y otros (2016), obtuvieron halos de 21 mm frente a *S. aureus* a partir de un extracto etanólico de la raíz de *Bletilla striata*, en otra investigación, Singh y otros (2016), reportaron halos de 19 mm frente a *E. coli* a partir del extracto metanólico de partes aéreas de *Eria alba*, por su parte Arora y otros (2017), mediante el extracto etanólico de pseudobulbos de *Crepidium acuminatum* obtuvieron halos de 15 mm frente a *E. coli*.

3.4 Evaluación de la actividad antioxidante

3.4.1 Actividad antioxidante con DPPH

Mediante la metodología de DPPH se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de hojas, determinando que *H. gustavi*, *H. meleagris* y *H. wallisii* presentan mejor

actividad en comparación con *H. burtii*. En la tabla 12 se muestran las concentraciones utilizadas de cada extracto con las absorbancias generadas mediante espectrofotometría y el porcentaje de inhibición de DPPH calculado con los datos obtenidos.

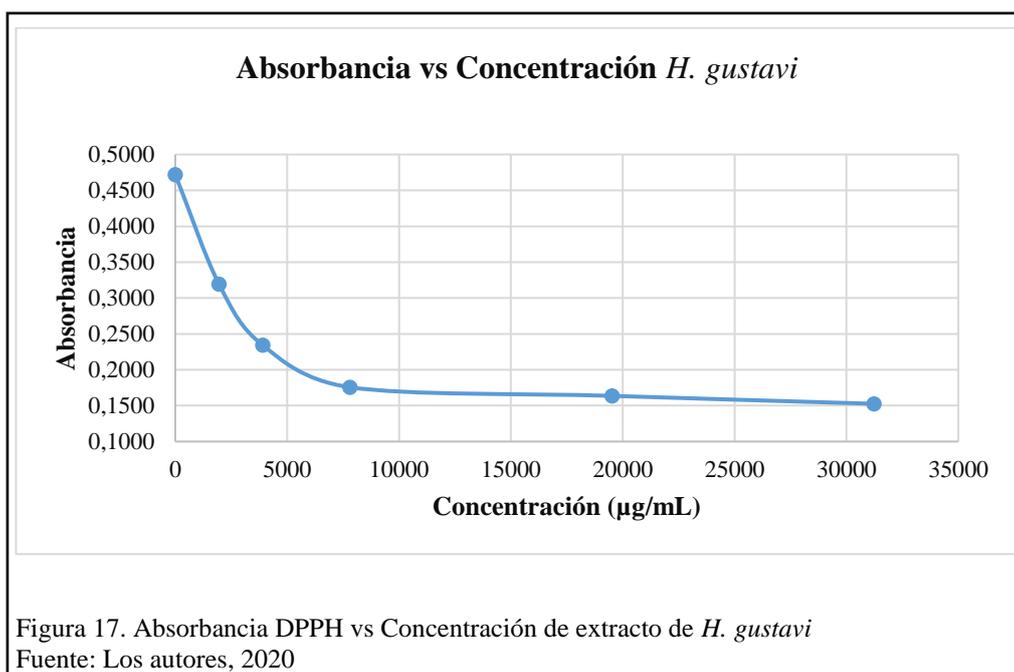
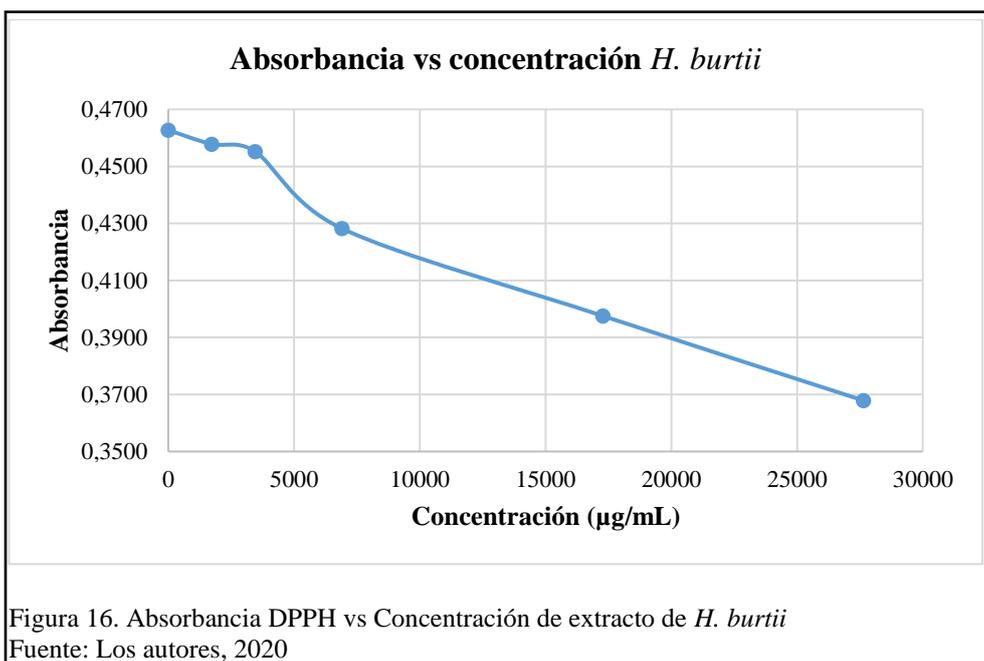
Tabla 12.

Porcentaje de inhibición de DPPH para cada extracto

Muestra	μL de muestra	Concentración (μg/mL)	Absorbancia					% inhibición
			R1	R2	R3	R4	Prom.	
Ácido ascórbico	0	0	0,4813	0,4852	0,4802	0,4871	0,4835	0
	5	0,1666	0,4731	0,4728	0,4733	0,4732	0,4731	2,1409
	10	0,3333	0,4676	0,4682	0,4482	0,4489	0,4582	5,2177
	20	0,6667	0,4349	0,4349	0,4396	0,4393	0,4372	9,5718
	50	1,6667	0,4105	0,4111	0,4084	0,4084	0,4096	15,2756
	80	2,6670	0,3358	0,3355	0,3030	0,3031	0,3194	33,9435
<i>H. burtii</i>	0	0	0,4559	0,4558	0,4697	0,4695	0,4627	0
	5	1727,4242	0,4529	0,4523	0,4631	0,4629	0,4578	1,0643
	10	3454,8485	0,4511	0,4507	0,4597	0,4594	0,4552	1,6208
	20	6909,6970	0,4367	0,4366	0,4198	0,4197	0,4282	7,4612
	50	17274,2424	0,4067	0,4076	0,3880	0,3880	0,3976	14,0796
	80	27638,7878	0,3669	0,3658	0,3693	0,3696	0,3679	20,4927
<i>H. gustavi</i>	0	0	0,4667	0,4668	0,4774	0,4772	0,4720	0
	5	1952,0417	0,3360	0,3359	0,3030	0,3030	0,3195	32,3182
	10	3904,0833	0,2195	0,2194	0,2494	0,2491	0,2344	50,3522
	20	7808,1667	0,1759	0,1756	0,1761	0,1750	0,1757	62,7880
	50	19520,4167	0,1629	0,1621	0,1630	0,1665	0,1636	65,3355
	80	31232,6667	0,1512	0,1514	0,1534	0,1542	0,1526	67,6818
<i>H. meleagris</i>	0	0	0,4691	0,4688	0,4266	0,4262	0,4477	0
	5	1751,2962	0,3908	0,3912	0,3990	0,3984	0,3949	11,7999
	10	3502,5926	0,3318	0,3317	0,3096	0,3092	0,3206	28,3911
	20	7005,1852	0,2763	0,2761	0,2745	0,2742	0,2753	38,5101
	50	17512,9629	0,1662	0,1663	0,1347	0,1345	0,1504	66,3986
	80	28020,7407	0,0689	0,0689	0,0607	0,0593	0,0645	85,6034
<i>H. wallisii</i>	0	0	0,4172	0,4170	0,4163	0,4161	0,4167	0
	5	1696,6805	0,2840	0,2836	0,2844	0,2840	0,2840	31,8373
	10	3393,3611	0,2626	0,2626	0,2009	0,2019	0,2320	44,3178
	20	6786,7222	0,1955	0,1956	0,1653	0,1644	0,1802	56,7503
	50	16966,8056	0,1311	0,1293	0,1388	0,1319	0,1328	68,1327
	80	27146,8889	0,1187	0,1186	0,1115	0,1138	0,1157	72,2429

Fuente: Los autores, 2020

Desde la figura 16 a la 19 se muestra la relación entre absorbancia y concentración de extracto, la cual es inversamente proporcional. Es decir, que mientras más alta sea la concentración, menor será la absorbancia. Como se puede apreciar en cada figura, mientras se generen absorbancias más cercanas a cero a concentraciones más bajas, mejor será la actividad antioxidante. Por tal motivo, visualmente se aprecia que *H. gustavi* y *H. wallisii* poseen mejor actividad.



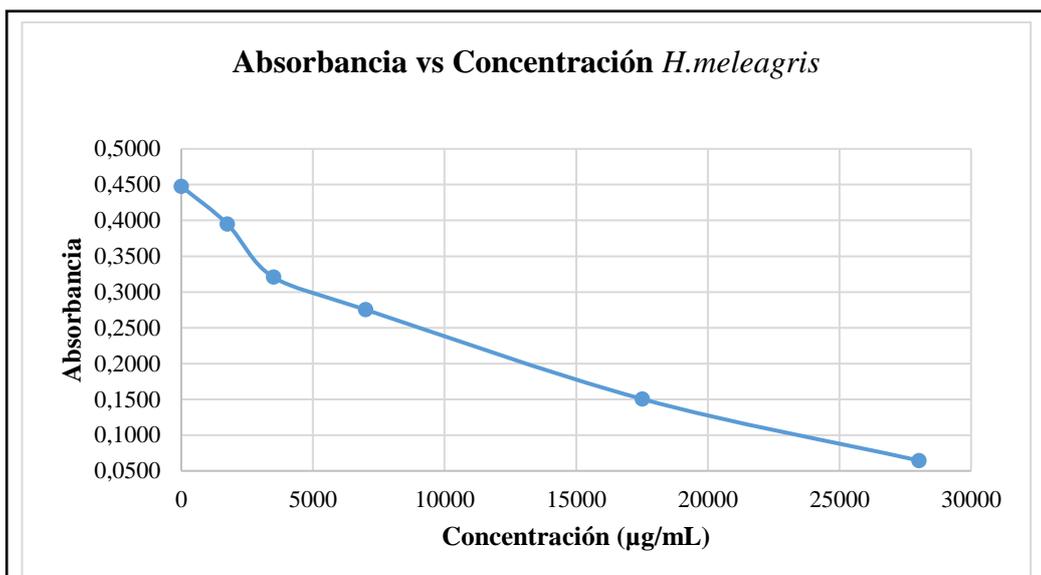


Figura 18. Absorbancia DPPH vs Concentración de extracto de *H. meleagris*
Fuente: Los autores, 2020

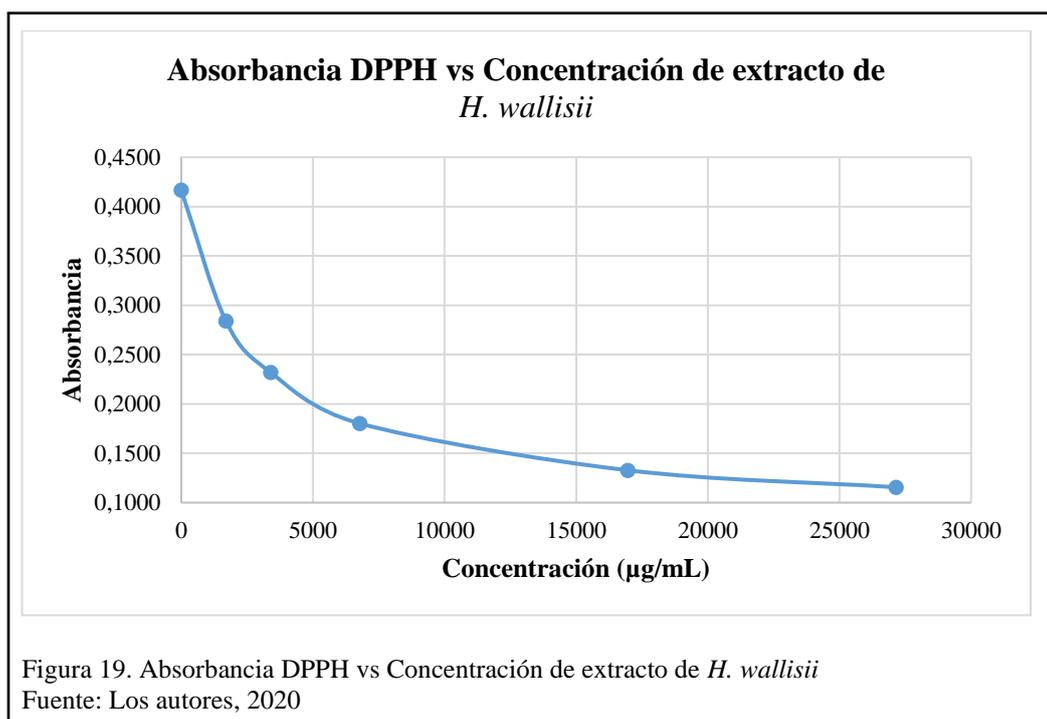
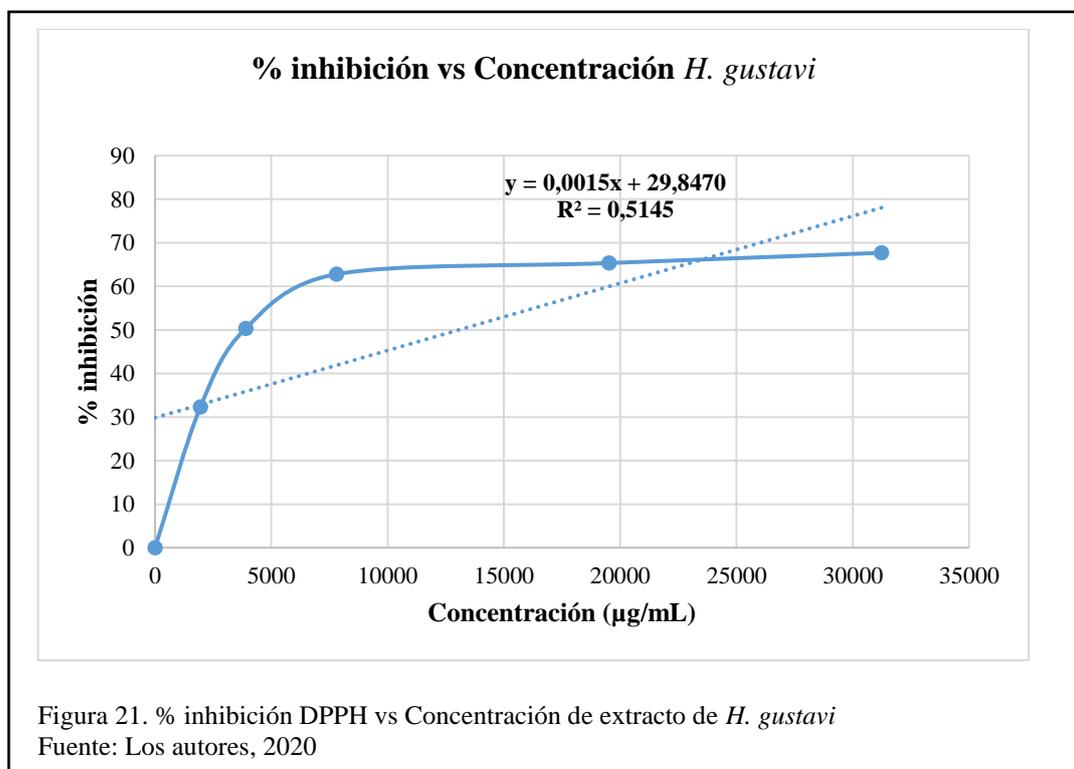
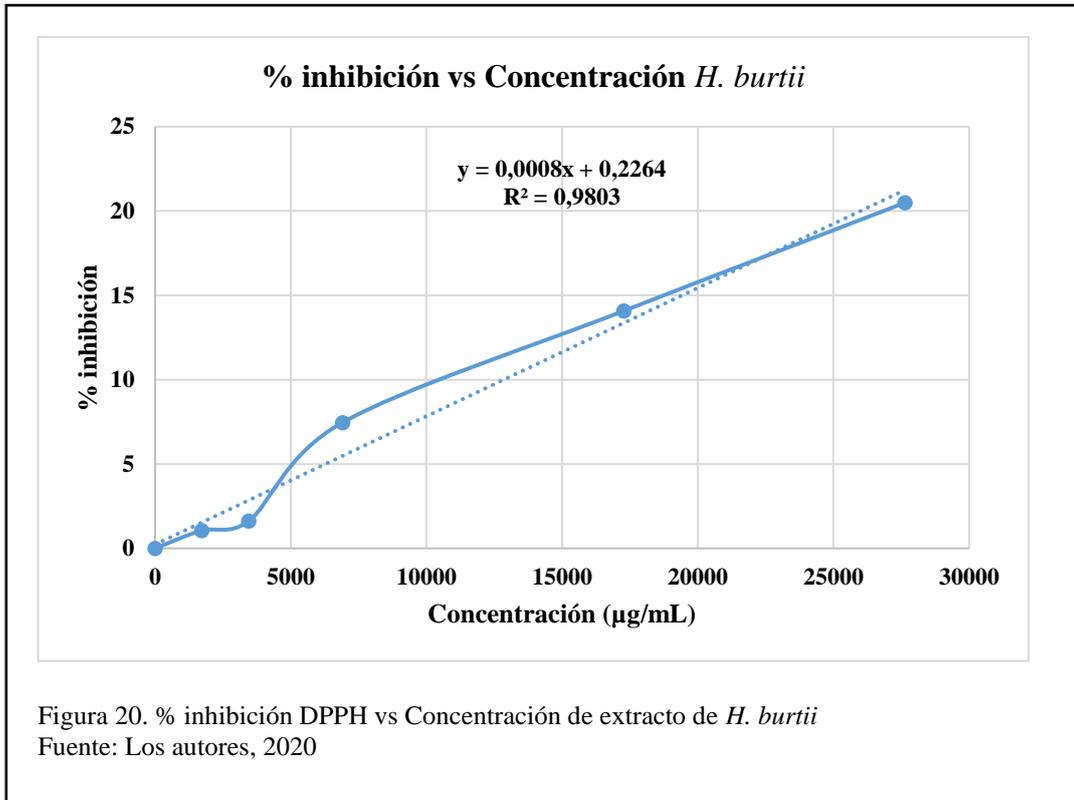


Figura 19. Absorbancia DPPH vs Concentración de extracto de *H. wallisii*
Fuente: Los autores, 2020

Desde la figura 20 a la 23 se muestra la relación entre concentración de extracto e inhibición de DPPH, la cual es directamente proporcional. Es decir, que mientras más alta sea la concentración, más alto será el porcentaje de inhibición de DPPH. Como se puede apreciar en cada figura, mientras a menor concentración se genere mayor

porcentaje de inhibición, mejor será la actividad antioxidante. Por tal motivo, visualmente se aprecia que *H. gustavi* y *H. wallisii* poseen mejor actividad.



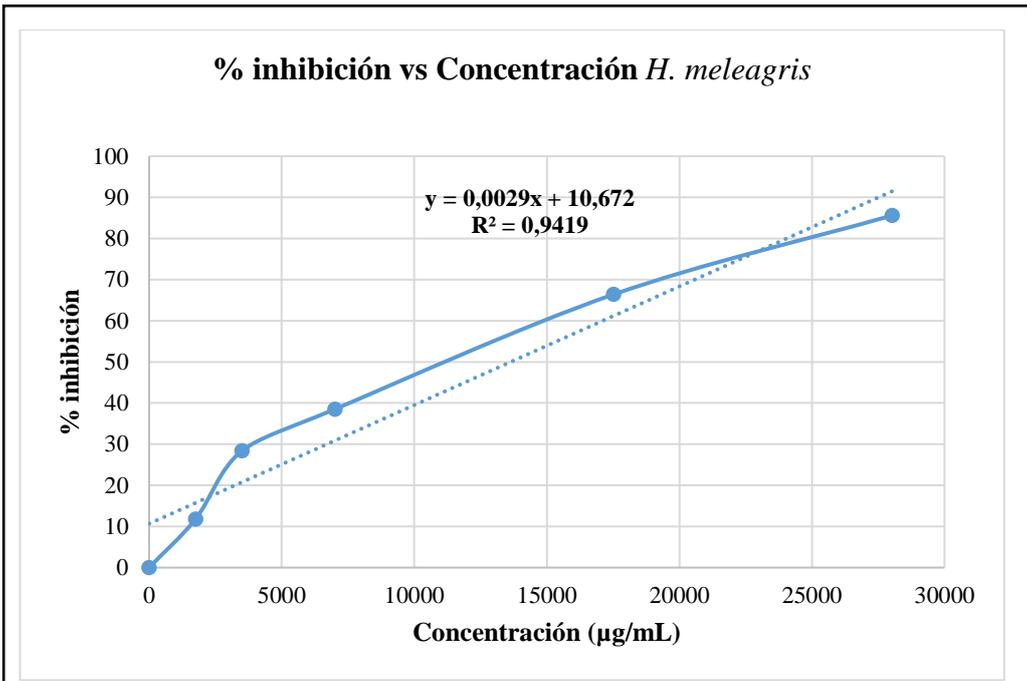


Figura 22. % inhibición DPPH vs Concentración de extracto de *H. meleagris*
Fuente: Los autores, 2020

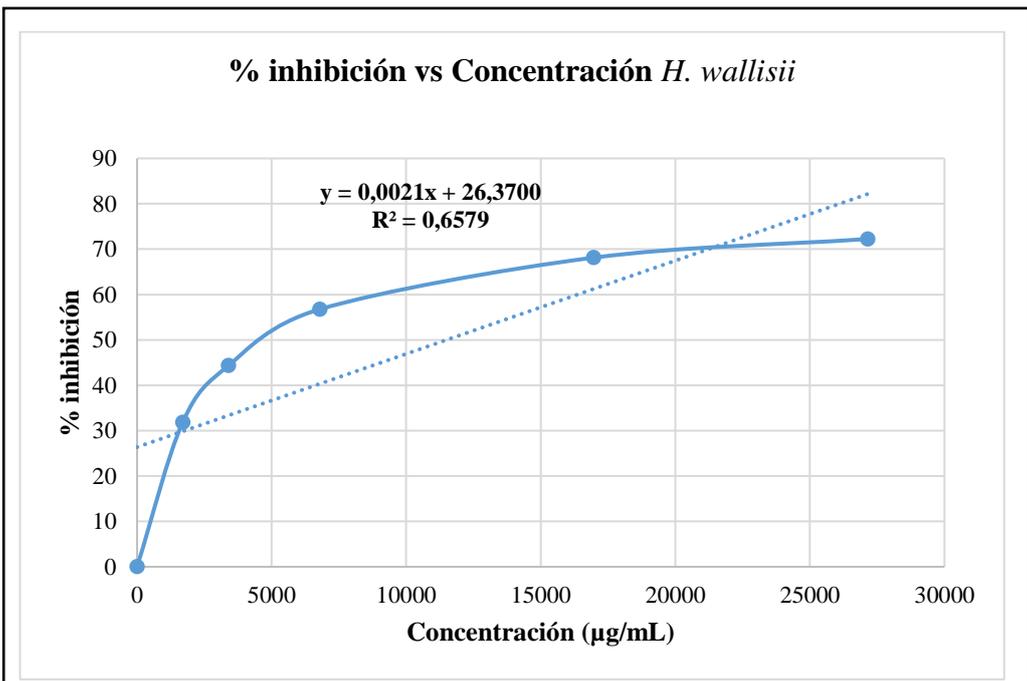


Figura 23. % inhibición DPPH vs Concentración de extracto de *H. wallisii*
Fuente: Los autores, 2020

En la tabla 13 se indica el IC50 de cada extracto junto con el ácido ascórbico utilizado como control positivo, esto para determinar la concentración con la cual se inhibe el 50 % del radical DPPH.

Tabla 13.

IC50 con DPPH para cada uno de los extractos (Ver Anexo 7)

Muestra	IC50 (mg/mL)
Ácido ascórbico	0,0042
<i>H. wallisii</i>	11,2524
<i>H. gustavi</i>	13,4353
<i>H. meleagris</i>	13,5614
<i>H. burtii</i>	62,2170

Fuente: Los autores, 2020

Los datos de IC50 obtenidos reflejan una mayor actividad antioxidante para *H. wallisii* con 11,2524 mg/mL, seguida por *H. gustavi* con 13,4353 mg/mL, mismos datos que se resumen gráficamente en la figura 24.

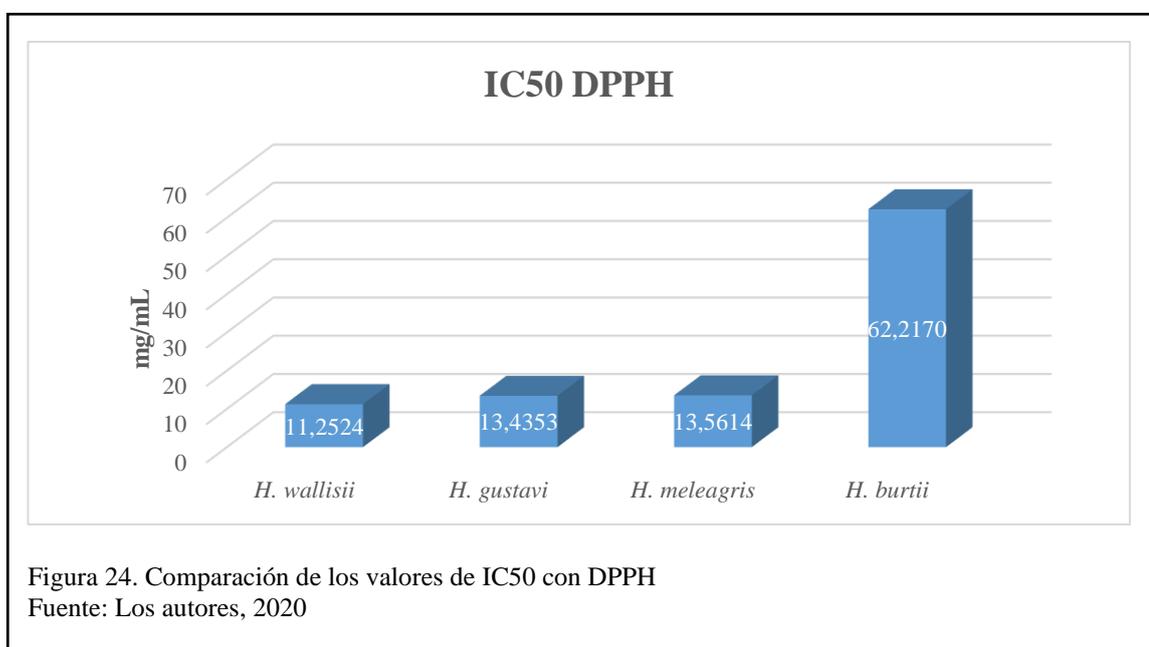


Figura 24. Comparación de los valores de IC50 con DPPH

Fuente: Los autores, 2020

Resultados similares obtuvieron Cerna y otros (2018), con el extracto etanólico de las hojas de la orquídea *Epidemdrum nocturnum* con un IC50 de 3,5000 mg/mL y

Oncidium excavatum con 31 mg/mL. Resultados distintos se han encontrado en otros géneros de orquídea, por ejemplo, Singh y otros (2016) mediante el extracto etanólico de las partes aéreas de *Eria alba* obtuvieron un IC50 de 0,0687 mg/mL, Dong y otros (2015) reportan un IC50 de 0,0369 mg/mL en el extracto con acetona de las raíces de *Bletilla striata*, por su parte Uddin y otros (2015) obtuvieron un IC50 de 0,0058 mg/mL en el extracto metanólico de las raíces de *Vanda roxburghii*.

3.4.1.1 Análisis estadístico de la actividad antioxidante con DPPH

Se realizó un análisis de varianza o ANOVA con método de comparación Tukey a un nivel de significancia de 0,05. Debido a que se obtuvo un p-valor <0,0001 se acepta la hipótesis alternativa (Ver Anexo 8). Además, según la prueba de Tukey, no existe diferencia estadística entre el valor IC50 de *H. gustavi*, *H. meleagris* y *H. wallisii*, pero *H. burtii* se diferencia de las otras tres especies, siendo ésta la que menor capacidad antioxidante posee.

3.4.2 Actividad antioxidante con ABTS

Mediante la metodología de ABTS se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de hojas, corroborando que *H. gustavi*, *H. meleagris* y *H. wallisii* presentan mejor actividad en comparación con *H. burtii*. En la tabla 14 se muestran las concentraciones utilizadas de cada extracto con las absorbancias generadas mediante espectrofotometría y el porcentaje de inhibición de ABTS calculado con los datos obtenidos.

Tabla 14.

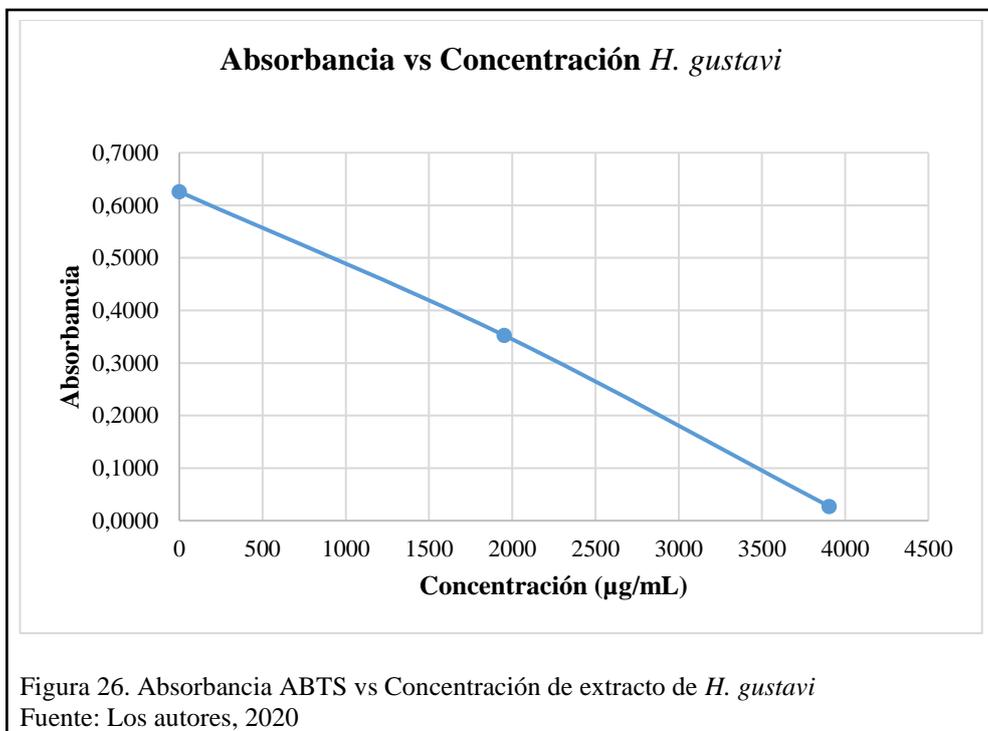
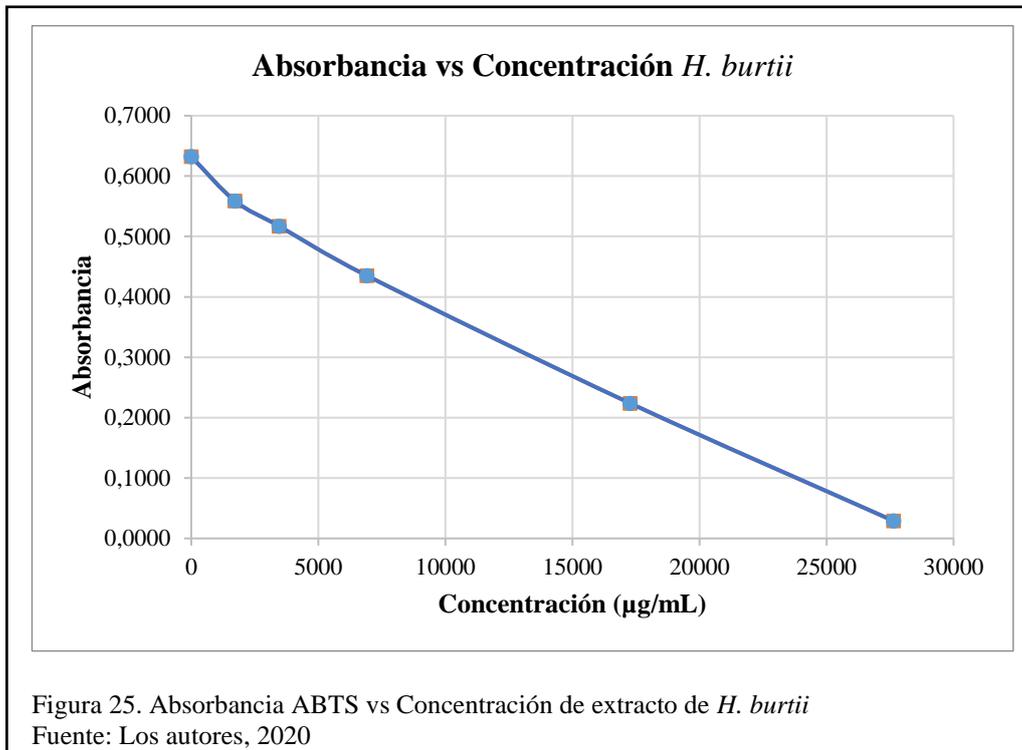
Porcentaje de inhibición de ABTS para cada extracto

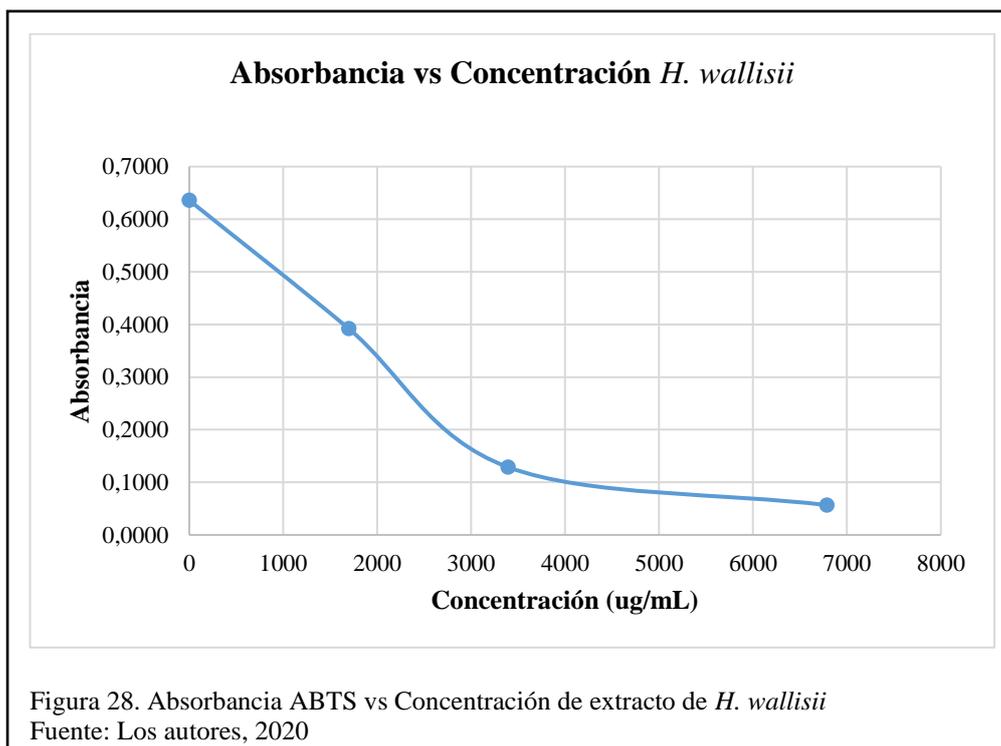
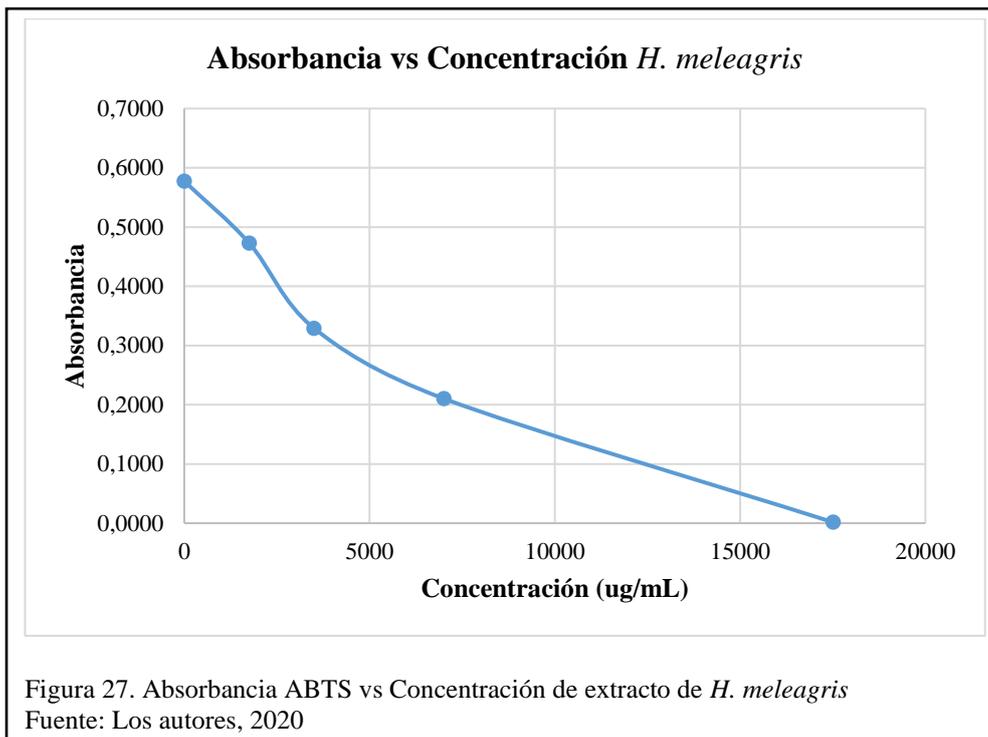
Muestra	μL de muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia					% inhibición
			R1	R2	R3	R4	Prom.	
Ácido ascórbico	0	0	0,6217	0,6216	0,6566	0,6562	0,63903	0
	5	0,1667	0,5960	0,5957	0,6150	0,6152	0,6055	5,2502
	10	0,3333	0,5807	0,5806	0,5709	0,5703	0,5756	9,9214
	20	0,6667	0,5609	0,5606	0,5644	0,5638	0,5624	11,9870
	50	1,6667	0,5429	0,5425	0,5245	0,5242	0,5335	16,5095
	80	2,6667	0,4589	0,4589	0,4676	0,4671	0,4631	27,5263
<i>H. burtii</i>	0	0	0,6464	0,6454	0,6185	0,6184	0,6322	0
	5	1727,4242	0,5363	0,5350	0,5835	0,5798	0,5587	11,6305
	10	3454,8485	0,5182	0,5147	0,5193	0,5165	0,5172	18,1912
	20	6909,6969	0,4269	0,4217	0,4447	0,4471	0,4351	31,1741
	50	17274,2424	0,2065	0,1942	0,2545	0,2400	0,2238	64,5984
	80	27638,7878	0,0488	0,0467	0,0118	0,0089	0,0291	95,4048
<i>H. gustavi</i>	0	0	0,6314	0,6310	0,6206	0,6204	0,6259	0
	5	1952,0417	0,3517	0,3483	0,3555	0,3543	0,3525	43,6846
	10	3904,0833	0,0423	0,0335	0,0198	0,0129	0,0271	95,6659
	20	7808,1667	0	0	0,0098	0,0095	0,0048	99,2290
	50	19520,4167	0	0	0	0	0	100
	80	31232,6667	0	0	0	0	0	100
<i>H. meleagris</i>	0	0	0,5744	0,5742	0,5806	0,5803	0,5774	0
	5	1751,2963	0,4967	0,4934	0,4520	0,4492	0,4728	18,1078
	10	3502,5926	0,3445	0,3348	0,3197	0,3172	0,3291	43,0093
	20	7005,1852	0,2282	0,2164	0,2026	0,1939	0,2103	63,5809
	50	17512,9629	0	0	0,0035	0,0026	0,0015	99,7359
	80	28020,7407	0	0	0	0	0	100
<i>H. wallisii</i>	0	0	0,6457	0,6455	0,6263	0,6260	0,6359	0
	5	1696,6806	0,3943	0,3915	0,3926	0,3905	0,3922	38,3173
	10	3393,3611	0,0736	0,0597	0,1947	0,1872	0,1288	79,7444
	20	6786,7222	0,0256	0,0185	0,0960	0,0866	0,0567	91,0871
	50	16966,8056	0	0	0	0	0	100
	80	27146,8889	0	0	0	0	0	100

Fuente: Los autores, 2020

Desde la figura 25 a la 28 se muestra la relación entre absorbancia y concentración de extracto, la cual es inversamente proporcional. Es decir, que mientras más alta sea la concentración, menor será la absorbancia. Como se puede apreciar en cada figura, mientras se generen absorbancias más cercanas a cero a concentraciones más bajas,

mejor será la actividad antioxidante. Por tal motivo, visualmente se aprecia que *H. gustavi* y *H. wallisii* poseen mejor actividad.





Desde la figura 29 a la 32 se muestra la relación entre concentración de extracto e inhibición de ABTS, la cual es directamente proporcional. Es decir, que mientras más alta sea la concentración, más alto será el porcentaje de inhibición de ABTS. Como se

puede apreciar en cada figura, mientras a menor concentración se genere mayor porcentaje de inhibición, mejor será la actividad antioxidante. Por tal motivo, visualmente se aprecia que *H. gustavi* y *H. wallisii* poseen mejor actividad.

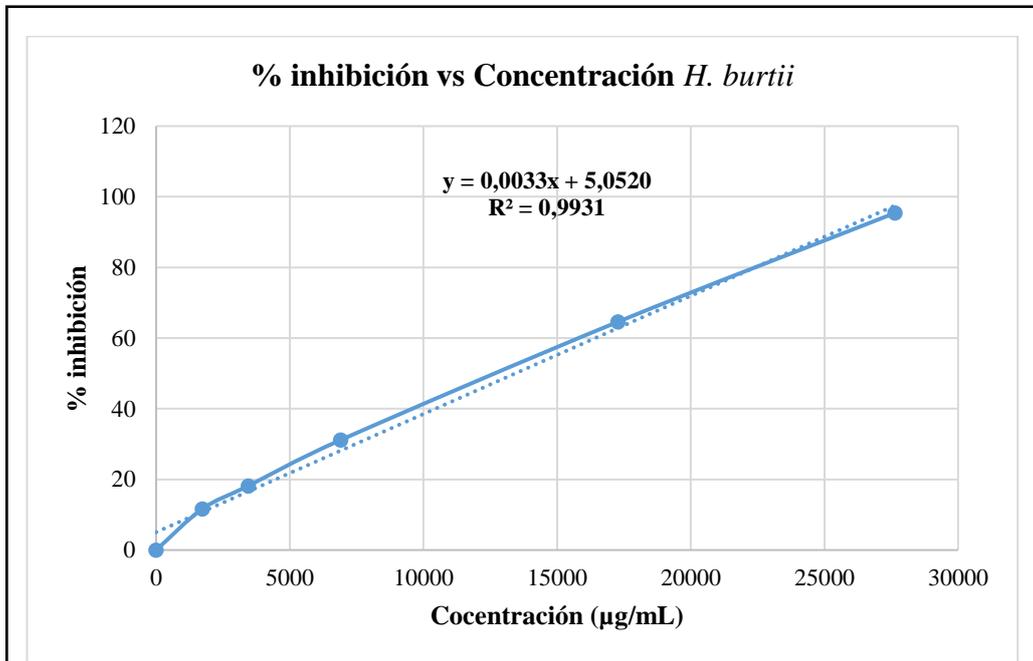


Figura 29. % inhibición ABTS vs Concentración de extracto de *H. burtii*
Fuente: Los autores, 2020

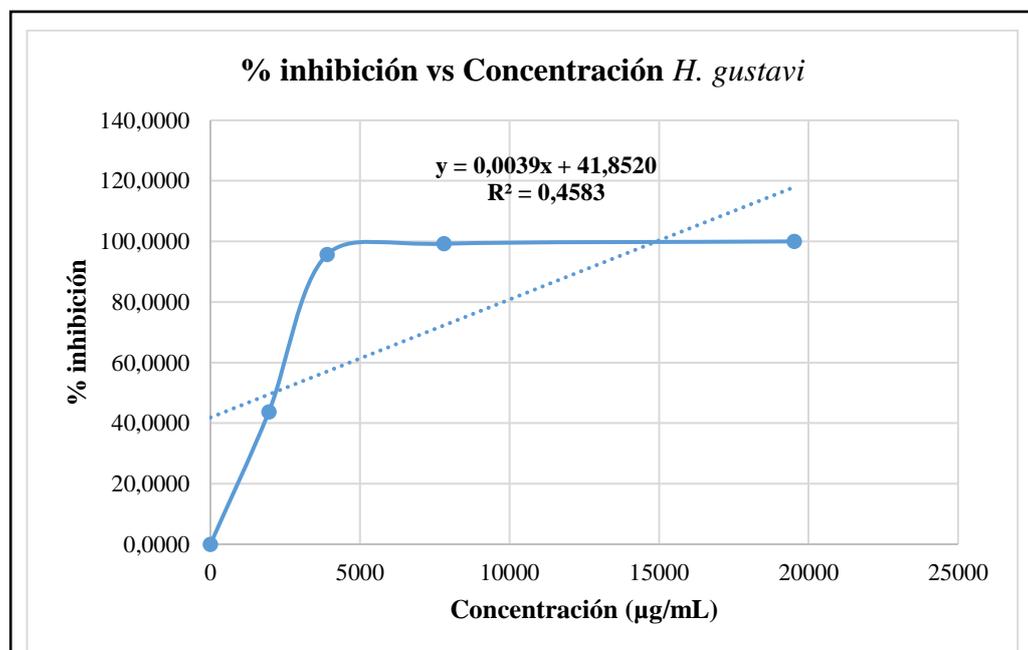
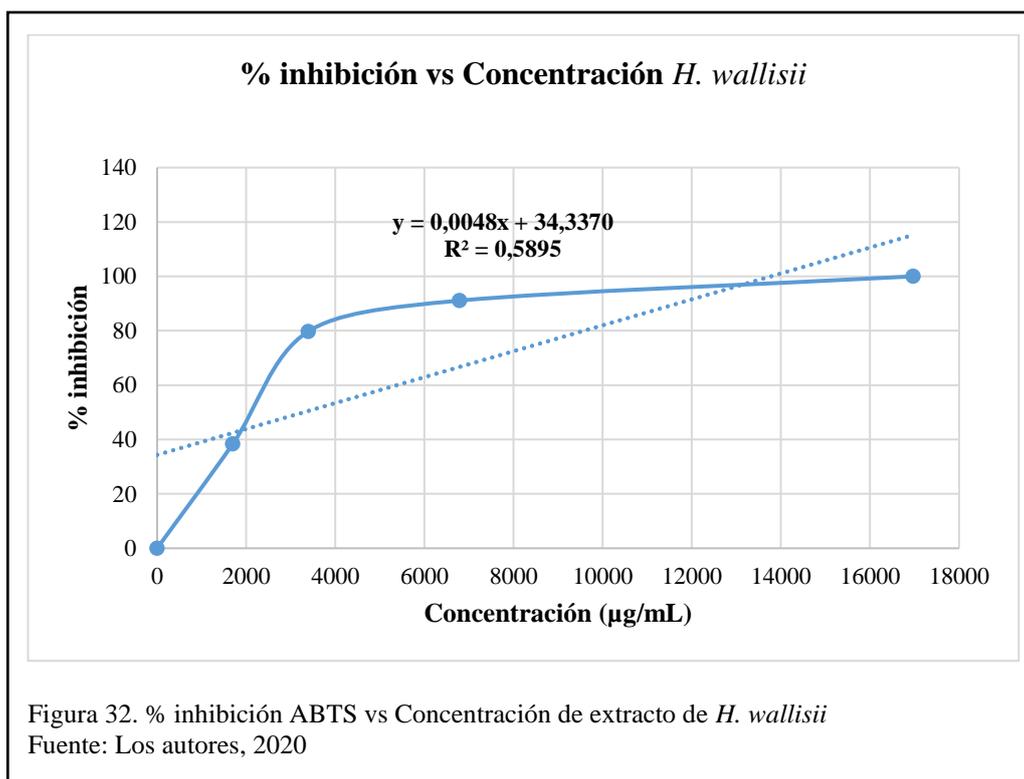
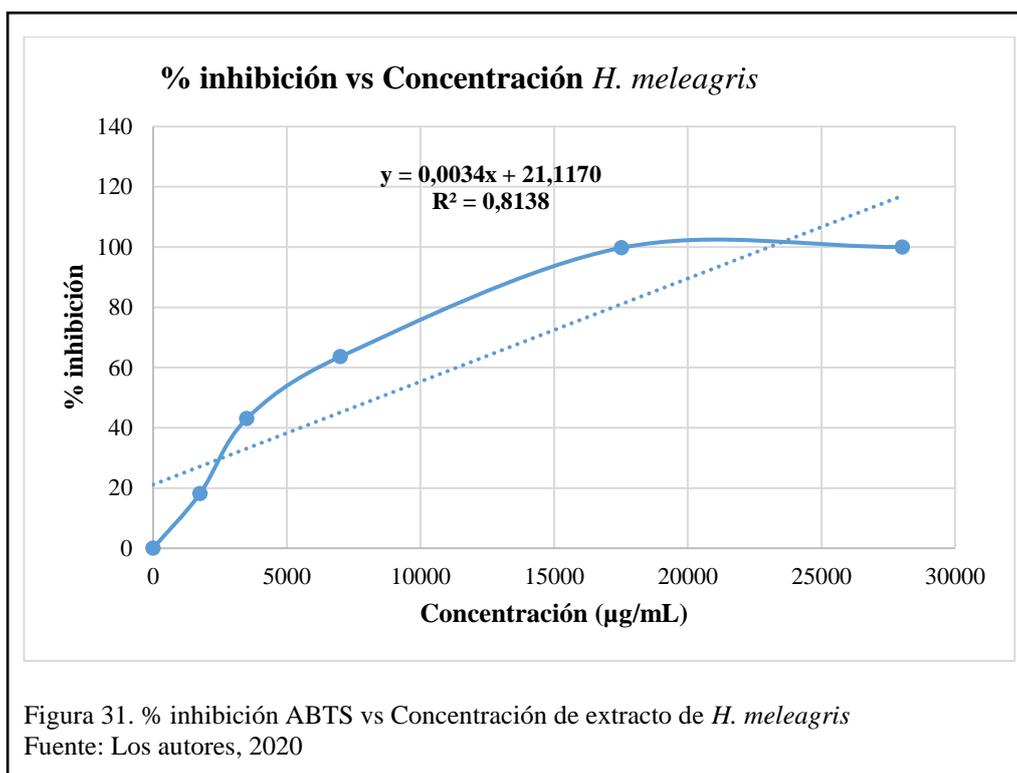


Figura 30. % inhibición ABTS vs Concentración de extracto de *H. gustavi*
Fuente: Los autores, 2020



En la tabla 15 se indica el IC50 de cada extracto junto con el ácido ascórbico utilizado como control positivo, esto para determinar la concentración con la cual se inhibe el 50 % de ABTS.

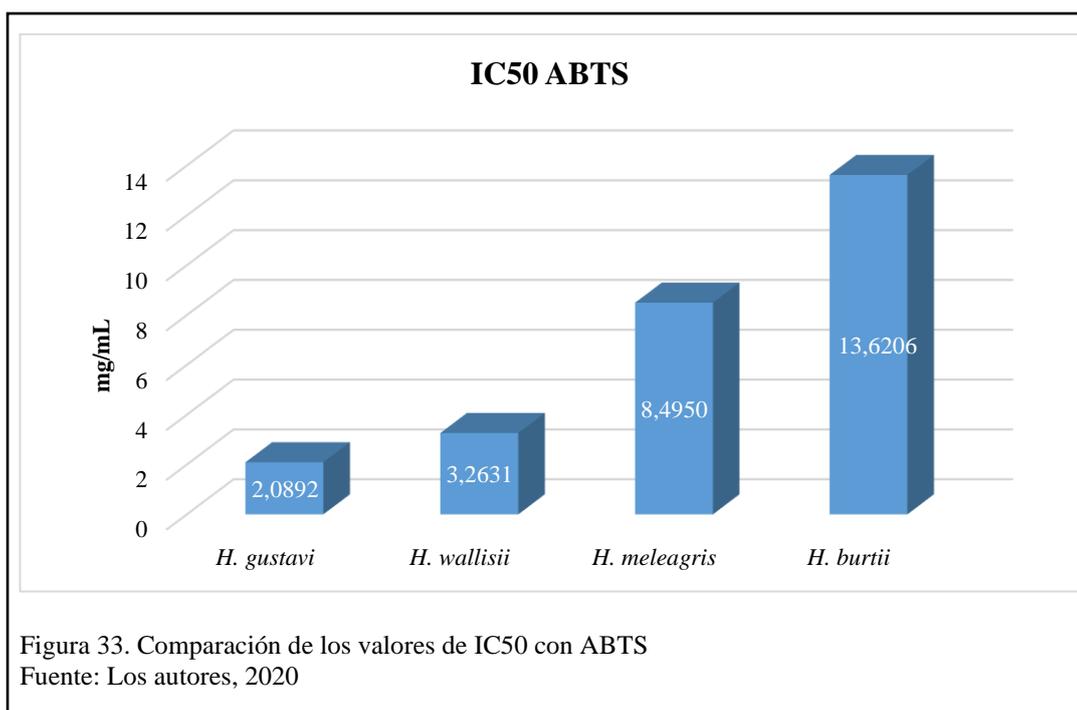
Tabla 15.

IC50 con ABTS para cada uno de los extractos (Ver Anexo 9)

Muestra	IC50 (mg/mL)
Ácido ascórbico	0,0052
<i>H. gustavi</i>	2,0892
<i>H. wallisii</i>	3,2631
<i>H. meleagris</i>	8,4950
<i>H. burtii</i>	13,6206

Fuente: Los autores, 2020

Los datos de IC50 obtenidos reflejan una mayor actividad antioxidante para *H. gustavi* con 2,0892 mg/mL, seguida por *H. wallisii* con 3,2631 mg/mL, mismos datos que se resumen gráficamente en la figura 33.



Resultados distintos se han reportado en otros géneros de orquídeas mediante el método de ABTS, por ejemplo, Mishra y otros (2018) encontraron un IC50 de 0,0245 mg/mL mediante el extracto metanólico del tubérculo de *Satyrium nepalense*, Li y

otros (2017) en el extracto etanólico de la raíz y tubérculo de *Cremastra appendiculata* determinaron un IC50 de 0,0144 mg/mL.

3.4.2.1 Análisis estadístico de la actividad antioxidante con ABTS

Se realizó un análisis de varianza o ANOVA con método de comparación Tukey a un nivel de significancia de 0,05. Debido a que se obtuvo un p-valor <0,0001 se acepta la hipótesis alternativa (Ver Anexo 10). Además, según la prueba de Tukey, existe diferencia estadística entre el valor IC50 de cada extracto.

3.5 Toxicidad

Se evaluó la capacidad citotóxica de los extractos fluidos de cuatro especies del género *Huntleya* a cinco concentraciones diferentes: 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{L/mL}$ o ppm frente a Nauplios de *Artemia salina*, determinados a los 20 segundos de no hallar movimiento, los resultados se muestran en la tabla 16, para datos ampliados ver Anexo 11, se debe tener en cuenta el cambio de porcentaje a estadístico Probit (Ver Anexo 12).

Tabla 16.

Datos para determinar CL50

MUESTRA	Concentración (ug/mL)	% Mortalidad			PROMEDIO % Mortalidad	LOG C	PROBIT	CL50 (ug/mL)
		1	2	3				
<i>H. burtii</i>	5	18,1800	16,67	27,2700	20,7100	0,6990	4,1600	104,8490
	10	36,3600	20	40	32,1200	1	4,5300	
	25	45,4500	40	36,3600	40,6100	1,3980	4,7500	
	50	45,4500	40	45,4500	43,6400	1,6990	4,8200	
	100	40	63,6400	40	47,8800	2	4,9200	
<i>H. gustavi</i>	5	0	18,1800	7,6900	8,6200	0,699	3,5900	81,1870
	10	10	10	18,1800	12,7300	1,0000	3,8200	
	25	36,3600	27,2700	45,4500	36,3600	1,3980	4,6400	
	50	41,6700	36,3600	45,4500	41,1600	1,6990	4,7700	
	100	45,4500	38,4600	66,6700	50,1900	2	5	
<i>H. meleagris</i>	5	0	0	11,1100	3,7000	0,6990	3,2500	19147,2550
	10	11,1100	0	0	3,7000	1	3,2500	
	25	0	10	10	6,6700	1,3980	3,5200	
	50	10	11,1100	11,1100	10,7400	1,6990	3,7700	
	100	10	10	16,6700	12,2200	2	3,8200	
<i>H. wallisii</i>	5	20	0	10	10	0,6990	3,7200	31747,8690
	10	10	10	10	10	1	3,7200	
	25	10	11,1100	10	10,3700	1,3980	3,7200	
	50	10	10	20	13,3300	1,6990	3,8700	
	100	20	30	20	23,3300	2	4,2600	
Etanol 96°	5	20	25	27,2700	24,0900	0,6990	4,2900	11,6850
	10	22,2200	21,4300	30	24,5500	1	4,3300	
	25	60	62,5000	50	57,5000	1,3980	5,2000	
	50	100	100	100	100	1,6990	8,0900	
	100	100	100	100	100	2	8,0900	
Agua marina artificial	5	10	11,1100	0	7,0400	0,6990	3,5200	35337,3240
	10	11,1100	0	0	3,7000	1	3,2500	
	25	0	0	0	1	1,3980	2,6700	
	50	12,5000	12,5000	11,1100	12,0400	1,6990	3,8200	
	100	0	10	44,4400	18,1500	2	4,0800	

Fuente: Los autores, 2020

Los datos obtenidos fueron validados con los resultados observados en el control positivo de etanol a 96 ° y el control negativo agua marina artificial que arrojaron valores de CL50 de 11,6850 y 35337,3240 ppm respectivamente, similares a los obtenidos por Cruz y otros, (2015) y Echeverría y otros (2016).

H. gustavi y *H. burtii* presentan un CL50 de 81,1870 y 104,8490 ppm respectivamente, entrando en la clasificación de altamente toxico el primero y medianamente toxico el segundo (Ver tabla 7), estos datos son comparados con Shie y otros (2015), quienes trabajaron con extractos de hojas y pseudobulbos de orquídeas como *Spathoglottis plicata* y *Cephalanceropsis gracilis*, en Indonesia, obteniendo una CL50 de 144,4100 y 112, 8000 ppm respectivamente sobre *A. salina*; también con Ponpon y otros (2016), que trabajaron con hojas en extracto fluido liofilizado de *Spathoglottis plicata* en Filipinas, obteniendo un CL50 de 97, 2500 ppm.

Mitra y otros (2018), determinan que la toxicidad de una planta está dada por la presencia de metabolitos secundarios como saponinas y alcaloides, también puede aumentar por la presencia excesiva de taninos y fenoles en ciertas plantas ya que pueden alterar la composición de ácidos grasos esenciales al ser ingeridos (Vélez y otros, 2014).

Gómez (2012), Martínez (2016) y Miranda (2018), concuerdan que al tener una planta capacidad toxica medianamente alta y con presencia de compuestos antioxidantes como fenoles y flavonoides pueden ser utilizados como antiinflamatorios y poseen una capacidad anticancerígena valiosa.

H. meleagris y *H. wallisii* presentan una CL50 de 19147,2550 y 31747,8690 ppm respectivamente, son datos muy alejados a los reportados por Bhatt y otros (2018), que trabajaron en la India con extracto hidroalcohólico de *Eulophia nuda* obteniendo una CL50 de 1010 ppm contra *A. salina* y con Uddin y otros (2015), en su investigación en Bangladesh usaron diferentes partes de *Vanda roxburghii* para determinar el grado de toxicidad, formulando cinco extractos hidroalcohólicos, obteniendo una CL50 de 750,7900 ppm para raíces (hexano), 502,4200 ppm para hojas, 653,7200 ppm para

raíces, 223,0100 ppm para flores y 3043,6400 ppm para pseudobulbos; todas estas plantas son determinadas como no tóxicas.

Berame (2017), Quazi (2017) y Gómez (2012) mencionan que una planta al sobrepasar una CL50 de 1000 ppm en ensayos con *A. salina* no tiene toxicidad, ya que los Nauplios de *A. salina* presentan una cutícula muy fina, lo que las hace sensibles a tóxicos en el medio, los cuales penetran a través de las barreras fisiológicas absorbiéndose rápidamente.

Conclusiones

Se cuantificaron los metabolitos secundarios de naturaleza polifenólica de cuatro especies del género *Huntleya*, todas presentaron un bajo contenido de fenoles totales, siendo *H. gustavi* la de mayor cantidad seguida por *H. wallisii*. Así mismo, se obtuvo un bajo contenido de flavonoides en todos los extractos, siendo *H. wallisii* el de mayor cantidad seguido por *H. gustavi*.

Los extractos de hojas no presentaron actividad antibacteriana, aunque con halos de inhibición insignificantes, *H. gustavi* generó un mayor tamaño frente a *S. aureus* y *E. coli*.

Se evidenció actividad antioxidante mediante DPPH en todas las especies, siendo *H. wallisii* la de mayor actividad seguida por *H. gustavi*. En la prueba comprobatoria con ABTS también se observó actividad antioxidante en todas las especies, siendo *H. gustavi* la de mayor actividad seguida por *H. wallisii*.

Las pruebas de toxicidad frente a *Artemia salina* demostraron que *H. gustavi* es altamente tóxica, *H. burtii* mostró toxicidad moderada, mientras que *H. meleagris* y *H. wallisii* resultaron inocuas.

Recomendaciones

Realizar estudios similares a partir de extractos con solventes como metanol y éter de petróleo, variando sus concentraciones, utilizando partes aéreas y raíces de la planta, los cuales deberán ser analizados mediante cromatografía de capa fina y espectrofotómetro de llama acoplado a masas.

No continuar con ensayos antimicrobianos en los extractos evaluadas, ya que no se observó actividad significativa.

Identificar y aislar las moléculas antioxidantes presentes en los extractos para probar su actividad frente a cultivos celulares.

Rastrear mediante cromatografía de capa fina y espectrofotómetro de llama acoplado a masas los distintos metabolitos que otorgan toxicidad a la planta.

Con la determinación de un grado de toxicidad importante y capacidad antioxidante de extractos de *H. gustavi* y *H. burtii*, además de presencia de fenoles y flavonoides, son evidencias que justifican un estudio de capacidad anticancerígena.

Estudiar otros metabolitos en las especies que tienen alta toxicidad *H. gustavi* y *H. burtii* como alcaloides, saponinas y otros. Para explicar el comportamiento toxicológico de las especies.

Referencias

- Ajithkumar, K., Rajendran, P., & Aswini, A. (2017). Conservation of orchids in the Western Ghats Region of Kerala, India. *National Agriculture*, 57–62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1165.8>
- Aldana, C., & Guayasamín, L. (2014). *Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de Ficus citrifolia y caracterización química de los polifenoles* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Allikas, G. (2009). *Huntleya*. Retrieved from American Orchid Society website: <http://www.aos.org/orchids/orchids-a-to-z/letter-h/huntleya.aspx>
- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Álvarez, A., Nuñez, F., Gutiérrez, H., Flores del Castillo, J., Carreño, F., & Angulo, E. (2015). *Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial*. Retrieved from <https://www.serfor.gob.pe/wp-content/uploads/2019/10/GU%C3%8DA-DE-IDENTIFICACI%C3%93N-DE-ORQUIDEAS-CON-MAYOR-DEMANDA-COMERCIAL.pdf>
- Andalucía, J. (2016). Las orquídeas. In *Bosques Protegidos* (Primera, pp. 45–96). Andalucía, España
- Armas, G. (2012). *Estudio de la actividad antibacteriana y tóxica del kuiship (jacaranda copaia)* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

- Arora, M., Kaur, G., Kahlon, P., Mahajan, A., & Sembi, J. (2017). Pharmacognostic Evaluation & Antimicrobial Activity of Endangered Ethnomedicinal Plant *Crepidium acuminatum* (D. Don) Szlach. *Pharmacognosy Journal*, 56–63.
- Aulestia, S. (2017). Cuidados en casa. Retrieved from OrquídeasWeb website: <https://www.orquideasweb.com/cuidados-en-casa/index.php>
- Baquero, L., Salazar, A., Molina, M., & Jauregui, P. (2015). *Tierra de Orquídeas* (Primera). Quito, Ecuador: Ediecuatorial.
- Barragán, A., Zuñiga, M., Guzmán, L., Leiva, M., Álvarez, A., Mesa, D., Gutiérrez, N. (2018). *Orquídeas de Cundinamarca* (Primera). Cundinamarca, Colombia: Zetta Comunicadores S.A.
- Berame, J. S., Cuenca, S. M. E., Cabilin, D. R. P., & Manaban, M. L. (2017). Preliminary Phytochemical Screening and Toxicity Test of Leaf and Root Parts of the Snake Plant (*Sansevieria trifasciata*). *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 5(3), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000187>
- Beyer, H., & Wlter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Barcelona, España: Reverté.
- Bhatt, D. R., Jethva, K. D., & Zaveri, M. N. (2018). In-vitro cytotoxicity studies of the therapeutic orchid : *Eulophia nuda*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), 680–683.
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Job, N., & Tandon, P. (2015). Phyto-molecular profiling and assessment of antioxidant activity within micropropagated plants of *Dendrobium thyrsiflorum*: a threatened, medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3), 535–550. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0783-6>

- Biswas, S., Pardeshi, R., Reddy, N. D., Haneefa, M., Nayak, P. G., Setty, M. M., & Pai, K. S. R. (2016). *Bulbophyllum* sterile petroleum ether fraction induces apoptosis in vitro and ameliorates tumor progression in vivo. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.005>
- Bose, B., Choudhury, H., Tandon, P., & Kumaria, S. (2017). Studies on secondary metabolite profiling , antiinflammatory potential, in vitro photoprotective and skinaging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis acuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 173(April), 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.07.010>
- Cai, J., Zhao, L., & Tao, W. (2015). Potent protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibiting constituents from *Anoectochilus chapaensis* and molecular docking studies. *Pharmaceutical Biology*, 53(7), 1030–1034. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.957781>
- Cai, J., Zhao, L., & Zhu, E. (2015). A new flavonol triglycoside derived from *Anoectochilus elwesii* on stimulating glucose uptake in insulin-induced human HepG2 cells. *Natural Product Research*, 29(15), 1414–1418. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1003135>
- Cameron, K. M., Salazar, G., Chase, M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Van den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(2), 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- Castillo, G., Díaz, M., Pica, Y., Ronco, A., Sobrero, C., Bulus, G., Sánchez, A. (2004). *Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas* (Cuarta).

México D.F., Mexico: IDCRA.

Cerna, J., & Rodríguez, R. (2013). *Características farmacognósticas y cuantificación de flavonoides totales del extracto fluido de hojas de Cynara Scolymus Var. Imperial Star proveniente del sector Tanguche, provincia Virú, región La Libertad* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

Cerna, M. (20 de junio de 2019). Usos tradicionales del género *Huntleya* en el Ecuador. (C. Quinchuela, e I. Vaca, Entrevistadores) Quito, Pichincha, Ecuador.

Cerna, M., Mencias, F., Salazar, T., & Gutiérrez, S. (2018). Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea*. *Bionatura*, 1(1).

Chaglla, J. (2015). *Evaluación del efecto cicatrizante del extracto de las hojas Bauhinia tarapotensis Benth (Pata de vaca) mediante lesiones inducidas en ratones (Mus musculus)* (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Changanaquí, K., Alvarado, D., & Alarcón, H. (2019). Síntesis y caracterización de nanocompuestos Fe₃O₄/Ag: su efecto contra *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*. *Revista Colombiana de Química*, 48, 34.

Charco, M. (2017). *Evaluación del extracto hidroalcohólico de Passiflora tripartita. y pre formulación de jarabe* (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Chiang, S.-H., & Lin, C.-C. (2018). Antioxidant properties of different portions of organic *Anoectochilus formosanus* with different drying treatments. *Bioscience Journal*, 34(1), 12–23. <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n1a2018-37203>

- Chico, T. (2018). *Infecciones por Enterobacter cloacae en pacientes hematológicos* (tesis de pregrado). Universidad de Cantabria, Santander, España.
- Cruz, J., & Gutiérrez, L. (2015). *Evaluación fitoquímica de los metabolitos secundarios para la determinación de la DL50, en la raíz de la especie vegetal mata de piedra (Anthurium cubense), tilgüe, isla de ometepe. Febrero – junio 2015* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua, Nicaragua.
- Dash, P. (2016). *Phytochemical Screening and Pharmacological Investigations on Hedychium coronarium*. Hamburg, Germany: Anchor Academic Publishing.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador* (Primera ed). Quito, Ecuador: Quito & Aarhus.
- Domínguez, O., Hernández, J., Piedrahíta, N., Saldarriaga, N., Vanegas, D., & González, J. (2008). Características clínico-epidemiológicas de las infecciones por *Enterobacter* en la Clínica Cardiovascular de Medellín. Agosto de 2004 a agosto de 2006. *Medicina UPB*, 27, 102.
- Dong, J.-W., Cai, L., Xiong, J., Chen, X.-H., Wang, W.-Y., Shen, N., Ding, Z.-T. (2015). Improving the antioxidant and antibacterial activities of fermented *Bletilla striata* with *Fusarium avenaceum* and *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry*, 50(1), 8–13.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.008>
- Echeverría, A., D´Armas, H., Matute, N., Jaramillo, C., Astudillo, L., & Benítez, R. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. *Revista Ciencia UNEMI*, 9, 29–35.

- Fang, Y.-S., Yang, M.-H., Cai, L., Wang, J.-P., Yin, T.-P., Yu, J., & Ding, Z.-T. (2018). New phenylpropanoids from *Bulbophyllum retusiusculum*. *Archives of Pharmacal Research*, *41*(11), 1074–1081. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1067-6>
- Ferraro, G., Martino, V., Bandoni, A., & Nadinic, J. (2016). *Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales*. Buenos Aires, Argentina: Eudeba.
- Flor, H., & Parra, M. (2017). *Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de ishpink, Ocotea quixos (lam.) koste*. (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Fuertes, B., Mallitasig, D., Cerna, M., & Gutiérrez, S. (2018). Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (Orchidaceae). *Bionatura*, *1*(1).
- Gallego, A., Garcinuño, M., & Morcillo, M. (2013). *Experimentación en química analítica*. Madrid, España: UNED.
- Gamez, C., & Ramirez, E. (2008). *Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con Daphnia magna* (tesis de pregrado). Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.
- Gómez, A., & Molina, S. (2012). *Evaluación preliminar de la actividad insecticida contra Puto barberi (Cochinilla harinosa) del extracto etanólico de las semillas desengrasadas de Annona muricata* (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- González, A. (2016). *Evaluación antibacteriana de extracto y aceite esencial de*

Pumamaqui (Oreopanax ecuadorensis Seeman.) frente a: (Staphylococcus aureus ATCC: 25923, Streptococcus pyogenes ATCC: 19615, Streptococcus pneumoniae ATCC: 49619 y Streptococcus mutans ATCC: 25175 (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

Guerrero, P., & Pozo, K. (2016). *Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de cinco variedades de aceites esenciales andinos (Aristeguietia glutinosa; Myrcianthes rhopaloides; Ambrosia arborescens; Lantana camara; Minthostachys mollis) (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.*

Guo, J.-J., Dai, B.-L., Chen, N.-P., Jin, L.-X., Jiang, F.-S., Ding, Z.-S., & Qian, C.-D. (2016). The anti-*Staphylococcus aureus* activity of the phenanthrene fraction from fibrous roots of *Bletilla striata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1488-z>

Gutiérrez, R., Reyes, C., Martínez, J., López, J., & Lazalde, B. (2018). Estrés oxidativo : promotor de enfermedades. *Revista Electrónica Semestral de Ciencias de La Salud*, 1–9.

Han, S., Wang, C., Cui, B., Sun, H., Zhang, J., & Li, S. (2019). Hepatoprotective activity of glucosyloxybenzyl succinate derivatives from the pseudobulbs of *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, *157*, 71–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.003>

Han, Y., Ming, F., Wang, J.-W., Wen, J. G., Ye, M.-M., & Shen, D.-L. (2016). Cloning and characterization of a novel chalcone synthase gene from *Phalaenopsis hybrida* orchid flowers. *Russian Journal of Plant Physiology*, *53*(2), 223–230. <https://doi.org/10.1134/S1021443706020129>

- Harding, P. (2008). *Huntleya and Related Orchids*. Portland, United States of America: Timber Press.
- Hernández, S., Pedraza, E., López, A., De la Cruz, E., Fernández, P., Martínez, A., & Martínez, M. (2017). Determinación del DL 50 con rayos gamma (^{60}Co) en protocormos de *Lehmannia autumnalis* in vitro. *Agrociencia*, 507–524.
- Hirtz, A. (21 de junio de 2019). Información actual disponible del género *Huntleya* en el Ecuador. (C. Quinchuela, e I. Vaca, Entrevistadores) Quito, Pichincha, Ecuador.
- Hoi, T. M., Thai, T. V., Ha, C. T. T., Van Anh, H. T., Minh, P. X. B., & Dat, N. T. (2016). Flavonoids from *Anoectochilus annamensis* and their anti-inflammatory activity. *Natural Product Communications*, 11(5), 613–614. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84982129797&partnerID=40&md5=0bf125f4bd77f81bb393da4de8b2fe16>
- Holzer, W. (2016). Glossary Term: Capsule. Retrieved from Orchids of New Guinea website: <http://www.orchidsnewguinea.com/orchid-glossary/define-term/Capsule/>
- Hu, J.-M., Fan, W., Dong, F., Miao, Z., & Zhou, J. (2012). Chemical components of *Dendrobium chrysotoxum*. *Chinese Journal of Chemistry*, 30(6), 1327–1330. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201100670>
- Ibarra, M., & Paredes, E. (2013). *Eficacia antibacteriana in vitro de marco (Ambrosia arborescens Mill.) y paico (Chenopodium ambrosioides L.) en una formulación cosmética* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Infante, R. A., Rodríguez, D. A., Sanabria, M. E., Ulacio, D., & Valera, E. (2015).

Efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la actividad de extractos etanólicos de *Lantana camara* L. y *Heliotropium indicum* L. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Sanidad Vegetal y Protección de Cultivos*, 64, 363–367.

Jaramillo, C., Jaramillo, A., Armas, H., Troccoli, L., & Rojas, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 25, 1172–1173.

Jorgensen, P., & León, S. (1999). *Catalogue of vascular plants of Ecuador*. Missouri, United States of America: Botanical Garden Press.

Kuo, Y.-T., Chao, Y.-T., Chen, W.-C., Shih, M.-C., & Chang, S.-B. (2019). Segmental and tandem chromosome duplications led to divergent evolution of the chalcone synthase gene family in *Phalaenopsis* orchids. *Annals of Botany*, 123(1), 69–77. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy136>

Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencias Tecnología de Alimentos*, 47(2), 726–727.

Leos, C., Rivas, C., & García, D. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica* (pp. 56–57). Nuevo León: OmniaScience.

Li, Q., Tu, Y., Zhu, C., Luo, W., Huang, W., Liu, W., & Li, Y. (2017). Cholinesterase, β -amyloid aggregation inhibitory and antioxidant capacities of Chinese medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 108, 512–519.

Lozano, L., García, C., Alvaríño, L., & Iannacone, J. (2017). 1.1.1 Toxicidad aguda

de tres enjuagues bucales a base de *Plantago major*, *Uncaria tomentosa* y *Eucalyptus globulus* en el camarón salino *Artemia franciscana*. *The Biologist*, 47, 438–439.

Mártinez, I., Quintero, G., Márquez, L., González, J., Alvarez, A., & Zarragoitía, A. (2016). Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el Método de *Artemia salina*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25(3), 429–431.

Mendoza, C., Flores, C., Melendez, C., Marquez, Y., & Matheus, N. (2019). Efecto protector de la vitamina C sobre el estrés oxidativo y daño al ADN en ratas con diabetes mellitus. *Revista Veterinaria*, 30(1), 12–16.

Miranda, A., Vinueza, D., Acosta, K., Toaquiza, C., Mendez, E., & Arias, F. (2018). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad citotóxica del látex de *Euphorbia laurifolia* Juss. ex. Lam sobre *Artemia salina*. *Revista Científica Perfiles*, 13–20.

Mishra, A., Saklani, S., Salehi, B., Parcha, V., Sharifi-Rad, M., Milella, L., Srivastava, M. (2018). *Satyrium nepalense*, a high altitude medicinal orchid of Indian Himalayan region: Chemical profile and biological activities of tuber extracts. *Cellular and Molecular Biology*, 64(8), 35–43. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.8.6>

Mitra, A., Sur, T., Upadhyay, S., Bhattacharyya, D., & Hazra, J. (2018). Effect of *Coelogyne cristata* Lindley in alleviation of chronic fatigue syndrome in aged Wistar rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 9(4), 266–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.06.011>

Montalvo, M., & Vargas, L. (2019). *Revisión de las especies latinoamericanas de*

- orquídeas del género Dracula mediante la técnica molecular barcode.*(Tesis de pregrado), Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Muñera, J., Ortiz, P., Aguirre, G., Chase, M., Dodson, C., Dressler, R., Luer, C. (1993). *Orquídeas Nativas de Colombia* (Primera). Medellín: Editorial Colina.
- Narkhede, A., Jagtap, S., Nirmal, P., Giramkar, S., Nagarkar, B., Kulkarni, O., & Harsulkar, A. (2016). Anti-fatigue effect of Amarkand on endurance exercise capacity in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-0995-2>.
- Narkhede, A., Mahajan, M., Singh, E., Harsulkar, A., & Jagtap, S. (2016). Antioxidant activity of fourteen *Eulophia* species traditionally known as amarkand. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *8*(9), 313–316. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i9.1280>.
- Neill, D., & Ulloa, C. (2011). *Adiciones a la Flora del Ecuador: Segundo Suplemento, 2005-2010* (Primera). Quito: Fundación Jatun Sacha.
- Nieto, V., & Viteri, J. (2015). *Evaluación de la toxicidad subaguda de los aceites esenciales de hierba luisa (Cymbopogon citratus) y cúrcuma (Curcuma longa) en barbus rosado (Puntius conchonius)*. (Tesis de pregrado), Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador
- Ojeda, J., & Gómez, Y. (2016). *Evaluación farmacológica del extracto de Calendula officinalis.*(Tesis de pregrado), Instituto Politécnico Nacional. México, México.
- Parada, L., Gualteros, A., & Sánchez, R. (2017). Caracterización fenotípica de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* como un modelo en enfermedades neurodegenerativas. *NOVA*, 69–78.

- Parveen, S., Ramesh, C. K., Mahmood, R., & Pallavi, M. (2018). Folklore medicinal orchids from south india: The potential source of antioxidants. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(6), 194–198. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i6.24726>
- Penduka, D., Mthembu, W., Cele, K. H., Mosa, R. A., Zobolo, A. M., & Opoku, A. R. (2018). Extracts of *Ansellia africana* and *Platycarpha glomerata* exhibit antibacterial activities against some respiratory tract, skin and soft tissue infections implicated bacteria. *South African Journal of Botany*, 116, 116–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.403>
- Ponpon, D., & Danrev, S. (2016). Phytochemical Analysis, Cytotoxicity and Antioxidant Capacity of Philippine Ground Orchid (*Spathoglottis plicata* Blume). *Kabacan University Journal, First*, 36–48.
- Qian, C.-D., Jiang, F.-S., Yu, H.-S., Shen, Y., Fu, Y.-H., Cheng, D.-Q., Ding, Z.-S. (2015). Antibacterial biphenanthrenes from the fibrous roots of *Bletilla striata*. *Journal of Natural Products*, 78(4), 939–943. <https://doi.org/10.1021/np501012n>
- Quazi, S. S., Chowdhury, A., & Misbahuddin, M. (2017). Brine shrimp lethality assay. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 186–189. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.32796>
- Quizhpe, A., Encalada, L., Andrade, D., Sacoto, A., & Muñoz, G. (2014). *Uso apropiado de Antibióticos y resistencia bacteriana. Gráficas del Austro* (Vol. 1).
- Renato, L. (2016). <https://www.orquideas.eco.br>. Morfologia: as flores das orquídeas. Recuperado de <https://www.orquideas.eco.br/morfologia-flores-orquideas/>
- Ricco, R. A., Agudelo, I., Garcés, M., Evelson, P., Wagner, M. L., & Gurni, A. A.

- (2011). Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 10(4), 325–332.
- Robustelli, F. S., Boselli, C., Papetti, A., Mannucci, B., Calevo, J., & Tava, A. (2018). Composition of Volatile Fraction from Inflorescences and Leaves of *Dendrobium moschatum* (Orchidaceae). *Natural Product Communications*, 13(1), 93-96.
<https://doi.org/10.1177/1934578X1801300127>
- Rodríguez, C., Zarate, A., & Sánchez, L. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *NOVA*, 126–127.
- Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). *Determinación de Metabolitos Secundarios de Plantas* (Primera). Machala, Ecuador. Editorial UTMACH.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. México D.F, México. Panamericana.
- Ruíz, C., Moreno, J., Salgado, M., & Olivera, A. (2016). *Orquídeas rescate por germinación in vitro* (Primero). Chiapas, México. Editorial UNACH.
- Rykaczewski, M., Krauze, M., Żuchowski, J., Krychowiak, M., Fikowicz, 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>
- Sánchez, E., Castillo, S., & García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En C. Rivas, M. Oranday, & M. Verde (Eds.), *Investigación en plantas de importancia médica*

(pp. 77–100). Cali, Colombia. OmniaScience.

Sánchez, L., & Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. *Cultura Científica*, 40–44.

Sánchez, V., & Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Medica Sur*, 20(3), 161–168.

Sarkar, N., Avasthi, A., & Ghosal, S. (2018). Bioactive fraction of *Tropidia curculioides*, a rare orchid of Arunachal Pradesh, India: Phytochemical profile and marker compounds. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(5), 155–161. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.24145>.

Savaris, C., Ghiraldi, D., Rovigatti, L., De Oliveira, S., Milaneze, M., Kischkel, B., Pomini, A. (2018). Phytochemical and biological studies of *Gomesa recurva* R. (Orchidaceae): Chemotaxonomic significance of the presence of phenanthrenoids. *Biochemical Systematics and Ecology*, 80(5), 11–13. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.05.008>.

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Primera). Bogotá, Colombia. Convenio Andrés Bello.

Shie, P., Huang, S., Deng, J., & Huang, G. (2015). *Spiranthes sinensis* suppresses production of pro-inflammatory mediators by down-regulating the NF- κ B signaling pathway and up-regulating HO-1/Nrf2 anti-oxidant protein. *American Journal of Chinese Medicine*, 43(5), 969–989. <https://doi.org/10.1142/S0192415X15500561>.

Silva, F., & Martínez, P. (2018). Complejo *Enterobacter cloacae*. *Revista Chilena de*

Infectología, 35(297–298).

- Singh, D., Sati, S., Chandra, S., Sati, M., Kumar, S., Kumar, A., Bhatt, U. (2016). Evaluation of Garhwal Himalaya medicinal plant *Eria alba*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 36(1), 173–175. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-4957539239&partnerID=40&md5=1cf575b517ee007c1bcb078640d57650>.
- Sinti, E., & Torres, F. (2017). Citotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart. sobre *Artemia franciscana*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú.
- Suárez, J., Eguiguren, J., & Herrera, P. (2016). Do mycorrhizal fungi drive speciation in *Teagueia* (*Orchidaceae*) in the upper Pastaza watershed of Ecuador *Symbiosis*, (69-75).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Jaen, España: Universitat Jaume.
- Tapia, W., & Armas, G. (2014). Estudio de la actividad antibacteriana y toxica del Kuiship. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 19(1), 12–20.
- Tejeda, O., Téllez, M., & Trejo, L. (2017). Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. Alternativa de aprovechamiento sustentable ex situ. *Agroproductividad*, 10, 37–45.
- The Plant List. (2019). The Plant List. *Orchidaceae*. Recuperado de <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/>
- Tomás, F., Ferreres, F., Ortiz, A., & Fernández, M. (1994). Estudio sobre el contenido en flavonoides de las mieles de La Alcarria. Madrid, España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

- Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T., & Fowler, V. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *CMR*, 604–605.
- Uddin, J., Rahman, M., & Sadik, G. (2015). *Vanda roxburghii*: an experimental evaluation of antinociceptive properties of a traditional epiphytic medicinal orchid in animal models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0833-y>
- Uddin, N., Afrin, R., Uddin, J., Uddin, J., Alam, A., & Aziz, A. (2015). *Vanda roxburghii* chloroform extract as a potential source of polyphenols with antioxidant and cholinesterase inhibitory activities: identification of a strong phenolic antioxidant. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0728-y>
- Vargas, L., & Victorino, A. (2015). *Caracterización morfológica y de las secuencias de aislamientos de hongos asociados a raíces de orquídeas en la región del sumapazs*. (Tesis de pregrado). Universidad de Cundinamarca. Cundinamarca, Colombia.
- Vélez, M., Campos, R., & Sánchez, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*, 17, 489–499.
- Veloz, J. (2018). Evaluación de la composición química y actividad biológica del aceite esencial proveniente de las hojas de *Piper barbatum* Kunth (cordoncillo). (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.
- Ventura, E., Menchaca, R., Toledo, T., & Kromer, T. (2018). Potencial de aprovechamiento de epífitas vasculares caídas en un bosque mesófilo de montaña

de los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89, 1263–1279.

Verde, M., González, S., & Rivas, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. *OmniaScience*, 1–40.

Yan, X., Tang, B., & Liu, M. (2018). Phenanthrenes from *Arundina graminifolia* and in vitro evaluation of their antibacterial and anti-haemolytic properties. *Natural Product Research*, 32(6), 707–710.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332606>

Zhang, Y., Wang, P., Song, X., Zuo, W., Wang, H., Chen, L., Dai, H. (2018). Chemical constituents from *Dendrobium hainanense*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/10286020.2018.1475476>

Anexos

Anexo 1. Factura de la compra de *H. burtii*, *H. meleagris*, *H. gustavi* y *H. wallisii*



Mundiflora

R.U.C.: 1900364660001

FACTURA

No. 001-001-000000286

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN
3005201901190036466000120010010000002861234567814

FECHA Y HORA DE AUTORIZACIÓN 30/05/2019 21:23:48.000

AMBIENTE: PRODUCCION

EMISIÓN: NORMAL

CLAVE DE ACCESO



3005201901190036466000120010010000002861234567814

ACARO TANDAZO EDGAR IVAN

MUNDIFLORA FAM

Dirección Matriz: GREGORIO MARAÑON Y GUTIERREZ DE SANTA CRUZ

Dirección Sucursal: GREGORIO MARAÑON Y GUTIERREZ DE SANTA CRUZ

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD NO

Razón Social / Nombres y Apellidos: MARCO CERNA

Identificación: 0501872071

Fecha Emisión: 30/05/2019

Guía Remisión:

Dirección RIO NAPO

Cod. Principal	Cod. Auxiliar	Cant	Descripción	Detalle Adicional	Detalle Adicional	Detalle Adicional	Precio Unitario	Subsidio	Precio Sin Subsidio	Descuento	Precio Total
033		1	GONGORA SCAPHEPHORUS				10,00	0,00	0,00	0	10,00
035		2	HUNTLEYA WALLISII				10,00	0,00	0,00	0	20,00
036		1	HUNTLEYA BURTII				10,00	0,00	0,00	0	10,00
037		3	HUNTLEYA CF GUSTAVII				10,00	0,00	0,00	0	30,00
038		2	CATASETUM MACROGLOSUM				10,00	0,00	0,00	0	20,00
039		2	HUNTLEYA MELEAGRIS				10,00	0,00	0,00	0	20,00
SUS001		1	PINO PICADO #3	SACO			10,00	0,00	0,00	0	10,00

Información Adicional

Dirección RIO NAPO

Email mcerna@ups.edu.ec

SUBTOTAL 12%	10,00
SUBTOTAL IVA 0%	110,00
SUBTOTAL NO OBJETO IVA	0,00
SUBTOTAL EXENTO IVA	0,00
SUBTOTAL SIN IMPUESTOS	120,00
DESCUENTO	0,00
ICE	0,00
IVA 12%	1,20
IRBPNR	0,00
PROPIÑA	0,00
VALOR TOTAL	121,20

Forma de Pago	Valor
SIN UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO	121,10

VALOR TOTAL SIN SUBSIDIO	0,00
AHORRO POR SUBSIDIO: (Incluye IVA cuando corresponda)	0,00

Anexo 2. Factura de la compra de *H. gustavi* y *H. wallisii*



R.U.C.: 1900364660001

FACTURA

No. 001-001-000000325

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN

0901202001190036466000120010010000003251234567812

FECHA Y HORA DE AUTORIZACIÓN 13/01/2020 10:13:46.000

AMBIENTE: PRODUCCION

EMISIÓN: NORMAL

CLAVE DE ACCESO



0901202001190036466000120010010000003251234567812

ACARO TANDAZO EDGAR IVAN

MUNDIFLORA FAM

Dirección Matriz: GREGORIO MARAÑÓN Y GUTIERREZ DE SANTA CRUZ

Dirección Sucursal: GREGORIO MARAÑÓN Y GUTIERREZ DE SANTA CRUZ

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD NO

Razón Social / Nombres y Apellidos: MARCO CERNA

Identificación: 0501872071

Fecha Emisión: 09/01/2020

Guía Remisión:

Dirección RIO NAPO

Cod. Principal	Cod. Auxiliar	Cant	Descripción	Detalle Adicional	Detalle Adicional	Detalle Adicional	Precio Unitario	Subsidio	Precio Sin Subsidio	Descuento	Precio Total
035		1	HUNTLEYA WALLISII				25.00	0.00	0.00	0	25.00
037		2	HUNTLEYA CF GUSTAVII				20.00	0.00	0.00	0	40.00

Información Adicional

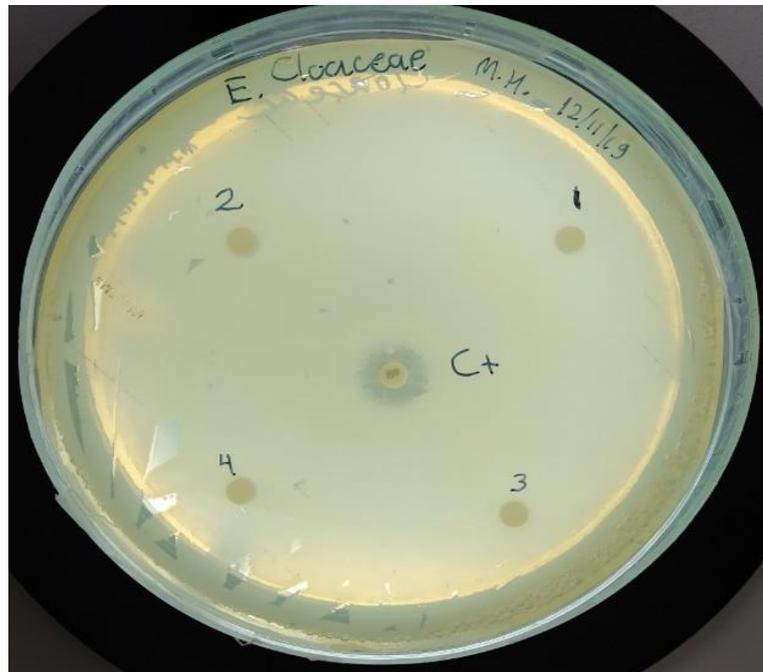
Dirección RIO NAPO
Email mcerna@ups.edu.ec

SUBTOTAL 12%	0.00
SUBTOTAL IVA 0%	65.00
SUBTOTAL NO OBJETO IVA	0.00
SUBTOTAL EXENTO IVA	0.00
SUBTOTAL SIN IMPUESTOS	65.00
DESCUENTO	0.00
ICE	0.00
IVA 12%	0.00
IRBPNR	0.00
PROPIÑA	0.00
VALOR TOTAL	65.00

Forma de Pago	Valor
OTROS CON UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO	65.00

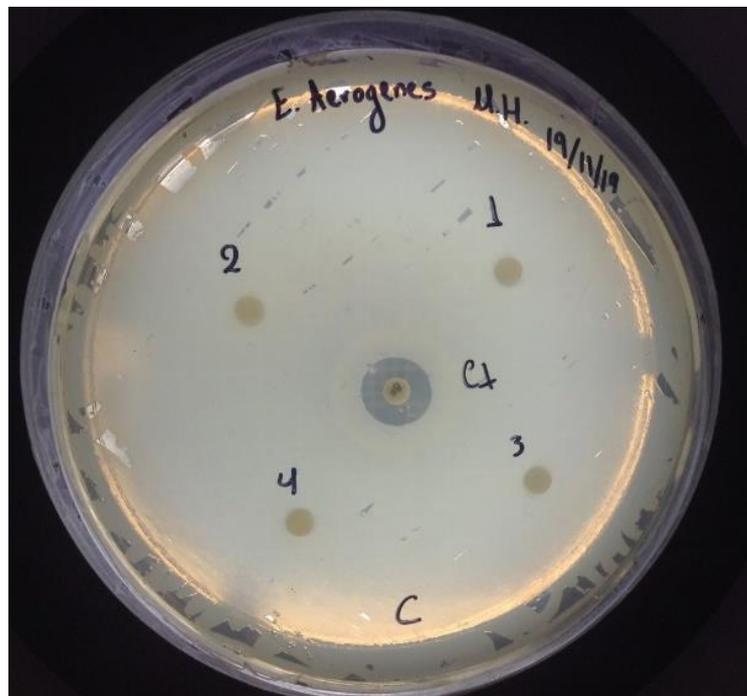
VALOR TOTAL SIN SUBSIDIO	0.00
AHORRO POR SUBSIDIO: (Incluye IVA cuando corresponda)	0.00

Anexo 3. Extractos frente a *E. cloacae*. 1: *H. burtii*, 2: *H. gustavi*, 3: *H. meleagris*, 4: *H. wallisii*, C+: Gentamicina



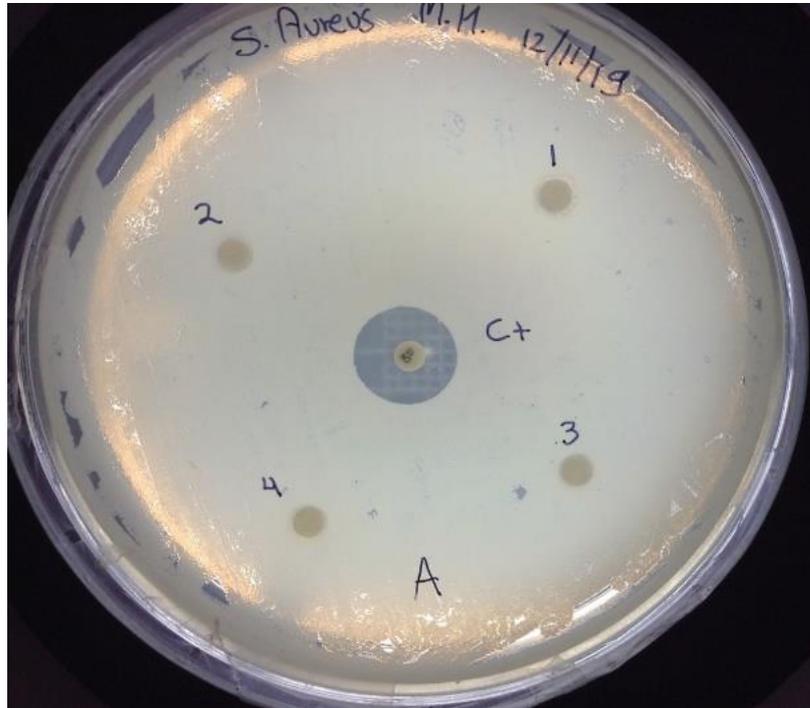
Fuente: Los autores, 2020

Anexo 4. Extractos frente a *E. aerogenes*. 1: *H. burtii*, 2: *H. gustavi*, 3: *H. meleagris*, 4: *H. wallisii*, C+: Gentamicina



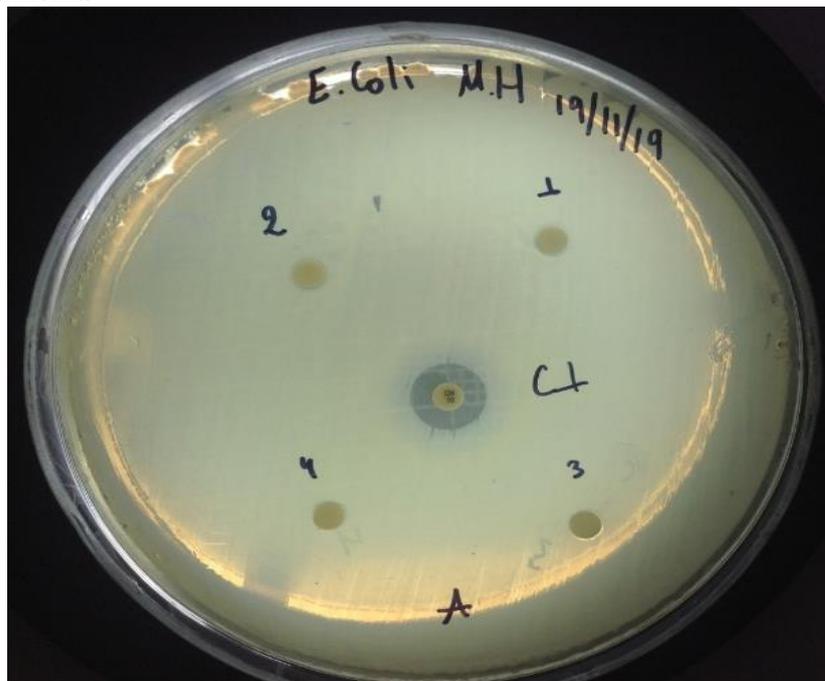
Fuente: Los autores, 2020

Anexo 5. . Extractos frente a *S. aureus*. 1: *H. burtii*, 2: *H. gustavi*, 3: *H. meleagris*, 4: *H. wallisii*, C+: Gentamicina



Fuente: Los autores, 2020

Anexo 6. Extractos frente a *E. coli*. 1: *H. burtii*, 2: *H. gustavi*, 3: *H. meleagris*, 4: *H. wallisii*,
C+: Gentamicina



Fuente: Los autores, 2020

Anexo 7. Datos utilizados para calcular IC50 con DPPH

Muestra	Concentración (µg/mL)	% inhibición	Ecuación concentración vs %inhibición	Cálculo IC50 (µg/mL)	IC50 (mg/mL)
Ácido ascórbico	0	0	$y = 11,7510x + 0,2530$	$(50-0,2530)/11,7510$	0,0042
	0,1667	2,1409			
	0,3333	5,2177			
	0,6667	9,5718			
	1,6667	15,2756			
	2,6667	33,9435			
<i>H. burttii</i>	0	0	$y = 0,0008x + 0,2264$	$(50-0,2264)/0,0008$	62,2170
	1727,4242	1,0644			
	3454,8485	1,6208			
	6909,6970	7,4612			
	17274,2424	14,0796			
	27638,7879	20,4927			
<i>H. gustavi</i>	0	0	$y = 0,0015x + 29,8470$	$(50-29,8470)/0,0015$	13,4353
	1952,0417	32,3182			
	3904,0833	50,3522			
	7808,1667	62,7880			
	19520,4167	65,3356			
	31232,6667	67,6818			
<i>H. meleagris</i>	0	0	$y = 0,0029x + 10,6720$	$(50-10,6720)/0,0029$	13,5614
	1751,2963	11,7999			
	3502,5926	28,3911			
	7005,1852	38,5101			
	17512,9630	66,3986			
	28020,7407	85,6034			
<i>H. wallisii</i>	0	0	$y = 0,0021x + 26,3700$	$(50-26,3700)/0,0021$	11,2524
	1696,6805	31,8373			
	3393,3611	44,3178			
	6786,7222	56,7503			
	16966,8056	68,1325			
	27146,8889	72,2429			

Fuente: Los autores, 2020

Anexo 8. Datos obtenidos del análisis de varianza y prueba de Tukey para actividad antioxidante con DPPH

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
IC50	16	0,98	0,98	12,74	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8778,17	3	2926,06	262,19	<0,0001
ESPECIE	8778,17	3	2926,06	262,19	<0,0001
Error	133,92	12	11,16		
Total	8912,10	15			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,01316
 Error: 11,1601 gl: 12

ESPECIE	Medias	n	E.E.	
H. burti	66,76	4	1,67	A
H. meleagris	13,59	4	1,67	B
H. gustavi	13,01	4	1,67	B
H. wallisii	11,50	4	1,67	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Fuente: Los autores, 2020

Anexo 9. Datos utilizados para calcular IC50 con ABTS

Muestra	Concentración (µg/mL)	% inhibición	Ecuación concentración vs %inhibición	Cálculo IC50 (µg/mL)	IC50 (mg/mL)
Ácido ascórbico	0	0	$y = 8,8078x + 3,7919$	$(50-3,7919)/8,8078$	0,0052
	0,1667	5,2502			
	0,3333	9,9214			
	0,6667	11,9870			
	1,6667	16,5095			
	2,6667	27,5263			
<i>H. burtii</i>	0	0	$y = 0,0033x + 5,0520$	$(50-5,0520)/0,0033$	13,6206
	1727,4242	11,6305			
	3454,8485	18,1912			
	6909,6970	31,1741			
	17274,2424	64,5984			
	27638,7879	95,4048			
<i>H. gustavi</i>	0	0	$y = 0,0039x + 41,8520$	$(50-41,8520)/0,0039$	2,0892
	1952,0417	43,6846			
	3904,0833	95,6659			
	7808,1667	99,2290			
	19520,4167	100			
<i>H. meleagris</i>	0	0	$y = 0,0034x + 21,1170$	$(50-21,1170)/0,0034$	8,4950
	1751,2963	18,1079			
	3502,5926	43,0093			
	7005,1852	63,5809			
	17512,9630	99,7390			
28020,7405	100				
<i>H. wallisii</i>	0	0	$y = 0,0048x + 34,3370$	$(50-34,3370)/0,0048$	3,2631
	1696,6806	38,3173			
	3393,3611	79,7444			
	6786,7222	91,0871			
	16966,8056	100			

Fuente: Los autores, 2020

Anexo 10. Datos obtenidos del análisis de varianza y prueba de Tukey para actividad antioxidante con ABTS.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
IC50	16	0,99	0,99	8,15	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	325,25	3	108,42	351,30	<0,0001
ESPECIE	325,25	3	108,42	351,30	<0,0001
Error	3,70	12	0,31		
Total	328,96	15			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,16625
 Error: 0,3086 gl: 12

ESPECIE	Medias	n	E.E.	
H. burtii	13,42	4	0,28	A
H. meleagris	8,49	4	0,28	B
H. wallisii	3,27	4	0,28	C
H. gustavi	2,09	4	0,28	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Fuente: Los autores, 2020

Anexo 11. Datos completos utilizados para cálculo de CL50

MUESTRA	Concentración (µg/mL)	REPETICION N 1		REPETICION N 2		REPETICION N 3		% MORTALIDAD			PROMEDIO % Mortalidad	LOG C	PROBIT	INTERCEPCIÓN	VARIABLE X1	X	CL50 (µg/mL)
		VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	repetición 1	repetición 2	repetición 3							
<i>H. burtii</i>	5	9	2	10	2	8	3	18,1800	16,6700	27,2700	20,7100	0,6989	4,1600	3,8880	0,5506	2,0206	104,8485
	10	7	4	8	2	6	4	36,3600	20	40	32,1200	1	4,5300				
	25	6	5	6	4	7	4	45,4500	40	36,3600	40,6100	1,3979	4,7500				
	50	6	5	6	4	6	5	45,4500	40	45,4500	43,6400	1,6989	4,8200				
	100	6	4	4	7	6	4	40	63,6400	40	47,8800	2	4,9200				
<i>H. gustavi</i>	5	12	0	9	2	12	1	0	18,1800	7,6900	8,6200	0,6989	3,5900	2,7932	1,1557	1,9095	81,1871
	10	9	1	9	1	9	2	10	10	18,1800	12,7300	1	3,8200				
	25	7	4	8	3	6	5	36,3600	27,2700	45,4500	36,3600	1,3979	4,6400				
	50	7	5	7	4	6	5	41,6700	36,3600	45,4500	41,1600	1,6989	4,7700				
	100	6	5	8	5	4	8	45,4500	38,4600	66,6700	50,1900	2	5				
<i>H. meleagris</i>	5	10	0	10	0	8	1	0	0	11,1100	3,7000	0,6989	3,2500	2,8347	0,5057	4,2821	19147,2547
	10	8	1	10	0	10	0	11,1100	0	0	3,7000	1	3,2500				

	25	10	0	9	1	9	1	0	10	10	6,6700	1,39 79	3,520 0				
	50	9	1	8	1	8	1	10	11,11 00	11,11 00	10,7400	1,69 89	3,770 0				
	100	9	1	9	1	10	2	10	10	16,67 00	12,2200	2	3,820 0				
<i>H. walli- sii</i>	5	8	2	10	0	9	1	20	0	10	10	0,69 90	3,720 0	3,3641	0,3634	4,50 17	31747, 8693
	10	9	1	9	1	9	1	10	10	10	10	1	3,720 0				
	25	9	1	8	1	9	1	10	11,11 00	10	10,3700	1,39 79	3,720 0				
	50	9	1	9	1	8	2	10	10	20	13,3300	1,69 90	3,870 0				
	100	8	2	7	3	8	2	20	30	20	23,3300	2	4,260 0				
ALCO -HOL	5	8	2	9	3	8	3	20	25	27,27 00	24,0900	0,69 89	4,290 0	1,3380	3,4299	1,06 76	11,685 0
	10	7	2	11	3	7	3	22,22 00	21,43 00	30	24,5500	1	4,330 0				
	25	4	6	3	5	5	5	60	62,50 00	50	57,5000	1,39 79	5,200 0				
	50	0	8	0	12	0	11	100	100	100	100	1,69 90	8,090 0				
	100	0	11	0	9	0	10	100	100	100	100	2	8,090 0				
AGUA	5	9	1	8	1	9	0	10	11,11 00	0	7,0400	0,69 90	3,520 0	2,8150	0,4804	4,54 82	35337, 3239
	10	8	1	10	0	10	0	11,11 00	0	0	3,7000	1	3,250 0				

	25	9	0	10	0	9	0	0	0	0	1	1,39 79	2,670 0				
	50	7	1	7	1	8	1	12,50 00	12,50 00	11,11 00	12,0400	1,69 90	3,820 0				
	100	10	0	9	1	5	4	0	10	44,44 00	18,1500	2	4,080 0				

Fuente: Los autores, 2020

Anexo 12. Tabla de transformación de porcentaje a Probit usada para determinación de CL50.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Fuente:(Miranda et al., 2018)