

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES.**

**TEMA:
“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICOS DE CINCO ESPECIES DE ORQUÍDEAS DE LOS GÉNEROS
Maxillaria, Catasetum y Epidendrum, PRESENTES EN EL ECUADOR”**

AUTORA:

LISBETH JUDITH MOLINA SANDOVAL

DIRECTOR:

MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito, agosto del 2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo Lisbeth Judith Molina Sandoval, con documento de identificación N° 0503830432, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación intitulado: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CINCO ESPECIES DE ORQUÍDEAS DE LOS GÉNEROS *Maxillaria*, *Catasetum* y *Epidendrum*, PRESENTES EN EL ECUADOR”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera 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 mi condición de autora reservo 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.



Lisbeth Judith Molina Sandoval

Cédula: 0503830432

Quito agosto del 2020

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CINCO ESPECIES DE ORQUÍDEAS DE LOS GÉNEROS *Maxillaria*, *Catasetum* y *Epidendrum*, PRESENTES EN EL ECUADOR” realizado por Lisbeth Judith Molina Sandoval, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, agosto del 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'MFC', with a long horizontal stroke extending to the right.

Marco Fernando Cerna Cevallos

0501872071

Dedicatoria

Primero a Dios por permitirme estar aquí y ahora, por brindarme salud, sabiduría, entendimiento y hacer que en muchas ocasiones la vida me sonría por sus bendiciones.

A mi familia, por estar siempre presente, especialmente a mi papito Luis Molina por ser el pilar de mi vida, mi ejemplo y fortaleza a mi hermana Tamara, por apoyarme y aconsejarme a mi madre que aunque esté ausente, sé que nos tiene presentes en su corazón, ustedes me dan la fuerza necesaria para continuar y las ganas de luchar y salir a delante.

A mi papito Pio Baschirotto por todo su apoyo incondicional, por escucharme, también por aconsejarme y sobre todo por ser el abuelo paterno que no tuve.

A mi licenciada Ana Rosa Vásquez, por todo su apoyo, consejos y ánimo para no rendirme durante todo mi proceso universitario y fuera de él.

A todos mis amigos, amigas y familiares quienes me han apoyado de una u otra forma.

A todos aquellos apasionados investigadores y conservacionistas que buscan el rescate del conocimiento ancestral, integrando la investigación en ese proceso que da forma a la farmacia viva, dónde las plantas en su estado natural constituyen nuestra medicina

del día a día.

Lisbeth.

Agradecimiento

A Dios por permitirme concluir esta etapa de mi vida.

A la Universidad Politécnica Salesiana por el financiamiento del Trabajo de Titulación a través del proyecto de investigación: “Estudio taxonómico, propiedades antibacteriales y anticancerígenas de especies seleccionadas de los géneros *Caucaea*, *Gongora*, *Bulbophyllum*, *Dichaea*, *Epidendrum*, *Huntleya*, *Maxillaria*, *Sobralia*, *Stelis* (Orchidaceae)” que se desarrolló en la UPS durante el período 2019, con el grupo Nunkui Wakan.

A mi tutor de tesis PhD. Marco Cerna, por permitirme conocer el maravilloso mundo de las orquídeas, también por su guía, apoyo y asesoría.

Al PhD. Paco Noriega, por compartirme sus conocimientos, por también guiarme y aconsejarme en el desarrollo de esta investigación.

A Priscilla Muriel, investigadora de la PUCE, Gabriel Sáenz, biólogo de la PUCE, por su apoyo, consejos, compartirme información valiosa y conectar en la idea de la farmacia viva despertando mi ánimo e interés en este campo de investigación.

Al investigador Luis Vaquero, por también compartirme sus conocimientos e información valiosa para desarrollar esta investigación.

A la Ing. Erika Paredes, Ing. Ely Yugsi, Ing. Byron Fuertes, por compartirme sus conocimientos y guía, pero sobre todo por brindarme su amistad y consejo.

A mis amigos y amigas: Lari Jaramillo, Bel Montaluisa, Adri Mogrovejo, Yaha Proaño, Martí Rojas, Andy Villarreal, Esteban Rojas, Francisco Hoyos, Danny Montoya, Viky Sánchez, Chris Quinchuela, Isra Vaca, Lili Tambaco, Tere Carbonell, Fulvio Cabrera, con quienes he compartido, conocimiento, proyectos, consejos, pero sobretodo esos momentos geniales de amistad que te animan a continuar y van abriendo nuevos caminos y oportunidades en la vida.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.....	3
Marco conceptual	3
1.1. Familia Orchidaceae	3
1.1.1. Generalidades.....	3
1.1.2. Importancia y usos de las orquídeas.....	3
1.1.3. Descripción de la familia Orchidaceae.....	4
1.1.4. Descripción taxonómica	8
1.1.5. Género <i>Maxillaria</i> Ruiz & Pav.	8
1.1.6. Género <i>Catasetum</i> Rich. ex Kunth.....	10
1.1.7. Género <i>Epidendrum</i> L.	11
1.1.8. Presencia de orquídeas en el Ecuador	12
1.1.9. Etnobotánica de las orquídeas.....	12
1.1.9.1. Orquídeas utilizadas en la medicina tradicional ecuatoriana	12
1.1.10. Estudios moleculares de las orquídeas	15
1.2. Fitoquímica de las orquídeas	15
1.2.1. Metabolitos secundarios	15
1.2.1.1. Fenoles.....	16
1.2.1.3. Flavonoides	17
1.2.1.4. Alcaloides	17
1.2.2. Métodos de extracción de metabolitos	18
1.2.2.1. Método de Maceración	18
1.2.3. Tipos de extractos botánicos.....	19
1.2.3.1. Extractos fluidos.....	19
1.2.4. Métodos de análisis químico de metabolitos.....	19
1.2.4.1. Tamizaje fitoquímico	19
1.2.4.2. Espectrofotometría UV-visible	19
1.3. Antioxidantes en orquídeas	19
1.3.2. Métodos de determinación de antioxidantes	20
1.3.2.1. Metodología DPPH	20
Capítulo 2.....	21
Marco metodológico	21
2.1. Valoración etnobotánica.....	21
2.1.1. Colección de material vegetal.....	21
2.1.2. Identificación botánica	23
2.1.2.1. Identificación morfológica.....	23

2.1.2.2. Identificación molecular	23
2.2. Estudio fitoquímico.....	26
2.2.1. Tratamiento del material vegetal	26
2.2.2. Obtención de los extractos	26
2.2.2. Tamizaje fitoquímico	27
2.2.2.1. Determinación de fenoles y taninos	27
2.2.2.2. Determinación de flavonoides	28
2.2.2.3. Determinación de alcaloides.....	28
2.2.3. Cuantificación espectrofotométrica de metabolitos.....	29
2.2.3.1. Cuantificación de fenoles totales	29
2.2.3.2. Cuantificación de flavonoides totales.....	32
2.3. Evaluación de la actividad antioxidante	35
2.3.1. Preparación de la solución de DPPH	35
2.3.2. Preparación de los estándares de <i>Ácido ascórbico</i> (vitamina C).....	35
2.3.3. Procedimiento para la evaluación de antioxidantes en estándares y extractos.....	36
2.3.3.1. Lectura de las soluciones	37
2.3.4. Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH	37
2.3.5. Determinación del IC50	37
2.3.6. Análisis estadístico de la actividad antioxidante frente al DPPH.....	37
Capítulo 3.....	38
Resultados y discusión.....	38
3.1. Identificación de Orquídeas de interés medicinal.....	38
3.1.1. Descripción botánica.....	39
3.1.2. Identificación molecular.....	45
3.1.3.1. Análisis bioinformático de las secuencias	46
3.2. Estudio fitoquímico.....	47
3.2.1. Obtención de extractos etanólicos	47
3.2.2. Tamizaje fitoquímico	47
3.2.3. Cuantificación de metabolito secundarios.....	49
3.2.3.1. Cuantificación de fenoles totales	49
3.2.3.2. Cuantificación de flavonoides totales.....	51
3.3. Determinación de la actividad antioxidante	53
3.3.1. Técnica de DPPH.....	53
3.3.2. Relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles y flavonoides	60
Conclusiones	63
Recomendaciones.....	64
Referencias.....	65
Anexos.....	82

Índice de tablas

Tabla 1. Protocolo para la Master Mix- Phire Plant Direct PCR.	25
Tabla 2. Diluciones preparadas a partir de la solución madre de Ácido gálico	30
Tabla 3. Curva de calibración del Ácido gálico para fenoles totales.	30
Tabla 4. Preparación de los extractos para lectura y determinación de fenoles totales.....	31
Tabla 5. Preparación de soluciones de Quercetina.....	33
Tabla 6. Lectura de estándares de Quercetina y obtención de la curva de calibración	33
Tabla 7. Preparación de los extractos para la lectura y determinación de flavonoides totales	34
Tabla 8. Diluciones a partir de la solución madre de Ácido ascórbico (vitamina C).....	36
Tabla 9. Preparación de estándares y extractos para evaluar la actividad antioxidante.	36
Tabla 10. Descripción botánica de <i>Maxillaria porrecta</i> , muestra 4236.....	40
Tabla 11. Descripción botánica de <i>Trigonidium insigne</i> , muestra 4237.	41
Tabla 12. Descripción botánica de <i>Maxillaria procurrens</i> , muestra 4237	42
Tabla 13. Descripción botánica de <i>Epidendrum quitensium</i> , muestra 4237.....	43
Tabla 14. Descripción botánica de <i>Catasetum macroglossum</i> , muestra 4237.....	44
Tabla 15. Tamizaje fitoquímico de fenoles, taninos, flavonoides y alcaloides en los extractos etanólicos.	48
Tabla 16. Cuantificación de fenoles totales.	50
Tabla 17. Cuantificación de flavonoides totales.	52
Tabla 18. Porcentajes de inhibición de DPPH y valores IC50 obtenidos para los extractos etanólicos.	54

Índice de figuras

Figura 1. Estructura floral de las orquídeas	5
Figura 2. Morfología del fruto de las orquídeas.....	6
Figura 3. Raíces de las orquídeas	6
Figura 4. Tipos de tallos de las orquídeas	7
Figura 5. Tipos de hojas de las orquídeas.....	7
Figura 6. Morfología y distribución de <i>Maxillaria</i>	9
Figura 7. Morfología y distribución de <i>Catassetum</i>	10
Figura 8. Morfología y distribución de <i>Epidendrum</i>	11
Figura 9. Reacción de reducción del DPPH	20
Figura 10. Cuantificación de fenoles totales.....	32
Figura 11. Cuantificaión de flavonoides totales.....	35
Figura 12. Gel electroforético de productos de PCR de la región <i>matK</i>	45
Figura 13. Gel electroforético de productos de PCR de la región <i>rpoCl</i>	46
Figura 14. Curva de calibración del Ácido gálico.....	50
Figura 15. Curva de calibración de Quercetina	52
Figura 16. Inhibición de DPPH del extracto de <i>Maxillaria porrecta</i>	55
Figura 17. Inhibición de DPPH del extracto de <i>Trigonidium insigne</i>	56
Figura 18. Inhibición de DPPH del extracto de <i>Maxillaria procurrens</i>	56
Figura 19. Inhibición de DPPH del extracto de <i>Epidendrum quitensium</i>	57
Figura 20. Inhibición de DPPH del extracto de <i>Catasetum macroglossum</i>	57
Figura 21. Valores de IC50 (mg/mL) de los extractos etanólicos	58
Figura 22. Regresión de los valores IC50 (mg/mL) con el contenido total de fenoles	60
Figura 23. Regresión de los valores IC50 (mg/mL) con el contenido total de flavonoides. ...	61

Índice de Anexos

Anexo 1. Uso de cinco especie de orquídeas en la medicina tradicional de Pichincha, Cotopaxi y Santo Domingo de los Tsachilas.	82
Anexo 2. Entrevistas personales a hierberos, curanderos y sobadores sobre el uso de orquídeas medicinales.....	83
Anexo 3. Procesamiento de muestras para herbario, elaboración de vouchers de orquídeas	84
Anexo 4. Comparación de las secuencia 4236- <i>matK</i> en la bases de datos BLAST –Genbank	86
Anexo 5. Comparación de la secuencia 4237- <i>matK</i> en la bases de datos BLAST -Genbank..	88
Anexo 6. Comparación de las secuencia 4101- <i>matK</i> en la bases de datos BLAST –Genbank.	90
Anexo 7. Comparación de las secuencia 4101- <i>rpoCl</i> en la bases de datos BLAST –Genbank	92
Anexo 8. <i>Maxillaria porrecta</i> , especie de mayor similitud con 4236, evaluación de la región <i>matK</i>	93
Anexo 9. <i>Trigonidium insigne</i> , especie de mayor similitud con 4237, evaluación de la región <i>matK</i>	94
Anexo 10. <i>Maxilaria procurrens</i> , especie de mayor similitud con 4101, evaluación de la región <i>matK</i> y <i>rpoCl</i>	95
Anexo 11. Tamizaje fitoquímico, observación de los ensayos colorimétricos.....	96
Anexo 12. Análisis estadístico de los porcentajes de inhibición de DPPH.	98
Anexo 13. Determinación de los valores de IC50 del Ácido ascórbico y los extractos.....	99
Anexo 14. Análisis estadístico de la actividad antioxidante de DPPH-valores IC50.	100

Resumen

En este estudio se realizó una bioprospección de los principales componentes bioactivos presentes en los extractos etanólicos de cinco especies de orquídeas, seleccionadas por su utilidad en la medicina tradicional y que podrían tener un potencial uso fitofarmacéutico. Las orquídeas seleccionadas fueron identificadas morfológica y molecularmente. Luego se desarrolló el estudio fitoquímico enfocado en la identificación de compuestos bioactivos, para esto se trabajó con extractos etanólicos, obtenidos por el método de maceración, con los cuales se determinó el perfil fitoquímico preliminar. Posteriormente se procedió a cuantificar los metabolitos mayoritariamente presentes por espectrofotometría cuantitativa UV-visible. Seguidamente se evaluó la capacidad antioxidante de cada extracto por el método DPPH.

Las especies identificadas en la medicina tradicional, fueron: *Maxillaria porrecta*, *Maxillaria procurrens*, *Trigonidium insigne*, *Epidendrum quintensium* y *Catasetum macroglossum*, en los extractos etanólicos de estas especies, se evidenció una presencia mayoritaria de fenoles y flavonoides; lo que está relacionado con los datos de su actividad antioxidante demostrada con la técnica de DPPH, en la cual *Maxillaria porrecta* (IC₅₀ de 0,16 mg/mL) *Trigonidium insigne* (IC₅₀ de 0,17 mg/mL) y *Maxillaria procurrens* (IC₅₀ de 0,55) mg/mL, demostraron tener la mayor actividad. Este estudio constituye uno de los pocos reportes sobre la fitoquímica de orquídeas de interés medicinal del Ecuador. Los resultados encontrados en esta investigación sugieren que aquellas especies con elevada actividad antioxidante, podrían tener un potencial uso fitofarmacéutico.

Palabras clave: *orquídeas, uso medicinal, fenoles, flavonoides, actividad antioxidante.*

Abstract

In this study, a bioprospecting of the main bioactive components present in the ethanolic extracts of five species of orchids was carried out, selected for their usefulness in traditional medicine and they could have a potential phytopharmaceutical use. The selected orchids were morphologically and molecularly identified. Then the phytochemical study focused on the identification of bioactive compounds was developed, for this we worked with ethanolic extracts, obtained by the maceration method, with which the preliminary phytochemical profile was determined. Subsequently, we proceeded to quantify the mainly present metabolites by Ultraviolet-Visible Spectroscopy. The antioxidant capacity of each extract was evaluated by DPPH method.

The species identified in traditional medicine were: *Maxillaria porrecta*, *Maxillaria procurrens*, *Trigonidium insigne*, *Epidendrum quintensium* and *Catasetum macroglossum*, in the ethanolic extracts of these species, a majority presence of phenols and flavonoids was evidenced; which is related to the data of its antioxidant activity demonstrated with the DPPH technique, trough wich *Maxillari porrecta* (IC50 of 0,16 mg/mL) *Trigonidium insigne* (IC50 of 0,17 mg/mL) and *Maxillaria procurrens* (IC50 of 0,55) mg/mL, showed to have the highest activity. This study constitutes one of the few reports on the phytochemistry of orchids of medicinal interest in Ecuador. The results found suggest that those species with high antioxidant activity could have a potential phytopharmaceutical use.

Key words: *orchids, medicinal use, phenols, flavonoids, antioxidant activity.*

Introducción

Las orquídeas han sido predominantemente utilizadas por sus cualidades ornamentales de acuerdo con Dalar, Guo, Esim, Sukru y Konczak (2015); sin embargo, merecen especial mención por su importancia medicinal (Paromik, Suman, Nikhil, & Pramod, 2015). Debido a que acumulan fitoquímicos diversos como fenoles, flavonoides, glucósidos, derivados de bencilo, fenantrenos, terpenoides, responsables de su actividad farmacológica (Hossain, 2011).

En este sentido algunas especies utilizadas actúan bien como agentes antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, etc (Sharma, *et al.* 2014). Se ha reportado la presencia de antioxidantes en orquídeas del género *Epidendrum* (Cerna, Mencias, Salazar, y Gutiérrez, 2018). Así también se resalta la presencia de metabolitos con actividad antiinflamatoria en *Catasetum* (Ramos, Colareda, Rosella y Debenedetti, 2012). Al igual que la importancia farmacológica de estilbenos con potencial espasmolítico y antiinflamatorio en *Maxillaria* (Estrada, López, Molina, & Mata, 2004). Con base en estos estudios previos, el presente trabajo, busca contribuir a la bioprospección de los principales componentes bioactivos que pudieran estar presentes en orquídeas de los géneros *Maxillaria*, *Catasetum* y *Epidendrum*, seleccionadas por su utilidad en la medicina tradicional del Ecuador, ya que algunas especies de estos géneros han sido empleadas, en el tratamiento de afecciones nerviosas (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, y Balslev, 2008), fracturas óseas (Ramos, Crivos, Colares, Spegazzini, y Rosella, 2011) o como relajantes musculares (Kinghorn *et al.*, 2019).

De acuerdo con Dalar y otros (2015), el estudio sobre las propiedades fitoquímicas de las orquídeas es limitado, a pesar de conocerse la importancia medicinal de muchas especies que se han descrito en farmacopeas tradicionales alrededor del mundo. En Ecuador se conoce un número grande de plantas de la familia Orchidaceae, utilizadas en la medicina

tradicional que aún no cuentan con una descripción química (Tene, Malagón, Finzi, Vidari, Armijos & Zaragoza, 2007; De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, y Balslev, 2008; Ramos, Crivos, Colares, Spegazzini, & Rosella, 2011).

Por lo anteriormente expuesto, en el presente estudio se pretende identificar especies de orquídeas utilizadas en la medicina tradicional, incluyendo una descripción botánica y molecular, detectar la presencia de compuestos bioactivos mediante ensayos cualitativos y cuantitativos, finalmente evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de las especies encontradas. Se resalta la importancia de esta investigación ya que la evaluación del perfil fitoquímico de las orquídeas aquí estudiadas, constituye el punto de partida, para evidenciar su potencial fitofarmacéutico y ampliar la descripción química de estas y otras especies de orquídeas utilizadas en la medicina tradicional ecuatoriana.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1.Familia Orchidaceae

1.1.1. Generalidades

Orchidaceae es la segunda familia más grande y diversa de plantas con flor (Chase *et al.*, 2015). En la actualidad se conoce que alrededor de 29199 especies publicadas han sido aceptadas a nivel mundial (Govaerts *et al.*, 2017). Las orquídeas se distribuyen en todas las regiones del mundo, con excepción de la Antártida y los desiertos cálidos, su mayor diversidad se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales (Hossain, 2011).

1.1.2. Importancia y usos de las orquídeas

Además de su diversidad geográfica y taxonómica, las orquídeas son ampliamente cultivadas y comercializadas para una variedad de propósitos, destacándose su uso ornamental, medicinal y alimenticio (Hinsley *et al.*, 2018).

Han sido principalmente valoradas por sus fascinantes flores que exhiben una gran diversidad de formas, tamaños, colores, fragancias y texturas, actualmente las orquídeas representan una parte significativa del comercio mundial de flores, con ventas anuales de más de \$ 4 mil millones a los Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2018). Taiwán y Tailandia son reconocidos como los mayores exportadores (UNEP-WCMC, 2017).

Entre otros usos extendidos de las orquídeas se incluye la medicina tradicional; así por ejemplo se resalta el uso de especies del género *Dendrobium* y *Eulophia* en la medicina Ayurvedica China al igual que del sur de Asia, para la preparación de tónicos medicinales (Teoh, 2016). En Europa se reconocen especies de los géneros *Ophrys*, *Epipactis* para el tratamiento de la gastritis, en América, las especies del género *Vanilla*, se utilizan en el tratamiento de la fiebre y el reumatismo (Hossain, 2011). Al igual que en África se la

utiliza para tratar la astenia (Randriamiharisoa *et al.*, 2015). En Australia especies de *Cymbidium* y *Dendrobium* se emplean en el tratamiento de la disentería y la diabetes (Pant, 2013).

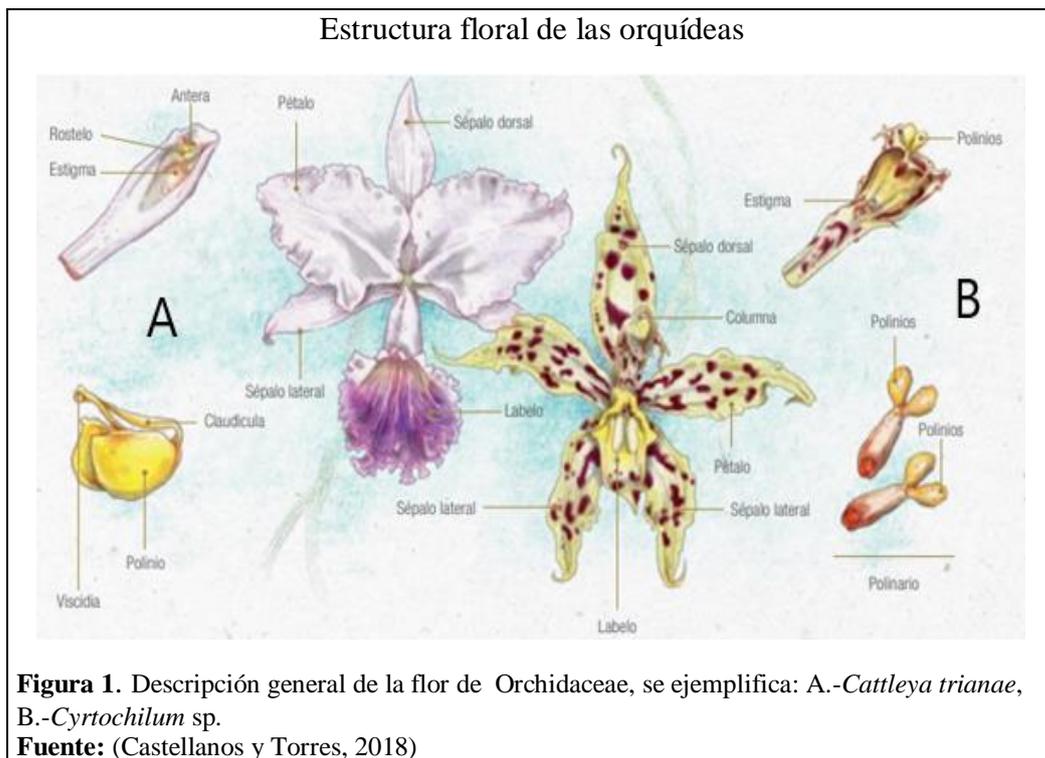
En el ámbito alimenticio, es bastante conocido el “*Salep*” una preparación comercial en la que se utilizan tubérculos de varias especies de orquídeas, que contienen un polisacárido nutritivo similar al almidón llamado glucomamano, Turkía es el principal exportador (Hossain, 2011; Pant, 2013). Las vainas secas de *Vanilla* se han comercializado durante mucho tiempo como materia prima para obtener el saborizante artificial de vainilla (Lubinsky, Bory, Hernández, Kim, & Gómez, 2008). En varios países de África se utilizan los tubérculos de orquídeas terrestres en la producción del “*Chikanda*” un plato tradicional cuya estructura es similar a la carne, preparado con orquídeas molidas, maní horneado y bicarbonato de sodio (Hinsley *et al.*, 2018).

1.1.3. Descripción de la familia Orchidaceae

Forma de vida de las orquídeas.- de acuerdo a lo referido por Miceli, Borraz, Córdoba y Gutiérrez (2014), las orquídeas pueden vivir como plantas: epífitas (sobre árboles o arbustos, por ejemplo las de los géneros: *Catleya*, *Oncidium*), hemiepífitas (crecen sobre el suelo pero trepan a los árboles, por ejemplo las orquídeas del género *Vanilla*), saprófitas (sobre materia en descomposición, por ejemplo: *Degranvillea dermáptera*), litófitas o rupícolas (sobre las rocas, por ejemplo las de los géneros: *Paphiopedilum* y *Cymbidium*), terrestres (sobre el humus o la materia orgánica del suelo a nivel de sotobosque, por ejemplo las de los géneros: *Phaius* o *Arundina*.

Flores.- son bilateralmente simétricas, tienen un verticilio externo con tres sépalos y un interno con tres pétalos, por lo general el pétalo mediano (labelo) es más colorido u ornamentado, la columna se constituye de la fusión entre el androceo y el gineceo, una

gran parte de las flores tienen una sola antera fértil, el polen suele aglutinarse unidades discretas llamadas polinias que varían en cuanto al color, número, formato y textura conforme al grupo taxonómico de orquídeas, en el gineceo se encuentran tres lóbulos estigmáticos, el del medio no es receptivo, se llama rostelo, secreta una sustancia pegajosa que adhiere las polinias al polinizador, ayudando en el proceso de polinización (Singer, 2009).



Fruto.- Su estructura capsular se divide en tres secciones, suelen ser largos, redondos, ovalados, su cubierta es una cáscara formada de células muertas, en su interior se encuentran miles de semillas procedentes de un solo cotiledón, por lo que se denominan monocotiledóneas (Castellanos y Torres, 2018).

Morfología del fruto de las orquídeas



Figura 2. Características morfológicas de los frutos de las orquídeas: 4A, B *Stanhopea*; 4C *Lycaste*; 4D *Prescottia*; 4E, F *Dichaea*; 4G *Sobralia*; 4H *Prosthechea*.

Fuente: (Cetzal, Noguera, & Basu, 2014)

Raíces.- Son tuberosas, carnosas, pero nunca leñosas, cuentan con un velamen consistente en células muertas que cubre toda la raíz a excepción de la punta, funciona en la absorción rápida de humedad y nutrientes de la atmósfera (Zotz & Winkler, 2013). Debido a que son monocotiledóneas las orquídeas nunca presentan una raíz principal, más bien sus sistema se compone de raíces secundarias que parten del tallo (Fernández y otros, 2018).

Raíces de las orquídeas

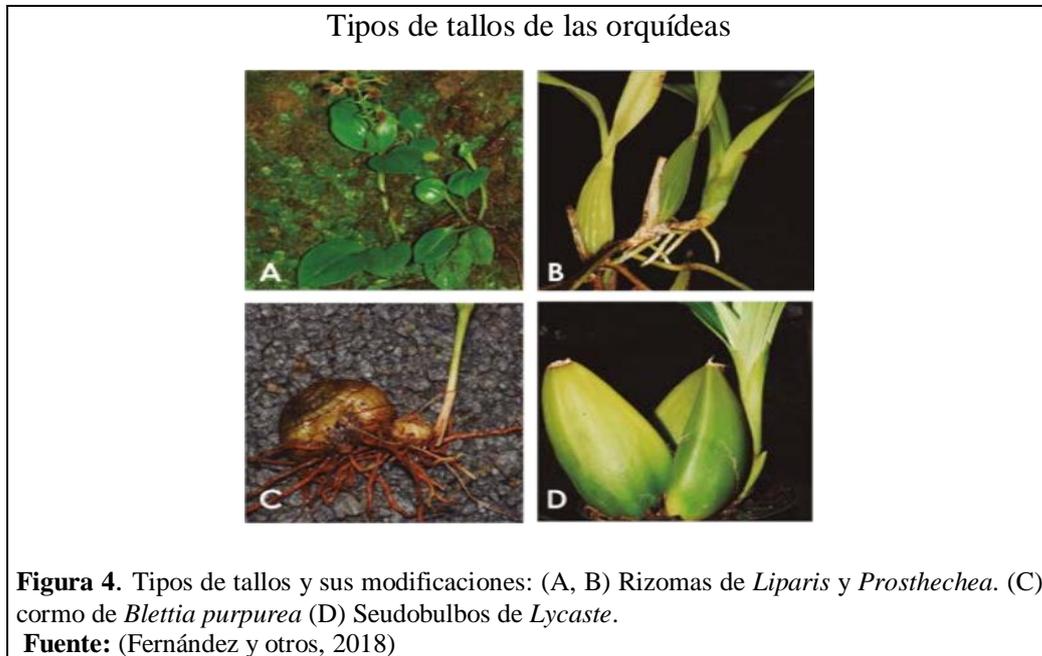


Figura 3. Raíces de orquídeas epífitas: (A) *Prosthechea* sp. Raíces de orquídeas terrestres: (B) *Habenaria amalfitana*.

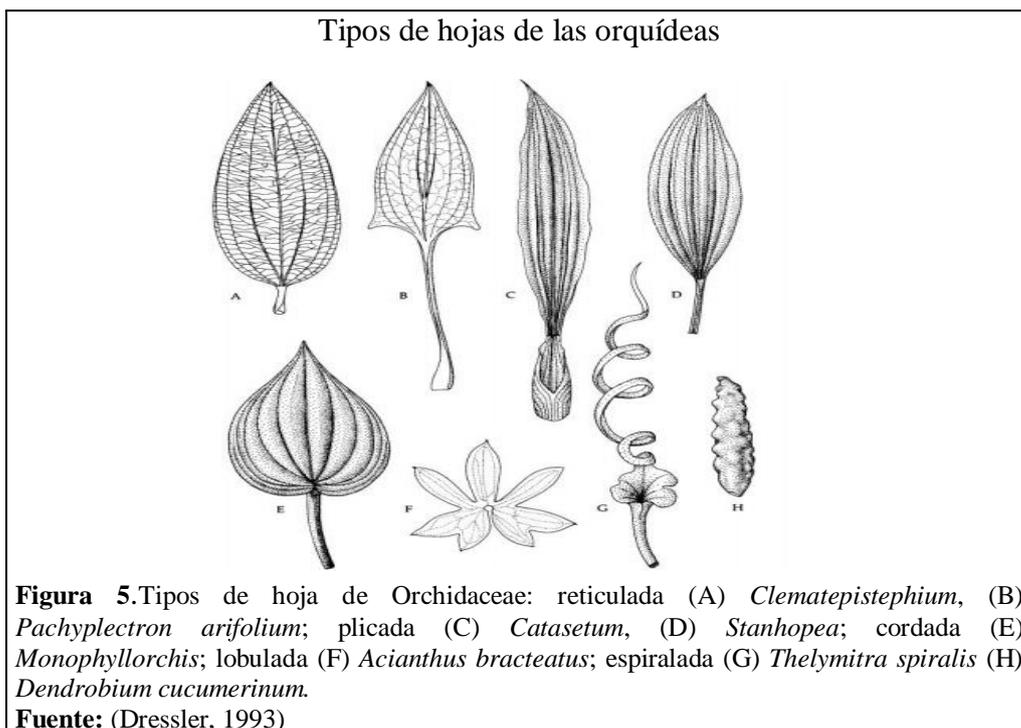
Fuente: (Díaz, 2013; Fernández y otros, 2018)

Tallos.- Pueden ser rizomas, observados como tallos horizontales que crecen dentro o fuera del sustrato, en algunas especies es corto, en tanto que en otras suele ser muy evidente, alargado y de consistencia semileñosa; cormos: son tallos engrosados que sirven como

órganos de reserva, en muchos casos son el alimento para los nuevos brotes; seudobulbos: son tallos engrosados aéreos que poseen clorofila e intervienen activamente en el proceso de la fotosíntesis (Fernández y otros, 2018).



Hojas.- las orquídeas generalmente tienen hojas simples con venas paralelas, aunque algunas especies, muestran una venación reticulada (Zhang *et al.*, 2018).



1.1.4. Descripción taxonómica

El sistema de clasificación de plantas con flores (APG, 2016) establece la siguiente clasificación para Orchidaceae:

Clase: Equisetopsida (embriofitas)

Subclase: Magnoliidae (angiospermas)

Superorden: Lilianae (monocotiledóneas)

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

De acuerdo a Chase y otros (2015); Fernández y otros, (2018), la familia Orchidaceae constituye un grupo natural, conformado por cinco subfamilias principales: Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Orchidoideae, Epidendroideae.

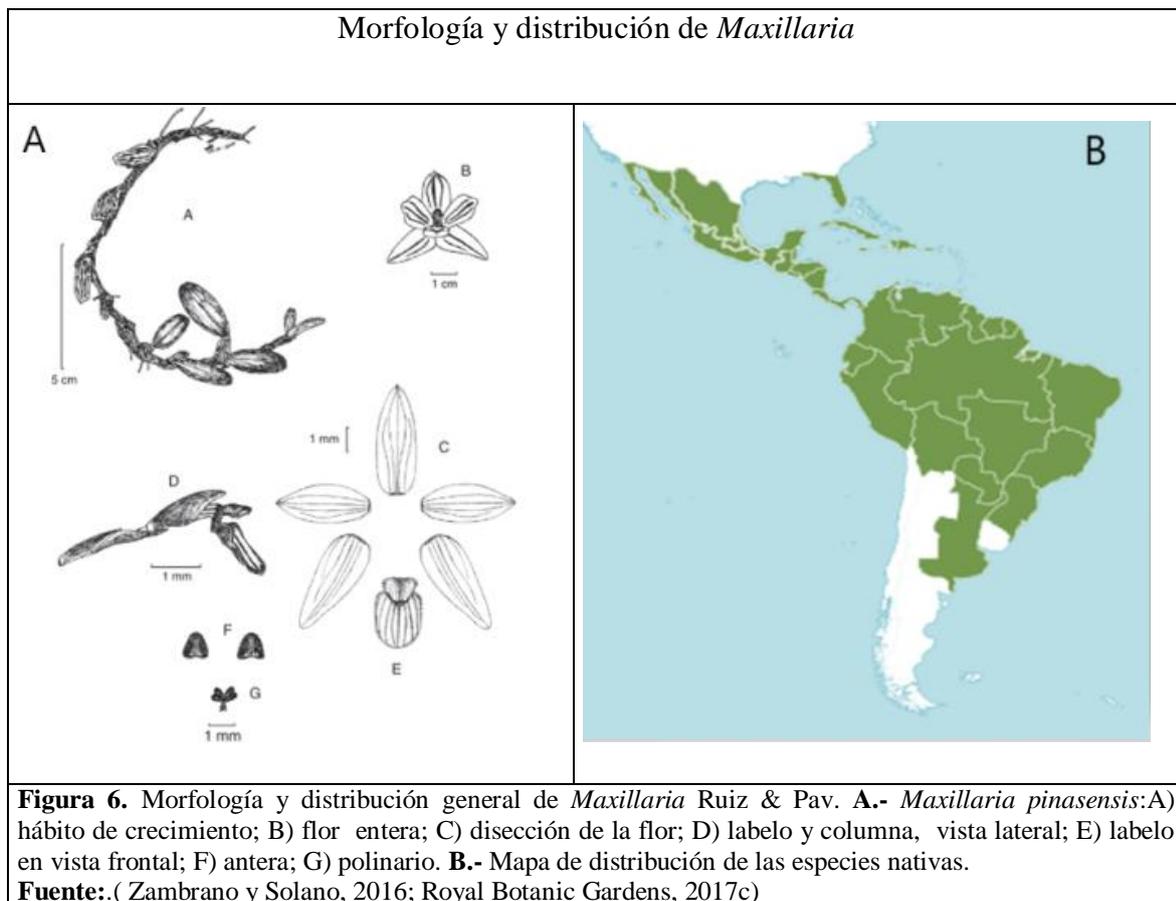
Conforme a la información proporcionada por Christenhusz y Byng (2016), se estima la presencia de 736 géneros para la familia Orchidaceae. En el presente estudio, describimos y destacamos la importancia de los géneros: *Maxillaria*, *Epidendrum* y *Catasetum*, por sus características de abundancia y gran diversidad en el Ecuador (Fernández y otros, 2018).

1.1.5. Género *Maxillaria* Ruiz & Pav.

La mayoría de especies de este género crecen en bosques húmedos como plantas epífitas o litófitas, se distribuyen de forma nativa en América tropical y subtropical (Lipińska & Kowalkowska, 2018). Se ha reconocido como un género fuertemente polifilético, que integra a géneros menores como por ejemplo *Trigonidium* (Whitten *et al.*, 2007), el cual es considerado de importancia para este estudio.

En Ecuador se reconocen alrededor de 200 especies, de un total aproximado de 650 reportadas para este género, por lo que se encuentra entre los géneros mayormente expandidos del país (Dodson, 2003; Fernández y otros, 2018).

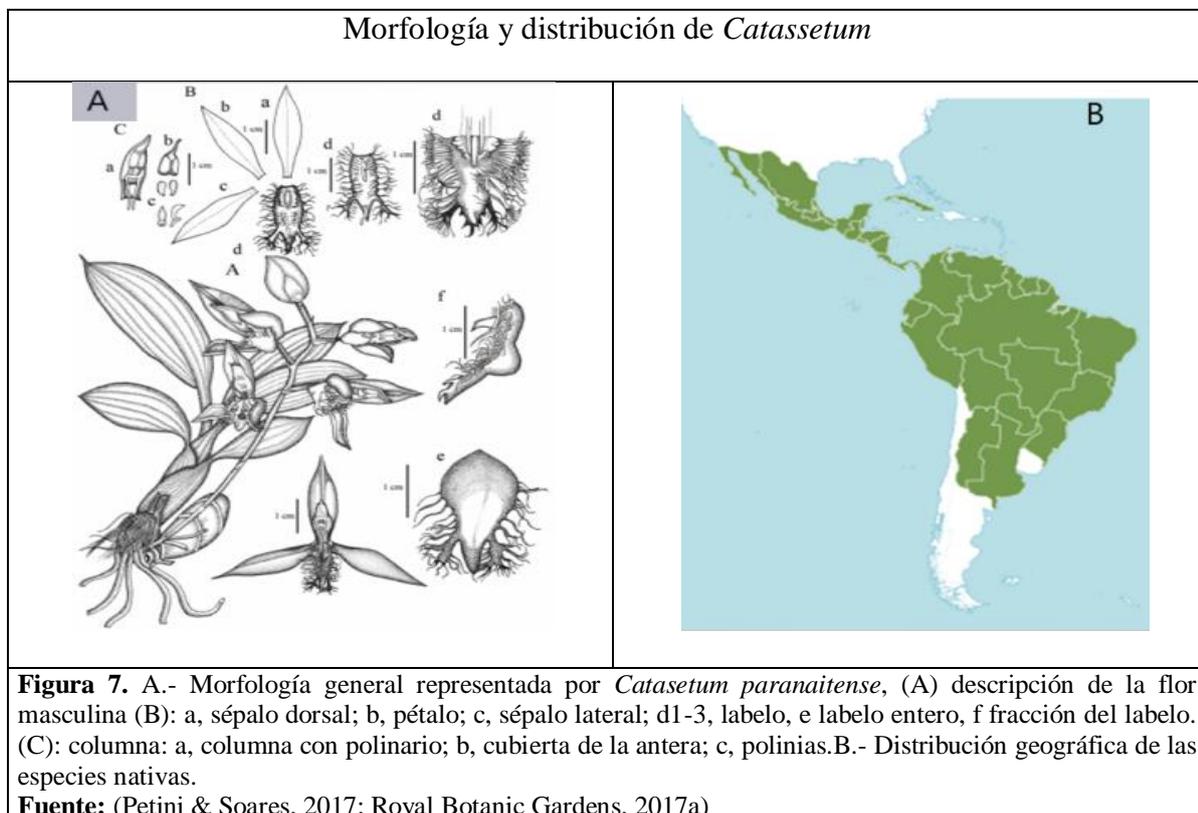
Características morfológicas.- presentan hojas sésiles, oblongas o elípticas, caracterizadas porque la capa de abscisión de la hoja apical a menudo se proyecta por encima del pseudobulbo en un tallo persistente denominado filopodio o “pie de la hoja”, los frutos son subglobosos o elipsoides, dehiscentes lateral o apicalmente(Whitten & Blanco, 2011). Las flores son diminutas o grandes, con sépalos y pétalos libres en la base, estos perduran por un largo tiempo y pueden estar constituidos de una capa fibrosa (Chase *et al.*, 2015). Las brácteas florales son similares en tamaño y forma a las escamas del pedúnculo, las haces vasculares de los tépalos son a menudo elásticos, fibrosos y muy fuertes, el labio suele ser mucho más corto que los tépalos, a menudo articulado con el pie de la columna o a veces rígidamente unido a él, las flores también presentan cuatro polinias, unidas a través de caudículas adhesivas a un viscidio de tipo semilunar (Lipińska & Kowalkowska, 2018).



1.1.6. Género *Catasetum* Rich. ex Kunth

El género comprende alrededor de 176 especies de orquídeas epífitas que crecen en algunas islas Caribeñas, en América Central y en la región tropical de América del Sur (Ramos, Colareda & Rosella, 2012; Chase *et al.*, 2015) En el Ecuador se han registrado 12 especies de las cuales tres son endémicas y crecen a ambos lados de la cordillera en alturas comprendidas entre los 0 a 1000 msnm (Fernández y otros, 2018).

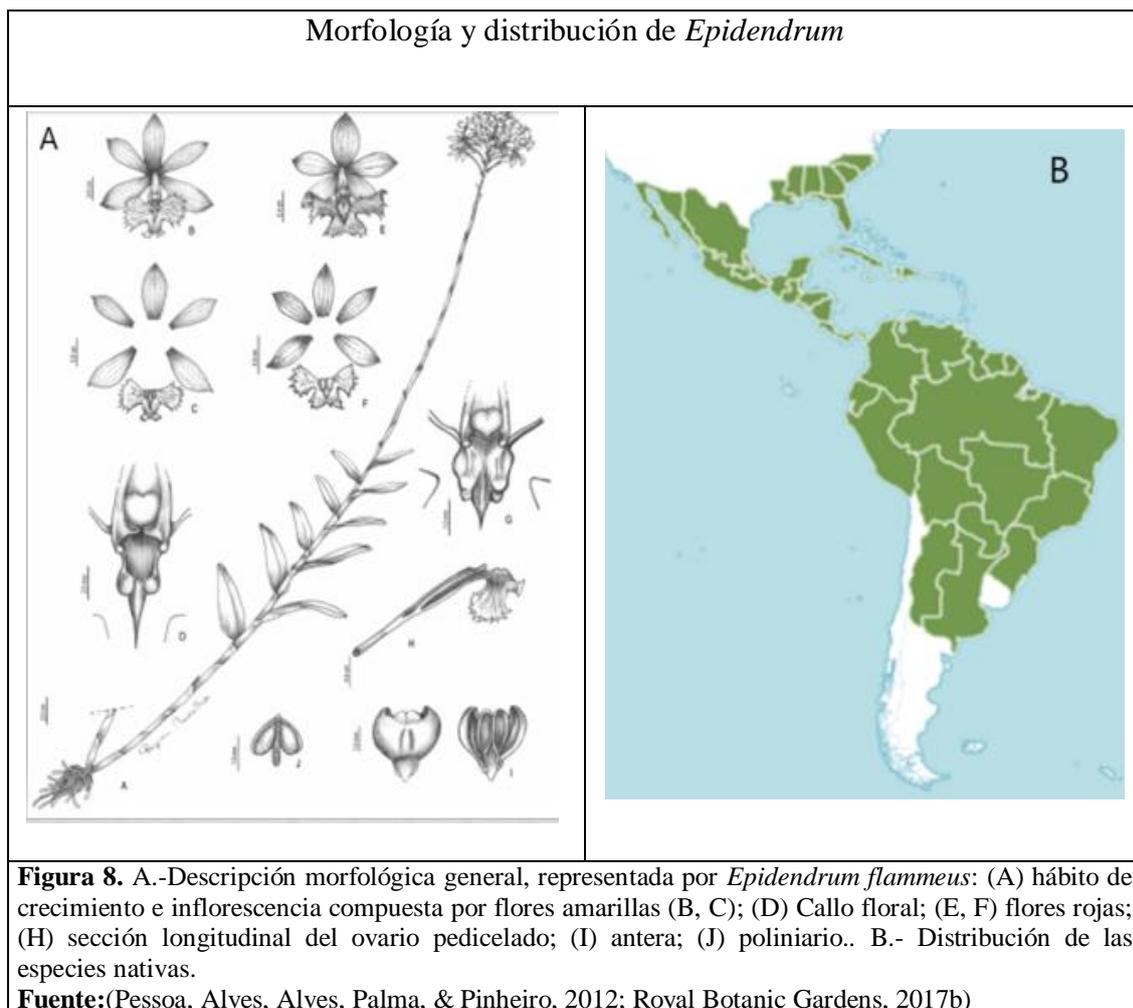
Características morfológicas.- Se caracteriza por la presencia de seudobulbos grandes, alargados, fusiformes, elipsoides, ovados o subcónicos en algunos casos, las hojas son plicadas, cuando se caen dejan una especie de espina, presentan una inflorescencia axial, sus flores son carnosas de colores blanco-verdosas, amarillentas o ligeramente violáceas, presentan dimorfismo sexual, algunas de ellas no cumplen ninguna función y las masculinas permiten establecer diferencias interespecíficas, por la presencia de antenas que parecen cerdas (Bonilla, Aguirre, Yepes, Gallego y Otero, 2016).



1.1.7. Género *Epidendrum* L.

Es un género de unas 1.000 especies de orquídeas epífitas, Ecuador alberga unas 150 especies, que se distribuyen en alturas menores a los 3500 msnm, pueden encontrarse en la mayoría de ecosistemas, su hábito de crecimiento se desarrolla principalmente en los valles interandinos o bosques nublados y húmedos (Cerna, Cárdenas, Cruz, y Jácome, 2012).

Características morfológicas.- Los tallos alcanzan los 2 metros de altura, son alargados tipo caña, carecen de pseudobulbos, sus hojas son carnosas y alargadas, presentan una inflorescencia con flores en forma de estrella en las cuales, el labelo unido con la columna forma un nectario interno (Leon, 2014).



1.1.8. Presencia de orquídeas en el Ecuador

De acuerdo a la información proporcionada por Pérez y otros (2020): Orchidaceae es la familia de plantas más diversa del Ecuador ya que cuenta con cerca de 4500 especies reportadas. Endara y otros, (2011) señalan que alrededor de 1707 especies son endémicas.

Las orquídeas del Ecuador representan el 18 % de las especies conocidas a nivel mundial, en el país se distribuyen entre los 0 y 4500 msnm, las especies nativas se encuentran entre los 1500 – 3000 msnm, principalmente en los bosques montano bajos como en los bosques de neblina montanos; esta gran diversidad de orquídeas se ve favorecida por la variada presencia de microclimas y ecosistemas, además de la ubicación geográfica del país (Endara, Williams, & Hall, 2009; Ministerio del Ambiente, 2015).

1.1.9. Etnobotánica de las orquídeas

Alrededor del mundo las orquídeas se emplean para tratar una serie de enfermedades (González, 2009). Hossain (2011), resalta la importancia de registrar el conocimiento tradicional y de continuar con la investigación fitoquímica de estas plantas de gran interés.

1.1.9.1. Orquídeas utilizadas en la medicina tradicional ecuatoriana

En la medicina tradicional ecuatoriana se reportan estudios etnobotánicos sobre orquídeas medicinales, cuyo conocimiento se distribuye mayoritariamente entre los grupos indígenas del país (Lalama, Montes, y Zaldumbide, 2016).

De la Torre y otros (2008), describen la mayor cantidad de especies reportadas en la medicina tradicional Ecuatoriana: *Aa maderoi*, la raíz sirve para tratar afecciones posparto; *Altensteinia*, se utiliza la planta entera para tratar el empacho y la recaída; *Campylocentrum*, se utilizan en el tratamiento de úlceras de la piel; *Cranichis*, toda la planta se utiliza como vendaje para tratar zona inflamadas, las hojas sirven para trata la mordedura de la serpiente conocida como “guacamayo” (*Bothriechis schlegelii*);

Cyclopogon epiphyticus, la planta entera sirve para tratar mordedura de serpientes; *Cyrtochilum longipes*, se emplea la infusión de la planta para tratar el reumatismo; *Dichaea laxa*, la infusión de todas sus partes se utiliza para tratar afecciones respiratorias y la picadura del milpiés; *Dichaea muricata*, la planta entera sirve para tratar infecciones en los ojos; *Elleanthus amethystinoide*, la infusión de la planta y la flor sirven para tratar afecciones nerviosas; *Epidendrum bracteolatum*, la planta entera sirve para tratar el acné, resfríos, heridas y la hinchazón; *Epidendrum compressum*, las hojas sirven para el enrojecimiento de los ojos; *Epidendrum densifolium*, el extracto de las hojas sirve para tratar el rostro lavándolo, promueve el crecimiento del cabello; *Epidendrum difforme*, sus hojas y flores permiten tratar la diabetes y el dolor de muelas; *Epidendrum excisum*, con el zumo de la planta se tratan dolores intensos provocados por caídas, la planta fresca en combinación con otras sirve para tratar afecciones renales; *Epidendrum frigidum*, la infusión de la planta permite tratar la presión baja; *Epidendrum gastropodium*; la planta macerada sirve para tratar la influenza; *Epidendrum quitensium*, con la infusión de la planta entera se tratan afecciones nerviosas; *Epidendrum secundum*, la planta se tritura, de modo que se obtenga la sabia que sirve para bajar la fiebre, la infusión de las flores permite tratar afecciones nerviosas y el colerín; *Erycina pusilla*, , la planta en cocción sirve para lavar heridas y el macerado se aplica en caso de mordedura de la serpiente *Bothrops asper* “equis”, también es usada para afecciones nerviosas; *Erythrodes*, las partes vegetativas, se emplean en caso de mordedura de la serpiente *Lachesis muta*, conocida como “equis verrugosa”; *Lycaste*, los pseudobulbos se utilizan para afecciones del hígado y de los riñones; *Maxillaria villosa*, todas las partes de la plantas se utilizan en el tratamiento de hernias; *Malaxis*, las hojas en cocción, permiten elevar la temperatura corporal; *Microchilus weberianus*, con las hojas maceradas se trata la mordedura de la serpiente “equis”; *Nemaconia graminifolia*, la cocción de las hojas se utiliza para calmar el dolor al

orinar, *Notylia rimbachii*, sus hojas permiten tratar desgarres al aplicarlas sobre la zona afectada; *Odontoglossum hallii*, sus pseudobulbos se utilizan para tratar afecciones cardíacas; *Phragmipedium pearcei*, la cocción de la planta entera se utiliza para el dolor de pecho y estómago; *Platythelys maculata*, el macerado de sus hojas se utiliza para la hinchazón de la cara y dolores reumáticos; *Prosthechea fragrans*, la maceración del tallo se utiliza para los dolores reumáticos; *Scaphyglottis prolifera*, la cocción de las hojas se utiliza en caso de mordedura de la serpiente *Lachesis muta*; *Sobralia bletiae*, la cocción de las hojas, se utiliza para tratar úlceras gástricas, fiebre y diversos dolores; *Sobralia macrophylla*, la cocción de las hojas, permite tratar la hinchazón causada por torceduras, *Sobralia rosea*, el cogollo sirve para la picadura de la araña; *Specklinia picta*, la planta sirve para el tratamiento de desgarres articulares; *Stelis gélida*, las hojas se emplean en el tratamiento de tumores; *Stenorrhynchos*, se utiliza su raíz en el tratamiento de manchas blancas de la piel; *Trichoceros antennifer*, las hojas y la raíz se emplean en el tratamiento de afecciones nerviosas; *Vanilla odorata*, con la decocción de las hojas se trata el dolor de estómago; *Vanilla palmarum*, las hojas sirven para eliminar las espinillas al frotar las hoja sobre la piel.

Tene y otros (2007), también describen especies de importancia medicinal: *Elleanthus aurantiacus*, las hojas en infusión se beben para afecciones hepáticas y de los riñones; *Epidendrum jamiesonis*, con la infusión de la planta se tratan problemas de los nervios y del corazón; *Epidendrum* sp., sus hojas y flores en infusión se emplean para tratar la influenza, la fiebre y la conjuntivitis; *Epidendrum fimbriatum*, la infusión de hojas y flores permite tratar problemas de riñones. Ramos, Crivos, Colares, Spegazzini, y Rosella (2011), reportan a *Catasetum macroglossum*, como planta útil empleada en el tratamiento de fracturas de óseas, inflamaciones y dolores articulares.

1.1.10. Estudios moleculares de las orquídeas

Las herramientas moleculares ayudan en la identificación de las orquídeas a nivel de especie (Hinsley *et al.*, 2018). Existen estudios previos que demuestran la efectividad de la técnica *Barcode* para la identificación molecular de orquídeas (Iza, 2018; Albán y Toapanta, 2019; Montalvo y Vargas, 2019).

Barcode utiliza una o unas pocas regiones del ADN, por ejemplo *rbcL* y *matK*, para luego compararlas en una biblioteca de muestras referenciales verificadas (Hollingsworth, Li, Van Der Bank, & Twyford, 2016).

Otra de las técnicas empleadas es la secuenciación de próxima generación, en la que se utiliza todo el genoma o un número mucho mayor de marcadores para la identificación de orquídeas a nivel de especie (Huang, Ci, Conran, & Li, 2015). Existen bases de datos públicas de ADN, como GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y BOLD Systems (<http://www.boldsystems.org/>) que constituyen depósitos importantes de datos de secuencias de ADN de Orchidaceae (Hinsley *et al.*, 2018).

1.2. Fitoquímica de las orquídeas

Los estudios fitoquímicos, permiten la detección de metabolitos secundarios o sustancia bioactivas (Guevara, 2013). La incursión de estudios de este tipo es reciente para la familia Orchidaceae (Singh *et al.*, 2012). En Ecuador uno de los estudios encontrados, es el de Cerna y otros (2018); que refieren la fitoquímica de los géneros: *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea* de la familia Orchidaceae.

1.2.1. Metabolitos secundarios

Estos constan de reacciones de biosíntesis propias para cada especie, que conducen a la formación de un producto natural conocido como sustancia bioactiva (Sánchez y otros, 2015).

1.2.1.1. Fenoles

Son hidroxibencenos que comprenden alrededor de 8000 compuestos, naturalmente se observan en forma de glucósidos, solubles en agua y disolventes orgánicos (Rojas, Jaramillo, y Lemus, 2015). De acuerdo con Alara, Abdurahman y Olalere (2017), su presencia se relaciona directamente con la actividad antioxidante.

Estructura.- Se compone de un anillo fenil unido a un grupo OH, el anillo fenil permite un efecto inductivo del grupo hidroxilo (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014).

Actividad farmacológica.- Son hepatoprotectores, gastroprotectores, ayudan a disminuir el riesgo de contraer cáncer, hipertensión o diabetes, al igual que problemas cardiovasculares (Guevara, 2013).

Clasificación.- Se clasifican en: fenoles simples; fenoles ácidos, cumarinas; xantonas, estilbenos, benzofenonas, quinonas; betacianinas, lignanos y ligninas (Rojas y otros, 2015).

1.2.1.2. Taninos

Son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran como polímeros polifenólicos, difíciles de disolver en agua ya que pueden formar soluciones coloidales ácidas y astringentes, su solubilidad depende de su comportamiento frente a agentes hidrolíticos como ácidos minerales diluidos (Vanegas, 2012; Coy, Parra y Cuca, 2014).

Actividad farmacológica.- Tienen actividad antibacteriana, expectorante y astringente (Ardoino, Toso y Boeris, 2013).

Clasificación.- De acuerdo con Peñarrieta y otros (2014), son de dos tipos:

Taninos hidrolizados (gálicos): Están constituidos por una molécula de un monosacárido de glucosa en la mayoría de los casos, dentro de estos se encuentran los elagitaninos no conjugados, que demuestran buenas propiedades antibacterianas, los galotaninos que demuestran buena actividad antioxidante.

Taninos condensados (catéquicos): Se forman cuando las unidades de los flavonoides como catequina y leucocianidina condensan en contacto con calor, ácidos fuertes o agentes de oxidación.

1.2.1.3. Flavonoides

Estos son compuestos fenólicos, responsables de la coloración de flores y frutos en las plantas; así pueden ser flavonoides amarillos como las chalconas y auronas o flavonoides rojos, azules o violetas dados por los antocianósidos (Sánchez y otros, 2015).

Solubilidad.- se disuelven fácilmente en alcohol (etanol, metanol y n-butanol) y en agua, principalmente los glicósidos, antocianinas y sulfatos, dentro de estos los compuestos que presentan pocos o ningún grupo hidroxilo son solubles en acetona, acetato de etilo y en éter etílico (Santizo, 2004).

Estructura.- está compuesta de tres anillos: el primero es un benzopirano 2-fenil, el segundo es un anillo fenólico mono, orto o vic- hidroxilado, el tercer anillo es heterocíclico con oxígeno pirano (Karak, 2019).

Actividad farmacológica.- Tienen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antivirales y anticancerígena, (Karak, 2019).

De acuerdo con Sánchez y otros, (2015), existen 5 grupos principales que son:

2 fenil cromonas: flavonas, flavonoles, biflavonoles,

2-fenil cromanos (flavanos): 3-flavanol (catecoles) y 3,4 flavandioles

Flavilios: Antocianos

Chalconas, dihidrochalconas

1.2.1.4. Alcaloides

Estos pueden estar presentes en hojas, flores, frutos, semillas, cortezas y raíces, han sido utilizados como agentes terapéuticos desde hace mucho tiempo, su estructura química consiste en bases orgánicas que contienen uno o más nitrógenos y cuya presencia puede

darse en forma de amina o amida, los nitrógenos de su estructura pueden conformar grupos funcionales diferentes en una misma molécula; por lo general se derivan de aminoácidos, son incoloros, sólidos, cristalinos, visibles al espectro óptico (Guerrero, 2012).

Solubilidad.- Son solubles en disolventes orgánicos con baja polaridad, previamente se deben tratar con soluciones alcalinas, el pH básico permite que los alcaloides se separen de sus sales y puedan disolverse en los disolventes orgánicos, también pueden ser solubles en agua, siempre que el pH del medio sea ácido, lo cual va a permitir la transformación de los alcaloides en sales y su disolución en agua (Ajana, Gundkalle, y Nayak, 2013)

Actividad farmacológica.- Son analgésicos y calmantes (Guevara, 2013).

Clasificación.- De acuerdo con Peñarrieta y otros (2014), existen cuatro grupos principales:

G1- Derivados de aminoácidos (triptófano, fenilalanina, lisina, histidina, arginina, tirosina), derivados de los ácidos: antracítico y nicotínico.

G2- alcaloides purínicos;

G3 - terpenos aminados;

G4 – alcaloides policétidos

1.2.2. Métodos de extracción de metabolitos

1.2.2.1. Método de Maceración

Es útil para la extracción de sustancias termolábiles y consiste en mantener el material vegetal en contacto con el disolvente frío, protegido de la luz, el tiempo de extracción es mínimo de 96 horas o idealmente de 8 días, por lo general el procedimiento se acompaña de la trituración mecánica del material y se utiliza especialmente para extraer sustancias termolábiles (González, 2009).

1.2.3. Tipos de extractos botánicos

1.2.3.1. Extractos fluidos

Son extractos vegetales que se preparan con etanol, de modo que el volumen de extracto final obtenido sea equivalente al peso inicial de la droga seca y molida (Cerna y Rodríguez, 2013). Pueden obtenerse por percolación o maceración, controlando el tiempo y la velocidad de flujo respectivamente, las fracciones más diluidas se pueden concentrar por evaporación o destilación a temperaturas menores a 60 °C, en caso de existir sedimentos, es posible filtrar, o decantar la porción transparente (USP30, 2007).

1.2.4. Métodos de análisis químico de metabolitos

1.2.4.1. Tamizaje fitoquímico

Es una técnica cualitativa que permite determinar si existe presencia (+) o ausencia (-) de metabolitos secundarios, mediante reacciones colorimétricas dadas por compuestos específicos (Vítek *et al.*, 2014).

1.2.4.2. Espectrofotometría UV-visible

Es una técnica analítica que permite determinar y cuantificar biomoléculas en solución, mediante el potencial que estas tengan para absorber longitudes de onda dentro del espectro UV-visible, considerando su estructura y las condiciones de humedad, temperatura y pH del medio experimental (Díaz y otros, 1984).

1.3. Antioxidantes en orquídeas

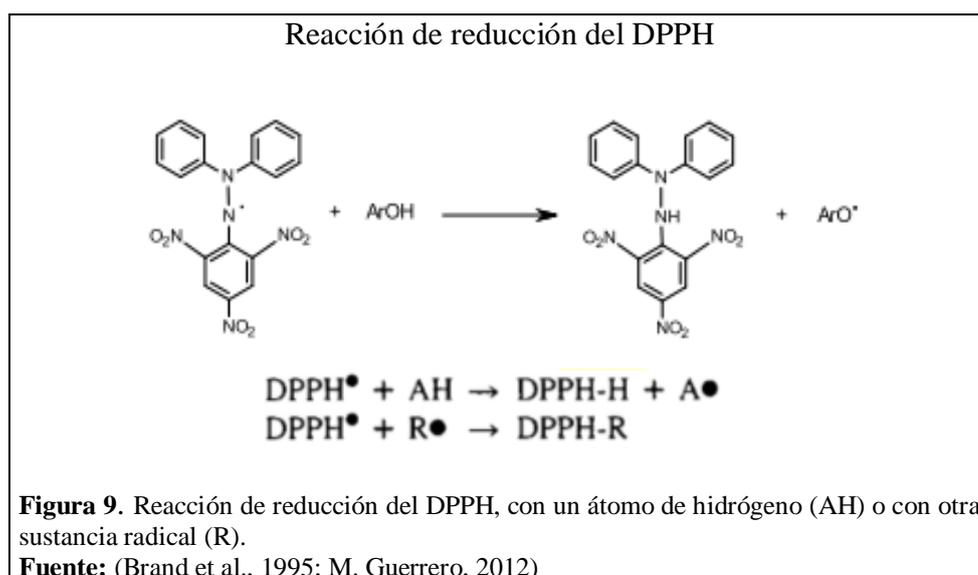
Los antioxidantes, son compuestos capaces de revertir el daño provocado por las especies reactivas de oxígeno (EROs) en células y biomoléculas, mediante la liberación de electrones, por lo que en las plantas por ejemplo pueden disminuir el estrés oxidativo causado por la presencia de insectos o condiciones ambientales adversas (López, Barragan, Lagunez, y Solano, 2016).

En las orquídeas, principalmente se han estudiado las especies del género *Dendrobium*, ya que la fuerte concentración de fenoles y flavonoides en su composición les confieren un gran potencial antioxidante (Obsuwan, Jeong, & Maksup, 2019).

1.3.2. Métodos de determinación de antioxidantes

1.3.2.1. Metodología DPPH

Esta metodología se fundamenta en la reacción antirradical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) que puede ejercer una especie o sustancia Guerrero (2012). Durante la reacción, el reactivo DPPH entra en contacto con un átomo de hidrógeno donado por alguna sustancia (por ejemplo el H del grupo hidroxilo de los polifenoles) o con otra especie radical, lo cual genera una forma reducida del radical (Véase **figura 9**), con la consecuente pérdida de la coloración por lo general de morado a transparente, por lo que también ocurre una disminución de la absorbancia del radical (Brand, Cuvelier, & Berset, 1995). Los resultados obtenidos de la lectura espectrofotométrica se expresan en valores de IC50, que indican la concentración necesaria de la sustancia antioxidante, para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH (Chinsamy, Finnie y Staden, 2014).



Capítulo 2

Marco metodológico

2.1. Valoración etnobotánica

El estudio etnobotánico se realizó en mercados y ferias de plantas medicinales, de tres provincias del Ecuador (Pichincha, Cotopaxi y Santo Domingo de los Tsáchilas) durante agosto y septiembre del 2019 (Véase **Anexo1**).

2.1.1. Colección de material vegetal

Las muestras se colectaron durante octubre y noviembre del 2019, los especímenes de *Maxillaria porrecta* y *Trigonidium insigne* fueron colectados en la provincia de Cotopaxi, cantón Pújilí, parroquia el Tingo, coordenadas: 0°52'27.0"S 79°9'32.3"O. Las muestras de *Maxillaria procurrans* y *Epidendrum quitensium*, se colectaron en la provincia de Pichincha, Cantón Quito, en la antigua vía a Nono, coordenadas 0°03'28.7"S 78°34'17.4"O. Los seudobulbos de *Catasetum macroglossum* fueron adquiridos en la tienda Ecuagenera ubicada en la ciudad de Quito, sector la Floresta.

El material para herbario se colectó de acuerdo al procedimiento propuesto por Jørgensen, Fuentes, Miranda y Cayola, (2015), para esto se tomaron 2 muestras de cada planta, verificando que el material vegetal esté en buen estado, a éste se lo dispuso en papel periódico y se le asignó un código el cual se registró en un cuaderno de campo, las muestras fueron prensadas colocándolas en medio de dos tablas sujetas con una correa, luego se deshidrataron en una secadora a 60 °C por un periodo de 5 días debido a la presencia de humedad en los seudobulbos.

Las muestras para el estudio fitoquímico se colectaron de acuerdo con la técnica descrita por Cerna y otros (2018), utilizando una tijera de podar previamente flameada y esterilizada con alcohol al 96 %, se cortó tejido foliar de *Epidendrum quitensium* y pseudobulbos frescos de *Maxillaria porrecta*, *Maxillaria procurrens*, *Trigonidium insigne* y *Catasetum macroglossum*, se observó la usencia de daños y enfermedades en el material vegetal que luego fue colocado en bolsas de papel dispuestas en fundas plásticas de cierres herméticos que contenían sílica gel para evitar la absorción de la humedad ambiental, manteniendo las muestras secas.

El material para el estudio molecular consistió en hojas enteras, frescas, libres de enfermedades, cortadas con una tijera estéril, las cuales se colocaron en bolsas de papel etiquetadas con su código de colecta, conforme a lo referido por (Fuertes, Mallitasig, Cerna, & Gutiérrez, 2018)

Una vez en el laboratorio, las muestras para el estudio fitoquímico y molecular, se lavaron con agua y jabón, se desinfectaron con alcohol al 70%, luego de 2 min se lavaron con agua destilada estéril e hipoclorito de sodio al 2 %, nuevamente después de 2min, se lavaron con agua destilada estéril, de acuerdo a la técnica de desinfección referida por Cerna, Mencias, Salazar y Gutiérrez, (2018). Los pseudobulbos, se separaron de forma manual de las raíces, utilizando un bisturí desinfectado conforme a la metodología de González (2009). Las muestras reposaron al ambiente hasta que se secaran, posteriormente se guardaron en refrigeración a una temperatura de -20 °C , hasta su utilización, en fundas de papel dispuestas dentro de fundas con cierres herméticos, debidamente etiquetadas, que contenían arroz para evitar la absorción de humedad, de acuerdo a la metodología descrita por Iza (2018).

2.1.2. Identificación botánica

2.1.2.1. Identificación morfológica

A partir de las muestras colectadas, se elaboró un voucher para cada planta (Véase **Anexo3**) que sirvió para identificarlas en base a la información obtenida del “*Catálogo de plantas Vasculares del Ecuador*” (Jorgensen y León, 1999) y sus últimas actualizaciones en la base de datos “Tropicos” del Missouri Botanical Garden (2020). También se ocupó la base de datos “Plants of the World online” del Royal Botanic Gardens, Kew. (2020). Al igual que la base de datos “The Plant List” (The Plant List, 2013a). Posteriormente, las muestras se ingresaron al herbario de la Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Biotecnología, Campus Girón bloque B.

2.1.2.2. Identificación molecular

El estudio molecular se desarrolló durante octubre, noviembre y diciembre del 2019 en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, campus Girón, ciudad de Quito. Se empleó la metodología BARCODE (International Barcode of Life, 2020), utilizando la región *matK* y *rpoCl* del genoma cloroplástico.

2.1.2.2.1. Extracción de ADN y amplificación PCR

Se utilizó el protocolo de extracción directa de Thermo Fisher Scientific Inc. (2018); de acuerdo a las recomendaciones del fabricante se empleó el Kit comercial *Phire Plant Direct PCR Master Mix* (Véase **Tabla 1**), que consistió en realizar cortes pequeños de aproximadamente 0,5 mm de diámetro de las hojas jóvenes y frescas, utilizando un bisturí desinfectado con cloro (2 %) y alcohol (96 %) después de cada corte, los finos trozos de las hojas fueron colocados en tubos *Eppendorf*TM de microcentrífuga de 1,5 mL, seguidamente se preparó la solución de *Master Mix* PCR Kit para 25 µL, como se observa en la tabla 1.

Los cebadores utilizados de acuerdo a la información proporcionada por Vijayan y Tsou (2010) fueron:

matK 2.1.a – forward (5' - ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC – 3')

matK 2.1.a – reverse (5' - GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG – 3')

rpoC1 – forward (5' - GTGGATACACTTCTTGATAATGG. – 3')

rpoC1 – reverse (5' - TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC – 3')

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador *ProFlex PCR System*, Applied Biosystems-USA, con las siguientes condiciones:

2 min a 94 °C (desnaturalización inicial), 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturalización); 30 segundos a 53,5 °C (alineamiento); 40 segundos a 72 °C (extensión)) y 5 min a 72 °C (extensión final), de acuerdo a lo propuesto por Iza (2018).

La presencia o ausencia de ADN se determinó por la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 %, el gel fue revelado en un fotodocumentador *Bio-imaging systems®*, para evaluar la concentración y el tamaño aproximado de las bandas de ADN, empleando el marcador referencial: *O'GeneRuler Express DNA Ladder* de 100-5000 pares de bases y de 40 a 100 ng / 0,5 µg de acuerdo con el fabricante Thermo Fisher Scientific Inc. (2012), técnica utilizada por Montalvo y Vargas, (2019).

Tabla 1.

Protocolo para la Master Mix- Phire Plant Direct PCR.

Componente	Para una muestra (μL)
2X Phire Plant PCR Buffer	12, 50
Primer <i>forward</i> (10 μM)	0, 50
Primer <i>reverse</i> (10 μM)	0, 50
Disolution	1, 50
Agua libre de ARNasas	9, 50
ADN	1, 00
Total	25, 00

Nota: Protocolo estándar para la preparación de la *Master Mix*, mediante el kit comercial..

Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2018).

2.1.2.2.2. Secuenciación

Los productos amplificados fueron secuenciados por la técnica Sanger clásica automatizada en la empresa *Macrogen Inc*, de acuerdo a la información obtenida de Macrogen (2018).

2.1.2.2.3. Análisis bioinformático

Se analizaron las secuencias mediante el programa Finch TV versión 1.4.0 para Windows de la empresa Geospiza, por medio del cual se visualizaron los electroferogramas y se evaluó la calidad de la secuencia (Véase **Anexos 4, 5 y 6**). Se utilizó el programa MEGA 7 para eliminar las señales de ruido de fondo y verificar las bases nitrogenadas. Las secuencias obtenidas con la región *matK* y *rpoC1* se compararon, mediante la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del Genbank.

2.2. Estudio fitoquímico

El estudio fitoquímico se realizó de noviembre a diciembre del 2019 y de enero a febrero del 2020, en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, campus Girón.

2.2.1. Tratamiento del material vegetal

Los pseudobulbos de *Maxillaria porrecta*, *Trigonidium insigne*, *Maxillaria procurrens*, *Catasetum macroglossum*, al igual que las hojas de *Epidendrum quitensium* fueron cortados en trozos finos, pequeños de 2 cm de diámetro, estos se secaron en estufa *Esco Isotherm*[®] a 60 °C por 3 días, luego se molieron en un procesador eléctrico de café *Bodum Bistro* hasta obtener un polvo fino de acuerdo al procedimiento de Schuster y otros (2017).

2.2.2. Obtención de los extractos

Se prepararon extractos etanólicos en relación a una concentración 1:10 (p/v) para lo cual se pesó 5 g de polvo de la droga vegetal en una balanza analítica *Mettler Toledo-MS304* y se disolvió con 50 mL de etanol al 96 %, la droga hidratada, fue llevada a ultrasonido *Fisher Scientific FS60* por 20 min siguiendo la metodología propuesta por Paudel, Chand, Pant, y Pant (2019).

Los extractos resultantes de la maceración, se dejaron reposar durante 24 horas a temperatura ambiente, de acuerdo al método de maceración para extractos fluídos, descrito por la USP30 (2007). Posteriormente éstos se llevaron nuevamente a ultrasonido por 20 min y se filtraron utilizando una jeringa de 5 mL con filtro (*PPTF* 22 µm), el mismo procedimiento se siguió para todos los extractos, de acuerdo con la técnica de extracción asistida por ultrasonido propuesta por Altemimi, Lakhssassi, Baharlouei, Watson, y Lightfoot (2017).

Los extractos filtrados se concentraron por 30 min en rotavapor *IKA-Bs1HB10-RV10* a 40 °C, 50 rpm, 175 mbar, siguiendo el procedimiento descrito por Sharma, Dixit, Singh, Agrawal, y Nizam (2015). El procedimiento se realizó hasta alcanzar una concentración 1:1 referente al volumen del extracto con respecto a la masa del material vegetal de partida de acuerdo con Cerna y Rodríguez (2013), por lo que se recuperó 5 mL de extracto concentrado para todas las muestras.

A partir de los extractos fluidos concentrados, se prepararon diluciones (1:10 con etanol al 96 %) para todos los ensayos fitoquímicos, de acuerdo con la técnica referida por Schuster y otros (2017). Los viales ámbar de 5 mL debidamente etiquetados, se almacenaron en refrigeración a 5 °C para los análisis posteriores conforme a lo sugerido por Paudel y otros (2019).

2.2.2. Tamizaje fitoquímico

2.2.2.1. Determinación de fenoles y taninos

Se desarrolló la prueba con Cloruro férrico (FeCl_3), conforme a la metodología estipulada por Coy y otros (2014): se dispuso 1 mL de extracto (1:10 v/v) en un tubo de ensayo, luego se adicionó cloruro férrico al 1 % (3 gotas), el control positivo se preparó con té negro (1 mg); mientras que el control negativo consistió en etanol al 96 % (2 mL), el ensayo se considera positivo, cuando brinda la siguiente información:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos de tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos de tipo pirogalotánicos.

La escala utilizada fue la siguiente: presencia alta (+++), media (++) o baja (+) conforme a lo referido por Guerrero (2014).

2.2.2.2. Determinación de flavonoides

De acuerdo con la metodología estipulada por Moreno y Jaramillo (2017), se realizó el ensayo de Shinoda: 3 gotas de extracto (1:10 v/v) se dispusieron en un tubo de ensayo, a continuación se agregó un trozo de cinta de Mg de 3 mm de longitud, se llevó a baño maría a 60 °C, luego se agregó 3 gotas de HCl (10 %), como control positivo se utilizó 1g de ralladura de manzana; mientras que el control negativo fue etanol al 96 % (2 mL), se esperó por 5 min. El resultado es positivo cuando aparece una coloración rojiza, rojo-naranja o rosada en una escala de intensidad alta (+++), media (++) , baja (+) de acuerdo con Soto (2015).

2.2.2.3. Determinación de alcaloides

La presencia de alcaloides se determinó usando el reactivo de Mayer: en un vaso de precipitación se disolvió 1,3 g de cloruro de mercurio concentrado al 2 % con 60 mL de agua, en otro vaso se disolvió 5 g de cloruro de potasio con 10 mL de agua, las dos soluciones se mezclaron en un balón aforado, se diluyeron con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 100 mL, siguiendo el procedimiento propuesto por Aguado, Nuñez, Bela, Okulik, y Bregni (2013).

Se realizó la prueba de Mayer, en base a la metodología propuesta por Sánchez y otros (2015); 1 mL de extracto (1:10 v/v) se dispuso en un tubo de ensayo, seguidamente se agregó el reactivo de Mayer (5 gotas), se esperó 20 min. El test se considera positivo si se observa que se forma un precipitado blanco coposo, considerando la siguiente escala: opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado blanco coposo (+++) de acuerdo a lo referido por Cerna y otros (2018).

2.2.3. Cuantificación espectrofotométrica de metabolitos

Se cuantificaron fenoles y flavonoides, utilizando un espectrofotómetro *JASCO V-70*, mediante el software *Spectra ManagerTM* en base al procedimiento referido por Mosquera, Parra, Flor, y Noriega (2017).

2.2.3.1. Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles totales de los estándares y extractos se cuantificaron en base a la metodología propuesta por Mosquera, Parra, Flor, y Noriega (2017).

2.2.3.1.1. Preparación de reactivos

Reactivo de Folin Ciocalteu: se preparó disolviendo 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0,2 g de ácido fosmolibdico y 5 mL de ácido fosfórico al 85 % en 75 mL de agua destilada, la solución se somete a reflujo en *Soxhlet* por 2 horas, después el volumen total se completa con 100 mL de agua destilada

Reactivo de Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20 %: 20 g del reactivo, se diluyeron con agua destilada en un balón volumétrico, aforándose hasta un volumen de 100 mL.

2.2.3.1.2. Curva de calibración de fenoles totales

Se preparó una solución madre de 2000 ppm de *Ácido gálico*, por lo que se pesaron 20 mg de ácido en una balanza analítica *Mettler Toledo-MS304* y se disolvieron en un balón aforado con 10 mL de etanol al 96 %, partiendo de la solución madre se prepararon soluciones etanólicas de 100, 250, 500 y 1000 ppm, como se observa en la tabla 2, estas soluciones constituyeron los estándares utilizados para la lectura espectrofotométrica (Ver **Tabla 3**).

Tabla 2.

Diluciones preparadas a partir de la solución madre de *Ácido gálico*.

Concentración de <i>Ácido gálico</i> (ppm)	Vol. Sol madre (mL)	Agua destilada (mL)	Estándares
100	0,50	9,50	Est. 1
250	1,25	8,75	Est. 2
500	2,50	7,50	Est.3
1000	5	5	Est.4

Elaborado por: La autora, 2020.

Tabla 3.

Curva de calibración del *Ácido gálico* para fenoles totales.

Estándares rotulación	Blanco	Est. 1	Est. 2	Est.3	Est.4
Volumen Est. (mL)	0	0,05			
Agua destilada (mL)	4	3,95			
Reactivo de Folin (mL)	0,25	0,25			
Esperar 2 minutos					
Carbonato de sodio Na ₂ CO ₃ (mL)	0,75	0,75			

Nota. Las abreviaciones Est. 1, 2, 3, 4, 5 representan a los estándares de lectura.

Elaborado por: La autora, 2020.

El procedimiento se realizó por triplicado, en frascos ámbar debidamente etiquetados, los cuales se llevaron a ultrasonido (*Fisher Scientific FS60*) por 5 min y luego se dejaron reposar durante 2 horas en condiciones de oscuridad. La lectura se realizó en espectrofotómetro *JASCO V-730* a 765 nm.

2.2.3.1.3. Procedimiento para la cuantificación de fenoles totales en los extractos

Los extractos se prepararon de acuerdo a la descripción de la tabla 4.

Tabla 4.

Preparación de los extractos para lectura y determinación de fenoles totales.

Extractos	Blanco	<i>M. prorrecta</i>	<i>T. insigne</i>	<i>M. procurrens</i>	<i>E. quitensium</i>	<i>C. macroglossum</i>
Rotulación	Blanco	4236	4237	4101	4102	4254
Extracto (mL)	0	0,05				
Agua destilada (mL)	4	3,95				
Reactivo de Folin (mL)	0,25	0,25				
Esperar 2 minutos						
Carbonato de sodio Na ₂ CO ₃ (mL)	0,75	0,75				

Elaborado por: La autora, 2020.

El procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra en frascos ámbar y de vidrio transparentes protegidos de la luz con papel aluminio, los cuales se llevaron por 5 min a ultrasonido (*Fisher Scientific* FS60), luego se dejaron reposar durante 2 horas en condiciones de oscuridad. La lectura se realizó en espectrofotómetro *JASCO V-730* a 765 nm.

2.2.3.1.4. Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron mediante regresión lineal, utilizando la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración del estándar de *Ácido gálico*, en base a la metodología de Athipornchai y Jullapo (2018).

Cuantificación de fenoles totales



Figura 10. A.- Preparación de soluciones para lectura en frascos ámbar. B.- Reacción colorimétrica del reactivo de Folin ciocalteu con el Carbonato de sodio (Na_2CO_3), en los extractos.

Elaborado por: La autora, 2020.

2.2.3.2. Cuantificación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se cuantificaron siguiendo el procedimiento descrito por Noriega, Sola, Barukcic, Garcia, y Osorio (2015):

2.2.3.2. 1.Preparación de los reactivos

Reactivo de Cloruro de Aluminio (AlCl_3) al 2 %: se pesaron 3 g de AlCl_3 y se diluyeron con agua destilada (20 mL) en un vaso de precipitación, luego se trasladó la dilución a un balón volumétrico de 100 mL y se aforó con agua destilada hasta completar el volumen.

2.2.3.2.2. Curva de calibración de flavonoides totales

Se preparó partiendo de una solución madre de 1000 ppm de *Quercetina*, por los que se procedió a pesar 5 mg del reactivo en una balanza analítica *Mettler Toledo-MS304* y se disolvió en 5 mL de etanol al 96 %, a partir de ésta, se realizaron soluciones etanólicas de 10, 20, 50, 70 ppm, a las que se denominó estándares, como se observa en la tabla 5.

Tabla 5.Preparación de soluciones de *Quercetina*

Concentración de <i>Quercetina</i> (ppm)	Volumen de la solución madre (µL)	Volumen de (µL)	Estándares
10	50	450	Est. 1
20	100	400	Est.2
50	250	250	Est. 3-
70	350	150	Est. 4

Elaborado por: La autora, 2020.

Los estándares se evaluaron espectrofotométricamente conforme al procedimiento explicado en la tabla 6.

Tabla 6.Lectura de estándares de *Quercetina* y obtención de la curva de calibración

Estándares	Blanco	Est. 1	Est. 2	Est.3	Est.4
Volumen Est. (mL)	0	0,50			
Agua destilada (mL)	2,80	2,80			
Etanol 96 % (mL)	2	1,50			
Acetato de potasio (mL)	0,10	0,10			
Cloruro de aluminio (mL)	0,10	0,10			

Nota. Las abreviaciones Est. 1, 2, 3, 4, 5 representan a los estándares de lectura.**Elaborado por:** La autora, 2020.

El procedimiento se realizó por triplicado, para todos los estándares, incluido el blanco, los frascos se llevaron a ultrasonido (*Fisher Scientific FS60*), por 5 min y se dejaron reposar en oscuridad durante 30 min, la lectura se realizó en un espectrofotómetro *JASCO V-730* a 415 nm.

2.2.3.3. Procedimiento para la cuantificación de flavonoides totales en los extractos

Los extractos fueron preparados conforme al procedimiento detallado en la tabla 7.

Tabla 7.

Preparación de los extractos para la lectura y determinación de flavonoides totales

Extractos	Blanco	<i>M. prorrecta</i>	<i>T. insigne</i>	<i>M. procurrens</i>	<i>E. quitensium</i>	<i>C. macroglossum</i>
Rotulación		4236	4237	4101	4102	4254
Extracto (mL)	0	0,5				
Agua destilada (mL)	2,8	2,8				
Etanol 96% (mL)	2	1,5				
Acetato de potasio (mL)	0,1	0,1				
Cloruro de aluminio (mL)	0,1	0,1				

Elaborado por: La autora, 2020.

El procedimiento se realizó por triplicado, utilizando frascos ámbar de 5 mL para preparar las soluciones de los extractos, incluido el blanco, los cuales fueron llevados a ultrasonido (*Fisher Scientific FS60*) por 5 min, luego se dejaron reposar en oscuridad durante 30 min, para su lectura en espectrofotómetro *JASCO V-730* a 415 nm.

2.2.3.2. 4. Determinación de flavonoides totales

La cantidad total de flavonoides se determinó mediante regresión lineal, utilizando la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración del estándar de *Quercetina*, conforme a la metodología de Athipornchai y Jullapo (2018).

Cuantificación de flavonoides totales



Figura 11. A.- Preparación de soluciones para lectura en frascos ámbar. B.- Reacción colorimétrica del cloruro de aluminio en los extractos.

Elaborado por: La autora, 2020.

2.3. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó, mediante el software *Spectra ManagerTM*, utilizando un espectrofotómetro *JASCO V-730*, conforme al procedimiento seguido por Cerna y otros (2018).

2.3.1. Preparación de la solución de DPPH

Se pesaron 20 mg de DPPH en una balanza analítica *Mettler Toledo-MS304* y se disolvieron con etanol al 96 %, aforando hasta alcanzar un volumen de 500 mL, en un balón aforado de vidrio (500 mL), se llevó a ultrasonido por 5 min, la solución se preparó 24 horas previas al análisis y se almacenó en refrigeración a 5 °C; en base a lo descrito por Paudel y otros (2019).

2.3.2. Preparación de los estándares de *Ácido ascórbico* (vitamina C)

En base a la metodología propuesta por Noriega y otros (2015), se partió de una solución madre de *Ácido ascórbico*, por lo que se pesaron 5 g de ácido en una balanza analítica *Mettler Toledo-MS304* y se disolvieron con agua ultrapura, aforando hasta un volumen de

50 mL, a partir de lo cual se hicieron soluciones con diferentes concentraciones como se detalla en la tabla 8:

Tabla 8.

Diluciones de la solución madre de *Ácido ascórbico* (vitamina C)

Dilución	Ácido ascórbico (µL)	Agua ultrapura (µL)
1	100	0
2	80	20
3	60	40
4	40	60
5	20	80
6	0	100

Elaborado por: La autora, 2020.

2.3.3. Procedimiento para la evaluación de antioxidantes en estándares y extractos

Las soluciones de los estándares y los extractos se prepararon conforme a lo referido por Aguado, Nuñez, Bela, Okulik, y Bregni (2013), conforme a lo descrito en la Tabla 9.

Tabla 9.

Preparación de estándares y extractos para evaluar la actividad antioxidante.

#Recipiente	Ácido ascórbico o Extracto (µL)	Etanol 96% (µL)	DPPH (µL)
1	0	100	2900
2	5	95	2900
3	10	90	2900
4	20	80	2900
5	50	50	2900
6	80	20	2900

Elaborado por: La autora, 2020.

Se siguió el mismo procedimiento por triplicado para los estándares y los extractos, utilizando viales ámbar de 5mL para todas las muestras.

2.3.3.1. Lectura de las soluciones

Para la lectura, las muestras se dejaron incubar en agitación protegidas de la luz a 200 rpm, durante 30 min a temperatura ambiente, en una incubadora marca Tecnal[®] TE-4200, la lectura se realizó a 517 nm, como lo refiere Minh y otros (2016).

2.3.4. Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH

La inhibición del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), se determinó por la ecuación referida por López y otros (2016):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} (100)$$

2.3.5. Determinación del IC50

De acuerdo con lo referido por Athipornchai y Jullapo (2018): la concentración de la muestra que proporciona un 50 % de inhibición (IC50) del oxidante DPPH, se calcula para cada extracto, empleando las ecuaciones presentadas en el **Anexo 15**, las cuales se han obtenido del contraste entre las concentraciones y los porcentajes de inhibición de los extractos.

2.3.6. Análisis estadístico de la actividad antioxidante frente al DPPH

Se realizó una prueba de Kruskal Wallis para determinar si los grupos de datos de los porcentajes de inhibición de los extractos poseen medianas estadísticamente similares o no en base a la metodología propuesta por (Suleiman, Abubakar, Sulaiman, & Sulaiman, 2018) las hipótesis planteadas se muestran en el **Anexo 12**.

La capacidad antioxidante de los extractos se evaluó estadísticamente, siguiendo la metodología de Biswas y otros (2016), para lo cual se desarrolló un análisis estadístico de varianza ANOVA a un nivel de significancia de 0,05 seguido de una prueba comparativa de Tukey, utilizando el programa *InfoStat* versión libre 2017. Las hipótesis planteadas, se aprecian en el **Anexo 14**.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Identificación de Orquídeas de interés medicinal

Se identificó el uso de 5 especies de orquídeas en la medicina tradicional de tres provincias del Ecuador: Pichincha, Cotopaxi y Santo Domingo de los Tsáchilas, los hallazgos se presentan en la tabla del **Anexo 1**, en ésta se detalla el uso medicinal de *Maxillaria porrecta*, *Maxillaria procurrans*, *Trigonidium insigne*, *Epidenrum quitensium* y *Catasetum macroglossum*. Las entrevistas realizadas a hierberos y curanderos se evidencian en el **Anexo2**.

En la entrevista personal realizada a Mirian Yanez hierbera del mercado San Roque provincia de Pichincha, se encontró que la infusión de flores de *Epidenrum quitensium* se utiliza para tratar afecciones nerviosas relacionadas con el hormigueo y entumecimiento muscular, la infusión de las hojas en combinación con hojas de cola de caballo y diente de león, se emplean para tratar inflamaciones de los riñones, estos resultados son coincidentes con lo reportado por De la Torre y otros (2008), quienes mencionan usos similares para esta especie.

La entrevista realizada al curandero Jose Jende Aguavil de la comuna Congoma, Santo Domingo de los Tsáchilas, durante la feria de plantas medicinales, se encontró que los pseudobulbos de *Catasetum macroglossum*, se utiliza para el tratamiento de torceduras, desviaciones o fracturas óseas. En un estudio similar Ramos y otros.(2011) encontraron que esta especie también es utilizada por hierberos de Quevedo, provincia de los Ríos, para tratar inflamaciones, dolores y facturas del hueso.

En la entrevista realizada al Sr. Marcelo Arias, curandero y sobador en el cantón La Maná provincia de Cotopaxi, se encontró que los seudobulbos de *Maxillaria porrecta* y *Trigonidium insigne* se utilizan para tratar los golpes o fracturas óseas. En cuanto a *Maxillaria procurrens*, la entrevista realizada a Martha Lema hierbera del mercado Ñaquito, refiere el uso medicinal de los seudobulbos en la parte noroccidental de la provincia de Pichincha, para tratar inflamaciones musculares. En el estudio realizado por Singh y otros (2012), se reporta la utilidad antiinflamatoria comprobada de otra especie dentro de este mismo género: *Maxillaria densa*.

3.1.1. Descripción botánica

Las descripciones botánicas de las cinco especies de orquídeas identificadas en la medicina tradicional ecuatoriana, se presentan en las tablas de la 10 a la 14. Los vouchers elaborados para herbario, se muestran en el **Anexo 3**.

Tabla 10.

Descripción botánica de *Maxillaria porrecta*, muestra 4236.

Código de la especie: 4236		Fecha de colección: 25/10/2019		 
Nombre científico	<i>Maxillaria porrecta</i>			
Sinónimos	<i>Maxillaria brenesii</i> <i>Maxillaria brunnea</i> <i>Maxillaria mutabilis</i> <i>Maxillaria trinitatis</i> <i>Maxillaria trinitensis</i>			
Nombre común	Soldadora			
Descripción: Planta epífita, con flores ligeramente amarillentas (3 cm-long.), hojas simples, largas, resistentes pero flexibles de hasta (45cm-long.), pseudobulbos ovoides, ligeramente comprimidos y rugosos de (3 cm-largo / 3cm-ancho), pedúnculo floral de (16 cm-long.), raíces secundarias finas que parten de los pseudobulbos, las más largas fueron de (13 cm-long.), cápsulas de (5 cm-largo / 9cm-ancho).				
Usos	En el tratamiento de golpes o fracturas			
Localización	Provincia de Cotopaxi-Cantón Pujilí		Coordenadas:0°52'27.0"S 79°9'32.3"O	
Distribución	Pichincha, Morona Santiago, El Oro, Esmeraldas, Los Ríos, Imbabura, Napo, Tungurahua, Zamora-Chinchipe.			
Rango altitudinal	500-2500 msnm			
Estatus	Nativa			
				

Nota: El nombre científico aceptado y los sinónimos han sido consultados en la base de datos (The Plant List, 2013d). Los datos de distribución (figura D), estatus y rango altitudinal, fueron obtenidos de las últimas actualizaciones del *Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador* en la base de datos (Tropicos, 2020d). Las figuras A, B y C, corresponden a la flor, pseudobulbos y planta entera de *Maxillaria porrecta* respectivamente. **Elaborado por:** La autora, 2020.

Tabla 11.

Descripción botánica de *Trigonidium insigne*, muestra 4237.

Código de la especie: 4236		Colección: 25/10/2019	
Nombre científico	<i>Trigonidium insigne</i>		
Sinónimos	Nombre aceptado sin sinónimos		
Nombre común	Pegante /Sanadora		
<p>Descripción: Planta epífita, con flores de color marrón claro de (5cm-largo/2cm-ancho), hojas alargadas, enteras, flexibles de hasta (14 cm-largo/2cm-ancho), rizoma dispuesto en forma de tallo de (28cm-long.), pseudobulbos alargados y rugosos de (3cm-long.), pedúnculo floral de (10cm, long).</p>			
Usos	Sirve para tratar golpes o fracturas óseas.		
Localización	Provincia de Cotopaxi-Cantón Pujilí	Coordenadas: 0°52'27.0"S 79°9'32.3"O	
Distribución	Cotopaxi, Esmeraldas, Los Ríos, Pichincha, Tungurahua		
Rango altitudinal	200 -1400 msnm		
Estatus	Nativa		

Nota: El nombre científico aceptado y los sinónimos han sido consultados en la base de datos (The Plant List, 2013f). Los datos de distribución (figura D), estatus, rango altitudinal, fueron obtenidos de las últimas actualizaciones del *Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador* en la base de datos (Tropicos, 2020e). Las figuras A, B y C, corresponden a la flor, planta entera y pseudobulbos de *Trigonidium insigne* respectivamente.

Elaborado por: La autora, 2020.

Tabla 12.

Descripción botánica de *Maxillaria procurrens*, muestra 4237

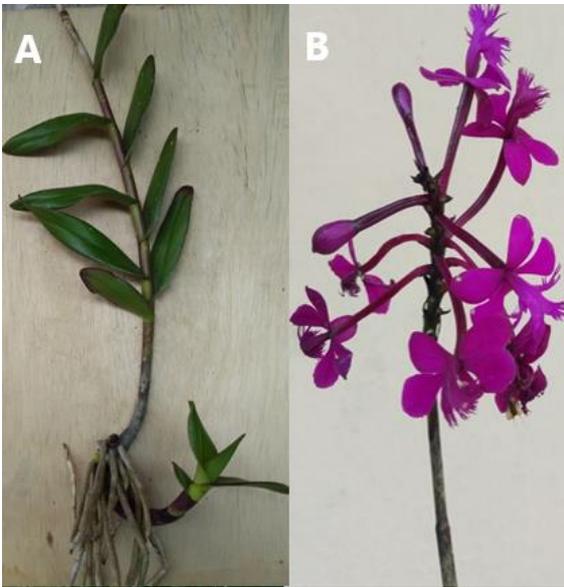
Código de la especie: 4101		Colección: 22/11/2019	
Nombre científico	<i>Maxillariella procurrens</i>		
Sinónimos	<i>Maxillaria procurrens</i>		
Nombre común	No determinado		
<p>Descripción: Encontrada en hábito litófito, con un rizoma dispuesto en forma de tallo de hasta (44cm-long.), hojas cortas con un ápice obtuso, de color verde-amarillentas de (6cm-largo/1cm-ancho), pseudobulbos lisos, ovoides de (3cm-largo/1cm-ancho).</p>			
Usos	Dolores musculares		
Localización	Provincia de Pichincha: Cantón Quito	Coordenadas: 0°03'28.7"S 78°34'17.4"O.	
Distribución	Carchi, Pichincha, Napo y Zamora		
Elevación	1800-2200 msnm		
Estatus	Nativa		

Nota: El nombre científico aceptado y los sinónimos han sido consultados en la base de datos (The Plant List, 2013e). Los datos de distribución (figura D), estatus, rango altitudinal, fueron obtenidos de las últimas actualizaciones del *Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador* en la base de datos (Tropicos, 2020a). Las figuras presentadas, se describen como: A (crecimiento de la planta en su hábitat natural), B (Disposición del rizoma, pseudobulbos y hojas), C (pseudobulbos).

Elaborado por: La autora, 2020

Tabla 13.

Descripción botánica de *Epidendrum quitensium*, muestra 4237.

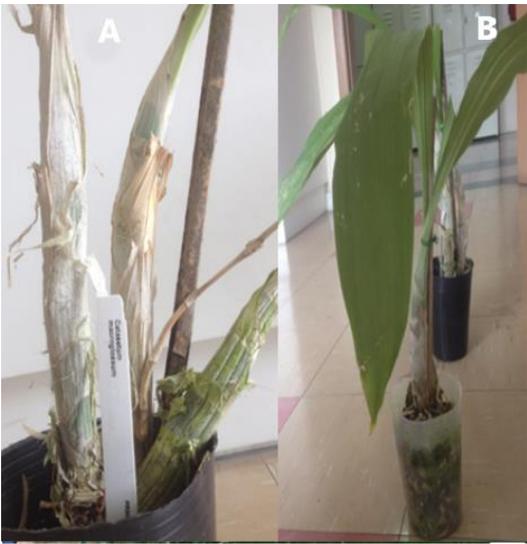
Código de la especie: 4102		Colección: 22/11/2019	
Nombre científico	<i>Epidendrum quitensium</i>		
Sinónimos	Nombre aceptado sin sinónimos		
Nombre común	Flor de cristo / Maygua		
Descripción: Planta epífita, de hojas elípticas, enteras, carnosas de (8cm-largo/1cm ancho). Tallo de (57 cm-long.), raíces secundarias de (21cm-long.) las más largas, inflorescencia con flores lilas, vistosas, de (10 mm-long.), sépalos lilas de (5mm-long).			
Usos	En el tratamiento de afecciones nerviosas.		
Localización	Provincia de Pichincha: Cantón Quito	Coordenadas: 0°03'28.7"S 78°34'17.4"O.	
Distribución	Azuay, Napo, Pichincha y Tungurahua		
Rango altitudinal	1600 - 2700 msnm		
Estatus	Nativa		
			

Nota: El nombre científico aceptado y los sinónimos han sido consultados en la base de datos (The Plant List, 2013c). Los datos de distribución (figura C), estatus, rango altitudinal, fueron obtenidos de las últimas actualizaciones del *Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador* en la base de datos (Tropicos, 2020c). A continuación se describe la correspondencia de las figuras: A (partes de la planta entera: hojas, tallo, raíces secundarias), B (inflorescencia).

Elaborado por: La autora, 2020

Tabla 14.

Descripción botánica de *Catasetum macroglossum*, muestra 4237.

Código de la especie: 4254		Colección: 29/11/2019		
Nombre científico	<i>Catasetum macroglossum</i>			
Sinónimos	No reportados			
Nombre común	Suelda con suelda			
<p>Descripción: Seudobulbos largos de (10 a 15 cm-long.), hojas plicadas, con una base que recubre a los seubobulbos, raíces secundarias de (7cm-long.) las más largas.</p>				
Usos	Para tratar afecciones óseas.			
Localización	Provincia de Pichincha: Cantón Quito	Cultivo comercial- Ecuagenera, la Floresta, Quito.		
Distribución	Cotopaxi, El Cañar, El Oro, Guayas, Los Ríos, Manabí			
Rango altitudinal	100 - 550 msnm			
Estatus	Nativa			
				

Nota: El nombre científico aceptado y los sinónimos han sido consultados en la base de datos (The Plant List, 2013b). Los datos de distribución (figura C), estatus, rango altitudinal, fueron obtenidos de las últimas actualizaciones del *Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador* en la base de datos (Tropicos, 2020b). Mientras que las figuras: A corresponde a pseudobulbos, B corresponde a la planta entera, en la que se aprecian principalmente las hojas.

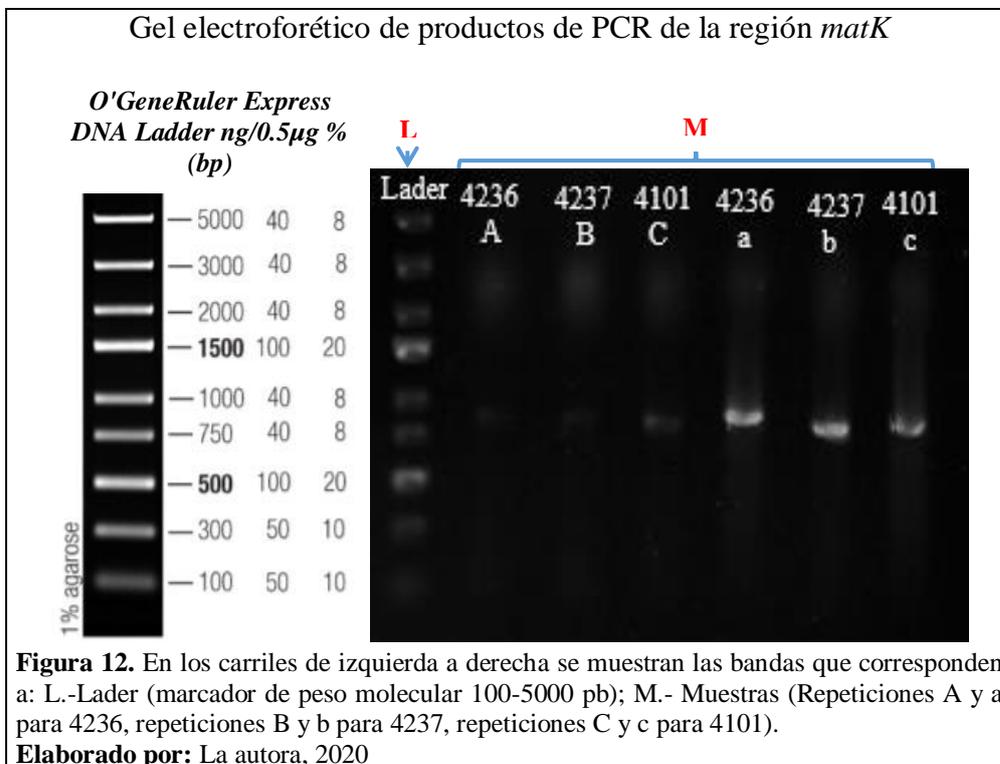
Elaborado por: La autora, 2020

3.1.2. Identificación molecular

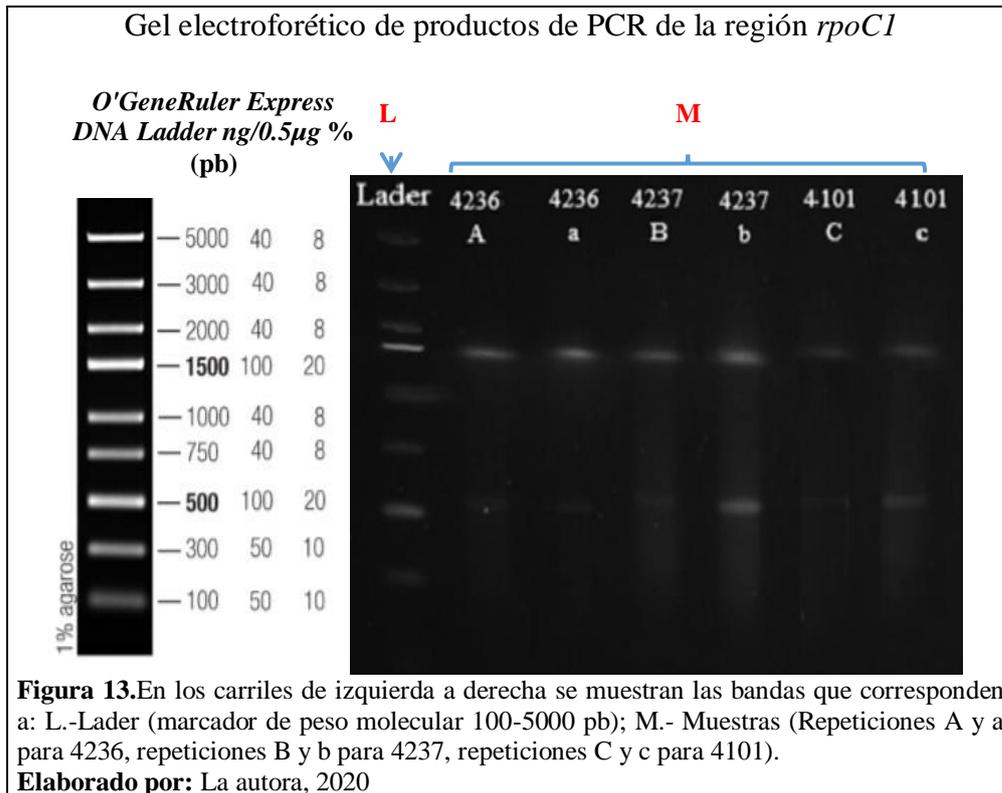
Se realizó la identificación molecular de tres especies: *Maxillaria porreta*, *Trigonidium insigne* y *Maxillaria procurrens*.

Las especies *Epidendrum quitensium* y *Catasetum macroglossum*, no fueron analizadas debido a que se tenía certeza de su identidad.

Los cebadores utilizados para la identificación fueron: *matK* y *rpoC1*, como se observa en las gráficas 12 y 13 respectivamente:



Los productos obtenidos con el marcador *matK*, para las repeticiones a, b, c de las muestras 4236, 4237 y 4101 respectivamente, presentaron bandas entre las 750 y 1000 pb , demostrando una concentración aproximada de ADN entre los 20 y 100 ng / μ L. Estos resultados coinciden, con los obtenidos por Albán y Toapanta (2019); Montalvo y Vargas (2019) que también trabajaron en la identificación de orquídeas por este método.



Los productos obtenidos con el marcador molecular *rpoCI*, para las repeticiones 4236 (A), 4237 (b) y 4101 (c), evidenciaron bandas de alrededor de 500 pb, demostrando una concentración aproximada de ADN entre los 20 y 100 ng /µL. Resultados similares fueron presentados por Iza (2018), quien estudió orquídeas del género *Dracula* por este método.

3.1.3.1. Análisis bioinformático de las secuencias

En la evaluación de la región *matK* con la herramienta BLAST del GenBank, se encontró que *Maxillaria porrecta*, presentó un 100 % de cobertura de la cadena y un 99,46 % de identidad con la muestra 4236 (Véase **Anexo 4**). *Trigonidium insigne* presentó un 100% de cobertura de la cadena e identidad del 100 % con la muestra 4237 (Véase **Anexo 5**) y *Maxillaria procurrans* obtuvo una cobertura del 100 % de la cadena e identidad del 99,25 % con la muestra 4101 (Véase **Anexo 6**).

En la evaluación de la región *rpoC1* con el software Blast sólo se obtuvo resultados para la muestra 4101, misma que presentó una identidad del 98 % y cobertura del 89 % con *Maxillaria procurrans* (Véase **Anexo 7**).

Los resultados obtenidos fueron corroborados con las descripciones morfológicas de las especies (Véase **Anexo 8, 9, 10**).

En un estudio similar Molineros (2012), identificó orquídeas del género *Vainilla* con el marcador molecular *matK*, para esto también incluyó la caracterización morfológica de las especies.

3.2. Estudio fitoquímico

3.2.1. Obtención de extractos etanólicos

Se obtuvieron cinco extractos etanólicos de las especies *Maxillaria porrecta*, *Maxillaria procurrans*, *Trigonidium insigne*, *Epidendrum quitensium* y *Catasetum macroglossum* en una concentración (1:1) (1 g/mL) de extracto fluido, alcanzando un volumen final de 5 mL para cada uno.

3.2.2. Tamizaje fitoquímico

Los resultados de la caracterización fitoquímica cualitativa, se presentan en la tabla 15 a manera de resumen, pudiéndose también visualizar el **Anexo 11**.

Tabla 15.

Tamizaje fitoquímico de fenoles, taninos, flavonoides y alcaloides en los extractos etanólicos.

Especie	Pruebas			
	Fenoles	Taninos	Flavonoides	Alcaloides
	Prueba con Cloruro férrico	Prueba con Cloruro férrico	Prueba de Shinoda	Prueba de Mayer
<i>M. porrecta</i>	+++	-	++	++
<i>T. insigne</i>	+++	-	+++	++
<i>M. procurrens</i>	+++	+++	+++	+++
<i>E. quitensium</i>	+++	-	-	+
<i>C. macroglossum</i>	++	-	+++	-

Nota: Las abreviaciones de las especies estudiadas corresponden a los géneros: *Maxillaria* (M.), *Trigonidium* (T.), *Epidendrum* (E.), *Catasetum* (C.). Se ocupó la siguiente escala colorimétrica para fenoles, taninos y flavonoides: presencia elevada (+++), intermedia (++), baja (+), inexistente (-). Para alcaloides la escala ocupada fue la siguiente: precipitado blanco coposo (+++), turbidez definida (++) , opalescencia (+), inexistencia (-).

Elaborado por: La autora, 2020.

Se encontró una presencia elevada de fenoles en *Maxillaria procurrens*, *Maxillaria porrecta*, *Trigonidium insigne*, *Epidendrum quitensium*, e intermedia en *Catasetum macroglossum*. En un estudio similar López y otros (2016) también evidenciaron una presencia elevada de fenoles en hojas, flores y seudobulbos de *Prosthechea karwinskii* y *Laelia furfurácea*.

Se observó la presencia de taninos de tipo pirocatecólicos únicamente en el extracto de *Maxillaria procurrens* con una coloración verde intensa. Resultados similares fueron obtenidos por Joseph, Jose, y Sequeira (2018), quienes evaluaron taninos en *Bulbophyllum mysorensis*, *Bulbophyllum sterile*, *Eria pauciflora*, *Eria pseudoclavicaulis*, encontrando presencia elevada de este tipo de compuestos únicamente en *B. sterile*.

La presencia de flavonoides fue elevada en *Maxillaria procurrens* y *Trigonidium insigne*, fue intermedia en *Maxillaria porrecta*, *Catasetum macroglossum* e inexistente en

Epidendrum quitensium. En un estudio similar Cerna y otros (2018), evaluaron flavonoides en orquídeas del género *Epidendrum*, encontrando la presencia de estos compuestos sólo en 4 especies de un total de 11 estudiadas: *E. cochlidium*, *E. nocturnum*, *E. secundum* y *E. secundum*. Otro estudio realizado por Marjoka, Alam, y Huda (2016) también permite evidenciar la presencia de flavonoides en otras orquídeas epífitas de interés medicinal: *Acampe papillosa*, *Cymbidium aloifolium* y *Rhyncostylis retusa*.

En cuanto a los alcaloides, de acuerdo a la prueba de Mayer, se observó la formación de un precipitado blanco coposo en el extracto de *Maxillaria procurrens*, se presentó turbidez definida en los extractos de *Maxillaria porrecta* y *Trigonidium insigne*, opalescencia en el extracto de *Epidendrum quitensium* e inexistencia en el extracto de *Catasetum macroglossum*. Chand, Paudel, y Pant (2016) también evidenciaron la presencia de alcaloides por este método en *Pholidota graminifolia*, *Gastrochilus acutifolius*, *Otochilus albus* y *Pholidota articulata*.

3.2.3. Cuantificación de metabolito secundarios

Se cuantificaron fenoles y flavonoides, ya que se observó una presencia mayoritaria de estos compuestos en los resultados del tamizaje fitoquímico.

3.2.3.1. Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles totales se obtuvieron por la metodología de Folin-Ciocalteu, partiendo de la curva de calibración del estándar de *Ácido gálico*, como se aprecia en la figura 14.

El R^2 obtenido con un valor de 0,9995 demuestra adecuada linealidad y correlación para obtener la cantidad total de fenoles presentes en los extractos etanólicos, a partir de la ecuación de la recta: $y=0,0301x + 0,01$. El contenido medio de fenoles totales en los extractos etanólicos de las cinco especies de orquídeas evaluadas, se presentan en la tabla 16 con un límite de confianza del 95%.

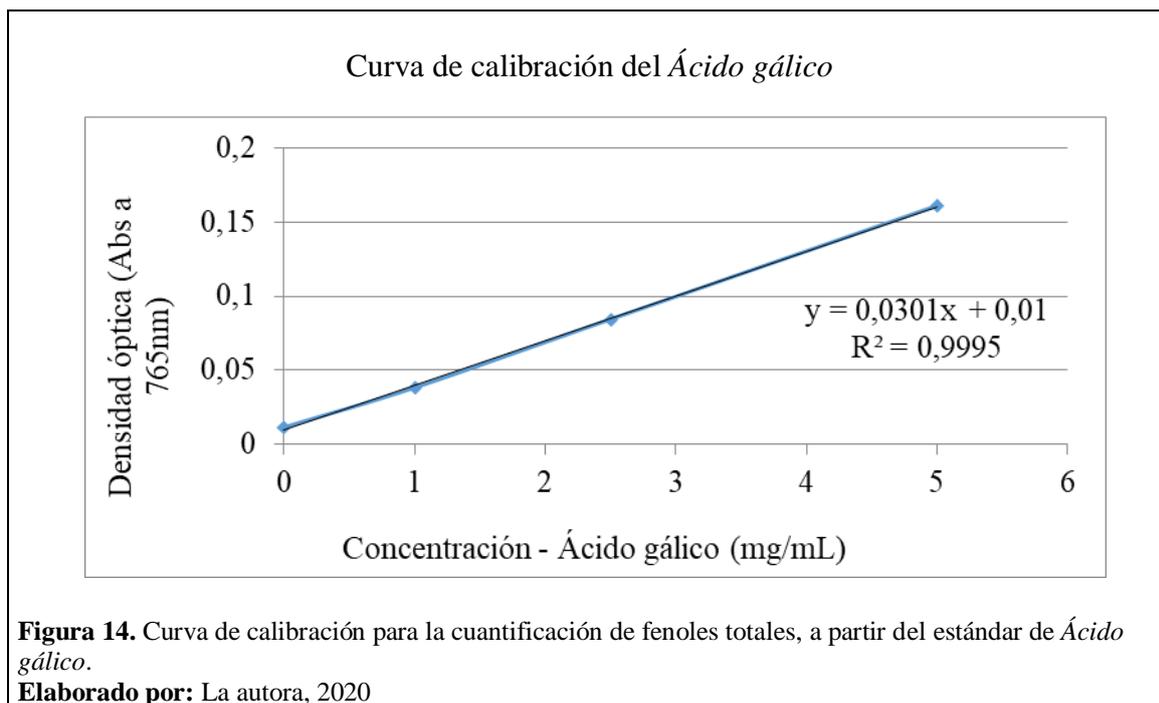


Tabla 16.

Cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales.

Código	Muestra	Absorbancia a 765nm			Promedio	Eq. [mg GAE/ mL de extracto] (fenólicos)
4236	<i>Maxillaria porrecta</i>	0,1913	0,1919	0,1919	0,1917	6,04 ± 0,03
4237	<i>Trigonidium insigne</i>	0,2147	0,2149	0,2145	0,2147	6,80 ± 0,02
4101	<i>Maxillaria procurrens</i>	0,3882	0,3556	0,3880	0,3772	12,20 ± 1,55
4102	<i>Epidendrum quitensium</i>	0,209	0,2001	0,2009	0,2033	6,42 ± 0,41
4254	<i>Catasetum macroglossum</i>	0,1515	0,154	0,1541	0,1532	4,76 ± 0,12

Nota: Los resultados de fenoles totales denotados como mg GAE / mL representan a los mg equivalentes al *Ácido gálico* por mL del extracto.

Elaborado por: La autora, 2020.

Los extractos etanólicos de las orquídeas evaluadas demostraron tener una cantidad moderada de compuestos fenólicos, en relación a estudios previos realizados con orquídeas de interés medicinal. El extracto de *Maxillaria procurrans* ($12,20 \pm 1,55$ mg GAE / mL) evidenció el mayor contenido de compuestos fenólicos totales.

En un estudio similar Rykaczewski y otros (2019) presentaron resultados comparables a los obtenidos en este estudio, con concentraciones de (10,2; 5,39 y 6,56 mg GAE /mL) en los extractos etanólicos de *Sobralia powellii*, *Brasolia catleya* y *Elleanthus oliganthus* respectivamente. Del mismo modo Chimsook (2016) evidenció un contenido medio de fenoles de ($5,52 \pm 0,28$; $8,83 \pm 0,07$ y $7,43 \pm 0,37$ mg GAE / mL) en tres extractos etanólicos de *Dendrobium signatum*. En otro estudio relacionado Chand y otros (2016) demuestran que una presencia moderada de metabolitos fenólicos puede potenciar significativamente la actividad antioxidante de los extractos.

3.2.3.2. Cuantificación de flavonoides totales

La cantidad total de flavonoides se obtuvo a partir de la curva de calibración del estándar de *Quercetina* (Véase **Tabla 17**) el valor de R^2 de 0,9962, indica adecuada linealidad y correlación para calcular los valores totales de flavonoides, partiendo de la ecuación de la recta $y = 4,9622x + 0,0269$, la cual se aprecia a continuación en la figura 15. El contenido medio de flavonoides totales en los extractos etanólicos de las cinco especies de orquídeas evaluadas, se presentan en la tabla 16 con un límite de confianza del 95 %.

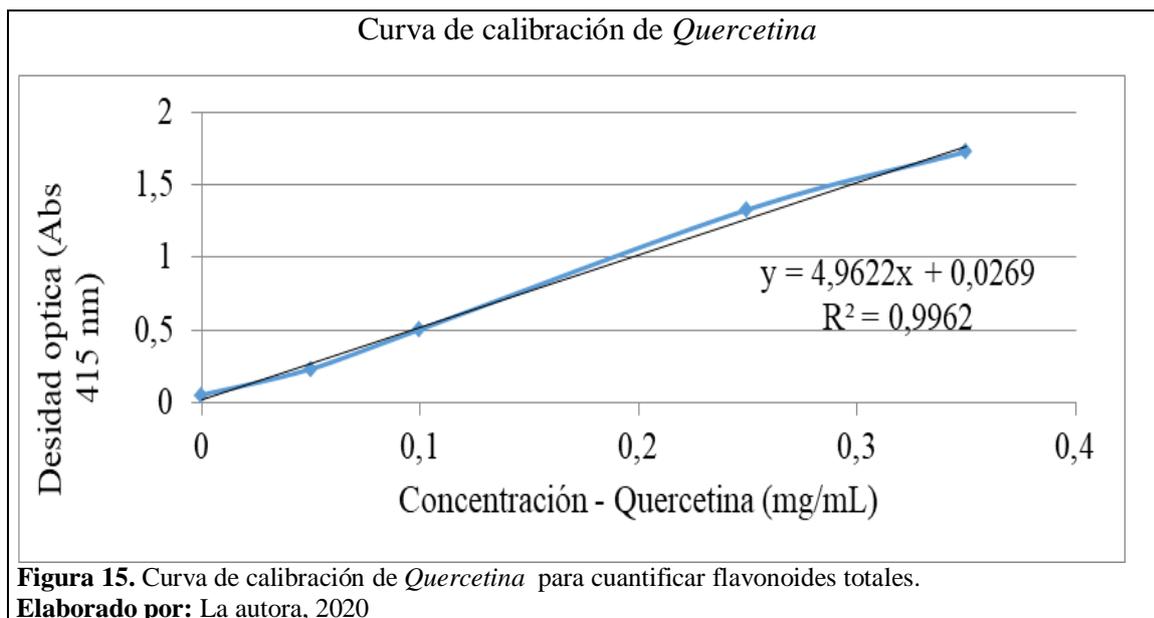


Tabla 17.

Cuantificación de flavonoides totales.

Código	Muestra	Absorbancia a 765nm			Promedio	Eq. [mg QE./ mL de extracto] (flavonoides)
4236	<i>Maxillaria porrecta</i>	0,1937	0,936	0,1935	0,44107	0,08 ± 0,22
4237	<i>Trigonidium insigne</i>	0,1577	0,1565	0,1559	0,15670	0,03 ± 0,00
4101	<i>Maxillaria procurrens</i>	1,0184	1,0241	1,0277	1,02340	0,20 ± 0,00
4102	<i>Epidendrum quitensium</i>	0,4417	0,4435	0,4358	0,44033	0,08 ± 0,01
4254	<i>Catasetum macroglossum</i>	0,1499	0,1519	0,1519	0,15123	0,02 ± 0,01

Nota: Los mg QE / mL, representan a mg equivalentes a la *Quercetina* por mL del extracto.

Elaborado por: La autora, 2020.

Un contenido elevado de flavonoides totales se observó en el extracto etanólico de *Maxillaria procurrens* (80,20 ± 0,00 mg QE / mL) en comparación con los demás extractos, que presentaron un contenido mínimo de estos metabolitos.

Resultados cercanos a los presentados en este estudio fueron obtenidos por Nagananda, Satishchandra y Rajath (2013), quienes evidenciaron concentraciones de flavonoides de: $0,097 \pm 0,317$ y $0,116 \pm 0,152$ mg QE / mL en los extractos etanólicos de pseudobulbos de la orquídea medicinal *Flickingeria nodosa*. Minh y otros (2016), explican que es razonable evidenciar concentraciones pequeñas de flavonoides, ya que estos constituyen fracciones de compuestos fenólicos, en su estudio hallaron contenidos de flavonoides de: $1,65 \pm 0,06$; $1,98 \pm 0,03$; $2,29 \pm 0,05$; $2,97 \pm 0,45$; $1,91 \pm 0,12$ y $0,55 \pm 0,00$ mg QE / mL al evaluar extractos etanólicos de híbridos comerciales de *Phalaenopsi* spp.

3.3. Determinación de la actividad antioxidante

3.3.1. Técnica de DPPH

En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la actividad antioxidante, mediante el ensayo de DPPH.

Tabla 18.

Porcentajes de inhibición de DPPH y valores IC50 obtenidos para los extractos etanólicos.

Muestra	V.M (μ l)	C.M. (mg/ml)	Absorbancia a 517 nm			Prom. Abs.	% Inib. DPPH	IC50
			R1	R2	R3			
Ácido ascórbico	0	0	0,5168	0,5168	0,5167	0,5168	0,000	0,004
	5	0,000166667	0,4427	0,443	0,443	0,4429	14,294	
	10	0,000333333	0,4237	0,4238	0,4239	0,4238	17,990	
	20	0,000666667	0,4085	0,4083	0,408	0,4083	20,996	
	50	0,001666667	0,3995	0,3993	0,3993	0,3994	22,718	
	80	0,002666667	0,3018	0,3036	0,3037	0,3030	41,360	
<i>M. porrecta</i>	0	0	0,5629	0,5617	0,5619	0,5622	0,000	0,165
	5	0,166666667	0,5039	0,5038	0,5038	0,5038	10,377	
	10	0,333333333	0,4628	0,4626	0,4633	0,4629	17,658	
	20	0,666666667	0,3872	0,3837	0,3832	0,3847	31,568	
	50	1,666666667	0,2746	0,2744	0,2745	0,2745	51,171	
	80	2,666666667	0,1501	0,1499	0,1404	0,1468	73,887	
<i>T. insigne</i>	0	0	0,5326	0,5329	0,533	0,5328	0,000	0,174
	5	0,166666667	0,5209	0,5108	0,5008	0,5108	4,129	
	10	0,333333333	0,4781	0,4738	0,4721	0,4747	10,916	
	20	0,666666667	0,4276	0,4275	0,4175	0,4242	20,388	
	50	1,666666667	0,2758	0,2757	0,2657	0,2724	48,877	
	80	2,666666667	0,1309	0,1309	0,1309	0,1309	75,433	
<i>M. procurrens</i>	0	0	0,5167	0,5167	0,5167	0,5488	0,000	0,553
	5	0,166666667	0,4669	0,4539	0,4531	0,5271	11,367	
	10	0,333333333	0,3486	0,3316	0,3314	0,5189	34,740	
	20	0,666666667	0,2266	0,2247	0,2014	0,5056	57,893	
	50	1,666666667	0,0612	0,061	0,0586	0,4707	88,336	
	80	2,666666667	0,036	0,0359	0,0359	0,4338	93,046	
<i>Epidendrum quitensium</i>	0	0	0,5488	0,5488	0,5488	0,5167	0,000	6,628
	5	0,166666667	0,5333	0,5239	0,5242	0,4580	3,948	
	10	0,333333333	0,5195	0,5187	0,5185	0,3372	5,448	
	20	0,666666667	0,5071	0,5049	0,5049	0,2176	7,866	
	50	1,666666667	0,4808	0,4707	0,4607	0,0603	14,225	
	80	2,666666667	0,4479	0,4368	0,4167	0,0359	20,955	
<i>Catasetum macroGLOSSUM</i>	0	0	0,5047	0,5046	0,5046	0,5046	0,000	4,271
	5	0,166666667	0,4746	0,4745	0,4746	0,4746	5,958	
	10	0,333333333	0,4583	0,4583	0,4583	0,4583	9,182	
	20	0,666666667	0,4434	0,443	0,443	0,4431	12,187	
	50	1,666666667	0,4049	0,3948	0,3949	0,3982	21,091	
	80	2,666666667	0,3425	0,3424	0,3423	0,3424	32,149	

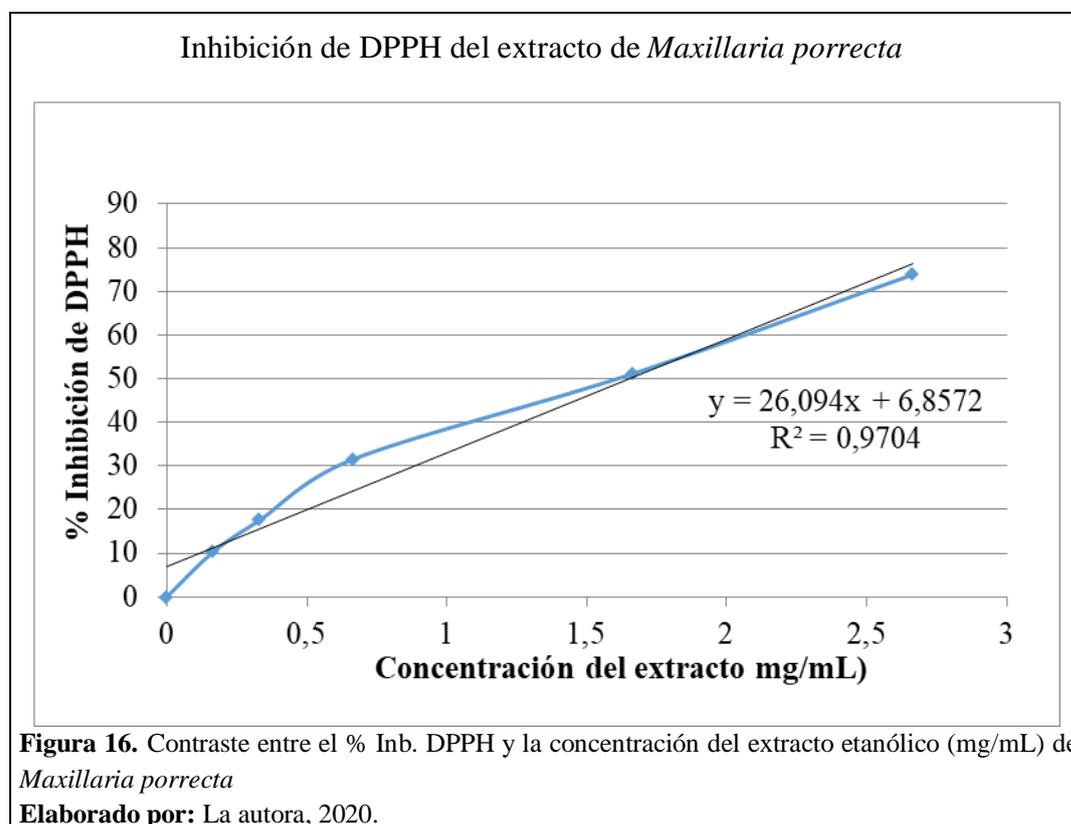
Nota: En el contenido de la tabla se denota: el volumen de la muestra (μ l) como (V.M.), la concentración de la muestra en mg/mL como (C.M.), el promedio de las absorbancias de las muestras (Prom. Abs) y el porcentaje de inhibición del extracto frente al radical DPPH (% Inb. DPPH).

Elaborado por: La autora, 2020.

Mediante el estadístico de Kruskal Wallis se establecieron diferencias significativas entre las medianas de los porcentajes de inhibición de los extractos, al obtenerse un p-valor de 0,0345 a un nivel de significancia de 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, la cual indica que al menos uno de los extractos evaluados presenta un porcentaje de inhibición diferente a los obtenidos para los demás extractos de las especies estudiadas.

La comparación de las medianas permitió evidenciar que el extracto de *Maxillaria procurrens* presentó la mayor inhibición del radical DPPH, observándose similitud estadística de éste con los extractos de *Maxillaria porrecta* y *Trigonidium insigne*. Estos datos son útiles para corroborar la actividad antioxidante de los extractos, dada por el contraste de los valores IC50 (Véase **Figura 21**).

Para determinar la concentración de inhibición del 50 % del radical DPPH o IC50 se establecieron las curvas de calibración usando los porcentajes de Inhibición de DPPH y la concentración del extracto de cada especie. Ver gráficos 16, 17, 18, 19 y 20.



Inhibición de DPPH del extracto de *Trigonidium insigne*

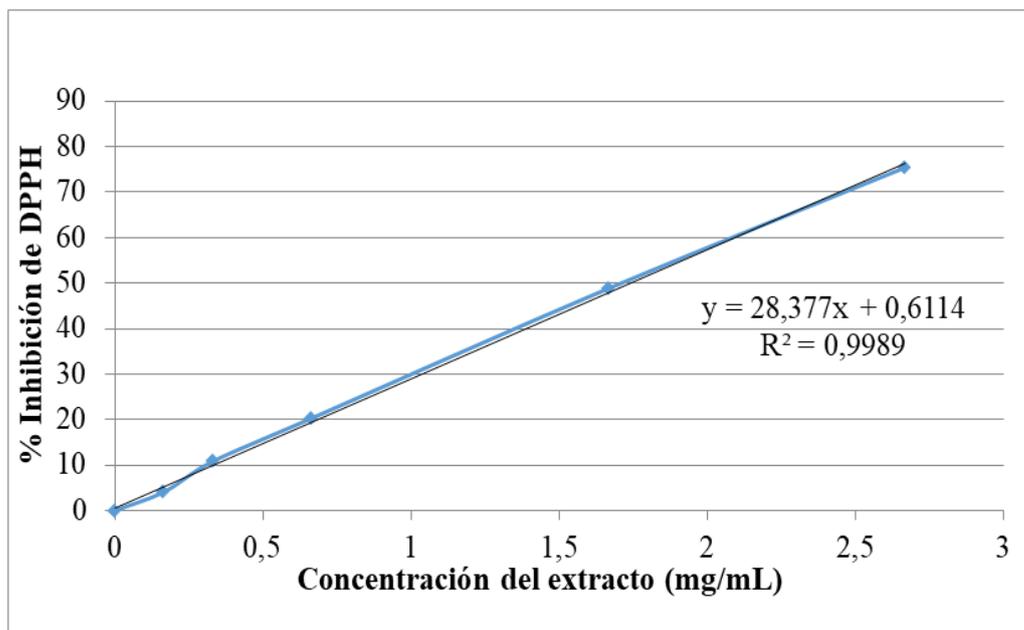
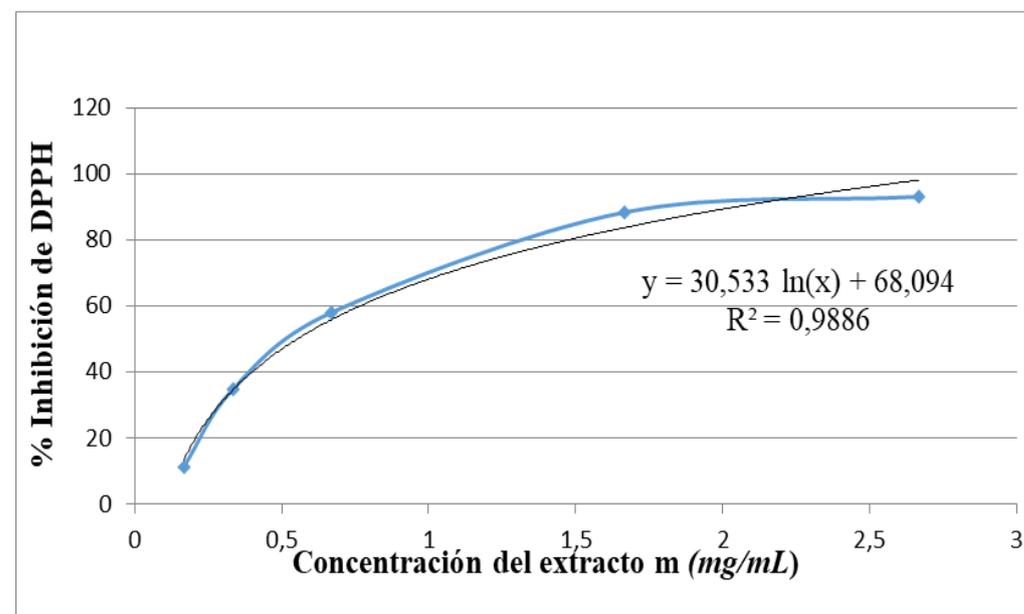


Figura 17. Contraste entre el % Inb. DPPH y la concentración del extracto etanólico (mg/mL) de *Trigonidium insigne*.

Elaborado por: La autora, 2020.

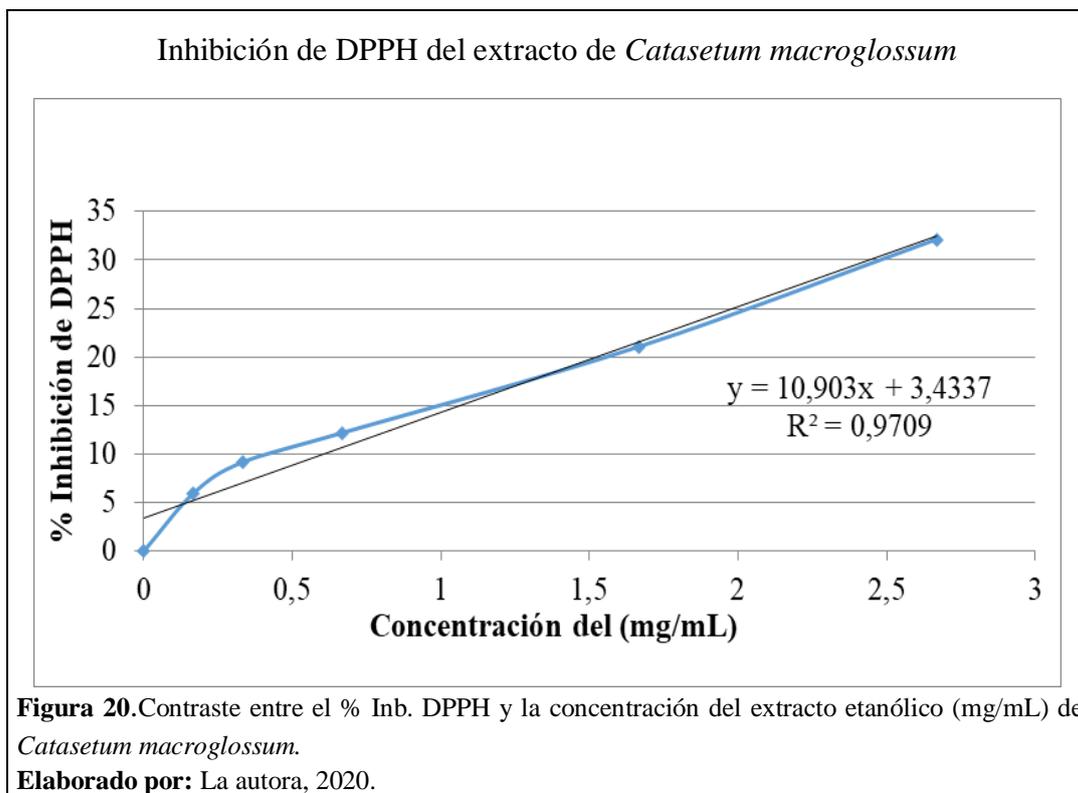
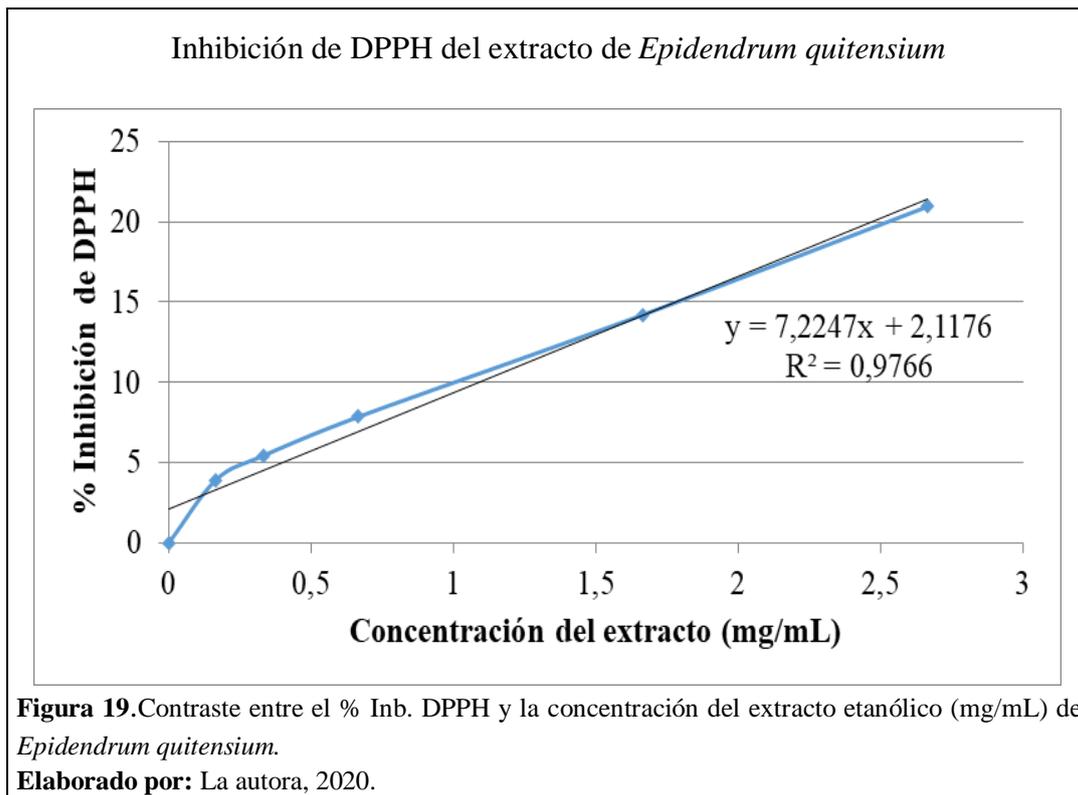
Inhibición de DPPH del extracto de *Maxillaria procurrens*



Nota: La pendiente de la gráfica logarítmica se calcula determinándose el cociente entre sus incrementos.

Figura 18. Contraste entre el % Inb. DPPH y la concentración del extracto etanólico (mg/mL) de *Maxillaria procurrens*.

Elaborado por: La autora, 2020.

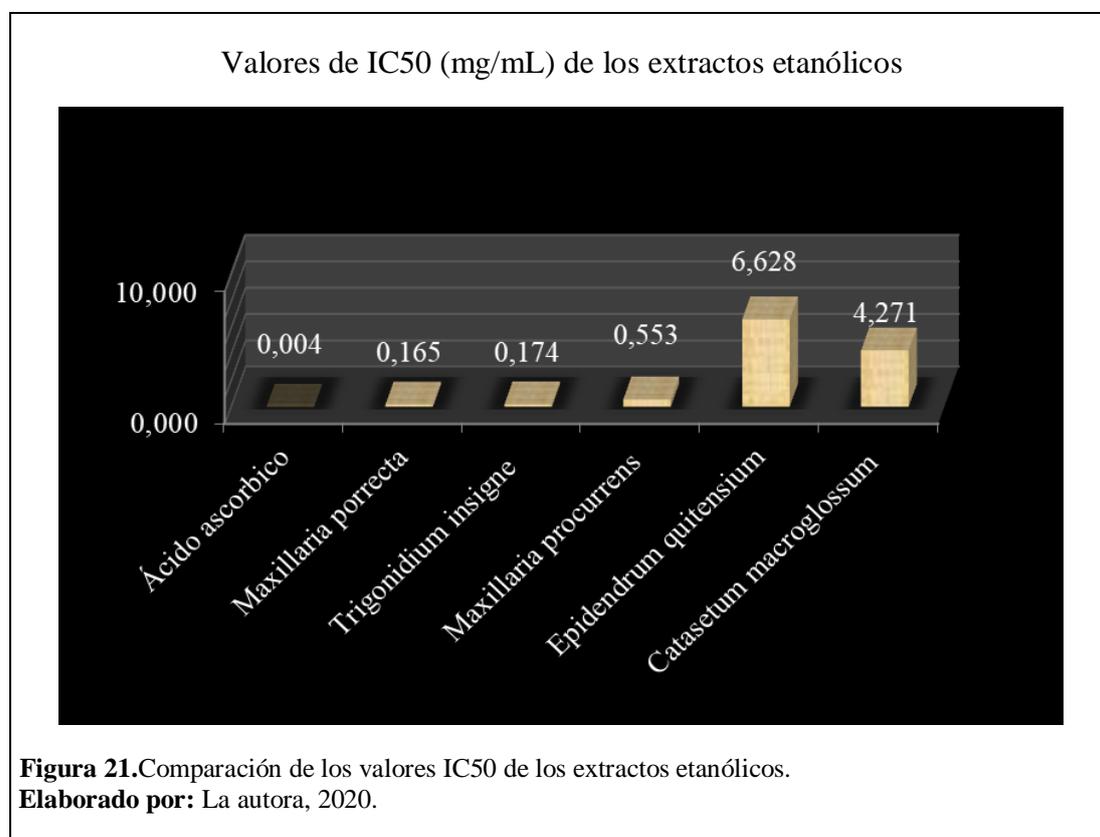


En las gráficas 16, 17, 19 y 20 la relación directamente proporcional entre el porcentaje de inhibición y la concentración de los extractos de *M. porrecta*, *T. insigne*, *E. quitensium*, *C.*

macroGLOSSUM, indica que la inhibición del radical DPPH comienza a concentraciones bajas (0,16 mg/mL) y continúa conforme se incrementa la concentración de los extractos, las regresiones lineales reflejan índices de correlación cercanos a 1 lo que indica que las ecuaciones de las curvas, son confiables para determinar los valores IC50 de los extractos.

Por otra parte en los resultados obtenidos para el extracto de *M. procurrrens* (Ver **Figura 18**) se presenta una gráfica logarítmica, que demuestra que si bien la inhibición del radical DPPH empieza a una concentración baja de (0,16 mg/mL), esta se mantiene constante al alcanzar una concentración intermedia de (1,16 mg/mL), lo que indica que a pesar de que se incremente la concentración del extracto, la inhibición del radical será constante.

En base a las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración, se determinaron los valores de IC50 necesarios para establecer la capacidad antioxidante de los extractos, los cálculos se muestran en el anexo 15, mientras que los resultados se presentan en la tabla 18 y figura 21.



En el análisis estadístico (Ver **Anexo 16**) se generó un conglomerado compuesto por dos grupos:

- Grupo 1.- integrado por el *Ácido ascórbico* y los extractos de *Maxillaria porrecta*, *Trigonidium insigne* y *Maxillaria procurrens*.
- Grupo 2.- integrado por *Catasetum macroglossum* y *Epidendrum quitensium*.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0,05 se demostró que existen diferencias significativas entre los valores IC₅₀ de los extractos, al obtenerse un p-valor de 0,0021, por lo que se acepta la hipótesis alternativa que establece que la actividad antioxidante de las cinco especies de orquídeas evaluadas, es significativamente diferente.

La prueba comparativa de *Tukey* y el conglomerado generado, establecieron similitud estadística entre la actividad antioxidante del *Ácido ascórbico* (control positivo) y la actividad antioxidante de los extractos de *Maxillaria porrecta*, *Trigonidium insigne* y *Maxillaria procurrens*, por lo que se concluye que estas especies tienen un potencial antioxidante significativo.

Estudios relacionados con la actividad antioxidante de orquídeas de importancia medicinal, reportaron resultados cercanos a los obtenidos para el primer grupo del conglomerado de este estudio; así Parveen y otros (2018) obtuvieron 0,137 mg / mL de IC₅₀ para el extracto de *Coelogyne breviscapa*; Chand y otros (2016) presentaron valores de IC₅₀ de: 0,143 y 0,153 mg / mL, para los extractos etanólicos de *Pinalia graminifolia* y *Otochilus albus* respectivamente. Nagananda, Satishchandra y Rajath (2013), presentaron valores de IC₅₀ de: 0,265 y 0,968 mg / mL en los extractos de seudobulbos de *Flickingeria nodosa*. Biswas y otros (2016), evidenciaron 0,4 mg / mL de IC₅₀ en el extracto de *Bulbophyllum sterile*.

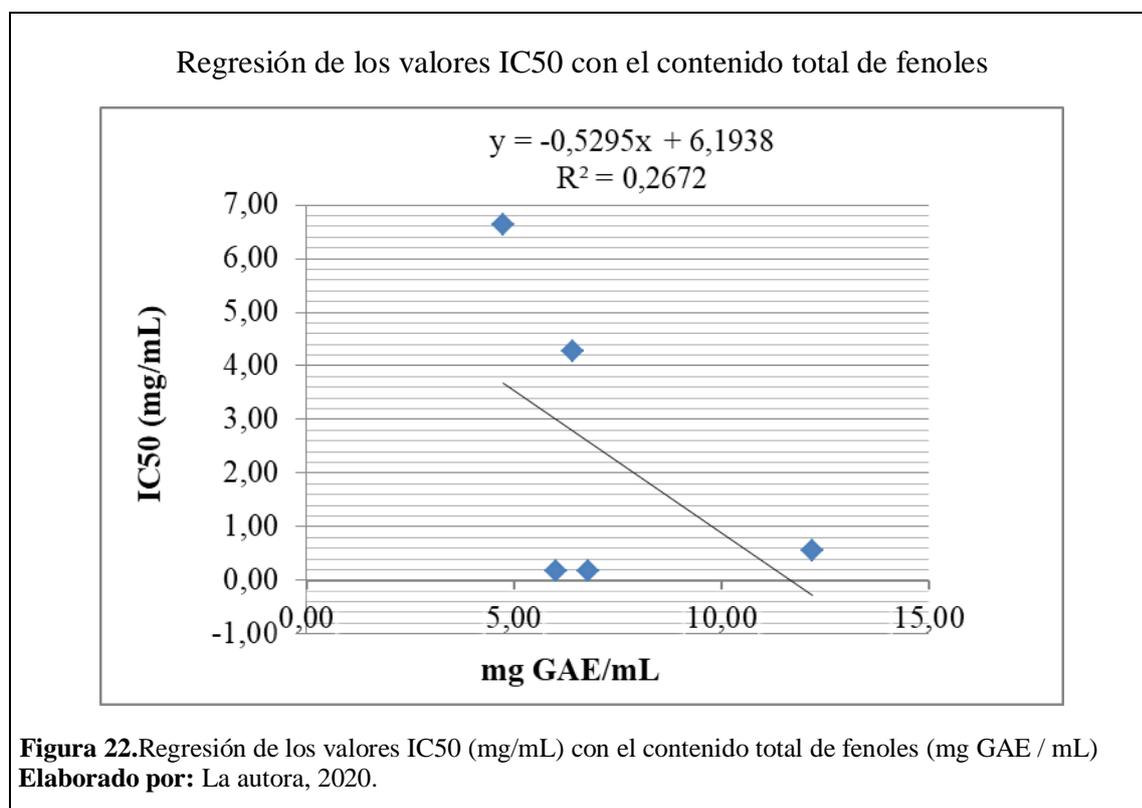
En otros estudios relacionados Cerna y otros (2018) evidenciaron 3,5 mg / mL de IC₅₀ en el extracto etanólico de *Epidendrum nocturnum*, mientras que López y otros (2016)

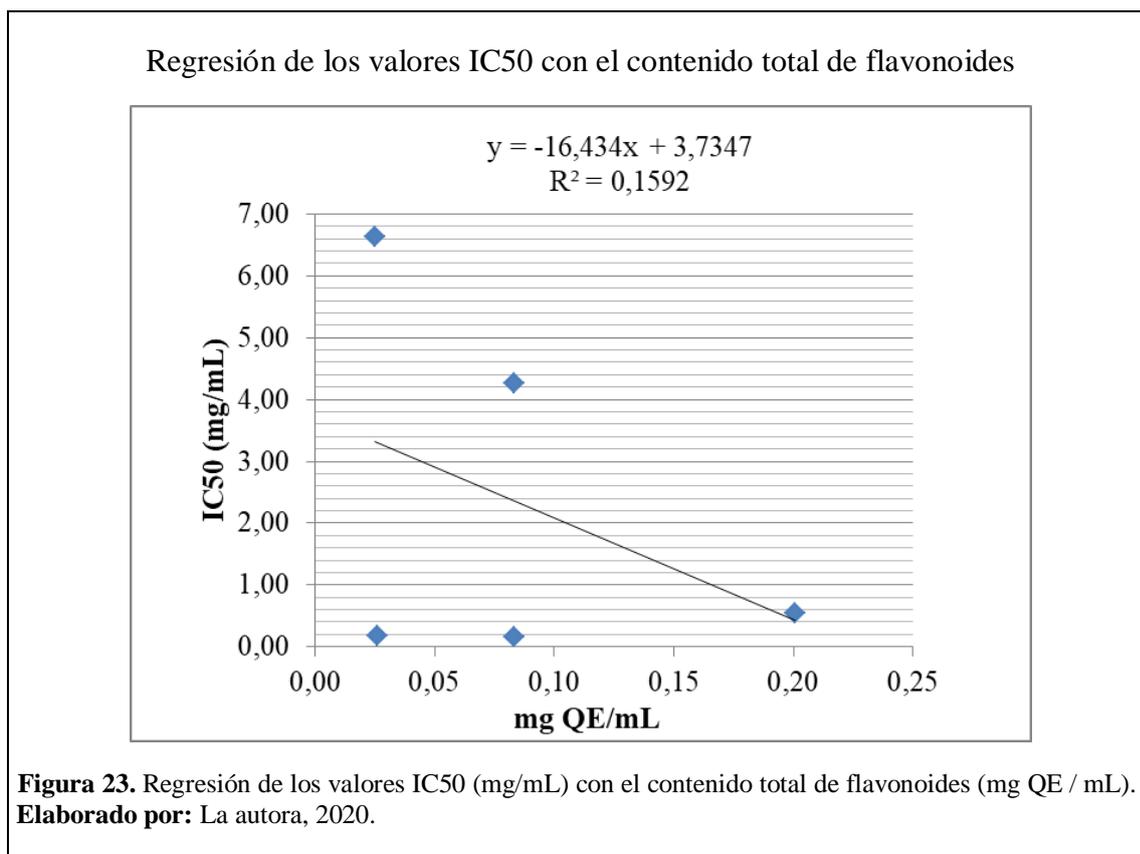
presentaron 2,93 mg / mL de IC₅₀ en el extracto etanólico de *Laelia furfurácea*, los resultados presentados no difieren en gran medida de los obtenidos en esta investigación para los extractos etanólicos del segundo grupo del conglomerado.

Los datos presentados corroboran la presencia de antioxidantes en orquídeas, a la vez que permiten validar los resultados de esta investigación, demostrándose que de las cinco especies evaluadas *Maxillaria porrecta*, *Trigonidium insigne* y *Maxillaria procurrens* tienen elevada actividad antioxidante.

3.3.2. Relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles y flavonoides

Los valores IC₅₀ que determinan la actividad antirradical DPPH de los extractos etanólicos de las cinco especies de orquídeas evaluadas, se correlacionaron negativamente, con el contenido total de fenoles, utilizando la ecuación de regresión: $y = -0,5295x + 6,1938$ y $R^2 = 0,2672$ (Ver **Figura 22**), así como con el contenido total de flavonoides utilizando la ecuación: $y = -16,434x + 3,7347$ y $R^2 = 0,1592$ (Ver **Figura 23**).





La correlación negativa de los valores indica que un incremento en el contenido total de fenoles y flavonoides, provoca un incremento de la actividad antioxidante de los extractos; conociéndose previamente que los valores más bajos de IC50 están relacionados con una mayor actividad antioxidante.

La correlación negativa de este estudio entre los valores más bajos de IC50 y los fenoles totales ($y = -0,5295x + 6,1938$ y $R^2 = 0,2672$) es similar a lo realizado en otros estudios previos de orquídeas de interés medicinal, sin embargo el coeficiente de correlación de los datos de este estudio es bajo en comparación con estudios previos. Por ejemplo en un estudio sobre las orquídeas medicinales de Nepal realizado por Chand y otros (2016), los valores IC50 se correlacionaron negativamente con los fenoles totales, presentando un $R^2 = 0,4022$. En otro estudio sobre las orquídeas medicinales del sur de India, Parveen y otros (2018) evidenciaron un $R^2 = 0,982$. Por otra parte se encontró una moderada correlación negativa entre los valores más bajos de IC50 y los flavonoides totales ($y = -16,434x +$

3,7347 y $R^2 = 0,1592$), en comparación con el estudio de Chand y otros (2016), quienes evidenciaron un $R^2 = 0,0405$. Sin embargo esta correlación resulta baja comparada con los resultados de Parveen y otros (2018), quienes presentaron un $R^2 = 0,983$.

Los coeficientes de correlación de este estudio revelan que los fenoles totales encontrados en los extractos de las cinco especies de orquídeas evaluadas contribuyen a disminuir en un 26,72% la actividad del radical DPPH, mientras que los flavonoides contribuyen con un 15,92 %. Los resultados de esta investigación sugieren que algunas de las propiedades medicinales atribuidas a las especies de orquídeas evaluadas, se deben en parte a su potencial antioxidante, siendo los compuestos fenólicos los que demuestran mayor capacidad de eliminar radicales libres.

Conclusiones

Mediante este estudio se describe el uso de cinco especies de orquídeas para la medicina tradicional ecuatoriana, tres de ellas no han sido aún reportadas: *Maxillaria porrecta*, *Trigonidium insigne* y *Maxillaria procurrens*, estas plantas se utilizan tradicionalmente para tratar afecciones musculares y fracturas óseas.

En los extractos etanólicos de las cinco especies de orquídeas evaluadas, se evidenció la presencia mayoritaria de fenoles, flavonoides y alcaloides, los taninos se evidenciaron en menor medida. La evaluación espectrofotométrica permitió identificar a *Maxillaria procurrens*, como la especie con el mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, lo que sugiere que la actividad antioxidante de esta especie, podría estar influenciada en gran medida por este tipo de metabolitos.

Los extractos etanólicos de las cinco especies de orquídeas evaluadas, demostraron tener una actividad antioxidante influenciada principalmente por la concentración de fenoles totales. Los extractos de *Maxillaria porrecta*, *Trigonidium insigne* y *Maxillaria procurrens*, evidenciaron la mayor actividad antioxidante ya que se relacionaron estadísticamente con el Ácido ascórbico por lo que estas especies podrían tener un potencial uso Fito farmacéutico

Los resultados de esta investigación constituyen el punto de partida para la elucidación de los metabolitos bioactivos, presentes en los extractos evaluados. A demás contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la presencia de antioxidantes en orquídeas y sirven de referencia para el desarrollo de nuevas investigaciones relacionadas a la fitoquímica de orquídeas utilizadas en la medicina tradicional ecuatoriana.

Recomendaciones

Profundizar el estudio etnobotánico de las especies de orquídeas identificadas en la medicina tradicional ecuatoriana, para conocer su uso y aplicación en otras regiones del país.

Identificar estructuralmente fenoles y flavonoides responsables de la actividad antioxidante, mediante cromatografía de capa fina y espectrofotometría de masas.

Realizar una cuantificación espectrofotométrica de alcaloides y analizar los extractos mediante pruebas de toxicidad, puesto que en el extracto: de *Maxillaria procurrens* que es una de las especies que mejores resultados ha brindado, la presencia de alcaloides es bastante evidente.

Evaluar la bioactividad de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en los extractos, mediante ensayos farmacológicos y pruebas sobre cultivos celulares.

Ampliar la investigación, realizando estudios fitoquímicos y la evaluación de la estabilidad genética en plantas micro propagadas, a partir de las especies que demuestran la mayor actividad antioxidante, como estrategia para un uso sustentable de orquídeas de interés medicinal.

Referencias

- Aguado, M., Nuñez, M., Bela, A., Okulik, N., & Bregni, C. (2013). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 44(3), 46–51.
- Ajanal, M., Gundkalle, M., & Nayak, S. (2013). Estimation of total alkaloid in *Chitrakadivati* by UV-Spectrophotometer. *Ancient Science of Life*, 31(4), 198. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.107361>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Olalere, O. A. (2017). Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.08.001>
- Albán, J., & Toapanta, C. (2019). Identificación molecular del género *Caucaea* (orchidaceae) mediante el sistema barcode y análisis químico de los aromas florales (Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador). Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 6–42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Ardoino, S. M., Toso, R. E., & Boeris, M. A. (2013). Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Ciencias Veterinarias*, 15, 115–125.
- Athipornchai, A., & Jullapo, N. (2018). Tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of

- Orchid (*Dendrobium* spp.). *South African Journal of Botany*, 119, 188–192.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.003>
- Biswas, S., Pardeshi, R., Reddy, N., Shoja, M., Nayak, P., Setty, M., & Pai, S. (2016). *Bulbophyllum sterile* petroleum ether fraction induces apoptosis in vitro and ameliorates tumor progression in vivo. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 1419–1427. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.005>
- Bonilla, M., Aguirre, C., Yepes, D., Gallego, E., & Otero, T. (2016). *Catasetum* (Orchidaceae: Catasetinae) en Colombia: lista actualizada. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(1), 22–35. <https://doi.org/10.18359/rfcb.1851>
- Brand, W., Cuvelier, E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25–30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Castellanos, C., & Torres, G. (2018). Guía para la identificación y el cultivo de algunas especies de orquídeas nativas de Cundinamarca (1st ed.; Instituto Alexander von Humboldt., Ed.). Bogotá D. C., Colombia.
- Cerna, J., & Rodríguez, R. (2013). Características farmacognósticas y cuantificación de flavonoides totales del extracto fluído de hojas de *Cynara scolymus* var. *imperial star* proveniente del sector Tanguche, provincia Virú, región La Libertad. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Cerna, M., Cárdenas, S., Cruz, A., & Jácome, I. (2012). Colección de germoplasma de especies de la familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez - Morona Santiago, Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 16(2), 5–13.
<https://doi.org/10.17163.lgr.n20.2014.01>

- Cerna, M., Mencias, F., Salazar, T., & Gutiérrez, S. (2018). Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea* Phytochemical. *Bionat*, *1*(1), 1–18.
- Cetzal, W., Noguera, E., & Basu, S. (2014). Orchidaceae: The Largest Family of Flowering Plants. *Encyclopedia of Earth*, 1–8. Retrieved from www.eoearth.org/view/article/53725e08ocf2aafa2ccd8e15
- Chand, M., Paudel, M. R., & Pant, B. (2016). The antioxidant activity of selected wild orchids of Nepal. *Journal of Coastal Life Medicine*, *4*(9), 731–736. <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016j6-141>
- Chase, M., Kenneth, C., John, F., Alec, P., Salazar, G., Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *177*, 151–174.
- Chimsook, T. (2016). Phytochemical screening, total phenolic content, antioxidant activities and cytotoxicity of *Dendrobium signatum* leaves. *MATEC Web of Conferences*, *62*, 1–6. <https://doi.org/10.1051/matecconf/20166203005>
- Chinsamy, M., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2014). Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterase activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. *South African Journal of Botany*, *91*, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.12.004>
- Christenhusz, M., & Byng, J. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, *261*(3), 201–217. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Coy, C., Parra, J., & Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia*

- heptaphylla* (rutaceae). *Elementos*, 4(4). <https://doi.org/10.15765/e.v4i4.513>
- Cribb, P. (2010). The orchid collections and illustrations of Consul Friedrich C. Lehmann. *Lankesteriana*, 10(2–3), 1–222. <https://doi.org/10.15517/lank.v10i2-3.18317>
- Dalar, A., Guo, Y., Esim, N., Sukru, A., & Konczak, I. (2015). Health attributes of an endemic orchid from Eastern Anatolia , *Dactylorhiza chuhensis* Renz & Taub . – In vitro investigations. *Perspectives in Medicine*, 5(2), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.02.001>
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. In L. De la Torre, H. Navarrete, P. Muriel, M. Macía, H. Balslev, D. la T. Carlos, ... V. de Contreras (Eds.), *Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus*. (Primera). Quito.
- Díaz, M. (2013). Manual de cultivo de orquídeas. *III Encuentro Mexicano de Orquideología*, p. 68. Retrieved from www.sev.gob.mx/Difucion/Publicaciones
- Díaz, N., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., ... Túnez, I. (1984). Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. In *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba*. <https://doi.org/10.4271/841496>
- Dodson, C. (2003). Why are there so many orchid species? *Lankesteriana*, 7(2), 99–103. <https://doi.org/10.15517/lank.v3i2.23028>
- Dressler, R. (1993). Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Robert L. Dressler. In *The Quarterly Review of Biology*. <https://doi.org/10.1086/418905>

- Endara, L., Hirtz, A., Reynolds, A., Neubig, K., Hagsater, E., Jost, L., ... Cornejo, X. (2011). Orchidaceae. In *Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (2nd ed., pp. 441–793). Quit: Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Endara, L., Williams, N., & Hall, D. (2009). Patrones De Endemismo De Orquídeas Endémicas Ecuatorianas : *ResearchGate*, (August 2017), 63–70. <https://doi.org/10.1117/12.2028244>
- Estrada, S., López, J., Molina, R., & Mata, R. (2004). Spasmolytic stilbenoids from *Maxillaria densa*. *Fitoterapia*, 75(7–8), 690–695. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.08.004>
- Fernández, D., Tobar, F., Garzón, C., Yáñez, M., Mena-, J., & González, D. (2018). Orquídeas y Bromelias de la provincia de El Oro. In *Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de El Oro GADPEO e Instituto Nacional de Biodiversidad INABIO*.
- 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).
- González, A. (2009). Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana* (Tesis de Masterado), Instituto Politécnico Nacional, México.
- Govaerts R., Bernet, P., Kratochvil, K., Gerlach, G., Carr, G., Alrich, P., ... JJ, W. (2017). World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens, Kew. Retrieved January 16, 2019, from Kewsicience website: <https://wcsp.science.kew.org/prepareChecklist.do?jsessionid=07847CA38311372A7796543731286EEC.kppapp05->

wcsp?checklist=selected_families%40%40016160120191716081

Guerrero, M. (2012). Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides* (casahuate). 78. Retrieved from http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/11616.pdf

Guerrero, N. (2014). “Caracterización Fitoquímica y Actividad Biológica de *Oryctanthus spicatus* (Loranthaceae) (Tesis de pregrado), Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.

Guevara, F. (2013). Etnobotánica y sustancias bioactivas de las principales especies no maderables con potencial económico de los bosques de neblina del norte del Perú, CIPCA, Perú.

Hinsley, A., DeBoer, H., Fay, M., Gale, S., Gardener, L., Gunaskeka, R., ... Wong, S. (2018). A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(3), 435–455.

Hollingsworth, P., Li, D. Z., Van Der Bank, M., & Twyford, A. (2016). Telling plant species apart with DNA: From barcodes to genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1702). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0338>

Hossain, M. (2011). Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances - An overview. *Fitoterapia*, 82(2), 102–140. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>

Huang, X., Ci, X. Q., Conran, J. G., & Li, J. (2015). Application of DNA barcodes in Asian tropical trees - A case study from Xishuangbanna Nature Reserve, Southwest China. *PLoS ONE*, 10(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129295>

International Barcode of Life. (2020). DNA BARCODING a tool for specimen

- identification and species discovery. Retrieved June 21, 2020, from <https://ibol.org/about/dna-barcoding>
- Iza, M. L. (2018). Identificación molecular de especies de orquídeas del género *Dracula*, mediante el sistema *BARCODE* (Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador). Retrieved from <https://www.dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15043>
- Jørgensen, P.-M., Fuentes, A. F., Miranda, T., & Cayola, L. (2015). Manual de equipos de trabajo. *Jardín Botánico de Missouri*, Vol. 1, p. 330. Retrieved from http://www.sanidad.ccoo.es/comunes/recursos/15617/doc68456_Manual_de_Maquinas_y_Equipos_de_Trabajo.pdf
- Jørgensen, P., & León, S. (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador (75th ed.; V. Hollowell, Ed.). U.S.A.: Missouri Botanical Garden Press.
- Joseph, M., Jose, L., & Sequeira, S. (2018). A comparative phytochemical screening of four epidendroid orchids of Kerala , India. *Orchid Soc.*, 32, 41–43.
- Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567–1574. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1567-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74)
- Kinghorn, D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Asakawa, Y., & Liu, J.-K. (2019). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 108. In *Springer International Publishing / Google Books* (1st ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-01099-7>
- Lalama, J., Montes, S., & Zaldumbide, M. (2016). Etnobotánica de plantas medicinales en el cantón Tena , para contribuir al conocimiento , conservación y valoración de la diversidad vegetal de la región amazónica. *Dominio de Las Ciencias*, 2, 26–48.

- Leon, H. (2014). Inventario taxonómico de especies de la familia orchidaceae en un área de bosque andino del predio La Sierra, santuario de fauna y flora Guanentá alto rio fonce. UNAD.
- Lipińska, M. M., & Kowalkowska, A. K. (2018). Floral morphology and micromorphology of selected *Maxillaria* species (Maxillariinae, orchidaceae). *Wulfenia*, 25(January 2019), 242–272.
- López, A., Barragan, G., Lagunez, L., & Solano, R. (2016). Capacidad antioxidante y perfil fitoquímico de dos especies de orquídeas mexicanas. *Journal CIM*, 4, 605–610.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J., Kim, S. C., & Gómez, A. (2008). Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62(2), 127–138. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>
- Marjoka, A., Alam, O., & Huda, M. (2016). Phytochemical screening of three medicinally important epiphytic orchids of Bangladesh. *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, 5(1), 95–99. <https://doi.org/10.3329/jujbs.v5i1.29748>
- Miceli, C., Borraz, F., Córdoba, M., & Gutiérrez, H. (2014). *Orquídeas de la Reserva de la Biosfera Selva El Ocote, Chiapas, México* (1st ed.). Chiapas: Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Minh, T., Khang, D. T., Tuyen, P. T., Minh, L. T., Anh, L. H., Van Quan, N., ... Xuan, T. D. (2016). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Phalaenopsis* orchid hybrids. *Antioxidants*, 5(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox5030031>
- Ministerio del Ambiente. (2015). *Quinto informe Nacional Para el Convenio sobre Diversidad Biológica*. Quito, Ecuador.
- Missouri Botanical Garden. (2020). Plant Science . Retrieved June 21, 2020, from

<https://www.missouribotanicalgarden.org/plant-science/plant-science/about-science-conservation.aspx>

Molineros, F. (2012). Caracterización morfológica y filogenia del género *Vanilla* en el distrito de Buenaventura-valle del Cauca (Colombia). Retrieved from <http://www.unal.edu.co/>

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, Ecuador). Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

Mosquera, T., Parra, M., Flor, H., & Noriega, P. (2017). Phytochemical standardization of hydroalcoholic extracts of ishpingo, *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. *Journal of Medicinal Plants Research*, *11*(36), 568–575. <https://doi.org/10.5897/jmpr2017.6447>

Nagananda, G., Satishchandra, N., & Rajath, S. (2013). Phytochemical evaluation and in vitro free radical scavenging activity of cold and hot successive pseudobulb extracts of medicinally important orchid *Flickingeria nodosa* (Dalz.) Seidenf. *Journal of Medical Sciences (Faisalabad)*, *13*(6), 401–409. <https://doi.org/10.3923/jms.2013.401.409>

Noriega, P., Sola, M., Barukcic, A., Garcia, K., & Osorio, E. (2015). Cosmetic Antioxidant Potential of Extracts from Species of the *Cinchona Pubescens* (Vahl). *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, *2*(1), 14. <https://doi.org/10.15171/ijpni.2015.14>

Obsuwan, K., Jeong, B., & Maksup, S. (2019). Analysis of bioactive compounds, polysaccharides and antioxidant activity in different parts of *Dendrobium* “Sonia Jo Daeng.” *Science, Engineering and Health Studies*, *13*(2), 73–82.

<https://doi.org/10.14456/sehs.2019.8>

Pant, B. (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*, 7(10), 448–467.

<https://doi.org/10.5897/ajps2013.1031>

Paromik, B., Suman, K., Nikhil, J., & Pramod, T. (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>

Parveen, S., Ramesh, C., 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>

Paudel, M., Chand, M., Pant, B., & Pant, B. (2019). Assessment of antioxidant and cytotoxic activities of extracts of *Dendrobium crepidatum*. *Biomolecules*, 9(9).

<https://doi.org/10.3390/biom9090478>

Peñarrieta, M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J., & Bravo, J. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31, 68–81. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0507.ch001>

Pérez, Á., Romoleroux, K., Zapata, N., Cevallos, D., Yela, H., Jost, L., & Tobar, F. (2020). Nuevo registro, redescubrimiento y notas taxonómicas de Orchidaceae de Ecuador.

Neotropical Biodiversity, 6(1), 88–97.

<https://doi.org/10.1080/23766808.2020.1752097>

Pessoa, E., Alves, M., Alves, A., Palma, C., & Pinheiro, F. (2012). Integrating different

- tools to disentangle species complexes: A case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). *Taxon*, 61(4), 721–734. <https://doi.org/10.1002/tax.614002>
- Petini, A., & Soares, C. (2017). New taxa of *Catasetum* (Orchidaceae , Catasetinae) from Mato Grosso , Brazil. *Richardiana*, (October). Retrieved from file:///C:/Users/HP/Downloads/4-Richardiana-Jardin-botanique-de-Guyane-Catasetum-paranaitense.pdf
- Ramos, C., Crivos, M., Colares, M., Spegazzini, D., & Rosella, A. (2011). Relevamiento etnofarmacobotánico de plantas medicinales usadas en tres zonas diferentes del cantón quevedo, provincia de Los Ríos (Ecuador). *Rojasiana*, 10(1), 9–20.
- Ramos, P., Colareda, G., Rosella, M., & Debenedetti, S. (2012). Phytochemical Profile and Anti-Inflammatory Effect of the Orchid *Catasetum macroglossum*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31(May 2014), 7–62.
- Randriamiharisoa, M., Kuhlman, A., Jeannoda, V., Rabarison, H., Rakotoarivelo, N., Randrianarivony, T., ... Bussmann, R. (2015). Medicinal plants sold in the markets of Antananarivo, Madagascar. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13002-015-0046-y>
- Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). *Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas*. (Primera). Retrieved from <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6653>
- Royal Botanic Gardens. (2020). Plants of the World Online | Kew Science. Retrieved June 21, 2020, from Kew science website: <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
- Royal Botanic Gardens, K. (2017a). *Catasetum* Rich. ex Kunth. Retrieved May 30, 2020, from Plants of the World Online | Kew Science website:

<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000124-2>

Royal Botanic Gardens, K. (2017b). *Epidendrum* L. | Plants of the World Online | Kew Science. Retrieved May 30, 2020, from Plants of the World Online | Kew Science website:

<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:326435-2>

Royal Botanic Gardens, K. (2017c). *Maxillaria* Ruiz & Pav. Retrieved May 30, 2020, from Plants of the World Online | Kew Science website:

<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:322776-2>

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(January), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.01.008>

Sánchez, Y., Santacruz, A., Téllez, N., Villa, D., Rincón, M., Mateus, A., ... Martínez, L. (2015). Fitoquímica de cinco especies del género *Baccharis* (*B. boyacensis* Cuatr, *B. lehmannii* Klatt, *B. macrantha* Kunth, *B. bogotensis* Kunth, *B. mutisiana* Cuatrec) endémicas del altiplano Cundiboyacense. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4253.7448>

Santizo, I. (2004). Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Universidad De San Carlos De Guatemala.

Schuster, R., Zeindl, L., Holzer, W., Khumpirapang, N., Okonogi, S., Viernstein, H., & Mueller, M. (2017). *Eulophia macrobulbon* – an orchid with significant anti-inflammatory and antioxidant effect and anticancerogenic potential exerted by its root extract. *Phytomedicine*, 24, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.11.018>

- Sharma, C., Dixit, M., Singh, R., Agrawal, M., & Nizam, M. (2015). Potential osteogenic activity of ethanolic extract and oxo flavonoid isolated from *Pholidota articulata* Lindley. *Journal of Ethnopharmacology*, 170, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.04.045>
- Sharma, C., Nizam, M., Dixit, M., Shukla, P., Kumari, T., Bhandari, S. P. S., ... Arya, K. R. (2014). Phytochemistry of ethanolic extract of *Coelogyne cristata* Lindley (Orchidaceae) and its compound coelogin promote osteoprotective activity in ovariectomized estrogen deficient mice. *European Journal of Integrative Medicine*, 21(12), 1702–1707. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.008>
- Singer, R. (2009). Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. *Acta Biológica Colombiana*, 14, 337–348.
- Singh, S., Singh, A. K., Kumar, S., Kumar, M., Pandey, P. K., & Singh, M. C. K. (2012). Medicinal properties and uses of orchids: a concise review. *Elixir Appl. Botany*, 52(January 2016), 11627–11634. Retrieved from www.elixirjournal.org
- Soto, M. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.21895/incres.2015.v6n1.04>
- Suleiman, A., Abubakar, A., Sulaiman, R., & Sulaiman, I. (2018). Antioxidant content and in vitro 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging activity of selected medicinal plants. *Intercultural Ethnopharmacology*, 7(1), 57–65.
- Swiss Orchid Foundation. (2016a). *Maxillaria porrecta* Lindl. Retrieved July 4, 2020, from Herbarium Jany Renz website: https://orchid.unibas.ch/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=3&SearchResultID=317518/Maxillaria/porrecta/Lindley_John&setLang=en-GB

- Swiss Orchid Foundation. (2016b). *Maxillariella procurrens* (Lindl.) M.A.Blanco & Carnevali. Retrieved July 4, 2020, from Herbarium Jany Renz website: https://orchid.unibas.ch/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=3&SearchResultID=313259/Maxillariella/procurrens/Lindley_John&setLang=en-GB
- Swiss Orchid Foundation. (2016c). *Trigonidium insigne* Rchb.f. ex Benth. & Hook.f. Retrieved July 4, 2020, from Herbarium Jany Renz website: https://orchid.unibas.ch/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=3&SearchResultID=311087/Trigonidium/insigne&setLang=en-GB
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, *111*(1), 63–81. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>
- Teoh, E. S. (2016). Medicinal orchids of Asia. In *Springer Nature*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3>
- The Angiosperm Phylogeny Group APG. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *181*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- The Plant List. (2013a). A working list of all known plant species. Retrieved July 8, 2020, from <http://www.theplantlist.org/>
- The Plant List. (2013b). *Catasetum macroglossum* Rchb.f. — The Plant List. Retrieved July 7, 2020, from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-35533>
- The Plant List. (2013c). *Epidendrum quitensium* Rchb.f. — The Plant List. Retrieved July

7, 2020, from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-69387>

The Plant List. (2013d). *Maxillaria porrecta* Lindl. — The Plant List. Retrieved July 3, 2020, from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-122876>

The Plant List. (2013e). *Maxillariella procurrens* (Lindl.) M.A.Blanco & Carnevali — The Plant List. Retrieved July 7, 2020, from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-374836>

The Plant List. (2013f). *Trigonidium insigne* Rchb.f. ex Benth. & Hook.f. — The Plant List. Retrieved July 3, 2020, from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-208717>

Thermo Fisher Scientific. (2018). *Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit : Plant Genotyping And Transgene Detection Without DNA Purification* (pp. 2–4). pp. 2–4. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F130WH#/F130WH>

Thermo Fisher Scientific Inc. (2012). *Thermo Scientific O'GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use*. Retrieved from https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013076_OGeneRuler_Express_DNALadder_RTU_UG.pdf

Tropicos. (2020a). *Maxillaria procurrens* Lindl. Retrieved July 7, 2020, from Missouri Botanical Garden website: <http://legacy.tropicos.org/NamePage.aspx?nameId=23510756&projectId=2>

Tropicos. (2020b). Tropicos | Name - *Catasetum macroglossum* Rchb. f. Retrieved July 7, 2020, from Missouri Botanical Garden website: <http://legacy.tropicos.org/NamePage.aspx?nameId=23511453&projectId=2>

- Tropicos. (2020c). Tropicos | Name - *Epidendrum quitensium*. Retrieved July 7, 2020, from Missouri Botanical Garden website: <https://www.tropicos.org/name/23508380>
- Tropicos. (2020d). Tropicos | Name - *Maxillaria porrecta* Lindl. Retrieved July 3, 2020, from Missouri Botanical Garden website: www.tropicos.org/Name/23516227
- Tropicos. (2020e). Tropicos | Name - *Trigonidium insigne* Rchb. f. ex Benth. & Hook. f. Retrieved July 3, 2020, from Missouri Botanical Garden website: <http://legacy.tropicos.org/NamePage.aspx?nameId=23510806&projectId=2>
- UNEP-WCMC. (2017). CITES Trade Database. Retrieved January 16, 2019, from CITES Trade Database website: <https://trade.cites.org/>
- USP30. (2007). Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos: Pruebas químicas-Extractos botánicos. In *Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 30) y Formulario Nacional (NF 25)* (30th ed.).
- Vanegas, E. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *UCV-Scientia*, 4(2), 161–175.
- Vijayan, K., & Tsou, C. H. (2010). DNA barcoding in plants: Taxonomy in a new perspective. *Current Science*, 99(11), 1530–1541.
- Vítek, P., Jehlička, J., Ascaso, C., Mašek, V., Gómez-Silva, B., Olivares, H., & Wierzechos, J. (2014). Distribution of scytonemin in endolithic microbial communities from halite crusts in the hyperarid zone of the Atacama Desert, Chile. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(2), 351–366. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12387>
- Whitten, M., Blanco, M., Williams, N., Koehler, S., Carnevali, G., Singer, R. B., ... Neubig, K. (2007). Molecular phylogenetics of *Maxillaria* and related genera

- (Orchidaceae: Cymbidieae) based on combined molecular data sets. *American Journal of Botany*, 94(11), 1860–1889. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.11.1860>
- Whitten, W., & Blanco, M. (2011). Defining Generic Limits in *Maxillaria*. *Orchids*, 80(2), 104–113.
- Zambrano, B., & Solano, R. (2016). Una nueva especie de *Maxillaria* (Orchidaceae: Maxillariinae) del suroccidente de Ecuador. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 29–34. Retrieved from http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42520988013%0Ahttp://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532011000300015&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, 40(4), 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>
- Zotz, G., & Winkler, U. (2013). Aerial roots of epiphytic orchids: The velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia*, 171(3), 733–741. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2575-6>

Anexos

Anexo 1. Uso de cinco especie de orquídeas en la medicina tradicional de Pichincha, Cotopaxi y Santo Domingo de los Tsáchilas.

Código	Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada	Aplicación terapéutica	Forma de preparación y uso	Entrevista de referencia
4102	<i>Epidendrum quitensium</i>	Flor de Cristo / Maygua	Flores y hojas	Flores: afecciones nerviosas: “tembladera” hormigueo, entumecimiento de los músculos. Hojas: inflamaciones de los riñones	Se bebe la infusión de las flores y de hojas, estas últimas se preparan en combinación con hojas de cola de caballo y diente de león.	Mirian Yanez
4101	<i>Maxillaria procurrans</i>	Bulbo	seudobulbos	Dolores del músculo.	El macerado del seudobulbo, en combinación con hojas de matico.	Martha Lema
4237	<i>M.axillaria porrecta</i>	Soldador a	seudobulbos	Golpes o fracturas del hueso.	Los seudobulbos se cortan y se pasan por fuego para colocar en la parte fracturada se usa en combinación con la cera de árbol de copal (<i>Protium copal</i>) El seudobulbo se machaca y se aplica sobre golpes o magulladuras	Marcelo Arias
4236	<i>Trigonidium insigne</i>	Pegante o Sanadora	seudobulbos			
4254	<i>Catasetum macroglossum</i>	Suelda con suelda	seudobulbos	Torceduras o desviaciones del tobillo, fracturas del hueso	Se extrae la pulpa del seudobulbo y se coloca en la parte afectada	José Jende Aguavil

Nota: La información procede de las entrevistas realizadas a yuyeros y sobadores del mercado San Roque, en la provincia de Pichincha, mercado de La Maná en la provincia de Cotopaxi y feria Kasama de la provincia de Santo Domingo de los Tsachilas.

Elaborado por: La autora, 2020

Anexo 2. Entrevistas personales a hierberos, curanderos y sobadores sobre el uso de orquídeas medicinales.



Nota: A1. Entrevista realizada a Miriam Yanez hierbera de 40 años en el mercado San Roque, provincia de Pichincha. A2. Entrevista realizada a Martha Lema, hierbera de 43 años del mercado Ñaquito, provincia de Pichincha. B1. Entrevista realizada a Jose Jende Aguavil, curandero de 78 años en la feria de plantas medicinales de Congoma, Santo Domingo de los Tsáchilas

Anexo 3. Procesamiento de muestras para herbario, elaboración de vouchers de orquídeas.



Cod.4236: *Maxillaria porrecta*



Cod.4237: *Trigonidium insigne*



Cod.4101: *Epidendrum quitensium*



Cod.4102: *Maxillaria procurrens*



Cod. 4254: *Catasetum macroglossum*

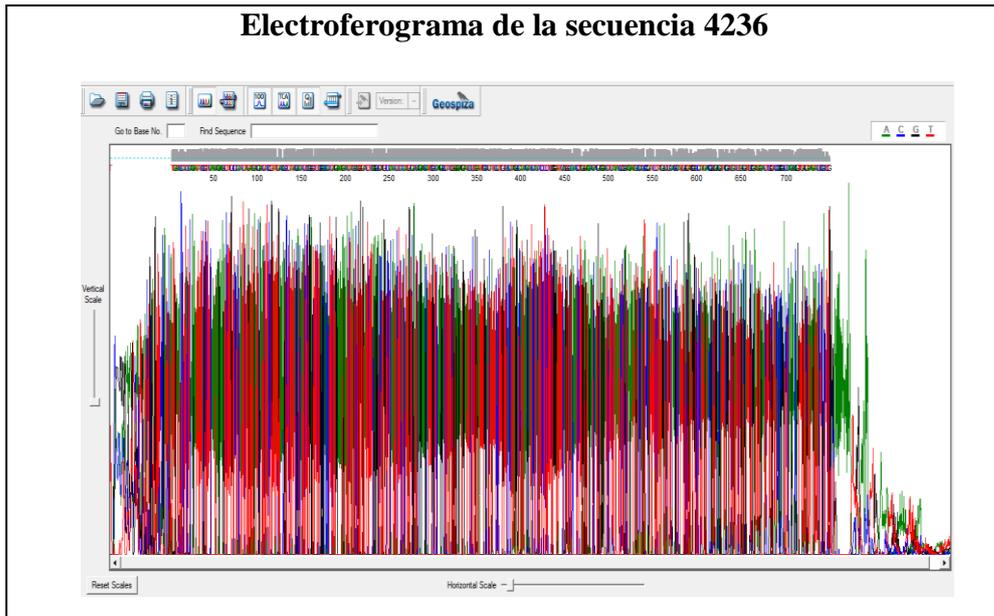
Elaborado por: La autora, 2020.

Anexo 4. Comparación de la secuencia 4236-*matK* en la bases de datos BLAST -Genbank

Código	Muestra 4236- <i>matk</i>
Marcador <i>matK</i>	<i>matK 2.1a</i> forward (5'- ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC-3')
	<i>matK 2.1a</i> reverse (5'-GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3')
Secuencia	TTTGAATAATCTCATTACTTCAAAGAAATTTATTTACGTCTTTT CAAAAATAAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCCTACATAATTCTTA TGTATATGAATTTCGAATATCTATTCTGTTTATTTGTAAACAGT CTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGA ACACATTTCTATGGAAAAATAGAATATCTTATAGTCATGTGTT GTAATTCTTTTCAGAGGATCCTATGGTTCCTCAAATATACTTTC ATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTTTGGCTTCAA AAGGAACCTCTTATTCTGATGAAGAAATGGAAATTTTCATCTTGT GAATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATA GGATCCATATAAAGCAATTACCTAACTATTCCTTCTCTTTTCTG GGGTATTTTCAAGTGTACTACAAAATCCTTTGGTAGTAAGAA ATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATACTCTGACTAA GAAATTAGATACCATAGTCCCAGTTATTTCTCTTATTGGATCA TTGTCAAAGCTCAATTTTGTACTGTATTGGGTCATCCTATTA GTAAACCGATCTGGAACGATTTATCGGATTCTGATATTCTTGA TCGATTTTGTCTGGATATGTAGAAATCTTTGTCTGTTATCACAGC GGATCCTCAAAGAAACAGGTTTTGTATCGTATAAAGTATATAC TTCGA
Comparación BLAST	<i>Maxillaria porrecta</i>
Cobertura	100 %
Identidad	99,46 %

Elaborado por: La autora, 2020.

Electroferograma de la secuencia 4236



Elaborado por: La autora, 2020.

Alineamiento-4236-matK

Maxillaria porrecta tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) pseudogene, complete sequence; chloroplast
 Sequence ID: [DQ211043.1](#) Length: 1776 Number of Matches: 1

Range 1: 614 to 1355 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1404 bits(730)	0.0	738/742(99%)	0/742(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTTGAATAATCTCATTACTTCAAAGAAATTTATTACGTCTTTTCAAAAAAAGAAAAG	60		
Sbjct 614	TTTGAATAATCTCATTACTTCAAATAAATTTATTACGTCTTTTCAAAAAAAGAAAAG	673		
Query 61	ATTCTTTTGGTTCCTACATAATCTTATGTATATGAATTCGAATATCTATTCTGTTTAT	120		
Sbjct 674	ATTCTTTTGGTTCCTACATAATCTTATGTATATGAATTCGAATATCTATTCTGTTTAT	733		
Query 121	TTGTAACAGCTCTCTTATTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTCTTGAGCGAACACA	180		
Sbjct 734	TTGTAACAGCTCTCTTATTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTCTTGAGCGAACACA	793		
Query 181	TTTCTATGGAAAAATAGAAATATCTTATAGTCATGTGTGAATCTTTTTCAGAGGATCCT	240		
Sbjct 794	TTTCTATGGAAAAATAGAAATATCTTATAGTCATGTGTGAATCTTTTTCAGAGGATCCT	853		
Query 241	ATGGTTCCTCAAATATACTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAACAATTTTGGC	300		
Sbjct 854	ATGGTTCCTCAAATATACTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAACAATTTTGGC	913		
Query 301	TTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAGAAATGGAAATTTTCATCTGTGAATTTTGGCA	360		
Sbjct 914	TTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAGAAATGGAAATTTTCATCTGTGAATTTTGGCA	973		
Query 361	ATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAGCAATTACCTAACTA	420		
Sbjct 974	ATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAGCAATTACCTAACTA	1033		
Query 421	TTCTTCTCTTTTCTGGGGTATTTTCAAGTGACTACAAAATCCTTTGGTAGTAAGAAA	480		
Sbjct 1034	TTCTTCTCTTTTCTGGGGTATTTTCAAGTGACTACAAAATCCTTTGGTAGTAAGAAA	1093		
Query 481	TCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATCTCTGACTAAGAAATAGATACCATAGT	540		
Sbjct 1094	TCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATCTCTGACTAAGAAATAGATACCATAGT	1153		
Query 541	CCCAGTTATTTCTCTTATTGGATCATTGTCAAAGCTCAATTTTGTACTGTATTGGGTCA	600		
Sbjct 1154	CCCAGTTATTTCTCTTATTGGATCATTGTCAAAGCTCAATTTTGTACTGTATTGGGTCA	1213		
Query 601	TCCTATTAGTAAACCGATCTGGAACGATTATCGGATTCTGATATCTTGATCGATTTTG	660		
Sbjct 1214	TCCTATTAGTAAACCGATCTGGAACGATTATCGGATTCTGATATCTTGATCGATTTTG	1273		
Query 661	TCGGATATGTAGAAATCTTTGTCGTTATCACAGCGGATCTCAAAGAAACAGGTTTGTGA	720		
Sbjct 1274	TCGGATATGTAGAAATCTTTGTCGTTATCACAGCGGATCTCAAAGAAACAGGTTTGTGA	1333		
Query 721	TCGTATAAAGTATATACTTCGA	742		
Sbjct 1334	TCGTATAAAGTATATACTTCGA	1355		

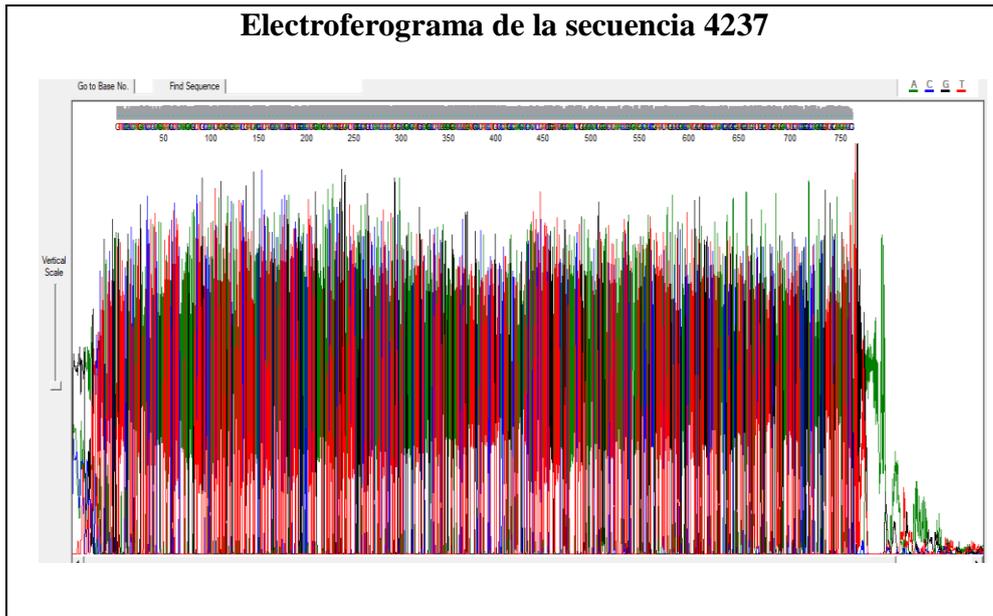
Elaborado por: La autora, 2020.

Anexo 5. Comparación de la secuencia 4237-*matK* en la bases de datos BLAST -Genbank

Código	Muestra 4237- <i>matK</i>
Marcador <i>matK</i>	<i>matK</i> 2.1a forward (5'- ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC-3')
	<i>matK</i> 2.1a reverse (5'-GTTCTAGCACAAGAAAGTTCG-3')
Secuencia	GTTTTTTCACGAATCTCATAATTTGAATAATCTCATTACTTCAA AGAAATTTATTTACGTCTTTTCAAAAATAAAGAAAAGATTCTT TTGGTTCCTACATAATTCTTATGTATATGAATTCGAATATATAT TCCTGTTTATTTGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTT CTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAATAGA ATATCTTATAGTCATGTGTTGTAATTTCTTTTCAGAGGATCCTAT GGTTCCCTCAAATATACTTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGA AAAGCAATTTTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAGA AATGGAAATTTTCATCTTGTGAATTTTGGCAATCTTATTTTCAC TTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAAGCAATTACCTAA CTATTCCTTCTATTTTCTGGGGTATTTTCAAGTGTACTAAAAA ATCCTTTGGTAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCT AATAAATACTCTGACTAAGAAATTAGATACCATAGTCCCAGTT ATTTATCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCTCAATTTTGTACTGT ATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATCTGGACCGATTTATCG GATTCTGATATTCTTGATCGATTTTGTTCGGATATGTAGAAATCT TTGTCGTTATCACAGCGGATCCTCAAAGAAGCAGGTTTTGTAT CGTATAAAGTATATACTTCG
Comparación BLAST	<i>Trigonidium insigne</i>
Cobertura	100 %
Identidad	100 %

Elaborado por: La autora, 2020

Electroferograma de la secuencia 4237



Elaborado por: La autora, 2020.

Alineamiento-4237-matK

Trigonidium insigne tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) pseudogene, complete sequence; chloroplast

Sequence ID: [DQ210977.1](#) Length: 1776 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) ▾

Range 1: 593 to 1354 [GenBank](#) [Graphics](#)

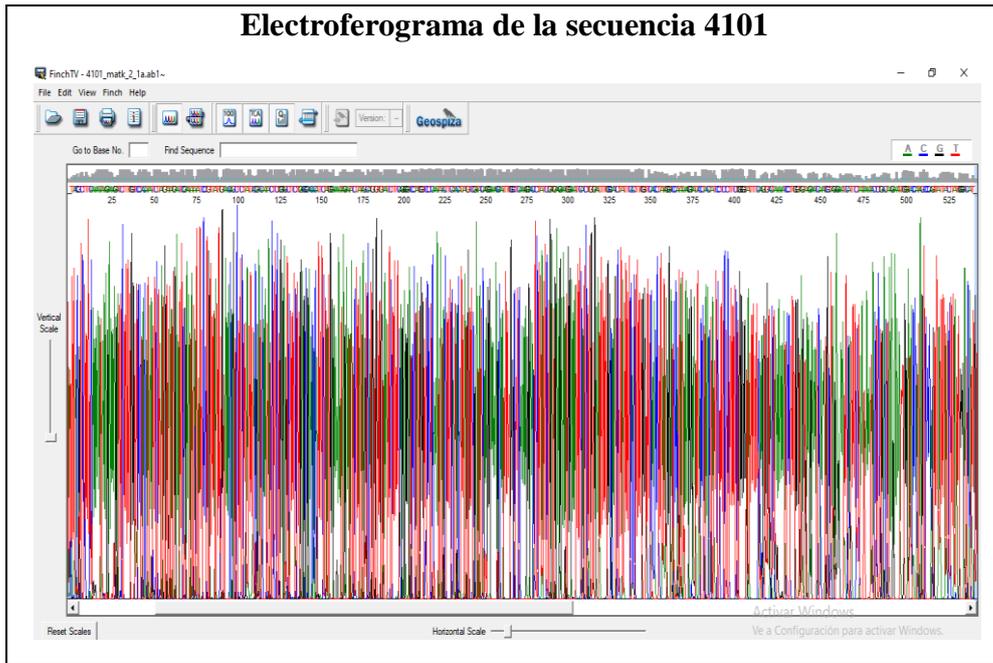
▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1408 bits(762)	0.0	762/762(100%)	0/762(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTTTTTTCACGAATCTCATAATTTGAATAATCTATTACTCAAAGAAATTTATTACGT	60		
Sbjct 593	GTTTTTTCACGAATCTCATAATTTGAATAATCTATTACTCAAAGAAATTTATTACGT	652		
Query 61	CTTTTCAAAAATAAAGAAAAGATTCTTTGGTTCTACATAATCTTATGTATATGAATT	120		
Sbjct 653	CTTTTCAAAAATAAAGAAAAGATTCTTTGGTTCTACATAATCTTATGTATATGAATT	712		
Query 121	CGAATATATATTCCTGTTTATTGTAACAGTCTTCTATTACGATCAATATCTCTGG	180		
Sbjct 713	CGAATATATATTCCTGTTTATTGTAACAGTCTTCTATTACGATCAATATCTCTGG	772		
Query 181	AGTCTTCTTGAGCGAACACATTCTATGGAAAAAGAAATATCTATAGTCATGTGTG	240		
Sbjct 773	AGTCTTCTTGAGCGAACACATTCTATGGAAAAAGAAATATCTATAGTCATGTGTG	832		
Query 241	TAATCTTTTCAGAGGATCCTATGGTTCTCAAATATACTTTCATACATTATGTCGATA	300		
Sbjct 833	TAATCTTTTCAGAGGATCCTATGGTTCTCAAATATACTTTCATACATTATGTCGATA	892		
Query 301	TCAAGGAAAAGCAATTTGGCTTCAAAGGAACTTTATCTGATGAAGAAATGGAAAT	360		
Sbjct 893	TCAAGGAAAAGCAATTTGGCTTCAAAGGAACTTTATCTGATGAAGAAATGGAAAT	952		
Query 361	TCATCTTGTGAATTTTGGCAATCTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCA	420		
Sbjct 953	TCATCTTGTGAATTTTGGCAATCTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCA	1012		
Query 421	TATAAGCAATTACCTAACTATCTCTATTTCTGGGGTATTTTCAAGTACTAAA	480		
Sbjct 1013	TATAAGCAATTACCTAACTATCTCTATTTCTGGGGTATTTTCAAGTACTAAA	1072		
Query 481	AAATCCTTTGGTAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTCTAATAAATACTCTGAC	540		
Sbjct 1073	AAATCCTTTGGTAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTCTAATAAATACTCTGAC	1132		
Query 541	TAAGAAATTAGATACCATAGTCCAGTTATTTATCTTATGGATCATTGTCGAAAGCTCA	600		
Sbjct 1133	TAAGAAATTAGATACCATAGTCCAGTTATTTATCTTATGGATCATTGTCGAAAGCTCA	1192		
Query 601	ATTTTGTACTGTATGGGTCATCTATTAGTAAACGATCTGGACGATTATCGGATTC	660		
Sbjct 1193	ATTTTGTACTGTATGGGTCATCTATTAGTAAACGATCTGGACGATTATCGGATTC	1252		
Query 661	TGATATCTTGATCGATTTTGTGGATATGAGAAATCTTTGTCGTTATCACAGCGGATC	720		
Sbjct 1253	TGATATCTTGATCGATTTTGTGGATATGAGAAATCTTTGTCGTTATCACAGCGGATC	1312		
Query 721	CTCAAAGAAGCAGGTTTGTATCGTATAAAGTATATACTTCG	762		
Sbjct 1313	CTCAAAGAAGCAGGTTTGTATCGTATAAAGTATATACTTCG	1354		

Elaborado por: La autora, 2020.

Anexo 6. Comparación de las secuencia 4101-*matK* en la bases de datos BLAST – Genbank.

Código	Muestra 4101- <i>matK</i>
Marcador matK	<i>matK 2.1a</i> forward (5'- ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC-3')
	<i>matK 2.1.a</i> reverse (5'-GTTCTAGCACAAGAAAGTTCG-3')
Secuencia	TTACGTCTTTTCAAAAATAAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCCTAC ATAATTCTTATGTATATGAATTCGAATATATATTCCTGTTTATT TGTAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTT TCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAATATCTTATA GTCATGTGTTGTAATTCTTTTCAGAGGATCCTATGGTTCCTCAA ATATACTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAGCAATT TTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAGAAATGGAAAT TTCATCTTGTGAATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTC AACCTTATAGGATCCATATAAAGGAATTACCTAACTATTCCTT CTCTTTTCTGGGGTATTTTTCAAGTGTACTAAAAAATCCTTTGG TAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAAATTCATTTCTAATAAAAT ACTCTGACTAAGAAATTTGGATACCATAGTCCCAGTTTATTTAT CTTATTGG
Comparación BLAST	<i>Trigonidium insigne</i>
Cobertura	100 %
Identidad	99,25 %



Elaborado por: La autora, 2020.

Alineamiento-4101-matK

Maxillaria procurrens tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) pseudogene, complete sequence; chloroplast

Sequence ID: [DQ210865.1](#) Length: 1776 Number of Matches: 1

Range 1: 647 to 1174 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
962 bits(500)	0.0	528/532(99%)	4/532(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTACGCTCTTTCAAAAAATAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCTACATAATTC TTATGTA			
Sbjct 647	TTACGCTCTTTCAAAAAATAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCTACATAATTC TTATGTA			
Query 61	TGAATTCGAATATATATTCCTGTTTATTTGTAACAGTCTTCTTATTACGATCAATA			
Sbjct 707	TGAATTCGAATATATATTCCTGTTTATTTGTAACAGTCTTCTTATTACGATCAATA			
Query 121	TTCTGGAGTCTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAATATCTTATAGTC			
Sbjct 767	TTCTGGAGTCTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAATATCTTATAGTC			
Query 181	GTGTTGTAATCTTTTCAGAGGATCCATGGTTCCCAAATATAC TTT C ATACATTAT			
Sbjct 827	GTGTTGTAATCTTTTCAGAGGATCCATGGTTCCCAAATATAC TTT C ATACATTAT			
Query 241	TCGATATCAAGGAAAAGCAATTTTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAGAAA			
Sbjct 887	TCGATATCAAGGAAAAGCAATTTTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAAGAAA			
Query 301	GAAATTTTCATCTTGTGAATTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTAT			
Sbjct 947	GAAATTTTCATCTTGTGAATTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTAT			
Query 361	GATCCATATAAAGGAATTACCTAACTATTCTTCTCTTTTCTGGGGTATTTTCAAGT			
Sbjct 1007	GATCCATATAAAGGAATTACCTAACTATTCTTCTCTTTTCTGGGGTATTTTCAAGT			
Query 421	ACTAAAAATCCTTTGGTAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAAATTCATTTCTAATAAA			
Sbjct 1067	ACTAAAAATCCTTTGGTAGTAAGAAATCAAATGCTAGAG-AATTCATTTCTAAT-AA			
Query 481	ACTCTGACTAAGAAATTTGGATACCATAGTCCAGTTTATTTATCTTATTGG 532			
Sbjct 1125	ACTCTGACTAAGAAA-TTGGATACCATAGTCCAG-TTATTTATCTTATTGG 1174			

Elaborado por: La autora, 2020.

Anexo 7. Comparación de la secuencia 4101-*rpoC1* en la bases de datos BLAST – Genbank

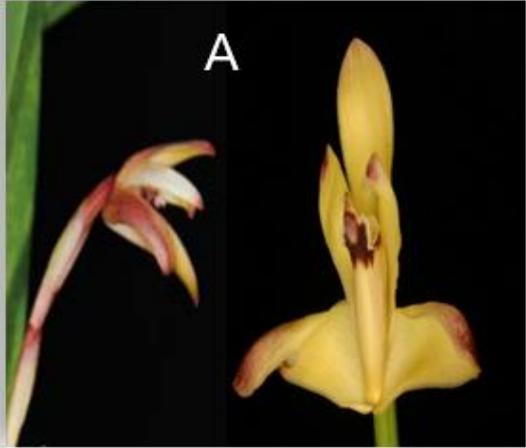
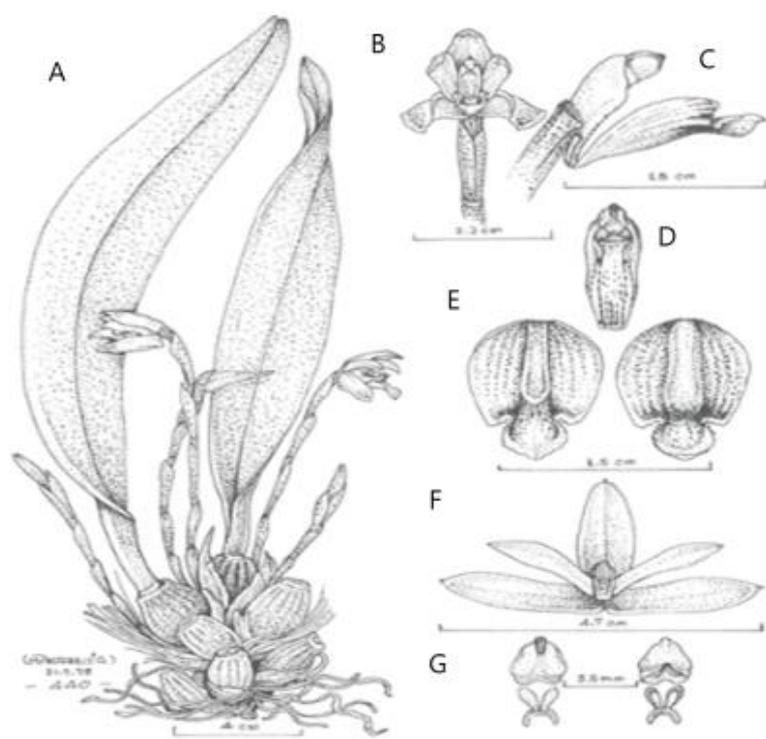
Código	Muestra 4101
Marcador <i>rpoC1</i>	<i>rpoC1</i> - forward (5' - GTGGATACACTTCTTGATAATGG-3')
	<i>rpoC1</i> -reverse (5' -TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC3')
Secuencia	TTTTTTTCCGTTATTGTCGTGGGTCCTTTGCTTTCATTACATCA ATGTGGATTACCTCGAGAAATAGCAATAGAGCTCTTCCAAAC ATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAGACAAGATGTTGCTTCTAAC ACAGGGGATTGCTAAAAGCAAATTCGGGGAAAAAGAACCC AAATTGTATGGGGAAATCCTTCAAGAAGTGATGCAGGGGCAT CCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGGG
Comparación BLAST	<i>Maxillaria porrecta</i>
Cobertura	89 %
Identidad	97,63 %

Elaborado por: La autora, 2020

Electroferograma de la secuencia 4101- <i>matK</i>				
Maxillaria procurrans <i>rpoC1</i> gene, partial sequence; chloroplast				
Sequence ID: DQ872548.1 Length: 2471 Number of Matches: 1				
Range 1: 1863 to 2068 GenBank Graphics				▼ Next Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
339 bits(176)	5e-89	206/211(98%)	5/211(2%)	Plus/Plus
Query 6	ttCCGTTATTGTCGTGGGTCCTTTGCTTTCATTACATCAATGTGGATTACCTCGAGAAAT	65		
Sbjct 1863	TTCCGTTATTGTCGTGGGTCCTTTGCTTTCATTACATCAATGTGGATTACCTCGAGAAAT	192		
Query 66	AGCAATAGAGCTCTTCCAAACATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAGACAAGATGTTGCTTC	125		
Sbjct 1923	AGCAATAGAGCTCTTCCAAACATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAGACAAGATGTTGCTTC	198		
Query 126	TAACACAGGGGATTGCTAAAAGCAAATTCGGGGAAAAAGAACCCAAATTGTATGGGGAA	185		
Sbjct 1983	TAACACA - GGGATTGCTAAAAGCAAATTC - GGGAAAAAGAACCC - - ATTGTAT - GGGAA	203		
Query 186	ATCCTTCAAGAAGTGATGCAGGGGCATCCTG	216		
Sbjct 2038	ATCCTTCAAGAAGTGATGCAGGGGCATCCTG	2068		

Elaborado por: La autora, 2020.

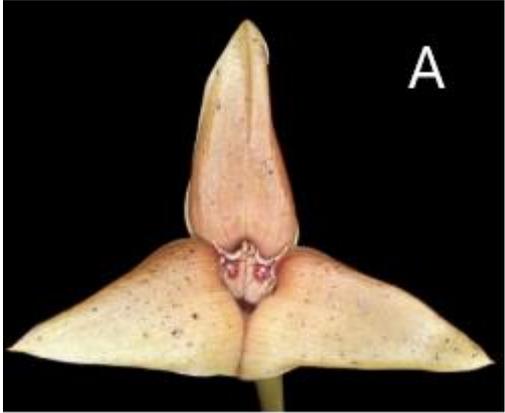
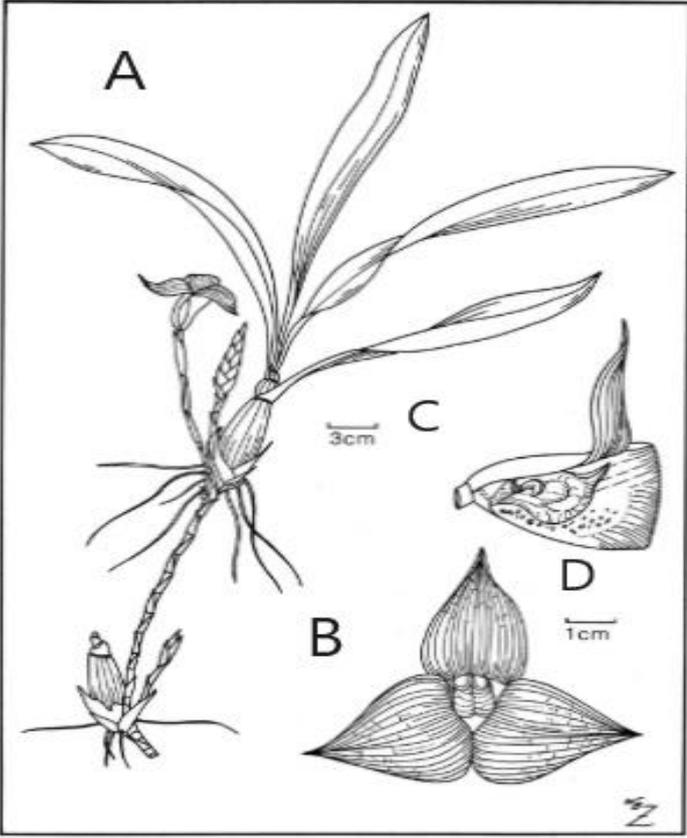
Anexo 8. *Maxillaria porrecta*, especie de mayor similitud con 4236, evaluación de la región *matK*.

 <p style="text-align: center;">A</p>	<p>Información botánica:</p> <p>Crecimiento: entre árboles y matorrales bajos en los bosques densos y muy húmedos.</p> <p>Rizoma grueso: con forma de tallo, de hasta 50 cm de longitud, formando mechones de muchos seudobulbos.</p> <p>Seudobulbos: pequeños, ovoides-oblongos, ligeramente comprimidos, longitudinalmente rugosos.</p> <p>Hojas: coriáceas, marrón-verde</p> <p>Flores: de color amarillo intenso y con ligerasmarchas rojas hacia el exterior.</p> <p>Labio. Negro-marrónrojizo en la punta</p>
 <p style="text-align: center;">A</p> <p style="text-align: center;">B C</p> <p style="text-align: center;">D</p> <p style="text-align: center;">E</p> <p style="text-align: center;">F</p> <p style="text-align: center;">G</p> <p style="text-align: center;">MAXILLARIA BRUNNEA Linden & Reichb.f Icones Orchidacearum Peruvianum</p> <p style="text-align: right;">Plate 094 (1993)</p>	

Nota: La flor característica de *Maxillaria porrecta*, se aprecia en la figura A. Mientras que las características morfológicas se describen como: A.-Vista de la planta entera, B.-Tamaño de la flor, C.-Tamaño del labelo (vista lateral), D.- Columna vista frontal E.- Tamaño de la columna F.- Tamaño de la flor abierta, G.- Polinias.

Fuente: (Cribb, 2010; Fernández et al., 2018; Swiss Orchid Foundation, 2016a)

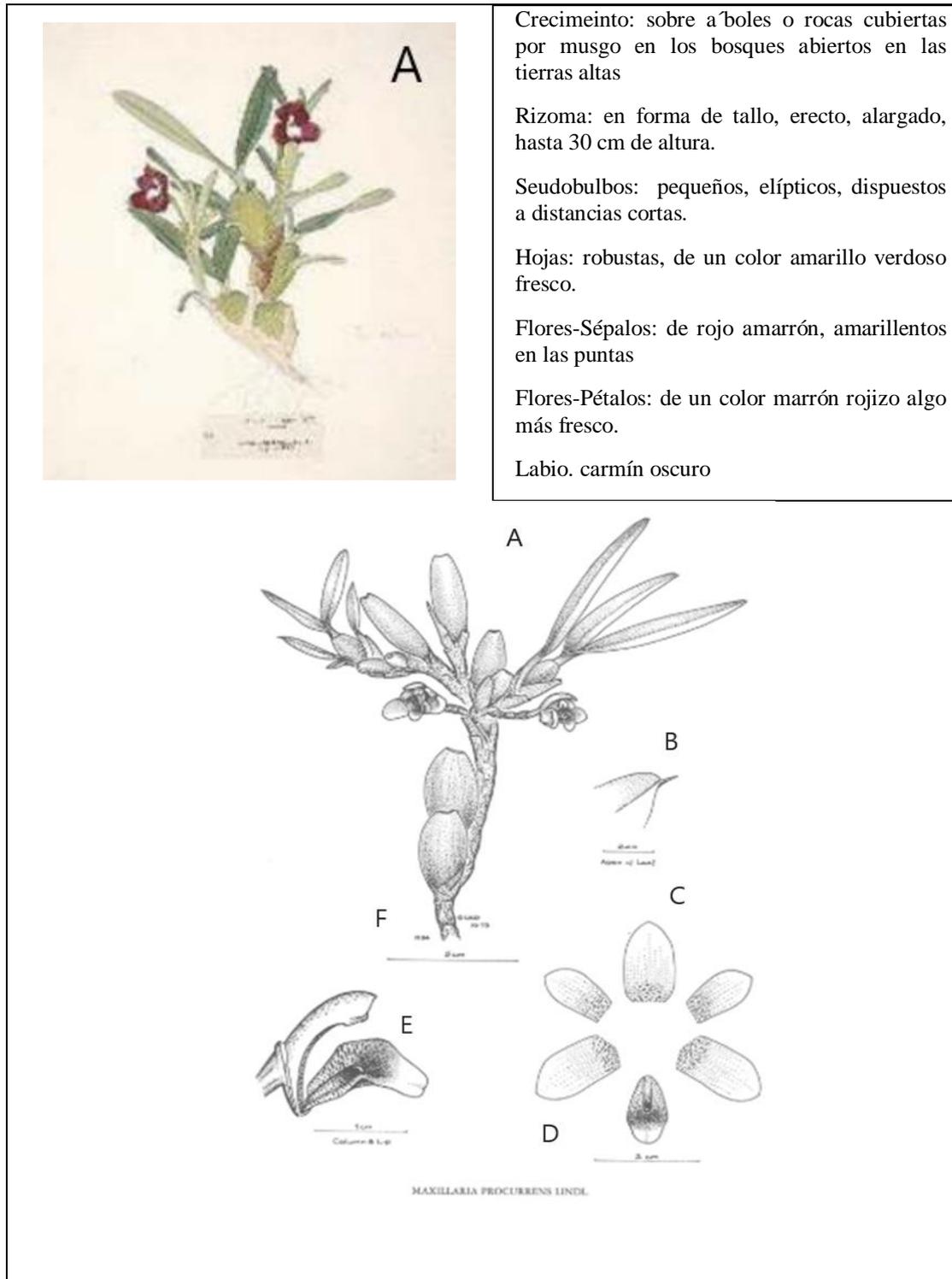
Anexo 9. *Trigonidium insigne*, especie de mayor similitud con 4237, evaluación de la región *matK*.

	<p>Información botánica:</p> <p>Crecimiento: epífita, sobre los árboles, en bosques húmedos tropicales.</p> <p>Rizoma: largo con forma de tallo, de hasta 45 cm de longitud, con pseudobulbos ampliamente espaciados.</p> <p>Seudobulbos: son estriados, tienen de una a cuatro hojas apicales y están sostenidos por brácteas no foliaceas.</p> <p>Hojas: son apicales, se presentan de una a tres.</p> <p>Flores: los sépalos forman una copa alrededor de los pétalos engrosados de color marrón brillante.</p> <p>Labio. Son pequeños y se reflejan en el medio.</p>
	
<p>TRIGONIDIUM INSIGNE Rehb. f. ex Benth & Hook. PLATE 346 <small>Test on reverse side. Icones Plantarum Tropicarum</small></p>	

Nota: En la figura A, se observa la flor característica de *Trigonidium insigne*. Mientras que la descripción morfológica se presenta como: A.- planta entera, B.- flor entera-vista frontal, C.- tamaño de los pseudobulbos, D.- tamaño de la columna floral

Fuente: (Whitten & Blanco, 2011; Swiss Orchid Foundation, 2016c)

Anexo 10. *Maxilaria procurrens*, especie de mayor similitud con 4101, evaluación de la región *matK* y *rpoC1*.



Nota: En la figura A se aprecia la ilustración de la planta entera de *Maxillari procurrens*, en la que se puede apreciar la formación floral. Por otra parte la morfología se describe a continuación: A.- planta entera, B.- ápice de la hoja (2mm) C.- disección de la flor, D.- tamaño del labio (2cm), E.- columna (1cm), F.- tamaño del rizoma entre pseudobulbos (5cm).

Fuente: (Cribb, 2010; Swiss Orchid Foundation, 2016b)

Anexo 11. Tamizaje fitoquímico, observación de los ensayos colorimétricos

Especie	Pruebas							
	Fenoles Rojo-vino		Taninos Verde intensa o azul		Flavonoides Rojiza, rojo-naranja o rosado		Alcaloides Precipitado blanco coposo	
	Prueba con Cloruro férrico		Prueba con Cloruro férrico		Prueba de Shinoda		Prueba de Mayer	
<i>Maxillaria porrecta</i>		+		-		+		+
<i>Trigonidium insigne</i>		+		-		+		+
<i>Maxillaria procurrens</i>		+		+		+		+
<i>Epidendrum quitensium</i>		+		-		-		+

<i>Catasetum macroGLOSSUM</i>		+		-		+		-
Control positivo	Té negro 	+	café negro 	+	manzana 	+	etanol 96% 	
Control negativo	etanol 96% 	-	etanol 96% 	-	etanol 96% 	-	etanol 96% 	-

Elaborado por: La autora, 2020

Anexo 12. Análisis estadístico de los porcentajes de inhibición de DPPH.

Análisis de varianza (ANAVA) del % Inb de DPPH								
Prueba de Kruskal Wallis								
Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	C	H	p
% Inb	C. macroglossum	6	13,43	11,53	10,68	1,00	10,38	0,0345
% Inb	E. quitensium	6	8,74	7,62	6,66			
% Inb	M.porrecta	5	36,93	25,85	31,57			
% Inb	M.procurrens	5	57,08	34,86	57,89			
% Inb	T.insigne	5	31,95	29,70	20,39			

Trat.	Medianas	Ranks		
E. quitensium	6,66	7,58	A	
C. macroglossum	10,68	10,58	A	B
T.insigne	20,39	15,00	A	B C
M.porrecta	31,57	17,40	B	C
M.procurrens	57,89	21,40		C

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

Fuente: La autora, 2020

Hipótesis nula: Las medianas de los porcentajes de inhibición de los extractos son iguales.

Hipótesis alternativa: Al menos un extracto presenta una mediana del porcentaje de inhibición diferente.

Anexo 13. Determinación de los valores de IC50 del Ácido ascórbico y los extractos.

Muestra	Concentración (mg/mL)	Promedio % Inhibición	Ecuación de la recta	Procedimiento	IC50 (mg/mL)
<i>Ácido ascórbico</i>	0	0,000	$y = 11593x + 8,9331$	$((50-8,9331)/11593)$	0,0035
	0,000166667	14,294			
	0,000333333	17,990			
	0,000666667	20,996			
	0,001666667	22,718			
	0,002666667	41,360			
<i>Maxillaria porrecta</i>	0	0,000	$y = 26,094x + 6,8572$ $R^2 = 0,9704$	$((50-6,8572)/260,94)$	0,1653
	0,166666667	10,377			
	0,333333333	17,658			
	0,666666667	31,568			
	1,666666667	51,171			
	2,666666667	73,887			
<i>Trigonidium insigne</i>	0	0,000	$y = 28,377x + 0,6114$ $R^2 = 0,9989$	$((50-0,6114)/283,77)$	0,1740
	0,166666667	4,129			
	0,333333333	10,916			
	0,666666667	20,388			
	1,666666667	48,877			
	2,666666667	75,433			
<i>Maxillaria procurrens</i>	0	0,000	$y = 30,533\ln(x) + 68,094$ $R^2 = 0,9886$	$((50-68,094)/30,533)$ $= -0,5926$ $e^{(2,71828)^{-0,5926}}$	0,5528
	0,166666667	11,367			
	0,333333333	34,740			
	0,666666667	57,893			
	1,666666667	88,336			
	2,666666667	93,046			
<i>Epidendrum quitensium</i>	0	0,000	$y = 7,2247x + 2,1176$	$((50-2,1176)/7,2247)$	6,6276
	0,166666667	3,948			
	0,333333333	5,448			
	0,666666667	7,866			
	1,666666667	14,225			
	2,666666667	20,955			
<i>Catasetum macroglossum</i>	0	0,000	$y = 10,903x + 3,4337$	$((50-3,4337)/10,903)$	4,2710
	0,166666667	5,958			
	0,333333333	9,182			
	0,666666667	12,187			
	1,666666667	21,091			
	2,666666667	32,149			

Elaborado por: La autora, 2020.

Anexo 14. Análisis estadístico de la actividad antioxidante de DPPH-valores IC₅₀.

Conglomerado generado en la comparación de valores IC₅₀

Caso	Muestra	IC ₅₀ (mg/ml)	Conglomerado
1	Ácido ascórbico	0,0035	1
2	Maxillaria porrecta	0,1653	1
3	Trigonidium insigne	0,1740	1
4	Maxillaria procurrens	0,5528	1
5	Catasetum macroglossum	4,2710	2
6	Epidendrum quitensium	6,6276	2

Fuente: La autora, 2020.

Análisis de varianza (ANOVA) de IC₅₀ -Determinación de la actividad antioxidante.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
IC ₅₀ (mg/ml)	6	0,93	0,91	43,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	36,41	1	36,41	49,54	0,0021
Grupos-Muestras	36,41	1	36,41	49,54	0,0021
Error	2,94	4	0,73		
Total	39,35	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,06122

Error: 0,7349 gl: 4

Grupos-Muestras Medias n E.E.

1	0,22	4	0,43	A
2	5,45	2	0,61	B

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

Fuente: La autora, 2020.

Hipótesis nula: No existe diferencia significativa entre los valores IC₅₀ de los extractos.

Hipótesis alternativa: Existe diferencia significativa entre los valores IC₅₀ de los extractos.